

Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Fakultät für Chemie und Chemische
Biologie der Technischen Universität Dortmund

UNTERSUCHUNGEN ZUR VARIATION VON STRUKTUR, DYNAMIK
UND FUNKTIONALITÄT VON PROTEIN- UND LIPIDSYSTEMEN
DURCH PHYSIOLOGISCH RELEVANTE OSMOLYTE UND
DRUCKAPPLIKATION

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Doctor rerum naturalium)

vorgelegt von

SAMY RASHAD AL-AYOUBI

geboren in Höxter

Dezember 2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2015 bis November 2018 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Technischen Universität Dortmund unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Roland Winter durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2019

Erstgutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stefan M. Kast

Vorsitzender: Prof. Dr. Andreas Steffen

Danksagung

Zuvorderst danke ich **Herrn Prof. Dr. Roland Winter** für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu können, für die interessanten Aufgabenstellungen sowie seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Stefan M. Kast danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Frau Prof. Dr. Judith Peters danke ich für die angenehme Zusammenarbeit am Institut Laue Langevine und ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Andrea Jeworrek danke ich für die freundliche Hilfe bei verwaltungstechnischen Angelegenheiten.

Ein besonderer Dank gilt **Herrn Dr. Süleyman Cinar**, **Herrn Paul Hendrik Schummel**, **Herrn Hasan Cinar** und **Herrn Artem Levin** für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die phantastische gemeinsame Zeit.

Frau Dr. Melanie Berghaus, **Herrn Peter K. F. Schinkel** und **Herrn Marius Herzog** danke ich für die angenehme Zusammenarbeit. **Frau Dr. Melanie Berghaus** danke ich zusätzlich für die Möglichkeit Messungen an der ESRF durchzuführen. Weiterhin danke ich allen **Mitarbeitern sowie ehemaligen Mitarbeitern** des Lehrstuhls Physikalische Chemie I für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie danke ich für die große Unterstützung während der Promotions-

zeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Motivation und Zielsetzung	1
1.2	Proteine	6
1.2.1	Proteinstabilität: Einfluss von Druck und Temperatur	7
1.2.2	Proteindynamik	10
1.2.3	Proteinfunktionalität: Enzymkinetik	12
1.3	Lipide	15
1.3.1	Phospholipide: Struktur, Dynamik und Phasenverhalten	15
1.4	Physiologisch relevante Osmolyte	18
1.4.1	Einfluss auf die Proteinstabilität	18
1.4.2	Verwendete Osmolyte	19
1.5	<i>Crowding</i>	23
2	Methoden	27
2.1	Streumethoden	29
2.1.1	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)	30
2.1.2	Quasielastische Neutronenstreuung (QENS)	35
2.1.3	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	39
2.2	Spektroskopische Methoden	40
2.2.1	FTIR-Spektroskopie	40
2.2.2	Fluoreszenz-Spektroskopie	43
3	Einfluss von osmotischem und hydrostatischem Druck auf multilamellare Lipidmembranen in Anwesenheit von PEG und Trehalose	47
3.1	Einleitung	49

3.2	Material und Methoden	52
3.2.1	Probenpräparation	52
3.2.2	Experimentelle Durchführung und Datenbearbeitung	53
3.3	Ergebnisse und Diskussion	55
3.3.1	Osmotischer Druck von Trehalose- und PEG- Lösungen	55
3.3.2	Einfluss von osmotischem und hydrostatischem Druck auf die Struktur multilamellarer Membranen	56
3.3.3	Einfluss von Trehalose	61
3.3.4	Kombinierte Effekte von PEG und Trehalose	65
3.3.5	Einfluss auf Fluktuationen und die Membran-Mechanik	68
3.3.6	Laurdan-Fluoreszenz	70
3.3.7	Kalorimetrie	72
3.4	Anhang	75
4	Einfluss von Druck, Temperatur, Crowding und Cosolventien auf die interne Proteindynamik und Stabilität von Lysozym	77
4.1	Einleitung	79
4.2	Material und Methoden	82
4.2.1	Probenpräparation	82
4.2.2	Experimentelle Durchführung und Datenbearbeitung	83
4.3	Ergebnisse und Diskussion	85
4.3.1	Einfluss von Druck und Osmolyten auf die Proteindynamik	85
4.3.2	Einfluss von Druckapplikation und Cosolventien auf die Pro- teinstabilität	90
4.4	Anhang	100
5	Einfluss von Druckapplikation auf die Struktur und Dynamik des Kom- plexes zwischen Calmodulin und der hypervariablen Region von KRas4B103	
5.1	Einleitung	105
5.2	Material und Methoden	108
5.2.1	Experimentelle Durchführung und Datenbearbeitung	108

5.3	Ergebnisse und Diskussion	111
5.3.1	Einfluss von Druck auf die Struktur von apo- und holo-Calmodulin	111
5.3.2	Validierung einer möglichen Dimer-Bildung durch Dynamische Lichtstreuung	121
5.3.3	Einfluss von Druck auf die Proteindynamik von Calmodulin und Calmodulin-Ligand-Komplexen	123
6	Einfluss von Osmolyten und Crowding auf die druckinduzierte Dissoziation und Deaktivierung von dimerer Alkoholdehydrogenase	129
6.1	Einleitung	131
6.2	Material und Methoden	135
6.2.1	Probenpräparation	135
6.2.2	Experimentelle Durchführung und Datenbearbeitung	135
6.3	Ergebnisse und Diskussion	140
6.3.1	Dynamische Lichtstreuung	140
6.3.2	FTIR-Spektroskopie	141
6.3.3	Fluoreszenz-Spektroskopie	146
6.3.4	Enzymkinetik	153
6.3.5	Temperaturabhängiges Verhalten	156
6.4	Anhang	164
7	Einfluss von Druck und Osmolyten auf die Dynamik und Aktivität von Lactatdehydrogenase	167
7.1	Einleitung	169
7.2	Material und Methoden	171
7.2.1	Probenpräparation	171
7.2.2	Experimentelle Durchführung und Datenbearbeitung	172
7.3	Ergebnisse und Diskussionen	174
7.3.1	Dynamik: EINS	174
7.3.2	Dynamik: QENS	178
7.3.3	FTIR-Spektroskopie	180
7.3.4	Enzymkinetik	182

7.4 Anhang	189
8 Zusammenfassung	193
8.1 Zusammenfassung der Forschungsprojekte	194
9 Englischsprachige Zusammenfassung	199
10 Verzeichnisse	201
Literaturverzeichnis	201
Abbildungsverzeichnis	225
Abkürzungsverzeichnis	235
11 Publikationsliste	239

1 Einleitung

1.1 Motivation und Zielsetzung

Leben ist unter diversen extremen Umweltbedingungen wie extremen Temperaturen, extremen pH-Werten oder unter osmotischem und hydrostatischem Druck beobachtet worden.¹ Dies setzt die evolutionäre Entwicklung bestimmter Kompensations-Strategien in extremophilen Organismen voraus. Einer dieser Mechanismen ist die vermehrte Biosynthese von Osmolyten. Dies sind niedermolekulare organische Verbindungen, welche den Einfluss negativer Stressfaktoren kompensieren.² Der Fokus dieser Arbeit liegt dabei vor allem auf dem Einfluss von hydrostatischem Druck auf die Eigenschaften von Membranen und Proteinen sowie der Fragestellung, inwieweit dieser Einfluss durch Osmolyte kompensiert wird. Zusätzlich wurde auch der Einfluss der Stressfaktoren Temperatur und osmotischer Druck betrachtet.

Die Gründe, sich mit dem Einfluss von Druckapplikation auf biologische Makromoleküle zu beschäftigen, sind vielfältig. Zum einen ist, wie eingangs erwähnt, Leben bei erhöhten Drücken in der Tiefsee beobachtet worden. So herrscht an der tiefsten Stelle des Mariannengraben ein Druck von bis zu 1100 bar.^{1,3} Interessanterweise zeigten aus dem Mariannengraben isolierte Mikroorganismen ein maximales Wachstum bei 800 bar.⁴ Dies ist von besonderem Interesse, da Tiefseehabitate als ein möglicher Ursprung des Lebens gelten.³ Eine genaue Kenntnis der Eigenschaften biologischer Makromoleküle unter Druck sowie möglicher Kompensations-Strategien gegen schädliche Einflüsse kann somit Beiträge zur Frage nach dem Ursprung des Lebens und somit zu einer der fundamentalsten Fragestellungen der gesamten Menschheitsgeschichte liefern.

Aber auch Abseits von Fragen nach dem Leben unter extremen Bedingungen sind Hochdruckuntersuchungen an Biomolekülen von wissenschaftlichem Interesse, besonders da Druckapplikation die Untersuchung von Volumeneffekten ermöglicht. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass Druck, anders als eine Temperaturerhöhung, nur Volumenänderungen und keine Änderungen der thermischen Energie verursacht. Gemäß des Prinzips von Le Châtelier wird bei Druckapplikation der Zustand des geringsten Volumens bevorzugt. Für die Druckabhängigkeit der Gleichgewichtskon-

stante K und der Geschwindigkeitskonstante k gilt:³

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p}\right)_T = -\frac{\Delta V}{RT} \quad (1.1)$$

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial p}\right)_T = -\frac{\Delta V^\#}{RT} \quad (1.2)$$

Hier ist ΔV die Volumenänderung, T die Temperatur und R die Gaskonstante. Darüber hinaus ermöglichen Hochdruckuntersuchungen die gezielte Variation nicht kovalenter Wechselwirkungen, welche in biologischen Systemen, z.B. bei der Ligan- denbindung, fundamental sind.^{3,5} Weiterhin stellt Druck eine einzigartige Möglichkeit dar, bestimmte, unter Normalbedingungen geringfügig besetzte, *conformational sub- states* zu besetzen und damit aufzufinden.⁵

Abgesehen von dieser wissenschaftlichen Relevanz sind Druckuntersuchungen auch von industrieller Relevanz. Dies zeigen beispielsweise Anwendungen in der Lebens- mitteltechnologie⁶⁻⁸ oder Enzymologie. Hier kann eine Steigerung der Aktivität von biotechnologisch relevanten Enzymen, unter der Voraussetzung eines negativen Ak- tivierungsvolumens $\Delta V^\#$, erfolgen.

Biologische Makromoleküle haben stets eine Funktion um den Organismus am Le- ben zu halten. Die Funktionalität dieser Moleküle hängt sowohl von deren Struktur als auch von deren Dynamik ab. Letztendlich ist alles Leben Nichtgleichgewichts- thermodynamik und beruht auf einem korrekten Zusammenspiel der Struktur und Dynamik biologischer Makromoleküle. Gegenstand dieser Arbeit ist die Fragestel- lung, inwieweit Struktur, Dynamik und damit auch die Funktionalität von Protei- nen und Modellmembranen sich gegenseitig beeinflussen und durch Druckapplikation und Zugabe von Osmolyten, und somit durch Änderungen der Lösungsbedingungen, modifiziert werden können.

Es folgt eine Vorstellung der durchgeführten Forschungsprojekte:

Projekt I: Einfluss von osmotischem und hydrostatischem Druck auf multilamellare Lipidmembranen in Anwesenheit von PEG und Trehalose

- Ziel dieses Projekts war die Evaluierung der kombinierten Einflüsse von hydrostatischem und osmotischem Druck auf multilamellare Membransysteme. Osmotischer Druck wurde dabei durch die Zugabe des Polymers Polyethylenglykol (PEG) und des Disaccharids Trehalose generiert. PEG wird im Gegensatz zu Trehalose vom Membranzwischenraum ausgeschlossen. Hier sollte nun evaluiert werden, inwieweit Trehalose die Effekte von hydrostatischem und osmotischem Druck kompensieren kann. Die Aufklärung der Struktur erfolgte durch Röntgenkleinwinkelstreuung. Kenntnisse über die Membranhydratisierung und Phasenübergänge wurden aus Messungen der Laurdan-Fluoreszenz bestimmt. Eine genauere thermodynamische Charakterisierung erfolgte durch kalorimetrische Messungen (DSC, PPC).

Projekt II: Einfluss von Druck, Temperatur, Crowding und Cosolventien auf die interne Proteindynamik und Stabilität von Lysozym

- Gegenstand dieses Projekts war die Fragestellung, inwieweit die interne Proteindynamik von Lysozym durch Druck und die Osmolyte TMAO und Harnstoff beeinflusst wird. Um zusätzlich den Einfluss von *self-crowding* auf die Dynamik in Anwesenheit der Osmolyte zu ergründen, kamen Proteinkonzentrationen von 80 mg mL⁻¹ und 160 mg mL⁻¹ zum Einsatz. Beide Osmolyte unterscheiden sich in ihrem Wechselwirkungsprofil mit dem Protein bzw. mit Wasser und üben unterschiedliche Effekte auf die Proteinstabilität aus. Während TMAO weitestgehend vom Protein ausgeschlossen wird und bevorzugt mit Wasser wechselwirkt, destabilisiert Harnstoff das Protein und interagiert direkt mit dem Peptidrückgrat sowie Seitenketten. Die Bestimmung der Proteindynamik auf der ps-ns Zeitskala erfolgte durch elastisch-inkohärente Neutronenstreuung (EINS). Zusätzlich wurde der Einfluss der Osmolyte auf die Stabilität unter *self-crowding* Bedingungen durch FTIR-spektroskopische Messungen untersucht.

Projekt III: Einfluss von Druckapplikation auf die Struktur und Dynamik des Komplexes zwischen Calmodulin und der hypervariablen Region von KRas4B

- Das Protein Calmodulin vollzieht im Zuge der Ligandenbindung große strukturelle Änderungen. Diese Änderungen sollten durch Röntgenkleinwinkelstreuung charakterisiert werden. Zusätzlich sollte durch elastisch inkohärente Neutronenstreuung der Einfluss dieser strukturellen Änderungen auf die interne Proteindynamik untersucht werden. Sowohl EINS- als auch SAXS-Messungen wurden druckabhängig durchgeführt, um den Einfluss von Druck auf die Struktur und Dynamik von Calmodulin und des Komplexes zwischen Calmodulin mit einem Bindungspeptid zu untersuchen. Druck ist dabei ein wirkungsvolles Werkzeug zur Charakterisierung der Protein-Liganden-Bindung.

Projekt IV: Einfluss von Osmolyten und Crowding auf die durch Druck induzierte Dissoziation und Deaktivierung von dimerer Alkoholdehydrogenase

- Die Dissoziation des dimeren Proteins Alkoholdehydrogenase, sowie der Einfluss von Osmolyten und *Crowding* auf diese Dissoziation konnte durch SAXS-Messungen gezeigt werden. Diese Dissoziation sowie der Einfluss von *Crowding* und Osmolyten auf selbige sollte zusätzlich durch FTIR- und Fluoreszenzspektroskopische Messungen untersucht werden. Dabei sollte durch FTIR-Spektroskopie ergründet werden, inwieweit die Dissoziation mit Änderungen der Sekundärstruktur einhergeht. Durch Messungen der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz sollten Polarisationsänderungen der Umgebung der Tryptophanreste im Zuge der Druckapplikation untersucht werden. Zusätzlich wurde die Fluoreszenz des Fluorophors ANS untersucht. Dieser bindet an hydrophobe Bereiche des Proteins. Abschließend wurde ebenfalls die Druckabhängigkeit der Enzymkinetik untersucht. Durch temperaturabhängige Messungen (FTIR-Spektroskopie, Fluoreszenz-Spektroskopie, SAXS) wurde das Dissoziations- und Aggregationsverhalten des Proteins charakterisiert.

Projekt V: Einfluss von Druck und Osmolyten auf die Dynamik und Aktivität von Lactatdehydrogenase

- Gegenstand dieses Projektes war erneut die Dissoziation eines oligomeren Enzyms, in diesem Fall diejenige des Tetramers Lactatdehydrogenase. Der Fokus lag dieses Mal jedoch weniger auf einer Charakterisierung der Dissoziation, sondern vielmehr auf der Fragestellung, inwieweit sich die durch Druck induzierte Änderung des Oligomerisierungsgrades auf die Dynamik des Proteins auswirkt. Um die Dynamik des Proteins in verschiedenen Zeitfenstern zu analysieren, kamen neben EINS Messungen auch Messungen der quasielastischen Neutronenstreuung (QENS) zum Einsatz. Zusätzlich wurde der Einfluss der Substratbindung sowie des Osmolyts Glycin auf die Druckabhängigkeit der internen Proteindynamik durch EINS-Messungen untersucht. Ebenfalls wurden die Druckeffekte auf die Enzymkinetik in Ab- und Anwesenheit der Osmolyte TMAO, Harnstoff und Glycin untersucht. Diese erlaubten, Erkenntnisse über Volumenänderungen im Zuge der Substratbindung zu gewinnen.

1.2 Proteine

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaute Polyamide und übernehmen eine Vielzahl von Funktionen im Organismus. Dazu zählen Strukturgebung, Katalyse, Zellsignale und Transport. Voraussetzung für die Funktionalität des Proteins ist dessen Struktur. Die Proteinstruktur wird in vier Ebenen gegliedert:^{9,10}

- Die Primärstruktur ist die Sequenz der Aminosäuren.
- Die Sekundärstruktur beschreibt die Ausbildung von Strukturelemente wie α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen innerhalb des Proteins. Die Ausbildung dieser Elemente beruht auf Wasserstoffbrücken zwischen den C=O und NH-Gruppen des Peptidrückgrats.
- Die Tertiärstruktur bezeichnet die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente und basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen, Coulombwechselwirkungen und H-Brücken.
- Die Quartärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung eines oligomeren Proteinkomplexes aus nicht kovalent verbundenen Polyamidketten.

Vorraussetzung für die Funktionalität eines Proteins ist häufig dessen Interaktion mit anderen Proteinen, Liganden, Hormonen oder Substraten. Dies erfordert eine gewisse Dynamik, da Bindungsprozesse mit leichten strukturellen Änderungen einhergehen.⁹ Von entscheidender Bedeutung für die jeweilige Funktion eines Proteins sind somit gleichermaßen dessen Struktur als auch dessen Dynamik.

1.2.1 Proteinstabilität: Einfluss von Druck und Temperatur

Von einem Zweizustandsmodell zwischen dem gefaltetem (F) und dem entfalteten (U) Zustand eines Proteins ausgehend, gilt für die Gleichgewichtskonstante K des Entfaltungsprozesses:¹¹

$$K = \frac{x_U}{x_F} = \exp(-\Delta G^\circ / RT) \quad (1.3)$$

Für den Unterschied der freien Enthalpie ΔG des ungefalteten und des gefalteten Zustand gilt:¹¹⁻¹³

$$d\Delta G^\circ = \Delta V^\circ dp - \Delta S^\circ dT \quad (1.4)$$

Integration über eine Taylorreihentwicklung, welche nach dem zweiten Glied abgebrochen wird, liefert:¹¹⁻¹⁴

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_0^\circ - \Delta S_0^\circ(T - T_0) + \Delta V_0^\circ(p - p_0) \\ & + \Delta\alpha'(p - p_0)(T - T_0) - \Delta C_{p,0}^\circ \left[T \ln \left(\left(\frac{T}{T_0} \right) - 1 \right) + T_0 \right] + \frac{\Delta\kappa'}{2}(p - p_0)^2 \end{aligned} \quad (1.5)$$

Dabei ist C_p° die Wärmekapazität bei konstantem Druck, $\kappa' = \left(\frac{\partial V}{\partial p} \right)_T$ die Kompressibilität und $\alpha' = \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_p$ die thermische Ausdehnung.¹¹⁻¹⁴ Der Index 0 gibt einen willkürlich gewählten Referenzwert an. Der Abbruch der Taylorreihentwicklung nach dem zweiten Glied erfolgt unter der Voraussetzung, dass die Druck- und Temperaturabhängigkeit der Größen ΔC_p° , $\Delta\kappa'$ und $\Delta\alpha'$ vernachlässigbar ist.¹¹⁻¹⁴

Liegen beide Zustände im Gleichgewicht vor ($\Delta G = 0$), ergibt sich eine elliptische Form des p, T -Phasendiagramms. Die Form der Phasengrenze wird gemäß (1.5) durch sechs thermodynamische Größen, namentlich $\Delta C_{p,0}^\circ$, ΔV_0° , ΔS_0° , $\Delta\kappa'$, $\Delta\alpha'$ und ΔG_0° , determiniert. Bei Kenntnis dieser Größen kann somit das Phasendiagramm berechnet werden. Der erste Term in (1.5) alleine würde eine lineare Phasengrenze liefern. Die elliptische Form geht somit auf ΔC_p° , $\Delta\kappa'$ und $\Delta\alpha'$ zurück.^{11-13,15} Abbildung 1.1 zeigt ein typisches p - T -Phasendiagramm eines monomeren Proteins.

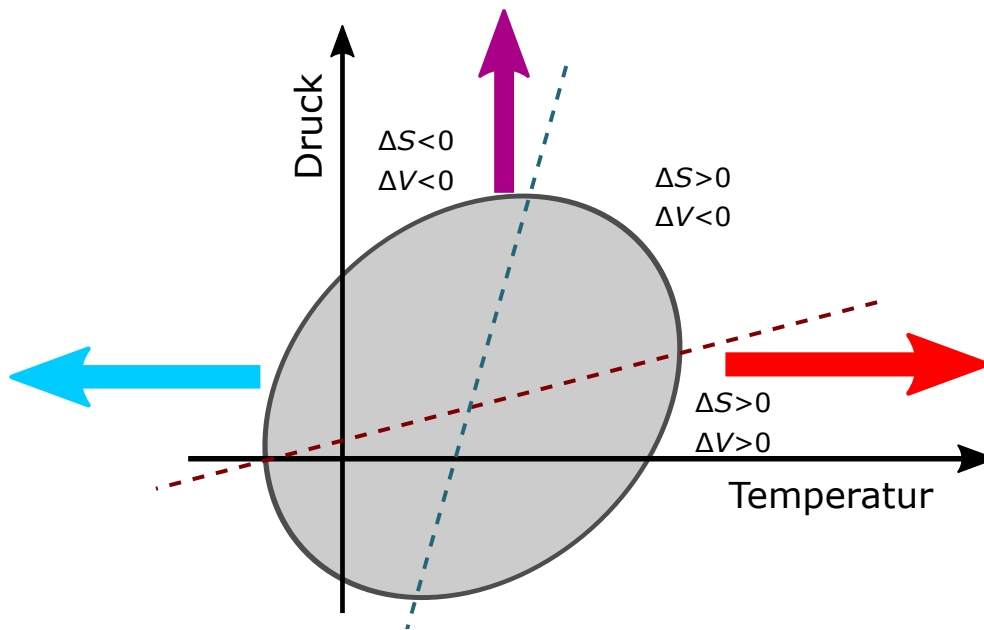


Abbildung 1.1: Typisches Phasendiagramm eines Proteins. In dem grau unterlegten Bereich liegt das Protein im gefalteten Zustand vor (Für die Entfaltungs-Gibbs-Energie gilt: $\Delta G > 0$). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Kombinationen von Druck- und Temperatur-Werten, bei denen $\Delta S = 0$ (blau), bzw. $\Delta V = 0$ (rot) ist. Die farbigen Pfeile kennzeichnen die Entfaltung durch hohe (rot) und niedrige (blau) Temperaturen, sowie durch Druckapplikation (violett). Abbildung modifiziert nach Referenz.¹¹

Unter reinen Lösungsmittelbedingungen können Proteine sowohl durch hohe und niedrige Temperaturen als auch durch Druck entfaltet werden. Dabei ist die Hitzedenaturierung entropiegetrieben und häufig, bedingt durch die Bildung von Aggregaten, irreversibel. Die Kältedenaturierung hingegen ist enthalpiegetrieben und beruht auf der Hydratisierung exponierter Seitenketten.¹⁶ Auch die Entfaltung von Proteinen durch negative Drücke kann realisiert werden.¹⁷

Die durch Druck induzierte Proteinentfaltung erfolgt für gewöhnlich ab Drücken von circa 4000 bar.⁶ Gemäß des Prinzips von Le Châtelier, bevorzugt Druck stets den Zustand des geringsten Volumens.

Das partielle molare Volumen eines Proteins V_i kann als Summe intrinsischer Terme und eines Hydratationsterms verstanden werden:^{18,19}

$$V_i = V_{\text{Atom}} + V_{\text{Kav}} + \Delta V_{\text{Hydratation}} \quad (1.6)$$

Hier ist V_{Atom} das van-der-Waals-Volumen der Atome des Proteins, V_{Kav} das Volumen der Kavitäten im Proteininneren und $\Delta V_{\text{Hydratation}}$ der Hydratationsterm. Da das Volumen der Atome während der Entfaltung konstant bleibt, hängt das Entfaltungsvolumen ΔV eines Proteins nur von V_{Kav} und $\Delta V_{\text{Hydratation}}$ ab:¹⁸

$$\Delta V = \Delta V_{\text{Kav}} + \Delta\Delta V_{\text{Hydratation}} \quad (1.7)$$

$\Delta\Delta V_{\text{Hydratation}}$ beruht auf den Hydratationsänderungen hydrophober und hydrophiler Gruppen sowie der Proteinkavitäten und wird vor allem durch Elektrostriktions-Effekte bestimmt.¹⁸ Der Anteil der Hydratationsänderungen an der Volumenänderung des Entfaltungsvorgangs ist, verglichen mit demjenigen des Auffüllens von Kavitäten und *void volumes*, gering.^{20,21}

Dissoziation oligomerer Proteine

Neben der bereits behandelten Entfaltung von Proteinen kann Druckapplikation bereits bei vergleichsweise geringeren Drücken unter 1000 bar die Dissoziation oligomerer Proteine induzieren.^{6,15,22–26}

Die durch Druckapplikation induzierte Dissoziation ist hauptsächlich durch die imperfekte Packung der Atome an der Grenzfläche der Untereinheiten zu erklären, wodurch *void volumes* an der Zwischenfläche entstehen. Im Rahmen der Dissoziation erfolgt die Hydratation der Grenzfläche, welches mit der Beseitigung dieser *void volumes*, und damit mit einer Verringerung des Volumens, einhergeht. Diese Volumenabnahme ist die Triebkraft der Dissoziation. Zusätzlich werden hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen in diesen Druckbereichen geschwächt.²⁶

Einhergehend mit der Dissoziation oligomerer Proteine, erfahren die Aminosäurereste an der Schnittstelle eine drastische Änderung der Umgebungspolarität. Während in der oligomeren Form die Aminosäuren der Grenzfläche in Kontakt mit den Aminosäuren der anderen Untereinheit stehen, werden sie im Zuge der Dissoziation hydratisiert.²⁷ Dies führt zu leichten konformationellen Änderungen, welche in der englisch-sprachigen Fachliteratur als *conformational drift* bezeichnet werden.^{22,23,28–30}

1.2.2 Proteindynamik

Interne Proteindynamik

Proteine sind hochdynamische Makromoleküle. Die Bewegungen innerhalb von Proteinen umfassen Längen von 0.01 Å bis 10 Å und Zeiten von 10^{-13} s bis 1 s.^{9,31} Proteine liegen nicht starr in einer bestimmten Konformation vor, sondern sind gewissen Fluktuationen unterworfen und besetzen eine Vielzahl sogenannter *conformational substates*. Diese sind Minima der Freie-Energie-Oberfläche.^{9,32,33} Das Abtasten dieser Oberfläche setzt die Dynamik des Proteins voraus.

Diese Dynamik ist für die jeweilige Funktion eines Proteins im Organismus unabdingbar und auch für die Proteinfaltung ist eine Dynamik der Polypeptidkette von Nöten. In gefalteten Proteinen ist eine gewisse Beweglichkeit essentiell, um beispielsweise konformationelle Änderungen während des Bindens von Liganden oder der enzymatischen Katalyse zu ermöglichen. Die Funktion eines Proteins hängt somit nicht nur von dessen Struktur, sondern eben so sehr von dessen Dynamik ab.^{31,34–42}

Die Bewegungen innerhalb von Proteinen erfolgen auf verschiedenen Zeitskalen. Einen Überblick über typische Bewegungen und deren Zeitskalen gewährt Abbildung 1.2. Die schnellsten Bewegungen sind Bindungsschwingungen, welche in der Größenordnung von circa 100 fs liegen. Rotationen von Methylgruppen und Aminosäureseitenketten spielen sich in Größenordnungen von ps bis ns ab, kollektive Bewegungen, wie die Bewegung von *loop*-Regionen einzelner Domänen, erfolgen in der Größenordnung von ns bis ms.^{9,32,40,42}

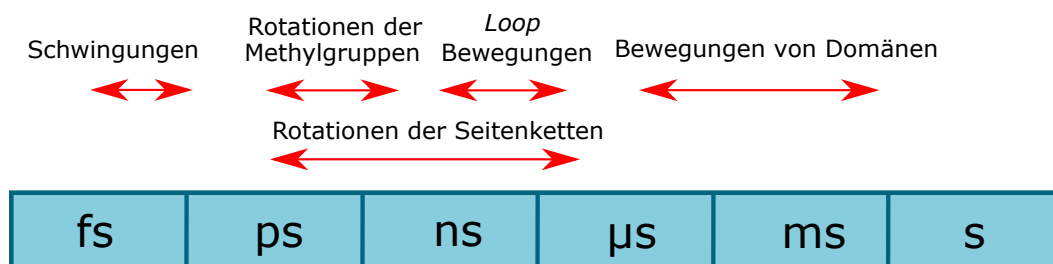


Abbildung 1.2: Zeitskalen der Proteindynamik. Abbildung modifiziert nach Referenz.³²

Globale Proteindynamik: Diffusion

Zusätzlich zu dieser internen Proteindynamik ist ein Protein aufgrund der Brownschen-Molekularbewegung auch einer globalen Translations-Dynamik unterworfen. Diese Bewegungen ermöglichen beispielsweise die Transportfunktion von Proteinen.

Der Konzentrationsausgleich gelöster Teilchen wird durch die Fickschen Gesetze beschrieben. Das erste Ficksche Gesetz beschreibt die Proportionalität des Teilchenflusses J zum Konzentrationsgradienten $\frac{dc}{dx}$. Die Proportionalitätskonstante ist der Diffusionskoeffizient D :^{10,43}

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad (1.8)$$

Die zeitliche Änderung der Konzentration beschreibt das zweite Ficksche Gesetz:¹⁰

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t} \right)_x = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right)_t \quad (1.9)$$

Durch Lösen der Differentialgleichung für freie Diffusion wird eine Gauss-Verteilung erhalten:¹⁰

$$\left(\frac{\partial c}{\partial x} \right)_t = -\frac{c_0}{2\sqrt{\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \quad (1.10)$$

Nach erfolgtem Konzentrationsausgleich ist die Diffusion der Teilchen ungerichtet, beruht auf der ungerichteten Wärmebewegung und kann durch einen *random walk* beschrieben werden. Die mittlere Verschiebung eines Teilchens ist in diesem Fall somit $\langle u \rangle = 0$. Für die durch Selbstdiffusion verursachte mittlere quadratische Verschiebung (*mean squared displacement*, MSD) gilt im dreidimensionalen Fall $\langle u^2 \rangle = 6Dt$.

Der Selbstdiffusion des Teilchens in Lösung wirkt die Reibungskraft $F = 6\pi\eta r_h$ entgegen. Hier ist η die Viskosität der Lösung. Die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten vom hydrodynamischen Radius r_h wird durch die Stokes-Einstein-Beziehung beschrieben:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h} \quad (1.11)$$

1.2.3 Proteinfunktionalität: Enzymkinetik

Enzyme sind Proteine, welche als Katalysator in biochemischen Reaktionen dienen und somit den Stoffwechsel der Zelle ermöglichen. Die Reaktion eines Substrates S zu einem Produkt P erfolgt dabei über einen kurzlebigen Übergangszustand ES*. Die Geschwindigkeitskonstante k einer Reaktion hängt dabei von $\Delta G^* = G_{ES^*} - G_S$ ab:¹⁰

$$k = A \cdot \exp(-\Delta G^*/RT) \quad (1.12)$$

Hier ist A ein präexponentieller Faktor. Enzyme beschleunigen biochemische Reaktionen durch eine Absenkung der freien Aktivierungsenthalpie ΔG^* . Dies erfolgt durch die Bildung eines Komplexes zwischen Enzym und Substrat.

Im Grenzfall hoher Substrat-Konzentrationen kann die Kinetik nach Michaelis-Menten beschrieben werden:^{10,44}



Dabei erfolgt zunächst die reversible Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ES aus dem Enzym E und dem Substrat S mit den Geschwindigkeitskonstanten k_1 bzw. k_{-1} . Die Umsetzung zum Produkt erfolgt irreversibel mit der Geschwindigkeitskonstante k_2 . Für die Reaktionsgeschwindigkeit v gilt dann:¹⁰

$$v = \frac{dc_P}{dt} = k_2 \cdot c_{ES} \quad (1.14)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit nähert sich für hohe Substratkonzentrationen dem Grenzwert v_{\max} . Für die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v gilt gemäß Michaelis-Menten:¹⁰

$$v = \frac{dc_P}{dt} = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (1.15)$$

Für die Michaelis Konstante K_m gilt:¹⁰

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (1.16)$$

Diese ist ein Maß für die Affinität des Substrats. Beträgt die Substratkonzentration K_m , so ist $v = \frac{1}{2}v_{\max}$.¹⁰ Die zweite charakteristische kinetische Größe ist die katalytische Wechselzahl k_{cat} .¹⁰

$$k_{\text{cat}} = k_2 = \frac{v_{\max}}{c_{\text{E0}}} \quad (1.17)$$

Einfluss von Druck auf die Enzymkinetik

Druckapplikation kann Enzyme sowohl aktivieren als auch deaktivieren. Entscheidend für den Einfluss von Druck auf die Kinetik einer enzymatisch katalysierten Reaktion ist das Aktivierungsvolumen ΔV^\ddagger . Bei einem negativen Wert von $\Delta V^\ddagger = V_{\text{ES}^\ddagger} - V_{\text{ES}}$ ist das Volumen des aktivierten Übergangszustandes ES^\ddagger geringer als dasjenige des Enzym-Substrat-Komplexes ES , wodurch die Reaktion durch Druckapplikation beschleunigt wird.^{25,45,46} Dieser Sachverhalt wird durch die Eyring-Gleichung beschrieben.^{44,46}

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial p} \right)_T = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (1.18)$$

Zusätzlich kann die Enzymkinetik aber auch durch die Kompression des Proteins unter Druck beeinflusst werden. Auch druckinduzierte Strukturänderungen wie die Dissoziation oligomerer Enzyme oder die Entfaltung beeinflusst die Kinetik.

Ein großer Vorteil druckabhängiger Untersuchungen der enzymatischen Aktivität ist die Möglichkeit, volumetrische Eigenschaften zu bestimmen.^{25,45,47,48} Typische Volumenprofile einer katalysierten Reaktion mit positivem und negativem Aktivierungsvolumen sind in Abbildung 1.3 gezeigt. Das Binden des Substrats, d.h. die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ES , führt zu der Volumenänderung ΔV_{ES} . Diese kann sowohl positiv als auch negativ sein.²⁵ Dieser Wert kann durch Bestimmung des Aktivierungsvolumens als Funktion der Substratkonzentration bestimmt werden.^{25,45,48} So ist bei geringen Substratkonzentrationen v proportional zu k_{cat}/K_m , d.h. in Gleichung (7.4) ist $k = k_{\text{cat}}/K_m$ und das Aktivierungsvolumen entspricht dem in Abbildung 1.3 eingezeichneten Volumen.^{25,45,48} Bei hohen Substratkonzentrationen hingegen ist v_0 proportional zu k_{cat} , d.h. k entspricht in Gleichung (7.4)

k_{cat} und das berechnete Aktivierungsvolumen entspricht der Volumendifferenz des Enzym-Substratkomplexes ES und dessen Übergangszustand ES^* .^{25,45,48} Diese Volumänderungen beruhen zum einen auf Änderungen der Packung und zum anderen auf Hydratationsänderungen.⁴⁷

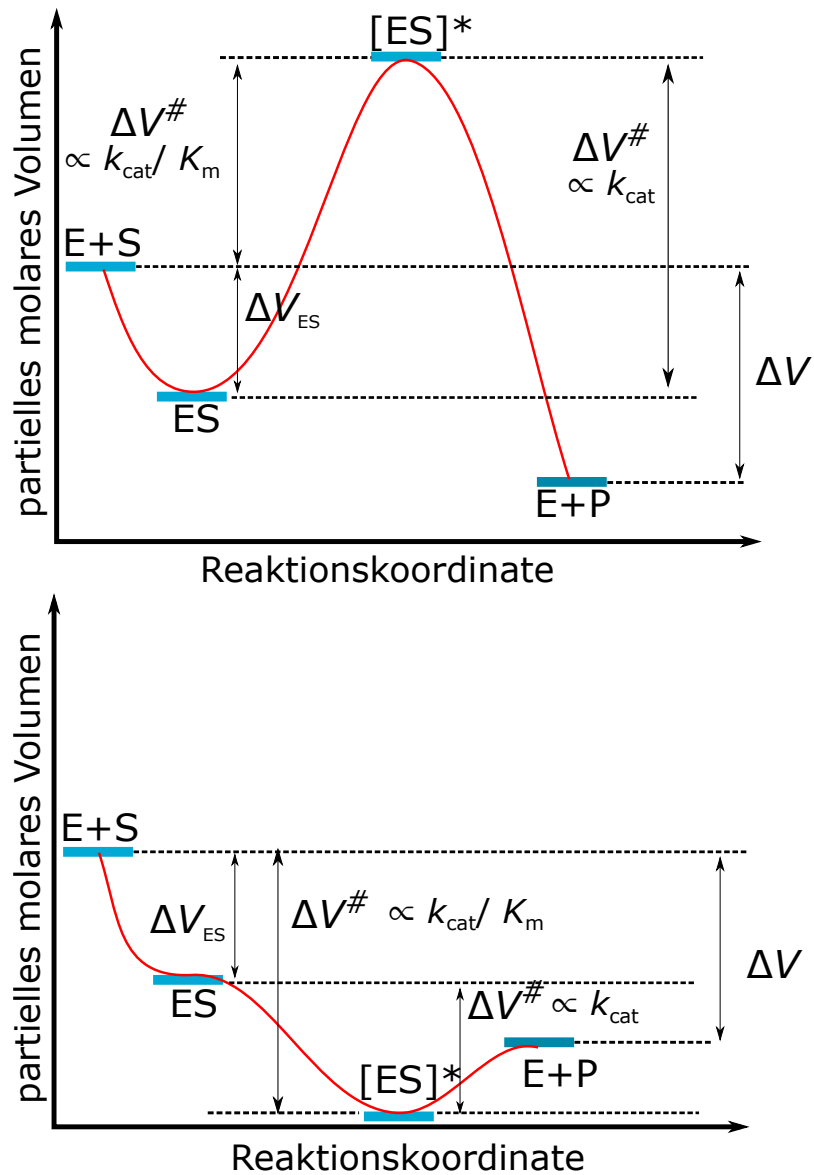


Abbildung 1.3: Volumenprofil einer enzymatisch katalysierten Reaktion. Modifiziert nach den Referenzen.^{25,46}

1.3 Lipide

Als Lipide werden jene Biomoleküle bezeichnet, welche in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Dazu zählen unter anderem Fettsäuren, Steroide sowie Phospho- und Glykolipide.¹⁰ In Wasser bilden diese spontan Aggregate aus. Entscheidend für die Struktur der ausgebildeten Aggregate ist dabei das Verhältnis der Durchmesser der hydrophilen und der hydrophoben Region (kritischer Packungsparameter). So können sich Mizellen, Doppelschichten oder inverse Mizellen bilden.^{10,43,49} Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen der Substanzklasse der Phospholipide, welche im Folgenden vorgestellt wird.

1.3.1 Phospholipide: Struktur, Dynamik und Phasenverhalten

Als Grundbaustein der Zellmembran garantieren Phospholipide im Organismus die Abgrenzung der Zelle von ihrer Umgebung. Auch innerhalb der Zelle werden einzelne Organellen von Biomembranen umschlossen. Die Zellmembran weist eine hochkomplexe unsymmetrische Zusammensetzung auf. Das Grundgerüst ist eine Doppelschicht von verschiedenen Phospholipiden, in welche unter anderem Membranproteine und Sterole eingelagert sind.¹⁰

Phospholipide bestehen aus einem Glycerolgerüst, welches über zwei Esterbindungen mit Fettsäureresten und über eine Phosphorsäureesterbindung mit Cholin verbunden ist. Es handelt sich somit um Amphiphile mit einer hydrophilen Kopfregion und einer hydrophoben Schwanzregion (siehe Abbildung 1.4 A).¹⁰ In Wasser lagern sich Phospholipide unter anderem zu aus multilamellaren Doppelschichten bestehenden Vesikeln zusammen (siehe Abbildung 1.4 B).^{10,43} Diese multilamellaren Vesikel können als einfachstes Modell der Zelle verstanden werden.

Der Gleichgewichtsabstand der einzelnen Schichten in multilamellaren Vesikeln wird durch verschiedene Kräfte bestimmt:⁴⁹⁻⁵¹ kurzreichende abstoßende Wechselwirkungen, die so genannten *hydradtion force*,⁴⁹⁻⁵⁴ weitreichende attraktive van-der-Waals-Wechselwirkungen^{49-51,55,56} und weitreichende sterische Undulations-(Helfrich)-Abstoßungen.^{49-51,57}

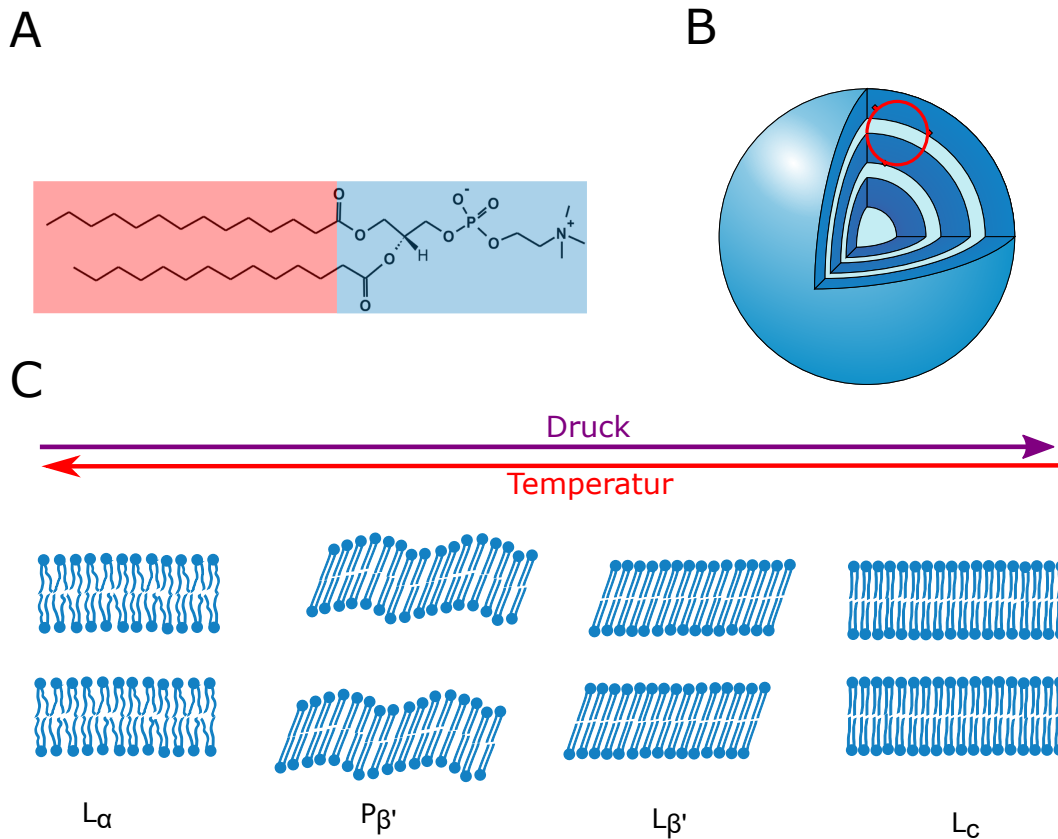


Abbildung 1.4: Strukturformel des Phosphatidylcholins DMPC, hydrophobe Bereiche sind in rot und hydrophile Bereiche in blau dargestellt(A). Struktur eines aus Lipiddoppelschichten aufgebauten multilamellaren Vesikels(B). Struktur lamellarer Lipid-Phasen (C).

Wie Abbildung 1.4 C zeigt, weisen Lipiddoppelschichten einen ausgeprägten Polymorphismus auf.^{10,43} Welche Phase ausgebildet wird, hängt von einer Vielzahl von Parametern, wie pH, Druck oder Temperatur, ab. Die biologisch-relevante Phase ist die fluide L_{α} -Phase. In dieser Phase liegt eine hohe Anzahl an *gauche* Konformeren in den Alkylketten vor.¹⁰ Daneben existiert eine Vielzahl an Gelphasen. Weiterhin existieren nicht-lamellare Phasen, wie beispielsweise hexagonale Phasen.¹⁰

Phasenübergänge können durch Änderungen des Drucks oder der Temperatur induziert werden. Das Phasendiagramm des Phospholipids DPPC ist in Abbildung 1.5 gezeigt. Membransysteme sind weitaus druckempfindlicher als Proteine. In den meisten Fällen hat Druck einen ähnlichen Einfluss wie ein Absenken der Temperatur, jedoch treten auch Phasen, wie beispielsweise die ineinandergreifende Gel-

phase $L_{\beta i}$, nur bei hohen Drücken auf. Da Druckapplikation stets den Zustand des geringsten Volumens begünstigt, kommt es im Zuge der Druckapplikation zu einer Zunahme der Kettenordnung, bereits vor dem Phasenübergang, verbunden mit einer verringerten Beweglichkeit der Ketten.¹⁰ Die Druckabhängigkeit einer Phasenübergangstemperatur T_{trans} wird durch die Clausius Clapeyron Gleichung beschrieben:^{58,59}

$$\frac{dT_{\text{trans}}}{dp} = \frac{\Delta V_m}{\Delta S_m} = \frac{T_{\text{trans}} \Delta V_m}{\Delta H_m} \quad (1.19)$$

Wie Proteine sind auch Membranen keine starren Strukturen, sondern weisen, besonders in der biologisch-relevanten fluiden Phase, eine Dynamik auf. So sind Membranen ständigen thermisch induzierten Undulations-Bewegungen unterworfen.^{50,51,60-62} Weiterhin erfolgt eine laterale Diffusion, welche für die Funktion biologischer Membranen unabdingbar ist, sowie eine Rotationsdiffusion.¹⁰

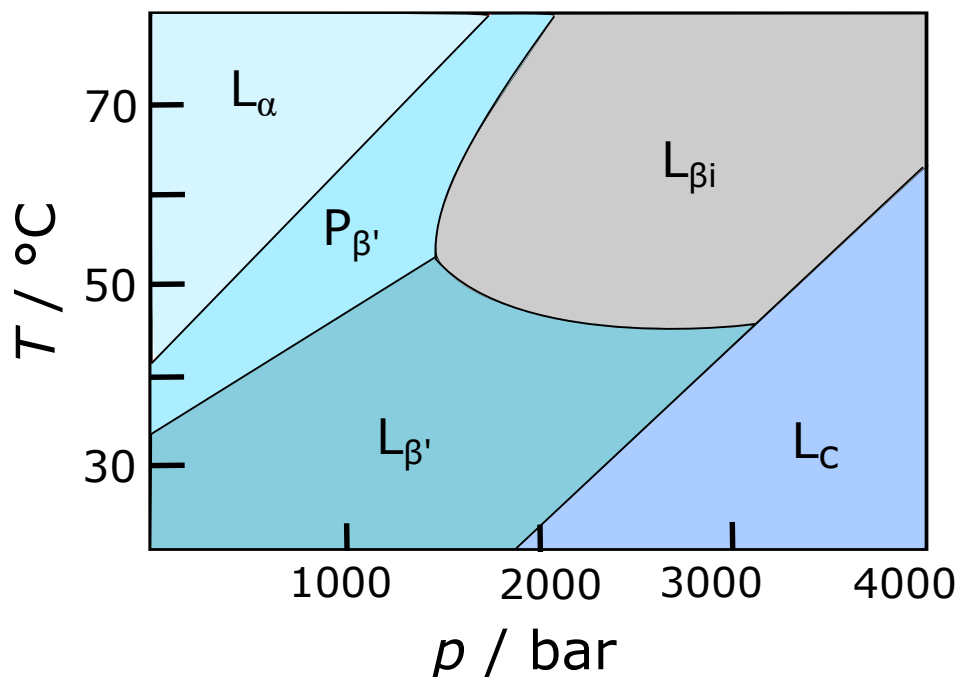


Abbildung 1.5: Temperatur-Druck-Phasendiagramm von DPPC-Doppelschichten in Exzess-Wasser. Abbildung modifiziert nach Referenz.⁶³

1.4 Physiologisch relevante Osmolyte

Osmolyte sind ungeladene, niedermolekulare, organische Verbindungen, welche insbesondere von extremophilen Organismen angereichert werden, um schädliche Einflüsse extremer Umweltbedingungen, wie extremen Temperaturen, Austrocknung, osmotischen oder hydrostatischen Druck, auszugleichen.^{2,64,65} Organische Osmolyte haben dabei gegenüber Salzen den Vorteil, dass auch bei hohen Konzentrationen (die Gesamtkonzentrationen an Osmolyten in marinen Organismen beträgt bis zu 0.6 M)⁶⁶ die Funktionalität der Biomoleküle erhalten bleibt, weshalb auch von kompatiblen Osmolyten gesprochen wird.^{67,68}

Physiologisch relevante Osmolyte werden generell in vier Klassen eingeteilt: Polyole (Trehalose, Glycerol, Inositol), Aminosäuren (Glycin, Prolin), Methylamine (Trimethyl-amin-*N*-Oxid (TMAO)) und Harnstoff.^{2,68-70} Harnstoff ist ein metabolisches Abfallprodukt der Niere und hat einen destabilisierenden Effekt auf biologische Systeme.⁷¹

1.4.1 Einfluss auf die Proteinstabilität

Seit den Arbeiten des böhmischen Chemikers Franz Hofmeister "Zur Lehre von der Wirkung der Salze"⁷² wurde der Einfluss kosmo- und chaotroper Substanzen auf die Struktur und Dynamik von Wasser und damit auch auf Proteinen intensiv erforscht.

Entscheidend für den stabilisierenden oder destabilisierenden Einfluss eines Cosolvents ist dabei, ob das Molekül mit Wasser bzw. dem Biomolekül interagiert. Die Entfaltung eines Proteins geht mit einer Zunahme der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche (engl. *solvent-accessible-surface area*, SASA) einher. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Binden eines mit dem Protein interagierenden Osmolyten, wodurch das Protein destabilisiert wird.¹¹

Es folgt eine thermodynamische Betrachtung der Effekte von Osmolyten auf die Proteinentfaltung. Von einem Drei-Komponenten-System, bestehend aus dem Protein, einem Cosolvent und Wasser, ergibt sich für ΔG° der Entfaltung bei Zugabe

eines Cosolvens mit dem chemischen Potential μ_C :^{11,64,65}

$$\left(\frac{\partial \Delta G^\circ}{\partial \mu_C}\right)_{T,p,m_j \neq C} = \left(\frac{\partial \Delta \mu_{\text{Protein}}^\circ(m_{\text{Cosolvens}})}{\partial \mu_C}\right)_{T,p,m_j \neq C} \quad (1.20)$$

Dabei bezeichnet $\Delta \mu_{\text{Protein}}(m_C) = \mu_{\text{u,solv}} - \mu_{\text{f,solv}}$ den Unterschied des chemischen Potentials des Proteins im ungefalteten und gefalteten Zustand in Anwesenheit des Cosolvents. Die Änderung der Proteinstabilität hängt von dem bevorzugten Bindungskoeffizienten $\Gamma_{\text{PC}} = (\partial m_C / \partial m_P)_{\mu_C}$ ab.^{11,65} Dieser hängt von der Anzahl der Cosolvensmoleküle ab, welche bei Zugabe des Proteins die Konzentrationen in der Bulk-Phase erhöhen bzw. erniedrigen. Ist $\Delta \Gamma_{\text{PC}}$ positiv, ist der Großteil der Cosolvensmoleküle nahe der Proteinoberfläche lokalisiert, wohingegen bei einem negativen Wert mehr Moleküle in der Bulk-Phase vorliegen. Für die Stabilitätsänderung gilt:¹¹

$$\left(\frac{\partial \Delta G^\circ}{\partial \mu_C}\right)_{T,p,m_j \neq C} = -\Delta \Gamma_{\text{PC}} = -\left(\Delta \Delta N_{\text{PC}} - \left(\frac{N_{\text{C}}^{\text{Bulk}}}{N_{\text{W}}^{\text{Bulk}}}\right) \Delta \Delta N_{\text{PW}}\right) \quad (1.21)$$

Eine Stabilisierung des Proteins erfolgt somit gemäß (1.21) bei einem negativen Wert von Γ_{PC} , d.h. bei Ausschluss des Cosolvents vom Protein. Da der ungefaltete Zustand eine höhere dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche hat, ist in diesem Fall Γ_{PC} negativer als im entfalteten Zustand.

Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen dem Effekt eines Osmolyts auf die Proteinstabilität sowie dessen osmotischen Koeffizienten ϕ beobachtet. Dieser Koeffizient gibt die Abweichung des osmotischen Drucks π von dem idealen van't Hoff Verhalten ($\pi = cRT$) an.^{11,73} So weisen ausgeschlossene Osmolyte eine positive Abweichung vom idealen Verhalten auf, d.h. $\phi = \frac{\pi}{\pi_{\text{ideal}}} > 1$.^{11,73}

1.4.2 Verwendete Osmolyte

In dieser Arbeit kamen die Osmolyte TMAO, Harnstoff, Trehalose und Glycin, das heißt je ein Vertreter der vier eingangs genannten Osmolyt-Klassen, zum Einsatz. Die Strukturformeln dieser Substanzen sind in Abbildung 1.6 gezeigt.

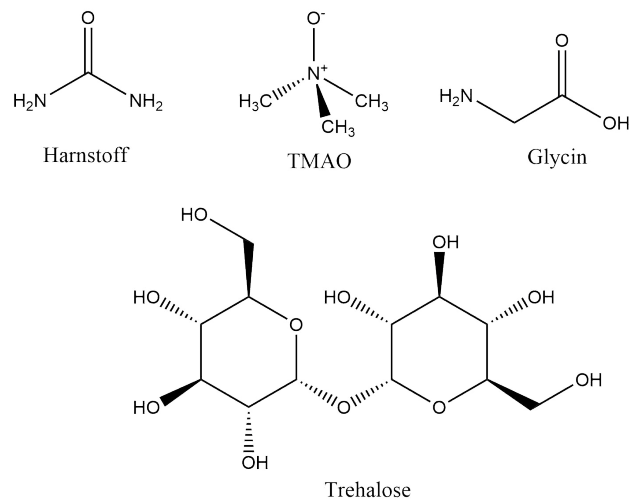


Abbildung 1.6: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Osmolyte Harnstoff, TMAO, Glycin und Trehalose.

TMAO und Harnstoff

Der stabilisierende Einfluss von TMAO auf Proteine gegen Druck und Temperaturfaltung konnte in einer Reihe von Studien gezeigt werden.⁷³⁻⁷⁸ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in Tiefseeorganismen der TMAO-Gehalt linear mit der bewohnten Meerestiefe ansteigt.⁶⁷ Dies lässt vermuten, dass TMAO in diesem Fall als Piezolyt dient.

In Lösung beeinflusst TMAO die Wasserstruktur, verstärkt das Wasserstoffbrücken-Netzwerk und verursacht somit eine verlangsamte Wasserdynamik.^{11,73-76,79,80} In Anwesenheit von Proteinen interagiert TMAO bevorzugt mit Wasser und wird somit von der Proteinoberfläche ausgeschlossen.⁷³⁻⁷⁶ Insgesamt wird in Anwesenheit von TMAO somit die kompakteste Form des Proteins, welche die geringste dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche besitzt, bevorzugt.

Trotz des stabilisierenden Einflusses von TMAO ist zu beachten, dass TMAO auch *in vivo* negative Effekte auf biologische Systeme haben kann und nur als Reaktion auf Umweltstress wie hydrostatischen Druck oder hohe Harnstoff-Konzentrationen im großen Maße akkumuliert wird.⁶⁹ So kann es in Abwesenheit dieser Faktoren zu einer Überstabilisierung durch TMAO kommen, welche u.a. Proteinaggregation

verursachen kann oder die Dynamik eines Proteins soweit verringert, dass dessen Funktionalität eingeschränkt wird.⁸¹

Harnstoff andererseits hat keinen signifikanten Einfluss auf die Struktur der Wasserstoffbrücken und deren Dynamik,⁸² interagiert nur schwach mit Wasser und bindet direkt an das Peptidrückgrat des Proteins (*preferential binding*).⁷³⁻⁷⁶ Dabei werden zwei Wassermoleküle durch ein Harnstoffmolekül ersetzt. Der destabilisierende Einfluss von Harnstoff beruht damit sowohl auf dem Enthalpie- als auch auf einem Entropie-Beitrag.¹¹

Weiterhin ist TMAO in der Lage den destabilisierenden Effekt von Harnstoff auszugleichen. Dieser *counteracting*-Effekt ist bei einem TMAO:Harnstoff-Verhältnis von etwa 1:2 gegeben, interessanterweise wurde dieses Verhältnis zwischen TMAO und Harnstoff auch *in vivo* gefunden, wo TMAO den negativen Einfluss des Abfallprodukts ausgleicht.⁶⁹ Dieser *counter acting* Effekt wird zumeist wasservermittelten Mechanismen zugeschrieben.^{79,83-85}

Trehalose

Zu den physiologisch relevanten kompatiblen Osmolyten zählen Zucker. Dabei scheint insbesondere das Disaccharid Trehalose eine, verglichen mit anderen Zuckern, besondere Rolle bezüglich der Stabilisierung von Biomolekülen, vor allem gegen extreme Temperaturen und Austrocknung, zu spielen.⁸⁶ Primär wurde der stabilisierende Einfluss von Trehalose auf Biomoleküle und Mikroorganismen gegen die Stressfaktoren Austrocknung und extreme Temperaturen (besonders Kryopräservierung) intensiv untersucht.⁸⁷⁻⁹²

Dennoch gibt es auch Hinweise darauf, dass Trehalose auch bei der Anpassung von Organismen an hohe Drücke eine wichtige Rolle zu spielen scheint. So ist Trehalose beispielsweise in Larven der mexikanischen Fruchtfliege, in Tiefsee-Mikroorganismen, *E. Coli* und Hefe an der Kompensierung störender Einflüsse durch osmotischen und hydrostatischen Druck beteiligt.^{90,93-102}

Auch hier ist zu beachten, dass Trehalose, beispielsweise in Hefe, nur unter Stressbedingungen akkumuliert wird, während der Trehalose-Gehalt unter optimalen Wach-

tumsbedingungen vergleichsweise gering ist. Im Einklang damit konnte gezeigt werden, dass Trehalose Enzyme bei hohen Temperaturen stabilisiert, unter Normalbedingungen jedoch inhibiert.^{69,103} Dieser Sachverhalt wurde durch Singer und Lindquist treffend als "the Yin and Yang of trehalose" zusammengefasst.¹⁰³

Trehalose ist, wie TMAO, eine kosmotrope Substanz, interagiert mit Wasser und zeigt eine positive Abweichung vom idealen van't Hoff Verhalten.^{86,104} So sind die Wechselwirkungen zwischen Trehalose- und Wassermolekülen stärker als jene zwischen Wassermolekülen untereinander.¹⁰⁵ Zusätzlich wird das tetraedrische Wasser-Netzwerk durch Trehalose gestört.¹⁰⁶ Neben attraktiven Wechselwirkungen welche zur Ausbildung von Trehalose-Clustern führen, herrschen zusätzlich sterische repulsive Wechselwirkungen zwischen Trehalosemolekülen.¹⁰⁴

Bezüglich des Wechselwirkungsmechanismus von Trehalose mit Membranen und Proteinen existieren verschiedene Szenarien. Zum einen wurden direkte Interaktionen mit dem Biomolekül beobachtet, wie die Interkalation von Trehalosemolekülen zwischen die hydrophilen Kopfgruppen der Membran,^{88,107–114} oder der Austausch von Wassermolekülen der Hydratationshülle von Biomolekülen.^{86,111,113–117} Aber auch ein Ausschluss von der Biomoleküloberfläche wird berichtet.^{86,118–121} Gleiches gilt für den Einschluss von Wasser zwischen dem Biomolekül und Trehalose (*entrapment*)^{122–125} Weiterhin können vor allem bei hohen Konzentrationen Vitrifikationseffekte auftreten.^{122,123,126–128} Diese Szenarien müssen nicht notwendigerweise exklusiv sein und es können auch Kombinationen verschiedener Effekte auftreten.^{122,124} Eine Konzentrationsabhängigkeit, welche den dominanten Einfluss bestimmt, kann auf den ersten Blick widersprüchliche Ergebnisse in Einklang bringen. So kamen verschiedenen Studien zu dem Ergebnis, dass das Verhalten bei geringen Konzentrationen auf direkten Interaktionen beruht, bei höheren Konzentrationen jedoch der Ausschluss von der Oberfläche das Verhalten bestimmt.^{119,129,130}

Glycin

Die Aminosäure Glycin ist der hauptsächliche Osmolyt in Seichtwasser-Wirbellosen.⁶⁷ Glycin wechselwirkt direkt mit dem Protein und zeigt eine negative Abweichung

vom idealen van't Hoff Verhalten, hat aber dennoch einen stabilisierenden Effekt auf Proteine.¹³¹

1.5 Crowding

Untersuchungen an Biomolekülen erfolgen für gewöhnlich unter stark verdünnten Bedingungen. Reale biologische Systeme weisen jedoch eine Vielzahl an Makromolekülen (50-400 mg mL⁻¹) auf. Da ein Großteil des Zellvolumens durch andere Makromoleküle eingenommen wird, können reale Systeme gewissermaßen als überfüllt bezeichnet werden.^{132,133} Dadurch wird einerseits die Viskosität der Lösung erhöht und andererseits das Volumen, welches dem beobachteten Makromolekül zugänglich ist, verringert.¹¹ Dieses Phänomen wird als makromolekulares *Crowding* bezeichnet.¹³⁴⁻¹³⁷ *Crowding* hat einen signifikanten Einfluss auf die Stabilität, Dynamik und Funktionalität von Biomolekülen.^{134,136-145}

Die Verringerung des zugänglichen Volumens durch Zugabe eines inerten Makromoleküls, aber auch des Biomoleküls selbst (*self-crowding*), ermöglicht somit die Erzeugung einer Umgebung, welche den überfüllten Zustand der Zelle besser widerspiegelt. In der Praxis kommen in der Regel inerte Polymere wie Polyethylenglykol oder Ficoll zum Einsatz. Dabei muss beachtet werden, dass die zelluläre Umgebung weitaus heterogener aufgebaut ist. So variieren die Makromoleküle des Cytoplasmas in Größe, Form und Polarität der Oberfläche. Der Einsatz von Proteinen, wie BSA oder Lysozym, sowie die Verwendung von Mischungen verschiedener *Crowding* Substanzen, erlaubt somit die Erschaffung einer Umgebung, welche die Bedingungen der Zelle besser widerspiegelt.¹¹

Für die Gleichgewichtskonstante eines Prozesses in *Crowding*-Umgebung im Vergleich zur Volumenphase gilt:^{11,146}

$$K_{Cr} = K_0 \exp(-\Delta\Delta G^\circ / RT) \quad (1.22)$$

Dabei ist $\Delta\Delta G^\circ = \Delta G_{\text{Cr}}^\circ - \Delta G_0^\circ$, und der *Crowding*-Koeffizient Γ_{Cr} :^{11,146}

$$\Gamma_{\text{Cr}} = \ln\left(\frac{K_{\text{Cr}}}{K_0}\right) = -\frac{\Delta\Delta G^\circ}{RT} = \frac{\Delta\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta\Delta S^\circ}{R} \quad (1.23)$$

Der Einfluss des makromolekularen *Crowdings* beruht somit auf entropischen und enthalpischen Beiträgen.¹¹

Die durch makromolekulares *Crowding* verursachten Effekte können zum einen durch die sterische Repulsion aufgrund der Anwesenheit der *Crowder*-Moleküle erklärt werden. Wie Abbildung 1.7 zeigt, wird durch die Anwesenheit dieser Makromoleküle das dem Biomolekül zugängliche Volumen eingeschränkt (*excluded volume*-Effekt), wodurch es zur Stabilisierung kompakter Konformationen kommt und beispielsweise der gefaltete Zustand eines Proteins gegenüber dem ungefalteten Zustand stabilisiert wird. Durch diesen Volumenausschluss steigt auch die effektive Konzentration, d.h. die Aktivität des Biomoleküls.¹¹

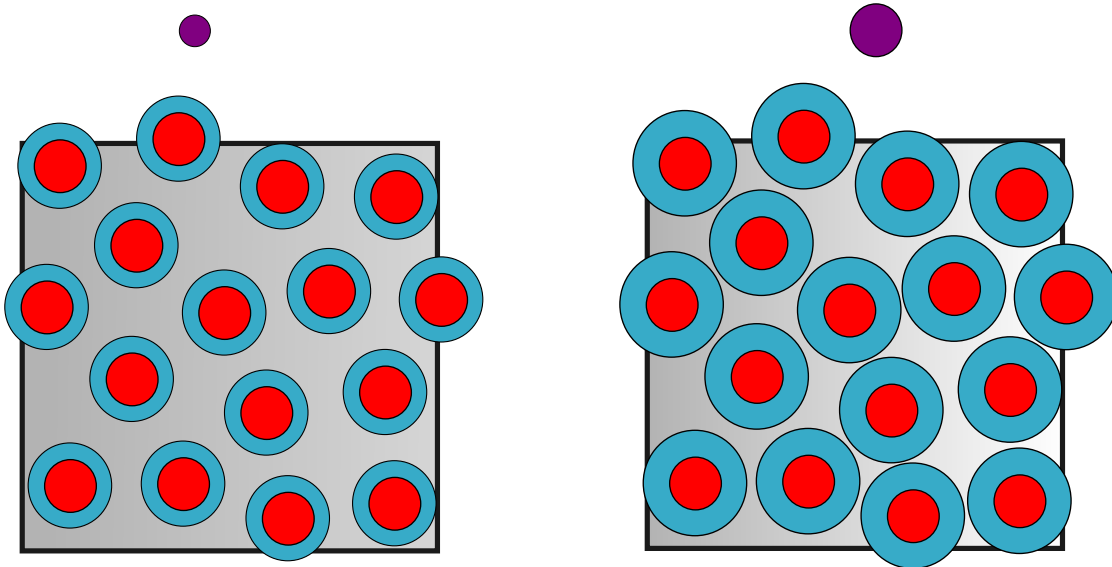


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Prinzips des ausgeschlossenen Volumens. Durch Anwesenheit der Makromoleküle (rot) sind die blau unterlegten Regionen für das Biomolekül (violett) unzugänglich (links). Durch eine Vergrößerung des Proteins nimmt das ausgeschlossene Volumen zu (rechts). Abbildung modifiziert nach Referenz.¹³⁵

Der *excluded volume*-Effekt ist unspezifisch und hängt lediglich von dem eingenommenen Volumen des *Crowder*-Moleküls und der Größe und Form von Biomolekül

und Cosolvens ab.¹³⁹ Die resultierenden *depletion forces* verringern die Konformationsentropie, vor allem diejenige des ausgedehnten ungefalteten Zustandes, und verschieben das Gleichgewicht in Richtung kompakter Konformationen.¹¹

Andererseits müssen ebenfalls enthalpische Beiträge wie Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen berücksichtigt werden. Anders als die zuvor erwähnten Effekte der sterischen Repulsion, hängen diese enthalpischen Beiträge sowohl von der Temperatur als auch von der Beschaffenheit der Biomoleküle und *Crowding*-Substanzen ab. So können die enthalpischen Beiträge sowohl den gefalteten als auch den ungefalteten Zustand eines Proteins stabilisieren. Beispielsweise verstärkt elektrostatische Abstoßung den entropischen Effekt, wohingegen attraktive Wechselwirkungen diesem entgegenwirken. Bei der Verwendung von Proteinen und Zell-Lysaten als *Crowding*-Substanzen wurde das Verhalten oftmals durch enthalpische Effekte dominiert.^{147,148} Die Effekte des *Crowdings* sind somit *in cellulo* weitaus komplexer und lassen sich nicht ausschließlich durch den *excluded volume* Effekt beschreiben.¹⁴⁸

2 Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Methoden lassen sich in spektroskopische und Streumethoden einteilen. Im Folgenden soll eine möglichst kurze Erläuterung dieser Methoden erfolgen, um so eine Einordnung der gezeigten Ergebnisse zu ermöglichen. Eine detaillierte Beschreibung der Methoden oder gar die Funktionsweise von Messinstrumenten und technischer Details sind nicht Gegenstand dieses Kapitels.

2.1 Streumethoden

In Streuexperimenten wird die Streuung von elektromagnetischer Strahlung wie Licht oder Röntgenstrahlung, aber auch von Materiewellen wie Neutronen, an dem zu untersuchenden System betrachtet. Die allgemeine Geometrie eines Streuvorgangs ist in Abb. 2.1 gezeigt. Der eingehende Strahl mit dem Wellenvektor \vec{k}_0 und der Energie \vec{E}_0 wird dabei um den Winkel 2θ in das Raumwinkelement $\Delta\Omega$ gestreut. Gemessen wird die in dieses Raumwinkelement gestreute Intensität I . Der differentielle Streuquerschnitt $\frac{d\sigma}{d\Omega}$ stellt eine auf die ursprüngliche Intensität I_0 und das Raumwinkelement normierte Form der Intensität dar:¹⁰

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{I/\Delta\Omega}{I_0/A_0} \quad (2.1)$$

Hierbei ist A_0 die Querschnittsfläche des eingehenden Strahls

Für den Betrag des Wellenvektors gilt $|\vec{k}| = 2\pi/\lambda$. Bei elastischer Streuung ist der Energieübertrag $\Delta E = 0$, und somit $\vec{k}_0 = \vec{k}_1$. Damit ergibt sich für den Betrag von \vec{Q} :¹⁰

$$Q = |\vec{Q}| = 2|\vec{k}_0|\sin\theta = \frac{4\pi}{\lambda}\sin\theta \quad (2.2)$$

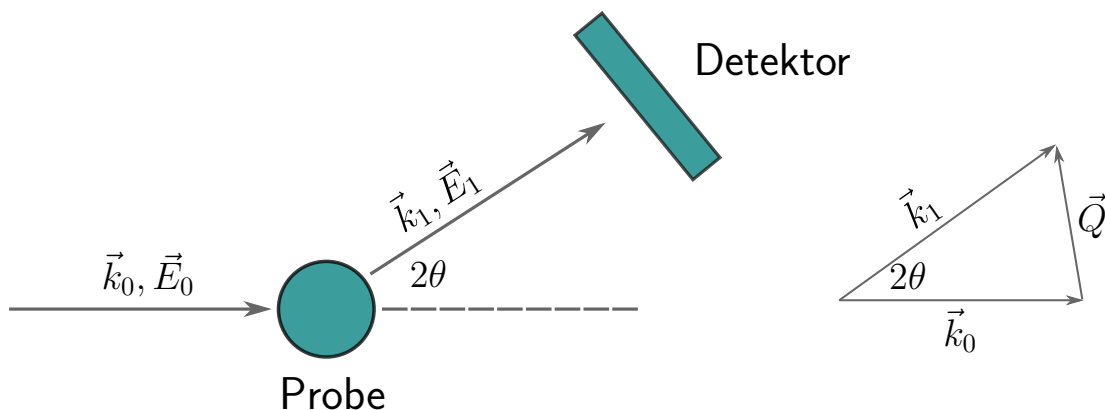


Abbildung 2.1: Allgemeines Prinzip der Kinematik eines Streuexperiments (modifiziert nach Referenz¹⁰).

2.1.1 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Röntgen- Kleinwinkelstreuung (engl.: *small-angle X-ray scattering*, SAXS) ist eine gängige Methode zur Strukturbestimmung von biologischen Makromolekülen.^{10,43,149–153} Sie basiert auf der Streuung von Röntgenstrahlung an den Elektronen des Moleküls. Die Phasendifferenz der zwischen den an zwei Elektronen am Ort \vec{r} und im Ursprung des Koordinatensystems gestreuten Strahlung beträgt $\vec{Q}\vec{r}$. Die Partialwelle ist somit proportional zu $\exp(i\vec{Q}\vec{r})$. Die Integration über das Volumen des Atoms liefert den Atomformfaktor $f(\vec{Q})$.¹⁰

$$f(\vec{Q}) = \int \rho(\vec{r}) \exp(i\vec{Q}\vec{r}) d\vec{r} \quad (2.3)$$

Dabei gibt die Elektronendichte $\rho(\vec{r})$ die Anzahl der Elektronen im Volumenelement $d\vec{r}$ an.

SAXS an verdünnten Proteinlösungen

Im Folgenden wird von einer verdünnten Proteinlösung ausgegangen. Dies heißt, dass die an verschiedenen Teilchen gestreuten Wellen nicht interagieren. Die Streuintensität wird dabei über alle Orientierungen gemittelt. Damit ergibt sich die Partikelstreuurve.¹⁰

$$I(Q) = N_p \left\langle \left| \int \rho(\vec{r}) \exp(i\vec{Q}\vec{r}) d\vec{r} \right|^2 \right\rangle \quad (2.4)$$

Dabei ist N_p die Teilchenzahl. Das Integral kann als Summe von Partialwellen der Elektronen verstanden werden. Die Elektronendichte $\rho(\vec{r})$ des Teilchens kann näherungsweise als konstant angesehen werden. Zusätzlich muss die Elektronendichte des Lösungsmittels $\rho(\vec{r}_p)$ berücksichtigt werden. Sind beide Größen gleich groß, findet kein Streuprozess statt. Der Formfaktor $F(\vec{Q})$ berechnet sich gemäß:¹⁰

$$F(\vec{Q}) = \frac{1}{V_p} \int \exp(i\vec{Q}\vec{r}) d\vec{r} \quad (2.5)$$

Der intrapartikuläre Strukturfaktor $P(\vec{Q})$ wird durch die Mittelung des Formfaktors über alle Orientierungen erhalten:

$$P(\vec{Q}) = |F(\vec{Q})|^2 \quad (2.6)$$

Somit ergibt sich:

$$I(Q) = N_P K^2 P(\vec{Q}) \quad (2.7)$$

In wechselwirkenden Systemen muss zusätzlich der Strukturfaktor $S(Q)$ berücksichtigt werden. Dieser ist in wechselwirkenden Systemen $\neq 1$. Damit ergibt sich:

$$I(Q) = N_P K^2 P(\vec{Q}) S(Q) \quad (2.8)$$

Der Strukturfaktor kann unter anderem der Bestimmung von Interaktionspotentialen von Proteinen dienen. Durch Fourier-Transformation des Strukturfaktors wird die Paarkorrelationsfunktion $g(r)$ erhalten.¹⁰

Die Paarabstandsverteilungsfunktion

Die Paarabstandsverteilungsfunktion kann durch Fourier-Transformation von $I(Q)$ erhalten werden:¹⁰

$$p(r) = \frac{r^2}{(2\pi)^3} \int_0^\infty I(Q) \frac{\sin(Qr)}{Qr} 4\pi Q^2 dQ \quad (2.9)$$

Die Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ spiegelt die Anzahl bestimmter Abstände der Streuzentren, d.h. Elektronen, wider und liefert somit Hinweise über die Struktur des Proteins.^{10,43,149,150,154} So unterscheidet sich beispielsweise die Paarabstandsverteilungsfunktion eines globulären Proteins signifikant von derjenigen eines hantelförmigen Proteins.^{149,150,154} $p(r)dr$ ist proportional zur Anzahl der Abstände zwischen r und $r+dr$ im Molekül. Der Schnittpunkt mit der r -Achse entspricht dem maximalen Abstand D_{\max} der Streuzentren. Praktisch ist es nicht möglich, $p(r)$ direkt als Fourier-Transformation von $I(Q)$ zu bestimmen. Stattdessen erfolgt die Auswertung durch indirekte Fourier-Transformation,¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ dabei wird eine Modell-Paarabstandsverteilungsfunktion,

welche die Linearkombination orthogonaler Funktionen darstellt, solange variiert, bis die entsprechende Streukurve $I(Q)$ den experimentellen Daten entspricht.¹⁰ Weiterhin ermöglicht die Paarabstandsverteilungsfunktion die Ermittlung des Gyrationradius R_G . Dieser gibt den quadratisch gemittelten Abstand aller Streuzentren vom Schwerpunkt an:¹⁰

$$R_G^2 = \frac{\sum_i m_i R_i^2}{\sum_i m_i} = \frac{\sum_i R_i^2}{N} \quad (2.10)$$

Dabei ist R_i der Abstand zwischen i und dem Massenschwerpunkt des Proteins und m_i .¹⁰

$$R_G^2 = \frac{\int_0^\infty r^2 p(r) dr}{2 \int_0^\infty p(r) dr} \quad (2.11)$$

Ab initio Strukturbestimmung

Die *ab initio* Erzeugung von Strukturmodellen aus experimentellen Streukurven ermöglicht eine anschauliche Darstellung der Proteinstruktur. Dabei wird eine zufällige Anordnung von *Dummy*-Partikeln angenommen und diese variiert, bis die Streukurve dieser Struktur möglichst gut mit den experimentellen Daten übereinstimmt.^{158,159} Da die ein-dimensionale Streukurve keine Informationen über die Orientierung enthält, werden mehrere Modelle gemittelt.¹⁶⁰

SAXS an multilamellaren Lipid-Systemen

Multilamellare Lipiddoppelschichten weisen eine periodische Struktur auf. Daher kommt es, durch die Beugung der Röntgenstrahlen an den Netzebenen, zur Entstehung von Beugungsreflexen, welche als Bragg-Peaks bezeichnet werden. Das Zustandekommen dieser Beugungsmaxima veranschaulicht Abbildung 2.2 A. Die Voraussetzung für das Auftreten der Beugungsmaxima ist konstruktive Interferenz. Diese erfolgt, wenn die Wegdifferenz zwischen den an verschiedenen Gitterebenen reflektierten Wellen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ ist.¹⁰ Dies wird durch die Bragg Gleichung beschrieben:¹⁰

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (2.12)$$

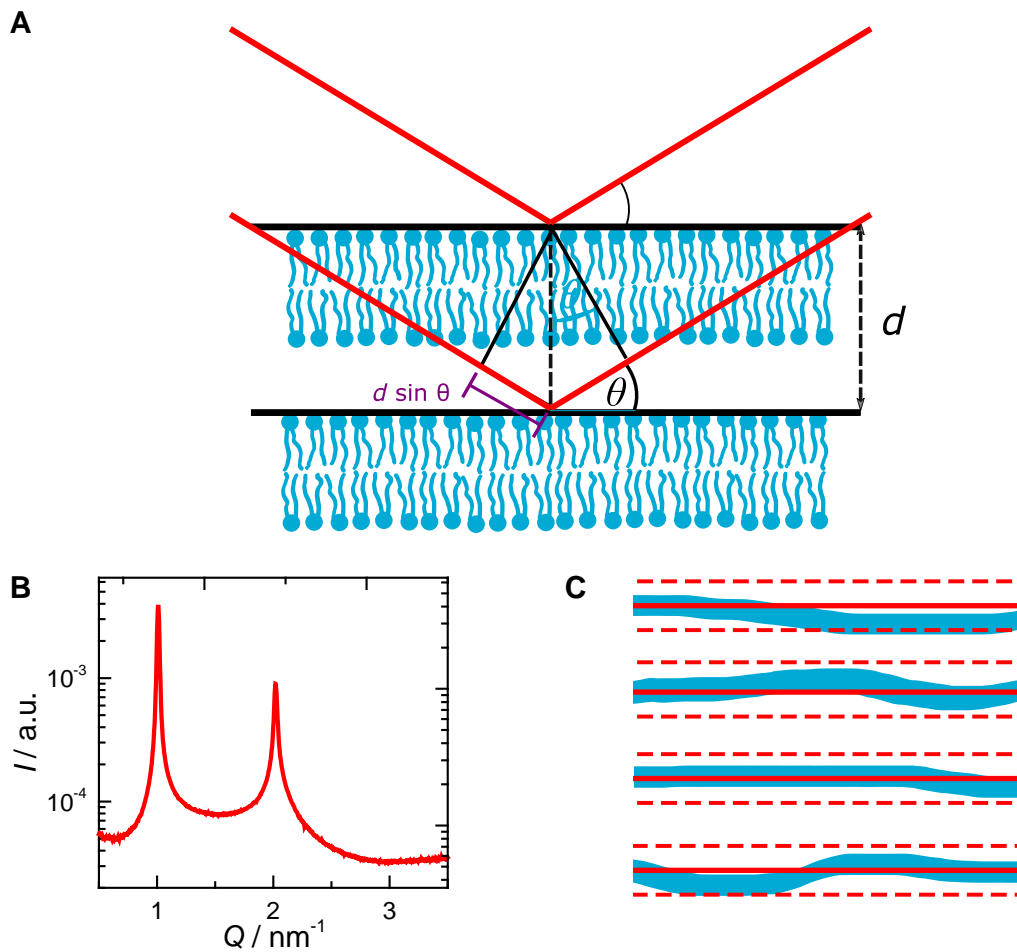


Abbildung 2.2: Schema zur Herleitung der Bragg-Gleichung (A). Typische Streukurve von DMPC in der fluiden Phase (B). Longitudinale und transversale Fluktuationen in multilamellaren Membransystemen (C). Abbildung modifiziert nach den Referenzen.^{10,60}

Abbildung 2.2 B zeigt eine typische Streukurve von DMPC in der fluiden Phase. Anders als bei einem Kristall wird dabei keine δ -Funktion erhalten. Stattdessen kommt es zu einer Verbreiterung der Peaks und es ist nur eine begrenzte Anzahl an Reflexen höherer Ordnungen vorhanden, in diesem Fall nur $n = 2$. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass multilamellare Lipiddoppelschichten keine starren Gebilde sind. Im Gegenteil sind sie, insbesondere in der fluiden Phase, Fluktuationen der Schichtdicke unterworfen und zusätzlich treten ebenfalls Undulationen der einzelnen Doppelschichten auf.^{50,51,60–62} All dies führt zu einer Verbreiterung der Bragg Peaks, einhergehend mit einer verringerten Intensität.^{60,61} Für $I(Q)$ eines multilamellaren Systems aus Lipiddoppelschichten gilt:⁵⁰

$$I(Q) = |F(Q)|^2 S(Q) \quad (2.13)$$

Hier ist $F(Q)$ der Formfaktor einer einzelnen Doppelschicht und $S(Q)$ der Strukturfaktor, welcher aus der räumlichen Korrelation der Doppelschichten resultiert. Für den Strukturfaktor gilt, gemäß Caillé, in der Nähe des Maximums des Bragg-Peaks Q_0 .^{50,60,61}

$$S(Q) \propto |Q - Q_0|^{-1+\eta} \quad (2.14)$$

Für den so genannten Caillé Parameter η gilt:^{50,60,61}

$$\eta = \frac{Q_0^2 k_B T}{8\pi \sqrt{K_c B}} \quad (2.15)$$

Dieser Caillé Parameter hängt somit von dem Elastizitätsmodul K_c und dem Kompressionsmodul B der Membran ab. B ist die inverse Kompressibilität und berücksichtigt die Interaktionen benachbarter Doppelschichten.⁵¹ Die Reflexe verschwinden somit gemäß (2.14) bei $\eta \geq 1$, d.h. zum einen bei hohen Q_h Werten und zum anderen bei geringen Werten von B und K_c . Die quadratische Fluktuation des Membranzwischenraumes lässt sich aus dem Caillé Parameter und der Schichtdicke d bestimmen:¹⁶¹

$$\sigma^2 = \frac{\eta_1 D^2}{\pi^2} \quad (2.16)$$

Die Caillé Theorie sondiert somit die durch Undulationen verursachte Verbreiterung von Bragg-Reflexen und ermöglicht die Extraktion mechanischer Parameter.

2.1.2 Quasielastische Neutronenstreuung (QENS)

Neutronen stellen eine weitere häufig verwendete Streusonde dar. Neben der Strukturaufklärung durch Kleinwinkelstreuung (SANS), ermöglichen sie ebenfalls die Untersuchung der Dynamik von Proteinen.^{162–167} Neutronen sind ungeladene subatomare Partikel mit einem Spin von $\frac{1}{2}$. Die Energie der Neutronen ergibt sich aus deren kinetischer Energie:¹⁰

$$E = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{h^2}{2m\lambda^2} \quad (2.17)$$

Mit der De Broglie Wellenlänge $\lambda = \frac{h}{mv}$. Für den Energieübertrag gilt:¹⁰

$$\hbar\omega = E - E_0 = \frac{\hbar^2}{2m}(k_1^2 - k_0^2) \quad (2.18)$$

Die Streuung von Neutronen erfolgt an den Atomkernen und ist anders als bei Röntgenstrahlung isotrop. Die Neutronenstreuulänge b eines Atoms ist somit von Q unabhängig, hängt unsystematisch vom Atom bzw. Isotop ab und kann auch ein negatives Vorzeichen besitzen. Ist dies der Fall, ist die gestreute Welle um 180° phasenverschoben. Zur Bestimmung des differentiellen Streuquerschnitts muss über alle Atome mit ihren unterschiedlichen Isotopzusammensetzungen summiert werden. Für den kohärenten bzw. inkohärenten Streuquerschnitt gilt:¹⁰

$$\sigma_{\text{coh}} = 4\pi b_{\text{coh}}^2 = 4\pi \bar{b}^2 \quad (2.19)$$

$$\sigma_{\text{inc}} = 4\pi b_{\text{inc}}^2 = 4\pi (\bar{b}^2 - \bar{b}^2) \quad (2.20)$$

Für H-Atome ist beispielsweise der inkohärente Streuquerschnitt und somit der inkohärente Streubetrag signifikant größer als für Deuterium-Atome.¹⁶⁸ Der doppelt-differentielle Streuquerschnitt entspricht der Anzahl der Neutronen, welche pro Zeiteinheit mit dem Energieübertrag $\hbar\omega$ in das Raumwinkelement $d\Omega$ gestreut werden. Er lässt sich in einen kohärenten Beitrag S_{coh} und einen inkohärenten Beitrag S_{inc} zerlegen. Deren Anteil wird durch die kohärente bzw. inkohärente Streulänge ge-

wichtet.

$$\frac{\partial^2 \sigma}{\partial \Omega \partial \omega} = N \frac{k_1}{k_0} \left(b_{\text{coh}}^2 S_{\text{coh}}(\vec{Q}, \omega) + b_{\text{inc}}^2 S_{\text{inc}}(\vec{Q}, \omega) \right) \quad (2.21)$$

Dabei ist N die Anzahl der streuenden Teilchen. Der typische Verlauf der Streufunktion $S(Q, \omega)$ bei einem bestimmten Q -Wert ist in Abbildung 2.3 gezeigt.

Generell lässt sich das Spektrum in drei Bereiche unterteilen. Im Falle von elastischer Strahlung ist der Energieübertrag $\hbar\omega = 0$. Der elastische Anteil ist somit idealerweise eine Deltafunktion bei $\hbar\omega = 0$. Diese ist jedoch immer mit der Auflösungsfunktion des jeweiligen Instruments gefaltet.¹⁶⁹ Quasielastische Streuung bezeichnet die Streuung von Neutronen bei kleinen Energieüberträgen bis zu 2 meV und beruht auf der Wechselwirkung der Neutronen mit diffundierenden Teilchen.¹⁰

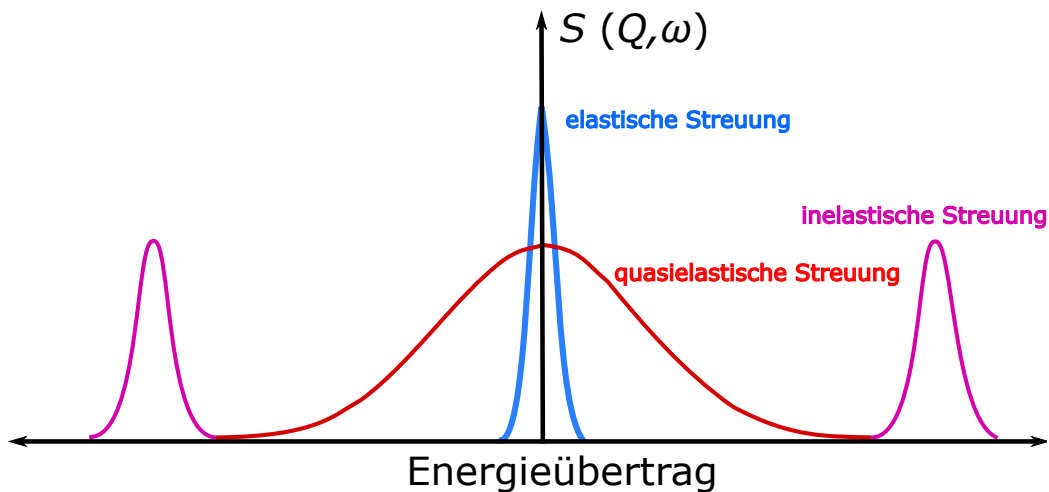


Abbildung 2.3: Typischer Verlauf eines QENS-Spektrums bei einem bestimmten Q -Wert. Gezeigt sind der elastische, der inelastische sowie der quasielastische Anteil der gestreuten Strahlung. Abbildung modifiziert nach Referenz.¹⁰

Die dynamischen Strukturfaktoren sind die Fourier-Transformierten der Van Hove-Korrelationsfunktionen¹⁷⁰ $G_d(\vec{r}, t)$ und $G_s(\vec{r}, t)$:^{10,171}

$$S_{\text{coh}}(\vec{Q}, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int \int G_d(\vec{r}, t) e^{i(\vec{Q}\vec{r} - \omega)t} d\vec{r} dt \quad (2.22)$$

$$S_{\text{inc}}(\vec{Q}, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int \int G_s(\vec{r}, t) e^{i(\vec{Q}\vec{r} - \omega)t} d\vec{r} dt \quad (2.23)$$

Die intermediäre Streufunktion I_{inc} ist die Ort-Fourier-Transformation von $G(\vec{r}, t)$ ¹⁷¹

bzw. die Frequenz-Fourier-Transformation von $S(Q, \omega)$:¹⁷²

$$I_{\text{inc}}(Q, t) = \int G(\vec{r}, t) e^{iQ\vec{r}} d\vec{r} \quad (2.24)$$

$$I_{\text{inc}}(Q, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int S(Q, \omega) e^{i\omega t} d\omega \quad (2.25)$$

Die Paarkorrelationsfunktion G_d gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein Teilchen am Ort \vec{r} zur Zeit t zu finden, wenn sich ein anderes Teilchen zur Zeit $t = 0$ am Ort $\vec{r} = 0$ befand. Die Selbstkorrelationsfunktion G_s hingegen gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein Teilchen am Ort \vec{r} zur Zeit t zu finden wenn sich dieses Teilchen bei $t = 0$ am Ort $\vec{r} = 0$ befand. Die Fourier-Transformierte des inkohärenten dynamischen Strukturfaktors lässt sich nach Van Hoove aus dem 2. Fickschen Gesetz bestimmen:¹⁷¹

$$G_s(r, t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{3/2}} \exp(-r^2/(4Dt)) \quad (2.26)$$

S_{inc} ist eine um $\omega = 0$ zentrierte Lorentz-Funktion:¹⁰

$$S_{\text{inc}}(Q, \omega) = \frac{1}{2\pi} \cdot \frac{DQ^2}{\omega^2 + (DQ^2)^2} \quad (2.27)$$

Der Diffusionskoeffizient D kann aus der Q -Abhängigkeit der Halbwertsbreite $\Delta\omega = 2DQ^2$ bestimmt werden.¹⁰

Elastische inkohärente Neutronenstreuung (EINS)

EINS ermöglicht die Bestimmung von atomaren Fluktuationen auf der ps- bis ns-Zeitskala. Bei der elastischen inkohärenten Neutronenstreuung wird im Gegensatz zur quasielastischen Streuung lediglich die, im Rahmen der Energieauflösung des Instrumentes, elastisch gestreute Intensität gemessen. Ein Vorteil ist dabei die Tatsache, dass der Betrag der elastisch gestreuten Strahlung weitaus größer ist, wodurch die Messzeit verkürzt wird und auch Instrumente mit vergleichbar geringem Neutronenfluss verwendet werden können.¹⁷³ Zusätzlich werden geringere Probenmengen benötigt. Der Verlust (*loss*) der elastisch-gestreuten Strahlung und die Zunahme (*gain*) der quasielastischen Strahlung sind gleich. Geringfügige Änderungen der Dy-

namik in Folge struktureller Änderungen führen zu einer zentrierten Abnahme der elastischen Intensität, wohingegen die Zunahme der quasielastischen Streuung sich auf die Seitenflügel des QENS-Spektrums verteilt.¹⁷³

Bei der Untersuchung von Proteinen wird EINS zur Bestimmung der mittleren quadratischen Verschiebung (englisch: *mean squared displacement*, MSD) der H-Atome des Proteins verwendet.^{173,174} Da der inkohärente Streuquerschnitt von H-Atomen, verglichen mit allen anderen Atomen der Probe, weitaus höher ist, wird die gemessene MSD, bei Verwendung von D₂O als Lösungsmittel, größtenteils durch die Dynamik der H-Atome bestimmt.¹⁶⁸

Die elastische Intensität entspricht der Geometrie der Bewegungen. Führen die H-Atome einer Probe beispielsweise in 100 ps eine Ellipse aus, so entspricht die Streufunktion derjenigen einer Ellipse. Bei langen Zeiten sind die Positionen $r(\infty)$ nicht mit der Ursprungsposition $r(0)$ korreliert. Damit ergibt sich für die intermediäre Streufunktion:^{165,166}

$$I_{\text{inc}}(Q, \infty) = \frac{1}{N} \sum_k | \langle e^{iQ\vec{r}_k} \rangle |^2 \quad (2.28)$$

Innerhalb der Gauss-Näherung ergibt sich für die Fourier-Transformation:^{165,171}

$$S_{\text{inc}}(Q, \omega = \pm\Delta E) \approx I_0 \exp\left(-\frac{1}{3}Q^2 \langle u^2 \rangle\right) \quad (2.29)$$

Die MSD kann somit, analog zur Guinier-Näherung in der Kleinwinkelstreuung, durch Auftragung von $\ln I$ gegen Q^2 ermittelt werden. Die so bestimmte MSD ist die gemittelte quadratische Verschiebung aller H-Atome in dem jeweiligen Zeitfenster:¹⁶⁷

$$\langle u^2 \rangle(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r(t) - r(t_0))^2 \quad (2.30)$$

Der Wert beschreibt also die komplette Amplitude der Bewegung in dem jeweiligen Zeitfenster und nicht bloß eine Verschiebung von der Gleichgewichtsposition.¹⁷⁵

Alle in dieser Arbeit gezeigten EINS-Messungen erfolgten an Instrument IN13 des Institut Laue Langevine (ILL, Grenoble, Frankreich).¹⁷⁶ Dieses Instrument ist

aufgrund seiner Energieauflösung und des zugänglichen Q -Bereiches eines der am besten geeigneten Instrumente zur Bestimmung der internen Proteindynamik, d.h. mit geringen Diffusionsbeiträgen.¹⁷⁵

2.1.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Ein zur Quasielastischen Neutronenstreuung analoges Verfahren, mit sichtbarem Licht als Streusonde, stellt die Dynamische Lichtstreuung (DLS) dar. Dabei wird die Intensität der unter einem festen Winkel 2θ gestreuten Strahlung als Funktion der Zeit gemessen. Bedingt durch die Brownsche Molekularbewegung gelöster Teilchen ist die gemessene Intensität Fluktuationen unterworfen.^{10,177} Zur Bestimmung einer Korrelationsfunktion $C(\tau)$ wird die Intensität zum Zeitpunkt t_i zur Zeit $t_i + \tau$ multipliziert.¹⁰

$$C(\tau) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I(t_i)I(t_i + \tau) \quad (2.31)$$

Bei $\tau = 0$ ist $C(\tau) = \langle I^2 \rangle$. Mit steigender Zeit nimmt die Korrelation ab und $C(\tau)$ entspricht $\langle I \rangle^2$. Dieser Abfall wird durch die Siegert-Gleichung ausgedrückt:

$$\frac{C(\tau)}{\langle I \rangle^2} = 1 + A |g_1(\tau)|^2 \quad (2.32)$$

Dabei ist A eine Konstante. Beruht die Korrelationsfunktion lediglich auf Translationsdiffusion (dies ist der Fall bei kleinen Q -Werten) gilt für $g_1(\tau)$:

$$g_1(\tau) = \exp(-DQ^2\tau) \quad (2.33)$$

Der Diffusionskoeffizient D kann durch Anpassung der experimentellen Daten ermittelt werden. Analog zur Quasielastischen Neutronenstreuung ergibt die Fouriertransformation der Korrelationsfunktion eine Lorentzkurve $S(\nu)$:

$$S(\nu) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{\infty} g_1(\tau) \exp(2\pi i \nu \tau) d\tau \quad (2.34)$$

2.2 Spektroskopische Methoden

Grundlage der Spektroskopie ist die Absorption bzw. Emission elektromagnetischer Strahlung der Wellenlänge λ . Für die Energie E gilt:

$$E = h\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (2.35)$$

Wobei h das Plancksche Wirkungsquantum, c die Lichtgeschwindigkeit und ν die Frequenz ist. Besitzen zwei Zustände den Energieunterschied ΔE und die Wellenfunktionen Ψ_1 und Ψ_2 wird bei Absorption eines Photons der Energie ΔE der angeregte Zustand induziert. Umgekehrt kann bei einem Übergang von einem angeregten in einen energetisch tiefer liegenden Zustand die Emission eines Photons der Energie ΔE erfolgen. Ein Maß für die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs und eine zentrale Größe der Spektroskopie ist das Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}$:¹⁰

$$\vec{\mu} = \int \Psi_2^* \hat{\mu} \Psi_1 dV \quad (2.36)$$

Hierbei ist $\hat{\mu}$ der Dipolmomentoperator und * kennzeichnet die komplex-konjugierte Wellenfunktion.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Absorbanz A wird durch das Gesetz von Lambert und Beer beschrieben:

$$A = \lg \frac{I}{I_0} = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (2.37)$$

Hier ist ϵ der Extinktionskoeffizient und d die Schichtdicke. Das Lambert-Beer-Gesetz ermöglicht somit die Bestimmung der Konzentration eines Chromophors.

2.2.1 FTIR-Spektroskopie

Grundlage der FTIR-Spektroskopie ist die Anregung von Schwingungszuständen durch die Absorption von IR-Strahlung. Dabei muss sich das elektrische Dipolmoment $\vec{\mu}_{\text{el}}$ während der Schwingung ändern.¹⁰ Das einfachste Modell zur Beschreibung von Molekülschwingungen ist das Modell des harmonischen Oszillators. Dabei sind Atome der Masse m durch eine Feder mit der Federkonstante k verbunden. Für die

Energie des harmonischen Oszillators gilt:¹⁰

$$E_\nu = h\nu_0 \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \quad (2.38)$$

mit $\nu=0,1,2,3..$ als Schwingungsquantenzahl. Für die Eigenfrequenz des Oszillator ν_0 gilt:¹⁰

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.39)$$

mit $\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$ als reduzierter Masse.

Der harmonische Oszillator eignet sich jedoch nur bedingt zur Beschreibung realer Moleküle, da weder Abstoßungen noch mögliche Moleküldissoziationen berücksichtigt werden. Ein weitaus realistischeres Modellpotential ist das Morse-Potential. Dabei handelt es sich um eine asymmetrische Potentialkurve in welcher die Abstände der Energieniveaus nicht mehr äquidistant sind.¹⁰ In Abbildung 2.4 sind beide Potentialkurven gegenüber gestellt.

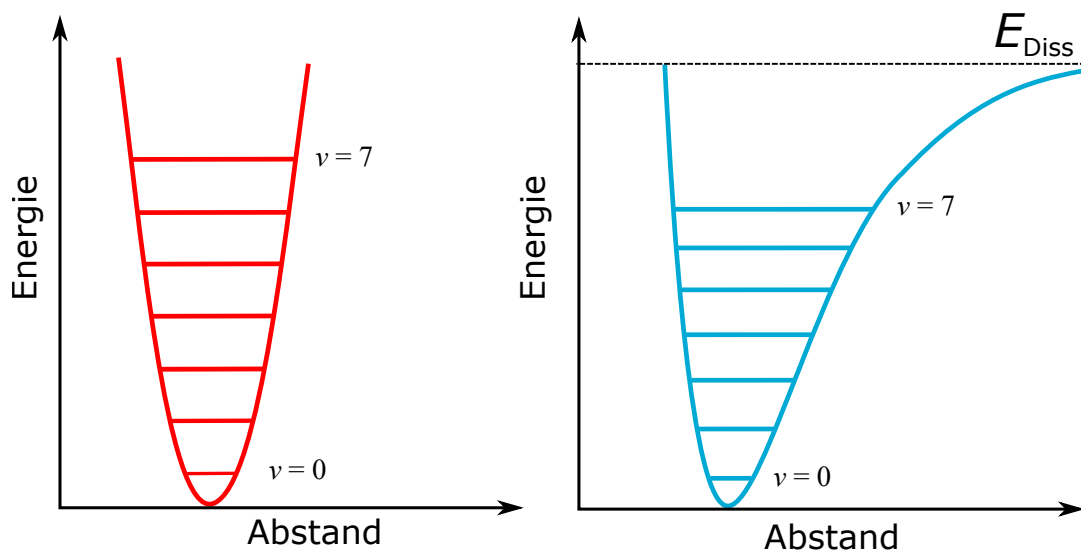


Abbildung 2.4: Potentialkurven des harmonischen Oszillators (links) und des Morse-Potentials (rechts). Abbildung modifiziert nach Referenz.¹⁰

In einem FTIR-Spektrometer wird das Spektrum als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu}$

durch die Fouriertransformation eines Interferograms erhalten.¹⁰

$$I(x) = \int_0^{\infty} A(\tilde{\nu})[1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}x)]d\tilde{\nu} \quad (2.40)$$

Die Interferogramm-Funktion $F(x)$ ist durch (2.41) gegeben:¹⁰

$$F(x) = I(x) - I(\infty) = \int_0^{\infty} A(\tilde{\nu})\cos(2\pi\tilde{\nu}x)d\tilde{\nu} \quad (2.41)$$

Fourier-Transformation liefert die Absorbanz als Funktion der Wellenzahl:¹⁰

$$A(\tilde{\nu}) = 4 \int_0^{\infty} F(x)\cos(2\pi\tilde{\nu}x)dx \quad (2.42)$$

FTIR-spektroskopische Untersuchung von Proteinen

Die relevanteste Absorptionsbande bei der FTIR-spektroskopischen Untersuchung der Sekundärstrukturen von Proteinen ist die Amid-I-Bande zwischen 1700 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} , welche bei der Verwendung von D_2O als Lösungsmittel als Amid-I'-Bande bezeichnet wird.¹⁷⁸⁻¹⁸⁷ Die Bande beruht größtenteils auf der C=O Streck-schwingung des Peptidrückgrats mit geringem Anteil (<20%) der NH-Biege-Schwingung.^{10,179}

Die Bandenposition hängt somit von der Natur der H-Brücken zwischen den C=O und NH-Gruppen des Proteinrückgrats ab.¹⁷⁹ Die Abhängigkeit der Amid-I-Bande eines Proteins von dessen Sekundärstruktur ist somit der Tatsache geschuldet, dass unterschiedliche Sekundärstruktur-Elemente unterschiedliche Wasserstoffbrücken-Muster aufweisen. Beispielsweise sind die Wasserstoffbrücken in β -Faltblattstrukturen weitaus stärker als jene in α -Helices.¹⁷⁹ Starke H-Brücken verringern die Elektronendichte der Carbonylbindung, wodurch die Kraftkonstante kleiner wird und sich somit gemäß Gleichung (2.39) auch die Wellenzahl der Schwingung verringert.

Die experimentell erhaltene Amid-I-Bande ist eine Superposition von Subbanden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente, welche spektral nicht aufgelöst sind.¹⁷⁹ Die Auflösung der Subbanden kann durch Fourier-Selbstentfaltung und Bildung der zweiten Ableitung der Amid-I'-Bande erfolgen.^{178-181,183,185,186}

Die Zuordnung der Subbanden zu bestimmten Sekundärstrukturelementen beruht

auf Normalkoordinatenanalysen oder der Vermessung synthetischer Modellpeptide bzw. Proteine mit bekannter Struktur.¹⁰ Diese Zuordnung ist nicht immer unproblematisch, weshalb die erhaltenen Ergebnisse einer Sekundärstrukturanalyse beispielsweise mit Kristallstrukturdaten abgeglichen werden sollten. Unter der Voraussetzung, dass sich der molare Extinktionskoeffizient der C=O-Streckschwingungen der einzelnen Sekundärstrukturen nicht signifikant unterscheidet, hängt die spektrale Intensität der Subbanden vom Anteil der jeweiligen Sekundärstruktur ab. Der prozentuale Flächenanteil einer Subbande an der Fläche der Amid-I-Bande ist zum Anteil des Sekundärstrukturelementes proportional.¹⁷⁹

In dieser Arbeit wurden stets sowohl die zweite Ableitung als auch das selbstenfaltete Spektrum zur Bestimmung der Subbandenpositionen verwendet.

Eine weitere relevante Bande bei der IR-spektroskopischen Untersuchung von Proteinen ist die Amid-II- bzw. Amid-II'-Bande. Diese ermöglicht beispielsweise die Untersuchung des HD-Austauschs eines Proteins in D₂O.^{179,188}

2.2.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Fluoreszenz bezeichnet die Emission elektromagnetischer Strahlung nach Absorption von Strahlung der Wellenlänge λ . Der Prozess der Fluoreszenz kann in einem sogenannten Jablonski-Diagramm (siehe Abbildung 2.5) veranschaulicht werden.^{10,189}

Die Anregung eines Fluorophors erfolgt durch die Absorption eines Photons. Dadurch geht der Fluorophor aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustands S_0 in einen angeregten Schwingungszustand des angeregten Zustandes S_1 über. Die Relaxion in den Grundzustand kann nun auf verschiedenen Wegen erfolgen. Zunächst erfolgt eine interne Umwandlung (*internal conversion*, IC) in den Zustand S_1 . Bei der Deaktivierung durch Fluoreszenz geht der Fluorophor in einen angeregten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustandes über, wodurch es zu einer Verschiebung des Emmisionslichtes hin zu höheren Wellenlängen, verglichen mit dem Absorptionslicht, kommt.

Weiterhin kann die Deaktivierung durch einen strahlungslosen Energietransfer auf einen weiteren Fluorophor erfolgen. Das Verhältnis der emittierten Intensität I_E zur

absorbierten Intensität I_A wird als Fluoreszenz-Quantenausbeute Q_F bezeichnet:¹⁰

$$Q_F = \frac{I_E}{I_A} \quad (2.43)$$

Eine weitere Form der Deaktivierung ist der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Dabei erfolgt eine strahlungslose Übertragung der Energie des angeregten Donors auf einen Akzeptor-Fluorophor, wodurch dieser angeregt wird und seinerseits Fluoreszenzlicht emittieren kann. Voraussetzung dafür ist ein Mindestabstand von etwa 8 nm sowie eine spektrale Überlappung zwischen dem Fluoreszenzspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors.^{10,189}

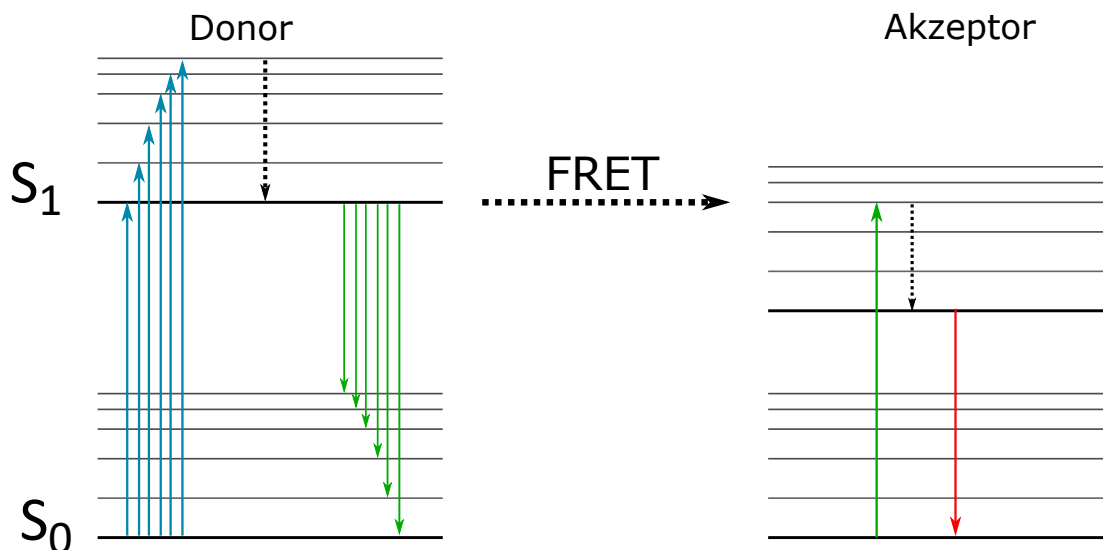


Abbildung 2.5: Energie-Schema des Fluoreszenzvorgangs (Jablonski-Schema). Gepunktete Pfeile kennzeichnen einen strahlungslosen Energieübertrag. Abbildung modifiziert nach Referenz.¹⁰

Das Emmissionsspektrum ist, verglichen mit dem Absorptionsspektrum, rot-verschoben. Diese Rotverschiebung des Emmisionspektrums hängt von der Polarität der Umgebung des Fluorophors ab und beruht auf der Wechselwirkung der Dipolmomente des Lösungsmittels mit dem des Fluorophors. Diese sind zunächst antiparallel ausgerichtet. Im Zuge der Anregung des Fluorophors durch Absorption eines Photons ändert sich dessen Dipolorientierung. Dadurch wird eine Umorientierung der Dipolmomente der Lösungsmittelmoleküle verursacht. Dies führt zu einer Absenkung der Energie des S_1 Zustands. Nach erfolgter Relaxation befindet sich das Fluorophor wie-

der im Grundzustand. Die Lösungsmitteldipolmomente müssen sich jedoch erneut umorientieren. In unpolaren Lösungsmitteln fällt diese Rotverschiebung weitaus geringer aus.^{10,189} Somit ist die Fluoreszenz von der Polarität der Umgebung des Fluorophors abhängig. Aufgrund dieser Abhängigkeit eignet sich die Fluoreszenzspektroskopie, um Polaritätsänderungen der Umgebung von intrinsischen oder extrinsischen Fluorophoren, beispielsweise im Zuge von strukturellen Änderungen oder Phasenübergängen, zu verfolgen.^{10,189}

Intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz von Proteinen

Die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen beruht auf dem Vorhandensein von aromatischen Aminosäure-Seitenketten, d.h. Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Die Fluoreszenzquantenausbeute des Tryptophans ist am höchsten, weshalb die Fluoreszenz des Tryptophans dominiert.^{10,189,190} Die Fluoreszenzeigenschaften des Tryptophans werden stark durch die Polarität der Umgebung beeinflusst, da das Dipolmoment von Tryptophan vergleichsweise hoch ist.¹⁹⁰

In nativen Proteinen befindet sich Tryptophan, bedingt durch seine hydrophobe Natur, in den meisten Fällen in einer hydrophoben Umgebung. Es ist somit für gewöhnlich komplett oder teilweise in Richtung des hydrophoben Inneren des Proteins orientiert, bzw. befindet sich an der Grenzfläche oligomerer Proteine.^{190,191} Kommt es im Zuge von Änderungen der Quartär- und Sekundärstruktur zu strukturellen Änderungen, können diese mit einer Änderung der Umgebung des Tryptophan-Restes einhergehen. So befindet sich das Emissionsmaximum der Tryptophanfluoreszenz gewöhnlich bei circa 335 nm, wenn es zum Wasser exponiert ist jedoch bei circa 355 nm.^{190,192}

Extrinsische Fluorophore zur Untersuchung von Protein- und Lipidsystemen

Neben der Fluoreszenzuntersuchungen intrinsischer Fluorophore ist auch die Untersuchung von extrinsischen Fluorophoren, welche nicht kovalent an das zu untersuchende Biomolekül binden, möglich. In dieser Arbeit wurden die Fluorophore 8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) und Laurdan verwendet. Die Strukturformeln dieser Fluorophore sind in Abb. 2.6 gezeigt.

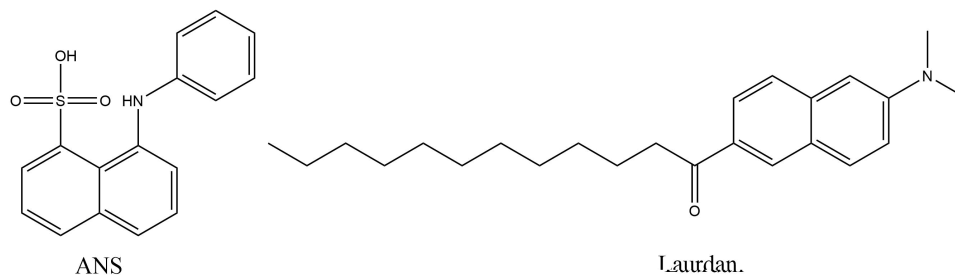


Abbildung 2.6: Struktur der Fluorophore ANS und Laurdan.

ANS

ANS wird zur fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Proteinen verwendet. Dieses Fluorophor zeichnet sich dadurch aus, dass es an hydrophobe Bereiche des Proteins bindet.^{189,190} Diese Bindung führt zu einer erhöhten Quantenausbeute sowie zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums hin zu höheren Wellenlängen. Die Bindung beruht auf der Bindung der Naphthalin- bzw. Anilin-Funktionalitäten in hydrophobe Kavitäten und wird häufig zusätzlich durch ionische Wechselwirkungen der Sulfonatgruppe mit positivgeladenen Aminosäuren stabilisiert.¹⁹³

Laurdan

Laurdan kommt bei der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Membranen zum Einsatz. Dabei wird es so in die Membran eingebaut, dass sich die aromatische Gruppierung auf Höhe der Glycerolgruppierung befindet.^{194–196} Die Fluoreszenzeigenschaften des gebundenen Fluorophors hängen folglich von der Polarität dieser Umgebung ab. Dadurch können sowohl die Änderungen der Membranhydratisierung, als auch die Zugänglichkeit dieser Region für Wassermoleküle untersucht werden. So verschiebt sich beispielsweise im Zuge des Phasenübergangs von der Gel-Phase zur fluiden Phase das Emissionsmaximum von 440 nm hin zu 490 nm. Die generalisierte Polarisation (*GP*) ergibt sich aus den jeweiligen Fluoreszenzintensitäten:^{194–196}

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (2.44)$$

3 Einfluss von osmotischem und hydrostatischem Druck auf multilamellare Lipidmembranen in Anwesenheit von PEG und Trehalose

Teile der hier gezeigten Daten wurden publiziert in:

Samy R. Al-Ayoubi, P. K. F. Schinkel, M. Berghaus, M. Herzog and R. Winter, *Soft Matter*, 2018, 14, 8792-8802.

3.1 Einleitung

Der Einfluss von sowohl osmotischem^{54,161,194,197-203} als auch hydrostatischem^{58,59,63,153,204-210} Druck auf Modellbiomembranen wurde bereits umfassend untersucht. Dennoch gibt es nur wenige Studien, welche sich mit den kombinierten Effekten dieser beiden Faktoren auf Membransysteme beschäftigen. Allgemein verringert osmotischer Druck die Hydratation eines Biomoleküls, wohingegen hydrostatischer Druck den gegenteiligen Effekt hat.^{63,211} Hydrostatischer Druck bevorzugt den Zustand des geringsten Volumens und sondiert somit Dichteunterschiede. Diese Volumenänderungen können zum einen durch konformationelle Änderungen (Änderungen der Packung) und zum anderen durch Hydratationsänderungen verursacht werden.^{47,211} Der Einfluss von osmotischem Druck beruht auf der Entfernung von Wassermolekülen vom Biomolekül bedingt durch die Anwesenheit der osmotisch aktiven Verbindung und die damit verbundene verringerte Aktivität des Wassers.²¹¹

Im Rahmen der biologischen Evolution entwickelten extremophile Organismen diverse Strategien, um unter extremen Umweltbedingungen, wie Austrocknung, extremen Temperaturen, oxidativem Stress oder osmotischem und hydrostatischem Druck überleben zu können. Eine verbreitete Methode, schädliche Einflüsse dieser Stressfaktoren auszugleichen, ist eine erhöhte Biosynthese von Osmolyten.⁶⁹ Zu den physiologisch relevanten Osmolyten zählen unter anderem Kohlenhydrate und Zucker.⁶⁹ Insbesondere das Disaccharid Trehalose scheint dabei, verglichen mit anderen Dissacchariden, besondere Eigenschaften aufzuweisen.⁸⁶ Der stabilisierende Effekt von Trehalose auf Biomoleküle und Mikroorganismen gegen Stressfaktoren wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in diversen Studien gezeigt.⁸⁷⁻⁹² Ein Großteil dieser Studien beschränkt sich jedoch auf die Stressfaktoren Temperatur und besonders Austrocknung.

Jedoch zeigen sowohl Hefe-Zellen⁹³⁻⁹⁸ als auch *Escherichia coli*-Bakterien^{90,99} eine erhöhte Trehalose-Synthese bei erhöhtem osmotischen bzw. hydrostatischem Druck. Auch die Larve der mexikanischen Fruchtfliege reagiert auf Druckapplikation mit einer erhöhten Synthese des Enzyms Trehalose-6-Phosphat-Synthase.¹⁰⁰ Weiterhin wurde gezeigt, dass Trehalose zur Osmoadaption in Mikroorganismen des Tiefsee-

Hydrothermalfeldes Iheya beiträgt.¹⁰² Gleiches gilt für das Archaeon *Halorhabdus tiamatea*, welches in Tiefsee Salzseen lebt und dadurch sowohl hydrostatischem als auch osmotischem Druck ausgesetzt ist.¹⁰¹ Somit scheint Trehalose in der Natur Organismen nicht ausschließlich gegen Austrocknung und extreme Temperaturen, sondern auch gegen osmotischen und hydrostatischen Druck zu stabilisieren.

In der Literatur werden verschiedene Wechselwirkungsszenarien zwischen Trehalose und biologischen Membranen diskutiert. Einerseits wurde der Ausschluss von Trehalose von der Membranoberfläche beobachtet.^{118–121} Andererseits aber auch eine direkte Interaktion, namentlich die Interkalation von Trehalose zwischen die polaren Kopfreionen der Membran, wird berichtet.^{88,107–114} Der Austausch von Wassermolekülen gegen Trehalosemoleküle (*water replacement*)^{111,113–117} und der Einschluss von Wasser zwischen dem Biomolekül und Trehalose (*water entrapment*)¹²⁵ werden ebenfalls diskutiert. Bei hohen Trehalose-Konzentrationen scheinen ebenfalls Vitrifikations-Effekte aufzutreten. Dabei wird das Biomolekül durch die Bildung einer amorphen Glasmatrix vor schädlichen mechanischen Einflüssen geschützt.^{126–128}

Zusätzlich ist zu beachten, dass auch Kombinationen der erwähnten Interaktionsszenarien möglich sind.¹²⁹ So kann beispielsweise die Interkalation von Trehalose-Molekülen mit dem Austausch von Wasser-Molekülen einhergehen. Der dominierende Effekt scheint dabei auch von der Trehalose-Konzentration abzuhängen. So wurde eine direkte Interaktion zwischen Trehalose und der Lipidmembran bei geringen Trehalose-Konzentrationen beobachtet. Bei höheren Konzentrationen scheinen die beobachteten Effekte hingegen durch den Ausschluss der Trehalose-Moleküle von der Membran verursacht zu sein.^{119,129,130} Aus diesem Grund wurden in dieser Studie, um einen möglichst umfassenden Konzentrationsbereich abzudecken, Trehalose-Konzentrationen zwischen 0.15 M (\approx 5wt.%) und 1.4 M (\approx 53 wt.%) untersucht.

Auch *in vivo* wurde, in Abhängigkeit von den jeweiligen Umweltbedingungen, eine große Spannbreite an Trehalose-Konzentrationen beobachtet. Beispielsweise enthalten Hefe-Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen lediglich geringe Mengen an Trehalose. Im Zuge einer Hitzebehandlung steigt der Trehalose-Anteil jedoch auf auf 1 g Trehalose pro 1 g Protein.²¹² Weiterhin führten Trehalose-Konzentrationen über 0.12 M zu einer gesteigerten Austrocknungstoleranz in *S. cerevisiae* mit einem

Maximum bei einer Trehalose-Konzentration von 0.5 M.²¹³ In Zysten des Salzkrebsesträgt der Trehalose-Gehalt 15 % des Trockengewichts, dies entspricht 0.15 M imhydratisierten Zustand.²¹⁴ Das erhöhte Vorkommen von Trehalose in dehydriertenOrganismen untermauert die Relevanz, auch hohe Konzentrationen am Rande derLöslichkeitsgrenze zu untersuchen.

Im Rahmen dieses Projektes sollten die kombinierten Effekte von hydrostatischem und osmotischem Druck auf die Struktur und die mechanischen Eigenschaften multilamellarer Vesikel auf DMPC-Basis untersucht werden. Osmotischer Druck wurde dabei durch die Zugabe des inerten Polymers Polyethylenglycol mit einer Molmasse von 20000 Dalton (PEG 20000) erzeugt. Dabei kam die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) zum Einsatz. Diese Methode ermöglicht die Aufklärung der Struktur sowie von Phasenkoexistenz,^{152,153,206,215–217} aber auch von mechanischen Eigenschaften und Fluktuationen der Membran.^{152,198,199,218–222} Die erhaltenen Ergebnisse wurden durch Messungen der Laurdan-Fluoreszenz und kalorimetrische Messungen ergänzt. Diese ermöglichten zum einen Rückschlüsse über den Einfluss von Trehalose auf die Hydratation und Kettenordnung der Membran und zum anderen Erkenntnisse über den Einfluss von Trehalose auf durch Druck bzw. Temperatur induzierte Phasenübergänge.

3.2 Material und Methoden

Die Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien zeigt Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien.

Substanz	Bezugsquelle
DMPC	Avanti Polar Lipids (Alabasta, AL, USA)
Trehalose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PEG 20000	Sigma Aldrich(Steinheim, Deutschland)

3.2.1 Probenpräparation

SAXS

Zunächst wurde die benötigte Menge DMPC in Chloroform gelöst und anschließend im Stickstoffstrom verdampft. Dabei sollte ein möglichst gleichmäßiger Film an der Gefäßwand erzeugt werden. Anschließend wurden mögliche Chloroformreste über Nacht im Vakuum entfernt. Im Anschluss daran wurde das Lipid in Wasser bzw. einer Trehalose- oder PEG-Lösung gelöst und für 20 min bei einer Temperatur von 50 °C für 20 min einer Ultraschallbehandlung unterzogen, gründlich durchmischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Darauf folgten fünf Zyklen bestehend aus fünfminütigem Einfrieren und zehnminütigem Aufwärmen bei 50 °C und gründlicher Durchmischung. Die Proben wurden mindestens 12 Stunden vor jeder Messung im Kühlschrank gelagert. Die Lipidkonzentration betrug 20 wt.%

Laurdan-Fluoreszenz

Die Präparation der Proben für die Fluoreszenz-spektroskopischen Messungen erfolgte analog. Jedoch wurde hier eine Lipidkonzentration von 3 mg mL⁻¹ verwendet. Zusätzlich wurde Laurdan in Chloroform gelöst und zu der Chloroform-Lösung des Lipids gegeben. Das molare Verhältnis des Lipids zu Laurdan betrug 500:1.

3.2.2 Experimentelle Durchführung und Datenbearbeitung

SAXS-Messungen

Druckabhängige SAXS-Messungen wurden an der *Beamline* ID02 der ESRF (Grenoble, Frankreich) durchgeführt. Die Energie der Strahlung betrug 16 keV und der Abstand zwischen Probe und Detektor 2.4 m. Die Messungen erfolgten in einer von Dr. C. Krywka entwickelten Hochdruckzelle.⁷⁸ Die Messzeit betrug 0.2 s. Zusätzlich erfolgten Messungen am SAXSess mc² Instrument der Firma Anton Paar. Die Positionsbestimmung der Bragg-Reflexe erfolgte nach Subtraktion des Hintergrundes bei entsprechendem Druck. Die Schichtdicke d wurde gemäß der Bragg-Gleichung aus dem Q -Wert am Maximum des Reflexes bestimmt.

$$d = n \frac{2\pi}{Q} \quad (3.1)$$

Weiterhin wurden die Daten gemäß der modifizierten Caillé-Theorie ausgewertet,⁶¹ womit der Caillé Parameter bestimmt wurde:

$$\eta = \frac{Q^2 k_B T}{8\pi \sqrt{K_c B}} \quad (3.2)$$

Hier sind K_c und B der Biege- bzw. Kompressionsmodul. Der Caillé-Parameter enthält somit Informationen über die mechanischen Eigenschaften der Membran. Die Fluktuationen σ des Membranenzwischenraumes ergibt sich gemäß:¹⁶¹

$$\sigma^2 = \frac{\eta \cdot d^2}{\pi^2} \quad (3.3)$$

Die Auswertung gemäß der modifizierten Caillé-Theorie erfolgte mit Hilfe des von O. Glatter entwickelten Programms GIFT des PCG Software Pakets.¹⁵⁶

Laurdan-Fluoreszenz

Fluoreszenz-Spektroskopie Messungen erfolgten an einem Multifrequency Cross-Correlation Phase and Modulation Fluorometer K2 der Firma ISS (Champaign, IL, USA) in einer ebenfalls von ISS bezogenen Hochdruckzelle.

Die Anregungswellenlänge für die Laurdan-Fluoreszenz war 390 nm. Das Emissionsmaximum von in die Membran eingebautem Laurdan hängt vom Hydratisierungsgrad der Membran ab. Aus diesem Grund wurde die Generalisierte Polarisierung GP bestimmt:^{194–196}

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (3.4)$$

Hier ist I_λ die Fluoreszenzintensität bei der Wellenlänge λ .

Dampfdruckosmometrie

Die Bestimmung der Osmolalität (Molalität der osmotisch aktiven Teilchen) Osm von PEG- und Trehalose-Lösungen erfolgte an einem Wescor VAPRO 5600 Dampfdruck Osmometer (ELITechGroup, Logan, UT, USA). Die Kalibrierung des Osmometers erfolgte vor jeder Messserie durch Standardlösungen des Herstellers. Die Bestimmung des osmotischen Drucks π bei $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$ erfolgte gemäß:¹¹

$$\pi = Osm \cdot \rho RT \quad (3.5)$$

Die Dichte ρ der Lösungen wurde dabei durch eine Feinwaage bestimmt.

Kalorimetrie

DSC-Messungen erfolgten an einem Q20 Kalorimeter der Firma TA Instruments (New Castle, DE) mit einer Heizrate von $1 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$. PPC(*pressure perturbation calorimetry*)-Messungen erfolgten an einem VP DSC Mikro-Kalorimeter der Firma MicroCal (Northhampton, MA, USA). Dabei erfolgten jeweils 4 Messungen: Wasser gegen Wasser, Wasser gegen Trehalose-Lösung, Trehalose-Lösung gegen Trehalose-Lösung und Probe gegen Trehalose-Lösung. Durch Integration der Wärmeänderung während eines Drucksprungs von circa 5 bar dQ_{rev}/dp wurde $Q_{\text{rev}}(T)$ erhalten. Die Bestimmung des thermischen Ausdehnungskoeffizienten bei einem konstanten Volumen α_V erfolgte gemäß:²²³

$$\alpha_V = -\frac{\Delta Q_{\text{rev}}}{TV\Delta p} \quad (3.6)$$

Die relative Volumenänderung während des Übergangs $\Delta V/V$ kann durch Integration von $\alpha(T)$ erhalten werden.^{223,224}

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Osmotischer Druck von Trehalose- und PEG- Lösungen

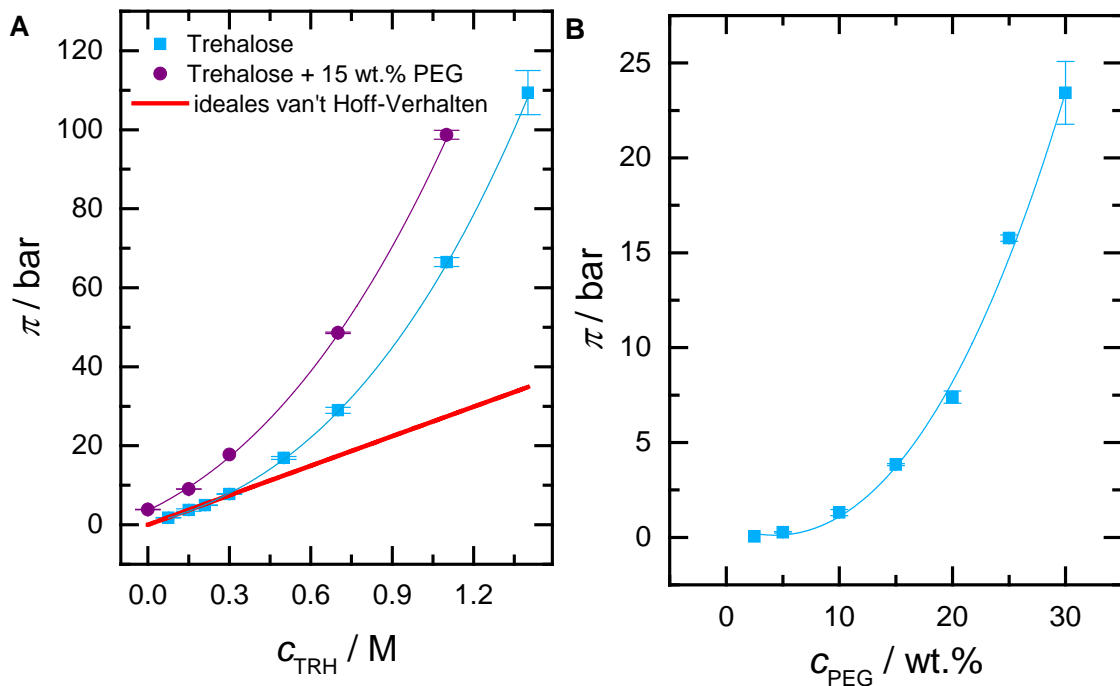


Abbildung 3.1: Osmotischer Druck von Trehalose und PEG Lösungen. Die rote Linie kennzeichnet das ideale van't Hoff-Verhalten von Trehalose. Die violetten und blauen Linien dienen der optischen Orientierung.

Abbildung 3.1 zeigt den osmotischen Druck von Trehalose- und PEG-Lösungen sowie den von Mischungen beider Substanzen. Die erhaltenen Ergebnisse stehen gut mit Literaturdaten im Einklang. Beispielsweise wurde hier für 1 molal (entspricht etwa 0.7 M) Trehalose eine Osmolalität von 1041 mOsm bestimmt, während in der Literatur ein Wert von geringfügig über 1000 mOsm beschrieben wird.²²⁵ Trehalose befolgt das ideale van't-Hoff-Verhalten ($\pi = cRT$) bis zu einer Konzentration von 0.3 M. Bei höheren Konzentrationen wurde, im Einklang mit Literaturdaten¹⁰⁴ eine positive Abweichung vom idealen Verhalten beobachtet.

Allgemein wurde postuliert, dass vom Biomolekül ausgeschlossene Osmolyte, wie TMAO, eine positive Abweichung vom idealen Verhalten zeigen, wohingegen beispielsweise Harnstoff, welcher direkt mit dem Protein wechselwirkt, eine negative Abweichung zeigt.⁷³

Auch die für PEG 20000 erhaltenen Werte stehen mit Literaturdaten im Einklang. Beispielsweise wurde bei 25 wt.% ein osmotischer Druck von $\pi = 15.7$ bar bestimmt, wohingegen ein Wert von 13-14 bar in der Literatur beschrieben wurde.²²⁶ In Mischungen von PEG und Trehalose sind die Effekte nicht additiv sondern verstärkend.

3.3.2 Einfluss von osmotischem und hydrostatischem Druck auf die Struktur multilamellarer Membranen

Abbildung 3.2 A zeigt die druckabhängige Entwicklung der SAXS-Streukurven multilamellarer DMPC-Vesikel in der fluiden Phase bei 35 °C. Die Bragg-Reflexe erster und zweiter Ordnung liegen bei $Q \approx 1 \text{ nm}^{-1}$ und $Q \approx 2 \text{ nm}^{-1}$. Der Phasenübergang in die Gelphase erfolgt zwischen 400 bar und 800 bar und führt zu einer Verschiebung der Bragg-Reflexe zu geringeren Q -Werten.

Die korrespondierenden lamellaren Schichtdicken zeigt Abbildung 3.2 B. So wurde bei 1 bar und 35 °C, vereinbar mit Literaturdaten,²⁰⁹ ein Wert von $d = 6.25$ nm bestimmt. Bereits bei geringer Druckerhöhung ist eine Zunahme der lamellaren Schichtdicke zu beobachten. Dies ist durch die druckinduzierte Zunahme der Kettenordnung zu erklären.⁵⁹ Zwischen 600 bar und 800 bar findet der Phasenübergang in die P'_{β} -Phase, deren wellige Überstruktur zu einer Zunahme der Schichtdicke auf 7 nm führt, statt.²⁰⁶ Eine erneute Abnahme der Schichtdicke auf 6.5 nm erfolgt zwischen 2000 bar und 3000 bar. Dies ist auf den Gel-Gel-Phasenübergang in die L'_{β} -Phase zurück zu führen.

Eine Veranschaulichung der beschriebenen Phasenübergänge gewährt das Phasendiagramm in Abbildung 3.2 C. Alle druckabhängigen Messungen wurden entlang der roten Linie, d.h. bei 35 °C, durchgeführt.

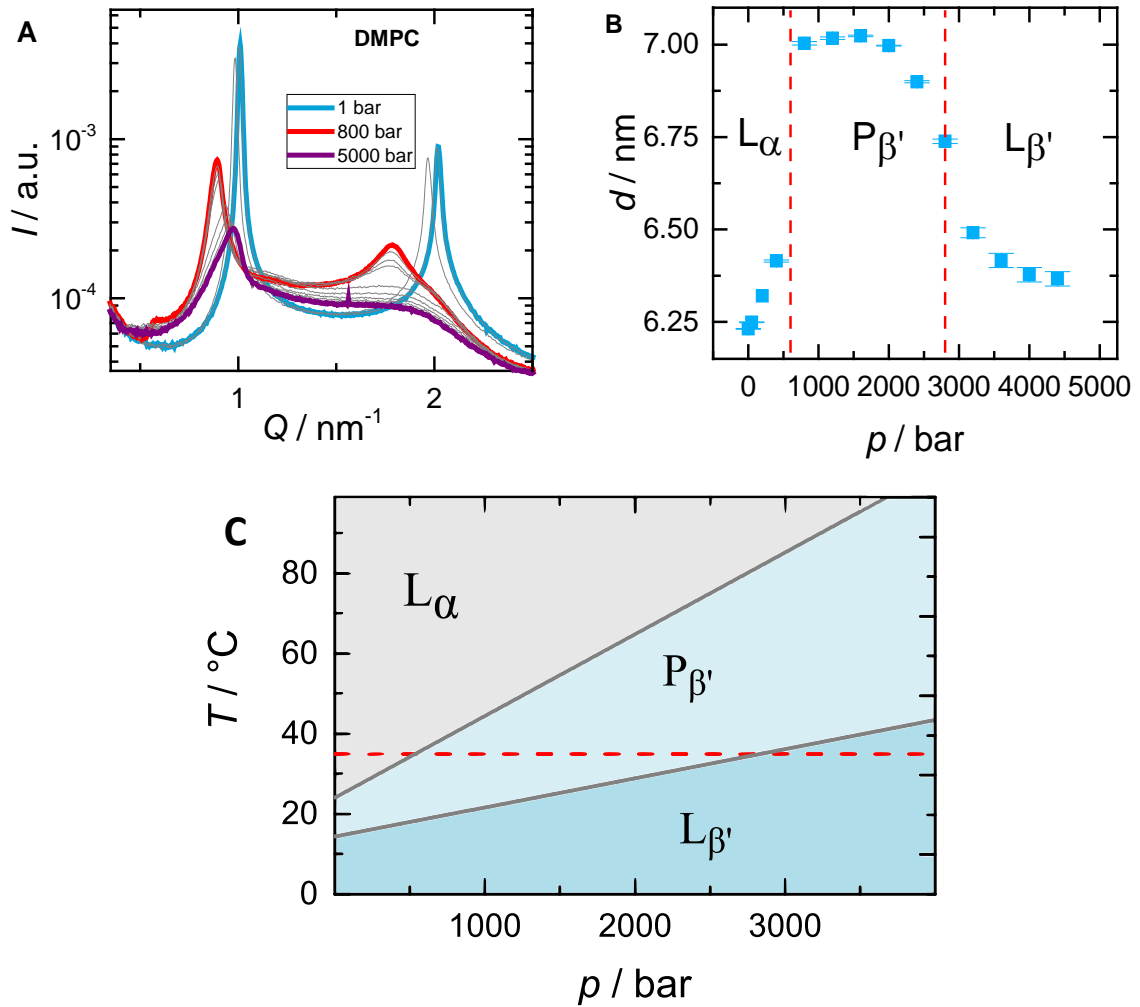


Abbildung 3.2: Druckabhängige SAXS-Streukurven multilamellarer DMPC-Vesikel (A). Druckabhängige Entwicklung der lamellaren Schichtdicke von DMPC bei 35°C (B). Temperatur-Druck-Phasendiagramm von DMPC in Exzess Wasser (C). Die in dieser Studie durchgeführten Messungen erfolgten entlang der roten Linie. Die Phasengrenze des $L_\alpha - P_{\beta'}$ Übergangs wurde aus Referenz⁶³ entnommen, diejenige des $P_{\beta'} - L_{\beta'}$ aus den Ergebnissen dieser Studie.

Die druckabhängigen SAXS-Streukurven in Anwesenheit von PEG 20000 sind in Abbildung 3.3 A gezeigt. Der durch Zugabe von PEG generierte osmotische Druck führt zu einer erhöhten Intensität der Bragg-Reflexe und somit zu einer erhöhten lamellaren Ordnung.

Außerdem verschiebt sich die Position der Bragg-Reflexe mit steigender PEG-Konzentration hin zu höheren Q -Werten und somit zu geringeren d -Werten. Dies ist eine Folge der Entfernung von Wasser aus den Membranenzwischenräumen durch

den Ausschluss des hydrophilen Polymers aus dem Intermembran-Raum.

Interessanterweise wurde für beide PEG-Konzentrationen in der Gelphase ein Bragg-Reflex bei $Q \approx 0.5 \text{ nm}^{-1}$ beobachtet. Die Position dieses Reflexes verschiebt sich mit steigendem Druck, im Gegensatz zur Position der anderen Peaks, zu größeren Q -Werten, d.h. kleineren lamellaren Abständen. In Anwesenheit von 30 wt.% PEG ist dabei ebenfalls der korrespondierende Bragg-Reflex dritter Ordnung ($n = 3$) bei $Q \approx 1.65 \text{ nm}^{-1}$ ersichtlich. Bedingt durch die Überlappung mit anderen Peaks ist eine eindeutige Zuordnung dieses Peaks zu einer bestimmten Lipidphase nicht möglich. So treten Reflexe dritter Ordnung in lamellaren, aber auch in hexagonalen Phasen auf.¹⁰ Eine lamellare Phase ist in diesem Fall jedoch die wahrscheinlichste.

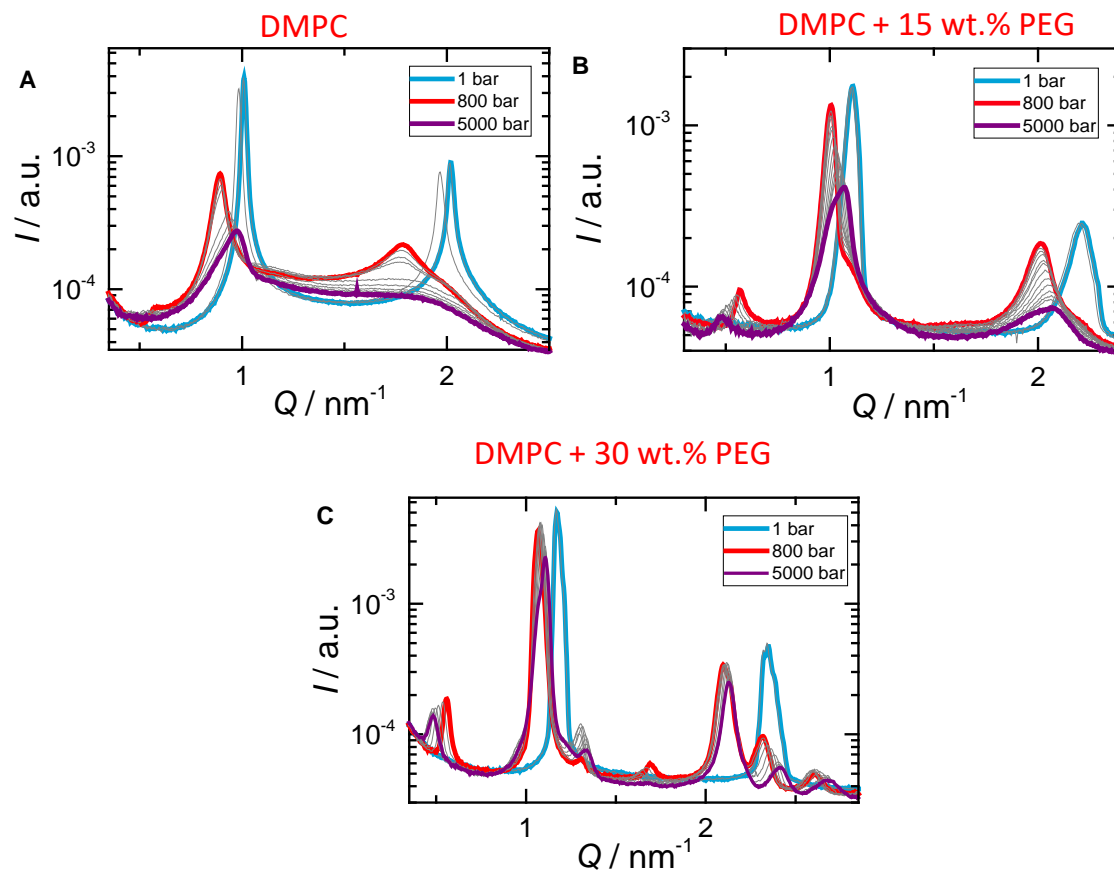


Abbildung 3.3: SAXS-Streukurven multilamellarer DMPC-Vesikel (20 wt.%) bei 35 °C im Druckbereich von 1 bar bis 5000 bar in der Anwesenheit von 15 wt.% und 30 wt.% PEG 20000.

Den Effekt von osmotischem Druck auf die Schichtdicke d zeigt Abbildung 3.4. Zunächst wurde der Einfluss von osmotischem Druck auf die multilamellare Schichtdicke bei Umgebungsdruck untersucht. Dazu wurden verschiedene PEG-Konzentrationen vermessen. Die Abbildungen 3.4 A und B zeigen den interlamellaren Abstand d als Funktion der PEG-Konzentration (A) und des entsprechenden osmotischen Drucks der Lösungen (B). So nimmt d mit steigendem osmotischen Druck von 6.25 nm auf 5.5 nm bei $\pi = 23.4$ bar ab.

Die druckabhängige Entwicklung der lamellaren Schichtdicke d in Anwesenheit von 15 wt.% und 30 wt.% PEG ist in den Abbildungen 3.4 D und E gezeigt. Die Anwesenheit von 15 wt.% PEG führt zu einer Verringerung der lamellaren Schichtdicke in der fluiden Phase sowie in beiden Gel-Phasen. Weiterhin verschwindet der Gel-Gel Phasenübergang mit steigender PEG-Konzentration. So ist dieser in Anwesenheit von 30 wt.% PEG schließlich komplett verschwunden. Stattdessen wurde die Koexistenz von drei Gelphasen beobachtet, welches aus der Aufspaltung der Bragg-Reflexe ersichtlich wird. Diese Aufspaltung ist besonders in den Reflexen zweiter Ordnung ersichtlich. Dort finden sich Reflexe bei $Q \approx 2.1 \text{ nm}^{-1}$, $Q \approx 2.3 \text{ nm}^{-1}$ und $Q \approx 2.6 \text{ nm}^{-1}$. Diese Positionen entsprechen Schichtdicken von $d = 5.8 \text{ nm}$, 5.3 nm und 4.75 nm . Diese d -Werte werden im Großen und Ganzen nicht durch eine weitere Druckerhöhung beeinflusst.

Die sehr geringe Schichtdicke von 4.75 nm kann unter anderem durch eine stark dehydratisierte Gelphase, oder aber durch eine sogenannte *interdigitated* Phase erklärt werden. Diese ineinandergreifenden Phasen treten nur im Zuge der Druckapplikation auf, konnten aber lediglich bei Phospholipiden mit einer Acylkettenlänge von über 16 C-Atomen, d.h. nicht für DMPC, beobachtet werden.^{227,228}

Die berechneten Schichtdicken, welche dem Reflex bei $Q \approx 0.5 \text{ nm}^{-1}$ zuzuordnen sind, zeigt Abbildung 3.4 D. Für beide PEG-Konzentrationen nimmt dieser Wert bis circa 3000 bar zu und bleibt im Rahmen einer weiteren Druckerhöhung weitestgehend konstant.

3 Einfluss von osmotischem und hydrostatischem Druck auf multilamellare Vesikel

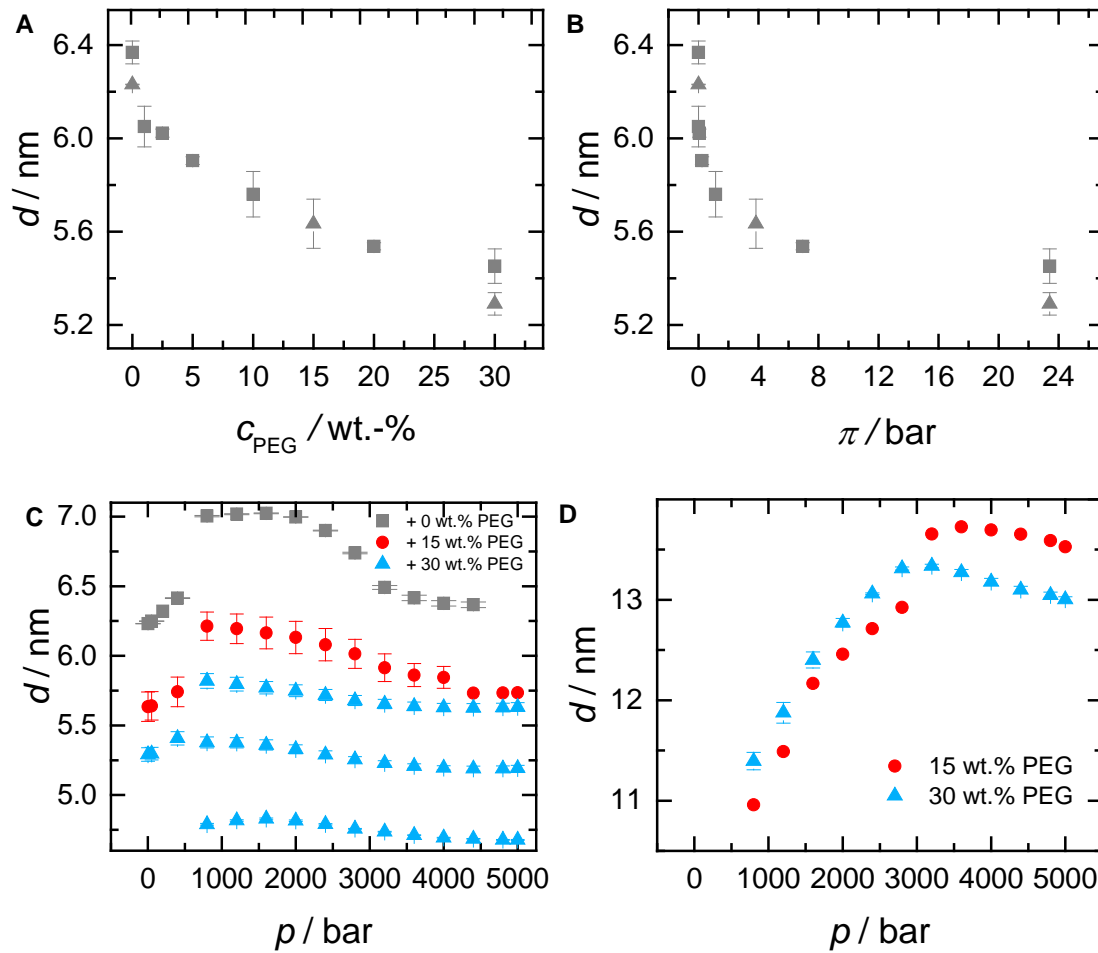


Abbildung 3.4: Einfluss des durch PEG generierten osmotischen Druckes auf die lamellare Schichtdicke d . Die Daten wurden am ESRF (Dreiecke) sowie am SAXSess mc² Instrument (Quadrate) generiert (A-B). Druckabhängige Entwicklung der lamellaren Schichtdicke vom DMPC bei 35 °C in der An- und Abwesenheit von PEG (C-D).

3.3.3 Einfluss von Trehalose

Der Einfluss von Trehalose auf die Streukurven ist in Abbildung 3.5 gezeigt.

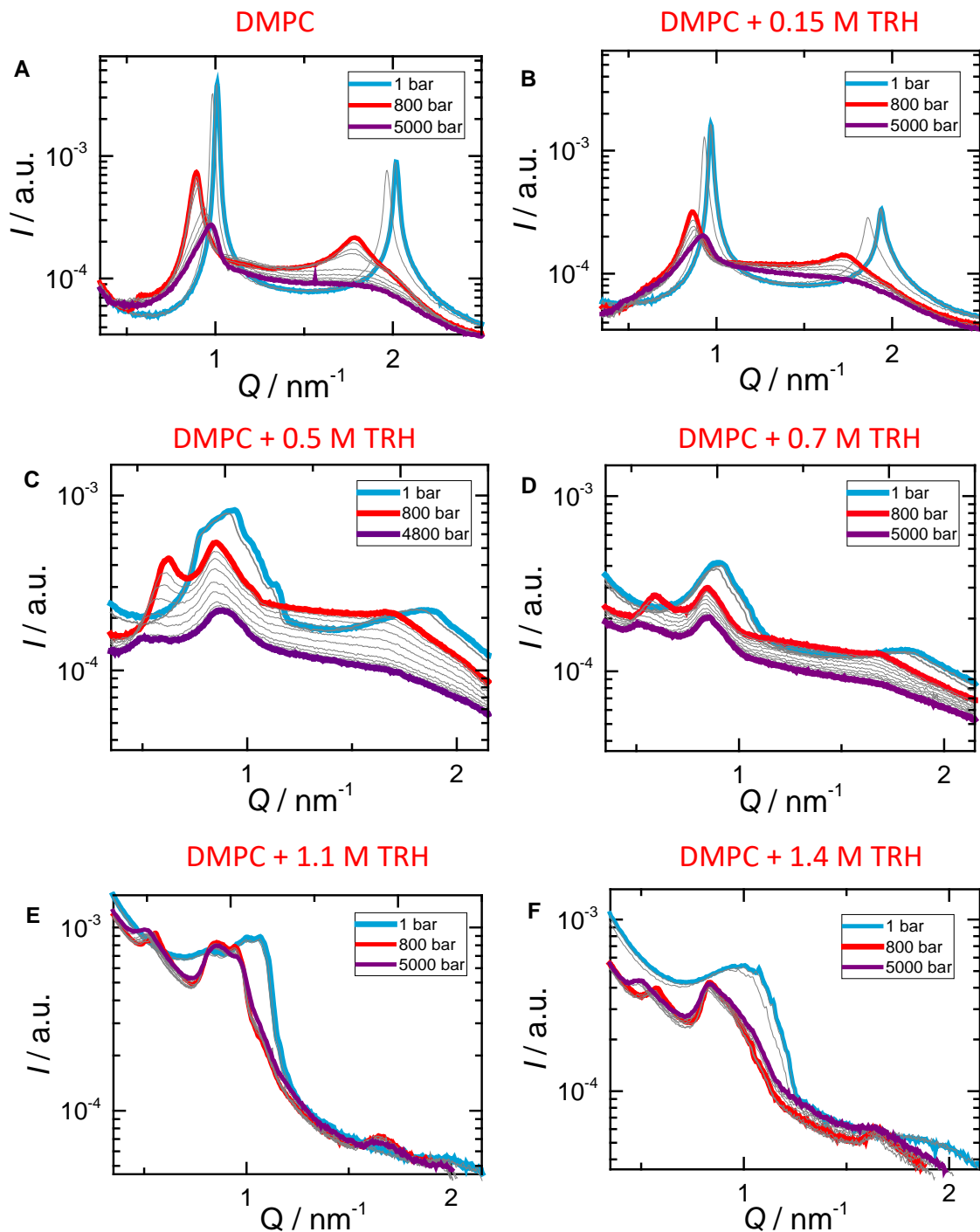


Abbildung 3.5: SAXS-Streukurven multilamellarer DMPC-Vesikel (20 wt.%) bei 35 °C im Druckbereich von 1 bar bis 5000 bar in der Anwesenheit von Trehalose.

Es ist ersichtlich, dass es mit steigender Trehalose-Konzentration zu einer drastischen Verbreiterung der Bragg-Reflexe, einhergehend mit einer Verringerung der Intensität des Reflexes kommt. Dies lässt auf eine Abnahme der lamellaren Ordnung schließen. Diese Verbreiterung von Bragg-Reflexen wurde bereits zuvor in Anwesenheit von Trehalose²²⁹ sowie der Saccharide Glucose und Fructose¹²⁰ beobachtet. Zusätzlich steigt die gestreute Intensität bei kleinen Q -Werten mit steigender Trehalose-Konzentration. Dies deutet auf eine verringerte periodische Ordnung und die Bildung von einzelnen nicht-lamellaren Strukturen hin.

In der Anwesenheit von 1.1 M und 1.4 M Trehalose ist in der Gelphase eine Aufspaltung der Bragg-Reflexe zu beobachten. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist eine nicht-homogene Verteilung der Trehalose-Moleküle im Intermembranraum, wodurch Regionen mit unterschiedlichen lamellaren Abständen entstehen. Die Clusterbildung von Trehalose durch Zucker-Zucker-Wasserstoffbindungen ist ein bekanntes Phänomen.^{104,106,230} Auch die Bildung von Trehalose-Aggregaten an der Membran Grenzfläche wurde bereits berichtet.^{111,231} So wurde besonders bei hohen Trehalose-Konzentrationen beobachtet, dass Trehalose-Moleküle nicht nur mit der Lipidgrenzfläche interagieren, sondern auch untereinander.²³² Auch eine bevorzugte Interaktion mit gekrümmten Bereichen der Membran wurde beschrieben.²³¹ Eine inhomogene Verteilung dieser Cluster kann zur Erklärung der beobachteten Phänomene herangezogen werden.

Abbildung 3.6 zeigt die druckabhängige Entwicklung der Schichtdicke in Anwesenheit von Trehalose. Trehalose-Konzentrationen bis 0.7 M erhöhen d in allen drei beobachteten Phasen. Diese Zunahme ist nicht auf eine Zunahme der Kettenordnung bzw. -länge, sondern auf Unterschiede der Wasserschichtdicke der Zwischenräume zurückzuführen. Zumal mehrfach gezeigt wurde, dass Trehalose die Membrandicke verringert,^{129,130} kann das Anschwellen nur durch eine Zunahme der Wasserschichtdicke erklärt werden. Diese Zunahme der Wasserschichtdicke überkompensiert die beschriebene Abnahme der Kettenlänge, wodurch es insgesamt zu einem Anstieg von d kommt. Dieses Anschwellen in der Anwesenheit von Trehalose wurde bereits zuvor beobachtet und ist auf eine Abnahme weitreichender attraktiver van der Waals Wechselwirkungen zurückzuführen.²²⁹

Wie bei der Anwesenheit von PEG, verschwindet auch bei Anwesenheit von Trehalose der druckinduzierte Gel-Gel-Übergang mit zunehmender Trehalose-Konzentration. Zusätzlich tritt auch in Anwesenheit von Trehalose ein Bragg-Reflex bei $Q \approx 0.5 \text{ nm}^{-1}$ auf. Die Schichtdicke, welche diesem Peak zugeordnet werden kann, steigt ebenfalls mit zunehmender Trehalose Konzentration bis circa 3000 bar bzw. 4000 bar in Anwesenheit von 0.5 M Trehalose.

Im Allgemeinen ist ein Anschwellen der Doppelschicht durch Zugabe von Co-solventien auf eine Interaktion des Moleküls mit der Doppelschicht zurückzuführen, wohingegen ausgeschlossene Osmolyte, beispielsweise TMAO, zu einer Abnahme der Schichtdicke führen.²³³

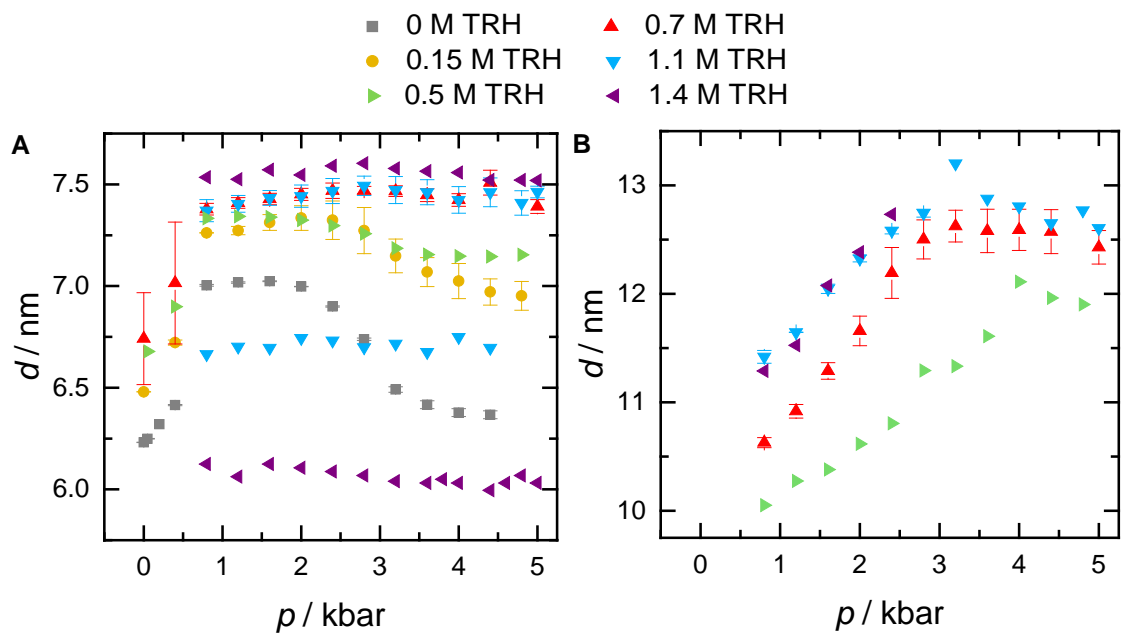


Abbildung 3.6: Druckabhängige Entwicklung der lamellaren Schichtdicke d in An- und Abwesenheit von Trehalose (TRH).

Ein mögliches Szenario, welches die Beobachtungen in Anwesenheit von Trehalose erklären kann, ist in Abb. 3.7 gezeigt. Demnach erfolgt bei geringen Konzentrationen eine Interkalation der Trehalosemoleküle zwischen die hydrophilen Kopfgruppen. Bei hohen Konzentrationen wird die lamellare Ordnung durch die Anwesenheit von Trehalose im Membranzwischenraum stark gestört und in der Gelphase kommt es zur

Phasenseparation aufgrund einer inhomogenen Verteilung von Trehalose-Clustern.

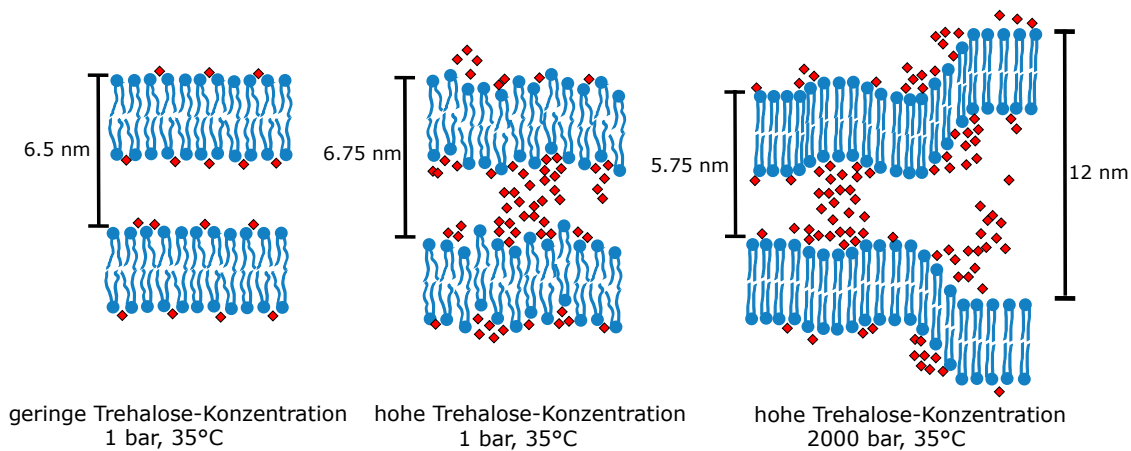


Abbildung 3.7: Schema des multilamellaren Trehalose-DMPC-Systems für geringe (0.3 M) und hohe (über 0.6 M) Trehalose-Konzentrationen.

Trehalose und PEG üben somit unterschiedliche Effekte auf die Membran aus. Während PEG die multilamellare Ordnung erhöht, von der Membran und dem Membranzwischenraum ausgeschlossen wird und die Schichtdicke verringert, verringert Trehalose die periodische Ordnung des Systems und verursacht ein Anschwellen der Membran.

Trotz dieser auf verschiedenen Interaktionsmechanismen beruhenden Unterschiede wurde sowohl bei Anwesenheit von PEG als auch bei Anwesenheit von Trehalose ab 800 bar (in der Gelphase) ein Bragg-Reflex bei $Q \approx 0.5 \text{ nm}^{-1}$ beobachtet. Dieser Reflex, d.h. das Vorhandensein sehr großer interlamellarer Abstände, kann somit nicht auf einen bestimmten Interaktionsmechanismus, d.h. den Ausschluss bzw. die Anreicherung von der Membranoberfläche und dem Membranzwischenraum, beruhen, sondern vielmehr auf der geringen Hydratation bedingt durch den durch PEG bzw. Trehalose induzierten osmotischen Druck oder aber durch den geringen Anteil an Bulk-Wasser, wodurch es zu weniger attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Schichten kommt.

3.3.4 Kombinierte Effekte von PEG und Trehalose

Abbildung 3.8 zeigt die Streukurven von multilamellaren DMPC-Vesikeln in der Anwesenheit von PEG und Trehalose.

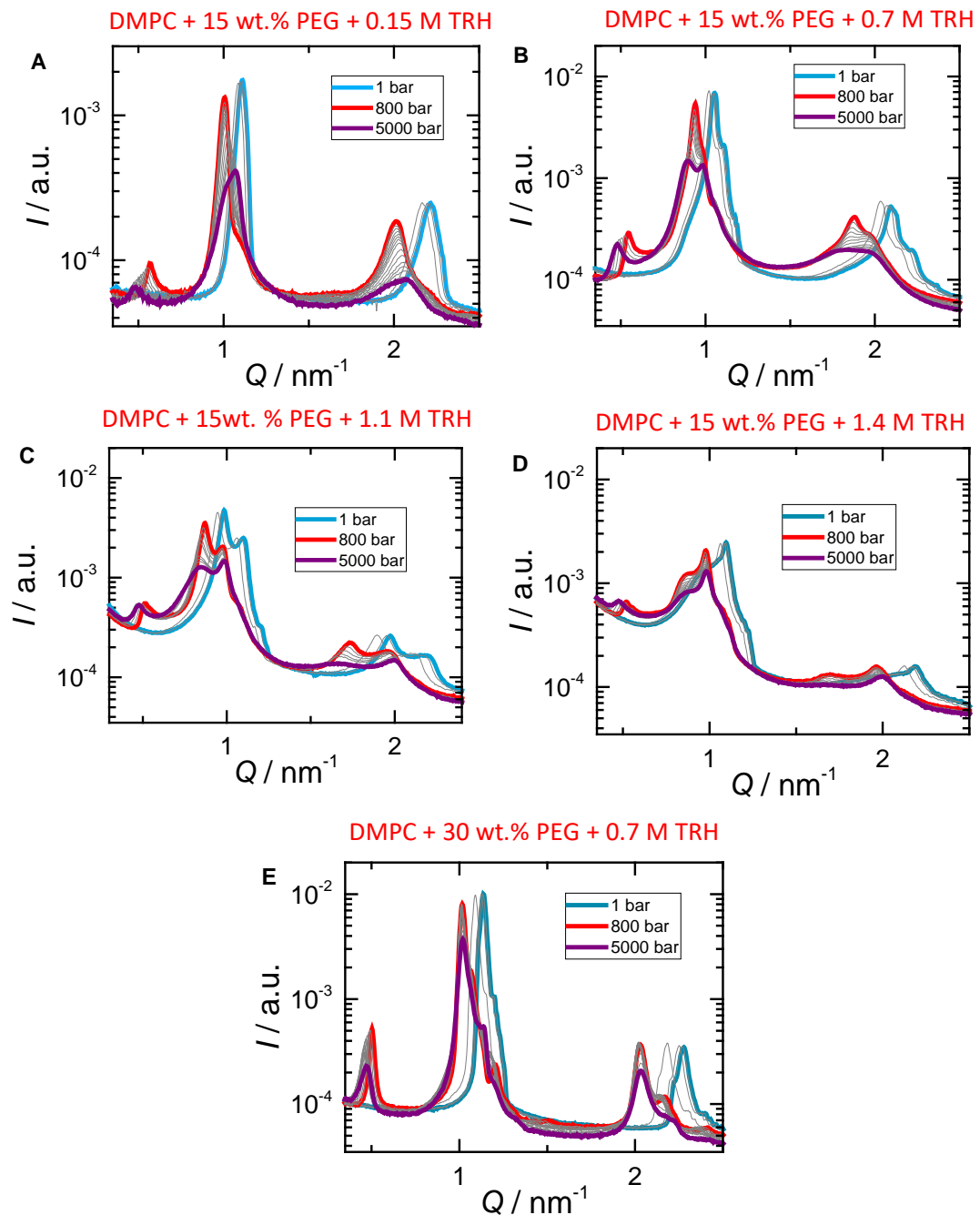


Abbildung 3.8: SAXS-Streukurven multilamellarer DMPC-Vesikel (20wt.%) bei 35 °C im Druckbereich von 1 bar bis 5000 bar in der Anwesenheit von 15 wt.% und verschiedenen Trehalosekonzentrationen (A-C) und in Anwesenheit von 30 wt.% PEG und 0.6 M Trehalose (D).

Vergleicht man diese Streukurven mit denen in Anwesenheit von Trehalose, zeigt sich, dass PEG den Einfluss von Trehalose auf die lamellare Ordnung auszugleichen scheint. So sinkt in Anwesenheit von 15 wt.% PEG die Intensität der Reflexe mit steigender Trehalose-Konzentration, während die Intensität der gestreuten Strahlung bei kleinen Q -Werten steigt. Ein direkter Vergleich zwischen Abbildung 3.8 A und D offenbart, dass bei konstanter Trehalose-Konzentration die multilamellare Ordnung durch PEG erhöht wird. Weiterhin ist eine Aufspaltung der Bragg-Reflexe bei Trehalose-Konzentrationen oberhalb von 0.7 M über den gesamten untersuchten Druckbereich zu beobachten. Die korrespondierenden Schichtdicken sind in Abbildung 3.9 gezeigt.

Auch in Anwesenheit von PEG führt Trehalose zu einem Anstieg der Schichtdicke. Abbildung 3.9 B zeigt, dass ebenfalls die Schichtdicke, welche dem Peak bei $Q \approx 0.5 \text{ nm}^{-1}$ zugeordnet werden kann, durch Trehalose erhöht wird. Den Einfluss von 0.6 M Trehalose bei Anwesenheit von 30 wt.% PEG zeigen Abbildungen 3.9 C-D. So wurde bei Anwesenheit von 30 wt.% PEG die Koexistenz von drei Gelphasen beobachtet, wohingegen bei Anwesenheit von 0.6 M Trehalose lediglich die Koexistenz zweier Gelphasen beobachtet wurde.

Bei Anwesenheit beider Substanzen kompensiert PEG die durch Trehalose verringerte Abnahme der multilamellaren Ordnung. Dies ist in Anbetracht der Tatsache, dass diverse Organismen Trehalose als Reaktion auf osmotischen Stress anreichern, von besonderem Interesse. So zeigen diese Ergebnisse, dass Trehalose in der Lage ist, die durch den osmotischen Druck ausgeschlossener Substanzen verursachte erhöhte Membranordnung zu kompensieren. Trehalose ist somit in der Lage, die Membranordnung und -fluidität unter schädlichen Bedingungen effektiv zu modellieren. In Abwesenheit ausgeschlossener Osmolyte führt Trehalose jedoch zu einer schädlichen Abnahme der Membranordnung. Dies erklärt, warum der Trehalose-Gehalt unter optimalen Wachstumsbedingungen vergleichsweise gering ist und Trehalose nur unter Stressbedingungen akkumuliert wird.²¹²

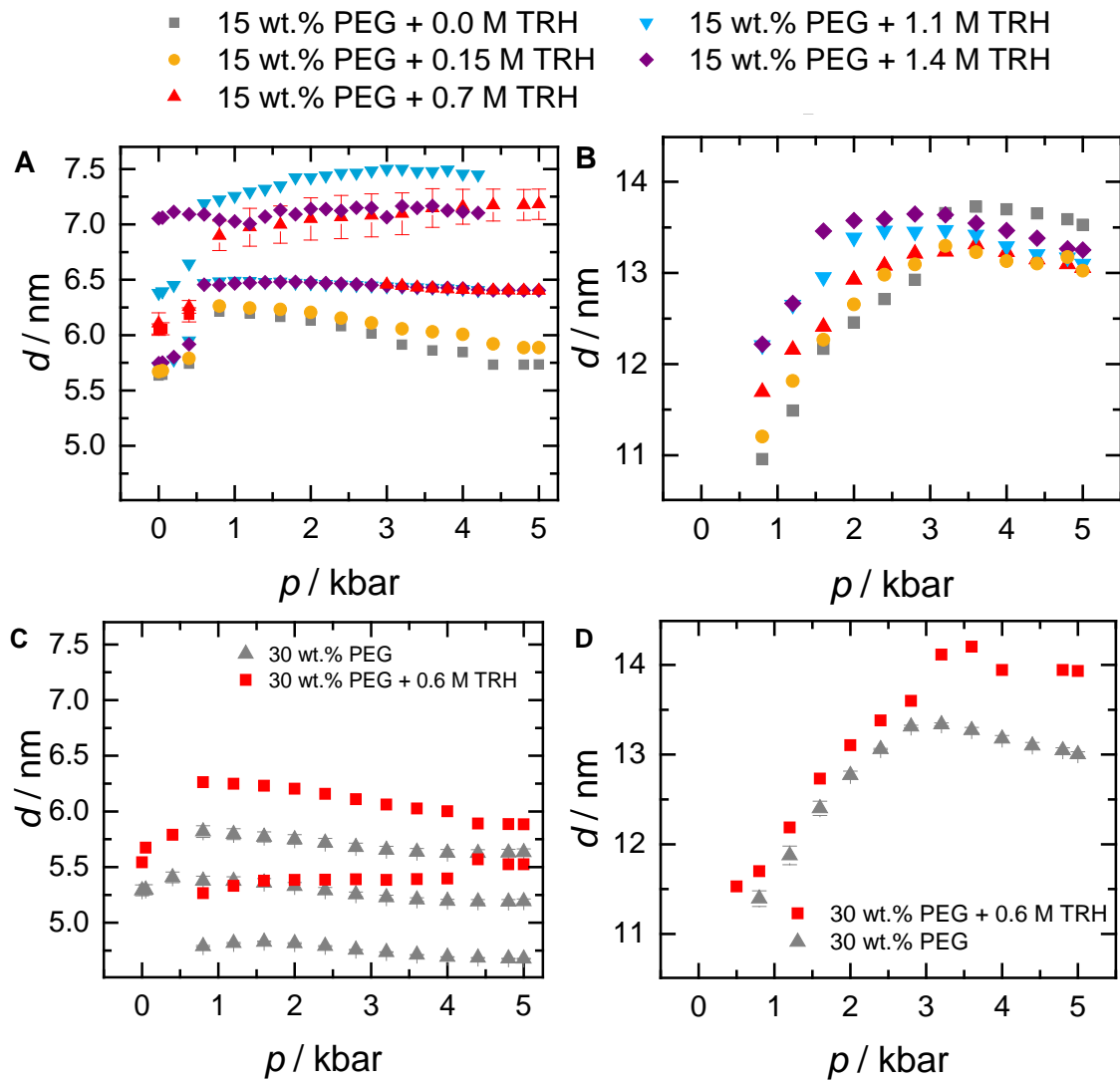


Abbildung 3.9: Druckabhängige Entwicklung der lamellaren Schichtdicke d bei Anwesenheit von 15 wt.% PEG und Trehalose und bei Anwesenheit von 30 wt.% PEG und 0.6 M Trehalose.

3.3.5 Einfluss auf Fluktuationen und die Membran-Mechanik

Die Ergebnisse der Analyse der experimentellen Daten gemäß der modifizierten Caillé-Theorie sind in Abbildung 3.10 zusammengefasst. Durch diese Analyse konnte der Einfluss von Trehalose und PEG auf die mechanischen Eigenschaften der Membranen evaluiert werden. Abbildung 3.10 A zeigt Beispiele der Funktionsanpassungen der experimentellen Daten gemäß der modifizierten Caillé-Theorie.⁶¹ Der Einfluss von PEG und Trehalose auf den Caillé-Parameter zeigt Abbildung 3.10 B.

In Abwesenheit von Trehalose bzw. PEG wurde ein Wert von $\eta = 0.089$ ermittelt. Dies entspricht einer mittleren Fluktuation der Wasserschicht von $\sigma = 0.6$ nm. Dieser Wert sinkt mit steigender PEG-Konzentration, d.h. mit steigendem osmotischen Druck. So beträgt der Caillé-Parameter bei einer PEG-Konzentration von 30 wt.% nur noch 0.02 ($\sigma = 0.25$ nm). Insgesamt stehen diese Ergebnisse im Einklang mit Literaturdaten.¹⁹⁷ Diese Abnahme ist auf die Entfernung von Wasser aus dem Membranzwischenraum, welche zu einer Rigidisierung der Membranen führt, zurückzuführen.

Trehalose hingegen erhöht den Caillé-Parameter auf $\eta = 0.12$ und $\sigma = 0.72$ nm (SAXSess) bzw. $\sigma = 0.76$ nm (ESRF) und reduziert somit die Rigidität der Membranen. Die verringerte Rigidität der Membran in Anwesenheit von bis zu 0.15 M Trehalose lässt auf eine direkte Interaktion von Trehalose mit der Membran bei vergleichsweise geringen Trehalose-Konzentrationen schließen.

Die Auswertung der Daten in Anwesenheit höherer Trehalose-Konzentrationen war bedingt durch die starke Verbreiterung bzw. Aufspaltung der Bragg-Reflexe nicht möglich. In der Literatur wurde bereits ein Einfluss von Sacchariden auf die mechanischen Eigenschaften von Modellmembranen untersucht.²³⁴⁻²³⁶ So konnte eine Abnahme von K_c von $1.2 \cdot 10^{-19}$ J auf $0.5 \cdot 10^{-19}$ J in der Anwesenheit von 0.4 M TRH für eine SOPC-Membran gefunden werden.²³⁶

Abbildung 3.10 C zeigt die Druckabhängigkeit des Caillé-Parameters. Generell wurden an dem SAXSess mc² Instrument sowie an dem ESRF vergleichbare Werte für DMPC in An- und Abwesenheit von 15 wt.% PEG sowie 0.15 M Trehalose erhalten. Im Rahmen der experimentellen Genauigkeit konnte kein signifikanter Druck-

effekt auf den Caillé-Parameter beobachtet werden. Jedoch konnte durch weitaus präzisere Methoden eine erhöhte Rigidität der Membran bei erhöhten Drücken beobachtet werden.²⁰⁴

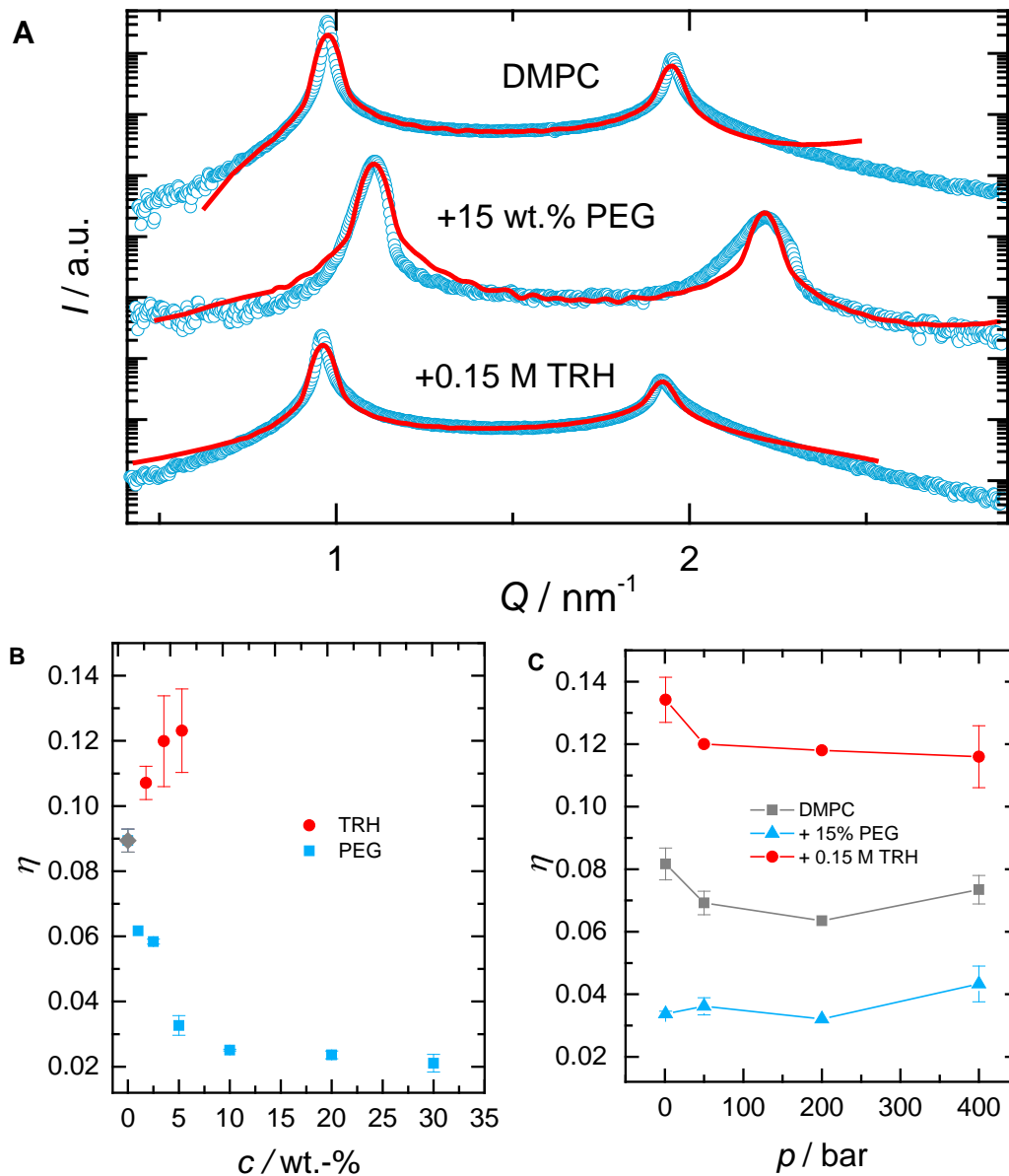


Abbildung 3.10: SAXS-Streukurven von DMPC bei Anwesenheit von PEG und Trehalose. Durchgezogene Linien kennzeichnen die Anpassungen der experimentellen Daten gemäß der modifizierten Caillé-Theorie (A). Caillé-Parameter multilamellarer DMPC-Vesikel bei Anwesenheit von Trehalose und PEG (B). Druckabhängigkeit des Caillé Parameters bei Anwesenheit von 15 wt.% PEG und 0.15 M (circa 5 wt.%) Trehalose (C).

3.3.6 Laurdan-Fluoreszenz

Zusätzliche Erkenntnisse über mögliche Änderungen des Phasenverhaltens, der Hydratation und der Kettenordnung von DMPC-Membranen bei Anwesenheit von PEG und Trehalose wurden aus Messungen der Laurdan-Fluoreszenz gewonnen. Abbildung 3.11 A zeigt die Druckabhängigkeit des GP -Wertes in An- und Abwesenheit von Trehalose.

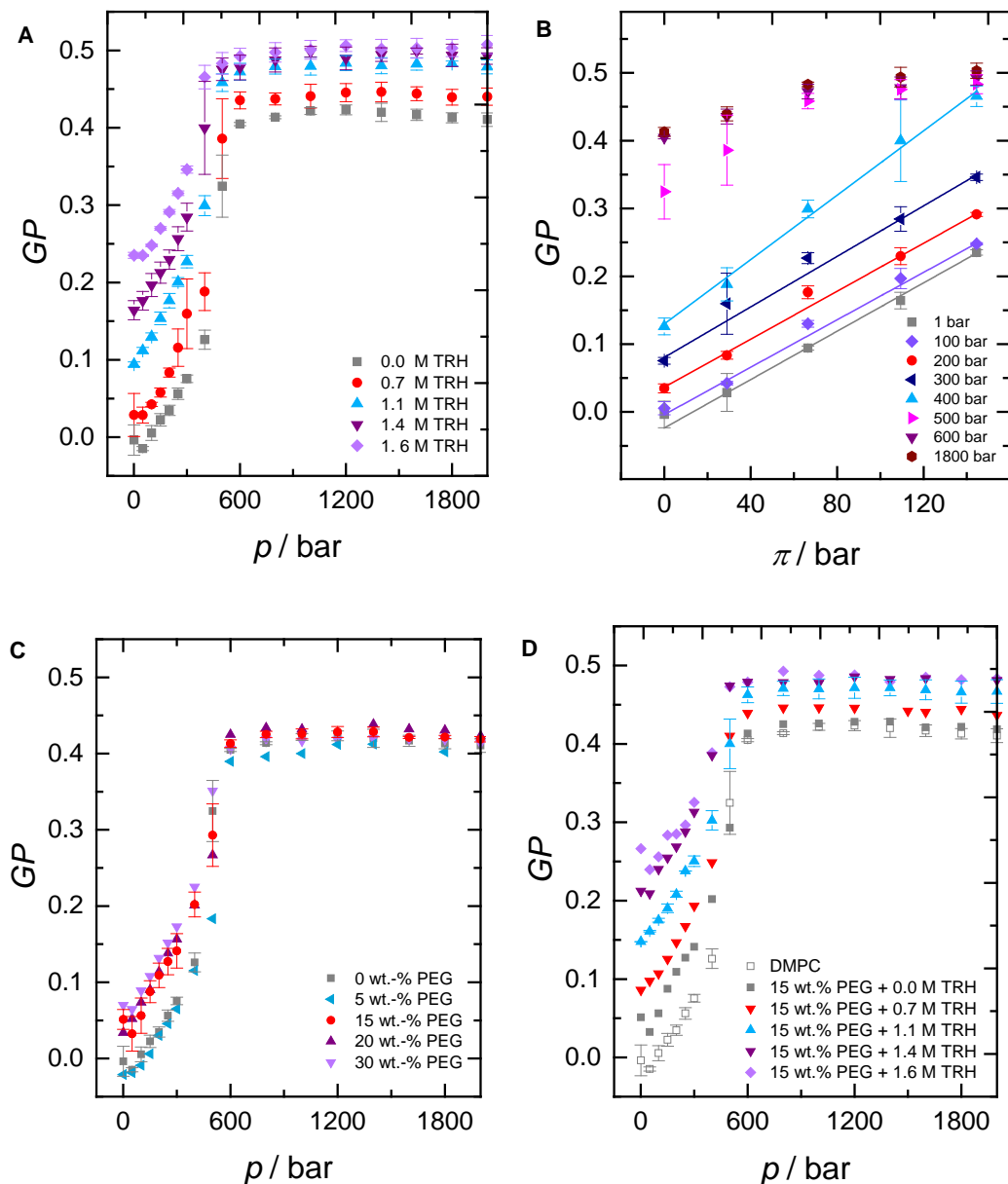


Abbildung 3.11: Druckabhängige Entwicklung des GP -Wertes von Laurdan in multilamellaren DMPC Vesikeln bei An- und Abwesenheit von Trehalose und PEG.

Laurdan wird in die Membran auf der Höhe des Glycerol-Rückgrats eingebaut, wodurch dessen Fluoreszenz von der Polarität dieser Umgebung, d.h. von dem Eindringen von Wassermolekülen in diese Region, abhängt. So verschiebt sich das Emissionsmaximum von gebundenem Laurdan während des Übergangs von der Gelphase zur fluiden Phase von 440 nm zu 490 nm.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶

Mit steigendem Druck nimmt der GP -Wert zunächst zu, bis der Phasenübergang zwischen 400 bar und 600 bar zu einem abrupten Anstieg des GP -Wertes führt. Die beobachtete Zunahme des GP -Wertes vor dem Phasenübergang ist durch die bereits in den SAXS-Messungen beobachtete Zunahme der Kettenordnung zu erklären. Diese vermindert das Eindringen von Wassermolekülen.

Trehalose-Konzentrationen über 0.6 M führen zu einem erhöhten GP - Wert. Trehalose verursacht somit eine geringere Hydratation der Kopfgruppen, was durch den Austausch von Wassermolekülen gegen Trehalosemoleküle erklärt werden kann. Dies steht mit MD-Simulationen im Einklang, welche zeigten, dass die Wasserdichte an der Membranoberfläche mit steigender Trehalose-Konzentration abnimmt.¹³⁰ Wie Abbildung 3.11 D zeigt, steigt der GP -Wert in der fluiden Phase linear mit dem osmotischen Druck der Trehalose Lösung. In der weniger hydratisierten Gelphase ist der Einfluss von Trehalose vergleichsweise gering. Ein erhöhter GP -Wert von membrangebundenem Laurdan wurde zuvor ebenfalls in Anwesenheit von Sucrose beobachtet.¹⁹⁴ Weiterhin zeigt sich, dass Trehalose den Phasenübergang leicht in Richtung geringerer Drücke (circa 120 bar für $c_{TRH} = 1.6$ M) verschiebt und somit die Gelphase, d.h. den weniger hydratisierten Zustand, stabilisiert.

In Abbildung 3.11 C ist der Einfluss von PEG auf den GP -Wert gezeigt. Hier wurde lediglich eine leichte Zunahme des GP -Wertes beobachtet, welche durch die Zunahme der Kettenordnung zu erklären ist. Ein Einfluss auf den Phasenübergang konnte nicht festgestellt werden. In Anwesenheit von sowohl Trehalose als auch PEG sind die Effekte beider Substanzen auf den GP -Wert nahezu additiv. (Abbildung 3.11 D).

Abbildung 3.11 A zeigt die Temperaturabhängigkeit des GP -Wertes bei An- und Abwesenheit von Trehalose und PEG. Dabei wurde erneut eine Stabilisierung der

Gelphase durch Trehalose festgestellt. So verschiebt sich der Phasenübergang in Anwesenheit von 1.6 M Trehalose um circa 3 °C hin zu höheren Temperaturen.

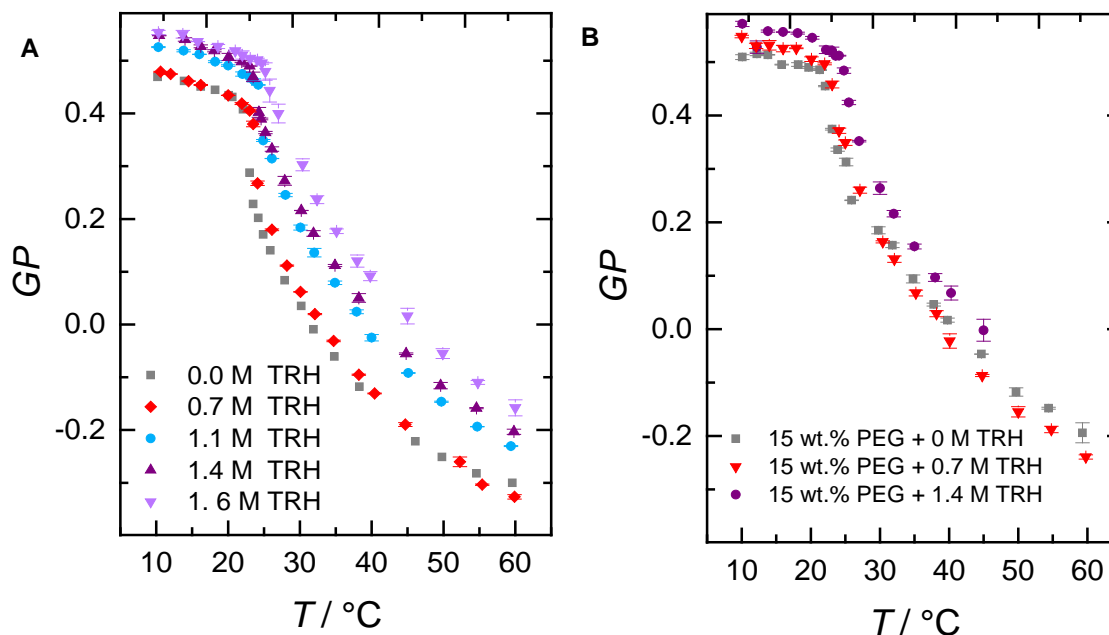


Abbildung 3.12: Temperaturabhängige Entwicklung des *GP*-Wertes von Laurdan in multilamellaren DMPC Vesikeln bei An- und Abwesenheit von Trehalose und PEG.

3.3.7 Kalorimetrie

Genauere Erkenntnisse über den Einfluss von Trehalose auf thermodynamische Größen des Systems wurden aus kalorimetrischen Messungen gewonnen. Ausgewählte DSC-Thermogramme sind in Abbildung 3.13 A gezeigt. Diese offenbaren ein konzentrationsabhängiges, zweiphasiges Verhalten des Phasenübergangs.

Während Trehalose-Konzentrationen unter 0.3 M den Phasenübergang hin zu geringeren Temperaturen verschieben, steigt T_m bei einer weiteren Erhöhung der Trehalose-Konzentration erneut (Abbildung 3.13 B). Zusätzlich führen Konzentrationen unter 0.7 M zu einer asymmetrischen Verbreiterung des Übergangs auf Seiten der geringen Temperaturen. Dieses Beobachtungen werden durch die PPC-Messungen bestätigt. Die Hauptergebnisse der PPC-Messungen zeigt 3.13 C. Die hier gezeigten Daten der kalorimetrischen Messungen sind Bestandteil der Bachelorarbeit von Peter Schinkel. Die Durchführung der Messungen sowie die Auswertung der Daten erfolgte durch Peter Schinkel unter Betreuung des Autors.

entsprechenden $\alpha(T)$ -Kurven zeigt Abbildung 3.13 D. Im Rahmen der experimentellen Genauigkeit konnte kein eindeutiger Einfluss von Trehalose auf die Volumenänderungen während des Phasenübergangs beobachtet werden. So wurde ein Wert von 2.5 % in Abwesenheit und von 3.2 % in der Anwesenheit von 0.45 M Trehalose bestimmt. Die Größenordnung dieser Ergebnisse ist mit Literaturdaten vergleichbar (2.4 %).²²³

Die beobachtete zweiphasige Konzentrationsabhängigkeit kann durch verschiedene Interaktionsmechanismen zwischen der Membran und den Trehalose-Molekülen erklärt werden. So können, je nach Trehalose Konzentration, andere Interaktionsmechanismen dominieren. Dialyse-Messungen zeigten, dass der Bindungsparameter für DMPC bei 30 °C positiv für geringe (unter 0.2 M) Trehalose-Konzentrationen und negativ für höhere Konzentrationen ist.¹²⁹ MD-Simulationen fanden eine maximale Affinität bei 0.15 M.¹³⁰

Diese Literaturdaten deuten, wie auch die hier erhaltenen Daten, auf eine Interkalation von Trehalose-Molekülen in die Membran bei geringen Trehalose-Konzentrationen. Diese Interkalation findet bevorzugt in der fluiden Phase statt, wodurch sich T_m verringert. Bei höheren Trehalose-Konzentrationen scheint die Membran gesättigt zu sein und der Anteil an ausgeschlossenen Trehalose-Molekülen nimmt zu. Dieser Ausschluss stabilisiert durch den *excluded volume*-Effekt die kompaktere Gel-Phase. Die fluoreszenz-spektroskopischen Messungen offenbarten, dass Trehalose die Membranhdratation effektiver als PEG erhöht. Dies deutet darauf hin, dass Trehalose, auch wenn es nicht weiter in die Membran interkaliert, die Membranoberfläche dehydriert.

Die hier gezeigten Daten der kalorimetrischen Messungen sind Bestandteil der Bachelorarbeit von Peter Schinkel. Die Durchführung der Messungen sowie die Auswertung der Daten erfolgte durch Peter Schinkel unter Betreuung des Autors.

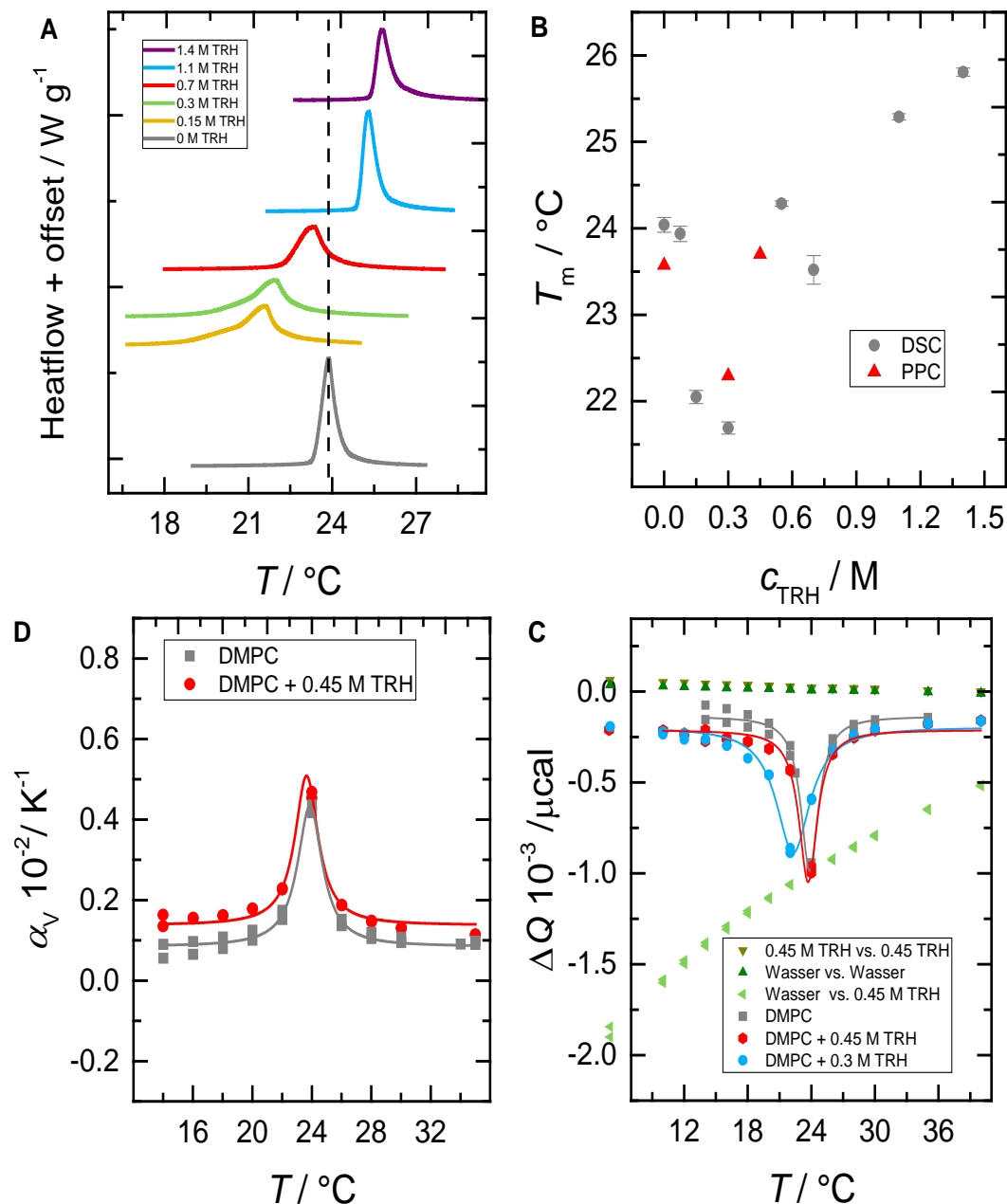


Abbildung 3.13: DSC-Kurven multilamellarer DMPC-Vesikel bei An- und Abwesenheit von Trehalose. Um einen direkten Vergleich zu erleichtern, wurden die Kurven verschoben und eine gestrichelte Linie, welche die Übergangstemperatur von DMPC angibt, eingezeichnet (A). Einfluss von Trehalose auf den temperaturinduzierten Hauptübergang (B). PPC-Daten multilamellarer DMPC-Vesikel (C). Temperaturabhängige Änderung des thermischen Expansionskoeffizienten von DMPC in den unterschiedlichen Lösungen (D). Die Durchführung der Messungen und die Auswertung der Daten erfolgte durch Peter Schinkel.

3.4 Anhang

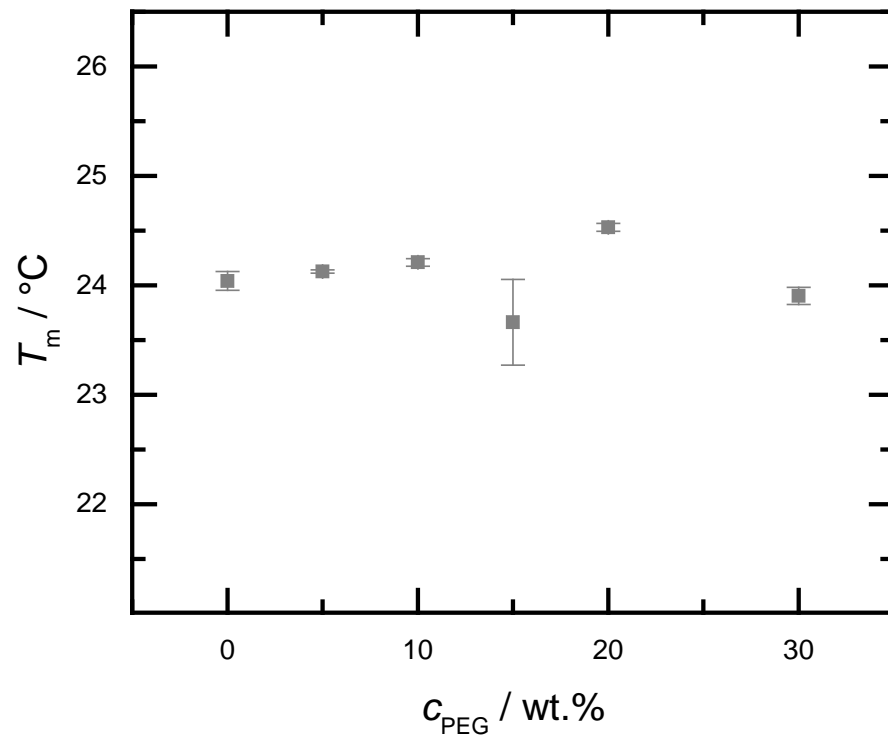


Abbildung 3.14: Einfluss von PEG 20000 auf die Hauptübergangstemperatur T_m von DMPC. Die Durchführung der Messungen und die Auswertung der Daten erfolgte durch Peter Schinkel.

4 Einfluss von Druck, Temperatur, Crowding und Cosolventien auf die interne Proteindynamik und Stabilität von Lysozym

Teile der hier gezeigten Daten wurden publiziert in:

Samy R. Al-Ayoubi, P. H. Schummel, M. Golub, J. Peters and R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2017**, 19, 14230-14237.

4.1 Einleitung

Gegenstand des vorgestellten Forschungsprojekts ist die Untersuchung des Einflusses der Osmolyte TMAO und Harnstoff auf die Proteindynamik von Lysozym auf der sub-ns Zeitskala. Als Methode kam dabei die elastisch inkohärente Neutronenstreuung (EINS) zum Einsatz. Osmolyte sind niedermolekulare Verbindungen, welche von extremophilen Organismen synthetisiert werden, um destruktive Einflüsse verschiedener Stressfaktoren wie Druck oder Temperatur zu kompensieren.^{69,70} In dieser Studie wurde der stabilisierende Osmolyt TMAO und das destabilisierende Abfallprodukt Harnstoff verwendet.⁷¹ Während TMAO von der Proteinoberfläche ausgeschlossen wird und das Wasserstoffbrücken-Netzwerk verstärkt, bindet Harnstoff direkt an das Protein.^{73–76} *Crowding* bezeichnet den Effekt, welcher durch ausgeschlossenes Volumen in der gefüllten Zelle entsteht.^{134,136–140} Genauere Hintergründe zu Osmolyten und *Crowding* können den Kapiteln 1.4 und 1.5 entnommen werden.

Der Einfluss von Osmolyten, *self-crowding* und Druck auf die Stabilität Struktur und das intermolekulare Interaktionspotential von Proteinen ist umfassend erforscht worden.^{77,78,141,237–239} Der Einfluss der oben genannten Faktoren auf die Proteindynamik ist hingegen vergleichsweise wenig untersucht. So beschränkt sich ein Großteil der Studien zur Proteindynamik auf verdünnte Lösungen oder hydratisierte Proteinpulver.^{240–244} Der Einfluss kompatibler Osmolyte auf die interne Proteindynamik, vor allem unter *self-crowding* Bedingungen, ist somit weitestgehend *terra incognita*.

Proteine sind jedoch hochdynamische Makromoleküle und neben dem häufig beschriebenen Zusammenhang zwischen Proteinstruktur und Funktion besteht ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Dynamik und der Funktion eines Proteins.¹⁷⁵ Gerade weil die Funktionalität eines Proteins immer auch von dessen Flexibilität abhängt, sind Erkenntnisse der Proteinstruktur somit mit Nichten ausreichend, um ein umfassendes Verständnis der Proteinfunktion zu erhalten (siehe Kapitel 1.2.2).

Die Flexibilität eines Proteins kann durch Fluktuationen von Atompositionen charakterisiert werden, diese können durch Streumethoden sowie MD-Simulationen ermittelt werden.^{174,240–243,245–250} Im Falle von EINS wird das Zeitfenster der untersuchten Dynamik durch die Energieauflösung des Instruments bestimmt, in die-

sem Fall $8 \mu\text{eV}$. Dies entspricht einem Zeitfenster von etwa 100 ps .^{169,251} Da der inkohärente Streuquerschnitt von Wasserstoffatomen weitaus größer ist als der aller anderen Atome in Proteinproben,¹⁶⁸ wird hauptsächlich die mittlere quadratische Verschiebung der H-Atome erhalten. Diese wird durch Diffusion, Rotation und Bewegungen der Seitenketten, beispielsweise der Rotation von Methylgruppen, bestimmt. Der Einfluss von Diffusionsbewegungen ist in dem hier untersuchten Zeitfenster gering. Die Struktur des Proteins Lysozym ist in Abbildung 4.1 gezeigt. Temperaturabhängige EINS-Messungen an hydratisierten Proteinen offenbarten ein als dynamischer Übergang bezeichnetes Phänomen. Dieses beschreibt die Zunahme der MSD bei circa 220 K ,^{245,246,252} welches auf eine thermisch induzierte Zunahme der konformationellen Flexibilität zurückzuführen ist.

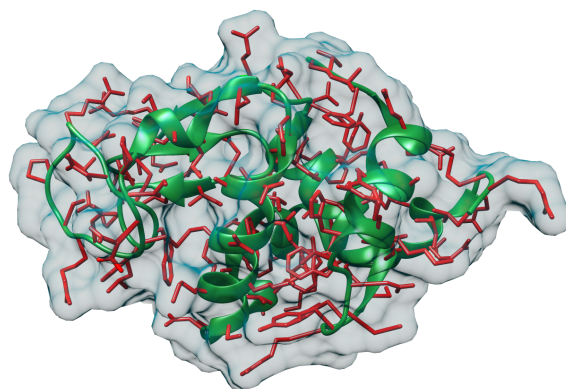


Abbildung 4.1: Struktur von Lysozym (pdb ID:1dpx,²⁵³ erstellt mit Chimera²⁵⁴). Die Aminosäureseitenketten sind in rot dargestellt.

Diese Studie ist als Folgestudie zu einer Studie, in welcher, durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Lysozymkonzentrationen (80 mg mL^{-1} und 160 mg mL^{-1}), untersucht wurde, inwieweit die interne Proteindynamik auf der sub-ns-Zeitskala durch Druckapplikation und *self-crowding* beeinflusst wird.¹⁴¹ Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Proteindynamik bei einer Konzentration von 80 mg mL^{-1} eine ausgeprägte Druckabhängigkeit aufweist.¹⁴¹ Bereits bei relativ geringen Drücken von einigen Hundert bar wurde eine Verringerung der H-Atom MSD beobachtet.¹⁴¹ Unter *self-crowding* Bedingungen ist die MSD um 60% geringer und es wurde keine Druckabhängigkeit mehr beobachtet.¹⁴¹

In dieser Studie sollte durch elastische inkohärente Neutronenstreuung (EINS) der

Einfluss von Druck und der Osmolyte TMAO und Harnstoff auf die Proteindynamik des Proteins Lysozym auf der ps-ns Zeitskala unter *self-crowding* Bedingungen untersucht werden.

Zusätzlich sollte durch druck- und temperaturabhängige FTIR-spektroskopische Messungen der Einfluss dieser Osmolyte auf die Faltungsstabilität von Lysozym unter *self crowding* Bedingungen evaluiert werden.

Um eine bessere Einordnung der gezeigten Daten zu ermöglichen, sind zusätzlich Messungen in Anwesenheit der Osmolyte Glycin und Trehalose gezeigt.*

*Die in dieser Arbeit gezeigten Hochdruck-EINS-Messungen an Lysozym wurden in Zusammenarbeit mit Paul Hendrik Schummel durchgeführt. Dabei erfolgte die Auswertung der Messungen in Anwesenheit von TMAO und Harnstoff durch den Autor dieser Arbeit und die Auswertung der Messungen in Anwesenheit von Glycin und Trehalose durch P. H. Schummel

4.2 Material und Methoden

Die Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 4.1 zusammengetragen.

Tabelle 4.1: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien.

Substanz	Bezugsquelle
Lysozym	Alpha Aesar (Karlsruhe, Deutschland)
D ₂ O	Alpha Aesar (Karlsruhe, Deutschland)
Harnstoff	Sigma Aldrich (Schnelldorf, Deutschland)
¹³ C Harnstoff	Sigma Aldrich (Schnelldorf, Deutschland)
TMAO	Sigma Aldrich (Schnelldorf, Deutschland)
BisTris	Sigma Aldrich (Schnelldorf, Deutschland)

4.2.1 Probenpräparation

Sofern nicht explizit erwähnt, verlief die Präparation der Proben für die FTIR-spektroskopischen und die EINS-Messungen analog. Sowohl die EINS-Messungen als auch die FTIR-spektroskopischen Messungen wurden in Puffern auf D₂O-Basis durchgeführt. Um einen konstanten pH-Wert über den jeweiligen Temperatur- bzw. Druckbereich zu garantieren, wurde für druckabhängige Messungen ein BisTris Puffer (50 mM, pD = 7.4) und für temperaturabhängige Messungen ein Phosphat Puffer (50 mM, pD = 7.4) verwendet.²⁵⁵ Der pD-Wert wurde gemäß $pD = pH + 0.4$ eingestellt.²⁵⁶ Für die FTIR-spektroskopischen Messungen wurde ¹³C Harnstoff verwendet, da ¹²C Harnstoff stark in der Amid I'-Region absorbiert und somit die korrekte Subtraktion des Hintergrundes erschwert.²⁵⁷

Um für die FTIR-spektroskopischen Messungen einen kompletten H/D-Austausch zu garantieren, wurde das Protein zuvor in D₂O gelöst und auf circa 60 °C erhitzt um auch den Austausch labiler H-Atome im Inneren des Proteins sicher zu stellen. Im Anschluss daran wurde das Protein über Nacht lyophilisiert und in der entsprechenden Pufferlösung gelöst.

4.2.2 Experimentelle Durchführung und Datenbearbeitung

EINS

Die EINS-Messungen wurden an Instrument IN13 des Institut Laue Langevine (ILL) in Grenoble durchgeführt.¹⁷⁶ An diesem Rückstreu (*backscattering*)-Spektrometer ist ein Q -Bereich von 0.2-4.9 Å⁻¹ zugänglich. Die Energieauflösung beträgt 8 µeV. Es wurde bei einer Wellenlänge von 2.23 Å gemessen. Die verwendete Hochdruck-Messzelle wurde vom ILL bereitgestellt.²⁵¹ Als druckübertragendes Medium kam Fluorinert zum Einsatz.²⁵⁸ Die Messdauer betrug mindestens 8 h pro Messpunkt. Neben den eigentlichen Proben wurde ebenfalls der verwendete Puffer in Ab- und Anwesenheit der Osmolyte und bei verschiedenen Drücken sowie die leere Zelle und Vanadium vermessen.

Von der gemessenen Streufunktion wurde die Streufunktion der leeren Zelle sowie die der Pufferlösung (unter Berücksichtigung des Volumenanteils des Proteins) abgezogen.²⁵⁹ Zusätzlich wurde auf einen Vanadium-Standard normiert. Dafür wurde die Software LAMP des ILL verwendet.²⁶⁰ Die mittlere quadratische Verschiebung $\langle u^2 \rangle$ wurde gemäß der Gauss-Näherung bestimmt:¹⁷¹

$$I(Q, 0 \pm \Delta E) \approx I_0 \exp\left(-\frac{1}{3} Q^2 \langle u^2 \rangle\right) \quad (4.1)$$

FTIR-Spektroskopie

Druckabhängige Messungen erfolgten in einem Nicolet Magna 550 FTIR-Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) unter Verwendung einer Diacell Vivo DAC Diamantstempelzelle (Almax EasyLab, Diksmuide, Belgien). Der Druck wurde pneumatisch durch ein PACE 5000 System (GE Sensing, Frankfurt, Deutschland) generiert. Zur Druckbestimmung wurde BaSO₄ zur Probe hinzugegeben und die druckabhängige Entwicklung der Sulfat-Bande verfolgt.²⁶¹ Temperaturabhängige Messungen erfolgten an einem Nicolet 6700 FTIR-Spektrometer mit CaF₂-Fenstern. Beide Spektrometer verfügen über einen Stickstoff-gekühlten MCT-Detektor und wurden kontinuierlich mit trockener Luft gespült. Es wurden 256 Interferometer Scans mit einer Auflösung von 2 cm⁻¹ aufgenommen und gemittelt. Die Aufnahme

der Spektren erfolgte nach einer Äquilibrierungszeit von 10 min. Zur Hintergrundkorrektur wurde ebenfalls ein Spektrum des Puffers in An- und Abwesenheit der Osmolyte aufgenommen.

Die Auswertung der gemessenen FTIR-Spektren umfasste die Subtraktion des Hintergrundes, eine Basislinienkorrektur und eine Flächennormierung der Amid-I'-Bande im Bereich von 1700 cm^{-1} bis 1600 cm^{-1} . Die Prozessierung erfolgte durch die Software GramsAI 8 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Die Positionen der Subbanden für die Sekundärstrukturanalyse wurden aus der 2. Ableitung der Spektren sowie der Fourier-selbstentfalteten Bande bestimmt. Durch die ermittelten Subbanden wurde das experimentelle Spektrum approximiert. Der Flächenanteil der einzelnen Subbanden entspricht dem Anteil bestimmter Sekundärstrukturelemente siehe Abschnitt 2.2.1.

Ausgehend von einem Zweizustandsmodell kann die Entwicklung eines Flächenanteils f mit steigendem Druck bzw. mit steigender Temperatur durch Boltzmann-Funktionen beschrieben werden:

$$f(p) = \frac{f_f - f_u}{1 + \exp\left(-\frac{(p - p_u)\Delta V_u^\circ}{RT}\right)} + f_u \quad (4.2)$$

$$f(T) = \frac{f_f - f_u}{1 + \exp\left(-\frac{\left(\frac{1}{T_u} - \frac{1}{T}\right)\Delta H_u^\circ}{R}\right)} + f_u \quad (4.3)$$

Hierbei sind f_f und f_u die Plateau-Werte des gefalteten und entfalteten Flächenanteils und ΔV_u° bzw. ΔH_u° das Standardentfaltungsvolumen bzw. die Standardentfaltungsenthalpie.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Einfluss von Druck und Osmolyten auf die Proteindynamik

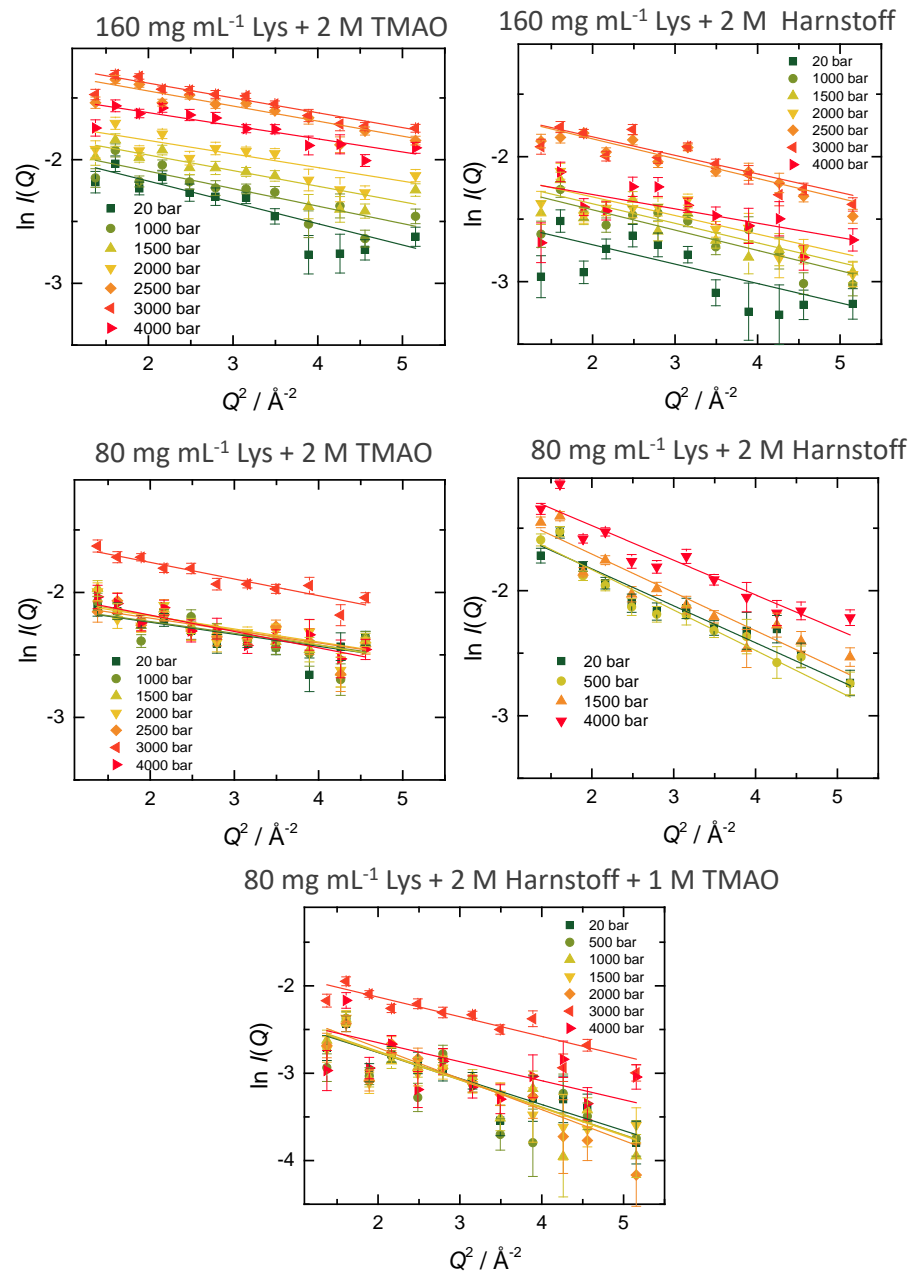


Abbildung 4.2: Semilogarithmische Auftragung der EINS-Intensität als Funktion von Q^2 für 80 mg mL⁻¹ und 160 mg mL⁻¹ Lysozym (Lys) in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff bei verschiedenen Drücken. Die Linien stellen die Funktionsanpassungen dar, aus denen gemäß der Gauss-Näherung die MSD bestimmt wurde.

Die durch die Gaussche Näherung bestimmten Werte der MSD für 80 mg mL^{-1} Lysozym sind in Abbildung 4.3 gezeigt. Die Daten für das reine Protein wurden aus der Referenz¹⁴² entnommen.

In reiner Pufferlösung zeigt die MSD der H-Atome bei dieser Proteinkonzentration eine ausgeprägte Druckabhängigkeit.¹⁴² So sinkt diese zwischen 1 bar und 2000 bar von 1.4 \AA^2 auf 1.0 \AA^2 . In Anwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff ist jedoch, im Rahmen der experimentellen Genauigkeit, keine signifikante Druckabhängigkeit der MSD auszumachen.

TMAO führt zu reduzierten MSD-Werten und damit zu einer geringeren Beweglichkeit der H-Atome des Proteins. So sinkt beispielsweise die MSD in der Anwesenheit von 2 M TMAO bei 1 bar um circa 70% .

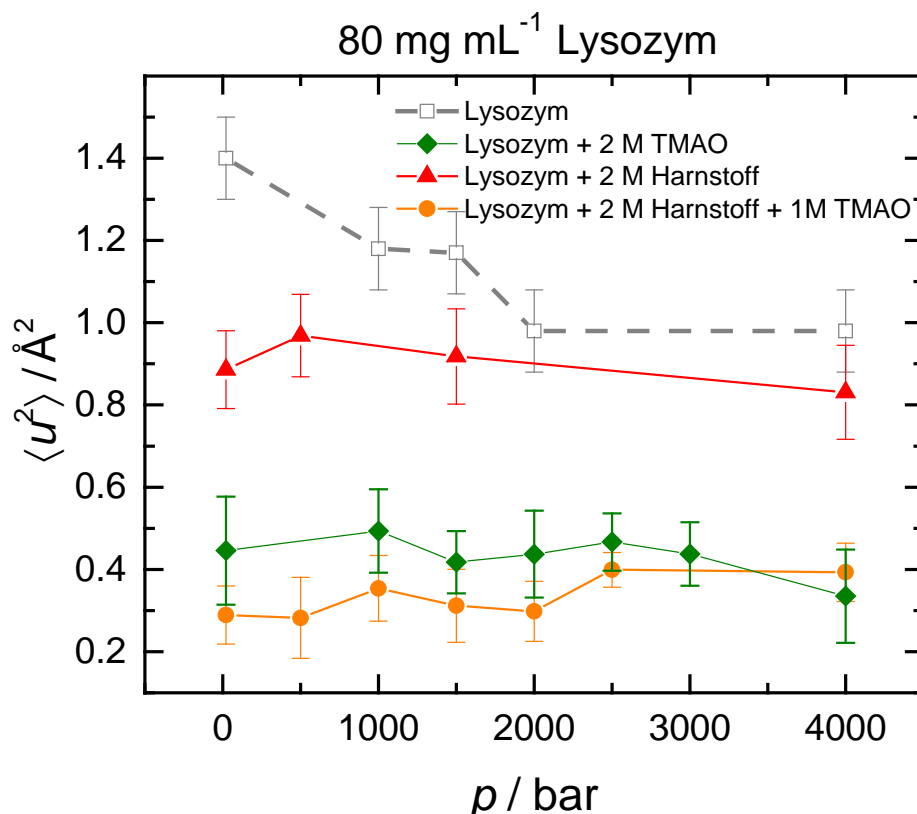


Abbildung 4.3: Druckabhängige Entwicklung der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) von 80 mg mL^{-1} Lysozym in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff. Die Daten in reiner Pufferlösung sind als Referenz gezeigt und wurden aus Referenz¹⁴² entnommen.

In Anwesenheit von 2 M Harnstoff ist die MSD bei geringen Drücken verglichen mit dem in Abwesenheit erhaltenen Wert leicht erniedrigt. Bei hohen Drücken sind die in An- und Abwesenheit von Harnstoff erhaltenen Werte nahezu identisch. Insgesamt konnte somit kein signifikanter Effekt von Harnstoff auf die interne Proteindynamik beobachtet werden.

Konsequenterweise ist der Effekt einer 2:1 Mischung von Harnstoff und TMAO nahezu mit jenem von 2 M TMAO identisch. Dies lässt somit ebenfalls darauf schließen, dass die Proteindynamik in dem hier beobachteten Zeitfenster nicht durch Harnstoff, jedoch durch TMAO beeinflusst wird.

Wie Abbildung 4.4 zeigt, wurden diese Effekte der beiden Osmolyte ebenfalls bei einer Proteinkonzentration von 160 mg mL^{-1} beobachtet.

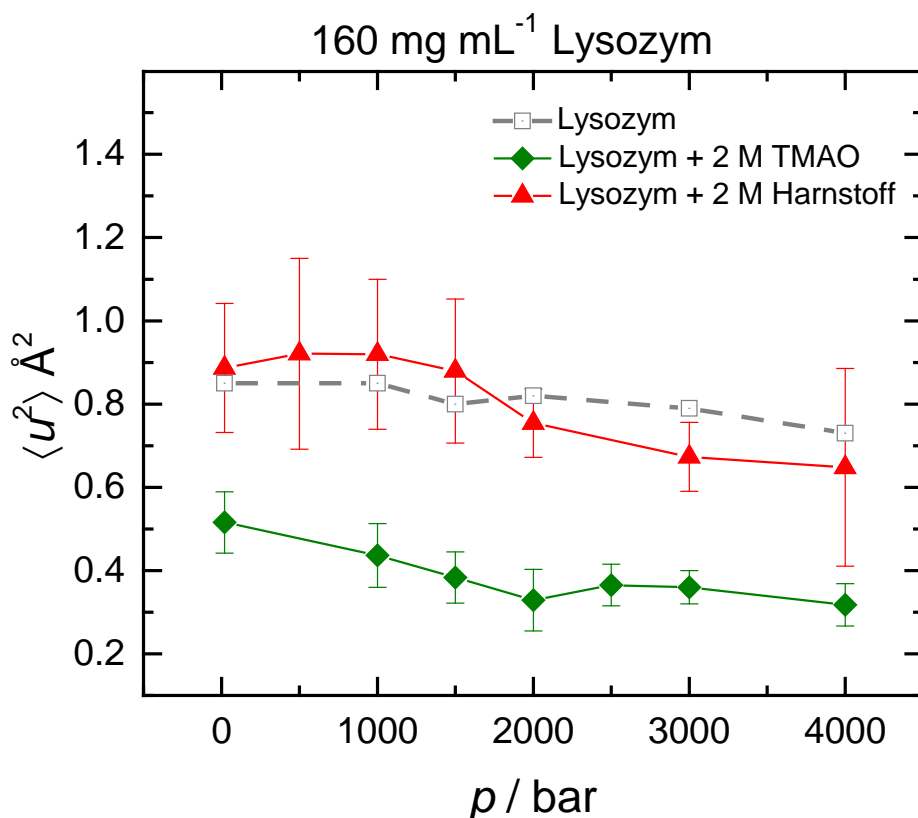


Abbildung 4.4: Druckabhängige Entwicklung der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) von 160 mg mL^{-1} Lysozym in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff. Die Daten in reiner Pufferlösung sind zum Vergleich gezeigt und wurden aus Referenz¹⁴² entnommen.

So induziert TMAO, auch unter verstärkten *self-crowding* Bedingungen, signifikant geringere (circa 40%) MSD Werte, wohingegen Harnstoff die MSD nicht beeinflusst. Die Druckabhängigkeit der MSD ist, unter Berücksichtigung des experimentellen Fehlers, gering. Eine leichte Abnahme der Dynamik mit steigendem Druck ist bestenfalls angedeutet, kann aber nicht eindeutig aus den Daten geschlossen werden.

Zusammenfassend konnte somit in allen drei Proben, welche TMAO enthielten, eine signifikante Abnahme der Proteindynamik beobachtet werden, wohingegen Harnstoff die MSD nicht beeinflusst. Weiterhin konnten bei Anwesenheit der Osmolyte, anders als in reiner Pufferlösung, kein signifikanter Einfluss von Druck oder *self-crowding* auf die interne Proteindynamik beobachtet werden. Dies kann möglicherweise durch den geringen Anteil an Bulk-Wasser in Anwesenheit der sehr hohen Osmolyt-Konzentrationen (2 M) erklärt werden.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Effekte von TMAO und Harnstoff stellen die unterschiedlichen Wechselwirkungsmechanismen der Osmolyte mit dem Protein bzw. mit Wasser dar. Generell wurde mehrfach ein Zusammenhang zwischen der Wasser- und Proteindynamik beobachtet. Während die interne Proteindynamik größtenteils durch die Dynamik der Hydratationshülle bestimmt wird, wird die globale Diffusions-Dynamik hauptsächlich durch die Dynamik von Bulk-Wasser bestimmt.^{262–264} So scheint die durch TMAO verursachte Verstärkung des Wasserstoffbrückennetzwerkes zu einer Verringerung der konformationellen Fluktuationen der Seitenketten der Proteinoberfläche zu führen.

Abbildung 4.5 zeigt die druckabhängige Entwicklung der MSD von Lysozym bei Anwesenheit von Glycin und der Disaccharide Trehalose und Sucrose. † Hier zeigt sich, dass sowohl 2 M Glycin als auch 20 wt.% Trehalose die MSD signifikant erhöhen. Sucrose hingegen zeigt keinen Effekt auf die MSD. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die MSD mit steigender Trehalose-Konzentration zunimmt (siehe Abbildung 4.14 in Anhang dieses Kapitels).

†Die in dieser Arbeit gezeigten Hochdruck-EINS-Messungen an Lysozym wurden in Zusammenarbeit mit Paul Hendrik Schummel durchgeführt. Dabei erfolgte die Auswertung der Messungen in Anwesenheit von TMAO und Harnstoff durch den Autor dieser Arbeit und die Auswertung der Messungen in Anwesenheit von Glycin, Sucrose und Trehalose durch P. H. Schummel.

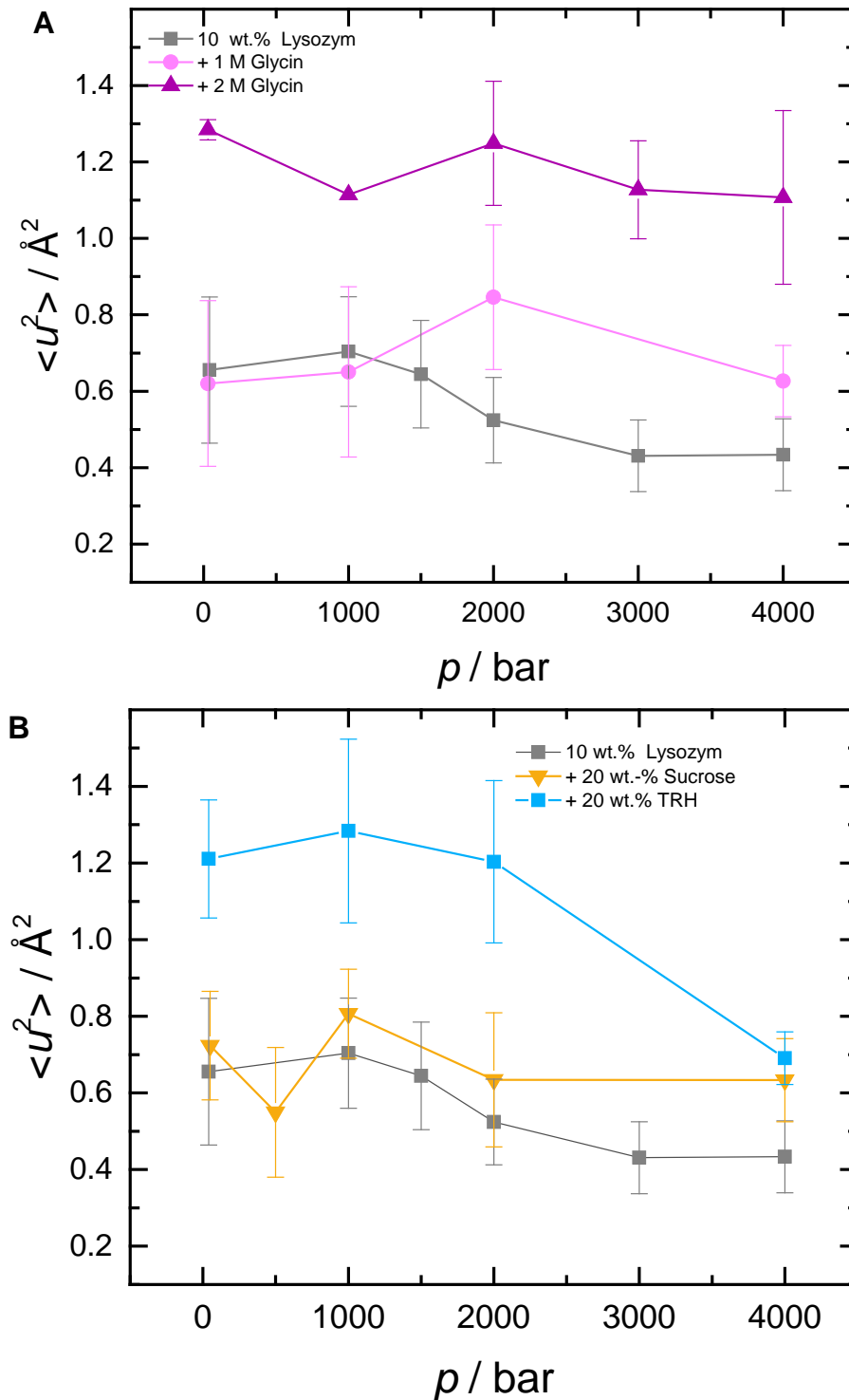


Abbildung 4.5: Druckabhängige Entwicklung der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) von 10 wt.% Lysozym in An- und Abwesenheit von Glycin (A), Sucrose und Trehalose (B). Die Verantwortlichkeit für die gezeigten Daten obliegt Paul Hendrik Schummel.

Wie erwähnt, wird die Proteindynamik in dem hier untersuchten Zeitfenster zu einem großen Teil durch die Lösungsmitteldynamik beeinflusst. Im Gegensatz zu Sucrose wurde für Trehalose mehrfach der Austausch von Wassermolekülen der Hydratationshülle gegen Trehalose-Moleküle, durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken, beobachtet. Dieser Austausch scheint die Dynamik zu beeinflussen. Glycin interagiert wie Harnstoff direkt mit dem Protein.

4.3.2 Einfluss von Druckapplikation und Cosolventien auf die Proteinstabilität

Der Einfluss der Osmolyte auf die Proteinstabilität unter *self-crowding* Bedingungen erfolgte durch FTIR-spektroskopische Messungen. Dazu erfolgte die Anpassung der experimentellen Amid-I'-Bande durch Subbanden. Die Position dieser Subbanden wurde aus der Fourier-selbstentfalteten Amid-I'-Bande sowie der 2. Ableitung dieser Bande entnommen. Dabei wurde die Anzahl der Banden möglichst gering gehalten. Dies ist in Abbildung 4.6 veranschaulicht.

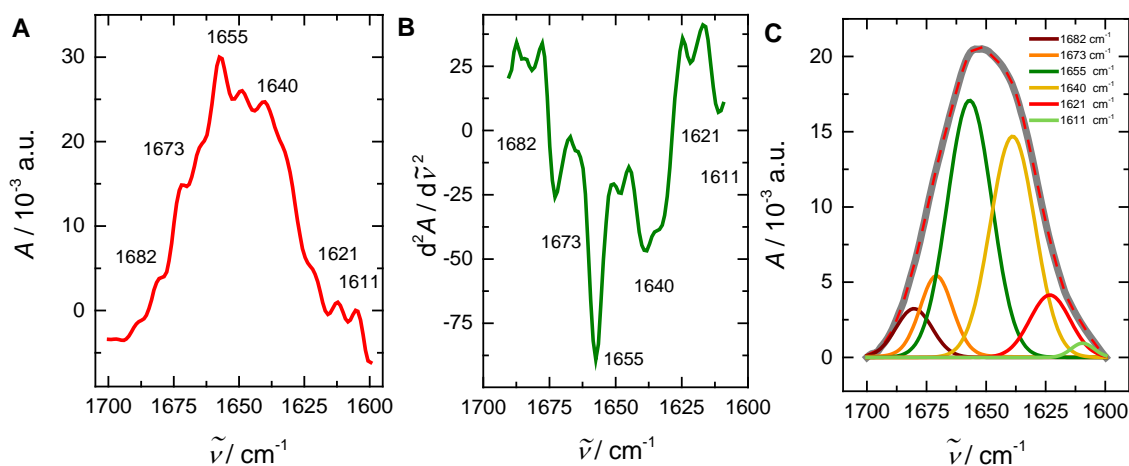


Abbildung 4.6: Repräsentatives Beispiel einer Fourier-selbstentfalteten Amid-I'-Bande (A), deren zweite Ableitung (B) sowie die approximierten Subbanden im Vergleich zu den experimentellen Daten mitsamt den unterliegenden Subbanden (C).

Die in dieser Arbeit gezeigten Hochdruck-EINS-Messungen an Lysozym wurden in Zusammenarbeit mit Paul Hendrik Schummel durchgeführt. Dabei erfolgte die Auswertung der Messungen in Anwesenheit von TMAO und Harnstoff durch den Autor dieser Arbeit und die Auswertung der Messungen in Anwesenheit von Glycin, Sucrose und Trehalose durch P. H. Schummel.

Die einzelnen Subbanden können bestimmten Sekundärstrukturelementen zugeordnet werden. Eine mögliche Zuordnung zeigt Tabelle 4.2.

Tabelle 4.2: Zuordnung der ermittelten Subbanden von Lysozym zu bestimmten Sekundärstrukturelementen.

Wellenzahl	Sekundärstrukturelement
1611 cm^{-1}	Basislinie
1621 cm^{-1}	β -Faltblatt
1640 cm^{-1}	ungeordnete Strukturen
1655 cm^{-1}	α -Helix
1673 cm^{-1}	β -Faltblatt
1682 cm^{-1}	Schleifen

Abbildung 4.7 zeigt die druckabhängige Entwicklung der Amid-I'-Bande von Lysozym in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff für beide untersuchten Proteinkonzentrationen. Generell führt Druckapplikation zu einer Verschiebung des Maximums der Amid-I'-Bande von 1654 cm^{-1} hin zu 1644 cm^{-1} .

Harnstoff verursacht eine verringerte Absorbanz, einhergehend mit einer leichten Verbreiterung der Bande. Dies kann durch leichte strukturelle Änderungen, aber auch durch eine Überlagerung mit der $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Bande des Harnstoffs erklärt werden.

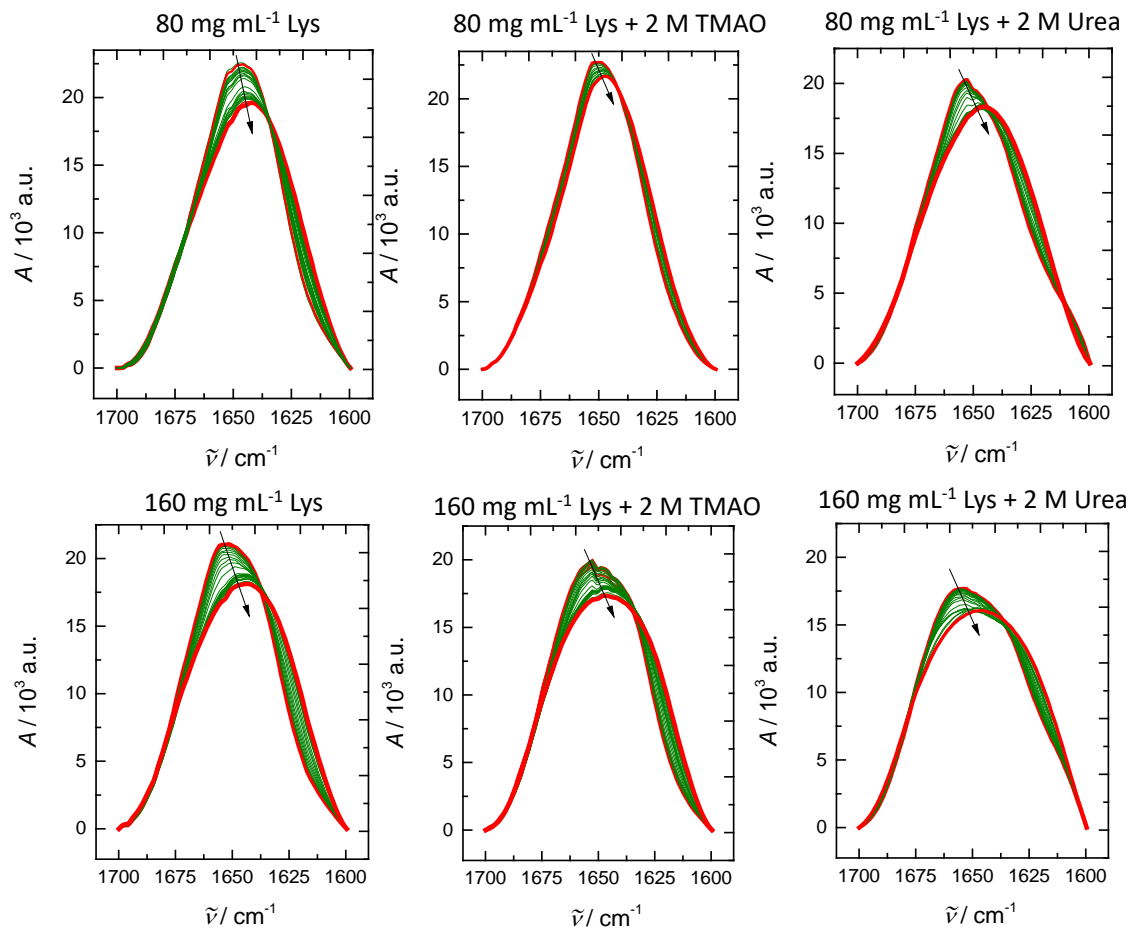


Abbildung 4.7: Druckabhängige Entwicklung der Amid-I'-Bande von Lysozym (160 mg mL⁻¹ und 80 mg mL⁻¹) in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff (Urea). Alle gezeigten Banden wurden basislinienkorrigiert und auf die Fläche normiert. $T = 25^\circ\text{C}$.

Abbildung 4.8 zeigt die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse für beide Proteinkonzentrationen.

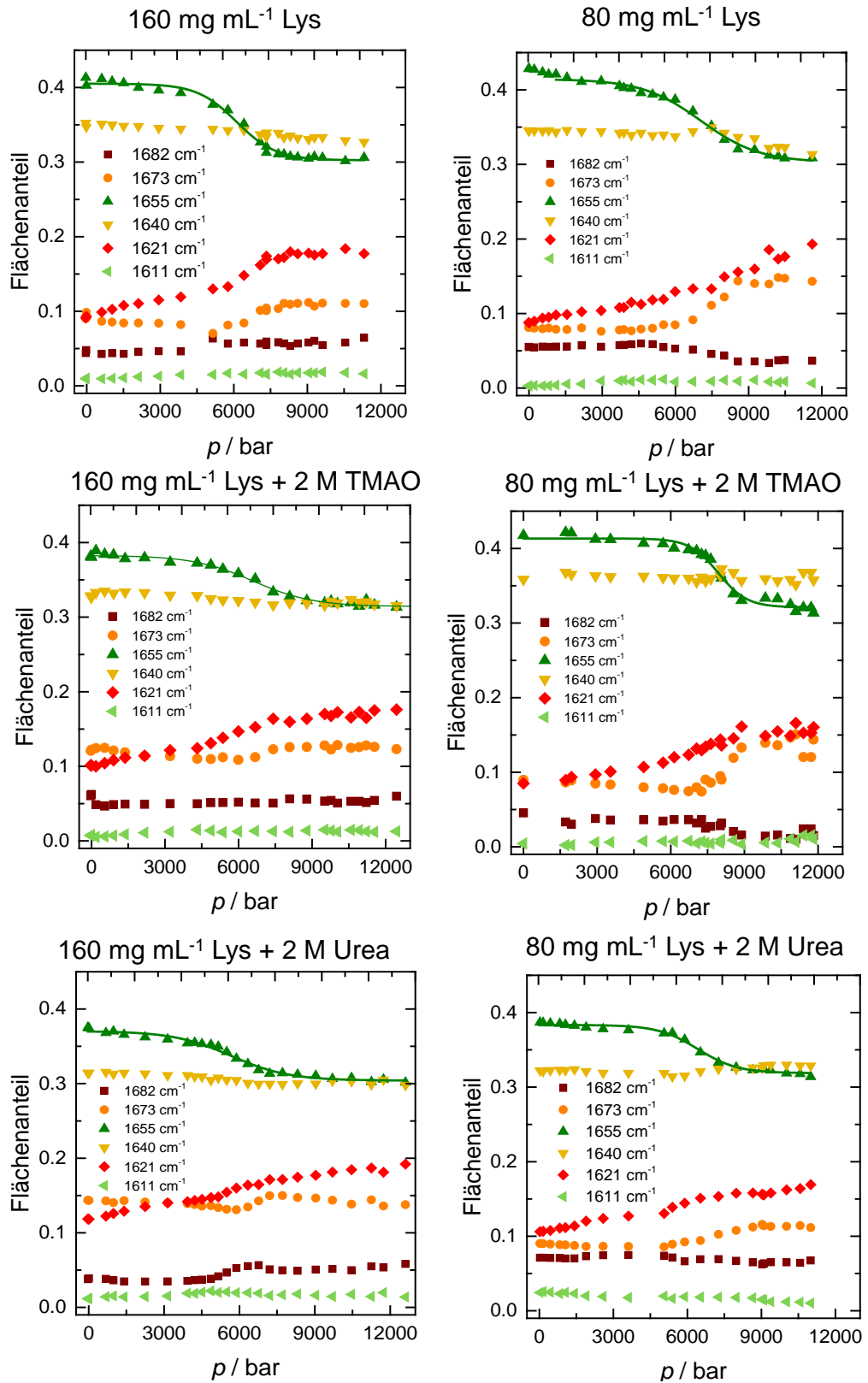


Abbildung 4.8: Druckabhängige Entwicklung der Flächenanteile der jeweiligen Subbanden in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff (Urea) für 80 mg mL⁻¹ und 160 mg mL⁻¹ Lysozym (Lys).

Zunächst zeigen die Ergebnisse der druckabhängigen Sekundärstrukturanalysen, dass selbst in Anwesenheit von 2 M Harnstoff keine Entfaltung in dem in den EINS Messungen untersuchten Druckbereich erfolgt. Geringe Änderungen, wie der lineare Anstieg des Flächenanteils der Bande bei 1621 cm^{-1} zwischen 1 bar und 6000 bar, können auf intrinsische elastische Druckeffekte auf die Amid-I'-Bande zurück geführt werden.^{14,265} Die druckabhängige Entfaltung des Proteins führt, einhergehend mit einer Zunahme des Anteils an exponierten Seitenketten, zu einer Abnahme des α -Helix Anteils um circa 10 % .

Der Entfaltungsdruck p_u sowie die Volumenänderung des Entfaltungsvorgangs ΔV_u° wurden aus Anpassungen des druckabhängigen Verlaufs des Helix-Anteils gemäß Gleichung (4.2) bestimmt. Die angepassten Funktionen sind in Abbildung 4.8 als durchgezogene Linien eingezeichnet. Der ermittelte Entfaltungsdruck ist in Abbildung 4.9 gezeigt. So wurden in Abwesenheit der Osmolyte Werte von $p_u = 6804 \pm 367$ bar (80 mg mL^{-1}) und $p_u = 6121 \pm 231$ bar (160 mg mL^{-1}) erhalten. Den Einfluss der Osmolyte auf den Entfaltungsdruck zeigt Abbildung 4.9. So steigt dieser Wert beispielsweise in Anwesenheit von TMAO um 1750 bar, wohingegen er in Anwesenheit von Harnstoff um circa 500 bar sinkt. Dies steht im Einklang mit der vielfach beobachteten Stabilisierung von Proteinen durch TMAO, sowie der Destabilisierung durch Harnstoff.^{77,78} Erstaunlicherweise verringert sich der Entfaltungsdruck auch durch Erhöhung der Proteinkonzentration. So wurde unter allen untersuchten Bedingungen ein geringerer Entfaltungsdruck für die 160 mg mL^{-1} , verglichen mit der 80 mg mL^{-1} Lösung, erhalten. Die erhaltenen Daten sprechen somit für eine leichte Destabilisierung des Systems durch *self-crowding*.

Die Volumenänderung des Entfaltungsvorgangs beträgt beispielsweise bei einer Proteinkonzentration von 160 mg mL^{-1} $\Delta V_u^\circ = -31 \pm 10\text{ mL mol}^{-1}$, d.h., die durch Druck induzierte Entfaltung führt durch das Auffüllen interner Kavitäten zu einer Verringerung des Volumens. Unter Berücksichtigung des experimentellen Fehlers konnte kein signifikanter Einfluss der Proteinkonzentration oder der Osmolyte auf diesen Wert festgestellt werden. Dies zeigt Abbildung 4.15 im Anhang dieses Kapitels. Generell stehen die erhaltenen Werte im Einklang mit Literaturdaten. Dort wurden Werte von -55 und -26 mL mol^{-1} ermittelt.^{266,267}

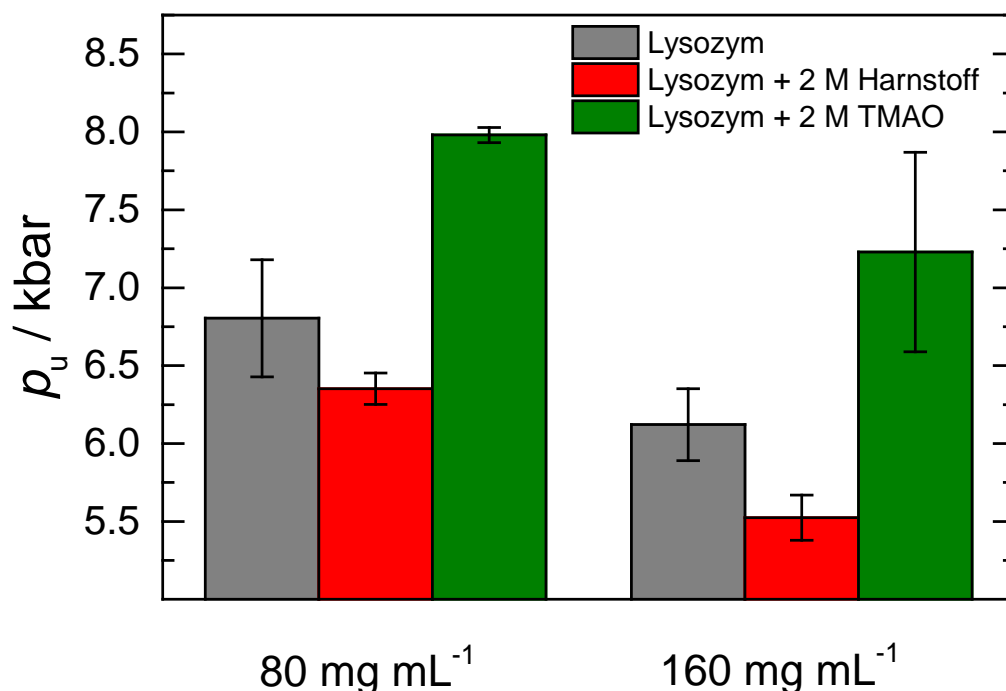


Abbildung 4.9: Entfaltungsdruck von 80 mg mL⁻¹ und 160 mg mL⁻¹ Lysozym in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff.

Um einen genaueren Überblick über das untersuchte System zu gewinnen, wurde zusätzlich der Einfluss von TMAO und Harnstoff auf die temperaturinduzierte Entfaltung untersucht. Abbildung 4.10 zeigt exemplarisch die Entwicklung der Amid-I'-Bande von Lysozym in An- und Abwesenheit von 2 M TMAO und Harnstoff.

Die temperaturabhängige Entwicklung der Amid-I'-Banden zeigt, dass in Anwesenheit von TMAO und Harnstoff, jedoch nicht in reiner Pufferlösung, eine temperaturinduzierte irreversible Aggregation, erfolgt. Dies wird durch die Banden-Maxima bei 1620 cm⁻¹ und 1680 cm⁻¹, welche auf die Bildung intermolekularer β -Faltblatt-Strukturen schließen lassen, gezeigt.^{268,269} Dabei ist dieser Effekt in Anwesenheit von TMAO stärker ausgeprägt als in Anwesenheit von Harnstoff.

TMAO stabilisiert Proteine somit einerseits gegen Denaturation, verursacht aber andererseits die Aggregation des denaturierten Proteins. Dieser Effekt von TMAO auf die Proteinaggregation wurde bereits in der Literatur beschrieben.²⁷⁰

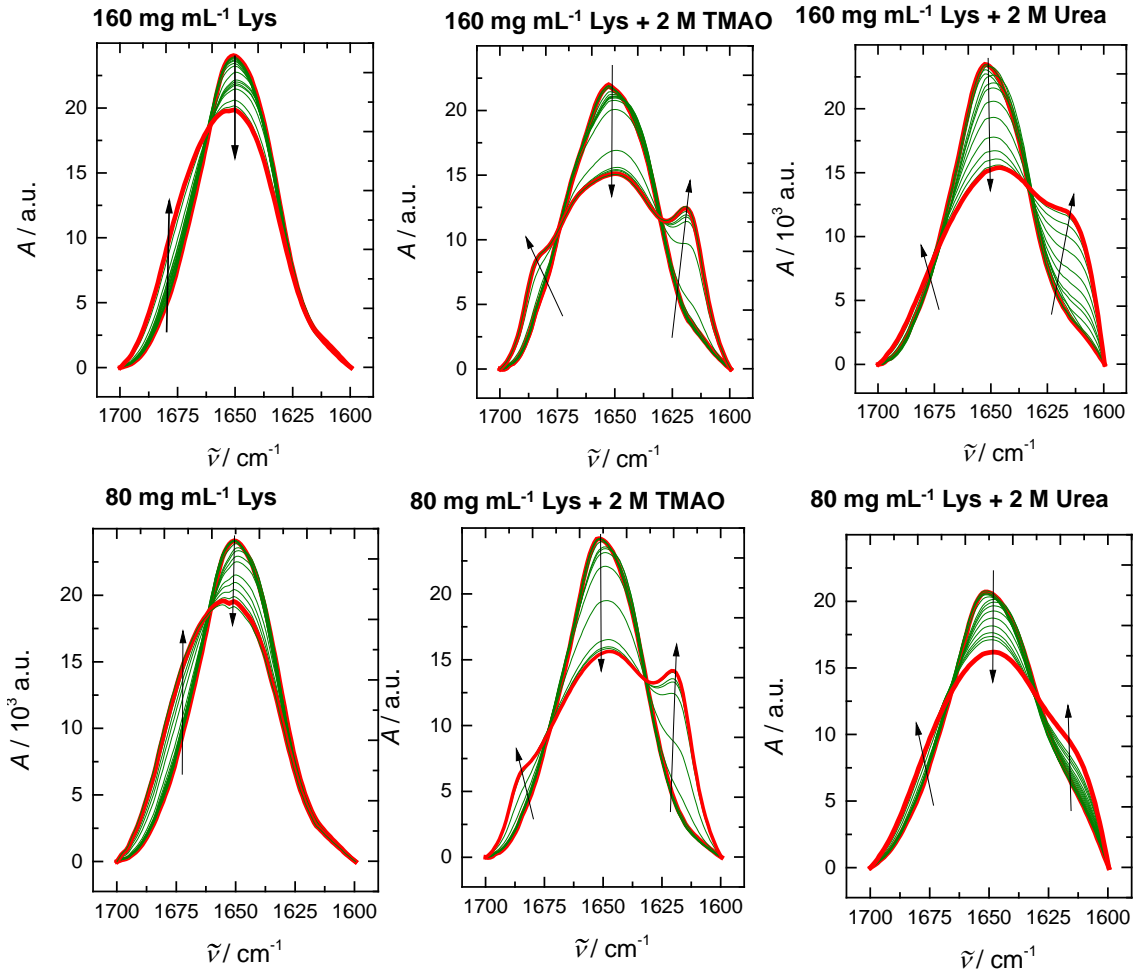


Abbildung 4.10: Temperaturabhängige Entwicklung der Amid-I'-Bande von Lysozym ($c = 160 \text{ mg mL}^{-1}$ und 80 mg mL^{-1}) in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff. Alle gezeigten Banden wurden basislinienkorrigiert und auf die Fläche normiert.

Die temperaturabhängige Entwicklung der Sekundärstrukturanteile ist in Abbildung 4.11 gezeigt. Die Entfaltungstemperatur T_m sowie die Änderung der van't Hoff Enthalpie $\Delta H_{u,vH}^\circ$ wurden durch Anpassung der temperaturabhängigen Entwicklung des α -Helix-Anteils gemäß Gleichung (4.3) bestimmt.

In Abwesenheit der Osmolyte ergaben sich Werte von $\Delta H_{u,vH}^\circ = 241 \pm 3 \text{ kJ mol}^{-1}$ (160 mg mL^{-1}) und $\Delta H_{u,vH}^\circ = 298 \pm 64 \text{ kJ mol}^{-1}$ (80 mg mL^{-1}). Literaturdaten berichten von einem Wert von $\Delta H_{u,vH}^\circ = 385 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei einer Proteinkonzentration von 20 mg mL^{-1} .²⁷¹ Bedingt durch die irreversible Aggregation des Proteins in Anwesenheit von TMAO und Harnstoff wurde die Enthalpieänderung in diesem Fall nicht ermittelt.

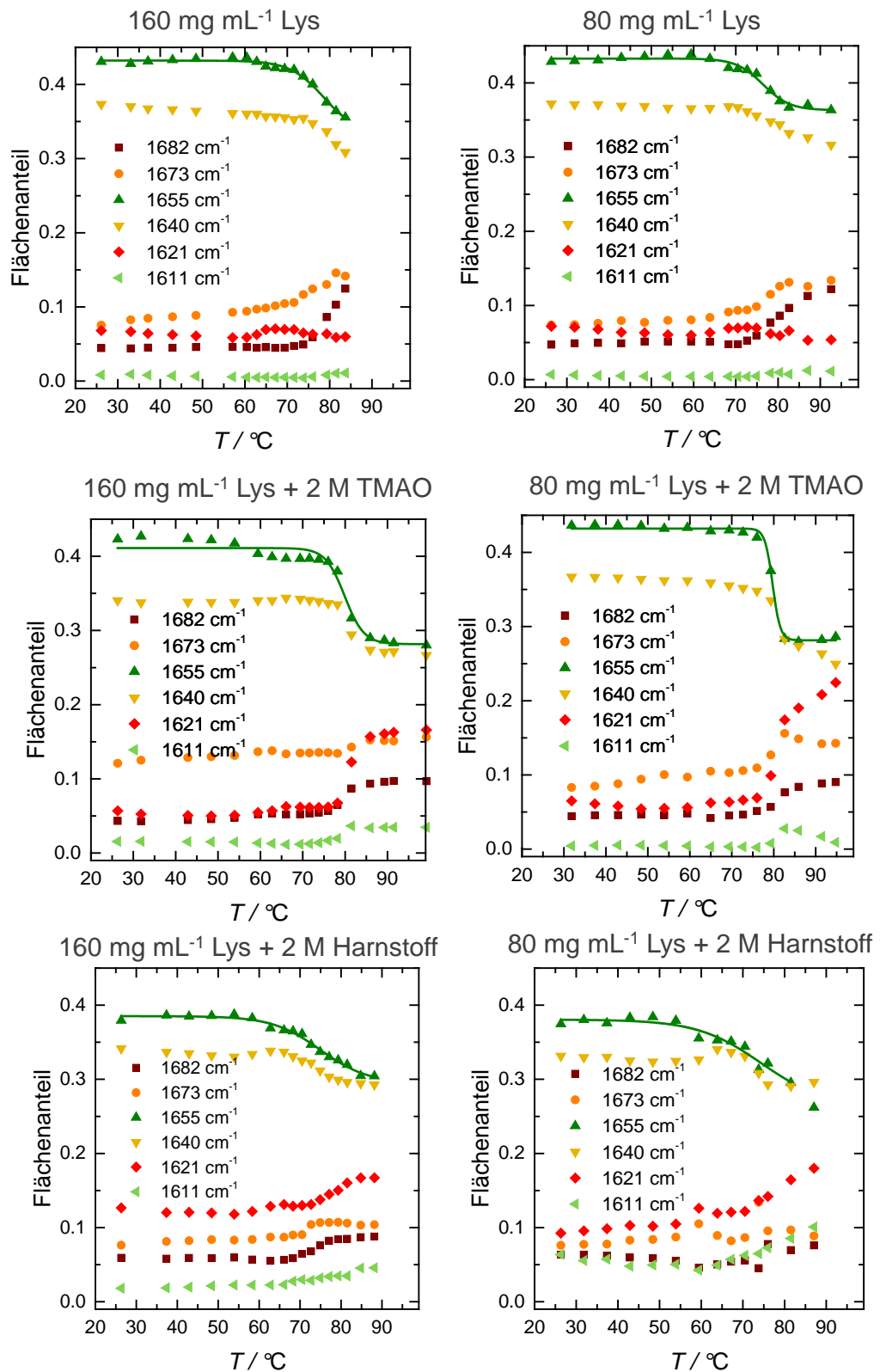


Abbildung 4.11: Temperaturabhängige Entwicklung der Flächenanteile der jeweiligen Subbanden in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff für 80 mg mL⁻¹ und 160 mg mL⁻¹ Lysozym.

Der Einfluss der Osmolyte TMAO und Harnstoff auf die Entfaltungstemperatur ist in Abbildung 4.12 gezeigt. Wie in den druckabhängigen Messungen, wurde auch hier ein stabilisierender Effekt durch TMAO und ein destabilisierender Effekt von Harnstoff beobachtet. Weiterhin wurde auch in den temperaturabhängigen Messungen ein leicht destabilisierender Effekt durch *self-crowding* beobachtet. Diese Ergebnisse wurden durch DSC Messungen bestätigt. Zusätzlich wurde bei ähnlichem pH bei einer Proteinkonzentration von 20 mg mL^{-1} , d.h. in der Abwesenheit destabilisierender intermolekularer Wechselwirkungen, ein weitaus höherer Wert gefunden.²⁷¹

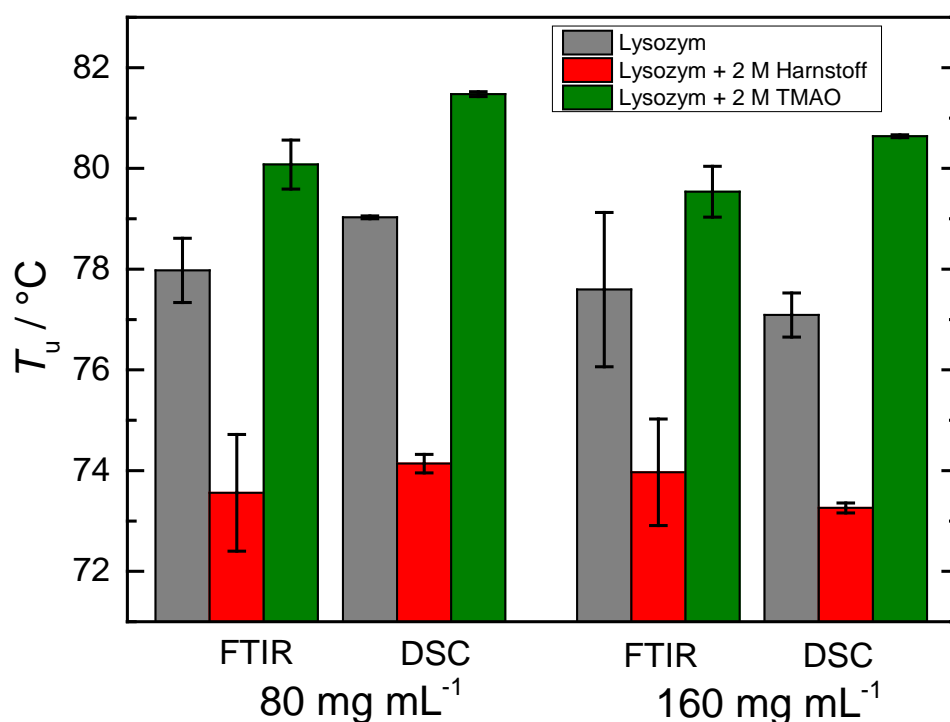


Abbildung 4.12: Durch FTIR-Messungen bestimmte Entfaltungstemperatur von 80 mg mL^{-1} und 160 mg mL^{-1} Lysozym in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff. Die Durchführung und Auswertung der DSC-Daten erfolgte durch Paul Hendrik Schummel.

Dieses Verhalten steht mit vorherigen kalorimetrischen Untersuchungen im Einklang, welche ebenfalls einen destabilisierten Einfluss von *self-crowding* offenbarten.²⁷² Dies lässt sich auf einen enthalpischen Effekt zurückführen. Für andere Systeme, wie das Protein SNase, wurde hingegen eine Stabilisierung durch *self-crowding* auf Lysozym beobachtet. Dies verdeutlicht, inwieweit der Einfluss von *self-crowding* von den

Eigenschaften des *Crowder*- Moleküls (Oberflächenladung und Ladungsverteilung) bestimmt wird.¹⁴¹

Abschließend wurde ein Druck-Temperatur-Phasendiagramm bei einer Proteinkonzentration von 160 mg mL^{-1} bestimmt. Dieses weist die für monomere Proteine charakteristische elliptische Form auf.

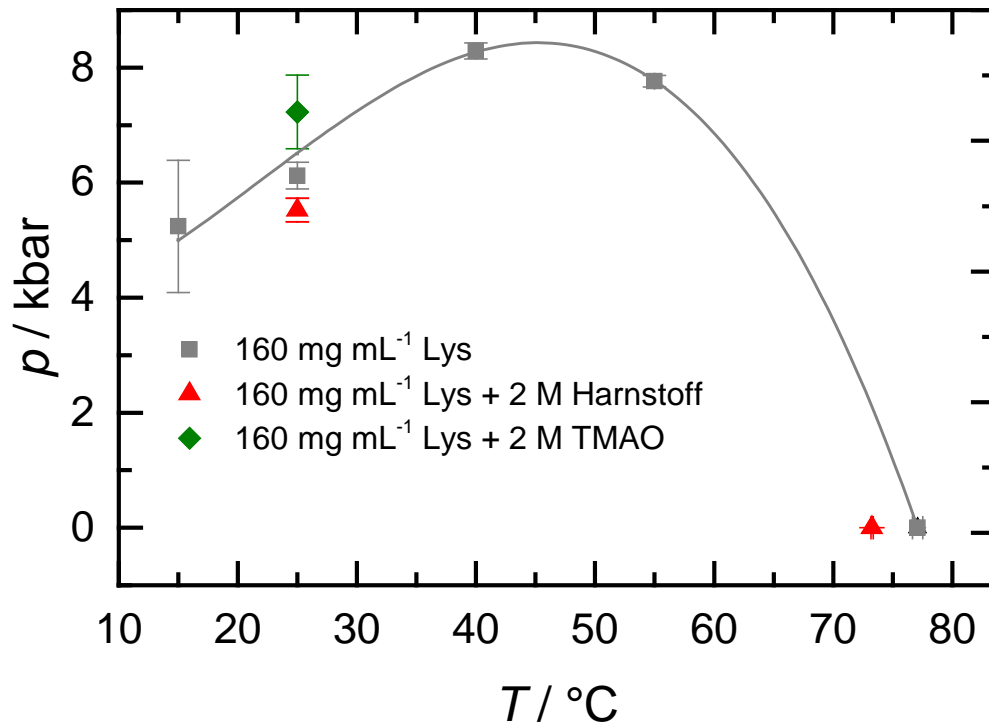


Abbildung 4.13: Druck-Temperatur-Phasendiagramm für 160 mg mL^{-1} Lysozym. Die durchgezogene Linie dient der optischen Orientierung.

4.4 Anhang

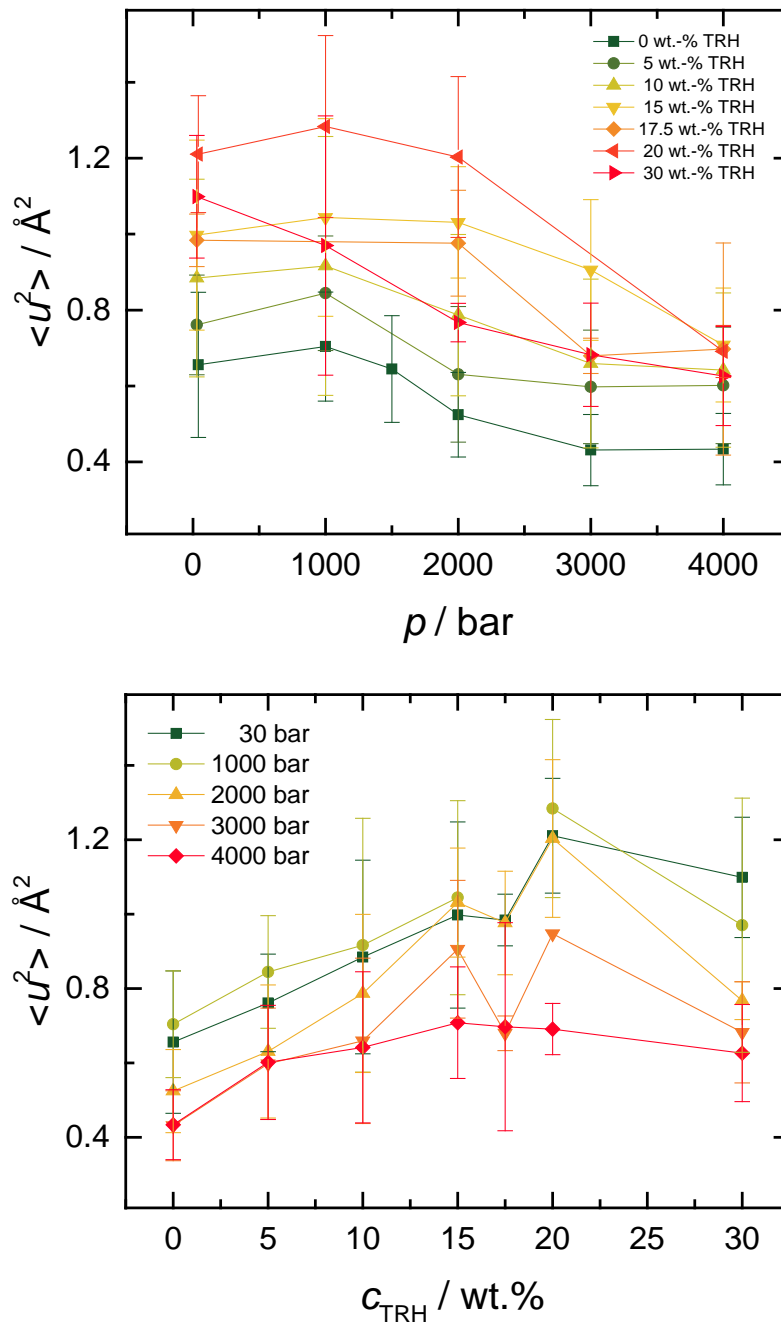


Abbildung 4.14: Druckabhängige Entwicklung der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) von 10 wt.% Lysozym in An- und Abwesenheit von Trehalose (A). Entwicklung der MSD mit steigender Trehalose-Konzentration bei ausgewählten Drücken (B). Die Verantwortlichkeit für die gezeigten Daten obliegt Paul Hendrik Schummel.

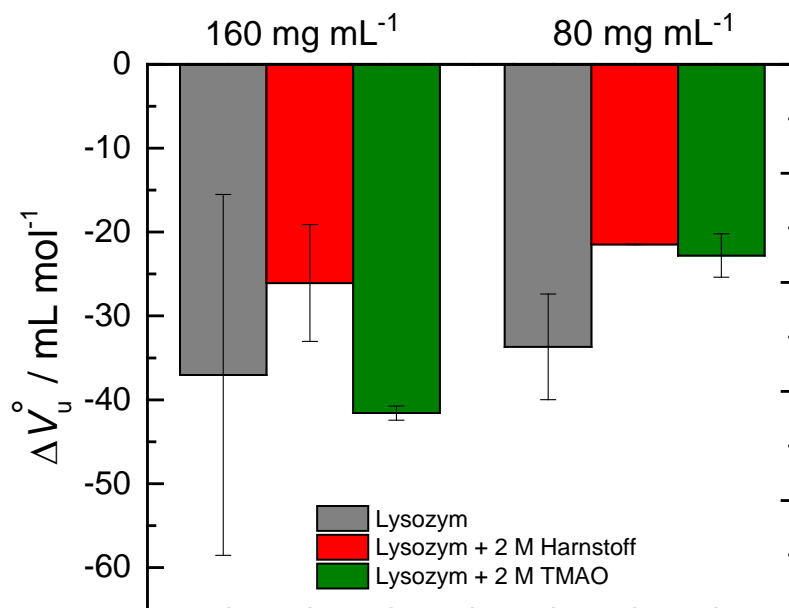


Abbildung 4.15: Entfaltungsvolumen von 80 mg mL⁻¹ und 160 mg mL⁻¹ Lysozym in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff.

5 Einfluss von Druckapplikation auf die Struktur und Dynamik des Komplexes zwischen Calmodulin und der hypervariablen Region von KRas4B

Teile der hier gezeigten Daten wurden publiziert in:

S. Cinar, **Samy Al-Ayoubi**, C. Sternemann, J. Peters, R. Winter, C. Czeslik, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2018**, 20, 3514-3522.

5.1 Einleitung

Das Calcium-Ionen bindende Protein Calmodulin (CaM) ist an der Regulation diverser zellulärer Signalwege beteiligt.²⁷³ Durch seine hohe Flexibilität ist es in der Lage, eine Vielzahl von Liganden zu binden.^{274,275} Calmodulin weist eine hantelförmige Struktur auf, wobei zwei kugelförmige Seitendomänen durch einen dynamischen Linker verbunden sind.^{276,277} Jede Seitendomäne enthält jeweils zwei EF-Hand-Motive, welche die Bindung von Ca^{2+} -Ionen ermöglichen.²⁷⁸ Calcium-freies apo-Calmodulin weist im Gegensatz zu Ca^{2+} -gebundenem holo-Calmodulin eine vergleichsweise geschlossene Konformation auf (siehe Abbildung 5.1). Die Strukturänderung im Rahmen des Bindens von Ca^{2+} -Ionen verursacht die Freilegung hydrophober und geladener Bereiche auf der Proteinoberfläche. Dadurch bindet holo-Calmodulin Liganden mit einer sehr viel höheren Affinität als apo-Calmodulin.^{276,279}

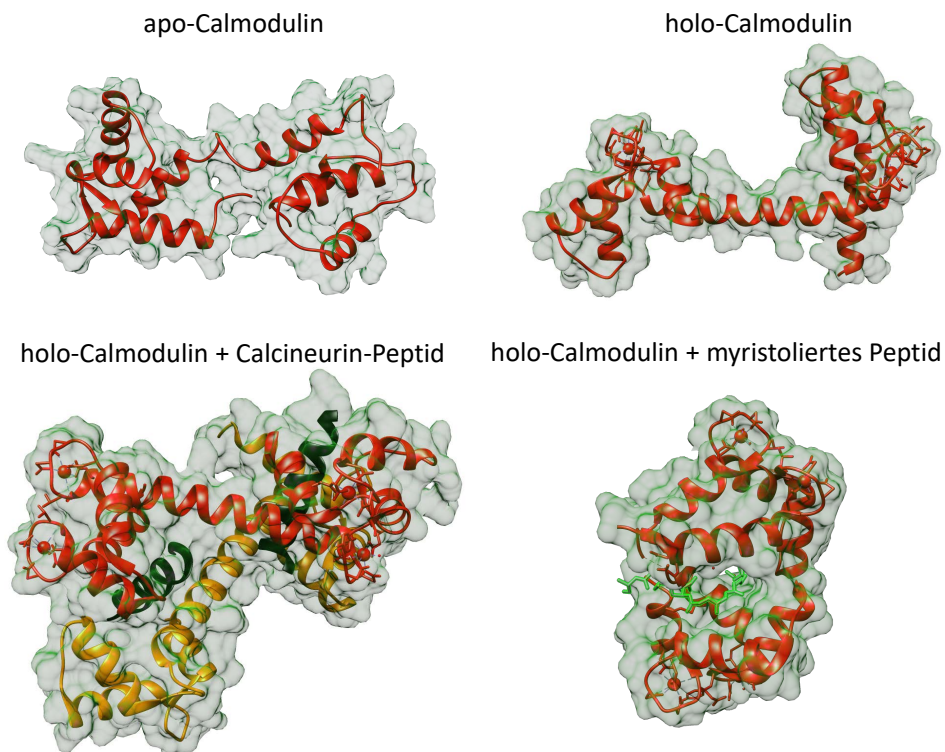


Abbildung 5.1: Strukturen von Calcium-freiem apo-Calmodulin, Calcium-gebundenem holo-Calmodulin sowie der Komplexe zwischen holo-Calmodulin mit einem myristolisiertem Peptid bzw. dem Calcineurin Bindungs-Peptid (pdb IDs:1CFD,²⁸⁰1CLL,²⁷⁸2R28,²⁸¹1LZ²⁸²). Die Abbildung wurde mit Chimera²⁵⁴ erstellt.

Calmodulin hat bei neutralem pH-Wert eine Nettoladung von -15.²⁸³ Zusätzlich weist es zwei hydrophobe Oberflächenregionen auf, welche die Bindung von Peptiden und Proteinen ermöglichen. Die Bindungspartner des Calmodulins weisen typischerweise hydrophobe Seitenketten auf und sind mehrfach positiv geladen.²⁸⁴ Ligandenbindung induziert zumeist eine Konformationsänderung von Calmodulin. Dabei umschließen die beiden kugelförmigen Seitendomänen den Liganden, wodurch in der Regel ein globulärer Komplex gebildet wird.^{278,283,285,286} Jedoch wurden auch X-förmige, dimere 2:1-Komplexe, beispielsweise zwischen Calmodulin und der Bindungsregion des Proteins Calcineurin^{281,287,288} oder dem Transkriptionsfaktor SEF2-1/E2-2²⁸⁹ beobachtet. Einen Überblick über mögliche Strukturen der Komplexe von Calmodulin mit Liganden liefert Abbildung 5.1.

Einer der zahlreichen Bindungspartner von Calmodulin ist das Protein KRas4B.^{290,291} Dieses Protein ist ein Vertreter der kleinen GTPasen und, aufgrund seiner Schalterfunktion in Signaltransduktionswegen, an der Regulation von Zell-Wachstum, -differenzierung und -tod beteiligt.²⁹² In 80% der Krebserkrankungen der Bauchspeicheldrüse liegt eine Mutation des KRas-Gens vor.²⁹³ Die Aktivität von KRas4B wird über ein Ca^{2+} -Signal durch Calmodulin gesteuert.^{290,291} Die Bindung von KRas4B an holo-Calmodulin wird durch dessen C-terminale Peptidsequenz ermöglicht. Diese wird auch als hypervariable Region (HVR) bezeichnet und enthält 8 Lysinreste, welche bei physiologischem pH-Wert positiv geladen sind, sowie einen hydrophoben Farnesyl-Rest.^{294,295}

Das Peptid, welches in dieser Studie zum Einsatz kam, entspricht den 12 terminalen Aminosäuren dieser hypervariablen Region (siehe Abb. 5.2). Um eine bessere Einordnung der gewonnenen Daten zu ermöglichen, sind zusätzlich Messungen mit dem Calmodulin-Inhibitor Trifluorperazin (TFP) gezeigt.* Dieser Antagonist wird als Antipsychotikum verwendet und unterdrückt beispielsweise die Aktivität von CamKII.^{296,297} Bei neutralem pH beträgt die Nettoladung von TFP +2, weiter

*Untersuchungen der Calmodulin-TFP-Wechselwirkungen sind ein Forschungsprogramm von Prof. Dr. C. Czeslik. Die in dieser Arbeit gezeigten Hochdruck-SAXS-Messungen wurden parallel an Calmodulin-TFP und Calmodulin-K-Ras4B(HVR)-Proben in Zusammenarbeit mit Dr. Süleyman Cinar durchgeführt, ausgewertet und interpretiert, wobei Dr. Cinar für die TFP-Proben und der Autor dieser Arbeit für die K-Ras4B(HVR)-Proben verantwortlich zeichnet.

5.2 Material und Methoden

Rekombinantes Wildtyp Calmodulin der Ratte wurde wie in Referenz³⁰⁰ beschrieben hergestellt. Der verwendete pET-14b Vektor wurde von GenScript (Piscataway, NJ, USA) und *E. coli* BL21-CondonPlus (DE3)-RIPL Zellen von Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) bezogen. Alle weiteren Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien offenbart Tabelle 5.1.

Tabelle 5.1: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien.

Substanz	Bezugsquelle
KRas4B-HVR-Peptid	Eurogentec (Searing, Belgien)
TFP	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
BisTris	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
MOPS	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
CaCl ₂	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
EGTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

5.2.1 Experimentelle Durchführung und Datenbearbeitung

Röntgenkleinwinkelstreuung

Für die SAXS-Messungen wurde eine Proteinkonzentration von 10 mg mL⁻¹ verwendet. Druckabhängige Messungen wurden in BisTris Puffer (pH = 6.6, 10 mM) durchgeführt, zusätzlich enthielt die Pufferlösung CaCl₂ (10 mM) und NaCl (150 mM). Für die Messungen an calciumfreien apo-Calmodulin enthielt der Puffer außerdem 5 mM EGTA, um die Entfernung von Calcium-Ionen zu garantieren.

Die druckabhängigen SAXS Messungen wurden an der Beamline BL9 des DELTA Synchrotrons (Dortmund, Deutschland) durchgeführt, die Detektion erfolgte durch einen mar345 *image Plate* Detektor. Die Wellenlänge betrug 1.24 Å. Die Kalibrierung erfolgte durch einen Silberbehenat-Standard. Die Integration der Rohdaten

erfolgte durch das Programm Fit2D.³⁰¹

Zusätzlich wurden temperaturabhängige SAXS-Messungen an dem SAXSess mc²-Instrument der Firma Anton Paar durchgeführt. Diese erfolgten in MOPS-Puffer unter ansonsten identischen Bedingungen zu den Messungen am DELTA-Synchrotron.

Von den gemessenen Streukurven wurde die Streukurve des Puffers (bei identischem Druck) als Hintergrund abgezogen. Die am SAXSess-Instrument generierten Daten wurden zusätzlich zur Korrektur der Linienkollimation entschmiert. Zur weiteren Auswertung der Daten wurde das ATSAS Software Package verwendet.³⁰² Durch das Programm GNOM¹⁵⁵ wurde die Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ aus der Streukurve $I(Q)$ erhalten (siehe Kapitel 2.1.1).

$$p(r) = \frac{r^2}{(2\pi)^3} \int_0^\infty I(Q) \frac{\sin(Qr)}{Qr} 4\pi Q^2 dQ \quad (5.1)$$

Der Gyrationradius R_G ergibt sich gemäß:

$$R_G^2 = \frac{\int_0^\infty r^2 p(r) dr}{2 \int_0^\infty p(r) dr} \quad (5.2)$$

Zur Berechnung von Streukurven aus Kristallstrukturdaten wurde das Programm Crysol verwendet.³⁰³

Die Generierung von *ab initio*-Strukturmodellen aus den experimentellen Daten erfolgte durch das Programm DAMMIF.¹⁵⁹ Dabei wurden mindestens 10 Strukturen erstellt, welche anschließend durch das Programm DAMAVER¹⁶⁰ gemittelt wurden. Die Überlagerung der gemittelten Strukturen mit Kristallstrukturen erfolgte durch das Programm SUPERCOMB.³⁰⁴

Elastisch inkohärente Neutronenstreuung

Die EINS-Messungen wurden in BisTris Puffer auf D₂O-Basis durchgeführt. Zusätzlich enthielt die Pufferlösung 30 mM CaCl₂ und 10 mM NaCl. Die Proteinkonzentration betrug hier 100 mg mL⁻¹. Die Messungen erfolgten an Instrument IN13 des Institut Laue Langevine.¹⁷⁶ Zur Auswertung wurde die Software LAMP des ILL verwendet. Die Messzeit betrug mindestens 7 Stunden pro Messpunkt. Die Behandlung der

Daten umfasste die Subtraktion des Hintergrundes bei entsprechendem Druck und eine Normierung auf den Vanadiumstandard. Dies erfolgte durch das Programm LAMP.²⁶⁰ Die Bestimmung der MSD erfolgte gemäß der Gauss-Näherung.¹⁷¹

$$I(Q, 0 \pm \Delta E) \approx I_0 \exp\left(-\frac{1}{3}Q^2 \langle u^2 \rangle\right) \quad (5.3)$$

Dynamische Lichtstreuung

Die DLS Messungen erfolgten in 20 mM MOPS Puffer (pH = 6.6), welcher zusätzlich 10 mM CaCl₂ und 150 mM NaCl enthielt. Die Calmodulin-Konzentration betrug 0.2 mM. Um Verunreinigungen und mögliche Aggregate aus der Lösung zu entfernen, wurde die Lösung durch Filter einer Porengröße von 0.02 μm gefiltert. Die Messungen erfolgten an dem Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Herrenberg). Der Diffusionskoeffizient D wurde gemäß 5.4 aus der Autokorrelationsfunktion $G(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle$ erhalten:

$$G(\tau) = A [1 + B \exp(2DQ^2\tau)] \quad (5.4)$$

Hierbei ist A die Basislinie der Autokorrelationsfunktion, B der *single exponential cumulant* und τ die Korrelationszeit. Der hydrodynamische Durchmesser d_h ergibt sich aus der Stokes-Einstein-Gleichung:

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (5.5)$$

Hier ist η die Viskosität der Lösung.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Einfluss von Druck auf die Struktur von apo- und holo-Calmodulin

Abbildung 5.3 zeigt die erhaltenen Streukurven sowie die entsprechenden Paarabstandsverteilungsfunktionen von apo- und holo-Calmodulin bei ausgewählten Drücken. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die approximierten Streukurven, welche durch indirekte Fourier-Transformation erhalten wurden. Die Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ liefert Hinweise über die Abstände r zwischen zwei Streuzentren innerhalb des Moleküls. Dabei ist $p(r)dr$ proportional zur Anzahl von Abständen zwischen r und $r + dr$ im Molekül. Der Schnittpunkt mit der r -Achse entspricht dem maximalen Abstand D_{\max} der Streuzentren.

Die Form der erhaltenen $p(r)$ -Funktionen von apo- und holo-Calmodulin ist charakteristisch für hantelförmige Proteine.¹⁵⁴ Dabei gibt das erste Maximum den Radius der C- und N-terminalen Domänen und das zweite Maximum den Abstand der beiden Domänen voneinander an.^{276,305} Es wurde eine leichte Druckabhängigkeit von $p(r)$ beobachtet. So steigt das zweite Maximum von $p(r)$ bei circa 4.5 nm mit steigendem Druck. Folglich nimmt die Anzahl größerer Abstände im Protein mit steigendem Druck zu. Dies spricht für eine partielle Entfaltung der Seitendomänen durch das Eindringen von Wasser in das Proteininnere. Weiterhin wurde eine Zunahme des Gyrationradius beobachtet. So steigt dieser von 2.16 nm bei 5 bar (Literaturwerte: 2.136 nm und 2.19 nm^{276,286}) auf 2.22 nm bei 3000 bar.

Ein ähnliches druckabhängiges Verhalten von $p(r)$ wurde ebenfalls für apo-Calmodulin beobachtet. Der Gyrationradius steigt dabei von 2.11 nm auf 2.22 nm. Der geringere Gyrationradius von apo-Calmodulin ist durch die höhere Flexibilität der C-terminalen Domäne in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen zu erklären.³⁰⁶

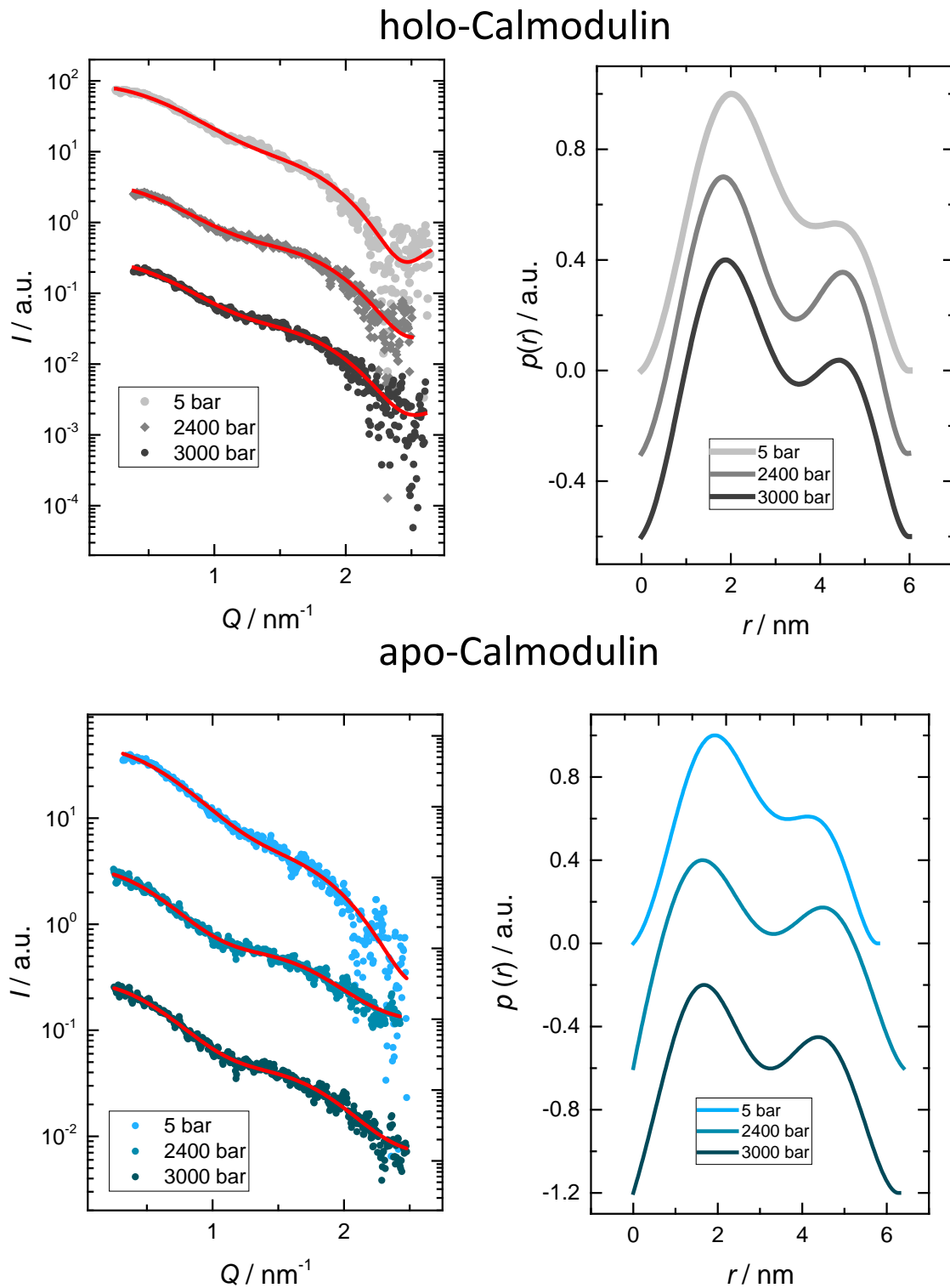


Abbildung 5.3: Streukurven (links) und normierte Paarabstandsverteilungsfunktionen (rechts) von holo-Calmodulin und apo-Calmodulin bei ausgewählten Drücken. Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassungen der experimentellen Daten durch indirekte Fouriertransformation dar.

Zur Veranschaulichung der Proteinstruktur wurden Strukturmodelle durch *ab initio*-Modellierung aus den experimentellen $I(Q)$ erstellt. Die berechneten *ab initio*-Strukturmodelle sind in Abbildung 5.4 gezeigt. Diese bestätigen die hantelförmige Konformation des Proteins über den gesamten untersuchten Druckbereich und können gut mit den entsprechenden Kristallstrukturdaten überlagert werden.

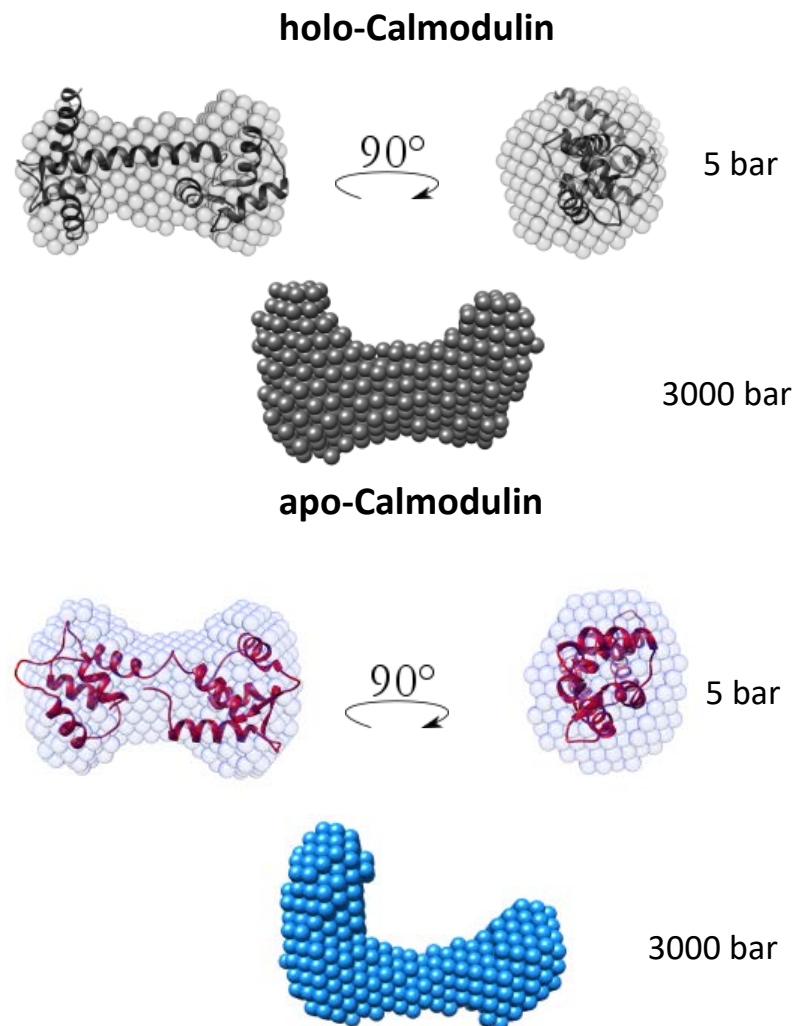


Abbildung 5.4: Durch DAMMIF erhaltene *ab initio*-Strukturmodelle von holo- und apo-Calmodulin bei 5 bar und 3000 bar. Die Strukturmodelle bei 5 bar wurden mit den entsprechenden Kristallstrukturen (PDB ID: 3CLN, 1LIN) überlagert. Die Abbildung wurde mit dem Programm Chimera erstellt.²⁵⁴

Einfluss von Druck auf die Struktur des Calmodulin-KRas4B-HVR-Komplexes

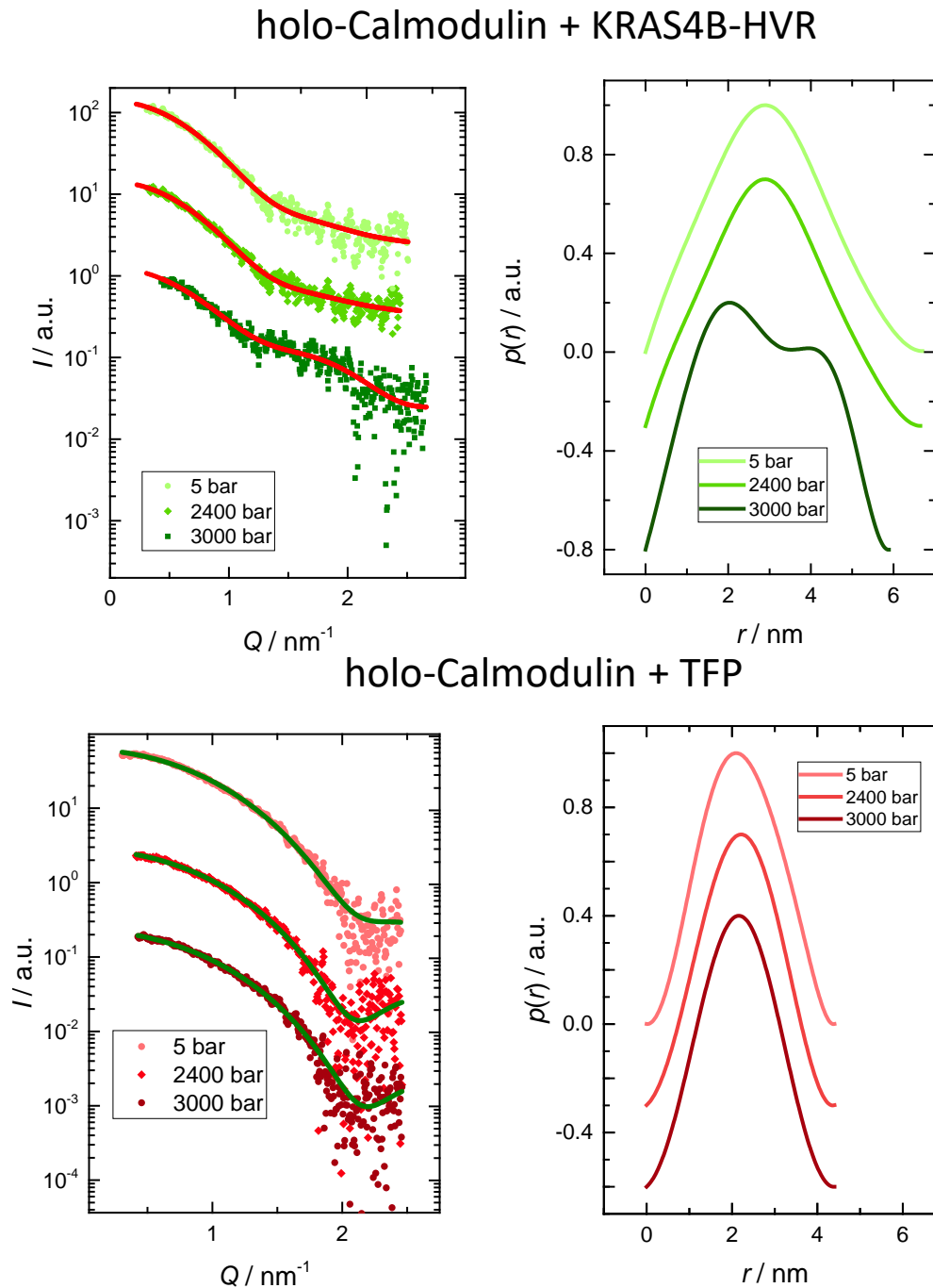


Abbildung 5.5: Streukurven (links) und normierte Paarabstandsverteilungsfunktion (rechts) des holo-Calmodulin-TFP-Komplexes und des holo-Calmodulin-KRas4B-HVR-Komplexes bei ausgewählten Drücken. Die durchgezogenen Linien stellen die entsprechenden Anpassungen der experimentellen Daten durch indirekte Fouriertransformation dar. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.

Die Streukurven und die dazugehörigen $p(r)$ -Funktionen der Komplexe von holo-Calmodulin mit dem KRas4B-HVR-Peptid und TFP sind in Abbildung 5.5 gezeigt. Die experimentellen Daten zeigen, dass sich die Form der Streukurven signifikant von den Streukurven der hantelförmigen Calmodulin-Spezies unterscheidet.

Die Streukurven der Komplexe von Calmodulin mit dem KRas4B-HVR-Peptid und mit TFP unterscheiden sich sowohl untereinander als auch von denen der hantelförmigen Spezies. Die Bindung der Liganden führt somit in beiden Fällen zu unterschiedlichen strukturellen Änderungen. Diese Strukturänderungen lassen sich durch Betrachtung der $p(r)$ -Funktionen genauer charakterisieren. So ist der Verlauf von $p(r)$ in Anwesenheit des KRas4B-HVR-Peptids nahezu symmetrisch. Dies lässt zunächst eine kugelförmige Geometrie vermuten, jedoch sind sowohl der erhaltene Gyrationradius mit $R_G=2.29$ nm, als auch der maximale Abstand im Molekül mit $D_{\max} = 7$ nm signifikant größer als in kugelförmigen Calmodulin-Komplexen. Bei 3000 bar weisen sowohl $I(Q)$ als auch $p(r)$ den für ein hantelförmiges Protein charakteristischen Verlauf auf. Weiterhin nimmt der Gyrationradius bei diesem Druck signifikant auf den Wert von holo-Calmodulin ab (siehe Abbildung 5.6). Dies lässt auf eine Dissoziation des Liganden in diesem Druckbereich schließen.

Die symmetrische Paarabstandsverteilungsfunktion des Calmodulin-TFP-Komplexes offenbart eine kugelförmige Struktur des Komplexes.¹⁵⁴ Der Gyrationradius sinkt in Rahmen der Druckapplikation von $R_G = 1.73$ nm bei 5 bar (Literaturwert: $R_G=1.76$ nm)²⁷⁶ auf $R_G = 1.65$ nm bei 3000 bar. Dies lässt auf eine leichte Kompression des Komplexes schließen. Die kugelförmige Struktur bleibt jedoch über den gesamten untersuchten Druckbereich erhalten. Eine druckinduzierte Dissoziation des Liganden findet somit nicht statt. Das Dissoziationsvolumen ist folglich nahezu null oder positiv. TFP bindet somit relativ kompakt an Calmodulin, d.h. es werden im Rahmen des Bindungsprozesses nur geringe *void volumes* ausgebildet. †

†Untersuchungen der Calmodulin-TFP-Wechselwirkungen sind ein Forschungsprogramm von Prof. Dr. C. Czeslik. Die in dieser Arbeit gezeigten Hochdruck-SAXS-Messungen wurden parallel an Calmodulin-TFP und Calmodulin-K-Ras4B(HVR)-Proben in Zusammenarbeit mit Dr. Süleyman Cinar durchgeführt, ausgewertet und interpretiert, wobei Dr. Cinar für die TFP-Proben und der Autor dieser Arbeit für die K-Ras4B(HVR)-Proben verantwortlich zeichnet.

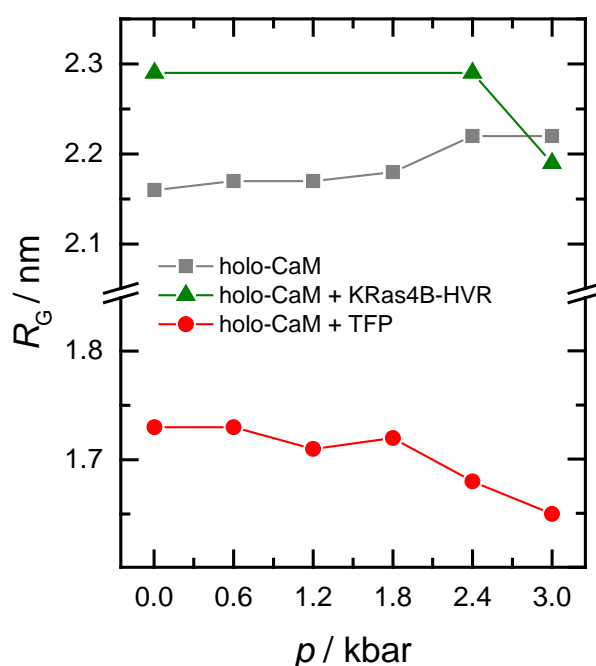


Abbildung 5.6: Druckabhängige Entwicklung des Gyrationradius von holo-Calmodulin in An- und Abwesenheit der untersuchten Liganden. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.

Neben der gängigen kugelförmigen Konformation von Calmodulin-Ligand-Komplexen wird in der Literatur auch von X-förmigen Dimer-Komplexen berichtet.^{281,287,288} Die genaue Struktur des Komplexes zwischen holo-Calmodulin und dem KRas4B-HVR-Peptid soll im Folgenden bestimmt werden. Dazu wurden zunächst *ab initio*-Modelle konstruiert. Die *ab initio*-Strukturmodelle des Calmodulin-KRAS4B-HVR-Peptid-Komplexes und des Calmodulin-TFP-Komplexes sind in Abbildung 5.7 gezeigt.

Aus diesen wird deutlich, dass das erhaltene Strukturmodell des Calmodulin-KRas4B-HVR-Peptid-Komplexes mit der Kristallstruktur des dimeren Komplexes zwischen Calmodulin und dem Calcineurin-Bindungseptid übereinstimmt. Dabei handelt es sich um ein X-förmiges Calmodulin-Dimer mit einer 2:2 Stöchiometrie.^{281,287,288} Weiterhin weist das Strukturmodell des Komplexes bei 3000 bar, im Einklang mit der $p(r)$ -Funktion, eine hantelförmige Konformation auf. Die *ab initio*-Modelle des Calmodulin-TFP-Komplexes bestätigen die kugelförmige Struktur des Komplexes bei 5 und 3000 bar.

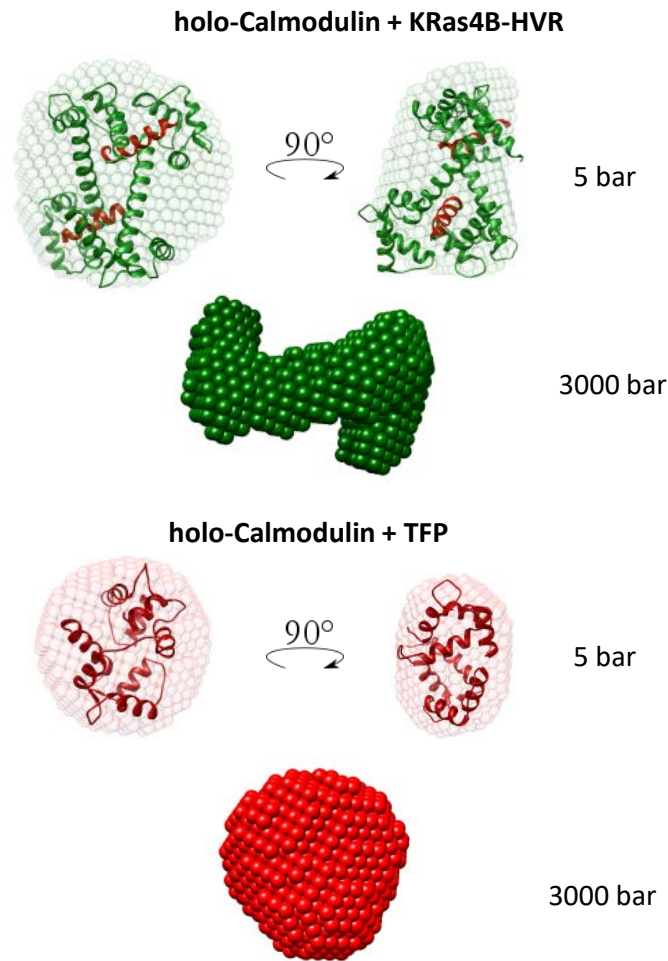


Abbildung 5.7: *Ab initio*-Strukturmodelle des holo-Calmodulin-KRas4B-Komplexes und des holo-Calmodulin-TFP-Komplexes bei 5 bar und 3000 bar. Die Strukturmodelle bei 5 bar wurden mit den Kristallstrukturen des holo-Calmodulin-TFP-Komplexes (pdb ID: 1LIN)³⁰⁷ und des holo-Calmodulin-Calcineurin-Komplexes (pdb ID: 2R28)²⁸¹ überlagert. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.

Um die Struktur des Calmodulin-KRas4B-Komplexes genauer zu untersuchen, wurden durch das Programm Crysol³⁰³ Streukurven aus den Kristallstrukturdaten von hantelförmigen holo-Calmodulin, einem kugelförmigen Komplex zwischen holo-Calmodulin und einem myrisolisiertem Peptid sowie dem X-förmigen dimeren Komplex zwischen Calmodulin und dem Calcineurin-Peptid bestimmt und den experimentellen Daten gegenübergestellt. Dies zeigt Abbildung 5.8. Dabei stimmt lediglich die berechnete Streukurve des Dimers mit den experimentellen Daten überein. Zusätzlich erfolgten Messungen unter identischen Bedingungen am SAXSess mc²-Instrument.

Auch hier konnte die Bildung des Dimers beobachtet werden.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der SAXS-Messungen somit darauf hin, dass Calmodulin bei einem Verhältnis von 1:1.5 einen X-förmigen Komplex mit dem KRas4B-HVR-Peptid bildet. Dieser Komplex dissoziiert bei 3000 bar, wo es aufgrund der *void volumes* der Zwischenfläche zur Dissoziation des Komplexes kommt und Calmodulin fortan in hantelförmiger Konformation vorliegt. Ob es ebenfalls zur Dissoziation des Peptids kommt, oder ob dieses immer noch an die hantelförmige Konformation gebunden ist, kann ausgehend von dieser Datenlage nicht beurteilt werden.

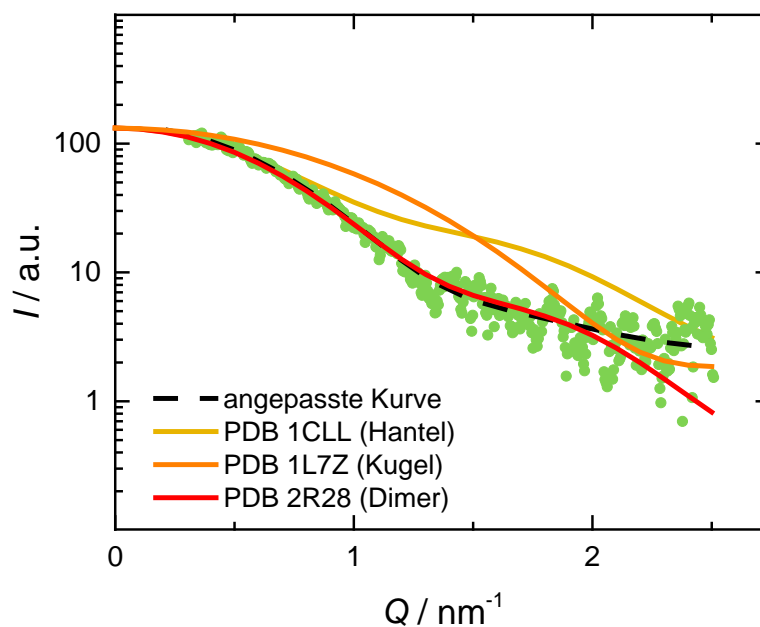


Abbildung 5.8: Experimentelle Streukurve des holo-Calmodulin-KRas4B-Komplexes bei 5 bar im Vergleich mit aus Kristallstrukturdaten berechneten Streukurven des hantelförmigen holo-Calmodulins (PDB ID: 1CLL), des kugelförmigen Komplexes zwischen Calmodulin und einem myrosiliertem Peptid (PDB ID: 1L7Z), sowie des dimeren Komplexes zwischen holo-Calmodulin und dem Calcineurin-Peptids (PDB ID: 2R28) sind als durchgezogene Linien gezeigt.

In der Literatur wird jedoch die Bildung eines kugelförmigen Komplexes mit einem Gyrationradius von $R_G = 1.96$ nm und einem maximalen Abstand von $D_{\max} = 4.8$ nm, d.h. mit ähnlichen Dimensionen wie der Calmodulin-TFP-Komplex berichtet.³⁰⁸ In dieser Studie betrug das Verhältnis von Calmodulin zum KRas4B-HVR-Peptid

1:10. Aus diesem Grund wurden SAXS-Messungen mit verschiedenen Konzentrationen des KRas4B-HVR-Peptids bei Umgebungsdruck durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 5.9 gezeigt. Bei einem Verhältnis von 1:1.5 wurde ebenfalls die $p(r)$ -Funktion des Dimers erhalten. Bei einem Verhältnis von 1:3.9 weisen die Streukurven jedoch einen anderen Verlauf auf und die Streukurven und Gyrationradien lassen auf einen kugelförmigen Komplex schließen. Weiterhin sind beide Komplexe bis zu Temperaturen von 85 °C stabil. Das molare Verhältnis zwischen Calmodulin und dem KRas4B-HVR-Peptid scheint somit die Struktur des gebildeten Komplexes zu bestimmen.

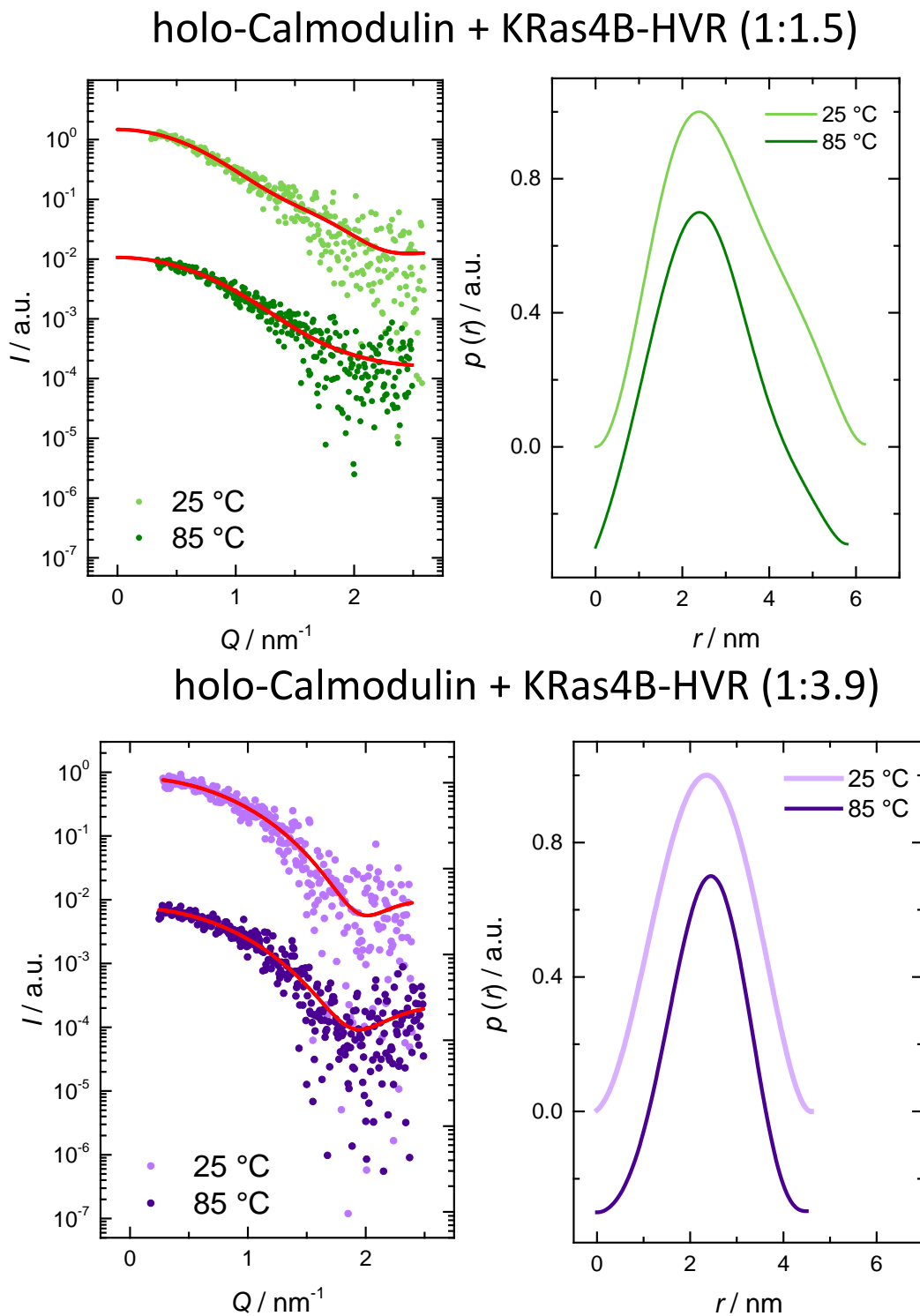


Abbildung 5.9: Einfluss des molaren Verhältnisses zwischen Calmodulin und dem KRas4B-HVR-Peptid auf die Streukurven und Paarabstandsverteilungsfunktionen des gebildeten Komplexes bei ausgewählten Temperaturen. Die durchgezogenen Linien stellen die entsprechenden Anpassungen der experimentellen Daten durch indirekte Fouriertransformation dar.

5.3.2 Validierung einer möglichen Dimer-Bildung durch Dynamische Lichtstreuung

Zusätzlich sollte eine mögliche Dimer-Bildung durch DLS-Messungen evaluiert werden. Außerdem konnte durch diese der Einfluss der durch Liganden induzierten Strukturänderungen auf die translationale Diffusion des Proteins ermittelt werden. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigt Abbildung 5.10.

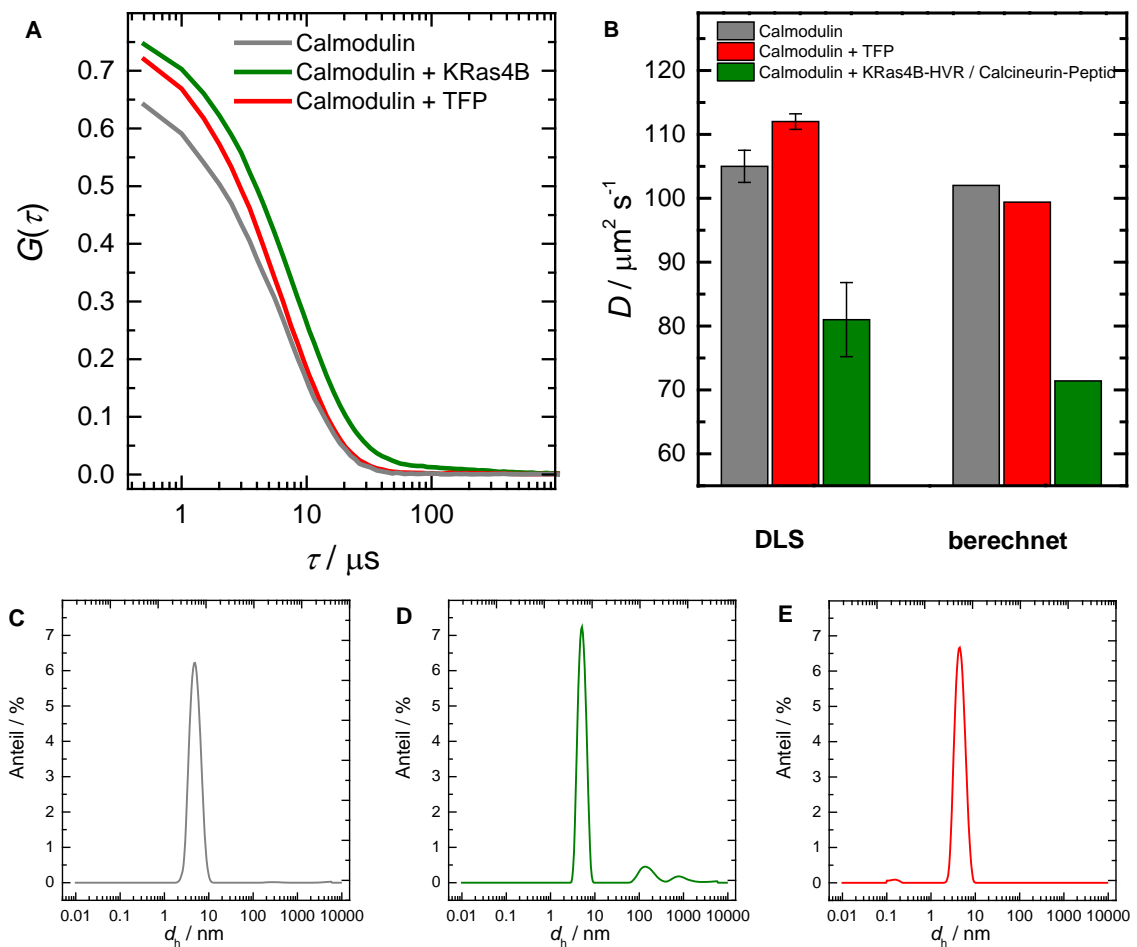


Abbildung 5.10: Autokorrelationsfunktionen (A) und gemessene sowie aus Kristallstrukturdaten berechnete Diffusionskoeffizienten (B) von holo-Calmodulin, sowie der Komplexe von holo-Calmodulin mit dem KRas4B-HVR-Peptid und dem Liganden TFP. Größenverteilungen der entsprechenden Messungen von holo-Calmodulin (C) holo-Calmodulin + KRas4B (D) und holo-Calmodulin + TFP (E). Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.

Für holo-Calmodulin wurde ein Diffusionskoeffizient von $D \approx 105 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ermittelt. Der Calmodulin-TFP-Komplex weist einen geringfügig höheren Wert auf, wohingegen der Komplex mit dem KRas4B-HVR-Peptid einen signifikant geringeren Diffusionskoeffizienten von $D \approx 80 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ aufweist. Jedoch ist zu beachten, dass diese Messung durch die Anwesenheit größerer Verunreinigung beeinflusst ist, wie die Größenverteilungen in Abbildung 5.10 zeigen. In der Literatur konnte durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie unter Dimer-Bedingungen ein Wert von $D \approx 90 \pm 12 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ermittelt werden.³⁰⁸ Unter Verwendung des Programms Hydropro wurden die Diffusionskoeffizienten aus Kristallstrukturdaten ermittelt.³⁰⁹ Dabei konnten vergleichbare Werte für den dimeren Komplex zwischen Calmodulin und dem KRas4B-HVR-Peptid erhalten werden. Die DLS-Messungen unterstützen somit die in den SAXS-Messungen beobachtete Dimer-Bildung. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass sich holo-Calmodulin und sein Komplex mit TFP nicht signifikant in der Translations-Dynamik unterscheiden. Es konnte außerdem kein signifikanter Unterschied zwischen dem Diffusionskoeffizienten des hantelförmigen Calmodulin und dessen kugelförmigen Komplex mit TFP festgestellt werden.

5.3.3 Einfluss von Druck auf die Proteindynamik von Calmodulin und Calmodulin-Ligand-Komplexen

Zusätzlich zu den SAXS-Messungen wurden EINS-Messungen durchgeführt, um den Einfluss der zuvor beobachteten strukturellen Änderungen auf die Proteindynamik zu untersuchen. Abbildung 5.11 zeigt die EINS Daten als Auftragung von $\ln I$ gegen Q^2 , sowie die linearen Anpassungen, aus welchen gemäß der Gauss-Näherung die MSD-Werte bestimmt wurden.

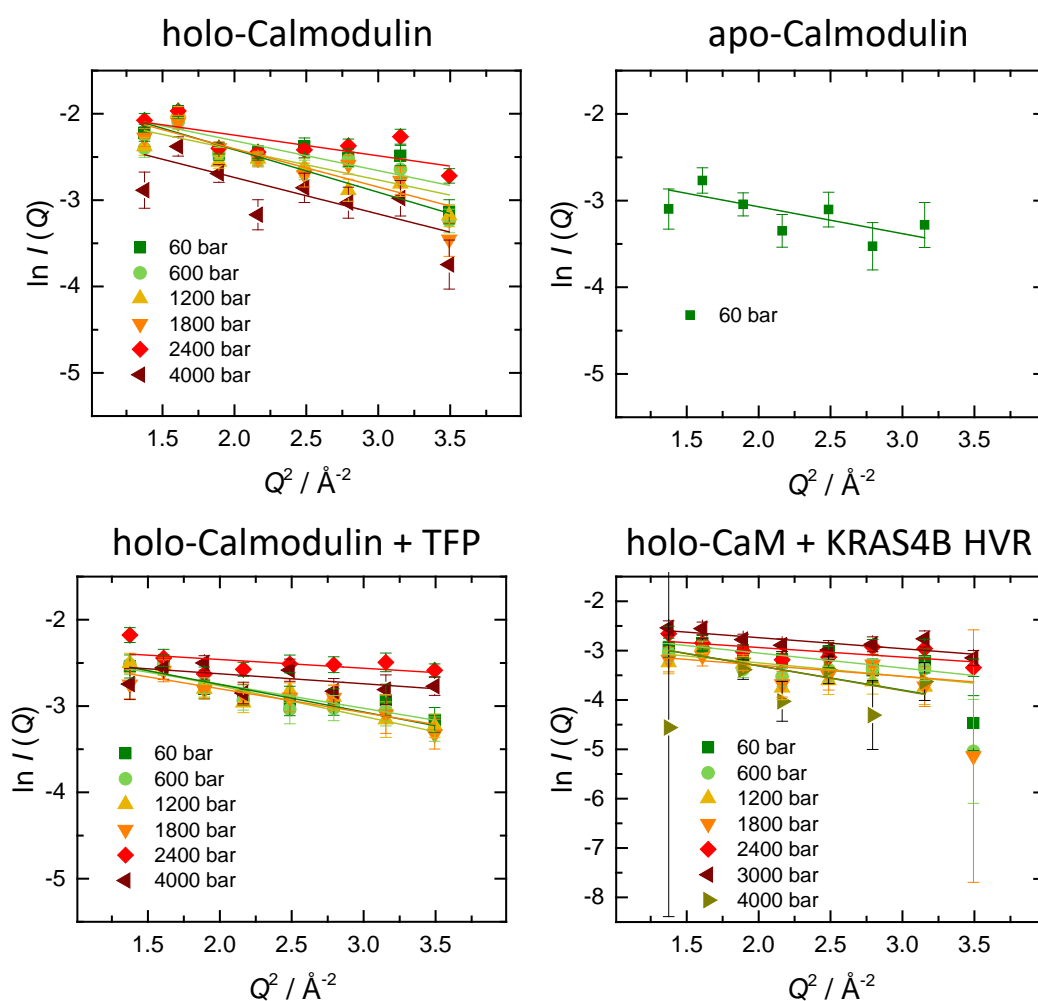


Abbildung 5.11: Semilogarithmische Auftragung der EINS Intensität als Funktion von Q^2 für holo-Calmodulin, apo-Calmodulin, den holo-Calmodulin-TFP-Komplex und den holo-Calmodulin KRas4B-HVR-Peptid-Komplex, bei verschiedenen Drücken. Die Linien stellen die Funktionsanpassungen dar, welche gemäß Gleichung (5.3) zur Bestimmung der MSD verwendet wurden. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.

Die druckabhängige Entwicklung der MSD-Werte ist in Abbildung 5.12 gezeigt. Die Daten zeigen, dass die zuvor beschriebenen strukturellen Änderungen, welche im Zuge der Liganden-Bindung stattfinden, keinen signifikanten Einfluss auf die Proteindynamik in dem hier untersuchten Zeitfenster haben. Bei 40 bar wurde sowohl für hantelförmiges apo- und holo-Calmodulin, als auch für den kugelförmigen Calmodulin-TFP-Komplex und für den X-förmigen Calmodulin-KRas4B-HVR-Peptid-Komplex ein Wert von $\langle u \rangle^2 \approx 0.9 \text{ \AA}^2$ erhalten. Somit zeigen diese Ergebnisse, dass weder das Binden von Liganden an Calmodulin, noch die damit einhergehende Konformationsänderung, die Proteindynamik in dem hier untersuchten Zeitfenster beeinflussen.

Drücke unterhalb von 2000 bar führen zu keiner signifikanten Änderung der MSD, Drücke über 2000 bar führen hingegen zu einer Abnahme der MSD. Dies kann auf das Eindringen von Wassermolekülen, welches bereits in den SAXS-Messungen beobachtet wurde, zurückgeführt werden. So führt das Füllen von *void volumes* zu einer erhöhten Packungsdichte, wodurch die Protein-Dynamik verringert wird.

Der holo-Calmodulin-KRas4B-HVR-Komplex zeigt, im Gegensatz zu den anderen Calmodulin-Spezies, eine Zunahme der MSD ab circa 3000 bar. Die SAXS-Messungen offenbarten die Dissoziation des dimeren Komplexes bei 3000 bar. Die Änderung ist nicht durch die Dissoziation des Dimers zu erklären, da in diesem Fall der Wert dem von holo-Calmodulin entsprechen würde. Es ist jedoch zu beachten, dass die MSD aller H-Atome in Lösung bestimmt wurde. Dies heißt, dass auch die Dynamik der H-Atome des Peptids zu den gemessenen MSD-Werten beitragen. Diese machen 8% der gesamten H-Atome in Lösung aus. Kommt es im Rahmen der Dissoziation des Komplexes zu einer Dissoziation des Peptids, so dürfte sich dessen Dynamik in Lösung stark von der im gebundenen Zustand unterscheiden, was wiederum den beobachteten Anstieg erklären könnte.

Untersuchungen der Calmodulin-TFP-Wechselwirkungen sind ein Forschungsprogramm von Prof. Dr. C. Czeslik. Die in dieser Arbeit gezeigten Hochdruck-SAXS- und EINS- Messungen wurden parallel an Calmodulin-TFP und Calmodulin-K-Ras4B(HVR)-Proben in Zusammenarbeit mit Dr. Süleyman Çınar durchgeführt, ausgewertet und interpretiert, wobei Dr. Çınar für die K-Ras4B(HVR)-Proben und der Autor dieser Arbeit für die TFP-Proben verantwortlich zeichnet.

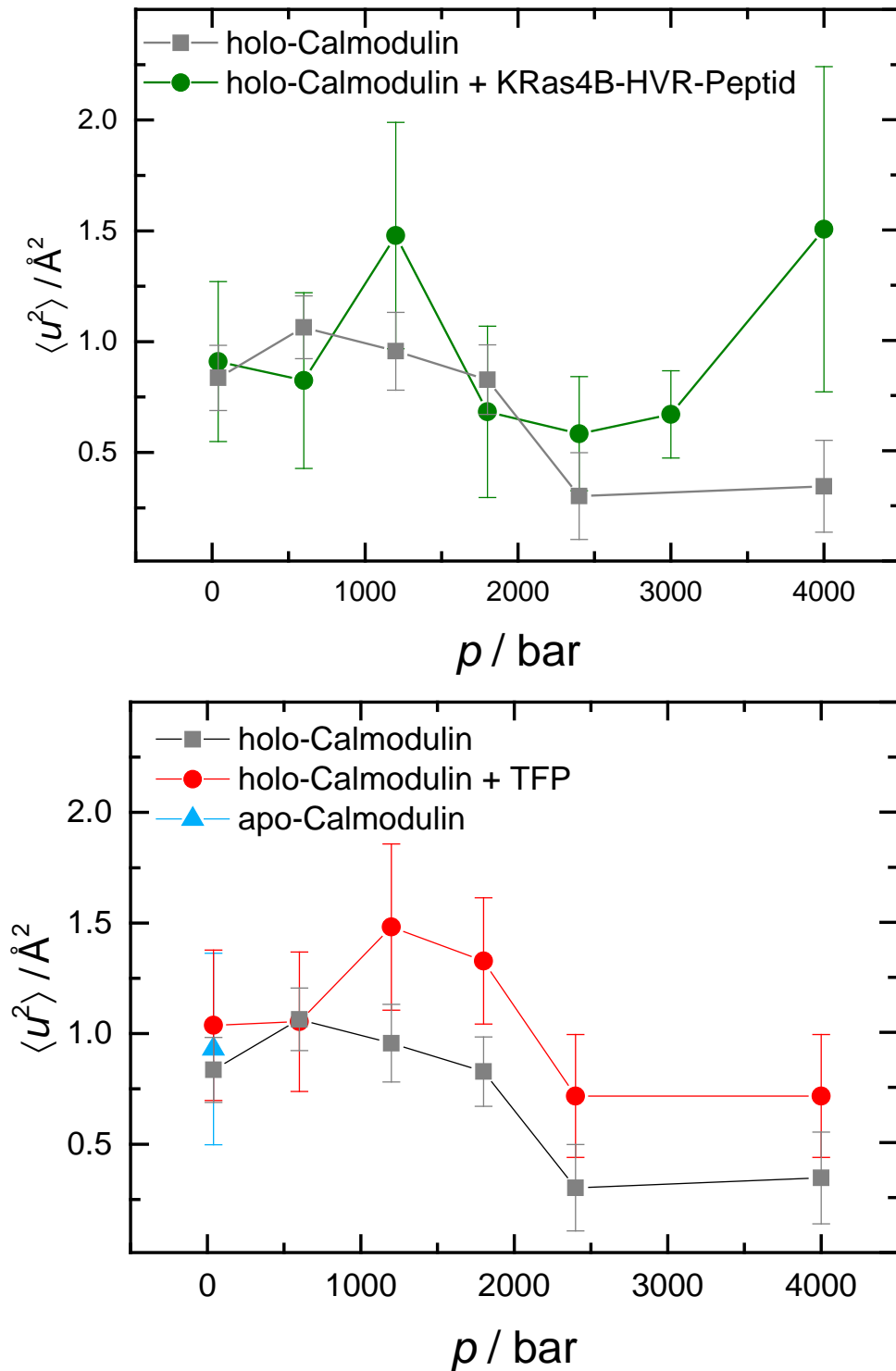


Abbildung 5.12: Druckabhängige Entwicklung der MSD von holo-Calmodulin, des holo-Calmodulin-TFP-Komplexes und des holo-Calmodulin KRas4B-HVR-Peptid-Komplexes bei verschiedenen Drücken, sowie die MSD von apo-Calmodulin bei 50 bar. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.

Weiterhin sind in Abbildung 5.13 die summierten elastischen Intensitäten gezeigt. Die Summierung erfolgte über den Q -Bereich der zur Bestimmung der MSD verwendet wurde.

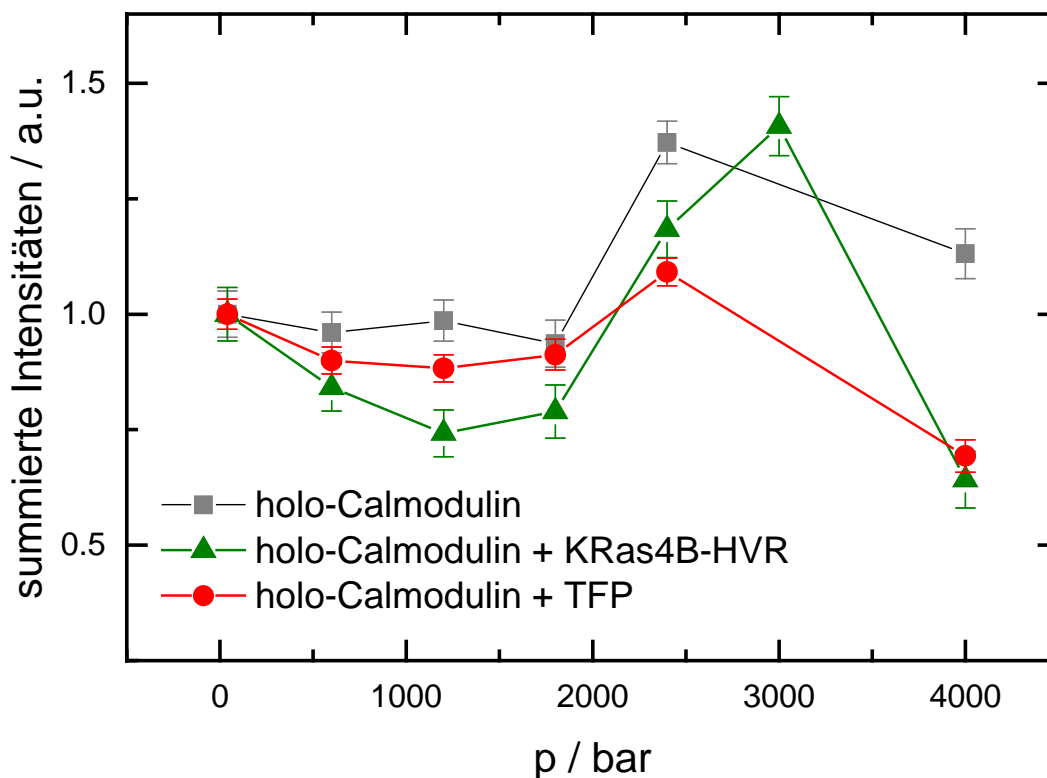


Abbildung 5.13: Elastische Intensitäten von holo-Calmodulin sowie dessen Komplexen mit dem KRas4B-HVR-Peptid und TFP. Die Werte wurden auf den bei 40 bar erhaltenen Wert normiert. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.

Da zur Bestimmung über den gesamten Q -Bereich normiert wurde, haben diese Werte verglichen zur MSD eine bessere Statistik. Der Absolutwert dieser Größe enthält keine Informationen über die Proteindynamik und wird hauptsächlich durch die Proteinmenge im Neutronenstrahl bestimmt. Aus diesem Grund wurden die Werte auf den Wert bei 40 bar normiert, um die druckabhängige Entwicklung der elastischen Intensität anschaulicher darzustellen. Die druckabhängige Entwicklung der Intensität ist dabei umgekehrt proportional zur druckabhängigen Entwicklung der MSD.¹⁶⁹

So lässt der Anstieg der elastischen Intensität bei 2000 bar auf die zuvor beobach-

tete Abnahme der Dynamik schließen. In Anwesenheit der Liganden konnte ebenfalls eine leichte Abnahme der elastischen Intensität, d.h. eine gesteigerte Dynamik bis 1200 bar beobachtet werden. Eine Zunahme der MSD ist ebenfalls angedeutet. Eine mögliche Erklärung ist eine Schwächung der Ligandenbindung in diesem Druckbereich, welche zu Fluktuationen führt. Auch hier können die H-Atome des Liganden zu den beobachteten Effekten beitragen. So kann die Schwächung der hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen dazu führen, dass diese weniger stabil an das Protein gebunden sind, was wiederum zu einer gesteigerten Dynamik führt. Dabei ist der Druckeinfluss auf den Calmodulin-KRas4B-HVR-Peptid-Komplex größer als auf den Komplex mit TFP. Dies lässt darauf schließen, dass die Bindung des synthetischen Liganden TFP an das Protein stabiler ist als diejenige des natürlichen Bindungspartners.

6 Einfluss von Osmolyten und Crowding auf die druckinduzierte Dissoziation und Deaktivierung von dimerer Alkoholdehydrogenase

Teile der hier gezeigten Daten wurden publiziert in:

K. Julius, **Samy R. Al-Ayoubi***, M. Paulus, M. Tolan and R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2018**, 20, 7093-7104.

*geteilte Erstautorenschaft

6.1 Einleitung

Alkoholdehydrogenasen katalysieren, unter Beteiligung des Coenzym NAD⁺ / NADH, die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden oder Ketonen sowie die entsprechende Rückreaktion.³¹⁰⁻³¹² Dies macht sie zu Schlüsselenzymen der alkoholischen Gärung und des Alkohol-Metabolismus. Weiterhin kommen sie im Rahmen industrieller Anwendungen, welche die Ethanoloxidation beinhalten, zum Einsatz.³¹³⁻³¹⁵ Somit sind genaue Kenntnisse der Aktivität und Stabilität dieser Proteine nicht nur von wissenschaftlicher, sondern auch von industrieller Relevanz.

In diesem Projekt erfolgten Untersuchungen an der Alkoholdehydrogenase der Pferdeleber (LADH). Dieses Enzym ist, im Gegensatz zur tetrameren Form aus Hefe, ein Dimer.³¹⁶ Jede Untereinheit des Dimers besteht aus zwei Domänen: einer Koenzymbindungsdomäne und einer katalytische Domäne und enthält ein strukturelles sowie ein katalytisches Zinkatom.^{317,318} Das Protein ist prolat, ellipsoid geformt, hat die Ausmaße 45 x 55 x 110 Å und ein Molekulargewicht von 80 kDa.^{317,319-324} Die Struktur des Proteins ist in Abbildung 6.1 gezeigt.

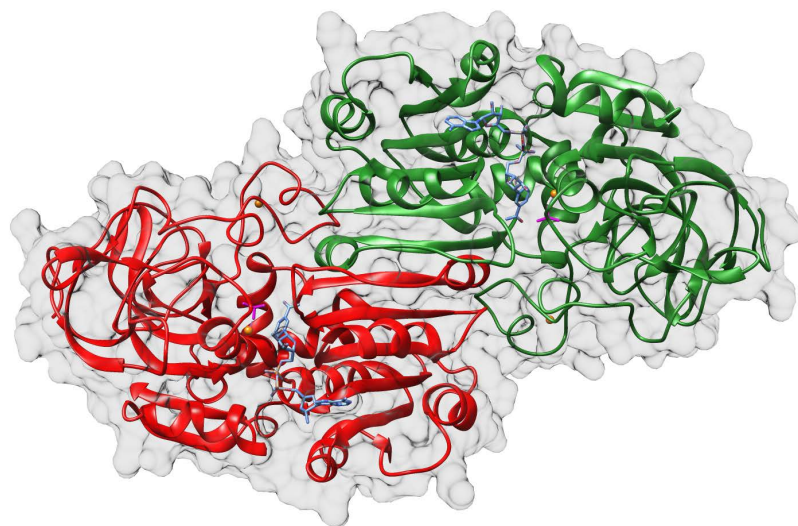


Abbildung 6.1: Struktur von LADH (pdb ID:6ADH)³²⁵ NAD⁺ ist blau, Zn²⁺ orange und DMSO magenta dargestellt. Erstellt mit Chimera.²⁵⁴

Vorherige Untersuchungen der Druckeffekte auf LADH untersuchten hauptsächlich die Effekte von Druckapplikation auf die Fluoreszenz- und Phosphoreszenz-Eigenschaften

der Tryptophanreste des Proteins. Dabei konnten bereits ausgeprägte Druckeffekte auf die Struktur des Proteins festgestellt werden. Eine Dissoziation des Proteins konnte in diesen Untersuchungen jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.^{326–328} Generell ist die durch Druck induzierte Dissoziation oligomerer Proteine jedoch ein bekanntes und mehrfach beschriebenes Phänomen.^{6,22–25,27–30,329–336} Als Folge der Dissoziation wurden mehrfach konformelle Änderungen des Monomers beobachtet, ein Phänomen, welches auch als *conformational drift* bezeichnet wird.^{22,23,28–30}

In der Zelle werden circa 30% des vorhandenen Volumens durch Makromoleküle eingenommen, wodurch der für das Biomolekül zur Verfügung stehende Raum eingeschränkt wird. Dieser als *Crowding* bezeichnete Effekt beeinflusst Struktur, Dynamik, Stabilität und Reaktivität biologischer Makromoleküle.^{134,136–139,141–145} Für weitere Hintergründe zum Thema *Crowding* siehe Kapitel 1.5. Osmolyte sind niedermolekulare Verbindungen, welche Organismen zur Kompensierung von Stressfaktoren, wie osmotischem und hydrostatischem Druck, Austrocknung und extremen Temperaturen synthetisieren.^{2,64,65} In diesem Projekt wurde der stabilisierende Osmolyt TMAO und das destabilisierende Abfallprodukt Harnstoff verwendet. Details zu Osmolyten können Kapitel 1.4 entnommen werden.

Um die Dissoziation des Proteins zu zeigen, wurden SAXS-Messungen an der Diamond Light Source (DLS, Didcot, UK) durchgeführt.[†] Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 6.2 gezeigt. Die experimentell bestimmten Gyrationenradien liegen bei Atmosphärendruck signifikant über dem theoretisch berechneten Wert des Dimers. Dies lässt auf die Anwesenheit höherer Oligomere bzw. loser Protein-Cluster schließen. Die Anwesenheit höherer Oligomere, welche sich unmittelbar nach Filtration bilden, wurde ebenfalls durch DLS-Messungen (siehe Ergebnisse und Diskussion) bestätigt. Diese Cluster dissoziieren, wie der drastische Abfall des Gyrationenradius zeigt, bereits unterhalb von 1000 bar. Ab diesem Druck nimmt das Protein die dimere Konformation an. Die Dissoziation der Dimere beginnt bei circa 2000 bar, ersichtlich aus der erneuten Abnahme des Gyrationenradius. Bei 3500 bar beträgt der

[†]Die hier gezeigten druckabhängigen SAXS-Messungen an LADH sind ein Forschungsprojekt von K. Julius, welcher die Verantwortlichkeit für die gezeigten Daten obliegt. Die experimentelle Durchführung der Messungen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Autor.

Volumenanteil des Monomers 34%.

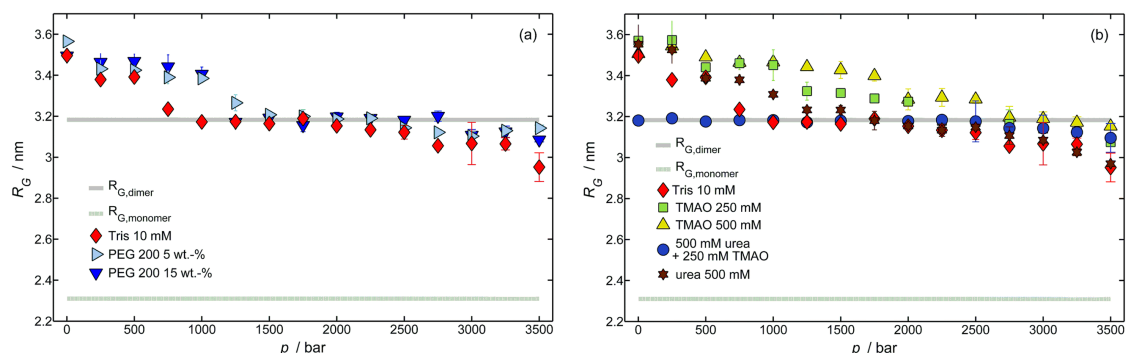


Abbildung 6.2: Druckabhängige Entwicklung des Gyrationradius von 0.7 wt.% LADH in An- und Abwesenheit von PEG 200 (a) sowie von Osmolyten (b). Die theoretischen Gyrationradien des Dimers und des Monomers sind als graue Linien dargestellt. Die Verantwortlichkeit für die gezeigten Daten obliegt K. Julius. Abbildung modifiziert nach Referenz.³³⁷

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Osmolyte und *Crowding* sowohl die Dissoziation der Protein-Cluster, als auch diejenige des Dimers beeinflussen. So stabilisieren PEG 200 und TMAO sowohl höhere Oligomere als auch die dimere Konformation gegen die druckinduzierte Dissoziation. Die Bildung von Protein-Zusammenlagerungen durch makromolekulares *Crowding* aufgrund des *excluded volume*-Effekts ist ein mehrfach beschriebenes Phänomen.^{338–340} In Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff konnte hingegen kein signifikanter Einfluss auf das druckabhängige Verhalten des Gyrationradius beobachtet werden.³³⁷

Um die druckinduzierte Dissoziation sowie deren Beeinflussbarkeit durch Osmolyte und makromolekulares *Crowding* genauer zu charakterisieren, wurden FTIR-spektroskopische Messungen durchgeführt. Durch diese sollte evaluiert werden, inwieweit die beobachteten Änderungen des Oligomerisierungsgrades zu einer Änderung der Sekundärstruktur des Proteins führen und ob diese durch Osmolyte beeinflusst werden können.

Zusätzlich sollten strukturelle Änderungen durch Messungen der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz sowie der Fluoreszenz des extrinsischen Fluorophors ANS

ergründet werden. Dieser Fluorophor bindet an hydrophobe Bereiche an der Proteinoberfläche und an hydrophobe Taschen im Proteininneren.¹⁹¹ Sowohl ANS als auch dessen dimere Form bis-ANS kamen bereits in einer Reihe von Studien zur druckinduzierten Dissoziation oligomerer Proteine zum Einsatz.^{327,331,341,342}

Abschließend wurde durch Messungen der enzymatischen Aktivität ergründet, inwieweit durch Druck induzierte Änderungen der Proteinstruktur bzw. des Oligomerisierungsgrades mit einer Änderung der enzymatischen Aktivität einhergehen. Auch hier wurde der Einfluss von Osmolyten und makromolekularem Crowding untersucht. Im Allgemeinen sind sowohl Osmolyte^{69,70,81,343,344} als auch Druckapplikation^{343,345} und Änderungen des Oligomerisierungsgrades³⁴⁶⁻³⁴⁸ effektive Werkzeuge um die enzymatische Aktivität gezielt zu beeinflussen.

Um das System und dessen Aggregationsverhalten genauer zu charakterisieren wurden abschließend temperaturabhängige FTIR-, Fluoreszenz- und SAXS-Messungen durchgeführt.

6.2 Material und Methoden

Die Bezugsquelle der verwendeten Chemikalien zeigt Tabelle 6.1

Tabelle 6.1: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien.

Substanz	Bezugsquelle
Alkoholdehydrogenase (aus Pferdeleber)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
TRIS	Sigma (St. Louis, MO, USA)
MOPS	Sigma (St. Louis, MO, USA)
TMAO	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Harnstoff	Sigma (St. Louis, MO, USA)
¹³ C Harnstoff	Sigma (St. Louis, MO, USA)
PEG 200	Sigma (St. Louis, MO, USA)
1-Anilino-naphthalene-8-sulfonat (ANS)	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
NAD ⁺	Alfa Aesar (Darmstadt, Deutschland)
D ₂ O	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trehalose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

6.2.1 Probenpräparation

Für druckabhängige Messungen wurde 10 mM TRIS-Puffer, für temperaturabhängige Messungen 10 mM MOPS-Puffer mit einem pH Wert von 8.5 verwendet. Um höhere Aggregate aus der Lösung zu entfernen, wurden die Proteinlösungen unmittelbar vor der Messung durch Filter einer Porengröße von 0.2 μm gereinigt. Die Proteinkonzentration nach Filtrierung wurde UV-spektroskopisch zu circa 0.7 wt.% bestimmt.

6.2.2 Experimentelle Durchführung und Datenbearbeitung

FTIR-Spektroskopie

Die FTIR-spektroskopischen Messungen erfolgten in Puffern auf D₂O-Basis. Der pD der Lösung wurde durch Addition von 0.4 zur pH-Meter Anzeige eingestellt.²⁵⁶ Vor den Messungen wurde ein HD-Austausch durchgeführt. Dazu wurde das Protein in

D₂O gelöst, für einige Stunden bei 4 °C gelagert und anschließend lyophilisiert. Eine Erhitzung der Probe wurde aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Proteins nicht durchgeführt. Um eventuell gebundenes Wasser von den Osmolyten und vor allem von den hygroskopischen PEG-Spezies zu entfernen, wurden diese ebenfalls in D₂O gelöst und anschließend lyophilisiert. Um ein ausreichendes Signal zu erhalten, sowie um den Einfluss der Wasserkontamination möglichst gering zu halten, wurde eine Konzentration von 2 wt.% (nach Filtration) verwendet.

Druckabhängige Messungen erfolgten in einem Nicolet Magna FTIR-Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) in einer VivoDAC Diamantstempelzelle (Almax EasyLab, Diksmuide, Belgien). Temperaturabhängige Messungen in einem Nicolet 6700 FTIR-Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland). Beide Spektrometer verfügen über einen stickstoffgekühlten MCT-Detektor und wurden kontinuierlich mit getrockneter Luft gespült. In beiden Fällen betrug die Äquilibrationszeit 5 min, jedes Spektrum bestand aus 126 Interferometerscans.

Die Auswertung erfolgte analog zu Abschnitt durch das Programm GRAMS AI 8.

Die temperaturabhängige Entwicklung des Flächenanteils f einer Subbande kann, unter Annahme eines Zweizustandmodells und eines reversiblen Übergangs, gemäß (6.1) und 6.2 beschrieben werden:

$$f(T) = \frac{f_f - f_u}{1 + \exp\left(-\frac{\left(\frac{1}{T_{\text{trans}}} - \frac{1}{T}\right) \Delta H_{\text{trans}}^{\circ}}{R}\right)} + f_u \quad (6.1)$$

$$f(p) = \frac{f_f - f_u}{1 + \exp\left(-\frac{(p - p_u) \Delta V_u^{\circ}}{RT}\right)} + f_u \quad (6.2)$$

Fluoreszenz-Spektroskopie

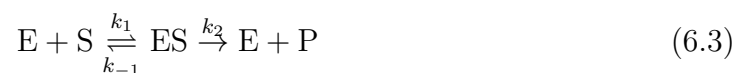
Für die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurde eine Konzentration von 0.7 wt.% LADH (nach Filtration) verwendet. Für Messungen der ANS-Fluoreszenz

wurde ANS hinzugegeben, um ein molares Verhältnis von 1:6 zu erhalten. Die Messungen erfolgten in einem K2 Multifrequency Cross Correlation Phase and Modulation Spektrometer der Firma ISS (Champaign, ILL, USA) in einer ebenfalls von ISS bezogenen Hochdruckzelle. Die Anregungswellenlängen für die Messung der Tryptophan-, bzw. ANS-Fluoreszenz betragen 295 nm bzw. 350 nm.

Die Spektren der Tryptophan-Fluoreszenz wurden auf eine Fläche von eins normiert. Die Spektren der ANS-Fluoreszenz wurden auf die Fläche des Spektrums bei 100 bar normiert. Um den Einfluss intrinsischer Druckeffekte auf die Fluoreszenz zu korrigieren, wurden ebenfalls Spektren von *N*-Acetyl-*L*-Tryptophanamid (NATA) und von ANS in einer 90 %igen DMSO (Dimethylsulfoxid)-Lösung gemessen. DMSO wurde als Lösungsmittel gewählt, da die Fluoreszenzeigenschaften von ANS stark von der Polarität der Umgebung abhängen. In 90 % DMSO konnte ein mit dem Spektrum in Anwesenheit von LADH vergleichbares Spektrum erhalten werden. Um die intrinsischen Druckeffekte zu kompensieren, wurde die Fluoreszenzintensität durch diejenige von NATA bzw. ANS in DMSO bei entsprechendem Druck dividiert.

Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Für die *stopped flow*-Messungen der Enzymkinetik wurde eine Proteinkonzentration von 18 nM verwendet. Die NAD^+ -Konzentration betrug 0.8 mM. Es wurden Ethanol-Konzentrationen zwischen 1 und 600 mM (alle Konzentrationen bezogen auf die Reaktionszelle) vermessen. Die Messungen erfolgten in einem HPSF-56 Instrument der Firma HiTech Scientific. Die Bildung von NADH wurde durch die zeitabhängige Aufnahme der Absorbanz bei 340 nm verfolgt. Die Messungen erfolgten nach einer Äquilibrationszeit von 5 min. Die Messzeit lag zwischen 500 s und 2500 s. Die Auswertung erfolgte gemäß der Michaelis-Menten-Kinetik. Dabei erfolgt die Bildung des Produktes P über die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes ES mit den angegebenen Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_{-1} und k_2 . Die Hintergründe können Abschnitt 1.2.3 entnommen werden.



Für v_0 ergibt gilt:

$$v_0 = \frac{dc_P}{dt} = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_m + c_S} \quad (6.4)$$

Hier sind c_S und c_P die Konzentrationen von Produkt und Substrat bei der Zeit t . Für die Michaelis-Konstante gilt: $K_m = (k_{-1} + k_2)k_1^{-1}$. Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit v_0 wurde durch lineare Regression der zeitabhängigen Entwicklung der Absorbanz bei 340 nm bestimmt. Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_m und $k_{\text{cat}} = k_2 = v_{\max} \cdot c_{E0}^{-1}$ erfolgte durch Approximation der experimentellen Konzentrationsabhängigkeit von v_0 gemäß Gleichung (7.3)

Dynamische Lichtstreuung

Messungen der Dynamischen Lichtstreuung erfolgten an einem Zetasizer Nano Series Instrument der Firma Malvern Instruments (Herrenberg). Aus der Autokorrelationsfunktion $G(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle$ wurde gemäß Gleichung (6.5) der Diffusionskoeffizient D erhalten.

$$G(\tau) = A [1 + B \exp(2DQ^2\tau)] \quad (6.5)$$

Hierbei ist A die Basislinie der Autokorrelationsfunktion, B der *single exponential cumulant* und τ die Korrelationszeit. Der hydrodynamische Durchmesser d_h ergibt sich unter der Annahme einer kugelförmigen Geometrie aus der Stokes-Einstein-Gleichung:

$$d_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (6.6)$$

Die Größenverteilung zeigt die relative Intensität des von Partikeln einer bestimmten Größe gestreuten Lichtes. Die Bestimmung der Volumenverteilung erfolgte basierend auf der Mie-Theorie.

Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Temperaturabhängige SAXS-Messungen erfolgten an einem SAXSess mc²-Instrument der Firma Anton Paar. Die Datenbearbeitung umfasste eine Hintergrundkorrektur und das Entschmieren der experimentellen Daten. Zur weiteren Auswertung der Daten wurde das ATSAS Software Package verwendet.³⁰² Die Paarabstandsvertei-

lungsfunktion $p(r)$ wurde aus der Streukurve $I(Q)$ erhalten (siehe Kapitel 2.1.1):

$$p(r) = \frac{r^2}{(2\pi)^3} \int_0^\infty I(Q) \frac{\sin(Qr)}{Qr} 4\pi Q^2 dQ \quad (6.7)$$

Der Gyrationradius R_G ergibt sich gemäß:

$$R_G^2 = \frac{\int_0^\infty r^2 p(r) dr}{2 \int_0^\infty p(r) dr} \quad (6.8)$$

6.3 Ergebnisse und Diskussion

6.3.1 Dynamische Lichtstreuung

Da die eingangs erwähnten SAXS-Messungen die Anwesenheit höherer Oligomere offenbarten, wurde die Größenverteilung von LADH-Oligomeren nach Filtration durch DLS charakterisiert. Dazu wurden Filter einer Porengröße von 200 nm und 20 nm verwendet.

Sowohl die Intensitäts- als auch die Volumenverteilungen des hydrodynamischen Durchmessers d_h sind in Abbildung 6.3 gezeigt.

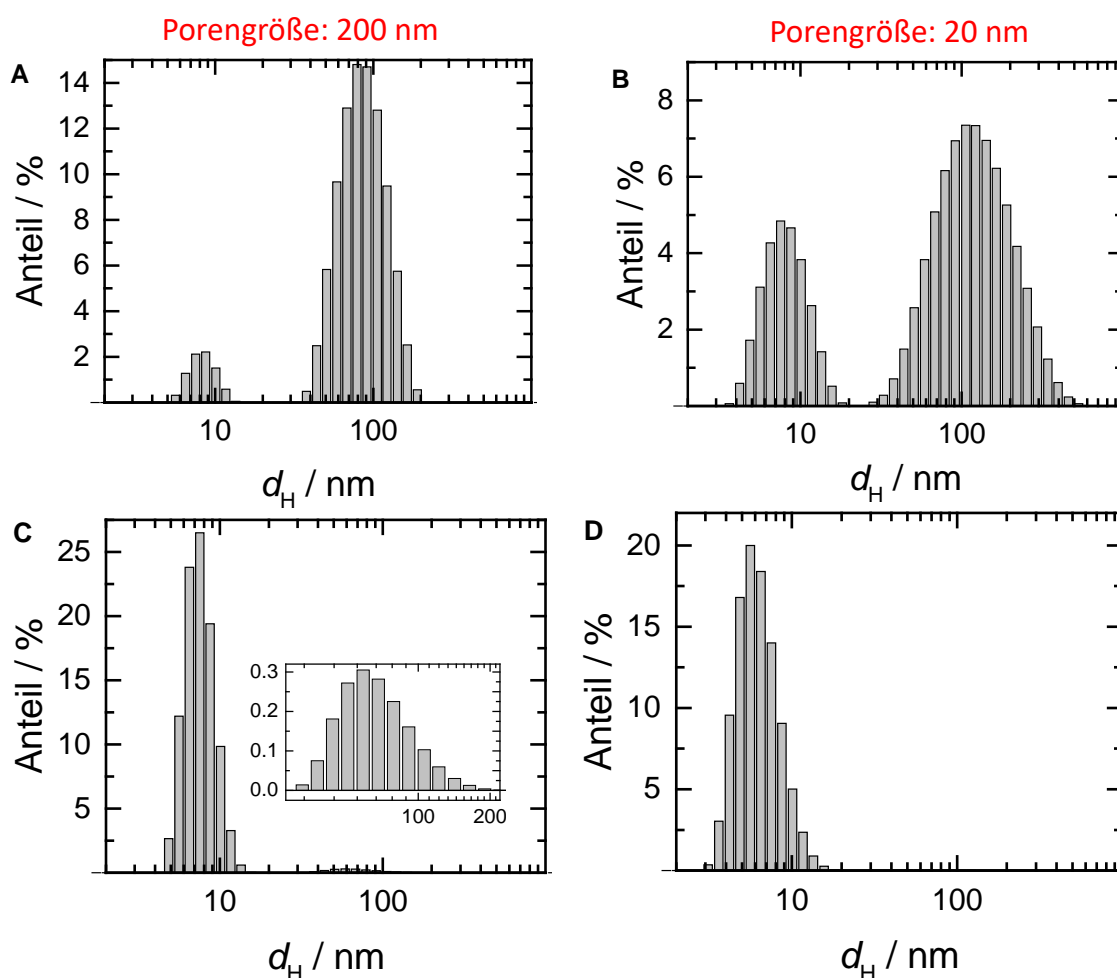


Abbildung 6.3: Durch dynamische Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung (hydrodynamischer Durchmesser) von LADH nach Filtration durch Filter mit einem Porendurchmesser von 200 nm (A,C) und 20 nm (B,C). Gezeigt sind die Intensitätsverteilungen (A,B) und die Volumenverteilungen (C,D).

Die Intensitätsverteilungen offenbaren, dass selbst bei Verwendung eines Porendurchmessers von 20 nm, die Anwesenheit von Aggregaten mit einem hydrodynamischen Durchmesser von $d_h \approx 100$ nm unmittelbar nach erfolgter Filtration. Der hydrodynamische Durchmesser des Dimers beträgt circa 8 nm, in der Literatur wird ein Wert von 11 nm angegeben.³⁴⁹ Die DLS-Messungen zeigen somit, dass ein geringer Anteil an höheren Oligomeren nach der Filtration ausgebildet wird.

Bei der Interpretation der Daten ist zu beachten, dass innerhalb des Rayleigh-Gesetzes die gestreute Intensität proportional zu d^6 ist, d.h. dass bereits eine geringe Anzahl an signifikant größeren Partikeln einen großen Einfluss auf die gestreute Intensität ausübt.¹⁷⁷ Aus diesem Grund wurde ebenfalls die Volumenverteilung bestimmt. Diese zeigt, dass die Anzahl dieser Protein-Cluster vergleichsweise gering ist.

6.3.2 FTIR-Spektroskopie

Abbildung 6.4 zeigt ein charakteristisches Beispiel für ein Fourier-selbstentfaltetes Spektrum der Amid-I'-Bande von LADH, deren zweite Ableitung, sowie die Approximation der experimentellen Daten inklusive der unterliegenden Subbanden.

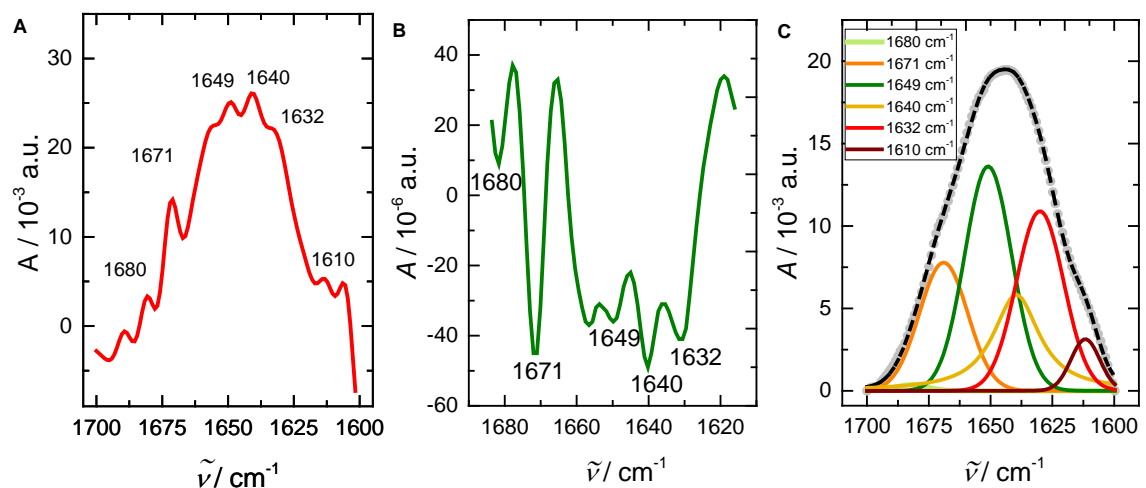


Abbildung 6.4: Repräsentatives Beispiel einer Fourier-selbstentfalteten Amid-I'-Bande, der zweiten Ableitung der Bande sowie die Approximation der experimentellen Daten mit den unterliegenden Subbanden. Alle gezeigten Banden wurden hintergrund- und basislinienkorrigiert sowie auf die Fläche normiert.

Eine mögliche Zuordnung der Subbanden zu bestimmten Sekundärstrukturelementen zeigt Tabelle 6.2.

Tabelle 6.2: Mögliche Zuordnung der ermittelten Subbanden von LADH zu bestimmten Sekundärstrukturelementen.

Wellenzahl	Sekundärstrukturelement
$1610 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$	intermolekulare β -Faltblätter
$1632 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$	intramolekulare β -Faltblätter
$1640 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$	ungeordnete Strukturen
$1649 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$	α -Helix
$1671 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$	Turn-Strukturen
$1680 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$	intermolekulare β -Faltblätter

Die Ergebnisse der Sekundärstruktur-Analyse zeigt Abbildung 6.5. Der Anteil an α -Helix-Strukturen liegt demgemäß bei ca. 30 %, wohingegen β -Faltblattstrukturen einen Anteil von 27% ausmachen. Dies steht im Einklang mit Kristallstrukturdaten (pdb ID: 1HLD),³¹⁸ welche einen Helix-Anteil von 30 % und einen β -Faltblatt-Anteil von 25 % angeben.

Druckapplikation führt zu einer leichten Abnahme des α -helicalen Anteils um 3-4 %. Diese Abnahme geht mit einer Zunahme des Anteils intramolekularer β -Faltblatt-Strukturen um 4-5 % einher. Der Anstieg der β -Faltblatt-Strukturen erfolgt zwischen 2000 bar und 4000 bar. Weiterhin ist eine sehr geringe Abnahme der Anteile von ungeordneten Strukturen angedeutet. Vergleichsweise geringe Änderungen, wie der lineare Anstieg der Subbanden bei 1610 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} , können elastischen Druckeffekten zugeschrieben werden.^{14,265} Insgesamt sind die beobachteten Änderungen der Sekundärstruktur jedoch gering. Dies deutet darauf hin, dass keine Denaturierung des Proteins in dem hier untersuchten Druckbereich, d.h. bis 8000 bar, stattfindet. Im Zuge der Proteindenaturierung wären weitaus größere Änderungen der Sekundärstruktur, verbunden mit der Bildung ungeordneter Strukturen, zu beobachten.¹⁴¹

Die Ergebnisse der FTIR-spektroskopischen Messungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen der eingangs erwähnten SAXS-Messungen. Diese zeigten, dass die druckinduzierte Dissoziation des Proteins bei circa 2000 bar beginnt. Die Dissoziation scheint somit mit einer leichten Änderung der Sekundärstruktur des Proteins einher zu gehen. Diese Änderungen der Sekundärstruktur können durch die Hydratation der Kontaktfläche zwischen den beiden Monomeren nach erfolgter Dissoziation erklärt werden. Dadurch kommt es zu einer Umorientierung der Aminosäureseitenketten. Konformationelle Änderungen infolge der Dissoziation von Proteinen sind ein mehrfach beobachtetes Phänomen, welches auch als *conformational drift* bezeichnet wird. Die Dissoziation des Proteins ist dem großen Anteil an *void volumes* zwischen der Kontaktfläche der einzelnen Monomere geschuldet. Diese werden nach der Dissoziation durch Wasser gefüllt, woraus eine Verringerung des Gesamtvolumens resultiert.

Die Abbildungen 6.5 B-E zeigen die druckabhängige Entwicklung der Sekundärstrukturanteile in der Anwesenheit von Osmolyten und PEG. Generell sind die beobachteten Änderungen bei Anwesenheit von TMAO weitaus stärker ausgeprägt. Weiterhin wurde eine Verschiebung der beobachteten Sekundärstrukturänderungen zu höheren Drücken beobachtet. Die analog durchgeführten SAXS-Messungen zeigten ebenfalls eine Verschiebung der Dissoziation zu höheren Drücken. Bei Anwesenheit von Harnstoff konnte hingegen kein signifikanter Effekt auf die druckabhängige Entwicklung der Sekundärstrukturanteile beobachtet werden. Die druckabhängige Entwicklung bei Anwesenheit einer 2:1 Mischung aus 0.5 M Harnstoff und 0.25 M TMAO entspricht jedoch jener in Abwesenheit von Cosolventien. Beide Beobachtungen stehen im Einklang mit den eingangs erwähnten SAXS-Messungen. Harnstoff scheint somit einer Überstabilisierung der dimeren Konformation durch TMAO entgegen zu wirken. Für PEG 200 hingegen wurde eine Verschiebung des Dissoziationsdrucks zu höheren Drücken beobachtet. All diese Beobachtungen stehen ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen der SAXS-Messungen.

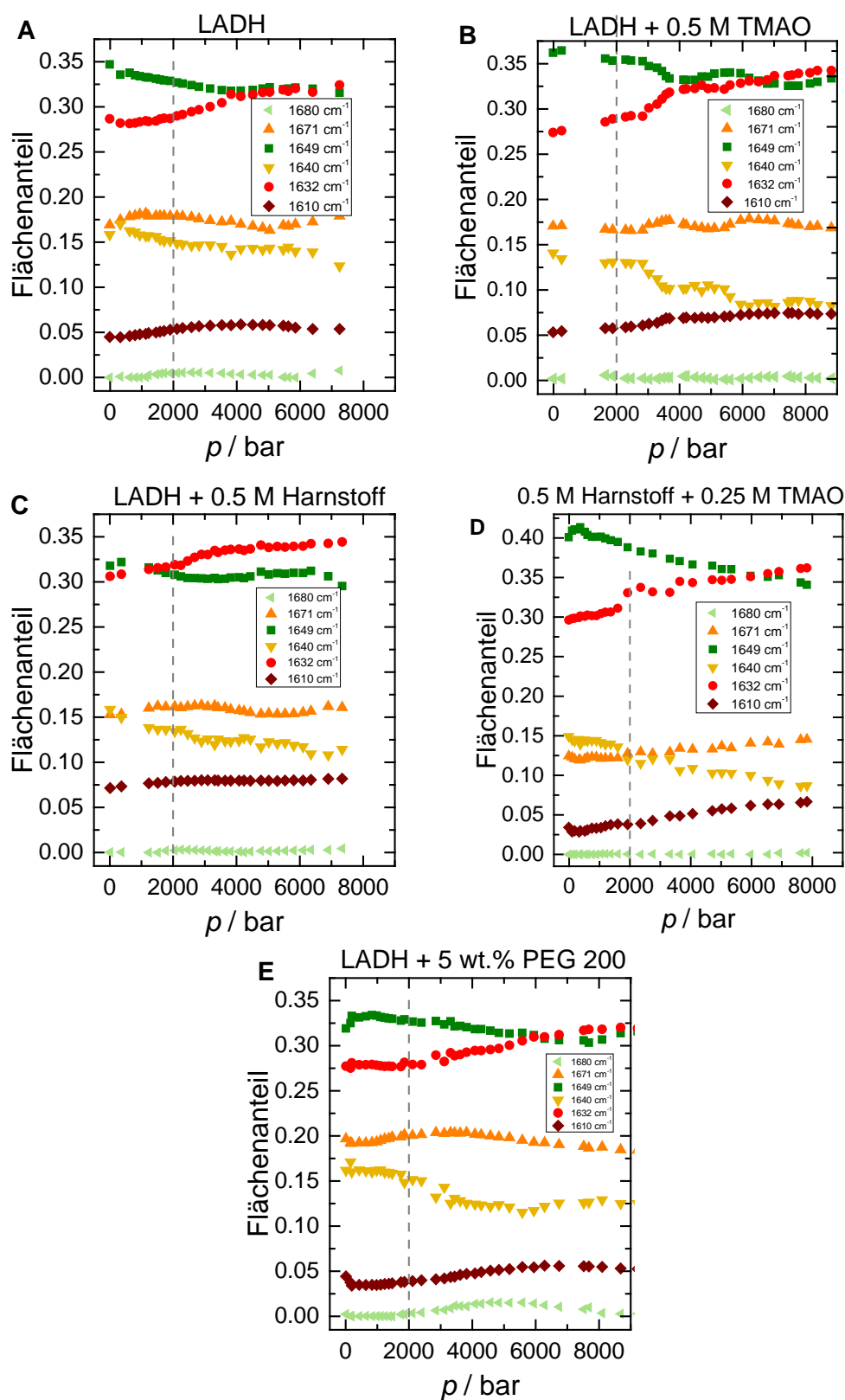


Abbildung 6.5: Druckabhängige Entwicklung der Flächenanteile der zur Anpassung der experimentellen FTIR-Daten verwendeten Subbanden in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO, Harnstoff und PEG 200 für LADH. Die graue Linie dient der optischen Orientierung.

Dieser Einfluss von PEG und TMAO kann durch den *excluded volume*-Effekt erklärt werden. Generell begünstigt Volumenausschluss die Zusammenlagerung von Proteinen, da diese Oligomere weniger Volumen ausschließen als die dissoziierten Untereinheiten. So wurde beispielweise gezeigt, dass makromolekulares *Crowding* durch Dextran die Assoziation von Dimeren zu Tetrameren des Proteins Spectrin induziert.³⁴⁰ Zusätzlich führt der Ausschluss von Osmolyten vom Protein zu einer Hydratisierung des Proteins und zu einer entropischen Stabilisierung.^{350,351}

6.3.3 Fluoreszenz-Spektroskopie

Tryptophan-Fluoreszenz

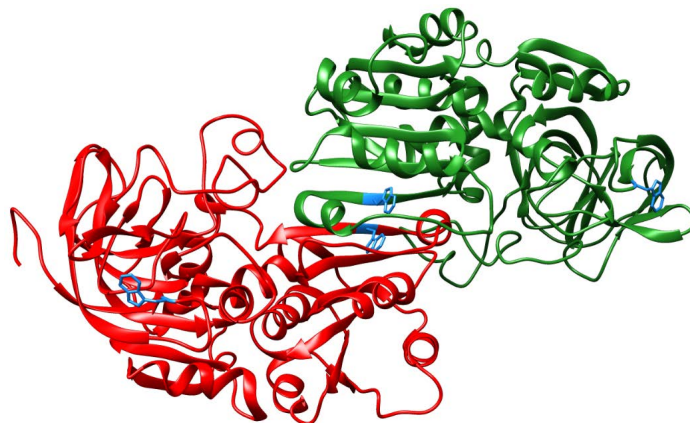


Abbildung 6.6: Struktur von LADH (pdb ID: 1HLD³¹⁸). Tryptophanseitenketten sind blau eingefärbt. Abbildung erstellt mit Chimera.²⁵⁴

Wie Abbildung 6.6 zeigt, enthält LADH zwei Tryptophanreste pro monomerer Untereinheit. Während Trp 15 an der Proteinoberfläche lokalisiert ist, befindet sich Trp 314 an der Grenzfläche zwischen den monomeren Einheiten. Folglich ist im Rahmen der Dissoziation des Proteins mit einer Hydratisierung von Trp 314 zu rechnen. Dies sollte durch Messungen der druckabhängigen Tryptophan-Fluoreszenz genauer evaluiert werden. In einer vorherigen Studie wurden, basierend auf Fluoreszenzmessungen, unter ähnlichen Bedingungen Übergänge bei 1000, 2000 und 5000 bar beobachtet.³⁵²

Die Ergebnisse der druckabhängigen Messungen der Tryptophan-Fluoreszenz sind in Abbildung 6.7 gezeigt. Die in der Literatur beschriebenen Übergänge bei 1000 bar und 2000 bar sind auch hier angedeutet und der druckabhängige Verlauf der Fluoreszenzintensität ähnelt dem in Referenz.³⁵² Nach der Korrektur intrinsischer Druckeffekte auf die Tryptophan-Fluoreszenz durch die NATA-Fluoreszenz konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Änderungen auf intrinsischen Druckeffekten beruhen und nicht auf einer Zunahme der Polarität der Umgebung der Tryptophanreste. Nach

der Korrektur intrinsischer Druckeffekte ist sogar eine geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität ab ca. 600 bar zu beobachten. Diese Änderungen sind vergleichsweise gering und können beispielsweise durch eine erhöhte Rigidität des Proteins oder geringfügige strukturelle Änderungen erklärt werden. Messungen der druckabhängigen ANS-Fluoreszenz (s.u.) offenbarten ebenfalls strukturelle Änderungen ab circa 600 bar.

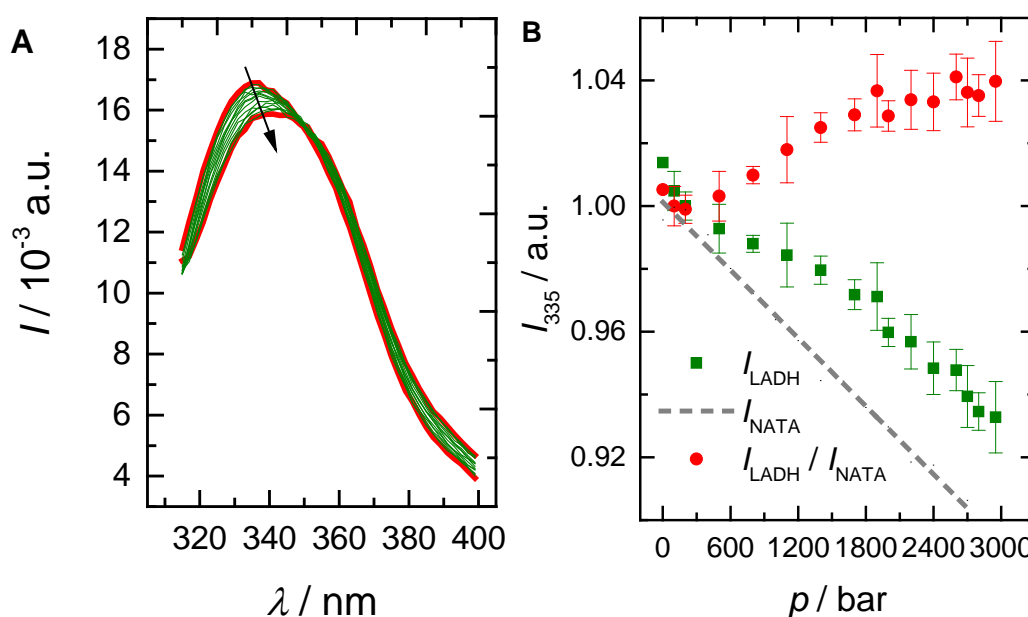


Abbildung 6.7: Druckabhängige Entwicklung der flächennormierten intrinsischen Tryptophanfluoreszenz bei 25 °C (A). Druckabhängige Entwicklung der Fluoreszenzintensität bei 335 nm. Die roten Kreise zeigen die Daten nach der Korrektur intrinsischer Druckeffekte durch die Fluoreszenzintensität von NATA (B). Um einen optischen Vergleich der relativen Änderungen zu ermöglichen, wurden die Intensitäten auf den Wert bei 100 bar normiert.

Die durch die Dissoziation des Dimers und die damit verbundene Exposition des Tryptophanrestes zu erwarten gewesene Abnahme der Fluoreszenzintensität ab circa 2000 bar wurde somit nicht beobachtet. Dies kann dadurch erklärt werden, dass, wie durch die FTIR-Messungen gezeigt, die Dissoziation mit Änderungen der Sekundärstruktur einhergeht. Im Zuge dieser Änderungen kann es zu einer Umorientierung des Tryptophanrestes in das hydrophobe Innere des Proteins und somit zu einer Abschirmung des Tryptophanrestes vom Lösungsmittel kommen. Weiterhin zeigten die SAXS-Messungen, dass der Monomer-Anteil bei 2800 bar vergleichsweise

gering ist.³³⁷

Fluoreszenz des Fluorophors ANS

Da kein Einfluss der Dissoziation des Proteins auf die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins festgestellt werden konnte, sollte im nächsten Schritt die Fluoreszenz des Fluorophors ANS in Anwesenheit des Proteins gemessen werden. Dieser Fluorophor bindet an hydrophobe Bereiche an der Proteinoberfläche und im Proteininneren. Folglich ist bei einer Dissoziation des Proteins die Freilegung von hydrophoben Bereichen und somit eine erhöhte Quantenausbeute der ANS-Fluoreszenz zu erwarten.

Die Ergebnisse der Messungen der ANS-Fluoreszenz sind in Abbildung 6.8 zusammengetragen. Abbildung 6.8 A zeigt die druckabhängigen Spektren von ANS in Pufferlösung, wohingegen Abbildung 6.8 B die Spektren in Anwesenheit des Proteins zeigt. Dabei wird ersichtlich, dass es in Anwesenheit von LADH zu einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von circa 540 nm zu 474 nm, einhergehend mit einem drastischen Anstieg der Fluoreszenzintensität, kommt. Daraus lässt sich schließen, dass es bereits bei 1 bar zu einer Bindung von ANS an das Protein kommt. Zusätzlich wurden zur Korrektur intrinsischer Druckeffekte die Spektren von ANS in einer 90%-igen DMSO-Lösung gemessen (6.8 C). DMSO wurde dabei als Lösungsmittel verwendet, um ein möglichst ähnliches Spektrum zu erhalten. Allgemein zeigt sich, dass die Fluoreszenzintensität bei Anwesenheit von LADH mit steigendem Druck zunimmt, in Puffer und DMSO jedoch abnimmt.

Die druckabhängige Entwicklung der Fläche der ANS-Bande, welche proportional zur Quantenausbeute ist, ist in Abbildung 6.8 B gezeigt. Dabei ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität ab circa 600-800 bar zu beobachten. Dies lässt auf ein vermehrtes Binden des Fluorophors an das Protein schließen.

Die Gründe für diese Beobachtungen können vielfältig sein. So können sowohl die beobachtete Dissoziation höherer Oligomere, bzw. des Dimers, als auch durch Druck induzierte strukturelle Änderungen, an denen beispielsweise die hydrophoben Bindungstaschen beteiligt sein können, den beobachteten Anstieg der Fluoreszenzinten-

sität erklären. SAXS-Messungen zeigen, dass die Dissoziation höherer Oligomere bei 800 bar bereits abgeschlossen ist, wohingegen die Dissoziation des Dimers erst bei einem signifikant höherem Druck von circa 2000 bar erfolgt. Folglich können diese Dissoziationsprozesse nicht zur Erklärung des beobachteten Anstiegs der ANS-Fluoreszenz herangezogen werden.

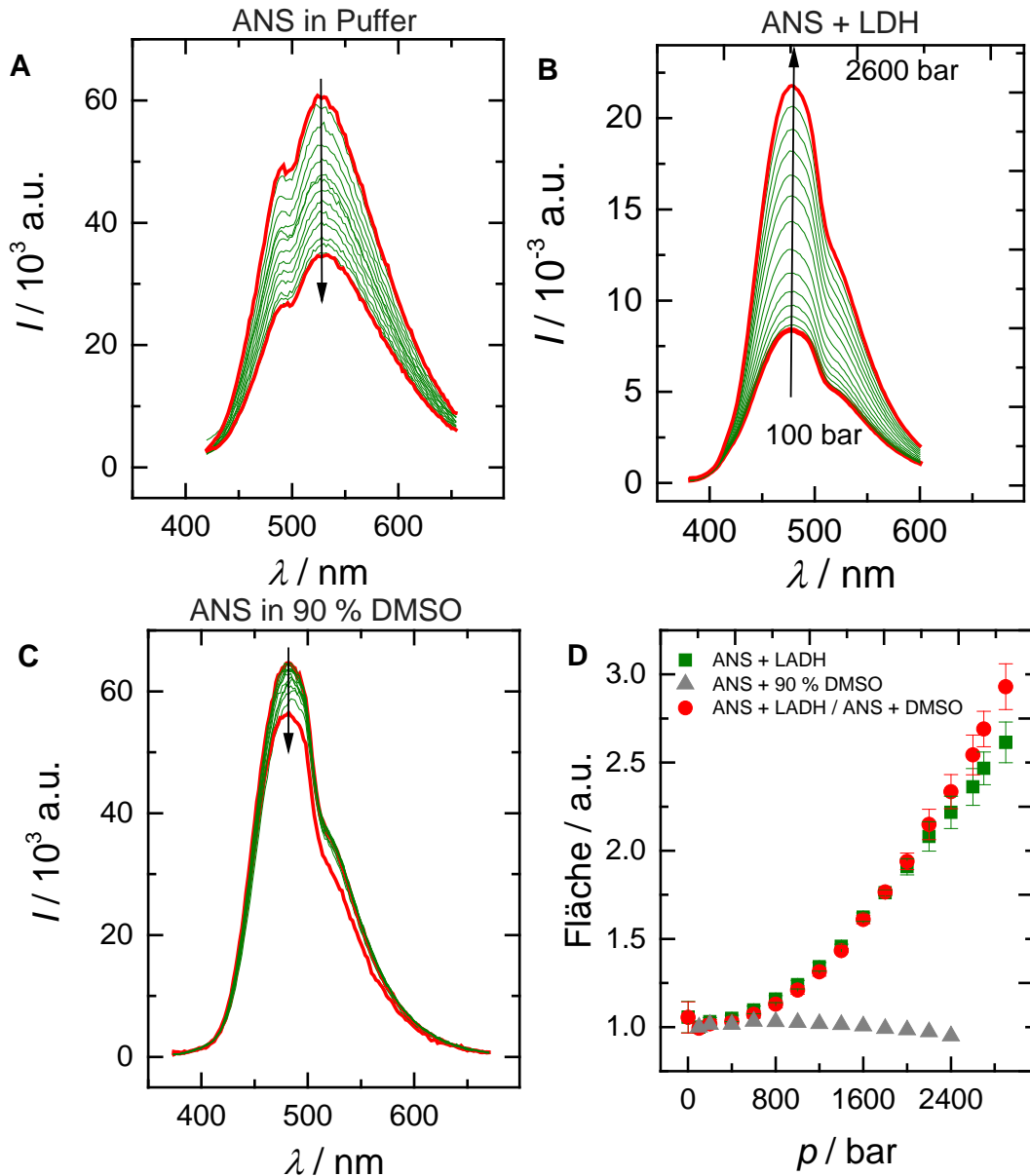


Abbildung 6.8: Druckabhängige Entwicklung der Fluoreszenzspektren von ANS (Anregungswellenlänge: 350 nm in Puffer (A), in Anwesenheit von LADH (B) und in 90% DMSO (C)). Die Pfeile kennzeichnen steigenden Druck. Druckabhängige Entwicklung der ANS-Fluoreszenz-Intensität (als Fläche der spektralen Bande, normiert auf den Wert bei 100 bar um die relative Änderung der Quantenausbeute darzustellen).

Konsequenterweise sollte im Folgenden der zu Grunde liegende Bindungsmechanismus genauer untersucht werden. Zunächst sollte evaluiert werden, ob ANS in Nähe der Tryptophanreste bindet. Sollte dies der Fall sein, sollte bei einer Anregung der Tryptophanfluoreszenz ein Förster-Resonanz-Energietransfer von Tryptophan auf ANS zu erwarten sein. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.9 gezeigt.

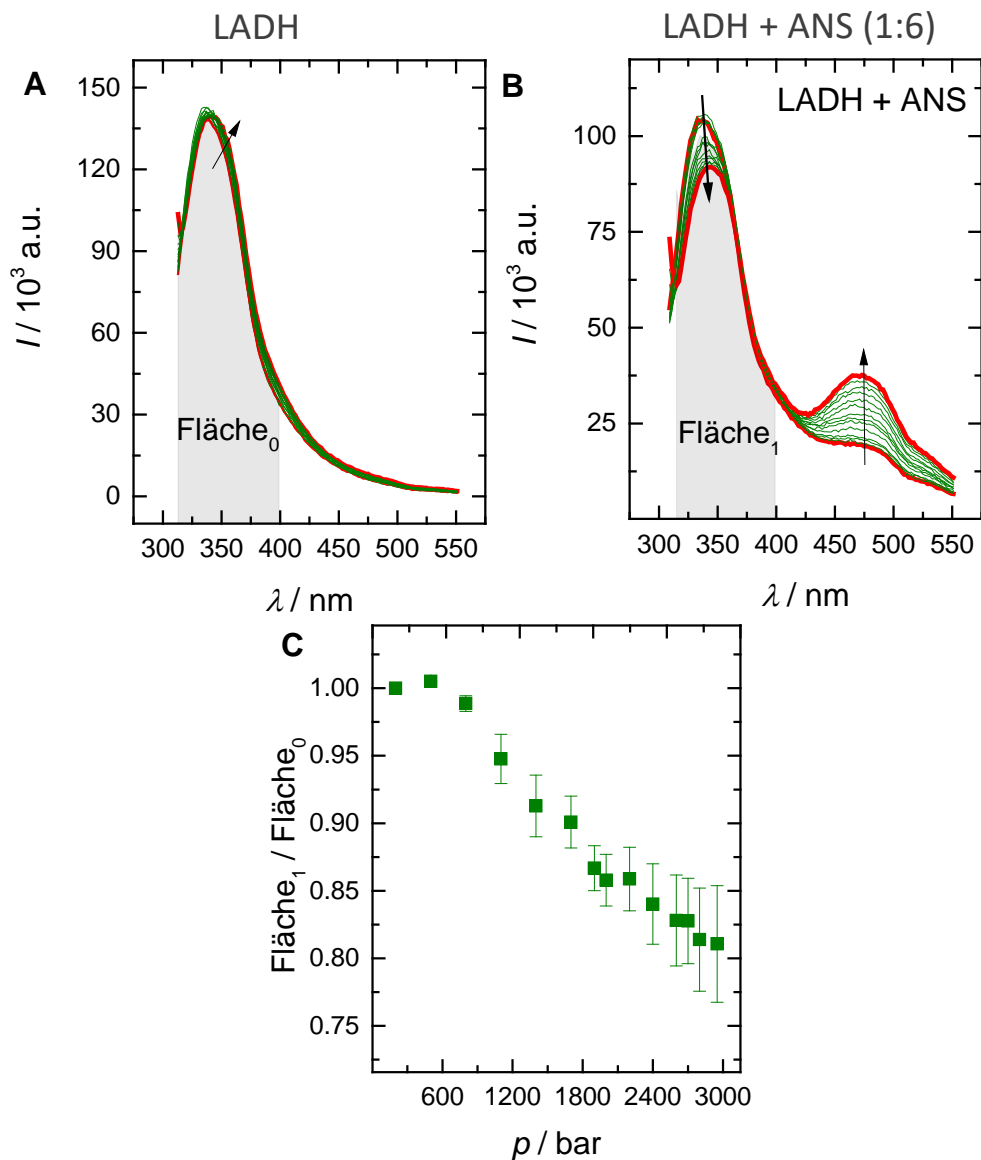


Abbildung 6.9: Druckabhängige Entwicklung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz (Anregungswellenlänge: 295 nm) von LADH in der An- und Abwesenheit des Fluorophors ANS (molares Verhältnis 1:6). Druckabhängige Entwicklung von $\text{Fläche}_1/\text{Fläche}_0$, wobei Fläche_1 und Fläche_0 die Fläche der Tryptophanbande in Ab- und Anwesenheit von ANS (integriert von 313-399 nm) ist.

Aus diesem Grund wurde die Tryptophanfluoreszenz (Anregungswellenlänge 295 nm) in An- und Abwesenheit von ANS gemessen. Bereits ein Blick auf die Spektren zeigt, dass der Druckeffekt auf die Tryptophanfluoreszenz vernachlässigbar ist. In Anwesenheit von ANS ist jedoch eine signifikante Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz zu beobachten.

Der Quotient der Flächen beider Banden ist in Abbildung 6.9 C gezeigt. Dieses Verhältnis sinkt ab circa 800 bar, d.h. dass in diesem Druckbereich der FRET von Tryptophan zunimmt und somit, dass ANS innerhalb des Förster-Abstandes des Tryptophanrestes an das Protein bindet.

ANS-Fluoreszenz in der Anwesenheit von NAD⁺

Um die Beteiligung der Coenzymbindungstasche genauer zu untersuchen, wurde die ANS-Fluoreszenz zusätzlich in Anwesenheit von NAD⁺ untersucht. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 6.10 gezeigt.

Dabei wird ersichtlich, dass die Änderungen in Anwesenheit des Coenzym im selben Druckbereich auftreten, jedoch weitaus geringer sind. Daraus lässt sich schließen, dass ANS im Zuge der Druckapplikation in die Bindungstasche bindet. Sofern diese durch NAD⁺ besetzt ist, bindet konsequenterweise weniger ANS in diese Tasche, wodurch der relative Anstieg der ANS-Fluoreszenzintensität geringer ist. Die Ergebnisse zeigen weiter, dass keine Dissoziation des NAD⁺ im Zuge der Druckapplikation erfolgt.

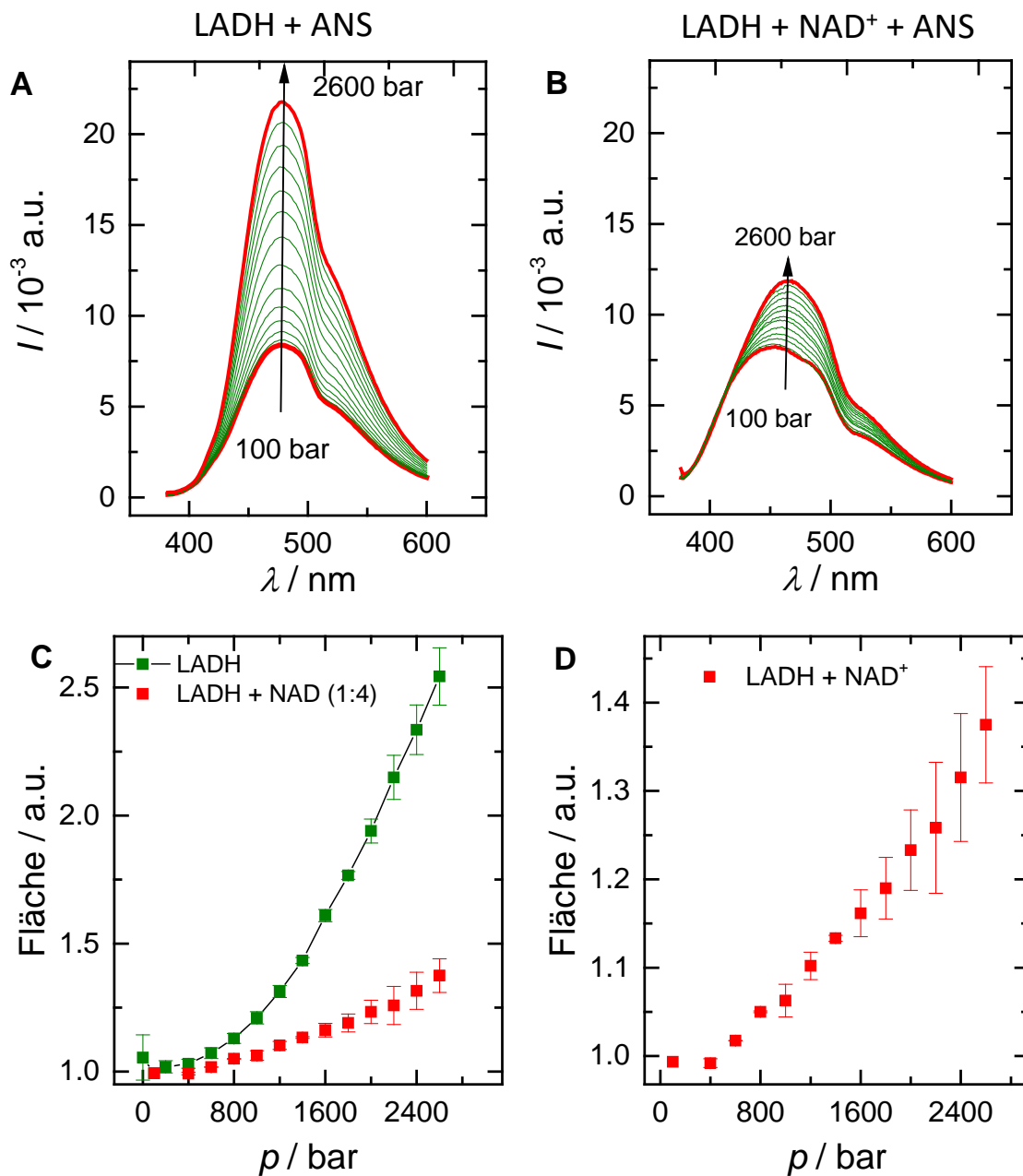


Abbildung 6.10: Druckabhängige Entwicklung der Fluoreszenzspektren von ANS (Anregungswellenlänge: 350 nm) bei Bindung an LADH in An- und Abwesenheit von NAD⁺ (A,B). Druckabhängige Entwicklung der normierten Fluoreszenzintensität (Fläche der spektralen Bande) von LADH in Anwesenheit von NAD⁺ (C,D).

Zusätzlich sollte der Einfluss von Osmolyten auf die druckabhängige Entwicklung der ANS- Fluoreszenz untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigt Abbildung 6.17 im Anhang dieses Kapitels. Dabei ist zu beachten, dass die Bindung

von ANS an das Protein vermutlich von Cosolventien beeinflusst wird. So bindet beispielsweise Harnstoff ebenfalls an das Protein, wodurch die Interpretation der Daten erschwert wird. Somit ist eine Interpretation der erhaltenen Daten problematisch. Dabei wurde in Anwesenheit aller Osmolyte eine Verschiebung des beobachteten Druckeffekts hin zu höheren Drücken beobachtet.

6.3.4 Enzymkinetik

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden *stopped flow*-Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigt Abbildung 6.11. Bedingt durch die geringe enzymatische Aktivität der kommerziell erhältlichen Alkoholdehydrogenase (0.5 U mg^{-1}), weisen die erhaltenen Ergebnisse, insbesondere bei geringen Substratkonzentrationen, einen hohen experimentellen Fehler auf. Dennoch konnten signifikante Druckeffekte auf die Enzymkinetik beobachtet werden.

Es wurde eine signifikante Abnahme von k_{cat} zwischen 500 und 900 bar beobachtet. Im Allgemeinen werden oligomere Proteine häufig durch Dissoziation deaktiviert.^{346,347} In diesem Fall erfolgt die Deaktivierung des Proteins jedoch unter 2000 bar und somit bereits im dimeren Oligomerisationszustand.

Zwischen 1 bar und 500 bar ist eine leichte Zunahme von k_{cat} angedeutet. Eine Zunahme der Aktivität vor der durch Druck induzierten Dissoziation steht mit dem in der Literatur beschriebenen negativen Aktivierungsvolumen von LADH in Einklang.³⁵³

Allgemein wird in der Literatur von einer Zunahme der enzymatischen Aktivität von LADH bis circa 1000 bar, gefolgt von einer Abnahme bei höheren Drücken, berichtet.^{326,352–355} Ein ähnliches Verhalten wurde auch für die tetramere Alkoholdehydrogenase TBADH beobachtet.³¹¹

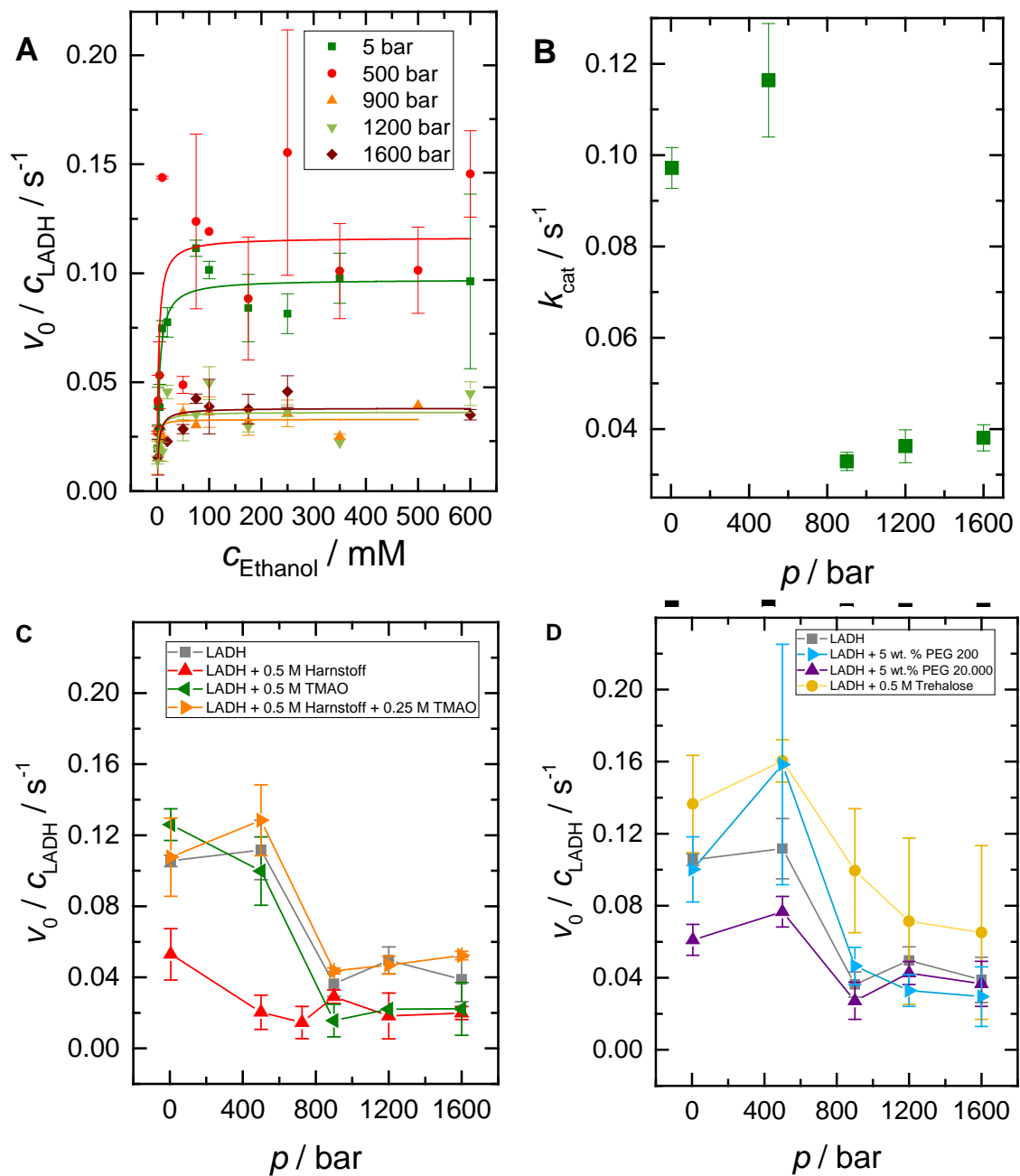


Abbildung 6.11: Michaelis-Menten-Auftragung der durch LADH katalysierten Oxidation von Ethanol bei 25 °C. Die durchgezogenen Linien zeigen Anpassungen gemäß Gleichung (7.3) (A). Druckabhängige Entwicklung von k_{cat} (B). Druckabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Ethanol-Konzentration von 100 mM und einer NAD^+ -Konzentration von 0.8 mM in der An- und Abwesenheit von Osmolyten und PEG 200 (C,D).

Diese Abnahme der enzymatischen Aktivität lässt sich vermutlich den strukturellen Änderungen zuschreiben, welche in den Fluoreszenz-Messungen beobachtet wurden. Diese zeigten bereits eine Beteiligung der Coenzymbindungsstasche an diesen strukturellen Änderungen. Dennoch ist zu beachten, dass die enzymatische Aktivität nicht komplett verschwindet, sondern immer noch eine Reaktion stattfindet.

Die hier ermittelten Werte für K_m liegen in der Größenordnung von 3 ± 2 mM und sind somit in einer vergleichbaren Größenordnung wie bei pH 8 ermittelte Werte (0.56 mM).³⁵² Im Rahmen des Fehlers konnten keine eindeutigen Aussagen über eine mögliche Druckabhängigkeit von K_m getroffen werden. (siehe Abbildung 6.18 im Anhang dieses Kapitels)

Zusätzlich wurde der Einfluss der zuvor verwendeten Osmolyte und *Crowding*-Substanzen untersucht. Dabei wurde die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer konstanten Substratkonzentration von 100 mM Ethanol gemessen. Abbildung 6.11 zeigt den Einfluss von Druck und Cosolventien auf diesen Wert. Es wird ersichtlich, dass Harnstoff zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit führt. Hingegen zeigen 0.25 M TMAO keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit oder deren Druckabhängigkeit. Jedoch wird interessanterweise der schädliche Einfluss von Harnstoff durch 0.25 M TMAO ausgeglichen. Dies steht im Einklang mit Literaturdaten, welche eine durch Harnstoff induzierte Abnahme von k_{cat} berichten, wohingegen TMAO gegenteilige Effekte hat und das *Counteracting* am effektivsten bei einem molaren Verhältnis von 2:1 ist. Die Effekte beider Osmolyte auf die Enzymkinetik werden durch deren Einfluss auf die Proteinkonformation erklärt. Während Harnstoff die Proteinstuktur durch Bindung lockert, bevorzugt TMAO die kompakte Konformation.³⁵⁶ PEG 200 zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. PEG 20000 andererseits führt jedoch zu einer Verringerung von v_0 .

Die langsame durch LADH-katalysierte Reaktion ist nicht diffusionskontrolliert.^{357,358}

6.3.5 Temperaturabhängiges Verhalten

FTIR-Spektroskopie

Als Ergänzung zu den druckabhängigen Messungen sollte ebenfalls das temperaturabhängige Verhalten des Proteins untersucht werden. Die Ergebnisse der temperaturabhängigen FTIR-Messungen sind in Abbildung 6.12 gezeigt.

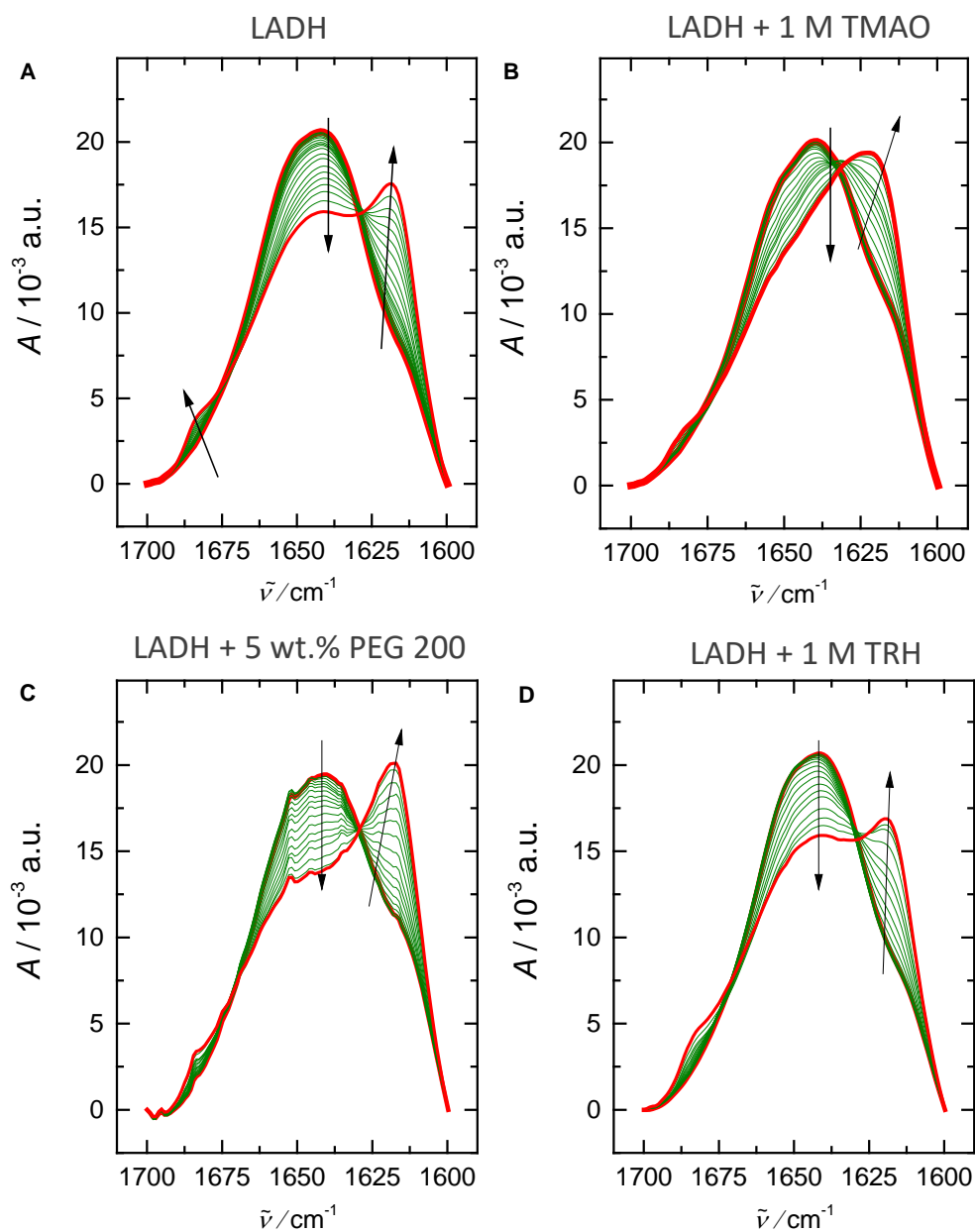


Abbildung 6.12: Temperaturabhängige Entwicklung der flächennormierten Amid-I'-Bande von LADH in An- und Abwesenheit von Osmolyten.

Die temperaturabhängige Entwicklung der Amid-I'-Bande zeigt, dass eine Temperaturerhöhung, anders als Druckapplikation, zur Aggregation des Proteins führt. Dies zeigen die Maxima der Amid-I'-Banden bei circa 1615 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} , welche durch die Bildung intermolekularer β -Faltblattstrukturen verursacht werden.^{268,269} Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass bei 25 °C keine Aggregate vorliegen und somit, dass es sich bei den höheren Oligomeren, welche in den DLS und SAXS-Messungen beobachtet wurden, eher um vergleichsweise lose Cluster als um stabile Aggregate handelt. Abbildung 6.13 zeigt die Entwicklung der Sekundärstrukturanteile mit steigender Temperatur.

Die temperaturabhängige Entwicklung der einzelnen Sekundärstrukturelemente offenbart, dass im Zuge der Temperaturerhöhung der Anteil an inter- und intramolekularen β -Faltblattstrukturen steigt, wohingegen der Anteil der α -Helices und der ungeordneten Strukturen abnimmt. Auffällig ist dabei, dass der Anstieg der intramolekularen β -Faltblattstrukturen (verbunden mit der Abnahme der ungeordneten Strukturen) bei signifikant niedrigeren (circa 8 °C) Temperaturen als die Abnahme des α -Helix Anteils (verbunden mit einer Zunahme des Anteils der intermolekularen β -Faltblattstrukturen) stattfindet. Diese Ergebnisse deuten somit daraufhin, dass es im Zuge der Temperaturerhöhung zu zwei Übergängen kommt.

Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre, dass eine Temperaturerhöhung zunächst die Dissoziation des Proteins induziert. Im Zuge dieser Dissoziation kommt es zu einer Abnahme des Anteils ungeordneter Strukturen. Dies wäre im Zuge einer Entfaltung nicht zu beobachten. Eine leichte Abnahme an ungeordneten Strukturen wurde ebenfalls im Zuge der druckabhängigen Entfaltung beobachtet (besonders aussagekräftig in Abb. 6.5 B). Im Zuge einer weiteren Temperaturerhöhung erfolgt die Entfaltung/Aggregation des Proteins, einhergehend mit einem Anstieg des Anteils intermolekularer β -Faltblatt-Strukturen. Diese Zunahme beruht auf der Aggregation des Proteins und wurde nicht in den druckabhängigen Messungen beobachtet. In der Literatur wurde bereits die Dissoziation von LADH bei 46 °C gefolgt von einer Aggregation bei 49 °C berichtet.³⁴⁹ Solch ein zweiphasiges Verhalten wurde auch für das oligomere Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase beobachtet.^{359,360}

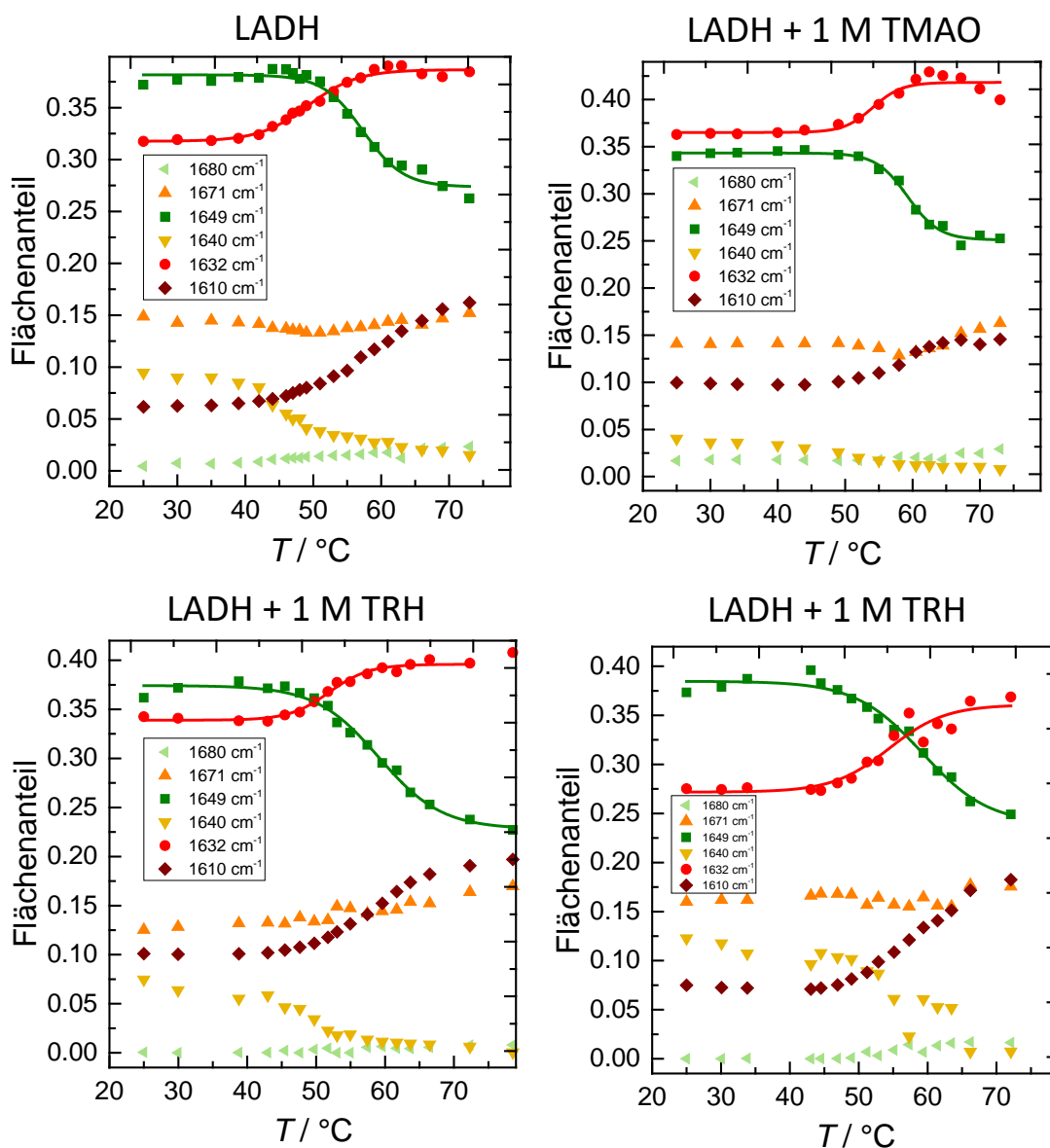


Abbildung 6.13: Temperaturabhängige Entwicklung der Flächenanteile der jeweiligen Subbanden in An- und Abwesenheit von Osmolyten.

Um die beobachteten Übergänge genauer zu quantifizieren, wurde die temperaturabhängige Entwicklung des Flächenanteils der Subbanden bei 1649 cm⁻¹ und 1632 cm⁻¹ gemäß Gleichung (6.1) approximiert. Dabei ist jedoch Vorsicht geboten. Da das temperaturabhängige Verhalten offensichtlich nicht durch ein Zweizustandsmodell beschrieben werden kann und die beobachtete Aggregation zudem nicht reversibel ist, ist die Bestimmung thermodynamischer Größen aus den Anpassungen nicht

möglich. Es wurde daher lediglich der Wendepunkt der Kurven bestimmt, um die Übergangstemperaturen T_{trans} zu quantifizieren. Die Ergebnisse in An- und Abwesenheit ausgewählter Osmolyte sind in Abbildung 6.14 zusammengetragen.

Hier zeigt sich, dass beide Übergangstemperaturen effektiv durch Osmolyte und makromolekulares *Crowding* beeinflusst werden können. So werden beide Übergangstemperaturen durch TMAO, PEG 200 und Trehalose erhöht.

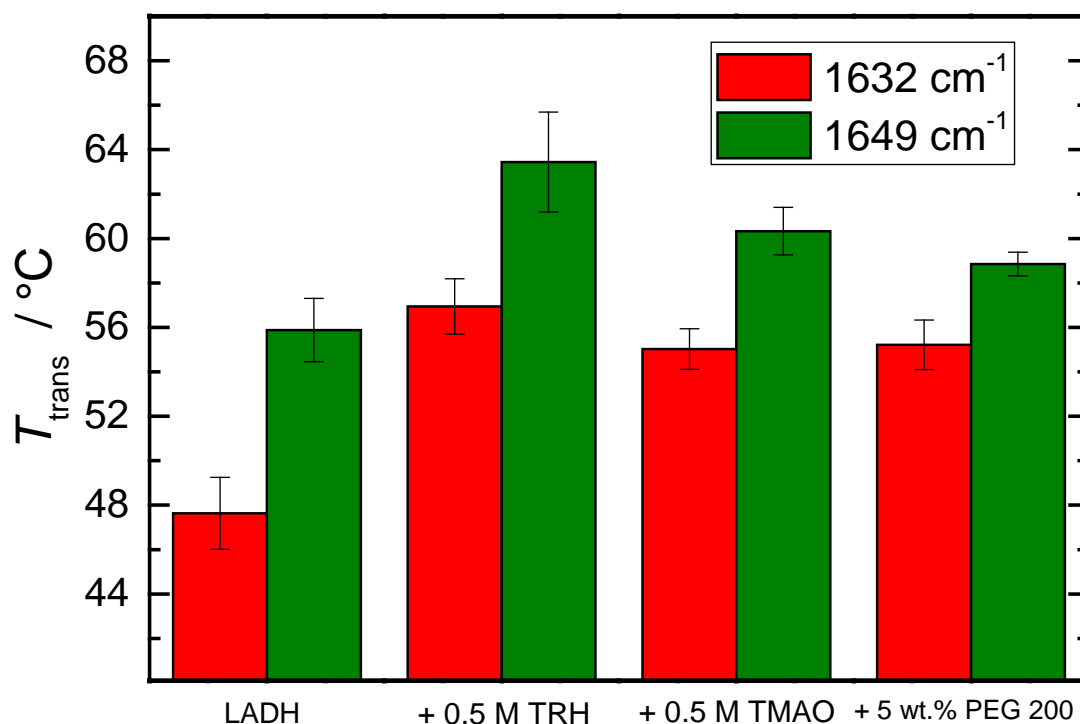


Abbildung 6.14: Aus FTIR-Messungen bestimmte Übergangstemperaturen von LADH in An- und Abwesenheit ausgewählter Osmolyte und dem *Crowder* PEG 200.

Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Ergebnisse der temperaturabhängigen Messungen der Tryptophan-Fluoreszenz sind in Abbildung 6.19 in Anhang dieses Kapitels gezeigt. Die bereits zuvor beobachtete Aggregation des Proteins verursacht das Auftreten von Streulicht in den Spektren. Die Entwicklung der Fluoreszenzintensität bei 335 nm ist in Abb 6.19 B gezeigt. Zur optischen Orientierung sind die aus den FTIR-Messungen bestimmten Übergangstemperaturen als gestrichelte Linien eingezeichnet. Dabei ist eine Abnah-

me der Fluoreszenzintensität bei circa 46 °C zu beobachten. Dies deutet auf eine erhöhte Polarität der Umgebung der Tryptophanreste hin. Dies kann sowohl durch die Dissoziation des Dimers als auch durch Entfaltung erklärt werden. Jedoch ist zu beachten, dass die druckinduzierte Dissoziationen die Tryptophan-Fluoreszenz nicht beeinflusst. Durch das verstärkte Auftreten von Streulicht wird jedoch auch die Fluoreszenzintensität bei 335 nm beeinflusst, wodurch eine korrekte Interpretation der Daten erschwert wird. Aus diesem Grund wurde ebenfalls die Entwicklung der ANS Fluoreszenz mit steigender Temperatur gemessen.

Die temperaturabhängige Entwicklung der ANS-Fluoreszenz ist in Abbildung 6.15 gezeigt. Dabei ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität bis circa 50 °C zu beobachten. Auf diesen Anstieg folgt, bei einer weiteren Erhöhung der Temperatur, eine Abnahme der Fluoreszenzintensität. Folglich kommt es mit steigender Temperatur zunächst zu einer vermehrten Bindung von ANS an das Protein, gefolgt von einer Dissoziation des Fluorophors ab 50 °C. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass eine Erhöhung der Temperatur zunächst eine Dissoziation des Proteins induziert und es bei höheren Temperaturen zur Denaturierung und Aggregation des Proteins kommt. Auch ein vermehrtes Binden des Fluorophors in beispielsweise hydrophobe Taschen kann zur Erklärung des beobachteten Anstiegs herangezogen werden. In der Literatur wird berichtet, dass es bei 46 °C zu einer Dissoziation des Proteins, gefolgt von einer Aggregation bei 49 °C kommt.³⁴⁹ Diese Werte stimmen gut mit den hier erhaltenen Ergebnissen überein. In Abbildung 6.15 sind die aus den FTIR-spektroskopischen Messungen erhaltenen Übergangstemperaturen als durchgezogene Linien eingezeichnet. Weiterhin ist die temperaturinduzierte Dissoziation, gefolgt von der Aggregation, auch für andere Proteine, beispielsweise Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.^{359,360} beobachtet worden. Um diese Hypothese zu evaluieren, wurden zusätzlich temperaturabhängige SAXS-Messungen durchgeführt.

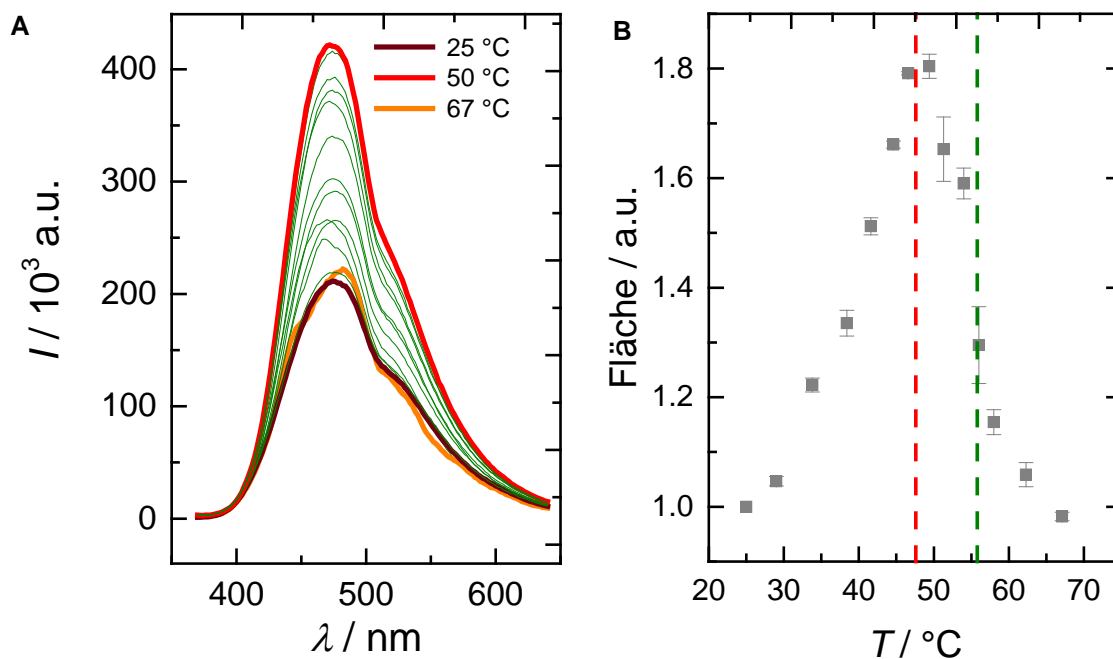


Abbildung 6.15: Temperaturabhängige Entwicklung der ANS Fluoreszenz in Anwesenheit von LADH (A). Relative Änderung der ANS-Fluoreszenzintensität (als Fläche der spektralen Bande) mit steigender Temperatur (B).

Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Die Ergebnisse der temperaturabhängigen SAXS-Messungen sind in Abbildung 6.16 gezeigt. Bei der Interpretation dieser Daten ist zu beachten, dass anders als die druckabhängigen SAXS-Messungen diese Messungen nicht an einer Synchrotron-Strahlungsquelle durchgeführt wurden. Da zusätzlich niedrigere Proteinkonzentrationen eingesetzt werden mussten (0.7 wt. %), ist die Qualität der erhaltenen Daten vergleichsweise gering, dennoch konnten aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Diese stehen in gutem Einklang mit den Daten der druckabhängigen SAXS-Messungen. So sind die erhaltenen Werte des Gyrationradius und des maximalen Abstandes D_{max} von vergleichbarer Größenordnung wie die aus den Synchrotrondaten ermittelten Daten.³³⁷ Ebenfalls konnte die Anwesenheit von Protein-Clustern, welche bereits in den druckabhängigen SAXS-Messungen und DLS Messungen beobachtet werden, auch hier beobachtet werden. Dies äußert sich durch den, verglichen mit dem theoretischen Wert des Dimers, erhöhten Gyrationradius.

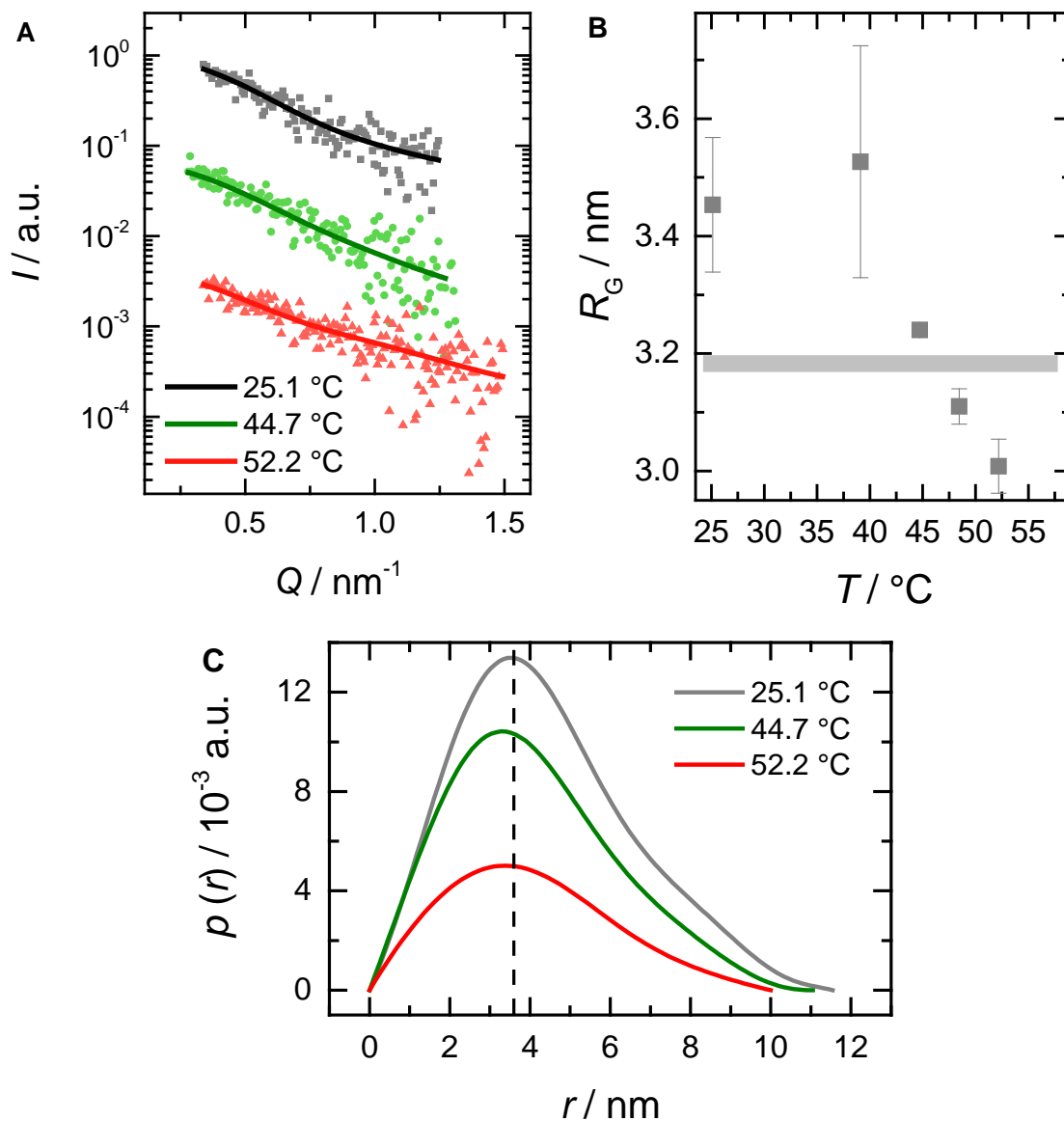


Abbildung 6.16: Experimentelle Streukurven von LADH bei ausgewählten Temperaturen. Durchgezogene Linien stellen die Funktionsanpassungen dar (A). Entwicklung des experimentell bestimmten Gyrationradius mit steigender Temperatur. Der theoretisch berechnete Gyrationradius ist als graue Linie gezeigt (B). Paarabstandsverteilungsfunktionen bei ausgewählten Temperaturen (C).

Bereits die temperaturabhängige Entwicklung der Paarabstandsverteilungsfunktion zeigt, dass mit steigender Temperatur der maximale Abstand im Molekül abnimmt. Zusätzlich ist eine minimale Verschiebung des Maximums von $p(r)$ angedeutet. Beide Beobachtungen wurden ebenfalls im Zuge der druckabhängigen Dissoziation ge-

macht. Die temperaturabhängige Entwicklung des Gyrationradius zeigt zunächst das Vorhandensein höherer Oligomere, welche ab circa 40 °C dissoziieren. Der Gyrationradius des Dimers wird zwischen 44 °C und 48 °C erreicht. Eine Aggregation wurde ab circa 55 °C beobachtet. Die SAXS-Messungen unterstützen somit ebenfalls das Dissoziations-Aggregations-Szenario. Dass der gemessene Gyrationradius signifikant größer als der des Monomers ist, zeigt, dass dennoch ein erheblicher Anteil der Proteine in Lösung in dimerer Konformation vorliegt.

Zusammenfassend offenbaren die temperaturabhängigen Messungen somit Folgendes:

Zunächst zeigten FTIR-spektroskopische Messungen das Auftreten zweier temperaturinduzierter Übergänge, bei circa 47 °C und 56 °C. Fluoreszenz und SAXS-Messungen zeigten, dass diese Übergänge möglicherweise der Dissoziation und der Entfaltung/Aggregation des Proteins zugeordnet werden können. So wurde eine Abnahme der Tryptophanfluoreszenz ab circa 47 °C beobachtet, die ANS-Fluoreszenz zeigte eine Zunahme bis 47 °C und die SAXS Messungen ergaben eine Abnahme des Gyrationradius bis circa 47 °C. Die Dissoziation von LADH bei 46 °C, gefolgt von einer Aggregation bei 49 °C, wurde bereits in der Literatur beschrieben. Auch für das Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase wurde eine temperaturinduzierte Dissoziation, gefolgt von Aggregation, beobachtet.^{359,360}

6.4 Anhang

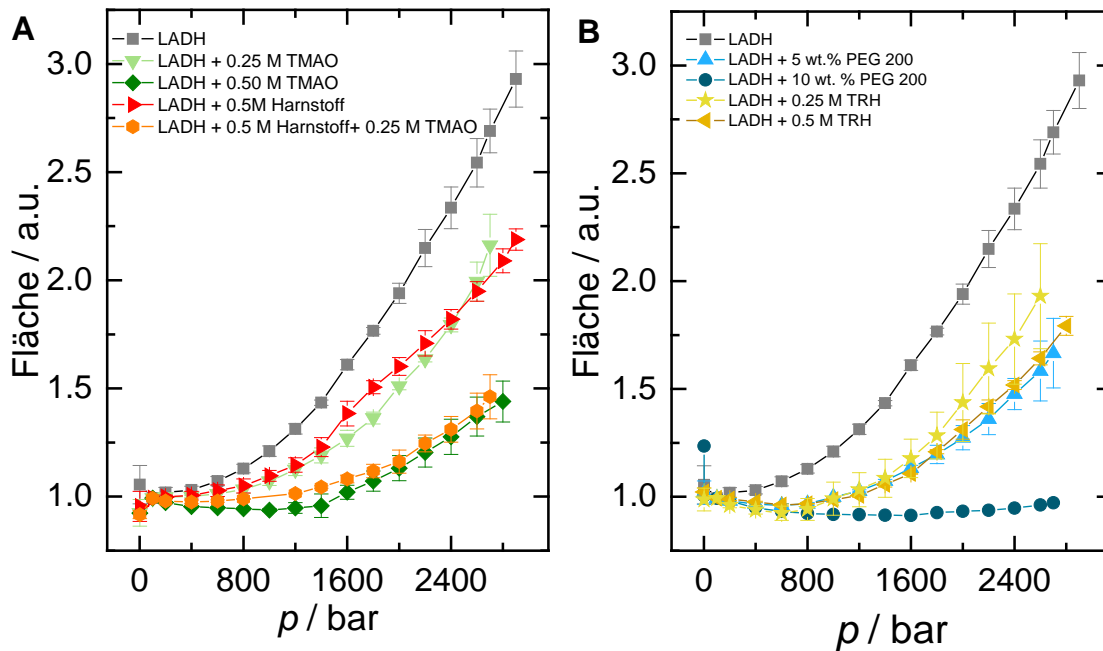


Abbildung 6.17: Druckabhängige Entwicklung der Fluoreszenzintensität (Fläche der spektralen Bande) von ANS gebunden an LADH in An- und Abwesenheit von Osmolyten und PEG 200.

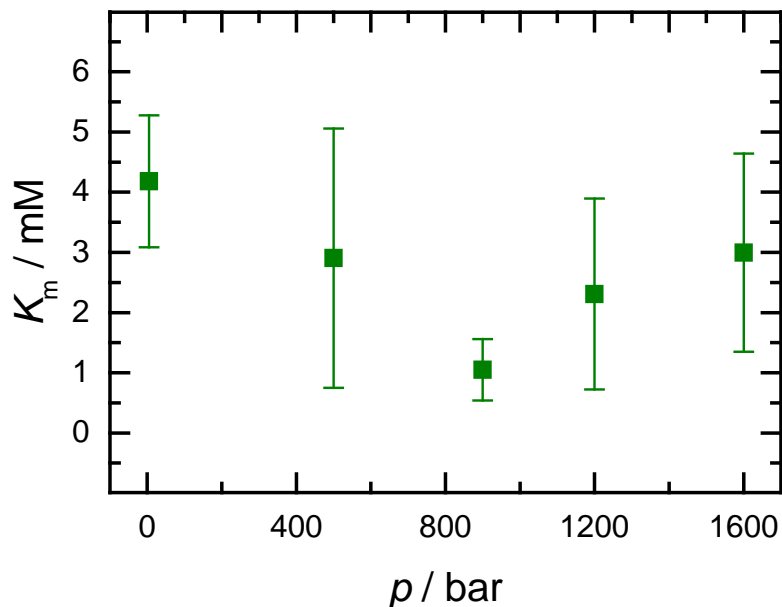


Abbildung 6.18: Druckabhängige Entwicklung von K_m der durch LADH katalysierten Ethanol-Oxidation.

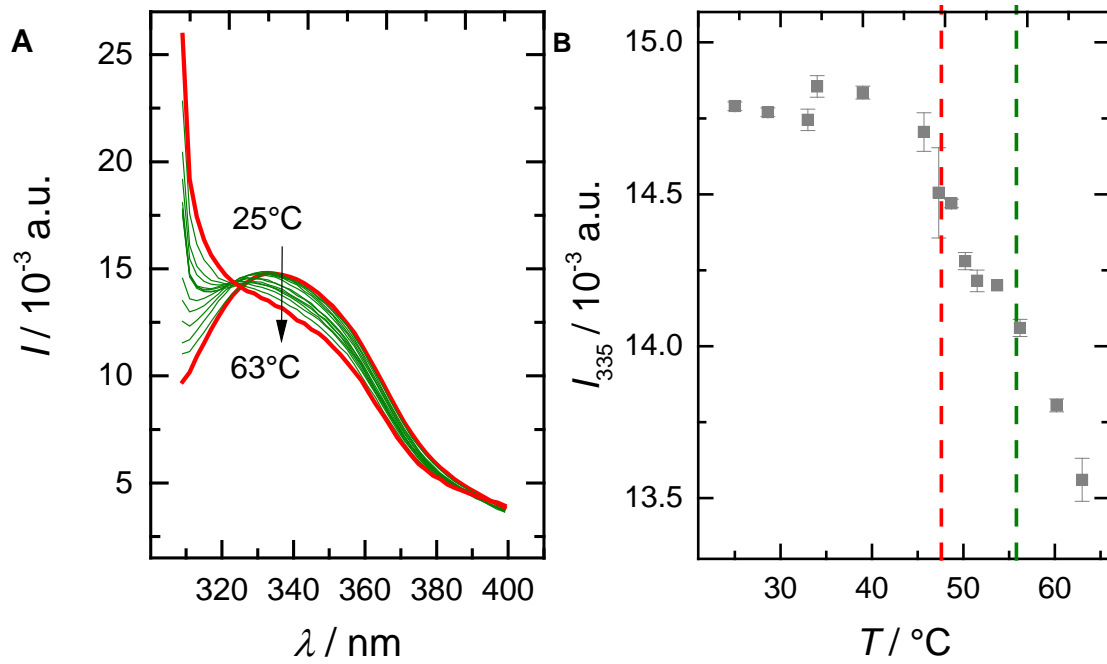


Abbildung 6.19: Temperaturabhängige Entwicklung der flächennormierten intrinsischen Tryptophanfluoreszenz (A). Temperaturabhängige Entwicklung der Fluoreszenzintensität bei 335 nm. Die gestrichelten Linien zeigen die in den FTIR-Messungen bestimmten Übergangstemperaturen (B).

7 Einfluss von Druck und Osmolyten auf die Dynamik und Aktivität von Lactatdehydrogenase

7.1 Einleitung

Die durch Druck induzierte Dissoziation oligomerer Proteine erfolgt für gewöhnlich zwischen 1000 bar und 2000 bar und wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht.^{6,22–25,27–30,329–336} Die Triebkraft der druckinduzierten Dissoziation ist die Beseitigung von *void volumes* der Monomer-Kontaktfläche (siehe Kapitel 1.2.1). Inwieweit vor allem die interne Proteindynamik durch die Dissoziation beeinflusst wird, ist jedoch weitestgehend unbekannt. Druckapplikation ist hierbei eine einzigartige Möglichkeit, den Oligomerisationsgrad zu ändern, um so zu ergründen, inwieweit sich die interne Proteindynamik von Monomer und Oligomer unterscheidet.

Der Einfluss von Osmolyten, d.h. niedermolekularen Verbindungen, welche von Organismen zur Kompensation von Stressfaktoren synthetisiert werden (siehe Kapitel 1.4), auf die interne Proteindynamik monomerer Proteine wurde bereits in Kapitel 4 behandelt. Dort konnte eine signifikante Abnahme der internen Proteindynamik des Protein Lysozym in Anwesenheit des Osmolyts TMAO beobachtet werden, wohingegen Harnstoff keinen signifikanten Einfluss auf die interne Proteindynamik hat.³⁶¹ Hier sollte der Einfluss des Osmolyts Glycin untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss von Osmolyten auf die enzymatische Aktivität untersucht werden, um so das Zusammenspiel zwischen Kinetik und Proteindynamik evaluieren zu können.

Dazu erfolgten in diesem Forschungsprojekt Messungen an dem tetrameren Enzym Lactatdehydrogenase (LDH). Dieses Enzym katalysiert mit NADH als Co-substrat die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat während der anaeroben Glykolyse.^{362,363} Der katalytische Mechanismus umfasst dabei das Binden von Pyruvat an den LDH-NADH-Komplex, den Verschluss des aktiven Zentrums durch eine mobile *loop* Region, den Hydrid-Transfer von NADH auf Pyruvat sowie die erneute Öffnung des aktiven Zentrums und die Produktfreilassung.^{362,363} Die einzelnen Reaktionsschritte wurden umfassend durch Temperatursprung-Relaxationsmethoden untersucht.^{364–368}

Pyruvat bindet dabei nur in Anwesenheit von NADH an LDH.^{369,370} Das aktive Zentrum ist in Abwesenheit von Pyruvat dem Lösungsmittel zugänglich, in Anwe-

senheit von Pyruvat erfolgt jedoch die Abschirmung des aktiven Zentrums durch die Umorientierung einer *loop*-Region.³⁷¹ LDH-Inhibitoren sind potentielle Mittel in der Krebsbehandlung.^{372,373}

Die druckabhängige Dissoziation des LDH-Tetramers wurde bereits intensiv erforscht und erfolgt ab circa 1000 bar, einhergehend mit einem Verlust der enzymatischen Aktivität.^{22,374–378} SAXS-Messungen zeigten die Dissoziation des Tetramers zu Dimeren.³⁷⁷ Durch MD Simulationen konnte gezeigt werden, dass die tetramere Konformation erforderlich ist, um die Anordnung des aktiven Zentrums zu erhalten und das Eindringen von Wassermolekülen zu verhindern, welches mit dem Verlust der enzymatischen Aktivität einhergeht.³⁷⁹

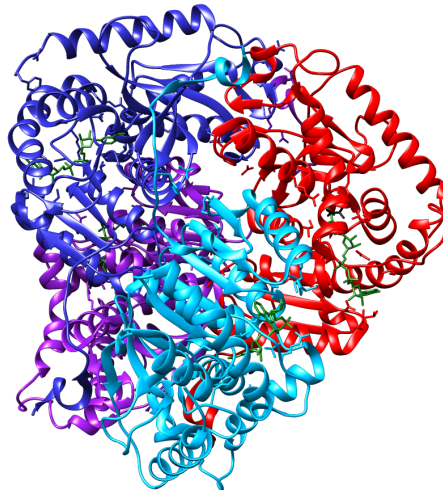


Abbildung 7.1: Struktur von Lactatdehydrogenase im Komplex mit NADH und Oxamat (pdb ID: 3H3F).³⁸⁰ Die monomeren Untereinheiten sind farbig dargestellt.

Um eine umfassende Charakterisierung der Proteindynamik auf verschiedenen Zeitskalen zu ermöglichen, wurden Neutronenstreuungs-Experimente an zwei Instrumenten des Institut Laue Langevin (ILL, Grenoble, Frankreich) durchgeführt. Zum einen elastisch inkohärente Neutronenstreuung am Instrument IN 13 und zum anderen Quasielastische Neutronenstreuung (QENS) am Instrument IN 16b. Durch EINS sollte zum einen der Einfluss von Druck und Substratbindung, welche mit der Abschirmung des aktiven Zentrums einhergeht, auf die Dynamik des Proteins auf der sub-ns Zeitskala untersucht werden. Dies ist ein interessanter Ansatz, da dies

die Verschließung des aktiven Zentrums induziert. Zusätzlich erfolgten Messungen in Anwesenheit des Osmolyts Glycin. Glycin ist in sofern ein interessanter Kandidat, da es wie Harnstoff direkt mit dem Protein interagiert, aber dieses wie TMAO stabilisiert. Zusätzliche Informationen über den Bindungsprozess wurden aus der druckabhängigen Bestimmung der Enzymkinetik erhalten. Diese ermöglichen zum einen die Bestimmung des Aktivierungsvolumens und zum anderen die Bestimmung der Volumenänderung im Zuge der Substratbindung. Zusätzlich wurde der Einfluss der Osmolyte TMAO, Harnstoff und Glycin auf die Enzymkinetik im Druckbereich der Dissoziation untersucht.

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Probenpräparation

Die Bezugsquellen der verwendeten Substanzen zeigt Tabelle 7.1.

Tabelle 7.1: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien.

Substanz	Bezugsquelle
LDH (aus dem Muskel des Hasens)	Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
TRIS	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
TMAO	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Harnstoff	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
¹³ C Harnstoff	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glycin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
NADH	Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland)
Oxamat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
D ₂ O	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Die Messungen erfolgten in 25 mM TRIS Puffer bei pH 7.6. Um die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen unter Druck zu verhindern, enthielt die Pufferlösung zusätzlich 10 mM DTT und 1 mM EDTA.^{375,376,381} Messungen der Neutronenstreuung und FTIR-Spektroskopie erfolgten in Puffern auf D₂O-Basis. Der pD wurde gemäß pD

= pH + 0.4 eingestellt.²⁵⁶

7.2.2 Experimentelle Durchführung und Datenbearbeitung

Neutronenstreuung

Die EINS-Messungen erfolgten an Instrument IN13 des ILL. Das Hochdruckequipment wurde von J. Peters und SANE entwickelt und zur Verfügung gestellt.^{251,382} Als druckübertragendes Medium kam Fluorinert zum Einsatz. Alle Messungen erfolgten bei 25 °C und jeder Druckpunkt wurde für mindestens 6 h gemessen. Die Datenbearbeitung umfasste eine Hintergrundkorrektur und eine Vanadium-Normierung. Die Bestimmung der MSD erfolgte gemäß der Gauss-Näherung:¹⁷¹

$$I(Q, 0 \pm \Delta E) \approx I_0 \exp\left(-\frac{1}{3}Q^2\langle u^2 \rangle\right) \quad (7.1)$$

QENS Messungen erfolgten am Instrument IN16b des ILL unter Verwendung der selben Hochdruckausrüstung. Die Messzeit betrug 4 h pro Messpunkt. Neben der Probe wurde ebenfalls der Puffer und ein Vanadiumzylinder zur Untergrundkorrektur bzw. Normierung vermessen.

Enzymkinetik

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte an einem Lambda 25 UV/VIS-Spektrometer der Firma Perkin Elmer mit einer hausgemachten Hochdruckzelle. Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit v_0 erfolgte durch die zeitabhängige Entwicklung der Absorbanz bei 340 nm, welche auf der Umwandlung von NADH zu NAD⁺ beruht. Die NADH-Konzentration betrug 0.6 mM und die finale Enzymkonzentration c_{E0} circa 0.46 nM. Die exakte Konzentration wurde für jeden Ansatz UV-spektroskopisch in einem Nanovue Plus Spectrometer (Biochrom, Cambridge, UK) bestimmt.

Die Auswertung erfolgte gemäß des Formalismus von Michaelis und Menten:



Für v_0 gilt:

$$v_0 = \frac{dc_P}{dt} = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (7.3)$$

Hier sind c_S und c_P die Konzentrationen von Produkt und Substrat bei der Zeit t . Für die Michaelis-Konstante gilt: $K_M = (k_{-1} + k_2)k_1^{-1}$. Die Bestimmung des Aktivierungsvolumens erfolgte durch die Eyring Gleichung:

$$\frac{d \ln k}{dp} = -\frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (7.4)$$

Bei geringen Substratkonzentrationen ist $k = k_{\text{cat}}K_m^{-1}$ und bei hohen Substratkonzentrationen gilt: $k = k_{\text{cat}}$.

FTIR-Spektroskopie

FTIR-spektroskopische Messungen erfolgten an einem Nicolet Magna 550 FTIR Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) in einer Diacell Vivo Diamantstempel-Zelle (Almax EasyLab, Diksmuide, Belgium). Druckapplikation erfolgte durch das PACE 5000 System (GE Sensing, Frankfurt, Germany). Zur Druckbestimmung wurde BaSO_4 zur Probe hinzugegeben.

Die Datenbearbeitung umfasste die Hintergrund- und Basislinienkorrektur der gemessenen Spektren sowie die Flächennormierung im Bereich von 1700 cm^{-1} bis 1600 cm^{-1} . Die Position der Subbanden wurde aus der 2. Ableitung der Amid-I'-Bande und dem Fourier-selbstenfalteten Spektrum bestimmt.

7.3 Ergebnisse und Diskussionen

7.3.1 Dynamik: EINS

Abbildung 7.2 zeigt die EINS-Daten als Auftragungen von $\ln I$ gegen Q^2 .

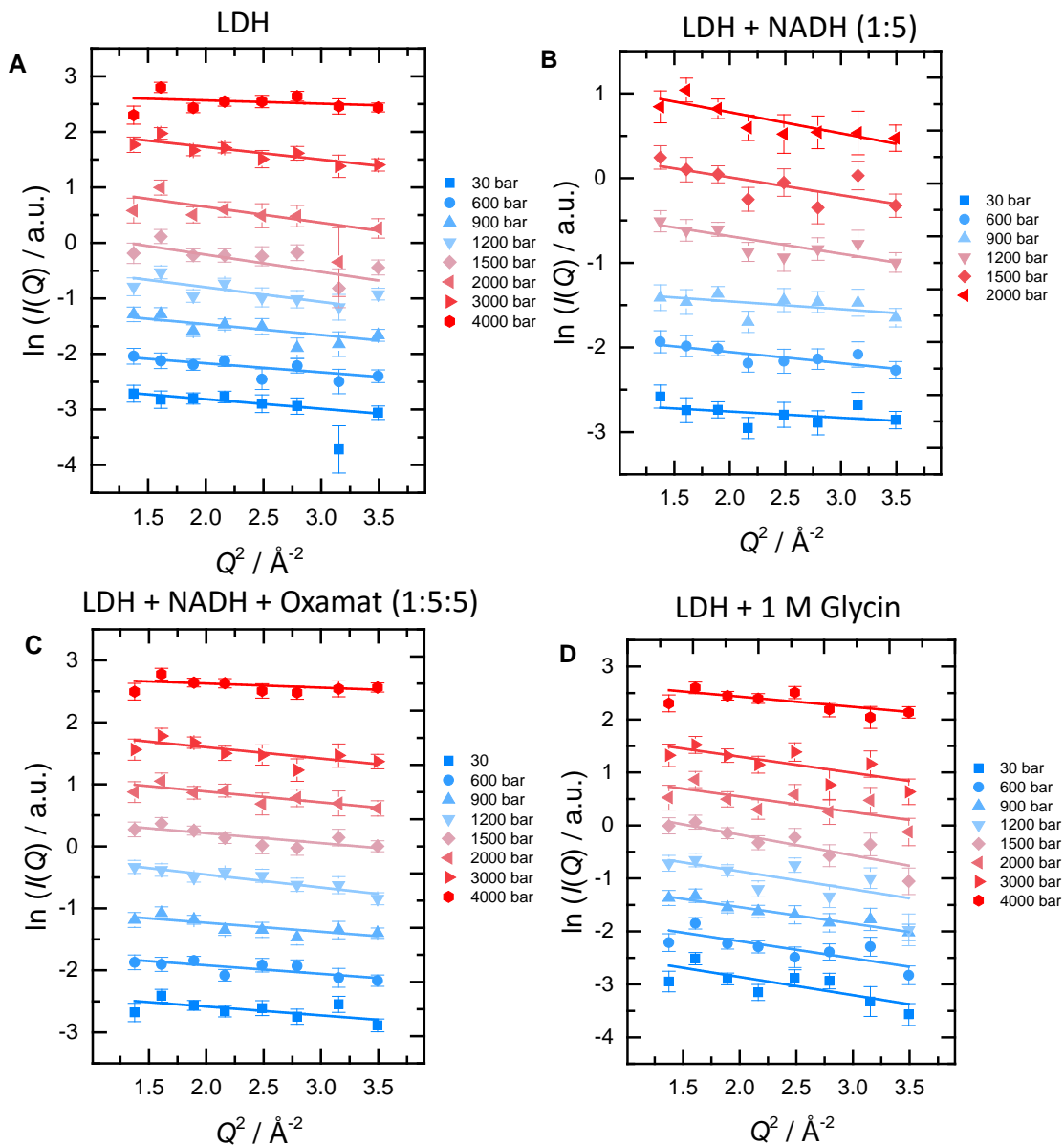


Abbildung 7.2: Semilogarithmische Auftragung der EINS-Intensität als Funktion von Q^2 für 90 mg mL⁻¹ LDH, den Komplex zwischen LDH und NADH (B) bzw. NADH + Oxamat (C) und LDH in Anwesenheit von 1 M Glycin (D) bei verschiedenen Drücken (vertikal verschoben). Die Linien stellen die Funktionsanpassungen dar, welche gemäß der Gauss-Näherung zur Bestimmung der MSD verwendet wurden.

Die Auswertung erfolgte von $Q^2=1.3 \text{ \AA}^{-2}$ bis 3.5 \AA^{-2} . Dieser Q -Bereich wurde zum einen gewählt um die Gültigkeit der Gauss-Näherung zu erfüllen. Diese ist, unter Annahme einer sphärischen Geometrie, bis $\sqrt{\langle u^2 \rangle Q^2} \approx 2.8$ gültig.¹⁷⁴ Zum anderen sollte dadurch der Einfluss von H_2O - und HDO -Verunreinigungen minimiert werden.^{174,383}

Die gemäß der Gaussischen Näherung bestimmten MSD-Werte sind in Abbildung 7.3 gezeigt. Im Zuge der Druckapplikation bleibt die MSD von apo-LDH bis 1000 bar nahezu konstant. Zwischen 1000 und 1400 bar steigt die MSD und bleibt bis 2000 bar konstant. Bei Drücken über 2000 bar erfolgt eine drastische Abnahme der MSD. Der Anstieg bei 1200 bar ist vermutlich durch die Dissoziation des Proteins zu erklären. Im Zuge der Dissoziation des Proteins kommt es zur Hydratation der Kontaktfläche und zusätzlich auch zum Eindringen von Wassermolekülen in das aktive Zentrum des Enzyms.³⁷⁹ Diese Hydratationsänderungen können zur Erklärung der Beobachtungen herangezogen werden. Die drastische Abnahme der MSD ab Drücken oberhalb von 2000 bar kann der bereits zuvor beobachteten Aggregation des Proteins in diesem Druckbereich zugeordnet werden.^{376,377} Während einer möglichen Aggregation des Proteins unter Druck scheinen somit keine *void volumes* ausgebildet werden. Dies wäre jedoch unwahrscheinlich. Die Abnahme der Dynamik kann beispielsweise auf einem Druckeffekt beruhen und nicht auf strukturellen Änderungen.

Im Folgenden wird der Einfluss der Substrat-Bindung auf die interne Proteindynamik sowie deren Druckabhängigkeit behandelt. Das Binden von NADH führt zu einer geringfügigen Abnahme der Proteindynamik. Erneut kommt es über 1000 bar, d.h. nach Dissoziation des Proteins, zu einer Zunahme der MSD. Die Druckeffekte auf die MSD des Komplexes des Enzyms mit NADH und dem Substratanalogen Oxamat zeigt Abbildung 7.3 B. Erneut verursacht die Substratbindung leicht verringerte MSD-Werte. Allerdings wird die MSD in diesem Fall bis 3000 bar nicht durch Druck beeinflusst. oberhalb von 3000 bar wurde erneut eine drastische Abnahme der MSD beobachtet. Das Binden von Oxamat an den Komplex zwischen LDH und NADH induziert den Verschluss des aktiven Zentrums durch die Umorientierung einer mobilen *loop* Region.³⁷¹ In dieser geschlossenen Konformation ist das aktive Zentrum, zumindest teilweise, vom Lösungsmittel abgeschirmt und die

interne Proteindynamik von Tetramer und Dimer unterscheidet sich nicht signifikant voneinander.

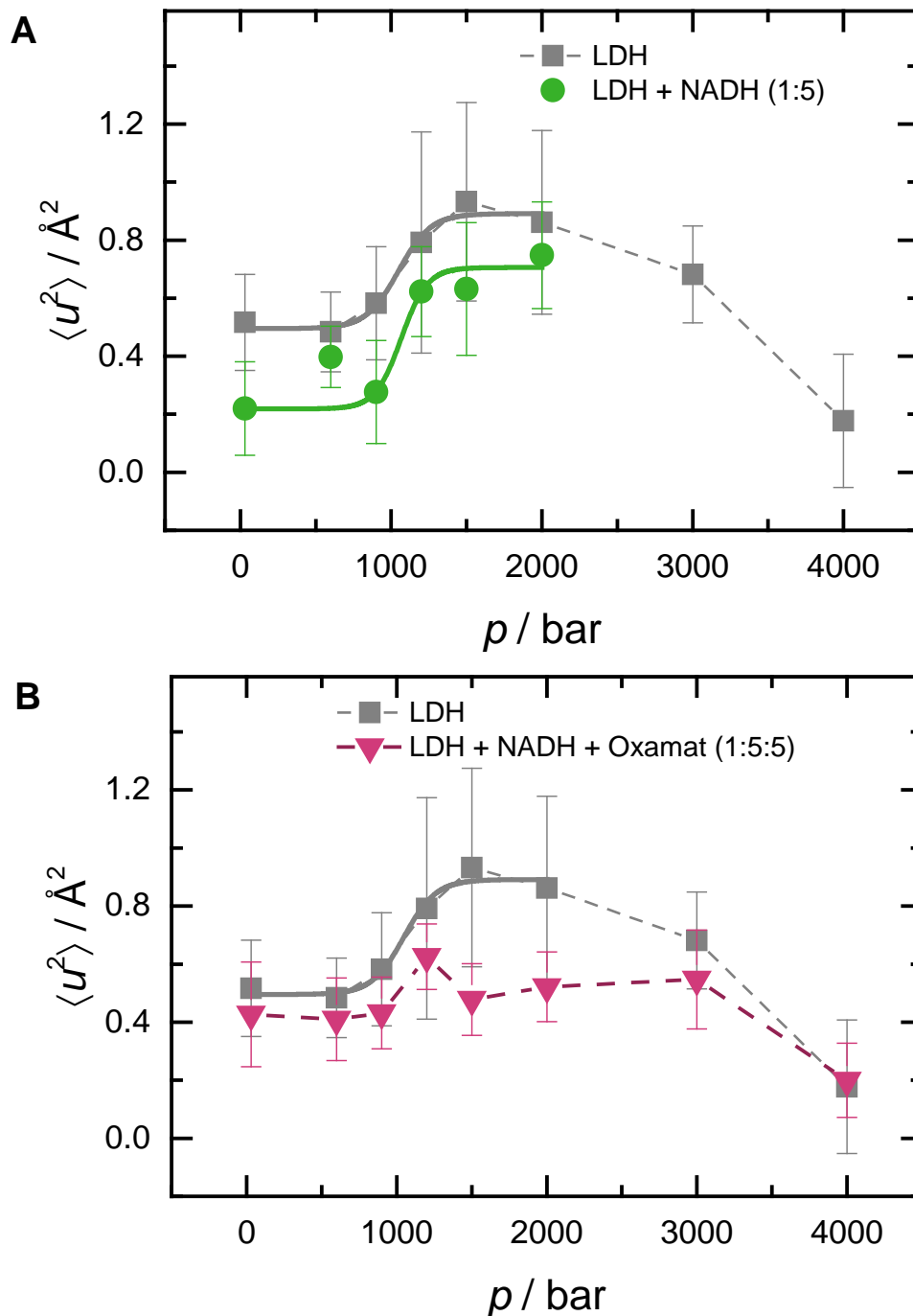


Abbildung 7.3: Druckabhängige Entwicklung der MSD von 90 mg mL^{-1} LDH und dem Komplex zwischen LDH und NADH (A) bzw. NADH + Oxamat (B). Die gestrichelten Linien und sigmoidalen Kurven dienen der optischen Orientierung.

Den Einfluss von 1 M Glycin auf die MSD zeigt Abbildung 7.4. So führt Glycin zu erhöhten MSD-Werten und damit zu einer erhöhten Dynamik. Im Rahmen der experimentellen Genauigkeit konnte keine Druckabhängigkeit der MSD in Anwesenheit von Glycin festgestellt werden. Eine Zunahme der MSD wurde ebenfalls für das Protein Lysozym beobachtet.

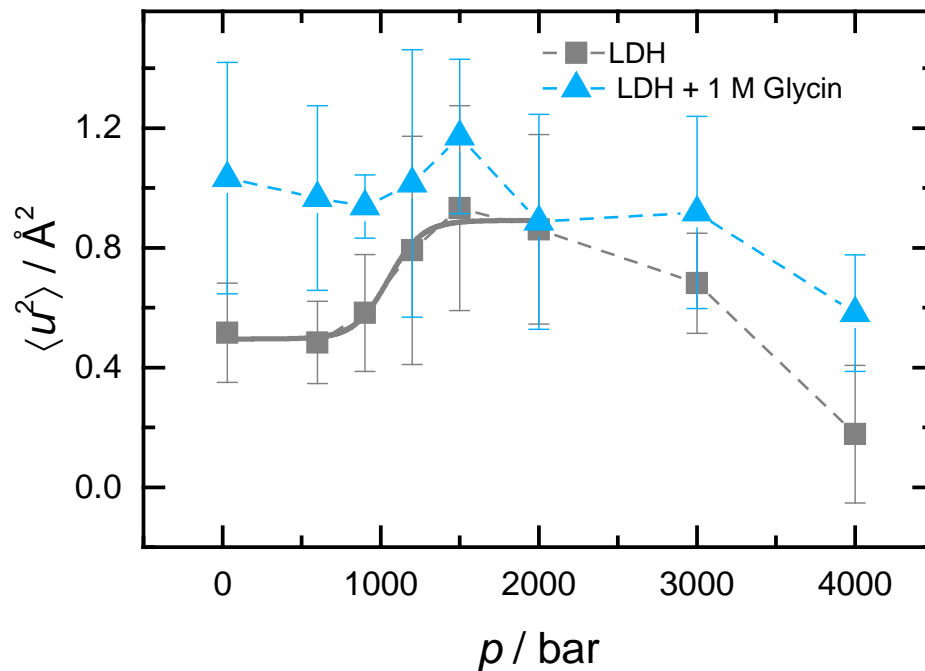


Abbildung 7.4: Druckabhängige Entwicklung der MSD von 90 mg mL^{-1} LDH in Anwesenheit von 1 M Glycin. Die gestrichelten Linien und sigmoidalen Kurven dienen der optischen Orientierung.

7.3.2 Dynamik: QENS

Abbildung 7.5 zeigt die summierten QENS-Intensitäten von LDH. Zusätzlich ist das Spektrum des Vanadiumzylinders gezeigt, um die Auflösungsfunktion des Instruments zu zeigen. Ab 1200 bar, d.h. nach Dissoziation des Proteins, kommt es zu einer Verbreiterung der Spektren, d.h. einer erhöhten Diffusion des Proteins. Ab 3000 bar nimmt die Breite der Spektren drastisch ab und das QENS-Spektrum bei 4000 bar unterscheidet sich nur geringfügig von dem des Vanadium-Zylinders.

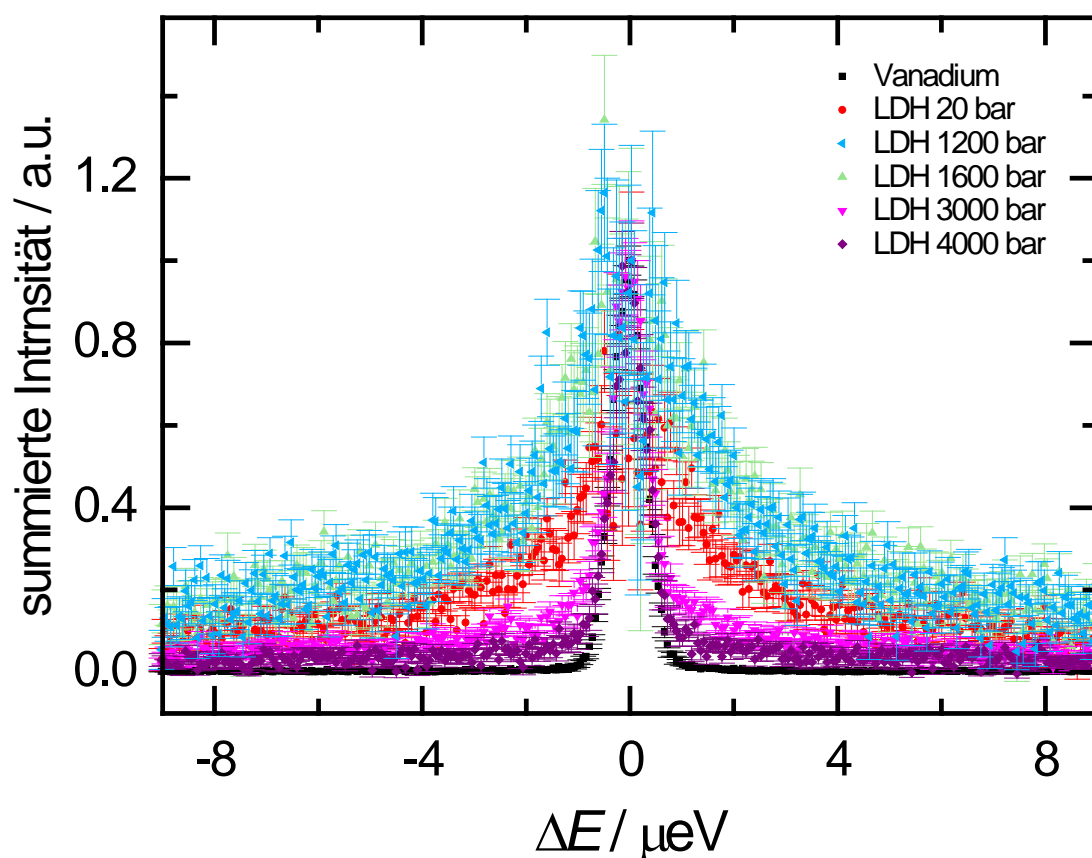


Abbildung 7.5: QENS-Spektren eines Vanadium-Zylinders und von 90 mg mL^{-1} LDH bei ausgewählten Drücken.

Abbildung 7.6 zeigt die aus elastischen Messungen am Instrument IN16b gewonnenen MSD-Werte. Zum Vergleich sind ebenfalls die am Instrument IN13 generierten Daten zu sehen. Bis 1200 bar sind die an beiden Instrumenten gewonnenen Werte nahezu identisch. Der signifikante Anstieg der MSD infolge der Dissoziation des Proteins

kann in den an IN16b generierten Daten nicht beobachtet werden. Oberhalb von 2000 bar wurde erneut eine Abnahme der MSD beobachtet.

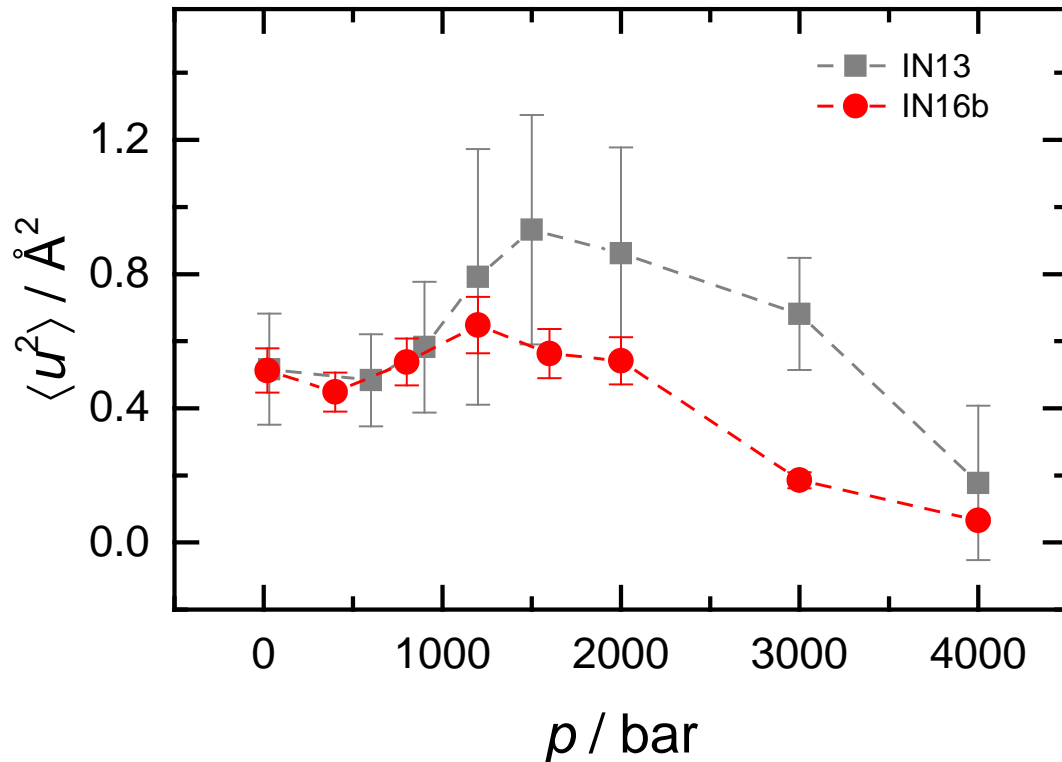


Abbildung 7.6: Druckabhängige Entwicklung der MSD von 90 mg mL^{-1} LDH, dem Komplex zwischen LDH und NADH (A) bzw. NADH + Oxamat (B) und LDH in Anwesenheit von 1 M Glycin. Die gestrichelten Linien und sigmoidalen Kurven dienen der optischen Orientierung.

Die weitere Auswertung der QENS-Daten war zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit nicht abgeschlossen.

7.3.3 FTIR-Spektroskopie

Eine Charakterisierung der Dissoziation und Aggregation des Proteins erfolgte durch FTIR-spektroskopische Messungen.

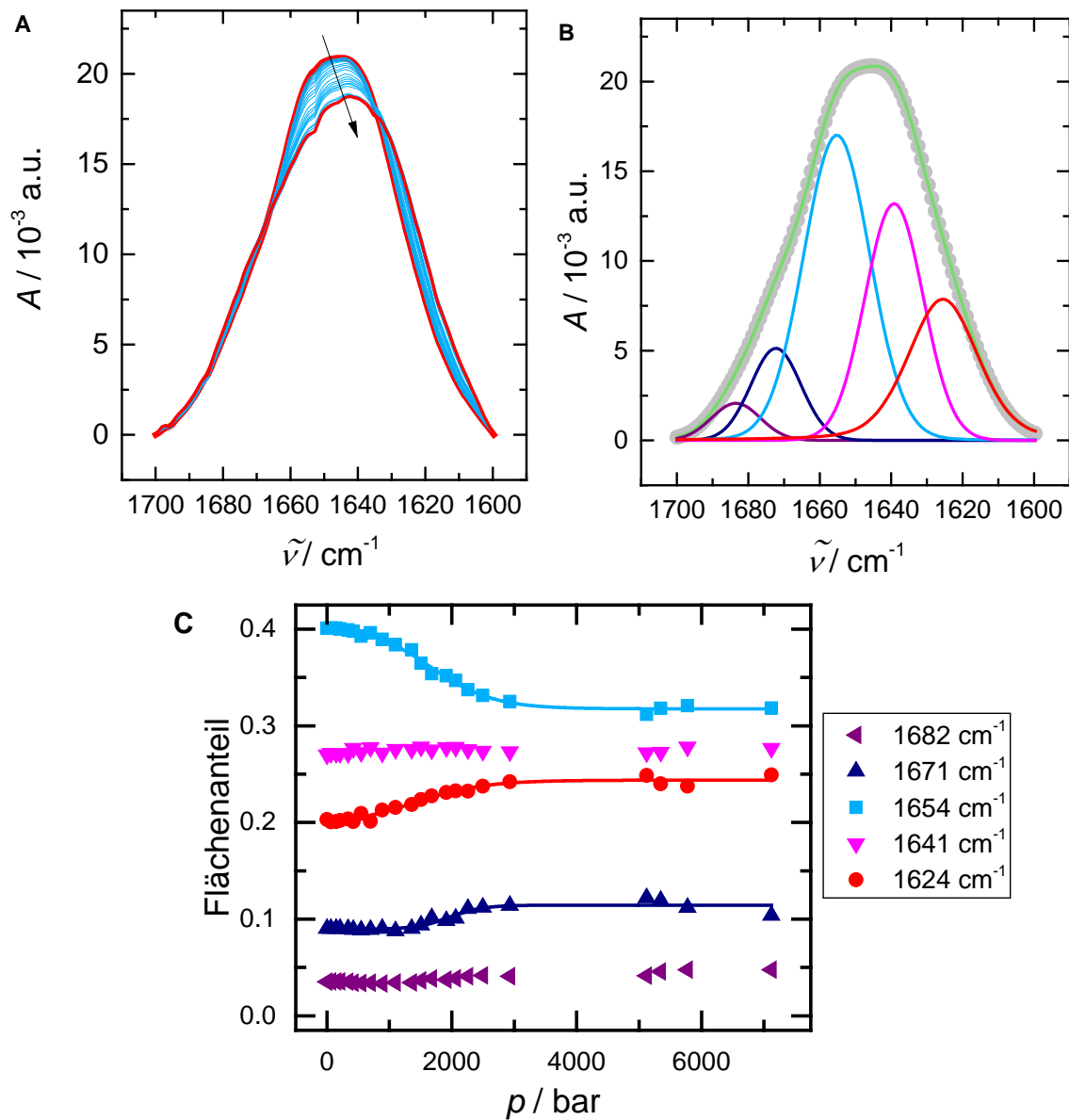


Abbildung 7.7: Druckabhängige Entwicklung der Amid-I'-Bande von LDH (A). Approximation der experimentellen Daten (Kreise) durch Subbanden (B). Druckabhängige Entwicklung des Flächenanteils dieser Subbanden (C).

Abbildung 7.7 A zeigt die druckabhängige Entwicklung der Amid-I'-Bande. Die Subbanden, welche zur Anpassung der experimentellen Daten verwendet wurden, zeigt Abbildung 7.7 B. Eine mögliche Zuordnung dieser Subbanden zu bestimmten Sekundärstrukturelementen kann Tabelle 7.2 entnommen werden. Dabei zeigt sich, dass es ab 1000 bar zu Änderungen der Sekundärstruktur, namentlich einer Abnahme des Anteils an α -Helices (repräsentiert durch die Subbande bei 1654 cm^{-1}), einhergehend mit einer Zunahme an β -Faltblattstrukturen (repräsentiert durch die Subbande bei 1624 cm^{-1}), kommt. Der Anteil an ungeordneten Strukturen bleibt bis 7000 bar konstant.

Die für eine Aggregation des Proteins charakteristischen Bandenmaxima bei 1615 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} wurden hier nicht beobachtet.^{268,269}

Tabelle 7.2: Mögliche Zuordnung der ermittelten Subbanden von LDH zu bestimmten Sekundärstrukturelementen.

Wellenzahl	Sekundärstrukturelement
$1624 \pm 2\text{ cm}^{-1}$	intermolekulare β -Faltblätter
$1641 \pm 2\text{ cm}^{-1}$	ungeordnete Strukturen
$1654 \pm 2\text{ cm}^{-1}$	α -Helix
$1671 \pm 2\text{ cm}^{-1}$	Turn-Strukturen
$1682 \pm 2\text{ cm}^{-1}$	intermolekulare β -Faltblätter

7.3.4 Enzymkinetik

Michaelis-Menten-Auftragungen der durch LDH katalysierten Reaktion bei ausgewählten Drücken sind exemplarisch in Abbildung 7.8 gezeigt. Hier zeigt sich bereits, dass die verwendeten Osmolyte die Form der angepassten Kurven sowie die Druckabhängigkeit der Kinetik beeinflussen.

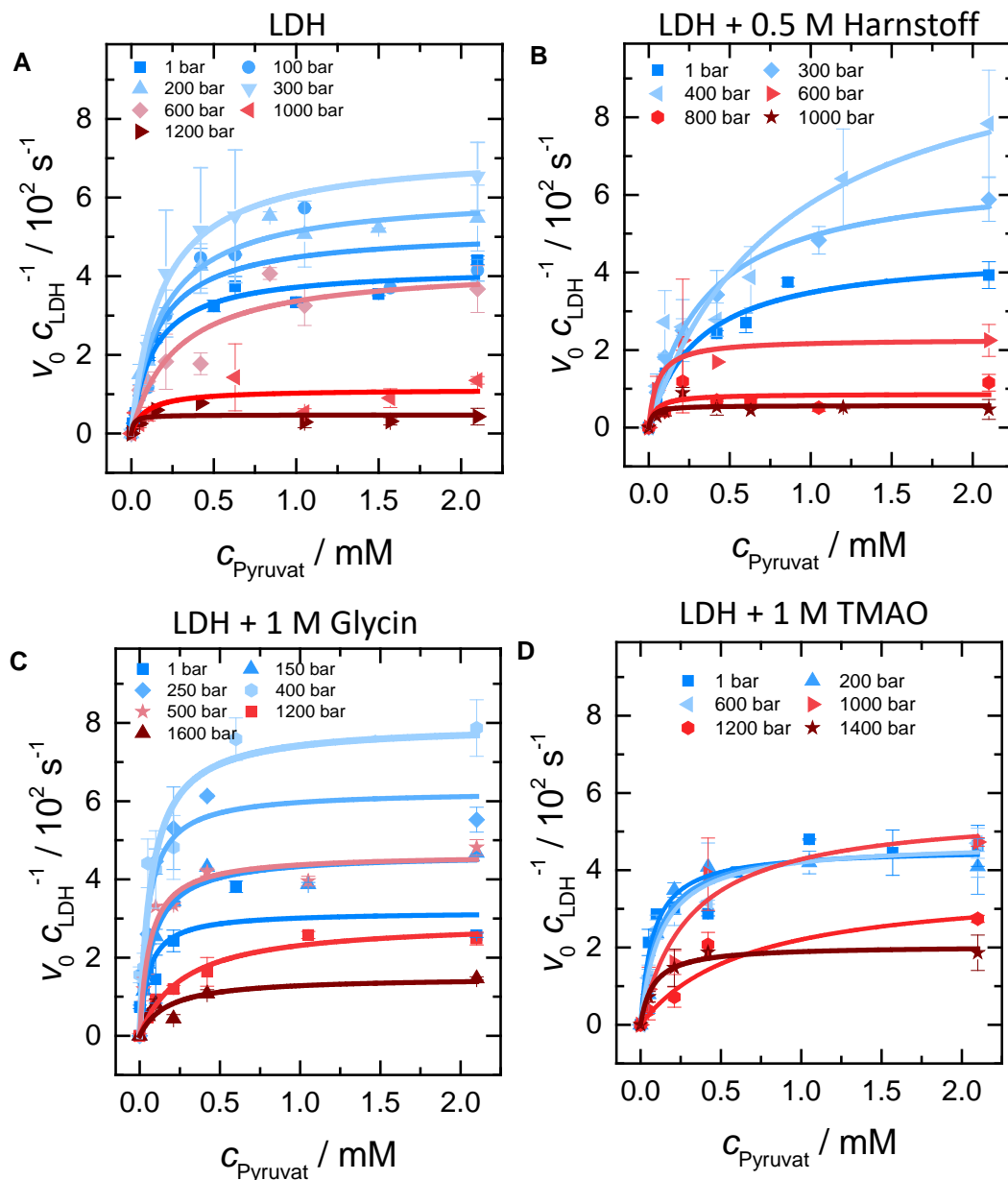


Abbildung 7.8: Michaelis-Menten-Auftragungen der durch LDH katalysierten Umwandlung von Pyruvat zu Lactat in Abwesenheit (A) sowie in Anwesenheit der Osmolyte Harnstoff (B), Glycin (C) und TMAO (D) bei ausgewählten Drücken.

Abbildung 7.9 zeigt die druckabhängige Entwicklung von k_{cat} in Ab- und Anwesenheit von Osmolyten.

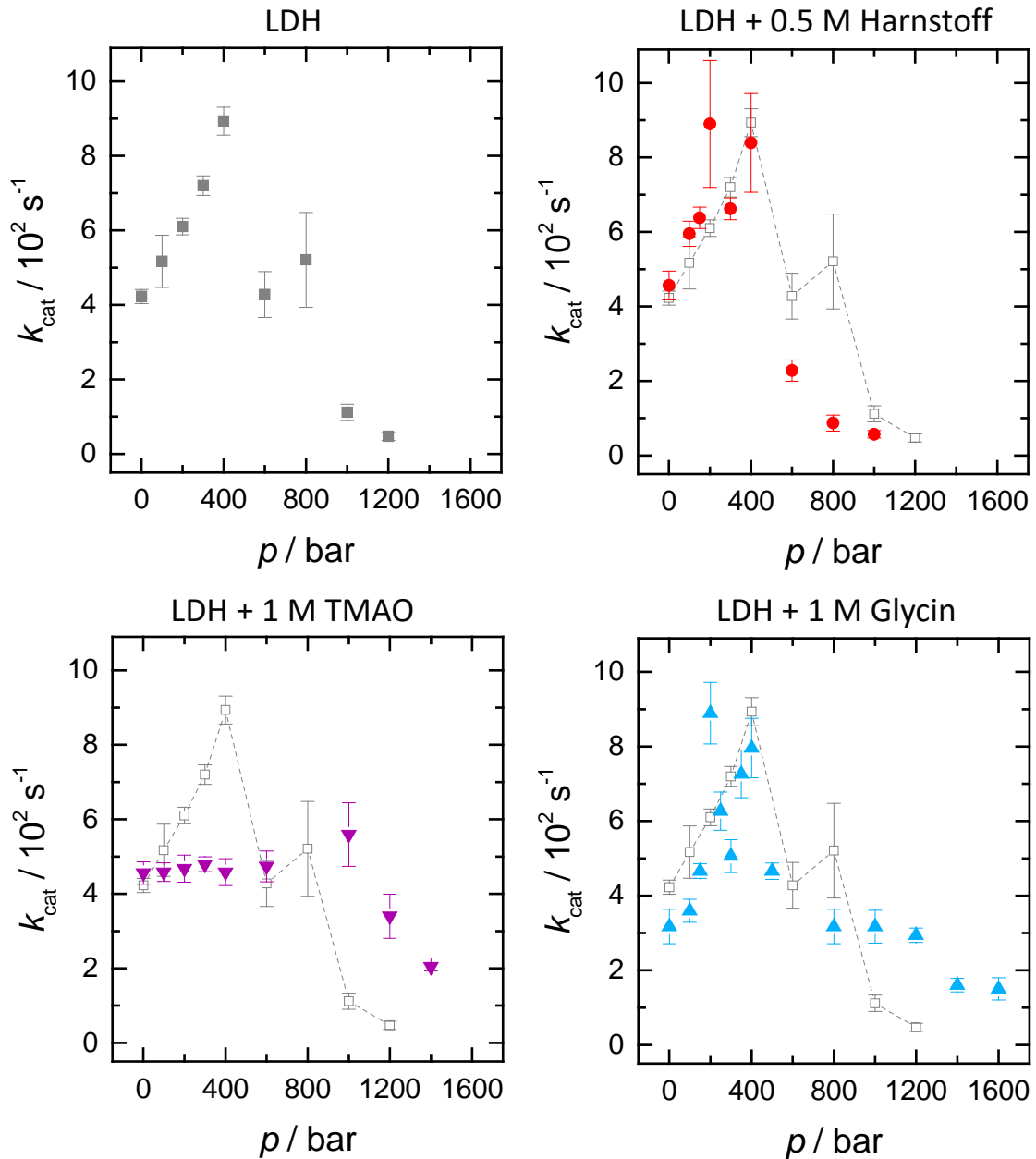


Abbildung 7.9: Druckabhängige Entwicklung von k_{cat} der durch LDH katalysierten Umwandlung von Pyruvat zu Lactat in An- und Abwesenheit der Osmolyte Harnstoff, TMAO und Glycin.

Bei 1 bar wurde in Abwesenheit von Osmolyten ein Wert von $k_{\text{cat}} \approx 400 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Zum Vergleich werden in der Literatur Werte von 350 s^{-1} für LDH des

Menschens³⁸⁴ und 190 s^{-1} für Bakterien-LDH angegeben.³⁶² In Abwesenheit von Osmolyten nimmt k_{cat} bis 400 bar linear mit steigendem Druck zu. Im Zuge einer weiteren Druckapplikation sinkt k_{cat} wieder auf den Ursprungswert. Bei 1000 bar erfolgt schließlich, bedingt durch die Dissoziation des Tetramers, die Deaktivierung des Enzyms. Dies ist dem Eindringen von Wassermolekülen in das aktive Zentrum zuzuschreiben.³⁷⁹

Darüber hinaus offenbart Abbildung 7.9, dass der druckabhängige Verlauf von k_{cat} , jedoch nicht der Absolutwert dieser Größe, durch die Anwesenheit der untersuchten Osmolyte beeinflusst wird. Der Anstieg von k_{cat} mit steigendem Druck, welcher in der reinen Pufferlösung beobachtet wurde, erfolgt ebenfalls in Anwesenheit von Harnstoff und Glycin. Jedoch beeinflussen beide Substanzen den Deaktivierungsdruck und somit die Dissoziation des Tetramers. So erfolgt die Deaktivierung in Anwesenheit von Harnstoff bereits ab 600 bar und in Anwesenheit von Glycin erst ab 1400 bar. In der Anwesenheit von TMAO zeigt sich ein anderes druckabhängiges Verhalten von k_{cat} . So wird der zuvor beschriebene Anstieg von k_{cat} hier nicht beobachtet. Die Deaktivierung erfolgt in Anwesenheit von 1 M TMAO ab circa 1200 bar. Wie Glycin stabilisiert also auch TMAO die tetramere Konformation des Enzyms.

Die druckabhängige Entwicklung von K_m ist in Abbildung 7.10 gezeigt. In Abwesenheit von Osmolyten steigt K_m mit zunehmendem Druck zunächst von 0.14 mM (Literaturwert: 1.38 mM³⁸⁵) auf 0.34 mM bei 800 bar. dies heißt, dass die Affinität des Substrats mit steigendem Druck abnimmt. Nach der Dissoziation nimmt K_m ab.

Den Osmolyt-Einfluss auf K_m zeigen die Abbildungen 7.10 B-D. Vor der Dissoziation ist eine Erhöhung von K_m durch 0.5 M Harnstoff angedeutet, eine eindeutige Aussage kann im Rahmen des experimentellen Fehlers jedoch nicht getroffen werden. In der Literatur wurde jedoch mehrfach berichtet, dass Harnstoff als kompetitiver Inhibitor von Pyruvat in Knochenfisch-, Plattenkiemer- und Säugetier-LDH agiert,³⁸⁶⁻³⁸⁸ wodurch sich ein möglicher Anstieg von K_m erklären ließe.

Auch in der Anwesenheit von Harnstoff wurde ein Anstieg von K_m bis zur Dissoziation, gefolgt von einer Abnahme bei höheren Drücken, beobachtet. Glycin und TMAO hingegen verringern K_m vor der Dissoziation. Bis 800 bar wurde in Anwe-

senheit dieser Osmolyte kein Druckeinfluss auf K_m festgestellt.

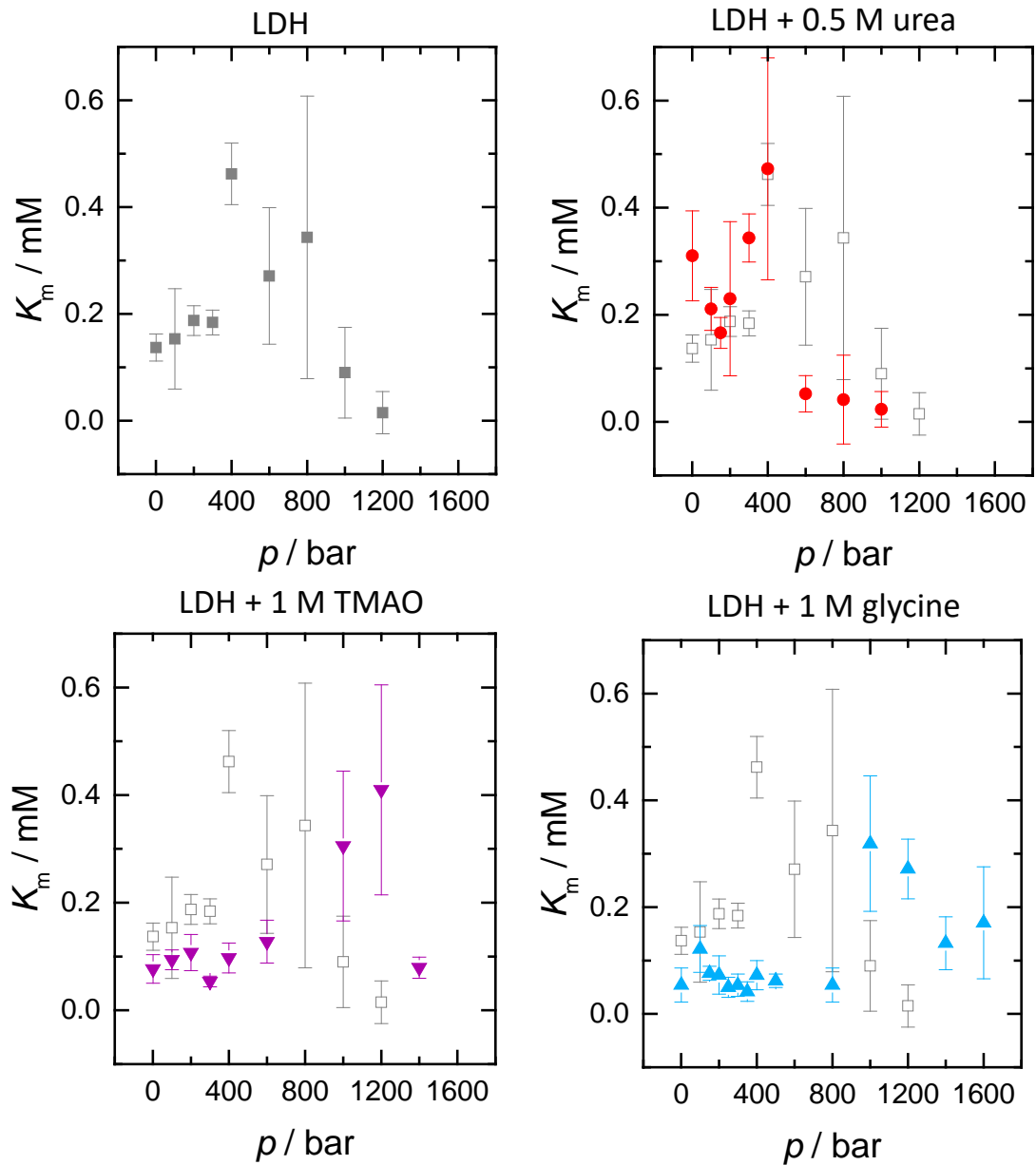


Abbildung 7.10: Druckabhängige Entwicklung von K_m für Pyruvat der durch LDH katalysierten Reaktion in Anwesenheit der Osmolyte Harnstoff, TMAO und Glycin.

Im Zuge einer weiteren Druckapplikation wurde ein Anstieg von K_m beobachtet. Eine Erhöhung von K_m durch Harnstoff wurde für mehrere Enzyme beobachtet, wohingegen TMAO oftmals den gegenteiligen Effekt hat.³⁴⁴ Dies wird zumeist den unterschiedlichen Einflüssen der Osmolyte auf die Proteinkonformation zugeschrie-

ben.³⁵⁶ Auch können Änderungen der Michaelis-Konstante in Anwesenheit der Osmolyte durch Änderungen von Aktivitätskoeffizienten erklärt werden.^{11,389} Der Osmolyt-Einfluss auf K_m muss somit nicht notwendigerweise auf Konformationsänderungen beruhen.

Druckabhängige Untersuchungen der Enzymkinetik ermöglichen darüber hinaus die Bestimmung von Volumenänderungen während der katalysierten Reaktion.^{25,45} Abbildung 7.11 A zeigt das Aktivierungsvolumen bei hohen und geringen Substratkonzentrationen, welches gemäß Gleichung (7.4) aus der Auftragung von $\ln k$ gegen den Druck bestimmt wurde (siehe Abbildung 7.13 im Anhang dieses Kapitels).

Eine genauere volumetrische Charakterisierung erfolgte durch die konzentrationsabhängige Bestimmung des Aktivierungsvolumens. Bei hohen Substratkonzentrationen ist v_0 proportional zu k_{cat} und das Aktivierungsvolumen entspricht der Volumendifferenz des Enzym-Substrat-Komplexes ES und des aktivierten Enzym-Substrat-Komplexes ES*. Bei geringen Konzentrationen ist v_0 proportional zu k_{cat}/K_m und das hieraus bestimmte Aktivierungsvolumen ermöglicht die Bestimmung der Volumenänderung, welche im Zuge der Substratbindung vonstattengeht (siehe hierzu Kapitel 1.2.3 und insbesondere Abbildung 1.3).

Für hohe Substratkonzentrationen wurde in reiner Pufferlösung ein Aktivierungsvolumen von $\Delta V^\ddagger = -45.3 \pm 1.3 \text{ mL mol}^{-1}$ bestimmt. Ein negatives Aktivierungsvolumen von circa -18 mL mol^{-1} wurde bereits in der Literatur unter anderen Reaktionsbedingungen (pH 8, 15°C) beschrieben.⁴⁷ Bei geringen Substratkonzentrationen wurde ein Aktivierungsvolumen von $-16.8 \pm 7.1 \text{ mL mol}^{-1}$ bestimmt. Das heißt, dass die Substratbindung zu einer Volumenzunahme von 28.5 mL mol^{-1} führt. Die Konzentrationsabhängigkeit des Aktivierungsvolumens wurde zusätzlich durch die Druckabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit bei bestimmten Substratkonzentrationen bestimmt (siehe Abbildung 7.12). Die durch beide Methoden bestimmten Aktivierungsvolumina sind, wie die Abbildungen 7.11 A + B zeigen, von vergleichbarer Größenordnung. Abbildung 7.11 C zeigt das Volumenprofil der katalysierten Reaktion. Demgemäß geht die Substratbindung mit einer Volumenzunahme einher. Da Druckapplikation den Zustand des geringsten Volumens stabilisiert, nimmt, wie

der druckabhängige Verlauf von K_m zeigt, mit steigendem Druck die Affinität des Substrats ab. der aktivierte Enzym-Substratkomplex weist jedoch ein geringeres Volumen auf.

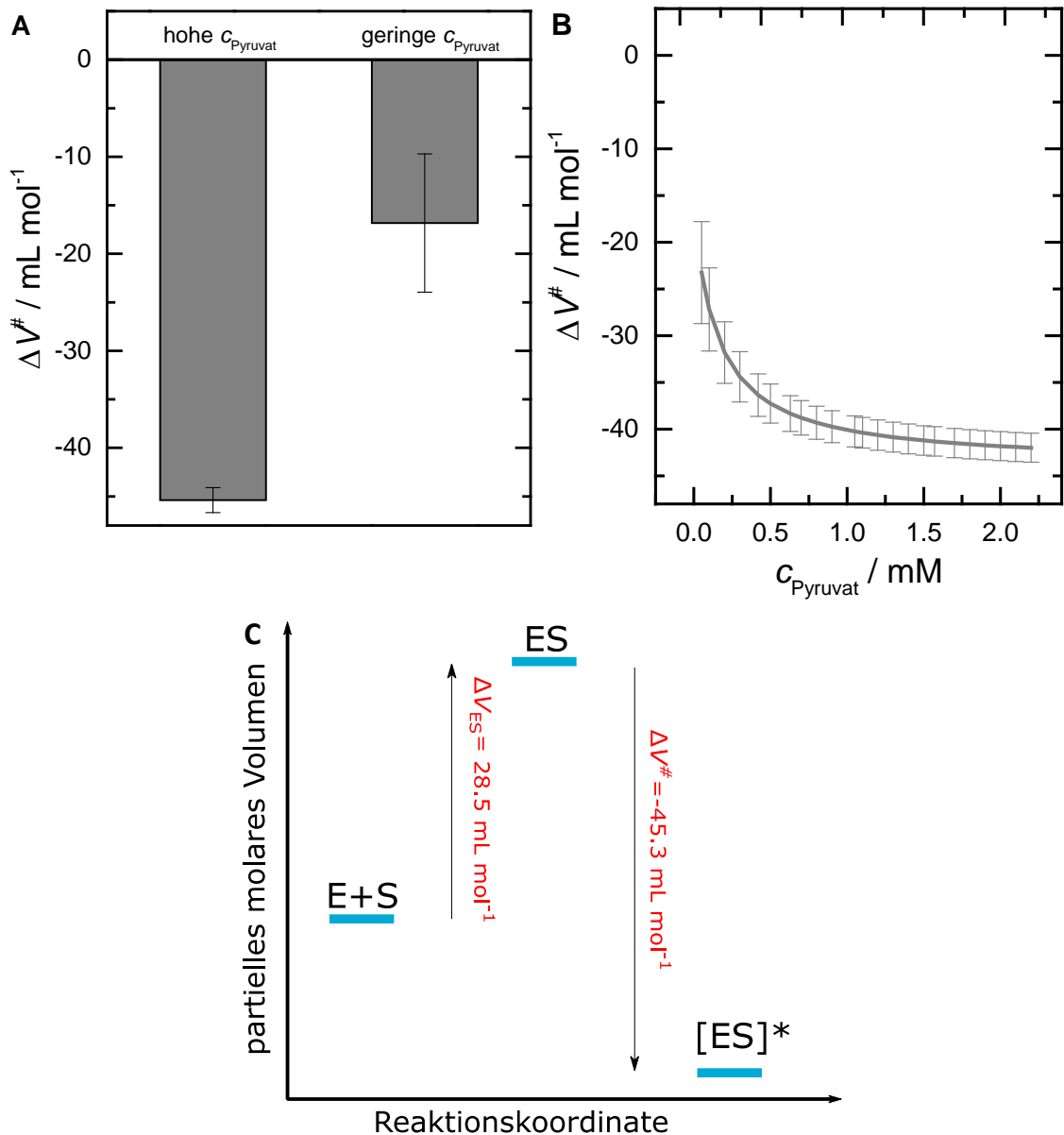


Abbildung 7.11: Aktivierungsvolumen der LDH-katalysierten Umwandlung von Pyruvat zu Lactat für hohe und geringe Pyruvat-Konzentrationen (A), Konzentrationsabhängigkeit des Aktivierungsvolumens (B) und Volumenprofil der katalysierten Reaktion (C).

Die Aktivierungsvolumina in Anwesenheit der Osmolyte sind in den Abbildungen 7.14 und 7.15 im Anhang dieses Kapitels gezeigt. Im Rahmen der experimentellen

Genauigkeit konnte kein signifikanter Einfluss von Glycin oder TMAO auf das Aktivierungsvolumen bei hohen Pyruvat-Konzentrationen beobachtet werden. In Anwesenheit von TMAO ist das Aktivierungsvolumen mit -4.5 ± 1.1 jedoch signifikant weniger negativ. Ein ähnlicher Einfluss, d.h. ein weniger negatives bzw. sogar positives Aktivierungsvolumen der durch LDH katalysierten Reaktion, wurde ebenfalls bei Zugabe von Salzen beobachtet.⁴⁷ Bei geringen Substratkonzentrationen weisen die in der Anwesenheit von Cosolventien bestimmten Werte, bedingt durch die Ungenauigkeit der K_m -Werte, eine vergleichsweise große Ungenauigkeit auf, weshalb keine aussagekräftigen Schlüsse gezogen werden können.

7.4 Anhang

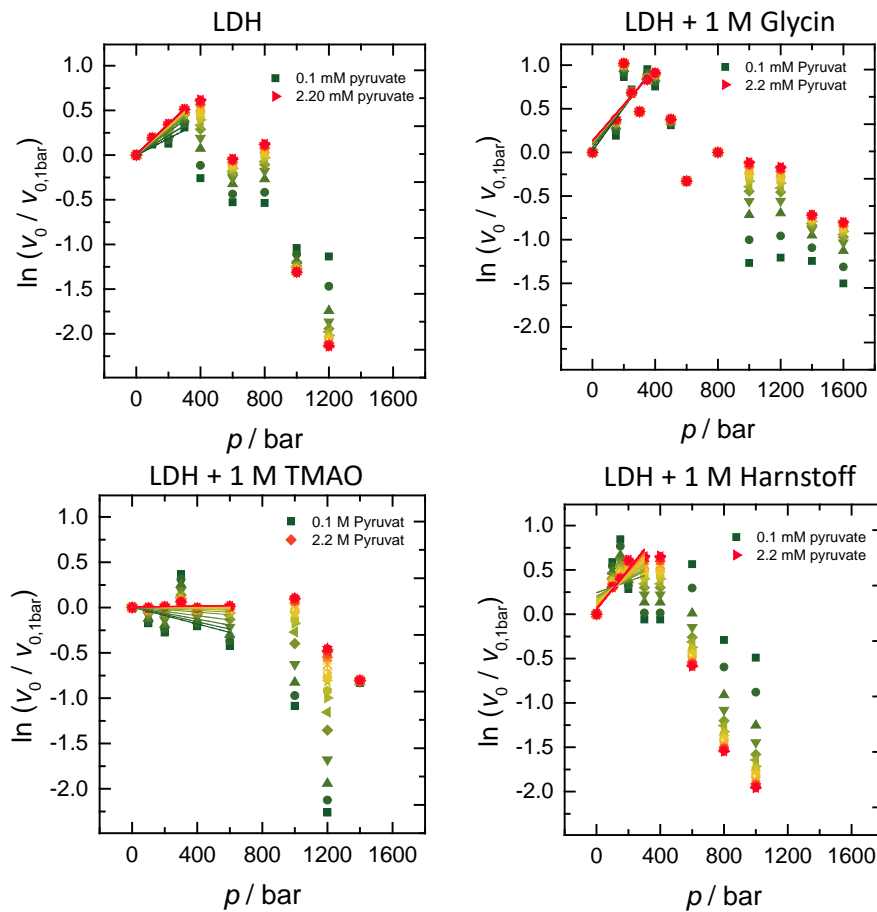


Abbildung 7.12: Semilogarithmische Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit der LDH-katalysierten Reaktion gegen den Druck für verschiedene Substratkonzentrationen. Die durchgezogenen Linien stellen Funktionsanpassungen dar, aus welchen das Aktivierungsvolumen bestimmt wurde.

7 Einfluss von Druck und Osmolyten auf die Dynamik und Aktivität von LDH

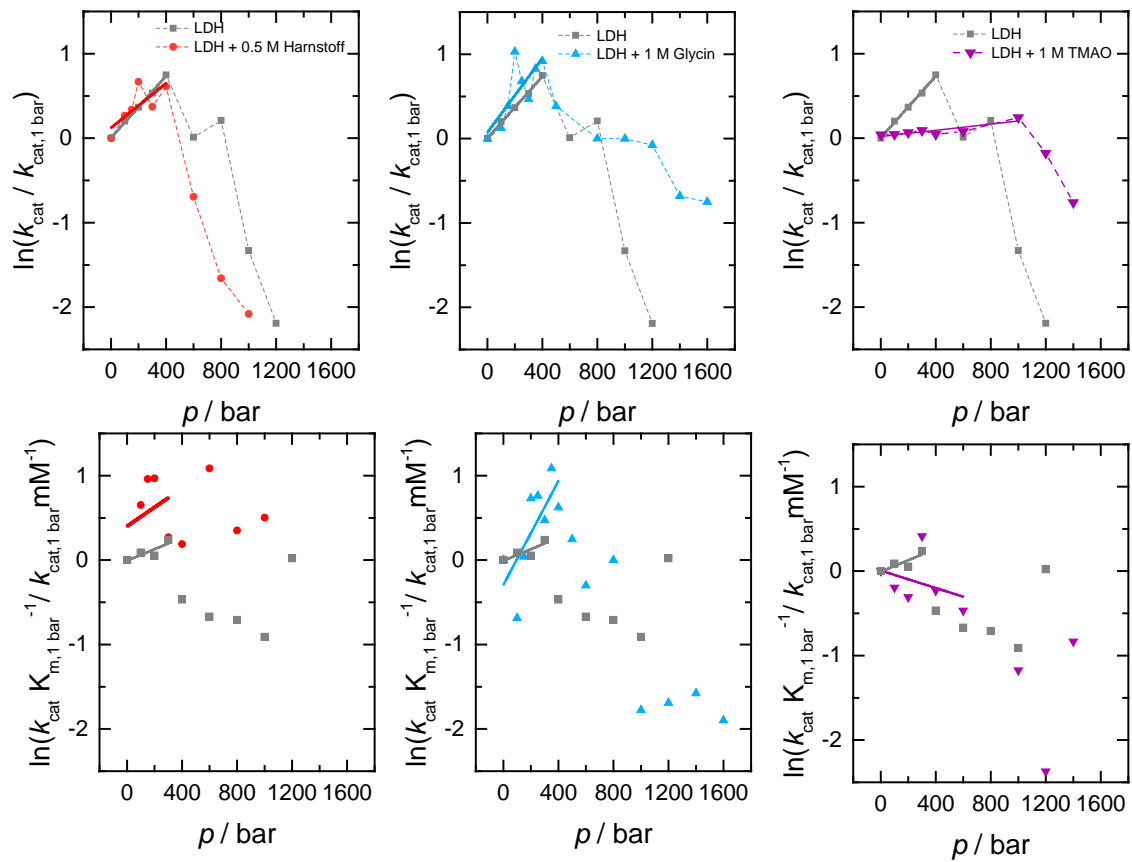


Abbildung 7.13: Semilogarithmische Auftragung von k_{cat} (oben) und $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (unten) gegen den Druck. Die durchgezogenen Linien stellen Funktionsanpassungen dar, aus welchen das Aktivierungsvolumen bestimmt wurde.

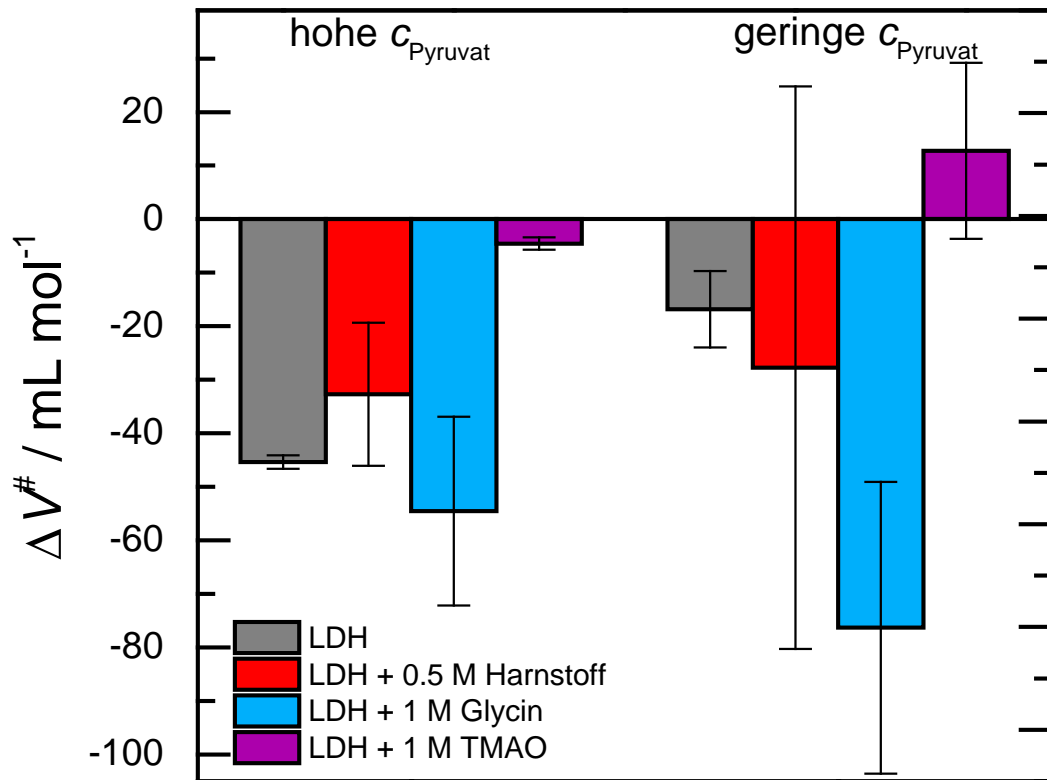


Abbildung 7.14: Aktivierungsvolumen der LDH-katalysierten Umwandlung von Pyruvat zu Lactat für hohe und geringe Pyruvat-Konzentrationen in An- und Abwesenheit der Osmolyte Harnstoff, Glycin und TMAO.

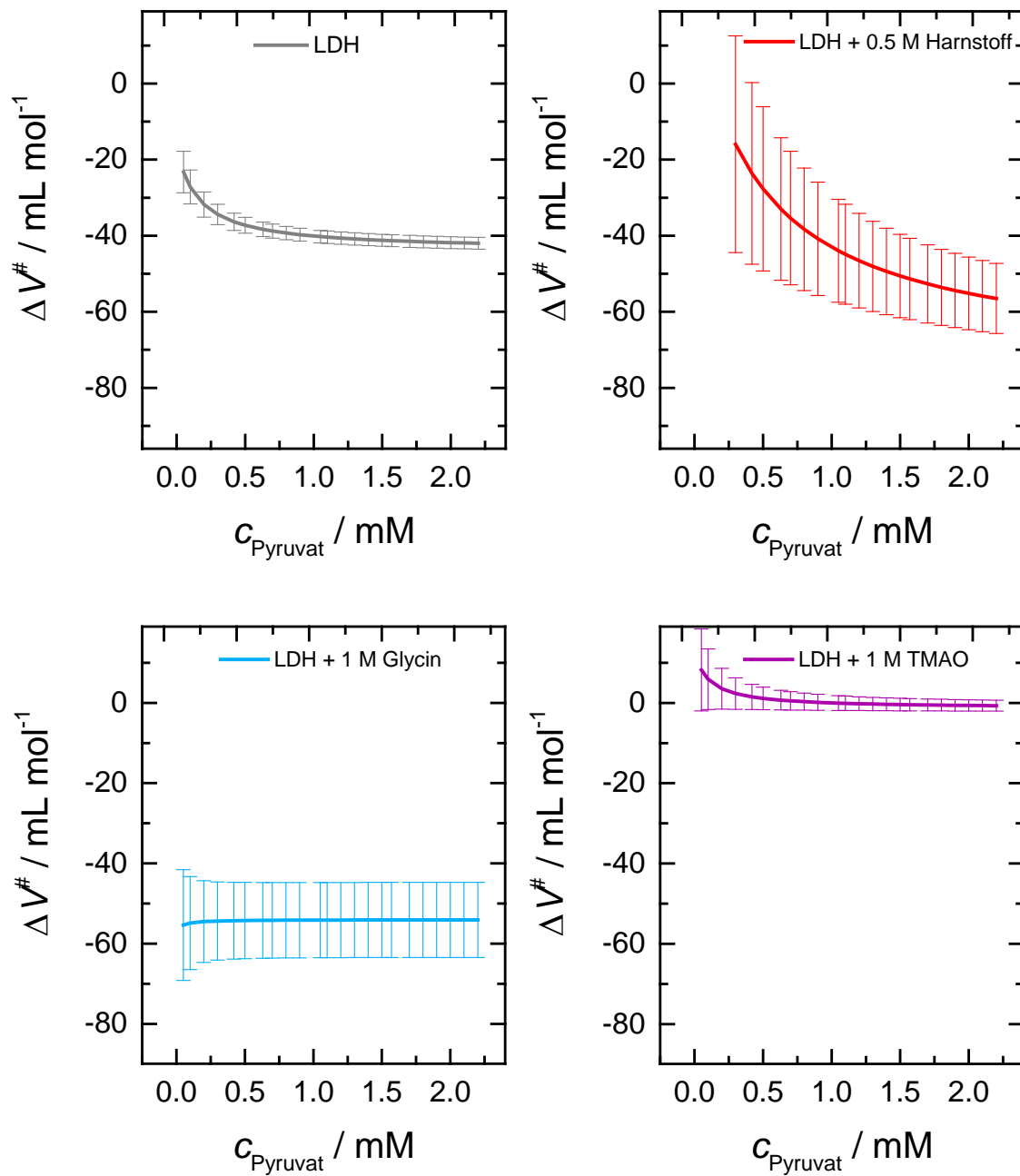


Abbildung 7.15: Konzentrationsabhängigkeit des Aktivierungsvolumens der LDH katalysierten Reaktion als Funktion der Substratkonzentration in Anwesenheit der Osmolyte.

8 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der kombinierten Einflüsse von Druck und physiologisch relevanten Osmolyten auf Proteine und Membransysteme. Die Anwendung einer Vielzahl an unterschiedlichen Methoden ermöglichte dabei stets das Zusammenspiel zwischen Struktur, Dynamik und Funktionalität des jeweiligen Biomoleküls zu ergründen. Es kamen Osmolyte, welche sich sowohl in ihrer chemischen Struktur, als auch in ihrem Interaktionsverhalten mit Biomolekülen stark unterscheiden, als Cosolventien zum Einsatz. Es folgt eine Vorstellung der wesentlichen Forschungsergebnisse.

8.1 Zusammenfassung der Forschungsprojekte

Projekt I: Einfluss von osmotischem und hydrostatischem Druck auf multilamellare Lipidmembranen in Anwesenheit von PEG und Trehalose

Zielsetzung:

Ziel war die Evaluierung der kombinierten Einflüsse von osmotischem und hydrostatischem Druck auf multilamellare Membransysteme. Osmotischer Druck wurde dabei durch Zugabe des inerten Polymers PEG, welches vom Membranzwischenraum ausgeschlossen wird, sowie durch das Disaccharid Trehalose generiert. Der Einfluss auf die Struktur wurde durch SAXS-Messungen aufgeklärt. Zusätzliche Erkenntnisse über das Phasenverhalten und Hydratationseigenschaften wurden durch fluoreszenzspektroskopische und kalorimetrische Messungen gewonnen.

Ergebnisse:

- Trehalose verringert die multilamellare Ordnung und führt zu einem Anschwellen des Membranzwischenraums bedingt durch die direkte Interaktion der Trehalosemoleküle mit der Lipidmembran. Weiterhin induziert Trehalose eine Phasenkoexistenz, vermutlich durch eine inhomogene Verteilung von Trehalose-Cluster im Membranzwischenraum. Bei geringen Trehalose-Konzentrationen konnte eine Interkalation der Trehalose-Moleküle beobachtet werden. Bei hohen Konzentrationen dominieren hingegen Ausschluss-Effekte.
- PEG führt zu einer Zunahme der multilamellaren Ordnung und zu einer Verringerung der Schichtdicke. In Anwesenheit von 30 wt. % PEG wurde unter Druck die Koexistenz von drei stark dehydratisierten Gelphasen beobachtet.
- In Anwesenheit beider Substanzen wirkt Trehalose der durch PEG induzierten Membranordnung entgegen.
- Druck induziert die Bildung einer stark angeschwollenen Gelphase in der Anwesenheit von sowohl PEG als auch Trehalose.
- Trehalose ist somit in der Lage, die Ordnung und Fluidität biologischer Membranen unter osmotischem oder hydrostatischem Druck zu regulieren, hat unter optimalen Wachstumsbedingungen jedoch auch negative Einflüsse.

Projekt II: Einfluss von Druck, Temperatur, Crowding und Cosolventien auf die interne Proteindynamik und Stabilität von Lysozym

Zielsetzung:

Es sollte der Einfluss von Druck und der Osmolyte TMAO und Harnstoff auf die interne Proteindynamik des Proteins Lysozym untersucht werden. Um *Crowding* Effekte beurteilen zu können, kamen zwei Proteinkonzentrationen zum Einsatz. Zusätzlich sollte der Einfluss der Osmolyte auf die Stabilität des Proteins durch FTIR- Spektroskopie untersucht werden.

Ergebnisse:

- TMAO führt zu einer signifikanten Abnahme der internen Proteindynamik, Harnstoff hingegen zeigt keinen Einfluss auf die Proteindynamik in dem hier untersuchten Zeitfenster. Der Effekt einer Mischung beider Osmolyte entspricht im Wesentlichen demjenigen von 2 M TMAO. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtungen ist die Tatsache, dass Harnstoff direkt mit dem Peptidrückgrat interagiert, wohingegen TMAO ausgeschlossen wird und bevorzugt mit Wasser interagiert. Die damit einhergehende Verstärkung des H-Brücken-Netzwerks scheint die konformellen Fluktuationen des Proteins einzuschränken.
- In Anwesenheit der Osmolyte wird die Dynamik des Systems weder durch Druck noch durch *self-crowding* signifikant beeinflusst.
- *Self-crowding* hat einen destabilisierenden Einfluss auf Lysozym, der Einfluss von *self-crowding* wird somit durch enthalpische Beiträge bestimmt.

Projekt III: Einfluss von Druckapplikation auf die Struktur und Dynamik des Komplexes zwischen Calmodulin und der hypervariablen Region von KRas4B

Zielsetzung:

Das hantelförmige Protein Calmodulin erfährt im Rahmen der Ligandenbindung große strukturelle Änderungen. So weisen Ligand-Calmodulin-Komplexe für gewöhnlich eine kugelförmige Struktur auf. Im Rahmen dieses Projektes sollte untersucht werden, inwieweit sich diese strukturellen Änderungen auf die interne Proteindynamik auswirken. Die Struktur der Komplexe wurde durch SAXS-Messungen und die Dynamik durch EINS Messungen aufgeklärt.

Ergebnisse:

- Calmodulin erfährt eine partielle Entfaltung, namentlich ein Eindringen von Wassermolekülen in die Seitendomänen, ab 1000 bar. Diese Entfaltung ist mit einer Zunahme der Proteindynamik verbunden.
- Calmodulin bildet mit dem KRas4B-HVR-Peptid, je nach dem molaren Verhältnis zwischen Protein und Peptid, einen X-förmigen dimeren Komplex oder einen kugelförmigen Komplex aus. Dies konnte sowohl durch SAXS- als auch durch DLS-Messungen gezeigt werden. Der X-förmige Komplex dissoziiert, wie druckabhängige SAXS-Messungen zeigten, bei 3000 bar.
- Es konnte kein signifikanter Unterschied der Dynamik von hantelförmigem apo- und holo- Calmodulin sowie Kugel- und X-förmiger Komplexe beobachtet werden. Die interne Proteindynamik wird somit, anders als die globale Diffusion, nicht durch die Form des Calmodulin-Komplexes bestimmt.

Projekt IV: Der Effekt von Osmolyten und *Crowding* auf die druckinduzierte Dissoziation und Deaktivierung von dimerer Alkoholdehydrogenase
Zielsetzung:

Die Dissoziation oligomerer Proteine unter Druck ist ein intensiv erforschtes Phänomen. Ziel dieses Projekts war es zu evaluieren, inwieweit diese Dissoziation durch Osmolyte und *Crowding* beeinflusst werden kann. Zusätzlich erfolgte eine Evaluierung struktureller Änderungen durch FTIR-Spektroskopie und Fluoreszenz-Spektroskopie. Inwieweit die Kinetik der katalysierten Reaktion durch die strukturellen Änderungen und Osmolyte beeinflusst wird, wurde durch Hochdruck-*stopped flow*-Messungen evaluiert.

Ergebnisse:

- Insgesamt konnten drei Druckeffekte beobachtet werden. Zunächst erfolgt die Dissoziation loser Proteincluster. Diese erfolgt bereits bei Drücken von unter 1000 bar. Bei circa 800 bar erfolgen leichte strukturelle Änderungen der Coenzym-Bindungstasche, welche mit der Deaktivierung des Proteins einhergehen. Die Dissoziation des Proteins erfolgt ab circa 2000 bar und ist mit einer Änderung der Sekundärstruktur verbunden.
- Die beschriebenen Druckeffekte können effektiv durch Osmolyte und *Crowding* beeinflusst werden. So bevorzugen TMAO und PEG die dimere Konformation. Harnstoff zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Dissoziation, wirkt aber in Kombination mit TMAO einer Überstabilisierung entgegen.
- Die Kinetik der LADH-katalysierten Ethanol-Oxidation wurde lediglich durch Harnstoff negativ beeinflusst. Alle weiteren Substanzen zeigten keine signifikanten Einflüsse auf die Reaktionsgeschwindigkeit.
- Temperaturabhängige FTIR-, Fluoreszenz- und SAXS-Messungen deuten darauf hin, dass es im Zuge einer Temperaturerhöhung zunächst zur Dissoziation, gefolgt von der Entfaltung / Aggregation des Proteins kommt.

Projekt V: Einfluss von Druck und Osmolyten auf die Dynamik und Aktivität von Lactatdehydrogenase

Aufbauend auf Projekt IV wurde erneut die Dissoziation eines oligomeren Enzyms untersucht. Die Zielsetzung lag dabei weniger auf der Charakterisierung der Dissoziation, sondern vielmehr auf der Fragestellung, inwieweit diese die Dynamik des Proteins beeinflusst. Hierfür kamen QENS und EINS zum Einsatz. Zusätzlich wurde der Einfluss der Substratbindung und von Glycin auf die interne Dynamik untersucht. Ebenfalls wurde der Einfluss von Druck und Osmolyten auf die Kinetik untersucht.

Ergebnisse:

- Die Dissoziation des LDH-Tetramers bei circa 1000 bar führt zu einer Zunahme der internen Proteindynamik als auch der Diffusion. Ab 2000 bar erfolgt die Aggregation des Proteins, welche zu einer drastischen Abnahme der Dynamik führt.
- Das Binden des Coenzym NADH an das Protein induziert eine leicht verringerte Proteindynamik. Auch in Anwesenheit von NADH erfolgt eine Zunahme der Proteindynamik ab 1000 bar.
- In der Anwesenheit von NADH und des Substrat-Analogons Oxamat konnte kein signifikanter Unterschied der Dynamik von Dimer und Tetramer beobachtet werden.
- Glycin erhöht die interne Proteindynamik von LDH.
- Druckapplikation führt zu einer erhöhten enzymatischen Aktivität.
- Die Substratbindung führt zu einer Volumenzunahme.
- Kinetische Größen und das Aktivierungsvolumen der Reaktion werden durch die Osmolyte TMAO, Glycin und Harnstoff beeinflusst.

9 Englischsprachige Zusammenfassung

The biological functionality of biomolecules depends on their structure as well as on their dynamics. In essence, all life is non-equilibrium thermodynamics and based on a correct interplay between the structure and dynamics of biological macromolecules. The aim of this thesis is to investigate to what extent the structure as well as the dynamics and thus also the functionality of proteins and model membranes influence each other and how these factors can be modified by pressure application and the addition of osmolytes, i.e. by changes of the solution conditions.

In nature, life has been observed under various extreme environmental conditions, such as extreme temperatures, extreme pH levels or high osmotic and hydrostatic pressure. This requires the evolutionary development of certain compensation strategies in extremophilic organisms. One of these mechanisms is the increased biosynthesis of osmolytes. These are low-molecular-weight organic compounds that compensate for the influence of negative stressors. The focus of this thesis is mainly on the influence of hydrostatic pressure on the properties of membranes and proteins as well as on the extent to which this influence is affected by osmolytes. In addition, the influence of the stressors temperature and osmotic pressure was considered.

In this thesis, the effects of pressure application and osmolytes on model membranes and proteins were investigated in five subprojects. The application of a variety of different biophysical methods enabled to disentangle the interaction between structure, dynamics and functionality of the biomolecules. Osmolytes, which differ greatly both in their chemical structure and in their interaction with biomolecules, were used as cosolvents.

The main results of the five subprojects are summarized below:

- Trehalose compensates harmful influences caused by osmotic or hydrostatic pressure and is able to modulate the membrane order and fluidity under disruptive conditions, but also exerts negative effects under optimal conditions.
- TMAO effectively influences the internal protein dynamics of lysozyme, whereas the influence of urea, self-crowding and pressure is neglectable.
- Depending on the molar ratio, calmodulin forms either a X-shaped dimer complex or a globular complex with the KRAS4B-HVR peptide. The internal protein dynamics of these calmodulin species do not differ significantly. Pressure application leads to the dissociation of the dimeric complex.
- In total, three effects of pressure on the dimeric enzyme LADH were found. First, the dissociation of protein clusters occurs below 800 bar, followed by structural changes in the coenzyme binding pocket, which is accompanied by a loss of enzymatic activity at 900 bar. The dissociation of the protein occurs at 2000 bar, accompanied by slight changes of the secondary structure.
- The pressure-induced dissociation of the tetrameric protein LDH influences both the internal and the global dynamics of the protein. The pressure effects on the enzymatic activity are biphasic. In detail, pressure application initially leads to increased activity until deactivation occurs after dissociation. Kinetic parameters are influenced by osmolytes.

In essence, these findings suggest that osmolytes and pressure application are effective tools to modify the structure, dynamics and thus function of biological macromolecules. Further, osmolytes are an effective way to compensate harmful effects of stress factors like hydrostatic pressure. However, overstabilisation might occur in the absence of stressors. Thus, *in cellulo*, a precise tuning of the osmolyte level, depending on the environmental conditions, is mandatory.

10 Verzeichnisse

Literaturverzeichnis

- [1] L. J. Rothschild, R. L. Mancinelli, *Nature* **2001**, *409*(6823), 1092–1101.
- [2] P. H. Yancey, J. F. Siebenaller, *Journal of Experimental Biology* **2015**, *218*(12), 1880–1896.
- [3] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*(10), 858.
- [4] C. Kato, L. Li, Y. Nakamura, Y. Nogi, J. Tamaoka, K. Horikoshi, *the Review of High Pressure Science and Technology* **1998**, *7*(4), 1274–1276.
- [5] T. Q. Luong, S. Kapoor, R. Winter, *ChemPhysChem* **2015**, *16*(17), 3555–3571.
- [6] M. Gross, R. Jaenicke, *European Journal of Biochemistry* **1994**, *221*(2), 617–630.
- [7] D. Knorr, V. Heinz, R. Buckow, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2006**, *1764*(3), 619 – 631, proteins Under High Pressure.
- [8] J. L. Silva, A. C. Oliveira, T. C. Vieira, G. A. de Oliveira, M. C. Suarez, D. Foguel, *Chem Rev* **2014**, *114*(14), 7239–7267.
- [9] C. L. Brooks III, M. Karplus, B. M. Pettitt, *Proteins : a theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics*, Bd. LXXI, J. Wiley, New York, NY, **1988**.
- [10] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Studienbücher Chemie, Vieweg+Teubner Verlag, **2011**.
- [11] M. Gao, C. Held, S. Patra, L. Arns, G. Sadowski, R. Winter, *ChemPhysChem* **2017**, *18*(21), 2951–2972.
- [12] S. A. Hawley, *Biochemistry* **1971**, *10*(13), 2436–2442.
- [13] L. Smeller, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2002**, *1595*(1-2), 11–29.
- [14] K. Heremans, L. Smeller, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1998**, *1386*(2), 353–370.
- [15] D. Lopes, S. Grudzielanek, K. Vogtt, R. Winter, *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics* **2007**, *32*(1), 41–97.

- [16] P. L. Privalov, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1990**, 25(4), 281–306.
- [17] E. Larios, M. Gruebele, *Methods* **2010**, 52(1), 51–56.
- [18] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, P. F. McMillan, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **2013**, 75(1), 607–648.
- [19] T. V. Chalikian, K. J. Breslauer, *Current Opinion in Structural Biology* **1998**, 8(5), 657–664.
- [20] J.-B. Rouget, T. Aksel, J. Roche, J.-l. Saldana, A. E. Garcia, D. Barrick, C. A. Royer, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133(15), 6020–6027.
- [21] C. A. Royer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2002**, 1595(1-2), 201–209.
- [22] L. King, G. Weber, *Biochemistry* **1986**, 25(12), 3637–3640.
- [23] J. L. Silva, E. W. Miles, G. Weber, *Biochemistry* **1986**, 25(19), 5780–5786.
- [24] G. Weber, *High Pressure Chemistry, Biochemistry and Materials Science* **1983**, 401, 471–472.
- [25] B. B. Boonyaratankornkit, C. B. Park, D. S. Clark, *Biochim Biophys Acta*. **2002**, 1595(25), 235–249.
- [26] C. Balny **1998**, 15(C), 197–204.
- [27] J. L. Silva, G. Weber, *Annual review of physical chemistry* **1993**, 44, 89–113.
- [28] K. Rúan, G. Weber, *Biochemistry* **1989**, 28(5)(1979), 2144–2153.
- [29] G. Weber, *Biochemistry* **1986**, 25(12), 3626–3631.
- [30] K. Ruan, G. Weber, *Biochemistry* **1993**, 32(24), 6295–6301.
- [31] R. Daniel, R. Dunn, J. Finney, J. Smith, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2003**, 32(1), 69–92.
- [32] K. Henzler-Wildman, D. Kern, *Nature* **2007**, 450(7172), 964–972.
- [33] H. Frauenfelder, S. Sligar, P. Wolynes, *Science* **1991**, 254(5038), 1598–1603.
- [34] M. Karplus, J. Kuriyan, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **2005**, 102(19), 6679–6685.
- [35] M. Wolf-Watz, V. Thai, K. Henzler-Wildman, G. Hadjipavlou, E. Z. Eisenmesser, D. Kern, *Nature Structural and Molecular Biology* **2004**, 11(10), 945–949.
- [36] E. Z. Eisenmesser, *Science* **2002**, 295(5559), 1520–1523.

-
- [37] R. Huber, W. S. Bennett, *Biopolymers* **1983**, *22*(1), 261–279.
- [38] H. J. Berendsen, S. Hayward, *Current Opinion in Structural Biology* **2000**, *10*(2), 165–169.
- [39] E. Z. Eisenmesser, O. Millet, W. Labeikovsky, D. M. Korzhnev, M. Wolf-Watz, D. A. Bosco, J. J. Skalicky, L. E. Kay, D. Kern, *Nature* **2005**, *438*(7064), 117–121.
- [40] K. Teilum, J. G. Olsen, B. B. Kragelund, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2009**, *66*(14), 2231–2247.
- [41] J. A. McCammon, *Reports on Progress in Physics* **1984**, *47*(1), 1–46.
- [42] K. Henzler-Wildman, D. Kern, *Nature* **2007**, *450*(7172), 964–972.
- [43] H. D. Dorfler, *Grenzflächen Und Kolloid-Disperse Systeme: Physik Und Chemie*, Springer, **2010**.
- [44] M. J. Eisenmenger, J. I. Reyes-De-Corcuera, *Enzyme and Microbial Technology* **2009**, *45*(5), 331–347.
- [45] P. Butz, K. O. Greulich, H. Ludwig, *Biochemistry* **1988**, *27*(5), 1556–1563.
- [46] C. Czeslik, T. Q. Luong, R. Winter, *MRS Bulletin* **2017**, *42*(10), 738–742.
- [47] P. S. Low, G. N. Somero, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1975**, *72*(8), 3014–8.
- [48] M. W. Jaworek, V. Schuabb, R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20*(3), 1347–1354.
- [49] J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Elsevier, **2011**.
- [50] V. I. Gordeliy, V. Cherezov, J. Teixeira, *Physical Review E - Statistical, Non-linear, and Soft Matter Physics* **2005**, *72*(6), 1–16.
- [51] J. F. Nagle, S. Tristram-Nagle, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* **2000**, *1469*(3), 159–195.
- [52] V. A. Parsegian, T. Zemb, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **2011**, *16*(6), 618–624.
- [53] R. P. Rand, V. A. Parsegian, *BBA - Reviews on Biomembranes* **1989**, *988*(3), 351–376.
- [54] V. Parsegian, R. Rand, N. Fuller, D. Rau, *Methods in enzymology* **1986**, *127*, 400–416.
- [55] S. Leikin, *Annual Review of Physical Chemistry* **1993**, *44*(1), 369–395.

- [56] J. Marra, J. Israelachvili, *Biochemistry* **1985**, *24*(17), 4608–4618.
- [57] W. Helfrich, *Z. Naturforsch. A* **1978**, *33*(1978), 305–315.
- [58] N. J. Brooks, O. Ces, R. H. Templer, J. M. Seddon, *Chemistry and Physics of Lipids* **2011**, *164*(2), 89–98.
- [59] N. J. Brooks, *IUCrJ* **2014**, *1*, 470–477.
- [60] R. Zhang, R. M. Suter, J. F. Nagle, *Physical Review E* **1994**, *50*(6), 5047–5060.
- [61] R. Zhang, S. Tristram-Nagle, W. Sun, R. L. Headrick, T. C. Irving, R. M. Suter, J. F. Nagle, *Biophysical Journal* **1996**, *70*(January), 349–357.
- [62] J. Als-Nielsen, J. D. Litster, R. J. Birgeneau, M. Kaplan, C. R. Safinya, A. Lindegaard-Andersen, S. Mathiesen, *Physical Review B* **1980**, *22*(1), 312–320.
- [63] R. Winter, C. Jeworrek, *Soft Matter* **2009**, *5*(17), 3157.
- [64] S. N. Timasheff, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* **1993**, *22*, 67–97.
- [65] S. N. Timasheff, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*(15), 9721–6.
- [66] R. H. Kelly, P. H. Yancey, *The Biological Bulletin* **1999**, *196*(1), 18–25.
- [67] P. H. Yancey, W. R. Blake, J. Conley, *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* **2002**, *133*(3), 667–676.
- [68] D. Harries, J. B. T. M. i. C. B. Rösger, „A Practical Guide on How Osmolytes Modulate Macromolecular Properties“ in *Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques*, , Bd. 84 Academic Press, **2008**, S. 679–735.
- [69] P. H. Yancey, *The Journal of experimental biology* **2005**, *208*(Pt 15), 2819–2830.
- [70] P. H. Yancey, *Journal of Experimental Biology* **2005**, *208*(15), 2819–2830.
- [71] R. Sarma, S. Paul, *Journal of Physical Chemistry B* **2013**, *117*(30), 9056–9066.
- [72] F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1888**, *24*, 247–260.
- [73] D. R. Canchi, P. Jayasimha, D. C. Rau, G. Makhatadze, A. E. Garcia, *Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*(September), 12095–12104.
- [74] M. Auton, D. W. Bolen, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*(42), 15065–15068.

- [75] M. Auton, L. M. F. Holthausen, D. W. Bolen, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*(39), 15317–15322.
- [76] D. W. Bolen, G. D. Rose, *Annual Review of Biochemistry* **2008**, *77*(1), 339–362.
- [77] P. H. Schummel, A. Haag, W. Kremer, H. R. Kalbitzer, R. Winter, *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120*(27), 6575–6586.
- [78] C. Krywka, C. Sternemann, M. Paulus, M. Tolan, C. Royer, R. Winter, *ChemPhysChem* **2008**, *9*(18), 2809–2815.
- [79] B. J. Bennion, V. Daggett, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101*(17), 6433–6438.
- [80] L. Knake, G. Schwaab, K. Kartaschew, M. Havenith, *Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*(43), 13842–13851.
- [81] P. Yancey, M. Clark, S. Hand, R. Bowlus, G. Somero, *Science* **1982**, *217*(4566), 1214–1222.
- [82] Y. L. A. Rezus, H. J. Bakker, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*(49), 18417–18420.
- [83] J. Hunger, N. Ottosson, K. Mazur, M. Bonn, H. J. Bakker, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17*(1), 298–306.
- [84] Q. Zou, B. J. Bennion, V. Daggett, K. P. Murphy, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*(7), 1192–1202.
- [85] C. J. Sahle, M. A. Schroer, I. Juurinen, J. Niskanen, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18*(24), 16518–16526.
- [86] N. K. Jain, I. Roy, *Protein Science* **2009**, *18*(1), 24–36.
- [87] S. B. Leslie, E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, L. M. Crowe, *Applied and Environmental Microbiology* **1995**, *61*(10), 3592–3597.
- [88] J. H. Crowe, L. M. Crowe, D. Chapman, *Science (New York, N.Y.)* **1984**, *223*(4637), 701–703.
- [89] A. D. Elbein, Y. T. Pan, I. Pastuszak, D. Carroll, *Glycobiology* **2003**, *13*(4), 17–27.
- [90] M. L. Rod, K. Y. Alam, P. R. Cunningham, D. P. Clark, *Journal of Bacteriology* **1988**, *170*(8), 3601–3610.
- [91] O. Kandror, A. DeLeon, A. L. Goldberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*(15), 9727–9732.

- [92] J. H. Crowe, L. M. Crowe, J. F. Carpenter, A. S. Rudolph, C. A. Wistrom, B. J. Spargo, T. J. Anchordoguy, *BBA - Reviews on Biomembranes* **1988**, *947*(2), 367–384.
- [93] P. M. B. Fernandes, A. D. Panek, E. Kurtenbach, *FEMS Microbiology Letters* **1997**, *152*(1), 17–21.
- [94] S. Fujii, K. Obuchi, H. Iwahashi, T. Fujii, Y. Komatsu, *Progress in Biotechnology* **1996**, *13*(C), 245–252.
- [95] H. Iwahashi, K. Obuchi, S. Fujii, Y. Komatsu, *FEBS Letters* **1997**, *416*(1), 1–5.
- [96] H. Iwahashi, K. Obuchi, S. Fujii, Y. Komatsu, *Letters in applied microbiology* **1997**, *25*(1), 43–47.
- [97] Y. Dong, Q. Yang, S. Jia, C. Qiao, *Biochemical Engineering Journal* **2007**, *37*(2), 226–230.
- [98] S. Fujii, H. Iwahashi, K. Obuchi, *FEMS Microbiology Letters* **1996**, *141*, 97–101.
- [99] J. E. Purvis, L. P. Yomano, L. O. Ingram, *Applied and environmental microbiology* **2005**, *71*(7), 3761–3769.
- [100] M. A. Vargas-Ortiz, R. Quintana-Castro, R. M. Oliart-Ros, J. De la Cruz-Medina, J. A. Ramírez de León, H. S. Garcia, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **2013**, *82*(4), 196–212.
- [101] A. Antunes, I. Alam, V. B. Bajic, U. Stingl, *Journal of Bacteriology* **2011**, *193*(17), 4553–4554.
- [102] H.-I. Wang, L. Sun, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2017**, *33*(5), 86.
- [103] M. A. Singer, S. Lindquist, *Trends in Biotechnology* **1998**, *16*(11), 460–468.
- [104] L. Sapir, D. Harries, *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*(4), 624–634.
- [105] C. Branca, S. Maccarrone, S. Magazù, G. Maisano, S. M. Bennington, J. Taylor, *The Journal of Chemical Physics* **2005**, *122*(17), 174513.
- [106] A. Lerbret, P. Bordat, F. Affouard, Y. Guinet, A. Hédoux, L. Paccou, D. Prévost, M. Descamps, *Carbohydrate Research* **2005**, *340*(5), 881–887.
- [107] M. d. C. Luzardo, F. Amalfa, A. Nuñez, S. Díaz, A. Biondi de Lopez, E. Disalvo, *Biophysical Journal* **2000**, *78*(5), 2452–2458.
- [108] L. I. Viera, S. Alonso-Romanowski, V. Borovyagin, M. R. Feliz, E. A. Disalvo, *BBA - Biomembranes* **1993**, *1145*(1), 157–167.

-
- [109] M. Doxastakis, A. K. Sum, J. J. De Pablo, *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 24173–24181.
- [110] C. Lambruschini, A. Relini, A. Ridi, L. Cordone, A. Gliozzi, *Langmuir* **2000**, *16*(12), 5467–5470.
- [111] C. S. Pereira, P. H. Hünenberger, *Molecular Simulation* **2008**, *34*(4), 403–420.
- [112] S. Leekumjorn, A. K. Sum, *Molecular Simulation* **2006**, *32*(3-4), 219–230.
- [113] A. Roy, R. Dutta, N. Kundu, D. Banik, N. Sarkar, *Langmuir* **2016**, *32*(20), 5124–5134.
- [114] F. Lairion, E. A. Disalvo, *Chemistry and Physics of Lipids* **2007**, *150*(2), 117–124.
- [115] E. A. Golovina, A. V. Golovin, F. A. Hoekstra, R. Faller, *Biophysical Journal* **2009**, *97*(2), 490–499.
- [116] A. Skibinsky, R. M. Venable, R. W. Pastor, *Biophysical Journal* **2005**, *89*(6), 4111–4121.
- [117] M. A. Villarreal, S. B. Díaz, E. A. Disalvo, G. G. Montich, *Langmuir* **2004**, *20*(18), 7844–7851.
- [118] P. Westh, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2008**, *10*(28), 4110–4112.
- [119] B. Kent, T. Hunt, T. A. Darwish, T. Hauß, C. J. Garvey, G. Bryant, *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20140069.
- [120] B. Demé, T. Zemb, *Journal of Applied Crystallography* **2000**, *33*(3 I), 569–573.
- [121] C. J. Garvey, T. Lenné, K. L. Koster, B. Kent, G. Bryant, *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14*(4), 8148–8163.
- [122] N. Grasmeyer, M. Stankovic, H. De Waard, H. W. Frijlink, W. L. J. Hinrichs, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2013**, *1834*(4), 763–769.
- [123] C. Olsson, H. Jansson, J. Swenson, *Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120*(20), 4723–4731.
- [124] M. V. Fedorov, J. M. Goodman, D. Nerukh, S. Schumm, *Physical chemistry chemical physics* **2011**, *13*(6), 2294–9.
- [125] P. Belton, A. M. Gil, *Biopolymers* **1994**, *34*(7), 957–61.
- [126] J. L. Green, C. A. Angell, *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93*(8), 2880–2882.

- [127] K. L. Koster, M. S. Webb, G. Bryant, D. V. Lynch, *BBA - Biomembranes* **1994**, *1193*(1), 143–150.
- [128] W. Q. Sun, A. C. Leopold, L. M. Crowe, J. H. Crowe, *Biophysical journal* **1996**, *70*(4), 1769–76.
- [129] H. D. Andersen, C. Wang, L. Arleth, G. H. Peters, P. Westh, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*(5), 1874–1878.
- [130] J. Kapla, J. Wohler, B. Stevansson, O. Engström, G. Widmalm, A. Maliniak, *Journal of Physical Chemistry B* **2013**, *117*(22), 6667–6673.
- [131] L. Arns, V. Schuabb, S. Meichsner, M. Berghaus, R. Winter, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2017**, *232*, 615–634.
- [132] R. J. Ellis, A. P. Minton, *Nature* **2003**, *425*, 27.
- [133] S. B. Zimmerman, S. O. Trach, *Journal of Molecular Biology* **1991**, *222*(3), 599–620.
- [134] A. P. Minton, *Current Opinion in Structural Biology* **2000**, *10*(1), 34–39.
- [135] A. P. Minton, *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*(14), 10577–10580.
- [136] A. P. Minton, *Biophysical Journal* **2005**, *88*(2), 971–985.
- [137] A. P. Minton, *Journal of cell science* **2006**, *119*(Pt 14), 2863–9.
- [138] R. J. Ellis, „Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones.“ in *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks* (Hrsg.: P. Csermely, L. Vigh), Springer New York, New York, NY, **2007**, S. 1–13.
- [139] H. X. Zhou, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2008**, *469*(1), 76–82.
- [140] R. Ravindra, S. Zhao, H. Gies, R. Winter, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*(39), 12224–12225.
- [141] M. Erilkamp, S. Grobelny, R. Winter, *Physical chemistry chemical physics* **2014**, *16*(13), 5965–76.
- [142] M. Erilkamp, J. Marion, N. Martinez, C. Czeslik, J. Peters, R. Winter, *Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*(14), 4842–4848.
- [143] R. J. Ellis, *Trends in Biochemical Sciences* **2001**, *26*(10), 597–604.
- [144] B. van den Berg, R. J. Ellis, C. M. Dobson, *The EMBO journal* **1999**, *18*(24), 6927–33.

-
- [145] M. S. Cheung, D. Klimov, D. Thirumalai, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*(13), 4753 – 4758.
- [146] G. Rivas, A. P. Minton, *Trends in Biochemical Sciences* **2016**, *41*(11), 970–981.
- [147] Y. Wang, M. Sarkar, A. E. Smith, A. S. Krois, G. J. Pielak, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*(40), 16614–16618.
- [148] M. Sarkar, A. E. Smith, G. J. Pielak, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*(48), 19342–19347.
- [149] H. D. Mertens, D. I. Svergun, *Journal of Structural Biology* **2010**, *172*(1), 128–141.
- [150] D. I. Svergun, M. H. J. Koch, *Reports on Progress in Physics* **2003**, *66*(10), 1735–1782.
- [151] M. H. Koch, P. Vachette, D. I. Svergun, *Quarterly reviews of biophysics* **2003**, *36*(2), 147–227.
- [152] G. Pabst, N. Kucerka, M.-P. Nieh, M. C. Rheinstädter, J. Katsaras, *Chemistry and physics of lipids* **2010**, *163*(6), 460–79.
- [153] R. Winter, *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, *1595*(1-2), 160–184.
- [154] C. E. Blanchet, D. I. Svergun, *Annual Review of Physical Chemistry* **2013**, *64*(1), 37–54.
- [155] D. Svergun, *Journal of Applied Crystallography* **1992**, *25*(4), 495–503.
- [156] G. Fritz, A. Bergmann, O. Glatter, *Journal of Chemical Physics* **2000**, *113*(21), 9733–9740.
- [157] A. Bergmann, G. Fritz, O. Glatter, *Journal of Applied Crystallography* **2000**, *33*(5), 1212–1216.
- [158] D. I. Svergun, *Biophysical journal* **1999**, *76*(6), 2879–2886.
- [159] D. Franke, D. I. Svergun, *Journal of Applied Crystallography* **2009**, *42*(2), 342–346.
- [160] V. V. Volkov, D. I. Svergun, *Journal of Applied Crystallography* **2003**, *36*(3 Part 1), 860–864.
- [161] H. Petrache, N. Gouliarov, S. Tristram-Nagle, R. Zhang, R. Suter, J. Nagle, *Physical Review E* **1998**, *57*(6), 7014–7024.
- [162] H. Schober, *Journal of Neutron Research* **2014**, *17*(3-4), 109–357.

- [163] M. Bee, *Quasielastic neutron scattering : principles and applications in solid state chemistry, biology and materials science*, A. Hilger, Bristol; Philadelphia, **1988**.
- [164] J. Fitter, T. Gutberlet, J. Katsaras, *Neutron Scattering in Biology: Techniques and Applications*, Biological and Medical Physics Series, Springer, **2006**.
- [165] G. Zaccai, *Journal of Physics: Condensed Matter* **2003**, *15*(18), S1673–S1682.
- [166] F. Gabel, D. Bicout, U. Lehnert, M. Tehei, M. Weik, G. Zaccai, *Quarterly Reviews of Biophysics* **2002**, *35*(4), 327–367.
- [167] D. Vural, X. Hu, B. Lindner, N. Jain, Y. Miao, X. Cheng, Z. Liu, L. Hong, J. C. Smith, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2017**, *1861*(1, Part B), 3638–3650.
- [168] V. F. Sears, *Neutron News* **1992**, *3*(3), 26–37.
- [169] J. Peters, N. Martinez, M. Trovaslet, K. Scannapieco, M. M. Koza, P. Masson, F. Nachon, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18*(18), 12992–13001.
- [170] L. Van Hove, *Physical Review* **1954**, *95*(1), 249–262.
- [171] A. Rahman, K. S. Singwi, A. Sjölander, *Physical Review* **1962**, *126*(3), 986–996.
- [172] S. Magazù, F. Migliardo, A. Benedetto, *Review of Scientific Instruments* **2011**, *82*(10).
- [173] W. Doster, H. Nakagawa, M. S. Appavou, *Journal of Chemical Physics* **2013**, *139*(4).
- [174] G. Zaccai, *Science* **2000**, *288*(5471), 1604–1607.
- [175] F. Gabel, *European Biophysics Journal* **2005**, *34*(1), 1–12.
- [176] N. Francesca, J. Peters, D. Russo, S. Barbieri, C. Chiapponi, A. Cupane, A. Deriu, M. T. Di Bari, E. Farhi, Y. Gerelli, P. Mariani, A. Paciaroni, C. Rivasseau, G. Schirò, F. Sonvico, *Neutron News* **2008**, *19*(4), 14–18.
- [177] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, *Biophysical Reviews* **2016**, *8*(4), 409–427.
- [178] H. Susi, D. Michael Byler, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1983**, *115*(1), 391–397.
- [179] J. Kong, S. Yu, *Acta biochimica et biophysica Sinica* **2007**, *39*(8), 549–559.
- [180] M. Jackson, H. H. Mantsch, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1995**, *30*(2), 95–120.

- [181] H. H. Mantsch, D. J. Moffatt, H. L. Casal, *Journal of Molecular Structure* **1988**, 173(C), 285–298.
- [182] W. K. Surewicz, H. H. Mantsch, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1988**, 952, 115–130.
- [183] H. Susi, D. M. Byler, *Methods in enzymology* **1986**, 130, 290–311.
- [184] S. Krimm, J. Bandekar, *Advances in protein chemistry* **1986**, 38, 181–364.
- [185] D. M. Byler, H. Susi, *Biopolymers* **1986**, 25(3), 469–487.
- [186] A. Barth, P. Haris, *Biological and Biomedical Infrared Spectroscopy*, Advances in biomedical spectroscopy, IOS Press, **2009**.
- [187] A. Dong, P. Huang, W. S. Caughey, *Biochemistry* **1990**, 29(13), 3303–3308.
- [188] S. Cinar, C. Czeslik, *Biochimica et biophysica acta* **2018**, 1866(5-6), 617–623.
- [189] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **2006**, S. 954.
- [190] C. A. Royer, *Chemical Reviews* **2006**, 106(5), 1769–1784.
- [191] A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot, *Pharmaceutical Research* **2008**, 25(7), 1487–1499.
- [192] Y. Engelborghs, A. J. W. G. Visser **2014**, 1076.
- [193] O. K. Gasymov, B. J. Glasgow, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2007**, 1774(3), 403–411.
- [194] T. Söderlund, J.-M. I. Alakoskela, A. L. Pakkanen, P. K. Kinnunen, *Biophysical Journal* **2003**, 85(4), 2333–2341.
- [195] T. Parasassi, G. De Stasio, A. D’Ubaldo, E. Gratton, *Biophysical Journal* **1990**, 57(6), 1179–1186.
- [196] T. Parasassi, E. K. Krasnowska, L. Bagatolli, E. Gratton, *Journal of fluorescence* **1998**, 8(4), 365–373.
- [197] H. I. Petrache, S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle, *Chemistry and physics of lipids* **1998**, 95(1), 83–94.
- [198] G. Pabst, J. Katsaras, V. A. Raghunathan, M. Rappolt, *Langmuir* **2003**, 19(5), 1716–1722.
- [199] H. I. Petrache, S. Tristram-Nagle, K. Gawrisch, D. Harries, V. A. Parsegian, J. F. Nagle, *Biophysical Journal* **2004**, 86(3), 1574–1586.

- [200] T. J. McIntosh, S. A. Simon, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1994**, *23*(1), 27–51.
- [201] J. J. Kinnun, K. J. Mallikarjunaiah, H. I. Petrache, M. F. Brown, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2015**, *1848*(1), 246–259.
- [202] R. P. Rand, *Annual review of biophysics and bioengineering* **1981**, *10*, 277–314.
- [203] B. W. Koenig, H. H. Strey, K. Gawrisch, *Biophysical Journal* **1997**, *73*(4), 1954–1966.
- [204] S. Purushothaman, P. Cicuta, O. Ces, N. J. Brooks, *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*(30), 9805–9810.
- [205] N. L. C. McCarthy, O. Ces, R. V. Law, J. M. Seddon, N. J. Brooks, *Chem. Commun.* **2015**, *51*(41), 8675–8678.
- [206] J. Eisenblätter, R. Winter, *Biophysical Journal* **2006**, *90*(3), 956–966.
- [207] B. Kollmitzer, P. Heftberger, R. Podgornik, J. F. Nagle, G. Pabst, *Biophysical Journal* **2015**, *108*(12), 2833–2842.
- [208] O. Reis, R. Winter, T. W. Zerda, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1996**, *1279*(1), 5–16.
- [209] M. Trapp, J. Marion, M. Tehei, B. Demé, T. Gutberlet, J. Peters, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*(48), 20951.
- [210] A. Brown, I. Skanes, M. R. Morrow, *Physical Review E - Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics* **2004**, *69*(1), 9.
- [211] C. Di Primo, E. Deprez, G. H. Hoa, P. Douzou, *Biophysical Journal* **1995**, *68*(5), 2056–2061.
- [212] T. Hottiger, T. Boller, A. Wiemken, *FEBS Letters* **1987**, *220*(1), 113–115.
- [213] E. C. A. Eleutheria, P. S. de Araujo, A. D. Panek, *BBA - General Subjects* **1993**, *1156*(3), 263–266.
- [214] A. Tunnacliffe, J. Lapinski, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2003**, *358*(1438), 1755–1771.
- [215] P. J. Quinn, C. Wolf, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2009**, *1788*(5), 1126–1137.
- [216] M. Belička, A. Weitzer, G. Pabst, *Soft Matter* **2017**, *13*(9), 1823–1833.
- [217] S. Tristram-Nagle, Y. Liu, J. Legleiter, J. F. Nagle, *Biophysical Journal* **2002**, *83*(6), 3324–3335.

-
- [218] G. Pabst, S. Danner, R. Podgornik, J. Katsaras, *Langmuir* **2007**, *23*(23), 11705–11711.
- [219] A. Hodzic, M. Rappolt, H. Amenitsch, P. Laggner, G. Pabst, *Biophysical Journal* **2008**, *94*(10), 3935–3944.
- [220] P. Heftberger, B. Kollmitzer, A. A. Rieder, H. Amenitsch, G. Pabst, *Biophysical Journal* **2015**, *108*(4), 854–862.
- [221] G. Pabst, A. Hodzic, J. Štrancar, S. Danner, M. Rappolt, P. Laggner, *Biophysical Journal* **2007**, *93*(8), 2688–2696.
- [222] B. S. Lu, S. P. Gupta, M. Belička, R. Podgornik, G. Pabst, *Langmuir* **2016**, *32*(50), 13546–13555.
- [223] H. Heerklotz, J. Seelig, *Biophysical Journal* **2002**, *82*(3), 1445–1452.
- [224] Y. Zhai, L. Okoro, A. Cooper, R. Winter, *Biophysical Chemistry* **2011**, *156*(1), 13–23.
- [225] E. S. Courtenay, M. W. Capp, C. F. Anderson, M. T. Record, *Biochemistry* **2000**, *39*(15), 4455–4471.
- [226] J. Williams, C. F. Shaykewich, *Canadian Journal of Soil Science* **1969**, *49*(3), 397–401.
- [227] R. Winter, W.-C. Pilgrim, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1989**, *93*(6), 708–717.
- [228] L. F. Braganza, D. L. Worcester, *Biochemistry* **1986**, *25*(9), 2591–2596.
- [229] M. A. Kiselev, J. Zbytovska, D. Matveev, S. Wartewig, I. V. Gapienko, J. Perez, P. Lesieur, A. Hoell, R. Neubert, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2005**, *256*(1 SPEC. ISS.), 1–7.
- [230] L. R. Winther, J. Qvist, B. Halle, *Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*(30), 9196–9207.
- [231] J. Kapla, B. Stevansson, A. Maliniak, *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120*(36), 9621–9631.
- [232] J. Kapla, O. Engström, B. Stevansson, J. Wohlert, G. Widmalm, A. Maliniak, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*(34), 22438–22447.
- [233] S. Sukenik, S. Dunskey, A. Barnoy, I. Shumilin, D. Harries, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*(Md), 29862–29871.
- [234] R. Dimova, *Advances in Colloid and Interface Science* **2014**, *208*, 225–234.

- [235] V. Vitkova, J. Genova, M. D. Mitov, I. Bivas, *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **2006**, *449*(1), 95–106.
- [236] J. Genova, A. Zheliaskova, M. D. Mitov, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **2007**, *9*(2), 427–430.
- [237] M. A. Schroer, Y. Zhai, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Angewandte Chemie - International Edition* **2011**, *50*(48), 11413–11416.
- [238] J. Möller, S. Grobelny, J. Schulze, S. Bieder, A. Steffen, M. Erbkamp, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Physical Review Letters* **2014**, *112*(2), 1–5.
- [239] S. Grobelny, M. Erbkamp, J. Möller, M. Tolan, R. Winter, *Journal of Chemical Physics* **2014**, *141*(22).
- [240] L. Meinhold, J. C. Smith, *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **2005**, *72*(6), 1–5.
- [241] L. Meinhold, J. C. Smith, A. Kitao, A. H. Zewail, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*(44), 17261–17265.
- [242] V. Calandrini, G. R. Kneller, *The Journal of Chemical Physics* **2008**, *128*(6), 065102.
- [243] V. Calandrini, V. Hamon, K. Hinsén, P. Calligari, M. C. Bellissent-Funel, G. R. Kneller, *Chemical Physics* **2008**, *345*(2-3), 289–297.
- [244] A. Lerbret, A. Hédoux, B. Annighöfer, M.-C. Bellissent-Funel, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2012**, *81*(2), 326–340.
- [245] D. Vural, L. Hong, J. C. Smith, H. R. Glyde, *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **2013**, *88*(5), 1–12.
- [246] J. H. Roh, J. E. Curtis, S. Azzam, V. N. Novikov, I. Peral, Z. Chowdhuri, R. B. Gregory, A. P. Sokolov, *Biophysical Journal* **2006**, *91*(7), 2573–2588.
- [247] L. Hong, D. C. Glass, J. D. Nickels, S. Perticaroli, Z. Yi, T. Madhusudan, H. O’Neill, Q. Zhang, A. P. Sokolov, J. C. Smith, *Physical Review Letters* **2013**, *110*(2), 1–5.
- [248] L. Hong, N. Smolin, B. Lindner, A. P. Sokolov, J. C. Smith, *Physical Review Letters* **2011**, *107*(14), 2–4.
- [249] L. Hong, X. Cheng, D. C. Glass, J. C. Smith, *Physical Review Letters* **2012**, *108*(23), 1–4.
- [250] A. Lerbret, A. Hedoux, B. Annighofer, M.-C. Bellissent-Funel, *Proteins* **2013**, *81*(2), 326–340.

- [251] J. Peters, M. Trapp, D. Hughes, S. Rowe, B. Demé, J.-L. Laborier, C. Payre, J.-P. Gonzales, S. Baudoin, N. Belkhier, E. Lelièvre-Berna, *High Pressure Research* **2012**, *32*(1), 97–102.
- [252] W. Doster, S. Cusack, W. Petry, *Nature* **1989**, *337*(6209), 754–756.
- [253] M. S. Weiss, G. J. Palm, R. Hilgenfeld, *Acta Crystallographica Section D* **2000**, *56*(8), 952–958.
- [254] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*(13), 1605–1612.
- [255] Y. Kitamura, T. Itoh, *Journal of Solution Chemistry* **1987**, *16*(9), 715–725.
- [256] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Analytical Chemistry* **1968**, *40*(4), 700–706.
- [257] D. Reinstadler, H. Fabian, J. Backmann, D. Naumann, *Biochemistry* **1996**, *35*(49), 15822–15830.
- [258] V. A. Sidorov, R. A. Sadykov, *Journal of Physics Condensed Matter* **2005**, *17*(40), 2–6.
- [259] J. Pérez, J. M. Zanotti, D. Durand, *Biophysical Journal* **1999**, *77*(1), 454–469.
- [260] D. Richard, M. Ferrand, G. J. Kearley, *Journal of Neutron Research* **1996**, *4*(1-4), 33–39.
- [261] P. T. T. Wong, D. J. Moffat, *Applied Spectroscopy* **1989**, *43*(7), 1279–1281.
- [262] M. C. Bellissent-Funel, A. Hassanali, M. Havenith, R. Henchman, P. Pohl, F. Sterpone, D. Van Der Spoel, Y. Xu, A. E. Garcia, *Chemical Reviews* **2016**, *116*(13), 7673–7697.
- [263] P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, B. H. McMahon, R. D. Young, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101*(40), 14408–14413.
- [264] H. Frauenfelder, G. Chen, J. Berendzen, P. W. Fenimore, H. Jansson, B. H. McMahon, I. R. Stroe, J. Swenson, R. D. Young, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*(13), 5129–5134.
- [265] W. Dzwolak, M. Kato, Y. Taniguchi, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2002**, *1595*(1-2), 131–144.
- [266] K. Sasahara, M. Sakurai, K. Nitta, *Journal of Molecular Biology* **1999**, *291*(3), 693–701.
- [267] T. M. Li, J. W. r. Hook, H. G. Drickamer, G. Weber, *Biochemistry* **1976**, *15*(25), 5571–5580.

- [268] P. Sassi, A. Giugliarelli, M. Paolantoni, A. Morresi, G. Onori, *Biophysical Chemistry* **2011**, *158*(1), 46–53.
- [269] F. Meersman, K. Heremans, *Biochemistry* **2003**, *42*(48), 14234–14241.
- [270] S. Choudhary, N. Kishore, *PLoS ONE* **2014**, *9*(8), 1–10.
- [271] S. Cinar, C. Czeslik, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *129*, 161–168.
- [272] S. Suladze, M. Kahse, N. Erwin, D. Tomazic, R. Winter, *Methods* **2015**, *76*, 67–77.
- [273] L. Van Eldik, D. Watterson, *Calmodulin and Signal Transduction*, Elsevier Science, **2012**.
- [274] H. Tidow, P. Nissen, *FEBS Journal* **2013**, *280*(21), 5551–5565.
- [275] K. L. Yap, J. Kim, K. Truong, M. Sherman, T. Yuan, M. Ikura, *Journal of Structural and Functional Genomics* **2000**, *1*(1), 8–14.
- [276] N. Matsushima, N. Hayashi, Y. Jinbo, Y. Izumi, *The Biochemical journal* **2000**, *347 Pt 1*, 211–215.
- [277] D. Chin, A. R. Means, *Trends in Cell Biology* **2000**, *10*(8), 322–328.
- [278] R. Chattopadhyaya, W. E. Meador, A. R. Means, F. A. Quiocho, *Journal of molecular biology* **1992**, *228*(4), 1177–1192.
- [279] T. H. Crouchl, C. B. Klee, *Biochemistry* **1980**, *19*(16), 3692–3698.
- [280] H. Kuboniwa, N. Tjandra, S. Grzesiek, H. Ren, C. B. Klee, A. Bax, *Nature structural biology* **1995**, *2*(9), 768–776.
- [281] Q. Ye, H. Wang, J. Zheng, Q. Wei, Z. Jia, *Proteins* **2008**, *73*(1), 19–27.
- [282] M. Matsubara, T. Nakatsu, H. Kato, H. Taniguchi, *EMBO Journal* **2004**, *23*(4), 712–718.
- [283] I. André, T. Kesvatera, B. Jönsson, K. S. Åkerfeldt, S. Linse, *Biophysical Journal* **2004**, *87*(3), 1929–1938.
- [284] W. Wriggers, E. Mehler, F. Pitici, H. Weinstein, K. Schulten, *Biophysical Journal* **1998**, *74*(4), 1622–1639.
- [285] B. A. Seaton, J. F. Head, D. M. Engelman, F. M. Richards, *Biochemistry* **1985**, *24*(24), 6740–6743.
- [286] M. Kataoka, J. F. Head, T. Vorherr, J. Krebs, E. Carafoli, *Biochemistry* **1991**, *30*(25), 6247–6251.

- [287] Y. Zhang, H. Tan, Z. Jia, G. Chen, *Journal of molecular recognition : JMR* **2008**, *21*(4), 267–274.
- [288] V. Majava, P. Kursula, *PLoS ONE* **2009**, *4*(4), 1–8.
- [289] G. Larsson, *Protein Science* **2001**, *10*(1), 169–186.
- [290] P. Villalonga, C. Lopez-Alcala, M. Bosch, A. Chiloeches, N. Rocamora, J. Gil, R. Marais, C. J. Marshall, O. Bachs, N. Agell, *Molecular and Cellular Biology* **2001**, *21*(21), 7345–7354.
- [291] R. S. Sidhu, R. R. Clough, R. P. Bhullar, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *304*(4), 655–660.
- [292] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angewandte chemie International Edition* **2000**, *39*, 4192–4214.
- [293] D. Radzioch, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, *2010*.
- [294] S. J. Abraham, R. P. Nolet, R. J. Calvert, L. M. Anderson, V. Gaponenko, *Biochemistry* **2009**, *48*(32), 7575–7583.
- [295] L. J. Wu, L. R. Xu, J. M. Liao, J. Chen, Y. Liang, *PLoS ONE* **2011**, *6*(7).
- [296] L. Tang, P. K. Shukla, Z. J. Wang, *Neuroscience Letters* **2006**, *397*(1-2), 1–4.
- [297] R. L. Kenigsberg, A. Côté, J. M. Trifaró, *Neuroscience* **1982**, *7*(9), 2277–2286.
- [298] A. Lutka, B. Gołda, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* **2006**, *63*(1), 3–8.
- [299] M. Rele, S. Kapoor, V. Salvi, C. K. K. Nair, T. Mukherjee, *Biophysical Chemistry* **2004**, *109*(1), 113–119.
- [300] N. Hayashi, M. Matsubara, A. Takasaki, K. Titani, H. Taniguchi, *Protein Expression and Purification* **1998**, *12*(1), 25–28.
- [301] A. P. Hammersley, S. O. Svensson, A. Thompson, *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, A* **1994**, *346*(1-2), 312–321.
- [302] D. Franke, M. V. Petoukhov, P. V. Konarev, A. Panjkovich, A. Tuukkanen, H. D. T. Mertens, A. G. Kikhney, N. R. Hajizadeh, J. M. Franklin, C. M. Jeffries, D. I. Svergun, *Journal of Applied Crystallography* **2017**, *50*(4), 1212–1225.
- [303] D. Svergun, C. Barberato, M. H. J. Koch, *Journal of Applied Crystallography* **1995**, *28*(6), 768–773.
- [304] M. B. Kozin, D. I. Svergun, *Journal of Applied Crystallography* **2001**, *34*(1), 33–41.

- [305] J. Trehwella, D. B. Heidorn, P. A. Seeger, *Molecular Crystals and Liquid Crystals Incorporating Nonlinear Optics* **1990**, *180*(1), 45–53.
- [306] H. Yoshino, O. Minari, N. Matsushima, T. Ueki, Y. Miyake, T. Matsuo, Y. Izumi, *The Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*(33), 19706–19709.
- [307] M. Vandonselaar, R. A. Hickie, J. W. Quail, L. T. Delbaere, *Nature structural biology* **1994**, *1*(11), 795–801.
- [308] N. Erwin, S. Patra, R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18*(43), 30020–30028.
- [309] A. Ortega, D. Amorós, J. García De La Torre, *Biophysical Journal* **2011**, *101*(4), 892–898.
- [310] J. P. Klinman, *CRC critical reviews in biochemistry* **1981**, *10*(1), 39–78.
- [311] S. Dallet, M. D. Legoy, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1996**, *1294*(1), 15–24.
- [312] E. Silverstein, P. D. Boyer, *Journal of biological chemistry* **1964**, *239*(11).
- [313] P. Galletti, E. Emer, G. Gucciardo, A. Quintavalla, M. Pori, D. Giacomini, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*(18), 4117.
- [314] D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Gucciardo, F. Paradisi, *Chemical Communications* **2007**, (39), 4038.
- [315] P. Galletti, M. Pori, D. Giacomini, *Synlett* **2010**, *2010*(17), 2644–2648.
- [316] B. V. Plapp, B. R. Savarimuthu, D. J. Ferraro, J. K. Rubach, E. N. Brown, S. Ramaswamy, *Biochemistry* **2017**, *56*(28), 3632–3646.
- [317] H. Eklund, B. Nordstrom, E. Zeppezauer, G. Soderlund, I. Ohlsson, T. Boiwe, C. I. Branden, *FEBS Lett.* **1974**, *44*(2), 200–204.
- [318] S. Ramaswamy, H. Eklund, B. V. Plapp, *Biochemistry* **1994**, *33*(17), 5230–5237.
- [319] H. Eklund, S. Ramaswamy, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2008**, *65*(24), 3907.
- [320] S. Al-Karadaghi, E. S. Cedergren-Zeppezauer, S. Hovmoller, K. Petratos, H. Terry, K. S. Wilson, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **1994**, *50*(6), 793–807.
- [321] R. Meijers, H.-W. Adolph, Z. Dauter, K. S. Wilson, V. S. Lamzin, E. S. Cedergren-Zeppezauer, *Biochemistry* **2007**, *46*(18), 5446–5454.

- [322] R. Meijers, R. J. Morris, H. W. Adolph, A. Merli, V. S. Lamzin, E. S. Cedergren-Zeppezauer, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*(12), 9316–9321.
- [323] O. De Smidt, J. C. Du Preez, J. Albertyn, *FEMS Yeast Research* **2008**, *8*(7), 967–978.
- [324] E. Sturgis, K. Dahlstrom, Y. Guan, S. Eicher, S. Strom, M. Spitz, Q. Wei, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **2001**, *10*(3), 273–275.
- [325] H. Eklund, J. P. Samama, L. Wallén, C. I. Brändén, Å. Åkeson, T. A. Jones, *Journal of Molecular Biology* **1981**, *146*(4), 561–587.
- [326] M. Trovaslet, S. Dallet-Choisy, F. Meersman, K. Heremans, C. Balny, M. D. Legoy, *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*(1), 119–128.
- [327] P. Cioni, G. B. Strambini, *J Mol Biol* **1996**, *263*(5), 789–799.
- [328] P. Cioni, G. B. Strambini, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2002**, *1595*(1-2), 116–130.
- [329] D. Knorr, V. Heinz, R. Buckow, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2006**, *1764*(3), 619–631.
- [330] V. Lullien-Pellerin, C. Balny, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2002**, *3*(3), 209–221.
- [331] G. Q. Tang, K. C. Ruan, *Progress in Biotechnology* **1996**, *13*(C), 163–166.
- [332] J. L. Silva, D. Foguel, A. T. Da Poian, P. E. Prevelige, *Current Opinion in Structural Biology* **1996**, *6*(2), 166–175.
- [333] J. L. Silva, C. F. Silveira, L. Pontes, *J. Mol. Biol* **1992**, *223*, 545–555.
- [334] X. Peng, J. Jonas, J. L. Silva, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90*(March), 1776–1780.
- [335] V. V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson, C. Balny, *Proteins* **1996**, *24*(1), 81–91.
- [336] X. Peng, J. Jonas, J. L. Silva, *Biochemistry* **1994**, *33*(27), 8323–9.
- [337] K. Julius, S. R. Al-Ayoubi, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20*(10), 7093–7104.
- [338] N. Cole, G. B. Ralston, *International Journal of Biochemistry* **2006**, *26*(6), 799–804.
- [339] J. A. Fernandez, A. P. Minton, *Biochemistry* **1999**, *38*, 9379–9388.

- [340] R. Lindner, G. Ralston, *Biophysical Chemistry* **1995**, *57*, 15–25.
- [341] S. M. Tian, K. C. Ruan, J. F. Qian, G. Q. Shao, C. Balny, *European journal of biochemistry / FEBS* **2000**, *267*(14), 4486–94.
- [342] J. Torrent, R. Lange, H. Rezaei, *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290*(33), 20417–20426.
- [343] T. Q. Luong, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*(35), 23273–23278.
- [344] P. H. Yancey, G. N. Somero, *Journal of Experimental Zoology* **1980**, *212*(2), 205–213.
- [345] T. Q. Luong, N. Erwin, M. Neumann, A. Schmidt, C. Loos, V. Schmidt, M. Fändrich, R. Winter, *Angewandte Chemie - International Edition* **2016**, *55*(40), 12412–12416.
- [346] D. Shallom, G. Golan, G. Shoham, Y. Shoham, *Journal of Bacteriology* **2004**, *186*(20), 6928–6937.
- [347] M. B. Ottosen, O. Björnberg, S. Nørager, S. Larsen, B. A. Palfey, K. F. Jensen, *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **2002**, *11*(11), 2575–2583.
- [348] P. T. Beernink, D. R. Tolan, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*(11), 5374–9.
- [349] F. Moosavi-Movahedi, A. A. Saboury, H. H. Alijanvand, M. Bohlooli, M. Salami, A. A. Moosavi-Movahedi, *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *58*, 66–72.
- [350] D. L. Pincus, C. Hyeon, D. Thirumalai, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*(12), 7364–7372.
- [351] T. O. Street, D. W. Bolen, G. D. Rose, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*(45), 13997 – 14002.
- [352] M. Trovaslet, S. Dallet-Choisy, F. Meersman, K. Heremans, C. Balny, M. D. Legoy, *European journal of biochemistry / FEBS* **2003**, *270*(1), 119–128.
- [353] M. Trovaslet, S. Dallet, M. D. Legoy, *High Pressure Research* **2000**, *19*(1-6), 303–309.
- [354] E. Morild, *Biophysical Chemistry* **1977**, *6*(August 1975), 351–362.
- [355] N. L. Klyachko, R. Köhling, J. Woenckhaus, A. K. Kazarov, S. A. Smirnov, A. V. Levashov, R. Winter, „The Role of Matrix Structure in Pressure Regulation of Enzymes Encapsulated in Ternary Surfactant-Water-Organic Solvent Systems“ in *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*

- (Hrsg.: R. Winter), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2003**, S. 235–239.
- [356] T. Mashino, I. Fridovich, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1987**, *258*(2), 356–360.
- [357] S. H. Schneider, S. P. Lockwood, D. I. Hargreaves, D. J. Slade, M. A. Loconte, B. E. Logan, E. E. McLaughlin, M. J. Conroy, K. M. Slade, *Biochemistry* **2015**, *54*(38), 5898–5906.
- [358] B. B. Hasinoff, R. Dreher, J. P. Davey, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1987**, *911*(1), 53–58.
- [359] K. A. Markossian, H. A. Khanova, S. Y. Kleimenov, D. I. Levitsky, N. a. Chebotareva, R. a. Asryants, V. I. Muronetz, L. Saso, I. K. Yudin, B. I. Kurganov, *Biochemistry* **2006**, *45*(44), 13375–13384.
- [360] N. A. Chebotareva, S. G. Roman, B. I. Kurganov, *Biophysical Reviews* **2016**, *8*(4), 397–407.
- [361] S. R. Al-Ayoubi, P. H. Schummel, M. Golub, J. Peters, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 14230–14237.
- [362] P. Kedzierski, K. Moreton, A. R. Clarke, J. J. Holbrook, *Biochemistry* **2001**, *40*(24), 7247–7252.
- [363] K. Swiderek, I. Tuñón, S. Martí, V. Moliner, *ACS Catalysis* **2015**, *5*(2), 1172–1185.
- [364] S. McClendon, N. Zhadin, R. Callender, *Biophysical Journal* **2005**, *89*(3), 2024–2032.
- [365] N. Zhadin, R. Callender, *Biochemistry* **2011**, *50*(10), 1582–1589.
- [366] N. Zhadin, R. Callender, *Biochemistry* **2011**, *50*(10), 1582–1589.
- [367] L. Qiu, M. Gulotta, R. Callender, *Biophysical Journal* **2007**, *93*(5), 1677–1686.
- [368] R. Callender, R. B. Dyer, *Chemical Reviews* **2006**, *106*(8), 3031–3042.
- [369] J. Holbrook, H. Gutfreund, *FEBS Letters* **1973**, *31*(2), 157–169.
- [370] J. R. T. Pineda, R. Callender, S. D. Schwartz, *Biophysical Journal* **2007**, *93*(5), 1474–1483.
- [371] A. R. Clarke, T. Atkinson, J. J. Holbrook, *Trends Biochem Sci* **1989**, *14*(3), 101–105.

- [372] F. Farabegoli, M. Vettraino, M. Manerba, L. Fiume, M. Roberti, G. Di Stefano, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *47*(4), 729–738.
- [373] Z. Zhao, F. Han, S. Yang, J. Wu, W. Zhan, *Cancer Letters* **2015**, *358*(1), 17–26.
- [374] L. King, G. Weber, *Biophysical Journal* **1986**, *49*(1), 72–73.
- [375] B. C. Schade, R. Rudolph, H. D. Luedemann, R. Jaenicke, *Biochemistry* **1980**, *19*(6), 1121–1126.
- [376] G. Schmid, H.-D. Ludemann, R. Jaenicke, *European Journal of Biochemistry* **1979**, *97*(2), 407–413.
- [377] T. Fujisawa, M. Kato, Y. Inoko, *Biochemistry* **1999**, *38*(20), 6411–6418.
- [378] R. Jaenicke, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **1981**, *10*(1), 1–67.
- [379] R. K. Schmidt, J. E. Gready, *Journal of Molecular Modeling* **1999**, *5*(9), 153–168.
- [380] K. Swiderek, A. Panczakiewicz, A. Bujacz, G. Bujacz, P. Paneth, *The journal of physical chemistry. B* **2009**, *113*(38), 12782–12789.
- [381] G. Schmid, H.-D. Ludemann, R. Jaenicke, *European Journal of Biochemistry* **1978**, *86*(1), 219–224.
- [382] E. Lelièvre-Berna, B. Demé, J. Gonthier, J.-P. Gonzales, J. Maurice, Y. Memphis, C. Payre, P. Oger, J. Peters, S. Vial, *700 MPa sample stick for studying liquid samples or solid-gas reactions down to 1.8 K and up to 550 K*, Bd. 19, **2017**, S. 1–8.
- [383] J. Marion, M. Trovaslet, N. Martinez, P. Masson, R. Schweins, F. Nachon, M. Trapp, J. Peters, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*(5), 3157–3163.
- [384] A. Cortes, D. C. Emery, D. J. Halsall, R. M. Jackson, A. R. Clarke, J. John Holbrook, *Protein Science* **1992**, *1*(7), 892–901.
- [385] J. H. Bai, H. J. Wang, D. S. Liu, H. M. Zhou, *Journal of Protein Chemistry* **1997**, *16*(8), 801–807.
- [386] K. Rajagopalan, *J Biol Chem.* **1961**, *236*(4), 1059–1065.
- [387] R. L. Joseph, D. C. Watts, E. Baldwin, *Biochem. J.* **1963**, *87*, 416–422.
- [388] P. H. Yancey, G. N. Somero, *Journal of Comparative Physiology B* **1978**, *125*(2), 135–141.

- [389] A. Wangler, R. Canales, C. Held, T. Q. Luong, R. Winter, D. H. Zaitsau, S. P. Verevkin, G. Sadowski, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20*(16), 11317–11326.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Typisches Phasendiagramm eines Proteins. In dem grau unterlegten Bereich liegt das Protein im gefalteten Zustand vor (Für die Entfaltungs-Gibbs-Energie gilt: $\Delta G > 0$). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Kombinationen von Druck- und Temperatur-Werten, bei denen $\Delta S = 0$ (blau), bzw. $\Delta V = 0$ (rot) ist. Die farbigen Pfeile kennzeichnen die Entfaltung durch hohe (rot) und niedrige (blau) Temperaturen, sowie durch Druckapplikation (violett). Abbildung modifiziert nach Referenz. ¹¹	8
1.2	Zeitskalen der Proteindynamik. Abbildung modifiziert nach Referenz. ³²	10
1.3	Volumenprofil einer enzymatisch katalysierten Reaktion. Modifiziert nach den Referenzen. ^{25,46}	14
1.4	Strukturformel des Phosphatidylcholins DMPC, hydrophobe Bereiche sind in rot und hydrophile Bereiche in blau dargestellt(A). Struktur eines aus Lipiddoppelschichten aufgebauten multilamellaren Vesikels(B). Struktur lamellarer Lipid-Phasen (C).	16
1.5	Temperatur-Druck-Phasendiagramm von DPPC-Doppelschichten in Exzess-Wasser. Abbildung modifiziert nach Referenz. ⁶³	17
1.6	Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Osmolyte Harnstoff, TMAO, Glycin und Trehalose.	20
1.7	Schematische Darstellung des Prinzips des ausgeschlossenen Volumens. Durch Anwesenheit der Makromoleküle (rot) sind die blau unterlegten Regionen für das Biomolekül (violett) unzugänglich (links). Durch eine Vergrößerung des Proteins nimmt das ausgeschlossene Volumen zu (rechts). Abbildung modifiziert nach Referenz. ¹³⁵	24
2.1	Allgemeines Prinzip der Kinematik eines Streuexperimentes (modifiziert nach Referenz ¹⁰).	29
2.2	Schema zur Herleitung der Bragg-Gleichung (A). Typische Streukurve von DMPC in der fluiden Phase (B). Longitudinale und transversale Fluktuationen in multilamellaren Membransystemen (C). Abbildung modifiziert nach den Referenzen. ^{10,60}	33
2.3	Typischer Verlauf eines QENS-Spektrums bei einem bestimmten Q -Wert. Gezeigt sind der elastische, der inelastische sowie der quasielastische Anteil der gestreuten Strahlung. Abbildung modifiziert nach Referenz. ¹⁰	36
2.4	Potentialkurven des harmonischen Oszillators (links) und des Morse-Potentials (rechts). Abbildung modifiziert nach Referenz. ¹⁰	41
2.5	Energie-Schema des Fluoreszenzvorgangs (Jablonski-Schema). Gepunktete Pfeile kennzeichnen einen strahlungslosen Energieübertrag. Abbildung modifiziert nach Referenz. ¹⁰	44
2.6	Struktur der Fluorophore ANS und Laurdan.	46

3.1	Osmotischer Druck von Trehalose und PEG Lösungen. Die rote Linie kennzeichnet das ideale van't Hoff-Verhalten von Trehalose. Die violetten und blauen Linien dienen der optischen Orientierung.	55
3.2	Druckabhängige SAXS-Streukurven multilamellarer DMPC-Vesikel (A). Druckabhängige Entwicklung der lamellaren Schichtdicke von DMPC bei 35 °C (B). Temperatur-Druck-Phasendiagramm von DMPC in Exzess Wasser (C). Die in dieser Studie durchgeführten Messungen erfolgten entlang der roten Linie. Die Phasengrenze des $L_\alpha - P_{\beta'}$ Übergangs wurde aus Referenz ⁶³ entnommen, diejenige des $P_{\beta'} - L_{\beta'}$ aus den Ergebnissen dieser Studie.	57
3.3	SAXS-Streukurven multilamellarer DMPC-Vesikel (20 wt.%) bei 35 °C im Druckbereich von 1 bar bis 5000 bar in der Anwesenheit von 15 wt.% und 30 wt.% PEG 20000.	58
3.4	Einfluss des durch PEG generierten osmotischen Druckes auf die lamellare Schichtdicke d . Die Daten wurden am ESRF (Dreiecke) sowie am SAXSess mc ² Instrument (Quadrate) generiert (A-B). Druckabhängige Entwicklung der lamellaren Schichtdicke vom DMPC bei 35 °C in der An- und Abwesenheit von PEG (C-D).	60
3.5	SAXS-Streukurven multilamellarer DMPC-Vesikel (20 wt.%) bei 35 °C im Druckbereich von 1 bar bis 5000 bar in der Anwesenheit von Trehalose.	61
3.6	Druckabhängige Entwicklung der lamellaren Schichtdicke d in An- und Abwesenheit von Trehalose (TRH).	63
3.7	Schema des multilamellaren Trehalose-DMPC-Systems für geringe (0.3 M) und hohe (über 0.6 M) Trehalose-Konzentrationen.	64
3.8	SAXS-Streukurven multilamellarer DMPC-Vesikel (20wt.%) bei 35 °C im Druckbereich von 1 bar bis 5000 bar in der Anwesenheit von 15 wt.% und verschiedenen Trehalosekonzentrationen (A-C) und in Anwesenheit von 30 wt.% PEG und 0.6 M Trehalose (D).	65
3.9	Druckabhängige Entwicklung der lamellaren Schichtdicke d bei Anwesenheit von 15 wt.% PEG und Trehalose und bei Anwesenheit von 30 wt.% PEG und 0.6 M Trehalose.	67
3.10	SAXS-Streukurven von DMPC bei Anwesenheit von PEG und Trehalose. Durchgezogene Linien kennzeichnen die Anpassungen der experimentellen Daten gemäß der modifizierten Caillé-Theorie (A). Caillé-Parameter multilamellarer DMPC-Vesikel bei Anwesenheit von Trehalose und PEG (B). Druckabhängigkeit des Caillé Parameters bei Anwesenheit von 15 wt.% PEG und 0.15 M (circa 5 wt.%) Trehalose (C).	69
3.11	Druckabhängige Entwicklung des GP -Wertes von Laurdan in multilamellaren DMPC Vesikeln bei An- und Abwesenheit von Trehalose und PEG.	70
3.12	Temperaturabhängige Entwicklung des GP -Wertes von Laurdan in multilamellaren DMPC Vesikeln bei An- und Abwesenheit von Trehalose und PEG.	72

3.13	DSC-Kurven multilamellarer DMPC-Vesikel bei An- und Abwesenheit von Trehalose. Um einen direkten Vergleich zu erleichtern, wurden die Kurven verschoben und eine gestrichelte Linie, welche die Übergangstemperatur von DMPC angibt, eingezeichnet (A). Einfluss von Trehalose auf den temperaturindizierten Hauptübergang (B). PPC-Daten multilamellarer DMPC-Vesikel (C). Temperaturabhängige Änderung des thermischen Expansionskoeffizienten von DMPC in den unterschiedlichen Lösungen (D). Die Durchführung der Messungen und die Auswertung der Daten erfolgte durch Peter Schinkel.	74
3.14	Einfluss von PEG 20000 auf die Hauptübergangstemperatur T_m von DMPC. Die Durchführung der Messungen und die Auswertung der Daten erfolgte durch Peter Schinkel.	75
4.1	Struktur von Lysozym (pdb ID:1dpx, ²⁵³ erstellt mit Chimera ²⁵⁴). Die Aminosäureseitenketten sind in rot dargestellt.	80
4.2	Semilogarithmische Auftragung der EINS-Intensität als Funktion von Q^2 für 80 mg mL ⁻¹ und 160 mg mL ⁻¹ Lysozym (Lys) in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff bei verschiedenen Drücken. Die Linien stellen die Funktionsanpassungen dar, aus denen gemäß der Gauss-Näherung die MSD bestimmt wurde.	85
4.3	Druckabhängige Entwicklung der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) von 80 mg mL ⁻¹ Lysozym in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff. Die Daten in reiner Pufferlösung sind als Referenz gezeigt und wurden aus Referenz ¹⁴² entnommen.	86
4.4	Druckabhängige Entwicklung der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) von 160 mg mL ⁻¹ Lysozym in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff. Die Daten in reiner Pufferlösung sind zum Vergleich gezeigt und wurden aus Referenz ¹⁴² entnommen.	87
4.5	Druckabhängige Entwicklung der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) von 10 wt.% Lysozym in An- und Abwesenheit von Glycin (A), Sucrose und Trehalose (B). Die Verantwortlichkeit für die gezeigten Daten obliegt Paul Hendrik Schummel.	89
4.6	Repräsentatives Beispiel einer Fourier-selbstenfalteten Amid-I'-Bande (A), deren zweite Ableitung (B) sowie die approximierten Bande im Vergleich zu den experimentellen Daten mitsamt den unterliegenden Subbanden (C). . .	90
4.7	Druckabhängige Entwicklung der Amid-I'-Bande von Lysozym 160 mg mL ⁻¹ und 80 mg mL ⁻¹) in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff (Urea). Alle gezeigten Banden wurden basislinienkorrigiert und auf die Fläche normiert. $T = 25^\circ\text{C}$	92
4.8	Druckabhängige Entwicklung der Flächenanteile der jeweiligen Subbanden in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff (Urea) für 80 mg mL ⁻¹ und 160 mg mL ⁻¹ Lysozym (Lys).	93
4.9	Entfaltungsdruck von 80 mg mL ⁻¹ und 160 mg mL ⁻¹ Lysozym in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff.	95
4.10	Temperaturabhängige Entwicklung der Amid-I'-Bande von Lysozym ($c = 160$ mg mL ⁻¹ und 80 mg mL ⁻¹) in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff. Alle gezeigten Banden wurden basislinienkorrigiert und auf die Fläche normiert.	96

4.11	Temperaturabhängige Entwicklung der Flächenanteile der jeweiligen Subbanden in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff für 80 mg mL ⁻¹ und 160 mg mL ⁻¹ Lysozym.	97
4.12	Durch FTIR-Messungen bestimmte Entfaltungstemperatur von 80 mg mL ⁻¹ und 160 mg mL ⁻¹ Lysozym in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff. Die Durchführung und Auswertung der DSC-Daten erfolgte durch Paul Hendrik Schummel.	98
4.13	Druck-Temperatur-Phasendiagramm für 160 mg mL ⁻¹ Lysozym. Die durchgezogene Linie dient der optischen Orientierung.	99
4.14	Druckabhängige Entwicklung der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) von 10 wt.% Lysozym in An- und Abwesenheit von Trehalose (A). Entwicklung der MSD mit steigender Trehalose-Konzentration bei ausgewählten Drücken (B). Die Verantwortlichkeit für die gezeigten Daten obliegt Paul Hendrik Schummel.	100
4.15	Entfaltungsvolumen von 80 mg mL ⁻¹ und 160 mg mL ⁻¹ Lysozym in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff.	101
5.1	Strukturen von Calcium-freiem apo-Calmodulin, Calcium-gebundenem holo-Calmodulin sowie der Komplexe zwischen holo-Calmodulin mit einem myri-soliertem Peptid bzw. dem Calcineurin Bindungs-Peptid (pdb IDs:1CFD, ²⁸⁰ 1CLL, ²⁷⁸ 2R28, ²⁸¹ 1L7Z ²⁸²). Die Abbildung wurde mit Chimera ²⁵⁴ erstellt.	105
5.2	KRas4B mit der Sequenz der hypervariablen Region. Die gezeigte Peptidsequenz entspricht der Sequenz des in dieser Arbeit verwendeten Peptids (pdb ID: 4lpk, Abbildung erstellt mit Chimera ²⁵⁴). Struktur des Calmodulin-Inhibitors TFP.	107
5.3	Streukurven (links) und normierte Paarabstandsverteilungsfunktionen (rechts) von holo-Calmodulin und apo-Calmodulin bei ausgewählten Drücken. Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassungen der experimentellen Daten durch indirekte Fouriertransformation dar.	112
5.4	Durch DAMMIF erhaltene <i>ab initio</i> -Strukturmodelle von holo- und apo-Calmodulin bei 5 bar und 3000 bar. Die Strukturmodelle bei 5 bar wurden mit den entsprechenden Kristallstrukturen (PDB ID: 3CLN, 1LIN) überlagert. Die Abbildung wurde mit dem Programm Chimera erstellt. ²⁵⁴ .	113
5.5	Streukurven (links) und normierte Paarabstandsverteilungsfunktion (rechts) des holo-Calmodulin-TFP-Komplexes und des holo-Calmodulin-KRas4B-HVR-Komplexes bei ausgewählten Drücken. Die durchgezogenen Linien stellen die entsprechenden Anpassungen der experimentellen Daten durch indirekte Fouriertransformation dar. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.	114
5.6	Druckabhängige Entwicklung des Gyrationradius von holo-Calmodulin in An- und Abwesenheit der untersuchten Liganden. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.	116

5.7	<i>Ab initio</i> -Strukturmodelle des holo-Calmodulin-KRas4B-Komplexes und des holo-Calmodulin-TFP-Komplexes bei 5 bar und 3000 bar. Die Strukturmodelle bei 5 bar wurden mit den Kristallstrukturen des holo-Calmodulin-TFP-Komplexes (pdb ID: 1LIN) ³⁰⁷ und des holo-Calmodulin-Calcineurin-Komplexes (pdb ID: 2R28) ²⁸¹ überlagert. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.	117
5.8	Experimentelle Streukurve des holo-Calmodulin-KRas4B-Komplexes bei 5 bar im Vergleich mit aus Kristallstrukturdaten berechneten Streukurven des hantelförmigen holo-Calmodulins (PDB ID: 1CLL), des kugelförmigen Komplexes zwischen Calmodulin und einem myrosiliertem Peptid (PDB ID: 1L7Z), sowie des dimeren Komplexes zwischen holo-Calmodulin und dem Calcineurin-Peptids (PDB ID: 2R28) sind als durchgezogene Linien gezeigt.	118
5.9	Einfluss des molaren Verhältnisses zwischen Calmodulin und dem KRas4B-HVR-Peptid auf die Streukurven und Paarabstandsverteilungsfunktionen des gebildeten Komplexes bei ausgewählten Temperaturen. Die durchgezogenen Linien stellen die entsprechenden Anpassungen der experimentellen Daten durch indirekte Fouriertransformation dar.	120
5.10	Autokorrelationsfunktionen (A) und gemessene sowie aus Kristallstrukturdaten berechnete Diffusionskoeffizienten (B) von holo-Calmodulin, sowie der Komplexe von holo-Calmodulin mit dem KRas4B-HVR-Peptid und dem Liganden TFP. Größenverteilungen der entsprechenden Messungen von holo-Calmodulin (C) holo-Calmodulin + KRas4B (D) und holo-Calmodulin + TFP (E). Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.	121
5.11	Semilogarithmische Auftragung der EINS Intensität als Funktion von Q^2 für holo-Calmodulin, apo-Calmodulin, den holo-Calmodulin-TFP-Komplex und den holo-Calmodulin KRas4B-HVR-Peptid-Komplex, bei verschiedenen Drücken. Die Linien stellen die Funktionsanpassungen dar, welche gemäß Gleichung (5.3) zur Bestimmung der MSD verwendet wurden. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.	123
5.12	Druckabhängige Entwicklung der MSD von holo-Calmodulin, des holo-Calmodulin-TFP-Komplexes und des holo-Calmodulin KRas4B-HVR-Peptid-Komplexes bei verschiedenen Drücken, sowie die MSD von apo-Calmodulin bei 50 bar. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.	125
5.13	Elastische Intensitäten von holo-Calmodulin sowie dessen Komplexen mit dem KRas4B-HVR-Peptid und TFP. Die Werte wurden auf den bei 40 bar erhaltenen Wert normiert. Die Verantwortlichkeit für die Daten in Anwesenheit von TFP obliegt Dr. S. Çınar.	126
6.1	Struktur von LADH (pdb ID:6ADH) ³²⁵ NAD ⁺ ist blau, Zn ²⁺ orange und DMSO magenta dargestellt. Erstellt mit Chimera. ²⁵⁴	131
6.2	Druckabhängige Entwicklung des Gyrationradius von 0.7 wt.% LADH in An- und Abwesenheit von PEG 200 (a) sowie von Osmolyten (b). Die theoretischen Gyrationradien des Dimers und des Monomers sind als graue Linien dargestellt. Die Verantwortlichkeit für die gezeigten Daten obliegt K. Julius. Abbildung modifiziert nach Referenz. ³³⁷	133

6.3	Durch dynamische Lichtstreuung bestimmte Größenverteilung (hydrodynamischer Durchmesser) von LADH nach Filtration durch Filter mit einem Porendurchmesser von 200 nm (A,C) und 20 nm (B,C). Gezeigt sind die Intensitätsverteilungen (A,B) und die Volumenverteilungen (C,D).	140
6.4	Repräsentatives Beispiel einer Fourier-selbstenfalteten Amid-I'-Bande, der zweiten Ableitung der Bande sowie die Approximation der experimentellen Daten mit den unterliegenden Subbanden. Alle gezeigten Banden wurden hintergrund- und basislinienkorrigiert sowie auf die Fläche normiert.	141
6.5	Druckabhängige Entwicklung der Flächenanteile der zur Anpassung der experimentellen FTIR-Daten verwendeten Subbanden in An- und Abwesenheit der Osmolyte TMAO, Harnstoff und PEG 200 für LADH. Die graue Linie dient der optischen Orientierung.	144
6.6	Struktur von LADH (pdb ID: 1HLD ³¹⁸). Tryptophanseitenketten sind blau eingefärbt. Abbildung erstellt mit Chimera. ²⁵⁴	146
6.7	Druckabhängige Entwicklung der flächennormierten intrinsischen Tryptophanfluoreszenz bei 25 °C (A). Druckabhängige Entwicklung der Fluoreszenzintensität bei 335 nm. Die roten Kreise zeigen die Daten nach der Korrektur intrinsischer Druckeffekte durch die Fluoreszenzintensität von NATA (B). Um einen optischen Vergleich der relativen Änderungen zu ermöglichen, wurden die Intensitäten auf den Wert bei 100 bar normiert.	147
6.8	Druckabhängige Entwicklung der Fluoreszenzspektren von ANS (Anregungswellenlänge: 350 nm in Puffer (A), in Anwesenheit von LADH (B) und in 90% DMSO (C). Die Pfeile kennzeichnen steigenden Druck. Druckabhängige Entwicklung der ANS-Fluoreszenz-Intensität (als Fläche der spektralen Bande, normiert auf den Wert bei 100 bar um die relative Änderung der Quantenausbeute darzustellen).	149
6.9	Druckabhängige Entwicklung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz (Anregungswellenlänge: 295 nm) von LADH in der An- und Abwesenheit des Fluorophors ANS (molares Verhältnis 1:6). Druckabhängige Entwicklung von Fläche ₁ /Fläche ₀ , wobei Fläche ₁ und Fläche ₀ die Fläche der Tryptophanbande in Ab- und Anwesenheit von ANS (integriert von 313-399 nm) ist.	150
6.10	Druckabhängige Entwicklung der Fluoreszenzspektren von ANS (Anregungswellenlänge: 350 nm) bei Bindung an LADH in An- und Abwesenheit von NAD ⁺ (A,B). Druckabhängige Entwicklung der normierten Fluoreszenzintensität (Fläche der spektralen Bande) von LADH in Anwesenheit von NAD ⁺ (C,D).	152
6.11	Michaelis-Menten-Auftragung der durch LADH katalysierten Oxidation von Ethanol bei 25 °C. Die durchgezogenen Linien zeigen Anpassungen gemäß Gleichung (7.3) (A). Druckabhängige Entwicklung von k_{cat} (B). Druckabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Ethanol-Konzentration von 100 mM und einer NAD ⁺ -Konzentration von 0.8 mM in der An- und Abwesenheit von Osmolyten und PEG 200 (C,D).	154
6.12	Temperaturabhängige Entwicklung der flächennormierten Amid-I'-Bande von LADH in An- und Abwesenheit von Osmolyten.	156
6.13	Temperaturabhängige Entwicklung der Flächenanteile der jeweiligen Subbanden in An- und Abwesenheit von Osmolyten.	158

6.14	Aus FTIR-Messungen bestimmte Übergangstemperaturen von LADH in An- und Abwesenheit ausgewählter Osmolyte und dem <i>Crowder</i> PEG 200.	159
6.15	Temperaturabhängige Entwicklung der ANS Fluoreszenz in Anwesenheit von LADH (A). Relative Änderung der ANS-Fluoreszenzintensität (als Fläche der spektralen Bande) mit steigender Temperatur (B).	161
6.16	Experimentelle Streukurven von LADH bei ausgewählten Temperaturen. Durchgezogene Linien stellen die Funktionsanpassungen dar (A). Entwicklung des experimentell bestimmten Gyrationradius mit steigender Temperatur. Der theoretisch-berechnete Gyrationradius ist als graue Linie gezeigt (B). Paaranstreuungsverteilungsfunktionen bei ausgewählten Temperaturen (C).	162
6.17	Druckabhängige Entwicklung der Fluoreszenzintensität (Fläche der spektralen Bande) von ANS gebunden an LADH in An- und Abwesenheit von Osmolyten und PEG 200.	164
6.18	Druckabhängige Entwicklung von K_m der durch LADH katalysierten Ethanol-Oxidation.	164
6.19	Temperaturabhängige Entwicklung der flächennormierten intrinsischen Tryptophanfluoreszenz (A). Temperaturabhängige Entwicklung der Fluoreszenzintensität bei 335 nm. Die gestrichelten Linien zeigen die in den FTIR-Messungen bestimmten Übergangstemperaturen (B).	165
7.1	Struktur von Lactatdehydrogenase im Komplex mit NADH und Oxamat (pdb ID: 3H3F). ³⁸⁰ Die monomeren Untereinheiten sind farbig dargestellt.	170
7.2	Semilogarithmische Auftragung der EINS-Intensität als Funktion von Q^2 für 90 mg mL ⁻¹ LDH, den Komplex zwischen LDH und NADH (B) bzw. NADH + Oxamat (C) und LDH in Anwesenheit von 1 M Glycin (D) bei verschiedenen Drücken (vertikal verschoben). Die Linien stellen die Funktionsanpassungen dar, welche gemäß der Gauss-Näherung zur Bestimmung der MSD verwendet wurden.	174
7.3	Druckabhängige Entwicklung der MSD von 90 mg mL ⁻¹ LDH und dem Komplex zwischen LDH und NADH (A) bzw. NADH + Oxamat (B). Die gestrichelten Linien und sigmoidalen Kurven dienen der optischen Orientierung.	176
7.4	Druckabhängige Entwicklung der MSD von 90 mg mL ⁻¹ LDH in Anwesenheit von 1 M Glycin. Die gestrichelten Linien und sigmoidalen Kurven dienen der optischen Orientierung.	177
7.5	QENS-Spektren eines Vanadium-Zylinders und von 90 mg mL ⁻¹ LDH bei ausgewählten Drücken.	178
7.6	Druckabhängige Entwicklung der MSD von 90 mg mL ⁻¹ LDH, dem Komplex zwischen LDH und NADH (A) bzw. NADH + Oxamat (B) und LDH in Anwesenheit von 1 M Glycin. Die gestrichelten Linien und sigmoidalen Kurven dienen der optischen Orientierung.	179
7.7	Druckabhängige Entwicklung der Amid-I'-Bande von LDH (A). Approximation der experimentellen Daten (Kreise) durch Subbanden (B). Druckabhängige Entwicklung des Flächenanteils dieser Subbanden (C).	180
7.8	Michaelis-Menten-Auftragungen der durch LDH katalysierten Umwandlung von Pyruvat zu Lactat in Abwesenheit (A) sowie in Anwesenheit der Osmolyte Harnstoff (B), Glycin (C) und TMAO (D) bei ausgewählten Drücken.	182

7.9	Druckabhängige Entwicklung von k_{cat} der durch LDH katalysierten Umwandlung von Pyruvat zu Lactat in An- und Abwesenheit der Osmolyte Harnstoff, TMAO und Glycin.	183
7.10	Druckabhängige Entwicklung von K_m für Pyruvat der durch LDH katalysierten Reaktion in Anwesenheit der Osmolyte Harnstoff, TMAO und Glycin.	185
7.11	Aktivierungsvolumen der LDH-katalysierten Umwandlung von Pyruvat zu Lactat für hohe und geringe Pyruvat-Konzentrationen (A), Konzentrationsabhängigkeit des Aktivierungsvolumens (B) und Volumenprofil der katalysierten Reaktion (C).	187
7.12	Semilogarithmische Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit der LDH-katalysierten Reaktion gegen den Druck für verschiedene Substratkonzentrationen. Die durchgezogenen Linien stellen Funktionsanpassungen dar, aus welchen das Aktivierungsvolumen bestimmt wurde.	189
7.13	Semilogarithmische Auftragung von k_{cat} (oben) und k_{cat}/K_m (unten) gegen den Druck. Die durchgezogenen Linien stellen Funktionsanpassungen dar, aus welchen das Aktivierungsvolumen bestimmt wurde.	190
7.14	Aktivierungsvolumen der LDH-katalysierten Umwandlung von Pyruvat zu Lactat für hohe und geringe Pyruvat-Konzentrationen in An- und Abwesenheit der Osmolyte Harnstoff, Glycin und TMAO.	191
7.15	Konzentrationsabhängigkeit des Aktivierungsvolumens der LDH katalysierten Reaktion als Funktion der Substratkonzentration in Anwesenheit der Osmolyte.	192

Abkürzungsverzeichnis

Symbol **Bedeutung**

ANS	<i>1-Anilinonaphthalene-8-Sulfonic Acid</i>
a.u.	Arbitrary unit
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)aminotris(hydroxymethyl)methan
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CaM	Calmodulin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPPE	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DSC	Diferenz-Scanningkalorimetrie
DTT	Dithiothreitol
DLS	Dynamische Lichtstreuung
EINS	Elastische inkohärente Neutronenstreuung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenbis(oxyethylennitrilo)tetraessigsäure
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FSD	Fourier-selfdeconvolution
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot
GP	<i>Generalized Polarization</i>
HVR	<i>hypervariable region</i>
ILL	Institut Laue-Langevin
IR	Infrarot
KRas	<i>Kirsten Rat Sacroma</i>
LADH	Leber-Alkoholdehydrogenase
LDH	Lactatdehydrogenase
Lys	Lysozym
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MSD	<i>Mean squared displacement</i>
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid

Symbol	Bedeutung
PDB	Protein data bank
PEG	Polyethylenglycol
PPC	Pressure perturbation calorimetry
QENS	Quasielastische Neutronenstreuung
SASA	<i>Solvent accessible surface area</i>
SAXS	<i>Small angle x-ray scattering</i>
TFP	Trifuoperazin
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -Oxid
trans	<i>transition</i> (Übergang)
TRH	Trehalose
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV/VIS	<i>ultraviolet / visible</i>
wt.%	<i>weight percent</i> (Gewichtsprozent)

11 Publikationsliste

1. **Samy R. Al-Ayoubi**, P. H. Schummel, M. Golub, J. Peters and R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2017**, 19, 14230-14237.
2. **Samy R. Al-Ayoubi**, P. K. F. Schinkel, M. Berghaus, M. Herzog and R. Winter, *Soft Matter*, 2018, 14, 8792-8802.
3. K. Julius, **Samy R. Al-Ayoubi**, M. Paulus, M. Tolan and R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2018**, 20, 7093-7104.*
4. S. Cinar, **Samy Al-Ayoubi**, C. Sternemann, J. Peters, R. Winter, C. Czeslik, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2018**, 20, 3514-3522.
5. S. Cinar, S. Möbitz, **Samy Al-Ayoubi**, B.-K. Seidlhofer, C. Czeslik, *Langmuir*, **2017**, 33, 3982-3990.
6. S. Zhang, B. Sperlich, F. Li, **Samy Al-Ayoubi**, H. Chen, Y. Zhao, Y. Li, K. Weise, R. Winter, Y. Chen, *ACS Chem Biol.* 2017 Jun 16;12(6):1703-1710.
7. M. Berghaus, M. Paulus, P. Salmen, **Samy Al-Ayoubi**, M. Tolan, and R. Winter, *J. Phys. Chem. B*, **2016**, 120 (29), 7148–7153.

in Bearbeitung:

1. **Samy R. Al-Ayoubi**, P. H. Schummel, T. Seydel, J. Peters, R. Winter, Effect of pressure on the dynamics of oligomeric proteins

*geteilte Erstautorenschaft