

COSOLVENSEINFLUSS AUF DIE  
STRUKTUR UND DYNAMIK  
AUSGEWÄHLTER PROTEINSYSTEME

---

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

(DR. RER. NAT.)

VORGELEGT VON

PAUL HENDRIK SCHUMMEL

GEBOREN AM 12. JULI 1986 IN ST. WENDEL

EINGEREICHT BEI DER

FAKULTÄT CHEMIE UND CHEMISCHE BIOLOGIE

DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND

DORTMUND

AUGUST 2019



# Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Schummel, Paul Hendrik

Name, Vorname  
(Surname, first name)

143078

Matrikel-Nr.  
(Enrolment number)

## Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

## Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Dortmund, den

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)

Titel der Dissertation:  
(Title of the thesis):

Cosolvenseinfluss auf die Struktur und Dynamik ausgewählter Proteinsysteme

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.\*

**\*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.**

Dortmund, den

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)



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

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Oktober 2019

Erstgutachter:	Prof. Dr. Roland Winter
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Stefan M. Kast
Vorsitzender:	Prof. Dr. Andreas Steffen



*„Ein Chemiker, der kein Physiker ist, ist überhaupt gar nichts.“*

Robert Wilhelm Bunsen

30.03.1811 – 16.08.1899





*Für meine Familie*



# Dankesworte

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, durch deren Unterstützung und Hilfe diese Arbeit erst möglich wurde.

Zuallererst danke ich **Herrn Prof. Dr. Roland Winter**, der mir die Möglichkeit geboten hat, diese Arbeit anzufertigen. Vielen Dank für die Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Bei **Herrn Prof. Dr. Stefan M. Kast** möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

**Frau Prof. Dr. Judith Peters** danke ich für die angenehme Zusammenarbeit am Institut Laue-Langevin.

**Frau Andrea Jeworrek** danke ich für die Hilfe bei allen organisatorischen und administrativen Tätigkeiten.

Meinen guten Freunden und Bürokollegen **Herrn Dr. Samy R. Al-Ayoubi** und **Herrn Dr. Süleyman Cinar** danke ich für die angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit sowie die zahlreichen Erlebnisse in unserer gemeinsamen Zeit.

**Frau Pia Glimm**, **Herrn Michel W. Jaworek** und **Herrn Christian Anders** danke ich für die konstruktive und zielführende Zusammenarbeit. Des Weiteren bedanke ich mich bei allen **Mitarbeitern sowie ehemaligen Mitarbeitern** des

Lehrstuhls Physikalische Chemie I für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

**Meiner Familie** gilt mein besonderer Dank. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung, ihren Rückhalt und ihren Glauben an mich von Anfang an wäre alles nicht möglich gewesen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Freundin **Mandy Gutzeit**, die an mich glaubt, in allem unterstützt, mir Kraft spendet und oftmals so viel Geduld mit mir hat.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Motivation und Zielsetzung . . . . .	3
1.2	Proteine . . . . .	8
1.2.1	Proteinstabilität . . . . .	9
1.2.1.1	Einfluss von Temperatur . . . . .	13
1.2.1.2	Einfluss von Druck . . . . .	14
	Proteindenaturierung . . . . .	14
	Dissoziation von Proteinoligomeren . . . . .	16
1.2.2	Proteindynamik . . . . .	17
1.2.2.1	Interne Proteindynamik . . . . .	17
1.2.2.2	Globale Proteindynamik . . . . .	18
1.3	Osmolyte . . . . .	19
1.3.1	Verwendete Osmolyte . . . . .	22
1.3.1.1	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid . . . . .	22
1.3.1.2	Harnstoff . . . . .	24
1.3.1.3	Glycin . . . . .	24
1.3.1.4	Trehalose . . . . .	25
1.4	<i>Crowding</i> . . . . .	26
<b>2</b>	<b>Proteinstabilität von globulärem Actin</b>	<b>31</b>
2.1	Einleitung . . . . .	33
2.2	Materialien und Methoden . . . . .	36
2.2.1	Chemikalien und Probenpräparation . . . . .	36
2.2.2	Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	37

2.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	39
2.3.1	Druckstabilität von G-Actin . . . . .	39
2.3.1.1	Druckabhängigkeit von <i>N</i> -Acetyl-L-Tryptophanamid . . . . .	39
2.3.1.2	Druckinduzierte Entfaltung von G-Actin . . . . .	41
2.3.1.3	Einfluss von TMAO auf die Druckstabilität von G-Actin . . . . .	44
2.3.1.4	Einfluss von Harnstoff auf die Druckstabilität von G-Actin . . . . .	47
2.3.1.5	Einfluss von TMAO-Harnstoff-Gemischen auf die Druckstabilität von G-Actin . . . . .	54
2.3.1.6	Einfluss von Makrocrowdern auf die Druckstabilität von G-Actin . . . . .	57
2.3.2	Thermostabilität von G-Actin . . . . .	61
2.3.2.1	Temperaturabhängige Entfaltung von G-Actin . . . . .	61
2.3.2.2	Einfluss von TMAO auf die Thermostabilität von G-Actin . . . . .	67
2.3.2.3	Einfluss von Harnstoff auf die Thermostabilität von G-Actin . . . . .	70
2.3.2.4	Einfluss von TMAO-Harnstoff-Gemischen auf die Thermostabilität von G-Actin . . . . .	73
2.3.2.5	Einfluss von Makrocrowdern auf die Thermostabilität von G-Actin . . . . .	75
2.4	Zusammenfassung . . . . .	76
2.5	Anhang . . . . .	79
2.5.1	Zusätzliche Abbildungen . . . . .	79
<b>3</b>	<b>Modulation der Polymerisationskinetik von <math>\alpha/\beta</math>-Tubulin</b>	<b>85</b>
3.1	Einleitung und Zielsetzung . . . . .	87
3.2	Material und Methoden . . . . .	90
3.2.1	Materialien und Probenpräparation . . . . .	90

3.2.2	Turbidimetrie-Messungen & Kinetikbestimmung der Polymerisation von $\alpha/\beta$ -Tubulin . . . . .	91
3.2.3	Fluoreszenzanisotropie-Messungen . . . . .	92
3.2.4	Bestimmung der kritischen Konzentration von $\alpha/\beta$ -Tubulin . . . . .	93
3.2.5	Confocal Laser Scanning Microscopy . . . . .	94
3.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	94
3.3.1	Einfluss von TMAO auf die Polymerisationskinetik . . . . .	96
3.3.2	Einfluss von Harnstoff auf die Polymerisationskinetik . . . . .	104
3.3.3	Einfluss von Crowdern auf die Polymerisationskinetik . . . . .	108
3.3.3.1	Ficoll <sup>®</sup> PM 70 . . . . .	108
3.3.3.2	Saccharose . . . . .	111
3.4	Zusammenfassung . . . . .	112
3.5	Anhang . . . . .	115
<b>4</b>	<b>Untersuchung des Einflusses natürlicher Cosolventien auf Mikrotubuli</b>	<b>121</b>
4.1	Einleitung . . . . .	123
4.2	Materialien und Methoden . . . . .	125
4.2.1	Chemikalien und Probenpräparation . . . . .	125
4.2.2	Temperatur- und druckabhängige FOURIER-Transform-Infrarot Spektroskopie . . . . .	126
4.2.3	Differentialthermoanalyse und Druck-Perturbations-Kalorimetrie	131
4.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	133
4.4	Zusammenfassung . . . . .	158
4.5	Anhang . . . . .	160
<b>5</b>	<b>Cosolvenseinfluss auf die Struktur und Dynamik von Lysozym</b>	<b>165</b>
5.1	Einleitung . . . . .	167
5.2	Materialien und Methoden . . . . .	171
5.2.1	Chemikalien und Probenpräparation . . . . .	171
5.2.2	Elastische Inkohärente Neutronenstreuung . . . . .	172
5.2.3	FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie . . . . .	173

5.2.4	Differentialthermoanalyse . . . . .	177
5.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	178
5.3.1	Einfluss von Cosolventien auf die Proteindynamik unter Druck	178
5.3.2	Einfluss von Cosolventien auf die Proteinstabilität unter Druck	189
5.3.3	Einfluss von Cosolventien auf die thermische Proteinstabilität	197
5.4	Zusammenfassung . . . . .	204
<b>6</b>	<b>Modulation des Dissoziationsprozesses von <math>\alpha/\beta</math>-Tubulin</b>	<b>207</b>
6.1	Einleitung . . . . .	209
6.2	Materialien und Methoden . . . . .	211
6.2.1	Chemikalien und Probenpräparation . . . . .	211
6.2.2	Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	212
6.2.3	Fluoreszenzanisotropie-Messungen . . . . .	215
6.2.4	Differentialthermoanalyse und Druck-Perturbations-Kalorimetrie	215
6.2.5	Temperatur- und Druckabhängige FOURIER-Transform-Infrarot Spektroskopie . . . . .	217
6.2.6	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie . . . . .	220
6.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	222
6.3.1	Druckinduzierte Dissoziation des $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimers .	223
6.3.1.1	Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	223
	Korrektur des intrinsischen Druckeffekts . . . . .	223
	Druckinduzierte Dissoziation von $\alpha/\beta$ -Tubulin . . . . .	225
	Einfluss von Cosolventien und Crowdern . . . . .	230
6.3.1.2	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie . . . . .	242
6.3.1.3	FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie . . . . .	246
6.3.2	Temperaturinduzierte Dissoziation des $\alpha/\beta$ -Tubulin Hetero- dimers . . . . .	252
6.3.2.1	Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	252
	Thermische Dissoziation von $\alpha/\beta$ -Tubulin . . . . .	252
	Einfluss von Cosolventien und Crowdern . . . . .	255
6.3.2.2	FOURIER-Transform-Infrarot-Spektroskopie . . . . .	263



6.3.2.3	Differentialthermoanalyse und Druck-Perturbations-	
	Kalorimetrie . . . . .	268
6.3.2.4	Statische Fluoreszenzanisotropie . . . . .	271
6.4	Zusammenfassung . . . . .	274
6.5	Anhang . . . . .	276
6.5.1	Zusätzliche Abbildungen . . . . .	276
<b>Zusammenfassung</b>		<b>281</b>
	Deutschsprachige Zusammenfassung . . . . .	283
	Abstract . . . . .	291
<b>Verzeichnisse</b>		<b>I</b>
	Literaturverzeichnis . . . . .	III
	Abbildungsverzeichnis . . . . .	XXIX
	Tabellenverzeichnis . . . . .	XLV
	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	XLVII
<b>Publikationsliste</b>		<b>LI</b>



# 1 Einleitung



## 1.1 Motivation und Zielsetzung

Die Beobachtung des Überlebens von Organismen bei extremsten Umweltbedingungen, wie beispielsweise hohe hydrostatische Drücke, hohe und tiefe Temperaturen oder extreme pH-Werte, veranlasste Forscher, diese Organismen und deren Überleben bei extremen Lebensbedingungen zu studieren.<sup>[1,2]</sup> Auf der Erdoberfläche liegt ein Druck von etwa 1 bar vor, allerdings macht dies nur etwa 1% der Biosphäre aus.<sup>[3]</sup> Der Planet Erde ist mit  $\sim 70\%$  von Ozeanen bedeckt, die eine durchschnittliche Tiefe von 3800 m aufweisen, was einem Druck von etwa 380 bar entspricht.<sup>[1,3,4]</sup> Mit einer Tiefe von  $\sim 11\,000$  m stellt der Marianengraben im westlichen Pazifik die tiefste Stelle auf der Erde dar, was einem Druck von 1.1 kbar, dem 1100-fachen des üblichen Drucks auf der Erdoberfläche, entspricht.<sup>[3,4]</sup> In der Tiefsee können neben hohen Drücken ebenfalls hohe Temperaturen auftreten, wie beispielsweise in Hydrothermalquellen mit einer Temperatur von mehr als  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . In solchen Habitaten ist ebenfalls ein Überleben von extremophilen Organismen möglich. Beispielsweise wurde in einer Tiefe von 11 000 m das barophile Bakterium *Shewanella benthica* gefunden, das bei einem Druck von 800 bar die höchsten Wachstumsraten aufweist.<sup>[5,6]</sup> Kashefi *et al.* berichten von dem Einzeller *Geogemma barossii* (Strain 121), der im nordöstlichen Pazifik in der Nähe eines „Schwarzen Rauchers“ gefunden wurde.<sup>[7]</sup> Der bevorzugte Temperaturbereich von diesem hyperthermophilen Organismus liegt bei über  $80\text{ }^\circ\text{C}$  und selbst bei einer Temperatur von  $121\text{ }^\circ\text{C}$  ist eine Reproduktion möglich.<sup>[7]</sup>

Das chemische Gleichgewicht sowie die Reaktionsgeschwindigkeit einer Reaktion können durch die physikalischen Parameter Druck  $p$  und Temperatur  $T$  beeinflusst werden, sodass die zuvor genannten extremen Umweltbedingungen im Labor nachgestellt werden können, um das Studium einiger Biomoleküle und deren Überlebensstrategien zu ermöglichen. Im Vergleich zu dem physikalischen Parameter Temperatur zeigt Druck einen milden Einfluss auf Moleküle, d.h. eine durch den physikalischen Parameter Druck induzierte Entfaltung eines Proteins ist oftmals reversibel und Intermediate können stabilisiert werden, was mithilfe des physikalischen Parameters Temperatur meist nicht möglich ist, obwohl die Energie, die aufgebracht

werden muss, um den Druck von einem Liter Wasser bei einer Temperatur von 20 °C von 1 bar auf 4 kbar zu erhöhen, genau der Energie entspricht, die nötig ist, um die Temperatur von einem Liter Wasser von 20 °C auf 25 °C bei Atmosphärendruck zu erhöhen.<sup>[3,4,8,9]</sup> Daher kann durch die Untersuchung von Biomolekülen unter Druck ein tieferes thermodynamisches und kinetisches Verständnis über ablaufende Prozesse erhalten werden.

In Eukaryonten besteht das Zytoskelett hauptsächlich aus Intermediärfilamenten, Mikrotubuli und Mikrofilamenten, den Actinfilamenten, die miteinander interagieren, der Zelle Stabilität verleihen und an verschiedenen Prozessen, wie beispielsweise dem intrazellulären Transport, der Beweglichkeit der Zelle und der Zellteilung, beteiligt sind.<sup>[10–12]</sup> Ein Überleben unter extremsten Umweltbedingungen ist nur durch das genaue Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren, der nativen dreidimensionalen Proteinkonformation und der Codierung der erforderlichen Proteine möglich. Durch Veränderungen der nativen Proteinkonformation, zum Beispiel durch eine Punktmutation während der Codierung, kann es zu schwerwiegenden Erkrankungen kommen, wie beispielsweise der Sichelzellenanämie.<sup>[13,14]</sup> Kommt es bei Actin während der Codierung zu einer Punktmutation, so entstehen Myopathien in der Herzmuskulatur, während es bei Tubulin zu kortikalen Missbildungen kommen kann.<sup>[15–17]</sup>

Die Funktionalität von Proteinen hängt sowohl von deren Struktur als auch von der Dynamik ab und dient dem Erhalt des Lebens. Aus diesem Grund ist ein tieferes Verständnis der Struktur, Dynamik und Stabilität von Proteinen und deren gegenseitiges Zusammenspiel von großer Bedeutung und Gegenstand dieser Arbeit.

Im Folgenden sollen die einzelnen Forschungsprojekte kurz vorgestellt werden:

### **PROJEKT I: COSOLVENS- UND CROWDING-EFFEKTE AUF DIE STRUKTUR UND DYNAMIK VON GLOBULÄREM ACTIN**

In dieser Studie soll gezeigt werden, wie bestimmte Lösungsbedingungen, die durch die Anwesenheit der beiden Cosolventien Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Harnstoff sowie des makromolekularen Crowders Ficoll<sup>®</sup> PM 70 variiert werden, den widrigen Bedingungen sowohl eines hohen hydrostatischen Drucks als auch einer hohen Temperatur auf die Proteinstabilität und Konformationsdynamik von globulärem Actin (G-Actin), dem Monomerbaustein der in eukaryotischen Zellen enthaltenen Mikrofilamente, entgegenwirken können. Dazu wurden sowohl druck- als auch temperaturabhängige Messungen der Fluoreszenzspektroskopie von G-Actin in An- und Abwesenheit der beiden Cosolventien TMAO und Harnstoff sowie des makromolekularen Crowders Ficoll<sup>®</sup> PM 70 durchgeführt, um Informationen über die Struktur und Stabilität von G-Actin zu erhalten.

### **PROJEKT II: MODULATION DER POLYMERISATIONSKINETIK VON $\alpha/\beta$ -TUBULIN**

In dieser Studie soll der Einfluss der natürlichen Osmolyte Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Harnstoff sowie der makromolekulare *Crowding*-Effekt durch die Anwesenheit von Ficoll<sup>®</sup> PM 70 auf die Kinetik der Polymerisationsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin *in vitro* untersucht werden. Hierzu wurden die biophysikalischen Methoden der Turbidimetrie, Fluoreszenzanisotropie sowie der Confocal Laser Scanning Microscopy verwendet, um zu zeigen, wie physikochemische Merkmale der zytosolischen Umgebung das Polymerisationsverhalten von  $\alpha/\beta$ -Tubulin, einer molekularen Schlüsselreaktion, die verantwortlich für die Dynamik und Motilität einer jeden Zelle ist, beeinflussen können.

### PROJEKT III: UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES NATÜRLICHER COSOLVENTIEN AUF MIKROTUBULI

In dieser Studie soll die Struktur und Stabilität von Mikrotubuli, einem Hauptbestandteil eukaryontischer Zellen, in An- und Abwesenheit der natürlichen Osmolyte Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), Harnstoff und Mischungen dieser Osmolyte über einen weiten Druck- und Temperaturbereich mithilfe der FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) in Kombination mit dynamischer Differenzkalorimetrie (engl.: *dynamic scanning calorimetry*, DSC) und Druck-Perturbations-Kalorimetrie (engl.: *pressure perturbation calorimetry*, PPC) untersucht werden, um ein tieferes mechanistisches Verständnis der limitierten Temperatur- und Druckstabilität der Mikrotubuli *in vivo* zu erlangen.

### PROJEKT IV: COSOLVENSEINFLUSS AUF DIE STRUKTUR UND DYNAMIK IM SUBNANOSEKUNDENBEREICH VON LYSOZYM

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung des Einflusses von Druck auf die interne Proteindynamik innerhalb einer Subnanosekunden-Zeitskala von Lysozym in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen der natürlichen Osmolyte Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), Harnstoff und Glycin sowie der beiden Disaccharide Saccharose und Trehalose unter *self-crowding*-Bedingungen. Hierzu wurden Messungen der elastischen inkohärenten Neutronenstreuung (EINS) durchgeführt. Des Weiteren sollen druck- und temperaturabhängige Messungen der FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) durchgeführt werden, um die Faltungstabilität des Proteins unter *self-crowding*-Bedingungen in Anwesenheit der natürlichen Osmolyte TMAO und Harnstoff sowie Mischungen der beiden Osmolyte zu untersuchen. Weiterhin werden die erhaltenen Ergebnisse mit Ergebnissen aus DSC-Messungen verglichen.



## PROJEKT V: MODULATION DES DISSOZIATIONSPROZESSES VON $\alpha/\beta$ -TUBULIN

Ziel dieser umfassenden Studie ist die Untersuchung des Einflusses der natürlichen Osmolyte Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Harnstoff, inklusive Mischungen der beiden Osmolyte, sowie der beiden Crowder Ficoll<sup>®</sup> PM 70 und Saccharose auf die druck- und temperaturabhängige Dissoziationsreaktion des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers über einen weiten Druck- und Temperaturbereich mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit den biophysikalischen Methoden der FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR), der dynamischen Differenzkalorimetrie (engl.: *dynamic scanning calorimetry*, DSC), der Druck-Perturbations-Kalorimetrie (engl.: *pressure perturbation calorimetry*, PPC), der Fluoreszenzanisotropie und der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (engl.: *fluorescence correlation spectroscopy*, FCS), um auf molekularer Ebene ein tieferes Verständnis der limitierten Druck- und Temperaturstabilität des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers *in vivo* zu erlangen.

## 1.2 Proteine

In jedem Organismus lassen sich Proteine nachweisen, die an einer Vielzahl von Prozessen, wie beispielsweise Transport, Zellsignale oder Katalyse, beteiligt sind.<sup>[18]</sup> Aufgebaut sind diese linearen Polymere aus L-Aminosäuren, wobei die  $\alpha$ -Carboxylgruppe einer Aminosäure über eine Peptidbindung (=Amidbindung) mit der  $\alpha$ -Aminogruppe einer weiteren Aminosäure verbunden ist.<sup>[18]</sup> Somit zählen Proteine aus chemischer Sicht zur Gruppe der Polyamide.<sup>[18]</sup> Die Funktionalität eines Proteins ist durch dessen strukturellen Aufbau bedingt. Hierbei kann die Proteinstruktur in vier Betrachtungsebenen aufgegliedert werden:<sup>[18-20]</sup>

- Die **Primärstruktur** bildet die Aminosäuresequenz einer Polypeptidkette, d.h. die Abfolge der enthaltenen Aminosäuren.
- Als **Sekundärstruktur** wird die Zusammensetzung des Proteins aus räumlich angeordneten Aminosäuren bezeichnet. Solche Sekundärstrukturelemente sind beispielsweise  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter, Zufallsknäuel oder Schleifen, die über Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Carbonyl- ( $-\text{C}=\text{O}$ ) und Aminogruppen ( $-\text{NH}$ ) des Proteinerückgrats ausgebildet werden.
- Die **Tertiärstruktur** ist der Sekundärstruktur übergeordnet und beschreibt die räumliche Anordnung der einzelnen Sekundärstrukturelemente im Protein. Die dreidimensionale Struktur wird durch kovalente Bindungen, wie beispielsweise Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten, sowie durch nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie beispielsweise Wasserstoffbrücken-Bindungen, Coulombwechselwirkungen oder hydrophobe Wechselwirkungen, definiert.
- Die **Quartärstruktur** beschreibt den Zusammenschluss mehrerer Polypeptidketten zu einem Proteinkomplex.

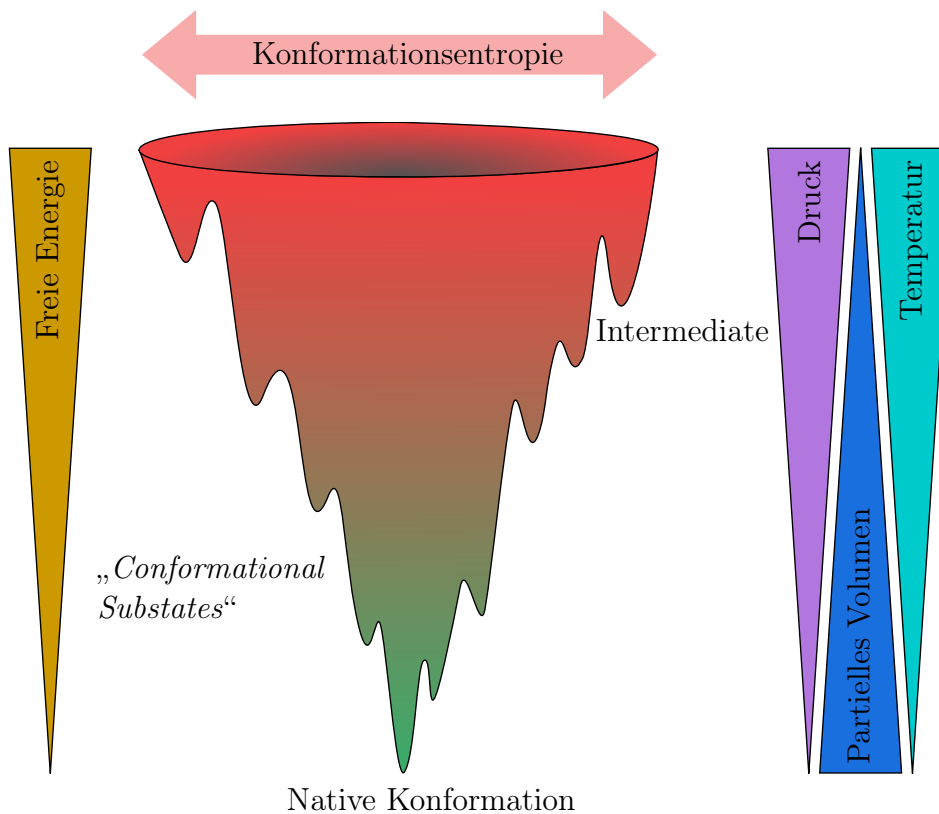
Die Funktionalität eines Proteins ist neben seiner Proteinstruktur oftmals auf eine Interaktion mit anderen Proteinen, Liganden, Substraten oder Hormonen angewiesen. Diese Interaktionen können zum Teil kleine strukturelle Änderungen mit sich bringen, wie beispielsweise bei der Bildung eines Protein-Ligand-Komplexes.

Des Weiteren spielt oftmals bei einer solchen Interaktion die Dynamik eine entscheidende Rolle, d.h. wie schnell sich die strukturelle Umgebung anpassen kann, damit beispielsweise ein solcher Protein-Ligand-Komplex entstehen kann.<sup>[19]</sup>

### 1.2.1 Proteinstabilität

Ein natives Protein besitzt eine dreidimensionale Konformation, die auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen, wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen, mit Bindungsenergien zwischen 2 und 25 kJ mol<sup>-1</sup>, beruht, wodurch die Proteinstabilität, also der Unterschied zwischen der freien Energie des nativen, gefalteten Zustandes und des entfalteten Zustandes, relativ gering ist.<sup>[21]</sup> Kommt es bei einem Protein zu einer spontanen Missfaltung, kann die Funktionalität erheblich beeinträchtigt werden, wie beispielsweise bei dem Prion-Protein PrP<sup>C</sup> (Prion Protein Cellular), woraus mittels einer spontanen Miss- bzw. Umfaltung die pathogene Konformation PrP<sup>Sc</sup> (Prion Protein Scrapie) gebildet wird, die bekanntermaßen der Auslöser der Creutzfeld-Jakob-Krankheit ist.<sup>[22,23]</sup>

Der Faltungsprozess eines Proteins kann mithilfe eines Faltungstrichters, wie er in Abbildung 1.1 illustriert ist, beschrieben werden.<sup>[27]</sup> Das Protein bzw. ein Ensemble an entfaltenen Zuständen besitzt zu Beginn des Faltungsprozesses eine hohe freie Energie sowie eine hohe Konformationsentropie. Mit fortschreitendem Faltungsgrad entstehen Faltungsintermediate mit einer partiell gefalteten Struktur, aus denen der native Zustand bzw. mehrere konformationelle Zustände („*Conformational Substates*“) im gefalteten Zustand entstehen, die eine minimierte freie Energie besitzen.<sup>[26]</sup> Während des Faltungsprozesses wird das partielle Volumen stetig, im Zuge der Ausbildung imperfekter Packungen und daraus resultierender Hohlräume im Inneren des Proteins, den sogenannten Kavitäten, vergrößert.<sup>[9]</sup> Aufgrund eines hochkooperativen Prozesses wird zur Beschreibung des Faltungs- bzw. Entfaltungsprozesses oftmals ein Zwei-Zustandsmodell herangezogen, in dem es lediglich den gefalteten, nativen Zustand und den entfaltenen Zustand gibt.<sup>[29-31]</sup> Unter der Annahme eines Zwei-Zustandsmodells kann der Faltungs- bzw. Entfaltungsprozess als Phasenübergang betrachtet werden, wobei folgende Gleichung gilt:



**Abbildung 1.1** – Schematische Darstellung des Faltungstrichters eines Proteins. Die Breite des Faltungstrichters entspricht der Konformationsentropie, während die Tiefe die freie Energie eines Ensembles an Faltungszuständen widerspiegelt. Mit fortlaufender Faltung nimmt das partielle Volumen aufgrund sich im Inneren bildenden Kavitäten zu und die freie Energie bis zum Erreichen des Minimums im gefalteten Zustand ab. Ausgehend von dem nativen Zustand kann mittels zunehmendem Druck bzw. zunehmender Temperatur der Prozess der Denaturierung eingeleitet werden.<sup>[9,24–28]</sup>

$$\Delta G_u = G_U - G_N = -\Delta S_u dT + \Delta V_u dp \quad (1.1)$$

Hierbei stehen die thermodynamischen Größen  $\Delta S_u$  und  $\Delta V_u$  für die Änderungen der Entropie bzw. des Volumens bei der Entfaltung und  $\Delta G_u$  für die Änderung der Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie, die sich aus der Differenz der Gibbs-Energien des entfalteten ( $G_U$ ) und nativen ( $G_N$ ) Proteins ergibt. Ein Phasenübergang kann durch unterschiedliche thermodynamische Parameter, wie beispielsweise Temperatur, Druck und pH-Wert oder durch die Zugabe von Cosolventien initiiert werden. Durch eine unabhängige Variation dieser Faktoren ergibt sich für die Änderung der

Standard-Entfaltungsgibbs-Energie eine multidimensionale Funktion  $f$ <sup>[32]</sup>:

$$\Delta G_u = \Delta G_{u,0} + f(T, p, \text{pH}, c_{\text{Cosolvens}} \dots) \quad (1.2)$$

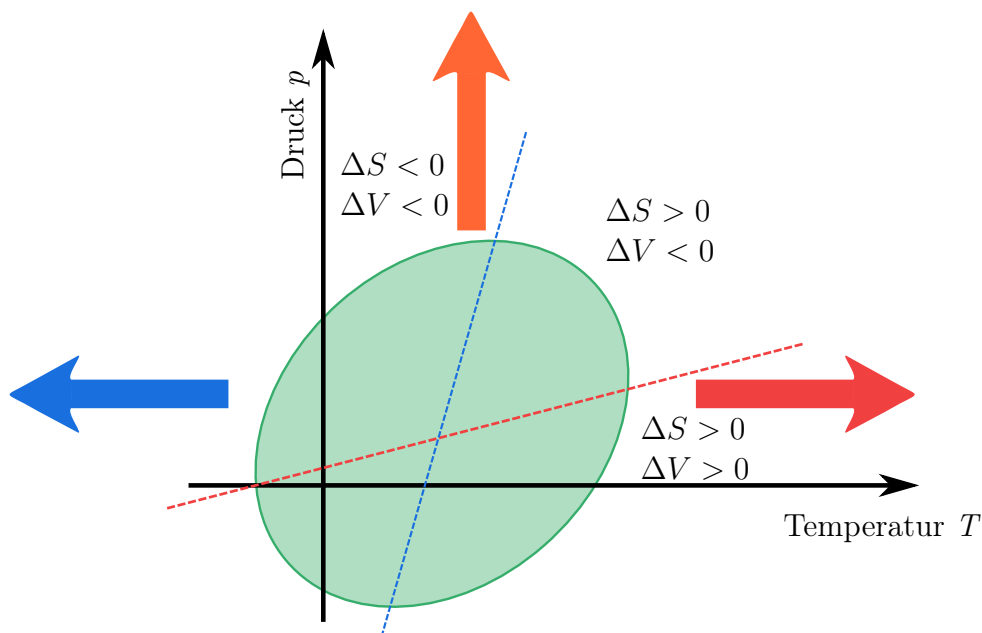
In der multidimensionalen Funktion  $f$  sind alle Parameter enthalten, die den Übergang vom nativen in den denaturierten Zustand charakterisieren, inklusive der Änderungen des Volumens, der spezifischen Wärmekapazität, der Kompressibilität, der Entropie und der thermischen Expansivität.<sup>[32]</sup> Wird Gleichung (1.1) ausgehend von einer Referenztemperatur  $T_0$  und einem Referenzdruck  $p_0$  nach der Temperatur  $T$  und dem Druck  $p$  unter der Voraussetzung, dass die Druck- und Temperaturabhängigkeit der spezifischen Wärmekapazität  $\Delta C_p$ , der Kompressibilität  $\Delta \kappa'$  und der thermischen Expansion  $\Delta \alpha'$  bei der Entfaltung vernachlässigbar ist und alle anderen Parameter konstant sind, integriert, so kann eine Taylorreihe bis zum 2. Term entwickelt werden, die den Entfaltungsprozess in Abhängigkeit der Temperatur und des Drucks beschreibt:<sup>[4,9,32–37]</sup>

$$\begin{aligned} \Delta G_u(T, p) = & \Delta G_{u,0} - \frac{\Delta \kappa'_u}{2} \cdot (p - p_0)^2 + \Delta \alpha'_u \cdot (T - T_0) \cdot (p - p_0) \\ & - \Delta C_{p,u} \left[ T \left( \ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] \\ & + \Delta V_u \cdot (p - p_0) - \Delta S_u \cdot (T - T_0) \end{aligned} \quad (1.3)$$

Das  $\Delta$  kennzeichnet hierbei, in Analogie zu Gleichung (1.1), die Änderung der Größe während des Entfaltungsprozesses, die sich aus der Differenz der jeweiligen Größe des entfalteten und des gefalteten Zustandes ergibt. Die isotherme Kompressibilität  $\kappa'$  mit dem isothermen Kompressibilitätskoeffizienten  $\kappa$  ist wie folgt definiert:<sup>[4,9]</sup>

$$\kappa' = - \left( \frac{\partial V}{\partial p} \right)_T = V \kappa \quad (1.4)$$

Die isotherme Ausdehnung  $\alpha'$  mit dem thermischen Ausdehnungskoeffizienten  $\alpha$  ergibt sich aus folgender Gleichung:<sup>[4,9]</sup>



**Abbildung 1.2** – Schematische Darstellung eines Druck-Temperatur-Phasendiagramms eines monomeren Proteins. Ein Protein liegt innerhalb des grün markierten Bereichs im nativen Zustand vor (■). Die durchgezogene grüne Linie (—) repräsentiert den Phasenübergang, an dem für die Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie gilt:  $\Delta G_u = 0$ . Verschiedene Druck-Temperatur-Kombinationen werden durch die gestrichelten Linien repräsentiert, bei denen  $\Delta S = 0$  (—) oder  $\Delta V = 0$  (—) ist. Die farbigen Pfeile repräsentieren die Kälte- (←) und Hitzedenaturierung (→) sowie die durch Druck (↑) induzierte Entfaltung. Abbildung modifiziert nach Gao *et al.*<sup>[34]</sup>

$$\alpha' = \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_p = V\alpha \quad (1.5)$$

Die Änderung der Enthalpie  $H$  ist über die Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_{p,u}$  wie folgt definiert:<sup>[4,9]</sup>

$$\Delta C_{p,u} = \left( \frac{\partial \Delta H_u}{\partial T} \right)_p \quad (1.6)$$

Beim Phasenübergang vom gefalteten in den entfalteten Zustand eines Proteins liegt ein Gleichgewicht vor und für die Entfaltungs-Gibbs-Energie gilt  $\Delta G_u = 0$ , sodass sich in einem Druck-Temperatur-Phasendiagramm eine elliptische Form ergibt, wie es in Abbildung 1.2 schematisch für ein monomeres Protein dargestellt ist. Hierbei kann die Phasengrenze mittels Gleichung (1.3) ermittelt werden, sofern die

sechs thermodynamischen Größen  $\Delta C_{p,u}$ ,  $\Delta V_u$ ,  $\Delta S_u$ ,  $\Delta \kappa'$ ,  $\Delta \alpha'$  und  $\Delta G_{u,0}$  bekannt sind. Die in Abbildung 1.2 zu erkennende elliptische Form der Phasengrenze resultiert aus der Größe und den Vorzeichen der thermodynamischen Größen  $\Delta C_{p,u}$ ,  $\Delta \kappa'$  und  $\Delta \alpha'$ .<sup>[4,34,35,37]</sup>

Der Übergang vom gefalteten in den entfalteten Zustand eines Proteins kann durch verschiedene thermodynamische Größen initiiert werden, wie beispielsweise hohe und tiefe Temperaturen oder hohen Druck. Während die Hitzedenaturierung entropiegetrieben und aufgrund einer begleiteten thermischen Aggregation häufig irreversibel ist, ist die Kältedenaturierung enthalpiegetrieben und beruht auf der Hydratisierung exponierter Seitenketten.<sup>[38]</sup> Generell ist eine Denaturierung durch negative Drücke realisierbar, allerdings nicht häufig anzutreffen.<sup>[39]</sup>

### 1.2.1.1 Einfluss von Temperatur

Wie bereits zuvor beschrieben, kann ein Protein von dem nativen Zustand mittels Erhöhung bzw. Erniedrigung der Temperatur in den entfalteten Zustand überführt werden. Aufgrund der zugeführten thermischen Energie wird die native Proteinkonformation in eine ungeordnete Struktur überführt, dessen Umwandlung durch einen Anstieg der Konformationsentropie und der Exponierung hydrophober Bereiche im Proteininneren begleitet wird, die anschließend durch umliegende Wassermoleküle hydratisiert werden, wodurch sich lokal geordnete Wasserstrukturen bilden.<sup>[32,40]</sup> Häufig wird die thermisch-induzierte Entfaltung durch eine Zusammenlagerung von intermolekularen, hydrophoben Bereichen begleitet, wodurch sich Proteinaggregate bilden und der Entfaltungsprozess in den meisten Fällen irreversibel ist.<sup>[41]</sup>

Ausgehend von einem Zwei-Zustandsmodell gilt am Phasenübergang vom gefalteten, nativen (N) Zustand in den entfalteten (U) Zustand eines Proteins folgender Zusammenhang:<sup>[20,42,43]</sup>

$$\Delta G_u^\circ = -RT \ln K = 0 \quad (1.7)$$

wobei R für die ideale Gaskonstante steht und  $K$  der temperaturabhängigen Gleichgewichtskonstanten entspricht, die sich wiederum aus dem Quotient des entfalteten

Anteils (u) und des gefalteten Anteils (f) ergibt:<sup>[20,42]</sup>

$$K = \frac{x_u}{x_f} = \frac{x_u}{1 - x_u} \quad (1.8)$$

Bei einer isobaren Auftragung von  $\ln K$  gegen die jeweilige reziproke absolute Temperatur  $T$  ergibt sich ein linearer Zusammenhang, für dessen Steigung folgt:<sup>[44]</sup>

$$\left( \frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = -\frac{1}{R} \frac{\partial}{\partial T} \frac{\Delta G_u^\circ}{T} \quad (1.9)$$

Mithilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung<sup>[44]</sup>

$$\left( \frac{\partial}{\partial T} \frac{\Delta G_u^\circ}{T} \right)_p = -\frac{\Delta H_u}{T^2} \quad (1.10)$$

lässt sich Gleichung (1.9) in die sogenannte VAN'T HOFF'SCHE Reaktionsisobare zusammenfassen,<sup>[20,43–46]</sup>

$$\left( \frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H_u}{RT^2} \quad (1.11)$$

die die Umwandlunghenthalpie angibt, d.h. die Energie die aufgebracht werden muss, um das Protein vom nativen in den entfaltenen Zustand zu überführen.<sup>[20,44]</sup> Zur besseren Unterscheidung und Kennzeichnung der VAN'T HOFF'SCHEN Umwandlunghenthalpie wird anstatt des Indexes „u“ der Index „vH“ im weiteren Verlauf verwendet.

### 1.2.1.2 Einfluss von Druck

#### Proteindenaturierung

Neben der Temperatur kann mittels Druck eine Entfaltung eines Proteins initiiert werden, wodurch es möglich ist, mittels einer Druckapplikation das thermodynamische Gleichgewicht in Richtung des entfaltenen Zustandes zu verschieben. Für die Änderung der Standard-Entfaltung-Gibbs-Energie ergibt sich bei einer druckinduzierten Entfaltung folgender Zusammenhang:<sup>[20,47]</sup>

$$\frac{d\Delta G_u^\circ}{dp} = \Delta V_u \quad (1.12)$$



Die Proteinentfaltung folgt dem Prinzip von LE CHÂTELIER, wobei Zustände unter Druck mit einem kleinen Volumen bevorzugt eingenommen werden. Der Vorteil einer druck-induzierten Denaturierung gegenüber einer thermisch-induzierten Entfaltung liegt darin, dass durch eine Druckerhöhung lediglich eine Volumenänderung  $\Delta V_u$  induziert wird,<sup>[48]</sup> sodass das Protein sehr schnell wieder in den gefalteten Zustand überführt werden kann, also renaturiert wird, da in den meisten Fällen eine durch Druck induzierte Entfaltung von Proteinen einen reversiblen Verlauf besitzt.<sup>[48,49]</sup>

Unter der Annahme eines Zwei-Zustandsmodells ist bei konstanter Temperatur  $T$  die Gleichgewichtskonstante  $K$  druckabhängig und bildet die VAN'T HOFF'SCHE Reaktionsisotherme,<sup>[4,9,46,50]</sup>

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p}\right)_T = -\frac{\Delta V_u}{RT} \quad (1.13)$$

wobei  $\Delta V_u$  das Entfaltungsvolumen bei der druck-induzierten Denaturierung beschreibt und dies meistens ein negatives Vorzeichen aufgrund der Freisetzung von proteininternen Kavitäten besitzt.<sup>[9,51-53]</sup>

In einem Lösungsmittel ist das partielle molare Volumen  $V_i$  eines Proteins  $i$  als die Volumenänderung definiert, die auftritt, wenn das Protein in dem Lösungsmittel gelöst wird, und der Stoffmenge des Proteins, das in diesem Lösungsmittel gelöst wurde, während alle sonstigen Stoffmengen konstant bleiben. Bei einer idealen Mischung ergibt sich das partielle molare Volumen  $V_i$  aus der Differenz der Volumina vor und nach dem Lösen des Proteins in dem Lösungsmittel. Allerdings verändert sich, aufgrund von Hydratationseffekten, beim Lösen eines Proteins in einem Lösungsmittel, dessen Volumen, weshalb das partielle molare Volumen  $V_i$  als Summe intrinsischer Terme und eines Hydratationsterms definiert werden kann:<sup>[49,54]</sup>

$$V_i = V_{\text{Atom}} + V_{\text{Kavitäten}} + \Delta V_{\text{Hydratation}} \quad (1.14)$$

Hierbei entsprechen  $V_{\text{Atom}}$  dem Van-der-Waals-Volumen der Proteinatome,  $V_{\text{Kavitäten}}$  dem Volumen der Kavitäten im Proteininneren, die aufgrund einer imperfekten Pa-

ckung der nativen Proteinkonformation entstehen, und  $\Delta V_{\text{Hydratation}}$  dem Hydratationsterm, der die Volumenänderung beinhaltet, die aufgrund der Interaktionen zwischen dem Protein und dem Lösungsmittel resultiert. Aufgrund der Tatsache, dass das Van-der-Waals-Volumen der Proteinatome während einer Entfaltung konstant bleibt, steht das Entfaltungsvolumen  $\Delta V$  lediglich in Abhängigkeit zu dem Kavitätsumfang  $V_{\text{Kavitäten}}$  und dem Hydratationsterm  $\Delta V_{\text{Hydratation}}$ .<sup>[49,55,56]</sup>

$$\Delta V = \Delta V_{\text{Kavitäten}} + \Delta \Delta V_{\text{Hydratation}} \quad (1.15)$$

Der hier aufgeführte Hydratationsterm  $\Delta \Delta V_{\text{Hydratation}}$  resultiert sowohl aus der Hydratation exponierter hydrophiler und hydrophober Seitengruppen des Proteins als auch aus der Hydratation von Kavitäten im Proteininneren, welche im Wesentlichen durch Elektrostriktions-Effekte bestimmt wird.<sup>[49,52,57–59]</sup>

Neben der Gleichgewichtskonstanten  $K$  kann durch eine Druckapplikation ebenso die Geschwindigkeitskonstante  $k$  beeinflusst werden, sodass in Analogie zu Gleichung (1.12) für die Geschwindigkeitskonstante  $k$  einer chemischen Reaktion eine Druckabhängigkeit mittels der Eyring-Gleichung definiert werden kann<sup>[60–63]</sup>

$$\left( \frac{\partial \ln k}{\partial p} \right)_T = - \frac{\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (1.16)$$

mit dem Aktivierungsvolumen  $\Delta V^\ddagger$ , welches entscheidend für den Einfluss einer Druckapplikation auf eine chemische Reaktion ist. Bei einem negativen Aktivierungsvolumen wird eine chemische Reaktion unter Druck beschleunigt, während ein positives Aktivierungsvolumen für eine verlangsamte Reaktionskinetik steht.<sup>[4,47,50,60–65]</sup>

### Dissoziation von Proteinoligomeren

Neben der zuvor vorgestellten Proteindenaturierung unter Druck kann eine Druckapplikation eine Dissoziation von Proteinoligomeren initiieren, wobei wesentlich kleinere Drücke aufzubringen sind ( $\leq 1$  kbar).<sup>[60,64,66–70]</sup>

Die druck-induzierte Dissoziation ist größtenteils aufgrund einer imperfekten Packung an der Schnittstelle der einzelnen Untereinheiten zu erklären, wodurch sich „void volumes“ bilden können. Im Verlauf einer druck-induzierten Dissoziation wird

die Grenzfläche der Untereinheiten hydratisiert, wodurch diese „*void volumes*“ verschwinden und das Volumen verringert wird, was der Triebkraft der Dissoziation entspricht.

Des Weiteren werden sowohl hydrophobe als auch elektrostatische Wechselwirkungen geschwächt und die Umgebungspolarität von Seitenketten an den Schnittstellen ändert sich.<sup>[66]</sup> In assoziierter Form stehen die Seitenketten an den Grenzflächen der Untereinheiten in Kontakt mit Seitenketten anderer Untereinheiten und werden im Verlauf der Dissoziation hydratisiert, wodurch es zu geringfügigen Konformationsänderungen kommen kann, den sogenannten „*conformational drifts*“.<sup>[66,67,69,71–73]</sup>

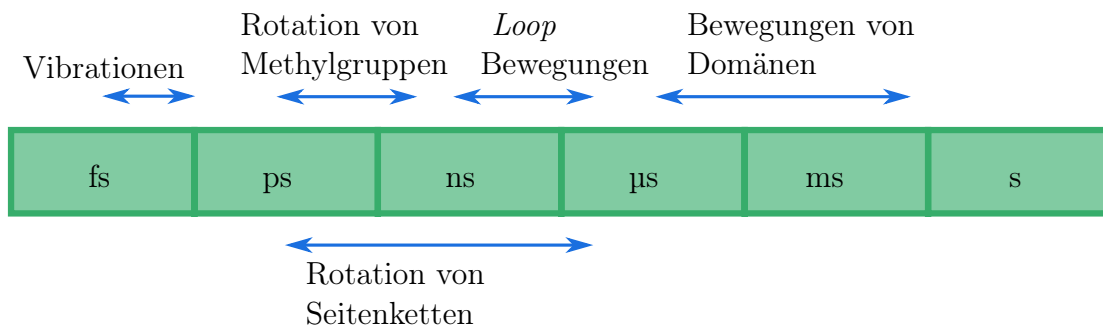
## 1.2.2 Proteindynamik

### 1.2.2.1 Interne Proteindynamik

Proteine bestehen aus einer Vielzahl von Atomen und liegen nicht in einer starren Konformation vor, d.h. Fluktuationen der Position einzelner Atome und Seitenketten sind möglich, ohne dass die Konformation und Funktionalität beeinträchtigt wird, wodurch das Protein verschiedene Minima der Freien-Energie-Oberfläche, die sogenannten „*conformational substates*“, einnehmen kann.<sup>[19,74,75]</sup> Diese Fluktuationen von Atomen im Proteininneren umfassen einen Längenbereich von 0.01 bis 10 Å.<sup>[19,76]</sup>

Die interne Proteindynamik ist essentiell sowohl für die Proteinfaltung als auch für die Funktionalität, sodass beispielsweise Liganden gebunden werden können oder eine enzymatische Katalyse initiiert werden kann. Durch diese Flexibilität ist es Proteinen möglich, durch molekulare Wechselwirkungen innerhalb der Zelle und sogar zwischen Zellen ihrer Funktionalität nachzugehen.<sup>[75–84]</sup>

Die Fluktuationen im Proteininneren erfolgen auf verschiedenen Zeitskalen, wie es in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt ist. Zu den schnellsten Bewegungen zählen die Schwingungen von Atombindungen, die innerhalb von 100 fs ablaufen, während die Dissoziation von Protein-Ligand Komplexen und die Protein(ent)faltung am langsamsten sind, die meiste Zeit in Anspruch nehmen und bis zu Stunden andauern können.<sup>[83]</sup> Die Rotation von Methylgruppen und Seitenketten erfolgt im Bereich von Piko- bis Nanosekunden.<sup>[19,75,83]</sup>



**Abbildung 1.3** – Schematische Darstellung der Zeitskala von verschiedenen Bewegungen innerhalb des Proteins. Abbildung modifiziert nach Henzler-Wildman *et al.* und Teilum *et al.*<sup>[75,83]</sup>

### 1.2.2.2 Globale Proteindynamik

Neben der internen Proteindynamik gibt es noch aufgrund der BROWNSCHEN Molekularbewegung die globale Translations-Dynamik, die den Transport von Proteinen ermöglicht, wobei die Diffusion aufgrund eines Konzentrationsausgleichs erfolgt, was mit ausreichender Zeit zu einer vollständigen Durchmischung führt. Dieser Ausgleich von Konzentrationsunterschieden wird durch das erste FICK'SCHE Gesetz beschrieben, das eine Proportionalität zwischen dem Teilchenfluss  $J$  und dem Konzentrationsgradienten  $\frac{\partial c}{\partial x}$  herstellt:<sup>[20,85]</sup>

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (1.17)$$

Hierbei ist die Proportionalitätskonstante der Diffusionskoeffizient  $D$  und  $x$  gibt die zurückgelegte Strecke an.<sup>[20,85]</sup> Die zeitliche Konzentrationsänderung wird durch das zweite FICK'SCHE Gesetz beschrieben:<sup>[20,85]</sup>

$$\left( \frac{\partial c}{\partial t} \right)_x = D \cdot \left( \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right)_t \quad (1.18)$$

Für diese Differentialgleichung existieren zahlreiche numerische und analytische Lösungsansätze. Für die freie Diffusion ergibt sich eine GAUSS-Verteilung:<sup>[20,85]</sup>

$$\left( \frac{\partial c}{\partial x} \right)_t = -\frac{c_0}{2\sqrt{\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \quad (1.19)$$

Bei abgeschlossenem Konzentrationsausgleich erfolgt eine ungerichtete Diffusion

der Teilchen. Diese beruht auf der ungerichteten Wärmebewegung und gleicht einem *random walk*, sodass die mittlere Verschiebung  $\langle r \rangle$  gleich Null ist. Im dreidimensionalen Fall gilt für die Selbstdiffusion für die mittlere quadratische Verschiebung (engl.: *mean squared displacement*, MSD):<sup>[20]</sup>

$$\langle r^2 \rangle = 6Dt \quad (1.20)$$

Die Reibungskraft<sup>[20]</sup>

$$F = 6\pi\eta R_h \quad (1.21)$$

arbeitet gegen die Selbstdiffusion eines Teilchens. Hierbei entspricht  $\eta$  der Viskosität der Lösung und  $R_h$  dem hydrodynamischen Radius eines kugelförmigen Teilchens, der mithilfe der STOKES-EINSTEIN-Beziehung in Abhängigkeit zum Diffusionskoeffizienten gebracht werden kann:<sup>[20]</sup>

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (1.22)$$

## 1.3 Osmolyte

Neben den physikalischen Größen Druck und Temperatur können Osmolyte ebenfalls die Stabilität von Proteinen beeinflussen. Osmolyte sind niedermolekulare, organische Verbindungen, die ungeladen oftmals *in vivo* anzutreffen sind, um schädlichen Umweltbedingungen, wie beispielsweise hohen und tiefen Temperaturen, langen Trockenperioden sowie osmotischen und hydrostatischen Drücke, entgegenzuwirken.<sup>[86–88]</sup> In einigen Meeresorganismen häufen sich die verschiedensten natürlichen Osmolyte, wie beispielsweise Zucker, Polyole, Methylamine oder Aminosäuren, mit einer Konzentration von bis zu 0.6 M an,<sup>[89]</sup> wodurch der osmotische Druck innerhalb der Zelle erhöht wird, um diese vor einem Aufplatzen oder Schrumpfen zu schützen.<sup>[90]</sup> Im Gegensatz zu Salzen bleibt durch die Anwesenheit natürlicher Osmolyte die Funktionalität von Biomolekülen erhalten.<sup>[91,92]</sup> Osmolyte, die den nativen Zustand von Proteinen stabilisieren, werden als chemische Chaperone bezeichnet.<sup>[90,93]</sup>

Zu den physiologisch relevanten Osmolyten zählen Polyole, wie beispielsweise Glycerol und Trehalose, Methylamine, mit dem bekanntesten Vertreter Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), Aminosäuren, wie z.B. Prolin und Glycin, sowie Harnstoff, [86,90,92] wobei letzterer eine destabilisierende Wirkung auf die Proteinstabilität aufweist. [94,95]

Franz Hofmeister legte bereits im Jahr 1888 mit seiner Arbeit den Grundstein für die bis heute weitergeführte Untersuchung des Einflusses von chao- und kosmotropen Substanzen auf die Stabilität von Biomolekülen. [96] Der Unterschied zwischen chao- und kosmotropen Substanzen liegt darin, ob eine Interaktion mit dem Biomolekül oder dem umliegenden Wasser auftritt, wodurch sich eine destabilisierende oder stabilisierende Wirkung auf die Stabilität eines Biomoleküls ergibt. Bei einer Denaturierung eines Proteins nimmt die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche (engl.: *solvent accessible surface area*, SASA) zu, wodurch verstärkt Interaktionen zwischen dem Protein und dem Cosolvens auftreten und somit die Proteinstabilität geschwächt wird. [34] Unter der Annahme eines Systems, welches aus den drei Komponenten Protein (P), Wasser (W) und Cosolvens (C) besteht, [32,34,87,88,97] ergibt sich für die Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie,  $\Delta G_u^\circ$ , bei konstanter Temperatur und konstantem Druck, bei Zugabe eines Cosolvens der Konzentration  $m_C$  mit seinem chemischen Potential  $\mu_C$  folgender Zusammenhang: [34,87]

$$\left( \frac{\partial \Delta G_u^\circ}{\partial \mu_C} \right)_{T,p,m_j \neq C} = \left( \frac{\partial \Delta \mu_P^\circ(m_C)}{\partial \mu_C} \right)_{T,p,m_j \neq C} \quad (1.23)$$

wobei  $\Delta \mu_P^\circ(m_C) = \mu_{C,U}^\circ - \mu_{C,F}^\circ$  gilt, was der Differenz des chemischen Potentials des Proteins im entfalteten (U) und gefalteten (F) Zustand in Anwesenheit des Cosolvens (C) entspricht. Durch die Zugabe eines Cosolvens ändert sich das chemische Gleichgewicht, weshalb das chemische Potential des Cosolvens, das das Protein umgibt, angepasst wird, damit das chemische Gleichgewicht wieder hergestellt wird. Diese Anpassung kann durch die Änderung der Konzentration des Cosolvens, welches das Protein umgibt, erfolgen. [34,88] Die Wechselwirkung zwischen Protein und umgebenen Cosolvens kann durch den bevorzugten Bindungskoeffizienten  $\Gamma_{PC}$  beschrieben werden, der folgendermaßen definiert ist: [34,88]

$$\Gamma_{\text{PC}} = - \left( \frac{\partial \mu_{\text{P}} / \partial m_{\text{C}}}{\partial \mu_{\text{C}} / \partial m_{\text{C}}} \right)_{m_{\text{P}}} = \left( \frac{\partial m_{\text{C}}}{\partial m_{\text{P}}} \right)_{\mu_{\text{C}}} \quad (1.24)$$

Der Bindungskoeffizient  $\Gamma_{\text{PC}}$  steht in Abhängigkeit der Cosolvensmoleküle, die durch die Zugabe des Proteins die Konzentration in der *Bulk*-Phase erniedrigen ( $\Gamma_{\text{PC}} > 0$ ), d.h. die meisten Cosolvensmoleküle befinden sich in der Nähe der Proteinoberfläche, oder erhöhen ( $\Gamma_{\text{PC}} < 0$ ), d.h. die meisten Cosolvensmoleküle befinden sich in der *Bulk*-Phase.<sup>[34,88]</sup>

Unter der Annahme eines Zwei-Domänen-Modells, bestehend aus der *Bulk*-Phase und einer lokalen Domäne an der Proteinoberfläche, befinden sich  $N_{\text{W}}^{\text{Bulk}}$  Wasser- und  $N_{\text{C}}^{\text{Bulk}}$  Cosolvensmoleküle in der *Bulk*-Phase, sowie  $N_{\text{W}}^{\text{Lokal}}$  Wasser- und  $N_{\text{C}}^{\text{Lokal}}$  Cosolvensmoleküle in der lokalen Domäne auf der Proteinoberfläche.<sup>[34]</sup> Hiernach können die bevorzugten Bindungskoeffizienten für Wasser und Cosolvens mit dem Protein jeweils über die überschüssigen Wasser- und Cosolvensmoleküle in der lokalen Domäne auf der Oberfläche des Proteins erhalten werden:<sup>[34]</sup>

$$\Gamma_{\text{PC}} = \Delta N_{\text{PC}} - \left( \frac{N_{\text{C}}^{\text{Bulk}}}{N_{\text{W}}^{\text{Bulk}}} \right) \Delta N_{\text{PW}} \quad (1.25)$$

$$\Gamma_{\text{PW}} = \Delta N_{\text{PW}} - \left( \frac{N_{\text{W}}^{\text{Bulk}}}{N_{\text{C}}^{\text{Bulk}}} \right) \Delta N_{\text{PC}} \quad (1.26)$$

mit  $\Delta N_{\text{PC}} = N_{\text{C}}^{\text{Lokal}} - N_{\text{C}}^{\text{Bulk}}$  und  $\Delta N_{\text{PW}} = N_{\text{W}}^{\text{Lokal}} - N_{\text{W}}^{\text{Bulk}}$  als den Überschüssen der Cosolvens- und Wassermolekülen in der lokalen Domäne auf der Proteinoberfläche.<sup>[34]</sup>

Der Einfluss eines Cosolvens auf die Proteinstabilität ist demnach abhängig von der Änderung des bevorzugten Bindungskoeffizienten des Cosolvens, wodurch sich für die Stabilitätsänderung folgender Zusammenhang ergibt:<sup>[34]</sup>

$$\begin{aligned} \left( \frac{\partial \Delta G_{\text{u}}^{\circ}}{\partial \mu_{\text{C}}} \right)_{T,p,m_j \neq \text{C}} &= - (\Gamma_{\text{PC,U}} - \Gamma_{\text{PC,F}}) = -\Delta \Gamma_{\text{PC}} \\ &= - \left( \Delta \Delta N_{\text{PC}} - \left( \frac{N_{\text{C}}^{\text{Bulk}}}{N_{\text{W}}^{\text{Bulk}}} \right) \Delta \Delta N_{\text{PW}} \right) \end{aligned} \quad (1.27)$$

Laut Gleichung (1.27) kommt es zu einer Stabilisierung des Proteins durch ein Cosolvens, sofern sich ein negativer Wert für  $\Delta\Gamma_{PC}$  ergibt, d.h. das Cosolvens wird von der Proteinoberfläche ausgeschlossen und interagiert weitestgehend mit dem umgebenden Wasser, ein Verhalten wie es beispielsweise der Osmolyt TMAO zeigt.<sup>[34,88]</sup>

### 1.3.1 Verwendete Osmolyte

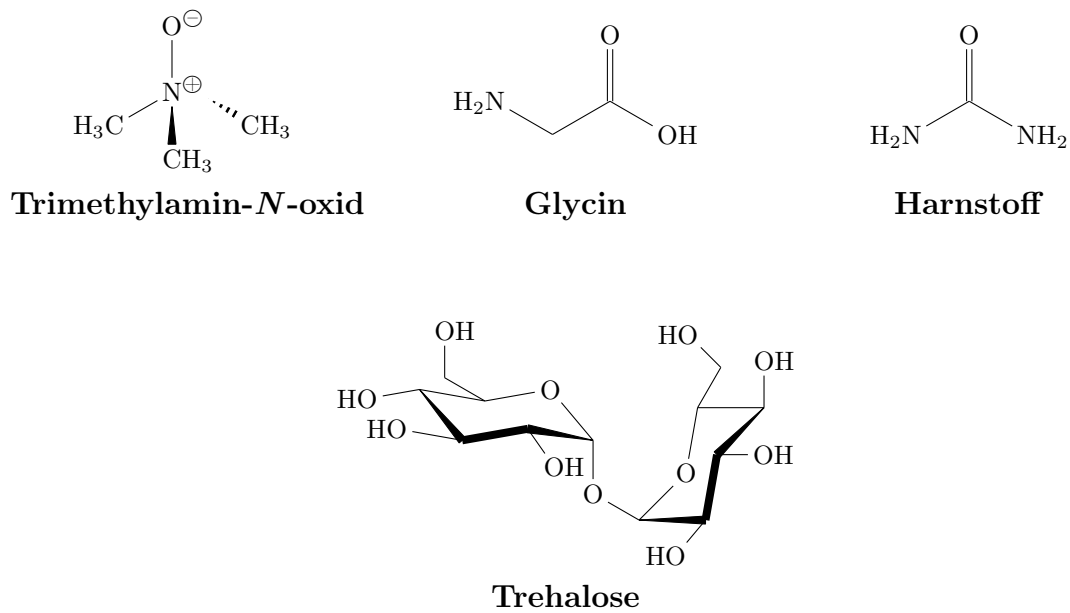
Physiologisch relevante Osmolyte können, wie bereits beschrieben, in vier Klassen eingeteilt werden: Polyole, Aminosäuren, Methylamine und Harnstoff. In dieser Dissertationsarbeit wurde jeweils ein Vertreter der zuvor genannten physiologisch relevanten Osmolytklassen, namentlich Trehalose, Glycin, Trimethylamin-*N*-oxid und Harnstoff, verwendet, deren chemische Strukturen in Abbildung 1.4 dargestellt sind. Im Folgenden erfolgt eine Vorstellung des jeweiligen Vertreters.

#### 1.3.1.1 Trimethylamin-*N*-oxid

Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) stammt aus der Klasse der Methylamine und zählt zu den chaotropen Osmolyten. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass TMAO eine stabilisierende Wirkung auf die Proteinstabilität besitzt, sobald diese physikalischen Parametern wie Druck oder Temperatur ausgesetzt werden.<sup>[98–106]</sup> Yancey *et al.* haben gezeigt, dass die Konzentration von TMAO in Meeresorganismen mit zunehmender Tiefe ansteigt und die Funktion eines Piezolyten innehat.<sup>[91]</sup>

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass in Anwesenheit des natürlichen Osmolyten TMAO das chemische Gleichgewicht bei Proteinassemblierungsreaktionen in Richtung der Oligomere verschoben und die Assemblierung beschleunigt wird.<sup>[107–109]</sup> In wässrigen Lösungen wurde gezeigt, dass TMAO sehr stark mit den umgebenden Wassermolekülen interagiert, wodurch die Wasserstruktur verändert und die Wasserdynamik verlangsamt wird.<sup>[34,98,99,101,102,110,111]</sup> Zou *et al.* haben gezeigt, dass sowohl die Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen als auch deren Stärke in Gegenwart von TMAO zunimmt.<sup>[112]</sup> In einem Drei-Komponenten-System, bestehend aus Protein, Wasser und TMAO, erfolgt aufgrund der geringen Affinität von TMAO gegenüber dem Proteinrückgrat und dessen Seitenketten eine Proteinstabilisierung,





**Abbildung 1.4** – Chemische Struktur der verwendeten Cosolventien Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), Glycin, Harnstoff (engl.: *urea*) und Trehalose.

wobei TMAO von der Proteinoberfläche ausgeschlossen wird und die intramolekularen Wechselwirkungen des Proteins, im Vergleich zu den Wechselwirkungen zwischen dem Protein und TMAO, begünstigt werden.<sup>[90,100,113]</sup> Des Weiteren haben Ma *et al.* gezeigt, dass TMAO in erhöhter Konzentration die Funktionalität eines makromolekularen Crowders übernehmen kann.<sup>[104]</sup>

Yancey *et al.* haben gezeigt, dass TMAO *in vivo* auch negative Einflüsse gegenüber dem biologischen System, in welchem es angereichert ist, besitzen kann, da generell seine Funktionalität auf Basis eines Aktion-Reaktion Mechanismus beruht, d.h. es reagiert auf äußere Umwelteinflüsse wie beispielsweise extreme Temperaturen, hohe Drücke oder hohe Konzentrationen eines destabilisierenden Cosolvens, um so die Zelle zu schützen.<sup>[90]</sup> Aufgrund einer fehlenden Aktion kann es bei einer zu hohen TMAO-Konzentration zu einer Überstabilisierung kommen, wodurch sich beispielsweise Proteinaggregate ausbilden oder die Proteindynamik dermaßen verringert wird, dass die Proteinfunktionalität verloren geht.<sup>[90,114]</sup>

### 1.3.1.2 Harnstoff

In völligem Kontrast zu TMAO steht der ebenfalls natürliche Osmolyt und gleichzeitig der als Stoffwechselprodukt in vielen Lebewesen vorkommende Harnstoff (engl.: *urea*). Aus chemischer Sicht zeigt sich bei der Betrachtung der Struktur (Abbildung 1.4) eine große Ähnlichkeit zu dem Proteinrückgrat. In Anwesenheit hoher Konzentrationen dieser chaotropen Verbindung kann eine Proteinentfaltung initiiert werden. Der Mechanismus der Proteinentfaltung durch die Anwesenheit von Harnstoff beruht darauf, dass Harnstoff direkt mit dem Proteinrückgrat und nur schwach mit dem umliegenden Wasser interagiert.<sup>[98,99,101,102,107,115]</sup> Hierbei konkurriert Harnstoff um Wasserstoffbrückenbindungen des Proteinrückgrats, die eigentlich für eine Stabilisierung von Sekundärstrukturelementen vorgesehen sind, wodurch die Ordnung der Proteinstruktur verringert wird.<sup>[20,107,115,116]</sup> Des Weiteren wurde in mehreren Studien gezeigt, dass Harnstoff ebenfalls in Wechselwirkung mit Proteinseitenketten steht.<sup>[117–119]</sup> Aufgrund der enthalpischen Begünstigung sowie der höheren Anzahl an Wechselwirkungsmöglichkeiten von Harnstoff mit einem Protein im entfaltenen Zustand verschiebt Harnstoff das chemische Gleichgewicht zwischen nativem und entfaltetem Zustand in Richtung des entfaltenen Zustandes.<sup>[90,116]</sup>

Befinden sich in einem System neben dem Protein sowohl die chaotrope Verbindung Harnstoff als auch die kosmotrope Verbindung TMAO, so resultiert ein entgegengewirkender Effekt (engl.: *counteracting effect*), d.h. TMAO ist in der Lage, dem destabilisierenden Effekt von Harnstoff entgegen zu wirken. Dieser Effekt, der auf Basis eines wasservermittelten Mechanismus beruht, ist bei einem TMAO/Harnstoff-Verhältnis von 1:2, ein Verhältnis das ebenfalls *in vivo* anzutreffen ist, am effektivsten.<sup>[90,110,112,120]</sup>

### 1.3.1.3 Glycin

Glycin ist die kleinste und einfachste Aminosäure und zählt zur Gruppe der hydrophilen Aminosäuren. Es ist der am häufigsten vorkommende Osmolyt in vielen wirbellosen Meerestieren.<sup>[91,121]</sup> Glycin besitzt einen stabilisierenden Effekt auf die Proteinstabilität.<sup>[122]</sup> Im Gegensatz zu TMAO interagiert Glycin sowohl mit Pro-

teinseitenketten als auch mit dem Proteinerückgrat. Dabei konkurriert es mit dem Hydratationswasser, sodass die Proteinoberfläche weniger hydratisiert ist.<sup>[122]</sup>

#### 1.3.1.4 Trehalose

Bei Trehalose handelt es sich um ein Disaccharid, welches aus Glukose-Einheiten besteht, die über eine  $\alpha,\alpha'$ -1,1-glycosidische Bindung miteinander verknüpft sind (Abbildung 1.4). Trehalose ist essentiell für Bakterien.<sup>[123]</sup> Mehrere Studien haben gezeigt, dass Biomoleküle und Mikroorganismen durch die Anwesenheit von Trehalose vor einer Austrocknung und extremen Temperaturen geschützt werden können.<sup>[124–130]</sup> Bei Wasserbären, ein Tierstamm der Häutungstiere, führt eine Erhöhung der zellulären Trehalose-Konzentration zur Kryopräservierung, sodass diese bei extremen Tiefsttemperaturen mittels Kryobiose überdauern können.<sup>[131,132]</sup>

Neben der Schutzfunktion gegen Tiefsttemperaturen haben einige Studien gezeigt, dass Trehalose in einigen Organismen, wie beispielsweise, *Escherichia coli*, Larven der mexikanischen Fruchtfliege *Anastrepha ludens*, *Saccharomyces cerevisiae* und Tiefsee-Organismen, in der Lage ist, störende Effekte, die durch einen Anstieg des osmotischen sowie hydrostatischen Drucks auftreten, zu kompensieren.<sup>[130,133–142]</sup> In der Hefenart *Saccharomyces cerevisiae* reichert sich Trehalose nur unter Stressbedingungen, insbesondere bei hohen Temperaturen, an, um vorhandene Enzyme zu stabilisieren, während der Anteil bei normalen Umweltbedingungen eher gering ist, da zu hohe Konzentrationen unter Normalbedingungen die Enzymaktivität inhibieren können.<sup>[90,143]</sup>

Trehalose zählt neben TMAO ebenfalls zu den kosmotropen Verbindungen. Befindet sich Trehalose in einer Proteinlösung, so interagiert es bevorzugt mit den umliegenden Wassermolekülen, sodass deren Wechselwirkung im Vergleich zu den Wechselwirkungen von Wassermolekülen untereinander stärker sind.<sup>[127,144–146]</sup> Zusätzlich zu den attraktiven Wechselwirkungen zur Ausbildung von Trehalose-Clustern liegen sterisch repulsive Wechselwirkungen der Trehalose-Moleküle untereinander vor, sodass dadurch die tetraedrische Struktur des Wassernetzwerks gestört wird.<sup>[145,146]</sup>

Bezüglich des Wechselwirkungsmechanismus zwischen Trehalose-Molekülen und

Proteinen bzw. Zellmembranen gibt es mehrere Ansätze, die in der Literatur diskutiert werden. Auf der einen Seite wird über einen Ausschluss von der Oberfläche des Biomoleküls gesprochen, [127,147–150] während auf der anderen Seite Studien gezeigt haben, dass Trehalose mittels Einlagerung in die Membran bzw. Austausches von Wassermolekülen innerhalb der Hydratationshülle direkt mit dem Biomolekül interagiert. [124,127,151–160] Ein weiterer Ansatz zur Erklärung des Wechselwirkungsmechanismus von Trehalose mit einem Biomolekül beruht auf dem Einschluss (engl.: *entrapment*) von Wassermolekülen zwischen Trehalosemolekülen und der Oberfläche des Biomoleküls. [161–164] Bei sehr hohen Trehalose-Konzentrationen kann es zu einer Vitrifizierung kommen, d.h. Biomoleküle werden innerhalb einer glasartigen Matrix aus zahlreichen Trehalosemolekülen eingeschlossen, sodass die native Konformation des Biomoleküls geschützt wird. [162–167] Die aufgezählten Effekte können allerdings auch in Kombination miteinander auftreten. [162,163] Einige Studien gehen davon aus, dass das Wechselwirkungsverhalten konzentrationsabhängig ist. Demnach kommt es bei hohen Trehalose-Konzentrationen zu einem Ausschluss von der Oberfläche des Biomoleküls, während bei niedrigen Konzentrationen an Trehalose von einer direkten Wechselwirkung ausgegangen wird. [149,168,169]

### 1.4 Crowding

Biologische Zellen beinhalten einen großen Anteil an Makromolekülen, die bis zu 30 % des Gesamtvolumens einer Zelle einnehmen können, sodass reale Systeme meist als „überfüllt“ (engl.: *crowded*) bezeichnet werden. [170,171] In diesem zellulären Milieu laufen alle physiologisch relevanten Prozesse ab. Durch die Anwesenheit von Makromolekülen wird auf der einen Seite die Viskosität der Lösung erhöht und auf der anderen Seite reduziert sich das zur Verfügung stehende Volumen für weitere Makromoleküle. [34] In mehreren Studien wurde gezeigt, dass durch die Anwesenheit von Makromolekülen in hochkonzentrierten Lösungen, dem sogenannten *Crowding*, [172–175] sowohl die Proteinstabilität als auch die Kinetik von Proteinassamblierungsreaktionen und die Funktionalität von Biomolekülen *in vitro* beeinflusst

werden können.<sup>[108,170,172–183]</sup> Demnach berichten Yamin *et al.*, dass in Anwesenheit des wasserlöslichen Polymers Polyethylenglycol (PEG) die Fibrillierungsreaktion von Amyloid-Fibrillen aus  $\beta$ -Synuclein und del Álamo *et al.*, dass in Anwesenheit von Dextran und Ficoll<sup>®</sup> PM 70 die Selbstassemblierung des HIV-1 Kapsid-Proteins jeweils signifikant beschleunigt werden.<sup>[184,185]</sup> Des Weiteren haben Zhai *et al.* in einer Studie gezeigt, dass durch die Anwesenheit hoher Konzentrationen des Polysaccharids Dextran die Druckstabilität von *Ribonuklease* (RNase) A signifikant gesteigert wird, während Erlkamp *et al.* von einer Steigerung der Thermostabilität des Proteins *Staphylococcal Nuclease* (SNase) in Gegenwart des synthetischen Polymers Ficoll<sup>®</sup> PM 70 berichten.<sup>[178,186]</sup>

Zur Nachahmung des zellulären Milieus *in vitro* werden häufig inerte Makromoleküle verwendet, wobei es auch bei entsprechend hoher Konzentration des Biomoleküls selbst zu *self-crowding*) Bedingungen kommen kann, wodurch das zur Verfügung stehende Volumen verringert wird. Da eine Zelle nicht nur mit einer Art eines Makromoleküls befüllt ist, werden für die Erzeugung realistischeren zellulären Milieus *in vitro* oftmals verschiedene Makromoleküle, darunter auch Proteine, miteinander vermischt.<sup>[34]</sup>

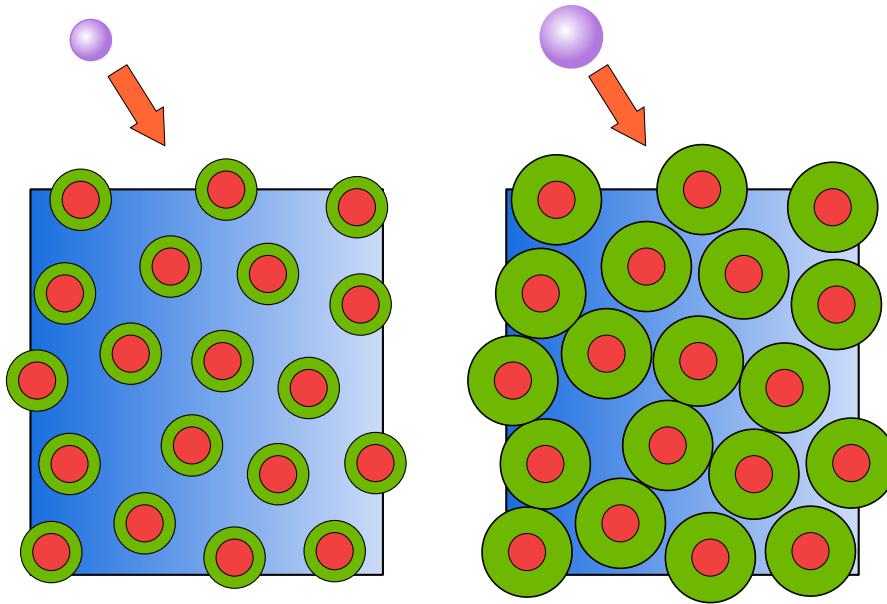
Die Änderung der freien Energie durch die Zugabe eines makromolekularen Crowders (mCr) ergibt sich aus der Differenz der Standard-Entfaltung-Gibbs-Energie in Anwesenheit des Crowders und der Standard-Entfaltung-Gibbs-Energie in der *Bulk*-Phase ohne Crowder.<sup>[34,187]</sup>

$$\Delta\Delta G^\circ = \Delta G_{\text{mCr}}^\circ - \Delta G_{\text{Bulk}} \quad (1.28)$$

Für die Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{mCr}}$  unter *Crowding*-Bedingungen ergibt sich somit folgender Zusammenhang.<sup>[34,187]</sup>

$$K_{\text{mCr}} = K_{\text{Bulk}} \cdot \exp(-\Delta\Delta G^\circ/RT) \quad (1.29)$$

Rivas *et al.* haben zur Beschreibung des makromolekularen *Crowding*-Effekts den *Crowding*-Koeffizienten  $\Gamma_{\text{mCr}}$  eingeführt, der einer Funktion durch die Anwesenheit



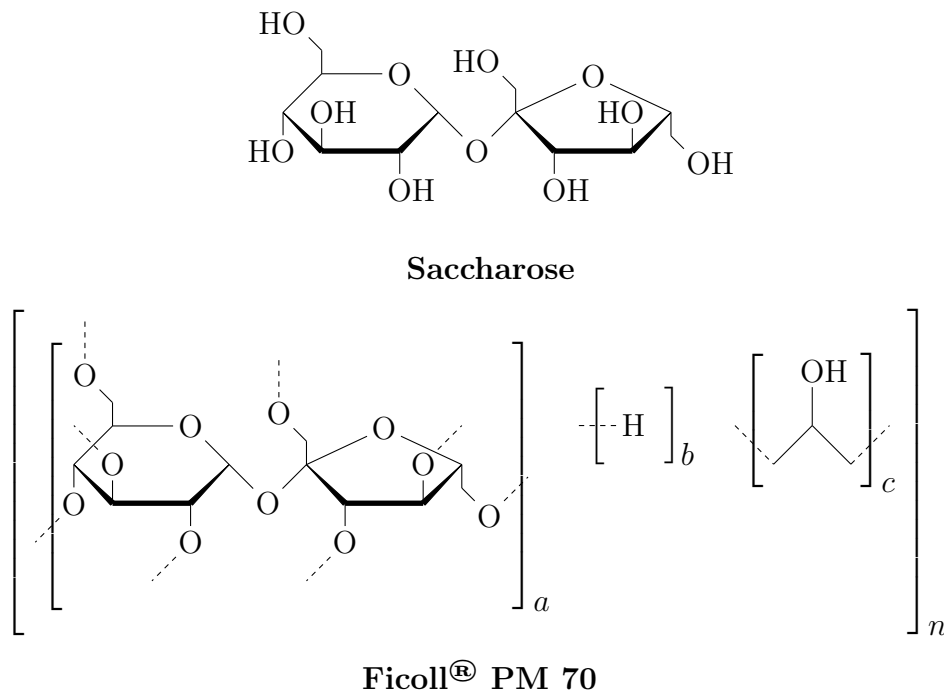
**Abbildung 1.5** – Schematische Darstellung des „*excluded volume*“-Effekts. Befindet sich ein Makromolekül (●) in Lösung, so ist ein gewisses Volumen (■) für ein Biomolekül (●) unzugänglich (links). Für größere Biomoleküle vergrößert sich das ausgeschlossene Volumen (rechts). Abbildung modifiziert nach A. P. Minton.<sup>[173]</sup>

von makromolekularen Crowdern induzierten Änderung der freien Energie, der Enthalpie und Entropie entspricht:<sup>[34,187]</sup>

$$\Gamma_{\text{mCr}} = \ln \left( \frac{K_{\text{mCr}}}{K_{\text{Bulk}}} \right) = -\frac{\Delta\Delta G^\circ}{RT} = -\frac{\Delta\Delta H^\circ}{R} \cdot \left( \frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta\Delta S^\circ}{R} \quad (1.30)$$

Hiernach beruht der Einfluss von makromolekularen Crowdern sowohl auf enthalpischen als auch auf entropischen Beiträgen.<sup>[34]</sup>

Die aufgezeigten entropischen Effekte von makromolekularem *Crowding* können auf Grundlage der Theorie des „ausgeschlossenen Volumens“ (engl.: *excluded volume*) erklärt werden, wie es in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt ist. Befindet sich ein Makromolekül in einem definierten Volumen, so nimmt dies zum einen selbst ein Teil des Volumens ein und zum anderen wird, bei hoher Konzentration des Makromoleküls, ein gewisser Teil des zur Verfügung stehenden Volumens ausgeschlossen, sodass einem weiteren Makromolekül, wie beispielsweise ein Protein, ein deutlich geringeres Volumen zur Verfügung steht.<sup>[173]</sup> In Folge dessen erhöht sich, in Bezug auf das noch zur Verfügung stehende Volumen, die effektive Konzentration des Proteins,



**Abbildung 1.6** – Chemische Struktur von Saccharose und Ficoll<sup>®</sup> PM 70 .

wodurch es zu einer Erhöhung von Geschwindigkeitskonstanten und Aktivitätskoeffizienten sowie einer Stabilisierung des nativen Zustandes aufgrund der Favorisierung kompakter Konformationen kommen kann.<sup>[34,170,178,186,188]</sup> Das Ausmaß des *excluded volume*-Effekts basiert auf der Form und Größe des Biomoleküls und Cosolvens sowie auf dem eingenommenen Volumen des als Crowder verwendeten Makromoleküls.<sup>[183]</sup> Dadurch resultiert eine sogenannte *depletion force*, die dafür sorgt, dass die Konformationsentropie des entfalteten Zustandes verringert und das Gleichgewicht in Richtung der nativen Konformation verschoben wird.<sup>[34]</sup>

Neben der sterischen Repulsion, die durch den „*excluded volume*“-Effekt beschrieben wird, müssen auch enthalpische Effekte, wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen, berücksichtigt werden, die sowohl den nativen als auch den entfalteten Zustand eines Proteins beeinflussen können. Diese enthalpischen Beiträge sind abhängig von der Temperatur und der Beschaffenheit des verwendeten Biomoleküls und eingesetzten Crowders.<sup>[189,190]</sup>

Als Crowdingreagenzien wurden in dieser Arbeit Ficoll<sup>®</sup> PM 70 als Makrocrowder sowie dessen Monomerbaustein Saccharose als Mikrocrowder verwendet, deren

chemische Strukturen in Abbildung 1.6 dargestellt sind. Saccharose ist ein Polyol und zählt zwar zu den zuvor vorgestellten Osmolyten,<sup>[90]</sup> wird aber zum besseren Vergleich hier mit Ficoll<sup>®</sup> PM 70 zusammen vorgestellt.

Bei Saccharose handelt es sich um ein Disaccharid. Es besteht aus jeweils einem Molekül  $\alpha$ -D-Glukose und  $\beta$ -D-Fructose, die über eine  $\alpha,\beta$ -1-2-glycosidische Bindung verbunden sind.<sup>[191]</sup> Es besitzt eine stabilisierende Wirkung auf die Proteinstruktur. Attri *et al.* haben gezeigt, dass  $\alpha$ -Chymotrypsin durch die Anwesenheit von Saccharose stabilisiert wird.<sup>[192]</sup> Die Stabilisierung in Gegenwart von Saccharose beruht auf dem bevorzugten Ausschluss des Disaccharids von der Oberfläche des Proteins.<sup>[193]</sup> Molekulardynamische Simulationen von Lerbret *et al.* haben gezeigt, dass Saccharose, genau wie Trehalose, Cluster bildet, die von der Proteinoberfläche ausgeschlossen sind, jedoch Saccharose im Vergleich zu Trehalose kleinere Cluster aufgrund der höheren Anzahl an Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen sich und dem Protein bildet.<sup>[194]</sup>

Bei Ficoll<sup>®</sup> PM 70 handelt es sich um ein leicht wasserlösliches, stark verzweigtes Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einer molaren Masse von  $\sim 70 \text{ kg mol}^{-1}$ . Ficoll<sup>®</sup> PM 70 wird in *in vitro*-Studien als makromolekularer Crowder verwendet, um das zelluläre Milieu nachzustellen.<sup>[178,195,196]</sup> Beispielsweise berichten Ernkamp *et al.* über eine Zunahme der Thermostabilität des Proteins *Staphylococcal Nuclease* (SNase) in Anwesenheit des synthetischen Polymers aufgrund des „*excluded volume*“-Effekts.<sup>[178]</sup>



## 2 Proteinstabilität von globulärem Actin

---

Teile dieser Studie wurden in folgender Referenz veröffentlicht:

Schummel, P. H.; Haag, A.; Kremer, W.; Kalbitzer, H. R.; Winter, R. Cosolvent and Crowding Effects on the Temperature and Pressure Dependent Conformational Dynamics and Stability of Globular Actin. *J. Phys. Chem. B*, **2016**, *120*, 6575-6586.<sup>[197]</sup>

Bei diesem Teilprojekt handelt es sich um eine Fortführung des Themas der Masterarbeit des Autors.<sup>[198]</sup>



## 2.1 Einleitung

Actin ist einer der wesentlichen Bestandteile des Cytoskeletts in eukaryotischen Zellen.<sup>[199]</sup> Die Skelettmuskel-Isoform, das sogenannte  $\alpha$ -Actin, kommt in Zellen in zwei Hauptformen vor, nämlich im monomeren Zustand mit seiner kugelförmigen Form (G-Actin), welches durch die Zugabe von Kationen zu Filamenten (F-Actin) polymerisieren kann.<sup>[200,201]</sup> Diese beiden morphologischen Zustände liegen in einem dynamischen Gleichgewicht vor, das von Actin-bindenden Proteinen sowie den Eigenschaften des Monomers selbst gesteuert wird.<sup>[202]</sup> Actin ist verantwortlich für viele verschiedene Zellfunktionen, wie beispielsweise der Zytokinese, der Endozytose, der Muskelkontraktion, dem Transport von Organellen oder der Erzeugung von Kräften.<sup>[203]</sup> Gazner *et al.* haben gezeigt, dass G-Actin eine geringere Thermostabilität aufweist als F-Actin, was von der Ionenstärke und dem gebundenen Nukleotid abhängig ist.<sup>[202]</sup> Über die druckabhängige Stabilität von G-Actin ist allerdings viel weniger bekannt, obwohl es auf der Erde eine Vielzahl von Orten gibt, an denen ein hoher hydrostatischer Druck (engl.: *high hydrostatic pressure*, HHP) vorliegt. Beispielsweise treten in den Meeresgräben und im tiefen Untergrund Drücke bis zu 1 kbar (100 MPa) und darüber hinaus auf, und der durchschnittliche Druck in der Tiefsee beträgt 380 bar.<sup>[60]</sup> Damit unter solch extremen Bedingungen ein Überleben möglich ist, müssen sich sowohl Mikroorganismen als auch Makroorganismen anpassen, um Proteine und andere Biopolymere vor einer Denaturierung zu schützen.<sup>[204–206]</sup>

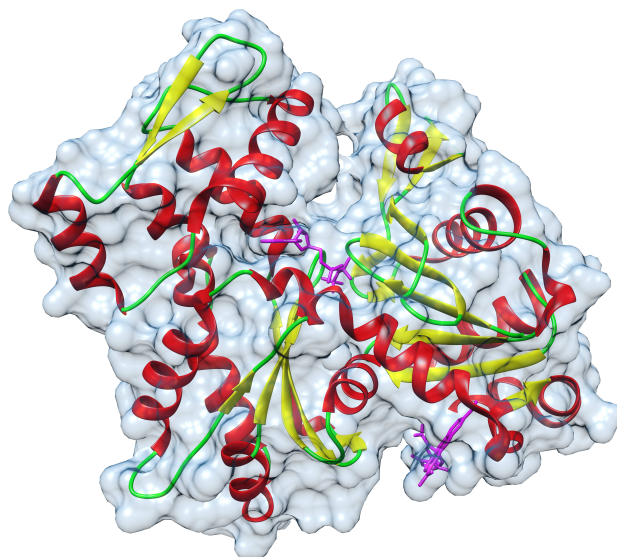
Im Allgemeinen wird die Stabilität von Biomakromolekülen, wie beispielsweise Proteinen, durch die Zusammensetzung der umgebenden Lösung beeinflusst.<sup>[116,207–211]</sup> Das Lösen von Proteinen hängt nicht nur von der Konzentration des zugesetzten Salzes ab, sondern auch von den spezifischen Ionen, die sich in der Lösung befinden (Hofmeister-Reihe). Im Allgemeinen wird die Stabilität von Proteinen *in vitro* signifikant durch Cosolventien und in der biologischen Zelle, also *in vivo*, durch das zelluläre Milieu beeinflusst. In Abhängigkeit der äußeren Bedingungen, wie beispielsweise hohe oder niedrige Temperaturen, hohe Drücke oder Trockenheit, wurden verschiedene Zusammensetzungen des zellulären Milieus gefunden. Im Vergleich zu

den Auswirkungen von Temperatur und osmotischem Stress auf die Regulierung des inneren Milieus ist sowohl über die mechanistischen Aspekte der Anpassung des zellulären Milieus an den äußeren Druckstress als auch über die Wechselwirkungen innerhalb des Wasser-Cosolvens-Biomolekül-Systems wenig bekannt. Cosolventien können zwischen chaotropen und kosmotropen Cosolventien unterschieden werden, wobei die Unterscheidung darauf beruht inwiefern sich die Anwesenheit auf die Wasserstruktureigenschaften auswirkt. Es ist bekannt, dass kosmotrope Cosolventien, wie beispielsweise Trimethylamin-*N*-oxid, den nativen Zustand eines Proteins stabilisieren können, wohingegen chaotrope Cosolventien, wie beispielsweise das Stoffwechselprodukt Harnstoff, den nativen Zustand destabilisieren und den entfalteten Zustand begünstigen. Eine detaillierte Erläuterung zu natürlichen Osmolyten kann dem Kapitel 1.3 entnommen werden.

Des Weiteren kann die freie Energielandschaft von Proteinen durch makromolekulares *Crowding* beeinflusst werden, d.h. durch die Anwesenheit von hohen Konzentrationen an Makromolekülen, was weitestgehend, aber nicht ausschließlich, auf den ausgeschlossenen Volumeneffekt (engl.: *excluded volume effect*) zurückzuführen ist.<sup>[178,210]</sup> Üblicherweise werden als makromolekulare Crowder das synthetische Polymer Ficoll<sup>®</sup> PM 70 oder das Polysaccharid Dextran *in vitro* dazu verwendet, um das *Crowding* im zellulären Milieu auf geeignete Weise zu simulieren. Eine detaillierte Erläuterung zu dem Thema *Crowding* kann dem Kapitel 1.4 entnommen werden.

Neben signifikanten Änderungen der Proteinkonformation, die beim Entfalten und Denaturieren eines Proteins beobachtet werden, ergeben sich während des Faltungsprozesses Faltungsintermediate, die partiell gefaltete Strukturen aufweisen und zu dem Konzept einer multidimensionalen potentiellen Energielandschaft von Proteinen führen.<sup>[74,212]</sup> In der molekularen Biophysik ist es eine zentrale Aufgabe, diese energiereichen Konformationen zu identifizieren und zu charakterisieren.

Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen und Interaktionspartner ist auch für G-Actin eine Vielzahl von „*Conformational Substates*“ zu erwarten. Solche Konformationen sind allerdings schwer zu detektieren, da sie nur einen geringen Anteil der Population ausmachen. Dazu können verschiedene chemische und physikalische



**Abbildung 2.1** – 3D-Bändermodell der Kristallstruktur von G-Actin (PDB-Struktur: 1nwk<sup>[213]</sup>). Das 3D-Bändermodell wurde mithilfe der Computersoftware UCSF CHIMERA v.1.13.1 erstellt und modifiziert.<sup>[214]</sup>

Methoden verwendet werden, um das Konformationsgleichgewicht zu verschieben und damit die seltenen „*Conformational Substates*“ zu charakterisieren. Die Druckapplikation ist ein elegantes und effizientes Mittel, um die Konformationspopulation mittels Volumendifferenzen umzuverteilen.<sup>[8,9,215–220]</sup> Nach dem Prinzip von LE CHÂTELIER wird bei einer Druckapplikation das Gleichgewicht in Richtung eines Systems mit kleinerem Gesamtvolumen verschoben, da Zustände mit einem kleineren partiellen Molvolumen bevorzugt werden. Die Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: *nuclear magnetic resonance*, NMR) unter Druck kann sehr gut dafür verwendet werden, um „*Conformational Substates*“ zu untersuchen,<sup>[216–218]</sup> indem die Druckapplikation auf die Volumina der einzelnen Konformere einwirkt, sodass auf diese Weise neue Informationen über die Struktur, thermodynamischen Eigenschaften und Konformationsdynamik von Proteinen mit atomarer Auflösung erhalten werden können.

Frühere Studien haben gezeigt, dass Harnstoff und TMAO die Polymerisationskinetik von Actin beeinflussen. Die Kinetik der G-zu-F-Transformation von Actin wird in Anwesenheit des Stoffwechselprodukts Harnstoff verlangsamt, während sie in Anwesenheit des Osmolyten TMAO beschleunigt wird.<sup>[107,108]</sup> Bei dieser Studie

handelt es sich um eine fortführende Arbeit, die bereits während der Masterarbeit begonnen und in eben dieser bereits teilweise beschrieben wurde.<sup>[198]</sup> In dieser fortführenden Studie soll gezeigt werden, wie bestimmte Lösungsbedingungen, die durch die Anwesenheit von Cosolventien und makromolekularen Crowdern variiert werden, den widrigen Bedingungen eines hohen hydrostatischen Drucks auf die Stabilität und Konformationsdynamik der Monomereinheit G-Actin, dessen Struktur als 3D-Bändermodell in Abbildung 2.1 dargestellt ist, entgegenwirken können. Dazu wurden druck- und temperaturabhängige Messungen der Fluoreszenzspektroskopie von G-Actin in An- und Abwesenheit der beiden Cosolventien TMAO und Harnstoff sowie des makromolekularen Crowderns Ficoll durchgeführt, um Informationen über den Einfluss der verwendeten Cosolventien auf die Struktur und Stabilität des Proteins zu erhalten.

## 2.2 Materialien und Methoden

### 2.2.1 Chemikalien und Probenpräparation

$\alpha$ -Actin, welches aus Kaninchenskelettmuskulatur extrahiert wurde, wurde von der Firma HYPERMOL (Bielefeld, Germany) bezogen. Es besteht aus 375 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 42 kDa.<sup>[221]</sup> Die natürlichen Osmolyte Harnstoff und TMAO (Trimethylamin-*N*-oxid) sowie das als makromolekularer Crowder verwendete synthetische Polymer Ficoll<sup>®</sup> PM 70 (durchschnittliche molare Masse von 70 kDa) wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Seelze, Germany) bezogen. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das verwendete Actin wurde in einem Puffer, bestehend aus 2 mM TRIS-Cl [Tris(hydroxymethyl)aminomethan, pH 8.2], 0.4 mM ATP (Adenosintriphosphat), 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT (1,4-Dithiothreitol), 1 mM Na<sub>3</sub>N und 0.3% Disaccharide, als Lyophilisat geliefert und bei -70 °C gelagert.<sup>[221]</sup> G-Actin wurde vor den Experimenten gegen G-Puffer, bestehend aus 2 mM TRIS-Cl [Tris(hydroxymethyl)aminomethan, pH 8.2], 0.4 mM ATP (Adenosintriphosphat), 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> und 0.5 mM DTT (1,4-Dithiothreitol), dialysiert und anschließend bei 100 000 *g* und 4 °C für 3 h zentrifugiert, um poten-

tielle Proteinaggregate zu entfernen. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mithilfe der Biuret-Methode bestimmt.<sup>[222]</sup>

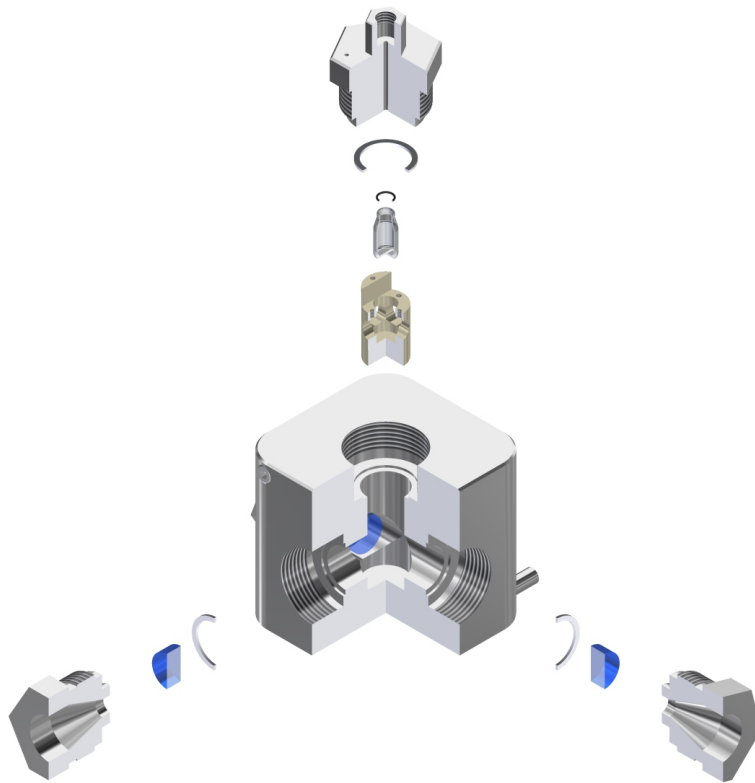
### 2.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Eine Lösung von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin wurde in G-Puffer inkubiert, der jeweils die entsprechende Menge an Cosolventien bzw. makromolekularem Crowder enthielt. Temperatur- und druckabhängige fluoreszenzspektroskopische Messungen wurden an einem Multifrequenz Phasen- und Modulationsfluorometer vom Typ K2 der Firma ISS (Urbana, IL) im *photon-counting*-Modus durchgeführt. Zur Detektion der intrinsischen Tryptophan Fluoreszenz erfolgte die Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$  mit einer 75 W Xenonlampe, sodass Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305 bis 425 nm aufgenommen werden konnten. Für die Experimente unter Druck wurde eine Hochdruckzelle der Firma ISS (Urbana, IL) verwendet, die mit Saphirglas Fenstern ausgestattet ist, um einem Druck von bis zu 4 kbar standhalten zu können.<sup>[223]</sup> Abbildung 2.2 zeigt den Aufbau der verwendeten Hochdruckzelle als Explosionszeichnung.

Die Probenlösung wurde in einem Quarzglasfläschchen mit einem Volumen von  $\sim 1 \text{ mL}$  platziert. Zur Abgrenzung der Probenlösung mit dem Druckmedium wurde das Quarzglasfläschchen mit einer druckübertragenden *Dura Seal*-Folie und einem O-Ring so verschlossen, dass sich keine Luftbläschen innerhalb des Probenbehälters befanden. Zum Schutz der Hochdruckzelle vor Korrosion wurde Ethanol als Druckmedium verwendet. Der Druck wurde mithilfe einer handbetriebenen Spindelpresse der Firma Hip (High Pressure Equipment Company, Erie, PA) generiert und mittels einer Stahlkapillare in die Hochdruckzelle übertragen. Ein Manometer der Firma Burster Präzisionstechnik (Gernsbach, Germany) diente als Drucksensor.

Der Druck wurde bei den jeweiligen Messreihen in Schritten von  $\Delta p = 100 \text{ bar}$  bzw. 250 bar bis hin zu einem Maximaldruck von 3 kbar variiert, wobei nach jeder Druckerhöhung eine Equilibrierung von  $t = 5 \text{ min}$  stattfand, damit das vermessene System sich an die Druckapplikation anpassen konnte.

Bei den temperaturabhängigen Aufnahmen der Emissionsspektren des intrinsi-



**Abbildung 2.2** – Explosionszeichnung der verwendeten Hochdruckzelle von ISS. Die Explosionszeichnung wurde mithilfe der Computersoftware AUTODESK INVENTOR2018<sup>[224]</sup> erstellt

schen Fluorophors Tryptophan von G-Actin wurde die jeweilige Probenlösung ( $V = 100 \mu\text{L}$ ) in eine Ultra-Mikro-Küvette der Firma Hellma (Müllheim, Germany) aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von  $3 \times 3 \text{ mm}$  pipettiert und mit einem Stopfen verschlossen, damit bei hohen Temperaturen keine Probenlösung entweichen kann. Zwei solcher mit Probenlösung befüllten Ultra-Mikro-Küvetten wurden in einem 3-Positionen-Küvettenhalter der Firma ISS (Urbana, IL) platziert, damit zeitgleich eine Doppelbestimmung stattfinden konnte. Zur Temperierung der Proben wurde ein zirkulierendes Wasserbad verwendet.

Die Temperatur wurde bei den jeweiligen Messreihen in Schritten von  $\Delta T = 10 \text{ }^\circ\text{C}$  bzw.  $3 \text{ }^\circ\text{C}$  bis hin zu einer Maximaltemperatur von  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  variiert, wobei nach jeder Temperaturerhöhung eine Equilibrierung von  $t = 5 \text{ min}$  stattfand, damit das vermessene System sich an die Temperaturerhöhung anpassen konnte.



## 2.3 Ergebnisse und Diskussion

Zum besseren Vergleich der einzeln gemessenen druck- und temperaturabhängigen Emissionsspektren erfolgte eine Normierung. Bei dieser wurde jedes einzelne Emissionsspektrum für sich integriert und anschließend jede gemessene Fluoreszenzintensität des Spektrums durch die integrierte Fläche dividiert:

$$I_{\text{Norm}}(\lambda, x) = \frac{I(\lambda, x)}{\int I(\lambda, x) d\lambda} \quad (2.1)$$

wobei  $x$  entweder für den Druck  $p$  oder die Temperatur  $T$  steht. Aus der Normierung folgt, dass die Fläche unter jedem Spektrum gleich Eins ist:

$$\int I_{\text{Norm}}(\lambda, x) d\lambda = 1 \quad (2.2)$$

Mithilfe dieser Flächennormierung ist nun ein Vergleich der einzelnen Emissionsspektren miteinander möglich, da die sich verschlechternden Quantenausbeuten mit steigendem Druck oder steigender Temperatur herausgerechnet wurden.

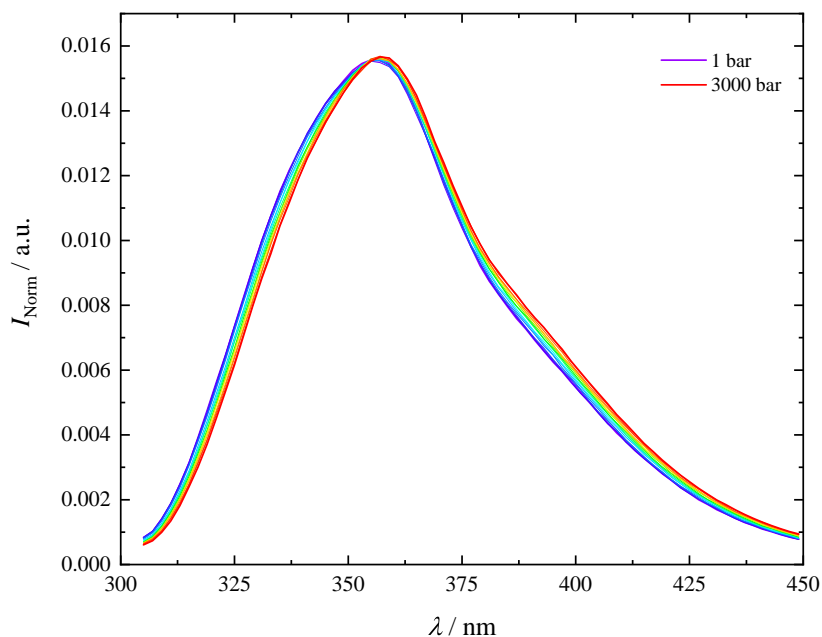
### 2.3.1 Druckstabilität von G-Actin

#### 2.3.1.1 Druckabhängigkeit von *N*-Acetyl-L-Tryptophanamid

Abbildung 2.3 zeigt die jeweils mit Gleichung (2.1) auf die Fläche normierten Emissionsspektren von  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $\hat{=}$   $407.7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) *N*-Acetyl-L-Tryptophanamid (NATA) in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25 °C. Wie zu erkennen ist, verändert sich die Lage der Emissionsspektren nur geringfügig mit steigendem Druck, dennoch ist eine kontinuierliche Rotverschiebung zu erkennen. Dieser Effekt kann bei vielen Fluorophoren bei ansteigendem Druck auftreten und mithilfe der Lippert-Mataga-Gleichung erklärt werden:<sup>[225,226]</sup>

$$\tilde{\nu}_{\text{A}} - \tilde{\nu}_{\text{F}} = \frac{2}{hc} \left( \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_{\text{E}} - \mu_{\text{G}})^2}{a^3} + \text{Konstante} \quad (2.3)$$

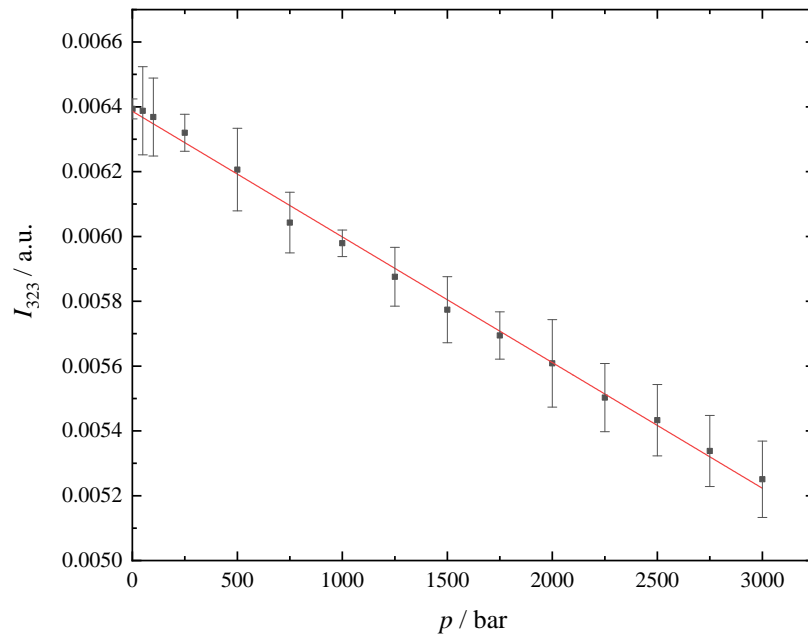
In dieser Gleichung stehen  $\tilde{\nu}_{\text{A}}$  und  $\tilde{\nu}_{\text{F}}$  für die Wellenzahlen (in  $\text{cm}^{-1}$ ) der Absorption bzw. Fluoreszenzemission,  $c$  für die Lichtgeschwindigkeit,  $h$  für das PLANCKsche



**Abbildung 2.3** – Druckabhängige, flächennormierte Emissionsspektren von  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $\cong 407.7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) *N*-Acetyl-L-Tryptophanamid in einfachem Monomix bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Wirkungsquantum,  $n$  für den Brechungsindex des Lösungsmittels,  $a$  für den Kavitätenradius, in der sich der Fluorophor befindet,  $\varepsilon$  für die Dielektrizitätskonstante und  $\mu_G$  bzw.  $\mu_E$  dem Dipolmoment des Fluorophors im Grund- bzw. angeregten Zustand. Aus Gleichung (2.3) resultiert, dass mit steigendem hydrostatischem Druck die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels steigt, wodurch sich die Wellenzahlendifferenz vergrößert und somit die Rotverschiebung zunimmt. [225,226]

Für eine genauere Betrachtung des Druckeffektes erfolgte eine Auftragung der flächennormierten Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 323 \text{ nm}$ , welche dem Emissionsmaximum des nativen G-Actins entspricht, gegen den jeweiligen Druck, bei der sich eine lineare Auftragung ergab (Abbildung 2.4). Eine Studie zeigte, dass in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Harnstoff die Steigung der linearen druckabhängigen Intensitätsänderung von *N*-Acetyl-L-Tryptophanamid kaum beeinflusst wird, [226] weshalb darauf verzichtet wurde weitere Messungen von *N*-Acetyl-L-Tryptophanamid in verschiedenen Cosolventien durchzuführen, um den intrinsischen Druckeffekt zu studieren. Für die Berücksichtigung des intrinsischen Druckeffektes auf den intrinsischen Fluorophor Tryptophan aller weiteren Messun-



**Abbildung 2.4** – Druckabhängige Intensitätsänderung von *N*-Acetyl-L-Tryptophanamid bei  $\lambda = 323$  nm und  $25$  °C.

gen erfolgte eine lineare Anpassung der in Abbildung 2.4 gezeigten Auftragung. Nach einer Verschiebung des Ordinatenabschnittes auf Null ergab sich folgende Geradengleichung:

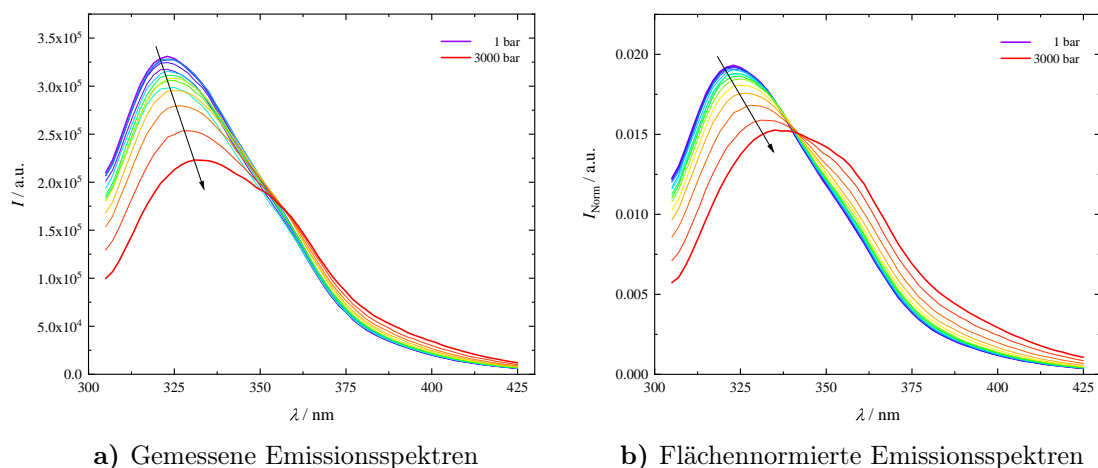
$$I_{323, \text{NATA}}(p) = -3.87 \times 10^{-7} \text{ bar}^{-1} \cdot p \quad (2.4)$$

Um die nachfolgenden Proteinentfaltungskurven um den intrinsischen Druckeffekt des Tryptophans zu korrigieren, erfolgte eine Subtraktion von Gleichung (2.4) von der jeweiligen gemessenen Fluoreszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von 323 nm beim jeweiligen Druck:

$$I_{323, \text{corr}}(p) = I_{323, \text{Norm}}(p) - I_{323, \text{NATA}}(p) = I_{\text{Norm}}(p) + 3.87 \times 10^{-7} \text{ bar}^{-1} \cdot p \quad (2.5)$$

### 2.3.1.2 Druckinduzierte Entfaltung von G-Actin

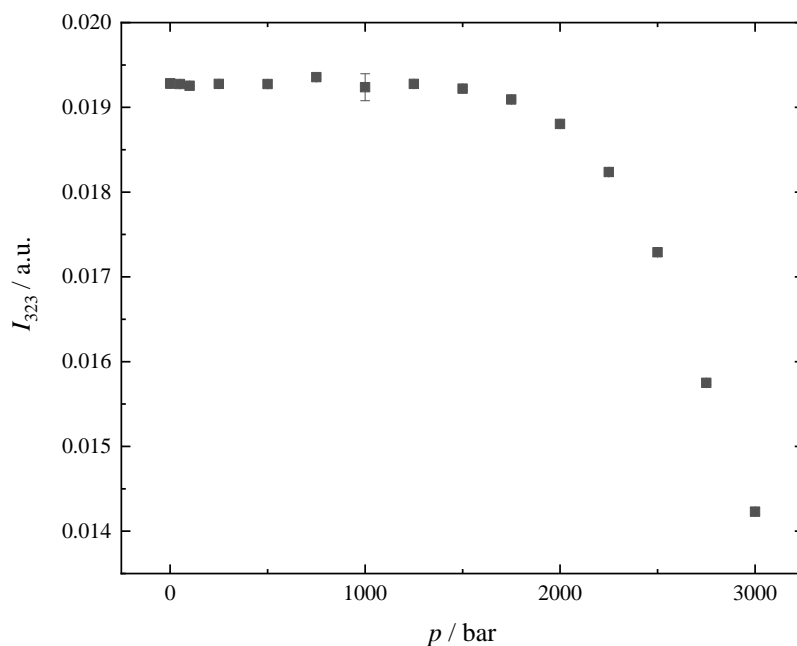
Zur fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung der Druckstabilität von G-Actin wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305–425 nm und einem



**Abbildung 2.5** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25  $^{\circ}\text{C}$ . Mit steigendem Druck ist sowohl eine deutliche Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.

Druckbereich von 1–3000 bar bei 25  $^{\circ}\text{C}$  aufgenommen. Um nur die Tryptophanemission zu betrachten, erfolgte die Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ . Abbildung 2.5a zeigt die detektierten Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin bei 25  $^{\circ}\text{C}$ . Es ist deutlich zu erkennen, dass mit steigendem hydrostatischem Druck sich sowohl das Emissionsmaximum ins Rote verschiebt als auch die gemessene Fluoreszenzintensität abnimmt, welche durch die Exposition der Tryptophanreste zum umgebenden Wasser begründet ist. Aufgrund dessen steigen mit steigendem hydrostatischem Druck sowohl die Dielektrizitätskonstante des Wassers als auch die Polarität der Umgebung.

Mithilfe von Gleichung (2.1) erfolgte eine Flächennormierung der einzelnen aufgenommenen Emissionsspektren, welche in Abbildung 2.5b dargestellt sind. Hierdurch wird die Rotverschiebung des Emissionsmaximums sowie die Intensitätsabnahme mit steigendem Druck deutlicher. Zu Beginn der Messreihe bei 1 bar liegt das Emissionsmaximum des gefalteten G-Actins bei 323 nm und verschiebt sich mit steigendem hydrostatischem Druck ins Rote. Die größte Änderung der Fluoreszenzintensität während des Druckanstiegs ist bei dem Emissionsmaximum zu erkennen, wodurch der Entfaltungsprozess nachverfolgt werden kann.



**Abbildung 2.6** – Entfaltungskurve von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin bei 25  $^{\circ}\text{C}$ . Aufgetragen ist die mit NATA korrigierte flächennormierte Intensität bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 323 \text{ nm}$  gegen den jeweiligen hydrostatischen Druck  $p$ .

Zur Untersuchung der Volumenänderung während des druckinduzierten Entfaltungsprozesses wurden die flächennormierten Fluoreszenzintensitäten bei dem Emissionsmaximum von  $\lambda = 323 \text{ nm}$  mithilfe von Gleichung (2.5) um den intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan korrigiert und gegen den jeweiligen Druck in Abbildung 2.6 aufgetragen. Mit steigendem hydrostatischem Druck nimmt die aufgetragene Fluoreszenzintensität ab. Bis zu einem Druck von etwa 1500 bar ist ein Plateau zu erkennen, welches den gefalteten Zustand repräsentiert in dem der Entfaltungsprozess noch nicht begonnen hat. Bei weiter ansteigendem hydrostatischem Druck beginnt die Fluoreszenzintensität abzunehmen. Dabei entspricht die Steigung in diesem Bereich der Volumenänderung  $\Delta V_u$  während des Entfaltungsprozesses. Wird der Entfaltungsprozess von G-Actin einem Zwei-Zustands-Modells zugeordnet, so entspricht der Verlauf der Entfaltungskurve einer sigmoidalen Kurve mit zwei Plateaus: dem des gefalteten und dem des entfalteten Zustandes. Unter dieser Annahme wird nun eine Kurvenanpassung möglich, die mithilfe der Computersoftware *Origin Pro 2015* unter Verwendung ihres Boltzmann-Fits durchgeführt wurde und folgender Gleichung entspricht:<sup>[227]</sup>

$$I(p) = \frac{I_F - I_U}{1 + e^{-(p-p_u) \cdot (\Delta V/RT)}} + I_U \quad (2.6)$$

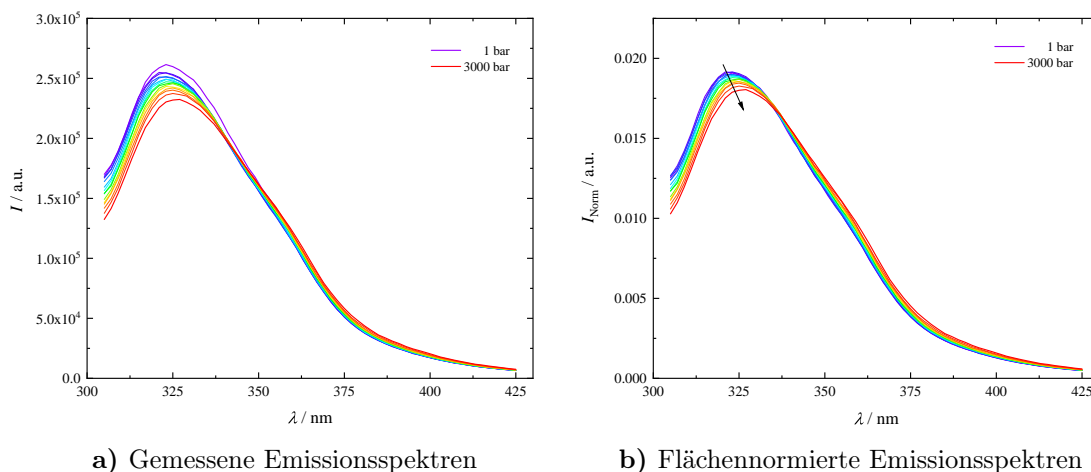
Hierbei entsprechen  $I_U$  und  $I_F$  den Fluoreszenzintensitäten im entfalteten (U) und gefalteten (F) Zustand,  $R$  der Universellen Gaskonstante,  $T$  der Temperatur,  $\Delta V$  der Volumenänderung während des Entfaltungsprozesses,  $p$  dem angelegten Druck und  $p_u$  dem Entfaltungsdruck. Bei dem Entfaltungsdruck liegen jeweils 50 % gefaltetes und entfaltetes G-Actin vor. Anhand der durchgeführten Kurvenanpassung ist eine direkte Bestimmung des Entfaltungsvolumens möglich.<sup>[227]</sup> Der an dieser Hochdruckanlage maximal mögliche Druck von 3000 bar reicht allerdings nicht aus, um G-Actin komplett in den entfalteten Zustand zu überführen, was daran zu erkennen ist, dass das Plateau des entfalteten Zustandes nicht erreicht wird. Dadurch ist eine Kurvenanpassung mithilfe von Gleichung (2.6) nicht möglich und es können keine Aussagen bezüglich des Entfaltungsdrucks und der Volumenänderung während des Entfaltungsprozesses getroffen werden.

Um dennoch die Volumenänderung während des druckinduzierten Entfaltungsprozesses mit dem an dieser Anlage maximal möglichen Druck von 3000 bar studieren zu können, wurde beschlossen, G-Actin in Anwesenheit von Cosolventien zu untersuchen, da Studien gezeigt haben, dass z.B. in Anwesenheit von Harnstoff der Entfaltungsdruck herabgesetzt wird, ohne Einfluss auf die Volumenänderung während des Entfaltungsprozesses zu nehmen.<sup>[57,226,228–230]</sup>

In den folgenden Abschnitten werden nun die Einflüsse der Cosolventien TMAO, Harnstoff und deren Gemische auf die Druckstabilität von G-Actin beschrieben.

### 2.3.1.3 Einfluss von TMAO auf die Druckstabilität von G-Actin

Im nun nachfolgenden Abschnitt wird das Entfaltungsverhalten von G-Actin in Anwesenheit des Osmolyten Trimethylamin-*N*-oxid beschrieben. Dazu wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305–425 nm in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25 °C aufgenommen, wobei die Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm erfolgte, um nur die Tryptophanreste anzuregen. Abbildung 2.7a zeigt beispielhaft für den Einfluss von TMAO auf die Proteinstabilität von G-Actin

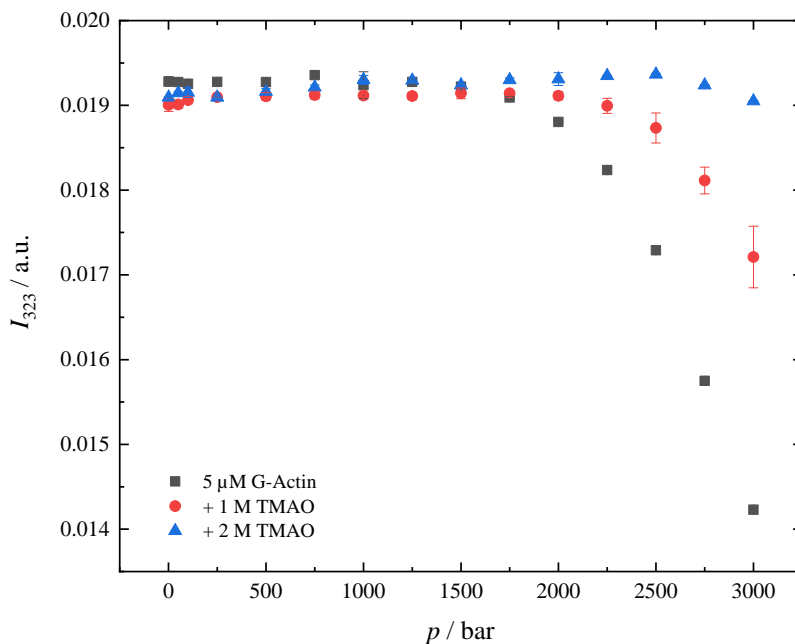


**Abbildung 2.7** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 2 M TMAO in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25  $^{\circ}\text{C}$ . Mit steigendem Druck ist sowohl eine geringfügige Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.

die aufgenommenen druckabhängigen Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 2 M TMAO. Die in Abhängigkeit des Drucks gemessenen und flächennormierten Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 1 M TMAO können der Abbildung 2.26 im Abschnitt 2.5.1 im Anhang entnommen werden.

Es ist zu erkennen, dass mit steigendem hydrostatischem Druck sowohl die Fluoreszenzintensität geringfügig abnimmt als auch eine geringfügige Rotverschiebung des Emissionsmaximums auftritt. Zur besseren Betrachtung erfolgte mithilfe von Gleichung (2.1) eine Flächennormierung der einzeln aufgenommenen Emissionsspektren. Abbildung 2.7b zeigt beispielhaft die druckabhängigen, auf ihre Fläche normierten Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 2 M TMAO bei 25  $^{\circ}\text{C}$ . Die Abnahme der Fluoreszenzintensität sowie die Rotverschiebung des Emissionsmaximums mit steigendem hydrostatischem Druck fallen im Vergleich mit den flächennormierten Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin (Abbildung 2.5b) deutlich geringer aus. Dies lässt darauf schließen, dass die 2 M TMAO einen deutlich stabilisierenden Effekt auf die Proteinstruktur von G-Actin besitzen.

Zur besseren Betrachtung des Einflusses von 1 bzw. 2 M TMAO auf die Proteininstabilität von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin und damit auf die Volumenänderung während des



**Abbildung 2.8** – Entfaltungskurven von 5  $\mu$ M G-Actin, sowie in Anwesenheit von 1 und 2 M TMAO bei einer Temperatur von 25  $^{\circ}$ C. Aufgetragen ist die mit NATA korrigierte, flächennormierte Fluoreszenzintensität bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 323$  nm gegen den jeweiligen hydrostatischen Druck  $p$ .

Entfaltungsprozesses erfolgte eine Auftragung der flächennormierten, mithilfe von Gleichung (2.5) um den intrinsischen Druckeffekt korrigierten Fluoreszenzintensitäten bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 323$  nm, dem Emissionsmaximum von nativem G-Actin, gegen den jeweiligen Druck in Abbildung 2.8.

Im Vergleich zur Entfaltungskurve von 5  $\mu$ M G-Actin ohne Zusatz von Cosolventien wird ersichtlich, dass der Entfaltungsprozess von G-Actin in Anwesenheit von 1 M TMAO erst ab einem Druck von etwa 2400 bar beginnt, was daran zu erkennen ist, dass die flächennormierte und um den intrinsischen Druckeffekt korrigierte Fluoreszenzintensität bis zu diesem Druck nahezu konstant verläuft, was dem Plateau des gefalteten Zustandes von G-Actin entspricht. Erst bei höheren Drücken beginnt eine Abnahme der Fluoreszenzintensität und somit der Entfaltungsprozess.

Durch die Anwesenheit von 2 M TMAO erfolgt eine weitere Stabilisierung des gefalteten Zustandes von G-Actin. Bis zu dem an dieser Hochdruckanlage maximal möglichen Druck von 3000 bar verläuft die flächennormierte und um den intrinsischen Druckeffekt korrigierte Fluoreszenzintensität von G-Actin in Anwesenheit von

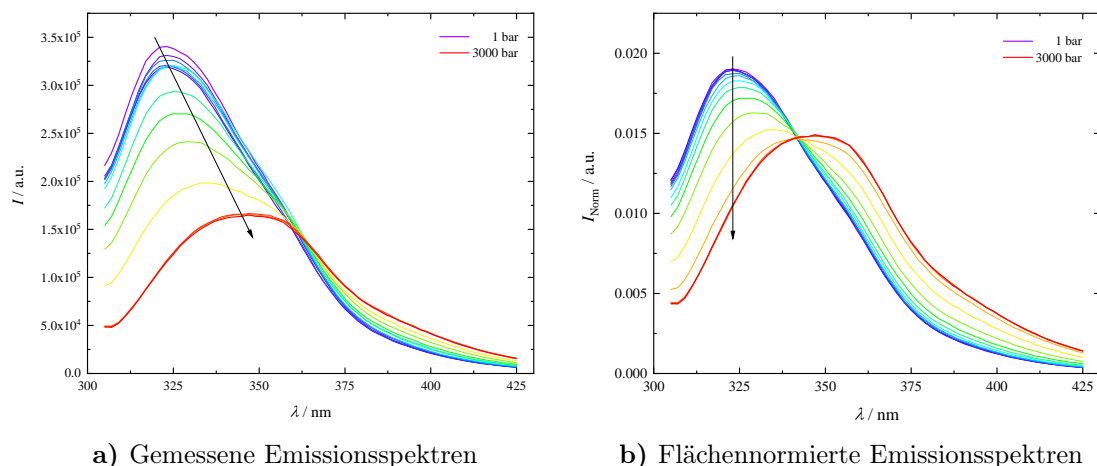


2 M TMAO nahezu konstant. Demzufolge hat der Entfaltungsprozess noch nicht begonnen und verlängert das Plateau des gefalteten Zustandes von G-Actin. Aufgrund der Tatsache, dass sich das zweite Plateau, das des entfalteten Zustandes, nicht ausgebildet hat, konnte keine Kurvenanpassung mithilfe von Gleichung (2.6) durchgeführt werden, um das Entfaltungsvolumen von G-Actin zu bestimmen. Es kann lediglich eine qualitative Aussage bezüglich der Proteinstabilität von G-Actin getroffen werden. Demzufolge steigt mit steigender Konzentration des Osmolyten der stabilisierende Effekt auf die Proteinstabilität von G-Actin.

#### 2.3.1.4 Einfluss von Harnstoff auf die Druckstabilität von G-Actin

Im folgenden Teil wurde der Einfluss des natürlich vorkommenden Harnstoffes auf die Proteinstabilität von globulärem Actin untersucht. Dazu wurden vergleichbare Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305–425 nm in einem Druckbereich von 1–3000 bar in Anwesenheit von 1, 2, 3 und 4 M Harnstoff bei 25 °C aufgenommen. Auch hier erfolgte lediglich eine Anregung der Tryptophanreste bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm. Beispielfür die druckabhängigen fluoreszenzspektroskopischen Messungen von G-Actin in Anwesenheit von verschiedenen Harnstoffkonzentrationen sind die in Abbildung 2.9a gemessenen und in Abbildung 2.9b die mithilfe von Gleichung (2.1) auf ihre Fläche normierten, druckabhängigen Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 2 M Harnstoff bei 25 °C dargestellt. Sowohl die gemessenen als auch die flächennormierten Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 1, 3 und 4 M Harnstoff können der Abbildung 2.27 im Anhang (Kapitel 2.5.1) entnommen werden.

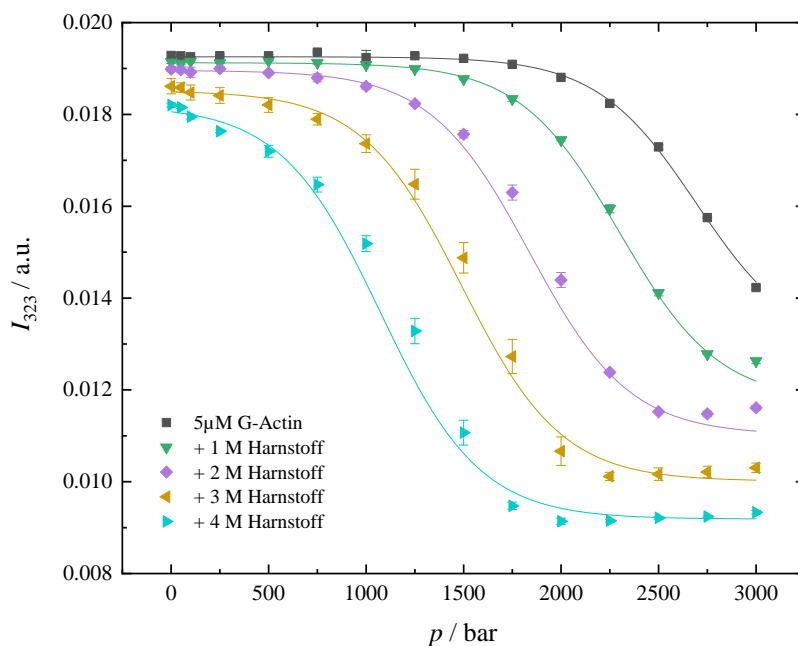
Es lässt sich erkennen, dass die flächennormierte Fluoreszenzintensität mit zunehmendem hydrostatischem Druck abnimmt, sowie die Lage des Emissionsmaximums ins Rote verschoben wird. Ab einem Druck von etwa 2500 bar überlagern sich die flächennormierten Emissionsspektren, was erste Schlüsse aufkommen lässt, dass G-Actin sich im entfalteten Zustand befindet. Durch die Flächennormierung wird ersichtlich, dass der Entfaltungsprozess von G-Actin einem Zwei-Zustands-Modell folgt.



**Abbildung 2.9** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von  $5 \mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von  $2 \text{ M}$  Harnstoff in einem Druckbereich von  $1\text{--}3000 \text{ bar}$  bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Mit steigendem Druck ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.

Zur Untersuchung des Einflusses von Harnstoff in verschiedenen Konzentrationen auf das Entfaltungsverhalten von G-Actin wurde bei den druckabhängigen fluoreszenzspektroskopischen Messungen in Anwesenheit von  $1, 2, 3$  und  $4 \text{ M}$  Harnstoff jeweils die Fluoreszenzintensität bei der konstanten Wellenlänge von  $323 \text{ nm}$ , dem Emissionsmaximum von nativem G-Actin, mithilfe von Gleichung (2.5) um den intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan korrigiert und gegen den jeweiligen hydrostatischen Druck in Abbildung 2.10 aufgetragen.

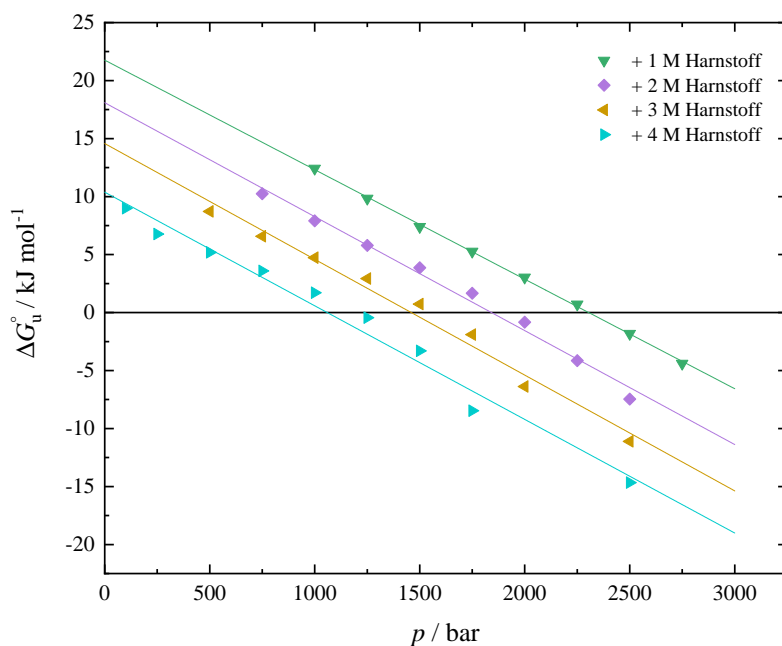
Durch den Vergleich der Entfaltungskurven von G-Actin in Anwesenheit von Harnstoff mit der Entfaltungskurve von reinem G-Actin wird ersichtlich, dass die Zugabe von Harnstoff den Entfaltungsprozess signifikant beeinflusst. Bei den Entfaltungskurven von G-Actin in Anwesenheit von Harnstoff sind jeweils zwei Plateaus zu erkennen: bei niedrigen Drücken das des gefalteten Zustandes und bei hohen Drücken das des entfalteten Zustandes. Der Druck, der notwendig ist, um den Entfaltungsprozess einzuleiten, welcher an dem Übergang vom ersten Plateau in den abfallenden Bereich der Kurve vorliegt, wird mit steigender Konzentration an Harnstoff geringer. Alle Entfaltungskurven, an denen Harnstoff beteiligt ist, zeigen einen sigmoidalen Kurvenverlauf, was die Annahme eines Zwei-Zustands-Modells verstärkt.



**Abbildung 2.10** – Druckabhängige Entfaltungskurven von  $5\ \mu\text{M}$  G-Actin, sowie in Anwesenheit von 1, 2, 3 und 4 M Harnstoff bei einer Temperatur von  $25\ ^\circ\text{C}$ . Aufgetragen ist die mit NATA korrigierte, flächennormierte Fluoreszenzintensität bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 323\ \text{nm}$  gegen den jeweiligen hydrostatischen Druck  $p$ . Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (2.6).

Die Steigung am Wendepunkt der sigmoidalen Kurve entspricht hierbei dem Entfaltungsvolumen. Somit ist eine Kurvenanpassung mithilfe von Gleichung (2.6) möglich, wodurch der Entfaltungsdruck sowie das Entfaltungsvolumen direkt aus den fluoreszenzspektroskopischen Daten bestimmt werden können. Diese Kurvenanpassung wurde mit der Computersoftware *Origin Pro 2015* durchgeführt. Dabei wurde das Entfaltungsvolumen zu  $-97 \pm 3\ \text{mL mol}^{-1}$  bestimmt. Die jeweiligen Entfaltungsdrücke von G-Actin in Anwesenheit von 1, 2, 3 und 4 M Harnstoff sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Der Entfaltungsdruck verringert sich um etwa 403 bar pro Mol Harnstoff. Demzufolge destabilisiert die Anwesenheit von Harnstoff die Proteinstabilität von G-Actin.

Neben der zuvor gezeigten Möglichkeit, das Entfaltungsvolumen und den Entfaltungsdruck direkt aus fluoreszenzspektroskopischen Daten mithilfe einer Kurvenanpassung (Gleichung (2.6)) zu bestimmen, lassen sich diese thermodynamischen Größen auch aus dem thermodynamischen Zusammenhang der Standard-Entfaltungs-



**Abbildung 2.11** – Mithilfe von Gleichung (2.7) bestimmte Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie  $\Delta G_u^\circ$  von  $5 \mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 1, 2, 3 und 4 M Harnstoff in Abhängigkeit des Drucks bei  $25^\circ\text{C}$ .

Gibbs-Energie  $\Delta G_u^\circ$  mit der Gleichgewichtskonstanten  $K_u$  der Proteinentfaltung bestimmen:<sup>[42]</sup>

$$\Delta G_u^\circ = -RT \ln K_u = -RT \ln \frac{x_U}{x_F} = -RT \ln \frac{I(p) - I_F}{I_U - I(p)} \quad (2.7)$$

Die Gleichgewichtskonstante  $K_u$  der Proteinentfaltung ergibt sich aus dem Quotient des entfalteten ( $x_U$ ) und gefalteten ( $x_F$ ) Anteils an Protein, mit den Bedingungen, dass  $x_F + x_U = 1$  und  $I(p) = x_F I_F + x_U I_U$ .  $I_F$  und  $I_U$  stehen hierbei für die Fluoreszenzintensitäten des gefalteten bzw. entfalteten Zustandes und  $I(p)$  für die Fluoreszenzintensität beim Druck  $p$ .<sup>[20]</sup> Das gesuchte Entfaltungsvolumen entspricht der Steigung der Geraden bei einer Auftragung der Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie  $\Delta G_u^\circ$  gegen den jeweiligen Druck:<sup>[229]</sup>

$$\left( \frac{\partial \Delta G_u^\circ}{\partial p} \right) = \Delta V_u^\circ \quad (2.8)$$

Aus den flächennormierten und um den intrinsischen Druckeffekt korrigierten Fluoreszenzintensitäten bei einer Wellenlänge von 323 nm der vier Harnstoff-Messreihen

wurde mithilfe von Gleichung (2.7) jeweils die Standard-Entfaltung-Gibbs-Energie für den jeweiligen Druck berechnet und in Abbildung 2.11 grafisch dargestellt. Aufgrund gezeigter Studien, dass der Einsatz von Denaturierungsmitteln keinen Einfluss auf das Entfaltungsvolumen nimmt, kann aus dieser Auftragung das Entfaltungsvolumen mithilfe einer linearen Regression bestimmt werden. [57,226,228,229]

Hierbei wird das Entfaltungsvolumen  $\Delta V_u^\circ$  anhand der Steigung der Ausgleichsgeraden bestimmt und der Ordinatenabschnitt entspricht der Standard-Entfaltung-Gibbs-Energie  $\Delta G_u^\circ(p_0)$  bei einem Druck von 1 bar. Der Entfaltungsdruck  $p_u$  entspricht dem Druck, an dem  $\Delta G_u^\circ = 0$  ist. Beim Entfaltungsdruck liegen jeweils 50 % der Proteine im gefalteten bzw. entfalteten Zustand vor.

Aus der linearen Anpassung ergab sich ein Wert für das Entfaltungsvolumen von G-Actin von  $-98 \pm 2 \text{ mL mol}^{-1}$ . Ein Vergleich der beiden auf unterschiedliche Weise bestimmten Entfaltungsvolumina lässt erkennen, dass durch die Zugabe von verschiedenen Harnstoff-Konzentrationen das Entfaltungsvolumen von G-Actin bestimmt werden kann und die jeweiligen Resultate miteinander verglichen werden können. Die beiden, auf unterschiedliche Weise bestimmten, Entfaltungsvolumina liegen im Rahmen des jeweiligen Fehlers und besitzen dieselbe Größenordnung wie Entfaltungsvolumina von etwa gleich großen Proteinen. [58] In der Literatur lässt sich ein Wert von  $-72 \text{ mL mol}^{-1}$  für das Entfaltungsvolumen von G-Actin finden. [231] Im Vergleich zu der gefundenen Literatur ist das in dieser Studie ermittelte Entfaltungsvolumen von G-Actin etwas größer. Ein Grund hierfür könnte sein, dass es sich um zwei unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Entfaltungsvolumens handelt, die eine unterschiedliche Sensitivität aufweisen.

Monomeres Actin besitzt ein Molekulargewicht von 42 348 Da und ein spezifisches Volumen von  $0.749 \text{ mL g}^{-1}$ . [227,232] Im Vergleich zu dem molaren Volumen beträgt die Volumenänderung  $\sim 0.3 \%$ , was in etwa 5 Wassermolekülen pro Actin-Molekül entspricht. Daraus lässt sich schließen, dass der gefaltete Zustand von G-Actin sehr dicht gepackt ist und während des druckinduzierten Entfaltungsprozesses nur wenige Wassermoleküle ins Innere der Proteinstruktur diffundieren.

Die erhaltenen Werte für die Entfaltungsdrücke sowie der Standard-Entfaltungs-

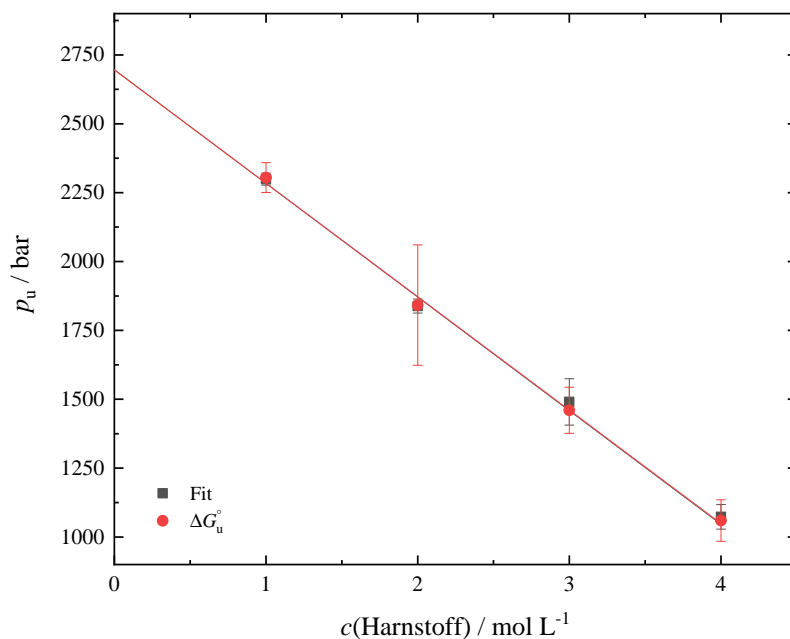
**Tabelle 2.1** – Entfaltungsdrücke von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin bei 25  $^\circ\text{C}$  in verschiedenen Harnstoff-Konzentrationen, sowie die aus Abbildung 2.12 extrapolierten Entfaltungsdrücke von reinem G-Actin in Abwesenheit von Harnstoff. Aufgelistet sind die Entfaltungsdrücke die sowohl mithilfe von Gleichung (2.6) als auch mithilfe von  $\Delta G_{\text{u}}^{\circ} = 0$  bestimmt wurden.

$c_{\text{Harnstoff}} / \text{mol L}^{-1}$	$p_{\text{u, Fit}} / \text{bar}$	$p_{\text{u, } \Delta G_{\text{u}}^{\circ}} / \text{bar}$	$\Delta G_{\text{u}}^{\circ}(p_0) / \text{kJ mol}^{-1}$
1	$2299 \pm 22$	$2305 \pm 46$	$21.8 \pm 0.2$
2	$1838 \pm 25$	$1842 \pm 199$	$18.1 \pm 0.7$
3	$1490 \pm 84$	$1460 \pm 87$	$14.6 \pm 0.8$
4	$1073 \pm 45$	$1060 \pm 79$	$10.4 \pm 0.7$
G-Actin	$2696 \pm 37$	$2696 \pm 33$	

Gibbs-Energie  $\Delta G_{\text{u}}^{\circ}(p_0)$  von G-Actin in Anwesenheit von verschiedenen Harnstoff-Konzentrationen sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Mit steigender Harnstoff-Konzentration sinkt sowohl der Entfaltungsdruck  $p_{\text{u}}$  als auch der aus dem Ordinatenabschnitt bestimmte Wert der Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie  $\Delta G_{\text{u}}^{\circ}(p_0)$ . Diese nimmt um etwa 4 kJ pro Mol Harnstoff ab. Um nun den Entfaltungsdruck von G-Actin in Abwesenheit des Cosolvens Harnstoff zu ermitteln, erfolgte eine Auftragung der bestimmten Entfaltungsdrücke gegen die jeweilige Harnstoff-Konzentration in Abbildung 2.12.

Bei beiden hier vorgestellten Methoden zur Bestimmung der Entfaltungsdrücke von G-Actin in Anwesenheit von verschiedenen Harnstoff-Konzentrationen wird ersichtlich, dass ein linearer Zusammenhang zwischen dem Entfaltungsdruck und der verwendeten Harnstoff-Konzentration besteht. Mithilfe einer linearen Anpassung erfolgte eine Bestimmung des Entfaltungsdrucks von reinem G-Actin in Abwesenheit von Harnstoff, der dem Ordinatenabschnitt entspricht. Bei beiden Bestimmungsmethoden des Entfaltungsdrucks ergab sich für den Entfaltungsdruck von reinem G-Actin mithilfe eine Extrapolation ein Wert von  $2696 \pm 33$  bar, der relativ gut mit Literaturdaten übereinstimmt.<sup>[227,231]</sup> Dadurch wird ersichtlich, dass die beiden Methoden sich kaum unterscheiden und beide zur Bestimmung des Entfaltungsdrucks herangezogen werden können.

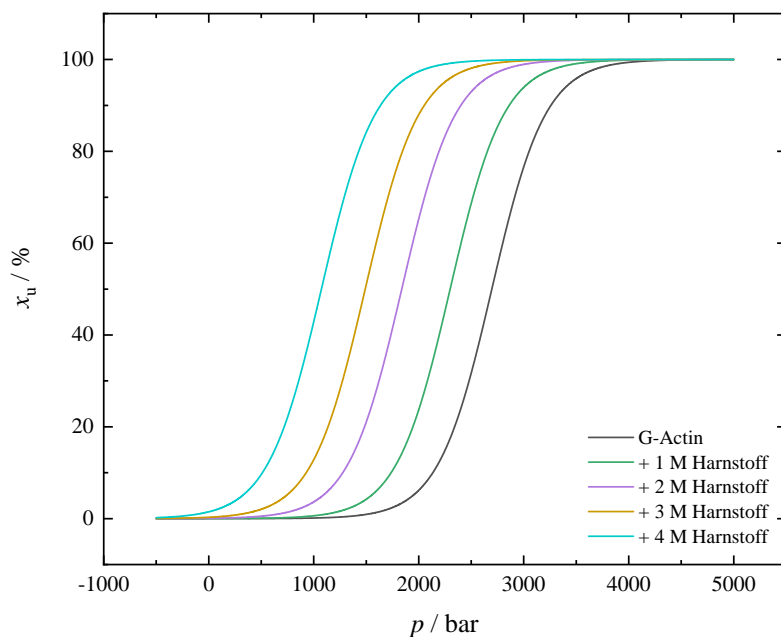
Mit den bis hier hin ermittelten Ergebnissen für das Entfaltungsvolumen  $\Delta V_{\text{u}}^{\circ} = -97 \pm 3 \text{ mL mol}^{-1}$  und dem Entfaltungsdruck von G-Actin in Abwesenheit von Harn-



**Abbildung 2.12** – Bestimmung des Entfaltungsdrucks  $p_u$  von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin bei 25  $^\circ\text{C}$ . Auftragung der mithilfe von Gleichung (2.6) (schwarz) sowie mithilfe von  $\Delta G_u^0 = 0$  (rot) ermittelten Entfaltungsdrücke gegen die jeweilige Harnstoff-Konzentration.

stoff  $p_u = 2696 \pm 33$  bar ist es nun möglich, eine Simulation der Entfaltungskurven durchzuführen. Dazu wurden die Computersoftware *Microsoft Excel 2013* und Gleichung (2.6) verwendet, um die Entfaltungskurven als entfaltenen Anteil  $x_u$  zu berechnen. Neben der Simulation für reines G-Actin, erfolgte die Simulation auch für G-Actin in Anwesenheit von 1, 2, 3 und 4 M Harnstoff. Die simulierten Entfaltungskurven sind in Abbildung 2.13 grafisch dargestellt.

Alle simulierten Kurven zeigen nun einen sigmoidalen Kurvenverlauf mit den jeweiligen Plateaus des gefalteten bzw. entfaltenen Zustandes. Die Steigung am Wendepunkt der sigmoidalen Kurve entspricht dem Entfaltungsvolumen und der Wendepunkt dem Entfaltungsdruck. Mit der hier durchgeführten Simulation lässt sich der Kurvenverlauf der gemessenen Entfaltungskurve von G-Actin in Anwesenheit von 4 M Harnstoff erklären. Diese eingesetzte Menge an Harnstoff reicht schon bei dem Startdruck von 1 bar aus, um den Entfaltungsprozess einzuleiten. Dadurch kann erklärt werden, dass in Abbildung 2.10 die Entfaltungskurve von G-Actin in Anwesenheit von 4 M Harnstoff kein Plateau des gefalteten Zustandes aufzeigt, da die



**Abbildung 2.13** – Simulierte Entfaltungskurven von  $5 \mu\text{M}$  G-Actin bei  $25^\circ\text{C}$ . Die Simulation erfolgte mithilfe der Software *Microsoft Excel 2013* und Gleichung (2.6). Die Werte der Entfaltungsdrücke  $p_{11}$  wurden aus der Tabelle 2.1 entnommen, das Entfaltungsvolumen  $\Delta V_u^\circ$  ergab sich aus dem Mittelwert der Harnstoffmessungen.

Entfaltung bereits begonnen hat und die gemessene Fluoreszenzintensität bereits abnimmt.

### 2.3.1.5 Einfluss von TMAO-Harnstoff-Gemischen auf die Druckstabilität von G-Actin

Es ist bekannt, dass in Tiefsee-Organismen durch die Präsenz von chaotropen und kosmotropen Cosolvens-Gemischen Zellen vor einem Aufplatzen oder Schrumpfen geschützt werden.<sup>[90]</sup> Aus diesem Grund wurde im Nachfolgenden die druckabhängige Denaturierung von  $5 \mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von TMAO-Harnstoff-Gemischen untersucht. Dafür wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305–425 nm in einem Druckbereich von 1–3000 bar in Anwesenheit von den in Tabelle 2.2 aufgelisteten TMAO-Harnstoff-Gemischen bei  $25^\circ\text{C}$  aufgenommen. Um nur die Tryptophanreste anzuregen, erfolgte die Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ .

Die aufgenommenen Emissionsspektren zeigen keine signifikanten Abweichungen

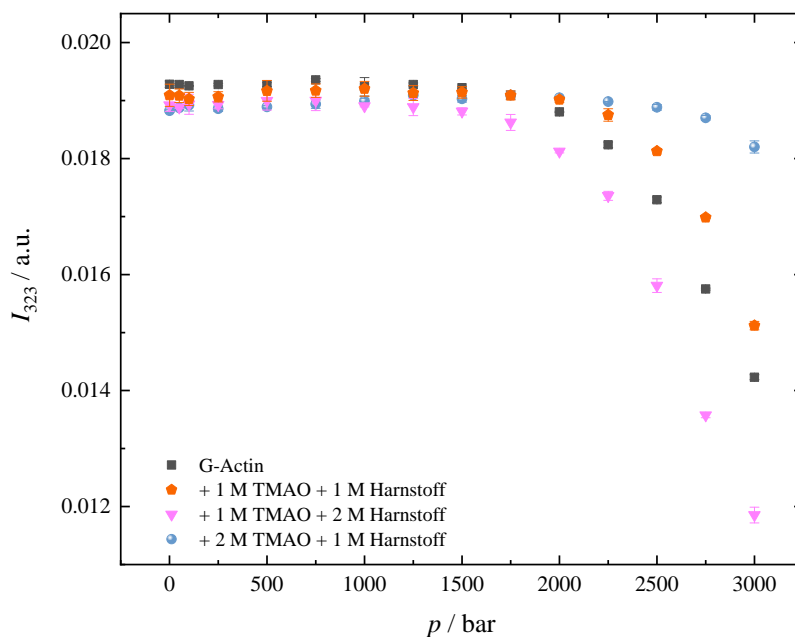


**Tabelle 2.2** – Aufzählung der benutzten TMAO/Harnstoff-Mischungen zur Untersuchung des Einflusses dieser Gemische auf das Entfaltungsverhalten von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin unter Druck bei einer Temperatur von 25 °C.

Nr.	$c(\text{TMAO}) / \text{M}$	$c(\text{Harnstoff}) / \text{M}$
1	1	1
2	1	2
3	2	1

zu den zuvor gezeigten Emissionsspektren, weshalb darauf verzichtet wird, diese hier zu zeigen, sondern der Abbildung 2.28 im Anhang (Kapitel 2.5.1) entnommen werden können. Die einzeln aufgenommenen, druckabhängigen Emissionsspektren wurden mithilfe von Gleichung (2.1) auf ihre jeweilige Fläche normiert. Im Anschluss erfolgte eine Auftragung der flächennormierten Fluoreszenzintensitäten bei der konstant gehaltenen Wellenlänge von 323 nm gegen den jeweiligen hydrostatischen Druck, wobei die flächennormierten Fluoreszenzintensitäten zuvor mithilfe von Gleichung (2.5) um den intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan korrigiert wurden. Die erhaltenen Entfaltungskurven für die einzelnen TMAO:Harnstoff-Gemische sind in Abbildung 2.14 im Vergleich zur Entfaltungskurve von reinem G-Actin dargestellt.

Es lässt sich erkennen, dass bei allen gezeigten Entfaltungskurven die flächennormierten und um den intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan korrigierten Fluoreszenzintensitäten bei geringen hydrostatischen Drücken nahezu konstant verlaufen und somit den gefalteten Zustand von G-Actin widerspiegeln. Bei allen vermessenen TMAO-Harnstoff-Gemischen lässt sich allerdings kein sigmoidaler Kurvenverlauf erkennen, was darauf schließen lässt, dass der an dieser Hochdruckanlage maximal mögliche Druck von 3000 bar nicht ausreicht, um G-Actin vollständig in den entfalteten Zustand zu überführen. Bei einem TMAO:Harnstoff Verhältnis von 2:1 verläuft die Fluoreszenzintensität nahezu konstant über den gesamten Druckbereich. Demzufolge stabilisieren 2 M TMAO die Proteinstruktur von G-Actin so stark, dass es in dem angelegten Druckbereich nicht zur Entfaltung kommt, obwohl 1 M Harnstoff anwesend ist, was eine genügend hohe Konzentration an Harnstoff darstellt, um G-Actin zu denaturieren (siehe Abbildung 2.10). Die Entfaltungskurve von G-Actin in Anwesenheit eines TMAO:Harnstoff Verhältnis von 1:1 folgt weitestgehend der Ent-



**Abbildung 2.14** – Entfaltungskurven von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin sowie in Anwesenheit von verschiedenen TMAO-Harnstoff-Gemischen bei einer Temperatur von 25  $^{\circ}\text{C}$ . Aufgetragen ist die mit NATA korrigierte, flächennormierte Fluoreszenzintensität bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 323$  nm gegen den jeweiligen hydrostatischen Druck  $p$ .

faltungskurve von G-Actin in Abwesenheit von Cosolventien. 1 M TMAO reicht demzufolge bereits aus, um die vollständige Denaturierung von G-Actin zu verhindern und wirkt der denaturierenden Wirkung von 1 M Harnstoff entgegen. Des Weiteren ist noch die Entfaltungskurve von G-Actin in Anwesenheit des TMAO:Harnstoff-Verhältnis von 1:2 gezeigt. Es lässt sich sowohl der destabilisierende Effekt von Harnstoff als auch der stabilisierende Effekt von TMAO erkennen. Die Konzentration von Harnstoff ist in diesem Gemisch doppelt so hoch als die von TMAO, jedoch reichen 2 M Harnstoff nicht aus, um G-Actin in dem untersuchten Druckbereich zum Entfalten zu bringen. Demzufolge stabilisiert schon 1 M TMAO die Proteinstruktur so stark, dass selbst die eingesetzte Menge an Harnstoff nicht ausreicht, um G-Actin in den entfaltenen Zustand zu überführen.

Aus den hier gezeigten Entfaltungskurven wird ersichtlich, dass TMAO eine sehr stabilisierende Wirkung auf die Proteinstabilität von G-Actin aufweist und sogar der denaturierenden Wirkung von Harnstoff entgegenwirken kann. Mit deutlich höheren Konzentrationen an Harnstoff kann allerdings G-Actin in den entfaltenen Zustand

überführt werden.

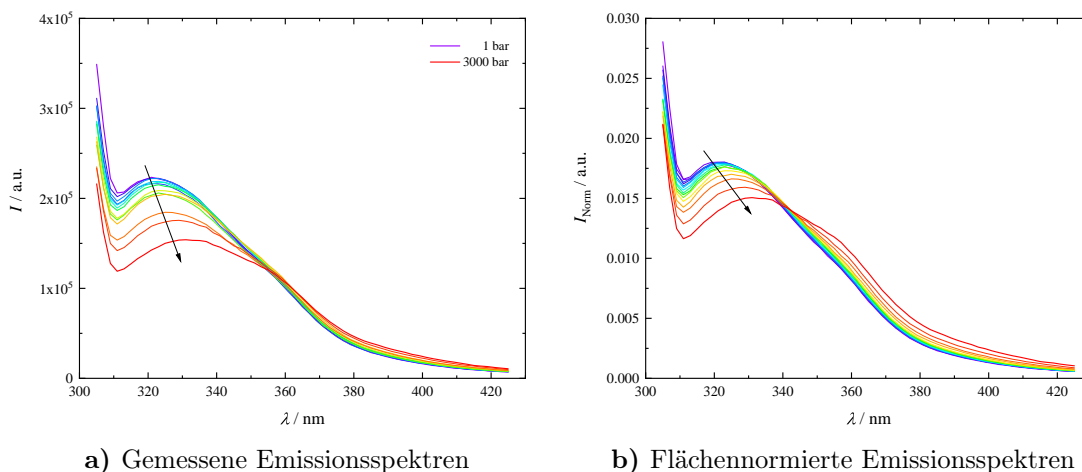
### 2.3.1.6 Einfluss von Makrocrowdern auf die Druckstabilität von G-Actin

Die bis hier hin durchgeführten *in vitro* Experimente entsprechen nicht ganz denselben realen Umweltbedingungen von zellulärem G-Actin, also *in vivo*-Bedingungen. Aus diesem Grund wurden im nachfolgenden Teil Makrocrowder verwendet, um die natürliche Umgebung in der Zelle besser nachstellen zu können. Durch das Vorhandensein solcher Crowdingmittel in der Zelle wird das zur Verfügung stehende Volumen reduziert.

Zur Untersuchung des Einflusses von Makrocrowdern auf die Proteinstabilität wurde in dieser Arbeit Ficoll<sup>®</sup> PM 70 verwendet. Dafür wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305–425 nm in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25 °C in Anwesenheit von 5, 10 und 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 aufgenommen. Als Anregung wurde eine Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm verwendet, um nur die Tryptophanreste anzuregen. Ficoll<sup>®</sup> PM 70 zeigt in dem vermessenen Wellenlängenbereich keine eigenständige Emission, sodass eine fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Proteinstabilität von G-Actin dadurch nicht beeinträchtigt wird.

Abbildung 2.15a zeigt beispielhaft für den Einfluss von Ficoll<sup>®</sup> PM 70 auf die Proteinstabilität von G-Actin die aufgenommenen Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 10 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25 °C. Mit steigendem hydrostatischem Druck sind sowohl eine Abnahme der Fluoreszenzintensität als auch eine Rotverschiebung der Emissionsbande von Tryptophan zu erkennen. Auffallend ist die Fluoreszenzabnahme bis zu einer Wellenlänge von  $\sim 310$  nm. Diese lässt sich vermutlich auf Lichtstreuung zurückführen, die aufgrund des vorhandenen Makrocrowders in der Lösung hervorgerufen wird.

Im Vergleich zu den gemessenen Emissionsspektren von reinem G-Actin (Abbildung 2.5a) sind auf den ersten Blick keine signifikanten Unterschiede im druckinduzierten Entfaltungverhalten zu erkennen. Auch hier erfolgte eine Flächennormierung der gemessenen Emissionsspektren mithilfe von Gleichung (2.1), die in Ab-

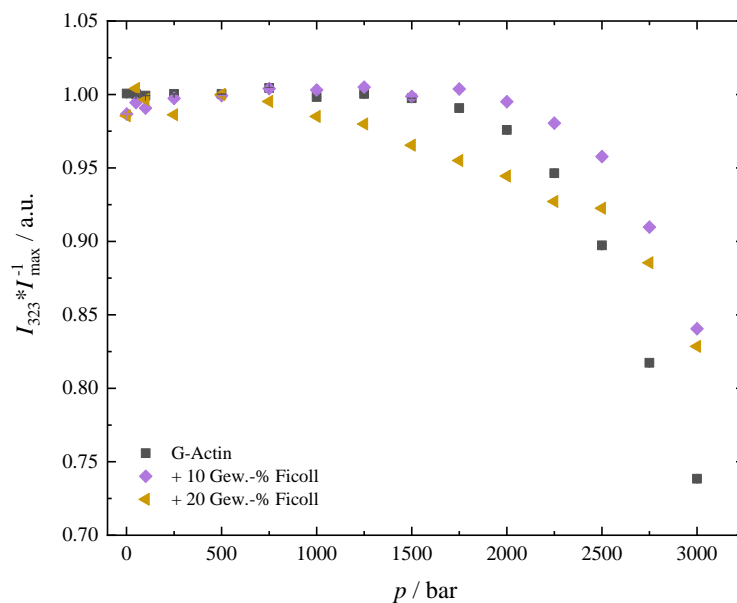


**Abbildung 2.15** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von 5 µM G-Actin in Anwesenheit von 10 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25 °C. Mit steigendem Druck ist sowohl eine geringfügige Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.

bildung 2.15b dargestellt sind. Zu erkennen ist eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 323 nm, dem Emissionsmaximum von G-Actin im gefalteten Zustand, sowie eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums mit zunehmendem hydrostatischem Druck. Diese Rotverschiebung indiziert den Eintritt in den Entfaltungsprozess von G-Actin. Die eingesetzten 10 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 entsprechen einer Konzentration von 2.85 mmol L<sup>-1</sup>. Somit ist der Raum, der dem G-Actin zur Verfügung steht, stark begrenzt.

Bei hohen hydrostatischen Drücken ist allerdings keine Überlagerung der flächennormierten Emissionsspektren zu erkennen, was darauf schließen lassen könnte, dass der an dieser Hochdruckanlage maximal mögliche Druck von 3000 bar nicht ausreicht, um G-Actin in den entfalteten Zustand überführen zu können.

Um nun den Einfluss von Ficoll<sup>®</sup> PM 70 auf die Volumenänderung während des Entfaltungsprozesses zu untersuchen und mit G-Actin in Abwesenheit des Crowders zu vergleichen, wurden bei den druckabhängigen Messungen von G-Actin in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Ficoll<sup>®</sup> PM 70 jeweils die flächennormierte Fluoreszenzintensität bei der konstant gehaltenen Wellenlänge 323 nm, dem nativen Emissionsmaximum von G-Actin, mithilfe von Gleichung (2.5) um den



**Abbildung 2.16** – Entfaltungskurven von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin, sowie in Anwesenheit von 10 und 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 bei einer Temperatur von 25  $^{\circ}\text{C}$ . Aufgetragen ist die mit NATA korrigierte, flächennormierte Fluoreszenzintensität bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 323 \text{ nm}$ , die wegen der vorhandenen Lichtstreuung auf  $I_{\text{max}}$  normiert wurden, gegen den jeweiligen hydrostatischen Druck  $p$ .

intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan korrigiert. Das in den aufgenommenen Emissionsspektren vorhandene Streulicht wird bei der mithilfe von Gleichung (2.1) durchgeführten Flächennormierung mit eingerechnet. Je mehr Streulicht in den Emissionsspektren vorhanden ist, desto größer wird die Fläche unter den Emissionsspektren, wodurch die Fluoreszenzintensität bei der gewählten Wellenlänge von 323 nm kleiner wird. Um nun die erhaltenen Entfaltungskurven besser miteinander vergleichen zu können, erfolgte zusätzlich eine Normierung auf das jeweilige Emissionsmaximum. Die auf diese Weise erhaltenen Entfaltungskurven sind in Abbildung 2.16 dargestellt.

Anhand der dargestellten Entfaltungskurven wird ersichtlich, dass durch die Zugabe von 10 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 der gefaltete Zustand von G-Actin stabilisiert wird. Bei der druckinduzierten Entfaltung von reinem G-Actin startet der Entfaltungsprozess bei  $\sim 2100 \text{ bar}$ , wohingegen bei der Anwesenheit von 10 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 der Eintritt in den Entfaltungsprozess erst bei  $\sim 2300 \text{ bar}$  erfolgt, was anhand der Abnahme der flächennormierten und um den intrinsischen Druckeffekt

von Tryptophan korrigierten Fluoreszenzintensität ab diesen Drücken zu erkennen ist. Bei der Entfaltungskurve von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 wird ersichtlich, dass der gefaltete Zustand von G-Actin weiter stabilisiert wird, sodass der Eintritt in den Entfaltungsprozess erst bei einem noch höheren Druck erfolgt. Die Entfaltungskurven von G-Actin, bei denen verschiedene Konzentrationen Ficoll<sup>®</sup> PM 70 beteiligt sind, zeigen allerdings kein zweites Plateau bei hohen hydrostatischen Drücken, was den entfalteten Zustand widerspiegeln würde, da der an dieser Hochdruckanlage maximal mögliche Druck von 3000 bar nicht ausreicht, um G-Actin vollständig in den entfalteten Zustand zu überführen. Dadurch ist eine Kurvenanpassung mithilfe von Gleichung (2.6) nicht möglich, um die Volumenänderung während der druckinduzierten Entfaltung von G-Actin zu quantifizieren. Es kann lediglich eine qualitative Aussage bezüglich des Einflusses von Ficoll<sup>®</sup> PM 70 auf das Entfaltungsverhalten von G-Actin getroffen werden: Je höher die Konzentration des Crowdingmittels Ficoll<sup>®</sup> PM 70 ist, desto stabiler wird der gefaltete Zustand von G-Actin.

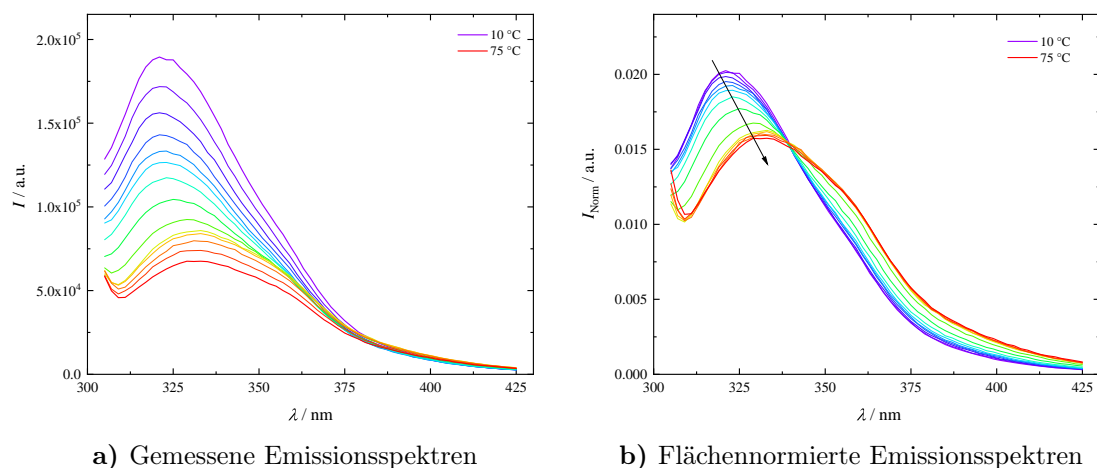
## 2.3.2 Thermostabilität von G-Actin

Ein weiterer Teil dieses Projektes war die Untersuchung der Thermostabilität von G-Actin, sowie in Anwesenheit von verschiedenen Cosolventien und Crowdingmitteln mittels temperaturabhängigen fluoreszenzspektroskopischer Messungen. Dazu sollten sowohl die Entfaltungstemperatur  $T_m$ , also die Temperatur, bei der je 50 % G-Actin im gefalteten bzw. entfalteten Zustand vorliegen, als auch die resultierende VAN'T HOFFSche Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{vH}^\circ$ , die widerspiegelt, wie viel Energie benötigt wird, um G-Actin zu denaturieren, bestimmt werden. Des Weiteren sollten aus der VAN'T HOFFSchen Umwandlungsenthalpie die beiden thermodynamischen Größen Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie  $\Delta G_u^\circ$  und die Entropieänderung der Entfaltung  $\Delta S_u^\circ$  abgeleitet werden.

### 2.3.2.1 Temperaturabhängige Entfaltung von G-Actin

Zur Untersuchung des Entfaltungsverhaltens von G-Actin wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305–425 nm in einem Temperaturbereich von 10–75 °C bei 1 bar aufgenommen, wobei die Anregung bei einer Wellenlänge von 295 nm erfolgte, um nur die Tryptophanreste anzuregen. In Abbildung 2.17a sind die aufgenommenen temperaturabhängigen Emissionsspektren von 5  $\mu$ M G-Actin bei einem Druck von 1 bar dargestellt.

Es lassen sich sowohl eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität als auch eine Rotverschiebung der Emissionsbande mit steigender Temperatur erkennen. Das Emissionsmaximum von gefaltetem G-Actin bei einer Temperatur von 10 °C liegt bei 321 nm und verschiebt sich mit steigender Temperatur bis auf 333 nm. Im Vergleich zu den durchgeführten druckabhängigen Messungen liegt das Emissionsmaximum von gefaltetem G-Actin leicht blauverschoben. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die temperaturabhängigen Messungen in Quarzküvetten durchgeführt wurden, wohingegen die druckabhängigen Messungen in dem in Abbildung 2.2 dargestellten Hochdruckautoklav stattfanden. In diesem muss das einfallende Licht, bevor es die Probe in den Quarzglasfläschchen erreicht, zuerst dickere Saphirglasscheiben passieren. Das einfallende Licht wird dadurch öfters gebrochen und kann eine Verschiebung



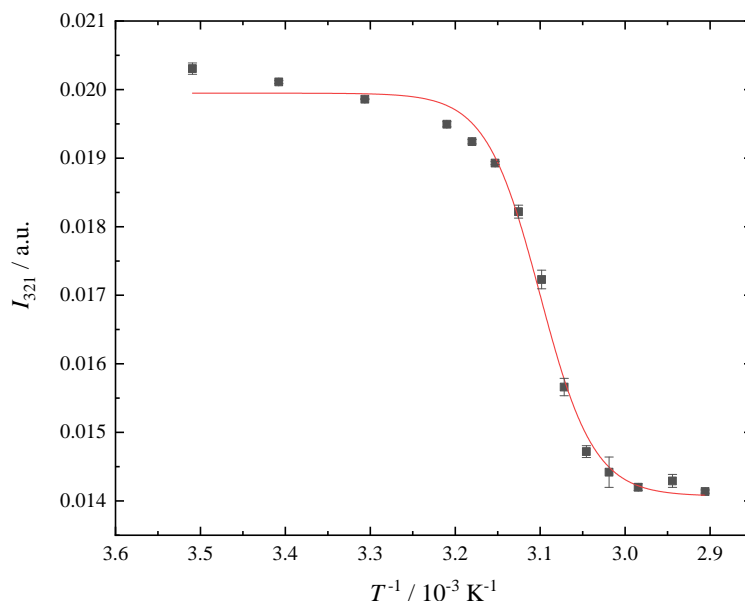
**Abbildung 2.17** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in einem Temperaturbereich von 10–75  $^{\circ}\text{C}$  bei einem Druck von 1 bar. Mit steigender Temperatur ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Temperaturgradienten.

der Emissionsbande hervorrufen.

Anschließend erfolgte, wie auch schon bei den druckabhängigen Messungen, eine Flächennormierung der einzelnen Emissionsspektren mithilfe von Gleichung (2.1), die in Abbildung 2.17b dargestellt sind. Mithilfe der Flächennormierung sind die Abnahme der Fluoreszenzintensität und die Rotverschiebung mit steigender Temperatur deutlicher zu erkennen. Das Emissionsmaximum des gefalteten Zustandes liegt bei 321 nm. Bei dieser Wellenlänge ist die größte temperaturabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität zu erkennen, welche die Entfaltung von G-Actin repräsentiert. Ab einer Temperatur von etwa 58  $^{\circ}\text{C}$  zeigen die flächennormierten Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin einen quasi identischen Verlauf und überlagern sich, was sich durch den Abschluss des Entfaltungsprozesses erklären lässt.

Für die Untersuchung des temperaturabhängigen Entfaltungsprozesses erfolgte eine Auftragung der flächennormierten Fluoreszenzintensität bei der konstanten Wellenlänge von  $\lambda = 321$  nm gegen die jeweilige reziproke Kelvin-Temperatur in Abbildung 2.18. Eine Korrektur um den intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan mithilfe von Gleichung (2.5) erfolgte nicht, da alle temperaturabhängigen Messungen bei einem konstanten Druck von 1 bar durchgeführt wurden. Bis zu einer Temperatur





**Abbildung 2.18** – Entfaltungskurve von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin bei einem Druck von 1 bar. Aufgetragen ist die flächennormierte Fluoreszenzintensität bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 321 \text{ nm}$  gegen die jeweilige reziproke Kelvin-Temperatur. Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (2.9).

von  $\sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$  verläuft die flächennormierte Fluoreszenzintensität nahezu konstant, was den gefalteten Zustand von G-Actin widerspiegelt. Die Proteinstruktur von G-Actin ist in diesem Temperaturbereich stabil und der Entfaltungsprozess hat noch nicht begonnen.

Zwischen  $43$  und  $58 \text{ }^\circ\text{C}$  sinkt die flächennormierte Fluoreszenzintensität konstant ab. Dabei entspricht die Steigung am Wendepunkt der sigmoidalen Kurve der VAN'T HOFFSchen Umwandlungsenthalpie. Ab einer Temperatur von etwa  $61 \text{ }^\circ\text{C}$  verläuft die flächennormierte Fluoreszenzintensität nahezu konstant, was bei einem Zwei-Zustands-Modell dem zweiten Plateau, das des entfaltenen Zustandes, entspricht. Zur Bestimmung der Entfaltungstemperatur  $T_m$  und der VAN'T HOFFSchen Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{\text{vH}}^\circ$  erfolgte eine Kurvenanpassung mithilfe der Computersoftware *Origin Pro 2015* und deren Boltzmann-Fit, der folgender Formel entspricht:<sup>[227]</sup>

$$I(T) = \frac{I_F - I_U}{1 + e^{-(1/T_m - 1/T) \cdot (\Delta H_{\text{vH}}^\circ / R)}} + I_U \quad (2.9)$$

Hierbei entsprechen  $I_U$  und  $I_F$  den Plateauwerten der flächennormierten Fluoreszenzintensität.

reszenzintensitäten im entfalteten (U) und gefalteten Zustand (F),  $R$  der Universalen Gaskonstante,  $\Delta H_{\text{vH}}^\circ$  der Enthalpieänderung während des Entfaltungsprozesses,  $T$  der jeweiligen Temperatur und  $T_m$  der Entfaltungstemperatur, bei der jeweils 50 % gefaltet und entfaltet vorliegen. Durch die Anwendung dieser Kurvenanpassung ist eine direkte Bestimmung der Entfaltungstemperatur  $T_m$  sowie der VAN'T HOFFSchen Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{\text{vH}}^\circ$  während des Entfaltungsprozesses aus den gemessenen fluoreszenzspektroskopischen Daten möglich.<sup>[227]</sup>

Die Kurvenanpassung der Entfaltungskurve ergab für die Entfaltungstemperatur einen Wert von  $49.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$  und für die VAN'T HOFFSche Umwandlungsenthalpie einen Wert von  $261.8 \pm 19.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ , die in denselben Größenordnungen liegen, wie gefundene Literaturangaben.<sup>[233]</sup> Bei der Entfaltungstemperatur besitzt die Gleichgewichtskonstante den Wert 1, demzufolge ist laut Gleichung (2.7)  $\Delta G_u^\circ(T_m) = 0$ , wobei der Standard-Zustand durch  $c^\circ = 1 \text{ mol L}^{-1}$  gegeben ist. Hieraus wird ersichtlich, dass G-Actin sich entfaltet, sobald die Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie einen negativen Wert erreicht. Mithilfe der ermittelten Entfaltungstemperatur, sowie der VAN'T HOFFSchen Umwandlungsenthalpie lässt sich die Entropieänderung während der Entfaltung  $\Delta S_u^\circ(T_m)$  bei der Entfaltungstemperatur mittels folgender Gleichung bestimmen, deren Wert positiv ist:<sup>[42,234]</sup>

$$\Delta S_u^\circ(T_m) = \frac{\Delta H_u^\circ(T_m)}{T_m} \quad (2.10)$$

Die Temperaturabhängigkeit der Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie ergibt sich aus folgender Gleichung:<sup>[234]</sup>

$$\begin{aligned} \Delta G_u^\circ(T) &= \Delta G_u^\circ(T_m) + \left( \frac{\partial \Delta G_u^\circ}{\partial T} \right)_p \cdot (T - T_m) \\ &= -\Delta S_u^\circ(T_m) \cdot (T - T_m) \end{aligned} \quad (2.11)$$

Diese Gleichung gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, dass sich die Wärmekapazitätsänderung während der Entfaltung nicht ändert, sodass  $\Delta C_p^\circ = 0$  ist.<sup>[227]</sup> Unter dieser Annahme bleiben sowohl die Enthalpie- als auch die Entropieänderung während der Entfaltung für jede beliebige Temperatur gleich.

**Tabelle 2.3** – Thermodynamische Analyse der temperatur-induzierten Entfaltung von 5  $\mu$ M G-Actin in Abwesenheit sowie von 5  $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit verschiedener Cosolventien und Crowdingmitteln. Die Entfaltungstemperatur  $T_m$  sowie die VAN'T HOFFSche Umwandelungsenthalpie  $\Delta H_{vH}^\circ$  wurden mithilfe einer Kurvenanpassung mit Gleichung (2.9) bestimmt. Daraus wurden mithilfe von Gleichung (2.10) die Entropieänderung während der Entfaltung  $\Delta S_u^\circ$  bei der Entfaltungstemperatur sowie die Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie  $\Delta G_u^\circ$  mithilfe von Gleichung (2.11) bei 25  $^\circ$ C bestimmt.

Probe	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{vH}^\circ(T_m) / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_u^\circ(T_m) / \text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$\Delta G_u^\circ(298.15 \text{ K}) / \text{kJ mol}^{-1}$
G-Actin	49.4 $\pm$ 0.3	261.8 $\pm$ 19.3	812 $\pm$ 60	19.8 $\pm$ 1.5
+ 1 M Harnstoff	47.4 $\pm$ 0.3	290.8 $\pm$ 22.9	907 $\pm$ 71	20.3 $\pm$ 1.6
+ 2 M Harnstoff	43.6 $\pm$ 0.2	331.9 $\pm$ 23.8	104 $\pm$ 75	19.5 $\pm$ 1.4
+ 1 M TMAO	53.4 $\pm$ 0.3	304.8 $\pm$ 26.9	933 $\pm$ 82	26.5 $\pm$ 2.4
+ 2 M TMAO	57.5 $\pm$ 0.3	320.7 $\pm$ 30.5	970 $\pm$ 92	31.5 $\pm$ 3.0
+ 1 M TMAO + 1 M Harnstoff	51.7 $\pm$ 0.4	265.3 $\pm$ 25.8	817 $\pm$ 79	21.8 $\pm$ 2.1
+ 1 M TMAO + 2 M Harnstoff	49.0 $\pm$ 0.2	293.5 $\pm$ 20.5	911 $\pm$ 64	21.9 $\pm$ 1.5
+ 2 M TMAO + 1 M Harnstoff	55.3 $\pm$ 0.3	294.6 $\pm$ 24.7	897 $\pm$ 75	27.2 $\pm$ 2.3
+ 5 Gew.-% Ficoll	50.5 $\pm$ 0.4	265.4 $\pm$ 25.7	820 $\pm$ 79	20.9 $\pm$ 2.1
+ 10 Gew.-% Ficoll	53.3 $\pm$ 0.5	236.9 $\pm$ 29.7	726 $\pm$ 91	20.5 $\pm$ 2.6
+ 20 Gew.-% Ficoll	59.5 $\pm$ 2.7	110.9 $\pm$ 33.0	333 $\pm$ 99	11.5 $\pm$ 3.5

Mithilfe von Gleichung (2.10) wurde zunächst die Entropieänderung während der Entfaltung zu  $812 \pm 60 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  bestimmt, um anschließend mithilfe von Gleichung (2.11) die Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie von reinem G-Actin bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  zu  $19.8 \pm 1.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  zu bestimmen. Die ermittelten thermodynamischen Größen sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

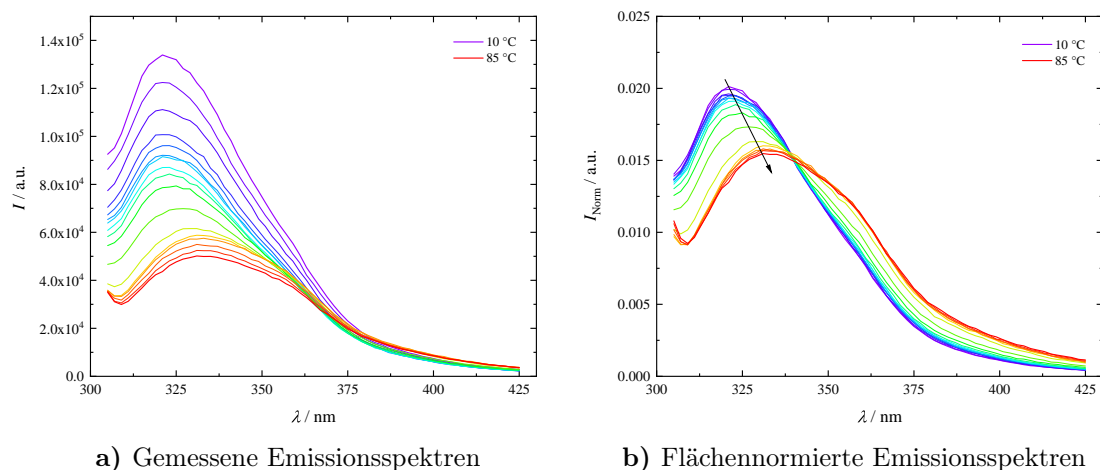
Das hier verwendete Zwei-Zustands-Modell zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter, beruht auf einer vollständigen Reversibilität des Entfaltungsprozesses. Während alle druckabhängigen Untersuchungen des Entfaltungsprozesses von  $5 \mu\text{M}$  G-Actin vollständig reversibel sind, sind die temperaturabhängigen Entfaltungskurven nur teilweise reversibel, falls die höchsten Temperaturen erreicht werden. Oftmals wird sich bei der Untersuchung des thermischen Entfaltungsprozesses von einem einfachen Entfaltungsmodell mit nur zwei Zuständen distanziert. [\[233,235\]](#) Daher müssen die temperaturabhängigen thermodynamischen Parameter mit gewisser Vorsicht betrachtet werden. Diese Tatsache ist allerdings kein großer Nachteil für diese Studie, da das Interesse im Wesentlichen den relativen Änderungen der thermodynamischen Parameter durch die Zugabe von Cosolventien und Crowdern gewidmet ist.

### 2.3.2.2 Einfluss von TMAO auf die Thermostabilität von G-Actin

Im folgenden Teil erfolgte eine Untersuchung des Entfaltungsverhaltens von G-Actin in Anwesenheit von 1 und 2 M TMAO. Dafür wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305–425 nm in einem Temperaturbereich von 10–85 °C bei 1 bar aufgenommen. Auch hier erfolgte die Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm, um nur die Tryptophanreste anzuregen.

In Abbildung 2.19a sind beispielhaft für die Untersuchungen des Einflusses von TMAO auf das temperaturabhängige Entfaltungsverhalten von G-Actin die aufgenommenen Emissionsspektren von 5  $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit von 2 M TMAO in einem Temperaturbereich von 10–85 °C bei einem Druck von 1 bar dargestellt, während in Abbildung 2.19b die dazugehörigen mithilfe von Gleichung (2.1) auf ihre Fläche normierten Emissionsspektren abgebildet sind. In beiden Darstellungen lassen sich sowohl eine Rotverschiebung der Emissionsbande von Tryptophan als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur erkennen. Die gemessenen und auf die Fläche normierten Emissionsspektren von 5  $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit von 1 M TMAO sind in Abbildung 2.29 in Abschnitt 2.5.1 des Anhangs abgebildet.

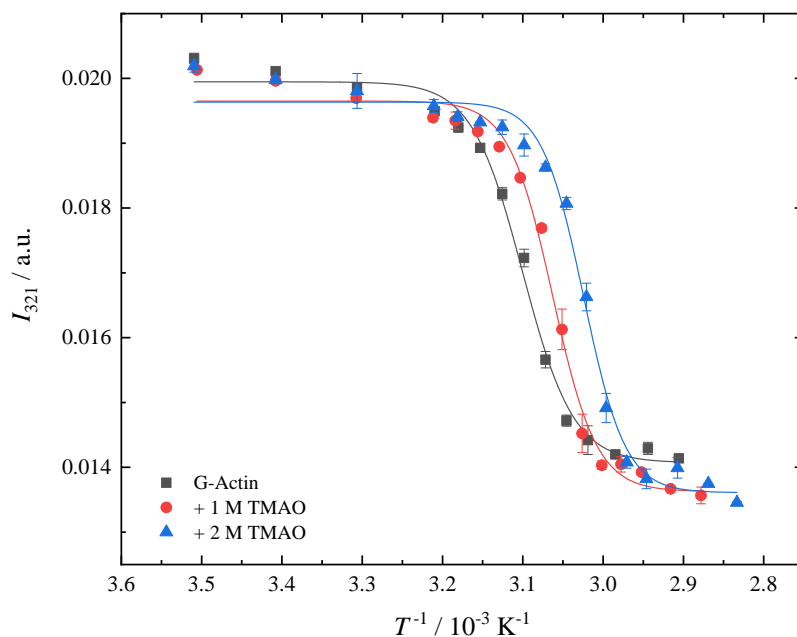
Zu Beginn der Messreihe (10 °C) liegt das Emissionsmaximum des gefalteten Zustandes von G-Actin bei 321 nm und verschiebt sich mit zunehmender Temperatur, bis es bei 85 °C bei 333 nm liegt. Bei dem Emissionsmaximum im gefalteten Zustand (321 nm) ist die größte temperaturabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Bei der Betrachtung der flächennormierten Emissionsspektren wird ersichtlich, dass zu Beginn der Messreihe die flächennormierten Emissionsspektren fast übereinander liegen und so den temperaturstabilen gefalteten Zustand von G-Actin widerspiegeln. Steigt nun die Temperatur an, so verschiebt sich die Emissionsbande ins Rötliche und die Fluoreszenzintensität nimmt ab. Ab einer Temperatur von  $\sim 67$  °C verlaufen die einzelnen Emissionsspektren wieder nahezu identisch und spiegeln so den entfalteten Zustand wieder. Der beschriebene temperaturabhängige Verlauf der Emissionsspektren lässt somit darauf schließen, dass der Entfaltungsprozess von G-Actin einem Zwei-Zustands-Modell folgt.



**Abbildung 2.19** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von  $5 \mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von  $2 \text{M}$  TMAO in einem Temperaturbereich von  $10\text{--}85 \text{ }^\circ\text{C}$  bei einem Druck von  $1 \text{ bar}$ . Mit steigender Temperatur ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Temperaturgradienten.

Um nun den Einfluss des Osmolyten TMAO auf das temperaturabhängige Entfaltungsverhalten von G-Actin zu untersuchen, erfolgte eine Auftragung der flächennormierten Fluoreszenzintensität sowohl der Messreihe von G-Actin in Anwesenheit von  $1 \text{ M}$  TMAO als auch in Anwesenheit von  $2 \text{ M}$  TMAO bei der konstanten Wellenlänge von  $\lambda = 321 \text{ nm}$  gegen die jeweilige reziproke Kelvin-Temperatur in Abbildung 2.20.

Die gezeigten Entfaltungskurven lassen annehmen, dass der Entfaltungsprozess einem Zwei-Zustands-Modell folgt. Die drei gezeigten Entfaltungskurven zeigen zu Beginn der temperaturabhängigen Messungen einen stationären Bereich auf, der den gefalteten Zustand von G-Actin repräsentiert. Mit weiter ansteigender Temperatur verlassen nun die flächennormierten Fluoreszenzintensitäten ihr jeweiliges Plateau und sinken ab, bis sie gegen Ende der Temperaturerhöhung wieder konstant verlaufen und so den entfalteten Zustand von G-Actin wiedergeben. Die Steigung am Wendepunkt der sigmoidalen Kurve, der die Entfaltungstemperatur angibt, entspricht der VAN'T HOFFSchen Umwandlungsenthalpie. Beide thermodynamischen Parameter wurden mithilfe von Gleichung (2.9) direkt aus den Entfaltungskurven ermittelt und sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Durch die Kurvenanpassung



**Abbildung 2.20** – Entfaltungskurven von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Abwesenheit sowie in Anwesenheit von 1 und 2 M TMAO bei einem Druck von 1 bar. Aufgetragen ist die flächennormierte Fluoreszenzintensität bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 321$  nm gegen die jeweilige reziproke Kelvin-Temperatur. Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (2.9).

wird ersichtlich, dass die Entfaltungstemperatur von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin um  $\sim 4^\circ\text{C mol}^{-1}$  TMAO zunimmt. Die ermittelten Entfaltungstemperaturen zeigen einen sehr kleinen Fehler, wodurch sich sagen lässt, dass diese Methode zur Bestimmung der Entfaltungstemperatur sehr empfindlich ist und die durchgeführte Kurvenanpassung sehr gut zu den experimentell bestimmten Daten passt. Die mithilfe von Gleichung (2.11) ermittelte Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie bei  $25^\circ\text{C}$  steigt von  $19.8 \pm 1.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  in reiner Pufferlösung auf  $26.5 \pm 2.4 \text{ kJ mol}^{-1}$  in Anwesenheit von 1 M TMAO und weiter auf  $31.5 \pm 3.0 \text{ kJ mol}^{-1}$  in Anwesenheit von 2 M TMAO (Tabelle 2.3). Einige Studien haben gezeigt, dass TMAO in der Lage ist, die Proteininstabilität ohne direkte Wechselwirkung mit Proteingruppen zu erhöhen, sondern eher die Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen polaren Gruppen und dem umliegenden Wasser abschwächt,<sup>[104,116]</sup> was auch eine Erklärung für die ähnlich bestimmten Enthalpieänderungen während der Entfaltung von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in An- und Abwesenheit verschiedener Cosolventien sein könnte (Tabelle 2.3).

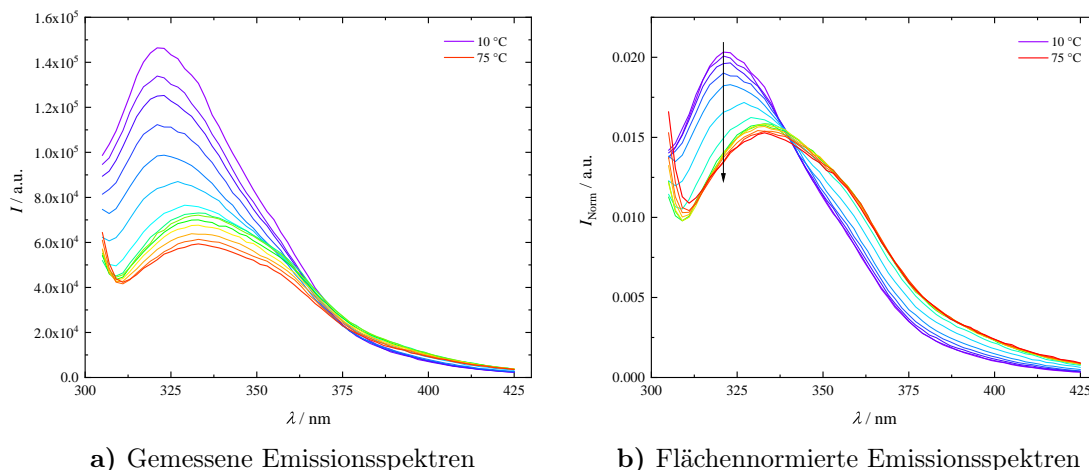
### 2.3.2.3 Einfluss von Harnstoff auf die Thermostabilität von G-Actin

Neben der Erforschung des thermischen Entfaltungsverhaltens von G-Actin in Anwesenheit des Osmolyten TMAO erfolgte auch eine Untersuchung des Entfaltungsverhaltens von G-Actin in Anwesenheit von 1 und 2 M Harnstoff. Dafür wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305–425 nm in einem Temperaturbereich von 10–85 °C bei 1 bar aufgenommen. Auch hier erfolgte die Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm, um nur die Tryptophanreste anzuregen.

Abbildung 2.21a zeigt beispielhaft für die Untersuchungen des Einflusses von Harnstoff auf das temperaturabhängige Entfaltungsverhalten von G-Actin die aufgenommenen Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 2 M Harnstoff in einem Temperaturbereich von 10–75 °C bei einem Druck von 1 bar, während in Abbildung 2.21b die dazugehörigen, mithilfe von Gleichung (2.1) auf ihre Fläche normierten, Emissionsspektren abgebildet sind. In beiden Darstellungen lassen sich sowohl eine signifikante Rotverschiebung der Emissionsbande von Tryptophan als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur erkennen. Die gemessenen und auf die Fläche normierten Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 1 M Harnstoff sind in Abbildung 2.30 in Abschnitt 2.5.1 des Anhangs abgebildet.

Das Emissionsmaximum von G-Actin liegt zu Beginn der Messreihe (10 °C), im gefalteten Zustand, bei 321 nm und verschiebt sich mit zunehmender Temperatur auf einen Wert von 333 nm bei einer Temperatur von 75 °C. Bei dieser gewählten Wellenlänge ist die größte temperaturabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Bei einer Betrachtung der flächennormierten Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 2 M Harnstoff wird ersichtlich, dass zu Beginn der Messreihe die auf ihre Fläche normierten Emissionsspektren fast übereinander liegen und somit den gefalteten Zustand widerspiegeln. Mit steigender Temperatur erfolgt sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Intensitätsabnahme der Emissionsbande (Abbildung 2.21b). Auch hier lässt sich bei der Betrachtung der flächennormierten Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 2 M Harnstoff erkennen, dass der Entfaltungsprozess einem Zwei-Zustands-Modell folgt.

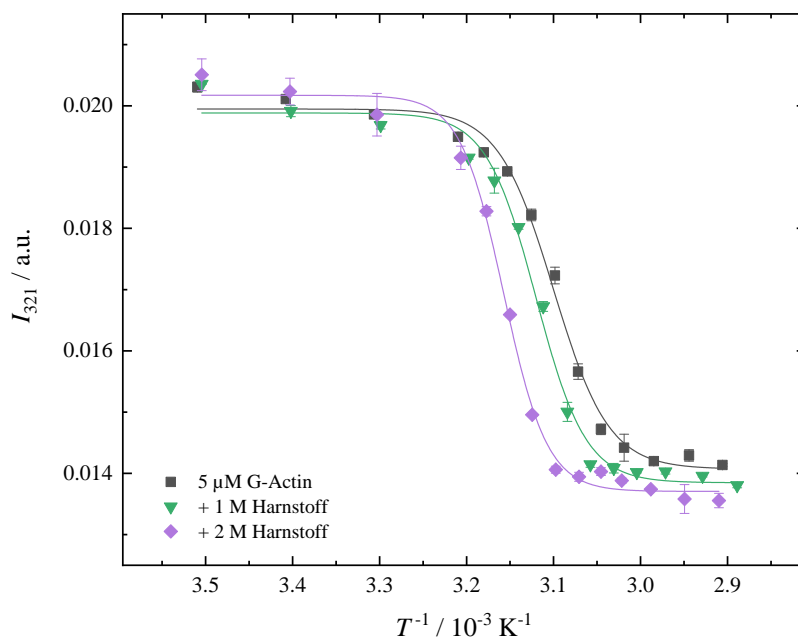




**Abbildung 2.21** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 2 M Harnstoff in einem Temperaturbereich von 10–75  $^{\circ}\text{C}$  bei einem Druck von 1 bar. Mit steigender Temperatur ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Temperaturgradienten.

Um den Einfluss von Harnstoff auf das thermische Entfaltungsverhalten von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin zu untersuchen, erfolgte eine Auftragung der flächennormierten Fluoreszenzintensität der Messreihe von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin sowohl in Anwesenheit von 1 M Harnstoff als auch in Anwesenheit von 2 M Harnstoff bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 321 \text{ nm}$  gegen die jeweilige reziproke Kelvin-Temperatur in Abbildung 2.22.

Auch hier lassen die gezeigten Entfaltungskurven darauf schließen, dass der Entfaltungsprozess von G-Actin in Anwesenheit von Harnstoff einem Zwei-Zustands-Modell folgt. Zu Beginn der jeweiligen Messreihe zeigen die Entfaltungskurven von G-Actin in Anwesenheit von Harnstoff jeweils einen stationären Bereich, der den nativen, gefalteten Zustand widerspiegelt. Ab einer Temperatur von  $\sim 35^{\circ}\text{C}$  verlässt die Entfaltungskurve von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 2 M Harnstoff das ersichtliche Plateau und geht über in den Entfaltungsprozess. In diesem sinkt die flächennormierte Fluoreszenzintensität konstant bis zu einer Temperatur von  $\sim 50^{\circ}\text{C}$  ab, bevor der Kurvenverlauf wieder konstant ist und damit den entfalteten Zustand widerspiegelt. Der Wendepunkt der jeweiligen Entfaltungskurve entspricht der Entfaltungstemperatur  $T_m$ , an welcher 50% der vorhandenen Actin-Moleküle im nativen



**Abbildung 2.22** – Thermische Entfaltungskurven von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin sowie in Anwesenheit von 1 und 2 M Harnstoff bei einem Druck von 1 bar. Aufgetragen ist die flächennormierte Fluoreszenzintensität bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 321 \text{ nm}$  gegen die jeweilige reziproke Kelvin-Temperatur. Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (2.9).

und 50 % im denaturierten Zustand vorliegen. Die Steigung der Entfaltungskurve an der Entfaltungstemperatur entspricht der VAN'T HOFF'schen Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{\text{vH}}^{\circ}$ . Beide thermodynamischen Größen wurden direkt unter Verwendung von Gleichung 2.9 bestimmt und sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Die Entfaltungstemperatur  $T_{\text{m}}$  von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin sinkt von  $49.4 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$  in reiner Pufferlösung auf  $47.4 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$  in Anwesenheit von 1 M Harnstoff und weiter auf  $43.6 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  in Anwesenheit von 2 M Harnstoff (Tabelle 2.3). Die mithilfe von Gleichung (2.11) ermittelte Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie  $\Delta G_{\text{u}}^{\circ}$  bei  $25^{\circ}\text{C}$  zeigt keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu der in reiner Pufferlösung bestimmten Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie auf (Tabelle 2.3).

### 2.3.2.4 Einfluss von TMAO-Harnstoff-Gemischen auf die Thermostabilität von G-Actin

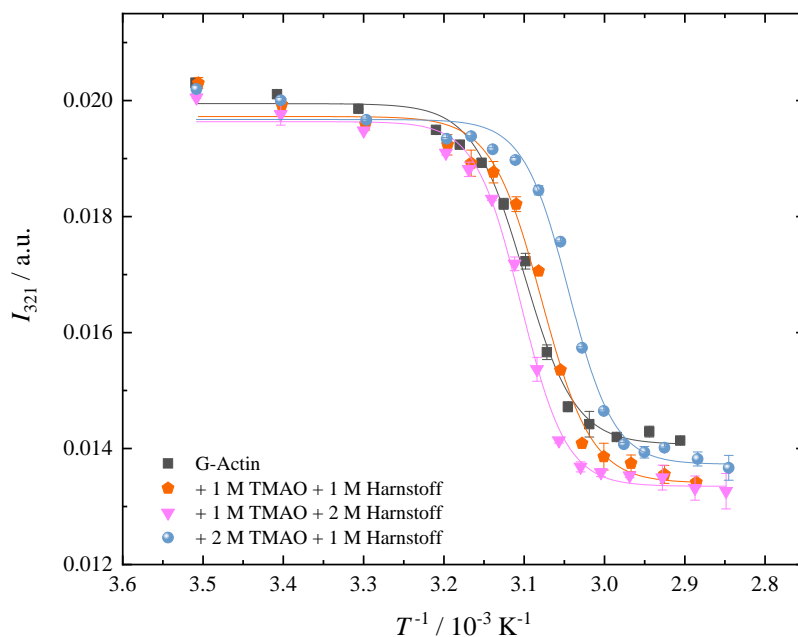
Zur Untersuchung des kombinierten Einflusses von chaotropen und kosmotropen Co-solventien auf den thermischen Entfaltungsprozess von G-Actin erfolgten, wie schon zuvor bei den druckabhängigen Untersuchungen durchgeführt, temperaturabhängige Aufnahmen von Emissionsspektren von G-Actin in Anwesenheit von den in Tabelle 2.4 aufgelisteten TMAO/Harnstoff-Mischungen in einem Wellenlängenbereich von 305–425 nm in einem Temperaturbereich von 10–80 °C und einem Druck von 1 bar. Die Anregung erfolgte ebenfalls bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm, um nur die Tryptophanreste anzuregen.

**Tabelle 2.4** – Aufzählung der benutzten TMAO/Harnstoff-Mischungen zur Untersuchung des Einflusses dieser Gemische auf das thermische Entfaltungsverhalten von 5  $\mu$ M G-Actin bei einem Druck von 1 bar.

Nr.	$c(\text{TMAO}) / \text{M}$	$c(\text{Harnstoff}) / \text{M}$
1	1	1
2	1	2
3	2	1

Die aufgenommenen temperaturabhängigen Emissionsspektren zeigen keine signifikanten Abweichungen zu den zuvor gezeigten Emissionsspektren und können der Abbildung 2.31 im Anhang (Kapitel 2.5.1) entnommen werden. Die einzeln aufgenommenen, temperaturabhängigen Emissionsspektren wurden mithilfe von Gleichung (2.1) auf ihre Fläche normiert, bevor eine Auftragung der flächennormierten Fluoreszenzintensitäten bei der konstant gehaltenen Wellenlänge von 321 nm gegen die jeweilige reziproke Kelvin Temperatur erfolgte. Die erhaltenen Entfaltungskurven für die einzelnen TMAO/Harnstoff-Mischungen sind in Abbildung 2.23 im Vergleich zur Entfaltungskurve von reinem G-Actin dargestellt.

Bei den gezeigten thermischen Entfaltungskurven lässt sich deutlich erkennen, dass zu Beginn der jeweiligen Messreihe die flächennormierten Fluoreszenzintensitäten bis zu einer Temperatur von  $\sim 40$  °C nahezu konstant verlaufen und somit den nativen Zustand widerspiegeln. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur sinken die flächennormierten Fluoreszenzintensitäten kontinuierlich ab, bis sie ab einer Tempe-



**Abbildung 2.23** – Thermische Entfaltungskurven von  $5\ \mu\text{M}$  G-Actin in Abwesenheit sowie in Anwesenheit von verschiedenen TMAO/Harnstoff-Gemischen bei einem Druck von 1 bar. Aufgetragen ist die flächennormierte Fluoreszenzintensität bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 321\ \text{nm}$  gegen die jeweilige reziproke Kelvin-Temperatur. Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (2.9).

ratur von  $\sim 60\ ^\circ\text{C}$  wieder konstant verlaufen und somit den entfalteten Zustand von G-Actin repräsentieren. Die Steigung am Wendepunkt, der die Entfaltungstemperatur  $T_m$  angibt, entspricht der VAN'T HOFF'schen Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{\text{vH}}^\circ$ . Beide thermodynamischen Parameter wurden mithilfe von Gleichung (2.9) direkt aus den Entfaltungskurven ermittelt und sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Es lässt sich deutlich erkennen, dass der destabilisierende Effekt von 2 M Harnstoff fast vollständig durch die Anwesenheit von 1 M TMAO kompensiert wird. Daraus lässt sich schließen, dass der stabilisierende Effekt von TMAO auf die Thermostabilität von G-Actin größer ist als der destabilisierende Effekt des chaotropen Osmolyten Harnstoff. Die verschiedenen TMAO/Harnstoff-Mischungen beeinflussen nicht wesentlich die VAN'T HOFF'sche Umwandlungsenthalpie (Tabelle 2.3), was bereits anhand der ähnlichen Steigungen an den jeweiligen Wendepunkten der Entfaltungskurven ersichtlich wird.

Aus den abgebildeten Entfaltungskurven von  $5\ \mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von

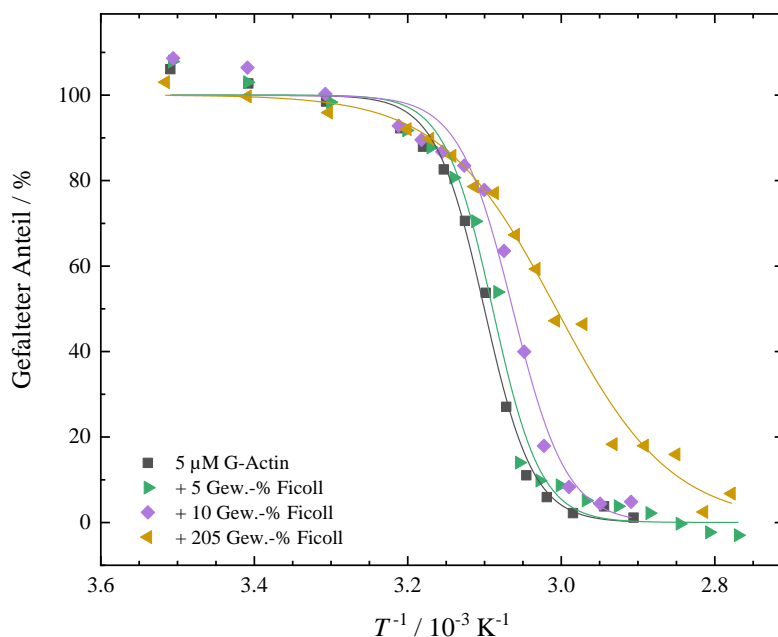
verschiedenen TMAO/Harnstoff-Mischungen wird ersichtlich, dass TMAO eine ausgeprägte stabilisierende Wirkung auf die Proteinstabilität von G-Actin besitzt und sogar der denaturierenden Wirkung von Harnstoff nicht nur entgegenwirken, sondern diese auch zum Teil aufheben kann.

### 2.3.2.5 Einfluss von Makrocrowdern auf die Thermostabilität von G-Actin

Neben der Untersuchung des Einflusses von chaotropen und kosmotropen Cosolventien auf die Thermostabilität von G-Actin erfolgten ebenfalls Untersuchungen bezüglich des Einflusses von makromolekularen Crowdern auf die Proteinstabilität. Um das zelluläre Milieu *in vitro* weiter zu imitieren, wurde Ficoll<sup>®</sup> PM 70 als makromolekulares Crowdingmittel in verschiedenen Konzentrationen der Proteinelösung hinzugefügt. Anschließend wurden in einem Temperaturbereich von 10–90 °C Emissionsspektren von 5 µM G-Actin in Anwesenheit von 5, 10 und 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 in einem Wellenlängenbereich von 305–425 nm bei einem Druck von 1 bar aufgenommen.

Abbildung 2.24 zeigt die thermischen Entfaltungskurven von 5 µM G-Actin sowie in Anwesenheit von 5, 10 und 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 bei einem Druck von 1 bar. Zwischen 10 und 43 °C sind keine signifikanten Änderungen des gefalteten Anteils bei den Entfaltungskurven von 5 µM G-Actin in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen Ficoll<sup>®</sup> PM 70 zu beobachten. Ab einer Temperatur von ~43 °C beginnt G-Actin zu entfalten und geht dabei in den Entfaltungsprozess über, der durch eine Abnahme des gefalteten Anteils zu erkennen ist. Ab einer Temperatur von ~60 °C ist das Protein fast vollständig denaturiert. Die Entfaltungstemperatur  $T_m$  steigt signifikant mit steigender Ficoll-Konzentration an (Tabelle 2.3), vergleichbar mit dem Effekt des kompatiblen Osmolyten TMAO. Studien haben gezeigt, dass Ficoll in der Lage ist, indirekt den gefalteten Zustand aufgrund eines starken destabilisierenden Effekts auf den entfalteten Zustand wegen des *excluded volume Effects* zu stabilisieren. [\[176,236,237\]](#)

Dies deutet auch darauf hin, dass destabilisierende enthalpische Effekte aufgrund schwacher Wechselwirkungen mit dem makromolekularen Crowder weitgehend feh-

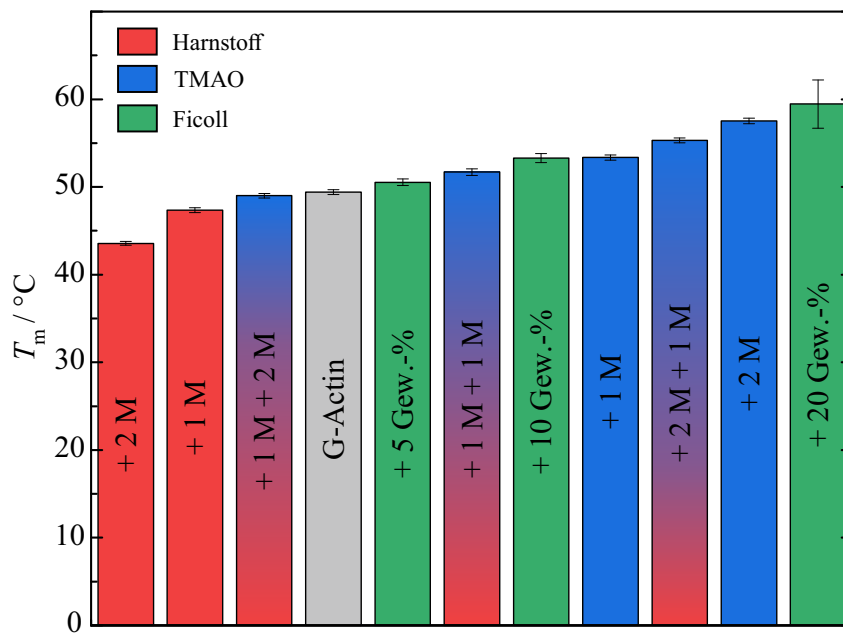


**Abbildung 2.24** – Thermische Entfaltungskurven von  $5\ \mu\text{M}$  G-Actin in Abwesenheit sowie in Anwesenheit von 5, 10 und 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 bei einem Druck von 1 bar. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität von Tryptophan bei der Wellenlänge  $\lambda = 321\ \text{nm}$ , anschließend auf die Fläche normiert und zum besseren Vergleich auf einer Skala von 0 bis 100 % normiert und gegen die jeweilige reziproke Kelvin-Temperatur aufgetragen. Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (2.9).

len. In Anwesenheit von 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70, was *in vivo*-Bedingungen in Zellen simulieren soll, steigt die Entfaltungstemperatur um  $\sim 10\ ^\circ\text{C}$  im Vergleich zu G-Actin in reiner Pufferlösung. Diese Zunahme entspricht in etwa dem Effekt, den die Anwesenheit von 2 M TMAO hervorruft.

## 2.4 Zusammenfassung

In dieser Studie sollte mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie die druck- und temperaturinduzierte Entfaltungsreaktion von G-Actin in An- und Abwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des chaotropen Cosolvens Harnstoff, des kosmotropen Osmolyten TMAO, Mischungen davon und des makromolekularen Crowders Ficoll<sup>®</sup> PM 70 darauf hin untersucht werden, ob das zelluläre Milieu die schädlichen Auswirkungen extremer Umweltbedingungen lindern kann (Abbildung 2.25). Während des thermischen Entfaltungsprozesses bei Atmosphärendruck ( $1\ \text{bar} = 0.1\ \text{MPa}$ ) wurde



**Abbildung 2.25** – Entfaltungstemperaturen  $T_m$  von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in An- und Abwesenheit von Cosolventien und Ficoll<sup>®</sup> PM 70 bei einem Druck von 1 bar.

eine Entfaltungstemperatur  $T_m$  von  $\sim 49^\circ\text{C}$  ermittelt, während bei Umgebungstemperatur ( $25^\circ\text{C}$ ) bei dem druckinduzierten Entfaltungsprozess von G-Actin ein Entfaltungsdruck  $p_u$  zu  $\sim 2700$  bar bestimmt wurde, der von einer Volumenänderung von  $-97 \text{ mL mol}^{-1}$  begleitet wird. Sowohl die Thermo- als auch die Druckstabilität von G-Actin wird durch die Anwesenheit des Stoffwechselprodukts Harnstoff verringert und in Anwesenheit des stabilisierenden Osmolyten TMAO signifikant gesteigert, was anhand der ermittelten Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie bei  $25^\circ\text{C}$  ersichtlich wird, die sich um  $\sim 5 \text{ kJ mol}^{-1}$  TMAO vergrößert.

In Anwesenheit von TMAO/Harnstoff-Gemischen wird ersichtlich, dass der Osmolyt TMAO in der Lage ist, dem destabilisierenden Effekt von Harnstoff entgegenzuwirken. Bei einem TMAO/Harnstoff-Verhältnis von 1:2 heben sich der stabilisierende Einfluss von TMAO und der destabilisierende Effekt von Harnstoff auf die Proteinstabilität fast vollkommen auf. Ein solcher Effekt auf die Stabilität des Proteins kann möglicherweise auf indirekte, d.h. durch das Lösungsmittel vermittelte Wechselwirkungen der beiden Cosolventien zurückgeführt werden. [\[238,239\]](#)

Neben der Anwesenheit von chaotropen und kosmotropen Cosolventien, wie beispielsweise TMAO und Harnstoff, erfolgten ebenfalls Messungen der Proteinstabi-

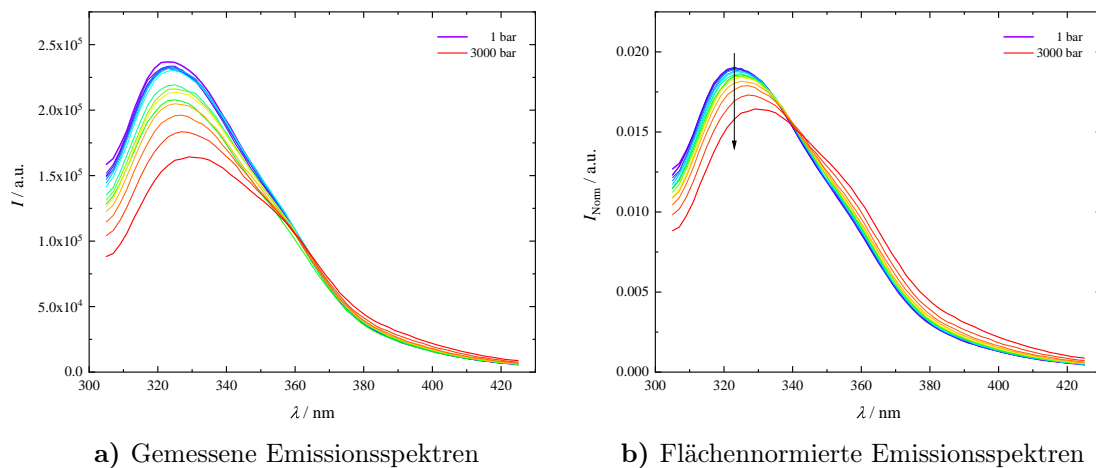
bilität von 5  $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen des makromolekularen Crowders Ficoll. Es wurde gezeigt, dass in Anwesenheit von 20 Gew.-% Ficoll, was zellähnliche Bedingungen *in vivo* nachstellen sollte, die Proteinstabilität von G-Actin in gleicher Weise gesteigert wird wie in Anwesenheit des kosmotropen Osmolyten TMAO.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch Anpassen des Niveaus kompatibler Osmolyte, wie beispielsweise TMAO, und der intrazellulären *Crowding*-Bedingungen die schädlichen Auswirkungen extremer Umgebungen, einschließlich hoher hydrostatischer Drücke, wie sie in der Tiefsee auftreten, auf die Stabilität von G-Actin weitgehend aufgehoben werden können, ohne dass dies wesentlich das Konformationsgleichgewicht der funktionalen nativen Zustände stört.

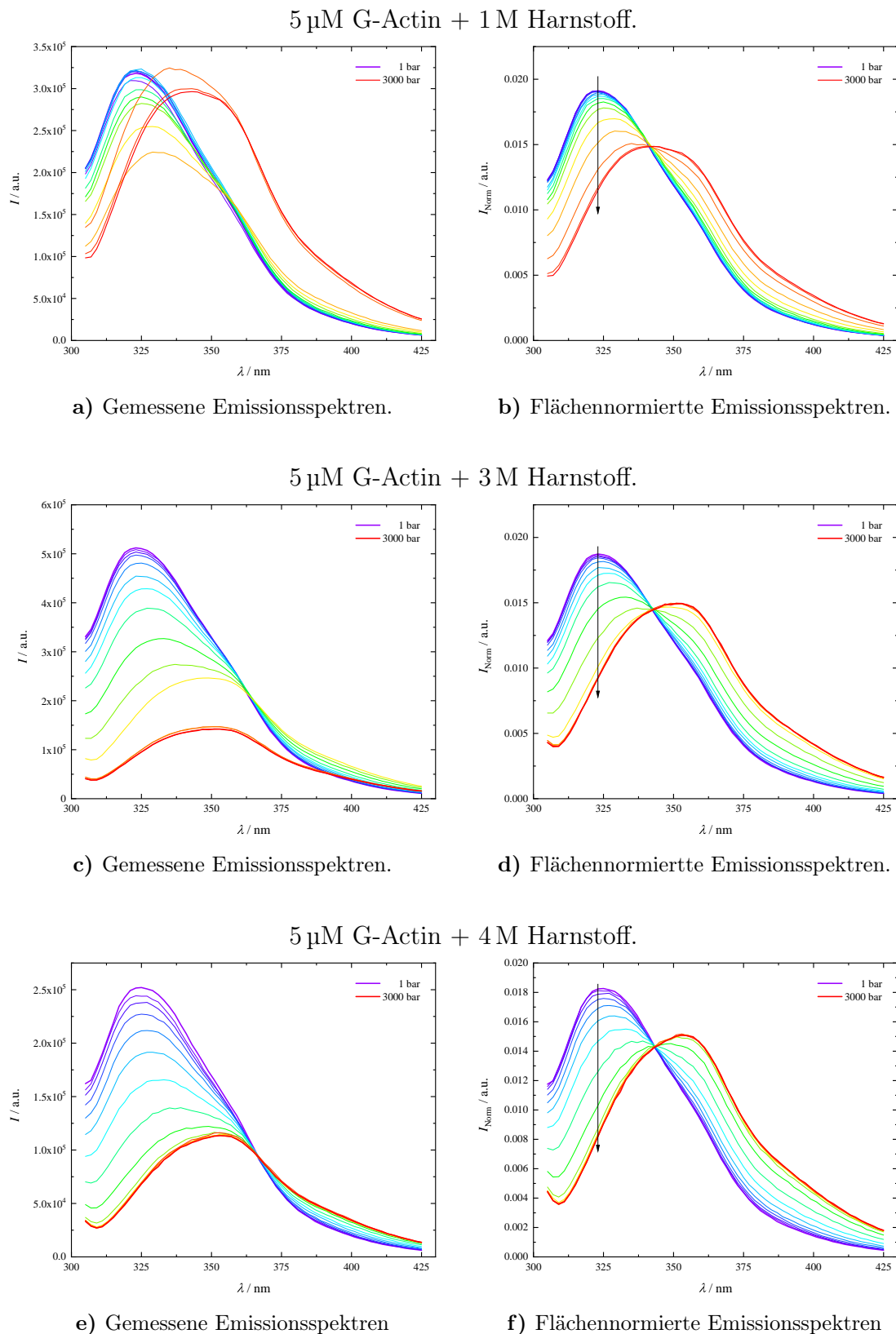


## 2.5 Anhang

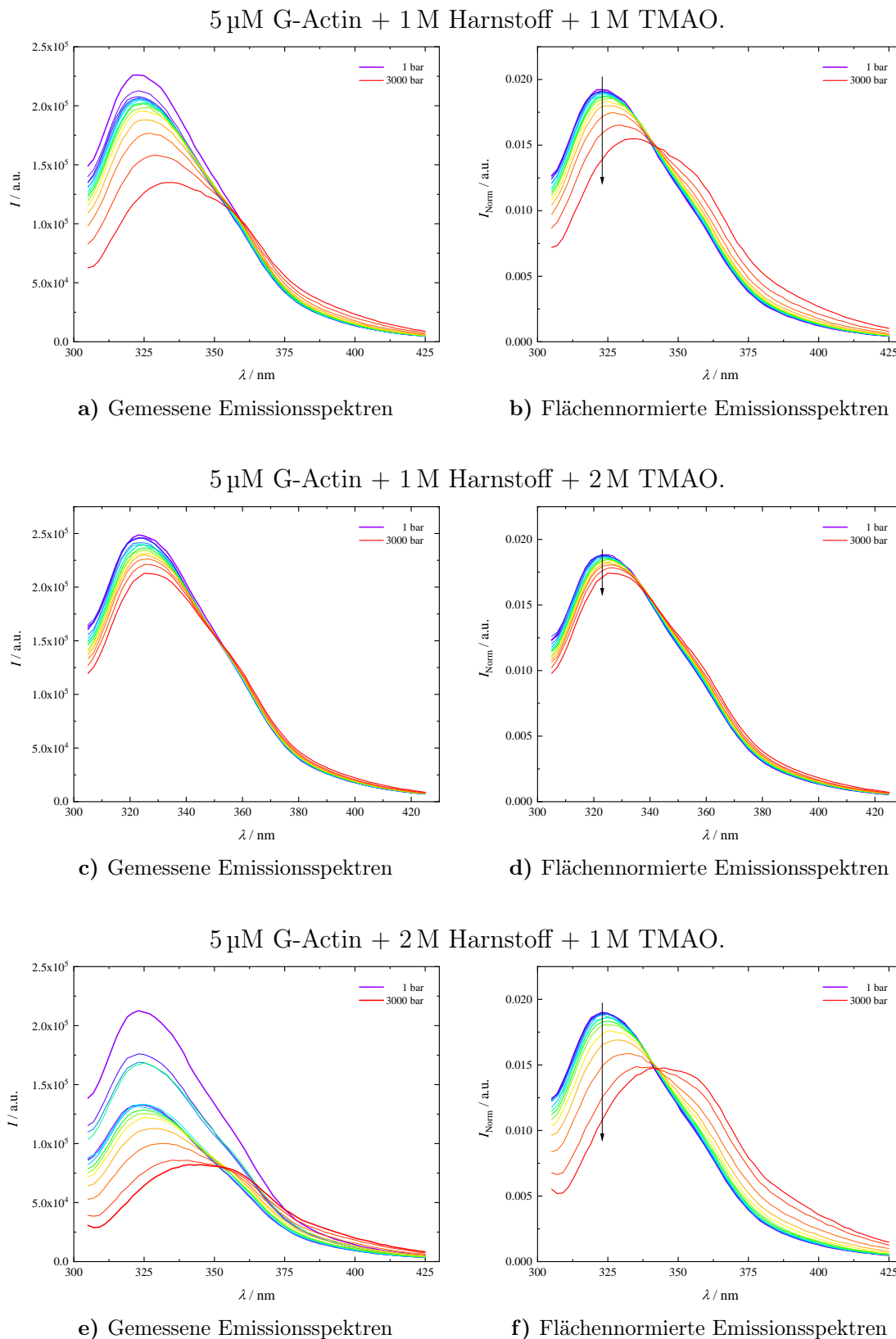
### 2.5.1 Zusätzliche Abbildungen



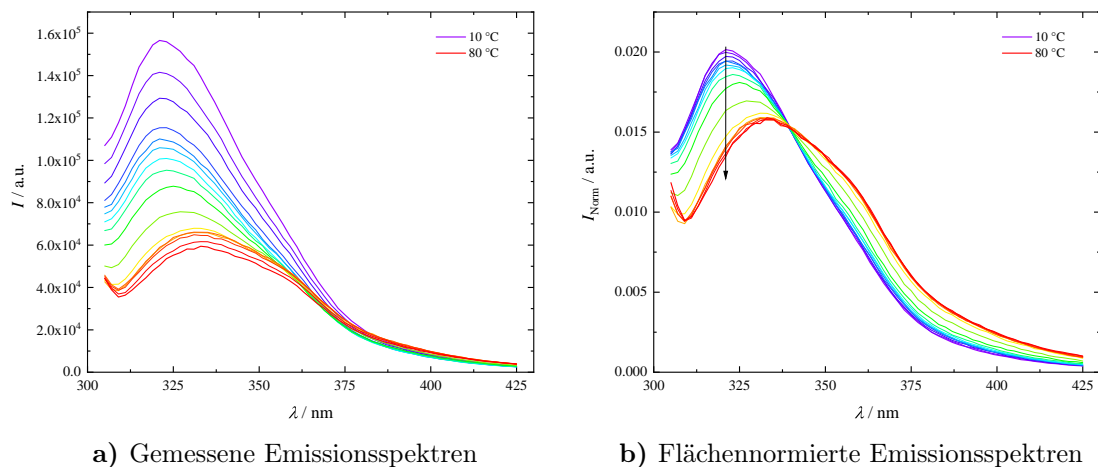
**Abbildung 2.26** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von  $5 \mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von  $1 \text{ M}$  TMAO in einem Druckbereich von  $1\text{--}3000 \text{ bar}$  bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Mit steigendem Druck ist sowohl eine geringfügige Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.



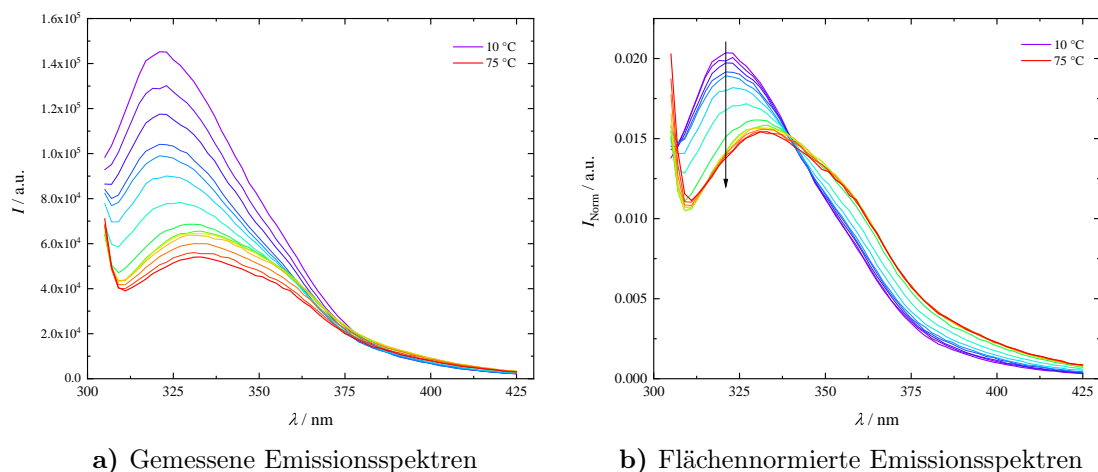
**Abbildung 2.27** – Gemessene (linke Spalte) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (rechte Spalte) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 1 M (a, b), 3 M (c, d) und 4 M (e, f) Harnstoff in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25 °C. Mit steigendem Druck ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.



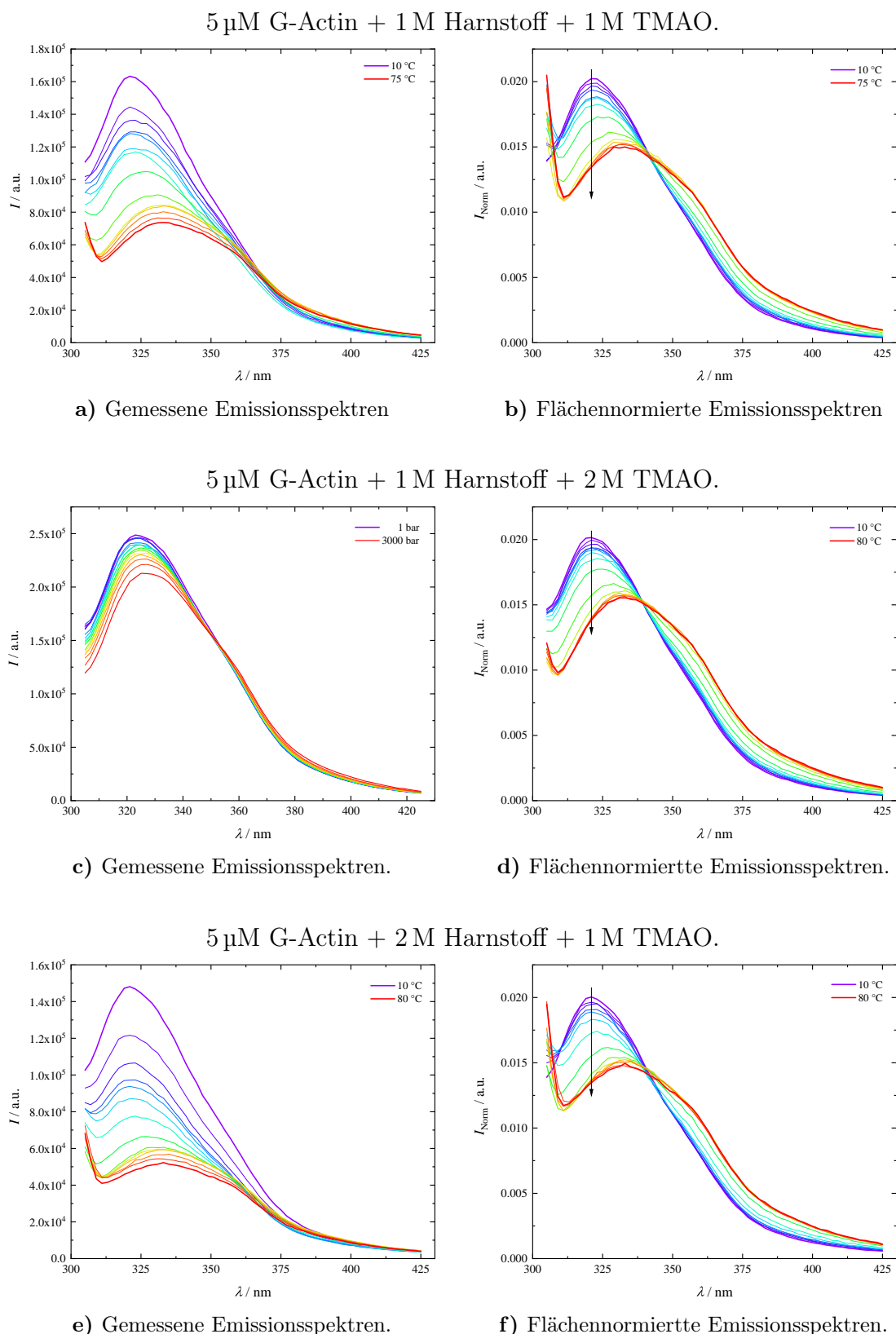
**Abbildung 2.28** – Gemessene (linke Spalte) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (rechte Spalte) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von Harnstoff/TMAO-Mischungen von 1:1 (**a**, **b**), 1:2 (**c**, **d**) und 2:1 (**e**, **f**) in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25 °C. Mit steigendem Druck ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.



**Abbildung 2.29** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 1 M TMAO in einem Temperaturbereich von 10–80  $^{\circ}\text{C}$  bei einem Druck von 1 bar. Mit steigender Temperatur ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Temperaturgradienten.



**Abbildung 2.30** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von 1 M Harnstoff in einem Temperaturbereich von 10–75  $^{\circ}\text{C}$  bei einem Druck von 1 bar. Mit steigender Temperatur ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Temperaturgradienten.



**Abbildung 2.31** – Gemessene (linke Spalte) und mithilfe von Gleichung (2.1) auf die Fläche normierte (rechte Spalte) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin in Anwesenheit von Harnstoff/TMAO-Mischungen von 1:1 (**a, b**), 1:2 (**c, d**) und 2:1 (**e, f**) in einem Temperaturbereich von 10–80  $^{\circ}\text{C}$  bei einem Druck von 1 bar. Mit steigender Temperatur ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Temperaturgradienten.



### 3 Modulation der Polymerisationskinetik von $\alpha/\beta$ -Tubulin durch Osmolyte und Macromolekulare Crowder

---

Teile dieser Studie wurden in folgender Referenz veröffentlicht:

Schummel, P. H.; Gao, M.; Winter, R. Modulation of the Polymerization Kinetics of  $\alpha/\beta$ -Tubulin by Osmolytes and Macromolecular Crowding. *ChemPhysChem*, **2017**, *18*, 189-197.<sup>[240]</sup>





## 3.1 Einleitung und Zielsetzung

Das  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimer ist eine Schlüsselkomponente des eukaryotischen Zytoskeletts, dessen Selbstassemblierungsreaktion einem molekularen Polymerisationsmotor entspricht, der für die Erzeugung der Zellbeweglichkeit, Polarität und Morphogenese verantwortlich ist und weiterhin den intrazellulären Transport und die Bildung der mitotischen Spindel während der Zellteilung steuert.<sup>[241-243]</sup>

Das  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimer polymerisiert zu hohlen Röhren mit einem Durchmesser von  $\sim 25$  nm, die als Mikrotubuli bekannt sind,<sup>[244]</sup> wobei zuerst lineare Protofilamente mit einer Kopf-Schwanz-Orientierung gebildet werden und *in vivo* sich 13 davon lateral zu einem Zylinder verbinden.<sup>[245,246]</sup> Die Polymerisationsdynamik ist an die Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) gebunden,<sup>[247]</sup> wobei jede Unter-einheit von Tubulin ein Molekül GTP bindet, aber nur das an  $\beta$ -Tubulin gebundene Nukleotid austauschbar ist und während der Polymerisation hydrolysiert wird.<sup>[248]</sup> Aufgrund dieser Asymmetrie sind die Mikrotubuli polare Strukturen, die an den beiden Enden unterschiedliche Polymerisationsgeschwindigkeiten besitzen.<sup>[249,250]</sup> Das langsam wachsende Ende ist *in vivo* an das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (engl.: *microtubule-organizing center*, MTOC) gebunden, welches als Keimbildungsstelle fungiert.<sup>[251]</sup>

Unter *in vitro*-Bedingungen benötigt es für die spontane Polymerisation ein stabiles Oligomer bzw. einen stabilen Nucleus, der aus 6-12  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimeren besteht.<sup>[252]</sup> Sobald solche Nuclei der Protofilamente gebildet sind, was dem zeitaufwändigsten Schritt während der Polymerisation der Mikrotubuli entspricht, verlängern sich diese sowohl in lateraler als auch longitudinaler Richtung.<sup>[253]</sup> Die Kinetik der Elongationsphase ist linear abhängig von der eingesetzten Tubulinkonzentration. Das Gleichgewicht der Selbstassemblierungsreaktion von Tubulin kann durch die sogenannte kritische Konzentration  $c_c$  beschrieben werden, die der Konzentration an unpolymerisierten  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimeren in Lösung entspricht, bei der die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten gleich groß sind.<sup>[254]</sup> Liegt die Konzentration an unpolymerisierten  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimeren oberhalb der kritischen Konzentration  $c_c$ , erfolgt die spontane Selbstassemblierung, während

bei einem Unterschreiten der kritischen Konzentration die gebildeten Mikrotubuli anfangen zu depolymerisieren.<sup>[248]</sup> Im Gleichgewicht erfolgen schnelle Zyklen des Auf- und Abbaus der Mikrotubuli, ein Verhalten, das als dynamische Instabilität bezeichnet und aufgrund der GTP-Hydrolyse verursacht wird, die an der Seite des  $\beta$ -Tubulins auftritt sobald ein weiteres  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimer an ein Ende der gebildeten Mikrotubuli angehängen wird.<sup>[255]</sup> Hierbei kann GTP als eine Art Kraftstoff angesehen werden, der die Polymerisation antreibt, und die Freisetzung mechanischer Spannungen, die durch die GTP-Hydrolyse induziert wird, kann als eine Art Kraftstoff angesehen werden, der die Depolymerisation antreibt,<sup>[256–258]</sup> wobei die GTP-Hydrolyse und die Phosphatfreisetzung mit großen Konformationsänderungen in den Untereinheiten einhergehen.<sup>[259]</sup>

Eine Vielzahl zusätzlicher Bindungsproteine, die sogenannten *microtubule-associated proteins*, kurz MAPs, und Signalwege regulieren *in vivo* die Bildung und die Dynamik des Nicht-Gleichgewichts der Mikrotubuli und tragen so zur Erfüllung ihrer vielen zellulären Funktionen bei.<sup>[260]</sup> Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass physikochemische Parameter wie Druck, Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke die Selbstassemblierung von Tubulin signifikant beeinflussen können.<sup>[261–265]</sup> Neben den zuvor genannten physikochemischen Parametern gibt es noch weitere Faktoren, wie beispielsweise die Anwesenheit von Osmolyten oder makromolekulare Crowder, die die Polymerisationsreaktion von Tubulin beeinflussen können und in dieser Studie verwendet werden, um zu untersuchen, welchen Effekt deren Anwesenheit auf die Polymerisationsreaktion von Tubulin besitzt. Eine detaillierte Erläuterung zu natürlichen Osmolyten kann dem Kapitel 1.3 entnommen werden.

In einer biologischen Zelle lassen sich häufig kleine chemische Verbindungen wie Methylamine, Polyole, Kohlenhydrate und Aminosäuren finden, um den osmotischen Druck innerhalb der Zelle auszugleichen und die Stabilität sowie die Funktionalität der Biomoleküle aufrechtzuerhalten.<sup>[90]</sup> Diese kleinen organische Verbindungen werden als Osmolyte oder chemische Chaperone bezeichnet.<sup>[112]</sup> Das bekannteste und gleichzeitig effektivste Osmolyt ist Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), welches sogar im Gewebe von verschiedenen, in der Tiefsee lebenden, Tieren gefunden werden kann

und dessen Konzentration mit der Meerestiefe, d.h. mit dem hydrostatischen Druck, in der diese Tiere leben, korreliert.<sup>[90,114]</sup> In einer von Yancey durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass TMAO als Piezolyt wirkt, um einem hohen hydrostatischen Druck entgegenzuwirken.<sup>[90]</sup> Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass TMAO in der Lage ist, der destabilisierenden Wirkung des Stoffwechselprodukts Harnstoff entgegenzuwirken.<sup>[87,101,107,116,197,266]</sup> Der Mechanismus der Gegenwirkung ist immer noch nicht ganz erforscht. Eine mögliche Erklärung wäre die Ausbildung eines TMAO-Harnstoff-Komplexes mittels Wasserstoffbrücken-Bindungen.<sup>[120,267,268]</sup> Im Allgemeinen wird die stabilisierende Wirkung solcher Osmolyte durch die Theorie der bevorzugten Hydratation erklärt, die darauf beruht, dass die Wechselwirkung zwischen dem Lösungsmittel, meist Wasser, und dem Osmolyt im Vergleich zu der Wechselwirkung zwischen der Proteinoberfläche und dem Osmolyt bevorzugt wird, was zu einer zunehmend geordneten Hydratationsschicht führt und damit zu einer kompakteren, weniger dynamischen Struktur des Biomoleküls mit einer geringeren, dem Lösungsmittel zugänglichen, Oberfläche (engl.: *solvent accessible surface area*, SASA).<sup>[87,100,269]</sup> Infolgedessen wird das Gleichgewicht der Proteinfaltung in Richtung des nativen Zustandes verschoben.<sup>[102]</sup>

Im Gegensatz dazu erfolgt die denaturierende Wirkung von Cosolventien, wie beispielsweise Harnstoff, durch direkte Wechselwirkungen mit dem Proteinerückgrat und polaren Seitenketten,<sup>[116]</sup> sodass der entfaltete Zustand mit einem größeren SASA bevorzugt wird. Des Weiteren können Osmolyte Fluktuationen der Konformation beeinflussen und damit die Population von „*conformational substates*“. Oftmals werden bestimmte Konformationen für Assoziations- und Bindungsreaktionen von Proteinen benötigt. So wurde beispielsweise gezeigt, dass stabilisierende Osmolyte eine Assoziationsreaktion durch die Minimierung der gesamten SASA begünstigen.<sup>[107,108,266]</sup> Es ist nur sehr wenig über den Einfluss von Cosolventien auf die Polymerisationsdynamik von Tubulin bekannt und somit *terra incognita*.

Unter dem makromolekularen Crowding-Effekt wird im Allgemeinen die Auswirkung hoher Konzentrationen von Makromolekülen innerhalb einer Zelle auf die Gleichgewichte und Kinetiken biochemischer Prozesse verstanden. Solche Makromo-

leküle können in der biologischen Zelle bis zu 30 % des Volumens einnehmen.<sup>[170,173]</sup> Bei *Crowding* handelt es sich um einen entropischen Volumenausschluss, wodurch das Gleichgewicht in Richtung kompakterer Zustände verschoben wird.<sup>[173,182]</sup> Eine detaillierte Erläuterung zu dem Thema *Crowding* kann dem Kapitel 1.4 entnommen werden. Neben dem ausgeschlossenen Volumeneffekt (engl.: *excluded volume effect*) können zusätzliche Faktoren des *Crowding*, wie beispielsweise eine veränderte Polarität des Lösungsmittels und Wasseraktivität, eine erhöhte Viskosität und anziehende unspezifische Wechselwirkungen, die Eigenschaften von Biomolekülen innerhalb ihrer physiologischen Umgebung beeinflussen.<sup>[270-272]</sup> Aus diesem Grund kann der Nettoeffekt von makromolekularem *Crowding* auf die Gleichgewichte und Kinetiken von Selbstassemblierungsreaktionen für verschiedene Proteine einen signifikanten Unterschied aufweisen. Über den *Crowding*-Effekt auf die Polymerisationsreaktion von Tubulin ist bisher nur wenig bekannt.<sup>[273]</sup> Um zellähnliche Bedingungen *in vitro* nachzustellen, werden oftmals synthetische Polymere, wie Polyethylenglykol, Dextran oder Ficoll, als makromolekulare Crowder verwendet.<sup>[182,274]</sup>

In dieser umfassenden Studie soll der Einfluss der natürlichen Osmolyte TMAO und Harnstoff sowie der makromolekulare *Crowding*-Effekt auf die Kinetik der Polymerisationsreaktion von Tubulin *in vitro* untersucht werden. Unter Verwendung der biophysikalischen Methoden der Turbidimetrie, der Fluoreszenzanisotropie und der Confocal Laser Scanning Microscopy soll gezeigt werden,<sup>[275-277]</sup> dass physikochemische Merkmale der zytosolischen Umgebung das Polymerisationsverhalten von Tubulin, einer molekularen Schlüsselreaktion, die für die Dynamik und Motilität einer jeden Zelle verantwortlich ist, beeinflussen können.

## 3.2 Material und Methoden

### 3.2.1 Materialien und Probenpräparation

$\alpha/\beta$ -Tubulin aus Kalbshirnen wurde vom *Centre of Biological Research (CSIC)* (Madrid, Spanien) als lyophilisiertes Pulver erworben, wohingegen die Cosolventien Harnstoff und Trimethylamin-*N*-oxid, der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-

2-phenylindol), und die molekularen Crowder Saccharose und Ficoll<sup>®</sup> PM 70, mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 70 kDa, von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) bezogen wurden. Zusätzlich stellte das *Centre of Biological Research (CSIC)* (Madrid, Spanien) aus Lammhirnen extrahiertes  $\alpha/\beta$ -Tubulin als lyophilisiertes Pulver bereit, um vergleichbare Messreihen durchzuführen.

Vor den jeweiligen Experimenten wurde das lyophilisierte  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Polymerisationpuffer gelöst, der 3.26 M Glycerin, 80 mM PIPES (1,4-Piperazin-diethansulfonsäure, pH6.8), 1 mM EGTA [Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure] und 1 mM DTT (1,4-Dithiothreitol) enthält, und anschließend für 10 min auf Eis gestellt und daraufhin bei  $11\,000\text{ min}^{-1}$  und  $2\text{ °C}$  für 2 min zentrifugiert, um potentielle Proteinaggregate zu entfernen.

Die Proteinkonzentration wurde durch UV/Vis-Spektroskopie mit einer 1:200-Verdünnung in einer Lösung, die 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat) und 10 mM Natriumphosphat (pH6.8) beinhaltet, bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280\text{ nm}$  mit einem Extinktionskoeffizient von  $\varepsilon_{280} = 1.15\text{ mL mg}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  bestimmt.<sup>[278]</sup>

### 3.2.2 Turbidimetrie-Messungen & Kinetikbestimmung der Polymerisation von $\alpha/\beta$ -Tubulin

Zur Vorbereitung der Messreihen wurden jeweils  $30\text{ }\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in einem Polymerisationspuffer inkubiert, der jeweils die entsprechende Menge an Cosolventien bzw. makromolekularem Crowder enthielt, und anschließend auf Eis gestellt. Vor dem jeweiligen Experiment wurden 6 mM  $\text{MgCl}_2$  und 1 mM GTP (Guanosin-5'-triphosphat) hinzugegeben. Um den Polymerisationsprozess zu verfolgen, wurde die Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340\text{ nm}$  in Zeitintervallen von 30 s bei einer Temperatur von  $37\text{ °C}$  gemessen, nachdem die Probe vorher jeweils 3 s lang geschüttelt wurde. Die Messungen der Absorptionzunahme erfolgten in einem TECAN Infinite M200 Mikrotiterplatten-Spektrometer. Die Induzierung der Polymerisationsreaktion erfolgte durch die Platzierung der Proben in eine auf  $37\text{ °C}$  vorgewärmte 96-well Mikrotiterplatte.

Eine Hintergrundkorrektur der gemessenen Turbidimetriedaten erfolgte durch Sub-

traktion der Absorption des entsprechenden Puffers ohne Tubulin. Für einen besseren Vergleich der Cosolvens- und Crowding-Effekte auf die Polymerisationsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin wurden die hintergrundkorrigierten Daten auf einer Skala von 0 bis 100 skaliert. Zur Auswertung der Kinetik wurden die normierten Änderungen der Absorption als Funktion der Zeit  $t$  aufgetragen. Der erhaltene Kurvenverlauf kann durch einen abgeänderten Boltzmann-Fit funktional beschrieben werden:<sup>[279]</sup>

$$\Delta A_{\text{Norm}} = \frac{A_i - A_f}{1 + e^{[(t-t_{1/2})/m]}} + A_f \quad (3.1)$$

Dabei entsprechen  $\Delta A_{\text{Norm}}$  der normierten Änderung in der Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm,  $A_i$  und  $A_f$  der Anfangs- bzw. Endänderung der Absorption. Der Wendepunkt  $t_{1/2}$  beschreibt hierbei die Halbwertszeit, bei der 50% der Maximaländerung der Absorption erreicht sind und kann ebenfalls als Maß der Polymerisationsgeschwindigkeit herangezogen werden. Zur Beschreibung der Wachstumsrate der gebildeten Mikrotubuli wird die apparente Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{app}}$  verwendet, die dem Kehrwert der Steigung  $m$  am Wendepunkt  $t_{1/2}$  entspricht, sodass gilt:<sup>[279]</sup>

$$k_{\text{app}} = m^{-1} \quad (3.2)$$

Des Weiteren kann die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$ , also jene Zeit, die verstreicht, bis der Polymerisationsprozess in die Elongationsphase eintritt, als Maß zur Beschreibung der Reaktionskinetik mithilfe folgender Gleichung ermittelt werden:<sup>[279]</sup>

$$t_{\text{lag}} = t_{1/2} - 2 \cdot m \quad (3.3)$$

### 3.2.3 Fluoreszenzanisotropie-Messungen

Statische Fluoreszenzanisotropie-Messungen wurden in einem PerkinElmer LS 55 Fluoreszenzspektrometer bei einer Temperatur von 37 °C unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 350$  nm durchgeführt, um das Emissionssignal bei  $\lambda = 455$  nm zu detektieren, welches der Emissionswellenlänge von DAPI entspricht,

das spezifisch an  $\alpha/\beta$ -Tubulin Untereinheiten der gebildeten Mikrotubuli bindet.<sup>[280]</sup> Die Schlitze des Anregungs- und Emissionslichts wurden bei der Messung auf 5 nm eingestellt.

### 3.2.4 Bestimmung der kritischen Konzentration von $\alpha/\beta$ -Tubulin

Um die kritische Konzentration  $c_c$  von  $\alpha/\beta$ -Tubulin zu bestimmen, wurden jeweils 50  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin vom Rind sowohl in reinem Polymerisationspuffer als auch in Polymerisationspuffer, der 0.5 M TMAO bzw. 0.5 M Harnstoff enthielt, polymerisiert. Der Polymerisationsprozess wurde, wie bereits zuvor beschrieben, spektroskopisch mittels Messung der zunehmenden Absorption verfolgt, bis sich jeweils ein stationärer Zustand ausgebildet hat. Im Anschluss wurden Konzentrationsreihen erstellt, um 30, 15, 10, 5, 2, 1, 0.5 und 0.05  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin Proben im jeweiligen Puffer zu erhalten, zum Einen in Abwesenheit von Cosolventien und zum Anderen in Anwesenheit der entsprechenden Mengen an TMAO bzw. Harnstoff. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$  der erstellten Proben in einem TECAN M200 Mikrotiterplatten-Spektrometer bei 37 °C gemessen, bis keine Änderung der Absorption mehr beobachtet werden konnte, was bedeutet, dass sich ein Gleichgewichtszustand zwischen Polymerisations- und Depolymerisationsreaktion eingestellt hat.

Unter Verwendung von Gleichung 3.1 wurden die apparenten Geschwindigkeitskonstanten für die Konzentrationsreihen reiner Tubulinlösungen sowie für die Tubulinlösungen, die die entsprechenden Mengen an Harnstoff und TMAO enthielten, bestimmt. Aus den grafischen Auftragungen der apparenten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{app}}$  gegen die jeweiligen Tubulinkonzentrationen  $c_{\text{Tubulin}}$  konnten die kritischen Tubulinkonzentration  $c_c$  durch die Schnittpunkte der sich ergebenden Geraden unterschiedlicher Steigungen sowohl in reinem Puffer als auch in Anwesenheit von 0.5 M TMAO bzw. 0.5 M Harnstoff bestimmt werden.

### 3.2.5 Confocal Laser Scanning Microscopy

30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin vom Rind wurden in reinem Polymerisationspuffer, sowie in Polymerisationspuffer, der 0.5 M TMAO bzw. 0.5 M Harnstoff enthielt, polymerisiert. Der Polymerisationsprozess wurde in einem TECAN M200 Mikrotiterplatten-Spektrometer bei 37 °C verfolgt, bis sich die Absorption nicht mehr änderte und sich ein Plateau gebildet hatte. Die gebildeten Mikrotubuli wurden dann im Anschluss durch die Zugabe von 28  $\mu\text{M}$  Taxol und 2  $\mu\text{M}$  mit Oregon Green 488 markiertem Taxol (Flutax-2) stabilisiert und fluoreszenzmarkiert.<sup>[281]</sup>

Zur Bildgebung wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:40 mit Polymerisationspuffer in Abwesenheit von Glycerin verdünnt. Die Bilder wurden unter Verwendung eines invertierten Nikon Eclipse TE300 Mikroskops aufgenommen, dem als Detektor ein Bio-Rad MRC-1024 (Hercules, CA, USA) diente. Die mit Flutax-2 markierten Proben wurden mithilfe eines Krypton-Argon-Lasers bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 488 \text{ nm}$  angeregt und das Laserlicht mit einem 100x Öl-Immersionsobjektiv (Nikon CFI P-Apo  $\lambda$  NA 1.45) in die Probe fokussiert.

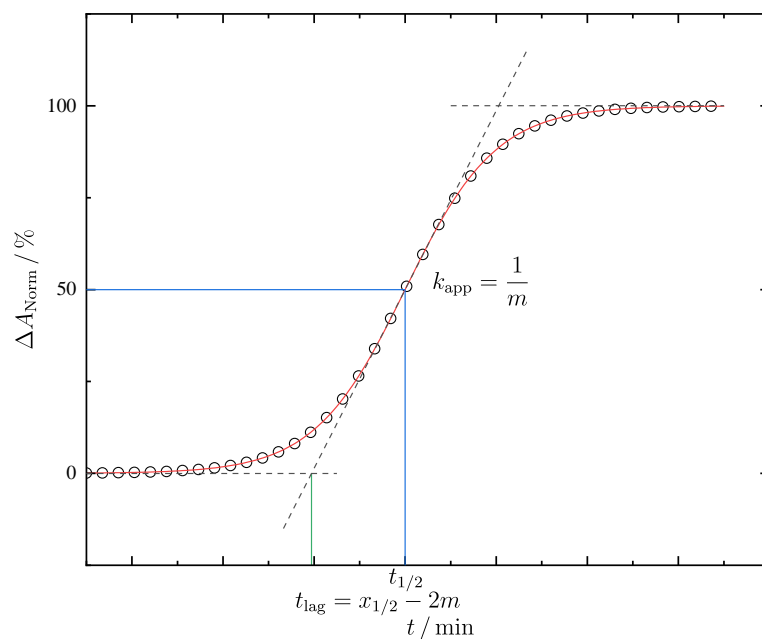
Ein Emissionsbandpassfilter mit  $\lambda = 522 \text{ nm}$  und einer vollen Breite bei halbem Maximum von  $\lambda = 35 \text{ nm}$  wurde vor den PMT platziert. Im Anschluss wurden die aufgenommenen Bilder hintergrundkorrigiert und der Kontrast verbessert.

## 3.3 Ergebnisse und Diskussion

Die *in vitro*-Polymerisationsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin, bei der die zylinderförmigen Mikrotubuli gebildet werden, kann durch ein Keimbildungs-Modell beschrieben werden, das drei kinetisch unterschiedliche Schritte aufweist, und die gesamte Polymerisationskinetik einem sigmoidalen Verlauf folgt (Abbildung 3.1).<sup>[282]</sup>

Die anfängliche Nukleation, die sogenannte *lag*-Phase, verläuft relativ langsam. In dieser erfolgt die Assoziation von kleinen elongationsfähigen Nuklei, die durch die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$  beschrieben werden kann und die zu verstreichende Zeit wiedergibt, bis die Polymerisation von der Nukleationsphase in die Elongationsphase wechselt. In dem Elongationsschritt wachsen und verlängern sich die Nuklei sowohl





**Abbildung 3.1** – Schematische Darstellung der sigmoidalen Absorptionszunahme während der Bildung von Mikrotubuli. Gleichung 3.1 ist an das kinetische Profil angepasst, um die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$ , Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  zu bestimmen.

in longitudinaler als auch in lateraler Richtung sehr schnell, um Mikrotubuli zu bilden.

Diese Elongationsphase kann durch die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  quantifiziert werden, die sich aus der Steigung am Wendepunkt, also der Halbwertszeit  $t_{1/2}$ , die die Zeit angibt an der die Polymerisation zu 50% abgeschlossen ist, des sigmoidalen Kurvenverlaufs ermitteln lässt. Der Elongationsschritt wird beendet, sobald die Konzentration an freien  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimeren in Lösung auf den Wert der kritischen Konzentration  $c_c$  abgesunken ist und somit die Polymerisationsreaktion in die *Steady-State*-Phase eintritt, in welcher die Assoziation von weiteren  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimeren gleich schnell abläuft wie der Dissoziationsprozess, sodass kein Nettowachstum der Mikrotubuli mehr erfolgt.

Die Polymerisation von  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin wurde mithilfe von Turbidimetrie-Messungen untersucht, die bei einer Wellenlänge von 340 nm und einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt wurden.<sup>[282]</sup> Dabei wurde eine Verweilzeit von  $t_{\text{lag}} = 583.6 \pm 5.9 \text{ s}$ , eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 795.7 \pm 2.9 \text{ s}$  und eine apparente Wachs-

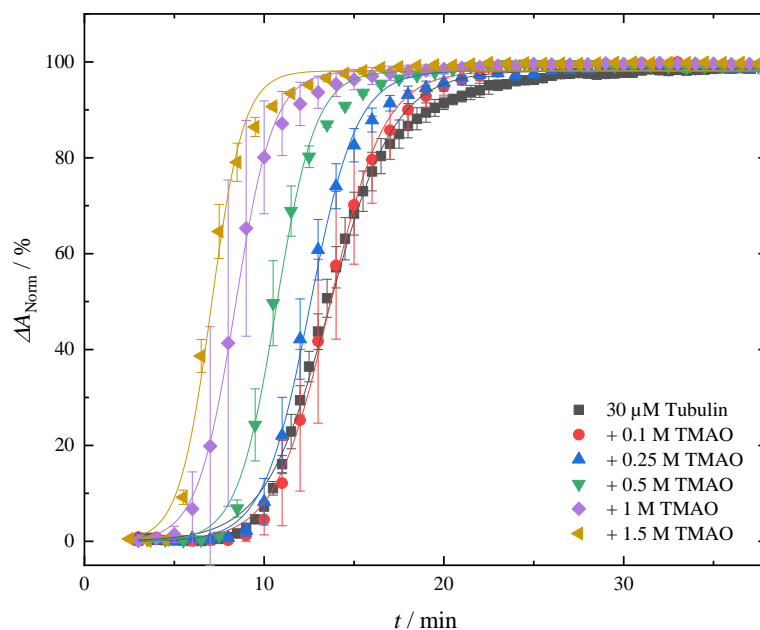
tumsrate von  $k_{\text{app}} = 9.43 \pm 0.23 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  für die Polymerisation von  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in reinem Polymerisationspuffer in Abwesenheit jeglicher Cosolventien bzw. makromolekularen Crowdern ermittelt, die gut mit Literaturwerten übereinstimmen.<sup>[282]</sup>

Nachfolgend werden die Ergebnisse dargestellt und diskutiert, die bei den Untersuchungen der Polymerisationsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von Cosolventien wie TMAO und Harnstoff bzw. makromolekularen Crowdern wie Ficoll<sup>®</sup> PM 70 und Saccharose erhalten wurden.

#### 3.3.1 Einfluss von TMAO auf die Polymerisationskinetik

Zu Beginn der Studie wurde der Einfluss von TMAO auf die Polymerisationskinetik von  $\alpha/\beta$ -Tubulin untersucht. Dabei wurden  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Polymerisationspuffer-Lösungen verwendet, die 0.1, 0.25, 0.5, 1 bzw. 1.5 M TMAO enthielten. Abbildung 3.2 zeigt den Effekt von TMAO auf die Kinetik der Polymerisationsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Anwesenheit von TMAO die Polymerisationskinetik in konzentrationsabhängiger Art und Weise drastisch beschleunigt, d.h. je mehr TMAO in dem Polymerisationspuffer anwesend ist, desto schneller erfolgt die Bildung von Mikrotubuli, was in einer verkürzten Nukleationsphase, einer erhöhten Steigung der Elongationsphase und in einem früheren Eintritt in die *Steady-State*-Phase in Abbildung 3.2 zu erkennen ist. Dabei erhöht sich ebenso die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  mit steigender Konzentration an TMAO um einem Faktor von  $1.09 \pm 0.05 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  pro Mol an anwesendem TMAO (Abbildung 3.3a und 3.4 und Tabelle 3.1), wohingegen sich die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  in Anwesenheit des Osmolyten drastisch verkürzen (Abbildung 3.3b). Des Weiteren wird die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$  in Anwesenheit von TMAO signifikant beeinflusst und verringert die Zeitspanne der Nukleationsphase in einem Konzentrationsbereich von 0.5 bis 1.5 M um  $\approx 4.5 \text{ min}$  (Abbildung 3.3c).

Darüber hinaus nehmen die Plateauwerte der *Steady-State*-Phase der unnormierten Turbidimetriedaten mit steigender TMAO-Konzentration zu (Abbildung 3.13 im Anhang des Kapitels). Dieses Verhalten könnte darauf hindeuten, dass in Gegenwart



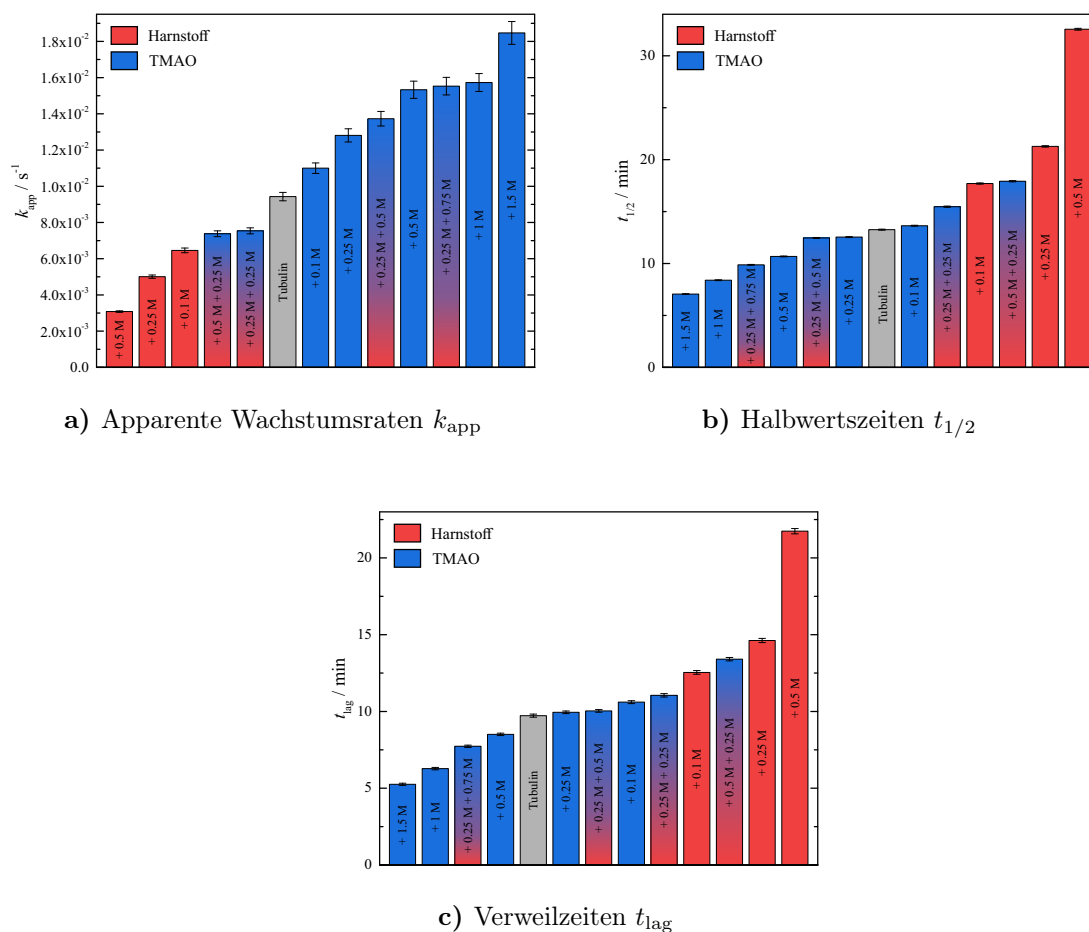
**Abbildung 3.2** – Normierte zeitliche Änderung der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  (bei einer Wellenlänge von 340 nm) der Polymerisationsreaktion von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 0.1, 0.25, 0.5, 1 und 1.5 M TMAO bei einer Temperatur von 37 °C. Die Daten sind hintergrundkorrigiert und zum besseren Vergleich auf einer Skala von 0–100 % normiert. Gleichung 3.1 ist jeweils an das kinetische Profil angepasst, um die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$ , Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  zu bestimmen.

von TMAO größere Mengen bzw. längere Mikrotubuli gebildet werden und durch eine reduzierte kritische Konzentration  $c_c$  von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von TMAO begründet werden. Um diese Annahme zu überprüfen, erfolgte eine Bestimmung der kritischen Konzentration  $c_c$  von  $\alpha/\beta$ -Tubulin sowohl in reiner Polymerisationspufferlösung als auch in Gegenwart von 0.5 M TMAO.

So verringert sich die kritische Konzentration  $c_c$  von  $9.42 \pm 0.36 \mu\text{M}$  in reiner Pufferlösung auf  $4.07 \pm 0.08 \mu\text{M}$  in Anwesenheit von 0.5 M TMAO (Abbildung 3.5).

Um der Frage nachzugehen, ob durch die Anwesenheit von TMAO, welches bereits die kritische Konzentration  $c_c$  abgesenkt hat, nun entweder die Menge oder die Länge der gebildeten Mikrotubuli beeinflusst, wurden vergleichbare statische Fluoreszenzanisotropie-Messungen sowie konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (*engl. Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM*) Experimente durchgeführt.

Da die Fluoreszenzanisotropie von der Rotationsdiffusionskonstanten abhängt, erlaubt die statische Fluoreszenzanisotropie  $r$  die Detektion von Größenänderungen



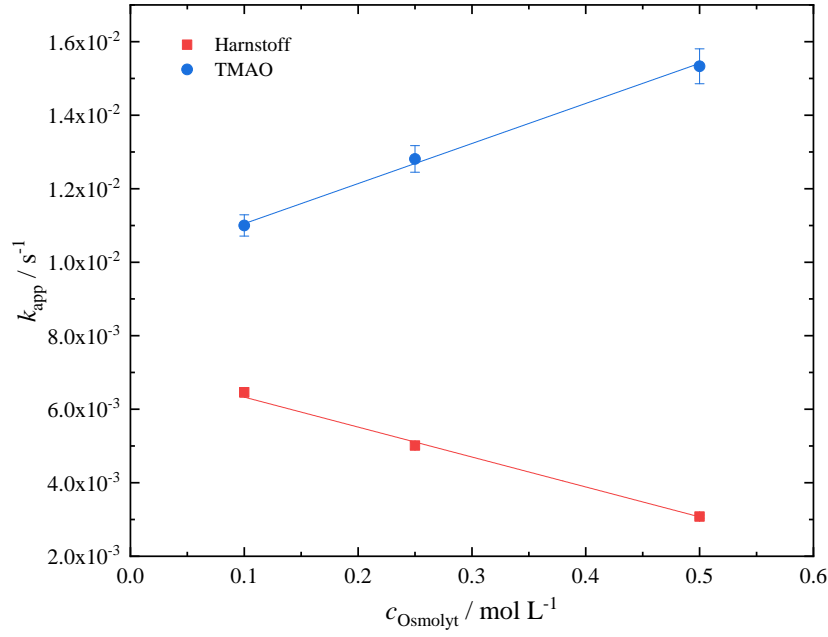
**Abbildung 3.3** – Kinetik-Analyse der Polymerisationsreaktion von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in An- und Abwesenheit von Cosolventien bei einer Temperatur von 37 °C. TMAO: ■, Harnstoff: ■. Farbverlauf der Harnstoff/TMAO-Mischungen entspricht der Zusammensetzung. **a)** Apparente Wachstumsrate  $k_{app}$ ; **b)** Halbwertszeiten  $t_{1/2}$ ; **c)** Verweilzeiten  $t_{lag}$ .

der während der Polymerisation gebildeten Mikrotubuli und ist durch folgende Gleichung gegeben: [225]

$$r^{-1} = r_0^{-1} \left( 1 + \frac{k_B T \bar{\tau}}{\eta V_h} \right) \quad (3.4)$$

Hierbei entsprechen  $r_0$  der intrinsischen Grenzanisotropie,  $k_B$  der Boltzmann-Konstanten,  $T$  der absoluten Temperatur,  $\eta$  der Mikroviskosität,  $\bar{\tau}$  der gemittelten Fluoreszenzlebenszeit des angeregten Zustands von DAPI und  $V_h$  dem hydrodynamischen Volumen von  $\alpha/\beta$ -Tubulin. [225]

Unter der Annahme, dass die Mikroviskosität gleich der in der *Bulk*-Phase ist, und

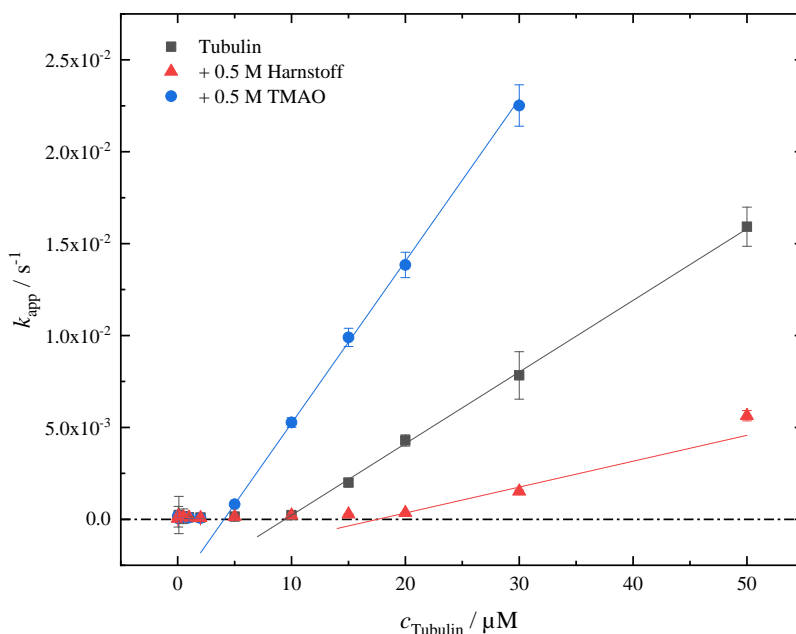


**Abbildung 3.4** – Konzentrationsabhängige Entwicklung der apparenten Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  von  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von TMAO (●) und Harnstoff (■).

bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  einem Wert von  $6.86 \times 10^{-4} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  entspricht, kann die Fluoreszenzanisotropie  $r$  approximiert werden, durch die die Größenänderung der während der Polymerisation gebildeten Mikrotubuli bestimmt werden kann. Die intrinsische Grenzanisotropie für Proteine ist gegeben durch  $r_0 = 0.25$ ,<sup>[225]</sup> und DAPI weist die beiden Fluoreszenzlebenszeiten  $\tau_{\text{F1}} = 2.81 \text{ ns}$  bzw.  $\tau_{\text{F2}} = 0.19 \text{ ns}$  mit den dazugehörigen präexponentiellen Faktoren  $\alpha_1 = 0.23$  und  $\alpha_2 = 0.77$  auf.<sup>[283,284]</sup> Unter Verwendung dieser Parameter kann die mittlere Fluoreszenzlebenszeit des doppelt-exponentiellen Zerfalls von DAPI zu  $\bar{\tau} = 2.33 \text{ ns}$  mithilfe folgender Gleichung berechnet werden:<sup>[225]</sup>

$$\bar{\tau} = \frac{\alpha_1 \tau_{\text{F1}}^2 + \alpha_2 \tau_{\text{F2}}^2}{\alpha_1 \tau_{\text{F1}} + \alpha_2 \tau_{\text{F2}}} \quad (3.5)$$

Das  $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimer besitzt eine zylindrische Form mit einer Länge von  $\approx 8 \text{ nm}$  und einem Durchmesser von  $\approx 4 \text{ nm}$ ,<sup>[285,286]</sup> sodass das hydrodynamische Volumen  $V_h$  mithilfe der Gleichung  $V_h = \pi h r^2$  zu  $100.5 \text{ nm}^3$  bestimmt werden kann. Mithilfe von Gleichung 3.4 kann nun unter Verwendung der zuvor bestimmten Mi-

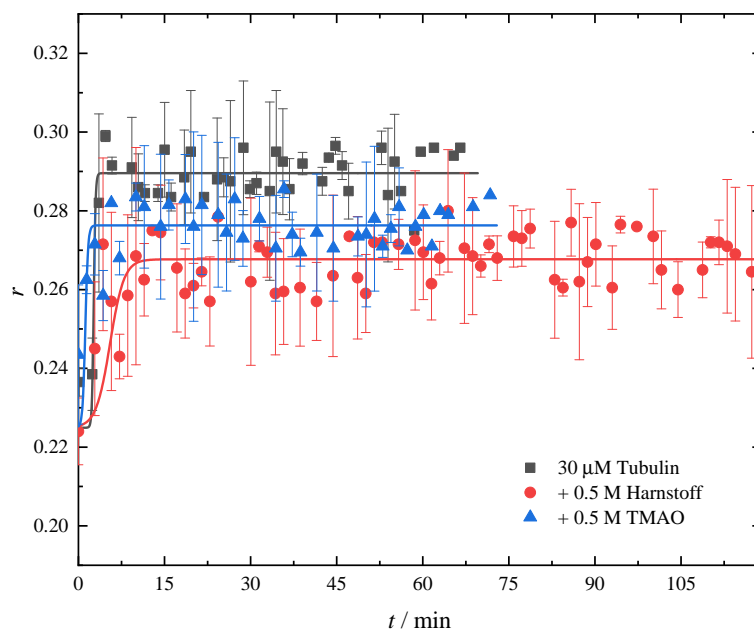


**Abbildung 3.5** – Bestimmung der kritischen Konzentration  $c_c$  von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reinem Polymerisationspuffer (■), in Anwesenheit von 0.5 M TMAO (●) sowie in 0.5 M Harnstoff (▲). 50  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin wurden in dem jeweiligen Polymerisationspuffer polymerisiert. Nach Beendigung der Polymerisation wurden die Proben in dem jeweils entsprechenden Polymerisationspuffer zu Lösungen verdünnt, die 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5 und 0.05  $\mu\text{M}$  Tubulin enthielten. Die Schnittpunkte der sich ergebenden Geraden der Auftragung der apparenten Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  gegen die Tubulin-Konzentration mit der Abszisse erlauben die Bestimmung der kritischen Konzentration  $c_c$  in An- und Abwesenheit von Cosolventien.

kroviskosität  $\eta$ , der mittleren Fluoreszenzlebenszeit  $\bar{\tau}$  und dem hydrodynamischen Volumen  $V_h$  die Fluoreszenzanisotropie bei einer Temperatur von 37°C zu 0.218 berechnet werden. Dieser theoretisch bestimmte Wert der Fluoreszenzanisotropie stimmt gut mit dem experimentell bestimmten Wert der Fluoreszenzanisotropie ( $r = 0.225 \pm 0.002$ ) von  $\alpha/\beta$ -Tubulin überein, der vor dem Start der Polymerisation gemessen wurde.

Aufgrund der Tatsache, dass Tubulin eine hohe Polydispersität bei der Bildung von Mikrotubuli aufweist, ist eine quantitative Strukturanalyse der gebildeten Spezies jedoch nicht möglich und es erachtet sich als sinnvoll, diese theoretische Berechnung der Fluoreszenzanisotropie von  $\alpha/\beta$ -Tubulin lediglich als monodisperses System durchzuführen.

Die Polymerisation von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung geht einher mit

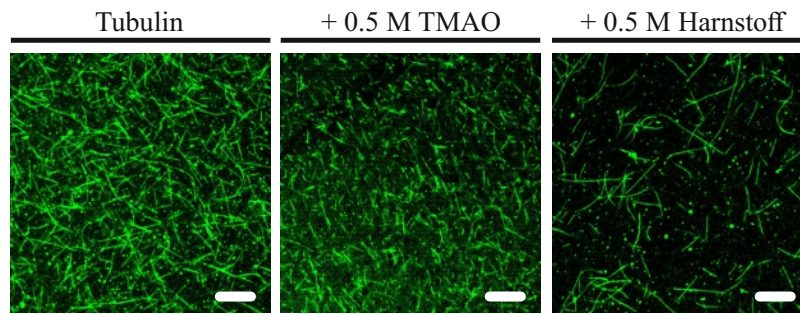


**Abbildung 3.6** – Zeitabhängige statische Fluoreszenzanisotropie-Daten von 30  $\mu$ M  $\alpha/\beta$ -Tubulin (aus Kalbshirn) bei 37  $^{\circ}$ C, erhalten durch die Fluoreszenz des extrinsichen Fluorophors DAPI während der Polymerisation von Tubulin in Abwesenheit von Cosolventien ( $\blacksquare$ ) sowie in Gegenwart von 0.5 M TMAO ( $\bullet$ ) und 0.5 M Harnstoff ( $\blacktriangle$ ).

einer Erhöhung des Anisotropiewertes mit fortschreitender Zeit und erreicht in der *Steady-State*-Phase einen Wert von  $r = 0.2890 \pm 0.0005$ , wohingegen in Anwesenheit von 0.5 M TMAO der Plateauwert lediglich einen Wert von  $r = 0.2760 \pm 0.0004$  erreicht, was dafür sprechen könnte, dass kürzere Mikrotubuli gebildet werden.

Entsprechende CLSM-Bilder zeigen, dass die Anwesenheit von 0.5 M TMAO zu einer Abnahme der durchschnittlichen Länge der gebildeten Mikrotubuli führt, aber mehr Mikrotubuli gebildet werden (Abbildung 3.7). Zusammenfassend stützen diese Daten die Hypothese, dass TMAO den *de novo* Nukleations- und Elongationsprozess der Mikrotubulibildung thermodynamisch und kinetisch begünstigt. Aufgrund der reduzierten kritischen Konzentration  $c_c$  in Anwesenheit von 0.5 M TMAO führt die erhöhte Anzahl an Keimbildungsstellen zur Bildung von verkürzten Mikrotubuli.

Der natürliche Osmolyt TMAO wird vor allem in Organismen gefunden, die äußerem Stress ausgesetzt sind, um deren Struktur zu stabilisieren und wird dementsprechend auch als „*chemisches Chaperon*“ bezeichnet.<sup>[104,116]</sup> Des Weiteren ist es bekannt, dass TMAO bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossen wird und



**Abbildung 3.7** – Repräsentative CLSM-Bilder von mit Flutax-2 angefärbten Mikrotubuli, die in reiner Pufferlösung sowie in Anwesenheit von 0.5 M TMAO bzw. 0.5 M Harnstoff gebildet wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

stattdessen das Wasserstoffbrücken-Netzwerk der umgebenden Wassermoleküle verstärkt und dadurch oligomere und polymere Proteine entropisch stabilisiert, was als „*preferential hydration effect*“,<sup>[109,112]</sup> zu deutsch: bevorzugter Hydratationseffekt, bezeichnet wird, und somit eine niedrige lösungsmittel-zugängliche Oberfläche (*engl.: solvent accessible surface area, SASA*) begünstigt.<sup>[87,100,269]</sup> Um nun die gesamte SASA zu minimieren und damit auf den Nukleationsprozess einzuwirken, ist es sehr wahrscheinlich, dass TMAO die Bildung von Tubulin-Oligomeren begünstigt, indem es das Monomer-Oligomer-Gleichgewicht auf die Seite des Oligomers, der Nuklei, verschiebt. Anhand der Daten wird ersichtlich, dass TMAO in der Lage ist, die konformationelle Population von Tubulin-Heterodimeren zu einer mehr elongationsfähigen Spezies zu verschieben, was anhand der verringerten kritischen Konzentration und der erhöhten apparenten Wachstumsrate zu erkennen ist. An dieser Stelle sei zu erwähnen, dass in der Fachliteratur darüber berichtet wurde, dass TMAO Mikrotubuli vor einer kälteinduzierten Depolymerisation schützt.<sup>[287]</sup>

In vielen Studien wurde gezeigt, dass TMAO in der Lage ist, Protein-Fibrillierungs- und Polymerisationsreaktionen zu begünstigen und zu beschleunigen.<sup>[288–290]</sup> Allerdings können der detaillierte Arbeitsmechanismus von TMAO und die morphologischen Ergebnisse der Biopolymere sehr unterschiedlich sein. Beispielsweise zeigt eine kürzlich durchgeführte Studie zur Bildung von Actinfilamenten, einer weiteren Schlüsselkomponente des eukaryotischen Zytoskeletts, dass TMAO den Nukleationsprozess beschleunigt und die kritische Konzentration durch Erhöhung der Assoziati-



**Tabelle 3.1** – Kinetische Analyse der Polymerisation von 30  $\mu\text{M}$  Tubulin, extrahiert aus Kalbshirnen, in An- und Abwesenheit verschiedener Cosolventien bei einer Temperatur von 37 °C.

	$k_{\text{app}} / 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{s}$	$t_{\text{lag}} / \text{s}$
Tubulin	9.43 $\pm$ 0.23	795.7 $\pm$ 2.9	583.6 $\pm$ 5.9
+ 0.1 M TMAO	11.00 $\pm$ 0.29	818.2 $\pm$ 2.7	636.3 $\pm$ 5.5
+ 0.25 M TMAO	12.81 $\pm$ 0.36	752.7 $\pm$ 2.5	596.6 $\pm$ 5.1
+ 0.5 M TMAO	15.33 $\pm$ 0.48	640.9 $\pm$ 2.3	510.4 $\pm$ 4.7
+ 1 M TMAO	15.73 $\pm$ 0.49	503.8 $\pm$ 2.3	376.6 $\pm$ 4.6
+ 1.5 M TMAO	18.47 $\pm$ 0.63	423.7 $\pm$ 2.1	315.4 $\pm$ 4.2
+ 0.1 M Harnstoff	6.46 $\pm$ 0.13	1062.2 $\pm$ 3.5	752.5 $\pm$ 7.2
+ 0.25 M Harnstoff	5.01 $\pm$ 0.09	1276.7 $\pm$ 4.0	877.4 $\pm$ 8.2
+ 0.5 M Harnstoff	3.08 $\pm$ 0.04	1953.3 $\pm$ 5.1	1304.6 $\pm$ 10.4
+ 0.25 M Harnstoff + 0.25 M TMAO	7.54 $\pm$ 0.16	928.3 $\pm$ 3.3	662.9 $\pm$ 6.7
+ 0.25 M Harnstoff + 0.5 M TMAO	13.73 $\pm$ 0.40	747.9 $\pm$ 2.4	602.2 $\pm$ 4.9
+ 0.25 M Harnstoff + 0.75 M TMAO	15.53 $\pm$ 0.48	592.7 $\pm$ 2.3	463.9 $\pm$ 4.6
+ 0.5 M Harnstoff + 0.25 M TMAO	7.38 $\pm$ 0.16	1075.4 $\pm$ 3.3	804.3 $\pm$ 6.7
+ 10 Gew.-% Saccharose	9.11 $\pm$ 0.22	1086.1 $\pm$ 3.0	866.6 $\pm$ 6.0
+ 15 Gew.-% Saccharose	6.12 $\pm$ 0.12	1169.0 $\pm$ 3.6	842.1 $\pm$ 7.4
+ 20 Gew.-% Saccharose	5.92 $\pm$ 0.11	1233.6 $\pm$ 3.7	896.1 $\pm$ 7.5
+ 10 Gew.-% Ficoll® PM 70	22.30 $\pm$ 1.39	536.2 $\pm$ 3.2	446.4 $\pm$ 6.5

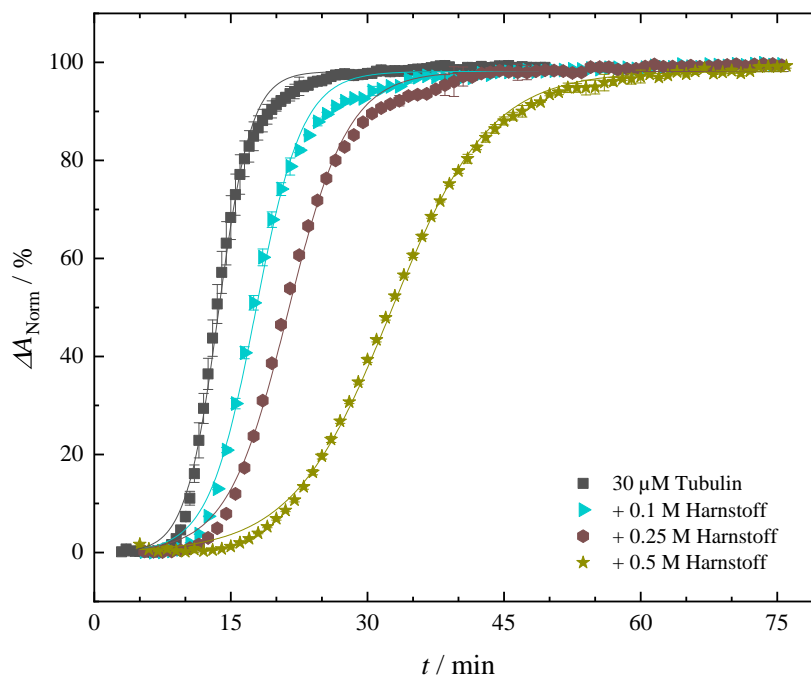
onsrate während des Elongationsprozesses reduziert,<sup>[291]</sup> was zu der morphologischen Konsequenz führt, dass ausgedehnte Actinfilamente gebildet werden.<sup>[291]</sup>

Daher zeigen diese Daten, dass zusätzliche Interaktionen neben dem „*preferential hydration effect*“ auch beteiligt sein können, die die Population von „*conformational (sub)states*“ und damit die Gesamtpolymerisationsreaktion modulieren. Das Endergebnis scheint in hohem Maße von den strukturellen Eigenschaften und der chemischen Zusammensetzung des verwendeten Biomoleküls abhängig zu sein.

#### 3.3.2 Einfluss von Harnstoff auf die Polymerisationskinetik

Als nächstes wurde der Einfluss von Harnstoff, als repräsentativen chaotropen Osmolyten auf die Polymerisationreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin untersucht. Dafür wurden Polymerisationspuffer-Lösungen, die 0.1, 0.25 und 0.5 M Harnstoff enthielten, hergestellt. Abbildung 3.8 zeigt den Effekt von Harnstoff auf die Kinetik der Polymerisationsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von 37 °C.

Die Zugabe von Harnstoff führt zu einer drastischen und konzentrationsabhängigen Zunahme der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  (Abbildung 3.3b) sowie der Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$  (Abbildung 3.3c) der Polymerisation von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von 37 °C. In Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff verlängert sich die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  der Polymerisationsreaktion von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin um etwa 12 min und die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$  verdoppelt sich in etwa im Vergleich zur Polymerisation von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in reinem Polymerisationspuffer. Die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  verringert sich um etwa  $8.14 \pm 0.41 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  pro Mol an anwesendem Harnstoff (Abbildung 3.3a und 3.4, Tabelle 3.1). Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der Polymerisationsreaktion von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 1 und 1.5 M Harnstoff. Allerdings verlangsamt sich die Polymerisation in Anwesenheit dieser beiden Konzentrationen so stark, dass in dem betrachteten Zeitraum keine Änderung der Absorption beobachtet werden konnte und demzufolge keine Polymerisation stattfand. Die Plateauwerte der unnormierten Turbidimetriedaten (*Steady-State-Phase*) verringern sich mit steigender Harnstoff-Konzentration, was darauf hindeuten könnte, dass während der Polymerisation weniger bzw. kürzere



**Abbildung 3.8** – Normierte zeitliche Änderung der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  (bei einer Wellenlänge von 340 nm) der Polymerisationsreaktion von  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 0.1, 0.25 und 0.5 M Harnstoff bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Die Daten sind hintergrundkorrigiert und zum besseren Vergleich auf einer Skala von 0–100 % normiert. Gleichung 3.1 ist jeweils an das kinetische Profil angepasst, um die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$ , Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  zu bestimmen.

Mikrotubuli gebildet werden (Abbildung 3.14 im Anhang des Kapitels). Die kritische Konzentration von Tubulin verdoppelt sich fast in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff von  $9.42 \pm 0.66 \mu\text{M}$  in reinem Polymerisationspuffer, auf  $17.54 \pm 5.73 \mu\text{M}$  (Abbildung 3.5).

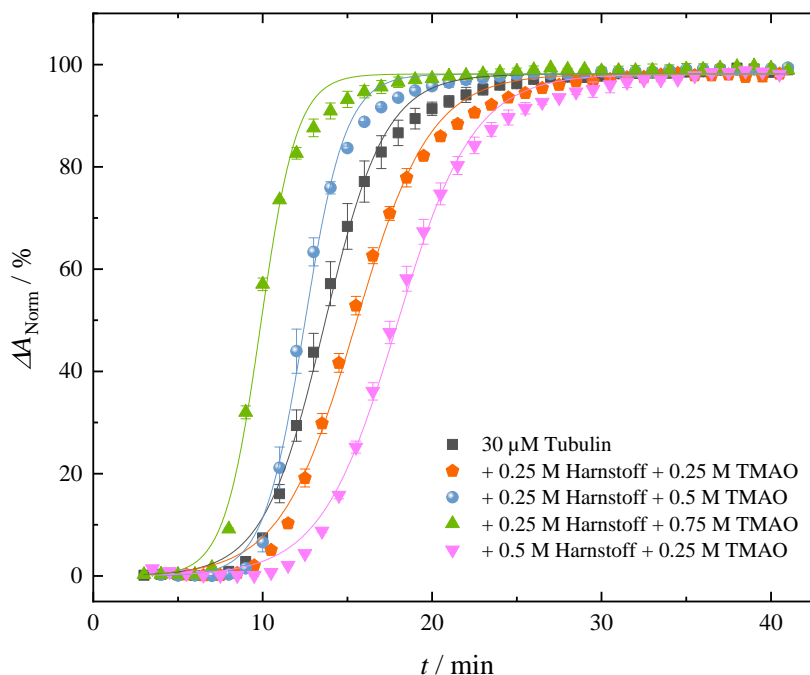
Wie schon zuvor bei den Untersuchungen der Polymerisationsreaktion von  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 0.5 M TMAO erfolgte auch hier eine zeitabhängige Messung der statischen Fluoreszenzanisotropie, um die Polymerisation von  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff zu untersuchen (Abbildung 3.6). Im Vergleich zur Polymerisation in Abwesenheit von Cosolventien lässt sich hierbei eine Retardierung der Polymerisationsreaktion erkennen, was gut mit den zuvor durchgeführten Turbidimetrie-Messungen übereinstimmt. In der *Steady-State*-Phase ergibt sich ein Plateauwert von  $r = 0.2680 \pm 0.0003$  und ist demzufolge signifikant kleiner als bei den in reinem Polymerisationspuffer gebildeten Mikrotubuli, was dar-

auf schließen lässt, dass weniger Mikrotubuli in Anwesenheit von Harnstoff gebildet werden. Dies wird ebenso durch die aufgenommenen CLSM-Bilder bestätigt (Abbildung 3.7), in denen sich erkennen lässt, dass zwar weniger Mikrotubuli gebildet wurden, diese aber im Vergleich zu den in reinem Polymerisationspuffer gebildeten Mikrotubuli nicht kürzer sind.

Da Harnstoff stärkere Wasserstoffbrücken-Bindungen mit dem Proteinrückgrat bildet als mit dem *Bulk*-Wasser,<sup>[292]</sup> kann die beobachtete Retardierung und Inhibition, die in Anwesenheit von Harnstoff auftreten, evtl. durch eine partielle Entfaltung der  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimere erklärt werden, wodurch die effektive Konzentration der polymerisationsfähigen Tubulin-Konformationen verringert wird. Des Weiteren induziert Harnstoff den Bruch von Wasserstoffbrücken-Bindungen und begünstigt so Konformationen mit einer ausgedehnten, dem Lösungsmittel zugänglichen, Oberfläche (SASA).<sup>[116]</sup>

Der destabilisierenden Wirkung von Harnstoff, ein hochkonzentriertes Abfallprodukt in Säugetiernieren, wird *in vivo* durch den Osmolyten TMAO, oftmals in einem physiologischen TMAO/Harnstoff-Verhältnis von 1:2, entgegengewirkt.<sup>[90,110,114]</sup> Um zu testen, ob auch bei der Polymerisation von  $\alpha/\beta$ -Tubulin ein kompensierender Effekt der beiden zuvor verwendeten Cosolventien vorliegt, erfolgte eine Untersuchung der Polymerisationskinetik von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in verschiedenen TMAO/Harnstoff-Mischungen, die in Abbildung 3.9 abgebildet sind.

Durch die Zugabe von 0.25 M Harnstoff zu 0.25 M oder 0.5 M TMAO-Lösungen wird der beschleunigende Effekt des Osmolyts TMAO verringert (Abbildung 3.3a). Bei einem TMAO/Harnstoff-Verhältnis von 1:2 erfolgt keine vollständige Kompensierung der beiden gegenläufigen Effekte der verwendeten Cosolventien. Erst bei einem TMAO/Harnstoff-Verhältnis von 2:1 wird die retardierende Wirkung von Harnstoff auf die Polymerisationskinetik durch den Osmolyt TMAO kompensiert, was durch ähnliche Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  (Abbildung 3.3b) und Verzögerungszeiten  $t_{\text{lag}}$  (Abbildung 3.3c) ersichtlich wird (Tabelle 3.1). Im Gegensatz hierzu wurde herausgefunden, dass bei der Polymerisation von Actin ein TMAO/Harnstoff-Verhältnis von etwa 1:2 benötigt wird, damit die beiden durch die Cosolventien induzierten Effek-



**Abbildung 3.9** – Normierte zeitliche Änderung der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  (bei einer Wellenlänge von 340 nm) der Polymerisationsreaktion von  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von verschiedenen TMAO/Harnstoff-Mischungen bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Die Daten sind hintergrundkorrigiert und zum besseren Vergleich auf einer Skala von 0–100 % normiert. Gleichung 3.1 ist jeweils an das kinetische Profil angepasst, um die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$ , Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  zu bestimmen.

te kompensiert werden,<sup>[291]</sup> was im Einklang mit Ergebnissen aus weiteren Studien zur Proteinstabilität steht.<sup>[197,238,239,268]</sup> Einige Molekül-Dynamik-Simulationen und Neutronen-Streuexperimente deuten darauf hin, dass der Mechanismus der Gegenwirkung des TMAO-Effekts eher eine bevorzugte Solvatisierung von TMAO ist als des Proteins durch Wasser und Harnstoff.<sup>[268,293]</sup> Die hier beobachteten kombinierten Effekte der beiden Cosolventien auf die Polymerisation von  $\alpha/\beta$ -Tubulin legen nahe, dass die entgegen gerichtete Wirkung von TMAO auf Harnstoff nicht einfach durch direkte Wechselwirkungen zwischen den beiden Cosolventien erklärt werden kann, sondern eher das vollständige quaternäre System, bestehend aus TMAO, Harnstoff, Wasser und Protein, betrachtet werden muss,<sup>[268]</sup> welches sensitiv von der Struktur, der Hydrophobizität, Polarität bzw. Ladungsverteilung des Biomoleküls abhängt, sowie von den Hydratationseigenschaften und der Art der beteiligten Reaktion.

Das TMAO/Harnstoff-Verhältnis für eine vollständige Kompensation des beschleunig-

nigenden Effekts von TMAO durch den retardierenden Effekt von Harnstoff auf die Polymerisation von  $\alpha/\beta$ -Tubulin variiert je nach Herkunft des Proteins. So reicht beispielsweise bei der Polymerisation von  $\alpha/\beta$ -Tubulin, welches aus Lammhirnen extrahiert wurde, bereits ein TMAO/Harnstoff-Verhältnis von etwa 1:1 aus, um eine vollständige Kompensation der beiden beobachteten Effekte der Cosolventien hervorzurufen (Abbildungen 3.18 und 3.20 und Tabelle 3.2). Die beiden Tubulin-Spezies wurden auf dieselbe Art und Weise aufgereinigt, um sicherzustellen, dass die erhaltenen Ergebnisse miteinander vergleichbar sind. Einziger Unterschied ist die Zusammensetzung des Puffers, in welchem das Protein vor der Induzierung der Polymerisation gelöst wurde.

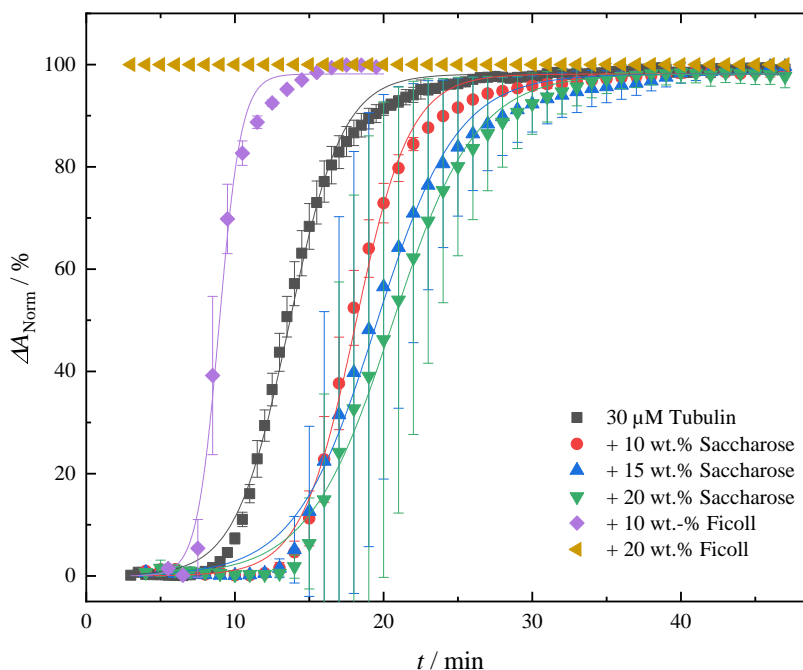
#### 3.3.3 Einfluss von Crowdern auf die Polymerisationskinetik

Die hier durchgeführten *in vitro*-Experimente entsprechen nicht genau den realen *in vivo* Umgebungsbedingungen von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in der Zelle, weshalb nun sowohl mikro- als auch makromolekulare Crowder verwendet wurden, um die natürliche Umgebung von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in der Zelle besser zu imitieren. Aufgrund der in der Zelle sich befindenden Crowding-Reagenzien wird das zur Verfügung stehende Volumen eingeschränkt. Als makromolekularen Crowder wurde an dieser Stelle das synthetische Polymer Ficoll<sup>®</sup> PM 70 verwendet, während als Mikrocrowder dessen Monomerbaustein Saccharose Verwendung fand. Die Polymerisationskinetik von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin wurde in Gegenwart von 10 – 20 Gew.-% Saccharose bzw. 10 – 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 spektroskopisch mittels Turbidimetrie-Messungen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$  und einer Temperatur von 37 °C untersucht.

##### 3.3.3.1 Ficoll<sup>®</sup> PM 70

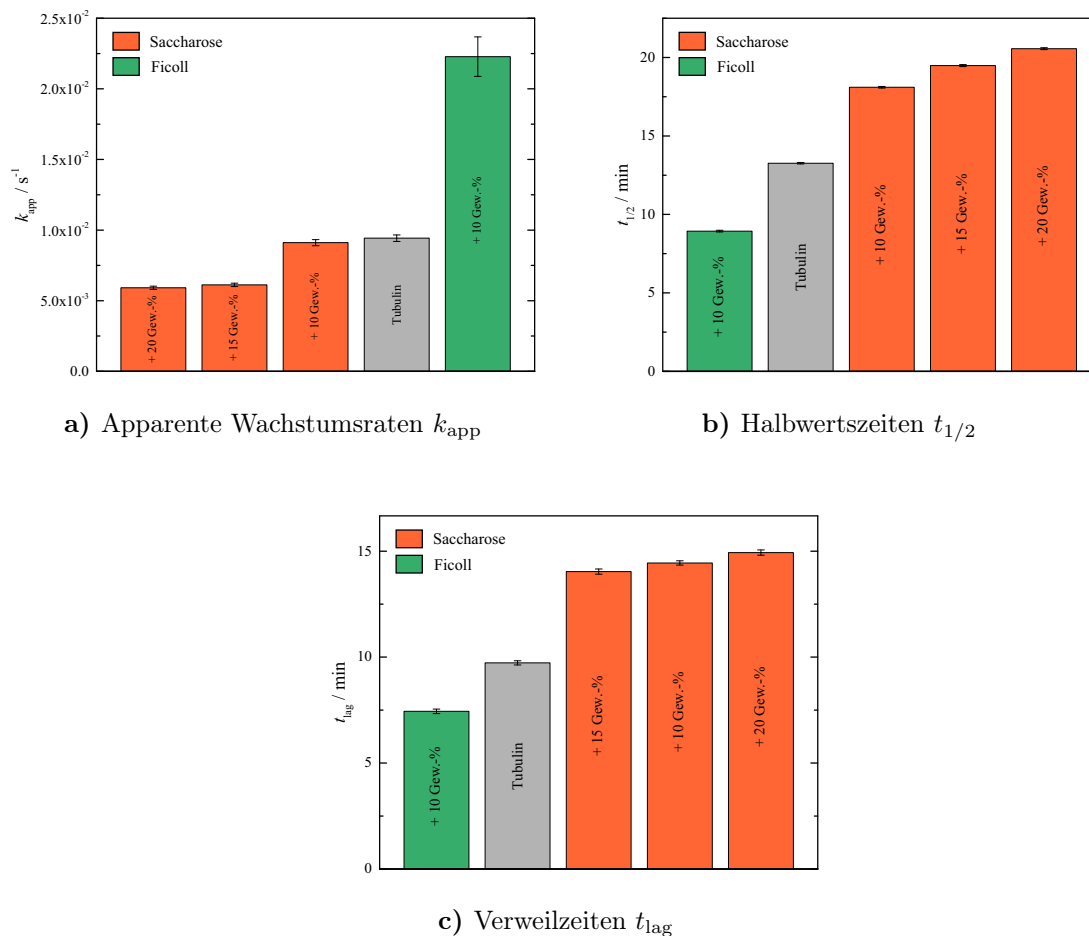
Abbildung 3.10 zeigt die normierten zeitlichen Änderungen der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  der Polymerisationsreaktion von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Wellenlänge von 340 nm in Anwesenheit von 10, 15 und 20 Gew.-% Saccharose sowie in Anwesenheit von 10 und 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 bei einer Temperatur von 37 °C.

In Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll<sup>®</sup> PM 70 ist eine drastische



**Abbildung 3.10** – Normierte zeitliche Änderung der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  (bei einer Wellenlänge von 340 nm) der Polymerisationsreaktion von  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 10, 15 und 20 Gew.-% Saccharose sowie in Anwesenheit von 10 und 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Die Daten sind hintergrundkorrigiert und zum besseren Vergleich auf einer Skala von 0–100 % normiert. Gleichung 3.1 ist jeweils an das kinetische Profil angepasst, um die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$ , Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  zu bestimmen.

Beschleunigung der Polymerisationsreaktion von  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  deutlich zu erkennen. Durch die Zugabe von 10 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 erfolgt eine Beschleunigung der Polymerisationskinetik, was zu einer Abnahme der Verzögerungszeit  $\Delta t_{\text{lag}}$  um etwa 2 min (Abbildung 3.11c) sowie der Halbwertszeit  $\Delta t_{1/2}$  (Abbildung 3.11b) um etwa 4 min im Vergleich zur Polymerisation von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Abwesenheit des makromolekularen Crowders führt. Die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  verdoppelt sich fast von  $9.43 \pm 0.23 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  in reinem Polymerisationspuffer auf  $22.30 \pm 1.39 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  in Anwesenheit von 10 Gew.-% des synthetischen Polymers (Abbildung 3.11a). Die Beschleunigung der Polymerisationskinetik in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll<sup>®</sup> PM 70 verstärkt sich mit steigender Konzentration. Demzufolge ist eine spektroskopische Verfolgung der Polymerisationskinetik in Anwesenheit von 15 und 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70



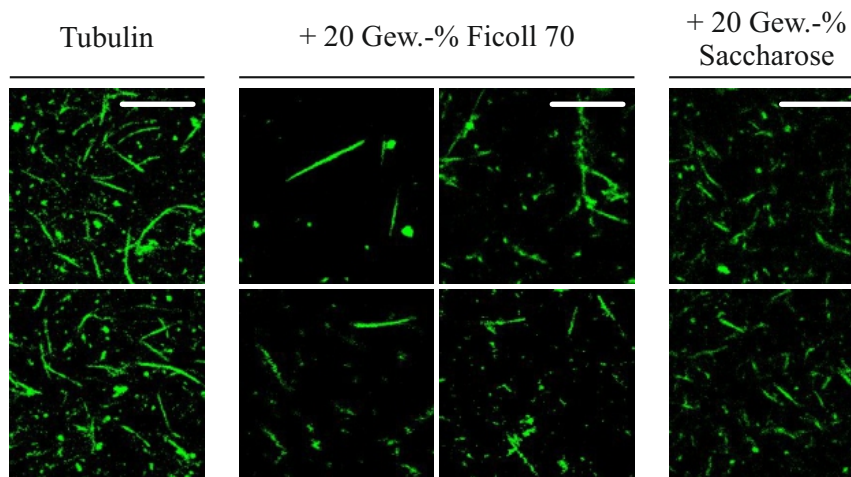
**Abbildung 3.11** – Kinetik-Analyse der Polymerisationsreaktion von  $30 \mu M$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in An- und Abwesenheit von Crowdern bei einer Temperatur von  $37^\circ C$ . Saccharose: ■, Ficoll<sup>®</sup> PM 70: ■. **a)** Apparente Wachstumsrate  $k_{app}$ ; **b)** Halbwertszeiten  $t_{1/2}$ ; **c)** Verweilzeiten  $t_{lag}$ .

nicht mehr möglich, da die Polymerisation bereits vor Start der Messung die stationäre Phase erreicht hatte, was mit dem Abschluss der Polymerisationsreaktion gleichzusetzen ist (Abbildung 3.10). Der Einfluss von 10 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 auf die Polymerisationskinetik entspricht in etwa dem Einfluss von hohen TMAO-Konzentrationen (Tabelle 3.1).

Die Morphologien der gebildeten Mikrotubuli in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll<sup>®</sup> PM 70 sind vielfältig, was anhand von aufgenommenen CLSM-Bildern ersichtlich wird (Abbildung 3.12).

Auf den CLSM-Bilder (Abbildung 3.12) lässt sich erkennen, dass die in Anwesenheit von 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 gebildeten Mikrotubuli in der Länge variieren





**Abbildung 3.12** – Representative CLSM-Bilder der gebildeten Mikrotubuli in reinem Polymerisationspuffer sowie in Anwesenheit von 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 und 20 Gew.-% Saccharose. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mithilfe von Flutax-2. Die gezeigten Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ .

und sich scheinbar mehrere zusammenlagern.

### 3.3.3.2 Saccharose

Neben der Verwendung von Ficoll<sup>®</sup> PM 70 als makromolekularen Crowder erfolgte ebenfalls die Untersuchung des Einflusses von Saccharose, einem Monomerbaustein des verwendeten synthetischen Polymers, auf die Polymerisationsreaktion von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von 37  $^{\circ}\text{C}$  als mikromolekularen Crowder. Wie in Abbildung 3.10 deutlich zu erkennen ist, führt die Zugabe des mikromolekularen Crowders Saccharose zu einer Retardierung der Polymerisationskinetik. Durch die Erhöhung der Saccharose-Konzentration nehmen die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  (Abbildung 3.11b) sowie die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$  (Abbildung 3.11c) der Polymerisationsreaktion zu, während die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  mit steigender Saccharose-Konzentration abnimmt (Abbildung 3.11a und Tabelle 3.1).

Bei der Betrachtung der aufgenommenen CLSM-Bilder von den in 20 Gew.-% Saccharose gebildeten Mikrotubuli (Abbildung 3.12) lässt sich deutlich erkennen, dass sich die Länge der gebildeten Mikrotubuli signifikant reduziert hat.

Ficoll<sup>®</sup> PM 70 und Saccharose beeinflussen die Polymerisationskinetik von  $\alpha/\beta$ -

Tubulin, das aus Kalbs- bzw. Lammhirn extrahiert wurde, in gleichem Maße, wie es in Abbildungen 3.19 und 3.20 und Tabelle 3.2 im Anhang ersichtlich wird.

Die hier beobachtete Retardierung der Polymerisationskinetik von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von Saccharose ist vermutlich auf die erhöhte Viskosität der verwendeten Lösung zurückzuführen.<sup>[294]</sup> Des Weiteren könnten zusätzliche enthalpische Effekte schwacher Natur ebenfalls dafür sorgen, dass die Polymerisationsgeschwindigkeit verringert wird.<sup>[274]</sup> Beispielsweise wurde eine ähnliche Wirkung von Saccharose für die Polymerisationsreaktion von Actinfilamenten und die Fibrillierung von humanem Insel-Amyloidpolypeptid (hIAPP) gefunden.<sup>[196,295]</sup> Die vergleichende Verwendung von Ficoll<sup>®</sup> PM 70 und Saccharose zeigt, dass die beschleunigende Wirkung des makromolekularen Crowders vorwiegend durch den ausgeschlossenen Volumeneffekt (*engl.: excluded volume effect*) von Ficoll<sup>®</sup> PM 70 verursacht wird,<sup>[296]</sup> wodurch sich die effektive Proteinkonzentration erhöht, und nicht durch Änderungen der Viskosität oder durch Auswirkungen enthalpischer Natur, wie beispielsweise schwache Protein-Crowder-Wechselwirkungen.<sup>[297]</sup>

## 3.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Kinetik der Polymerisationsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin, einer für die Zelldynamik und Motilität essentiell wichtigen molekularen Reaktion, durch die Anwesenheit von biologisch relevanten Osmolyten und Crowdern signifikant moduliert werden kann. Zur Untersuchung des Einflusses der Osmolyte Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Harnstoff sowie den makromolekularen Crowding-Effekt, der durch die Zugabe von Ficoll<sup>®</sup> PM 70 und dessen Monomerbaustein Saccharose simuliert wurde, auf die Polymerisationskinetik von  $\alpha/\beta$ -Tubulin wurden die biophysikalischen Methoden der Turbidimetrie, der statischen Fluoreszenzanisotropie und Confocal Laser Scanning Microscopy verwendet.

Lebende Organismen akkumulieren eine hohe Konzentration an Osmolyten als Reaktion auf vorhandene Stresssituationen, die beispielsweise durch Chemikalien, einen hohen Salzgehalt, die Temperatur oder den umgebenen Druck hervorgerufen

werden.<sup>[90,114,298]</sup> Zahlreiche Studien belegen, dass stabilisierendes TMAO und das Denaturierungsmittel Harnstoff in bestimmten Verhältnissen in biologischen Fluiden koexistieren.<sup>[90,114]</sup> In dieser Studie wurde gezeigt, dass TMAO die Polymerisationsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin durch die thermodynamische und kinetische Begünstigung der *de novo* Nukleationsreaktion beschleunigt, was wahrscheinlich auf die bevorzugte Wechselwirkung von TMAO mit dem Lösungsmittel und nicht mit der Proteinoberfläche zurückzuführen ist. Infolgedessen werden oligomere und polymere Zustände des Proteins bevorzugt, um so die gesamte, dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche von Tubulin zu minimieren. Die gebildeten Nuklei werden durch die Anwesenheit von TMAO stabilisiert, wodurch das Monomer-Oligomer-Gleichgewicht in Richtung des oligomeren Zustandes verschoben wird. Als Resultat dessen wird die Polymerisationsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin beschleunigt und sowohl die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  als auch die Verzögerungszeiten  $t_{lag}$  herabgesetzt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass TMAO die Konformationspopulation der  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimere in Richtung der elongationsfähigen verschiebt, was eine verringerte kritische Konzentration  $c_c$  und eine erhöhte Wachstumsrate  $k_{app}$  widerspiegelt. CLSM-Bilder haben weiterhin gezeigt, dass die in Anwesenheit von TMAO gebildeten Mikrotubuli kürzer sind als jene, die in reiner Pufferlösung polymerisiert wurden. Studien haben gezeigt, dass Mikrotubuli, die in Anwesenheit von TMAO gebildet wurden, gegen eine kälteinduzierte Depolymerisation unempfindlich sind.<sup>[287]</sup>

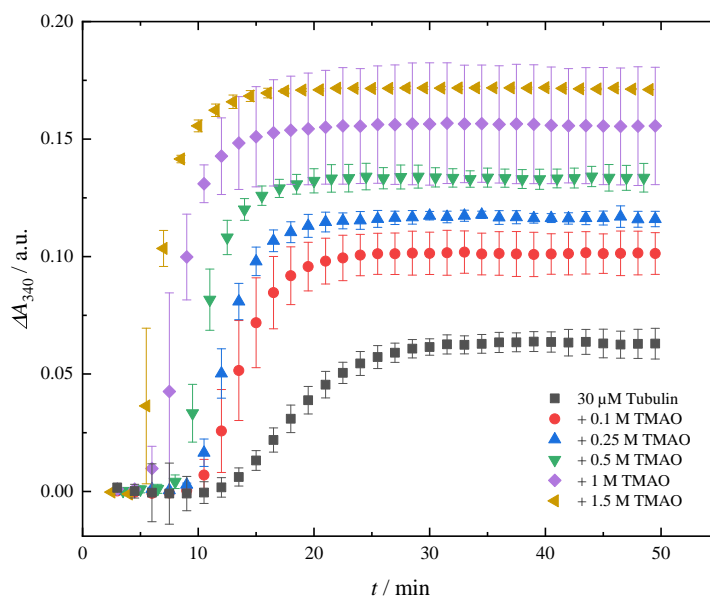
Im Gegensatz zu TMAO sammelt sich das Stoffwechselprodukt Harnstoff bevorzugt in der Nähe des Proteinrückgrats und polaren Seitenketten des Proteins an, wodurch Proteine durch direkte Wechselwirkungen destabilisiert werden, ohne dass die umgebende Wasserstruktur signifikant beeinflusst wird.<sup>[103,116,299–301]</sup> In dieser Studie wurde gezeigt, dass bereits moderate Konzentrationen an Harnstoff, wie beispielsweise 0.1 bis 0.5 M, ausreichen, um  $\alpha/\beta$ -Tubulin partiell zu entfalten bzw. das Heterodimer in eine polymerisations-inkompetenten Konformation überführen, so dass die Polymerisationskinetik verlangsamt wird und das Gleichgewicht in Richtung der Heterodimere, also dem unpolymerisierten Zustand, zu verschieben, wie es anhand der erhöhten kritischen Konzentration  $c_c$  ersichtlich ist. Infolgedessen wer-

den weniger Nuklei gebildet und somit weniger auspolymerisierte Mikrotubuli. Des Weiteren wurde gezeigt, dass dem retardierenden und destabilisierenden Effekt von Harnstoff durch die Zugabe von TMAO entgegengewirkt werden kann. Dieser entgegengewirkende Effekt ist am effektivsten bei einem TMAO/Harnstoff-Verhältnis von etwa 2:1 für Tubulin, welches aus Kalbshirnen extrahiert wurde, und etwa 1:1 für Tubulin, welches aus Lammhirnen extrahiert wurde. Bei diesen TMAO/Harnstoff-Verhältnissen wurde der retardierende Effekt von Harnstoff und der beschleunigende Effekt von TMAO auf die Polymerisationskinetik fast vollständig aufgehoben.

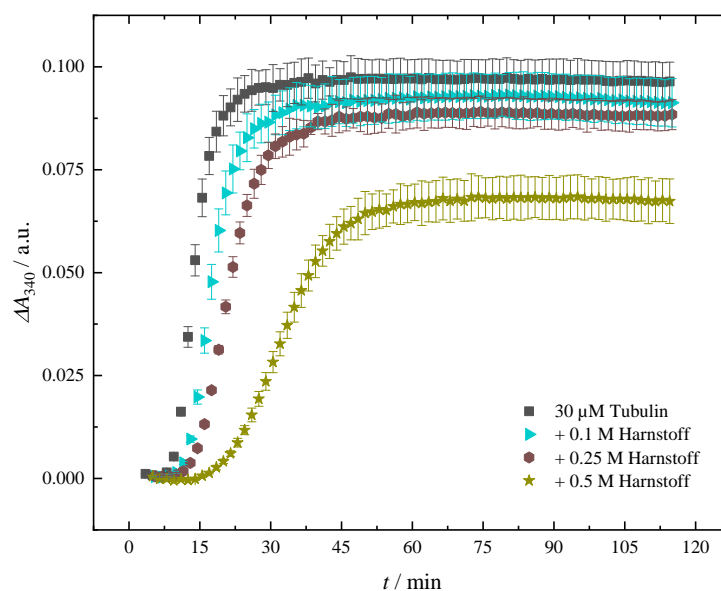
Unter makromolekularen *Crowding*-Bedingungen, die durch die Zugabe von Ficoll<sup>®</sup> PM 70 simuliert wurden, erfolgte eine signifikante Beschleunigung der Polymerisationsreaktion von Tubulin, die auf das verringerte verfügbare Volumen in der dicht gepackten Umgebung zurückzuführen ist. Aufgrund des ausgeschlossenen Volumeneffekts werden kompaktere Konformationen von Tubulinspezies, wie beispielsweise oligomere und polymere Zustände, begünstigt. Wieczorek *et al.* haben gezeigt, dass andere makromolekulare Crowder, wie beispielsweise das Protein *Bovine Serumalbumin* (BSA), das Polysaccharid Dextran und das Polymer Polyethylenglycol (PEG), eine ähnliche Wirkung auf die Polymerisationskinetik von Tubulin besitzen.<sup>[273]</sup> Experimente mit Saccharose zeigten in dieser Studie, dass zusätzliche Eigenschaften einer dicht gepackten Zelle, wie beispielsweise eine erhöhte Viskosität oder schwache nicht spezifische Wechselwirkungen, bei der Modulation der Polymerisationskinetik von Tubulin eine untergeordnete Rolle spielen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie eindeutig, dass die generellen physikochemischen Eigenschaften der zytosolischen Umgebung selbst, wie beispielsweise die Anwesenheit von Osmolyten oder makromolekularen Crowdern, das Polymerisationsverhalten von Tubulin, einer essentiell wichtigen molekularen Reaktion, die die Dynamik und Motilität der Zelle steuert, signifikant beeinflussen können, sodass diese Effekte bei einer Betrachtung von biomolekularen Assoziationsreaktionen in lebenden Organismen nicht vernachlässigt werden dürfen.

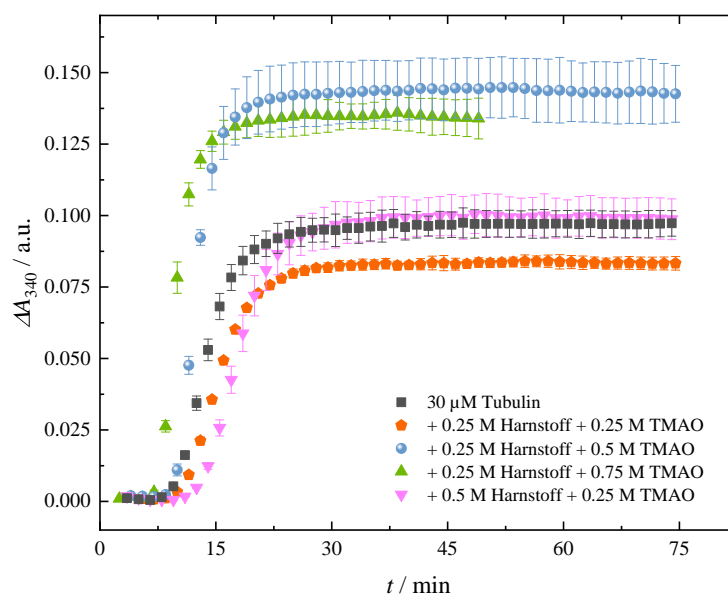
## 3.5 Anhang



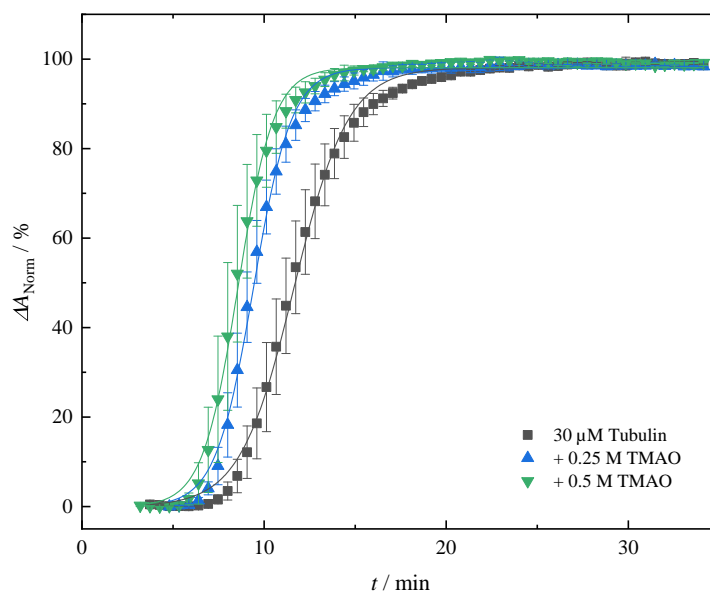
**Abbildung 3.13** – Unnormierte zeitliche Änderung der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  (bei einer Wellenlänge von 340 nm) der Polymerisationsreaktion von  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 0.1, 0.25, 0.5, 1 und 1.5 M TMAO bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Die Daten sind lediglich hintergrundkorrigiert.



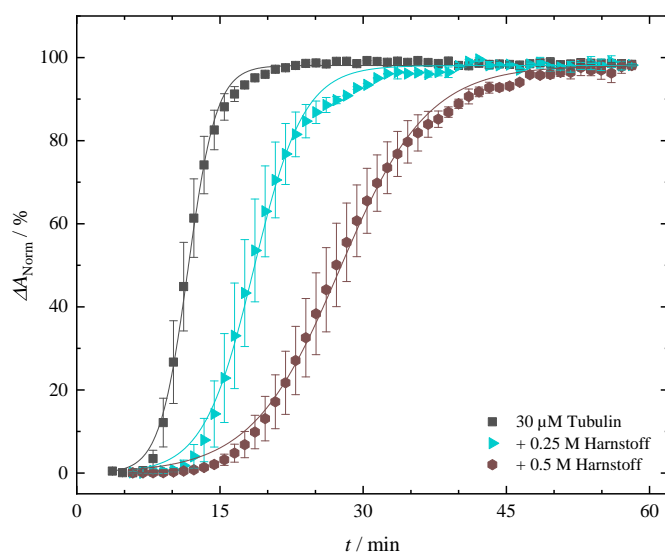
**Abbildung 3.14** – Unnormierte zeitliche Änderung der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  (bei einer Wellenlänge von 340 nm) der Polymerisationsreaktion von  $30 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 0.1, 0.25 und 0.5 M Harnstoff bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Die Daten sind lediglich hintergrundkorrigiert.



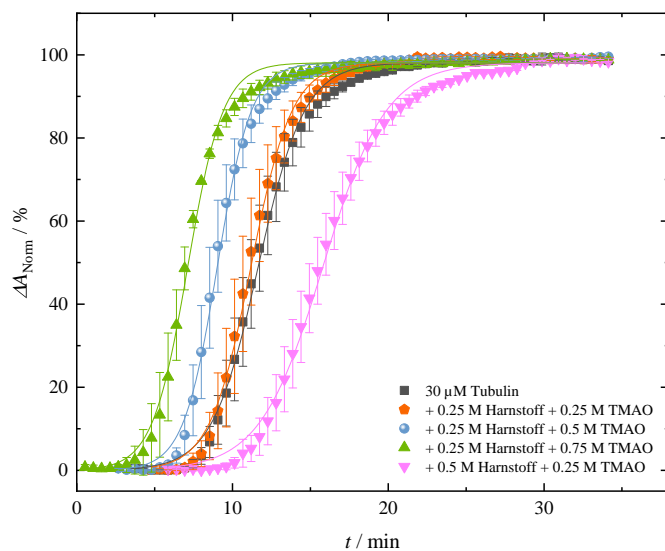
**Abbildung 3.15** – Unnormierte zeitliche Änderung der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  (bei einer Wellenlänge von 340 nm) der Polymerisationsreaktion von 30  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von verschiedenen TMAO/Harnstoff-Mischungen bei einer Temperatur von 37 °C. Die Daten sind lediglich hintergrundkorrigiert.



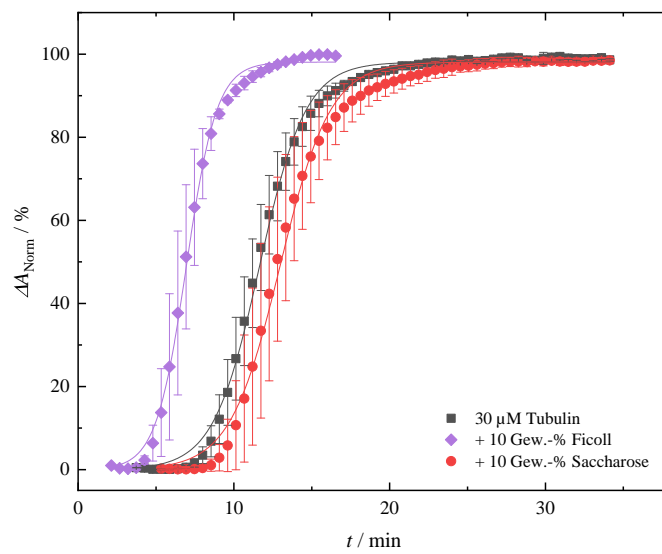
**Abbildung 3.16** – Normierte zeitliche Änderung der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  (bei einer Wellenlänge von 340 nm) der Polymerisationsreaktion von 30  $\mu\text{M}$  Tubulin, extrahiert aus Lammhirnen, in Anwesenheit von 0.25 und 0.5 M TMAO bei einer Temperatur von 37 °C. Die Daten sind hintergrundkorrigiert und zum besseren Vergleich normiert auf einer Skala von 0–100 %. Gleichung 3.1 ist jeweils an das kinetische Profil angepasst, um die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$ , Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  zu bestimmen.



**Abbildung 3.17** – Normierte zeitliche Änderung der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  (bei einer Wellenlänge von 340 nm) der Polymerisationsreaktion von 30  $\mu\text{M}$  Tubulin, extrahiert aus Lammhirnen, in Anwesenheit von 0,25 und 0,5 M Harnstoff bei einer Temperatur von 37 °C. Die Daten sind hintergrundkorrigiert und zum besseren Vergleich auf einer Skala von 0–100 % normiert. Gleichung 3.1 ist jeweils an das kinetische Profil angepasst, um die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$ , Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  zu bestimmen.

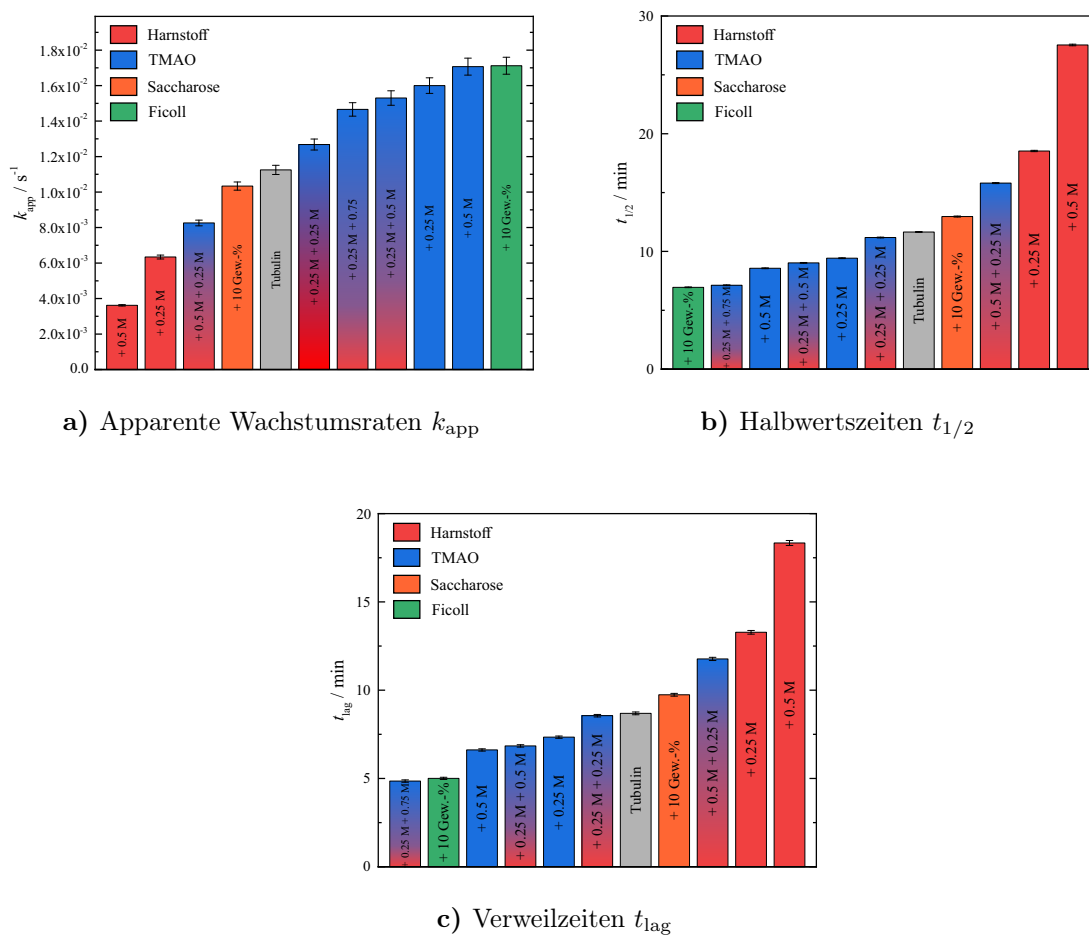


**Abbildung 3.18** – Normierte zeitliche Änderung der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  (bei einer Wellenlänge von 340 nm) der Polymerisationsreaktion von 30  $\mu\text{M}$  Tubulin, extrahiert aus Lammhirnen, in Anwesenheit von verschiedenen TMAO/Harnstoff-Mischungen bei einer Temperatur von 37 °C. Die Daten sind hintergrundkorrigiert und zum besseren Vergleich auf einer Skala von 0–100 % normiert. Gleichung 3.1 ist jeweils an das kinetische Profil angepasst, um die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$ , Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  zu bestimmen.



**Abbildung 3.19** – Normierte zeitliche Änderung der Absorption  $\Delta A_{\text{Norm}}$  (bei einer Wellenlänge von 340 nm) der Polymerisationsreaktion von  $30 \mu\text{M}$  Tubulin, extrahiert aus Lammhirnen, in Anwesenheit von 10 Gew.-% Saccharose sowie in Anwesenheit von 10 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Die Daten sind hintergrundkorrigiert und zum besseren Vergleich auf einer Skala von 0–100 % normiert. Gleichung 3.1 ist jeweils an das kinetische Profil angepasst, um die Verzögerungszeit  $t_{\text{lag}}$ , Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und die apparente Wachstumsrate  $k_{\text{app}}$  zu bestimmen.





**Abbildung 3.20** – Kinetik-Analyse der Polymerisationsreaktion von Tubulin, extrahiert aus Lammhirnen, in An- und Abwesenheit von Cosolventien und Crowdern bei einer Temperatur von 37 °C. Harnstoff: ■, TMAO: ■, Saccharose: ■, Ficoll® PM 70: ■. Farbverlauf der Harnstoff/TMAO-Mischungen entspricht der Zusammensetzung. **a)** Apparente Wachstumsrate  $k_{app}$ ; **b)** Halbwertszeiten  $t_{1/2}$ ; **c)** Verweilzeiten  $t_{lag}$ .

**Tabelle 3.2** – Kinetische Analyse der Polymerisation von 30  $\mu\text{M}$  Tubulin, extrahiert aus Lammhirnen, in An- und Abwesenheit verschiedener Cosolventien bei einer Temperatur von 37 °C.

	$k_{\text{app}} / 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{s}$	$t_{\text{lag}} / \text{s}$
Tubulin	11.25 $\pm$ 0.26	699.1 $\pm$ 2.3	521.2 $\pm$ 4.7
+ 0.25 M TMAO	16.00 $\pm$ 0.44	565.4 $\pm$ 2.0	440.4 $\pm$ 4.0
+ 0.5 M TMAO	17.07 $\pm$ 0.48	514.1 $\pm$ 1.9	396.9 $\pm$ 3.8
+ 0.25 M Harnstoff	6.34 $\pm$ 0.11	1112.0 $\pm$ 3.1	796.7 $\pm$ 6.3
+ 0.5 M Harnstoff	3.62 $\pm$ 0.04	1652.6 $\pm$ 4.1	1100.2 $\pm$ 8.4
+ 0.25 M Harnstoff + 0.25 M TMAO	12.68 $\pm$ 0.31	671.0 $\pm$ 2.2	513.3 $\pm$ 4.4
+ 0.25 M Harnstoff + 0.5 M TMAO	15.30 $\pm$ 0.41	541.5 $\pm$ 2.0	410.7 $\pm$ 4.0
+ 0.25 M Harnstoff + 0.75 M TMAO	14.66 $\pm$ 0.38	427.7 $\pm$ 2.0	291.3 $\pm$ 4.1
+ 0.5 M Harnstoff + 0.25 M TMAO	8.26 $\pm$ 0.16	948.4 $\pm$ 2.7	706.2 $\pm$ 5.5
+ 10 Gew.-% Saccharose	10.34 $\pm$ 0.23	777.9 $\pm$ 2.4	584.4 $\pm$ 4.9
+ 10 Gew.-% Ficoll® PM 70	17.12 $\pm$ 0.48	417.1 $\pm$ 1.9	300.3 $\pm$ 3.8

# 4 Untersuchung des Einflusses natürlicher Cosolventien auf Mikrotubuli

---

Teile dieser Studie wurden in folgender Referenz veröffentlicht:

Schummel, P. H.; Jaworek, M. W.; Rosin, C.; Högg, J.; Winter, R. Exploring the Influence of Natural Cosolvents on the Free Energy and Conformational Landscape of Filamentous Actin and Microtubules. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2018**, *20*, 28400–28411.<sup>[302]</sup> Die gezeigten Daten sind teilweise Bestandteil der Masterarbeit von Michel W. Jaworek. Die Durchführung der Messungen sowie die Auswertung der Daten erfolgte unter Betreuung des Autors.

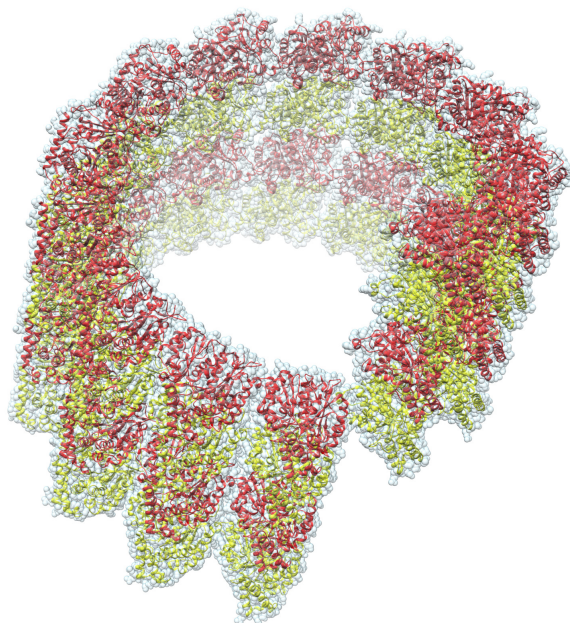


## 4.1 Einleitung

Tubulin ist neben Actin ein weiteres essentielles Protein des Zytoskeletts, welches in fast jeder eukaryotischen Zelle gefunden werden kann und ist verantwortlich für die Morphogenese, die Polarität, die Generierung der Zellbeweglichkeit, die Bildung des mitotischen Spindelapparats während der Zellteilung und für die Steuerung des intrazellulären Transports.<sup>[241-243,303]</sup> Tubulin kann *in vivo* in mindestens zwei morphologischen Zuständen gefunden werden, dem monomeren Zustand, der aus dem  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimer besteht,<sup>[304]</sup> und dem polymeren Zustand, dem Mikrotubuli.<sup>[305]</sup> Das Heterodimer ist in der Lage, lineare Protofilamente mit einer Kopf-Schwanz-Orientierung zu bilden, und 10-15 eben dieser Protofilamente können sich seitlich anordnen, um einen Zylinder mit einem Durchmesser von etwa 25 nm zu formen, das sogenannte Mikrotubuli.<sup>[244,256]</sup>

Die Proteinstabilität in wässrigen Lösungen und somit auch die Wechselwirkungen und Reaktionen der Proteine können durch die Zugabe von Cosolventien oder Osmolyten, die ebenfalls in biologischen Zellen vorkommen, verändert werden. Es ist bekannt, dass biologisch relevante chemische Verbindungen, wie beispielsweise Kohlenhydrate, Polyole, Aminosäuren und Methylamine, den gefalteten Zustand eines Proteins stabilisieren können, weshalb diese Verbindungen auch oftmals als chemische Chaperone bezeichnet werden, während chemische Verbindungen, wie beispielsweise das Stoffwechselprodukt Harnstoff, als Denaturierungsmittel bezeichnet werden, da diese den denaturierten Zustand begünstigen.<sup>[87,101,107,114,116]</sup>

Des Weiteren fanden Hatori *et al.* heraus, dass einige Osmolyte, wie beispielsweise Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), das Gleichgewicht von polymerisierbaren Proteinen in Richtung des oligomeren Zustands verschieben können, während Harnstoff den gegenteiligen Effekt besitzt.<sup>[107]</sup> Frühere Studien zur Untersuchung des Effekts von TMAO und Harnstoff auf die Polymerisationsreaktion von Actin und Tubulin haben gezeigt, dass Harnstoff die Kinetik von sowohl der Polymerisation von Actin als auch der Bildung von Mikrotubuli verlangsamt, während die Anwesenheit des Osmolyten TMAO die Kinetik beschleunigt.<sup>[107,108,240]</sup> Eine ausführliche Erläuterung zu natürlichen Osmolyten kann dem Kapitel 1.3 und eine detaillierte Ausarbeitung



**Abbildung 4.1** – 3D-Bändermodell der Kristallstruktur von Mikrotubuli (PDB-Struktur: 5syg<sup>[306]</sup>). Das 3D-Bändermodell wurde mithilfe der Computersoftware UCSF CHIMERA v.1.13.1 erstellt und modifiziert.<sup>[214]</sup>

der Studie über den Einfluss von Cosolventien auf die Polymerisationsreaktion von Mikrotubuli kann dem Kapitel 3 entnommen werden.

Frühere Studien untersuchten oftmals eine Druckapplikation auf einfache biologisch relevante Systeme, wie Lipiddoppelschichten und monomere Proteine. <sup>[8,186,197,205,307,308]</sup> Gross *et al.* zeigten beispielsweise, dass eine dicht gepackte Proteinstruktur, welche nur wenige kleine Hohlräume aufgrund einer unvollständigen Packung aufweist, eine minimale, dem hydrophoben Lösungsmittel zugängliche Oberfläche (engl. *solvent accessible surface area*, SASA) und eine verringerte Menge an Ionenpaaren innerhalb oder zwischen Seitenketten oder Untereinheiten zu einer erhöhten Druckstabilität führen.<sup>[60]</sup> Es gibt nur wenige Studien, die sich mit einer Druckapplikation auf komplexere biomolekulare Systeme und Reaktionen, wie beispielsweise Stoffwechsel- und Signalprozesse oder Polymerisationsreaktionen, beschäftigen. Studien haben gezeigt, dass neben Druckeffekten auf Lipiddoppelschichten, die Polymerisationsreaktionen von Actin und Tubulin zu den druckempfindlichsten biochemischen Prozessen zählen.<sup>[231,266,309–314]</sup> Ikkai und Ooi erforschten bereits im Jahr 1966 die Proteinstabilität von Actin bei erhöhtem Druck.<sup>[310]</sup> Dabei wurde gezeigt,

dass Actin-Monomere (G-Actin) im Vergleich zu polymerisiertem, filamentösem Actin (F-Actin) wesentlich druckempfindlicher sind und der Druck das Gleichgewicht der G-zu-F-Polymerisation in Richtung der Monomere verschiebt und F-Actin in einem Druckbereich von 2500 bis 4000 bar denaturiert.<sup>[310]</sup>

In dieser Studie sollte die Struktur und Stabilität von Mikrotubuli, welches in Abbildung 4.1 als 3D-Bändermodell dargestellt ist, in An- und Abwesenheit natürlicher Osmolyte, wie TMAO, Harnstoff und Mischungen davon, über einen weiten Temperatur- und Druckbereich mithilfe der FOURIER-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie in Kombination mit dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) und Druck-Perturbations-Kalorimetrie (PPC) untersucht werden, um ein tieferes, mechanistisches Verständnis der limitierten Temperatur- und Druckstabilität der Mikrotubuli *in vivo* zu erlangen.

## 4.2 Materialien und Methoden

### 4.2.1 Chemikalien und Probenpräparation

$\alpha/\beta$ -Tubulin wurde als aus Kalbshirnen extrahiertes Lyophilisat von dem *Centre of Biological Research (CSIS)* (Madrid, Spanien) bezogen und bei einer Temperatur von  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im Vorfeld zu den eigentlichen Experimenten wurden jeweils 2 mg des Lyophilisats in Polymerisations- $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer resuspendiert, welcher 80 mM PIPES (1,4-Piperazin-diethansulfonsäure, pD 6.8), 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT (1,4-Dithiothreitol), 1 mM EGTA [Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- $N,N,N',N'$ -tetraessigsäure] und 2.76 M Glycerin enthielt. Die Einstellung des pD-Wertes erfolgte mittels Zugabe von NaOD bzw. DCl und wurde mithilfe einer herkömmlichen pH-Elektrode bestimmt, wobei die Umrechnung des pH-Wertes in den pD-Wert mittels der Gleichung  $\text{pD} = \text{pH} + 0.4$  erfolgte.<sup>[315]</sup> Um den H/D-Austausch von Glycerin gewährleisten zu können, wurde das Polyol in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst und direkt im Anschluss daran lyophilisiert. Nach dem Lösen des Tubulin-Lyophilisats in dem zuvor genannten Polymerisations- $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer wurden die jeweiligen Proben für 10 min auf Eis gestellt, bevor diese bei  $11\,000\text{ min}^{-1}$  und  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 2 min zentrifugiert wurden, um

potentielle Proteinaggregate zu entfernen.

Die Bestimmung der Tubulin-Konzentration erfolgte mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie mit einer 1:200-Verdünnung in einer Lösung, die 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat) und 10 mM Natriumphosphat (pH 6.8) beinhaltet. Dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280$  nm bestimmt, um diese mit dem dazugehörigen Extinktionskoeffizienten von  $\varepsilon_{280} = 1.15 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  in die vorliegende Proteinkonzentration umzurechnen.<sup>[278]</sup>

Um die Mikrotubuli-Bildung verfolgen zu können, wurde die Zunahme der Absorption in einem TECAN Infinite M200 Mikrotiterplatten-Spektrometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340$  nm und einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  in Zeitintervallen von 30 s gemessen, nachdem die Probe vorher jeweils 3 s lang geschüttelt wurde. Die Induzierung der Polymerisationsreaktion erfolgte durch die Platzierung der Proben in eine auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmte 96-well Mikrotiterplatte nachdem 1 mM GTP (Guanosin-5'-triphosphat) der Probenlösung hinzugegeben wurde. Nachdem der gemessene Absorptionswert für wenigstens 10 min sichtlich konstant schien, erfolgte die Zugabe von  $110 \mu\text{M}$  Taxol zur Probenlösung in einem Verhältnis von 1:2 mit anschließender Inkubation bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  für 15 min, um das gebildete Polymer zu stabilisieren und vor einer Depolymerisation zu schützen.

### 4.2.2 Temperatur- und druckabhängige

#### Fourier-Transform-Infrarot Spektroskopie

Temperaturabhängige Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie (FTIR) Messungen wurden in einem Nicolet 5700 der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) in einem Wellenzahlenbereich von  $4000$  bis  $1100 \text{ cm}^{-1}$  durchgeführt, welches mit einem MCT-Detektor (HgCdTe, Quecksilber-Cadmium-Tellur) ausgerüstet ist und eben dieser mithilfe von flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Ein Probenvolumen von  $\sim 20 \mu\text{L}$  wurde zwischen zwei runden  $\text{CaF}_2$  (Calciumfluorid)-Fenstern mit den Maßen  $25 \times 4 \text{ mm}$  (Pike Technologies, Madison, WI, USA) platziert. Als Separator diente ein  $50 \mu\text{m}$  dicker Dichtungsring aus Mylar-Folie mit einem Innendurchmesser von  $10.5 \text{ mm}$ , sodass sich ein effektives Probenvolumen von  $4.3 \mu\text{L}$  ergibt. Die so



assemblierte Probenzelle wurde anschließend in eine temperierbare Vorrichtung platziert. Die Temperatur, die in der Probenzelle vorliegt, wurde mithilfe eines digitalen Thermometers gemessen und durch ein externes Wasserbad des Typs F32-HL der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) mit einer Fehlertoleranz von  $\Delta T = \pm 0.2^\circ\text{C}$  geregelt.

Druckabhängige FTIR-Messungen wurden an einem MAGNA 550 der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), welches mit einem MCT-Detektor (Hg-CdTe) ausgestattet ist, in einem Wellenzahlenbereich von 4000 bis  $650\text{ cm}^{-1}$  und einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  durchgeführt. Um die Proben einem Druck von bis zu 15 kbar (1.5 GPa) auszusetzen, fand eine membrangetriebene Diamantstempelzelle (Diacell<sup>®</sup> VivoDAC) der Firma Almax easyLab (Diskmuide, Belgien) ihren Einsatz. Zum kontrollierten Druckaufbau wurde ein automatisierter, pneumatisch geregelter Druckregler der Firma GE (PACE 5000, vertrieben durch Almax easyLab, iGM Controller) verwendet. Als Probenraum sowie Abstandshalter der beiden Diamantfenster diente ein  $50\text{ }\mu\text{m}$  dicker, aus Messing gestanzter Dichtungsring mit einem Außendurchmesser von 4 mm und einer zentrierten Bohrung mit einem Durchmesser von 0.5 mm, sodass sich ein effektives Probenvolumen von  $\sim 9.8\text{ nL}$  ergibt. Dieser wurde auf ein  $730\text{ }\mu\text{m}$  dickes Typ IIa Diamantfenster (Almax easyLab) gelegt und etwa  $3\text{ }\mu\text{L}$  Probe auf die zentrierte Bohrung aufgebracht. Für eine akkurate Druckbestimmung wurde als interner Druckindikator die druckabhängige Bandenverschiebung der  $\text{SO}_4^{2-}$ -Streckschwingung von Bariumsulfat ( $\text{BaSO}_4$ ) mit einer Absorptionsbande bei  $\sim 983\text{ cm}^{-1}$  (Atmosphärendruck) verwendet.<sup>[316]</sup>

Sowohl die druck- als auch die temperaturabhängigen FTIR-Experimente wurden mit einer Proteinkonzentration von  $25\text{ mg mL}^{-1}$  durchgeführt. Die Temperatur innerhalb der Probenzellen wurde mithilfe eines Digitalthermometers, dessen Genauigkeit bei  $\Delta T = \pm 0.2^\circ\text{C}$  liegt, gemessen, während diese über ein externes Wasserbad des Typs F32-HL der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) kontrolliert wurde, wodurch ein kontrollierbarer Temperaturbereich von 1 bis  $98^\circ\text{C}$  geboten wurde. Zur Gewährleistung eines guten Signal-Rausch-Verhältnisses wurde die Probenkammer des Spektrometers kontinuierlich mit  $\text{CO}_2$ -freier, trockener Luft gespült (Adsorpti-

onstrockner Typ 15, Zander, Essen, Deutschland). Nachdem die Probenzelle in dem jeweiligen FTIR-Spektrometer platziert wurde, erfolgte eine Wartezeit von bis zu 30 min um sicherzustellen, dass sich ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis eingestellt hat. Für jede eingestellte Temperatur bzw. jeden eingestellten Druck wurden mithilfe der Spektralverarbeitungssoftware Omnic 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 256 Spektren in Folge aufgenommen, diese jeweils zu einem resultierenden FTIR-Spektrum gemittelt und mit einer HAPP-GENZEL-Funktion angepasst. Die aufgenommenen FTIR-Spektren wurden unter Zuhilfenahme des Softwarepakets Thermo GRAMS / AI prozessiert und analysiert. Dazu erfolgte zunächst eine Subtraktion des Pufferspektrums und eine anschließende Glättung der Spektren. Im Bereich der Amid-I'-Bande, die sich im Wellenzahlenbereich von 1700 bis 1600  $\text{cm}^{-1}$  befindet, erfolgte eine Flächennormierung, damit druck- bzw. temperaturabhängige Änderungen besser verglichen werden konnten. Dabei wurde jedes einzelne FTIR-Spektrum in dem Amid-I'-Bandenbereich für sich integriert und anschließend jede gemessene Absorption des hintergrundkorrigierten Spektrums durch die integrierte Fläche dividiert:

$$A_{\text{Norm}}(\tilde{\nu}, x) = \frac{A(\tilde{\nu}, x)}{\int_{1600}^{1700} A(\tilde{\nu}, x) d\tilde{\nu}} \quad (4.1)$$

wobei das in Gleichung 4.1 auftretende  $x$  entweder für den Druck  $p$  oder die Temperatur  $T$  steht. Aus der Normierung folgt, dass die Fläche unter jeder Amid-I'-Bande gleich Eins ist:

$$\int_{1600}^{1700} A_{\text{Norm}}(\tilde{\nu}, x) d\tilde{\nu} = 1 \quad (4.2)$$

Zur Identifikation einzelner Subbanden der Amid-I'-Bande, woraus eine Konformationsänderung des Proteins nachverfolgt werden kann, wurden im Anschluss an die Flächennormierung der einzelnen Amid-I'-Banden jeweils die sogenannte FOURIER-Selbstentfaltung (engl.: *Fourier Self-Deconvolution*, FSD) durchgeführt, sowie jeweils die 2. Ableitung gebildet und Differenzspektren herangezogen. Dabei können

**Tabelle 4.1** – Sekundärstrukturelemente und Absorptionsbanden von Mikrotubuli im spektralen Bereich der Amid-I'-Bande.<sup>[317]</sup>

Sekundärstrukturelement	Absorptionsbereich / $\text{cm}^{-1}$
Seitenketten	$< 1615$
Intermolekulare $\beta$ -Faltblätter	$\sim 1615, \sim 1684$
Intramolekulare $\beta$ -Faltblätter	$\sim 1628, \sim 1636$
Ungeordnete Strukturen	$\sim 1646$
$\alpha$ -Helices	$\sim 1654$
Schleifen	$\sim 1660\text{--}1670$

Subbanden an den Positionen nachgewiesen werden, an denen sich ein Maximum im FSD-Spektrum und zugleich ein Minimum im Spektrum der 2. Ableitung befindet. Auf diese Art und Weise der Subbanden-Analyse konnten den vermessenen Mikrotubuli sieben Subbanden zugeordnet werden, deren Absorptionsbereiche in Tabelle 4.1 aufgelistet sind.

Die relativen Änderungen in der Population von Sekundärstrukturelementen können unter Verwendung von sieben gemischter Gauß-Lorentz-Funktionen in einer Linearkombination bestimmt werden. Da zuvor eine Flächennormierung der Amid-I'-Bande stattgefunden hat, entspricht die Fläche unter der jeweils angepassten Kurve dem Absorptionsbeitrag des jeweiligen Sekundärstrukturelements und gibt somit dessen Population in der gerade vorliegenden Konformation an.<sup>[318]</sup>

Unter der Annahme, dass der beobachteten Proteinfaltung bzw. der Proteindissoziation ein Zwei-Zustands-Modell zugrunde liegt, kann eine modifizierte BOLTZMANN-Funktion verwendet werden, um jeweils den druck- (Gleichung 4.3) bzw. temperaturabhängigen (Gleichung 4.4) Verlauf der sigmoidalen Kurven der Populationsänderung der Sekundärstrukturelemente mathematisch zu beschreiben. Die durch Druck bzw. Temperatur induzierten Änderungen der Intensitäten sind dabei durch folgende Gleichungen gegeben:<sup>[227]</sup>

$$I(p) = \frac{I_F - I_U}{1 + \exp \left[ - (p - p_m) \cdot \left( \frac{\Delta V}{RT} \right) \right]} + I_U \quad (4.3)$$

$$I(T) = \frac{I_F - I_U}{1 + \exp \left[ - \left( \frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \cdot \left( \frac{\Delta H}{R} \right) \right]} + I_U \quad (4.4)$$

Bei diesem Zwei-Zustands-Modell entsprechen der native, also der gefaltete (F) Zustand bzw. der entfaltete oder dissoziierte (U) Zustand des Proteins den Plateauwerten der IR-Bandenintensitäten  $I_F$  bzw.  $I_U$ . Die Wendepunkte der sigmoidalen Kurven entsprechen dem Übergangsdruck  $p_m$  bzw. der Übergangstemperatur  $T_m$ , bei denen jeweils 50 % native und entfaltete/dissoziierte Mikrotubuli vorliegen. Die erhaltenen thermodynamischen Parameter  $\Delta H$  und  $\Delta V$  entsprechen der Änderung der Standardreaktionsenthalpie (VAN'T HOFFsche-Enthalpie,  $\Delta H = \Delta H_{vH}$ ) und der Volumenänderung der Entfaltungsreaktion und können mithilfe der zuvor beschriebenen Gleichungen (4.3) und (4.4) direkt anhand einer Kurvenanpassung an die experimentellen Daten bestimmt werden.<sup>[227]</sup>

Zur Bestimmung der druck- bzw. temperaturabhängigen thermodynamischen Parameter wurde jede Probe mindestens dreimal gemessen und wie zuvor beschrieben, analysiert. Bei der Analyse der druck-induzierten Änderungen der Sekundärstrukturanteile wurde mithilfe einer globalen Funktionsanpassung der Gleichung (4.3) an den jeweiligen Datensatz individuell angepasst. Dabei wurde ausschließlich der Kurvenverlauf der  $\alpha$ -Helices ( $\sim 1651 \text{ cm}^{-1}$ ) berücksichtigt.

Bei der Analyse der thermisch-induzierten Änderungen der Sekundärstrukturanteile wurde mithilfe einer globalen Funktionsanpassung die Gleichung (4.4) an den jeweiligen Datensatz individuell angepasst. Hierbei wurden ausschließlich die Kurvenverläufe der  $\alpha$ -Helices ( $\sim 1651 \text{ cm}^{-1}$ ), der intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1629 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren und der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter ( $\sim 1618$  und  $\sim 1683 \text{ cm}^{-1}$ ) verwendet. Zur thermodynamischen Analyse sowohl der druck- als auch der temperaturabhängigen Messreihen wurden ausschließlich die Änderungen der zuvor genannten Sekundärstrukturelemente verwendet, da diese im Vergleich zu den Änderungen der restlichen Sekundärstrukturelemente, die zur Kurvenanpassung an die Amid-I'-Bande verwendet wurden, eine hohe Druck- bzw. Temperatursensitivität aufweisen. Die erhaltenen thermodynamischen Parameter der einzelnen Datensätze wurden anschließend über die Anzahl der durchgeführten

Experimente gemittelt, um sowohl qualitative als auch quantitative Rückschlüsse auf den Entfaltungs- bzw. Dissoziationsprozess der vermessenen Mikrotubuli ziehen zu können.

### 4.2.3 Differentialthermoanalyse und Druck-Perturbations-Kalorimetrie

Sowohl die dynamischen Differenzkalorimetrie- (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) als auch die Druck-Perturbations-Kalorimetrie- (engl. *pressure perturbation calorimetry*, PPC) Experimente wurden an einem VP-DSC-System der Firma MicroCal (Northampton, MA, USA) durchgeführt, welches mit dem benötigten Zubehör für die Drucksprungtechnik ausgerüstet ist. Neben den Probenlösungen wurden auch die Referenzlösungen mithilfe eines Vakuumentgasers entgast, damit sich in den jeweiligen Zellen des Messsystems keine Luftblasen mehr bilden konnten. Das Volumen der Proben- bzw. Referenzzelle beträgt jeweils etwa 0.5 mL. In die Probenzelle wurde die zu untersuchende Proteinlösung und in die Referenzzelle die jeweilige Pufferlösung eingefüllt. Für die DSC-Experimente wurde eine Proteinkonzentration von  $1.2 \text{ g mL}^{-1}$  verwendet, die in einem Temperaturbereich von 20 bis  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  bei einer Heizrate von  $60 \text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$  vermessen wurden. Aus den DSC-Kurven kann die Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  während der Entfaltung erhalten werden. Die Übergangstemperatur  $T_m$  und die kalorimetrische Enthalpieänderung  $\Delta H_{\text{cal}}$  des Entfaltungs- bzw. Dissoziationsprozesses von Mikrotubuli wurden mithilfe der Auswertungssoftware *MicroCal Origin 7* erhalten. Zur besseren Auswertung erfolgte eine Basislinienkorrektur im Bereich des Übergangs der erhaltenen Thermogramme.

Mithilfe einer FOURIER-Selbstentfaltung der Thermogramme konnten einzelne Subbanden, die die verschiedenen Prozesse während der thermischen Entfaltung des Proteins darstellen, identifiziert werden, sodass im Anschluss eine entsprechende Anzahl an GAUSS-Funktionen an den Peak des Thermogramms angefitet werden konnte. Die Software *Origin 2017Pro* beinhaltet die kleine Anwendung **Fourier Self-Deconvolution** und die Funktion **Differentiate**, die zur Berechnung der FSD-Spektren bzw. der 2. Ableitung der DSC-Thermogramme verwendet wurden.

Existiert bei der FSD ein positiver Peak und gleichzeitig bei der 2. Ableitung ein negativen Peak bei der gleichen Temperatur, so kann eine darunter liegende Subbande mit dem Zentrum bei eben dieser Temperatur identifiziert werden. Die auf diese Art ermittelten Subbanden bei den einzelnen Temperaturen konnten dann mithilfe des Programms **Peak Analysis** der Software *Origin 2017Pro* an das experimentelles DSC-Thermogramm angepasst werden.

Bei den PPC-Experimenten wurde eine Proteinkonzentration von  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  verwendet, die in einem Temperaturbereich von 25 bis  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  in Temperaturschritten von  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  vermessen wurden. Für die Drucksprünge mit einer Amplitude von  $\pm 5 \text{ bar}$  wurde als Druckmedium Stickstoffgas ( $\text{N}_2$ ) verwendet. Alle Proben wurden auf die selbe Art und Weise wie für die DSC-Experimente vorbereitet.

Für die thermodynamische Analyse der erhaltenen PPC-Daten wurde zunächst eine Reihe von Referenzmessungen des entsprechenden Puffer *vs.* Puffer, Puffer *vs.* deuteriertem Wasser ( $\text{D}_2\text{O}$ ) und  $\text{D}_2\text{O}$  *vs.*  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt und mithilfe der *MicroCal Origin 7* Verarbeitungssoftware analysiert. Aus den zuvor durchgeführten Referenzmessungen wurden anschließend mithilfe der quadratischen Gleichung  $a_{x/x} + b_{x/x} \cdot t + c_{x/x} \cdot t^2$  die Parameter  $a_{x/x}$ ,  $b_{x/x}$  und  $c_{x/x}$  ermittelt, die neben der verwendeten Mikrotubuli-Konzentration und dessen spezifischen Volumen für die Bestimmung des thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha$  benötigt werden. Des Weiteren erfolgte eine Subtraktion des Puffer *vs.*  $\text{D}_2\text{O}$ -Thermogramms von dem Proben-Thermogramm, um daraus die Temperaturabhängigkeit des thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha(T)$  zu erhalten. Nach anschließender Basislinienkorrektur kann mittels Integration der Peakfläche in dem Temperaturintervall des Übergangs von  $T_1$  nach  $T_2$  die relative Volumenänderung  $\Delta V/V$  mittels folgender Gleichung bestimmt werden:<sup>[319]</sup>

$$\frac{\Delta V}{V} = \int_{T_1}^{T_2} \alpha(T) dT \quad (4.5)$$

## 4.3 Ergebnisse und Diskussion

Um einen tieferen Einblick in das temperatur- und druckabhängige Struktur- und Phasenverhalten von Mikrotubuli zu erhalten, wurden Untersuchungen mittels FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie), Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) und Druck-Perturbations-Kalorimetrie (PPC) in einem Temperaturbereich von 20 bis 90 °C und einem Druckbereich von 1 bar bis 15 kbar (1.5 GPa) durchgeführt. Aus den erhaltenen FTIR-spektroskopischen Daten können Informationen über Änderungen der Bindungsmuster von Wasserstoff-Brückenbindungen und somit Rückschlüsse auf Konformationsänderungen der Sekundärstruktur des Proteins gewonnen und assoziierte thermodynamische Parameter wie beispielsweise Änderungen der Enthalpie, der Entropie und des Volumens, die aus dem Entfaltungsbzw. Dissoziationsprozess der Mikrotubuli resultieren, abgeleitet werden. Die verwendeten kalorimetrischen Methoden DSC und PPC liefern zusätzliche thermodynamische Informationen über die Proteinentfaltung bzw. -dissoziation sowie Hydratations- und Volumenänderungen der untersuchten Mikrotubuli.

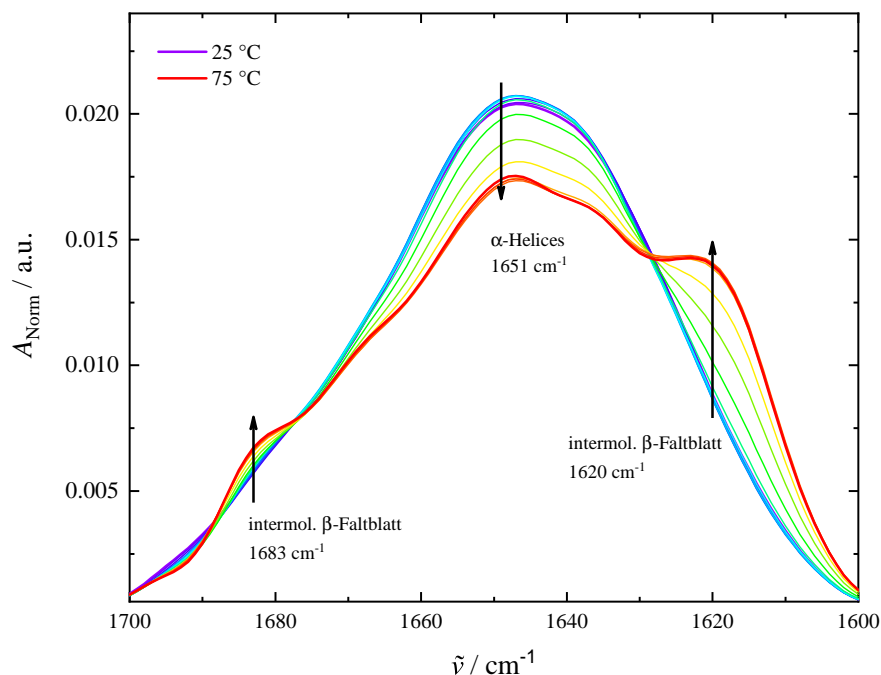
Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, wurden die aufgenommenen FTIR-Spektren hintergrundkorrigiert, d.h., dass das jeweils dazugehörige Pufferspektrum vom Probenspektrum subtrahiert wurde. Anschließend erfolgte eine Glättung und Flächennormierung im Bereich der Amid-I'-Bande. Die auf diese Art und Weise prozessierten FTIR-Spektren sind in Abbildung 4.2 für Mikrotubuli in reinem Puffer für den Temperaturbereich von 25 bis 78 °C exemplarisch abgebildet.

Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Intensität im Bereich der  $\alpha$ -Helices, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1651 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, mit steigender Temperatur abnimmt, während im Absorptionsbereich der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter, die bei den Wellenzahlen  $\sim 1683$  und  $\sim 1618 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, die Intensität mit steigender Temperatur zunimmt.

Um die Amid-I'-Bande der verwendeten Mikrotubuli hinsichtlich ihrer Temperatur-

---

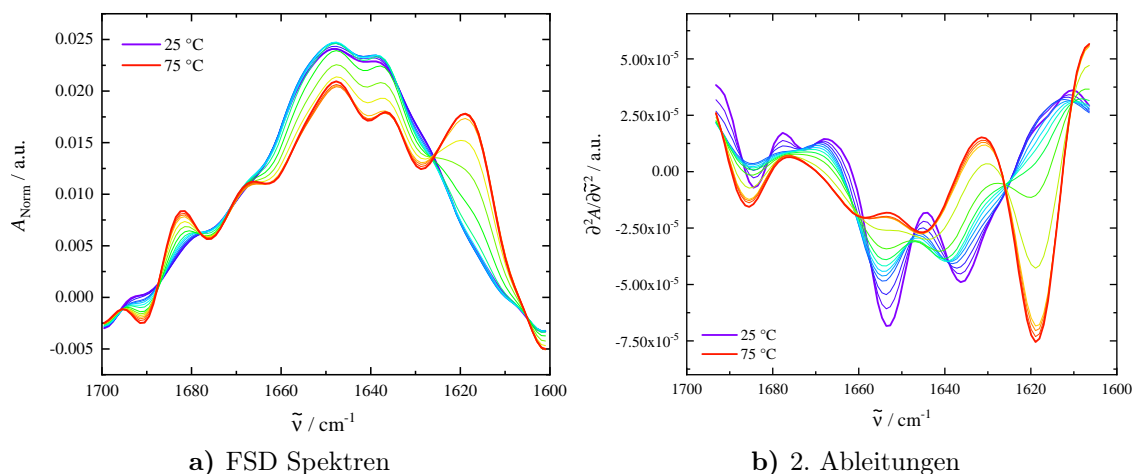
Die hier gezeigten FTIR-spektroskopischen Daten sind Bestandteil der Masterarbeit von Michel W. Jaworek. Die Durchführung der Messungen sowie die Auswertung der Daten erfolgte durch Michel W. Jaworek unter Betreuung des Autors. Die Auswertung der kalorimetrischen Daten erfolgte durch den Autor



**Abbildung 4.2** – Temperaturabhängigkeit der flächennormierten Amid-I'-Bande von Mikrotubuli bei Atmosphärendruck. Der Farbverlauf von lila nach rot entspricht dem Temperaturgradienten und damit dem Übergang von dem nativen in den entfalteten/dissoziierten Zustand bzw. in eine Form der Aggregation.

und Druckabhängigkeit untersuchen zu können, erfolgte im Anschluss an deren Prozessierung eine Subbandenanalyse eben dieser, damit die Zusammensetzung der Sekundärstruktur im nativen Zustand bestimmt werden kann. Mithilfe zweier mathematischer Methoden, zum einen der Bildung der 2. Ableitung und zum anderen die Anwendung einer FOURIER-Selbstentfaltung-Funktion (FSD), erfolgte eine Bestimmung bezüglich Anzahl und Lage der einzelnen Subbanden der einzelnen Sekundärstrukturanteile unter der betrachteten Amid-I'-Bande, die spektral nicht aufgelöst werden konnten. In Abbildung 4.3 sind zum einen die temperaturabhängigen FSD-Spektren (4.3a) und zum anderen die temperaturabhängigen 2. Ableitungen der flächennormierten Amid-I'-Bande (4.3b) der untersuchten Mikrotubuli in reinem Puffer bei Atmosphärendruck abgebildet. Es lässt sich anhand der beiden Graphen wiederum deutlich erkennen, dass der Anteil an  $\alpha$ -Helices mit steigender Temperatur abnimmt, erkennbar an der temperaturabhängigen Zunahme der Intensität im FSD-Spektrum bzw. der temperaturabhängigen Abnahme der Inten-

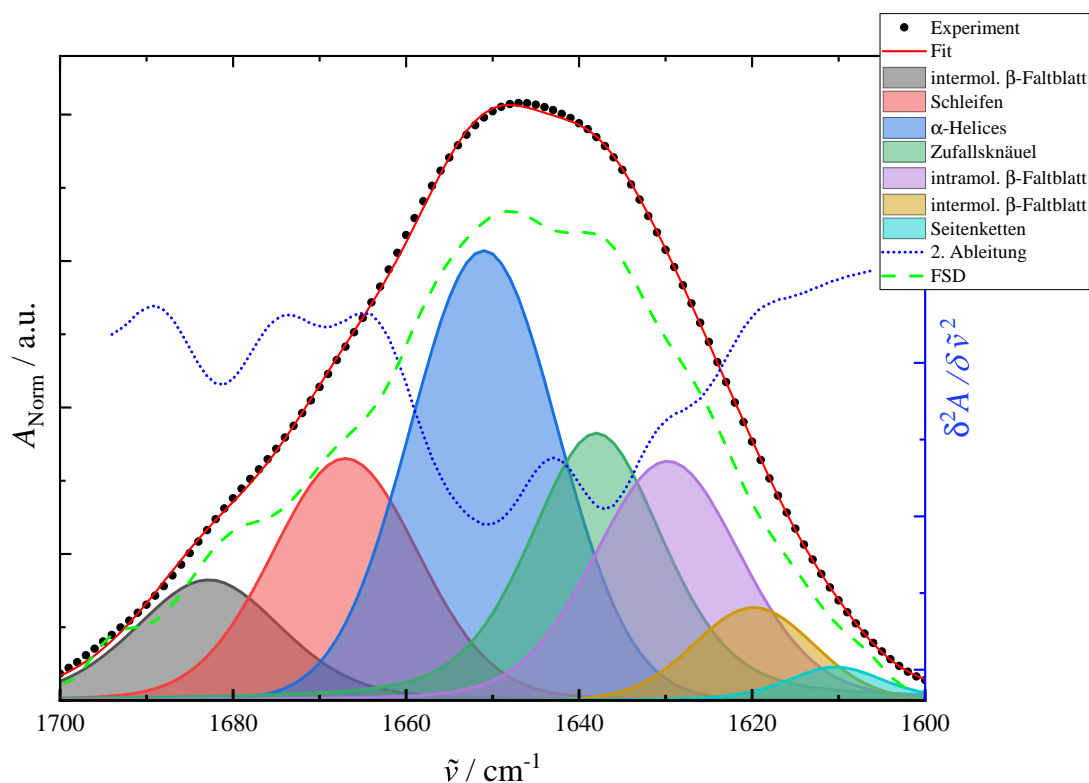




**Abbildung 4.3** – Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstruktur von Mikrotubuli. **a)** Temperaturabhängige Selbstentfaltungsspektren der flächennormierten Amid-I'-Bande von Mikrotubuli bei Atmosphärendruck. Subbanden der einzelnen Sekundärstrukturelemente können bei vorhandenen Maxima gefunden werden. **b)** 2. Ableitung der flächennormierten Amid-I'-Bande von Mikrotubuli. Die Anzahl und die Lage der einzelnen Subbanden der Sekundärstrukturelemente stimmt mit der Lage der vorhandenen Minima überein.

sität im Spektrum der 2. Ableitung bei einer Wellenzahl von  $\sim 1651 \text{ cm}^{-1}$ , während der Anteil an intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern, welche bei Wellenzahlen von  $\sim 1618$  und  $\sim 1683 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, in dem betrachteten Temperaturintervall ansteigen, was anhand des entgegengesetzten Verhaltens des temperaturabhängigen Intensitätsverlaufs im FSD-Spektrum und in der 2. Ableitung an der jeweiligen Position zu erkennen ist.

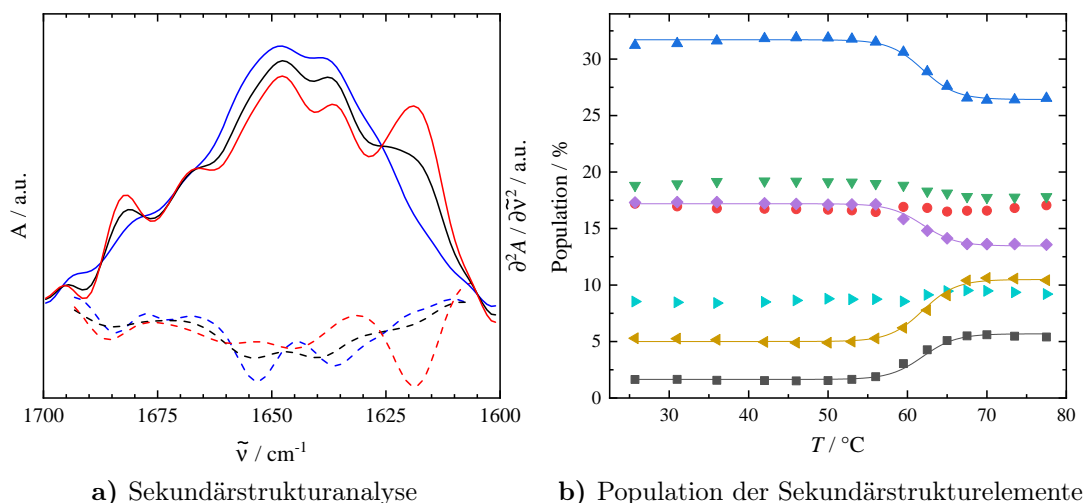
Befindet sich im Selbstentfaltungsspektrum ein positiver Peak und gleichzeitig an der selben Position im Spektrum der 2. Ableitung ein Minimum, so kann an dieser Position eine Subbande nachgewiesen werden. Bei dieser Subbandenanalyse wurde die Publikation von de Pereda *et al.* herangezogen, um die Lage und Anzahl der gefundenen Subbanden miteinander abgleichen zu können (vgl. Tabelle 4.1).<sup>[317]</sup> In Abbildung 4.4 sind sowohl die experimentell bestimmte Amid-I'-Bande als auch die zur Subbandenanalyse benötigten Spektren der FOURIER-Selbstentfaltung und der 2. Ableitung zum besseren Vergleich gemeinsam abgebildet. Hierbei ist deutlich das gegenläufige Verhalten der auftretenden Maxima im FSD-Spektrum im Vergleich zu den an derselben Position in der 2. Ableitung auftretenden Minima zu erkennen. Aus



**Abbildung 4.4** – Experimentell bestimmte Amid-I'-Bande von Mikrotubuli (●) bei Atmosphärendruck und 25 °C sowie die durch Subbanden gebildete Funktionsanpassung (–). Die Bestimmung der Subbanden erfolgte durch Bildung des FSD-Spektrums (– –) und der 2. Ableitung (· · ·).

der Subbandenanalyse resultieren sieben Subbanden, die im Superpositionsprinzip an die experimentell bestimmte Amid-I'-Bande angepasst wurden und ebenfalls zur Verdeutlichung in Abbildung 4.4 abgebildet sind.

Wie bereits zuvor erwähnt, sind die am meisten betroffenen Sekundärstrukturelemente während einer Temperaturerhöhung  $\alpha$ -Helices, welche bei einer Wellenzahl von  $\sim 1651 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter, die eine Absorptionsbande bei  $\sim 1629 \text{ cm}^{-1}$  besitzen, sowie intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter mit Absorptionsbanden bei  $\sim 1618$  und  $\sim 1683 \text{ cm}^{-1}$ , die sich aufgrund einer Aggregation bei höheren Temperaturen ausbilden. Neben diesen genannten Banden der Sekundärstrukturelemente wurden auch solche verwendet, die entweder erst bei höheren Temperaturen auftreten oder zur Verbesserung der Qualität der Funktionsanpassung beitragen, innerhalb der Kurvenanpassung allerdings konstant gehalten wurden, wie beispielsweise Schleifen mit einem Absorptionsmaximum bei  $\sim 1668 \text{ cm}^{-1}$ .



**Abbildung 4.5** – Temperaturabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Abwesenheit von Cosolventien. **a)** FSD-Spektrum der Amid-I'-Bande von Mikrotubuli bei einer Temperatur von 25 °C (—), bei der Übergangstemperatur  $T_m$  (—) und bei einer Temperatur von 75 °C (—), sowie die dazugehörigen 2. Ableitungen, dargestellt als gestrichelte Linien in den entsprechenden Farben. **b)** Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.4). ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1683  $\text{cm}^{-1}$ ), ● Schleifen (1669  $\text{cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices (1651  $\text{cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel (1637  $\text{cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1629  $\text{cm}^{-1}$ ), ◀ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1618  $\text{cm}^{-1}$ ), ▶ Seitenketten (<1615  $\text{cm}^{-1}$ ).

In einer CryoEM Studie wurde herausgefunden, dass die Sekundärstruktur des  $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimers  $\sim 39\%$   $\alpha$ -Helices und  $\sim 13\%$   $\beta$ -Faltblättern enthält,<sup>[242]</sup> was in guter Übereinstimmung mit den hier mittels FTIR-Spektroskopie bestimmten Sekundärstrukturanteilen ist, wobei kleinere Unterschiede in der Zusammensetzung auf die unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zurückzuführen sind. Da in der folgenden Untersuchung lediglich relative Änderungen des jeweiligen Sekundärstrukturelements betrachtet werden, kann der absolut bestimmte Anteil des jeweiligen Sekundärstrukturelements vernachlässigt werden.

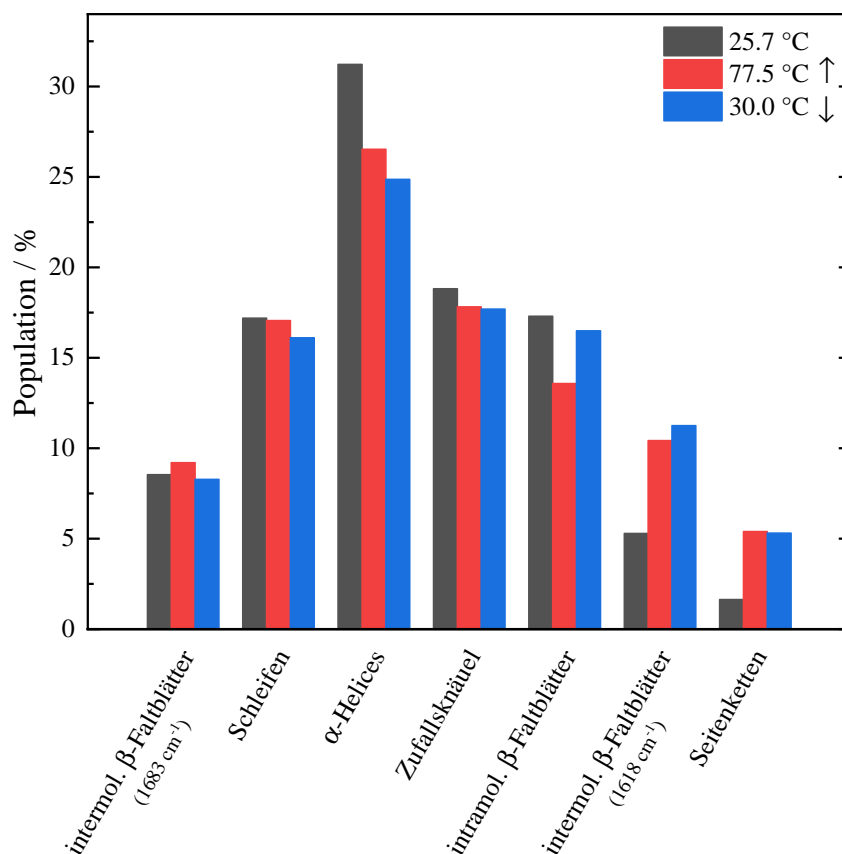
In Abbildung 4.5a sind beispielhaft temperaturabhängige FSD-Spektren den dazugehörigen 2. Ableitungen der Amid-I'-Bande von Mikrotubuli bei Atmosphärendruck und charakteristischen Temperaturen gegenübergestellt. Diese Gegenüberstellung dient, wie bereits zuvor beschrieben, zur genauen Bestimmung der Lage der einzelnen Subbanden. Anhand dieser Abbildung ist bereits deutlich zu erken-

nen, dass mit steigender Temperatur der Anteil an helikalen Strukturen, welche eine Absorptionsbande bei  $\sim 1651 \text{ cm}^{-1}$  besitzen, abnimmt, während der Anteil an intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern, mit Absorptionsbanden bei  $\sim 1618$  und  $\sim 1683 \text{ cm}^{-1}$ , mit steigender Temperatur zunimmt.

Im Anschluss an die Subbandenanalyse und die Bandenanpassung, kann der prozentuale Anteil der einzelnen Sekundärstrukturelemente temperaturabhängig ermittelt werden, welcher in Abbildung 4.5b dargestellt ist. Hierbei ist wiederum deutlich zu erkennen, dass mit steigender Temperatur der Anteil der vorhandenen  $\alpha$ -Helices und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern abnimmt, während der Anteil der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter zunimmt.

In dem Temperaturbereich zwischen 25 und 55 °C sind keine signifikanten Veränderungen in den Anteilen der Sekundärstrukturelemente zu beobachten. Ab einer Temperatur von  $\sim 55$  °C beginnt der thermische Entfaltungsprozess, der von einer geringen Abnahme des helikalen Anteils ( $\sim -5\%$ ) und an intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim -4\%$ ), deren Absorptionsbande bei  $\sim 1629 \text{ cm}^{-1}$  liegt, begleitet wird. Während dieser partiellen thermischen Entfaltung der Mikrotubuli bilden sich antiparallele intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter aus, die bei Wellenzahlen von  $\sim 1618$  und  $\sim 1683 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren. Die relative Zunahme dieser antiparallelen intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter während des temperaturinduzierten Entfaltungsprozess beträgt  $\sim 10\%$  und ist ein Indiz dafür, dass die vorhandenen Mikrotubuli bei höheren Temperaturen aggregieren (Abbildung 4.5b). Somit beträgt die gesamte relative Änderung der Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente etwa 19%. Mithilfe der abgewandelten Boltzmann-Funktion in Gleichung (4.4) kann die Entfaltungstemperatur  $T_m$ , an welcher 50% der vorhandenen Mikrotubuli im nativen und 50% im entfalteten Zustand vorliegen, zu  $62.8 \pm 0.4$  °C und eine VAN'T HOFFsche-Enthalpieänderung  $\Delta H_{vH}$  zu  $456 \pm 32 \text{ kJ mol}^{-1}$  für den thermisch-induzierten strukturellen Übergang bestimmt werden.

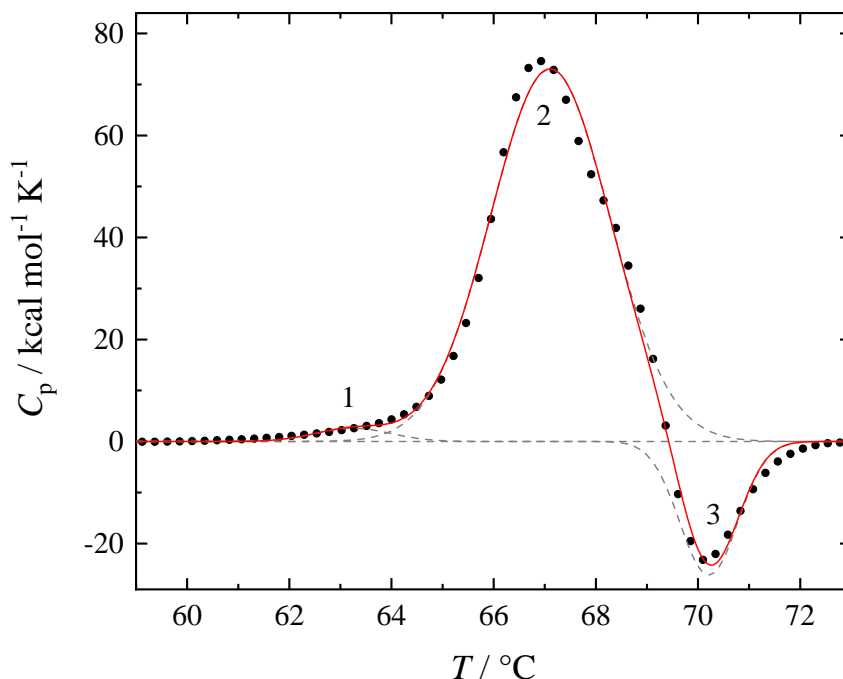
Zur Erforschung, ob der hier betrachtete thermische Übergang von reversibler Natur ist, wurde eine Probe von Mikrotubuli in Abwesenheit von Cosolventien bei Atmosphärendruck und 25.7 °C spektroskopisch vermessen. Im Anschluss wurde diese



**Abbildung 4.6** – Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente in reiner Pufferlösung bei Atmosphärendruck und 25.7 °C (■), nach Erwärmung auf 77.5 °C (■) und nach erneuter Abkühlung auf 30.0 °C (■) zeigen eine partielle Irreversibilität des thermischen Entfaltungsprozesses.

Probe auf eine Temperatur von 77.5 °C erwärmt, bevor jene dann wiederum auf eine Temperatur von 30.0 °C abgekühlt und jeweils vermessen wurde. Bei dieser temperaturabhängigen Messung ergaben sich die in Abbildung 4.6 dargestellten Anteile der Sekundärstrukturelemente. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass es sich bei dem hier betrachteten thermischen Übergang der vermessen Mikrotubuli um einen partiell irreversiblen Prozess handelt, was anhand der zumeist deutlich unterschiedlichen Anteile der Sekundärstrukturelemente vor und nach Erwärmung zu erkennen ist.

Aufgrund dieser partiellen irreversiblen Natur des themisch-induzierten Übergangs von Mikrotubuli (Abbildung 4.6), die auch bei den meisten Proteinen vorliegt, sollten die  $\Delta H_{\text{vH}}$ -Werte sorgfältig berücksichtigt und nicht als Absolutwerte betrachtet werden, können jedoch zum Vergleich mit den Ergebnissen dienen, die aus den temperaturabhängigen Messungen von Mikrotubuli in Anwesenheit verschiedener



**Abbildung 4.7** – Experimentell bestimmtes Thermogramm von Mikrotubuli in Abwesenheit von Cosolventien. Die experimentellen Daten ( $\bullet$ ) wurden durch Anwendung einer FOURIER-Selbstentfaltung (FSD) analysiert, um die zugrunde liegenden Teilprozesse des gesamten thermischen Entfaltungsprozesses von Mikrotubuli aufzudecken. Dabei wurden drei Peaks gefunden, die mithilfe von GAUSS-Funktionen ( $- -$ ) an die experimentellen Daten angepasst wurden ( $-$ ).

Cosolventien erhalten werden.<sup>[35,320,321]</sup>

Abbildung 4.7 zeigt das DSC-Thermogramm von Mikrotubuli in reiner Pufferlösung in einem Temperaturbereich von 59 bis 75 °C, das einen breiten Peak zwischen 60 °C und 73 °C aufweist.<sup>[322]</sup> Die Analyse der DSC-Peakform durch Anwendung einer FOURIER-Selbstentfaltung (FSD) legt nahe, dass der Entfaltungsprozess von Mikrotubuli zweiphasig ist, wobei Übergangstemperaturen bei 63,2 °C (Peak 1) bzw. 67,1 °C (Peak 2) auftreten (Tabelle 4.2).

Das *et al.* fanden heraus, dass der thermische Entfaltungsprozess des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers, dem Baustein der Mikrotubuli, ebenfalls auf einem zweiphasigen Prozess basiert, der wahrscheinlich auf einem sequentiellen Entfaltungs- oder Dissoziationsprozess der beiden Untereinheiten der Heterodimere beruht.<sup>[323]</sup>

Bei den hier untersuchten Mikrotubuli können die DSC-Peaks 1 und 2 daher der partiellen Entfaltung und/oder Dissoziation der  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Untereinheiten zu-

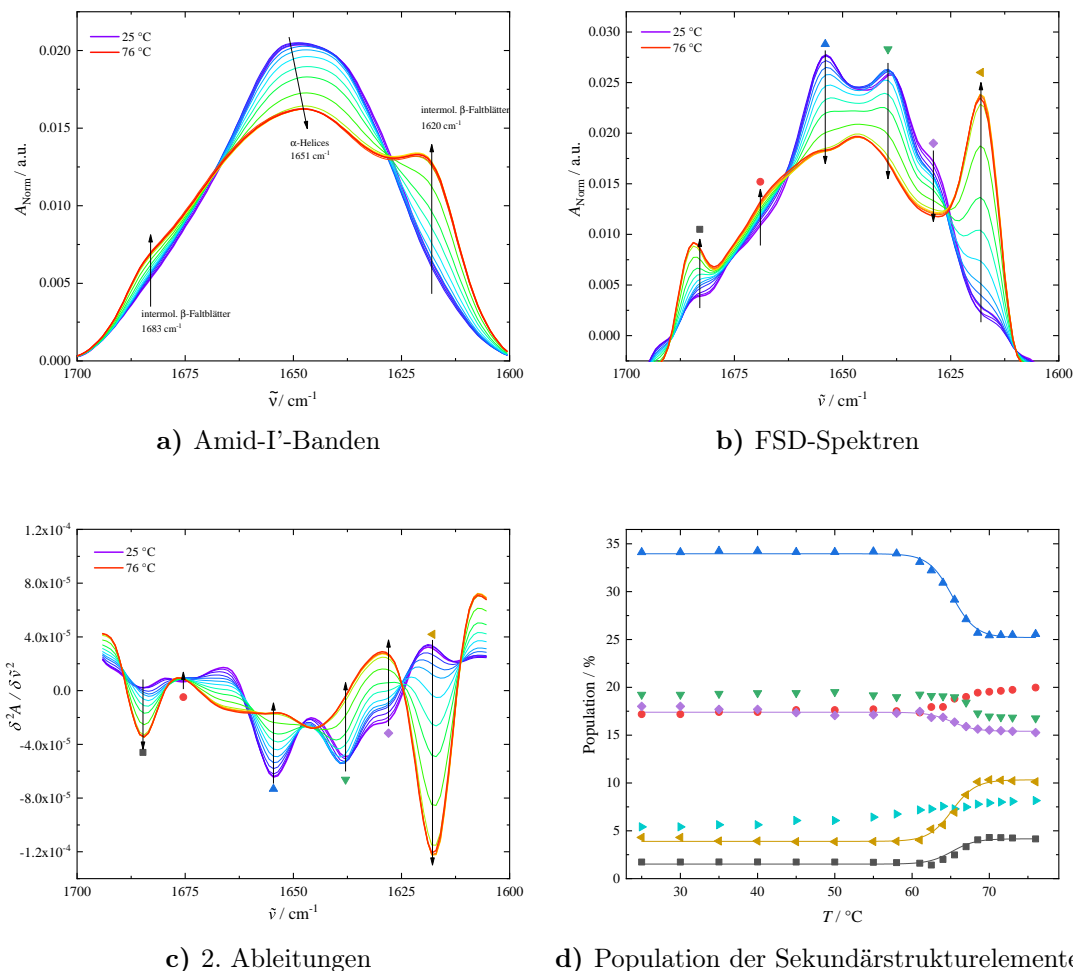
**Tabelle 4.2** – Durch DSC bestimmte sequentielle Übergangstemperaturen  $T_{m,i}$  und apparente Gesamtenthalpieänderungen  $\Delta H_{\text{cal}}^{\circ}$  von Mikrotubuli in reiner Pufferlösung und in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 1 M TMAO.

Cosolvens	$T_{m,1}, T_{m,2}, T_{m,3} / ^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_{\text{cal}} / \text{kJ mol}^{-1}$
Keins	63.2, 67.1, 70.2 $\pm$ 0.1	751 $\pm$ 43
0.5 M Harnstoff	59.6, 63.5, 65.6 $\pm$ 0.1	570 $\pm$ 49
1 M TMAO	68.3, 71.6, 85.0 $\pm$ 0.1	798 $\pm$ 56

geschrieben werden, worauf eine exotherm irreversible Aggregation folgt, die sich anhand von Peak 3 bei einer Temperatur von 70.2 °C erkennen lässt. Die DSC-Daten stimmen gut mit den in dieser Studie durchgeführten temperaturabhängigen FTIR-Messungen überein, d.h. die entsprechenden Änderungen der Sekundärstrukturelemente treten im gleichen Temperaturbereich auf, in dem Änderungen im DSC-Thermogramm auftreten. Die Gesamtintegration über den Übergangspeak des DSC-Thermogramms führt zu einer apparenten kalorimetrischen Enthalpieänderung  $\Delta H_{\text{cal}}^{\circ}$  von 751 kJ mol<sup>-1</sup>. Diese ist fast doppelt so groß wie die spektroskopisch bestimmte VAN'T HOFFsche-Enthalpieänderung  $\Delta H_{\text{vH}}^{\circ}$ , die auf einem vereinfachten Zwei-Zustands-Übergangsmodell beruht und wiederum aufgrund der partiellen Irreversibilität des Entfaltungsprozesses keine echten thermodynamischen Daten darstellt und lediglich zum Vergleich untereinander herangezogen werden kann.

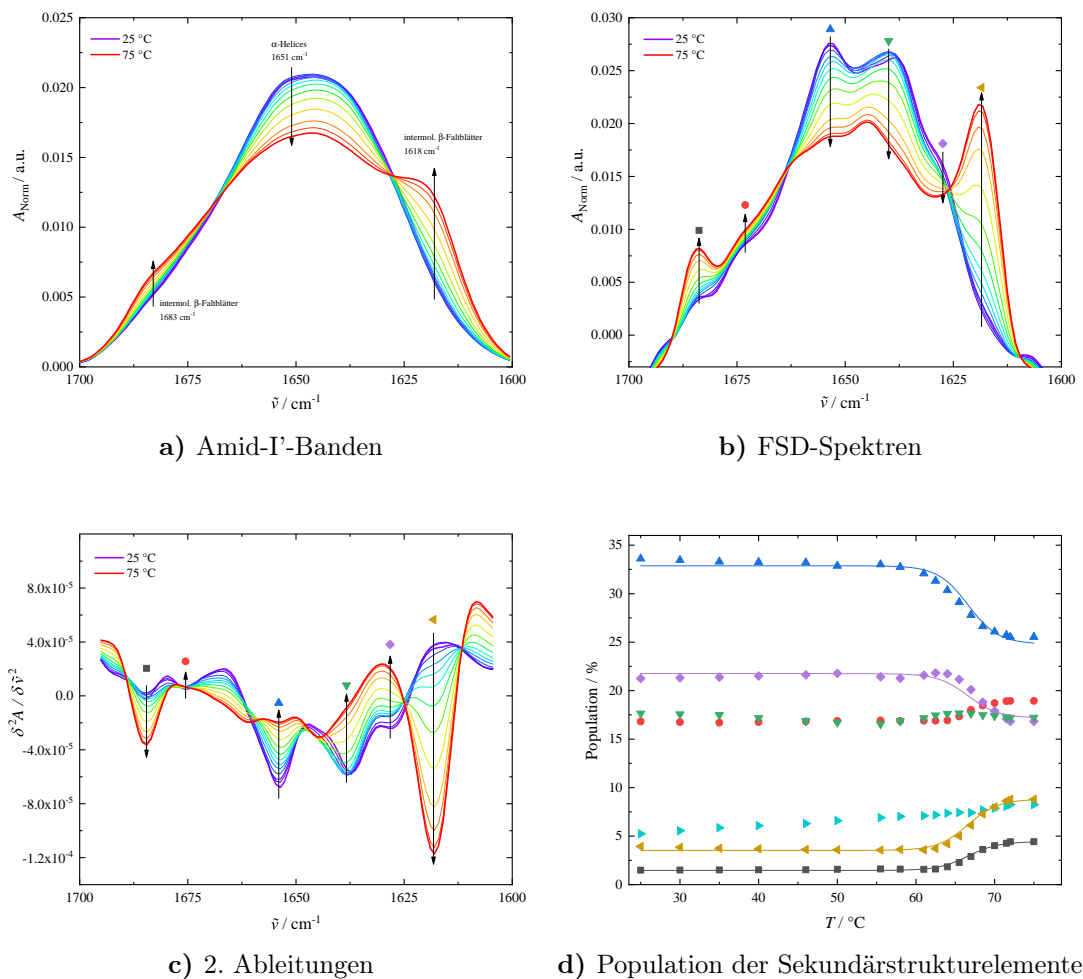
Im Anschluss erfolgte die Untersuchung des Einflusses natürlicher Osmolyte auf die thermische Proteinstabilität von Mikrotubuli. In Abbildung 4.8 sind die temperaturabhängigen FTIR-Daten von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M TMAO, in Abbildung 4.9 in Anwesenheit von 2 M TMAO, in Abbildung 4.10 in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und in Abbildung 4.11 in Anwesenheit von 1 M Harnstoff abgebildet.

Jede Abbildung besteht aus vier Teilgraphen. Neben der temperaturabhängigen Entwicklung der flächennormierten Amid-I'-Bande (Abbildungen 4.8a, 4.9a, 4.10a und 4.11a) sind die prozessierten FSD-Spektren (Abbildungen 4.8b, 4.9b, 4.10b und 4.11b), die aus den Amid-I'-Banden gebildeten 2. Ableitungen (Abbildungen 4.8c, 4.9c, 4.10c und 4.11c) und die aus der Subbandenanalyse resultierenden Anteile der

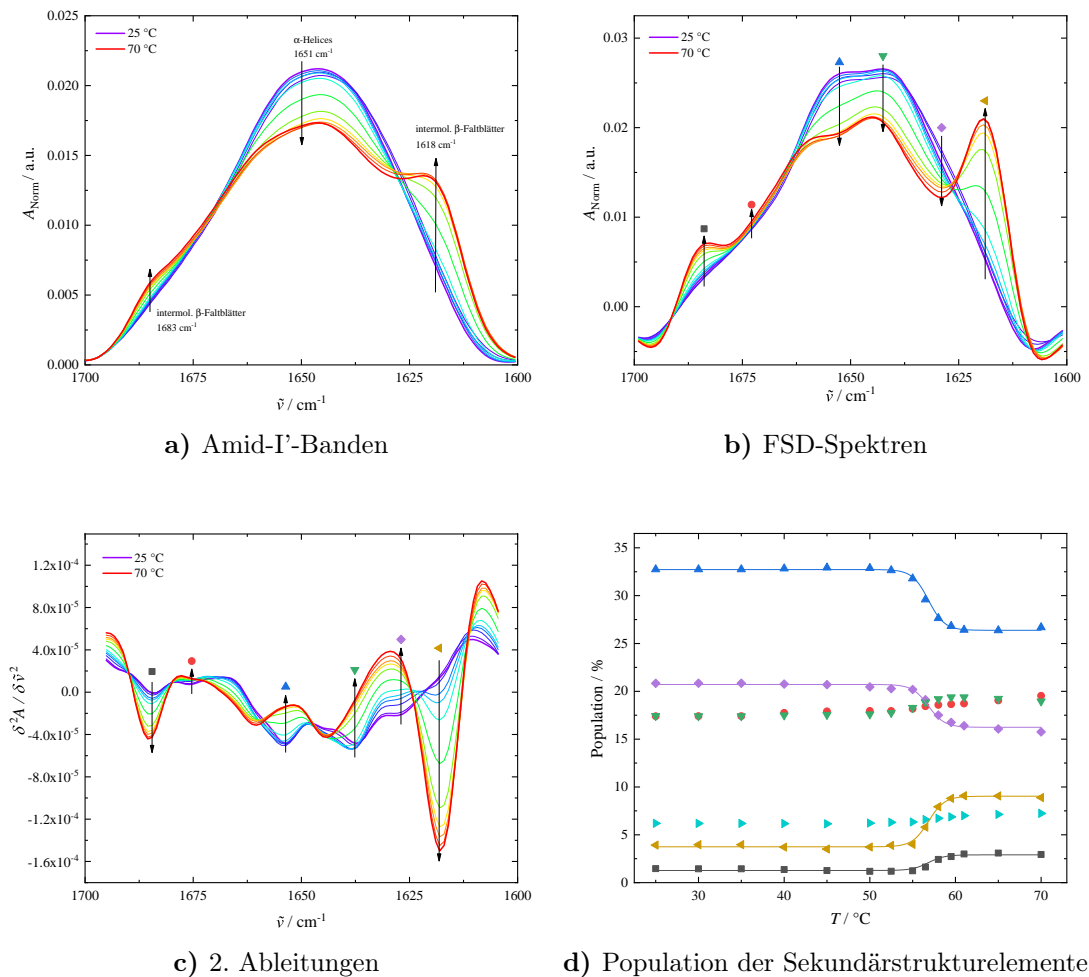


**Abbildung 4.8** – Temperaturabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M TMAO in einem Temperaturbereich von 25 bis 76 °C. **a)** Temperaturabhängige Amid-I'-Bande. **b)** Temperaturabhängige FSD-Spektren der Amid-I'-Bande. **c)** Temperaturabhängige 2. Ableitungen der Amid-I'-Bande. **d)** Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M TMAO. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.4). ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1683  $\text{cm}^{-1}$ ), ● Schleifen (1669  $\text{cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices (1651  $\text{cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel (1637  $\text{cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1629  $\text{cm}^{-1}$ ), ▲ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1618  $\text{cm}^{-1}$ ), ► Seitenketten (<1615  $\text{cm}^{-1}$ ).

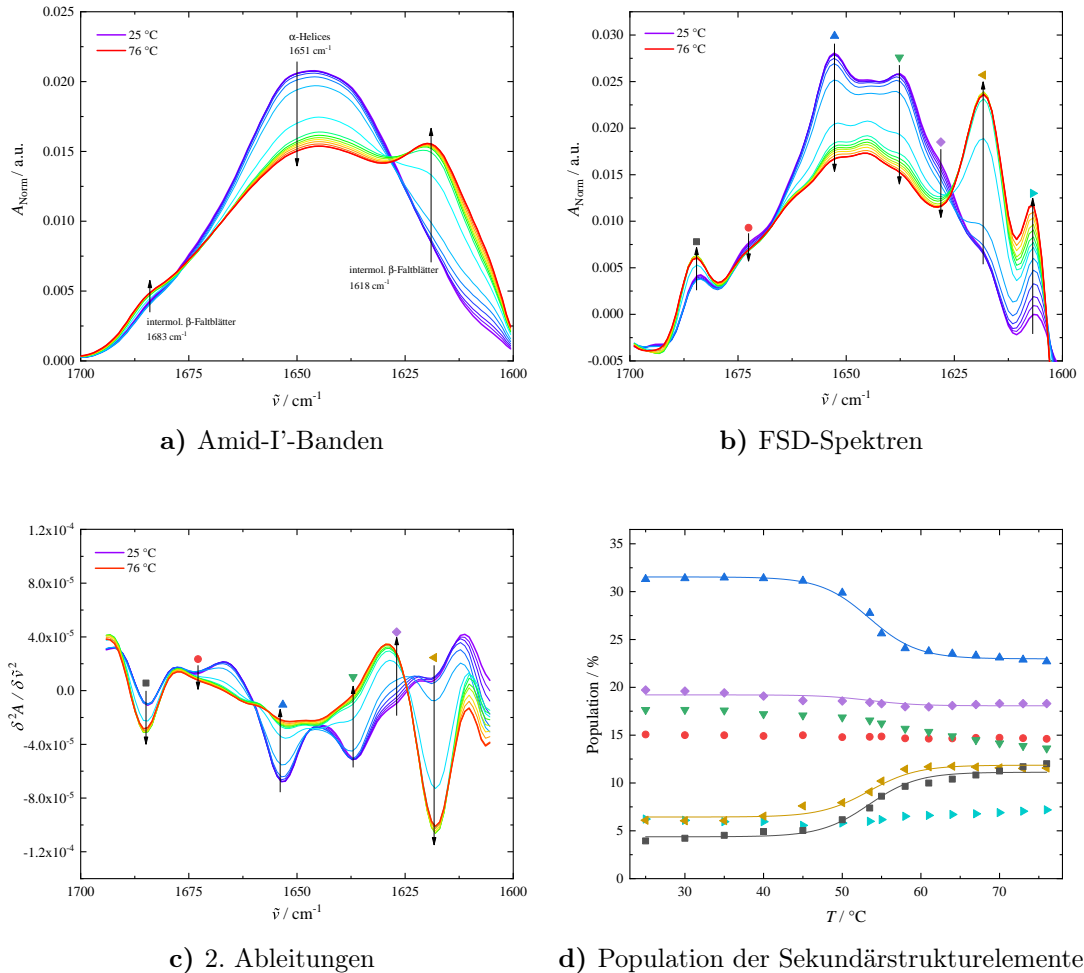




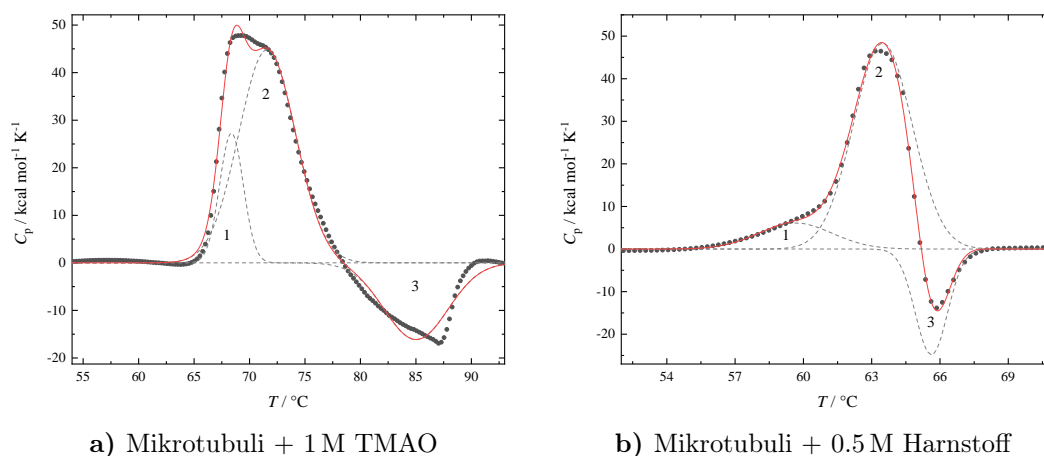
**Abbildung 4.9** – Temperaturabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Anwesenheit von 2M TMAO in einem Temperaturbereich von 25 bis 75 °C. **a)** Temperaturabhängige Amid-I-Bande. **b)** Temperaturabhängige FSD-Spektren der Amid-I-Bande. **c)** Temperaturabhängige 2. Ableitungen der Amid-I-Bande. **d)** Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli in Anwesenheit von 2M TMAO. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.4). ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1683  $\text{cm}^{-1}$ ), ● Schleifen (1669  $\text{cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices (1651  $\text{cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel (1637  $\text{cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1629  $\text{cm}^{-1}$ ), ▲ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1618  $\text{cm}^{-1}$ ), ► Seitenketten (<1615  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Abbildung 4.10** – Temperaturabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff in einem Temperaturbereich von 25 bis 70 °C. **a)** Temperaturabhängige Amid-I'-Bande. **b)** Temperaturabhängige FSD-Spektren der Amid-I'-Bande. **c)** Temperaturabhängige 2. Ableitungen der Amid-I'-Bande. **d)** Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.4). ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1683  $\text{cm}^{-1}$ ), ● Schleifen (1669  $\text{cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices (1651  $\text{cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel (1637  $\text{cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1629  $\text{cm}^{-1}$ ), ▲ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1618  $\text{cm}^{-1}$ ), ► Seitenketten (<1615  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Abbildung 4.11** – Temperaturabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M Harnstoff in einem Temperaturbereich von 25 bis 76 °C. **a)** Temperaturabhängige Amid-I'-Bande. **b)** Temperaturabhängige FSD-Spektren der Amid-I'-Bande. **c)** Temperaturabhängige 2. Ableitungen der Amid-I'-Bande. **d)** Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M Harnstoff. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.4).  $\blacksquare$  intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1683  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\bullet$  Schleifen (1669  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\blacktriangle$   $\alpha$ -Helices (1651  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\blacktriangledown$  Zufallsknäuel (1637  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\blacklozenge$  intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1629  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\blacktriangleleft$  intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1618  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\blacktriangleright$  Seitenketten (<1615  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Abbildung 4.12** – Experimentell bestimmte DSC-Thermogramme von Mikrotubuli in Anwesenheit von **a)** 1 M TMAO und **b)** 0.5 M Harnstoff. Die experimentellen Daten ( $\bullet$ ) wurden durch Anwendung einer FOURIER-Selbstentfaltung (FSD) analysiert, um die zugrunde liegenden Teilprozesse des gesamten thermischen Entfaltungsprozesses von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M TMAO bzw. 0.5 M Harnstoff aufzudecken. Dabei wurden drei Peaks gefunden, die mithilfe von GAUSS-Funktionen ( $- -$ ) an die experimentellen Daten angepasst wurden ( $-$ ).

Sekundärstrukturelemente (Abbildungen 4.8d, 4.9d, 4.10d und 4.11d) als Funktion der Temperatur grafisch dargestellt.

Die durchgeführten FTIR-spektroskopischen Messungen an Mikrotubuli in Anwesenheit von TMAO und Harnstoff wurden mit DSC-Messungen ergänzt, deren Thermogramme in Abbildung 4.12 dargestellt sind. Es lässt sich anhand der Abbildungen 4.10, 4.11 und 4.12b deutlich erkennen, dass die Anwesenheit von Harnstoff die thermische Stabilität der Mikrotubuli signifikant beeinflusst. Die FTIR-spektroskopisch ermittelte Entfaltungstemperatur von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff nimmt um  $\sim 6^\circ\text{C}$  ab, während die ermittelte Änderung der VAN'T HOFFSchen Enthalpie höher ist im Vergleich zu der Probe in reiner Pufferlösung.

In Anwesenheit von 1 und 2 M TMAO verschiebt sich der thermische Entfaltungsprozess hin zu höheren Temperaturen (Abbildung 4.8d und 4.9d). Dabei erhöht sich die Entfaltungstemperatur von  $62.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$  in reiner Pufferlösung um  $\Delta T = 2.5^\circ\text{C}$  auf  $65.3 \pm 0.2^\circ\text{C}$  in Anwesenheit von 1 M TMAO und erhöht sich weiter auf  $66.6 \pm 0.3^\circ\text{C}$  in Anwesenheit von 2 M TMAO (Tabelle 4.3). Die ermittelte Änderung der VAN'T HOFFSchen Enthalpie  $\Delta H_{\text{vH}}^\circ$  von Mikrotubuli in Anwesenheit

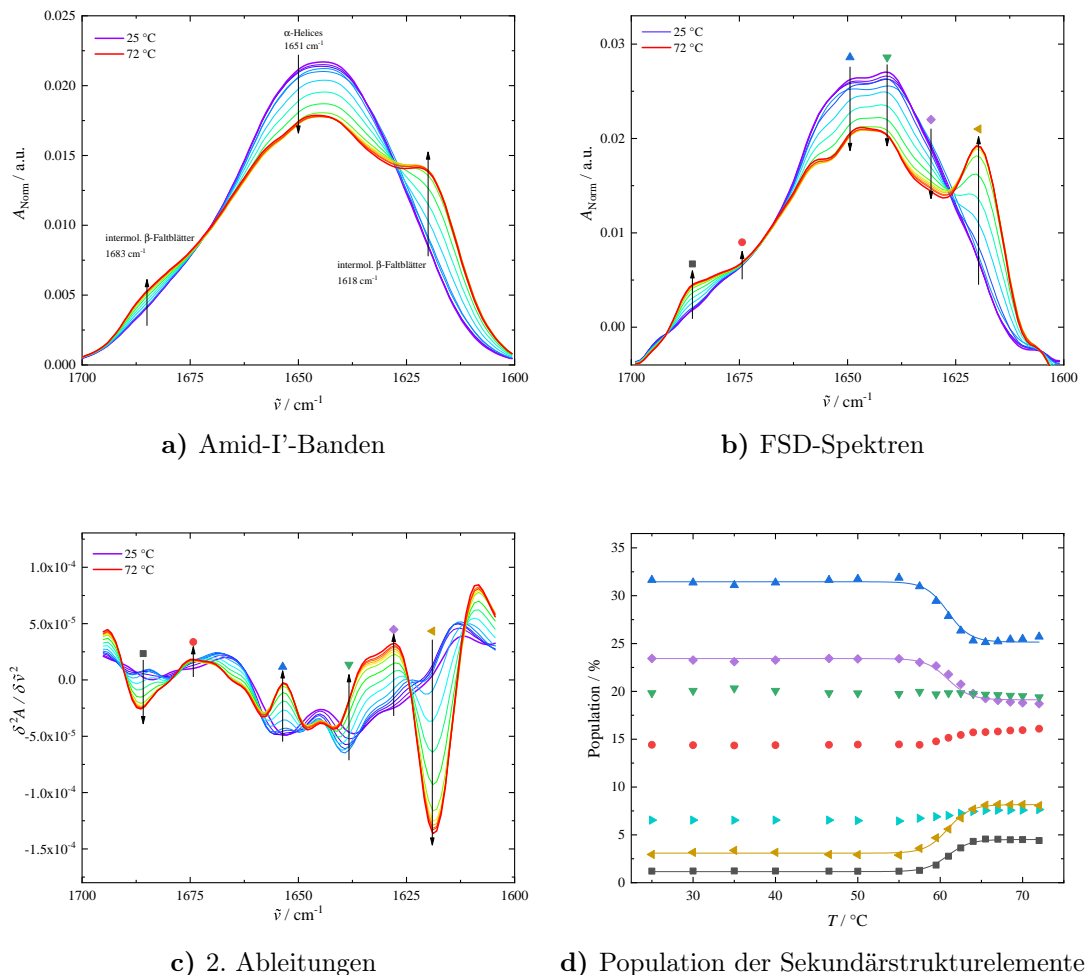
**Tabelle 4.3** – Durch FTIR-Spektroskopie bestimmte Übergangstemperaturen  $T_m$  und Änderungen der VAN’T HOFFSchen Enthalpie  $\Delta H_{vH}^\circ$  von Mikrotubuli in reiner Pufferlösung und in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an Harnstoff, TMAO und Harnstoff-TMAO-Mischungen.

Cosolvens	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{vH}^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$
Keins	$62.8 \pm 0.4$	$456 \pm 32$
0.5 M Harnstoff	$56.4 \pm 0.7$	$880 \pm 144$
1 M Harnstoff	$52.9 \pm 0.4$	$733 \pm 60$
1 M TMAO	$65.3 \pm 0.2$	$466 \pm 30$
2 M TMAO	$66.6 \pm 0.3$	$441 \pm 47$
0.5 M Harnstoff + 0.5 M TMAO	$60.8 \pm 0.6$	$688 \pm 53$
0.5 M Harnstoff + 1 M TMAO	$63.4 \pm 0.5$	$588 \pm 92$

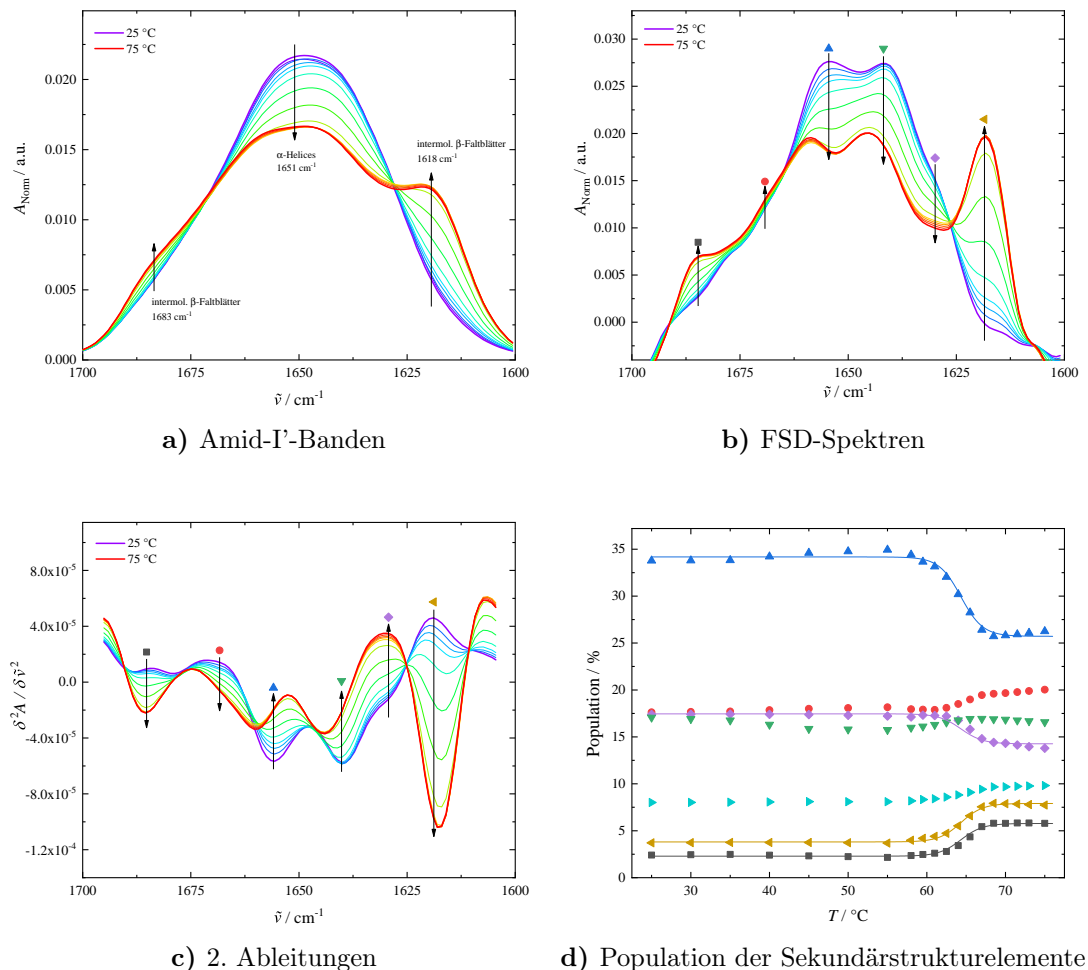
von 1 und 2 M TMAO ändert sich nicht wesentlich im Vergleich zu der Probe in reiner Pufferlösung, was darauf hinweist, dass der Entfaltungsmechanismus selbst nicht beeinflusst wird. Diese Ergebnisse stimmen mit mehreren Studien überein, die gezeigt haben, dass TMAO die Proteinstabilität aufgrund ungünstiger Wechselwirkungen zwischen dem Osmolyten und dem Proteinrückgrat verbessern kann, ohne in direkter Wechselwirkung mit dem Protein zu treten (*excluded volume effect*).<sup>[104,116]</sup>

Um die kombinierte Wirkung der beiden verwendeten Cosolventien zu untersuchen, erfolgten temperaturabhängige FTIR-spektroskopische Messungen von Mikrotubuli in Anwesenheit von verschiedenen TMAO-Harnstoff-Gemischen, deren Ergebnisse in Abbildungen 4.13 und 4.14 dargestellt sind. Wiederum ist die temperaturabhängige Entwicklung der Amid-I'-Bande (Abbildung 4.13a und 4.14a) den prozessierten FSD-Spektren (Abbildung 4.13b und 4.14b) und den aus der Amid-I'-Bande gebildeten 2. Ableitung (Abbildung 4.13c und 4.14c) gegenübergestellt, die zur Ermittlung der Anteile der Sekundärstrukturelemente (Abbildung 4.13d und 4.14d) dienen.

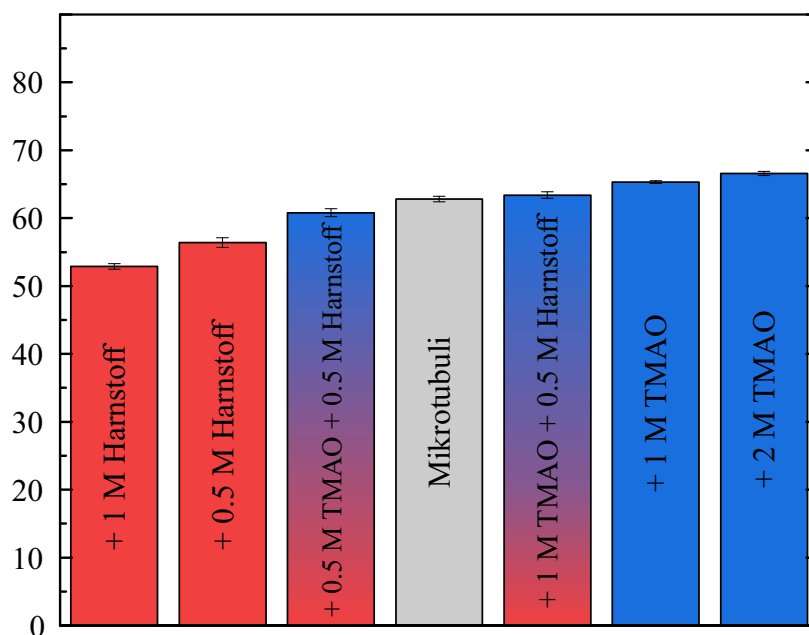
Anhand der temperaturabhängigen Entwicklung der Amid-I'-Bande von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 0.5 M TMAO (Abbildung 4.13a) sowie in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 1 M TMAO (Abbildung 4.14a) lässt sich mit steigender Temperatur deutlich eine Intensitätsabnahme der Amid-I'-Bande und die Ausbildung von intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 1615$  und  $\sim 1684 \text{ cm}^{-1}$ ) erkennen.



**Abbildung 4.13** – Temperaturabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 0.5 M TMAO in einem Temperaturbereich von 25 bis 72 °C. **a)** Temperaturabhängige Amid-I'-Bande. **b)** Temperaturabhängige FSD-Spektren der Amid-I'-Bande. **c)** Temperaturabhängige 2. Ableitungen der Amid-I'-Bande. **d)** Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 0.5 M TMAO. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.4). ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1683\text{ cm}^{-1}$ ), ● Schleifen ( $1669\text{ cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices ( $1651\text{ cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel ( $1637\text{ cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1629\text{ cm}^{-1}$ ), ◀ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1618\text{ cm}^{-1}$ ), ▶ Seitenketten ( $<1615\text{ cm}^{-1}$ ).



**Abbildung 4.14** – Temperaturabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 1 M TMAO in einem Temperaturbereich von 25 bis 75 °C. **a)** Temperaturabhängige Amid-I-Bande. **b)** Temperaturabhängige FSD-Spektren der Amid-I-Bande. **c)** Temperaturabhängige 2. Ableitungen der Amid-I-Bande. **d)** Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 1 M TMAO. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.4). ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1683  $\text{cm}^{-1}$ ), ● Schleifen (1669  $\text{cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices (1651  $\text{cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel (1637  $\text{cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1629  $\text{cm}^{-1}$ ), ◀ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1618  $\text{cm}^{-1}$ ), ▶ Seitenketten (<1615  $\text{cm}^{-1}$ ).

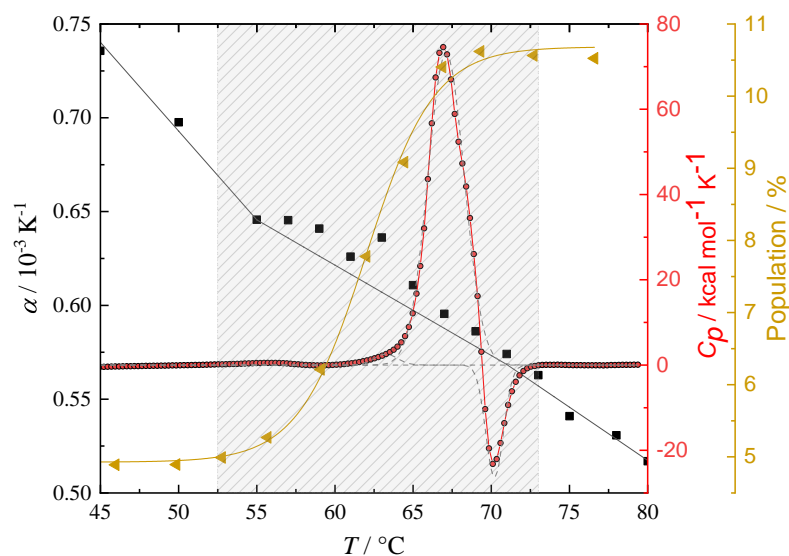


**Abbildung 4.15** – Grafische Darstellung der FTIR-spektroskopisch bestimmten Übergangstemperaturen  $T_m$  von Mikrotubuli (■) in reiner Pufferlösung und in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an Harnstoff (■), TMAO (■) und deren Mischungen in unterschiedlichen Verhältnissen bei Atmosphärendruck.

Des Weiteren lässt sich anhand der Abbildungen 4.13d und 4.14d erkennen, dass der destabilisierende Effekt von 0.5 M Harnstoff durch die Anwesenheit von 1 M TMAO fast vollständig aufgehoben wird, was darauf schließen lässt, dass der destabilisierende Effekt von Harnstoff auf die thermische Proteinstabilität von Mikrotubuli größeren Einfluss nimmt als der stabilisierende Effekt des Osmolyten TMAO.

Bei einem Vergleich der FTIR-spektroskopisch ermittelten Entfaltungstemperaturen (Abbildung 4.15) mit den kalorimetrisch bestimmten lässt sich erkennen, dass alle FTIR-spektroskopisch ermittelten Entfaltungstemperaturen  $T_m$  sehr nahe an der Übergangstemperatur  $T_{m,1}$  des 1. Peaks der DSC-Ergebnisse liegen, was darauf hinweist, dass der Entfaltungs- und/oder Dissoziationsprozess des Heterodimers innerhalb der Mikrotubuli von großen Änderungen der Zusammensetzung der Sekundärstruktur begleitet wird. Der temperaturabhängigen Dissoziations- und Aggregationsprozesse, welche im DSC-Thermogramm durch die DSC-Peaks 2 und 3 beschrieben werden (Abbildungen 4.7 und 4.12), scheinen nicht mit signifikanten Än-





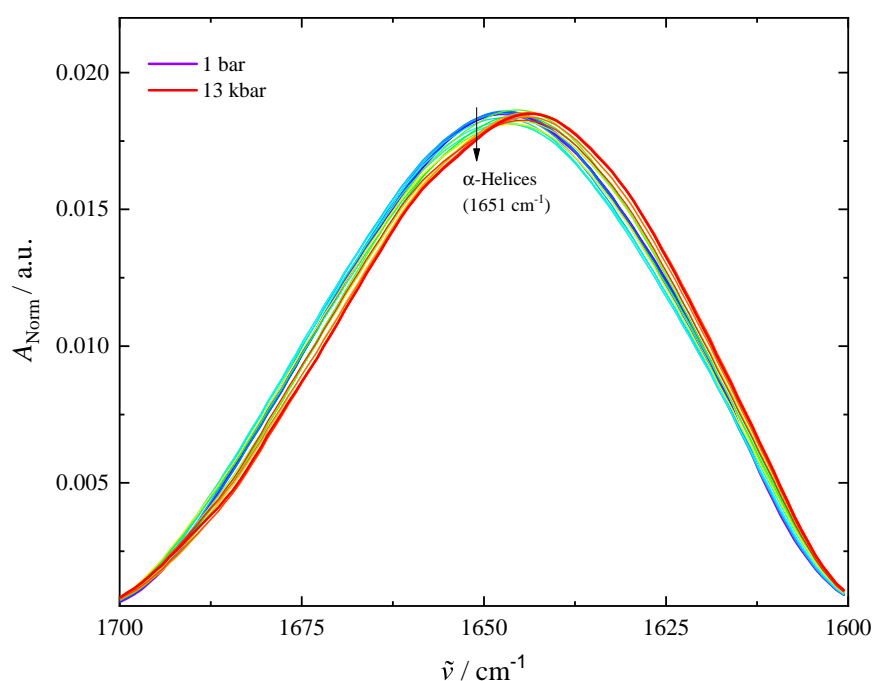
**Abbildung 4.16** – Vergleich der temperaturabhängigen spektroskopischen mit den kalorimetrischen Ergebnissen von Mikrotubuli in Abwesenheit von Co-solventien. Zum Vergleich der temperaturabhängigen Ergebnisse der FTIR-Spektroskopie ( $\blacktriangle$ ) mit den kalorimetrischen Ergebnissen sind zum einen die Anteile intermolekularer  $\beta$ -Faltblätter ( $1618\text{ cm}^{-1}$ ), deren Anteil aufgrund der thermisch-induzierten Proteinaggregation steigt, inklusive der durch den abgewandelten Boltzmann-Fit (Gleichung (4.4)) erhaltenen Kurvenanpassung und zum anderen das erhaltene DSC-Thermogramm ( $\bullet$ ) mit den darunter liegenden Subbanden ( $---$ ) sowie der thermische Expansionskoeffizient  $\alpha$  ( $-$ ), der durch die getätigten PPC-Messungen bestimmt wurde, aufgetragen.

derungen der Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente verbunden zu sein. Die Entfaltung des Heterodimers innerhalb der Mikrotubuli ist von Änderungen der Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente und der Dissoziation des Polymers begleitet, sodass die anschließende thermisch irreversible Aggregation direkt aus den anfänglichen Konformationsänderungen resultiert.

Abbildung 4.16 zeigt die Temperaturabhängigkeit des durch PPC-Messungen bestimmten thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha$  von Mikrotubuli in reiner Pufferlösung. Unter Verwendung eines partiellen spezifischen Volumens von  $0.735\text{ mL g}^{-1}$ <sup>[324]</sup> und des Molekulargewichts von  $110\text{ kDa}$  für das  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimer<sup>[305]</sup> kann die Volumenänderung während des thermischen Entfaltungsprozesses durch Integration von  $\alpha(T)$  über den Temperaturbereich der Entfaltung, welcher mittels DSC-Messungen bestimmt wurde, ermittelt werden. Bei Anwendung von Gleichung (4.5)

ergibt sich eine Volumenänderung von  $\Delta V_u = 20.7 \pm 4.3 \text{ mL mol}^{-1}$ , was  $\sim 0.03\%$  des gesamten Proteinvolumens entspricht.

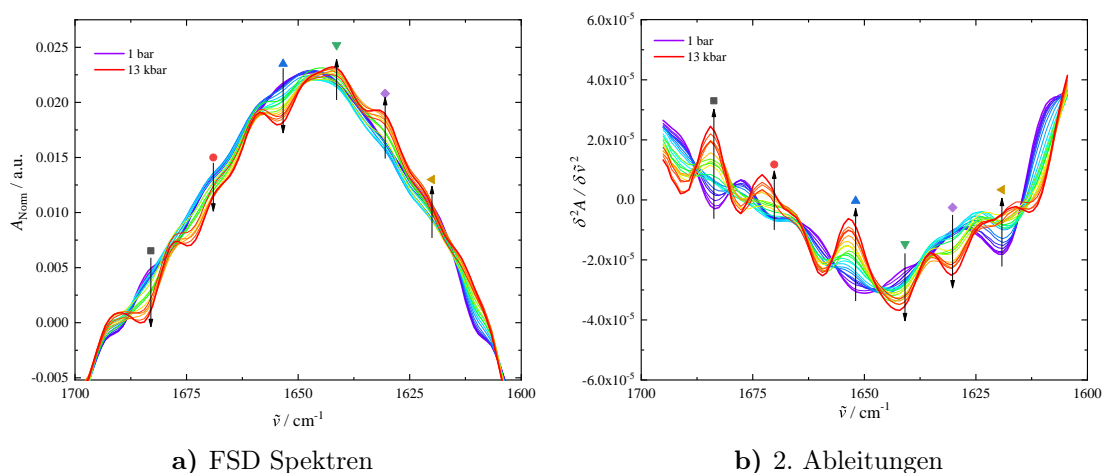
Mehrere Studien haben gezeigt, dass der thermische Expansionskoeffizient sehr abhängig ist von den Hydratationseigenschaften an der Grenzfläche zwischen Protein und Wasser sowie von der exponierten Oberfläche, die dem Lösungsmittel zugänglich ist.<sup>[52,53,319,325]</sup> Oftmals besitzt der thermische Expansionskoeffizient  $\alpha$  von polaren globulären Proteinen eine negative Steigung des Temperaturverlaufs von  $\alpha(T)$ , die weitestgehend auf eine mit steigender Temperatur abnehmende robuste Hydratationsschicht zurückzuführen ist.<sup>[325]</sup> Auf der anderen Seite deutet eine positive Steigung, oder ein breiter, positiver Peak, wie es im Übergangsbereich der PPC-Messungen von Mikrotubuli in reiner Pufferlösung in Abbildung 4.16 zu sehen ist, darauf hin, dass eine Anhäufung unpolarer Seitenketten während einer hydrophoben Hydratation und/oder ein ausgedehntes Netzwerk interstitieller Hydratationsschichten sich mit steigender Temperatur während der Entfaltung bzw. Dissoziation des Proteins auflöst, wie es beispielsweise PPC-Messungen an F-Actin gezeigt haben.<sup>[227]</sup>



**Abbildung 4.17** – Druckabhängigkeit der flächennormierten Amid-I'-Bande von Mikrotubuli bei einer Temperatur von 25 °C. Der Farbverlauf von lila nach rot entspricht dem Druckgradienten.

Neben der temperaturabhängigen FTIR-spektroskopischen Untersuchung erfolgten auch druckabhängige FTIR-Messungen von Mikrotubuli in An- und Abwesenheit der beiden Osmolyte TMAO und Harnstoff. Abbildung 4.17 zeigt die druckabhängige Entwicklung der Amid-I'-Bande von Mikrotubuli in reiner Pufferlösung bei einer Temperatur von 25 °C in einem Druckbereich von 1 bar bis 13 kbar. Es lässt sich eine geringe Intensitätsabnahme im Bereich  $\alpha$ -helikaler Strukturen, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1651 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, mit steigendem Druck erkennen.

Im Anschluss an die Prozessierung der Amid-I'-Bande erfolgte eine Subbandenanalyse um die Zusammensetzung der Sekundärstruktur und damit deren druckabhängige Entwicklung ermitteln zu können. Hierzu wurden zwei mathematische Methoden verwendet. Zum einen wurde die 2. Ableitung der Amid-I'-Bande bestimmt und zum anderen eine FOURIER-Selbstentfaltungsfunktion angewandt, damit eine Bestimmung bezüglich Lage und Anzahl der einzelnen Subbanden der Sekundärstrukturelemente unter der Amid-I'-Bande möglich ist, die spektral nicht aufgelöst



**Abbildung 4.18** – Druckabhängige Änderung der Sekundärstruktur von Mikrotubuli. **a)** Druckabhängige Selbstentfaltungsspektren der flächennormierten Amid-I'-Bande von Mikrotubuli bei einer Temperatur von 25 °C. Subbanden der einzelnen Sekundärstrukturelemente können bei vorhandenen Maxima gefunden werden. **b)** 2. Ableitung der flächennormierten Amid-I'-Bande von Mikrotubuli. Die Anzahl und die Lage der einzelnen Subbanden der Sekundärstrukturelemente stimmt mit der Lage der vorhandenen Minima überein. ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblatt ( $1683 \text{ cm}^{-1}$ ), ● Schleifen ( $1669 \text{ cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices ( $1651 \text{ cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel ( $1637 \text{ cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1629 \text{ cm}^{-1}$ ), ◀ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1618 \text{ cm}^{-1}$ ), ▶ Seitenketten ( $<1615 \text{ cm}^{-1}$ ).

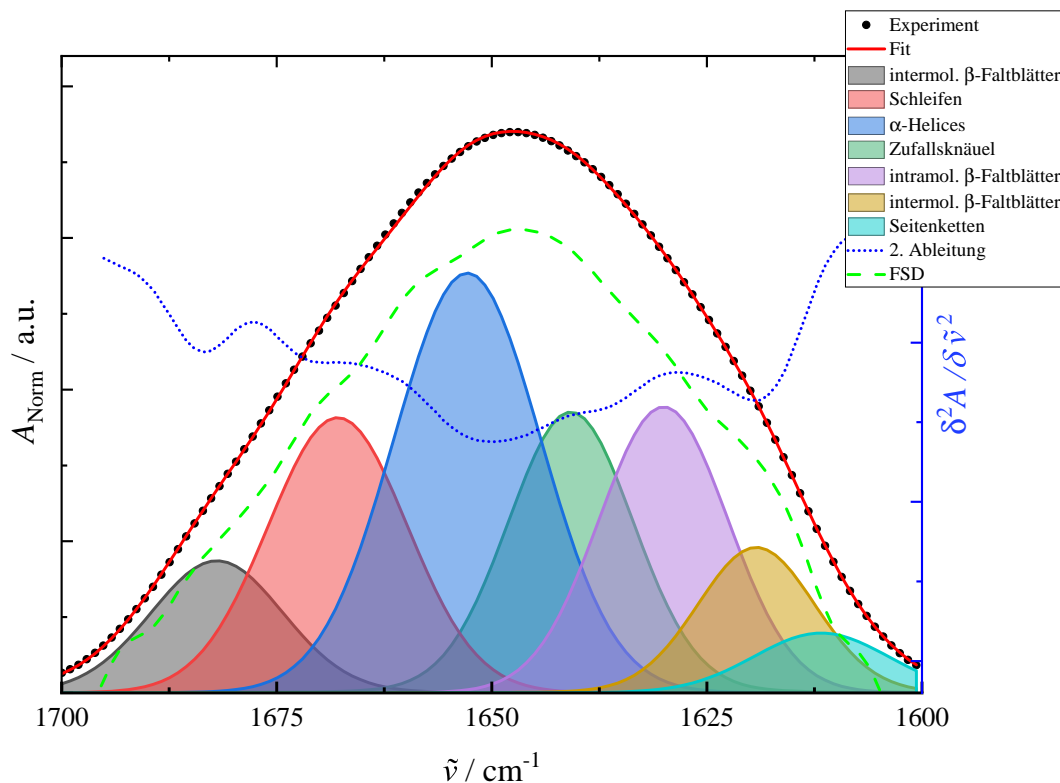
werden können.

Abbildung 4.18a zeigt die druckabhängige Entwicklung der prozessierten FSD-Spektren, während in Abbildung 4.18b die druckabhängige Entwicklung der gebildeten 2. Ableitung der flächennormierten Amid-I'-Banden der untersuchten Mikrotubuli in reiner Pufferlösung dargestellt ist. Anhand der beiden Graphen lässt sich eine geringfügige Abnahme  $\alpha$ -helikaler Strukturen, welche bei einer Wellenzahl von  $\sim 1651 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, mit steigendem Druck beobachten, was anhand der druckabhängigen Intensitätsabnahme im FSD-Spektrum bzw. der druckabhängigen Zunahme der Intensität im Spektrum der 2. Ableitung jeweils zu erkennen ist. Durch den Vergleich der gebildeten FSD-Spektren mit den 2. Ableitungen lässt sich die Lage und Anzahl der einzelnen Subbanden unter der Amid-I'-Bande ermitteln. In Abbildung 4.19 sind sowohl die experimentell bestimmte Amid-I'-Bande als auch die zur Subbandenanalyse benötigten Spektren der FOURIER-Selbstentfaltung und der 2. Ableitung zum besseren Vergleich miteinander gemeinsam abgebildet.

Anhand dieser gemeinsamen Auftragung lässt sich deutlich das gegenläufige Verhalten der auftretenden Maxima im FSD-Spektrum im Vergleich zu den an selber Position im Spektrum der 2. Ableitung auftretenden Minima erkennen. Die sieben aus der Subbandenanalyse resultierenden Subbanden, die im Superpositionsprinzip an die experimentell bestimmte Amid-I'-Bande angepasst wurden, sind ebenfalls in Abbildung 4.19 abgebildet.

In Abbildung 4.20a sind beispielhaft druckabhängige FSD-Spektren den dazugehörigen 2. Ableitungen der Amid-I'-Bande von Mikrotubuli bei einer Temperatur von  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  und charakteristischen Drücken gegenübergestellt. Diese Gegenüberstellung dient zur genaueren Bestimmung der Lage der einzelnen Subbanden unter der Amid-I'-Bande. Anhand dieser Auftragung ist wiederum eine geringfügige Abnahme  $\alpha$ -helikaler Strukturen, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1651 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, mit steigendem Druck zu erkennen.

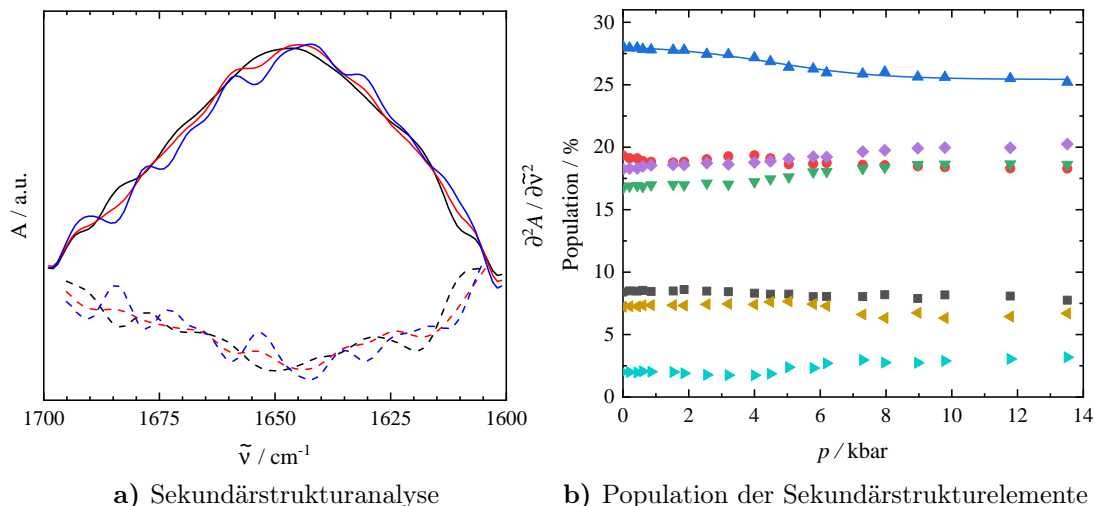
Im Anschluss an die Subbandenanalyse inklusive der Bandenanpassung kann der prozentuale Anteil der einzelnen Sekundärstrukturelemente druckabhängig ermittelt werden, der in Abbildung 6.26 abgebildet ist. Anhand dieser Auftragung lässt



**Abbildung 4.19** – Experimentell bestimmte Amid-I-Bande von Mikrotubuli (●) bei 1 bar und 25 °C in der Diamantstempelzelle sowie die durch Subbanden gebildete Funktionsanpassung (–). Die Bestimmung der Subbanden erfolgte durch Bildung des FSD-Spektrums (– –) und der 2. Ableitung (· · ·).

sich deutlich erkennen, dass mit steigendem Druck der Anteil  $\alpha$ -helikaler Strukturen abnimmt, während der Anteil an intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern geringfügig zunimmt.

In dem Druckbereich zwischen 1 bis 2000 bar sind keine signifikanten Veränderungen in den Anteilen der Sekundärstrukturelemente zu beobachten. Ab einem Druck von 2 kbar treten geringfügige druckinduzierte Konformationsänderungen der mithilfe von Taxol stabilisierten Mikrotubuli auf, was anhand der Abnahme des Anteils  $\alpha$ -helikaler Strukturen um  $\sim -3\%$  zu erkennen ist. Der Anteil an intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern mit einer Absorptionsbande bei  $\sim 1629\text{ cm}^{-1}$ , die  $\beta$ -Faltblätter mit stärkeren Wasserstoffbrücken repräsentieren, nimmt mit steigendem Druck um  $\sim 2\%$  zu. Mithilfe der abgewandelten Boltzmann-Funktion in Gleichung (4.3) kann der Entfaltungsdruck  $p_m$ , an welchem 50 % der vorhandenen Mikrotubuli im nativen und 50 % im entfalteten Zustand vorliegen, zu  $\sim 4.5\text{ kbar}$  und eine Volumenände-

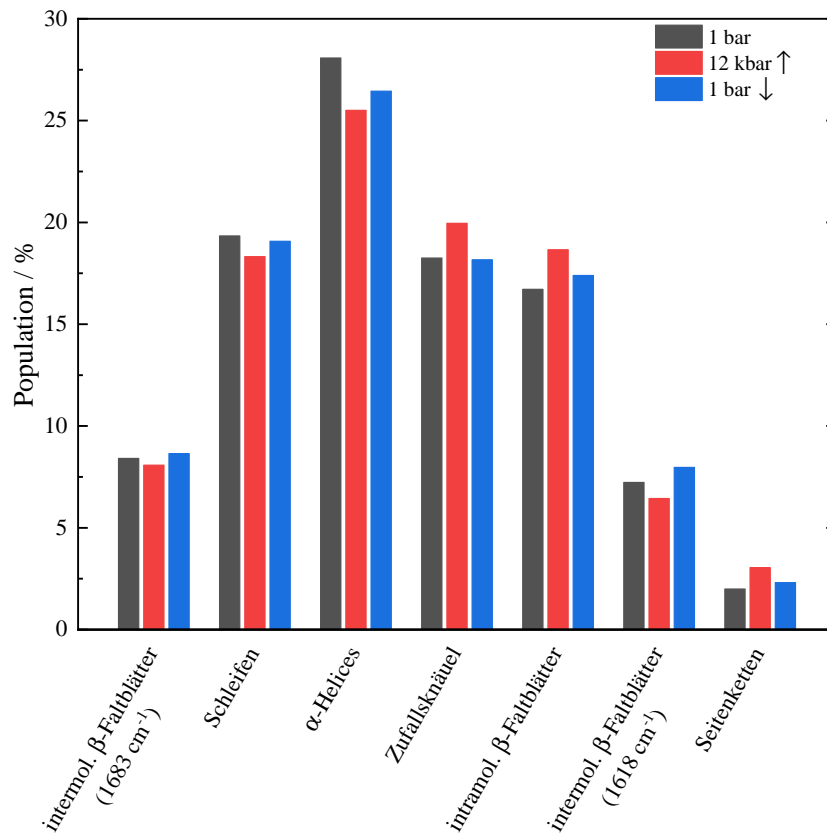


**Abbildung 4.20** – Druckabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Abwesenheit von Cosolventien. **a)**: FSD-Spektrum der Amid-I-Bande von Mikrotubuli bei einem Druck von 1 bar (—), bei dem Übergangsdruck  $p_m$  (---) und bei einem Druck von 13 kbar (— · —), sowie die dazugehörigen 2. Ableitungen, dargestellt als gestrichelte Linien in den entsprechenden Farben. **b)**: Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.3). ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblatt (1683  $\text{cm}^{-1}$ ), ● Schleifen (1669  $\text{cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices (1651  $\text{cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel (1637  $\text{cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1629  $\text{cm}^{-1}$ ), ◀ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1618  $\text{cm}^{-1}$ ), ▶ Seitenketten (<1615  $\text{cm}^{-1}$ ).

rung  $\Delta V_u$  während der Entfaltung zu  $-15 \pm 2 \text{ mL mol}^{-1}$  für den druck-induzierten Übergang der Mikrotubuli in reiner Pufferlösung bei einer Temperatur von 25 °C bestimmt werden. Diese hohe Druckstabilität der Mikrotubuli weist darauf hin, dass eine dichte Packung der Monomerbausteine vorliegt, wodurch die Bildung von Hohlräumen weitestgehend vermieden wird.

Unter Verwendung eines partiellen spezifischen Volumens von 0.735  $\text{mL g}^{-1}$ <sup>[324]</sup> und einem Molekulargewicht von 110 kDa des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers<sup>[305]</sup> entspricht die zuvor bestimmte Volumenänderung während des Entfaltungsprozesses  $\sim 0.02\%$ , was lediglich dem Volumen von  $\sim 1$  Wasser-Molekül entspricht.

Die negative Volumenänderung während der Entfaltung, die mittels FTIR-spektroskopischen Messungen an Mikrotubuli und einer Temperatur von 25 °C bestimmt wurde, zeigt deutlich, dass die Volumenänderung  $\Delta V_u$  während der Entfaltung stark temperaturabhängig ist und mit steigender Temperatur positiver wird, wie es bei-



**Abbildung 4.21** – Druckabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente in reiner Pufferlösung bei 25 °C und 1 bar (■), nach Erhöhung des Drucks auf 12 kbar (■) und nach erneuter Entspannung auf 1 bar (■) zeigen eine partielle Irreversibilität des druck-induzierten Entfaltungsprozesses.

spielsweise auch für die Entfaltung des monomeren Proteins *Staphylococcal nuclease* (SNase) ermittelt wurde.<sup>[319,326]</sup>

Zur Erforschung, ob der hier betrachtete druck-induzierte Übergang von reversibler Natur ist, wurde ein Probe von Mikrotubuli in Abwesenheit von Cosolventien bei einer Temperatur von 25 °C spektroskopisch vermessen. Im Anschluss wurde diese Probe einem Druck von 12 kbar ausgesetzt, bevor sie dann wiederum auf einen Druck von 1 bar entspannt und vermessen wurde. Bei dieser druckabhängigen Messung ergaben sich die in Abbildung 4.21 dargestellten Anteile der Sekundärstrukturelemente. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass es sich bei dem hier betrachteten druck-induzierten Übergang der vermessen Mikrotubuli um einen partiell irreversiblen Prozess handelt, was anhand des zumeist deutlich unterschiedlichen Anteils der

Sekundärstrukturelemente vor und nach der Druckapplikation zu erkennen ist.

Druckabhängige FTIR-Messungen von Mikrotubuli in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an TMAO, Harnstoff und Mischungen daraus zeigen keine signifikanten druckabhängigen Änderungen der Sekundärstrukturelemente im untersuchten Druckbereich. Die druckabhängigen FTIR-Ergebnisse von Mikrotubuli in Anwesenheit der zuvor genannten Cosolventien können den Abbildungen 4.22, 4.23, 4.24 und 4.25 im Anhang (4.5) entnommen werden. Die hauptsächlich betroffenen Sekundärstrukturelemente der Mikrotubuli in Anwesenheit der verschiedenen Cosolventien sind  $\alpha$ -Helices, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1651 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren. Ihr Anteil sinkt in allen Fällen um  $\sim -3\%$  unter Anlegen eines Drucks von bis zu 10 kbar. Der ermittelte Entfaltungsdruck  $p_m$  liegt bei  $\sim 4.5 \text{ kbar}$  und die Volumenänderung  $\Delta V_u$  während des Entfaltungsprozesses bei  $-15 \pm 2 \text{ mL mol}^{-1}$ . Diese Daten implizieren, dass im Vergleich zu druckabhängigen FTIR-Messungen an filamentösem Actin (F-Actin), Mikrotubuli eine viel höhere Druckstabilität besitzen als ihr Begleiter im Zytoskelett.<sup>[227,302]</sup>

## 4.4 Zusammenfassung

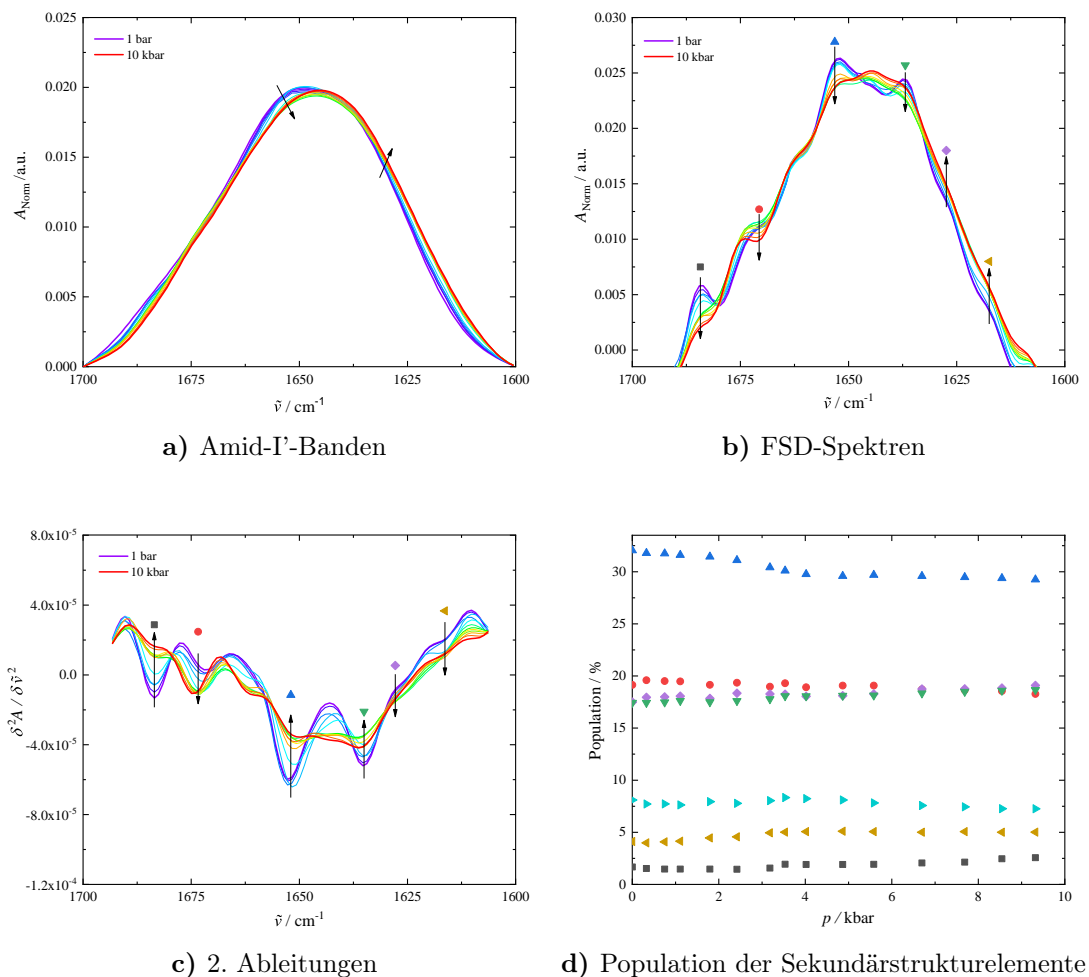
In dieser Studie erfolgte die Untersuchung der temperatur- und druck-induzierten Denaturierung von Mikrotubuli in An- und Abwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der natürlichen Osmolyte TMAO, Harnstoff und deren Mischungen, wie sie auch in der Natur vorkommen. Zur Vermeidung einer Überstabilisierung und Aggregation von Proteinen durch starke Stabilisatoren, wie beispielsweise TMAO, wurde Harnstoff als primärer Osmolyt einiger Organismen gewählt, obwohl es einen destabilisierenden Effekt auf die Stabilität von Proteinen und andere Biomoleküle besitzt. Harnstoff, das die Ammoniak-Toxizität verringern kann, ist als metabolisches Abfallprodukt des Proteinkatabolismus leicht zugänglich und es kann energetisch günstiger sein als beispielsweise Aminosäuren als komplementäre Osmolyte, die zur Energiegewinnung und Proteinsynthese benötigt werden. In dieser Studie wurden sowohl spektroskopische Methoden wie die FTIR-Spektroskopie als auch



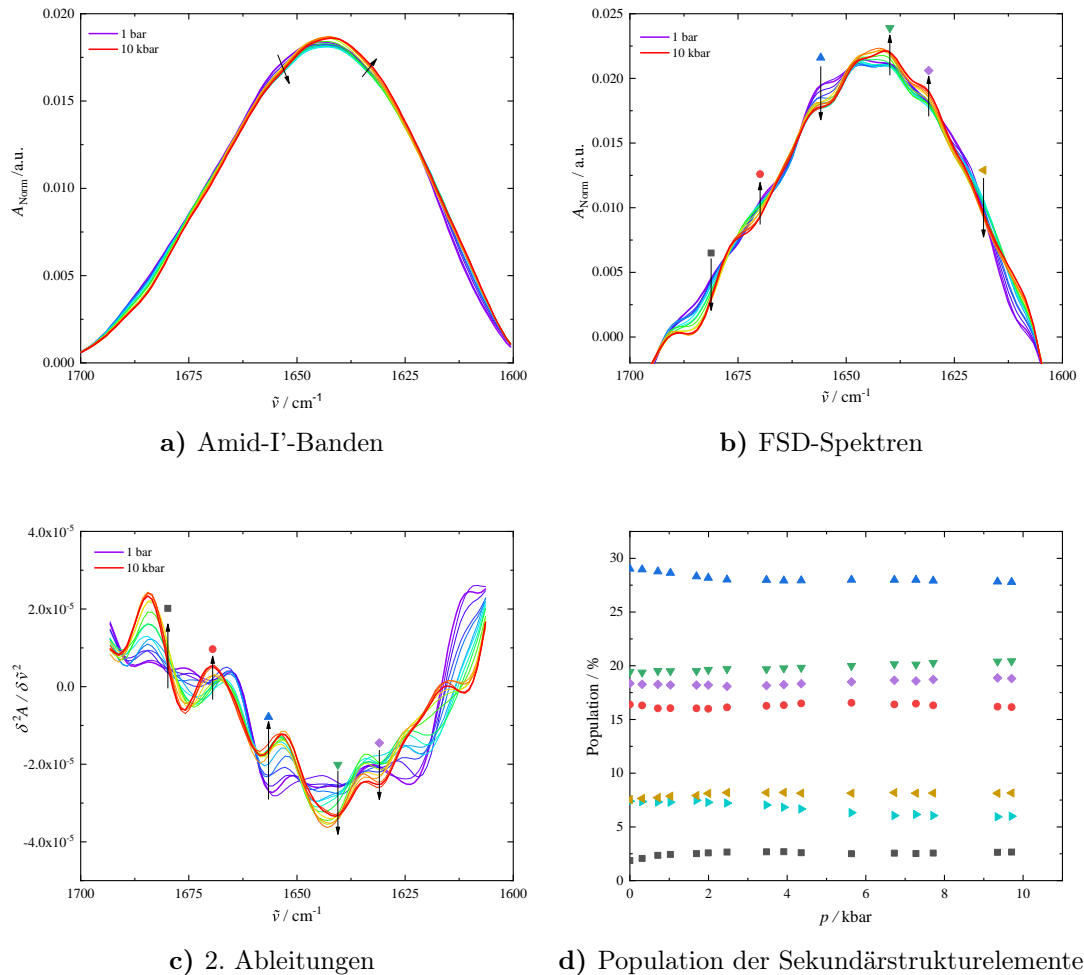
kalorimetrische Methoden mit DSC- und PPC-Messungen verwendet, um Veränderungen der Sekundärstruktur und thermodynamischen Eigenschaften während der druck- bzw. temperatur-induzierten Entfaltung von Mikrotubuli zu bestimmen.

Eine thermodynamische Analyse der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli in reiner Pufferlösung bei einer Temperatur von 25 °C ergibt einen partiellen Entfaltungsdruck  $p_u$  von  $\sim 4.5$  kbar und eine Volumenänderung  $\Delta V_u$  während der Entfaltung von  $-15 \pm 2 \text{ mL mol}^{-1}$ , was dem Volumen von lediglich einem Wassermolekül entspricht. Somit wurde gezeigt, dass die Sekundärstruktur von Mikrotubuli viel druckstabiler ist als die von filamentösem Actin (F-Actin), einem weiteren Protein des Zytoskelettes.<sup>[227,302]</sup> Die hohe Druckstabilität der Mikrotubuli deutet auf eine dichte Packung der dem Polymer zugrunde liegenden Monomerbausteine hin, wodurch die Bildung von Hohlräumen weitestgehend vermieden wird. Während Mikrotubuli druckstabiler sind als F-Actin, besitzt F-Actin eine höhere Thermostabilität, welche wahrscheinlich aufgrund stärker ausgebildeter Wasserstoffbrücken zurückzuführen ist.<sup>[227,302]</sup> Die hohe Druckempfindlichkeit der Polymerisation der Zytoskelettproteine *in vivo* ist wahrscheinlich auf den druckempfindlichen Keimbildungsschritt zurückzuführen, der die Polymerisation der Mikrotubuli und F-Actin initiiert und nicht auf die limitierte Druckstabilität der gebildeten Polymere.<sup>[108,240]</sup> Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Auswirkungen extremer Umweltbedingungen, einschließlich eines hohen hydrostatischen Drucks, wie er in der Tiefsee vorliegt, durch Anpassen des Osmolytgehalts, wie beispielsweise durch Erhöhung der TMAO-Konzentration, weitestgehend vermieden werden können. Bei einigen Tiefseetieren, wie beispielsweise Haien und Rochen, wurde ein Zusammenhang zwischen der Fangtiefe und dem Mischverhältnis von TMAO und Harnstoff gefunden.<sup>[327]</sup> Dabei ist es diesen Tiefseetieren möglich, die Konzentration an TMAO mit zunehmender Tiefe zu erhöhen, während gleichzeitig die Konzentration an Harnstoff und anderen Osmolyten reduziert wird, wodurch das Überleben in der Tiefsee unter hohen hydrostatischen Drücken erst möglich wird.<sup>[327]</sup>

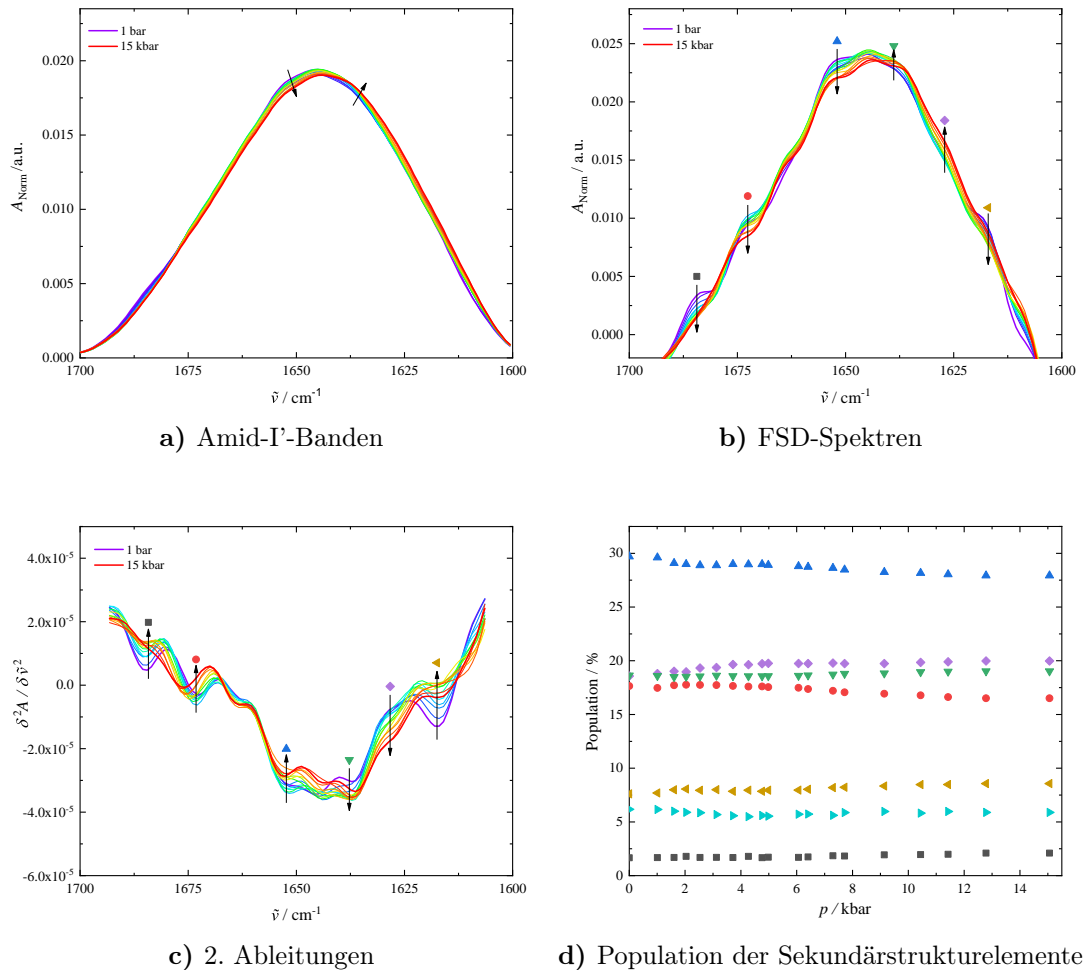
## 4.5 Anhang



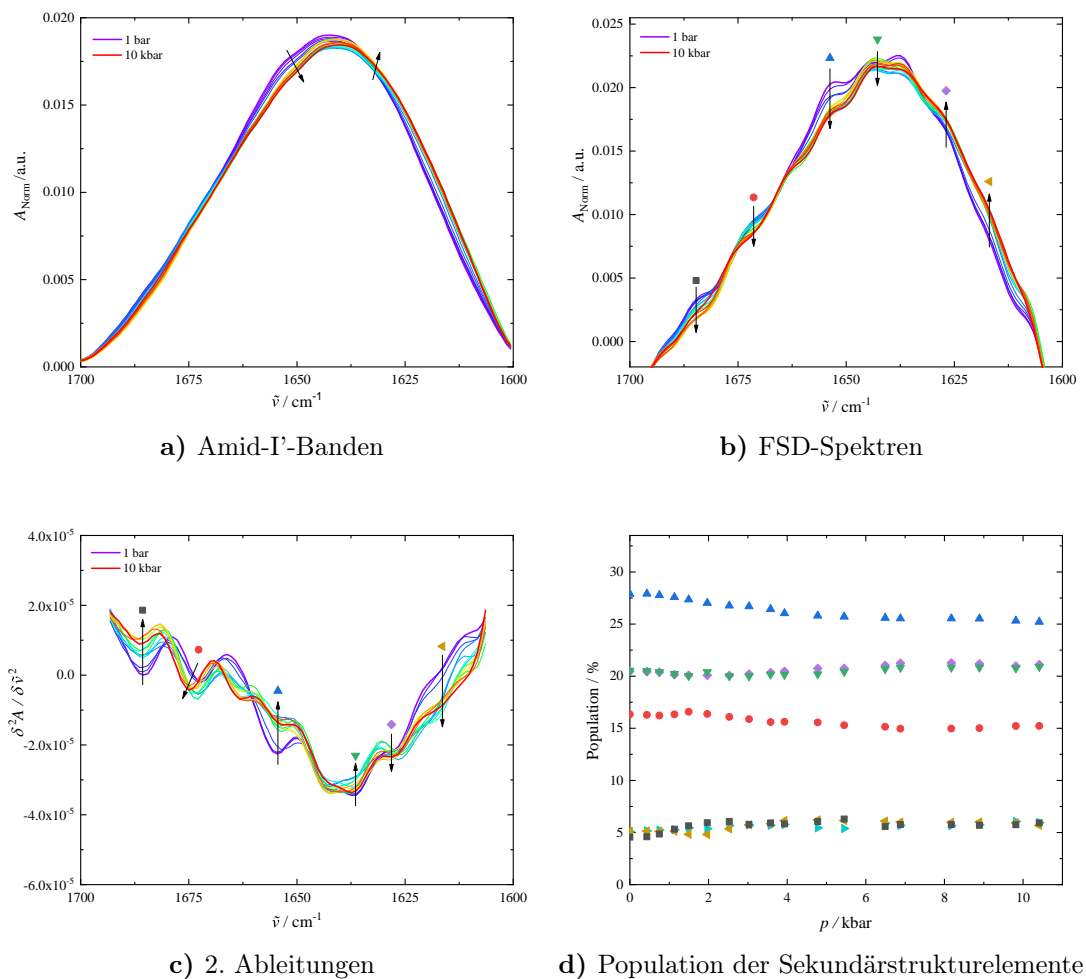
**Abbildung 4.22** – Druckabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M TMAO in einem Druckbereich von 1 bar bis 10 kbar. **a)** Druckabhängige Amid-I'-Bande. **b)** Druckabhängige FSD-Spektren der Amid-I'-Bande. **c)** Druckabhängige 2. Ableitungen der Amid-I'-Bande. **d)** Druckabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M TMAO. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.3). ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1683\text{ cm}^{-1}$ ), ● Schleifen ( $1669\text{ cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices ( $1651\text{ cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel ( $1637\text{ cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1629\text{ cm}^{-1}$ ), ◀ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1618\text{ cm}^{-1}$ ), ▶ Seitenketten ( $<1615\text{ cm}^{-1}$ ).



**Abbildung 4.23** – Druckabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff in einem Druckbereich von 1 bar bis 10 kbar. **a)** Druckabhängige Amid-I-Bande. **b)** Druckabhängige FSD-Spektren der Amid-I-Bande. **c)** Druckabhängige 2. Ableitungen der Amid-I-Bande. **d)** Druckabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.3). ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1683\text{ cm}^{-1}$ ), ● Schleifen ( $1669\text{ cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices ( $1651\text{ cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel ( $1637\text{ cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1629\text{ cm}^{-1}$ ), ◀ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1618\text{ cm}^{-1}$ ), ▶ Seitenketten ( $<1615\text{ cm}^{-1}$ ).



**Abbildung 4.24** – Druckabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Anwesenheit von 2M Harnstoff in einem Druckbereich von 1 bar bis 15 kbar. **a)** Druckabhängige Amid-I'-Bande. **b)** Druckabhängige FSD-Spektren der Amid-I'-Bande. **c)** Druckabhängige 2. Ableitungen der Amid-I'-Bande. **d)** Druckabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli in Anwesenheit von 2M Harnstoff. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.3). ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1683\text{ cm}^{-1}$ ), ● Schleifen ( $1669\text{ cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices ( $1651\text{ cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel ( $1637\text{ cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1629\text{ cm}^{-1}$ ), ◀ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1618\text{ cm}^{-1}$ ), ▶ Seitenketten ( $<1615\text{ cm}^{-1}$ ).



**Abbildung 4.25** – Druckabhängige FTIR-Daten von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 0.5 M TMAO in einem Druckbereich von 1 bar bis 10 kbar. **a)** Druckabhängige Amid-I-Bande. **b)** Druckabhängige FSD-Spektren der Amid-I-Bande. **c)** Druckabhängige 2. Ableitungen der Amid-I-Bande. **d)** Druckabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 0.5 M TMAO. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (4.3).  $\blacksquare$  intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1683  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\bullet$  Schleifen (1669  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\blacktriangle$   $\alpha$ -Helices (1651  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\blacktriangledown$  Zufallsknäuel (1637  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\blacklozenge$  intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1629  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\blacktriangleleft$  intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter (1618  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\blacktriangleright$  Seitenketten ( $<1615 \text{ cm}^{-1}$ ).



# 5 Cosolvenseinfluss auf die Struktur und Dynamik im Subnanosekundenbereich von Lysozym

---

Teile dieser Studie wurden in folgender Referenz veröffentlicht:

S. R. Al-Ayoubi, P. H. Schummel, M. Golub, J. Peters, R. Winter. Influence of cosolvents, self-crowding, temperature and pressure on the sub-nanosecond dynamics and folding stability of lysozyme. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2017**, *19*, 14230–14237.<sup>[328]</sup>





## 5.1 Einleitung

Das Leben auf dem Planet Erde entwickelte sich möglicherweise unter extremen Bedingungen, wie beispielsweise einem erhöhten Druck in der Tiefsee.<sup>[205]</sup> Aus diesem Grund ist die Erlangung eines tieferen Verständnisses des Einflusses eines erhöhten hydrostatischen Drucks auf Biomoleküle von hoher wissenschaftlicher Relevanz. Der Marianengraben, die tiefste Stelle der Erdoberfläche, besitzt eine Tiefe von etwa 11 km mit einem Druck von bis zu 100 MPa (1000 bar), der die dort lebenden Organismen während der Evolution dazu zwang, neue Strategien zur Bewältigung solcher harscher Bedingungen zu entwickeln.<sup>[49,205]</sup> Zum jetzigen Zeitpunkt konnten weder genetische noch genomische Untersuchungen solche strukturellen Anpassungen an extremste Bedingungen wie den Druck in den Organismen nachweisen, was eine widersprüchliche Situation darstellt im Vergleich zu anderen Umweltbedingungen wie beispielsweise der Temperatur, für die die strukturellen Anpassungen von Proteinen in den Genomen der Zellen identifiziert wurden.<sup>[329]</sup>

Eine mögliche und dabei weitverbreitete Strategie zur Stabilisierung von Proteinen und anderen biologisch relevanten biomolekularen Systemen gegen extreme Drücke und Temperaturen ist die metabolische Synthese von Osmolyten,<sup>[90]</sup> wie beispielsweise die Gruppe der Methylamine und darunter insbesondere Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), von denen bekannt ist, dass diese Proteine gegen Umwelteinflüsse, insbesondere gegen hohe Drücke vor einer Denaturierung schützen.<sup>[90]</sup> Des Weiteren ist bekannt, dass TMAO in der Lage ist, die destabilisierende Wirkung des Stoffwechselprodukts Harnstoff, einem weiteren Osmolyten, zu kompensieren.<sup>[95]</sup> Studien haben gezeigt, dass diese Kompensation *in vivo* bei einem Harnstoff:TMAO Verhältnis von 2:1 am effektivsten wirkt.<sup>[90]</sup> Im Gegensatz zu Harnstoff, welcher direkt mit dem Proteinrückgrat interagiert,<sup>[98,99,101,116]</sup> wird TMAO oftmals von der Proteinoberfläche ausgeschlossen und stärkt das Wasserstoffbrücken-Netzwerk des umliegenden Wassers.<sup>[110,116,293,330–332]</sup> Eine detaillierte Erläuterung zu natürlichen Osmolyten kann dem Kapitel 1.3 entnommen werden.

Biomakromoleküle besetzen etwa 30 % des intrazellulären Volumens einer biologischen Zelle. Aus diesem Grund ist eine Erforschung des *Crowding*, worunter der

Ausschluss von Volumina, verursacht durch andere Polymere oder des gleichen Polymers (*self-crowding*), verstanden wird, von großer wissenschaftlicher Bedeutung, um genauere Informationen über die Systematik des *Crowding* und seines Einflusses auf die verwendeten Biomoleküle zu erlangen. Eine detaillierte Erläuterung zu dem Thema *Crowding* kann dem Kapitel 1.4 entnommen werden. Studien haben gezeigt, dass unter *Crowding*-Bedingungen sich die Konformationsdynamik, die Stabilität und die Aktivität der Biomoleküle ändern können im Vergleich dazu, wenn sich das Biomolekül in einer verdünnten Lösung befindet.<sup>[174,175,177,183,188,333–336]</sup> Während der Einfluss von Cosolventien, *self-crowding*, Druck und Temperatur auf die Proteinstabilität, die Proteinstruktur und das intermolekulare Interaktionspotential ausgiebig untersucht worden ist,<sup>[105,178,197,238,239,337–340]</sup> ist der Einfluss eben dieser Faktoren auf die Proteindynamik trotz der starken Korrelation zwischen Flexibilität und Funktion von Proteinen kaum erforscht.<sup>[341]</sup> Martinez *et al.* haben vor kurzen gezeigt, dass die Proteinflexibilität und die reduzierte Dynamik des Hydratationswassers im Wesentlichen zur Druckanpassung in Prokaryoten beitragen,<sup>[342]</sup> weshalb es nahe liegt, dass ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Osmolyten und der Fähigkeit zur Druckanpassung besteht. Die Proteinflexibilität kann durch Schwankungen der Atompositionen im Protein charakterisiert und aus Molekulardynamik-Simulationen abgeleitet werden.<sup>[343–353]</sup> Allerdings beschränken sich die meisten Neutronenstreu-Experimente und Molekulardynamik-Simulationen zur Untersuchung der Proteindynamik auf verdünnte Lösungen oder hydratisierte Proteinpulver.<sup>[343,344,348–350]</sup> Der Einfluss von Cosolventien auf die interne Proteindynamik, insbesondere unter *self-crowding*-Bedingungen, ist kaum untersucht.

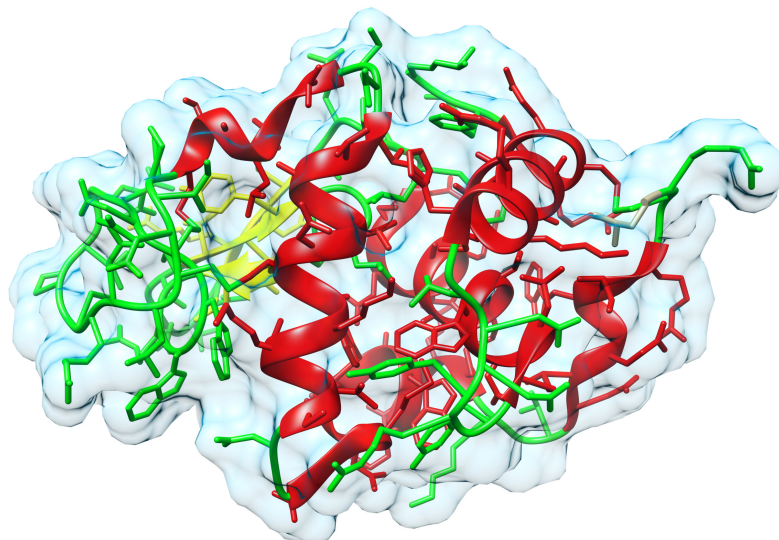
Bei der Durchführung von EINS-Messungen wird das Zeitfenster der untersuchten internen Dynamik von der Energieauflösung des Instruments bestimmt, die im Fall von IN13 (Institut Laue Langevin, Grenoble, France) bei 8  $\mu\text{eV}$  liegt, was einem Zeitfenster von  $\sim 100$  ps entspricht.<sup>[354,355]</sup> Bei der Untersuchung der internen Dynamik von Biomolekülen wird hauptsächlich die mittlere quadratische Verschiebung (engl.: *mean squared displacement*, MSD) der Wasserstoffatome des Biomoleküls ermittelt, da der inkohärente Streuquerschnitt von Wasserstoffatomen signifikant größer ist als

der aller anderen Atomen in den untersuchten Proben.<sup>[356]</sup> Dabei ist die mittlere quadratische Verschiebung abhängig von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise der Diffusion, der Rotation und der Bewegung von einzelnen Seitenketten. In dem hier untersuchten Zeitfenster auf der Subnanosekunden-Zeitskala spielt der Einfluss von Diffusionsbewegungen auf die mittlere quadratische Verschiebung kaum eine Rolle.

Temperaturabhängige Messungen der elastischen inkohärenten Neutronenstreuung (EINS) an hydratisierten Proteinen führten zu neuen Erkenntnissen über die Dynamik von Proteinen bei sehr tiefen Temperaturen, insbesondere über den sogenannten *Dynamischen Übergang*.<sup>[351,352,357]</sup> Dabei ist ein Anstieg der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) bei einer Temperatur von etwa 220 K ( $\sim -53^\circ\text{C}$ ) zu beobachten, der aus einer thermisch induzierten Flexibilität der Konformationen, wie beispielsweise durch Sprünge der Seitenketten des Proteins, resultiert und darauf hinweist, dass die Hydratationseigenschaften des Proteins dessen interne Bewegungen mitbestimmen.<sup>[345,358]</sup>

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Fortsetzung einer bereits im Jahr 2015 getätigten Studie von ErIkamp *et al.*, in welcher zwei unterschiedliche Konzentrationen von Lysozym ( $80\text{ mg mL}^{-1}$  und  $160\text{ mg mL}^{-1}$ ) verwendet wurden, um zu untersuchen, welchen Einfluss *self crowding*, d.h. hohe Proteinkonzentration, und eine Druckapplikation auf die interne Proteindynamik innerhalb einer Subnanosekunden-Zeitskala besitzen.<sup>[179]</sup> ErIkamp *et al.* fanden heraus, dass bei einer Proteinkonzentration von  $80\text{ mg mL}^{-1}$  die interne Proteindynamik eine ausgeprägte Druckabhängigkeit aufweist, während bei einer Konzentration von  $160\text{ mg mL}^{-1}$ , bei der ein sogenanntes *self crowding* vorliegt, der MSD um etwa 60 % reduziert ist und keine Druckabhängigkeit mehr aufweist.<sup>[179]</sup> Für die geringere Proteinkonzentration wurde gezeigt, dass der MSD mit steigendem Druck bis etwa 2000 bar abnimmt, bevor eine weitere Druckerhöhung zu keiner Veränderung der MSD führt.<sup>[179]</sup>

In dieser fortführenden Studie sollte mithilfe der elastischen inkohärenten Neutronenstreuung (EINS) der Einfluss von Druck auf die interne Proteindynamik auf der Subnanosekunden-Zeitskala von Lysozym, dessen Struktur als 3D-Bändermodell in Abbildung 5.1 dargestellt ist, in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen



**Abbildung 5.1** – 3D-Bändermodell der Kristallstruktur von Lysozym (PDB-Struktur: 1dpx<sup>[359]</sup>). Das 3D-Bändermodell wurde mithilfe der Computersoftware UCSF CHIMERA v.1.13.1 erstellt und modifiziert.<sup>[214]</sup>

nen der natürlichen Osmolyte TMAO, Harnstoff und Glycin, sowie der beiden Disaccharide Sucrose und Trehalose unter den bereits zuvor verwendeten *self crowding*-Bedingungen untersucht werden. Des Weiteren sollten fortführende druck- und temperaturabhängige Untersuchungen mithilfe der FTIR-Spektroskopie durchgeführt werden, um die Faltungstabilität des Proteins unter diesen *self crowding*-Bedingungen in Anwesenheit der Osmolyte TMAO und Harnstoff sowie Mischungen der beiden Cosolventien zu untersuchen. Diese Ergebnisse sollten weiterhin mit Ergebnissen aus DSC-Messungen verglichen werden.<sup>†</sup>

---

<sup>†</sup>Die in dieser Arbeit gezeigten elastischen inkohärenten Neutronenstreuungen (EINS) Messungen von Lysozym unter Druck wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi durchgeführt. Hierbei erfolgte die Auswertung der EINS-Messungen von Lysozym in Anwesenheit von Trehalose, Sucrose und Glycin durch den Autor, während die Auswertung der EINS-Messungen an Lysozym in Anwesenheit von TMAO, Harnstoff und Mischungen der beiden Cosolventien durch Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi erfolgten.

## 5.2 Materialien und Methoden

### 5.2.1 Chemikalien und Probenpräparation

Lysozym und D<sub>2</sub>O wurden von Alpha Aesar (Karlsruhe, Germany) erworben, während Harnstoff, <sup>13</sup>C-Harnstoff, TMAO und BisTris von Sigma Aldrich (Schnelldorf, Germany) bezogen wurden. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Falls nicht anders angegeben, waren die Probenvorbereitung sowie -zusammensetzung für die in dieser Studie durchgeführten FTIR, DSC- und EINS-Messungen identisch. Für die FTIR-Experimente wurde <sup>13</sup>C-Harnstoff verwendet, da <sup>12</sup>C-Harnstoff eine starke Absorption in dem Wellenzahlenbereich der Amid-I'-Bande des Proteins aufweist. Durch Verwendung des isotopmarkierten Harnstoffs verschiebt sich die Absorptionsbande der <sup>13</sup>C=O Streckschwingung zu kleineren Wellenzahlen, sodass dadurch eine korrekte Subtraktion des Pufferspektrums vom Probenspektrum gewährleistet wird.<sup>[360]</sup> Die hier verwendeten Pufferlösungen besitzen eine D<sub>2</sub>O-Basis, sodass bei den durchgeführten Messungen lediglich die H-Atome des vermessenen Lysozyms für die Neutronen sichtbar sind. Bei den druckabhängigen Messungen wurde ein 50 mM BisTris und bei den temperaturabhängigen Messungen ein 50 mM Phosphatpuffer verwendet, um einen konstanten pH-Wert über den vermessenen Druck- bzw. Temperaturbereich zu garantieren.<sup>[361]</sup> Mithilfe der Gleichung

$$\text{pD} = \text{pH} + 0.4 \quad (5.1)$$

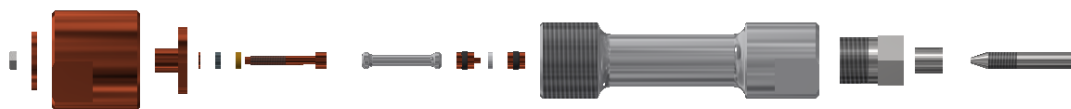
wurde der pD-Wert mit einer handelsüblichen pH-Elektrode auf 7.4 eingestellt.<sup>[315]</sup>

Da es für die FTIR-Messungen zwingend erforderlich ist, dass ein vollständiger H/D-Austausch des Proteins stattgefunden hat, wurde vor der Durchführung der eigentlichen Messungen das Protein in D<sub>2</sub>O gelöst und auf eine Temperatur von etwa 60 °C erhitzt, bevor es über Nacht lyophilisiert wurde, um es anschließend in dem entsprechenden D<sub>2</sub>O-Puffer für die eigentlichen Messungen zu lösen.

## 5.2.2 Elastische Inkohärente Neutronenstreuung

Die elastisch inkohärenten Neutronenstreu-Experimente (EINS) wurden an dem thermischen *backscattering*-Spektrometer IN13 des Instituts Laue Langevine (ILL) in Grenoble durchgeführt,<sup>[362]</sup> an welchem in einem  $Q$ -Bereich von 0.2 bis 4.9 Å mit einer Energieauflösung von 8  $\mu\text{eV}$  gemessen werden kann. Bei den hier durchgeführten elastischen Streuexperimenten wurde eine Wellenlänge von 2.23 Å verwendet. Unter diesen Bedingungen sind Bewegungen in einem Zeitfenster von bis zu 100 ps möglich, in welchem besonders interne, lokale Diffusionsbewegungen vonstatten gehen. Das verwendete Hochdruck-Equipment, wozu auch die in Abbildung 5.2 dargestellte Hochdruckzelle zählt, wurde vom ILL entwickelt und zur Verfügung gestellt.<sup>[354]</sup> Als Drucküberträger wurde die Flüssigkeit Fluorinert verwendet, welche bei Neutronenuntersuchungen oft als druckübertragendes Medium aufgrund der sehr geringen inkohärenten Streuung von Neutronen Verwendung findet.<sup>[363]</sup> Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und die Messzeit für jeden einzelnen Messpunkt betrug mindestens 8 h, um ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten.

Zur Datenverarbeitung wurde sowohl die Streukurve der leeren Zelle als auch die Streukurve der verwendeten Pufferlösung bei dem entsprechenden Druck unter Berücksichtigung des Volumenanteils des vermessenen Proteins von der Streukurve der Probe subtrahiert, bevor eine Normierung der Streuintensität  $I$  auf einen Vanadium-Standard erfolgte.<sup>[365]</sup> Aufgrund der Tatsache, dass der inkohärente Streuquerschnitt der Wasserstoffatome viel höher ist als bei allen anderen im Protein vorhandenen Atomen,<sup>[356]</sup> liefern die hier durchgeführten EINS-Experimente im Wesentlichen In-



**Abbildung 5.2** – Explosionszeichnung der verwendeten EINS-Hochdruckzelle. Die Explosionszeichnung wurde mithilfe der Computersoftware AUTODESK INVENTOR2018<sup>[224]</sup> erstellt und modifiziert nach Referenzen<sup>[354,364]</sup>.

formationen über die interne gemittelte Dynamik, wie beispielsweise Schwingungen oder Rotationsdiffusion, der Wasserstoffatome innerhalb des Proteins auf einer Zeitskala von Piko- zu Nanosekunden.

Die mittlere quadratische Verschiebung der Bewegungen (*engl.: mean-squared displacement, MSD*)  $\langle u^2 \rangle$  wurde auf Grundlage der GAUSSschen Näherung mittels folgender Gleichung bestimmt:<sup>[366]</sup>

$$I(Q, 0 \pm \Delta E) \approx I_0 \exp\left(-\frac{1}{3}Q^2 \langle u^2 \rangle\right) \quad (5.2)$$

Hierbei entsprechen  $Q$  dem Impulsübertrag der Neutronen und  $\Delta E$  der instrumentellen Energieauflösung. Für die Datenverarbeitung wurde die vom ILL entwickelte Computersoftware LAMP verwendet.<sup>[367]</sup>

### 5.2.3 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Temperaturabhängige FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) Messungen wurden an einem Nicolet 6700 der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) in einem Wellenzahlenbereich von 4000 bis 1100  $\text{cm}^{-1}$  durchgeführt. Dieses FTIR-Spektrometer ist mit einem MCT-Detektor (HgCdTe, Quecksilber-Cadmium-Tellur) ausgerüstet, der mittels flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Das Probenvolumen betrug  $\sim 20 \mu\text{L}$  und wurde zwischen zwei runde  $\text{CaF}_2$  (Calciumfluorid)-Fenster der Größe 25 x 4 mm (Pike Technologies, Madison, WI, USA) platziert. Ein 50  $\mu\text{m}$  dicker Dichtungsring aus Mylar-Folie mit einem Innendurchmesser von 10.5 mm wurde als Separator verwendet, sodass ein effektives Probenvolumen von 4.3  $\mu\text{L}$  resultiert. Die auf diese Art und Weise vorbereitete Probenzelle wurde daraufhin in einer temperierbaren Vorrichtung platziert. Die Proben temperatur wurde durch ein externes Wasserbad des Typs F32-HL der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) mit einer Fehlertoleranz von  $\Delta T = \pm 0.2^\circ\text{C}$  reguliert und mithilfe eines digitalen Thermometers gemessen.

Die druckabhängigen FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie-Messungen wurden in einem MAGNA 550 der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) durchgeführt. Dieses Spektrometer ist ebenfalls mit einem MCT-Detektor (HgCdTe)

ausgestattet ist, der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Die Messungen fanden in einem Wellenzahlenbereich von 650 bis 4000  $\text{cm}^{-1}$  und einer Temperatur von 25 °C statt. Eine membrangetriebene Diamantstempelzelle (Diacell<sup>®</sup> VivoDAC) der Firma Almax easyLab (Diskmuide, Belgien) wurde verwendet, um die Proben einem Druck von bis zu 15 kbar (1.5 GPa) aussetzen zu können. Für einen kontrollierbaren Druckaufbau wurde ein automatisierter, pneumatisch geregelter Druckregler der Firma GE (PACE 5000, iGM Controller), der von der Firma Almax easyLab angeboten wird, verwendet. Als Abstandshalter der beiden Diamantfenster, der zugleich den Probenraum bildet, wurde ein 50  $\mu\text{m}$  dicker Messingring mit einem Außendurchmesser von 4 mm und einer zentrierten 0.5 mm Bohrung verwendet, sodass dementsprechend ein effektives Probenvolumen von  $\sim 9.8$  nL vorliegt. Der Messingring wurde auf einen 730  $\mu\text{m}$  dicken Typ IIa Diamantfenster (Almax easyLab) gelegt und  $\sim 3$   $\mu\text{L}$  Probe auf die zentrierte Bohrung aufgebracht. Zur Druckbestimmung wurde Bariumsulfat ( $\text{BaSO}_4$ ) als interner Druckindikator verwendet, um die druckabhängige Bandenverschiebung der  $\text{SO}_4^{2-}$ -Streckschwingung nachzuverfolgen, deren Absorptionsbande bei  $\sim 983$   $\text{cm}^{-1}$  (Atmosphärendruck) liegt. <sup>[316]</sup>

Sowohl die temperatur- als auch die druckabhängigen FTIR-spektroskopischen Experimente wurden mit einer Lysozymkonzentration von 80 bzw. 160  $\text{mg mL}^{-1}$  durchgeführt. Die temperaturabhängigen FTIR-spektroskopische Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 25 bis 92 °C durchgeführt. Die Probenkammer des Spektrometers wurde kontinuierlich mit  $\text{CO}_2$ -freier, trockener Luft gespült (Adsorptionstrockner Typ 15, Zander, Essen, Deutschland), um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten. Nach dem Platzieren der vorbereiteten Probenzelle in dem FTIR-Spektrometer wurde 30 min gewartet, damit die Probe sich equilibrieren konnte.

Mithilfe der Spektralverarbeitungssoftware OMNIC 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurden für jede zu messende Temperatur bzw. jeden zu messenden Druck 256 Spektren mit einer Auflösung von 2  $\text{cm}^{-1}$  in Folge aufgenommen, um diese zu einem resultierenden FTIR-Spektrum zu mitteln und mit einer HAPPGENZEL-Funktion anzupassen. Mithilfe des Softwarepakets THERMO GRAMS / AI



8 der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) wurden die aufgenommenen FTIR-Spektren prozessiert und analysiert. Dies beinhaltete zum einen die Subtraktion des Pufferspektrums und zum anderen eine Basislinienkorrektur sowie eine Flächennormierung im Bereich der Amid-I'-Bande, die sich im Wellenzahlenbereich von 1700 bis 1600  $\text{cm}^{-1}$  befindet. Diese Flächennormierung dient dazu, um druck- bzw. temperaturabhängige Änderungen besser herauskristallisieren zu können. Dazu wurde jedes einzelne hintergrundkorrigierte FTIR-Spektrum im Bereich der Amid-I' für sich integriert, um im Anschluss jede gemessene Absorption bei den vermessenen Wellenzahlen durch die integrierte Fläche zu dividieren:

$$A_{\text{Norm}}(\tilde{\nu}, x) = \frac{A(\tilde{\nu}, x)}{\int_{1600}^{1700} A(\tilde{\nu}, x) d\tilde{\nu}} \quad (5.3)$$

Hierbei entspricht in der Gleichung 5.3 das auftretende  $x$  entweder dem Druck  $p$  oder der Temperatur  $T$ . Aus dieser Flächennormierung resultiert, dass die Fläche unter jeder Amid-I'-Bande gleich Eins ist:

$$\int_{1600}^{1700} A_{\text{Norm}}(\tilde{\nu}, x) d\tilde{\nu} = 1 \quad (5.4)$$

Im Anschluss an die Flächennormierung der Amid-I'-Bande erfolgte die Bildung der sogenannten FOURIER-Selbstentfaltung (engl.: *Fourier Self-Deconvolution*, FSD), sowie jeweils der 2. Ableitung. Aus diesen beiden gebildeten Spektren können die Positionen einzelner Subbanden erhalten werden, sobald sich an Positionen ein Maximum im FSD-Spektrum und gleichzeitig ein Minimum im Spektrum der 2. Ableitung befindet. Anhand dieser Subbandenanalyse konnten dem vermessenen Lysozym sechs Subbanden zugeordnet werden, deren Absorptionsbereiche in Tabelle 5.1 aufgelistet sind.

Bei der Bildung einer Linearkombination unter Verwendung von sechs gemischten Gauß-Lorentz-Funktionen können die relativen Änderungen in der Population von Sekundärstrukturelementen bestimmt werden. Aufgrund der zuvor durchgeführten Flächennormierung der FTIR-Spektren im Amid-I'-Bandenbereich entspricht die

**Tabelle 5.1** – Sekundärstrukturelemente und Absorptionsbanden von Lysozym im spektralen Bereich der Amid-I'-Bande.

Sekundärstrukturelement	Absorptionsbereich / $\text{cm}^{-1}$
Basislinie	1611
Intermolekulare $\beta$ -Faltblätter	$\sim 1621, \sim 1673$
Ungeordnete Strukturen	$\sim 1640$
$\alpha$ -Helices	$\sim 1655$
Schleifen	$\sim 1682$

Fläche unter der jeweils resultierenden Gauß-Lorentz-Funktion dem Absorptionsbeitrag des jeweiligen Sekundärstrukturelements, der der Population in der gerade vorliegenden Konformation entspricht.<sup>[318]</sup>

Unter Zuhilfenahme der Annahme, dass die beobachtete Proteinfaltung einem Zwei-Zustands-Modell folgt, kann eine modifizierte BOLTZMANN-Funktion verwendet werden, um jeweils den temperatur- (Gleichung 5.6) bzw. druckabhängigen (Gleichung 5.5) Verlauf der sigmoidalen Kurven der Populationsänderung der Sekundärstrukturelemente mathematisch zu beschreiben. Die Änderungen der Absorption, die durch Anlegen eines Drucks bzw. einer Temperatur induziert wurden, können durch folgende Gleichungen beschrieben werden:<sup>[227]</sup>

$$A(p) = \frac{A_F - A_U}{1 + \exp \left[ - (p - p_u) \cdot \left( \frac{\Delta V_u^\circ}{RT} \right) \right]} + A_U \quad (5.5)$$

$$A(T) = \frac{A_F - A_U}{1 + \exp \left[ - \left( \frac{1}{T_u} - \frac{1}{T} \right) \cdot \left( \frac{\Delta H_u^\circ}{R} \right) \right]} + A_U \quad (5.6)$$

Hierbei entsprechen der native, d.h. der gefaltete (F) Zustand bzw. der entfaltete (U) Zustand des Proteins den jeweiligen Plateauwerten der Absorptions-Intensitäten  $A_F$  bzw.  $A_U$  und die dazugehörigen Wendepunkte dem Übergangsdruck  $p_u$  bzw. der Übergangstemperatur  $T_u$ . An diesen thermodynamischen Kenngrößen liegen jeweils 50 % natives und entfaltetes Lysozym vor. Mithilfe der Gleichungen 5.5 und 5.6 können direkt die thermodynamischen Parameter  $\Delta H_u^\circ$  und  $\Delta V_u^\circ$ , die der Änderung der Standardreaktionsenthalpie (VAN'T HOFF'schen-Enthalpie,  $\Delta H^\circ = \Delta H_{vH}$ ) und

der Volumenänderung der Entfaltungsreaktion entsprechen, durch eine Kurvenanpassung an die zuvor experimentell bestimmten Daten erhalten werden.<sup>[227]</sup>

Jede Probe wurde zur Bestimmung der druck- bzw. temperaturabhängigen thermodynamischen Parameter mindestens dreimal gemessen und entsprechend analysiert.

Zur Analyse der druckabhängigen Änderungen der Sekundärstrukturanteile fand eine globale Funktionsanpassung mithilfe der Gleichung (5.5) an den jeweiligen Datensatz statt, wohingegen bei den thermisch-induzierten Änderungen der Sekundärstrukturanteile eine globale Funktionsanpassung der Gleichung (5.6) an den jeweiligen Datensatz durchgeführt wurde.

Die aus der jeweiligen Funktionsanpassung der Gleichungen (5.5) bzw. (5.6) an die entsprechenden experimentellen Datensätze erhaltenen thermodynamischen Parameter wurden über die Anzahl der durchgeführten Experimente gemittelt, damit sowohl quantitative als auch qualitative Rückschlüsse auf den Entfaltungsprozess des untersuchten Lysozyms gezogen werden konnten.

#### 5.2.4 Differentialthermoanalyse

Kalorimetrische Experimente wurden an einem Q20-DSC-System der Firma TA Instruments (New Castle, DE, USA) durchgeführt. Das Volumen der Proben- und Referenzzelle beträgt jeweils 20  $\mu\text{L}$ . Die Probenzelle beinhaltete die zu untersuchende Proteinlösung, während in der Referenzzelle die jeweilige Pufferlösung eingefüllt wurde. Die DSC-Experimente wurden mit einer Proteinkonzentration von 80  $\text{mg mL}^{-1}$  bzw. 160  $\text{mg mL}^{-1}$  in einem Temperaturbereich von 30 bis 100  $^{\circ}\text{C}$  bei einer Heizrate von 60  $^{\circ}\text{C h}^{-1}$  durchgeführt.

Aus den erhaltenen Thermogrammen können die Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  während der Entfaltung und die Übergangstemperatur  $T_u$  erhalten werden. Zur besseren Auswertung erfolgte eine Basislinienkorrektur im Bereich des Übergangs der erhaltenen Thermogramme.

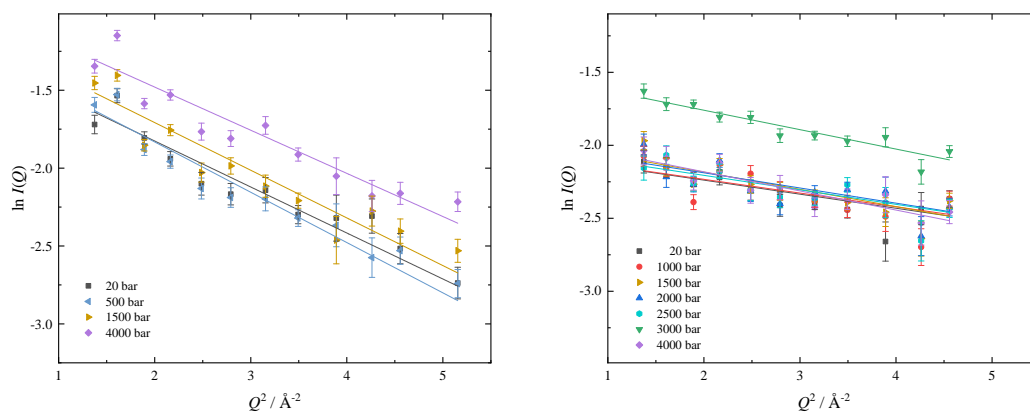
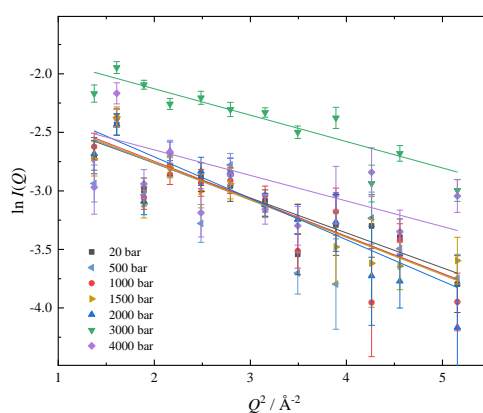
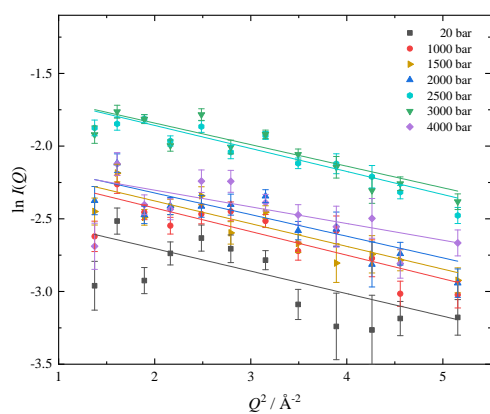
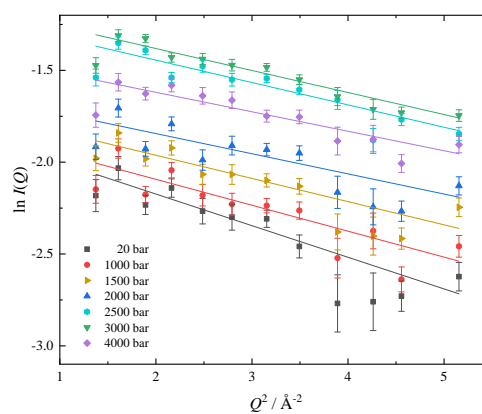
## 5.3 Ergebnisse und Diskussion

### 5.3.1 Einfluss von Cosolventien auf die Proteindynamik unter Druck

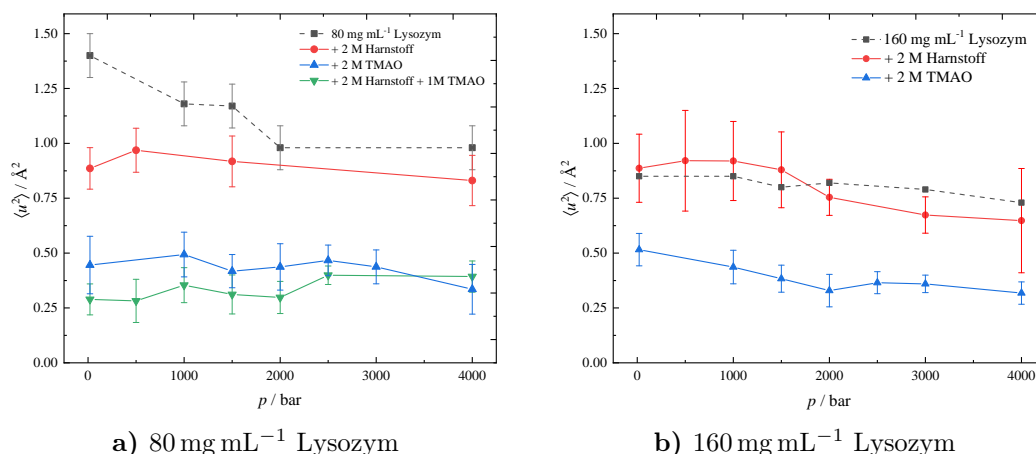
Abbildung 5.3 zeigt die experimentellen Daten der durchgeführten EINS-Messungen als semilogarithmische Auftragung bei Raumtemperatur und verschiedenen Drücken, die zur Bestimmung der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) mithilfe der GAUSS-Näherung (Gleichung 5.2) verwendet wurden. Die Abbildungen 5.3a bis 5.3c zeigen die Ergebnisse der Messungen von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym, während in den Abbildungen 5.3d und 5.3e die Messergebnisse von  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym dargestellt sind. Beide Proteinkonzentrationen wurden sowohl in Anwesenheit von 2 M Harnstoff (Abbildung 5.3a und 5.3d) als auch in Anwesenheit von 2 M TMAO (Abbildung 5.3b und 5.3e) vermessen. Zusätzlich wurde bei einer Proteinkonzentration von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  die gleichzeitige Anwesenheit von 2 M Harnstoff und 1 M TMAO (Abbildung 5.3c) untersucht. Da die gemessenen Intensitäten bei einem  $Q^2$ -Wert kleiner 1 der Wasserdynamik zugeordnet werden können,<sup>[368]</sup> wurden diese Datenpunkte nicht zur Bestimmung der MSD verwendet und daher auch nicht eingezeichnet.

Die in Gleichung (5.2) dargestellte GAUSS-Näherung behält ihre Gültigkeit bis zu einem Wert von  $\langle u^2 \rangle Q^2 \approx 1$ . Da allerdings die hier gezeigten Datenpunkte bei höheren  $Q^2$ -Werten immer noch ein lineares Verhalten aufweisen, wird diese Bedingung hier überschritten.

Die mithilfe der GAUSS-Näherung (Gleichung 5.2) bestimmten MSD-Werte von Lysozym bei Raumtemperatur sind für eine Proteinkonzentration von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  in Abbildung 5.4a und für eine Proteinkonzentration von  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  in Abbildung 5.4b als Funktion des Druckes aufgetragen. Die eingezeichneten druckabhängigen MSD-Werte von 80 bzw.  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in reiner Pufferlösung sind zum besseren Vergleich eingezeichnet und entstammen der Referenz<sup>[179]</sup>.

a)  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym + 2 M Harnstoffb)  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym + 2 M TMAOc)  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym + 2 M Harnstoff +  
1 M TMAOd)  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym + 2 M Harnstoffe)  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym + 2 M TMAO.

**Abbildung 5.3** – Semilogarithmische EINS-Intensitäten von  $80$  und  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in Anwesenheit von Harnstoff und TMAO als Funktion von  $Q^2$  bei verschiedenen Drücken.  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in Anwesenheit von **a)** 2 M Harnstoff, **b)** 2 M TMAO und **c)** 2 M Harnstoff und 1 M TMAO.  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in Anwesenheit von **d)** 2 M Harnstoff und **e)** 2 M TMAO. Eingezeichnete Linien repräsentieren die beste Kurvenanpassung der GAUSS-Näherung (Gleichung 5.2) an die experimentellen Daten, deren Steigung zur Berechnung des MSD benötigt wird. Die Verantwortlichkeit der hier gezeigten Daten obliegt Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi.



**Abbildung 5.4** – Mittlere quadratische Verschiebung (MSD) in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff von **a)**  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  und **b)**  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym als Funktion des Drucks. Zum besseren Vergleich sind die MSD-Werte von  $80$  bzw.  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in Abwesenheit von Cosolventien, die von Erlkamp *et al.* bestimmt wurden, als Referenz mit eingezeichnet.<sup>[179]</sup> Die Verantwortlichkeit der hier gezeigten Daten obliegt Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi.

Wie Erlkamp *et al.* bereits zeigten, weist die MSD der Wasserstoffatome von Lysozym bei einer Proteinkonzentration von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  eine deutliche Druckabhängigkeit auf.<sup>[179]</sup> Bis zu einem Druck von  $2 \text{ kbar}$  sinkt diese um  $0.4 \text{ \AA}^2$  von anfänglichen  $1.4 \text{ \AA}^2$  auf  $1.0 \text{ \AA}^2$ , bevor diese dann, im Rahmen des experimentellen Fehlers, konstant bei diesem Wert bleibt (Abbildung 5.4a).<sup>[179]</sup> In Anwesenheit der beiden Osmolyte TMAO und Harnstoff ist allerdings bei einer Proteinkonzentration von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym, im Rahmen der experimentellen Genauigkeit, keine Druckabhängigkeit zu erkennen.

Die Anwesenheit des Osmolyten TMAO bewirkt eine insgesamt verringerte MSD im Vergleich zu der von Erlkamp *et al.* bestimmten MSD von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in reiner Pufferlösung. So ist diese bei Umgebungsdruck um etwa  $70\%$  verringert. Eine verringerte MSD ist gleichzusetzen mit einer geringeren inneren Beweglichkeit der Wasserstoffatome des Proteins.

In Anwesenheit von  $2 \text{ M}$  Harnstoff ist die MSD bei Atmosphärendruck um etwa  $35\%$  verringert im Vergleich zu der von Erlkamp *et al.* bestimmten MSD von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym.<sup>[179]</sup> Ab einem Druck von etwa  $2 \text{ kbar}$  sind die bestimmten MSD-Werte von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in An- und Abwesenheit von  $2 \text{ M}$  Harnstoff,

im Rahmen des experimentellen Fehlers, in etwa gleich groß. Insgesamt gesehen kann somit kein signifikanter Einfluss von 2 M Harnstoff auf die Proteindynamik von Lysozym bei einer Konzentration von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  beobachtet werden.

Zur Untersuchung, ob die beiden verwendeten Osmolyte einen sich entgegenwirkenden Effekt auf die Proteindynamik besitzen, wurde zusätzlich zu den zuvor genannten Messungen, in denen die Effekte der beiden Cosolventien auf die Proteindynamik von Lysozym separat voneinander untersucht wurden, eine druckabhängige Messreihe von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in Anwesenheit von sowohl 2 M Harnstoff als auch von 1 M TMAO durchgeführt, deren daraus resultierenden MSD-Werte ebenfalls in Abbildung 5.4a abgebildet sind. Dieses Molverhältnis von 2:1 wurde gewählt, da *in vivo*-Studien gezeigt haben, dass bei diesem Verhältnis die Effekte der beiden Cosolventien sich aufheben sollen.<sup>[329]</sup> Anhand dieser Abbildung lässt sich deutlich erkennen, dass der druckabhängige Verlauf der MSD-Werte des vermessenen Gemischs in etwa gleich dem Verlauf der MSD-Werte von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in Anwesenheit von 2 M TMAO entspricht, sodass an dieser Stelle davon ausgegangen werden kann, dass die in diesem Zeitfenster beobachtete interne Proteindynamik nicht durch Harnstoff, sondern lediglich durch die Anwesenheit des Osmolyten TMAO beeinflusst wird.

Neben einer Proteinkonzentration von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym wurde ebenfalls eine Proteinkonzentration von  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  in Anwesenheit von Harnstoff bzw. TMAO vermessen, um den Einfluss der beiden Cosolventien auf die interne Proteindynamik zu untersuchen. Die Abbildungen 5.3d und 5.3e zeigen die gemessenen und hintergrundkorrigierten Intensitäten in einer semilogarithmischen Auftragung bei verschiedenen Drücken. Mithilfe der GAUSS-Näherung (Gleichung 5.2) erfolgte eine Kurvenanpassung an die experimentellen Daten, um den MSD bei dem jeweiligen Druck zu bestimmen, die in Abbildung 5.4b als Funktion des Drucks aufgetragen sind. Zum besseren Vergleich sind auch hier die von Erlkamp *et al.* bestimmten druckabhängigen MSD-Werte von  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in reiner Pufferlösung eingezeichnet, die der Referenz<sup>[179]</sup> entnommen wurden.

Die zuvor bei einer Proteinkonzentration von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym anfänglich

zu erkennende Druckabhängigkeit bis zu einem Druck von etwa 2 kbar ist bei der doppelt so hohen Lysozym-Konzentration nicht mehr zu erkennen.<sup>[179]</sup> Insgesamt gesehen sind die MSD-Werte bei der doppelt so großen Proteinkonzentration, bei der nun sogenannte *self-crowding*-Bedingungen vorliegen, verringert auf einen Wert von etwa  $0.9 \text{ \AA}^2$ .<sup>[179]</sup>

Bei einer Betrachtung der MSD-Werte von  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in Anwesenheit von 2 M TMAO lässt sich wiederum erkennen, dass die Anwesenheit des Osmolyts eine Verringerung der MSD-Werte induziert, sodass diese um etwa 40 % kleiner sind als in Abwesenheit des Cosolvens. Des Weiteren lässt sich in Anwesenheit von 2 M TMAO eine leichte Druckabhängigkeit der MSD-Werte erkennen. So sinken die Werte um etwa  $0.1 \text{ \AA}^2/\text{kbar}$  mit steigendem Druck.

Die Anwesenheit von 2 M Harnstoff scheint keinen signifikanten Einfluss auf die interne Proteindynamik zu nehmen, was anhand von ähnlichen MSD-Werten in An- und Abwesenheit von Harnstoff zu erkennen ist. Auch hier ist wiederum lediglich eine geringfügige Druckabhängigkeit der MSD-Werte angedeutet. So verringern sich die MSD-Werte von  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in Anwesenheit von 2 M Harnstoff, im Rahmen des experimentellen Fehlers, nur minimal bis zu einem Druck von etwa 2 bis 3 kbar.

Insgesamt gesehen deuten die hier gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass der Osmolyt TMAO einen deutlichen Einfluss auf die interne Proteindynamik besitzt, was sogar den *self-crowding*-Effekt um einen Faktor von zwei übertrifft. Diese These wird durch die Betrachtung der MSD-Werte in der Harnstoff-TMAO-Mischung bestätigt, da in dem Gemisch ähnliche MSD-Werte bestimmt werden konnten wie in der Probe, die lediglich 2 M enthielt. Des Weiteren kann in Anwesenheit der beiden Osmolyte weder eine signifikante Druckabhängigkeit noch ein *self-crowding*-Effekt auf die interne Proteindynamik erkannt werden, was möglicherweise auf den sehr geringen *Bulk*-Wasser-Anteil in Anwesenheit der hohen Osmolyt-Konzentration von 2 M zurückzuführen ist. An dieser Stelle sei erwähnt, dass globale Bewegungen des Proteins nicht für die hier beobachteten Änderungen der Proteindynamik verantwortlich sind, da diese auf IN13 in dem hier betrachteten Zeitfenster nicht wahrgenommen wer-



den können und diese zusätzlich in dicht gepackten Lösungen gedämpft werden.<sup>[369]</sup>

Die unterschiedlichen Einflüsse von Harnstoff und TMAO können evtl. dadurch erklärt werden, dass diesen unterschiedliche Wechselwirkungsmechanismen mit dem Protein bzw. dem umliegenden Wasser zugrunde liegen. So interagiert Harnstoff direkt mit dem Proteinerückgrat, während TMAO vorwiegend vom Protein ausgeschlossen wird und mit dem umliegenden Wasser stark in Interaktion tritt, wodurch das gesamte Wasserstoffbrücken-Netzwerk des Solvens verstärkt wird. Allgemein betrachtet, wurde mehrfach ein Zusammenspiel zwischen der Wasser- und Proteindynamik postuliert, d.h. dass die Proteindynamik stark von der Wasserdynamik der umliegenden Wassermoleküle beeinflusst wird. Während die internen Proteinbewegungen vor allem durch die Dynamik der ersten Schale der Hydratationshülle beeinflusst werden, werden globale Bewegungen besonders durch die Dynamik des *Bulk*-Wassers bestimmt.<sup>[370–372]</sup> Die Anwesenheit von TMAO, welches stark mit dem Lösungsmittel Wasser interagiert und dadurch ein starkes Wasserstoffbrücken-Netzwerk ausbildet, führt zu drastisch reduzierten MSD-Werten im beobachteten Zeitfenster.

Im Gegensatz dazu interagiert Harnstoff bevorzugt mit dem Proteinerückgrat, sodass die erste Schale der Hydratationshülle stark beeinflusst wird. Da nun die beiden verwendeten Osmolyte unterschiedlich mit dem Protein in Interaktion treten,<sup>[90,95,98,99,101,110,116,293,330–332]</sup> verhalten sich die beiden Cosolventien wie erwartet und beeinflussen dementsprechend die Proteindynamik.

Im Vergleich zu den von Erlkamp *et al.* ermittelten MSD-Werten von Lysozym in reiner Pufferlösung, die unter *self-crowding*-Bedingungen stark verringert werden,<sup>[179]</sup> führen die hier vorliegenden Konzentrationen von Lysozym zu keiner weiteren Verringerung der MSD-Werte. Die hier beobachteten Unterschiede in der Größenordnung und der Cosolvens-Empfindlichkeit der ermittelten MSD-Werte bei den zwei verschiedenen Konzentrationen an Lysozym können evtl. darauf zurückgeführt werden, dass in der hochkonzentrierten Proteinlösung, in welcher  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym vorliegen, praktisch kein *Bulk*-Wasser mehr vorhanden ist und somit die Proteine nur durch wenige Wasser- bzw. Cosolvens-Schichten voneinander getrennt sind.

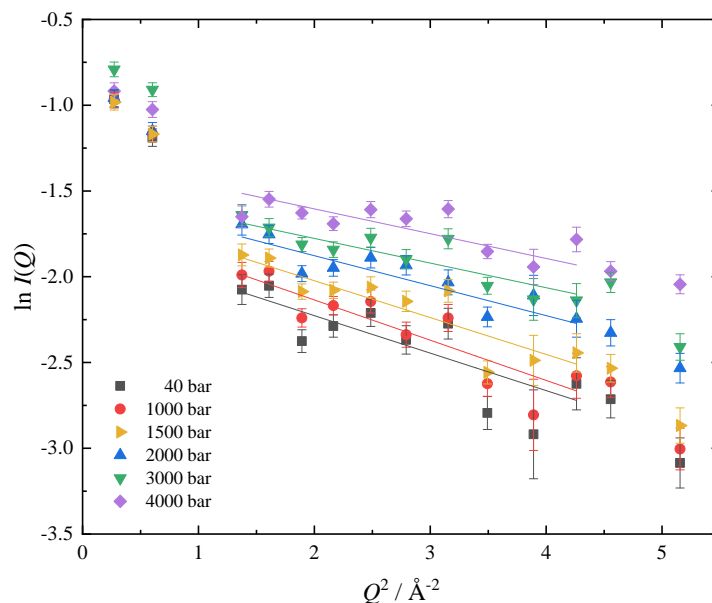
Dies würde den Ergebnissen früherer SAXS-Hochdruckstudien an einem ähnlichen System entsprechen, die das Ermitteln des druckabhängigen intermolekularen Interaktionspotential ermöglichen.<sup>[238,239,337–340,373]</sup> So zeigt bei einer hochkonzentrierten Lysozym-Lösung der anziehende Teil des Wechselwirkungspotentials  $J$  ein deutliches Minimum bei etwa 1.5 kbar, welches mit zunehmender Proteinkonzentration flacher wird.<sup>[340]</sup> Andererseits erhöht die Anwesenheit von TMAO die Druckabhängigkeit des Wechselwirkungspotentials  $J$ , sodass die druckabhängige Abnahme des Wechselwirkungspotentials viel schneller vonstatten geht und dessen Minimum auf etwa 2.5 kbar verschoben wird.<sup>[238,239]</sup> Die Anwesenheit von Harnstoff bewirkt zwar eine Abnahme des Wechselwirkungspotentials, nimmt allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Lage des Minimums oder dessen Druckabhängigkeit.<sup>[238,239]</sup>

Da üblicherweise die abstoßenden Wechselwirkungen mit steigendem Druck zunehmen, wird erwartet, dass die MSD-Werte leicht abnehmen. Während das Wechselwirkungspotential eine signifikante Druckabhängigkeit aufweist,<sup>[340]</sup> ist bei der Betrachtung der ermittelten MSD-Werte entweder nur eine marginale oder sogar vernachlässigbare Druckabhängigkeit der MSD-Werte zu beobachten. Aus diesem Grund kann keine direkte Korrelation zwischen der Druckabhängigkeit des Wechselwirkungspotentials  $J$  und der MSD-Werte im betrachteten Subnanosekundenbereich vorliegen. Da die interne Proteindynamik hauptsächlich von der Dynamik der Hydratationshülle und nicht von dem umliegenden *Bulk*-Wasser beeinflusst wird,<sup>[371,372]</sup> kann ein unterschiedliches druckabhängiges Verhalten des Wechselwirkungspotentials und der MSD erwartet werden, wobei das Wechselwirkungspotential scheinbar empfindlicher auf das Vorhandensein von Cosolventien reagiert.

Neben den bisher gezeigten druckabhängigen Untersuchungen der Proteindynamik von Lysozym in Anwesenheit der beiden Osmolyte TMAO und Harnstoff erfolgten weitere druckabhängige EINS-Messungen von Lysozym in Anwesenheit von Glycin und der beiden Disaccharide Sucrose und Trehalose.<sup>‡</sup> Abbildung 5.5 zeigt

---

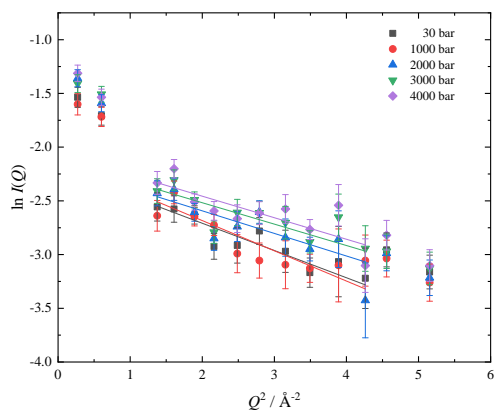
<sup>‡</sup>Die in dieser Arbeit gezeigten elastischen inkohärenten Neutronenstreuungen (EINS) Messungen von Lysozym unter Druck wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi durchgeführt. Hierbei erfolgte die Auswertung der EINS-Messungen von Lysozym in Anwesenheit von Trehalose, Sucrose und Glycin durch den Autor, während die Auswertung der EINS-Messungen an Lysozym in Anwesenheit von TMAO, Harnstoff und Mischungen der beiden Cosolventien durch Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi erfolgten.



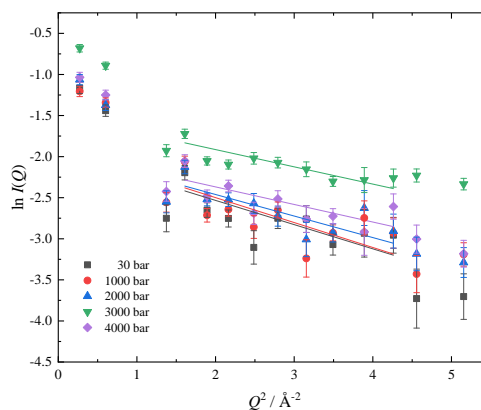
**Abbildung 5.5** – Semilogarithmische EINS-Intensitäten von  $114 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym als Funktion von  $Q^2$  bei verschiedenen Drücken. Eingezeichnete Linien repräsentieren die beste Kurvenanpassung der GAUSS-Näherung (Gleichung 5.2) an die experimentellen Daten, deren Steigung zur Berechnung des MSD benötigt wird.

die experimentellen Daten der durchgeführten EINS-Messungen von  $114 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym (entspricht einer Massenkonzentration von 10 Gew.-%) als semilogarithmische Auftragung bei verschiedenen Drücken und Raumtemperatur, die zur Bestimmung der MSD-Werte mithilfe der GAUSS-Näherung (Gleichung 5.2) verwendet wurden. In Abbildung 5.6 sind die experimentellen Daten der druckabhängigen EINS-Messungen als semilogarithmische Auftragung von  $114 \text{ mg mL}^{-1}$  in Anwesenheit von 5 bis 30 Gew.-% Trehalose (Abbildung 5.6a bis 5.6f) in einem Druckbereich von 30 bis 4000 bar bei Raumtemperatur dargestellt.

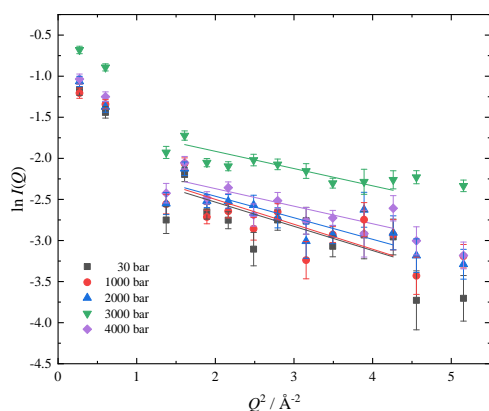
Neben der Anwesenheit des Disaccharids Trehalose erfolgten weitere druckabhängige EINS-Messungen an Lysozym in Anwesenheit von sowohl Sucrose als auch Glycin, deren experimentellen Daten als semilogarithmische Auftragung in Abbildung 5.7 als Funktion von  $Q^2$  aufgetragen sind. Bei den druckabhängigen EINS-Messungen wurden Lysozymproben sowohl in Anwesenheit von 1 und 2 M Glycin (Abbildung 5.7a und 5.7b) als auch in Anwesenheit von 20 Gew.-% Sucrose (Abbildung 5.7c) in einem Druckbereich von 30 bis 4000 bar vermessen.



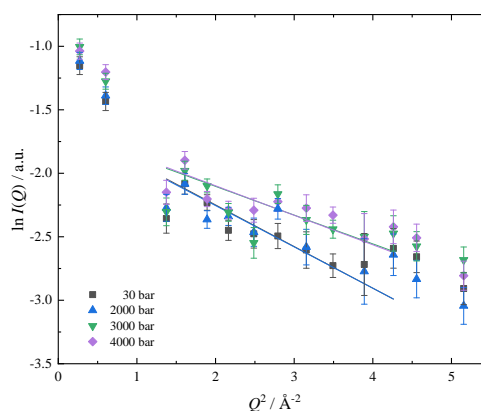
a) Lysozym + 5 Gew.-% Trehalose



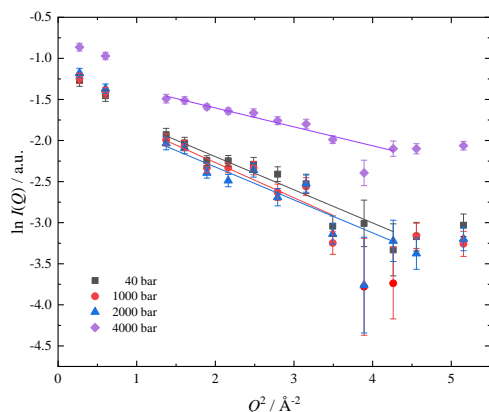
b) Lysozym + 10 Gew.-% Trehalose



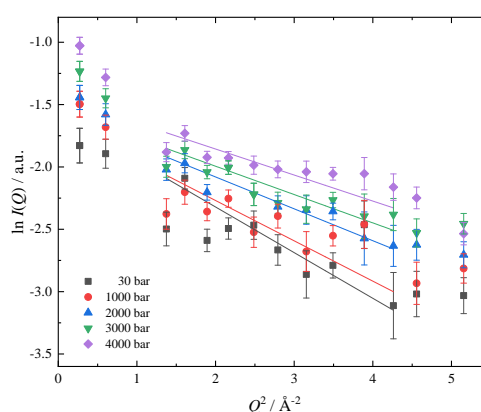
c) Lysozym + 15 Gew.-% Trehalose



d) Lysozym + 17.5 Gew.-% Trehalose

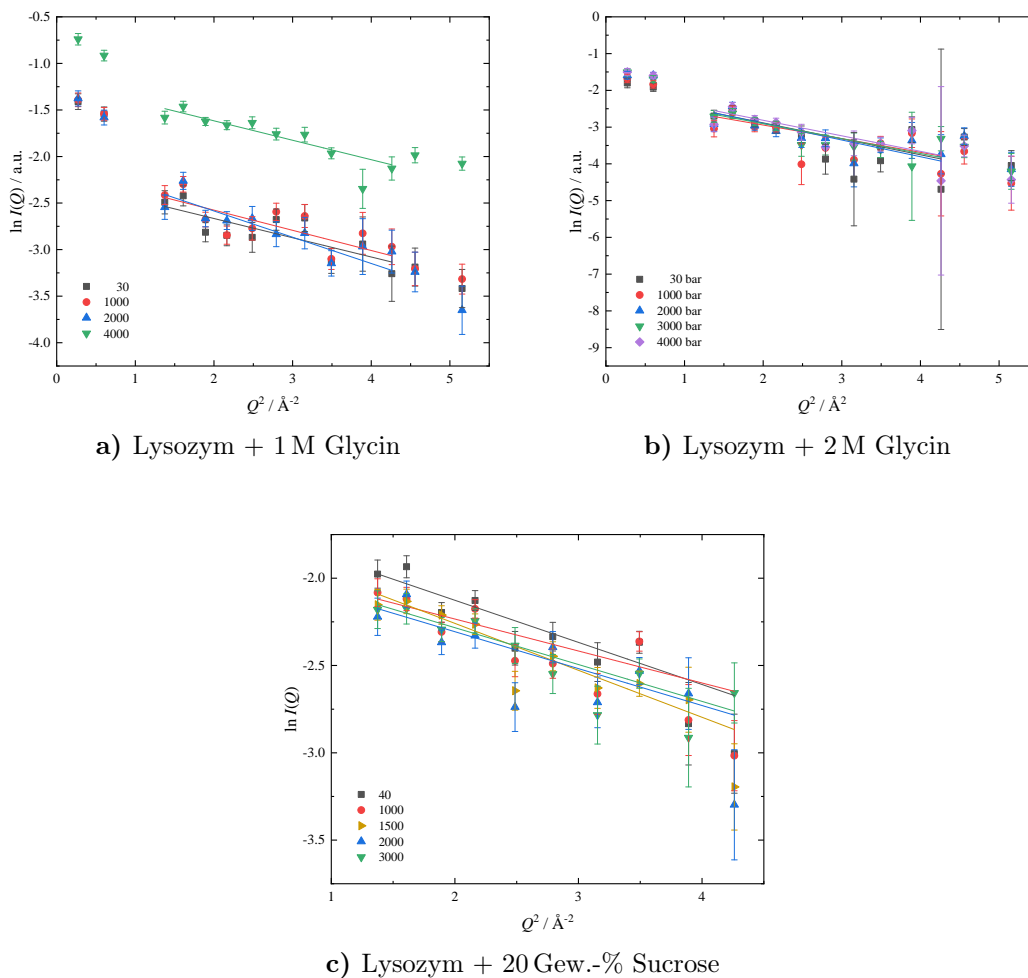


e) Lysozym + 20 Gew.-% Trehalose



f) Lysozym + 30 Gew.-% Trehalose

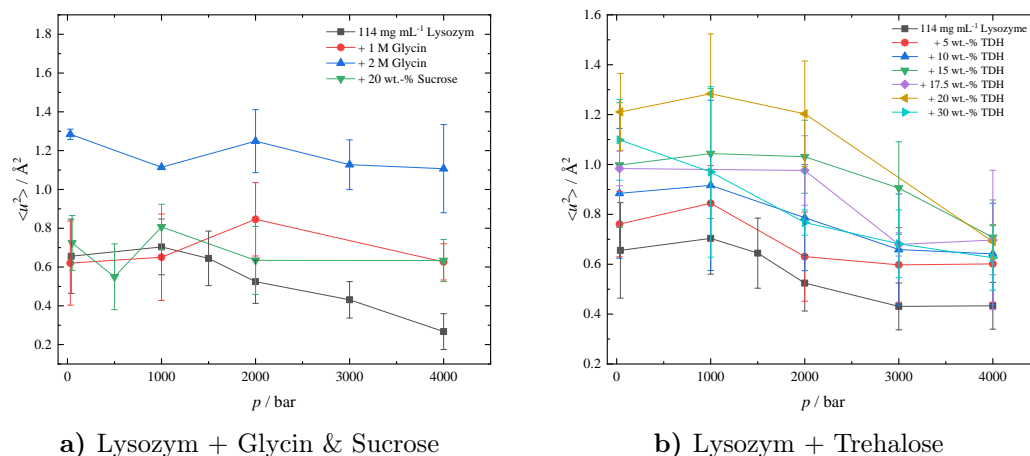
**Abbildung 5.6** – Semilogarithmische EINS-Intensitäten von  $114 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in Anwesenheit von a) 5 Gew.-% Trehalose, b) 10 Gew.-% Trehalose, c) 15 Gew.-% Trehalose, d) 17.5 Gew.-% Trehalose, e) 20 Gew.-% Trehalose und f) 30 Gew.-% Trehalose als Funktion von  $Q^2$  bei verschiedenen Drücken. Eingezeichnete Linien repräsentieren die beste Kurvenanpassung der GAUSS-Näherung (Gleichung 5.2) an die experimentellen Daten, deren Steigung zur Berechnung des MSD benötigt wird.



**Abbildung 5.7** – Semilogarithmische EINS-Intensitäten von  $114 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in Anwesenheit von a) 1 M Glycin, b) 2 M Glycin und c) 20 Gew.-% Sucrose als Funktion von  $Q^2$  bei verschiedenen Drücken. Eingezeichnete Linien repräsentieren die beste Kurvenanpassung der GAUSS-Näherung (Gleichung 5.2) an die experimentellen Daten, deren Steigung zur Berechnung des MSD benötigt wird.

Da die gemessenen Intensitäten bei einem  $Q^2$ -Wert von kleiner 1 der Wasserdynamik zugeordnet werden können,<sup>[368]</sup> wurden diese Datenpunkte nicht zur Bestimmung der MSD-Werte verwendet und sind daher nur der Vollständigkeit halber mit eingezeichnet.

Mithilfe der GAUSS-Näherung aus Gleichung (5.2) erfolgte eine Kurvenanpassung an die experimentellen Daten, um anschließend jeweils aus der ermittelten Steigung den MSD-Wert bei dem entsprechenden Druck zu bestimmen. Die auf diese Weise bestimmten MSD-Werte von Lysozym in Anwesenheit von Glycin und den



**Abbildung 5.8** – Mittlere quadratische Verschiebung (MSD) von  $114 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in An- und Abwesenheit von a) 1 und 2 M Glycin und 20 Gew.-% Sucrose und b) 5 bis 30 Gew.-% Trehalose (TDH) als Funktion des Drucks.

beiden Disacchariden Sucrose und Trehalose sind in Abbildung 5.8 als Funktion des Drucks abgebildet. Hierbei stellt Abbildung 5.8a die ermittelten druckabhängigen MSD-Werte von  $114 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in An- und Abwesenheit von 1 und 2 M Glycin bzw. 20 Gew.-% Sucrose dar, während in Abbildung 5.8b die ermittelten MSD-Werte von Lysozym in Anwesenheit von 5 bis 30 Gew.-% Trehalose abgebildet sind. Anhand von Abbildung 5.8a wird ersichtlich, dass durch die Anwesenheit von 2 M Glycin die MSD-Werte drastisch erhöht werden, während die Anwesenheit von 20 Gew.-% Sucrose keinen signifikanten Einfluss auf die MSD-Werte nimmt. Bei der Betrachtung der MSD-Werte von Lysozym in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen Trehalose (Abbildung 5.8b) wird deutlich, dass mit steigender Trehalose-Konzentration die MSD-Werte zu Beginn der jeweiligen Messreihen steigen, sodass hier von einer konzentrationsabhängigen Steigerung der MSD-Werte gesprochen werden kann. Dies bedeutet, dass mit steigender Trehalose-Konzentration die Proteindynamik zunimmt.

Wie bereits erwähnt, wird die Proteindynamik in dem an IN13 möglichen Zeitfenster größtenteils durch die Dynamik des umliegenden Lösungsmittels beeinflusst. Für die Interaktion von Trehalose mit einem Protein gibt es mehrere mögliche Theorien. Zum einen die Wasseraustausch-Theorie und zum anderen eine Theorie über das Einbauen von Wassermolekülen in eine Zwischenschicht zwischen den Zuckermolekülen

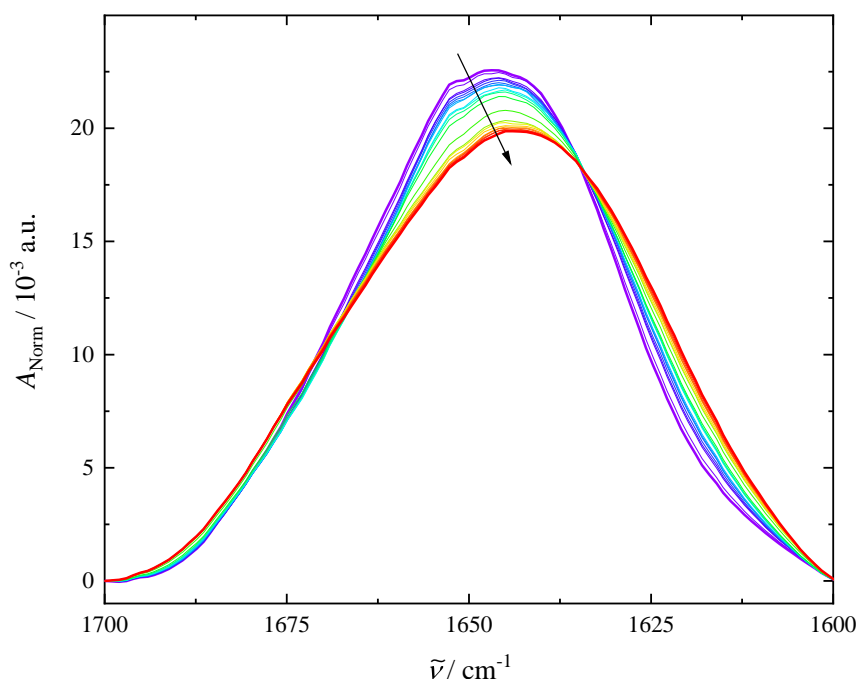
und der Oberfläche des Proteins. In FTIR-spektroskopischen Experimenten wurde beobachtet,<sup>[374]</sup> dass eine Vielzahl direkter Wasserstoffbrücken zwischen Trehalose-Molekülen und der Lysozym-Oberfläche ausgebildet werden, was für einen Austausch von Wassermolekülen der Hydratationshülle des Proteins durch Trehalose-Moleküle sprechen lässt.<sup>[162]</sup> Auf der anderen Seite gibt es zahlreiche experimentelle und theoretische Studien,<sup>[194,375–381]</sup> in denen beobachtet wurde, dass die vorliegenden Wechselwirkungen zwischen dem Protein und den Zuckermolekülen besser durch die Theorie des Einbaus der Wassermoleküle in eine Zwischenschicht zwischen den Zuckermolekülen und der Proteinoberfläche beschrieben werden kann.<sup>[162]</sup> Ein solcher Austausch von Wassermolekülen der Hydratationshülle durch Trehalose-Moleküle, welcher bei dem Disaccharid Sucrose nicht beobachtet wurde, beeinflusst scheinbar die Proteindynamik im Subnanosekundenbereich.

Des Weiteren wurde in einer experimentellen Studie herausgefunden, dass das Disaccharid Sucrose, ebenfalls wie Harnstoff, mit dem Proteinerückgrat bzw. mit den Seitenketten der Aminosäuren des Proteins interagiert,<sup>[122]</sup> sodass auch hier, wie bei der Anwesenheit von Harnstoff ebenfalls erkennbar, kein signifikanter Einfluss auf die Proteindynamik genommen wird.

### 5.3.2 Einfluss von Cosolventien auf die Proteinstabilität unter Druck

Neben der Durchführung von EINS-Messungen zur Untersuchung der Proteindynamik von hochkonzentrierten Lysozym-Lösungen unter Druck in An- und Abwesenheit von Cosolventien wurde ebenfalls die Proteinstabilität von Lysozym unter *self-crowding*-Bedingungen in An- und Abwesenheit der Cosolventien TMAO und Harnstoff mithilfe von FTIR-spektroskopischen Messungen untersucht.

Wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben, wurden die aufgenommenen FTIR-Spektren durch Subtraktion des Pufferspektrums vom Probenspektrum hintergrundkorrigiert, geglättet und im Bereich der Amid-I'-Bande flächennormiert. Die auf diese Weise prozessierten FTIR-Spektren von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in reiner Pufferlösung sind in Abbildung 5.9 in einem Druckbereich von 1 bar bis 12 kbar und einer Temperatur von

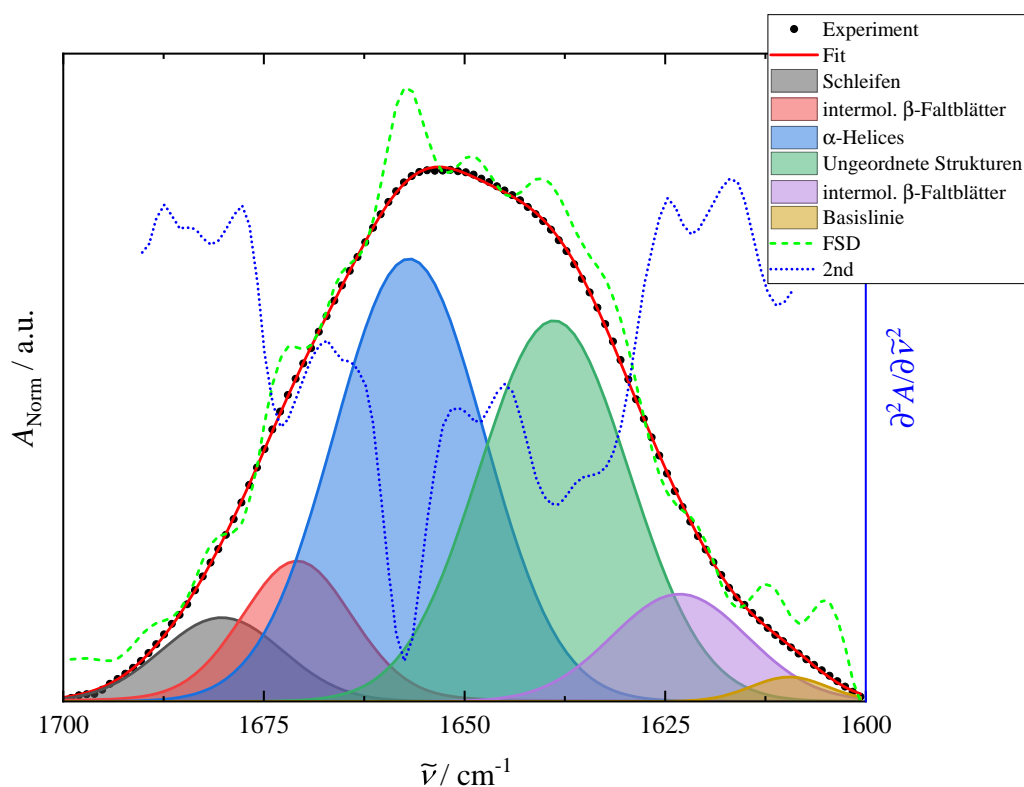


**Abbildung 5.9** – Druckabhängigkeit der flächennormierten Amid-I'-Bande von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in reiner Pufferlösung bei Atmosphärendruck und einer Temperatur von  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten und damit dem Übergang von dem nativen in den entfalteten Zustand. Die Verantwortlichkeit der hier gezeigten Daten obliegt Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi.

$25 \text{ }^\circ\text{C}$  abgebildet. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Intensität im Bereich der  $\alpha$ -Helices, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$  eine Absorptionsbande besitzen, mit steigendem Druck abnimmt.

Zur Bestimmung der Sekundärstruktur erfolgte nach der Prozessierung der Amid-I'-Bande eine Subbandenanalyse. Dazu erfolgte die Bildung der zweiten Ableitung sowie die Anwendung einer FOURIER-Selbstentfaltungs-Funktion (FSD) zur Erzeugung eines FSD-Spektrums, um anhand der beiden prozessierten Spektren die Lage und Anzahl der unter der Amid-I'-Bande sich befindenden Subbanden zu bestimmen. In Abbildung 5.10 sind sowohl die experimentell bestimmte Amid-I'-Bande als auch die daraus gebildeten Spektren der FOURIER-Selbstentfaltung und der zweiten Ableitung von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in reiner Pufferlösung bei Atmosphärendruck und einer Temperatur von  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  zum besseren Vergleich gemeinsam abgebildet. Hierbei ist deutlich das gegenläufige Verhalten des FSD-Spektrums und des Spektrums der zweiten Ableitung zu erkennen. Befindet sich im FSD-Spektrum an einer Stelle

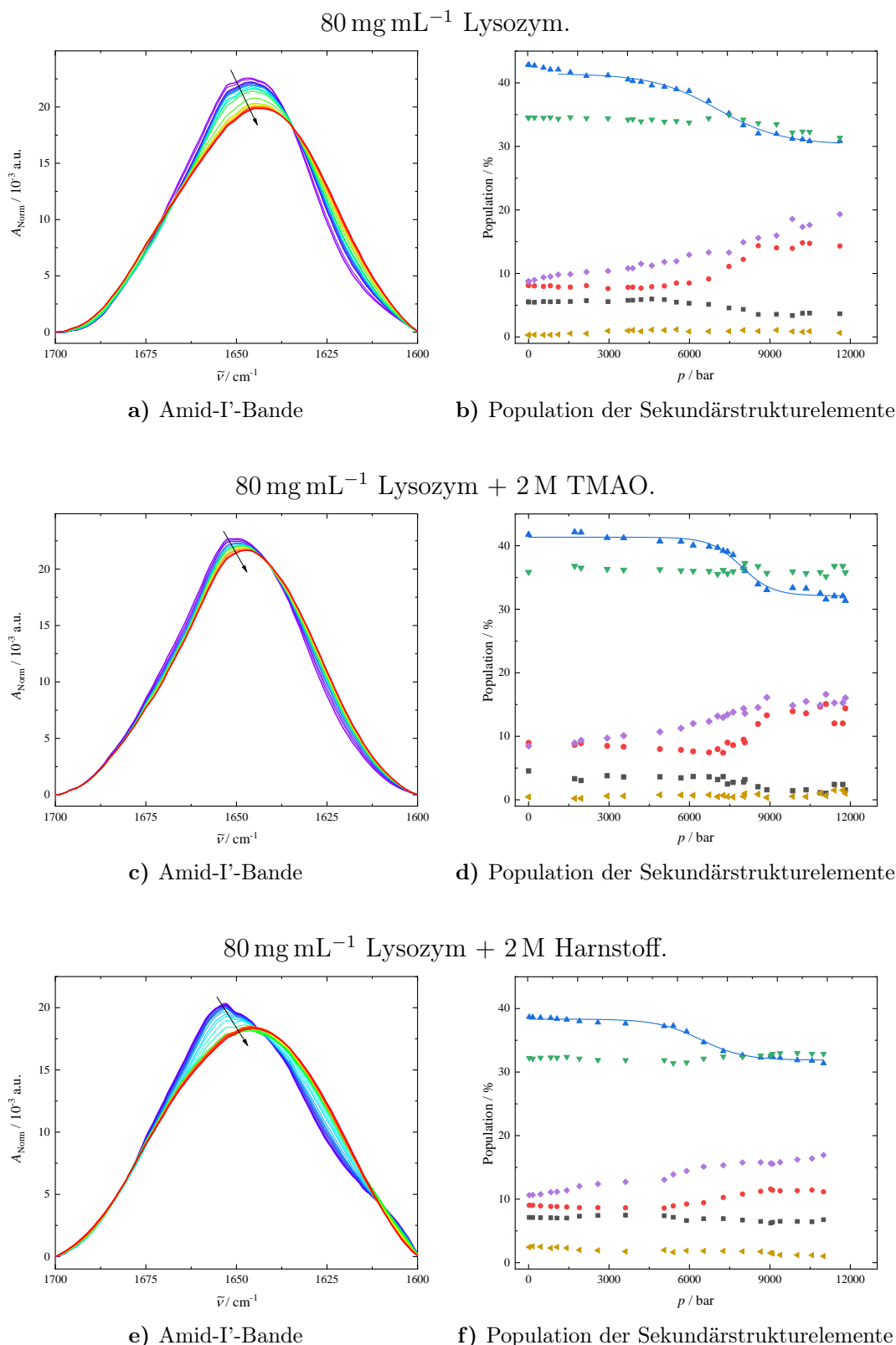




**Abbildung 5.10** – Experimentell bestimmte Amid-I'-Bande von Lysozym (●) bei Atmosphärendruck und 25 °C sowie die durch Subbanden gebildete Funktionsanpassung (—). Die Bestimmung der Subbanden erfolgte durch Bildung des FSD-Spektrums (---) und der 2. Ableitung (···). Die Verantwortlichkeit der hier gezeigten Daten obliegt Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi.

ein Maximum und gleichzeitig im Spektrum der zweiten Ableitung ein Minimum an der gleichen Position, so kann an dieser Position eine Subbande unter der Amid-I'-Bande nachgewiesen werden, die sonst spektral nicht aufgelöst werden kann. Aus der Subbandenanalyse resultieren sechs Subbanden, die im Superpositionsprinzip an die experimentell bestimmte Amid-I'-Bande angepasst wurden und ebenfalls in Abbildung 5.10 dargestellt sind. Die Zuordnung von Sekundärstrukturelementen zu den bestimmten Subbanden erfolgte gemäß Tabelle 5.1.

In Abbildung 5.11 sind die druckabhängigen Amid-I'-Banden von 80 mg mL<sup>-1</sup> Lysozym (linke Spalte) den jeweils aus der Subbandenanalyse resultierenden Anteilen der Sekundärstrukturelemente (rechte Spalte) gegenübergestellt. Neben der Untersuchung von 80 mg mL<sup>-1</sup> Lysozym in reiner Pufferlösung (Abbildung 5.11a und 5.11b)



**Abbildung 5.11** – Druckabhängige FTIR-Daten von 80 mg mL<sup>-1</sup> (a,b) sowie in Anwesenheit von 2 M TMAO (c,d) und 2 M Harnstoff (e,f) in einem Druckbereich von 1 bar (–) bis 12 kbar (–). Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (5.5). ■ Schleifen (1682 cm<sup>-1</sup>), ● β-Faltblätter (1673 cm<sup>-1</sup>), ▲ α-Helices (1655 cm<sup>-1</sup>), ▼ ungeordnete Strukturen (1640 cm<sup>-1</sup>), ◆ β-Faltblätter (1621 cm<sup>-1</sup>), ◀ Basislinie (1611 cm<sup>-1</sup>). Die Verantwortlichkeit obliegt Dr. Samy Ras-had Al-Ayoubi.

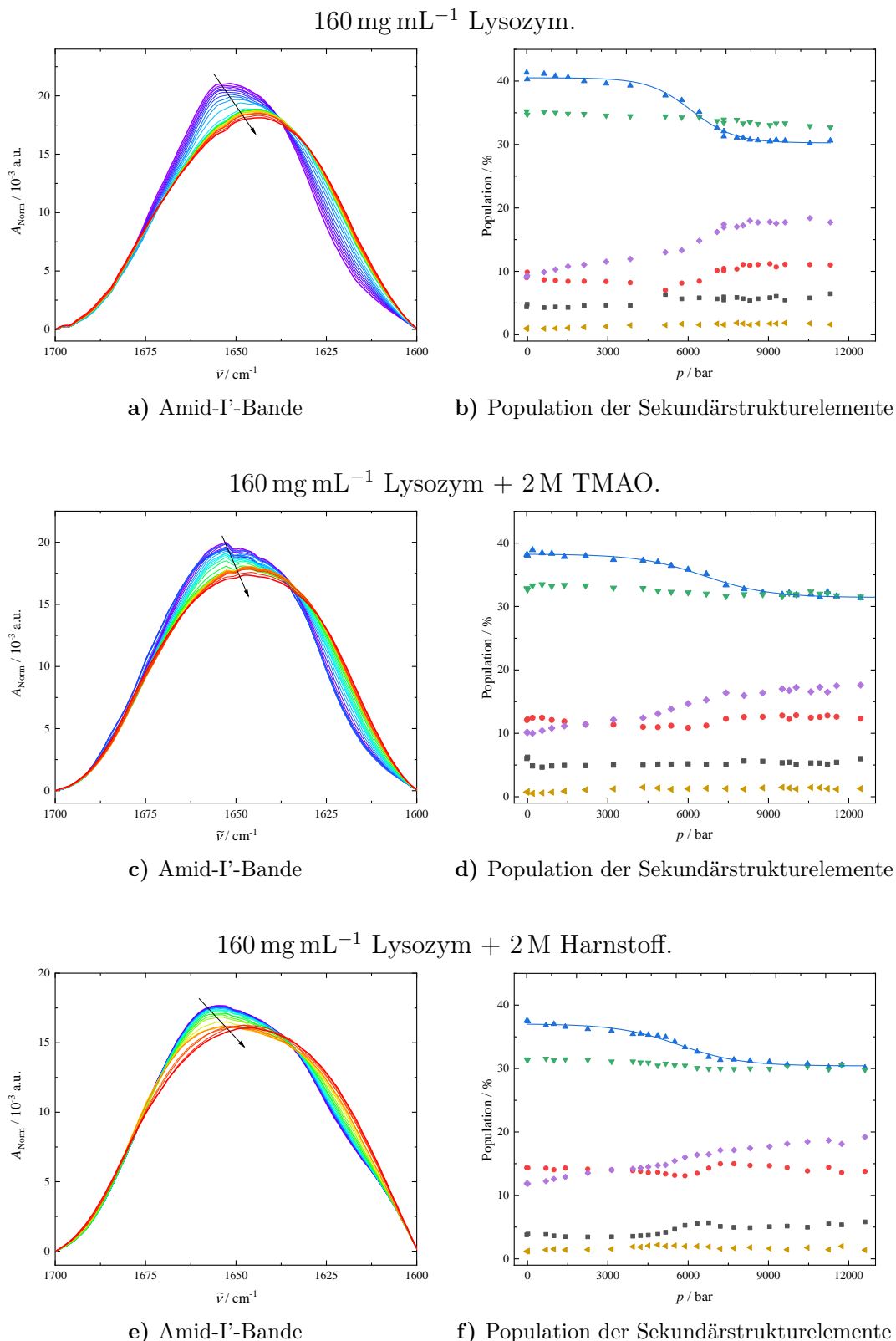
erfolgte die Untersuchung in Anwesenheit von 2 M TMAO (Abbildung 5.11c und 5.11d) und 2 M Harnstoff (Abbildung 5.11e und 5.11f) jeweils in einem Druckbereich von 1 bar bis 12 kbar und einer Temperatur von 25 °C. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) der Amid-I'-Banden entspricht dem Druckgradienten und damit dem Übergang von dem nativen in den entfalteten Zustand.

Bei der Betrachtung der Amid-I'-Bande (Teile a,c,e der Abbildung 5.11) lässt sich deutlich erkennen, dass durch Anlegen eines Drucks von bis zu 12 kbar eine Rotverschiebung der Amid-I'-Bande von  $1654\text{ cm}^{-1}$  nach  $1644\text{ cm}^{-1}$  induziert wird.

Die Anwesenheit von 2 M Harnstoff (Abbildung 5.11e) führt zu einer Verringerung der Intensität der Amid-I'-Bande sowie zu einer leichten Verbreiterung dieser, was evtl. auf eine Überlagerung der  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Streckschwingung des Harnstoffs oder geringfügige strukturelle Änderungen zurückzuführen ist.

Im Anschluss an die Subbandenanalyse und die Bandenanpassung, kann der prozentuale Anteil der einzelnen Sekundärstrukturelemente von  $80\text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in An- und Abwesenheit von Cosolventien druckabhängig bestimmt werden (Teile b,d,f der Abbildung 5.11). Hierbei wird deutlich, dass in dem verwendeten Druckbereich der EINS-Messungen (max. 4 kbar), selbst in Anwesenheit von 2 M Harnstoff, kein Entfaltungsprozess stattgefunden hat und somit die Proteindynamik des gefalteten Proteins in Kapitel 5.3.1 untersucht wurde. Ab einem Druck von etwa 5.5 kbar beginnt der druckinduzierte Entfaltungsprozess des Proteins, der von einer Abnahme des helikalen Anteils ( $\sim -10\%$ ) begleitet wird. Der geringfügige Anstieg an  $\beta$ -Faltblättern, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1621\text{ cm}^{-1}$  absorbieren, kann evtl. auch auf etwaige intrinsische Druckeffekte auf die Amid-I'-Bande zurückgeführt werden.<sup>[36,382]</sup>

Neben einer Konzentration von  $80\text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym wurde ebenfalls eine Proteinkonzentration von  $160\text{ mg mL}^{-1}$  in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff FTIR-spektroskopisch unter Druckapplikation untersucht, deren Ergebnisse in Abbildung 5.12 als Gegenüberstellung der prozessierten Amid-I'-Bande und der erhaltenen Sekundärstrukturanteile nach Durchführung einer Subbandenanalyse dargestellt sind. Neben der Untersuchung von  $160\text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in reiner Puffer-



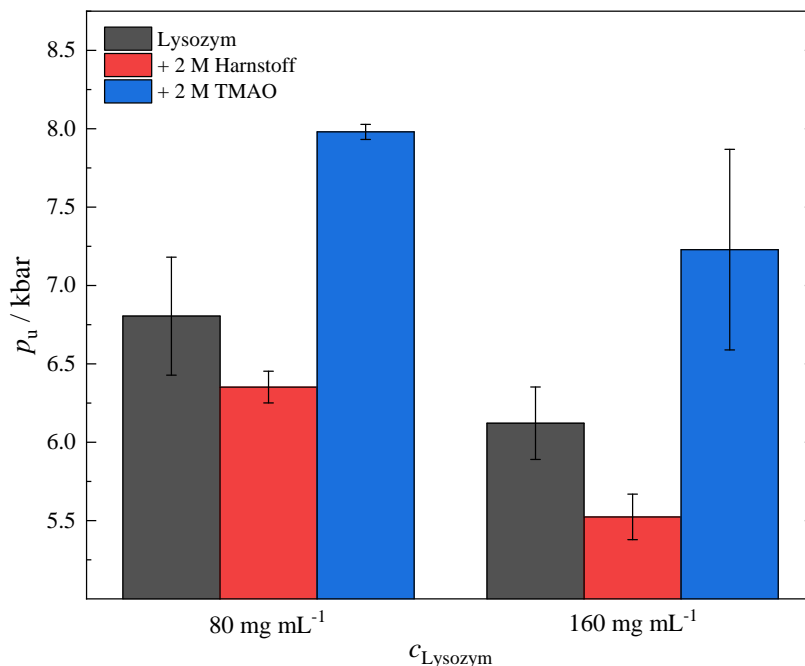
**Abbildung 5.12** – Druckabhängige FTIR-Daten von 160 mg mL<sup>-1</sup> (a,b) sowie in Anwesenheit von 2 M TMAO (c,d) und 2 M Harnstoff (e,f) in einem Druckbereich von 1 bar (–) bis 12 kbar (–). Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (5.5). ■ Schleifen (1682 cm<sup>-1</sup>), ● β-Faltblätter (1673 cm<sup>-1</sup>), ▲ α-Helices (1655 cm<sup>-1</sup>), ▼ ungeordnete Strukturen (1640 cm<sup>-1</sup>), ◆ β-Faltblätter (1621 cm<sup>-1</sup>), ◀ Basislinie (1611 cm<sup>-1</sup>). Die Verantwortlichkeit obliegt Dr. Samy Ras-had Al-Ayoubi.

lösung (Abbildung 5.12a und 5.12b) erfolgte die Untersuchung in Anwesenheit von 2 M TMAO (Abbildung 5.12c und 5.12d) und 2 M Harnstoff (Abbildung 5.12e und 5.12f) jeweils in einem Druckbereich von 1 bar bis 12 kbar und einer Temperatur von 25 °C. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) der Amid-I'-Banden entspricht dem Druckgradienten und damit dem Übergang von dem gefalteten in den entfalteten Zustand.

Auch hier lässt sich wiederum eine induzierte Rotverschiebung der Amid-I'-Bande während der Druckapplikation um etwa  $10 \text{ cm}^{-1}$  erkennen (Teile a,c,e der Abbildung 5.12). Generell ist die Intensität der Amid-I'-Bande im Vergleich zur  $80 \text{ mg mL}^{-1}$ -Probe etwas geringer und verringert sich in Anwesenheit von 2 M Harnstoff weiter (Abbildung 5.12e).

Nach der Subbandenanalyse und der dazugehörigen Bandenanpassung wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Sekundärstrukturelemente ermittelt und in den Grafiken b,d und f der Abbildung 5.12 als Funktion des Drucks dargestellt. Es lässt sich deutlich erkennen, dass sowohl in Abwesenheit von Cosolventien als auch in Anwesenheit von 2 M Harnstoff bis zu einem Druck von 4 kbar, dies entspricht dem Maximaldruck der getätigten EINS-Messungen, kein Entfaltungsprozess stattgefunden hat und somit auch bei der hochkonzentrierten Proteinprobe die Proteindynamik im gefalteten Zustand untersucht wurde (vgl. Kapitel 5.3.1). Ab einem Druck von etwa 4.5 kbar beginnt der druckinduzierte Entfaltungsprozess des Proteins, der von einer Abnahme des helikalen Anteils ( $\sim -10\%$ ) begleitet wird. Auch hier kann der geringfügige Anstieg an  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 10\%$ ), deren Absorptionsbande bei  $\sim 1621 \text{ cm}^{-1}$  liegt, evtl. auf etwaige intrinsische Druckeffekte, die auf die Amid-I'-Bande wirken, zurückgeführt werden.<sup>[36,382]</sup>

Mithilfe der abgewandelten Boltzmann-Funktion (Gleichung 5.5) kann der Entfaltungsdruck  $p_u$ , an welchem 50 % des vorhandenen Lysozyms im nativen und 50 % im entfalteten Zustand vorliegen, durch Kurvenanpassung an den Anteil helikaler Strukturen, zu  $6804 \pm 367 \text{ bar}$  bei einer Proteinkonzentration von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  und zu  $6121 \pm 231 \text{ bar}$  bei einer Proteinkonzentration von  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  bestimmt werden. In Anwesenheit von 2 M TMAO vergrößert sich der Entfaltungsdruck um



**Abbildung 5.13** – Grafische Darstellung der FTIR-spektroskopisch bestimmten Entfaltungsdrücke  $p_u$  von 80 mg mL<sup>-1</sup> und 160 mg mL<sup>-1</sup> Lysozym in reiner Pufferlösung (■) sowie in Anwesenheit von 2 M Harnstoff (■) und 2 M TMAO (■) bei einer Temperatur von 25 °C. Die Verantwortlichkeit obliegt Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi.

~1750 bar, während dieser in Anwesenheit von 2 M Harnstoff um ~500 bar sinkt (Abbildung 5.13). Diese Ergebnisse stimmen gut mit vorherigen Studien überein, wonach TMAO einen stabilisierenden Effekt auf die Proteinstabilität besitzt, wohingegen Harnstoff destabilisierend auf die Proteinstruktur wirkt.<sup>[105,197]</sup> Beim Vergleich der Entfaltungsdrücke der beiden verwendeten Proteinkonzentrationen fällt auf, dass generell der Entfaltungsdruck  $p_u$  bei den höher konzentrierten Proben verringert ist, was für eine Destabilisierung des Proteins unter *self-crowding*-Bedingungen spricht.

Des Weiteren kann durch die Kurvenanpassung der abgewandelten Boltzmann-Funktion (Gleichung 5.5) an die experimentellen Daten die Volumenänderung während des Entfaltungsprozesses bestimmt werden. So ergibt sich beispielsweise für die 160 mg mL<sup>-1</sup> Probe in reiner Pufferlösung eine Volumenänderung von  $\Delta V_u^\circ = -31 \pm 10 \text{ mL mol}^{-1}$ , die gut mit gefundenen Literaturwerten übereinstimmt. Sahara *et al.* ermittelten beispielsweise eine Volumenänderung von  $-55 \text{ mL mol}^{-1}$ ,<sup>[229]</sup> wohingegen Li *et al.* einen Wert von  $-26 \text{ mL mol}^{-1}$  erhielten.<sup>[383]</sup> Aus der ermittelten

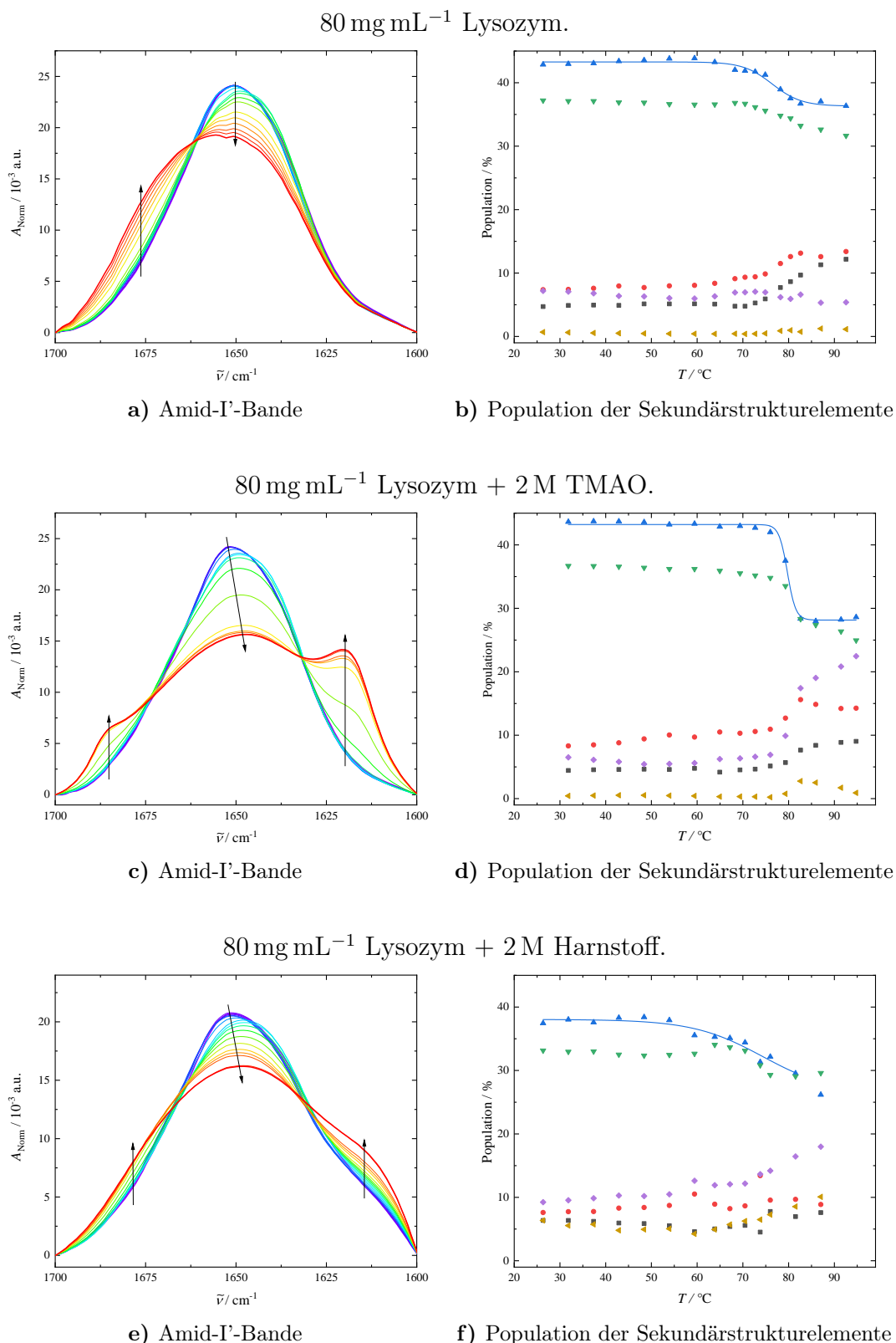
Volumenänderung während der Entfaltung folgt, dass während des druckinduzierten Entfaltungsprozess interne Kavitäten aufgefüllt werden, wodurch sich das Volumen verringert. Dieser Wert liegt im experimentellen Fehlerraum aller durchgeführten Experimente, woraus folgt, dass weder Cosolventien noch die Proteinkonzentration einen signifikanten Einfluss auf die Volumenänderung während des Entfaltungsprozesses nehmen.

Unter Verwendung eines partiellen spezifischen Volumens von  $0.734 \text{ mL g}^{-1}$  und eines Molekulargewichts von  $14.3 \text{ kDa}$  für Lysozym, [229,384] entspricht die zuvor bestimmte Volumenänderung während des partiellen Entfaltungsprozesses  $\sim 0.3 \%$ , was lediglich dem Volumen von  $\sim 2$  Wasser-Molekülen entspricht.

### 5.3.3 Einfluss von Cosolventien auf die thermische Proteinstabilität

Neben der Untersuchung des Einflusses von Cosolventien auf die druckabhängige Entfaltung von Lysozym unter *self-crowding*-Bedingungen erfolgten auch temperaturabhängige FTIR-spektroskopische Messungen zur Untersuchung des Einflusses von Cosolventien auf die thermische Proteinstabilität. Die linke Spalte der Abbildung 5.14 zeigt die Amid-I'-Banden von  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in reiner Pufferlösung (Abbildung 5.14a) sowie in Anwesenheit von  $2 \text{ M TMAO}$  (Abbildung 5.14c) und  $2 \text{ M Harnstoff}$  (Abbildung 5.14e) in einem Temperaturbereich von  $25$  bis  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Bei der Betrachtung der Amid-I'-Banden während des thermischen Entfaltungsprozesses (Teilgrafik a,c,e der Abbildung 5.14) ist eine deutliche Abnahme der Bandenintensität zu erkennen, besonders im Bereich der  $\alpha$ -helikalen Strukturen, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren. Des Weiteren lässt sich erkennen, dass in Anwesenheit sowohl von  $2 \text{ M TMAO}$  (Abbildung 5.14c) als auch von  $2 \text{ M Harnstoff}$  (Abbildung 5.14e), jedoch nicht in Abwesenheit dieser Osmolyte (Abbildung 5.14a), eine thermisch irreversible Entfaltung stattfindet, die durch die Ausbildung intermolekularer  $\beta$ -Faltblätter gekennzeichnet ist, welche charakteristisch bei Wellenzahlen von  $1620$  und  $1680 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren und deren Intensitäten mit steigender Temperatur zunehmen. [385,386] Dieser Effekt ist in Anwesenheit von  $2 \text{ M TMAO}$  stärker



**Abbildung 5.14** – Temperaturabhängige FTIR-Daten von 80 mg mL<sup>-1</sup> (a,b) sowie in Anwesenheit von 2 M TMAO (c,d) und 2 M Harnstoff (e,f) in einem Temperaturbereich von 25 °C (–) bis 95 °C (–). Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (5.6). ■ Schleifen (1682 cm<sup>-1</sup>), ● β-Faltblätter (1673 cm<sup>-1</sup>), ▲ α-Helices (1655 cm<sup>-1</sup>), ▼ ungeordnete Strukturen (1640 cm<sup>-1</sup>), ◆ β-Faltblätter (1621 cm<sup>-1</sup>), ▼ Basislinie (1611 cm<sup>-1</sup>). Die Verantwortlichkeit obliegt Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi.

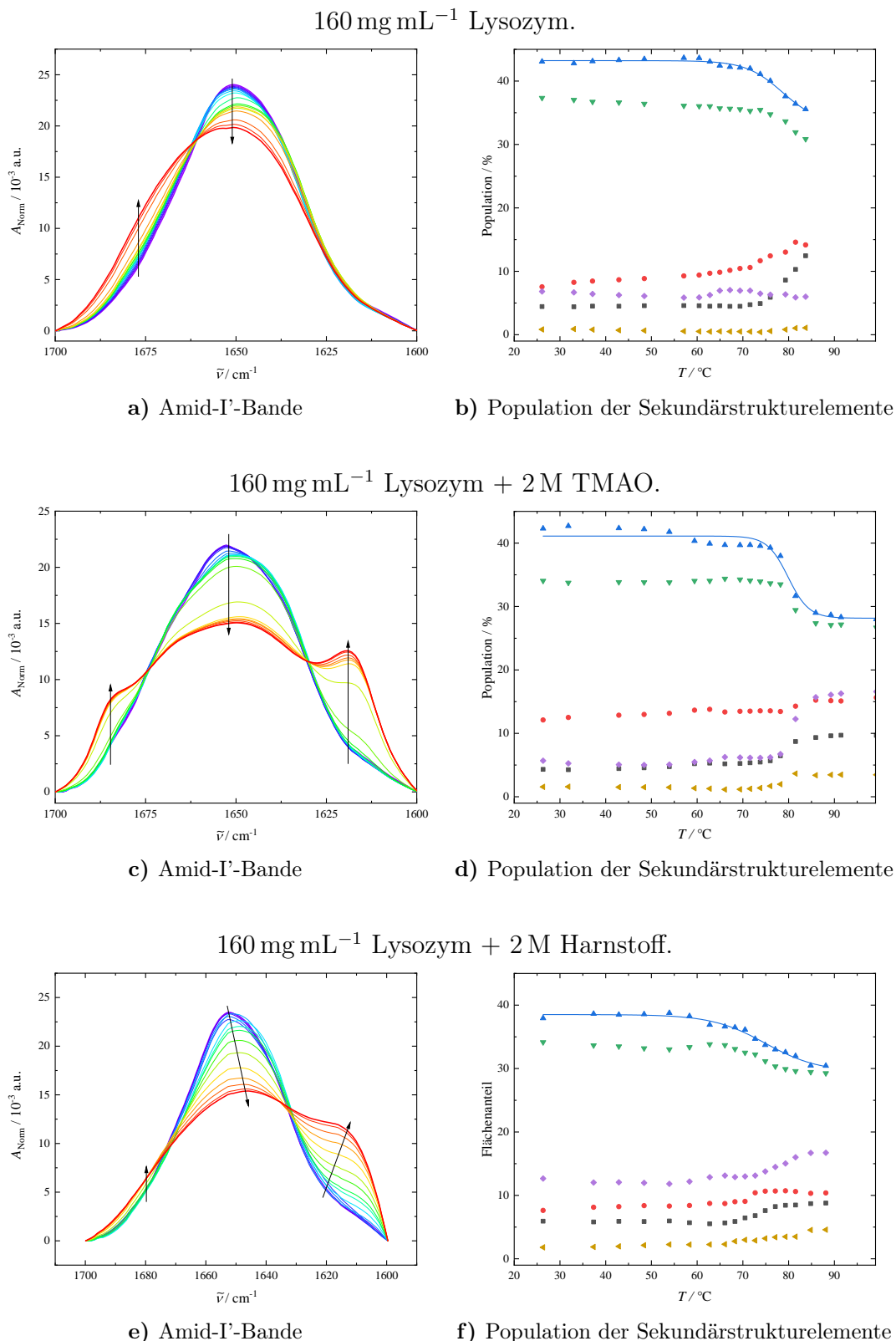


ausgeprägt als in Anwesenheit von 2 M Harnstoff. Dies bedeutet, dass TMAO auf der einen Seite das Protein gegenüber einer Denaturierung stabilisiert, aber auf der anderen Seite auch eine thermische Aggregation fördert.<sup>[387]</sup>

Im Anschluss an die Subbandenanalyse und die dazugehörige Bandenanpassung kann der prozentuale Anteil der einzelnen Sekundärstrukturelemente ermittelt und grafisch dargestellt werden, wie es in den Graphen b,d und f der Abbildung 5.14 erfolgt ist. Im Temperaturbereich von 25 bis 60 °C sind keine signifikanten Veränderungen der Anteile an Sekundärstrukturelementen zu beobachten. Ab einer Temperatur von 65 °C beginnt der thermische Entfaltungsprozess von Lysozym in reiner Pufferlösung (Abbildung 5.14b). In Anwesenheit von 2 M beginnt der thermische Entfaltungsprozess bereits ab einer Temperatur von  $\sim 55$  °C (Abbildung 5.14f) und in Anwesenheit von 2 M TMAO (Abbildung 5.14d) verschiebt sich der Eintritt der Entfaltung auf eine Temperatur von  $\sim 75$  °C.

Wie bereits zuvor erwähnt, sind die am meisten betroffenen Sekundärstrukturelemente während einer Temperaturerhöhung  $\alpha$ -Helices, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1655$   $\text{cm}^{-1}$  absorbieren, und sich aufgrund einer Aggregation bei höheren Temperaturen bildende  $\beta$ -Faltblätter, deren Absorptionsbande bei  $\sim 1621$   $\text{cm}^{-1}$  liegt. Der Anteil an  $\alpha$ -Helices sinkt um  $\sim -8\%$  in reiner Pufferlösung, während er in Anwesenheit von 2 M Harnstoff um  $\sim -10\%$  sinkt und in Anwesenheit von 2 M TMAO um  $\sim -13\%$  abnimmt. In Anwesenheit von 2 M Harnstoff beträgt die Zunahme der sich bildenden intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter  $\sim +10\%$  und in Anwesenheit von 2 M TMAO  $\sim +18\%$ .

Neben einer Konzentration von 80  $\text{mg mL}^{-1}$  Lysozym wurde ebenfalls eine Proteinkonzentration von 160  $\text{mg mL}^{-1}$  in An- und Abwesenheit von Cosolventien FTIR-spektroskopisch in Abhängigkeit der Temperatur in einem Temperaturbereich von 25 bis 95 °C vermessen, deren Ergebnisse in Abbildung 5.15 als Gegenüberstellung der prozessierten Amid-I<sup>2</sup>-Banden und der erhaltenen Sekundärstrukturanteile nach Durchführung einer Subbandenanalyse dargestellt sind. Dabei sind die Ergebnisse der temperaturabhängigen FTIR-spektroskopischen Messungen von 160  $\text{mg mL}^{-1}$  Lysozym in reiner Pufferlösung in den Abbildungen 5.15a und 5.15b abgebildet,



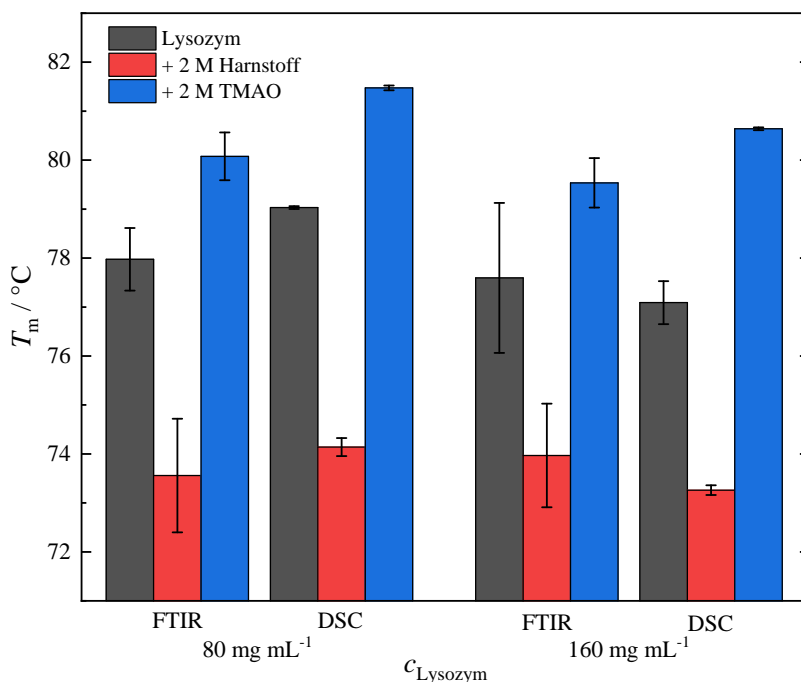
**Abbildung 5.15** – Temperaturabhängige FTIR-Daten von 160 mg mL<sup>-1</sup> (a,b) sowie in Anwesenheit von 2 M TMAO (c,d) und 2 M Harnstoff (e,f) in einem Temperaturbereich von 25 °C (–) bis 95 °C (—). Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (5.6). ■ Schleifen (1682 cm<sup>-1</sup>), ● β-Faltblätter (1673 cm<sup>-1</sup>), ▲ α-Helices (1655 cm<sup>-1</sup>), ▼ ungeordnete Strukturen (1640 cm<sup>-1</sup>), ◆ β-Faltblätter (1621 cm<sup>-1</sup>), ▲ Basislinie (1611 cm<sup>-1</sup>). Die Verantwortlichkeit obliegt Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi.

während die Ergebnisse der Untersuchungen in Anwesenheit von 2 M TMAO in den Abbildungen 5.15c und 5.15d und in Anwesenheit von 2 M Harnstoff in den Abbildungen 5.15e und 5.15f dargestellt sind.

Auch bei der hochkonzentrierten Lysozymprobe lässt sich bei der Betrachtung der Amid-I'-Bande (Teilgraphen a,c und e der Abbildung 5.15) eine deutliche Intensitätsverringering im Bereich  $\alpha$ -helikaler Strukturen, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, erkennen. Des Weiteren steigt die Intensität in Anwesenheit sowohl von 2 M TMAO (Abbildung 5.15c) als auch von 2 M Harnstoff im Bereich der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter, mit Absorptionsbanden bei  $\sim 1621$  und  $\sim 1673 \text{ cm}^{-1}$ , die sich aufgrund einer thermischen Aggregation bei höheren Temperaturen ausbilden.<sup>[385,386]</sup> Wiederum ist dieser Effekt in Anwesenheit von 2 M TMAO stärker ausgeprägt als in Anwesenheit von 2 M Harnstoff und in Abwesenheit von Cosolventien steigt lediglich die Intensität der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1673 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren. Dies festigt die Aussage, dass TMAO das Protein gegenüber einer Denaturierung stabilisiert, allerdings eine thermische Aggregation fördert.<sup>[387]</sup>

Mithilfe der abgewandelten Boltzmann-Funktion (Gleichung 5.6) können die Entfaltungstemperatur  $T_m$ , an welcher 50% des vorhandenen Lysozyms im gefalteten und 50% im entfalteten Zustand vorliegen, sowie die Änderung der VAN'T HOFFSchen Enthalpie  $\Delta H_{u,vH}^\circ$  durch eine Kurvenanpassung an den Anteil  $\alpha$ -helikaler Strukturen bestimmt werden.

Für die  $80 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym-Probe in reiner Pufferlösung ergaben sich hieraus eine Änderung der VAN'T HOFFSchen Enthalpie  $\Delta H_{u,vH}^\circ$  von  $298 \pm 64 \text{ kJ mol}^{-1}$  und eine Entfaltungstemperatur von  $T_m = 77.9 \pm 0.6 \text{ }^\circ\text{C}$ , während für die  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Probe eine Änderung der VAN'T HOFFSchen Enthalpie von  $\Delta H_{u,vH}^\circ = 241 \pm 3 \text{ kJ mol}^{-1}$  und eine Entfaltungstemperatur  $T_m$  zu  $77.6 \pm 1.5 \text{ }^\circ\text{C}$  bestimmt wurden. Cinar *et al.* ermittelten beispielsweise eine Änderung der VAN'T HOFFSchen Enthalpie von  $385 \text{ kJ mol}^{-1}$  unter Verwendung einer Proteinkonzentration von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ .<sup>[234]</sup> Da in Anwesenheit sowohl von 2 M TMAO als auch von 2 M Harnstoff eine irreversible Aggregation während der thermischen Entfaltung stattfindet, wurden keine Ände-



**Abbildung 5.16** – Grafische Darstellung der FTIR-spektroskopisch und kalorimetrisch bestimmten Entfaltungstemperaturen  $T_m$  von 80 mg mL<sup>-1</sup> und 160 mg mL<sup>-1</sup> Lysozym in reiner Pufferlösung (■) sowie in Anwesenheit von 2 M Harnstoff (■) und 2 M TMAO (■) bei einer Temperatur von 25 °C. Die Verantwortlichkeit obliegt Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi.

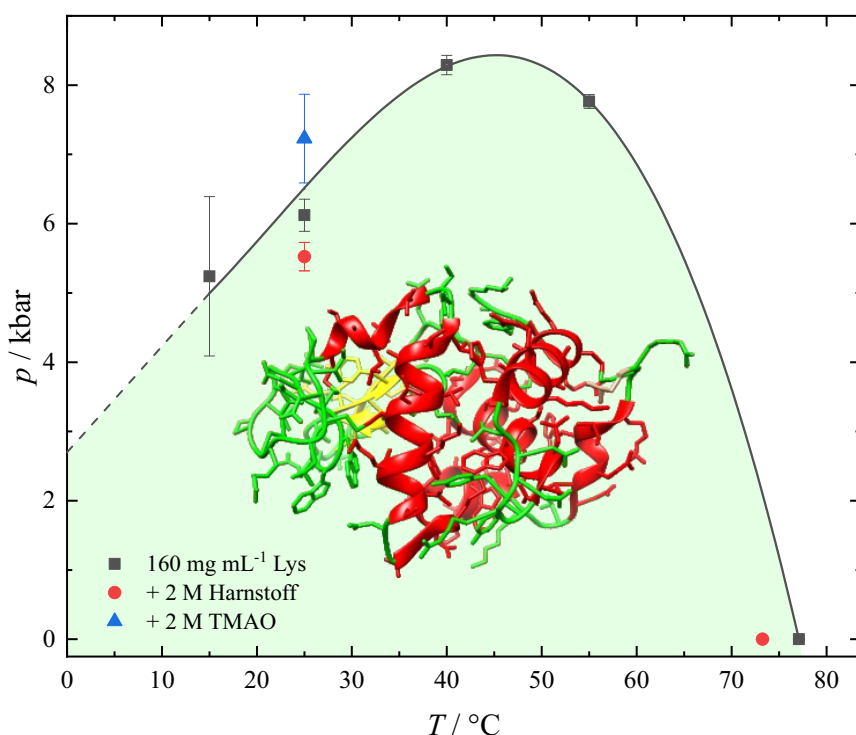
rungen der VAN'T HOFFSchen Enthalpie bestimmt.

Abbildung 5.16 zeigt den Einfluss der verwendeten Cosolventien auf die Entfaltungstemperatur  $T_m$  in einer Gegenüberstellung der FTIR-spektroskopisch und kalorimetrisch ermittelten Entfaltungstemperaturen. Die Ergebnisse der durchgeführten DSC-Messungen stimmen gut mit den FTIR-spektroskopisch ermittelten Entfaltungstemperaturen überein. Wiederum lässt sich eine stabilisierende Wirkung von TMAO auf die Proteinestabilität erkennen, während die Anwesenheit von Harnstoff einen destabilisierenden Effekt auf die thermische Entfaltung von Lysozym aufweist. Des Weiteren besitzt Lysozym in den niedrig konzentrierten Lösungen eine höhere Stabilität gegenüber einer thermischen Entfaltung als in den höher konzentrierten Proteinlösungen, was wiederum dafür spricht, dass *self-crowding*-Bedingungen einen destabilisierenden Effekt besitzen.

Dies stimmt gut mit früheren kalorimetrischen Studien an Lysozym unter *self-crowding*-Bedingungen überein. So fanden Suladze *et al.* beispielsweise heraus, dass

*self-crowding*-Bedingungen einen destabilisierenden Effekt auf die Temperaturbeständigkeit von Lysozym besitzt und darauf hinweist, dass ein enthalpischer Effekt vorliegt und kein Effekt aufgrund des ausgeschlossenen Volumens.<sup>[388]</sup> Bei SNase, einem anderen Protein, fanden Erlkamp *et al.* beispielsweise heraus, dass *crowding* und *self-crowding* zu einer Erhöhung von sowohl der Druck- als auch der Temperaturstabilität führt, was darauf hinweist, dass die auftretenden Effekte besonders durch die vorliegende Proteinkonzentration und Lösungsbedingungen beeinflusst werden, wie beispielsweise dem pH-Wert, der Ionenstärke oder der Anwesenheit von Cosolventien, sowie von der Oberflächenladung mitsamt dem pI-Wert und der Ladungsverteilung.<sup>[178]</sup>

Cinar *et al.* bestimmten bei einem ähnlichen pH-Wert für eine  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym-Lösung, eine Konzentration bei der destabilisierende intermolekulare Wechselwir-



**Abbildung 5.17** – Druck-Temperatur-Phasendiagramm von  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym in reiner Pufferlösung. Zur optischen Orientierung dient die durchgezogene Linie. Die Werte für Lysozym in Anwesenheit von 2 M Harnstoff bzw. 2 M TMAO dienen der besseren Einordnung. Das 3D-Bändermodell von Lysozym (PDB-Struktur: 1dpx<sup>[359]</sup>) wurde mithilfe der Computersoftware UCSF CHIMERA v.1.13.1 erstellt.<sup>[214]</sup> Die Verantwortlichkeit obliegt Dr. Samy Rashad Al-Ayoubi.

kungen fehlen, einen weitaus höheren Wert für den Entfaltungsdruck.<sup>[234]</sup> Dies entspricht den zuvor genannten Argumenten und der verringerten Änderung der VAN'T HOFF'schen Enthalpie.<sup>[388]</sup>

In Abbildung 5.17 ist ein Druck-Temperatur-Phasendiagramm für Lysozym mit einer Konzentration von  $160 \text{ mg mL}^{-1}$  dargestellt, das aus den FTIR-spektroskopischen Messungen bestimmt wurde. Der Verlauf der Stabilitätsgrenzkurve des Proteins entspricht hierbei einem Ellipsoid, der charakteristisch für monomere Proteine ist.

## 5.4 Zusammenfassung

Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen deutlich einen stabilisierenden Effekt des verwendeten Osmolyten TMAO auf die interne Dynamik der Wasserstoffatome von Lysozym im Subnanosekundenbereich anhand einer Reduktion der ermittelten MSD-Werte von Lysozym in Anwesenheit von 2 M TMAO, während in Anwesenheit von 2 M Harnstoff die MSD-Werte nicht signifikant beeinflusst wurden. In der TMAO-Harnstoff-Mischung konnte kein entgegenwirkender Effekt der beiden verwendeten Cosolventien auf die Dynamik der internen Wasserstoffatome von Lysozym beobachtet werden. Die unterschiedlichen Wirkungsweisen der beiden Osmolyte können evtl. dadurch erklärt werden, dass Harnstoff nur schwach mit dem umgebenden Wasser, aber stark mit dem Proteinrückgrat interagiert, während der Osmolyt TMAO vorzugsweise von der Proteinoberfläche ausgeschlossen wird und stark mit dem umgebenden Wasser wechselwirkt. Durch die Anwesenheit von TMAO wird die Gesamtstruktur des Wasserstoffbrücken-Netzwerks verstärkt, wodurch es zu einer Dämpfung der Dynamik von Oberflächengruppen und evtl. auch der inneren Dynamik des Proteins kommt und dadurch die MSD-Werte verringert werden.

Anhand der durchgeführten Messungen lässt sich erkennen, dass der Osmolyt TMAO in der Lage ist, das Volumen zu beeinflussen, welches den Proteinatomen für eine lokale Diffusion zugänglich ist und dieser Effekt sich von der Proteinoberfläche aus ins Proteininnere mithilfe einer Kopplung der vorliegenden Diffusionsbewegungen ausbreitet. Dadurch wird zusätzlich die globale Flexibilität des Proteins

beeinflusst, was sich an den verringerten MSD-Werten von Lysozym in Anwesenheit des Osmolyten erkennen lässt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Konformationsdynamik von Lysozym sowohl eine signifikante Temperaturabhängigkeit besitzt als auch durch die Anwesenheit von Cosolventien, die eine Änderung der Hydratationseigenschaften induziert, effektiv moduliert werden kann.<sup>[389]</sup> Es handelt sich dabei um eine globale Wirkung, die nicht nur auf die dem Lösungsmittel zugänglichen Aminosäurereste beschränkt ist.<sup>[346,389,390]</sup>

Unter *self-crowding*-Bedingungen, wobei Konzentrationen erreicht werden, die typischerweise im Zellinnern vorzufinden sind, verringern sich die für Lysozym in reiner Pufferlösung ermittelten MSD-Werte. Allerdings hat in Anwesenheit der beiden verwendeten Osmolyte ein solcher *Crowding*-Effekt keinen wesentlichen Einfluss auf die MSD-Werte des Proteins. Sowohl unter solchen *self-crowding*-Bedingungen als auch in Anwesenheit von Cosolventien in hohen Konzentrationen, wie beispielsweise den hier verwendeten 2 M TMAO bzw. Harnstoff, werden die MSD-Werte des Proteins relativ unempfindlich gegenüber dem anliegenden Druck.

In Anwesenheit des Disaccharids Trehalose steigen die ermittelten MSD-Werte mit steigender Konzentration des Zuckers. In Anwesenheit von bis zu 20 Gew.-% Trehalose bleibt der ermittelte MSD-Wert bis zu einem Druck von  $\sim 2$  kbar konstant, bevor dieser aufgrund der Kompression abfällt. Es ist bekannt, dass die Dynamik in dem hier untersuchten Zeitfenster stark von der Dynamik der Hydratationshülle des Proteins beeinflusst wird, sodass hier davon ausgegangen werden kann, dass die Anwesenheit von Trehalose einen großen Einfluss auf die Hydratationshülle des Proteins besitzt. Des Weiteren ist bekannt, dass Trehalose in der Lage ist, eine bestimmte Menge an Wassermolekülen der Hydratationshülle durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit dem Protein zu ersetzen.<sup>[162]</sup> Dieser Austausch von Wassermolekülen der Hydratationshülle durch Trehalose-Moleküle beeinflusst die Dynamik des Proteins im Subnanosekundenbereich. Die MSD-Werte sind in Anwesenheit von 2 M Glycin drastisch erhöht, während die Anwesenheit von 2 Gew.-% Sucrose keinen signifikanten Einfluss auf die MSD-Werte nimmt. Da Sucrose, wie Harnstoff auch, direkt mit dem Proteinrückgrat bzw. mit den Seitenketten der Aminosäuren des Pro-

teins interagiert,<sup>[122]</sup> ist eine Beeinflussung durch die Anwesenheit des Disaccharids nicht zu erkennen.

Sowohl die durchgeführten komplementären druck- und temperaturabhängigen FTIR-Messungen als auch die kalorimetrischen Daten geben zusätzliche Einblicke auf den Einfluss der verwendeten Cosolventien auf die Proteinstabilität und erlauben die Erstellung eines Druck-Temperatur-Phasendiagramms von Lysozym, welches in Abbildung 5.17 dargestellt ist und den für monomere Proteine typischen elliptischen Verlauf besitzt.<sup>[35,49,60]</sup> Bei beiden vermessenen Proteinkonzentrationen stabilisiert die Anwesenheit von TMAO das Protein gegenüber einer druck- und thermisch-induzierten Entfaltung, während die Anwesenheit von Harnstoff eine destabilisierende Wirkung auf die Proteinstabilität aufweist. Das Vorliegen von *self-crowding*-Bedingungen führt zu einer geringfügigen Destabilisierung des Lysozyms gegenüber einer druck- bzw. thermisch-induzierten Entfaltung, was auf einen enthalpischen Effekt zurückzuführen ist, der bei solch hohen Proteinkonzentrationen durch die Ausbildung schwacher intermolekularer Wechselwirkungen entsteht.<sup>[387]</sup> Im Gegensatz zu einer druck-induzierten Entfaltung führt eine Temperaturerhöhung bei hohen Proteinkonzentrationen zur sofortigen Denaturierung mit anschließender irreversibler Aggregation in Anwesenheit sowohl von TMAO als auch von Harnstoff.



# 6 Cosolvens und Crowding Effekte auf den temperatur- und druckabhängigen Dissoziations-Prozess des $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers

---

Teile dieser Studie wurden in folgender Referenz veröffentlicht:

Schummel, P. H.; Anders, C.; Jaworek, M. W.; Winter, R. Cosolvent and Crowding Effects on the Temperature and Pressure Dependent Dissociation Process of the  $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimer. *ChemPhysChem*, **2019**, *20*, 1098-1109. [\[391\]](#)



## 6.1 Einleitung

Tubulin zählt neben Actin und den Intermediärfilamenten zu den Hauptkomponenten des Zytoskeletts und kann in fast jeder eukaryotischen Zelle gefunden werden.<sup>[242,303]</sup> Tubulin ist verantwortlich für eine Vielzahl zellulärer Funktionen, wie beispielsweise Morphogenese, den intrazellulären Transport, die Motilität, oder die Bildung des mitotischen Spindelapparats während der Zellteilung.<sup>[241–243]</sup> Innerhalb der Zelle kann Tubulin in zwei möglichen Zuständen vorliegen: zum einen Tubulin, das Monomer, ein Heterodimer, welches aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut ist,<sup>[304]</sup> und zum anderen der polymere Zustand, die Mikrotubuli.<sup>[305]</sup>  $\alpha/\beta$ -Tubulin ist in der Lage, lineare Protofilamente mit einer Kopf-Schwanz-Orientierung zu bilden. 10–15 dieser Protofilamente können sich dann wiederum seitlich miteinander verbinden und schließen, sodass sich die zylinderförmigen Mikrotubuli mit einem Durchmesser von 25 nm bilden können. Jede Untereinheit des Heterodimers ist in der Lage ein Molekül Guanosintriphosphat (GTP) zu binden. Dabei ist das gebundene Nukleotid des  $\alpha$ -Tubulins nicht austauschbar (engl.: *non-exchangeable*, N-Seite) und wird während der Polymerisation nicht hydrolysiert, während das Nukleotid, welches an die  $\beta$ -Untereinheit gebunden ist, austauschbar ist (engl.: *exchangeable*, E-Seite) und bei der Polymerisation hydrolysiert wird.<sup>[248]</sup> Aufgrund dieser Tatsache sind die gebildeten Mikrotubuli asymmetrisch und besitzen eine polare Struktur mit unterschiedlichen Wachstumsraten an den beiden Enden.<sup>[249,250]</sup>

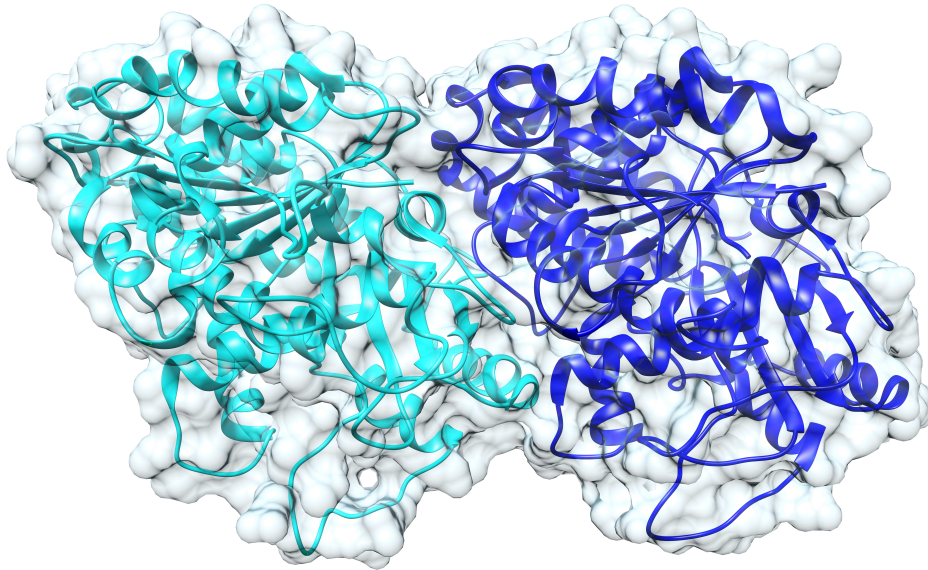
Auf der Erde gibt es zahlreiche Bereiche, in denen ein hoher hydrostatischer Druck (engl.: *high hydrostatic pressure*, HHP) vorliegt. Während der durchschnittliche Druck in der Tiefsee etwa 400 bar beträgt, kann in den Tiefseegräben und dem tiefen Untergrund ein Druck von bis zu 1 kbar vorliegen.<sup>[60]</sup> Damit das Überleben unter extremen Umweltbedingungen, wie beispielsweise einem hohen hydrostatischen Druck, möglich ist, müssen Organismen Anpassungen vornehmen, um die enthaltenen Proteine vor einer Denaturierung oder einer Dissoziation zu bewahren, damit deren Funktionalität und Aktivität weiterhin erhalten bleibt.<sup>[204–206]</sup> Die druckabhängige Stabilität von Biomolekülen, wie beispielsweise Proteinen, die an druckempfindlichen Polymerisationsreaktionen beteiligt sind, so wie in diesem Fall

$\alpha/\beta$ -Tubulin, ist bis jetzt kaum erforscht.

Im Allgemeinen wird die Stabilität von Proteinen sowie deren Reaktionen und Wechselwirkungen in wässriger Lösung signifikant durch die Anwesenheit von Cosolventien beeinflusst, insbesondere von Osmolyten, die in der biologischen Zelle vorkommen.<sup>[90]</sup> Beispielsweise wird der native Zustand von Proteinen durch die Anwesenheit von Methylaminen, Polyolen, Kohlenhydraten oder Aminosäuren stabilisiert, weshalb diese chemischen Verbindungen oftmals als *Chemische Chaperone* bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu destabilisieren Denaturierungsmittel, wie beispielsweise das Stoffwechselprodukt Harnstoff, den nativen Zustand und begünstigen den entfalteten Zustand von Proteinen.<sup>[87,101,107,114,116,170,271]</sup> Als ein Beispiel für einen stabilisierenden Osmolyten sei an dieser Stelle Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) genannt, welches in der Lage ist, den nativen Zustand von Proteinen signifikant zu stabilisieren.<sup>[107,197]</sup> Eine detaillierte Erläuterung zu natürlichen Osmolyten kann dem Kapitel 1.3 entnommen werden.

Chemische Prozesse innerhalb der biologischen Zelle laufen häufig in einem Medium ab, das hohe Konzentrationen an Makromolekülen enthält, die bis zu 30 % des verfügbaren Gesamtvolumens einnehmen.<sup>[170]</sup> Die Faltung, die Konformationsdynamik sowie die damit verbundenen Gleichgewichte von Proteinen verändern sich in solchen *Crowding*-Bedingungen, was weitestgehend auf den ausgeschlossenen Volumeneffekt (engl.: *Excluded Volume Effect*) zurückzuführen ist, den diese Crowder auf das Biomolekül ausüben.<sup>[178,210,270,272,392,393]</sup> Eine detaillierte Erläuterung zu dem Thema *Crowding* kann dem Kapitel 1.4 entnommen werden. In dieser Arbeit wird als makromolekularer Crowder Ficoll<sup>®</sup> PM 70 verwendet und mit dessen monomeren Untereinheit Saccharose, welches als Nanocrowder dient, verglichen.

Frühere Studien haben gezeigt, dass solche Cosolventien und makromolekulare Crowder die Polymerisationskinetik von Tubulin signifikant beeinflussen können,<sup>[240]</sup> wie es in Kapitel 3 detailliert beschrieben ist. Dabei wurde gezeigt, dass sowohl der Osmolyt TMAO als auch der makromolekulare Crowder Ficoll<sup>®</sup> PM 70 die Polymerisationskinetik von Tubulin beschleunigen, während durch die Anwesenheit des Stoffwechselprodukts Harnstoff die Bildung der Mikrotubuli verlangsamt wird.<sup>[240]</sup>



**Abbildung 6.1** – 3D-Bändermodell der Kristallstruktur des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers (PDB-Struktur: 1jff<sup>[242]</sup>). Das 3D-Bändermodell wurde mithilfe der Computersoftware UCSF CHIMERA v.1.13.1 erstellt und modifiziert.<sup>[214]</sup>

In dieser Studie sollte der Einfluss von Cosolventien und Crowdern auf die druck- und temperaturabhängige Dissoziationsreaktion des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers, dessen Struktur als 3D-Bändermodell in Abbildung 6.1 dargestellt ist, über einen weiten Temperatur- und Druckbereich mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit FOURIER-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie, dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC), Druck-Perturbations-Kalorimetrie (PPC), Fluoreszenzanisotropie und Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) untersucht werden, um auf molekularer Ebene ein tieferes Verständnis der limitierten Temperatur- und Druckstabilität des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers *in vivo* zu erlangen.

## 6.2 Materialien und Methoden

### 6.2.1 Chemikalien und Probenpräparation

$\alpha/\beta$ -Tubulin wurde als aus Kalbshirnen extrahiertes Lyophilisat von dem *Centre of Biological Research (CSIS)* (Madrid, Spanien) bezogen und bei einer Temperatur von  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Für die FCS-Messungen wurde ein mit TAMRA (5-Carboxytetramethylrhodamin) gelabeltes Tubulin der Firma BIOZOL (Eching, Ger-

many) verwendet, welches aus Schweinehirnen extrahiert wurde. Die natürlichen Osmolyte Trimethylamin-*N*-oxid und Harnstoff sowie die *Crowding*-Reagenzien Ficoll<sup>®</sup> PM 70 und Saccharose wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Seelze, Germany) bezogen. Für die Hochdruck-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Messungen (FCS) wurde *Bovines Serumalbumin* (BSA) für die Beschichtung der Kapillaren verwendet und ebenfalls von der Firma Sigma-Aldrich (Seelze, Germany) bezogen.

Im Vorfeld zu den eigentlichen Experimenten wurde das Lyophilisat sowohl des gelabelten als auch des ungelabelten Tubulins in einem D<sub>2</sub>O-Puffer resuspendiert, welcher 80 mM PIPES (1,4-Piperazin-diethansulfonsäure, pD 6.8) und 1 mM EGTA [Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetra-essigsäure] enthielt. Die Einstellung des pD-Wertes erfolgte mittels Zugabe von NaOD bzw. DCl und wurde mithilfe einer herkömmlichen pH-Elektrode bestimmt, wobei die Umrechnung des pH-Wertes in den pD-Wert mittels der Gleichung  $\text{pD} = \text{pH} + 0.4$  erfolgte.<sup>[315]</sup> Nach dem Lösen des Tubulin-Lyophilisats in dem zuvor genannten D<sub>2</sub>O-Puffer, wurden die jeweiligen Proben für 10 min auf Eis gestellt, bevor diese bei 11 000 min<sup>-1</sup> und 2 °C für 2 min zentrifugiert wurden, um potentielle Proteinaggregate zu entfernen. Zum besseren Vergleich mit den FTIR-Daten wurden alle Messungen in dem gleichen D<sub>2</sub>O-Puffer durchgeführt.

Die Bestimmung der Tubulin-Konzentration erfolgte mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie bei einer 1:200-Verdünnung in einer Lösung, die 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat) und 10 mM Natriumphosphat (pH6.8) beinhaltet. Dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280 \text{ nm}$  bestimmt, um diese mit dem dazugehörigen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{280} = 1.15 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  in die vorliegende Proteinkonzentration umzurechnen.<sup>[278]</sup>

### 6.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Eine Lösung von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin wurde in D<sub>2</sub>O-Puffer, der jeweils die entsprechende Menge an Cosolventien bzw. makromolekularem Crowder enthielt, inkubiert und auf Eis gestellt. Druck- und temperaturabhängige fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen wurden an einem Multifrequenz Phasen- und Modulationsfluorometer

vom Typ K2 der Firma ISS (Urbana, IL) im *photon-counting*-Modus durchgeführt.

Die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm unter Verwendung einer 75 W Xenonlampe angeregt, sodass Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305 bis 450 nm aufgenommen werden konnten.

Für die Experimente unter Druck wurde eine Hochdruckzelle der Firma ISS (Urbana, IL) verwendet (siehe Abbildung 2.2 in Kapitel 2.2.2 auf Seite 38), die mit Saphir-Fenstern ausgestattet ist, um einem Druck von bis zu 4 kbar standhalten zu können.<sup>[223]</sup> Die Probenlösung wurde in einem Quarzglasfläschchen mit einem Volumen von  $\sim 1$  mL platziert, während zur Abgrenzung der Probenlösung mit dem Druckmedium eine druckübertragende *Dura Seal*-Folie verwendet und mit einem O-Ring so verschlossen wurde, dass sich keine Luftbläschen innerhalb des Probenbehälters befanden. Als Druckmedium wurde Ethanol verwendet, um die Hochdruckzelle vor Korrosion zu schützen. Der Druck wurde mithilfe einer handbetriebenen Spindelpresse der Firma Hip (High Pressure Equipment Company, Erie, PA) generiert und mittels einer Stahlkapillare in die Hochdruckzelle übertragen. Als Drucksensor wurde ein Manometer der Firma Burster Präzisionstechnik (Gernsbach, Germany) verwendet.

Der Druck wurde bei den jeweiligen Messreihen in Schritten von  $\Delta p = 100$  bar bzw. 250 bar bis hin zu einem Maximaldruck von 3 kbar variiert, wobei nach jeder Druckerhöhung eine Equilibrierung von  $t = 5$  min stattfand, damit das vermessene System sich an die Druckapplikation anpassen konnte.

Bei den temperaturabhängigen fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurde die jeweilige Probenlösung ( $V = 100 \mu\text{L}$ ) in eine Ultra-Mikro-Küvette der Firma Hellma (Müllheim, Germany) aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von 3x3 mm pipettiert und mit einem Stopfen verschlossen, um sicherzustellen, dass bei hohen Temperaturen keine Probenlösung entweichen kann. Zwei solcher mit Probenlösung befüllten Ultra-Mikro-Küvetten wurden in einem 3-Positionen-Küvettenhalter der Firma ISS (Urbana, IL, USA) platziert, damit zeitgleich eine Doppelbestimmung stattfinden konnte. Zur Temperierung der Proben wurde ein zirkulierendes Wasser-

bad verwendet.

Die Temperatur wurde bei den jeweiligen Messreihen in Schritten von  $\Delta T = 10^\circ\text{C}$  bzw.  $3^\circ\text{C}$  bis hin zu einer Maximaltemperatur von  $90^\circ\text{C}$  variiert, wobei nach jeder Temperaturerhöhung eine Equilibrierung von  $t = 5$  min stattfand, damit das vermessene System sich an die Temperaturerhöhung anpassen konnte.

Zum besseren Vergleich der einzeln gemessenen Emissionsspektren in Abhängigkeit des Drucks bzw. der Temperatur erfolgte eine Flächennormierung. Bei dieser wurde jedes einzelne Emissionsspektrum für sich integriert und anschließend jede gemessene Fluoreszenzintensität des Spektrums durch die integrierte Fläche dividiert:

$$I(\lambda, x)_{\text{Norm}} = \frac{I(\lambda, x)}{\int I(\lambda, x) d\lambda} \quad (6.1)$$

wobei  $x$  entweder für den Druck  $p$  oder die Temperatur  $T$  steht. Aus der Normierung folgt, dass die Fläche unter jedem Spektrum gleich Eins ist:

$$\int I(\lambda, x)_{\text{Norm}} d\lambda = 1 \quad (6.2)$$

Mithilfe dieser Flächennormierung ist nun ein Vergleich der einzelnen Emissionsspektren untereinander möglich, da die mit steigendem Druck oder steigender Temperatur sich verschlechternden Quantenausbeuten herausgerechnet wurden.

Für die thermodynamische Analyse der fluoreszenzspektroskopischen Daten wurden die jeweiligen flächennormierten Fluoreszenzintensitäten bei der konstant gehaltenen Wellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 325$  nm verwendet und gegen den jeweiligen Druck  $p$  bzw. Temperatur  $T$  aufgetragen. Unter der Annahme eines Zwei-Zustand-Modells der Dissoziation des Proteins, kann eine modifizierte Boltzmann-Funktion verwendet werden, um thermodynamische Parameter direkt aus den druck- bzw. temperaturabhängigen experimentellen Daten zu bestimmen:<sup>[227]</sup>

$$I(p) = \frac{I_A - I_D}{1 + e^{-(p-p_D) \cdot (\Delta V^\circ / RT)}} + I_D \quad (6.3)$$

$$I(T) = \frac{I_A - I_D}{1 + e^{-(1/T_D - 1/T) \cdot (\Delta H_{\text{vH}}^\circ / R)}} + I_D \quad (6.4)$$



Die Herleitung von Gleichung (6.3) und (6.4) ist dem Abschnitt ?? im Anhang des Kapitels 2 zu entnehmen. Hierbei entsprechen  $I_A$  und  $I_D$  den flächennormierten Fluoreszenzintensitäten des assoziierten (A) und dissoziierten (D) Dimers,  $R$  der Universellen Gaskonstante,  $T$  der Temperatur und  $p$  dem angelegten Druck. Die Volumenänderung  $\Delta V^\circ$  sowie die Enthalpieänderung  $\Delta H_{\text{vH}}^\circ$  während des Dissoziationsprozesses können direkt mithilfe der Kurvenanpassung ermittelt werden.<sup>[227]</sup> Die Wendepunkte  $p_D$  und  $T_D$  entsprechen dem Dissoziationsdruck bzw. der Dissoziationstemperatur, d.h. die Punkte an denen bereits 50 % der Dimere dissoziiert sind.

Für einen besseren Vergleich des Einflusses von Cosolventien bzw. makromolekularen Crowdern auf den druck- bzw. temperaturabhängigen Dissoziationsprozess des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers, erfolgte eine Skalierung auf 100 %, wobei der Anteil assoziierter Heterodimere (HD)  $x_{\text{HD}}$  nach

$$x_{\text{HD}} = \frac{I_D - I(y)}{I_D - I_A} \cdot 100 [\%] \quad (6.5)$$

berechnet wurde, wobei  $y$  dem angelegten Druck  $p$  bzw. der vorliegenden Temperatur  $T$  entspricht.

### 6.2.3 Fluoreszenzanisotropie-Messungen

Statische Fluoreszenzanisotropie-Messungen wurden in einem PerkinElmer LS 55 Fluoreszenzspektrometer unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm durchgeführt, um das Emissionssignal bei  $\lambda_{\text{em}} = 340$  nm zu detektieren, welches der Emissionswellenlänge von Tryptophan entspricht. Die Schlitze des Anregungs- und Emissionslichts wurden bei der Messung auf 10 nm eingestellt.

### 6.2.4 Differentialthermoanalyse und

#### Druck-Perturbations-Kalorimetrie

Die kalorimetrischen Experimente wurden an einem VP-DSC-System der Firma MicroCal (Northampton, MA, USA) durchgeführt, welches mit dem benötigten Zu-

behör für die Drucksprungtechnik (engl.: *pressure perturbation calorimetry*, PPC) ausgerüstet ist. Sowohl die Proben- als auch die Referenzlösungen wurden mithilfe eines Vakuumentgasers entgast, um sicherzustellen, dass sich in den einzelnen Zellen des Messsystems keine Luftblasen mehr bilden konnten. Anschließend wurden sowohl die Probe als auch die Referenz in die entsprechende Zelle eingefüllt, deren Volumen jeweils etwa 0.5 mL beträgt.

Für die dynamischen Differenzkalorimetrie-Experimente (engl.: *differential scanning calorimetry*, DSC) wurde eine Proteinkonzentration von  $1.2 \text{ g mL}^{-1}$  verwendet, die in einem Temperaturbereich von 20 bis  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  bei einer Heizrate von  $60 \text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$  vermessen wurde. Aus den erhaltenen Thermogrammen kann die Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  während der Entfaltung/Dissoziation erhalten werden. Die Übergangstemperatur  $T_D$  und die kalorimetrische Enthalpieänderung  $\Delta H_{\text{cal}}$  des Entfaltungsbzw. Dissoziationsprozesses von  $\alpha/\beta$ -Tubulin wurden mithilfe der Auswertungssoftware *MicroCal Origin 7* erhalten. Zur besseren Auswertung erfolgte eine Basislinienkorrektur im Bereich des Übergangs der erhaltenen Thermogramme.

Bei den PPC-Experimenten wurde eine Proteinkonzentration von  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  verwendet, die in einem Temperaturbereich von 25 bis  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  in Temperaturschritten von  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  vermessen wurden. Für die Drucksprünge mit einer Amplitude von  $\pm 5 \text{ bar}$  wurde als Druckmedium Stickstoffgas ( $\text{N}_2$ ) verwendet. Alle Proben wurden auf die selbe Art und Weise wie für die DSC-Experimente vorbereitet.

Für die thermodynamische Analyse der erhaltenen PPC-Daten wurde zunächst eine Reihe von Referenzmessungen des entsprechenden Puffer *vs.* Puffer, Puffer *vs.* deuteriertem Wasser ( $\text{D}_2\text{O}$ ) und  $\text{D}_2\text{O}$  *vs.*  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt und mithilfe der *MicroCal Origin 7* Verarbeitungssoftware analysiert. Aus den zuvor durchgeführten Referenzmessungen wurden im Anschluss mithilfe der quadratischen Gleichung  $a_{x/x} + b_{x/x} \cdot t + c_{x/x} \cdot t^2$  die Parameter  $a_{x/x}$ ,  $b_{x/x}$  und  $c_{x/x}$  ermittelt, die neben der verwendeten Tubulin-Konzentration und dessen spezifischen Volumen für die Bestimmung des thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha$  benötigt werden. Des Weiteren erfolgte eine Subtraktion des Puffer *vs.*  $\text{D}_2\text{O}$ -Thermogramms von dem Proben-Thermogramm, um daraus die Temperaturabhängigkeit des thermischen Expansi-

onskoeffizienten  $\alpha(T)$  zu erhalten. Nach anschließender Basislinienkorrektur kann mittels Integration der Peakfläche in dem Temperaturintervall des Übergangs von  $T_1$  nach  $T_2$  die relative Volumenänderung  $\Delta V/V$  mittels folgender Gleichung bestimmt werden:<sup>[319]</sup>

$$\frac{\Delta V}{V} = \int_{T_1}^{T_2} \alpha(T) dT \quad (6.6)$$

## 6.2.5 Temperatur- und Druckabhängige

### Fourier-Transform-Infrarot Spektroskopie

Für temperaturabhängige FOURIER-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) Experimente wurde eine Nicolet 5700 der Firma Fisher Scientific /Waltham, MA, USA) verwendet, welches mit einem MCT-Detektor (HgCdTe, Quecksilber-Cadmium-Tellur) ausgerüstet ist und mithilfe von flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Absorptionsspektren wurden in einem Wellenzahlenbereich von 4000 bis 1100  $\text{cm}^{-1}$  in einem Temperaturbereich von 5 bis 85 °C mit Intervallen von 5 °C aufgenommen. Die Probenlösung ( $V \approx 20 \mu\text{L}$ ) wurde zwischen zwei runden Calciumfluorid-Fenstern ( $\text{CaF}_2$ ) mit den Maßen 25 x 4 mm (Pike Technologies, Madison, WI, USA) platziert, die mittels einer Mylar-Folie mit einer Dicke von 50  $\mu\text{m}$  und einem Innendurchmesser von 10.5 mm separiert wurden, sodass sich ein effektives Probenvolumen von 4.3  $\mu\text{L}$  ergibt. Die so assemblierte Probenzelle wurde anschließend in einer temperierbaren Transmissionszelle platziert.

Druckabhängige FTIR-Experimente wurden in einem Nicolet 6700 der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) durchgeführt, welches mit einem MCT-Detektor (HgCdTe, Quecksilber-Cadmium-Tellur) ausgerüstet ist und mithilfe von flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Um die Proben einem Druck von bis zu 16 kbar (1.6 GPa) aussetzen zu können, wurde eine Diamantstempelzelle (P-series) der Firma High Pressure Diamond Optics (Tucson, AZ, USA) verwendet. Diese Diamantstempelzelle besitzt als Fenster zwei Typ IIa Diamanten mit einem Oberflächendurchmesser von 0.6 mm, die mit einem 50  $\mu\text{m}$  dicken, aus Messing gestanz-

tem Dichtungsring mit einem Außendurchmesser von 4 mm und einer zentrierten Bohrung mit einem Durchmesser von 0.5 mm separiert werden, sodass sich ein effektives Probenvolumen von  $\sim 9.8$  nL ergibt. Druckabhängige Absorptionsspektren wurden in einem Wellenzahlenbereich von 4000 bis  $650\text{ cm}^{-1}$  in einem Druckbereich von 1 bar bis  $\sim 16$  kbar bei einer Temperatur von  $25\text{ }^\circ\text{C}$  aufgenommen. Für eine akkurate Druckbestimmung wurde als interner Druckindikator die druckabhängige Bandenverschiebung der  $\text{SO}_4^{2-}$ -Streckschwingung von Bariumsulfat ( $\text{BaSO}_4$ ) mit einer Absorptionsbande bei  $\sim 983\text{ cm}^{-1}$  (Atmosphärendruck) verwendet.<sup>[316]</sup>

Sowohl die temperatur- als auch die druckabhängigen FTIR-Experimente wurden mit einer Proteinkonzentration von  $20\text{ mg mL}^{-1}$  durchgeführt. Die Temperatur, die in der Probenzelle vorliegt, wurde mithilfe eines digitalen Thermometers gemessen und durch ein externes Wasserbad des Typs F32-HL der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) mit einer Fehlertoleranz von  $\Delta T = \pm 0.2\text{ }^\circ\text{C}$  geregelt, sodass ein kontrollierbarer Temperaturbereich von 1 bis  $98\text{ }^\circ\text{C}$  möglich war. Die Probenkammer des Spektrometers wurde zur Gewährleistung eines guten Signal-Rausch-Verhältnisses kontinuierlich mit  $\text{CO}_2$ -freier, trockener Luft gespült (Adsorptionstrockner Typ 15, Zander, Essen, Deutschland).

Nach Platzierung der Probenzelle in dem jeweiligen FTIR-Spektrometer, erfolgte eine Wartezeit von  $\sim 30$  min, damit sich ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis einstellen konnte. Mithilfe der Spektralverarbeitungssoftware Omnic 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden für jeden eingestellten Druck bzw. jede eingestellte Temperatur 256 Absorptionsspektren in Folge aufgenommen, zu einem Spektrum gemittelt und mit einer HAPP-GENZEL-Funktion angepasst. Mithilfe des Softwarepakets Thermo GRAMS / AI wurden aufgenommene FTIR-Spektren prozessiert und analysiert, indem zuerst eine Subtraktion des Pufferspektrums und anschließend eine Glättung der Spektren durchgeführt wurde. Im Bereich der Amid-I'-Bande, d.h. im Wellenzahlenbereich von  $1700$  bis  $1600\text{ cm}^{-1}$ , wurde eine Flächennormierung durchgeführt, sodass temperatur- bzw. druckabhängige Änderungen besser herauskristallisiert werden konnten. Jedes einzelne FTIR-Spektrum wurde in dem Amid-I'-Bandenbereich für sich integriert und anschließend jede gemessene Absorption des

hintergrundkorrigierten Spektrums durch die integrierte Fläche dividiert:

$$A_{\text{Norm}}(\tilde{\nu}, x) = \frac{A(\tilde{\nu}, x)}{\int_{1600}^{1700} A(\tilde{\nu}, x) d\tilde{\nu}} \quad (6.7)$$

wobei in Gleichung 6.7 das auftretende  $x$  entweder den Druck  $p$  oder die Temperatur  $T$  repräsentiert. Aus der Normierung folgt, dass die Fläche unter jeder Amid-I'-Bande gleich Eins ist:

$$\int_{1600}^{1700} A_{\text{Norm}}(\tilde{\nu}, x) d\tilde{\nu} = 1 \quad (6.8)$$

Einzelne Subbanden der Amid-I'-Bande, die zur Nachverfolgung einer Konformationsänderung des Proteins verwendet werden können, wurden im Anschluss an die Flächennormierung der einzelnen Amid-I'-Banden jeweils durch den Vergleich der gebildeten FOURIER-Selbstentfaltung (engl.: *Fourier Self-Deconvolution*, FSD)-Spektren mit den gebildeten Spektren der 2. Ableitung identifiziert. Subbanden können an den Positionen nachgewiesen werden, an denen sich ein Maximum im FSD-Spektrum und zugleich ein Minimum im Spektrum der 2. Ableitung befindet. Auf diese Art und Weise der Subbanden-Analyse konnten den vermessenen  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimeren acht Subbanden zugeordnet werden, deren Absorptionsbereiche in Tabelle 6.1 aufgelistet sind.

**Tabelle 6.1** – Sekundärstrukturelemente und Absorptionsbanden von  $\alpha/\beta$ -Tubulin im spektralen Bereich der Amid-I'-Bande.<sup>[317]</sup>

Sekundärstrukturelement	Absorptionsbereich / $\text{cm}^{-1}$
Seitenketten	< 1615
Intermolekulare $\beta$ -Faltblätter	$\sim 1615$ , $\sim 1684$
Intramolekulare $\beta$ -Faltblätter	$\sim 1628$ , $\sim 1636$
Ungeordnete Strukturen	$\sim 1646$
$\alpha$ -Helices	$\sim 1654$
Schleifen	$\sim 1660$ – $1670$

Relative Änderungen in der Population von Sekundärstrukturelementen können unter Verwendung von acht gemischten Gauß-Lorentz-Funktionen in einer Linear-

kombination bestimmt werden. Aufgrund der zuvor durchgeführten Flächennormierung der Amid-I'-Bande entspricht die Fläche unter den einzelnen Subbanden jeweils dem Absorptionsbeitrag des jeweiligen Sekundärstrukturelements und gibt somit dessen Population in der gerade vorliegenden Konformation an.<sup>[318]</sup>

Jede Probe wurde mindestens dreimal gemessen und wie zuvor beschrieben analysiert, um die druck- bzw. temperaturabhängigen thermodynamischen Parameter zu bestimmen. Bei der Bestimmung der druckabhängigen thermodynamischen Parameter erfolgte eine Funktionsanpassung der Gleichung (6.3) an den jeweiligen Datensatz, wobei ausschließlich die Kurvenverläufe der  $\alpha$ -Helices ( $\sim 1654\text{ cm}^{-1}$ ) und der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter ( $\sim 1615\text{ cm}^{-1}$ ) berücksichtigt wurden.

Bei der Bestimmung der temperaturabhängigen thermodynamischen Parameter erfolgte eine Funktionsanpassung der Gleichung (6.4) an den jeweiligen Datensatz, wobei ausschließlich die Kurvenverläufe der  $\alpha$ -Helices ( $\sim 1654\text{ cm}^{-1}$ ), der intramolekularen  $\beta$ -Faltblätter, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1636\text{ cm}^{-1}$  absorbieren und der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter ( $\sim 1615$  und  $\sim 1682\text{ cm}^{-1}$ ) verwendet wurden. Die Änderungen der aufgezählten Sekundärstrukturanteile zeigen eine hohe Druck- bzw. Temperatursensitivität, weshalb diese zur thermodynamischen Analyse verwendet wurden. Die erhaltenen thermodynamischen Parameter der einzelnen Datensätze wurden anschließend über die Anzahl der durchgeführten Experimente gemittelt, um sowohl qualitative als auch quantitative Rückschlüsse auf den Dissoziationsprozess der vermessenen  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimere ziehen zu können.

### 6.2.6 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl.: *fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) Experimente wurden an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop des Typs MicroTime 200 der Firma Picoquant (Berlin, Germany) durchgeführt. Das verwendete System besteht aus einem invertierten Mikroskop (Olympus IX 71), das mit einem Wasser-Immersion-Objektiv (UplansApo, 60x, NA 1.2) ausgestattet ist. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus kann der Referenz von Patra *et al.* entnommen werden.<sup>[294]</sup> Ein grüner Laserpuls mit einer Wellenlänge von 560 nm (LDH-Serie,

Picoquant) wurde verwendet, um das kovalent gebundene TAMRA-Rhodamin anzuregen. Als Detektionskanal für die TAMRA-Fluoreszenz wurde eine Single-Photon-Avalanche-Diode (SPAD) der SPCM-AQR-Serie verwendet. Die Messungen wurden unter frei diffundierenden Bedingungen durchgeführt.

Aus dem Fluoreszenzsignal des mit Rhodamin gelabelten Tubulins wurden die Autokorrelationskurven unter Verwendung des Analysemodus der Fluoreszenzlebenszeitkorrelationsspektroskopie (engl.: *fluorescence lifetime correlation spectroscopy*, FLCS) verwendet,<sup>[394]</sup> der die Fluoreszenzsignale auf Basis der Fluoreszenzlebenszeiten auftrennt und eine Autokorrelationskurve für jede Fluoreszenzlebenszeit aufzeichnet. Bei der Verwendung dieser Analyse-Methode wird der Detektor-Afterpulsing-Effekt unterdrückt, der bei herkömmlichen FCS-Messungen die Autokorrelationskurve bei kurzen Korrelationszeiten  $\tau$  verzerrt. Ein TimeHarp 200 TCSPC-Modul wurde in einem zeitmarkierten und zeitaufgelösten Modus für die Datenerfassung verwendet. Die Analyse der Autokorrelationskurven erfolgte mithilfe der Analysesoftware **SymPhoTime** von Picoquant. Für die Fluktuationen der Fluoreszenzintensität ist die Autokorrelationsfunktion durch folgende Gleichung gegeben:<sup>[225,395]</sup>

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (6.9)$$

Dabei ist  $F(t)$  die Photonendetektionsintensität zum gegebenen Zeitpunkt  $t$ , und die Klammern bezeichnen die Mittlung über alle möglichen Werte der Zeit  $t$ .  $\delta F(t)$  beschreibt die Abweichung der Fluoreszenzintensität vom zeitlichen Mittel des Signals  $F(t)$  und ist gegeben durch:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (6.10)$$

$$\delta F(t + \tau) = F(t + \tau) - \langle F(t) \rangle \quad (6.11)$$

Unter der Annahme eines Gaußschen Beobachtungsvolumens können die erzeugten Autokorrelationskurven mit folgender Gleichung angefitet werden:

$$G(\tau) = \sum_i \frac{1}{N_i} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_i}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad (6.12)$$

mit  $G(\tau)$  als Amplitude der Korrelation nach einer gewissen Zeitverzögerung  $\tau$ , der Anzahl an Molekülen  $N_i$  im Beobachtungsvolumen, der Diffusionszeit  $\tau_i$  und dem geometrischen Parameter des Beobachtungsvolumens  $\kappa = \omega_z/\omega_{xy}$ , wobei  $\omega_z$  und  $\omega_{xy}$  den Längs- und Querradien entsprechen. Das verwendete Instrument wurde mit der bekannten Diffusionskonstanten von Atto 488 in Wasser ( $400 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) kalibriert.<sup>[396]</sup> Bei der Verwendung von  $\kappa = 9.0$  ergibt sich ein lateraler Radius von  $0.342 \mu\text{m}$  und damit ein Beobachtungsvolumen von 2 fL.

### 6.3 Ergebnisse und Diskussion

Zum besseren Vergleich der einzeln gemessenen druck- und temperaturabhängigen Emissionsspektren erfolgte eine Flächennormierung, wobei jedes einzelne Emissionsspektrum für sich integriert und anschließend jeweils die gemessene Fluoreszenzintensität des Spektrums durch die integrierte Fläche dividiert wurde (vgl. Gleichung 6.1). Dadurch ist ein Vergleich der einzelnen Emissionsspektren untereinander möglich, da die sich mit steigendem Druck verschlechterten Quantenausbeuten herausgerechnet wurden. Der Dissoziationsprozess von  $\alpha/\beta$ -Tubulin wurde sowohl in Abhängigkeit des Drucks als auch der Temperatur in An- und Abwesenheit von Cosolventien und Crowdern mit verschiedenen biophysikalischen Methoden untersucht, deren Ergebnisse im Einzelnen präsentiert werden.



## 6.3.1 Druckinduzierte Dissoziation des $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimers

### 6.3.1.1 Fluoreszenzspektroskopie

#### Korrektur des intrinsischen Druckeffekts

Im Allgemeinen kann die Entfaltung bzw. die Dissoziation eines Proteins fluoreszenzspektroskopisch durch eine Rotverschiebung der Tryptophan-Bande verfolgt werden.<sup>[197,225,226]</sup> Um nun den intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan korrigieren zu können, erfolgten zunächst fluoreszenzspektroskopische Messungen an dem Biomolekül *N*-Acetyl-L-Tryptophanamid (NATA).<sup>[197,225,226]</sup> Abbildung 6.2 zeigt sowohl die gemessenen (Abbildung 6.2a) als auch die jeweils mit Gleichung (6.1) auf die Fläche normierten Emissionsspektren (Abbildung 6.2b) von  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $\hat{=} 407.7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) *N*-Acetyl-L-Tryptophanamid (NATA) in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei einer Temperatur von  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Wie zu erkennen ist, verändert sich die Lage der Emissionsbande nur geringfügig mit steigendem Druck, dennoch ist eine kontinuierliche Rotverschiebung zu erkennen. Dieser Effekt kann bei vielen Fluorophoren bei ansteigendem Druck auftreten und mithilfe der Lippert-Mataga-Gleichung erklärt werden:<sup>[225,226]</sup>

$$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left( \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + \text{Konstante} \quad (6.13)$$

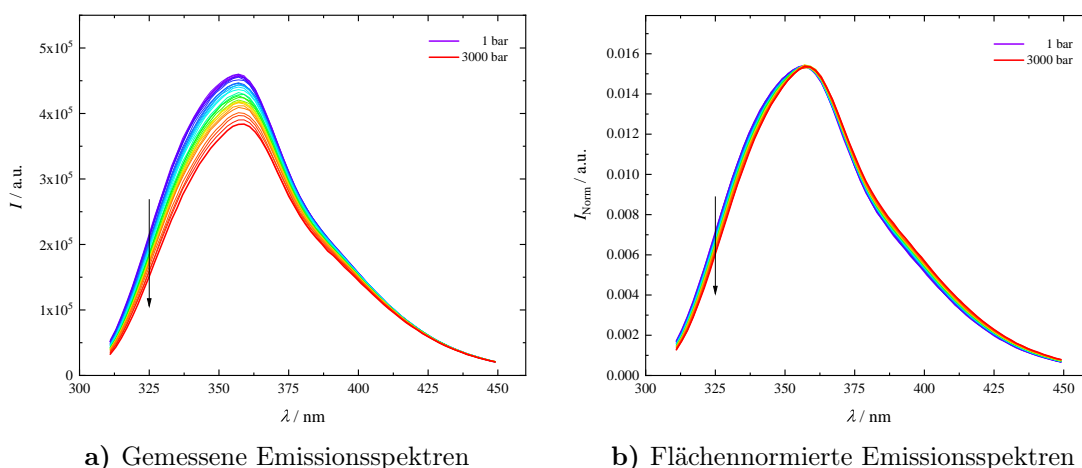
Hierbei entsprechen  $\tilde{\nu}_A$  und  $\tilde{\nu}_F$  den Wellenzahlen (in  $\text{cm}^{-1}$ ) der Absorption bzw. Emission,  $c$  der Lichtgeschwindigkeit,  $h$  dem PLANCKSchen Wirkungsquantum,  $n$  dem Brechungsindex des Lösungsmittels,  $a$  dem Radius der Kavitäten, in der sich der Fluorophor befindet,  $\varepsilon$  der Dielektrizitätskonstanten und  $\mu_G$  bzw.  $\mu_E$  dem elektrischen Dipolmoment des Fluorophors im Grund- bzw. angeregten Zustand. Anhand der Lippert-Mataga-Gleichung wird deutlich, dass mit steigendem hydrostatischem Druck die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels steigt, wodurch die Wellenzahlendifferenz vergrößert wird und somit eine größere Rotverschiebung zustande kommt.<sup>[225,226]</sup>

Abbildung 6.3 zeigt eine Auftragung der flächennormierten Fluoreszenzintensität

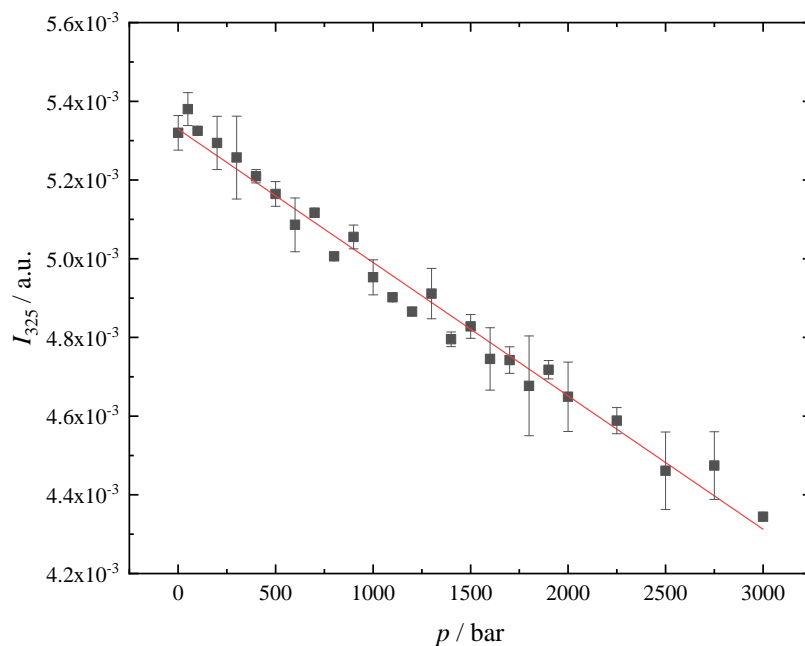
bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 325$  nm, welche dem Emissionsmaximum des nativen  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers entspricht, gegen den jeweiligen Druck, die einen linearen Verlauf aufweist. Koo *et al.* haben gezeigt, dass in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen Harnstoff sich die Steigung der linearen druckabhängigen Intensitätsabnahme von *N*-Acetyl-L-Tryptophanamid nicht signifikant ändert, weshalb an dieser Stelle darauf verzichtet wurde, weitere fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des Modellmoleküls in Anwesenheit verschiedener Cosolventien durchzuführen.<sup>[226]</sup> Zur Korrektur des intrinsischen Druckeffekts auf den intrinsischen Fluorophor Tryptophan aller weitere Messungen, erfolgte eine lineare Anpassung an die experimentellen Daten. Nach einer Verschiebung des Ordinaten-Abschnitts auf Null, da nur die Steigung an dieser Stelle von Bedeutung ist, ergibt sich folgende Geradengleichung:

$$I_{325, \text{NATA}}(p) = -3.87 \times 10^{-7} \text{ bar}^{-1} \cdot p \quad (6.14)$$

Zur Korrektur der nachfolgenden Dissoziationskurven um den intrinsischen Druckeffekt des Tryptophans, erfolgte eine Subtraktion der Gleichung (6.14) von der jeweiligen flächennormierten Fluoreszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von



**Abbildung 6.2** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $\cong 407.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) *N*-Acetyl-L-Tryptophanamid in  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei  $15^\circ\text{C}$ . Mit steigendem Druck ist sowohl eine geringfügige Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.



**Abbildung 6.3** – Druckabhängige Intensitätsänderung von *N*-Acetyl-L-Tryptophanamid bei  $\lambda = 325$  nm bei 25 °C.

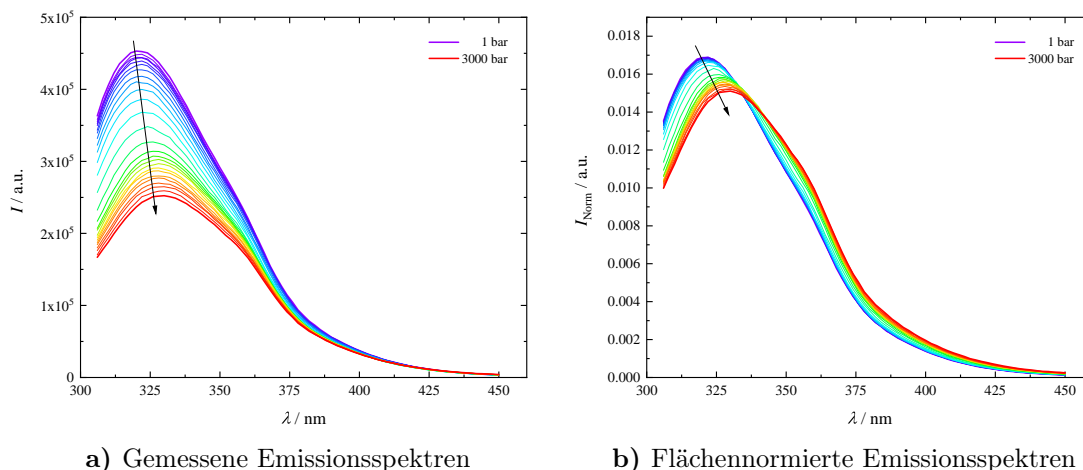
325 nm beim jeweiligen Druck:

$$I_{325, \text{corr}}(p) = I_{325, \text{Norm}}(p) - I_{325, \text{NATA}}(p) = I_{\text{Norm}}(p) + 3.87 \times 10^{-7} \text{ bar}^{-1} \cdot p \quad (6.15)$$

### Druckinduzierte Dissoziation von $\alpha/\beta$ -Tubulin

Zur fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung der Druckstabilität des  $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimers wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 300–450 nm über einen Druckbereich von 1–3000 bar bei einer Temperatur von 15 °C aufgenommen.

Zur Detektion der intrinsischen Tryptophanemission erfolgte die Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm. Abbildung 6.4a zeigt die detektierten Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$  G-Actin bei 25 °C. Anhand der grafischen Darstellung wird ersichtlich, dass mit steigendem hydrostatischem Druck sowohl die Emissionsbande ins Rötliche verschoben wird als auch die Intensität der Bande abnimmt, was auf die Exposition der Tryptophanreste zum umgebenden Wasser zurückzuführen ist. Dabei steigen mit steigendem hydrostatischem Druck sowohl die dielektrische Leitfähigkeit des Wassers als auch die Polarität der Umgebung.

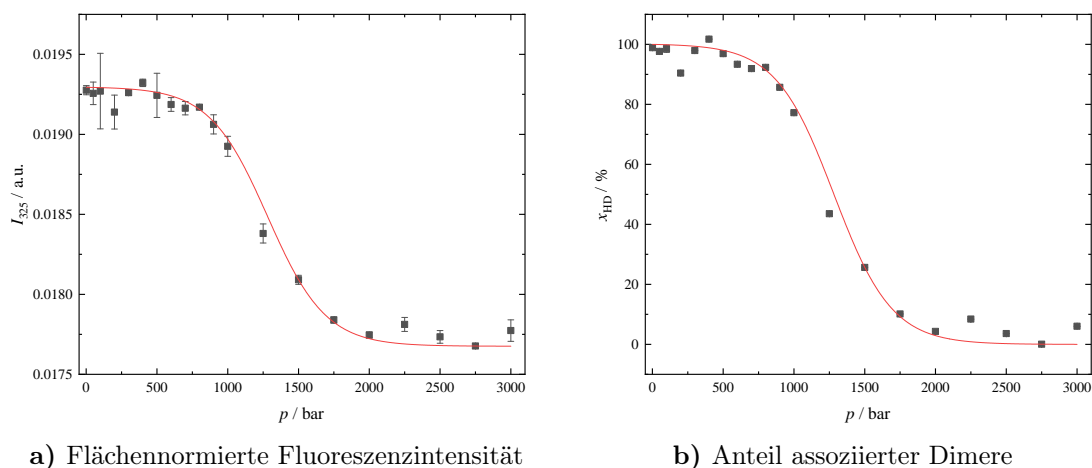


**Abbildung 6.4** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von  $5 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei  $25^\circ\text{C}$ . Mit steigendem Druck ist sowohl eine deutliche Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.

Mithilfe von Gleichung (6.1) erfolgte eine Flächennormierung der einzelnen Emissionsspektren, die in Abbildung 6.4b abgebildet sind. Anhand dieser Auftragung wird sowohl die Rotverschiebung der acht Tryptophanreste<sup>[397]</sup> als auch die Intensitätsabnahme bei der Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 325 \text{ nm}$  mit steigendem hydrostatischem Druck besser hervorgehoben. Diese Intensitätsabnahme bei  $\lambda_{\text{em}} = 325 \text{ nm}$  kann zum Verfolgen des Dissoziationsprozesses verwendet werden.

Die flächennormierten Fluoreszenzintensitäten bei dem Emissionsmaximum von  $\lambda_{\text{em}} = 325 \text{ nm}$  wurden zur Untersuchung der Volumenänderung während des Dissoziationsprozesses mithilfe von Gleichung (6.15) um den intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan korrigiert und gegen den jeweiligen Druck in Abbildung 6.5a aufgetragen.

Zum besseren Vergleich der einzelnen Dissoziationskurven wurde mithilfe von Gleichung (6.5) der Anteils assoziierter Heterodimere (HD)  $x_{\text{HD}}$  aus den flächennormierten Fluoreszenzintensitäten ermittelt. Eine Auftragung des Anteils assoziierter Heterodimere gegen den jeweiligen Druck ist in Abbildung 6.5b dargestellt. Bis zu einem Druck von  $\sim 750 \text{ bar}$  ist ein Plateau zu erkennen, welches den nativen Zustand widerspiegelt. Bei weiter ansteigendem Druck beginnt die flächennormierte Fluores-

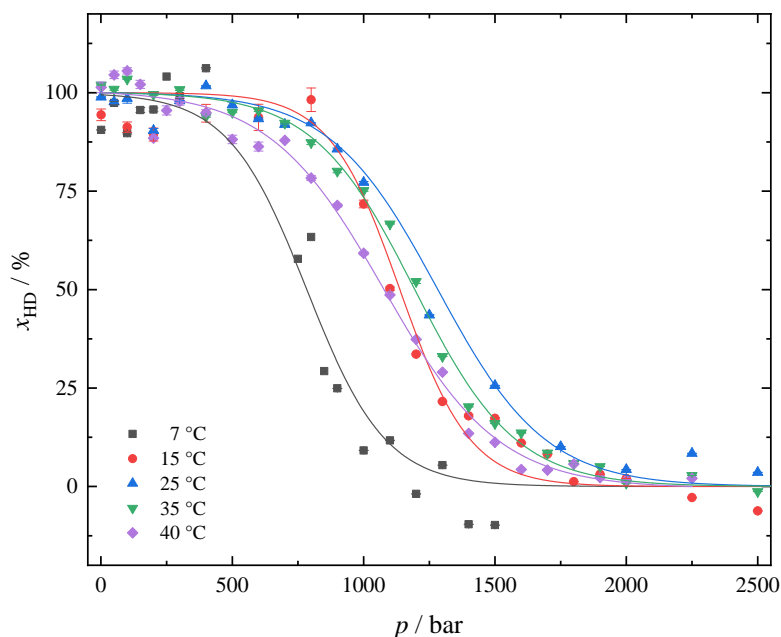


**Abbildung 6.5** – Druckabhängige Dissoziationskurve von  $5\text{ }\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von  $25\text{ °C}$ . Aufgetragen ist **a)** die mit NATA korrigierte flächennormierte Intensität bei der konstanten Wellenlänge  $\lambda = 325\text{ nm}$  und **b)** der mithilfe von Gleichung (6.5) ermittelte Anteil assoziierter Heterodimere (HD)  $x_{\text{HD}}$  gegen den jeweiligen hydrostatischen Druck  $p$ .

zenzintensität abzunehmen. Hierbei entspricht die Steigung am Wendepunkt der Volumenänderung  $\Delta V_{\text{D}}$  während des Dissoziationsprozesses. Unter der Annahme, dass der Dissoziationsprozess des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers einem Zwei-Zustands-Modell folgt, entspricht der Verlauf der Dissoziationskurve einer sigmoidalen Kurve mit zwei Plateaus: dem des Heterodimers und dem des dissoziierten Zustandes.

Durch eine Kurvenanpassung der Gleichung (6.3) an die Dissoziationskurve ergeben sich Werte für einen Dissoziationsdruck von  $p_{\text{D}} = 1282 \pm 20\text{ bar}$  und eine Volumenänderung im Verlaufe der Dissoziation von  $\Delta V_{\text{D}} = -98 \pm 6\text{ mL mol}^{-1}$  bei einer Temperatur von  $25\text{ °C}$ .

Der druckinduzierte Dissoziationsprozess von  $\alpha/\beta$ -Tubulin wurde ebenfalls bei weiteren Temperaturen in einem Temperaturbereich von  $7$  bis  $40\text{ °C}$  fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die aufgenommenen und auf die jeweilige Fläche normierten Emissionsspektren können den Abbildungen 6.44 und 6.45 im Anhang (Abschnitt 6.5.1) entnommen werden. Bei allen vermessenen Temperaturen lässt sich erkennen, dass mit steigendem hydrostatischem Druck die Fluoreszenzintensität abnimmt und die Emissionsbande des intrinsischen Fluorophors Tryptophan ins Rote verschoben wird. Die flächennormierten Fluoreszenzintensitäten bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{em}} = 325\text{ nm}$  wurden mithilfe der Gleichungen (6.15) und (6.5) um den intrin-



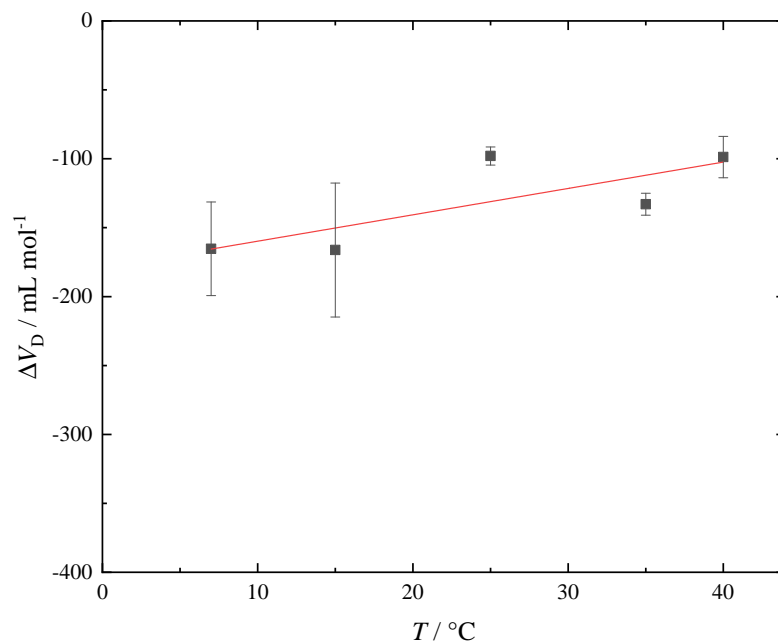
**Abbildung 6.6** – Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere  $x_{\text{HD}}$  bei 7, 15, 25, 35 und 40 °C.

sischen Druckeffekt von Tryptophan korrigiert und daraus der Anteil assoziierter Heterodimere  $x_{\text{HD}}$  bestimmt, der in Abbildung 6.6 gegen den jeweiligen Druck für die jeweils untersuchten Temperaturen aufgetragen ist.

Durch eine Kurvenanpassung der Gleichung (6.3) an die experimentellen Daten, können sowohl der Dissoziationsdruck  $p_{\text{D}}$ , der dem Wendepunkt der sigmoidalen Kurve entspricht, als auch die Volumenänderung im Verlaufe der Dissoziation  $\Delta V_{\text{D}}$  direkt bestimmt werden. Für die einzelnen Dissoziationsprozesse von Tubulin bei unterschiedlichen Temperaturen sind die erhaltenen thermodynamischen Größen in Tabelle 6.2 aufgelistet.

Demnach steigt der Dissoziationsdruck  $p_{\text{D}}$  bei einer Erhöhung der Temperatur von 7 °C auf 15 °C um  $\sim 315$  bar von  $823 \pm 14$  bar auf  $1138 \pm 40$  bar, bevor dieser mit weiter steigender Temperatur sinkt. Die ermittelten Volumenänderungen bei der Dissoziation steigen mit zunehmender Temperatur von  $-165 \pm 34$  mL mol $^{-1}$  bei 7 °C auf  $-98 \pm 6$  mL mol $^{-1}$  bei einer Temperatur von 25 °C.

Abbildung 6.7 zeigt eine Auftragung der ermittelten Volumenänderungen während der Dissoziation gegen die jeweilige Temperatur. Mit steigender Temperatur



**Abbildung 6.7** – Auftragung der Volumenänderung von  $\alpha/\beta$ -Tubulin im Verlaufe der Dissoziation gegen die jeweilige Temperatur sowie die lineare Regression mittels Gleichung (6.16).

erfolgt ein linearer Anstieg der Volumenänderung, der mithilfe folgender Gleichung mathematisch in Abhängigkeit der Temperatur beschrieben werden kann:<sup>[398]</sup>

$$\Delta V_D = V_D - V_A = \Delta V_0 + \Delta \alpha_D (T - T_0) \quad (6.16)$$

Aus der ermittelten Steigung kann die Änderung der Expansivität  $\Delta \alpha_D$  zu einem Wert von  $1.91 \pm 0.80 \text{ mL mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  bestimmt werden, der vergleichbar mit gefundenen Werten von Metmyoglobin ( $1.8 \text{ mL mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),<sup>[399]</sup> *Staphylokokken-Nuklease*

**Tabelle 6.2** – Thermodynamische Parameter der druckabhängigen Dissoziation des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers bei verschiedenen Temperaturen. Aufgelistet sind die Dissoziationsdrücke  $p_D$  und Volumenänderungen  $\Delta V_D$ , die mithilfe von Gleichung (6.3) bestimmt wurden.

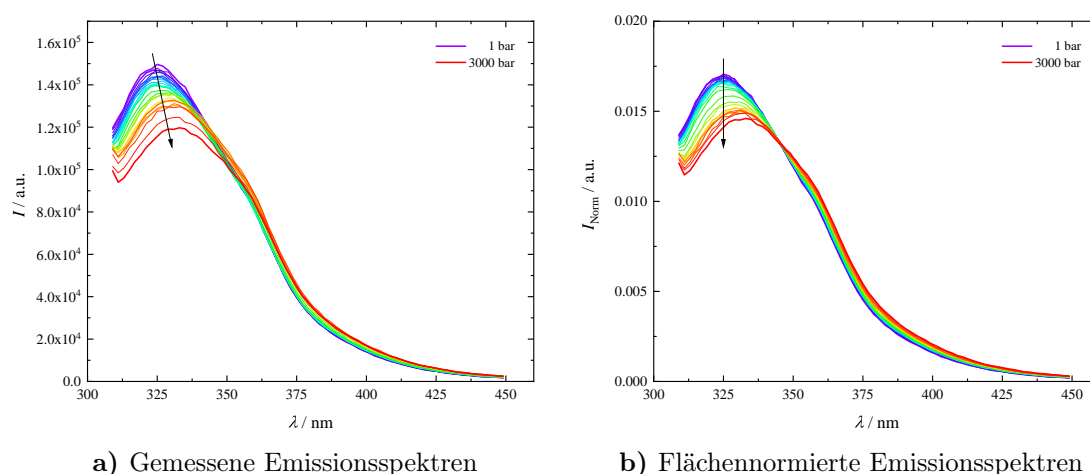
$T / ^\circ\text{C}$	$p_D / \text{bar}$	$\Delta V_D / \text{mL mol}^{-1}$
7	$823 \pm 14$	$-165 \pm 34$
15	$1138 \pm 40$	$-166 \pm 48$
25	$1282 \pm 20$	$-98 \pm 6$
35	$1194 \pm 13$	$-132 \pm 7$
40	$1077 \pm 28$	$-98 \pm 15$

( $1.33 \text{ mL mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),<sup>[400]</sup> Lysozym ( $1.07 \text{ mL mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),<sup>[398]</sup> oder der Ribonuklease A ( $1.32 \text{ mL mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) ist.<sup>[401]</sup> Der positive  $\Delta\alpha_D$ -Wert ist höchstwahrscheinlich auf ein erhöhtes thermisches Volumen an der Proteingrenzfläche, d.h. eine vergrößerte, dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche (engl.: *solvent accessible surface area*, SASA), aufgrund der erhöhten Exposition des Proteinrückgrates und/oder einer erhöhten Dynamik von Oberflächengruppen zurückzuführen.<sup>[402,403]</sup>

### Einfluss von Cosolventien und Crowdern

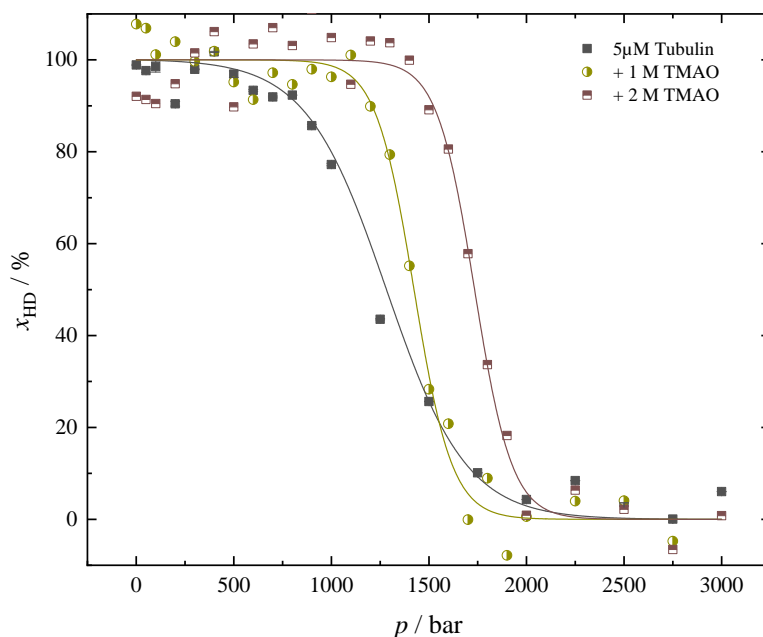
Die druckinduzierte Dissoziation von  $\alpha/\beta$ -Tubulin wurde ebenfalls in Anwesenheit von verschiedenen Cosolventien, wie beispielsweise dem Stoffwechselprodukt Harnstoff und dem kompatiblen Osmolyten Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Hierzu wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305–450 nm in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei einer Temperatur von 25 °C aufgenommen, wobei die Anregung bei einer Wellenlänge von 295 nm verwendet wurde, um lediglich die Tryptophanreste innerhalb des Proteins anzuregen.

Abbildung 6.8 zeigt exemplarisch für die Untersuchungen des Einflusses von TMAO



**Abbildung 6.8** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von  $5 \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 1 M TMAO in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25 °C. Mit steigendem Druck ist sowohl eine deutliche Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.

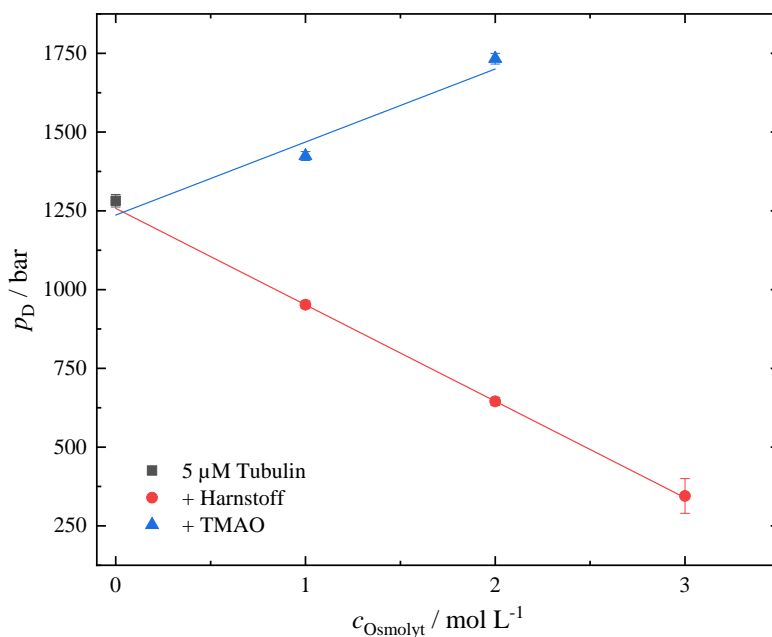




**Abbildung 6.9** – Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere  $x_{\text{HD}}$  in Anwesenheit von 1 und 2 M TMAO bei einer Temperatur von 25 °C.

auf das Dissoziationsverhalten von  $\alpha/\beta$ -Tubulin die gemessenen (Abbildung 6.8a) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierten (Abbildung 6.8b) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 1 M TMAO. Mit steigendem Druck ist sowohl eine Abnahme der Fluoreszenzintensität als auch eine Rotverschiebung zu beobachten.

Die flächennormierten Fluoreszenzintensitäten bei einer Wellenlänge von 325 nm, dem Emissionsmaximum des nativen  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers, wurden mithilfe von Gleichung (6.5) in den Anteil assoziierter Heterodimere  $x_{\text{HD}}$  umgerechnet und gegen den jeweiligen Druck in Abbildung 6.9 gemeinsam mit dem Anteil assoziierter Heterodimere in reiner Pufferlösung sowie in Anwesenheit von 2 M TMAO aufgetragen. Es lässt sich deutlich erkennen, dass mit steigender TMAO-Konzentration das Plateau des nativen Zustandes, dem der assoziierten Heterodimere, deutlich druckstabiler wird, d.h., dass der Übergang zum Dissoziationsprozess erst bei höheren hydrostatischen Drücken einsetzt. Mittels einer Kurvenanpassung der Gleichung (6.3) an den Anteil assoziierter Heterodimere kann sowohl der Dissoziationsdruck  $p_{\text{D}}$  als auch die Volumenänderung  $\Delta V_{\text{D}}$  während der Dissoziation bestimmt werden.



**Abbildung 6.10** – Dissoziationsdruck von  $\alpha/\beta$ -Tubulin als Funktion der Osmolytkonzentration bei einer Temperatur von 25 °C.

Der Dissoziationsdruck des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimeres steigt von  $1282 \pm 20$  bar in reiner Pufferlösung auf  $1424 \pm 14$  bar in Anwesenheit von 1 M TMAO und weiter auf  $1733 \pm 17$  bar in Anwesenheit von 2 M TMAO. Abbildung 6.10 zeigt eine Auftragung der ermittelten Dissoziationsdrücke des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers als Funktion der Osmolytkonzentration. Demnach steigt der Dissoziationsdruck des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimeres um etwa  $\sim 225 \text{ bar mol}^{-1}$  TMAO linear an, woraus die signifikante stabilisierende Wirkung von TMAO gegenüber der Dissoziation des Proteins ersichtlich wird. TMAO ist in der Lage, Proteine ohne direkte Wechselwirkungen (*excluded volume effect*), jedoch aufgrund seiner starken Wechselwirkung mit dem *Bulk*-Wasser und der Abschwächung der Stärke der Wasserstoffbrücken zwischen dem umliegenden Wasser und den polaren Seitenketten, zu stabilisieren.<sup>[104,116]</sup> Die ermittelten Volumenänderungen während der Dissoziation weisen größere negative Werte im Vergleich zu denen auf, die für  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Abwesenheit von Cosolventien bestimmt wurden (Tabelle 6.3).

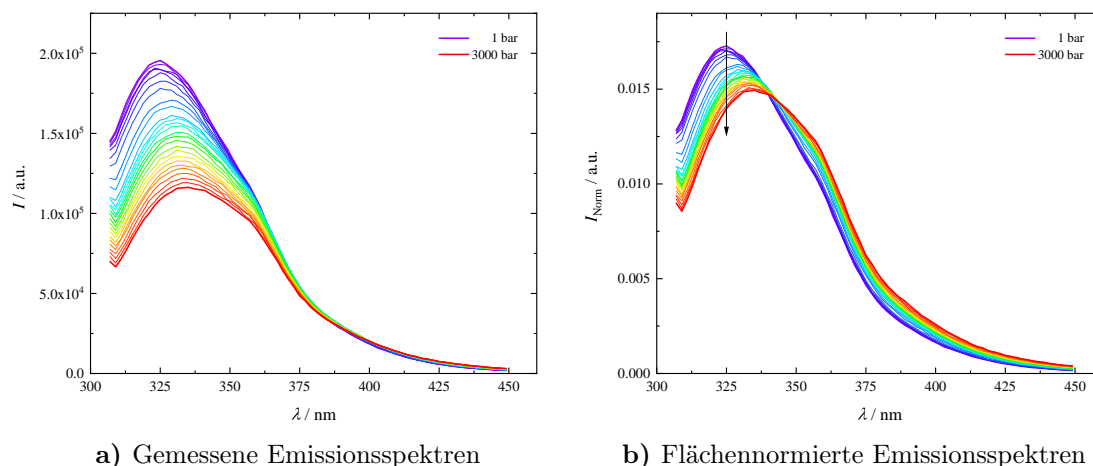
Abbildung 6.11 zeigt exemplarisch für die Untersuchungen des Einflusses von Harnstoff auf das Dissoziationsverhalten von  $\alpha/\beta$ -Tubulin die gemessenen (Abbil-

**Tabelle 6.3** – Thermodynamische Parameter der druckabhängigen Dissoziation des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers in Anwesenheit verschiedener Cosolventien und makromolekularen Crowdern bei einer Temperatur von 25 °C. Aufgelistet sind die Dissoziationsdrücke  $p_D$  und Volumenänderungen  $\Delta V_D$ , die mithilfe von Gleichung (6.3) bestimmt wurden.

Probe	$p_D$ / bar	$\Delta V_D$ / mL mol <sup>-1</sup>
$\alpha/\beta$ -Tubulin	1282 ± 20	-120 ± 6
+ 1 M Harnstoff	952 ± 12	-198 ± 15
+ 2 M Harnstoff	645 ± 13	-192 ± 18
+ 3 M Harnstoff	345 ± 55	-113 ± 28
+ 1 M TMAO	1424 ± 14	-253 ± 32
+ 2 M TMAO	1733 ± 17	-258 ± 39
+ 1 M Harnstoff + 1 M TMAO	1265 ± 8	-265 ± 19
+ 1 M Harnstoff + 2 M TMAO	1582 ± 25	-210 ± 40
+ 2 M Harnstoff + 1 M TMAO	1016 ± 16	-162 ± 15
+ 5 Gew.-% Ficoll <sup>®</sup> PM 70	1194 ± 8	-333 ± 43
+ 10 Gew.-% Ficoll <sup>®</sup> PM 70	1276 ± 25	-156 ± 21
+ 20 Gew.-% Ficoll <sup>®</sup> PM 70	1196 ± 12	-140 ± 8
+ 5 Gew.-% Saccharose	1350 ± 37	-205 ± 55
+ 10 Gew.-% Saccharose	1395 ± 29	-212 ± 47
+ 20 Gew.-% Saccharose	1582 ± 52	-233 ± 102
+ 30 Gew.-% Saccharose	1891 ± 30	-356 ± 55

dung 6.11a) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierten (Abbildung 6.11b) Emissionsspektren von 5  $\mu$ M  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 2 M Harnstoff bei einer Temperatur von 25 °C. Die aufgenommenen und auf die Fläche normierten Emissionsspektren von Tubulin in Anwesenheit von 1 und 3 M Harnstoff können der Abbildung 6.46 im Anhang (Abschnitt 6.5.1) von diesem Kapitel entnommen werden. Das Emissionsmaximum des nativen Zustandes liegt bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{em} = 325$  nm. Mit steigendem Druck ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Diese beiden druckabhängigen Effekte treten bei einer Betrachtung der flächennormierten Emissionsspektren deutlicher hervor.

Die flächennormierten Fluoreszenzintensitäten bei der Wellenlänge  $\lambda_{em} = 325$  nm wurden unter Anwendung von Gleichung (6.15) um den intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan korrigiert und anschließend mittels Gleichung (6.5) in den Anteil assoziierter Heterodimere  $x_{HD}$  umgerechnet und in Abbildung 6.12 zusammen mit



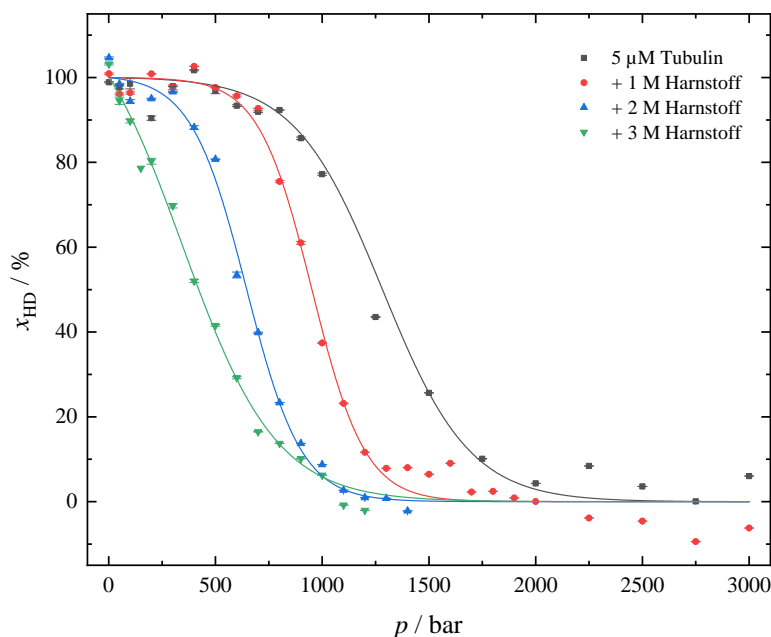
**Abbildung 6.11** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von  $5\ \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von  $2\ \text{M}$  Harnstoff in einem Druckbereich von  $1\text{--}3000\ \text{bar}$  bei  $25\ ^\circ\text{C}$ . Mit steigendem Druck ist sowohl eine deutliche Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.

der Dissoziationskurven von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung sowie in Anwesenheit von  $1$  und  $3\ \text{M}$  Harnstoff gegen den jeweiligen Druck aufgetragen.

Es lässt sich deutlich erkennen, dass mit steigender Harnstoff-Konzentration das Plateau des nativen Zustandes drucklabiler wird, d.h., dass der Übergang in den Dissoziationsprozess bereits bei kleineren Drücken stattfindet. Der Dissoziationsdruck  $p_D$  und die Volumenänderung  $\Delta V_D$  während der Dissoziation wurden mittels einer Kurvenanpassung der Gleichung (6.3) an den Anteil assoziierter Heterodimere bestimmt und sind in Tabelle 6.3 aufgelistet.

Der Dissoziationsdruck sinkt mit steigender Harnstoff-Konzentration um  $306 \pm 2\ \text{bar}$  pro Mol Harnstoff (vgl. Abbildung 6.13, Abbildung 6.10 und Tabelle 6.3). Diese Abnahme beruht auf dem destabilisierenden Effekt von Harnstoff, welcher direkt mit dem Proteinrückgrat und den Seitenketten des Proteins interagiert und so das Konformations-Gleichgewicht in Richtung des dissoziierten Zustandes verschiebt.

Infolgedessen besitzen die ermittelten Volumenänderungen der Dissoziation  $\Delta V_D$  von Tubulin in Anwesenheit von Harnstoff einen größeren negativen Wert im Vergleich zu Tubulin in reiner Pufferlösung. Dies ist auf die Bildung von stärker ausgedehnten Konformationszuständen des Proteins zurückzuführen, wenn das Hete-



**Abbildung 6.12** – Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere  $x_{\text{HD}}$  in Anwesenheit von 1, 2 und 3 M Harnstoff bei einer Temperatur von 25 °C.

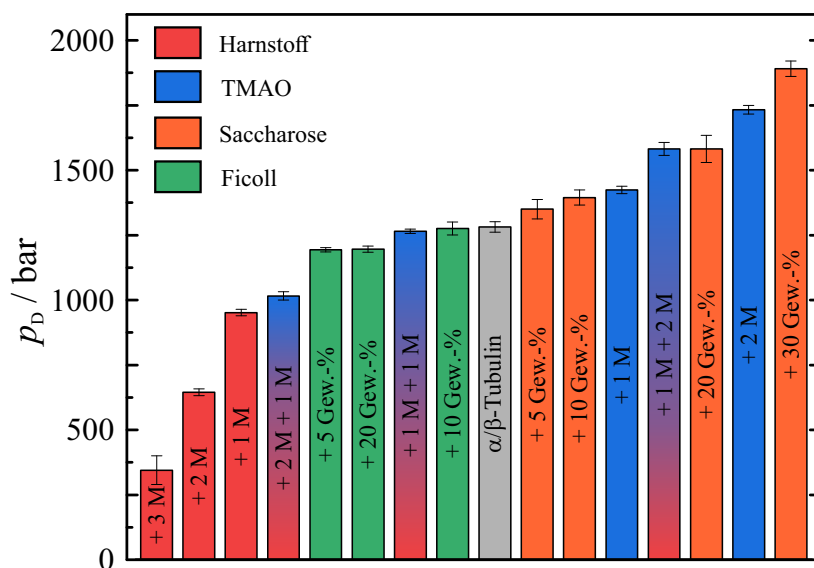
rodimer in Gegenwart von Harnstoff dissoziiert oder sogar partiell entfaltet. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Effekt auf dem Verlust des Hohlraumvolumens und/oder der erhöhten elektrostriktiven Hydratation der größer exponierten, dem Lösungsmittel zugänglichen, Oberfläche des Proteins beruht.

Frühere Studien haben gezeigt, dass in Tiefseeorganismen die Kombination von chaotropen und kosmotropen Osmolyten, wie beispielsweise TMAO und Harnstoff, eine Überstabilisierung und ein osmotisches Schrumpfen verhindert, wobei am häufigsten ein TMAO/Harnstoff-Verhältnis von 1:2 gefunden wurde.<sup>[90,110,114]</sup>

Um diesen kombinierten Effekt der beiden Cosolventien auf das Dissoziations-

**Tabelle 6.4** – Aufzählung der benutzten TMAO/Harnstoff-Mischungen zur Untersuchung des Einflusses dieser Gemische auf das Dissoziationsverhalten von 5 µM  $\alpha/\beta$ -Tubulin unter Druck bei einer Temperatur von 25 °C.

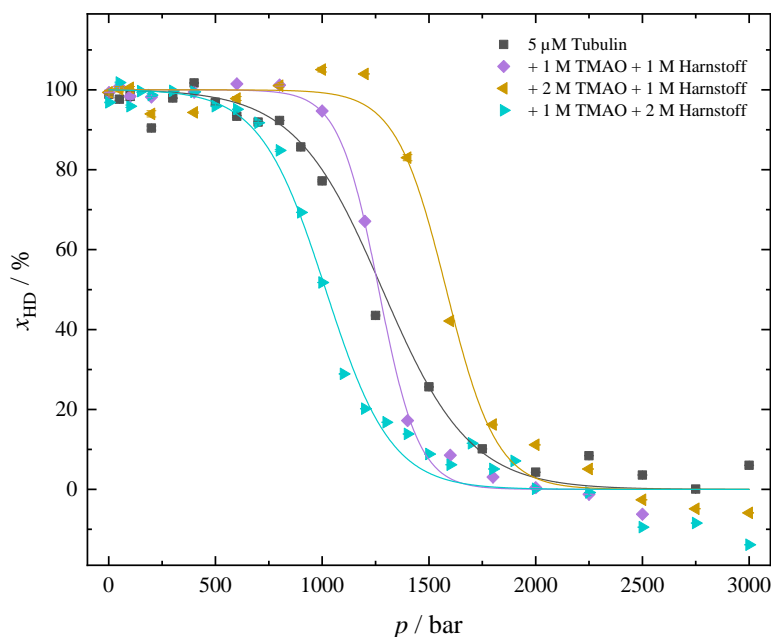
Nr.	$c(\text{TMAO}) / \text{M}$	$c(\text{Harnstoff}) / \text{M}$
1	1	1
2	1	2
3	2	1



**Abbildung 6.13** – Spektroskopisch bestimmte Dissoziationsdrücke  $p_D$  des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers in An- und Abwesenheit verschiedener Cosolventien und makromolekularen Crowdern bei einer Temperatur von 25 °C. TMAO: ■, Harnstoff: ■, Ficoll<sup>®</sup> PM 70 : ■ und Saccharose: ■. Farbverlauf der Harnstoff/TMAO-Mischungen entspricht der Zusammensetzung.

verhalten von  $\alpha/\beta$ -Tubulin zu untersuchen, wurden druckabhängige Emissionsspektren von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in einem Wellenlängenbereich von 305–450 nm über einem Druckbereich von 1–3000 bar in Anwesenheit von den in Tabelle 6.4 aufgelisteten TMAO/Harnstoff-Gemischen bei 25 °C aufgenommen. Um nur die Tryptophanreste anzuregen, erfolgte die Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm.

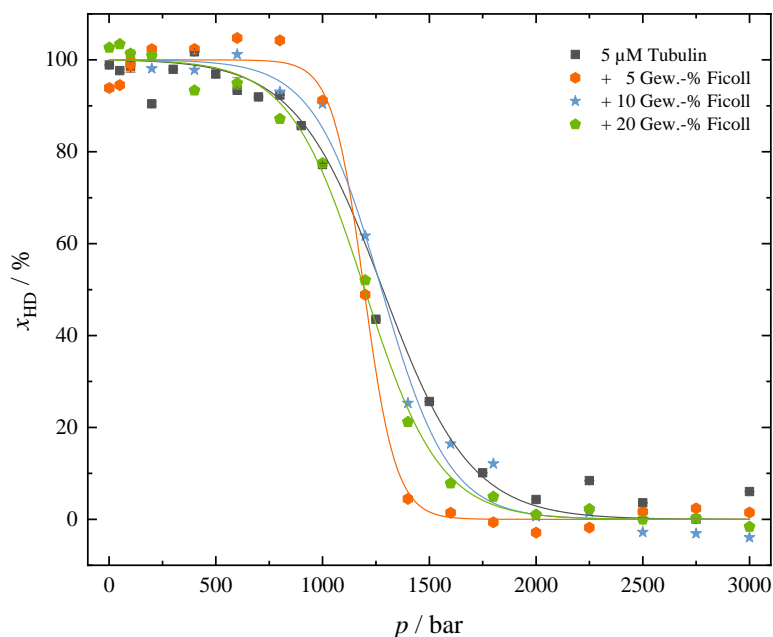
Die aufgenommenen Emissionsspektren zeigen keine signifikanten Abweichungen von den zuvor gezeigten Emissionsspektren, weshalb darauf verzichtet wird, diese hier zu zeigen, sondern der Abbildung 6.47 im Anhang (Abschnitt 6.5.1) entnommen werden können. Die einzelnen aufgenommenen, druckabhängigen Emissionsspektren wurden mithilfe von Gleichung (6.1) auf ihre jeweilige Fläche normiert. Die flächennormierte Fluoreszenzintensität bei der konstant gehaltenen Wellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 325$  nm wurde mithilfe von Gleichung (6.15) um den intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan korrigiert und anschließend mittels Gleichung (6.5) der Anteil assoziierter Heterodimere gebildet. Die erhaltenen Dissoziationskurven für die einzelnen TMAO/Harnstoff-Gemische sind in Abbildung 6.14 im Vergleich zur Dissoziationskurve von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung dargestellt.



**Abbildung 6.14** – Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere  $x_{\text{HD}}$  in Anwesenheit verschiedener TMAO/Harnstoff-Mischungen bei einer Temperatur von 25 °C.

Anhand der beiden Abbildungen 6.13 und 6.14 wird deutlich, dass ein gegenwirkender Effekt der beiden Cosolventien vorliegt. Ein TMAO/Harnstoff-Verhältnis zwischen 1:1 und 2:1 kann die destabilisierende Wirkung von Harnstoff auf die Piezostabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin aufheben, was anhand ähnlicher Dissoziationsdrücke ersichtlich wird (vgl. Abbildung 6.13 und Tabelle 6.3), die gut mit den für die Bildung von Mikrotubuli erhaltenen Ergebnissen übereinstimmen (vgl. Kapitel 3).<sup>[240]</sup> Im Vergleich hierzu haben Rosin *et al.* für die vollständige Gegenwirkung im Falle der Polymerisationsreaktion von Actin ein TMAO/Harnstoff-Verhältnis von 1:2 bestimmt,<sup>[108]</sup> und andere Studien über die Proteinstabilität berichten ebenfalls von einem TMAO/Harnstoff-Verhältnis von 1:2 für die vollständige Aufhebung der Wirkung der beiden Cosolventien.<sup>[197,238,239,268]</sup> Molekulardynamische Simulationen und Neutronenstreuexperimente haben gezeigt, dass der dem zugrunde liegende Mechanismus eher auf der bevorzugten Solvatisierung von TMAO durch Wasser und Harnstoff beruht als auf der Wechselwirkung mit dem Protein, d.h. es handelt sich hierbei um einen von dem Lösungsmittel vermittelten Effekt.<sup>[238,239,268]</sup>

Die bisher durchgeführten *in vitro*-Experimente entsprechen nicht der zellulären



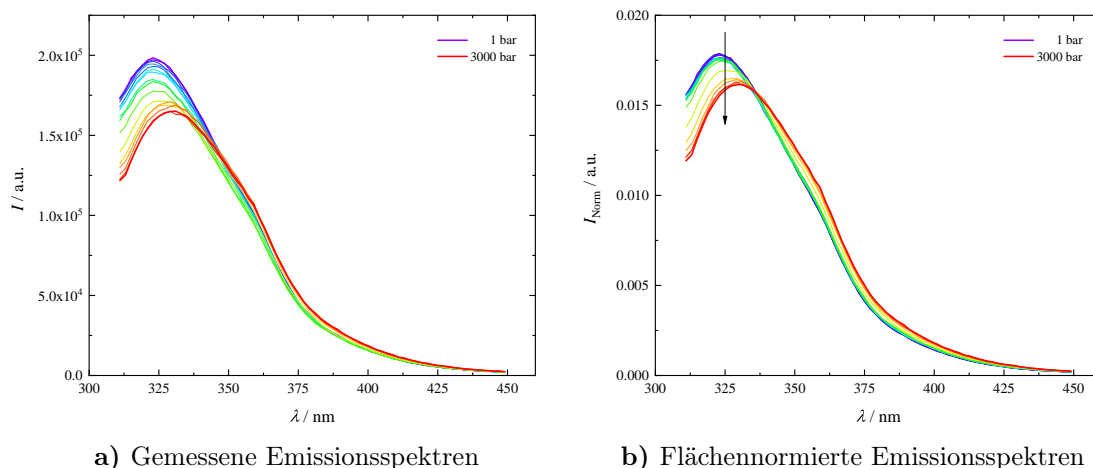
**Abbildung 6.15** – Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere  $x_{HD}$  in Anwesenheit von 5, 10 und 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 bei einer Temperatur von 25 °C.

*in vivo*-Umgebung von  $\alpha/\beta$ -Tubulin. Aus diesem Grund wurden das synthetische Polymer Ficoll<sup>®</sup> PM 70 als Makrocrowder, sowie dessen Monomerbaustein Saccharose als Nanocrowder verwendet, um die natürliche Umgebung in der Zelle nachstellen zu können, wodurch das zur Verfügung stehende Volumen reduziert wird.

Dafür wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305–450 nm in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25 °C in Anwesenheit von 5, 10 und 20 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 sowie in Anwesenheit von 5, 10, 20 und 30 Gew.-% Saccharose aufgenommen. Um nur die Tryptophanreste anzuregen, wurde zur Anregung eine Wellenlänge von  $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$  verwendet.

Die aufgenommenen Emissionsspektren von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen Ficoll<sup>®</sup> PM 70 zeigen keine signifikanten Abweichungen zu den zuvor gezeigten Emissionsspektren, weshalb darauf verzichtet wird, diese hier zu zeigen. Nach der Flächennormierung der einzelnen Emissionsspektren wurde mithilfe von Gleichung (6.1) die flächennormierte Fluoreszenzintensität bei  $\lambda_{em} = 325 \text{ nm}$  mittels Gleichung (6.15) um den intrinsischen Druckeffekt von Tryptophan korrigiert und unter Anwendung von Gleichung (6.5) in den Anteil assozi-



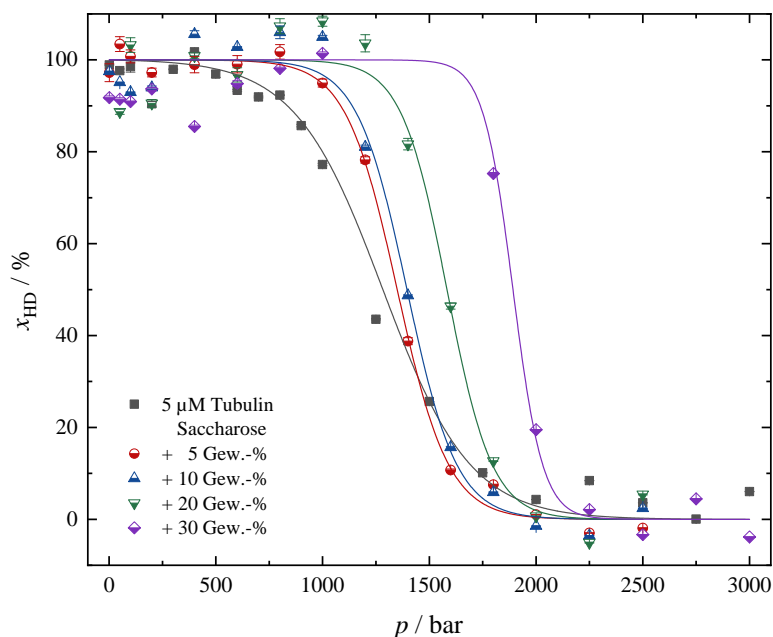


**Abbildung 6.16** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von  $5\ \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 30 Gew.-% Saccharose in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei  $25\ ^\circ\text{C}$ . Mit steigendem Druck ist sowohl eine deutliche Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.

ierter Heterodimere  $x_{\text{HD}}$  umgerechnet. Die erhaltenen Dissoziationskurven von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Ficoll<sup>®</sup> PM 70 sind in Abbildung 6.15 im Vergleich zur Dissoziationskurve von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung dargestellt.

Anhand der Abbildungen 6.15 und 6.13 wird ersichtlich, dass Ficoll<sup>®</sup> PM 70 keinen signifikanten Einfluss auf den Dissoziationsprozess von  $\alpha/\beta$ -Tubulin besitzt. Die Dissoziationsdrücke  $p_{\text{D}}$  und Volumenänderungen  $\Delta V_{\text{D}}$  im Verlaufe der Dissoziation liegen, im Rahmen des jeweiligen Fehlers, im selben Größenbereich wie die Werte, die für  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung bestimmt wurden (Tabelle 6.3).

Abbildung 6.16 zeigt exemplarisch für die Untersuchung des Einflusses von Saccharose auf das Dissoziationsverhalten von  $\alpha/\beta$ -Tubulin die gemessenen (Abbildung 6.16a) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierten (Abbildung 6.16b) Emissionsspektren von  $5\ \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 30 Gew.-% Saccharose bei einer Temperatur von  $25\ ^\circ\text{C}$ . Die aufgenommenen und auf die Fläche normierten Emissionsspektren von  $5\ \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 5, 10 und 20 Gew.-% Saccharose können der Abbildung 6.48 im Anhang (Abschnitt 6.5.1) von diesem Kapitel entnommen werden. Mit steigendem Druck lässt sich sowohl eine Rotver-

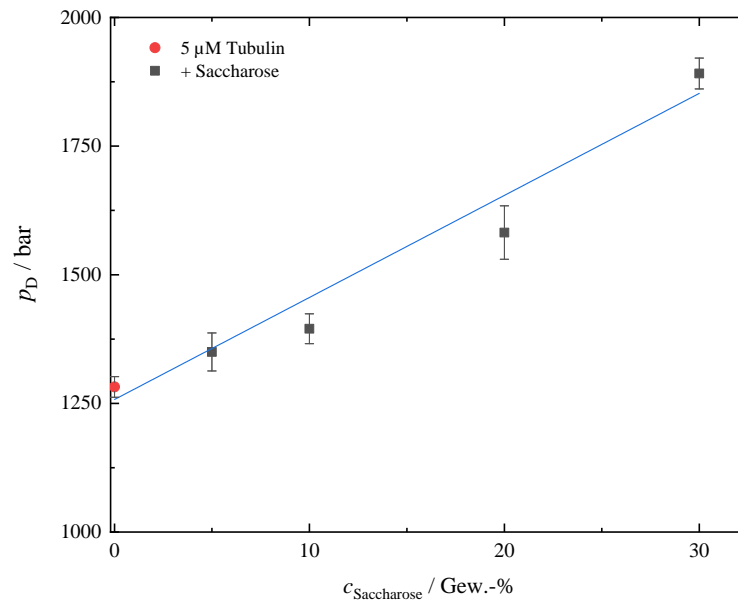


**Abbildung 6.17** – Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere  $x_{HD}$  in Abwesenheit von 5, 10, 20 und 30 Gew.-% Saccharose bei einer Temperatur von 25 °C.

schiebung der Emissionsbande von Tryptophan als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachten, was anhand der flächennormierten Emissionsspektren deutlicher hervorgehoben wird.

Die flächennormierten Fluoreszenzintensitäten bei der Wellenlänge  $\lambda_{em} = 325 \text{ nm}$  wurden mithilfe von Gleichung (6.15) um den intrinsichen Druckeffekt von Tryptophan korrigiert und anschließend mittels Gleichung (6.5) in den Anteil assoziierter Heterodimere  $x_{HD}$  umgerechnet und in Abbildung 6.17 zusammen mit den Dissoziationskurven von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung sowie in Anwesenheit von 5, 10 und 20 Gew.-% Saccharose gegen den jeweiligen Druck aufgetragen.

Anhand der Dissoziationskurven wird ersichtlich, dass durch die Anwesenheit des Disaccharids Saccharose die Druckstabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin gesteigert wird. Abbildung 6.18 zeigt eine Auftragung der ermittelten Dissoziationsdrücke des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers als Funktion der Saccharose-Konzentration. Demnach steigt bei einer Erhöhung der Saccharose-Konzentration der Dissoziationsdruck nahezu linear bis auf 20 Gew.-% Saccharose um  $\sim 16 \text{ bar per Gew.-% Saccharose}$  an, wodurch die stabilisierende Wirkung von Saccharose gegenüber der Dissoziation des



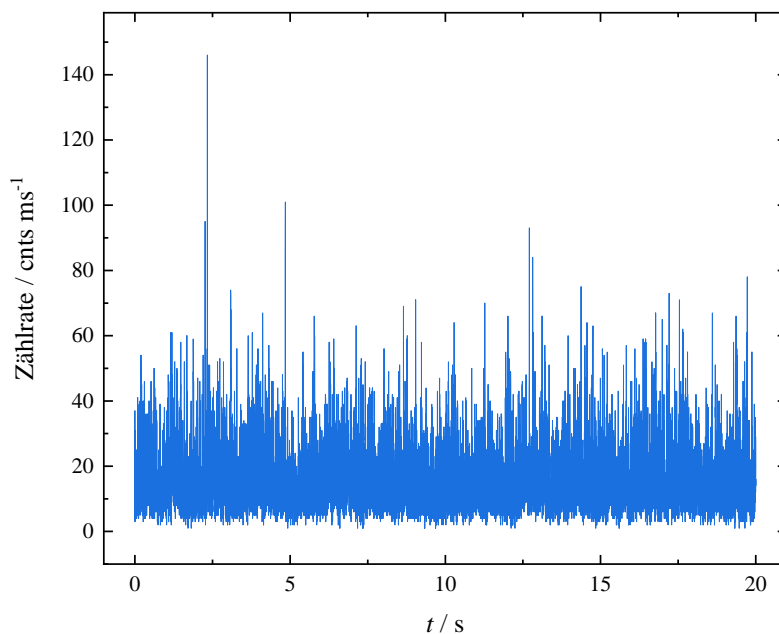
**Abbildung 6.18** – Dissoziationsdruck von  $\alpha/\beta$ -Tubulin als Funktion der Nanocrowderkonzentration von Saccharose bei einer Temperatur von 25 °C.

Proteins ersichtlich wird (Abbildung 6.13 und Tabelle 6.3). Ab einer Konzentration von etwa 20 Gew.-% Saccharose wechselt der Anstieg des Dissoziationsdrucks von einem linearen Verhalten zu einem exponentiellen Anstieg. Der Einfluss von 10 Gew.-% Saccharose auf die Druckstabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin entspricht in etwa dem Einfluss, den 1 M TMAO auf den Dissoziationsprozess nimmt. Die Anwesenheit sowohl des Osmolyten TMAO als auch des Nanocrowders Saccharose führt zu einer deutlichen Stabilisierung des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers, was durch den ausgeschlossenen Volumeneffekt erklärt werden könnte.<sup>[294]</sup> Beide interagieren stark mit Wasser und werden daher bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossen. Das ausgeschlossene Volumen ist dabei proportional zur SASA des Proteins.<sup>[32,87,193,404]</sup> Somit wird das Protein in seiner assoziierten Form, dem Heterodimer, stabilisiert. Ein solcher Effekt wurde ebenfalls für die Fibrillationsreaktion des humanen Insulamyloidpolypeptids (hIAPP), die Elongationsreaktion von Actinfilamenten sowie für die Bildung von Mikrotubuli *in vitro* gefunden.<sup>[196,240,295]</sup>

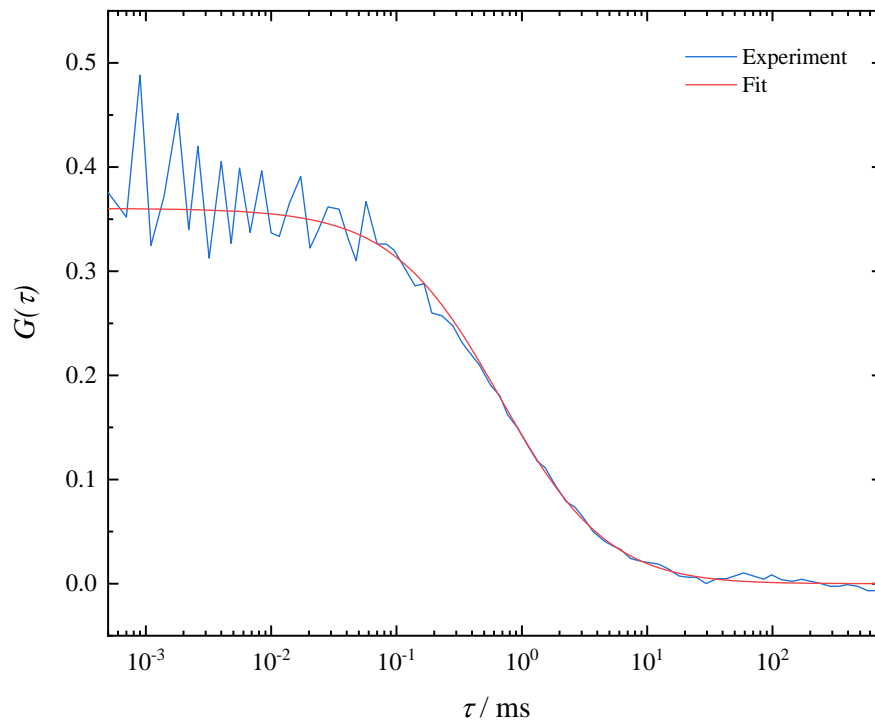
### 6.3.1.2 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl.: *fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) erlaubt eine detaillierte Detektion von Konformationsänderungen. Die Technik wird hier genutzt, um den Dissoziationsprozess des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers auf molekularer Ebene zu untersuchen. Dazu wurden FCS-Messungen von 3 nM  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung sowie in Anwesenheit von 0.2, 0.5 und 1 M Harnstoff in einem Druckbereich von 1–1500 bar aufgenommen. Abbildung 6.19 zeigt, exemplarisch für alle durchgeführten FCS-Messungen, die aufgenommene Fluoreszenzintensitätsfluktuation von 3 nM  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung über einen Zeitraum von 20 s bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 25 °C.

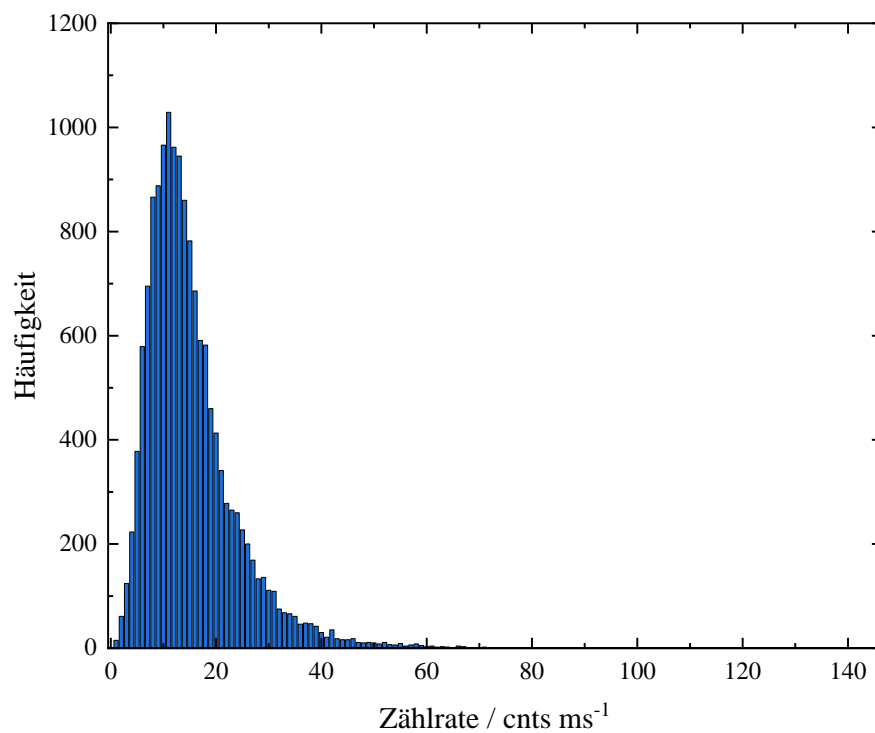
Mithilfe von Gleichung (6.9) erfolgte die Erstellung der Autokorrelationsfunktion aus den Fluoreszenzintensitätsfluktuationen, die in Abbildung 6.20a abgebildet ist. Die Kurvenanpassung erfolgte mit einem einkomponentigen, dreidimensionalen Diffusionsmodell (Gleichung 6.12). Hierbei entspricht der Kehrwert von  $G(0)$ , d.h. der Ordinatenabschnitt, der Anzahl an Teilchen  $N$  in dem Beobachtungsvolumen. Aus den Fluoreszenzintensitätsfluktuationen wurde ebenfalls das in Abbildung 6.20b



**Abbildung 6.19** – Fluoreszenzintensitätsfluktuation von  $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 25 °C.



a) Autokorrelation



b) Photon Counting Histogram

**Abbildung 6.20** – Autokorrelationsfunktion (a) und Photon Counting Histogram (PCH) (b) von 3 nM  $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 25 °C.

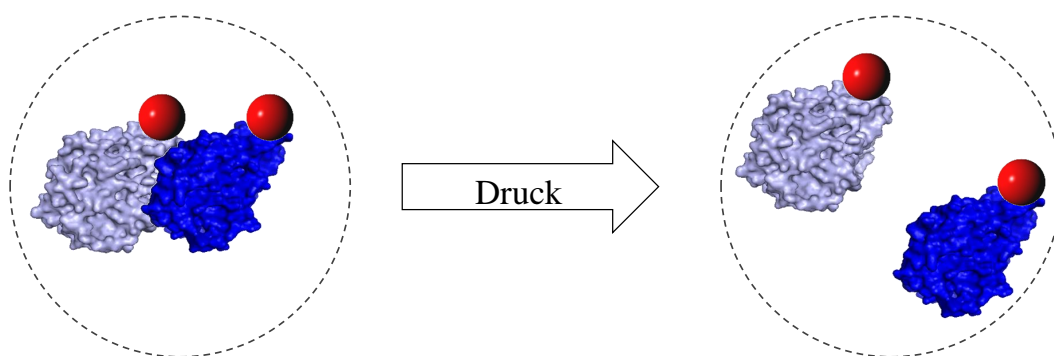
dargestellte *Photon Counting Histogram* (PCH) erstellt, wobei es sich um eine Häufigkeitsverteilung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten handelt. Anhand des Photon Counting Histograms kann die mittlere Zählrate  $\langle F(t) \rangle$  unter Anwendung folgender Gleichung ermittelt werden:

$$\langle F(t) \rangle = \frac{\sum I_i \cdot f_i}{\sum f_i} \quad (6.17)$$

Hierbei entspricht  $I_i$  der Zählrate und  $f_i$  der dazugehörigen Häufigkeit. Zur Betrachtung des Dissoziationsverhaltens erfolgt die Bestimmung der molekularen Helligkeit  $\eta$ , die der durchschnittlichen Anzahl detektierter Photonen pro Abtastzeit und Molekül entspricht,<sup>[405,406]</sup> und mittels folgender Gleichung berechnet werden kann:

$$\eta = \frac{\langle F(t) \rangle}{N} = \langle F(t) \rangle \cdot G(0) \quad (6.18)$$

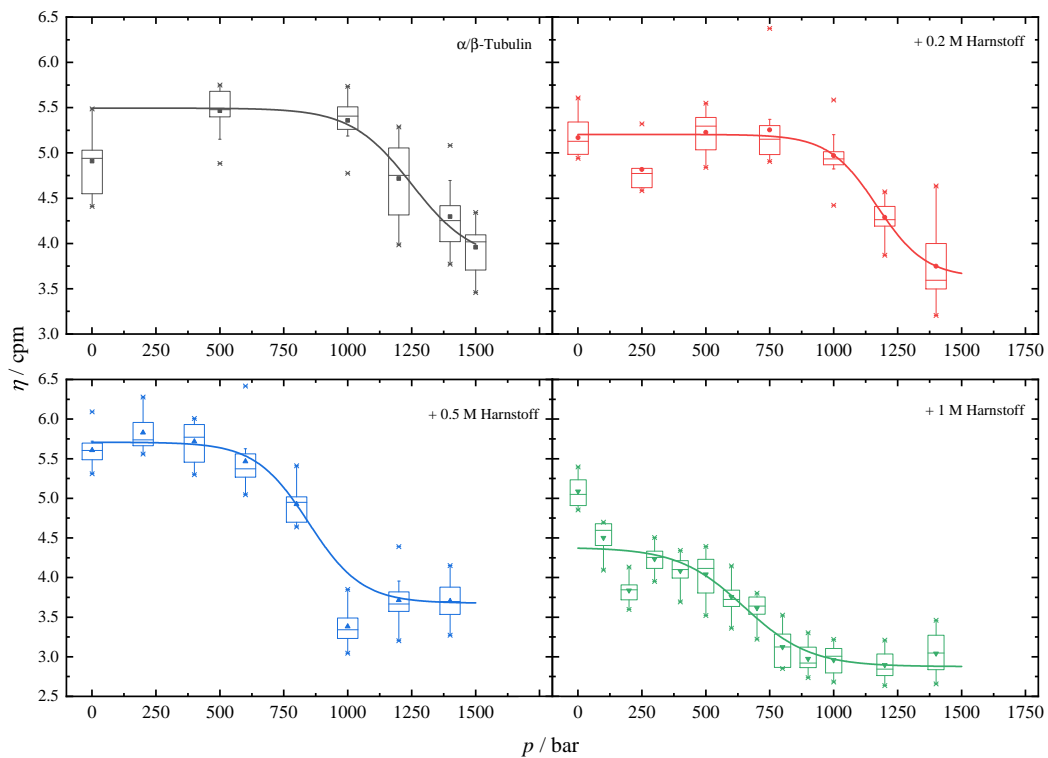
Bei dem druckabhängig untersuchten Prozess handelt es sich um eine Dissoziation, sobald die molekulare Helligkeit  $\eta$  abnimmt, was anhand von Abbildung 6.21 schematisch erklärt wird: Zu Beginn der Messreihe, liegt das Tubulin als Heterodimer vor, an dessen Untereinheit idealerweise jeweils ein Fluorophor kovalent gebunden ist. Befindet sich nun in dem Beobachtungsvolumen ein Dimer ( $N = 1$ ) und handelt



**Abbildung 6.21** – Schema der molekularen Helligkeit  $\eta$  von 3 nM  $\alpha/\beta$ -Tubulin. Zu Beginn der Messreihe befindet sich  $N = 1$  Molekül im Beobachtungsvolumen, wobei jede Untereinheit des Dimers kovalent fluoreszenzmarkiert ist. Nach einer Druckapplikation befinden sich  $N = 2$  gelabelte Monomere im Beobachtungsvolumen, wodurch sich die molekulare Helligkeit bei gleich bleibender mittlerer Zählrate  $\langle F(t) \rangle$  theoretisch laut Gleichung (6.18) halbiert.

es sich bei dem untersuchten Prozess um eine Dissoziation, so diffundieren die beiden Untereinheiten des Dimers mit zunehmendem Druck auseinander, sodass schließlich zwei gelabelte Monomere im Beobachtungsvolumen vorliegen ( $N = 2$ ). Die mittlere Zählrate  $\langle F(t) \rangle$  bleibt also gleich, aber die molekulare Helligkeit  $\eta$  halbiert sich, da sich nun doppelt so viele Teilchen in dem Beobachtungsvolumen befinden. Das hier gezeigte Schema geht von idealen Bedingungen aus, d.h., dass jede Untereinheit fluoreszenzmarkiert ist. Allerdings liegt bei dem hier verwendeten TAMRA-gelabelten Tubulin der DOL (engl.: *degree of labeling*) bei  $\sim 1.7$ , woraus folgt, dass sich die molekulare Helligkeit bei vollständiger Dissoziation nicht halbiert, da es Monomere gibt, die keinen Fluorophor gebunden haben.

Die molekulare Helligkeit wurde von 3 nM  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung sowie in Anwesenheit von 0.2, 0.5 und 1 M Harnstoff in einem Druckbereich von 1–



**Abbildung 6.22** – Boxplots der molekularen Helligkeit  $\eta$  von 3 nM  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung (a) sowie in Anwesenheit von 0.2 M (b), 0.5 M (c) und 1 M Harnstoff (d) als Funktion des Drucks bei einer Temperatur von 25 °C.

1500 bar und einer Temperatur von 25 °C ermittelt und mehrfach reproduziert. Abbildung 6.22 zeigt die ermittelten molekularen Helligkeiten der einzelnen Proben als Funktion des Druck in Form von Boxplots zur Wiedergabe der reproduzierten Ergebnisse. Anhand der Abbildung 6.22a lässt sich deutlich ein Übergang vom Dimer zum Monomer im Druckbereich zwischen 1000 und 1500 bar von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung erkennen, was durch die Abnahme der molekularen Helligkeit  $\eta$  in dem Druckbereich verdeutlicht wird. Mithilfe einer Kurvenanpassung einer Boltzmann-Funktion (Gleichung 6.3) an die experimentellen Daten kann ein Dissoziationsdruck  $p_D$  von  $1250 \pm 112$  bar für  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung bestimmt werden, der in guter Übereinstimmung mit den fluoreszenzspektroskopischen Ergebnissen steht. Des Weiteren nimmt in ähnlicher Weise auch der Dissoziationsdruck mit zunehmender Harnstoffkonzentration ab, wie es bereits bei den fluoreszenzspektroskopischen Messungen gezeigt wurde (Tabelle 6.3).

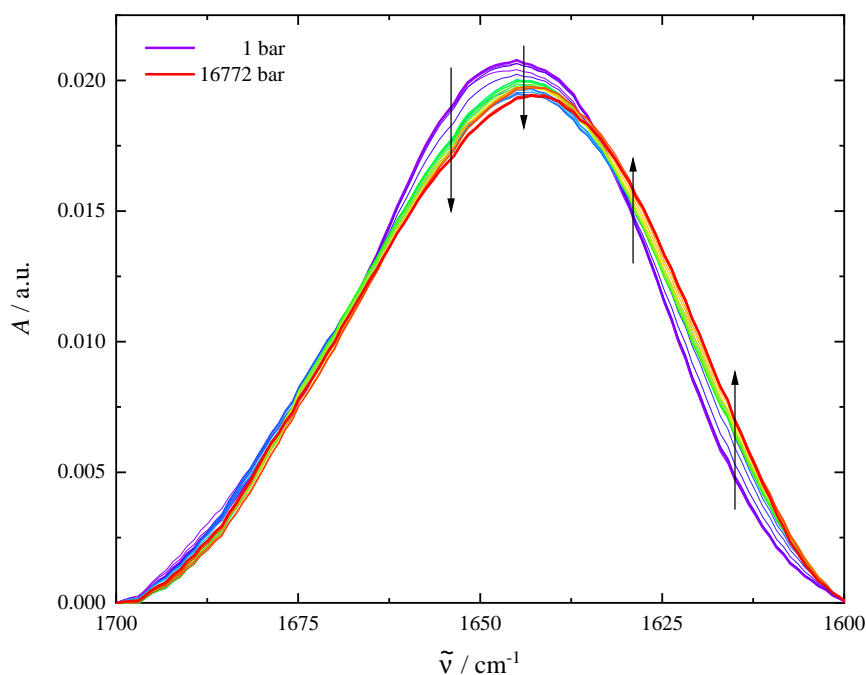
### 6.3.1.3 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Mithilfe der FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) ist es möglich, Änderungen von Sekundärstrukturelementen aufgrund von Änderungen der Bindungsmuster von Wasserstoffbrückenbindungen zu erfassen.

Wie in Abschnitt 6.2.5 beschrieben, wurden die aufgenommenen FTIR-Spektren hintergrundkorrigiert, wobei das jeweils dazugehörige Pufferspektrum von dem Probenspektrum subtrahiert wurde. Im Bereich der Amid-I'-Bande ( $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ ) erfolgte eine Glättung und Flächennormierung mithilfe von Gleichung (6.7). Die auf diese Art und Weise prozessierten FTIR-Spektren sind in Abbildung 6.23 für  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung für den Druckbereich von 1 bar bis 16 kbar bei einer Temperatur von 25 °C exemplarisch abgebildet, wobei sich erkennen lässt, dass die Absorption im Bereich  $\alpha$ -helikaler Strukturen ( $\sim 1654\text{ cm}^{-1}$ ) mit steigendem Druck geringfügig abnimmt.

Nach der Prozessierung der FTIR-Spektren erfolgte eine Subbandenanalyse, um die Zusammensetzung der Sekundärstruktur und damit deren druckabhängige Entwicklung ermitteln zu können, wobei zwei mathematische Methoden verwendet wur-

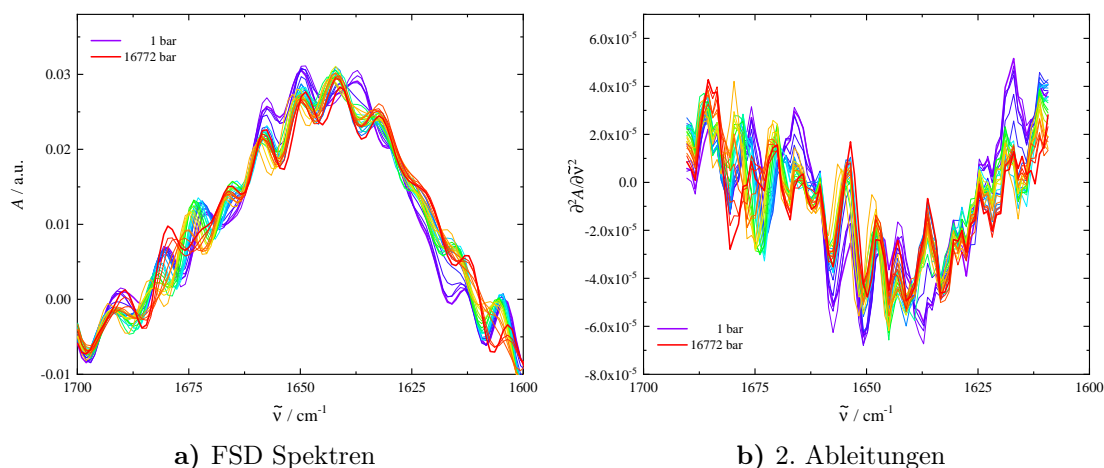




**Abbildung 6.23** – Druckabhängigkeit der flächennormierten Amid-I'-Bande von  $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von 25 °C. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten und damit dem Übergang von dem nativen in den dissoziierten Zustand.

den. Zum einen wurde die 2. Ableitung der Amid-I'-Bande bestimmt und zum anderen eine FOURIER-Selbstentfaltungsfunktion (engl.: *FOURIER Self Deconvolution*, FSD) angewandt, um die Lage und Anzahl einzelner Subbanden der Sekundärstrukturelemente unter der Amid-I'-Bande zu identifizieren, die spektral nicht aufgelöst werden können.

In Abbildung 6.24a ist die druckabhängige Entwicklung der prozessierten FSD-Spektren dargestellt, während in Abbildung 6.24b die druckabhängige Entwicklung der 2. Ableitung der flächennormierten Amid-I'-Banden des untersuchten  $\alpha/\beta$ -Tubulins in reiner Pufferlösung abgebildet ist. Anhand der beiden Abbildungen lässt sich eine geringfügige Abnahme  $\alpha$ -helikaler Strukturen, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, mit steigendem Druck beobachten, was anhand der druckabhängigen Intensitätsabnahme im FSD-Spektrum und der druckabhängigen Intensitätszunahme im Spektrum der 2. Ableitung jeweils zu erkennen ist. Mithilfe des Vergleichs der gebildeten 2. Ableitungen mit den dazugehörigen FSD-Spektren lässt sich die Lage und Anzahl der einzelnen Subbanden unterhalb



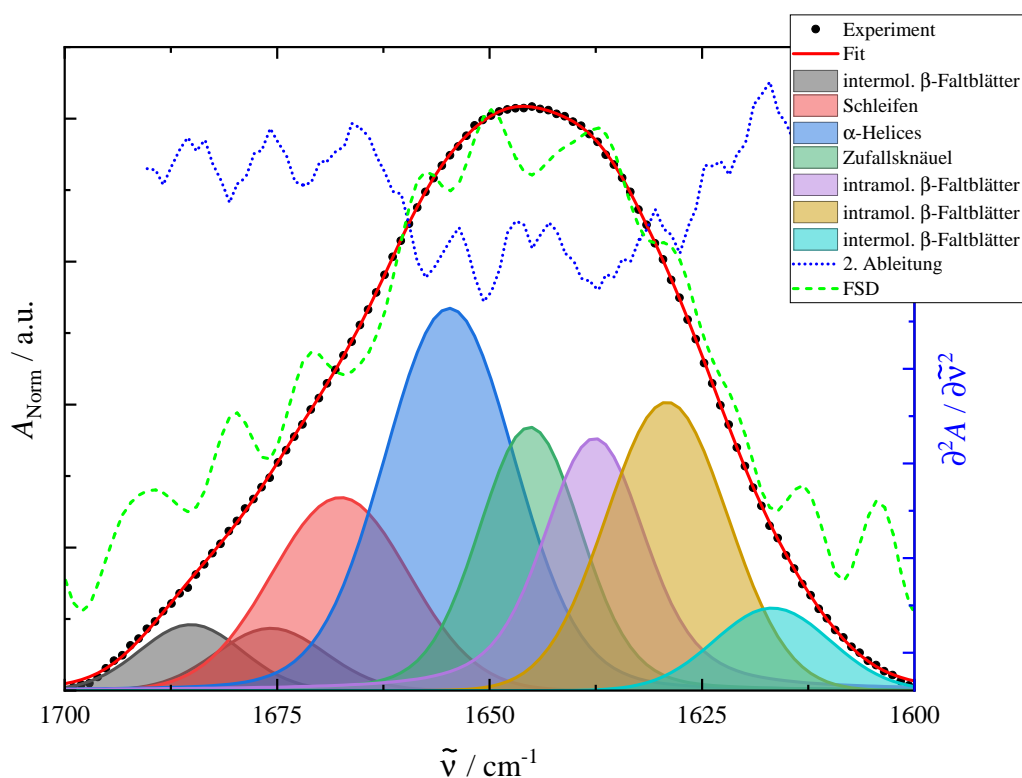
**Abbildung 6.24** – Druckabhängige Änderung der Sekundärstruktur von  $\alpha/\beta$ -Tubulin. **a)** Druckabhängige Selbstentfaltungsspektren der flächennormierten Amide-I-Bande von  $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von 25 °C. Subbanden der einzelnen Sekundärstrukturelemente können bei vorhandenen Maxima gefunden werden. **b)** 2. Ableitung der flächennormierten Amide-I-Bande von  $\alpha/\beta$ -Tubulin. Die Anzahl und die Lage der einzelnen Subbanden der Sekundärstrukturelemente stimmt mit der Lage der vorhandenen Minima überein.

der Amide-I-Bande identifizieren. Abbildung 6.25 zeigt sowohl die experimentell bestimmte Amide-I-Bande als auch die zur Subbandenanalyse benötigten Spektren der 2. Ableitung und FOURIER-Selbstentfaltung zum besseren Vergleich miteinander.

Bei dieser gemeinsamen Auftragung der FSD-Spektren und der Spektren der 2. Ableitung lässt sich deutlich das gegenläufige Verhalten der auftretenden Maxima im FSD-Spektrum und den Minima im Spektrum der 2. Ableitung erkennen. Die acht aus der Subbandenanalyse resultierenden Subbanden, die im Superpositionsprinzip an die experimentell bestimmte Amide-I-Bande angepasst wurden, sind ebenfalls in Abbildung 6.25 eingezeichnet.

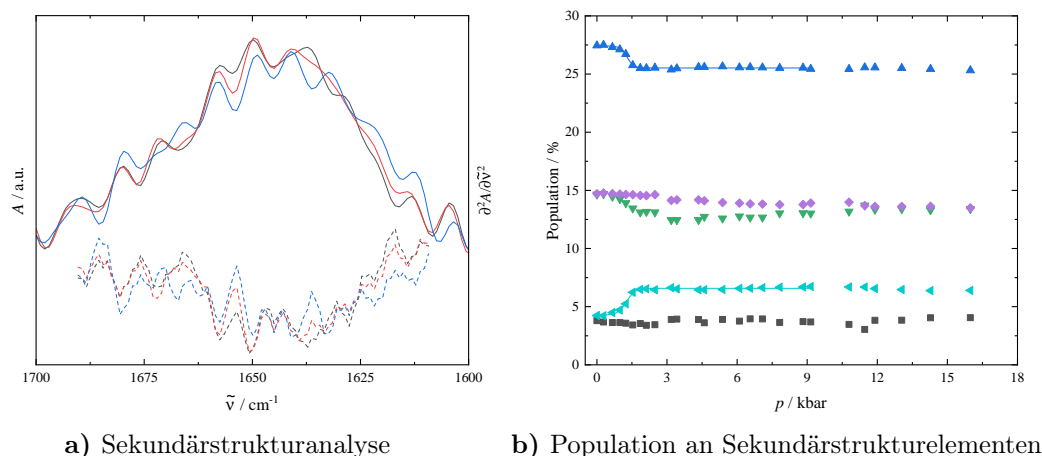
In Abbildung 6.26a sind beispielhaft die gebildeten FSD-Spektren den Spektren der 2. Ableitung der Amide-I-Bande bei spezifischen Drücken gegenübergestellt, wodurch die Bestimmung bezüglich der Lage und Anzahl der unter der Amide-I-Bande sich befindenden Subbanden besser verdeutlicht werden soll. Mit steigendem Druck ist auch hier wiederum eine geringfügige Abnahme  $\alpha$ -helikaler Strukturen, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, zu erkennen.

Nach erfolgreicher Subbandenanalyse inklusive der dazugehörigen Bandenanpas-



**Abbildung 6.25** – Experimentell bestimmte Amid-I'-Bande von  $\alpha/\beta$ -Tubulin ( $\bullet$ ) bei einem Druck von 1 bar und einer Temperatur von 25 °C in der Diamantstempelzelle sowie die durch Subbanden gebildete Funktionsanpassung ( $-$ ). Bestimmung der Subbanden erfolgte durch Bildung des FSD-Spektrums ( $- -$ ) und der 2. Ableitung ( $\cdot\cdot\cdot$ ).

sung der einzelnen Subbanden an die Amid-I'-Bande kann der prozentuale Anteil der einzelnen Sekundärstrukturelemente in Abhängigkeit des Drucks ermittelt werden, der in Abbildung 6.26b dargestellt ist. Hierbei lässt sich erkennen, dass die hauptsächlich betroffenen Sekundärstrukturelemente von  $\alpha/\beta$ -Tubulin  $\alpha$ -Helices, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter, mit Absorptionsbanden bei  $\sim 1636 \text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1628 \text{ cm}^{-1}$  und intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter, die bei  $\sim 1684 \text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1615 \text{ cm}^{-1}$  aufgrund einer Aggregation absorbieren, sind. Die Kristallstruktur des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers weist einen Anteil von 39 % an  $\alpha$ -Helices bzw. 13 % an  $\beta$ -Faltblätter auf.<sup>[242]</sup> Der mittels FTIR-Spektroskopie bestimmte Anteil an  $\alpha$ -helikaler Strukturen liegt bei  $\sim 28 \%$ , während der Anteil an  $\beta$ -Faltblättern höher ist im Vergleich zu jenem, der in der Kristall-



**Abbildung 6.26** – Druckabhängige FTIR-Daten von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung. **a)** FSD-Spektrum der Amid-I-Bande von  $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 1 bar (—), bei dem Dissoziationsdruck  $p_m$  (---) und bei einem Druck von 16 kbar (· · ·), sowie die dazugehörigen 2. Ableitungen, dargestellt als gestrichelte Linien in den entsprechenden Farben. **b)** Druckabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von  $\alpha/\beta$ -Tubulin. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (6.3). ■ intermolekulare  $\beta$ -Faltblatt ( $1684 \text{ cm}^{-1}$ ), ▲  $\alpha$ -Helices ( $1654 \text{ cm}^{-1}$ ), ▼ Zufallsknäuel ( $1644 \text{ cm}^{-1}$ ), ◆ intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1634 \text{ cm}^{-1}$ ), ◀ intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1615 \text{ cm}^{-1}$ ).

struktur beobachtet wurde. Möglicherweise ist dieser Sachstand auf einen geringfügigen Unterschied in den Absorptionskoeffizienten der verschiedenen Sekundärstrukturelemente zurückzuführen, was aber in dieser Studie weniger relevant ist, da ausschließlich relative Änderungen der Anteile an Sekundärstrukturelementen betrachtet werden. Mit steigendem Druck nimmt der Anteil  $\alpha$ -helikaler Strukturen sowie der Anteil ungeordneter Strukturen, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1644 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, geringfügig ab, während der Anteil an intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1682 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, keine druckabhängigen Änderungen aufweist.

In dem Druckbereich zwischen 1 bis 800 bar sind keine signifikanten Veränderungen in den Anteilen der Sekundärstrukturelemente zu erkennen. Bei weiter ansteigendem Druck sind nur geringfügige Änderungen des Anteils sekundärer Strukturelemente zu beobachten. So sinkt der Anteil an  $\alpha$ -helikalen und ungeordneten Strukturen um  $\sim -3\%$ , wohingegen der Anteil an  $\beta$ -Faltblättern geringfügig, um  $\sim 3\%$ , während der druckinduzierten Dissoziation des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers zu-

nimmt, was möglicherweise lediglich auf einen Konformationsdrift zurückzuführen ist. Unter der Annahme, dass die Konformationsänderung auf der Dissoziation des Heterodimers beruht, kann mithilfe einer abgewandelten Boltzmann-Funktion (Gleichung 6.3) eine Kurvenanpassung erfolgen, wodurch ein Dissoziationsdruck  $p_D$  von  $\sim 1300$  bar und eine Volumenänderung  $\Delta V_D$  von  $-122 \text{ mL mol}^{-1}$  bestimmt werden kann. Die bestimmten thermodynamischen Größen stimmen, im Rahmen des experimentellen Fehlers, gut mit den mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelten Werten überein (vgl. Tabell 6.3). Im Allgemeinen können als Mechanismus für die druckinduzierte Entfaltung und Dissoziation von Proteinen die Freisetzung von Hohlräumen an den Kontaktflächen der Untereinheiten, die Abschwächung hydrophober Wechselwirkungen und die elektrostriktiven Effekte neu exponierter und hydratisierter Reste genannt werden.<sup>[205]</sup> Aufgrund der Tatsache, dass die Selbstassemblierung von Tubulin zu Mikrotubuli weitgehend entropiegetrieben ist, spielen hydrophobe Effekte eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Mikrotubuli, die bei höheren Drücken abgeschwächt werden sollten.<sup>[407]</sup>

## 6.3.2 Temperaturinduzierte Dissoziation des $\alpha/\beta$ -Tubulin

### Heterodimers

Neben der Untersuchung der Druckstabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin beinhaltet ein weiterer Teil dieser Studie die Untersuchung der Thermostabilität des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers sowie die Untersuchung des Einflusses von Cosolventien und Crowdern auf die temperatur-induzierte Dissoziation des Dimers. Zur biophysikalischen Untersuchung wurden sowohl spektroskopische Methoden, wie die der FTIR- und Fluoreszenzspektroskopie, inklusive der statischen Fluoreszenzanisotropie, als auch die kalorimetrischen Methoden der Differentialthermoanalyse und der Druck-Perturbations-Kalorimetrie, verwendet, deren Ergebnisse in den folgenden Abschnitten präsentiert werden.

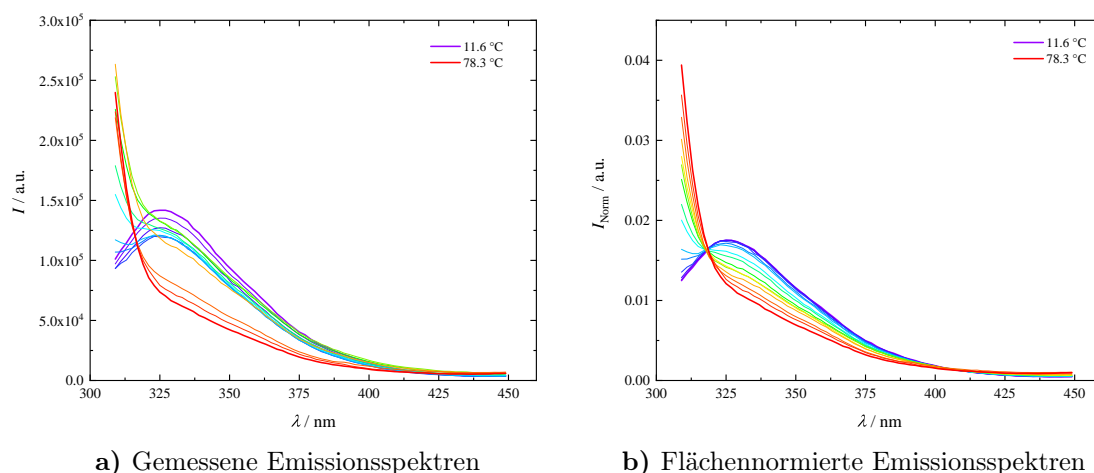
#### 6.3.2.1 Fluoreszenzspektroskopie

##### Thermische Dissoziation von $\alpha/\beta$ -Tubulin

Zur Untersuchung des Dissoziationsverhaltens des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305 bis 450 nm über einen Temperaturbereich von 10 bis 85 °C bei Atmosphärendruck aufgenommen, wobei zur Detektion der intrinsischen Tryptophanemission eine Anregung bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm erfolgte.

Abbildung 6.27a zeigt die detektierten Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung bei einem Druck von 1 bar. Hierbei lässt sich erkennen, dass mit steigender Temperatur sowohl die Fluoreszenzintensität abnimmt als auch die Emissionsbande ins Rötliche, hin zu größeren Wellenlängen, verschoben wird, was auf die Exposition der Tryptophanreste zum umgebenden Wasser zurückzuführen ist. Da bei den temperaturabhängigen Messungen Ultra-Mikro-Küvetten verwendet wurden, ist in den aufgenommenen Emissionsspektren der Peak des Anregungslichts ersichtlich, der allerdings nicht die weitere Auswertung stört.

Mithilfe von Gleichung (6.1) erfolgte eine Flächennormierung der einzelnen Emissionsspektren, die in Abbildung 6.27b abgebildet sind und mit steigender Temperatur die Intensitätsabnahme sowie die Rotverschiebung besser veranschaulichen.

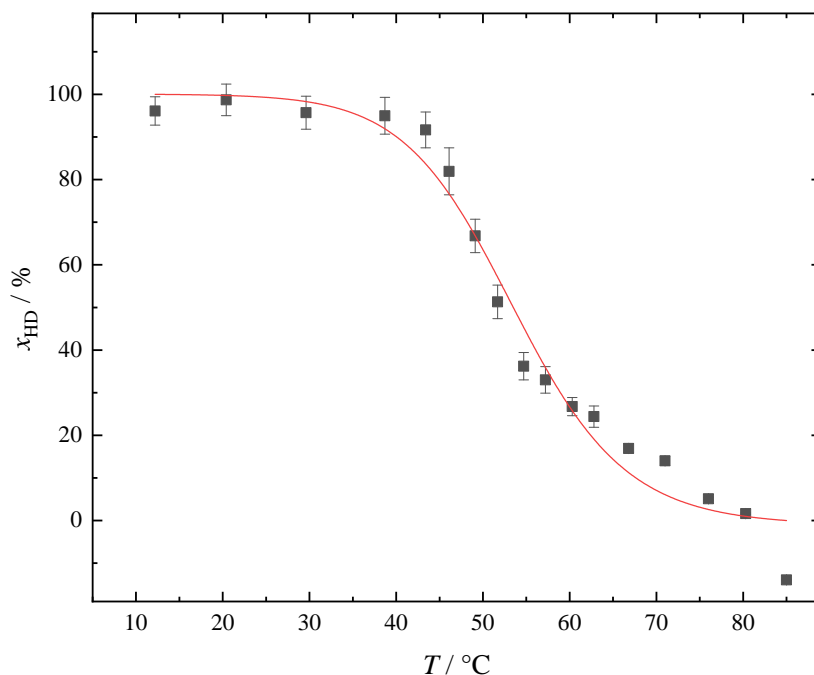


**Abbildung 6.27** – Gemessene (a) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierte (b) Emissionsspektren von  $5\ \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in einem Temperaturbereich von  $10\text{--}80\text{ }^\circ\text{C}$  bei einem Druck von 1 bar. Mit steigender Temperatur ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Temperaturgradienten.

Das Emissionsmaximum von nativen  $\alpha/\beta$ -Tubulin liegt bei einer Wellenlänge von  $325\ \text{nm}$ , bei welcher die größte temperaturabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität zu beobachten ist. Ab einer Temperatur von  $\sim 60\text{ }^\circ\text{C}$  zeigen die flächennormierten Emissionsspektren von  $\alpha/\beta$ -Tubulin einen fast identischen Verlauf und überlagern sich, was womöglich den Abschluss der Dissoziation anzeigt.

Aus den auf die Fläche normierten Emissionsintensitäten bei dem Emissionsmaximum von  $325\ \text{nm}$  wurde mithilfe von Gleichung (6.5) der Anteil assoziierter Heterodimere (HD)  $x_{\text{HD}}$  berechnet, der in Abbildung 6.28 als Funktion der Temperatur abgebildet ist. Bis zu einer Temperatur von  $\sim 40\text{ }^\circ\text{C}$  ist ein Plateau, welches den nativen Zustand von  $\alpha/\beta$ -Tubulin widerspiegelt, zu erkennen und somit keine signifikante Änderung des Anteils assoziierter Heterodimere. Im Temperaturbereich von  $40$  bis  $60\text{ }^\circ\text{C}$  sinkt der Anteil assoziierter Heterodimere, was auf den Dissoziationsprozess des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers zurückzuführen ist. Die Steigung am Wendepunkt, der Dissoziationstemperatur  $T_{\text{D}}$ , entspricht der VAN'T HOFFschen Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{\text{vH}}$  während des Dissoziationsprozesses.

Durch eine Kurvenanpassung der Gleichung (6.4) an die Dissoziationskurve ergeben sich Werte für eine Dissoziationstemperatur von  $T_{\text{D}} = 53.6 \pm 1.0\text{ }^\circ\text{C}$  und



**Abbildung 6.28** – Druckabhängige Dissoziationskurve von  $5\ \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von  $25\ ^\circ\text{C}$ . Aufgetragen ist der mithilfe von Gleichung (6.5) gebildete Anteil assoziierter Heterodimere (HD)  $x_{\text{HD}}$  gegen die jeweilige Temperatur. Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (6.4).

eine VAN'T HOFFsche Umwandlungsenthalpie für die Dissoziation von  $\Delta H_{\text{vH}} = 138 \pm 40\ \text{kJ mol}^{-1}$ . Mithilfe der ermittelten Dissoziationstemperatur sowie der VAN'T HOFFschen Umwandlungsenthalpie lässt sich die Entropieänderung während der Dissoziation  $\Delta S_{\text{D}}(T_{\text{D}})$  von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung bei der Dissoziationstemperatur zu  $422 \pm 122\ \text{J mol}^{-1}\ \text{K}^{-1}$  (Tabelle 6.5) mittels folgender Gleichung bestimmen:<sup>[42,234]</sup>

$$\Delta S_{\text{D}}^{\circ}(T_{\text{D}}) = \frac{\Delta H_{\text{vH}}^{\circ}(T_{\text{D}})}{T_{\text{D}}} \quad (6.19)$$

Unter der Annahme, dass die Wärmekapazitätsänderung während der Dissoziation konstant bleibt,  $\Delta C_{\text{p}}^{\circ} = 0$ , bleiben sowohl die Enthalpie- als auch die Entropieänderung während der Dissoziation für jede beliebige Temperatur gleich und es ergibt sich für die Temperaturabhängigkeit der Standard-Entfaltung-Gibbs-Energie folgende Gleichung:<sup>[234]</sup>



$$\begin{aligned}\Delta G_D(T) &= \Delta G_D(T_D) + \left(\frac{\partial \Delta G_D}{\partial T}\right) \cdot (T - T_D) \\ &= -\Delta S_D(T_D) \cdot (T - T_D)\end{aligned}\quad (6.20)$$

Die Standard-Entfaltung-Gibbs-Energie von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung bei einer Temperatur von 25 °C kann so zu  $\Delta G_D^\circ = 12.1 \pm 3.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  bestimmt werden. Die ermittelten thermodynamischen Größen sind in Tabelle 6.5 aufgelistet.

Zur Ableitung der thermodynamischen Parameter wurde eine einfache Zwei-Zustands-Analyse verwendet, die auf der vollständigen Reversibilität des Dissoziationsprozesses beruht. Während alle druckabhängigen Studien vollständig reversibel waren, war der temperaturabhängige Dissoziationsprozess nur bei Erreichen der höchsten Temperaturen teilweise reversibel, weshalb einige Studien zeigten, dass bei der temperaturabhängigen Dissoziation besser von dem einfachen Zwei-Zustands-Modell abgewichen werden sollte.<sup>[263,408]</sup> Daher müssen die bestimmten temperaturabhängigen thermodynamischen Parameter mit gewisser Vorsicht betrachtet werden. Allerdings ist dies kein großer Nachteil für diese Studie, da das Interesse im Wesentlichen den relativen Änderungen der thermodynamischen Parameter durch die Zugabe von Cosolventien und Crowdern gewidmet ist.

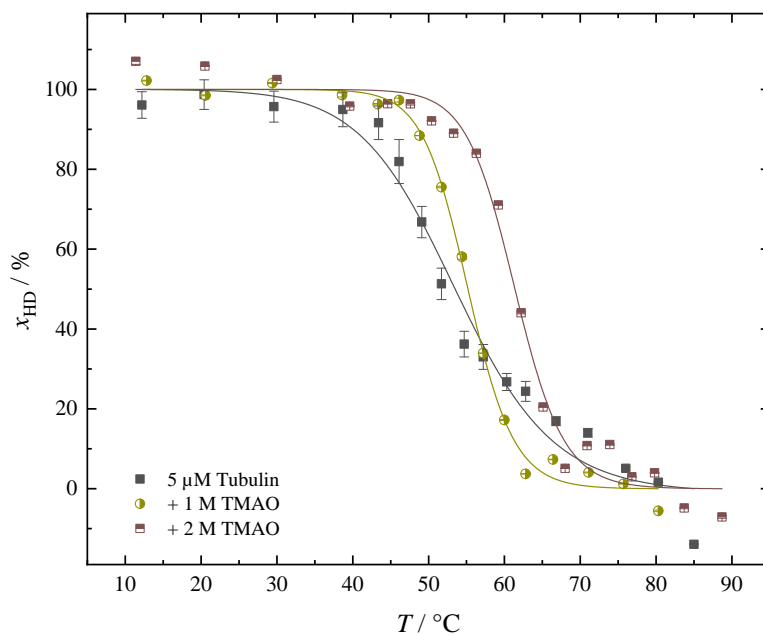
### **Einfluss von Cosolventien und Crowdern**

Die thermische Dissoziation von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin wurde ebenfalls in Anwesenheit von verschiedenen Cosolventien, wie beispielsweise dem natürlichen Osmolyten TMAO oder dem Stoffwechselprodukt Harnstoff, fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Hierzu wurden Emissionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 305 bis 450 nm über einen Temperaturbereich von 10 bis 85 °C bei Atmosphärendruck aufgenommen, wobei zur Anregung der Tryptophanemission eine Wellenlänge von  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$  verwendet wurde.

Nach Aufnahme der Emissionsspektren bei verschiedenen Temperaturen erfolgte mithilfe von Gleichung (6.1) eine Flächennormierung der einzelnen Emissionsspektren. Da die detektierten und auf die Fläche normierten Emissionsspektren von  $\alpha/\beta$ -

**Tabelle 6.5** – Thermodynamische Parameter der thermischen Dissoziation des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers in Anwesenheit verschiedener Cosolventen und makromolekularen Crowdern bei einem Druck von 1 bar. Aufgelistet sind die Dissoziationstemperaturen  $T_D$ , Änderungen der VAN’T HOFFSchen Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{vH}^\circ$ , der Entropie  $\Delta S_D^\circ$  und der Standard-Entfaltungsgibbs-Energie  $\Delta G_D^\circ$ , die mithilfe von Gleichung (6.4) aus den fluoreszenzspektroskopischen Daten bestimmt wurden.

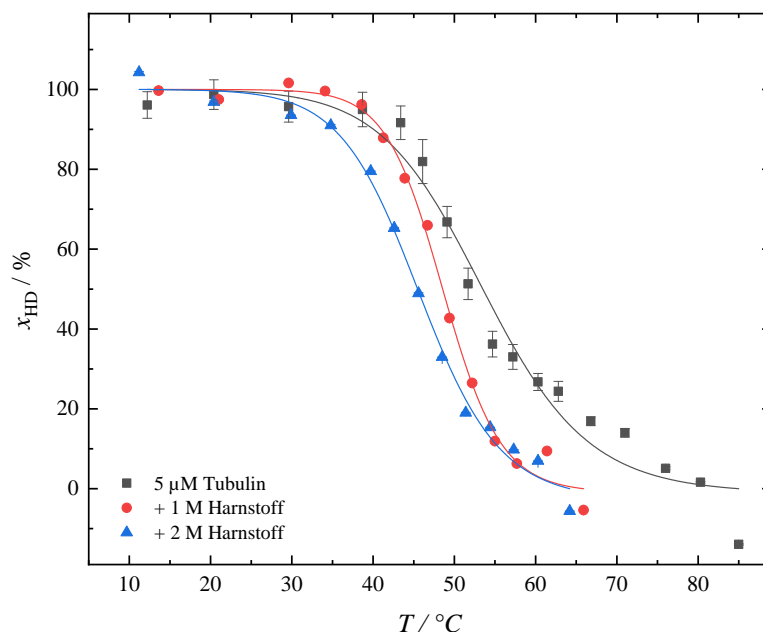
Probe	$T_D / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{vH}^\circ(T_D) / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_D^\circ(T_D) / \text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	$\Delta G_D^\circ(298 \text{ K}) / \text{kJ mol}^{-1}$
5 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin	53.6 $\pm$ 1.0	138 $\pm$ 40	422 $\pm$ 122	12.1 $\pm$ 3.5
+ 1 M Harnstoff	48.6 $\pm$ 0.4	243 $\pm$ 26	755 $\pm$ 81	17.8 $\pm$ 1.9
+ 2 M Harnstoff	45.7 $\pm$ 0.5	171 $\pm$ 16	536 $\pm$ 50	11.1 $\pm$ 1.1
+ 1 M TMAO	55.2 $\pm$ 0.4	296 $\pm$ 35	901 $\pm$ 107	27.2 $\pm$ 3.2
+ 2 M TMAO	61.4 $\pm$ 0.5	288 $\pm$ 40	861 $\pm$ 120	31.3 $\pm$ 4.4
+ 1 M TMAO + 1 M Harnstoff	55.2 $\pm$ 0.8	176 $\pm$ 26	536 $\pm$ 79	16.2 $\pm$ 2.4
+ 1 M TMAO + 2 M Harnstoff	49.6 $\pm$ 0.7	265 $\pm$ 49	821 $\pm$ 152	20.2 $\pm$ 3.8
+ 2 M TMAO + 1 M Harnstoff	61.3 $\pm$ 0.6	229 $\pm$ 28	685 $\pm$ 84	24.9 $\pm$ 3.1
+ 5 Gew.-% Ficoll <sup>®</sup> PM 70	54.2 $\pm$ 1.0	114 $\pm$ 15	348 $\pm$ 46	10.2 $\pm$ 1.4
+ 10 Gew.-% Ficoll <sup>®</sup> PM 70	56.9 $\pm$ 0.5	112 $\pm$ 6	339 $\pm$ 18	10.8 $\pm$ 0.6
+ 20 Gew.-% Ficoll <sup>®</sup> PM 70	56.2 $\pm$ 0.6	187 $\pm$ 20	568 $\pm$ 61	17.7 $\pm$ 1.9
+ 30 Gew.-% Ficoll <sup>®</sup> PM 70	53.6 $\pm$ 0.4	153 $\pm$ 10	468 $\pm$ 31	13.4 $\pm$ 0.9
+ 5 Gew.-% Saccharose	63.7 $\pm$ 7.1	113 $\pm$ 80	335 $\pm$ 238	13.0 $\pm$ 9.5
+ 10 Gew.-% Saccharose	48.4 $\pm$ 3.7	114 $\pm$ 56	355 $\pm$ 174	8.3 $\pm$ 4.3
+ 20 Gew.-% Saccharose	58.0 $\pm$ 1.1	164 $\pm$ 30	495 $\pm$ 91	16.3 $\pm$ 3.0
+ 30 Gew.-% Saccharose	57.6 $\pm$ 0.4	315 $\pm$ 42	952 $\pm$ 127	31.0 $\pm$ 4.2



**Abbildung 6.29** – Temperaturabhängige Dissoziationskurve von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 1 bar in Anwesenheit von 1 und 2 M TMAO. Aufgetragen ist der mithilfe von Gleichung (6.5) gebildete Anteil assoziierter Heterodimere (HD)  $x_{\text{HD}}$  gegen die jeweilige Temperatur. Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (6.4).

Tubulin in Anwesenheit von den verwendeten Cosolventien keine signifikanten Abweichungen zu den zuvor gezeigten Spektren von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung (Abbildung 6.27) aufweisen, werden sie an dieser Stelle nicht explizit dargestellt.

Mittels Gleichung (6.5) wurde aus den flächennormierten Emissionsintensitäten bei der Wellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 325 \text{ nm}$  der Anteil assoziierter Heterodimere  $x_{\text{HD}}$  berechnet und in Abbildung 6.29 für  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 1 und 2 M TMAO gegen die jeweilige Temperatur aufgetragen. Es lässt sich deutlich erkennen, dass mit steigender TMAO-Konzentration das Plateau des nativen Zustandes ausgedehnt wird, was einer steigenden Thermostabilität der assoziierten Dimere entspricht. Demnach beginnt mit steigender TMAO-Konzentration erst bei höheren Temperaturen der jeweilige Dissoziationsprozess von  $\alpha/\beta$ -Tubulin. Die Dissoziations-temperatur von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von TMAO steigt aufgrund des ausgeschlossenen Volumeneffekts um  $\sim 4^\circ\text{C}$  pro 1 M TMAO (Tabelle 6.5). In Anwesenheit von 2 M TMAO steigt die Dissoziations-temperatur von  $53.6 \pm 1.0^\circ\text{C}$  auf  $61.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$  und die Standard-Gibbs-Energie bei  $25^\circ\text{C}$  verdreifacht sich fast von

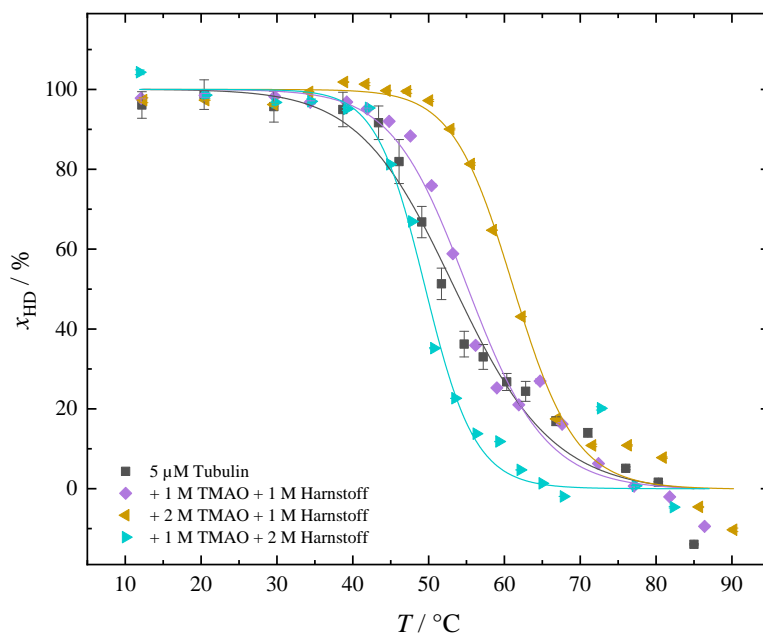


**Abbildung 6.30** – Temperaturabhängige Dissoziationskurve von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 1 bar in Anwesenheit von 1 und 2 M Harnstoff. Aufgetragen ist der mithilfe von Gleichung (6.5) gebildete Anteil assoziierter Heterodimere (HD)  $x_{\text{HD}}$  gegen die jeweilige Temperatur. Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (6.4).

$12.1 \pm 3.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  in reiner Pufferlösung auf  $31.3 \pm 4.4 \text{ kJ mol}^{-1}$  in Anwesenheit von 2 M TMAO (Tabelle 6.5).

Abbildung 6.30 zeigt die Dissoziationskurven von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung sowie in Anwesenheit von 1 und 2 M Harnstoff. Aufgetragen ist der mittels Gleichung (6.5) aus den flächennormierten Emissionsintensitäten bei der Wellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 325 \text{ nm}$  gebildete Anteil assoziierter Heterodimere als Funktion der Temperatur mit dem für die Dissoziation typischen sigmoidalen Verlauf. Mit steigender Harnstoff-Konzentration verkürzt sich das Plateau des nativen Zustandes, d.h., dass bereits bei geringeren Temperaturen der Dissoziationsprozess von  $\alpha/\beta$ -Tubulin eingeleitet wird.

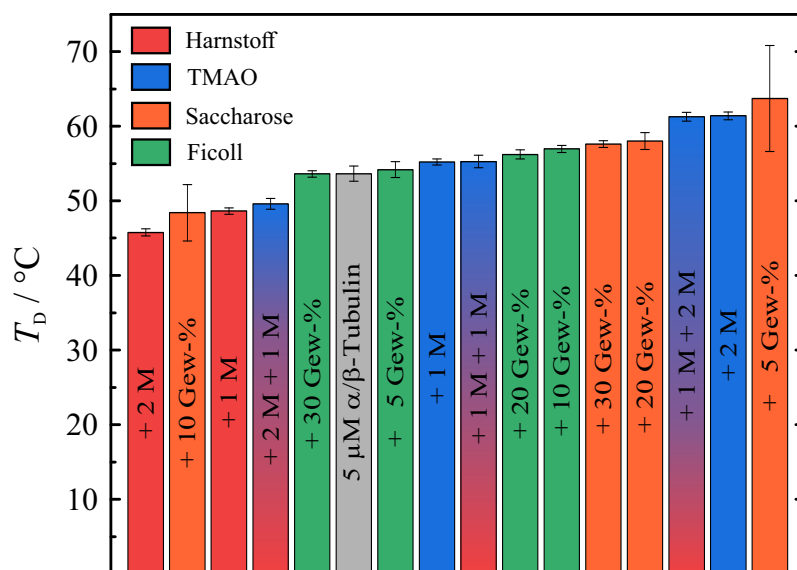
Mittels einer Kurvenanpassung der Gleichung (6.4) an die Dissoziationskurven kann sowohl die Dissoziationstemperatur  $T_{\text{D}}$  als auch die VAN'T HOFFSche Umwandlungsenthalpie bestimmt werden. Nicht nur der Dissoziationsdruck  $p_{\text{D}}$ , sondern auch die Dissoziationstemperatur  $T_{\text{D}}$  wird in Anwesenheit von Harnstoff signifikant reduziert. Im Fall der thermischen Dissoziation verringert sich die Dissoziationstem-



**Abbildung 6.31** – Temperaturabhängige Dissoziationskurve von  $5\ \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von verschiedenen TMAO/Harnstoff-Mischungen bei Atmosphärendruck. Aufgetragen ist der mithilfe von Gleichung (6.5) gebildete Anteil assoziierter Heterodimere (HD)  $x_{\text{HD}}$  gegen die jeweilige Temperatur. Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (6.4).

peratur um  $\sim 4^\circ\text{C}$  pro 1 M Harnstoff (Abbildung 6.30 und Tabelle 6.5). Die Anwesenheit von Harnstoff führt zu einer Verringerung der Dissoziationstemperatur  $T_{\text{D}}$  von  $53.6 \pm 1.3^\circ\text{C}$  in reiner Pufferlösung zu  $48.6 \pm 0.4^\circ\text{C}$  in Anwesenheit von 1 M Harnstoff und weiter zu  $45.7 \pm 0.5^\circ\text{C}$  in Anwesenheit von 2 M Harnstoff. Es ist bekannt, dass sich Harnstoff im Gegensatz zu TMAO bevorzugt in der Nachbarschaft des Proteinrückgrats und der Seitenketten des Proteins anreichert und Proteine aufgrund einer direkten Wechselwirkung destabilisiert, ohne einen großen Einfluss auf die Lösungsmittelstruktur zu haben. [116,299,301]

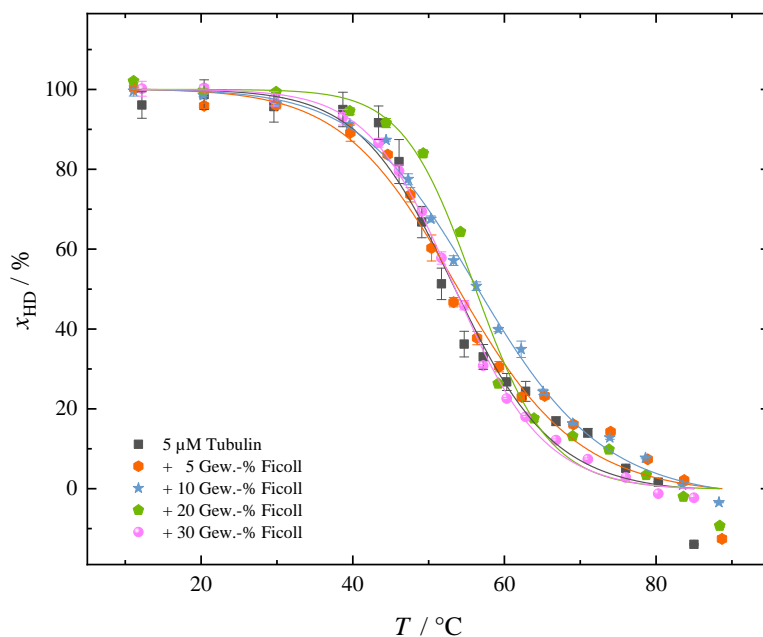
Zur Untersuchung eines kombinierten Effektes von chaotropen und kosmotropen Cosolventien auf die Thermostabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin wurden  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Lösungen in Anwesenheit von verschiedenen TMAO/Harnstoff-Mischungen (vgl. Tabelle 6.4) fluoreszenzspektroskopisch vermessen. Ähnlich wie bei den druckabhängigen Messungen ist auch hier ein entgegenwirkender Effekt dieser beiden gelösten Stoffe auf die Thermostabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin zu erkennen (Abbildung 6.31 und Abbildung 6.32). Dem destabilisierenden Effekt von 2 M Harnstoff auf die Thermo-



**Abbildung 6.32** – Spektroskopisch bestimmte Dissoziationstemperaturen  $T_D$  des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers in An- und Abwesenheit verschiedener Cosolventien und makromolekularen Crowdern bei einem Druck von 1 bar. TMAO: ■, Harnstoff: ■, Ficoll<sup>®</sup> PM 70 : ■ und Saccharose: ■. Farbverlauf der Harnstoff/TMAO-Mischungen entspricht der Zusammensetzung.

stabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin wird fast vollständig durch die Anwesenheit von 1 M TMAO entgegengewirkt. Dadurch wird ersichtlich, dass der stabilisierende Einfluss von TMAO auf die Thermostabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin größer und somit effektiver ist als der destabilisierende Einfluss von Harnstoff auf die thermische Proteinstabilität. Bei einem TMAO:Harnstoff-Mischungsverhältnis zwischen 1:1 und 1:2 kann beispielsweise die verschlechternde Wirkung von Harnstoff auf die Thermostabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin aufgehoben werden. Bei einem TMAO:Harnstoff-Gemisch von 1:1 ist die VAN'T HOFFSche Umwandlungsenthalpie, im Rahmen des experimentellen Fehlers, in etwa so groß wie die von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Abwesenheit der beiden verwendeten Cosolventien, was anhand einer in etwa gleich großen Steigung am Wendepunkt der Dissoziationskurven ersichtlich wird.

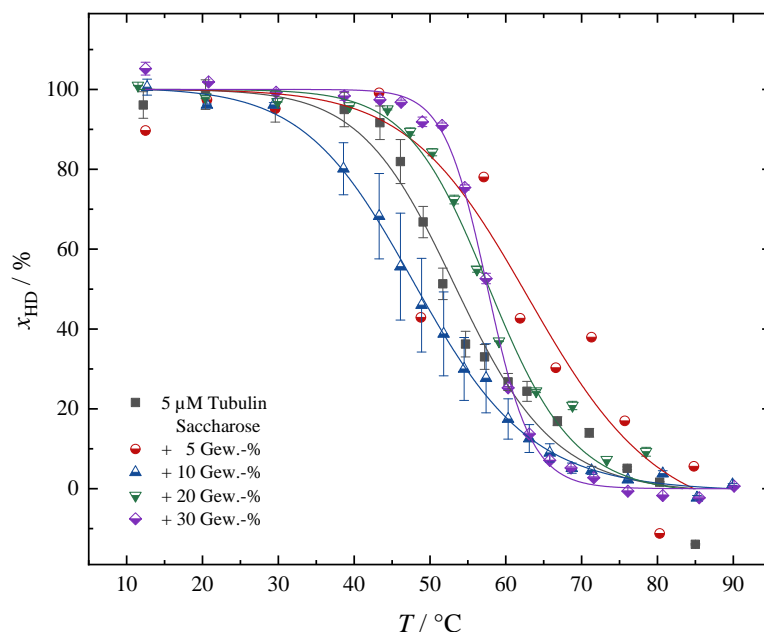
Neben der Untersuchung des Einflusses von Cosolventien auf die Thermostabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin wurde ebenfalls das zelluläre Milieu durch die Zugabe von Nano- und Makrocrowdern *in vitro* nachgestellt, um deren Einfluss auf die thermische Dissoziation zu erforschen. Abbildung 6.33 zeigt den Anteil assoziierter Heterodi-



**Abbildung 6.33** – Temperaturabhängige Dissoziationskurve von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 1 bar in Anwesenheit von 5, 10, 20 und 30 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70. Aufgetragen ist der mithilfe von Gleichung (6.5) gebildete Anteil assoziierter Heterodimere (HD)  $x_{HD}$  gegen die jeweilige Temperatur. Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (6.4).

mere als Funktion der Temperatur von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in An- und Abwesenheit von 5, 10, 20 und 30 Gew.-% Ficoll<sup>®</sup> PM 70 bei Atmosphärendruck. Ähnlich wie in den druckabhängigen Studien scheint der makromolekulare Crowder Ficoll<sup>®</sup> PM 70 keinen signifikanten Einfluss auf das Dissoziationsverhalten von  $\alpha/\beta$ -Tubulin zu nehmen. Die Dissoziationstemperaturen  $T_D$  und Änderungen der VAN'T HOFFSchen Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{vH}$  liegen, im Rahmen des jeweiligen Fehlers, im selben Größenbereich wie die Werte, die für  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung ermittelt wurden (Tabelle 6.5 und Abbildung 6.32).

Abbildung 6.34 zeigt den mittels Gleichung (6.5) aus den flächennormierten Emissionsintensitäten bei der Wellenlänge  $\lambda_{em} = 325 \text{ nm}$  gebildeten Anteil assoziierter Heterodimere von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in An- und Abwesenheit von 5, 10, 20 und 30 Gew.-% Saccharose als Funktion der Temperatur bei Atmosphärendruck. Es lässt sich deutlich erkennen, dass durch die Anwesenheit des Nanocrowders Saccharose die Thermostabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin signifikant erhöht wird, wie es bereits durch

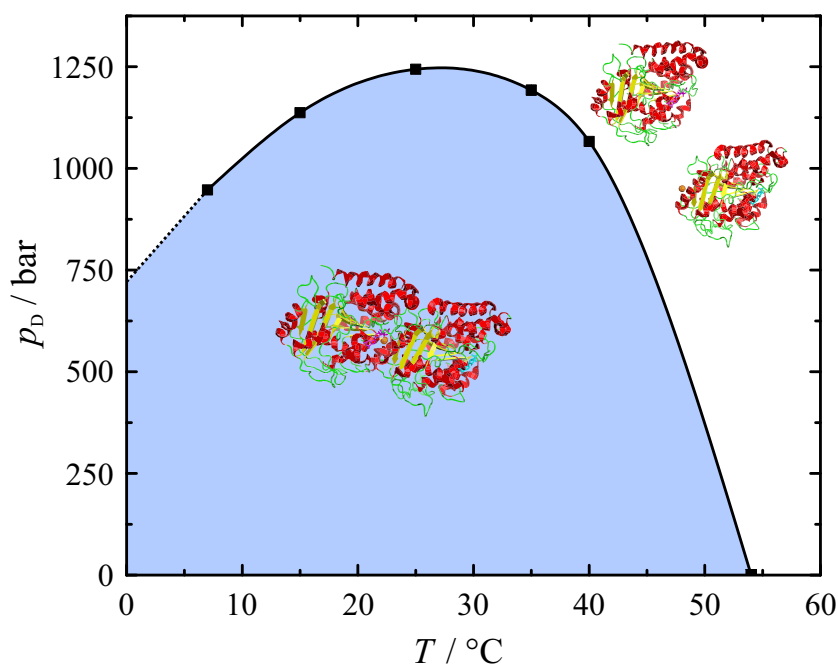


**Abbildung 6.34** – Temperaturabhängige Dissoziationskurve von  $5\ \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 1 bar in Anwesenheit von 5, 10, 20 und 30 Gew.-% Saccharose. Aufgetragen ist der mithilfe von Gleichung (6.5) gebildete Anteil assoziierter Heterodimere (HD)  $x_{\text{HD}}$  gegen die jeweilige Temperatur. Die Kurvenanpassung erfolgte mithilfe von Gleichung (6.4).

die Anwesenheit des natürlichen Osmolyten TMAO zu beobachten war. Die Dissoziationstemperatur  $T_{\text{D}}$  erhöht sich von  $53.6 \pm 1.0\ ^\circ\text{C}$  in reiner Pufferlösung auf  $58.0 \pm 1.1\ ^\circ\text{C}$  in Anwesenheit von 20 Gew.-% Saccharose, während die Änderung der VAN'T HOFF'schen Umwandlungsenthalpie ähnlich der von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung ist. Dies deutet darauf hin, dass ein destabilisierender enthalpischer Effekt aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Nanocrowder weitgehend nicht vorhanden ist.

In Abbildung 6.35 ist ein Druck-Temperatur-Phasendiagramm für  $5\ \mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung dargestellt, das aus den druck- und temperaturabhängigen fluoreszenzspektroskopischen Messungen bestimmt wurde. In dem Temperaturbereich zwischen  $5\ ^\circ\text{C}$  und  $25\ ^\circ\text{C}$  dissoziiert das  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimer bei Drücken zwischen 950 bar und 1250 bar. Der Verlauf des Druck-Temperatur-Phasendiagramms des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers ähnelt dem des Übergangs vom gefalteten in den entfalteten Zustand von monomeren Proteinen. Allerdings beschreibt das hier gezeigte Druck-Temperatur-Phasendiagramm die Dissoziation des



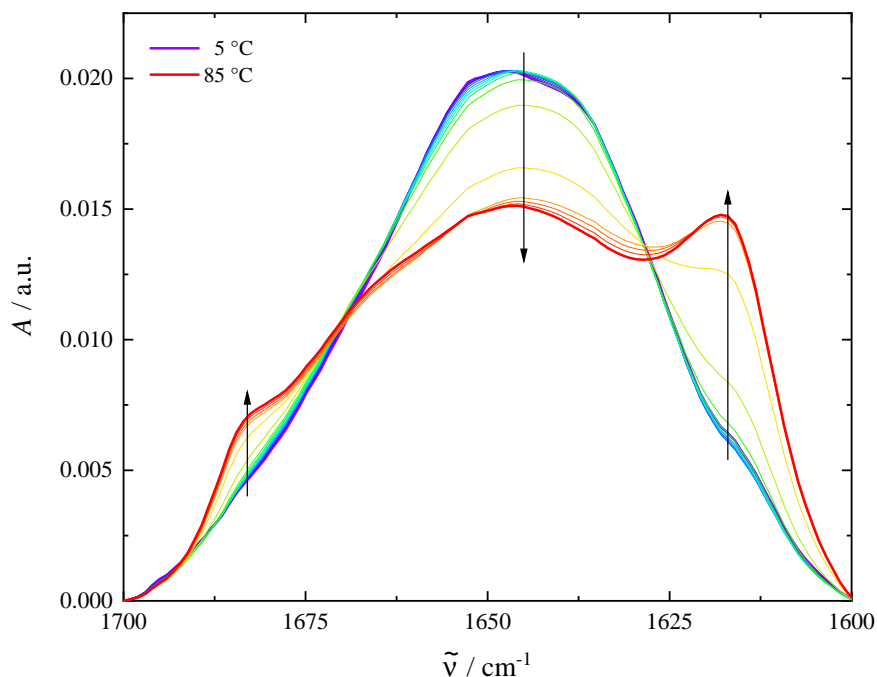


**Abbildung 6.35** – Druck-Temperatur-Phasendiagramm von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung. Zur optischen Orientierung dient die durchgezogene Linie. Das 3D-Bändermodell von  $\alpha/\beta$ -Tubulin (PDB-Struktur: 1jff<sup>[242]</sup>) wurde mithilfe der Computersoftware UCSF CHIMERA v.1.13.1 erstellt.<sup>[214]</sup>

$\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers und den damit einhergehenden Konformationsänderungen, jedoch nicht eine vollständige Entfaltung des Proteins.<sup>[35,60,328]</sup> Druck-induzierte Volumenänderungen während der Dissoziation  $\Delta V_D$  bei den unterschiedlich vermessenen Temperaturen folgen dem Prinzip von LE CHÂTELIER und besitzen ein negatives Vorzeichen. Dabei reichen die bestimmten Volumenänderungen von  $-178$  bis  $-118 \text{ mL mol}^{-1}$ , was in etwa 6–10 Wassermolekülen entspricht.

### 6.3.2.2 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie

Neben temperaturabhängigen fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden ebenfalls FTIR-spektroskopische Messungen zur Untersuchung des Dissoziationsprozesses von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Abhängigkeit der Temperatur durchgeführt. Wie in Abschnitt 6.2.5 beschrieben, wurden die aufgenommenen FTIR-Spektren hintergrundkorrigiert, indem das jeweils dazugehörige Pufferspektrum vom Probenspektrum subtrahiert wurde. Es erfolgte eine Glättung, sowie mithilfe von Gleichung (6.7) eine

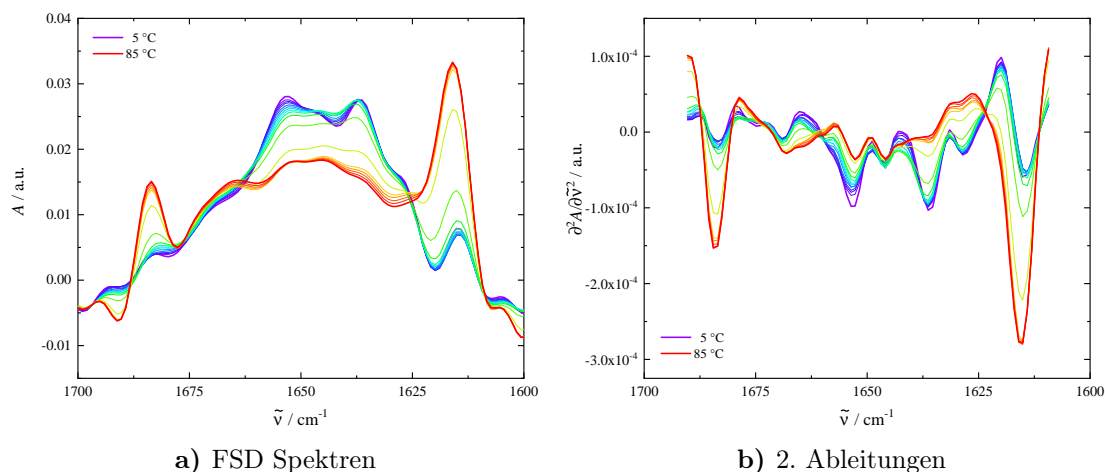


**Abbildung 6.36** – Temperaturabhängigkeit der flächennormierten Amid-I'-Bande von  $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 1 bar. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Temperaturgradienten und damit dem Übergang von dem nativen in den dissoziierten Zustand.

Flächennormierung im Bereich der Amid-I'-Bande ( $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ ).

Abbildung 6.36 zeigt exemplarisch die auf diese Art und Weise prozessierten FTIR-Spektren von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung in einem Temperaturbereich von 5 bis  $85\text{ °C}$  bei einem Druck von 1 bar. Es lässt sich erkennen, dass mit steigender Temperatur die Absorption im Bereich  $\alpha$ -helikaler Strukturen, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1654\text{ cm}^{-1}$  absorbieren, abnimmt, während sie im Bereich der intermolekularen  $\beta$ -Faltblätter, mit Absorptionsbanden bei  $\sim 1615\text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1682\text{ cm}^{-1}$ , zunimmt.

Im Anschluss an die Prozessierung der FTIR-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande erfolgte wie zuvor eine Subbandenanalyse bezüglich Lage und Anzahl der unter der Amid-I'-Bande sich befindenden Subbanden, die spektral nicht aufgelöst werden können, um Informationen über die Zusammensetzung der Sekundärstruktur und deren temperaturabhängigen Entwicklung zu erhalten. Hierbei wurden mittels einer FOURIER-Selbstentfaltungsfunktion die FSD-Spektren und zum anderen die 2. Ableitung der Amid-I'-Bande gebildet, die in Abbildung 6.37 für verschiedene

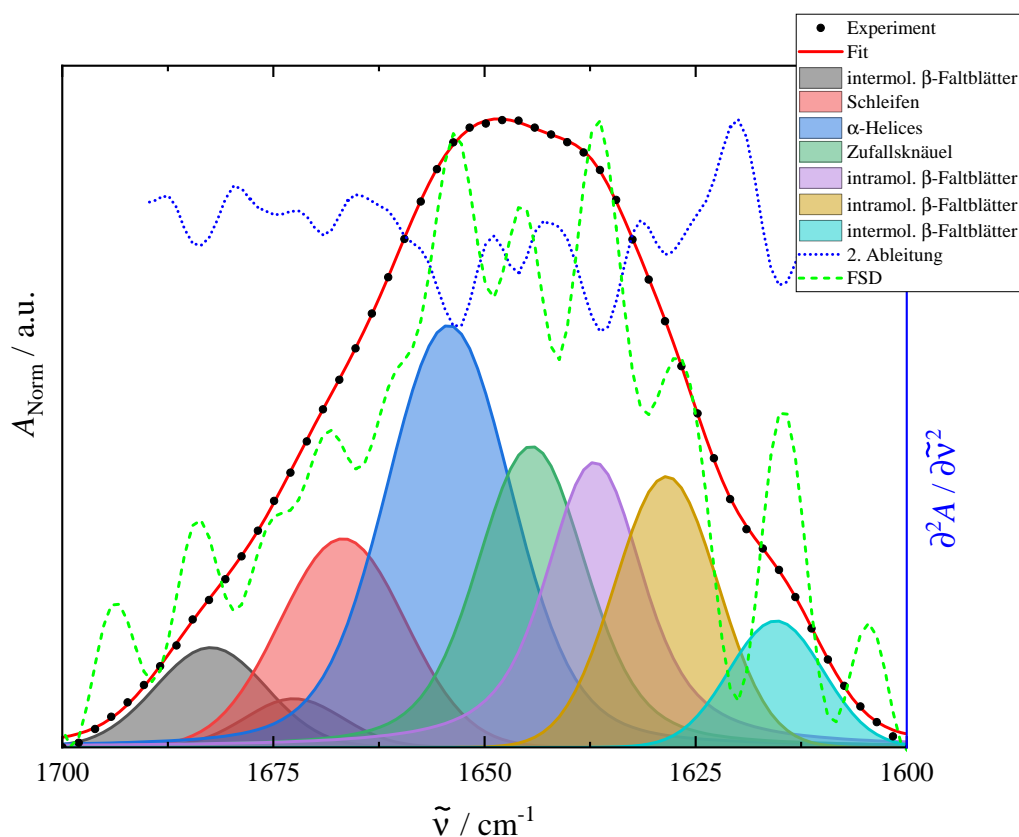


**Abbildung 6.37** – Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstruktur von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung. **a)** Temperaturabhängige Selbstentfaltungsspektren der flächennormierten Amid-I'-Bande von  $\alpha/\beta$ -Tubulin bei Atmosphärendruck. Subbanden der einzelnen Sekundärstrukturelemente können bei vorhandenen Maxima gefunden werden. **b)** 2. Ableitung der flächennormierten Amid-I'-Bande von  $\alpha/\beta$ -Tubulin. Die Anzahl und die Lage der einzelnen Subbanden der Sekundärstrukturelemente stimmt mit der Lage der vorhandenen Minima überein.

Temperaturen abgebildet sind.

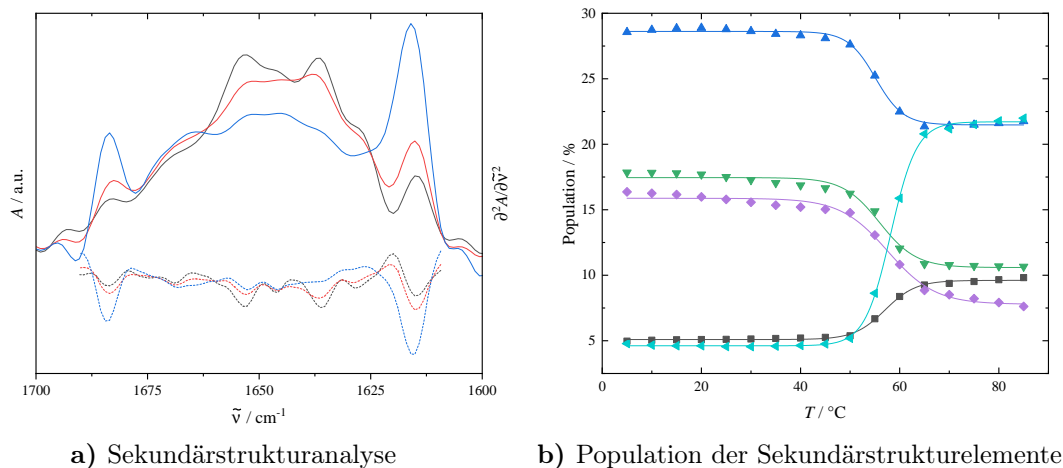
Abbildung 6.37a zeigt die temperaturabhängige Entwicklung der prozessierten FSD-Spektren im Bereich der Amid-I'-Bande von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung bei einem Druck von 1 bar, während in Abbildung 6.37b die temperaturabhängige Entwicklung der 2. Ableitung der flächennormierten Amid-I'-Bande dargestellt ist. Anhand der beiden Abbildungen lässt sich erkennen, dass der Anteil  $\alpha$ -helikaler Strukturen, die bei einer Wellenzahl von  $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, mit steigender Temperatur abnimmt, was aus der temperaturabhängigen Intensitätsabnahme im FSD-Spektrum bzw. der temperaturabhängigen Intensitätszunahme im Spektrum der 2. Ableitung hervorgeht. Des Weiteren lässt sich eine Zunahme an intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern ( $\sim 1615 \text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1682 \text{ cm}^{-1}$ ) anhand einer temperaturabhängigen Intensitätsabnahme im FSD-Spektrum bzw. einer Intensitätszunahme im Spektrum der 2. Ableitung erkennen. Durch den Vergleich der prozessierten FSD-Spektren mit den gebildeten Spektren der 2. Ableitung lässt sich die Lage und Anzahl der einzelnen Subbanden unter der Amid-I'-Bande ermitteln.

Abbildung 6.38 zeigt die experimentell bestimmte Amid-I'-Bande sowie die dazu-



**Abbildung 6.38** – Experimentell bestimmte Amid-I'-Bande von  $\alpha/\beta$ -Tubulin ( $\bullet$ ) bei Atmosphärendruck und  $5^\circ\text{C}$  sowie die durch Subbanden gebildete Funktionsanpassung ( $-$ ). Bestimmung der Subbanden erfolgte durch Bildung des FSD-Spektrums ( $--$ ) und der 2. Ableitung ( $\cdots$ ).

gehörenden Spektren der FSD und 2. Ableitung von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung bei Atmosphärendruck und einer Temperatur von  $5^\circ\text{C}$ . Anhand der Abbildung lässt sich deutlich das gegenläufige Verhalten der auftretenden Maxima im FSD-Spektrum und den auftretenden Minima im Spektrum der 2. Ableitung erkennen. Befindet sich im FSD-Spektrum ein positiver Peak und gleichzeitig an der selben Position im Spektrum der 2. Ableitung ein Minimum, so kann an dieser Position eine Subbande nachgewiesen werden. Bei dieser Subbandenanalyse wurde die Publikation von de Pereda *et al.* herangezogen, um die Lage und Anzahl der gefundenen Subbanden miteinander abgleichen zu können (vgl. Tabelle 6.1).<sup>[317]</sup> Die aufgrund der durchgeführten Subbandenanalyse resultierenden acht Subbanden wurden im Superpositionsprinzip an die experimentell bestimmte Amid-I'-Bande angepasst und



**Abbildung 6.39** – Temperaturabhängige FTIR-Daten von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung. **a)** FSD-Spektrum der Amid-I'-Bande von  $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von 5 °C (—), bei der Dissoziationstemperatur  $T_D$  (---) und bei einer Temperatur von 85 °C (---), sowie die dazugehörigen 2. Ableitungen, dargestellt als gestrichelte Linien in den entsprechenden Farben. **b)** Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstrukturelemente von  $\alpha/\beta$ -Tubulin. Linien repräsentieren die Funktionsanpassung des abgewandelten Boltzmann-Fits (6.4).  $\blacksquare$  intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1682 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\blacktriangle$   $\alpha$ -Helices ( $1654 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\blacktriangledown$  Zufallsknäuel ( $1644 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\blacklozenge$  intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1636 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\blacktriangleleft$  intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ( $1615 \text{ cm}^{-1}$ ).

sind ebenfalls in Abbildung 6.38 eingezeichnet.

In Abbildung 6.39a sind beispielhaft die FSD-Spektren den Spektren der 2. Ableitung der Amid-I'-Bande bei spezifischen Temperaturen, zum besseren Vergleich miteinander, gegenübergestellt. Mit steigender Temperatur ist sowohl eine Abnahme  $\alpha$ -helikaler Strukturen als auch eine Zunahme an intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern zu erkennen.

Anhand der durchgeführten Subbandenanalyse und der sich anschließenden Bandenanpassung der einzelnen Subbanden an die Amid-I'-Bande kann der prozentuale Anteil der einzelnen Sekundärstrukturelemente temperaturabhängig ermittelt werden, der in Abbildung 6.39b für  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung, bei einem Druck von 1 bar, als Funktion der Temperatur dargestellt ist. Es lässt sich erkennen, dass die hauptsächlich beeinflussten Sekundärstrukturelemente von  $\alpha/\beta$ -Tubulin  $\alpha$ -Helices, welche bei einer Wellenzahl von  $\sim 1654 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren, intramolekulare  $\beta$ -Faltblätter, die bei Wellenzahlen von  $\sim 1636 \text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1628 \text{ cm}^{-1}$  absorbieren,

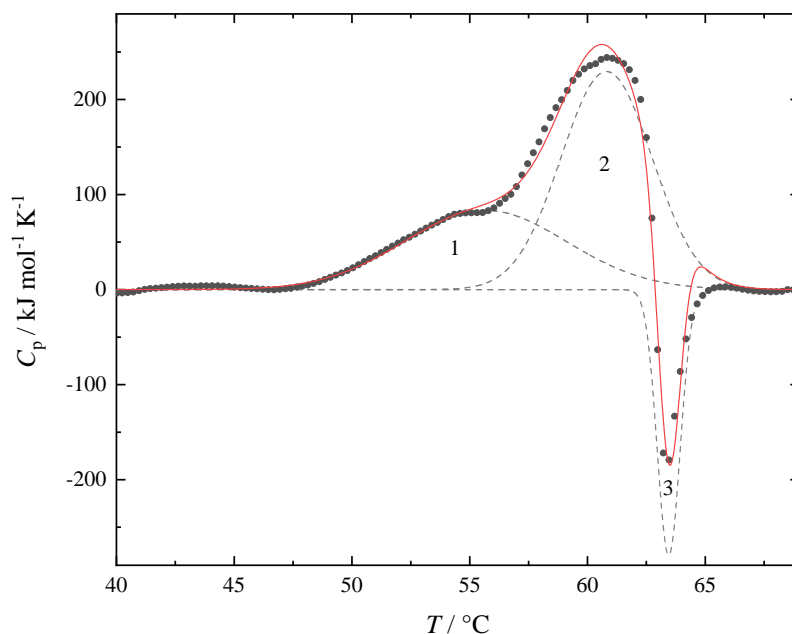
und intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter, die aufgrund einer thermischen Aggregation bei Wellenzahlen von  $\sim 1682\text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1615\text{ cm}^{-1}$  Absorptionsbanden aufzeigen, sind.

In dem Temperaturbereich von 5 bis  $45\text{ }^\circ\text{C}$  sind keine signifikanten Veränderungen in der Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente zu erkennen. Ab einer Temperatur von  $45\text{ }^\circ\text{C}$  beginnt die temperatur-induzierte Dissoziation von  $\alpha/\beta$ -Tubulin, was anhand einer Abnahme der Anteile an  $\alpha$ -helikalen Strukturen um  $\sim -7\%$ , ungeordneten Strukturen um  $\sim -7\%$  und intramolekularen  $\beta$ -Faltblättern um  $\sim -8\%$  zu erkennen ist. Während der temperatur-induzierten Dissoziation steigt der Anteil an antiparallelen intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern, welche bei Wellenzahlen von  $\sim 1682\text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1615\text{ cm}^{-1}$  absorbieren, um  $\sim 22\%$ , was auf eine an die Dissoziation angeschlossenen Aggregation des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers hindeutet.

Mittels einer abgewandelten Boltzmann-Funktion (Gleichung 6.4) erfolgt eine Kurvenanpassung an die experimentell bestimmten Daten, wobei die Dissoziationstemperatur zu  $\sim 57.7 \pm 0.2\text{ }^\circ\text{C}$  und eine apparente Änderung der VAN'T HOFFSchen-Enthalpie  $\Delta H_{\text{vH}}$  von  $316 \pm 21\text{ kJ mol}^{-1}$  bestimmt wurde. Aufgrund der Tatsache, dass der temperatur-induzierte Prozess der Dissoziation, Entfaltung und anschließenden Aggregation von Proteinen ein irreversibler Prozess ist, haben die aus der thermodynamischen Analyse erhaltenen Daten keine echte thermodynamische Grundlage, sondern können lediglich zum Vergleich mit den Ergebnissen der anderen angewandten Methoden dienen.<sup>[35,320,409]</sup>

### 6.3.2.3 Differentialthermoanalyse und Druck-Perturbations-Kalorimetrie

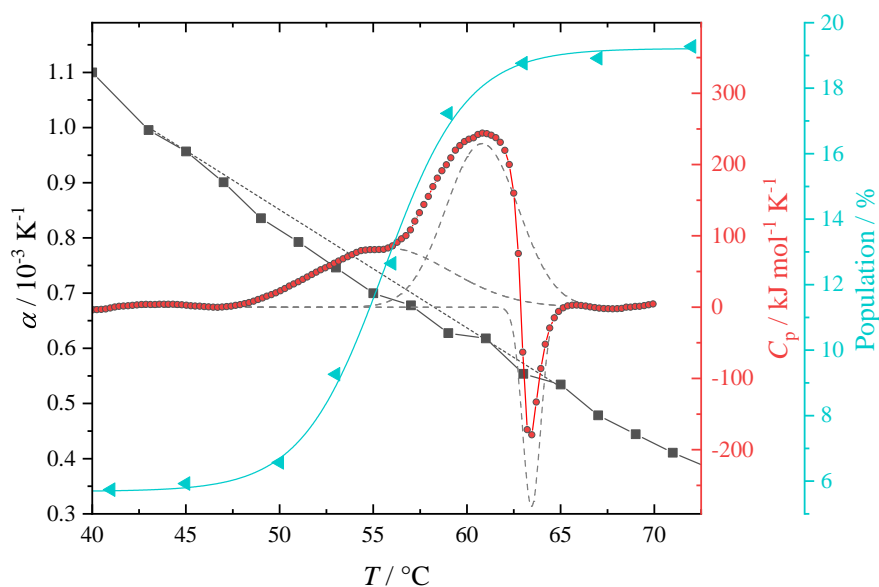
Abbildung 6.40 zeigt das DSC-Thermogramm von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung in einem Temperaturbereich von  $40$  bis  $70\text{ }^\circ\text{C}$ , das einen breiten Peak zwischen  $\sim 47\text{ }^\circ\text{C}$  und  $\sim 67\text{ }^\circ\text{C}$  aufweist.<sup>[322]</sup> Unter Anwendung einer FOURIER-Selbstentfaltung (FSD) erfolgt die Analyse der DSC-Peakform, wobei sich herausstellt, dass der Denaturierungsprozess von  $\alpha/\beta$ -Tubulin auf einem zweiphasigen Entfaltungsprozess beruht, bei dem Übergangstemperaturen bei  $55.6\text{ }^\circ\text{C}$  (Peak 1) und  $60.8\text{ }^\circ\text{C}$  (Peak 2) auftreten. Das *et al.* fanden heraus, dass der thermische Entfaltungsprozess des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers auf einem zweiphasigen Prozess basiert, der wahrschein-



**Abbildung 6.40** – Experimentell bestimmtes DSC-Thermogramm von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Abwesenheit von Cosolventien. Die experimentellen Daten ( $\bullet$ ) wurden durch Anwendung einer FOURIER-Selbstentfaltung (FSD) analysiert, um die zugrunde liegenden Teilprozesse des gesamten thermischen Dissoziationsprozesses von  $\alpha/\beta$ -Tubulin aufzudecken. Dabei wurden drei Peaks gefunden, die mithilfe von GAUSS-Funktionen ( $- -$ ) an die experimentellen Daten angepasst wurden ( $-$ ).

lich auf einen sequentiellen Entfaltungs- oder Dissoziationsprozess der beiden Untereinheiten des Heterodimers beruht.<sup>[323]</sup> Die DSC-Peaks 1 und 2 des Thermogramms können einer partiellen Entfaltung und/oder Dissoziation des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers zugeordnet werden, während DSC-Peak 3 bei einer Temperatur von 63.5 °C einer exothermen irreversiblen Aggregation entspricht.

Die DSC-Daten stimmen gut mit den durchgeführten temperaturabhängigen Messungen mittels FTIR- und Fluoreszenzspektroskopie überein, d.h. die entsprechenden Änderungen der Sekundärstrukturelemente treten im gleichen Temperaturbereich auf, in dem Änderungen im DSC-Thermogramm auftreten. Eine anschließende Wiederholung der DSC-Messungen der Probe zeigt, dass die endotherme Entfaltung und anschließende exotherme Aggregation von  $\alpha/\beta$ -Tubulin irreversibel ist. Die Gesamtintegration über den Übergangspeak des DSC-Thermogramms führt zu einer apparenten kalorimetrischen Enthalpieänderung  $\Delta H_{cal}$  von 1419 kJ mol<sup>-1</sup>, welche fast viermal so groß wie die spektroskopisch bestimmte VAN'T HOFFsche-



**Abbildung 6.41** – Vergleich der temperaturabhängigen spektroskopischen mit den kalorimetrischen Ergebnissen von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung. Zum Vergleich der temperaturabhängigen Ergebnisse der FTIR-Spektroskopie ( $\blacktriangleleft$ ) mit den kalorimetrischen Ergebnissen sind zum einen die Anteile intermolekularer  $\beta$ -Faltblätter ( $1615\text{ cm}^{-1}$ ), deren Anteil aufgrund der thermisch-induzierten Proteinaggregation steigt, inklusive deren durch den abgewandelten Boltzmann-Fit (Gleichung (6.4)) erhaltenen Kurvenanpassung und zum anderen das erhaltene DSC-Thermogramm ( $\bullet$ ) mit den darunter liegenden Subbanden ( $-$ ) sowie der thermische Expansionskoeffizient  $\alpha$  ( $-$ ), der durch die getätigten PPC-Messungen bestimmt wurde, aufgetragen.

Enthalpieänderung  $\Delta H_{\text{vH}}$  ist, die auf einem vereinfachten Zwei-Zustands-Modell beruht und wiederum auf eine signifikante Population an Zwischenzuständen während des temperaturinduzierten Entfaltungsprozesses hinweist.

Abbildung 6.41 zeigt die Temperaturabhängigkeit des durch PPC-Messungen bestimmten thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha$  von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung. Unter Verwendung eines partiellen spezifischen Volumens von  $0.735\text{ mL g}^{-1}$ <sup>[324]</sup> und einem Molekulargewicht von  $110\text{ kDa}$ ,<sup>[305]</sup> kann die Volumenänderung während des thermischen Dissoziations- und Entfaltungsprozesses durch Integration von  $\alpha(T)$  über den Temperaturbereich des Übergangs, welcher mittels DSC-Messungen bestimmt wurde, ermittelt werden. Mithilfe von Gleichung (6.6) kann die Volumenänderung  $\Delta V_{\text{D}}$  zu  $-33.8 \pm 8.0\text{ mL mol}^{-1}$  bestimmt werden, was  $\sim 0.04\%$  des gesamten Proteinvolumens entspricht.



In mehreren Studien wurde gezeigt, dass der thermische Expansionskoeffizient  $\alpha$  sehr stark in Abhängigkeit sowohl von den Hydratationseigenschaften an der Grenzfläche zwischen Protein und Wasser als auch von der exponierten Oberfläche, die dem Lösungsmittel zugänglich ist (engl.: *solvent accessible surface*, SASA), steht.<sup>[52,53,319,325]</sup> Es wird allgemein angenommen, dass die negative Steigung des temperaturabhängigen Verlaufs des thermischen Expansionskoeffizienten  $\alpha(T)$  auf eine, mit zunehmender Temperatur abnehmende, starke Hydratationsschicht für polare globuläre Proteine zurückzuführen ist.<sup>[325]</sup> Die negative Volumenänderung der Dissoziation, die mittels Messungen der Fluoreszenz- ( $-120 \text{ mL mol}^{-1}$ ) und FTIR-Spektroskopie ( $-122 \pm 7 \text{ mL mol}^{-1}$ ) bei einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  erhalten wurden, zeigen jeweils eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit von  $\Delta V_D$  an, die mit zunehmender Temperatur positiver wird, wie es auch für die Entfaltung des monomeren Proteins *Staphylococcal nuclease* (SNase) festgestellt wurde.<sup>[319,326]</sup>

#### 6.3.2.4 Statische Fluoreszenzanisotropie

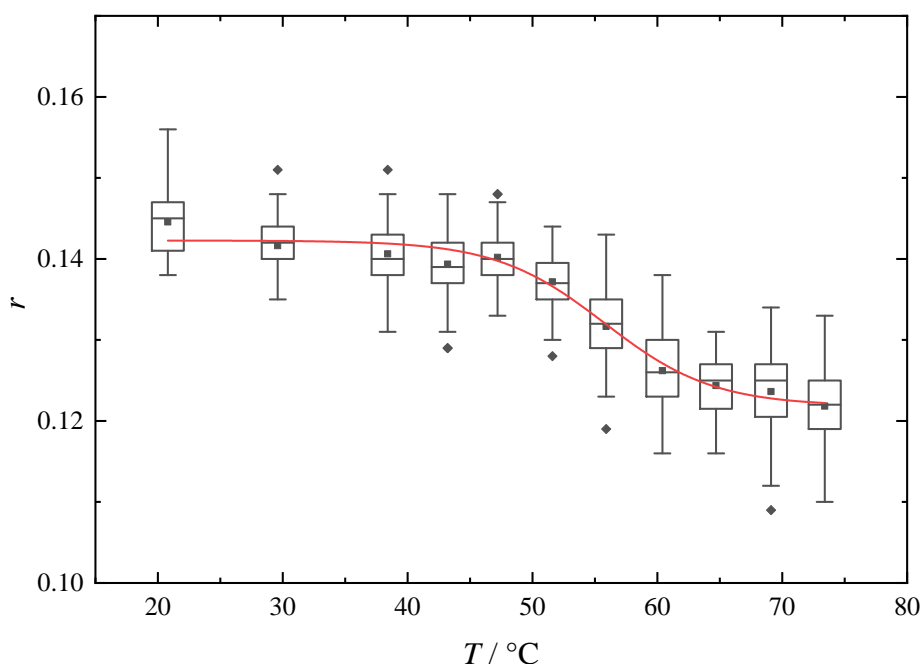
Die temperaturabhängige Dissoziation von  $\alpha/\beta$ -Tubulin wurde ebenfalls mithilfe von Messungen der statischen Fluoreszenzanisotropie untersucht.

Abbildung 6.42 zeigt Boxplots der statischen Fluoreszenz Anisotropie  $r$  als Funktion der Temperatur in einem Temperaturbereich von 20 bis  $75^\circ\text{C}$ . Da die Fluoreszenzanisotropie von der Rotationsdiffusionskonstanten abhängt, erlauben statische Fluoreszenzanisotropie Messungen den Nachweis von Größenänderungen des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers während seiner temperaturabhängigen Dissoziation, die durch die PERRIN-Gleichung gegeben ist:

$$r^{-1} = r_0^{-1} \cdot \left( 1 + \frac{k_B T \bar{\tau}}{\eta V_h} \right) \quad (6.21)$$

wobei  $r_0$  der intrinsischen Grenzanisotropie,  $k_B$  der BOLTZMANN-Konstanten,  $T$  der absoluten Temperatur,  $\eta$  der Mikroviskosität,  $\bar{\tau}$  der mittleren Lebenszeit des angeregten Zustandes der Tryptophanreste und  $V_h$  dem hydrodynamischen Volumen von  $\alpha/\beta$ -Tubulin entsprechen.<sup>[225]</sup>

In dem Temperaturbereich zwischen 20 und  $40^\circ\text{C}$  können keine signifikanten Än-

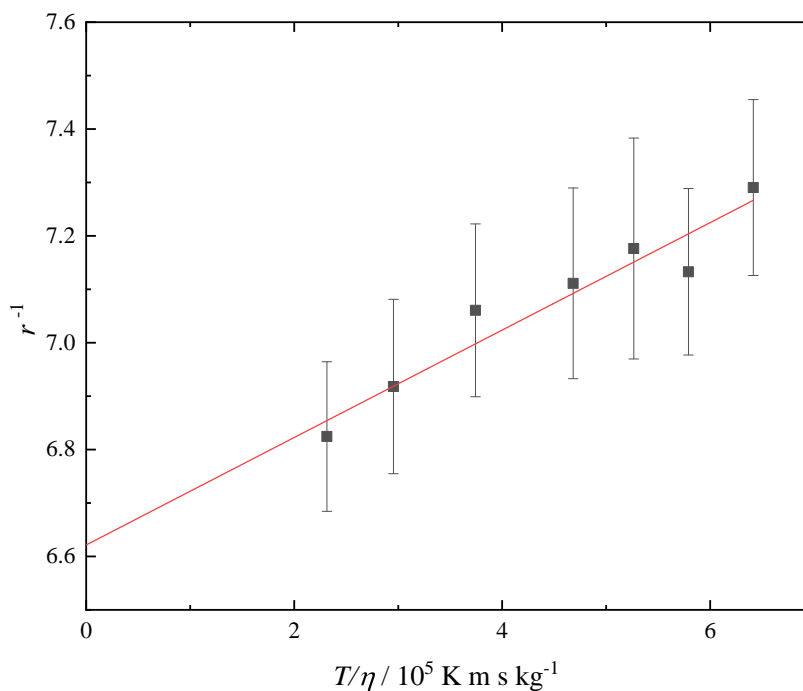


**Abbildung 6.42** – Boxplots der statischen Fluoreszenzanisotropie von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung bei einem Druck von 1 bar.

derungen der statischen Fluoreszenzanisotropie beobachtet werden. Ab einer Temperatur von  $\sim 40$  °C beginnt die thermische Dissoziation des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers, was sich durch eine Abnahme des Anisotropie-Wertes  $r$  erkennen lässt. Mittels einer Kurvenanpassung einer abgewandelten Boltzmann-Funktion (Gleichung 6.4) an die experimentellen Daten kann die Dissoziationstemperatur  $T_D$  zu  $55.7 \pm 1.3$  °C bestimmt werden, die im Rahmen des experimentellen Fehlers gut mit den Übergangstemperaturen übereinstimmt, die mittels Fluoreszenzspektroskopie, FTIR-Spektroskopie und DSC-Messungen ermittelt wurden.

Frühere Studien haben gezeigt, dass die Tryptophanreste von Tubulin einem zwei-exponentiellen Fluoreszenz-Zerfallsprozess folgen, der die zwei Fluoreszenzlebenszeiten  $\tau_1 = 4.51$  ns und  $\tau_2 = 0.73$  ns mit den dazugehörigen präexponentiellen Faktoren  $\alpha_1 = 0.22$  und  $\alpha_2 = 0.78$  besitzen.<sup>[410]</sup> Die mittlere Fluoreszenzlebenszeit  $\bar{\tau}$  wurde mithilfe von Gleichung (6.22)<sup>[225]</sup>

$$\bar{\tau} = \frac{\alpha_1 \tau_1^2 + \alpha_2 \tau_2^2}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2} \quad (6.22)$$



**Abbildung 6.43** – PERRIN-Auftragung von  $\alpha/\beta$ -Tubulin.

zu 3.13 ns berechnet. Das  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimer besitzt eine zylindrische Form mit einer Länge von 8 nm und einem Durchmesser von  $\sim 4$  nm.<sup>[285,286]</sup> Das hydrodynamische Volumen  $V_h$  des Heterodimers kann mittels der Relation  $V_h = \pi r^2 h$  zu  $100.5 \text{ nm}^3$  bestimmt werden. Unter der Annahme, dass die Mikroviskosität gleich derer des *Bulk*-Wassers ist ( $\eta = 1 \times 10^{-4} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei  $T = 20^\circ\text{C}$ ), kann anhand der PERRIN-Auftragung in Abbildung 6.43 die intrinsische Grenzanisotropie  $r_0$  mittels Extrapolation auf den Ordinatenabschnitt zu  $0.151 \pm 0.001$  bestimmt werden. Mithilfe von Gleichung 6.21 kann nun unter Verwendung der zuvor bestimmten Mikroviskosität  $\eta$ , der mittleren Fluoreszenzlebenszeit  $\bar{\tau}$ , der intrinsischen Grenzanisotropie  $r_0$  und dem hydrodynamischen Volumen  $V_h$  die Fluoreszenzanisotropie bei einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  zu  $\sim 0.15 \pm 0.06$  berechnet werden. Dieser theoretisch bestimmte Wert der Fluoreszenzanisotropie stimmt gut mit dem experimentell bestimmten Wert der statischen Fluoreszenzanisotropie ( $r = \sim 0.144 \pm 0.001$ ) von  $\alpha/\beta$ -Tubulin überein, der experimentell bestimmt wurde.

Unter der Annahme, dass das Heterodimer bei einer Temperatur von  $70^\circ\text{C}$  vollständig dissoziiert vorliegt, halbiert sich das hydrodynamische Volumen  $V_h$ , sodass

mithilfe von Gleichung (6.21) die Fluoreszenzanisotropie bei eben dieser Temperatur zu 0.087 berechnet werden kann, jedoch viel kleiner im Vergleich zu dem experimentell bestimmten Wert von  $0.123 \pm 0.005$  ist. Dieser Sachstand lässt vermuten, dass die thermische Dissoziation des Heterodimers bei einer Temperatur von  $70^\circ\text{C}$  noch nicht vollständig beendet wurde.

## 6.4 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die druck- und temperatur-induzierte Dissoziation des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers in reiner Pufferlösung und in Anwesenheit von verschiedenen Cosolventien, wie beispielsweise der natürlichen Osmolyt TMAO oder Harnstoff, sowie in Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll<sup>®</sup> PM 70 und dessen Monomerbaustein Saccharose untersucht, um einen tieferen Einblick zu bekommen, ob das zelluläre Milieu schädliche Auswirkungen extremer Umweltbedingungen lindern kann. Das  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimer dissoziiert bei Umgebungsdruck bei einer Temperatur von  $\sim 57^\circ\text{C}$ . Bei Raumtemperatur ( $25^\circ\text{C}$ ) wurde mittels fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen herausgefunden, dass das Dimer vollständig bei einem Druck von  $\sim 1280$  bar dissoziiert und die Dissoziation von einer Volumenänderung von  $-120\text{ mL mol}^{-1}$  begleitet wird. Bei tiefen Temperaturen, wie sie in der Tiefsee vorliegen ( $\sim 4^\circ\text{C}$ ), liegt die Druckstabilität von  $\alpha/\beta$ -Tubulin unter 1 kbar (Abbildung 6.35), dem in der Tiefsee erreichten Maximaldruck.

Sowohl die Druck- als auch die Temperaturstabilität wird in Anwesenheit des Stoffwechselprodukts Harnstoff deutlich herabgesetzt und steigt in Gegenwart des natürlichen Osmolyten TMAO signifikant an, was anhand eines Anstiegs des Dissoziationsdrucks  $p_D$  um  $\sim 225$  bar pro 1 M TMAO ersichtlich wird (Abbildung 6.10 und Tabelle 6.3). In Mischungen dieser beiden Cosolventien wirkt TMAO der destabilisierenden Wirkung von Harnstoff entgegen. So zeigt sich bei TMAO:Harnstoff-Mischungen mit einem Verhältnis zwischen 1:1 und 1:2, dass sich die stabilisierende Wirkung von TMAO sowie die destabilisierende Wirkung von Harnstoff auf den assoziierten Zustand von  $\alpha/\beta$ -Tubulin fast vollständig aufheben. Bei dem natürli-

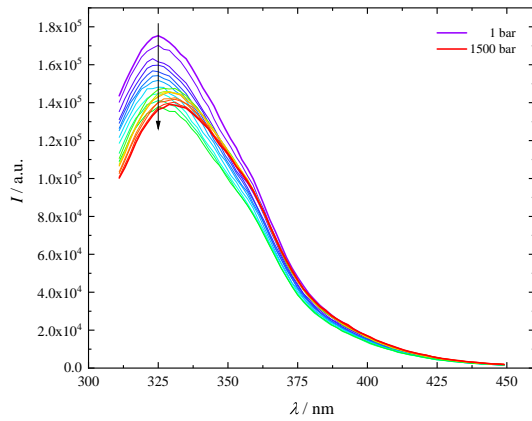
chen Osmolyten TMAO ist diese stabilisierende Wirkung bei einem pH-Wert von  $\sim 7$  am effektivsten, da das Molekül deprotoniert vorliegt und ein ziemlich großes elektrisches Dipolmoment von etwa 5 Debye aufweist.<sup>[411,412]</sup> Da TMAO ein weitgehend negativ geladenes Sauerstoffatom besitzt, welches mit umgebenden Wassermolekülen drei starke Wasserstoffbrückenbindungen<sup>[411,413,414]</sup> eingehen kann und deren Stärke mit zunehmendem Druck zunimmt, ist die Wechselwirkung mit umgebenden Wassermolekülen stärker als mit dem Proteinrückgrat oder den Proteinseitenketten.<sup>[268,411,412,415,416]</sup> Frühere Studien haben gezeigt, dass die kompensatorische Wirkung von TMAO und destabilisierenden Cosolventien, wie beispielsweise Harnstoff, keine direkte Wechselwirkung dieser Cosolventien erfordert.<sup>[417]</sup> Dieser entgegenwirkende Effekt der beiden verwendeten Cosolventien beruht höchstwahrscheinlich auf einer indirekten, d.h. durch das Lösungsmittel vermittelten Wechselwirkung.<sup>[238,239]</sup>

Ähnlich wie beim Osmolyten TMAO kann auch die Anwesenheit des Nanocrowders Saccharose in ausreichenden Mengen zu einer starken Stabilisierung des Heterodimers führen.

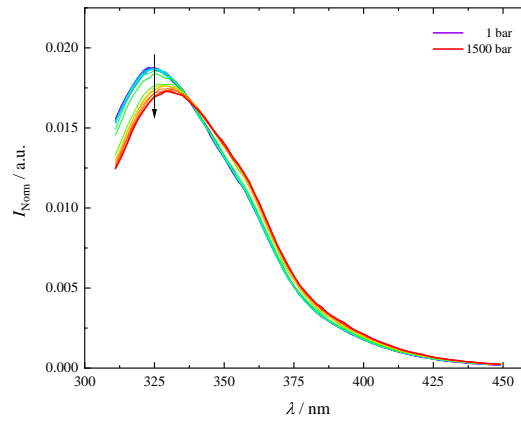
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Modulation der Konzentration natürlich stabilisierender Osmolyte, wie beispielsweise TMAO, und intrazellulärer Crowdingmittel die schädlichen Auswirkungen extremer Umgebungsbedingungen, einschließlich hoher hydrostatischer Drücke, auf die Stabilität von Proteinen wie  $\alpha/\beta$ -Tubulin weitgehend aufgehoben werden können.

## 6.5 Anhang

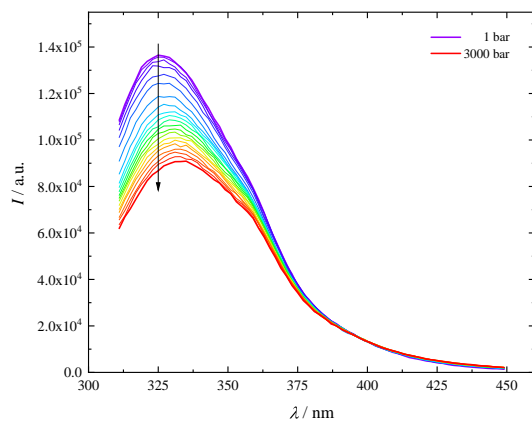
## 6.5.1 Zusätzliche Abbildungen

5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei  $T = 7^\circ\text{C}$ .

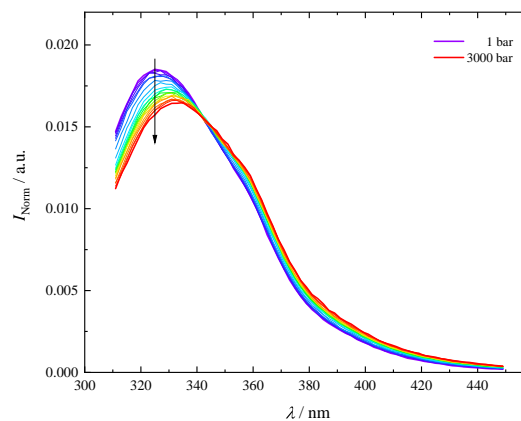
a) Gemessene Emissionsspektren



b) Flächennormierte Emissionsspektren

5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei  $T = 15^\circ\text{C}$ .

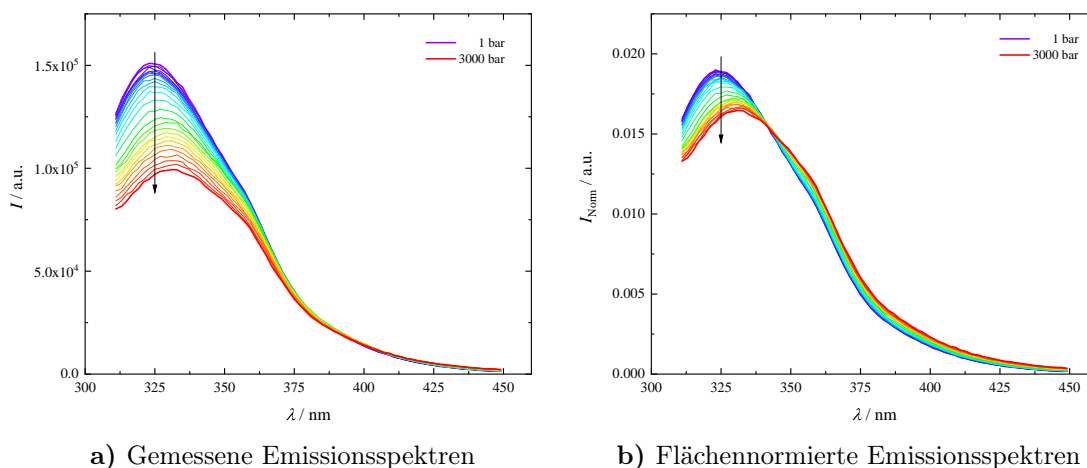
c) Gemessene Emissionsspektren



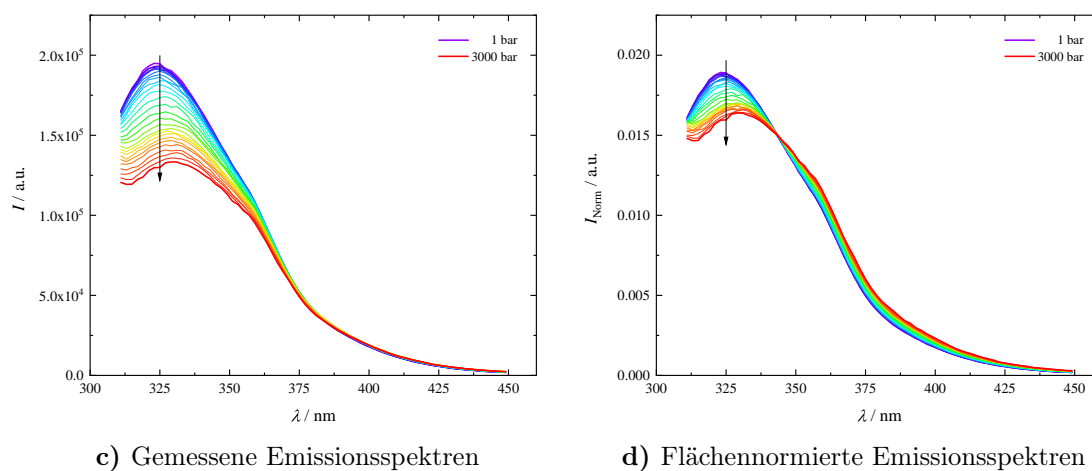
d) Flächennormierte Emissionsspektren

**Abbildung 6.44** – Gemessene (linke Spalte) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierte (rechte Spalte) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von  $7^\circ\text{C}$  (**a**, **b**) und  $15^\circ\text{C}$  (**c**, **d**) in einem Druckbereich von 1–3000 bar. Mit steigendem Druck ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.

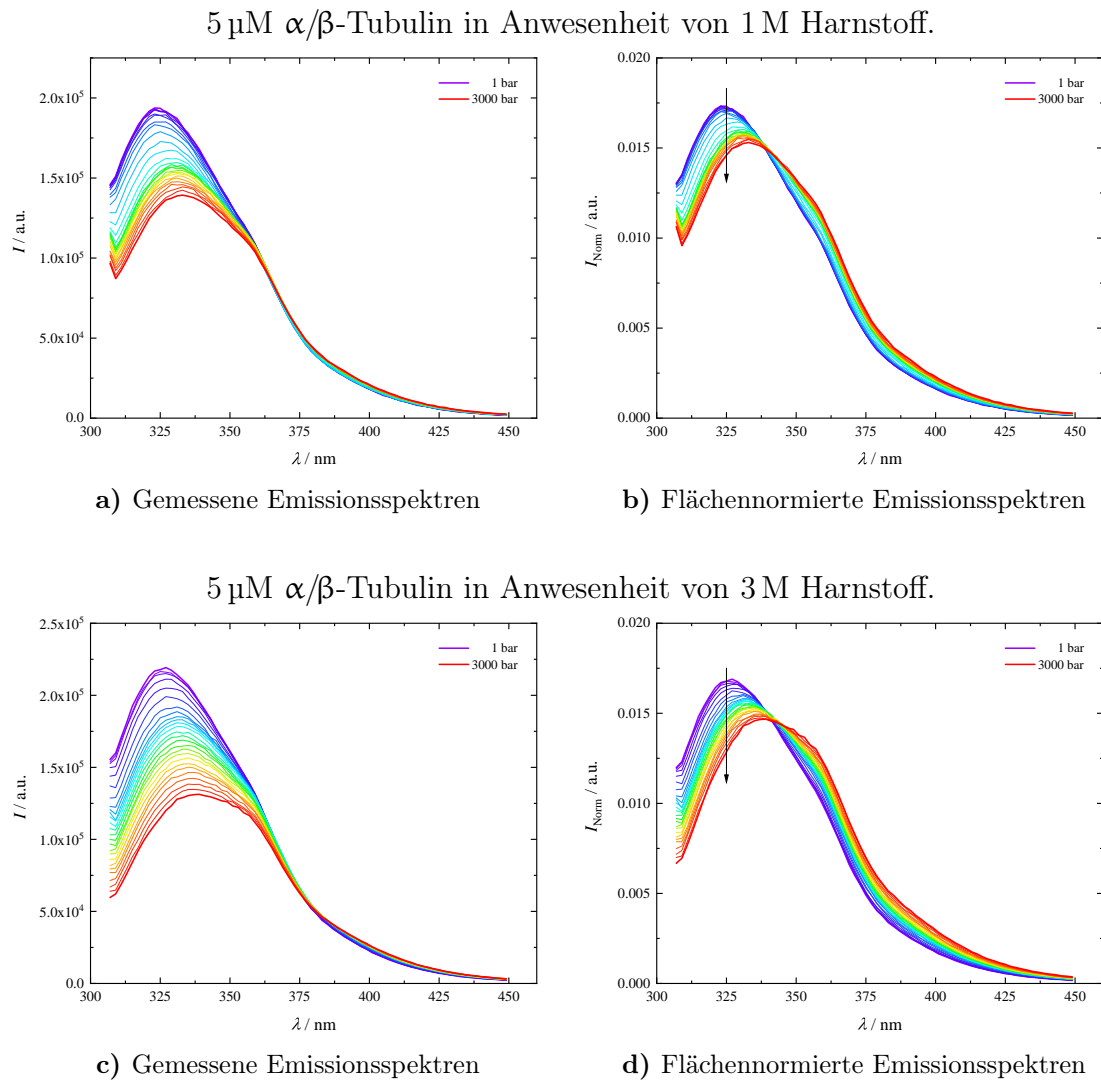
5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei  $T = 35^\circ\text{C}$ .



5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei  $T = 40^\circ\text{C}$ .



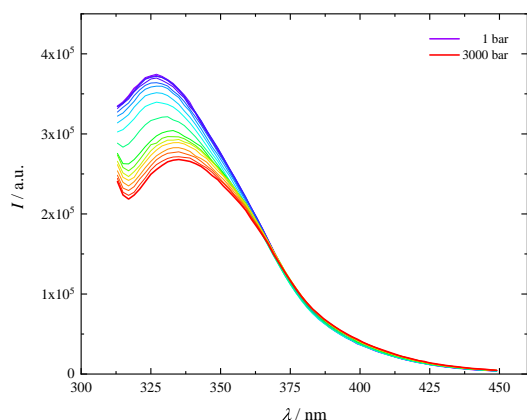
**Abbildung 6.45** – Gemessene (linke Spalte) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierte (rechte Spalte) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von  $35^\circ\text{C}$  (a, b) und  $40^\circ\text{C}$  (c, d) in einem Druckbereich von 1–3000 bar. Mit steigendem Druck ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.



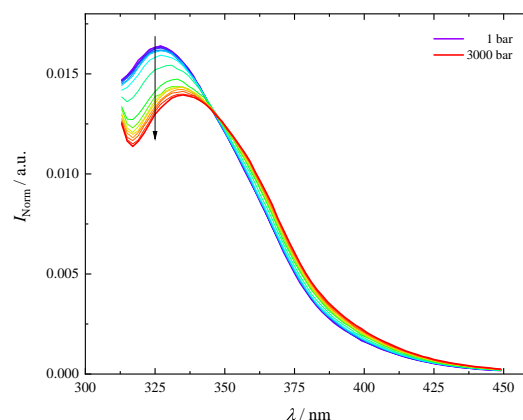
**Abbildung 6.46** – Gemessene (linke Spalte) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierte (rechte Spalte) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 1 M Harnstoff (**a, b**) und 3 M Harnstoff (**c, d**) in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei einer Temperatur von 25 °C. Mit steigendem Druck ist sowohl eine deutliche Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.



5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 1 M TMAO + 1 M Harnstoff.

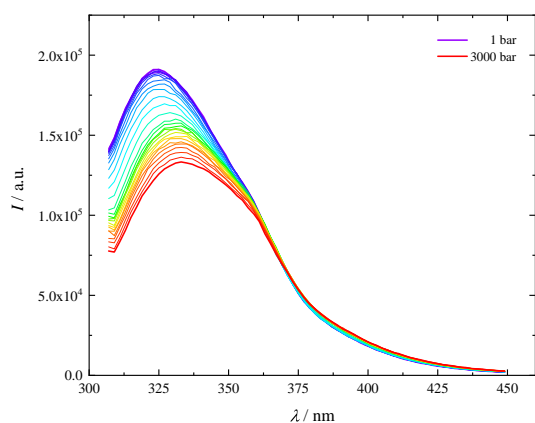


a) Gemessene Emissionsspektren

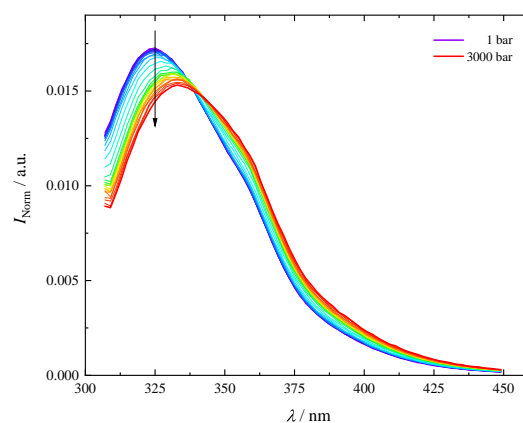


b) Flächennormierte Emissionsspektren

5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 1 M TMAO + 2 M Harnstoff.

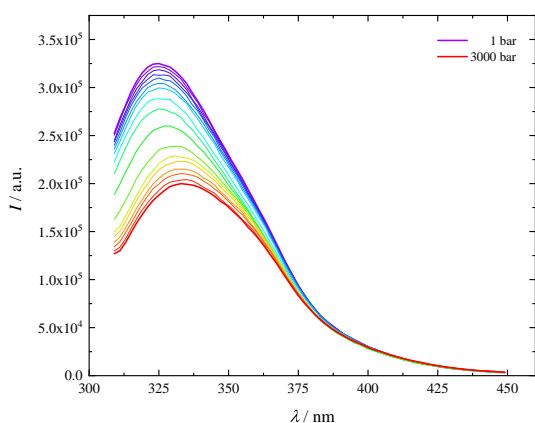


c) Gemessene Emissionsspektren

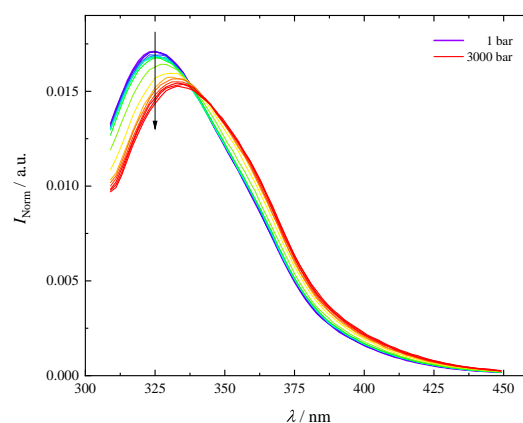


d) Flächennormierte Emissionsspektren

5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 2 M TMAO + 1 M Harnstoff.

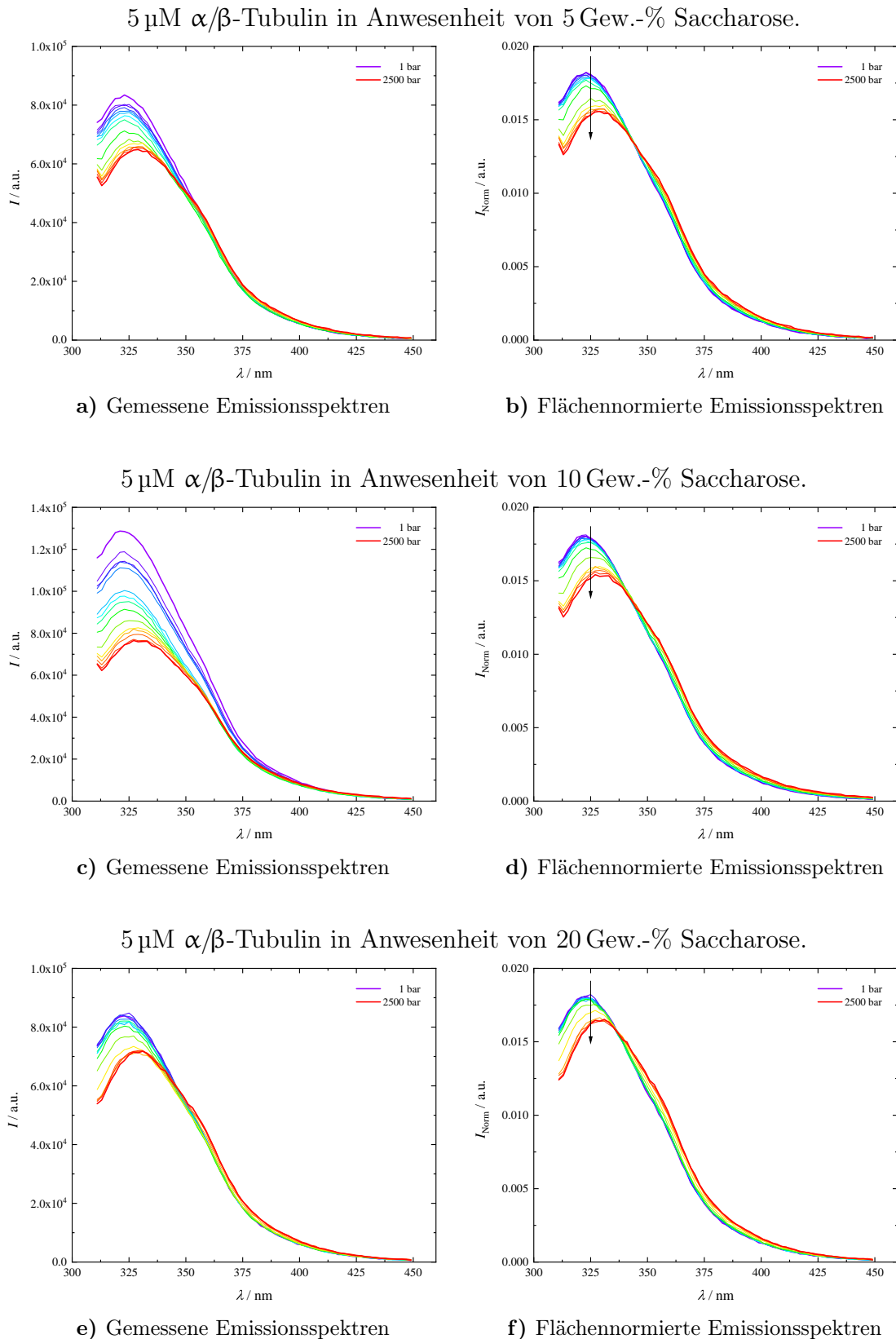


e) Gemessene Emissionsspektren



f) Flächennormierte Emissionsspektren

**Abbildung 6.47** – Gemessene (linke Spalte) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierte (rechte Spalte) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von TMAO/Harnstoff von 1:1 (**a, b**), 1:2 (**c, d**) und 2:1 (**e, f**) in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25 °C. Mit steigendem Druck ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.



**Abbildung 6.48** – Gemessene (linke Spalte) und mithilfe von Gleichung (6.1) auf die Fläche normierte (rechte Spalte) Emissionsspektren von 5  $\mu\text{M}$   $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 5 Gew.-% Saccharose (**a, b**), 10 Gew.-% Saccharose (**c, d**) und 20 Gew.-% Saccharose (**e, f**) in einem Druckbereich von 1–3000 bar bei 25 °C. Mit steigendem Druck ist sowohl eine Rotverschiebung als auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Der Farbverlauf von lila (–) nach rot (–) entspricht dem Druckgradienten.

# Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation des Einflusses der physikalischen Parameter Druck und Temperatur in Kombination mit anwesenden Osmolyten bzw. molekularen Crowdern auf ausgewählte Protein-Systeme. Hierbei wurden verschiedene biophysikalische Methoden verwendet, um das Zusammenspiel zwischen Struktur, Stabilität und Dynamik der verschiedenen Protein-Systeme zu erforschen. Es folgt eine Zusammenfassung der wichtigsten Forschungsergebnisse sowohl in deutscher als auch englischer Sprache.



## Deutschsprachige Zusammenfassung

### PROJEKT I: COSOLVENS- UND CROWDING-EFFEKTE AUF DIE STRUKTUR UND DYNAMIK VON GLOBULÄREM ACTIN

Das Ziel dieses Teilprojekts war die Untersuchung der druck- und temperaturabhängigen Proteinstabilität von globulärem Actin (G-Actin), dem Monomerbaustein der in eukaryotischen Zellen enthaltenen Mikrofilamente, und dessen Beeinflussung durch die Anwesenheit der natürlichen Osmolyte Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Harnstoff sowie Ficoll<sup>®</sup> PM 70 als makromolekularen Crowder. Hierzu wurden sowohl druck- als auch temperaturabhängige fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von G-Actin in An- und Abwesenheit der beiden Cosolventien TMAO und Harnstoff sowie des makromolekularen Crowders Ficoll<sup>®</sup> PM 70 durchgeführt.

Für den thermischen Entfaltungsprozess von G-Actin bei Atmosphärendruck wurde eine Entfaltungstemperatur von  $\sim 49^\circ\text{C}$  ermittelt, während bei Umgebungstemperatur ( $25^\circ\text{C}$ ) für den druckinduzierten Entfaltungsprozess ein Entfaltungsdruck von  $\sim 2700$  bar bestimmt wurde, der von einer Volumenänderung von etwa  $-97\text{ mL mol}^{-1}$  begleitet wird. Durch die Anwesenheit des Stoffwechselprodukts Harnstoff verringern sich sowohl die Entfaltungstemperatur  $T_m$  als auch der Entfaltungsdruck  $p_u$  und die Proteinstabilität wird herabgesetzt. In Gegenwart des natürlichen Osmolyten TMAO erfolgt eine Steigerung der Proteinstabilität um  $\sim 5\text{ kJ mol}^{-1}$  TMAO.

Bei den untersuchten TMAO/Harnstoff-Gemischen wird ersichtlich, dass TMAO der destabilisierenden Wirkung von Harnstoff entgegenwirkt und sich die beiden entgegengerichteten Effekte bei einem TMAO/Harnstoff-Verhältnis von 1:2 fast vollständig aufheben. In Anwesenheit des makromolekularen Crowders Ficoll<sup>®</sup> PM 70 erfolgt, ähnlich der Anwesenheit des kosmotropen Osmolyten TMAO, eine Stabilisierung des nativen Zustandes.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Modulation kompatibler Osmolyte und der intrazellulären *Crowding*-Bedingungen den schädlichen Auswirkungen extremer Umweltbedingungen, wie beispielsweise hohe hydrostatische Drücke in der Tiefsee, auf die Proteinstabilität von G-Actin entgegengerichtet werden kann, ohne das Konformationsgleichgewicht der funktionalen nativen Zustände zu stören.

## PROJEKT II: MODULATION DER POLYMERISATIONSKINETIK VON $\alpha/\beta$ -TUBULIN

Ziel dieses Projekts war die Untersuchung des Einflusses der natürlichen Osmolyte Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Harnstoff sowie des makromolekularen *Crowding*-Effekts durch die Anwesenheit von Ficoll<sup>®</sup> PM 70 auf die Polymerisationskinetik der Assemblierungsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin *in vitro*. Hierzu wurden Turbidimetrie-, Fluoreszenzanisotropie- sowie Confocal Laser Scanning Microscopy-Untersuchungen durchgeführt, um zu zeigen, wie physikochemische Merkmale der zytosolischen Umgebung das Polymerisationsverhalten von  $\alpha/\beta$ -Tubulin, einer molekularen Schlüsselreaktion, die verantwortlich ist für die Dynamik und Motilität einer jeden Zelle, beeinflussen können.

In Anwesenheit des natürlichen Osmolyten TMAO wird die Polymerisationsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin durch die thermodynamische und kinetische Begünstigung der *de novo*-Nukleationsreaktion beschleunigt, was höchstwahrscheinlich auf die bevorzugte Wechselwirkung von TMAO mit dem umliegenden Wasser und nicht mit der Oberfläche des Proteins zurückzuführen ist. Hierdurch wird das Gleichgewicht in Richtung oligomerer und polymerer Zustände verschoben, um die Oberfläche, die dem Lösungsmittel zugänglich ist, zu minimieren. Infolgedessen wird die Polymerisationsreaktion von  $\alpha/\beta$ -Tubulin beschleunigt und sowohl die Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  als auch die Verzögerungszeiten  $t_{lag}$  der Reaktion herabgesetzt. Des Weiteren wird durch die Anwesenheit von TMAO die Konformationspopulation in Richtung der elongationsfähigen Spezies verschoben, was anhand einer verringerten kritischen Konzentration  $c_c$  und einer erhöhten apparenten Wachstumsrate  $k_{app}$  ersichtlich wird. Weiterhin haben CLSM-Bilder gezeigt, dass die in Anwesenheit des kosmotropen Osmolyten gebildeten Mikrotubuli kürzer sind als jene, die sich in reiner Pufferlösung bilden.

In Anwesenheit bereits moderater Konzentrationen des chaotropen Cosolvens Harnstoff wird ersichtlich, dass eine partielle Entfaltung der  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimere eintritt bzw. die Heterodimere in eine polymerisations-inkompetente Konformation übergehen, wodurch die Polymerisationskinetik verlangsamt wird und das Gleichge-

wicht in Richtung monomerer Zustände verschoben wird, was anhand einer erhöhten kritischen Konzentration  $c_c$  ersichtlich wird. Aufgrund dessen werden weniger Nuklei gebildet und folglich weniger auspolymerisierte Mikrotubuli.

In Anwesenheit von TMAO/Harnstoff-Mischungen wird ersichtlich, dass dem retardierenden und destabilisierenden Effekt von Harnstoff auf die Polymerisationsreaktion durch die Anwesenheit von TMAO entgegengewirkt werden kann. Am effektivsten erfolgt diese Kompensation bei einem TMAO/Harnstoff-Verhältnis von etwa 2:1 für Tubulin, welches aus Kalbshirnen extrahiert wurde und etwa 1:1 für Tubulin, das aus Lammhirnen gewonnen wurde.

Durch die Zugabe des makromolekularen Crowders Ficoll<sup>®</sup> PM 70 wurde das zelluläre Milieu simuliert. Unter diesen *Crowding*-Bedingungen erfolgt eine Beschleunigung der Polymerisationskinetik aufgrund des verringerten zur Verfügung stehenden Volumens in der dicht gepackten Umgebung. Dadurch wird das Gleichgewicht in Richtung oligomerer und polymerer Zustände verschoben. Zusätzliche Eigenschaften einer dicht gepackten Zelle, wie beispielsweise eine hohe Viskosität, wurden durch die Zugabe des Disaccharids Saccharose nachgestellt. Allerdings spielen diese Eigenschaften bei der Modulation der Polymerisationskinetik von  $\alpha/\beta$ -Tubulin eine untergeordnete Rolle.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die physikalisch-chemischen Eigenschaften einer zytosolischen Umgebung selbst, wie beispielsweise die Anwesenheit von Osmolyten und makromolekularen Crowdern, das Polymerisationsverhalten von Tubulin, einer essentiell wichtigen biomolekularen Reaktion, die die Dynamik und Motilität einer Zelle steuert, signifikant beeinflussen können, sodass diese Effekte bei einer Betrachtung von Assemblierungsreaktionen in lebenden Organismen nicht vernachlässigt werden dürfen.

### PROJEKT III: UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES NATÜRLICHER COSOLVENTIEN AUF MIKROTUBULI

Ziel der Studie war die Untersuchung von Mikrotubuli in Hinblick auf deren Struktur und Stabilität in An- und Abwesenheit der natürlichen Osmolyte Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), Harnstoff und Mischungen dieser Osmolyte über einen weiten Druck- und Temperaturbereich mithilfe der FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) in Kombination mit dynamischer Differenzkalorimetrie (engl.: *dynamic scanning calorimetry*, DSC) und Druck-Perturbations-Kalorimetrie (engl.: *pressure perturbation calorimetry*, PPC), um ein tieferes mechanistisches Verständnis der limitierten Temperatur- und Druckstabilität der Mikrotubuli *in vivo* zu erlangen.

Bei einer thermodynamischen Analyse von Mikrotubuli in reiner Pufferlösung wurde ein Entfaltungsdruck von  $\sim 4.5$  kbar bei einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  ermittelt, der von einer Volumenänderung von  $-15 \pm 2$  mL mol<sup>-1</sup> begleitet wird, was in etwa dem Volumen von einem Wassermolekül entspricht. Die hohe Druckstabilität der Mikrotubuli deutet auf eine dichte Packung der Monomerbausteine hin, wodurch die Bildung von Kavitäten weitestgehend vermieden wird.

Den Auswirkungen extremer Umweltbedingungen, einschließlich hoher Drücke in der Tiefsee, kann durch Modulation des Osmolytgehalts, beispielsweise durch Erhöhung der TMAO-Konzentration, entgegengewirkt werden, um die Mikrotubuli zu stabilisieren.



## PROJEKT IV: COSOLVENSEINFLUSS AUF DIE STRUKTUR UND DYNAMIK IM SUBNANOSEKUNDENBEREICH VON LYSOZYM

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses von Druck auf die interne Proteindynamik innerhalb einer Subnanosekunden-Zeitskala von Lysozym in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen der natürlichen Osmolyte Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), Harnstoff und Glycin, sowie der beiden Disaccharide Saccharose und Trehalose unter *self-crowding*-Bedingungen. Hierzu wurden Messungen der elastischen inkohärenten Neutronenstreuung (EINS) durchgeführt. Des Weiteren sollten DSC-Messungen sowie druck- und temperaturabhängige Messungen der FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) durchgeführt werden, um die Faltungsstabilität des Proteins unter *self-crowding*-Bedingungen in Anwesenheit der natürlichen Osmolyte zu untersuchen.

Bei den durchgeführten druckabhängigen EINS-Messungen wurde gezeigt, dass durch die Anwesenheit des natürlichen Osmolyten TMAO eine Stabilisierung der internen Dynamik der Wasserstoffatome im Subnanosekundenbereich erfolgt, was anhand von reduzierten Werten der mittleren quadratischen Abweichung (engl.: *mean squared displacement*, MSD) zu erkennen ist, während die Anwesenheit von Harnstoff die MSD-Werte nicht signifikant beeinflusst. Bei den verwendeten TMAO-Harnstoff-Mischungen lässt sich kein kompensierender Effekt der beiden Cosolventien beobachten. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte die unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Cosolventien sein, da Harnstoff im Gegensatz zu TMAO direkt mit dem Proteinrückgrat wechselwirkt, während TMAO vorzugsweise von der Proteinoberfläche ausgeschlossen wird und stark mit dem umgebenden Wasser interagiert. Dadurch wird in Anwesenheit von TMAO das Wasserstoffbrücken-Netzwerk verstärkt, wodurch es zu einer Dämpfung von konformellen Fluktuationen des Proteins kommt. Die Anwesenheit von TMAO beeinflusst das Volumen, welches den Proteinatomen für eine lokale Diffusion zugänglich ist. Dieser Effekt breitet sich möglicherweise ausgehend von der Proteinoberfläche mithilfe einer Kopplung der Diffusionsbewegungen von Solvens und Protein ins Proteininnere aus, wodurch die globale Dynamik des Proteins insgesamt beeinflusst wird.

Unter *self-crowding*-Bedingungen, die typischerweise im Zellinnern auftreten, reduzieren sich die MSD-Werte von Lysozym,<sup>[179]</sup> während in Anwesenheit von TMAO bzw. Harnstoff kein signifikanter Einfluss auf die MSD-Werte zu erkennen ist und die MSD-Werte des Proteins gegenüber dem anliegenden Druck relativ unempfindlich sind.

In Anwesenheit des Disaccharids Trehalose steigen die ermittelten MSD-Werte mit steigender Konzentration des Zuckers an, da Trehalose einen signifikanten Einfluss auf die Hydratationshülle besitzt. Aufgrund des Austauschs von Wassermolekülen der Hydratationshülle durch Trehalose-Moleküle wird die Proteindynamik im Subnanosekundenbereich beeinflusst. Die ermittelten MSD-Werte von Lysozym in Anwesenheit von Glycin sind drastisch erhöht, während in Anwesenheit von Saccharose kein signifikanter Einfluss auf die MSD-Werte beobachtet werden kann.

FTIR-spektroskopische Untersuchungen und komplementäre kalorimetrische Daten geben zusätzliche Einblicke auf den Einfluss der verwendeten Cosolventien auf die Proteinstabilität von Lysozym und erlauben die Erstellung eines Druck-Temperatur-Phasendiagramms. In Anwesenheit von TMAO wird das Protein gegenüber einer druck- und thermisch-induzierten Entfaltung stabilisiert, während die Anwesenheit von Harnstoff eine destabilisierende Wirkung auf die Proteinstabilität aufweist. Unter *self-crowding*-Bedingungen ist eine Destabilisierung von Lysozym zu beobachten, die, aufgrund der Ausbildung von schwachen intermolekularen Wechselwirkungen, auf enthalpische Beiträge zurückzuführen ist.

## PROJEKT V: MODULATION DES DISSOZIATIONSPROZESSES VON $\alpha/\beta$ -TUBULIN

Ziel dieser umfassenden Studie war die Untersuchung des Einflusses der natürlichen Osmolyte Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Harnstoff, inklusive Mischungen der beiden Osmolyte, sowie der beiden Crowder Ficoll<sup>®</sup> PM 70 und Saccharose auf die druck- und temperaturabhängige Dissoziationsreaktion des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers über einen weiten Druck- und Temperaturbereich mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit den biophysikalischen Methoden der FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR), dynamischen Differenzkalorimetrie (engl.: *dynamic scanning calorimetry*, DSC), Druck-Perturbations-Kalorimetrie (engl.: *pressure perturbation calorimetry*, PPC), Fluoreszenzanisotropie und Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (engl.: *fluorescence correlation spectroscopy*, FCS), um auf molekularer Ebene ein tieferes Verständnis der limitierten Druck- und Temperaturstabilität des  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers *in vivo* zu erlangen.

Das  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimer dissoziiert bei Umgebungsdruck und einer Temperatur von  $\sim 57^\circ\text{C}$ , während bei Umgebungstemperatur ( $25^\circ\text{C}$ ) eine vollständige Dissoziation bei einem Druck von  $\sim 1280$  bar zu beobachten ist, der mit einer Volumenänderung von  $-120\text{ mL mol}^{-1}$  begleitet wird. Bei tiefen Temperaturen, wie sie beispielsweise in der Tiefsee vorliegen, liegt die Druckstabilität des Heterodimers unter 1 kbar, dem Maximaldruck in der Tiefsee.

In Anwesenheit des Stoffwechselprodukts Harnstoff wird sowohl die Druck- als auch die Temperaturstabilität signifikant herabgesetzt, während diese in Anwesenheit des kompatiblen Osmolyten TMAO gesteigert wird. In Mischungen der beiden Osmolyte wirkt TMAO der destabilisierenden Wirkung von Harnstoff entgegen und kann diese bei entsprechendem Mischungsverhältnis sogar komplett aufheben. In Anwesenheit des Nanocrowders Saccharose in ausreichenden Mengen lässt sich eine Stabilisierung des Heterodimers beobachten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Modulation des Osmolytgehalts, wie beispielsweise TMAO, und intrazellulärer Crowdingmittel schädliche Auswirkungen extremer Umweltbedingungen auf  $\alpha/\beta$ -Tubulin kompensiert werden

können.

---

## Englischsprachige Zusammenfassung

Life on Earth is mainly based on a correct interplay between the structure and dynamics of biomolecules such as proteins, which can be found in all organisms. A certain amount of organisms are living in the deep sea, in which pressures up to 1 kbar are reached and the temperature decreases down to below 4 °C. Organisms have to undergo adaptations to survive under such extreme environmental conditions by accumulating high concentrations of natural osmolytes such as trimethylamine-*N*-oxide with increasing depth to compensate the pressure and stabilize the native state of proteins.<sup>[90,114]</sup> The aim of this thesis is to explore the effects of high hydrostatic pressure and temperature as well as of cosolvents and macromolecular crowding agents on the stability and dynamics of different proteins.

Actin can be found in nearly all eukaryotic cells and is responsible for many cellular functions, such as cytokinesis, endocytosis, transport of organelles, generation of forces or muscle contraction.<sup>[199,203]</sup> It was found that the polymerization reaction of actin is one of the most pressure sensitive processes *in vivo*.<sup>[310,311]</sup> One aim of this thesis was to explore the effects of kosmotropic and chaotropic cosolvents, such as TMAO and urea, and crowding agents on the pressure and temperature stability of globular Actin (G-actin) by using fluorescence spectroscopy over a wide range of pressures and temperatures, ranging from 1 bar to 3 kbar and from 10 °C to 80 °C, respectively, to determine the pressure and temperature of unfolding as well as of thermodynamic parameters upon unfolding, such as enthalpy and volume changes. In the presence of TMAO, both the temperature and pressure of unfolding are significantly increased, while the presence of urea leads to a reduction of these parameters. In mixtures of these two cosolutes, urea is able to counteract the stabilizing effect of TMAO. To mimic a cell-like environment, Ficoll<sup>®</sup> PM 70 was added which increases the pressure as well as the temperature stability of G-actin.

Next to actin, tubulin is another component of the cytoskeleton of eukaryotic cells, which is responsible for cell motility, morphogenesis and polarity as well as for the intracellular transport and the formation of the mitotic spindle during cell division.<sup>[241-243]</sup> Tubulin is able to polymerize into hollow microtubules.<sup>[244]</sup> Another aim

of this thesis was to explore the effects of the two osmolytes urea and TMAO as well as of the crowding agents Ficoll<sup>®</sup> PM 70 and its monomeric subunit sucrose on the polymerization reaction of  $\alpha/\beta$ -tubulin. To this end, turbidimetry and fluorescence anisotropy experiments are carried out to investigate the polymerization kinetics of the polymerization reaction, yielding informations about the lag-time, the half-life, growth rate and critical concentrations. In the presence of urea, the apparent growth rate of the formation of microtubules is significantly decreased, while it is dramatically increased in the presence of TMAO. In mixtures of the two cosolutes, TMAO is able to counteract the retarding effect of urea on the polymerization kinetics. Under cell-like crowding conditions, which were achieved by adding Ficoll<sup>®</sup> PM 70 to the solution, the apparent growth rate increases by one order of magnitude. Thus, the polymerization reaction of tubulin is strongly based on the surrounding solvent and can be modulated by adjusting the level of compatible solutes.

The aim of another part of this thesis was to explore the effects of temperature and pressure on the dynamical properties and folding stability of highly concentrated hen-egg white lysozyme solutions in the absence as well as in the presence of TMAO and urea. Elastic incoherent neutron scattering (EINS) were performed in the pressure range between ambient pressure and 4 kbar to yield information about the mean-squared displacement (MSD) of the hydrogen atoms of the protein on the sub-nanosecond timescale. To yield information about the self-crowding effect, two protein concentrations are used, i.e. 80 mg mL<sup>-1</sup> and 80 mg mL<sup>-1</sup>, respectively. In the presence of TMAO, the mobility is decreased, while the presence of urea owns no significant effect on the dynamics and so, no counteracting effect of these two cosolutes can be observed in mixtures of the two osmolytes. At high protein concentrations, the MSD is not affected by the applied pressure. FOURIER-transform infrared (FTIR) spectroscopy measurements were performed to yield further informations about the folding stability of lysozyme. In the presence of TMAO, a stabilization of the protein can be observed, while in the presence of urea, the stability of both concentrations is decreased upon temperature- and pressure-induced denaturation. At high protein concentrations, a slight destabilizing effect upon self-crowding can

be observed, which is due to destabilizing intermolecular interactions.

Another aim of this thesis was to explore the effects of different natural osmolytes, such as TMAO and urea, on the pressure- and temperature-dependent stability of microtubules, the polymeric state of tubulin. To this end, pressure- and temperature-dependent Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy measurements were carried out over a wide pressure and temperature range, ranging from 1 bar to 11 kbar and from 20 °C to 90 °C, respectively, to yield information about the pressure and temperature of unfolding as well as of associated volume and enthalpy changes upon unfolding, which are compared with results obtained from differential scanning and pressure perturbation calorimetry. Conversely to urea, the pressure and temperature stability is increased in the presence of TMAO. The high pressure stability indicates compact packing, including little void volumes, of the underlying building block in the polymeric state of tubulin.

Last but not least, another goal of this thesis was to explore the effects of the two osmolytes TMAO and urea as well as of the crowding agents Ficoll<sup>®</sup> PM 70 and its monomeric subunit sucrose on the temperature and pressure stability of the building block of microtubules, i.e. the  $\alpha/\beta$ -tubulin. To this end, fluorescence and FTIR-spectroscopy, differential scanning and pressure perturbation calorimetry as well as fluorescence anisotropy and correlation spectroscopy measurements were carried out, to yield information about the dissociation process of the  $\alpha/\beta$ -tubulin heterodimer. The pressure and temperature of dissociation of  $\alpha/\beta$ -tubulin as well as associated thermodynamic parameters upon dissociation, such as enthalpy and volume changes, were determined for the various solution conditions. The pressure and temperature of dissociation are significantly increased in the presence of TMAO and the nanocrowder sucrose, while in the presence of urea they are decreased.

In conclusion, by adjusting the level of compatible osmolytes, such as TMAO, and crowders, cells are able to avoid the deleterious effects of extreme environmental conditions, e.g. on the polymerization kinetics, protein stability and dynamics.





# Verzeichnisse



# Literaturverzeichnis

- [1] F. Abe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 2347–2357.
- [2] L. J. Rothschild, R. L. Mancinelli, *Nature* **2001**, *409*, 1092–1101.
- [3] N. Rivalain, J. Roquain, G. Demazeau, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 659–672.
- [4] R. Winter, D. Lopes, S. Grudzielanek, K. Vogtt, *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **2007**, *32*, 41–97.
- [5] C. Kato, L. Li, Y. Nogi, Y. Nakamura, J. Tamaoka, K Horikoshi, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 1510–1513.
- [6] L. Barton, *Structural and Functional Relationships in Prokaryotes*, Springer, **2005**.
- [7] K. Kashefi, D. R. Lovley, *Science* **2003**, *301*, 934.
- [8] S. Kapoor, G. Triola, I. R. Vetter, M. Erlkamp, H. Waldmann, R. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 460–465.
- [9] J. L. Silva, A. C. Oliveira, T. C.R. G. Vieira, G. A. P. de Oliveira, M. C. Suarez, D. Foguel, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 7239–7267.
- [10] E. D. Korn, *Physiol. Rev.* **1982**, *62*, 672–737.
- [11] M. Guharoy, B. Szabo, S. C. Martos, S. Kosol, P. Tompa, *Cytoskeleton* **2013**, *70*, 550–571.
- [12] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie (Springer-Lehrbuch) (German Edition)*, Springer, **2005**.
- [13] E. Clarkson, C. F. Costa, L. M. Machesky, *J. Pathol.* **2004**, *204*, 407–417.
- [14] M. J. Stuart, R. L. Nagel, *The Lancet* **2004**, *364*, 1343–1360.

- [15] R. Belvindrah, K. Natarajan, P. Shabajee, E. Bruel-Jungerman, J. Bernard, M. Goutierre, I. Moutkine, X. H. Jaglin, M. Savariradjane, T. Irinopoulou, J.-C. Poncer, C. Janke, F. Francis, *J. Cell Biol.* **2017**, *216*, 2443–2461.
- [16] D. Sanoudou, A. H. Beggs, *Trends Mol. Med.* **2001**, *7*, 362–368.
- [17] J. C. Sparrow, K. J. Nowak, H. J. Durling, A. H. Beggs, C. Wallgren-Pettersson, N. Romero, I. Nonaka, N. G. Laing, *Neuromuscul. Disord.* **2003**, *13*, 519–531.
- [18] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, 6. Aufl. 2007, korr. Nachdruck 2010, Spektrum Akademischer Verlag, **2009**.
- [19] C. L. Brooks III, M. Karplus, B. M. Pettitt, *Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics*, Wiley, New York, **1988**.
- [20] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, 2. Aufl., Vieweg+Teubner Verlag, **2011**.
- [21] S.-Y. Sheu, D.-Y. Yang, H. L. Selzle, E. W. Schlag, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 12683–12687.
- [22] S. B. Prusiner, *Sci. Am.* **2004**, *291*, 86–93.
- [23] X. Xiao, J. Yuan, L. Qing, I. Cali, J. Mikol, M.-B. Delisle, E. Uro-Coste, L. Zeng, M. Abouelsaad, D. Gazgalis, M. C. Martines, G.-X. Wang, P. Brown, J. W. Ironsied, P. Gambetti, Q. Kong, W.-Q. Zou, *J. Clin. Cell. Immunol.* **2014**, *5*, pii: 240.
- [24] L. J. Lapidus, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 30–35.
- [25] J. N. Onuchic, N. D. Socci, Z. Luthey-Schulten, P. G. Wolynes, *Fold Des.* **1996**, *1*, 441–450.
- [26] J. N. Onuchic, H. Nymeyer, A. E. García, J. Chahine, N. D. Socci, *Adv. Protein Chem.* **2000**, *53*, 87–152.
- [27] J. N. Onuchic, P. G. Wolynes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 70–75.
- [28] P. G. Wolynes, *Biochimie* **2015**, *119*, 218–230.

- 
- [29] E. Kloss, N. Courtemanche, D. Barrick, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *469*, 83–99.
- [30] J. J. Portman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 11–15.
- [31] D. Thirumalai, E. P. O'Brien, G. Morrison, C. Hyeon, *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 159–183.
- [32] C. Scharnagl, M. Reif, J. Friedrich, *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1749*, 187–213.
- [33] W. Doster, J. Friedrich in *Protein Folding Handbook*, (Hrsg.: J. Buchner, T. Kiefhaber), Wiley-VCH Verlag GmbH, **2005**, S. 99–126.
- [34] M. Gao, C. Held, S. Patra, L. Arns, G. Sadowski, R. Winter, *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 2951–2972.
- [35] L. Smeller, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 11–29.
- [36] K. Heremans, L. Smeller, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1386*, 353–370.
- [37] S. A. Hawley, *Biochemistry* **1971**, *10*, 2436–2442.
- [38] P. L. Privalov, *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **1990**, *25*, 281–306.
- [39] E. Larios, M. Gruebele, *Methods* **2010**, *52*, 51–56.
- [40] G. W. Robinson, C. H. Cho, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 3311–3318.
- [41] C. M. Dobson, *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2004**, *15*, 3–16.
- [42] M. R. Eftink, *Biophys. J.* **1994**, *66*, 482–501.
- [43] I. N. Serdyuk, N. R. Zaccai, J. Zaccai, *Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function*, 1. Aufl., Cambridge University Press, **2007**.
- [44] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie: Auflage v. 4 (German Edition)*, 4th Revised edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, **2006**.
- [45] L. A. Marky, K. J. Breslauer, *Biopolymers* **1987**, *26*, 1601–1620.
- [46] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie (German Edition)*, 5. Aufl., Wiley-VCH, **2005**.

- [47] C. Czeslik, H. Seemann, R. Winter, *Basiswissen Physikalische Chemie (Studienbücher Chemie) (German Edition)*, 4., akt. Aufl. 2010, Vieweg+Teubner Verlag, **2010**.
- [48] C. Balny, P. Masson, *Food Rev. Int.* **1993**, *9*, 611–628.
- [49] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, P. F. McMillan, *Rev. Mineral. Geochem.* **2013**, *75*, 607–648.
- [50] *Industrial High Pressure Applications: Processes, Equipment, and Safety*, 1. Aufl., (Hrsg.: R. Eggers), Wiley-VCH, **2012**.
- [51] T. V. Chalikian, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 12566–12578.
- [52] K. J. Frye, C. A. Royer, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2217–2222.
- [53] J. Roche, J. A. Caro, D. R. Norberto, P. Barthe, C. Roumestand, J. L. Schlessman, A. E. Garcia, B. García-Moreno E., C. A. Royer, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 6945–6950.
- [54] T. V. Chalikian, K. J. Breslauer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 657–664.
- [55] K. Heremans, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2005**, *38*, 1157–1165.
- [56] F. Meersman, L. Smeller, K. Heremans, *Biochim. Biophys. Acta.* **2006**, *1764*, 346–354.
- [57] J. B. Rouget, T. Aksel, J. Roche, J. L. Saldana, A. E. Garcia, D. Barrick, C. a. Royer, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6020–6027.
- [58] C. A. Royer, *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1595*, 201–209.
- [59] N. Taulier, T. V. Chalikian, *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1595*, 48–70.
- [60] M. Gross, R. Jaenicke, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221*, 617–630.
- [61] M. J. Eisenmenger, J. I. Reyes-De-Corcuera, *Enzyme Microb. Tech.* **2009**, *45*, 331–347.
- [62] C. Czeslik, T. Q. Luong, R. Winter, *MRS Bulletin* **2017**, *42*, 738–742.
- [63] H. Eyring, J. L. Magee, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1942**, *20*, 169–177.

- 
- [64] B. B. Boonyaratanakornkit, C. B. Park, D. S. Clark, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 235–249.
- [65] P. Butz, K. O. Greulich, H. Ludwig, *Biochemistry* **1988**, *27*, 1556–1563.
- [66] C. Balny in *Stability and Stabilization of Biocatalysts*, Bd. 15, (Hrsg.: A. Ballesteros, F. Plou, J. Iborra, P. Halling), C, Elsevier, Amsterdam, **1998**, S. 197–204.
- [67] L. King, G. Weber, *Biochemistry* **1986**, *25*, 3637–3640.
- [68] D. Lopes, S. Grudzielanek, K. Vogtt, R. Winter, *J. Non-Equil. Thermody.* **2007**, *32*, 41–97.
- [69] J. L. Silva, E. W. Miles, G. Weber, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5780–5786.
- [70] G. Weber in *High Pressure Chemistry, Biochemistry and Materials Science*, (Hrsg.: R. Winter, J. Jonas), Springer Netherlands, Dordrecht, **1993**, S. 471–487.
- [71] K. Ruan, G. Weber, *Biochemistry* **1989**, *28*, 2144–2153.
- [72] K. Ruan, G. Weber, *Biochemistry* **1993**, *32*, 6295–6301.
- [73] G. Weber, *Biochemistry* **1986**, *25*, 3626–3631.
- [74] H. Frauenfelder, S. Sligar, P. Wolynes, *Science* **1991**, *254*, 1598–1603.
- [75] K. Henzler-Wildman, D. Kern, *Nature* **2007**, *450*, 964–972.
- [76] R. Daniel, R. Dunn, J. Finney, J. Smith, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 69–92.
- [77] H. J. Berendsen, S. Hayward, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *10*, 165–169.
- [78] E. Z. Eisenmesser, D. A. Bosco, M. Akke, D. Kern, *Science* **2002**, *295*, 1520–1524.
- [79] 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*, 117–121.
- [80] R. Huber, W. S. Bennett Jr., *Biopolymers* **1983**, *22*, 261–279.

- [81] M. Karplus, J. Kuriyan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 6679–6685.
- [82] J. A. McCammon, *Rep. Prog. Phys.* **1984**, *47*, 1–46.
- [83] K. Teilum, J. G. Olsen, B. B. Kragelund, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2231–2247.
- [84] M. Wolf-Watz, V. Thai, K. Henzler-Wildman, G. Hadjipavlou, E. Z. Eisenmesser, D. Kern, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 945–949.
- [85] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer, **2002**.
- [86] P. H. Yancey, J. F. Siebenaller, *J. Exp. Biol.* **2015**, *218*, 1880–1896.
- [87] S. N. Timasheff, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 67–97.
- [88] S. N. Timasheff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9721–9726.
- [89] R. H. Kelly, P. H. Yancey, *Biol. Bull.* **1999**, *196*, 18–25.
- [90] P. H. Yancey, *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 2819–2830.
- [91] P. H. Yancey, W. R. Blake, J. Conley, *Comp. Biochem. Physiol. A* **2002**, *133*, 667–676.
- [92] D. Harries, J. Rösigen in *Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques*, (Hrsg.: J. J. Correia, H. W. Detrich III), Academic Press, London, **2008**, S. 679–735.
- [93] B. A. Seibel, P. J. Walsh, *J. Exp. Biol.* **2002**, *205*, 297–306.
- [94] V. Daggett, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1898–1916.
- [95] R. Sarma, S. Paul, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 5691–5704.
- [96] F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Phar.* **1888**, *24*, 247–260.
- [97] S. Shimizu, R. Stenner, N. Matubayasi, *Food Hydrocolloids* **2017**, *62*, 128–139.
- [98] M. Auton, D. W. Bolen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2005**, *102*, 15065–15068.



- 
- [99] M. Auton, L. M. F. Holthauzen, D. W. Bolen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 15317–15322.
- [100] D. W. Bolen, I. V. Baskakov, *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 955–963.
- [101] D. W. Bolen, G. D. Rose, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 339–362.
- [102] D. R. Canchi, P. Jayasimha, D. C. Rau, G. I. Makhatadze, A. E. Garcia, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 12095–12104.
- [103] S. S. Cho, G. Reddy, J. E. Straub, D. Thirumalai, *J. Phys. Chem. B.* **2011**, *115*, 13401–13407.
- [104] J. Ma, I. M. Pazos, F. Gai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2014**, *111*, 8476–8481.
- [105] C. Krywka, C. Sternemann, M. Paulus, M. Tolan, C. Royer, R. Winter, *ChemPhysChem.* **2008**, *9*, 2809–2815.
- [106] J. A. Raymond, A. L. DeVries, *Fish Physiol. Biochem.* **1998**, *1*, 387–398.
- [107] K. Hatori, T. Iwasaki, R. Wada, *Biophys. Chem.* **2014**, *193–194*, 20–26.
- [108] C. Rosin, P. H. Schummel, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *17*, 8330–8337.
- [109] D.-S. Yang, C. M. Yip, T. H. J. Huang, A. Chakrabartty, P. E. Fraser, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32970–32974.
- [110] B. J. Bennion, V. Daggett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6433–6438.
- [111] L. Knake, G. Schwaab, K. Kartaschew, M. Havenith, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 13842–13851.
- [112] Q. Zou, B. J. Bennion, V. Daggett, K. P. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1192–1202.
- [113] S. N. Timasheff in *Water and Life: A Comparative Analysis of Water Relationships at the Organismic, Cellular, and Molecular Levels*, (Hrsg.: G. N. Somero, C. B. Osmond, C. L. Bolis), Springer-Verlag, Berlin, **1992**, S. 70–84.
- [114] P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus, G. N. Somero, *Science* **1982**, *217*, 1214–1222.

- [115] L. Hua, R. Zhou, D Thirumalai, B. J. Berne, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 16928–16933.
- [116] D. R. Canchi, A. E. García, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, *64*, 273–293.
- [117] E. J. Guinn, L. M. Pegram, M. W. Capp, M. N. Pollock, M. T. Record, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16932–16937.
- [118] D. Horinek, R. R. Netz, *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 6125–6136.
- [119] S. Lee, Y. L. Shek, T. V. Chalikian, *Biopolymers* **2010**, *93*, 866–879.
- [120] C. J. Sahle, M. A. Schroer, I. Juurinen, J. Niskanen, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 16518–16526.
- [121] W. E. S. Carr, J. C. Netherton III., R. A. Gleeson, C. D. Derby, *Biol. Bull.* **1996**, *190*, 149–160.
- [122] L. Arns, V. Schuabb, S. Meichsner, M. Berghaus, R. Winter, *Z. Phys. Chem.* **2018**, *232*, 615–634.
- [123] M. Tropis, X. Meniche, A. Wolf, H. Gebhardt, S. Strelkov, M. Chami, D. Schomburg, R. Krämer, S. Morbach, M. Daffé, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26573–26585.
- [124] J. H. Crowe, L. M. Crowe, D. Chapman, *Science* **1984**, *223*, 701–703.
- [125] J. H. Crowe, L. M. Crowe, J. F. Carpenter, A. S. Rudolph, C. A. Wistrom, B. J. Spargo, T. J. Anchordoguy, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *947*, 367–384.
- [126] A. D. Elbein, Y. T. Pan, I. Pastuszak, D. Carroll, *Glycobiology* **2003**, *13*, 17R–27R.
- [127] N. K. Jain, I. Roy, *Prot. Sci.* **2009**, *18*, 24–36.
- [128] O. Kandror, A. DeLeon, A. L. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 9727–9732.
- [129] S. B. Leslie, E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe, L. M. Crowe, *Appl. Environ. Microb.* **1995**, *61*, 3592–3597.

- 
- [130] M. L. Rod, K. Y. Alam, P. R. Cunningham, D. P. Clark, *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 3601–3610.
- [131] E. Katenz, F. W. R. Vondran, R. Schwartlander, G. Pless, X. Gong, X. Cheng, P. Neuhaus, I. M. Sauer, *Liver Transplant.* **2007**, *13*, 38–45.
- [132] Y. Neuman, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2006**, *92*, 258–267.
- [133] A. Antunes, I. Alam, H. E. El Dorry, R. Siam, A. Robertson, V. B. Bajic, U. Stingl, *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 4551–4552.
- [134] Y. Dong, Q. Yang, S. Jia, C. Qiao, *Biochem. Eng. J.* **2007**, *37*, 226–230.
- [135] P. M. B. Fernandes, A. D. Panek, E. Kurtenbach, *FEMS Microbiol. Lett.* **2018**, *152*, 17–21.
- [136] S. Fujii, K. Obuchi, H. Iwahashi, T. Fujii, Y. Komatsu, *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *141*, 97–101.
- [137] S. Fujii, K. Obuchi, H. Iwahashi, T. Fujii, Y. Komatsu in *High Pressure Bioscience and Biotechnology*, (Hrsg.: R. Hayashi, C. Balny), Elsevier B.V., **1996**, S. 245–252.
- [138] H. Iwahashi, K. Obuchi, S. Fujii, Y. Komatsu, *Lett. Appl. Microbiol.* **1997**, *25*, 43–47.
- [139] H. Iwahashi, K. Obuchi, S. Fujii, Y. Komatsu, *FEBS Letters* **1997**, *416*, 1–5.
- [140] J. E. Purvis, L. P. Yomano, L. O. Ingram, *Appl. Environ. Microb.* **2005**, *71*, 3761–3769.
- [141] M. A. Vargas-Ortiz, R. Quintana-Castro, R. M. Oliart-Ros, J. De la Cruz-Medina, J. A. Ramírez de León, H. S. Garcia, *Arch. Insect Biochem.* **2013**, *82*, 196–212.
- [142] H. Liang Wang, L. Sun, *World J. Microb. Biot.* **2017**, *33*, 86.
- [143] M. A. Singer, S. Lindquist, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 460–468.
- [144] C. Branca, S. MacCarrone, S. Magazu, G. Maisano, S. M. Bennington, J. Taylor, *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 174513.

- [145] A. Lerbret, P. Bordat, F. Affouard, Y. Guinet, A. Hédoux, L. Paccou, D. Prévost, M. Descamps, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 881–887.
- [146] L. Sapir, D. Harries, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 624–634.
- [147] B. Demé, T. Zemb, *J. Appl. Cryst.* **2000**, *33*, 569–573.
- [148] C. J. Garvey, T. Lenné, K. L. Koster, B. Kent, G. Bryant, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 8148–8163.
- [149] B. Kent, T. Hunt, T. A. Darwish, T. Hauß, C. J. Garvey, G. Bryant, *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20140069.
- [150] P. Westh, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 4110–4112.
- [151] M. Doxastakis, A. K. Sum, J. J. De Pablo, *J. Phys. Chem. B.* **2005**, *109*, 24173–24181.
- [152] E. A. Golovina, A. V. Golovin, F. A. Hoekstra, R. Faller, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 490–499.
- [153] F. Lairion, E. A. Disalvo, *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *150*, 117–124.
- [154] C. Lambruschini, A. Relini, A. Ridi, L. Cordone, A. Gliozzi, *Langmuir* **2000**, *16*, 5467–5470.
- [155] S. Leekumjorn, A. K. Sum, *Mol. Simulat.* **2006**, *32*, 219–230.
- [156] C. S. Pereira, P. H. Hünenberger, *Mol. Simulat.* **2008**, *34*, 403–420.
- [157] A. Roy, R. Dutta, N. Kundu, D. Banik, N. Sarkar, *Langmuir* **2016**, *32*, 5124–5134.
- [158] A. Skibinsky, R. M. Venable, R. W. Pastor, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 4111–4121.
- [159] L. I. Viera, S. Alonso-Romanowski, V. Borovyagin, M. R. Feliz, E. A. Disalvo, *BBA - Biomembranes* **1993**, *1145*, 157–167.
- [160] M. A. Villarreal, S. B. Díaz, E. A. Disalvo, G. G. Montich, *Langmuir* **2004**, *20*, 7844–7851.
- [161] P. S. Belton, A. M. Gil, *Biopolymers* **1994**, *34*, 957–961.

- [162] M. V. Fedorov, J. M. Goodman, D. Nerukh, S. Schumm, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 2294–2299.
- [163] N. Grasmeyer, M. Stankovic, H. De Waard, H. W. Frijlink, W. L. J. Hinrichs, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* **2013**, *1834*, 763–769.
- [164] C. Olsson, H. Jansson, J. Swenson, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 4723–4731.
- [165] J. L. Green, C. A. Angell, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 2880–2882.
- [166] K. L. Koster, M. S. Webb, G. Bryant, D. V. Lynch, *BBA - Biomembranes* **1994**, *1193*, 143–150.
- [167] W. Q. Sun, A. C. Leopold, L. M. Crowe, J. H. Crowe, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1769–1776.
- [168] H. D. Andersen, C. Wang, L. Arleth, G. H. Peters, P. Westh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 1874–1878.
- [169] J. Kapla, J. Wohler, B. Stevansson, O. Engström, G. Widmalm, A. Maliniak, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 6667–6673.
- [170] R. J. Ellis, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 597–604.
- [171] S. B. Zimmerman, S. O. Trach, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 599–620.
- [172] A. P. Minton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 34–39.
- [173] A. P. Minton, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10577–10580.
- [174] A. P. Minton, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 971–985.
- [175] A. P. Minton, *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2863–2869.
- [176] M. S. Cheung, D. Klimov, D. Thirumalai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 4753–4758.
- [177] R. J. Ellis 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.
- [178] M. Erkkamp, S. Grobelny, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 5965–5976.

- [179] M. Erlkamp, J. Marion, N. Martinez, C. Czeslik, J. Peters, R. Winter, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 4842–4848.
- [180] R. Ravindra, S. Zhao, H. Gies, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12224–12225.
- [181] B. van den Berg, R. J. Ellis, C. M. Dobson, *EMBO J.* **1999**, *18*, 6927–6933.
- [182] H.-X. Zhou, G. Rivas, A. P. Minton, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 375–397.
- [183] H.-X. Zhou, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *469*, 76–82.
- [184] M. del Álamo, G. Rivas, M. G. Mateu, *J. Virol.* **2005**, *79*, 14271–14281.
- [185] G. Yamin, L. a. Munishkina, M. a. Karymov, Y. L. Lyubchenko, V. N. Uversky, A. L. Fink, *Biochemistry* **2005**, *44*, 9096–9107.
- [186] Y. Zhai, R. Winter, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 386–393.
- [187] G. Rivas, A. P. Minton, *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 970–981.
- [188] A. P. Minton, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 101–109.
- [189] M. Sarkar, A. E. Smith, G. J. Pielak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 19342–19347.
- [190] Y. Wang, M. Sarkar, A. E. Smith, A. S. Krois, G. J. Pielak, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16614–16618.
- [191] R. V. Stick, S. J. Williams in *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life*, (Hrsg.: R. V. Stick, S. J. Williams), Elsevier, Oxford, **2009**, S. 321–341.
- [192] P. Attri, P. Venkatesu, M. J. Lee, *J. Phys. Chem. B.* **2010**, *114*, 1471–1478.
- [193] B. S. Kendrick, B. S. Chang, T. Arakawa, B. Peterson, T. W. Randolph, M. C. Manning, J. F. Carpenter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 11917–11922.
- [194] A. Lerbret, P. Bordat, F. Affouard, A. Hédoux, Y. Guinet, M. Descamps, *J. Phys. Chem B* **2007**, *111*, 9410–9420.
- [195] J. Bai, M. Liu, G. J. Pielak, C. Li, *ChemPhysChem* **2016**, *18*, 55–58.

- [196] M. Gao, K. Estel, J. Seeliger, R. P. Friedrich, S. Dogan, E. E. Wanker, R. Winter, S. Ebbinghaus, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 8338–48.
- [197] P. H. Schummel, A. Haag, W. Kremer, H. R. Kalbitzer, R. Winter, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 6575–6586.
- [198] P. H. Schummel, Masterarbeit, TU Dortmund, **2015**.
- [199] P. Sheterline, J. Clayton, J. Sparrow, *Protein Profile* **1995**, *2*, 1–103.
- [200] A. A. Lal, S. L. Brenner, E. D. Korn, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 8794–8800.
- [201] L. S. Tobacman, S. L. Brenner, E. D. Korn, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 8806–8812.
- [202] B. Gaszner, M. Nyitrai, N. Hartvig, T. Köszegi, B. Somogyi, J. Belágyi, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12885–12892.
- [203] T. D. Pollard, J. A. Cooper, *Science* **2009**, *326*, 1208–1212.
- [204] D. H. Bartlett, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 367–381.
- [205] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 858–875.
- [206] A. Picard, I. Daniel, *Biophys. Chem.* **2013**, *183*, 30–41.
- [207] A. Ben-Naim, *Molecular Theory of Solutions*, Oxford University Press, Oxford, **2009**.
- [208] A. Ben-Naim, *Molecular Theory of Water and Aqueous Solutions: The role of water in protein folding, self-assembly and molecular recognition*, World Scientific, **2011**.
- [209] A. Salis, B. W. Ninham, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7358–7377.
- [210] S. Sukenik, L. Sapir, D. Harries, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2013**, *18*, 495–501.
- [211] N. Vlachy, B. Jagoda-Cwiklik, R. Vácha, D. Touraud, P. Jungwirth, W. Kunz, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *146*, 42–47.
- [212] J. N. Onuchic, Z. Luthey-Schulten, P. G. Wolynes, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, *48*, 545–600.

- [213] P. Graceffa, R. Dominguez, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34172–34180.
- [214] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- [215] *High Pressure Bioscience - Basic Concepts, Applications and Frontiers*, (Hrsg.: K. Akasaka, M. Hitoshi), Springer, **2015**, S. 730.
- [216] K. Akasaka, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1814–1835.
- [217] M. Beck Erlach, C. E. Munte, W. Kremer, R. Hartl, D. Rochelt, D. Niesner, H. R. Kalbitzer, *J. Mag. Res.* **2010**, *204*, 196–199.
- [218] H. R. Kalbitzer, M. Spoerner, P. Ganser, C. Hozsa, W. Kremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16714–16719.
- [219] R. Mishra, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6518–6521.
- [220] J. L. Silva, D. Foguel, C. A. Royer, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 612–618.
- [221] HYPERMOL – Protein & Cytoskeleton Research Tools, **2019**, [www.hypermol.com](http://www.hypermol.com).
- [222] A. G. Gornall, C. J. Bardawill, M. M. David, *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 751–766.
- [223] ISS, High Pressure Cell System - Data Sheet.
- [224] Autodesk, Autodesk Inventor, San Rafael, CA, **2018**.
- [225] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd, Springer, **2011**.
- [226] J. Koo, C. Czeslik, *Soft Matter* **2012**, 11670–11676.
- [227] C. Rosin, M. Erkkamp, J. von der Ecken, S. Raunser, R. Winter, *Biophys. J.* **2014**, *107*, 2973–2983.
- [228] G. Pappenberger, C. Saudan, M. Becker, a. E. Merbach, T. Kiefhaber, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 17–22.
- [229] K. Sasahara, M. Sakurai, K. Nitta, *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 693–701.



- [230] J. B. Rouget, M. A. Schroer, C. Jeworrek, M. Pühse, J. L. Saldana, Y. Bessin, M. Tolan, D. Barrick, R. Winter, C. A. Royer, *Biophys. J.* **2010**, *98*, 2712–2721.
- [231] Y. Ikeuchi, A. Suzuki, T. Oota, K. Hagiwara, R. Tatsumi, T. Ito, C. Balny, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 364–371.
- [232] N. Suzuki, Y. Tamura, K. Mihashi, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1292*, 265–272.
- [233] D. Lorinczy, F. Könczöl, B. Gaszner, J. Belagyi, *Thermochim. Acta* **1998**, *322*, 95–100.
- [234] S. Cinar, C. Czeslik, *Colloid. Surface B* **2015**, *129*, 161–168.
- [235] A. Bertazzon, G. H. Tian, A. Lamblin, T. Y. Tsong, *Biochemistry* **1990**, *29*, 291–298.
- [236] I. Kuznetsova, K. Turoverov, V. Uversky, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 23090–23140.
- [237] H.-X. Zhou, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 123–130.
- [238] M. A. Schroer, Y. Zhai, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11615–11618.
- [239] M. A. Schroer, Y. Zhai, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11413–11416.
- [240] P. H. Schummel, M. Gao, R. Winter, *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 189–197.
- [241] C. Bonfils, N. Bec, B. Lacroix, M. C. Harricane, C. Larroque, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5570–5581.
- [242] J. Löwe, H. Li, K. Downing, E. Nogales, *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 1045–1057.
- [243] L. M. Rice, E. A. Montabana, D. A. Agard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 5378–5383.
- [244] A. Desai, T. J. Mitchison, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 83–117.
- [245] L. Evans, T. Mitchison, M. Kirschner, *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 1185–1191.

- [246] R. Zhang, E. Nogales, *J. Struct. Biol.* **2015**, *192*, 245–254.
- [247] Y. Gebremichael, J.-W. Chu, G. a. Voth, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 2487–2499.
- [248] H. P. Erickson, E. T. O’Brien, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 145–166.
- [249] C. Allen, G. G. Borisy, *J. Mol. Biol.* **1974**, *90*, 381–402.
- [250] L. A. Amos, A Klug, *J. Cell Sci.* **1974**, *14*, 523–549.
- [251] J. M. Kollman, A. Merdes, L. Mourey, D. A. Agard, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 709–721.
- [252] D. Job, O. Valiron, B. Oakley, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 111–117.
- [253] G. M. Alushin, G. C. Lander, E. H. Kellogg, R. Zhang, D. Baker, E. Nogales, *Cell* **2014**, *157*, 1117–1129.
- [254] F. Oosawa, M. Kasai, *J. Mol. Biol.* **1962**, *4*, 10–21.
- [255] T. Mitchison, M. Kirschner, *Nature* **1984**, *312*, 232–237.
- [256] G. J. Brouhard, L. M. Rice, *J. Cell Biol.* **2014**, *207*, 323–334.
- [257] A. A. Hyman, S Salser, D. N. Drechsel, N Unwin, T. J. Mitchison, *Mol. Biol. Cell* **1992**, *3*, 1155–1167.
- [258] E. Nogales, R. Zhang, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *37*, 90–96.
- [259] R. B. G. Ravelli, B. Gigant, P. A. Curmi, I. Jourdain, S. Lachkar, A. Sobel, M. Knossow, *Nature* **2004**, *428*, 198–202.
- [260] C. Conde, A. Cáceres, *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 319–332.
- [261] L. I. Binder, J. L. Rosenbaum, *J. Cell. Biol.* **1978**, *79*, 500–515.
- [262] M. Nishiyama, Y. Kimura, Y. Nishiyama, M. Terazima, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1142–1150.
- [263] D. L. Sackett, R. E. Lippoldt, *Biochemistry* **1991**, *30*, 3511–3517.
- [264] K. A. Suprenant, J. C. Marsh, *J. Cell Sci.* **1987**, *87*, 71–84.
- [265] B. Vulevic, J. J. Correia, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1357–1375.

- [266] C. Rosin, K. Estel, J. Hälker, R. Winter, *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 1379–1385.
- [267] P. Ganguly, N. F. A. van der Vegt, J.-E. Shea, *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 3052–3059.
- [268] F. Meersman, D. Bowron, A. K. Soper, M. H. J. Koch, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 2559–2566.
- [269] R. Gilman-Politi, D. Harries, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 3816–3828.
- [270] M. Jiao, H.-T. Li, J. Chen, A. P. Minton, Y. Liang, *Biophys. J.* **2010**, *99*, 914–923.
- [271] S. R. McGuffee, A. H. Elcock, *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6*, e1000694.
- [272] Y. Phillip, M. Harel, R. Khait, S. Qin, H.-X. Zhou, G. Schreiber, *Biophys. J.* **2012**, *103*, 1011–1019.
- [273] M. Wieczorek, S. Chaaban, G. J. Brouhard, *Cell. Mol. Bioeng.* **2013**, *6*, 383–392.
- [274] J. Seeliger, A. Werkmüller, R. Winter, *PloS one* **2013**, *8*, e69652.
- [275] G. G. Kovács, L. László, J. Kovács, P. H. Jensen, E. Lindersson, G. Botond, T. Molnár, A. Perczel, F. Hudecz, G. Mezo, A. Erdei, L. Tirián, A. Lehotzky, E. Gelpi, H. Budka, J. Ovádi, *Neurobiol. Dis.* **2004**, *17*, 155–162.
- [276] D. Hall, A. P. Minton, *Anal. Biochem.* **2005**, *345*, 198–213.
- [277] J. J. Arbildua, J. E. Brunet, D. M. Jameson, M. López, E. Nova, R. Lagos, O. Monasterio, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 410–419.
- [278] J. C. Lee, R. P. Frigon, S. N. Timasheff, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 7253–7262.
- [279] L. Nielsen, R. Khurana, A. Coats, S. Frokjaer, J. Brange, S. Vyas, V. N. Uversky, A. L. Fink, *Biochemistry* **2001**, *40*, 6036–6046.
- [280] D. Bonne, C. Heusele, C. Simon, D. Pantaloni, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 2819–2825.

- [281] J. Fernando Díaz, R. Strobe, Y. Engelborghs, A. A. Souto, J. M. Andreu, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26265–26276.
- [282] K. A. Johnson, G. G. Borisy, *J. Mol. Biol.* **1979**, *117*, 1–31.
- [283] M. L. Barcellona, E. Gratton, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *993*, 174–178.
- [284] M. L. Barcellona, G. Cardiel, E. Gratton, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *170*, 270–280.
- [285] P. A. Deymier, Y. Yang, J. Hoying, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear Soft Matter Phys.* **2005**, *72*, 021906–1–8.
- [286] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4th., W. H. Freeman, New York, **2000**.
- [287] D. L. Sackett, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **1997**, *273*, R669–R676.
- [288] J. Seeliger, K. Estel, N. Erwin, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 8902–8907.
- [289] F. Scaramozzino, D. W. Peterson, P. Farmer, J. T. Gerig, D. J. Graves, J. Lew, *Biochemistry* **2006**, *45*, 3684–3691.
- [290] V. N. Uversky, J. Li, A. L. Fink, *FEBS Letters* **2001**, *509*, 31–35.
- [291] C. Rosin, P. H. Schummel, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *17*, 8330–8337.
- [292] D. R. Canchi, D. Paschek, A. E. García, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2338–2344.
- [293] S. Paul, G. N. Patey, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4476–4482.
- [294] S. Patra, N. Erwin, R. Winter, *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 2164–2169.
- [295] M. Gao, R. Winter, *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 3681–3686.
- [296] D. Gnutt, M. Gao, O. Brylski, M. Heyden, S. Ebbinghaus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2548–2551.

- [297] L. A. Benton, A. E. Smith, G. B. Young, G. J. Pielak, *Biochemistry* **2012**, *51*, 9773–9775.
- [298] P. H. Yancey, A. L. Fyfe-Johnson, R. H. Kelly, V. P. Walker, M. T. Auñón, *J. Exp. Zool.* **2001**, *289*, 172–176.
- [299] B. Moeser, D. Horinek, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 107–114.
- [300] E. Schneck, D. Horinek, R. R. Netz, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 8310–8321.
- [301] J. Yoon, D. Thirumalai, C. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12112–12121.
- [302] P. H. Schummel, M. W. Jaworek, C. Rosin, J. Högg, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 28400–28411.
- [303] S. A. Berkowitz, G. Velicelebi, J. W. Sutherland, J. M. Sturtevant, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 4425–4429.
- [304] D. Sept, N. A. Baker, J. A. McCammon, *Protein Sci.* **2003**, *12*, 2257–2261.
- [305] S. A. Sánchez, J. E. Brunet, D. M. Jameson, R. Lagos, O. Monasterio, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 81–88.
- [306] E. H. Kellogg, N. M. A. Hejab, S. Howes, P. Northcote, J. H. Miller, J. F. Díaz, K. H. Downing, E. Nogales, *J. Mol. Biol.* **2017**, *429*, 633–646.
- [307] S. Kapoor, A. Werkmüller, R. S. Goody, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6149–6156.
- [308] G. Panick, R. Malessa, R. Winter, G. Rapp, K. J. Frye, C. A. Royer, *J. Mol. Biol.* **1998**, *275*, 389–402.
- [309] M. Gao, M. Berghaus, S. Möbitz, V. Schuabb, N. Erwin, M. Herzog, K. Julius, C. Sternemann, R. Winter, *Biophys. J.* **2018**, *114*, 1080–1090.
- [310] T. Ikkai, T. Ooi, *Biochemistry* **1966**, *5*, 1551–1560.
- [311] T. Ikkai, T. Ooi, H. Noguchi, *Science* **1966**, *152*, 1756–1757.
- [312] M. Kikumoto, Y. Tamura, A. Ooi, K. Mihashi, *J. Biochem.* **2003**, *133*, 687–691.

- [313] R. R. Swezey, G. N. Somero, *Biochemistry* **1985**, *24*, 852–860.
- [314] R. Winter, C. Jeworrek, *Soft Matter* **2009**, *5*, 3157–3173.
- [315] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700–706.
- [316] P. T. T. Wong, D. J. Moffatt, *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 1279–1281.
- [317] J. M. De Pereda, D. Leynadier, J. A. Evangelio, P. Chacón, J. M. Andreu, *Biochemistry* **1996**, *35*, 14203–14215.
- [318] G. Panick, R. Winter, *Biochemistry* **2000**, *39*, 1862–1869.
- [319] L. Mitra, N. Smolin, R. Ravindra, C. Royer, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 1249–1265.
- [320] G. Panick, R. Malessa, R. Winter, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6512–6519.
- [321] H. Herberhold, R. Winter, *J. Phys.: Condens. Matter* **2002**, *14*, 11485–11488.
- [322] J. F. Díaz, M. Menéndez, J. M. Andreu, *Biochemistry* **1993**, *32*, 10067–10077.
- [323] A. Das, S. Sinha, B. R. Acharya, P. Paul, B. Bhattacharyya, G. Chakrabarti, *BMB reports* **2008**, *41*, 62–67.
- [324] G. C. Na, S. N. Timasheff, *J. Mol. Biol.* **1981**, *151*, 165–178.
- [325] Y. Zhai, L. Okoro, A. Cooper, R. Winter, *Biophys. Chem.* **2011**, *156*, 13–23.
- [326] L. Mitra, J.-B. Rouget, B. Garcia-Moreno, C. A. Royer, R. Winter, *Chem-PhysChem* **2008**, *9*, 2715–2721.
- [327] P. H. Yancey, B. Speers-Roesch, S. Atchinson, J. D. Reist, A. R. Majewski, J. R. Treberg, *Physiol. Biochem. Zool.* **2018**, *91*, 788–796.
- [328] S. R. Al-Ayoubi, P. H. Schummel, M. Golub, J. Peters, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 14230–14237.
- [329] P. M. Oger, M. Jebbar, *Res. Microbiol.* **2010**, *161*, 799–809.
- [330] A. Kuffel, J. Zielkiewicz, *J. Chem. Phys.* **2010**, *133*, 035102.
- [331] A. Panuszko, P. Bruździak, J. Zielkiewicz, D. Wyrzykowski, J. Stangret, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 14797–14809.

- [332] H. Wei, Y. Fan, Y. Q. Gao, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 557–568.
- [333] A. P. Minton, *Curr. Biol.* **2006**, *16*, R269–R271.
- [334] R. Ravindra, R. Winter, *ChemPhysChem.* **2004**, *5*, 566–571.
- [335] S. Zhao, H. Gies, R. Winter, *Z. Phys. Chem.* **2007**, *221*, 139–154.
- [336] H.-X. Zhou, K. A. Dill, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11289–11293.
- [337] M. A. Schroer, J. Markgraf, D. C. F. Wieland, C. J. Sahle, J. Möller, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *106*, 178102.
- [338] J. Möller, M. A. Schroer, M. Erlkamp, S. Grobelny, M. Paulus, S. Tiemeyer, F. J. Wirkert, M. Tolan, R. Winter, *Biophys. J.* **2012**, *102*, 2641–2648.
- [339] J. Möller, S. Grobelny, J. Schulze, S. Bieder, A. Steffen, M. Erlkamp, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Phys. Rev. Lett.* **2014**, *112*, 028101.
- [340] S. Grobelny, M. Erlkamp, J. Möller, M. Tolan, R. Winter, *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 22D506.
- [341] F. Gabel, D. Bicout, U. Lehnert, M. Tehei, M. Weik, G. Zaccai, *Q. Rev. Biophys.* **2002**, *35*, 327–367.
- [342] N. Martinez, G. Michoud, A. Cario, J. Ollivier, B. Franzetti, M. Jebbar, P. Oger, J. Peters, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32816.
- [343] V. Calandrini, V. Hamon, K. Hinsén, P. Calligari, M. C. Bellissent-Funel, G. R. Kneller, *Chem. Phys.* **2008**, *345*, 289–297.
- [344] V. Calandrini, G. R. Kneller, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 065102.
- [345] L. Hong, N. Smolin, B. Lindner, A. P. Sokolov, J. C. Smith, *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *107*, 148102.
- [346] L. Hong, X. Cheng, D. C. Glass, J. C. Smith, *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *108*, 238102.
- [347] L. Hong, D. C. Glass, J. D. Nickels, S. Perticaroli, Z. Yi, M. Tyagi, H. O. Neill, Q. Zhang, A. P. Sokolov, J. C. Smith, *Phys. Rev. Lett.* **2013**, *110*, 028104.

- [348] A. Lerbret, A. Hédoux, B. Annighöfer, M.-C. Bellissent-Funel, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2012**, *81*, 326–340.
- [349] L. Meinhold, J. C. Smith, *Phys. Rev. E: Stat. Nonlinear Softmatter Phys.* **2005**, *72*, 061908.
- [350] L. Meinhold, J. C. Smith, A. Kitao, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 17261–17265.
- [351] J. H. Roh, J. E. Curtis, S. Azzam, V. N. Novikov, I. Peral, Z. Chowdhuri, R. B. Gregory, A. P. Sokolov, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2573–2588.
- [352] D. Vural, L. Hong, J. C. Smith, H. R. Glyde, *Phys. Rev. E: Stat. Nonlinear Softmatter Phys.* **2013**, *88*, 052706.
- [353] G. Zaccai, *Science* **2000**, *288*, 1604–1608.
- [354] 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 Res.* **2012**, *32*, 97–102.
- [355] J. Peters, N. Martinez, M. Trovaslet, K. Scannapieco, M. M. Koza, P. Masson, F. Nachon, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 12992–13001.
- [356] V. Sears, *Neutron News* **1992**, *3*, 26–37.
- [357] W. Doster, S. Cusack, W. Petry, *Nature* **1989**, *337*, 754–756.
- [358] S. Magazù, F. Migliardo, A. Benedetto, C. Mondelli, M. A. Gonzalez, *J. Non-Cryst. Solids* **2011**, *357*, 664–670.
- [359] M. S. Weiss, G. J. Palm, R. Hilgenfeld, *Acta Crystallogr. D* **2000**, *56*, 952–958.
- [360] D. Reinstädler, H. Fabian, J. Backmann, D. Naumann, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15822–15830.
- [361] Y. Kitamura, T. Itoh, *J. Solution Chem.* **1987**, *16*, 715–725.
- [362] 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*, 14–18.



- [363] V. A. Sidorov, R. A. Sadykov, *J. Phys-Condens. Mat.* **2005**, *17*, S3005–S3008.
- [364] E. Lelièvre-Berna, B. Demé, J. Gonthier, J.-P. Gonzales, J. Maurice, Y. Memphis, C. Payre, P. Oger, J. Peters, S. Vial, *J. Neutron Res.* **2017**, *19*, 77–84.
- [365] J. Pérez, J.-M. Zanotti, D. Durand, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 454–469.
- [366] A. Rahman, K. S. Singwi, A. Sjölander, *Phys. Rev.* **1962**, *126*, 986–996.
- [367] D. Richard, M. Ferrand, G. J. Kearley, *J. Neutron Res.* **1996**, *4*, 33–39.
- [368] J. Marion, M. Trovaslet, N. Martinez, P. Masson, R. Schweins, F. Nachon, M. Trapp, J. Peters, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 3157–3163.
- [369] F. Roosen-Runge, M. Hennig, F. Zhang, R. M. J. Jacobs, M. Sztucki, H. Schober, T. Seydel, F. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 11815–11820.
- [370] H. Frauenfelder, G. Chen, J. Berendzen, P. W. Fenimore, H. Jansson, B. H. McMahon, I. R. Stroe, J. Swenson, R. D. Young, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 5129–5134.
- [371] P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, B. H. McMahon, R. D. Young, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14408–14413.
- [372] M.-C. Bellissent-Funel, A. Hassanali, M. Havenith, R. Henchman, P. Pohl, F. Sterpone, D. van der Spoel, Y. Xu, A. E. Garcia, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7673–7697.
- [373] J. Möller, S. Grobelny, J. Schulze, A. Steffen, S. Bieder, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 7423–7429.
- [374] S. D. Allison, B. Chang, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *365*, 289–298.
- [375] L. Cordone, M. Ferrand, E. Vitrano, G. Zaccai, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1043–1047.
- [376] L. Cordone, G. Cottone, S. Giuffrida, G. Palazzo, G. Venturoli, C. Viappiani, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom.* **2005**, *1749*, 252–281.

- [377] L. Cordone, G. Cottone, S. Giuffrida, *J. Phys-Condens. Mat.* **2007**, *19*, 205110.
- [378] G. Cottone, S. Giuffrida, G. Ciccotti, L. Cordone, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2005**, *59*, 291–302.
- [379] A. Lerbret, F. Affouard, P. Bordat, A. Hédoux, Y. Guinet, M. Descamps, *Chem. Phys.* **2008**, *345*, 267–274.
- [380] A. Lerbret, F. Affouard, P. Bordat, A. Hédoux, Y. Guinet, M. Descamps, *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 245103.
- [381] R. D. Lins, C. S. Pereira, P. H. Hünenberger, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2004**, *55*, 177–186.
- [382] W. Dzwolak, M. Kato, Y. Taniguchi, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 131–144.
- [383] T. M. Li, J. W. Hook III, H. G. Drickamer, G. Weber, *Biochemistry* **1976**, *15*, 5571–5580.
- [384] Y. L. Shek, T. V. Chalikian, *Biochemistry* **2013**, *52*, 672–680.
- [385] F. Meersman, K. Heremans, *Biochemistry* **2003**, *42*, 14234–14241.
- [386] P. Sassi, A. Giugliarelli, M. Paolantoni, A. Morresi, G. Onori, *Biophys. Chem.* **2011**, *158*, 46–53.
- [387] S. Choudhary, N. Kishore, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104600.
- [388] S. Suladze, M. Kahse, N. Erwin, D. Tomazic, R. Winter, *Methods* **2015**, *76*, 67–77.
- [389] K. Wood, F.-X. Gallat, R. Otten, A. J. van Heel, M. Lethier, L. van Eijck, M. Moulin, M. Haertlein, M. Weik, F. A. A. Mulder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 665–668.
- [390] S. Dellerue, A.-J. Petrescu, J. C. Smith, M.-C. Bellissent-Funel, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1666–1676.
- [391] P. H. Schummel, C. Anders, M. Jaworek, R. Winter, *ChemPhysChem* **2019**, *20*, 1098–1109.

- [392] D. Drenckhahn, T. D. Pollard, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12754–12758.
- [393] R. A. Lindner, G. B. Ralston, *Biophys. Chem.* **1997**, *66*, 57–66.
- [394] P. Kapusta, R. Macháň, A. Benda, M. Hof, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 12890–12910.
- [395] E. Haustein, P. Schwille, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2007**, *36*, 151–169.
- [396] P. Kapusta, Picoquant, *Appl. Note* **2009**, 1–3.
- [397] P. S. Sardar, S. S. Maity, L. Das, S. Ghosh, *Biochemistry* **2007**, *46*, 14544–14556.
- [398] A. Maeno, H. Matsuo, K. Akasaka, *Biophysics* **2009**, *5*, 1–9.
- [399] A. Zipp, W. Kauzmann, *Biochemistry* **1973**, *12*, 4217–4228.
- [400] M. W. Lassalle, H. Yamada, K. Akasaka, *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 293–302.
- [401] J. F. Brandts, R. J. Oliveira, C. Westort, *Biochemistry* **1970**, *9*, 1038–1047.
- [402] C. A. Royer, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1769–1784.
- [403] C. Royer, R. Winter, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, *16*, 568–571.
- [404] T. Q. Luong, S. Kapoor, R. Winter, *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 3555–3571.
- [405] Y. Chen, J. D. Müller, P. T. So, E. Gratton, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 553–567.
- [406] D. E. Koppel, *Phys. Rev. A* **1974**, *10*, 1938–1945.
- [407] G. Hummer, S. Garde, A. E. García, M. E. Paulaitis, L. R. Pratt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 1552–1555.
- [408] F. Montecinos-Franjola, P. Schuck, D. L. Sackett, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 9281–9294.
- [409] H. Herberhold, R. Winter, *Biochemistry* **2002**, *41*, 2396–2401.
- [410] S. Guha, S. S. Rawat, A. Chattopadhyay, B. Bhattacharyya, *Biochemistry* **1996**, *35*, 13426–13433.
- [411] C. Hölzl, P. Kibies, S. Imoto, R. Frach, S. Suladze, R. Winter, D. Marx, D. Horinek, S. M. Kast, *J. Chem. Phys.* **2016**, *144*, 144104.

- [412] M. Vigorita, S. Cozzolino, R. Oliva, G. Graziano, P. Del Vecchio, *Biopolymers* **2018**, e23104.
- [413] S. Imoto, P. Kibies, C. Rosin, R. Winter, S. M. Kast, D. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9534–9538.
- [414] S. Imoto, P. Kibies, C. Rosin, R. Winter, S. M. Kast, D. Marx, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 9686–9690.
- [415] V. Kocherbitov, V. Veryazov, O. Söderman, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2007**, *808*, 111–118.
- [416] K. L. Munroe, D. H. Magers, N. I. Hammer, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 7699–7707.
- [417] C. Schuabb, S. Patarraia, M. Berghaus, R. Winter, *Biophys. Chem.* **2017**, *231*, 161–166.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des Faltungstrichters eines Proteins. . . . .	10
1.2	Schematische Darstellung eines Druck-Temperatur-Phasendiagramms eines monomeren Proteins. . . . .	12
1.3	Schematische Darstellung der Proteinbewegungen. . . . .	18
1.4	Verwendete Cosolventien. . . . .	23
1.5	Schematische Darstellung des „ <i>excluded volume</i> “-Effekts. . . . .	28
1.6	Chemische Struktur von Saccharose und Ficoll <sup>®</sup> PM 70 . . . . .	29
2.1	3D-Bändermodell der Kristallstruktur von G-Actin. . . . .	35
2.2	Explosionszeichnung der verwendeten Hochdruckzelle von ISS. . . . .	38
2.3	Druckabhängige, flächennormierte Emissionsspektren von <i>N</i> -Acetyl- L-Tryptophanamid . . . . .	40
2.4	Druckabhängige Intensitätsänderung bei $\lambda = 323$ nm von NATA. . . . .	41
2.5	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M G-Actin. . . . .	42
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	42
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	42
2.6	Entfaltungskurve von 5 $\mu$ M G-Actin . . . . .	43
2.7	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit von 2 M TMAO. . . . .	45
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	45
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	45
2.8	Entfaltungskurven von 5 $\mu$ M G-Actin, sowie in Anwesenheit von 1 und 2 M TMAO . . . . .	46

2.9	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit von 2 M Harnstoff. . . . .	48
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	48
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	48
2.10	Entfaltungskurven von 5 $\mu$ M G-Actin sowie in Anwesenheit von Harnstoff . . . . .	49
2.11	Standard-Entfaltungs-Gibbs-Energie von G-Actin in Anwesenheit von Harnstoff . . . . .	50
2.12	Bestimmung des Entfaltungsdrucks von G-Actin . . . . .	53
2.13	Simulierte Entfaltungskurven von G-Actin . . . . .	54
2.14	Entfaltungskurven von 5 $\mu$ M G-Actin sowie in Anwesenheit von TMAO-Harnstoff-Gemischen . . . . .	56
2.15	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit von 10 Gew.-% Ficoll <sup>®</sup> PM 70 . . . . .	58
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	58
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	58
2.16	Entfaltungskurven von 5 $\mu$ M G-Actin, sowie in Anwesenheit von Mikro- und Makrocrowdern . . . . .	59
2.17	Temperaturabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M G-Actin. . . . .	62
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	62
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	62
2.18	Entfaltungskurve von 5 $\mu$ M G-Actin bei einem Druck von 1 bar . . . . .	63
2.19	Temperaturabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit von 2 M TMAO. . . . .	68
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	68
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	68
2.20	Entfaltungskurven von 5 $\mu$ M G-Actin sowie in Anwesenheit von 1 und 2 M TMAO bei einem Druck von 1 bar. . . . .	69
2.21	Temperaturabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit von 2 M Harnstoff. . . . .	71

---

a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	71
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	71
2.22	Thermische Entfaltungskurven von 5 $\mu$ M G-Actin in Abwesenheit sowie in Anwesenheit von 1 und 2 M Harnstoff bei einem Druck von 1 bar. . . . .	72
2.23	Thermische Entfaltungskurven von 5 $\mu$ M G-Actin sowie in Anwesenheit von verschiedenen TMAO/Harnstoff-Gemischen bei einem Druck von 1 bar. . . . .	74
2.24	Thermische Entfaltungskurven von 5 $\mu$ M G-Actin sowie in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen Ficoll <sup>®</sup> PM 70 bei einem Druck von 1 bar. . . . .	76
2.25	Entfaltungstemperaturen von 5 $\mu$ M G-Actin in An- und Abwesenheit von Cosolventien. . . . .	77
2.26	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit von 1 M TMAO. . . . .	79
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	79
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	79
2.27	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit von 1, 3 und 4 M Harnstoff. . . . .	80
a	Gemessene Emissionsspektren. . . . .	80
b	Flächennormierte Emissionsspektren. . . . .	80
c	Gemessene Emissionsspektren. . . . .	80
d	Flächennormierte Emissionsspektren. . . . .	80
e	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	80
f	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	80
2.28	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M G-Actin in Anwesenheit von TMAO/Harnstoff-Mischungen. . . . .	81
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	81
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	81
c	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	81

d	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	81
e	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	81
f	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	81
2.29	Temperaturabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu\text{M}$ G-Actin in Anwesenheit von 1 M TMAO. . . . .	82
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	82
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	82
2.30	Temperaturabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu\text{M}$ G-Actin in Anwesenheit von 1 M Harnstoff. . . . .	82
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	82
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	82
2.31	Temperaturabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu\text{M}$ G-Actin in Anwesenheit von TMAO/Harnstoff-Mischungen. . . . .	83
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	83
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	83
c	Gemessene Emissionsspektren. . . . .	83
d	Flächennormierte Emissionsspektren. . . . .	83
e	Gemessene Emissionsspektren. . . . .	83
f	Flächennormierte Emissionsspektren. . . . .	83
3.1	Schematische Darstellung des Polymerisationsverlaufs von Tubulin. . . . .	95
3.2	Polymerisationskinetik von 30 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von TMAO. . . . .	97
3.3	Kinetik-Analyse der Polymerisation von 30 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von Cosolventien. . . . .	98
a	Apparente Wachstumsraten $k_{\text{app}}$ . . . . .	98
b	Halbwertszeiten $t_{1/2}$ . . . . .	98
c	Verweilzeiten $t_{\text{lag}}$ . . . . .	98
3.4	Konzentrationsabhängige Entwicklung der apparenten Wachstumsrate $k_{\text{app}}$ von 30 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von TMAO und Harnstoff. . . . .	99
3.5	Bestimmung der kritischen Konzentration $c_c$ von $\alpha/\beta$ -Tubulin . . . . .	100



---

3.6	Statische Fluoreszenzanisotropie-Daten der Polymerisation von $\alpha/\beta$ -Tubulin . . . . .	101
3.7	Repräsentative CLSM-Bilder von Mikrotubuli in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff. . . . .	102
3.8	Polymerisationskinetik von 30 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von Harnstoff. . . . .	105
3.9	Polymerisationskinetik von 30 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von TMAO/Harnstoff-Mischungen. . . . .	107
3.10	Polymerisationskinetik von 30 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von Crowdern. . . . .	109
3.11	Kinetik-Analyse der Polymerisation von 30 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von Crowdern. . . . .	110
a	Apparente Wachstumsraten $k_{app}$ . . . . .	110
b	Halbwertszeiten $t_{1/2}$ . . . . .	110
c	Verweilzeiten $t_{lag}$ . . . . .	110
3.12	Representative CLSM-Bilder der gebildeten Mikrotubuli in Anwesenheit von Crowdern. . . . .	111
3.13	Unnormierte Polymerisationskinetik von 30 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von TMAO. . . . .	115
3.14	Unnormierte Polymerisationskinetik von 30 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von Harnstoff. . . . .	115
3.15	Unnormierte Polymerisationskinetik von 30 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von TMAO/Harnstoff-Mischungen. . . . .	116
3.16	Polymerisationskinetik von 30 $\mu$ M Tubulin, extrahiert aus Lammhirnen, in Anwesenheit von TMAO. . . . .	116
3.17	Polymerisationskinetik von 30 $\mu$ M Tubulin, extrahiert aus Lammhirnen, in Anwesenheit von Harnstoff. . . . .	117
3.18	Polymerisationskinetik von 30 $\mu$ M Tubulin, extrahiert aus Lammhirnen, in Anwesenheit von TMAO/Harnstoff-Mischungen. . . . .	117

3.19	Polymerisationskinetik von 30 $\mu$ M Tubulin, extrahiert aus Lammschirnen, in Anwesenheit von Crowdern. . . . .	118
3.20	Kinetik-Analyse der Polymerisation von Tubulin, extrahiert aus Lammschirnen, in An- und Abwesenheit von Cosolventien und Crowdern. . .	119
a	Apparente Wachstumsraten $k_{app}$ . . . . .	119
b	Halbwertszeiten $t_{1/2}$ . . . . .	119
c	Verweilzeiten $t_{lag}$ . . . . .	119
4.1	3D-Bändermodell der Kristallstruktur von Mikrotubuli. . . . .	124
4.2	Temperaturabhängigkeit der Amid-I'-Bande von Mikrotubuli bei Atmosphärendruck. . . . .	134
4.3	Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstruktur von Mikrotubuli. . . . .	135
a	FSD Spektren . . . . .	135
b	2. Ableitungen . . . . .	135
4.4	Subbandenanalyse der Amid-I'-Bande von Mikrotubuli bei Atmosphärendruck und 25 °C. . . . .	136
4.5	Temperaturabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli. . . . .	137
a	Sekundärstrukturanalyse . . . . .	137
b	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	137
4.6	Temperaturabhängige Änderungen der Sekundärstrukturelemente. . .	139
4.7	Thermogramm von Mikrotubuli. . . . .	140
4.8	Temperaturabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M TMAO. . . . .	142
a	Amid-I'-Banden . . . . .	142
b	FSD-Spektren . . . . .	142
c	2. Ableitungen . . . . .	142
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	142
4.9	Temperaturabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli in Anwesenheit von 2 M TMAO. . . . .	143
a	Amid-I'-Banden . . . . .	143

---

b	FSD-Spektren . . . . .	143
c	2. Ableitungen . . . . .	143
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	143
4.10	Temperaturabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff. . . . .	144
a	Amid-I'-Banden . . . . .	144
b	FSD-Spektren . . . . .	144
c	2. Ableitungen . . . . .	144
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	144
4.11	Temperaturabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M Harnstoff. . . . .	145
a	Amid-I'-Banden . . . . .	145
b	FSD-Spektren . . . . .	145
c	2. Ableitungen . . . . .	145
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	145
4.12	DSC-Thermogramme von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M TMAO und 0.5 M Harnstoff. . . . .	146
a	Mikrotubuli + 1 M TMAO . . . . .	146
b	Mikrotubuli + 0.5 M Harnstoff . . . . .	146
4.13	Temperaturabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 0.5 M TMAO. . . . .	148
a	Amid-I'-Banden . . . . .	148
b	FSD-Spektren . . . . .	148
c	2. Ableitungen . . . . .	148
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	148
4.14	Temperaturabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 1 M TMAO. . . . .	149
a	Amid-I'-Banden . . . . .	149
b	FSD-Spektren . . . . .	149
c	2. Ableitungen . . . . .	149

d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	149
4.15	Spektroskopisch bestimmte Übergangstemperaturen von Mikrotubuli.	150
4.16	Vergleich der temperaturabhängigen spektroskopischen mit den kalorimetrischen Ergebnissen von Mikrotubuli in Abwesenheit von Cosolventien. . . . .	151
4.17	Druckabhängigkeit der Amid-I'-Bande von Mikrotubuli bei einer Temperatur von 25 °C. . . . .	152
4.18	Druckabhängige Änderung der Sekundärstruktur von Mikrotubuli. . .	153
a	FSD Spektren . . . . .	153
b	2. Ableitungen . . . . .	153
4.19	Subbandenanalyse der Amid-I'-Bande von Mikrotubuli bei einer Druck von 1 bar und einer Temperatur 25 °C in der Diamantstempelzelle. . .	155
4.20	Druckabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli. . . . .	156
a	Sekundärstrukturanalyse . . . . .	156
b	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	156
4.21	Druckabhängige Änderungen der Sekundärstrukturelemente. . . . .	157
4.22	Druckabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli in Anwesenheit von 1 M TMAO. . . . .	160
a	Amid-I'-Banden . . . . .	160
b	FSD-Spektren . . . . .	160
c	2. Ableitungen . . . . .	160
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	160
4.23	Druckabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff. . . . .	161
a	Amid-I'-Banden . . . . .	161
b	FSD-Spektren . . . . .	161
c	2. Ableitungen . . . . .	161
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	161
4.24	Druckabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli in Anwesenheit von 2 M Harnstoff. . . . .	162

---

a	Amid-I'-Banden . . . . .	162
b	FSD-Spektren . . . . .	162
c	2. Ableitungen . . . . .	162
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	162
4.25	Druckabhängige FTIR-Analyse von Mikrotubuli in Anwesenheit von 0.5 M Harnstoff und 0.5 M TMAO. . . . .	163
a	Amid-I'-Banden . . . . .	163
b	FSD-Spektren . . . . .	163
c	2. Ableitungen . . . . .	163
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	163
5.1	3D-Bändermodell der Kristallstruktur von Lysozym. . . . .	170
5.2	Explosionszeichnung der verwendeten EINS-Hochdruckzelle. . . . .	172
5.3	Semilogarithmische EINS-Intensitäten von 80 und 160 mg mL <sup>-1</sup> Ly- sozym in Anwesenheit von Harnstoff und TMAO als Funktion von $Q^2$ bei verschiedenen Drücken. . . . .	179
a	80 mg mL <sup>-1</sup> Lysozym + 2 M Harnstoff . . . . .	179
b	80 mg mL <sup>-1</sup> Lysozym + 2 M TMAO . . . . .	179
c	80 mg mL <sup>-1</sup> Lysozym + 2 M Harnstoff + 1 M TMAO . . . . .	179
d	160 mg mL <sup>-1</sup> Lysozym + 2 M Harnstoff . . . . .	179
e	160 mg mL <sup>-1</sup> Lysozym + 2 M TMAO. . . . .	179
5.4	Mittlere quadratische Verschiebung (MSD) von Lysozym in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff als Funktion des Drucks. . . . .	180
a	80 mg mL <sup>-1</sup> Lysozym . . . . .	180
b	160 mg mL <sup>-1</sup> Lysozym . . . . .	180
5.5	Semilogarithmische EINS-Intensitäten von 114 mg mL <sup>-1</sup> Lysozym als Funktion von $Q^2$ bei verschiedenen Drücken. . . . .	185
5.6	Semilogarithmische EINS-Intensitäten von 114 mg mL <sup>-1</sup> Lysozym in Anwesenheit von Trehalose als Funktion von $Q^2$ bei verschiedenen Drücken. . . . .	186
a	Lysozym + 5 Gew.-% Trehalose . . . . .	186

b	Lysozym + 10 Gew.-% Trehalose . . . . .	186
c	Lysozym + 15 Gew.-% Trehalose . . . . .	186
d	Lysozym + 17.5 Gew.-% Trehalose . . . . .	186
e	Lysozym + 20 Gew.-% Trehalose . . . . .	186
f	Lysozym + 30 Gew.-% Trehalose . . . . .	186
5.7	Semilogarithmische EINS-Intensitäten von $114 \text{ mg mL}^{-1}$ Lysozym in Anwesenheit von Glycin und Sucrose als Funktion von $Q^2$ bei verschiedenen Drücken. . . . .	187
a	Lysozym + 1 M Glycin . . . . .	187
b	Lysozym + 2 M Glycin . . . . .	187
c	Lysozym + 20 Gew.-% Sucrose . . . . .	187
5.8	Mittlere quadratische Verschiebung (MSD) von Lysozym in An- und Abwesenheit von Glycin, Trehalose und Sucrose als Funktion des Drucks. . . . .	188
a	Lysozym + Glycin & Sucrose . . . . .	188
b	Lysozym + Trehalose . . . . .	188
5.9	Druckabhängigkeit der Amid-I'-Bande von Lysozym bei Atmosphärendruck. . . . .	190
5.10	Subbandenanalyse der Amid-I'-Bande von Lysozym bei Atmosphärendruck und $25^\circ\text{C}$ . . . . .	191
5.11	Druckabhängige FTIR-Analyse von $80 \text{ mg mL}^{-1}$ Lysozym in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff. . . . .	192
a	Amid-I'-Bande . . . . .	192
b	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	192
c	Amid-I'-Bande . . . . .	192
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	192
e	Amid-I'-Bande . . . . .	192
f	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	192
5.12	Druckabhängige FTIR-Analyse von $160 \text{ mg mL}^{-1}$ Lysozym in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff. . . . .	194

---

a	Amid-I'-Bande . . . . .	194
b	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	194
c	Amid-I'-Bande . . . . .	194
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	194
e	Amid-I'-Bande . . . . .	194
f	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	194
5.13	Spektroskopisch bestimmte Entfaltungsdrücke von Lysozym. . . . .	196
5.14	Temperaturabhängige FTIR-Analyse von 80 mg mL <sup>-1</sup> Lysozym in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff. . . . .	198
a	Amid-I'-Bande . . . . .	198
b	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	198
c	Amid-I'-Bande . . . . .	198
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	198
e	Amid-I'-Bande . . . . .	198
f	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	198
5.15	Temperaturabhängige FTIR-Analyse von 160 mg mL <sup>-1</sup> Lysozym in An- und Abwesenheit von TMAO und Harnstoff. . . . .	200
a	Amid-I'-Bande . . . . .	200
b	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	200
c	Amid-I'-Bande . . . . .	200
d	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	200
e	Amid-I'-Bande . . . . .	200
f	Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	200
5.16	Spektroskopisch und kalorimetrisch bestimmte Entfaltungstempera- turen von Lysozym. . . . .	202
5.17	Druck-Temperatur-Phasendiagramm von Lysozym. . . . .	203
6.1	3D-Bändermodell der Kristallstruktur des $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers. . . . .	211
6.2	Druckabhängige Emissionsspektren von <i>N</i> -Acetyl-L-Tryptophanamid. . . . .	224
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	224
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	224

6.3	Druckabhängige Intensitätsänderung bei $\lambda = 325$ nm von NATA. . . . .	225
6.4	Druckabhängige Emissionsspektren von $5 \mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin. . . . .	226
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	226
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	226
6.5	Druckabhängige Dissoziationskurve von $5 \mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin bei $25^\circ\text{C}$ . . . . .	227
a	Flächennormierte Fluoreszenzintensität . . . . .	227
b	Anteil assoziierter Dimere . . . . .	227
6.6	Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere bei verschiedenen Temperaturen. . . . .	228
6.7	Temperaturabhängige Auftragung der Volumenänderung während der Dissoziation. . . . .	229
6.8	Druckabhängige Emissionsspektren von $5 \mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von $1 \text{ M}$ TMAO. . . . .	230
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	230
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	230
6.9	Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere in Anwesenheit von TMAO. . . . .	231
6.10	Dissoziationsdruck von $\alpha/\beta$ -Tubulin als Funktion der Osmolytkonzentration. . . . .	232
6.11	Druckabhängige Emissionsspektren von $5 \mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von $2 \text{ M}$ Harnstoff. . . . .	234
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	234
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	234
6.12	Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere in Anwesenheit von Harnstoff. . . . .	235
6.13	Spektroskopisch bestimmte Dissoziationsdrücke des Tubulin-Heterodimers. . . . .	236
6.14	Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere in Anwesenheit von TMAO/Harnstoff-Gemischen. . . . .	237
6.15	Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere in Anwesenheit von Ficoll <sup>®</sup> PM 70 . . . . .	238



---

6.16	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 30 Gew.-% Saccharose. . . . .	239
	a Gemessene Emissionsspektren . . . . .	239
	b Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	239
6.17	Druckabhängiger Anteil assoziierter Tubulin-Heterodimere in Anwesenheit von Saccharose. . . . .	240
6.18	Dissoziationsdruck von $\alpha/\beta$ -Tubulin als Funktion der Nanocrowderkonzentration von Saccharose. . . . .	241
6.19	Fluoreszenzintensitätsfluktuation von $\alpha/\beta$ -Tubulin. . . . .	242
6.20	FCS-Analyse von 3 nM $\alpha/\beta$ -Tubulin. . . . .	243
	a Autokorrelation . . . . .	243
	b Photon Counting Histogram . . . . .	243
6.21	Schema der molekularen Helligkeit von $\alpha/\beta$ -Tubulin. . . . .	244
6.22	Boxplots der molekularen Helligkeit von $\alpha/\beta$ -Tubulin als Funktion des Drucks. . . . .	245
6.23	Druckabhängigkeit der Amid-I'-Bande von $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einer Temperatur von 25 °C. . . . .	247
6.24	Druckabhängige Änderung der Sekundärstruktur von $\alpha/\beta$ -Tubulin. . . . .	248
	a FSD Spektren . . . . .	248
	b 2. Ableitungen . . . . .	248
6.25	Subbandenanalyse der Amid-I'-Bande von $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 1 bar und einer Temperatur von 25 °C in der Diamantstempelzelle. . . . .	249
6.26	Druckabhängige FTIR-Analyse von $\alpha/\beta$ -Tubulin. . . . .	250
	a Sekundärstrukturanalyse . . . . .	250
	b Population an Sekundärstrukturelementen . . . . .	250
6.27	Temperaturabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin. . . . .	253
	a Gemessene Emissionsspektren . . . . .	253
	b Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	253

6.28	Temperaturabhängige Dissoziationskurve von 5 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin bei 25 $^{\circ}\text{C}$ . . . . .	254
6.29	Temperaturabhängige Dissoziationskurve von 5 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin bei 25 $^{\circ}\text{C}$ in Anwesenheit von TMAO. . . . .	257
6.30	Temperaturabhängige Dissoziationskurve von 5 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin bei Atmosphärendruck in Anwesenheit von Harnstoff. . . . .	258
6.31	Temperaturabhängige Dissoziationskurve von 5 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von verschiedenen TMAO/Harnstoff-Mischungen bei Atmosphärendruck . . . . .	259
6.32	Spektroskopisch bestimmte Dissoziationstemperaturen des $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers. . . . .	260
6.33	Temperaturabhängige Dissoziationskurve von 5 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 1 bar in Anwesenheit von Ficoll <sup>®</sup> PM 70. . . . .	261
6.34	Temperaturabhängige Dissoziationskurve von 5 $\mu\text{M}$ $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 1 bar in Anwesenheit von Saccharose. . . . .	262
6.35	Druck-Temperatur-Phasendiagramm von $\alpha/\beta$ -Tubulin. . . . .	263
6.36	Temperaturabhängigkeit der Amid-I'-Bande von $\alpha/\beta$ -Tubulin bei einem Druck von 1 bar. . . . .	264
6.37	Temperaturabhängige Änderung der Sekundärstruktur von $\alpha/\beta$ -Tubulin. 265	
	a    FSD Spektren . . . . .	265
	b    2. Ableitungen . . . . .	265
6.38	Subbandenanalyse der Amid-I'-Bande von $\alpha/\beta$ -Tubulin bei Atmosphärendruck und 5 $^{\circ}\text{C}$ . . . . .	266
6.39	Temperaturabhängige FTIR-Analyse von $\alpha/\beta$ -Tubulin. . . . .	267
	a    Sekundärstrukturanalyse . . . . .	267
	b    Population der Sekundärstrukturelemente . . . . .	267
6.40	DSC-Thermogramm von $\alpha/\beta$ -Tubulin. . . . .	269
6.41	Vergleich der temperaturabhängigen spektroskopischen mit den kalorimetrischen Ergebnissen von $\alpha/\beta$ -Tubulin in reiner Pufferlösung. . .	270

---

6.42	Boxplots der statischen Fluoreszenzanisotropie von $\alpha/\beta$ -Tubulin in Abhängigkeit der Temperatur bei einem Druck von 1 bar. . . . .	272
6.43	PERRIN-Auftragung von $\alpha/\beta$ -Tubulin. . . . .	273
6.44	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin bei verschiedenen Temperaturen. . . . .	276
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	276
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	276
c	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	276
d	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	276
6.45	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin bei verschiedenen Temperaturen. . . . .	277
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	277
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	277
c	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	277
d	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	277
6.46	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von 1 und 3 M Harnstoff. . . . .	278
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	278
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	278
c	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	278
d	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	278
6.47	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von verschiedenen Cosolvens-Mischungen. . . . .	279
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	279
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	279
c	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	279
d	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	279
e	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	279
f	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	279

6.48	Druckabhängige Emissionsspektren von 5 $\mu$ M $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von verschiedenen Saccharose Konzentrationen. . . . .	280
a	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	280
b	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	280
c	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	280
d	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	280
e	Gemessene Emissionsspektren . . . . .	280
f	Flächennormierte Emissionsspektren . . . . .	280

# Tabellenverzeichnis

2.1	Entfaltungsdrücke $p_u$ von G-Actin . . . . .	52
2.2	Druckabhängige TMAO/Harnstoff-Gemische . . . . .	55
2.3	Temperaturabhängige, thermodynamische Analyse . . . . .	65
2.4	Temperaturabhängige TMAO/Harnstoff-Gemische . . . . .	73
3.1	Kinetische Analyse der Polymerisation von 30 $\mu$ M Tubulin, extrahiert aus Kalbshirnen, in An- und Abwesenheit verschiedener Cosolventien bei einer Temperatur von 37°C. . . . .	103
3.2	Kinetische Analyse der Polymerisation von 30 $\mu$ M Tubulin, extrahiert aus Lammhirnen, in An- und Abwesenheit verschiedener Cosolventien bei einer Temperatur von 37°C. . . . .	120
4.1	Sekundärstrukturelemente und Absorptionsbanden von Mikrotubuli. .	129
4.2	DSC-Ergebnisse von Mikrotubuli . . . . .	141
4.3	FTIR-Ergebnisse von Mikrotubuli . . . . .	147
5.1	Sekundärstrukturelemente und Absorptionsbanden von Lysozym. . .	176
6.1	Sekundärstrukturelemente und Absorptionsbanden von $\alpha/\beta$ -Tubulin.	219
6.2	Thermodynamische Parameter der druckabhängigen Dissoziation des $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers. . . . .	229
6.3	Thermodynamische Parameter der druckabhängigen Dissoziation des $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers. . . . .	233
6.4	Druckabhängige TMAO/Harnstoff-Gemische . . . . .	235
6.5	Thermodynamische Parameter der thermischen Dissoziation des $\alpha/\beta$ - Tubulin-Heterodimers. . . . .	256



# Abkürzungsverzeichnis

---

Symbol	Bedeutung
$\alpha$	Thermischer Expansionskoeffizient
$\alpha'$	Isotherme Ausdehnung
$A$	Absorption
a.u.	Arbitrary unit
ATP	Adenosintriphosphat
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)aminotris(hydroxymethyl)methan
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
$c$	Konzentration Lichtgeschwindigkeit
$C_p$	Wärmekapazität
CLSM	<i>Confocal laser Scanning Microscopy</i>
$\Delta$	Differenz
D <sub>2</sub> O	Deuteriertes Wasser
$D$	Diffusionskoeffizient
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DOL	<i>degree of labeling</i>
DSC	<i>dynamic scanning calorimetry</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
$E$	Energie
$\epsilon$	Dielektrizitätskonstante

---

Symbol	Bedeutung
	Extinktionskoeffizient
EINS	Elastische inkohärente Neutronenstreuung
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
$F$	Reibungskraft
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
FLCS	<i>fluorescence lifetime correlation spectroscopy</i>
FSD	FOURIER self-deconvolution
FTIR	FOURIER-Transform-Infrarot
$G$	Gibbs-Energie
$\Gamma$	Bindungskoeffizient
Gew.-%	Gewichtsprozent
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
$h$	PLANCKSche Wirkungsquantum
$H$	Enthalpie
hIAPP	Humanes Insel-Amyloid-Polypeptid
HHP	<i>high hydrostatic pressure</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
$I$	Intensität
ILL	Institut Laue-Langevin
IR	Infrarot
$J$	Teilchenfluss
	Wechselwirkungspotential
$k$	Geschwindigkeitskonstante
$K$	Gleichgewichtskonstante
$\kappa'$	Kompressibilität
$k_B$	BOLTZMANN-Konstante
$\lambda$	Wellenlänge
$m$	Masse
$M$	Molekulargewicht

---



---

Symbol	Bedeutung
MSD	<i>mean squared displacement</i>
$\mu$	Chemisches Potential
MAP	<i>microtubule-associated protein</i>
MTOC	<i>microtubule-organizing center</i>
$\eta$	Viskosität
	Molekulare Helligkeit
$n$	Brechungsindex
$N$	Anzahl
NATA	<i>N-Acetyl-L-Tryptophanamid</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
$p$	Druck
$\partial$	Partielles Differential
PCH	<i>Photon Counting Histogram</i>
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	1,4-Piperazin-diethansulfonsäure
PPC	<i>pressure perturbation calorimetry</i>
$Q$	Impulsübertrag
$r$	Fluoreszenzanisotropie
$\langle r \rangle$	Mittlere Verschiebung
R	Universelle Gaskonstante
$R_h$	Hydrodynamischer Radius
RNase A	<i>Ribonuklease A</i>
$S$	Entropie
SASA	<i>solvent accessible surface area</i>
$\Sigma$	Summe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNase	<i>Staphylococcal Nuclease</i>
$T$	Temperatur

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

Symbol	Bedeutung
$\tau$	Korrelationszeit Fluoreszenzlebenszeit
TAMRA	5-Carboxytetramethylrhodamin
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV/Vis	<i>ultraviolet/visible</i>
$V$	Volumen
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
$V_h$	Hydrodynamisches Volumen
$x$	Anteil

---

# Publikationsliste

- [1] T. Pongratz, P. Kibies, L. Eberlein, N. Tielker, C. Hölzl, S. Imoto, M. Beck Erlach, S. Kurrmann, P. H. Schummel, M. Hofmann, O. Reiser, R. Winter, W. Kremer, H.-R. Kalbitzer, D. Marx, D. Horinek, S. M. Kast, PRESSURE-DEPENDENT ELECTRONIC STRUCTURE CALCULATIONS USING INTEGRAL-BASED SOLVATION MODELS, *Biophys. Chem.* **2019**, *im Druck*.
- [2] S. R. Al-Ayoubi, P. H. Schummel, A. Cisse, T. Seydel, J. Peters, R. Winter, OSMOLYTES MODIFY PROTEIN DYNAMICS AND FUNCTION OF TETRAMERIC LACTATE DEHYDROGENASE UPON PRESSURIZATION, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 12806–12817.
- [3] P. H. Schummel, C. Anders, M. W. Jaworek, R. Winter, COSOLVENT AND CROWDING EFFECTS ON THE TEMPERATURE- AND PRESSURE-DEPENDENT DISSOCIATION PROCESS OF THE  $\alpha/\beta$ -TUBULIN HETERODIMER, *ChemPhysChem* **2019**, *20*, 1098–1109.
- [4] P. H. Schummel, M. W. Jaworek, C. Rosin, J. Högg, R. Winter, EXPLORING THE INFLUENCE OF NATURAL COSOLVENTS ON THE FREE ENERGY AND CONFORMATIONAL LANDSCAPE OF FILAMENTOUS ACTIN AND MICROTUBULES, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 28400-28411.
- [5] S. Patra, C. Anders, P. H. Schummel, R. Winter, ANTAGONISTIC EFFECTS OF NATURAL OSMOLYTE MIXTURES AND HYDROSTATIC PRESSURE ON THE CONFORMATIONAL DYNAMICS OF A DNA HAIRPIN PROBED AT THE SINGLE-MOLECULE LEVEL, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 13159–13170.
- [6] S. R. Al-Ayoubi, P. H. Schummel, M. Golub, J. Peters, R. Winter, INFLUENCE OF COSOLVENTS, SELF-CROWDING, TEMPERATURE AND PRESSURE

- ON THE SUB-NANOSECOND DYNAMICS AND FOLDING STABILITY OF LYSOZYME, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 14230–14237.
- [7] P. H. Schummel, M. Gao, R. Winter, MODULATION OF THE POLYMERIZATION KINETICS OF  $\alpha/\beta$ -TUBULIN BY OSMOLYTES AND MACROMOLECULAR CROWDING, *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 189–197.
- [8] P. H. Schummel, A. Haag, H. R. Kalbitzer, R. Winter, COSOLVENT AND CROWDING EFFECTS ON THE TEMPERATURE AND PRESSURE DEPENDENT CONFORMATIONAL DYNAMICS AND STABILITY OF GLOBULAR ACTIN, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 6575–6586
- [9] C. Rosin, P. H. Schummel, R. Winter, COSOLVENT AND CROWDING EFFECTS ON THE POLYMERIZATION KINETICS OF ACTIN, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 8330–8337.