

Biophysikalische Studien zum Einfluss zytomimetischer Medien auf das Konformationsgleichgewicht ausgewählter Biomoleküle

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht bei der

Technischen Universität Dortmund

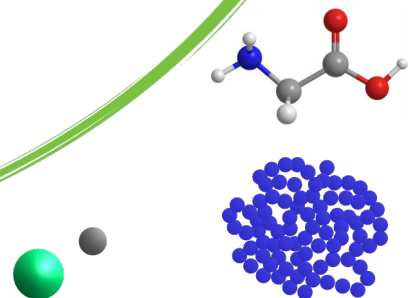
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

vorgelegt von

Loana Arns

geboren in Duisburg

Dortmund 2021



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juni 2016 bis September 2019 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Roland Winter angefertigt.

Dissertation eingereicht am: 10.02.2021

Tag der Disputation: 22.06.2021

Amtierender Dekan Prof. Dr. Stefan M. Kast

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Paul Czodrowski
Chemische Biologie, CCB, TU Dortmund

Erster Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter
Physikalische Chemie, CCB, TU Dortmund

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Claus Czeslik
Physikalische Chemie, CCB, TU Dortmund

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt zuallererst **Prof. Dr. Roland Winter**, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gab diese Arbeit anzufertigen. Durch seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und seine fachliche Expertise hat er mich in stets ermutigenden Gesprächen unterstützt und motiviert. Darüber hinaus möchte ich mich für die Ermöglichung bedanken, die Ergebnisse meiner Arbeit auch international präsentieren zu dürfen.

Des Weiteren gebührt mein Dank **Prof. Dr. Claus Czeslik** für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Für die gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei **Dr. Mimi Gao** für ihre fachliche und praktische Hilfe vor allem zu Beginn meiner Promotionszeit. Darüber hinaus bin ich sehr dankbar für ihre Freundschaft und ihre Unterstützung auch in privaten Angelegenheiten. Ich danke ferner **Dr. Satyajit Patra** für die Einführung in die

Danksagung

Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie und für die zahlreichen fachlichen Diskussionen, aber auch für die privaten Gespräche. Außerdem danke ich **Jim-Marcel Knop** für die Zurverfügungstellung seiner Skripte, die meine Datenanalyse erheblich beschleunigt haben. Meinen Bürokolleginnen **Dr. Marie Kahse**, **Dr. Melanie Berghaus** und **Dr. Sudeshna Banerjee** danke ich für die gute gemeinsame Zeit.

Ein großer Dank geht auch an **Andrea Jeworrek**, **Simone Möbitz** und **Bertina Schuppan** für ihre immerwährende Hilfe bei administrativen und labortechnischen Problemen jeglicher Art. Außerdem danke ich den **Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der mechanischen und elektronischen Werkstätten**.

Nicht zuletzt danke ich meiner **Familie**, die mir in allen Lebenslagen zur Seite gestanden hat. Ich danke meinem Mann **Ulrich Arns** für die Korrektur dieser Arbeit, vor allem aber für seine Liebe und seine Zuversicht in weniger optimistischen Zeiten.

Publikationen

- M. Gao, L. Arns, R. Winter, “Modulation of the Thermodynamic Signatures of an RNA Thermometer by Osmolytes and Salts”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **56** (2017) 2302-2306.
- M. Gao, C. Held, S. Patra, L. Arns, G. Sadowski, R. Winter, “Crowders and Cosolvents - Major Contributors to the Cellular Milieu and Efficient Means to Counteract Environmental Stresses”, *ChemPhysChem* **18** (2017) 2951-2972.
- L. Arns, V. Schuabb, S. Meichsner, M. Berghaus, R. Winter, “The Effect of Natural Osmolyte Mixtures on the Temperature-Pressure Stability of the Protein RNase A”, *Z. Phys. Chem.* **232** (2018) 615-634.
- L. Arns, R. Winter, “Liquid–liquid phase separation rescues the conformational stability of a DNA hairpin from pressure–stress”, *Chem. Comm.* **55** (2019) 10673-10676.
- L. Arns, J. M. Knop, S. Patra, C. Anders, R. Winter, “Single-molecule insights into the temperature and pressure dependent conformational dynamics of nucleic acids in the presence of crowders and osmolytes”, *Biophys. Chem.* **251** (2019) 106190.

Kurzfassung

Die Kinetik und Energetik chemischer Reaktionen hängt neben dem Druck und der Temperatur auch von den Eigenschaften des Lösungsmittels (z. B. Polarität, Azidität, Protizität) ab. In lebenden Zellen dient das Zytosol als Reaktionsmedium für biochemische Prozesse. Dieses besteht aus in Wasser gelösten Molekülen, wie z. B. anorganische Salzen, organische Osmolyten und Bio-Makromolekülen. Anders als in der konventionellen Chemie befinden sich also die Reaktanden bei intrazellulären Reaktionen nicht in einer verdünnten Lösung, sondern sind von einer hohen Konzentration von Molekülen umgeben, die selbst nicht an der Reaktion teilnehmen. Diese sog. Background-Moleküle (*engl.* Hintergrund) können die Dynamik und Konformation von Bio-Makromolekülen und somit auch die Kinetik und Energetik biochemischer Prozesse beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von Background-Molekülen dreier Substanzklassen auf die Konformationsdynamik von Biomolekülen untersucht: anorganische Salze, organische Osmolyte und Makromoleküle.

Mithilfe der Druckperturbationskalorimetrie wird der Effekt verschiedener organischer Osmolyte auf die volumetrischen Eigenschaften des Modellproteins Ribonuklease A untersucht. Die Interpretation des Verlaufs der temperaturabhängigen Expansibilität hinsichtlich der Beiträge der thermischen Expansibilität und der Expansibilität der Hydrathülle des Proteins liefert Erkenntnisse über mögliche Stabilisierungsmechanismen der Osmolyte. Es wird gezeigt, dass die Anwesenheit der Osmolyte vor allem die Expansibilität des gefalteten Proteins beeinflusst. Dieses ist im Wesentlichen auf Änderungen der Mobilität der Oberflächengruppen des Proteins zurückzuführen. Es wird daher ein entropischer Stabilisierungsmechanismus angenommen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anreicherung bestimmter Osmolyte im Zytosol eine Strategie zur Kompensierung von schädlichen Konformationsänderungen durch äußere Stressfaktoren darstellen könnte. In einer Einzelmolekül-FRET-Studie wird der Effekt unterschiedlicher Lösungszusammen-

setzungen auf das Konformationsgleichgewicht der microROSE-RNA-Haarnadel untersucht. Durch Variation der Kaliumchloridkonzentration wird gezeigt, dass sowohl ein unvollständiger Ausgleich der negativen Ladungen der Phosphatgruppen des RNA-Rückgrats, als auch ein starker Anstieg der Konzentration von Chloridionen in der Umgebung der Nukleinsäure die native, gefaltete Konformation destabilisieren. Die organischen Osmolyte Glyzin und Trimethylamin-*N*-Oxid wirken dem denaturierenden Effekt erhöhter Temperaturen entgegen, obwohl sie bei Raumtemperatur die gefaltete Konformation schwächen. Des Weiteren wird anhand des Crowdingreagenz Ficoll der Einfluss des Ausschlussvolumens durch Makromoleküle auf die Konformationen der RNA-Haarnadel untersucht. Entgegen der Erwartung wird ein destabilisierender Effekt beobachtet. Durch vergleichende Messungen mit dem Ficoll-Monomer Saccharose wird gezeigt, dass die Oberflächengruppen des Polymers enthalpisch günstige Wechselwirkungen mit den Nukleobasen eingehen, wodurch die gefaltete Konformation der RNA-Haarnadel destabilisiert wird. Dieser Effekt überwiegt den Ausschlussvolumeneffekt.

Eine weitere Besonderheit des zellulären Mediums ist die Bildung intrazellulärer fluider, nicht-lipidhaltiger Kompartimente, welche begrenzte Reaktionsvolumina mit individuellen physikochemischen Eigenschaften darstellen können. Anhand eines Modellsystems aus Polyethylenglycol, Dextran und Wasser werden zum ersten Mal Einzelmolekül-FRET-Messungen in einem wässrigen Zweiphasensystem durchgeführt. Es wird nachgewiesen, dass eine DNA-Haarnadel vollständig in die gebildeten dextranreichen Tröpfchen partitioniert. Der starke Ausschlussvolumeneffekt des Makromoleküls Dextran innerhalb der Tröpfchen stabilisiert die gefaltete Konformation der DNA-Haarnadel bei hohen Drücken von bis zu 1.5 kbar. Es wird daher vermutet, dass die Phasenseparation in Kombination mit einem starken Ausschlussvolumeneffekt in lebenden Zellen eine Strategie zur Erhaltung Konformation und daher der Funktion von Biomolekülen unter dem Einfluss hoher hydrostatischer Drücke sein könnte.

Abstract

The kinetics and energetics of chemical reactions is strongly dependent on the environmental conditions. Besides the actual pressure and temperature, the physicochemical properties (*e.g.*, polarity, acidity, proticity) of the solvent play an important role. In the cellular environment, the cytosol represents the reaction medium for biochemical processes. The cytosol is an aqueous composition of molecules like inorganic salts, organic osmolytes, and bio-macromolecules. In contrast to conventional chemistry, where the reactants are in dilute solution, intracellular reactions take place in the presence of high concentrations of molecules that do not participate in the process themselves. These so-called background molecules may impact the dynamics and conformation of bio-macromolecules and hence the kinetics and energetics of biochemical reactions. The present work studies the effect of background molecules of three different substance classes on the conformational dynamics of biomolecules: inorganic salts, organic osmolytes and macromolecules.

The effect of organic osmolytes on the volumetric properties of the model protein ribonuclease A is investigated by means of the pressure perturbation calorimetry technique. The interpretation of the expansibility graphs with regard to the contribution of the thermal expansibility and the expansibility of the hydration layer of the protein provides insights into probable stabilization mechanisms of the osmolytes. It is shown that the presence of osmolytes mainly impacts the expansibility of the folded protein, which is primarily explained by changes of the mobility of the surface groups of the protein. Hence, an entropic stabilization mechanism is assumed. The accumulation of particular organic osmolytes in the cytosol may thus be a strategy to counteract the deleterious effects of conformational changes caused by external stress factors.

In a single molecule FRET study, the conformational dynamics of the microROSE RNA hairpin is studied in aqueous solutions of different additives. By the variation of the potassium chloride concentration it is shown that an incomplete charge balancing of the anionic

phosphate groups at the RNA backbone as well as a strong concentration increase of chloride ions in the vicinity of the hairpin destabilizes the native folded conformation of the nucleic acid. The organic osmolytes glycine and trimethylamine *N*-oxide counteract the denaturing effect of high temperatures, even though they weaken the stability of the folded state at room temperature. Furthermore, the crowding agent Ficoll is added to investigate the excluded volume effect of macromolecules. Unexpectedly, a destabilizing effect is observed. In comparative measurements with the Ficoll monomer sucrose, enthalpically favorable interactions of the polymer's surface groups with the nucleobases are found to be the origin of the destabilization.

A further property of the cellular medium is the formation of fluid intracellular compartments that provide confined reaction volumes with individual physicochemical properties. On the basis of a model system consisting of polyethylene glycol, dextran and water, single molecule FRET measurements are performed in an aqueous two phase system for the first time. A complete partitioning of a DNA hairpin into the dextran-enriched droplets is demonstrated. The strong excluded volume effect of the macromolecule dextran inside the droplets stabilizes the folded conformation of the DNA hairpin at high pressures up to 1.5 kbar. It is thus surmised that in living cells the phase separation in combination with a strong excluded volume effect may be a potential strategy to maintain the conformation and function of biomolecules in the presence of high hydrostatic pressure stress.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	vii
Publikationen	ix
Kurzfassung	xi
Abstract	xiii
Abbildungsverzeichnis	xix
Tabellenverzeichnis	xxiii
1 Einleitung	1
1.1 <i>In vitro</i> Mimesis zellulärer Background-Moleküle	1
1.1.1 Organische Osmolyte	2
1.1.2 Makromoleküle - Crowding	6
1.1.3 Kompartimentierung	9
1.2 Temperatur- und Druckabhängigkeit des Entfaltungsgleichgewichts	12

2 Methoden	15
2.1 Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie	15
2.1.1 FÖRSTER-Resonanz-Energie-Transfer	15
2.1.2 Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie	17
2.2 Kalorimetrie	20
2.2.1 Differenz-Scanning-Kalorimetrie	20
2.2.2 Druckperturbationskalorimetrie	21
2.3 Dampfdruckosmometrie	22
2.4 Dichtemessung nach der Biegeschwingermethode	25
2.5 RÖNTGEN-Kleinwinkelstreuung	26
3 Einfluss organischer Osmolyte auf die volumetrischen Eigenschaften der Ribonuklease A	29
3.1 Einleitung	31
3.2 Experimentelles	36
3.2.1 Chemikalien	36
3.2.2 Probenpräparation	36
3.2.3 Kalorimetrische Messungen	36
3.2.4 Dichtemessungen	37
3.2.5 Dampfdruckosmometrie	37
3.2.6 RÖNTGEN-Kleinwinkelstreuung	38
3.3 Ergebnisse	38
3.4 Zusammenfassung	54
4 Einfluss organischer Osmolyte und Crowdingreagenzien auf das Konformationsgleichgewicht einer RNA Haarnadel	57
4.1 Einleitung	59

4.2	Experimentelles	61
4.2.1	Chemikalien	61
4.2.2	Probenpräparation	62
4.2.3	DSC-Messungen	62
4.2.4	Ensemble-FRET	63
4.2.5	Einzelmolekül-FRET	63
4.3	Einfluss von verschiedenen Salzkonzentrationen und Mutationen	65
4.4	Osmolyt-Effekt	74
4.5	Crowding-Effekt	77
4.6	Zusammenfassung	82
5	Einkapselung einer DNA Haarnadel in einem wässrigen Zweiphasensystem	85
5.1	Einleitung	87
5.2	Experimentelles	89
5.2.1	Chemikalien	89
5.2.2	Probenpräparation	89
5.2.3	Charakterisierung des wässrigen Zweiphasensystems	89
5.2.4	Mikroskopie	91
5.2.5	Einzelmolekül-FRET	91
5.2.6	Hochdruckapparatur	91
5.3	Das PEG / Dextran-Zweiphasensystem	92
5.4	Druckabhängigkeit des Konformationsgleichgewichts	93
5.4.1	In reinem Puffer	93
5.4.2	Im wässrigen Zweiphasensystem	95
5.5	Zusammenfassung	99
	Literaturverzeichnis	101

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	109
Anhang	111

Abbildungsverzeichnis

1.1	Ausschlussvolumen	8
1.2	Schematische Darstellung des Phasendiagramms eines wässrigen Zweiphasensystems zweier Polymere	11
2.1	Konfokalmikroskop	18
2.2	TCSPC Histogramm	19
2.3	Pused Interleaved Excitation	19
2.4	Thermogramm einer Proteinlösung	21
2.5	PPC-Kurve einer Proteinlösung	22
3.1	Teilbeiträge des partiellen molaren Volumens eines Proteins und exemplarische $E(T)$ -Kurve	32
3.2	Strukturformeln der untersuchten Osmolyte	34
3.3	Thermogramme der Ribonuklease A in Anwesenheit verschiedener Osmolyte	39
3.4	Differenz der aus den Thermogrammen der Ribonuklease A ermittelten Schmelztemperaturen	40
3.5	Ergebnisse der Dichte- und Osmometriemessungen der verschiedenen Osmolytlösungen	42
3.6	Osmotischer Koeffizient ϕ der verschiedenen Osmolytlösungen	43

3.7	PPC-Kurven der Ribonuklease A in Anwesenheit verschiedener Osmolyte	45
3.8	Einfluss der Osmolyte auf die volumetrischen Eigenschaften der Ribonuklease A im Temperaturbereich vor der Entfaltung	47
3.9	Relative Änderung des Entfaltungsvolumens in Anwesenheit der Osmolyte und Temperaturabhängigkeit von ΔV	50
3.10	Gyrationsradius R_g der Ribonuklease A in verschiedenen Osmolytlösungen	51
4.1	Skizze der ROSE mRNA-Struktur	61
4.2	Exemplarische Thermogramme der microROSE RNA Haarnadel	66
4.3	Absorptions- und Emmissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe Atto 550 und Atto 647N	67
4.4	Ensemble-FRET Messungen bei verschiedenen Salzkonzentrationen	68
4.5	smFRET-Histogramme der microROSE-RNA bei verschiedenen Salzkonzentrationen, $T = 20^\circ\text{C}$	69
4.6	Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der drei verschiedenen Konformere bei einer Salzkonzentration von $c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$	70
4.7	smFRET-Histogramme der microROSE-RNA bei verschiedenen Salzkonzentrationen, $T = 80^\circ\text{C}$	71
4.8	Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der drei verschiedenen Konformere bei einer Salzkonzentration von $c_{\text{KCl}} = 25 \text{ mmol L}^{-1}$	71
4.9	Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der drei verschiedenen Konformere bei einer Salzkonzentration von $c_{\text{KCl}} = 150 \text{ mmol L}^{-1}$	73
4.10	3D-Modelle der microROSE RNA	73
4.11	smFRET-Histogramme des microROSE Wildtyps in Anwesenheit der Osmolyte TMAO und Glyzin	75
4.12	Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der drei verschiedenen Konformere in Anwesenheit der Osmolyte TMAO und Glyzin	75

4.13 Thermogramme der microROSE RNA Haarnadel in Anwesenheit der Osmolyte TMAO und Glyzin	76
4.14 smFRET-Histogramme des microROSE Wildtyps in Anwesenheit von Ficoll und Saccharose, $T = 20^{\circ}\text{C}$	78
4.15 smFRET-Histogramme des microROSE Wildtyps in Anwesenheit von Ficoll und Saccharose, $T = 80^{\circ}\text{C}$	79
4.16 Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der drei verschiedenen Konformere in Anwesenheit von Ficoll und Saccharose	80
4.17 Thermogramme der microROSE RNA Haarnadel in Anwesenheit von Ficoll und Saccharose	81
5.1 Schematische Darstellung des Konformationsgleichgewichts der DNA Haarnadel	88
5.2 Binodalkurve des wässrigen Zweiphasensystems aus 4.6 kDa und 10 kDa	90
5.3 Tröpfchen des PEG / Dextran-Zweiphasensystems zwischen zwei Deckgläsern	92
5.4 Tröpfchen des PEG / Dextran-Zweiphasensystems in der Kapillare	93
5.5 Druckabhängige smFRET-Daten der DNA Haarnadel in reinem Puffer	94
5.6 Druckabhängige smFRET-Histogramme der DNA Haarnadel im ATPS und in einer 11 gew%-igen PEG bzw. Dextran-Lösung	96
5.7 Analyse der druckabhängigen smFRET-Histogramme der DNA Haarnadel im ATPS und in einer 11 gew%-igen PEG- bzw. Dextran-Lösung	98
5.8 Druckabhängige smFRET-Histogramme der DNA Haarnadel in einer 30 gew%-igen Dextran-Lösung	99

Tabellenverzeichnis

3.1	Ergebnisse der Analyse der DSC-, PPC- und SAXS-Daten der temperaturinduzierten Entfaltung der RNase A in Anwesenheit der verschiedenen Osmolyte.	53
4.1	Thermodynamische Parameter des Hauptübergangs der hitzeinduzierten Öffnung der microROSE RNA-Haarnadel in Abhängigkeit der Salzkonzentration.	67
4.2	Thermodynamische Parameter des Hauptübergangs der hitzeinduzierten Öffnung der microROSE RNA-Haarnadel in Anwesenheit der Osmolyte TMAO und Glyzin.	77
4.3	Thermodynamische Parameter des Hauptübergangs der hitzeinduzierten Öffnung der microROSE RNA-Haarnadel in Anwesenheit der Crowding-Reagenzien Ficoll und Saccharose. $c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$	81

KAPITEL 1

Einleitung

1.1 *In vitro* Mimesis zellulärer Background-Moleküle

Der flüssige Bestandteil des Zellplasmas, das Zytosol, besteht aus einer Vielzahl von in Wasser gelösten Molekülen. Dazu zählen anorganische Salze, organische Osmolyte und Bio-Makromoleküle, wie z.B. Proteine und Nukleinsäuren. Das Zytosol dient zum einen als Reaktionsmedium, zum anderen nehmen einige seiner Bestandteile selbst an biochemischen Reaktionen teil. Moleküle, die selbst nicht direkt in eine bestimmte Reaktion involviert sind, werden in der Literatur als Background-Moleküle (*engl.* Hintergrund) bezeichnet. Ihr Einfluss auf biochemische Prozesse ist von großem wissenschaftlichen Interesse und bis heute nicht hinreichend aufgeklärt. Die Wirkungsweise der Background-Moleküle ist unspezifisch und aufgrund ihrer Vielzahl schwer zu quantifizieren. Daher beruht ein Großteil unseres Wissens über biochemische Reaktionen oder Konformationsgleichgewichte auf Studien in verdünnten wässrigen Lösungen. Mittlerweile gibt es

jedoch zahlreiche biophysikochemische Studien, in denen die Wechselwirkungen von Zytosolbestandteilen mit Bio-Makromolekülen untersucht wurden. Zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen wird in den meisten Fällen der Fokus auf eine einzelne Substanzklasse der Background-Moleküle gelegt. Drei Schwerpunkte der biophysikochemischen Forschung zu biochemischen Prozessen in zytomimetischen Medien werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.1.1 Organische Osmolyte

Organische Osmolyte sind niedermolekulare, elektrisch neutrale, metabolische Verbindungen, welche im Zytosol angereichert werden. Für eukaryontische Zellen sind folgende Substanzklassen bekannt: Aminosäuren und deren Derivate, Polyole und Zucker, Methylamine, Methylsulfoniumverbindungen und Harnstoff.^[1] Mithilfe von Osmolyten kann die Zelle osmotischem Stress (erhöhte Aufnahme oder Verlust von Wasser) entgegenwirken. Das betrifft beispielsweise Meeresorganismen, die im salzhaltigen Meerwasser einem osmotischen Druck von $1000 \text{ mosmol kg}^{-1}$ (Einheit der Osmolalität b_{osm}) ausgesetzt sind. Der intrazelluläre osmotische Druck setzt sich aus Beiträgen von anorganischen Ionen und anderen löslichen Bestandteilen ($300 - 400 \text{ mosmol kg}^{-1}$) und Osmolyten ($600 \text{ mosmol kg}^{-1}$) zusammen.^[2] Der Vorteil vieler organischer Osmolyte gegenüber den anorganischen Ionen liegt in ihrer Kompatibilität. Hohe Konzentrationen von Ionen wie K^+ oder Na^+ können biochemische Prozesse hemmen. Die Konzentration einer Vielzahl von organischen Osmolyten hingegen kann beliebig hoch reguliert werden, ohne die Biomoleküle in ihrer Funktion zu beeinträchtigen. Es gibt jedoch auch nicht kompatible Osmolyte, wie z. B. Harnstoff oder Arginin.^[3]

Osmolyte zeigen einen großen Einfluss auf die Entfaltungsreaktion von Proteinen. In Bezug auf das Gleichgewicht zwischen dem nativen und denaturierten Zustand $\text{N} \rightleftharpoons \text{D}$ werden Osmolyte als stabilisierend oder destabilisierend eingestuft, je nachdem in welche

Richtung das Gleichgewicht verschoben wird. Zur Erklärung dieser gegensätzlichen Wirkungsweise ist die Annahme eines *direkten* und eines *indirekten* Mechanismus allgemein anerkannt.^[4] Der direkte Mechanismus beruht auf enthalpisch günstigen Wechselwirkungen eines Kosolvenz mit der Proteinoberfläche (Proteinrückgrat, Aminosäureseitenketten). Da das entfaltete Protein eine größere Oberfläche (*engl.* solvent accessible surface area, SASA) besitzt und somit eine erhöhte Anzahl an Bindungsstellen zur Verfügung stehen, wird das Entfaltungsgleichgewicht in Richtung des entfalteten, denaturierten Zustands verschoben. Diese disruptiven Kosolvenzien werden auch als Denaturanzien (z. B. Harnstoff) bezeichnet. Stabilisierende Osmolyte hingegen begünstigen den nativen Zustand. Sie präferieren Wechselwirkungen mit Wassermolekülen gegenüber Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche und verschieben somit indirekt das Entfaltungsgleichgewicht in Richtung des kompakteren nativen Zustands, welcher eine geringere SASA aufweist. Diese ungünstigen Wechselwirkungen zwischen Protein und Osmolyt werden auch als *osmophober Effekt* bezeichnet.^[5]

Zur thermodynamischen Beschreibung der Kosolvenzeffekte auf das Entfaltungsgleichgewicht von Proteinen haben sich zwei Modelle etabliert. Das *Transfermodell*, entwickelt von C. TANFORD,^[6] setzt die Differenz der Transfer-GIBBS-Energien ΔG_{tr} , welche sich beim Transfer des nativen Proteins (N) und des denaturierten Proteins (D) von einer rein wässrigen Lösung in eine 1 M Kosolvenzlösung ergeben, mit der Differenz der EntfaltungsgIBBS-Energien $\Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{D}}$ in den beiden Medien gleich:

$$\Delta G_{\text{tr}}^{\text{D}} - \Delta G_{\text{tr}}^{\text{N}} = \Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{D}}^{\text{Kosolvenz}} - \Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{D}}^{\text{Wasser}} . \quad (1.1)$$

Dieses Modell nimmt weiterhin an, dass sich $\Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{D}}^{\text{Kosolvenz}}$ additiv aus den Beiträgen der einzelnen Proteinbausteine, welche mit dem Solvenz in Kontakt stehen, zusammensetzt:

$$\Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{D}}^{\text{Kosolvenz}} = \Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{D}}^{\text{Wasser}} + \sum_i n_i \alpha_i \delta g_i^{\text{tr}} . \quad (1.2)$$

Die Transfer-GIBBS-Energien einer Komponente i (Aminosäureseitenketten und Peptidrückgrat) δg_i^{tr} sind über die Bestimmung der Löslichkeitsgrenze experimentell zugänglich.^[7] Der Parameter α_i beschreibt die Anzahl exponierter Komponenten i im Verhältnis zur Gesamtmenge der Komponente n_i , $\alpha_i = (n_i^{\text{D}} - n_i^{\text{N}})/n_i$. Die Summe auf der rechten Seite in Gleichung 1.2 entspricht dem sogenannten m -Wert: $m = \sum_i n_i \alpha_i \delta g_i^{\text{tr}}$. Dieser thermodynamische Parameter wird als Maß für die Stabilität eines Proteins in einer Kosolvenzlösung interpretiert und kann über einen linearen Fit der Abhängigkeit der Standardentfaltungs-GIBBS-Energie $\Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{D}}^\circ$ von der Kosolvenzkonzentration c_{K} bestimmt werden: $\Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{D}}^\circ(\text{Kosolvenz}) = \Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{D}}^\circ(\text{Wasser}) + m \cdot c_{\text{K}}$. Es ist daher möglich, mithilfe des Transfermodells m -Werte vorherzusagen.^[8] Aus der Unterteilung des m -Werts in die Beiträge der Einzelkomponenten schlussfolgerten BOLEN *et al.*, dass der stabilisierende bzw. destabilisierende Effekt von Kosolvenzien zum größten Teil auf ungünstige bzw. günstige Wechselwirkungen mit dem Peptidrückgrat zurückzuführen ist. Wechselwirkungen des Kosolvenz mit den Aminosäureseitenketten haben demzufolge einen geringen Anteil am beobachteten Effekt.^[9]

Das zweite Modell beschreibt die Wechselwirkungen von Kosolvenzien (K) mit Proteinen (P) mithilfe des präferentiellen Wechselwirkungskoeffizienten Γ_{PK} . Die Zugabe eines hydratisierten Proteinmoleküls zu einer wässrigen Kosolvenzlösung führt zu einer Änderung des chemischen Potentials des Kosolvenz μ_{K} :^[10]

$$\left(\frac{\partial \mu_{\text{K}}}{\partial b_{\text{P}}} \right)_{b_{\text{K}}} = \left(\frac{\partial \mu_{\text{P}}}{\partial b_{\text{K}}} \right)_{b_{\text{P}}}, \quad (1.3)$$

mit dem chemischen Potenzial $\mu_i = \mu^\circ + RT \ln(b_i \cdot \gamma_i)$ der Komponente i , wobei b_i der Molalität und γ_i dem Aktivitätskoeffizienten der Komponente entspricht. Dadurch kommt es in der direkten Umgebung des Proteins zu einer Störung des chemischen Gleichgewichts. Dem kann durch eine lokale Änderung der Kosolvenzkonzentration b_{K} entgegengewirkt

werden:^[10]

$$\left(\frac{\partial b_K}{\partial b_P}\right)_{\mu_K} = -\frac{(\partial\mu_K/\partial b_P)_{b_K}}{(\partial\mu_K/\partial b_K)_{b_P}} = -\left(\frac{\partial\mu_P/\partial b_K}{\partial\mu_K/\partial b_K}\right)_{b_P} = \left(\frac{\partial\mu_P}{\partial\mu_K}\right)_{b_P} = \Gamma_{PK}. \quad (1.4)$$

Der präferentielle Wechselwirkungskoeffizient Γ_{PK} ist experimentell über Dichtemessungen oder Osmometrie zugänglich.^[11,12] Γ_{PK} kann sowohl positive als auch negative Werte annehmen. Im Falle $\Gamma_{PK} < 0$ bestehen ungünstige Wechselwirkungen zwischen Protein und Kosolvenz. Dies führt zum präferentiellen Ausschluss des Kosolvenz aus der direkten Umgebung des Proteins und somit zu einer präferentiellen Hydratisierung der Proteinoberfläche. Dabei ist zu beachten, dass ein präferentieller Ausschluss nicht mit einer vollständigen Entfernung des Kosolvenz gleichzusetzen ist. Es werden lediglich relative Konzentrationsunterschiede zwischen der Solvathülle und der Volumenphase betrachtet. Im entgegengesetzten Fall, $\Gamma_{PK} > 0$, kommt es zu einer Erhöhung der Kosolvenzkonzentration an der SASA des Proteins, ausgelöst durch günstige Wechselwirkungen. Generell zeigen stabilisierende Osmolyte negative und destabilisierende Osmolyte positive Γ_{PK} -Werte.^[13] Auch dieses Modell liefert einen Bezug zum m -Wert (s.o.). Die Differenz der präferentiellen Wechselwirkungskoeffizienten im denaturierten und nativen Zustand $\Delta\Gamma_{PK} = \Gamma_{PK}^D - \Gamma_{PK}^N$ steht über die folgende Beziehung im Zusammenhang mit dem m -Wert:^[4]

$$m = RT \frac{\Delta\Gamma_{PK}}{c_K}, \quad (1.5)$$

wobei c_K die Kosolvenzkonzentration ist. In Molekulardynamik-Simulationsrechnungen zu Wechselwirkungen des Denaturanz Harnstoff mit einem Modellprotein fanden D. CANCHI *et al.*, dass die Wechselwirkungen mit den Aminosäureseitenketten zu 60% zum m -Wert beitragen.^[14] Das Modell steht daher im starken Widerspruch zum Transfermodell, welches den Seitenketten einen vernachlässigbar kleinen Anteil zuschreibt (s.o.).

Obwohl sich beide Modelle zur Vorhersage von m -Werten eignen, können aus ihnen keine Aussagen zu mechanistischen Aspekten abgeleitet werden. Dazu müssten Informatio-

nen mit atomarer Auflösung vorliegen. Einen ersten Ansatz dazu lieferten X. CHENG *et al.*, indem sie die Stärke von attraktiven bzw. repulsiven Wechselwirkungen von Harnstoffderivaten mit Amid-N-, Amid-O-, aliphatischen sp^3C -, Amid- sp^2C - und aromatischen sp^2C -Atomen in wässriger Lösung quantifizierten.^[15]

1.1.2 Makromoleküle - Crowding

Alle Zellen enthalten eine hohe Konzentration an Makromolekülen, wie z.B. Proteine, Nukleinsäuren und Polysaccharide. Ihr Anteil am Gesamtvolumen liegt zwischen 5 und 40 %.^[16] Dieses Phänomen wird im englischen als *Crowding* bezeichnet (*engl. crowd* = Menge, Gedränge).^[17] Der evolutionäre Ursprung des Crowdings ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass bereits in den Protobionten (hypothetische Vorläufer der Zelle) der RNA-Welt die crowdinginduzierte Erhöhung von RNA-Faltungs- und Reaktionsraten einen evolutionären Vorteil bot.^[18] In modernen Zellen ist makromolekulares Crowding beispielsweise an der zellulären Volumenregulation und der Bildung größerer makromolekularer Komplexe beteiligt.^[19]

In der dicht gedrängten Zelle liegt der Abstand zwischen den Makromolekülen üblicherweise bei 1 – 2 nm.^[20] Durch das geringe freie Volumen innerhalb des Zytosols entsteht der sogenannte Ausschlussvolumeneffekt (s.u.).^[17] Zusätzlich kann es zu unspezifischen attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Bio-Makromolekülen kommen.^[21] Außerdem beeinflusst der hohe Volumenanteil der Makromoleküle die Diffusion von Reaktanden biochemischer Prozesse.^[16] Die Untersuchung des Crowding-Effekts *in cellulo* erfolgt üblicherweise durch die spektroskopische Beobachtung von fluoreszenz- oder isotonenmarkierten Probenmolekülen. Die Ergebnisse dieser Experimente liefern jedoch nur über das gesamte Volumen der Zelle gemittelte Informationen, die nicht die Realität widerspiegeln, da das Zytosol ein komplexes und inhomogenes Medium darstellt. Es gibt zahlreiche Mikroumgebungen, die sich in ihrer Zusammensetzung und somit auch in der Art der

Wechselwirkung zwischen Proben- und Background-Molekülen (s.o.) unterscheiden.^[21] Zur Erlangung quantitativer Erkenntnisse zum Einfluss des Crowding-Effekts auf biochemische Prozesse war und ist es daher unabdingbar, *in vitro*-Studien mit wohldefinierten Modellsystemen durchzuführen. Als Crowding-Reagenzien werden dabei künstliche Polymere, wie Polyethylenglycol (PEG), Ficoll und Dextran, oder Modellproteine, wie z.B. BSA (bovines Serumalbumin) oder Lysozym, eingesetzt. Studien an derartigen Modellsystemen zeigten, dass Crowding die native Form von Proteinen und die Tertiärstruktur von RNA stabilisiert, die Ribozymaktivität und die Protein-Protein-Assoziation steigert und die Proteinpolymerisation und Proteinaggregation begünstigt.^[22] Diese Beobachtungen sind auf unspezifische repulsive Wechselwirkungen zurückzuführen, welche eine Komprimierung von Molekülen oder Komplexen zur Folge haben. Dieser rein sterische Effekt lässt sich anhand des Hartkugelmodells veranschaulichen. Dabei werden Makromoleküle als starre Kugeln betrachtet.^[23] Die Mittelpunkte zweier starrer Kugeln mit dem gleichen Radius r können sich aufgrund der gegenseitigen Undurchdringbarkeit nur bis zu einem Abstand von $2r$ nähern (s. Abb. 1.1). Es entsteht daher ein Ausschlussvolumen von $(4/3) \pi (2r)^3$, welches für weitere Kugeln unzugänglich ist. Das entspricht dem achtfachen Volumen eines Moleküls ($2^3 \cdot ((4/3) \pi r^3)$). Für reale Biomoleküle, die nicht kugelförmig sind, ist das Ausschlussvolumen sogar noch größer. Je mehr Crowding-Moleküle sich in einer Lösung befinden, desto weniger kann sich ein einzelnes Molekül frei bewegen. Es kommt also zu einem Entropieverlust. Da der entfaltete Zustand von Biomolekülen im Vergleich zur nativen Form über eine höhere Zahl an Freiheitsgraden verfügt, wirkt sich der Verlust an Konformationsentropie stärker auf die denaturierte Form aus und das Konformationsgleichgewicht wird in Richtung des gefalteten Zustands verschoben. In Analogie zur thermodynamischen Beschreibung des Kosolvenzeffekts kann auch für den Crowding-Effekt das Transfermodell (vgl. Abschn. 1.1.1) angewendet werden. Im Falle des Konformationsgleichgewichts $N \rightleftharpoons D$ zwischen dem nativen und denaturierten Zustand eines Biomoleküls gilt für die Differenz der Entfaltungs-GIBBS-Energien in einer

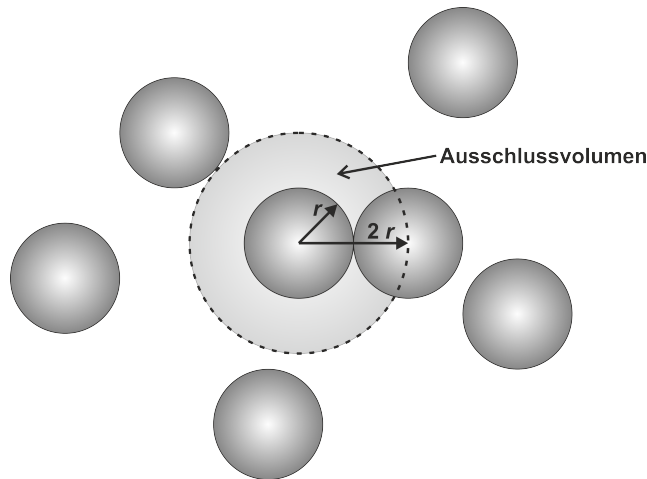


Abbildung 1.1 | Ausschlussvolumen.

Crowder-Lösung $\Delta G_{N \rightarrow D}^{\text{Crowding}}$ und einer verdünnten Lösung $\Delta G_{N \rightarrow D}^{\text{verdünnt}}$:

$$\Delta \Delta G_{N \rightarrow D} = \Delta G_{N \rightarrow D}^{\text{Crowding}} - \Delta G_{N \rightarrow D}^{\text{verdünnt}} = \Delta G_{\text{tr}}^{\text{D}} - \Delta G_{\text{tr}}^{\text{N}}. \quad (1.6)$$

Für die quantitative Beschreibung des Crowding-Effekts wird der Crowding-Koeffizient Γ_{Cr} wie folgt definiert:

$$\ln \Gamma_{\text{Cr}} = \ln \left(\frac{K_{N \rightarrow D}^{\text{Crowding}}}{K_{N \rightarrow D}^{\text{verdünnt}}} \right) = -\frac{\Delta \Delta G_{N \rightarrow D}}{RT} = -\frac{\Delta \Delta H_{N \rightarrow D}}{R} \left(\frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta \Delta S_{N \rightarrow D}}{R}, \quad (1.7)$$

mit den Gleichgewichtskonstanten $K_{N \rightarrow D} = [D]/[N]$ in der Crowder-Lösung bzw. der verdünnten Lösung. Aus Gleichung 1.7 ist ersichtlich, dass die Temperaturabhängigkeit des Crowding-Effekts mit der Größe des Enthalpiebeitrags zusammenhängt.^[21] Enthalpiebeiträge sind auf unspezifische chemische Wechselwirkungen (hydrophobe, elektrostatische) zurückzuführen, die stark von den chemischen Eigenschaften des Crowders und des Biomoleküls abhängig sind. Attraktive chemische Wechselwirkungen können dem Effekt der sterisch repulsiven Wechselwirkungen entgegenwirken und eine Entfaltung des Biomoleküls begünstigen, da der denaturierte Zustand eine größere SASA besitzt.^[21,24,25]

1.1.3 Kompartimentierung

Intrazelluläre Kompartimente können begrenzte Reaktionsvolumina für bestimmte biochemische Prozesse bilden. Der Zellkern, Mitochondrien und Lysosome sind bekannte Beispiele für membranumhüllte Kompartimente. Die semipermeable Membran dieser Organellen sorgt für eine räumliche Begrenzung für die in ihr enthaltenen Makromoleküle und ermöglicht gleichzeitig den Austausch kleinerer Moleküle, wie z. B. Ionen, mit dem Zytosol. Im Gegensatz dazu bilden membranlose makromolekulare Ansammlungen hochdynamische Kompartimente, bei denen ein schneller Austausch von Komponenten mit der Umgebung stattfindet. Der wahrscheinlich bekannteste Vertreter membranloser Kompartimente ist der Nukleolus im Inneren des Zellkerns. Weitere Beispiele sind Zentrosome, Cajal-Körper und Stress-Granulae. Diese membranlosen Organellen sind hochviskose Multikomponentensysteme mit flüssigkeitsähnlichen Eigenschaften. Ihre Zusammensetzung und Gestalt wird durch Änderungen in der zellulären Umgebung beeinflusst und spielt daher auch in der Stresserkennung eine wichtige Rolle. Die Hauptkomponenten dieser fluiden Kompartimente sind Ribonukleinsäuren und Proteine. Es wird vermutet, dass sich die membranlosen Organellen durch eine flüssig/flüssig-Phasenseparation bilden (*engl.* liquid/liquid phase separation, LLPS). Die Phasenseparation wird durch unterschiedliche Affinitäten der einzelnen Komponenten zueinander hervorgerufen. Die getrennten Phasen sind dabei Mischungen aller Komponenten, jedoch ist eine Phase jeweils mit einer bestimmten Komponente angereichert. So kommt es in den Kompartimenten zu einer 10-100-fachen Aufkonzentrierung von Proteinen und Nukleinsäuren. Die Assoziation wird durch attraktive Wechselwirkungen - darunter elektrostatische Wechselwirkungen, Kation- π , Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, $\pi - \pi$ -Stapelwechselwirkungen und hydrophobe Wechselwirkungen - gesteuert. Proteine, die in Verbindung mit der flüssig/flüssig-Phasenseparation stehen, weisen einige Gemeinsamkeiten auf. Häufig besitzen sie strukturell ungeordnete Sequenzen mit geringer Komplexität, bestehend

aus geladenen und aromatischen Aminosäuren. Die wiederholte Folge von gefalteten und ungeordneten Segmenten schafft die Grundlage für multivalente intermolekulare Wechselwirkungen. Die entstandenen Kompartimente wiederum können Moleküle aus der Umgebung aufnehmen. Durch die Aufkonzentrierung bzw. die Kollokalisierung von Reaktanden oder durch die geänderten chemischen Eigenschaften innerhalb des Kompartiments (z. B. pH-Wert, Aktivitätskoeffizienten der Komponenten) können biochemische Prozesse beschleunigt werden. Des Weiteren können durch die Aufnahme von Komponenten aus der Umgebung externe Prozesse gestoppt werden oder es kann im Falle der Aufnahme von Giftstoffen eine Schädigung der Zelle verhindert werden.^[26,27,28,29]

Die Funktion dieser fluiden Organellen und die Mechanismen ihrer Entstehung sind von hohem gegenwärtigem wissenschaftlichen Interesse. Aufgrund der hohen Komplexität von biologischen Kompartimenten dienen künstliche wässrige Zweiphasensysteme (*engl.* aqueous two phase system, ATPS) als Modell für die zelluläre Kompartimentierung. Die Grundlage dieser ATPS bilden wasserlösliche Polymere. Strukturell verschiedene Polymere bilden in wässriger Lösung separate Phasen, die jeweils mit einem der Polymere angereichert sind. Dazu muss eine bestimmte Polymerkonzentration überschritten werden. In den entstandenen Phasen sind die Polymere dicht gepackt (Crowding-Effekt, s. Abschnitt 1.1.2). Die Zusammensetzung der beiden Phasen kann in einem Phasendiagramm dargestellt werden, in dem die x -Achse den Massenanteil des Polymers, welches sich in der unteren Phase anreichert, und die y -Achse den Massenanteil x des Polymers, welches sich in der oberen Phase anreichert, angibt (Abb. 1.2). Die Binodale trennt das Phasendiagramm in einen einphasigen und einen zweiphasigen Bereich. Ein Punkt im Diagramm gibt die Gesamtkonzentration (hier in gew%) an Polymer 1 und Polymer 2 in der wässrigen Lösung an. Die Zusammensetzung der oberen und unteren Phase kann mithilfe der Konode, auf der sich ein Punkt befindet, ermittelt werden. Alle Zweiphasensysteme, deren Gesamtzusammensetzung sich auf derselben Konode befindet, besitzen dieselbe Phasenzusammensetzung. Die Volumina der Phasen sind hingegen variabel. Beispiels-

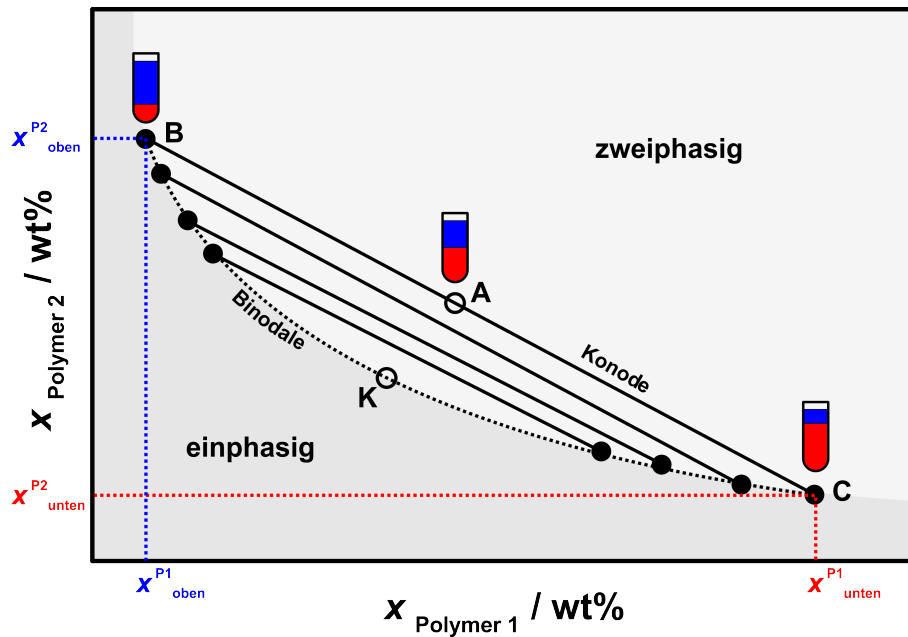


Abbildung 1.2 | Schematische Darstellung des Phasendiagramms eines wässrigen Zweiphasensystems zweier Polymere.

weise hat die obere Phase des ATPS mit der Gesamtzusammensetzung A, welche sich auf der Konode B-C befindet, einen Anteil an Polymer 1 bzw. Polymer 2, welcher der Zusammensetzung in Punkt B entspricht. Der kritische Punkt K spiegelt den Fall wider, in dem sowohl das Volumen als auch die Zusammensetzung der beiden Phasen genau gleich sind.^[30]

Ähnlich wie in den oben beschriebenen fluiden Organellen können auch in den polymerbasierten wässrigen Zweiphasensystemen weitere Komponenten in einer der beiden Phasen angereichert werden. In der präparativen und analytischen Chemie und Biologie werden ATPS zur Extraktion einzelner Komponenten aus Stoffgemischen verwendet. Die Verteilung der Komponenten ist dabei von der Affinität zu einer der Phasen und den physikochemischen Eigenschaften des ATPS abhängig. Sie wird üblicherweise durch den Verteilungskoeffizienten $K = c_{\text{oben}}/c_{\text{unten}}$ charakterisiert, wobei c_{oben} der Konzentration der Komponente in der oberen Phase und c_{unten} der Konzentration der Komponente in der unteren Phase entspricht.

1.2 Temperatur- und Druckabhängigkeit des Entfaltungsgleichgewichts

Das thermodynamische Gleichgewicht zwischen dem nativen und denaturierten Zustand $N \rightleftharpoons D$ eines Biomakromoleküls ist temperatur- und druckabhängig. Für das Zweizustandsmodell beschreibt die VAN'T HOFF'sche Gleichung die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante $K = [D]/[N]$ bei konstantem Druck p :

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2}, \quad (1.8)$$

mit der Standardentfaltungsenthalpie $\Delta H^\circ = H_D - H_N$. Die Gleichgewichtskonstante steht im Zusammenhang mit der Standardentfaltungs-GIBBS-Energie ΔG° :

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G^\circ}{RT}\right), \quad (1.9)$$

welche wie folgt definiert ist:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ, \quad (1.10)$$

mit der Entfaltungsenthalpie ΔH° und -entropie ΔS° , deren Temperaturabhängigkeit durch die Entfaltungswärmekapazität ΔC_p gegeben ist:

$$\Delta C_p = \frac{d\Delta H^\circ}{dT} = T_m \frac{d\Delta S^\circ}{dT} \quad (1.11)$$

und

$$\Delta C_p = T_m \frac{d\Delta S^\circ}{dT}, \quad (1.12)$$

mit der Entfaltungstemperatur T_m . Durch die experimentelle Beobachtung (mit Hilfe der Spektroskopie oder Kalorimetrie) von thermischen Übergängen, die dem Zweizustandsmodell folgen, können die genannten thermodynamischen Größen bestimmt werden. Des

Weiteren kann aus den erhaltenen Entfaltungskurven die Entfaltungstemperatur T_m , bei der $K = 1$ und somit $\Delta G^\circ = 0$ ist, bestimmt werden. Sie dient als Maß für die thermische Stabilität des Biomakromoleküls (die thermodynamische Stabilität ist jedoch ausschließlich über ΔG definiert). Das Ausmaß der Änderung der verschiedenen Parameter durch die Entfaltung wird durch die Stärke der intramolekularen Wechselwirkungen und durch die Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel (in biophysikalischen Studien i.d.R. Wasser) bestimmt.^[31] Die Betrachtung von wärmeinduzierten Entfaltungsreaktionen ist daher ein probates Mittel, um den Effekt von Kosolvenzien (Salze, Osmolyte, Crowder) zu untersuchen, da diese durch (un)günstige Wechselwirkungen mit dem Biomolekül das Entfaltungsgleichgewicht beeinflussen (s.o.).

Die Druckabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante wird durch Größe und Vorzeichen des Entfaltungsvolumens $\Delta V = V_D - V_N$ bestimmt:

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

Nach dem Prinzip von LE CHÂTELIER wird das Gleichgewicht durch die Druckeinwirkung in Richtung der Konformation mit dem kleinsten Volumen verschoben. Eine druckinduzierte Entfaltung findet daher nur statt, wenn diese mit einem negativen ΔV -Wert verbunden ist. Laut CHALIKIAN *et al.* kann das partielle Volumen \hat{V} des Proteins und damit auch ΔV durch die Summe von intrinsischen, thermischen und Hydratationsbeiträgen beschrieben werden:

$$\Delta V = \Delta V_i + \Delta V_t + \Delta \Delta V_h. \quad (1.14)$$

Das intrinsische Volumen V_i wird durch das VAN-DER-WAALS-Volumen des Moleküls und durch die durch Packungsdefekte entstandenen Leervolumina, welche für das Lösungsmittel unzugänglich sind, bestimmt. Das thermische Volumen V_t umfasst die Leervolumina an der Molekül-Wasser-Grenzfläche. Es ist abhängig von der Größe der SASA und von den thermisch induzierten Molekülschwingungen des Biomoleküls und des Lösungsmittels.

Das Hydratationsvolumen ΔV_h enthält Volumenänderungen des Hydratwassers relativ zur Volumenphase, die durch Wechselwirkungen mit dem Biomolekül entstehen. Dazu zählen Wasserstoffbrückenbindungen zu polaren Gruppen, hydrophobe Wechselwirkungen mit unpolaren Gruppen und Elektrostriktion, hervorgerufen durch geladene Reste auf der Moleküloberfläche.^[32,33] Aufgrund der höheren Dichte des Hydratwassers, trägt ΔV_h negativ zum Gesamtvolumen bei, während V_t das Molekülvolumen erhöht. Bei der Entfaltung werden die Leervolumina frei, die Moleküloberfläche wird größer und die freigewordenen Molekülbereiche werden hydratisiert. Es sind daher negative Werte für ΔV_i und $\Delta\Delta V_h$ und positive Werte für ΔV_t zu erwarten.

Die Abhängigkeit der Änderung der Entfaltungs-GIBBS-Energie von Temperatur und Druck, wird durch Gleichung 1.15 beschrieben.

$$d\Delta G = -d\Delta SdT + \Delta Vdp. \quad (1.15)$$

Die Integration mit Bezug zu einer Referenztemperatur T_0 und einem Referenzdruck p_0 liefert:^[34,35]

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta V_0(p - p_0) - \frac{\Delta\kappa'}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\alpha'(p - p_0)(T - T_0) - \Delta C_p \left[T \left(\ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] - \Delta S_0(T - T_0), \quad (1.16)$$

mit der Änderung der isothermalen Kompressibilität $\Delta\kappa' = -(\partial\Delta V/\partial p)_T$, der Änderung der Expansibilität $\Delta\alpha' = \Delta E = (\partial\Delta V/\partial T)_p = -(\partial\Delta S/\partial p)_T$ und der Änderung der Wärmekapazität $\Delta C_p = T(\partial\Delta S/\partial T)_p$. κ' steht im Zusammenhang mit dem isothermen Kompressibilitätskoeffizienten $\kappa_T = -(1/V)(\partial V/\partial p)_T$, welcher die Druckabhängigkeit des Volumens beschreibt: $\kappa' = V \cdot \kappa_T$. Die Temperaturabhängigkeit von V ist durch den thermischen Expansionskoeffizienten $\alpha = -(1/V)(\partial V/\partial T)_p$ gegeben ($\alpha' = E = V \cdot \alpha$).

KAPITEL 2

Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Methoden kurz vorgestellt.

2.1 Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie

2.1.1 FÖRSTER-Resonanz-Energie-Transfer

Unter dem Begriff FÖRSTER-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) versteht man den strahlungslosen Energietransfer von einem elektronisch angeregten Donormolekül (D) auf ein Akzeptormolekül (A). Voraussetzung dafür ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Für den Fall, dass der räumliche Abstand zwischen Donor und Akzeptor größer ist als die molekularen Dimensionen, kann der Energietransfer näherungsweise durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beschrieben werden. Die Stärke dieser Wechselwirkungen hängt vom Abstand R und der gegenseitigen

Orientierung der beiden Dipole κ^2 ab. Die Energietransferrate k_{FRET} ist gegeben durch

$$k_{\text{FRET}} = 8.79 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{\varphi_{\text{D}} \kappa^2 J}{\tau_{\text{D}} R^6 n^4}, \quad (2.1)$$

mit der Quantenausbeute φ_{D} und der Lebenszeit des angeregten Zustands τ_{D} des Donors in Abwesenheit eines Akzeptors, dem Brechungsindex des umgebenden Mediums n und dem Überlappungsintegral J . Mithilfe des Försterradius R_0 kann Gleichung 2.1 vereinfacht werden zu

$$k_{\text{FRET}} = \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \cdot \frac{1}{\tau_{\text{D}}}, \quad (2.2)$$

mit

$$R_0^6 = 8.79 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{\varphi_{\text{D}} \kappa^2 J}{n^4}. \quad (2.3)$$

R_0 beschreibt denjenigen Abstand zwischen D und A, bei dem jeweils die Hälfte des Energieverlusts der Donormoleküle durch Energietransfer bzw. durch normale Emissions- oder strahlungsfreie Prozesse verursacht wird. R_0 nimmt in der Regel Werte zwischen 1 – 10 nm an. Die Effizienz des Energietransfers E_{FRET} ergibt sich aus dem Anteil der angeregten Donormoleküle, welche ihre Anregungsenergie auf den Akzeptor übertragen. Sie ergibt sich aus den Raten der einzelnen Prozesse:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{k_{\text{FRET}}}{k_{\text{FRET}} + k_{\text{F,D}}}. \quad (2.4)$$

Dabei ist $k_{\text{F,D}}$ die Rate der reinen Donorfluoreszenz. Aufgrund der hohen Abstandsabhängigkeit der Energietransferrate ist die Messung der FRET-Effizienz eine beliebte Methode, um Konformationsdynamiken oder Wechselwirkungsmechanismen von fluoreszenzmarkierten Biomolekülen zu untersuchen.^[36,37,38]

2.1.2 Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Die Aussagekraft von Ensemble-FRET Messungen verringert sich, sobald die zu untersuchende Probe ein Ensemble verschiedener Konformationen eines Moleküls enthält. Das Ergebnis spiegelt dann den Mittelwert über alle Zustände wider. Differenzierte Informationen über die vorliegenden Spezies können durch Einzelmolekül-FRET-Messungen erhalten werden. Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie kann das Beobachtungsvolumen der Probe auf wenige Femtoliter verringert werden, sodass in einer stark verdünnten Lösung die Detektion einzelner Moleküle möglich wird.

Konfokalmikroskopie

Im Vergleich zu konventionellen Lichtmikroskopen, bei denen die gesamte Probe beleuchtet wird, erfolgt bei der Konfokalmikroskopie eine Punktillumination. Durch die Positionierung von Lochblenden im Strahlengang des Anregungslichts und vor dem Detektor wird Strahlung, die außerhalb des Fokus emittiert wird, nicht detektiert. So wird eine hohe Auflösung erreicht. Das Anregungslicht wird durch einen Laser erzeugt. Das kohärente Licht trifft zunächst auf einen dichroitischen Spiegel, der den Laserstrahl von der von der Probe emittierten Fluoreszenz trennt. Anschließend fokussiert das Objektiv den Laserstrahl auf einen einzelnen Punkt der Probe (s. Abb. 2.1).

Das Detektionsvolumen (PSF, *engl.* point spread function) kann durch eine dreidimensionale GAUSS-Funktion beschrieben werden,

$$\text{PSF}(x, y, z) = \exp\left(-\frac{2x^2 + y^2}{\omega_r} - \frac{2z^2}{\omega_z}\right), \quad (2.5)$$

mit den Abständen zum Mittelpunkt ω_r und ω_z in lateraler (x, y) bzw. axialer (z) Richtung, bei denen sich die Detektionseffizienz auf $1/e^2$ reduziert hat.

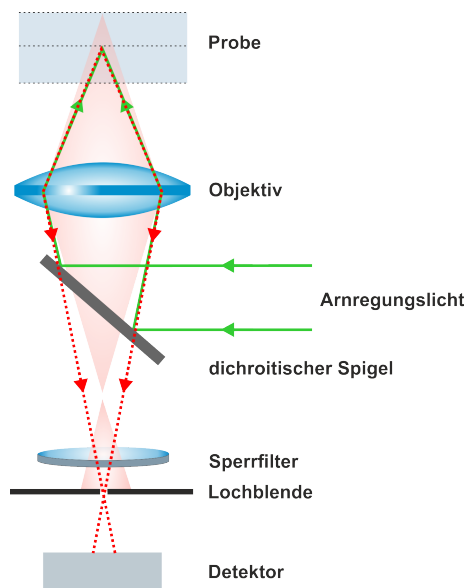


Abbildung 2.1 | Schematische Darstellung eines Konfokalmikroskops. Gezeichnet nach Referenz [39].

Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Mit Hilfe der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (*engl.* Time Correlated Single Photon Counting, TCSPC) ist es möglich, den Zeitpunkt, an dem ein Photon auf den Detektor trifft, genau zu bestimmen. Die Methode ist vergleichbar mit einer Stoppuhr, bei der der Laserpuls als Start- und das Eintreffen des Photons am Detektor als Stoppsignal dient. Die Verteilung der detektierten Photonen in Abhängigkeit der Ankunftszeit ergibt ein Histogramm, welches die Form einer Abklingkurve annimmt (s. Abb. 2.2).^[40,41]

Aufgrund der geringen Probenkonzentration unter Einzelmolekülbedingungen befindet sich nicht zu jedem Zeitpunkt der Messung ein Fluorophor im konfokalen Detektionsvolumen. Demzufolge induziert auch nicht jeder Laserpuls die Emission eines Photons. Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung wird daher um den sogenannten Time-Tagged Time-Resolved Modus (TTTR) ergänzt, durch den die Laserpulse zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messsignalen gezählt werden.

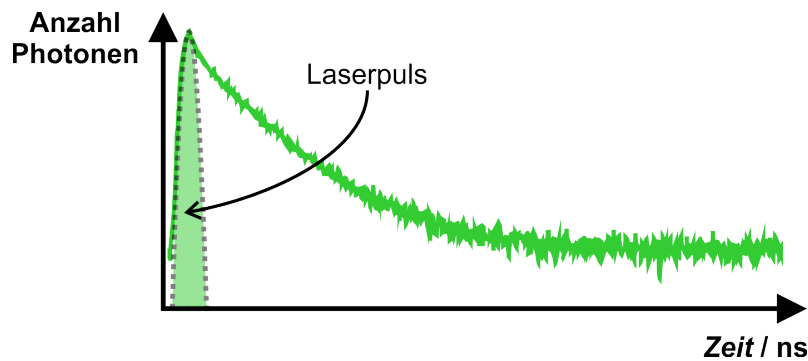


Abbildung 2.2 | TCSPC Histogramm.

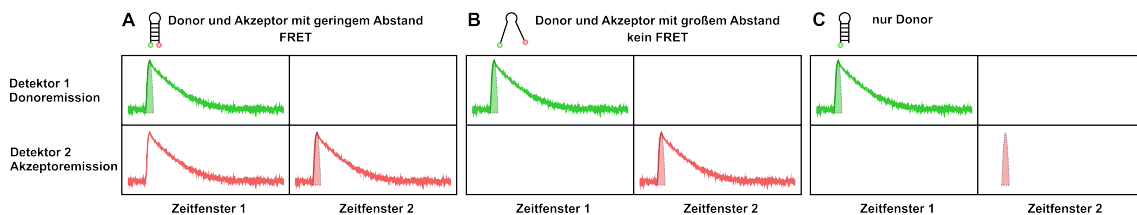


Abbildung 2.3 | Prinzip der *pulsed interleaved excitation* (PIE).

Pulsed Interleaved Excitation

Die Ausbeute der Fluoreszenzmarkierung eines Moleküls mit einem FRET-Paar aus Donor und Akzeptor liegt nie bei 100 %. Es befinden sich in einer Probe immer Moleküle, die nur einfach markiert sind. Das hat zur Folge, dass die in Gleichung 2.4 Beziehung für die FRET-Effizienz verfälscht wird, da die Rate der reinen Donorfluoreszenz $k_{F,D}$ erhöht wird. Die Methode der *pulsed interleaved excitation* (PIE) beruht auf der Verwendung von zwei gepulsten Lasern unterschiedlicher Wellenlänge und zwei Detektoren, die jeweils nur die Donor- bzw. Akzeptoremission detektieren. Dabei werden Donor und Akzeptor alternierend zur Fluoreszenz angeregt. Der zeitliche Abstand der einzelnen Laserpulse liegt im Nanosekundenbereich.

Abbildung 2.3 soll das Prinzip der PIE verdeutlichen. Im ersten Zeitfenster erfolgt die Anregung der Donorfluoreszenz, im zweiten Zeitfenster die der Akzeptorfluoreszenz. Liegt ein FRET-Paar mit genügend kleinem Abstand vor, wird die Akzeptoremission in beiden Zeitfenstern detektiert, bei großem Abstand nur im zweiten. Bei einfach markierten

Molekülen wird in keinem der beiden Zeitfenster die Akzeptoremission detektiert. Für die FRET-Effizienz gilt dann

$$E_{\text{FRET}} = \frac{n_{\text{A}}}{n_{\text{A}} + \gamma n_{\text{D}}}, \quad (2.6)$$

mit der Anzahl der detektierten Photonen n_{A} und n_{D} im Akzeptor- bzw. Donorkanal und dem Korrekturfaktor γ . Dieser berücksichtigt das Verhältnis der Quantenausbeuten ϕ und die Detektionssensitivität α von Donor und Akzeptor:

$$\gamma = \frac{\phi_{\text{A}} \alpha_{\text{A}}^{\lambda_{\text{em}}^{\text{A}}}}{\phi_{\text{D}} \alpha_{\text{D}}^{\lambda_{\text{em}}^{\text{D}}}}. \quad (2.7)$$

2.2 Kalorimetrie

2.2.1 Differenz-Scanning-Kalorimetrie

Das Prinzip der Differenz-Scanning-Kalorimetrie (DSC) beruht auf der Messung der Wärmemenge, die von einer Probe im Vergleich zu einer Referenz aufgenommen oder abgegeben wird. Dazu werden Probe und Referenz in einem thermisch isolierten System mit einer definierten Heizrate $\beta = \Delta T / \Delta t$ über einen bestimmten Temperaturbereich erwärmt. Das Messsignal ist die Differenz der elektrischen Heizleistung $\Delta P = P_{\text{Probe}} - P_{\text{Referenz}}$, die benötigt wird, um Probe und Referenz während des Heizvorgangs auf gleicher Temperatur zu halten. Diese Differenz entsteht, wenn in der Probenkammer ein endothermer oder exothermer Prozess stattfindet. Der Quotient aus ΔP und der Heizrate β liefert die Differenz der Wärmekapazitäten:

$$\frac{\Delta P}{\beta} = \Delta C(T) = C_{\text{Probe}} - C_{\text{Referenz}}. \quad (2.8)$$

Abbildung 2.4 zeigt ein typisches Thermogramm einer Proteinlösung und die daraus hervorgehenden thermodynamischen Parameter. Das Maximum der Kurve entspricht der

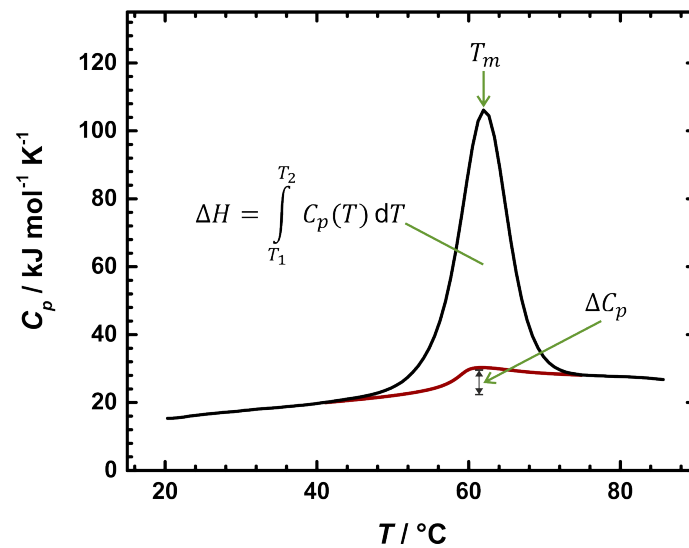


Abbildung 2.4 | Thermogramm einer Proteinlösung.

mittleren Entfaltungstemperatur T_m , bei der die Hälfte aller Proteinmoleküle vollständig entfaltet sind. Die Fläche unterhalb des Peaks liefert die Entfaltungsenthalpie $\Delta H^{\circ} = \int_{T_1}^{T_2} C_p(T) dT$. Die Basislinie nach der Entfaltung liegt oberhalb der Basislinie vor der Entfaltung, was auf der hydrophoben Hydratation exponierter unpolarer Gruppen beruht. Für die Entfaltung ergibt sich daher eine Differenz der Wärmekapazitäten ΔC_p .

2.2.2 Druckperturbationskalorimetrie

Die Druckperturbationskalorimetrie (*engl.* Pressure Perturbation Calorimetry, PPC) ist eine Erweiterung der DSC. Das Kalorimeter wird dazu mit einer Druckkammer versehen. Es erfolgt eine isotherme Messung der während einer Druckänderung $\Delta p = \pm 5 \text{ bar}$ abgegebenen bzw. aufgenommenen Wärmeenergie ΔQ_{rev} . Bei jedem Temperaturschritt werden jeweils zwei Peaks erhalten, für die Expansion und die Kompression. Die Integration der Peaks dQ/dt liefert die aufgenommene bzw. abgegebene Wärmemenge ΔQ_{rev} , welche über Gleichung 2.9 in Zusammenhang mit dem thermischen Ausdehnungskoeffizienten α

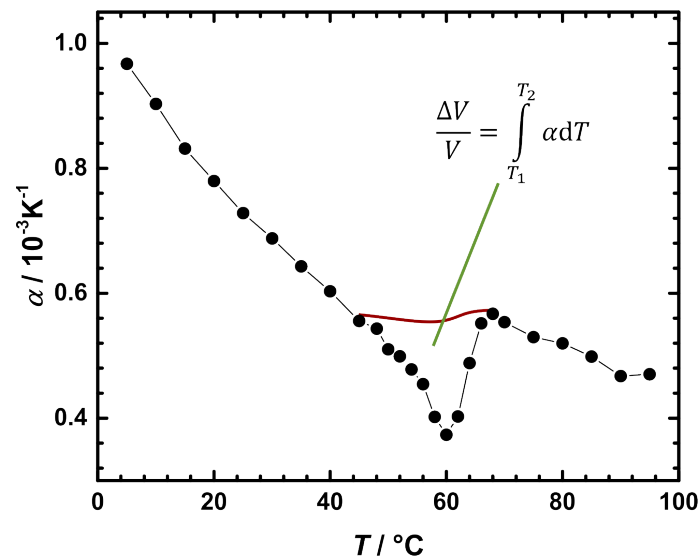


Abbildung 2.5 | PPC-Kurve einer Proteinlösung.

steht:

$$\alpha = -\frac{\Delta Q_{\text{rev}}}{TV\Delta p}, \quad (2.9)$$

mit der Temperatur T , dem Volumen V und der Druckänderung Δp . Der thermischen Ausdehnungskoeffizient α gibt die anteilige Volumenänderung bei Änderung der Temperatur an:

$$\alpha = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_p. \quad (2.10)$$

Die Integration der PPC-Kurve (s. Abb. 2.5) im Bereich des thermischen Übergangs liefert die relative Volumenänderung $\Delta V/V$ der Zustandsänderung.

2.3 Dampfdruckosmometrie

Das Phänomen der Osmose beschreibt das Bestreben eines Lösungsmittels einen Konzentrationsausgleich zwischen zwei durch eine semipermeable Membran (durchlässig für Lösungsmittelmoleküle, undurchlässig für Moleküle der gelösten Substanz) getrennte

Lösungen herzustellen. Der osmotische Druck Π beschreibt den Druck, der aufgewendet werden müsste, um die Permeation des Lösungsmittels zu verhindern. Im Gleichgewicht ist das chemische Potenzial des Lösungsmittels μ_{LM} auf beiden Seiten der Membran gleich:^[42,43]

$$\mu_{\text{LM}}(p) = \mu_{\text{LM}}(x_{\text{LM}}, p + \Pi) \quad (2.11)$$

$$\text{mit} \quad \mu_{\text{LM}}(x_{\text{LM}}, p + \Pi) = \mu_{\text{LM}}(p) + \int_p^{p+\Pi} V_{\text{m}} dp + RT \ln x_{\text{LM}}$$

$$\text{also ist} \quad -RT \ln x_{\text{LM}} = \Pi V_{\text{m}},$$

wobei x_{LM} der Molenbruch und V_{m} das molare Volumen des Lösungsmittels ist. Für verdünnte Lösungen ($x_{\text{LM}} \rightarrow 1$) kann $\ln x_{\text{LM}}$ durch $\ln(1 - x_{\text{S}}) \approx -x_{\text{S}}$, mit dem Molenbruch x_{S} der gelösten Substanz, ersetzt werden. Des Weiteren entspricht der Molenbruch der gelösten Substanz bei verdünnten Lösungen dem Quotienten der Stoffmengen der Substanz und des Lösungsmittels $x_{\text{S}} \approx n_{\text{S}}/n_{\text{LM}}$. Außerdem ist der Druckbereich des Integrals so gering, dass V_{m} als konstant angenommen werden kann. Mit Hilfe der Beziehung $V = n_{\text{LM}}V_{\text{m}}$ für das Gesamtvolumen V der Lösung erhält man die VAN'T-HOFF-Gleichung:^[42]

$$\Pi = c_{\text{S}} \cdot RT, \quad (2.12)$$

mit der Stoffmengenkonzentration $c_{\text{S}} = n_{\text{S}}/V$ der gelösten Substanz.

Bei Kenntnis des osmotischen Drucks kann die Osmolalität, welche die Molalität b der osmotisch aktiven Teilchen einer Lösung beschreibt, ermittelt werden. Diese kann mittels Dampfdruckosmometrie bestimmt werden. Im Vergleich zum reinen Lösungsmittel ist in einer Lösung osmotisch aktiver Teilchen der Dampfdruck p_{LM} des Lösungsmittels erniedrigt. Das RAOULT-Gesetz beschreibt den Zusammenhang des Dampfdrucks mit

dem Molenbruch x_S der gelösten Substanz:^[42]

$$p_{LM} = x_S \cdot p_{LM}^0, \quad (2.13)$$

wobei p_{LM}^0 der Dampfdruck des reinen Lösungsmittels ist. Die moderne Dampfdruckosmometrie betrachtet anstelle der Dampfdruckerniedrigung die Taupunkterniedrigung einer Lösung im Vergleich zum reinen Lösungsmittel (i. d. R. Wasser). Dazu werden Temperatur und Dampfdruck der Probe in einer Probenkammer äquilibriert. Die Gleichgewichtstemperatur entspricht der Raumtemperatur und dient als Referenz T_R . Anschließend wird das enthaltene Thermoelement unter den Taupunkt gekühlt, sodass das Wasser aus der Gasphase in der Messzelle kondensiert. Es folgt eine Temperaturerhöhung, bis der Taupunkt T_T erreicht ist. An diesem Punkt sind die Verdunstungs- und Verdampfungswärme gleich groß. Das Messsignal entspricht der Taupunkterniedrigung ΔT :^[44]

$$\Delta T = T_R - T_T = \frac{\Delta p}{(dp/dT)_{T_R}},$$

mit der Differenz der Dampfdrücke $\Delta p = p_{\text{Wasser}}^\circ - p$, wobei p_{Wasser}° der Sättigungsdampfdruck des Lösungsmittels Wasser und p der Dampfdruck in der Messzelle ist. Für die Steigung $(dp/dT)_{T_R}$ gilt

$$\left(\frac{dp}{dT}\right)_{T_R} = \frac{\Delta_v H p_{\text{Wasser}}^\circ}{RT^2}.$$

Somit ist

$$\Delta T = \frac{RT^2}{\Delta_v H} \cdot \frac{p}{p^\circ}, \quad (2.14)$$

mit der Verdampfungsenthalpie $\Delta_v H$. Die Taupunkterniedrigung ΔT wird als Spannungssignal an einem Thermoelement gemessen. Aufgrund der Linearität des RAOULT-Gesetzes kann das Osmometer mit Natriumchlorid-Standardlösungen kalibriert werden und somit das ΔT -Signal in die Osmolalität der Lösung mit der Einheit [mOsm = mmol kg⁻¹] konvertiert werden.

2.4 Dichtemessung nach der Biegeschwingermethode

Bei Dichtemessungen im Biegeschwinger wird die Probe in ein U-förmiges Glasröhrchen, welches zur ungedämpften Oszillation angeregt wird, gefüllt. Die Schwingungsrichtung steht senkrecht zur Ebene der beiden U-Schenkel. Das System bildet einen Masse-Feder-Schwinger, dessen Masse m sich aus der Summe der effektiven Masse des leeren U-Röhrchens m_0 und der Masse der Probe m_P ergibt: $m = m_0 + m_P$. Die Eigenfrequenz ω eines Biegeschwingers mit der Federkonstante k ist abhängig von der Gesamtmasse m , welche wiederum mit der Dichte ρ der Probe im Zusammenhang steht:

$$\omega = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} = \sqrt{\frac{k}{m_0 + \rho V}}. \quad (2.15)$$

Das Probenvolumen V wird durch die Schwingknoten, welche an der Stelle an der das U-Röhrchen befestigt ist entstehen, begrenzt und ist daher immer gleich. Mit den Gerätekonstanten $A = k/4\pi^2 \cdot V$ und $B = m_0/V$ und der Schwingungsperiode $T = 1/\omega$ (= Messgröße) gilt für die Dichte der Probe

$$\rho = A \cdot T^2 - B. \quad (2.16)$$

Da das Volumen V und die Masse des leeren U-Röhrchens m_0 unbekannt sind, müssen die Konstanten A und B durch Kalibrierungsmessungen mit Substanzen bekannter Dichte bestimmt werden. Hierzu dienen in den meisten Fällen Luft und Wasser. Für die Differenz der Dichten zweier Proben gilt:^[45]

$$\Delta\rho = \rho_1 - \rho_2 = A(T_1^2 - T_2^2). \quad (2.17)$$

2.5 RÖNTGEN-Kleinwinkelstreuung

Der folgende Abschnitt basiert auf den Quellen [46] und [43].

Die RÖNTGEN-Kleinwinkelstreuung (*engl.* small angle X-ray scattering, SAXS) liefert Informationen über die mittlere Größe oder Form streuender Partikel der Größenordnung von 1 – 100 nm. Die RÖNTGEN-Strahlen werden an der Elektronenhülle eines Atoms elastisch gestreut (THOMSON-Streuung). Energiereiche RÖNTGEN-Photonen regen die Elektronen zur Oszillation an. Die Elektronen benachbarter Atome oszillieren dabei synchron und emittieren elektromagnetische Strahlung, dessen Wellenlänge gleich der Wellenlänge der einfallenden Strahlung ist. Die kohärenten Wellen interferieren und die resultierende Streuintensität wird als Funktion des Streuwinkels 2θ detektiert. Aufgrund der hohen Energie der RÖNTGEN-Strahlung können Wechselwirkungen zwischen Photonen und Elektronen vernachlässigt werden. Bei der elastischen Streuung ist der Betrag des Wellenvektors der einfallenden Strahlung $|\vec{k}_0|$ gleich dem der Streustrahlung $|\vec{k}_1|$:

$$|\vec{k}_0| = |\vec{k}_1| = \frac{2\pi}{\lambda}. \quad (2.18)$$

Für den Betrag des Wellenvektorübertrags $\vec{q} = \vec{k}_1 - \vec{k}_0$ gilt dann:

$$q = |\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta. \quad (2.19)$$

Die Streuintensität eines freien Elektrons I_1 ist gegeben durch

$$I_1 = I_0 r_e^2 \frac{1 + \cos^2 \theta}{2}, \quad (2.20)$$

mit der THOMSON-Streulänge r_e , die dem klassischen Elektronenradius entspricht, und der Intensität der einfallenden Strahlung I_0 . Aufgrund der hohen Energie der RÖNTGEN-Strahlung werden alle Elektronen eines Atoms angeregt. SAXS-Daten sind nicht atomar

aufgelöst. Daher wird die Streuwelle eines Atoms über die Elektronendichte $\rho(\vec{r})$ beschrieben:

$$f(\vec{q}) = \int \rho(\vec{r}) e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r}, \quad (2.21)$$

wobei $d\vec{r}$ einem Volumenelement des Atoms entspricht. Die gemessene Streuintensität hängt neben der Intensität der einfallenden Strahlung auch vom Raumwinkelement $\Delta\Omega$, welches vom Detektor abgedeckt wird, ab. Deshalb erfolgt eine Normierung der Streuintensität und man erhält den sog. differentiellen Streuquerschnitt:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{I_1/\Delta\Omega}{I_0/A_0}, \quad (2.22)$$

mit der Querschnittsfläche des einfallenden Strahls A_0 . Der Wirkungsquerschnitt σ ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass eine Streuung am Streuzentrum stattfindet. $d\sigma$ beschreibt eine Teilfläche. Die gemessene Streuintensität ergibt sich aus der Mittelung des Betragsquadrats von $f(\vec{q})$ über alle Orientierungen eines Teilchens:

$$I(q) = \left\langle \left| \int \rho(\vec{r}) e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \right|^2 \right\rangle. \quad (2.23)$$

Für Biomoleküle, wie z.B. Proteine, in verdünnten Lösungen können intermolekulare Wechselwirkungen vernachlässigt werden. Es kommt also nicht zur Interferenz zwischen an unterschiedlichen Teilchen gestreuten Streuwellen. Es muss jedoch die Elektronendichte des Lösungsmittels ρ_L berücksichtigt werden. Der Kontrast K für ein Makromolekül mit dem Volumen V_M und der Elektronendichte ρ_M ist definiert durch

$$K = V_M(\rho_M - \rho_L). \quad (2.24)$$

Die Streuintensität von N_M gelösten Makromolekülen entspricht dann

$$I(q) = N_M (\rho_M - \rho_L)^2 \left\langle \left| \int e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \right|^2 \right\rangle. \quad (2.25)$$

Die Streuintensität $I(q)$ hängt von der äußeren Form des Makromoleküls und der Verteilung der Makromoleküle in der Lösung ab. Über die Definition des Formfaktors

$$F(q) = \frac{1}{V_M} \int e^{i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \quad (2.26)$$

lässt sich Gleichung 2.25 vereinfachen zu

$$I(q) = N_M K^2 \langle |F(q)|^2 \rangle = N_M K^2 \langle P(q) \rangle = N_M K^2 P(q). \quad (2.27)$$

$P(q)$ ist der sog. intrapartikuläre Strukturfaktor.

GUINIER-Näherung

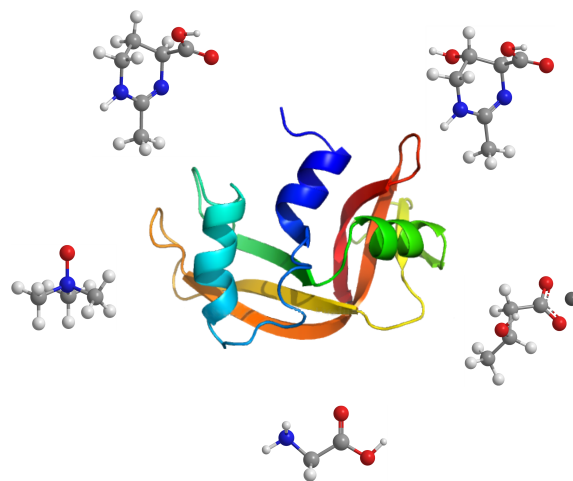
Bei kleinen q -Werten kann aus der Kleinwinkelstreu Kurve der Streumassenradius (auch Gyrationradius) R_g über eine GUINIER-Auftragung ermittelt werden. R_g^2 gibt den quadratisch gemittelten Abstand aller Streuzentren zum Schwerpunkt eines Partikels an. Über die GUINIER-Näherung gilt für $I(q)$:

$$I(q) = I(0) \left[1 - \frac{1}{3} q^2 R_g^2 \right] \approx I(0) e^{-q^2 R_g^2 / 3}. \quad (2.28)$$

Aus der Auftragung von $\ln I(q)$ gegen q^2 ergibt sich eine Gerade mit der Steigung $-R_g^2/3$. Abweichungen vom linearen Verlauf lassen auf Aggregate (Anstieg) oder repulsive Wechselwirkungen (Abstieg) innerhalb der Probe schließen.

KAPITEL 3

Einfluss organischer Osmolyte auf die volumetrischen Eigenschaften der Ribonuklease A



Die Messdaten dieser Studie wurden in Zusammenarbeit mit Julia Kudelka, Lena Ostermeier und Armin Kamali im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten generiert.

Die osmotischen Koeffizienten ϕ für TMAO in Abbildung 3.5 wurden bereits publiziert: M. Gao, C. Held, S. Patra, L. Arns, G. Sadowski, R. Winter, "Crowders and Cosolvents - Major Contributors to the Cellular Milieu and Efficient Means to Counteract Environmental Stresses", *ChemPhysChem* **18** (2017) 2951-2972. Die Daten der entsprechenden Abbildung des Originaltextes (DOI: 10.1002/cphc.201700762) wurden mit Erlaubnis des Verlags *John Wiley and Sons* wiederverwendet.

3.1 Einleitung

Biochemische Prozesse werden durch äußere Stressfaktoren, wie Temperaturschwankungen, Dürre, hydrostatischen Druck oder hohe Salinität, stark beeinflusst. Dennoch gibt es Organismen, die sich an extreme Umweltbedingungen angepasst haben. Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene zelluläre Schutzmechanismen entwickelt, die die Besiedelung lebensfeindlicher Regionen ermöglichten. Durch die intrinsische Adaptation von Bio-Makromolekülen wurden beispielsweise die funktionellen Eigenschaften von Proteinen und deren Aminosäuresequenzen sowie Variationen des genetischen Codes an die äußeren Bedingungen angepasst.^[47] Aber auch externe Adaptationsstrategien, wie die intrazelluläre Anreicherung von anorganischen und organischen Osmolyten, tragen zur Erhaltung der biochemischen Funktionalität der Biomoleküle bei. Neben der Regulation des osmotischen Drucks können organische Osmolyte den denaturierenden Effekten der äußeren Stressfaktoren entgegenwirken, indem sie die native Konformation von Biomolekülen stabilisieren. Über den osmophoben Effekt (s. Abschn. 1.1.1), der auf ungünstigen Wechselwirkungen zwischen Biomolekül und Osmolyt beruht, wird die freie Enthalpie der entfalteten Konformation erhöht. Der native Zustand bleibt hingegen unbeeinflusst, weshalb in diesem Zusammenhang auch von kompatiblen Osmolyten gesprochen wird. Als mögliche Ursache der stabilisierenden Wirkung gilt auch der Einfluss der Osmolyte auf die Struktur des Lösungsmittels Wasser. Basierend auf den Studien von F. HOFMEISTER,^[48,49] wird vermutet, dass stabilisierende Kosolvenzien die Wasserstruktur stärken, während destabilisierende Kosolvenzien die Wasserstruktur schwächen. Demnach würde ihr Einfluss auf die Wasserstoffbrückenbindungen der Wassermoleküle indirekt die konformationsbestimmenden intramolekularen Wechselwirkungen (z. B. H-Brücken, hydrophobe Wechselwirkungen) des Biomoleküls beeinflussen. Einige experimentelle und theoretische Studien fanden jedoch keinen kausalen Zusammenhang zwischen den stabilisierenden Osmolyteigenschaften und dem Einfluss auf die Wasserstruktur und widerlegen somit die

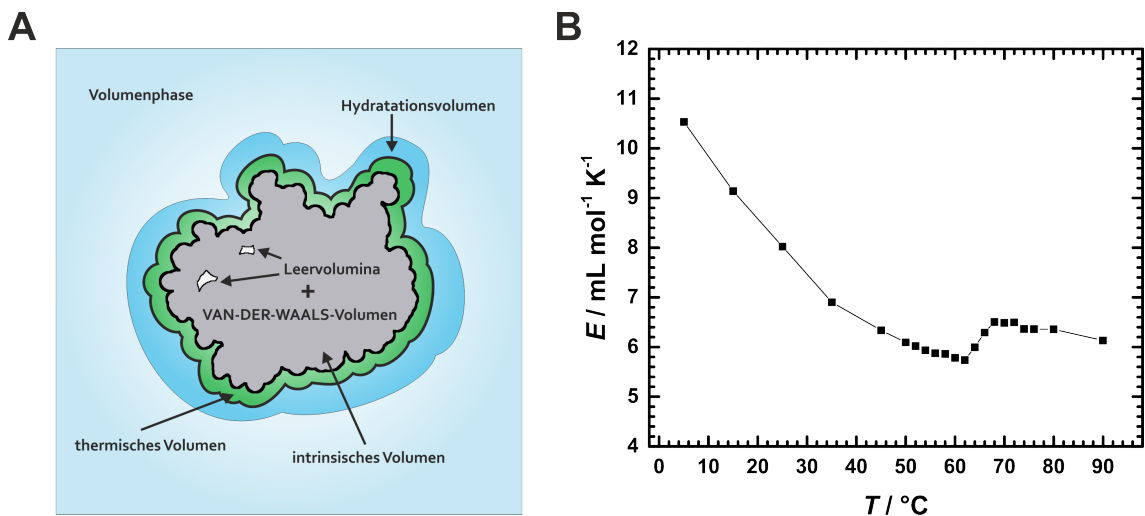


Abbildung 3.1 | **A** Teilbeiträge des partiellen molaren Volumens eines Proteins. **B** Exemparische $E(T)$ -Kurve (part. mol. Expansibilität) eines Proteins.

universelle Gültigkeit dieser These.^[50,51,52,53] Aktuelle Molekulardynamikstudien befassen sich deshalb mit dem direkten Einfluss der Osmolyte auf die Struktur und Dynamik der Wassermoleküle innerhalb der Hydrathülle von Biomolekülen. Zusätzliche mechanistische Hinweise können durch die Betrachtung der volumetrischen Eigenschaften der Biomoleküle gewonnen werden. Die Änderung des partiellen molaren Volumens \bar{V} eines Proteins in Anwesenheit eines Osmolyts lässt Rückschlüsse auf dessen Einfluss auf die Hydratation, die konformationelle Dynamik oder molekulare Packung zu. In wässriger Lösung ist die Proteinoberfläche von einer Hydrathülle umgeben. Da sich die volumetrischen Eigenschaften des Hydratwassers von denen des Wassers der Volumenphase unterscheiden, wird das partielle molare Volumen des Hydratwassers $\Delta\bar{V}_h$ dem partiellen molaren Volumen \bar{V} des Proteins zugeordnet. \bar{V} enthält neben dem intrinsischen Volumen des Biomoleküls \bar{V}_i (s. Abb. 3.1) den Beitrag des thermischen Volumens \bar{V}_t , welches Volumenbeiträge durch temperaturinduzierte molekulare Schwingungen des Biomoleküls und des Hydratwassers mit einbezieht (vgl. Abschn. 1.2):^[32,33]

$$\bar{V} = \bar{V}_i + \bar{V}_t + \Delta\bar{V}_h. \quad (3.1)$$

Aufgrund des Dichteunterschieds zwischen dem Hydratwasser und dem Wasser der Volumenphase nimmt der Hydratationsterm $\Delta\bar{V}_h = \bar{V}_h - \bar{V}_0$ in der Regel negative Werte an. Änderungen des partiellen molaren Volumens können über seine Druck- bzw. Temperaturabhängigkeit experimentell bestimmt werden. Die Ableitung $-(\partial\bar{V}/\partial p)_T$ liefert die partielle molare Kompressibilität K und $(\partial\bar{V}/\partial T)_p$ die partielle molare Expansibilität E . E ist über die Messung des thermischen Ausdehnungskoeffizienten $\alpha = (1/\bar{V}) \cdot (\partial\bar{V}/\partial T)_p$, z. B. mittels Druckperturbationskalorimetrie (PPC), experimentell zugänglich: $E = \bar{V} \cdot \alpha$. In Analogie zu Gleichung 3.1 kann auch die partielle molare Expansibilität durch ihre Teilbeiträge beschrieben werden:

$$E = \left(\frac{\partial\bar{V}_i}{\partial T}\right)_p + \left(\frac{\partial\bar{V}_t}{\partial T}\right)_p + \left(\frac{\partial\Delta\bar{V}_h}{\partial T}\right)_p = \bar{E}_i + \bar{E}_t + \Delta\bar{E}_h. \quad (3.2)$$

Die partielle molare Expansibilität E ist ebenfalls temperaturabhängig. Für kleine globuläre Proteine nimmt sie im Bereich vor der Entfaltung mit steigender Temperatur ab (s. Abb. 3.1 B). Mithilfe von Molekulardynamik-Simulationen konnte gezeigt werden, dass das intrinsische Volumen \bar{V}_i und das thermische Volumen \bar{V}_t eines Proteins mit steigender Temperatur zunehmen.^[54] Da das VAN-DER-WAALS-Volumen konstant ist, wird die Zunahme von \bar{V}_i durch die Ausdehnung von inneren Leervolumina bestimmt und führt vermutlich nur zu geringen Änderungen der Gesamtexpansibilität E , da die Ausdehnung im Temperaturbereich vor der Entfaltung durch die kompakte Faltung des Proteins limitiert ist. Der Beitrag der Hydratation $\Delta\bar{E}_h = \bar{V} \cdot (\alpha_h - \alpha_0)$ nimmt mit steigender Temperatur ab. Durch die erhöhte thermische Energie der Wassermoleküle des Hydratwassers bei Temperaturzunahme kommt es zum Ausgleich des Dichteunterschieds relativ zum Wasser der Volumenphase und der Hydratationsbeitrag zum partiellen molaren Volumens \bar{V} des Proteins sinkt, wodurch schließlich auch E abnimmt.

Des Weiteren liefert die Integration der $E(T)$ -Kurve im Temperaturbereich der Entfaltung die Volumenänderung ΔV , die mit der Konformationsänderung des Proteinmoleküls ein-

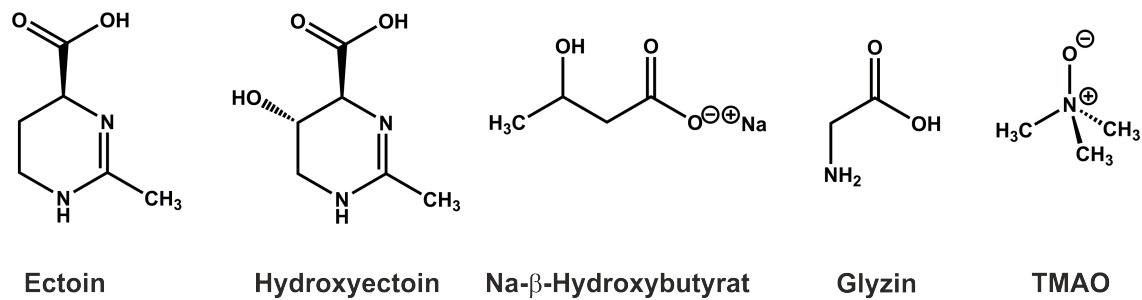


Abbildung 3.2 | Strukturformeln der untersuchten Osmolyte Ectoin, Hydroxyectoin, Na-β-Hydroxybutyrat, Glycin und Trimethylamin-N-oxid (TMAO).

hergeht. Anders als bei der druckinduzierten Entfaltung, bei der ΔV immer negativ sein muss, kann das Entfaltungsvolumen bei einer temperaturinduzierten Entfaltung sowohl ein positives, als auch ein negatives Vorzeichen haben. Bei der Proteindenaturierung werden die durch Packungsdefekte entstandenen Leervolumina frei und die atomaren Gruppen, die zuvor nicht im Kontakt mit der umgebenden wässrigen Lösung standen, werden hydratisiert. Infolgedessen verringert sich das partielle molare Volumen \bar{V} des Proteins aufgrund der Abnahme des intrinsischen Volumens \bar{V}_i und des Hydratationsvolumens $\Delta\bar{V}_h$, da die SASA und damit die hydratisierte Oberfläche größer wird und das Hydratwasser im Vergleich zum Wasser der Volumenphase eine höhere Dichte aufweist. Die Änderung des thermischen Volumens \bar{V}_t , welches proportional zur SASA des Proteins ist, nimmt bei der Entfaltung positive Werte an. Aufgrund der entgegengesetzten Vorzeichen der einzelnen Volumenbeiträge ist die Änderung des Gesamtvolumens ($\Delta V \approx \Delta\bar{V}$) nur sehr gering.^[33] Des Weiteren ist ΔV von der Konformation des denaturierten Zustands abhängig. Zwischen der vollständig entfalteten *Random Coil* (engl. Zufallsknäuel) Konformation und dem nativen Zustand des Proteins liegt ein Ensemble denaturierter Zustände mit unterschiedlich ausgeprägten Sekundärstrukturen. Der Grad der Entfaltung ist auch von den Lösungsmitelegenschaften, wie z. B. dem pH-Wert, der Ionenstärke oder der Anwesenheit von Kosolvenzien, abhängig.^[55,56,57]

In diesem Kapitel soll nun der Einfluss der Osmolyte Ectoin, Hydroxyectoin, Na-β-

Hydroxybutyrat, Glyzin und Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) (s. Abb. 3.2) auf die volumetrischen Eigenschaften des Modellproteins Ribonuklease A (RNase A) untersucht werden. TMAO kommt in den Gewebezellen von Meerestieren vor und wurde zunächst für seine proteinstabilisierende Wirkung gegenüber dem Denaturanz Harnstoff bekannt.^[58] Später fanden P. H. YANCEY *et al.* eine Korrelation des TMAO-Gehalts von Gewebeproben von Meerestieren mit der Meerestiefe, in der sie gefangen wurden.^[59] Sie vermuteten daher, dass die intrazelluläre Anreicherung von TMAO dem destabilisierenden Einfluss des hydrostatischen Drucks entgegenwirkt und konnten dies auch durch Hochdruckexperimente an verschiedenen Proteinen bestätigen.^[60] Als weiterer sog. Piezolyt gilt Na- β -Hydroxybutyrat. Kulturen des Tiefseebakteriums *Photobacterium profundum* weisen bei Drücken von 28 MPa im Vergleich zur Kultivierung bei Atmosphärendruck einen erhöhten Anteil des Osmolyts auf.^[61] Des Weiteren kann Na- β -Hydroxybutyrat der Proteinaggregation bei erhöhten Temperaturen bzw. erhöhter Salzkonzentration entgegenwirken.^[62] Die Osmolyte Ectoin und Hydroxyectoin wurden im Zellextrakt einer Reihe von halophilen Bakterien gefunden.^[63,64] Aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften ist Ectoin Bestandteil einiger Kosmetik- und Medizinprodukte.^[65] Glyzin ist die einfachste Aminosäure und somit der Grundbaustein aller Aminosäuren und Aminosäurederivate. Es dient sowohl als Osmolyt, als auch als Monomer in der Proteinsynthese.

3.2 Experimentelles

3.2.1 Chemikalien

Das Protein Ribonuklease A (Katalognummer: R6513) und die Osmolyte TMAO, Glyzin und Na- β -Hydroxybutyrat sowie das Wasser mit HPLC-Reinheitsgrad (Verdampfungsrückstand < 0.0003 %) wurden bei der Firma Sigma Aldrich (Deutschland) erworben. Die Osmolyte Ectoin und Hydroxyectoin wurden von der Firma Bitop (Dortmund, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Probenpräparation

Die Osmolytlösungen wurden in einem 100 mM Phosphatpuffer (pH 7) hergestellt und anschließend mit einem 0.45 μ m Whatman Spritzenfilter (GE Healthcare Life Sciences, Deutschland) filtriert. Für die DSC-Messungen wurden 1 mg und für die PPC-Messungen 5 mg in 1 mL der jeweiligen Lösung gelöst und anschließend im ThermoVac der Firma MicroCal entgast. Die exakte Proteinkonzentration wurde durch eine UV-spektrometrische Messung ermittelt. Die Proteinkonzentration für die SAXS-Messungen betrug 1 gew%. Die Osmolytlösungen für die Dichtemessungen und die Osmometrie wurden in Wasser mit HPLC-Reinheitsgrad hergestellt und anschließend mit einem Spritzenfilter (s. o.) filtriert.

3.2.3 Kalorimetrische Messungen

Die DSC- und PPC-Messungen wurden in einem VP-DSC-Mikrokalorimeter der Firma MicroCal (Northampton, MA, USA) durchgeführt. Die DSC-Kurven wurden in einem Temperaturbereich von 20 – 90 °C mit einer Heizrate von 60 °C h⁻¹ aufgenommen. Die Referenzzelle wurde mit dem Puffer bzw. der jeweiligen Puffer-Osmolytlösung befüllt. Um die temperaturabhängige molare Wärmekapazität C_p zu erhalten, wurden die Basislinie (Puffer-vs.-Puffer-Scan) von der Messkurve abgezogen. Anschließend erfolgte eine Nor-

mierung der Scans auf die Proteinkonzentration. Es wurden jeweils drei Messungen von neu präparierten Proben aufgenommen. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der MicroCal Origin-Software, die von der Firma zur Verfügung gestellt wurde.

Für die PPC-Messungen wurde das Kalorimeter durch das PPC-Zubehör, welches die Drucksprünge generiert, erweitert. Die Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 5 – 95 °C in Temperaturintervallen von 10, 5 und 2 °C durchgeführt. Für die PPC-Messungen wurden jeweils drei Basislinien aufgenommen: eine Puffer-Puffer-, eine Puffer-Wasser- und eine Wasser-Wasser-Basislinie. Die Datenanalyse erfolgte ebenfalls mit der MicroCal Origin-Software. Mithilfe der molaren Masse $M = 13700 \text{ g mol}^{-1}$ und des partiellen spezifischen Volumens $V_s = 0.704 \text{ mL g}^{-1}$ des Proteins^[66] wurde aus dem thermischen Ausdehnungskoeffizienten α die molare Expansibilität E berechnet:

$$E = M \cdot V_s \cdot \alpha = \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_p . \quad (3.3)$$

3.2.4 Dichtemessungen

Die Dichtemessungen erfolgten in der Dichte-Messapparatur DMA 5000 der Firma Anton Paar GmbH (Graz, Österreich). Das U-Röhrchen wurde vor jeder Messung gereinigt und getrocknet. Das Messgerät wurde mit Luft und Reinstwasser kalibriert. Die Messungen der Proben erfolgten bei $T = 20 \text{ °C}$.

3.2.5 Dampfdruckosmometrie

Die Bestimmung der Osmolalität der Osmolytlösungen erfolgte mit Hilfe eines Wescor Vapro Dampfdruckosmometers (Modell 5600) bei Raumtemperatur (22 °C). Vor jeder Messreihe wurde das Osmometer mit den von der Firma mitgelieferten Opti-Mole Natriumchlorid-Standards kalibriert. Die Umrechnung der erhaltenen Daten von $[\text{mOsm} = \text{mmol kg}^{-1}]$ in $[\text{mol L}^{-1}]$ erfolgte über die Dichte der Osmolytlösungen. Diese wurde im Falle von TMAO

und Glycin aus der Literatur^[67,68] entnommen und im Falle von Na- β -Hydroxybutyrat, Ectoin und Hydroxyectoin in Dichtemessungen ermittelt (s. Abschnitt 3.2.4). Die Berechnung des osmotischen Drucks erfolgte über die VAN'T-HOFF-Gleichung $\Pi = c \cdot RT$, mit der molaren Konzentration c , der universellen Gaskonstante R und der Temperatur T .

3.2.6 RÖNTGEN-Kleinwinkelstreuung

Die temperaturabhängigen SAXS-Messungen wurden in der SAXSess mc2-Apparatur der Firma Anton Paar GmbH (Graz, Österreich) durchgeführt. Als Strahlungsquelle diente ein Iso-Debyeflex 3003 RÖNTGEN-Strahlen-Generator der Firma GE Inspection Technologies (Ahrensburg, Deutschland). Es wurde Cu-K α -Strahlung ($\lambda = 0.154$ nm) und ein Schlitzkollimationssystem verwendet. Als Probenbehälter diente eine 1 mm Quarzglas-Kapillare, welche in einem TCS 120 Probenhalter der Firma Anton Paar auf 20 bzw. 80°C temperiert wurde. Die Messzeit betrug jeweils 30 Minuten. Die Detektion erfolgte über 2D-Bildplatten, die mit Hilfe des Cyclone[®] Plus Storage Phosphor Systems von Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts) und der Software OptiQuant ausgelesen wurden. Mittels der Software 2D-SAXSquant wurden die Streuintensitäten $I(q)$ erhalten. Die Rohdaten wurden auf die Intensität der Primärstrahlung normiert und der Hintergrund abgezogen. Die Berechnung der Gyrationen R_g erfolgte mittels GUINIER-Auftragung.

3.3 Ergebnisse

Als Indikator für die stabilisierende Wirkung von Osmolyten wird häufig ihr Einfluss auf die Übergangstemperatur der Proteinentfaltung T_m untersucht. Sie dient als Maß für die thermische Stabilität des Proteins. Abbildung 3.3 zeigt die Thermogramme der Ribonuklease A für die verschiedenen Osmolytlösungen im Vergleich zur Referenzmessung in reinem Puffer (schwarze Kurve) bei Osmolytkonzentrationen von 0.5 und 1 mol L⁻¹. Bis auf Ectoin verschieben alle Osmolyte die thermisch induzierte Entfaltung der RNase A zu

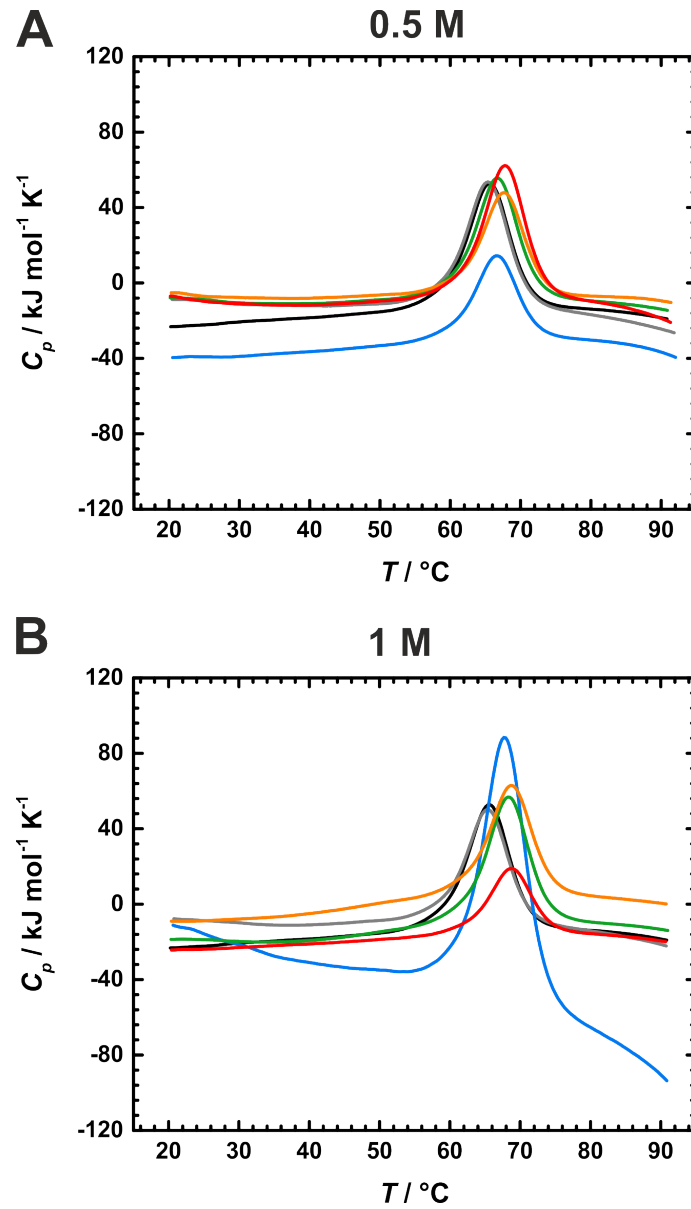


Abbildung 3.3 | Thermogramme der Ribonuklease A in Anwesenheit verschiedener Osmolyte. **A** $c_{\text{Osm}} = 0.5 \text{ mol L}^{-1}$. **B** $c_{\text{Osm}} = 1 \text{ mol L}^{-1}$. Schwarz: Referenz, grau: Ectoin, blau: Hydroxyectoin, grün: Na- β -Hydroxybutyrat, orange: Glyzin, rot: TMAO.

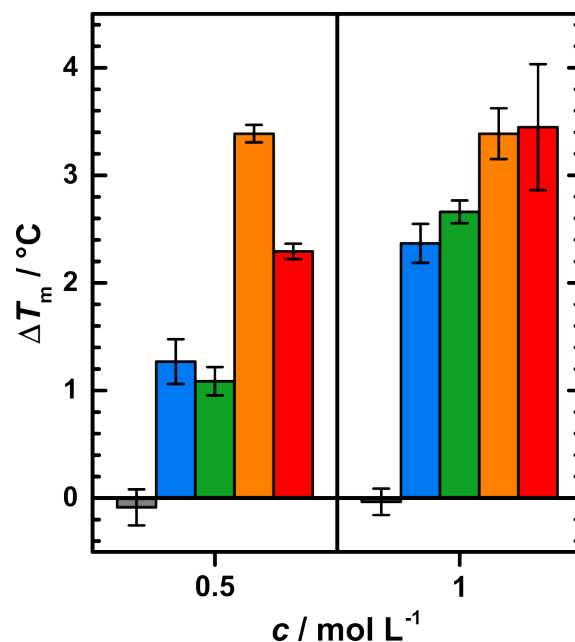


Abbildung 3.4 | Differenz der aus den Thermogrammen der Ribonuklease A ermittelten Schmelztemperaturen $\Delta T_m = T_m(\text{Osmolyt}) - T_m(\text{Referenz})$. Grau: Ectoin, blau: Hydroxyectoin, grün: Na- β -Hydroxybutyrat, orange: Glyzin, rot: TMAO.

höheren Temperaturen (Abb. 3.4, 3.1). Die thermische Stabilisierung durch die Osmolyte Hydroxyectoin, Na- β -Hydroxybutyrat und TMAO ist konzentrationsabhängig, während höhere Glycin-Konzentrationen keinen zusätzlichen Effekt haben.

Für stabilisierende Osmolyte wird im Allgemeinen ein indirekter Mechanismus (s. Abschn. 1.1.1) angenommen, bei dem die Osmolyte nicht mit dem Protein wechselwirken. Laut D. CANGHI *et al.* besteht ein direkter Zusammenhang zwischen den repulsiven Wechselwirkungen zwischen Protein und Osmolyt und dem osmotischen Druck Π der reinen Osmolytlösung. Für ideale Lösungen ist Π über die VAN'T-HOFF-Gleichung $\Pi = c \cdot RT$ definiert (c : molare Konzentration, R : universelle Gaskonstante, T : Temperatur). Abweichungen vom idealen Verhalten können mithilfe des osmotischen Koeffizienten ϕ beschrieben werden:

$$\phi = \frac{\Pi_{\text{gemessen}}}{\Pi_{\text{ideal}}} = \frac{\Pi}{c \cdot RT} \quad (3.4)$$

Für den stabilisierenden Osmolyt TMAO fanden D. CANCHI *et al.* positive Abweichungen und für den destabilisierenden Osmolyt Harnstoff negative Abweichungen vom Idealwert $\phi = 1$. Positive Abweichungen vom Idealwert ($\phi > 1$) implizieren repulsive Wechselwirkungen zwischen den gelösten Molekülen, während attraktive Wechselwirkungen durch negative Abweichungen vom Idealwert ($\phi < 1$) angezeigt werden. Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass stabilisierende Osmolyte, die bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossen werden, generell repulsive Selbstwechselwirkungen aufweisen müssen ($\phi > 1$). Denaturierende Osmolyte, die bevorzugt mit der Proteinoberfläche wechselwirken, sollten hingegen attraktive Selbstwechselwirkungen aufweisen ($\phi < 1$).^[69]

Abbildung 3.5 zeigt die mithilfe von Dichte- und Osmometriemessungen ermittelte Konzentrationsabhängigkeit des osmotischen Drucks der reinen Osmolytlösungen dieser Studie. Über Gleichung 3.4 wurden anschließend die osmotischen Koeffizienten (Abb. 3.6) berechnet. Der osmotische Koeffizient von Glyzin (orange) weicht negativ vom Idealwert ab, was auf attraktive Selbstwechselwirkungen hinweist. Die anderen Osmolyte dieser Studie weisen repulsive Selbstwechselwirkungen ($\phi > 1$) auf. Wie erwartet, zeigt das Salz Na- β -Hydroxybutyrat (grün), welches in Wasser gelöst in jeweils zwei Teilchen dissoziiert, die höchste positive Abweichung. Den Überlegungen von D. CANCHI *et al.* zufolge sollte Glyzin, ähnlich wie Harnstoff, mit der Proteinoberfläche wechselwirken und so zu einer Destabilisierung des nativen Zustands des Proteins führen. In einer DSC-Studie mit den Proteinen BSA, Lysozym und Myoglobin, fanden L. PLATTS *et al.* ab einer Glyzinkonzentration von 0.1 mol L^{-1} erhöhte T_m -Werte unabhängig vom untersuchten Protein. Bei geringeren Konzentrationen wurden je nach Protein geringe oder destabilisierende Effekte beobachtet. Die Autoren vermuten deshalb das Auftreten von präferentiellen Wechselwirkungen zwischen Glyzin und der Proteinoberfläche unterhalb einer Konzentration von 0.1 mol L^{-1} . Für den stabilisierenden Effekt bei höheren Konzentrationen schlagen sie einen alternativen Stabilisierungsmechanismus zur präferentiellen Hydratation vor.

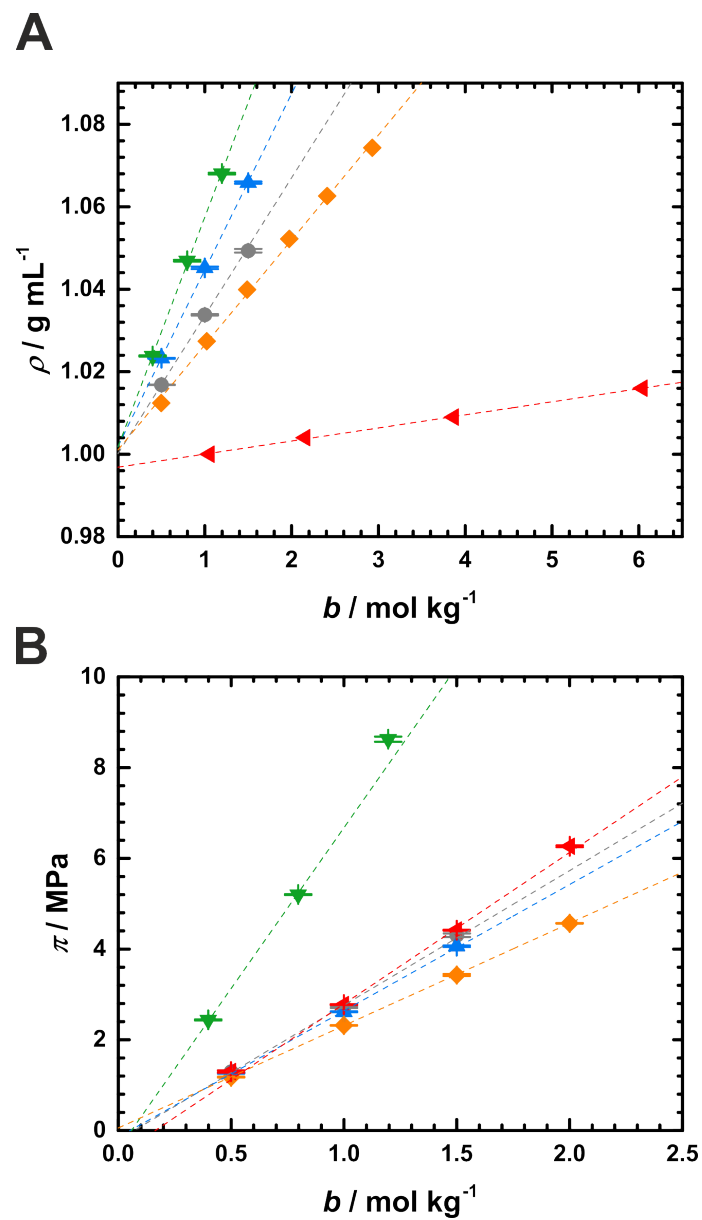


Abbildung 3.5 | Ergebnisse der Dichte- und Osmometriemessungen der verschiedenen Osmolytlösungen in Abhängigkeit der Molalität b der Osmolyte. **A** Dichte ρ . Die Daten für Glyzin und TMAO stammen aus der Literatur.^[67,68] **B** Osmotischer Druck π . **C** Osmotischer Koeffizient ϕ . Grau: Ectoin, blau: Hydroxyectoin, grün: Na- β -Hydroxybutyrat, orange: Glyzin, rot: TMAO.

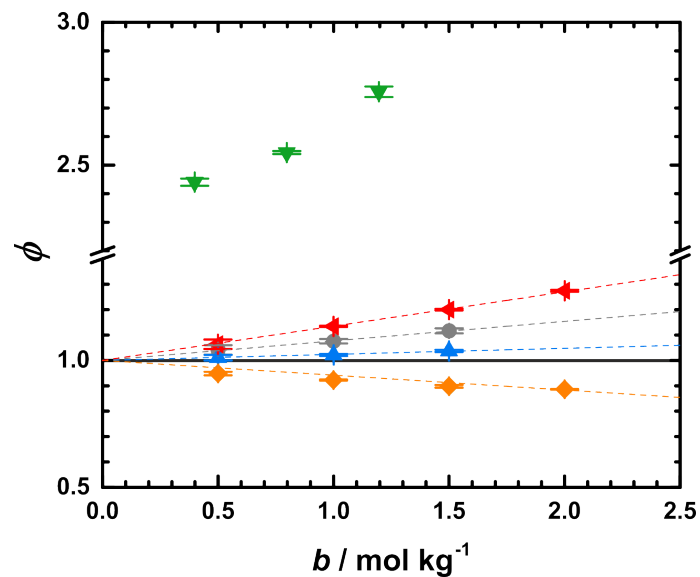


Abbildung 3.6 | Osmotischer Koeffizient ϕ der verschiedenen Osmolytlösungen. Grau: Ectoin, blau: Hydroxyectoin, grün: Na- β -Hydroxybutyrat, orange: Glycine, rot: TMAO.

Aufgrund der starken Hydratation der Glycinmoleküle steht den durch Entfaltung freierwerdenden Atomgruppen bei höheren Glyzinkonzentrationen nicht genügend freies Wasser aus der Volumenphase für die Hydratation zur Verfügung. Stattdessen konkurrieren sie mit den Glycinmolekülen um das Hydratwasser, was zu einer Stabilisierung des gefalteten Zustands führt.^[70] Dieser hypothetische Mechanismus könnte ergänzend zur Theorie von D. CANCHI *et al.* auch das gleichzeitige Auftreten von negativen ϕ -Werten und erhöhten T_m -Werten in Anwesenheit von Glycin erklären. Er erweckt jedoch zugleich die Frage, ob die Konkurrenz um das Hydratwasser nicht allgemein bei allen Osmolyten, die stark mit Wasser wechselwirken, auftreten müsste. Beispielsweise wird die Stärkung der Wasserstruktur durch TMAO bisher in der Literatur mit dem Mechanismus der präferentiellen Hydratation bzw. mit dem Ausschluss von der Proteinoberfläche in Verbindung gebracht.^[22,67,71] Für die Osmolyte Ectoin, Hydroxyectoin, Na- β -Hydroxybutyrat und TMAO bestätigt sich die Schlussfolgerung von D. CANCHI *et al.*. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des ϕ -Werts und der Verschiebung des T_m -Werts kann nicht festgestellt werden. Die thermische Stabilisierung (im Bezug auf $T_m \uparrow$ anstelle von $\Delta G^\circ \uparrow$) beruht demnach

nicht ausschließlich auf dem osmophoben Effekt, sondern wird auch durch die spezifischen Eigenschaften der untersuchten Osmolyte hervorgerufen. Um weitere Erkenntnisse zu mechanistischen Aspekten zu erhalten, wurde der Einfluss der Osmolyte auf die volumetrischen Eigenschaften der RNase A mittels Druckperturbationskalorimetrie (PPC) untersucht.

Abbildung 3.7 zeigt die ermittelten $E(T)$ -Kurven der RNase A in Anwesenheit der einzelnen Osmolyte im Vergleich zur Referenzmessung in reinem Phosphatpuffer (schwarze Kurve). Auffällig ist, dass der Verlauf der PPC-Kurve im Temperaturbereich vor der Entfaltung des Proteins ($5 - 45^\circ\text{C}$) deutlich durch die Osmolyte beeinflusst wird. Der Anteil der drei Teilbeiträge \bar{E}_i , \bar{E}_t und $\Delta\bar{E}_h$ zur Gesamtexpansibilität E ist für das Protein RNase A annähernd gleichgroß.^[72] Unter der Annahme der Kompatibilität der Osmolyte sollte sich die Konformation des Proteins und somit der Beitrag der intrinsischen Expansibilität \bar{E}_i im Vergleich zur Referenzmessung nicht signifikant ändern. Der Einfluss der Osmolyte auf die volumetrischen Eigenschaften des nativen Zustands des Proteins resultiert daher im Wesentlichen aus Veränderungen der Beiträge \bar{E}_t und/oder $\Delta\bar{E}_h$. Das Ausmaß des Effekts ist von den spezifischen chemischen Eigenschaften des jeweiligen Kosolvenz abhängig. Durch den Einfluss der Osmolyte ändert sich sowohl der Anfangswert $E_{5^\circ\text{C}}$ als auch die Steigung $m_{5-45^\circ\text{C}} = \Delta E/\Delta T$ der PPC-Kurve der RNase A. Abbildung 3.8 zeigt die relative Änderung dieser beiden Parameter im Vergleich zur Referenzmessung in reinem Phosphatpuffer (Absolutwerte in Tab. 3.1). Die Aminosäurederivate Ectoin und Hydroxyectoin unterscheiden sich nur durch die zusätzliche Hydroxylgruppe an Position 5 des Pyrimidinrings (vgl. Abb. 3.2). Beide Osmolyte wechselwirken stark mit Wassermolekülen und haben einen ordnenden Effekt auf die Wasserstruktur.^[73,74] Des Weiteren wird in ihrer Anwesenheit die Dynamik von Wassermolekülen reduziert.^[73,75] Molekulardynamik-Studien zeigten für Ectoin eine verminderte Diffusion von Wassermolekülen in der Nähe der Proteinoberfläche^[76] und für Hydroxyectoin eine erhöhte Lebenszeit von Wasser-Protein-Wasserstoffbrückenbindungen.^[75] Es kann daher in beiden Fällen eine reduzierte

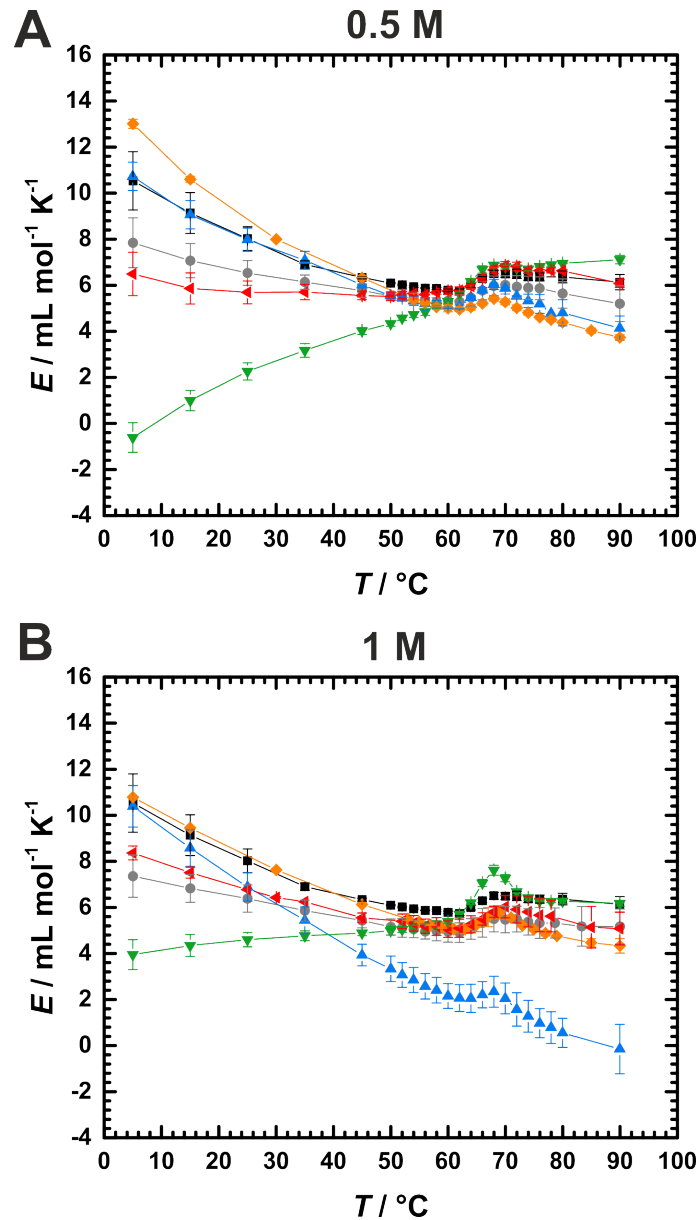


Abbildung 3.7 | PPC-Kurven der Ribonuklease A in Anwesenheit verschiedener Osmolyte. **A** $c_{\text{Osm}} = 0.5 \text{ mol L}^{-1}$. **B** $c_{\text{Osm}} = 1 \text{ mol L}^{-1}$. Schwarz: Referenz, grau: Ectoin, blau: Hydroxyectoin, grün: Na- β -Hydroxybutyrat, orange: Glyzin, rot: TMAO.

Mobilität der Oberflächengruppen des Proteins und somit eine Abnahme der thermischen Expansibilität angenommen werden. Ein negativer $\Delta E_{5^\circ\text{C}}$ -Wert wird allerdings nur in Anwesenheit von Ectoin beobachtet. Die reduzierte Dynamik der Wassermoleküle in der Hydrathülle liefert außerdem eine Erklärung für den positiven $\Delta m_{5-45^\circ\text{C}}$ -Wert. Der oben beschriebene Ausgleich des Dichteunterschieds zwischen dem Hydratwasser und dem Wasser der Volumenphase bei erhöhten Temperaturen findet hier in geringerem Maße statt und führt somit zu einer geringeren Temperaturabhängigkeit der $E(T)$ -Kurve. Da in der Anwesenheit des Hydroxyectoins keine Änderung des Anfangswertes $E_{5^\circ\text{C}}$ beobachtet wird, muss die zusätzliche Hydroxylgruppe einen positiven Beitrag zu $E(T)$ hervorrufen, der dem negativen Effekt durch die reduzierte thermische Expansibilität entgegenwirkt. In Molekulardynamik-Simulationen von elektrisch geladenen und neutralen Kügelchen in wässrigen Hydroxyectoin-Lösungen wurden in einem Abstand von 0.6 nm präferentielle Wechselwirkungen mit negativ geladenen Kügelchen gefunden, die zu einem Austausch von Wassermolekülen mit Hydroxyectoinmolekülen führen.^[77] Es könnte daher auch im Falle der RNase A zum Austausch von Hydratwassermolekülen mit Hydroxyectoinmolekülen in der Nähe von negativ geladenen Bereichen der Proteinoberfläche kommen. Der \bar{E}_h -Beitrag würde folglich positiver, da die Umgebung des Proteins der Volumenphase ähnlicher wird. Dies liefert gleichzeitig eine Erklärung für den negativen $\Delta m_{5-45^\circ\text{C}}$ -Wert. Als Extremolyt könnte Hydroxyectoin durch die Hydroxylgruppe als Wasserersatz dienen und somit die Dehydratisierung eines Proteins kompensieren, welche durch äußere Stressfaktoren hervorgerufen wurde. K. LIPPERT *et al.* untersuchten den Effekt von Ectoin und Hydroxyectoin auf die Enzymaktivität von PFK (Phosphofruktokinase) und LDH (Laktatdehydrogenase) bei Hitze bzw. Trockenheit. Nach einer Gefriertrocknung wurden die Enzyme rehydriert. In Anwesenheit von Ectoin konnte eine Restaktivität von 10 bzw. 30 % bestimmt werden, während durch Hydroxyectoin 70 % der Aktivität erhalten blieb. Die Autoren vermuten, dass durch Wechselwirkungen der OH-Gruppe mit der Proteinoberfläche die aktive Konformation des Enzyms auch bei Trockenheit erhalten bleibt.^[78]

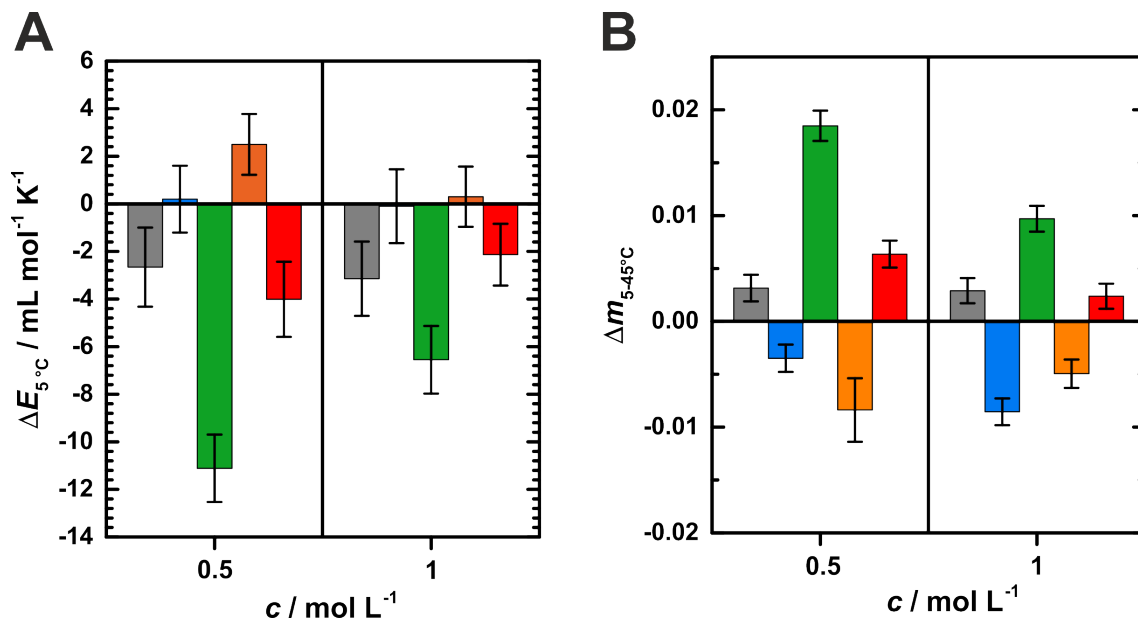


Abbildung 3.8 | Einfluss der Osmolyte auf die volumetrischen Eigenschaften der Ribonuklease A im Temperaturbereich vor der Entfaltung. **A** Differenz der $E(T)$ -Werte bei 5°C : $\Delta E_{5^\circ\text{C}} = E_{5^\circ\text{C}}(\text{Osmolyt}) - E_{5^\circ\text{C}}(\text{Referenz})$. **B** Relative Änderung der Steigung der PPC-Kurve im Bereich von $5 - 45^\circ\text{C}$ in Anwesenheit der Osmolyte: $\Delta m_{5-45^\circ\text{C}} = m_{5-45^\circ\text{C}}(\text{Osmolyt}) - m_{5-45^\circ\text{C}}(\text{Referenz})$. $\Delta m_{5-45^\circ\text{C}}$ wurde mittels linearer Anpassung der $E(T)$ -Kurven im betreffenden Temperaturbereich ermittelt. Die Fehlerbalken wurden aus den jeweiligen Fit-Fehlern berechnet. Grau: Ectoin, blau: Hydroxyectoin, grün: Na- β -Hydroxybutyrat, orange: Glyzin, rot: TMAO.

Der Verlauf der $E(T)$ -Kurve in Anwesenheit des Na- β -Hydroxybutyrats (Abb. 3.7, grün) ähnelt aufgrund des stark negativen $\Delta E_{5^\circ\text{C}}$ -Werts und der positiven Steigung im Bereich vor der Entfaltung dem Verlauf einer PPC-Kurve der RNase A in einer Kaliumsulfatlösung (vgl. Referenz [79]). Es scheint daher, dass der Salz-Effekt vorherrschend ist. In Abhängigkeit von der Ladung eines Proteins ist der Einfluss der Salzionen auf dessen Stabilität im Allgemeinen durch zwei Effekte bestimmt. Bei geringen Salzkonzentrationen sind elektrostatische Wechselwirkungen entscheidend (Abschirmung von Ladungen), während bei höheren Konzentrationen der ionenspezifische HOFMEISTER-Effekt vorherrscht.^[80,81,82] Die Nettoladung der Ribonuklease A bei pH7 beträgt +4 (pI = 9.6).^[83] Daher sollte der Einfluss des Salzanions überwiegen. Der stabilisierende Effekt von Oxo-Anionen, wie SO_4^{2-} , auf die RNase A, bei dessen Anwesenheit eine vergleichbare PPC-Kurve resul-

tiert, ist laut einer thermodynamischen Studie von M. SENSKE *et al.* auf einen starken entropischen Effekt ($T\Delta\Delta S_{N\rightarrow D} \ll 0$) zurückzuführen.^[84] Falls sich die Effekte des Sulfat- und des Hydroxybutyrat-Ions ähneln, könnte der stark negative $\Delta E_{5^\circ\text{C}}$ -Wert durch eine stark eingeschränkte molekulare Dynamik und damit einer drastischen Abnahme des thermischen Volumens $\bar{E}_t \downarrow$ hervorgerufen werden. Dieser Effekt nimmt mit steigender Temperatur ab, wodurch eine positive Steigung $m_{5-45^\circ\text{C}}$ der $E(T)$ -Kurve resultiert.

Als Ursache für die stabilisierende Wirkung der Aminosäure Glyzin wird ein osmophober Effekt vermutet, der mit der präferentiellen Hydratation des Proteins einhergeht.^[85] Falls sich infolge dessen das Hydratationsvolumen $\Delta\bar{V}_h$ erhöht, würde dies das Gesamtvolumen \bar{V} vergrößern und somit zu einer größeren molaren Expansibilität des Proteins führen, was experimentell auch beobachtet wird ($\Delta E_{5^\circ\text{C}} > 0$). Dies könnte jedoch auch durch eine erhöhte thermische Expansibilität \bar{E}_t erklärt werden. Aus den Osmometrie-Messungen ging jedoch ein negativer osmotischer Koeffizient ϕ für die Glyzin-Lösung hervor, was auf attraktive Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche hindeutet. Diese könnten intramolekulare Wechselwirkungen des Proteins schwächen, wodurch die Mobilität der Oberflächengruppen und somit \bar{E}_t erhöht würde.

Im Falle des TMAOs ergibt die Analyse der PPC-Daten einen negativen $\Delta E_{5^\circ\text{C}}$ -Wert und einen positiven $\Delta m_{5-45^\circ\text{C}}$ -Wert. In einer aktuellen Molekuldynamik-Studie konnte gezeigt werden, dass der Anteil des TMAOs in der Nähe des Proteins SNase (Staphylokokken-Nuklease) dem Anteil in der Volumenphase annähernd gleich ist. Das partielle molare Volumen \bar{V} des Proteins ist in Anwesenheit von TMAO erhöht. Die einzelnen Teilbeiträge ändern sich wie folgt: \bar{V}_i (kleine Änderung) und \bar{V}_t werden verringert, während $\Delta\bar{V}_h$ einen vergleichsweise weniger negativen Wert annimmt.^[86] Die Volumenänderung des Hydratwassers geht auf den Einfluss der hydrophoben Methylreste des TMAOs zurück, die eventuell mit hydrophoben Seitenketten interagieren, während die Wechselwirkung des TMAOs mit dem Proteinrückgrat eher repulsiv ist. Die hydrophobe Hydratation hat eine Verringerung der Dichte des Wassers in der Hydrathülle zur Folge,^[86,87,88] wodurch

der Dichteunterschied zum Wasser der Volumenphase geringer wird. Daraus resultiert eine Erhöhung der molaren Expansibilität des Hydratwassers $\Delta\bar{E}_h$. Die Ursache des negativen $\Delta E_{5^\circ\text{C}}$ -Werts muss daher eine starke Verringerung der thermischen Expansibilität \bar{E}_t sein. Als Nano-Crowding-Reagenz^[89] könnte TMAO durch einen starken Ausschlussvolumeneffekt die molekulare Dynamik des Proteins (insbesondere der Oberflächengruppen) einschränken. Eine Temperaturerhöhung bewirkt einen leichten Anstieg des Anteils an TMAO in der Hydrathülle des Proteins SNase.^[86] Da die negative Steigung der $E(T)$ -Kurve im Bereich vor der Entfaltung durch eine Angleichung des Dichteunterschieds des Hydratwassers des Proteins und des Wassers der Volumenphase begründet ist, führt die Anwesenheit des TMAOs in der Hydrathülle zu einer weniger negativen Steigung $m_{5-45^\circ\text{C}}$. Insgesamt nehmen die beobachteten Effekte mit zunehmender Osmolytkonzentration ab. Eine mögliche Ursache ist ein Anstieg der Anzahl von Osmolytmolekülen in der Hydrathülle. Folglich kommt es zu einer Angleichung der volumetrischen Eigenschaften des Hydratwassers und des Wassers der Volumenphase. Der Beitrag des partiellen molaren Volumens des Hydratwassers $\Delta\bar{V}_h$ zum Gesamtvolumen fällt daher weniger stark ins Gewicht.

Wie in der Einleitung dieses Kapitels beschrieben, lässt das Entfaltungsvolumen ΔV Rückschlüsse auf die Konformation des denaturierten Zustands des Proteins zu. In reinem Phosphatpuffer (0.1 mol L^{-1} , pH 7) nimmt das Volumen des Proteins bei der Entfaltung um $-5.8 \pm 0.9 \text{ mL mol}^{-1}$ ab, was darauf hindeutet, dass die negativen Beiträge des intrinsischen und des Hydratationsvolumens im Vergleich zum positiven Beitrag des thermischen Volumens bei der Zunahme der SASA überwiegen. Abbildung 3.9 A zeigt die aus den PPC-Kurven (Abb. 3.7) ermittelte relative Änderung des Entfaltungsvolumens in Anwesenheit der Osmolyte $\Delta\Delta V = \Delta V(\text{Osmolyt}) - \Delta V(\text{Referenz})$. Als Referenz dient die Messung in reinem Puffer. Nicht in allen Fällen sind die erhöhten T_m -Werte auch mit einer Änderung des Entfaltungsvolumens ΔV im Vergleich zur Referenzmessung verbunden (s. Abb. 3.9 B). Da ΔV generell temperaturabhängig ist, deutet dies darauf hin, dass die Osmolyte die

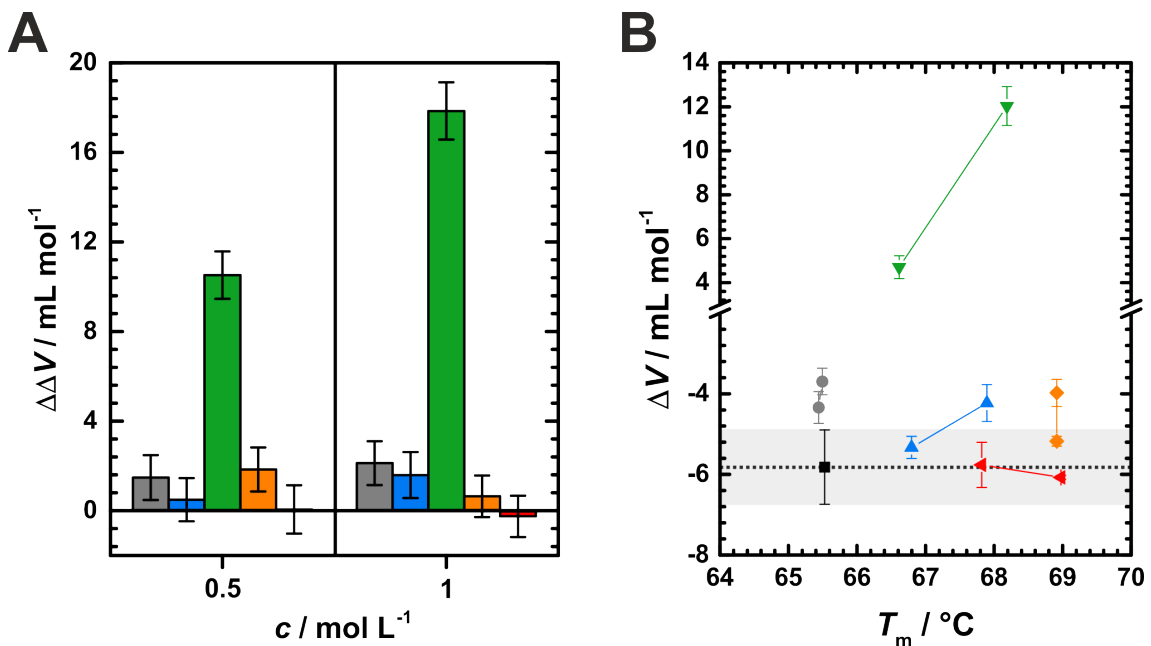


Abbildung 3.9 | **A** Relative Änderung des Entfaltungsvolumens in Anwesenheit der Osmolyte: $\Delta\Delta V = \Delta V(\text{Osmolyt}) - \Delta V(\text{Referenz})$. **B** Temperaturabhängigkeit von ΔV . Grau: Ectoin, blau: Hydroxyectoin, grün: Na- β -Hydroxybutyrat, orange: Glyzin, rot: TMAO.

strukturellen Eigenschaften des denaturierten Zustands beeinflussen. Den stärksten Effekt weist das Salz Na- β -Hydroxybutyrat auf. Bei beiden hier untersuchten Konzentrationen (0.5 und 1 mol L^{-1}) nimmt ΔV deutlich positive Werte an (4.7 ± 0.5 bzw. $12.0 \pm 0.9 \text{ mL mol}^{-1}$). Die Ursache dafür könnte ein Überwiegen des positiven $\Delta\bar{V}_t$ -Beitrags (s. Abschn. 3.1) und / oder Packungsdefekte der Struktur des entfalteten Zustands sein. Dies deutet auf eine Konformation des denaturierten Zustands hin, die in der englischsprachigen Literatur mit *molten globule*, also geschmolzenes Kügelchen, bezeichnet wird. Darunter versteht man eine expandierte Konformation mit Hohlräumen und weitgehend intakter Sekundärstruktur, bei der jedoch die Aminosäureseitenketten frei rotieren können und somit die spezifische Tertiärstruktur verloren geht.^[90]

Die anderen Osmolyte zeigen einen vergleichsweise geringen bzw. keinen Effekt auf ΔV . Aufgrund der Temperaturabhängigkeit von ΔV wäre zunächst ein übergeordneter (linearer)

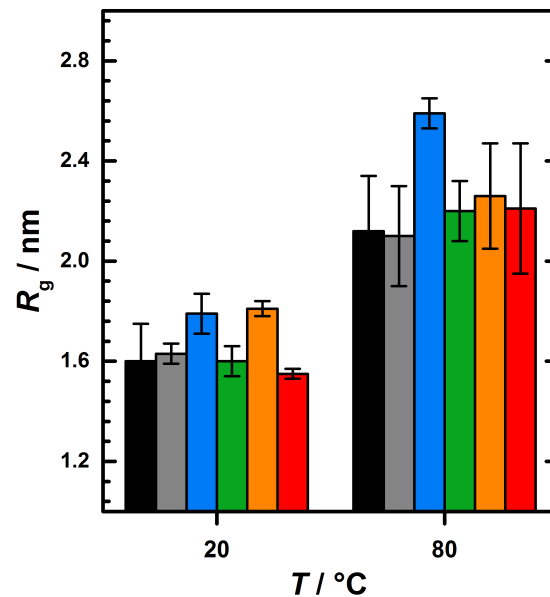


Abbildung 3.10 | Gyrationradius R_g der Ribonuklease A in verschiedenen Osmolytlösungen bei 20 und 80 °C. Schwarz: Referenz, grau: Ectoin, blau: Hydroxyectoin, grün: Na- β -Hydroxybutyrat, orange: Glyzin, rot: TMAO.

Trend für $\Delta V(T_m)$ zu erwarten gewesen. Dies ist, wie in Abbildung 3.9 B zu sehen ist, bei den untersuchten Osmolyten nicht der Fall. Beispielsweise ist in Anwesenheit von TMAO der T_m -Wert erhöht und ΔV bleibt unverändert, während Ectoin zu leicht erhöhten Entfaltungsvolumina führt, obwohl die Entfaltungstemperatur des Proteins nicht beeinflusst wird. Es ist daher davon auszugehen, dass die Osmolyte die Struktur des entfalteten Zustands beeinflussen. In Anwesenheit der Osmolyte Ectoin, Hydroxyectoin, Glyzin und TMAO wurden bei beiden untersuchten Konzentrationen negative ΔV -Werte ermittelt (s. Tab. 3.1 für Absolutwerte). Das Protein entfaltet also wie bei der Referenzmessung unter Freiwerden innerer Leervolumina und Hydratation der neu exponierten Atomgruppen. Die im Vergleich zur Referenz leicht positiveren ΔV -Werte (ausgenommen TMAO) lassen auf eine unvollständige Entfaltung bzw. auf ein Ensemble von Konformationen im entfalteten Zustand schließen, das auch zum Teil kompakte Sekundärstrukturelemente enthält.

Ergänzend zu den kalorimetrischen Daten wurde zusätzlich der Gyrationradius R_g des

Proteins mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) bei 20 und 80 °C bestimmt (Abb. 3.10, Tab. 3.1, Streukurven im Anhang). Die Referenzwerte in reinem Puffer $R_g = 1.6 \pm 0.2$ nm bei 20 °C bzw. 2.1 ± 0.2 nm bei 80 °C stimmen mit Literaturdaten überein.^[91,92] Der R_g -Wert des entfalteten Zustands deutet auf eine relativ kompakte Form hin, da für eine vollständig entfaltete *Random Coil*-Konformation ein Gyrationradius von mindestens 4.1 nm zu erwarten wäre.^[93] Bis auf Hydroxyectoin zeigt keiner der Osmolyte einen signifikanten Effekt. Der Grund dafür ist vermutlich die geringere Sensitivität der Methode im Vergleich zu Druckperturbationskalorimetrie. Die Auswertung der PPC-Kurven liefert Volumenänderungen, die kleiner als das Volumen eines einzelnen Wassermoleküls (18 mL mol^{-1}) sind.

Tabelle 3.1 | Ergebnisse der Analyse der DSC-, PPC- und SAXS-Daten der temperaturinduzierten Entfaltung der RNase A in Anwesenheit der verschiedenen Osmolyte.

	$c_{\text{Osm}} / \text{mol L}^{-1}$	$T_m / ^\circ\text{C}$	$E_{5^\circ\text{C}} / \text{mL mol}^{-1}\text{K}^{-1}$	$m_{5-45} \cdot 10^{-3}$	$\Delta V / \text{mL mol}^{-1}$	R_g / nm	
						20 °C	80 °C
Referenz	0	65.5 ± 0.1	11 ± 1	-8 ± 1	-5.8 ± 0.9	1.6 ± 0.2	2.1 ± 0.2
Ectoin	0.5	65.4 ± 0.2	7.8 ± 0.9	-4.7 ± 0.4	-4.3 ± 0.4	/	/
	1	65.5 ± 0.1	7.4 ± 0.7	-4.9 ± 0.1	-3.7 ± 0.3	1.63 ± 0.04	2.1 ± 0.2
Hydroxyectoin	0.5	66.8 ± 0.2	10.7 ± 0.4	-11.3 ± 0.5	-5.3 ± 0.3	/	/
	1	67.9 ± 0.2	10.4 ± 0.6	-16.4 ± 0.4	-4.2 ± 0.5	1.79 ± 0.08	2.59 ± 0.06
Na-β-Hydroxybutyrat	0.5	66.6 ± 0.1	-0.6 ± 0.5	10.7 ± 0.8	4.7 ± 0.5	/	/
	1	68.2 ± 0.1	3.9 ± 0.5	1.9 ± 0.3	12.0 ± 0.9	1.60 ± 0.06	2.2 ± 0.1
Glyzin	0.5	68.9 ± 0.1	13.0 ± 0.2	-16 ± 3	-4.0 ± 0.3	/	/
	1	68.9 ± 0.2	10.79 ± 0.01	-12.8 ± 0.6	-5.2 ± 0.1	1.81 ± 0.03	2.3 ± 0.2
TMAO	0.5	67.82 ± 0.04	6.5 ± 0.8	-1.5 ± 0.5	-5.8 ± 0.6	/	/
	1	69.0 ± 0.6	8.4 ± 0.2	-5.4400 ± 0.0002	-6.07 ± 0.05	1.55 ± 0.02	2.2 ± 0.3

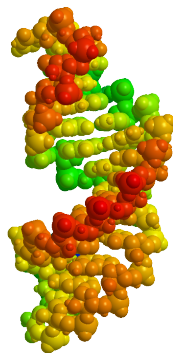
3.4 Zusammenfassung

Extremolyte sind spezielle Osmolyte, die als Reaktion auf äußere Stressfaktoren in der Zelle angereichert werden. In dieser Studie wurde der Effekt verschiedener Extremolyte auf die volumetrischen Eigenschaften des Modellproteins Ribonuklease A mittels Druck-perturbationskalorimetrie untersucht. Die Interpretation des Verlaufs der $E(T)$ -Kurven hinsichtlich der Beiträge der thermischen Expansibilität \bar{E}_t und der Expansibilität der Hydrathülle $\Delta\bar{E}_h$ lieferte Einblicke in mögliche Stabilisierungsmechanismen. Es zeigte sich, dass der Einfluss der Osmolyte auf den nativen Zustand des Proteins im Wesentlichen auf Änderungen der Mobilität und Hydratation der Oberflächengruppen zurückgeht. Die Osmolyte Ectoin, TMAO und Na- β -Hydroxybutyrat werden bevorzugt von der Proteinoberfläche ausgeschlossen und erniedrigen die Expansibilität E des gefalteten Proteins. Für ihre proteinstabilisierende Wirkung kann daher ein entropischer Mechanismus angenommen werden. Hydroxyectoin verfügt über eine OH-Gruppe, welche im Falle einer Dehydratisierung des Proteins die Funktion von Wassermolekülen bei der Stabilisierung der nativen Konformation ersetzen kann. Die Aminosäure Glyzin erhöht die Expansibilität E des nativen Zustands. Durch attraktive Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche erhöht sich die Dynamik der Oberflächengruppen und somit auch die thermische Expansibilität \bar{E}_t . Dennoch wird die thermische Stabilität erhöht ($T_m \uparrow$), was vermutlich auf die Konkurrenz um freie Wassermoleküle für die Hydratation der bei der Entfaltung freierwerdenden Atomgruppen mit den stark hydratisierten Glyzinmolekülen zurückzuführen ist. Neben dem Ausgleich des osmotischen Drucks bietet die gezielte Anreicherung bestimmter Osmolyte der Zelle eine Strategie, um die störenden Auswirkungen äußerer Stressfaktoren zu kompensieren. Des Weiteren bietet die Kombination verschiedener Osmolyte die Möglichkeit, die jeweiligen Effekte in Balance zu bringen. Ein zu starker Ausschlussvolumeneffekt durch TMAO könnte beispielsweise durch die Anwesenheit von Glyzin gemindert werden. Dies würde verhindern, dass die biochemische Funktion durch

eine zu stark eingeschränkte molekulare Dynamik des Proteins verloren geht, welche z. B. für die Enzymaktivität erforderlich ist.

KAPITEL 4

Einfluss organischer Osmolyte und Crowdingreagenzien auf das Konformationsgleichgewicht einer RNA Haarnadel



Teile dieses Kapitels wurden bereits publiziert:

L. Arns, J. M. Knop, S. Patra, C. Anders, R. Winter, "Single-molecule insights into the temperature and pressure dependent conformational dynamics of nucleic acids in the presence of crowders and osmolytes", *Biophys. Chem.* **251** (2019) 106190.

Die verwendeten Inhalte und Abbildungen des englischen Originaltextes (DOI: 10.1016/j.bpc.2019.106190) wurden ins Deutsche übertragen. Die Verlagsrechte der *Elsevier B.V.* erlauben Autoren eine nichtkommerzielle Wiederverwendung der Inhalte ohne gesonderte Erlaubnis.

4.1 Einleitung

Hohe Temperaturen können Biomoleküle irreversibel schädigen und somit zelluläre Prozesse beeinflussen. Einige Bakterien exprimieren zum Schutz sogenannte Hitzeschockproteine. Sobald ein bestimmter Temperaturwert überschritten wird, erfolgt die Translation der kodierten Hitzeschutzgene. Diese Translation wird durch die Konformationsänderung eines mRNA-Stranges (engl. messenger RNA, Boten-RNA) induziert.^[94] Mit steigender Temperatur werden sukzessive Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren gebrochen, was zur Entfaltung führt. Sobald der AUG-Startcodon der mRNA zugänglich ist, erfolgt die Translation durch die Transfer-RNA (tRNA). Ein Beispiel für ein solches RNA-Thermometer ist die ROSE-RNA (engl. repressor of heat-shock gene expression, Hitzeschockgen-Hemmer). Diese mRNA besteht aus vier aufeinander folgenden Haarnadelstrukturen (Abb. 4.1 A).^[95] Als Modell-RNA-Thermometer dient in dieser Studie die microROSE RNA-Haarnadel, welche die SHINE-DALGARNO-Sequenz (SD-Sequenz) enthält. Die microROSE RNA besitzt in der Mitte des Stranges einen Versatz, welcher zur Ausbildung einer inneren Schleife führt (Abb. 4.1 B). Diese Schleife ist für die Temperaturerkennung essentiell.^[94,95] S. CHOWDHURY *et al.* zeigten, dass durch die Löschung der Nukleobase G83 der Versatz aufgehoben (s. Abb. 4.1 B unten) und dadurch die Translation der Hitzeschockgene inhibiert wird.

Die RNA-Haarnadel stellt ein doppelhelikales Strukturelement dar, welches durch Wechselwirkungen zweier komplementärer Sequenzen eines Einzelstranges gebildet wird.^[96] Dabei sind die Nukleobasen ins Innere der Helix gerichtet. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat ist dem Solvenz zugewandt. Durch die helikale Windung entstehen zwei unterschiedlich große Vertiefungen auf der Oberfläche des Moleküls, die große und die kleine Furche. Die große Furche ist schmal (4.7 Å) und tief (12.9 Å) und die kleine ist weit (10.8 Å) und flach (3.3 Å).^[97] Die Oberfläche der RNA ist aufgrund der Phosphatgruppen stark negativ geladen. Bei der Faltung nähern sich die Phosphatgruppen bis auf wenige Ångström.^[98]

Aufgrund der entstehenden elektrostatischen Abstoßung hängt die Stabilität der gefalteten Konformation des RNA-Moleküls stark vom Ladungsausgleich durch Gegenionen ab. In Lösung mit einem Salz kommt es teilweise zur Ausbildung von Chelatkomplexen mit dehydratisierten Metallkationen (K^+ , Mg^{2+}).^[99] Der überwiegende Teil der Gegenionen ist Teil einer Ionenwolke, welche die Nukleinsäure umgibt. In ihr bleiben die Kationen vollständig hydratisiert und können innerhalb des elektrischen Felds frei diffundieren.^[99] Die Ladungsdichte der RNA-Oberfläche ist in der großen Furche am höchsten, da der Abstand der negativ geladenen Phosphatgruppen hier besonders gering ist.^[100] In dieser Studie soll der Einfluss verschiedener Salzkonzentrationen auf das Entfaltungsgleichgewicht der microROSE RNA-Haarnadel im Vergleich zur $\Delta G83$ -Mutante (s. Abb. 4.1B unten) untersucht werden. Der fehlende Versatz in der Mitte des RNA-Stranges sorgt für eine perfekte Symmetrie der beiden gepaarten Sequenzen. Das legt die Vermutung nahe, dass die Sekundärstruktur der $\Delta G83$ -Mutante stabiler gegenüber äußeren Einflüssen, wie z. B. erhöhte Temperaturen, ist.

Da die temperaturinduzierten Konformationsänderungen der microROSE RNA-Haarnadel für den Schutz vor hitzebedingten Schädigungen der Zelle essentiell sind, soll des Weiteren der Einfluss zellähnlicher Background-Moleküle, wie Osmolyte und Makromoleküle, untersucht werden. Osmolyte und Crowding-Reagenzien können das Konformationsgleichgewicht von Biomakromolekülen sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Der Osmolyt TMAO (Trimethylamin-*N*-Oxid) zum Beispiel stabilisiert Proteine im Wesentlichen über einen indirekten Mechanismus. Die Wechselwirkungen von TMAO mit Wassermolekülen sind thermodynamisch günstiger als die mit der Proteinoberfläche.^[4,5,67] Somit ist die Entfaltung, bei der die Fläche der SASA zunimmt, thermodynamisch ungünstig. Der Effekt von TMAO auf das Konformationsgleichgewicht von Nukleinsäuren ist weniger universell. D. LAMBERT *et al.* zeigten in ihren Studien, dass TMAO die Tertiärstruktur von RNAs stabilisiert, aber gleichzeitig einen leicht destabilisierenden Effekt auf die Sekundärstruktur aufweist.^[101,102] Die Destabilisierung ist auf die Bildung von Wasserstoff-

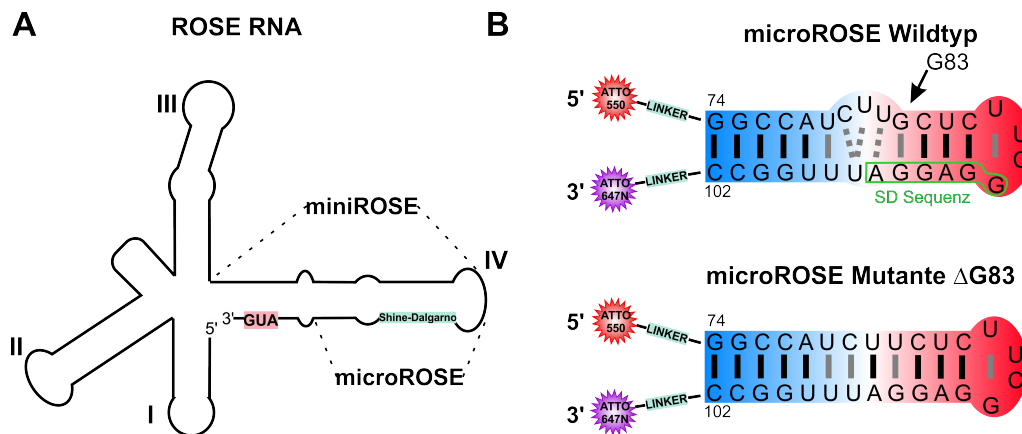


Abbildung 4.1 | **A** Skizze der ROSE mRNA-Struktur. Das microROSE-Segment ist Teil der vierten Haarnadel und beinhaltet die SHINE-DALGARNO-Sequenz. **B** Strukturformeln des Wildtyps und der $\Delta G83$ -Mutante der microROSE RNA-Haarnadel. Die grau dargestellten H-Brücken sind nicht-kanonisch.

brückenbindungen zwischen TMAO und den Nukleobasen zurückzuführen.^[103] Der Effekt von Crowding-Reagenzien ist im Allgemeinen durch einen stabilisierenden Beitrag durch den Ausschlussvolumeneffekt und durch einen destabilisierenden Beitrag aufgrund von enthalpisch günstigen Wechselwirkungen mit dem Biomakromolekül bedingt (s. Abschn. 1.1.2). Im Falle des Entfaltungsgleichgewichts von Proteinen ist der Ausschlussvolumeneffekt vorherrschend.^[104] Der Effekt auf RNAs ist weniger eindeutig. Crowding-Reagenzien wie PEG und Ficoll wirken stabilisierend auf die Tertiär- und Quartärstruktur, während die Sekundärstruktur destabilisiert wird.^[105,106,107]

4.2 Experimentelles

4.2.1 Chemikalien

Der Wildtyp (WT) der microROSE-Haarnadel und die Mutante ($\Delta G83$) wurden von IBA (Göttingen, Deutschland) erworben. Die Sequenzen der RNAs lauten WT: GGCC AUCU UGCU CUUC GGAG GAUU UGGCC und $\Delta G83$: GGCC AUCU UCUC UUCG GAGG AUUU GGCC. Für die Ensemble- und Einzelmolekül-FRET Messungen wurden die Enden der

Stränge mit den Fluoreszenzfarbstoffen Atto 550 (NHS-Ester) über einen C6-Aminolinker am 5'-Terminus und mit Atto 647N via Click-Chemie über C8-Alkin-dC am 3'-Terminus, ebenfalls von IBA, markiert. Die Additive TMAO, Glyzin und Saccharose wurden von Sigma Aldrich (Deutschland) und Ficoll™ PM70 von GE Healthcare (Uppsala, Schweden) bezogen.

4.2.2 Probenpräparation

Die Probenlösungen wurden in einem 15 mM Tris-HCl Puffer (pH 7.4) angesetzt, welcher zuvor mit einem 0.02 µm Whatman Anotop™ 25 Plus Spritzenfilter (GE Healthcare Life Sciences, Deutschland) filtriert wurde. Für die Messungen bei verschiedenen Salzkonzentrationen wurden Pufferlösungen mit 25 mM, 100 mM und 150 mM KCl hergestellt. Die Messungen in Anwesenheit der Additive wurden mit einer Salzkonzentration von 100 mM KCl durchgeführt. Die lyophilisierten RNA Proben wurden in der jeweiligen Lösung gelöst, 10 Minuten lang bei 95 °C erhitzt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Konzentration der microROSE RNA-Haarnadel war 0.2 mM für die DSC-Messungen, 0.3 µM für die Ensemble-FRET Messungen und circa 100 pM für die Einzelmolekül-FRET Messungen.

4.2.3 DSC-Messungen

Die DSC-Messungen wurden in einem VP-DSC-Mikrokalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA) durchgeführt. Die Probenzelle wurde mit der RNA-Lösung und die Referenzzelle mit der jeweiligen Pufferlösung befüllt. Die Thermogramme wurden in einem Temperaturbereich von 20 – 95 °C mit einer Heizrate von 1 °C min⁻¹ erwärmt. Um die temperaturabhängige molare Wärmekapazität C_p der RNA zu erhalten, wurde die Basislinie (Puffer-vs.-Puffer-Scan) von der Messkurve abgezogen. Anschließend erfolgte eine Normierung der Scans auf die RNA-Konzentration. Es wurden jeweils drei Messungen von

neu präparierten Proben aufgenommen. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der MicroCal Origin Software, die von der Firma zur Verfügung gestellt wurde. Bei der Bestimmung der thermodynamischen Parameter wurden jeweils zwei verschiedene Baseline-Modelle verwendet.

4.2.4 Ensemble-FRET

Die temperaturabhängigen fluoreszenzspektroskopischen Messungen erfolgten mithilfe eines K2TM Multifrequenz-Phasen- und Modulations-Fluorometers (ISS Inc., USA). Dazu wurde die mit der Probe befüllte Quarzküvette in einen beheizbaren Probenhalter gestellt, der an ein Umwälzthermostat (Julabo, Deutschland) angeschlossen war. Die Temperatur der Probe wurde mit einem digitalen Thermometer überwacht. Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda = 554 \text{ nm}$ und das Emissionsspektrum wurde über den Bereich von $\lambda = 566 - 729 \text{ nm}$ aufgezeichnet. Die Spektren wurden auf $[0, 1]$ normiert und das FRET-Signal wurde aus dem Verhältnis der Intensitäten der Donor- und Akzeptorfluoreszenz I_D/I_A bei 590 nm bzw. 676 nm berechnet. Die Auftragung der erhaltenen FRET-Signale gegen die Temperatur ergab die jeweilige Schmelzkurve.

4.2.5 Einzelmolekül-FRET

Für die Einzelmolekül-FRET-Messungen wurde ein konfokales MicroTime 200 Fluoreszenzmikroskop (PicoQuant) verwendet. Dieses enthielt ein Inversmikroskop (Olympus IX71), ein Wasserimmersionsobjektiv (UplansApo, 60x, NA 1.2) und eine $50 \mu\text{m}$ große Lochblende. Die Messzelle bestand aus zwei Deckgläsern, die an einem Teflonrahmen befestigt wurden. Die Temperaturzelle wurde über einen Aluminiumblock erwärmt, welcher wiederum an ein Umwälzthermostat (LAUDA, Deutschland) angeschlossen wurde. Die Unterscheidung zwischen einfach- und zweifachmarkierten RNA-Molekülen erfolgte über Pulsed Interleaved Excitation (PIE, s. Abschnitt 2.1.2). Die Anregungswellenlängen

der Laserpulse (20 MHz Pulsrate) betragen 560 und 635 nm. Der Ausgang der gepulsten Laserdioden war über ein polarisationserhaltendes Einmoden-Glasfaserkabel mit den optischen Elementen des Konfokalmikroskops verbunden. Das Anregungslicht gelang über einen dichroitischen Spiegel (ZT 405/488/561/640, Chroma) zum Eingang des Inversmikroskops und wurde dort über die Objektivlinse in die Messzelle fokussiert. Das Emissionslicht gelang auf dem gleichen Weg zurück zum dichroitischen Spiegel und wurde anschließend durch einen 575 nm Langpassfilter (HQ, Chroma, 575 LP) und eine 50 μm Lochblende geleitet. Die spektrale Aufspaltung der Donor- und Akzeptoremission erfolgte über einen weiteren dichroitischen Spiegel (FF650 Di01, Semrock). Außerdem wurden die Eingänge des Donor- und Akzeptorkanals mit Bandbreitenfiltern (FF01-593/40 und FF01-676/29, Semrock) versehen. Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Photonen wurden mit zwei Lawinendioden (SPCM-AQR, Perkin Elmer Inc.) detektiert. Die zeitliche Bestimmung des Eintreffens eines Photons am Detektor erfolgte mittels TCSPC im TTTR Modus (s. Abschnitt 2.1.2) über TimeHarp 200 PCI-Karten. Die Analyse der Daten erfolgte mithilfe der PicoQuant SymPhoTime-Software. Die *Time Traces* (zeitliche Intensitätsänderung) wurden in Untereinheiten (*engl.* bins) von 1 ms unterteilt. Die Berechnung der FRET-Effizienz E_{FRET} aus der Donor- und Akzeptorintensität I_{D} und I_{A} muss aufgrund der unterschiedlichen Quantenausbeuten φ_{D} und φ_{A} und Detektionseffizienzen $\alpha_{\text{D}}^{\lambda_{\text{em}}^{\text{D}}}$ und $\alpha_{\text{A}}^{\lambda_{\text{em}}^{\text{A}}}$ von Donor und Akzeptor mit einem Korrekturfaktor γ versehen werden:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{I_{\text{A}}}{I_{\text{A}} + \gamma I_{\text{D}}} \quad (4.1)$$

mit

$$\gamma = \frac{\varphi_{\text{A}} \alpha_{\text{A}}^{\lambda_{\text{em}}^{\text{A}}}}{\varphi_{\text{D}} \alpha_{\text{D}}^{\lambda_{\text{em}}^{\text{D}}}} \quad (4.2)$$

Der Korrekturfaktor für das hier verwendete FRET-Paar Atto 550 und Atto 647N beträgt $\gamma = 0.88$. Die E_{FRET} -Histogramme wurden mit einer trimodalen GAUSS-Verteilung angepasst.

Jeder der drei Kurven wurde eine andere Konformation zugeordnet. Die jeweilige FRET-Effizienz der angenommenen Konformationen wurde aus Histogrammen von Messungen ermittelt, in denen der Anteil einer der drei Konformationen überwog. Die Peakmaxima für die Konformere mit niedriger, mittlerer und hoher FRET-Effizienz liegen bei 0.25 ± 0.05 , 0.55 ± 0.05 und 0.85 ± 0.05 . Die Peakflächen der GAUSS-Kurven entsprechen dem prozentualen Anteil der drei Konformere.

4.3 Einfluss von verschiedenen Salzkonzentrationen und Mutationen

In den DSC-Thermogrammen ist zu erkennen, dass sich die hitzeinduzierte Öffnung der microROSE-RNA-Haarnadel nicht durch das klassische Zweizustandsmodell beschreiben lässt. Die DSC-Kurven (s. Abb. 4.2) weisen im Bereich vor dem Peak eine Schulter auf (WT: $35 - 45^\circ\text{C}$, ΔG83 : $45 - 55^\circ\text{C}$), welche auf einen Vorübergang hindeutet. Dieser ist im Thermogramm der ΔG83 -Mutante etwas deutlicher vom Hauptübergang getrennt als beim Wildtyp, bei dem der Vorübergang direkt in den Hauptübergang übergeht. CHOWD-HURY *et al.* zeigten in NMR-Messungen, dass in diesem Temperaturbereich erste Wasserstoffbrückenbindungen in der inneren (U79-G83 und G94-U97) und oberen Schleife aufbrechen. Auch die Entfaltung der Mutante beginnt in diesen Sequenzbereichen, da sich dort die weniger stabilen nicht-kanonischen Basenpaare befinden (s. Abb. 4.1).^[95] Der breite Peak des anschließenden Hauptübergangs deutet auf eine geringe Kooperativität hin, wobei die Halbwertsbreiten der Messungen der Mutante geringer sind als die des Wildtyps (vgl. Tabelle 4.1, FWHM). Das Fehlen des Versatzes innerhalb des Stamms der Mutante scheint die Kooperativität der Entfaltung zu erhöhen. Chen *et al.* erklärten die geringe Kooperativität bei der Hitzedenaturierung von RNA-Haarnadelstrukturen anhand eines "Reißverschluss-Mechanismus", bei dem die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen sukzessive destabilisiert werden.^[108] Die Übergangstemperatur

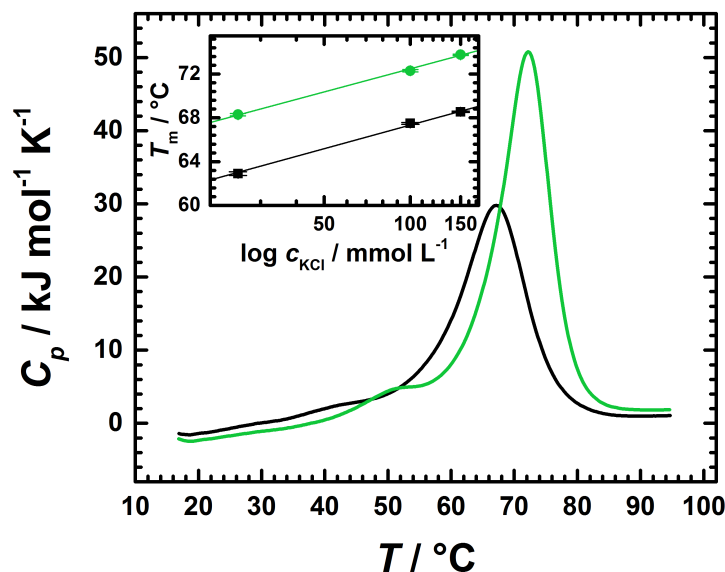


Abbildung 4.2 | Exemplarische Thermogramme der microROSE RNA Haarnadel bei $c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$. Schwarz: Wildtyp; grün: ΔG83 -Mutante. Innere Graphik: Abhängigkeit der Hauptübergangstemperatur T_m von der Salzkonzentration.

T_m des Hauptübergangs zeigt in beiden Fällen eine lineare Abhängigkeit vom Logarithmus der Kalziumchloridkonzentration $\log c_{\text{KCl}}$ (s. Abb. 4.2, innere Graphik), was durch den steigenden Ladungsausgleich zu erklären ist, der die repulsiven Wechselwirkungen der negativ geladenen Phosphatgruppen verringert und somit stabilisierend wirkt. Die Entfaltungsenthalpie ΔH° hingegen bleibt unverändert (vgl. Tab. 4.1). Die Mutante ist etwas weniger temperatursensitiv als der Wildtyp. Der T_m -Wert ist jeweils um ca. 5°C erhöht. Die Entfaltung erfordert eine höhere Energieaufnahme ($\Delta\Delta H^\circ = +150 \text{ kJ mol}^{-1}$). Der Grund dafür könnten die zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Stamms sein. Tatsächlich liegt der beobachtete $\Delta\Delta H^\circ$ -Wert in der Größenordnung der Dissoziationsenthalpie einzelner Basenpaare.^[109]

Für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurde das 5'-Ende mit dem Farbstoff Atto 550 und das 3'-Ende mit Atto 647N markiert (s. Abb. 4.1 u. 4.3). Die beiden Farbstoffe bilden ein FRET-Paar, dessen FRET-Effizienz E_{FRET} abstandsabhängig variiert. Aus den

Tabelle 4.1 | Thermodynamische Parameter des Hauptübergangs der hitzeinduzierten Öffnung der microROSE RNA-Haarnadel in Abhängigkeit der Salzkonzentration.

$c_{\text{KCl}} / \text{mM}$	$T_m / ^\circ\text{C}$		$\Delta H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$		FWHM / $^\circ\text{C}$	
	WT	ΔG83	WT	ΔG8	WT	ΔG83
25	62.9 ± 0.2	68.3 ± 0.1	334 ± 30	476 ± 14	14 ± 2	9.2 ± 0.1
100	67.5 ± 0.1	72.3 ± 0.1	320 ± 13	534 ± 60	11.1 ± 0.1	8.5 ± 0.1
150	68.6 ± 0.1	73.8 ± 0.1	311 ± 11	469 ± 62	10.8 ± 0.3	8.4 ± 0.3

FWHM= (engl. Full Width at Half Maximum, Halbwertsbreite des Peaks)

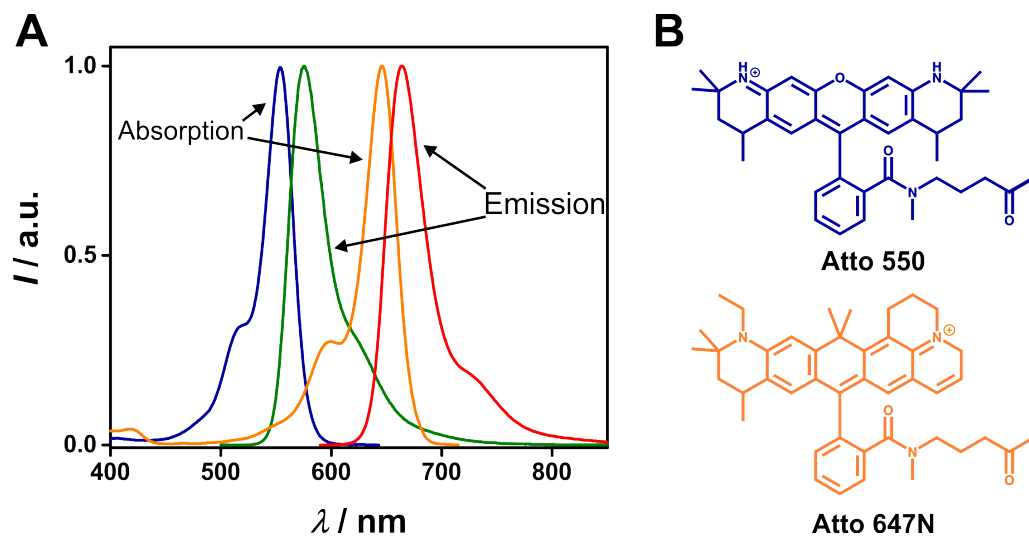


Abbildung 4.3 | **A** Absorptions- und Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe Atto 550 (blau, grün) und Atto 647N (orange, rot). **B** Strukturformeln der Fluoreszenzfarbstoffe.

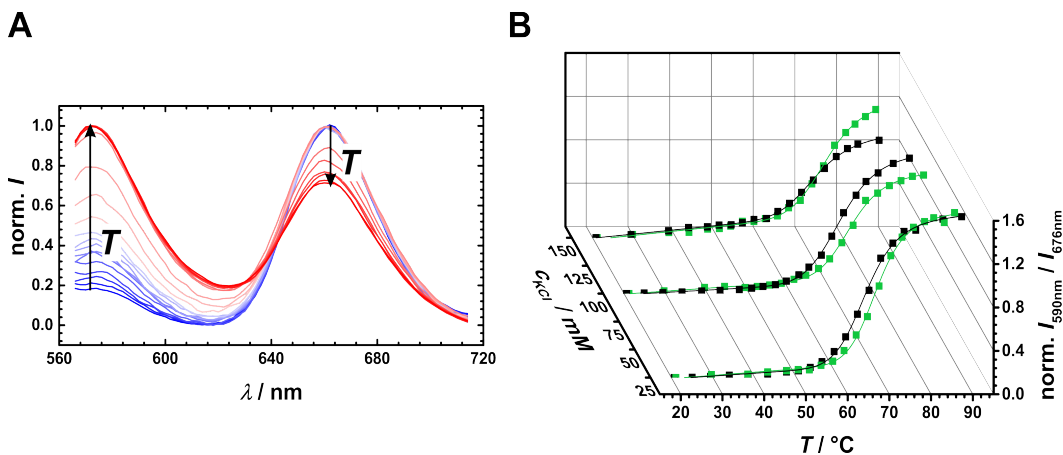


Abbildung 4.4 | **A** Exemplarisches Fluoreszenzspektrum des Wildtyps bei $c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$. **B** Schmelzkurven des Wildtyps (schwarz) und der ΔG83 -Mutante (grün) bei verschiedenen Salzkonzentrationen.

Ensemble-FRET-Messungen (s. Abb. 4.4 A) wurden sigmoidale Schmelzkurven erhalten (s. Abb. 4.4 B). Aufgrund von instrumentellen Einschränkungen konnte das Plateau bei höheren Temperaturen nicht vollständig aufgenommen werden. Eine verlässliche thermodynamische Analyse war daher nicht möglich. Die Wendepunkte der Kurven, welche den Übergangstemperaturen T_m entsprechen, scheinen jedoch im gleichen Bereich wie bei den DSC-Messungen zu liegen. Auch die geringe Kooperativität, welche in den DSC-Messungen beobachtet wurde, wird durch die geringen Steigungen im Bereich des Übergangs bestätigt. Es wird daher angenommen, dass die temperaturinduzierte Öffnung der RNA-Haarnadel nicht durch die angefügten Fluoreszenzfarbstoffe beeinflusst wird.

Mithilfe von Einzelmolekül-FRET-Messungen (*engl.* single molecule FRET, smFRET) kann zwischen verschiedenen, gleichzeitig vorkommenden Konformationen unterschieden werden. Die erhaltenen E_{FRET} -Histogramme spiegeln die Verteilung der einzelnen Spezies wider (s. Abb. 4.5). Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Histogramme mit einer trimodalen GAUSS-Verteilung gefittet. Dazu wurden drei Spezies unterschiedlicher FRET-Effizienz angenommen. Hohe E_{FRET} -Werte entsprechen einer geringen Distanz des Donor-Akzeptorpaars und somit der geschlossenen Konformation der RNA-Haarnadel.

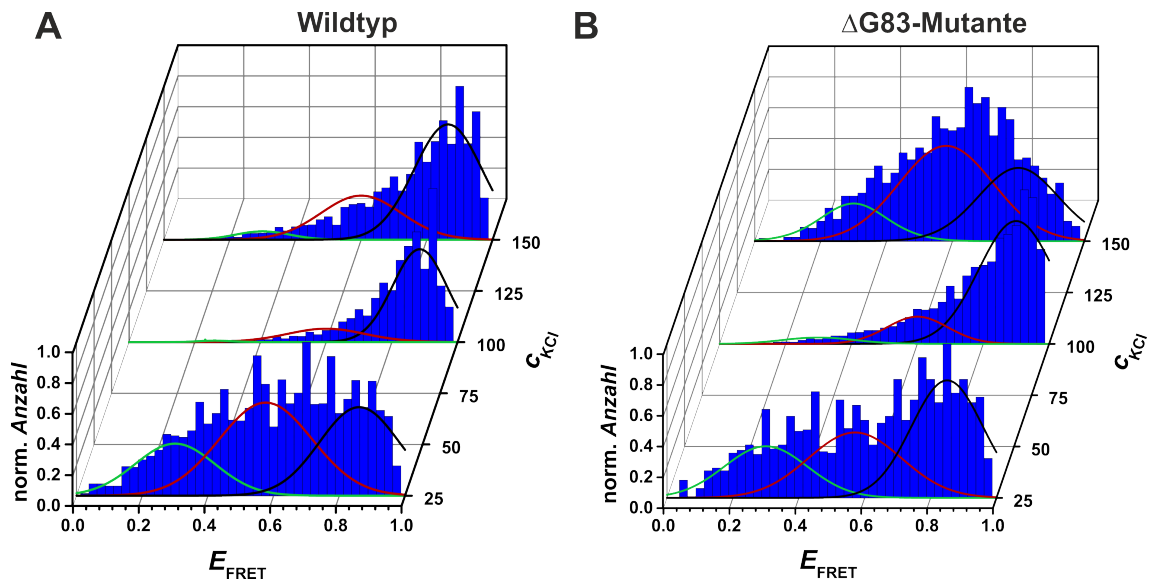


Abbildung 4.5 | smFRET-Histogramme der microROSE-RNA bei verschiedenen Salzkonzentrationen, $T = 20^\circ\text{C}$. **A** Wildtyp. **B** ΔG83 -Mutante. Die GAUSS-Fits repräsentieren drei verschiedene Spezies: schwarz: hohe E_{FRET} ; rot: mittlere E_{FRET} ; grün: niedrige E_{FRET} .

Bei einer FRET-Effizienz von etwa 0.25 wird der Abstand maximal. Bei Spezies mit einer mittleren FRET-Effizienz handelt es sich vermutlich um Zwischenzustände, bei denen die H-Brücken in der Nähe des Stammendes bereits geschwächt, aber noch nicht gebrochen sind. Die Integrale der Kurven können als prozentualer Anteil der jeweiligen Konformation interpretiert werden.

Bei der physiologischen Kaliumchloridkonzentration von $c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$ liegen sowohl der Wildtyp, als auch die Mutante vorwiegend in der geschlossenen Konformation vor. Abbildung 4.6 zeigt die Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der drei verschiedenen Konformere. Der Verlauf zeigt eine Verringerung des Anteils an geschlossenen Konformeren zugunsten der Konformere mit mittlerer E_{FRET} . Der Anteil an vollständig geöffneten Konformeren bleibt annähernd konstant (grüne Dreiecke) und steigt erst bei hohen Temperaturen auf 11 % (90°C). Daraus lässt sich schließen, dass der in den DSC-Messungen beobachtete Hauptübergang lediglich den Übergang in den Zwischen-

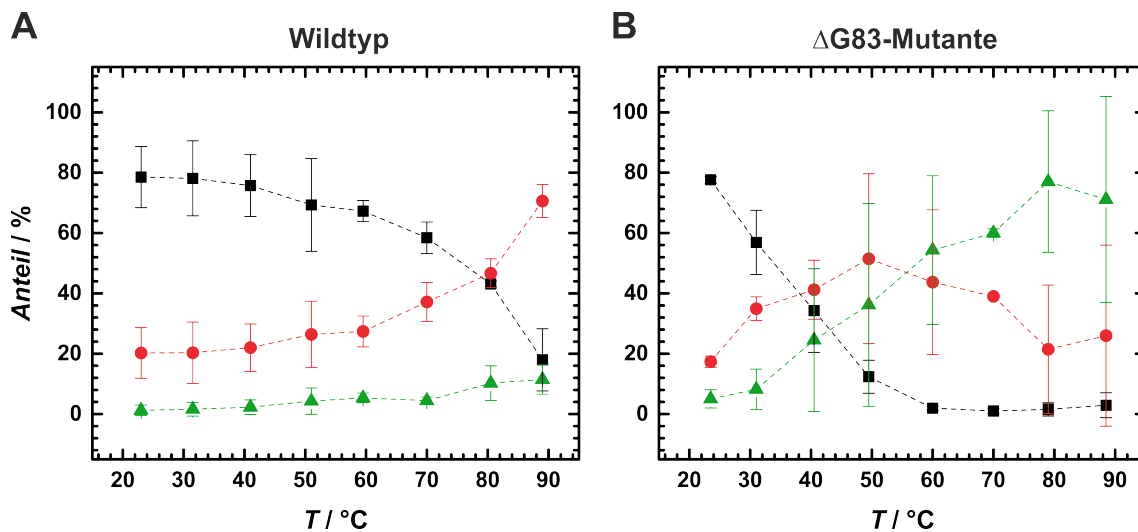


Abbildung 4.6 | Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der drei verschiedenen Konformere bei einer Salzkonzentration von $c_{KCl} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$. **A** Wildtyp. **B** $\Delta G83$ -Mutante. Schwarz: hohe E_{FRET} ; rot: mittlere E_{FRET} ; grün: niedrige E_{FRET} .

zustand darstellt. Bei der Mutante hingegen liegt bei hohen Temperaturen ein Gemisch der Konformationen mittlerer und niedriger FRET-Effizienz vor. Des Weiteren nimmt der Anteil an geschlossenen Konformeren bereits bei niedrigeren Temperaturen stark ab. Dies deutet auf eine vergleichsweise höhere Kooperativität hin, was durch die geringeren Halbwertsbreiten der DSC-Kurven bestätigt wird.

Bei einer KCl-Konzentration von 25 mmol L^{-1} ist eine breite Verteilung in den Histogrammen beider Haarnadeln zu beobachten (Abb. 4.5). Die geringe Konzentration an K^+ -Ionen reicht nicht aus, um die negativen Ladungen der Phosphatgruppen des RNA-Rückgrats auszugleichen. Die repulsiven Wechselwirkungen sorgen für eine unvollständige Faltung der RNA-Moleküle. Auch bei hohen Temperaturen bleibt die Verteilung breit, ist aber tendenziell zu Zuständen mit mittlerer FRET-Effizienz verschoben (s. Abb. 4.7). Im Verlauf der Temperaturerhöhung nimmt der Anteil an geschlossenen Konformeren im Falle der Mutante stärker ab als beim Wildtyp (4.8).

Eine Erhöhung der KCl-Konzentration über die physiologische Salzkonzentration hinaus ($c_{KCl} = 150 \text{ mmol L}^{-1}$) scheint zur Destabilisierung der Sekundärstruktur der RNA-

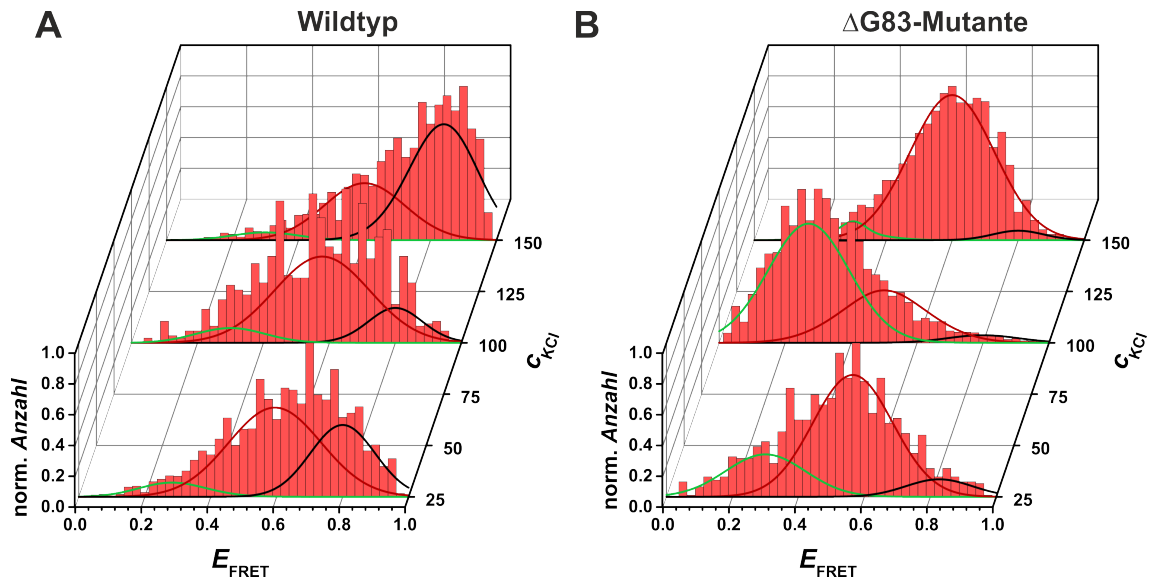


Abbildung 4.7 | smFRET-Histogramme der microROSE-RNA bei verschiedenen Salzkonzentrationen, $T = 80^\circ\text{C}$. **A** Wildtyp, **B** ΔG83 -Mutante. Die GAUSS-Fits repräsentieren drei verschiedene Spezies: schwarz: hohe E_{FRET} ; rot: mittlere E_{FRET} ; grün: niedrige E_{FRET} .

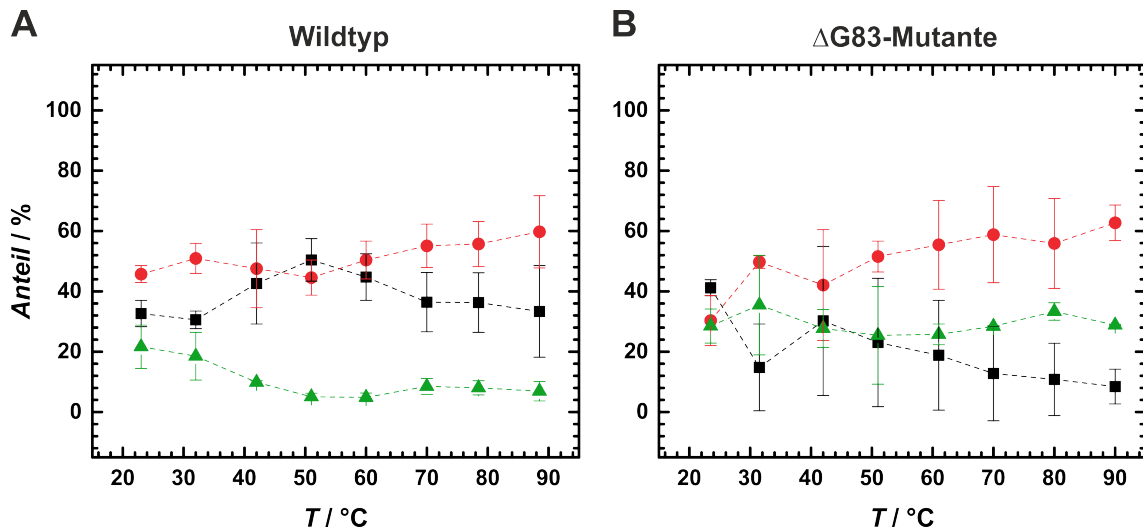


Abbildung 4.8 | Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der drei verschiedenen Konformere bei einer Salzkonzentration von $c_{\text{KCl}} = 25 \text{ mmol L}^{-1}$. **A** Wildtyp, **B** ΔG83 -Mutante. Schwarz: hohe E_{FRET} ; rot: mittlere E_{FRET} ; grün: niedrige E_{FRET} .

Segmente zu führen. Im Vergleich zur Messung bei 100 mM KCl kommt es bereits bei 20 °C vermehrt zur Population von Konformeren mit mittlerer FRET-Effizienz (vgl. Abb. 4.5). Dieser Effekt ist bei der Mutante stärker ausgeprägt und es kommt zusätzlich zur Bildung von vollständig geöffneten Konformeren. Eine Temperaturerhöhung zeigt keinen Einfluss auf die Verteilung der Konformere des Wildtyps (s. Abb. 4.9). Die Mutante hingegen bildet bevorzugt die mittlere E_{FRET} -Spezies. Die Destabilisierung könnte mit der gleichzeitigen Erhöhung der Konzentration an Chloridionen zusammenhängen. MINER *et al.* zeigten in Moleküldynamiksimulationen, dass Chloridionen bevorzugt mit entfalteten RNA-Molekülen interagieren.^[110] Somit würde die Öffnung der RNA-Haarnadel begünstigt werden. Gründe für die stärkere Destabilisierung der Δ G83-Mutante könnten in der veränderten 3D-Struktur der Haarnadel liegen (s. Abb. 4.10). Die Löschung der Nukleobase G83 bewirkt eine Krümmung des RNA-Segments und führt zu einer Verengung der großen Furche. Beispielsweise sinkt der Abstand der sich gegenüberliegenden Phosphatreste C77-P-A78 und A92-P-G91 von 17.1 Å auf 12.9 Å (berechnet aus den PDB-Strukturen: 2GIO, 2GIP^[95]). Diese Verengung könnte den Zugang von Hydratwasser und Gegenionen (K^+) erschweren und somit die repulsiven Wechselwirkungen der gegenüberliegenden Phosphatgruppen erhöhen.

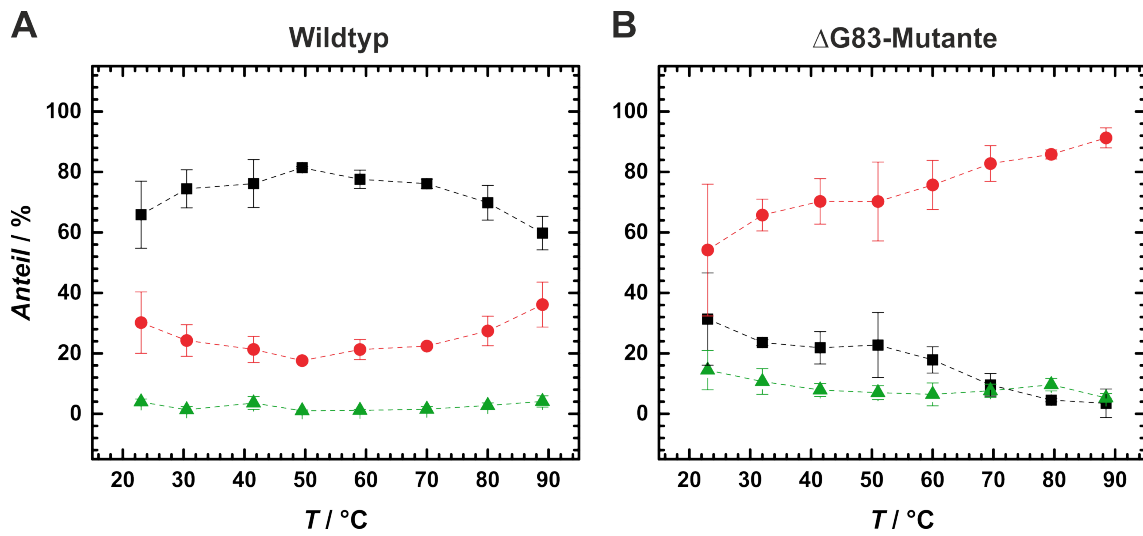


Abbildung 4.9 | Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der drei verschiedenen Konformere bei einer Salzkonzentration von $c_{KCl} = 150 \text{ mmol L}^{-1}$. **A** Wildtyp. **B** $\Delta G83$ -Mutante. Schwarz: hohe E_{FRET} ; rot: mittlere E_{FRET} ; grün: niedrige E_{FRET} .

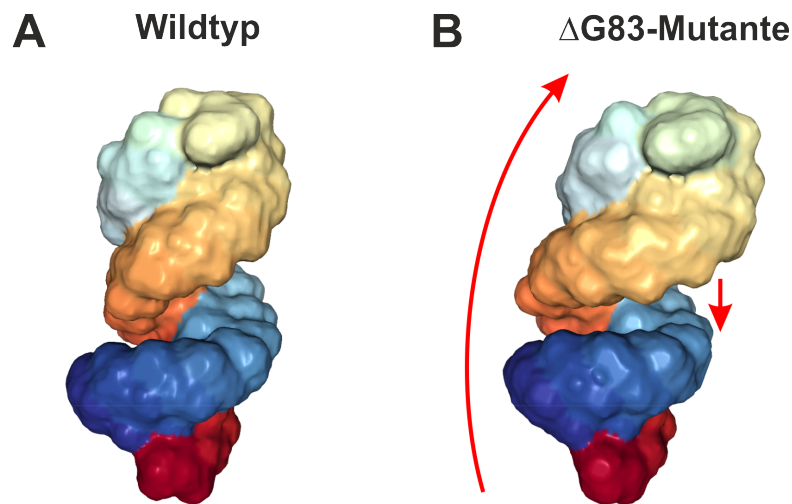


Abbildung 4.10 | 3D-Modelle der microROSE RNA.^[111] **A** Wildtyp. **B** $\Delta G83$ -Mutante. Die Löschung der Nukleobase G83 bewirkt eine Krümmung des RNA-Segments und führt zu einer Verengung der großen Furche. PDB: 2GIO, 2GIP.^[95]

4.4 Osmolyt-Effekt

Basierend auf den vorherigen Ergebnissen wurde der Effekt der organischen Osmolyte TMAO und Glyzin auf das Konformationsgleichgewicht untersucht. Die KCl-Konzentration betrug jeweils 100 mmol L^{-1} . Abbildung 4.11 zeigt die entsprechenden Histogramme bei $T = 20^\circ\text{C}$ und $T = 80^\circ\text{C}$ im Vergleich zur Referenzmessung ohne Osmolyt. Bei niedrigen Temperaturen nimmt vor allem in Anwesenheit des Glyzins der Anteil an geschlossenen Konformeren zugunsten der anderen beiden Konformere ab. Insgesamt ist das Konformationsgleichgewicht jedoch weniger temperatursensitiv (Abb. 4.12). Bei hohen Temperaturen ist im Vergleich zur Referenz eine deutliche Stabilisierung zu beobachten, wobei TMAO hier den größeren Effekt aufweist. LAMBERT *et al.* fanden einen leicht destabilisierenden Effekt von TMAO auf RNA-Sekundärstrukturen.^[102] Eine stabilisierende Wirkung gegenüber Hitzedenaturierung wurde ebenfalls in Studien zur 4U-RNA-Haarnadel beobachtet.^[112] In einer vorherigen Veröffentlichung zum Einfluss von Osmolyten auf RNA-Sekundärstrukturen fanden LAMBERT *et al.* eine generelle Destabilisierung, welche durch bevorzugte Wechselwirkungen der Osmolyte mit den Nukleobasen ausgelöst wird.^[101] Im Falle des Glyzins, und in geringerem Maße auch bei TMAO, scheinen diese Wechselwirkungen bereits bei niedrigen Temperaturen eine Öffnung der Haarnadel zu begünstigen. Die Analyse der DSC-Kurven ergibt eine Verschiebung der Hauptübergangstemperatur zu geringeren Werten (s. Abb. 4.13 und Tab. 4.2). Aufgrund der smFRET-Ergebnisse ist davon auszugehen, dass es sich hierbei nicht um eine vollständige Öffnung des RNA-Segments handelt. Da die beiden Fluoreszenzfarbstoffe jeweils an einem Ende des RNA-Stranges angebracht sind, liefern die sm-FRET-Messungen lediglich Informationen über Konformationsänderungen am Ende des Haarnadel-Stamms, während die kalorimetrischen Messsignale das ganze Molekül betreffen. Es ist daher möglich, dass der Peak der Thermogramme das Aufbrechen von Basenpaaren anzeigt, welche sich in einiger Entfernung des Stammendes befinden und deshalb die FRET-Effizienz nicht beeinflusst

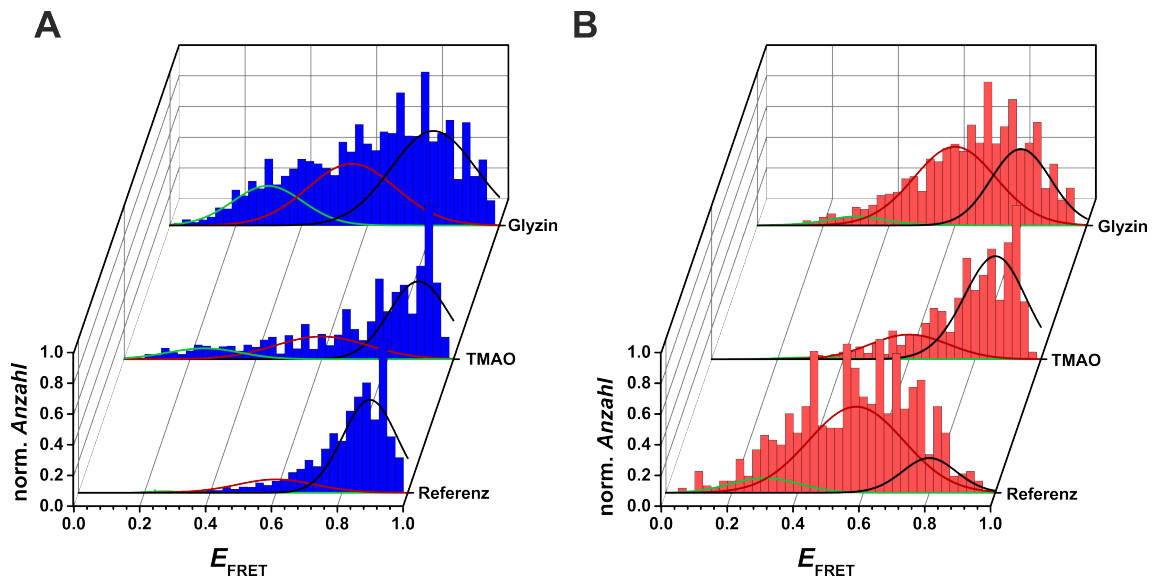


Abbildung 4.11 | smFRET-Histogramme des microROSE Wildtyps in Anwesenheit von 1 M TMAO und Glyzin und der Referenzmessung ohne Osmolyt. $c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$. **A** $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. **B** $T = 80 \text{ }^\circ\text{C}$. Die GAUSS-Fits repräsentieren drei verschiedene Spezies: schwarz: hohe E_{FRET} ; rot: mittlere E_{FRET} ; grün: niedrige E_{FRET} .

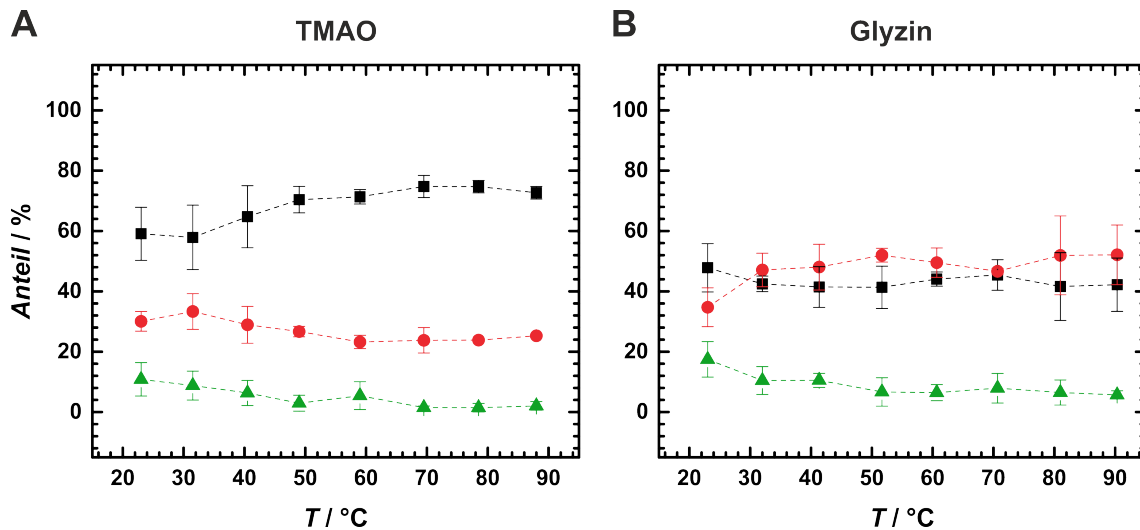


Abbildung 4.12 | Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der drei verschiedenen Konformere in Anwesenheit von **A** 1 M TMAO und **B** 1 M Glyzin. Schwarz: hohe E_{FRET} ; rot: mittlere E_{FRET} ; grün: niedrige E_{FRET} .

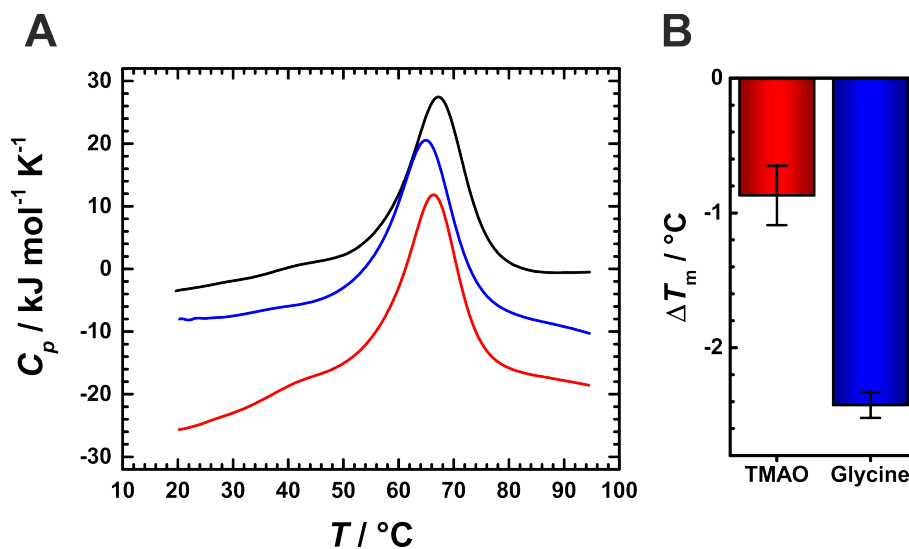


Abbildung 4.13 | **A** Thermogramme der microROSE RNA Haarnadel in Anwesenheit von 1 M TMAO (rot) und 1 M Glyzin (blau) im Vergleich zur Referenz (schwarz), $c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$. **B** Änderung der Hauptübergangstemperatur T_m : $\Delta T_m = T_{m,\text{Osm}} - T_{m,\text{Ref}}$.

wird. Vermutlich kommt es infolge der Destabilisierung der nicht-kanonischen Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der beiden Schleifen zunächst nur zum Aufbrechen der drei WATSON-CRICK-Basenpaare, die zwischen den Schleifen liegen. Eine vollständige Denaturierung würde demzufolge eine höhere Energiezufuhr benötigen. Dass der T_m -Wert dieser unvollständigen Denaturierung im Falle des Glyzins bei niedrigeren Temperaturen liegt als in Anwesenheit von TMAO, liegt wahrscheinlich an einer stärkeren Affinität des Glyzins zu den Nukleobasen, was die Exposition dieser begünstigt.

Tabelle 4.2 | Thermodynamische Parameter des Hauptübergangs der hitzeinduzierten Öffnung der microROSE RNA-Haarnadel in Anwesenheit der Osmolyte TMAO und Glyzin.

	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	FWHM / $^\circ\text{C}$
Referenz	67.5 ± 0.1	320 ± 13	11.1 ± 0.1
1 M TMAO	66.6 ± 0.2	299 ± 22	10.4 ± 0.3
1 M Glyzin	65.07 ± 0.03	312 ± 24	11.1 ± 0.2

FWHM= (engl. Full Width at Half Maximum, Halbwertsbreite des Peaks)

4.5 Crowding-Effekt

Um die hohe Konzentration an Makromolekülen innerhalb der Zelle zu imitieren, wurden smFRET-Messungen in Anwesenheit des Crowdingreagenz Ficoll bei zwei verschiedenen Konzentrationen (150 g L^{-1} und 300 g L^{-1}) durchgeführt. Die smFRET-Histogramme zeigen eine drastische Verschiebung des Konformationsgleichgewichts (Abb. 4.14). Im Vergleich zur Messung in reinem Puffer wird durch die Zugabe des Crowders der Anteil der Spezies mit hoher FRET-Effizienz zugunsten von Konformeren mit mittlerer und niedriger E_{FRET} verringert. Diese Destabilisierung des nativen Zustands ist durch enthalpische Wechselwirkungen der Zucker-Reste des Polymers mit den Ribose-Einheiten (OH-Gruppen) oder den Nukleobasen der RNA zu erklären. Eine Stabilisierung aufgrund des Volumenausschlussprinzips kann daher nicht beobachtet werden. Zur Verifizierung der Wechselwirkungshypothese wurden ergänzend Messungen in Anwesenheit der Ficoll-Monomereinheit Saccharose durchgeführt. Hier ist der Effekt noch stärker ausgeprägt, was vermutlich daran liegt, dass die OH-Gruppen der Saccharose besser zugänglich sind als die der verknäuelten Polymerketten. Der Anteil an geschlossenen Konformeren liegt nur noch bei 4.6%. Bei einer Konzentration von 300 g L^{-1} (s. Abb. 4.14 B) gleichen sich die Effekte von Ficoll und Saccharose. Die Histogramme der Messungen bei $T = 80 ^\circ\text{C}$ deuten auf eine hohe Affinität zwischen den Saccharose-Molekülen und den Nukleobasen hin, welche infolge der Entfaltung zugänglich werden (Abb. 4.15). Im Verlauf der Temperaturer-

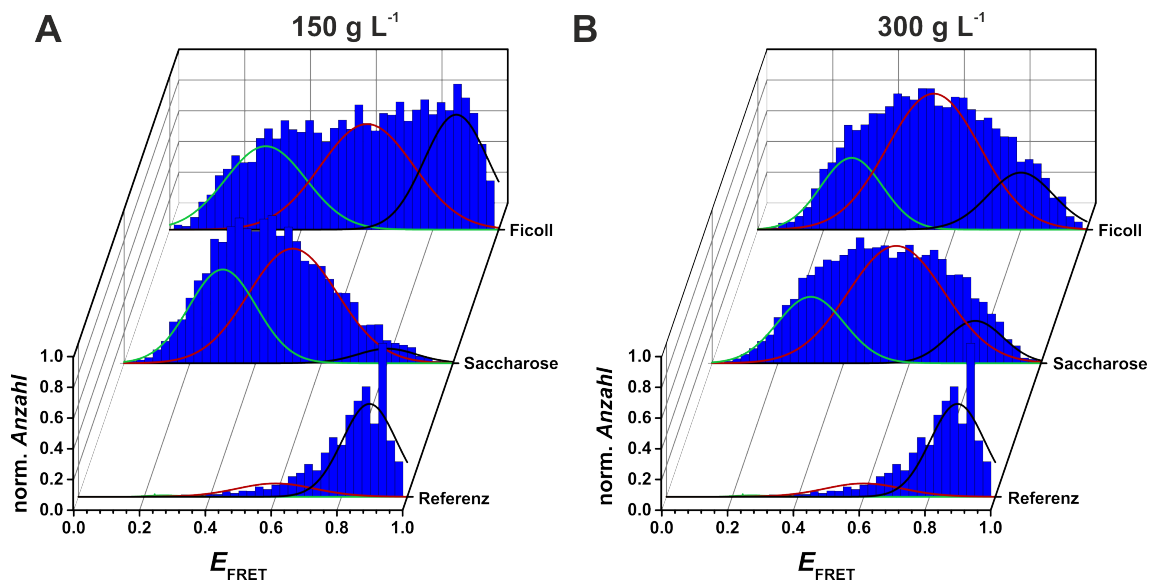


Abbildung 4.14 | smFRET-Histogramme des microROSE Wildtyps in Anwesenheit von Ficoll und Saccharose und der Referenzmessung ohne Crowder, $c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $T = 20^\circ\text{C}$. **A** $c_{\text{Cr}} = 150 \text{ g L}^{-1}$. **B** $c_{\text{Cr}} = 300 \text{ g L}^{-1}$. Die GAUSS-Fits repräsentieren drei verschiedene Spezies: schwarz: hohe E_{FRET} ; rot: mittlere E_{FRET} ; grün: niedrige E_{FRET} .

höhung verschiebt sich das Konformationsgleichgewicht fast vollständig in Richtung der geöffneten RNA-Haarnadel (s. Abb 4.16 C und D). Durch den Vergleich zwischen Polymer und Monomer konnte daher gezeigt werden, dass der destabilisierende Effekt von Ficoll durch enthalpisch günstige Wechselwirkungen mit den Nukleobasen zu erklären ist. Einen ähnlichen Effekt beobachteten auch GAO *et al.* in temperaturabhängigen Ensemble-FRET Studien zur Im-4U-RNA-Haarnadel. In Anwesenheit von Ficoll und Saccharose sank die Standardentfaltungsgibbs-Energie ΔG° , was durch eine verringerte Wasseraktivität und attraktive Wechselwirkungen der Kosolute mit den Nukleobasen begründet wurde.^[113]

Aufgrund des geringen Anteils an Spezies mit hoher FRET-Effizienz bei Raumtemperatur entspricht die in den DSC-Messungen ermittelte Ensemble-Schmelztemperatur T_m in Anwesenheit der Crowding-Reagenzien (Abb. 4.17, Tab. 4.3) nicht mehr dem bei der Referenzmessung beobachteten Übergang zwischen gefaltetem und Zwischenzustand, sondern dem Übergang vom Zwischenzustand zum vollständig geöffneten Konformer.

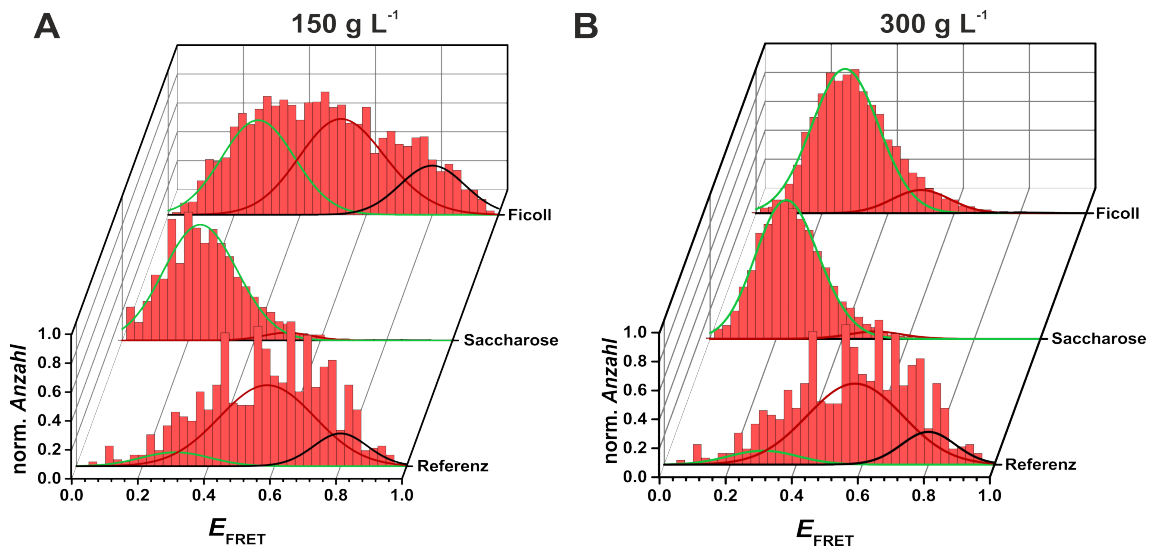


Abbildung 4.15 | smFRET-Histogramme microROSE Wildtyps in Anwesenheit von Ficoll und Saccharose und der Referenzmessung ohne Crowder, $c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $T = 80^\circ\text{C}$. **A** $c_{\text{Cr}} = 150 \text{ g L}^{-1}$. **B** $c_{\text{Cr}} = 300 \text{ g L}^{-1}$. Die GAUSS-Fits repräsentieren drei verschiedene Spezies: schwarz: hohe E_{FRET} ; rot: mittlere E_{FRET} ; grün: niedrige E_{FRET} .

Im Falle von Saccharose findet dieser Übergang bei niedrigeren Temperaturen als bei Ficoll statt. Vermutlich kommt es trotz des vorherrschenden destabilisierenden Effekts durch die Wechselwirkungen mit den Nukleobasen zu einer leichten Stabilisierung des Zwischenzustands durch den Crowding-Effekt des Polymers.

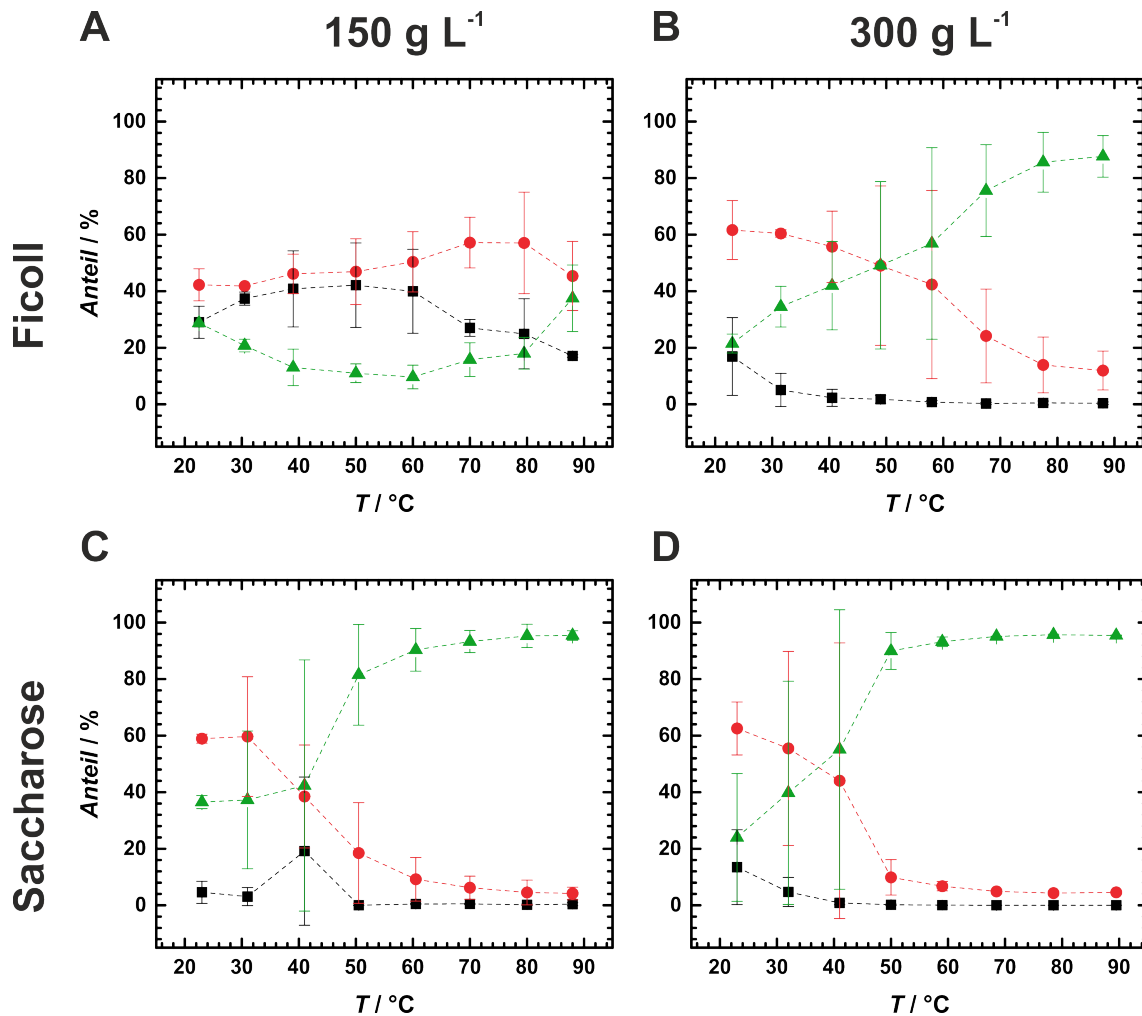


Abbildung 4.16 | Temperaturabhängigkeit des prozentualen Anteils der drei verschiedenen Konformere in Anwesenheit von Ficoll **A** $c_{\text{Cr}} = 150 \text{ g L}^{-1}$, **B** $c_{\text{Cr}} = 300 \text{ g L}^{-1}$ und Saccharose **C** $c_{\text{Cr}} = 150 \text{ g L}^{-1}$, **D** $c_{\text{Cr}} = 300 \text{ g L}^{-1}$. Schwarz: hohe E_{FRET} ; rot: mittlere E_{FRET} ; grün: niedrige E_{FRET} . $c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$.

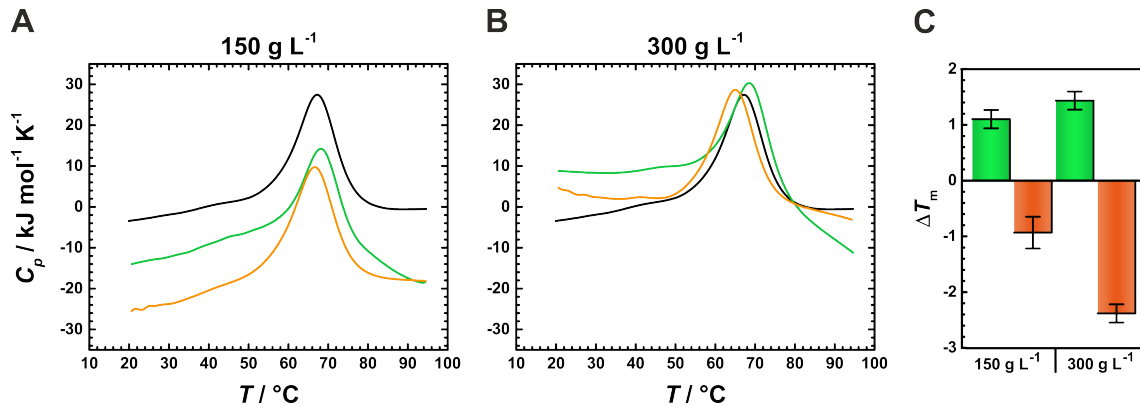


Abbildung 4.17 | Thermogramme der microROSE RNA Haarnadel in Anwesenheit von Ficoll (grün) und Saccharose (orange) im Vergleich zur Referenz (schwarz). **A** $c_{Cr} = 150 \text{ g L}^{-1}$. **B** $c_{Cr} = 300 \text{ g L}^{-1}$. **C** Änderung der Hauptübergangstemperatur T_m , $\Delta T_m = T_{m,Cr} - T_{m,Ref}$. $c_{KCl} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$.

Tabelle 4.3 | Thermodynamische Parameter des Hauptübergangs der hitzeinduzierten Öffnung der microROSE RNA-Haarnadel in Anwesenheit der Crowding-Reagenzien Ficoll und Saccharose. $c_{KCl} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$.

	$c_{Cr} / \text{g L}^{-1}$	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	FWHM / $^\circ\text{C}$
Referenz		67.5 ± 0.1	320 ± 13	11.1 ± 0.1
Ficoll	150	68.6 ± 0.1	281 ± 41	10.6 ± 0.5
	300	68.9 ± 0.1	290 ± 33	10.6 ± 0.3
Saccharose	150	66.6 ± 0.3	323 ± 17	11.1 ± 0.2
	300	65.1 ± 0.1	307 ± 27	11.1 ± 0.1

FWHM= (engl. Full Width at Half Maximum, Halbwertsbreite des Peaks)

4.6 Zusammenfassung

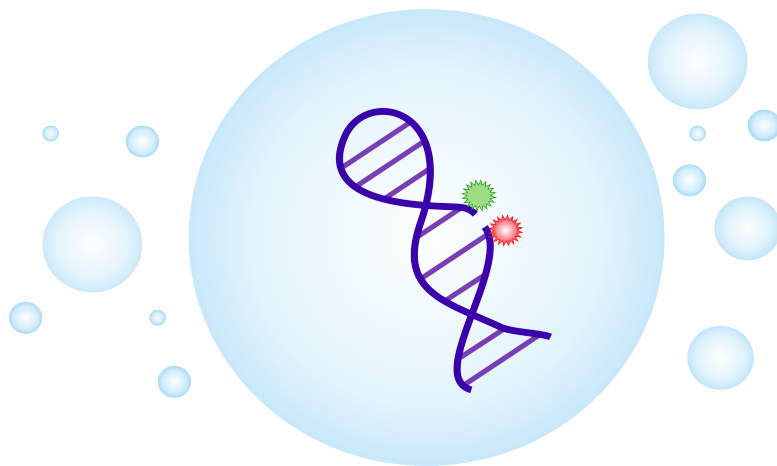
Mithilfe von Einzelmolekül-FRET-Messungen konnten neue Erkenntnisse über den Einfluss verschiedener Lösungszusammensetzungen auf das Konformationsgleichgewicht einer RNA-Haarnadel gewonnen werden. Diese Details sind durch Ensemble-Messungen nicht zugänglich, da diese nur gemittelte Informationen über die Gesamtheit aller Moleküle der Probe liefern. Um die komplexe Zusammensetzung des zellulären Milieus nachzuahmen, wurden Vertreter dreier Substanzklassen - Salze, Osmolyte und Makromoleküle - ausgewählt. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Abweichen von der physiologischen Konzentration von Kaliumchlorid ($c_{\text{KCl}} = 100 \text{ mmol L}^{-1}$) bereits bei Umgebungstemperaturen zur Öffnung der Haarnadel führen. Sowohl ein unvollständiger Ausgleich der negativen Ladungen der Phosphatgruppen des Rückgrats, als auch ein starker Anstieg der Konzentration von Chloridionen in der Umgebung der Nukleinsäure destabilisieren die native, gefaltete Konformation. Interessanterweise erwies sich die ΔG83 -Mutante, deren Sekundärstruktur keinen Versatz aufweist, als labiler gegenüber Änderungen der Temperatur und der Salzkonzentration. Die organischen Osmolyte TMAO und Glyzin haben bei Raumtemperatur einen leicht destabilisierenden Einfluss auf die Sekundärstruktur des Wildtyps. Bei höheren Temperaturen wird jedoch die geschlossene Konformation durch beide Osmolyte, insbesondere durch TMAO, gegen die Hitzedenaturierung stabilisiert. Hier überkompensiert der starke Volumenausschlusseffekt des TMAOs die Wechselwirkungen mit der RNA, welche durch die erhöhte thermische Energie bei höheren Temperaturen geschwächt werden. Der stabilisierende Effekt des Nano-Crowders TMAO scheint durch die chaotropen Eigenschaften des Kaliumchlorids teilweise abgeschwächt zu werden.^[114] Aufgrund der geringen Ladungsdichte und der leicht hydrophoben Eigenschaften, könnte das Salz die Struktur der Hydrathülle der RNA beeinflussen, was zur Schwächung des stärker hydratisierenden Effekts des TMAOs führen könnte. Das Crowdingreagenz Ficoll übt durch enthalpisch günstige Wechselwirkungen mit den Nukleobasen eine destabilisierende Wirkung auf

die microROSE-RNA aus. Daher ist dieses Polymer nicht geeignet, um den Einfluss des Volumenausschlusses durch Makromoleküle auf die Konformationen von RNA-Haarnadeln nachzuahmen. In Studien mit anderen Biomolekülen, wie DNA oder Proteinen, erwies sich Ficoll als stabilisierend.^[22,115] Der Effekt durch Additive, wie Osmolyte oder Crowding-Reagenzien, muss daher für die verschiedenen Klassen und auch die einzelnen Bausteine von Biomolekülen individuell betrachtet werden. Ein universeller Mechanismus scheint nicht vorzuliegen.

Der starke Effekt der hier untersuchten Kosolvenzen deutet darauf hin, dass die Kombination verschiedener zellulärer Hintergrundmoleküle die Zelle befähigt, das zelluläre Milieu je nach Bedarf anzupassen, um die konformationellen Eigenschaften von Biomolekülen zu steuern. Die vergleichenden Studien mit der Mutante lassen darauf schließen, dass in der lebenden Zelle vermeintliche strukturelle Defekte, wie beispielsweise der Versatz durch eine überzählige Nukleobase, eine präzise Steuerung zellulärer Prozesse ermöglichen.

KAPITEL 5

Einkapselung einer DNA Haarnadel in einem wässrigen Zweiphasensystem



Die Daten dieses Kapitels wurden bereits publiziert:

L. Arns, R. Winter, "Liquid–liquid phase separation rescues the conformational stability of a DNA hairpin from pressure–stress", *Chem. Comm.* **55** (2019) 10673-10676.

Die Inhalte und Abbildungen des englischen Originaltextes (DOI: 10.1039/C9CC04967C) wurden mit Erlaubnis der *Royal Society of Chemistry* ins Deutsche übertragen. Des Weiteren wurden Abbildungen der elektronischen Zusatzinformationen (ESI, DOI:10.1039/c9cc04967c) in den Haupttext eingefügt.

5.1 Einleitung

Die Entdeckung membranloser Zellkompartimente (s. Abschn. 1.1.3) inspirierte Wissenschaftler dazu, den Effekt der Phasenseparation auf biochemische Prozesse mithilfe von künstlichen ATPS (*engl.* aqueous two phase system, wässriges Zweiphasensystem) zu untersuchen.^[116,117,118,119] Häufig kommt dabei das ATPS aus den Polymeren Polyethylenglycol (PEG) und Dextran zum Einsatz.^[29,116,120,121,122] Proteine reichern sich gewöhnlich in der hydrophileren dextranreichen Phase an, in der es zur Ausbildung von günstigen elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Dextranmolekülen und dem Protein kommt. Auch Nukleinsäuren weisen unterschiedliche Affinitäten für die beiden Phasen eines ATPS auf. Die Verteilung ist abhängig von der Kettenlänge, der Sequenz und der Struktur der Nukleinsäure sowie von der chemischen Zusammensetzung des Zweiphasensystems. Beispielsweise reichert sich im PEG-Dextran-System einzelsträngige RNA üblicherweise in der dextranreichen Phase an, wobei die Affinität mit steigender Kettenlänge zunimmt.^[29]

Da die wässrige Zweiphasenseparation stark durch äußere Einflüsse (z. B. pH-Wert, Wasseraktivität, Ionenstärke, Temperatur, Druck) beeinflusst wird, wird vermutet, dass die zelluläre Kompartimentierung auch eine Rolle bei der Reaktion auf äußere Stressfaktoren spielt.^[26,27,123] Bisher wurden Studien zu wässrigen Zweiphasensystemen vor allem bei Umgebungsdruck durchgeführt. Ein immer noch wenig erforschter Stressfaktor für biochemische Prozesse ist der hohe hydrostatische Druck (HHP), dem eine Vielzahl von Organismen ausgesetzt ist. In Gewässern nimmt der hydrostatische Druck pro 10 m Tiefe etwa um 1 bar zu. Auf dem Grund des Marianengrabens (ca. 11000 m) herrscht ein Druck von 1000 bar. Demnach sind HHP-Studien biologischer Systeme grundlegend für das Verständnis mariner Lebensformen.^[124,125] Kanonische DNA-Duplexstrukturen, wie die B-DNA, zeigen unter hohen Drücken nur kleinere strukturelle Änderungen wie eine Verbreiterung der großen Furche oder die Verringerung der Länge der Wasserstoffbrückenbindungen

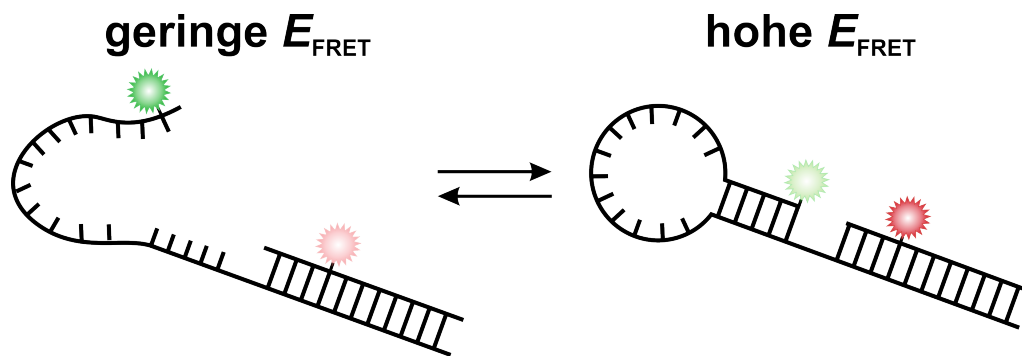


Abbildung 5.1 | Schematische Darstellung des Konformationsgleichgewichts der DNA Haarnadel.

der Basenpaare.^[126] Nicht-kanonische DNA-Strukturen, wie DNA-Haarnadeln oder G-Quadruplexe, zeigen hingegen größere konformationelle Änderungen.^[112,115,127,128,129,130] Die physikalische und biologische Relevanz des hydrostatischen Drucks für die Konformationsdynamik von Biomakromolekülen in flüssigen Zweiphasensystemen ist noch unklar. In dieser Studie soll unter Hochdruckbedingungen die Verteilung und die konformationelle Stabilität einer DNA-Haarnadel in einem künstlichen wässrigen Zweiphasensystem, welches als Modellsystem für zelluläre Kompartimente dient, untersucht werden. Einzelmolekül-FRET-Messungen ermöglichen die Beobachtung der Druckabhängigkeit des Konformationsgleichgewichts (s. Abb. 5.1). Die DNA-Haarnadel besteht aus einem GC-reichen Strang, welcher eine A32-Schleife enthält, und einem kürzeren komplementären Strang. Die FRET-Effizienz, welche über die Konformation der DNA Auskunft gibt, hängt vom Abstand zwischen Donor- (Atto 550) und Akzeptorfluorophor (Atto 647N) ab, welche in der Nähe der A32-Schleife bzw. an dem kurzen Strang in Richtung des 5'-Endes angebracht wurden. Dieses System wurde basierend auf den Studien von BALTIERRA-JASSO *et al.*^[131] von S. PATRA im Arbeitskreis etabliert. Studien zum Einfluss von Osmolyten, Crowding-Reagenzien und Salzen wurden bereits publiziert.^[127,129,130]

5.2 Experimentelles

5.2.1 Chemikalien

Dextran 10 kDa wurde bei Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Polyethylenglycol (PEG) 4.6 kDa bei Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) erworben. Das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B markierte Dextran 10 kDa wurde von Invitrogen (Thermo Fischer Scientific) erhalten. Die DNA Oligonukleotide wurden von der Firma IBA Life Solutions GmbH (Göttingen, Deutschland) synthetisiert und mit den Fluoreszenzfarbstoffen Atto 550 und Atto 647N markiert. Die Sequenzen lauten: H2-Strang: 5'-TGG CGA CGG CAG CGA GGC TTA GCG GCA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AGC CGC X-3' (X = T-Atto 550); A2-Strang: 5'-GCC TCG CXG CCG TCG CCA-3' (X = T-Atto 647N).^[131]

5.2.2 Probenpräparation

Die Oligonukleotide H2 und A2 wurden in einem wässrigen Puffer, bestehend aus 20 mM Tris-HCl und 50 mM NaCl (pH 7.5), im Verhältnis 1:1 gemischt. Für die Hybridisierung der beiden Stränge wurde die Lösung 5 Minuten lang bei 95 °C erhitzt und dann in einem Thermocycler mit einer Rate von -0.5 °C min^{-1} langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Messungen wurde ein 20 mM Tris-Puffer (pH 7.4) mit 15 mM Natriumchlorid verwendet. Der Puffer wurde mit einem sterilen 0.45 µm Whatman Puradisc 30 Spritzenfilter (GE Healthcare Life Sciences, Deutschland) filtriert.

5.2.3 Charakterisierung des wässrigen Zweiphasensystems

Das verwendete Zweiphasensystem enthielt Polyethylenglycol (PEG) 4.6 kDa und das Glukosepolymer Dextran 10 kDa. Das System wurde bereits in der Arbeitsgruppe von C. D. KEATING detailliert charakterisiert und für verschiedene biochemische Anwendungen

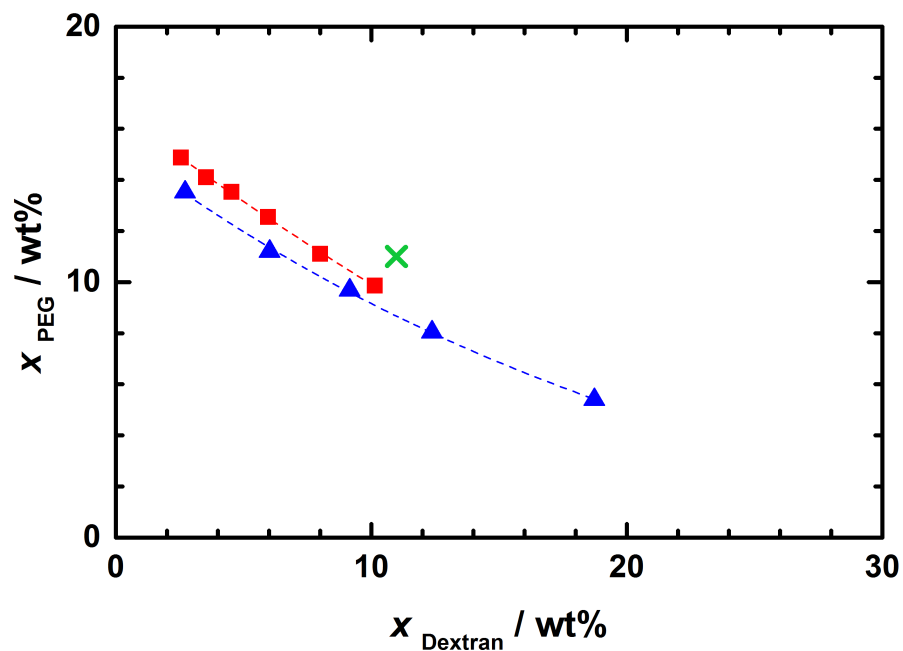


Abbildung 5.2 | Binodalkurven des wässrigen Zweiphasensystems aus PEG 4.6 kDa und Dextran 10 kDa. Blau: in Wasser bei 25 °C (Daten aus Referenz [132]), rot: in 20 mM Tris-Puffer (pH 7.4) mit 15 mM Natriumchlorid bei 22 °C. Die gestrichelten Linien representieren die entsprechenden Binodalkurven. Grünes Kreuz: Zusammensetzung des wässrigen Zweiphasensystems, welches für diese Studie verwendet wurde.

verwendet.^[132] Das Phasendiagramm (Abb. 5.2) wurde über eine Trübungstitration erhalten. Dazu wurden Dextran-Puffer-Lösungen unterschiedlicher Konzentration gegen eine 20 gew%-ige PEG-Puffer-Lösung titriert, bis sich die Lösung trübte. Das für die druckabhängigen smFRET-Messungen verwendete System bestand aus 11 gew% PEG und 11 gew% Dextran und Puffer (s. Abschn. 5.2.2).

5.2.4 Mikroskopie

Die lichtmikroskopischen Bilder wurden mit einem ECLIPSE TE2000-U Inversmikroskop der Firma Nikon über eine Digitalkamera aufgenommen. Die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen wurden mit einem Nikon Eclipse TE-300 Inversmikroskop über eine CCD Kamera (Andor iXon Ultra, Acal BFi, Deutschland) erstellt. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampfampe (Hg 100 W, Nikon, Tokyo, Japan). Die ATPS-Proben wurden zunächst gründlich durchmischt und mittels Unterdruck in eine polymerbeschichtete Quarzglas-Mikrokapillare gezogen. Mithilfe eines Feuerzeugs wurde zuvor ein Teil der Beschichtung verbrannt, um ein optisches Fenster zu erzeugen. Die Kapillare besitzt einen quadratischen Querschnitt und hat einen äußeren Durchmesser von 360 μm und einen inneren Durchmesser von 50 μm . Nach 15 Minuten befand sich die Phasenseparation im Gleichgewicht.

5.2.5 Einzelmolekül-FRET

Die Einzelmolekül-FRET-Messungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie in Abschnitt 4.2.5 beschrieben durchgeführt. Als Messzelle diente die in Abschnitt 5.2.4 beschriebene Mikrokapillare.

5.2.6 Hochdruckapparatur

Ein Ende der Mikrokapillare wurde mit einem Epoxid-Zweikomponentenkleber in einem Hochdruckstutzen befestigt. Nachdem das optische Fenster freigelegt wurde und die Kapillare mit der Probe befüllt wurde (s. Abschn. 5.2.4), wurde das offene Ende mithilfe eines Sauerstoff-Propangas-Brenners versiegelt. Der Stutzen wurde anschließend über ein Übergangsstück mit einer Justiereinheit und der Hochdruck-Einheit verbunden. Die Justiereinheit ermöglicht eine präzise Positionierung der Kapillare in x -, y - und z -Richtung. Des Weiteren kann die Kapillare um ihre Längsachse gedreht werden, um eine akkurate

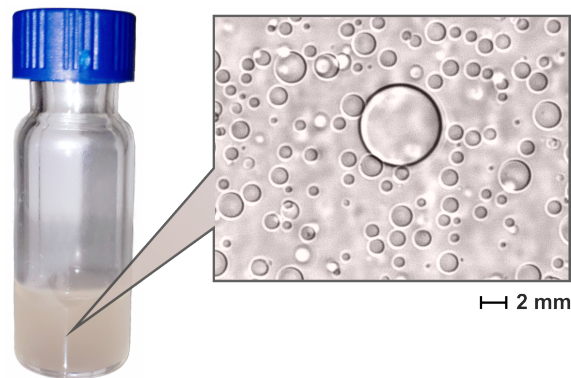


Abbildung 5.3 | Tröpfchen des PEG / Dextran-Zweiphasensystems zwischen zwei Deckgläsern bei Raumtemperatur.

Ausrichtung in der Brennebene zu erreichen. Siehe hierzu auch PATRA *et al.* 2018.^[128] Die hohen hydrostatischen Drücke wurden über eine Handspindelpresse erzeugt, welche über eine Kapillare und einen flexiblen Schlauch mit der Justiereinheit verbunden waren. Die Punktspreizfunktion (*engl.* point spread function, PSF), welche die Geometrie des Konfokalkolumens beschreibt, wurde mithilfe von fluoreszierenden Perlen mit einem Durchmesser von $0.1\ \mu\text{m}$ bestimmt. Siehe hierzu PATRA *et al.* 2018, Zusatzinformationen.^[128]

5.3 Das PEG / Dextran-Zweiphasensystem

Wässrige Zweiphasensysteme aus Polyethylenglycol (PEG) und dem Glukosepolymer Dextran bieten geeignete Verteilungskoeffizienten für eine Reihe von Biomolekülen und zählen deshalb zu den am häufigsten verwendeten ATPS.^[30,133] Das hier verwendete System aus PEG 4.6 kDa und Dextran 10 kDa ist den Studien von KEATING *et al.* nachempfunden.^[132] In einer Probenzelle, welche durch zwei Deckgläschen begrenzt wird, bilden sich stabile mit Dextran angereicherte Tröpfchen unterschiedlicher Größe in der umgebenden PEG-reichen Phase (Abb. 5.3). In der Kapillare ist die Größe der Tröpfchen durch den Durchmesser der Kapillare limitiert. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkiertem (Rhodamin B) Dextran 10 kDa kann die Dextranphase deutlich lokalisiert werden (s.

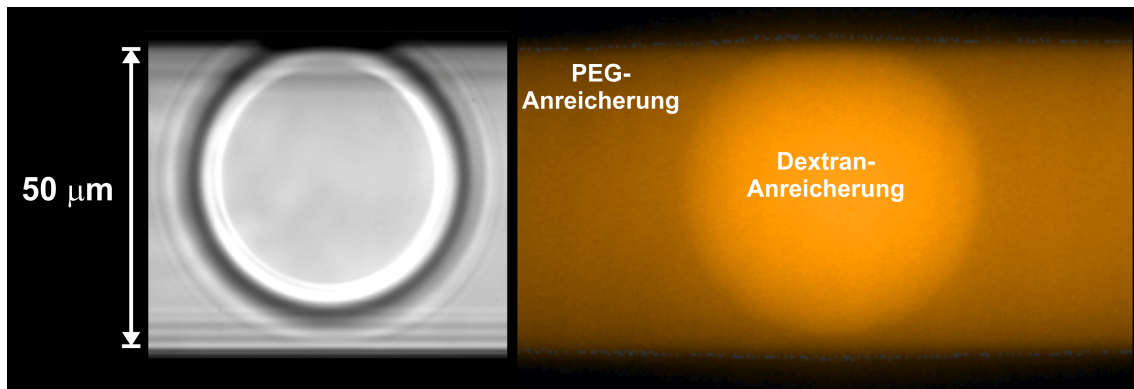


Abbildung 5.4 | Tröpfchen des PEG / Dextran-Zweiphasensystems in der Kapillare bei Raumtemperatur. Links: Lichtmikroskopische Aufnahme, rechts: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Es wurde fluoreszenzmarkiertes (Rhodamin B) Dextran 10 kDa verwendet.

Abb. 5.4). Die Tröpfchen sind über den hier untersuchten Druckbereich (1 – 1500 bar) stabil und bewegen sich innerhalb eines Messzeitraums (45 Minuten) in der engen Kapillare nicht.

5.4 Druckabhängigkeit des Konformationsgleichgewichts

5.4.1 In reinem Puffer

Abbildung 5.5 A zeigt die smFRET-Histogramme der DNA-Haarnadel bei Drücken zwischen 1 und 1500 bar. Die Histogramme wurden mit einer bimodalen GAUSS-Verteilung angepasst. Die Peaks entsprechen zwei verschiedenen Konformationen mit unterschiedlichen Abständen R der Fluoreszenzfarbstoffe und somit unterschiedlichen FRET-Effizienzen $E_{\text{FRET}} = R_0^6 / (R_0^6 + R^6)$. Der FÖRSTER-Radius R_0 der beiden Fluorophore Atto 550 und Atto 647N entspricht einem Wert von 0.6 nm.^[134] Aus den FRET-Effizienzen der beiden Spezies lassen sich die Abstände R der Fluorophore berechnen. In der geschlossenen Konformation entspricht R einer Distanz von 4.5 nm. Bei der geöffneten Haarnadel ist $R = 7.8$ nm. Die Integration der beiden Peaks liefert den Anteil f des jeweiligen Konformers.

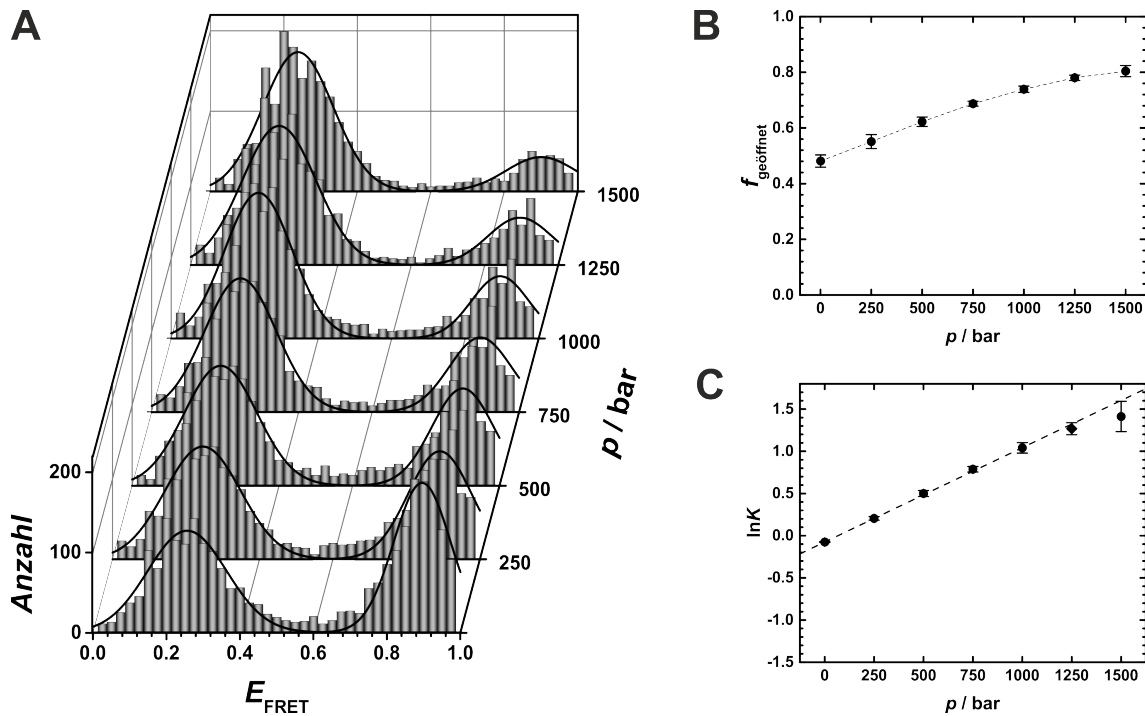


Abbildung 5.5 | Druckabhängige smFRET-Daten der DNA Haarnadel in reinem Puffer. **A** Histogramme **B** Anteil an geöffneten Konformeren $f_{\text{geöffnet}}$, **C** Logarithmus der Gleichgewichtskonstante K .

Bei Umgebungsdruck und -temperatur ist das Gleichgewicht zwischen den Konformeren annähernd ausgeglichen ($f_{\text{geschlossen}} = 0.52 \pm 0.02$, $f_{\text{geöffnet}} = 0.48 \pm 0.02$). Hohe Drücke hingegen verschieben das Gleichgewicht in Richtung der geöffneten Konformation. Der Anteil an Molekülen mit geringer FRET-Effizienz steigt auf 80% bei 1500 bar (s. Abb. 5.5 B). Zur Bestimmung des Standardentfaltungsvolumens ΔV° wurde zunächst die Gleichgewichtskonstante $K(p) = f_{\text{geöffnet}}/f_{\text{geschlossen}}$ für jeden Druck-Schritt bestimmt. Aus der Steigung der $\ln K(p)$ -Auftragung lässt sich ΔV° berechnen ($(d\ln K/dp)_T = -\Delta V^\circ/RT$). In reinem Puffer beträgt $\Delta V^\circ = -27 \pm 2 \text{ mL mol}^{-1}$. Das partielle molare Volumen der geöffneten Konformation ist also kleiner als das der geschlossenen Konformation, was die Präferenz für die denaturierte Haarnadel bei hohen Drücken erklärt.

5.4.2 Im wässrigen Zweiphasensystem

Mithilfe der Justiereinheit (s. Abschn. 5.2.6) kann der Fokus des Mikroskops präzise in das Innere eines Tröpfchens positioniert werden. Die Apparatur ermöglicht es daher, auch den Verteilungskoeffizienten der DNA-Haarnadel zu bestimmen. Die DNA-Konzentration innerhalb der jeweiligen Phase kann mithilfe der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ aus einer FLCS-Messung (*engl.* fluorescence lifetime correlation spectroscopy) in einer der beiden Phasen berechnet werden. Eine Trennung der beiden Phasen ist somit nicht erforderlich. In der mit PEG angereicherten Phase wurde kein Signal detektiert, was auf eine vollständige Partitionierung der DNA-Haarnadel in die dextranreiche Phase, in der ein starkes FRET-Signal erhalten wurde, hindeutet. Die hohe Affinität zur Dextranphase ist wahrscheinlich durch repulsive Wechselwirkungen der Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats mit den leicht hydrophoben PEG-Molekülen zu erklären. BAMBERGER *et al.* begründeten die Partitionierung von Phosphat-Ionen in die Dextranphase eines PEG/Dextran-ATPS durch die Abstoßung der Phosphat-Ionen aus der PEG-Phase.^[135]

Abbildung 5.6 zeigt die druckabhängigen smFRET-Histogramme der DNA Haarnadel im ATPS im Vergleich zu einer 11 gew%-igen PEG- bzw. Dextran-Lösung. Im Gegensatz zur Messung in reinem Puffer befinden sich unter diesen drei Bedingungen 74 % der DNA-Moleküle in der geschlossenen Konformation. Im Verlaufe der Druckerhöhung wird der stark stabilisierende Effekt des wässrigen Zweiphasensystems deutlich (Abb. 5.7, rote Quadrate). Über den gesamten Druckbereich wird die geschlossene Konformation begünstigt. Das Entfaltungsvolumen sinkt auf $\Delta V^\circ = -4.2 \pm 0.6 \text{ mL mol}^{-1}$. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der starke Volumenausschluss-Effekt des makromolekularen Crowders Dextran innerhalb der Tröpfchen das für die DNA-Moleküle zur Verfügung stehende Volumen soweit einschränkt, dass eine druckbedingte Entfaltung verhindert wird. In reinem Puffer ändert die Standardentfaltungs-GIBBS-Energie ΔG° bereits bei Drücken von 70 bar ihr Vorzeichen. Unter der Annahme, dass $\Delta G^\circ(p)$ linear verläuft, würde die Ausgleichsge-

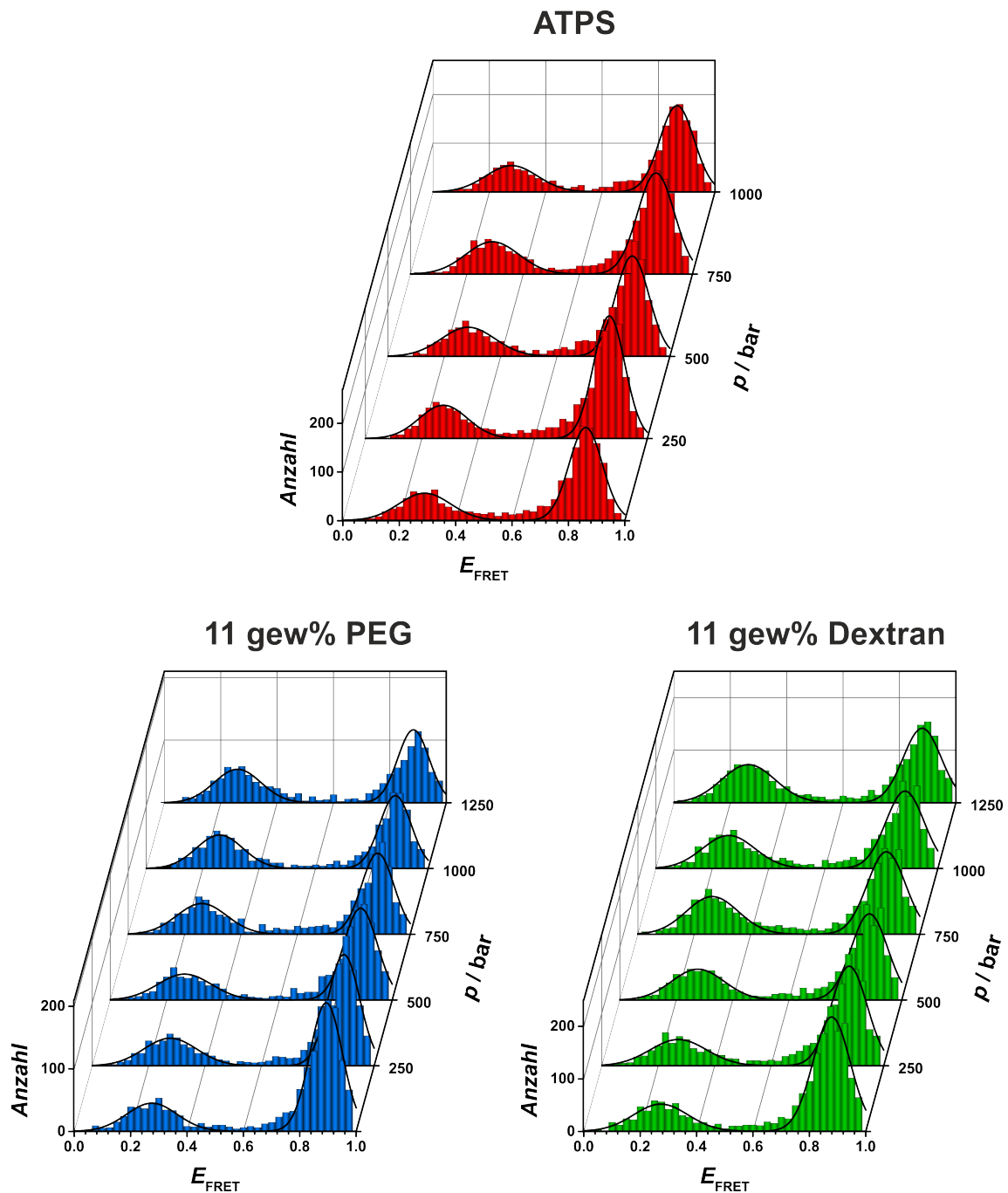


Abbildung 5.6 | Druckabhängige smFRET-Histogramme der DNA Haarnadel im ATPS und in einer 11 gew%-igen PEG bzw. Dextran-Lösung. Rot: ATPS, blau: 11 gew% PEG, grün: 11 gew% Dextran.

rade im Falle des ATPS die x -Achse erst bei $\Delta G^\circ(p) = 6200$ bar schneiden.

Die Vergleichsmessungen in der 11 gew%-igen PEG- und der 11 gew%-igen Dextran-Lösung zeigen einen ähnlich stabilisierenden Effekt, der jedoch im Vergleich zum ATPS etwas schwächer ausgeprägt ist. Das Entfaltungsvolumen beträgt $\Delta V^\circ = -12.8 \pm 0.7 \text{ mL mol}^{-1}$ in der Dextran-Lösung und $-16.4 \pm 0.3 \text{ mL mol}^{-1}$ in der PEG-Lösung. Der Unterschied zum Zweiphasensystem ist dadurch zu erklären, dass die Phasenzusammensetzung des ATPS nicht der ursprünglich eingewogenen Gewichtsanteile entspricht. Die Dextrankonzentration innerhalb der Tröpfchen steigt auf ca. 30 gew%.^[120,121,136,137] Somit ist ein erhöhter Volumenausschluss-Effekt zu erwarten. Dieses ist in den Histogrammen einer Vergleichsmessung mit 30 gew% Dextran deutlich zu erkennen (s. Abb. 5.8).

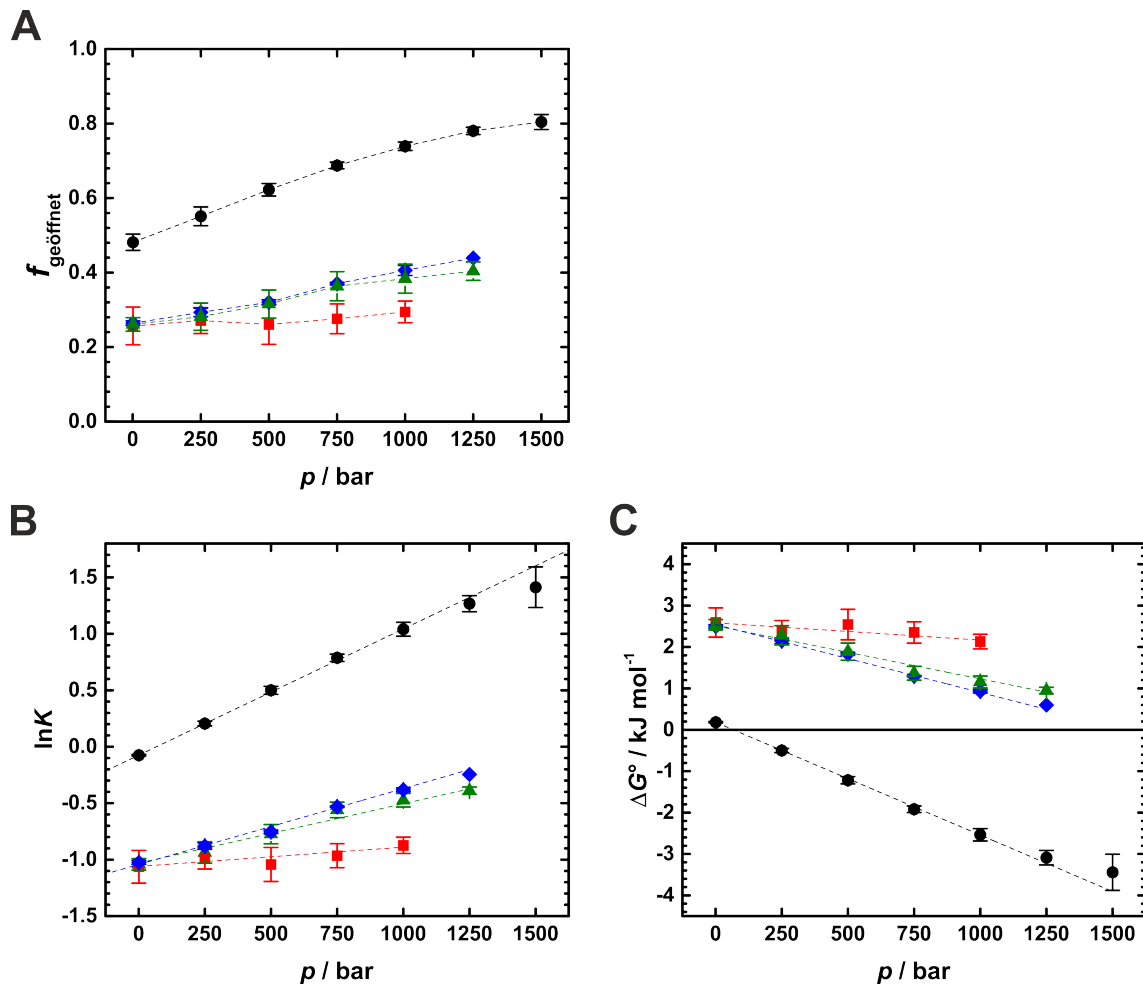


Abbildung 5.7 | Analyse der druckabhängigen smFRET-Histogramme der DNA Haarnadel im ATPS und in einer 11 gew%-igen PEG- bzw. Dextran-Lösung. **A** Anteil an geöffneten Konformeren $f_{\text{geöffnet}}$, **B** Logarithmus der Gleichgewichtskonstante K , **C** Standardentfaltungs-GIBBS-Energie ΔG° . Schwarz: Puffer, rot: ATPS, blau: 11 gew% PEG, grün: 11 gew% Dextran.

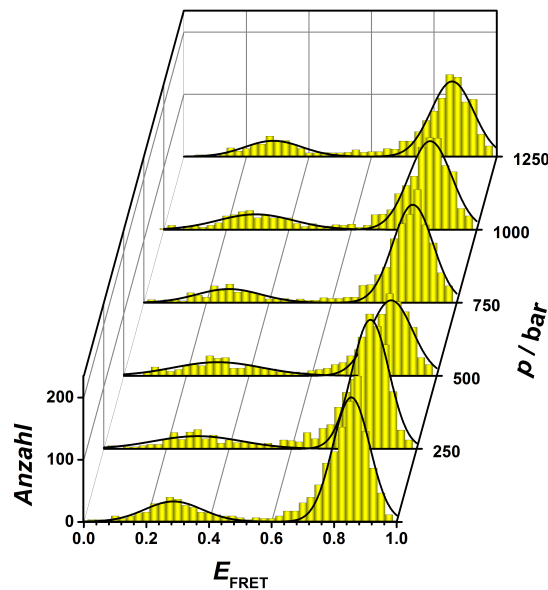


Abbildung 5.8 | Druckabhängige smFRET-Histogramme der DNA Haarnadel in einer 30 gew%-igen Dextran-Lösung.

5.5 Zusammenfassung

In dieser Studie sollte der Effekt der intrazellulären Flüssig-flüssig-Phasenseparation auf konformationelle Eigenschaften von Biomolekülen untersucht werden. Als Modellsystem diente ein wässriges Zweiphasensystem aus Polyethylenglycol und Dextran. Mithilfe von druckabhängigen smFRET-Messungen konnte der Einfluss der Partitionierung auf das Konformationsgleichgewicht und die volumetrischen Eigenschaften einer DNA-Haarnadel untersucht werden. Die Druckeinwirkung verschiebt das Konformationsgleichgewicht in Richtung des entfalteten Zustands, welcher ein geringeres partielles molares Volumen aufweist. Die Partitionierung der DNA-Haarnadel in die dextranreichen Tröpfchen hat eine drastische Stabilisierung der geschlossenen Konformation gegenüber der Druckeinwirkung zur Folge. Durch eine Vergleichsmessung in einer 30 gew%-igen Dextran-Lösung konnte gezeigt werden, dass die Stabilisierung innerhalb der Tröpfchen durch den starken Volumenausschluss-Effekt des makromolekularen Crowding-Reagenz Dextran begründet

werden kann. In lebenden Zellen könnte die Phasenseparation in Kombination mit einem starken Volumenausschluss-Effekt eine Strategie zur Erhaltung der Funktion von Biomolekülen gegenüber hohen hydrostatischen Drücken sein. In natürlich vorkommenden Polysaccharid-basierten Zweiphasensystemen (z. B. Glycosaminoglykane, Lipopolysaccharide, Proteoglykane) könnte es zu einem ähnlichen Effekt kommen. In Systemen, in denen die Phasenseparation auf der Aufkonzentrierung von Proteinen oder Nukleinsäuren beruht, könnten jedoch auch andere Effekte, zum Beispiel Wechselwirkungen mit den Background-Molekülen, auftreten. Des Weiteren könnten diese Systeme drucksensitiver als das verwendete Modellsystem sein.

Literaturverzeichnis

- [1] P. H. Yancey, *J. Exp. Biol.* **2005**, 208(15), 2819–2830.
- [2] P. H. Yancey, *Sci. Prog.* **2004**, 87(Pt 1), 1–24.
- [3] P. H. Yancey, M. Clark, S. Hand, R. Bowlus, G. Somero, *Science (80-.)*. **1982**, 217(4566), 1214–1222.
- [4] D. R. Canchi, A. E. García, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, 64(1), 273–293.
- [5] D. W. Bolen, I. V. Baskakov, *J. Mol. Biol.* **2001**, 310(5), 955–963.
- [6] C. Tanford, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86(10), 2050–2059.
- [7] A. Wang, D. W. Bolen, *Biochemistry* **1997**, 36(30), 9101–9108.
- [8] M. Auton, D. W. Bolen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102(42), 15065–15068.
- [9] D. W. Bolen, G. D. Rose, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77(1), 339–362.
- [10] S. N. Timasheff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99(15), 9721–9726.
- [11] T. Arakawa, S. N. Timasheff, *Biochemistry* **1982**, 21(25), 6536–6544.
- [12] E. S. Courtenay, M. W. Capp, C. F. Anderson, M. T. Record, *Biochemistry* **2000**, 39(15), 4455–4471.
- [13] S. N. Timasheff, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* **1993**, 22, 67–97.
- [14] D. R. Canchi, A. E. García, *Biophys. J.* **2011**, 100(6), 1526–1533.
- [15] X. Cheng, I. A. Shkel, K. O'Connor, J. Henrich, C. Molzahn, D. Lambert, M. T. Record, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139(29), 9885–9894.
- [16] R. J. Ellis, A. P. Minton, *Nature* **2003**, 425(6953), 27–28.
- [17] A. P. Minton, *Biopolymers* **1981**, 20(10), 2093–2120.
- [18] R. Saha, A. Pohorille, I. A. Chen, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2014**, 44(4), 319–324.
- [19] M. A. Mourão, J. B. Hakim, S. Schnell, *Biophys. J.* **2014**, 107(12), 2761–2766.
- [20] P. Ball, *Chem. Rev.* **2008**, 108(1), 74–108.

- [21] G. Rivas, A. P. Minton, *Trends Biochem. Sci.* **2016**, 41(11), 970–981.
- [22] M. Gao, C. Held, S. Patra, L. Arns, G. Sadowski, R. Winter, *ChemPhysChem* **2017**, 18(21), 2951–2972.
- [23] A. P. Minton, *Mol. Cell. Biochem.* **1983**, 55(2), 119–140.
- [24] M. Senske, L. Törk, B. Born, M. Havenith, C. Herrmann, S. Ebbinghaus, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136(25), 9036–9041.
- [25] A. P. Minton, *Biopolymers* **2013**, 99(4), 239–244.
- [26] A. A. Hyman, C. A. Weber, F. Jülicher, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, 30(1), 39–58.
- [27] D. M. Mitrea, R. W. Kriwacki, *Cell Commun. Signal.* **2016**, 14(1), 1.
- [28] C. P. Brangwynne, P. Tompa, R. V. Pappu, *Nat. Phys.* **2015**, 11(11), 899–904.
- [29] W. M. Aumiller, C. D. Keating, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, 239, 75–87.
- [30] B. Y. Zaslavsky, *Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry and Bioanalytical Applications*, Marcel Dekker, New York, **1995**.
- [31] G. I. Makhatadze, „Thermal Unfolding of Proteins Studied by Calorimetry“ in *Protein Fold. Handb.* (Hrsg.: J. Buchner, T. Kiefhaber), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, **2005**, Kapitel 4, S. 70–98.
- [32] T. V. Chalikian, K. J. Breslauer, *Biopolymers* **1996**, 39(5), 619–626.
- [33] T. V. Chalikian, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, 32(1), 207–235.
- [34] S. A. Hawley, *Biochemistry* **1971**, 10(13), 2436–2442.
- [35] D. N. Dubins, A. Lee, R. B. Macgregor, T. V. Chalikian, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(38), 9254–9259.
- [36] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**.
- [37] M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, WILEY-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, **2011**.
- [38] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3. Aufl., Springer Science+Business Media, New York, **2006**, S. 954.
- [39] PicoQuant, „MicroTime 200“.
- [40] W. Becker, *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*, Bd. 111 von *Springer Series in Chemical Physics*, Springer International Publishing, Cham, **2015**.

- [41] P. Kapusta, M. Wahl, R. Erdmann, *Advanced Photon Counting*, Bd. 15 von *Springer Series on Fluorescence*, Springer International Publishing, Cham, **2015**.
- [42] P. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 5. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- [43] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, 2. Aufl., Vieweg+Teubner Verlag, Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, Wiesbaden, **2011**.
- [44] Bedienungsanleitung Wescor, „Wescor Dampfdruckosmometer VAPRO Modell 5520“.
- [45] O. Kratky, H. Leopold, H. Stabinger, „The determination of the partial specific volume of proteins by the mechanical oscillator technique“ in *Methods Enzymol.*, Bd. 27 (Hrsg.: S. N. Timasheff, C. H. W. Hirs), Elsevier Inc., **1973**, Kapitel Enzyme Str, S. 98–110.
- [46] D. I. Svergun, M. H. J. Koch, P. A. Timmins, R. P. May, *Small Angle X-Ray Neutron Scatt. from Solut. Biol. Macromol.* **2013**, 2013.
- [47] P. H. Yancey, J. F. Siebenaller, *J. Exp. Biol.* **2015**, 218(12), 1880–1896.
- [48] F. Hofmeister, *Arch. für Exp. Pathol. und Pharmakologie* **1888**, 25(1), 1–30.
- [49] F. Hofmeister, *Arch. für Exp. Pathol. und Pharmakologie* **1888**, 25(1), 1–30.
- [50] A. Di Michele, M. Freda, G. Onori, M. Paolantoni, A. Santucci, P. Sassi, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110(42), 21077–21085.
- [51] R. G. A. R. Maclagan, C. Malardier-Jugroot, M. A. Whitehead, M. Lever, *J. Phys. Chem. A* **2004**, 108(13), 2514–2519.
- [52] J. D. Batchelor, A. Olteanu, A. Tripathy, G. J. Pielak, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(7), 1958–1961.
- [53] A. Panuszko, P. Bruździak, E. Kaczkowska, J. Stangret, *J. Phys. Chem. B* **2016**, 120(43), 11159–11169.
- [54] V. P. Voloshin, N. N. Medvedev, N. Smolin, A. Geiger, R. Winter, *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119(5), 1881–1890.
- [55] K. A. Dill, D. Shortle, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, 60(1), 795–825.
- [56] D. Shortle, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, 3(1), 66–74.
- [57] C. M. Dobson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, 2(1), 6–12.
- [58] P. H. Yancey, G. N. Somero, *Biochem. J.* **1979**, 183(2), 317–323.

- [59] R. H. Kelly, P. H. Yancey, *Biol. Bull.* **1999**, 196(1), 18–25.
- [60] P. H. Yancey, A. L. Fyfe-Johnson, R. H. Kelly, V. P. Walker, M. T. Aunon, *J. Exp. Zool.* **2001**, 289(3), 172–176.
- [61] D. D. Martin, D. H. Bartlett, M. F. Roberts, *Extremophiles* **2002**, 6(6), 507–514.
- [62] G. Soto, L. Setten, C. Lisi, C. Maurelis, M. Mozzicafreddo, M. Cuccioloni, M. Angeletti, N. D. Ayub, *Extremophiles* **2012**, 16(3), 455–462.
- [63] E. A. Galinski, H.-P. Pfeiffer, H. G. Truper, *Eur. J. Biochem.* **1985**, 149(1), 135–139.
- [64] G. Lentzen, T. Schwarz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 72(4), 623–634.
- [65] C. D. Jorge, N. Borges, I. Bagan, A. Bilstein, H. Santos, *Extremophiles* **2016**, 20(3), 251–259.
- [66] K. Gekko, H. Noguchi, *J. Phys. Chem.* **1979**, 83(21), 2706–2714.
- [67] Q. Zou, B. J. Bennion, V. Daggett, K. P. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124(7), 1192–1202.
- [68] A. Soto, A. Arce, M. K. Khoshkbarchi, *Biophys. Chem.* **1998**, 74(3), 165–173.
- [69] D. R. Canchi, P. Jayasimha, D. C. Rau, G. I. Makhatadze, A. E. Garcia, *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116(40), 12095–12104.
- [70] L. Platts, R. J. Falconer, *Int. J. Pharm.* **2015**, 486(1-2), 131–5.
- [71] J. Hunger, K.-J. Tielrooij, R. Buchner, M. Bonn, H. J. Bakker, *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116(16), 4783–4795.
- [72] T. V. Chalikian, R. B. Macgregor, *Biophys. Chem.* **2019**, 246(November 2018), 8–15.
- [73] M. B. Hahn, T. Solomun, R. Wellhausen, S. Hermann, H. Seitz, S. Meyer, H.-J. Kunte, J. Zeman, F. Uhlig, J. Smiatek, H. Sturm, *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119(49), 15212–15220.
- [74] J. Smiatek, R. K. Harishchandra, O. Rubner, H. J. Galla, A. Heuer, *Biophys. Chem.* **2012**, 160(1), 62–68.
- [75] A. Narayanan Krishnamoorthy, C. Holm, J. Smiatek, *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118(40), 11613–11621.
- [76] I. Yu, M. Nagaoka, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 388(4-6), 316–321.
- [77] J. Smiatek, *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118(3), 771–782.
- [78] K. Lippert, E. Galinski, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, 37(1), 61–65.

- [79] R. Ravindra, R. Winter, *Zeitschrift für Phys. Chemie* **2003**, 217(10-2003), 1221–1244.
- [80] J. W. Bye, R. J. Falconer, *Protein Sci.* **2013**, 22(11), 1563–1570.
- [81] S. Sukenik, L. Sapir, R. Gilman-Politi, D. Harries, *Faraday Discuss.* **2013**, 160, 225–237.
- [82] L. M. Pegram, T. Wendorff, R. Erdmann, I. Shkel, D. Bellissimo, D. J. Felitsky, M. T. Record, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, 107(17), 7716–7721.
- [83] F. M. Richards, H. W. Wyckoff, „Bovine Pancreatic Ribonuclease“ in *Enzymes*, Bd. 4 (Hrsg.: P. D. Boyer), 3. Aufl., Academic Press, New York and London, **1971**, Kapitel 24, S. 647–806.
- [84] M. Senske, D. Constantinescu-Aruxandei, M. Havenith, C. Herrmann, H. Weingärtner, S. Ebbinghaus, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, 18(43), 29698–29708.
- [85] P. Bruździak, A. Panuszko, J. Stangret, *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117(39), 11502–11508.
- [86] N. Smolin, V. P. Voloshin, A. V. Anikeenko, A. Geiger, R. Winter, N. N. Medvedev, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19(9), 6345–6357.
- [87] D. Paschek, *J. Chem. Phys.* **2004**, 120(22), 10605–10617.
- [88] A. Kim, N. Medvedev, A. Geiger, *J. Mol. Liq.* **2014**, 189, 74–80.
- [89] S. S. Cho, G. Reddy, J. E. Straub, D. Thirumalai, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115(45), 13401–13407.
- [90] M. Arai, K. Kuwajima, *Adv. Protein Chem.* **2000**, 53, 209–282.
- [91] T. M. Ryan, Y. Xun, N. P. Cowieson, J. P. Mata, A. Jackson, B. R. Pauw, A. J. Smith, N. Kirby, D. McGillivray, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, 473(4), 834–839.
- [92] T. R. Sosnick, J. Trehwella, *Biochemistry* **1992**, 31(35), 8329–8335.
- [93] W. G. Miller, C. V. Goebel, *Biochemistry* **1968**, 7(11), 3925–3935.
- [94] S. Chowdhury, C. Ragaz, E. Kreuger, F. Narberhaus, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278(48), 47915–47921.
- [95] S. Chowdhury, C. Maris, F. H.-T. Allain, F. Narberhaus, *EMBO J.* **2006**, 25(11), 2487–2497.
- [96] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, 7. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2018**.

- [97] S. Neidle, „RNA Structures and Their Diversity“ in *Princ. Nucleic Acid Struct.*, 1. Aufl., Elsevier, Amsterdam, **2008**, Kapitel 6, S. 204–248.
- [98] D. R. Jacobson, O. A. Saleh, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *45*(4), gkw1305.
- [99] D. E. Draper, D. Grilley, A. M. Soto, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*(1), 221–243.
- [100] D. E. Draper, *RNA* **2004**, *10*(3), 335–343.
- [101] D. Lambert, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*(5), 993–1005.
- [102] D. Lambert, D. Leipply, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **2010**, *404*(1), 138–157.
- [103] D. L. Pincus, C. Hyeon, D. Thirumalai, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*(23), 7364–7372.
- [104] H.-X. Zhou, G. Rivas, A. P. Minton, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*(1), 375–397.
- [105] D. Kilburn, J. H. Roh, L. Guo, R. M. Briber, S. A. Woodson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*(25), 8690–8696.
- [106] E. Fiorini, R. Börner, R. K. O. Sigel, *Chim. Int. J. Chem.* **2015**, *69*(4), 207–212.
- [107] M. Gao, D. Gnutt, A. Orban, B. Appel, F. Righetti, R. Winter, F. Narberhaus, S. Müller, S. Ebbinghaus, *Angew. Chemie* **2016**, *128*(9), 3279–3283.
- [108] S.-J. Chen, K. A. Dill, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*(2), 646–651.
- [109] J. Rinnenthal, B. Klinkert, F. Narberhaus, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*(11), 3834–3847.
- [110] J. C. Miner, A. E. García, *J. Chem. Phys.* **2018**, *148*(22), 222837.
- [111] A. S. Rose, A. R. Bradley, Y. Valasatava, J. M. Duarte, A. Prić, P. W. Rose, *Bioinformatics* **2018**, *34*(21), 3755–3758.
- [112] M. Gao, L. Arns, R. Winter, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, *56*(9), 2302–2306.
- [113] M. Gao, D. Gnutt, A. Orban, B. Appel, F. Righetti, R. Winter, F. Narberhaus, S. Müller, S. Ebbinghaus, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55*(9), 3224–3228.
- [114] K. Collins, *Biophys. J.* **1997**, *72*(1), 65–76.
- [115] J.-M. Knop, S. Patra, B. Harish, C. A. Royer, R. Winter, *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*(54), 14346–14351.
- [116] C. D. Keating, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*(12), 2114–2124.
- [117] B. Drobot, J. M. Iglesias-Artola, K. Le Vay, V. Mayr, M. Kar, M. Kreysing, H. Mutschler, T.-Y. D. Tang, *Nat. Commun.* **2018**, *9*(1), 3643.

- [118] C. A. Strulson, R. C. Molden, C. D. Keating, P. C. Bevilacqua, *Nat. Chem.* **2012**, 4(11), 941–946.
- [119] B. Monterroso, S. Zorrilla, M. Sobrinos-Sanguino, C. D. Keating, G. Rivas, *Sci. Rep.* **2016**, 6(1), 35140.
- [120] Z. Zhao, Q. Li, X. Ji, R. Dimova, R. Lipowsky, Y. Liu, *J. Chromatogr. A* **2016**, 1452, 107–115.
- [121] G. Zijlstra, M. Michielsen, C. de Gooijer, L. van der Pol, J. Tramper, *Biotechnol. Prog.* **1996**, 12(3), 363–370.
- [122] S. Zimmermann, S. Gretzinger, P. K. Zimmermann, A. Bogsnes, M. Hansson, J. Hubbuch, *Biotechnol. J.* **2018**, 13(2), 1700250.
- [123] S. Alberti, A. Gladfelter, T. Mittag, *Cell* **2019**, 176(3), 419–434.
- [124] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chem Soc Rev* **2006**, 35(10), 858–875.
- [125] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, P. F. McMillan, *Rev. Mineral. Geochemistry* **2013**, 75(1), 607–648.
- [126] D. J. Wilton, M. Ghosh, K. V. A. Chary, K. Akasaka, M. P. Williamson, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36(12), 4032–4037.
- [127] S. Patra, C. Anders, N. Erwin, R. Winter, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, 56(18), 5045–5049.
- [128] S. Patra, C. Anders, P. H. Schummel, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, 20(19), 13159–13170.
- [129] S. Patra, V. Schuabb, I. Kiesel, J.-M. Knop, R. Oliva, R. Winter, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47(2), 981–996.
- [130] L. Arns, J.-M. Knop, S. Patra, C. Anders, R. Winter, *Biophys. Chem.* **2019**, 251(April), 106190.
- [131] L. E. Baltierra-Jasso, M. J. Morten, L. Laflör, S. D. Quinn, S. W. Magennis, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137(51), 16020–16023.
- [132] M. S. Long, C. D. Jones, M. R. Helfrich, L. K. Mangeney-Slavin, C. D. Keating, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102(17), 5920–5925.
- [133] H. Walter, D. E. Brooks, D. Fisher, *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems*, Elsevier, Orlando, **1985**.
- [134] Atto-Tec GmbH, „Foerster-radius of selected ATTO-Dye Pairs in Å (1 Å = 0.1 nm)“, **2009**.

- [135] S. Bamberger, G. V. Seaman, J. A. Brown, D. E. Brooks, *J. Colloid Interface Sci.* **1984**, 99(1), 187–193.
- [136] D. Forciniti, C. Hall, M.-R. Kula, *Fluid Phase Equilib.* **1991**, 61(3), 243–262.
- [137] J. Gaube, R. Hoechemer, B. Keil, A. Pfennig, *J. Chem. Eng. Data* **1993**, 38(2), 207–210.

Abkürzungsverzeichnis

ATPS	-	<i>engl.</i> aqueous two phase system
BSA	-	<i>engl.</i> bovine serum albumin
DNA	-	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid
DSC	-	<i>engl.</i> differential scanning calorimetry
FLCS	-	<i>engl.</i> fluorescence lifetime correlation spectroscopy
FRET	-	FÖRSTER-Resonanz-Energie-Transfer
HHP	-	hoher hydrostatischer Druck
LDH	-	Laktatdehydrogenase
LLPS	-	<i>engl.</i> liquid/liquid phase separation
PEG	-	Polyethylenglycol
PFK	-	Phosphofruktokinase
PIE	-	<i>engl.</i> pulsed interleaved excitation
PPC	-	<i>engl.</i> Pressure Perturbation Calorimetry
PSF	-	<i>engl.</i> point spread function
RNA	-	<i>engl.</i> ribonucleic acid
RNase A	-	Ribonuklease A
SASA	-	<i>engl.</i> solvent accessible surface area
SAXS	-	<i>engl.</i> small angle X-ray scattering
SNase	-	Staphylokokken-Nuklease
TCSPC	-	<i>engl.</i> time correlated single photon counting
TMAO	-	Trimethylamin- <i>N</i> -Oxid
TTTR	-	<i>engl.</i> time-tagged time-resolved
UV	-	ultraviolett

Anhang

- Streukurven der Ribonuklease A in Anwesenheit verschiedener Osmolyte bei 20 und 80 °C.
- Lizenz für DOI: 10.1002/cphc.201700762 des Verlags *John Wiley and Sons*
- Eidesstattliche Versicherung

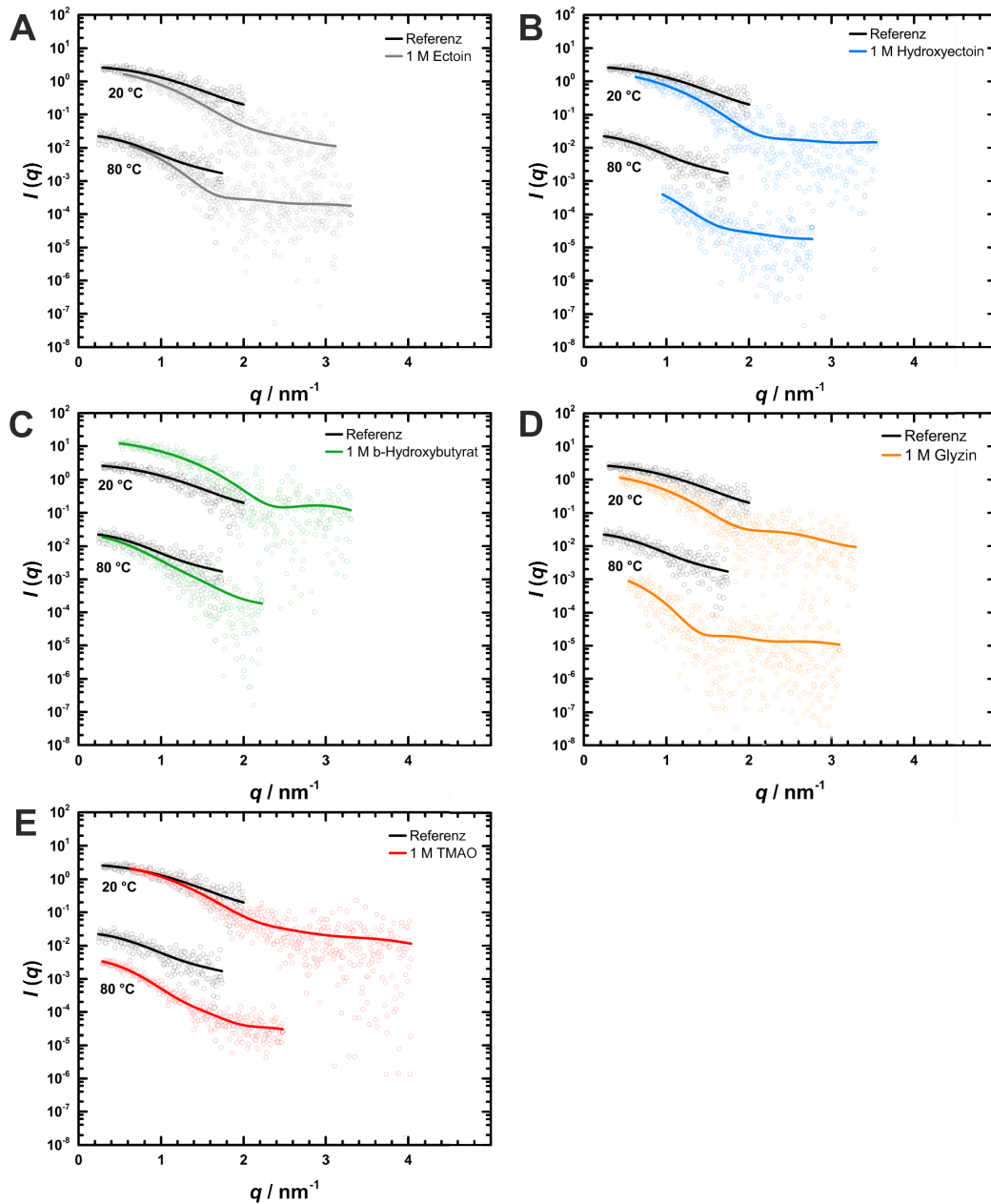


Abbildung 1 | Streukurven der Ribonuklease A in Anwesenheit der Osmolyte **A** Ectoin, **B** Hydroxyectoin, **C** Na- β -Hydroxybutyrat, **D** Glyzin und **E** TMAO im Vergleich zur Referenz in reinem Phosphatpuffer (0.1 mol L^{-1} , pH 7) bei 20 und 80 °C, $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Dec 04, 2020

This Agreement between Löttringhauser Str. 74 ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4961850213183
License date	Dec 04, 2020
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	ChemPhysChem
Licensed Content Title	Crowders and Cosolvents—Major Contributors to the Cellular Milieu and Efficient Means to Counteract Environmental Stresses
Licensed Content Author	Roland Winter, Gabriele Sadowski, Loana Ams, et al
Licensed Content Date	Sep 27, 2017
Licensed Content Volume	18
Licensed Content Issue	21
Licensed Content Pages	22

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Arns, Loana

Name, Vorname
(Surname, first name)

0113848

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, 25.06.2021

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Biophysikalische Studien zum Einfluss zytomimetischer Medien

auf das Konformationsgleichgewicht ausgewählter Biomoleküle

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, 25.06.2021

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)