

**Änderungen intramolekularer Abstände  
bei der Faltung des Kälteschockproteins  
aus *Bacillus caldolyticus***

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von  
**Christine Magg**

Bayreuth 2004

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2001 bis Oktober 2004 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Anleitung von Prof. Dr. Franz Xaver Schmid angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 15. Oktober 2004

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 21. Januar 2005

Erster Gutachter: Prof. Dr. Franz Xaver Schmid

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Carlo Unverzagt

## INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Proteinfaltung .....	1
1.2	Sichtweisen der Proteinfaltung: Chemische Reaktion oder Energiehyperfläche .....	2
1.3	Schnelle Faltung .....	4
1.4	Theorien zur schnellen Faltung .....	5
1.5	Bedeutung von Intermediaten für die Proteinfaltung .....	7
1.6	Der entfaltete Zustand von Proteinen .....	8
1.7	Das Kälteschockprotein aus <i>Bacillus caldolyticus</i> .....	9
1.8	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET).....	11
1.9	Problemstellung und Ziele der vorliegenden Arbeit .....	13
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	15
2.1	Materialien.....	15
2.1.1	<i>Bakterienstämme und Plasmide</i> .....	15
2.1.2	<i>Nährmedium</i> .....	15
2.1.3	<i>Enzyme</i> .....	16
2.1.4	<i>Standards</i> .....	16
2.1.5	<i>Chemikalien und Säulenmaterialien</i> .....	16
2.1.6	<i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	17
2.1.7	<i>Geräte</i> .....	17
2.1.8	<i>Software</i> .....	18
2.2	Elektrophoretische Methoden.....	18
2.2.1	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	18
2.2.2	<i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	19
2.2.3	<i>Diskontinuierliche Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i> .....	19
2.3	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	20
2.3.1	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Reinigung mit Silica</i> ..	20
2.3.2	<i>Plasmid-Präparation mit FlexiPrep-Kit</i> .....	20
2.3.3	<i>Sequenzspezifische Mutagenese (QuikChange)</i> .....	20
2.3.4	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR bzw. Kolonie-PCR)</i> .....	21
2.3.5	<i>Restriktion</i> .....	21
2.3.6	<i>Ligation</i> .....	22
2.3.7	<i>Herstellung und Transformation elektrokompetenter E. coli-Zellen</i> .....	22
2.3.8	<i>Herstellung und Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter E. coli-Zellen</i> .....	23
2.4	Proteinexpression und Reinigung.....	23
2.4.1	<i>Csp ohne Cysteinreste</i> .....	23
2.4.2	<i>Reinigung von Cystein-haltigem Csp bei Expression als lösliches Protein</i> .....	24
2.4.3	<i>Reinigung von Cystein-haltigem Csp aus hydrophobem Fusionsprotein</i> .....	26

2.5	Modifikation Cystein-haltiger Proteine .....	28
2.5.1	Modifikation mit 1,5-IAEDANS .....	28
2.5.2	Modifikation mit Iodacetamid .....	28
2.6	Synthese der Referenzverbindung Trp-EDANS .....	29
2.7	Spektroskopische Charakterisierung .....	30
2.7.1	Messung von Absorptionsspektren .....	30
2.7.2	Bestimmung des Absorptionskoeffizienten und der Konzentration von Proteinen .....	30
2.7.3	Circulardichroismus-Spektren .....	31
2.7.4	Fluoreszenzspektren .....	31
2.7.5	Gleichgewichts-Fluoreszenzanisotropie .....	32
2.7.6	Massenspektrometrische Untersuchung der Proteine .....	32
2.8	Konzentrationsbestimmung von GdmCl und Harnstoff .....	33
2.9	Bestimmung der konformationellen Stabilität von Bc-Csp .....	33
2.9.1	Auswertung und Messung Denaturierungsmittel-induzierter Übergänge .....	34
2.9.2	Auswertung und Messung thermisch induzierter Übergänge .....	35
2.10	Experimente zur Kinetik der Proteinfaltung .....	36
2.10.1	Kinetiken nach schneller Mischung .....	36
2.10.2	Messung von Kinetiken mit Drucksprüngen (p-Sprung) .....	37
2.10.3	Messung von Kinetiken mit Temperatursprüngen (T-Sprung) .....	38
2.11	Bestimmung von Abständen .....	38
2.11.1	Bestimmung der Quantenausbeute .....	39
2.11.2	Berechnung des charakteristischen Transferabstands $R_0$ .....	39
2.11.3	Bestimmung der Transfereffizienz und des apparenten Abstands $R$ .....	40
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	41
3.1	Auswahl der Positionen für Donor und Akzeptor .....	41
3.2	Tryptophan an verschiedenen Positionen in Bc-Csp* .....	43
3.2.1	Absorption .....	43
3.2.2	Circulardichroismus .....	44
3.2.3	Thermodynamische Stabilität der Bc-Csp*-Varianten .....	45
3.2.4	Fluoreszenzemission .....	46
3.2.5	Fluoreszenzanisotropie .....	50
3.2.6	Eignung der Tryptophan-Varianten für FRET-Experimente .....	51
3.3	Markierung Cystein-haltiger Proteine mit AEDANS .....	52
3.3.1	Massenspektrometrische Kontrolle der Markierung mit AEDANS .....	53
3.3.2	Absorptionseigenschaften des Akzeptors AEDANS .....	54
3.3.3	Beweglichkeit von proteingebundenem AEDANS .....	56
3.4	FRET von Tryptophan auf AEDANS .....	57
3.4.1	Fluoreszenzemission von AEDANS-markiertem Bc-Csp* .....	57
3.4.2	Einfluß von Abstandsänderungen auf die Fluoreszenz .....	58
3.4.3	Försterabstand $R_0$ .....	59

3.4.4	<i>Abstandsbestimmung aus Fluoreszenzspektren</i> .....	61
3.4.5	<i>Vergleich der berechneten Abstände mit Referenzdaten</i> .....	63
3.4.6	<i>FRET als Sonde in der Proteinfaltung</i> .....	65
3.5	Einfluß der AEDANS-Markierung auf die Stabilität und Faltungskinetik.....	66
3.5.1	<i>GdmCl-induzierte Entfaltungsübergänge</i> .....	66
3.5.2	<i>Stabilität der Donor-Akzeptor Proteine</i> .....	67
3.5.3	<i>Einfluß von Mutation und Markierung auf die Kinetik der Faltung</i> .....	72
3.6	Kinetik der Abstandsänderung bei der Faltung.....	77
3.6.1	<i>Geschwindigkeitskonstanten der Faltung</i> .....	77
3.6.2	<i>Amplituden der Faltungsreaktionen</i> .....	77
3.6.3	<i>Modelle des denaturierten Zustands unter Nativbedingungen und schneller Kollaps</i> .....	79
3.6.4	<i>Ausgeprägte Abstandsverkürzung bei 50→66, 50→24 und 50→2</i> .....	82
3.6.5	<i>Positionen mit geringer Abstandsverkürzung</i> .....	84
3.6.6	<i>FRET im früh strukturierten <math>\beta 1, \beta 2</math>-Bereich</i> .....	87
3.6.7	<i>Donor-Akzeptor Proteine ohne Tyrosin</i> .....	90
3.7	Zeitauflösung des Kollapses.....	93
3.7.1	<i>Drucksprung</i> .....	93
3.7.2	<i>Drucksprungexperimente im Übergangsbereich der GdmCl-induzierten Entfaltung</i> .....	94
3.7.3	<i>Drucksprungexperimente im Übergangsbereich der thermischen Entfaltung</i> ....	97
3.7.4	<i>Temperatursprung</i> .....	98
3.7.5	<i>Fazit der Drucksprung- und Temperatursprungmessungen</i> .....	102
3.8	Einfluß von Lösungsmittelzusätzen auf den kollabierten Zustand.....	103
3.8.1	<i>Effekte von Lösungsmittelzusätzen auf die Stabilität von Proteinen</i> .....	103
3.8.2	<i>Rückfaltung von Bc-Csp* in Gegenwart von Lösungsmittelzusätzen</i> .....	104
4	ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION.....	111
4.1	Abstandsänderungen in den Donor-Akzeptor Proteinen.....	111
4.2	Schneller Kollaps in verschiedenen Varianten von Bc-Csp*.....	112
4.3	Charakterisierung des kollabierten Zustands.....	114
4.4	Bedeutung des Kollapses für die Proteinfaltung.....	117
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	121
6	SUMMARY.....	123
7	ABKÜRZUNGEN.....	125
8	LITERATUR.....	127
9	DANKSAGUNG.....	135



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Proteinfaltung

Proteine sind die vielseitigste Klasse von biologischen Makromolekülen. Sie sind als Biokatalysatoren aktiv, transportieren niedermolekulare Substanzen, bilden biologische Strukturen aus, regulieren zelluläre Vorgänge, wehren Krankheitserreger ab und vieles mehr. Dieses breite Spektrum von Aufgaben wird fast immer durch die spezifische dreidimensionale Struktur der Proteine vermittelt. Die Anordnung der Peptidkette im Raum (Topologie) bestimmt z.B. die Wechselwirkung mit anderen Makromolekülen oder den Aufbau von katalytisch aktiven Zentren. Für die Funktion eines Proteins ist neben der definierten Struktur auch die Dynamik wichtig. Diese wird durch die nur geringe thermodynamische Stabilität des gefalteten Zustands im Vergleich zum entfalteten Zustand erreicht. Zwar wurden auch intrinsisch unstrukturierte Proteine beschrieben (Uversky, 2002), die weit überwiegende Zahl aller natürlichen Peptidketten faltet sich jedoch zu geordneten, nativen Strukturen. Die Information für den Faltungsprozeß ist in der Aminosäuresequenz des Proteins enthalten (zweite Hälfte des genetischen Codes, (Goldberg, 1985)), und bewirkt dadurch die reversible Faltung vieler Proteine.

Die zentrale Fragestellung der Proteinfaltung lautet, wie aus der linearen Peptidkette die native Konformation entsteht. Proteine sind sehr komplexe Moleküle mit Tausenden von Atomen und besitzen daher extrem viele Anordnungsmöglichkeiten im Raum. Würde die Faltung eines Proteins auf dem zufälligen Absuchen des gesamten Konformationsraums beruhen, könnte ein Protein nicht in einer beobachtbaren Zeit falten (Levinthal, 1969). Tatsächlich falten Proteine im Bereich von Mikrosekunden bis Tagen, und deshalb müssen gezielte Wechselwirkungen die Faltung beschleunigen. Dieses Konzept der Faltungswege geht davon aus, daß der native Zustand in einer zeitlichen Abfolge von Ereignissen erreicht wird (Levinthal, 1968).

Durch jahrzehntelange Forschung sind inzwischen sehr viele Details über Faltungsvorgänge bekannt und die Faltungswege einzelner Proteine sehr gut untersucht. Proteine unterscheiden sich sehr stark im Hinblick auf die Zeitkonstante der Bildung des nativen Zustands und dem Vorliegen von Intermediaten bei der Faltung. Außerdem bestimmt häufig die Domänenstruktur oder die Oligomerisierung eines Proteins seinen Faltungsmechanismus. Aus den jetzigen Erkenntnissen über die Proteinfaltung kann kein allgemein gültiger Mechanismus abgeleitet werden, vielmehr scheinen verschiedene Faltungsmechanismen für unterschiedliche Proteinfamilien zu existieren. Die extreme strukturelle und funktionelle Diversität der Proteine spiegelt sich auch in verschiedenen Faltungsverläufen wider (Schmid, 1999).

Noch ist die Stabilität von Proteinen auf molekularer Ebene besser verstanden als ihre Faltung. Dieses Wissen wurde kürzlich zum rechnergestützten Design eines künstlichen Proteins eingesetzt, das eine in der Natur bisher nicht gefundene Topologie besitzt (Dantas *et al.*, 2003; Kuhlman *et al.*, 2003). Außerdem wurden Proteine in Designstudien stabilisiert (Dantas

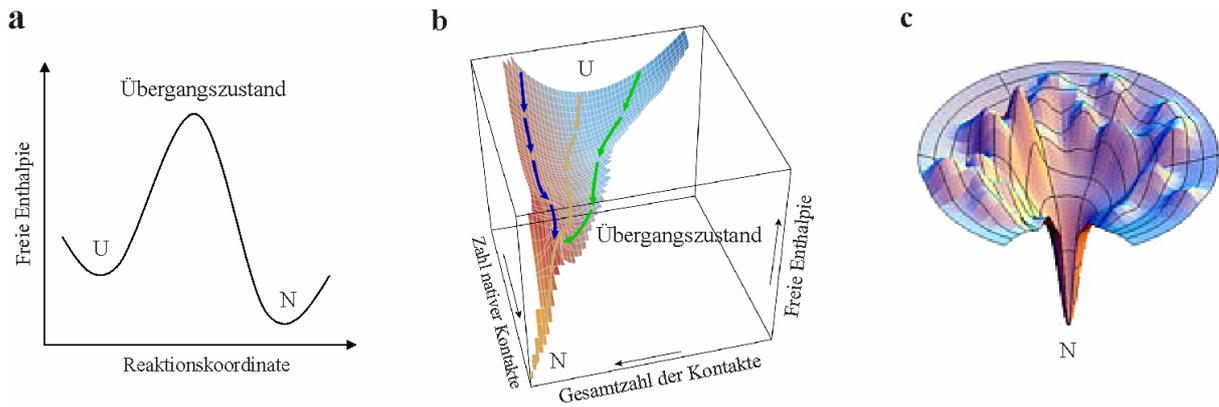
*et al.*, 2003) oder die Bindungseigenschaften verändert (Looger *et al.*, 2003). Inzwischen ist es Hellinga und Mitarbeitern sogar gelungen, eine enzymatische Aktivität in ein ursprünglich nicht katalytisch aktives Protein einzuführen (Dwyer *et al.*, 2004). Das Proteindesign trägt auch erste Erkenntnisse zur Proteinfaltung bei (Kuhlman & Baker, 2004). Die Proteine G und L sind strukturell ähnlich, unterscheiden sich aber in der Abfolge der Faltung von zwei  $\beta$ -*hairpin*-Bereichen. Durch Proteindesign konnte die Reihenfolge dieser Strukturierung vertauscht werden, so daß Protein G mit der Charakteristik von Protein L faltet und umgekehrt (Nauli *et al.*, 2001).

Die computergestützte Simulation von Faltungswegen ist auf atomarer Ebene durch Moleküldynamikrechnungen möglich. Durch die stark gestiegene Rechnerkapazität kann eine große Zahl von Zeitverläufen im Nanosekundenbereich simuliert werden. Für schnell faltende Proteine können in der resultierenden Gesamtzeit aus allen Berechnungen (mehrere Mikrosekunden) wenige Faltungsereignisse beobachtet werden. Für die aus 35 Aminosäuren bestehende Subdomäne Villin *headpiece* wurde aus Simulationen eine Zeitkonstante von 5  $\mu$ s vorhergesagt (Zagrovic *et al.*, 2002), die experimentell bestätigt werden konnte (Kubelka *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003a). Noch sind die vorhergesagten Faltungsraten mit großen Unsicherheiten belastet, und die Interpretation der erhaltenen Strukturen im Sinne von Faltungswegen ist schwierig (Kubelka *et al.*, 2004).

## 1.2 Sichtweisen der Proteinfaltung: Chemische Reaktion oder Energiehyperfläche

Klassischerweise wird die Proteinfaltung mit einer chemischen Reaktion verglichen: Der entfaltete Zustand U des Proteins muß entlang der Reaktionskoordinate den energiereichen Übergangszustand überwinden, um zur nativen Struktur N zu gelangen (Abbildung 1.1a). Dieser Reaktionsverlauf steht im Einklang mit der von Levinthal begründeten Vorstellung eines definierten, sequentiellen Faltungsweges (Levinthal, 1968). Sowohl die thermodynamische Stabilität von Proteinen als auch das Auftreten exponentieller Zeitverläufe der Faltung werden durch dieses Reaktionsschema erklärt. Allerdings stellt es eine starke Vereinfachung der Situation dar. Ein Protein liegt nur im nativen Zustand in einer einheitlichen dreidimensionalen Struktur vor; der denaturierte Zustand dagegen besteht aus einem Ensemble verschiedener Konformationen. Die Existenz einer Energiebarriere zwischen N und U sollte die Faltung eines Proteins verlangsamen und kann daher nicht die extrem schnelle Faltung einiger Proteine in wenigen Mikrosekunden erklären.

Eine neue Sichtweise der Proteinfaltung („*new view*“) ergab sich aus Simulationen von Faltungsvorgängen in Modellen mit niedriger Auflösung (Baldwin, 1994). Die Reste eines Proteins werden z.B. als Kette von Kugeln dargestellt, die sich auf einem würfelförmigen Gitter anordnen können. Durch Monte Carlo Simulation werden alle möglichen Anordnungen der Kugeln auf den Gitterplätzen erzeugt und deren Energieinhalt bestimmt (Sali *et al.*, 1994a; Sali *et al.*, 1994b; Dobson *et al.*, 1998). Die Berechnungen zeigen, daß Moleküle mit einer



**Abbildung 1.1:** Verschiedene Sichtweisen der Proteinfaltung. (a) Analogie zu einer chemischen Reaktion mit eindeutig definiertem entfalteten (U), nativen (N) und Übergangszustand. (b) „new view“ der Proteinfaltung mit verschiedenen Faltungswegen ausgehend vom Ensemble des denaturierten Zustands, modifiziert nach Dobson, 2003. Die Oberfläche wurde aus der Computersimulation eines stark vereinfachten Modells für die Faltung eines kleinen Proteins erhalten. (c) Faltungstrichter als Veranschaulichung für schnelle Faltungsreaktionen. Das Ensemble des entfalteten Zustands am Rand des Trichters kann über vielfältige Faltungswege den nativen Zustand erreichen. Abbildung entnommen aus Chan & Dill, 1998.

bestimmten Sequenz entlang verschiedener Faltungswege falten können. Möglicherweise verläuft auch die Proteinfaltung über verschiedene, parallele Faltungswege und Übergangszustände, die vom Ausgangszustand der Faltungsreaktion abhängen (Baldwin, 1994; Sali *et al.*, 1994a). Dadurch ergibt sich eine Energiehyperfläche zwischen dem Ensemble des entfalteten Zustands und dem nativen Zustand des Proteins. Alle Faltungswege verlaufen innerhalb dieser Energiehyperfläche. Eine vereinfachte schematische Darstellung einer solchen Energiehyperfläche für ein kleines Protein und mögliche Faltungswege sind in Abbildung 1.1b skizziert. Das zweidimensionale, klassische Bild der Energiebarriere (Abbildung 1.1a) wird um eine Koordinate (Gesamtzahl der Kontakte) erweitert, und eine dreidimensionale, aber trotzdem noch übervereinfachte Darstellung erhalten. In einfachen Gittermodellen existiert ein nativer Zustand mit der niedrigsten freien Enthalpie, die Komplexität steigt mit der Kettenlänge, und es werden exponentielle Faltungskinetiken erhalten. Deshalb werden diese Modelle für die Simulation von Faltungsvorgängen verwendet (Schonbrun & Dill, 2003).

Eine noch bildlichere Darstellung der Proteinfaltung sind die sogenannten Faltungstrichter (Wolynes *et al.*, 1995). In Abbildung 1.1c ist der Faltungstrichter eines schnell faltenden Proteins dargestellt (Dill & Chan, 1997). Die verschiedenen Konformationen des entfalteten Zustands am Rande des Trichters haben sehr viele Möglichkeiten, sich entlang der Energiehyperfläche in den nativen Zustand umzuwandeln. Das Fehlen von Energiebarrieren wird als *downhill* Faltung bezeichnet (Sabelko *et al.*, 1999). Die Form der Energiehyperfläche erklärt damit sehr einfach die schnelle Faltung von Proteinen. Trotzdem wird auch in der Abwesenheit von Energiebarrieren eine exponentielle Faltungsreaktion beobachtet. Der zentrale Bereich des Faltungstrichters mit einer stark geneigten Energiehyperfläche wird sehr einfach erreicht. Dort sammeln sich allerdings nativähnliche Konformationen an, die nur noch sehr wenige Möglichkeiten haben, weitere native Kontakte zu bilden und deshalb langsam falten

(Zwanzig, 1997; Schonbrun & Dill, 2003). Diese Konformationen müssen ähnlich wie der Übergangszustand in der klassischen Darstellung durchlaufen werden. Hier handelt es sich aber um stark populierte Zustände, wogegen sich der Übergangszustand aufgrund seines hohen Energiegehalts kaum anreichert.

Die Erweiterung der klassischen Sichtweise zu einer Energiehyperfläche trägt der speziellen Energetik der Proteinfaltung Rechnung. Im Gegensatz zu der Reaktion niedermolekularer Moleküle werden bei der Faltung keine kovalenten Bindungen gespalten oder gebildet, sondern die Enthalpie ändert sich durch viele schwache Wechselwirkungen innerhalb der Peptidkette. Deshalb kann die Proteinfaltung nur durch ein Netzwerk von einzelnen Konformationsänderungen zustande kommen (Onuchic & Wolynes, 2004), das durch die Energiehyperfläche und parallele Faltungswege beschrieben wird. Ein zusätzlicher Aspekt ist die Abnahme der Kettenentropie bei der Faltung zur nativen Struktur. Dadurch wird ein Großteil des Enthalpiegewinns der Faltung aufgehoben. Eine Verengung der Energiehyperfläche symbolisiert das Absinken der Entropie.

### 1.3 Schnelle Faltung

In den letzten Jahrzehnten sind die Methoden zur Messung schneller Kinetiken kontinuierlich verbessert worden. So wurde z.B. die Totzeit von *stopped-flow*-Geräten (ca. 1 ms) durch die Weiterentwicklung zu *continuous-flow*-Apparaturen auf 50-100  $\mu$ s verringert (Chan *et al.*, 1997; Shastry *et al.*, 1998). Dabei werden zwei strömende Lösungen in einem turbulenten Mischer vereinigt, und das Signal der resultierenden, ebenfalls strömenden Lösung in einem Bereich von mehreren Zentimetern nach dem Mischungspunkt aufgezeichnet. Bei bekannter Strömungsgeschwindigkeit ergibt sich dadurch der Zeitverlauf der Faltung. Noch bessere Zeitauflösungen können durch Laser-induzierte Temperatursprünge erzielt werden. Die Erwärmung der Proteinlösung kann bereits nach 100 ps abgeschlossen sein (Phillips *et al.*, 1995). Durch NMR-Linienformanalyse können außerdem schnelle Faltungsraten aus Gleichgewichtsmessungen bestimmt werden (Huang & Oas, 1995; Wang *et al.*, 2003a).

Schnell faltende Proteine sind meist kleine Eindomänenproteine mit weniger als 100 Aminosäuren (Kubelka *et al.*, 2004), die keine Disulfidbrücken oder *cis*-Peptidyl-Prolyl-Bindungen enthalten. Die Faltungsreaktionen sind monoexponentiell und zeigen die direkte Umwandlung des nativen in den entfalteten Zustand und umgekehrt. Stabile Faltungsintermediate treten nicht auf, und deshalb spricht man auch von einem Zweizustandsverhalten der Faltung. Die Faltungsraten der Zweizustandsproteine liegen im Bereich von Mikrosekunden bis Sekunden (Gillespie & Plaxco, 2004). Zur Zeit ist eine Mutante der B-Domäne des Proteins A aus *Staphylococcus aureus* mit einer Zeitkonstante von 3  $\mu$ s eines der am schnellsten faltenden, bekannten Proteine (Arora *et al.*, 2004). Nur wenig langsamer falten Villin *head-piece* (Kubelka *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003a) mit einer Zeitkonstante von 5  $\mu$ s oder die *Engrailed homeodomain* mit einer Zeitkonstante von 25  $\mu$ s (Mayor *et al.*, 2000).

Alaninreiche Modellpeptide von  $\alpha$ -Helices falten im Zeitbereich von 0,5  $\mu$ s (Wang *et al.*, 2003b). Dagegen ist die Bildung eines  $\beta$ -*hairpin* langsamer und findet innerhalb von ca. 10  $\mu$ s statt (Munoz *et al.*, 1997; Kubelka *et al.*, 2004). In einer  $\alpha$ -Helix bilden sich ausschließlich lokale Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren  $i$  und  $i+4$  aus. Dagegen müssen in einem  $\beta$ -*hairpin* Kontakte zwischen weiter entfernten Aminosäuren zustande kommen, was offensichtlich langsamer erfolgt als die Faltung einer  $\alpha$ -Helix. Auch die ultraschnell faltenden Proteine Villin *headpiece* (35 Aminosäuren, Zeitkonstante 5  $\mu$ s) und B-Domäne des Proteins A (60 Aminosäuren, Zeitkonstante 3  $\mu$ s) sind helikale Proteine. Die WW-Domänen der Proteine Pin bzw. FBP28 (34 bzw. 37 Aminosäuren) sind mit Zeitkonstanten von 80 bzw. 30  $\mu$ s die am schnellsten faltenden  $\beta$ -Faltblattproteine (Ferguson *et al.*, 2001; Jäger *et al.*, 2001). Generell kann die Faltung  $\alpha$ -helikaler Proteine schneller ablaufen als diejenige ähnlich großer  $\beta$ -Faltblattproteine. Für diese ultraschnell faltenden Proteine wird eine *downhill* Faltung ohne Energiebarriere diskutiert (Kubelka *et al.*, 2004).

#### 1.4 Theorien zur schnellen Faltung

Die schnelle Faltung von Proteinen erfolgt meist ohne die Bildung von Intermediaten nach dem Zweizustandsmodell. Die Zeitkonstanten der Faltung variieren dabei in einem Bereich von sechs Größenordnungen zwischen Mikrosekunden und Sekunden (Plaxco *et al.*, 2000; Gillespie & Plaxco, 2004). Eine Theorie der Faltung, die alle Details des Vorganges erfasst, sollte diesen enormen Unterschied in den Faltungsgeschwindigkeiten erklären können (Gillespie & Plaxco, 2004).

Aus der Simulation der Faltung in einfachen Gittermodellen wurden mögliche Zusammenhänge abgeleitet: Die Faltung könnte von der Rauheit der Energiehyperfläche bestimmt werden. In Gittermodellen treten bei rauhen Energiehyperflächen aber auch komplexe Zeitverläufe auf (Onuchic *et al.*, 1997). Eine raue Energiehyperfläche kann die Faltung verlangsamen, erklärt aber nicht den Zeitbereich von sechs Größenordnungen. Ein weiteres Kriterium für die schnelle Faltung könnte der energetische Abstand der stabilsten nativen Konformation zu den übrigen energieniedrigsten Konformationen sein (Sali *et al.*, 1994a). Diese Energielücke ist experimentell nicht zugänglich; eine Abschätzung des Energieunterschieds über die thermische Stabilität des Proteins korreliert nicht mit den Faltungsraten (Gillespie & Plaxco, 2004). In Gittermodellen kommt es zu einem unspezifischen *coil-to-globule* Kollaps aufgrund der schlechten Löslichkeit der Kette (Baysal & Karasz, 2003). Der Unterschied der Übergangsmittelpunkte des Kollapses und der Faltungsreaktion bestimmt die Geschwindigkeit der Faltungsreaktion. Für die bisher untersuchten Proteine stimmen beide Übergänge überein und zeigen damit die schnelle Faltung an (Millett *et al.*, 2002b). Dieses Kriterium kann aber unterschiedlich große Faltungsraten nicht erklären.

Proteine auf Gittern stellen äußerst vereinfachte Modelle für die Proteinfaltung dar. So zeigen die meisten Gittermodelle rauhe Energiehyperflächen, reale Proteine dagegen scheinen

eher glatte Energiehyperflächen zu besitzen (Gillespie & Plaxco, 2004). Die rauhe Energiehyperfläche kann entweder durch die Einschränkung der Anordnungsmöglichkeiten im Gittermodell verursacht werden, oder es haben sich in der Evolution Proteine mit glatten Energiehyperflächen durchgesetzt. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist die geringe Stabilität des nativen Zustands in Gittermodellen durch viele konkurrierende Wechselwirkungen. Eine Veränderung der Sequenz (entsprechend einer Mutation) kann das globale Minimum stark verschieben und damit den nativen Zustand verändern. Dies könnte bei einem Protein zum Funktionsverlust führen. Durch die Evolution wurden deshalb Sequenzen selektiert, in denen sich die Wechselwirkungen innerhalb der Kette gegenseitig verstärken anstatt miteinander in Konkurrenz zu treten (Onuchic & Wolynes, 2004). Daraus resultiert die hohe Kooperativität der Proteinfaltung. Es müssen bereits etwa 90 % der nativen Wechselwirkungen gebildet sein, um den Entropieverlust bei der Einschränkung des Konformationsraumes auszugleichen (Gillespie & Plaxco, 2004). Simulationen geben die Kooperativität nur ungenügend wieder.

Auch aus experimentellen Daten wurden verschiedene Modelle abgeleitet (Myers & Oas, 2002; Gillespie & Plaxco, 2004). Die Faltungsraten hängen kaum von der Stabilität des Proteins, von einzelnen Mutationen oder von der Länge der Peptidkette ab. Allerdings wurde ein Zusammenhang zwischen der Topologie des Proteins und der Faltungsrate festgestellt. Kooperative lokale Wechselwirkungen bilden sich schneller als kooperative nichtlokale und erklären damit die höheren Faltungsraten  $\alpha$ -helikaler Proteine im Vergleich zu  $\beta$ -Faltblattproteinen (Baker, 2000; Gillespie & Plaxco, 2004). Zahlreiche Untersuchungen zeigen aber auch, daß die Topologie nicht allein bestimmend für die Faltungsrate ist: Das Redesign von natürlichen Proteinen verändert nicht deren Topologie, aber ihre Faltungsraten (Scalley-Kim & Baker, 2004). Die zirkulare Permutation des ribosomalen Proteins S6 führt zu identischen Faltungsraten, obwohl sich der Anteil lokaler und nicht-lokaler Wechselwirkungen verändert (Miller *et al.*, 2002).

Nach dem Nukleations-Kondensations-Modell ist die Kondensation der Kette mit der Bildung eines Faltungskerns im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt gekoppelt (Fersht, 1995). Viele Reste tragen zur Stabilisierung des Übergangszustands bei. Der Faltungskern hat praktisch native Struktur, während der Rest des Proteins noch expandiert vorliegt.

Beim Diffusions-Kollisions-Mechanismus wird die transiente Bildung instabiler Sekundärstrukturelemente angenommen. Durch Diffusion treffen strukturierte Bereiche aufeinander und bilden ebenfalls instabile Mikrodomänen und schließlich das native Protein (Karplus & Weaver, 1994). Es ist sowohl die Bildung eines definierten Übergangszustands als auch eines Ensembles von verschiedenen Übergangszuständen denkbar. Sind Bereiche der Peptidkette im entfalteten Zustand strukturiert, können diese auch zum Übergangszustand beitragen. So ist z.B. bei Protein L der erste  $\beta$ -hairpin in 2 M GdmCl ausgebildet (Yi *et al.*, 2000) und dominiert auch die Struktur des Übergangszustands (Kim *et al.*, 2000). Äquivalent zum Diffusions-Kollisions-Mechanismus ist das Topomersuche-Modell, in dem die entfaltete

Kette durch Diffusion verschiedene Topologien einnimmt, und das zufällig auftretende native Topomer durch native Wechselwirkungen stabilisiert wird (Gillespie & Plaxco, 2004).

Bei der Faltung eines Proteins muß immer die Abnahme der Kettenentropie durch energetisch günstige Wechselwirkungen ausgeglichen werden. Neben spezifischen, elektrostatischen Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen (Mirsky & Pauling, 1936) spielen vor allem hydrophobe Wechselwirkungen eine große Rolle (Kauzmann, 1959). Dabei werden unpolare Gruppen aus der wäßrigen Lösung in eine ebenfalls unpolare Umgebung im Proteininneren überführt. Der Beitrag von Wasserstoffbrücken bzw. hydrophoben Wechselwirkungen wurde kontrovers diskutiert, und bei der Bildung teilgefalteter Gleichgewichtszustände von 41 globulären Proteinen auch experimentell untersucht (Uversky & Fink, 2002). Wasserstoffbrücken führen zur Ausbildung von Sekundärstrukturen und können durch Circular dichroismus (CD) nachgewiesen werden; hydrophobe Wechselwirkungen äußern sich in einer Abnahme des Stokes-Radius eines Proteins (hydrophober Kollaps). Bei den untersuchten Proteinen korreliert die Kompaktheit der Intermediate stark mit der Bildung geordneter Sekundärstruktur, d.h. die Beiträge von Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen können nicht getrennt werden.

### 1.5 Bedeutung von Intermediaten für die Proteinfaltung

Ursprünglich wurde angenommen, daß die Bildung von Intermediaten den zugänglichen Konformationsraum der Peptidkette stark einschränkt und daher zu einer Beschleunigung der Proteinfaltung führt (Kim & Baldwin, 1982). Tatsächlich wurden bei einigen Proteinen wie z.B. Ubiquitin (Khorasanizadeh *et al.*, 1996) oder Lysozym (Parker *et al.*, 1995) teilgefaltete Zustände gefunden. Produktive *on-pathway* Intermediate erhöhen die Faltungsrate, *off-pathway* Intermediate hingegen verlangsamen die Faltung eines Proteins. Die freie Enthalpie eines Intermediates im Vergleich zum nativen und entfalteten Zustand entscheidet darüber, ob das Intermediat im Gleichgewicht angereichert wird (Stabilität zwischen N und U), oder ob es nur vorübergehend bei der Faltungsreaktion auftritt (instabiler als N und U). Die Bedeutung von Intermediaten für eine effiziente Faltung wird durch die Zweizustandsfaltung in Frage gestellt. Proteine, die Intermediate ausbilden, falten meist langsamer als Zweizustandsproteine. Der fehlende Nachweis von Intermediaten bei der Zweizustandsfaltung muß nicht bedeuten, daß keine teilgefalteten Zustände zwischen N und U existieren. Allerdings besitzen sie eine höhere Energie als U und N und reichern sich daher nicht an (Myers & Oas, 2002). Auch bei einigen schnell faltenden Proteinen wurden Intermediate nachgewiesen. So bildet das bakterielle Immunitätsprotein Im7 unter verschiedenen Bedingungen ein *on-pathway* Intermediat (Capaldi *et al.*, 2001); das ribosomale Protein S6 zeigt normalerweise ein Zweizustandsverhalten, aber in Gegenwart von Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tritt in der Faltung ein nichtnatives Intermediat auf (Otzen & Oliveberg, 1999). Ob bei der Faltung eines Proteins Intermediate auftreten, hängt

davon ab, wo sich das Intermediat auf der Energiehyperfläche des jeweiligen Proteins unter den gegebenen Lösungsmittelbedingungen befindet.

Die Bildung von Intermediaten kann direkt durch schnelle Meßverfahren (1.3) oder indirekt durch Signaländerungen in der Totzeit der Faltungsreaktion nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz ist empfindlich für die Entstehung der Tertiärstruktur, CD für Sekundärstrukturelemente und Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) für den Trägheitsradius  $R_g$  des Proteins. Daneben kann auch der schnelle Schutz der Amidprotonen gegen Austausch mit dem Lösungsmittel zum Nachweis von Intermediaten verwendet werden (Englander, 2000).

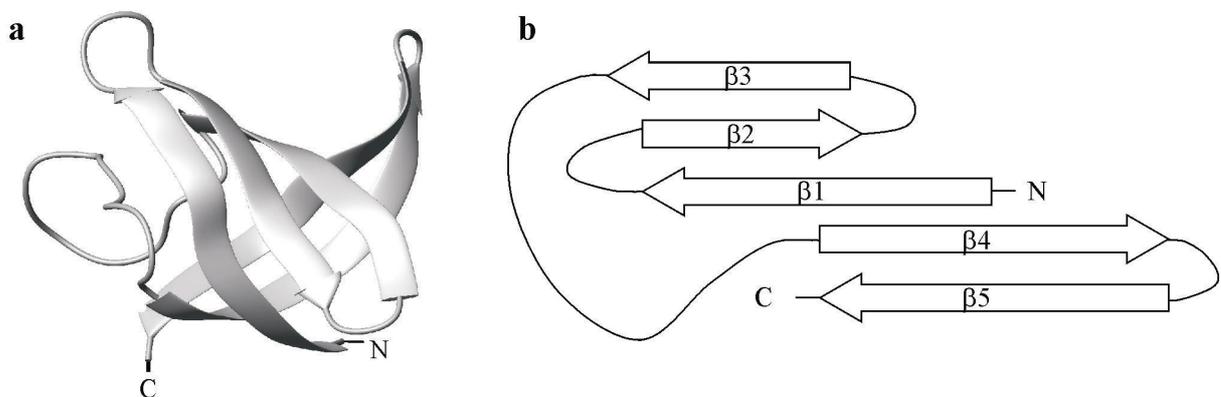
## 1.6 Der entfaltete Zustand von Proteinen

In den letzten Jahren ist der entfaltete Zustand eines Proteins zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Ursprünglich wurde angenommen, daß entfaltete Proteine alle möglichen Konformationen mit gleicher Wahrscheinlichkeit einnehmen. Tatsächlich können in entfaltenen Proteinen in der Regel keine Sekundärstrukturen mit Circular dichroismus nachgewiesen werden. Neuere Untersuchungen mit magnetischer Kernresonanz bieten einen anderen Blickwinkel, da nicht die gemittelten Eigenschaften der gesamten Peptidkette gemessen werden, sondern Informationen über einzelne Reste des Proteins erhalten werden. So wurden bei Lysozym selbst in 8 M Harnstoff definierte Anordnungen von hydrophoben Aminosäuren gefunden (Klein-Seetharaman *et al.*, 2002), obwohl Harnstoff hydrophobe Wechselwirkungen stört. Auch in einer dauerhaft entfaltenen Variante der Staphylokokken-Nuklease wurden Reste nativer Topologie nachgewiesen (Shortle & Ackerman, 2001).

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, daß in entfaltenen Proteinen die Rückgratwinkel  $\phi$  und  $\psi$  jeder Aminosäure sterisch unabhängig sind von der Konformation der benachbarten Aminosäuren (Flory, 1969). Der numerische Vergleich der möglichen Konformationen eines Polyalaninpeptids zeigt aber, daß die zugänglichen Rückgratkonformationen durch sterische Einflüsse beschränkt werden (Pappu *et al.*, 2000). Der Effekt benachbarter Reste wird möglicherweise durch die Solvation des Peptidrückgrats bestimmt, wobei die Seitenketten das Wasser von den Kopfgruppen abschirmen (Avbelj & Baldwin, 2004). Mit verschiedenen experimentellen Methoden wurde in Peptiden die gestreckte Polyprolin II-Konformation nachgewiesen (Baldwin, 2002). Die Annahme zufälliger Konformationen eines entfaltenen Proteins ist nur bei der Betrachtung der gesamten Kette sinnvoll, auf lokaler Ebene ist der Konformationsraum eingeschränkt. Es wird diskutiert, ob im denaturierten Zustand bereits nativähnliche Strukturen vorhanden sind. Zumindest scheint die Entropie des entfaltenen Zustands kleiner zu sein als lange angenommen, so daß bei der Faltung ein geringerer Entropieverlust auftritt und dadurch die Bildung der nativen Struktur erleichtert wird (Pappu *et al.*, 2000).

### 1.7 Das Kälteschockprotein aus *Bacillus caldolyticus*

In vielen prokaryontischen Organismen werden bei starker Erniedrigung der Wachstumstemperatur unter anderem kleine Kälteschockproteine (Csp) exprimiert (Graumann & Marahiel, 1998; Ermolenko & Makhatadze, 2002). Dabei handelt es sich um Eindomänenproteine mit knapp 70 Aminosäuren. Verschiedene Csp's aus demselben Organismus zeigen häufig eine ausgeprägte Sequenzhomologie. Diese ist beim Vergleich der Proteine aus verschiedenen Organismen weniger ausgeprägt, aber alle Csp's besitzen dieselbe Topologie der nativen Struktur. Zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter aus drei ( $\beta 1$ - $\beta 3$ ) bzw. zwei ( $\beta 4$ - $\beta 5$ ) Strängen ergänzen sich zu einem sogenannten  $\beta$ -barrel (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2:** Struktur des Kälteschockproteins Csp aus *Bacillus caldolyticus*. (a) Bänderdarstellung der Kristallstruktur von *Bc*-Csp (Mueller *et al.*, 2000); die Abbildung wurde mit MOLMOL erstellt (Koradi *et al.*, 1996). (b) Zweidimensionale Projektion der Anordnung der Faltblattstränge in der nativen Struktur. Das  $\beta$ -barrel wird zwischen den Faltblattsträngen  $\beta 3$  und  $\beta 5$  geschlossen.

Die homologen Proteine CspB aus dem mesophilen Organismus *Bacillus subtilis* (*Bs*-CspB), Csp aus dem thermophilen Organismus *Bacillus caldolyticus* (*Bc*-Csp) und Csp aus dem hyperthermophilen Organismus *Thermotoga maritima* unterscheiden sich kaum in ihrer Faltungsgeschwindigkeit. Sie falten bei 25 °C sehr schnell innerhalb von 1 ms, haben aber unterschiedliche Entfaltungsraten, die zur unterschiedlichen Stabilität der Proteine führen (Perl *et al.*, 1998). Die Csp's sind gute Modelle für das Zweizustandsverhalten bei der Proteinfaltung, da sich bisher keine Hinweise auf das Vorliegen von Intermediaten ergeben haben (Schindler *et al.*, 1995). Die Faltung von *Bs*-CspB wird durch die Viskosität der Lösung beeinflusst, d.h. die Peptidkette diffundiert während der Faltung im Lösungsmittel (Jacob *et al.*, 1997).

Der Übergangszustand der Faltung von *Bs*-CspB bzw. *Bc*-Csp ist, im Hinblick auf die Wechselwirkung mit Denaturierungsmitteln, zu etwa 90 % nativähnlich (Perl *et al.*, 1998). Bei der Faltung eines  $\beta$ -Faltblattproteins müssen gleichzeitig viele nichtlokale Wechselwirkungen gebildet werden, und somit ähnelt der Übergangszustand dem nativen Protein. Mutationen oder Sequenzunterschiede zwischen homologen Proteinen ändern diesen Übergangszustand kaum, da es vermutlich keine alternativen Strukturen mit ähnlich niedriger Energie gibt.

Im Gegensatz dazu verändern Mutationen in  $\alpha$ -helikalen Proteinen häufig den Übergangszustand, da durch lokale Wechselwirkungen verschiedene energiearme Zustände zugänglich sind (Burton *et al.*, 1997).

Durch Mutationsanalyse wurde die Energetik des Übergangszustands von *Bs*-CspB auf der Ebene einzelner Aminosäuren charakterisiert (Garcia-Mira *et al.*, 2004). Die meisten Reste bilden im Übergangszustand noch keine der Interaktionen wie im nativen Zustand aus, wenige Reste vor allem im Faltblattstrang  $\beta 1$  sind aber schon in nativähnliche Wechselwirkungen eingebunden. Im Faltblattstrang  $\beta 4$  sind an wenigen Positionen die nativen Interaktionen zumindest teilweise ausgebildet. Der Kontakt zwischen  $\beta 1$  und  $\beta 4$  und damit zwischen den beiden Faltblättern ( $\beta 1$ - $\beta 3$  und  $\beta 4$ - $\beta 5$ ) ist also bereits im Übergangszustand vorhanden.

Auch theoretische Arbeiten haben sich mit der Faltung von *Bs*-CspB beschäftigt. Die Berechnung der Nativähnlichkeit einzelner Aminosäuren im Übergangszustand führt zu einem zweigeteilten Bild: Das erste Faltblatt ist laut der Vorhersage bereits gefaltet, während  $\beta 4$  und  $\beta 5$  noch nicht nativähnlich sind (Alm *et al.*, 2002). Die Berechnungen ergeben im Vergleich mit den experimentellen Ergebnissen ein sehr stark vereinfachtes Bild, da keine Details über die Eigenschaften der einzelnen Faltblattstränge oder Aminosäuren erhalten werden.

Experimente oder Berechnungen zur Nativähnlichkeit des Übergangszustands zeigen den Energieinhalt dieses Zustands auf. Es werden allerdings keine Informationen über den Faltungsweg erhalten. Modelle zum Faltungsverlauf wurden durch theoretische Berechnungen entwickelt, in denen jedoch der Übergangszustand als energiereichste Konformation häufig schwierig zu identifizieren ist. Die Vorhersage von Faltungswegen mit möglichst niedrigem Entropieverlust geht davon aus, daß ein Protein durch die aufeinanderfolgende Kontaktbildung in Schleifenbereichen zur nativen Struktur gelangt (Weickl & Dill, 2003). Dieser „Reißverschlußmechanismus“ ist damit abhängig von der Topologie des untersuchten Proteins. Nach diesem Modell beginnt die Faltung von *Bs*-CspB mit lokalen Wechselwirkungen innerhalb eines Faltblattes und führt schließlich zu Kontakten zwischen  $\beta 1$  und  $\beta 4$  bzw.  $\beta 3$  und  $\beta 5$ . Verschiedene Berechnungen der Energiehyperfläche des Proteins CspA aus *Escherichia coli* sprechen für einen Beginn der Faltung im ersten Faltblatt ( $\beta 1$ - $\beta 3$ ) (Karanicolas & Brooks, 2003). Je nach Art des Modells lagern sich die Faltblattstränge  $\beta 4$  und  $\beta 5$  an das bereits bestehende Faltblatt an, oder es bildet sich vor der Anlagerung das zweite Faltblatt ( $\beta 4$ - $\beta 5$ ). In einer weiteren Studie wurde die Entfaltung von *Bc*-Csp durch Moleküldynamikrechnungen simuliert (Morra *et al.*, 2003). Das zweite Faltblatt und der Kontakt zwischen  $\beta 1$  und  $\beta 4$  bleiben am längsten erhalten. Dies läßt aber nur eingeschränkt Rückschlüsse auf den Faltungsmechanismus zu, sondern spiegelt eher die hohe Stabilität des zweiten Faltblatts wider.

## 1.8 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Beim Übergang vom elektronisch angeregten Zustand eines Aromaten in den Grundzustand kann Fluoreszenz auftreten. Innerhalb der Lebenszeit des angeregten Zustands können aber auch Konkurrenzprozesse wie z.B. Löschung stattfinden. Deshalb hängt die Fluoreszenz sehr stark von der molekularen Umgebung des Fluorophors ab. Die Anregungsenergie kann auch strahlungslos auf einen zweiten Fluorophor (Akzeptor) übertragen werden. Dieser Vorgang wird als Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet; der physikalische Hintergrund des Phänomens wurde von Förster auf der Grundlage der Theorie von Perrin entwickelt (Förster, 1948). Dabei kommt es nicht zu einer Emission von Photonen durch den angeregten Fluorophor (Donor) und einer anschließenden Reabsorption durch den Akzeptor, sondern zu einer Dipol-Dipol Wechselwirkung der beiden Fluorophore. Beide Fluorophore werden als schwingende Dipole betrachtet, die bei ähnlicher Resonanzfrequenz Energie austauschen können.

Damit FRET stattfinden kann, muß das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. In diesem Überschneidungsbereich wird bei der Rückkehr des elektronisch angeregten Donors in den Grundzustand genau dieselbe Energiemenge abgegeben, die gleichzeitig zur Anregung des Akzeptors führt. Die Effizienz der Energieübertragung hängt außer von den spektralen Eigenschaften der beiden Fluorophore auch von deren relativer Orientierung zueinander und dem Brechungsindex der Lösung ab. Den größten Einfluß auf die Transfereffizienz hat jedoch der Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Da dipolare Wechselwirkungen die Ursache für die Energieübertragung sind, ergibt sich eine Abhängigkeit der Transfereffizienz  $E$  von der sechsten Potenz des Abstands  $R$  (Gleichung 1.1) (Lakowicz, 1999).

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad \text{Gl. 1.1}$$

Der Förster- oder charakteristische Transferabstand  $R_0$  kennzeichnet den Abstand, bei dem die Hälfte der Anregungsenergie des Donors auf den Akzeptor übertragen wird; die andere Hälfte wird als Donor-Fluoreszenz freigesetzt. Aus der Effizienz des Energietransfers können Abstände im Bereich von  $0,5 R_0$  bis  $1,5 R_0$  verlässlich bestimmt werden.

Durch Kombination verschiedener Fluorophore kann  $R_0$  stark variiert werden und ermöglicht dadurch die Bestimmung von Abständen zwischen 10 und 100 Å (Wu & Brand, 1994). Damit ist FRET optimal zur Untersuchung von Proteinen geeignet und wird auch als „spektroskopisches Lineal“ bezeichnet (Stryer, 1978). Inzwischen wird FRET bei allen Klassen von biologischen Makromolekülen eingesetzt, um Abstandsveränderungen zu untersuchen (Selvin, 2000). Dadurch sind Rückschlüsse auf Strukturen, Konformationsänderungen oder die Bildung von Komplexen möglich.

Auch die Faltung von Proteinen ist mit der Änderung von Abständen verbunden. Durch die Wahl geeigneter Donor-Akzeptor Paare können Informationen über den Faltungsverlauf

erhalten werden. Wie durch SAXS wird die räumliche Ausdehnung des Proteins bestimmt; bei FRET-Experimenten wird jedoch die Entfernung zwischen zwei definierten Positionen gemessen und nicht die globale Größe des Proteins. Beispielsweise wurde die Faltung der Staphylokokken-Nuklease untersucht (Nishimura *et al.*, 2000), die über mehrere stabile Intermediate verläuft. Sowohl im Gleichgewicht als auch bei kinetischen Messungen wurde mit FRET ein schneller Kollaps der Kette nachgewiesen, der stärker ausgeprägt ist als die gleichzeitige Bildung von stabilen Sekundärstrukturen (CD-Experimente). Möglicherweise geht der hydrophobe Kollaps der Staphylokokken-Nuklease der Entstehung von Sekundärstrukturelementen voraus. Die Entfaltung von Barnase wurde durch zeitaufgelöste FRET-Messungen untersucht (Lakshminanth *et al.*, 2001). Dabei wurden im Übergangsbereich mehrere Spezies mit verschiedenen Fluoreszenz-Lebenszeiten gefunden, woraus die Hypothese eines schrittweisen Verlusts der nativen Struktur abgeleitet wurde. Für beide Studien wurde ein natürlich vorkommendes Tryptophan als Donor verwendet. Bei der Barnase befindet sich das Tryptophan im Inneren des gefalteten Proteins und ändert daher seine Fluoreszenzeigenschaften bei Entfaltung stark. Die Interpretation der FRET-Experimente wird dadurch erschwert.

Werden lichtstarke Fluorophore mit einem Laser angeregt, können auch einzelne Moleküle detektiert werden. Für das Zweizustandsprotein Chymotrypsin-Inhibitor 2 wurde im Übergangsbereich eine Effizienzverteilung mit zwei Maxima erhalten, die dem gefalteten bzw. entfaltenen Protein entsprechen (Deniz *et al.*, 2000). Eine experimentelle Herausforderung dieser Methode ist die Fixierung des Proteins, um die Beobachtungszeit zu verlängern. Zum Beispiel können Makromoleküle in fixierte Lipidvesikel verpackt und daher sehr lange beobachtet werden, ohne daß durch die Anknüpfung an eine Oberfläche die Faltung gestört würde (Rhoades *et al.*, 2003). In diesem Fall limitiert die photochemische Schädigung der Fluorophore durch das Laserlicht die Beobachtungsdauer.

Auch am Kälteschockprotein aus *Thermotoga maritima* wurden bereits Einzelmolekül-FRET-Experimente durchgeführt (Schuler *et al.*, 2002; Lipman *et al.*, 2003). An die beiden Kettenenden wurden Fluorophore mit einem Försterabstand  $R_0$  von 54 Å angebracht. Dies entspricht ungefähr dem doppelten Durchmesser des Proteins, und deshalb war die gemessene Transfereffizienz in allen Zuständen sehr groß (>50 %). Das Zweizustandsverhalten zeigte sich im Gleichgewicht in einer Population des nativen Zustands mit hoher Transfereffizienz und einer Population des entfaltenen Zustands mit niedrigerer Transfereffizienz. Die Transfereffizienz des nativen Zustands ist unabhängig von der GdmCl-Konzentration, wogegen die Transfereffizienz des entfaltenen Zustands mit sinkender GdmCl-Konzentration ansteigt. Dies deutet auf einen kompakteren entfaltenen Zustand bei geringeren Konzentrationen des Denaturierungsmittels hin (Schuler *et al.*, 2002). Ergänzend wurde dasselbe Protein in kinetischen Experimenten untersucht. In einem miniaturisierten Mischer wurde denaturiertes Protein mit Rückfaltungspuffer gemischt und ähnlich einer *continuous-flow*-Apparatur in verschiedenem Abstand zum Mischungspunkt gemessen. Die Zeitauflösung der Apparatur beträgt nur 100 ms, und zu diesem Zeitpunkt ist der Kollaps des entfaltenen Zustands bereits erfolgt (Lipman *et al.*, 2003).

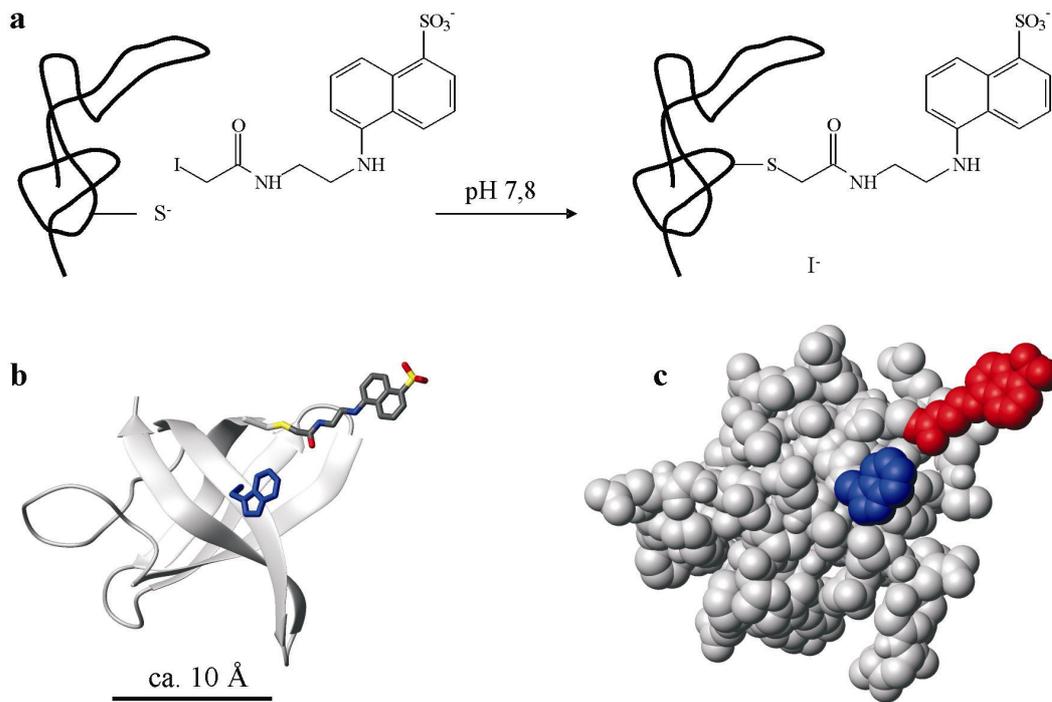
## 1.9 Problemstellung und Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Kälteschockproteine *Bs-CspB* und *Bc-Csp* wurden schon ausführlich untersucht. Neben der Charakterisierung der Struktur (Schnuchel *et al.*, 1993; Mueller *et al.*, 2000), der Funktion (Lopez *et al.*, 2001; Zeeb & Balbach, 2003) und der Ursachen der thermodynamischen Stabilität des Proteins aus dem thermophilen Organismus *Bacillus caldolyticus* (Perl *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2002) wurde besonders die sehr schnelle Faltung dieser Proteine intensiv erforscht (Schindler *et al.*, 1995; Jacob *et al.*, 1997; Perl *et al.*, 1998). Wie schon ausgeführt, ergaben sich weder im Gleichgewicht noch bei kinetischen Messungen Hinweise auf das Vorliegen von Intermediaten (Schindler *et al.*, 1995). Beide Kälteschockproteine sind daher hervorragende Beispiele für die Zweizustandsfaltung. Als spektroskopische Sonde wurde bei all diesen Experimenten die Fluoreszenz des Tryptophans an Position 8 verwendet, die für Veränderungen der direkten Umgebung sensitiv ist.

In dieser Arbeit sollte *Bc-Csp* (66 Aminosäuren) an verschiedenen Positionen mit einem Donor-Akzeptor Paar zur Messung von FRET ausgestattet werden, um mehrere Abstände und ihre Veränderungen während der Faltung verfolgen zu können. Als Donor sollte Tryptophan und als Akzeptor 5-(((acetylamino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure (AEDANS; Strukturformel in Abbildung 1.3a) verwendet werden. Der Försterabstand  $R_0$  dieses Fluorophorenpaars beträgt 22 Å. Er liegt damit in derselben Größenordnung wie der Durchmesser von *Bc-Csp* in der nativen Struktur (25 Å). Im Bereich um  $R_0$  ist die Transfereffizienz am empfindlichsten für Abstandsänderungen, und deshalb ist das System Tryptophan und AEDANS optimal für die Untersuchung von *Bc-Csp* mit FRET geeignet. Im Vergleich zu anderen Fluorophoren sind Tryptophan und AEDANS außerdem sehr klein und sollten daher die Faltung von *Bc-Csp* kaum beeinflussen (Abbildung 1.3b, c).

Durch FRET kann der Abstand zwischen zwei Positionen der Peptidkette bestimmt werden. Man erhält also nicht wie bei SAXS eine Information gemittelt über das gesamte Protein, sondern vielmehr über Entfernungen zwischen einzelnen Aminosäuren. Durch die Einführung des Donors bzw. Akzeptors an verschiedenen Positionen können definiert verschiedene Abstände gemessen werden, die das Verhalten einzelner Bereiche des Proteins wiedergeben.

Der Donor Tryptophan wird durch ortsgerichtete Mutagenese in das Protein eingebracht. Der Akzeptor wird durch die Modifikation von Cysteinresten mit 1,5-IAEDANS an das Protein gebunden; die Cysteinreste werden ebenfalls durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführt. FRET-Experimente besitzen die höchste Aussagekraft, wenn die Fluoreszenz des Donors und Akzeptors möglichst wenig vom Faltungszustand des Proteins abhängen. Dazu sollten Positionen gewählt werden, an denen die ursprüngliche Seitenkette zum Lösungsmittel exponiert ist und möglichst nicht mit den umgebenden Resten an der Proteinoberfläche interagiert.



**Abbildung 1.3:** Modifikation von *Bc-Csp* mit 5-(((2-Iodacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure (1,5-IAEDANS). (a) Die deprotonierte Seitenkette eines Cysteins reagiert mit 1,5-IAEDANS unter Bildung eines Thioethers. Das Protein ist als Linie angedeutet. (b) und (c) Größenvergleich von *Bc-Csp* mit den Fluorophoren. In (b) ist das Protein in der Bänderdarstellung, die Seitenketten von Tryptophan (blau) bzw. des mit AEDANS modifizierten Cysteins (gelb) sind als Stäbchenmodelle gezeigt. (c) Das Protein aus (b) in Kalotten-darstellung, wobei Tryptophan blau und AEDANS rot hervorgehoben sind. Die mutierten Aminosäuren wurden mit Hilfe des Swiss-PdbViewer (Guex & Peitsch, 1997) in das Protein (Mueller *et al.*, 2000) modelliert; es sind beliebige Rotamere dargestellt. (b) und (c) wurden mit MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) erstellt.

Zunächst müssen daher die Eigenschaften der nur-Donor Proteine und nur-Akzeptor Proteine hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für FRET-Experimente untersucht werden. Geeignete Positionen der Fluorophore können dann zu Donor-Akzeptor Proteinen kombiniert und diese zu FRET-Messungen eingesetzt werden.

Aus Fluoreszenzmessungen der Donor-Akzeptor Proteine im Gleichgewicht kann der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren in Abhängigkeit vom Faltungszustand bestimmt werden. Daneben soll der Einfluß der Mutationen und Modifikationen auf die Stabilität der Proteine untersucht werden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der kinetischen Untersuchung von Abstandsänderungen zwischen definierten Positionen der Peptidkette im Verlauf der Proteinfaltung. Dazu dienen *stopped-flow*-Experimente mit verschiedenen Donor-Akzeptor Varianten von *Bc-Csp*. Eine bessere Zeitauflösung kann mit ergänzenden Drucksprung- bzw. Temperatursprungmessungen erreicht werden. Durch die Bestimmung dieser Abstandsänderungen kann ein differenziertes Bild der Vorgänge bei der Faltung in verschiedenen Bereichen des Proteins erhalten werden. Die FRET-Experimente ergänzen damit die Messungen der Fluoreszenz von Trp8, bei denen nur der globale Faltungszustand detektiert werden konnte.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Zur Produktion von Plasmid-DNA und der Expression der Proteine wurden verschiedene *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme verwendet:

<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F' proAB, lacI<sup>d</sup>ZAM15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene, Heidelberg, D
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	B F <sup>-</sup> , <i>dcm, ompT, hsdS</i> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal λ(DE3)	Stratagene, Heidelberg, D
<i>E. coli</i> K38	<i>hfrC</i> [λ]	(Russel & Model, 1984)

Das Plasmid pLysS codiert für T7-Lysozym, das geringe Mengen von T7-RNA-Polymerase bindet und dadurch die Expression im nichtinduzierten Zustand von *E. coli* BL21 verhindert. Im Stamm *E. coli* K38 ist die T7-RNA-Polymerase im Gegensatz zu BL21 nicht chromosomal codiert. Das Gen befindet sich auf dem Plasmid pGP1-2, das durch eine Kanamycin-Resistenz stabil in den Zellen gehalten werden kann.

Als Expressionsvektoren mit den entsprechenden Genen für die Csp-Varianten dienten

pBluescript II SK <sup>-</sup>	Das Gen für <i>Bc</i> -Csp ist als <i>KpnI/EcoRI</i> -Fragment kloniert, Ausgangsvariante <i>Bc</i> -Csp W8Y (Abkürzung <i>Bc</i> -Csp*)	Stratagene, Heidelberg, D (Rape, 1999)
pET 11a	Klonierung des <i>B. caldolyticus</i> Csp-Gens mit <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> aus pBluescript II SK <sup>-</sup> mit Csp-Gen	Novagen, Schwalbach, D
pTCLE	Csp-Gen wird als <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment hinter eine hydrophobe Leadersequenz (107 Aminosäuren) und einen His <sub>6</sub> -tag kloniert. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Terrence G. Oas zur Verfügung gestellt.	(Calderone <i>et al.</i> , 1996)

Alle Expressionsvektoren enthalten eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion.

#### 2.1.2 Nährmedium

dYT-Medium:	5 g NaCl, 10 g Hefeextrakt, 16 g Pepton pro 1 l H <sub>2</sub> O (Zusatz von wenig Antifoam A für Fermentationen)
Feste Nährböden:	dYT-Medium mit 15 g Agar-Agar pro 1 l Medium

Das Medium und alle Lösungen für molekularbiologische Anwendungen wurden vor der Verwendung 20 min bei 121 °C und 2 bar Druck autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden dem Medium die benötigten Antibiotika (300 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Chloramphenicol oder 50 µg/ml Kanamycin) in sterilfiltrierter Form zugesetzt.

### 2.1.3 Enzyme

Taq- und Pfu-DNA-Polymerase	M. Wunderlich, Uni Bayreuth
Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach, D
Restriktionsendonukleasen <i>Bam</i> HI, <i>Nde</i> I, <i>Dpn</i> I	New England Biolabs, Schwalbach, D
Shrimp-Alkalische Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas St.Leon-Rot, D
T4-DNA-Ligase	GibcoBRL, Karlsruhe, D
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma, Deisenhofen, D

### 2.1.4 Standards

Protein-Leiter Roti <sup>®</sup> -Mark 10-150	Roth, Karlsruhe, D
pUC19 DNA / <i>Msp</i> I ( <i>Hpa</i> II)-Marker	MBI Fermentas St.Leon-Rot, D
Lambda DNA / <i>Eco</i> 130I ( <i>Sty</i> I)-Marker	
N-Acetyl-L-tryptophanamid (NAWA)	Sigma, Deisenhofen, D

### 2.1.5 Chemikalien und Säulenmaterialien

(±)-N <sub>α</sub> -Acetyl-DL-tryptophan, 1,5-EDANS	Aldrich, Taufkirchen, D
Ammoniumhydrogencarbonat, β-Mercaptoethanol,	Fluka, Neu-Ulm, D
Na-Cacodylat Trihydrat, p-Nitroanilin	
IPTG, Kanamycin	Gerbu, Gaiberg, D
Cl-HOBt, HCTU	IRIS Biotech, Marktredwitz, D
Fractogel EMD TMAE-650 (M)	Merck, Darmstadt, D
1,5-IAEDANS, TCEP	MoBiTec, Göttingen, D
GdmCl ( <i>ultra pure</i> ), Harnstoff ( <i>ultra pure</i> )	MP Biomedicals, Eschwege, D
Oligodesoxyribonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg, D
Butyl Sepharose 4 Fast Flow,	Pharmacia, Freiburg, D
HiLoad Superdex 75 prep grade	
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden, D
30 % Acrylamidlösung („Rotiphorese 30“), Agarose,	Roth, Karlsruhe, D
Ampicillin, Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dTTP,	
dGTP), EDTA, Ethidiumbromid, GdmCl, Roti-Load-	
Proteinauftragspuffer, Tricin, Tris	

Ammoniumperoxodisulfat, Deoxycholsäure-Natriumsalz, SDS, TEMED	Serva, Heidelberg, D
Antifoam A, Bromphenolblau, Chloramphenicol, Coomassie Brilliant Blue G, 2,6-Dichlorphenol-Indophenol (DCIP), Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen, D

Alle hier nicht angegebenen Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. von der Firma Merck (Darmstadt, D) bezogen. Für alle Pufferlösungen wurde deionisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit kleiner 0,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$  verwendet. Puffer für den Einsatz an der FPLC oder für spektroskopische Messungen wurden über 0,45  $\mu\text{m}$ -Nylonfilter filtriert.

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Plastikküvetten	Brand, Wertheim, D
Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Petrischalen, PP-Zentrifugenröhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
Millipore-Filter Typ VS (Porengröße 0,025 $\mu\text{m}$ )	Millipore, Bedford, USA
NAP-10 Säule aus Sephadex G-25, FlexiPrep Kit	Pharmacia, Freiburg, D
Membranfilter 0,45 $\mu\text{m}$ und 0,22 $\mu\text{m}$	Fisher Scientific, Schwerte, D
Spectro/Por-Dialyseschlauch (Ausschlußgrenze 3,5 kDa)	Spectrum, Los Angeles, CA, USA

### 2.1.7 Geräte

DX.17MV Sequential <i>Stopped-Flow</i> Spektrofluorimeter	Applied Photophysics, Leatherhead, UK
Transilluminator, 302 nm	Bachhofer, Reutlingen, D
Christ Alpha 1-4 Gefriertrocknungsanlage	Christ, Osterode, D
Kühlzentrifuge "Sorvall RC5B Plus"	DuPont, Bad Homburg, D
Thermoschüttler "Thermomixer 5436", Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Haake Thermostate K und CH	Haake, Karlsruhe, D
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil <sup>®</sup>	Hellma, Mühlheim, D
Brutschrank, Zentrifuge „Labofuge 400R“	Heraeus, Hanau, D
Spektralfluorimeter F-4010, F-4500	Hitachi, Tokio, Japan
Dampfsterilisator FVS 2/3 Typ 6.0	Integra Biosciences, Fernwald, D
Jasco J-600 Spektropolarimeter, Peltierelement PTC-348I	Jasco, Groß-Umstadt, D
Spektrometer „UVIKON 860“	Kontron Instruments, Neufahrn, D
Refraktometer	Krüss, Hamburg, D
Bio-Print Darkroom CN-UV/WL	LTF Labortechnik, Wasserburg, D
Microfluidizer M-110L	Microfluidics, Newton, USA
Micromass LCT, ESI-TOF Massenspektrometer	Micromass, Manchester, UK

Thermocycler PTC 100 "Mini-Cycler"	MJ Research, Watertown, USA
Schüttler G24, Wasserbadschüttler „Innova 300“	New Brunswick, Edison, USA
Easyject Prima Elektroporationsapparatur	Peqlab, Erlangen, D
Spektralfluorimeter LS50B mit Filmpolarisatoren	Perkin Elmer, Weiterstadt, D
FPLC-Anlage, 2050 MIDGET Electrophoresis Unit	Pharmacia, Freiburg, D
Seralpur PRO 90 CN Reinstwasser-Anlage	Seral, Ransbach-Baumbach, D
Cary 100 Bio UV-VIS-Spektrophotometer	Varian, Darmstadt, D

### 2.1.8 Software

Grafit Version 3.0	Erithacus Software, Staines, UK
Swiss-PdbViewer Version 3.7	GlaxoSmithKline, München, D; (Guex & Peitsch, 1997)
MolMol Version 2K.2	(Koradi <i>et al.</i> , 1996)
Biocapt	LTF-Labortechnik, Wasserburg, D
MassLynx 3.4 und 3.5	Waters, Eschborn, D
OligoDemo Version 5.0	National Biosciences, Plymouth, MN, USA
Chromas Version 1.45	Technelysium, Helensvale, Australien

## 2.2 Elektrophoretische Methoden

### 2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

0,5 x TAE-Puffer: 20 mM Tris/HCl, 10 mM Eisessig, 0,5 mM EDTA, pH<sup>20 °C</sup> 8,0  
 Probenpuffer: 4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin,  
 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wird zur Überprüfung der Größe und der Reinheit von DNA-Fragmenten genutzt. Außerdem ist eine präparative Trennung von DNA möglich. Abhängig von der Länge der aufzutrennenden DNA wurden Agarosekonzentrationen von 0,6 oder 1,6 % (w/v) in 0,5 x TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 20 % (v/v) Probenpuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese in 0,5 x TAE-Puffer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 6 V/cm Elektrodenabstand. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden in einer Ethidiumbromidlösung (ca. 2 µg/ml in 0,5 x TAE-Puffer) gefärbt und durch Fluoreszenz im UV-Licht nachgewiesen.

### 2.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gelpuffer:	3 M Tris/HCl, 0,3 % (w/v) SDS, pH <sup>25°C</sup> 8,45
4 x Roti-Load-	200 mM Tris/HCl, pH <sup>25°C</sup> 7,0, 120 mM DTE, 40 mM EDTA,
Probenpuffer:	48 % (w/v) Glycerin, 15 % (w/v) SDS, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
Kathodenpuffer:	0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH <sup>25°C</sup> 8,23
Anodenpuffer:	0,2 M Tris/HCl, pH <sup>25°C</sup> 8,9
Fixierlösung:	20 % (w/v) Trichloressigsäure
Färbelösung:	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol

Das Verfahren von Schägger und von Jagow (Schägger & von Jagow, 1987) ist zur Auftrennung kleiner Proteine (5 bis 20 kDa) optimiert. Hierbei wird als Folgeion Tricin anstelle von Glycin verwendet (Ornstein, 1964; Laemmli, 1970).

Zur Herstellung des 5 cm hohen 10 % Trenngels wurden 25 ml Lösung (8,2 ml ddH<sub>2</sub>O, 8,2 ml Gelpuffer, 8,4 ml Acrylamidlösung) entgast, durch Zugabe von 15 µl TEMED und 200 µl 10 % APS die Polymerisation gestartet und die Lösung sofort in die Gelapparatur gegossen. Die Gellösung wurde mit wassergesättigtem Isobutanol bedeckt. Nach der Polymerisation (ca. 45 min) wurde das Isobutanol durch gründliches Spülen mit VE-H<sub>2</sub>O entfernt und das Sammelgel (8,0 ml ddH<sub>2</sub>O, 3,3 ml Gelpuffer, 1,9 ml Acrylamidlösung) entgast. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 10 µl TEMED und 100 µl APS gestartet, die Lösung auf das Trenngel gegossen und die Kämme eingesetzt.

Die Proben (ca. 4-10 µg Csp) wurden mit 4 x Probenpuffer versetzt, 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt und vor dem Auftragen zentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer MIDGET-Vertikalelektrophoresekammer bei einer Stromstärke von 25 mA für das Sammel- und 45 mA für das Trenngel.

Bevor der Farbmarker das Ende des Gels erreichte wurde die Elektrophorese beendet, das Sammelgel entfernt, die Proteine für 10 min im Trenngel fixiert, 120 min mit Coomassie-Lösung gefärbt und das Gel über Nacht entfärbt.

### 2.2.3 Diskontinuierliche Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen ermöglicht eine Aussage über die im gefalteten Protein vorhandenen Ladungen. Somit kann der Austausch von Aminosäuren mit geladenen Seitenketten oder die Modifikation mit geladenen Substanzen nachgewiesen werden.

Experimentell gleicht dieses Verfahren der SDS-PAGE (siehe 2.2.2), allerdings enthält kein Puffer SDS. Alle anderen Konzentrationen und pH-Werte bleiben unverändert. Als 3 x Probenauftragspuffer wurde 30 % Glycerin, 2,7 mM EDTA, 0,03 % Bromphenolblau verwendet. Die Proteine wurden mit dem Probenauftragspuffer versetzt und ohne Erhitzen auf das Gel aufgetragen.

## 2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Reinigung mit Silica

Silica-Suspension: 1 g Silica in 10 ml 3 M NaI

Waschpuffer: 50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 2,5 mM EDTA, pH<sup>25°C</sup> 7,5,  
50 % Ethanol

Nach der elektrophoretischen Trennung (siehe 2.2.1) wurde die Bande des gewünschten DNA-Fragments aus dem Agarosegel ausgeschnitten (möglichst kurze Färb- und Belichtungszeit, um Schäden an der DNA zu vermeiden). Das ausgeschnittene Gelstück wurde mit dem doppelten Volumen 6 M NaI versetzt und 5 min unter Schütteln bei 55 °C aufgeschmolzen. Danach wurde ein geeignetes Volumen Silica zugegeben (1 mg bindet ca. 3 µg DNA) und der Ansatz 5 min auf Eis gelagert. Das Silica wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte in einem Bettvolumen ddH<sub>2</sub>O für 5 min bei 45 °C. Nach mehrfacher Zentrifugation wurde der Überstand bei -20 °C gelagert. Dasselbe Verfahren (ohne das Aufschmelzen des Gels) kann zur Entsalzung genutzt werden.

### 2.3.2 Plasmid-Präparation mit FlexiPrep-Kit

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden 5 ml-Übernachtskulturen der entsprechenden Bakterien verwendet. 1,5 ml der Kultur wurden zentrifugiert und das Pellet mit dem FlexiPrep-Kit (Pharmacia, Freiburg, D) gemäß den Angaben des Herstellers behandelt. Der Zellaufschluß erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989); die DNA wurde mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O von der Anionenaustauschermatrix eluiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und bei -20 °C gelagert.

### 2.3.3 Sequenzspezifische Mutagenese (QuikChange)

*Pfu*-Puffer (10x): 200 mM Tris/HCl, pH 8,8<sup>25°C</sup>, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 % Triton X-100, 1 mg/ml BSA

Mutationen wurden mit dem *QuikChange*-Verfahren (Stratagene, Heidelberg) in Plasmide eingebracht. Dabei werden zwei zueinander komplementäre, mutagene Primer an den entsprechenden Strang der Plasmid-DNA angelagert. Die DNA wird mit Hilfe der thermostabilen *Pfu*-Polymerase (proofreading-Polymerase) linear amplifiziert. Nur die *Template*-DNA ist methyliert und kann deshalb von der Restriktionsendonuklease *DpnI* (Zielsequenz 5'-G<sup>m6</sup>ATC-3') gespalten werden.

Für 50 µl-Ansätze wurden 5 µl *Pfu*-10x-Puffer, 2 µl dNTP (je 10 mM), je 2 µl (10 µM) der beiden Primer, 0,5 µl *Template*-DNA und 37,5 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt und im Thermocycler auf 95 °C aufgeheizt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 U *Pfu*-Polymerase gestartet (hot start). Die *QuikChange*-Reaktion wurde mit dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 2 min Aufheizen auf 95 °C, anschließend 25 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Primer-Anlagerung bei der entsprechenden Temperatur (je nach Länge des Pri-

mers zwischen 52 °C und 60 °C) und 15 min (bzw. 2 min pro kb DNA-Länge) Polymerisation bei 68 °C. 5 µl des Ansatzes wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1) auf die richtige Länge des Produkts überprüft. Die Template-DNA wurde durch Inkubation mit 10 U *DpnI* für 6 bis 24 Stunden bei 37 °C gespalten. Die zurückbleibende, mutierte DNA wurde in *E. coli* XL1-Blue elektrotransformiert (2.3.7). Einzelne Kolonien wurden in dYT-Medium überimpft und daraus Plasmid-DNA isoliert (2.3.2). Die erhaltene DNA wurde durch Sequenzierung (Seqlab, Göttingen, D) auf die gewünschte Sequenz geprüft.

#### 2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR bzw. Kolonie-PCR)

Mg-freier Puffer für *Taq*-Polymerase (10x):

100 mM Tris/HCl, pH<sup>25 °C</sup> 9,0, 500 mM KCl, 1 % Triton-X-100

Die PCR wird zur exponentiellen Anreicherung von DNA-Fragmenten verwendet. Es werden entweder gereinigte DNA oder Zellen mit dem entsprechenden Plasmid (Kolonie-PCR) eingesetzt. Soll das amplifizierte Fragment kloniert werden, wird Vent-Polymerase aufgrund ihrer 3',5'-Exonukleaseaktivität verwendet.

Für analytische Zwecke (z.B. Kontrolle auf erfolgreiche Klonierung in einen Expressionsvektor oder Test auf Insertionen bei *QuikChange*) wurden 160 µl Stamm-Mix hergestellt: 16 µl Mg-freier Puffer (10x), 16 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 µl dNTP (je 10 mM), je 4 µl der beiden benötigten Primer (je 10 µM), 1 µl *Taq*-Polymerase (5 U) und 115 µl ddH<sub>2</sub>O. Die Zellen einer einzelnen Bakterienkolonie wurden in 10 µl des Stamm-Mix überführt, und anschließend wurden 50 µl dYT-Medium mit derselben Pipettenspitze beimpft (Kultur des Klons zur Plasmidpräparation, etc.). Die PCR erfolgte durch folgendes Temperaturprogramm: 2 min Aufheizen auf 95 °C, 30 Zyklen von jeweils 20 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Anlagerung der Primer bei 50 °C, 40 s Polymerasereaktion bei 72 °C. Die Ansätze wurden mit 2 µl Probenpuffer versetzt und das Produkt durch Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1) auf die richtige Länge überprüft.

#### 2.3.5 Restriktion

NEB-Puffer 2: 10 mM Tris/HCl, pH<sup>25 °C</sup> 7,9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM DTT

Für einige Varianten von *Bc*-Csp fand im pBluescript/*E. coli* K38 pGP1-2 System keine Expression statt. Daher wurden die entsprechenden Gene in die Expressionsplasmide pET 11a bzw. pTCLE kloniert. Nach Amplifikation mit einem N-terminalen Primer (enthält *NdeI*-Schnittstelle) und dem SK-Primer (*Bam*HI-Schnittstelle) und anschließender Entsalzung (2.3.1) wurde das Fragment der Restriktion unterzogen.

Für die Spaltung wurde das Csp-haltige DNA-Fragment mit 1/10 des Volumens an NEB-Puffer 2 (10x), 1/100 des Volumens an BSA (100x), 1 U/µl (Endkonzentration) *Bam*HI und 1 U/µl (Endkonzentration) *NdeI* versetzt und für 10 h bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsenzyme wurden durch 20minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 80 °C inaktiviert.

Für die Spaltung des Plasmids wurden zusätzlich zu den oben angegebenen Bedingungen 0,05 U/µl (Endkonzentration) Shrimp-Alkalische Phosphatase zugesetzt. Dadurch werden die 5'-Enden des geschnittenen Vektors dephosphoryliert und somit eine intramolekulare Re-

ligation des Vektors verhindert. Die Reinigung der geschnittenen Vektor-DNA erfolgte über präparative Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1); sowohl Vektor als auch Csp-Fragment wurden vor der Ligation entsalzt (2.3.1).

### 2.3.6 Ligation

T4-DNA-Ligase-Puffer (5x): 250 mM Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % (w/v) PEG-8000

Die T4-DNA-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden verschiedener DNA-Moleküle. Zur Ligation wurden 7 µl geschnittener Vektor, 7 µl geschnittenes Csp-Fragment, 4 µl 5x Ligase-Puffer und 2 µl T4-DNA-Ligase (2 U) vermischt und 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. 10 µl des Ligationsansatzes wurden gegen Wasser mikrodialysiert. *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurden mit der salzfreien DNA elektrotransformiert (2.3.7). Die erhaltenen Bakterienkolonien wurden durch Kolonie-PCR mit vektorspezifischen Primern auf die Gegenwart des Csp-Gens überprüft (2.3.4). Bei richtiger Länge des Inserts wurden die Zellen in Flüssigmedium überimpft, Plasmid präpariert (2.3.2) und eine Sequenzierung durchgeführt (Seqlab, Göttingen, D).

### 2.3.7 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 500 ml dYT-Medium mit 1 ml Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue beimpft und bei 30 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,7 geschüttelt. Die Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert und durch anschließende Zentrifugation (GS-3, 5.000 U/min, 4 °C, 10 min) geerntet. Zur Entfernung von Salzen wurde der Zellschlag zuerst in 500 ml sterilem, eiskaltem ddH<sub>2</sub>O und anschließend in 250 ml sterilem, kaltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 10 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen, in SS-34 Zentrifugenbecher überführt und erneut zentrifugiert (SS-34, 6.000 U/min, 4 °C, 10 min). Danach wurden die Zellen in 1,5 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in 40 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

Die zu transformierende DNA aus *QuikChange* (2.3.3) oder Ligation (2.3.6) wurde zur Entsatzung auf Millipore-Filtern (Porengröße 0,025µm) 15 min mikrodialysiert und auf die zuvor auf Eis aufgetauten elektrokompenten Zellen gegeben. Die Suspension wurde in eiskalte Elektroporationsküvetten überführt und einem elektrischen Puls (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω, 4 ms bis 5 ms) ausgesetzt. Danach wurde 700 µl dYT-Medium zugegeben, die Zellen abzentrifugiert (13.000 U/min, 4 °C, 30 s), auf dYT-Nährböden mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.8 Herstellung und Transformation $\text{CaCl}_2$ -kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation des Expressionsstamms *E. coli* BL21 (DE3) pLysS müssen  $\text{CaCl}_2$ -kompetente Zellen verwendet werden, da keine elektrokompenten Zellen dieses Stamms erhalten werden können. Das produzierte T7-Lysozym labilisiert die Bakterienzellwand und führt damit im hypotonischen Medium zur Lyse der Bakterien. Auch von *E. coli* K38 pGP1-2 wurden  $\text{CaCl}_2$ -kompetente Zellen verwendet.

500 ml dYT-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS oder *E. coli* K38 pGP1-2 beimpft und bei 30 °C bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 geschüttelt. Die Kultur wurde auf Eis gekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (GS-3, 8.000 U/min, 4 °C, 15 min) geerntet. Die Bakterien wurden in 200 ml sterilem, kaltem 100 mM  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (GS-3, 8.000 U/min, 4 °C, 15 min) wurden die Zellen in 10 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$  in SS-34 Zentrifugenbecher überführt, wiederum zentrifugiert (SS-34, 10.000 U/min, 4 °C, 10 min) und in 4 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 ml sterilem 87 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Es wurden Aliquots von 200 µl bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot  $\text{CaCl}_2$ -kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, der gewünschte Expressionsvektor (1 ng bis 10 ng Plasmid-DNA) zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 90 s einem Hitzeimpuls bei 42 °C ausgesetzt und sofort mit 700 µl dYT-Medium versetzt. Die Zellen wurden 30 min bei 37 °C geschüttelt (Expression der resistenzvermittelnden Gene), zentrifugiert (4.000 U/min, 4 °C, 30 s) und auf Nährböden mit den entsprechenden Selektionsantibiotika plattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C.

## 2.4 Proteinexpression und Reinigung

### 2.4.1 *Csp* ohne Cysteinreste

Alle Cystein-freien Varianten von *Bc-Csp\** (*Bc-Csp\** E21W, G22W, F38W, S48W, E50W, Q59W) waren auf dem Expressionsplasmid pBluescript II SK<sup>-</sup> kodiert und wurden in *E. coli* K38 pGP1-2 exprimiert. Die Zellen wurden bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,7 bei 30 °C geschüttelt. Durch Erhöhung der Temperatur auf 43 °C wurde die Expression von *Bc-Csp\** induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (GS-3, 8.000 U/min, 4 °C, 10 min) geerntet, in Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol,  $\text{pH}^{20^\circ\text{C}}$  8,0) resuspendiert und mittels eines Microfluidizers aufgeschlossen.

Bei *Bc-Csp* handelt es sich um ein Protein aus einem thermophilen Organismus, das gegenüber den meisten Proteinen aus dem mesophilen *E. coli* eine erhöhte thermische Stabilität aufweist. Durch Inkubation des Überstands des Zellaufschlusses für 30 min bei 60 °C werden *E. coli* Proteine denaturiert und damit abgetrennt. Dieser Hitzeschritt erleichtert die nachfolgenden Reinigungsschritte, ist aber fakultativ.

Die chromatographische Reinigung beinhaltet eine Anionenaustausch-Chromatographie, eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie zur Abtrennung gebundener Nukleinsäuren und eine abschließende Gelfiltrations-Chromatographie. Alle Puffer wurden wie beschrieben verwendet (Schindelin *et al.*, 1992; Mueller *et al.*, 2000).

#### 2.4.2 Reinigung von Cystein-haltigem Csp bei Expression als lösliches Protein

Die überwiegende Zahl aller *Bc*-Csp-Varianten mit Cystein konnte als cytosolisch lösliches Protein exprimiert werden. Dabei kam hauptsächlich das unter 2.4.1 beschriebene System mit pBluescript II SK<sup>-</sup> als Expressionsplasmid in *E. coli* K38 pGP1-2 zum Einsatz.

Das Protein *Bc*-Csp\* E50W/S24C konnte zwar aus *E. coli* K38 pGP1-2 gereinigt werden, allerdings war keine vollständige Markierung dieser Proteincharge möglich. Das entsprechende Gen wurde deshalb in pET 11a kloniert, um die Expression bei 37 °C in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS statt bei 43 °C in *E. coli* K38 pGP1-2 durchzuführen. Unter diesen schonenderen Bedingungen wurde Protein erhalten, das problemlos markiert werden konnte. Ebenso wurde *Bc*-Csp W8F/Y15F/E50W/S24C exprimiert.

Für alle *Bc*-Csp-Varianten mit Cystein an Position 2 konnte weder in *E. coli* K38 pGP1-2 noch in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS eine gute Expression erreicht werden. Eventuell stört *Bc*-Csp mit Cystein 2 den Stoffwechsel von *E. coli* oder Cystein 2 führt zu einem schnellen Abbau des Proteins. Die Expression und Reinigung dieser Varianten ist unter 2.4.3 beschrieben.

Bei der Reinigung Cystein-haltiger Proteine muß die Oxidation oder Modifikation der Cysteinreste vermieden werden. Eine Oxidation findet vor allem an deprotonierten Cysteinresten unter Katalyse von Metallionen (z.B. Cu<sup>2+</sup>) statt. Außerdem wird molekularer Sauerstoff als Oxidationsmittel benötigt.

Um die Oxidation von Cysteinresten zu vermeiden, wurde deshalb der pH-Wert des Puffers abgesenkt (ca. 2 Einheiten unter den pK von Cystein, d.h. 99 % der Cysteinreste sind protoniert). Die Puffer wurden vor der Verwendung entgast und mit Stickstoff gesättigt, um möglichst wenig molekularen Sauerstoff in der Lösung zu belassen. Die katalytisch wirkenden Metallionen wurden durch EDTA komplexiert, und als Reduktionsmittel wurde  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) zugesetzt.

Die erhaltenen *Bc*-Csp-Varianten sind in ihrer thermischen Stabilität vergleichbar mit dem Wildtypprotein. Dennoch wurde kein Hitzeschritt zur Denaturierung mesophiler Proteine angewandt, da das Cystein bei 60 °C um ein Vielfaches schneller oxidiert würde als bei Raumtemperatur. Aus demselben Grund wurden alle Reinigungen bei 4 °C durchgeführt. Für alle chromatographischen Reinigungsschritte wurde eine FPLC-Anlage von Pharmacia verwendet.

##### i) Fermentation und Zellaufschluß

*E. coli* K38-Zellen wurden bei 30 °C, *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 geschüttelt (5 l dYT-Medium). Die Induktion der Expression erfolgte bei *E. coli* K38 durch Erhöhung der Temperatur auf 43 °C, bei *E. coli* BL21 (DE3) durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration). Nach 3 h wurden die Kulturen zentrifugiert (GS-3, 8.000 U/min, 4 °C, 10 min) und die Zellen in Aufschlußpuffer (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM EDTA, 50 mM  $\beta$ -ME, pH 6,2) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mit Hilfe eines Microfluidizers. Durch Zentrifugation (SS-34, 18.000 U/min, 4 °C, 30 min) wurden Zelltrümmer aus dem Rohlysat abgetrennt.

## ii) Anionenaustausch-Chromatographie

Puffer A: 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM EDTA, 10 mM β-ME, pH<sup>4°C</sup> 6,2

Puffer B: 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM EDTA, 10 mM β-ME, 1 M NaCl, pH<sup>4°C</sup> 6,2

Der Überstand des Zellaufschlusses wurde mit Puffer A auf das doppelte Volumen verdünnt (Erniedrigung der physiologischen Salzkonzentration) und nach Einstellen des pH-Werts (6,2) auf eine mit Puffer A equilibrierte Fractogel EMD TMAE-650 (M)-Säule mittels P1-Pumpe bei einer Flußrate von 5 ml/min aufgetragen. Nichtbindende Proteine wurden als Durchbruch gesammelt. Die Säule wurde 2 h bei einer Flußrate von 5 ml/min mit Puffer A gewaschen. Anschließend wurden gebundene Proteine mit einem Gradienten von 0 auf 600 mM NaCl (60 % Puffer B) innerhalb von 90 min eluiert. Eventuell noch gebundene Proteine wurden mit 1 M NaCl von der Säule entfernt.

Alle gesammelten Fraktionen wurden mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.2.2) auf die Gegenwart von *Bc*-Csp untersucht. In allen Fällen befand sich das *Bc*-Csp im Durchbruch.

## iii) Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)

Puffer A: 20 mM Na-Citrat, 5 mM EDTA, 10 mM β-ME, pH 6,2

Puffer B: 20 mM Na-Citrat, 5 mM EDTA, 10 mM β-ME, 80 %<sup>0°C</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 6,2

Der Durchbruch der Anionenaustausch-Chromatographie wurde mit 230 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt (40 % Sättigung). Die dabei ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation (GS-3, 8.000 U/min, 4 °C, 30 min) entfernt. Der klare Überstand wurde auf eine mit 50 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (37,5 % Puffer A, 62,5 % Puffer B) equilibrierte Butyl Sepharose 4 Fast Flow-Säule mit einer Flußrate von 2 ml/min über eine P1-Pumpe aufgetragen. Zum Entfernen von Nukleinsäuren wurde 2 h mit 50 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch Reduzierung des (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Gehalts auf 0 % innerhalb von 12 min eluiert und in 2 ml-Fractionen gesammelt. Alle Fraktionen wurden anhand von Absorptionsspektren auf die Gegenwart von Nukleinsäuren überprüft.

## iv) Gelfiltrations-Chromatographie

Puffer: 20 mM Na-Citrat, 2 mM EDTA, 5 mM β-ME, 100 mM KCl, pH 6,2

Dialyse I: 20 mM Ammoniumacetat, 1 mM EDTA, 5 mM β-ME

Dialyse II: 10 mM Ammoniumacetat, 0,5 mM EDTA, 5 mM β-ME

Dialyse III: 5 mM Ammoniumacetat, 0,2 mM EDTA, 5 mM β-ME

Die vereinigten Nukleinsäure-freien Fraktionen der HIC wurden der Gelfiltration an einer HiLoad Superdex 75 prep grade-Säule (Größe 16/60) unterzogen. Es wurden jeweils 5 ml der Proteinlösung auf die equilibrierte Säule aufgetragen und die Proteine mit einer Flußrate von 1,7 ml/min eluiert. Ab dem Elutionsvolumen von 51 ml (30 min nach dem Auftragen des Proteins) wurde mit dem Sammeln von 1,7 ml-Fractionen begonnen.

Die *Bc*-Csp-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und bei 4 °C nacheinander gegen die Dialysepuffer I-III dialysiert. Die Proteinlösung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert. Das trockene Protein wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.4.3 Reinigung von Cystein-haltigem Csp aus hydrophobem Fusionsprotein

*Bc*-Csp mit Cystein 2 wurde in den sonst verwendeten Systemen (2.4.2) nicht als lösliches Protein exprimiert. Deshalb wurde zur Expression der Varianten mit Cystein 2 das pTCLE-Plasmid als Expressionsvektor verwendet (Calderone *et al.*, 1996). In diesem Vektor wird das Gen des gewünschten Proteins hinter einen 107 Aminosäuren langen Leader-Bereich und einen His<sub>6</sub>-tag kloniert. Aufgrund des großen Anteils an hydrophoben Aminosäuren im Leader-Bereich (21 Leu, 3 Ile, 9 Val, 1 Phe, 4 Tyr, 11 His) und des hydrophoben Beitrags von 5 Lysin- und 11 Argininresten ist das Fusionsprotein nur bei niedrigem pH oder in Gegenwart hoher Konzentrationen von chaotropen Denaturierungsmitteln löslich. Bei der Expression in *E. coli* werden deshalb *inclusion bodies* gebildet, was die Zelle vor der eventuell schädlichen Wirkung des Proteins schützt und außerdem die Proteinausbeute erhöht.

Nach Waschen der *inclusion bodies* und Reinigung des Fusionsproteins durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule wird eine BrCN-Spaltung durchgeführt. Dabei wird der Leader-Bereich vom *Bc*-Csp abgetrennt. Methionin 1 des *Bc*-Csp wird in Homoserin umgewandelt und ebenfalls abgespalten. Allen *Bc*-Csp-Varianten, die durch die Expression des Fusionsproteins erhalten wurden, fehlt somit Met1.

#### i) Fermentation, Zellaufschluß und Waschen der *inclusion bodies*

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM β-ME, pH<sup>20°C</sup> 8,0

Waschpuffer: 1 mg/ml Deoxycholat, 1 mM EDTA, 20 mM β-ME, pH<sup>20°C</sup> 8,0  
(Die Puffer wurden vor der Zugabe von β-ME entgast.)

Die Zellanzucht des Expressionsstamms *E. coli* BL21 (DE3) pLysS in 2,5 l dYT-Medium erfolgte wie unter 2.4.2 beschrieben. Da das Fusionsprotein in den *inclusion bodies* vor proteolytischem Abbau geschützt ist, wurden die Zellen erst 6 h nach Induktion der Expression geerntet. Die Zellen wurden in 50 ml Lysepuffer resuspendiert und mit dem Microfluidizer aufgeschlossen. Die *inclusion bodies* wurden im SS-34-Rotor bei 12.000 U/min und 4 °C für 20 min sedimentiert, und der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde in 30 ml Waschpuffer (ohne β-ME) resuspendiert und mit 0,2 mg/ml Lysozym versetzt. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert (SS-34, 12.000 U/min, 4 °C, 10 min). Die *inclusion bodies* wurden anschließend noch weitere zweimal mit 20 ml Waschpuffer, viermal mit 20 ml Lysepuffer und einmal mit 20 ml 20 mM β-ME gewaschen und zentrifugiert (SS-34, 12.000 U/min, 4 °C, 10 min).

#### ii) Reinigung des Fusionsproteins

Ni-NTA-Puffer: 100 mM Na-Phosphat, 10 mM Tris, 6 M GdmCl, 20 mM β-ME,  
pH<sup>4°C</sup> 8,0 bzw. 6,3 bzw. 5,3

Säulenreinigung: 6 M GdmCl, 0,2 M Essigsäure

Die *inclusion bodies* wurden in 50 ml Ni-NTA-Puffer pH<sup>4°C</sup> 8,0 aufgenommen und auf eine ebenfalls in Ni-NTA-Puffer pH<sup>4°C</sup> 8,0 equilibrierte Ni-NTA-Säule mit einer Flußrate von 2,5 ml aufgetragen. Nichtgebundene Proteine wurden durch Waschen mit Ni-NTA-Puffer

pH<sup>4°C</sup> 6,3 für 50 min entfernt. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte mit Ni-NTA-Puffer pH<sup>4°C</sup> 5,3. Die Säule wurde durch Waschen mit 6 M GdmCl, 0,2 M Essigsäure von eventuellen Resten des Leader-Proteins gereinigt.

Das Eluat der Säule (pH<sup>4°C</sup> 5,3) wurde mit EDTA versetzt (Endkonzentration 0,5 mM) und dreimal gegen 0,2 M Essigsäure, 15 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol dialysiert. Die Proteinlösung wurde schockgefroren und lyophilisiert.

### iii) Spaltung des Fusionsproteins mit BrCN

400 mg trockenes Fusionsprotein wurden in 30 ml 70 % Ameisensäure gelöst und mit 600  $\mu$ l 5 M BrCN in Acetonitril versetzt (150 facher Überschuß) (Gross, 1967). Zum Schutz der Cysteinreste wurden 500  $\mu$ l 100 mM TCEP zugesetzt. Der Ansatz wurde 5 Stunden bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel mit einer Hochvakuum-Pumpe entfernt.

### iv) Reinigung von *Bc*-Csp aus dem Spaltungsansatz

Ni-NTA-Puffer: 100 mM Na-Phosphat, 10 mM Tris, 6 M GdmCl, 20 mM  $\beta$ -ME, pH<sup>4°C</sup> 8,0

Säulenreinigung: 6 M GdmCl, 0,2 M Essigsäure

Dialysepuffer: 20 mM Ammoniumacetat, 1 mM EDTA, 5 mM  $\beta$ -ME

Der trockene Rückstand der Spaltungsreaktion wurde in 80 ml Ni-NTA-Puffer pH<sup>4°C</sup> 8,0 aufgenommen. Dabei säuerten Reste von Ameisensäure die Lösung stark an, und der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH wieder auf 8,0 gebracht. Das gelöste Protein wurde auf eine in Ni-NTA-Puffer pH<sup>4°C</sup> 8,0 equilibrierte Ni-NTA-Säule mit einer Flußrate von 2,5 ml/min aufgetragen. Der *Bc*-Csp-haltige Durchbruch wurde gesammelt und bei 4 °C dreimal gegen Dialysepuffer dialysiert. Alle an die Säule gebundenen Proteine wurden mit 6 M GdmCl, 0,2 M Essigsäure eluiert. Das Dialysat wurde schockgefroren, lyophilisiert und einer abschließenden Gelfiltrations-Chromatographie unterzogen (identische Bedingungen wie unter 2.4.2)

Häufig führte die langsame Entfernung von GdmCl während der Dialyse zur Aggregation von *Bc*-Csp. Wurde das aggregierte Protein in einem kleinen Volumen 6 M GdmCl aufgenommen und schnell in das 10fache Volumen Nativpuffer verdünnt, konnte lösliches Protein erhalten werden.

### v) alternative Abfolge der Reinigungsschritte

Bei einer schnelleren Version zur Reinigung von *Bc*-Csp aus dem hydrophoben Fusionsprotein wurde auf die Aufreinigung des Fusionsproteins verzichtet. Die gewaschenen *inclusion bodies* wurden in 70 % Ameisensäure gelöst und mit 5 M BrCN in Acetonitril versetzt (siehe iii, ca. 1 ml BrCN auf 1,5 g *inclusion bodies*). Der Durchbruch der anschließenden Ni-NTA-Affinitätschromatographie enthielt sowohl *Bc*-Csp als auch Nukleinsäuren. Deshalb wurde nach der Dialyse (und vor der Gelfiltration) eine zusätzliche Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (siehe 2.4.2) notwendig.

## 2.5 Modifikation Cystein-haltiger Proteine

Für FRET-Experimente wurde der Donor Tryptophan durch ortsgerichtete Mutagenese in das Protein eingebracht. Der Akzeptor AEDANS wurde durch die chemische Modifikation von Cystein in das Protein eingeführt.

Proteine enthalten verschiedene Gruppen, die zur Anknüpfung von Fluorophoren verwendet werden können (hauptsächlich Amino- und Thiolgruppen). Zur selektiven Modifikation von Cysteinresten werden überwiegend Iodacetamid-Derivate der Farbstoffe eingesetzt (Haugland, 2002). Bei der Umsetzung eines Thiolats mit Iodacetamid im Zuge einer nukleophilen Substitutionsreaktion entsteht ein Thioether, der in wäßriger Lösung äußerst stabil ist. Diese Reaktion wird bei pH-Werten durchgeführt, bei denen Cystein teils deprotoniert vorliegt (ca. pH 6,5-8,0); höhere pH-Werte können allerdings zu Modifikationen von Aminogruppen führen. Die Zugänglichkeit der Cysteinreste kann durch teilweise Entfaltung des Proteins mit Denaturierungsmitteln erhöht werden. Zum Schutz vor Oxidation wird das nicht-nukleophile Reduktionsmittel TCEP eingesetzt.

Bei der Modifikation in Lösungen mit hoher Proteinkonzentration wurde mehr EDTA und TCEP zugesetzt; der Überschuß an Modifikationsreagenz wurde verringert, um Mehrfachmarkierungen zu vermeiden.

### 2.5.1 Modifikation mit 1,5-IAEDANS

Nativpuffer: 100 mM Na-Phosphat, pH 7,0

Entfaltungspuffer: 10 mM Na-Phosphat, 7 M GdmCl, pH 7,0

2 bis 15 mg gefriergetrocknetes Protein wurden in 970 µl Nativpuffer aufgenommen, zur vollständigen Reduktion mit 30 µl 100 mM TCEP versetzt und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. (Proteine mit Cys11 wurden in Puffer mit 3 M GdmCl gelöst). Nach Zentrifugation wurden niedermolekulare Substanzen durch Gelfiltration an einer NAP-10 Säule in Nativpuffer entfernt und dem Eluat 15 µl 100 mM TCEP und 15 µl 100 mM EDTA zugesetzt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Absorptionsmessung (2.7.2). Die Proteinlösung (1500 µl) wurde mit 900 µl Entfaltungspuffer gemischt (GdmCl-Endkonzentration 2,5 M) und der pH-Wert der Lösung mit 2 M Tris auf 7,8 eingestellt. Die benötigte Menge 1,5-IAEDANS (30facher Überschuß bei Proteinendkonzentration < 150 µM, 20facher Überschuß bei Proteinendkonzentration > 150 µM) wurde in 100 µl DMF gelöst und zum Protein gegeben. Der Markierungsansatz wurde 12 h bei 20 °C im Dunkeln inkubiert. Die Reinigung des modifizierten Proteins erfolgte durch zwei aufeinanderfolgende Chromatographieschritte an einer NAP-10 Säule in 15 mM Ammoniumacetat.

### 2.5.2 Modifikation mit Iodacetamid

Die Modifikation mit Iodacetamid erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben. Iodacetamid wurde im 100fachen Überschuß zur Proteinmenge eingesetzt. Die Reaktion wurde vor den abschließenden Chromatographieschritten durch Zugabe von β-Mercaptoethanol gestoppt.

## 2.6 Synthese der Referenzverbindung Trp-EDANS

Um die Fluoreszenz von AEDANS nach Anregung durch Energietransfer untersuchen zu können, wurden Tryptophan und 1,5-EDANS kovalent zu der Modellverbindung Trp-EDANS verknüpft (Abbildung 2.1). Zur Aktivierung der Edukte wurden O-(1H-6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorosphat (HCTU) und 6-Chloro-1-hydroxybenzotriazol (Cl-HOBt) sowie die nichtnukleophile Base Diisopropylethylamin (DIPEA) eingesetzt. Tryptophan bildet im ersten Reaktionsschritt *in situ* einen Aktivester mit Cl-HOBt, der im zweiten Schritt mit EDANS unter Bildung eines Amids reagiert (Knorr *et al.*, 1989; Albericio & Carpino, 1997).

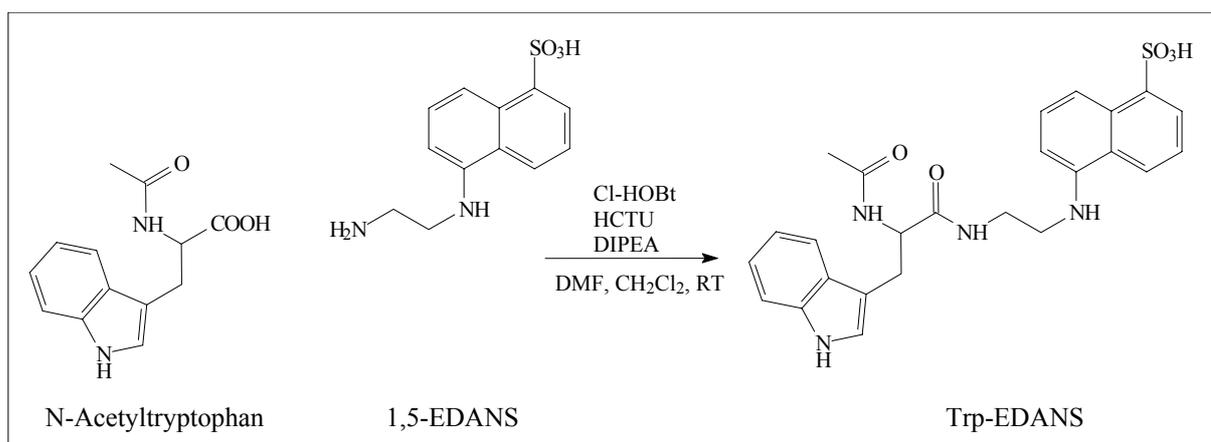


Abbildung 2.1: Synthese von Trp-EDANS.

(±)-N<sub>α</sub>-Acetyl-DL-tryptophan (277 mg, 1,13 mmol), Cl-HOBt (191 mg, 1,13 mmol) und HCTU (466 mg, 1,13 mmol) wurden in 20 ml DMF und 2 ml Dichlormethan gelöst. Durch Zutropfen von 580 µl Diisopropylethylamin (DIPEA, 3,40 mmol) wurde der pH-Wert auf 9 eingestellt. Nach der Zugabe von 1,5-EDANS (300 mg, 1,13 mmol) und weiteren 200 µl DIPEA (Deprotonierung der Naphthalinsulfonsäure) wurde der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Das Reaktionsgemisch wurde mit Dichlormethan verdünnt, mit 2 M KHCO<sub>3</sub> ausgeschüttelt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Aufgrund der hohen Polarität von Trp-EDANS war dieses überwiegend in den wässrigen Extrakten enthalten. Daher wurden die wässrigen Extrakte gefriergetrocknet und mit Acetonitril extrahiert. Mit Kieselgel (Merck Kieselgel 60, 63-200 µm) wurde aus dem erhaltenen, leicht fluoreszierenden Öl ein Säulenkopf hergestellt und der Flash-Chromatographie (Still *et al.*, 1978) an Merck Kieselgel 60 (40-63 µm) unterzogen. Die Elution erfolgte in einem Stufengradient mit 500 ml Dichlormethan:Methanol 5:1, 400 ml 3:1, 300 ml 2:1 und 250 ml 1:4. Es wurden 75 mg Trp-EDANS als gelbgrünes, fluoreszierendes Öl erhalten.

Trp-EDANS konnte dünnschichtchromatographisch (Laufmittel Dichlormethan:Methanol 4:1) aufgrund der charakteristischen, grünblauen Fluoreszenz (EDANS) und der Färbung mit Ninhydrin (Trp) identifiziert werden. ESI-Massenspektrometrie (ESI-MS, 2.7.6, positiver und negativer Modus) und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestätigten das Vorliegen von Trp-EDANS. Die Reinheit des Produkts wurde auf ≥ 95 % geschätzt.

## 2.7 Spektroskopische Charakterisierung

### 2.7.1 Messung von Absorptionsspektren

UV-Absorptionsspektren wurden an einem Kontron UVIKON 860 Absorptionsspektrophotometer oder einem Cary 100 Bio UV-VIS-Spektrophotometer im Bereich zwischen 240 und 350 nm (nichtmarkierte Proteine) bzw. 240 und 450 nm (AEDANS-Derivate) aufgenommen. Proteine für spektroskopische Messungen wurden zuvor durch Gelfiltration an einer NAP-10 Säule von Salzresten gereinigt und 30 Minuten zentrifugiert, um Aggregat zu entfernen. Die Absorptionsspektren wurden in Quarzküvetten von 1 bzw. 0,5 cm Schichtdicke mit dem entsprechenden Puffer als Referenz gemessen; die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 50 nm/min bei einer Bandbreite von 2 nm und einer Auflösung von 0,5 nm.

### 2.7.2 Bestimmung des Absorptionskoeffizienten und der Konzentration von Proteinen

Wird ein Protein durch ein chaotropes Denaturierungsmittel entfaltet, erreichen alle Aminosäuren eine maximale Exposition zum Lösungsmittel. Daher entsprechen die Absorptionskoeffizienten der chromophoren Aminosäuren eines Proteins in 6 M GdmCl den Absorptionskoeffizienten der freien Aminosäuren in 6 M GdmCl. Aus den tabellierten Werten der freien Aminosäuren in 6 M GdmCl (Edelhoch, 1967; Gill & von Hippel, 1989) kann der Absorptionskoeffizient des denaturierten Proteins ( $\epsilon_U$ ) berechnet werden (Pace & Schmid, 1997). Dabei wird der Absorptionskoeffizient einer Aminosäure bei 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) mit der Anzahl der entsprechenden Aminosäuren im Protein multipliziert und diese Beiträge für alle chromophoren Aminosäuren (Trp, Tyr, Cystin) addiert. Die verwendeten Werte sind  $\epsilon_{280} = 5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für Tryptophan und  $\epsilon_{280} = 1280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  für Tyrosin; Bc-Csp enthält keine Disulfidbrücke.

Der Absorptionskoeffizient des nativen Proteins ( $\epsilon_N$ ) kann durch Absorptionsmessung zweier gleich konzentrierter Proteinlösungen in 0 bzw. 6 M GdmCl bestimmt werden (Gleichung 2.1), (Pace & Schmid, 1997). Dabei gilt aufgrund des Lambert-Beer-Gesetzes:

$$\epsilon_N = \frac{A_N}{A_U} \cdot \epsilon_U \quad \text{Gl. 2.1}$$

$\epsilon_N$ ,  $\epsilon_U$ : Absorptionskoeffizienten des nativen bzw. entfalteten Proteins bei 280 nm;  $A_N$ ,  $A_U$ : Absorption des Proteins bei 280 nm in 0 bzw. 6 M GdmCl

In gleicher Weise wurden Absorptionskoeffizienten für AEDANS-markierte Proteine bei 337 nm bestimmt. Als Referenzverbindung diente das Produkt der Reaktion von  $\beta$ -Mercaptoethanol mit 1,5-IAEDANS ( $\beta$ -ME-AEDANS). Mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten von  $\beta$ -ME-AEDANS unter Nativbedingungen (Hudson & Weber, 1973) und durch Messung gleichkonzentrierter Lösungen in 0 und 6 M GdmCl konnte  $\epsilon_{337}$  in 6 M GdmCl bestimmt werden ( $5480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Dieser Wert wurde auch als Absorptionskoeffizient  $\epsilon_{337}$  für denaturierte, AEDANS-markierte Proteine angenommen. Die Bestimmung von  $\epsilon_{337}$  für native, AEDANS-markierte Proteine erfolgte wie oben für  $\epsilon_{280}$  beschrieben. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt.

Bei bekanntem Absorptionskoeffizient kann mittels des Lambert-Beer-Gesetzes die Konzentration der Lösung aus der gemessenen Absorption bestimmt werden. Für nichtmarkierte Proteine wurde  $\epsilon_{280}$ , für AEDANS-markierte Proteine  $\epsilon_{337}$  zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Zusätzlich vorhandene Cysteinreste haben keinen Einfluß auf  $\epsilon_{280}$  und Tryptophan ändert  $\epsilon_{337}$  nicht. Somit konnten die in Tabelle 2.1 aufgeführten Absorptionskoeffizienten für alle untersuchten Proteinvarianten verwendet werden.

**Tabelle 2.1:** Absorptionskoeffizienten der verwendeten Proteine

Protein	$\epsilon_{280}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	Protein	$\epsilon_{337}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
<i>Bc-Csp*</i> E21W	8200	<i>Bc-Csp*</i> Q2C-AEDANS	5870
<i>Bc-Csp*</i> G22W	8150	<i>Bc-Csp*</i> N11C-AEDANS	5630
<i>Bc-Csp*</i> F38W	8150	<i>Bc-Csp*</i> S24C-AEDANS	5660
<i>Bc-Csp*</i> E50W	8160	<i>Bc-Csp*</i> L66C-AEDANS	5640

### 2.7.3 Circular dichroismus-Spektren

Nah- und Fern-UV-Circular dichroismus-Spektren wurden an einem Jasco J-600 Spektropolarimeter in temperierbaren Quarzküvetten aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 40  $\mu M$  in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,0. Nah-UV Spektren (250 bis 320 nm) wurden bei einer Schichtdicke von 1 cm, Fern-UV Spektren (190 bis 250 nm) bei einer Schichtdicke von 0,05 cm gemessen. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 20 nm/min bei einer Bandbreite von 1 nm und einer Dämpfung von 1 s. Die Spektren wurden achtmal aufgenommen, gemittelt, das Pufferspektrum subtrahiert und mit Gleichung 2.2 die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure  $[\Theta]_{MRW}$  bestimmt.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{AS}} \quad \text{Gl. 2.2}$$

$[\Theta]_{MRW}$ : mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest in  $\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ;  $\Theta$ : gemessene Elliptizität in Grad;  $c$ : molare Konzentration des Proteins;  $d$ : Schichtdicke in cm;  $N_{AS}$ : Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

### 2.7.4 Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren wurden an Hitachi F-4010 und F-4500 Spektralfluorimetern bei 25 °C gemessen. Die Konzentration des Proteins oder niedermolekularer Fluorophore betrug im allgemeinen 1  $\mu M$  in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0. Um eine Erniedrigung der Konzentration durch Adsorption an Oberflächen möglichst gering zu halten, wurden die Lösungen direkt in einer 1x1  $\text{cm}^2$  Fluoreszenzrührküvette hergestellt, wobei das Protein immer in Puffer ohne GdmCl gegeben wurde. Nach dreiminütiger Inkubation im thermostatisierbaren Küvettenblock des Spektralfluorimeters wurden die Spektren mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 120 nm/min und einer Dämpfung von 0,5 s aufgenommen, die Anregungsbandbreite betrug 5 nm und die Emissionsbandbreite 10 nm. Die Anregung erfolgte bei 280 oder 295 nm, die Emission AEDANS-markierter Proteine wurde im Bereich von 300 bis 550 nm (Anregung 280 nm) bzw. im Bereich von 310 bis 580 nm (Anregung 295 nm)

aufgezeichnet. Von den gemessenen Spektren wurde das Spektrum des verwendeten Puffers abgezogen, wodurch Beiträge der Pufferfluoreszenz und des Ramanpeaks des Wassers korrigiert wurden. Fluoreszenzanregungsspektren wurden mit den oben angegebenen Parametern gemessen, wobei die Fluoreszenz bei 495 nm detektiert wurde.

### 2.7.5 Gleichgewichts-Fluoreszenzanisotropie

Erfolgt die Anregung eines Fluorophors mit polarisiertem Licht, werden überwiegend Moleküle angeregt, deren Absorptions-Übergangsdipole parallel zum elektrischen Feldvektor des Anregungslichts ausgerichtet sind. Dadurch ist auch das Emissionslicht teilweise polarisiert. Durch Rotationsbewegungen der Moleküle wird die Polarisation reduziert und zwar umso schneller, je kleiner und somit beweglicher das Molekül ist. Die Anisotropie wird durch Messung der Fluoreszenz parallel und senkrecht zur Ebene des polarisierten Anregungslichts bestimmt (Gleichung 2.3).

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \text{Gl. 2.3}$$

$r$ : Fluoreszenzanisotropie;  $I_{\parallel}$ ,  $I_{\perp}$ : Intensität des emittierten Lichts parallel bzw. senkrecht zur Ebene des polarisierten Anregungslichts

Die Gleichgewichts-Fluoreszenzanisotropie wurde an einem Perkin-Elmer Spektralfluorimeter LS50B gemessen. Mit einer Lösung des freien Fluorophors (NAWA bzw.  $\beta$ -ME-AEDANS), in der es nach Anregung mit polarisiertem Licht aufgrund der schnellen Bewegung der Moleküle zu einer vollständigen Depolarisation kommt, wurde der Gerätefaktor bestimmt. Die Messungen wurden bei einer Proteinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0 durchgeführt. Die Trp-Fluoreszenz wurde bei 280 bzw. 295 nm angeregt und die Emission bei 350 nm gemessen, wobei die Bandbreite der Anregung 8 nm und die Bandbreite der Emission 15 nm betrug. Vor der Berechnung der Anisotropie wurde das Signal im Photomultiplier mit 700 V verstärkt und 20 s integriert. Die entsprechenden Parameter für die Messung der AEDANS-Fluoreszenzanisotropie waren Anregung bei 336 nm, Emission bei 495 nm, beide Bandbreiten 10 nm, Integration für 15 s, die Signalverstärkung wurde automatisch gewählt. Es wurden für jede Proteinprobe mindestens 10 Meßwerte bestimmt und gemittelt.

### 2.7.6 Massenspektrometrische Untersuchung der Proteine

Sowohl nach der Reinigung als auch nach der kovalenten Modifikation mit 1,5-IAEDANS oder Iodacetamid wurde die Masse aller Proteine bestimmt. Dazu wurden die Proben an NAP-10 Säulen entsalzt und gleichzeitig in 15 mM Ammoniumacetat umgepuffert, das als flüchtiger, protonenhaltiger Puffer die Ionisation fördert. Die Proteinkonzentration lag im Bereich von 5 bis 20  $\mu\text{M}$ . Die Messungen wurden an einem Micromass LCT, *electrospray ionization, time of flight* (ESI-TOF) Massenspektrometer (AG Prof. Unverzagt) durchgeführt. Zum Nachweis positiv geladener *Bc*-Csp Ionen wurde im  $\text{ES}^+$ -Modus gemessen (Capillary 3200 V, Sample Cone 60 V, Extraction Cone 3 V, RF Lens 200 V, Desolvation Temperature 150 °C,

Source Temperature 120 °C). Die Referenzsubstanz Trp-EDANS enthält eine Sulfonsäure und ließ sich deshalb besser als Anion im ES<sup>-</sup>-Modus nachweisen (Parameter wie bei ES<sup>+</sup>, RF Lens 300 V).

Aus den gemessenen Spektren wurden für jeden Ladungszustand die m/z-Werte mit der höchsten Ionenintensität bestimmt und daraus gemäß Gleichung 2.4 die molekulare Masse M des Proteins bestimmt. Zum Vergleich wurden mit dem ExpASy Proteomics Server (<http://www.expasy.org>) Durchschnittsisotopenmassen berechnet, wobei die natürliche Häufigkeit der verschiedenen Isotope berücksichtigt wurde.

$$M = (m/z - 1) \cdot z \quad \text{Gl. 2.4}$$

M: molekulare Masse; m/z: gemessener Quotient Masse/Ladung eines mehrfach geladenen Ions; z: Ladung

## 2.8 Konzentrationsbestimmung von GdmCl und Harnstoff

In fast allen Experimenten wurde GdmCl oder Harnstoff als Denaturierungsmittel eingesetzt. Die Konzentration von GdmCl oder Harnstoff wurde aus der Differenz der Brechungsindizes des Puffers in Gegenwart und Abwesenheit des Denaturierungsmittels berechnet (Gleichung 2.5 bis 2.7) (Pace, 1986).

$$[\text{GdmCl}] = 57,147 \cdot \Delta n + 38,68 \cdot (\Delta n)^2 - 91,6 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2.5}$$

$$[\text{Harnstoff}] = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753 \cdot (\Delta n)^2 + 185,56 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2.6}$$

Enthält der Puffer zusätzlich 0,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ändert sich der Brechungsindex der Lösung und damit auch die Parameter zur Bestimmung der GdmCl-Konzentration (Gleichung 2.7).

$$[\text{GdmCl}]^{\text{AMS}} = 60,460 \cdot \Delta n + 24,687 \cdot (\Delta n)^2 - 100,87 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2.7}$$

[GdmCl]: GdmCl-Konzentration in mol/l; [Harnstoff]: Harnstoff-Konzentration in mol/l; [GdmCl]<sup>AMS</sup>: GdmCl-Konzentration in mol/l in einer Probe mit zusätzlich 0,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Δn: Differenz der Brechungsindizes der Lösungen mit und ohne GdmCl bzw. Harnstoff

## 2.9 Bestimmung der konformationellen Stabilität von Bc-Csp

Die konformationelle Stabilität eines Proteins beschreibt die Lage des Gleichgewichts zwischen dem nativen Zustand (N) und dem entfalteten Zustand (U) des Proteins. Dabei kann jeder Unterschied in einer physikalischen Eigenschaft y zwischen N und U als Sonde der Entfaltungsreaktion verwendet werden.

Die Faltung von Bc-Csp verläuft ohne das Auftreten charakterisierbarer Intermediate, d.h. N und U stehen im Sinne eines Zweizustandsmodells miteinander im Gleichgewicht (Gleichung 2.8, (Tanford, 1968)).



Die Gleichgewichtskonstante K<sub>U</sub> der Entfaltungsreaktion kann bei Gültigkeit des Zweizustandsmodells aus der Eigenschaft y erhalten werden (Gleichung 2.9), wobei y<sub>N,U</sub> die

Eigenschaft des nativen bzw. entfalteten Proteins und  $y_{\text{obs}}$  die Meßgröße bei Vorliegen einer Mischung von N und U darstellen. Die freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G_U$  ist über die Gleichgewichtskonstante  $K_U$  definiert (Gleichung 2.10).

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{(y_N - y_{\text{obs}})}{(y_{\text{obs}} - y_U)} \quad \text{Gl. 2.9}$$

$$\Delta G_U = -RT \cdot \ln K_U \quad \text{Gl. 2.10}$$

### 2.9.1 Auswertung und Messung Denaturierungsmittel-induzierter Übergänge

Das lineare Extrapolationsmodell (LEM, *linear extrapolation model*) beschreibt die lineare Abhängigkeit der Proteinstabilität von der Denaturierungsmittel-Konzentration ([D]) (Gleichung 2.11). Dabei ist  $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$  die freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels und  $m$  die Kooperativität des Entfaltungsübergangs.

$$\Delta G_U = \Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) + m \cdot [\text{D}] \quad \text{Gl. 2.11}$$

Auch die spektroskopischen Eigenschaften von N und U hängen oft in linearer Weise von [D] ab (Gl. 2.12). Dabei ist  $y_{\text{N,U}}^0$  die spektroskopische Eigenschaft des nativen bzw. entfalten Proteins in Abwesenheit von Denaturierungsmittel,  $m_{\text{n,u}}$  stellt die Steigung der Basislinie des nativen bzw. denaturierten Proteins dar.

$$y_{\text{N,U}} = y_{\text{N,U}}^0 + m_{\text{N,U}} \cdot [\text{D}] \quad \text{Gl. 2.12}$$

Durch Kombination der Gleichungen 2.9 bis 2.12 ergibt sich Gleichung 2.13, die den Entfaltungsübergang anhand der Meßgröße  $y_{\text{obs}}$  in Abhängigkeit von der Konzentration des Denaturierungsmittels beschreibt (Santoro & Bolen, 1988). Die enthaltenen Parameter wurden durch nichtlineare Regression an die experimentellen Daten angeglichen.

$$y_{\text{obs}}([\text{D}]) = \frac{y_N^0 + m_N[\text{D}] + (y_U^0 + m_U[\text{D}]) \cdot e^{-\frac{\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) + m[\text{D}]}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) + m[\text{D}]}{RT}}} \quad \text{Gl. 2.13}$$

Als Meßsonde wurden ausschließlich Fluoreszenzmessungen eingesetzt. Bei allen Stabilitätsmessungen wurden Proben in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0 mit einem Gesamtvolumen von 1600  $\mu\text{l}$  in 1x1  $\text{cm}^2$  Fluoreszenzrührküvetten (teilweise verspiegelt) bei 25 °C verwendet. Vor der Messung wurde die Proteinlösung mindestens drei Minuten bei 25 °C inkubiert; nach der Messung wurde die genaue GdmCl-Konzentration refraktometrisch bestimmt (2.8). Die Pufferfluoreszenz wurde durch Messung entsprechender proteinfreier Proben (1 M GdmCl-Schritte) bestimmt und von den Meßwerten des Proteins abgezogen. Die Bandbreiten des Anregungs- und Emissionslichts betragen 5 bzw. 10 nm bei einer Dämpfung von 2 s. Es wurden am Hitachi F-4010 Spektralfluorimeter jeweils sieben Meßwerte innerhalb von 60 s gemessen und für die Auswertung gemittelt.

Sowohl die Proteinkonzentration als auch die Art der gemessenen Fluoreszenz variierte mit dem eingesetzten Protein. Proteine ohne AEDANS-Markierung wurden als 1  $\mu\text{M}$  Lösungen der Messung der Tyr-Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 280 nm, Emissionswellenlänge 305 nm) und der Trp-Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 280 nm und 295 nm, Emissionswellenlänge 355 nm) unterzogen. Enthielten die Proteine freie Cysteinreste, wurden dem Puffer zusätzlich 1 mM EDTA und 1 mM TCEP zugesetzt.

In Proteinen, die gleichzeitig Trp und AEDANS enthalten, findet FRET statt. Deshalb wurden in diesen Fällen die Trp-Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 280 nm, Emissionswellenlänge 355 nm), die AEDANS-Fluoreszenz nach Anregung von Trp und Transfer zu AEDANS (Anregungswellenlänge 280 nm, Emissionswellenlänge 495 nm) sowie die AEDANS-Fluoreszenz nach direkter Anregung (Anregungswellenlänge 336 nm, Emissionswellenlänge 495 nm) gemessen. Aufgrund des starken Fluoreszenzunterschieds zwischen N und U war eine Proteinkonzentration von 0,6  $\mu\text{M}$  ausreichend.

### 2.9.2 Auswertung und Messung thermisch induzierter Übergänge

Auch bei der thermisch induzierten Entfaltung erfolgt die Auswertung auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells (2.9). Damit sind in diesem Zusammenhang die Gleichungen 2.9 und 2.10 gültig. Die freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G_U$  wurde durch Integration des Enthalpie- und des Entropieterms zwischen  $T_m$  und  $T$  erhalten (Gleichung 2.14). Dabei ist  $T_m$  die Temperatur im Mittelpunkt des thermischen Übergangs,  $\Delta H_U(T_m)$  die van't Hoff-Enthalpie bei  $T_m$  und  $\Delta C_p$  die Änderung der Wärmekapazität bei Entfaltung des Proteins bei konstantem Druck. Die lineare Änderung der Meßgröße des nativen und entfalteten Proteins ist in Gleichung 2.15 ausgedrückt.  $y_{N,U}^0$  ist die spektroskopische Meßgröße bei 0 K, und  $m_{N,U}$  gibt die Steigung der Basislinien wieder. Durch Kombination der Gleichungen 2.9, 2.10, 2.14 und 2.15 ergibt sich Gleichung 2.16, (Griko *et al.*, 1988; Privalov, 1993). Die Variablen in Gleichung 2.16 wurden durch nichtlineare Regression an die experimentellen Daten ( $y_{\text{obs}}$ ) angeglichen. Für  $\Delta C_p$  wurde der Wert von 4,0 kJ/(mol·K) konstant gesetzt.

$$\Delta G_U(T) = \Delta H_U(T_m) \cdot \frac{T_m - T}{T_m} - \Delta C_p \cdot \left[ T_m - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) \right] \quad \text{Gl. 2.14}$$

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m_{N,U} \cdot T \quad \text{Gl. 2.15}$$

$$y_{\text{obs}}(T) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot T + (y_U^0 + m_U \cdot T) \cdot e^{\left\{ -\frac{\Delta H_U(T_m)}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[ 1 - \frac{T_m}{T} + \ln\left(\frac{T_m}{T}\right) \right] \right\}}}{1 + e^{\left\{ -\frac{\Delta H_U(T_m)}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[ 1 - \frac{T_m}{T} + \ln\left(\frac{T_m}{T}\right) \right] \right\}}} \quad \text{Gl. 2.16}$$

Alle thermisch induzierten Entfaltungsübergänge wurden an einem Jasco J-600 Spektropolarimeter gemessen, das mit dem Peltierelement PTC-348I zur genauen Kontrolle der Temperatur ausgestattet war. Die Temperatur in der Küvette wurde mit einem PT-100 Widerstandsthermometer gemessen. Die Eichung dieses Temperaturfühlers erfolgte durch die Be-

stimmung von  $T_m$  einer 30  $\mu\text{M}$  Lösung von Lysozym in 30 mM K-Acetat, pH 4,6 und 0 bis 2 M GdmCl sowohl am Spektropolarimeter als auch an einem *differential scanning* Kalorimeter. Unter den gegebenen Bedingungen lag  $T_m$  im Bereich von 76,8 bis 57,3 °C (Kalorimeter) bzw. 75,1 bis 55,5 °C (Spektropolarimeter). Die Ergebnisse der Messung am Spektropolarimeter wurden durch eine Geradengleichung mit den kalorimetrisch bestimmten Werten korreliert, und diese Geradengleichung zur Korrektur der mit dem PT-100 gemessenen Temperaturen verwendet.

Es wurden 3400  $\mu\text{l}$  4  $\mu\text{M}$  *Bc*-Csp in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0 (Puffer entgast) mit einer Heizrate von 60 °C/h entfaltet. Die Meßwerte wurden im Bereich zwischen 20 und 105 °C mit einer Auflösung von 0,2 °C aufgezeichnet. Zur Detektion diente die Elliptizität  $\Theta$  bei 222,6 nm; dabei betrug die Schichtdicke 1 cm, die spektrale Bandbreite 1 nm und die Dämpfung 8 s.

## 2.10 Experimente zur Kinetik der Proteinfaltung

Das Kälteschockprotein *Bc*-Csp faltet mit einer Zeitkonstante von ca. 1 ms bei 25 °C. Aufgrund dieser äußerst kurzen Zeiträume kommen nur Methoden zur Messung der Kinetik in Betracht, die eine schnelle Verschiebung des Gleichgewichts zulassen.

Durch schnelle Mischmethoden können die Lösungsmittelbedingungen extrem verändert und somit die gesamte Proteinpopulation in einen anderen Faltungszustand überführt werden. Die Amplituden der Faltungsreaktion sind daher sehr hoch und gut auswertbar.

Im Gegensatz hierzu wird bei Relaxationsverfahren die Zusammensetzung der Lösung nicht verändert, sondern das Gleichgewicht wird durch sprunghafte Änderung des Drucks oder der Temperatur verschoben. Das Ausmaß der Verschiebung ist hier geringer als bei Mischmethoden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich schnelle Mischungsexperimente zur Messung von Kinetiken eingesetzt. In Kooperationen mit Georg Holtermann (Max-Planck-Institut, Dortmund, D) und Jan Kubelka (*National Institutes of Health*, Bethesda, USA) wurden außerdem Kinetiken nach Druck- oder Temperatursprüngen gemessen.

### 2.10.1 Kinetiken nach schneller Mischung

Bei kinetischen Messungen werden immer apparente Geschwindigkeitskonstanten  $\lambda$  bestimmt, die Beiträge der Rück- und Entfaltungsreaktion beinhalten. Für das Zweizustandsmodell ist die Abhängigkeit von  $\lambda$  von [D] in Gleichung 2.17 gegeben. Dabei sind  $k_{\text{NU}}^0$  und  $k_{\text{UN}}^0$  die extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten in Abwesenheit des Denaturierungsmittels,  $m_{\text{NU}}$  und  $m_{\text{UN}}$  sind die kinetischen Kooperativitätsparameter.

$$\lambda = k_{\text{NU}}^0 \cdot e^{m_{\text{NU}}[\text{D}]} + k_{\text{UN}}^0 \cdot e^{m_{\text{UN}}[\text{D}]} \quad \text{Gl. 2.17}$$

Schnelle Mischexperimente wurden an einem Applied Photophysics DX.17MV Sequential *Stopped-Flow* Spektrofluorimeter durchgeführt. Zum Start der Reaktion wurde ein

Volumenteil einer 11fach konzentrierten Proteinlösung mit zehn Volumenteil eines geeigneten Puffers verdünnt. Für Entfaltungskinetiken wurde natives Protein in 1 bis 6 M GdmCl denaturiert, für Rückfaltungskinetiken wurde Protein aus 5 M GdmCl auf 0,45 bis 3,1 M GdmCl verdünnt. Als Puffer wurde 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0 verwendet, dem bei Vorliegen eines freien Cysteins 1 mM EDTA und 1 mM TCEP zugesetzt wurde. Die Endkonzentration lag für nichtmarkierte Proteine bei 1  $\mu$ M und für AEDANS-markierte Proteine bei 0,5  $\mu$ M. Die verwendete Misch- und Beobachtungszelle hat ein Volumen von 20  $\mu$ l ( $10 \times 2 \times 1$  mm<sup>3</sup>).

Kinetiken von Proteinfaltungsreaktionen wurden generell anhand von Fluoreszenzänderungen bei 25 °C verfolgt. Die Anregung der Fluorophore erfolgte bei 280 oder 295 nm mit einer Bandbreite von 10 nm; ein Photomultiplier detektierte die daraus resultierende integrale Fluoreszenz. Um gestreutes Anregungslicht herauszufiltern oder einen bestimmten Fluoreszenzbereich zu selektieren, konnten verschiedene Filter zwischen die Beobachtungszelle und den Photomultiplier gebracht werden. Aceton in der Schichtdicke 0,5 cm absorbiert unterhalb von 320 nm und wurde als cut-off Filter zur Messung der Trp-Fluoreszenz (in Abwesenheit von AEDANS) eingesetzt. In AEDANS-markierten Proteinen konnte die Trp-Fluoreszenz mit Hilfe zweier Glasfilter gemessen werden, die nur im Bereich von 310 bis 390 nm transparent sind. Ein geeigneter cut-off Filter zur Messung der AEDANS-Fluoreszenz ist eine Lösung von p-Nitroanilin in Ethanol (2 mg/ml) in einer 0,5 cm-Küvette.

Alle Kinetiken wurden mindestens achtmal gemessen, gemittelt und eine monoexponentielle Funktion an die Daten angepaßt. Die Meßzeit betrug ca. die fünffache Zeitkonstante der beobachteten Reaktion. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnis wurden Dämpfungen bis zu 1 % der Gesamtmeßzeit verwendet.

Zur Totzeitbestimmung der Apparatur wurde das Verfahren nach Tonomura (Tonomura *et al.*, 1978) für 1:10-Mischung modifiziert. Eine 1,1 mM Lösung von DCIP in 5 % Isopropanol wurde mit Ascorbinsäure in 0,011 M HCl, 0,11 M NaCl gemischt (Endkonzentration Ascorbinsäure 0,5 bis 25 mM). Das Verschwinden der blauen Farbe des DCIP bei der Reduktion durch Ascorbinsäure kann durch Absorptionsmessung bei 524 nm gemessen werden.

### 2.10.2 Messung von Kinetiken mit Drucksprüngen (*p*-Sprung)

Der entfaltete Zustand von *Bc*-Csp nimmt ein geringeres Volumen ein als der native Zustand des Proteins (Jacob *et al.*, 2002). Deshalb führt die Erhöhung des Drucks zu einer Begünstigung des entfalteten Zustands, und es wird eine Entfaltungskinetik beobachtet. Umgekehrt führt die Relaxation eines angelegten Drucks zu einer Rückfaltungsreaktion. Die entsprechenden *p*-Sprungmessungen wurden am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund von Georg Holtermann bzw. unter seiner Anleitung durchgeführt.

Der Aufbau der Apparatur ist in der Literatur beschrieben (Jacob *et al.*, 1999). Ein Piezoelement übt Druck auf 10  $\mu$ M Protein in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0 aus. Es wurden Sprünge von ca. 10 auf 300 bar und umgekehrt ausgeführt. Je höher die Druckänderung, um so größer ist zwar die Amplitude der Reaktion, aber um so stärker treten auch irreversible Aggregations- oder Adsorptionsprozesse auf. Aus diesem Grund wurde auch der Druckanstieg langsamer gestaltet als die Druckrelaxation. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnis

wurden 20 bis 100 Messungen gemittelt. An alle Daten wurden monoexponentielle Funktionen angepaßt.

In den p-Sprungexperimenten wurde ausschließlich die AEDANS-Fluoreszenz gemessen. Die Anregung erfolgte bei 280 nm mit einer Bandbreite von 1,2 nm. Die Fluoreszenz wurde nach Durchtritt durch einen cut-off Filter (GG 455, absorbiert unter 455 nm) von einem Photomultiplier mit einer negativen Spannung verstärkt und das invertierte Signal detektiert. Das Signal des nativen Proteins wurde bei allen Messungen auf 10 V eingestellt. Für Messungen im Bereich des  $T_m$  von Bc-Csp wurde die Proteinkonzentration auf 20  $\mu\text{M}$  erhöht, um trotz der temperaturbedingt geringeren Fluoreszenz ein ausreichend hohes Meßsignal zu erhalten.

### 2.10.3 Messung von Kinetiken mit Temperatursprüngen (T-Sprung)

Im Bereich des Übergangsmittelpunkts der thermischen Entfaltung kann das Gleichgewicht einer Faltungsreaktion auch durch schnelle Veränderung der Temperatur verschoben werden. Alle Messungen wurden freundlicherweise von Jan Kubelka (NIH, Bethesda, USA) durchgeführt (Thompson *et al.*, 1997; Kubelka *et al.*, 2003).

## 2.11 Bestimmung von Abständen

Die Effizienz des Energietransfers zwischen Donor und Akzeptor hängt stark vom Abstand zwischen den beiden Fluorophoren ab. Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um von den spektralen Fluoreszenzeigenschaften des Proteins auf intramolekulare Abstände zu schließen.

Die Auswertung beruht auf dem Vergleich der Fluoreszenz im Protein mit beiden bzw. nur einem Fluorophor. Wird als nur-Donor Protein das nichtmarkierte Protein mit freiem Cystein verwendet, wird nicht nur die Fluoreszenzänderung aufgrund von FRET gemessen, sondern auch eine potentielle Löschung der Trp-Fluoreszenz durch das freie Cystein. Im markierten Protein dagegen liegt anstelle des Cysteins ein Thioether vor, der deutlich andere Lösch-eigenschaften hat. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, wurde das nur-Donor Protein mit Iodacetamid modifiziert. Damit liegt sowohl im AEDANS-freien als auch im AEDANS-haltigen Protein das Cystein als Thioether vor, und der gemessene Unterschied sollte ausschließlich auf Energietransfer beruhen.

Für die Bestimmung eines Abstands wurden unter identischen Bedingungen (2.7.4) die Fluoreszenzemissionsspektren von drei Proteinen nach Anregung bei 280 und 295 nm gemessen: nur-Donor Protein (Cystein mit Iodacetamid carbamoylmethyliert; CAM-Form), Donor-Akzeptor Protein und nur-Akzeptor Protein (enthält kein Tryptophan). Als Referenz zur Bestimmung der Quantenausbeute diente 1  $\mu\text{M}$  N-Acetyl-L-tryptophanamid (NAWA). Von allen Proteinen wurden gleichkonzentrierte Stammlösungen (34  $\mu\text{M}$ ) in 15 mM Ammoniumacetat hergestellt, die Spektren bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  gemessen und die Pufferfluoreszenz (Puffer mit Ammoniumacetat) subtrahiert. Alle Messungen wurden dreimal wiederholt.

Auf eine Korrektur der Spektren hinsichtlich der Charakteristik der Lampe und des Photomultipliers wurde verzichtet, da die Korrektur keine Auswirkung auf die erhaltenen Quantenausbeuten und Abstände hatte.

### 2.11.1 Bestimmung der Quantenausbeute

Die Quantenausbeute  $\phi_{\text{Trp}}$  von Tryptophan in einer bestimmten *Bc*-Csp-Variante wurde durch Vergleich der Spektren der CAM-Form dieses Proteins und NAWA (gleiche Konzentration) erhalten. Für NAWA wurde die Fluoreszenz im gesamten gemessenen Bereich (300 bis 550 nm) integriert. Aufgrund der Beiträge der beiden Tyrosinreste wurde für das Protein erst bei 315 nm mit der Integration begonnen, so daß nur die Trp-Fluoreszenz berücksichtigt wurde. Die Quantenausbeute  $\phi_{\text{NAWA}}$  von NAWA ist 0,14 (Eftink *et al.*, 1995) und wurde ebenso wie der Brechungsindex  $n$  der Lösung zur Berechnung der gesuchten Quantenausbeute  $\phi_{\text{Trp}}$  verwendet (Gleichung 2.18, (Brand & Witholt, 1967)).  $F_{\text{Trp}}$  und  $F_{\text{NAWA}}$  stehen für das jeweilige Fluoreszenzintegral.

$$\phi_{\text{Trp}} = \phi_{\text{NAWA}} \cdot \frac{F_{\text{Trp}}}{F_{\text{NAWA}}} \cdot \frac{n_{\text{Trp}}^2}{n_{\text{NAWA}}^2} \quad \text{Gl. 2.18}$$

### 2.11.2 Berechnung des charakteristischen Transferabstands $R_0$

Der charakteristische Transfer- oder Försterabstand  $R_0$  ist definiert als der Abstand, bei dem die Hälfte der Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen wird.  $R_0$  hängt von den spektroskopischen Eigenschaften der Fluorophore, vom Brechungsindex  $n$  der Lösung und der relativen Orientierung der Übergangsdipole der Fluorophore im Raum ( $\kappa^2$ ) ab. Da alle Fluorophore sehr niedrige Gleichgewichts-Fluoreszenzanisotropien zeigten, wurde freie Drehbarkeit angenommen, was einem  $\kappa^2$  von 2/3 entspricht.  $R_0$  kann mit Gleichung 2.19 berechnet werden.

$$R_0 = \left( 8,79 \cdot 10^{-5} \frac{\kappa^2 \cdot \phi_{\text{Trp}} \cdot J}{n^4} \right)^{1/6} \quad \text{Gl. 2.19}$$

$R_0$ : Försterabstand in Å;  $\kappa^2$ : relative Orientierung der Übergangsdipole von Donor und Akzeptor, bei freier Beweglichkeit 2/3;  $\phi_{\text{Trp}}$ : Quantenausbeute des Donors Tryptophan;  $J$ : Überlappungsintegral zwischen Emission des Donors und Absorption des Akzeptors;  $n$ : makroskopischer Brechungsindex der Lösung.

$$J = \int F_{\text{Trp}}(\lambda) \cdot \varepsilon_{\text{AEDANS}}(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad \text{Gl. 2.20}$$

$J$ : Überlappungsintegral zwischen Emission des Donors und Absorption des Akzeptors;  $F_{\text{Trp}}(\lambda)$ : normalisierte Fluoreszenz des Donors Tryptophan;  $\varepsilon_{\text{AEDANS}}(\lambda)$ : Absorptionskoeffizient des Akzeptors AEDANS;  $\lambda$ : Wellenlänge

Das Emissionsspektrum des nur-Donor Proteins wurde auf die Gesamtintensität 1 normiert. Aus diesem normierten Emissionsspektrum des nur-Donor Proteins in der CAM-Form und dem Absorptionsspektrum des nur-Akzeptor Proteins wurde das Überlappungsintegral  $J$  gemäß Gleichung 2.20 berechnet. In Annäherung an die Integration wurden die Spektren in 1 nm-Abschnitte unterteilt, multipliziert und aufsummiert. Das Überlappungsintegral wurde im Bereich von 310 bis 450 nm berechnet.

### 2.11.3 Bestimmung der Transfereffizienz und des apparenten Abstands $R$

Die Effizienz  $E$  des Energietransfers in einem Protein kann durch den Vergleich von Spektren erhalten werden, die unter denselben Bedingungen gemessen wurden. Betrachtet man die Veränderung der Donor-Fluoreszenz, so werden die Spektren des nur-Donor Proteins in der CAM-Form und des Donor-Akzeptor Proteins benötigt. Die Berechnung der Effizienz erfolgt nach Gleichung 2.21.

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad \text{Gl. 2.21}$$

Hierbei ist  $F_{DA}$  die Fluoreszenz des Donors in Gegenwart des Akzeptors (Donor-Akzeptor Protein) und  $F_D$  die Fluoreszenz des Donors in Abwesenheit des Akzeptors (nur-Donor Protein). Wurde die Effizienz aus der Fluoreszenz nach Anregung bei 280 nm bestimmt, mußte die mittlere Effizienz des Transfers im Wellenlängenbereich zwischen 360 und 380 nm ermittelt werden. Unterhalb von 350 nm führt der Beitrag der Tyr-Fluoreszenz zu einer Verfälschung der Ergebnisse. Wurden Spektren mit einer Anregungswellenlänge von 295 nm ausgewertet, war die Effizienz über den ganzen Bereich der Trp-Fluoreszenz konstant.

Alternativ kann auch aus der Akzeptorfluoreszenz auf die Effizienz geschlossen werden (Gleichung 2.22, (Lakowicz, 1999)). Es werden die Spektren des Donor-Akzeptor Proteins ( $F_{AD}$ ) und des nur-Akzeptor Proteins ( $F_A$ ), sowie die Absorptionskoeffizienten von Trp ( $\epsilon_D$ ) und AEDANS ( $\epsilon_A$ ) bei der Anregungswellenlänge benötigt. Die Auswertung erfolgte nur für Spektren mit Anregungswellenlänge 295 nm, da bei dieser Wellenlänge  $\epsilon_D$  nicht durch die Tyrosin-Absorption verfälscht wird. Gl 2.22 setzt voraus, daß das Protein vollständig markiert vorliegt. Die mittlere Effizienz des Energietransfers wurde im Maximum der AEDANS-Fluoreszenz (490 bis 500 nm) bestimmt.

$$E = \frac{\epsilon_A}{\epsilon_D} \left( \frac{F_{AD}}{F_A} - 1 \right) \quad \text{Gl. 2.22}$$

Aus den ermittelten Effizienzen  $E$  und dem Försterabstand  $R_0$  kann der apparente Abstand  $R$  der Fluorophore im Protein bestimmt werden (Gleichung 2.23).

$$R = R_0 \cdot \left( \frac{1}{E} - 1 \right)^{1/6} \quad \text{Gl. 2.23}$$

### 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

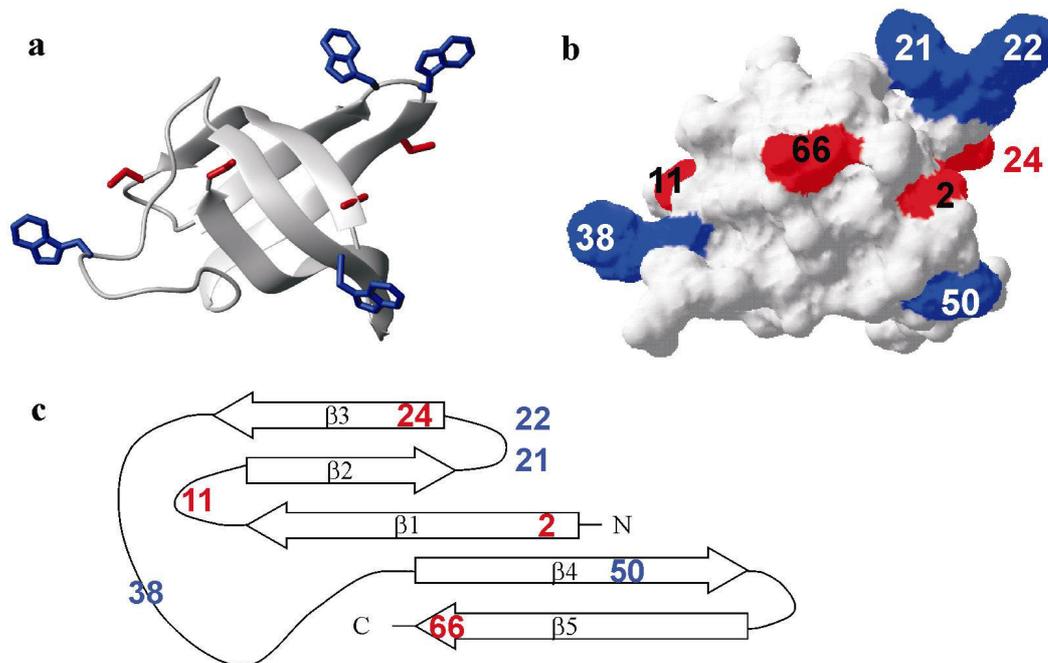
#### 3.1 Auswahl der Positionen für Donor und Akzeptor

Die Änderung von Abständen auf molekularer Ebene kann durch FRET-Experimente beobachtet werden. Dabei dient die Fluoreszenzintensität des Donors und idealerweise auch des Akzeptors (falls dieser fluoresziert) als Meßsignal. Sowohl der Donor als auch der Akzeptor sollten möglichst frei beweglich an der Oberfläche des gefalteten Proteins lokalisiert sein. Diese Anforderung an die Fluorophore ergibt sich aus mehreren Sachverhalten: i) Das Donor-Akzeptor Paar soll als Sonde für die Faltungsreaktion dienen, aber die Faltung und damit die Stabilität des Proteins möglichst nicht beeinflussen. Diese Bedingung wird am besten erfüllt, wenn beide Fluorophore lösungsmittel exponiert sind. ii) Zur Berechnung von Abständen aus der gemessenen Fluoreszenz wird der Försterabstand  $R_0$  des Fluorophorenpaars benötigt. Dieser wird neben den spektroskopischen Eigenschaften der Fluorophore auch vom Brechungsindex der Lösung und der relativen Orientierung der Übergangsdipole von Donor und Akzeptor ( $\kappa^2$ ) beeinflusst (2.11.2). Der Faktor  $\kappa^2$  kann nicht experimentell bestimmt, sondern nur abgeschätzt werden. Bei freier Drehbarkeit beider Fluorophore ergibt sich für  $\kappa^2$  der gemittelte Wert  $2/3$ , und damit kann  $R_0$  verlässlich bestimmt werden. iii) Die Interpretation der FRET-Messungen ist dann am klarsten, wenn sich die intrinsische Fluoreszenz der beiden einzelnen Fluorophore bei Entfaltung des Proteins nicht ändert. Dies gilt besonders für kinetische Messungen, bei denen der direkte Vergleich mit dem einfachmarkierten Protein schwierig ist. Exponierte Fluorophore sind oft frei beweglich und ändern ihre Emission im Verlauf der Faltung kaum, da ihre Umgebung im ge- und entfalteten Zustand des Proteins ähnlich ist. Im hydrophoben Inneren eines nativen Proteins hingegen ist die Beweglichkeit aromatischer Reste häufig stark eingeschränkt und die Emission stark verändert (Schmid, 1997).

Trp8 des *Bc-Csp* Wildtypproteins bietet hierfür ein gutes Beispiel. Seine Fluoreszenzintensität sinkt bei Entfaltung des Proteins auf 30 % des Ausgangswertes ab (Schindler *et al.*, 1995). Zwar liegt die Seitenkette von Trp8 teilweise lösungsmittel exponiert an der Oberfläche von *Bc-Csp*, doch in der nativen Struktur bildet sich ein hydrophober Cluster aromatischer Aminosäuren, die an der Bindung von Nukleinsäuren beteiligt sind (Zeeb, 2004). In der Kristallstruktur von *Bc-Csp* (Mueller *et al.*, 2000) sind die aromatischen Ringe von Tyr15 bzw. Phe17 etwa 7 bzw. 5 Å vom Indolring des Trp8 entfernt. Die ausgeprägten Wechselwirkungen mit benachbarten Resten im nativen Protein im Unterschied zum lösungsmittel exponierten entfalteten Zustand führen zur starken Abhängigkeit der Fluoreszenz vom Faltungszustand. Somit besitzt Trp8 keine optimalen Eigenschaften als Donor in FRET-Experimenten und wurde durch Tyrosin ersetzt (Rape, 1999). Das Protein *Bc-Csp* W8Y ist damit die Referenz für alle weiteren Varianten und wird deshalb als Pseudo-Wildtypprotein *Bc-Csp\** bezeichnet.

Anhand der Kristallstruktur von *Bc-Csp* (Mueller *et al.*, 2000) wurden dann lösungsmittel exponierte Positionen ausgewählt, an denen der Donor Tryptophan oder Cystein über

ortsgerichtete Mutagenese eingeführt wurden. Die Cysteine wurden nach der Reinigung des Proteins mit dem Akzeptor AEDANS modifiziert. Exponierte Seitenketten befinden sich entweder in Schleifenbereichen des Proteins oder an der Außenseite der beiden Faltblätter. Ein Kriterium für die Auswahl der Positionen war, daß der  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ -Vektor der Seitenkette möglichst radial vom Zentrum des Proteins nach außen zeigt. Für FRET-Experimente wurden jeweils ein Tryptophan und ein Cystein in einer Proteinvariante kombiniert. Alle verwendeten Positionen sind in Abbildung 3.1 in einer einzigen Proteinstruktur zusammengefaßt.



**Abbildung 3.1:** Positionen des Donors Tryptophan (blau) und des Cysteins (rot) in den verschiedenen Varianten für FRET-Messungen. Es sind alle Positionen in einer einzigen Proteinstruktur zusammengefaßt. (a) Bänderdarstellung und (b) Oberfläche von *Bc-Csp* (Mueller *et al.*, 2000). Die mutierten Aminosäuren wurden mit Hilfe des Swiss-PdbViewer (Guex & Peitsch, 1997) in das Protein modelliert; es sind beliebige Rotamere dargestellt. (a) wurde mit MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) erstellt. (c) Zweidimensionale Projektion der Struktur, die Positionen von Tryptophan sind in blau, von Cystein in rot gekennzeichnet.

Die Änderung des Abstands und damit der Effizienz des Energietransfers zwischen zwei Positionen hängt von der sequentiellen Entfernung der Reste entlang der Peptidkette und von ihrem Abstand in der nativen Struktur ab. Durch paarweise Kombinationen verschiedener Donorpositionen (21, 22, 38, 50) und Akzeptorpositionen (2, 11, 24, 66) kann die Faltung in verschiedenen Bereichen des Proteins verfolgt werden. Zum Beispiel sind die Reste 2 und 50 entlang der Kette durch 47 Aminosäuren getrennt, der Abstand der  $C_{\beta}$ -Atome in der nativen Struktur ist aber nur 8 Å. Dieses Protein ist empfindlich für die Faltung des gesamten  $\beta$ -barrel. Andere Kombinationen detektieren lokale Abstandsänderungen bei der Bildung von  $\beta$ -hairpin-Bereichen (z.B. 21 und 2, 38 und 11) oder der Streckung eines  $\beta$ -Faltblattstranges (21 und 11). Die Strukturierung des langen Schleifenbereichs zwischen  $\beta 3$  und  $\beta 4$  wirkt sich auf die Abstände zu Trp38 aus.

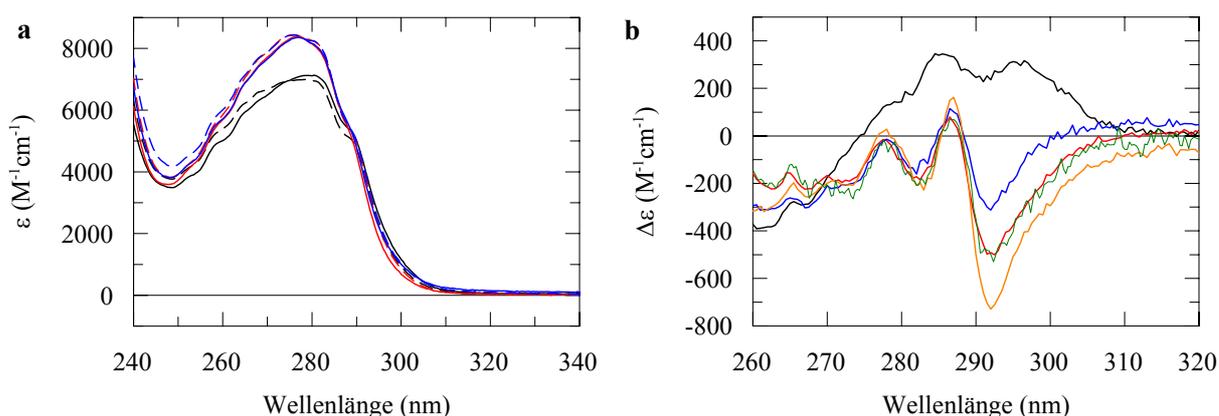
### 3.2 Tryptophan an verschiedenen Positionen in *Bc-Csp\**

Für FRET-Experimente wurden über ortsgerichtete Mutagenese Tryptophanreste in *Bc-Csp\** eingebaut. Alle gewählten Positionen (21, 22, 38, 48, 50, 59) sind im nativen Zustand des Wildtypproteins lösungsmittel exponiert. Die Proteine wurden gereinigt (2.4.1) und spektroskopisch charakterisiert.

#### 3.2.1 Absorption

Das Absorptionsspektrum eines Proteins im Bereich von 240 bis 300 nm wird durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin bestimmt. Tryptophan absorbiert am stärksten und dominiert daher das Absorptionsspektrum. Bei der Entfaltung des Proteins ändert sich die Polarisierbarkeit der Umgebung der absorbierenden Reste; dadurch werden der Grundzustand bzw. der angeregte Zustand der Chromophore unterschiedlich stark stabilisiert und es kommt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums (Schmid, 1997).

In Abbildung 3.2a sind die Spektren von Wildtyp *Bc-Csp*, *Bc-Csp\** F38W und *Bc-Csp\** E50W sowohl im nativen Zustand als auch in Gegenwart von 6 M GdmCl dargestellt. Alle *Bc-Csp\**-Varianten enthalten im Vergleich zum Wildtypprotein zusätzlich ein Tyrosin an Position 8 und besitzen deshalb höhere Absorptionskoeffizienten. Bei der Entfaltung des Proteins werden die Chromophore in eine wässrige Umgebung exponiert. Da Wasser schlechter polarisierbar ist als aromatische Reste im nativen Protein, ist der angeregte Zustand des Chromophors nach Entfaltung energiereicher und es kommt zu einer Blauverschiebung des Spektrums. Die geringfügigen Unterschiede zwischen den Spektren der nativen und entfalteten Proteine sind in Abbildung 3.2b als Differenzspektren dargestellt.

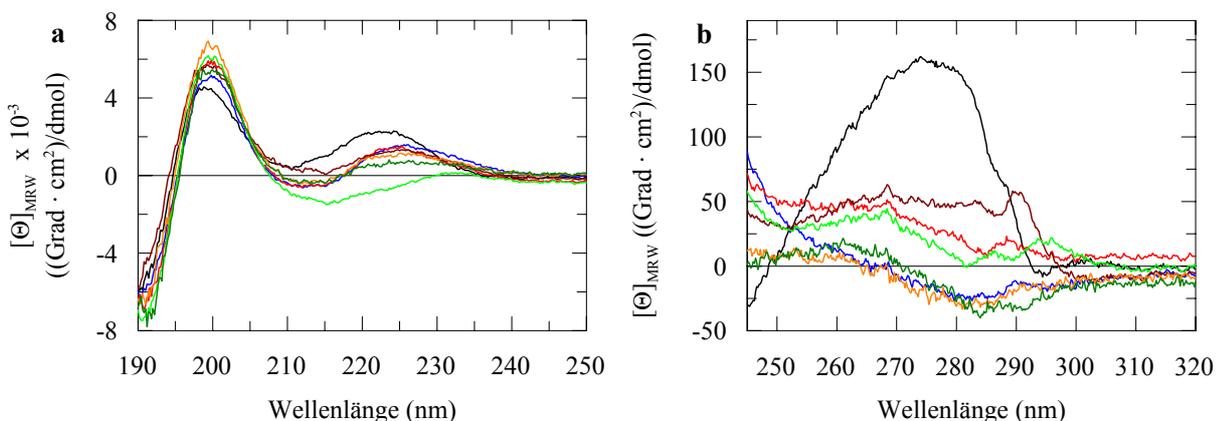


**Abbildung 3.2:** Absorptionseigenschaften verschiedener *Bc-Csp\**-Varianten. (a) Absorptionsspektren der nativen Proteine (durchgezogene Linie) und der entfalteten Proteine in 6 M GdmCl (gestrichelte Linie). Die Spektren des Wildtypproteins sind in schwarz, *Bc-Csp\** F38W in rot und *Bc-Csp\** E50W in blau dargestellt. Die Messungen wurden in 15 mM Ammoniumacetat, pH 7.0 bei Proteinkonzentrationen von 15 bis 22  $\mu$ M durchgeführt. (b) Differenzspektren zwischen nativem und entfaltetem Protein für *Bc-Csp* Wildtypprotein (schwarz), *Bc-Csp\** F38W (rot), *Bc-Csp\** E50W (blau), *Bc-Csp\** E21W (orange), *Bc-Csp\** G22W (dunkelgrün).

Für alle *Bc-Csp\**-Varianten mit exponiertem Tryptophan (F38W, E50W, E21W und G22W) zeigen die Differenzspektren einen ähnlichen Verlauf. Allerdings unterscheiden sie sich vom Differenzspektrum des Wildtypproteins, was bei 292 nm am deutlichsten zu erkennen ist. Diese Abweichung ist ein Hinweis auf einen veränderten Expositionsgrad des Tryptophans entweder im nativen oder im entfalteten Zustand im Vergleich zum Wildtypprotein. Für alle Proteine sind die Änderungen des Absorptionskoeffizienten bei Entfaltung sehr klein (maximal 5 %).

### 3.2.2 Circular dichroismus

Durch Circular dichroismus (CD) Spektroskopie kann sowohl die Sekundär- als auch die Tertiärstruktur von Proteinen untersucht werden. Im Fern-UV (190 bis 250 nm) ergeben Peptidbindungen in definierten Sekundärstrukturen (z.B.  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblattstränge) charakteristische Signale. Dagegen kann im Nah-UV (250 bis 300 nm) die Fixierung einzelner Aromaten in einer asymmetrischen Umgebung und damit die Tertiärstruktur des Proteins beobachtet werden. In Abbildung 3.3 sind die Fern- und Nah-UV CD-Spektren von *Bc-Csp\**-Varianten mit Tryptophan an verschiedenen Positionen gezeigt.



**Abbildung 3.3:** CD-Spektren verschiedener *Bc-Csp\**-Varianten. (a) Fern-UV und (b) Nah-UV CD-Spektren von *Bc-Csp* Wildtypprotein (schwarz), *Bc-Csp\** F38W (rot), *Bc-Csp\** E50W (blau), *Bc-Csp\** E21W (orange), *Bc-Csp\** G22W (dunkelgrün), *Bc-Csp\** S48W (hellgrün) und *Bc-Csp\** Q59W (dunkelrot). Es ist die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure  $[\Theta]_{MRW}$  aufgetragen. Die Messungen erfolgten mit 40  $\mu$ M Protein in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,0 bei 25 °C. Für Fern-UV CD-Spektren betrug die Schichtdicke 0,05 cm, für Nah-UV CD-Spektren 1 cm.

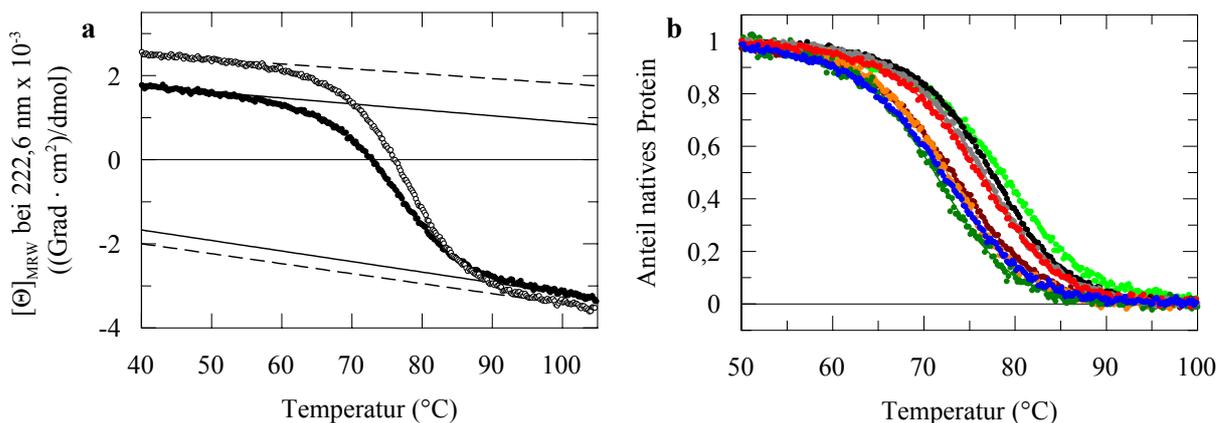
Die Fern-UV CD-Spektren in Abbildung 3.3a zeigen für das Wildtypprotein und alle Tryptophan-Varianten eine gute Übereinstimmung zwischen 190 und 205 nm. Das Maximum des CD-Signals in diesem Bereich ist charakteristisch für  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Somit liegt für alle Varianten ein ähnlicher Anteil an  $\beta$ -Faltblattelementen vor, was auf eine vergleichbare Gesamtstruktur schließen lässt. Der Bereich von 210 bis 230 nm gibt nicht nur das Signal der Sekundärstruktur wieder, sondern enthält auch Beiträge der aromatischen Aminosäuren (Sreerama *et al.*, 1999; Rogers & Hirst, 2004). Deshalb kann aus den CD-Unterschieden in

diesem Bereich nicht auf eine Veränderung in der Sekundärstruktur geschlossen werden. Vermutlich tragen die Tryptophanreste an den einzelnen Positionen unterschiedlich zum CD von 210 bis 230 nm bei.

Die Eigenschaften der aromatischen Reste können einfacher aus den Nah-UV CD-Spektren abgelesen werden (Abbildung 3.3b). Es tritt nur dann ein CD-Signal auf, wenn der absorbierende Rest sich dauerhaft in einer asymmetrischen Umgebung befindet. Dies ist offenbar für Trp8 des Wildtyp *Bc-Csp* der Fall, wie an der hohen Elliptizität  $[\Theta]_{MRW}$  zu erkennen ist. Aufgrund seiner starken Absorption dominiert Tryptophan das CD-Spektrum im Nah-UV; die Beiträge von Tyrosinresten sind geringer und bei niedrigeren Wellenlängen (Maximum bei 276 nm) zu finden. Alle *Bc-Csp*\*-Varianten mit Tryptophan an den Positionen 21, 22, 38, 48, 50 oder 59 zeigen eine äußerst geringe Elliptizität im Nah-UV. Die durch Mutagenese eingeführten Tryptophanreste sind daher nicht in einer asymmetrischen Umgebung am Protein fixiert. Vielmehr sind die Indolringe der Seitenketten frei drehbar, d.h. zum Lösungsmittel exponiert.

### 3.2.3 Thermodynamische Stabilität der *Bc-Csp*\*-Varianten

Die konstruierten *Bc-Csp*\*-Varianten sollten nicht nur Fluoreszenzeigenschaften besitzen, die für FRET-Experimente vorteilhaft sind, sondern sie sollten auch in ihrer Stabilität möglichst dem Wildtypprotein entsprechen. Zur Bestimmung der thermodynamischen Stabilität wurden die Proteine thermisch entfaltet und die Änderung des CD-Signals bei 222,6 nm beobachtet (Abbildung 3.4a). Die normierten Entfaltungsübergänge sind in Abbildung 3.4b aufgetragen,



**Abbildung 3.4:** Thermische Entfaltungsübergänge verschiedener *Bc-Csp*\*-Varianten. (a) Stabilität von *Bc-Csp*\* F38W (●) im Vergleich zu *Bc-Csp* (○). Die Basislinien des nativen und entfalteten Proteins sind für *Bc-Csp*\* F38W als durchgezogene Linien und für *Bc-Csp* als gestrichelte Linien gezeigt. (b) Normierte Auftragung der Meßdaten und Angleiche für das *Bc-Csp* Wildtypprotein (schwarz), *Bc-Csp*\* (grau), *Bc-Csp*\* F38W (rot), *Bc-Csp*\* E50W (blau), *Bc-Csp*\* E21W (orange), *Bc-Csp*\* G22W (dunkelgrün), *Bc-Csp*\* S48W (hellgrün) und *Bc-Csp*\* Q59W (dunkelrot) dargestellt. Die Messungen erfolgten bei einer Proteinkonzentration von 4  $\mu\text{M}$  in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7.0 bei 1 cm Schichtdicke, 1 nm Bandbreite und 8 s Dämpfung. Als Signal diente die Elliptizität  $\Theta$  bei 222,6 nm; die Heizrate betrug 60  $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ .

die thermodynamischen Daten sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt. Im Vergleich zum Wildtypprotein ist die Stabilität der meisten Tryptophan-Varianten etwas verringert, nur *Bc-Csp\** S48W ist stabiler als *Bc-Csp*. Generell korrelieren die Schmelzpunkte  $T_m$  mit der freien Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G_U$ . Die vergleichsweise niedrige thermodynamische Stabilität von *Bc-Csp\** S48W bei gleichzeitig hohem  $T_m$  erklärt sich aus der geringeren Kooperativität des Übergangs, was sich in einer niedrigen van't Hoff-Enthalpie widerspiegelt. Die Mutationen zu Tryptophan verringern die Stabilität von *Bc-Csp\** nicht stark. Durch die Auswahl exponierter Positionen wurden sterische Abstoßungen mit den umgebenden Resten weitgehend vermieden. Bei *Bc-Csp\** G22W als instabiler Variante liegt der Schmelzpunkt nur 5,3 °C unterhalb des  $T_m$  von *Bc-Csp\**. Damit führt der Einbau von Tryptophan bei einigen Varianten zwar zu einer leichten Verringerung der Stabilität, aber drastische Veränderungen der Stabilität und damit der Struktur können ausgeschlossen werden.

**Tabelle 3.1:** Thermodynamische Stabilitätsdaten für die Tryptophan-Varianten von *Bc-Csp\**.

Protein	$T_m$ (°C)	$\Delta H_U (T_m)$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_U (70\text{ °C})$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )
<i>Bc-Csp</i>	77,4	234	4,6
<i>Bc-Csp*</i>	76,5	231	4,0
<i>Bc-Csp*</i> E21W	72,5	227	1,6
<i>Bc-Csp*</i> G22W	71,2	226	0,8
<i>Bc-Csp*</i> F38W	75,9	219	3,5
<i>Bc-Csp*</i> S48W	78,4	196	4,3
<i>Bc-Csp*</i> E50W	71,9	203	1,1
<i>Bc-Csp*</i> Q59W	73,1	204	1,7

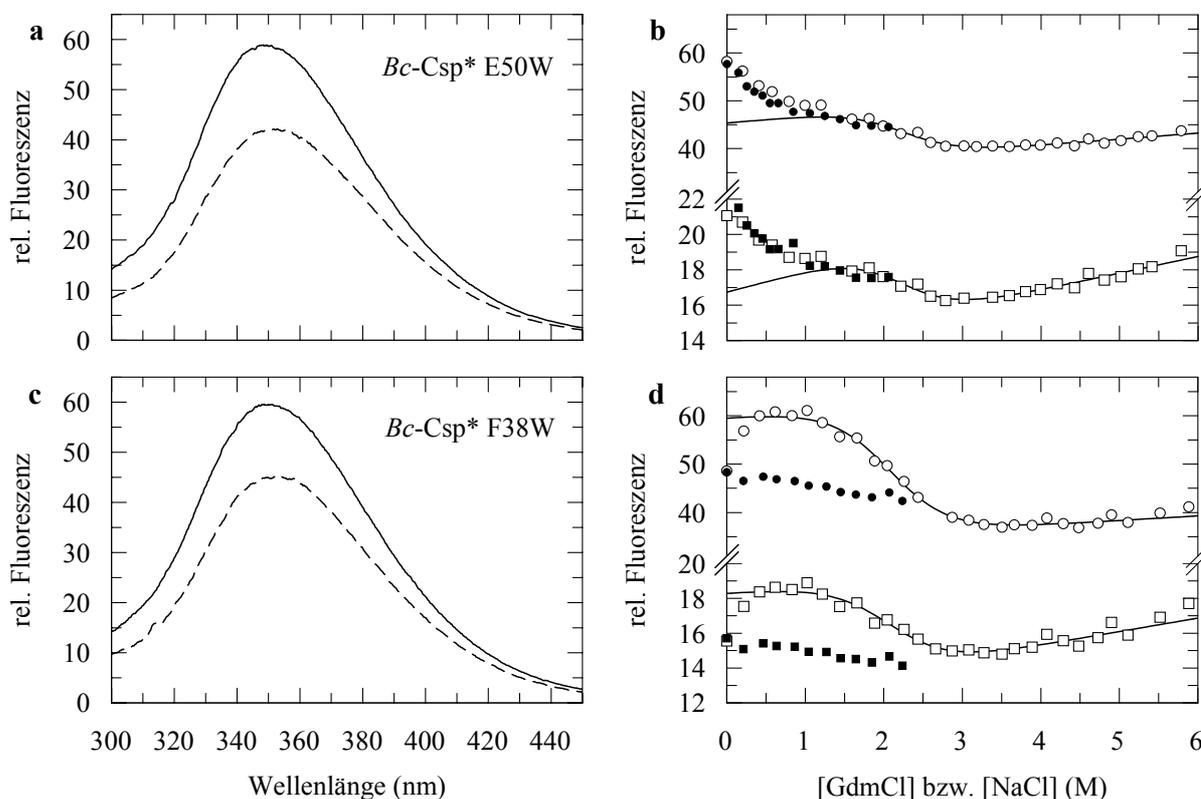
Die Daten wurden aus den in Abbildung 3.4 dargestellten Meßwerten durch Angleich nach dem Zweizustandmodell erhalten.  $T_m$  ist die Temperatur im Mittelpunkt des thermischen Übergangs,  $\Delta H_U (T_m)$  die van't Hoff-Enthalpie bei  $T_m$  und  $\Delta G_U$  die freie Enthalpie der Entfaltung. Bei allen Proteinen wurde für  $\Delta C_p$  ein Wert von 4,0 kJ/(mol·K) angenommen.

### 3.2.4 Fluoreszenzemission

Für FRET-Experimente sind die Fluoreszenzeigenschaften des Donors Tryptophan entscheidend. Es wurden Emissionsspektren der nativen und in 4 M GdmCl entfalteten *Bc-Csp\**-Varianten aufgenommen. Für Proteine mit geringem Unterschied in der Fluoreszenz des gefalteten bzw. entfalteten Proteins wurde zusätzlich die Trp-Fluoreszenz als Funktion der GdmCl-Konzentration gemessen.

Alle untersuchten Proteine enthalten als fluoreszierende Reste neben einem Tryptophan auch zwei Tyrosinreste an den Positionen 8 und 15. Energietransfer von Tyrosin auf Tryptophan ist möglich, allerdings liegt der Försterabstand dieses Fluorophorenpaars bei lediglich 9 Å, so daß nur zwischen räumlich sehr nahen Resten ein Transfer stattfindet. In den Proteinen *Bc-Csp\** F38W, S48W, E50W und Q59W beträgt die Entfernung zwischen Tryptophan

und den beiden Tyrosin-Seitenketten sowohl im gefalteten als auch im entfalteten Zustand mindestens 15 Å. Bei diesem Abstand und einem  $R_0$  von 9 Å ergibt sich eine Transfereffizienz von 0,05, d.h. nur 5 % der Energie werden von Tyrosin auf Tryptophan übertragen. Für diese Proteine wurde die Anregungswellenlänge 280 nm gewählt, bei der zwar auch Tyrosin angeregt wird, was aber aufgrund der geringen Transfereffizienz die Fluoreszenzspektren kaum beeinflusst. Der Vorteil der Anregungswellenlänge 280 nm gegenüber der selektiven Anregung von Tryptophan bei 295 nm ist die stärkere Absorption und damit eine wesentlich höhere Fluoreszenzemission des Tryptophans. Die Fluoreszenzemissionsspektren von *Bc-Csp\** F38W und E50W sowie die entsprechenden Entfaltungsübergänge sind in Abbildung 3.5 gezeigt. Bei *Bc-Csp\** S48W und Q59W sinkt die Fluoreszenz bei Entfaltung auf 38 % bzw. 35 % der Fluoreszenz des nativen Zustands (Daten nicht gezeigt). Sie zeigen somit eine ähnliche Fluoreszenzänderung wie das Wildtypprotein und sind für FRET-Experimente nicht gut geeignet.



**Abbildung 3.5:** Fluoreszenzeigenschaften von *Bc-Csp\** E50W und F38W. (a, c) Fluoreszenzspektren und (b, d) Entfaltungsübergänge von (a, b) *Bc-Csp\** E50W und (c, d) *Bc-Csp\** F38W. (a, c) Die Fluoreszenz bei 25 °C wurde für natives Protein (durchgezogene Linie) und für entfaltetes Protein in 4 M GdmCl (gestrichelte Linie) nach Anregung bei 280 nm gemessen. (b, d) Entfaltungsübergang der Trp-Fluoreszenz nach Anregung bei (○) 280 nm bzw. (□) 295 nm. Salzabhängigkeit der Fluoreszenz in Gegenwart von NaCl nach Anregung bei (●) 280 nm bzw. (■) 295 nm. Die durchgezogenen Linien sind Angleiche an die Daten nach dem Zweizustandsmodell (für *Bc-Csp\** E50W wurde zwischen 0 und 2 M GdmCl eine Korrektur der Salzabhängigkeit vorgenommen). Alle Messungen wurden mit 1 µM Protein in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0 vorgenommen.

Die Fluoreszenz von Proteinen reagiert äußerst empfindlich auf Veränderungen in der Umgebung des fluoreszierenden Restes. Während der Lebensdauer des angeregten Zustands

kann durch strahlungslose Konkurrenzprozesse wie z.B. Fluoreszenzlöschung eine Rückkehr in den Grundzustand erfolgen und dadurch die Fluoreszenzemission reduziert werden. Bei der Entfaltung eines Proteins erfolgt mit der Exposition der Seitenketten zum Lösungsmittel eine starke Änderung der Umgebung und damit der Fluoreszenz, sofern der Rest nicht schon in der nativen Struktur exponiert ist.

Für die Proteine *Bc-Csp\** F38W und E50W sinkt die Fluoreszenz bei Entfaltung in 4 M GdmCl auf ca. 75 % des Wertes für das native Protein ab (siehe Abbildung 3.5a, c). Ein genaueres Bild ergeben die Entfaltungsübergänge in Abbildung 3.5b, d. Hier ist die Änderung der Fluoreszenz sowohl bei der Entfaltung durch GdmCl als auch in Gegenwart von NaCl aufgetragen.

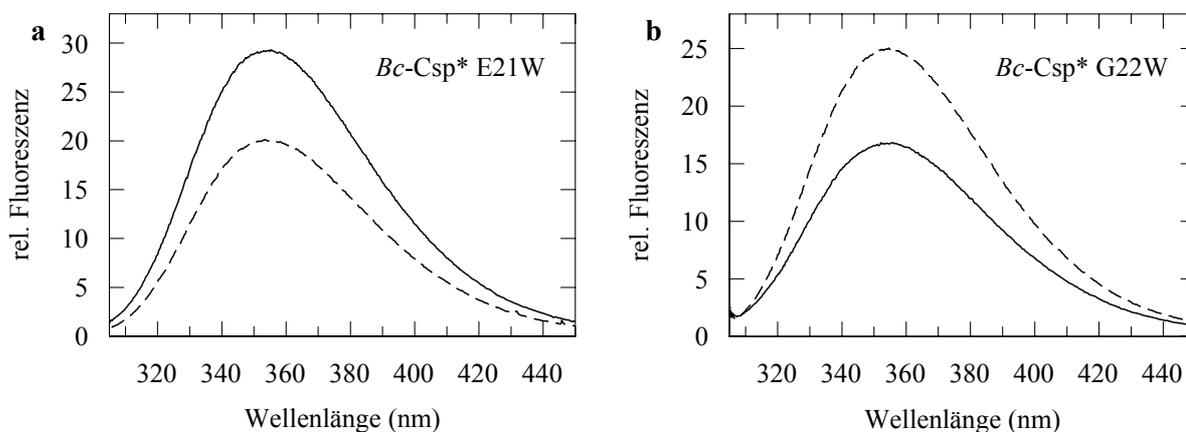
Neben der denaturierenden Wirkung auf das Protein übt GdmCl als Salz auch einen direkten Einfluß auf die Fluoreszenz aus. Dieser Effekt kann in Kontrolltitrationen mit NaCl nachgestellt werden. In Gegenwart von 0 bis 2 M GdmCl bzw. NaCl zeigt die Fluoreszenz von *Bc-Csp\** E50W einen identischen Verlauf (Abbildung 3.5b). Damit ist die Abnahme der Fluoreszenz bis 2 M GdmCl auf einen Salzeffekt und nicht auf eine Umgebungsänderung bei der Entfaltung zurückzuführen. Die mit der Faltungsreaktion verbundene Fluoreszenzänderung ist daher sehr viel kleiner (ca. 10 %) als der Unterschied in den Spektren in Abbildung 3.5a. Der in Abbildung 3.5b gezeigte Angleich an die Daten (um den Salzeffekt korrigiert) ergibt denselben Übergangsmittelpunkt wie der mit Tyrosin als Sonde gemessene Übergang. Dieser Befund bestätigt einerseits das Vorliegen des Salzeffekts und andererseits die Gültigkeit des Zweizustandsmodells.

Bei *Bc-Csp\** F38W kann der starke Anstieg der Fluoreszenz im Entfaltungsübergang zwischen 0 und 0,5 M GdmCl nicht durch die Zugabe von NaCl nachgestellt werden. Damit liegt beim Tryptophan an Position 38 kein Salzeffekt vor, sondern es handelt sich um ein GdmCl-spezifisches Phänomen. Es ist möglich, daß Guanidinium-Kationen Wechselwirkungen mit dem Indolring des Tryptophans eingehen. Die Fluoreszenzänderung im Verlauf der Entfaltungsreaktion von *Bc-Csp\** F38W beträgt also tatsächlich ca. 25 %.

In die Proteine *Bc-Csp\** F38W und E50W wurden zum Anknüpfen eines Akzeptors an verschiedenen Positionen Cysteinreste eingebracht. Nur ein Teil dieser Varianten zeigt die hier beschriebenen charakteristischen Fluoreszenzverläufe bei geringen GdmCl-Konzentrationen. Offenbar können die intrinsischen Fluoreszenzeigenschaften eines Tryptophans durch benachbarte Cysteinreste moduliert werden, da in den Varianten mit geringem Abstand zwischen Tryptophan und Cystein (*Bc-Csp\** F38W/N11C und E50W/Q2C) kein Salzeffekt auftritt (vgl. 3.5.2).

Das unterschiedliche Ausmaß der Fluoreszenzänderung bei der Faltung von *Bc-Csp\** F38W und E50W wurde auch in kinetischen Experimenten bestätigt. *Bc-Csp\** E50W zeigt in Entfaltungs- und Rückfaltungsexperimenten eine äußerst geringe Änderung der Trp-Fluoreszenz (maximal 10 % des Gesamtsignals) und ist damit sehr gut als Donor für FRET-Experimente geeignet.

In den Proteinen *Bc-Csp\** E21W und G22W liegen zwischen dem Tyrosin an Position 15 und dem Tryptophan nur fünf bzw. sechs Reste entlang der Peptidkette. Zwar beträgt der Abstand zwischen den beiden Resten im nativen Zustand aufgrund der gestreckten Konformation des  $\beta$ 2-Faltblattstranges mehr als 20 Å, aber im entfalteten Protein verringert sich der Abstand auf ca. 13 Å. Bei dieser Entfernung ist Energietransfer vom Tyrosin auf Tryptophan möglich. Für die Proteine *Bc-Csp\** E21W und G22W wurde deshalb die Anregungswellenlänge 295 nm gewählt, um Beiträge aus dem Energietransfer von Tyrosin zur beobachteten Trp-Fluoreszenz zu vermeiden. Die Fluoreszenzemissionsspektren dieser beiden Varianten sind in Abbildung 3.6 dargestellt.



**Abbildung 3.6:** Fluoreszenzspektren von (a) *Bc-Csp\** E21W und (b) *Bc-Csp\** G22W. Die Fluoreszenz bei 25 °C wurde für natives Protein (durchgezogene Linie) und für entfaltetes Protein in 4 M GdmCl (gestrichelte Linie) nach Anregung bei 295 nm gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 1  $\mu$ M in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0.

Im Vergleich mit den Fluoreszenzspektren in Abbildung 3.5 ist zu erkennen, daß im Bereich um 310 nm keine Tyr-Fluoreszenz auftritt. Damit ist sichergestellt, daß nur die Trp-Fluoreszenz beobachtet wird.

Die Fluoreszenz von *Bc-Csp\** E21W sinkt bei Entfaltung auf 70 % der Fluoreszenz des nativen Proteins ab. Dagegen erfolgt bei *Bc-Csp\** G22W eine Zunahme der Fluoreszenz auf 145 % der Fluoreszenz des nativen Proteins. Da die beiden Tryptophanreste in der Proteinsequenz direkt aufeinanderfolgen und in der nativen Struktur in der Schleife zwischen den Faltblattsträngen  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 exponiert sind, überrascht dieses stark unterschiedliche Verhalten. Wahrscheinlich ist die verringerte Fluoreszenz von nativem *Bc-Csp\** G22W auf eine Fluoreszenzlöschung, möglicherweise durch Glu21, zurückzuführen.

Befindet sich Indol in einer hydrophoben Umgebung (z.B. Cyclohexan), ist das Emissionsmaximum zu Wellenlängen im Bereich von 300 nm verschoben. Ähnlich starke Blauverschiebungen wurden auch für Tryptophanreste in Proteinen (z.B. Azurin) beschrieben (Szabo *et al.*, 1983). Die extreme Verschiebung wird durch die vollständig hydrophobe Umgebung des Tryptophans im Proteininneren des Azurins verursacht (Gilardi *et al.*, 1994), (Nar *et al.*, 1991).

Bei allen hier vorliegenden Varianten des *Bc-Csp\** liegt das Emissionsmaximum des Tryptophans nahe 350 nm. Dieser Wert entspricht dem Emissionsmaximum von freiem Tryptophan in wässriger Lösung und bestätigt damit die Exposition der eingeführten Tryptophan-Seitenketten zum Lösungsmittel. Auch durch die Entfaltung des Proteins ändert sich die Lage des Emissionsmaximums kaum; es kommt lediglich zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität.

### 3.2.5 Fluoreszenzanisotropie

Wird eine Lösung von Fluorophoren mit polarisiertem Licht bestrahlt, absorbieren nur Moleküle, deren Absorptions-Übergangsdipol parallel zum elektrischen Feldvektor des einstrahlten Lichts ausgerichtet ist. Obwohl die Moleküle in der Lösung zufällig angeordnet sind, kommt es durch die selektive Anregung zu einer Auswahl von gleich ausgerichteten Molekülen im angeregten Zustand. Diese makroskopische Polarisation des angeregten Zustands wird durch die Bewegungen des gesamten Proteins in der Lösung oder auch des Fluorophors innerhalb des Proteins verringert. Wenn die Emission der Fluoreszenz stattfindet, bevor sich alle angeregten Moleküle im thermischen Gleichgewicht befinden, ist auch das Fluoreszenzlicht polarisiert. Durch die Messung der Fluoreszenzanisotropie kann also die Beweglichkeit von fluoreszierenden Resten abgeschätzt werden. Es wurde die Gleichgewichts-Fluoreszenzanisotropie der Tryptophanreste in den *Bc-Csp\**-Varianten bestimmt (2.7.5).

Die Anisotropie  $r$  für ein beliebig orientiertes Molekül kann aus Gleichung 3.1 berechnet werden. Dabei ist  $\theta$  der Winkel zwischen dem elektrischen Feldvektor des polarisierten Lichts und dem Absorptions-Übergangsdipol des Fluorophors.

$$r = \frac{3(\cos^2 \theta) - 1}{2} \quad \text{Gl. 3.1}$$

Für einen einzigen, parallel zum Anregungslicht orientierten Absorptions-Übergangsdipol beträgt der Maximalwert der Anisotropie 1,0. In einer Lösung von nichtorientierten Fluorophoren können mit geringerer Wahrscheinlichkeit aber auch Moleküle angeregt werden, die nicht exakt parallel ausgerichtet sind. Damit ergibt sich eine Verteilung der angeregten Moleküle um den elektrischen Feldvektor, und aufgrund der verschiedenen Orientierungen der einzelnen Übergangsdipole sinkt das Anisotropiemaximum auf 0,4. Dieser Wert ist aber nur gültig, wenn innerhalb des Moleküls der Absorptions- und Emissions-Übergangsdipol parallel angeordnet sind.

In den meisten Fluorophoren sind Absorptions- und Emissions-Übergangsdipole nicht exakt parallel ausgerichtet. Die Anisotropie wird um so kleiner, je größer der Winkel zwischen den Dipolen wird. Ein Sonderfall ist Tryptophan mit 2 verschiedenen Absorptions-Übergangsdipolen im Indolring. Es erfolgt sowohl Anregung in den  $^1L_b$  als auch in den  $^1L_a$  Zustand, aber die Emission wird ausschließlich von  $^1L_a$  abgegeben.  $^1L_b$  und  $^1L_a$  sind zueinander senkrecht angeordnet und durch die Übertragung der Energie von  $^1L_b$  auf  $^1L_a$  kommt es

zu einer weiteren Verringerung der Anisotropie. Für Tryptophan beträgt der maximale Anisotropiewert bei direkter Anregung von  $^1L_a$  oberhalb von 295 nm 0,3 (Ruggiero *et al.*, 1990). Die für die *Bc-Csp\**-Varianten erhaltenen Anisotropiewerte sind in Tabelle 3.2 enthalten.

**Tabelle 3.2:** Gleichgewichts-Fluoreszenzanisotropie  $r$  des Tryptophans in verschiedenen *Bc-Csp\**-Varianten im nativen und entfalteten Zustand.

Protein	$r$ (0 M GdmCl)		$r$ (4 M GdmCl)
	Anregung 280 nm	Anregung 295 nm	Anregung 295 nm
<i>Bc-Csp</i>	0,045	0,068	0,045
<i>Bc-Csp*</i> E50W	0,034	0,050	0,050
<i>Bc-Csp*</i> F38W	0,026	0,047	0,050
<i>Bc-Csp*</i> E21W	0,026	0,038	0,053
<i>Bc-Csp*</i> G22W	n.b.	0,067	0,047

Die Anregungswellenlänge betrug 280 bzw. 295 nm, die Fluoreszenz wurde bei 350 nm detektiert. Die Anisotropie von Trp22 nach Anregung bei 280 nm wurde nicht bestimmt (n.b.)

Alle gemessenen Anisotropiewerte sind eindeutig kleiner als 0,3, was auf eine ausgeprägte Beweglichkeit hindeutet. Allerdings kann nicht zwischen der schnellen Gesamtbewegung des kleinen *Bc-Csp* und der Beweglichkeit des Fluorophors innerhalb des Proteins unterschieden werden. Die Anisotropie nach Anregung bei 280 nm ist generell kleiner als nach Anregung bei 295 nm. Dieser Befund kann durch die Interaktion zwischen  $^1L_b$  und  $^1L_a$  erklärt werden. Bei 280 nm werden beide Zustände angeregt und durch die Umwandlung von  $^1L_b$  in  $^1L_a$  wird die Anisotropie verringert. Dagegen absorbiert bei 295 nm fast ausschließlich  $^1L_a$ , das direkt emittiert und deshalb eine höhere Anisotropie verursacht.

Im entfalteten Zustand zeigen alle Tryptophanreste unabhängig von ihrer Position in der Proteinkette eine Anisotropie von ca. 0,050. Es ergibt sich damit für keinen der Tryptophanreste ein Hinweis auf das Vorliegen einer teilweise geordneten Struktur in Gegenwart von 4 M GdmCl. Die Tryptophanreste an Position 38 und 50 haben im nativen und denaturierten Zustand denselben Anisotropiewert, d.h. die Beweglichkeit dieser Reste ist auch im gefalteten Zustand nicht eingeschränkt. In *Bc-Csp\** G22W sind die Anisotropien in beiden Zuständen mit dem Wildtypprotein vergleichbar; das Tryptophan an Position 22 scheint damit wie Trp8 des Wildtypproteins im nativen Zustand nicht vollständig exponiert zu sein. Trp21 hingegen ist im nativen Zustand sogar besser beweglich als im entfalteten Zustand. Für alle *Bc-Csp\**-Varianten ist die Anisotropie sehr gering, wodurch die Annahme der freien Drehbarkeit (ausgedrückt als  $\kappa^2 = 2/3$ ) gerechtfertigt ist.

### 3.2.6 Eignung der Tryptophan-Varianten für FRET-Experimente

Alle untersuchten Varianten von *Bc-Csp\** mit Tryptophan an den Positionen 21, 22, 38, 48, 50 und 59 sind im Vergleich zum Wildtypprotein nur leicht destabilisiert (3.2.3). Die Fern-

UV CD-Spektren (3.2.2) aller Proteine sind charakteristisch für  $\beta$ -Faltblattstrukturen und deuten damit auf eine unveränderte Gesamtstruktur der Proteine hin. Für die Durchführung von FRET-Experimenten ist außerdem eine möglichst geringe Änderung der intrinsischen Fluoreszenz wünschenswert. Die Proteine *Bc-Csp\** S48W und *Bc-Csp\** Q59W wurden aufgrund der ausgeprägten Fluoreszenzänderung bei Entfaltung (> 60 %) nicht für Energietransfer-Untersuchungen verwendet. In der Kristallstruktur befinden sich in der Umgebung von Trp48 bzw. Trp59 hydrophobe bzw. aromatische Reste, die vermutlich zu einer Erhöhung der Fluoreszenz im nativen Zustand führen.

Das Tryptophan an Position 38 liegt in dem langen Schleifenbereich zwischen den Faltblattsträngen  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4. In der Peptidkette befindet sich das Tryptophan in der Sequenz EGWKT, bildet aber kaum Wechselwirkungen zu diesen Resten aus. Es existieren auch keine Kontakte zu entfernteren Bereichen des Proteins. Die Fluoreszenzintensität ändert sich bei Entfaltung leicht, die Fluoreszenzanisotropie dagegen bleibt konstant; damit ist *Bc-Csp\** F38W für FRET-Experimente gut geeignet.

Mit einer äußerst geringen Fluoreszenzänderung und einer gleichbleibenden Fluoreszenzanisotropie bei Entfaltung ist *Bc-Csp\** E50W ein nahezu idealer Donor. Trp50 liegt zentral im Faltblattstrang  $\beta$ 4 und ist von Ser48 und Val52, sowie von Met1 auf Strang  $\beta$ 1 und Asn62 auf  $\beta$ 5 umgeben. Trotz der vielen möglichen Wechselwirkungen ist Trp50 stark exponiert und außerdem frei beweglich.

In der Schleife zwischen  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 wurden Austausche zu Trp21 und Trp22 durchgeführt. Dabei wurden in der Sequenz EVEGGS Glu21 bzw. Gly22 (kursiv) ersetzt. Trotz der starken Exposition und keiner erkennbaren Wechselwirkung zu anderen Proteinbereichen ändern sich sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Fluoreszenzanisotropie der beiden Tryptophanreste bei Entfaltung. Aufgrund der strategisch günstigen Positionierung am Ende von  $\beta$ 2 wurde Trp21 bzw. Trp22 als Donor für FRET-Experimente im  $\beta$ 1, $\beta$ 2-Bereich von *Bc-Csp\** eingesetzt.

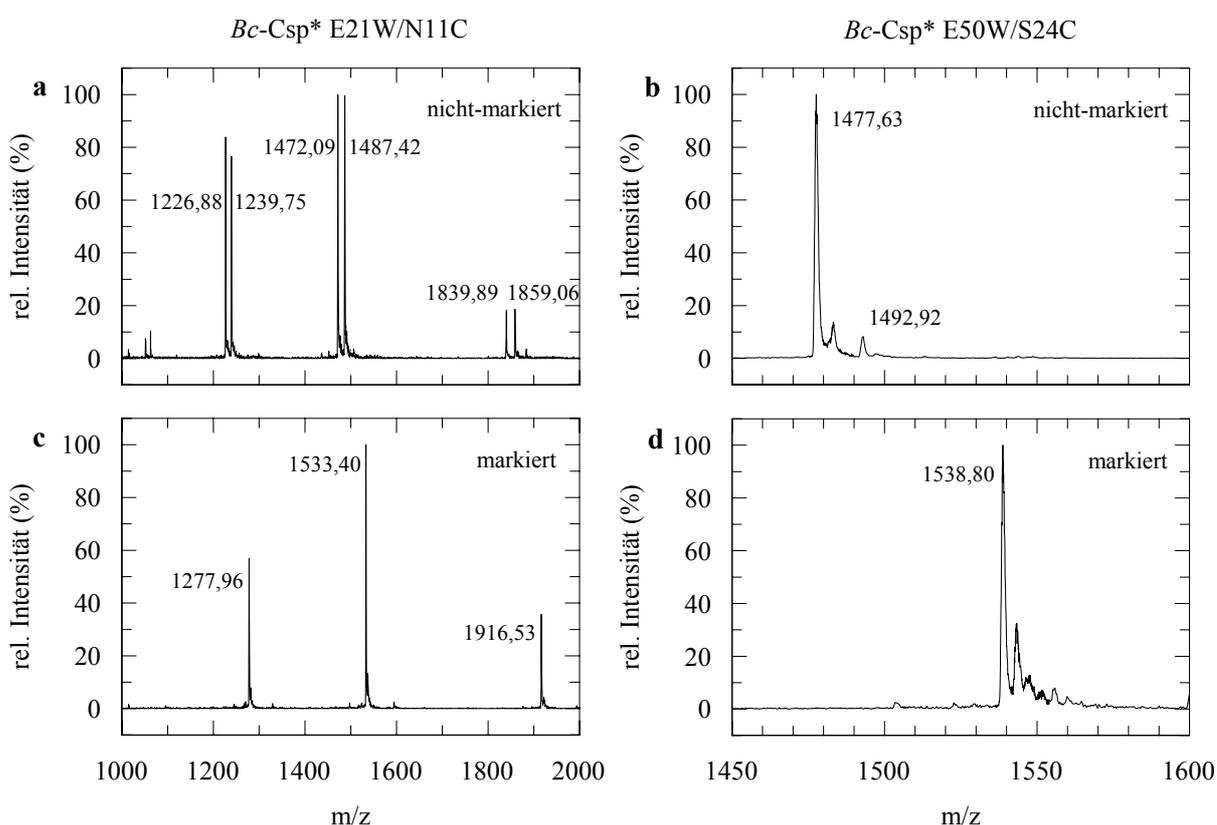
### 3.3 Markierung Cystein-haltiger Proteine mit AEDANS

Die Cysteinreste zur Anknüpfung des Akzeptormoleküls AEDANS wurden, ebenso wie die Tryptophanreste, an lösungsmittlexponierten Positionen in *Bc-Csp\** eingebracht. Dadurch werden einerseits eine größtmögliche Flexibilität des Akzeptors und andererseits eine minimale Beeinflussung der Proteineigenschaften durch die Modifikation gewährleistet. Die ortsgerichtete Mutagenese zu Cystein erfolgte an den Kettenenden (Position 2 und 66), in der Schleife zwischen  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 (Position 11) und am Anfang des Stranges  $\beta$ 3 (Position 24). In Kombination mit Trp50 und Trp38 konnten Abstände gemessen werden, die sich über das gesamte Protein erstrecken; Trp21 und Trp22 wurden nur mit Cys2 und Cys11 kombiniert, um spezifisch lokale Abstandsänderungen im  $\beta$ 1, $\beta$ 2-Bereich zu untersuchen.

Die Markierung mit AEDANS erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben. In Proteinen, die sowohl Trp als auch AEDANS enthalten, kann Energietransfer stattfinden. Für diese Proteine wird anstelle der Benennung *Bc-Csp\** TrpX/CysY-AEDANS die einfachere Kurzbezeichnung X→Y verwendet. Dabei steht X für die Position des Donors und Y für die Position des Akzeptors; z.B. ist 21→11 das Protein *Bc-Csp\** E21W/N11C-AEDANS mit dem Donor Tryptophan an Position 21 und dem Akzeptor AEDANS an Position 11.

### 3.3.1 Massenspektrometrische Kontrolle der Markierung mit AEDANS

Die Proteine wurden sowohl nach der Reinigung als auch nach der Modifikation mit 1,5-IAEDANS oder Iodacetamid mit ESI-MS analysiert. Dabei wurde das Vorliegen der korrekten Molekularmasse und nach Modifikation auch die Vollständigkeit der Reaktion überprüft. In Abbildung 3.7 sind die ESI-MS-Spektren zweier Proteine und der jeweiligen AEDANS-Derivate dargestellt.



**Abbildung 3.7:** ESI-Massenspektren der Proteine (a) *Bc-Csp\** E21W/N11C und (b) *Bc-Csp\** E50W/S24C sowie der mit AEDANS markierten Proteine (c) 21→11 und (d) 50→24. Die Intensität des höchsten Signals wurde auf 100 % normiert. In (a) und (c) sind von rechts nach links die Signale der vierfach, fünffach, sechsfach und siebenfach geladenen Proteine zu erkennen. (b) und (d) zeigen jeweils die Masse des fünffach geladenen Proteins.

Die berechneten molaren Massen der Proteine *Bc-Csp\** E21W/N11C und *Bc-Csp\** E50W/S24C betragen 7356,3 und 7383,3 g/mol. Aus Abbildung 3.7a ergeben sich für die Signale der vier- bis sechsfach geladenen Ionen von *Bc-Csp\** E21W/N11C (kleinerer m/z-Wert)

Molekularmassen von 7355,6, 7355,5 und 7355,3 g/mol; für *Bc-Csp\** E50W/S24C wird aus Abbildung 3.7b eine molare Masse von 7383,2 g/mol ermittelt. Die Abweichung der experimentell bestimmten von den berechneten Werten liegt hier und bei allen untersuchten Proteinen im Bereich von < 1 g/mol.

Alle Puffer zur Reinigung von Cystein-haltigen *Bc-Csp\**-Varianten enthalten  $\beta$ -ME als Reduktionsmittel. Neben dem Schutz des Cysteins vor Oxidation kann auch die Bildung von gemischten Disulfiden aus Protein und  $\beta$ -ME erfolgen, was zu einer Zunahme der molaren Masse um 76,1 g/mol führt. Dieses gemischte Disulfid verursacht die Signale bei größeren m/z-Werten aller Ladungszustände in Abbildung 3.7a und das Signal bei 1492,92 in Abbildung 3.7b. Das Verhältnis von Protein mit freiem Cystein und  $\beta$ -ME-Disulfid variiert bei den einzelnen *Bc-Csp\**-Varianten bzw. Proteinreinigungen stark, z.B. liegt *Bc-Csp\** E21W/N11C ungefähr zur Hälfte und *Bc-Csp\** E50W/S24C überwiegend mit einem freien Cystein vor. Vor der Markierung wurde das gemischte Disulfid durch TCEP gespalten und  $\beta$ -ME durch Gelfiltration entfernt.

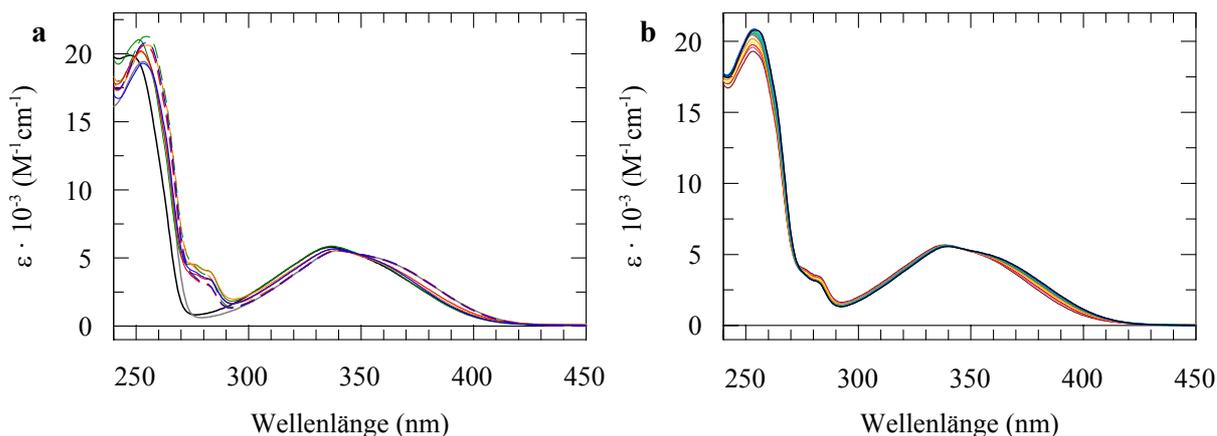
Nach der Umsetzung der Proteine mit 1,5-IAEDANS kommt es zu einer Massenzunahme von 306,3 g/mol und damit zu einer Verschiebung der Ionensignale zu höheren m/z-Werten. Diese Zunahme ist in Abbildung 3.7c,d im Vergleich mit dem jeweils darüber dargestellten nichtmarkierten Protein deutlich zu erkennen, und die experimentell erhaltene Molekularmasse stimmt mit dem berechneten Wert gut überein. Da das Signal des nichtmarkierten Proteins fehlt, kann von einer vollständigen Markierung mit AEDANS ausgegangen werden. Für weitergehende spektroskopische Messungen wurden nur vollständig modifizierte Proteinproben eingesetzt.

Die Ionisierung von *Bc-Csp* erfolgt hauptsächlich durch die Anlagerung von Protonen. Daneben tritt in geringerem Umfang auch die Bindung von Natrium- oder Kaliumionen auf, die zu den Signalen bei höheren m/z-Werten in Abbildung 3.7d führen.

### 3.3.2 Absorptionseigenschaften des Akzeptors AEDANS

Das Absorptionsspektrum des Akzeptors AEDANS wird zur Berechnung des Überlappungsintegrals und damit des Försterabstands  $R_0$  benötigt. Es wurden die Spektren der nur-Akzeptor Proteine *Bc-Csp\** Q2C-AEDANS, N11C-AEDANS, S24C-AEDANS und L66C-AEDANS gemessen. Die molekulare Umgebung des Akzeptors ist hierbei identisch zum entsprechenden Donor-Akzeptor Protein, in dem Energietransfer stattfindet. Die Spektren der nur-Akzeptor Proteine enthalten die Absorption von AEDANS sowie der beiden Tyrosinreste von *Bc-Csp\**, allerdings trägt Tyrosin nur im Bereich unter 300 nm zur Absorption bei und hat damit keinen Einfluß auf die Berechnung von  $R_0$  bei Wellenlängen über 310 nm (2.11.2).

Abbildung 3.8a zeigt die Absorptionsspektren der vier nur-Akzeptor Proteine in der gefalteten bzw. entfalteten Form; in Abbildung 3.8b sind die Spektren von *Bc-Csp\** S24C-AEDANS bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen dargestellt.



**Abbildung 3.8:** Absorptionsspektren des Akzeptors AEDANS. (a) Absorptionskoeffizient des Addukts von  $\beta$ -Mercaptoethanol an 1,5-IAEDANS ( $\beta$ -ME-AEDANS) bei 0,0 (schwarz) bzw. 6,0 M GdmCl (grau). Für die Proteine *Bc-Csp\** Q2C-AEDANS (dunkelgrün), N11C-AEDANS (orange), S24C-AEDANS (blau) und L66C-AEDANS (rot) sind die Absorptionskoeffizienten des nativen Proteins (durchgezogene Linie) und des entfalteten Proteins bei 6,0 M GdmCl (gestrichelte Linie) dargestellt. (b) Absorptionskoeffizient von *Bc-Csp\** S24C-AEDANS bei 0,0 bis 6,0 M GdmCl (0,5 M-Schritte, Farbcodierung: dunkelrot (0,0 M GdmCl), orange (2,0 M GdmCl), schwarz (6,0 M GdmCl)). Als Puffer wurde 15 mM Ammoniumacetat, pH 7.0 verwendet.

1,5-IAEDANS wurde mit  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) umgesetzt, um das Iodacetamid des Fluorophors in einen Thioether umzuwandeln. Das Produkt  $\beta$ -ME-AEDANS besitzt dieselbe chemische Struktur wie AEDANS an einem modifizierten Protein. Das Absorptionsspektrum von  $\beta$ -ME-AEDANS ist als schwarze Linie in Abbildung 3.8a dargestellt. Zwischen der langwelligeren Absorptionsbande mit einem Maximum bei 337 nm und der ca. 3,5fach stärker absorbierenden Bande bei 250 nm befindet sich ein Minimum der Absorption bei 280 nm. Wird bei FRET-Experimenten die Anregungswellenlänge 280 nm verwendet, wird AEDANS so wenig wie möglich direkt angeregt und dadurch das Hintergrundsignal der Akzeptorfluoreszenz minimiert. Aufgrund der Absorptionsbande oberhalb von 300 nm kann Energie von angeregtem Tryptophan auf AEDANS übertragen werden.

In Gegenwart von 6 M GdmCl kommt es zu einer geringfügigen Verschiebung des gesamten Spektrums von  $\beta$ -ME-AEDANS (graue Linie in Abbildung 3.8a) zu höheren Wellenlängen. Eine vergleichbare Rotverschiebung (zumindest der langwelligeren Flanken) wird auch in Ethanol-haltigen Lösungen von AEDANS beobachtet. Möglicherweise wird der angeregte Zustand des Chromophors in GdmCl oder Ethanol durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert und ist dadurch energieärmer als in Wasser.

Die Spektren der Proteine *Bc-Csp\** Q2C-AEDANS, N11C-AEDANS, S24C-AEDANS und L66C-AEDANS sind ebenfalls in Abbildung 3.8a dargestellt und zeigen unterhalb von 300 nm den zusätzlichen Beitrag der beiden Tyrosinreste. Im für die  $R_0$ -Bestimmung relevanten Bereich oberhalb von 310 nm besitzen alle entfaltenen Proteine dieselbe Absorption wie  $\beta$ -ME-AEDANS, d.h. es liegen in 6 M GdmCl keine Wechselwirkungen zwischen dem Protein und AEDANS vor.

Das Absorptionsverhalten der nativen Proteine unterscheidet sich dagegen leicht in Abhängigkeit von der Position der AEDANS-Modifikation. So sind die Spektren von nativem *Bc-Csp\** Q2C-AEDANS und  $\beta$ -ME-AEDANS oberhalb von 310 nm identisch. Wird Cys2 mit AEDANS modifiziert, ergeben sich also offenbar kaum Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und dem Protein. Für die Proteine *Bc-Csp\** N11C-AEDANS, S24C-AEDANS und L66C-AEDANS wird eine geringfügige Rotverschiebung im Vergleich zu  $\beta$ -ME-AEDANS beobachtet.

Für alle nur-Akzeptor Proteine wurden Absorptionsspektren im Bereich von 0 bis 6 M GdmCl gemessen. In Abbildung 3.8b sind beispielhaft die Spektren von *Bc-Csp\** S24C-AEDANS in 0,5 M GdmCl-Schritten gezeigt. Die Tyrosin-Absorption verschiebt sich nur im Bereich zwischen 0 und 3 M GdmCl, in dem der Übergang von nativem zu entfaltetem Protein stattfindet. Dagegen werden die Absorptionsbanden von AEDANS (über 310 nm) kontinuierlich mit steigender GdmCl-Konzentration zu höheren Wellenlängen verschoben. Die Entfaltung des Proteins hat keinen erkennbaren Einfluß auf die AEDANS-Absorption.

Beim Vergleich sowohl der Proteine untereinander als auch der Spektren eines Proteins bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen ergeben sich nur geringfügige Änderungen. Alle Absorptionskoeffizienten der Proteine sind ähnlich zu den Werten von  $\beta$ -ME-AEDANS. Eine signifikante Beeinflussung der AEDANS-Absorption durch das Protein kann dadurch ausgeschlossen werden. Umgekehrt sollte auch das Verhalten des Proteins durch die Modifikation mit AEDANS kaum verändert werden.

### 3.3.3 *Beweglichkeit von proteingebundenem AEDANS*

Die Fluoreszenz von AEDANS wird durch die aromatische Naphthalinsulfonsäure verursacht. Der Chromophor ist im modifizierten Protein durch einen langen *linker* (Abbildung 1.3) mit dem Rückgrat der Polypeptidkette verbunden. An die Cysteinseitenkette ist die Acetyl-ethylendiamin-Einheit von AEDANS als Thioether angeknüpft. Dadurch ergibt sich eine Kette aus 8 Atomen, in der die freie Drehbarkeit um die Bindungen nur an der zentralen Amidbindung eingeschränkt ist. Im Unterschied dazu ist z.B. der Indolring des Tryptophans nur über eine einzelne Methylengruppe mit der Hauptkette verknüpft. Aufgrund der äußerst flexiblen Anknüpfung von AEDANS ist mit einer hohen Beweglichkeit der fluoreszierenden Gruppe zu rechnen.

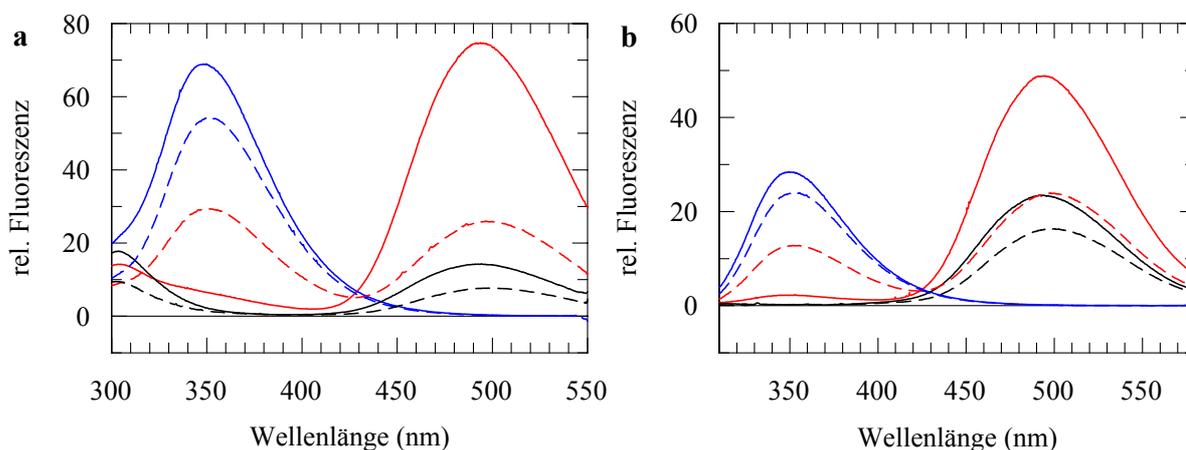
Ist ein aromatisches System in einer chiralen Umgebung fixiert, ergibt sich durch die unterschiedliche Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht ein CD-Signal. Wenn AEDANS in einer definierten, gleichbleibenden Orientierung an das Protein gebunden wäre, sollte sich das CD-Signal im Vergleich zum nichtmarkierten Protein ändern. Die CD-Spektren von 50→24 und dem nur-Donor Protein *Bc-Csp\** E50W/S24C stimmen im Bereich der Absorptionsbanden von AEDANS allerdings überein und bestätigen damit die ausgeprägte Beweglichkeit der AEDANS-Gruppe.

Alternativ kann die Flexibilität eines Fluorophors durch Messung der Fluoreszenzanisotropie abgeschätzt werden. Je kleiner der Anisotropiewert, desto größer ist die Beweglichkeit des Fluorophors. Die für AEDANS gemessenen Werte liegen alle unter 0,020 und sind damit sehr klein. Auch die Anisotropiemessungen bestätigen somit die freie Beweglichkeit von AEDANS. Die Annahme des Wertes  $2/3$  für  $\kappa^2$  ist aufgrund der freien Drehbarkeit sowohl des Tryptophan- als auch des AEDANS-Restes gerechtfertigt.

### 3.4 FRET von Tryptophan auf AEDANS

#### 3.4.1 Fluoreszenzmission von AEDANS-markiertem Bc-Csp\*

Durch FRET kann die Anregungsenergie des Tryptophans strahlungslos auf AEDANS übertragen werden. Der Energietransfer führt zur Relaxation des angeregten Zustands von Tryptophan und ist somit ein Konkurrenzprozess zur Fluoreszenz. In Fluoreszenzmissionsspektren äußert sich FRET in der Abnahme der Donor-Fluoreszenz (Tryptophan) und in der Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz (AEDANS). In Abbildung 3.9 ist der Effekt des Energietransfers auf die Fluoreszenzspektren am Beispiel von 50→66 und den entsprechenden nur-Donor und nur-Akzeptor Proteinen gezeigt. Das Cystein im nur-Donor Protein wurde mit Iodacetamid modifiziert, um die Anknüpfung eines Fluorophors in Form eines Thioethers mit Acetamid zu imitieren. Als Kurzbezeichnung für dieses carbamoylemethylierte Protein wird *Bc-Csp\** E50W/L66C-CAM verwendet.



**Abbildung 3.9:** Fluoreszenzspektren von 50→66 im gefalteten Zustand bei 0 M GdmCl (durchgezogene Linie) und im entfalteten Zustand bei 4 M GdmCl (gestrichelte Linie). Es sind die Spektren des Donor-Akzeptor Proteins 50→66 (rot), des nur-Donor Proteins *Bc-Csp\** E50W/L66C-CAM (blau), und des nur-Akzeptor Proteins *Bc-Csp\** L66C-AEDANS (schwarz) gezeigt. Die Spektren wurden nach Anregung bei (a) 280 nm bzw. (b) 295 nm bei 25 °C gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 1  $\mu$ M in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0.

Sowohl das nur-Donor Protein (blaue Spektren in Abbildung 3.9) als auch das nur-Akzeptor Protein (schwarze Spektren in Abbildung 3.9) zeigen in der nativen und entfalteten Form ähnliche Spektren. Dagegen kommt es bei Entfaltung des Donor-Akzeptor Proteins

50→66 zu einer deutlichen Veränderung des Fluoreszenzspektrums aufgrund des zusätzlich stattfindenden FRET. Die hohe Effizienz des Energietransfers im nativen Zustand führt zu einer stark erniedrigten Trp-Fluoreszenz bei gleichzeitig sehr hoher Fluoreszenz des Akzeptors AEDANS (Emissionsmaximum bei 495 nm). Bei der Entfaltung des Proteins in 4 M GdmCl sinkt die Transfereffizienz. Im Vergleich zum nativen Protein ist die Trp-Fluoreszenz erhöht und die AEDANS-Fluoreszenz erniedrigt.

Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 280 nm trägt auch Tyrosin zu den Fluoreszenzspektren bei (Abbildung 3.9a). Dieser zusätzliche Beitrag (Maximum bei 305 nm) ist am deutlichsten im Spektrum des nur-Akzeptor Proteins (schwarzes Spektrum) zu erkennen. Die Fluoreszenz von Tyr8 und Tyr15 in *Bc-Csp\** ist stark umgebungsabhängig und sinkt bei der Entfaltung des Proteins auf ca. 50 % ab. Daher konnte die Tyr-Fluoreszenz als unabhängige Sonde zur Bestimmung der Stabilität in Entfaltungsübergängen verwendet werden. Bei Wellenlängen über 350 nm tritt keine Tyr-Fluoreszenz auf.

Durch Anregung bei 295 nm läßt sich die Emission der Tyrosinreste zwar unterdrücken (Abbildung 3.9b), allerdings wird dann das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Tryptophan und AEDANS im Vergleich zur Anregung bei 280 nm ungünstiger. Die Trp-Fluoreszenz verringert sich auf 40 % und gleichzeitig steigt die AEDANS-Fluoreszenz um 65 % an. Messungen nach Anregung bei 295 nm zeigen deshalb ein viel stärkeres Hintergrundsignal des Akzeptors AEDANS und gleichzeitig geringere Signaländerungen aufgrund von FRET. Deshalb wurde die Anregungswellenlänge 295 nm nur für Varianten verwendet, bei denen Energietransfer von Tyrosin auf Tryptophan ausgeschlossen werden mußte (Trp21 und Trp22 als Donor).

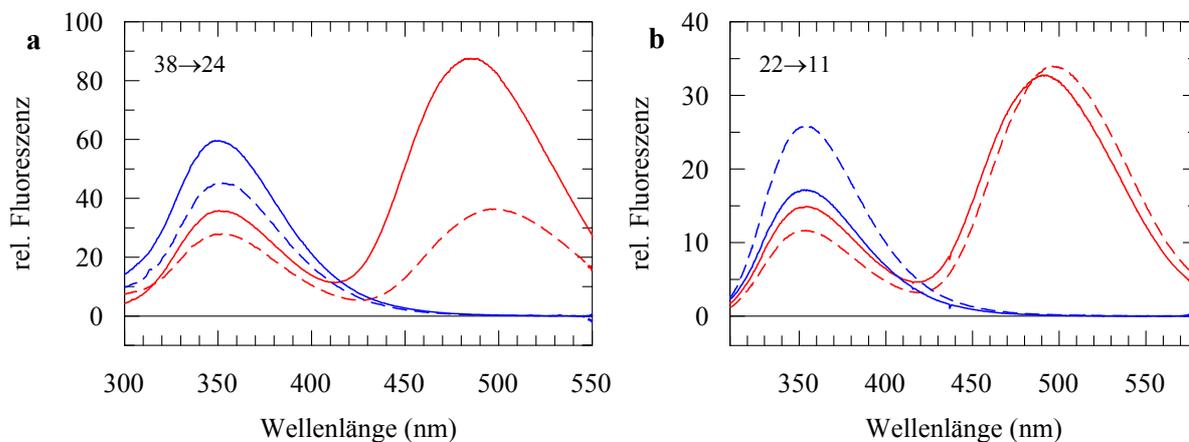
#### 3.4.2 Einfluß von Abstandsänderungen auf die Fluoreszenz

Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor im nativen Protein kann aus der Kristallstruktur von *Bc-Csp* (Mueller *et al.*, 2000) bestimmt werden. Beim entfalteten Zustand handelt es sich um ein Ensemble verschiedener Konformationen der Polypeptidkette. Der durchschnittliche Abstand der Fluorophore im entfalteten Zustand wird aus der Länge der Polypeptidkette zwischen den Fluorophoren abgeschätzt (vgl. 3.4.5).

Je nach Position des Donors und Akzeptors kann der Abstand bei Entfaltung des Proteins zunehmen, gleichbleiben oder abnehmen. Für das Protein 50→66 nimmt der Abstand bei Entfaltung zu. Demzufolge sinkt die Effizienz des Energietransfers, was sich in einer Zunahme der Trp-Fluoreszenz und einer Abnahme der AEDANS-Fluoreszenz äußert (Abbildung 3.9).

Die Fluoreszenzspektren von 38→24 bzw. 22→11 in Abbildung 3.10 geben einen gleichbleibenden bzw. reduzierten Abstand bei Entfaltung des Proteins wieder. Im Falle von 38→24 ändert sich der Abstand kaum mit dem Faltungszustand. Die Trp-Fluoreszenz nimmt bei Entfaltung zwar leicht ab, dieser Effekt ist aber auf die intrinsische Änderung der Fluoreszenz zurückzuführen (blaue Spektren in Abbildung 3.10a). Die starke Abnahme der AEDANS-

Fluoreszenz bei Entfaltung wird auch im nur-Akzeptor Protein beobachtet (Daten nicht gezeigt) und ist daher nicht durch eine Abstandsänderung bedingt.



**Abbildung 3.10:** Fluoreszenzspektren von (a) 38→24 (Anregungswellenlänge 280 nm) und (b) 22→11 (Anregungswellenlänge 295 nm) in der nativen Form (durchgezogene Linie) und in Gegenwart von 4 M GdmCl (gestrichelte Linie). Die Spektren des Donor-Akzeptor Proteins sind in rot und die Spektren des entsprechenden nur-Donor Proteins in blau abgebildet. Die Messungen erfolgten bei 25 °C und einer Proteinkonzentration von 1  $\mu$ M in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0.

Die Positionen 22 und 11 befinden sich im nativen Protein an den Enden eines  $\beta$ -Faltblattstrangs. Bei der Entfaltung des Proteins wird diese gestreckte Konformation aufgehoben und Donor und Akzeptor nähern sich an. Die hohe Effizienz des Energietransfers im denaturierten Zustand ist in Abbildung 3.10b zu erkennen. Zwar sinkt die Trp-Fluoreszenz von 22→11 bei Entfaltung nur wenig ab, dabei muß aber die starke intrinsische Zunahme der Fluoreszenz berücksichtigt werden. Vergleicht man das Donor-Akzeptor Protein 22→11 mit dem nur-Donor Protein, so wird klar, daß im nativen Zustand nur ein schwacher, im entfaltenen Zustand dagegen ein ausgeprägter Energietransfer stattfindet. Die geringfügige Zunahme der AEDANS-Fluoreszenz bei Entfaltung resultiert aus einer Zunahme durch effizienteren Energietransfer und einer ähnlich großen Abnahme der intrinsischen Fluoreszenz.

### 3.4.3 Försterabstand $R_0$

Der charakteristische Transfer- oder Försterabstand  $R_0$  wurde für alle Varianten bei GdmCl-Konzentrationen zwischen 0 und 6 M aus den entsprechenden Spektren berechnet. Mit steigendem Brechungsindex der Lösung kommt es nach Gl. 2.19 zu einer leichten Abnahme von  $R_0$ . Das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors werden in Gegenwart von GdmCl nicht relativ zueinander verschoben, so daß das Überlappungsintegral annähernd konstant bleibt. Den stärksten Einfluß auf  $R_0$  hat die Quantenausbeute des Donors,  $\phi_{\text{Trp}}$ . Zu ihrer Bestimmung wurden nur-Donor Proteine verwendet, in denen die Cysteinreste mit Iodacetamid modifiziert waren (CAM-Form). Sowohl der charakteristische Transferabstand  $R_0$  als auch die Quantenausbeute  $\phi_{\text{Trp}}$  sind in Tabelle 3.3 für alle Proteine angegeben.

**Tabelle 3.3:** Försterabstand  $R_0$  und Quantenausbeute  $\phi_{\text{Trp}}$  für Donor-Akzeptor Proteine.

Protein	Natives Protein (0 M GdmCl)		Denaturiertes Protein (4 M GdmCl)	
	$R_{0, N}$ (Å)	$\phi_{\text{Trp}, N}$	$R_{0, U}$ (Å)	$\phi_{\text{Trp}, U}$
38→11	21,8	0,102	21,3	0,103
38→24	22,4	0,122	21,3	0,103
38→66	22,6	0,126	21,2	0,102
50→2	23,4	0,159	21,5	0,109
50→11	22,9	0,139	21,8	0,118
50→24	22,7	0,131	21,6	0,111
50→66	23,0	0,138	21,8	0,120
21→11	24,3	0,200	22,1	0,128
22→11	21,3	0,091	22,2	0,132

Es sind die Daten bei 0 M GdmCl ( $R_{0, N}$ ,  $\phi_{\text{Trp}, N}$ ) und 4 M GdmCl ( $R_{0, U}$ ,  $\phi_{\text{Trp}, U}$ ) angegeben. Bei der Berechnung von  $R_0$  wurde für  $\kappa^2$  der Wert 2/3 angenommen.

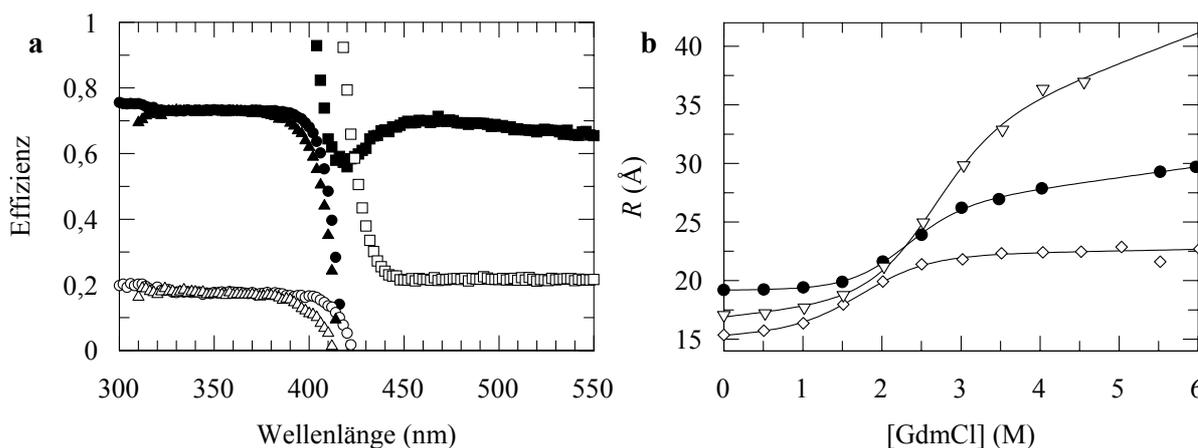
Im denaturierten Zustand sind die Quantenausbeuten  $\phi_{\text{Trp}, U}$  für die verschiedenen Proteine ähnlich (0,102 bis 0,132), wobei die Werte von der Position des Tryptophans abhängen. Trp38 besitzt in allen Varianten eine Quantenausbeute von 0,102 bzw. 0,103, für Trp50 liegen die Werte im Bereich zwischen 0,109 und 0,120. Der charakteristische Transferabstand für das entfaltete Protein  $R_{0, U}$  hängt linear von der Quantenausbeute ab und liegt für alle Proteine zwischen 21,2 und 22,2 Å.

Für die nativen Proteine ist ebenfalls eine Korrelation zwischen dem Försterabstand  $R_{0, N}$  und der Quantenausbeute  $\phi_{\text{Trp}, N}$  zu erkennen, allerdings sind die Werte der einzelnen Proteine tendenziell größer und weichen stärker voneinander ab als im denaturierten Zustand. Die Extremwerte der Quantenausbeute liegen für Trp21 bei 0,200 und für Trp22 bei 0,091; die entsprechenden Werte des charakteristischen Transferabstandes sind 24,3 Å für 21→11 und 21,3 Å für 22→11. Mit der deutlichen Abnahme der Quantenausbeute von Trp21 bei Entfaltung (nativ 0,200, denaturiert 0,128) kann auch die in Abbildung 3.6 gezeigte starke Abnahme der Fluoreszenzintensität erklärt werden. Für Trp22 nehmen sowohl die Quantenausbeute als auch die Fluoreszenzintensität bei Entfaltung zu. In den Proteinen mit Trp38 variiert die Quantenausbeute im nativen Zustand zwischen 0,102 und 0,126. Der Abstand zwischen Trp38 und Cys11 ist mit 9 Å extrem kurz. Wahrscheinlich führt das Schwefelatom des Cystein-Thioethers zu einer Fluoreszenzlöschung und damit zur niedrigen Quantenausbeute von 38→11 (0,102) im Vergleich mit 38→24 (0,122) und 38→66 (0,126). Für Trp50 ist die Quantenausbeute etwas höher als für Trp38 und liegt zwischen 0,131 und 0,159. Auch hier macht sich in der gut definierten, nativen Struktur der Positionseffekt der einzelnen Cysteinreste stärker bemerkbar als im entfalteten Zustand.

### 3.4.4 Abstandsbestimmung aus Fluoreszenzspektren

Die Effizienz des Energietransfers kann aus den Spektren des Donor-Akzeptor Proteins im Vergleich mit den Spektren der einfach markierten Proteine berechnet werden (2.11.3). Die Berechnung der Transfereffizienz mit Hilfe der Donor-Fluoreszenz ist für Spektren nach Anregung bei 280 oder 295 nm möglich. Bei der Berechnung aus der Akzeptorfluoreszenz werden nur Spektren mit der Anregungswellenlänge 295 nm eingesetzt, da die Absorptionskoeffizienten sowohl des Donors als auch des Akzeptors bei der Anregungswellenlänge bekannt sein müssen. Dies ist nur bei 295 nm der Fall; bei 280 nm dagegen wird die Absorption des Donors Tryptophan von Tyrosin überlagert.

Aus der Effizienz des Transfers und dem Försterabstand  $R_0$  kann gemäß Gl. 2.23 der apparente Abstand zwischen den Fluorophoren berechnet werden. Ein Vergleich der Transfer-effizienzen, die mit den verschiedenen Bestimmungsmöglichkeiten erhalten wurden, ist in Abbildung 3.11 für das Protein 50→24 gezeigt. Außerdem sind für drei Proteine die apparenten Abstände als Funktion der GdmCl-Konzentration aufgetragen.



**Abbildung 3.11:** Effizienzbestimmung und apparenter Abstand zwischen den Fluorophoren. (a) Bestimmung der Effizienz des Energietransfers bei 0 M GdmCl (gefüllte Symbole) und 4 M GdmCl (offene Symbole) für die Variante 50→24. Die Effizienz wurde aus der Donor-Fluoreszenz nach Anregung bei (●, ○) 280 nm bzw. (▲, △) 295 nm und aus der (■, □) Akzeptor-Fluoreszenz berechnet. (b) Der apparente Abstand zwischen den Fluorophoren ist für die Proteine (●) 50→24, (◇) 50→66 und (▽) 50→2 gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen. Die Angleiche an die Daten gemäß dem Zweizustandsmodell sind als Linie gezeigt. Die zugrundeliegenden Fluoreszenzspektren wurden mit 1  $\mu$ M Protein in 100 mM Na-cacodylat, pH 7,0 bei 25 °C aufgenommen.

Die Effizienz kann nur in Wellenlängenbereichen ausgewertet werden, in denen ausschließlich ein Fluorophor emittiert. Für den Akzeptor AEDANS wird der Bereich des Emissionsmaximums um 495 nm verwendet, für Tryptophan der Bereich zwischen 350 und 380 nm, da hier Beiträge von Tyrosin ausgeschlossen werden können. In diesen Bereichen sind die in Abbildung 3.11a dargestellten Effizienzwerte konstant. Zwischen 400 und 450 nm enthält die Fluoreszenz des Donor-Akzeptor Proteins Beiträge beider Fluorophore. Bei der Berechnung der Effizienz wird diese Fluoreszenz mit der Emission eines einzelnen Fluoro-

phors verglichen, und die Resultate sind folglich verfälscht, was in Abbildung 3.11a an der starken Änderung der Effizienz zu erkennen ist.

Vergleicht man in Abbildung 3.11a die aus der Donor-Fluoreszenz (um 350 nm) und aus der Akzeptor-Fluoreszenz (um 500 nm) bestimmte Effizienz, so liegen die Werte für natives 50→24 (gefüllte Symbole) bei 0,7 und für das entfaltete Protein (offene Symbole) bei 0,2. Die gute Übereinstimmung der Werte aus der Donor- und der Akzeptor-Fluoreszenz bestätigt, daß die beobachteten Fluoreszenzänderungen im Donor-Akzeptor Protein tatsächlich auf FRET zurückzuführen sind. Die Berechnung der Effizienz beruht auf dem Vergleich gleichkonzentrierter Lösungen verschiedener Proteine. Deshalb summieren sich Unsicherheiten bei der Bestimmung des Absorptionskoeffizienten und der Proteinkonzentration auf und machen geringe Abweichungen in der Transfereffizienz bei alternativer Berechnung aus Donor- oder Akzeptor-Fluoreszenz fast unvermeidlich. Die wahlweise Verwendung der Donor-Fluoreszenz nach Anregung bei 280 oder bei 295 nm liefert dieselben Ergebnisse, d.h. die zusätzliche Anregung von Tyrosin bei 280 nm hat keine Auswirkung auf die ermittelte Transfereffizienz.

Aus den Effizienzen des Energietransfers wurden apparente Abstände bestimmt (Abbildung 3.11b). Für die gezeigten Proteine 50→24, 50→66 und 50→2 nimmt der Abstand bei Entfaltung des Proteins zu. Die experimentell bestimmten Abstände ergeben einen Entfaltungsübergang nach dem Zweizustandsmodell (Linien in Abbildung 3.11b). Intramolekulare Abstände können demzufolge ähnlich wie spektroskopische Sonden den Faltungszustand eines Proteinensembles wiedergeben.

Sowohl Trp50 als auch Cys24 befinden sich in der nativen Struktur von *Bc*-Csp innerhalb eines Faltblattstranges; dagegen bilden Cys2 bzw. Cys66 den N- bzw. C-Terminus der Polypeptidkette. Die Kettenenden eines Proteins sind flexibler als Bereiche innerhalb der Kette. Bei den Proteinen 50→66 und 50→2 steigt die Basislinie des nativen Proteins an, bei 50→24 besitzt diese Basislinie keine Steigung (Abbildung 3.11b). Dieser Befund könnte ein Hinweis darauf sein, daß sich die Kettenenden bereits bei geringen GdmCl-Konzentrationen etwas von der restlichen Proteinstruktur entfernen, ohne daß Entfaltung eintritt. Bei 50→24 bewirken niedrige GdmCl-Konzentrationen keine Flexibilisierung der Struktur, und der Abstand ändert sich erst bei der Entfaltung des gesamten  $\beta$ -barrel.

Für 50→2 sinkt die Effizienz bei über 4 M GdmCl auf Werte unter 0,04. In diesem Effizienzbereich ist keine verlässliche Bestimmung des Abstands mehr möglich und damit ist auch die Steigung der Basislinie des entfalteten Zustands schlecht definiert. Allerdings unterscheiden sich die Basislinien der denaturierten Proteine stark in ihrer Steigung. Dabei scheint die Größe der Steigung proportional zum Abstand von Donor und Akzeptor entlang der Kette zu sein. Bei 50→66 (16 Reste entlang der Kette) ist der Abstand im denaturierten Zustand nahezu unabhängig von der GdmCl-Konzentration; bei 50→24 (26 Reste) steigt der Abstand leicht und bei 50→2 (48 Reste) stark mit der GdmCl-Konzentration an. Ein entfaltetes Protein ist anscheinend kein Ensemble mit definierter Ausdehnung der Kette, sondern es kommt mit steigender GdmCl-Konzentration zu einer Expansion. Dieser Effekt zeigt sich bei langen Kettensegmenten besonders deutlich.

### 3.4.5 Vergleich der berechneten Abstände mit Referenzdaten

Die Verlässlichkeit der experimentell bestimmten apparenten Abstände wurde mit Vergleichsdaten überprüft. Für native Proteine wurde der Abstand  $R_{\text{Kristall}}$  zwischen dem  $C_{\beta}$  des Tryptophans und dem  $C_{\beta}$  des Cysteins aus der Kristallstruktur von *Bc-Csp* (Mueller *et al.*, 2000) herangezogen. Der durchschnittliche Abstand  $R_{\text{coil}}$  im Ensemble der denaturierten Peptidketten wurde mit Gleichung 3.2 berechnet.

$$R_{\text{coil}} = 5,45 \cdot (aa_1 - aa_2)^{1/2} \quad \text{Gl. 3.2}$$

Dabei stehen  $aa_1$  und  $aa_2$  für die Positionen der Fluorophore im Protein. Gleichung 3.2 beruht auf der Betrachtung eines Proteins als Polymerkette. Der Abstand der Kettenenden in einem beliebigen Polymer ist definiert als  $L \cdot B^{1/2}$ , wobei B die Anzahl und L den Abstand der Monomeren angibt, der bei Proteinen 3,8 Å beträgt (Goldenberg, 2003). Der größere Faktor 5,45 in Gleichung 3.2 wurde empirisch für Peptide und Proteine bestimmt (Haas, 1996).

Für alle Varianten wurden  $R_{\text{Kristall}}$  und  $R_{\text{coil}}$  bestimmt. Diese werden in Tabelle 3.4 mit den experimentellen Daten verglichen. Es sind die apparenten Abstände  $R_{\text{N}}$  und  $R_{\text{U}}$  aus den verschiedenen Möglichkeiten der Effizienzbestimmung bei 0 und 4 M GdmCl angegeben.

**Tabelle 3.4:** Abstände zwischen Donor und Akzeptor in AEDANS-markierten *Bc-Csp*\* Varianten.

Protein	Natives Protein (0 M GdmCl)				Denaturiertes Protein (4 M GdmCl)			
	$R_{\text{Kristall}}$ (Å)	$R_{\text{N, Trp}}$ (280 nm) (Å)	$R_{\text{N, Trp}}$ (295 nm) (Å)	$R_{\text{N, AEDANS}}$ (Å)	$R_{\text{coil}}$ (Å)	$R_{\text{U, Trp}}$ (280 nm) (Å)	$R_{\text{U, Trp}}$ (295 nm) (Å)	$R_{\text{U, AEDANS}}$ (Å)
38→11	9,1	13,7	13,8	n.b.	28,3	27,4	28,0	24,1
38→24	27,7	24,1	25,0	24,0	20,4	23,0	23,0	23,4
38→66	17,8	23,0	22,9	22,9	28,8	27,3	27,2	28,1
50→2	7,9	17,0	17,1	18,2	37,8	36,3	37,4	30,6
50→11	22,7	23,5	23,8	24,9	34,0	27,5	27,6	28,5
50→24	14,6	19,2	19,3	19,9	27,8	27,9	28,0	26,7
50→66	14,2	15,3	15,3	17,8	21,8	22,4	22,4	25,5
21→11	24,6	25,5	25,7	25,7	17,2	20,1	20,3	18,8
22→11	27,7	28,1	29,3	26,8	18,1	21,3	21,5	19,2
2→11	24,1	26,0	26,2	24,4	16,4	19,6	19,9	18,1

Es ist der Abstand  $R_{\text{Kristall}}$  zwischen dem  $C_{\beta}$  des Tryptophans und dem  $C_{\beta}$  des Cysteins in der Kristallstruktur sowie der gemäß Gleichung 3.2 berechnete Abstand  $R_{\text{coil}}$  für ein vollständig entfaltetes Protein angegeben. Der apparente Abstand im nativen Protein,  $R_{\text{N}}$ , wurde experimentell mit Hilfe der Trp-Fluoreszenz ( $R_{\text{N, Trp}}$ ) bzw. der AEDANS-Fluoreszenz ( $R_{\text{N, AEDANS}}$ ) bestimmt. Für das entfaltete Protein in 4 M GdmCl wurde der Abstand  $R_{\text{U, Trp}}$  aus der Trp-Fluoreszenz und  $R_{\text{U, AEDANS}}$  aus der AEDANS-Fluoreszenz bestimmt. Die zugrundeliegenden Fluoreszenzspektren des Tryptophans wurden bei 280 bzw. 295 nm angeregt; für die AEDANS-Fluoreszenz wurde ausschließlich die Anregungswellenlänge 295 nm verwendet.

Die experimentell bestimmten Abstände  $R_{N, \text{Trp}}$  (280 nm) und  $R_{N, \text{Trp}}$  (295 nm) weichen maximal um 1 Å voneinander ab; meist ist die Abweichung sogar kleiner als 0,2 Å. Die Anregungswellenlänge der Fluoreszenzspektren hat somit keinen Einfluß auf die Abstandsbestimmung. Auch für die apparenten Abstände  $R_{U, \text{Trp}}$  (280 nm) und  $R_{U, \text{Trp}}$  (295 nm) findet sich eine ähnlich gute Übereinstimmung.

Der Vergleich von  $R_{N, \text{Trp}}$  mit  $R_{N, \text{AEDANS}}$  bzw. von  $R_{U, \text{Trp}}$  mit  $R_{U, \text{AEDANS}}$  zeigt ein uneinheitliches Bild. Vor allem für Abstände im Bereich des charakteristischen Transferabstands  $R_0$  (vgl. 3.4.3) stimmen die Werte sehr gut überein. Daneben werden aber auch Abweichungen von bis zu 2 Å, im Extremfall beim entfalteten Zustand von 50→2 sogar von 6 Å beobachtet. Der Abstand ist bei sehr hohen oder sehr kleinen Effizienzwerten nur noch schlecht definiert, und deshalb können schon kleine Konzentrationsunterschiede zwischen dem doppel- und einfachmarkierten Protein zu veränderten Effizienzen und damit zu fehlerhaften Abständen führen. Außerdem ist die Bestimmung von Abständen mittels der Akzeptor-Fluoreszenz generell weniger verlässlich als die Bestimmung aus der Donor-Fluoreszenz (Lakowicz, 1999).

Die bestimmten apparenten Abstände für das native Protein sind meist größer als der Abstand in der Kristallstruktur. Ist  $R_{\text{Kristall}}$  größer als 20 Å, ist der experimentelle Wert nur ca. 1 Å größer als  $R_{\text{Kristall}}$ . Eine Ausnahme ist 38→24, da hier der experimentelle Wert mit ca. 24,5 Å um 3 Å kleiner ist als  $R_{\text{Kristall}}$  (27,7 Å). Für Proteine mit  $R_{\text{Kristall}}$  kleiner als 20 Å ergibt sich generell eine stärkere Abweichung. Der apparente Abstand ist bei 50→66 um 2 Å, bei 50→24, 38→11 und 38→66 um 5 Å und bei 50→2 sogar um 10 Å größer als der Abstand der  $C_\beta$ -Atome in der Struktur. Die kleinsten  $R_{\text{Kristall}}$  liegen bei den Varianten 38→11 (9,1 Å) und 50→2 (7,9 Å) vor. Bei allen Proteinen ist AEDANS mit dem Cystein über einen langen *linker* verbunden, der in der gestreckten Konformation einen Bereich von 10 Å zwischen dem Schwefelatom und dem Naphthalinsystem überbrückt. Der apparente Abstand setzt sich aus  $R_{\text{Kristall}}$  und einem Beitrag des *linker* zusammen, der allerdings stark von der Orientierung von AEDANS im Molekül abhängt. Die Richtung des  $C_\alpha$ - $C_\beta$ -Vektors des Cysteins gibt auch die Vorzugsrichtung für das AEDANS-Molekül vor. In 38→11 sind die  $C_\alpha$ - $C_\beta$ -Vektoren von Trp38 und Cys11 einander zugewandt und der apparente Abstand ist deshalb nur knapp 5 Å größer als  $R_{\text{Kristall}}$ . Dagegen weisen in 50→2 die  $C_\alpha$ - $C_\beta$ -Vektoren in entgegengesetzte Richtungen, und der durchschnittliche Abstand vergrößert sich daher um die gesamte *linker*-Länge im Vergleich zu  $R_{\text{Kristall}}$ . Bei Varianten mit großem  $R_{\text{Kristall}}$  unterscheiden sich die einzelnen Anordnungsmöglichkeiten von AEDANS nicht so gravierend in ihrer Transfereffizienz wie in Varianten mit kleinem  $R_{\text{Kristall}}$ . Der zusätzliche Beitrag des *linker*-Abstands trägt somit bei großen  $R_{\text{Kristall}}$  weniger zum experimentell bestimmten Abstand bei.

Für die meisten denaturierten Proteine weichen der experimentell bestimmte Abstand und der berechnete Wert  $R_{\text{coil}}$  um weniger als 3 Å voneinander ab. Bei 50→11 und 50→2 liegt die Effizienz aufgrund des großen Abstands bei unter 0,07. Folglich ist die Abstandsbestimmung ungenau, und die gute Übereinstimmung der Werte für 50→2 ist eher überraschend als signifikant. Für 50→11 dagegen ist der experimentell bestimmte Abstand 6 Å kleiner als für eine

vollständig entfaltete Kette erwartet. Eventuell könnte dies auf eine kompakte Reststruktur im denaturierten Zustand hindeuten. Die Unterschiede zwischen berechneten und experimentellen Abständen sind tendenziell kleiner als beim nativen Protein. Da in der entfalteten Proteinkette keine feste Orientierung der  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ -Vektoren von Trp und Cys vorliegt, kann sich der flexible *linker* von AEDANS beliebig anordnen und führt damit zu keiner Vergrößerung des apparenten Abstands.

Generell stimmen die experimentell aus Fluoreszenzspektren bestimmten Abstände sehr gut mit den Referenzwerten aus der Kristallstruktur des nativen Proteins bzw. den berechneten Abständen für ein entfaltetes Protein überein (Tabelle 3.4). Dies gilt für die Bestimmung sowohl aus der Donor- als auch aus der Akzeptor-Fluoreszenz. Demzufolge beruhen die Änderungen in der Emission der Donor-Akzeptor Proteine tatsächlich auf Änderungen in der Effizienz des Energietransfers zwischen Tryptophan und AEDANS.

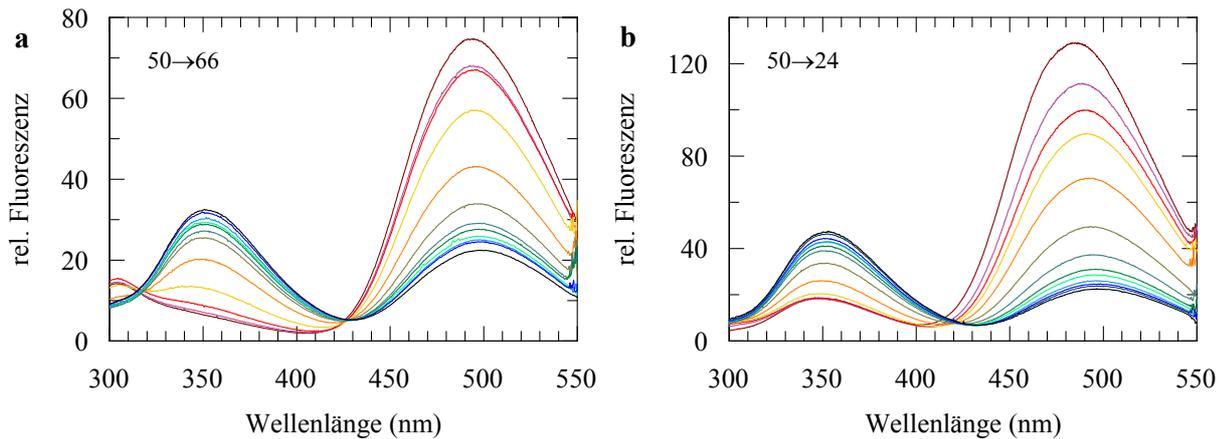
#### 3.4.6 FRET als Sonde in der Proteinfaltung

Bei der Faltung von Proteinen geht das Ensemble des entfalteten Zustands in die definierte dreidimensionale Struktur des nativen Zustands über. Die Konformationsänderung des gesamten Proteins zeigt sich im veränderten Abstand zwischen definierten Positionen innerhalb der Peptidkette. Intramolekulare Abstände können verlässlich aus den Fluoreszenzspektren von Donor-Akzeptor Proteinen bestimmt werden (3.4.5) und eignen sich als Sonde für die Proteinfaltung (3.4.4). Allerdings erfordert die Bestimmung von Abständen immer den Vergleich von doppel- und einfachmarkiertem Protein unter identischen Meßbedingungen. Dies ist besonders bei kinetischen Messungen kaum durchführbar.

Die Fluoreszenzspektren von Donor-Akzeptor Proteinen sind die primäre Meßgröße für die Bestimmung von Abständen und enthalten deshalb die Information über die Transfer-effizienz. Zwar sind auch intrinsische Änderungen der Fluoreszenz von Tryptophan und AEDANS in diesen Spektren enthalten, aber der Haupteffekt beruht auf FRET (3.4.1). In Abbildung 3.12 sind die Fluoreszenzspektren von 50→66 und 50→24 bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen dargestellt.

Bei Entfaltung beider Proteine vergrößert sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor (vgl. Tabelle 3.4). Folglich nimmt mit steigender GdmCl-Konzentration die Trp-Fluoreszenz zu und die AEDANS-Fluoreszenz ab (Abbildung 3.12). Die Fluoreszenzänderung erfolgt nicht linear mit der GdmCl-Konzentration, sondern findet hauptsächlich zwischen 1 und 3 M GdmCl statt. Dies ist der Übergangsbereich bei der GdmCl-induzierten Entfaltung von *Bc-Csp\**. In den Fluoreszenzeigenschaften spiegelt sich die unterschiedliche Transfereffizienz der verschiedenen Faltungszustände wider, und die Fluoreszenz von Donor oder Akzeptor kann daher als Sonde für Faltungsreaktionen eingesetzt werden.

Die Emission der Tyrosinreste bei 305 nm verhält sich bei den Proteinen 50→66 und 50→24 unterschiedlich. Für 50→66 (Abbildung 3.12a) sinkt die Fluoreszenz bei Entfaltung auf 50 % des Wertes des nativen Proteins, wie es auch für *Bc-Csp\** E50W beobachtet wird.



**Abbildung 3.12:** Fluoreszenzspektren von (a) 50→66 und (b) 50→24 bei 0 bis 6 M GdmCl. Es sind Spektren in 0,5 M GdmCl-Schritten dargestellt: 0,0 M dunkelrot, 1,0 M rot, 2,0 M orange, 4,0 M grün und 6,0 M schwarz. Die Messungen erfolgten bei 25 °C und einer Proteinkonzentration von 1  $\mu$ M in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0.

Dagegen ist in nativem 50→24 die Tyr-Fluoreszenz erniedrigt und steigt im Verlauf der Entfaltung leicht an. Die Ursache hierfür ist Energietransfer von Tyrosin auf AEDANS im gefalteten Zustand von 50→24. Die Abstände zwischen Tyr8 bzw. Tyr15 und AEDANS an Position 24 sind mit 14,8 bzw. 16,1 Å kleiner als der charakteristische Transferabstand von Tyrosin und AEDANS (ca. 21 Å). Bei der Entfaltung des Proteins vergrößert sich der Abstand zu Tyr8 und die Tyr-Fluoreszenz steigt an. Im Vergleich zu Tryptophan sind die Beiträge von Tyrosin zum FRET jedoch äußerst gering.

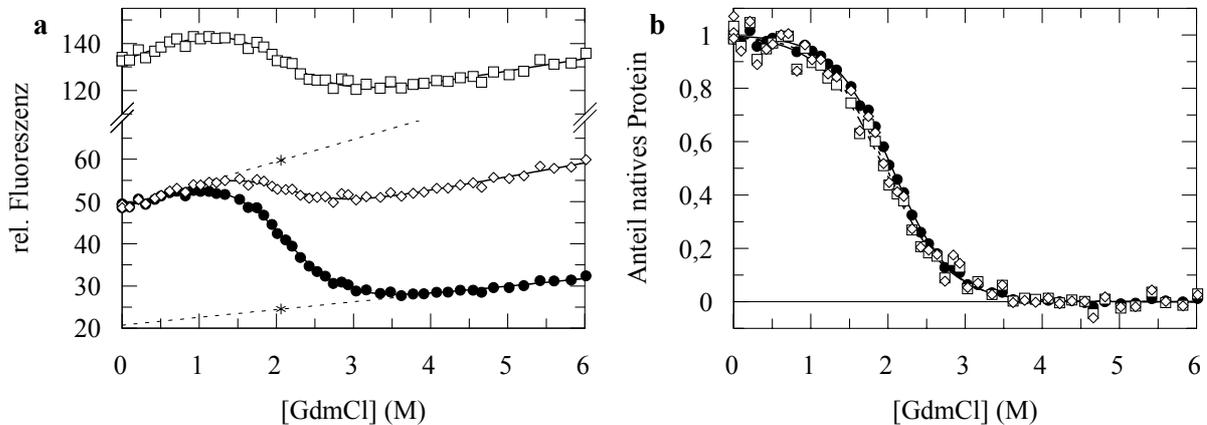
### 3.5 Einfluß der AEDANS-Markierung auf die Stabilität und Faltungskinetik

#### 3.5.1 GdmCl-induzierte Entfaltungsübergänge

Die Faltung der Donor-Akzeptor Proteine wurde fast ausschließlich nach Änderung der GdmCl-Konzentration in schnellen Mischexperimenten untersucht. Deshalb wurde auch die thermodynamische Stabilität der Proteine in GdmCl-induzierten Entfaltungsübergängen bestimmt. Harnstoff ist für die Denaturierung von *Bc-Csp\** ungeeignet, da die Basislinie des denaturierten Proteins nicht erreicht wird. In Abbildung 3.13 ist die Stabilität von *Bc-Csp\** E50W/Q2C (Protein ohne Akzeptor) gegen Entfaltung gezeigt. Als Meßsonde wurden die Tyr-Fluoreszenz nach Anregung bei 280 nm und die Trp-Fluoreszenz nach Anregung bei 280 bzw. 295 nm verwendet.

Sowohl die Tyrosin- als auch die Trp-Fluoreszenz nimmt bei Entfaltung ab, wobei aber das Ausmaß der Änderung stark unterschiedlich ist. Die Fluoreszenz des Donors Tryptophan verringert sich um weniger als 15 %, was für spätere FRET-Experimente wünschenswert ist, aber die Bestimmung der Proteinstabilität erschwert. Dagegen nimmt die Tyr-Fluoreszenz um ca. 50 % ab und ist damit eine sehr verlässliche Sonde für die Stabilitätsbestimmung. Sie wurde bei allen nur-Donor Proteinen eingesetzt, da die Trp-Fluoreszenz aufgrund der geringen

Signaländerung häufig nicht verwendbar war. Die normierte Auftragung der Übergänge in Abbildung 3.13b macht deutlich, daß die drei Meßsonden demselben Übergang folgen, wodurch das Vorliegen eines Zweizustandsverhaltens bestätigt wird.



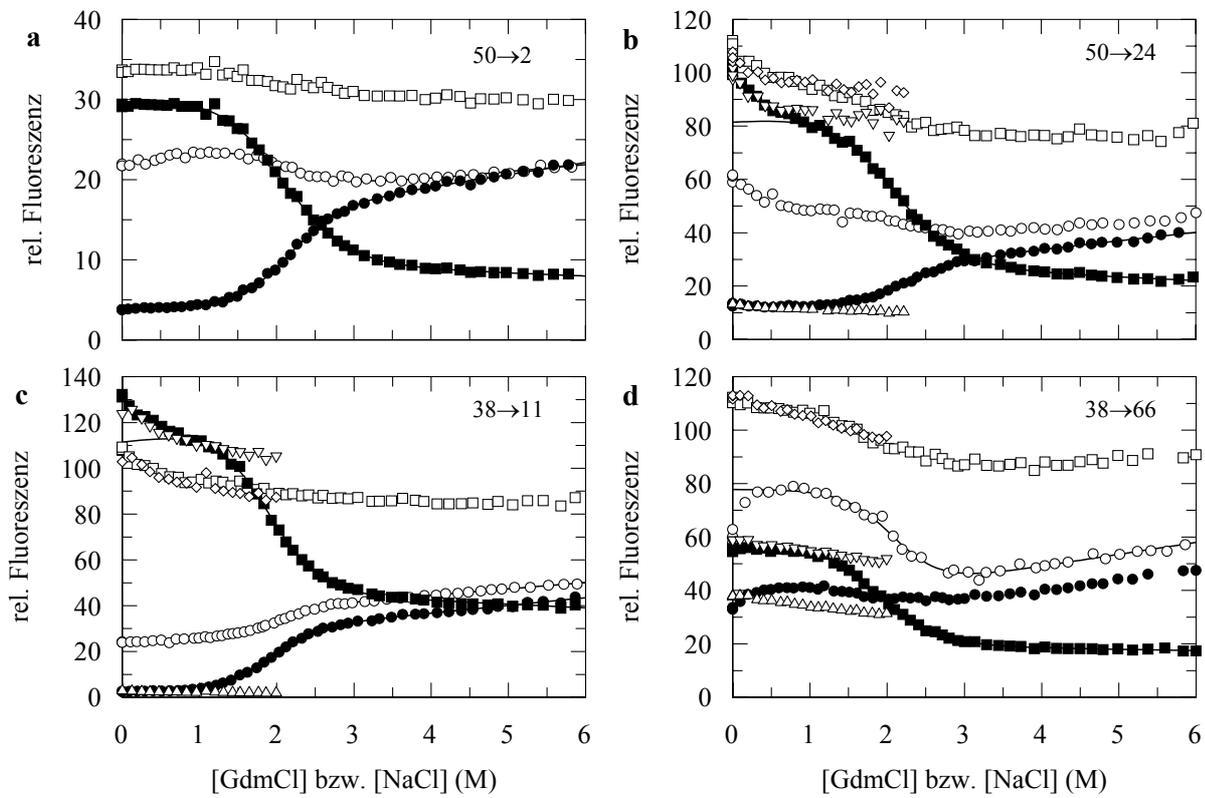
**Abbildung 3.13:** GdmCl-induzierter Entfaltungsübergang von *Bc-Csp\** E50W/Q2C. (a) (●) Tyr-Fluoreszenz bei 305 nm nach Anregung bei 280 nm, Trp-Fluoreszenz bei 355 nm nach Anregung bei (□) 280 nm bzw. (◇) 295 nm. Durchgezogene Linien sind Angleiche des Zweizustandsmodells an die Daten, gepunktete Linien stellen die Basislinien des mit Tyr-Fluoreszenz gemessenen Übergangs dar. Die Sternchen sind die Tyr-Fluoreszenzwerte des nativen bzw. entfaltenen Proteins im Mittelpunkt des Übergangs. Die Messungen wurden bei 25 °C mit 1,3  $\mu$ M Protein in 100 mM Na-Cacodylat, 1 mM EDTA, 1 mM TCEP, pH 7,0 durchgeführt. (b) Normierte Darstellung der Übergänge aus (a) unter Verwendung derselben Symbole. Die Angleiche sind als durchgezogene Linie (Tyr-Fluoreszenz), gestrichelte Linie (Trp-Fluoreszenz nach Anregung bei 280 nm) und gepunktete Linie (Trp-Fluoreszenz nach Anregung bei 295 nm) dargestellt.

### 3.5.2 Stabilität der Donor-Akzeptor Proteine

Bei der Entfaltung eines Donor-Akzeptor Proteins kommt es zu Änderungen in der Tryptophan- und der AEDANS-Fluoreszenz. Mit diesen beiden Sonden wurden die Stabilitäten der Donor-Akzeptor Proteine ermittelt. Die Signaländerung aufgrund des Energietransfers ist in Abbildung 3.14 für vier *Bc-Csp\**-Varianten dargestellt. Zum Vergleich ist die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz von Tryptophan bzw. AEDANS gezeigt.

Bei 50→2, 50→24, 38→11 und 38→66 vergrößert sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor bei Entfaltung des Proteins (Tabelle 3.4). In den Entfaltungsübergängen dieser Proteine nimmt deshalb mit steigender GdmCl-Konzentration die Trp-Fluoreszenz zu und die AEDANS-Fluoreszenz nach Anregung des Tryptophans ab (gefüllte Symbole in Abbildung 3.14). Die Effizienz des Energietransfers läßt sich aus dem Vergleich der Trp-Fluoreszenz im Donor-Akzeptor Protein (gefüllte Punkte) mit der Fluoreszenz des nur-Donor Proteins (offene Punkte) erkennen. Je stärker die Donor-Fluoreszenzwerte in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Akzeptors voneinander abweichen, um so größer ist die Transfereffizienz, d.h. um so kleiner ist der Abstand. So findet im entfaltenen Zustand von 50→2 (Abbildung 3.14a) fast kein Transfer statt, da die Trp-Fluoreszenzwerte in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Akzep-

tors nahezu identisch sind. Dagegen wird im gefalteten Zustand von 38→11 (Abbildung 3.14c) fast die gesamte Trp-Fluoreszenz auf AEDANS übertragen.



**Abbildung 3.14:** GdmCl-induzierte Entfaltung der Donor-Akzeptor Proteine (a) 50→2, (b) 50→24, (c) 38→11 und (d) 38→66. Es wurde die (●) Trp-Fluoreszenz bei 355 nm und die (■) AEDANS-Fluoreszenz bei 495 nm nach Anregung des Tryptophans bei 280 nm und Energietransfer gemessen. Im Donor-Akzeptor Protein wurde die (□) AEDANS-Fluoreszenz nach direkter Anregung des Fluorophors bei 336 nm bestimmt. Die (○) Trp-Fluoreszenz des entsprechenden nur-Donor Proteins (mit freiem Cystein) nach Anregung bei 280 nm wurde auf identische Proteinkonzentration und Meßbedingungen normiert. (△) Trp-Fluoreszenz, (▽) AEDANS-Fluoreszenz nach Energietransfer und (◇) AEDANS-Fluoreszenz nach Anregung bei 336 nm des Donor-Akzeptor Proteins in Gegenwart von NaCl. Durchgezogene Linien sind Angleiche an die Daten gemäß dem Zweizustandsmodell. Die Messungen erfolgten bei 25 °C und einer Proteinkonzentration von 0,6 µM in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0. Puffer für Proteine mit freiem Cystein enthielten zusätzlich 1 mM EDTA und 1 mM TCEP.

Sowohl die Fluoreszenz des nur-Donor Proteins (offene Punkte) als auch die AEDANS-Fluoreszenz nach Anregung im Absorptionsmaximum von AEDANS bei 336 nm (offene Quadrate) ändern sich kaum bei Entfaltung der Proteine. Eine Ausnahme stellt 38→66 dar (Abbildung 3.14d). Hier nimmt die AEDANS-Fluoreszenz nach direkter Anregung nicht kontinuierlich ab, sondern sie ändert sich verstärkt im Übergangsbereich des Proteins. AEDANS als umgebungssensitiver Fluorophor (Hudson & Weber, 1973; Spruijt *et al.*, 1996) detektiert in diesem Fall den Faltungszustand des Proteins. Im nur-Donor Protein *Bc-Csp\** F38W/L66C nimmt die Trp-Fluoreszenz bei Entfaltung um ca. 25 % ab. In 38→66 vergrößert sich bei Entfaltung der Abstand, und die Trp-Fluoreszenz sollte deshalb zunehmen. Die intrinsische Abnahme der Fluoreszenz und die Zunahme aufgrund der geringeren Transfereffizienz heben

sich auf und führen zu der experimentell bestimmten, nahezu gleichbleibenden Trp-Fluoreszenz im gesamten GdmCl-Konzentrationsbereich.

Die AEDANS-Fluoreszenz im Bereich der Basislinie des nativen Proteins hat bei 50→2 einen konstanten Wert, bei den übrigen Proteinen sinkt die Fluoreszenz dagegen zwischen 0 und ca. 1,5 M GdmCl ab. Dieselbe Abnahme der Fluoreszenz wird auch in Gegenwart von NaCl beobachtet (offene Dreiecke in Abbildung 3.14). Es handelt sich hier um die unspezifische Beeinflussung der AEDANS-Fluoreszenz durch Salze und nicht um eine Veränderung des Faltungszustands durch GdmCl. An Position 2 ist die AEDANS-Fluoreszenz unempfindlich gegenüber Salzen. Zur Auswertung der Übergänge wurden die Werte bis 1 M GdmCl auf den Salzeffekt korrigiert und ein konstanter Fluoreszenzwert für die Basislinie des nativen Proteins angenommen.

Unter 3.2.4 sind die Fluoreszenzeigenschaften von *Bc-Csp\** F38W und E50W beschrieben. Der Verlauf der Basislinie des nativen Proteins stimmt für *Bc-Csp\** E50W und *Bc-Csp\** E50W/S24C (offene Punkte in Abbildung 3.14b) überein. Die Fluoreszenz nimmt zwischen 0 und 2 M GdmCl (bzw. NaCl) kontinuierlich ab und es ist kein Übergang zu erkennen. Dasselbe Verhalten in Abhängigkeit von der Salzkonzentration wurde für *Bc-Csp\** E50W/L66C beobachtet. Dagegen steigt die Basislinie des nativen Proteins bei *Bc-Csp\** E50W/Q2C an (Abbildung 3.14a), und es ergibt sich ein auswertbarer Übergang. Die unterschiedlichen Fluoreszenzverläufe hängen von der Position des Cysteins ab, da sich das Tryptophan in allen genannten Proteinen an Position 50 befindet. In der Kristallstruktur ist der Abstand zwischen den  $C_{\beta}$  von Trp50 und Cys24 bzw. Cys66 größer als 14 Å (Tabelle 3.4), aber die Distanz zwischen Trp50 und Cys2 beträgt nur 8 Å. Bei dieser kurzen Entfernung ist zwischen dem Schwefelatom des Cysteins und dem Indolring des Tryptophans ein atomarer Kontakt möglich, der zur Fluoreszenzlöschung führen kann (Chen & Barkley, 1998). Das Löschen äußert sich in der verringerten Fluoreszenz des nativen Zustands; wird bei der Entfaltung der Abstand vergrößert, entspricht die Fluoreszenz von *Bc-Csp\** E50W/Q2C der von *Bc-Csp\** E50W. Für das Tryptophan an Position 38 werden ähnliche Eigenschaften beobachtet: Die Fluoreszenz von *Bc-Csp\** F38W/L66C ( $R_{\text{Kristall}} = 18 \text{ \AA}$ ) zeigt mit steigender GdmCl-Konzentration denselben Verlauf wie bei *Bc-Csp\** F38W. Dagegen ist die Fluoreszenz des nativen Proteins *Bc-Csp\** F38W/N11C ( $R_{\text{Kristall}} = 9 \text{ \AA}$ ) durch die Einwirkung des Cysteins stark verringert. Bei Entfaltung des Proteins nimmt deshalb die Fluoreszenz nicht wie bei *Bc-Csp\** F38W ab, sondern zu. Auch der charakteristische, GdmCl-spezifische Anstieg der Fluoreszenz von Trp38 zwischen 0 und 0,5 GdmCl (Abbildung 3.5d) tritt nicht mehr auf. Die Restfluoreszenz nach Fluoreszenzlöschung wird durch GdmCl nicht beeinflusst.

Die thermodynamischen Stabilitäten der verschiedenen nur-Donor und Donor-Akzeptor Proteine sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Als Sonden für nichtmarkierte Proteine wurden die intrinsische Tyrosin- und/oder Trp-Fluoreszenz, für AEDANS-markierte Proteine die Tryptophan- und AEDANS-Fluoreszenz sowie die Änderung des apparenten Abstands eingesetzt.

**Tabelle 3.5:** Stabilität verschiedener *Bc-Csp\**-Varianten.

Protein	Sonde	Anregung (nm)	[GdmCl] <sub>M</sub> (M)	<i>m</i> (kJ·mol <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup> )	Δ <i>G</i> <sub>U</sub> <sup>25°C</sup> (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\frac{\Delta F}{F_{\max}}$
<i>Bc-Csp*</i>	Tyr	280	2,36	6,40	15,2	
<i>Bc-Csp*</i> F38W	Tyr	280	2,18	7,31	15,9	0,46 ↓
<i>Bc-Csp*</i> F38W	Trp	280	2,12	6,92	14,7	0,41 ↓
<i>Bc-Csp*</i> F38W	Trp	295	2,11	6,54	13,8	0,27 ↓
<i>Bc-Csp*</i> E50W	Tyr	280	2,18	7,09	15,5	0,57 ↓
<i>Bc-Csp*</i> E50W	Trp	280	2,23	6,95	15,5	0,21 ↓
<i>Bc-Csp*</i> E50W	Trp	295	2,20	7,11	15,6	0,22 ↓
<i>Bc-Csp*</i> G22W	Tyr	280	1,92	6,61	12,7	0,66 ↓
<i>Bc-Csp*</i> G22W	Trp	280	1,74	6,70	11,6	0,29 ↑
<i>Bc-Csp*</i> G22W	Trp	295	1,76	6,95	12,2	0,28 ↑
<i>Bc-Csp*</i> F38W/N11C	Tyr	280	2,06	6,20	12,8	0,48 ↓
<i>Bc-Csp*</i> F38W/N11C	Trp	280	2,01	9,11	18,3	0,30 ↑
<i>Bc-Csp*</i> F38W/N11C	Trp	295	2,00	9,13	18,2	0,36 ↑
<i>Bc-Csp*</i> 38→11	Trp	280	1,87	8,17	15,3	0,90 ↑
<i>Bc-Csp*</i> 38→11	FRET	280	1,85	7,37	13,6	0,62 ↓
<i>Bc-Csp*</i> F38W/L66C	Tyr	280	2,22	9,84	21,8	0,58 ↓
<i>Bc-Csp*</i> F38W/L66C	Trp	280	2,11	7,93	16,8	0,48 ↓
<i>Bc-Csp*</i> F38W/L66C	Trp	295	2,11	7,30	15,4	0,41 ↓
<i>Bc-Csp*</i> 38→66	FRET	280	1,83	6,44	11,8	0,67 ↓
<i>Bc-Csp*</i> E50W/Q2C	Tyr	280	2,06	6,55	13,5	0,59 ↓
<i>Bc-Csp*</i> E50W/Q2C	Trp	280	1,95	5,94	11,6	0,29 ↓
<i>Bc-Csp*</i> E50W/Q2C	Trp	295	1,98	6,15	12,2	0,25 ↓
<i>Bc-Csp*</i> 50→2	Trp	280	2,13	7,63	16,3	0,73 ↑
<i>Bc-Csp*</i> 50→2	FRET	280	2,02	6,02	12,2	0,70 ↓
<i>Bc-Csp*</i> E50W/S24C	Tyr	280	2,14	7,63	16,3	0,56 ↓
<i>Bc-Csp*</i> 50→24	Trp	280	2,09	6,86	14,4	0,60 ↑
<i>Bc-Csp*</i> 50→24	FRET	280	2,05	5,97	12,2	0,68 ↓
<i>Bc-Csp*</i> 50→24	<i>R</i>		2,25	6,72	15,2	
<i>Bc-Csp*</i> E50W/L66C	Tyr	280	1,74	6,72	11,7	0,59 ↓
<i>Bc-Csp*</i> 50→66	Trp	280	1,64	8,23	13,5	0,70 ↑
<i>Bc-Csp*</i> 50→66	FRET	280	1,66	6,29	10,5	0,63 ↓
<i>Bc-Csp*</i> 50→66	<i>R</i>		1,76	5,82	10,2	
<i>Bc-Csp*</i> 21→2	Trp	295	2,26	6,74	15,2	0,79 ↑
<i>Bc-Csp*</i> 21→2	FRET	295	2,50	7,80	19,5	0,42 ↓

Alle Daten wurden aus GdmCl-induzierten Entfaltungsübergängen durch Fluoreszenzmessung erhalten. Der Übergangsmittelpunkt ([GdmCl]<sub>M</sub>), die Kooperativität der Entfaltung (*m*) und die freie Enthalpie der Entfaltung bei 25 °C (Δ*G*<sub>U</sub><sup>25°C</sup>) sind für *Bc-Csp\** und verschiedene Varianten angegeben. Als Meßsignal diente die Fluoreszenz bei 305 nm (Tyr), 355 nm (Trp) oder 495 nm nach Anregung bei 280 bzw. 295 nm. Die Änderung der Fluoreszenz (Δ*F*/*F*<sub>max</sub>) wurde aus den Werten der Basislinien am Übergangsmittelpunkt berechnet; Pfeile nach oben bzw. unten deuten zu- bzw. abnehmende Fluoreszenz bei der Entfaltung an. Auch die Änderung des apparenten Abstands *R* diente als Sonde für die Entfaltung. Die Auswertung erfolgte gemäß dem Zweizustandsmodell. Die Proteinkonzentration betrug 1 μM für nichtmarkierte und 0,6 μM für AEDANS-markierte Proteine in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0.

Die Bestimmung der Stabilität eines Proteins mit verschiedenen Sonden führt zu identischen Übergangsmittelpunkten (Abweichung kleiner als 0,1 M GdmCl). Für *Bc-Csp\**

F38W/N11C ergeben die Tyrosin- und Trp-Fluoreszenz Mittelpunkte von 2,06 und 2,01 M GdmCl. Trotz dieser hervorragenden Übereinstimmung weichen die Werte der Kooperativität und der freien Enthalpie der Entfaltung deutlich ab (Tyr-Fluoreszenz:  $m = 6,20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ,  $\Delta G_U^{25^\circ\text{C}} = 12,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; Trp-Fluoreszenz:  $m = 9,11 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ,  $\Delta G_U^{25^\circ\text{C}} = 18,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Bei beiden Fluoreszenzsonden steigen die Basislinien des nativen und entfalteten Proteins an, aber die Tyr-Fluoreszenz nimmt bei Entfaltung ab und die Trp-Fluoreszenz zu. Die Kooperativität  $m$  ist ein Maß für die Breite des Übergangsbereichs. Erfolgt die Änderung der Fluoreszenz in den Basislinien und im Übergang in dieselbe Richtung (z.B. Trp-Fluoreszenz bei *Bc-Csp\** F38W/N11C), ist der Übergangsbereich scheinbar schmaler und die Kooperativität damit höher. Aufgrund dieser Unsicherheiten von  $m$  und  $\Delta G_U$  werden im Folgenden, etwas vereinfacht, die Übergangsmittelpunkte als Stabilitätsparameter verwendet. Die Bestimmung der Stabilität mit Hilfe der Trp-Fluoreszenz ist unabhängig von der Wellenlänge des Anregungslichts.

Die einzelnen Sonden unterscheiden sich im Ausmaß der Fluoreszenzänderung bei der Entfaltung. Aus den extrapolierten Werten der Basislinien am Übergangsmittelpunkt wurde der Quotient  $\Delta F/F_{\text{max}}$  ermittelt, der die Fluoreszenzänderung auf den Wert der Basislinie mit der höheren Fluoreszenz bezieht (grafische Darstellung der Fluoreszenzwerte des nativen bzw. entfalteten Proteins am Übergangsmittelpunkt als Sternchen in Abbildung 3.13a). Sonden mit hohen  $\Delta F/F_{\text{max}}$ -Werten liefern die zuverlässigsten Stabilitätsdaten. Bei nichtmarkierten Proteinen ergibt die Tyr-Fluoreszenz ( $\Delta F/F_{\text{max}} > 0,5$ ) generell verlässlichere Werte als die Trp-Fluoreszenz ( $0,21 \leq \Delta F/F_{\text{max}} \leq 0,48$ ).

*Bc-Csp\** wurde durch ortsgerichtete Mutagenese und chemische Modifikation in ein Donor-Akzeptor Protein umgewandelt. Die Einführung eines Tryptophans an Position 38 oder 50 senkt den Übergangsmittelpunkt geringfügig von 2,36 (*Bc-Csp\**) auf 2,18 M GdmCl, aber die Mutation G22W führt zu einem deutlichen Absinken der Stabilität auf 1,92 M GdmCl. Die Diederwinkel von Glycin 22 können aus der Kristallstruktur bestimmt werden. Mit  $\phi = 73^\circ$  und  $\psi = 17^\circ$  liegt Glycin 22 in einem Bereich des Ramachandran-Plots, der für die Position 2 in einem Typ I'  $\beta$ -hairpin turn charakteristisch ist (Sibanda & Thornton, 1985). Glycin ist an dieser Position der Schleife obligatorisch und Aminosäuren mit größeren Seitenketten verursachen sterische Probleme. Die Destabilisierung des Proteins *Bc-Csp\** G22W um ca.  $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  kann durch Umstrukturierungen des Schleifenbereichs zwischen den Faltblattsträngen  $\beta 2$  und  $\beta 3$  erklärt werden.

Die Mutationen zu Cystein an verschiedenen Positionen führen zu nur geringfügigen Destabilisierungen um durchschnittlich 0,1 M GdmCl. Die Einführung von Cys2 am N-Terminus der Peptidkette ergibt z.B. das Protein *Bc-Csp\** E50W/Q2C mit einem Übergangsmittelpunkt von 2,06 M GdmCl. Im Gegensatz zum flexiblen Kettenende ist an den Positionen 11 (Schleife zwischen  $\beta 1$  und  $\beta 2$ ) und 24 (Faltblattstrang  $\beta 3$ ) die Konformation der Aminosäure durch die Gesamtstruktur von *Bc-Csp\** vorgegeben. Trotz dieser Einschränkung werden mit *Bc-Csp\** F38W/N11C (Mittelpunkt 2,06 M GdmCl) und *Bc-Csp\** E50W/S24C (Mittelpunkt

2,14 M GdmCl) sehr stabile Proteine erhalten. Durch die Mutation zu Cystein wird die Stabilität des Proteins praktisch nicht verändert. Eine Ausnahme stellt *Bc-Csp\** E50W/L66C dar: Es ist um 0,4 M instabiler als *Bc-Csp\** E50W. Im Hintergrund von *Bc-Csp\** F38W verändert sich die Stabilität beim Austausch L66C dagegen nicht. Leu66 trägt entscheidend zur Stabilität von *Bc-Csp* im Vergleich zu *Bs-CspB* bei (Perl *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2001); die Destabilisierung von *Bc-Csp\** E50W/L66C kann aber nur durch ein Zusammenwirken der Mutationen an Position 50 und 66 erklärt werden. Bei der Modifikation mit dem Akzeptor AEDANS wird durch die Sulfonsäure eine zusätzliche negative Ladung an der Proteinoberfläche eingebracht. Diese negative Ladung ist z.B. an Position 66 ungünstig, wie an der Destabilisierung von *Bc-Csp* L66E um  $5,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  im Vergleich zum Wildtypprotein zu erkennen ist (Perl *et al.*, 2000). Die Proteine 50→66 und 38→66 mit Mittelpunkten von 1,64 und 1,83 M GdmCl sind die instabilsten Donor-Akzeptor Konstrukte von *Bc-Csp\**. Im Gegensatz dazu scheint AEDANS an Position 2 leicht stabilisierend zu wirken, da 50→2 und 21→2 mit Übergangsmittelpunkten von 2,13 und 2,26 M GdmCl die stabilsten FRET-Systeme sind. Eventuell kommt es zur Wechselwirkung des Naphthalinrests von AEDANS mit hydrophoben und/oder aromatischen Resten der Nukleinsäure-Bindungsmotive von *Bc-Csp\**, es sind aber auch elektrostatische Wechselwirkungen mit Arg3, Lys5 und Lys7 denkbar. Die Bestimmung der Stabilität aus den apparenten Abständen führt zu ähnlichen Ergebnissen wie die Auswertung der Fluoreszenzdaten.

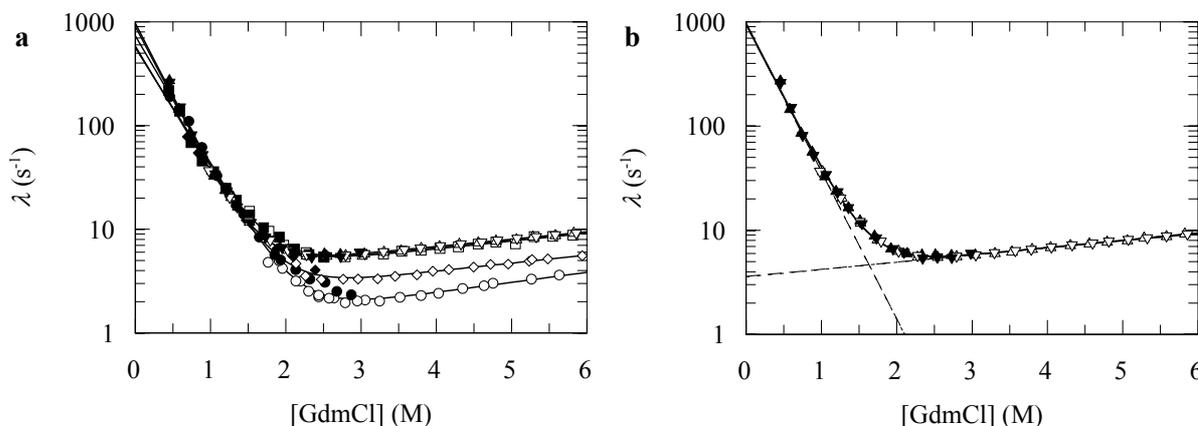
Proteine mit Cystein an Position 2 wurden als Fusionsproteine exprimiert und verlieren bei der BrCN-Spaltung Met1. Die Gegenwart des N-terminalen Methionins führt z.B. bei  $\alpha$ -Lactalbumin zu einer Destabilisierung (Chaudhuri *et al.*, 1999), bei Ribonuklease A dagegen zu einer Stabilisierung (Schultz & Baldwin, 1992) des Proteins. Bei *Bc-Csp\** scheint Met1 die Stabilität kaum zu beeinflussen, da sich der Übergangsmittelpunkt von *Bc-Csp\** E50W/Q2C kaum von den anderen Varianten mit freiem Cystein unterscheidet.

Insgesamt verändert der Einbau von Tryptophan und AEDANS als FRET-Sonden in *Bc-Csp\** die Stabilität des gefalteten Proteins kaum. Alle Donor-Akzeptor Proteine sind mit Übergangsmittelpunkten um 2 M GdmCl im Vergleich zu *Bc-Csp\** (2,36 M GdmCl) nur wenig destabilisiert. Damit ist das wichtige Kriterium erfüllt, daß der Einbau der Sonden die zu untersuchenden Eigenschaften des Proteins nicht verändern darf.

### 3.5.3 Einfluß von Mutation und Markierung auf die Kinetik der Faltung

Rück- und Entfaltungsreaktionen der verschiedenen Varianten wurden durch schnelle Mischung in der *stopped-flow*-Apparatur initiiert. Die Faltung von *Bc-Csp\** wurde anhand der Tyr-Fluoreszenz verfolgt (Rape, 1999); bei allen übrigen Proteinen wurde die Trp-Fluoreszenz und bei Donor-Akzeptor Proteinen zusätzlich die AEDANS-Fluoreszenz gemessen. Die aus den Zeitverläufen erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten  $\lambda$  wurden in einer sogenannten Chevronauftragung logarithmisch gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen. Die Chevronauftragung von 50→66 ist in Abbildung 3.15 dargestellt, Abbildung 3.15a

enthält zum Vergleich die Raten für das Pseudo-Wildtypprotein *Bc-Csp\**, die Tryptophan-Variante *Bc-Csp\** E50W und die Doppelmutante *Bc-Csp\** E50W/L66C mit freiem Cystein.



**Abbildung 3.15:** Faltungsraten von 50→66 in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration bei 25 °C; Rückfaltungsexperimente sind als gefüllte Symbole, Entfaltungsexperimente als offene Symbole dargestellt. (a) (●, ○) Faltung von *Bc-Csp\** gemessen durch die Tyr-Fluoreszenz über 300 nm. (◆, ◇) Geschwindigkeitskonstanten von *Bc-Csp\** E50W und (■, □) von *Bc-Csp\** E50W/L66C, jeweils bestimmt aus der Trp-Fluoreszenz über 320 nm. Bei 50→66 wurde die (▲, △) Trp-Fluoreszenz zwischen 320 nm und 390 nm und die (▼, ▽) AEDANS-Fluoreszenz über 460 nm gemessen. Die Anregung erfolgte für alle Proteine bei 280 nm. (b) Geschwindigkeitskonstanten von 50→66 wie in (a). Durchgezogene Linien stellen Angleiche an die experimentellen Daten auf der Grundlage des Zweizustandsmodells dar. Gestrichelte bzw. gepunktete Linien in (b) sind extrapolierte Rückfaltungs- und Entfaltungsraten für 50→66 mit der Tryptophan- bzw. FRET-Sonde. Die Proteinkonzentration betrug 1 μM für nichtmarkierte Proteine und 0,5 μM für 50→66 in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0. Für Messungen von *Bc-Csp\** E50W/L66C enthielt der Puffer zusätzlich 1 mM EDTA und 1 mM TCEP.

Die Rückfaltungsraten von *Bc-Csp\**, der Mutante E50W, der Doppelmutante E50W/L66C und des Donor-Akzeptor Proteins 50→66 sind praktisch identisch in ihren Werten und in ihren Abhängigkeiten von der GdmCl-Konzentration. Damit wird die Faltungsreaktion von *Bc-Csp\**, die in weiteren Experimenten untersucht wurde, weder von der Einführung des Donors noch des Akzeptors verändert.

Die Entfaltungsreaktion von *Bc-Csp\** E50W ist gegenüber *Bc-Csp\** beschleunigt; die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der GdmCl-Konzentration bleibt unverändert. Durch die Einführung von Cys66 wird die Entfaltungsrate weiter erhöht. Die schnellere Entfaltung bei gleichen Rückfaltungsraten ist die Ursache für die geringere Stabilität der Proteine *Bc-Csp\** E50W bzw. E50W/L66C im Vergleich zum Pseudo-Wildtypprotein (Tabelle 3.5).

Die chemische Modifikation von Cys66 mit AEDANS hat keine Auswirkung auf Rück- und Entfaltung. Die Anknüpfung von AEDANS über einen langen, flexiblen *linker* minimiert den Einfluß des Fluorophors auf den Faltungsprozeß. Im Donor-Akzeptor Protein 50→66 wurden die Faltungsraten durch Messung der Tryptophan- und der AEDANS-Fluoreszenz bestimmt. Mit beiden Sonden wurden identische Geschwindigkeitskonstanten erhalten (Abbildung 3.15b). Sowohl die Donor- als auch die Akzeptor-Fluoreszenz eignen sich sehr gut für kinetische Messungen der Proteinfaltung. Die zugrundeliegenden Abstandsänderungen

in *Bc-Csp\** führen zu monoexponentiellen Reaktionsverläufen und bestätigen damit das Zweizustandsverhalten von *Bc-Csp\**.

Aus einer Chevronauftragung können durch eine Zweizustandsanalyse die Geschwindigkeitskonstanten der Rück- und Entfaltung in Abwesenheit von Denaturierungsmittel bestimmt werden ( $k_{\text{NU}}^0$  und  $k_{\text{UN}}^0$ , Wert der gestrichelten und gepunkteten Linien in Abbildung 3.15b bei 0 M GdmCl). Der Quotient dieser Raten entspricht der Gleichgewichtskonstante und ermöglicht die Berechnung der thermodynamischen Stabilität. Die kinetischen Parameter aller Varianten sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung aller Varianten weichen maximal um Faktor 3 von der Rate des Pseudo-Wildtypproteins *Bc-Csp\** ab. Dies gilt sowohl für die extrapolierten Werte bei 0 M GdmCl als auch für die Werte bei 0,8 M GdmCl. Letztere können direkt gemessen werden und sind deshalb verlässlicher als die Werte bei 0 M GdmCl, bei denen eine Extrapolation über mindestens 0,5 M GdmCl nötig ist. Die Rückfaltung der *Bc-Csp\**-Varianten wird nur geringfügig durch die eingeführten Mutationen und die Modifikation mit AEDANS verändert. In den kinetischen FRET-Experimenten wird die Rückfaltung der Donor-Akzeptor Proteine untersucht. Diese entspricht exakt der Rückfaltung des Pseudo-Wildtypproteins *Bc-Csp\**. Das FRET-System aus Tryptophan und AEDANS erfüllt damit hervorragend die zentrale Eigenschaft einer Sonde, die zwar als Reporter dienen soll, aber die untersuchten Eigenschaften des Proteins nicht verändern darf.

Die unterschiedlichen Stabilitäten der einzelnen Varianten spiegeln sich in den Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung wider. So besitzen z.B. die Proteine 50→66 und 21→2 sehr ähnliche Rückfaltungseigenschaften wie *Bc-Csp\**; die Entfaltungsrate  $k_{\text{NU}}^0$  beträgt aber für 50→66 ca.  $3 \text{ s}^{-1}$  und für 21→2 ca.  $0,5 \text{ s}^{-1}$  im Vergleich zu  $1 \text{ s}^{-1}$  für *Bc-Csp\**. Damit ist 50→66 instabiler und 21→2 stabiler als das Pseudo-Wildtypprotein (vgl. Tabelle 3.5 und Tabelle 3.6). Bei den Proteinen *Bc-Csp\** F38W/N11C und *Bc-Csp\** F38W/L66C und den

**Legende zu Tabelle 3.6:** Die kinetischen Daten wurden durch Fluoreszenzmessung in *stopped-flow*-Experimenten bestimmt. Es sind die extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung  $k_{\text{UN}}^0$  und der Entfaltung  $k_{\text{NU}}^0$ , sowie die Rate der Rückfaltung  $k_{\text{UN}}$  bei 0,8 M GdmCl gegeben.  $m_{\text{UN}}$  bzw.  $m_{\text{NU}}$  sind die kinetischen  $m$ -Werte der Rückfaltung bzw. Entfaltung.  $\alpha$  ist die anteilige Änderung des Rückfaltungs- $m$ -Wertes bezogen auf die Gesamtänderung ( $\alpha = m_{\text{UN}}/(m_{\text{UN}}-m_{\text{NU}})$ ). Am Übergangsmittelpunkt  $[\text{GdmCl}]_{\text{M}}$  sind die Rück- und Entfaltungsraten identisch ( $[\text{GdmCl}]_{\text{M}} = \ln(k_{\text{NU}}^0/k_{\text{UN}}^0)/(m_{\text{UN}}-m_{\text{NU}})$ ). Der Kooperativitätsparameter  $m$  wird aus den kinetischen  $m$ -Werten ermittelt ( $m = R \cdot T \cdot (m_{\text{NU}}-m_{\text{UN}})$ ). Die freie Enthalpie der Entfaltung wird berechnet als  $\Delta G_{\text{U}}^{25^\circ\text{C}} = -R \cdot T \cdot \ln(k_{\text{NU}}^0/k_{\text{UN}}^0)$ . Die allgemeine Gaskonstante  $R$  beträgt  $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ . Als Sonde wurde die integrale Fluoreszenz über 300 nm (Tyr), 320 nm (Trp) (für AEDANS-markierte Proteine zwischen 320 und 390 nm) oder über 460 nm (FRET) nach Anregung bei 280 oder 295 nm verwendet. Für 38→66 wurde die AEDANS-Fluoreszenz nach Anregung bei 336 nm gemessen. Die Daten wurden gemäß dem Zweizustandsmodell ausgewertet. Die Proteinkonzentration betrug  $1 \mu\text{M}$  für nichtmarkierte Proteine bzw.  $0,5 \mu\text{M}$  für Donor-Akzeptor Proteine in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0.

Tabelle 3.6: Kinetische Daten verschiedener Bc-Csp\*-Varianten (Legende siehe Seite 74).

Protein	Sonde	Anregung (nm)	$k_{UN}^0$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{UN}^0$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{UN}$ bei 0,8 M GdmCl (s <sup>-1</sup> )	$m_{UN}$ (M <sup>-1</sup> )	$m_{NU}$ (M <sup>-1</sup> )	$\alpha$	[GdmCl] <sub>M</sub> (M)	$m$ (kJ·mol <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup> )	$\Delta G_U^{25^\circ C}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )
Bc-Csp*	Tyr	280	733	1,01	75	-2,85	0,22	0,93	2,15	7,61	16,3
Bc-Csp* F38W	Trp	280	533	1,24	70	-2,53	0,27	0,90	2,17	6,94	15,0
Bc-Csp* E50W	Trp	280	582	1,93	62	-2,80	0,18	0,94	1,92	7,39	14,2
Bc-Csp* E21W	Trp	295	661	1,10	54	-3,13	0,21	0,94	1,92	8,28	15,9
Bc-Csp* G22W	Trp	295	166	0,76	22	-2,55	0,25	0,91	1,92	6,94	13,4
Bc-Csp* F38W/N11C	Trp	280	2234	3,72	206	-2,98	0,19	0,94	2,02	7,86	15,9
Bc-Csp* 38→11	Trp	280	1525	2,72	111	-3,27	0,21	0,94	1,82	8,63	15,7
Bc-Csp* 38→11	FRET	280	1420	2,75	105	-3,26	0,20	0,94	1,81	8,58	15,5
Bc-Csp* F38W/L66C	Trp	280	649	2,04	80	-2,61	0,26	0,91	2,01	7,11	14,3
Bc-Csp* 38→66	FRET	280	2326	2,59	134	-3,57	0,22	0,94	1,79	9,39	16,9
Bc-Csp* 38→66	AEDANS	336	2700	2,58	158	-3,55	0,21	0,94	1,85	9,32	17,2
Bc-Csp* E50W/Q2C	Trp	280	221	1,83	37	-2,25	0,20	0,92	1,96	6,07	11,9
Bc-Csp* 50→2	Trp	280	765	1,33	82	-2,79	0,20	0,93	2,13	7,41	15,8
Bc-Csp* 50→2	FRET	280	1497	1,62	110	-3,26	0,16	0,95	2,00	8,48	16,9
Bc-Csp* E50W/S24C	Trp	280	1185	1,34	108	-2,99	0,26	0,92	2,09	8,06	16,8
Bc-Csp* 50→24	Trp	280	363	1,38	54	-2,38	0,22	0,92	2,14	6,44	13,8
Bc-Csp* 50→24	FRET	280	615	1,37	72	-2,68	0,21	0,93	2,11	7,16	15,1
Bc-Csp* E50W/L66C	Trp	280	562	3,21	64	-2,71	0,17	0,94	1,79	7,14	12,8
Bc-Csp* 50→66	Trp	280	545	3,08	58	-2,81	0,19	0,94	1,73	7,44	12,8
Bc-Csp* 50→66	FRET	280	457	3,02	52	-2,72	0,19	0,93	1,72	7,21	12,4
Bc-Csp* 50→11	Trp	280	285	2,12	48	-2,23	0,24	0,90	1,98	6,12	12,1
Bc-Csp* 50→11	FRET	280	347	2,63	49	-2,45	0,20	0,92	1,84	6,57	12,1
Bc-Csp* 21→2	Trp	295	689	0,53	75	-2,78	0,29	0,91	2,34	7,61	17,8
Bc-Csp* 21→2	FRET	295	837	0,42	90	-2,79	0,32	0,90	2,44	7,71	18,8
Bc-Csp* 21→11	Trp	295	367	1,47	33	-3,00	0,24	0,93	1,70	8,03	13,7
Bc-Csp* 21→11	FRET	295	301	1,53	30	-2,88	0,25	0,92	1,69	7,76	13,1
Bc-Csp* 22→11	Trp	295	529	1,49	31	-3,54	0,23	0,94	1,56	9,35	14,6
Bc-Csp* 22→11	FRET	295	228	1,27	23	-2,89	0,25	0,92	1,65	7,78	12,9

entsprechenden Donor-Akzeptor Proteinen sind die Rück- und Entfaltung im gleichen Ausmaß beschleunigt. Hier resultiert die höhere Entfaltungsrate (um  $2,5 \text{ s}^{-1}$ ) nur in einer geringfügigen Destabilisierung.

Die kinetischen  $m$ -Werte  $m_{\text{UN}}$  bzw.  $m_{\text{NU}}$  geben die Abhängigkeit der Faltungsraten von der GdmCl-Konzentration wieder. Für alle Varianten ist diese Abhängigkeit ähnlich wie bei *Bc-Csp\**. Ist  $m_{\text{UN}}$  erhöht, werden auch sehr hohe Werte für  $m$  erhalten (z.B.  $38 \rightarrow 66$ ), das die Kooperativität des Entfaltungsübergangs im Gleichgewicht angibt. Wahrscheinlich ist die Erhöhung von  $m_{\text{UN}}$  bei  $38 \rightarrow 66$  nicht signifikant, da  $m$  aus dem Gleichgewichts-Entfaltungsübergang nicht erhöht ist (Tabelle 3.5). Auf molekularer Ebene beschreibt  $m$  die unterschiedliche Wechselwirkung des nativen bzw. des entfalteten Proteins mit dem Denaturierungsmittel (Schellman, 1978). Bei Entfaltung des Proteins werden mehr Bindungsstellen für das Denaturierungsmittel exponiert und daher stellt  $m$  ein Maß für den Anstieg der zugänglichen Oberfläche dar (Myers *et al.*, 1995). In Analogie hierzu geben auch die kinetischen  $m$ -Werte  $m_{\text{UN}}$  und  $m_{\text{NU}}$  die Änderung der Wechselwirkungen mit dem Denaturierungsmittel und damit der zugänglichen Oberfläche wieder. Der kinetische  $m$ -Wert der Rückfaltung  $m_{\text{UN}}$  zeigt die Veränderungen zwischen dem entfalteten Zustand und dem Übergangszustand,  $m_{\text{NU}}$  zwischen dem nativen Zustand und dem Übergangszustand an. Bei *Bc-Csp* sind die Rückfaltungsraten stärker GdmCl-abhängig als die Entfaltungsraten, d.h. der Übergangszustand ähnelt dem nativen Zustand (Perl *et al.*, 1998). Als Maß für die Nativähnlichkeit wird der Parameter  $\alpha$  (Tabelle 3.6) verwendet.  $\alpha$  liegt bei allen *Bc-Csp\**-Varianten über 0,90 und bestätigt damit, daß die Einführung der Donor/Akzeptor-Paare den nativähnlichen Charakter des Übergangszustands nicht verändert.

Die kinetischen Parameter, der Übergangsmittelpunkt und die Kooperativität  $m$  stimmen bei der Bestimmung durch die Sonde Trp oder FRET für dasselbe Protein sehr gut überein. Die Auswertung beruht ausschließlich auf den Faltungsraten und wird daher nicht von Eigenschaften der Fluoreszenz, wie z.B. den Steigungen der Basislinien, beeinflusst. Die aus den kinetischen Daten erhaltenen Kooperativitäten sind damit verlässlicher als die Werte aus Gleichgewichtsexperimenten und bewirken auch eine ausgezeichnete Übereinstimmung der freien Enthalpie  $\Delta G_{\text{U}}$  für verschiedene Sonden. Extreme Unterschiede wie für *Bc-Csp\** F38W/N11C in Gleichgewichtsexperimenten (3.5.2,  $\Delta G_{\text{U}}$  zwischen  $12,8$  und  $18,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) treten bei der kinetischen Bestimmung mit mehreren Sonden nicht auf. Die kinetischen Experimente ergeben für *Bc-Csp\** F38W/N11C eine Stabilität von  $15,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Die Übergangsmittelpunkte aus den kinetischen Messungen bestätigen im Rahmen der Meßgenauigkeit die Stabilitäten aus den Gleichgewichtsexperimenten (Tabelle 3.6). Die Abweichungen liegen meist im Bereich von  $0,1 \text{ M}$  GdmCl. Durch die Einführung der FRET-Sonden in *Bc-Csp\** werden weder die Stabilität noch die Rückfaltungskinetik entscheidend verändert.

In den verschiedenen *Bc-Csp\**-Varianten werden Abstände zwischen unterschiedlichen Positionen beobachtet. Diese Abstände sind voneinander unabhängige Sonden, ergeben aber

immer ähnliche Faltungskinetiken und Stabilitäten. Eine Übereinstimmung aller Sonden bei der Faltung eines Proteins ist ein typisches Merkmal für das Zweizustandsverhalten. Der bislang stets angenommene Zweizustandscharakter der Faltung von *Bc-Csp* wird durch die Energietransfer-Experimente eindrucksvoll bestätigt.

### 3.6 Kinetik der Abstandsänderung bei der Faltung

#### 3.6.1 Geschwindigkeitskonstanten der Faltung

Die Abstandsänderung während der Faltung der Donor-Akzeptor Proteine führt zu komplementären Intensitätsveränderungen der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz. Die Emissionen beider Fluorophore wurden als Sonden für Faltungsexperimente eingesetzt, und es wurden damit ähnliche Faltungsraten erhalten wie mit der lokalen Fluoreszenzsonde Trp8 im Wildtypprotein *Bc-Csp* (Perl *et al.*, 1998).

#### 3.6.2 Amplituden der Faltungsreaktionen

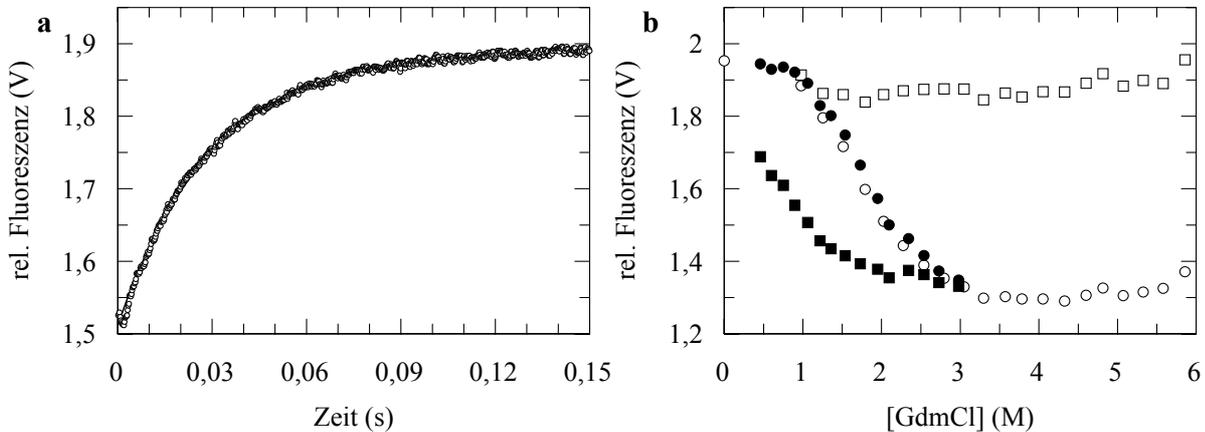
Aus dem Zeitverlauf einer Faltungsreaktion kann neben der Geschwindigkeitskonstante auch der Start- und Endwert des Fluoreszenzsignals bestimmt werden. Die Differenz dieser beiden Werte stellt die Amplitude der Faltungsreaktion dar. Da die Signaländerung auf Energietransfer beruht, ist die Größe der Amplitude ein Maß für die Abstandsänderung im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung. Ein Beispiel für die Zunahme der AEDANS-Fluoreszenz im Verlauf einer Rückfaltungsreaktion ist in Abbildung 3.16a für die 50→66 Variante gezeigt. Rückfaltungsreaktionen konnten bei GdmCl-Endkonzentrationen zwischen 0,5 und 3,0 M, Entfaltungsreaktionen zwischen 1,0 und 6,0 M GdmCl gemessen werden. In Abbildung 3.16b sind die Start- und Endwerte aus allen Faltungsexperimenten mit 50→66 gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen.

Bei der Rückfaltung von 50→66 verringert sich der Abstand zwischen Tryptophan und AEDANS von 22,4 auf 15,3 Å (Tabelle 3.4). Daher erhöht sich die Effizienz des Energietransfers, und die Fluoreszenz des Akzeptors AEDANS (nach Anregung von Tryptophan) steigt im Verlauf der Rückfaltungsreaktion an (Abbildung 3.16a).

Alle Faltungsreaktionen zeigten einen monoexponentiellen Verlauf. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion beschreibt die Überwindung einer Energiebarriere zwischen zwei definierten Zuständen. Verhält sich ein Protein gemäß dem Zweizustandsmodell, werden wie für 50→66 monoexponentielle Reaktionsverläufe beobachtet. Das Zweizustandsverhalten von *Bc-Csp* wird also durch den Zeitverlauf der Signaländerung bestätigt.

Die Endwerte aller Rück- und Entfaltungsreaktionen bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen zeigen die Form eines Entfaltungsübergangs (Abbildung 3.16b). Der Übergangsmittelpunkt liegt im selben Bereich wie bei der Bestimmung aus dem Gleichgewichts-Entfal-

tungsübergang (Tabelle 3.5) oder aus den Geschwindigkeitskonstanten (Tabelle 3.6). Im Übergangsbereich sind die Endwerte der Rück- und Entfaltungsreaktionen identisch. Diese Übereinstimmung zeigt den reversiblen Charakter sowohl der Rückfaltung als auch der Entfaltung von *Bc-Csp*.



**Abbildung 3.16:** Verlauf der Faltungsreaktion gemessen mit der AEDANS-Fluoreszenz. (a) Rückfaltung von 50→66 in Gegenwart von 1,0 M GdmCl. Es wurde die integrale Fluoreszenz über 460 nm nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 10 nm) gemessen. Vollständig entfaltetes Protein (5,5  $\mu\text{M}$  in 5 M GdmCl) wurde 11fach in Rückfaltungspuffer (100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0 mit geeigneter GdmCl-Konzentration) verdünnt. Der Angleich an die Daten ist eine monoexponentielle Funktion mit der apparenten Geschwindigkeitskonstante  $\lambda = 33 \text{ s}^{-1}$ . (b) (■, □) Start- und (●, ○) Endwerte der AEDANS-Fluoreszenz einzelner Faltungskinetiken von 50→66 bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen. Gefüllte Symbole stehen für die Daten aus Rückfaltungsexperimenten, offene Symbole für Entfaltungsexperimente.

Für das Donor-Akzeptor Protein 50→66 wurde ein kinetisches Zweizustandsverhalten festgestellt (3.5.3). Gilt dieser Zweizustandsmechanismus auch auf struktureller Ebene, so sollte die gesamte Abstandsänderung im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion erfolgen. Die Amplitude der Entfaltungsreaktion von 50→66 (offene Symbole in Abbildung 3.16b) nimmt im Übergangsbereich zu und spiegelt den Anteil des entfalteten Proteins unter Gleichgewichtsbedingungen wider. Die unveränderte Amplitude der Entfaltungsreaktion im Bereich der Basislinie des entfalteten Proteins (oberhalb von 3 M GdmCl) entspricht der Reaktion von vollständig nativem zu vollständig entfaltetem Protein und bestätigt damit das Vorliegen eines Zweizustandsmechanismus im Sinne von Abstandsänderungen. Die Startwerte der Entfaltungsreaktionen folgen der Basislinie des nativen Proteins aus Gleichgewichtsexperimenten. Zu Beginn der Entfaltungsreaktion ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor also unverändert, d.h. so wie im nativen Protein.

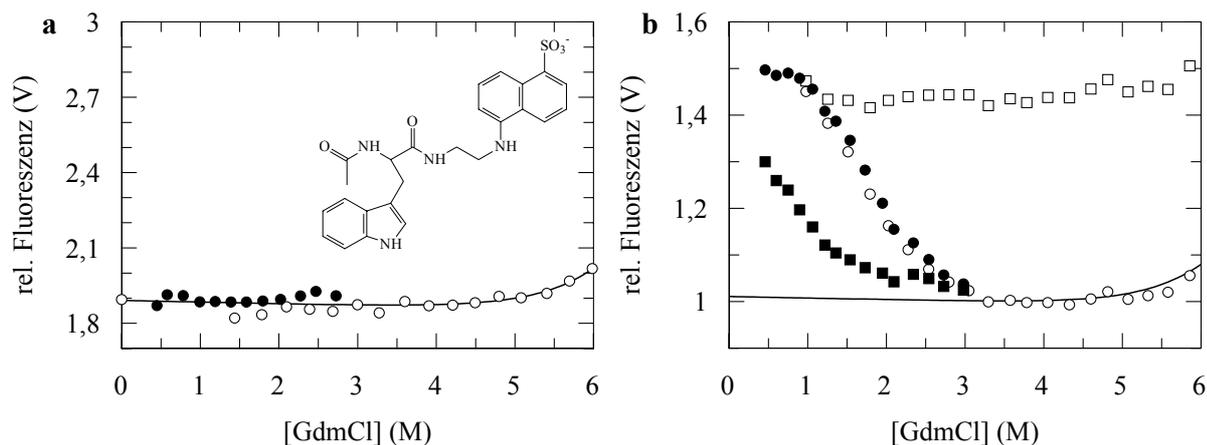
Bei allen Rückfaltungsreaktionen ist die Amplitude geringer als die Amplitude bei vollständiger Entfaltung von 50→66. Die Rückfaltung stellt die Umkehrreaktion der Entfaltung dar, wobei *Bc-Csp* reversibel faltet, und die Basislinien des nativen und des entfalteten 50→66 in Gleichgewichtsexperimenten annähernd parallel verlaufen. Unter diesen Bedingungen müsste die Amplitude im Bereich der Basislinie des nativen Proteins (unter 1 M GdmCl) ähnlich groß sein wie in der Entfaltung bei hohen GdmCl-Konzentrationen. Dies ist

aber nicht der Fall, und die Startwerte der Rückfaltungsreaktionen sind bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen deutlich erhöht. Zur Beurteilung dieses Verhaltens muß allerdings die Fluoreszenz des vollständig entfalteten Proteins unter Nativbedingungen bekannt sein (Basislinie des denaturierten Proteins).

### 3.6.3 Modelle des denaturierten Zustands unter Nativbedingungen und schneller Kollaps

Es ist keine Variante von *Bc*-Csp bekannt, die unter Nativbedingungen entfaltet vorliegt und hier als Referenzprotein verwendet werden könnte. Deshalb wurde die Abhängigkeit der AEDANS-Fluoreszenz von der GdmCl-Konzentration durch Anregung von  $\beta$ -ME-AEDANS bei 280 oder 336 nm bestimmt. Die AEDANS-Fluoreszenz wurde in *stopped-flow*-Experimenten unter denselben Bedingungen gemessen, die auch bei den Faltungsexperimenten der Donor-Akzeptor Proteine vorlagen. Der Verlauf der Basislinie der AEDANS-Fluoreszenz hängt von der Anregungswellenlänge ab: Nach Anregung bei 280 nm ist die AEDANS-Fluoreszenz zwischen 0 und 2 M konstant und steigt bis 6 M GdmCl um ca. 15 % an. Dagegen sinkt die AEDANS-Fluoreszenz nach Anregung bei 336 nm über den gesamten GdmCl-Bereich kontinuierlich um ca. 15 % ab. Licht der Wellenlänge 280 nm regt die beiden Absorptionsbanden bei 250 und 337 nm an (3.3.2). Die Anregung bei 336 nm ist zwar spezifisch für die langwelligste Absorptionsbande, diese wird aber durch mindestens zwei verschiedene elektronische Übergänge verursacht (Stryer, 1965; Hudson & Weber, 1973) und kompliziert dadurch die Fluoreszenzeigenschaften. Es ist *a priori* unklar, welche der beiden Anregungswellenlängen 280 bzw. 336 nm am besten die Anregung von AEDANS durch Energietransfer von Tryptophan in den doppelmarkierten *Bc*-Csp\*-Varianten widerspiegelt. Außerdem findet bei Donor-Akzeptor Proteinen immer eine Kombination aus direkter Anregung von AEDANS bei 280 nm und der Anregung über Energietransfer von Tryptophan statt.

Die Referenzverbindung Trp-EDANS stellt die beste Annäherung an den denaturierten Zustand eines Donor-Akzeptor Proteins dar. Im Gegensatz zu Proteinen kann diese niedermolekulare Verbindung natürlich nicht falten und reflektiert so nur den direkten Einfluß von GdmCl auf die spektroskopischen Eigenschaften von Donor und Akzeptor. Wie bei den doppelmarkierten Proteinen führt die Anregung von Trp-EDANS bei 280 nm sowohl zur direkten Anregung von AEDANS als auch zur Anregung durch Energietransfer. Die Anregungsenergie des Tryptophans wird fast vollständig auf AEDANS übertragen und somit überwiegt die Anregung durch Energietransfer. Die Fluoreszenz von Trp-EDANS unter *stopped-flow*-Bedingungen nach Anregung bei 280 nm ist in Abbildung 3.17a dargestellt. Im Bereich zwischen 0 und 4 M GdmCl ist die Akzeptor-Fluoreszenz konstant und steigt bei höheren GdmCl-Konzentrationen leicht an. Zum besseren Vergleich wurde die Fluoreszenz von Trp-EDANS und denaturiertem 50 $\rightarrow$ 66 auf einen gemeinsamen Wert von 1 normiert (Abbildung 3.17b).

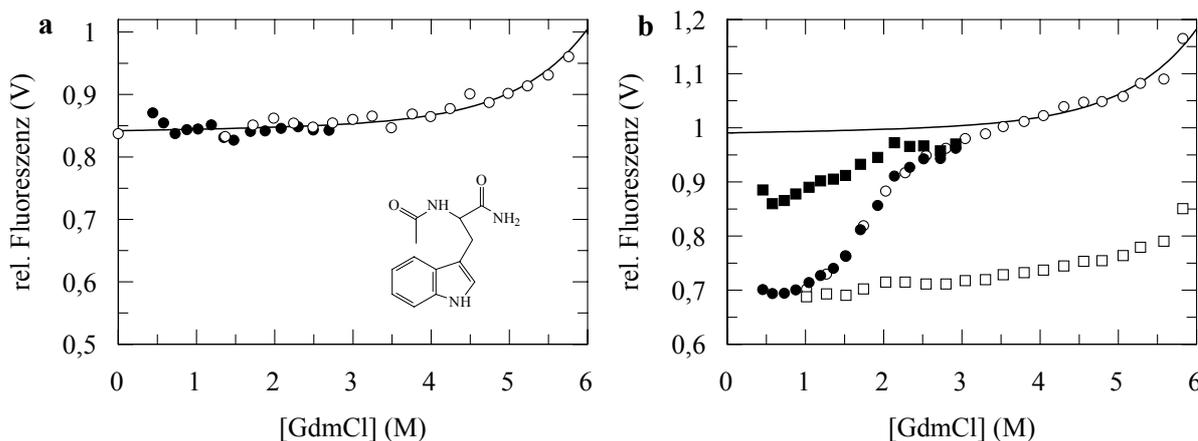


**Abbildung 3.17:** Trp-EDANS als Referenz für die Basislinie des denaturierten Proteins. (a) Strukturformel von Trp-EDANS und dessen Fluoreszenz bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen. Es wurde die integrale Fluoreszenz über 460 nm nach Anregung bei 280 nm in (○)Entfaltungs- und (●)Rückfaltungsreaktionen gemessen. Die Konzentration von Trp-EDANS betrug  $0,5 \mu\text{M}$  in  $100 \text{ mM}$  Na-Cacodylat,  $\text{pH } 7,0$ . Die Linie stellt einen Angleich an die Daten dar. (b) Normierte Auftragung der Start- und Endwerte von  $50 \rightarrow 66$  (Akzeptor-Fluoreszenz, Daten aus Abbildung 3.16b). Die Linie ist der Angleich an die Fluoreszenzdaten von Trp-EDANS aus (a). Die Fluoreszenz von denaturiertem  $50 \rightarrow 66$  und Trp-EDANS ist auf den Wert 1 normiert.

Die aus der Trp-EDANS-Fluoreszenz bestimmte Basislinie des denaturierten Proteins stimmt äußerst gut mit den Endwerten der Entfaltungsreaktionen von  $50 \rightarrow 66$  überein (Abbildung 3.17b, GdmCl-Konzentrationen größer  $3 \text{ M}$ ). Bei den Rückfaltungsreaktionen dagegen sind alle Startwerte im Vergleich zu dieser Basislinie tatsächlich erhöht. Die experimentell bestimmten Startwerte (gefüllte Quadrate) weichen bei geringen GdmCl-Konzentrationen am stärksten von den Ausgangswerten des denaturierten Proteins (Basislinie) ab. Unter diesen Bedingungen kommt es also zu einer schnellen Konformationsänderung der entfalteten Peptidkette, die vor der geschwindigkeitsbestimmenden Faltungsreaktion erfolgt und zu einer Erhöhung der Akzeptor-Fluoreszenz führt. Die AEDANS-Fluoreszenz nimmt zu, wenn sich der Abstand zwischen Tryptophan und AEDANS verringert. Die Ursache für den beobachteten Anstieg der Startwerte ist demzufolge ein schneller Kollaps der entfalteten Peptidketten, der innerhalb der Totzeit der *stopped-flow*-Mischung stattfindet.

Änderungen der Effizienz des Energietransfers wirken sich sowohl auf die Donor-Fluoreszenz als auch auf die Akzeptor-Fluoreszenz aus. Daher wurde auch die Trp-Fluoreszenz während der Faltung von  $50 \rightarrow 66$  verfolgt. Die Basislinie des denaturierten Proteins wurde durch *stopped-flow*-Verdünnungsmessungen mit N-Acetyl-L-tryptophanamid (NAWA) erhalten, die analog zu den Faltungsexperimenten mit  $50 \rightarrow 66$  durchgeführt wurden. Die Trp-Fluoreszenz von  $50 \rightarrow 66$  und der Referenzverbindung NAWA ist in Abbildung 3.18 gezeigt.

NAWA ist ein Modell für Tryptophanreste, die während der Faltung zum Lösungsmittel exponiert bleiben. Die Trp-Fluoreszenz bleibt zwischen  $0$  und  $4 \text{ M}$  GdmCl annähernd konstant und steigt bis  $6 \text{ M}$  GdmCl leicht an (Abbildung 3.18a). Bei den Proteinen *Bc*-Csp\* E50W, E50W/Q2C, E50W/S24C und E50W/L66C mit dem lösungsmittlexponierten Trp50



**Abbildung 3.18:** NAWA als Referenz für die Basislinie des denaturierten Proteins. (a) Strukturformel von NAWA und dessen Fluoreszenz bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen. Es wurde die integrale Fluoreszenz zwischen 310 und 390 nm nach Anregung bei 280 nm in (○)Entfaltungs- und (●)Rückfaltungsreaktionen gemessen. Die Konzentration von NAWA betrug 0,5  $\mu$ M in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0. Die Linie stellt einen Anstieg an die Daten dar. (b) (■, □) Start- und (●, ○) Endwerte der Trp-Fluoreszenz einzelner Faltungskinetiken von 50→66 bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen. Gefüllte Symbole stehen für die Daten aus Rückfaltungsexperimenten, offene Symbole für Entfaltungsexperimente. Die Linie ist der Anstieg an die Fluoreszenzdaten von NAWA aus (a). Die Fluoreszenz von denaturiertem 50→66 und NAWA ist auf den Wert 1 normiert.

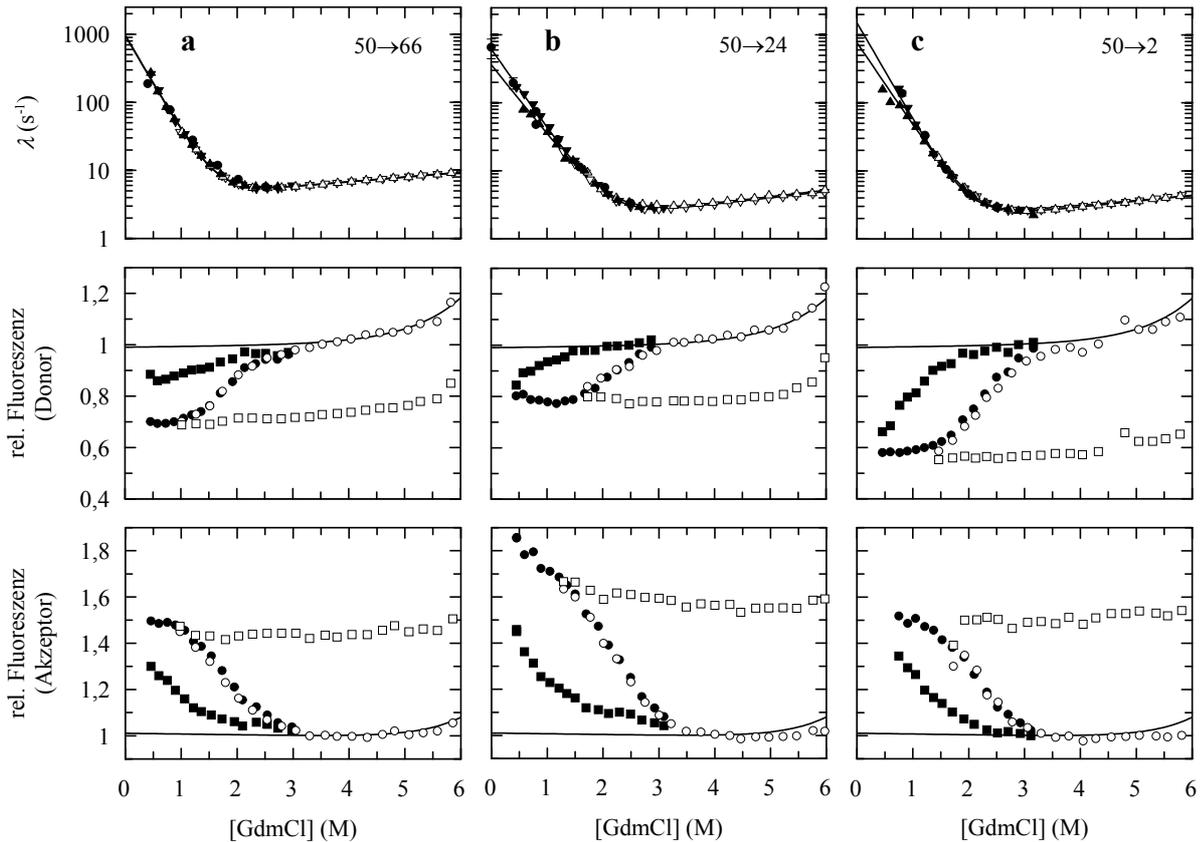
(aber ohne Akzeptor) verhalten sich die Startwerte der Trp-Fluoreszenz wie bei NAWA (Daten nicht gezeigt).

In Anwesenheit des Akzeptors (in 50→66) sind die Startwerte der Trp-Fluoreszenz (gefüllte Quadrate in Abbildung 3.18b) hingegen im Vergleich mit der Basislinie des denaturierten Proteins erniedrigt. Wie bei der AEDANS-Fluoreszenz ist die Abweichung bei geringen GdmCl-Konzentrationen am stärksten ausgeprägt. Die schwächere Donor-Fluoreszenz kann, wie die erhöhte Akzeptor-Fluoreszenz, durch das Vorliegen eines kompakten Zustands erklärt werden und bestätigt damit den schnellen Kollaps innerhalb der Totzeit von Rückfaltungsexperimenten. Nur wenn sich die Effekte in der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz reziprok verhalten, beruhen die beobachteten Fluoreszenzänderungen tatsächlich auf Änderungen der Effizienz des Energietransfers. Bei der isolierten Betrachtung eines einzelnen Fluorophors dagegen kann nicht eindeutig zwischen der Änderung der Transfereffizienz und der Änderung von Fluoreszenzeigenschaften aufgrund anderer Einflüsse unterschieden werden.

Die monoexponentiellen Zeitverläufe sowohl bei der Entfaltung als auch bei der Rückfaltung von 50→66 deuten auf ein kinetisches Zweizustandsverhalten von *Bc-Csp\** hin. Die Amplitudenanalyse bestätigt diesen Mechanismus für die Entfaltungsreaktion ohne Einschränkungen; für die Rückfaltung wird allerdings eine schnelle Verkürzung des Abstands beobachtet, die in der Totzeit der Messung abläuft und der Zweizustandsfaltung vorausgeht. Dieser schnelle Kollaps kann nur durch abstandsempfindliche Methoden wie FRET nachgewiesen werden, aber nicht durch die Fluoreszenz von Trp8, die sich hierbei nicht ändert.

### 3.6.4 Ausgeprägte Abstandsverkürzung bei 50→66, 50→24 und 50→2

Für alle Donor-Akzeptor Proteine wurden die Start- und Endwerte aus den kinetischen Experimenten bestimmt und gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen. Ein Kollaps der entfalteten Peptidkette in der Rückfaltung führt zu dem bei 50→66 beobachteten Muster (Abbildung 3.17b und Abbildung 3.18b). Entsprechende Auftragungen der experimentell bestimmten Start- und Endwerte sind in Abbildung 3.19 für die Proteine 50→66, 50→24 und 50→2 gezeigt.



**Abbildung 3.19:** Rückfaltungs- und Entfaltungskinetik der Donor-Akzeptor Proteine (a) 50→66, (b) 50→24 und (c) 50→2. Die oberen Felder jeder Teilabbildung zeigen die apparenten Faltungsraten  $\lambda$  der Rückfaltung (gefüllte Symbole) und der Entfaltung (offene Symbole). Die Messungen erfolgten mit ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) Trp-Fluoreszenz und ( $\blacktriangledown$ ,  $\triangledown$ ) AEDANS-Fluoreszenz nach Anregung bei 280 nm. ( $\bullet$ ) Raten aus Drucksprungexperimenten. Die Linien zeigen Angleiche an die Daten gemäß dem Zweizustandsmodell. In den mittleren bzw. unteren Feldern sind die Amplituden der Donor- bzw. Akzeptor-Fluoreszenz dargestellt. ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ) Start- und ( $\bullet$ ,  $\circ$ ) Endwerte der Rückfaltungs- (gefüllte Symbole) und Entfaltungskinetiken (offene Symbole). Die Linien im mittleren bzw. unteren Feld kennzeichnen die Basislinien des entfalteten Proteins und wurden durch Kontrollexperimente mit NAWA (Abbildung 3.18a) bzw. Trp-EDANS (Abbildung 3.17a) erhalten. Die Fluoreszenz des entfalteten Proteins wurde in allen Fällen auf den Wert 1 normiert.

Die Bestimmung der Amplitude einer sehr schnellen Reaktion ist häufig unsicher. Aufgrund des exponentiellen Verlaufs findet ein Großteil der Signaländerung in den ersten 2 bis 3 ms der Messung statt, die von Mischungsartefakten überlagert sein können und deshalb nicht sicher ausgewertet werden können. So erfolgt bei Raten um  $200 \text{ s}^{-1}$  die Hälfte der Sig-

naländerung bereits in den ersten 3 ms. Oft werden aus den restlichen Zeitverläufen zu geringe Geschwindigkeitskonstanten und damit zu geringe Amplituden ermittelt. Zusätzlich zu den Start- und Endwerten der Einzelkinetiken sind in den oberen Feldern der Abbildung 3.19 auch die Geschwindigkeitskonstanten aufgetragen. Die Raten der Rückfaltungsreaktion wurden durch *stopped-flow*-Messungen (gefüllte Dreiecke) und durch Drucksprungexperimente (gefüllte Punkte) bestimmt. Die Totzeit der Drucksprungexperimente ist kleiner als 100  $\mu\text{s}$ , und deshalb können die Geschwindigkeitskonstanten sehr zuverlässig bestimmt werden. Mit diesen beiden unabhängigen Methoden wurden identische Raten erhalten. Außerdem zeigen die Chevron-Auftragungen die für Zweizustandsverhalten typische lineare Abhängigkeit der Raten von der GdmCl-Konzentration; wären die Raten bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen zu klein, müßte ein Absinken der Raten zu beobachten sein („*rollover*“). Es gibt daher keinen Hinweis darauf, daß die bestimmten Raten und Amplituden kleiner sind als die tatsächlichen Werte.

Bei *stopped-flow*-Messungen ist die Aufzeichnung der Daten mit dem Abstoppen der Lösung und dadurch mit dem Beginn der Faltungsreaktion in der Beobachtungszelle gekoppelt. Der Aufbau der *stopped-flow*-Apparatur bedingt allerdings häufig eine Verzögerung der Datenaufnahme relativ zum Reaktionsbeginn um die sogenannte Totzeit. Eine als zu klein angenommene Totzeit der *stopped-flow*-Apparatur kann zu verringerten Amplituden führen. Bei der verwendeten Apparatur wurde die Totzeit jedoch immer als  $\leq 1$  ms bestimmt (2.10.1). Eine völlige Ignorierung dieser Totzeit würde die Amplitude einer Reaktion mit der Geschwindigkeitskonstante  $\lambda = 100 \text{ s}^{-1}$  jedoch lediglich um 10 % verringern. Die gemessenen Amplituden aus Abbildung 3.19 sind allerdings so gering, daß sie nicht durch Fehler in der Totzeit erklärt werden können. Die verringerten Amplituden der Rückfaltungsreaktionen sind also nicht durch Meßfehler verursacht sondern tatsächlich die Auswirkungen des schnellen Kollapses der Peptidkette.

Die Start- und Endwerte der Donor-Akzeptor Proteine 50 $\rightarrow$ 24 und 50 $\rightarrow$ 2 ergeben ähnliche Muster wie 50 $\rightarrow$ 66. In allen drei Fällen zeigt die Donor-Fluoreszenz stark verringerte Startwerte und die Akzeptor-Fluoreszenz entsprechend stark erhöhte Startwerte bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen. Dieses komplementäre Verhalten der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz bestätigt, daß sich die beobachteten intramolekularen Abstände schon vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung sehr schnell und sehr stark verringern. Insgesamt verkürzt sich der Abstand zwischen dem Donor und dem Akzeptor während der Faltung um 7 Å (50 $\rightarrow$ 66), 9 Å (50 $\rightarrow$ 24) bzw. 19 Å (50 $\rightarrow$ 2) (Tabelle 3.4). Der Amplitudenverlust vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ist in der Variante 50 $\rightarrow$ 2 am stärksten ausgeprägt. Bei ihr liegt mit 47 Aminosäuren ein Großteil der Peptidkette zwischen dem Donor und dem Akzeptor.

Für diese Proteine mit Trp50 als Donor und dem Akzeptor an den Positionen 2, 24 und 66 sind die Abstände im entfalteten Zustand größer als  $R_0$ , im gefalteten Zustand dagegen kleiner als  $R_0$ . Im Bereich um  $R_0$  zeigen FRET-Experimente die höchste Empfindlichkeit für

Abstandsänderungen und ergeben daher die beobachteten, großen Fluoreszenzänderungen. Außerdem hängt die Transfereffizienz im Bereich von  $R_0$  annähernd linear vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor ab. Bei 0,5 M GdmCl findet für alle Varianten mindestens 50 % der Signaländerung in der Totzeit der Faltungsexperimente statt. Aufgrund der annähernd linearen Abhängigkeit zwischen Abstand und Effizienz kann auch die Änderung des Abstands durch den schnellen Kollaps auf mindestens 50 % geschätzt werden. Eine genaue Berechnung des Abstands im kollabierten Zustand ist nicht möglich, da der gemessene Startwert der Fluoreszenz von einer Mischung aus nativem, kollabiertem und entfaltetem Protein verursacht wird und die Verteilungsbreiten der Abstände in diesen Konformationen nicht bekannt sind.

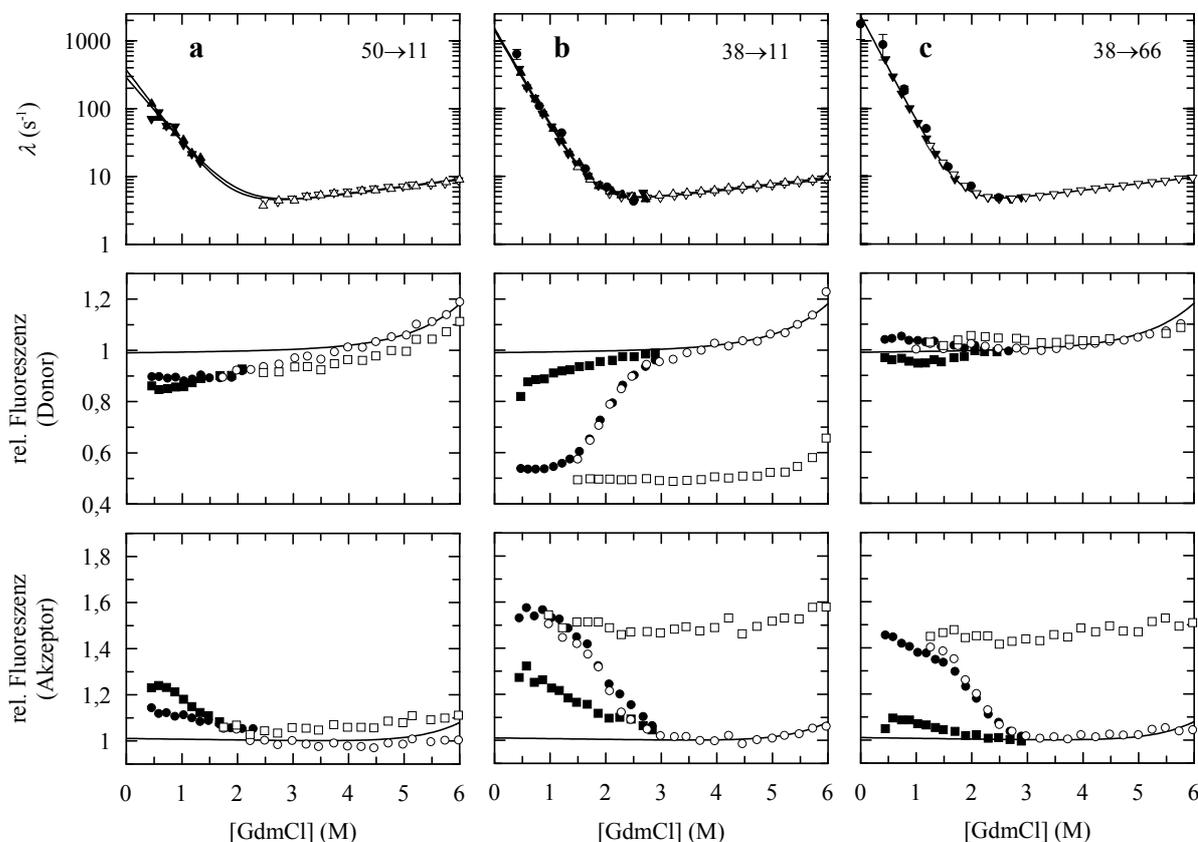
Bei geringen GdmCl-Konzentrationen hat der Kollaps den größten Anteil an der gesamten Abstandsänderung während der Faltung. So findet bei 50→2 ca. 70 % der Abstandsänderung innerhalb der Totzeit der *stopped-flow*-Messung statt (Abbildung 3.19c). Nur die restlichen 30 % werden als Amplitude des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts gemessen. Mit steigender GdmCl-Konzentration nimmt der Anteil des Kollapses ab und die gemessene Amplitude steigt an. Der kollabierete Zustand von *Bc-Csp\** wird also durch GdmCl schon unter Bedingungen stark destabilisiert, bei denen der native Zustand die stabilste Konformation ist (bis 1,5 M GdmCl). Die Endpunkte von Ent- und Rückfaltung ergeben einen Entfaltungsübergang des nativen Proteins und spiegeln dessen Stabilität wider. In Analogie dazu können die Startwerte der Rückfaltung als eine Art Entfaltungsübergang des kollabierten Zustands interpretiert werden und verdeutlichen dessen geringe Stabilität.

### 3.6.5 Positionen mit geringer Abstandsverkürzung

Nicht bei allen Donor-Akzeptor Proteinen ist die schnelle Verkürzung der Abstände innerhalb der Totzeit so ausgeprägt wie bei 50→66, 50→24 und 50→2. Aber gerade die Varianten mit weniger ausgeprägtem Kollapsverhalten zeigen grundlegende Eigenschaften des FRET-Systems auf. In Abbildung 3.20 sind sowohl die Geschwindigkeitskonstanten als auch die Start- und Endwerte von 50→11, 38→11 und 38→66 gezeigt.

Im Protein 50→11 vergrößert sich der Abstand bei Entfaltung nur um 4 Å ( $R_N = 24$  Å,  $R_U = 28$  Å, Tabelle 3.4). Die daraus resultierende leichte Verringerung der Transfereffizienz führt in den kinetischen Entfaltungsexperimenten zu sehr kleinen Amplituden sowohl in der Donor- als auch in der Akzeptor-Fluoreszenz (Abbildung 3.20a). Bei Rückfaltungsreaktionen verringert sich der durchschnittliche Abstand zwischen Donor und Akzeptor in der Totzeit, was an den erniedrigten Startwerten der Trp-Fluoreszenz und den erhöhten Startwerten der AEDANS-Fluoreszenz zu erkennen ist. Im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird bei GdmCl-Konzentrationen größer als 1,5 M keine Amplitude beobachtet, und bei GdmCl-Konzentrationen kleiner als 1,5 M verringert sich die Effizienz des Energietransfers leicht. Dieses Verhalten deutet darauf hin, daß im Verlauf der Faltung zuerst ein kompakter, kollabierter Zustand vorliegt, der sich im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt leicht ausdehnt

und damit zum größeren Abstand der Positionen 50 und 11 führt. Da die beobachteten Effekte sehr klein sind, können alternative Erklärungen natürlich nicht sicher ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.20:** Rückfaltungs- und Entfaltungskinetik der Donor-Akzeptor Proteine (a) 50→11, (b) 38→11 und (c) 38→66. Es wurden dieselben Symbole verwendet und die Daten unter denselben Bedingungen gemessen wie in Abbildung 3.19 beschrieben.

Alle Proteine mit Trp50 zeigen ein komplementäres Verhalten der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz (Abbildung 3.19, Abbildung 3.20). Bei Proteinen mit dem Donor Trp38 ist dies nur eingeschränkt der Fall: Die Faltung von 38→66 führt nur in der Akzeptor-Fluoreszenz zu einer großen Amplitude, nicht dagegen in der Donor-Fluoreszenz (Abbildung 3.20c). Dieser scheinbare Widerspruch zwischen den beiden Fluoreszenzsonden wird durch die intrinsische Fluoreszenzänderung von Trp38 hervorgerufen (3.2.4).

Der Abstand zwischen den Positionen 38 und 66 unterscheidet sich im nativen und entfalten Zustand des Proteins nur um 4 Å ( $R_N = 23$  Å,  $R_U = 27$  Å, Tabelle 3.4). Ähnlich wie bei 50→11 ist die Amplitude der Faltungsreaktion aufgrund der veränderten Transfereffizienz nur gering. Bei der Entfaltung von 38→66 sinkt die Transfereffizienz und die Trp-Fluoreszenz sollte daher zunehmen. Gleichzeitig nimmt aber die intrinsische Fluoreszenz von Trp38 bei der Entfaltung ab (3.2.4). Da diese beiden gegenläufigen Effekte ähnlich groß sind, heben sie sich nahezu auf. In der Rückfaltung ändern beide Effekte zwar das Vorzeichen, bleiben aber ähnlich groß. Damit kommt es in der Rück- und Entfaltung zu der kaum meßbaren Amplitude der Donor-Fluoreszenz von 38→66 (mittleres Feld von Abbildung 3.20c). Die Akzeptor-

Fluoreszenz wird ebenfalls durch die Änderung der Transfereffizienz und der Quantenausbeute von Trp38 beeinflusst: Bei der Entfaltung sinkt die AEDANS-Fluoreszenz mit der Effizienz ab, während das Absinken der intrinsischen Fluoreszenz von Trp38 zusätzlich zu einem geringeren Übertrag von Anregungsenergie auf AEDANS führt. Hier führen beide Effekte in der Entfaltung zu einem Absinken und in der Rückfaltung zu einer Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz und damit zu der großen Gesamtamplitude (unteres Feld von Abbildung 3.20c).

In allen Donor-Akzeptor Proteinen mit dem Donor Trp38 wird die Änderung der Transfereffizienz durch die intrinsische Fluoreszenzänderung von Trp38 überlagert. Wie bereits diskutiert tragen bei 38→66 die beiden Effekte zu gleichen Teilen zur beobachteten Fluoreszenz bei. Dagegen überwiegt bei 38→11 die Änderung der Transfereffizienz, da sich der Abstand bei Rückfaltung um 14 Å verkürzt. In diesem Fall wird, wie bei den Proteinen mit Trp50, ein komplementäres Verhalten der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 3.20b). Die intrinsische Änderung der Fluoreszenz von Trp38 wird bei 38→11 durch die weit größeren Effekte der Abstandsänderung vollständig überlagert. Das andere Extrembeispiel stellt 38→24 dar. Hier findet praktisch keine Abstandsänderung statt (1 Å) und deshalb überwiegt die intrinsische Fluoreszenzänderung (Daten nicht gezeigt).

Aus kinetischen Messungen mit den nur-Donor Proteinen *Bc-Csp\** F38W, F38W/N11C und F38W/L66C ist bekannt, daß die intrinsische Änderung der Fluoreszenz von Trp38 im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung erfolgt, d.h. die Startwerte der Rückfaltung folgen der Basislinie des entfalteten Proteins (Daten nicht gezeigt). Die Änderung der Transfereffizienz in der Totzeit der Reaktion wird also nicht durch die intrinsische Fluoreszenzänderung beeinflusst.

Bei 38→24 ist keine Aussage über den Kollaps möglich, da sich die Transfereffizienz nicht ändert. In 38→11 findet eine Verkürzung des Abstands in der Totzeit der Messung statt, der Kollaps ist aber nicht so stark ausgeprägt wie in den Proteinen mit Donor Trp50. Dagegen scheint in 38→66 fast kein Kollaps stattzufinden. Eine schnelle Verkürzung von Abständen in der Totzeit müßte zu einem Absinken der Startwerte der Donor-Fluoreszenz führen, da die intrinsische Fluoreszenzzunahme von Trp38 erst im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt auftritt. Es werden aber wie in der AEDANS-Fluoreszenz nur minimale Abweichungen der Startwerte von der Basislinie des denaturierten Proteins beobachtet.

Am Beispiel der Proteine 38→11 und 38→66 ist deutlich zu erkennen, daß Abstände zwischen verschiedenen Positionen im Protein beim schnellen Kollaps unterschiedlich stark verkürzt werden. Im Falle eines unspezifischen Kollapses zu einer kompakten, aber völlig unstrukturierten Konformation sollte das Ausmaß des Kollapses nur vom Abstand im denaturierten Zustand  $R_U$  abhängen und nicht vom Abstand im nativen Zustand des Proteins. Gegen diese Korrelation mit  $R_U$  spricht der schwache Kollaps von 38→66 ( $R_U = 27$  Å) im Vergleich zum stärkeren Kollaps bei 50→66 ( $R_U = 22$  Å, Tabelle 3.4).

Möglicherweise hängt das Ausmaß des Kollapses davon ab, wie stark sich der Abstand bei der Faltung des jeweiligen Proteins ändert. Neben 38→66 (schwacher Kollaps, Abstandsänderung 4 Å) und 38→11 (deutlicher Kollaps, Abstandsänderung 14 Å) bestätigt auch 50→2

(stärkster beobachteter Kollaps, Abstandsänderung 19 Å) diese Hypothese. Auf molekularer Ebene bedeutet diese Erklärung, daß im kollabierten Zustand keine elongierten Strukturen mehr vorliegen, sondern eher eine globuläre Konformation mit eventuell schon nativ-ähnlicher Topologie.

### 3.6.6 FRET im früh strukturierten $\beta 1, \beta 2$ -Bereich

Der Parameter  $\alpha$  gibt die Zugänglichkeit des Denaturierungsmittels zum Übergangszustand im Vergleich zum nativen und entfalteten Zustand an. Dadurch kann die Nativähnlichkeit des Übergangszustands bei der Faltung eines Proteins abgeschätzt werden. Für *Bc*-Csp ist  $\alpha$  größer als 0,90 und der Übergangszustand damit nativähnlich (3.5.3). Der Wert  $\alpha$  bezieht sich auf das gesamte Protein und läßt keine differenzierte Betrachtung verschiedener Kettenabschnitte zu.

Durch Mutationsanalyse kann der Beitrag einzelner Aminosäuren zur Stabilisierung des Übergangszustands ermittelt werden. Die Veränderung einer Seitenkette (meist Reduktion auf die Methylgruppe von Ala) kann sich sowohl auf die freie Enthalpie des Übergangszustands als auch auf die Gleichgewichtsstabilität des Proteins auswirken. Der Quotient der beiden Energieänderungen wird als  $\Phi$  bezeichnet (Matouschek *et al.*, 1989; Fersht *et al.*, 1992). Werden durch eine Mutation dieselben Wechselwirkungen im nativen Zustand und im Übergangszustand verändert, ist  $\Phi = 1$ , und die Seitenkette besitzt bereits im Übergangszustand nativähnliche Kontakte. Hat die Mutation dagegen keinen Einfluß auf die Stabilität des Übergangszustands, bildet diese Seitenkette im Übergangszustand noch keine definierten Wechselwirkungen aus und  $\Phi = 0$ .

Aus der Mutationsanalyse von *Bs*-CspB ergab sich ein polarisierter Übergangszustand (Garcia-Mira *et al.*, 2004). Viele Positionen innerhalb der Faltblattstränge  $\beta 1$  und  $\beta 2$  zeigten hohe  $\Phi$ -Werte, und für einzelne Aminosäuren im Faltblattstrang  $\beta 4$  (Leu41, Gln45, Ala46, Ser48) ergaben sich mittlere  $\Phi$ -Werte. In den restlichen Bereichen des Proteins wurden niedrige  $\Phi$ -Werte erhalten. Im Übergangszustand sind daher überwiegend die Kontakte zwischen den Faltblattsträngen  $\beta 1$  und  $\beta 2$  ausgebildet, und der Faltblattstrang  $\beta 4$  ist durch wenige Wechselwirkungen an  $\beta 1$  angelagert. Aufgrund der starken Ähnlichkeit von *Bs*-CspB und *Bc*-Csp sollte auch hier ein ähnlich polarisierter Übergangszustand vorliegen.

Auf dem Faltungsweg von *Bc*-Csp geht der Übergangszustand aus dem kollabierten Zustand hervor. Die Bereiche von *Bc*-Csp mit nativähnlichen Wechselwirkungen im Übergangszustand könnten also auch schon im kollabierten Zustand nativähnlich strukturiert sein. Interessanterweise befinden sich Trp50 (Faltblattstrang  $\beta 4$ ) und Cys2 (Faltblattstrang  $\beta 1$ ) im strukturierten Bereich des Übergangszustands. Das entsprechende Donor-Akzeptor Protein 50→2 zeigt einen stark ausgeprägten Kollaps (Abbildung 3.19c), was andeutet, daß die Faltblattstränge  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 4$  möglicherweise schon im kollabierten Zustand strukturiert vorliegen.

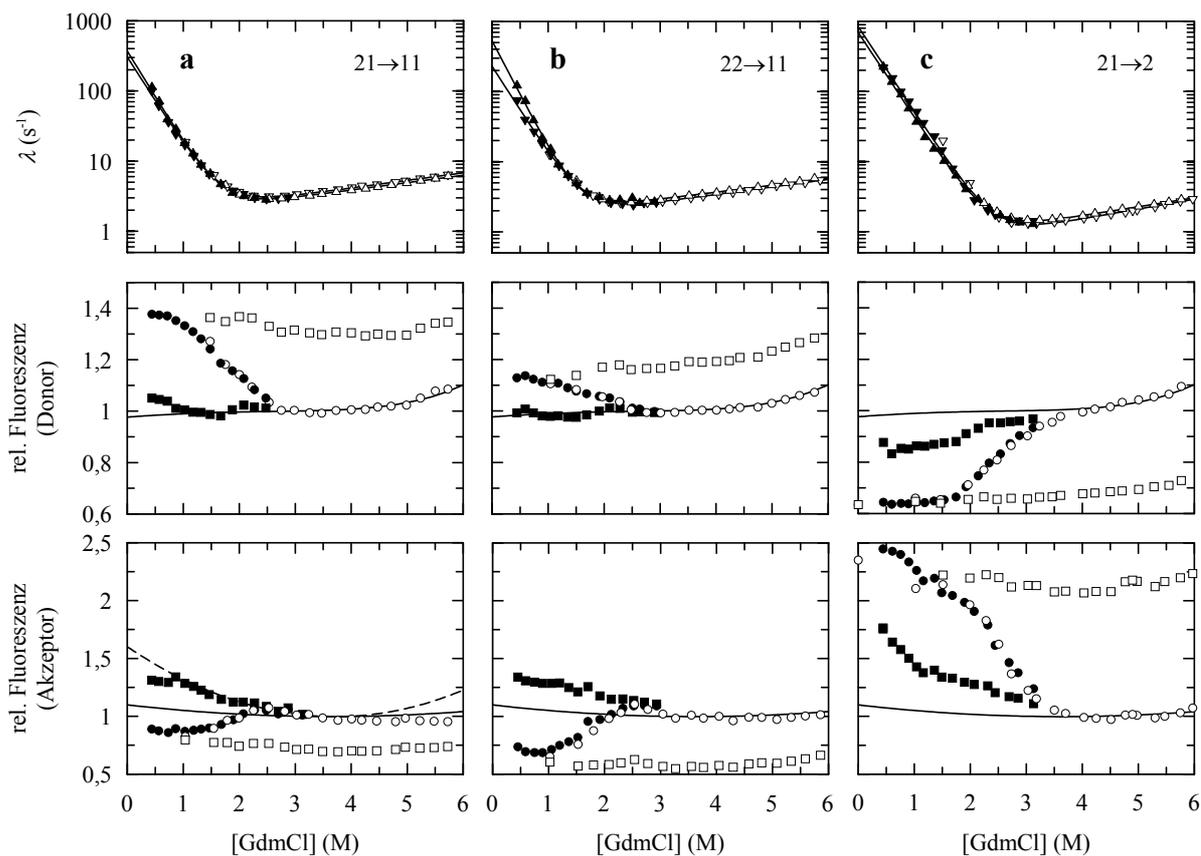
Um diese Hypothese eines teilweise strukturierten kollabierten Zustands zu überprüfen, wurden weitere Donor-Akzeptor Proteine verwendet. Mit den Proteinen 21→11, 22→11 und 21→2 wurden gezielt verschiedene Abstände im Bereich der Faltblattstränge  $\beta 1$  und  $\beta 2$  beobachtet (Abbildung 3.21). Die Positionen 11 und 21 (bzw. 22) liegen an den beiden Enden des Faltblattstranges  $\beta 2$ . Dieser liegt in der nativen Struktur gestreckt vor, und deshalb ist der Abstand zwischen den Positionen 11 und 21 im nativen Zustand größer als im entfalteten Protein (21→11, 22→11, Tabelle 3.4). Im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Rückfaltung nimmt tatsächlich die Effizienz des Energietransfers aufgrund der Streckung von  $\beta 2$  ab. Demzufolge steigt die Donor-Fluoreszenz in der Rückfaltung an und die Akzeptor-Fluoreszenz sinkt; in der Entfaltung erfolgen beide Fluoreszenzänderungen in die entgegengesetzten Richtungen. Sowohl 21→11 als auch 22→11 zeigen dieses Verhalten (Abbildung 3.21a, b).

Die intrinsische Fluoreszenz von Trp21 bzw. Trp22 ist allerdings vom Faltungszustand abhängig. Bei Entfaltung sinkt die Fluoreszenz von Trp21 um 30 % ab und die Fluoreszenz von Trp22 steigt um 45 % an. Wie bei Proteinen mit dem Donor Trp38 (3.6.5) kommt es auch hier zur Überlagerung der intrinsischen Fluoreszenzänderung mit der Änderung aufgrund des Energietransfers. Bei der Entfaltung von 21→11 verringert sich die Trp-Fluoreszenz durch die intrinsische Abnahme und den stärker werdenden Energietransfer. Die Akzeptor-Fluoreszenz nimmt bei der Entfaltung zu (Abbildung 3.21a). Offensichtlich dominiert hier also die Zunahme aufgrund der steigenden Transfereffizienz über die gleichzeitig absinkende Quantenausbeute und damit Anregung durch Trp21.

Für den Donor Trp22 steigt die intrinsische Trp-Fluoreszenz bei Entfaltung an. Gleichzeitig erhöht sich die Effizienz des Energietransfers auf AEDANS und führt damit zu einer Abnahme der Trp-Fluoreszenz. In der Summe wird eine Abnahme der Trp-Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 3.21b). Bei den beiden Proteinen 21→11 und 22→11 überwiegt daher die Änderung durch FRET über die intrinsische Änderung der Fluoreszenz.

Die Fluoreszenz von Proteinen mit Trp21 bzw. Trp22 wurde nach Anregung bei 295 nm gemessen, um Beiträge von Tyr8 und Tyr15 auszuschließen. Daher wurden auch die Basislinien des entfalteten Proteins aus der Fluoreszenz der Modellverbindungen NAWA bzw. Trp-EDANS nach Anregung bei 295 nm bestimmt. Die in Abbildung 3.21 gezeigten Basislinien (durchgezogene Linien im mittleren und unteren Feld jeder Teilabbildung) unterscheiden sich nur wenig von den Basislinien nach Anregung bei 280 nm (Abbildung 3.19).

Die intrinsische Fluoreszenzänderung von Trp21 bzw. Trp22 erfolgt im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung (nahezu konstante Startwerte für alle Rückfaltungsreaktionen von *Bc-Csp\** E21W und G22W). Daher werden bei der Faltung von 21→11 und 22→11 die Startwerte der Rückfaltung nur durch die Effizienz des Energietransfers bestimmt. Bei beiden Proteinen stimmen die Startwerte der Trp-Fluoreszenz gut mit der Basislinie des entfalteten Proteins überein. Dagegen sind die Startwerte der AEDANS-Fluoreszenz etwas erhöht. Die Erhöhung der Akzeptor-Fluoreszenz wird hier nicht durch FRET verursacht, da kein gleichzeitiges Absinken der Donor-Fluoreszenz beobachtet wird. Vielmehr führt die



**Abbildung 3.21:** Rückfaltungs- und Entfaltungskinetik der Donor-Akzeptor Proteine (a) 21→11, (b) 22→11 und (c) 21→2. Es sind dieselben Symbole verwendet wie in Abbildung 3.19 beschrieben. Alle Fluoreszenzmessungen wurden nach Anregung bei 295 nm durchgeführt. Die AEDANS-Fluoreszenz von *Bc-Csp\** N11C-AEDANS nach Anregung bei 295 nm ist im unteren Feld von (a) als gestrichelte Linie gezeigt.

Anregungswellenlänge 295 nm zu einem starken Hintergrundsignal durch direkte Anregung von AEDANS. Der Energietransfer ist hingegen schwächer als bei der Anregungswellenlänge 280 nm, da Tryptophan bei 295 nm nur noch schwach angeregt wird. Bei direkter Anregung von AEDANS bei 295 nm nimmt die Fluoreszenz zwischen 0 und 3 M GdmCl ab. Dieses Verhalten ist in Abbildung 3.21a für das nur-Akzeptor Protein *Bc-Csp\** N11C-AEDANS nach Anregung bei 295 nm gezeigt (gestrichelte Linie). Weder Trp-EDANS noch das nur-Akzeptor Protein sind eine optimale Referenz für die AEDANS-Fluoreszenz nach Anregung bei 295 nm: In Trp-EDANS ist die direkte Anregung von AEDANS unterrepräsentiert, im nur-Akzeptor Protein ist dagegen kein FRET möglich. Zur Beurteilung des Kollapses kann deshalb nur die Donor-Fluoreszenz herangezogen werden.

Die Faltung von 21→11 bzw. 22→11 führt zur Streckung des Faltblattstranges  $\beta 2$ . Falls eine nativähnliche, gestreckte Konformation bereits im kollabierten Zustand vorliegt, sollten die Startwerte der Donor-Fluoreszenz in der Rückfaltung erhöht sein. Ist der schnelle Kollaps hingegen unspezifisch, so sollten sich die Abstände in 21→11 und 22→11 innerhalb der Totzeit im Vergleich zum entfalteten Zustand verringern und so die Startwerte der Trp-Fluoreszenz erniedrigt sein. Die experimentell bestimmten Startwerte sind weder erhöht noch erniedrigt und damit können beide Grenzfälle ausgeschlossen werden. Möglicherweise findet

während des Kollapses eine teilweise Streckung im Bereich von  $\beta 2$  statt, die jedoch noch nicht so ausgeprägt ist wie im nativen Protein.

Der Donor Trp21 am Ende des Faltblattstranges  $\beta 2$  und der Akzeptor Cys2-AEDANS am Anfang des Faltblattstranges  $\beta 1$  (wie im Protein 21 $\rightarrow$ 2) sollten eine ideale Kombination darstellen, um die Bildung des  $\beta$ -hairpin aus den Strängen  $\beta 1$  und  $\beta 2$  zu verfolgen. Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor beträgt im nativen Zustand nur 10 Å und vergrößert sich bei Entfaltung auf 24 Å. Die Bildung des  $\beta$ -hairpin führt tatsächlich zu einer starken Zunahme der Transfereffizienz im Verlauf der Faltung. Dies äußert sich bei der Rückfaltung in einer Abnahme der Trp- und einer Zunahme der AEDANS-Fluoreszenz. In Abbildung 3.21c ist zu erkennen, daß maximal 30 % dieser Fluoreszenzänderung in der Totzeit der Reaktion stattfinden und deshalb im kollabierten Zustand dieser  $\beta$ -hairpin noch nicht so ausgebildet ist wie im nativen Protein. Die endgültige Strukturierung erfolgt erst im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt.

Unabhängig davon, ob die Faltung des Proteins mit einer Streckung (21 $\rightarrow$ 11, 22 $\rightarrow$ 11) oder mit einer Verkürzung (21 $\rightarrow$ 2) des untersuchten Abstands einhergeht, erfolgt nur ein kleiner Teil der Änderung der Transfereffizienz in der Totzeit der Messung. Dies deutet darauf hin, daß im kollabierten Zustand der Bereich der Faltblattstränge  $\beta 1$  und  $\beta 2$  noch nicht in einer nativähnlichen Struktur vorliegt. Erst im Übergangszustand des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes werden die nativen Abstände in *Bc*-Csp ausgebildet.

Der Kollaps der Peptidkette von *Bc*-Csp wird nur bei der Messung von Abständen durch Energietransfer beobachtet. Dieses Verfahren setzt voraus, daß sich ein Donor und ein Akzeptor am Protein befinden. Sowohl der Indolring von Tryptophan als auch das Naphthalinsystem von AEDANS sind als Aromaten in wäßrigen Lösungen schlecht löslich. Es ist daher theoretisch möglich, daß Donor und Akzeptor bei der Rückfaltung hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden und den Kollaps der Kette nur vortäuschen. Da alle verfügbaren Fluorophore Aromaten enthalten, kann dieser Einwand durch FRET-Experimente mit anderen Sonden aber nie völlig entkräftet werden. Bei den Proteinen 21 $\rightarrow$ 11 und 22 $\rightarrow$ 11 wird jedoch keine Änderung der Trp-Fluoreszenz in der Totzeit beobachtet. Dies ist ein wichtiges Indiz dafür, daß Tryptophan und AEDANS keine unspezifischen Wechselwirkungen eingehen und deshalb tatsächlich als Reporter für Abstandsänderungen in der Peptidkette geeignet sind.

### 3.6.7 Donor-Akzeptor Proteine ohne Tyrosin

Der charakteristische Transferabstand  $R_0$  von Tyrosin und AEDANS beträgt ca. 21 Å. In *Bc*-Csp\* befindet sich Tyr8 im Faltblattstrang  $\beta 1$  und Tyr15 im Faltblattstrang  $\beta 2$ . Damit ist Energietransfer von Tyrosin vor allem auf AEDANS an Position 11 (in der Schleife zwischen  $\beta 1$  und  $\beta 2$ ) und 24 (im benachbarten Faltblattstrang  $\beta 3$ ) möglich, wie bereits anhand der Fluoreszenzspektren von 50 $\rightarrow$ 24 gezeigt wurde (3.4.6). Der Abstand  $R_{\text{Kristall}}$  zwischen den beiden Tyrosinresten und Cys2 bzw. Cys66 (annähernd 20 Å) wird durch die Modifikation

der Cysteinreste mit AEDANS zusätzlich vergrößert, und damit findet bei Proteinen mit AEDANS an Position 2 oder 66 kaum Energietransfer von Tyrosin statt (3.4.6).

Der zusätzliche Beitrag von Tyrosin hat keinen Einfluß auf die Berechnung der Transfer-effizienz (3.4.4 und 3.4.5) aus Fluoreszenzspektren. Dazu wurden die Spektren allerdings bei 295 nm angeregt (Akzeptor-Fluoreszenz), oder die Donor-Fluoreszenz wurde im Bereich über 350 nm ausgewertet, in dem keine Tyr-Fluoreszenz auftritt. Bei den kinetischen Experimenten hingegen erfolgte die Anregung bei 280 nm, wodurch auch Tyr-Fluoreszenz oder Energie-transfer zu AEDANS auftritt. Diese Energieübertragung ist stark abstandsabhängig und könnte, wie der Energietransfer von Tryptophan auf AEDANS, zu dem beobachteten Amplitudenverlust der Akzeptor-Fluoreszenz (3.6.4) beitragen.

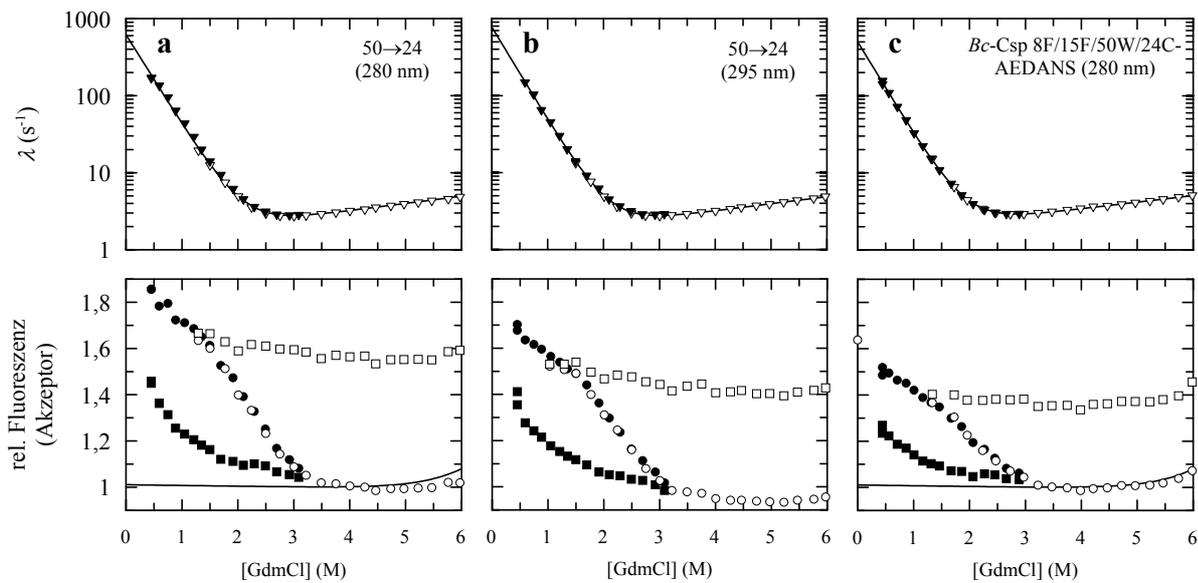
Um zu überprüfen, ob die Anregung von Tyrosin zu dem beobachteten Muster der erhöhten Startwerte der Akzeptor-Fluoreszenz beiträgt, wurden vergleichende Messungen mit der Variante 50→24 nach Anregung bei 280 und 295 nm durchgeführt. Außerdem wurde durch ortsgeriçtete Mutagenese ein Tyrosin-freies Protein erhalten, das wie 50→24 den Donor Trp50 und AEDANS an Position 24 besitzt (*Bc-Csp* W8F/Y15F/E50W/S24C-AEDANS, Kurzbezeichnung 50→24-Tyr). Hier erfolgte die Anregung der Trp-Fluoreszenz bei 280 nm, um das Hintergrundsignal von AEDANS möglichst gering zu halten. Die Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden der Messungen mit 50→24 und dem entsprechenden Tyrosin-freien Protein sind in Abbildung 3.22 dargestellt.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung von 50→24-Tyr sind identisch mit den Raten aus beiden Messungen mit 50→24, nur die Rückfaltung ist geringfügig verlangsamt. Der Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin beeinflusst also weder die thermodynamische Stabilität noch das Faltungsverhalten des Proteins. Allerdings werden Proteine mit Phe8 und Phe15 schlechter exprimiert und neigen bei höheren Konzentrationen zur Aggregation.

50→24 bzw. 50→24-Tyr ergeben nach Anregung bei 280 nm normierte Gesamtamplituden der Entfaltung von ca. 0,6 bzw. 0,4 (Abbildung 3.22a, c). Außerdem ist das (nicht normierte) Gesamtsignal von 50→24-Tyr geringer als von 50→24. Die Übertragung von Anregungsenergie von Tyrosin auf AEDANS scheint in 50→24 zu einer erhöhten Akzeptor-Fluoreszenz zu führen, in 50→24-Tyr ist dieser Energietransfer nicht möglich. Daneben können aber auch unterschiedliche Konzentrationen der beiden Proteine für den Effekt verantwortlich sein. Generell sind die normierten Gesamtamplituden aus verschiedenen Messungen schwierig zu vergleichen, da die Meßdaten immer Beiträge des Puffersignals enthalten.

Unabhängig davon, ob die Tyr-Fluoreszenz durch die Wahl der Anregungswellenlänge 295 nm (Abbildung 3.22b) oder durch Austausch der Tyrosinreste (Abbildung 3.22c) vermieden wird, verhalten sich die Start- und Endwerte der Rückfaltung wie bei 50→24 nach Anregung bei 280 nm (Abbildung 3.22a). Das charakteristische Muster der erhöhten Startwerte in der Rückfaltung wird eindeutig durch den Energietransfer von Tryptophan auf AEDANS hervorgerufen. Die Interpretation dieses Phänomens als räumliche Annäherung zweier definierter Positionen auf der Peptidkette wird durch 50→24-Tyr unterstrichen. Zwar wird auch Energie von Tyrosin auf AEDANS übertragen, dies ist jedoch nicht die Ursache für den beob-

achteten Amplitudenverlust. Tatsächlich wird bei Rückfaltungsexperimenten mit dem Tryptophan-freien *Bc*-Csp\* S24C-AEDANS fast kein Amplitudenverlust beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die starke intrinsische Fluoreszenzänderung der Tyrosine erschwert hier aber eine quantitative Einschätzung. Möglicherweise verkürzen sich die Abstände zwischen Tyr8 bzw. Tyr15 und AEDANS an Position 24 in der Totzeit weniger als der Abstand zwischen Trp50 und AEDANS.



**Abbildung 3.22:** Rückfaltungs- und Entfaltungskinetik der Donor-Akzeptor Proteine (a), (b) 50→24 und (c) *Bc*-Csp W8F/Y15F/E50W/S24C-AEDANS. Die oberen Felder jeder Teilabbildung zeigen die apparenten Faltungsraten  $\lambda$  der Rückfaltung (gefüllte Symbole) und der Entfaltung (offene Symbole). Es wurde die AEDANS-Fluoreszenz nach Anregung bei (a) und (c) 280 nm bzw. (b) 295 nm gemessen. Die Linien zeigen Angleiche an die Daten gemäß dem Zweizustandsmodell. In den unteren Feldern sind die Amplituden der Akzeptor-Fluoreszenz dargestellt. (■, □) Start- und (●, ○) Endwerte der Rückfaltungs- (gefüllte Symbole) und Entfaltungskinetiken (offene Symbole). Die Linien im unteren Feld kennzeichnen die Basislinien des entfalteten Proteins und wurden durch Kontrollexperimente mit Trp-EDANS nach Anregung bei 280 nm erhalten. Die Fluoreszenz des entfalteten Proteins wurde in allen Fällen auf den Wert 1 normiert.

In 50→66 findet kaum Transfer von Tyrosin auf AEDANS statt. Theoretisch könnte aber Energietransfer von Tyrosin auf Tryptophan stattfinden, und damit könnte die Verkürzung des Abstands zwischen Tyr8 bzw. Tyr15 und Trp 50 für den Amplitudenverlust mitverantwortlich sein. Das Protein 50→66-Tyr (Tyrosin-frei) zeigt einen ähnlichen Amplitudenverlust in der Rückfaltung wie 50→66 (Daten nicht gezeigt). Auch hier ist der Energietransfer von Tryptophan auf AEDANS der dominierende Prozeß. Während der Rückfaltung nähern sich Tyrosin und Tryptophan zwar an, aber die Transfereffizienz ist äußerst gering (3.2.4).

Tyr8 und Tyr15 in Donor-Akzeptor Proteinen können im Prinzip Anregungsenergie auf Tryptophan oder auf AEDANS übertragen. Zusammenfassend läßt sich jedoch sagen, daß Tyrosin aufgrund des niedrigen Absorptionskoeffizienten und der meist geringen Transfer-effizienz nur unwesentlich zur Akzeptor-Fluoreszenz beiträgt. In *Bc*-Csp-Varianten ohne

Tyrosin wird derselbe Amplitudenverlust beobachtet wie in den Proteinen mit Tyrosin, d.h. die schnelle Abstandsänderung in der Totzeit findet zwischen Tryptophan und AEDANS statt.

### 3.7 Zeitauflösung des Kollapses

Die schnelle Verkürzung intramolekularer Abstände bei der Rückfaltung von *Bc-Csp* findet in der Totzeit der *stopped-flow*-Mischung statt. Nach 1 ms liegt der kollabierte Zustand vor und die Kinetik seiner Bildung kann nicht beobachtet werden. Die vergleichsweise lange Totzeit der *stopped-flow*-Experimente von etwa 1 ms wird durch den Mischungsvorgang selbst bedingt.

Bei Relaxationsmethoden wird die Faltungsreaktion nicht durch eine Änderung in der Zusammensetzung des Lösungsmittels induziert, sondern durch die extrem schnelle Veränderung eines physikalischen Parameters wie z.B. Druck oder Temperatur. Dadurch ist die Totzeit geringer als bei *stopped-flow*-Experimenten und beträgt für Drucksprungexperimente (p-Sprungexperimente) 50-100  $\mu$ s (Jacob *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2002), bei Laser-induzierten Temperatursprungexperimenten (T-Sprungexperimente) ist die Temperaturerhöhung nach nur 10 ns (Thompson *et al.*, 1997) abgeschlossen. Beide Methoden wurden verwendet, um den Zeitverlauf der Entstehung des kollabierten Zustands zu verfolgen.

Im Vergleich zu Mischungs-Experimenten führt die Veränderung des Drucks oder der Temperatur immer nur zu einer moderaten Verschiebung des Gleichgewichts. Daher können die Faltungskinetiken nur im Bereich des Entfaltungsübergangs beobachtet werden, wo bereits geringe Druck- oder Temperaturänderungen zu einer meßbaren Verschiebung zwischen den Populationen der verschiedenen Spezies führen. In den Basislinien des nativen und entfaltenen Proteins sind dagegen Messungen nicht möglich, da das Gleichgewicht kaum beeinflußt wird.

#### 3.7.1 Drucksprung

Nur Reaktionen, bei denen eine Volumenänderung stattfindet, können durch Druckänderungen beeinflußt werden. Im Falle einer Proteinfaltungsreaktion müssen sich also die Volumina des nativen und des entfaltenen Proteins in Lösung unterscheiden. Für *Bs-CspB* beträgt das Reaktionsvolumen der Entfaltung durch Harnstoff bzw. Guanidiniumthiocyanat -43 bzw. -42 ml/mol (Jacob *et al.*, 2002), d.h. das Volumen von 1 mol Protein nimmt bei Entfaltung um ca. 42 ml ab. Nach dem Prinzip von Le Chatelier führt eine Erhöhung des Drucks zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zum kompakteren, entfaltenen Zustand. Durch Druckrelaxation wird die Rückfaltung begünstigt. Dieselben Zusammenhänge zwischen Druckänderung und Faltungsreaktion wurden für *Bc-Csp* bestätigt (Perl *et al.*, 2001).

Bei allen p-Sprungexperimenten mit Donor-Akzeptor Proteinen wurde ausschließlich die Akzeptor-Fluoreszenz über 455 nm gemessen. Ein Filter für die Trp-Fluoreszenz in Gegenwart von AEDANS war nicht verfügbar.

### 3.7.2 Drucksprungexperimente im Übergangsbereich der GdmCl-induzierten Entfaltung

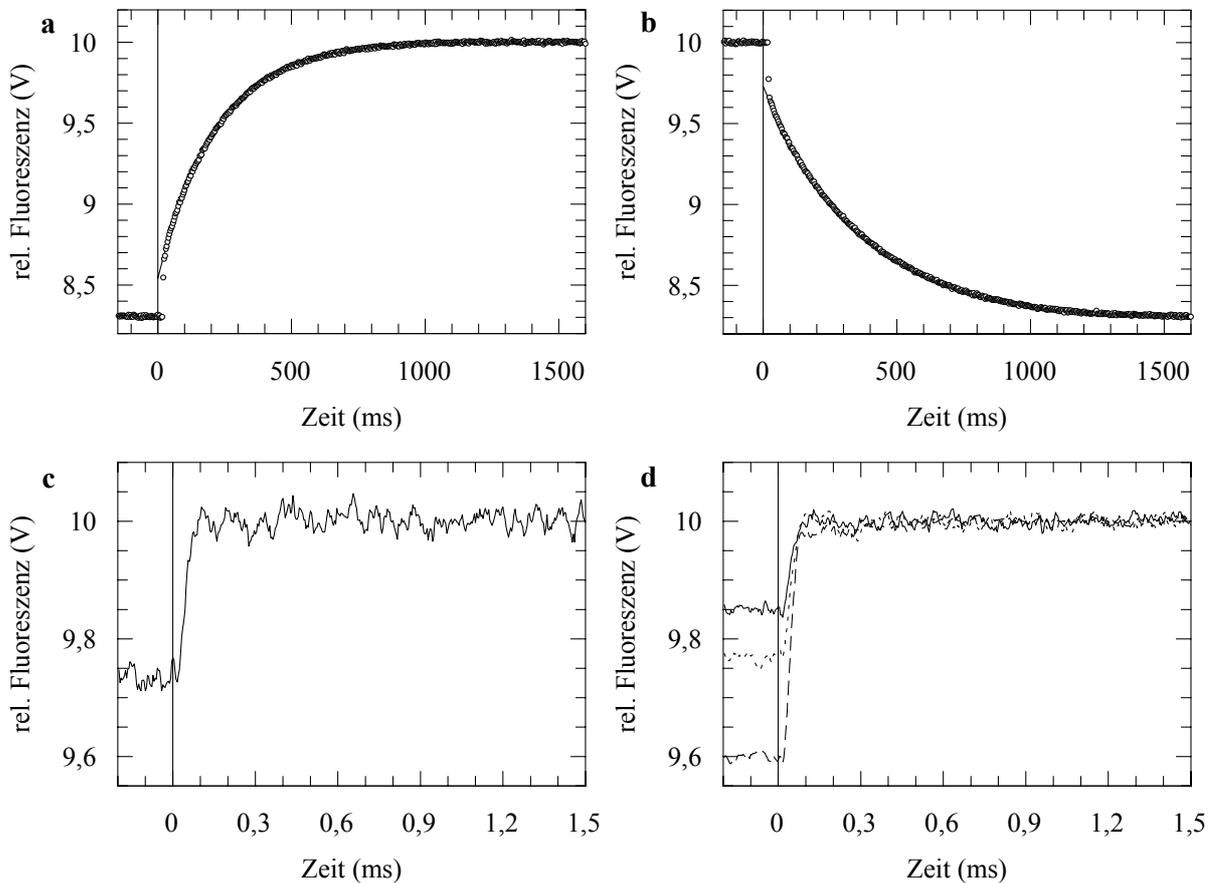
Optimale Meßbedingungen für p-Sprungexperimente liegen im Übergangsbereich eines Proteins vor. Der Übergangsmittelpunkt der GdmCl-induzierten Entfaltung befindet sich für alle Donor-Akzeptor Proteine bei 25 °C im Bereich von 2 M GdmCl. Bei 2 M GdmCl ist daher in p-Sprungexperimenten die größte Amplitude des geschwindigkeitsbestimmenden Faltungsschritts zu erwarten.

Für den Nachweis des Kollapses ist die Wahl der experimentellen Bedingungen stärker eingeschränkt. Die Startwerte der *stopped-flow*-Rückfaltungen können als Entfaltungsübergang des kollabierten Zustands interpretiert werden (3.6.4). Dessen thermodynamische Stabilität ist geringer als die des nativen Zustands, und deshalb sollte die Bildung des kollabierten Zustands bei GdmCl-Konzentrationen unter 1 M am besten zu beobachten sein, weil hier der größte Amplitudenverlust auftritt. Andererseits kann der Kollaps nur auftreten, wenn zu Beginn der Rückfaltungsreaktion entfaltetes Protein vorliegt. Dies ist im Übergangsbereich bei GdmCl-Konzentrationen über 1 M GdmCl der Fall. Beide Bedingungen, d.h. das Vorliegen von denaturiertem Protein vor dem p-Sprung und die Ausbildung des kollabierten Zustands, sind nur im Bereich um 1 M GdmCl halbwegs erfüllt, wobei aber der Amplitudenverlust schwach ausgeprägt ist und vor der Reaktion nur wenig entfaltetes Protein vorliegt.

Da beim Donor-Akzeptor Protein 50→2 der deutlichste Amplitudenverlust beobachtet wurde (Abbildung 3.19), sollte dieses Protein bei der Bildung des kollabierten Zustands die stärkste Signaländerung ergeben. In Abbildung 3.23 sind Zeitverläufe der Akzeptor-Fluoreszenz von 50→2 nach p-Sprüngen zwischen 10 und 300 bar (1 und 30 MPa) dargestellt. Die Abbildung 3.23a und b zeigen die Zweizustandsfaltung von 50→2 bei 2 M GdmCl im Sekundenbereich. Der Fluoreszenzverlauf in Abbildung 3.23c ist im Millisekundenbereich bei 1,2 M GdmCl aufgenommen, wo die Bildung des kollabierten Zustands am besten detektierbar sein sollte.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Zweizustandsfaltung des Donor-Akzeptor Proteins 50→2 verläuft bei p-Sprungexperimenten vollständig reversibel. Daher zeigen die Rückfaltungs- und Entfaltungsreaktion in Gegenwart von 2 M GdmCl (Abbildung 3.23a, b) übereinstimmende Start- und Endwerte. Die Geschwindigkeitskonstante der Rück- bzw. Entfaltung beträgt  $4,6 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $2,8 \text{ s}^{-1}$ . Bei Mischungsexperimenten im Bereich des Übergangsmittelpunkts ergeben Rück- und Entfaltung dieselbe apparente Rate, da die Endbedingungen identisch sind. Dagegen unterscheidet sich bei p-Sprungexperimenten der Druck nach Rück- bzw. Entfaltung. Während die Rückfaltung nahezu bei Normaldruck abläuft, findet die Entfaltung bei 300 bar statt. Alle Faltungsreaktionen des homologen *Bs-CspB* werden durch Druck

verlangsamt (Jacob *et al.*, 2002). Ursache ist das größere Volumen des Übergangszustands im Vergleich zum nativen oder entfalteten Zustand. Die etwas niedrigere Entfaltungsrate von 50→2 ist das Resultat der höheren Aktivierungsbarriere der Entfaltungsreaktion bei hohem Druck.



**Abbildung 3.23:** p-Sprungexperimente mit 50→2 bei 25 °C. (a) Rückfaltung und (b) Entfaltung von 50→2 in 2 M GdmCl durch Druckänderung von (a) 300 auf 10 bar und (b) 10 auf 300 bar. Es wurde die integrale Fluoreszenz über 455 nm nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 1,2 nm) detektiert und das Signal aus 20 Messungen gemittelt. Die Dämpfung betrug 100  $\mu$ s. Die Linien sind Angleiche einer monoexponentiellen Funktion an die Daten. Das Signal des nativen Proteins beträgt 10 V. (c) Rückfaltung von 50→2 in 1,2 M GdmCl durch schnellstmögliche Druckänderung (RC 1) von 300 auf 10 bar. Die Akzeptor-Fluoreszenz wurde mit einer Dämpfung von 3,3  $\mu$ s detektiert und 250 Zeitverläufe gemittelt. (d) „Rückfaltung“ von NAWA (durchgezogene Linie), Bc-Csp\* E50W (gepunktete Linie) und  $\beta$ -ME-AEDANS (gestrichelte Linie) in 0 M GdmCl durch Druckänderung wie in (c). Die integrale Trp-Fluoreszenz über 320 nm wurde bei NAWA und Bc-Csp\* E50W nach Anregung bei 280 nm gemessen. Bei  $\beta$ -ME-AEDANS wurde die integrale AEDANS-Fluoreszenz über 455 nm nach Anregung bei 334 nm gemessen. Die Konzentration aller Proteine und Fluorophore betrug 10  $\mu$ M in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0.

In *stopped-flow*-Experimenten mit 50→2 wurde bei 2 M GdmCl eine apparente Geschwindigkeitskonstante von 4,4  $s^{-1}$  erhalten. Bei Rückfaltungsreaktionen sind die Endbedingungen in Mischungs- und p-Sprungexperimenten gleich und daher werden identische Faltungsraten beobachtet. Diese gute Übereinstimmung der Raten aus *stopped-flow*-Experi-

menten und p-Sprung-Rückfaltungen tritt bei allen Donor-Akzeptor Proteinen auf, mit denen die druckinduzierte Faltung gemessen wurde (Abbildung 3.19, Abbildung 3.20).

Bei der Faltung von 50→2 beträgt die Amplitude 17 % des Gesamtsignals der Akzeptor-Fluoreszenz. In vergleichbaren Experimenten mit *Bc-Csp* R3E (Druckänderung 350 bar) wurde die intrinsische Fluoreszenz von Trp8 dagegen nur um 8 % verändert (Perl *et al.*, 2001). Das FRET-System aus Tryptophan und AEDANS ist also eine empfindlichere Sonde als Trp8 und läßt damit genauere Messungen zu. Die Positionen von Donor und Akzeptor innerhalb von *Bc-Csp\** haben nahezu keinen Einfluß auf die Signaländerung: Bei 38→11, 38→66, 50→2, 50→24 und 50→66 beträgt die maximale Amplitude der p-Sprungexperimente 16-18 %.

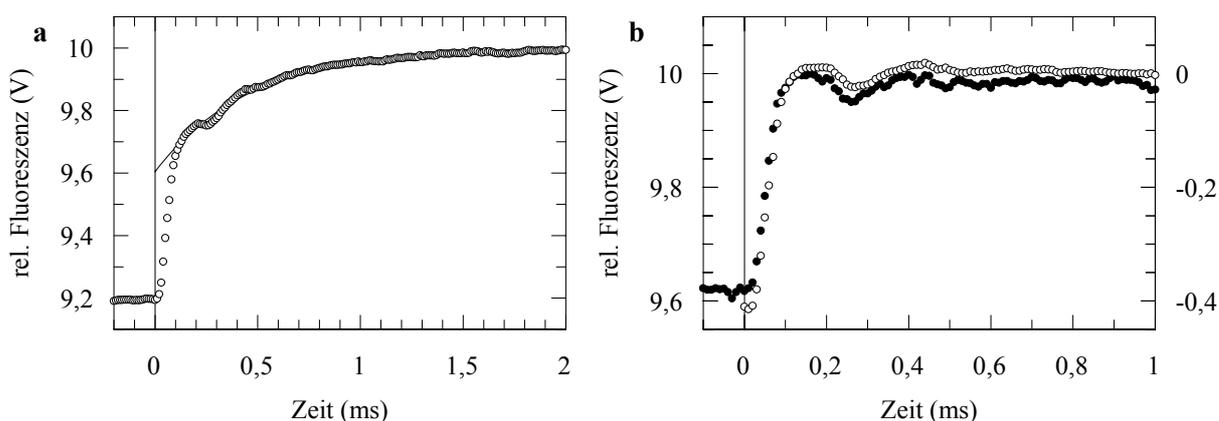
Alle Reaktionsverläufe auf einer Sekunden-Zeitskala sind monoexponentiell und entsprechen damit der Zweizustandsfaltung von *Bc-Csp\**. Die Bildung des kollabierten Zustands findet innerhalb der Totzeit der *stopped-flow*-Mischung statt und muß demnach im Millisekunden-Bereich abgeschlossen sein. Daher wurden bei 1,2 M GdmCl Zeitverläufe des Fluoreszenzsignals nach einer sehr schnellen Druckrelaxation und bei geringer Dämpfung über wenige Millisekunden gemessen (Abbildung 3.23c). Es wird keine Kinetik erhalten, sondern eine abrupte Änderung der Fluoreszenz um 2,7 % bei nachlassendem Druck. Nach 100 µs haben sowohl der Druck als auch die Fluoreszenz ihren Endwert erreicht. Da die Akzeptor-Fluoreszenz als Sonde verwendet wurde, könnte der schnelle Fluoreszenzanstieg durch eine ebenso schnelle Abstandsverkürzung bei nachlassendem Druck verursacht werden. Allerdings werden auch sprunghafte Fluoreszenzänderungen innerhalb der Totzeit beobachtet, wenn kein Energietransfer stattfinden kann (Abbildung 3.23d). NAWA bzw. β-ME-AEDANS sind einzelne Fluorophore, deren intrinsische Fluoreszenz um 1,5 bzw. 4,0 % ansteigt. *Bc-Csp\** E50W zeigt in der Basislinie des nativen Proteins in Abwesenheit von Faltungsvorgängen ebenfalls einen Fluoreszenzsprung von 2,3 %. Die Empfindlichkeit eines Fluorophors für Druckänderungen hängt auch von der Position im Protein ab. So wird für *Bc-Csp\** F38W eine Abnahme der intrinsischen Fluoreszenz bei Druckrelaxation beobachtet, während Trp8 aus *Bc-Csp* bzw. *Bs-CspB* nicht auf Druckänderungen reagiert (Jacob *et al.*, 1999). Der beobachtete, sprunghafte Anstieg der AEDANS-Fluoreszenz der Donor-Akzeptor Proteine wird vermutlich durch die Druckabhängigkeit der Emission der einzelnen Fluorophore verursacht, und nicht durch eine erhöhte Transfereffizienz infolge der Annäherung der Fluorophore.

Die schnelle Fluoreszenzzunahme tritt bei allen untersuchten Donor-Akzeptor Proteinen und bei allen GdmCl-Konzentrationen auf. Auch die Erniedrigung der Temperatur auf 5 °C verlangsamt den Kollaps nicht so stark, daß eine Kinetik meßbar würde. Ebenso hat der Zusatz des viskositätserhöhenden und stabilisierenden Ethylenglykol (EG, bis zu 65 g/100 ml) keine Auswirkungen. Unter allen Bedingungen ist 100 µs nach Beginn der Druckrelaxation keine Änderung des Signals mehr zu erkennen. Damit ist die Bildung des kollabierten Zustands entweder bereits nach 100 µs abgeschlossen, oder der kollabierte Zustand unterscheidet sich im Volumen nicht vom entfalteten Zustand und ist damit nicht durch Änderung des

Drucks induzierbar. Vergleichbare Volumina sind denkbar, wenn die Peptidkette im kollabierten Zustand zwar kompakter vorliegt, aber noch dieselben Wechselwirkungen mit Wassermolekülen ausbildet wie der entfaltete Zustand. Erst die Bildung des wasserfreien hydrophoben *core* im oder nach dem Übergangszustand führt zu einer Volumenzunahme des Gesamtsystems aus Protein und Wasser.

### 3.7.3 Drucksprungexperimente im Übergangsbereich der thermischen Entfaltung

Bei der thermischen Entfaltung der Donor-Akzeptor Proteine liegt der Übergangsbereich zwischen 60 und 70 °C. Die Geschwindigkeitskonstanten der Faltung der Proteine können in diesem Temperaturbereich nicht mit der *stopped-flow*-Apparatur bestimmt werden, da die Reaktionen zu schnell sind. Die Faltungsraten bei hohen Temperaturen sind aber essentiell für die Interpretation der T-Sprungexperimente (3.7.4). p-Sprungexperimente sind aufgrund der guten Zeitauflösung und der problemlosen Thermostatisierbarkeit der Meßanlage optimal für kinetische Messungen bei hoher Temperatur geeignet. Stellvertretend ist die Rückfaltung von 50→2 bei 66 °C in Abbildung 3.24 gezeigt.



**Abbildung 3.24:** p-Sprungexperimente bei 66 °C. (a) Rückfaltung von 50→2 durch Reduktion des Drucks von 300 auf 10 bar. Es wurde die integrale Fluoreszenz über 455 nm nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 1,2 nm) detektiert. Die Linie ist der Angleich einer monoexponentiellen Funktion an die Daten. Das Signal des nativen Proteins beträgt 10 V. (b) (●) Trp-EDANS unter denselben Bedingungen wie in (a), die Akzeptor-Fluoreszenz ist auf der linken Achse aufgetragen. (○) Differenz der Meßdaten für 50→2 und des Angleichs aus (a), die Abweichung der Fluoreszenz ist auf der rechten Achse aufgetragen. Die Konzentration von 50→2 bzw. Trp-EDANS betrug 20 bzw. 10 µM in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0.

Bei der Rückfaltung von 50→2 findet ca. die Hälfte der gesamten Fluoreszenzänderung in den ersten 100 µs statt. Danach steigt die Fluoreszenz weiter an, zeigt dabei aber keinen klar monoexponentiellen Verlauf, sondern ist von einer schwingungsartigen Funktion überlagert. In Abbildung 3.24b ist die Abweichung der Meßdaten von einer monoexponentiellen Funktion gezeigt (offene Symbole). Diese überlagernde Schwingung stimmt exakt mit dem zeitlichen Verlauf einer Messung von Trp-EDANS unter Rückfaltungsbedingungen (gefüllte Symbole in Abbildung 3.24b) überein. Die Fluoreszenz von Trp-EDANS zeigt einen sprung-

haften Anstieg der Fluoreszenz um 4 % während der Druckrelaxation und anschließend ein schwaches Minimum und Maximum einer Schwingung. Sowohl der sprunghafte Anstieg als auch die Schwingung müssen direkt durch Druckänderungen hervorgerufen werden, da in Trp-EDANS keine „Faltungsvorgänge“ auftreten können. Der schnelle Druckabbau versetzt die Lösung in der Meßzelle in Schwingungen, die sich im Fluoreszenzsignal zwischen 0,1 und 0,5 ms widerspiegeln. Die beobachtete Abweichung vom monoexponentiellen Verlauf der Rückfaltungsreaktion von 50→2 ist also eindeutig ein Druckartefakt. Wie schon bei den Experimenten in Gegenwart von GdmCl bei 25 °C (3.7.2) kann die Bildung des kollabierten Zustands nicht zeitlich aufgelöst werden.

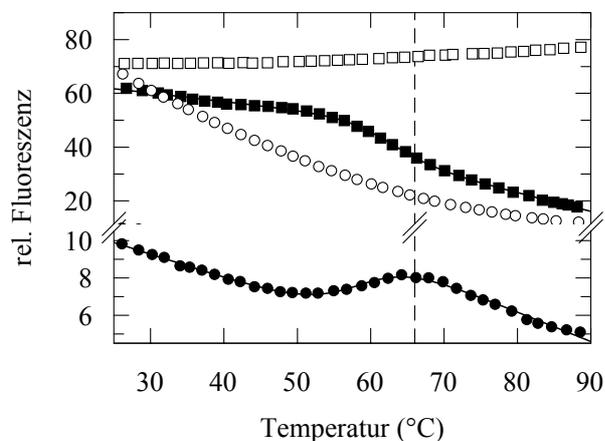
An die Fluoreszenzverläufe der Rückfaltungsreaktionen ab 100  $\mu$ s wurden monoexponentielle Funktionen angepaßt. Entfaltungsreaktionen zeigen ausgeprägtere Schwingungsartefakte und sind deshalb schwieriger auszuwerten. Generell sind die Entfaltungsraten um ca. 25 % kleiner als die Rückfaltungsraten (vgl. 3.7.2). Die Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung liegen für 50→2 im Bereich von 2.400  $s^{-1}$  (66 °C) bis 3.000  $s^{-1}$  (70 °C) und für 50→66 bei 3.000  $s^{-1}$  (66 °C) bis 3.500  $s^{-1}$  (70 °C).

#### 3.7.4 *Temperatursprung*

Bei T-Sprungexperimenten wird ein sehr kleines Volumen der Proteinelösung ( $\sim 0,1 \mu$ l) durch einen Nah-Infrarot Laserpuls mit 1,54  $\mu$ m Wellenlänge innerhalb weniger Nanosekunden erwärmt. Um das Fluoreszenzsignal im erwärmten Bereich der Lösung zu detektieren, wird die Probe kontinuierlich mit einem UV-Laser bestrahlt und emittierte Photonen durch einen Photomultiplier verstärkt (Thompson *et al.*, 1997).

Die Detektion der Faltungsreaktion erfolgt nach dem T-Sprung bei konstanter Temperatur. Da die Fluoreszenz stark temperaturabhängig ist (Schmid, 1997), kann aber während des T-Sprunges eine große Signaländerung auftreten. Um die Änderung der Fluoreszenz mit der Temperatur und das Gesamtsignal der Fluoreszenz bei hohen Temperaturen zu bestimmen, wurden Gleichgewichtsexperimente zur thermischen Entfaltung der Donor-Akzeptor Proteine mit Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Die Trp- und AEDANS-Fluoreszenz von 50→2 bei thermischer Entfaltung ist in Abbildung 3.25 gezeigt. Zum Vergleich ist die Abnahme der Fluoreszenz von NAWA (offene Punkte) um etwa 1 % pro °C bei steigender Temperatur gezeigt. Erstaunlicherweise ist die AEDANS-Fluoreszenz von Trp-EDANS (offene Quadrate) nahezu unabhängig von der Temperatur. Dies gilt sowohl für die Anregung durch Energietransfer von Tryptophan (Anregung 280 nm) als auch für die direkte Anregung von EDANS bei 336 nm (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zur Trp-Fluoreszenz wird der Energietransfer von Tryptophan auf EDANS bei steigender Temperatur also nicht abgeschwächt. Zumindest gilt dies für den extrem kleinen Abstand zwischen Tryptophan und EDANS in Trp-EDANS, bei dem die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers sehr hoch ist. Die Anregungsenergie des Tryptophans wird auf EDANS übertragen, bevor Fluoreszenzlöschung auftreten

kann. Bei hoher Temperatur beschleunigt sich zwar die Fluoreszenzlöschung, wie an der Abnahme der Trp-Fluoreszenz zu erkennen ist, trotzdem bleibt Energietransfer der bestimmende Prozeß in Trp-EDANS.

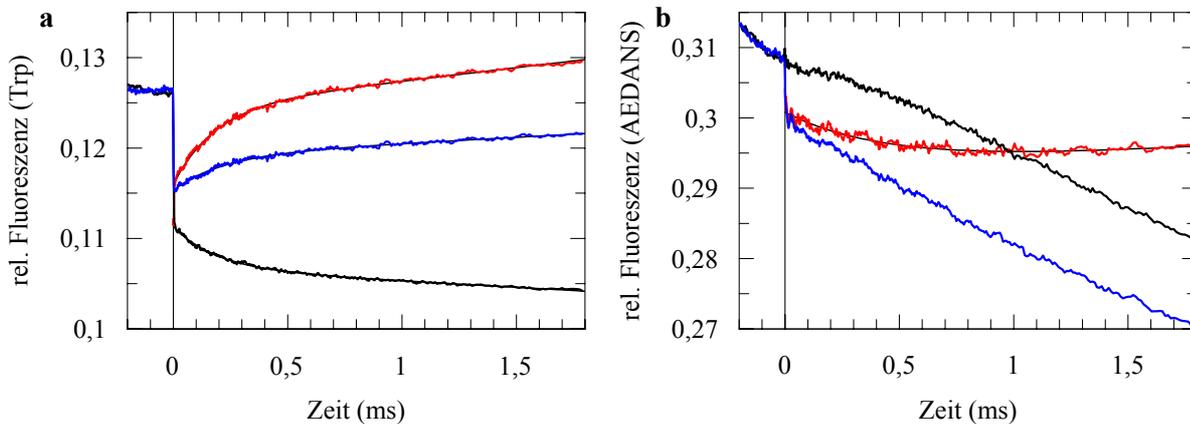


**Abbildung 3.25:** Fluoreszenzsignal bei thermischer Entfaltung von 50→2. (●) Trp-Fluoreszenz bei 355 nm und (■) AEDANS-Fluoreszenz bei 495 nm nach Anregung bei 280 nm. Die Fluoreszenz von (○) NAWA bei 355 nm bzw. (□) Trp-EDANS bei 495 nm nach Anregung bei 280 nm ist zum Vergleich aufgetragen. Durchgezogene Linien sind Angleiche an die Daten nach dem Zweizustandsmodell. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Übergangsmittelpunkt  $T_m$  von 50→2 aus der CD-Messung. Alle Proteine und Fluorophore wurden bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in 100 mM Na-Cacodylat, pH 7,0 gemessen.

Bei der Entfaltung von 50→2 vergrößert sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Die Zunahme der Trp-Fluoreszenz aufgrund der sinkenden Transfereffizienz wird aber von der starken temperaturabhängigen Abnahme der intrinsischen Fluoreszenz überlagert (gefüllte Punkte in Abbildung 3.25). Im Bereich des Entfaltungsübergangs ändern sich die Trp-Fluoreszenzwerte daher kaum. Die intrinsische Fluoreszenz von AEDANS und die Transfereffizienz der Energieübertragung von Tryptophan auf AEDANS sind dagegen nahezu unabhängig von der Temperatur. Die Abnahme der AEDANS-Fluoreszenz von 50→2 (gefüllte Quadrate) spiegelt daher die Vergrößerung des Abstands bei Entfaltung wider. Mit zunehmendem Abstand zwischen Tryptophan und AEDANS verringert sich allerdings die Rate des Energietransfers. Daher wird im entfalteten Zustand bei hoher Temperatur neben Energietransfer auch Löschung der Trp-Fluoreszenz bestimmend, da die Geschwindigkeitskonstanten beider Prozesse ähnlich werden. Die Verringerung der Energieübertragung auf AEDANS durch Löschung führt zu der stark abfallenden Basislinie des denaturierten Proteins bei Beobachtung der Akzeptor-Fluoreszenz.

Die Mittelpunkte der thermischen Übergänge von 50→2 bei Fluoreszenzdetektion liegen bei 61,8 °C (AEDANS-Fluoreszenz) bzw. 58,4 °C (Trp-Fluoreszenz). Die stark geneigten Basislinien erschweren die Auswertung und führen zu einer geringen Verlässlichkeit der Ergebnisse. Die Messung des CD-Signals ergibt zuverlässigere Stabilitätsdaten. Für die Proteine 50→2 bzw. 50→66 liegt der Mittelpunkt des thermischen Übergangs bei  $T_m = 66,1$  °C bzw. 67,8 °C. Die gestrichelte Linie in Abbildung 3.25 kennzeichnet den Übergangsmittelpunkt von 50→2 aus der CD-Messung.

Im Bereich von  $T_m$  wurden kinetische Messungen nach Laser-induzierten T-Sprüngen durchgeführt. Die Erhöhung der Temperatur beim T-Sprung bewirkt eine Verschiebung des Gleichgewichts zum entfalteten Zustand, so daß Entfaltungsreaktionen gemessen werden. Beispielhafte Zeitverläufe der Trp- bzw. AEDANS-Fluoreszenz des Donor-Akzeptor Proteins 50→2 nach einem T-Sprung sind in Abbildung 3.26 als blaue Linien gezeigt.



**Abbildung 3.26:** Laser-induzierter T-Sprung von 50→2. (a) Trp-Fluoreszenz und (b) AEDANS-Fluoreszenz von 50→2 nach T-Sprung von 65 auf 70 °C. Die Anregungswellenlänge betrug 264 nm. Die Daten von 50→2 sind als blaue Linien dargestellt. Das (a) nur-Donor Protein *Bc-Csp\** E50W/Q2C-CAM und (b) das nur-Akzeptor Protein *Bc-Csp\** Q2C-AEDANS sind als schwarze Linie gezeigt. Aus der Korrektur der Daten von 50→2 mit dem entsprechenden einfachmarkierten Protein ergibt sich der rot dargestellte Verlauf. Monoexponentielle Anleiche sind als schwarze Linie gezeigt.

Neben der Faltungsreaktion beeinflussen zwei weitere Effekte den Zeitverlauf der Fluoreszenz: i) Der T-Sprung kann die intrinsische Fluoreszenz verändern. ii) Die Bestrahlung der Probe mit einem energiereichen UV-Laser zur Detektion des Signals führt teilweise zur photochemischen Schädigung der Fluorophore (sogenanntes Bleichen). Die Meßdaten sollten vor der Auswertung möglichst um beide Effekte korrigiert werden. Für beide Fluorophore erfolgt diese Korrektur durch Temperatursprünge mit dem entsprechenden einfachmarkierten Protein.

In Abbildung 3.26a ist die Änderung der Fluoreszenz des nur-Donor Proteins *Bc-Csp\** E50W/Q2C-CAM nach dem T-Sprung dargestellt (schwarzer Zeitverlauf). Das Bleichen von Tryptophan spielt hier eine untergeordnete Rolle, wie an der gleichbleibenden Fluoreszenz vor dem T-Sprung zu sehen ist. Mit dem T-Sprung kommt es jedoch zu einer starken Verringerung der Trp-Fluoreszenz (ca. 10 %). Bei der AEDANS-Fluoreszenz ist die Gewichtung der Effekte umgekehrt. Die schwarze Linie in Abbildung 3.26b ist eine T-Sprungkinetik mit dem nur-Akzeptor Protein *Bc-Csp\** Q2C-AEDANS. Durch die Einstrahlung des Lasers kommt es schon vor dem T-Sprung zu einer Abnahme der AEDANS-Fluoreszenz um 1,6 % in 0,2 ms. Dieser starke Bleicheffekt wird durch die Anregungswellenlänge 264 nm verursacht. Hier besitzt AEDANS eine starke Absorptionsbande (Abbildung 3.8) mit einem Absorptionskoeffizienten um  $15.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Tryptophan hat im Vergleich dazu bei 264 nm nur einen Absorptionskoeffizienten von  $4.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Je mehr Energie ein Chromophor aufnimmt, um so schneller tritt photochemische Schädigung auf und die Fluoreszenz nimmt ab. Wie schon in

den Gleichgewichtsexperimenten ist die AEDANS-Fluoreszenz nicht temperaturabhängig und ändert sich deshalb nicht aufgrund des T-Sprungs. Trp-EDANS ist als Referenzverbindung für T-Sprungexperimente ungeeignet, da es stärker gebleicht wird als das Donor-Akzeptor Protein.

Die quantitative Auswertung der Akzeptor-Fluoreszenz ist wegen der starken Bleich-effekte nicht möglich. Als Reaktion auf den T-Sprung nimmt die AEDANS-Fluoreszenz von 50→2 sprunghaft ab (blau), während die Fluoreszenz des nur-Akzeptor Proteins konstant bleibt (schwarz). Der Unterschied zwischen den beiden Proteinen ist die Möglichkeit zum FRET in 50→2. Die Abnahme der AEDANS-Fluoreszenz gleichzeitig mit der Temperaturerhöhung deutet auf eine äußerst schnelle, leichte Expansion des Proteins hin. Auch die Trp-Fluoreszenzwerte der 50→2 Variante und des entsprechenden nur-Donor Proteins unterscheiden sich direkt nach dem T-Sprung. Bei 50→2 (blau) findet im Vergleich zu *Bc-Csp\** E50W/Q2C-CAM (schwarz) nur ca. 75 % der Fluoreszenzabnahme in der Totzeit des T-Sprungs ab, d.h. es findet eine gleichzeitige, kompensierende Erhöhung der Fluoreszenz statt. Damit sind die Änderungen für Donor und Akzeptor reziprok, und der Hinweis auf eine geringe, sehr schnelle Abnahme der Transfereffizienz bestätigt sich. Möglicherweise erhöht sich durch die Temperaturerhöhung die Dynamik des Proteins und der Abstand zwischen Tryptophan und AEDANS vergrößert sich. Diese Expansion wurde bei *stopped-flow*-Entfaltungsreaktionen nie beobachtet und scheint nur bei hohen Temperaturen stattzufinden. Tatsächlich werden bei T-Sprungexperimenten bei 25 °C in Gegenwart von 1 M GdmCl keine sprunghaften Fluoreszenzänderungen beobachtet. Diese schnelle Fluoreszenzänderung ist innerhalb der Totzeit bereits 0,1 µs nach dem T-Sprung abgeschlossen.

In der Folge des T-Sprungs kommt es zu einer Änderung der Trp-Fluoreszenz im Millisekunden-Bereich. Im Donor-Akzeptor Protein 50→2 dominiert der Energietransfer (Fluoreszenzzunahme) über die Änderung der intrinsischen Fluoreszenz (Abnahme). Monoexponentielle Angleiche für die Meßdaten von 50→2 (blau), das nur-Donor Protein (schwarz) und für 50→2 nach Korrektur (durch Abzug des Verlaufs des nur-Donor Proteins, rot) sind in Abbildung 3.26a dargestellt. Die hohe Temperatur ist nur für ca. 1 ms stabil. Danach treten temperaturbedingte Fluoreszenzänderungen auf, die durch eine lineare Komponente im Angleich berücksichtigt wurden. Für alle Zeitverläufe wurden ähnliche Geschwindigkeitskonstanten erhalten: 4.600 s<sup>-1</sup> für 50→2 (Rohdaten), 5.500 s<sup>-1</sup> für 50→2 (korrigiert) und 5.400 s<sup>-1</sup> für das nur-Donor Protein. Die FRET-Sonde in 50→2 detektiert denselben Vorgang wie *Bc-Csp\** E50W/Q2C-CAM, in dem nur intrinsische Fluoreszenzänderungen auftreten können. Bei dem beobachteten Vorgang handelt es sich also um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung.

Die Raten aus dem monoexponentiellen Angleich werden auch durch die Drucksprünge bei hohen Temperaturen bestätigt (3.7.3). Bei 70 °C beträgt die Rate aus p-Sprungexperimenten 3.000 s<sup>-1</sup>, das T-Sprungexperiment ergibt eine Rate von 5.500 s<sup>-1</sup>. Die Abweichung um weniger als Faktor zwei ist in Anbetracht der sehr schnellen Reaktion bedeutungslos. Auch

für die Variante 50→66 wurden monoexponentielle Zeitverläufe und übereinstimmende Raten aus T- und p-Sprungexperimenten erhalten.

Der schnelle Kollaps aus Rückfaltungsreaktionen äußert sich in Entfaltungsexperimenten also nicht in einer sehr schnellen, zeitaufgelösten Reaktion mit einer Zeitkonstante von  $\geq 0,1 \mu\text{s}$ . Eine sprunghafte Änderung der Fluoreszenz gleichzeitig mit dem T-Sprung könnte auf eine geringe Expansion des Proteins bei Entfaltung hindeuten. Diese Interpretation bleibt jedoch spekulativ. Falls die Umwandlung des entfalteten in den kollabierten Zustand nicht mit einer Enthalpieänderung verknüpft ist, führen Temperaturänderungen nicht zu einer Verschiebung des Gleichgewichts und der Kollaps (bzw. die Expansion vom kollabierten zum entfalteten Zustand) ist dann in T-Sprungexperimenten nicht nachweisbar.

### 3.7.5 *Fazit der Drucksprung- und Temperatursprungmessungen*

p-Sprung- und T-Sprungexperimente sind optimal geeignet, die schnelle Zweizustandsfaltung von Bc-Csp zu messen. Sowohl im Übergangsbereich der GdmCl-induzierten Entfaltung bei 25 °C als auch im Bereich von  $T_m$  des thermischen Übergangs konnten Faltungsraten durch p-Sprungmessungen bestimmt werden. Wegen der auf etwa 1 ms beschränkten Meßzeit in T-Sprungexperimenten sind diese nur für Entfaltungen bei hohen Temperaturen geeignet. Die Faltungsexperimente mit beiden Methoden ergeben unter vergleichbaren Bedingungen identische Geschwindigkeitskonstanten.

Mit keiner der beiden Methoden konnte der Zeitverlauf der Bildung des kollabierten Zustands gezeigt werden. Bei allen Drucksprüngen erfolgte eine sprunghafte Änderung der Fluoreszenz in der Totzeit der Druckanpassung (100  $\mu\text{s}$ ). Es bleibt unklar, ob dieser Anstieg der AEDANS-Fluoreszenz durch den Kollaps der Peptidkette oder durch Druckeffekte verursacht wird. In der Totzeit der T-Sprungmessungen (0,1  $\mu\text{s}$ ) trat möglicherweise eine schwache Expansion des Proteins bei Entfaltung auf.

Um eine Reaktion durch Druckänderung auslösen zu können, muß sich bei der Reaktion das Volumen des Systems ändern. Entsprechend setzt eine Verschiebung des Gleichgewichts durch Temperaturänderung unterschiedliche Enthalpien der Zustände voraus. Da der kollabierte Zustand vermutlich noch große Ähnlichkeit mit dem entfalteten Zustand hat, kann sowohl die Volumen- als auch die Enthalpieänderung gering sein. Der Kollaps wäre dann nicht mit Druck- oder Temperatursprüngen nachzuweisen. Alternativ besteht immer noch die Möglichkeit, daß die schnelle Bildung des kollabierten Zustands in der Totzeit der p-Sprung- und sogar der T-Sprungexperimente stattfindet.

### 3.8 Einfluß von Lösungsmittelzusätzen auf den kollabierten Zustand

#### 3.8.1 Effekte von Lösungsmittelzusätzen auf die Stabilität von Proteinen

Die Stabilität von Proteinen kann durch Lösungsmittelzusätze stark moduliert werden. Bekannte Beispiele hierfür sind die starken Destabilisierungen durch die chaotropen Denaturierungsmittel GdmCl und Harnstoff, aber auch die stabilisierende Wirkung von Glycerin z.B. bei der Lagerung von Enzymen. Lösungsmittelzusätze verschieben das Gleichgewicht zwischen dem nativen und dem denaturierten Zustand, da sie unterschiedlich mit den beiden Zuständen interagieren. Auf molekularer Ebene sind zwei Effekte für den Einfluß der Lösungsmittelzusätze verantwortlich: präferentielle Interaktion (Bindung) und präferentieller Ausschluß (Timasheff & Arakawa, 1997; Timasheff, 2002).

Durch Bindung niedermolekularer Substanzen an das Protein kann die Stabilität direkt beeinflußt werden. Unterschiedliche Lösungsmittelzusätze haben dabei verschiedene bevorzugte Bindungsstellen. So binden GdmCl oder Harnstoff an die Peptidbindungen eines Proteins (Prakash *et al.*, 1981); 2-Methyl-2,4-pentandiol bindet an unpolare Aminosäuren, Glycerin interagiert überwiegend mit polaren Bereichen. Die Anzahl der möglichen Bindungsstellen unterscheidet sich im nativen und entfalteten Protein. Da im denaturierten Protein meist mehr Bindungsstellen zugänglich sind, wird durch die Bindung derartiger Moleküle oder Ionen das Gleichgewicht zum entfalteten Zustand hin verschoben. Die direkte Bindung eines Lösungsmittelzusatzes wirkt daher fast immer destabilisierend.

Die zweite Möglichkeit der Wechselwirkung ist der sogenannte präferentielle Ausschluß des Lösungsmittelzusatzes von der Proteinoberfläche. Das Phänomen des präferentiellen Ausschlusses äußert sich in negativen experimentellen Bindungsparametern, d.h. es sind überwiegend Wassermoleküle an das Protein gebunden und der Lösungsmittelzusatz ist von der Proteinoberfläche ausgeschlossen. Deshalb ist die Bezeichnung präferentielle Hydratation gleichbedeutend mit dem präferentiellen Ausschluß des Lösungsmittelzusatzes.

Beim präferentiellen Ausschluß des Lösungsmittelzusatzes bildet sich um das Proteinmolekül eine Schicht, die bevorzugt aus Wassermolekülen und nicht aus dem Lösungsmittelzusatz besteht. An der Proteinoberfläche findet also eine Entmischung des Lösungsmittels statt. Die Entropie des Lösungsmittels ist damit verringert und bedingt eine energetisch ungünstige Situation, die aber durch den Zusatz des Lösungsmittelzusatzes verursacht wurde. Native, globuläre Proteine haben in Bezug auf ihr Volumen eine kleinstmögliche Oberfläche und daher ist der Entropieverlust durch die präferentielle Hydratation ebenfalls minimal. Bei Entfaltung nimmt die solvensexponierte Oberfläche des Proteins zu. Diese Vergrößerung der Oberfläche ist aufgrund der Entropieabnahme ungünstig und deshalb wird der entfaltete Zustand noch stärker destabilisiert als der native. Das Resultat der präferentiellen Hydratation ist die Stabilisierung des nativen Zustands in Gegenwart des Lösungsmittelzusatzes (Timasheff & Arakawa, 1997).

Der präferentielle Ausschluß wird durch die Eigenschaften des Lösungsmittelzusatzes oder dessen Wechselwirkung mit dem Protein verursacht. Ist der Lösungsmittelzusatz größer als Wasser, so kann sich der Lösungsmittelzusatz nicht so weit an das Protein annähern wie Wasser. Deshalb ist das Protein vorwiegend von Wasser umgeben. Dieser sterische Ausschluß tritt z.B. bei Polyethylenglykol auf.

Auch Substanzen, die die Oberflächenspannung der Lösung erhöhen, führen zu präferentieller Hydratation. Die Ursache einer hohen Oberflächenspannung ist die geringere Konzentration des Lösungsmittelzusatzes an der Grenzschicht der Lösung. Sowohl an der makroskopischen Oberfläche als auch an der mikroskopischen Grenzfläche zum Protein befinden sich also überwiegend Wassermoleküle. Die stabilisierende Wirkung auf das Protein kann als Volumenminimierung durch die hohe Oberflächenspannung veranschaulicht werden. Die Stabilisierung durch Zucker, Aminosäuren oder Salze wie  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird durch die Erhöhung der Oberflächenspannung verursacht.

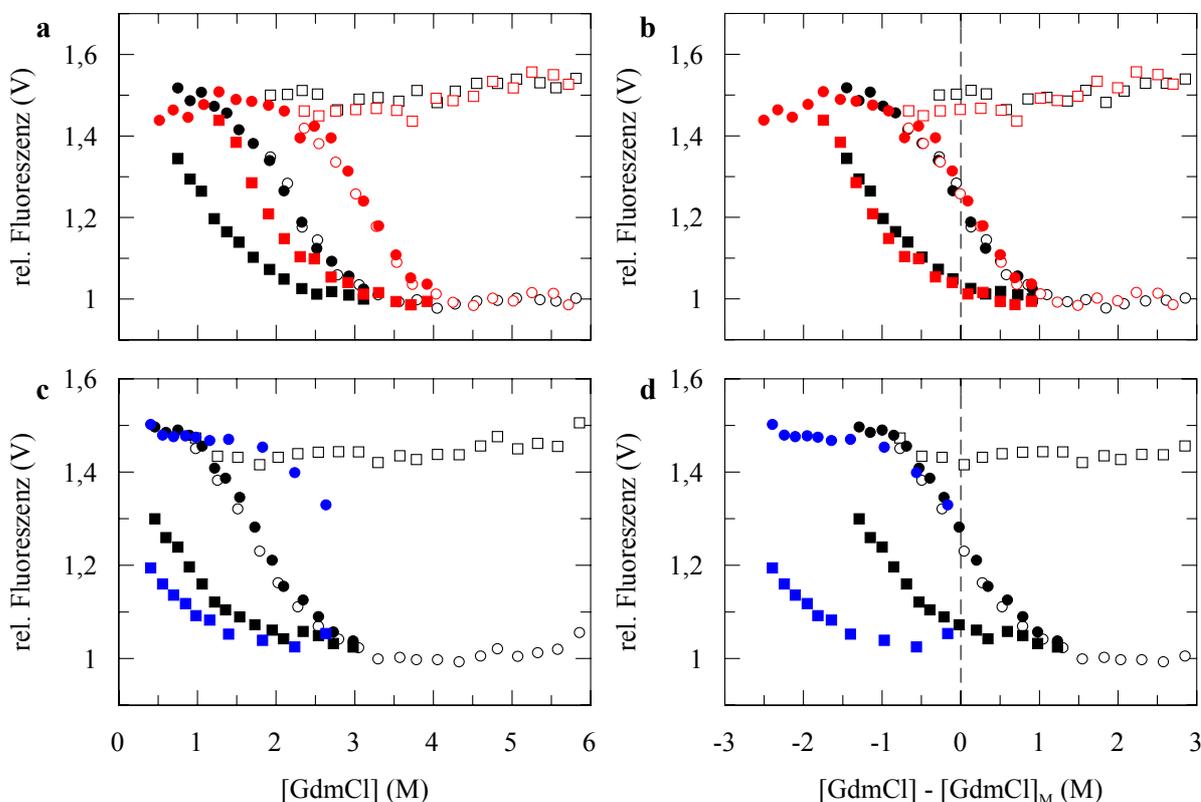
Selbst wenn eine Bindung des Lösungsmittelzusatzes an bestimmte Bereiche des Proteins möglich ist, kann präferentielle Hydratation auftreten. So bindet 2-Methyl-2,4-pentandiol an unpolare Aminosäuren und verringert zusätzlich die Oberflächenspannung. Trotzdem wird es von der Oberfläche des Proteins ausgeschlossen, da es durch geladene Seitenketten stark abgestoßen wird.

### 3.8.2 Rückfaltung von *Bc-Csp\** in Gegenwart von Lösungsmittelzusätzen

Der Einfluß eines Lösungsmittelzusatzes auf die Stabilität eines Proteins hängt stark davon ab, in welcher Konformation das Protein vorliegt, und welche Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Lösungsmittelzusatz auftreten. Lösungsmittelzusätze können deshalb dazu genutzt werden, verschiedene Zustände eines Proteins hinsichtlich ihrer räumlichen Ausdehnung zu charakterisieren oder z.B. stabilisierende Wechselwirkungen in Faltungsintermediaten nachzuweisen (Kamiyama *et al.*, 1999). Auch die Eigenschaften des kollabierten Zustands von *Bc-Csp\** können durch den Einsatz von Lösungsmittelzusätzen genauer beschrieben werden. Es wurden Faltungsexperimente in Gegenwart von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Ethylenglykol (EG) durchgeführt, und die gemessenen Start- und Endwerte mit den Werten in Abwesenheit des Lösungsmittelzusatzes verglichen (Abbildung 3.27).

In wäßrigen Lösungen von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ist die Oberflächenspannung stark erhöht. Die Sulfationen bilden stärkere Wechselwirkungen mit Wassermolekülen aus als die Wassermoleküle untereinander, und deshalb sind Sulfationen immer von einer hochgeordneten Hydrathülle umgeben. Die Zahl der Wassermoleküle in einer solchen Hülle wurde experimentell (Wang *et al.*, 2001) und in Computersimulationen (Plumridge *et al.*, 2000) auf ca. 12 bis 16 bestimmt.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  induziert also eine „Strukturbildung“ im Wasser, die die Entropie der Lösung reduziert. Das freie Wasser außerhalb der Hydrathülle kompensiert diesen Entropieverlust (zumindest teilweise) durch die Verkleinerung aller Ober- und Grenzflächen. Der präferen-

tielle Ausschluß der Sulfationen von der Proteinoberfläche wird durch die Hydrathülle verursacht, und führt letztlich zu einer Begünstigung kompakter Zustände des Proteins. Die Methode der  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung beruht auf dieser stark stabilisierenden Wirkung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .



**Abbildung 3.27:** Amplituden der Faltungsreaktion von (a), (b) 50→2 in Gegenwart von 0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (rote Symbole) bzw. ohne  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (schwarze Symbole, aus Abbildung 3.19 entnommen) und von (c), (d) 50→66 in Gegenwart von 70 g/100 ml EG (blaue Symbole) bzw. ohne EG (schwarze Symbole, aus Abbildung 3.19 entnommen). Es wurde die integrale Akzeptor-Fluoreszenz über 460 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. (■, □) Start- und (●, ○) Endwerte der Rückfaltungs- (gefüllte Symbole) und Entfaltungskinetiken (offene Symbole). In (a) und (c) sind die Amplituden gegen die tatsächliche GdmCl-Konzentration aufgetragen, (b) bzw. (d) zeigt die Auftragung der Werte aus (a) bzw. (c) gegen  $[\text{GdmCl}] - [\text{GdmCl}]_M$ , d.h. die Amplituden mit und ohne Lösungsmittelzusatz sind auf denselben Stabilitätsunterschied zu  $[\text{GdmCl}]_M$  normiert. Die gestrichelte Linie zeigt den Übergangsmittelpunkt an. Die Daten in Gegenwart und Abwesenheit des Lösungsmittelzusatzes sind auf dieselbe Maximalamplitude und den Wert 1 für denaturiertes Protein normiert.

Durch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wird das Gleichgewicht zwischen nativem und entfaltetem 50→2 zugunsten der nativen Form verschoben. Dies äußert sich in einer Verschiebung des Mittelpunkts des Entfaltungsübergangs um ca. 1 M zu höheren GdmCl-Konzentrationen in Gegenwart von 0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Endpunkte in Abbildung 3.27a). Ähnliche Stabilisierungen wurden auch für die Proteine 50→24 und 38→66 erhalten. Bei allen Proteinen sind in Gegenwart von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung geringfügig verringert, die Rückfaltungsraten aber deutlich erhöht (Daten nicht gezeigt, extrapolierte Rate  $k_{\text{UN}}^0$  um  $3000 \text{ s}^{-1}$ ). Die Destabilisierung des entfalteten Zustands durch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  erleichtert also die Rückfaltung.

Wie in den vorausgegangenen kinetischen Experimenten folgen die Endwerte der Einzelkinetiken dem Entfaltungsübergang des nativen Proteins, und die Startwerte der Rückfaltung können als Entfaltungsübergang des kollabierten Zustands angesehen werden. Bei allen dargestellten Messungen wurde die Akzeptor-Fluoreszenz als Meßsonde verwendet. Daher ist das Protein im kollabierten Zustand um so kompakter, je höher der Startwert der Rückfaltung ist. Durch Zusatz von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zu Rückfaltungsreaktionen von 50→2 wird ein kompakterer Ausgangszustand erhalten (erhöhte Startwerte in Abbildung 3.27a). Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Stabilität des nativen Proteins erhöht ist, und daher die Auftragungen der Amplituden mit und ohne  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gegeneinander verschoben sind. Definiert man jeweils den Mittelpunkt des Übergangs als neuen Nullpunkt, können beide Meßserien direkt verglichen werden (Abbildung 3.27b). In Gegenwart von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ergeben die Start- und Endwerte dasselbe Muster wie in Abwesenheit des Lösungsmittelzusatzes, oder anders ausgedrückt: der kollabierte Zustand wird genauso stark durch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  stabilisiert wie der native Zustand.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wird von der Proteinoberfläche präferentiell ausgeschlossen, und daher der gefaltete Zustand gegenüber dem entfalteten Zustand stabilisiert, da er eine kompakte Struktur aufweist. Da der kollabierte Zustand ähnlich stabilisiert wird wie das native Protein, sollte die kollabierte Konformation des Proteins für hydratisierte Sulfationen ähnlich schlecht zugänglich sein wie der gefaltete Zustand. Hydratisierte Sulfationen sind im Vergleich zu Wasser sehr groß (molekulare Masse einschließlich der Hydrathülle  $\geq 300$  g/mol) und können daher eine kompakte Konformation der Peptidkette kaum durchdringen.

Auch bei den Varianten 50→24 und 38→66 werden der native und der kollabierte Zustand durch Zusatz von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  jeweils im gleichen Ausmaß stabilisiert (Daten nicht gezeigt). Beim Kollaps von 38→66 wird der Abstand zwischen den Fluorophoren auch in Gegenwart von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nur wenig verkürzt, bei 50→24 dagegen stark. Dies bedeutet, daß  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  die Struktur des kollabierten Zustands kaum beeinflusst, da die Charakteristik der einzelnen Abstandssonden erhalten bleibt. Die stabilisierende Wirkung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  beruht auf der Destabilisierung des entfalteten Zustands, nicht auf einer Veränderung des nativen oder kollabierten Zustands.

Unterhalb von 1,2 M GdmCl kann für 50→2 in Gegenwart von 0,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  keine Fluoreszenzänderung im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt detektiert werden (Abbildung 3.27a, b). Unter diesen Bedingungen (2 GdmCl-Einheiten unterhalb des Mittelpunkts) erfolgt die gesamte Abstandsänderung zwischen Donor und Akzeptor in der Totzeit der Messung. Der Abstand zwischen den Positionen 50 und 2 ändert sich im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung nicht mehr.

EG unterscheidet sich in seiner Wirkung auf Proteine grundsätzlich von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Durch den Zusatz von EG wird die Oberflächenspannung einer Lösung verringert (Breslow & Guo, 1990). EG reichert sich also an der Grenzfläche an, und deshalb muß, im Gegensatz zu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , auch die Bindung von EG an das Protein in Betracht gezogen werden.

Sowohl die Verringerung der Oberflächenspannung als auch die Bindung des Lösungsmittelzusatzes an das Protein führen dazu, daß ausgedehnte Strukturen energetisch begünstigt sind. Demnach sollte das kompakte, native Protein destabilisiert werden. Tatsächlich wirkt EG bei pH 2,0 destabilisierend auf Chymotrypsinogen (Gekko & Morikawa, 1981b). Bei neutralem pH-Wert wird EG dagegen von der Proteinoberfläche ausgeschlossen, d.h. es liegt präferentielle Hydratation vor (Gekko & Morikawa, 1981a). Dies scheint auf den ersten Blick im Widerspruch zur verringerten Oberflächenspannung zu stehen. Eine Erklärung liefern die Energien, die nötig sind, um Aminosäuren bzw. das Peptidrückgrat aus Wasser in wäßriges EG zu überführen: Alle Aminosäure-Seitenketten zeigen negative Transferenergien und bevorzugen daher wäßriges EG (Nozaki & Tanford, 1965; Kamiyama *et al.*, 1999). Dagegen ist der Transfer des Peptidrückgrats energetisch extrem ungünstig (Nozaki & Tanford, 1965; Liu & Bolen, 1995). Die Größe der beiden Effekte und die Tatsache, daß die Peptidbindung die häufigste Gruppe eines Proteins ist, führen zur insgesamt ungünstigen Energie beim Transfer eines Proteins aus Wasser in wäßriges EG. Daraus ergibt sich der präferentielle Ausschluß von EG und damit die Stabilisierung kompakter Zustände.

Die bekannte stabilisierende Wirkung von EG auf *Bs*-CspB (Jacob *et al.*, 1997) wird auch beim Donor-Akzeptor Protein 50→66 beobachtet (Abbildung 3.27c). Im entfalteten Zustand des Proteins ist der überwiegende Teil des Peptidrückgrats zum Lösungsmittel exponiert. Durch die ungünstige Wechselwirkung zwischen den Peptidbindungen und EG kommt es zur Destabilisierung des entfalteten Zustands durch präferentiellen Ausschluß von EG. Im nativen Zustand befindet sich das Peptidrückgrat dagegen größtenteils im Inneren der Struktur und die Seitenketten werden zum Lösungsmittel exponiert. Je nach Beschaffenheit der Proteinoberfläche kann es also zu schwacher präferentieller Hydratation oder zur Bindung von EG kommen. Bindende Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und dem Lösungsmittelzusatz treten im nativen und im entfalteten Zustand auf. Wegen der größeren Zahl von exponierten Bindungsstellen im denaturierten Zustand hat die Bindung von EG einen destabilisierenden Effekt auf das native Protein. Experimentell wird aber eine starke Stabilisierung durch EG beobachtet, so daß der ungünstige präferentielle Ausschluß vom exponierten Peptidrückgrat im denaturierten Protein der maßgebliche Effekt sein muß. Das native Protein ist kompakt und in der Grenzfläche zum Lösungsmittel findet nur teilweise ein energetisch ungünstiger Ausschluß des Lösungsmittelzusatzes statt. Dagegen nimmt der denaturierte Zustand ein größeres Volumen ein und außerdem ist hier der präferentielle Ausschluß viel ausgeprägter. Die Lage des Peptidrückgrats im Inneren des nativen Proteins verursacht also die Stabilisierung von *Bc*-Csp durch EG.

Aus den Experimenten mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ist bekannt, daß der kollabierte Zustand ähnlich kompakt ist wie der native Zustand. Trotzdem wird für den kollabierten Zustand in Gegenwart von EG keine Stabilisierung, sondern eine Destabilisierung beobachtet (Startwerte in Abbildung 3.27d). Im Vergleich zum nativen Zustand muß der präferentielle Ausschluß von EG im kollabierten Zustand verändert sein. D.h. der kollabierte Zustand ist zwar kompakt, hat aber eine andere Oberflächenzugänglichkeit als der native Zustand. Diese muß noch Eigen-

schaften des denaturierten Zustands besitzen, da der kollabierte Zustand nur geringfügig stabiler ist als der entfaltete Zustand. Während im nativen Zustand das Peptidrückgrat im Innern verborgen ist, ist es im kollabierten Zustand vermutlich noch teilweise zugänglich. Im Vergleich zum nativen Zustand führt diese Exposition beim kollabierten Zustand zu einem starken präferentiellen Ausschluß und einer entsprechenden Destabilisierung. Dieses Verhalten gegenüber EG deutet darauf hin, daß die Wechselwirkungen im kollabierten Zustand noch schwach sind, und daß das Peptidrückgrat zumindest für sehr kleine Moleküle wie EG noch teilweise zugänglich ist.

Die Stabilität des kollabierten gegenüber dem denaturierten Zustand wird durch den Zusatz von EG stark verringert. Der kollabierte Zustand ist deshalb nur noch bei geringen GdmCl-Konzentrationen nachweisbar. In Abwesenheit von EG wird der Kollaps von 50→66 bereits bei GdmCl-Konzentrationen von 0,5 M unterhalb des Mittelpunkts des Entfaltungsübergangs beobachtet, in Gegenwart von 70 g/100 ml EG dagegen erst bei 2 M GdmCl unterhalb des Mittelpunkts (vgl. Abbildung 3.27d).

Sowohl  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als auch EG stabilisieren das native Protein im Vergleich zum entfalteten Zustand. Die molekulare Grundlage dieser Stabilisierung ist bei den beiden Lösungsmittelzusätzen unterschiedlich:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wird aufgrund seiner Hydrathülle von der Proteinoberfläche ausgeschlossen und führt so generell zu einer präferentiellen Hydratation. Diese Entmischung des Lösungsmittels an der Grenzfläche zum Protein ist energetisch ungünstig, und dadurch wird der ausgedehnte entfaltete Zustand stärker destabilisiert als kompakte Zustände. Durch die ausgedehnte Hydrathülle kann sich  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wahrscheinlich nicht in demselben Volumenbereich aufhalten wie eine Peptidkette. Deshalb stellt die Einhüllende der Peptidkette im Raum die Grenzfläche zu einer  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung dar, und diese Oberfläche ist entscheidend für die Stabilität der einzelnen Faltungszustände des Proteins in Gegenwart von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

EG dagegen reichert sich an Grenzflächen an und bildet als „Strukturbrecher“ keine definierte Hydrathülle aus, sondern führt zu einer unregelmäßigeren Anordnung der Wassermoleküle in der Lösung. Da EG (molekulare Masse 62 g/mol) sehr viel kleiner ist als ein hydratisiertes Sulfation, kann es auch kompakte Konformationen der Peptidkette durchdringen, die für Sulfationen unzugänglich sind. In Gegenwart von EG findet nur dann ein präferentieller Ausschluß statt, wenn das Peptidrückgrat zum Lösungsmittel exponiert ist. Da im nativen Zustand das Peptidrückgrat nicht exponiert ist, wird das gefaltete Protein stabilisiert.

Der kollabierte Zustand von *Bc-Csp\** ist wahrscheinlich für  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und EG unterschiedlich gut zugänglich. Durch diesen Sachverhalt können verschiedene Aspekte der Struktur des kollabierten Zustands untersucht werden. Der native und der kollabierte Zustand werden durch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  vergleichbar stabilisiert und deshalb scheint die für Sulfationen zugängliche Oberfläche dieser beiden Zustände ähnlich groß zu sein. Dieser Befund bestätigt die Verkürzung von Abständen zwischen definierten Positionen auf der Peptidkette während des Kollapses. Nach Zusatz von EG ist nicht die Ausdehnung der Peptidkette bestimmend, sondern die Zugänglichkeit des Rückgrats zum Lösungsmittel. Der kollabierte Zustand ist in

Gegenwart von EG nur geringfügig stabiler als der entfaltete Zustand, und deshalb müssen große Teile des Rückgrates auch im kollabierten Zustand noch für das Lösungsmittel zugänglich sein. Während des Kollapses wird also das Wasser noch nicht vollständig aus dem Proteininneren verdrängt.

Die Faltungsexperimente in Gegenwart der Lösungsmittelzusätze  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und EG deuten darauf hin, daß der kollabierte Zustand ähnlich kompakt ist wie der native Zustand, gleichzeitig aber noch keine nativähnliche Struktur besitzt. Damit entspricht die schnelle Verkürzung von Abständen einem weitgehend unspezifischen Kollaps.



## 4 ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION

### 4.1 Abstandsänderungen in den Donor-Akzeptor Proteinen

Durch FRET können Abstände und Abstandsänderungen auf molekularer Ebene bestimmt werden. Für die Experimente mit *Bc-Csp\** wurde Tryptophan als Donor und AEDANS als Akzeptor der Anregungsenergie verwendet. Der Försterabstand dieses Fluorophorenpaars liegt mit 21 bis 23 Å in demselben Bereich wie der Durchmesser von *Bc-Csp\** (25 Å) und garantiert daher eine hohe Empfindlichkeit der Experimente. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden Tryptophan bzw. Cystein (anschließende chemische Modifikation mit 1,5-IAEDANS) an lösungsmittel-exponierten Positionen in das Protein eingeführt, um eine freie Beweglichkeit beider Fluorophore zu ermöglichen. Die geringen Werte der Gleichgewichts-Fluoreszenz-anisotropie von 0,04 bis 0,07 für Tryptophan und  $\leq 0,02$  für AEDANS bestätigen eine ausgeprägte Flexibilität.

Tryptophan und AEDANS sind kleine Fluorophore, welche die Proteinstruktur möglichst wenig beeinflussen. An den gewählten oberflächenexponierten Positionen führten die Mutationen zu Tryptophan nur zu einer geringfügigen Destabilisierung von *Bc-Csp\**; die Modifikation mit AEDANS hatte aufgrund des langen *linker* kaum Einfluß auf die Stabilität des Proteins. Die Kombinationen einzelner Tryptophanreste an den Positionen 21, 22, 38 oder 50 mit einem Akzeptor an Position 2, 11, 24 oder 66 führten zu Donor-Akzeptor Proteinen mit Übergangsmittelpunkten um 2 M GdmCl (0,3 M GdmCl instabiler als das Pseudo-Wildtypprotein *Bc-Csp\**). Die Rückfaltungsreaktion von *Bc-Csp\** wird durch die Einführung des Donors und Akzeptors praktisch nicht verändert. Dies ist von äußerster Wichtigkeit für die Durchführung kinetischer FRET-Experimente, da auch die Donor-Akzeptor Proteine die Eigenschaften von *Bc-Csp\** widerspiegeln. Die Entfaltungsreaktion ist beschleunigt und führt zu der verringerten Stabilität der Donor-Akzeptor Proteine.

Die Aussagekraft von FRET-Experimenten ist dann am höchsten, wenn die Fluoreszenz der einzelnen Fluorophore nicht vom Faltungszustand des Proteins abhängt. Für den Akzeptor AEDANS ist dies an allen vier verwendeten Positionen der Fall. Die Trp-Fluoreszenz verhält sich an den gewählten Positionen unterschiedlich: Bei Trp50 ändert sich die Fluoreszenz nur um 10 %, obwohl es sich in der nativen Struktur in der Mitte eines Faltblattstranges lokalisiert ist. Dagegen ändert sich die Trp-Fluoreszenz an den Positionen 38, 21 bzw. 22 in den exponierten Schleifenbereichen von *Bc-Csp\** bei Entfaltung um 25, 30 bzw. 45 %. Tryptophan ist nicht durch einen langen *linker*, sondern nur durch eine einzelne Methylengruppe mit dem Peptidrückgrat verbunden. Dadurch wird Tryptophan sehr leicht von seiner Umgebung beeinflusst und ist deshalb die am häufigsten verwendete Sonde in der Proteinfaltung.

Die Abstände zwischen den beiden Fluorophoren im Donor-Akzeptor Protein konnten durch den Vergleich der Fluoreszenzspektren des doppelmarkierten und des nur-Donor bzw. nur-Akzeptor Proteins bestimmt werden. Bei der Berechnung der Transfereffizienz mit Hilfe der Donor- bzw. Akzeptor-Fluoreszenz wurden identische Ergebnisse erhalten. Auch die

Anregungswellenlänge der Fluoreszenzmessung hatte keinen Einfluß auf den ermittelten Abstand. Die Entfaltung eines Donor-Akzeptor Proteins führt zu einer Änderung des Abstands in Form eines Zweizustandsübergangs.

Werden die aus FRET-Experimenten bestimmten Abstände des nativen Proteins ( $R_N$ ) mit den Abständen der  $C_\beta$ -Atome von Tryptophan und Cystein aus der Kristallstruktur verglichen ( $R_{\text{Kristall}}$ ), so findet sich für  $R_{\text{Kristall}} \geq 20 \text{ \AA}$  generell eine gute Übereinstimmung (Tabelle 3.4). Größere Abweichungen wurden bei Varianten mit kleinen  $R_{\text{Kristall}}$ -Werten gefunden. So zeigt die Variante 50→2 Werte von  $R_{\text{Kristall}} = 7,9 \text{ \AA}$  und  $R_N = 17,1 \text{ \AA}$ . Die Differenz dieser beiden Werte wird durch den *linker* von AEDANS und die Größe der beiden Fluorophore bedingt. Der in Fluoreszenzmessungen des denaturierten Proteins bei 4 M GdmCl bestimmte Abstand ( $R_U$ ) stimmt für alle Donor-Akzeptor Proteine sehr gut mit dem für ein vollständig entfaltetes Protein berechneten Abstand überein. Im entfalteten Protein sind die Seitenketten von Tryptophan und Cystein (modifiziert mit AEDANS) zufällig angeordnet und liefern deshalb keinen zusätzlichen Beitrag zum Abstand. Bei keinem der Proteine ergibt sich ein eindeutiger Hinweis auf das Vorliegen einer teilweise strukturierten, kompakten Struktur in Gegenwart von GdmCl, die als Ausgangspunkt für die schnelle Faltung von *Bc-Csp* dienen könnte. Mit steigender GdmCl-Konzentration kommt es zu einer leichten Ausdehnung der entfalteten Peptidkette. Die Zunahme des Abstandes korreliert mit der Zahl der Reste zwischen dem Donor und dem Akzeptor und beruht auf GdmCl als gutem Lösungsmittel (Millett *et al.*, 2002a).

Insgesamt zeigen diese Gleichgewichtsmessungen, daß der FRET zwischen Tryptophan und AEDANS eine verlässliche Sonde zur Bestimmung von Abstandsänderungen im Verlauf der Faltung der einzelnen Varianten von *Bc-Csp*\* darstellt.

## 4.2 Schneller Kollaps in verschiedenen Varianten von *Bc-Csp*\*

In *stopped-flow*-Experimenten wurde die Rück- bzw. Entfaltung der Donor-Akzeptor Proteine beobachtet. Die Fluoreszenz des völlig entfalteten Proteins bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen wurde durch Messungen mit den niedermolekularen Referenzverbindungen NAWA (Trp-Fluoreszenz) und Trp-EDANS (AEDANS-Fluoreszenz) abgeschätzt. Die experimentell bestimmten Fluoreszenzwerte zu Beginn der Rückfaltungsreaktion zeigen bei einigen Donor-Akzeptor Proteinen Abweichungen von dieser Fluoreszenz der Referenzsubstanzen. Die beobachtbare Amplitude der Faltungsreaktion ist dabei verringert. Die Trp-Fluoreszenz (Donor) ist in diesen Fällen erniedrigt und die AEDANS-Fluoreszenz (Akzeptor) erhöht. Das komplementäre Verhalten der Fluoreszenz des Donors und des Akzeptors ist der Nachweis für eine Änderung der Transfereffizienz zwischen den beiden Fluorophoren. In der Totzeit der *stopped-flow*-Experimente erhöht sich die Transfereffizienz, da sich der Abstand zwischen Tryptophan und AEDANS verkürzt. Der Befund, daß sich Abstände zwischen verschiedenen Positionen von *Bc-Csp*\* verkürzen, zeigt, daß ein schneller Kollaps der entfalteten Peptidkette vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung stattfindet. In Entfaltungsexperi-

menten erfolgt hingegen die gesamte Abstandsänderung im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Entfaltung.

Die Varianten 38→66 und 50→11 besitzen annähernd identische  $R_N$  und  $R_U$ , und der Abstand zwischen Donor und Akzeptor vergrößert sich bei Entfaltung des Proteins jeweils nur um 4 Å. Daher nimmt die Effizienz des FRET bei Entfaltung dieser Proteine nur wenig ab. Bei 38→66 wird die Änderung der Fluoreszenz aufgrund des Energietransfers von der intrinsischen Fluoreszenzänderung von Trp38 überlagert. Die Entfaltung des Proteins führt zu einer Erhöhung der Trp-Fluoreszenz durch die abnehmende Transfereffizienz; gleichzeitig nimmt die intrinsische Trp-Fluoreszenz aber in ähnlichem Ausmaß ab, so daß insgesamt keine Änderung der Trp-Fluoreszenz beobachtet wird (Abbildung 3.20c). Beim Akzeptor führen beide Effekte zu einer Abnahme der Fluoreszenz, und deshalb wird eine starke Änderung der AEDANS-Fluoreszenz detektiert. Dieses Beispiel betont die Bedeutung reziproker Änderungen der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz bei der Interpretation von FRET-Messungen. Liegt kein komplementäres Verhalten vor, wird der Energietransfer durch andere Einflüsse überlagert. Würde nur die Fluoreszenz des Donors gemessen, könnten die Ergebnisse zu einer falschen Schlußfolgerung führen. Daher ist es immer sinnvoll, in FRET-Experimenten einen fluoreszierenden Akzeptor zu verwenden.

Die intrinsische Fluoreszenz von Trp50 hängt kaum vom Faltungszustand des Proteins ab, wodurch Trp50 ein nahezu idealer Donor für FRET-Messungen ist. Deshalb wirkt sich bei der Entfaltung der Variante 50→11 nur die veränderte Transfereffizienz auf die Fluoreszenz aus. Sowohl für Tryptophan als auch für AEDANS werden sehr kleine, aber komplementäre Signaländerungen gemessen (Abbildung 3.20a). Kleine Abstandsänderungen führen also wie erwartet nur zu geringen Fluoreszenzänderungen.

In den Proteinen 50→2, 50→24, 50→66 (alle in Abbildung 3.19), 38→11 (Abbildung 3.20b) und 21→2 (Abbildung 3.21c) wird die Faltungsreaktion von großen Abstandsverkürzungen begleitet. Die kleinste Änderung tritt bei 50→66 auf (7 Å), die größte bei 50→2 (19 Å), und in allen Fällen liegt der Försterabstand  $R_0$  zwischen  $R_N$  und  $R_U$ . Alle Proteine zeigen starke Änderungen der Fluoreszenz im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung, aber unterschiedlich stark ausgeprägte Amplitudenverluste, d.h. das Ausmaß des Kollapses der entfalteten Peptidkette ist abhängig von der Position der beiden Fluorophore. Im Extremfall (50→2) findet 70 % der gesamten Fluoreszenzänderung in der Totzeit der *stopped-flow*-Mischung statt; bei 50→24 und 50→66 führt der Kollaps zu ca. 50 % und bei 38→11 und 21→2 zu ca. 30 % der gesamten Fluoreszenzänderung. Im Bereich um  $R_0$  besteht eine annähernd lineare Beziehung zwischen der Transfereffizienz und dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Der Anteil der Abstandsverkürzung während des Kollapses entspricht daher ungefähr dem Prozentsatz der Fluoreszenzänderung in der Totzeit. Das Ausmaß des Kollapses hängt nicht nur vom Abstand im entfalteten Zustand  $R_U$  ab, sondern auch von der gesamten Änderung des Abstandes während der Faltung. Möglicherweise ist der kollabierte Zustand also nicht vollständig unstrukturiert, sondern könnte eventuell schon eine nativ-ähnliche Topologie besitzen.

Der Übergangszustand der Faltung von *Bs*-CspB ist polarisiert, d.h. nur in den Faltblattsträngen  $\beta 1$  und  $\beta 2$  bilden einige Seitenketten bereits nativähnliche Wechselwirkungen aus. Mit den Proteinen 21 $\rightarrow$ 11, 22 $\rightarrow$ 11 und 21 $\rightarrow$ 2 (Abbildung 3.21) wurde das Ausmaß des Kollapses in diesem früh strukturierten Bereich von *Bc*-Csp\* untersucht. Unabhängig davon, ob die Faltung des Proteins mit einer Streckung (21 $\rightarrow$ 11, 22 $\rightarrow$ 11) oder mit einer Verkürzung (21 $\rightarrow$ 2) des untersuchten Abstands einhergeht, erfolgt nur ein kleiner Teil der Änderung der Transfereffizienz in der Totzeit der Messung. Der Bereich der Faltblattstränge  $\beta 1$  und  $\beta 2$  hat im kollabierten Zustand also noch keine nativähnliche Struktur.

### 4.3 Charakterisierung des kollabierten Zustands

In einer Chevronauftragung sind die apparenten Geschwindigkeitskonstanten einer Faltungsreaktion logarithmisch gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen. Dabei zeigt der kinetische  $m$ -Wert der Rückfaltung ( $m_{UN}$ ) die Veränderung der Wechselwirkungen mit dem Denaturierungsmittel (und damit der zugänglichen Oberfläche) zwischen dem entfalteten Zustand und dem Übergangszustand der Rückfaltungsreaktion an. Faltet ein Protein nach dem Zweizustandsmechanismus und mit einem gleichbleibenden Übergangszustand, so ist  $m_{UN}$  bei allen GdmCl-Konzentrationen konstant, da immer dieselbe Änderung der zugänglichen Oberfläche mit der Reaktion verbunden ist. Die Auftragung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten ergibt dann einen linearen Verlauf bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen. Tritt dagegen in der Rückfaltung ein kompaktes Intermediat auf, ist dieses kompakte Intermediat der Ausgangspunkt des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Faltung. Die zugängliche Oberfläche ändert sich bei der Faltung also weniger als bei einem Zweizustandsmechanismus (Ausgangspunkt entfalteter Zustand), und folglich sinkt  $m_{UN}$  (und damit auch die gemessene Faltungsrate) bei geringen GdmCl-Konzentrationen ab (sogenanntes *rollover*). Für *Bc*-Csp wird weder mit der lokalen Fluoreszenzsonde Trp8 noch mit der abstandsabhängigen Fluoreszenz der Donor-Akzeptor Proteine ein solches *rollover* beobachtet (z.B. Abbildung 3.15, Abbildung 3.19). Dieses kinetische Zweizustandsverhalten von *Bc*-Csp\* steht in scheinbarem Widerspruch zu der schnellen Verkürzung von Abständen in der Totzeit der Faltung, die zu einem kompakten Zustand und damit zu einem *rollover* führen sollte.

Die Zugänglichkeit eines Faltungszustands für das Lösungsmittel kann durch Lösungsmittelzusätze wie  $(NH_4)_2SO_4$  oder EG charakterisiert werden. Der präferentielle Ausschluß eines Lösungsmittelzusatzes von der Proteinoberfläche ist, aufgrund der teilweisen Entmischung des Lösungsmittels, energetisch ungünstig und führt deshalb zur Stabilisierung kompakter Zustände.  $(NH_4)_2SO_4$  ist von einer großen Hydrathülle umgeben und wird deshalb auch als Strukturbildner in einer wäßrigen Lösung angesehen. Es wird generell von der Oberfläche eines Proteins ausgeschlossen. Der kollabierte Zustand von *Bc*-Csp\* wird durch  $(NH_4)_2SO_4$  ähnlich stark stabilisiert wie der native Zustand und sollte daher ähnlich kompakt sein wie das gefaltete Protein. EG hingegen ist ein sogenannter Strukturbrecher ohne Hydrat-

hülle, und es findet nur in Bereichen mit exponiertem Peptidrückgrat ein präferentieller Ausschluß von der Proteinoberfläche statt. In Gegenwart von EG ist der kollabierte Zustand von *Bc-Csp\** nur geringfügig stabiler als der entfaltete Zustand, d.h. große Teile des Peptidrückgrats sind im kollabierten Zustand noch für EG zugänglich. Während die großen Sulfationen durch die kompakte Einhüllende der Peptidkette ausgeschlossen werden, ist für kleine Strukturbrecher wie EG oder GdmCl noch fast dieselbe Oberfläche zugänglich wie im entfalteten Zustand. Deshalb nimmt bei der Bildung des Übergangszustands aus dem kollabierten (niedrige GdmCl-Konzentration) bzw. entfalteten Zustand (hohe GdmCl-Konzentration) die zugängliche Oberfläche in vergleichbarem Ausmaß ab. Dies äußert sich in einem konstanten  $m_{UN}$ -Wert und der Abwesenheit eines *rollover*.

Der Zusammenhang zwischen der Kompaktheit des entfalteten Zustands und seiner zugänglichen Oberfläche wurde auch durch Monte Carlo Simulationen untersucht (Goldenberg, 2003). Dabei wurden auf der Grundlage der Sequenz verschiedener realer Proteine mögliche Konformationen des denaturierten Zustands berechnet. Für alle berechneten Strukturen wurde die Kompaktheit mit Hilfe des Trägheitsradius  $R_g$  abgeschätzt und die zugängliche Oberfläche bestimmt. Unabhängig von der Kettenlänge des entfalteten Proteins war für die meisten Konformationen des Ensembles  $R_g$  nur wenig größer als im nativen Zustand, gleichzeitig entsprach die für Wasser zugängliche Oberfläche aber fast der einer vollständig gestreckten Kette. Ein kompakter entfalteter Zustand, wie der kollabierte Zustand von *Bc-Csp\**, kann also gleichzeitig eine große wasserzugängliche Oberfläche besitzen.

Bei der Faltung eines Proteins werden Teile der Peptidkette dem umgebenden Wasser entzogen und bilden das hydrophobe *core* der nativen Struktur. Simulationen mit Methan in Wasser bzw. der drk SH3-Domäne aus *Drosophila melanogaster* legen nahe, daß diese Desolvatisierung der Peptidkette erst im Übergangszustand der Faltung beginnt (Rank & Baker, 1997; Cheung *et al.*, 2002). Dieses  $\beta$ -Faltblattprotein liegt in Abwesenheit von Denaturierungsmittel als Mischung einer nativen und entfalteten Form vor (Choy *et al.*, 2002). Möglicherweise dient die Abgabe von Wassermolekülen aus dem vorgebildeten hydrophoben *core* dazu, in einem letzten Faltungsschritt sehr schnell den funktionellen nativen Zustand zu erreichen. Bei *Bs-CspB* können die experimentell bestimmten Aktivierungsvolumina mit einem im Übergangszustand noch solvatisierten hydrophoben *core* erklärt werden (Jacob *et al.*, 2002). Die hier gefundene vollständige Zugänglichkeit der Peptidkette zum Lösungsmittel im kollabierten Zustand von *Bc-Csp\** bestätigt, daß Wassermoleküle erst später in der Faltung (z.B. im Übergangszustand) von der Peptidkette abgelöst werden.

Der zeitliche Verlauf der Bildung des kollabierten Zustands konnte weder mit p-Sprung- noch mit T-Sprungmessungen beobachtet werden. In p-Sprungexperimenten findet nur dann eine Verschiebung des Gleichgewichts statt, wenn sich das Volumen bei der Reaktion ändert. Die Bildung des vollständig lösungsmittlexponierten kollabierten Zustands aus dem ebenfalls vollständig solvatisierten entfalteten Zustand führt vermutlich nicht zu einer meßbaren Volumenänderung des Systems und kann deshalb nicht mit p-Sprungexperimenten verfolgt

werden. Eine Volumenänderung tritt erst im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt durch den Austritt der Wassermoleküle aus dem hydrophoben *core* auf. Bei T-Sprungmessungen kann nur dann ein Reaktionsverlauf beobachtet werden, wenn sich die Enthalpie bei der Reaktion ändert. Da der kollabierte Zustand kompakter ist als der denaturierte Zustand, könnten prinzipiell günstige Wechselwirkungen innerhalb der Peptidkette auftreten. Allerdings konnte kein Zeitverlauf für die Bildung des kollabierten Zustands erhalten werden. Eine schwache Expansion des Proteins innerhalb der Totzeit (0,1  $\mu$ s) einer Entfaltungsreaktion kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die geringen Volumen- bzw. Enthalpieänderungen bei der Bildung des kollabierten Zustands erschweren dessen Nachweis ebenso wie der äußerst schnelle Verlauf der Reaktion.

Die Geschwindigkeit der Kontaktbildung in Peptiden und entfalteten Proteinen wurde experimentell untersucht. An Peptide verschiedener Länge wurden ein Triplet-Donor und ein Triplet-Akzeptor angebracht. Befinden sich Donor und Akzeptor im van der Waals-Kontakt, tritt Triplet-Triplet Energietransfer auf. Dieser Prozeß ist diffusionskontrolliert und ergibt eine Zeitkonstante von 57 ns für die Kontaktbildung zwischen zwei Positionen im Abstand von 30 Aminosäuren (Krieger *et al.*, 2003). In längeren Ketten oder in Gegenwart von Denaturierungsmitteln ist die Kontaktbildung verlangsamt. Alternativ wurde die Kontaktbildung in Peptiden auch anhand der Löschung des Tryptophan Triplet-Zustands durch Cystein verfolgt. Diese Löschung ist allerdings nicht diffusionskontrolliert, da ein Kontakt von Cystein mit dem angeregten Tryptophan nicht immer zur Löschung führt, und ergibt daher geringere apparente Raten für die Kontaktbildung (Lapidus *et al.*, 2000). Im Csp aus *Thermotoga maritima* wurde mit derselben Methode die Kontaktbildung zwischen Trp29 und Cys67 im entfalteten Zustand untersucht (Buscaglia *et al.*, 2003). Der Kontakt zwischen diesen beiden Positionen bildete sich bei 20 °C und bei hohen GdmCl-Konzentrationen mit einer Zeitkonstante von ca. 10  $\mu$ s, bei niedrigeren GdmCl-Konzentrationen geringfügig schneller. Da die Reaktion nicht diffusionskontrolliert ist, könnte ein Kontakt möglicherweise auch schneller gebildet werden. Für die Donor-Akzeptor Proteine von *Bc-Csp\** wäre eine Kontaktbildung also innerhalb der Totzeit der p-Sprung- oder T-Sprungexperimente möglich.

Der schnelle Kollaps von *Bc-Csp\** geht dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung voraus. Sowohl Rück- als auch Entfaltungsreaktionen zeigen dabei mit allen Sonden (Tyr-, Donor- oder Akzeptor-Fluoreszenz) monoexponentielle Reaktionsverläufe, und die Veränderung verschiedener Abstände innerhalb des Proteins erfolgt mit nahezu gleichen Zeitkonstanten. Dieses Zweizustandsverhalten der Faltung von *Bc-Csp\** wird auch durch die Linearität der Chevronauftragung bei niedrigen und hohen GdmCl-Konzentrationen bestätigt. Zusätzlich stimmt die Summe der kinetischen *m*-Werte mit dem *m*-Wert aus den Gleichgewichtsexperimenten überein. Unabhängig vom schnellen Kollaps verläuft die Faltung von *Bc-Csp* also nach einem Zweizustandsmechanismus.

#### 4.4 Bedeutung des Kollapses für die Proteinfaltung

Proteine sind natürlich vorkommende Heteropolymere, und manche ihrer Eigenschaften können durch die Polymertheorie beschrieben werden. Ausgehend von den Arbeiten von Flory wurde das Verhalten von Homo- und Heteropolymeren untersucht (Flory, 1953; Chan & Dill, 1991). Die Ausdehnung einer Polymerkette hängt stark von den Eigenschaften des Lösungsmittels ab, das die Stärke der Wechselwirkungen zwischen den Monomeren beeinflusst. In einem guten Lösungsmittel treten kaum anziehende Kräfte zwischen den Monomeren auf, und die Polymerkette liegt aufgrund der sterischen Abstoßung einzelner Kettensegmente in einer ausgedehnten Konformation vor. In einem sogenannten  $\theta$ -Lösungsmittel heben sich abstoßende und anziehende Kräfte auf, und in einem schlechten Lösungsmittel kommt es durch die starken, anziehenden intramolekularen Wechselwirkungen zu einem Kollaps des Polymers (Chan & Dill, 1991). Für Proteine ist GdmCl ein gutes Lösungsmittel, in dem die Peptidketten gestreckte Konformationen einnehmen. Wird dieses entfaltete Protein in das schlechtere Lösungsmittel Wasser überführt, kommt es zu einem Kollaps der Peptidkette. Homopolymere bilden dabei ein Ensemble von ähnlich stabilen Strukturen, während Heteropolymere nur eine oder wenige Konformationen mit niedriger Energie einnehmen (Chan & Dill, 1991). Bei der Bildung kompakter Zustände während der Proteinfaltung spielt also das Lösungsmittel eine entscheidende Rolle.

Der Kollaps einer entfalteten Peptidkette kann in unterschiedlicher Weise verlaufen: Die Bildung von nativähnlichen Sekundärstrukturen wird als spezifischer Kollaps bezeichnet; fehlen diese nativen Strukturelemente, spricht man von einem unspezifischen Kollaps (Roder & Colon, 1997; Qiu *et al.*, 2003). In beiden Fällen sind hydrophobe Wechselwirkungen die Haupttriebkraft für den Kollaps. Die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Peptidbindungen ist zwar in wässriger Lösung begünstigt, die Desolvatisierung einer Wasserstoffbrücke in einer hydrophoben Umgebung ist aber mit einem starken Anstieg der freien Enthalpie (bis zu  $10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) verbunden (Baldwin, 2003). Deshalb kann nur eine beschränkte Zahl von Wasserstoffbrücken in Sekundärstrukturelementen in eine wasserfreie Umgebung transferiert werden. Die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen ist hingegen energetisch begünstigt.

In der Literatur finden sich häufig widersprüchliche Angaben zum Auftreten eines Intermediates bei der Faltung eines Proteins. Abhängig von der Zeitauflösung der Experimente wurde für die Rückfaltung von Ubiquitin ein Intermediat postuliert (Khorasanizadeh *et al.*, 1996) und angezweifelt (Krantz *et al.*, 2002). In beiden Studien wurde die Fluoreszenz von Tryptophan als lokale Sonde verwendet. Durch die zusätzliche Bestimmung der Sekundärstruktur mit CD und der Ausdehnung der Peptidkette durch SAXS wurde das Vorliegen eines kompakten Intermediates bestätigt (Qin *et al.*, 2002). Die Trp-Fluoreszenz von Ubiquitin ist also insensitiv für den Nachweis des Intermediates. Deshalb sollten zum Nachweis eines Faltungsintermediates am besten verschiedene Detektionsverfahren eingesetzt werden. Auch bei *Bc-Csp* beeinflusst der Kollaps der Peptidkette die Fluoreszenz der lokalen Sonde Trp8

nicht. Durch die Messungen verschiedener intramolekularer Abstände in Donor-Akzeptor Proteinen konnte der Kollaps dagegen eindeutig nachgewiesen werden.

Der Kollaps einer Peptidkette kann innerhalb von Mikrosekunden erfolgen oder um Größenordnungen langsamer im Sekundenbereich ablaufen. Hieraus ergab sich die Vorstellung, daß der Kollaps um so schneller abläuft, je unspezifischer die Konformationen im kollabierten Zustand sind (Qiu *et al.*, 2003). Die Bildung nativähnlicher Strukturen sollte über eine energetische Barriere verlaufen und deshalb langsamer erfolgen als ein unspezifischer Kollaps ohne Barriere. Mit Fragmenten von Cytochrom c, die nicht bis zum nativen Zustand falten können, wurde allerdings ein monoexponentiell verlaufender Kollaps in T-Sprungexperimenten beobachtet, und die Barriere zur Bildung des kollabierten Zustands war ähnlich groß wie im natürlichen Protein. Die Fähigkeit eines Proteins, einen gefalteten Zustand einzunehmen, ist also keine Voraussetzung für das Auftreten eines Kollapses und bestimmt nicht dessen Dynamik (Qiu *et al.*, 2003).

Nichtfaltende Mutanten von Cytochrom c (Sosnick *et al.*, 1997) und Ribonuklease A (Qi *et al.*, 1998) wurden dazu verwendet, die Basislinie des denaturierten Proteins unter Rückfaltungsbedingungen zu bestimmen. In beiden Fällen wurde im schlechteren Lösungsmittel ein kompakterer entfalteter Zustand beobachtet.

Die Notwendigkeit von kollabierten Intermediaten für eine effiziente Faltung wird weiter kontrovers diskutiert (Hagen & Eaton, 2000; Roder *et al.*, 2000; Millett *et al.*, 2002a; Ferguson & Fersht, 2003; Jacob *et al.*, 2004). Für große Proteine oder Proteine mit Disulfidbrücken, nicht-nativen Prolinisomeren oder Kofaktoren wird meistens eine schnelle Bildung kompakter Intermediate beobachtet. Dagegen tritt bei dem kleinen Protein L (62 Aminosäuren) in zeitaufgelösten SAXS-Experimenten kein Kollaps auf (Plaxco *et al.*, 1999). Protein L faltet wie *Bc-Csp* nach einem Zweizustandsmechanismus. Der Kollaps von *Bc-Csp* ist also nicht allein auf seine Größe zurückzuführen. Das Auftreten von kollabierten Zuständen und deren Struktur und Rolle im Verlauf der Faltung hängt stark vom einzelnen Protein ab. Jedes Protein hat aufgrund seiner Sequenz eine charakteristische Energiehyperfläche, die die Faltungswege und damit auch das Auftreten von kollabierten Zuständen bestimmt.

Für verschiedene Proteine wurde die Kompaktheit des kollabierten Zustands und sein Gehalt an Sekundärstruktur bestimmt. Das  $\alpha$ -helikale Protein Apomyoglobin bildet ein Intermediat mit drei Helices aus. Die Bildung dieses Intermediates wurde durch Kombination von *continuous*- und *stopped-flow*-Experimenten untersucht (Uzawa *et al.*, 2004). Parallel mit dem Auftreten von Sekundärstruktur (CD) verringert sich der Trägheitsradius  $R_g$  um 6 Å (SAXS). Die Faltung von Apomyoglobin scheint also über einen kollabierten Zustand mit spezifischen nativähnlichen Strukturen zu verlaufen. Die drk SH3-Domäne aus *Drosophila melanogaster* ist ein  $\beta$ -Faltblattprotein und liegt in Abwesenheit von Denaturierungsmittel zu ungefähr gleichen Teilen in der nativen und entfalteten Form vor. Bei Zugabe von 2 M GdmCl vergrößert sich  $R_g$  des denaturierten Proteins um 5 Å, und die Konformation wird gestreckter als bei 0 M GdmCl (Choy *et al.*, 2002; Millett *et al.*, 2002a). Der kompakte ent-

faltete Zustand in Abwesenheit des Denaturierungsmittels wurde mittels NMR auf Wechselwirkungen zwischen aromatischen und hydrophoben Seitenketten untersucht (Crowhurst & Forman-Kay, 2003). Im Gegensatz zu Apomyoglobin ist der kollabierte Zustand der drk SH3-Domäne sehr heterogen, und es werden überwiegend nicht-native Strukturen gefunden. Möglicherweise ist der Kollaps von  $\beta$ -Faltblattproteinen weniger spezifisch als derjenige von helikalen Proteinen. Auch *Bc*-Csp besteht ausschließlich aus  $\beta$ -Faltblattsträngen und zeigt im kollabierten Zustand keine ausgeprägt nativähnliche Struktur.

Das Auftreten eines kollabierten Zustands muß nicht im Widerspruch zu einer Zweizustandsfaltung im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt stehen. Die Umwandlung des ausge dehnten in einen kompakten entfalteten Zustand kann als schnelles vorgelagertes Gleichgewicht der Faltungsreaktion angesehen werden (Shortle, 2002). Dieser Prozeß verläuft nicht kooperativ sondern kontinuierlich, da keine Energiebarriere vorhanden ist. Tatsächlich wurde für eine nichtfaltende Variante der *Engrailed homeodomain* eine kontinuierliche nicht-kooperative „Entfaltung“ der kompakten Form beobachtet (Mayor *et al.*, 2003). Alternativ kann eine Zweizustandsreaktion auch den Spezialfall einer Dreizustandsreaktion mit instabilem Intermediat darstellen (Roder & Colon, 1997; Sánchez & Kiefhaber, 2003). Beide Sichtweisen unterstützen die Vorstellung eines Kontinuums von entfalteten Zuständen mit unterschiedlicher Kompaktheit (Parker & Marqusee, 1999). Die verschiedenen Konformationen des entfalteten Zustands falten mit ähnlichen Geschwindigkeitskonstanten, da der Kollaps den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltungsreaktion kaum beeinflusst. Dieses Modell könnte für die Zweizustandsfaltung von *Bc*-Csp nach einem schnellen Kollaps zutreffend sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch kinetische Ensemble-FRET-Experimente ein kompakter denaturierter Zustand vor der Faltung von *Bc*-Csp bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen nachgewiesen. Dies bestätigt die Ergebnisse aus Einzelmolekül-FRET-Experimenten mit Csp aus *Thermotoga maritima* im Gleichgewicht, bei denen anhand eines einzigen Abstands ebenfalls ein Kollaps des entfalteten Proteins bei geringen Konzentrationen des Denaturierungsmittels gezeigt werden konnte (Schuler *et al.*, 2002). In kinetischen Einzelmolekül-FRET-Experimenten war der Kollaps innerhalb der sehr langen Totzeit der Mischung von 100 ms abgeschlossen (Lipman *et al.*, 2003). Trotz der besseren Zeitauflösung konnte die Kinetik der Bildung des kollabierten Zustands auch in Ensemble *stopped-flow*-Experimenten nicht verfolgt werden. Der Kollaps erfolgt somit in weniger als 1 ms. Möglicherweise wird der kollabierte Zustand sogar innerhalb der Totzeit von T-Sprungexperimenten (0,1  $\mu$ s) gebildet, wobei allerdings unklar bleibt, ob T-Sprünge überhaupt zu einer ausreichenden Verschiebung des Gleichgewichts zwischen dem kollabierten und dem entfalteten Zustand führen. Ein weiterer Aspekt ist die Spezifität des Kollapses. In den Einzelmolekül-Experimenten mit einem Donor-Akzeptor Paar war darüber keine Aussage möglich. Die Beobachtung mehrerer Abstände innerhalb von *Bc*-Csp während der Faltung und der Einsatz der Lösungsmittelzusätze  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und EG zeigen, daß im kollabierten Zustand weitgehend

unspezifische nicht-native Wechselwirkungen auftreten. Dieser Kollaps spiegelt einerseits die Eigenschaften der Proteinkette von *Bc*-Csp als Heteropolymer in einem schlechten Lösungsmittel wider. Andererseits ist er so spezifisch, daß er eine sehr schnelle produktive Faltung zum nativen Zustand innerhalb weniger Millisekunden ermöglicht.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das kleine Kälteschockprotein *Bc*-Csp bildet ein  $\beta$ -barrel aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen. Es faltet gemäß einem Zweizustandsmechanismus und erreicht den nativen Zustand in Abwesenheit von Denaturierungsmittel innerhalb einer Millisekunde. Um die strukturellen Veränderungen während dieser schnellen Faltungsreaktion zu untersuchen, wurden intramolekulare Abstandsänderungen mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) bestimmt.

Einzelne Tryptophanreste wurden als Donor und einzelne 5-(((acetylamino)ethyl)amino)-naphthalin-1-sulfonsäure-Reste (AEDANS) als Akzeptor in das Protein eingeführt. An der Oberfläche von *Bc*-Csp wurden vier verschiedene Donor- und vier verschiedene Akzeptorpositionen ausgewählt. Diese Positionen wurden zu neun einzelnen Donor-Akzeptor Proteinvarianten kombiniert, so daß Änderungen von neun intramolekularen Abständen verfolgt werden konnten. In den nativen Proteinen betragen diese Abstände zwischen 14 und 28 Å. Für das Trp/AEDANS Paar liegt  $R_0$  im Bereich von 22 Å, was ungefähr dem Durchmesser von *Bc*-Csp entspricht und daher sehr empfindliche Messungen ermöglicht.

In den einzelnen Proteinen wurde der Abstand zwischen Donor und Akzeptor sowohl unter nativen als auch unter Entfaltungsbedingungen bestimmt. Für die gefalteten Proteine sind die gemessenen Abstände mit denen aus der Kristallstruktur von *Bc*-Csp vereinbar, wenn die Länge des AEDANS *linker* berücksichtigt wird. Bei den entfalteten Proteinen wird eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Abständen in einer zufällig angeordneten Peptidkette gefunden. Es gibt daher keinen Hinweis auf nativähnliche Reststrukturen im entfalteten Protein.

Die Mutationen und Modifikationen, um sowohl den FRET Donor als auch Akzeptor einzuführen, verringerten die Stabilität von *Bc*-Csp nur geringfügig und führten zu keiner Veränderung der Rückfaltungsreaktion. Die Änderungen der Transfereffizienz während der Faltung wurden in kinetischen *stopped-flow*-Experimenten anhand der Trp- und der AEDANS-Fluoreszenz bestimmt. Für diese beiden Sonden wurden reziproke Effekte beobachtet. Bei niedrigen Konzentrationen des Denaturierungsmittels wird bereits in der Totzeit der *stopped-flow*-Rückfaltungsexperimente ein Anstieg der Transfereffizienz beobachtet, der von einem schnellen Kollaps des entfalteten Proteins verursacht wird. In Abhängigkeit von der Position des Donors und des Akzeptors findet bis zu 70 % der gesamten Abstandsänderung vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung statt. Mit Drucksprung- und Temperatursprungexperimenten wird eine höhere Zeitauflösung erreicht, aber der Zeitverlauf des Kollapses konnte auch mit diesen Methoden nicht verfolgt werden. In der Totzeit der Temperatursprungmessungen kommt es zu einer schwachen Effizienzänderung, so daß der Kollaps möglicherweise schneller ist als 0,1  $\mu$ s.

Alle Donor-Akzeptor Proteine zeigen unabhängig vom äußerst schnellen Kollaps ein Zweizustandsverhalten im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung. Es tritt keine Abweichung von der Linearität in den Chevronauftragungen auf, und die kinetischen und die

Gleichgewichts-*m*-Werte stimmen überein. Diese Befunde deuten auf einen kollabierten Zustand hin, der zwar eine kompakte Struktur besitzt, aber für Wasser und Denaturierungsmittel immer noch gut zugänglich ist. Beide Eigenschaften konnten mit Hilfe verschiedener Lösungsmittelzusätze bestätigt werden:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  stabilisiert den kompakten kollabierten Zustand, durch Ethylenglykol wird er hingegen destabilisiert. Ethylenglykol wird vom immer noch lösungsmittelzugänglichen Peptidrückgrat des kollabierten Zustands ausgeschlossen. Beim kollabierten Zustand handelt es sich also nicht um ein gut definiertes, teilgefaltetes Intermediat. Der entfaltete und der kollabierte Zustand von *Bc-Csp* sind wahrscheinlich nicht durch eine Energiebarriere getrennt, sondern bilden zusammen ein Kontinuum von Konformationen mit unterschiedlicher Kompaktheit. Thermodynamisch betrachtet können die kollabierten Moleküle so dem entfalteten Zustand zugeordnet werden. Der Kollaps der Peptidkette ist eine Reaktion auf den Transfer in ein schlechteres Lösungsmittel bei der Rückfaltung. Dieser kollabierte Zustand verzögert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung nicht, und daher erfolgt die effiziente und schnelle Bildung des nativen Zustands von *Bc-Csp* innerhalb von Millisekunden.

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits publiziert:

Magg, C. & Schmid, F. X. (2004) Rapid collapse precedes the fast two-state folding of the cold shock protein. *J. Mol. Biol.* **335**, 1309-1323.

## 6 SUMMARY

The small cold shock protein *Bc*-Csp forms a five-stranded antiparallel  $\beta$ -barrel. Its folding follows a two-state mechanism and is complete within a millisecond in the absence of denaturant. The structural changes during this rapid folding reaction were investigated by measuring distance changes within the protein by Förster resonance energy transfer (FRET).

Single tryptophan residues were engineered into the protein as the donors and combined with single 5-(((acetylamino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonate (AEDANS) residues as the acceptors. Four different donor and four different acceptor sites at the protein surface of *Bc*-Csp were selected. They were variably combined to give nine single donor-acceptor labelled protein variants, which accordingly could be used to probe the changes in nine intramolecular distances during folding. In the native proteins these distances were between 14 and 28 Å. The  $R_0$  of the Trp/AEDANS pair is around 22 Å, which equals the diameter of *Bc*-Csp and allows highly sensitive measurements.

For the individual proteins the distance between donor and acceptor was determined under native and under unfolding conditions. In the native proteins the measured distances are compatible with those derived from the crystal structure of *Bc*-Csp, when the length of the AEDANS linker is accounted for. For the unfolded proteins a good correlation is found with the calculated distances in a randomly oriented chain. Thus there is no evidence for residual native structure in the unfolded protein.

The mutations and modifications to introduce both the FRET donor and acceptor reduced the stability of the proteins only marginally and did not alter their refolding kinetics. The changes in the transfer efficiency during folding were monitored in kinetic stopped-flow experiments by both Trp- and AEDANS-fluorescence and reciprocal effects were found. At low denaturant concentrations an increase of the transfer efficiency is observed already in the dead-time of stopped-flow refolding experiments, which is due to a rapid collapse of the unfolded protein. Depending on the position of the donor and acceptor up to 70 % of the total change in distance is complete before the rate-limiting step of folding. A higher time-resolution was reached in pressure-jump and temperature-jump experiments, but the kinetics of the collapse could not be resolved even with these methods. There is a small change in the dead-time of the temperature-jump, so possibly the collapse is faster than 0.1  $\mu$ s.

Irrespective of the very rapid collapse, all donor-acceptor proteins show two-state-behaviour in the rate-limiting step of folding. There is no deviation from linearity in chevron plots or a difference between kinetic and equilibrium  $m$ -values. These findings point to a collapsed state, which is compact in shape but still highly accessible to solvent and denaturants. Both features could be confirmed by the use of different cosolvents:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  stabilises the compact collapsed state, whereas ethylene glycol destabilises it, because it is excluded from the still solvent-accessible peptide backbone of the collapsed state. Therefore the collapsed state is not a well defined, partially folded intermediate. The unfolded and collapsed states of *Bc*-Csp are probably not separated by an energetic barrier but form a continuum of conformations

with a varying degree of compactness. Thermodynamically, the collapsed molecules thus belong to the unfolded state. The collapse represents a contraction of the peptide chain upon transfer to a poor solvent in refolding experiments. This collapsed state does not retard the rate-limiting step of folding, and thus the efficient and fast formation of the native state of *Bc-Csp* occurs within milliseconds.

## 7 ABKÜRZUNGEN

AEDANS	5-(((acetylamino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Bc</i> -Csp*	Csp W8Y aus <i>Bacillus caldolyticus</i> ; Pseudo-Wildtypprotein
BSA	Rinderserumalbumin
<i>Bs</i> -CspB	CspB aus <i>Bacillus subtilis</i>
$\Delta C_p$	Änderung der Wärmekapazität bei Entfaltung des Proteins bei konstantem Druck
CAM	carbamoylemethyliert (mit Iodacetamid modifiziert)
CD	Circulardichroismus
Cl-HOBt	6-Chloro-1-hydroxybenzotriazol
Csp	Kälteschockprotein ( <i>cold shock protein</i> )
ddH <sub>2</sub> O	doppeldestilliertes Wasser
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
dYT	doppelt konzentriertes <i>yeast-tryptone</i> Medium
<i>E</i>	Effizienz des Energietransfers
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDANS	5-(2-Aminoethylamino)naphthalin-1-sulfonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Ethylenglykol
ESI-MS	<i>electrospray ionization</i> Massenspektrometrie
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
$\Delta G_U$	freie Enthalpie der Entfaltung
GdmCl	Guanidiniumchlorid
[GdmCl] <sub>M</sub>	GdmCl-Konzentration im Mittelpunkt eines GdmCl-induzierten Übergangs
$\Delta H_U(T_m)$	van't Hoff-Enthalpie bei $T_m$
HCTU	O-(1H-6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorphosphat
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
1,5-IAEDANS	5-(((2-Iodacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
$k_{NU}^0$ bzw. $k_{UN}^0$	Geschwindigkeitskonstante der Ent- bzw. Rückfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels
$m$	Kooperativität des Entfaltungsübergangs, $m = \delta\Delta G_U / \delta[GdmCl]$
$m_{n,u}$	Steigung der Basislinie des nativen bzw. denaturierten Proteins
$m_{NU}$ bzw. $m_{UN}$	kinetischer Kooperativitätsparameter der Ent- bzw. Rückfaltung, $m_{NU} = \delta \ln k_{NU} / \delta[GdmCl]$
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
$\beta$ -ME-AEDANS	Thioether aus $\beta$ -ME und 1,5-IAEDANS

$n$	Brechungsindex
N	nativer Zustand des Proteins
NAWA	N-Acetyl-L-tryptophanamid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG-8000	Polyethylenglykol (mittlere molekulare Masse 8000 g/mol)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
p-Sprung	Drucksprung
$r$	Anisotropie
$R$	Abstand
$R_0$	Förster- oder charakteristischer Transferabstand
$R_{N, Trp}$	Abstand; der Index gibt den Faltungszustand des Proteins und die Fluoreszenzsonde zur Bestimmung des Abstands wieder
$R_{coil}$	Abstand in einer entfalteten Peptidkette
$R_{Kristall}$	Abstand der $C_{\beta}$ -Atome in der Kristallstruktur
RT	Raumtemperatur
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung ( <i>small-angle X-ray scattering</i> )
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
$T_m$	Temperatur im Mittelpunkt des thermischen Übergangs
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin, Hydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp-EDANS	Amid aus Acetyltryptophan und EDANS
T-Sprung	Temperatursprung
U	entfalteter Zustand eines Proteins
U/min	Umdrehungen pro Minute
VE-H <sub>2</sub> O	vollentsalztes Wasser
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X→Y	Varianten von <i>Bc-Csp*</i> mit dem Donor Tryptophan an Position X und dem Akzeptor AEDANS, gekoppelt an ein Cystein an Position Y
X→Y-Tyr	wie X→Y im Hintergrund eines Tyrosin-freien <i>Bc-Csp</i> (W8F/Y15F)
$\alpha$	Nativähnlichkeit des Übergangszustands in Bezug auf die Zugänglichkeit für Lösungsmittel
$\kappa^2$	relative Orientierung der Übergangsdipole der Fluorophore
$\lambda$	apparente Geschwindigkeitskonstante
$[\Theta]_{MRW}$	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure ( $\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ )
$\Phi$	Nativähnlichkeit der Wechselwirkungen einer Seitenkette im Übergangszustand der Faltung
$\phi_{Trp}$	Quantenausbeute von Trp

## 8 LITERATUR

- Albericio, F. & Carpino, L. A. (1997) Coupling reagents and activation. *Methods Enzymol.* **289**, 104-126.
- Alm, E., Morozov, A. V., Kortemme, T. & Baker, D. (2002) Simple physical models connect theory and experiment in protein folding kinetics. *J. Mol. Biol.* **322**, 463-76.
- Arora, P., Oas, T. G. & Myers, J. K. (2004) Fast and faster: A designed variant of the B-domain of protein A folds in 3 microsec. *Protein Sci.* **13**, 847-53.
- Avbelj, F. & Baldwin, R. L. (2004) Origin of the neighboring residue effect on peptide backbone conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10967-72.
- Baker, D. (2000) A surprising simplicity to protein folding. *Nature* **405**, 39-42.
- Baldwin, R. L. (1994) Protein folding. Matching speed and stability. *Nature* **369**, 183-4.
- Baldwin, R. L. (2002) A new perspective on unfolded proteins. *Adv. Protein Chem.* **62**, 361-7.
- Baldwin, R. L. (2003) In search of the energetic role of peptide hydrogen bonds. *J. Biol. Chem.* **278**, 17581-8.
- Baysal, B. M. & Karasz, F. E. (2003) Coil-globule collapse in flexible macromolecules. *Macromol. Theor. Simul.* **12**, 627-646.
- Brand, L. & Witholt, B. (1967) Fluorescence measurements. *Methods Enzymol.* **11**, 776-856.
- Breslow, R. & Guo, T. (1990) Surface tension measurements show that chaotropic salting-in denaturants are not just water-structure breakers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 167-9.
- Burton, R. E., Huang, G. S., Daugherty, M. A., Calderone, T. L. & Oas, T. G. (1997) The energy landscape of a fast-folding protein mapped by Ala→Gly substitutions. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 305-10.
- Buscaglia, M., Schuler, B., Lapidus, L. J., Eaton, W. A. & Hofrichter, J. (2003) Kinetics of intramolecular contact formation in a denatured protein. *J. Mol. Biol.* **332**, 9-12.
- Calderone, T. L., Stevens, R. D. & Oas, T. G. (1996) High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **262**, 407-12.
- Capaldi, A. P., Shastry, M. C., Kleanthous, C., Roder, H. & Radford, S. E. (2001) Ultrarapid mixing experiments reveal that Im7 folds via an on-pathway intermediate. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 68-72.
- Chan, C. K., Hu, Y., Takahashi, S., Rousseau, D. L., Eaton, W. A. & Hofrichter, J. (1997) Submillisecond protein folding kinetics studied by ultrarapid mixing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1779-84.
- Chan, H. S. & Dill, K. A. (1991) Polymer principles in protein structure and stability. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 447-90.
- Chan, H. S. & Dill, K. A. (1998) Protein folding in the landscape perspective: Chevron plots and non-arrhenius kinetics. *Proteins* **30**, 2-33.
- Chaudhuri, T. K., Horii, K., Yoda, T., Arai, M., Nagata, S., Terada, T. P., Uchiyama, H., Ikura, T., Tsumoto, K., Kataoka, H., Matsushima, M., Kuwajima, K. & Kumagai, I. (1999) Effect of the extra n-terminal methionine residue on the stability and folding of recombinant alpha-lactalbumin expressed in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **285**, 1179-94.
- Chen, Y. & Barkley, M. D. (1998) Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* **37**, 9976-82.
- Cheung, M. S., García, A. E. & Onuchic, J. N. (2002) Protein folding mediated by solvation: Water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 685-90.
- Choy, W. Y., Mulder, F. A., Crowhurst, K. A., Muhandiram, D. R., Millett, I. S., Doniach, S., Forman-Kay, J. D. & Kay, L. E. (2002) Distribution of molecular size within an unfolded state ensemble using small-angle x-ray scattering and pulse field gradient NMR techniques. *J. Mol. Biol.* **316**, 101-12.
- Crowhurst, K. A. & Forman-Kay, J. D. (2003) Aromatic and methyl NOEs highlight hydrophobic clustering in the unfolded state of an SH3 domain. *Biochemistry* **42**, 8687-95.
- Dantas, G., Kuhlman, B., Callender, D., Wong, M. & Baker, D. (2003) A large scale test of computational protein design: Folding and stability of nine completely redesigned globular proteins. *J. Mol. Biol.* **332**, 449-60.

- Deniz, A. A., Laurence, T. A., Beligere, G. S., Dahan, M., Martin, A. B., Chemla, D. S., Dawson, P. E., Schultz, P. G. & Weiss, S. (2000) Single-molecule protein folding: Diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5179-84.
- Dill, K. A. & Chan, H. S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 10-9.
- Dobson, C. M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884-90.
- Dobson, C. M., Sali, A. & Karplus, M. (1998) Protein folding: A perspective from theory and experiment. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 868-893.
- Dwyer, M. A., Looger, L. L. & Hellinga, H. W. (2004) Computational design of a biologically active enzyme. *Science* **304**, 1967-71.
- Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**, 1948-54.
- Eftink, M. R., Jia, Y. W., Hu, D. & Ghiron, C. A. (1995) Fluorescence studies with tryptophan analogues - excited-state interactions involving the side-chain amino group. *J. Phys. Chem.* **99**, 5713-5723.
- Englander, S. W. (2000) Protein folding intermediates and pathways studied by hydrogen exchange. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 213-238.
- Ermolenko, D. N. & Makhatadze, G. I. (2002) Bacterial cold-shock proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1902-13.
- Ferguson, N. & Fersht, A. R. (2003) Early events in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 75-81.
- Ferguson, N., Johnson, C. M., Macias, M., Oschkinat, H. & Fersht, A. (2001) Ultrafast folding of WW domains without structured aromatic clusters in the denatured state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13002-7.
- Fersht, A. R. (1995) Optimization of rates of protein folding: The nucleation-condensation mechanism and its implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 10869-73.
- Fersht, A. R., Matouschek, A. & Serrano, L. (1992) The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding. *J. Mol. Biol.* **224**, 771-82.
- Flory, P. J. (1953) Principles of polymer chemistry. Ithaca, New York, Cornell Univ. Press.
- Flory, P. J. (1969) Statistical mechanics of chain molecules. New York, Wiley.
- Förster, T. (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **6**, 55-75.
- Garcia-Mira, M. M., Boehringer, D. & Schmid, F. X. (2004) The folding transition state of the cold shock protein is strongly polarized. *J. Mol. Biol.* **339**, 555-69.
- Gekko, K. & Morikawa, T. (1981a) Preferential hydration of bovine serum albumin in polyhydric alcohol-water mixtures. *J. Biochem. (Tokyo)* **90**, 39-50.
- Gekko, K. & Morikawa, T. (1981b) Thermodynamics of polyol-induced thermal stabilization of chymotrypsinogen. *J. Biochem. (Tokyo)* **90**, 51-60.
- Gilardi, G., Mei, G., Rosato, N., Canters, G. W. & Finazzi-Agro, A. (1994) Unique environment of Trp48 in *Pseudomonas aeruginosa* azurin as probed by site-directed mutagenesis and dynamic fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 1425-32.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-26.
- Gillespie, B. & Plaxco, K. W. (2004) Using protein folding rates to test protein folding theories. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 837-59.
- Goldberg, M. E. (1985) The second translation of the genetic message: Protein folding and assembly. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 388-391.
- Goldenberg, D. P. (2003) Computational simulation of the statistical properties of unfolded proteins. *J. Mol. Biol.* **326**, 1615-33.
- Graumann, P. L. & Marahiel, M. A. (1998) A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 286-90.
- Griko, Y. V., Privalov, P. L., Sturtevant, J. M. & Venyaminov, S. (1988) Cold denaturation of staphylococcal nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 3343-7.
- Gross, E. (1967) The cyanogen bromide reaction. *Methods Enzymol.* **11**, 238-255.
- Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-23.

- Haas, E. (1996) The problem of protein folding and dynamics: Time-resolved dynamic nonradiative excitation energy transfer measurements. *IEEE J. Sel. Topics Quant. Electr.* **2**, 1088-1106.
- Hagen, S. J. & Eaton, W. A. (2000) Two-state expansion and collapse of a polypeptide. *J. Mol. Biol.* **297**, 781-9.
- Haugland, R. P. (2002) Handbook of fluorescent probes and research products. Molecular Probes, Inc.
- Huang, G. S. & Oas, T. G. (1995) Submillisecond folding of monomeric lambda repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6878-82.
- Hudson, E. N. & Weber, G. (1973) Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents. *Biochemistry* **12**, 4154-61.
- Jacob, J., Krantz, B., Dothager, R. S., Thiyagarajan, P. & Sosnick, T. R. (2004) Early collapse is not an obligate step in protein folding. *J. Mol. Biol.* **338**, 369-82.
- Jacob, M., Holtermann, G., Perl, D., Reinstein, J., Schindler, T., Geeves, M. A. & Schmid, F. X. (1999) Microsecond folding of the cold shock protein measured by a pressure-jump technique. *Biochemistry* **38**, 2882-91.
- Jacob, M., Schindler, T., Balbach, J. & Schmid, F. X. (1997) Diffusion control in an elementary protein folding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5622-7.
- Jacob, M. H., Saudan, C., Holtermann, G., Martin, A., Perl, D., Merbach, A. E. & Schmid, F. X. (2002) Water contributes actively to the rapid crossing of a protein unfolding barrier. *J. Mol. Biol.* **318**, 837-45.
- Jäger, M., Nguyen, H., Crane, J. C., Kelly, J. W. & Gruebele, M. (2001) The folding mechanism of a beta-sheet: The WW domain. *J. Mol. Biol.* **311**, 373-93.
- Kamiyama, T., Sadahide, Y., Nogusa, Y. & Gekko, K. (1999) Polyol-induced molten globule of cytochrome c: An evidence for stabilization by hydrophobic interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1434**, 44-57.
- Karanicolas, J. & Brooks, C. L., 3rd (2003) The importance of explicit chain representation in protein folding models: An examination of Ising-like models. *Proteins* **53**, 740-7.
- Karplus, M. & Weaver, D. L. (1994) Protein folding dynamics: The diffusion-collision model and experimental data. *Protein Sci.* **3**, 650-68.
- Kauzmann, W. (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **14**, 1-63.
- Khorasanizadeh, S., Peters, I. D. & Roder, H. (1996) Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 193-205.
- Kim, D. E., Fisher, C. & Baker, D. (2000) A breakdown of symmetry in the folding transition state of protein L. *J. Mol. Biol.* **298**, 971-84.
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L. (1982) Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 459-89.
- Klein-Seetharaman, J., Oikawa, M., Grimshaw, S. B., Wirmer, J., Duchardt, E., Ueda, T., Imoto, T., Smith, L. J., Dobson, C. M. & Schwalbe, H. (2002) Long-range interactions within a nonnative protein. *Science* **295**, 1719-22.
- Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W. & Gillessen, D. (1989) New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.* **30**, 1927-1930.
- Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**, 51-5, 29-32.
- Krantz, B. A., Mayne, L., Rumbley, J., Englander, S. W. & Sosnick, T. R. (2002) Fast and slow intermediate accumulation and the initial barrier mechanism in protein folding. *J. Mol. Biol.* **324**, 359-71.
- Krieger, F., Fierz, B., Bieri, O., Drewello, M. & Kiefhaber, T. (2003) Dynamics of unfolded polypeptide chains as model for the earliest steps in protein folding. *J. Mol. Biol.* **332**, 265-74.
- Kubelka, J., Eaton, W. A. & Hofrichter, J. (2003) Experimental tests of villin subdomain folding simulations. *J. Mol. Biol.* **329**, 625-30.
- Kubelka, J., Hofrichter, J. & Eaton, W. A. (2004) The protein folding 'speed limit'. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 76-88.
- Kuhlman, B. & Baker, D. (2004) Exploring folding free energy landscapes using computational protein design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 89-95.

- Kuhlman, B., Dantas, G., Ireton, G. C., Varani, G., Stoddard, B. L. & Baker, D. (2003) Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. *Science* **302**, 1364-8.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lakowicz, J. R. (1999) Principles of fluorescence spectroscopy. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Lakshmikanth, G. S., Sridevi, K., Krishnamoorthy, G. & Udgaonkar, J. B. (2001) Structure is lost incrementally during the unfolding of barstar. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 799-804.
- Lapidus, L. J., Eaton, W. A. & Hofrichter, J. (2000) Measuring the rate of intramolecular contact formation in polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7220-5.
- Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* **65**, 44-45.
- Levinthal, C. (1969) How to fold graciously. *Mössbauer Spectroscopy in Biological Systems Proceedings* **67**, 22-24.
- Lipman, E. A., Schuler, B., Bakajin, O. & Eaton, W. A. (2003) Single-molecule measurement of protein folding kinetics. *Science* **301**, 1233-5.
- Liu, Y. & Bolen, D. W. (1995) The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* **34**, 12884-91.
- Looger, L. L., Dwyer, M. A., Smith, J. J. & Hellinga, H. W. (2003) Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions. *Nature* **423**, 185-90.
- Lopez, M. M., Yutani, K. & Makhatadze, G. I. (2001) Interactions of the cold shock protein CspB from *Bacillus subtilis* with single-stranded DNA. Importance of the T base content and position within the template. *J. Biol. Chem.* **276**, 15511-8.
- Martin, A., Kather, I. & Schmid, F. X. (2002) Origins of the high stability of an *in vitro*-selected cold-shock protein. *J. Mol. Biol.* **318**, 1341-9.
- Martin, A., Sieber, V. & Schmid, F. X. (2001) *In-vitro* selection of highly stabilized protein variants with optimized surface. *J. Mol. Biol.* **309**, 717-26.
- Matouschek, A., Kellis, J. T., Jr., Serrano, L. & Fersht, A. R. (1989) Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering. *Nature* **340**, 122-6.
- Mayor, U., Grossmann, J. G., Foster, N. W., Freund, S. M. & Fersht, A. R. (2003) The denatured state of engrailed homeodomain under denaturing and native conditions. *J. Mol. Biol.* **333**, 977-91.
- Mayor, U., Johnson, C. M., Daggett, V. & Fersht, A. R. (2000) Protein folding and unfolding in microseconds to nanoseconds by experiment and simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13518-22.
- Miller, E. J., Fischer, K. F. & Marqusee, S. (2002) Experimental evaluation of topological parameters determining protein-folding rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10359-63.
- Millett, I. S., Doniach, S. & Plaxco, K. W. (2002a) Toward a taxonomy of the denatured state: Small angle scattering studies of unfolded proteins. *Adv. Protein Chem.* **62**, 241-62.
- Millett, I. S., Townsley, L. E., Chiti, F., Doniach, S. & Plaxco, K. W. (2002b) Equilibrium collapse and the kinetic 'foldability' of proteins. *Biochemistry* **41**, 321-5.
- Mirsky, A. E. & Pauling, L. (1936) On the structure of native, denatured, and coagulated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **22**, 439-447.
- Morra, G., Hodoscek, M. & Knapp, E. W. (2003) Unfolding of the cold shock protein studied with biased molecular dynamics. *Proteins* **53**, 597-606.
- Mueller, U., Perl, D., Schmid, F. X. & Heinemann, U. (2000) Thermal stability and atomic-resolution crystal structure of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein. *J. Mol. Biol.* **297**, 975-88.
- Munoz, V., Thompson, P. A., Hofrichter, J. & Eaton, W. A. (1997) Folding dynamics and mechanism of beta-hairpin formation. *Nature* **390**, 196-9.
- Myers, J. K. & Oas, T. G. (2002) Mechanism of fast protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 783-815.
- Myers, J. K., Pace, C. N. & Scholtz, J. M. (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* **4**, 2138-48.
- Nar, H., Messerschmidt, A., Huber, R., van de Kamp, M. & Canters, G. W. (1991) Crystal structure analysis of oxidized *Pseudomonas aeruginosa* azurin at pH 5.5 and pH 9.0. A pH-induced conformational transition involves a peptide bond flip. *J. Mol. Biol.* **221**, 765-72.
- Nauli, S., Kuhlman, B. & Baker, D. (2001) Computer-based redesign of a protein folding pathway. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 602-5.

- Nishimura, C., Riley, R., Eastman, P. & Fink, A. L. (2000) Fluorescence energy transfer indicates similar transient and equilibrium intermediates in staphylococcal nuclease folding. *J. Mol. Biol.* **299**, 1133-46.
- Nozaki, Y. & Tanford, C. (1965) The solubility of amino acids and related compounds in aqueous ethylene glycol solutions. *J. Biol. Chem.* **240**, 3568-75.
- Onuchic, J. N., Luthey-Schulten, Z. & Wolynes, P. G. (1997) Theory of protein folding: The energy landscape perspective. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**, 545-600.
- Onuchic, J. N. & Wolynes, P. G. (2004) Theory of protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 70-5.
- Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 321-49.
- Otzen, D. E. & Oliveberg, M. (1999) Salt-induced detour through compact regions of the protein folding landscape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11746-51.
- Pace, C. N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, 266-280.
- Pace, C. N. & Schmid, F. X. (1997) How to determine the molar absorbance coefficient of a protein. In *Protein structure, a practical approach* (Creighton, T. E., ed.). IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, 253-259.
- Pappu, R. V., Srinivasan, R. & Rose, G. D. (2000) The floppy isolated-pair hypothesis is not valid for polypeptide chains: Implications for protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12565-70.
- Parker, M. J. & Marqusee, S. (1999) The cooperativity of burst phase reactions explored. *J. Mol. Biol.* **293**, 1195-210.
- Parker, M. J., Spencer, J. & Clarke, A. R. (1995) An integrated kinetic analysis of intermediates and transition states in protein folding reactions. *J. Mol. Biol.* **253**, 771-86.
- Pearson, D. S., Holtermann, G., Ellison, P., Cremo, C. & Geeves, M. A. (2002) A novel pressure-jump apparatus for the microvolume analysis of protein-ligand and protein-protein interactions: Its application to nucleotide binding to skeletal-muscle and smooth-muscle myosin subfragment-1. *Biochem. J.* **366**, 643-51.
- Perl, D., Holtermann, G. & Schmid, F. X. (2001) Role of the chain termini for the folding transition state of the cold shock protein. *Biochemistry* **40**, 15501-11.
- Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. & Schmid, F. X. (2000) Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 380-3.
- Perl, D., Welker, C., Schindler, T., Schröder, K., Marahiel, M. A., Jaenicke, R. & Schmid, F. X. (1998) Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 229-35.
- Phillips, C. M., Mizutani, Y. & Hochstrasser, R. M. (1995) Ultrafast thermally induced unfolding of RNase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7292-6.
- Plaxco, K. W., Millett, I. S., Segel, D. J., Doniach, S. & Baker, D. (1999) Chain collapse can occur concomitantly with the rate-limiting step in protein folding. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 554-6.
- Plaxco, K. W., Simons, K. T., Ruczinski, I. & Baker, D. (2000) Topology, stability, sequence, and length: Defining the determinants of two-state protein folding kinetics. *Biochemistry* **39**, 11177-83.
- Plumridge, T. H., Steele, G. & Waigh, R. D. (2000) Geometry-based simulation of the hydration of small molecules. *PhysChemComm* **3**, 36-41.
- Prakash, V., Loucheux, C., Scheufele, S., Gorbunoff, M. J. & Timasheff, S. N. (1981) Interactions of proteins with solvent components in 8 M urea. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 455-64.
- Privalov, P. L. (1993) Physical basis of the stability of the folded conformations of proteins. In *Protein folding* (Creighton, T. E., ed.). Freeman, New York.
- Qi, P. X., Sosnick, T. R. & Englander, S. W. (1998) The burst phase in ribonuclease A folding and solvent dependence of the unfolded state. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 882-4.
- Qin, Z., Ervin, J., Larios, E., Gruebele, M. & Kihara, H. (2002) Formation of a compact structured ensemble without fluorescence signature early during ubiquitin folding. *J. Phys. Chem. B* **106**, 13040-13046.
- Qiu, L., Zachariah, C. & Hagen, S. J. (2003) Fast chain contraction during protein folding: "foldability" and collapse dynamics. *Phys. Rev. Lett.* **90**, 168103.
- Rank, J. A. & Baker, D. (1997) A desolvation barrier to hydrophobic cluster formation may contribute to the rate-limiting step in protein folding. *Protein Sci.* **6**, 347-54.
- Rape, M. (1999) Fluoreszenz-Energietransfer zur Analyse der Faltung des Kälteschockproteins aus *Bacillus caldolyticus*. *Diplomarbeit*, Universität Bayreuth

- Rhoades, E., Gussakovsky, E. & Haran, G. (2003) Watching proteins fold one molecule at a time. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3197-202.
- Roder, H. & Colon, W. (1997) Kinetic role of early intermediates in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 15-28.
- Roder, H., Elöve, G. A. & Shastry, M. C. R. (2000) Early stages of protein folding. In *Mechanisms of protein folding* (Pain, R. H., ed.). Oxford University Press, 65-104.
- Rogers, D. M. & Hirst, J. D. (2004) Calculations of protein circular dichroism from first principles. *Chirality* **16**, 234-43.
- Ruggiero, A. J., Todd, D. C. & Fleming, G. R. (1990) Subpicosecond fluorescence anisotropy studies of tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1003-1014.
- Russel, M. & Model, P. (1984) Replacement of the fip gene of *Escherichia coli* by an inactive gene cloned on a plasmid. *J. Bacteriol.* **159**, 1034-9.
- Sabelko, J., Ervin, J. & Gruebele, M. (1999) Observation of strange kinetics in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6031-6.
- Sali, A., Shakhnovich, E. & Karplus, M. (1994a) How does a protein fold? *Nature* **369**, 248-51.
- Sali, A., Shakhnovich, E. & Karplus, M. (1994b) Kinetics of protein folding. A lattice model study of the requirements for folding to the native state. *J. Mol. Biol.* **235**, 1614-36.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez, I. E. & Kiefhaber, T. (2003) Evidence for sequential barriers and obligatory intermediates in apparent two-state protein folding. *J. Mol. Biol.* **325**, 367-76.
- Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**, 8063-8068.
- Scalley-Kim, M. & Baker, D. (2004) Characterization of the folding energy landscapes of computer generated proteins suggests high folding free energy barriers and cooperativity may be consequences of natural selection. *J. Mol. Biol.* **338**, 573-83.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-79.
- Schellman, J. A. (1978) Solvent denaturation. *Biopolymers* **17**, 1305-1322.
- Schindelin, H., Herrler, M., Willimsky, G., Marahiel, M. A. & Heinemann, U. (1992) Overproduction, crystallization, and preliminary x-ray diffraction studies of the major cold shock protein from *Bacillus subtilis*, CspB. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **14**, 120-4.
- Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. A. & Schmid, F. X. (1995) Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 663-73.
- Schmid, F. X. (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Protein structure, a practical approach* (Creighton, T. E., ed.). IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, 261-297.
- Schmid, F. X. (1999) Protein folding. In *Protein: A comprehensive treatise* (Allen, G., ed.). JAI Press Inc., Greenwich, Connecticut, **2**, 153-215.
- Schnuchel, A., Wiltschek, R., Czisch, M., Herrler, M., Willimsky, G., Graumann, P., Marahiel, M. A. & Holak, T. A. (1993) Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nature* **364**, 169-71.
- Schonbrun, J. & Dill, K. A. (2003) Fast protein folding kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12678-82.
- Schuler, B., Lipman, E. A. & Eaton, W. A. (2002) Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature* **419**, 743-7.
- Schultz, D. A. & Baldwin, R. L. (1992) Cis proline mutants of ribonuclease A. I. Thermal stability. *Protein Sci.* **1**, 910-6.
- Selvin, P. R. (2000) The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 730-4.
- Shastry, M. C., Luck, S. D. & Roder, H. (1998) A continuous-flow capillary mixing method to monitor reactions on the microsecond time scale. *Biophys. J.* **74**, 2714-21.
- Shortle, D. (2002) The expanded denatured state: An ensemble of conformations trapped in a locally encoded topological space. *Adv. Protein Chem.* **62**, 1-23.

- Shortle, D. & Ackerman, M. S. (2001) Persistence of native-like topology in a denatured protein in 8 M urea. *Science* **293**, 487-9.
- Sibanda, B. L. & Thornton, J. M. (1985) Beta-hairpin families in globular proteins. *Nature* **316**, 170-4.
- Sosnick, T. R., Shtilerman, M. D., Mayne, L. & Englander, S. W. (1997) Ultrafast signals in protein folding and the polypeptide contracted state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8545-50.
- Spruijt, R. B., Wolfs, C. J., Verver, J. W. & Hemminga, M. A. (1996) Accessibility and environment probing using cysteine residues introduced along the putative transmembrane domain of the major coat protein of bacteriophage M13. *Biochemistry* **35**, 10383-91.
- Sreerama, N., Manning, M. C., Powers, M. E., Zhang, J. X., Goldenberg, D. P. & Woody, R. W. (1999) Tyrosine, phenylalanine, and disulfide contributions to the circular dichroism of proteins: Circular dichroism spectra of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* **38**, 10814-22.
- Still, W. C., Kahn, M. & Mitra, A. (1978) Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **43**, 2923-2925.
- Stryer, L. (1965) The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J. Mol. Biol.* **13**, 482-95.
- Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 819-46.
- Szabo, A. G., Stepanik, T. M., Wayner, D. M. & Young, N. M. (1983) Conformational heterogeneity of the copper binding site in azurin. A time-resolved fluorescence study. *Biophys. J.* **41**, 233-44.
- Tanford, C. (1968) Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **23**, 121-282.
- Thompson, P. A., Eaton, W. A. & Hofrichter, J. (1997) Laser temperature jump study of the helix  $\rightleftharpoons$  coil kinetics of an alanine peptide interpreted with a 'kinetic zipper' model. *Biochemistry* **36**, 9200-10.
- Timasheff, S. N. (2002) Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. *Biochemistry* **41**, 13473-82.
- Timasheff, S. N. & Arakawa, T. (1997) Stabilization of protein structure by solvents. In *Protein structure, a practical approach* (Creighton, T. E., ed.). IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, 349-364.
- Tonomura, B., Nakatani, H., Ohnishi, M., Yamaguchi-Ito, J. & Hiromi, K. (1978) Test reactions for a stopped-flow apparatus. Reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol and potassium ferricyanide by L-ascorbic acid. *Anal. Biochem.* **84**, 370-83.
- Uversky, V. N. (2002) What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* **269**, 2-12.
- Uversky, V. N. & Fink, A. L. (2002) The chicken-egg scenario of protein folding revisited. *FEBS Lett.* **515**, 79-83.
- Uzawa, T., Akiyama, S., Kimura, T., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I. & Fujisawa, T. (2004) Collapse and search dynamics of apomyoglobin folding revealed by submillisecond observations of alpha-helical content and compactness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1171-6.
- Wang, M., Tang, Y., Sato, S., Vugmeyster, L., McKnight, C. J. & Raleigh, D. P. (2003a) Dynamic NMR line-shape analysis demonstrates that the villin headpiece subdomain folds on the microsecond time scale. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6032-3.
- Wang, T., Du, D. & Gai, F. (2003b) Helix-coil kinetics of two 14-residue peptides. *Chem. Phys. Lett.* **370**, 842-848.
- Wang, X. B., Yang, X., Nicholas, J. B. & Wang, L. S. (2001) Bulk-like features in the photoemission spectra of hydrated doubly charged anion clusters. *Science* **294**, 1322-5.
- Weikl, T. R. & Dill, K. A. (2003) Folding rates and low-entropy-loss routes of two-state proteins. *J. Mol. Biol.* **329**, 585-98.
- Wolynes, P. G., Onuchic, J. N. & Thirumalai, D. (1995) Navigating the folding routes. *Science* **267**, 1619-20.
- Wu, P. & Brand, L. (1994) Resonance energy transfer: Methods and applications. *Anal. Biochem.* **218**, 1-13.
- Yi, Q., Scalley-Kim, M. L., Alm, E. J. & Baker, D. (2000) NMR characterization of residual structure in the denatured state of protein I. *J. Mol. Biol.* **299**, 1341-51.
- Zagrovic, B., Snow, C. D., Shirts, M. R. & Pande, V. S. (2002) Simulation of folding of a small alpha-helical protein in atomistic detail using worldwide-distributed computing. *J. Mol. Biol.* **323**, 927-37.

- Zeeb, M. (2004) Strukturbiologische Untersuchungen und Faltungsstudien von Modellproteinen mittels NMR-Spektroskopie. *Dissertation*, Universität Bayreuth
- Zeeb, M. & Balbach, J. (2003) Single-stranded DNA binding of the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis*: NMR mapping and mutational characterization. *Protein Sci.* **12**, 112-23.
- Zwanzig, R. (1997) Two-state models of protein folding kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 148-50.

## 9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Franz Schmid für die Möglichkeit, dieses herausfordernde Thema zu bearbeiten, und für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Er hat durch sein stetes Interesse, zahllose gute Hinweise und seine ständige Diskussionsbereitschaft erheblichen Anteil an dieser Arbeit.

Für die gute Zusammenarbeit im Labor und für viele Tips möchte ich den Laborkolleginnen und -kollegen Jochen Balbach, Barbara Eckert, María del Mar García-Mira, Insa Kather, Christian Löw, Raimund Maier, Andreas Martin, Dieter Perl, Michael Wunderlich und Markus Zeeb danken. Bei Bettina Theissen und Michael Rape bedanke ich mich für ihren Einsatz im Rahmen von Diplomarbeiten.

Vielen Dank an Herrn Georg Holtermann und die ganze Arbeitsgruppe von Herrn PD Jochen Reinstein am MPI für molekulare Physiologie in Dortmund für die Gastfreundschaft und zahlreiche Drucksprungmessungen.

Am NIH (Bethesda, USA) bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. William A. Eaton und besonders bei Herrn Jan Kubelka für die große Ausdauer bei der Optimierung der Temperatursprungmessungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Carlo Unverzagt und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die Benutzung des ESI-Massenspektrometers bedanken. Xaver Schratt und Stefano Mezzato danke ich für die Einweisung am ESI-Massenspektrometer. Außerdem danke ich Manuela Schaffrath für ihre Hilfe bei der Synthese von Trp-EDANS.

Mein Dank gilt Frau Dagmar Klostermeier und Herrn Maik Jacob für zahlreiche Informationen und wichtige Ratschläge. Danke auch an Herrn Prof. Dr. Terrence G. Oas für lebhafte Diskussionen zum kollabierten Zustand.

Außerdem danke ich allen im universitären und privaten Umfeld, die mich in irgendeiner Form bei dieser Arbeit unterstützt haben.



## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, daß ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 20. Oktober 2004