

## 2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten FTIR-spektroskopische Messungen zur Struktur des Modellproteins RNase T1 durchgeführt werden. Im einzelnen sollten hierbei folgende Ziele verfolgt werden:

- Das Enzym RNase T1 sollte erstmals an den Kohlenstoffatomen der Carbonylgruppen aller vier im Protein vorkommenden Proline mit dem schweren Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  markiert werden. Hierzu sollte ein Expressionssystem für die RNase T1 in dem prolinauxotrophen Hefestamm *S. cerevisiae* DT1103 etabliert werden. Aufgrund des unterschiedlichen Expressionsverhaltens von *S. cerevisiae* im Vergleich zu *E. coli*, aus dem bisher die RNase T1 rekombinant isoliert worden war, war ebenfalls die Entwicklung eines geeigneten Aufreinigungsprotokolls notwendig, das für die IR-spektroskopischen Messungen ein hochreines Produkt liefert.
- Der Einfluss der Isotopenmarkierungen auf die Schwingungsspektren der RNase T1 sollte zunächst unter Bedingungen des thermodynamischen Gleichgewichts untersucht und anschließend auf Grundlage der Kristallstruktur des Proteins und theoretischer Überlegungen bzw. computersimulierter IR-Spektren diskutiert werden.
- Es war zu erwarten, dass die Ausbeuten an isotopenmarkierter RNase T1 im Bereich weniger Milligramm liegen würden. Die bisher für die kinetischen Experimente (siehe unten) verwendete Temperatursprungapparatur ist für Messungen mit Probenmengen in einem so geringen Maßstab ungeeignet und weist darüber hinaus Unzulänglichkeiten hinsichtlich der Handhabung und Zuverlässigkeit auf. Aus diesem Grunde sollte eine neue bzw. weiterentwickelte Temperatursprungapparatur zur Durchführung der geplanten Experimente konzipiert werden.
- Einen weiteren Schwerpunkt der FTIR-spektroskopischen Untersuchungen sollten Faltexperimente unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen in Form so genannter Temperatursprünge bilden. Temperaturinduzierte Rückfaltungsexperimente mit der RNase T1 hatten bereits gezeigt, dass die Proline an den Positionen 39 und 55 einen entscheidenden Einfluss auf die Kinetik der Rückfaltung des Proteins haben. Diese erreichen ihre native Konformation nämlich nur durch eine für den gesamten Rückfaltungsprozess geschwindigkeitsbestimmende *trans*→*cis*-Isomerisierungsreaktion, die bisher noch nicht IR-spektroskopisch verfolgt werden konnte. Durch die Isotopenmarkierung sollte es nun möglich werden diese *trans*→*cis*-Isomerisierung anhand spezifischer Banden in den Schwingungsspektren zu detektieren.

## 2 Zielsetzung