

4 Methoden

4.1 Proteinexpression und -aufreinigung

Das Modellprotein RNase T1 ist in dieser Arbeit Ziel FTIR-spektroskopischer Strukturuntersuchungen. Hierfür sollte es zum ersten Mal an den Kohlenstoffatomen der Carbonylgruppen aller vier Proline mit dem schweren Kohlenstoffisotop ^{13}C markiert werden.

In den folgenden Kapiteln wird beschrieben, mit welchen Methoden sowohl die unmarkierte als auch die ^{13}C -markierte RNase T1 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) exprimiert und für FTIR-spektroskopische Untersuchungen aufgereinigt werden kann. Sämtliche mikrobiologischen und ein Teil der biochemischen Arbeiten wurden während eines sechsmonatigen Aufenthaltes an der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Uli Hahn durchgeführt. Die endgültige Aufreinigung der ^{13}C -markierten und unmarkierten RNase T1 erfolgte am Robert Koch-Institut in Berlin.

4.1.1 Expressionssystem

S. cerevisiae ist ein einzelliger Hefepilz, der sich durch Sprossung vermehrt (ein guter Übersichtsartikel ist [79]). Er ist nicht pathogen, stellt nur einfache Ansprüche an seine Nährstoffquelle und zeichnet sich durch eine schnelle Generationszeit aus (die Zellen teilen sich etwa alle zwei Stunden). Im Vergleich zu anderen Eukaryonten besitzt *S. cerevisiae* nur ein verhältnismäßig kleines Genom. Es ist etwa vier mal so groß, wie das von *E. coli* aber ungefähr 200-mal kleiner als die meisten Säugetiergenome, so dass es sich relativ einfach untersuchen lässt. Bei Hefen kann man sowohl den diploiden als auch den haploiden Zustand aufrecht erhalten. Da im haploiden Zustand auch rezessive Mutationen zur Ausprägung kommen, sind bei *S. cerevisiae* sehr viele Auxotrophievarianten bekannt. Hierbei handelt es sich um Stämme, die nicht dazu in der Lage sind, bestimmte Stoffwechselprodukte selbst zu synthetisieren. Es liegt deshalb nahe, eine prolinauxotrophe Mutante von *S. cerevisiae* mit einem Vektor zu transformieren, der ein Gen für die Expression von RNase T1 trägt. Je nach Zugabe von ^{13}C -markiertem oder unmarkiertem Prolin zum Kulturmedium, wird dieses in alle vom Organismus synthetisierten Proteine eingebaut. Angesichts der Toxizität der RNase T1 muss die Expression ins Kulturmedium erfolgen. Da Hefen von Natur aus einige Proteine (zum Beispiel den α -Faktor) ins Medium sekretieren, kann man auch fremde Proteingene mit Signalen ausstatten, die bewirken, dass das entsprechende Protein ins Medium ausgeschleust wird.

4.1.1.1 Kultivierung von *S. cerevisiae* DT1103

Der prolinauxotrophe Hefestamm *S. cerevisiae* DT1103 wurde freundlicherweise von Dr. Marion C. Brandriss (New Jersey Medical School) zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm weist neben einer Prolinauxotrophie auch noch eine Uraciluxotrophie auf. Die Kultivierung erfolgte deshalb auf Medium 1, dem sowohl Prolin als einzige Aminosäure als auch Uracil zugesetzt wurden.

4.1.1.2 Transformation von *S. cerevisiae* DT1103 mit pDP(α)T1

Der Expressionsvektor pDP(α)T1 für RNase T1 in *S. cerevisiae* wurde freundlicherweise von Prof. Uli Hahn (Leipzig) zur Verfügung gestellt [80]. Hierbei handelt es sich um ein episomales Hefepiasmid (pYeDP60) [81], in das das für die RNase T1 kodierende Gen direkt hinter die präpro-Region des α -Faktors kloniert wurde [82]. Letztere sorgt dafür, dass die für den Hefeorganismus toxische RNase T1 ins Medium sekretiert wird. Die Transkription des RNase T1-Gens wird über den GAL10-Promotor mit Galaktose reguliert, das heißt die Proteinexpression erfolgt erst nachdem Galaktose dem Medium zugegeben wird [83]. Weiterhin verfügt das Plasmid pDP(α)T1 über das Selektionsmarker-gen (URA3), das die Uraciluxotrophie von *S. cerevisiae* DT1103 komplementiert.

Der Hefestamm *S. cerevisiae* DT1103 wurde mit dem Plasmid pDP(α)T1 nach der so genannten Lithiumacetatmethode transformiert [84]. Hierzu wurde eine Impföse einer höchstens sieben Tage alten Hefekultur *S. cerevisiae* DT1103 in Wasser suspendiert und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 mM LiAc resuspendiert und 5 min bei 30°C inkubiert. Nach weiteren 5 min wurde erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das so erhaltene Pellet wurde mit folgendem Ansatz suspendiert:

- 240 μ L PEG 4000 (50% w/v)
- 36 μ L LiAc
- 25 μ L ss-DNA (2 mg/mL DNA 10 min bei 95°C denaturiert)
- 5 μ L Plasmid-DNA (0,1 bis 5 μ g/ μ L)
- 45 μ L H₂O.

Anschließend wurde es zunächst für 30 min bei 30°C, dann weitere 30 min bei 42°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 400 μ L H₂O resuspendiert. Die Zellen wurden dann auf Medium 2 ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Nach 3 bis 4 Tagen erschienen die ersten transformierten *S. cerevisiae* DT1103 Kolonien auf der Platte. Durch die Abwesenheit von Uracil im Medium 2 wurden auf der Platte nur die Hefezellen selektiert, die zuvor mit dem Plasmid pDP(α)T1 transformiert worden waren.

4.1.1.3 Test auf RNase-T1-Expression und Revertanten

Zum Test auf RNase-T1-Expression wurden die transformierten Hefen auf Medium 3 ausplattiert. Die Kohlenstoffquelle Glukose ist in diesem Medium durch Galaktose

ersetzt. Die Galaktose bindet an den reprimierten GAL10-Promotor auf dem Plasmid pDP(α)T1 und kontrolliert somit die RNase-T1-Transkription und -Expression. Als Substrat für die RNase T1 ist dem Medium Hefe-RNA zugesetzt und zusätzlich noch ein pH-Indikator (Toluidinblau-O). Die durch die RNA-Spaltung (siehe Kapitel 1.1.4.1) bedingte Zunahme der Azidität im Medium führt zu einem Farbumschlag des Indikators von blau nach rot [85]. Um die Hefekolonien herum bildeten sich rote Höfe und deuteten auf eine RNase-T1-Expression hin. Zur Kontrolle wurden nicht-transformierte Hefezellen auf Medium 4 ausplattiert. Im Gegensatz zu den transformierten Hefezellen durften sich hier keine roten Höfe bilden.

Damit gewährleistet werden konnte, dass die RNase T1 zu 100 % an den Prolinen ^{13}C -markiert worden war, wurden die transformierten Hefen von Zeit zu Zeit auf Revertanten getestet, das heißt auf einen Verlust der Prolinauxotrophie. Hierfür wurden die transformierten *S. cerevisiae* DT1103 auf Medium 5 (ohne Prolin) kultiviert. Die Zellen durften hier weder wachsen noch durften sich roten Höfe bilden. Revertanten konnten zu keinem Zeitpunkt detektiert werden.

4.1.1.4 Flüssigkultivierung von *S. cerevisiae* DT1103

Zur Vorbereitung auf eine Flüssigkultivierung wurde eine transformierte Einzelkolonie von *S. cerevisiae* DT1103 auf Medium 2 ausplattiert und über Nacht bei 30°C wachsen gelassen. Von dieser Kultur wurde eine volle Impföse in ca. 20 mL Vorkultur übertragen und weitere 24 Stunden bei 30°C im Schüttler inkubiert. Mit je 4 mL Vorkultur wurden dann vier 800 mL Hauptkulturen in 2 L-Schikanekolben angeimpft. Die Hauptkulturen wurden vier Tage im Schüttler bei 30°C inkubiert.

In Anbetracht der hohen Kosten für ^{13}C -markiertes Prolin, wurde die Zusammensetzung der Hauptkultur auf ein möglichst dichtes Wachstum der Hefezellen, bei einem möglichst geringem Prolineinsatz optimiert. Zur Bestimmung der Wachstumsdichte wurden Messungen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Photometer durchgeführt (OD_{600}).

Ein weiterer wichtiger Punkt betraf die Regulierung der RNase-T1-Expression durch den GAL-Promotor. Für eine effizienter Regulierung wurde auf eine bereits in der Literatur beschriebene Methode zurückgegriffen, die für die Expression von RNase T1 aus *S. cerevisiae* DT1103 leicht modifiziert wurde [81].

Die RNase-T1-Aktivität wurde mit Medium-5-Platten abgeschätzt, in die Löcher mit ca. 5 mm Durchmesser gestanzt wurden. In diese Löcher wurden je 50 μL Kultur gegeben, anschließend wurden die Platten ca. 2 Stunden bei 37°C inkubiert und die RNase-T1-Expression der jeweiligen Kultur nach dem Grad der Rotfärbung der Höfe semiquantitativ nach Augenmaß bewertet.

4.1.2 Aufreinigungsprozedur

E. coli hat sich als gängiges Expressionssystem für RNase-T1-Wildtyp und Varianten etabliert [38, 78, 86, 87]. Die Expression des toxischen Enzyms erfolgt dabei ins Periplasma. Durch ein vorsichtiges Abzentrifugieren der Zellen mit anschließender Lyse

4 Methoden

erhält man den RNase T1-Wildtyp nach einer Anionenaustauscher- und Gelfiltrationschromatographie in Ausbeuten von ca. 30 mg/L Kulturmedium [87].

Die in dieser Arbeit beschriebene Expression von RNase T1 aus Prolin auxotrophen Hefen, erforderte die Entwicklung eines vollständig neuen Aufreinigungsprotokolls. Hierbei galt es insbesondere folgende Punkte zu beachten:

1. Hefen sind allgemein schlechtere Expressionssysteme für rekombinante Proteine als *E. coli* [88]. Die zu erwartende Ausbeute an RNase T1 wurde noch dadurch geschmälert, dass der prolinauxotrophe Stamm *S. cerevisiae* DT1103 auf Minimalmedium (ohne jegliche Aminosäuren) kultiviert werden musste, um einen vollständigen Einbau von ^{13}C -markiertem und unmarkiertem Prolin zu gewährleisten. Zusätzlich stand das Prolin den Hefen aus ökonomischen Gründen nicht im Überschuss zur Verfügung, sondern ist in dem Maße angeboten worden, dass gerade noch ein effizientes Wachstum der Zellen erreicht wurde.
2. Der mit dem Vektor pDP(α)T1 transformierte Hefestamm *S. cerevisiae* DT1103 exprimiert die RNase T1 ins Kulturmedium. Im Gegensatz zu *E. coli*, wo die Expression ins Periplasma dirigiert ist, musste bei Verwendung von Hefen als Expressionssystem, das Enzym aus einer weitaus komplexeren Matrix isoliert werden. Hierbei stellt zum einen die Vielfalt weiterer, ins Kulturmedium sekretierter Proteine und Stoffwechselprodukte ein Problem dar und zum anderen, die damit verbundene hohe Ionenstärke der Lösung.
3. Bei der IR-spektroskopischen Strukturuntersuchung der ^{13}C -markierten und unmarkierten RNase T1, sollten kleinste spektrale Unterschiede zwischen diesen beiden Spezies detektiert werden. Es musste also ein System zur Aufreinigung der beiden Enzyme Verwendung finden, mit dem sich kleinste Mengen Protein (im μg -Bereich) in hoher Reinheit reproduzierbar isolieren und mengenmäßig erfassen lassen.

4.1.2.1 Chromatographische Methoden

Die Hauptkultur wurde auf Enzymaktivität getestet und anschließend bei 8000 g und 4 °C 20 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert und zunächst gegen deionisiertes Wasser, dann gegen TE 25-Puffer dialysiert, um die Ionenstärke der Lösung herabzusetzen. Die RNase T1 (pI 4,5 [43]) konnte nun mit verschiedenen chromatographischen Methoden aufgereinigt werden:

Anionenaustauscher- und Gelfiltrationschromatographie Die dialysierte Lösung wurde mit einer Flussrate von 5 mL/min auf eine DEAE-Fractogel-Anionenaustauschersäule (3 × 16 cm) geladen, die zuvor mit dem TE 25-Puffer äquilibriert worden war. Im Durchlauf konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden (Medium 5). Nach dem Waschen der Säule mit 5 Säulenvolumina Waschpuffer, wurde anschließend bei einer Flussrate von 3 mL/min isochratisch mit dem Elutionspuffer eluiert. Die Elution wurde mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 278 nm verfolgt.

Weil über die gesamte Breite des eluierten Peaks Enzymaktivität ermittelt werden konnte (Medium 5), wurde der ganze Peak als ca. 100-mL-Fraktion gesammelt.

Das Eluat der Anionenaustauschersäule wurde anschließend entweder auf einer G 25-Gelfiltrationssäule (5 × 35 cm) oder durch Dialyse entsalzt. Bei beiden Verfahren wurde eine 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung (pH 7,9) verwendet. Die entsalzte Lösung wurde schließlich zur Einengung in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC) Die *reversed phase* (RP) oder Umkehrphasenchromatographie in Verbindung mit HPLC (*high performance liquid chromatography*) hat sich in den letzten Jahren zu einem Standardverfahren in der Analytik kleiner hydrophiler Peptide und Proteine entwickelt. Im Gegensatz zur Normalphasenchromatographie, bei der die stationäre Phase polar ist, ist diese bei der RP-HPLC unpolar. Die Trennung erfolgt durch Wechselwirkungen zwischen dem hydrophoben Trägermaterial und entsprechenden Bereichen im Protein [89]. Substanzen mit hydrophoben Oberflächenbereichen werden reversibel an die hydrophoben Alkylketten des RP-Materials gebunden. Durch die Erhöhung des organischen Anteils im Eluenten kommt es zur Verringerung der Molekülhydrathülle und damit zur Desorption und chromatographischen Auftrennung der Substanzen nach ihrer Hydrophobizität. Die hohe Auflösung der RP-HPLC wurde bei der Trennung verschiedener Insulinvarianten unter Beweis gestellt, die sich nur in einer Aminosäure voneinander unterscheiden [90]. Neben ihrer Trenneffizienz wird die RP-HPLC auch aufgrund ihrer hohen Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit in Zukunft in der Proteomforschung, insbesondere in Verbindung mit der Massenspektrometrie, eine immer wichtigere Rolle spielen [91, 92].¹

Der Handel bietet für die RP-HPLC Trennsäulen vom analytischen bis hin zum präparativen Maßstab an. Es wurde zunächst auf eine semipräparative Säule auf Kieselgelbasis mit Octylphase (C 8) einer Länge von 300 mm, einem Innendurchmesser von 15 mm, einer Porengröße von 300 Å und einem Korngröße von 7 µm zurückgegriffen. Zunächst wurde die lyophilisierte Probe in 1 bis 1,5 mL H₂O aufgenommen und filtriert (0,45 µm). Die Lösung konnte nun in bis zu 500 µL großen Portionen auf die Trennsäule aufgegeben werden. Als Elutionsmittel wurden, wie für diesen Säulentyp üblicherweise empfohlen, Acetonitril (AcN)/Wasser Gemische mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) verwendet.

Abbildung 4.1 auf der nächsten Seite zeigt das RP-HPLC-Chromatogramm einer RNase-T1-haltigen Fraktion nach der Anionenaustauscherchromatographie. Nach Aufgabe der Probe wurde die Säule zunächst 20 min lang mit einer 30 %igen AcN/H₂O-Mischung bei einer Flussrate von 3 mL/min gespült, um nicht an die Säule bindende Komponenten zu entfernen. Anschließend wurde die AcN Konzentration innerhalb von 20 min auf 50 % erhöht und die Trennung bei 278 nm photometrisch verfolgt.

¹Aufgrund des hydrophoben Charakters des Säulenmaterials und des hohen Anteils organischen Lösemittels wird die RP-HPLC fast ausschließlich für vergleichsweise kleine Proteine und Peptide verwendet.

4 Methoden

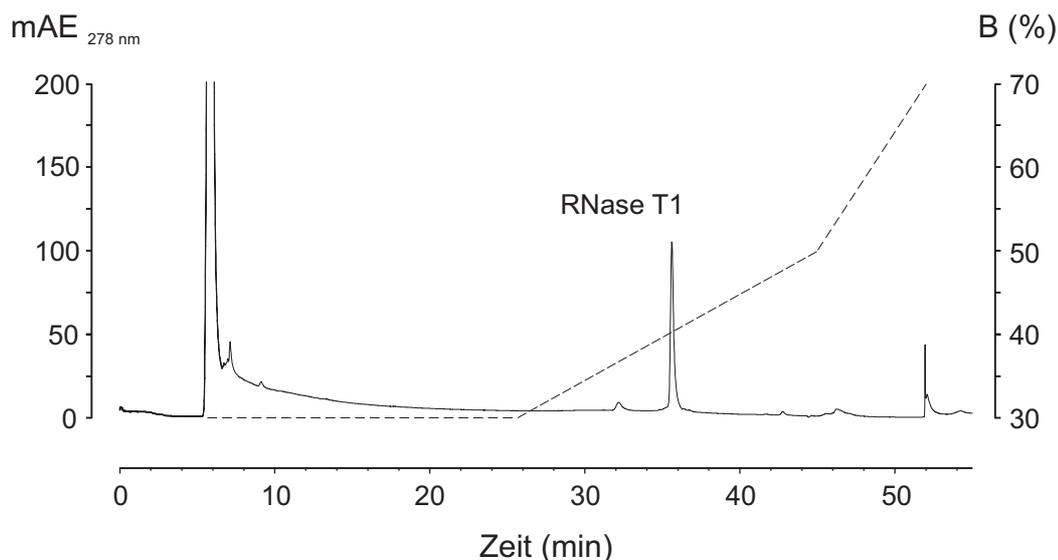


Abbildung 4.1: RP-HPLC-Chromatogramm von aus Hefen exprimierter RNase T1 nach der ersten Aufreinigung über eine Anionenaustauschersäule. Den Eluenten H₂O und AcN wurde TFA 0,1 %ig zugesetzt. Die gestrichelte Linie zeigt die Lösemittelzusammensetzung an.

Die RNase T1 wurde bei einer Konzentration von 42 % AcN eluiert, gesammelt, 12 h gegen H₂O dialysiert, eingefroren und lyophilisiert. Das lyophilisierte Protein wurde in D₂O-Cacodylatpuffer (pH 7) aufgenommen, in einer CaF₂-Küvette bei 70 °C thermisch entfaltet und dadurch H-/D-ausgetauscht (siehe auch Kapitel 1.2.3.2).

Abbildung 4.2 auf der nächsten Seite zeigt das IR-Spektrum der nach der gerade beschriebenen Methode aus den Hefen aufgereinigten RNase T1. Im Unterschied zu dem in *E. coli* exprimierten Protein weist das IR-Spektrum von in Hefen exprimierter RNase T1 eine starke Absorptionsbande bei 1672 cm⁻¹ auf. Diese C=O-Streckschwingungsbande stammt von der TFA, die noch in Resten an das Protein gebunden war. Leider ließ sie sich durch eine Dialyse gegen H₂O nie vollständig vom Protein entfernen. Auch eine Dialyse gegen 0,1 M HCl, um die TFA quantitativ abzutrennen, brachte keinen Erfolg.² Nur eine Dialyse oder Gelfiltration mit 0,1 M Ammoniumbicarbonatlösung nach vorheriger thermischer Entfaltung konnte die TFA vollständig von der RNase T1 entfernen. Leider waren sämtliche Schritte, die auf diese Weise zu einem reinen Produkt führten, aufgrund der geringen Menge an aufgereinigtem Protein mit erheblichem Substanzverlust verbunden (bis zu 50 %).

Aus diesem Grunde wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die es erlaubt, vollkommen auf TFA bei der RP-HPLC zu verzichten. Die TFA fungiert bei der RP-

²Mündliche Mitteilung von Herrn Dr. Michael Beyermann (Forschungszentrum für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin). Diese Methode wird am FMP erfolgreich zur Entfernung von TFA aus Peptidproben nach der automatischen Peptidsynthese und anschließender RP-HPLC-Reinigung eingesetzt.

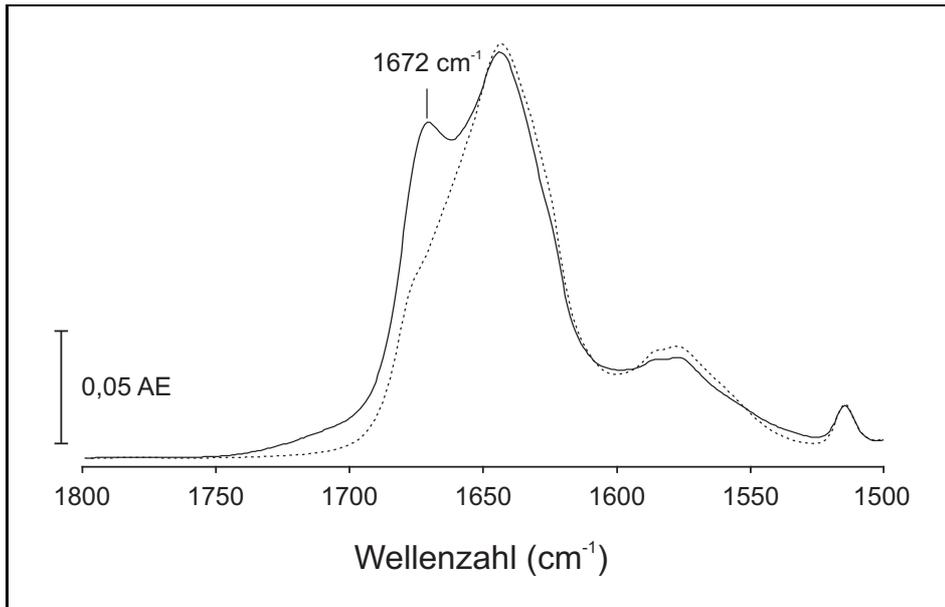


Abbildung 4.2: IR-Spektren von vollständig H-/D-ausgetauschter RNase T1 aus *S. cerevisiae* (durchgezogene Linie) in einer 50 μm Küvette nach der RP-HPLC-Aufreinigung mit TFA als Ionenpaarbildner. Zum Vergleich das Spektrum der nach der herkömmlichen Methode [78] aus *E. coli* isolierten RNase T1 (gestrichelte Linie).

HPLC als Ionenpaarbildner und beeinflusst auf diese Weise die Hydrophobizität der zu trennenden Substanzen. Diverse Versuche die TFA zu ersetzen – zum Beispiel mit Ameisensäure, Essigsäure, Salzsäure und Acetatpuffer – bzw. ganz auf sie zu verzichten, brachten entweder keine befriedigende Auftrennung der Komponenten oder führten zu überhaupt keiner Bindung der RNase T1 an die Säule. Die Endreinigung der RNase T1 wurde schließlich mit einer Octadecylphase (C18) auf Basis eines mit Divinylbenzol quervernetzten Polystyrolharzes (NUCLEOGEL RP 100-8 C 18, Porendurchmesser 100 \AA , Korngröße 8 μm , Länge 300 mm, Innendurchmesser 7,7 mm) durchgeführt. C 18-Phasen sind sehr hydrophob und weisen deshalb eine gänzlich andere Selektivität auf als C 4- oder C 8-Phasen. Mit dieser Trennsäule gelang die Aufreinigung der RNase T1 ohne den Zusatz von TFA und einer damit verbundenen Kontamination der Probe.

Die Probenaufgabe erfolgte in bis zu 500 μL großen Volumina. Als Eluenten wurden einerseits 50 mM Ammoniumbicarbonat in H_2O (Eluent A) und andererseits 60 % AcN in H_2O (Eluent B) verwendet. Abbildung 4.3 auf der nächsten Seite zeigt ein typisches Chromatogramm einer RNase-T1-aktiven Fraktion nach der Anionenaustauscherchromatographie und anschließender Entsalzung und Einengung. Nach der Probenaufgabe wurde die Säule zunächst 5 min bei einer Flussrate von 1,5 mL/min, einer Konzentration von 20 % Eluent B und einem Anfangsdruck von 72 bar gespült. Anschließend wurde mit einem Gradienten von 4%/min eluiert, bis hin zu

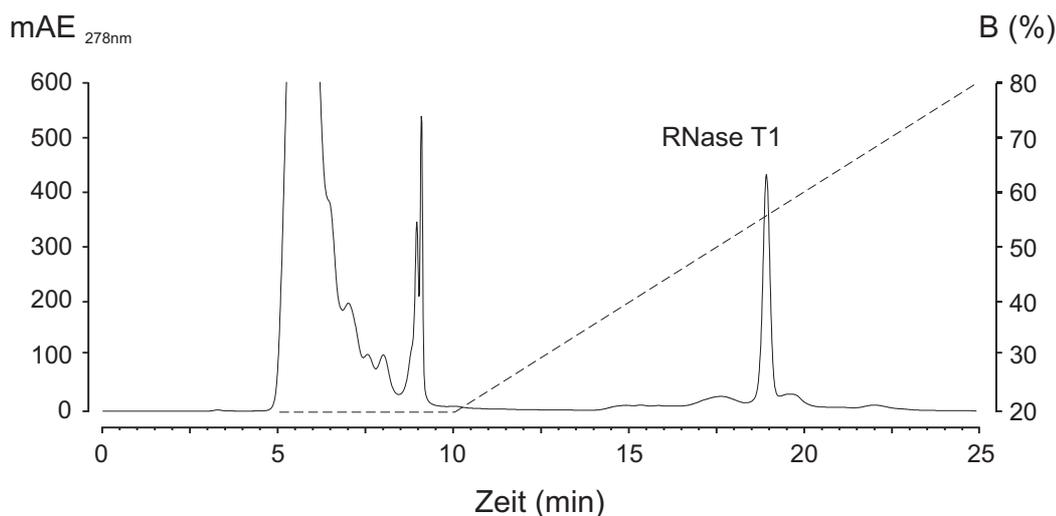


Abbildung 4.3: Typisches RP-HPLC-Chromatogramm von in Hefen exprimierter RNase T1 nach der ersten Aufreinigung über eine Anionenaustauschersäule. Die Trennung erfolgte im Gegensatz zu der in Abbildung 4.1 auf Seite 36 gezeigten Trennung mit einer NUCLEOGEL-C 18-Trennsäule ohne Verwendung von TFA als Ionenpaarbildner. Die gestrichelte Linie zeigt die Lösemittelzusammensetzung an.

einer Konzentration von 80 % Eluent B. Die Elution der RNase T1 erfolgte schließlich bei ca. 56 % Eluent B. Das Enzym wurde am Detektorausgang der HPLC gesammelt, eingefroren, lyophilisiert und stand nun für spektroskopische Untersuchungen zur Verfügung.

Zur Konzentrationsbestimmung der eluierten RNase T1 wurde zuvor eine Kalibrationsgerade mit einem definierten RNase-T1-Standard aus *Aspergillus oryzae* erstellt (Abbildung 4.4 auf der nächsten Seite). Hierzu wurden die Integrale der Elutionspeaks berechnet und zur chromatographierten Proteinmenge ins Verhältnis gesetzt. Auf Grundlage dieser Kalibrationsgeraden konnte die Menge der durch die RP-HPLC isolierten RNase T1 direkt und mit hoher Genauigkeit bestimmt werden.

4.1.2.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von RNase T1

Eine genaue Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität von RNase T1 gelang durch Messung der Spaltung des Dinucleotids GpC [93]. Hierzu wurde der Verlauf der Hydrolyse von GpC anhand der Absorptionzunahme bei 257 nm verfolgt ($\Delta A_{257}/(\text{min} \cdot \text{mg})$). Die genaue Konzentration von RNase T1 wurde entweder mit der RP-HPLC (siehe Abschnitt 4.1.2.1), oder photometrisch bestimmt, durch Absorption bei 278 nm auf Grundlage des Extinktionskoeffizienten ϵ_{278} von 1,9 mg/mL [40, 87].

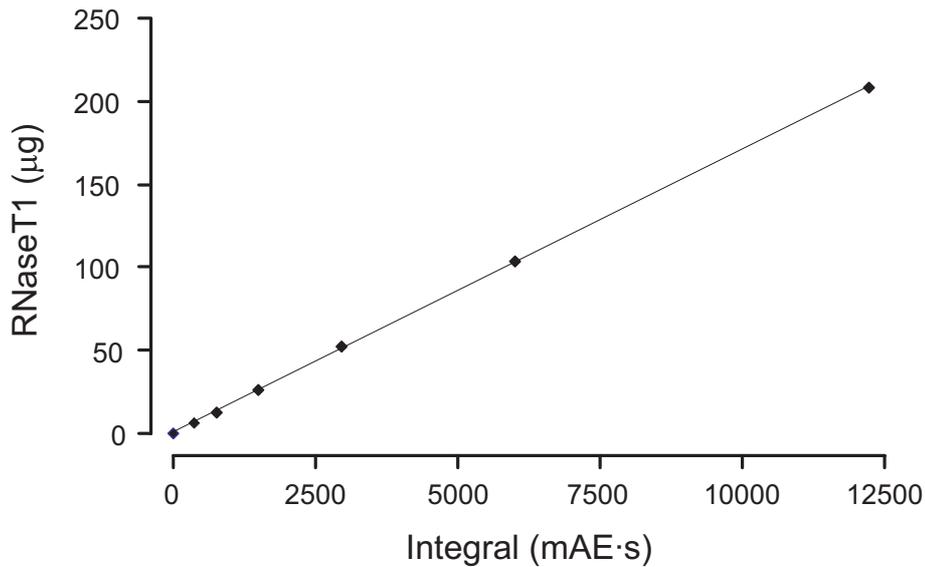


Abbildung 4.4: RP-HPLC-Kalibrationsgerade für RNase T1. Die Kalibrationsgerade wurde mit Hilfe definierter Mengen RNase T1-Standard aus *Aspergillus oryzae* erstellt ($R = 0,99996$).

4.2 CD-Spektroskopie

Die CD-Messungen zur Untersuchung der dreidimensionalen Struktur der ^{13}C -markierten und unmarkierten RNase T1 wurden mit einem CD-Spektrometer Jasco J-720 am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin freundlicherweise von Herrn Dr. Gast und Herrn Dr. Zirwer durchgeführt.

Die Proteine wurden hierzu in 5 mM Cacodylatpuffer mit einer Konzentration von 0,15 mg/mL gelöst; der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 7 eingestellt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 278 nm und einem Extinktionskoeffizienten ϵ_{278} von 1,9 mg/mL [40, 87]. Die Proben wurden in Küvetten einer Schichtdicke von 1 mm im Bereich von 260 bis 195 nm bei Raumtemperatur gemessen.

4.3 FTIR-Spektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden FTIR-spektroskopische Messungen an Proteinlösungen durchgeführt. Von besonderem Interesse waren hierbei strukturelle Änderungen der Proteine in Abhängigkeit der Temperatur. Diese Änderungen wurden einerseits unter thermodynamischen Gleichgewichtsbedingungen und andererseits unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen, in kinetischen Experimenten nach einem Temperatursprung untersucht.

4.3.1 Messungen unter Bedingungen des thermodynamischen Gleichgewichts

Sämtliche Messungen wurden an FTIR-Spektrometern der Firma BRUKER am Robert Koch-Institut und am Max Delbrück-Centrum in Berlin durchgeführt. Die Spektrometer, das IFS 28B und das IFS 66, wurden kontinuierlich mit trockener Luft gespült, um Absorptionen durch atmosphärischen Wasserdampf so gering wie möglich zu halten. Als Strahlungsquelle diente ein luft- bzw. wassergekühlter Globar, der Strahlung im mittleren IR-Bereich von 5000 bis 400 cm^{-1} emittiert. Das IFS 66 war mit einem MICHELSON- und das IFS 28B mit einem *Cube-Corner*-Interferometer ausgestattet. In beiden Geräten befand sich ein Strahlteiler aus Kaliumbromid.

4.3.1.1 Ablauf der Messungen

Die mit der HPLC isolierten und quantifizierten gefriergetrockneten RNase-T1-Proben wurden in 100 mM Cacodylatpuffer gelöst und der pH^D -Wert mit DCl auf pH^D 7,1 eingestellt. Die Proben wurden portioniert, abermals lyophilisiert und vor den Messungen in entgastem D_2O gelöst. Die Proben wurden in eine Messküvette bestehend aus zwei runden, optisch polierten CaF_2 -Fenstern mit einem Durchmesser von 35 mm gegeben. Das Deckfenster ist planar, wohingegen in das Zentrum des anderen Fensters eine Aussparung mit einem Durchmesser von 14 mm und einer Tiefe von 50 μm zur Aufnahme der Probe planar eingeschliffen worden war. Es wurden nun ca. 9 μL der Proteinlösung luftblasenfrei zwischen die Küvettenfenster gegeben und die Ränder mit Silikonöl abgedichtet. Eine Rinne zwischen Probenraum und Rand verhinderte eine Kontamination der Probe mit dem Öl. Referenzmessungen mit Pufferlösung wurden in einer äquivalenten Küvette, allerdings mit einer um 1 bis 2 % geringeren Schichtdicke durchgeführt. Auf diese Weise konnte die D_2O -Absorption optimal kompensiert werden. Die Küvetten wurden in eine Messinghalterung plaziert, die mit einem Thermostaten temperiert werden konnte. Die Differenz zwischen der tatsächlichen Temperatur (Isttemperatur) in der Küvette und der Badtemperatur im Thermostaten wurde zuvor mit einem Thermofühler ermittelt, der in ein Küvettenfenster geklebt worden war. Die Küvette samt temperierbarer Halterung wurde im Spektrometerraum auf einem Schlitten befestigt, der automatisch bei jeder eingestellten Temperatur die Probe in den Strahlengang hinein und – für die Hintergrundmessung – wieder hinaus schieben konnte. Auf diese Weise war gewährleistet, dass Schwankungen des Wasserdampflevels im Spektrometerraum während der Messserien so gut wie keinen Einfluss auf die IR-Spektren hatten. Sollte dennoch eine Wasserdampfkorrektur nötig gewesen sein, wurde sie wie in Abschnitt 4.3.1.3 beschrieben durchgeführt. Bei jeder Messtemperatur ließ man die Probe 3 Minuten äquilibrieren, bevor Hintergrund und Proteinlösung mit je 128 Scans gemessen wurden. Nach Ablauf jeder Messserie wurde der Puffer in der Referenzküvette nach demselben Verfahren gemessen.

4.3.1.2 Messparameter

Die Spektren wurden bei einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} mit einem *zero-filling*-Faktor von 4 und einer HAPP-GENZEL-Apodisierungsfunktion aufgenommen. Als Detektor diente ein pyroelektrischer DTGS- (*deuterated triglycine sulfate*)-Detektor. Die Spiegelgeschwindigkeit wurde für den DTGS-Detektor auf 10 kHz festgelegt und die Datenaquisition erfolgt im *double-sided-forward-backward*-Modus, das heißt die Interferogramme wurden auf beiden Seiten aufgenommen, was im Vergleich zum *single-sided*-Modus zu einem verbesserten Signal-/Rauschverhältnis um $\sqrt{2}$ führte.

4.3.1.3 Auswertung

Zur Auswertung der Spektren fanden Methoden Anwendung, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

Pufferkorrektur Die Pufferkorrektur der Spektren erfolgte durch eine einfache Subtraktion der Pufferspektren von den Proteinspektren bei der jeweiligen Temperatur.

Wasserdampfkorrektur Trotz der Spülung des Spektrometers mit getrockneter Luft lassen sich im Messraum des Spektrometers Schwankungen des Wasserdampflevels nicht vermeiden. Die Rotationsschwingungsbanden des Wasserdampfs sind bei einer exakten Auswertung der Proteinbanden in IR-Spektren störend. Die Spektren lassen sich aber in der Regel gut durch geeignete Wasserdampfspektren kompensieren. Zu diesem Zweck wurde unter Verwendung der zweiten Ableitung im spektralen Bereich von 1715 bis 1845 cm^{-1} die Intensität einiger markanter Wasserdampfbanden bestimmt und dadurch der geeignete Subtraktionsfaktor ermittelt. Diese Prozedur wurde entweder manuell oder mit Hilfe eines Makros erledigt.

Fourier-Selbstdekonvolution Die Auflösung der Spektren wurde mit Hilfe der FOURIER-Selbstdekonvolution (FSD) mathematisch erhöht (siehe Abschnitt 1.2.2.3). Die FSD wurde mit einer LORENTZ-Funktion der Halbwertsbreite 2,7 durchgeführt. Die Auflösungsverstärkung betrug 2,2. Die FSD wurde in dem Intervall von 1450 bis 1900 cm^{-1} durchgeführt.

Berechnung der Entfaltungstemperatur Zur Ermittlung der Phasenübergänge (Entfaltungstemperaturen) von Proteinen wurden die Intensitäten bzw. Absorptionsfrequenzen verschiedener struktursensitiver IR-Banden in Abhängigkeit von der jeweiligen Temperatur aufgetragen. Die Daten wurden in der Regel aus den entsprechenden FSD-Spektren mit Hilfe von OPUS NT v3.1-Makros oder MICROSOFT EXCEL ausgelesen und anschließend mit MICROCAL ORIGIN v6.1 ausgewertet.

Hierzu wurden zunächst Steigung und Achsenabschnitte der linearen Abschnitte der Vor- und Nachübergangsbereiche mit einer linearen Regression bestimmt

$$y_{\text{nativ}}(T) = mT + b \quad \text{bzw.} \quad y_{\text{entfaltet}}(T) = mT + b, \quad (4.1)$$

wobei y entweder die Intensität oder die Frequenz des Messwertes bezeichnet. Anschließend wurde jeder Messpunkt gemäß folgender Beziehung

$$f_{nativ}(T) = \frac{y(T) - y_{entfaltet}(T)}{y_{nativ}(T) - y_{entfaltet}(T)} \quad (4.2)$$

normalisiert, wobei $y_{nativ}(T)$ und $y_{entfaltet}(T)$ die mit den Geradengleichungen 4.1 auf die jeweilige Temperatur T extrapolierten Messwerte y sind. Die Größe f_{nativ} gibt den Anteil nativ gefalteter Proteine bei der Temperatur T an. Der Phasenübergang bzw. die Schmelztemperatur T_m ist definiert bei $f_{nativ} = \frac{1}{2}$ also dem Wendepunkt der normalisierten Kurve, in dem sich die Hälfte der Moleküle im nativen bzw. entfalteten Zustand befindet.

Berechnung der van 't Hoff'schen Enthalpieänderung Die VAN 'T HOFF'sche Enthalpieänderung $\Delta H_{VAN 'T HOFF}$ lässt sich aus den normalisierten Entfaltungskurven aus der Steigung von f_{nativ} am Phasenübergang T_m ermitteln nach:

$$\Delta H_{VAN 'T HOFF} = 4RT_m^2 \left(\frac{df_{nativ}}{dT} \right)_{T_m}. \quad (4.3)$$

4.3.2 Zeitaufgelöste Messungen

Die zeitaufgelösten Messungen zur temperaturinduzierten Rückfaltung von Proteinen wurden am Robert Koch-Institut an dem Spektrometer IFS 66 der Firma BRUKER durchgeführt.

Neben den eigentlichen Messungen, galt es eine bereits bestehende Apparatur [3,23] zu verbessern bzw. durch eine neue Temperatursprungapparatur zu ersetzen. Die ersten temperaturinduzierten Rückfaltungsexperimente an Proteinlösungen, die mit der zeitaufgelösten FTIR-Spektroskopie untersucht worden waren, basierten noch auf einer manuellen Einspritzung der Probenlösung in eine IR-Küvette [94]. Später wurde dieses manuelle Verfahren durch den Einsatz einer pneumatisch getriebenen Ramme, deren Auslösung automatisch durch ein elektrisches Signal vom Spektrometer getriggert wurde, ersetzt [3, 23]. Dies bedeutete eine enorme Verbesserung hinsichtlich der Synchronisation von Einspritzvorgang und Datenaufnahme und führte zu gut reproduzierbaren Messergebnissen. Diese Apparatur sollte im Rahmen dieser Arbeit in folgenden Punkten verbessert werden:

1. Die Ausbeuten an aus den Hefen isolierter unmarkierter und insbesondere ^{13}C -markierter RNase T1 waren erwartungsgemäß sehr gering. Dies machte eine Verkleinerung der vorhandenen Temperatursprungapparatur hinsichtlich der benötigten Probenmenge zwingend erforderlich. Weiterhin sollten die temperaturinduzierten Rückfaltungsexperimente mit Proteinlösungen einer Konzentration zwischen 10 und 20 mg/mL durchgeführt werden. Es war angestrebt, die Probenmenge bei der verbesserten Apparatur um mindestens ein Drittel von ca. 1 bis 2 mg pro Experiment auf 300 bis 600 μg zu verringern.

2. Die Probenaufgabe erwies sich bisher als sehr unpraktisch und die Vorbereitung der Apparatur für die nächste Messung als sehr zeitintensiv. 100 μL Probe mussten bisher umständlich mit einer Glasspritze der Firma HAMILTON, ausgestattet mit einem Lueransatz, aus einem relativ breiten Gefäß luftblasenfrei aufgezogen werden. Anschließend musste die Spritze samt Lösung wieder in das Messsystem integriert werden bevor die Messung gestartet werden konnte. Hierbei war die Proteinlösung in D_2O -haltigem Puffer stets mehr oder weniger lange der Kontamination durch atmosphärischen H_2O -Dampf ausgesetzt. Nach jeder Messung musste die gesamte Apparatur zunächst mit D_2O gespült und dann durch Einblasen mit trockener Luft getrocknet werden, bevor die nächste Messung gestartet werden konnte. Es war deshalb angestrebt die neue Apparatur hinsichtlich Probenaufgabe und Handhabung derart zu verbessern, dass nun innerhalb eines Tages viele Experimente reproduzierbar hintereinander gemacht werden können.
3. Ein empfindlicher Schwachpunkt der bisherigen Temperatursprungapparatur war die Verbindung zwischen der Spritze und den Zuleitungen zur Messzelle. Diese Verbindung wurde durch einen Luer Lock-Anschluss geschaffen, der den hohen Drücken während des Einspritzvorgangs nicht immer Stand hielt. Grund hierfür war vor allem der Luer Lock-Adapter an der Spritze, bei dem ein konischer Teflonabschluss in den Glaskörper der Spritze geklebt ist. Diese Klebestelle wurde häufig in Folge der Temperierung, die außerhalb der vom Hersteller angegebenen Spezifikation lag (50°C), undicht. Folgen dieser Problematik waren zum einen Luftblasen in der Messzelle und zum anderen der teilweise oder sogar totale Verlust der Probe. Bei der verbesserten Apparatur sollte durch den Einsatz von Komponenten, wie sie auch in der HPLC Verwendung finden, die Dichtigkeit auch bei hohen Drücken gewährleistet sein. Dies war für die vorgesehenen Experimente wichtig, weil die Proben, insbesondere die ^{13}C -markierte RNase T1 unter hohem Arbeitsaufwand und hohen Kosten hergestellt worden waren und deshalb nicht unbegrenzt zur Verfügung standen.

Bei der Neu- bzw. Weiterentwicklung der Temperatursprungapparatur wurden zwei Ansätze verfolgt. Der erste Ansatz basiert auf einer *stopped-flow*-Apparatur, wie sie bereits am Forschungszentrum Karlsruhe (FZK) am Lehrstuhl für Analytische Chemie in der Arbeitsgruppe von Dr. David Moss Verwendung findet, der zweite Ansatz, mit dem die Experimente letztendlich durchgeführt wurden, ist eine Weiterentwicklung der bereits am RKI bestehenden Apparatur, unter Verwendung von HPLC-Komponenten.

4.3.2.1 Neuentwicklung einer Temperatursprungapparatur

Abbildung 4.5 auf der nächsten Seite zeigt den schematischen Aufbau des Prototypen einer neuentwickelten Temperatursprungapparatur. Das Kernstück der Anlage bildet die Hochdruckdurchflusszelle. Sie wurde von Ralf Masuch in der Arbeitsgruppe von Dr. David Moss am FZK während seiner Doktorarbeit entwickelt (heute Fir-

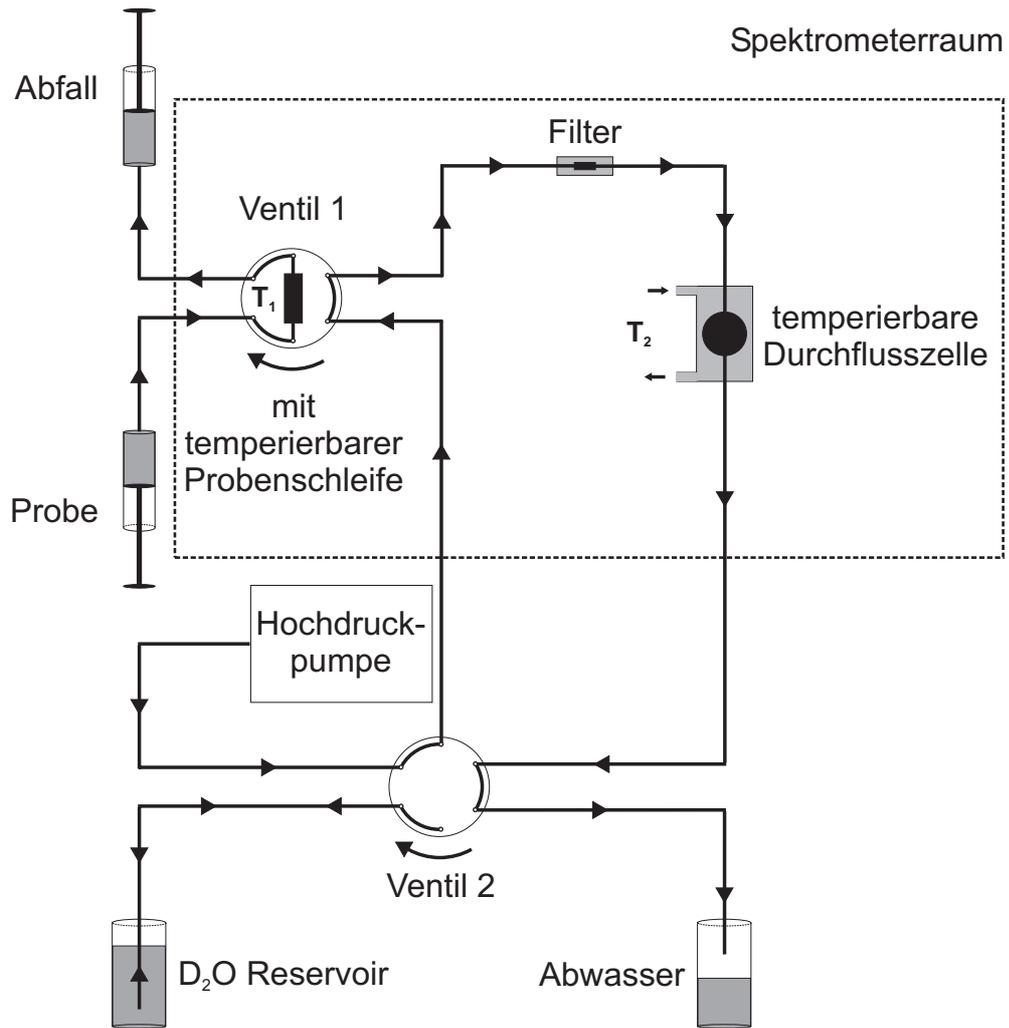


Abbildung 4.5: Schematischer Aufbau der neu entwickelten Temperatursprungapparatur. Die Probe wird direkt in die temperierbare Probenschleife injiziert. Der Proben transport in die Durchflusszelle erfolgt mit Hilfe von D_2O und einer Hochdruckpumpe (genaue Funktionsbeschreibung im Text).

ma MICRO-BIOLYTICS, Freiburg). Die Zelle besteht aus zwei Calciumfluoridfenstern (CaF_2), die fest miteinander verklebt sind. Sie hat eine Schichtdicke von $55,3 \mu m$ bei einem Volumen von ca. $2 \mu L$. Die Zelle befindet sich in einem Messingmantel, der mit Hilfe eines Thermostaten temperiert werden kann. Über einen Filter und ein HPLC-Ventil mit sechs Eingängen (Ventil 1) ist die Durchflusszelle über HPLC-Zuleitungen mit einer Probenschleife aus bioinertem Titan mit einem Volumen von $10 \mu L$ verbunden, die auf die Entfaltungstemperatur T_1 des Proteins temperiert werden kann. Ventil 2, das so genannte Stoppventil, ist zum einen an eine HARVARD-Pumpe angeschlossen, die zwei Präzisionspritzen antreibt, welche von einem D_2O -Reservoir mit

entgastem D₂O befüllt werden können. Das Befüllen der Probenschleife mit der zu untersuchenden Proteinlösungen erfolgt außerhalb des Spektrometerraums über Ports, die in die Gehäusewand eingelassen sind. In Abbildung 4.5 befindet sich Ventil 1 in einer Position, die das Befüllen der Probenschleife ermöglicht. Durch ein Schalten dieses Ventils kann nun die Probe mit Hilfe des in den Spritzen befindlichen D₂O in die Durchflusszelle transportiert werden, die auf die Rückfaltungstemperatur T_2 temperiert ist. Ein Schalten von Ventil 2 zu dem Zeitpunkt, an dem sich die Probe in der Zelle befindet, stoppt den Fluss und setzt die zeitaufgelöste Messung in Gang. Das Schalten der Ventile bzw. die Steuerung der Pumpe erfolgt über eine Software unter Windows NT. Die zeitliche Steuerung der Ventile wird mit dieser Software über Skriptdateien geregelt, die auch das Triggersignal zum Start der zeitaufgelösten Messungen an das Spektrometer senden.

Vorteile Im Unterschied zur bisher verwendeten Apparatur ist diese neuentwickelte Apparatur zu jedem Zeitpunkt mit entgaster Flüssigkeit gefüllt. Nach jeder Messung kann das gesamte System mit D₂O gespült werden. Zum vollständigen Befüllen der Probenschleife sind 30 μ L Probenlösung notwendig, die nun nicht mehr einzeln vor jeder Messung aufgezogen werden müssen, sondern für jede Messung einfach aus einer Vorratsspritze in die Probenschleife injiziert werden können. Die Apparatur zeichnet sich deshalb aus durch:

- ein geringeres Probenvolumen, nämlich 30 μ L anstelle von 100 μ L bei der alten Apparatur,
- eine verbesserte Probenaufgabe,
- einen höheren Probendurchsatz.

Nachteile Erste Testmessungen zur Stabilität der Probe über einen längeren Zeitraum mit einer Modellsubstanz (Lysozym 10 mg/mL) zeigten ein gravierendes Problem der Apparatur auf. Ein Auftragen der Absorptionsbande bei 1658 cm^{-1} der Lysozymbilösung über einen Zeitraum von etwa einer Stunde (Abbildung 4.6 auf der nächsten Seite) nach dem Transport der Probe aus der Probenschleife in die Messzelle, zeigte eine kontinuierliche Intensitätsabnahme.

Dieser Effekt beruht sehr wahrscheinlich auf Diffusion des D₂O aus den Zuleitungen, die sich vor und hinter der Durchflusszelle befinden, in die Durchflusszelle. Leider lag der ermittelte Verdünnungseffekt in der Größenordnung der spektralen Änderungen der Proteinamidbanden während der zeitaufgelösten Messungen temperaturinduzierter Rückfaltungsexperimente im selben Zeitraum. Die Überlagerungen dieser Diffusionseffekte mit den Intensitätsänderungen des Proteinspektrums in Folge der Rückfaltung lassen sich nur schwer mathematisch voneinander trennen und machen die Anwendung dieser Temperatursprungapparatur für Messungen über einen längeren Zeitraum (länger als 5 bis 10 Minuten) untauglich. Der Einsatz größerer Probenschleifen verlangsamt zwar den Diffusionseffekt, verlangt aber auf der anderen Seite größere Probenmengen. Zur Messung von Kinetiken, die im Zeitraum von

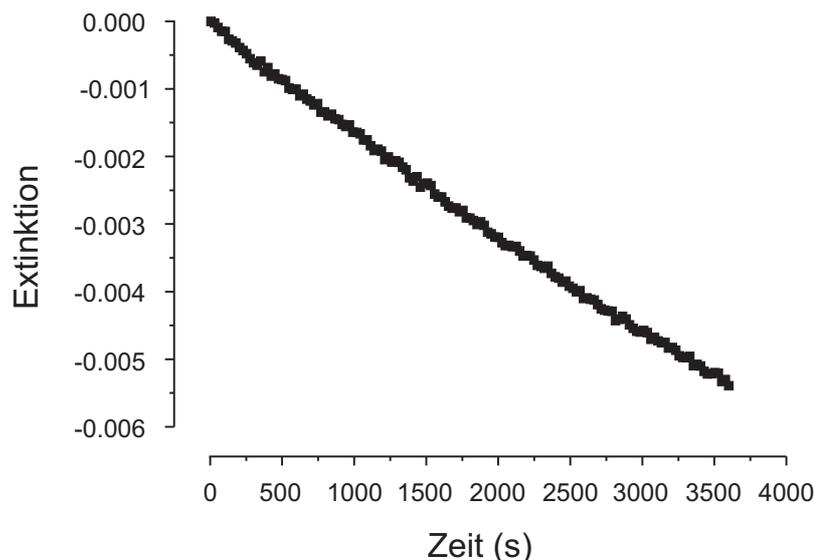


Abbildung 4.6: Relative Intensitätsabnahme der Absorptionsbande bei 1658 cm^{-1} einer Lysozymlösung der Konzentration 10 mg/mL

Minuten abgeschlossen sind, ist diese Apparatur allerdings gut einsetzbar, besonders dann, wenn mit größeren Probenschleifen gearbeitet wird.³ Nichtsdestotrotz wurden die Handhabung und der Probendurchsatz (siehe oben) im Unterschied zur bisher verwendeten Apparatur wesentlich verbessert.

4.3.2.2 Weiterentwicklung der bisherigen Temperatursprungapparatur

Weil die in Abschnitt 4.3.2.1 beschriebene Apparatur nicht die für Langzeitmessungen nötige Stabilität aufwies, wurde aufbauend auf dem Konzept der bisher am RKI verwendeten Temperatursprungapparatur eine neue Apparatur entwickelt.

Abbildung 4.7 auf der nächsten Seite zeigt den schematischen Aufbau der weiterentwickelten Temperatursprungapparatur, mit der die kinetischen Messungen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Das Grundprinzip des Probentransportes ist gleich geblieben: Die Probenlösung wird mit Hilfe einer pneumatischen Ramme aus der temperierbaren Spritze mit der Entfaltungstemperatur T_1 in die ebenfalls temperierbare Durchflusszelle mit der Rückfaltungstemperatur T_2 befördert. Sämtliche Zuleitungen wurden in dieser Weiterentwicklung ersetzt durch gasdichte HPLC-Zuleitungen. Die Messzelle wurde ersetzt durch eine Hochdruckdurchflusszelle der Firma MICRO-BIOLYTICS. Das Befüllen der temperierbaren Spritze erfolgt nun nicht durch eine Demontage der Apparatur, sondern bequem über ein HPLC-Ventil aus einer anderen Spritze, die als Probenreservoir dient. Durch diese Anordnung ist gewährleistet, dass die temperierbare Spritze stets luftblasenfrei mit neuer Probenlösung befüllt werden kann.

³Natürlich vorausgesetzt, die spektralen Änderungen in der Probe sind viel größer als der Diffusionseffekt.

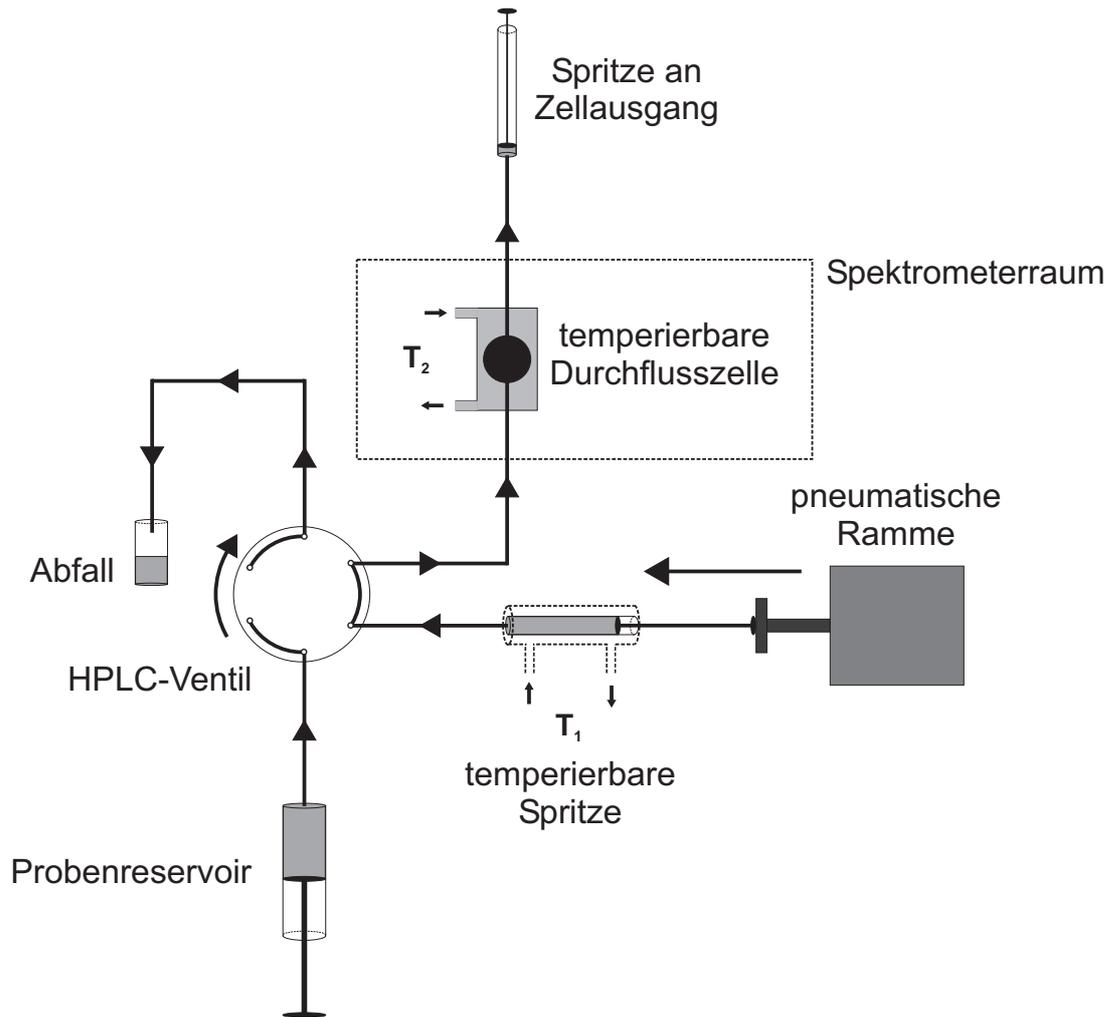


Abbildung 4.7: Schematischer Aufbau der weiterentwickelten Temperatursprungapparatur. Die Probe, die sich in der temperierbaren Spritze befindet, wird mit Hilfe der pneumatisch getriebenen Ramme in die Durchflusszelle transportiert (genaue Funktionsbeschreibung im Text).

Insgesamt bieten sich mit dieser Anlage zwei unterschiedliche Optionen eine temperaturinduzierte Rückfaltungskinetik IR-spektroskopisch zu messen:

1. Wenn Substanz in ausreichender Menge zur Verfügung steht, kann die temperierbare Spritze vor jeder Messung aus dem Probenreservoir neu befüllt werden. Die gemessene Probe wird dann automatisch in der Spritze am Zellausgang gesammelt.
2. Steht nur wenig Probe zur Verfügung und lässt sich das Protein reversibel ent- und rückfalten, bietet sich die Möglichkeit an, durch ein einmaliges Befüllen der

4 Methoden

Apparatur viele Messungen hintereinander durchzuführen. Hierzu wird nach jeder Messung die in der Spritze am Zellausgang gesammelte Lösung einfach wieder in die temperierbare Spritze zurückgedrückt und steht somit für eine weitere Messung zur Verfügung.

Da für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit nur eine geringe Probenmenge zur Verfügung stand und die Experimente unter Gleichgewichtsbedingungen zeigten, dass die Proteine sich reversibel ent- und rückfalten lassen, wurde die zweite Messmethode gewählt.

Messvolumen Zur Ermittlung der Probenmenge, die notwendig ist, um die Messzelle vollständig zu befüllen, wurden zunächst sämtliche Zuleitungen mit entgastem D_2O befüllt und dann schrittweise eine Proteinlösung aus der temperierbaren Spritze in Richtung Messzelle gedrückt und die Extinktion im Amid-I-Bereich bei 1645 cm^{-1} verfolgt. Abbildung 4.8 zeigt, dass die Zelle bereits ab $30\text{ }\mu\text{L}$ Proteinlösung vollständig gefüllt ist. Für die Rückfaltungsexperimente wurden deshalb, um eine vollständige

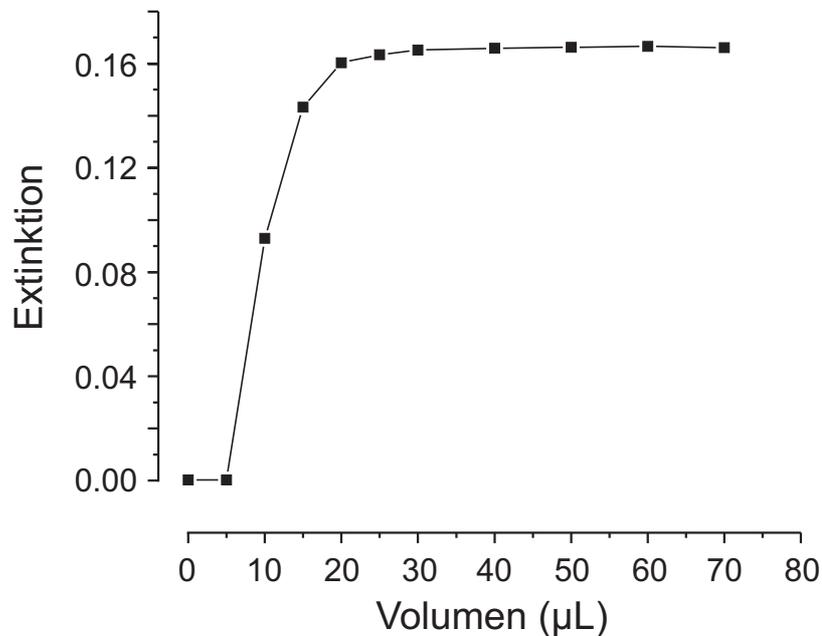


Abbildung 4.8: Extinktion einer Proteinlösung im Amid-I-Bereich bei 1645 cm^{-1} in Abhängigkeit vom injizierten Volumen.

Befüllung mit Sicherheit zu gewährleisten, bei jedem Experiment mindestens $40\text{ }\mu\text{L}$ Proteinlösung aus der temperierbaren Spritze in die Durchflusszelle geschoben. Damit eine Verdünnung der Probe verhindert wurde, wurde zuvor das gesamte System mit $30\text{ bis }50\text{ }\mu\text{L}$ derselben Proteinlösung gespült. Es wurden also mindestens $70\text{ bis }90\text{ }\mu\text{L}$ Probe für die Messungen benötigt.

Die Tatsache, dass mindestens 40 μL temperierte Probenlösung in die Messzelle injiziert wurden, verhinderte eine Verfälschung der gemessenen Kinetiken: Die großzügig bemessene Flüssigkeitsmenge, die praktisch noch teilweise durch die Messzelle hindurch geschoben wurde und dadurch auch die Zuleitungen nach der Messzelle füllte, gewährleistete, dass es nicht zu einer Vermischung mit nicht temperierter Proteinlösung kam, die sich bereits vor dem Auslösen der Ramme in den Zuleitungen befand. Nach jeder Messung konnte die Probe aus der Spritze am Zellausgang wieder in die temperierbare Spritze zurückgeschoben und die neue Messung gestartet werden. Die Proben wurden für ca. 5 Minuten vor jeder Messung temperiert.

Steuerung Die pneumatisch angetriebene Ramme wird von dem FTIR-Spektrometer in Form eines 5 V TTL-Signals ausgelöst. Die Geschwindigkeit, mit der die Flüssigkeit befördert wird, kann durch den an die Ramme angelegten Druck verändert werden. Die Koordination von Datenaquisition und Impulsgabe wird mit Hilfe von Skriptdateien und der Spektrometersoftware OPUS v3.1 bewerkstelligt. Der Druck wird manuell reguliert.

Für die zeitaufgelösten Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurde die pneumatisch angetriebene Ramme zunächst von einem elektrischen Impuls gestartet und kurz vor der maximalen Auslenkung durch einen weiteren Impuls gestoppt. Letzterer markierte gleichzeitig den Startzeitpunkt der für die Auswertung relevanten Daten. Die Datenaquisition wurde schon vor dem Auslösen des ersten Impulses gestartet, damit die Spiegelauslenkung im Interferometer für jedes Experiment mit der Impulsauslösung synchronisiert war. Die Skriptdateien zur Steuerung der Anlage und Datenaquisition wurden individuell an das jeweilige Messproblem angepasst. Da zu Beginn der temperaturinduzierten Rückfaltungsexperimente die größten spektralen Änderungen zu erwarten waren, wurden wegen der höheren Zeitauflösung nur Einzelspektren aufgenommen, die dann mit fortlaufender Dauer des Experiments zur Erhöhung des Signal-/Rauschverhältnisses immer weiter gemittelt wurden.

Totzeit des Einspritzvorgangs Die Totzeit der Probeninjektion in die Messzelle hängt zum einen von der Strömungsgeschwindigkeit der Probenflüssigkeit ab und zum anderen von der Schaltzeit des pneumatischen Ventils in der Ramme. Der Hersteller gibt die Schaltzeit des Ventils bei einem angelegten Druck von 6 bar mit ca. 20 ms an. Die Experimente wurden bei einem Druck von ca. 2 bar durchgeführt, was einer Strömungsgeschwindigkeit von ca. 1,3 $\mu\text{L}/\text{ms}$ entspricht. Da die Durchflusszelle schon mit ca. 30 μL vollständig gefüllt ist (siehe Abbildung 4.8 auf der vorherigen Seite), errechnet sich zusammen mit der Strömungsgeschwindigkeit für die Befüllung eine Zeit von ca. 25 ms. Zusammen mit der Schaltzeit des Ventils kann man die Totzeit für den Einspritzvorgang der Probe auf ca. 40 bis 50 ms abschätzen. Diese Zeit ließe sich sicher noch durch Erhöhung des Drucks verringern.

Temperaturanpassung Im Idealfall hätte sich die Temperatur der Proteinlösung nach der Injektion in die Durchflusszelle schon beim ersten Scan auf die erforderliche

4 Methoden

Rückfaltungstemperatur abgekühlt. Abbildung 4.9 zeigt, dass dies nicht der Fall war. Nach einem Temperatursprung von 65 °C nach 20 °C beträgt die Temperatur einer

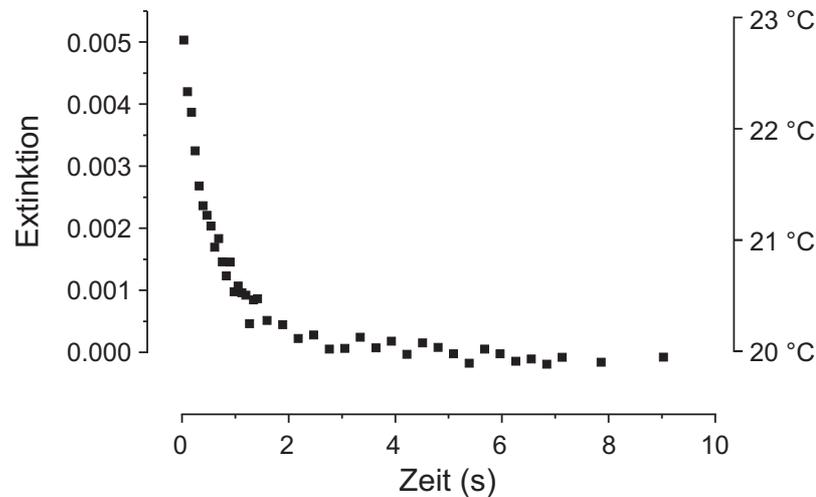


Abbildung 4.9: Temperaturanpassung einer Pufferlösung nach einem Temperatursprung von 65 °C nach 20 °C. Die Extinktionänderungen wurden anhand der temperaturempfindlichen D₂O-Bande bei 1595 cm⁻¹ verfolgt.

Pufferlösung zur Zeit des ersten gemessenen Spektrums in der Messzelle noch ca. 23 °C. Die restliche Temperaturanpassung erfolgt relativ rasch innerhalb der nächsten 2 Sekunden. Die Standardabweichung in der Extinktion lag bei ca. 3 % und errechnete sich aus 5 Experimenten. Die Temperaturen der gemessenen Spektren konnten relativ genau durch Korrelation der Differenzspektren eines Temperatursprungs mit Pufferlösung, mit Kalibrierungsmessungen derselben Pufferlösung unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt werden. Hierbei diente die breite, sehr temperaturempfindliche D₂O-Bande um 1595 cm⁻¹ als Sonde.

Für die Rückfaltung der Proteine spielt die anfänglich geringe Abweichung der Probenlösung von der Solltemperatur keine Rolle. Leider liegen aber die durch die Temperaturanpassung der D₂O-Bande hervorgerufenen spektralen Änderungen in der Größenordnung der detektierbaren Rückfaltungsereignisse der Proteine und überlagerten diese daher während der ersten Sekunden der Datenaquisition. Aus diesem Grunde wurden Experimente unter identischen Bedingungen mit derselben Pufferlösung durchgeführt, in der auch die Proteine gelöst waren. Durch Verrechnung der beiden Experimente ließ sich das Abkühlverhalten der Probenlösung zuverlässig kompensieren (siehe hierzu auch Abschnitt 4.3.2.4).

4.3.2.3 Messparameter

Die zeitaufgelösten Spektren wurden bei einer spektralen Auflösung von 4 cm⁻¹ mit einem *zero-filling*-Faktor von 4 und der HAPP-GENZEL-Apodisierungsfunktion

aufgenommen. Als Detektor diente im Gegensatz zu den Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen ein Photoleitfähigkeitsdetektor (MCT, Mercury Cadmium Telluride). Aufgrund seines schnellen Ansprechverhaltens und seiner hohen Empfindlichkeit (spezifische Detektivität $D^* = 5,7 \cdot 10^{10} \text{ cm Hz}^{\frac{1}{2}} \text{ W}^{-1}$) musste der Detektor mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden, um das thermisch bedingte Rauschen so gering wie möglich zu halten. Damit die zeitaufgelösten Messungen besser mit alten Messungen verglichen werden können, wurde ein Teil der Experimente im *single-sided-forward-backward*-Modus aufgenommen und ein Teil im *double-sided-forward-backward*-Modus. Bei beiden Aquisitionsmodi konnte aufgrund des verwendeten Detektors eine hohe „Scannergeschwindigkeit“ von 280 kHz eingestellt werden. Hinsichtlich der Zeitauflösung ist der *single-sided*-Modus dem *double-sided*-Modus überlegen. Die Zeitdauer eines Scans beträgt im *single sided*-Modus 37 ms mit einer Totzeit von 11 ms zwischen den einzelnen Scans, im Gegensatz zu 62 ms und einer Totzeit von ebenfalls 11 ms im *double-sided*-Modus. Dafür zeichnet sich letzterer durch ein um $\sqrt{2}$ verbessertes Signal-/Rauschverhältnis und eine höhere Ordinaten Genauigkeit aus.

Eine signifikante Verringerung des Rauschniveaus um einen Faktor von etwa 2,5 [95] wurde durch die Verwendung eines optischen Langpassfilters erreicht, der die Transmission von IR-Strahlung oberhalb von 2000 cm^{-1} blockiert und für Strahlung zwischen 2000 und 1000 cm^{-1} mit einer mittleren Transmission von 80,7 % durchlässig ist.

Basislinienrauschen Das Basislinienrauschen im spektralen Bereich zwischen 1500 und 1800 cm^{-1} wurde mit einem einzelnen Scan durch die mit D_2O gefüllte Küvette bestimmt (vergleiche Abbildung 1.4 auf Seite 19). Hierbei betrug der *peak-to-peak*-Wert, also die maximale Abweichung der Absorptionsspeaks innerhalb dieses Wellenzahlenbereichs, $7,75 \cdot 10^{-4}$ Absorptionseinheiten. Der RMS-Wert, also die Standardabweichung in der Absorption innerhalb dieses Wellenzahlenbereichs, lag bei $1,8 \cdot 10^{-4}$ Absorptionseinheiten.

Standardabweichung bei den zeitaufgelösten Messungen Zur Verbesserung des Signal-/Rauschverhältnisses wurden für die Auswertung der zeitaufgelösten Messungen mindestens drei Experimente gemittelt. Abbildung 4.10 auf der nächsten Seite zeigt die Standardabweichung in der Intensität der α -Helix-Markerbande des DNA-bindenden Proteins λ -Phagen-Cro-Repressor bei 1651 cm^{-1} in einem T-Sprungexperiment von 60°C nach 20°C . Die Standardabweichung ist zu Beginn des Experimentes am größten und nimmt dann exponentiell ab. In diesem Beispiel beträgt die Abweichung im ersten gemessenen Spektrum ca. 7 % der spektralen Gesamtänderung der Bande bei 1651 cm^{-1} . Die Standardabweichung ist hauptsächlich durch Druckschwankungen an dem Ventil bedingt, das die pneumatische Ramme auslöst. Diese Druckschwankungen wirken sich direkt auf die Einspritzgeschwindigkeit der Probenlösung aus. Dadurch kommt es zu einer fehlerhaften Kompensation der Temperaturanpassung der Probenlösung durch eine entsprechende Pufferlösung (siehe Abschnitt 4.3.2.2).

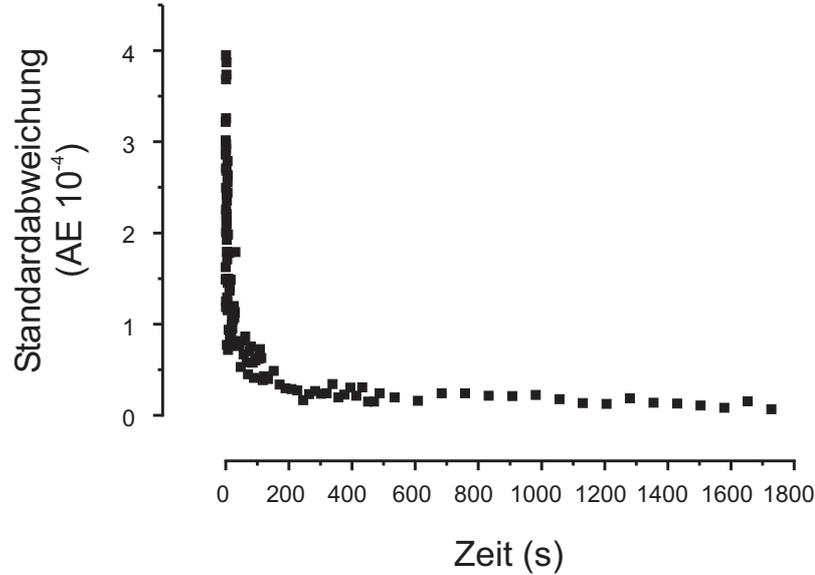


Abbildung 4.10: Standardabweichung der α -Helix Markerbandenintensität des λ -Phagen-Cro-Repressors ($c = 10 \text{ mg/mL}$) bei 1651 cm^{-1} in einem T-Sprungexperiment von 60°C nach 20°C als Funktion der Zeit.

4.3.2.4 Auswertung der zeitaufgelösten Messungen

Differenzspektren Zur Kompensation der Resttemperaturanpassung zu Beginn der temperaturinduzierten Rückfaltungsexperimente wurden aus den Einkanalspektren der in Puffer gelösten Proteine $S_{\text{Protein+Puffer}}$ und den Einkanalspektren der Pufferlösungen S_{Puffer} zu jedem Zeitpunkt t der Messung Absorbanzspektren A_t gemäß

$$A_t = \log \left(\frac{S_{\text{Puffer}}}{S_{\text{Protein+Puffer}}} \right) \quad (4.4)$$

berechnet. Aus diesen pufferkorrigierten Absorbanzspektren konnte nun gemäß

$$D_t = A_\infty - A_t \quad (4.5)$$

eine Serie von Differenzspektren berechnet werden. Hierbei bezeichnet D_t das Differenzspektrum aus A_∞ , dem zuletzt gemessenen Spektrum, und dem Spektrum zum Zeitpunkt A_t .

Neben diesen Differenzspektren, denen als Referenz das letzte in der Serie gemessene Spektrum zugrunde liegt, lassen sich auch noch die spektralen Änderungen zwischen zwei Zeitpunkten visualisieren. Dies geschieht nach folgender Gleichung

$$D_{t_2 \leftrightarrow t_1} = A_{t_2} - A_{t_1}, \quad (4.6)$$

wobei A_{t_1} das Spektrum zum Zeitpunkt t_1 ist und A_{t_2} das Spektrum zu einem späteren Zeitpunkt t_2 ist. Wenn die auf diese Weise berechneten Differenzspektren eine sehr

geringe Intensität aufwiesen, wurden mehrere Spektren zur Erhöhung des Signal-/Rauschverhältnisses gemittelt.

Kinetiken Zur Darstellung der Änderung der Intensität bzw. Frequenz einiger struktursensitiver Banden als Funktion der Zeit wurden die Intensitätsänderungen aus den Differenzspektren (Gleichung 4.5) und die Frequenzänderungen aus den Absorbanzspektren (Gleichung 4.4) nach einer Offset-Korrektur im Bereich zwischen 1740 und 1770 cm^{-1} ausgelesen. Die Zeitpunkte für den Scananfang und das Scanende wurden von der OPUS-NT-Software mit den Spektren abgespeichert, so dass mit Hilfe von MICROSOFT EXCEL der mittlere Scanzeitpunkt errechnet und die sich daraus ergebenden Funktionen dargestellt werden konnten.

Anschließend erfolgte iterativ mit Hilfe der Software MICROCAL ORIGIN eine nicht lineare Kurvenanpassung mit einer Summe von Exponentialfunktionen, die alle Reaktionen erster Ordnung repräsentieren,

$$y(t) = y_0 + \sum_i \alpha_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (4.7)$$

wobei jedes exponentielle Glied durch die Amplitude α_i , die ein Maß für die Intensität der i -ten Phase darstellt und durch die Zeitkonstante τ_i , die die Abklinggeschwindigkeit der Funktion wiedergibt, beschrieben wird. Dabei wurde auf die kleinste Anzahl exponentieller Glieder zurückgegriffen, die zu einem befriedigenden Anpassungsergebnis führte.

Ereignisse in der experimentellen Totzeit Die zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie kann nicht den gesamten Rückfaltungsprozess von Proteinen erfassen. Sämtliche Ereignisse, die in der experimentellen Totzeit (siehe Abschnitt 4.3.2.2) geschehen, sind nicht zugänglich. Unter Zuhilfenahme der Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen, lassen sie sich insgesamt jedoch rekonstruieren. Hierzu ist es erforderlich, Differenzspektren jeweils zwischen den beiden Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen zu berechnen $D_{\text{Gleichgewicht}}|_{T_1}^{T_2}$, zwischen deren Temperaturen auch die zeitaufgelösten Temperatursprungexperimente $D_{\text{Kinetik}}|_{T_1}^{T_2}$ durchgeführt werden sollen. Weitere Differenzspektren zwischen diesen Spektren und den Spektren, die die detektierbaren Gesamtänderungen während der kinetischen Experimente $D_{\text{Experiment}}|_{T_1}^{T_2}$ repräsentieren, visualisieren die spektralen Gesamt ereignisse in der experimentellen Totzeit $D_{\text{Totzeit}}|_{T_1}^{T_2}$. Mathematisch lässt sich diese Prozedur folgendermaßen beschreiben: Aus Gleichung

$$D_{\text{Kinetik}}|_{T_1}^{T_2} = D_{\text{Totzeit}}|_{T_1}^{T_2} + D_{\text{Experiment}}|_{T_1}^{T_2} \quad (4.8)$$

wird $D_{\text{Totzeit}}|_{T_1}^{T_2}$ zugänglich durch

$$D_{\text{Totzeit}}|_{T_1}^{T_2} = D_{\text{Gleichgewicht}}|_{T_1}^{T_2} - D_{\text{Experiment}}|_{T_1}^{T_2}. \quad (4.9)$$

Bei den Gleichgewichtsexperimenten ist zusätzlich zu den spektralen Änderungen, die die strukturellen Änderungen der Proteine auf molekularer Ebene widerspiegeln,

4 Methoden

ein zusätzlicher, nur von der Temperatur abhängiger Beitrag $D_{\text{unspez. T. Anpassung}}|_{T_1}^{T_2}$ festzustellen. Zur Berechnung von $D_{\text{Totzeit}}|_{T_1}^{T_2}$ muss dieser Beitrag, auch bezeichnet als unspezifische Temperaturanpassung, kompensiert werden. $D_{\text{Gleichgewicht}}|_{T_1}^{T_2}$ muss deshalb korrigiert werden zu

$$D_{\text{Gleichgewicht (korr.)}}|_{T_1}^{T_2} = D_{\text{Gleichgewicht}}|_{T_1}^{T_2} + D_{\text{unspez. T. Anpassung}}|_{T_1}^{T_2}. \quad (4.10)$$

Dieser Anteil der unspezifischen Temperaturanpassung wird in den Temperaturabschnitten zugänglich, die sich ober- bzw. unterhalb der Schmelztemperatur der RNase T1 befinden. Wie in den FTIR-spektroskopisch bestimmten Schmelzkurven zu erkennen ist, verhält sich diese unspezifische Temperaturanpassung linear (vergleiche Abbildung 5.10 auf Seite 70). Die Korrektur von $D_{\text{Gleichgewicht}}|_{T_1}^{T_2}$ erfolgt nun durch die Generierung von Differenzspektren in diesem linearen Bereich zwischen 65 und 75 °C. Eine Multiplikation dieser Differenzspektren mit den Faktoren 2 und 4,5 erzeugt geeignete Spektren für $D_{\text{unspez. T. Anpassung}}|_{T_1}^{T_2}$, um die in den Temperaturintervallen von 20 bzw. 45 K (Temperatursprungexperimente von 65 °C auf 20 bzw. 45 °C) berechnete spektrale Gesamtänderung im Gleichgewichtsexperiment $D_{\text{Gleichgewicht}}|_{T_1}^{T_2}$ zu korrigieren.

Zur Verbesserung des Signal-/Rauschverhältnisses der Spektren, die die Gesamtereignisse in der experimentellen Totzeit repräsentieren, wurden zur Berechnung der detektierbaren Gesamtänderungen während des Temperatursprungexperimentes $D_{\text{Experiment}}|_{T_1}^{T_2}$ die ersten beiden Messungen gemittelt. Zusammen mit der Totzeit des Einspritzvorgangs (siehe Abschnitt 4.3.2.2) ergibt sich eine Totzeit von 90 bis 100 ms für die Temperatursprungexperimente.

4.4 Berechnung der Amid-I-Bande auf Basis von Übergangsdipolkopplungen (TDC)

In Kooperation mit Herrn Prof. Max Diem (Hunter College, New York) wurden die Amid-I-Banden (C=O-Streckschwingungsverteilungen) der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1 berechnet. Die Rechnungen basieren auf dem Ansatz, nur Kopplungen zwischen den einzelnen C=O-Gruppen zu berücksichtigen, die aus Resonanzinteraktionen der Übergangsdipolmomente resultieren [76, 96, 97]. Hierzu fand im Rahmen dieser Arbeit die Methode von XIANG *et al.* Anwendung [97]: Für ein Peptid oder Protein, das aus k Aminosäuren besteht, werden die Amid-I-Schwingungsfrequenzen bzw. Übergangsdipolmomente der i -ten C=O-Gruppe mit ν_i und μ_i bezeichnet. Aus den Übergangsdipolkopplungen aller Dipole ergibt sich die Matrix

$$V_{ij} = \frac{\mu_i \cdot \mu_j}{|T_{ij}|^3} - 3 \frac{(\mu_i \cdot T_{ij})(\mu_j \cdot T_{ij})}{|T_{ij}|^5}, \quad \text{für } i \neq j \quad (4.11)$$

mit

$$V_{ij} = \nu_i, \quad \text{für } i \neq j. \quad (4.12)$$

4.4 Berechnung der Amid-I-Bande auf Basis von Übergangsdipolkopplungen (TDC)

T_{ij} ist ein Vektor, der die Schwerpunkte der C=O-Oszillatoren i und j verbindet. Wie aus Gleichung 4.12 hervorgeht, sind die diagonalen Elemente der Matrix identisch und beschreiben die ungestörten Frequenzen der C=O-Schwingungen. Bevor die V -Matrix diagonalisiert wurde, musste die Kopplungsenergie der Übergangsdipole in Wellenzahlen konvertiert werden. Das Ergebnis der Diagonalisierung waren k Exitonfrequenzen der wechselwirkenden Dipole. Diese sind nun nicht mehr unabhängig voneinander, sondern stellen eine Linearkombination aller wechselwirkenden Dipole im Polypeptid dar. Des Weiteren wurde die Dipolstärke D_k des k -ten Übergangs definiert als

$$D_k = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N c_{ik} c_{jk} (\mu_i \cdot \mu_j). \quad (4.13)$$

Die Übergangsdipolmomente μ_i waren für alle C=O-Gruppen identisch und hatten einen Wert von 950 L/(mol·cm). Die berechneten Dipolstärken (in esu²·cm²) wurden in Absorptionsbanden ϵ_{max} (L/(mol·cm)) mit LORENTZ'schen Bandenformen konvertiert mit der Näherung

$$D \approx 9,2 \cdot 10^{-39} \pi \epsilon_{max} w \nu_0^{-1}, \quad (4.14)$$

wobei w die Halbwertsbreite der Bande ist.

4 Methoden