

# 5 Ergebnisse

## 5.1 Proteinaufreinigung

Insgesamt wurden aus allen angestzten *S. cerevisiae*-Kulturen etwa 5 mg unmarkierte und 2,8 mg  $^{13}\text{C}$ -markierte RNase T1 isoliert. Die Ausbeuten lagen zwischen 100 und 200  $\mu\text{g}$  Protein pro Liter Kulturmedium.

### 5.1.1 Chromatographie

Mit der in Abschnitt 4.1.2.1 beschriebenen Elutionsmethode wurde eine Mischung aus ungefähr gleichen Anteilen der aus *S. cerevisiae* DT1103 exprimierten  $^{13}\text{C}$ -markierten und unmarkierten RNase T1 einerseits und RNase-T1-Standard aus *Aspergillus oryzae* andererseits mit der HPLC chromatographiert. Abbildung 5.1 zeigt das entsprechende Chromatogramm. Man sieht deutlich, dass bei einer Retentionszeit von 19

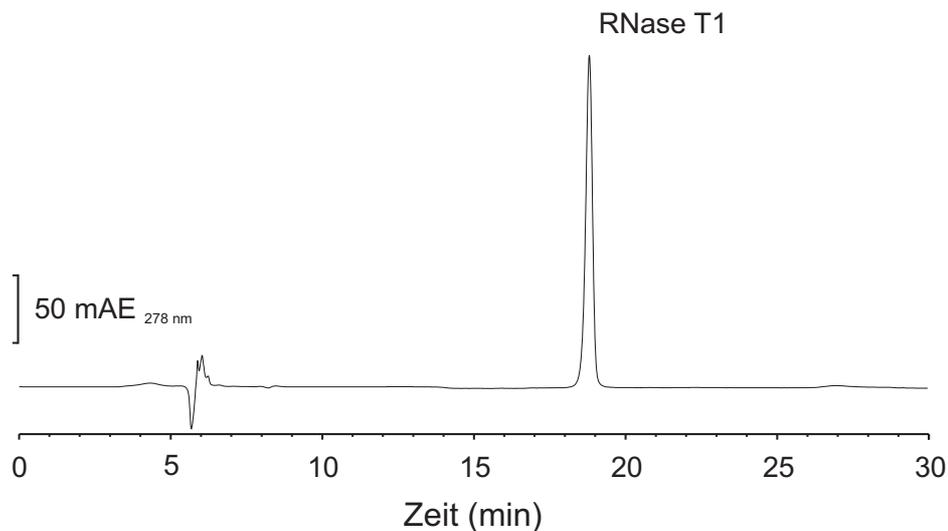


Abbildung 5.1: RP-HPLC-Chromatogramm einer Mischung von RNase-T1-Standard aus *A. oryzae* und  $^{13}\text{C}$ -markierter sowie unmarkierter RNase T1 aus *S. cerevisiae* DT1103.

Minuten ein singulärer, symmetrischer Peak eluiert wird. Hieraus kann man schließen, dass alle Komponenten der Mischung dieselbe Retentionszeit haben.

### 5.1.2 Spezifische Enzymaktivität

Die spezifische enzymatische Aktivität der  $^{13}\text{C}$ -markierten und unmarkierten endgereinigten RNase T1 aus *S. cerevisiae* wurde auf  $115 \Delta A_{257}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  bestimmt. Dieser Wert wurde auch für die RNase T1-Standards aus *E. coli* bzw. *A. oryzae* ermittelt und stimmt mit dem Literaturwert überein [87].

Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität des Kulturmediums und des Eluates nach der Anionenaustauscherchromatographie führte nach Anwendung dieser Methode zu stark streuenden Ergebnissen. Grund hierfür war wahrscheinlich eine mehr oder weniger hohe Restkonzentration weiterer Proteine und Nukleotide in diesen Medien, die die Messergebnisse verfälschten.

### 5.1.3 CD-Spektroskopie

Zur Überprüfung der Strukturidentität der  $^{13}\text{C}$ -markierten und unmarkierten RNase T1 wurden CD-Spektren aufgenommen. Die Spektren sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die CD-Spektren der beiden Proteine im Rahmen der

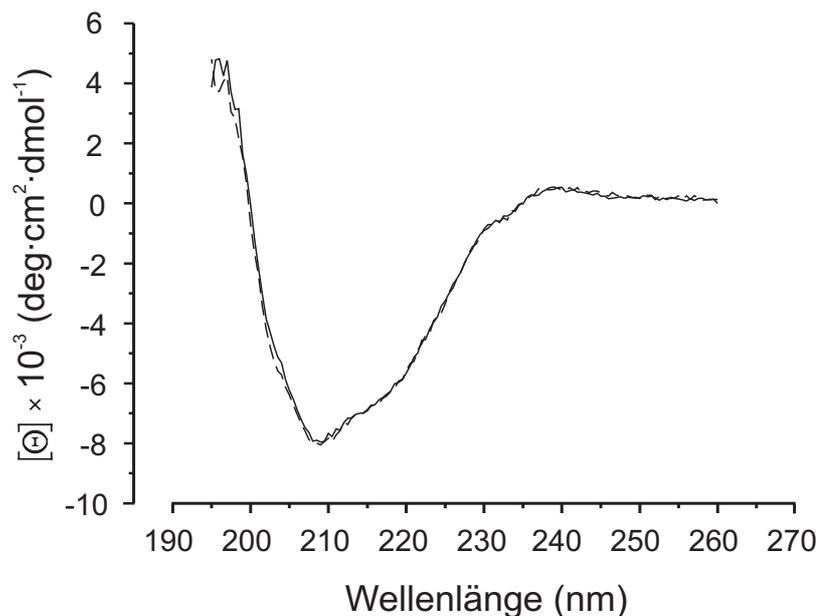


Abbildung 5.2: CD-Spektren von in *S. cerevisiae* DT1103 exprimierter  $^{13}\text{C}$ -markierter (durchgezogene Linie) und unmarkierter RNase T1 (gestrichelte Linie).

Messgenauigkeit identisch sind. Die leicht schwankenden Absorptionswerte im Bereich um 195 nm stammen vom Cacodylatpuffer, der in diesem Bereich stark absorbiert.

### 5.1.4 FTIR-Spektroskopie

Eine weitere, empfindliche Methode zur Überprüfung der Identität von Proteinen bzw. chemischer Substanzen im Allgemeinen stellt die FTIR-Spektroskopie dar. Wie bereits in Kapitel 1.2.3.1 beschrieben, reagiert besonders der Amid-I-Bereich sehr empfindlich auf Strukturänderungen des Proteinrückgrats. Abbildung 5.3 zeigt die durch Bildung der zweiten Ableitung in der Auflösung verstärkten Spektren von in *E. coli* exprimierter [78] und aus *S. cerevisiae* DT1103 isolierter unmarkierter RNase T1 im Bereich von 1500 bis 1750  $\text{cm}^{-1}$ . Die Spektren wurden auf die Tyrosinbandenintensität bei

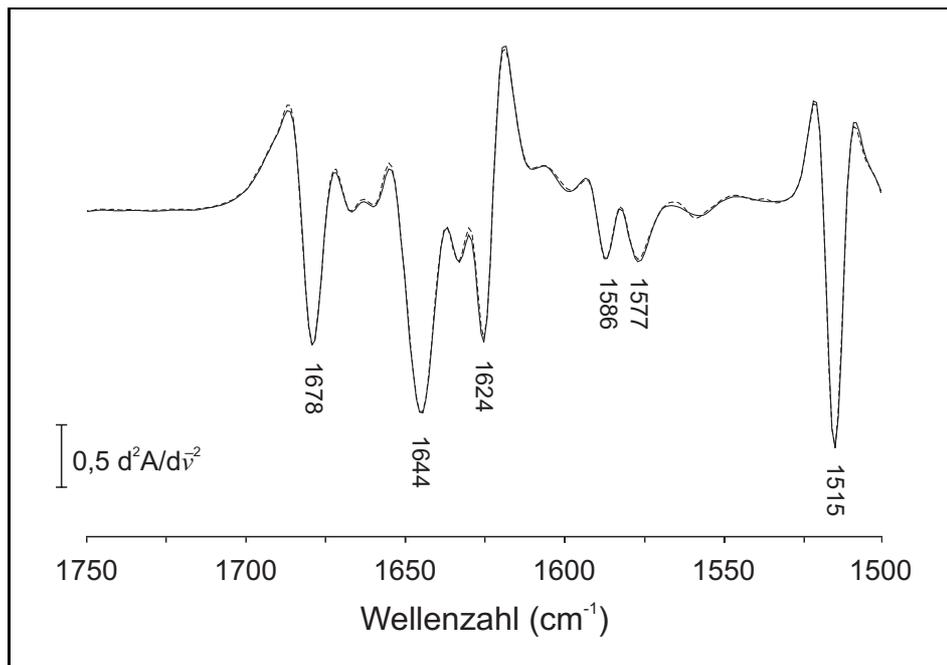


Abbildung 5.3: Zweite Ableitungen der IR-Spektren von in *S. cerevisiae* DT1103 (durchgezogene Linie) und in *E. coli* (gestrichelte Linie) exprimierter unmarkierter RNase T1 bei RT.

1515  $\text{cm}^{-1}$  normiert. Abbildung 5.3 zeigt eindeutig, dass die IR-Spektren der Proteine aus den unterschiedlichen Expressionssystemen im Rahmen der Messgenauigkeit identisch sind.

## 5.2 FTIR-Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen

Die Abbildungen 5.4 und 5.5 auf der nächsten Doppelseite zeigen den Amid-I-Bereich der Absorbanz-, der FSD-Spektren und der zweiten Ableitungen der Absorbanzspektren von Lösungen unmarkierter und  $^{13}\text{C}$ -markierter RNase T1 im Temperaturbereich zwischen 20 und 80  $^{\circ}\text{C}$ . Die Messungen wurden nach der in Abschnitt 4.3.1.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Temperaturintervalle, in denen gemessen wurde

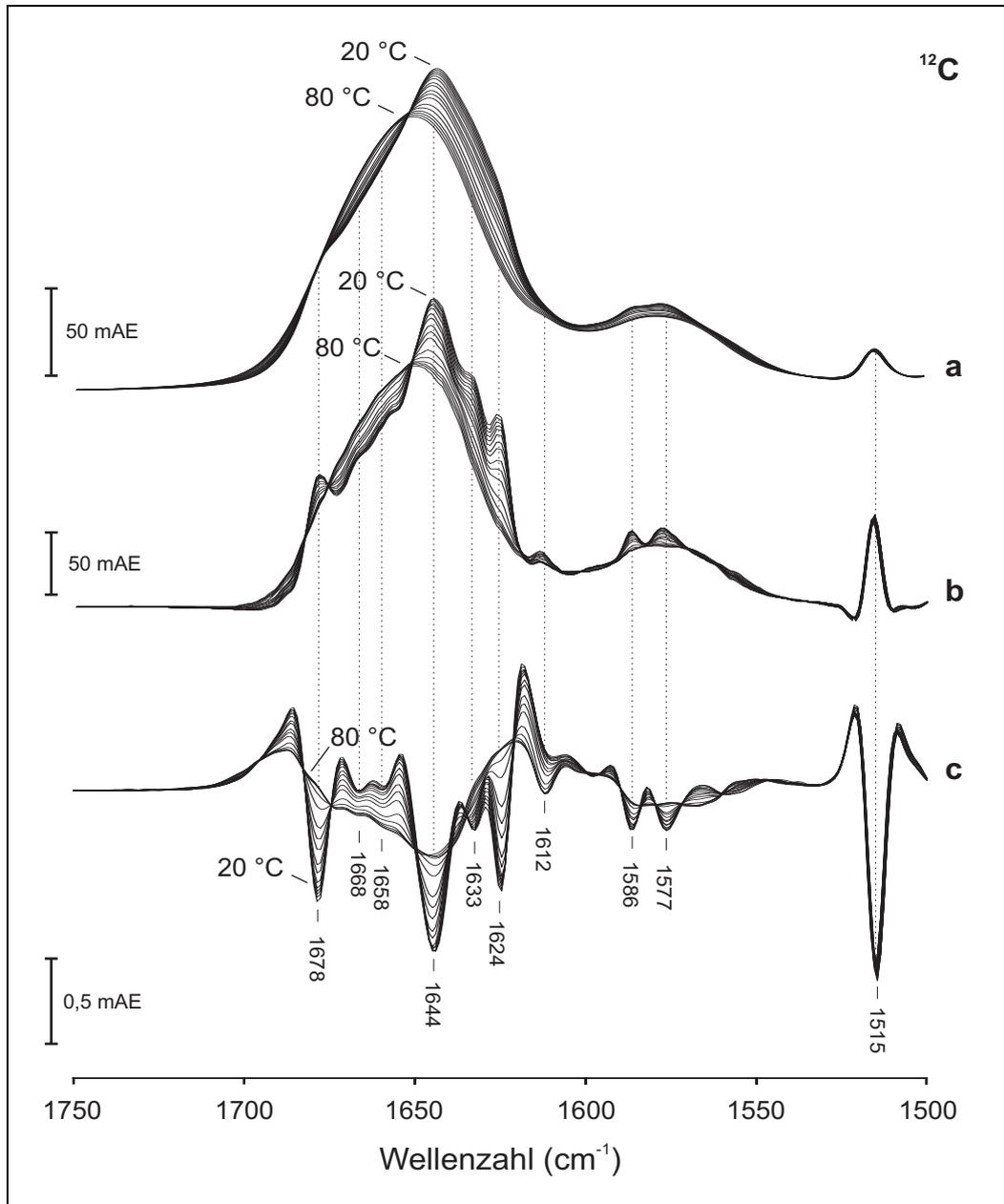


Abbildung 5.4: Absorbanzspektren (a), FSD-Spektren (b) und zweite Ableitungen der Absorbanzspektren (c) von unmarkierter RNase T1 im Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C.

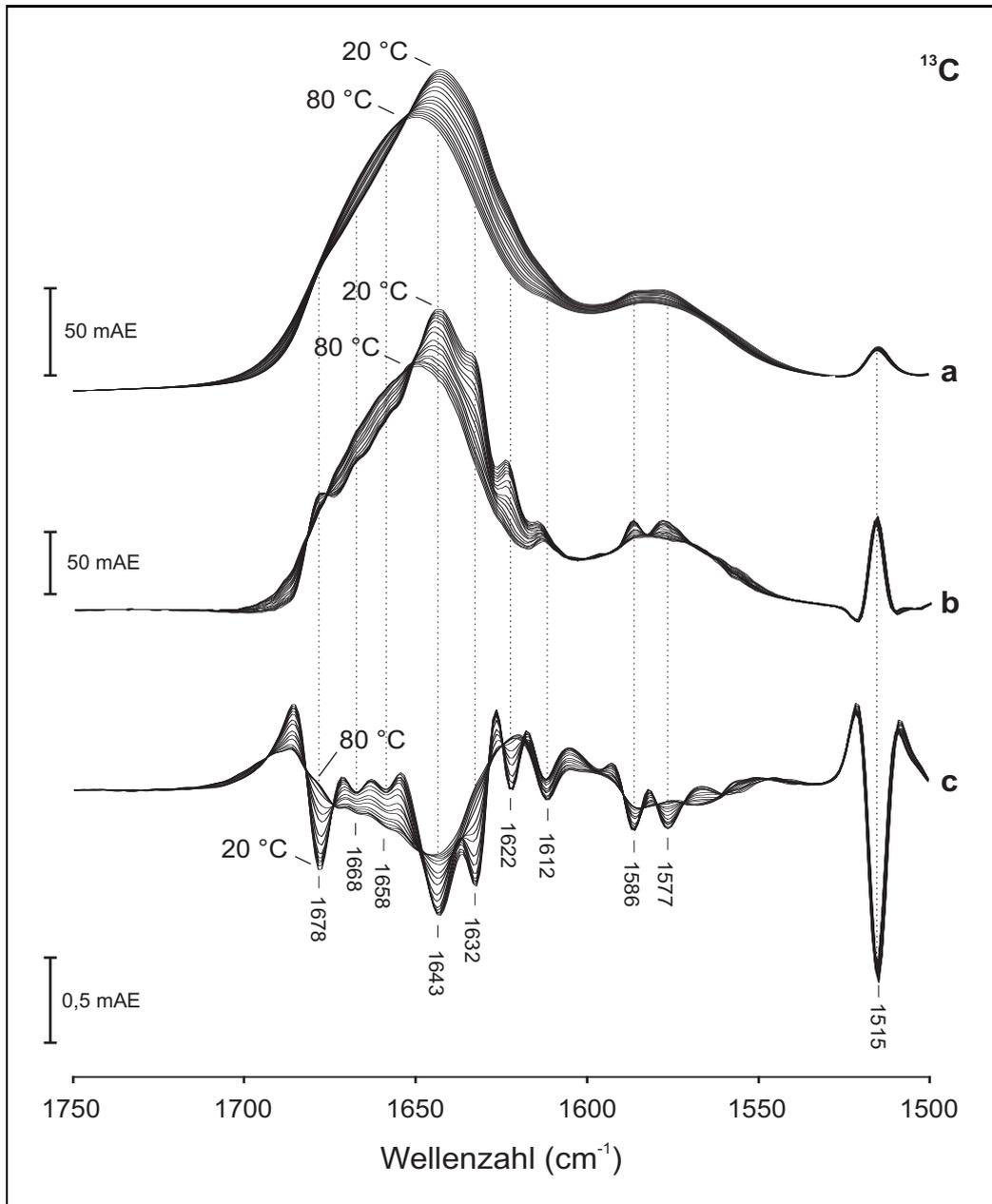


Abbildung 5.5: Absorbanzspektren (a), FSD-Spektren (b) und zweite Ableitungen der Absorbanzspektren (c) von  $^{13}\text{C}$ -markierter RNase T1 im Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C.

## 5 Ergebnisse

betragen 5 °C bzw. 2 °C im Temperaturbereich des Phasenübergangs der RNase T1 zwischen 50 und 60 °C.

In den Abbildungen 5.6 und 5.7 auf den Seiten 64 und 65 sind die Original- und FSD-Spektren der unmarkierten und  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 bei 20 und 80 °C übereinandergelegt. Hierbei handelt es sich um dieselben Spektren, die bereits in den Abbildungen 5.4 und 5.5 gezeigt wurden. Damit die Gesamtintensitäten der beiden Spektren genauer miteinander verglichen werden können, wurden sie über die Tyrosin-Bande normalisiert. Dieses Verfahren ist zulässig, weil nicht zu erwarten ist, dass die Seitengruppenabsorptionen der Tyrosine in irgendeiner Form von den Isotopenmarkierungen beeinflusst werden.

Abbildung 5.8 auf Seite 66 zeigt die übereinandergelegten zweiten Ableitungen der Absorbanzspektren aus den Abbildungen 5.6 und 5.7 ebenfalls bei 20 und 80 °C. Die auflösungsverstärkten FSD-Spektren und die zweiten Ableitungen der Absorbanzspektren lassen genauere Aussagen über die Proteinstruktur zu. Eine Bandenzuordnung gelingt mit den aus der Literatur bekannten Werten für den Amid-I-Bereich der RNase T1. Diese sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst:

Tabelle 5.1: Bandenzuordnung für den Amid-I-Bereich von RNase T1 (nach [60])

Bandenposition ( $\text{cm}^{-1}$ )	Zuordnung
1624, 1633	unterschiedliche $\beta$ -Faltblattstrukturen (niederfrequent)
1644	irreguläre Strukturen, Turn
1658	$\alpha$ -Helix
1667	Turn
1678, 1688	$\beta$ -Faltblattbande (hochfrequent), Turn

Die Banden bei 1678 und 1624  $\text{cm}^{-1}$  sowie die Bande bei 1633  $\text{cm}^{-1}$  wurden dem  $\beta$ -Faltblatt-System im RNase T1-Molekül zugeordnet. Es wird darüber diskutiert, ob eine der beiden niederfrequenten Banden das fünfsträngige Faltblatt und die andere das zweisträngige Faltblatt repräsentiert, oder ob eine Bande die vier kurzen, außenliegenden  $\beta$ -Stränge darstellt und die andere die drei Stränge, die den Kern des großen Faltblattsystems in der RNase T1 bilden. Die breite Bande bei 1644  $\text{cm}^{-1}$  ist eine Überlagerung nicht aufgelöster Banden ungeordneter Strukturen, Schleifen und Turns [60]. Letztere absorbieren auch im Bereich zwischen 1650 und 1690  $\text{cm}^{-1}$  [62]. Die Bande bei 1667  $\text{cm}^{-1}$  wurde deshalb ebenfalls der Absorption von Turnstrukturen zugeschrieben [60]. Die  $\alpha$ -Helix in der Struktur der RNase T1 konnte bisher noch nicht eindeutig einer bestimmten Bande zugeordnet werden. Nach H/D-Austauschexperimenten wurde die  $\alpha$ -Helix der Bande bei 1658  $\text{cm}^{-1}$  zugeordnet [60], obwohl diese Absorptionsfrequenz für Helices in globulären Proteinen eigentlich zu hoch und eher typisch für Membranproteine ist [98,99]. Des Weiteren konnte bei dieser Wellenzahl die Helixbildung in Kinetikexperimenten bisher noch nicht beobachtet werden [3,47]. Die verschiedenen Ringschwingungen der Aminosäureseitengruppe Tyrosin absorbieren bei 1612 und 1515  $\text{cm}^{-1}$ . Die Aminosäureseitengruppen Aspartat und Glutamat absorbieren bei 1586 und 1577  $\text{cm}^{-1}$ .

## 5.2 FTIR-Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen

Die Absorbanzspektren der unmarkierten und  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 haben über den gesamten Temperaturbereich einen ähnlichen Verlauf (Abbildungen 5.4 und 5.5). Die Unterschiede zwischen den Absorbanzspektren der beiden RNase T1-Varianten sind bei den jeweiligen Temperaturen nur sehr gering. Die Amidbanden sind so breit und unstrukturiert, dass der Einfluss der Isotopenmarkierungen an vier der 104 Aminosäuren im Protein, kaum ins Gewicht fällt. Diese Beobachtung wird umso plausibler wenn man sich vor Augen führt, dass der eigentliche Massenunterschied zwischen diesen beiden RNase T1-Molekülen lediglich auf vier zusätzliche Neutronen zurückzuführen ist. Diese machen nur etwa 0,4 ‰ der Gesamtmasse der RNase T1 aus. Aus diesen Gründen war es auch nicht möglich, den Massenunterschied zwischen den beiden Proteinvarianten mit den uns zur Verfügung stehenden massenspektrometrischen Techniken (MALDI-TOF, Universität Leipzig) zu detektieren.<sup>1</sup>

Abbildung 5.6 a auf der nächsten Seite zeigt im direkten Vergleich die übereinandergelegten Absorbanzspektren der unmarkierten und isotoopenmarkierten RNase T1 bei 20 °C. Trotz der relativ breiten Amid-I-Kontur lassen sich hier Unterschiede in der Intensitätsverteilung feststellen. Das Spektrum der isotoopenmarkierten RNase T1 weist am Intensitätsmaximum der Amid-I-Bande bei 1643  $\text{cm}^{-1}$  eine etwas geringere Intensität auf als das der unmarkierten Variante. Hingegen ist die Intensität der  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 im Bereich um 1600  $\text{cm}^{-1}$  etwas höher als beim unmarkierten Protein. Die Schwingungsfrequenzen der isotoopenmarkierten C=O-Gruppen sind also aufgrund der höheren Masse des Kohlenstoffisotops  $^{13}\text{C}$  nach niedrigerer Energie verschoben. Mit  $\nu = \frac{c}{\lambda}$  und  $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$  folgt aus Gleichung 1.7 von Seite 10

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}. \quad (5.1)$$

Nimmt man für  $^{12}\text{C}$  eine Masse von 12 g/mol, für  $^{13}\text{C}$  eine Masse von 13 g/mol und für O eine Masse von 16 g/mol, so ergeben sich für die entsprechenden reduzierten Massen  $\mu^{12\text{C}} = 1,143 \cdot 10^{-26}$  kg und für  $\mu^{13\text{C}} = 1,195 \cdot 10^{-26}$  kg. Die experimentell ermittelte Differenz in der Intensitätsverteilung der Amid-I-Bande zwischen  $^{12}\text{C}=\text{O}$  und  $^{13}\text{C}=\text{O}$  beträgt ca. 40  $\text{cm}^{-1}$  und stimmt demzufolge mit dem nach Gleichung 5.1 theoretisch berechneten Wert von 35  $\text{cm}^{-1}$  gut überein.<sup>2</sup>

Wesentlich komplexer als in den bisher betrachteten Absorbanzspektren sind jedoch die spektralen Unterschiede zwischen den FSD-Spektren der unmarkierten und  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 bei 20 °C (Abbildung 5.6 b). Man sieht deutlich, dass die Isotoopenmarkierungen nicht einfach eine Verschiebung der entsprechenden C=O-Streckschwingungsabsorptionen um ca. 35  $\text{cm}^{-1}$  nach niedrigerer Energie zur Folge haben, wie es nach Gleichung 5.1 zu erwarten wäre. Wie schon bei den Absorbanzspektren, so ist auch bei den FSD-Spektren bei 1643 bzw. 1644  $\text{cm}^{-1}$  eine Intensitätsabnahme zu verzeichnen. Eine höhere Intensität wird für die isotoopenmarkierte RNase T1 bei 1633  $\text{cm}^{-1}$ , bei 1614  $\text{cm}^{-1}$  und um 1600  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet. Hingegen verliert

<sup>1</sup>Sicherlich ließen sich die Isotoopenmarkierungen durch eine Totalhydrolyse oder *peptide mapping* nachweisen [27].

<sup>2</sup>Die Kraftkonstante  $k$  liegt bei Doppelbindungen in der Größenordnung von  $10^3 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$  [49].

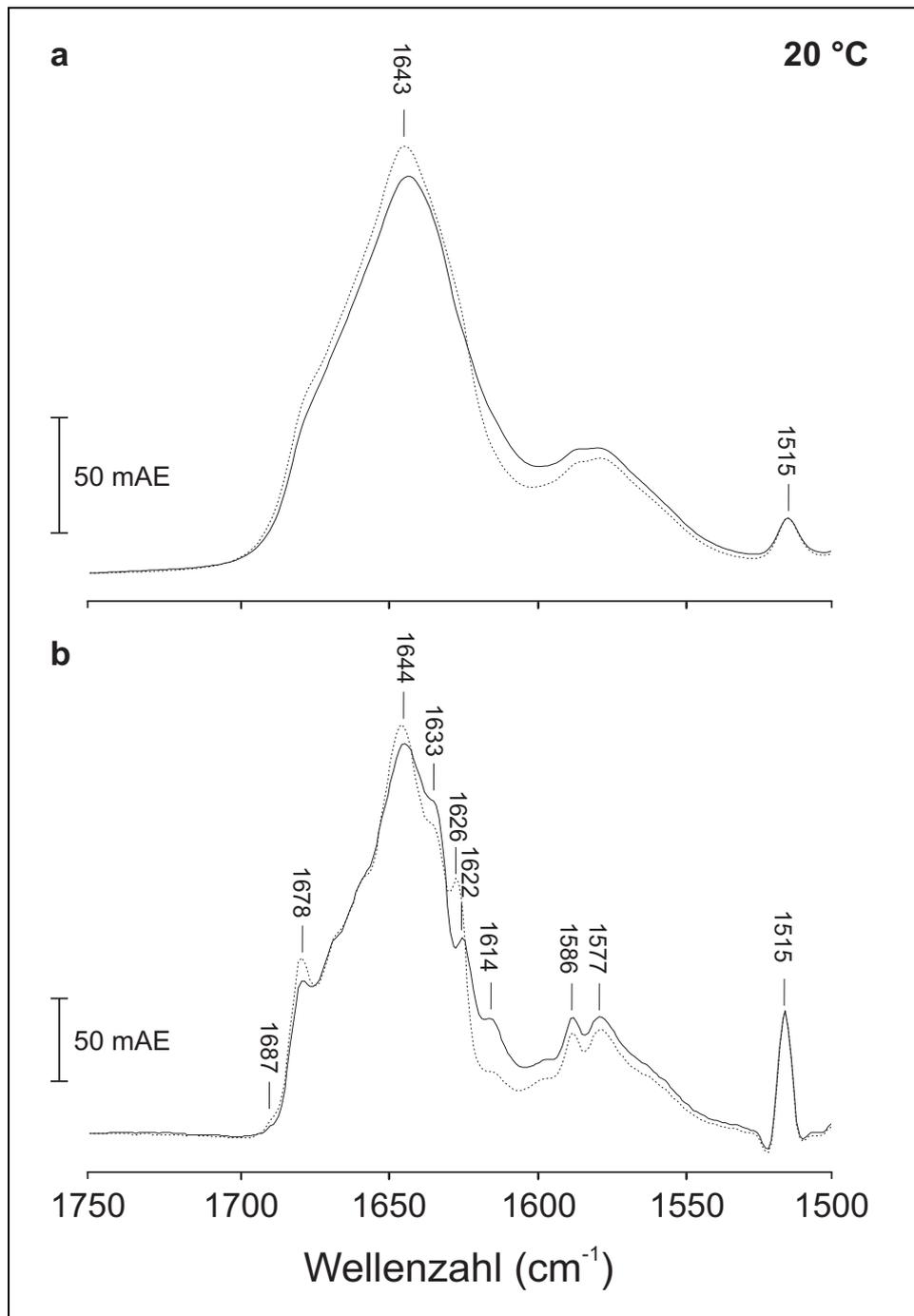


Abbildung 5.6: Original- (a) und FSD-Spektrum (b) von <sup>13</sup>C-markierter (durchgezogene Linie) und unmarkierter (gestrichelte Linie) RNase T1 bei 20 °C.

## 5.2 FTIR-Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen

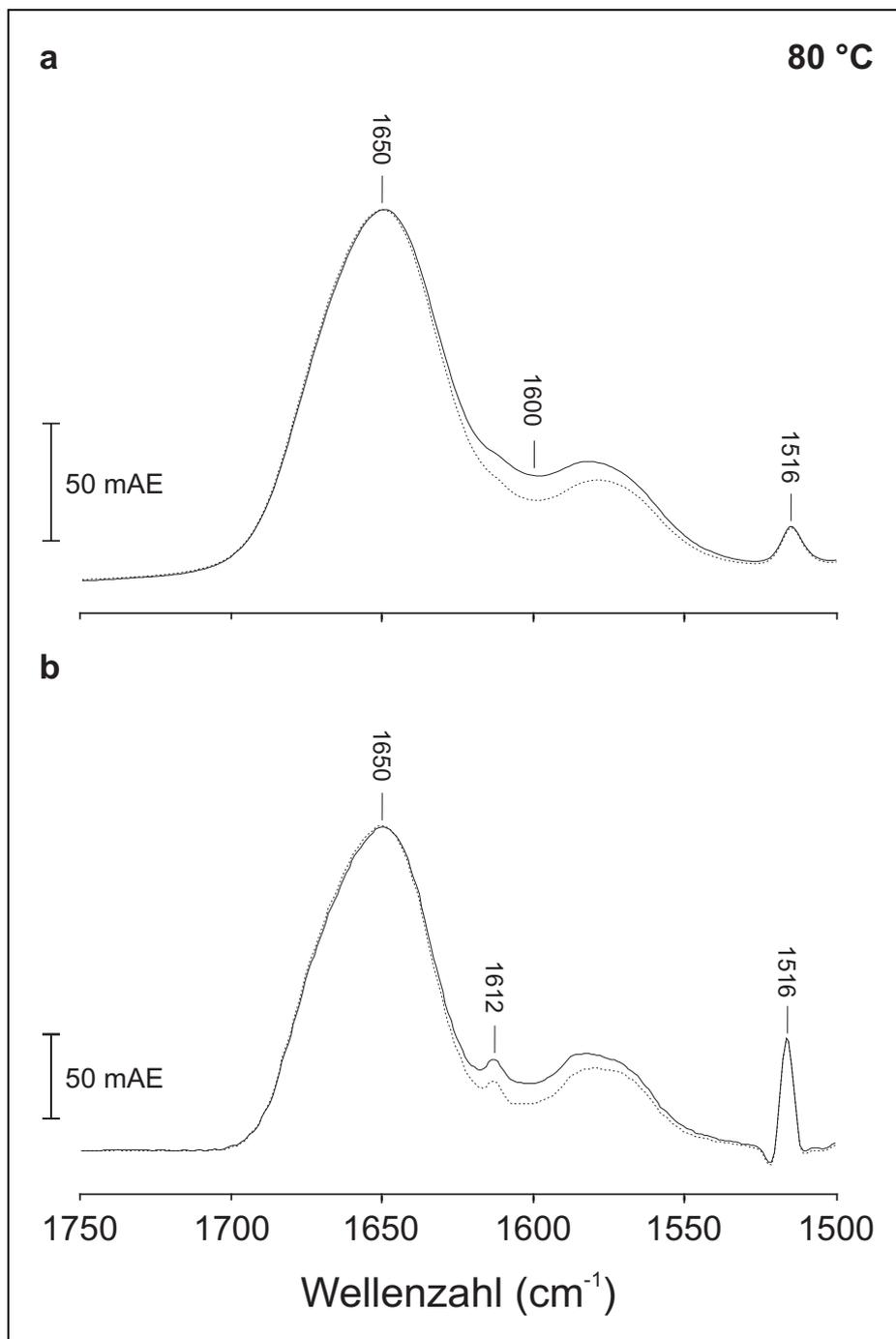


Abbildung 5.7: Original- (a) und FSD-Spektrum (b) von <sup>13</sup>C-markierter (durchgezogene Linie) und unmarkierter (gestrichelte Linie) RNase T1 bei 80 °C.

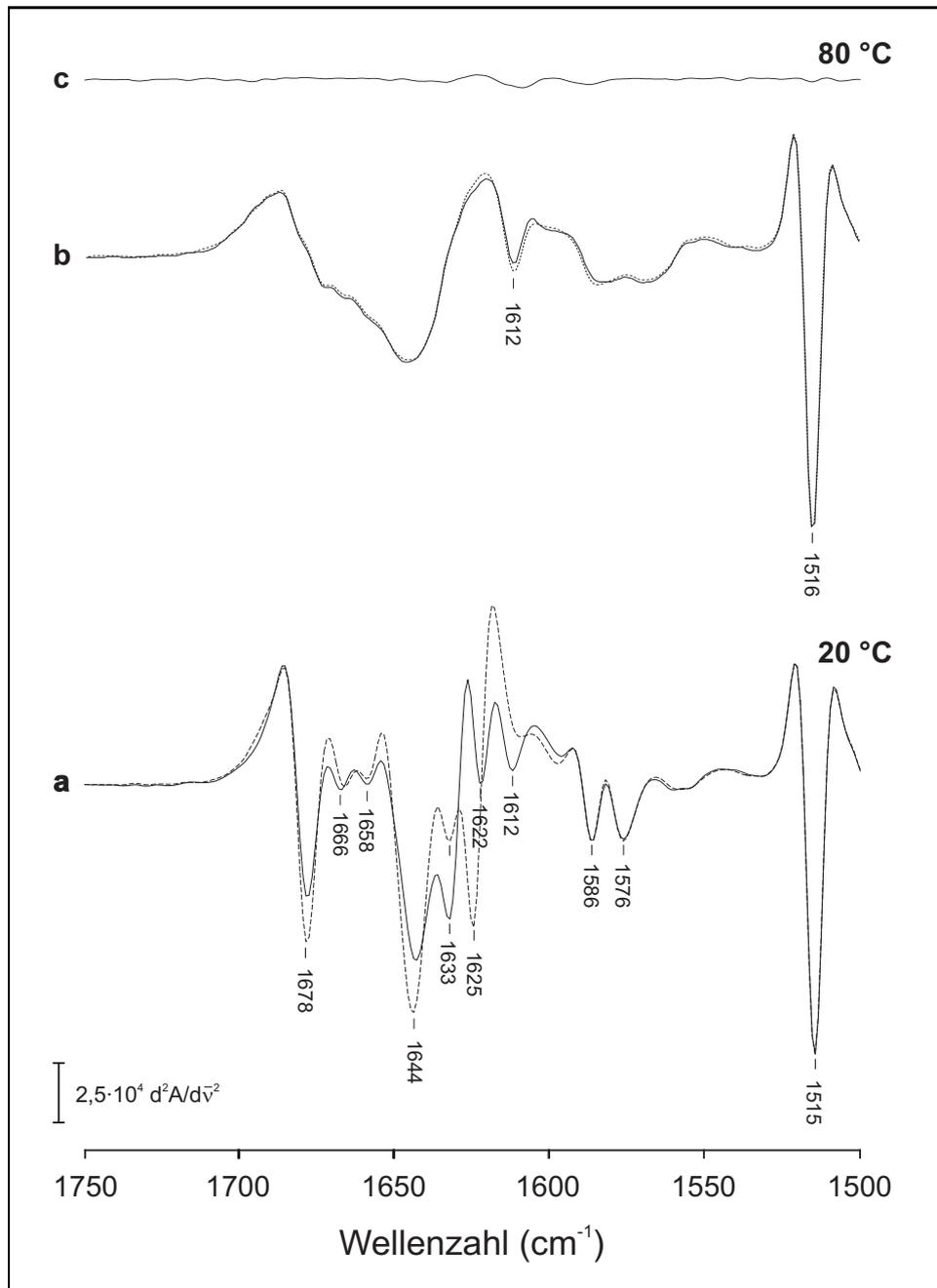


Abbildung 5.8: Zweite Ableitungen der Absorbanzspektren von unmarkierter (gestrichelte Linie) und <sup>13</sup>C-markierter (durchgezogene Linie) RNase T1 bei 20 °C (a) und 80 °C (b). Abbildung c zeigt das Differenzspektrum aus den zweiten Ableitungen der beiden thermisch entfalteten Proteinvarianten (b).

## 5.2 FTIR-Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen

die isotoopenmarkierte RNase T1 bei 1678 und 1626  $\text{cm}^{-1}$  aufgrund der vier  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffatome in den Prolinen an Intensität.

Abbildung 5.7 auf Seite 65 zeigt die Spektren der unmarkierten und  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 bei 80°C. Die Proteine sind aufgrund der hohen Temperatur, die weit über ihrem Schmelzpunkt liegt, vollständig entfaltet. Dementsprechend zeigen die Absorbanz- und FSD-Spektren eine breite unstrukturierte Amid-I-Bande. Im Amid-I-Bereich von 1700 bis 1630  $\text{cm}^{-1}$  liegen die Spektren beider RNase T1-Varianten sehr gut übereinander. Im Bereich um 1600  $\text{cm}^{-1}$  hat jedoch die isotoopenmarkierte RNase T1 sowohl in den Absorbanz- als auch in den FSD-Spektren eine höhere Intensität als das unmarkierte Protein. Wie schon bei den Spektren bei 20°C, so stimmen auch bei 80°C die Bandenpositionen der Tyrosinabsorptionen genau überein. Dies ist ein sicherer Hinweis darauf, dass die Proteine bei beiden Temperaturen dieselben Konformationen haben [23, 47, 100]. In den FSD-Spektren wird zusätzlich noch bei beiden Proteinen bei 1612  $\text{cm}^{-1}$  eine Bande aufgelöst, die ebenfalls auf eine Seitengruppenabsorption der Tyrosine im Molekül zurückzuführen ist (siehe auch [59] und Tabelle 1.3 auf Seite 20).

Die Feinstruktur des Amid-I-Bereichs tritt noch besser in den zweiten Ableitungen der Absorbanzspektren in Abbildung 5.8 auf der vorherigen Seite hervor. Hier lassen sich ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den beiden Proteinvarianten bei 20°C erkennen: Die beiden Banden bei 1633 und 1625  $\text{cm}^{-1}$  der unmarkierten RNase T1 haben beim isotoopenmarkierten Protein ein deutlich verändertes Intensitätenverhältnis zueinander. Hinzu kommt, dass die Bande bei 1625  $\text{cm}^{-1}$  durch die Isotoopenmarkierung drei Wellenzahlen niederfrequent verschoben ist. Des Weiteren ist bei der  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 bei der hochfrequenten  $\beta$ -Faltblatt-Bande bei 1678  $\text{cm}^{-1}$  und der Bande bei 1644  $\text{cm}^{-1}$  ein deutlicher Intensitätsverlust festzustellen.<sup>3</sup> Im Gegensatz zum Amid-I-Bereich ist der Bereich der Aminosäureseitengruppenabsorptionen bei beiden Varianten nahezu identisch. Ähnlich wie schon zuvor bei den FSD-Spektren beschrieben, lassen sich auch bei den zweiten Ableitungen die Spektren der temperaturinduziert entfalteten unmarkierten und  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 im Rahmen der Messgenauigkeit praktisch nicht unterscheiden.

Die spektralen Unterschiede zwischen den beiden RNase T1-Varianten treten noch deutlicher in Differenzspektren hervor. Abbildung 5.9 auf der nächsten Seite zeigt die Differenzspektren der Absorbanz- und FSD-Spektren bei 20°C und 80°C. Diese Differenzspektren wurden durch eine einfache mathematische Subtraktion der jeweiligen Spektren der unmarkierten RNase T1 von denen der  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 generiert. Das Differenzspektrum bei 20°C in Abbildung 5.9 a zeigt die Unterschiede zwischen den Absorbanzspektren der beiden Proteinvarianten wesentlich detaillierter als Abbildung 5.6 a auf Seite 64. Die isotoopenmarkierte RNase T1 hat bei 1614 und 1635  $\text{cm}^{-1}$  eine höhere Intensität als die unmarkierte RNase T1. Hingegen hat sie bei 1679, 1645 und 1626  $\text{cm}^{-1}$  eine niedrigere Intensität. Das entsprechende FSD-

---

<sup>3</sup>Es sei an dieser Stelle nochmals angemerkt, dass die Intensitäten in den zweiten Ableitungen von Absorbanzspektren sehr stark von den Halbwertsbreiten der jeweiligen Banden abhängen (siehe Abschnitt 1.2.2.3) und deshalb eine Interpretation der Intensitätsverhältnisse stets mit Vorsicht durchzuführen ist.

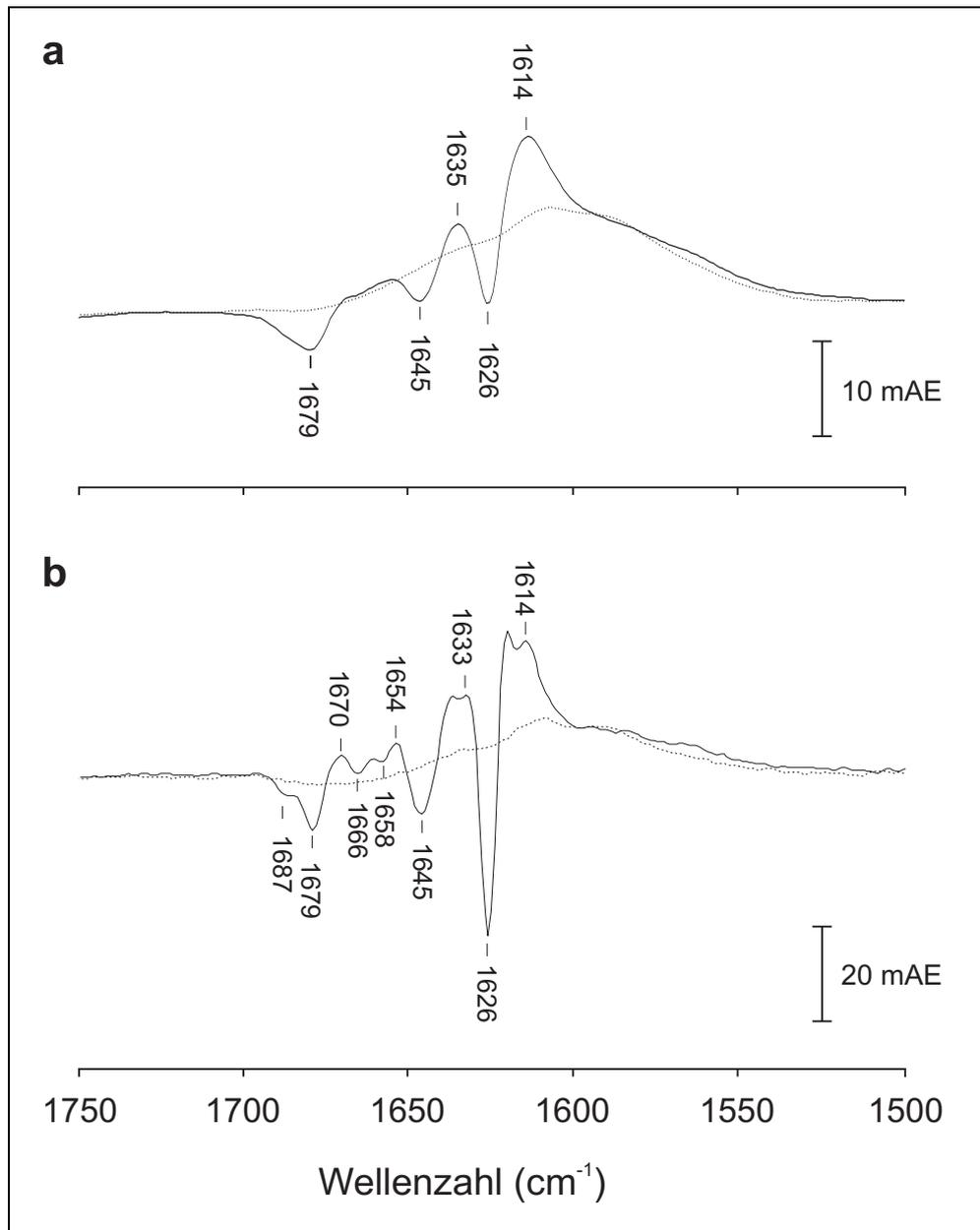


Abbildung 5.9: Differenzspektren zwischen der  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 und unmarkierten RNase T1. Abbildung a zeigt die Differenzspektren aus den Originalspektren bei 20°C (durchgezogene Linie) und bei 80°C (gestrichelte Linie). Abbildung b zeigt die Differenzspektren aus den FSD-Spektren bei 20°C (durchgezogene Linie) und bei 80°C (gestrichelte Linie). Die Spektren wurden zunächst auf die Tyrosinbande (bei 1515 bzw. 1516  $\text{cm}^{-1}$ ) normiert, dann wurde das  $^{12}\text{C}$ -Spektrum vom  $^{13}\text{C}$ -Spektrum subtrahiert.

## 5.2 FTIR-Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen

Spektrum in Abbildung 5.9 b zeigt das gleiche Ergebnis – allerdings mit erhöhter Auflösung. Die breiten positiven Banden in Abbildung 5.9 a bei 1614 und 1635  $\text{cm}^{-1}$  sind strukturierter, bei 1658 bzw. 1666  $\text{cm}^{-1}$  sind jetzt kleine negative Banden zu erkennen, bei 1654 bzw. 1670  $\text{cm}^{-1}$  positive und bei 1687  $\text{cm}^{-1}$  ist an der negativen Kontur eine Schulter aufgelöst.

Die Differenzspektren bei 80 °C in Abbildung 5.9 a und b lassen noch eine breite, positive Kontur um 1600  $\text{cm}^{-1}$  erkennen. Diese Kontur ist in den auflösungsverstärkten FSD-Spektren (5.9 b) schwächer ausgeprägt, als in den Absorbanzspektren (5.9 a). Des Weiteren zeigen die überlagerten Spektren der entfalteten und nativ gefalteten Proteine, dass diese breite Absorptionsbande ebenfalls bei 20 °C nahezu unverändert enthalten ist. Es handelt sich deshalb hierbei sicherlich nicht um spektrale Informationen, die auf die Isotopenmarkierungen zurückzuführen sind. Vielmehr sind die Ursachen für diese breite Kontur ein schlecht kompensierter Untergrund, wie er zum Beispiel bei Differenzspektren von Proben mit unterschiedlichen HOD-Gehalten, pH-Werten oder Schichtdicken beobachtet werden kann. Hierfür spricht weiterhin die Tatsache, dass die zweiten Ableitungen der Absorbanzspektren bei 80 °C in Abbildung 5.8 auf Seite 66 diese breite Untergrundabsorption nicht verstärken. Wie bereits in Abschnitt 1.2.2.3 erläutert wurde, hängt der Grad der Auflösungsverstärkung von den Halbwertsbreiten der entsprechenden Banden ab. Das resultierende Differenzspektren von Abbildung 5.8 c zeigt eindeutig, dass die beiden Proteinvarianten im entfalteten Zustand praktisch ununterscheidbar sind. Die Isotopenmarkierungen sind nicht mehr detektierbar. Ein ähnlicher Effekt wurde auch schon bei einem Vergleich der Spektren isotopenmarkierter und unmarkierter Peptide (20 Aminosäuren, je vier Isotopenmarkierungen) in der Literatur beschrieben [101].

### 5.2.1 Schmelzkurvenvergleich der beiden Proteinvarianten anhand von IR-Markerbanden

Aus den FSD-Spektren und den zweiten Ableitungen der Absorbanzspektren (Abbildungen 5.4 und 5.5) wurde der Intensitäts- bzw. Frequenzverlauf einiger struktursensitiver IR-Markerbanden als Funktion der Temperatur aufgetragen (Abbildung 5.10 auf der nächsten Seite).

Ein Vergleich der Schmelzkurven der unmarkierten RNase T1 mit denen der  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 zeigt, dass diese über den gesamten Temperaturbereich einen nahezu identischen Verlauf haben. Die jeweiligen Kurven unterscheiden sich erwartungsgemäß lediglich in der Intensität. Des Weiteren zeigt Abbildung 5.10 eindrucksvoll für beide Proteine den Phasenübergang zwischen dem nativen und entfalteten Zustand bei ungefähr 55 °C. Die kleinen Unterschiede in den Bandenpositionen der Markerbanden im Gegensatz zu den in den Abbildungen 5.3 bis 5.5 dargestellten Werten, ergeben sich aus den unterschiedlichen Methoden zur Bandenanschärfung (zweite Ableitungen bzw. FSD). Die Intensitäten wurden aus den FSD-Spektren ausgelesen, weil diese von der Halbwertsbreite der Banden unabhängige Werte liefern (siehe Abschnitt 1.2.2.3). Die genauen Positionen der Tyrosinbanden wurde aus den zweiten Ableitungen der Absorbanzspektren bestimmt.

## 5 Ergebnisse

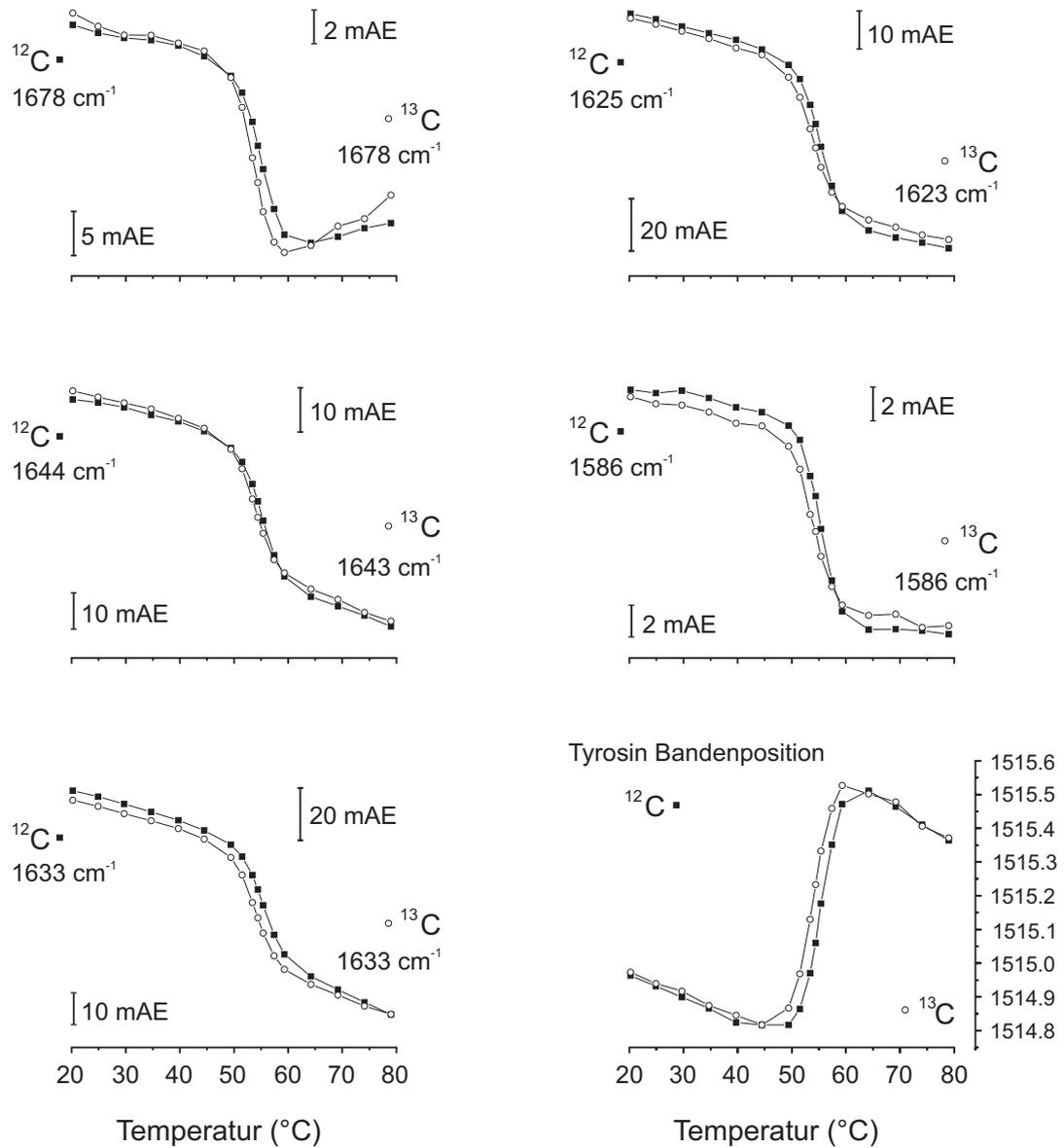


Abbildung 5.10: Änderungen der Intensitäten einiger IR-Banden bzw. der Tyrosin-Bandenposition von unmarkierter (geschlossene Quadrate) und  $^{13}\text{C}$ -markierter (offene Kreise) RNase T1 während der thermisch induzierten Denaturierung unter Gleichgewichtsbedingungen. Die Intensitäten wurden aus FSD-Spektren und die Tyrosin-Bandenposition aus den zweiten Ableitungen der Absorbanzspektren ermittelt.

## 5.2 FTIR-Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen

Die Schmelzkurven von Abbildung 5.10 wurden nach der in Abschnitt 4.3.1.3 beschriebenen Methode normalisiert und sind in Abbildung 5.11 dargestellt. Eine solche Normalisierung erlaubt einen besseren Vergleich der einzelnen Schmelzkurven miteinander und kompensiert die linear ansteigenden Abschnitte vor bzw. hinter dem Phasenübergang. Diese sind nämlich nicht auf Veränderungen der Proteinstrukturen zurückzuführen, sondern resultieren aus dem Einfluss der Temperatur auf die Probe. Die Normalisierung wurde unter Annahme eines Zweizustandsgleichgewichtes durchgeführt, wobei nun jeder Messpunkt die Fraktion nativer Moleküle als einen Wert zwischen Null und Eins darstellt. Die Schmelztemperaturen der beiden Proteinvarianten sind demnach definiert als die Temperaturen, bei denen bereits 50 % der Moleküle den Phasenübergang vollzogen haben.

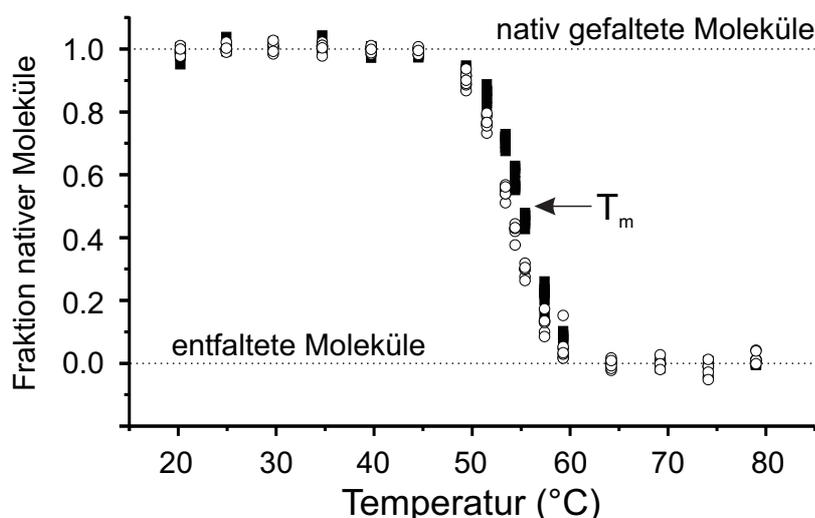


Abbildung 5.11: Normierte Intensitäten der IR-Banden bei 1577, 1586, 1623, 1625, 1633, 1643, 1644 und 1678  $\text{cm}^{-1}$  und Position der Bande bei 1515  $\text{cm}^{-1}$  von unmarkierter (geschlossene Quadrate) und <sup>13</sup>C-markierter (offene Kreise) RNase T1 während der thermisch induzierten Denaturierung zwischen 20 und 80 °C. Sämtliche Intensitäten wurden aus FSD-Spektren und die Bandenposition der Tyrosinbande bei 1515  $\text{cm}^{-1}$  aus den zweiten Ableitungen der Absorbanzspektren ermittelt.

Aus den normalisierten Schmelzkurven wurden die Schmelztemperaturen und die VAN 'T HOFF'sche Enthalpieänderungen am Phasenübergang berechnet. Die entsprechenden Werte sind Tabelle 5.2 auf der nächsten Seite dargestellt. Für die Ermittlung dieser Größen wurden die Messpunkte der einzelnen Markerbanden für jede Proteinvariante gemittelt. Es ist zusätzlich aus Abbildung 5.11 ersichtlich, dass zwar alle Banden der jeweiligen RNase T1-Variante kooperativ aufschmelzen, jedoch zwischen den einzelnen Markerbanden eine kleine Toleranz festzustellen ist. Dies wird auch durch die thermodynamischen Größen in Tabelle 5.2 widergespiegelt. Für die Schmelztem-

Tabelle 5.2: Schmelztemperaturen und VAN 'T HOFF-Enthalpieänderungen am Phasenübergang von unmarkierter und  $^{13}\text{C}$ -markierter RNase T1 aus *S. cerevisiae*.

RNase T1	Schmelztemperatur $T_m$ (°C)	$\Delta H_{\text{VAN 'T HOFF}}$ (kJ·mol $^{-1}$ )
$^{12}\text{C}$	55,1 ( $\pm 0,2$ )	390 ( $\pm 30$ )
$^{13}\text{C}$	53,8 ( $\pm 0,3$ )	335 ( $\pm 40$ )

peratur und die VAN 'T HOFF'sche Enthalpieänderung am Phasenübergang ergeben sich zwischen den beiden Proteinvarianten geringe Unterschiede. Die  $^{13}\text{C}$ -markierte RNase T1 weist demnach eine etwas geringere Stabilität auf. Dies war nicht zu erwarten. Die vier Isotopenmarkierungen sollten eigentlich das Schmelzverhalten der RNase T1 nicht beeinflussen. Es ist allerdings bekannt, dass selbst geringe Toleranzen im pH-Wert und in der Ionenstärke von Protein- oder Polymerlösungen Einfluss auf charakteristische thermodynamische Größen nehmen können. Beeinflusst werden dabei in erster Linie die schwachen intra- und intermolekularen Wechselwirkungen [102]. Nachdem jedoch bereits mit verschiedenen Methoden die Identität der beiden Proteinvarianten bestätigt werden konnte, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass nicht identische Lösebedingungen zu den geschilderten Diskrepanzen führten. Wegen Substanzmangel konnte das Experiment leider nicht wiederholt werden.

### 5.3 Berechnete Spektren

Abbildung 5.12 auf der nächsten Seite zeigt die nach der in Abschnitt 4.4 vorgestellten Methode auf Basis von TDC berechneten Amidbanden der unmarkierten und  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1. Die genauen Koordinaten der C=O-Gruppen stammen von einem pdb-File der Kristallstruktur des Proteins [42]. Wie auch schon bei den experimentell ermittelten Spektren der unmarkierten und  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 beobachtet werden konnte (siehe Abbildungen 5.4 und 5.5 auf den Seiten 60 und 61 sowie Abbildung 5.6 auf Seite 64), weisen die isotonenmarkierten Spektren im Bereich um  $1620\text{ cm}^{-1}$  eine höhere Intensität auf als die des unmarkierten Proteins. Des Weiteren ist bei  $1647\text{ cm}^{-1}$  eine geringere Intensität festzustellen, sowie bei  $1669\text{ cm}^{-1}$  eine etwas höhere als bei der unmarkierten Variante.

Das aus den beiden Absorbanzspektren errechnete Differenzspektrum ist in Abbildung 5.13 auf der nächsten Seite dargestellt. Negative Differenzen ergeben sich bei  $1643$ ,  $1652$ ,  $1677$  und  $1684\text{ cm}^{-1}$ . Positive Differenzbanden werden bei  $1615$ ,  $1625$  und  $1667\text{ cm}^{-1}$  festgestellt. Qualitative betrachtet, ist das berechnete Differenzspektrum dem experimentell ermittelten Differenzspektrum zwischen unmarkierter und  $^{13}\text{C}$ -markierter RNase T1 sehr ähnlich.

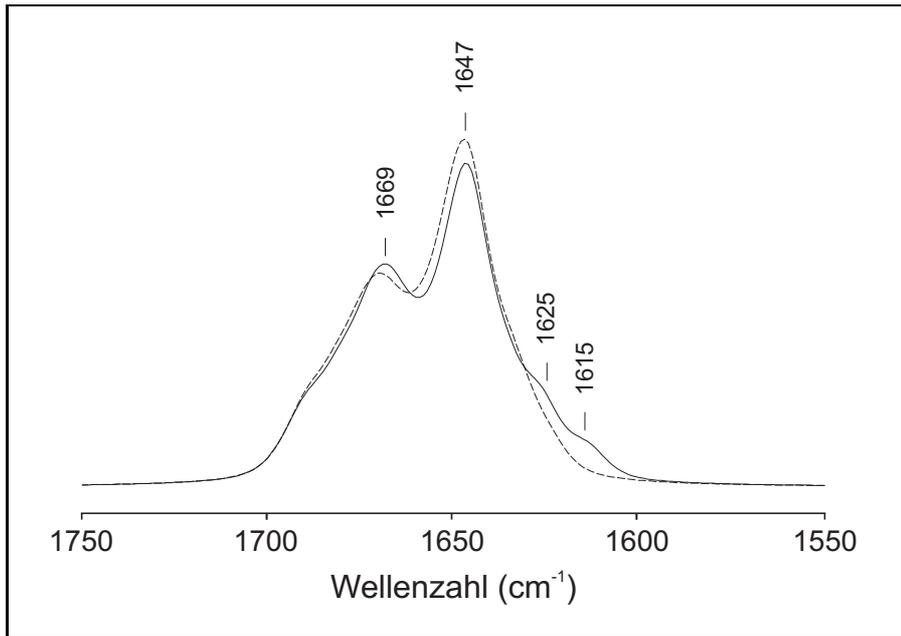


Abbildung 5.12: Amid-I-Bereich der berechneten Spektren von unmarkierter (gestrichelte Linie) und  $^{13}\text{C}$ -markierter (durchgezogene Linie) RNase T1.

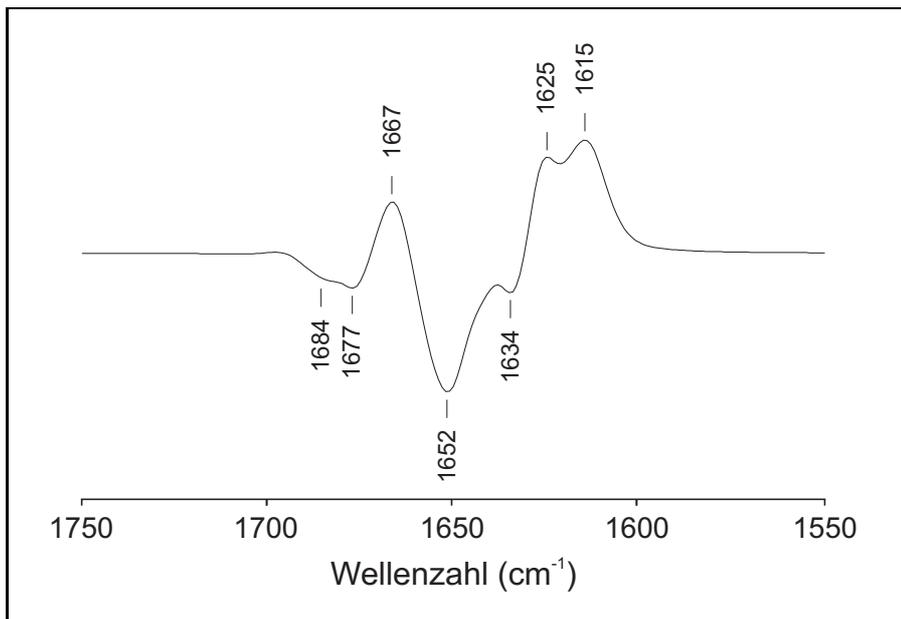


Abbildung 5.13: Differenzspektrum der berechneten Spektren von Abbildung 5.12 (vierfach vergrößert). Entsprechend Abbildung 5.9 auf Seite 68 wurde das Spektrum der unmarkierten von dem der  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 abgezogen.

## 5.4 FTIR-Messungen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen

Die FTIR-Messungen an der unmarkierten und  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen wurden in Form zeitaufgelöster Temperatursprünge (siehe Abschnitt 4.3.2) durchgeführt. Bei diesen Messungen kam erstmalig die weiterentwickelte Apparatur zum Einsatz, mit der es nun möglich war, mit minimalem Probeneinsatz viele Messungen durchzuführen (siehe Abschnitt 4.3.2.2). Die Anzahl der möglichen Experimente ist von der thermischen Stabilität der entsprechenden Proteine abhängig, da für jede Messung dieselbe Proteinlösung verwendet wird. Es hat sich gezeigt, dass Lösungen der RNase T1 nur für eine begrenzte Anzahl von Messungen bei einer Rückfaltungstemperatur von  $45^\circ\text{C}$  verwendet werden konnten. Nach ca. drei Temperatursprüngen bei dieser Rückfaltungstemperatur war bereits eine leichte Trübung der Probenlösung festzustellen, was darauf hindeutete, dass das Protein auszufallen begann.<sup>4</sup> Die Konzentration der unmarkierten RNase T1 betrug bei den Experimenten ca.  $10\text{ mg/mL}$ , die der  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 ca.  $7\text{ mg/mL}$ . Eine erste Messreihe mit dem isotope markierten Protein führte aufgrund einer Präzipitation in einem Filter zu einem erheblichen Probenverlust. Aus diesem Grund stand für die hier dokumentierten Messungen nicht mehr Material zur Verfügung.

### 5.4.1 Differenzspektren

Die Temperatursprünge wurden vom thermisch entfalteten Zustand der beiden RNase T1-Varianten bei  $65^\circ\text{C}$  unter stabilisierenden Bedingungen (weit unterhalb des Phasenübergangs, vergleiche Abbildung 5.11 auf Seite 71) nach  $10^\circ\text{C}$  bzw.  $20^\circ\text{C}$  und unter destabilisierenden Bedingungen (in der Nähe des Phasenübergangs) nach  $45^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Abbildungen 5.14, 5.15 und 5.16 auf den nächsten Seiten zeigen die entsprechenden Differenzspektren. Die Spektren wurden nach der in Abschnitt 4.3.2.4 vorgestellten Methode ermittelt. Für jedes Experiment wurden drei bis fünf Temperatursprünge gemittelt. Es sei darauf hingewiesen, dass positive Intensitäten auf sich bildende Strukturen hinweisen, wohingegen negative Intensitäten Strukturen charakterisieren, die während der Messung verschwinden. Demnach bezeichnet das Differenzspektrum mit der höchsten Intensität in der Regel auch das erste aufgezeichnete Spektrum, weil sich bereits hier die meiste Struktur gebildet hat.

Ein Vergleich der Differenzspektren der unterschiedlichen Temperaturintervalle zeigt für die beiden Proteinvarianten einen ähnlichen Verlauf. Die Spektren der isotope markierten RNase T1 weisen bei  $1633\text{ cm}^{-1}$  eine höhere Intensität auf als die der

---

<sup>4</sup>Es ist bekannt, dass eine Proteinaggregation begünstigt ist, wenn möglichst viele hydrophobe Seitengruppen exponiert sind [7, 103]. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn Proteine als so genannte *molten globules* vorliegen. In Abschnitt 5.4.2 wird gezeigt, dass zu Beginn des Rückfaltungsprozesses bei  $45^\circ\text{C}$  die Moleküle einen Zustand durchlaufen, der der Definition eines *molten globules* nahe kommt. Ein solcher Zustand wird bei den Rückfaltungstemperaturen von  $10$  und  $20^\circ\text{C}$  nicht beobachtet. Hieraus lässt sich schließen, dass zu Beginn der Rückfaltung bei  $45^\circ\text{C}$  die Voraussetzungen für eine irreversible Aggregation gegeben sind.

5.4 FTIR-Messungen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen

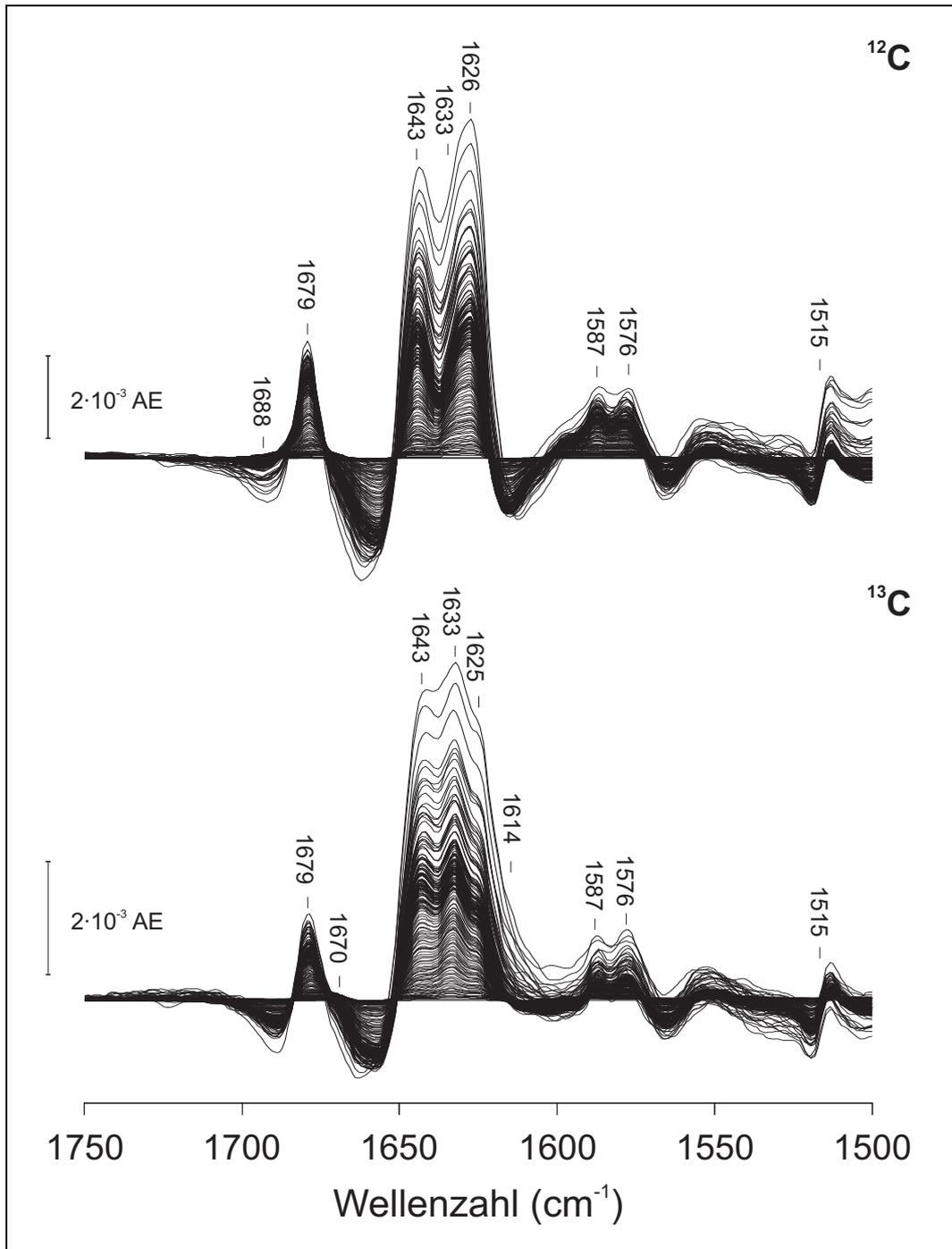


Abbildung 5.14: Differenzspektren von unmarkierter und  $^{13}\text{C}$ -markierter RNase T1 bei einem Temperatursprung von 65 nach 10°C.

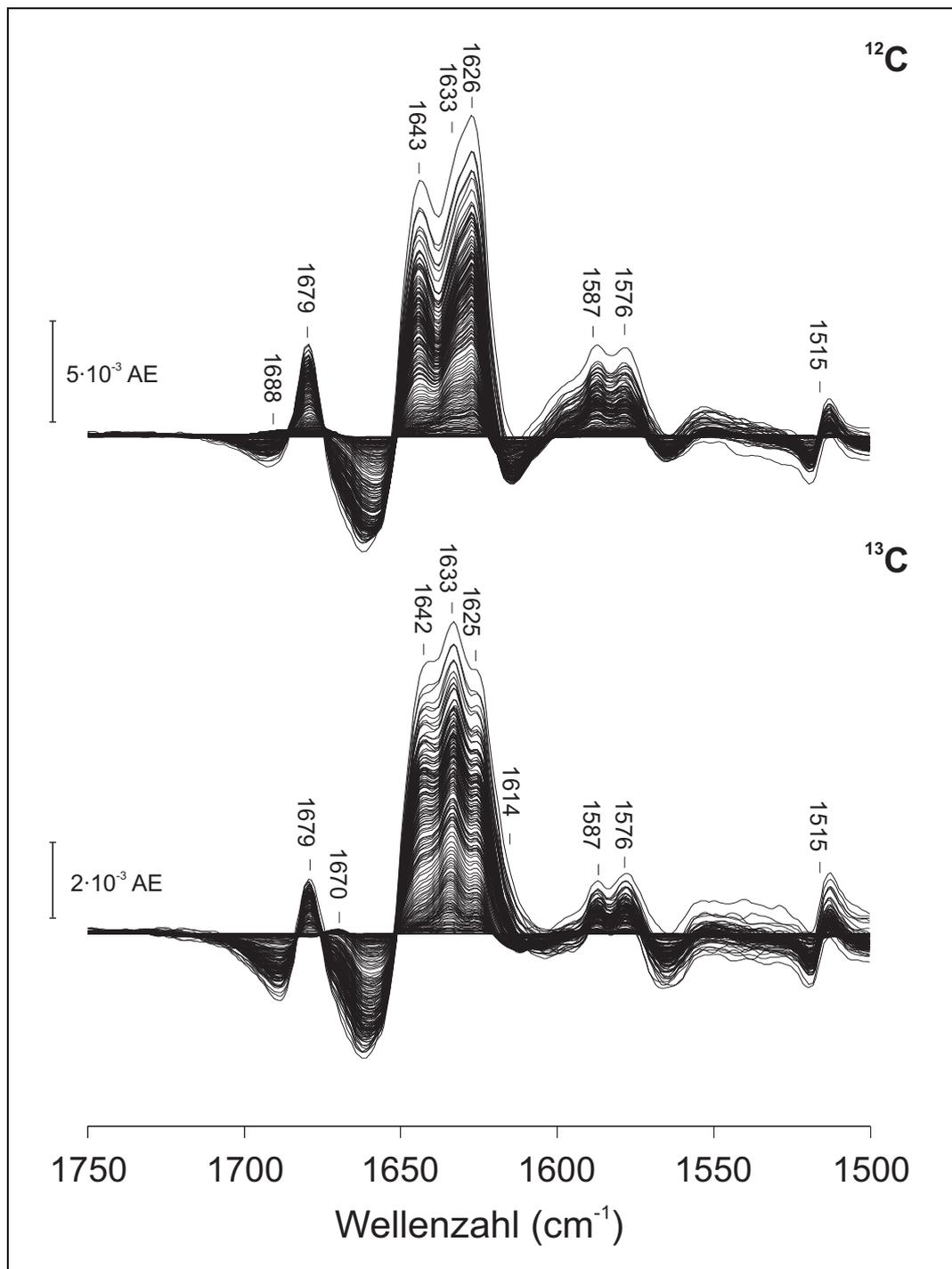


Abbildung 5.15: Differenzspektren von unmarkierter und  $^{13}\text{C}$ -markierter RNase T1 bei einem Temperatursprung von 65 nach 20°C.

5.4 FTIR-Messungen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen

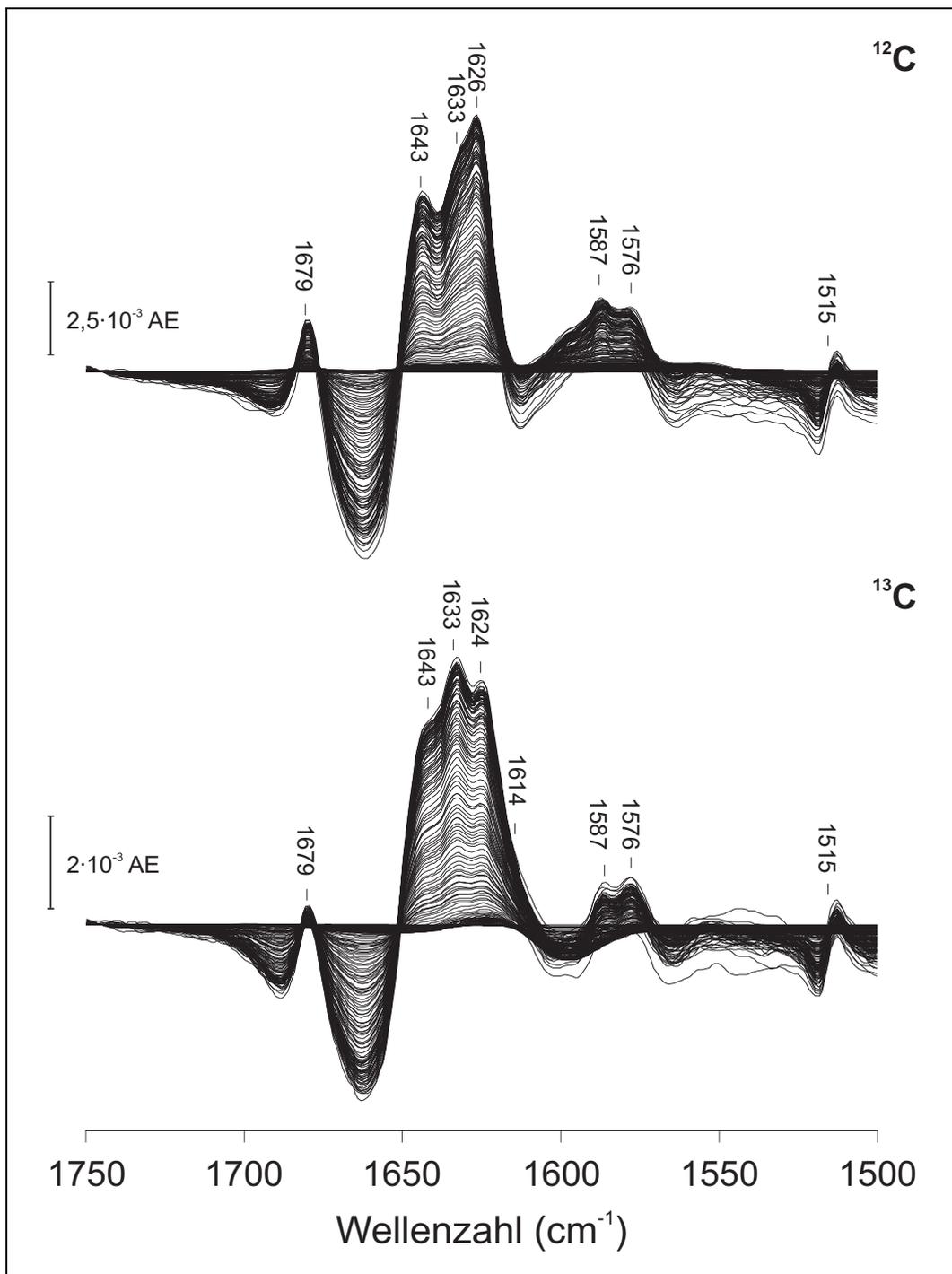


Abbildung 5.16: Differenzspektren von unmarkierter und <sup>13</sup>C-markierter RNase T1 bei einem Temperatursprung von 65 nach 45 °C.

unmarkierten RNase T1. Dieser Befund ist nicht verwunderlich, da ja auch schon in den FSD-Spektren und in den zweiten Ableitungen der Absorbanzspektren (siehe Abbildungen 5.4 und 5.5 auf den Seiten 60 und 61) an dieser Position eine höhere Intensität beobachtet wurde. Die geringere Intensität der Differenzspektren bei den Temperatursprüngen auf 45 °C sind darauf zurückzuführen, dass sich zwischen 45 und 65 °C etwa 25 % weniger Struktur bildet als zwischen 20 und 65 °C. Qualitativ und quantitativ betrachtet sind die Differenzspektren der unmarkierten RNase T1 den zuvor mit der „alten“ Apparatur gemessenen Spektren sehr ähnlich [23, 47, 95].

Aus diesen Differenzspektren wurde für einige Banden die Intensität in Abhängigkeit von der Zeit ausgelesen. Die Intensitätsplots sind in Abbildung 5.17 auf der nächsten Seite dargestellt. Es ist offensichtlich, dass die Kurvenverläufe für die unmarkierte und <sup>13</sup>C-markierte RNase T1 sehr ähnlich sind. Bei einer Rückfaltungstemperatur von 45 °C ist die Rückfaltungsgeschwindigkeit für alle Banden am höchsten. Bei einer Rückfaltungstemperatur von 10 °C ist in den ersten Sekunden die Strukturbildung viel höher als bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 oder 45 °C. In der mittleren Phase des Messzeitraums wird dann jedoch die Strukturbildung bei einem Temperatursprung auf 10 °C geringer als auf 20 °C und nähert sich gegen Ende der Messzeit an die Rückfaltungsgeschwindigkeit des Experimentes bei 20 °C an. Zu diesem Zeitpunkt ist die Rückfaltung bei 45 °C bereits abgeschlossen. Da die Isotopenmarkierung, wie bereits bei den Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen gezeigt wurde, keinen Einfluss auf die Bandenposition der Tyrosinbande während der Rückfaltung hat, wurde diese ebenfalls in Abhängigkeit von der Zeit für beide Proteinvarianten nach einem Temperatursprung auf 20 °C aufgetragen. Auch hier sind die Kurvenverläufe sehr ähnlich.<sup>5</sup> In dem gleichen Diagramm sind die normierten Kurvenverläufe der niederfrequenten  $\beta$ -Faltblattmarkerbanden derselben Experimente übereinandergelegt. Man sieht deutlich, dass die Kurvenverläufe der Markerbanden für beide RNase T1-Varianten nahezu identisch sind.

Die zeitlichen Änderungen der struktursensitiven Markerbanden von Abbildung 5.17 wurden mit der in Abschnitt 4.3.2.4 beschriebenen Methode gefittet. Die ermittelten kinetischen Konstanten sind in Tabelle 5.3 auf Seite 80 zusammengefasst. Die den jeweiligen Zeitkonstanten  $\tau_i$  entsprechenden Amplituden  $\alpha_i$  spiegeln die in den einzelnen kinetischen Phasen veränderten Amplitudenwerte als prozentualen Anteil der jeweiligen im Gleichgewichtsexperiment beobachtbaren Intensitäts- bzw. Frequenzänderungen wider. Die Tyrosinbandenverschiebungen konnten bei 10 °C und 20 °C am besten mit zwei und bei 45 °C am besten mit nur einer Exponentialfunktion beschrieben werden. Alle anderen Markerbanden wurden bei 10 und 20 °C jeweils mit drei und bei 45 °C mit zwei Exponentialfunktionen angepasst. Insgesamt gelang es, die Phasen der Strukturbildung mit Exponentialfunktionen zu beschreiben, in denen die meiste Struktur gebildet wird (ca. 40 bis 600 Sekunden). Besonders bei den beiden niedrigen Rückfaltungstemperaturen zeigen jedoch die Bandenverläufe in Ab-

<sup>5</sup>Gegen Ende des Experiments weisen die Tyrosinbandenpositionen einen sehr geringen Unterschied von weniger als 0,05 cm<sup>-1</sup> auf. Diese Toleranz kann bereits aus geringen Unterschieden in der Temperatur, der Proteinkonzentration, der Ionenstärke oder des pH-Werts resultieren.

#### 5.4 FTIR-Messungen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen

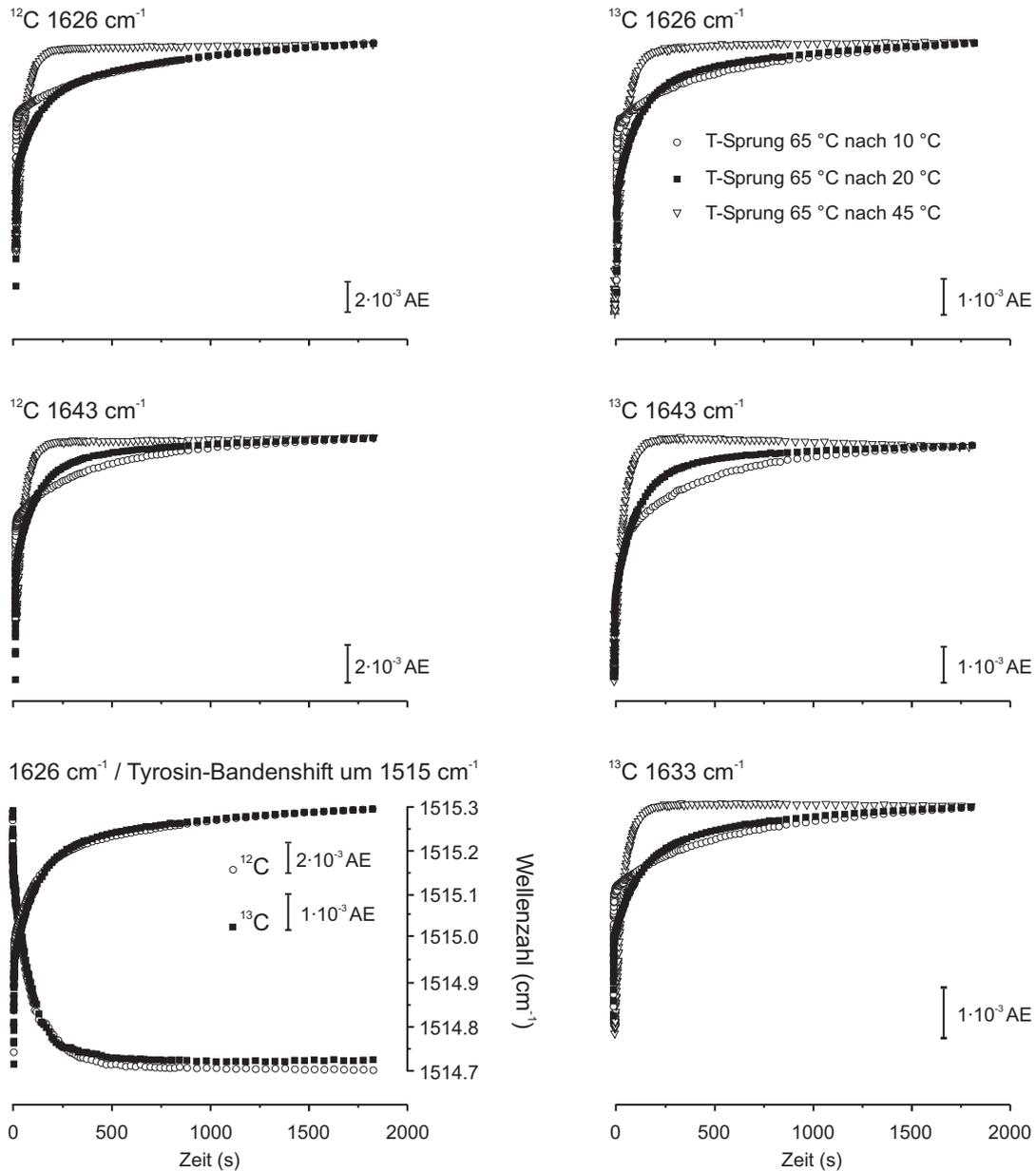


Abbildung 5.17: Intensitätsverläufe der Banden bei 1626 und 1643  $\text{cm}^{-1}$  von unmarkierter und  $^{13}\text{C}$ -markierter RNase T1 und bei 1633  $\text{cm}^{-1}$  von isotonmarkierter RNase T1 bei Temperatursprüngen von 65 auf 10, 20 und 45  $^{\circ}\text{C}$ . Zusätzlich sind noch die zeitliche Änderung der Tyrosinbandenposition um 1515  $\text{cm}^{-1}$  bei einem Temperatursprungexperiment von 65 nach 20  $^{\circ}\text{C}$  dargestellt.

Tabelle 5.3: Kinetische Konstanten der Temperatursprungexperimente von 65 °C auf 10 °C, 20 °C und 45 °C.

$T$	$I$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$^{12/13}\text{C}$	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)	$\tau_3$ (s)	$\alpha_1$ (%)	$\alpha_2$ (%)	$\alpha_3$ (%)	$R^2$ <sup>a</sup>
10 °C	1515	$^{12}\text{C}$	0,43 ( $\pm 0,05$ )		282 ( $\pm 8$ )	27,4 ( $\pm 1,2$ )		37,4 ( $\pm 0,6$ )	0,992
		$^{13}\text{C}$	0,54 ( $\pm 0,09$ )		333 ( $\pm 12$ )	25,0 ( $\pm 1,6$ )		31,2 ( $\pm 0,5$ )	0,986
	1626	$^{12}\text{C}$	0,18 ( $\pm 0,02$ )	2,3 ( $\pm 0,2$ )	542 ( $\pm 17$ )	22,4 ( $\pm 0,7$ )	11,2 ( $\pm 0,6$ )	22,3 ( $\pm 0,2$ )	0,996
		$^{13}\text{C}$	0,22 ( $\pm 0,02$ )	1,9 ( $\pm 0,2$ )	480 ( $\pm 17$ )	26,7 ( $\pm 1,1$ )	15,8 ( $\pm 0,9$ )	20,2 ( $\pm 0,4$ )	0,993
	1633	$^{13}\text{C}$	0,34 ( $\pm 0,02$ )	2,7 ( $\pm 0,2$ )	535 ( $\pm 16$ )	26,6 ( $\pm 8,0$ )	11,2 ( $\pm 8,0$ )	25,0 ( $\pm 0,2$ )	0,997
	1643	$^{12}\text{C}$	0,24 ( $\pm 0,02$ )	1,9 ( $\pm 0,2$ )	375 ( $\pm 10$ )	33,7 ( $\pm 1,6$ )	18,1 ( $\pm 1,5$ )	37,9 ( $\pm 0,4$ )	0,996
	$^{13}\text{C}$	0,29 ( $\pm 0,02$ )	2,8 ( $\pm 0,3$ )	376 ( $\pm 12$ )	45,2 ( $\pm 2,0$ )	17,4 ( $\pm 2,0$ )	40,2 ( $\pm 0,4$ )	0,996	
20 °C	1515	$^{12}\text{C}$	1,01 ( $\pm 0,10$ )	96,1 ( $\pm 1,7$ )		19,1 ( $\pm 0,8$ )	46,4 ( $\pm 2,6$ )		0,997
		$^{13}\text{C}$	0,62 ( $\pm 0,10$ )	91,4 ( $\pm 2,2$ )		17,7 ( $\pm 1,1$ )	50,0 ( $\pm 3,1$ )		0,993
	1626	$^{12}\text{C}$	0,64 ( $\pm 0,02$ )	74,2 ( $\pm 5,3$ )	600 ( $\pm 74$ )	32,1 ( $\pm 0,7$ )	25,4 ( $\pm 1,5$ )	25,2 ( $\pm 1,0$ )	0,997
		$^{13}\text{C}$	0,48 ( $\pm 0,02$ )	85,8 ( $\pm 5,7$ )	569 ( $\pm 97$ )	22,5 ( $\pm 0,6$ )	25,3 ( $\pm 1,5$ )	16,3 ( $\pm 1,2$ )	0,997
	1633	$^{13}\text{C}$	0,49 ( $\pm 0,02$ )	93,5 ( $\pm 6,1$ )	559 ( $\pm 70$ )	22,1 ( $\pm 0,5$ )	25,0 ( $\pm 1,6$ )	20,1 ( $\pm 1,3$ )	0,998
	1643	$^{12}\text{C}$	0,63 ( $\pm 0,02$ )	70,3 ( $\pm 5,3$ )	371 ( $\pm 57$ )	51,1 ( $\pm 10,5$ )	45,5 ( $\pm 3,5$ )	26,7 ( $\pm 3,3$ )	0,997
	$^{13}\text{C}$	0,52 ( $\pm 0,02$ )	83,1 ( $\pm 5,2$ )	375 ( $\pm 65$ )	32,1 ( $\pm 0,7$ )	41,3 ( $\pm 3,0$ )	19,2 ( $\pm 2,9$ )	0,997	
45 °C	1515	$^{12}\text{C}$		38,5 ( $\pm 0,6$ )			76,7 ( $\pm 0,7$ )		0,996
		$^{13}\text{C}$		39,1 ( $\pm 0,8$ )			72,5 ( $\pm 0,8$ )		0,993
	1626	$^{12}\text{C}$	0,62 ( $\pm 0,02$ )	44,2 ( $\pm 0,3$ )		-22,1 ( $\pm 0,4$ )	69,3 ( $\pm 0,2$ )		0,999
		$^{13}\text{C}$	0,59 ( $\pm 0,07$ )	46,2 ( $\pm 0,5$ )		-12,7 ( $\pm 0,7$ )	73,8 ( $\pm 0,4$ )		0,998
	1633	$^{13}\text{C}$	0,73 ( $\pm 0,04$ )	44,3 ( $\pm 0,4$ )		-14,9 ( $\pm 0,5$ )	65,0 ( $\pm 0,2$ )		0,999
	1643	$^{12}\text{C}$	0,62 ( $\pm 0,02$ )	42,5 ( $\pm 0,4$ )		-24,1 ( $\pm 0,4$ )	48,2 ( $\pm 0,2$ )		0,998
	$^{13}\text{C}$	0,72 ( $\pm 0,05$ )	43,0 ( $\pm 0,5$ )		-20,4 ( $\pm 0,8$ )	73,9 ( $\pm 0,4$ )		0,985	

<sup>a</sup>Abkürzungen:  $I$  Intensitätsverlauf bei der entsprechenden Wellenzahl;  $\tau_i$  Zeitkonstante der  $i$ ten kinetischen Phase;  $\alpha_i$  Amplitude der  $i$ ten kinetischen Phase als prozentualer Anteil der im Gleichgewichtsexperiment beobachteten Faltungseignisse;  $\alpha_0$  bezeichnet die Intensitätsänderungen in der experimentellen Totzeit (ca. 100 ms) als Differenz der im Gleichgewichtsexperiment beobachteten Intensitätsänderungen und den Änderungen während des kinetischen Experiments;  $R$  Korrelationskoeffizient.

#### 5.4 FTIR-Messungen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen

bildung 5.17, dass die Strukturbildung am Ende der Messzeit (ca. 30 Minuten) noch nicht abgeschlossen ist. Dies kann auch bei den Messungen mit der alten Temperatursprungapparatur beobachtet werden [23, 95]. Bei einem Temperatursprung von 65 °C auf 45 °C sind die Zeitkonstanten für die Markerbanden der unmarkierten und <sup>13</sup>C-markierten RNase T1 praktisch identisch. Unterschiede bestehen bei den Amplitudenverhältnissen. Des Weiteren kann festgestellt werden, dass die ermittelten Zeitkonstanten im großen und ganzen mit denen übereinstimmen, die mit alten Versuchsaufbau bestimmt wurden [23, 95]. Ein Vergleich der kinetischen Konstanten der Temperatursprünge von 65 °C auf 10 und 20 °C zeigt allerdings deutliche Unterschiede. Bei einer Rückfaltungstemperatur von 10 °C sind die Zeitkonstanten für die drei aufgelösten Phasen kleiner als bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C. Dies gilt insbesondere für die zweite aufgelöste Phase.

In Abschnitt 4.3.2.4 wurde beschrieben, auf welche Weise sich Ereignisse zwischen zwei Zeitpunkten während der Rückfaltung visualisieren lassen. Die Auflösung der Rückfaltungskinetiken in verschiedene Zeitinkremente ist in den folgenden Abbildungen gezeigt.

Es ist offensichtlich, dass die Ereignisse in den verschiedenen Phasen während der Rückfaltung für beide Proteinvarianten sehr ähnlich sind. Bei den Temperatursprungexperimenten auf Rückfaltungstemperaturen, die weit unterhalb des Schmelzpunktes der RNase T1 liegen (siehe Abbildungen 5.18, 5.19, 5.20 und 5.21), also auf 10 oder 20 °C, fluktuieren die Intensitäten während der ersten Sekunden der Rückfaltung stark.<sup>6</sup> Im weiteren Verlauf wird ersichtlich, dass sich die spektralen Änderungen innerhalb der dargestellten Zeitintervalle sehr ähnlich sind. Diese Phase ist bei den Experimenten mit einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C bereits nach ca. 300 s beendet, bei einer Rückfaltungstemperatur von 10 °C erst nach ca. 500 bis 800 s. In der sich daran anschließenden Phase, lassen sich fast nur noch Intensitätsänderungen im Bereich bis 1770 cm<sup>-1</sup> detektieren. Im Bereich darüber sind keine gravierenden Änderungen mehr registrierbar. Anders stellen sich die Ergebnisse bei einem Temperatursprungexperiment auf eine Rückfaltungstemperatur von 45 °C dar (siehe Abbildungen 5.22 auf Seite 86 und 5.23 auf Seite 87). In den ersten Sekunden ist kaum eine Strukturbildung registrierbar. Die ersten Spektren weisen sehr breite, unstrukturierte, negative Konturen auf. In der darauf folgenden Phase, sind sich die Differenzspektren in den einzelnen Zeitintervallen sehr ähnlich. Anders als bei den Temperatursprungexperimenten auf 10 und 20 °C ist bei 45 °C keine Phase mit stark fluktuierenden Intensitäten zu erkennen. Hinzu kommt, dass bereits nach ca. 300 Sekunden der gesamte Rückfaltungsprozess beendet ist.<sup>7</sup>

---

<sup>6</sup>Zur Verbesserung des Signal-/Rauschverhältnisses wurden die ersten drei Spektren nach dem Auslösen der Rückfaltung gemittelt. Die Aufnahme jedes Spektrums dauert 37 ms mit einer Totzeit von 11 ms zwischen den Spektren, daraus errechnet sich eine mittlere Scanzeit für das erste gemittelte Spektrum von ca. 0,06 s.

<sup>7</sup>In dem Zeitintervall von 480 bis 820 Sekunden konnten aufgrund eines elektronischen Spektrometerdefekts die Messdaten des Experiments mit der isopenmarkierten RNase T1 nicht ausgewertet werden (siehe Abbildung 5.23 auf Seite 87).

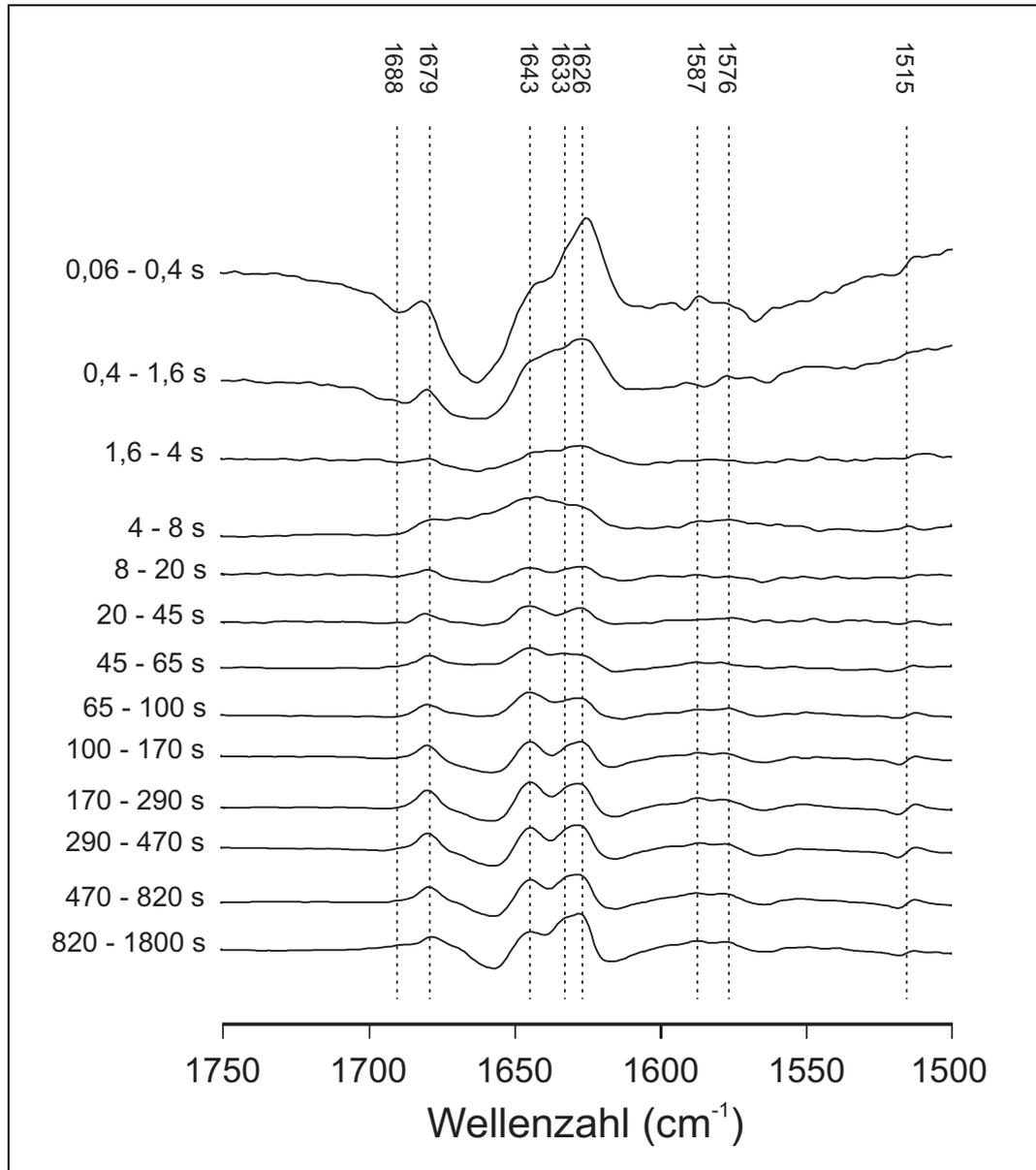


Abbildung 5.18: Differenzspektren während der Rückfaltung von unmarkierter RNAse T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von 10°C. Die entsprechenden Intervalle sind am Rand angegeben.

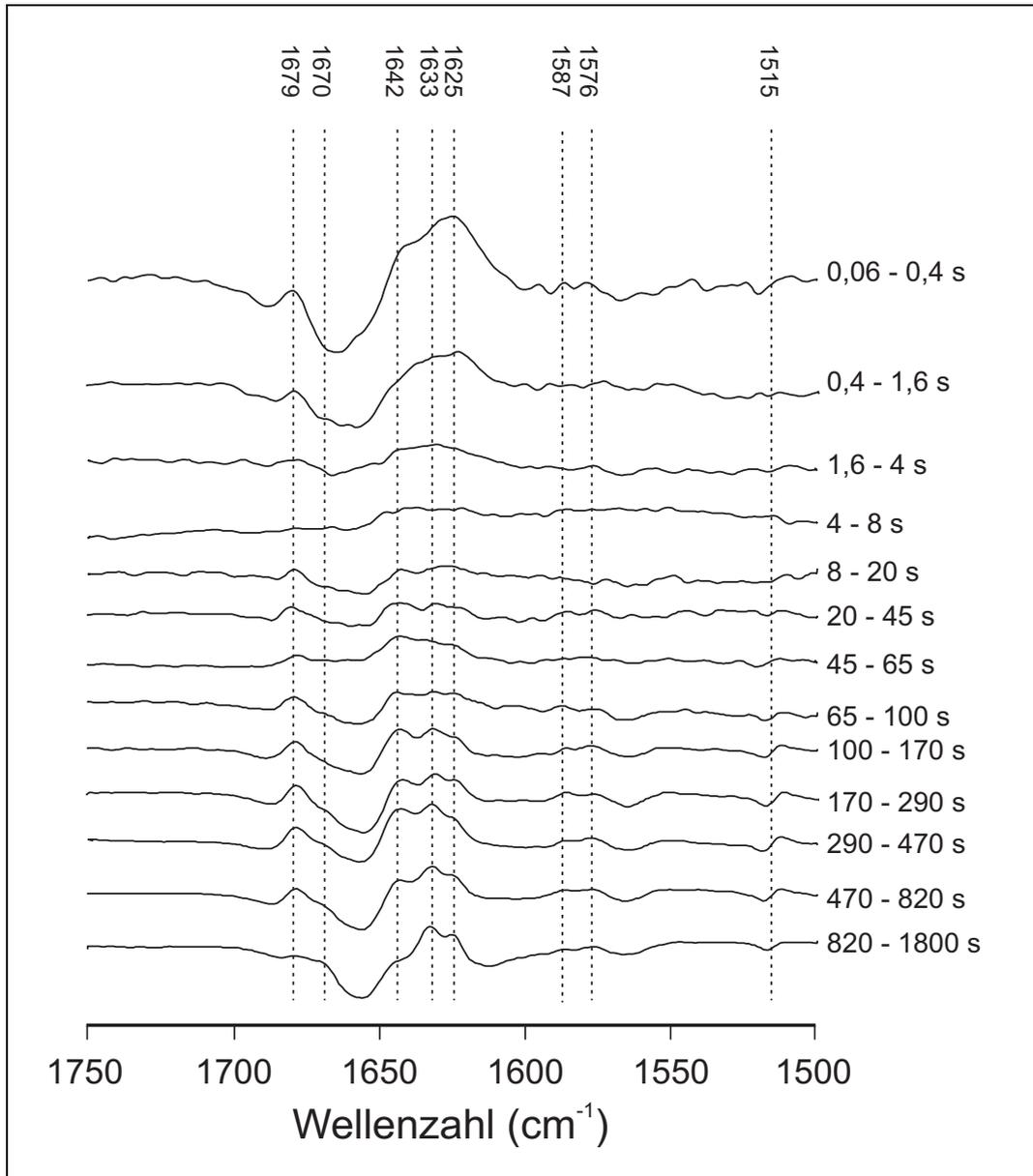


Abbildung 5.19: Differenzspektren während der Rückfaltung von  $^{13}\text{C}$ -markierter RNase T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von  $10^\circ\text{C}$ . Die entsprechenden Intervalle sind am Rand angegeben.

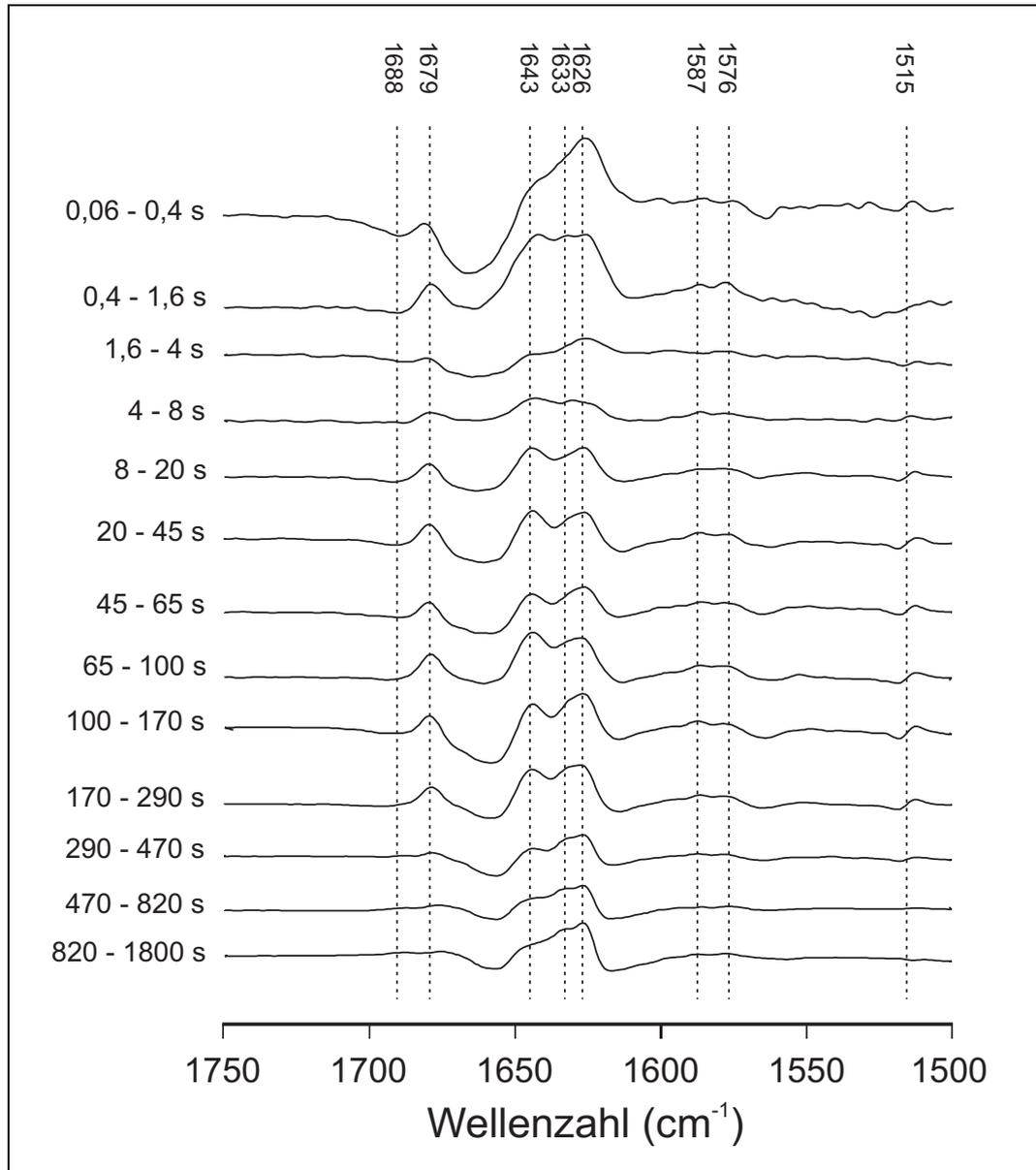


Abbildung 5.20: Differenzspektren während der Rückfaltung von unmarkierter RNAse T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C. Die entsprechenden Intervalle sind am Rand angegeben.

#### 5.4 FTIR-Messungen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen

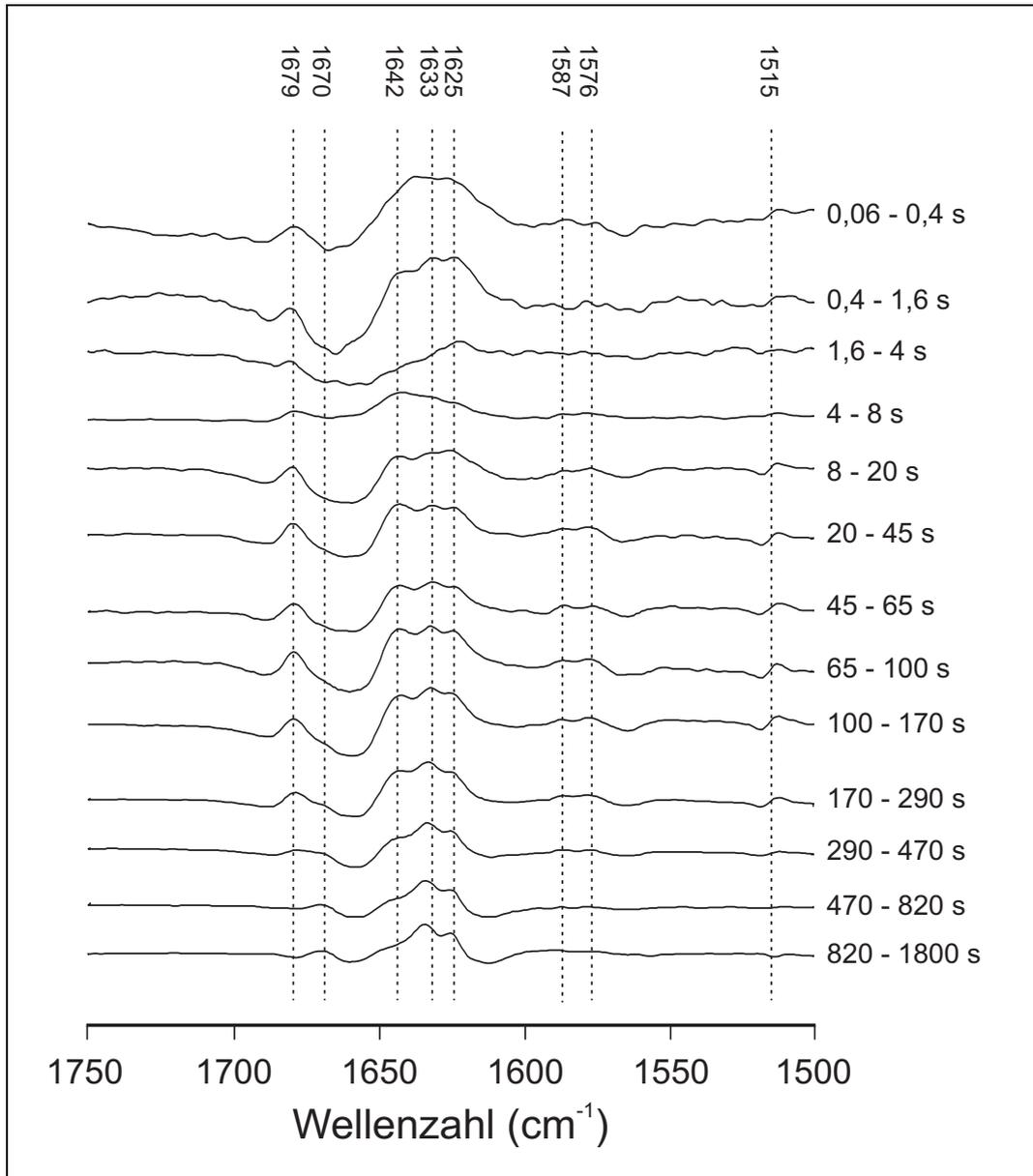


Abbildung 5.21: Differenzspektren während der Rückfaltung von  $^{13}\text{C}$ -markierter RNase T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von 20°C. Die entsprechenden Intervalle sind am Rand angegeben.

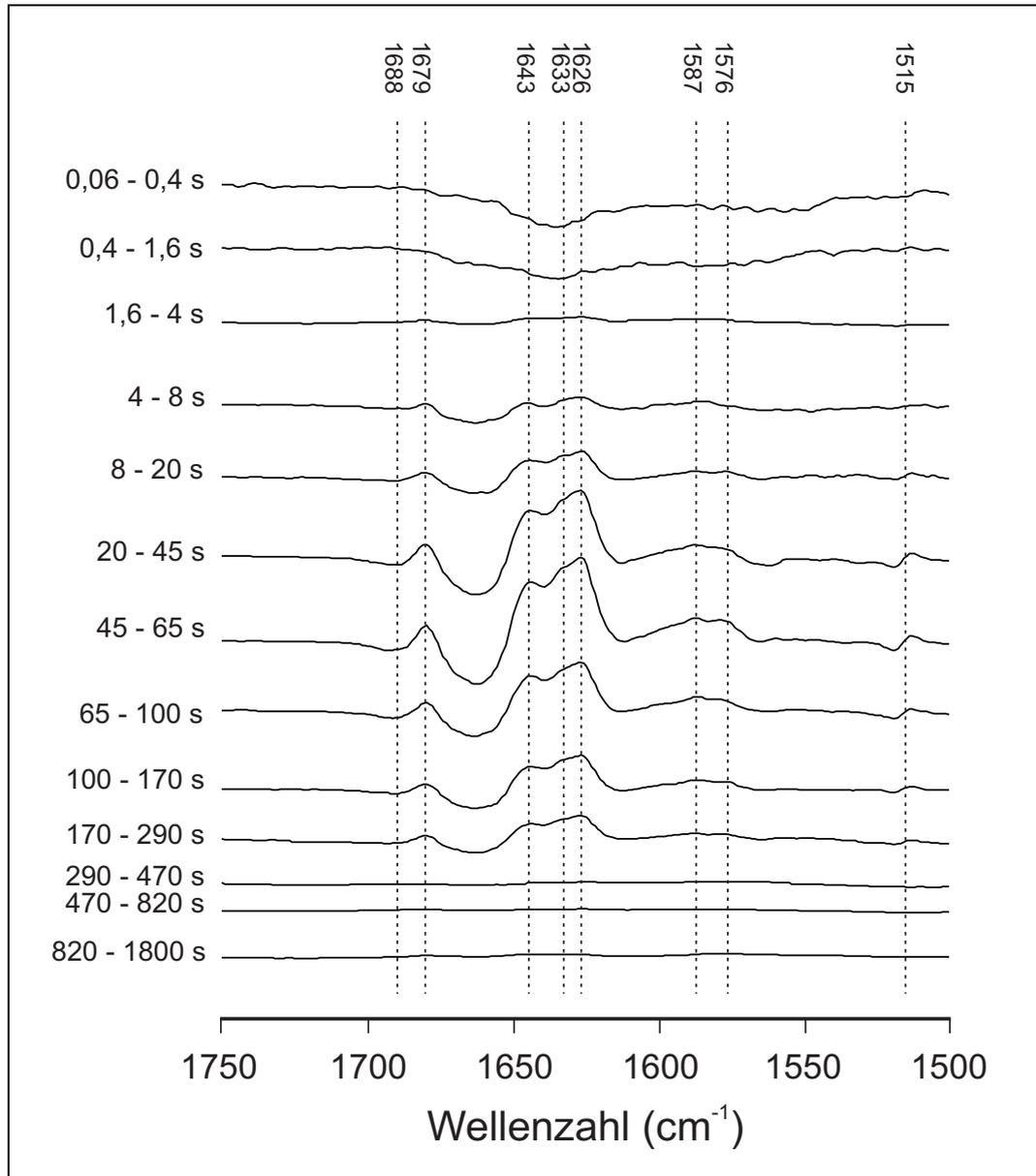


Abbildung 5.22: Differenzspektren während der Rückfaltung von unmarkierter RNase T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von 45 °C. Die entsprechenden Intervalle sind am Rand angegeben.

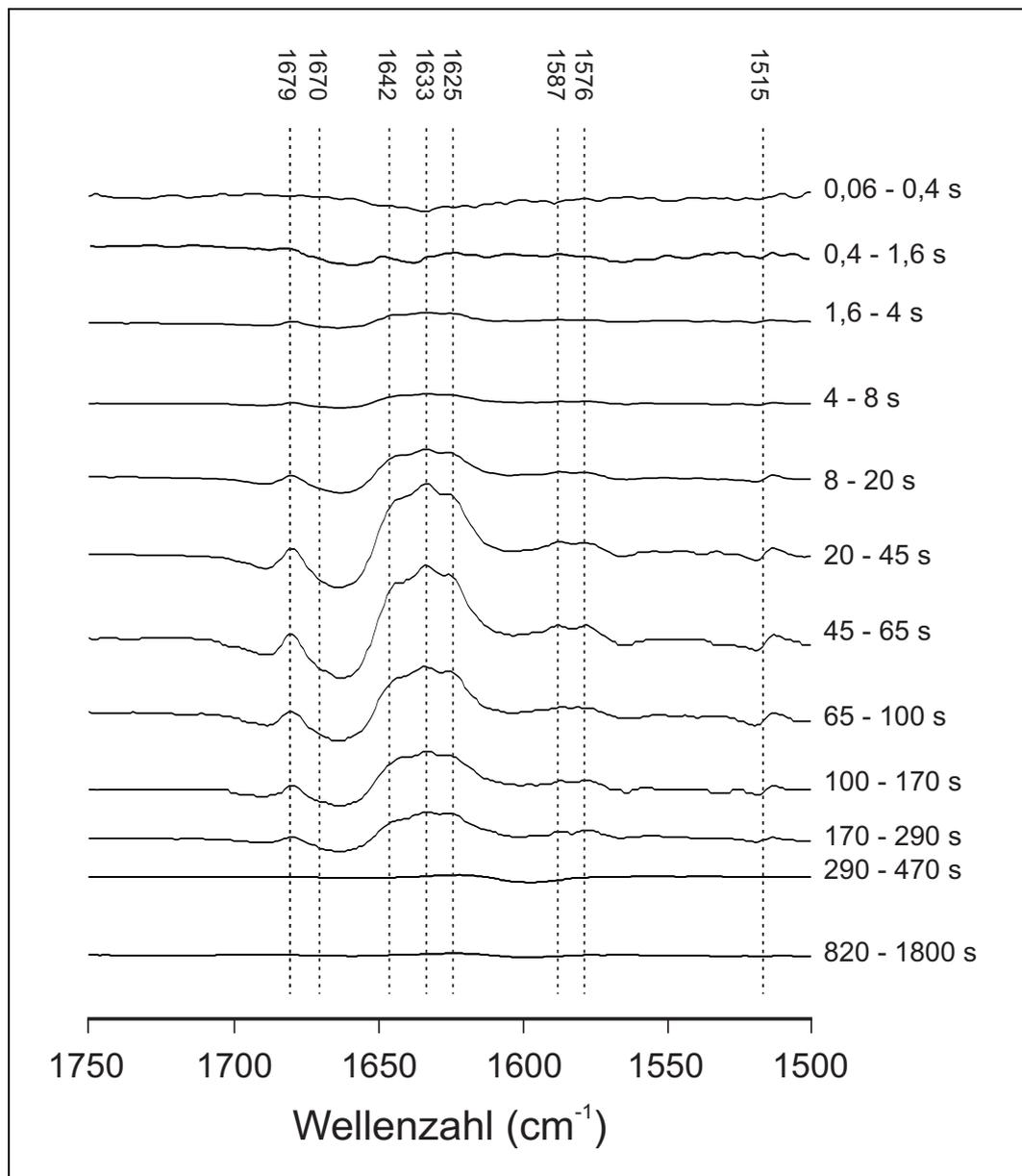


Abbildung 5.23: Differenzspektren während der Rückfaltung von  $^{13}\text{C}$ -markierter RNase T1 innerhalb diskreter Zeitintervalle bei einer Rückfaltungstemperatur von  $45^\circ\text{C}$ . Die entsprechenden Intervalle sind am Rand angegeben.

### 5.4.2 Totzeitspektren

Bisher wurden in den zeitaufgelösten Temperatursprungexperimenten die Prozesse der Proteinrückfaltung FTIR-spektroskopisch analysiert, die ab dem Zeitpunkt stattfanden, ab dem die zuvor auf die Entfaltungstemperatur von 65 °C erhitzte Proteinlösung in die Messküvette injiziert worden war. Alle strukturellen Änderungen der Proteinmoleküle in der Probenlösung auf ihrem Weg von der temperierten Spritze bis in die Messküvette – in der Totzeit – entzogen sich einer zeitaufgelösten Betrachtung (vergleiche Abschnitt 4.3.2.2). Diese in der Totzeit stattfindenden Prozesse können jedoch summarisch rekonstruiert werden, indem man die spektralen Ereignisse der Gleichgewichtsexperimente mit denen der zeitaufgelösten Messungen kombiniert. Abbildung 5.24 auf der nächsten Seite zeigt exemplarisch die Differenzspektren aus den Absorbanzspektren der unmarkierten und <sup>13</sup>C-markierten RNase T1 bei 20 bzw. 45 °C und 65 °C unter Gleichgewichtsbedingungen. Des Weiteren sind die spektralen Gesamtänderungen, die während der zeitaufgelösten Messungen detektiert werden können, dargestellt. Die Differenz aus diesen Spektren repräsentiert die Gesamtergebnisse, die in der experimentellen Totzeit stattfinden. Eine detaillierte Ausführung zur Berechnung dieser „Totzeitspektren“ findet sich im Methodenteil in Abschnitt 4.3.2.4.

Das Totzeitspektrum der unmarkierten RNase T1 bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C entspricht qualitativ den bereits bekannten, mit der alten Apparatur gemessenen Totzeitspektren [23,95]. Eine Verschiebung der Tyrosinbandenposition bei 1515 cm<sup>-1</sup>, sowie deutlich erkennbare Intensitäten bei 1587 und 1576 cm<sup>-1</sup> deuten auf die Bildung erheblicher Anteile von Tertiärstruktur bereits in der experimentellen Totzeit hin [23,95]. Ebenso zeigen die hohen Intensitäten bei 1620 und 1679 cm<sup>-1</sup>, dass sich auch schon ein erheblicher Anteil an  $\beta$ -Faltblattstruktur gebildet hat. Hingegen demonstriert die Abweichung der Bandenposition der niederfrequenten  $\beta$ -Faltblattbande, die im nativen Protein bei 1626 cm<sup>-1</sup> absorbiert, dass die in den ersten 100 ms gebildete  $\beta$ -Faltblattstruktur noch nicht mit der nativen  $\beta$ -Faltblattstruktur identisch ist. Letztere bildet sich endgültig erst noch im weiteren Verlauf der Rückfaltung. Insgesamt beträgt der Anteil der in dieser frühen Phase gebildeten Struktur an der im Gleichgewichtsexperiment beobachteten Strukturdivergenz im spektralen Bereich von 1610 bis 1720 cm<sup>-1</sup> ca. 24 %. Das Totzeitspektrum der <sup>13</sup>C-markierten RNase T1 bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C ist dem der unmarkierten RNase T1 ähnlich. In den ersten 100 ms nach dem Auslösen der Rückfaltung haben sich bereits ca. 22 % Tertiärstruktur gebildet. Auch die charakteristischen  $\beta$ -Faltblattbanden bei 1679 und 1620 cm<sup>-1</sup> treten ebenso wie bei dem unmarkierten Protein deutlich hervor. Hingegen tritt auch in dieser sehr frühen Phase eine starke Differenzbande bei 1633 cm<sup>-1</sup> auf. Bei dieser Frequenz wurden auch in den späten Phasen der Rückfaltung und, wie bereits zuvor erwähnt, bei den Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen eine höhere Intensität festgestellt.

Die Totzeitspektren bei einer Rückfaltungstemperatur von 45 °C unterscheiden sich massiv von den entsprechenden, mit der alten Apparatur bestimmten Totzeitspektren. Während sich bei diesen in der Totzeit (170 ms) überhaupt keine Struktur gebildet hat, haben sich bei den Messungen im Rahmen dieser Arbeit in den ersten 100 ms

## 5.4 FTIR-Messungen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen

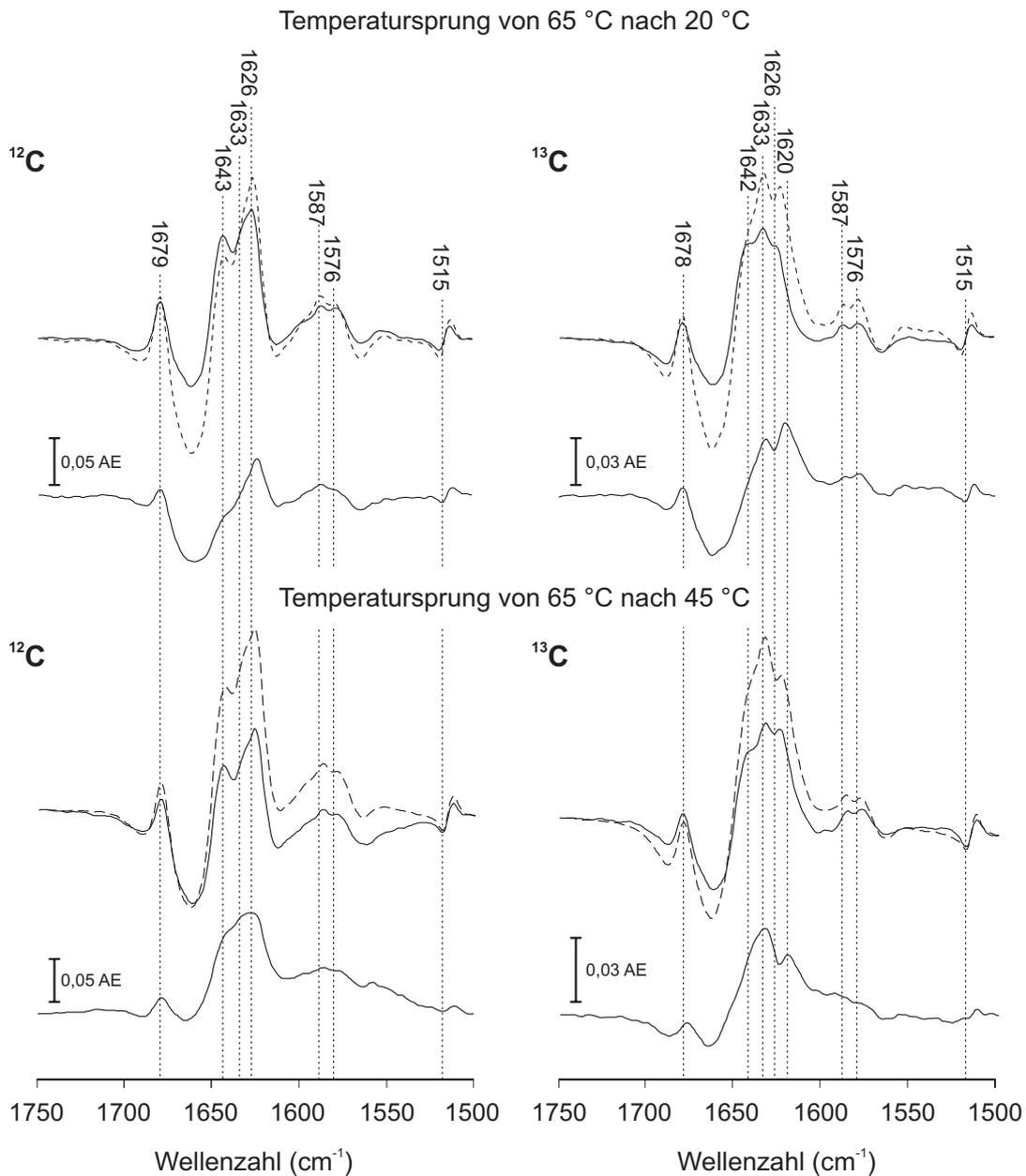


Abbildung 5.24: Spektrale Gesamtänderungen zwischen 20 bzw. 45 °C und 65 °C im Gleichgewichtsexperiment (gestrichelte Linie), detektierte Gesamtänderungen der zeitaufgelösten Experimente (durchgezogene Linie) und darunter die aus den beiden Differenzspektren berechneten Ereignisse während der ersten 100 ms der Temperatursprungexperimente (Totzeit).

bereits ca. 40 % der endgültigen Intensität gebildet. Interessanterweise stimmen trotzdem die aus diesen Experimenten ermittelten Rückfaltungskinetiken erstaunlich gut mit denen aus früheren Messungen überein [23, 95]. Der Grund für die Differenzen der im Rahmen dieser Arbeit bei einer Rückfaltungstemperatur von 45 °C gemachten Messungen zu den Messungen mit dem alten Versuchsaufbau ist gerätetechnisch bedingt. Deshalb soll eine Diskussion dieser Diskrepanzen hier stattfinden und nicht in Kapitel 6, das in erster Linie einer Diskussion der durch die Isotopenmarkierung hervorgerufenen spektralen Effekten vorbehalten sein soll.

Bei einer Rückfaltungstemperatur von 45 °C zeigen in Abbildung 5.24 die charakteristischen Seitengruppenabsorptionen sowohl im Differenzspektrum der unmarkierten als auch im Differenzspektrum der  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1, anders als bei einer Rückfaltungstemperatur von 20 °C, kaum Tertiärstrukturbildung an. Des Weiteren ist bei beiden Proteinvarianten unter diesen Bedingungen  $\beta$ -Faltblattstrukturbildung festzustellen. Bei der  $^{13}\text{C}$ -markierten RNase T1 steht diese  $\beta$ -Faltblattbildung wieder in Zusammenhang mit einer Differenzbande bei  $1633\text{ cm}^{-1}$ . Insgesamt weisen beide Differenzspektren eine sehr breite Kontur im Bereich von  $1610$  bis  $1660\text{ cm}^{-1}$  auf. Zusammengefasst deuten die FTIR-spektroskopischen Strukturmerkmale auf ein Polypeptid mit Sekundärstruktur aber ohne feste Tertiärstruktur hin. Laut Definition entspricht deshalb der beobachtete Zustand der Proteine dem eines *molten globule* [103–106]. Wie in Abschnitt 6.2.3.1 gezeigt werden wird, bedeuten stark stabilisierende Rückfaltungsbedingungen eine hohe Strukturbildungsrate zu Beginn der Rückfaltung. Die neu entwickelte Temperatursprungapparatur zeichnet sich durch ein geringes Probenvolumen und sehr dünne Zuleitungen zur Messzelle aus. Diese Zuleitungen sind nicht thermostatisiert und führen aufgrund ihrer großen Oberfläche zu einer raschen Abkühlung der anfangs auf 65 °C temperierten Lösung unter die Schmelztemperatur der RNase T1 während ihres Transports zur Messzelle. In dieser Zeit bilden die Proteinmoleküle deshalb bereits in den Zuleitungen erste Strukturen aus, jedoch mit wenigen nativen Tertiärkontakten. Vielmehr handelt es sich hierbei um eine Vielzahl von Intermediatstrukturen, die in Nebenminima auf der Energieoberfläche des Faltungstrichters „gefangen“ sind (siehe Abschnitt 1.1.2 und Abschnitt 6.2.3.1, Abbildung 6.6 auf Seite 110). Erreicht nun die abgekühlte Proteinlösung die 45 °C warme Messzelle, so werden durch die erneute Aufheizung in der Messzelle die Energiebarrieren dieser Nebenminima so klein, dass der Faltungstrichter eine annähernd glatte Oberfläche darstellt. Die Intermediatstrukturen der Proteine können sich aufgrund der höheren Energie nun rearrangieren und zur nativen Proteinstruktur rückfalten. Dieser Prozess ist innerhalb der ersten Sekunden der Differenzspektren zu erkennen (siehe hierzu Abbildungen 5.22 und 5.23 auf den Seiten 86 und 87). Die negativen Konturen bei den ersten beiden Differenzspektren belegen eindeutig, dass sich Struktur zurückbildet. Der sich nun anschließende Faltungsprozess zur nativen Proteinstruktur verläuft nun so schnell und kooperativ, dass keine Unterschiede in der Kinetik zur alten Apparatur festzustellen sind. Die praktisch glatte Basislinie in den Totzeitspektren der früheren Arbeiten, zeigen den genau entgegengesetzten Effekt [23, 95]. Aufgrund des höheren Probenvolumens, der dickeren Zuleitungen und des größeren Messzellenvolumens ist anzunehmen, dass sich die Temperatur der Pro-

#### 5.4 FTIR-Messungen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen

benlösung in den ersten Millisekunden der Messung noch oberhalb der Schmelztemperatur der RNase T1 befunden hat und deshalb der Rückfaltungsprozess erst nach dem Abkühlen unterhalb dieser Temperatur startete. In einer idealen Versuchsanordnung würde die Abkühlung einer Probenlösung nach einer sehr geringen Totzeit erst in der Messzelle stattfinden. Eine solche Versuchsanordnung lässt sich apparativ nur sehr schwierig bewerkstelligen, würde jedoch das in 1.1.2 angesprochene „Faltungsproblem“ am besten experimentell annähern. Der in Abschnitt 4.3.2.2 beschriebene Versuchsaufbau sollte für zukünftige Experimente deshalb in dieser Hinsicht noch verbessert werden.

## 5 Ergebnisse