

Literaturverzeichnis

- [1] HUHEEY, J. E. ; KEITER, E. A. ; KEITER, R. L.: *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*. 4. New York : Harper Collins College Publisher, 1993
- [2] ANFINSEN, C. B.: Principles that Govern the Folding of Protein Chains. In: *Science* 181 (1973), S. 223–230
- [3] REINSTÄDLER, D. ; FABIAN, H. ; BACKMANN, J. ; NAUMANN, D.: Refolding of Thermally and Urea-denatured Ribonuclease A Monitored by Time-resolved FTIR Spectroscopy. In: *Biochemistry* 35 (1996), S. 15822–15830
- [4] EATON, W. A. ; MUNOZ, V. ; THOMPSON, P. A. ; CHAN, C.-K. ; HOFRICHTER, J.: Submillisecond kinetics of protein folding. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997), S. 10–14
- [5] LANG, K. ; SCHMID, F. X.: Protein-Disulphide Isomerase and Prolyl Isomerase Act Differently and Independently as Catalysts of Protein Folding. In: *Nature* 331 (1988), S. 453–455
- [6] LANG, K. ; SCHMID, F. X. ; FISCHER, G.: Catalysis of Protein Folding by Prolyl Isomerase. In: *Nature* 329 (1987), S. 268–270
- [7] HARTL, F. U.: Molecular Chaperones in Cellular Protein-Folding. In: *Nature* 381 (1996), S. 571–580
- [8] KARPLUS, M. ; SHAKHNOVICH, E.: Protein Folding: Theoretical Studies of Thermodynamics and Dynamics. In: CREIGHTON, T. E. (Hrsg.): *Protein Folding*. San Francisco : Freeman, 1992, S. 127–195
- [9] LEVINthal, C.: Are there Pathways for Protein Folding? In: *J. Chim. Phys.* 65 (1968), S. 44–45
- [10] DILL, K. A. ; CHAN, H. S.: From Levinthal to Pathways to Funnels. In: *Nature Struct. Biol.* 4 (1997), S. 10–19
- [11] WILDEGGER, G. ; KIEFHABER, T.: Three-state Model for Lysozyme Folding: Triangular Folding Mechanism with an Energetically Trapped Intermediate. In: *J. Mol. Biol.* 270 (1997), Nr. 2, S. 294–304

- [12] ONUCHIC, J. N. ; LUTHEY-SCHULTEN, Z. ; WOLYNES, P. G.: Theory of Protein Folding: The Energy Landscape Perspective. In: *Annu. Rev. Phys. Chem.* 48 (1997), S. 545–600
- [13] KIM, P. S. ; BALDWIN, R. L.: Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding. In: *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982), S. 459–489
- [14] LI, L. ; MIRNY, L. A. ; SHAKHNOVICH, E. I.: Kinetics, Thermodynamics and Evolution of Non-native Interactions in a Protein Folding Nucleus. In: *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000), S. 336–342
- [15] BALBACH, J. ; STEEGBORN, C. ; SCHINDLER, T. ; SCHMID, F. X.: A Protein Folding Intermediate of Ribonuclease T1 Characterized at High Resolution by 1D and 2D Real-time NMR Spectroscopy. In: *J. Mol. Biol.* 285 (1999), Nr. 2, S. 829–842
- [16] SCHMID, F. X.: Mechanism of Folding of Ribonuclease A. Slow Refolding is a Sequential Reaction *via* Structural Intermediates. In: *Biochemistry* 22 (1983), Nr. 20, S. 4690–4696
- [17] KIM, P. S. ; BALDWIN, R. L.: Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins. In: *Annu. Rev. Biochem.* 59 (1990), S. 631–660
- [18] SOSNICK, L. A. ; MAYNE, L. ; HILLER, R. ; ENGLANDER, S. W.: The Barriers in Protein Folding. In: *Nature Struct. Biol.* 1 (1994), S. 149–156
- [19] KIEFHABER, T. ; SCHMID, F. X.: Kinetic Coupling between Protein Folding and Prolyl Isomerization - II. Folding of Ribonuclease A and Ribonuclease T1. In: *J. Mol. Biol.* 224 (1992), S. 231–240
- [20] KIEFHABER, T. ; KOHLER, H.-H. ; SCHMID, F. X.: Kinetic Coupling between Protein Folding and Prolyl Isomerization. In: *J. Mol. Biol.* 224 (1992), S. 217–229
- [21] KIEFHABER, T. ; QUAAS, R. ; HAHN, U. ; SCHMID, F. X.: Folding of Ribonuclease T1. 1. Existence of Multiple Unfolded States Created by Proline Isomerization. In: *Biochemistry* 29 (1990), Nr. 12, S. 3053–3061
- [22] KIEFHABER, T. ; GRUNERT, H. P. ; HAHN, U. ; SCHMID, F. X.: Replacement of a *cis*-Proline Simplifies the Mechanism of Ribonuclease T1 Folding. In: *Biochemistry* 29 (1990), Nr. 27, S. 6475–6480
- [23] REINSTÄDLER, D. ; FABIAN, H. ; NAUMANN, D.: New Structural Insights into the Refolding of Ribonuclease T1 as Seen by Time-resolved Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. In: *Proteins* 34 (1999), Nr. 3, S. 303–316
- [24] DOBSON, C. M. ; SALI, A. ; KARPLUS, M.: Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998), S. 868–893

- [25] LAURENTS, C. V. ; BALDWIN, R. L.: Protein Folding: Matching Theory and Experiment. In: *Biophys. J.* 75 (1998), S. 428–424
- [26] HOLTZHAUER, M.: *Methoden in der Proteinanalytik*. Berlin : Springer-Verlag, 1996
- [27] CREIGHTON, T. E.: *Protein Structure: A Practical Approach*. New York : Oxford University Press, 1997
- [28] LOTTSPEICH, F. ; ZORBAS, H.: *Bioanalytik*. 1. Heidelberg : Spectrum Akademischer Verlag, 1998
- [29] DÖTSCH, V. ; WAGNER, G.: New Approaches to Structure Determination by NMR Spectroscopy. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8 (1998), S. 619–623
- [30] WÜTHRICH, K.: Biological Macromolecules: Structure Determination in Solution. In: GRANT, D. M. (Hrsg.) ; HARRIS, R. K. (Hrsg.): *Enzyklopedie of Nuclear Magnetic Resonance* Bd. 2. New York : Wiley, 1996, S. 932–939
- [31] WIDER, G. ; WÜTHRICH, K.: NMR Spectroscopy of Large Molecules and Multimolecular Assemblies in Solution. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999), S. 594–601
- [32] STEEGBORN, C. ; SCHNEIDER-HASSLOFF, H. ; ZEEB, M. ; BALBACH, J.: Cooperativity of a Protein Folding Reaction Probed at Multiple Chain Positions by Real-time 2D NMR Spectroscopy. In: *Biochemistry* 39 (2000), S. 7910–7919
- [33] KIEFHABER, T. ; QUAAS, R. ; HAHN, U. ; SCHMID, F. X.: Folding of Ribonuclease T1. 2. Kinetic Models for the Folding and Unfolding Reactions. In: *Biochemistry* 29 (1990), Nr. 12, S. 3061–3070
- [34] GAST, K. ; DAMASCHUN, H. ; MISSELWITZ, R. ; MUELLER-FROHNE, M. ; ZIRWER, D. ; DAMASCHUN, G.: Compactness of Protein molten globules: Temperature-induced Structural Changes of the Apomyoglobin Folding Intermediate. In: *European Biophysics Journal* 23 (1994), Nr. 4, S. 297–305
- [35] GRIKO, Y. V. ; ROGOV, V. V. ; PRIVALOV, P. L.: Domains in Lambda Cro Repressor. A Calorimetric Study. In: *Biochemistry* 31 (1992), S. 12701–12705
- [36] FILIMONOV, V. V. ; ROGOV, V. V.: Reversible Association of the Equilibrium Unfolding Intermediate of Lambda Cro Repressor. In: *J. Mol. Biol.* 255 (1996), S. 767–777
- [37] SATO, K. ; EGAMI, F.: Studies on Ribonucleases in Takadiastase. In: *J. Biochem. (Tokyo)* 44 (1957), S. 753–767
- [38] QUAAS, R. ; MCKEOWN, Y. ; STANSSENS, P. ; FRANK, R. ; BLÖCKER, H. ; HAHN, U.: Expression of the Chemically Synthesized Gene for Ribonuclease T1

- in *Escherichia coli* Using a Secretion Cloning Vector. In: *Eur. J. Biochem.* 173 (1988), S. 617–622
- [39] UCHIDA, T. ; EGAMI, F.: Microbial Ribonucleases with Special Reference to RNases T1, T2, N1, and U2. In: *The Enzymes, III.* Boyer, P. New York : Academic Press, 1971, S. 205
- [40] EGAMI, F. ; TAKAHASHI, K. ; UCHIDA, T.: Ribonucleases in Taka-Diastase: Properties, Chemical Nature, and Applications. In: DAVIDSON, J. (Hrsg.) ; COHN, W. (Hrsg.): *Progress in Nucleic Acid Res. and Molec. Biol., III.* New York : Academic Press, 1964, S. 59
- [41] HEINEMANN, U. ; SAENGER, W.: Specific Protein-Nucleic Acid Recognition in Ribonuclease T1-2'-Guanylic Acid Complex: an X-ray Study. In: *Nature* 299 (1982), S. 27–31
- [42] MARTINEZ-OYANEDEL, J. ; HUI-WOOG, C. ; HEINEMANN, U. ; SAENGER, W.: Ribonuclease T1 with Free Recognition and Catalytic Site: Crystal Structure Analysis at 1.5 Å Resolution. In: *J. Mol. Biol.* 222 (1991), S. 335–352
- [43] PACE, C. N. ; HEINEMANN, U. ; HAHN, U. ; SAENGER, W.: Ribonuclease-T1 - Structure, Function, and Stability. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 30 (1991), S. 343–360
- [44] KIEFHABER, T. ; GRUNERT, H. P. ; HAHN, U. ; SCHMID, F. X.: Folding of RNase T1 is Decelerated by a Specific Tertiary Contact in a Folding Intermediate. In: *Proteins* 12 (1992), Nr. 2, S. 171–179
- [45] THOMSON, J. A. ; SHIRLEY, B. A. ; GRIMSLEY, G. R. ; PACE, C. N.: Conformational Stability and Mechanism of Folding of Ribonuclease T1. In: *J. Biol. Chem.* 264 (1989), Nr. 20, S. 11614–11620
- [46] MULLINS, L. S. ; PACE, C. N. ; RAUSHEL, F. M.: Investigation of Ribonuclease T1 Folding Intermediates by Hydrogen-deuterium Amide Exchange-two-dimensional NMR Spectroscopy. In: *Biochemistry* 32 (1993), Nr. 24, S. 6152–6156
- [47] MORITZ, R. ; REINSTÄDLER, D. ; FABIAN, H. ; NAUMANN, D.: Time-resolved FTIR Difference Spectroscopy as Tool for Investigating Refolding Reactions of Ribonuclease T1 Synchronized with *trans*→*cis* Prolyl Isomerization. In: *Biospectroscopy* 67 (2002), Nr. 3, S. 145–155
- [48] KIEFHABER, T.: *Methods In Molecular Biology.* Bd. 41: *Protein Folding Kinetics.* Totowa, NJ, 1995
- [49] SKOOG, D. A. ; LEARY, J. J.: *Principles of Instrumental Analysis.* Fourth Edition. Orlando, : Saunders College Publishing, 1992

- [50] KAUPPINEN, J. R. ; MOFFAT, D. G. ; MANTSCH, H. H. ; CAMERON, D. G.: Fourier Self-Deconvolution: A Method for Resolving Intrinsically Overlapping Bands. In: *Appl. Spectroscopy* 35 (1981), S. 271–276
- [51] JACKSON, M. ; MANTSCH, H. H.: The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein-structure. In: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30 (1995), S. 95–120
- [52] SUSI, H. ; BYLER, D. M.: Resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Enzymes. In: *Methods Enzymol.* 311 (1986), Nr. 1986
- [53] ELLIOT, A. ; AMBROSE, E. J.: Structure of Synthetic Polypeptides. In: *Nature* 165 (1950), S. 921–922
- [54] SUTHERLAND, G. B. B. M.: Infrared Analysis of the Structure of Amino Acids: Polypeptides and Proteins. In: *Adv. Protein Chem.* 5 (1952), S. 291–318
- [55] SUSI, H.: Structure and Stability of Biological Macromolecules. New York : Dekker, M., 1969, S. 575–663
- [56] ARRONDO, J. L. R. ; MUGA, A. ; CASTRESANA, J. ; GONI, F. M.: Quantitative Studies of the Structure of Proteins in Solution by FOURIER Transform Infrared Spectroscopy. In: *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 59 (1993), S. 23–56
- [57] BACKMANN, J. ; SCHULTZ, C. ; FABIAN, H. ; HAHN, U. ; SAENGER, W. ; NAUMANN, D.: Thermally Induced Hydrogen Exchange Processes in Small Proteins as Seen by FTIR Spectroscopy. In: *Proteins* 24 (1996), Nr. 3, S. 379–387
- [58] CHIRGADZE, Y. N. ; FEDOROW, O. V. ; TRUSHINA, N. P.: Estimation of Amino Acid Residue Side-chain Absorption in the Infrared Spectra of Protein Solutions in Heavy Water. In: *Biopolymers* 14 (1975), S. 679–694
- [59] BARTH, A.: The Infrared Absorption of Amino Acid Side Chains. In: *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 74 (2000), S. 141–173
- [60] FABIAN, H. ; SCHULTZ, C. ; NAUMANN, D. ; LANDT, O. ; HAHN, U. ; SAENGER, W.: Secondary Structure and Temperature-induced Unfolding and Refolding of Ribonuclease T1 in Aqueous-Solution - A Fourier-transform Infrared Spectroscopic Study. In: *J. Mol. Biol.* 232 (1993), S. 967–981
- [61] BARTH, A. ; ZSCHERP, C.: What Vibrations Tell us about Proteins. In: *Quarterly Review of Biophysics* 35 (2002), Nr. 4, S. 369–430
- [62] KRIMM, S. ; BANDEKAR, J.: Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides and Proteins. In: *Adv. Protein Chem.* 38 (1986), S. 181–364

- [63] MIYAZAWA, Tatsuo ; SHIMANOUCI, Takehiko ; MIZUSHIMA, San-Ichiro: Characteristic Infrared Bands of Monosubstituted Amides. In: *J. Chem. Phys.* 24 (1956), Nr. 2, S. 408–418
- [64] WILSON, E. B. ; DECIUS, J. C. ; CROSS, P. C.: *Molecular Vibrations. The Theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra.* New York : McGraw-Hill Book Company, 1955
- [65] MIYAZAWA, T.: Perturbation Treatment of the Characteristic Vibrations of Polypeptide Chains in Various Configurations. In: *J. Chem. Phys.* 32 (1960), Nr. 6, S. 1647–1652
- [66] KRIMM, S.: Infrared Spectra and Chain Conformation of Proteins. In: *J. Mol. Biol.* 4 (1962), S. 528–540
- [67] DENG, H. ; CALLENDER, R.: Raman Spectroscopic Studies of the Structures, Energetics, and Bond Distortions of Substrates Bound to Enzymes. In: *Methods Enzymol.* 308 (1999), S. 176–201
- [68] JACKSON, M. ; MANTSCH, H. H.: Protein Secondary Structure from FTIR Spektroskopie: Correlation with Dihedral Angles from Three-dimensional Ramachandran Plots. In: *Can. J. Chem.* 69 (1991), S. 1639–1642
- [69] JACKSON, M. ; MANTSCH, H. H.: Beware of Proteins in DMSO. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1079 (1991), S. 231–235
- [70] STRYER, L.: *Biochemistry.* Fourth Edition. New York : W. H. Freeman and Company, 1995
- [71] CHIRGADZE, N. ; SHESTOPALOV, B. V. ; YU, S.: Intensities and Other Spectral Parameters of Infrared Amide Bands of Polypeptides in the β - and Random Forms. In: *Biopolymers* 12 (1973), S. 1337–1351
- [72] CHIRGADZE, Yu. N. ; NEVSKAYA, N. A.: Infrared Spectra and Resonance Interaction of Amide-I Vibration of the Antiparallel-chain Pleated Sheet. In: *Biopolymers* 15 (1976), S. 607–625
- [73] HAMM, P ; LIM, M ; DEGRADO, W. F. ; HOCHSTRASSER, R. M.: The Two-dimensional Nonlinear Spectroscopy of a Cyclic Penta-Peptide in Relation to its Three-dimensional Structure. In: *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 96 (1999), S. 2036–2041
- [74] KRIMM, S. ; ABE, Yasuaki: Intermolecular Interaction Effects in the Amide I Vibrations of β Polypeptides. In: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69 (1972), S. 2788–2792
- [75] MOORE, W. H. ; KRIMM, S.: Transition Dipole Coupling in Amide I Modes of β -Polypeptides. In: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72 (1975), Nr. 12, S. 4933–4935

- [76] TORII, J. ; TASUMI, M.: Model Calculations on the Amide I Infrared Bands of Globular Proteins. In: *J. Chem. Phys.* 96 (1991), Nr. 5, S. 3379–3387
- [77] BRAUNER, J. W. ; DUGAN, C. ; MENDELSON, R.: ¹³C Isotope Labeling of Hydrophobic Peptides. Origin of the Anomalous Intensity Distribution in the Infrared Amide I Spectral Region of β -Sheet Structures. In: *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000), S. 677–683
- [78] LANDT, O. ; ZIRPEL-GIESEBRECHT, M. ; MILDE, A. ; HAHN, U.: Improving Purification of Recombinant Ribonuclease T1. In: *J. Biotechnol.* 24 (1992), Nr. 2, S. 189–194
- [79] SHERMAN, F.: Getting Started with Yeast. In: *Methods Enzymol* 194 (1991), S. 3–21
- [80] MAIER, T.: *Etablierung der Expression von Ribonuclease T1 in Saccharomyces cerevisiae*, Universität Leipzig, Diplomarbeit, 1997
- [81] POMPON, D. ; LAUERAT, B. ; BRONINE, A. ; URBAN, P.: Yeast Expression of Animal and Plant P450s in Optimized Redox Environments. In: *Methods Enzymol.* 272 (1996), S. 51–64
- [82] BRAKE, A. J.: α -Factor Leader-Directed Secretion of Heterologous Proteins from Yeast. In: *Methods Enzymol.* 185 (1990), S. 408–421
- [83] MYLIN, L. M. ; HOFMANN, K. J. ; SCHULTZ, L. D. ; HOPPER, J. E.: Regulated GAL4 Expression Cassette Providing Controllable and High-level Output from High-copy Galactose Promoters in Yeast. In: *Methods Enzymol.* 185 (1990), S. 297–308
- [84] SCHIESTL, R. H. ; GIETZ, R. D.: High Efficiency Transformation of Intact Yeast Cells Using Single Stranded Nucleic Acids as a Carrier. In: *Curr. Genet.* 16 (1989), Nr. 5-6, S. 339–346
- [85] QUAAS, R. ; LANDT, O. ; GRUNERT, H. P. ; BEINEKE, M. ; HAHN, U.: Indicator Plates for Rapid Detection of Ribonuclease T1 Secreting *Escherichia coli* Clones. In: *Nucleic Acids Res.* 17 (1989), Nr. 8, S. 3318
- [86] PACE, C. N. ; GRIMSLEY, G. R. ; BARNETT, B. J.: Purification of Ribonuclease T1. In: *Anal. Biochem.* 167 (1987), Nr. 2, S. 418–422
- [87] MAYR, L. M. ; SCHMID, F. X.: A Purification Method for Labile Variants of Ribonuclease T1. In: *Protein Expr. Purif.* 4 (1993), Nr. 1, S. 52–58
- [88] ROMANOS, M. A. ; SCORER, C. A. ; CLARE, J. J.: Foreign Gene Expression in Yeast: a Review. In: *Yeast* 8 (1992), S. 423–488
- [89] OLIVER, R. W. A.: *HPLC of Macromolecules*. Oxford : Oxford University Press, 1989

- [90] RIVIER, J. ; R., McClintock.: Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of Insulins from Different Species. In: *J. Chrom.* 268 (1983), S. 112–119
- [91] PENG, J. ; GYGI, S. P.: Proteomics: The Move to Mixtures. In: *J. Mass. Spectrom.* 36 (2001), S. 1083–1091
- [92] PANDEY, A. ; MANN, M.: Proteomics to Study Genes and Genomes. In: *Nature* 405 (2000), S. 837–846
- [93] ZABINSKI, M. ; WALZ, Jr.: Subsites and Catalytic Mechanism of Ribonuclease T1: Kinetic Studies Using GpC and GpU as Substrates. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 175 (1976), Nr. 2, S. 558–564
- [94] BACKMANN, J. ; FABIAN, H. ; NAUMANN, D.: Temperature-jump-induced Refolding of Ribonuclease A: A Time- resolved FTIR Spectroscopic Study. In: *FEBS Lett.* 364 (1995), Nr. 2, S. 175–178
- [95] REINSTÄDLER, D.: *Zeitaufgelöste Untersuchungen zu Faltungsprozessen der Proteine Ribonuclease A und Ribonuklease T1*, Freie Universität, PhD Thesis, 1998
- [96] BIRKE, S. S. ; AGBAJE, I. ; DIEM, M.: Experimental and Computational Infrared CD Studies of Prototypical Peptide Conformations. In: *Biochemistry* 31 (1992), Nr. 2, S. 450–455
- [97] XIANG, T. ; GOSS, D. J. ; DIEM, M.: Strategies for the Computation of Infrared CD and Absorption Spectra of Biological Molecules. In: *Biophys. J.* 65 (1993), S. 14872–14877
- [98] LUDLAM, C. F. C. ; ARKIN, I. T. ; LIU, X. M. ; ROTHMAN, M. S. ; RATH, P. ; AIMOTO, S. ; SMITH, S. O. ; ENGELMANN, D. M. ; ROTHSCHILD, K. J.: Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Site-directed Isotope Labeling as a Probe of Local Secondary Structure in the Transmembrane Domain of Phospholamban. In: *Biophys. J.* 70 (1996), S. 1728–1738
- [99] NAUMANN, D. ; SCHULTZ, C. ; GÖRNE-TSCHELNOKOW, U. ; HUCHO, F.: Secondary Structure and Temperature Behaviour of the Acetylcholine Receptor by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: *Biochemistry* 32 (1993), S. 3162–3168
- [100] FABIAN, H. ; SCHULTZ, C. ; BACKMANN, J. ; HAHN, U. ; SAENGER, W. ; MANTSCH, H. H. ; NAUMANN, D.: Impact of Point Mutations on the Structure and Thermal Stability of Ribonuclease T1 in Aqueous Solution Probed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: *Biochemistry* 33 (1994), Nr. 35, S. 10725–10730

- [101] DECATUR, S. M.: IR Spectroscopy of Isotope-Labeled Helical Peptides: Probing the Effect of N-Acetylation on Helix Stability. In: *Biopolymers* 54 (2000), S. 180–185
- [102] MAYER, C. ; MORITZ, R. ; KIRSCHNER, C. ; BORCHARD, W. ; MAIBAUM, R. ; WINGENDER, J. ; FLEMMING, H. C.: The Role of Intermolecular Interactions: Studies on Model Systems for Bacterial Biofilms. In: *Int. J. Biol. Macromol.* 26 (1999), S. 3–16
- [103] BUCHNER, J. ; RENNER, M. ; LILIE, H. ; HINZ, H. J. ; JAENICKE, R. ; KIEFHABER, T. ; RUDOLPH, R.: Alternatively Folded States of an Immunoglobulin. In: *Biochemistry* 30 (1991), S. 6922–6929
- [104] JAENICKE, R.: Protein-Folding and Association – In-vitro Studies For Self-organization and Targeting in the Cell. In: *Curr. Top. Cell. Regul.* 34 (1996), S. 209–314
- [105] PTITSYN, O. B.: The Molten Globule State. In: CREIGHTON, T.E. (Hrsg.): *Protein folding*. New York : Freeman, W. H., 1992, S. 243–300
- [106] DOBSON, C. M.: Unfolded Proteins, Compact States and Molten Globules. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1992), S. 6–12
- [107] RIVIER, J. ; MCCLINTOCK, R.: Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of Insulins from Different Species. In: *J. Chrom.* 268 (1983), S. 112–119
- [108] HARTMANIS, M. ; ENGSTROM, A.: Occurrence of Methionine Sulfoxide During Production of Recombinant Human Insulin-like Growth Factor (IGF-I). In: *Second Symposium of the Protein Society* Bd. Abstract Number 502, 1988
- [109] KUNITANI, M. ; JOHNSON, D.: Model of Protein Conformation in the Reversed-Phase Separation of Interleukin-2 Muteins. In: *J. Chrom.* 371 (1986), S. 313–333
- [110] ZHANG, M. ; FABIAN, H. ; MANTSCH, H. H. ; VOGEL, H.J.: Isotope-edited Fourier Transform Infrared Spectroscopy Studies of Calmodulin's Interaction with its Target Peptides. In: *Biochemistry* 33 (1994), S. 10883–10888
- [111] DECATUR, S. M. ; ANTONIC, J.: Isotope-edited Infrared Spectroscopy of Helical Peptides. In: *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999), S. 11914–11915
- [112] TADESSE, L. ; RAMINA, N. ; WALTERS, L.: Isotopically Enhanced Infrared Spectroscopy: A Novel Method for Examining Secondary Structure at Specific Sites in Conformationally Heterogeneous Peptides. In: *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991), S. 7036–7037
- [113] HARIS, P. I. ; ROBILLARD, G. T. ; VAN DIJK, A. A. ; CHAPMAN, D.: Potential of Carbon-13 and Nitrogen-15 Labeling for Studying Protein-protein interactions

- using Fourier-transform infrared spectroscopy. In: *Biochemistry* 31 (1992), S. 6279–6284
- [114] LUDLAM, C. F. C. ; SONAR, S. ; LEE, C. P. ; COLEMAN, M. ; HERZFELD, J. ; RAJBHANDARY, U. L. ; ROTHSCCHILD, K. J.: Site-directed Isotope Labeling and ATR-FTIR Difference Spectroscopy of Bacteriorhodopsin – the Peptide Carbonyl Group of Tyr-185 Is Structurally Active During the bR→N Transition. In: *Biochemistry* 34 (1995), S. 2–6
- [115] KUBELKA, J. ; KEIDERLING, T. A.: The Anomalous Infrared Amide I Intensity Distribution in ¹³C Isotopically Labeled Peptide β -Sheets Comes from Extended, Multiple-stranded Structures. An ab Initio Study. In: *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001), S. 6142–6150
- [116] MORITZ, R. ; FABIAN, H. ; HAHN, U. ; DIEM, M. ; NAUMANN, D.: Impact of Four ¹³C-Proline Isotope Labels on the Infrared Spectra of Ribonuclease T1. In: *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002), S. 6259–6264
- [117] FABIAN, H. ; FAELBER, K. ; GAST, K. ; REINSTAEDLER, D. ; ROGOV, V. V. ; NAUMANN, D. ; ZAMYATKIN, D. F. ; FILIMONOV, V. V.: Secondary Structure and Oligomerization Behavior of Equilibrium Unfolding Intermediates of the λ Cro-Repressor. In: *Biochemistry* 38 (1999), Nr. 17, S. 5633–5642
- [118] HALVERSON, K. J. ; SUCHOLEIKI, I. ; ASHBURN, T. T. ; LANSBURY, P. T.: Location of β -Sheet-Forming Sequences in Amyloid Proteins by FTIR. In: *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991), S. 6701–6703
- [119] TORII, H. ; TASUMI, M.: Model Calculations on the Amid-I Infrared Bands of Globular Proteins. In: *J. Chem. Phys.* 96 (1992), S. 3379–3387
- [120] LAGANT, P. ; VERGOTEN, G. ; FLEURY, G. ; LOUCHEUX-LEFEBVRE, M. H.: Vibrational Normal Modes of Folded Prolyl-containing Peptides. Application to β Turns. In: *Eur. J. Biochem.* 139 (1984), S. 379–393
- [121] MOORE, W. H. ; KRIMM, S.: Vibrational Analysis of Peptides, Polypeptides and Proteins. II. Poly(L-alanine) and beta-Poly(L-alanylglycine). In: *Biopolymers* 15 (1976), S. 2465–2483
- [122] MOORE, W. H. ; KRIMM, S.: Vibrational Analysis of Peptides, Polypeptides and Proteins. I. Polyglycine I. In: *Biopolymers* 15 (1976), S. 2439–2464
- [123] ABE, Y. ; KRIMM, S.: Normal Vibrations of Crystalline Polyglycine I. In: *Biopolymers* 11 (1972), S. 1817–1839
- [124] WEISS, M. S. ; JABS, A. ; HILGENFELD, R.: Peptide Bonds Revisited. In: *Nat Struct Biol* 5 (1998), Nr. 8, S. 676

- [125] RADZICKA, A. ; PEDERSEN, L. ; WOLFENDEN, R.: Influences of Solvent Water on Protein Folding: Free Energies of Solvation of *cis* and *trans* Peptides are Nearly Identical. In: *Biochemistry* 27 (1988), Nr. 12, S. 4538–4541
- [126] MAIGRET, B. ; PERAHIA, D. ; PULLMAN, B.: Molecular Orbital Calculations on the Conformation of Polypeptides and Proteins. IV. The Conformation of the Prolyl and Hydroxyprolyl Residues. In: *J. Theor. Biol.* 29 (1970), Nr. 2, S. 275–291
- [127] PERRICAUDET, M. ; PULLMAN, A.: An Abinitio Quantum-Mechanical Investigation on the Rotational Isomerism in Amides and Esters. In: *J. Pept. Protein. Res.* 5 (1973), Nr. 2, S. 99–107

Literaturverzeichnis

Anhang

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Naumann für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Robert-Koch-Institut in Berlin anzufertigen. Seine Betreuung war stets motivierend, insbesondere in „weniger erfolgreichen“ Tagen. Bei der Anfertigung dieser Arbeit und den gemeinsamen Publikationen schätzte ich seine ständige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik.

Herrn Dr. Bernhard Reinicke vom Robert-Koch-Institut danke ich für die Einführung in die HPLC ganz herzlich.

Bei Herrn Prof. Dr. Uli Hahn möchte ich mich für den sechsmonatigen Forschungsaufenthalt bedanken, den ich in seiner Arbeitsgruppe an der Universität Leipzig verbringen konnte.

Herrn Prof. Dr. Max Diem vom Hunter College in New York danke ich für seine Kooperationsbereitschaft bei der Spektrenberechnung.

Bei Herrn Dr. Heinz Fabian bedanke ich mich für die Möglichkeit, Messungen am Max-Delbrück-Centrum-Berlin durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Saenger danke ich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten für diese Arbeit anzufertigen.

Allen Mitgliedern von Dieter Naumann's Arbeitsgruppe P34 danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, die anregenden Diskussionen und die große Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich mich bei Fabian Sokolowski für die gründliche Durchsicht dieser Arbeit, sowie bei Maren Stämmler und Roswitha Puttkammer für die Unterstützung bei der Kultivierung der Hefen bedanken.

Publikationen

Poster- und Buchbeiträge

- FABIAN, H.; MORITZ, R.; REINSTÄDLER, D.; GAST, K.; ROGOV, V. V.; ZAMYATKIN, D. F.; FILIMONOV, V. V.; NAUMANN, D.: Structure and Folding of the λ Cro Repressor Protein: Characterization by Static and Time-resolved FTIR Spectroscopy. In: ITOH, K.; TASUMI, M. (Hrsg.): *Fourier Transform Spectroscopy*. Tokyo: Waseda University Press, 1999, S. 437-438
- MORITZ, R.; FABIAN, H.; HAHN, U.; NAUMANN, D.: Impact of ^{13}C -labeled Prolines on the FTIR-spectrum of Ribonuclease T1. In: *Spectroscopy of Biological Molecules*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001

Zeitschriftenartikel

- MORITZ, R.; REINSTÄDLER, D.; FABIAN, H.; NAUMANN, D.: Time-resolved FTIR Difference Spectroscopy as Tool for Investigating the Refolding Reactions of Ribonuclease T1 Synchronized with *trans* \rightarrow *cis* Prolyl Isomerization. In: *Biospectroscopy*, 67 (2002), Nr. 3, S. 145-155
- MORITZ, R.; FABIAN, H.; HAHN, U.; DIEM, M.; NAUMANN, D.: Impact of Four ^{13}C -proline Isotope Labels on the Infrared Spectra of Ribonuclease T1. In: *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002), S. 6259-6264

Zusammenfassung

In den Schwingungsspektren von Proteinen wird hauptsächlich der Amid-I-Bereich zur Analyse der Proteinsekundärstrukturen herangezogen, weil er sich im wesentlichen aus den struktursensitiven Absorptionen der Carbonylstreckschwingungen des Polypeptidrückgrats zusammensetzt. Ein Austausch von $^{12}\text{C}=\text{O}$ -Gruppen durch $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Gruppen einzelner Aminosäuren ermöglicht deshalb einen Zugang zu Strukturinformationen auf Peptidbindungsebene. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus diesem Grunde zum ersten Mal die Kohlenstoffatome der Carboxylgruppen aller vier Proline im Enzym Ribonuklease T1 durch das Kohlenstoffisotop ^{13}C substituiert. Der Isotopenaustausch gelang biosynthetisch durch die Etablierung eines Expressionssystems für RNase T1 in einem prolinauxotrophen Hefestamm von *Saccharomyces cerevisiae*. Hierzu wurden die Hefen in Minimalmedium kultiviert, das neben isotopenmarkiertem Prolin keine weiteren Aminosäuren enthielt. Anders als bei dem bereits etablierten Isolierungsprotokoll der RNase T1 aus *Escherichia coli* konnte das für den Expressionsorganismus toxische Protein nicht ins Periplasma sekretiert werden, sondern musste ins Kulturmedium ausgeschleust werden. Zur Isolierung eines chromatographisch und spektroskopisch reinen Produktes aus dieser komplexen Matrix war deshalb die Entwicklung eines neuen Aufreinigungsprotokolls auf der Grundlage moderner Trenn- und Analysemethoden erforderlich.

Die unmarkierte und ^{13}C -markierte RNase T1 wurde vergleichend mit FOURIER-Transform-Infrarot (FTIR)-spektroskopischen Methoden untersucht. Hierbei stand der Einfluss der isotopenmarkierten Proline auf den Amid-I-Bereich unter Bedingungen des thermodynamischen Gleichgewichts und Nicht-Gleichgewichts im Mittelpunkt des Interesses.

Unter Bedingungen des thermodynamischen Gleichgewichts wurden die unmarkierte und ^{13}C -markierte RNase T1 stufenweise thermisch entfaltet. Es zeigte sich, dass die Isotopenmarkierungen im nativ gefalteten Protein einen deutlichen Einfluss auf die Schwingungsspektren haben. Im thermisch entfalteten Zustand hingegen waren die beiden Proteinvarianten FTIR-spektroskopisch praktisch ununterscheidbar. Auf Basis der Schwingungsspektren konnten nun mit Hilfe theoretischer Überlegungen die Positionen der Proline in Einklang mit den Kristallstrukturdaten in bestimmten Sekundärstrukturen des Proteins lokalisiert werden. Insbesondere wurde hierbei der Einfluss der so genannten Übergangsdipolkopplungen (*transition dipole coupling*, TDC) der Carbonylstreckschwingungen auf die Sekundärstrukturmarkerbanden von β -Faltblatt- und Turnstrukturen diskutiert. Kopplungen *via* TDC sind sehr stark von den räumlichen Orientierungen und den Resonanzfrequenzen der beteiligten Carbonylgruppen abhängig. Sie wirken sich im starren, nativ gefalteten Protein am

stärksten aus, im flexiblen, thermisch entfalteteten Polypeptid hingegen ist ihr Einfluss vernachlässigbar.

Mit Hilfe von Spektrensimulationen auf Basis von TDC konnten die experimentell beobachteten Unterschiede zwischen den Schwingungsspektren der unmarkierten und ^{13}C -markierten RNase T1 sehr gut reproduziert werden. Damit wurden wichtige Voraussetzungen dafür geschaffen, die komplexen Strukturinformationen des Amid-I-Bereichs in IR-Spektren mit theoretischen Methoden auf Peptidebene zu berechnen.

Von besonderem Interesse waren neben den Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen zeitaufgelöste FTIR-spektroskopische Untersuchungen unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen. Die Proteinrückfaltung aus einem thermisch entfalteteten in den nativen Zustand wurde mit Hilfe von Temperatursprungexperimenten realisiert. Für diese Experimente wurde aufgrund der geringen Expressionsraten für RNase T1 in *S. cerevisiae* eine miniaturisierte Temperatursprungapparatur konzipiert, die bei sehr geringem Probenbedarf die Durchführung vieler reproduzierbarer Messungen ermöglichte. Die *trans*→*cis*-Isomerisierung von Pro 39, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt während der Rückfaltung der RNase T1 darstellt, ist synchronisiert mit einer räumlichen Neuorientierung der Pro 39-Carbonylgruppe. Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss dieser unmarkierten und ^{13}C -markierten Carbonylgruppe *via* TDC auf das benachbarte Turnsysteem im Verlauf der Isomerisierung in den zeitaufgelösten Schwingungsspektren durch spezifische spektrale Änderungen entsprechender Sekundärstrukturmarkerbanden in Erscheinung tritt. Auf diese Weise wurde zum ersten Mal eine direkte Detektion der *trans*→*cis*-Isomerisierungsreaktion von Pro 39 in der RNase T1 während der thermisch induzierten Rückfaltung mit der zeitaufgelösten FTIR-Spektroskopie möglich.

Abstract

The amide I region in vibrational spectroscopic spectra is generally used for the evaluation of protein secondary structure. Since the carbonyl groups are part of the polypeptide backbone their vibrational frequencies are very sensitive to structural changes. A substitution of single $^{12}\text{C}=\text{O}$ groups by $^{13}\text{C}=\text{O}$ groups in a given polypeptide chain provides details regarding structural information at the polypeptide bond level. Following this approach in the enzyme ribonuclease T1 (RNase T1) the carbon atoms of all four prolines were replaced by the isotope ^{13}C for the first time. The isotope labeled protein was biosynthesized by heterologous expression in a proline auxotrophic yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*. In order to fully enrich the protein with labeled prolines the yeast strain had to be cultured in minimal medium containing labeled proline as the only amino acid. In the well established purification protocol for RNase T1 from *Escherichia coli* the protein is expressed into the periplasm due to the protein's toxicity. In the case of the yeast the secretion of the RNase T1 had to be directed into the culture medium. In order to isolate a chromatographically and spectroscopically pure protein from this complex matrix a new purification protocol was developed on the basis of modern separation and analyses methodologies.

The labeled and unlabeled RNases were investigated by comparative Fourier Transform Infrared (FTIR) measurements. These measurements focused on the impact of the isotope labels on the amide I region under thermodynamical equilibrium and non-equilibrium conditions.

Under equilibrium conditions the unlabeled and ^{13}C labeled RNase T1 were stepwise thermally unfolded. These studies revealed that in the natively folded protein the isotope labels have a significant impact on the infrared spectra. By contrast, in the thermally unfolded state, the FTIR spectra of the two isotopomers were practically undistinguishable. On the basis of vibrational spectroscopy the positions of the prolines could be localized by theoretical considerations in specific secondary structural elements. These assignments were in accordance with the crystal structure of the RNase T1. Particularly, the interactions of the $\text{C}=\text{O}$ oscillators *via* transition dipole coupling (TDC) were taken into account to explain the impact of the isotope labels on β -sheet and turn-structure marker bands. It is well known that TDC depends on the geometries and resonance frequencies of the carbonyl groups concerned. In the natively folded protein, the impact of TDC is therefore strongest whereas at high temperatures in the flexible unfolded polypeptide it becomes nearly negligible.

Furthermore the amide I regions of the unlabeled and labeled RNase T1 IR spectra were modeled on the basis of TDC calculations. The calculated differences between

the two isotopomers were in reasonable accordance with the experimentally observed spectral differences. Following this approach isotope edited infrared spectroscopy in combination with computer modeling has the potential to extract the complex structural information in the amide I regions of vibrational spectra on the peptide group level.

Of particular interest were time-resolved FTIR spectroscopic measurements under non-equilibrium conditions. In these measurements protein refolding from a temperature unfolded state to the native state was induced by temperature jump experiments. Since protein expression in yeast was inefficient an experimental set-up was developed that allowed reproducible measurements using only small amounts of isotope labeled sample in the μL range. It is known that the *trans* \rightarrow *cis* isomerization of Pro 39 is a rate determining step on the refolding pathway of RNase T1. Since this isomerization reaction is synchronized with a spatial reorientation of the relating proline carbonyl groups, the impact of the labeled and unlabeled carbonyl carbons on the adjacent turn-system could be detected in the corresponding marker bands. In this way the *trans* \rightarrow *cis* isomerization reaction of Pro 39 could be traced directly by FTIR spectroscopy for the first time.