

Strukturuntersuchungen verschiedener
Mutanten des Maltose-Bindungsproteins
(MBP) mit Hilfe der ESR
Spektroskopie

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades

“Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte

DISSERTATION

(D 386)

vorgelegt von

Dipl. - Biol. Mohammed Chakour

unter Anleitung von

Prof. Dr. W. E. Trommer

Wissenschaftliche Aussprache:

18. Juni 2015

Meinen lieben Eltern.

Das beste Wissen ist das, was du kennst, wenn du es brauchst.

(khayru l-'ilmi ma hadarak)

(arabische Sprichwort)

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum März 2010 bis August 2013 im Fachbereich Chemie, Abteilung Biochemie, der Technischen Universität Kaiserslautern.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer für die Überlassung dieses höchst interessanten Themas, für die Unterstützung, für den Freiraum bei der Durchführung und für die stetige Diskussionsbereitschaft. Weiterhin danke ich für viele lehrreiche Einblicke, auch in andere Gebiete der Biochemie.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18. Juni 2015

Promotionskommission:

Vorsitzender der Prüfungskommission:	Prof. Dr.-Ing. C. Ernst
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. E. Trommer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. J. Cullum

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGEN	8
PHYSIKALISCHE KONSTANTE	10
1 EINLEITUNG UND THEORIE	11
1.1 Struktur und Faltung von Proteinen	11
1.2 Der Faltungstrichter	12
1.3 Der <i>molten globule</i> Zustand als Faltungsintermediat	13
1.3.1 Die Rolle des <i>molten globule</i> im Faltungsprozess	15
1.4 Maltose-Bindungsprotein aus <i>Escherichia coli</i>	15
1.4.1 Struktur des Maltose-Bindungsproteins	16
1.4.2 Genetische Kontrolle, Expression und Export von MBP	17
1.4.3 Das Maltosetransportsystem	19
1.4.4 Verwendung von dem Maltose-Bindungsproteins	21
1.5 ESR-Spektroskopie	22
1.5.1 Der Elektronenspin	22
1.5.2 Resonanz	23
1.5.3 Relaxation	24
1.5.4 Spinlabeling	24
1.5.5 Kontinuierliche Mikrowelleneinstrahlung (<i>cw</i>) und gepulste ESR	25
1.5.6 Messung von Abständen mittels Puls-ESR	26
2 AUFGABENSTELLUNG	30
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	32
3.1 Isolierung und Aufreinigung der MBP-Mutanten	32
3.2 ANS-Bindung an MBP	34
3.3 CD-Spektroskopie	37
3.3.1 Fern-UV-CD-Spektren der nativen und <i>molten globule</i> Struktur des MBP-Wt	37

3.3.2 Nah-UV-CD-Spektren.....	41
3.4 ITC-Messungen bei 5 °C	43
3.5 Ergebnisse der <i>cw</i> -ESR-Spektroskopie	48
3.5.1 Prüfung des <i>site-directed</i> Spinlabelings.....	48
3.5.2 pH-abhängige Denaturierung und Lokalisierung des <i>molten globule</i> Zustands	49
3.5.3 <i>cw</i> -Messung bei Tieftemperatur (150 K) des MBP5 und ihre Simulation zur Abstandsbestimmung	50
3.5.4 Die Molekulardynamik-Simulationen.....	52
3.5.5 DEER-Messungen bei pH 7,0.....	54
3.5.6 DEER-Messungen des MBP in dem <i>molten globule</i> Zustand	59
3.6 Diskussion der Daten	64
4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	67
5 EXPERIMENTELLE METHODEN.....	71
5.1 Allgemeines	71
5.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	71
5.1.2 Chemikalien	72
5.1.3 Verbrauchsmaterialien	74
5.1.4 Säulen und Säulenmaterial.....	74
5.1.5 Vorgefertigte Lösungen und Reagenzien.....	75
5.1.5.1 REAGENZIEN, STAMMLÖSUNGEN UND PUFFER	75
5.1.6 MBP-Sequenz mit Plasmidarchitektur.....	79
5.2 Biochemische Methoden	80
5.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien.....	80
5.2.2 Transformation der kompetenten Zellen.....	80
5.2.3 Kleinkultur	80
5.2.4 Glycerinkulturen	81
5.2.5 Plasmidisolierung (Miniprep)	81
5.2.6 Großkultur.....	81

5.2.7 Zellaufarbeitung	81
5.3 Chromatographische Methoden.....	81
5.3.1 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie	81
5.3.2 Die Trennung von MBP	82
5.3.3 Entfernung der Maltose mittels Hydroxyapatitsäule.....	83
5.3.4 Entfernung von Maltose mittels Dialyse.....	83
5.3.4.1 RENATURIERUNG VON MBP MIT DROP DILUTION.....	83
5.3.4.2 ENTFERNUNG VON HARNSTOFF MITTELS DIALYSE	84
5.3.5 Gel Filtration bei Verwendung der PD-10-Säule:.....	84
5.4 Spinlabeling.....	85
5.5 Allgemeine Arbeitsmethoden	86
5.5.1 Konzentrationsbestimmungen.....	86
5.5.1.1 UV/VIS-Spektroskopie.....	86
5.5.1.2 PROTEINBESTIMMUNG MITTELS BICINCHONINSÄURE-(BCA)-ASSAY	86
5.5.1.3 BRADFORDTEST	86
5.5.2 Disk-SDS-PAGE.....	87
5.5.3 Proteinaufkonzentrierung	88
5.5.3.1 AUFKONZENTRIERUNG/PUFFERAUSTAUSCH MIT KONZENTRATOREN	88
5.6 Massenspektrometrische Methoden.....	89
5.6.1 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI).....	89
5.6.2 Fluoreszenzspektroskopie und ANS-Bindung	89
5.6.3 CD-Experimente	89
5.6.4 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	90
5.7 Elektronenparamagnetische-Resonanz (EPR)	92
5.7.1 <i>Continuous Wave</i> -EPR Messungen (X-BAND)	92
5.7.1.1 TIEFTEMPERATURMESSUNGEN.....	93
5.7.2 Vier-Puls-DEER-Messung bei 50 K	94
5.7.3 MD Simulation.....	96

5.7.3.1	ZUR ABSTANDSBERECHNUNG AUS TIEFTEMPERATUR CW- EPR-SPEKTREN	96
5.7.3.2	MOLEKULARDYNAMIK-SIMULATIONEN VON DEER- EPR-SPEKTREN	97
6	ANHANG	98
6.1	X-Band cw-ESR-Parameter	98
6.2	MD-Parameter	100
6.3	Vierpuls-DEER:.....	101
6.3.1	Parameter für MBP bei pH 7,0 (native Zustand)	101
6.3.2	Parameter für MBP bei pH 3,3 (<i>moten globule</i> Zustand)	102
6.4	Tikhonov Regularisierung bei pH 7, 0 (Native Zustand)	102
6.5	ITC Parameter:	103
6.6	Masterplan	104
6.7	MBP wt-Sequenz.....	105
7	LITERATURVERZEICHNIS	106
7.1	Literatur	106
7.2	Internet.....	114
	DANKSAGUNG	116
	PUBLIKATIONEN.....	118
	LEBENS LAUF	120
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	121

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 3.1: Ermittelte Daten der Molekulargewichte.....	33
Tabelle 3.2: Die Auflistung der aus SEDFIT berechneten thermodynamischen Parameter.....	44
Tabelle 3.3: Die Auflistung der aus SEDFIT berechneten thermodynamischen Parameter.....	45
Tabelle 3.4: Berechnete thermodynamische Parameter im Vergleich mit Literaturwerten.....	45
Tabelle 3.5: Zusammenfassung der Abstände.	54
Tabelle 3.6: Vergleich zwischen modellierten Abständen und durch DEER Messungen.....	58
Tabelle 3.7: Vergleich der durch DEER-Messungen erhaltenen Abstände.....	62
Tabelle 5.1: Medien und Nährlösungen.....	75
Tabelle 5.2a: Verwendete Stammlösungen und Puffer für die Proteinreinigungen	76
Tabelle 5.3b: Verwendete Stammlösungen und Puffer für die Proteinreinigungen	76
Tabelle 5.4: Verwendete Stammlösungen und Puffer für die <i>Spinlabeling</i>	77
Tabelle 5.5: Verwendete SDS-PAGE Stammlösungen und Puffer.	78
Tabelle 5.6: Verwendete Puffern für ANS und CD-Messungen	78
Tabelle 5.7: Zusammensetzung von Trenngel bzw. Sammelgel für ein Gel.....	88

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1.1: Globale, trichterförmige Energielandschaft eines Proteins.....	12
Abbildung 1.2: Illustration verschiedener Modelle für die Struktur des <i>molten globule</i>	14
Abbildung 1.3: Die dreidimensionale Struktur des Maltose-Bindungsproteins (MBP).....	16
Abbildung 1.4: Darstellung verschiedener Kristallstrukturen des MBP.....	17
Abbildung 1.5: Die Transkriptionsregulation der beiden divergenten Operons <i>malEFG</i> und <i>malKLM</i>	18
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Maltose/Maltodextrintransport.....	20
Abbildung 1.7: Energieniveauschema der beiden Spin zustände	23
Abbildung 1.8: Reaktion des Spinlabels MTSL	24
Abbildung 1.10: Schematische Aufbau eines <i>cw</i> -ESR Spektrometers.	25
Abbildung 1.11: Pake-Pattern der dipolaren Kopplung zweier Spins.	27
Abbildung 1.12: 4-Puls-DEER-Sequenz.....	28
Abbildung 3.1: Chromatogram der Amylosesäule der Mutante MBP4.....	32
Abbildung 3.2: SDS-Gel.....	33
Abbildung 3.3: MALDI-TOF-Massenspektrum von MBP3 (Referenzmasse: BSA).	34
Abbildung 3.4: Fluoreszenz-Emissions-Spektrum des MBP3 / ANS-Komplex.....	36
Abbildung 3.5: Fluoreszenzspektren von ANS.....	36
Abbildung 3.6: Fern-UV-CD-Spektren des MBP.....	37
Abbildung 3.7: Fern-UV-CD-Spektren von MBP3 (rot) und MBP-Wt (schwarz) bei pH 7,4.	38
Abbildung 3.8: Fern-UV-CD-Spektren bei pH 3,0.....	39
Abbildung 3.9: Fern-UV-CD-Spektren des MBP im nativen und <i>molten globule</i> Zustand.	40
Abbildung 3.10: Die Nah-UV-CD-Spektren.....	41
Abbildung 3.11: Vergleich der Nah-UV-CD-Spektren.....	42
Abbildung 3.12: Die Titrationskurve des nativen Zustands.....	43
Abbildung 3.13: Fitkurve mittels NITPIC mit MBP bei pH 7 mit 40 Injektionen einer Maltose- Lösung.	44
Abbildung 3.14: Rohdaten I (oben) und Thermogramm (durch NITPIC bearbeitet) (unten) bei pH 3,3	46
Abbildung 3.15: Rohdaten II (oben) und Thermogramm (durch NITPIC bearbeitet) (unten) bei pH 3,3	47
Abbildung 3.16: <i>cw</i> -ESR-Spektren der sieben Biradikal-Mutanten bei 295 K (RT).....	49
Abbildung 3.17: pH-abhängige Denaturierung von MBP1.	50

Abbildung 3.18: <i>cw</i> -ESR-Spektrum der Mutante MBP5 bei 150 K.	51
Abbildung 3.19: Messung der immobilisierten Biradikale bei 80 K	52
Abbildung 3.20: Ergebnisse der MD-Simulationen für alle sieben MBP-Biradikale	54
Abbildung 3.21: Dipolare Evolutionszeit der DEER-Messungen aller Biradikale	55
Abbildung 3.22: Dipolare Evolutionsfunktionen MBP1 - MBP7 in der Zeitdomäne mit bestem Fit..	58
Abbildung 3.23: Normierte Abstandsverteilungen der sieben Biradikale.	59
Abbildung 3.24: a) Zeitdomäne-Signale und b) Abstandsverteilung von MBP3	60
Abbildung 3.25: Dipolare Evolutionszeit der DEER-Messungen aller 7 Biradikale	61
Abbildung 3.26: Darstellung von MBP mit acht mutierten Cysteinen.	63
Abbildung 5.1: Chromatogramm der Mutante MBP6..	82
Abbildung 5.2: Albumin-Entfernung von NaCl-Lösung mittels Eine PD-10 Säule.	84
Abbildung 5.3: Schematischer Darstellung eines ITC-Geräts.	90
Abbildung 5.4: Beispiel für ein Thermogramm.	91
Abbildung 5.5: Immobilisiertes Biradikal MBP5-Mutant	94
Abbildung 5.6: Echo-detektiertes Spektrum des MBP-Biradikals.....	95
Abbildung 6.1: Masterplan der Arbeit bis zur Modifizierung der MBP mit MTS.....	104

ABKÜRZUNGEN

AK	Arbeitskreis
Amp	Ampicillin
ANS	8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AT	aquisition trigger
a.u.	arbitrary units/ beliebige Einheiten
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin/Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
B α LA	bovines α -Lactalbumin
CD	circular dichroism
CGH	Citrat/ Glycin/ HEPES
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
cw	<i>continuous wave</i>
dB	Dezibel
DEER	Double electron electron resonance
Disk-SDS-PAGE	Diskontinuierliche- <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
DTT	DL-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELDOR	electron electron double resonance
ENDOR	electron nuclear double resonance
ESE	Elektronenspin echo
ESR	Elektronenspinresonanz
FT	Fouriertransformation
GdnHCl	Guanidin Hydrochlorid
H ₂ O _{dd}	Bidestilliertes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
LB	<i>lysogeny broth</i>
kDa	kiloDalton
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
MBP	Maltose-Bindungsprotein

MD	Molekulardynamik
MG	<i>Molten globule</i>
MPIP	Max-Planck-Institut für Polymerforschung
MS	Massenspektrometrie
MTS	1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methylthiosulfonat
MWCO	molecular weight cut-off
OD	optische Dichte
pdb-ID	protein data base identifier
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RMS	root mean square
SDS	Natriumdodecylsulfat/Natriumlaurylsulfat
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TOF	Flugzeitanalysator (<i>time of flight</i>)
ÜNK	Übernachkultur
UV	ultraviolettes Licht
VIS	sichtbares Licht
ψ	Wellenfunktion des Elektrons
WT	Wildtyp

PHYSIKALISCHE KONSTANTE

e	$1,602176487(40) \cdot 10^{-19} \text{ C}$	Elementarladung
g_e	$2,0023193043622(15)$	Landé-Faktor des freien Elektrons
\hbar	$1,054571628(53) \cdot 10^{-34} \text{ J s} = h/2\pi$	Reduziertes Planck'sches Wirkungsquantum
k_B	$1,3806504(24) \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$	Boltzmann-Konstante
m_e	$9,10938215(45) \cdot 10^{-31} \text{ kg}$	Ruhemasse des Elektrons
m_p	$1,672621637(83) \cdot 10^{-27} \text{ kg}$	Ruhemasse des Protons
μ_B	$9,227400915(23) \cdot 10^{-24} \text{ J T}^{-1} = e\hbar/2m_e$	Bohr'sches Magneton
μ_n	$5,05078324(13) \cdot 10^{-27} \text{ J T}^{-1} = e\hbar/2m_p$	Kernmagneton

1 EINLEITUNG UND THEORIE

Die Zellwand von *E. coli*, durch die Innenmembran vom Zytoplasma abgegrenzt, umfasst das Periplasma und die Außenmembran. Membranproteine stellen eine der wichtigsten Grenzen in den Bereichen der strukturellen Biologie und Strukturproteomik dar. Während 30-40% aller Proteine Membranproteine sind, sind weniger als 1% der Strukturen der Membranproteine bekannt.

Proteine sind biologische Moleküle, deren Wirksamkeit sehr vielfältig sein kann. Sie üben viele verschiedene Funktionen innerhalb der Zelle aus. Sie sind Grundbausteine der Architektur der Zelle, sowie sie auch eine zentrale Funktion im Zellstoffwechsel haben (wie zum Beispiel der Maltose-Transport in die Zelle). Die Reihenfolge der Aminosäuren und ihre Wechselwirkungen miteinander bestimmen die Eigenschaften der Proteine. Proteine sind in der Lage ihre räumliche Struktur zu ändern um eine Funktion auszuüben. Die Konformation eines Proteins hat einen starken Einfluss auf seine Funktion. Oft genügt eine kleine Änderung in der dreidimensionalen Struktur, um eine große Änderung in der Aktivität eines Enzyms zu bewirken. Wie kann nun eine lineare Proteinkette in die korrekt gefaltete Konformation übergehen?

1.1 Struktur und Faltung von Proteinen

Der Mechanismus, wie eine Polypeptidkette nach ihrer Synthese am Ribosom ihre native, funktionelle Struktur erreicht ist bis jetzt in der Naturwissenschaft eine offene Fragestellung. Es gibt heute mehr als 30 bekannte Arten der Architektur von Proteindomänen (Orengo C.A. *et al.*, 1994; Thornton J.M. *et al.*, 1999). Proteine gibt es in gefalteten, nativen und in ungefalteten, denaturierten Zuständen, wobei letztere starke Unterschiede in Enthalpie und Entropie erkennen lassen.

Christian Anfinsen konnte zeigen, dass der native Aufbau von Proteinen einen thermodynamisch stabilen Zustand darstellt (Anfinsen, C. B., 1973). Cyrus Levinthal verwarf eine zufällige Konformationssuche, und erklärte es, dass ein Protein einen bestimmten Pfad bei der Faltung (Faltungsweg, *engl. Folding pathway*) beanspruchen muss auf dem es hinreichend schnell an sein Ziel kommt (Levinthal, C. 1969). Ein Protein, das sich in denaturierter (ungefalteter) Form befindet würde unter geeigneten Beschränkungen eine vorgegebene Folge von Konformationen (Zwischen- bzw. Intermediär-zustände) absolvieren, bis es den nativen (gefalteten) Zustand einnimmt.

Das neue Konzept der Proteinfaltung vermeidet die lange Dauer einer Zufallssuche. In einem davon abgeleiteten neuen Szenario wurde das Pfadkonzept eines sequentiellen Faltungsverfahrens ersetzt durch ein Trichter-Konzept von parallelen Ereignissen ersetzt (C. Branden *et al.*, 1999, Dill, K. A. *et al.*, 1997).

1.2 Der Faltungstrichter

Entsprechend dem Faltungstrichter in Abbildung 1.1 wird der Konformationsraum immer kleiner während die freie Enthalpie fällt. Im Faltungstrichter sind verschiedene Wege aus der Vielzahl entfalteter Konformationen zum gefalteten Zustand möglich. Lokale Minima im Trichter führen zu einer "Rauigkeit", welche die Geschwindigkeit der Faltungsreaktion steuert.

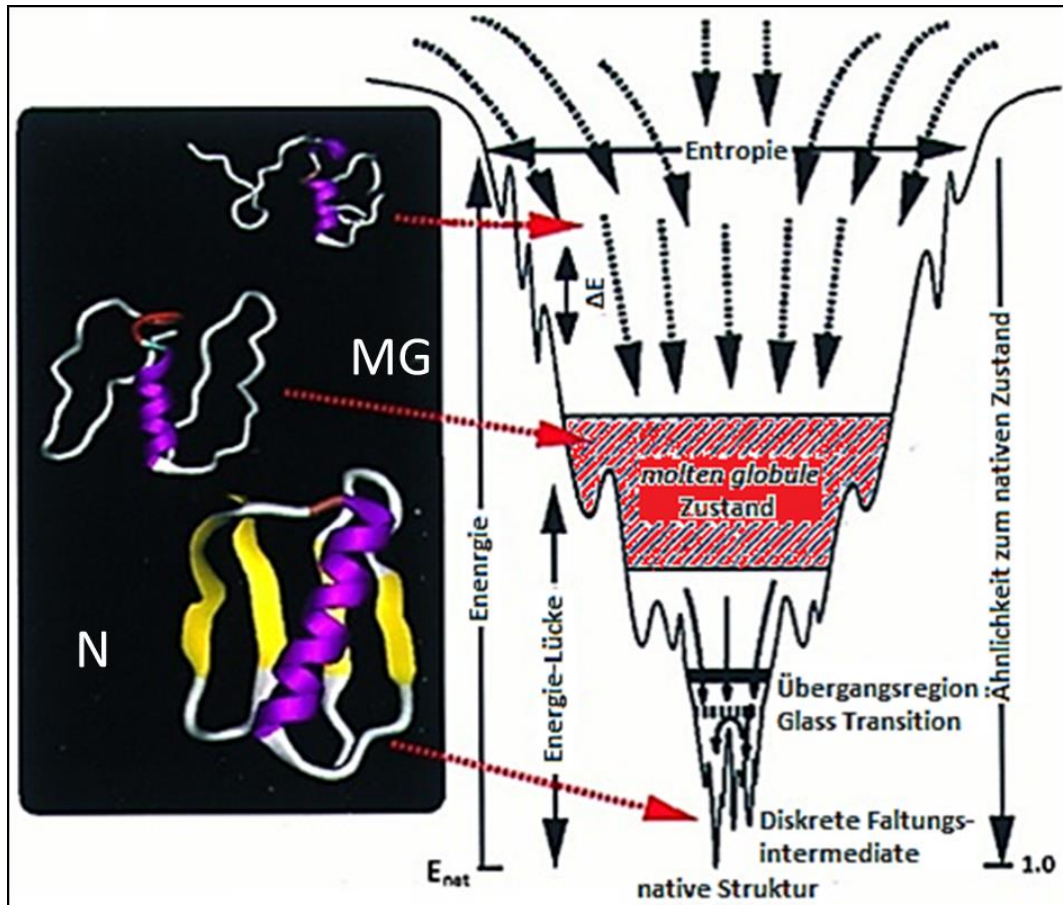


Abbildung 1.1: Globale, trichterförmige Energielandschaft eines Proteins. Die Vertikale repräsentiert die effektive Energie der Kette, die schematisch gegen zwei der vielen Konformationsfreiheitsgrade aufgetragen ist. Auf der linken Seite sind die Proteinstrukturen dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert nach K. A. Dill *et al.*, 1997 und P. G. Wolynes *et al.*, 1999) modifiziert.

Die Bildung der nativen Struktur am unteren Rand des Trichters in der Abbildung wird von einer Abnahme der Entropie begleitet (Wolynes P.G. *et al.*, 1995). An der Stelle adoptieren Polypeptidketten mehrere Zustände von niedriger Energie. Beim Modell der sog. *two-state folders*, welchem eine recht große Zahl von Proteinen experimentell zugeordnet werden konnte, werden sämtliche Konformationsvarianten entweder zum nativen oder zum ungefalteten Zustand zusammengefasst.

Im Zusammenhang mit der Proteinfaltung wird weiterhin postuliert, dass eine Kooperativität kleiner gefalteter Bereiche die Faltung anderer Bereiche erleichtert. Der sogenannte *zipping and assembly mechanism* ZAM erfüllt die Postulate der Faltungsgeschwindigkeit, indem sich der Zeitaufwand der Suche nach der effektiven Größe der Schleife richtet (Dill K.A. *et al.*, 1993, Fiebig und Dill K.A., 1993), welche die Polypeptidketten bei jedem Schritt umorientieren müssen. Die Trichterform ermöglicht, dass der gefaltete Zustand in kurzer Zeit erreicht wird. Dieser Mechanismus (ZAM) scheint eine nützliche Grundlage für ausführliche Berechnungsmodelle (engl. *computational modeling*) zu sein.

1.3 Der *molten globule* Zustand als Faltungsintermediat

Die Erzeugung von gefalteten Intermediaten wurde von Ptitsyn und Rashin (1973) aus theoretischen Überlegungen postuliert. Von Ohgushi und Wada wurde (1983) der Begriff des *molten globule* zum ersten Mal eingeführt. Dass der *molten globule* Zustand eines Proteins ein generelles Faltungsintermediat ist, wurde von Ptitsyn O.B. *et al.* (1990) vorgeschlagen. Er wird auch als denaturierter Zustand unter physiologischen Bedingungen angesehen (Fersht A., 1999). Der Begriff des *molten globule* wurde von Goldberg D. *et al.* (1990) als ein kompaktes Intermediat mit einem hohen Gehalt an nativer Sekundärstruktur, aber ohne Tertiärstruktur definiert.

Wie in Kap. 1.1 ausgeführt wurde, ist die Proteinfaltung keine zufällige Suche nach der richtigen Konformation, eher wird die Polypeptidkette durch eine Reihe zunehmend strukturierter Intermediate zur nativen Konformation navigiert. Die immer zahlreicheren Beobachtungen von Transienten oder Gleichgewichtsintermediaten, die sich vom kompakten Zustand des denaturierten Proteins und vom nativen Protein unterscheiden, bestätigten die Annahme, dass Proteine unter bestimmten Bedingungen Faltungsintermediate bilden. Diese können als sequenzielle oder durch alternative Faltungswege bedingte Intermediate auftreten (Fink, A. L., 1995, Kim, P. S. *et al.*, 1990).

Der *molten globule* Zustand ist eine intermediäre Konformation, die von vielen globulären Proteinen unter mild denaturierenden Bedingungen eingenommen wird (Kuwajima, K. und M. Arai., 2000, Ptitsyn, O. B., 1995). Trotz des wesentlichen Erhalts an Sekundärstruktur fehlen die meisten spezifischen Tertiärkontakte und eine feste Packung der Seitenketten. Locker gepackte hydrophobe Bereiche des Moleküls sind lösungsmittelzugänglich und können durch Bindungsexperimente mit dem hydrophoben Farbstoff 1-Anilino-8-naphthalinsulfonat (ANS) detektiert werden. Für das Proteinmolekül ist dieser Zustand bereits kompakt, wobei der Radius nur bis zu 30 % gegenüber dem nativen Zustand vergrößert ist. Der *molten globule* Zustand ist heterogen und dynamisch; seine Stabilität kann bei verschiedenen Proteinen stark variieren.

Die typischen experimentellen Techniken, die man verwendet, um *molten globules* Zustände zu erkennen sind (1) Bindungsexperimente mit hydrophobem Farbstoff (typischerweise ANS, 8-Anilino-1-naphthalinsulfonat), die die Bildung eines losen hydrophoben Kerns erkennen und den Umfang des hydrophoben Bereichs, der dem Lösungsmittel ausgesetzt ist, abschätzen lassen (Kap.

5.6.3). (2) Fern- und Nah-UV-CD Spektren, die die Sekundär- und Tertiärstrukturanteile eines Proteins erkennen (Kap. 5.6.4), und (3) hydrodynamische Methoden wie Viskositätsmessung und Molekularsieb-Chromatographie, welche die Molekülgröße des Proteins bestimmen. Diese Verfahren bieten jedoch nur Informationen über die durchschnittlichen strukturellen Eigenschaften der Protein-Moleküle.

Fortgeschrittene Techniken, die eine genauere Sicht auf den *molten globule* Zustand bieten, wurden nicht vor den 1990er Jahren entwickelt. Daher ist die genaue Struktur des *molten globule* sehr umstritten. Abbildung 1.2 zeigt eine Darstellung von zwei verschiedenen Modellen des *molten globule* Zustands.

Die traditionelle Auffassung vom *molten globule* (Shakhnovich E.I. und Finkelstein A.V., 1989; Ptitsyn O.B., 1992) geht davon aus, dass das Rückgrat der Polypeptidkette fluktuiert und der nativen Faltung ähnlich ist (Abb. 1.2 A), während die Unordnung in den Seitenketten zu erkennen ist (Abb. 1.2 B). Diese Ansicht wurde jedoch aufgrund der thermodynamischen Argumente und der Energie-Landschafts-Theorie (Dill K.A. *et al.*, 1995; Priwalow P.L., 1996) kritisiert. Priwalow (1996) führte aus, dass *molten globule* Zustände entweder missgefaltete Strukturen sind oder Zustände, wo ein Teil der Struktur bereits gefaltet und ein anderer noch entfaltet ist (Abb. 1.2 C).

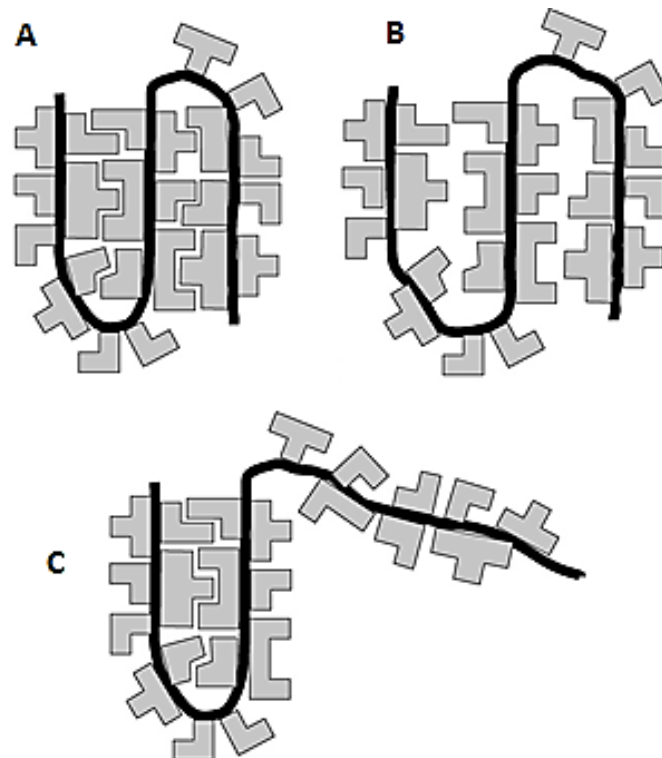


Abbildung 1.2: Illustrationen verschiedener Modelle für die Struktur des *molten globule*. Das Rückgrat des Proteins wird durch eine dicke Linie dargestellt und Seitenketten sind als Stücke verschiedener am Rückgrat hängender Formen gezeigt. (A) Der native Zustand des Proteins, mit allen verborgenen Seitenketten eng zusammengepasst wie die Teile eines Puzzles. (B) das Seitenketten- *molten globule* Modell: die Faltung des Rückgrats ist nativ-ähnlich, aber die Seitenketten sind nur lose gepackt. (C) Die Hälfte des Moleküls ist vollständig gefaltet, während die andere Hälfte vollständig entfaltet ist (Redfield, 2004)

Priwalows Studien bestätigen die Auffassung, dass der *molten globule* Zustand vieler Proteine tatsächlich heterogener als zuvor angenommen ist: ein Teil der Struktur ist besser organisiert und nativ-ähnlich, während andere Teile weniger organisiert sind (Modell C). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass bei verschiedenen anderen Proteinen auch andere Verhältnisse vorliegen. Die experimentellen Techniken, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, wie Stopped-Flow-Circulardichroismus, gepulster Wasserstoff-Exchange und Röntgenstreuung erlauben den *molten globule* Zustand gut im Detail charakterisieren zu lassen.

1.3.1 Die Rolle des *molten globule* im Faltungsprozess

Das Studium des *molten globule* war stark motiviert von der Annahme, dass dieser Zustand im Verlauf der Faltung eines Proteins vorkommt. Diese Theorie wurde von kinetischen Messungen mittels Circulardichroismus an A-Laktalbumin unterstützt (Ikeguchi M. *et al.*, 1986). Kinetische Messungen während der Rückfaltung von mehreren Proteinen einschließlich Interleukin1 β , Staphylokokken-Nuklease und Apomyoglobin (Heidary D. K. *et al.*, 1997; Walkenhorst W. F. *et al.*, 1997; Jamin M. und Baldwin R. L., 1998; Maki K. *et al.*, 1999) ergaben weitere Bestätigungen der theoretischen Vorhersagen, dass der *molten globule* Zustand als Zwischenprodukt im Faltungsweg in den meisten Fällen tatsächlich auftritt. Diese Ergebnisse führten zu dem hierarchischen Modell der Protein-Reifung (Arai M. und Kuwajima K., 2000) wo die Faltung eines Proteins in zwei Stufen erfolgt: (1) Bildung des *molten globule* aus dem vollständig ungefalteten Zustand und (2) Bildung des nativen Zustand aus dem *molten globule*.

1.4 Maltose-Bindungsprotein aus *Escherichia coli*

Das Periplasma Gram-negativer Bakterien weist eine hohe Konzentration an Enzymen sowie Binde- und Transportproteinen auf, die in verschiedene biochemische Aktionen eingebunden sind. Das Maltose-Bindungsprotein MBP (MalE) aus *Escherichia coli* ist Teil des Maltodextrin-Transportsystems und gehört zu der weitverbreiteten Gruppe der ABC (*ATP-binding cassette*) Transporter (Higgins C. F. *et al.*, 1992; Boos W. und Lucht J.M., 1996). Es ist eines der am besten untersuchten Proteine, die in Transport und Chemotaxis (Shilton B.H. *et al.*, 1996) beteiligt sind. Die Lokalisierung und Faltung im Periplasma sind vital für seine Funktion.

MBP ist ein monomeres Protein ohne Disulfidbindungen, prosthetische Gruppen, gebundenen Metallionen oder Cofaktoren. Die Kristallstrukturen von MBP sind sowohl im Komplex mit anderen Proteinen (Sharf A. *et al.*, 1992) als auch mit gebundener Maltose (Spurlino J.C *et al.*, 1991) bestimmt worden (Abb. 1.3 & Abb. 1.4). Im Gegensatz zu anderen großen Proteinen erfährt MBP eine reversible Entfaltung entweder durch chemische Denaturanzien wie Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl) oder Zuführung von Energie in Form einer Temperaturerhöhung (Ganesh C.

et al., 1997). All das qualifiziert es als ein attraktives Modellsystem für die Untersuchung der Proteinfaltung.

1.4.1 Struktur des Maltose-Bindungsproteins

Die MBP-Kristallstruktur (Abb. 1.3) zeigt, dass MBP aus zwei globulären Domänen besteht, mit einer Spalte zwischen den Domänen, wo das Polysaccharid binden kann (Duan X. und Quioco F.A., 2002, Sharff A.J. *et al.*, 1992, Spurlino J.C. *et al.*, 1991). Es ist ein Molekül aus 370 Aminosäureresten mit einem Molekulargewicht von $M_r = 40622$ Da (Spurlino J.C. *et al.*, 1991). Die an den Wasserstoffbrücken zum Liganden beteiligten Aminosäuren befinden sich in Domäne I (N-Terminus) während der C-Terminus in Domäne II ist. Die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen, welche diese Domänen bilden, lassen die beide dennoch ähnlichen Sekundärstrukturen aufweisen. Die beiden Domänen sind durch drei Ketten miteinander verknüpft.

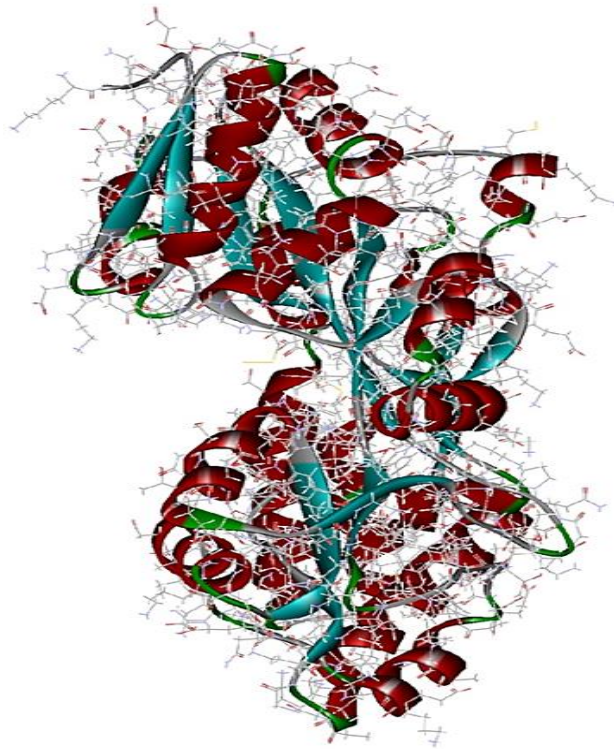


Abbildung 1.3: Die dreidimensionale Struktur des Maltose-Bindungsproteins (MBP). Zwischen den zwei Loops, nämlich der N-terminalen Domäne an der Spitze und der C-terminalen Domäne unten, befindet sich die Maltose- und Maltodextrin -Bindungsstelle. Die Abbildung wurde mit dem Programm Accelrys Discovery Studio 2.5 erstellt (Sharff A.J. *et al.*, 1992). Man erkennt: rot = α -Helices, cyan = β -Faltblätter.

In Abwesenheit seines Liganden nimmt MBP eine "offene" Konformation (Abb. 1.4 links) ein, wobei die Ränder der Spalte weit auseinander klaffen. Eine Liganden-Bindung wird von einer Konformationsänderung begleitet, wobei eine Verdrehung zwischen den N- und C-Domänen (35°)

aufeinander zu und 8° seitlich) die Bindungsstelle schließt. Diese Änderung in der Konformation scheint für die Funktion von Bedeutung zu sein und kann durch eine charakteristische Änderung in der intrinsischen Fluoreszenz-Emission von MBP verfolgt werden. Man kann davon ausgehen, dass MBP in Lösung in Abwesenheit von seinem Substrat in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen der offenen und der geschlossenen Form vorliegt (Abb. 1.4 rechts Bild), wobei die offene Form in Abwesenheit des Liganden energetisch bevorzugt ist.

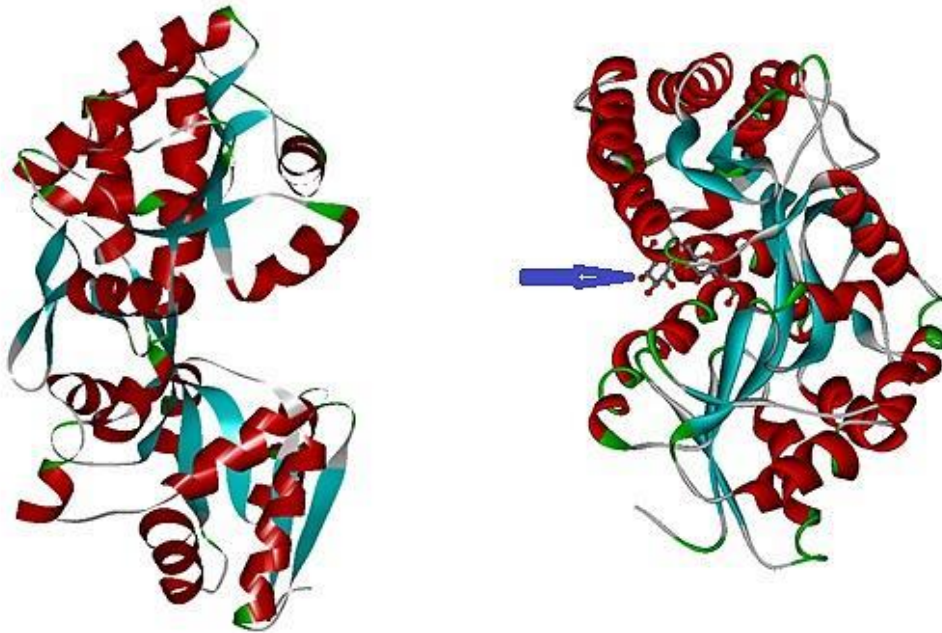


Abbildung 1.4: Darstellung verschiedener Kristallstrukturen des MBP. Die Modellierung des MBP erscheint rechts in geschlossener Form (PDB-ID: 1ANF) (Sharff *et al.*, 1992), wobei die hydrophoben und hydrophilen Bereiche unterschiedlich eingefärbt sind und der blaue Pfeil auf die Maltose in ihrer Bindungsstelle zeigt. Im linken Bild (PDB-ID: 1OMP) (Spurlino J.C. *et al.*, 1991) ist MBP ohne Substrat in geöffneter Form dargestellt, (Eigene Darstellung mit dem Programm Accelrys Discovery Studio 2.5).

1.4.2 Genetische Kontrolle, Expression und Export von MBP

Das *malE*-Gen kodiert das Maltose-Bindungsprotein MBP und gehört zu dem *malEFG Operon*, das zusammen mit dem divergent transkribierten *malKLM Operon*, die *malB*-Region bildet (Abb. 1.5). Beide Operons sind in den Maltose-Transport involviert und auch Teil der Maltose-Regulation. Diese Operons enthalten mindestens neun Gene, die durch den transkriptionellen Aktivator *Malt* positiv gesteuert werden (Balbach, J. und F. X. Schmid, 2000). Die Operons der *malB*-Region und damit die *MalE* Expression unterliegen der positiven Kontrolle direkt durch die Bildung des Komplexes cAMP-CAP-Rezeptor (CRP), welcher an die Promotor-Region bindet, und indirekt durch *Malt*, das die CAP-Steuerung ermöglicht (Debarbouille M. *et al.*, 1978; Chapon C. *et al.*, 1983). Obwohl die Expression

des MBPs durch Maltose induzierbar ist, wird Maltotriose als der interne Induktor bevorzugt, der zusammen mit ATP an MalT bindet kann und die Transkription startet (Schwartz M. *et al.*, 1967).

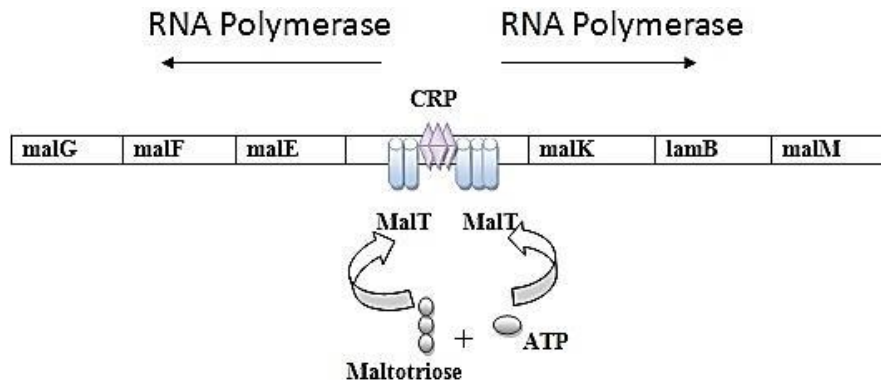


Abbildung 1.5: Die Transkriptionsregulation der beiden divergenten Operons *malEFG* und *malKLM* aus der Maltose-Regulation. Die beiden Operons werden positiv gesteuert durch den Transkriptions-Regulatoren MalT und den Komplexen aus cAMP und Kataboli-Aktivatorprotein (cAMP-CAP). (Die Abbildung wurde modifiziert nach Schwartz M. *et al.*, 1967).

MBP, wie auch andere periplasmatische Proteine, wird als Vorstufe (Pre-MBP; engl. *Precursor MBP*) im Cytosol synthetisiert, bevor es in das Periplasma exportiert wird. Ein Protein, das im Periplasma lokalisiert ist, muss zuerst die zytoplasmatische Membran durchqueren. Das Durchschleusen eines Proteins durch die zytoplasmatische Membran wird als "Translokation" bezeichnet. Die Translokation des MBP wird dann ausgelöst, wenn etwa 80% des Proteinmoleküls synthetisiert worden ist, und erfordert, dass das Pre-MBP in einem lose-gefalteten Proteinase-sensitivem Zustand gehalten wird. Diese entfaltete Konformation wird durch die Bildung eines Protein-Komplexes (Pre-MBP-SecB) stabilisiert (Dev I.K, Ray PH, 1990) und für den Membrantransport vorbereitet. Spezifische Wechselwirkungen zwischen MBP und SecB finden mit Hilfe der MBP-Erkennungssequenz von 26-Aminosäure-Seitenketten statt (siehe MBP-Sequenz in Kap. 5), die während der Translokation abgespalten wird. Die initiale Bindung von SecB an das Substrat-Protein wird wahrscheinlich durch elektrostatische Wechselwirkungen ausgelöst (Quiocho F.A. & Ledvina P.S., 1996; Quiocho F.a. *et al.*, 1997). Die Spezifität von SecB (tetrameres Chaperon) für das exportierte Substrat (Bsp. Maltose-Bindungsprotein (MBP), Galaktose -Bindeprotein (GBP), Außen Membranprotein (OmpA, OmpF und LamB)) erklärt man sich durch die verringerte Faltungskinetik von signalsequenztragenden Proteinen (Hardy S.J.S. und Randall L. L., 1991; Intyre M. *et al.*, 1991).

Kumamotos und Beckwiths Studien über das SecB-Gen von *E. coli* führten zu der Hypothese, dass das Gen einen Bestandteil der Zell-Export-Maschinerie kodieren könne und dass das SecB-Genprodukt frühzeitig im Translokations-Prozess funktioniere. Jede Mutation des SecB-Gens führt zu Mängeln im Export von bestimmten Proteinen wie z.B. MBP (Kumamoto C. A. und Gannon P. M., 1988).

Generell sind die Faltung von MBP im periplasmatischen Raum sowie die Abhängigkeit von einigen periplasmatischen Chaperonen bis jetzt noch nicht gut verstanden. In Wildtyp-Zellen beträgt die periplasmatische Konzentration von MBP etwa 1 mM, sie entspricht damit dem 20 - 30-fachen molaren Überschuss über den anderen am Transport und Chemotaxis beteiligten intrinsischen Membranproteine.

1.4.3 Das Maltosetransportsystem

Das periplasmatische Protein MBP von *Escherichia coli* ist dafür bekannt mit hoher Affinität Maltose zu binden. Der MBP-Ligand dient als ein Rezeptor für Chemotaxis und Genregulation. Maltose (Disaccharid) und Maltodextrine (mehr Glucose-Einheiten bis zu 20) werden vom Bakterium *E. coli* als Kohlenstoffquellen genutzt. Das Disaccharid besteht aus zwei α -1,4-glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen, auf dieselbe Art sind bei Maltodextrinen mehrere Glucosereste miteinander verbunden. Abb. 6A gibt einen Überblick über die verschiedenen Komponenten der Maltose- und Maltodextrintransporter und ihre Lokalisierung in *E. coli* Zellen. Das Porin LamB erleichtert die Zucker-Diffusion durch die äußere Membran. Der ABC-Transporter, der aus den Proteinen MalF, MalG und MalK Protein besteht, sorgt zusammen mit MBP für eine Energie-abhängige Aufnahme durch die innere Membran (Shuman B.M. *et al.*, 1981). Mutationen im *malE* Gen können den Export des MBP und seine Ligandenbindung verhindern oder auch zu Wechselwirkungen mit den Membrantransportelementen führen und damit einen Maltose-negativen Phänotyp ergeben. Dies lässt stark vermuten, dass MBP für den Transport sehr wichtig ist. Beim Vergleich mit Transportsystemen, die kein periplasmatisches Bindeprotein verwenden, scheint es, dass das Vorhandensein von einem periplasmatischen Bindungselement die Affinität des Transports bis auf 100-faches erhöht. Entsprechend sind die K_d -Werte der Bindung von Maltose an MBP *in vitro* im μ M-Bereich und die Substratkonzentration bei halb-maximaler Transportrate praktisch identisch (Prajapati R.S. *et al.*, 2007). Ein solches Permease-System, das für eine hohe Substrataufnahmerate bekannt und mit hoher Affinität gekoppelt ist, ermöglicht den Zellen zu wachsen sowie der Maltose und Maltodextrine effizient zu verwenden, sogar wenn diese in sehr geringen Konzentrationen im Medium vorhanden sind.

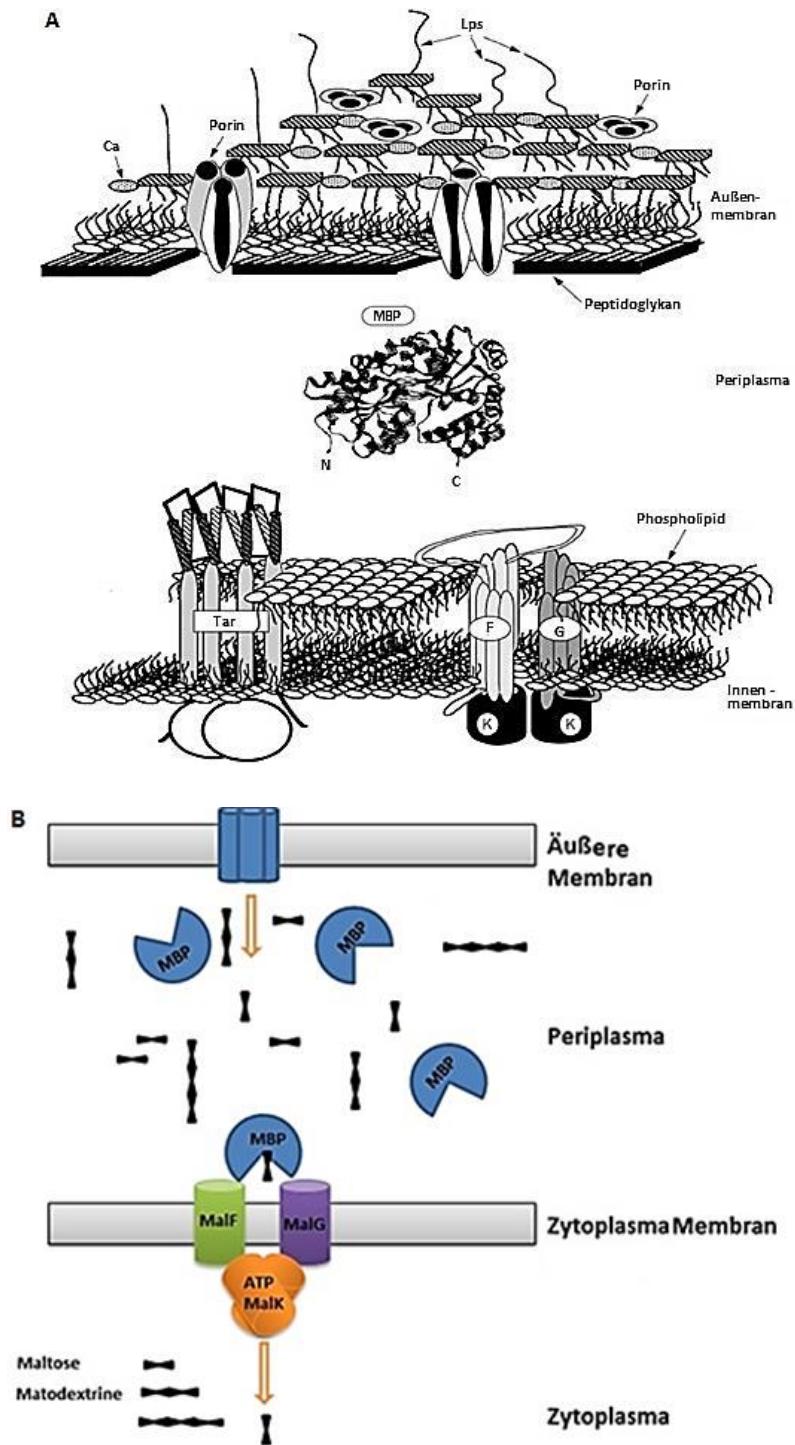


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Maltose/Maltodextrintransport- und Stoffwechselsystems aus *E. coli*. A) Die Komponenten des Maltosesystems sind schematisch dargestellt. Maltose und Maltodextrine gelangen über das Porin LamB ins Periplasma. MBP bindet das Substrat und gibt es an den Transportkomplex in der Innenmembran weiter. Dieser besteht aus den Membrankomponenten MalF, MalG und zwei Molekülen MalK. MalK ist nur Membranassoziiert und energetisiert den Transport durch ATP-Hydrolyse. (Die Abbildung wurde modifiziert nach Schwartz M. *et al.*, 1987). B) Das Transport-Modell für MBP. Die gebundene Form von MBP wechselwirkt mit dem Membrankomplexe MalFGK2 des ABC-Transporters. Diese Interaktion löst reversible Konformationsänderungen aus, gefolgt mit der Hydrolyse von ATP und der Translokation des Liganden über die innere Membran.

Freie Substratmoleküle durchqueren die äußere Membran und erreichen den periplasmatischen Raum, daraufhin werden sie fest an MBP gebunden, und damit einer Rückdiffusion nach außen entzogen. Die hohe Konzentration von MBP im periplasmatischen Raum (ca. 1 mM) sowie die Stabilität des Maltosekomplexes (Quioco F.A., 1990) begünstigen die Liganden-Retention durch MBP und verhindern infolgedessen die Zirkulation des freien Liganden im Periplasma (Spurlino J. C. *et al.*, 1991). Auf diese Art scheint die Lieferung von Substrat zum ABC-Transporter durch MBP gewährleistet zu sein. Die Translokation über die innere Membran hängt auch von den effektiven Wechselwirkungen zwischen dem Maltose-haltigen MBP und dem Membran-Komplex (MalFGK2) ab. Allein MBP in Gegenwart von Maltose ist in der Lage, die für den Transport notwendige ATP-Hydrolyse auszulösen (Ehrmann M. *et al.*, 1998, Krämer R., 1997). Es scheint auch, dass MBP in „geschlossener“ Konformation in der Lage ist, MalK zu aktivieren und gleichzeitig eine Kaskade von Ereignissen zu induzieren, die zur Freisetzung und Übertragung von Liganden über die innere Membran dienen (Abb. 1.6B). Dabei zeigten van Veen und Koninhs in einer Studie, dass eine MBP-Mutante mit zwei eingeführten Cysteinresten in beiden Domänen (N- und C-Lobe) des Proteins nicht nur zu einer negativen Ausprägung auf das Maltose-Wachstum führt sondern auch den Maltose-transport und die Chemotaxis beeinträchtigt (van Veen H.W. & Koninhs W.N., 1997). Dies stärkt die Hypothese, dass beide Formen des MBP (offene und geschlossene) mit den Membran-Transporter-Elementen interagieren.

1.4.4 Verwendung von dem Maltose-Bindungsproteins

Periplasmatisches MBP wurde auch als Hilfsmittel zum Export von fusionierten Proteinmutanten und zur Identifizierung von Genen in der Protein-Sekretion (Bsp. die Sec-Gene) (Topping und Randall, 1994) genutzt. MBP ist weit verbreitet als Vektor-Protein in der Molekularbiologie (New England BioLabs Inc.). Das Protein wird verwendet, um die Löslichkeit rekombinanter Proteine in *E. coli* zu erhöhen. In diesem Zusammenhang wird das Protein oft als MBP-Fusionsprotein exprimiert, um die Aggregation des Ziel-Proteins zu verhindern (ähnlich einem molekularen Chaperon). Der Löslichkeitserhöhungs-Mechanismus von MBP ist bis jetzt nicht gut verstanden.

Darüber hinaus kann MBP als Affinitäts-Tag zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen verwendet werden. Das Fusionsprotein bindet Amylose (Amylose Säule), während alle anderen Proteine ausgewaschen werden können. Das MBP-Fusionsprotein kann von der Säule mit Maltose eluiert werden. Nachdem das Fusionsprotein in gereinigter Form erhalten wurde, wird das Protein häufig von MBP mit einer spezifischen Protease abgespalten. Das Protein kann schließlich von MBP durch Ionenaustausch-Chromatographie abgetrennt werden.

1.5 ESR-Spektroskopie

Die Elektronen Spin Resonanz (ESR) (oder auch electron paramagnetic resonance) Spektroskopie dient der Quantifizierung und der Strukturaufklärung paramagnetischer Substanzen. Es handelt sich dabei um die resonante Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch eine paramagnetische Probe in einem Magnetfeld. Schon 1896 entdeckte Pieter Zeeman durch Anlegen eines Magnetfelds in optischen Spektren eine Aufspaltung von Linien (Zeeman P., 1896). Während sich dieser normale Zeeman-Effekt später mit dem Bahndrehmoment der Elektronen erklären ließ, beobachtete man bald auch anomale Zeeman-Effekte mit komplizierteren Aufspaltungsmustern. Stern und Gerlach zeigten 1920 dann in einem grundlegenden Experiment der frühen Quantenmechanik, dass das magnetische Moment des Elektrons im Magnetfeld nur diskrete Orientierungen einnehmen kann (Stern O., 1921). Dieses Experiment und der anomale Zeeman-Effekt wurden von Goudsmit und Uhlenbeck 1925 dahingehend interpretiert, dass eine bis dahin unbekannte Quantenzahl des Elektrons, die Spinquantenzahl existieren müsse (Goudsmit S., 1925). Diese bezeichnet den "Eigendrehimpuls" des Elektrons, den sogenannten Spin (Primas H. *et al.*, 1990).

1.5.1 Der Elektronenspin

Die Absorption von Mikrowellenstrahlung durch paramagnetische Substanzen im Magnetfeld beruht auf der Anregung von Übergängen zwischen verschiedenen Energieniveaus der Elektronenspins. Aus der Summe des Eigendrehimpulses (Spin) S und des Bahndrehimpulses L eines Elektrons ergibt sich sein Gesamtdrehimpuls J . Dieser erzeugt zusammen mit der Ladung ein magnetisches Moment

$$\vec{\mu} = g \cdot \beta \cdot \vec{J} \quad . \quad (1.5.1)$$

Wobei g der Landé-Faktor ist.

Und β das Bohr'sche Magneton $\beta = \frac{\hbar e}{2m_e}$ ist.

Wird ein Elektron in einem statischen Magnetfeld B_0 platziert, so orientiert sich das magnetische Moment in einer Weise, dass die Z-Komponente (definiert durch die Richtung von B_0) folgende Werte annehmen kann:

$$\mu_z = m_s \cdot g \cdot \beta \quad . \quad (1.5.2)$$

Die magnetische Spinquantenzahl der beiden Zustände ($m = \pm 1/2$) werden in der Quantenmechanik durch die Spin Funktion mit α ($m_s = 1/2$) und β ($m_s = -1/2$) beschrieben. Die Energie eines freien Elektronenspins im magnetischen Feld B_z kann durch

$$E = -\mu_z \cdot B_z = g \cdot \beta \cdot m_s \cdot B_z \tag{1.5.3}$$

beschrieben werden. Man erhält für die Energiedifferenz zwischen α - und β -Zustand des Elektrons:

$$\Delta E = h \cdot \nu_L = g \cdot \beta \cdot \vec{B}_0 \tag{1.5.4}$$

Wobei ν_L die Resonanzfrequenz ist.

Diese mit ansteigendem Magnetfeld zunehmende Aufspaltung wird nach seinem Entdecker als *Zeeman-Effekt* bezeichnet (Abb. 1.7).

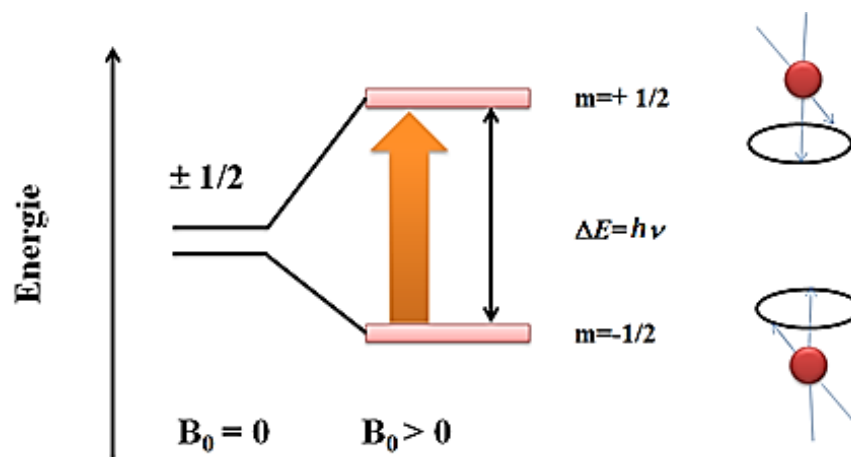


Abbildung 1.7: Energieniveauschema der beiden Spinzustände (parallel und antiparallel) eines Elektrons in einem äußeren Magnetfeld.

1.5.2 Resonanz

In einem externen Magnetfeld B_0 bezeichnet der Begriff Larmorfrequenz $\omega_L = 2\pi\nu_L$ eines Elektrons die Präzession des Drehimpulses um die z-Achse, sobald die Magnetisierung der Spins in der Gleichgewichtslage von der magnetischen Komponente B_1 der Mikrowelle gestört wird. Diese Störung hängt von der Stärke des Magnetfeldes B_0 und dem gyromagnetische Verhältnis γ ab:

$$\omega_L = \gamma \cdot \vec{B}_0 \tag{1.5.5}$$

Eine elektromagnetische Welle besteht aus einer magnetischen und einer elektrischen Komponente. Die magnetische Komponente lässt sich im EPR-Experiment als zweites magnetisches Feld mit der Flussdichte $B_1 \perp B_0$ beschreiben, die im Resonanzfall mit ν_L und B_Z präzediert. Die Überlagerung der Präzessionsbewegung führt zu einer Spiralbahn des magnetischen Momentes μ zwischen den durch die Spinquantenzahlen festgelegten Richtungen. Eine geeignete zirkular polarisierte elektro-

magnetische Welle induziert durch Absorption das eben genannte Rotationsverhalten und Resonanz liegt vor.

1.5.3 Relaxation

In einer paramagnetischen Probe wechselwirken die atomaren magnetischen Momente nicht nur mit dem äußeren magnetischen Feld, welches die Magnetisierung der Probe hervorruft, sondern auch intern (z. B. Spin-Bahn- und Spin-Spin-Wechselwirkungen). Das führt dazu, dass sich die Magnetisierung in einem äußeren Feld in z-Richtung einstellt.

Die magnetische Komponente der eingestrahlten Mikrowelle bewirkt ein longitudinales Invertieren der Spins. Diesem Prozess steht die longitudinale Relaxation mit der Relaxationszeit T_1 entgegen, welche die Spins wieder in ihren Gleichgewichtszustand bringt. Die Quermagnetisierung verschwindet mit der Phasenkohärenz der Spins, ein Vorgang der hauptsächlich durch Spin-Spin-Relaxation mit der Relaxationszeit T_2 (Wertz J.E. & Bolton J.R., 1986) beschrieben wird.

1.5.4 Spinlabeling

Voraussetzung für die ESR-Untersuchungen von Proteinen ist das Vorhandensein von mindestens einem ungepaarten Elektron im Molekül. Nur wenige Proteine besitzen paramagnetische Elemente. Diese Eigenschaft kann entweder natürlichen Ursprungs sein oder künstlich eingefügt werden. Erst mit der Einführung von Spinsonden oder Spinlabels erhält man eine Auflösung der Struktur auf Ebene des Proteingerüsts und der Orientierung von Seitenketten (Hubbel W., 1994, Review). Thiol-spezifische Spinlabel (Berliner L. 1982), wie z. B. MTS-SL, werden an Cystein-Seitenketten gebunden. (Abb. 1.8)

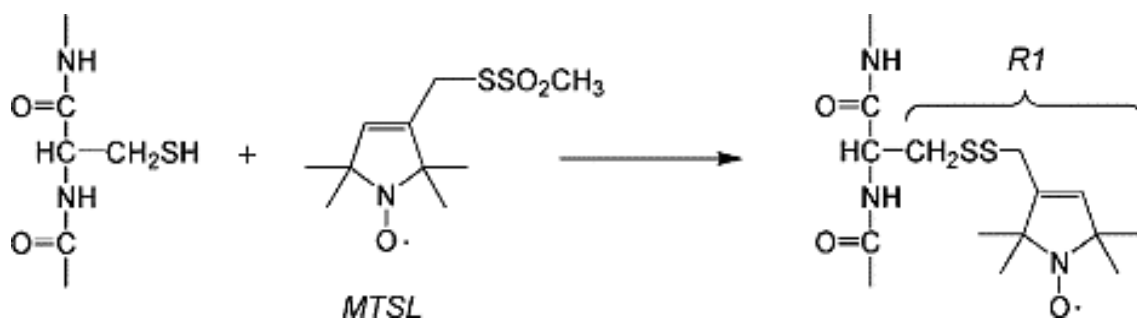


Abbildung 1.8: Reaktion des Spinlabels MTSL (1-Oxyl-2,2,5,5,-tetramethylpyrrolin-3-methyl)-Methanthio-sulfonat mit einer Cystein-Seitenkette. Die resultierende Aminosäure wird im Folgenden auch mit R1 bezeichnet.

Weiterhin wird durch Anwendung von ortsspezifischer Mutagenese das Einfügen von Cysteinen an jeder beliebigen Position und somit das Abtasten ganzer Strukturelemente ermöglicht (Altenbach C.,

1990, Voss J., 1996). In der Praxis erfährt diese Methode zwei wesentliche Einschränkungen. Zum einen existieren Aminosäuren, die für den Aufbau der nativen Struktur oder die unbeeinträchtigte Funktion unverzichtbar sind. Mutation und Spinmarkierung an diesen Positionen führt daher zu keinem verwertbaren Ergebnis. Des Weiteren sind native Proteine mit zahlreichen freien und gut zugänglichen Cysteinen ungeeignet, sofern sich diese Residuen nicht durch Mutation ersetzen lassen, ohne das Protein zu schädigen.

1.5.5 Kontinuierliche Mikrowelleneinstrahlung (*cw*) und gepulste ESR

Man unterscheidet bei ESR-Experimenten prinzipiell zwischen zwei Anwendungsmethoden, zum einen dem *cw*-Betrieb (*continuous wave*) und zum anderen den FT- (*Fourier transform*) oder Pulsbetrieb. Wir verwendeten für unsere ESR-Untersuchungen ein BRUKER Elexsys 580-Spektrometer (Abb. 1.10), welches im X-Band (Mikrowelle, $\nu \approx 9.5$ GHz) arbeitet. Mittels eines Hohlleiters werden die Mikrowellen von der Quelle fast verlustfrei zum Zirkulator weitergeleitet und von dort aus gelangt die Mikrowelle in den Resonator in welchem sich die Probe befindet. Als Resonator dient eine Reflektionskavität. Die Kavität ist ein Hohlraum, dessen Abmessungen in der Größenordnung der Wellenlänge des eingestrahlten Wechselfelds liegen, so dass sich dort bei geeigneter Geometrie und durch passende Ankopplung eine stehende Welle ausbildet. Dazu ist die Einstellung der exakten Frequenz notwendig. Als Detektor dient eine Mikrowellendiode.

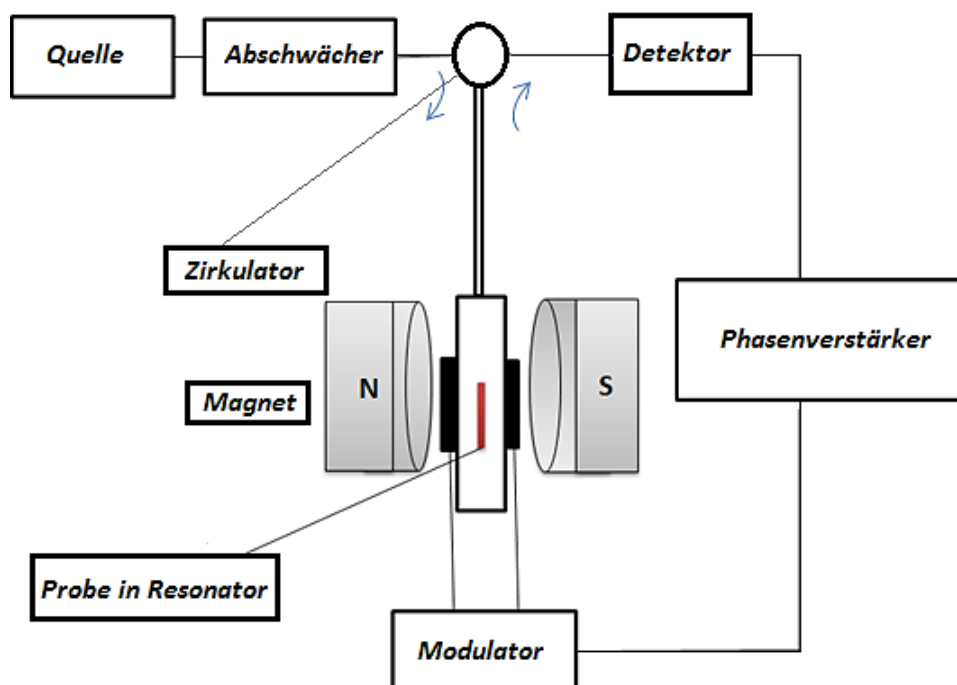


Abbildung 1.9: Schematische Aufbau eines *cw*-ESR Spektrometers.

Im *cw*-Betrieb, unter Veränderung des Magnetfelds, wird die Probe kontinuierlich mit elektromagnetischen Wellen konstanter Frequenz bestrahlt. Im Gegensatz dazu werden bei der Puls Methode

definierte Mikrowellenpulse bei konstantem Magnetfeld generiert. Mit Hilfe von kurzen ($t > 4$ ns) Mikrowellenpulsen wird eine Emission von Mikrowellen angeregt, die als Funktion der Zeit detektiert wird. Aufgrund der hohen Zeitauflösung von 4 ns lassen sich auch schnelle chemische und physikalische Prozesse untersuchen.

1.5.6 Messung von Abständen mittels Puls-ESR

Die Basis für Abstandsbestimmungen mit Spinlabeln in Proteinen bildet die dipolare Wechselwirkung zwischen zwei paramagnetischen Zentren. Diese dipolare Wechselwirkung hat Auswirkungen auf die Energieniveaus des betrachteten Spinsystems und äußert sich in einer Beeinflussung der transversalen Relaxationszeit T_2 .

4-Puls-DEER, oder auch PELDOR (*pulsed electron double resonance*) genannt, ist eine Doppelfrequenz-Technik, welche zwei verschiedene Spinsysteme zur Resonanz anregt. Um das Echosignal in der Observerfrequenz (ν_{obs}) modulieren zu können, muss eine zweite Pumpfrequenz (ν_{pump}) eingespeist werden, so dass beide Bereiche des Elektronenspinechos (ESE), sowohl das Maximum, als auch die Schulter, angeregt werden können. Der Hauptmechanismus, der diesen Modulationseffekt hervorruft, ist die dipolare Wechselwirkung zwischen den Spins. Wenn zwei Spins weit genug voneinander entfernt sind, so dass die Austausch-Wechselwirkung an Geltung verliert, bleibt nur die dipolare Wechselwirkung übrig, welche einer r^{-3} -Abhängigkeit gehorcht. Bei Entfernungen von mehr als $\sim 1,5$ nm können mit der totzeitfreien 4-Puls-DEER-Methode Abstände zwischen ungepaarten Elektronen im Bereich von ca. 1,5 – 8,0 nm gemessen werden (Pannier M., 2000; Jeschke G., 2002). Die dipolare Kopplung hängt sowohl von der Entfernung als auch von dem Winkel des Spin-Spin-Vektors ab. In den meisten Fällen sind die Seitenketten gleichartig orientiert und die Wechselwirkung kann mit einem Pake-Pattern beschrieben werden (Abb. 1.11).

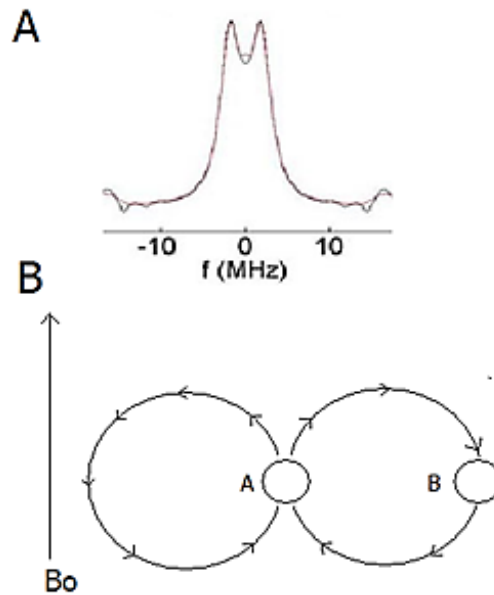


Abbildung 1.10: A) Pake-Pattern der dipolaren Kopplung zweier Spins. Obwohl die Spins zufällig orientiert sind, ist der wahrscheinlichste Winkel zwischen dem Vektor und dem äußeren Feld 90° . B) Der beobachtbare dipolare Beitrag aus dem Magnetfeld von Spin A wird durch den zweiten Spin B maximiert, wenn der Winkel zwischen dem Verbindungsvektor und dem äußeren Feld B_0 90° beträgt (Pake G., 1948).

Das Pake-Pattern ist eine Fourier-Transformation der DEER-Zeitspur und der spektrale Abstand der beiden Maxima stellt die doppelte Dipolkopplungsfrequenz dar. Sofern die dipolare Kopplungsfrequenz bekannt ist, kann der Abstand der beiden paramagnetischen Zentren berechnet werden. Wie noch erläutert werden wird, kann dieser Abstand nicht immer aus dem Pake-Pattern ermittelt werden, da kleine Verzerrungen in der gemessenen Zeitspur große Auswirkungen auf die Berechnung der Abstandsverteilung haben. Aus diesem Grund wird hierbei in der Regel die Tikhonov-Regularisation. (Jeschke G. *et al.*, 2006) angewandt, um die errechnete Lösung zu stabilisieren.

Die DEER-Zeitspur ist wie oben schon erwähnt eine Modulation der Amplitude eines Elektronenspinechos, welches zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch den Pumpimpuls gestört wird (Abb. 1.12). Die zeitliche Aneinanderreihung der verschiedenen Pumpimpulspositionen ergibt die DEER-Zeitspur, welche sich über den Zeitraum der dipolaren Evolutionszeit erstreckt. Die resultierenden Oszillationen in der Zeitspur sind direkt auf die dipolare Wechselwirkungsfrequenz ω_{dd} zurückzuführen. Da ω_{dd} umgekehrt proportional zu der dritten Potenz der Entfernung ist, ergeben größere Distanzen niedrige Schwingungsfrequenzen, die dann aufgrund der technischen Gegebenheiten nicht mehr detektiert werden können. Aus diesem Grund ist der Bereich der zugänglichen Distanzen des DEER-Experimentes begrenzt. Das DEER-Zeitsignal ist eine Überlagerung aus einem exponentiell abfallenden Hintergrund, der durch intermolekulare Wechselwirkungen der Spins hervorgerufen wird, und den periodischen Schwingungen aufgrund der intramolekularen Wechselwirkungen von gepaarten Spins. Dafür die Abstandsbestimmung nur der

intramolekulare Beitrag von Interesse ist, kann der exponentielle Hintergrund mit verschiedenen Modellen zu einer exponentiellen Kurve extrapoliert und von der Zeitspur subtrahiert werden. Übrig bleibt die hintergrundkorrigierte dipolare Oszillation, welche der Abstandsbestimmung dient.

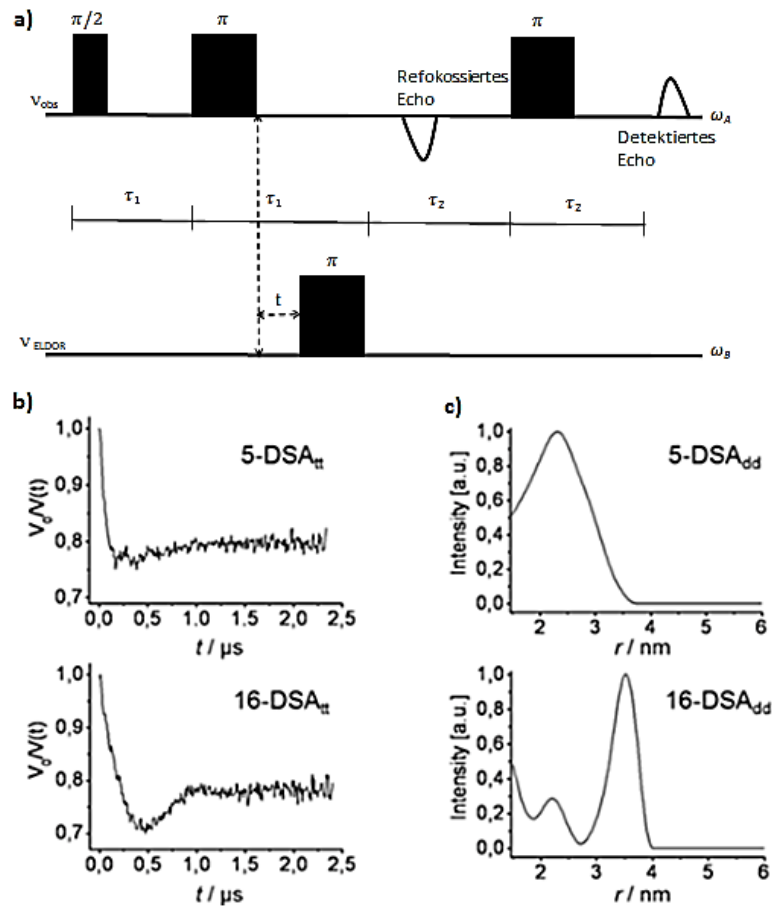


Abbildung 1.11: a) 4-Puls-DEER-Sequenz. Das Pumpen der B-Spins stört die Evolution des Spinsystems der A-Spins und abhängig von der Position des Pumpimpulses wird die daraus resultierende Echo-Intensität unterschiedlich moduliert. b) Dipolare Evolutionsfunktionen der DEER Messung von 5-Doxylstearinsäure (DSA) und -16- Doxylstearinsäure und c) zugehöriges DEER-Zeitdomänensignal (Junk M. *et. al* 2010).

Während des 4-Puls-DEER-Experimentes (Pannier M. *et.al* 2000) (Abb. 1.12a) wird zunächst eine Echosequenz in der Observerfrequenz gestartet. Nachdem der Pumpimpuls gestartet wurde, wird wiederum in der Observerfrequenz ein refokussierender Puls gesetzt, der ein refokussiertes Echo ausbildet. Man umgeht mit dem refokussierenden Puls also die Totzeit nach dem zweiten Puls.

Die Sequenz lautet:

$$\pi/2 (v_{\text{obs}}) - \tau_1 - \pi (v_{\text{obs}}) - t - \pi (v_{\text{ELDOR}}) - (\tau_1 + \tau_2 - t) - \pi (v_{\text{obs}}) - \tau_2 - \text{Echo}.$$

Hier sind die Anregungsfenster von Observer- und Pump-Pulsen nicht überlappend, und die Observer-Pulse bzw. die Pump-Pulse sollen ausschließlich jeweils die A-Spins und die B-Spins anregen. Wenn zum Zeitpunkt t der Pump-Puls die B-Spins invertiert, verändert er das lokale Feld der A-Spins. Infolgedessen ändert sich die Präzessionsfrequenz der A-Spins zum Zeitpunkt t um die Elektron-Elektron Kopplung ω_{DD} . Zum Zeitpunkt der Echobildung ist also die Magnetisierung um den Winkel $\Delta\varphi = \omega_{DD}t$ aus der Phase getreten. Damit kann nun die Frequenz der Elektron-Elektron Kopplung ω_{dd} bestimmt werden, indem die Amplitude des Echos in Abhängigkeit der Zeit t aufgenommen wird. Die Oszillation in der resultierenden DEER-Zeitspur variiert nun kosinusförmig (Abb. 1.12b und Abb. 1.12c).

2 AUFGABENSTELLUNG

Das *malE* Gen codiert für die Pre-MBP Vorstufe (396 Aminosäureresten), die bei der Spaltung der sich in der NH₂-Terminal befindlichen Erkennungssequenz (26 Aminosäure-Rückstände) die Reife Maltose-Bindungsprotein (370 Aminosäure-Seitenketten) ergibt. Das Maltose-Bindungsprotein ist ein Teil des Maltose/Maltodextrin-Systems von *Escherichia coli*, verantwortlich für die Aufnahme und den effizienten Katabolismus von Maltodextrin. Die Maltose/Maltodextrin ist ein komplexes regulatorischen Transportsystem mit vielen Proteinen und Proteinkomplexen. MBP erhöht den Ertrag der Fusionspartner in vielen Fällen und ist oft in der Lage, die Löslichkeit der fusionierenden Polypeptide zu erhöhen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst aus sieben pMAL-Plasmide, welche freundlich vom Prof. R. Varadarajan an der Molecular Biophysics Unit des Indian Institute of Science in Bangalore bereitgestellt wurden, sieben MBP-Mutanten in ihrem gefalteten (nativen) Zustand exprimiert, durch Amylose Säule aufgereinigt und näher mit ESR-Spektroskopie untersucht werden, wobei die sieben Doppel-Cystein-Mutanten des Maltose-Bindungsproteins (MBP) mit jeweils einer Mutation im aktiven Zentrum bei 298 und dem zweiten Cystein über beide Domänen des Proteins verteilt erzeugt werden sollen. Diese Cysteine könnten mit dem Nitroxid-MTS mittels site-directed Spinlabeling (SDSL) chemisch modifiziert, die Entfernungen zwischen den radikalen Paaren durch 4-fach gepulste Elektron-Elektron-Resonanz (DEER)-Messungen bestimmt und ein Vergleich mit theoretischen Abstandsdaten, die mit MD-Simulationen ermittelt werden.

Geplant war der Einsatz von *cw*-ESR-Messungen bei Raumtemperatur zur Bestimmung der Mobilität und Umgebung des Spinlabels. *Cw*-ESR-Tiefemperatur-Messungen bei 150 K und 80 K zur Distanzbestimmung zwischen zwei Spinlabeln im Bereich von 0,8 - 2,0 nm (MBP5) und Puls-ESR Experimente bei 50 K für den Abstandsbereich von 2,0 – 8,0 nm zur Detektion zeitaufgelöster konformationeller Änderungen der MBP-Proteine sollten durchgeführt werden (Berlinerb L.J., Eaton S.S. & Eaton G., 2000).

In Abwesenheit von Denaturanzien bei neutralem pH-Wert ist das Protein im nativen Zustand, während es bei pH 3,3 einen *molten globule* bildet. Diese Struktur besitzt in CD-Spektren kein Signal im Bereich der Tertiärstruktur aber Sekundärstruktur, dem nativen Zustand ähnlich. Außerdem wollten wir den *molten globule* Zustand von MBP durch die ANS-Fluoreszenz –Messungen bestimmen, sowie die Bindungsfähigkeit von MBP mit Maltose im *molten globule* Zustand mittels ITC überprüfen. Circular dichroism-Messungen sollten zusätzlich verwendet werden, um den Intermediär-Zustand zu untersuchen, dadurch würde die Konformation von MBP untersucht werden (Lottspeich F., 1998).

Für die weitere Charakterisierung des *molten globule* Zustands wäre es zudem erforderlich, diesen zunächst mittels Denaturierungsexperimenten sowohl in UV-CD- als auch *Cw*-ESR-Spektren

aufzuspüren. Angesichts der pH-abhängigen Entfaltung von MBP ist eine zusätzliche Überprüfung der Stabilität von MTS unter diesen Bedingungen unerlässlich (J. Reichenwallner, 2011).

Mit den daraus erhaltenen Ergebnissen sollen in dieser Arbeit zuerst Referenzabstände von den Mutanten im gefalteten (nativen) Zustand bestimmt und mit theoretischen Abstandsdaten, aus MD-Simulationen verglichen werden. Schließlich soll die Abstände beider Zustände (nativer- und *molten globule* Zustand) miteinander verglichen werden.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Isolierung und Aufreinigung der MBP-Mutanten

Die mit den in 5.2.2 beschriebenen Methoden Transformation und Expression waren bei allen sieben MBP Mutanten erfolgreich. Von den gewachsenen Zellkolonien wurden Kleinkulturen herangezogen, es wurde parallel das Isolierungskit QIAprep Spin Miniprep Kit (50) verwendet um aus den Zellkulturen 50 μ l Plasmid-DNA-Lösung zu isolieren. Ebenfalls wurden es ausreichende Glycerinkulturen von jeder Mutante angelegt.

Die von Kleinkulturen angeimpften Großkulturen konnten dann ausreichend Lysat liefern. Die Aufreinigung des Proteins wurde dann mit der Amylose-Afinitätschromatographie durchgeführt (Abb. 3.1) und die Maltose konnte mittels der in 5.3.3 und 5.3.4 beschriebenen Methoden getrennt werden.

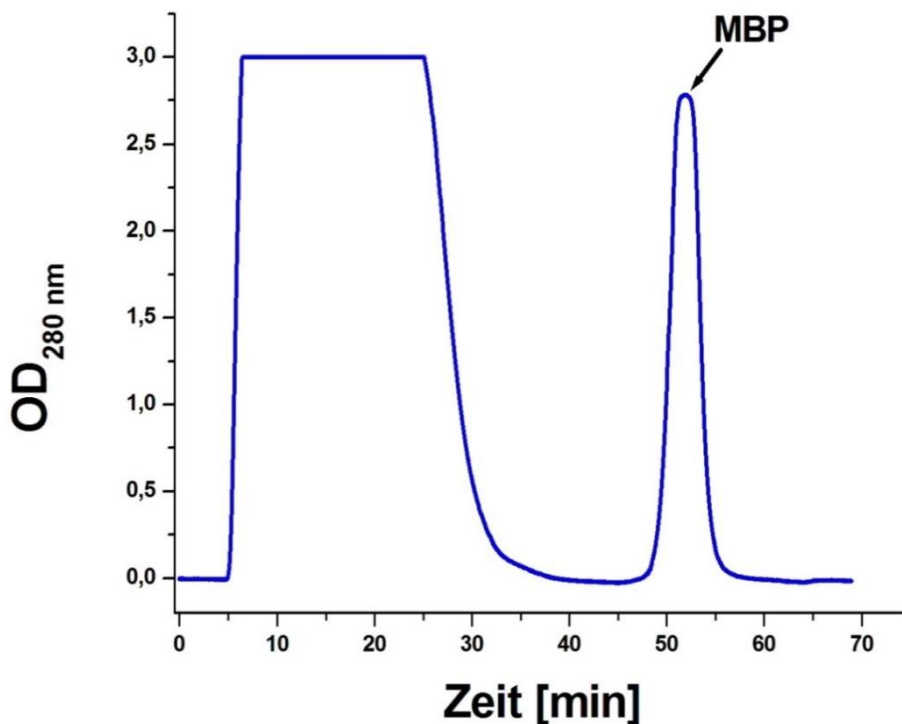


Abbildung 3.1: Chromatogramm der Amylosesäule der Mutante MBP4.

Es wurde zunächst um die Reinheit der Proteine zu ermitteln, ein SDS-Gel mit einem Probenpuffer zum Protein Verhältnis von 1:1 angefertigt (Abb. 3.2). Die Molekulargewichte Bestimmung (MW_{Gel}) erfolgte mit der Methode nach (Weber K. & Osborn M., 1969). Das theoretische Molekulargewicht

(MW_{theo}) ergab sich rechnerisch ausgehend vom nativen Molekulargewicht von 40,71 kDa (vgl. Kap. 5.1.6). Die Reinheit der Proteine wurde densitometrisch bestimmt (Tab. 3.1).

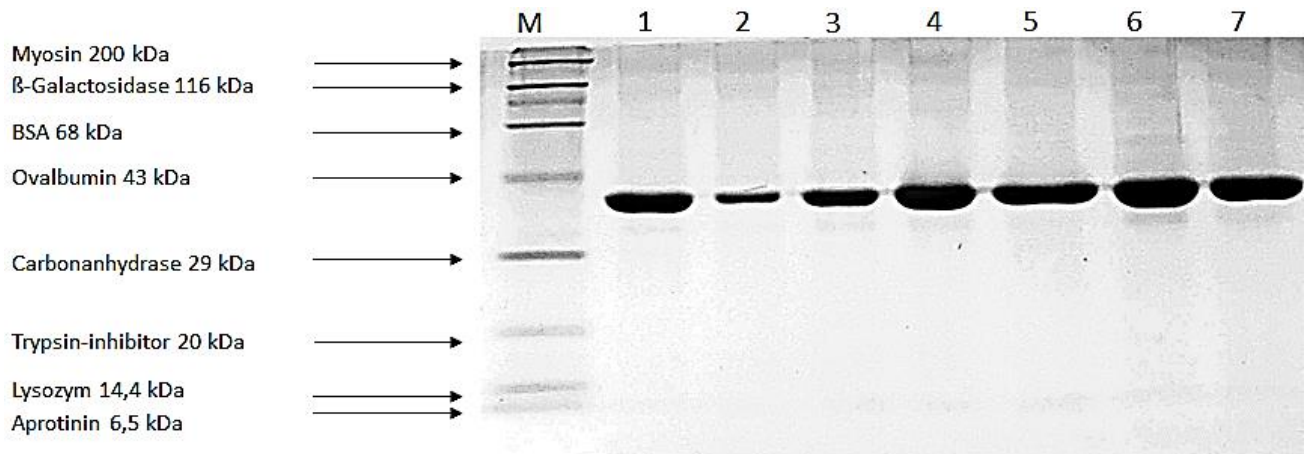


Abbildung 3.2: Das SDS-PAGE Gel nach der Expression aller sieben MBP Mutanten

Tabelle 3.1: Die Ermittelte Daten der Molekularmasse (MW_{Gel}) aus der R_f Werte (relativen Beweglichkeit), die theoretische Werte (MW_{theo}) und der anschließenden densitometrischen Auswertung aus Abb. 3.2.

Mutante	MW_{theo} [kDa]	MW_{Gel} [kDa]	Reinheit [%]
MBP1	40,72	$36,8 \pm 2,4$	99
MBP2	40,70	$37,5 \pm 1,2$	100
MBP3	40,70	$36,3 \pm 1,9$	100
MBP4	40,69	$36,1 \pm 3,2$	100
MBP5	40,69	$35,9 \pm 2,3$	99
MBP6	40,69	$35,4 \pm 3,5$	97
MBP7	40,73	$35,7 \pm 3,0$	97

Ausgegangen von den ermittelten Molekulargewichten erkennt man aus dieser Tabelle die Tatsache, dass die relativen Beweglichkeit der Gelbanden etwas kleiner sind als die theoretischen Werte. Das kann auf die Ungenauigkeit der Methode bezüglich der Massenauflösung im Gel zurückzuführen sein (Weber K. & Osborn M., 1969). Die Abweichungen in molekulare Masse des Gels resultieren sich aus der Ausbreitung der Gelbanden. Die isolierten und aufgereinigten Protein-Proben wurden in 1 ml Fraktionen aliquotiert, etikettiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Wiederverwendung im Gefrierschrank aufbewahren.

Zur Verifizierung der erfolgreichen Aufreinigung von MBP erfolgte die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation und die Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (MALDI-TOF-MS) (vgl. Abschnitt 5.6.1). Hier ist das Ergebnis von MBP3 als Beispiel in Abb. 3.3 zu sehen.

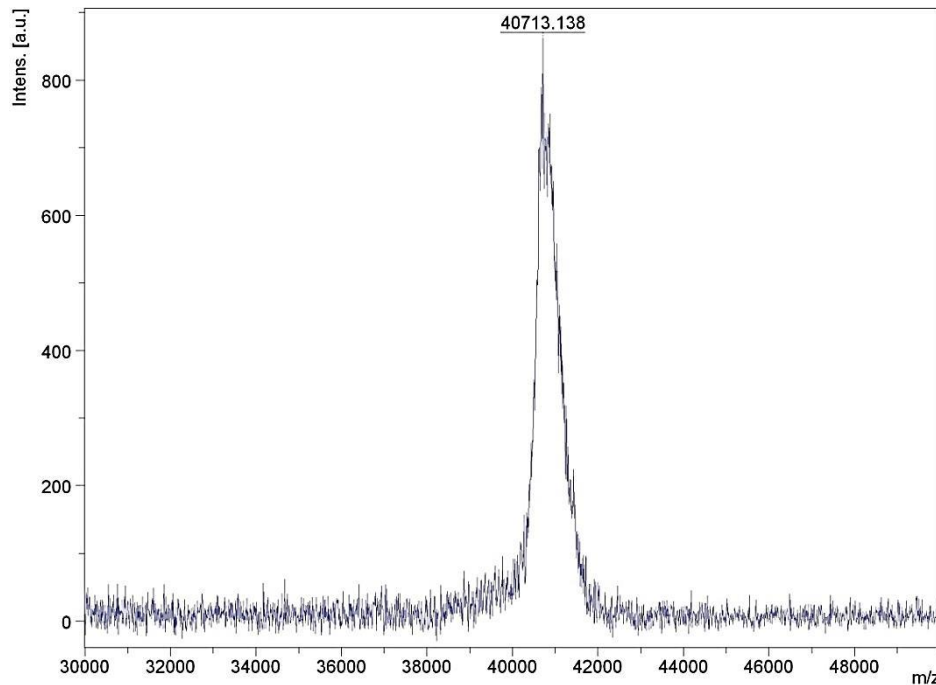


Abbildung 3.3: MALDI-TOF-Massenspektrum von MBP3 (Referenzmasse: BSA).

Durch Analyse der gemessenen Massenspektren stellte sich heraus, dass das Ergebnis exemplarisch für alle MBP-Mutanten ist (in Abb. 3.3). Zu erkennen ist ein Peak von 40,71 kDa. Die molekulare Masse stimmt mit der molekularen Masse von MBP mit 40,7 kDa überein (Duplay P. *et al.*, 1984).

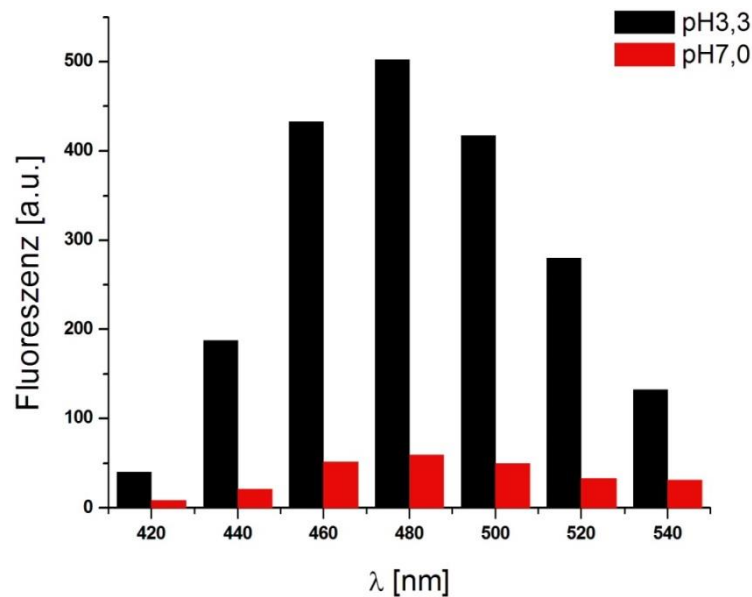
3.2 ANS-Bindung an MBP

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine sehr verbreitete Analysenmethode in der Biochemie. Durch Auswahl der Anregungs - und Emissionswellenlänge kann eine hohe Spezifität und damit eine große Sensitivität erreicht werden. Dank dieser Methode können auch (geringe) Änderungen des Fluorophors oder seiner Umgebung verfolgt werden, was z.B für die Untersuchung der strukturellen Eigenschaften von MBP in dieser Arbeit genutzt wurde (Ganesh C. *et al.*, 1997). Hier wurde Fluoreszenzmessung zur Bestimmung der *molten globule* -Struktur eingesetzt.

Die Bindung von ANS an lösungsmittlexponierte hydrophobe Bereiche des MBP ist mit einer sehr starken Erhöhung der ANS-Fluoreszenz verbunden (Abb. 3.4a) (Uversky V. N., Winter S., und Löber G., 1998). Der *molten globule* Zustand besitzt meist eine hohe Bindungsfähigkeit für ANS (Abb. 3.4b) (Kuwajima K. und Arai M., 2000), da die Fluoreszenz von ANS von der Polarität der Umgebung abhängt. In polarer Umgebung (wie bei nativen MBP zu sehen ist) wird die Fluoreszenz fast völlig

gequencht (d. h. gelöscht), während in unpolarer Umgebung ANS effizient fluoresziert. Weitere Absenken des pH auf der sauren entfaltetn Zustand ist durch ein Verlust der sekundärstruktur begleitet sowie eine Reduktion der Bindungsaffinität zu ANS. Da eine Abnahme des pH zur protonierung von negativ geladenen Resten des Proteins und einer daraus folgenden Erhöhung der gesamten positiven Ladung des Proteins. Dies hat eine erhöhte elektrostatische Abstossung auf der Oberfläche des Proteins. Folglich gibt es einen Verlust der tertiärstruktur und einige hydrophobe Reste, die früher im inneren ds Proteins verstärkt mit den Lösungsmittel als die mit nativem Zustand ausgesetzt waren (Prajapati, 2007).

a)



b)

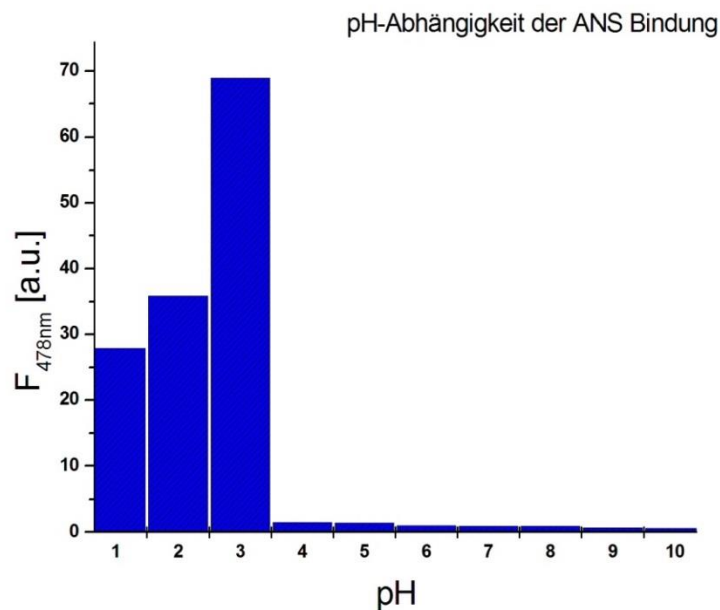


Abbildung 3.4: a) Fluoreszenz-Emissions-Spektrum des MBP3 / ANS-Komplex bei pH 3,3 (in schwarz) und bei pH 7,0 (in rot). Die ANS-Bindung wurde durch die Veränderung der Fluoreszenz bei 478 nm nach Anregung bei 380 nm beobachtet. b) pH-Abhängigkeit der ANS-Bindung an MBP3. Die Fluoreszenz durch freies ANS und freies MBP3 wurde aus der Mischung von ANS und MBP3 an jedem aufgezeichneten pH subtrahiert. Die Fit Kurve ist in rot zu sehen (Origin 6.0G).

Zur Charakterisierung des teilgefalteten MBP wurde eine Entfaltungskurve mit je 1 M GdnHCl und Harnstoff in Gegenwart von ANS gemessen (Abb. 3.5). Die Entfaltung konnte auch über die Zunahme der ANS-Fluoreszenz bei 480 nm detektiert werden. Dabei wies das teilentfaltete MBP im Gegensatz zum nativen Protein weitere hydrophobe exponierte Bereiche auf, die die bereits gebundenen ANS-Moleküle abschirmten. Es ergab sich, dass das Intermediat (*molten globule*) die höchste ANS-Bindung im Vergleich mit dem nativen und denaturierten Protein zeigt.

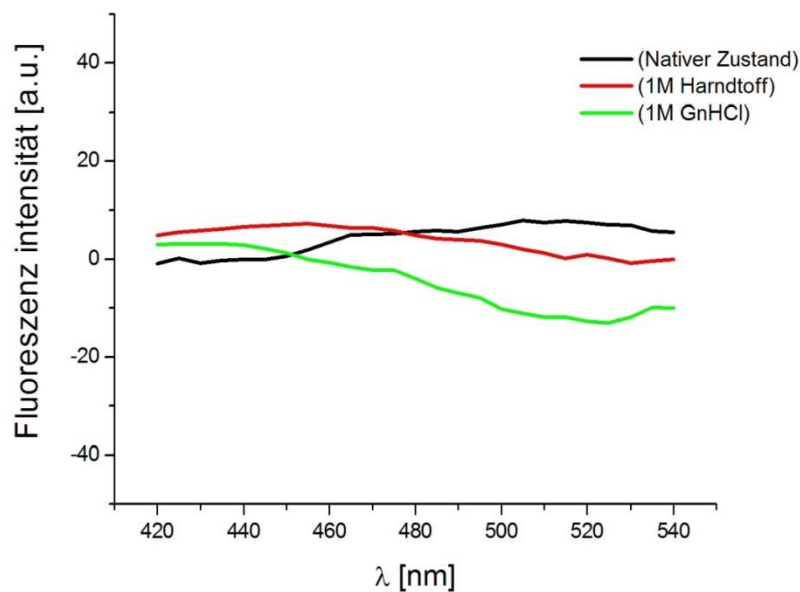


Abbildung 3.5: Fluoreszenzspektren von ANS mit MBP im nativen Zustand sowie mit 1 M Harnstoff bzw. mit 1 M GdnHCl entfaltet.

Ein weiteres Absenken des pH (unter pH 3,0) im sauren entfalteten Zustand ist von einem Verlust der Sekundärstruktur als auch einer Verringerung der ANS Bindungsaffinität begleitet (Sheshadri S., *et al.*, 1999). Die Affinität des sauren *molten globule* und des entfalteten Zustands für Maltose wurde durch eine fluorimetrische Titration bestimmt (Ganesh C. *et al.*, 1997). Dabei wurde festgestellt, dass

die *molten globule* Struktur eine mehr als 30 % niedrigere Bindungsaffinität zur Maltose aufweist (siehe Kapitel 3.4).

3.3 CD-Spektroskopie

Fern-UV-CD- (190-250 nm) Messungen dienen als guter Nachweis des Sekundärstruktur-Gehalts in Proteinen unter verschiedenen Bedingungen (Woody R.W., 1995), während im nahen UV-CD- (250 - 300 nm) Messungen zur Verfolgung der tertiären strukturellen Veränderungen vorgenommen werden. Die Fern- und Nah-UV-CD-Spektren von MBP wurden bei pH 7 und unter dem Einfluss der Denaturierungsmittel Harnstoff (8 M) bzw. GdnHCl (8 M), sowie bei pH 3 aufgenommen. Die Untersuchung der Konformationsänderung des nativen und *molten globule* Zustands wurde zusätzlich in Ab- u. Anwesenheit der Maltose durchgeführt.

3.3.1 Fern-UV-CD-Spektren der nativen und *molten globule* Struktur des MBP-Wt

Die Elliptizitäten von MBP im Fern-UV-CD-Bereich werden als Funktion der Wellenlänge bei gefaltetem nativen und teilentfaltetem *molten globule* Zustand aufgenommen. Die Fern-UV-CD-Spektren von MBP des *molten globule* Zustands unterscheiden sich im Bereich von 205 bis 260 nm nur geringfügig vom nativen Zustand (Abb. 3.6), was für eine sehr ähnliche Sekundärstruktur spricht.

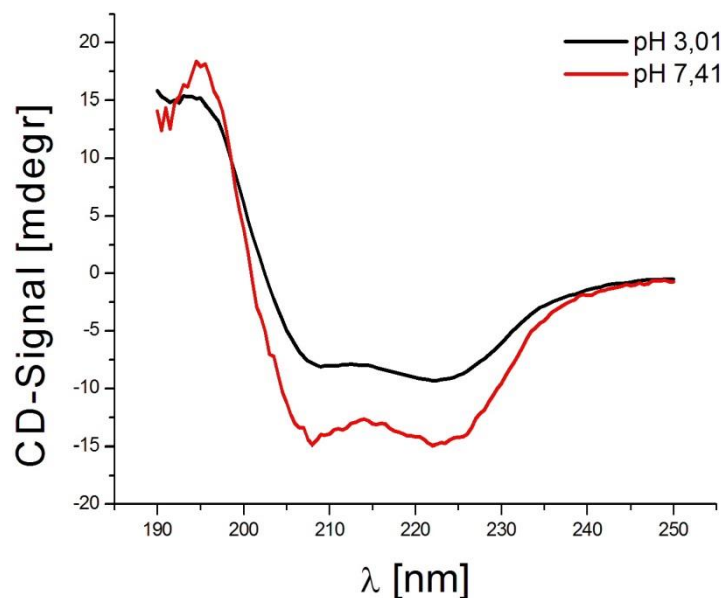


Abbildung 3.6: Fern-UV-CD-Spektren des MBP. MBP3 im *molten globule* Zustand (schwarz) in Vergleich mit dem nativen Zustand pH 7, 41 (rot). Die Aufnahme der Spektren erfolgte in CGH10 Puffer. Unterhalb von 205 nm sinkt die Elliptizität des teilentfalteten Zustands unterschiedlich stark ab.

Die Bande bei 190 nm entspricht den β -Faltblattstrukturen, die im Vergleich zu α -Helices zu niedrigeren Wellenlängen verschoben sind. Zudem ist das Signal von α -helikalen Bereichen konzentrationsbezogen wesentlich intensiver (Kelly, S. M. und Price N. C., 2000, Johnson, W. C., 1990). Die geringere Elliptizität bei Wellenlängen unterhalb von 205 nm und die vor allem beobachtete Verschiebung des Maximums zu längeren Wellenlängen könnte somit auf einen verringerten helikalen Anteil, verbunden mit einer Zunahme an β -Faltblattstrukturen, hinweisen. Diese Veränderungen des Sekundärstrukturgehalts werden häufig bei Proteinaggregation beobachtet (Clark, E. D. B., 1998). Aggregate führen außerdem zu Streulicht, welches die CD-Messungen stören kann (Kelly, S. M., und Price N. C., 2000). Da der Streulichtanteil mit abnehmender Wellenlänge exponentiell steigt, könnte gerade der betrachtete Wellenlängenbereich (unterhalb 205 nm) durch streulichtverursachende Aggregate verfälscht worden sein und daher ebenfalls zu der beobachteten Abnahme der Elliptizität führen.

Um die Eigenschaft des MBP als Wildtyp und durch doppelt cysteinmutiertes MBP besser zu verstehen, wurde die Veränderung der Sekundärstruktur dieser beiden Proteinvarianten untersucht (Abb. 3.7). Dabei wurden die Fern-UV-CD-Spektren von MBP-Wt mit und ohne Maltose bei pH 7,0 bzw. pH 3,0 gemessen (Abb. 3.7), sowie unter Denaturierungsbedingungen aufgenommen (Abb. 3.8).

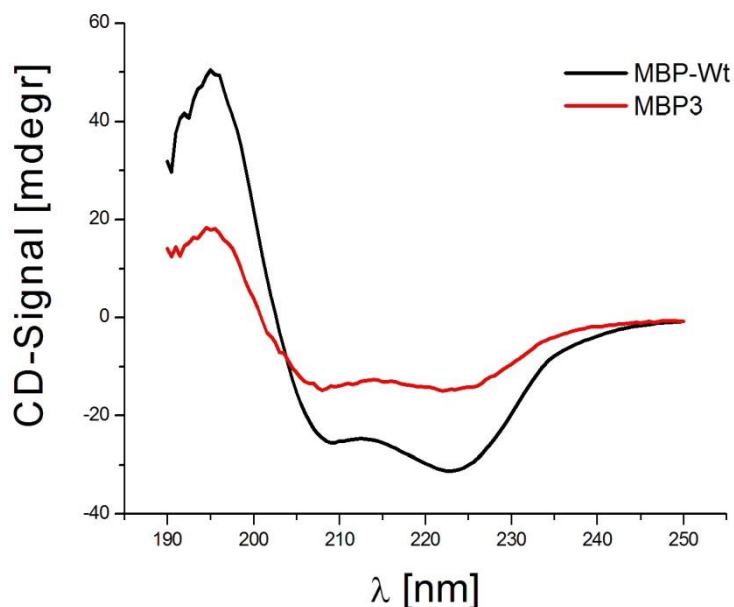


Abbildung 3.7: Fern-UV-CD-Spektren von MBP3 (rot) und MBP-Wt (schwarz) bei pH 7,4.

In den dargestellten Fern-UV-CD-Spektren des MBP3 und MBP-Wt bei pH 7,4 ist ein deutlich unterschiedlicher Verlauf erkennbar. Dies ist aufgrund der zusätzlichen Cysteinreste in MBP3

wahrscheinlich, da es sich bei den Mutanten um Proteine mit jeweils einer doppelten Cysteinmutation handelt. Prinzipiell kann es nicht ausgeschlossen werden, dass irgendwelche Mutationen (z.B. zwei nicht miteinander wechselwirkende Cysteine) die Stabilität des Proteins erhöhen. Allerdings liegt in solchen Fällen (also wenn sich die Intensitäten des CD-Signals stark unterscheiden) immer der Verdacht nahe, dass die Unterschiede eher auf Abweichungen in der Proteinkonzentration zurückzuführen sind. Wenn man genau die Spektren betrachtet, kann man sicher sagen, dass es ja nicht nur Unterschiede in der Intensität gibt, sondern auch in der Form der Spektren. Das spricht dann schon eher dafür, dass die Cys-Reste einen Einfluss auf die Konformation des Proteins haben und damit die Faltung des Proteins zu stören wie man an der Abnahme der Intensität der Mutante im Vergleich zum Wt sieht.

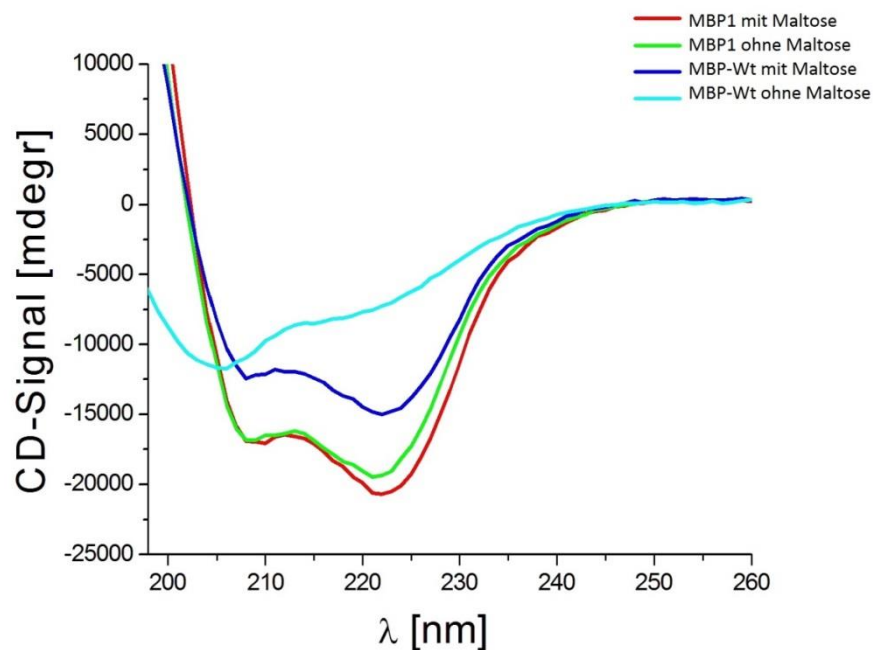


Abbildung 3.8: Fern-UV-CD-Spektren bei pH 3,0. MBP1 bzw. mit (rot) und ohne Maltose (grün) in Vergleich zu MBP-Wt mit (blau) und ohne Maltose (cyan).

Es ist zu erkennen, dass die MBP1-Spektren in Gegenwart und Abwesenheit von Maltose fast keinen Unterschied aufweisen, während im Vergleich die Elliptizitäten des MBP-Wt ohne Maltose eine schwächere Intensität zeigen als die mit Maltose. Dies beruht wohl auf einer erhöhten Stabilität des MBP im intermediären Zustand; auch trotz der niedrigen Affinität der Bindung des *molten globule* an Maltose (Sharff A. J. *et al.*, 1992).

Parallel zeigen die Fern-UV-CD-Spektren von MBP3 und MBP-Wt unter Einfluss der beiden Denaturierungsmittel (8 M GndHCl bzw. 10 M Harnstoff) im Vergleich zur Referenz keinen negativen Peak und weisen damit keine Sekundärstruktur auf (Abb. 3.9).

Bei pH 3 ist der negative Peak zwar noch zu erkennen, jedoch ist seine Signalstärke drastisch reduziert. Somit liegt das Protein unter diesen Bedingungen nur teilweise entfaltet vor.

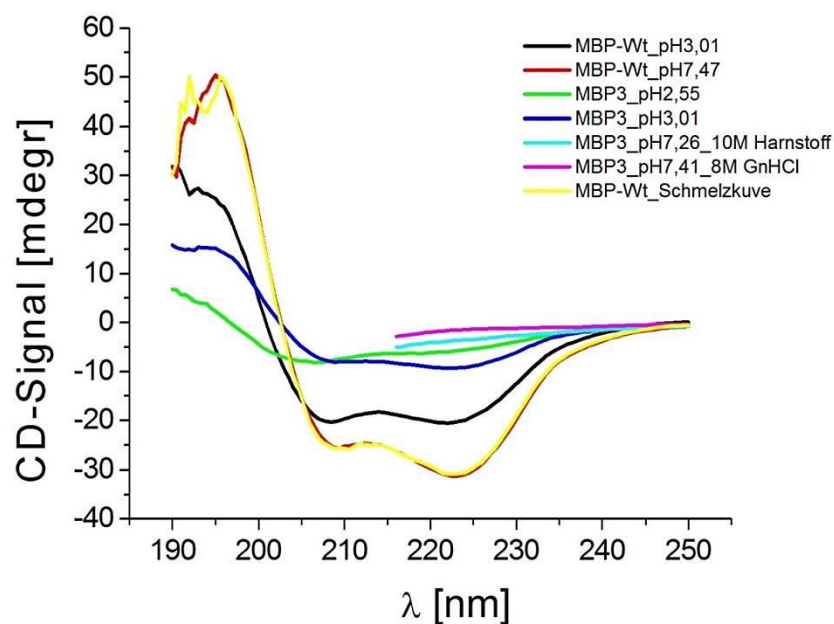


Abbildung 3.9: Fern-UV-CD-Spektren des MBP im nativen und *molten globule* Zustand und unter verschiedenen denaturierenden Bedingungen. MBP-Wt pH 3,01 (schwarz), MBP-Wt pH 7,47 (rot), MBP3 pH 2,55 (grün), MBP3 pH 3,01 (blau), MBP3 pH 7,26 in 10 M Harnstoff (cyan), MBP3 pH 7,41 in 8 M GndHCl (magenta) und MBP-Wt nach der Schmelzkuve (gelb). Die Aufnahme der Spektren erfolgte in CGH10-Puffer.

Wie Abbildung 3.9 zeigt, kann die Mutante MBP3 bei pH 7,47 unter Einfluss der beiden Denaturierungsmittel (10 M Harnstoff und 8 M GndHCl) ihre Sekundärstruktur nicht bewahren, während diese Struktur im sauren Milieu nur gering von der bei neutralem pH abweicht.

Beim Vergleich von MBP3 in den sauren pH-Bereichen (pH 2,55 und pH 3) lässt sich jedoch eine deutlich höhere Signalstärke des *molten globule* Zustands (pH 3) nachweisen, da der Anteil an Sekundärstruktur (α -Helices und β -Faltblattstrukturen) in diesem Zustand gut erhalten und das Protein somit nur partiell entfaltet ist. Bei der Säure-induzierten Entfaltung (pH-Wert 2,55) indes entstand ein teilentfaltetes und aggregationsanfälliges Intermediat.

Noch deutlicher ist zu erkennen, dass MBP-Wt nach Temperatur-induzierter Entfaltung, bei dem tiefsten negativen Signalmesspunkt Θ_{222} (T) und bei Erhitzung von 25 °C auf 85 °C mit einer Geschwindigkeit von 80 °C/h, immer reversible Rückfaltung zeigt und letztendlich die Elliptizität der Referenz ähnelt. Das bestätigt die Annahme, dass die Säure-entfaltete Form etwa 30 % der Signalintensität des nativen Zustands aufweist und die Reversibilität nach der pH-induzierten Entfaltung auf eine Rückfaltung bis etwa 88 % Effizienz geschätzt wurde (Ganesh C. *et al.*, 1997).

3.3.2 Nah-UV-CD-Spektren

Nah-UV-CD -Spektroskopie charakterisiert die tertiäre Strukturumgebung tertiäre Struktur-umgebung aromatische Reste. Vollständig entfaltete Polypeptide zeigen schwache Signale. Da die aromatischen Reste gut innerhalb des hydrophoben Kerns verpackt sind, ist ihr CD-Signal in der Regel besonders groß, wenn die Reste in dem gleichen Lösungsmittel exponiert sind. Somit bietet die nahe UV-CD-Spektroskopie ein empfindliches Maß für die tertiäre Struktur von Proteinen und ist für die qualitative Beurteilung der Verpackung der aromatischen Reste nützlich. Die Nah-UV-CD Spektren von MBP-Wt ohne Maltose sind in Abb. 3.10 dargestellt.

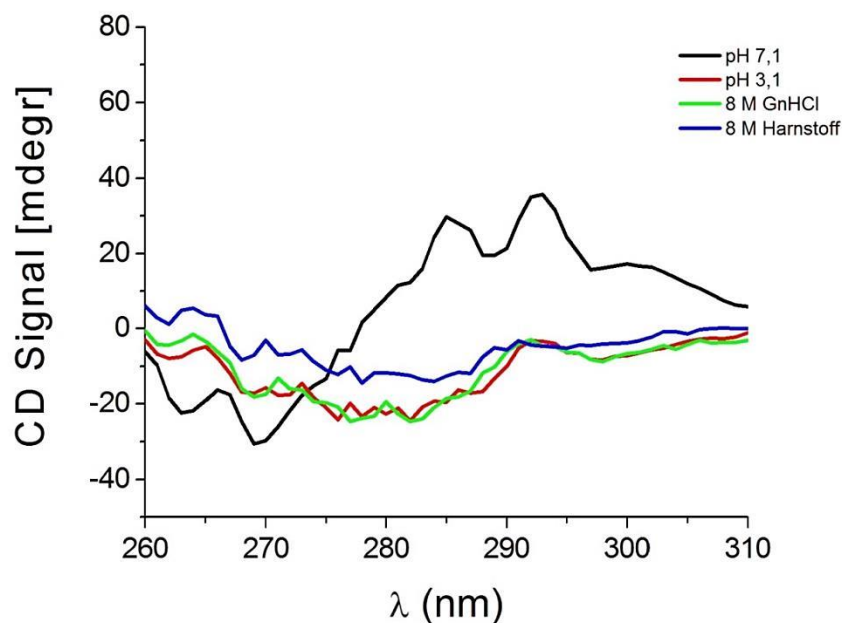


Abbildung 3.10: Die Nah-UV-CD-Spektren von MBP-Wt ohne Maltose jeweils bei pH 3,1, pH 7,1 und in jeweils (8 M) GdnHCl und Harnstoff.

Hier ist die Signalstärke des MBP-Wt ohne Substrat bei pH 3 und nach Behandlung mit einer Konzentration von jeweils 8 M GdnHCl und Harnstoff gleichmäßig stark reduziert. Das durch Denaturanzien vollständig entfaltete Protein löst die Sekundär- und Tertiärstruktur auf und somit ist auch nur eine schwache Intensität in den CD-Signalen feststellbar. Die Tertiärstruktur von MBP-Wt ist auch mit Ligand von der GdnHCl-induzierten Entfaltung betroffen, dies insbesondere aufgrund der unspezifischen Bindung von GdnHCl, welche zur Denaturierung von Proteinen führt (Aune, K. C., und Tanford C., 1969, Wu, J. W., und Wang Z. X., 1999).

Außerdem wurde zur Verifizierung des Stabilitätsaspekts der Maltose für die Tertiärstruktur bei MBP-Wt ein Vergleich der Mutante MBP2 in An- und Abwesenheit von Maltose bei pH 3 und 7 durchgeführt (Abb. 3.11).

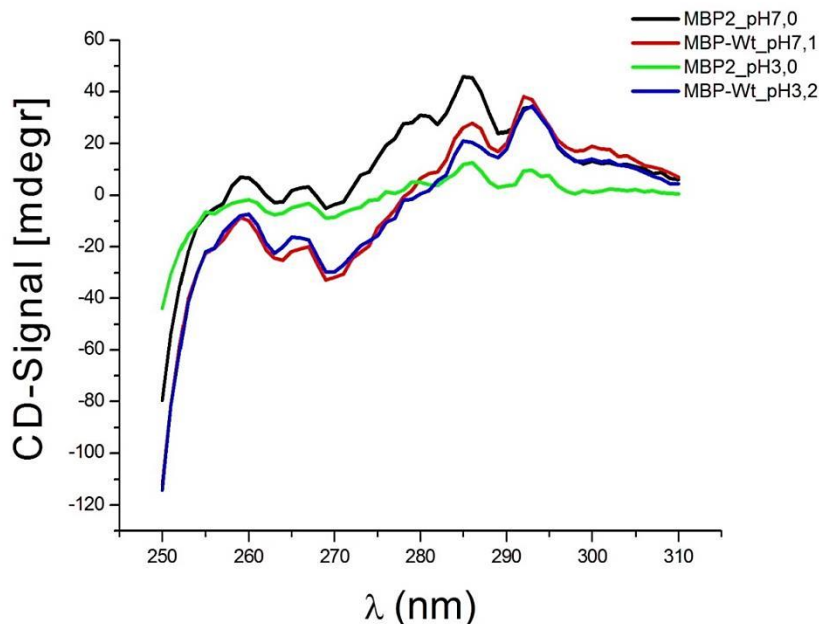


Abbildung 3.11: Vergleich der Nah-UV-CD-Spektren von MBP-Wt und ihrer Mutante MBP2 mit Maltose jeweils bei pH 3 und pH 7.

Die Untersuchung der in Abbildung 3.11 dargestellten Kurven ergab, dass MBP-Wt mit Maltose bei pH 3 ein ähnliches Spektrum wie im nativen Zustand aufweist. Also kann die Bindung von Maltose in MBP-Wt die Faltung zum nativen Zustand induzieren und damit als Faltungstreiber wirken, während die Wechselwirkungen der zwei Cysteinreste innerhalb der Mutante MBP2 diese stark stabilisiert.

Im Allgemeinen gilt der Komplex mit der Maltose als „Stabilisator“ bei saurem pH-Wert (pH 3), nicht nur für die gut erhaltene Sekundärstruktur wie in Abb. 3.9 angezeigt ist, sondern auch für die Tertiärstruktur des MBP (Abb. 3.11).

3.4 ITC-Messungen bei 5 °C

Zur Kontrolle der MBP-Bindungsfähigkeit an seinen Reaktionspartner Maltose wurde eine isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)-Messung durchgeführt. Mit einer kleinen Änderung gegenüber dem in der Literatur beschriebenen Experiment (Prajapati R. S. *et al.*, 2007) fanden diese Versuche bei 5 °C (anstatt 25 °C) (Jasco T. *et al.*, 2012) statt. Dabei wurden jeweils 40 µl Maltose- Lösung (10-fach höhere Konzentration als die Proteinlösung) in einer unterschiedlichen Anzahl von Injektionen zur Proteinlösung des MBP hinzugegeben (siehe Parameter in Kapitel 6.5). Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der Software NITPIC und SEDFIT (Keller S. *et al.*, 2012) bearbeitet. Als Referenz wurden Messungen bei pH 7,0 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.12 und Abb. 3.13 dargestellt.

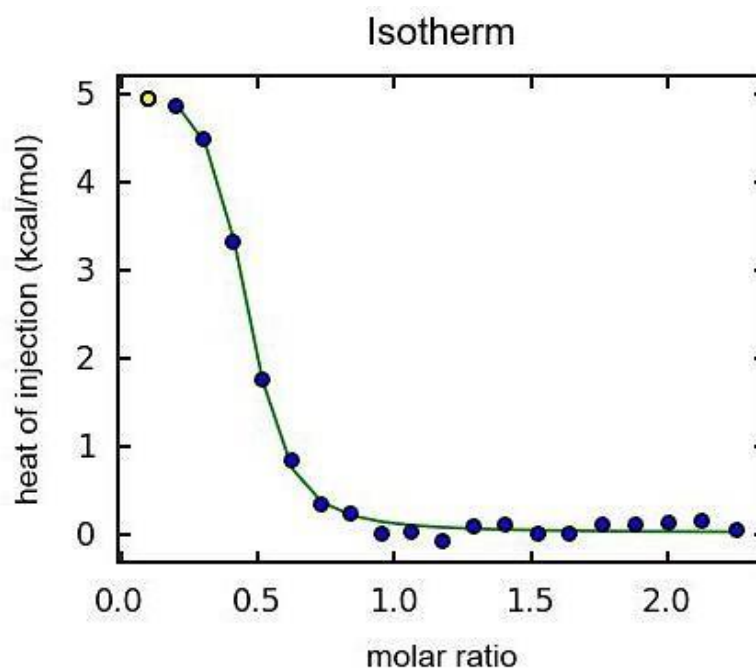


Abbildung 3.12: Die Titrationskurve des nativen Zustands von MBP, gemessen durch ITC. Datenelemente, ist mittels ausgefüllter Kreise dargestellt, die durchgezogene Linie zeigt die Fitkurve.

Es war exakt feststellbar, dass Maltose bei pH 7,0 an MBP-Wt bindet und dass sich diese Reaktion als endothermer Prozess darstellt. Die genauen thermodynamischen Parameter wurden mittels SEDFIT berechnet und sind in Tab. 3.2 erfasst.

Es ist darauf hinzuweisen, dass die Versuchsbedingungen (Messung bei 5 °C) eine Abnahme der Bindungsfähigkeit zur Folge hatten, somit nur 42 % des Proteins bindungsfähig sind und schließlich die gefundenen Ergebnisse eine Korrektur erfordern. Nach Verdünnungskorrektur und der Korrektur der Basisline, bei der leichte Abweichungen ausgeglichen wurden, konnten die Signale ausgewertet werden. Durch Integration über die Wärmesignale erhält man die entstandene Wärme pro Stoffmenge.

Tabelle 3.2: Die Auflistung der aus SEDFIT berechneten thermodynamischen Parameter und die zugehörige Korrektur für 20 Injektionen.

	SEDFIT	Korrektur
$\lg K_a$	6,36	6,00
K_a (μM)	0,43	1,02
ΔH (kcal/mol)	5,19	2,20

Dieser Versuch wurde mit einer Anzahl von 40 Injektionen wiederholt, die Ergebnisse sind in Abb. 3.13 dargestellt.

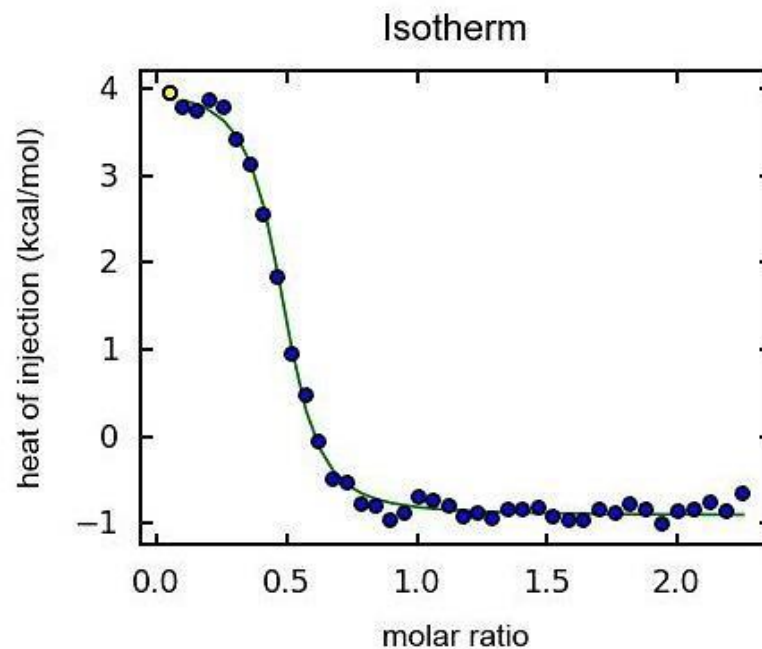


Abbildung 3.13: Fitkurve mittels NITPIC mit MBP bei pH 7 bei 40 Injektionen einer Maltose-Lösung.

Hier wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet, es sind aber nur 47 % des Proteins bindungsfähig. Die thermodynamischen Parameter und die zugehörige Korrektur sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Die Auflistung der aus SEDFIT berechneten thermodynamischen Parameter und die zugehörige Korrektur bei 40 Injektionen.

	SEDFIT	Korrektur
$\lg K_a$	6,42	6,10
K_a (μM)	0,38	0,80
ΔH (kcal/mol)	4,96	2,30

Nun wurden in der Tabelle 3.4 die aus den korrigierten Daten berechneten Mittelwerte mit den Literaturwerten verglichen.

Tabelle 3.4: Berechnete thermodynamische Parameter im Vergleich mit den Literaturwerten.

	Versuch mit 20 Injektionen	Versuch mit 40 Injektionen	Mittelwerte \pm Standardabweichung	Literaturwerte (Prajapati, 2007)
$\lg K_a$	6,00	6,10	$6,05 \pm 0,07$	$5,9 \pm 0,1^*$
K_a (μM)	1,00	0,80	$0,90 \pm 0,14$	$1,3 \pm 0,3$
ΔH (kcal/mol)	2,20	2,30	$2,25 \pm 0,07$	$2,3 \pm 0,1$

In Tabelle 3.4 ist zu sehen, dass die thermodynamischen Parameter, die sich als Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, mit den Literaturwerten vergleichbar sind.

Folglich wurden, um die Bindungsfähigkeit von MBP an Maltose im *molten globule* Zustand zu untersuchen, die pH-Werte der Proteinlösung und der Maltose-Lösung auf 3,3 eingestellt. Beim ersten Versuch war die Maltose-Konzentration 10-fach höher als die von MBP. Die Rohdaten und das mittels NITPIC dargestellte Thermogramm zeigt Abb. 3.14.

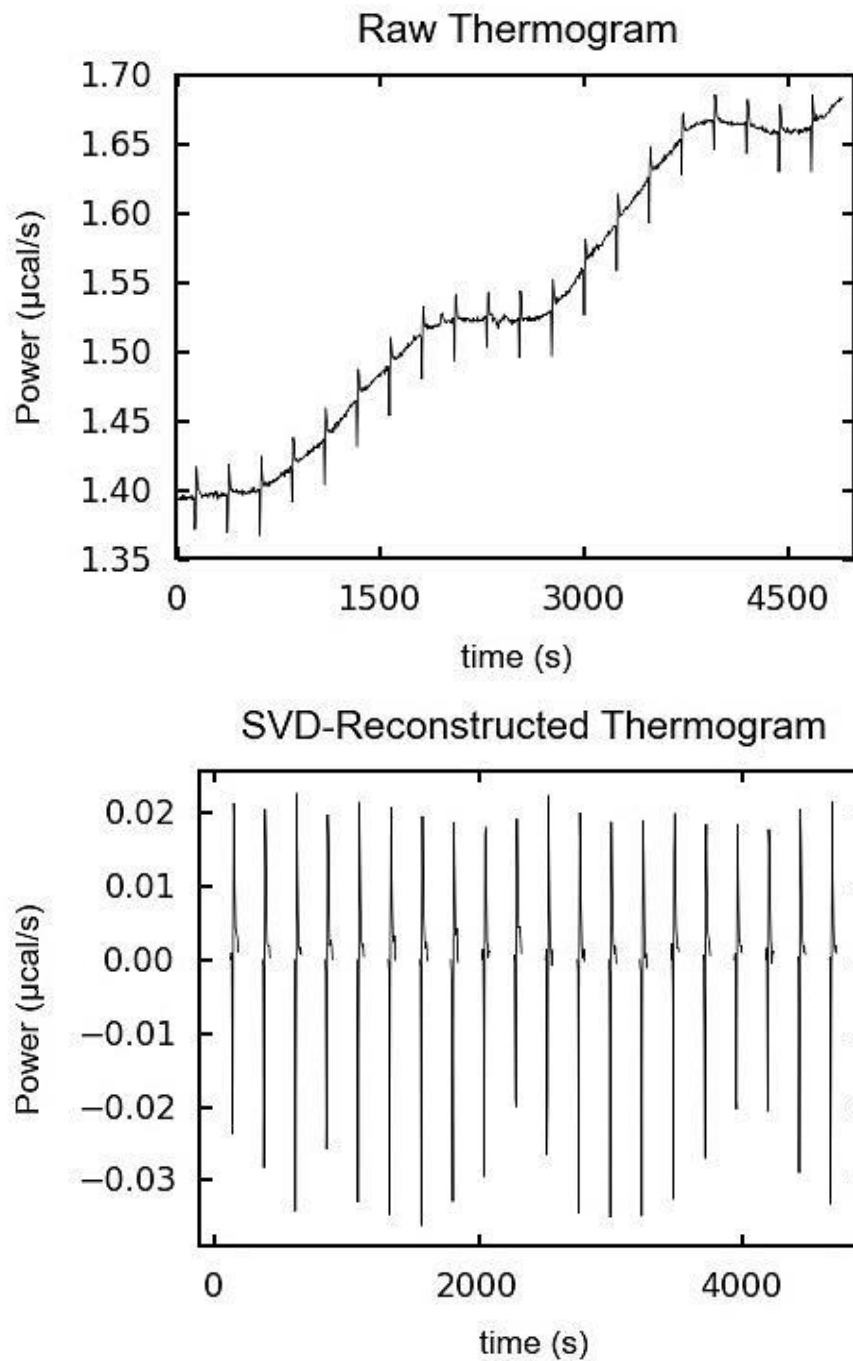


Abbildung 3.14: Rohdaten I (oben) und Thermogramm (durch NITPIC bearbeitet) (unten) bei pH 3,3 mit 20 Injektionen einer Maltose-Lösung.

Bei einem zweiten Versuch mit hoher Konzentration an Maltose (30-fach höher als die von MBP) wurde gleichzeitig eine höhere Konzentration von MBP verwendet, da die Bindung zwischen MBP und Maltose möglicherweise sehr schwach ist. Die Rohdaten und das mittels NITPIC dargestellte Thermogramm sind aus Abb. 3.15 zu ersehen.

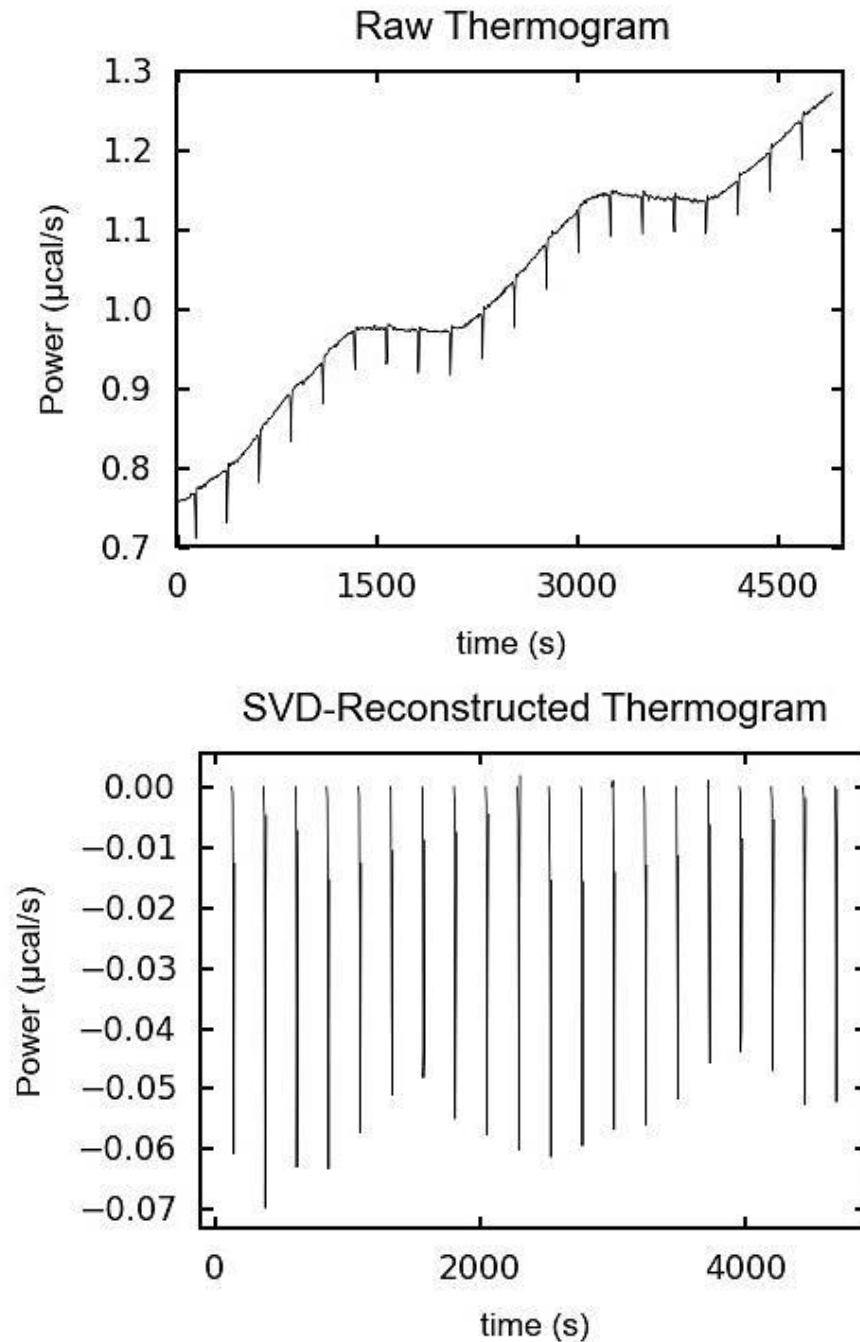


Abbildung 3.15: Rohdaten II (oben) und Thermogramm (durch NITPIC bearbeitet) (unten) bei pH 3,3 mit 20 Injektionen einer Maltose-Lösung.

In beiden Fällen konnte keine Bindungsenthalpie beobachtet werden. Es wurde Leider kaum Bindungsenthalpie beobachtet. Eine oder mehrere Gründe könnten die Ursache sein: das Protein trotz alle Mühe, die wir gemacht haben, um den restlichen Maltose zu entfernen, bleibt ein klein Menge an Maltose-Population an MBP gebunden, die die Titration störten. Auch nach Denaturierung mit 6M Harnstoff während der Dialyse könnte ein Teil des MBP aggregiert gegangen ist und damit nicht in der Lage wieder Maltose zu binden. Auch mithilfe von ESR Messungen könnte das nicht nachweisen,

da die Spektren fast ähnlich aussehen. Darüber hinaus die sinkende bzw. schlechte Bindungsfähigkeit von MBP im molten globule Zustand bei 5 °C kann zurück zuführen auf die Tatsache, dass das Protein im nativen Zustand bei diesen Bedingungen (5 °C) nur zu 42 % bzw. 47 % aktiv ist.

Aus den bestehenden Ergebnissen könnte man schließen, dass MBP in nativem Zustand eine sehr gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten (Prajapati R. S. *et al.*, 2007) aufweist, allerdings zeigen die ITC-Messungen beim *molten globule* Zustand keine Spuren von Bindung.

Außerdem bindet MBP als *molten globule* die Maltose mit niedrigerer Affinität als in seinem nativen Zustand und somit ist die Kohlenhydrat-Liganden-Bindungsaffinität des MBP in seinem *molten globule* Zustand bis 30-fach niedriger als die im nativen Zustand (Pajapati R. S. *et al.*, 2007). Dies kann insoweit möglich sein, weil die Bindung an Kohlenhydrate durch mehrere Wasserstoffbrücken vermittelt wird, die eine geordnete Bindungs-Tasche erfordern, während die Bindung an die Aminosäure durch eine weniger spezifische van-der-Waals-Wechselwirkung mit den Seitenketten vermittelt wird, obwohl die Amino und Carboxyl-Gruppen der Aminosäure an bestimmten Wasserstoffverbindungen mit dem Protein beteiligt sind (Magnusson, U. *et al.*, 2004, Trakhanov, S. *et al.*, 2005, Spurlino, J. C. *et al.*, 1991).

3.5 Ergebnisse der cw-ESR-Spektroskopie

3.5.1 Prüfung des *site-directed* Spinlabelings

Neben der Möglichkeit, die mit dem Spinlabeling verbundene Massenzunahme der Proteine mittels MALDI zu ermitteln (ca. 388,54 Dalton für ein MTS-Biradikal), kann man auch mit Hilfe von cw-ESR erkennen, ob diese chemische Modifizierung erfolgreich war. Das überschüssige ungebundene MTS sollte mittels PD-10-Säulen entfernt werden, damit seine scharfen Peaks in dem aufgenommenen Spektrum nicht stören. Die mittels MTS chemische Modifizierung wurde für die sieben MBP Mutanten nach dem in Kap. 5.4 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Danach in CGH10-Puffer bei einem pH 7,0 wurden die Proteins auf eine Endkonzentration von jeweils 6,0 mg/ml verdünnt und bei 295 K vermessen (siehe Anhang: Parameter B). Das Probenvolumen ergab sich zu 20 - 35 µl. Die Messungen wurden der Übersichtlichkeit halber in einer Gesamtdarstellung zusammengefasst, wobei die relativen Intensitäten auf den Wert 1 normiert sind. Der dazugehörige Normierungsfaktor ist im jeweiligen Spektrum rechts eingefügt (Abb. 3.16).

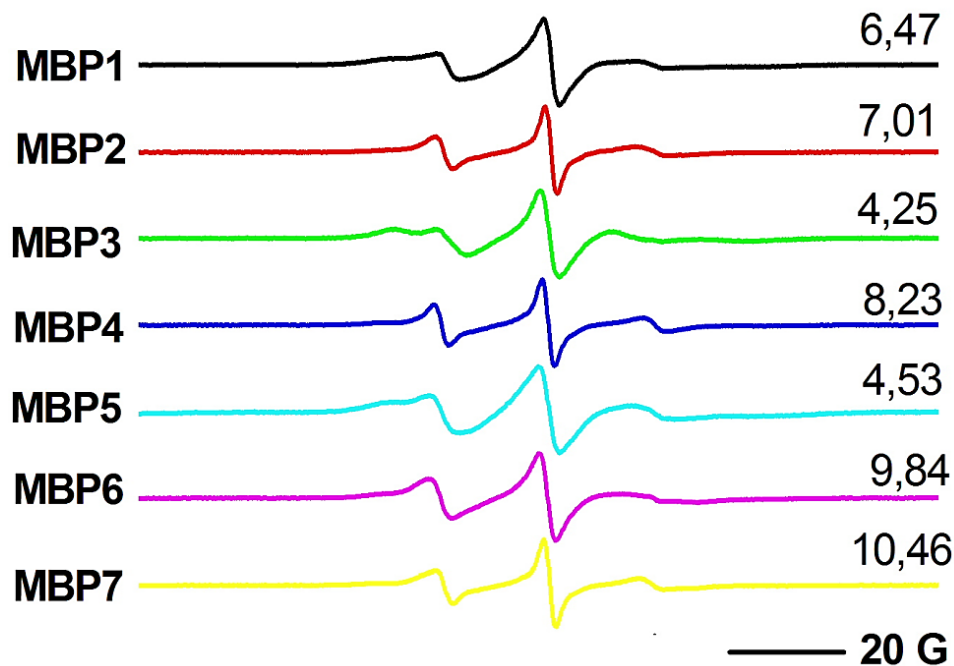


Abbildung 3.16: *cw*-ESR-Spektren (Basislinien-korrigiert) der sieben Biradikal-Mutanten MBP 1-7 bei 295 K (RT).

In dieser Abbildung erkennt man, dass die ESR-Spektren im langsamen Regime (Steinhoff H. J. & Hubbell W. L., 1996) befinden, d. h., die Rotationskorrelationszeit τ_c ist hier relativ groß und daher typisch für teil-immobilisierte Spinlabel, die an ein Makromolekül legiert sind. Somit betrachtet man die mit MTS chemische Modifizierung als erfolgreich.

3.5.2 pH-abhängige Denaturierung und Lokalisierung des *molten globule* Zustands

Molten globules werden durch ANS-Bindung detektiert (Sheshadri S. *et al.*, 1999). Die Information über diesen Zustand kann man ebenfalls mittels *cw*-ESR-Spektroskopie erhalten (Linge J. P., 1997; Berliner L. J., 1998; Berengian A. R. *et al.*, 1999). Abbildung 3.17 zeigt für die reproduzierbare Mutante MBP1 bei pH 3,3 einen deutlichen Knick an der Stelle, wo die Verhältnisse der Intensitäten von Hoch- bzw. Niederfeldmaxima zur Feldspitze im mittleren Bereich des *cw*-EPR-Spektrums aufgetragen wurden. Dabei stellte sich heraus, dass bei diesem pH Wert (pH 3,3) eine teilweise Rückfaltung der Proteine um 4 – 5 % stattfindet. Interessanterweise ist dies genau der Bereich, in dem sich auch das *molten globule* bildet (Sheshadri S. *et al.*, 1999).

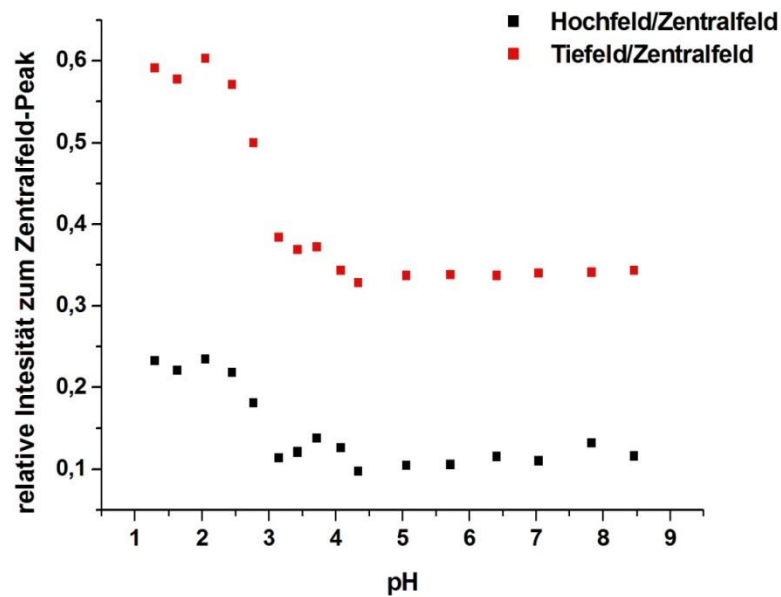


Abbildung 3.17: pH-abhängige Denaturierung von MBP1. Illustration des Rückgangs des Hochfeld- und Tieffeldpeaks in Abhängigkeit vom PH-Bereich (1,30 - 8,46). Es ist ein Knick bei einem pH von etwa 3,3 festzustellen.

3.5.3 *cw*-Messung bei Tieftemperatur (150 K) des MBP5 und ihre Simulation zur Abstandsbestimmung

Tieftemperatur-*cw*-ESR-Spektren können Dipolwechselwirkungen zwischen zwei Nitroxid-Einheiten anzeigen. Um kürzere Abstände (unter 20 Å) in Biradikalen abzuschätzen, eignet sich das Intensitätsverhältnis $d1 / d$ (wie in Abb. 3.18 dargestellt), dessen Werte, wenn sie über 0,40 liegen, wahrscheinlich auf derartigen Wechselwirkungen beruhen (Panse V.G. *et al.*, 2001). Eine Messung bei 150 K wurde durchgeführt (siehe Anhang: Parameter G). Das Resultat ist nachfolgend als roter Graph in Abb. 3.18 dargestellt.

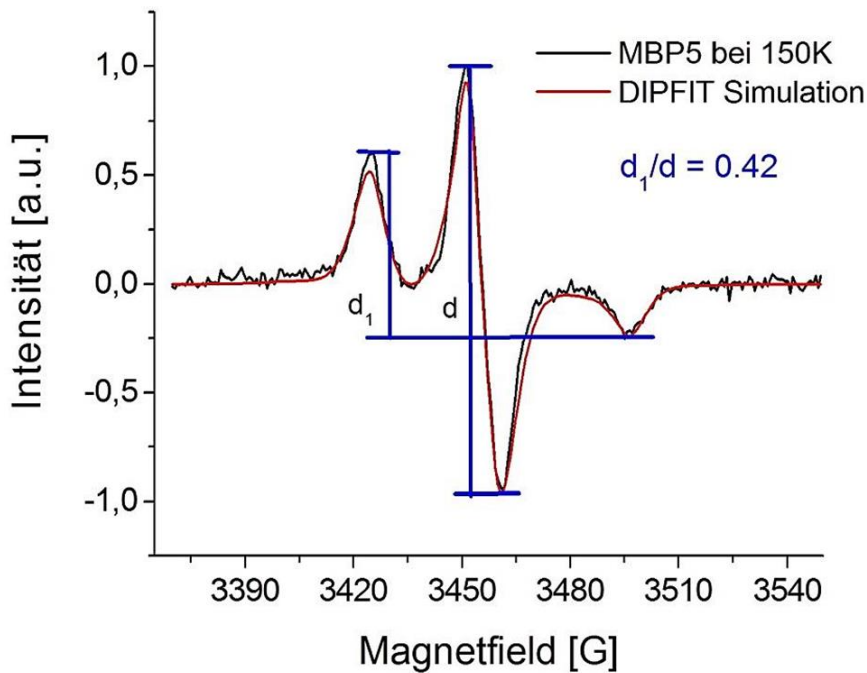


Abbildung 3.18: *cw*-ESR-Spektrum der Mutante MBP5 bei 150 K. Die rote Linie stellt die durch eine modifizierte Version des Programms Dipfit (Steinhoff H. J *et al.*, 1997) (mit den *g*- und *A*-Tensoren fixiert) berechnete Linienform dar. Der Abstand wurde zu $14,5 \pm 3,5$ Å erhalten. Blaue Linien definieren das Peak-Verhältnis d_1 / d .

Bei allen anderen Mutanten finden sich die zu erwartenden Abstände nicht im Bereich dieses Verfahrens, da hierdurch spektrale Änderungen nur bis zu einem Abstand von ca. 20 Å zu beobachten sind (Rabenstein M. D. und Shin Y., 1995). Entsprechend hat sich aus der Simulation des MBP5-Spektrums unter Verwendung des Programms Dipfit (Steinhoff H. J. *et al.*, 1997) ein geschätzter Abstand von $14,5 \pm 3,5$ Å ergeben. Dieser Wert unterscheidet sich deutlich vom simulierten Abstand von 27,4 Å (N_{SL} - N_{SL} -Abstand) (vgl. Tabelle 3.5), steht jedoch in guter Übereinstimmung mit dem berechneten C_α - C_α Abstand von 14,1 Å.

Es wurden ebenfalls Tieftemperatur ESR-Spektren immobilisierter Radikale bei 80 K (Abb. 3.19) von etwa 300 μ M MBP-Mutanten aufgezeichnet (siehe Anhang: Parameter F). Jedoch lassen sich die kurzen Abstände zwischen den benachbarten MTS-Untereinheiten mit dem Programm Dipfit 2.0 nicht simulieren, da die durch die entsprechenden dipolaren Wechselwirkungen verursachten Peaks im normalen *cw*-Spektrum nicht aufgelöst werden können. Aus diesem Grund war eine aussagekräftige Simulation dieser Abstände auf diese Weise nicht möglich, d. h. die N-O N-O Abstände liegen oberhalb von 20 Å.

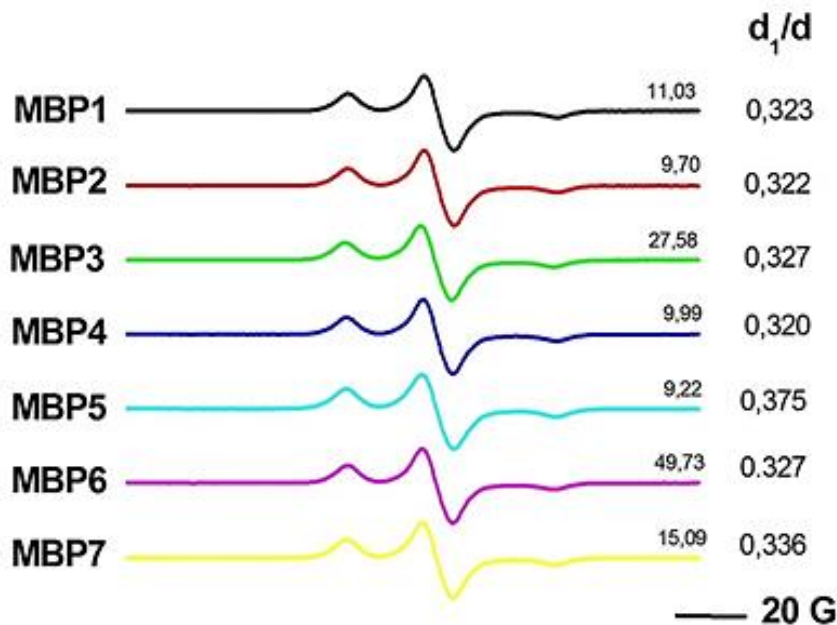


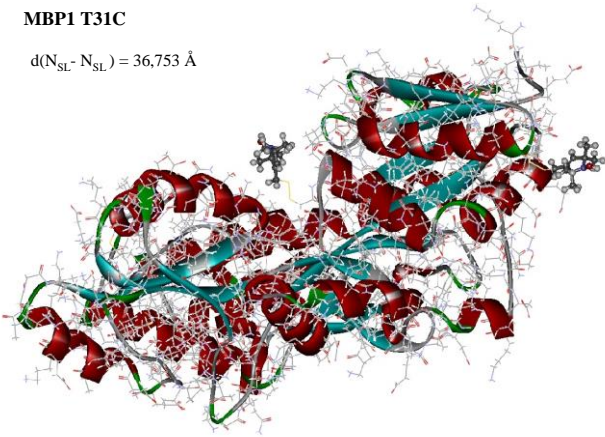
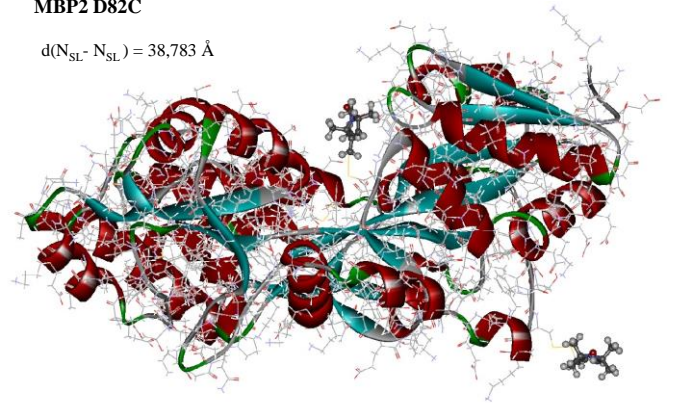
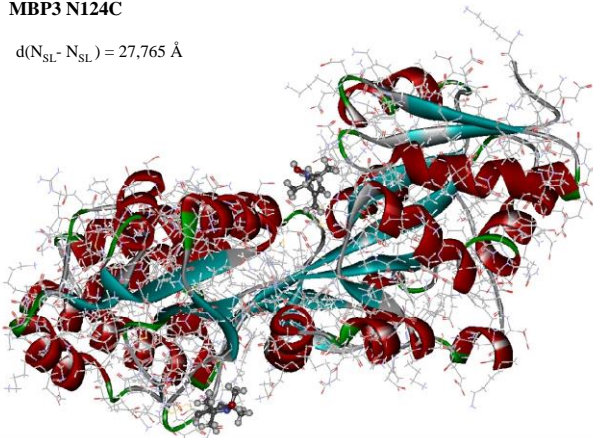
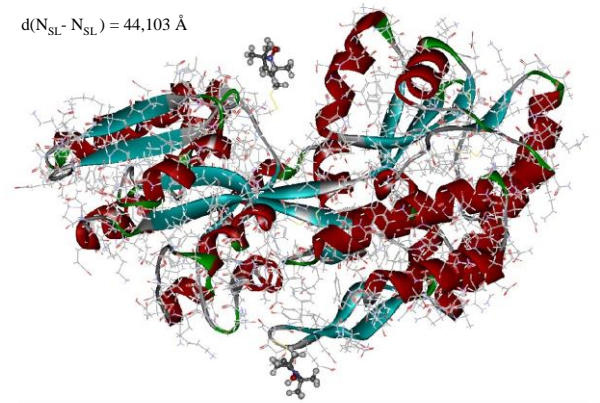
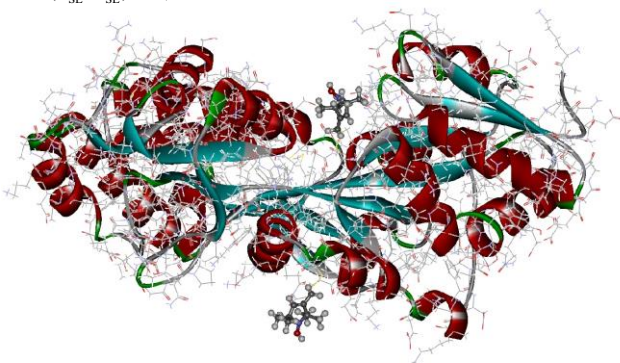
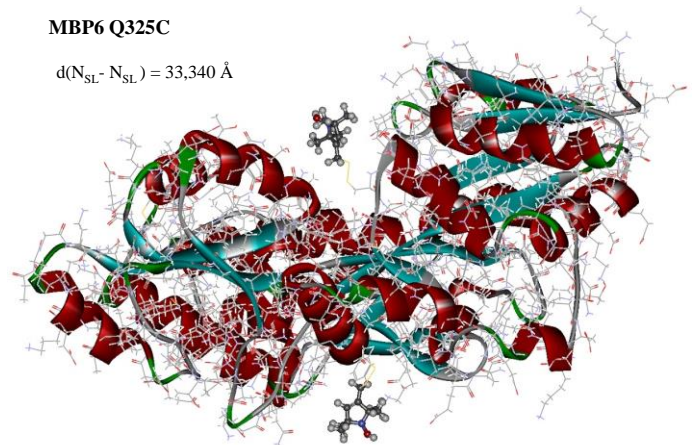
Abbildung 3.19: Die durch Tieftemperatur- cw -ESR immobilisierten Biradikale bei 80 K. Die ermittelte d_1/d -Werte sind rechts dargestellt.

Auf diesen Spektren in Abb. 3.19 ist keine beachtlich starken dipolaren Linienverbreiterungen zuerkenn. Auch die d_1/d -Werte aus dieser Abbildung bringte Grösse unterhalb von 0,4 (d.h., die N-O N-O Abstände liegen oberhalb von 20 Å) für eine mögliche Simulation mit dem Programm Dipfit.

3.5.4 Die Molekulardynamik-Simulationen

Rechnerische Modelle und Simulationen haben unser Verständnis bezogen auf die Proteinfaltung erheblich erweitert. Zur theoretischen Vorhersage der Elektronenspin-Abstände wurde das Programm Accelrys Discovery Studio angewendet. Nach dem in Kap. 5.7.3 beschriebenen Vorgehen wurden Modelle aller MBP-Mutanten zu Biradikalen mit MTS-Seitenketten umgebildet. Die C_α - C_α -Abstände von MBP können vorab direkt aus der zugehörigen 1omp-Topologiedatei (Sharff A. J. *et al.*, 1992) entnommen werden und sind nochmals in Tab. 3.5 erfasst.

Die Ergebnisse der Molekulardynamik-Simulationen sind in Abb. 3.21 zusammengefasst. Die wichtigsten Energie-minimierungs- und Simulationsparameter sind im Anhang (Parameter G und H) zu aufgelistet.

MBP1 T31C $d(N_{SL} - N_{SL}) = 36,753 \text{ \AA}$ **MBP2 D82C** $d(N_{SL} - N_{SL}) = 38,783 \text{ \AA}$ **MBP3 N124C** $d(N_{SL} - N_{SL}) = 27,765 \text{ \AA}$ **MBP4 K175C** $d(N_{SL} - N_{SL}) = 44,103 \text{ \AA}$ **MBP5 K313C** $d(N_{SL} - N_{SL}) = 27,368 \text{ \AA}$ **MBP6 Q325C** $d(N_{SL} - N_{SL}) = 33,340 \text{ \AA}$ 

MBP7 S238C

$$d(N_{SL}-N_{SL}) = 20,020 \text{ \AA}$$

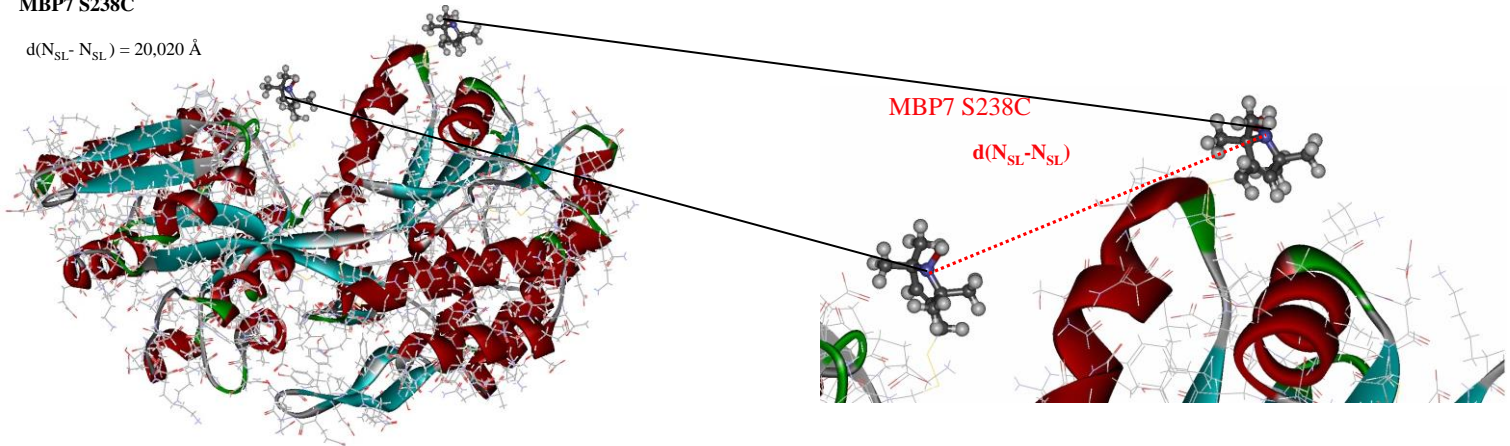


Abbildung 3.20: Ergebnisse der MD-Rechnungen für die sieben MBP-Biradikale mit den ermittelten zugehörigen Abständen der Nitroxid-Radikale in den MTS-Seitenketten, rot: α -Helices, türkis: β -Faltblätter. Zur besseren Veranschaulichung wurde MTS im Kugel-Stäbchen-Modell dargestellt. Eine Nahaufnahme als Beispiel für Nitroxid-Radikale MBP7 (blau, verbunden mit gestrichelt roter Linie) ist dargestellt.

Tabelle 3.5: Die Abstände: C_{α} - C_{α} - und C_{β} - C_{β} -Abstände des Proteins und N_{SL} - N_{SL} -Abstände (r_{theo}) nach Energieminimierung und MD-Simulation der MBP-Biradikale bei pH 7,0.

Mutante	$d(C_{\alpha}-C_{\alpha})_{Iomp}$ [nm]	$d(C_{\alpha}-C_{\alpha})_{Sim}$ [nm]	$d(C_{\beta}-C_{\beta})_{Sim}$ [nm]	$d(N_{SL}-N_{SL})_{Sim}$ [nm]
MBP1	2,7512	2,7611	2,8117	3,6753
MBP2	2,7951	2,7921	2,9679	3,8783
MBP3	2,7232	2,7202	2,6883	2,7765
MBP4	3,1300	3,1194	3,2969	4,4103
MBP5	1,4101	1,4175	1,3915	2,7368
MBP6	1,9663	1,9650	1,9583	3,3340
MBP7	1,9746	1,9844	1,8816	2,0201

Die hier berechneten Abstandswerte können nun gegen den aus den DEER-Messungen bei pH 7,0 ermittelten experimentellen Werten geprüft werden. Desweiteren kann anhand dessen auch die Optimierung der dipolare Evolutionszeit der DEER-Messung gewährleistet werden.

3.5.5 DEER-Messungen bei pH 7,0

Die Abstandsbestimmung durch die Tieftemperatur *cw*-EPR-Spektren bei 80 K war nicht erfolgreich, was darauf hindeutet, dass die Abstände der gesamten MBP-Biradikale wie erwartet oberhalb von 20 Å liegen (vgl. Tab. 3.5 der MD Rechnungen) und daher nur über DEER-Messungen zugänglich sind.

Daher wurde hier die gepulste EPR-Spektroskopie eingesetzt. Diese ermöglicht Entfernungsabschätzungen bis zu 50 Å, in Sonderfällen auch 76 - 80 Å (Pannier M. *et al.*, 2000).

Der Ablauf der gepulsten ESR-Versuche erfolgte gemäß der Beschreibung in Kap. 5.7.2. In Abb. 3.21 sind zunächst einmal die Rohdaten aufgeführt.

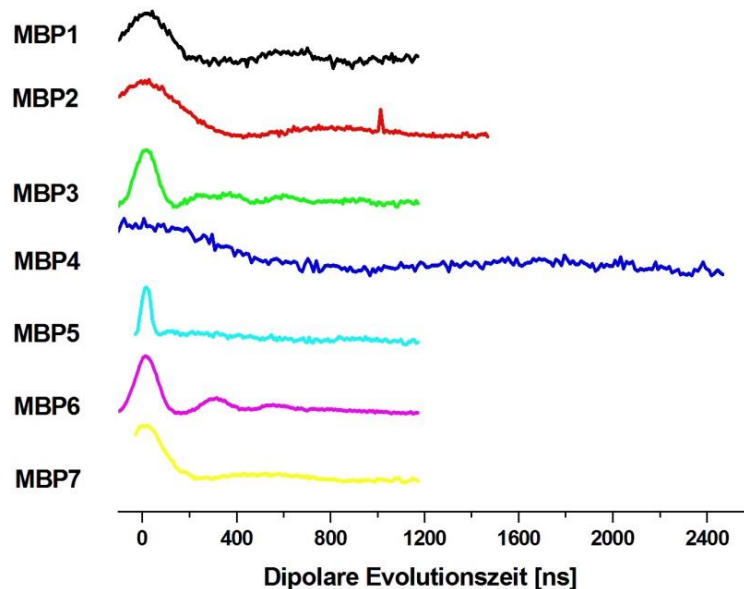
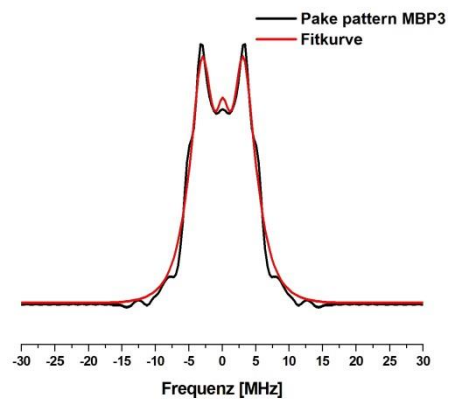
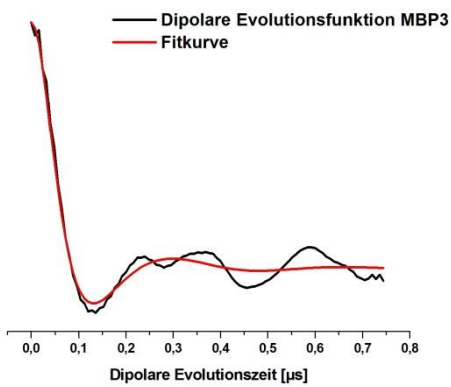
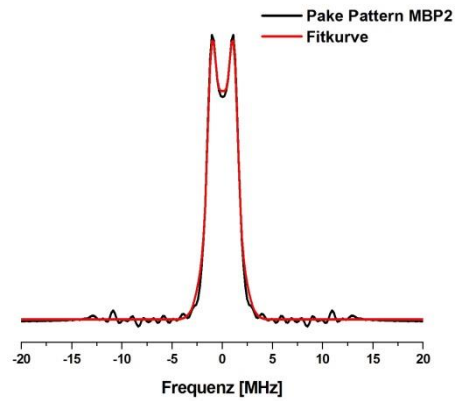
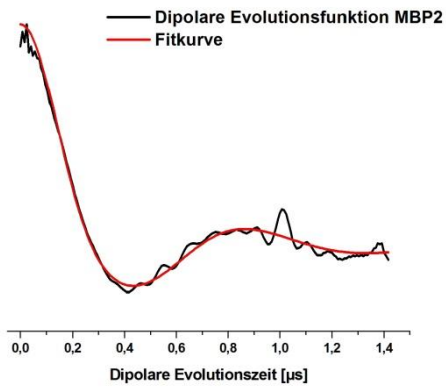
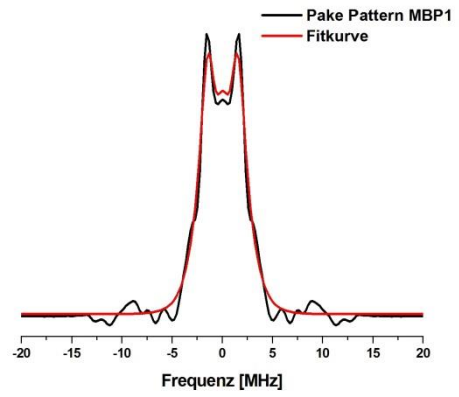
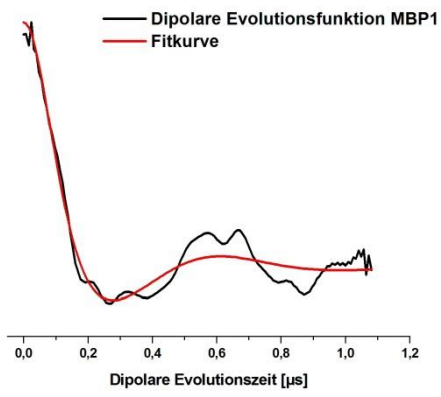
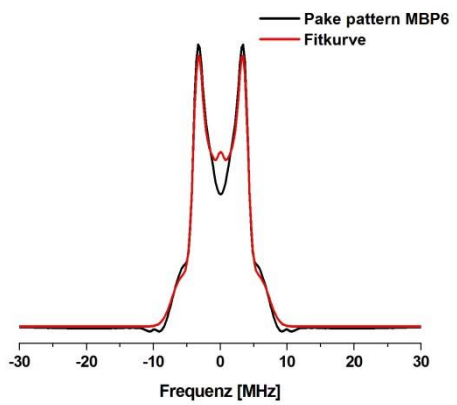
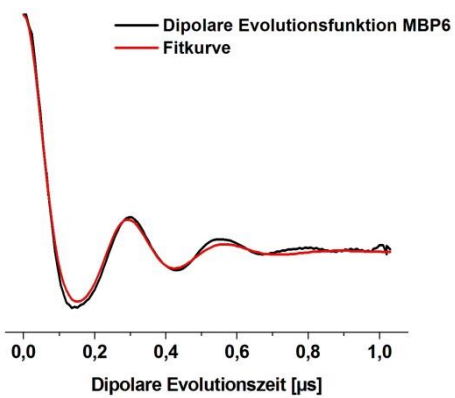
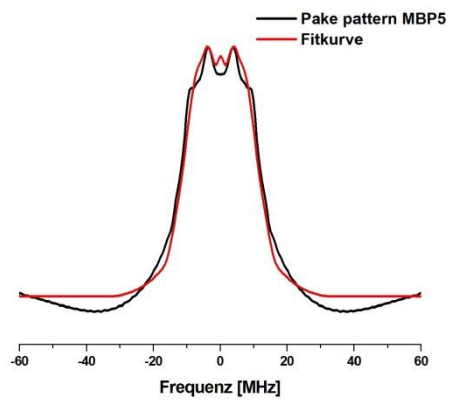
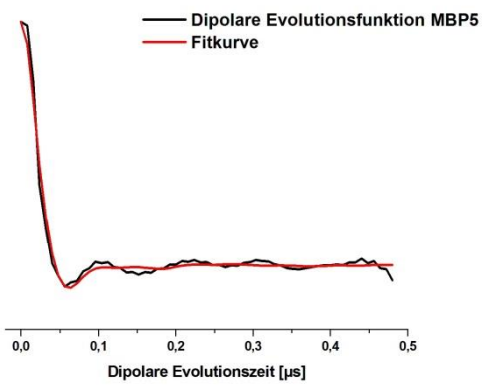
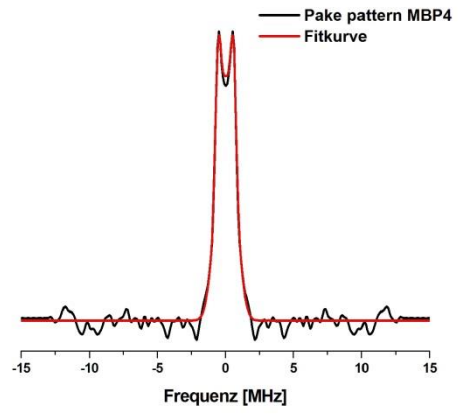
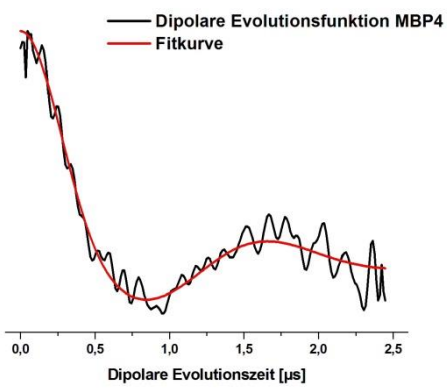


Abbildung 3.21: Dipolare Evolutionszeit der DEER-Messungen aller Biradikale des MBP (von MBP1 - MBP7) bei pH 7,0 und einer Temperatur von 50 K.

Anhand dieser Spektren kann man erkennen, dass z. B. MBP4 ein relativ geringes SNR (SNR = signal-to-noise ratio) und im Gegensatz zu den anderen Biradikalen eine sehr ausgedehnte Oszillation, die auf einen relativ großen Abstand schließen lässt, zeigt (Jeschke G., 2006). Das größte SNR ist bei MBP6 zu erkennen und ergab damit die schärfste Distanzverteilung mit einer Breite von 0,1 nm (Fajer P.G. *et al.*, 2007). Die Modulationen, sowohl von MBP3 und MBP6 als auch von MBP1 und MBP7, weisen jeweils ähnliche Charakteristika auf und die Abstände sollten demnach auch in etwa gleich groß sein.

Im Folgenden werden die Ergebnisse nach der Bearbeitung mit DeerAnalysis vorgestellt. In Abbildung 3.22 sieht man die hintergrundkorrigierten Evolutionsfunktionen (Zeitdomäne) und die dazugehörige Pake patterns (Frequenzdomäne) der Biradikale MBP1 – MBP7 mit der entsprechenden Fitkurve.





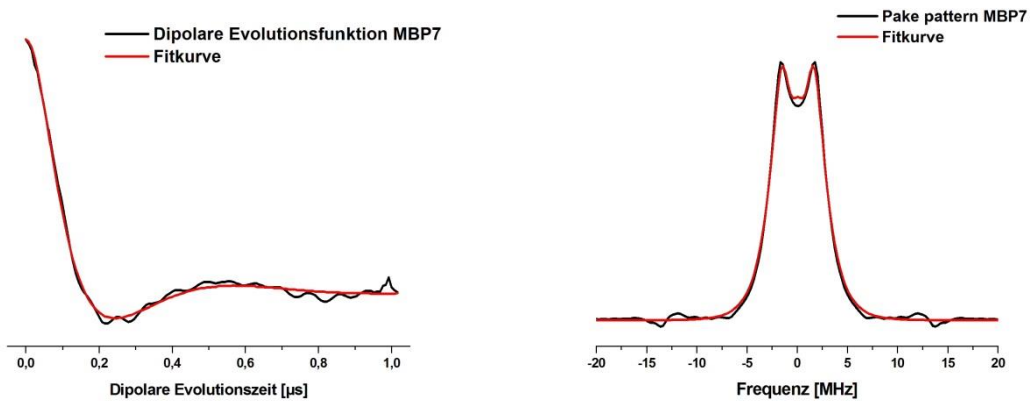


Abbildung 3.22: links: Dipolare Evolutionsfunktionen MBP1 - MBP7 in der Zeitdomäne mit bestem Fit, rechts: Pake Pattern entsprechend in der Frequenzdomäne mit bestem Fit.

Um aus diesen Befunde eine Abstandsverteilung zu gewinnen, wurde die Tikhonov-Regularisierung genutzt (siehe Kap. 6.4). Die Parameter sind im Anhang unter Parameter K zu finden. Die Abstandswerte sind in Tab. 3.6 aufgelistet:

Tabelle 3.6: Vergleich zwischen modellierten Abständen und durch DEER Messungen ermittelten Werten wobei $r_{\text{Biradical}}$ den mittleren Abstand zeigt (Abb. 3.21) und σ_r die Breite der Abstandsverteilung aus Abb. 3.23 ist.

Mutante	$d(N_{\text{SL}}-N_{\text{SL}})_{\text{sim}}$ [nm]	$r_{\text{Biradical}} \pm \sigma_r$ [nm]
MBP1	36,80	$29,7 \pm 0,41$
MBP2	38,80	$34,5 \pm 0,32$
MBP3	27,80	$23,3 \pm 0,34$
MBP4	44,10	$43,1 \pm 0,44$
MBP5	27,40	$18,1 \pm 0,36$
MBP6	33,40	$24,0 \pm 0,10$
MBP7	20,02	$28,0 \pm 0,39$

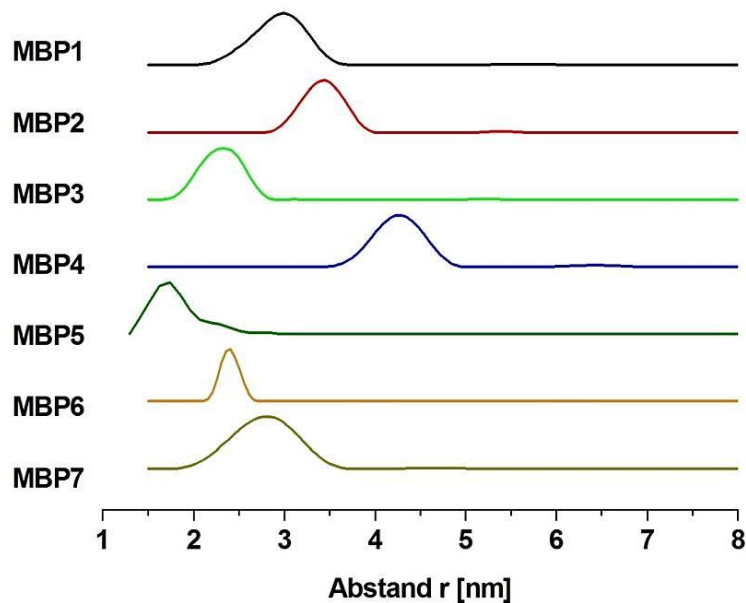


Abbildung 3.23: Normierte Werte der Abstandsverteilungen der gesamten Biradikale (MBP1 - MBP7) nach der Tikhonov- Regularisierung.

Aus Tab. 3.5, Tab. 3.6 und Abb. 3.23 ist zu schließen, dass die Abstände aus den MD-Simulationen (r_{theo}) mit den Abständen aus den experimentellen DEER-Messungen ($r_{\text{Biradikal}}$) gut übereinstimmen. Dabei der Fehler liegt innerhalb der Standardabweichung (σ_r) Grenzen für MBP2 - MBP4. Die Übereinstimmung der Abstände für alle anderen Biradikale liegt etwas höher.

3.5.6 DEER-Messungen des MBP in dem *molten globule* Zustand

Überraschenderweise kann der *molten globule* Zustand auch durch die cw-EPR-Spektren bei niedrigen pH-Werten mit dem Verfahren von Berengian A. R. *et al.* (1999) erkannt werden. Es ist ein deutlicher Knick für die Mutante MBP1 bei pH 3,3 in den Hoch- und Niederfeld-Verhältnissen zum Mittelfeldpeak in den cw-EPR-Spektren (Abb. 3.17) zu erkennen. Es zeigt sich eine teilweise Rückfaltung oder erneute Stabilisierung des Proteins bei diesem niedrigen pH-Wert.

In Vorversuchen wurden DEER-Spektren der Mutante MBP5 bei pH 3,3 aufgezeichnet, der einzigen Mutanten mit kurzem Abstand. Leider waren die Echos (ESE; Elektronspinecho) allgemein sehr schwach und konnten kaum detektiert werden. Die erste positive Aufnahme wurde für die Mutante MBP3 erfasst (Abb. 3.24).

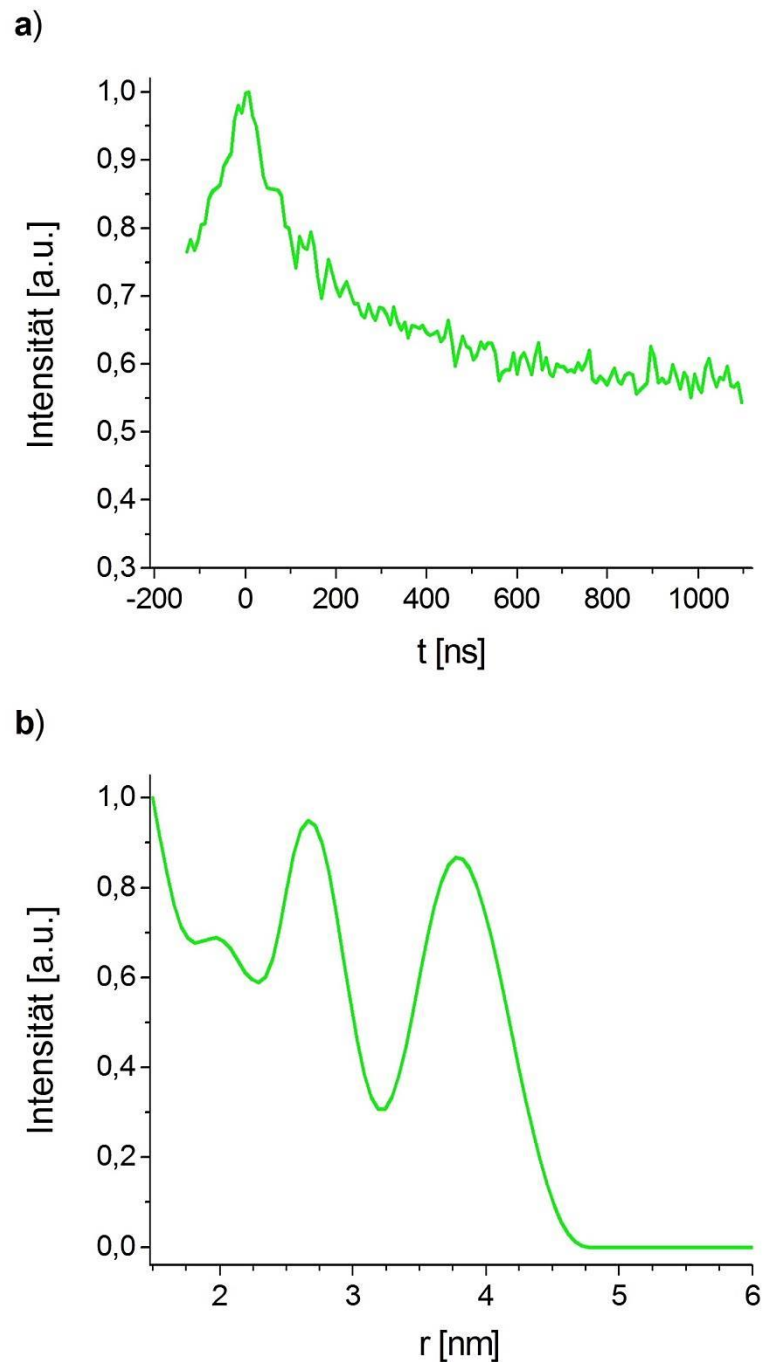


Abbildung 3.24: a) Zeitdomäne-Signale und b) Abstandsverteilung von MBP3 bei pH 3,3 nach Tikhonov-Regularisierung.

Die verwendeten Parameter sind in Anhang J aufgeführt. Die Zeitspuren in Abb. 3.24 wurden Fourier-transformiert, die resultierenden Daten in der Frequenzdomäne sind für MBP3 sowie für die anderen MBP-Mutanten in Abb. 3.25 dargestellt.

Um eine quantitative Analyse der Abstände durchzuführen, wurden die dipolaren Spektren aus Abb. 3.25 a simuliert.

Die Resultate dieser Rechnungen sind in Abb. 3.25 b wiedergegeben.

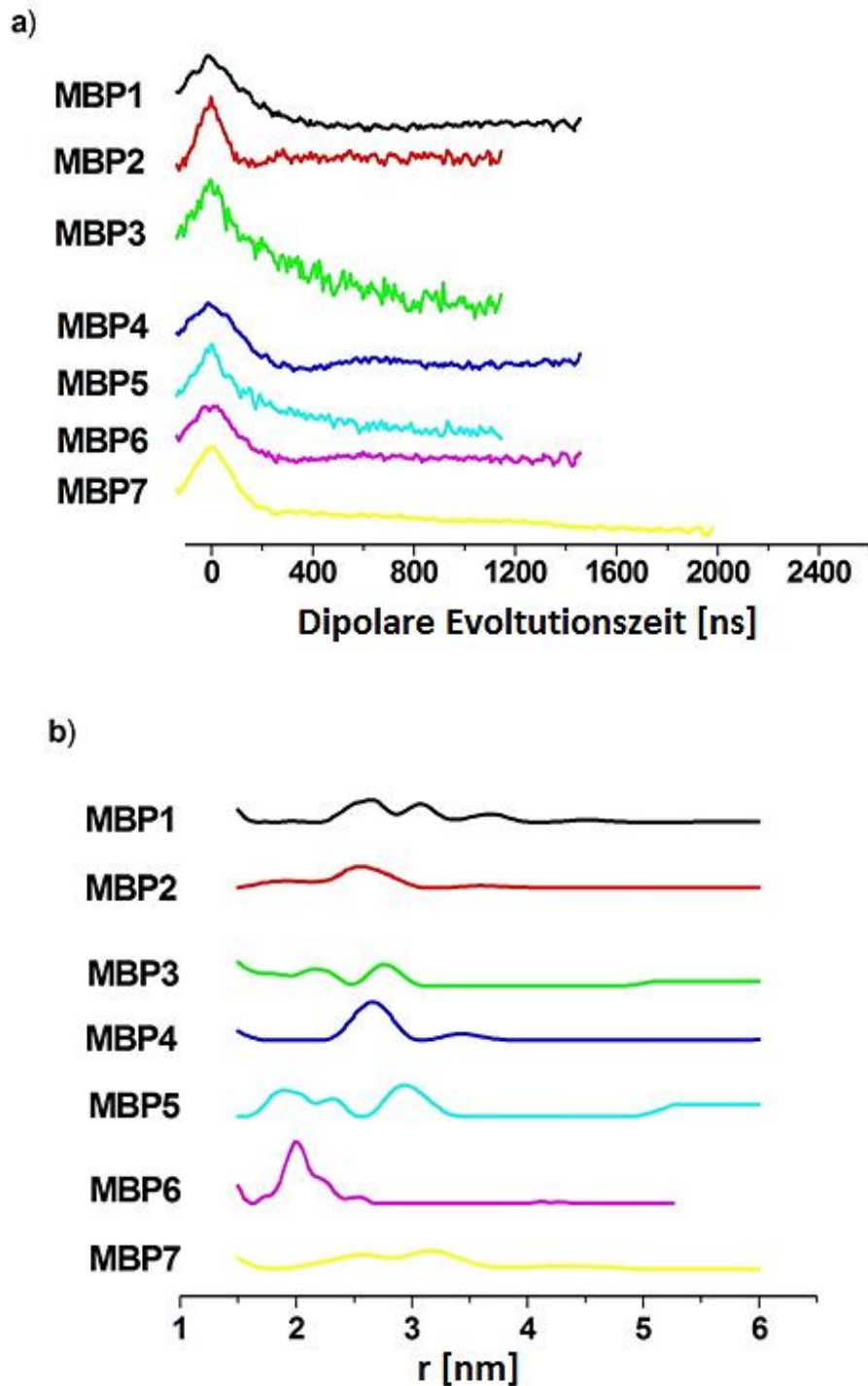


Abbildung 3.25: Dipolare Evolutionszeit der DEER-Messungen aller 7 Biradikale von MBP1 - MBP7 bei pH 3,3 nach Tikhonov-Regularisierung. a) Zeitdomäne-Signale und b) Abstandsverteilung.

Bei der quantitativen Analyse der Daten scheint es zunächst plausibel anzunehmen, dass hier aus allen ESR-spektroskopischen Untersuchungen zusammengenommen deutlichere Hinweise auf Konformationsänderung des MBP im molten globule Zustand vorliegen und dass MBP keine einzige

Abstandsverteilung hat sondern mehrere besitzt: Somit MBP2, MBP4 und MBP6 haben jeweils eine dominierende Abstandverteilung, während die restlichen Biradikale mindestens zwei dominierende Abstände beinhalten. Ein Vergleich der gewonnenen Daten der Biradikale in beiden Zustände in Bezug auf die dominierende Abstandverteilung bei der molten globule sind in Tabelle 3.7 aufgelistet. Als Referenz dienen die Abstände der sieben MBP Mutanten bei pH 7,0.

Tabelle 3.7: Vergleich der durch DEER-Messungen erhaltenen Abstände zwischen den Nitroxid-Radikalen der MTS-Label bei pH 3,3 und pH 7,0.

Mutante	$r_{\text{BiradikalMG}}$ (nm) (pH 3,3)	$r_{\text{Biradikal}}$ (nm) (pH 7,0)
MBP1	2,80	2,97
MBP2	2,80	3,45
MBP3	2,90	2,33
MBP4	3,10	4,31
MBP5	2,40	1,81
MBP6	2,30	2,40
MBP7	3,30	2,80

Bei der ersten Beobachtung kann man erkennen, dass die Abstandänderungen entweder als Komprimierung oder Aufweitung der Distanzen der Biradikalen in der MG Zustand getreten sind, abhängig von der Position der Spinlabeln.

Die Abstandsänderungen der Biradikale deuten darauf hin, dass die Abstandsverteilung im *molten globule* Zustand kürzer ist als im nativen Zustand oder als breite Abstandsverteilung anzeigt. Es ist zu erkennen, dass die Abstände bei den Mutanten MBP1, MBP2, MBP4 und MBP6 im *molten globule* Zustand kürzer als in ihren nativen Zustand sind. Im Gegensatz dazu ist die Abstandsverteilung bei den Mutanten MBP3, MBP5 und MBP7 umgekehrt, nämlich viel breiter als in ihrer nativen Struktur. Um über ein besseres visuelles Modell der gesamten MBP-Mutanten-Strukturen zu verfügen, wurde ein Molekülmodell mit dem Programm „Accelrys Discovery Studio 2.5“ angefertigt (Abb. 3.20) und daraus eine molekulare Darstellung von MBP mit acht mutierten Cysteinen (Abb. 3.26) abgeleitet.

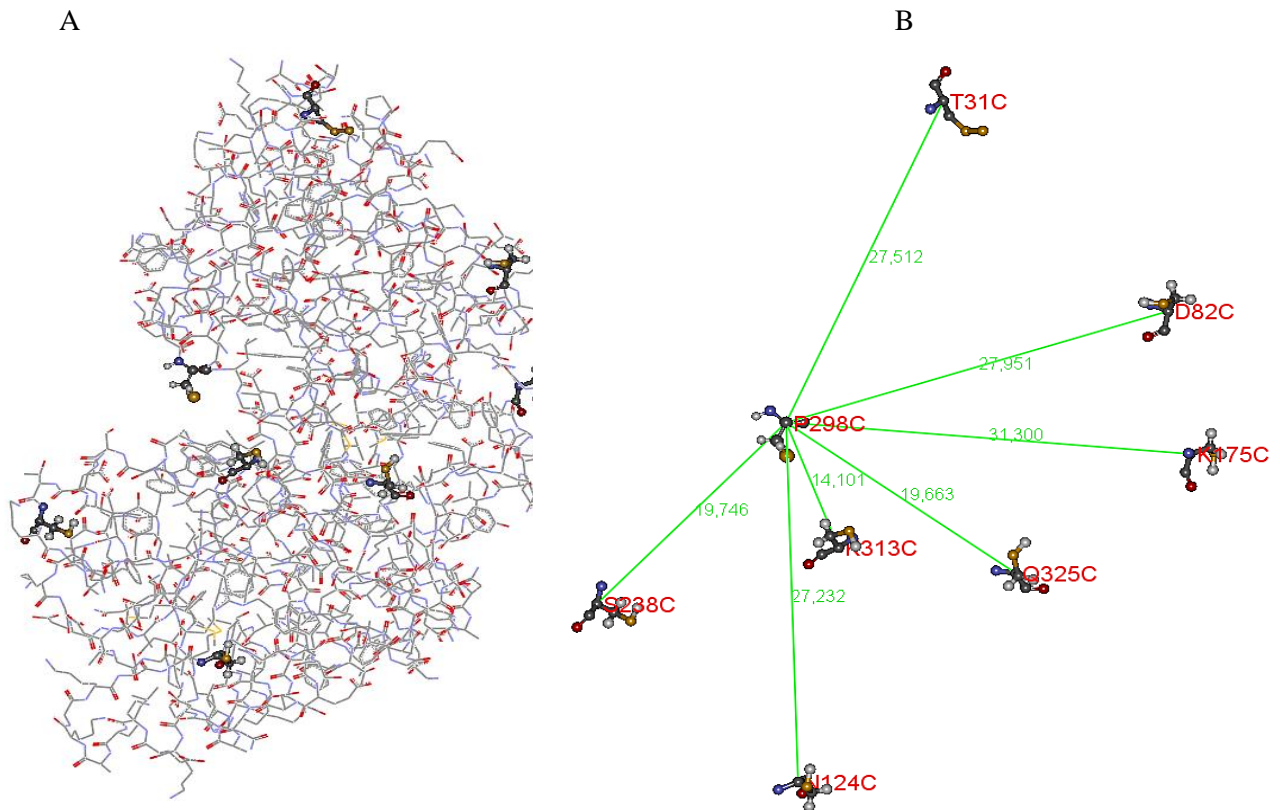


Abbildung 3.26: Darstellung von MBP mit acht mutierten Cysteinen (Accelrys Discovery Studio 2.5.5, PDB ID:1omp). A: Hier sieht man die molekulare Darstellung von MBP mit acht mutierten Cysteinen. B: die Darstellung der Abstände zwischen den zwei mutierten Cysteinen der gesamten MBP-Mutanten (P298CT31C, P298CD82C, P298CN124C, P298CK175C, P298CS238C, P298CK313C und P298CQ325C).

Die sieben doppelt Cysteine Mutanten haben eine gemeinsame Mutation, P298C (in schwarz dargestellt). Der andere Punkt ist jeweils farblich markiert. P298C kombiniert mit einem der anderen Punkte ergeben jeweils eine Mutante. Auf diese Weise sind alle mutierten Cysteine in einem Bild dargestellt (Abb. 3.26A). Zwischen den beiden Domänen ist die Spalte an der Maltose bindet. Die Abbildung 3.26B zeigt nur die Positionen der sieben durch Mutation eingeführten Cysteinreste.

Die Analyse der resultierenden Abstände weist darauf hin (Tab. 3.7 und Abb. 3.25), dass die untere Domäne, in der die Veränderungen durch MBP1, MBP2, MBP4 und MBP6 ermittelt wurden, im *molten globule* Zustand komprimiert ist. Die Biradikal-Abstände von MBP2 und MBP4 werden jeweils stärker komprimiert als die von MBP1 und MBP6. Im Gegensatz dazu ist die obere Domäne, deren Veränderungen anhand von MBP3, MBP5 und MBP7 ermittelt wurden, erweitert. Dies stimmt mit der Beschreibung von Ptitsyn O. B. (1987) überein und legt die Vermutung nahe, dass im *molten globule* Zustand die Seitenketten der Aminosäuren eine uneinheitliche Packungsdichte aufweisen. Außerdem konnte die Veränderung bei MBP5 zeigen, dass im aktiven Zentrum die Veränderung des

Abstands am größten ist. Daher kann man davon ausgehen, dass die Maltose-Bindestelle im *molten globule* Zustand größtenteils offen ist.

Die zusammenfassende Betrachtung dieser DEER-Messung hat die Erwartungen erfüllt. Die Abstandverteilung ist sehr breit geworden, weil die *molten globule* Struktur keine Seitenketten-Tertiärstruktur-Interaktionen besitzt und das Protein in diesem Zustand erheblich flexibler ist. Da deren Seitenketten im hydrophoben Kern schlecht gepackt sind und mehrere Konformationen annehmen können.

3.6 Diskussion der Daten

In dieser Studie wurden intramolekulare Abstände, die durch Spin Markierung und ESR-Spektroskopie gewonnen wurden, mit Daten aus Molekülmodellen verglichen. Zu diesem Zweck wurde als erstes ein Cystein in das aktive Zentrum und sechs weitere Mutationen in einer Kugelzone um diese Position eingeführt. Des Weiteren wurden ESR-Spektroskopie-Techniken angewendet, um die Abstände zwischen den Paaren Spin-markierter Cysteine zu bestimmen. Es ist sicher, dass ein Zweifel bei den Strukturmodellen hinsichtlich der genauen Position des Nitroxids relativ zu dem C_α-Atom des Proteinrückgrats verbleibt. Die Konformation der neu in die Modelle eingeführten MTS-Spin-Markierung war Energie-minimiert. Jedoch korrelieren, wie es in Tabelle 3.6, Abb. 3.21 und Abb. 3.23 dargestellt ist, die aus DEER-abgeleiteten Werte sehr gut mit den Modellen (Reichenwallner J. *et.al*, 2013). Die vorliegende Untersuchung bestätigt daher die Übereinstimmung der aus der Röntgenstruktur gewonnenen Modelle mit der Lösungsstruktur, an welcher die Experimente vorgenommen wurden.

Danach wollten wir Informationen über den *molten globule* Zustand gewinnen. Eine Voraussetzung dafür war die Stabilität des Spin-Labels unter sauren Bedingungen (pH 3,3). Verluste in der Signalintensität erwiesen sich als so geringfügig, so dass dennoch DEER-Messungen möglich waren (Reichenwallner, 2011). Ebenso konnte der *molten globule* Zustand durch ANS -Bindung überprüft werden. Die DEER Messungen bei diesem niedrigen pH-Wert bereiteten erhebliche Probleme. Schwierigkeiten traten auch beim Erkennen des Echos auf. Im vorläufigen Experiment ermöglichte jedoch die MBP3-Mutante eine ungefähre Interpretation der Daten und ergab eine extrem breite Abstands-Verteilung (Abb. 3.25). Dies war insoweit zu erwarten, wenn keine definierte Tertiärstruktur gegeben ist und die einzelnen Helices in alle möglichen Richtungen zeigen.

Beim Vergleich der Abstandsverteilung für das MBP3 bei pH 7,0 (Abb. 3.21 & Abb. 3.25) und pH 3,3 (Abb. 3.23) konnten wir darauf schließen, dass eine Änderung der wichtigsten Distanz-Peaks bei 2,33 nm (pH 7, 0) auf einen höheren Wert von 2,67 nm (pH 3,3) ansteigt, während der breite Peak bei 3,85 nm ein Regularisierungs-Artefakt hinsichtlich der kurzen dipolaren Evolutionszeit von 1 μ s zu sein

scheint. Diese deutliche Differenz legt die Vermutung nahe, dass das MBP in seinem *molten globule* Zustand mehr Bewegungsfreiheit besitzt als die potentiell flexibleren Spinsonden von MBP in gefaltetem Zustand. Letztere scheinen sich der Proteinumgebung besser anzupassen und demzufolge auch eine stärkere Immobilisierung zu erfahren.

Der *molten globule* Zustand weist einen deutlichen Anteil an Sekundärstruktur auf, ähnlich dem nativen Zustand, gemessen durch Fern-UV-CD-Spektren (Abb. 3.6). Er zeigt auch einen Verlust der Tertiärstruktur und eine Vergrößerung der für das Lösungsmittel zugänglichen hydrophoben Oberfläche (Abb. 3.10). Diese Eigenschaften des *molten globule* zeigten sich in ähnlicher Form auch bei anderen Proteinen (Ohgushi M. *et al.*, 1983; Chimienti M. *et al.*, 1987; Dolgikh D. A. *et al.*, 1985; Kuwajima K., 1977; Ptitsyn O. B., 1995; Semisotnov G. V. *et al.*, 1991).

Eine Abnahme des pH-Werts führt zur Protonierung negativ geladener Proteinreste und einem daraus resultierenden Anstieg der positiven Gesamtladung des Proteins. Daraus folgt eine deutlichere elektrostatische Abstoßung auf der Oberfläche des Proteins (Prajapati R. S. *et al.*, 2007). Folglich gibt es Verluste in der Tertiärstruktur einiger hydrophober Reste, die in stärkerem Maße als im nativen Zustand dem Lösungsmittel ausgesetzt sind. Dies erklärt auch die Reduktion des Nah-UV-CD-Signals und die Bindung des hydrophoben Farbstoffs ANS.

Es sind relativ wenige kalorimetrische Charakterisierungen eines *molten globule* Zustands, besonders in Abwesenheit von Denaturanzien, zu registrieren. Dies liegt wohl an der niedrigen bis negativen Enthalpie dieses Zustandes, welche daher einen schnellen und starken Aggregationsauftritt der exponierten hydrophoben Oberfläche begünstigt (Hamada D., *et al.*, 1994; Nakamura S. und Kidokoro S., 2005).

Obwohl *molten globules* wenig oder gar keine Tertiärstruktur zeigen (vgl. die Nah-UV-CD-Daten), bleibt die Rolle von spezifischen Wechselwirkungen bei der Stabilisierung von *molten globules* unklar. Die Ligand-Bindung an MBP beteiligt mehrere Reste, welche räumlich in der dreidimensionalen Struktur voneinander entfernt sind. Daher scheint es rational zu folgern, dass die Ligand-Bindung an das *molten globule* nur möglich ist, wenn es sich um eine dem nativen Zustand ähnliche-Topologie handelt und nicht nur um eine lokalisierte strukturelle Organisation. Jedoch sind weitere strukturelle Studien erforderlich, um diese Annahme zu bestätigen.

Die Bindung des Liganden an das *molten globule* zeigt, dass, obwohl der *molten globule* Zustand seine Tertiärstruktur relativ zum nativen Zustand zu verlieren scheint (siehe Nah-UV-CD-Spektren), die Bindungs-Tasche in einer nativ-artigen Konformation beibehalten wird und daher eine besondere Seitenketteneckung in diesem *molten globule* verfügbar sein dürfte.

Die Daten zeigen auch, dass der Verlust eines beobachtbaren Nah-UV-CD-Signals nicht unbedingt einen Mangel an definierter Packung und/oder einen erheblichen Verlust der Protein-Tertiärstruktur

impliziert. Es könnten daher über das *molten globule* weitere Untersuchungen vorgenommen werden mit dem Ziel, das Ausmaß der Tertiärstruktur auf anderen geeigneten funktionalen und spektroskopischen Ebenen zu charakterisieren.

Außerdem ist die Liganden-Bindungsaffinität sehr sensitiv in Bezug auf die Tertiärstruktur, deshalb soll, um den *molten globule* nachzuweisen, darauf geachtet werden, dass durch die Liganden-Bindung keine Tertiärstruktur induziert wird (Prajapati R. S. *et al.*, 2007).

Aufgrund der Abwesenheit von prosthetischen Gruppen bei MBP ist es wahrscheinlich, dass der Zustand des *molten globule* durch hydrophobe Wechselwirkungen, spezifische Packungen und Wasserstoff-Bindungen stabilisiert wird. MBP bindet seine Kohlenhydrat-Liganden in seinem *molten globule* Zustand mit über 30-fach niedrigerer Affinität als im nativen Zustand (Prajapati R. S. *et al.*, 2007), weil die Bindung an Kohlenhydrate durch mehrere Wasserstoffbrücken vermittelt wird, die eine geordnete Bindungs-Tasche erfordern (Magnusson U. *et al.*, 2004; Trakhanov S. *et al.*, 2005; Spurlino J. C., *et al.*, 1991).

Zu bemerken bleibt, dass die meisten früheren Studien mit einem *molten globule* sich auf relativ kleine Proteine konzentrierten. Wegen der Aggregation und Mangel an Reversibilität wurden nur wenige Studien auf die Faltung von großen Proteinen geachtet. Im Gegensatz dazu zeigt das periplasmatische Bindungs-Protein, welches in der vorliegenden Studie untersucht wurde, reversible Faltung.

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das Maltose-Bindungsprotein (MBP auch MalE) wird durch das Gen *malE* kodiert und ist ein periplasmatisches Protein (Duplay *et al.*, 1984). Durch MBP wird dem Transportsystem ohne Verlust der Transporteffizienz eine hohe Affinität zum Substrat verliehen. Die Menge an Maltose-Bindungsprotein im Periplasma übersteigt die der Membrankomponenten um das 30-50-Fache und kann eine Konzentration bis zu 1 mM erreichen (Dietzel I. *et al.*, 1978).

Für den Transport ist eine Interaktion des substratbeladenen MBP mit den integralen Innenmembranproteinen MalF und MalG notwendig (Treptow N.a. *et al.*, 1988). Darüber hinaus interagiert substratbeladenes MBP nicht nur mit MalF und MalG, sondern auch mit dem Chemotaxis-Sensor-Protein Tar und ermöglicht dem Bakterium so eine chemotaktische Antwort auf Maltose- und Maltodextrinkonzentrationsgradienten im Medium (Koiwai O. *et al.*, 1979; Zhang Y. *et al.*, 1992).

Die Bindung der hydrophoben fluoreszierenden Sonde 1-Anilino-naphthalin-8-sulfonsäure (ANS; Stryer L., 1965) an verschiedene strukturelle Organisationszustände des MBPs hat gezeigt, dass ANS eine viel höhere Affinität zu dem „*molten globule*“-Zustand (Ku wajima K., 1989; Arai M. Ku wajima K., 2000) mit ausgeprägter Sekundärstruktur und Kompaktheit hat, aber ohne tertiäre dicht gepackte Struktur gegenüber ihrer Affinität zum nativen Zustand.

Ziel dieser Arbeit war es in erster Linie, sieben Doppel-Cystein-Mutanten des Maltose-Bindungsproteins (MBP) mit einer Mutation im aktiven Zentrum an Position 298 und einem zweiten Cystein, über Domänen des Proteins verteilt, zu generieren. Diese Cysteine wurden für die späteren EPR-spektroskopischen Messungen durch Spinlabel 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl- Δ^3 -pyrrolidin-3-methyl-methanthiosulfonat (MTS) markiert. Untersuchungen mit MALDI-ToF-MS sowie eine bei Raumtemperatur durchgeführte cw-ESR-Messung (nicht dargestellt) bestätigten den quantitativen Erfolg des site-directed Spinlabeling mit MTS an jeder der sieben Doppel-Cystein-Mutanten von MBP.

Im *molten globule* Zustand und ohne Substrat (Maltose) zeigten die Fern-UV-CD-Spektren von MBP-Wt eine leichte Reduktion der Signale. Allerdings wurde eine starke Reduktion der Signale der Nah-UV-CD-Spektren beobachtet, welche auf einen Verlust der Tertiärstruktur hindeutet (Ganesh C. *et al.* 1997), da die aromatischen Aminosäurereste in diesem Intermediat in einer eher chiralen Umgebung rotieren. Daher zeigt der *molten globule* Zustand keinen Circular dichroismus im Nah-UV.

Darüber hinaus weisen die Fern- und Nah-UV-CD-Spektren von MBP-Wt mit Maltose auf eine teilweise Entfaltung der Sekundärstruktur und Tertiärstruktur hin. Dies stimmt nicht mit den beschriebenen Eigenschaften des *molten globule* Zustands überein. Die Wechselwirkung der Maltose mit der MBP-Wt-Sekundärstruktur und -Tertiärstruktur stabilisiert diese Strukturen. Eine Erklärung könnte sein, dass Bindungen zwischen Ligand und Protein letzteres in einer stabilen Konformation halten. Auch die Cys - Reste haben einen deutlichen Einfluss auf der Faltung der MBP und letztendlich

auf seine Konformation, welche in der Fern-UV-CD Spektren der Beiden Zustände des MBP klar zu erkennen ist.

Die thermische Denaturierung von nativem MBP zeigt einen Zwei-Zustand-Übergang (Ganesh C. *et al.* 1997). Bis 88 °C bleibt MBP sehr resistent und lässt sich hervorragend zurückfalten.

Eine Solvensdenaturierung erfolgt durch Bindung von Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid an das MBP im denaturierten Zustand, so dass ein Gemisch vieler verschiedener Konformationen vorliegt (Ptitsyn O.B., 1995, Kuwajima, K. *et al.*, 2000), dessen Eigenschaften extrem von den jeweiligen Lösungsmittelbedingungen abhängen.

Der erste Übergang der GdnHCl- bzw. Harnstoff-induzierten Entfaltung sowie die Säure- und Temperatur-induzierte Entfaltung führten zu einem teilweisen bzw. bis zum komplett entfalteten Zustand des MBP. Das teilentfaltete MBP bindet den hydrophoben Farbstoff 1-Anilino-8-naphthalinsulfonat, weist eine nativ-ähnliche Sekundärstruktur auf, zeigt jedoch keine definierte Tertiärstruktur mehr. Dieses Intermediat hat somit *molten globule*-ähnliche Eigenschaften. Der neue Begriff des *molten globule* gilt für alle kompakten denaturierten Zustände welche Sekundärstruktur, aber wenig oder keine definierte tertiäre Struktur haben.

Das in dieser Studie verwendete Protein erfüllt wie erwartet die oben genannten Kriterien, die in der Regel gebraucht werden, um den Zustand des *molten globule* (Abbildung 3.6) zu definieren. Jedoch muss angemerkt werden, dass der Rückgang des CD-Signals im nahen UV keinen Verlust der Tertiärstruktur bedeuten muss.

Während im nativen Zustand die MBP-Maltose-Interaktion hervorragend war (Prajapati *et al.*, 2007), war für die Maltose-Bindung im *molten globule* jedoch keine Bindungsenthalpie zu beobachten. Die Ursache hierfür könnte die Kontaminierung des Proteins mit Maltose während der Probenvorbereitung und/oder eine Reduktion in der Proteinaffinität zu seinem Substrat sein, welche die MBP-Bindungsfähigkeit in seinem *molten globule* Zustand beschränkt (Jasco T. *et al.* 2012). Gelegentlich wurde auch vermutet, dass diese Bindungsfähigkeit bei einem sauren pH (pH 3,0) signifikant negative Effekte hat, welche schließlich zu einer schwachen Stabilität des Proteins führen können (Sheshadri S. *et al.*, 1999).

Die gewonnenen cw-ESR-Spektren bei Raumtemperatur zeigten mehr als eine spektrale Komponente aufgrund der Wahrscheinlichkeit der verschiedenen Label-Konformationen.

Die X-Band-ESR-Tiefemperatur -Messungen bei 80 K lieferten eine indirekte Bestätigung dafür, dass alle Abstände der Biradikale oberhalb von 20 Å liegen, indem ansonsten keine Hinweise auf dipolare Wechselwirkungen in den immobilisierten Spektren zu erkennen waren. Die Simulation des noch am stärksten gekoppelten Biradikals MBP5 lieferte mit dem Programm Dipfit keinen direkten Abstand, es wurde jedoch eine weitgehende Übereinstimmung mit dem berechneten C α -C α -Abstand der Messung bei 150 K registriert. Diese Tatsache wurde sowohl mit den MD-Simulationen, als auch mit den 4-Puls-DEER-Messungen weitgehend gestützt. Mit Hilfe des *Molecular Modeling* wurden aus dem Datensatz der MBP-Wt- Kristallstruktur von E. coli die theoretischen Abstände zwischen den

Nitroxid-Radikalen der MTS-gelabelten Cysteine der MBP im substratfreien Zustand abgeschätzt. Zu diesem Zweck wurden die Kristallstrukturdaten hinsichtlich der Veränderungen in den MBP-Mutanten modifiziert. Es wurden alle Cysteine durch ein MTS-gelabeltes Cystein ersetzt. Eine Energie-minimierung der Spinlabel-Konformation innerhalb der Proteine wurde mit Hilfe von molekular-dynamischen (MD) Rechnungen erzielt. Zusammen mit Mobilität, Zugänglichkeit und Polaritätsanalyse bietet die interspin- Abstandsbestimmung ein einzigartiges Mittel zur Ableitung struktureller Details in Proteinen unbekannter Struktur. Die Analyse der Proteindynamik ist mit solchen Methoden allerdings nur eingeschränkt durchführbar, weil die gelieferten Daten in den meisten Fällen begrenzt sind bzw. deren Interpretation nicht so eindeutig ist.

Im Allgemeinen ist somit die mittels cw-ESR-Tieftemperatur-Messungen (150 K bzw. 80 K) erfolglose Abstandsbestimmung auf zu schwache dipolare Kopplungen zurückzuführen. Der Abstand von MBP5 befindet sich in der Grauzone zwischen Auflösungsminimum der DEER-Messung und Auflösungsmaximum der cw-ESR-Spektroskopie an immobilisierten Radikalen.

Die 4-Puls-DEER-Messungen haben bei allen sieben Mutanten funktioniert. Die Übereinstimmung mit den theoretischen Abständen liegt für MBP2 - MBP4 innerhalb der Fehlergrenzen. Für alle anderen Biradikale ist die Abweichung mit mindestens 5 – 26 % relativ groß.

Während die 4-Puls-DEER-Messungen des nativen MBP erfolgreich waren und die Abstandsverteilungen der sieben MBP-Mutanten mittels DeerAnalysis ermittelt werden konnten, ergaben die Abstandsmessungen im *molten globule* Zustand deutliche Veränderungen. Diese Veränderungen führten aufgrund der Zeitdomäne-Daten der MBP-Biradikale entweder zu Domänen-Komprimierung oder zur Ausdehnung der MBP Struktur. So fand man für jede Mutante im *molten globule* Zustand entweder breite, aber in der Regel verschiedene mehrere Abstände. Das begründet eindeutig die Divergenz in der Packungsdichte ihrer Seitenketten, welche tatsächlich bei dem *molten globule* Zustand charakteristisch ist (Ptitsyn O.B., 1987).

Analog zeigten die Mutanten MBP 2, MBP 4 und MBP 6 jeweils eine dominierende Distanz, hingegen waren bei MBP1, MBP3, MBP5 und MBP7 mindestens zwei dominierende Abstände vorhanden.

Obwohl es viele Verbesserungen erfordert, die im Hinblick auf die zuverlässige Interpretation der Daten vorgenommen werden müssen, ist das DEER-Experiment eine leistungsfähige Methode zur Messung intramolekularer Abstände, insbesondere aufgrund seiner Sensitivität und Spezifität. Damit kann das DEER- Experiment Techniken wie FRET, NMR und Röntgenkristallographie ergänzen.

Gegenstand zukünftiger Arbeiten auf diesem Gebiet könnte das Einbringen einer Spinmarkierung an zentral gelegenen Positionen sein, um stärkere Effekte in der Abstandsänderung beobachten zu können, die auch nur durch cw-ESR Messungen ermittelt werden könnten, da die Abstände in diesem Fall 20 Å nicht überschreiten dürften. Darüberhinaus ist es notwendig, vor der Abstandbestimmung bei dem *molten globule* Zustand neue und bessere Versuchsbedingungen zur Optimierung der ITC-Messungen, um jegliche Problematik auszuschließen, anzustreben. Hinsichtlich der

Kontaminationsvermutung sind genaue Überprüfungen notwendig. Parallel und aufgrund der sensitiven Kalorimeter-Messung wäre es auch entscheidend, für den neuen Versuch frisches MBP zu verwenden in einem Temperaturbereich zwischen 20 – 25 °C, damit die Protein-Aktivität eventuell gut erhalten bleibt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgreich und im Hinblick auf die Aufgabenstellung zielführend waren.

5 EXPERIMENTELLE METHODEN

5.1 Allgemeines

5.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Für die vorliegende Arbeit wurden die folgenden Geräte verwendet:

Autoklave	Systec, V-65, Wettenberg
Brutschrank	Memmert
CD	Applied Photophysics, Chirascan™-plus
ESR	BRUKER ELEXSYS E580 Electron Paramagnetic Resonance Konsole BRUKER Pulsed Microwave Bridge E580-1010 BRUKER E 580 - 400 U (ELDOR-Quelle) BRUKER Netzteil ER 082 (155/45) Applied Systems engineering TWT Amplifier 1 KW Model no. 117X Messing Dummy ELEXSYS E580 <i>cw/pulse</i> EPR, Bruker Flexline Split-Ring Resonator ER4118X_MS3, Bruker ARS AF204, maßgefertigt für Puls EPR, ARS, Macungie ELEXSYS EX680 <i>cw/pulse</i> EPR, Bruker W-Band EN600-1021H Tera Flex ENDOR Resonator CF935 Kryostat, Oxford ITC4 Temperature Controller, Oxford Software: Xepr, Bruker
Gefrierschrank	Sanyo MDF-U3086S Ultra Low Sanyo MDF-U72V, VIP™ Series, Ultra Low
ITC	GE Healthcare, iTC ₂₀₀
Kühlschrank	Liebherr
Magnetrührer	Janke und Kunkel IKA Motor KMO2 electronic Ultraflex MALDI-ToF, Bruker Anchor Chip Target®
MALDI	Zip-Tip® Spitzen, Millipore
Mini-Electrophoresis-Systems	Bio-Rad, Mini-PROTEAN® Tetra Cell
Mini-Shaker	Retsch Mixer
pH-Meter	Mettler Toledo, Inlab® mirco
Pipetten	Eppendorf Research plus Brand Transferpette® S
Pipettus	Brand, Accu-jet® Pro

Power-Supply	PowerPac 3000, Bio-Rad
Pumpe	Pharmacia Biotech Pump P-1
Rotoren:	JA-10, JA-14 und JA-20, Beckman Ti-70, Beckman
Schüttelgeräte	Thermo Scientific, MaxQ 400 New Brunswick Scientific, Innova 4000, Nürtinger HT Infors AG, Bottmingen Desaga, Diffusions-Entfärbe-Apparatur, Heidelberg
Software	Accelrys Discovery Studio 2.5.5 DeerAnalysis2006 NITPIC 0.7.6 beta SEDFIT1055 beta Pro-Data™ Software Suite
Sterilbank	Heraeus Instruments, Laminair® HB 2448
Thermo-Shaker	Eppendorf, Thermomixer comfort
Trockenschrank	Heraeus
Ultraschallgerät	Branson Sonic, Sonifier® B-12, Cell Disruptor
UV/VIS-Spektrometer	Eppendorf, BioPhotometerplus Beckman DU® 640 Spectrophotometer Jasco V-630 Thermoscientific Genesys 10 UV scanning
Waagen	Sartorius Typ 1413 Sartorius analytic Mettler Toledo, Xs205 DualRange Analytical Balance
Zentrifugen	Eppendorf, Centrifuge 5415C Beckman® Model J2-21 Eppendorf, 5810 R Stuart Rotator SB3

5.1.2 Chemikalien

Alle unteren Chemikalien wurden in analysereiner Form von folgenden Herstellern bezogen:

Aceton	Merck Darmstadt
Acetonitril	Fisher Scientific, Schwerte
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5 : 1)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Kobe I. pulv., Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich

Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Amylose Resin	BioLabs
B CA-Reagenz A und B	Pierce, Weiskirchen
Bovine Serum Albumin	Interchim, Uptima
Bromphenolblau (für SDS-Puffer)	Fluka, USA
BSA Standard (Stammlösung) 2 mg/ml,	Uptima
Butanol	Riedel-de-Haen, Seelze
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Citrat	Riedel-de-Haen, Seelze
Coomassie Brillant-Blue G-250	Serva, Heidelberg
D(+)-Maltose Monohydrat	für die Biochemie, Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	GERBU Biotechnik
Ethanol	Sigma Aldrich
Glycerin	Fluka
Glycin	Molecular biology grade, AppliChem
Guanidin-Hydrochlorid (GndHCl)	für die Biochemie, Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth Karlsruhe
HEPES	Pufferan [®] , Roth, Karlsruhe
Hydroxyapatit	Bio-Gel [®] HTP Bio-Rad
Isopentan	AppliChem
Isopropanol	Molecular biology grade, AppliChem
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche Diagnostic, Mannheim
Kaliumacetat	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
LB-Medium (Luria/Miller)	für die Molekularbiologie, Roth, Karlsruhe
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
MTS	Prof. Dr. Kálmán Hidek, Universität Pécs, Ungarn
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Meets USP testing specification, Sigma Aldrich, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN Biomedicals
Page-Blue	Fermentas, Vilnius
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	GERBU Biotechnik
Rotiphores [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	J.T Backer, Holland
TEMED	AppliChem

Trinatriumphosphat Dodecahydrat	p.a. ACS reagent, Sigma Aldrich, USA
Tris	ultra pure, MP Biomedicals, Inc., France
Aceton	Merck Darmstadt
Acetonitril	Fisher Scientific, Schwerte
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (37,5 : 1)	Roth, Karlsruhe

5.1.3 Verbrauchsmaterialien

Dialysierschlauch	Viking Cellulose Typ 27/32 inch, Roth
Protein-Konzentrator	Sartorius Stedim: Vivaspin 6 und 20 Polythersulfone, 10,000 MWCO
Pasteur-pipetten	Glas, 230 mm, Roth
PD-10-Säule	Sephadex G 25 M GE Healthcare
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht; ULPlast, Poland
Quarzkapillare	Ø 3 mm, Eigenbau
Quarzküvette	Hellma [®] Analytics: 110-QS 1 mm und 10 mm mit Zertifikat
Reagiergefäß	1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht
Röhre (Tube)	Sarstedt, Nümbrecht: 50 ml, 115 x 28 mm, PP 15 ml, 120 x 17 mm, PP
Steril Filter s 0.2	Sarstedt, Nümbrecht

5.1.4 Säulen und Säulenmaterial

Für die affinitätschromatographische Isolierung und Aufreinigung der Proteine wurden folgende Säulenmaterialien verwendet:

Amylosesäule	Amylose resin E8021 (15 ml) New England Biolabs Säule: $H = 20,7$ cm Ø = 2,3 cm Filter 3
Hydroxyapatitsäule BioGel HTP (3 g)	Bio Rad Säule: $H = 31,2$ cm Ø = 1,4 cm Filter 3
PD-10-Säule Sephadex [™] G-25 Medium	GE Healthcare, München Säule: $H = 8$ cm Ø = 1,5 cm

5.1.5 Vorgefertigte Lösungen und Reagenzien

BCA-Protein-Assay-Reagenz A und B	Uptima
InstantBlue™	Expedeon
QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (50)	Qiagen
Protein-Marker III (6,6-200)	AppliChem

5.1.5.1 REAGENZIEN, STAMMLÖSUNGEN UND PUFFER

Tabelle 5.1: Medien und Nährlösungen.

Stammlösung	Zusammensetzung
LB-Flüssigmedium (500 ml)	12,5 g LB-Medium ad 500 ml H ₂ O _{dd} autoklavieren, Lagerung bei 4°C
LB-Amp-Agarplatten	12,5 g LB-Medium 7,5 g Agar-Agar ad 500ml H ₂ O _{dd} autoklavieren auf 40 °C abkühlen 500 µl Ampicillin-Stammlösung zugeben Lagerung bei 4°C

Tabelle 5.2a: Verwendete Stammlösungen und Puffer für die Proteinreinigungen

Puffer für Proteinreinigung	Zusammensetzung
ASP1-Waschpuffer (1 l)	2,423 g Tris (20 mM) 11,688 g NaCl (200 mM) ad 1000 ml H ₂ O _{dd} pH 7,4, steril filtrieren 1ml PMSF-Stammlösung (0,75mM) Lagerung bei 4°C
ASP2-Elutionspuffer (1 l)	2,423 g Tris (20 mM) 1,461 g NaCl (200 mM) 3,603 g Maltose-Monohydrat (10 mM) ad 1000 ml H ₂ O _{dd} pH 7,4 , steril filtrieren 1 ml PMSF-Stammlösung (0,75 mM) Lagerung bei 4°C

Tabelle 5.3b: Verwendete Stammlösungen und Puffer für die Proteinreinigungen

Puffer für Proteinreinigung	Zusammensetzung
HAP1-Waschpuffer (1 l)	7,602 g Trinatriumphosphat Dodecahydrat (20 mM) 11,688 g NaCl (200 mM) ad 1000 ml H ₂ O _{dd} pH 7,2, steril filtrieren Lagerung bei RT
HAP2-Elutionspuffer (1 l)	190,06 g Trinatriumphosphat Dodecahydrat (500 mM) ad 1000 ml H ₂ O _{dd} pH 7,2, steril filtrieren, Lagerung bei RT
PMSF-Stammlösung (1 l)	0,31 g PMSF (0,75 M) 2,34 ml Isopropanol, votexen
SDS-Stammlösung (1 l)	1 g SDS (0,1 %) ad 1000 ml H ₂ O _{dd} steril filtrieren, Lagerung bei RT
Ethanol-Stammlösung (1 l)	200 ml Ethanol (20 % v/v) ad 1000 ml H ₂ O _{dd} Ad 800 ml H ₂ O _{dd} steril filtrieren, Lagerung bei 4°C
DL1-Puffer (5 l)	12,115 g Tris (20 mM) 7,305 g NaCl (200 mM) 2405 g Harnstoff (8 M) ad 5l H ₂ O _{dd} pH 7,4 , Lagerung bei RT
DL2-Puffer (5 l)	12,115 g Tris (20 mM) 7,305 g NaCl (200 mM) ad 5l H ₂ O _{dd} pH 7,4 , Lagerung bei RT

Tabelle 5.4: Verwendete Stammlösungen und Puffer für die *Spinlabeling*.

<i>spin labeling</i> Puffer	Zusammensetzung
DTT-Stammlösung (10 ml)	0,154 g DTT (0,1 M) ad 10 ml H ₂ O _{dd} vortexen und steril filtrieren Lagerung bei 4°C
MTS-Stammlösung (1 ml)	26,45 mg MTS (0,1 M) unter Stickstoff-Atmosphäre in 1 ml getrocknetem Acetonitril lösen Lagerung bei -80°C
SL1-Waschpuffer (1 l)	2,38 g HEPES (10 mM) 29,44 g Kaliumacetat (300 mM) ad 1000 ml H ₂ O _{dd} pH 6,7, steril filtrieren Lagerung bei RT
SL2-Elutionspuffer (1 l)	2,38 g HEPES (10 mM) 29,44 g Kaliumacetat (300 mM) 1,072 g Magnesiumacetat-Tetrahydrat (5 mM) ad 1000 ml H ₂ O _{dd} pH 6,7, steril filtrieren Lagerung bei RT

Tabelle 5.5: Verwendete SDS-PAGE Stammlösungen und Puffer.

SDS-PAGE Puffer	Zusammensetzung
1,5 M Tris-HCl (250 ml)	45,5 g Tris 1 g SDS ad 250 ml H ₂ O _{dd} pH 8,8 Lagerung bei 4°C
0,5 M Tris-HCl (250 ml)	15,5 g Tris 1 g SDS ad 250 ml H ₂ O _{dd} pH 6,8 Lagerung bei 4°C
SDS-Lösung (10 % w/v)	5 g SDS ad 50 ml H ₂ O _{dd}
SDS-Probenpuffer (100 ml)	50 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 40 ml Glycerin 1,24 g SDS 1,5 mg DTE 0,16 g Bromphenolblau Volumenangabe (5 %) 2-Mercaptoethanol ad 100 ml H ₂ O _{dd}
Laufpuffer-SL (10x) (2 l)	288 g Glycin (2 M) 60 g Tris-HCl, pH 8,3 (250 mM) g 20 g SDS (1 %)

Tabelle 5.6: Verwendete Puffern für ANS und CD-Messungen

Puffer	Zusammensetzung
CGH5-Puffer (500 ml)	0,736 g sodium citrat (5 mM) 0,188 g Glycin (5 mM) 0,596 g HEPES (5 mM) ad 500 ml H ₂ O _{dd} Lagerung bei 4°C
CGH10-Puffer (500 ml)	1,471 g sodium citrat (10 mM) 0,375 g Glycin (10 mM) 1,192 g HEPES (10 mM) ad 500 ml H ₂ O _{dd} Lagerung bei 4°C

5.1.6 MBP-Sequenz mit Plasmidarchitektur

Bakterienstämme und Plasmide *E. coli*-Stamm:

BL21(DE3) Gentyt : $BF^- dcm ompT hsdS_B (r_B^-, m_B^-) gal dcm (DE3)$

Die in dieser Arbeit verwendeten pMal-Plasmide wurden von Indu *et al.* aus dem Labor von Prof. Dr. Raghavan Varadarajan, Indian Institute of Science, Bangalore, Indien zur Verfügung gestellt. In welchem Protein welches Plasmid verändert wurde, ist im Folgenden angegeben.

MBP1: pMalp2 P298C T31C MBP	Resistenz Amp.
MBP2: pMalp2 P298C D82C MBP	Resistenz Amp.
MBP3: pMalp2 P298C N124C MBP	Resistenz Amp.
MBP4: pMalp2 P298C K175C MBP	Resistenz Amp.
MBP5: pMalp2 P298C K313C MBP	Resistenz Amp.
MBP6: pMalp2 P298C Q325C MBP	Resistenz Amp.
MBP7: pMalp2 P298C S238C MBP	Resistenz Amp.

Die Abkürzung „P298C T31C MBP“ bedeutet durch gezielte Mutationen werden die Aminosäuren Prolin an der Stelle 298 und Threonin an der Stelle 31 in der AS-Sequenz des MBP-Wildtyps jeweils durch Cystein ersetzt. Der entsprechende Mutant wurde MBP1 genannt. Ebenso sind die Bezeichnungen der anderen sechs Mutanten zu verstehen.

Nachfolgend ist die Aminosäuresequenz des MBP-Wt angegeben. Die Aminosäuren die durch Cysteine ersetzt wurden sind entsprechend der Mutanten farbig markiert.

MBP-Sequenz (Wildtyp) (RCSB, PDB ID:1omp):

```

1   KIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDII
61  FWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSIIYNKD
121 LLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKD
181 VGVDNAGAKAGLTLFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKV
241 NYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLG
301 AVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEA
361 LKDAQTRITK

```

5.2 Biochemische Methoden

Alle Geräte wurden durch Autoklavieren entkeimt und die nicht autoklavierbaren Gegenstände wurden mit alkoholischer Lösung (70 %iges Ethanol) desinfiziert.

5.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz der Plasmid-DNA in *E. coli* BL21(DE3) wurden zur Erzeugung der Kompetenz Zellen eingesetzt, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase mit geringer Zelldichte befunden hatten und die mit Calciumchlorid behandelt wurden.

500 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer 10 ml -Übernachtskultur angeimpft und für ca. 1,5 Stunden bei 37°C unter kräftigem Schütteln bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,2 bis 0,3 je Milliliter Kultur inkubiert. Zur Ernte wurden die Zellen in der Zentrifuge für 5 Minuten bei 4°C und 2500 rpm sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml vorgekühlter 75 mM Calciumchlorid-Lösung resuspendiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und nochmals für 5 Minuten bei 4°C, 2500 rpm zentrifugiert. Das sichelförmige Zellpellet wurde in 1 ml vorgekühlter 75 mM Calciumchlorid- 25% Glycerin- Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei -80° C sind die so erhaltenen kompetenten Zellen mehrere Monate haltbar.

5.2.2 Transformation der kompetenten Zellen

Die Transformation der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte nach dem Verfahren von Hanahan (Hanahan D., 1983). Ein 100 µl Aliquot kompetenter Bakterienzellen (BL21(DE3)) wurde mit 5 µl der Plasmid-DNA versetzt und einstündig auf Eis aufgetaut und inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C im Thermomixer. Anschließend wurde das zur Zellsuspension 500 µl vorgewärmte LB-Medium ohne Antibiotika zugegeben und für 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Minute Zentrifugieren bei 3000 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5415C) wurde der Überstand verworfen, 150 µl der restlichen Zellsuspension wurden auf die LB-Amp-Agarplatte gut verteilt und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Ende wurde die Platte mit Parafilm versiegelt und bei 4 °C gelagert.

5.2.3 Kleinkultur

Zuerst wurden 15 µl Ampicillin in 15 ml autoklaviertem LB-Flüssigmedium zugesetzt. Anschließend wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers eine einzelne Kolonie von den transformierten Zellen gepickt und dazu hinzugegeben. Die Inkubation wurde bei 37 °C, 200 rpm (Thermo Scientific, MaxQ 400) für etwa sechzehn Stunden durchgeführt (Standard Bedingungen).

5.2.4 Glycerinkulturen

In einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß wurden 500 µl autoklaviertes Glycerin (100 %) zusammen mit dem gleichen Volumen an Übernachtskultur vorsichtig resuspendiert, schockgefroren (in flüssige Stickstoff) und bei – 80 °C gelagert.

5.2.5 Plasmidisolierung (Miniprep)

Die Plasmidisolierung wurde mithilfe dem QIAprep Spin Miniprep Kit (50) von Qiagen (Vorschrift des beiliegenden Protokolls) durchgeführt wurde. Die erhaltenen 50 µl Plasmidlösung wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

5.2.6 Großkultur

12,5 ml der Übernachtskultur wurden in 500 ml autoklaviertem LB-Flüssigmedium in einem zwei Liter Erlenmeyerkolben geimpft und mit 500 µl Ampicillin Antibiotika versetzt. Die Wachstumsbedingungen waren gleich wie zuvor bei der Kleinkultur. Zur Kontrolle des Wachstums war eine Messung der optischen Dichte (OD) des Wachstumsmediums bei 600 nm notwendig. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 wachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Induktion mit einer 500 µl IPTG und die Inkubation wurde unter gleichen Inkubation Bedingungen über Nacht fortgesetzt.

5.2.7 Zellaufarbeitung

Das Zellwachstum der Kulturen wurde durch 15 minütige Inkubation auf Eis gestoppt. Die ÜNK wurde für 20 min bei 4110 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets bei 4 °C im Wasserbadschüttler HTBTR 112 in 50 ml ASP1-Waschpuffer resuspendiert und danach mit dem Ultraschallgerät bei 70 % Leistung 13 mal für 10 Sekunden mit je 20 Sekunden Pause im Eisbad lysiert. Die Suspension wurde erneut bei 19300 rcf für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde in 20 ml Fraktionen aliquotiert. Nach dem Schockfrieren wurde das Lysat bei -80 °C gelagert.

5.3 Chromatographische Methoden

5.3.1 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie

Diese Methode beruht auf der hohen Affinität des Proteins zu seinem Substrat bzw. seinem Liganden. Bei Proteinen sind dies oft Interaktionspartner wie Enzym-Substrat, Antikörper-Antigen, Enzym-Koenzym. Dass ein Substrat bzw. ein Ligand des gewünschten Proteins kovalent an das Säulenmaterial gebunden wird, ist eine Voraussetzung in dieser Methode. Die Trennung erfolgt über eine Säule (engl. *Collum*) damit Protein und Liganden effizient wechselwirken können und keine Behinderung darstellt. Das Säulenmaterial wird dann in einem entsprechenden Laufpuffer oder Waschpuffer genannt, über die Säule gegossen, wobei das gesuchte Protein gebunden wird, während

andere Proteine bei diesem Schritt eluieren. Die selektiv an die Säule gebundenen Proteine können dann durch Zugabe eines Überschusses an Substrat oder Ligand wieder von der Säule eluiert werden. Diese Technik ist sehr effizient und liefert meistens sehr reines Protein.

5.3.2 Die Trennung von MBP

Das Maltose-Bindungsprotein kann von anderen Proteinen mittels Amylose-Affinitätschromatographie getrennt werden. Eine Amylosesäule wurde so lange mit ASP1-Waschpuffer gespült (ca. 100 ml), bis die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 280 nm konstant bleibt (Basis). Anschließend wurde das Lysat auf die Säule aufgetragen und wieder mit ASP1-Waschpuffer gespült, bis die Fluoreszenz auf dem Basiswert verbleibt, dann wurde das Eluat gesammelt nach der Zugabe des ASP2-Elutionspuffer gesammelt, anschließend wurde die Proteinlösung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ schockgefroren und gelagert.

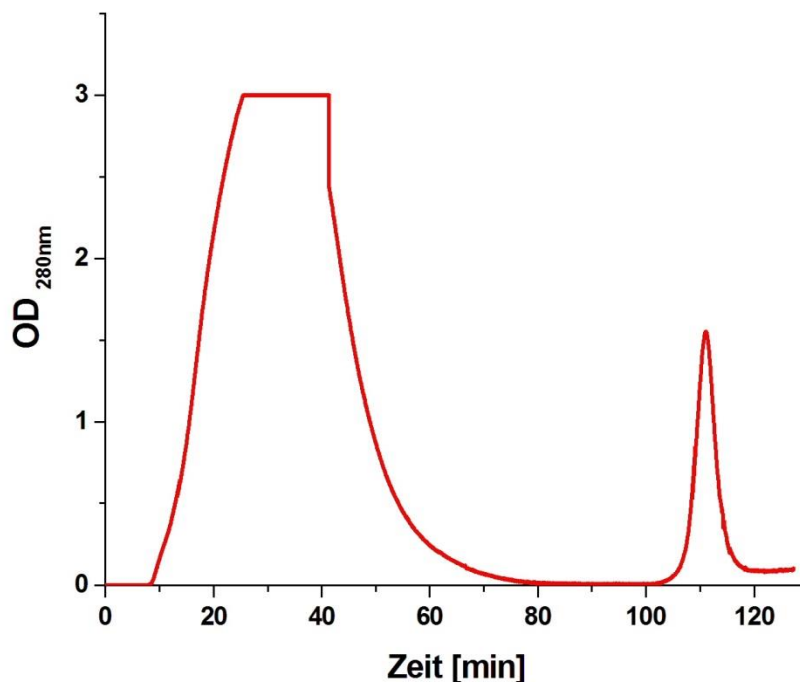


Abbildung 5.1: Chromatogramm der Mutante MBP6. Die nicht an das Säulenmaterial gebundenen Proteine werden mit dem Säulenpuffer ASP1 rausgewaschen (erster Peak), und das gebundene MBP wird mit ASP2-Elutionspuffer eluiert (zweiter Peak).

Die Regenerierung der Amylose Säule erfolgte durch Zugabe von zwei Säulenvolumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ (ca. 30 ml), und nacheinander 30ml SDS-Lösung (0,1 %, RT), ein Säulenvolumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, zwei Säulenvolumen APS1-Waschpuffer und schließlich mit zwei Säulenvolumen Ethanol-Lösung (20 % v/v) gespült. Die Amylosesäule wurde anschließend bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt (Kühlraum).

5.3.3 Entfernung der Maltose mittels Hydroxyapatitsäule

Um Maltose von MBP zu entfernen wurde zuerst die Hydroxyapatit-Chromatographie verwendet. Dafür wurden 2 bis 3g Hydroxyapatit Bio-Gel[®] HTP Bio-Rad in 100 ml HAP1-Waschpuffer gegeben und die Suspension wurde für eine Stunde gerührt. Danach wurde das Gemisch kurz stehengelassen und der Überstand vorsichtig abdekantiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und im Anschluss wurde das Gemisch für einen Tag aufquellen gelassen, bevor es in eine Säule gegossen wurde. Mit einer konstanten Durchflussrate von 2,5 - 3,0 ml/min ließ sich die Hydroxyapatitmatrix sedimentieren und danach folgte die Zugabe von 50 ml HAP1 Wasch-Puffer.

Anschließend wurde die Proteinlösung unter einer Pumpen-Durchflussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen und wieder mit 50 ml HAP1-Waschpuffer gewaschen. Dann folgten 40 ml HAP2-Elutionspuffer und anschließend wurden die ersten 30 ml Eluat gesammelt. Die größte Menge MBP sollte sich allerdings in den ersten 8 – 10 ml nach Austritt der Elutionsfraktion befinden. Die Regenerierung der Säule erfolgte mit 100 ml HAP1-Waschpuffer und diese wurde dann bei Raumtemperatur gelagert. Eine solche Säule wurde bis zu dreimal verwendbar.

Das aufgefangene Protein wurde bei 15 °C, 2906 rcf auf ca. 3 ml aufkonzentriert (Vivaspin MWCO 10.000 (20 ml)) und bei -20 °C gelagert. Es folgte ein BCA-Test (Kap. 6.2.1) und eine SDS-PAGE (Kap. 6.5) um zusammen mit dem Volumen der aufkonzentrierten Lösung jeweils die gesamte aufgereinigte Proteinmenge zu bestimmen und ihre Reinheit zu charakterisieren.

5.3.4 Entfernung von Maltose mittels Dialyse

Die Maltose-Entfernung mithilfe der Hydroxyapatitsäule erfolgte unter einem großen Verlust an Proteinen. Die Verwendung der Hydroxyapatitsäule hatte zudem nur teilweise funktioniert (siehe Kap. 3.4.). Deshalb wurde die Maltose-Entfernung erneut mittels Dialyse durchgeführt: Die Proteinlösung aus der Amylosesäule wurde bei 4 °C, 2906 rcf auf 50 ml aufkonzentriert und in einen Dialysierschlauch gefüllt. Zum Dialysieren wurde der Dialysierschlauch Visking, Cellulose Typ 27/32 Inch von Roth verwendet. Der Dialysierschlauch wurde 4 Stunden (ggf. über Nacht) in 5 l DL1-Lösung getaucht. Dabei dient 8 M Harnstoff als Denaturierungsmittel, damit sich das Protein entfaltet und die Maltose vom Protein abgelöst werden kann. Nach zweimaligem Umtausch des Puffers war die Dialyse abgeschlossen.

5.3.4.1 RENATURIERUNG VON MBP MIT DROP DILUTION

Die *drop dilution* diente der langsamen Zurückfaltung des Proteins. Die Proteinlösung aus der Dialyse wurde durch eine Pumpe zu einer Menge an DL2-Puffer unter leichtem Rühren tropfenweise zugegeben. Die Durchflussrate soll mit einer Pumpe so eingestellt werden, dass erst nach dem Verschwinden des Schleiers von dem letzten Tropfen der nächste Tropfen in die Lösung fällt.

5.3.4.2 ENTFERNUNG VON HARNSTOFF MITTELS DIALYSE

Um Harnstoff-Reste vom dem Protein zu entfernen wurde erneut eine Dialyse durchgeführt. Diese erfolgte prinzipiell wie unter 5.3.4 beschrieben ist, jedoch unter Verwendung der DL2-Lösung als Dialysepuffer. Zum Schluss wurde das Protein bei 4 °C, 2906 rcf auf ca. 3 ml aufkonzentriert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.3.5 Gel Filtration bei Verwendung der PD-10-Säule:

Zur Entsalzung und zum Puffer Austausch können Amersham Biosciences PD-10 Entsalzungssäulen mit Sephadex™ G-25 Medium zur Trennung von groß- ($M_r > 5000$) und kleinemolekularen ($M_r < 1000$) Substanzen dienen. Als Beispiel ist ein typisches Chromatogramm zur Entsalzung der Proteinprobe (Albumin) mit einer PD10-Säulen gezeigt (Abb. 5.2).

Zuerst wurden die PD-10 Säulen mit 30 ml destilliertem Wasser gewaschen und anschließend die Probe mit 25mg Humanserumalbumin in 2,5 ml 0,5 M NaCl Lösung hinzugegeben. Insgesamt 23,8 mg Albumin wurden in 3,5 ml Elutionsmittel erhalten, dies entspricht einer Ausbeute von 95,3 % (Menge zwischen den Pfeilen).

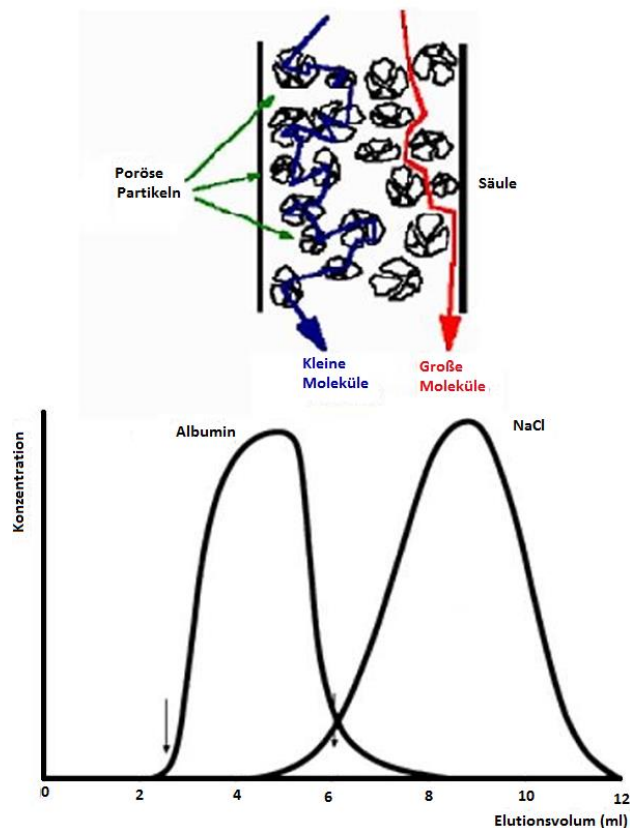


Abbildung 5.2: Albumin-Entfernung von NaCl-Lösung mittels Eine PD-10 Säule.

5.4 Spinlabeling

Die Modifizierung des MBP erfolgte grundsätzlich mithilfe der Gel-Filtration unter Verwendung einer PD-10-Säule (Sephadex G 25 M GE Healthcare).

1,17 ml Proteinprobe wurden mit 130 µl DTT-Stammlösung (100 mM) gemischt (Endkonzentration von DTT entspricht 10 mM) und im Dunkeln bei RT und 6 rpm (Stuart Rotator SB3) für 3 Stunden inkubiert. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 30 ml SL-1 Puffer wurden 1,3 ml der o. g. Probe mit 1,2 ml SL-1 Puffer auf die Säule aufgetragen und einsickern gelassen. Danach erfolgte die Elution mit 3,5 ml SL-1 Puffer. Dieses Eluat wurde bei 4 °C und 2906 rcf auf ca. 1 ml aufkonzentriert und durch einen BCA Test wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Das MTS wurde mit 10-15-fachem molarem Überschuss zur Proteinprobe gegeben. Nach Formel 5.4.1 wurde die benötigte Menge von MTS berechnet.

$$V_{MTS} = \frac{c_{MBP} [\text{mg/ml}] \cdot V_{MBP} [\text{ml}] \cdot n_{MTS}}{MW_{MBP} [\text{mg/mol}] \cdot c_{MTS} [\text{mol/l}]} \quad (5.4.1)$$

V_{MTS} : benötigte Volumen von MTS

C_{MBP} : Konzentration der Proteinprobe

V_{MBP} : Volumen der Proteinprobe

n_{MTS} : Überschuss von MTS

M_{MBP} : Molekulare Masse von MBP

C_{MTS} : Konzentration der MTS-Stammlösung (0,1 M)

Nach Zugabe von MTS wurde das Gemisch im Dunkeln bei 4 °C und 2 rpm (Stuart Rotator SB3) über Nacht inkubiert. Durch die PD-10-Säule wurde erneut wie oben erwähnt, jedoch mit SL-2 Puffern, überschüssiges ungebundenes MTS entfernt. Die Proteinprobe wurde bei 4 °C und 2906 rcf auf ca. 400 µl aufkonzentriert, nach Bestimmung der Konzentration schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.5 Allgemeine Arbeitsmethoden

5.5.1 Konzentrationsbestimmungen

5.5.1.1 UV/VIS-Spektroskopie

Die starke Absorption von UV-Licht durch Proteine ermöglicht eine schnelle Analyse von Protein-Proben, einschließlich Protein-Kristallen, durch Mikroskopie und Mikrospektroskopie. Auf Aminosäure-Ebene wird die optische Absorption von Proteinen bei 280 nm gemessen.

Bei dieser Wellenlänge ist die Absorption von Protein vor allem aufgrund der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein mit ihre absinkende molaren Absorptionskoeffizienten (Layne E., 1957) verbunden. Der molare Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm hängt selbst von den relativen Konzentrationen dieser drei Aminosäuren ab. Daher können unterschiedliche Proteine verschiedene Absorptionskoeffizienten haben und daher kann auch die Wellenlänge der maximalen Absorption abweichen. Diese Tatsache kann verwendet werden, um Proteine durch relativ schnelle und einfache optische Tests zu charakterisieren. Darüber hinaus kann das Bakterienwachstum durch die Bestimmung der scheinbaren Absorption bei 600 nm verfolgt werden. Werte bis zu einer scheinbaren Absorption von 3,0 E konnten direkt gemessen werden, für dichtere Kulturen wurde die Probe mit LB 1:10 vorverdünnt.

5.5.1.2 PROTEINBESTIMMUNG MITTELS BICINCHONINSÄURE-(BCA)-ASSAY

Zur Konzentrationsbestimmung des Proteingehalts wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Diese Methode nutzt die Entstehung eines Farbkomplexes von Cu^+ mit Na-Bicinchoninat unter alkalischen Bedingungen. Cu^{2+} wird durch ein Protein zu Cu^+ reduziert, welches mit 2 Bicinchoninat einen Komplex bildet. Die Absorption dieses Komplexes wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert (Smith P.K. *et al.*, 1985). Die Durchführung erfolgt laut der Beschreibung des Praktikumsskripts (Trommer W.E, 2012).

5.5.1.3 BRADFORDTEST

Diese Methode nach (Bradford, 1976) dient auch wie der BCA-Test der quantitativen Proteinbestimmung. Sie baut auf einer Farbreaktion unter Beteiligung des Säurefarbstoffs Coomassie Brilliant-Blue G 250 auf. Dieser Farbstoff bindet in saurer Lösung an Proteine und dessen charakteristisches Absorptionsmaximum verschiebt sich von 465 auf 595 nm. Der Farbstoff adsorbiert Proteine und die Komplexierung bewirkt eine Übertragung seiner Absorptionsspitze die von rot nach blau wechselt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode nur als qualitativer Schnelltest bei der Affinitätschromatographie (siehe Kap. 5.3) und bei dem Spinlabeling (siehe Kap. 5.4) vorgenommen. Die Durchführung erfolgte nach dem Praktikumsskript (Trommer W.E., 2010). Zur Herstellung des Bradford – Reagenz wurden 0,1 g Coomassie Brilliant-Blue G-250 in 50 ml 50 % -igem Ethanol (v/v)

gelöst. Dann wurden 100 ml 85-% -ige Phosphorsäure hinzugegeben und mit destilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Vor Gebrauch wurde das Reagenz im Volumenverhältnis 1:4 mit destilliertem Wasser gemischt und filtriert (Bradford M.M., 1976; Holtzhauer M., 1988).

Zur Proteinbestimmung in den 1 ml - Fraktionen wurde jeweils ein Volum von 15 µl entnommen und zu 1 ml Bradford Reagenz pipettiert und gut vermischt. Nach 2 Minuten war der Farbkomplex stabil. Die Extinktionsmessung erfolgte in Kunststoffküvetten bei 595 nm.

5.5.2 Disk-SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-PAGE stellt neben der Reinheitskontrolle von Proteinlösungen ebenfalls eine Methode zur Molekulargewichtsabschätzung der Proteine dar. Sie ist ein Trennungverfahren, welches die geladene Proteinmoleküle in einem Gel unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes migrieren lässt.

Das Polyacrylamidgel wird durch Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid in Gegenwart von polymerisationsinitiierenden Mitteln (TEMED & Ammoniumpersulfat (APS)) erstellt. Über eine höhere Acrylamidkonzentration sind die größeren Poren kleiner und die Moleküle im Gel weiter eingeschränkt.

Die Gelmatrix ist in zwei Bereiche unterteilt, das Sammelgel und das Trenngel. Diese Bereiche unterscheiden sich sowohl in der Porengröße, als auch im pH-Wert. Die unterschiedlichen pH-Werte, die auf die isoelektrischen Optima des Tris-Chlorid/Tris-Glycin Puffersystems abgestimmt sind, führen im Sammelgel zu einem elektrischen Feldgradienten, welcher eine Stapelung der Proteine in eine schmale Bande zur Folge hat. Im Trenngel hingegen bewegen sich die Proteine mit einer konstanten Geschwindigkeit. In Gegenwart von SDS erhalten Proteine eine negative scheinbare Ladung, so dass sie alle zur Anode migrieren. Dies bedeutet, dass nur das Molekulargewicht des Proteins Faktor der Trennung ist. Proteine mit niedrigem Molekulargewicht werden weniger in den Poren des Polyacrylamidgels gehalten und können dann weiter als die Großen migrieren.

Durch den dortigen Siebeffekt kann man Proteingemische in ihre Einzelkomponenten auftrennen und deren Massen anhand eines Proteinmarkers (AppliChem Protein Marker III) über einen relativen Beweglichkeitskoeffizienten R_f ermitteln (Weber K. & Osborn M., 1969). Die Durchführung erfolgt nach dem Biochemischen Praktikumsskript (Trommer W.E., 2010; Smith P.K., 1984) unter Verwendung des in Tabelle 5.7 angegebenen Probenpuffers.

Tabelle 5.7: Zusammensetzung von Trenngel bzw. Sammelgel für ein Gel.

	Trenngel (10 %)	Sammelgel (4 %)
H ₂ O _{dd} (ml)	1,90	3,00
Acrylamid (30 %) (ml)	1,65	0,65
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (ml)	1,25	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (ml)	-	1,25
SDS (10 % w/v) (μl)	50	50
APS (10 %) (μl)	25	25
TEMED (μl)	5	5

Der SDS-Probenpuffer wurde 1 : 1 mit den Proteinproben gemischt und bei 92 °C, 400 rpm für 2 min inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200V. Angefärbt wurde das Gel mit Page-Blue. Als Standard wurde Protein-Marker III (6,6-200) (AppliChem) verwendet. Die Gele wurden auf der Lichtbank fotografiert und mit dem Programm UVP Doc ItLS nachbearbeitet. Um die Reinheit der Proteine zu bestimmen, wurden die Gele zudem densitometrisch vermessen (Hirschmann elscript 400).

5.5.3 Proteinaufkonzentrierung

5.5.3.1 AUFKONZENTRIERUNG/PUFFERAUSTAUSCH MIT KONZENTRATOREN

Diese Methode basiert auf der Verwendung spezieller Membranen für die Erhöhung der Konzentration der Proteinlösungen. Die Porengröße wurde so gewählt, dass sie für kleinere Moleküle durchlässig ist, jedoch solche mit größerem Durchmesser als dem der Poren zurückhält und diese somit aufkonzentriert. Durch geeignete Wahl der Poren-größen kann sowohl die Protein-Konzentration einsteigen, als auch die Reinheit der Proteine erhöhen.

Für diese Arbeit wurden die Konzentratoren bei ca. 4000 rpm so lange zentrifugiert (Heraeus Minifuge T, Eppendorf Centrifuge 5810R) bis sich die gewünschten Volumina der Proteinlösungen erreicht werden. Um die Vivaspin Röhrchen-Membran von den Konservierungsstoffen zu befreien, wurden sie immer vor Anwendung mit autoklaviertem H₂O_{dd} für mindestens 10 min gewaschen.

5.6 Massenspektrometrische Methoden

5.6.1 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

Der Erfolg der Aufreinigung von MBP wurde unter der Verwendung einer MALDI Massenspektroskopie verifiziert (Kap. 3.1).

Die Probenvorbereitung der MBP Mutanten erfolgte nach dem Zip-Tip® Handbuch für Reversed-Phase (Millipore, Schwalbsch / Ts, Deutschland). Anschließend wurden die Proben auf die Anchor Chip Target® unter Verwendung des getrockneten Tropfen Verfahren mit gesättigter Sinapinsäure als Matrix-Lösung aufgetragen. Die Kalibrierung wurde mit den Kalibrierstandards Protein I (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Die Spektren wurden im LinTOF Verfahren im positiven Messbereich mit einer Beschleunigungsspannung von 25 kV aufgenommen.

5.6.2 Fluoreszenzspektroskopie und ANS-Bindung

Dieses spektroskopische Verfahren nutzt Fluoreszenz-Phänomene um qualitative und quantitative Eigenschaften von Substanzen nachzuweisen, hierbei wird die Emission und nicht die Absorption von Strahlung gemessen.

Die ANS Bindung wurde durch Fluoreszenzspektroskopie bei 25 °C in einem Perkin Elmer LS-5 Spektrofluorimeter unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emission Wellenlänge von 478 nm mit einer spektralen Bandbreiten von 10 und 3 nm für jeweils die Emission und die Erregung beobachtet. Das Konzentrationsverhältnis von jeweils MBP und ANS war 1 zu 100 µM. Die Emissionsspektren wurden über den Wellenlängenbereich von 420 bis 550 nm aufgefangen. Jedes Spektrum bestand aus einem Durchschnitt von vier aufeinander folgenden Scans. Puffer-Spektren (CGH 10 Puffer, 10 mM jeweils von Citrat, Glycin und HEPES, pH 7,4) wurden unter ähnlichen Bedingungen erfasst und von den Proteinspektren vor der Analyse subtrahiert.

5.6.3 CD-Experimente

Die Messungen wurden an einem Photophysis Chirascan™-plus Spektropolarimeter (mit einer Peltier-Temperaturregelung ausgestattet) bei 25 °C durchgeführt. Die CD-Spektren wurden mit einer Bandweite von 1 nm, einer Integrationszeit von 1 s und einer Schrittweite von 0,1 nm aufgenommen. Bei einer Messgeschwindigkeit von 10 nm/min wurden 3 Einzelspektren akkumuliert. Vor der Messungen wurden die Proben 2 - 3 Stunden bei RT inkubiert.

Für die Fern-UV-CD-Probe (185 - 250 nm) wurde eine Proteinkonzentration von 0,1 bis 0,2 mg/ml in CGH5 Puffer (Citrat, Glycin und HEPES jeweils 5 mM und (-/+) 10 mM Maltose) aufgelöst und dann in einer 1 mm-Zellen platziert.

Für die Nah-UV-CD-Messungen (250 - 320 nm) wurden 0,5 mg/ml Protein im gleichen CGH Puffer wie für die Fern-UV-CD-Probe aber im 10 mM Überschuss gelöst und dann in einer 10 mm-Zellen zur

Messung platziert. Die hierbei aufgezeichneten Spektren wurden mit einer Integrationszeit von 5 s aufgenommen.

In Gegenwart von Harnstoff und GdnHCl wurde MBP in 10 mM CGH-Puffer, pH 7,4, für 2 - 3 h inkubiert. Die CD-Spektren wurden wie oben beschrieben im Fern-UV Bereich aufgenommen.

Für die thermische Entfaltung wurde das MBP wie oben beschrieben unter Fern-UV Bedingungen eingesetzt. Die Entfaltung wurde bei 220 nm mit einer Heizrate von 80 °C / h von 20 bis 85 °C verfolgt. Außerdem wurden Fern-UV-CD-Spektren wie oben beschrieben bei 85 °C aufgenommen.

Die Basislinien-Puffer wurden aus den Daten normalisiert und subtrahiert. Die Auswertung der Daten wurde mittels der ORIGIN-Software durchgeführt.

5.6.4 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine hoch sensitive Methode um Wärmeänderungen zur Charakterisierung von Biomakromolekülen in Lösung zu nutzen (Perozzo, *et al.*, 2004). Sie dient der Bestimmung thermodynamischer Parameter (wie der Assoziationskonstante (K_a), der Enthalpie (ΔH), der Entropie (ΔS), der freien Energie (ΔG) und der Stöchiometrie (Leavitt S. und Freire E., 2001; Perozzo R. *et al.*, 2004) vieler biochemischer Molekül-Ligand-Interaktionen (Praefcke G.J. *et al.*, 2005), wie z. B. Antigen-Antikörper, Protein-Zucker oder Enzym-Substrat.

In Abbildung 5.3 ist die Funktionsweise eines Isothermen Titrationskalorimeters schematisch dargestellt und in Abbildung 5.4 ist ein Beispiel eines typischen ITC-Experimentes gezeigt.

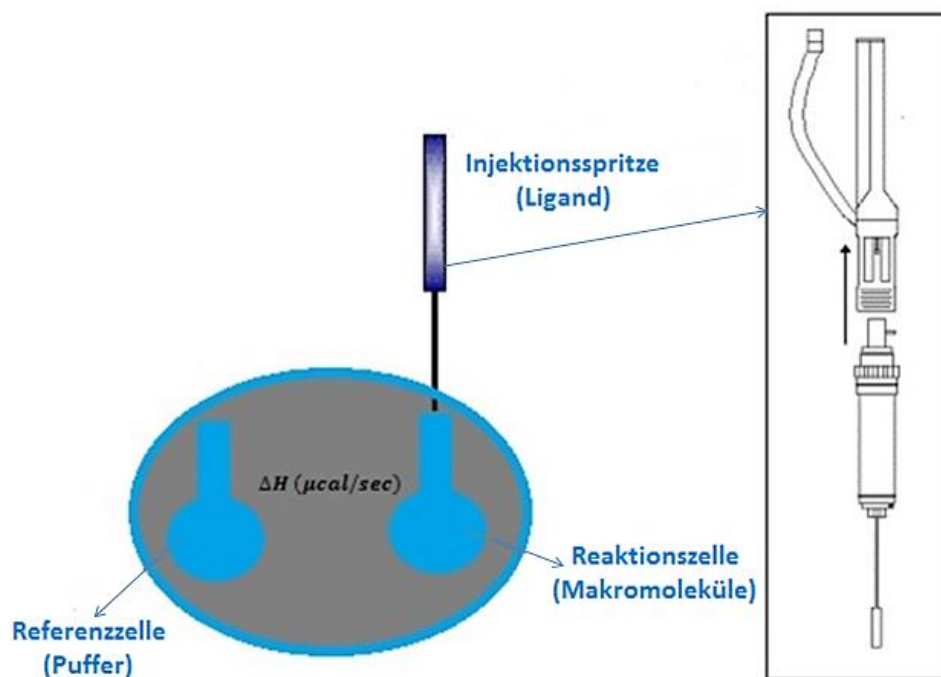


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung eines ITC-Geräts.

Die Reaktionszelle enthält in der Regel das Makromolekül in einem Puffer. Den Puffer verwendet die Referenzzelle, um das Makromolekül zu lösen. Die Injektionsspritze enthält den Liganden (L), der ebenfalls in dem gleichen Puffer gelöst wurde. Diese Lösung wird in der Reaktionszelle durch kleine aufeinanderfolgende Injektionen eingeführt. Bei jeder Injektion wird die Energiedifferenz zwischen der Referenzzelle und der Zellreaktion aufgezeichnet und auf einem Thermogramm (Oberes Diagramm in Abb. 5.4) angegeben. Die Integration der Oberfläche jeder der Spitzen wird dann benutzt, um eine bindungsisotherme Darstellung zu erzeugen, die die Änderung der Enthalpie in Abhängigkeit von dem molaren Verhältnis von wechselwirkenden Molekülen (untere Diagramm in Abb. 5.4) repräsentiert.

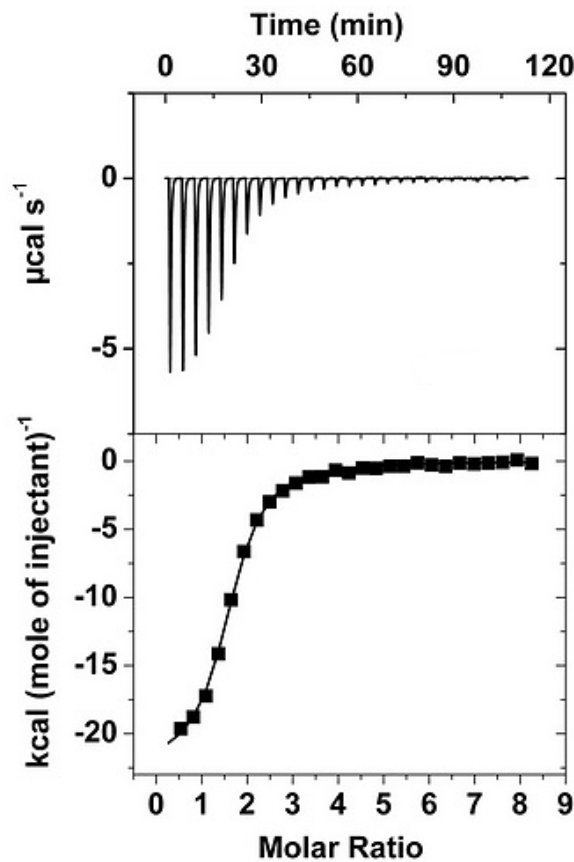


Abbildung 5.4: Beispiel für ein Thermogramm (Oben) und eine Bindungsisotherme (unten) eines ITC-Experiment. Hierfür wurde Cytosin-Monophosphat (CMP) auf eine RNase titriert. In dem oberen Teil der Abbildung sind die Primärdaten der Messung in Form von Wärmesignalen zu sehen, bei dem unteren Teil die Auswertung der Messdaten.

Alle ITC-Messungen wurden unter Verwendung des iTC200 Isothermal Titration Calorimeter von GE Healthcare in dem Molecular Biophysics Labor von Prof. Dr. Keller in der TU Kaiserslautern durchgeführt. Die Vorbereitung der Versuche erfolgte nach dem Handbuch (iTC₂₀₀ User Guidelines) von Prof. Keller.

Dabei wurde eine Endkonzentration von 1 μM und 14 μM von jeweils MBP und Maltose für alle Titrationen verwendet. Die Messungen des MBP im *molten globule* Zustand wurden bei pH 3,3 in CGH5-Puffer durchgeführt, während für den nativen Zustand bei pH 7,0 in DL2-Puffer gemessen wurde. Protein- und Liganden-Puffer wurden getrennt in der Zelle bei 25 °C für 3 h inkubiert. In die Referenzzelle wurde Wasser gefüllt. Die Messzelle enthielt die wässrige Probe (MBP) mit dem Reaktionspartner (Maltose). Zwei Versuche wurden durchgeführt mit 20 und 40 Injektionen mit je 2 μl Lösung in einem Intervall von 4,2 Minuten, bis eine Sättigung beobachtet wurde. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse garantieren zu können, wurde bei allen Messungen eine Rotationsgeschwindigkeit von 310 rpm gewählt. Die Temperatur betrug 5 °C innerhalb einer Genauigkeit von 0,01 °C. Die Verdünnung des Liganden beziehungsweise des Proteins in dem Puffer wurde bestimmt und als Verdünnungskorrekturen vor der Datenanalyse aufgenommen.

Die Daten wurden mit der NITPIC und SEDFIT Software (Keller S. *et al.*, 2012) ausgewertet, und dann mit der Origin Software analysiert. Wegen des bei *molten globule* nicht erfolgreichen ersten ITC-Versuchs, wurden diese Messungen erneut wiederholt, diesmal jedoch mit einem 30-fachen Überschuss der Konzentration von Maltose.

5.7 Elektronenparamagnetische-Resonanz (EPR)

Elektronenparamagnetische-Resonanz (EPR), auch Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) genannt, ist eine Technik, die verwendet wird, um chemische Spezies mit ungepaarten Elektronen zu untersuchen. Die EPR-Spektroskopie spielt eine wichtige Rolle für das Verständnis der organischen und anorganischen Radikalen, Übergangsmetallkomplexe, und einiger Biomoleküle. In der EPR wendet man entweder die kontinuierlich- (cw, engl. continuous wave) oder die Puls-Methode an. Bei der cw-ESR entsteht das Spektrum durch Einstrahlen einer konstanten Mikrowellenfrequenz, während das Magnetfeld im Verlauf der Messung variiert wird. Bei der Puls-Technik (Schweiger, A. & Jeschke, G., 2001) wird das Spektrum durch einen Mikrowellenimpuls bei konstantem Magnetfeld erzeugt. Dieser Puls führt zu einer Zeitabhängigkeit des effektiven Hamiltonoperators.

5.7.1 Continuous Wave-EPR Messungen (X-BAND)

Zur Aufnahme aller cw- bzw. Puls-EPR-Spektren stand ein kommerzielles EPR-Spektrometer der Firma BRUKER, Flexline Resonator ER 4118X MD5, mit einer durchstimmbaren Arbeitsfrequenz von $\nu = 9,1\text{--}10,1\text{GHz}$ (X-Band) zur Verfügung gestanden. Es ist eine Spektrometerskizze bzw. ein schematischer Aufbau eines cw-ESR Spektrometers in den Abbildung 1.11 in Kapitel 1 zu sehen.

Die Steuerung des Spektrometers erfolgte über das Programm Xepr. Bei einer Mikrowellenleistung von 15 dB (= 6,392 mW) konnte das Tuning im Bereich von 50 – 12 dB erfolgen. Die Aufzeichnungen entstanden unter Verwendung von Quarzkapillaren mit 1 mm Innendurchmesser. Gemessen wurde bei einer Temperierung von ca. 298 K (RT) sowie unter Heliumkühlung bei 80 K für

Tieftemperaturmessungen (siehe Kap. 3.5.3). Die Messparameter sind im Anhang (Kap. 6.1) aufgelistet.

5.7.1.1 TIEFTEMPERATURMESSUNGEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Tieftemperaturkühlsystem installiert und in Betrieb genommen. Hier soll nun die Vorgehensweise zur Tieftemperaturmessung bei Verwendung von flüssigem Helium als Kühlmittel im Einzelnen dargestellt werden. Anstatt des Dummies wird nun der Helium-Transferarm in das Kryostat eingeführt.

Für eine erfolgreiche Abkühlung des Systems war ein dauerhaftes Evakuieren der äußeren Vakuumkammer des Kryostates und der Transferröhre notwendig. Der Dewar für den Referenztemperaturfühler musste mit flüssigem Helium gefüllt sein. Floß das Helium, so stellte sich bei einer Durchflussrate von 0,5 L/h ein Druck von ca. 900 mbar (Kontrolle über VC 31) ein. Durch die Temperaturkontroll-Einheit (ITC 503) kann man die Temperatur im Resonator folgen.

Probenvorbereitung (natives MBP)

Nach Einschalten der Temperaturkontrolleinheit wurde die gewünschte Temperatur gewählt, die Abkühlung des Systems dauert etwa 1 Stunde. Anschließend konnte die Probe eingeführt und das Spektrometer getunt werden. Zur Verhinderung der hohen Temperaturdifferenzen bei Einführung der Probe in den Resonator, wurde die Probe in gekühltem 2-Methylbutan vorgekühlt.

Durch Umrühren ermittelte man die ansteigende Viskosität der Lösung und konnte dann die ESR-Kapillare schockfrieren. Man erhielt zusätzlich zu der Temperaturanpassung einen Schnappschuss des molekularen Systems in der Probe (Hinderberger D. *et al.*, 2004). Die Proben für die DEER-Messungen wurden zudem mit 30 % Glycerin (Hemminga M.A. & Berliner L. J., 2007) versetzt. Für die Tieftemperaturmessungen wurden ausschließlich Quarz-Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 1,4 mm verwendet. Die Spinlabel-Konzentrationen der Proben für die DEER-Messungen lagen dabei zwischen 50 – 300 μM (Weber R. T., 2006).

Zum Wechsel der Probe musste die Pumpe ausgeschaltet werden. Nachdem der Druck auf 1000 mbar angestiegen war, konnte der Stab entnommen werden. Um ein Kondensieren von Feuchtigkeit im Resonator zu verhindern, musste die Öffnung dann sofort verschlossen werden. Dann wurde die neue Probe eingeführt, danach konnte die Pumpe wieder eingeschaltet werden. Die Einstellung des Nadelventiles musste in der Regel nicht verändert werden. Nach einigen Minuten wurde die vorher eingestellte Temperatur wieder erreicht.

Aufnahme des Spektrums

Ebenfalls wie bei den cw-Messungen in RT wurde für die Tieftemperaturmessungen der dielektrische Resonator (BRUKER Flexline Resonator ER 4118X MD5) verwendet, die Mikrowellenleistung wurde hierbei in 10 dB-Schritten von 50 dB auf 32 dB reduziert. Die Auswertung der Spektren erfolgte

mittels des Programms Dipfit (Steinhoff H. J *et al.*, 1997) (siehe Beschreibung in Kap. 5.7.3.1), das auf der starken Kopplung der Biradikalen basiert ist. Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Stärke dieser Kopplung ist das Intensitätsverhältnis d_1/d (Abb. 5.5). Liegt dieses unterhalb eines Wertes von 0,40, so ist die Leistung der Kopplung der Biradikalen nicht gut genug um einen Abstand zu berechnen (Panse V.G. *et al.*, 2001).

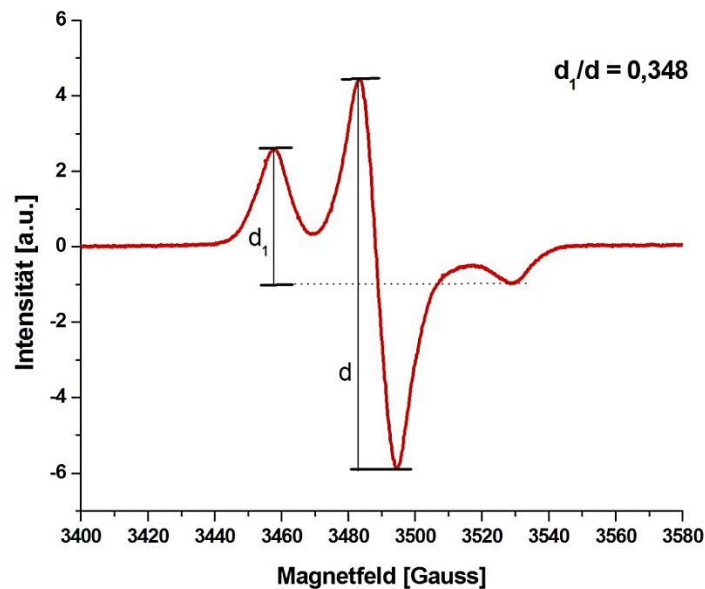


Abbildung 5.5: Immobilisiertes Biradikal Spektrum des gelabelten MBP5-Mutanten bei 80 K mit der dazugehörigen d_1/d -Intensitätsverhältnis.

5.7.2 Vier-Puls-DEER-Messung bei 50 K

Die zu den Vier-Puls-EPR-Messungen erforderlichen Einstellungen erfolgen zum einen über die Steuerungssoftware und zum anderen direkt an der Puls-Brücken-Kontrolleinheit des Spektrometers. Weiterhin wurde im Vergleich zum cw-Betrieb die Aufzeichnung unter Verwendung des splitting Resonator durchgeführt (BRUKER Flexline Resonator ER 4118X MS3). Die Temperatureinstellung wurde nach (Hemminga & Berliner, 2007) mit 50 K übernommen. Ebenso wie bei der cw-Spektroskopie musste auch zu Beginn einer Messung der Abgleich der verschiedenen Spektrometer Komponenten (Bsp. Resonator) erfolgen. Im Gegensatz zur ersten Methoden ist man bei der Pulstechnik bemüht, einen möglichst hohen Q-Faktor ($Q \approx 100$) zu erzielen und den Resonator zu überkoppeln, d. h. die Iris vollständig zu öffnen. Die Mikrowellenleistung wurde aus Sicherheitsgründen, um Schäden am Spektrometer zu vermeiden, immer auf ≥ 60 dB reduziert werden, solange keine Puls-Messung, cw-Messung oder das Tuning erfolgen. Nach dem Tuning der Pulsbrücke erfolgte eine Detektierung des Elektronspinecho (ESE) wobei das refokussierte Echo detektiert wurde.

Auf der Oszilloskopanzeige des SpectJet ist das Echo-Signal in Form der beiden Quadrature-Detection-Signale zu erkennen (Abb. 5.6).

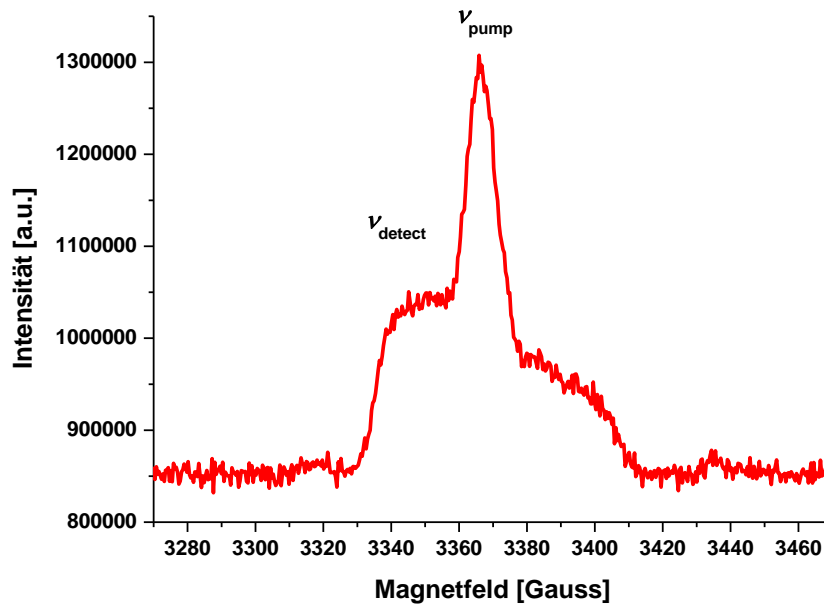


Abbildung 5.6: Echo-detektiertes Spektrum des MBP-Biradikals.

Nach Optimierung des Pumpimpulses, indem man den Magnetfeld-Wert der maximalen Intensität im echo detektierten Spektrum einstellt (in Abb. 5.6 bei v_{pump}), folgt die ELDOR-Abschwächung wobei es auf 0 dB gesetzt und die Pulslänge mit der Zeitbasis von 4 ns bis ca. 40 ns hochgesetzt wird. Um die Frequenz des ELDOR-Pulses zu ermitteln, bestimmt man im echodetektierten ESR-Spektrum die Magnetfelddifferenz $\Delta B = B_{\text{Obs}} - B_{\text{Pump}}$ (erhält man eine analoge Frequenzdifferenz von 65 bis 70 MHz, das entspricht die lokalen Maximum des Tieffelds des Nitroxid-Spektrums), die zu der Observerfrequenz addiert wird und setzt die ELDOR-Frequenz schließlich auf diesen Wert. Die Aufzeichnung der Proben erfolgt über einen Zeitraum von mehreren Stunden (10 - 16 h). Für die nativen DEER-Messungen (bei pH 7) wurde kein Phasecycling (Pannier M. *et al.*, 2000) angewandt. Zu den *molten globule* Zustand Untersuchungen wurden die 4-Puls-DEER-Messungen am MPI für Polymerforschung in Mainz im Arbeitskreis Spiess durchgeführt. Die Proben wurden mittels Hamilton Spritze bis zu einer Füllhöhe von etwa 1 cm in CFQ-Quarz Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,7 mm eingefüllt und bei etwa 50 K in den Resonator eingesetzt.

Auf pH 3,3 wurden die MBP Proben in CGH10-Puffer eingestellt und darauf geachtet dass der Glycerinanteil 30 % nicht überschreitet und die Endkonzentration des Proteins ca. 67 μM in 100 μl entsprach. Nach dem über Nacht Inkubieren bei 4 °C wurde ca. 100 μl Probe mittels Hamilton Spritze in eine CFQ-Quarz-kapillare mit 3 mm Außendurchmesser gefüllt. Dann wurde die Probe in ein mit

flüssigem Stickstoff abgekühltem Isopentanreservoir getaucht und gerührt bis ihre Viskosität zunahm. Die Kapillare wurde zunächst in dickflüssiges Isopentan und dann in flüssigen Stickstoff eingetaucht, letztendlich wurde die Probe in die Cavity eingeführt. Diese 4-Puls Messung erfolgte ebenfalls wie bei den nativen Proben nach dem „Elexsys E 580 User's Manual“ und „Pulsed ELDOR Option User's Manual“ (Weber, 2005; Weber, 2006), jedoch mit dem Vorteil der Verwendung von Phasecycling in der Durchführung.

Auswertung der Daten:

Die Analyse der DEER-Rohdaten der Zeitdomäne erfolgte unter Verwendung des Programmpakets DeerAnalysis 2006 & 2011 (Jeschke G. *et al.*, 2006). Die Abstandsverteilungen wurden durch Tikhonov Regulierung erhalten.

5.7.3 MD Simulation

5.7.3.1 ZUR ABSTANDSBERECHNUNG AUS TIEFTEMPERATUR CW- EPR-SPEKTREN

Die Spin-Spin Wechselwirkung (zwischen zwei an ein Protein gebundenen Spin Sonden) ist mit der statischen dipolaren Wechselwirkung, der Modulation der dipolaren Wechselwirkung durch die Zusammenbewegung der Spin -Label- Seitenketten und Austauschwechselwirkungen gebunden. Die statische Dipol- Wechselwirkung führt zu einer erheblichen Verbreiterung des cw-ESR-Spektrums, wenn der Interspin-Abstand weniger als 2 nm beträgt. Die Spektren-Simulationen ergeben den Abstand zwischen den Nitroxiden (Hustedt E.J. *et al* 1997; Hustedt E.J. *et al.*, 1999). Allerdings besteht der am häufigsten anzutreffenden Fall im SDSL in der Verwendung von Nitroxiden, die eine statistische Verteilung der Abstände und Relativorientierungen einnehmen. Die Werte der Interspin-Entfernungen können aus einer detaillierten Analyse der Linienform in den gemessenen Spektren unter 200 K bestimmt werden (Rabenstein M.D. und Shin Y., 1995, Steinhoff H. J. *et. al.*, 1991 Steinhoff H.J. *et al.*1997) oder in Lösungen mit hoher Viskosität (Altenbach *et al.*, 2001) mit Spektren Faltung oder Dekonvolutionstechniken bezeichnet werden. Das ESR-Spektren Simulationsprogramm Dipfit verwendet z. B. automatisierte Routinen um zu arbeiten, dabei verwendet es unter anderem Best-Fit Parameter, eine Gauß-Verteilung der Interspin-Entfernungen und variable Beiträge einzelner Spin- markierter Proteine. Die Linienverbreiterung aufgrund von dipolaren Wechselwirkungen wird durch den Einbau simulierter EPR-Pulverspektren in experimentelle Daten bestimmt. Diese Spektren sind infolge der Flexibilität der Spin Labeln-Seitenkette und der Vielfalt der Konformationsänderungen der gefrorenen Proben aus verschiedenen Arten relativer Nitroxid-Orientierungen und Interspin-Entfernungen zusammengesetzt.

5.7.3.2 MOLEKULARDYNAMIK-SIMULATIONEN VON DEER- EPR-SPEKTREN

Mit Hilfe des Molecular Modeling (Programm Accelrys Discovery Studio 2.5 MD-Simulationen) wurden aus dem Datensatz der MBP-Wildtyp (pdb-ID: 1omp) Kristallstruktur von *E. coli* die theoretischen Vorhersage der Abstände zwischen den Nitroxidbiradikalen der MTS-gelabelten Cysteine der MBP-Mutante berechnet. Zu diesem Zweck wurden die Kristallstrukturdaten hinsichtlich den Veränderungen in den MBP-Mutanten modifiziert. Anhand der Aminosäure-Topologie wurde eine Energieminimierung zur Strukturrelaxierung durchgeführt. Das im Zuge der Spektrensimulation verwendete Kraftfeld heißt CHARMM-Kraftfeld (Brooks R.B. *et al.*, 1983). Für die MD-Simulationen wurde das System von 50 auf 300 K aufgeheizt und wieder auf 0 K abgekühlt. Das Temperatursprung-Verfahren ist eine etablierte Methode zur Analyse von Reaktionskinetiken zwischen miteinander im Gleichgewicht stehenden Systemzuständen, was einem besonderen Vorteil bietet auch sehr schnelle Kinetik zu detektieren.

Infolgedessen wird die Ermittlung der Abstände zwischen den Stickstoffatomen der MTS-Seitenketten im Biradikal-Protein gewährleistet. Dieser Referenzwert r_{theo} ermöglicht den Vergleich mit den experimentell bestimmten Abstandsdaten r und gestattet so auch die Zuordnung der gemessenen Abstände im Protein.

6 ANHANG

6.1 X-Band *cw*-ESR-Parameter

Parameter A	ER 4118X MD5		ER 4118X MS3
Temperatur [K]	293,0 ± 0,1	80,00 ± 0,02	80,00 ± 0,02
Probe	Kapillare		
Averaged Scans	2		
Sampling Time [ms]	40,96		
Modulation Amp. [G]	2	6	6
Modulation Freq. [kHz]	100		
Microwave Freq. [GHz]	9,72180	9,79354	9,75656
Microwave Power [mW]	6,392 (15 dB)	0,06377 (35 dB)	
Receiver Time Constant [ms]	10,24		
Number Of Points	8192		
Sweep Width [G]	4500		
Receiver Gain [dB]	60	39	39

Parameter B	MBP-Biradikal 1-7
c_{MTS} [μM]	294,84
c_{MBP} [mg/ml]	6,0
Temperatur [K]	295,0 ± 0,1
Averaged Scans	20
Sampling Time [ms]	20,48
Modulation Amp. [G]	1
Modulation Freq. [kHz]	100
Microwave Freq. [GHz]	9,725 – 9,727
Microwave Power [mW]	6,392 (15 dB)
Receiver Time Constant [ms]	5,12
Number Of Points	1024
Sweep Width [G]	120
Receiver Gain [dB]	60

Parameter D	MBP-MTS
Temperatur [K]	293,0 ± 0,1
Averaged Scans	10
Sampling Time [ms]	20,48
Modulation Amp. [G]	1
Modulation Freq. [kHz]	100
Microwave Freq. [GHz]	9,7 – 9,8
Microwave Power [mW]	6,392 (15 dB)
Receiver Time Constant [ms]	5,12
Number Of Points	1024
Sweep Width [G]	120
Receiver gain [dB]	38
Center field [G]	3460

Parameter F	MBP1	MBP2	MBP3	MBP4	MBP5	MBP6	MBP7
c_{MBP} [mg/ml]	6,12	10,40	11,30	7,20	10,30	15,60	8,37
c_{MTS} [μM]	300,74	511,06	555,28	353,81	506,14	766,58	411,30
Temperatur [K]	80,00 ± 0,02						
Averaged Scans	20						
Sampling Time [ms]	40,96						
Modulation Amp. [G]	6						
Modulation Freq. [kHz]	100						
Microwave Freq. [GHz]	9,801	9,801	9,798	9,800	9,800	9,799	9,799
Microwave Power [mW]	0,06392						
Receiver Time Constant [ms]	10,24						
Number Of Points	1024						
Sweep Width [G]	200						
Receiver gain [dB]	39						
Center field [G]	3480						

Parameter G	MBP-Biradikal 1-7
Temperatur [K]	150,0 ± 0,1
c_{MTS} [μ M]	294,84
c_{MBP} [mg/ml]	6,0
Averaged Scans	20
Sampling Time [ms]	40,96
Modulation Amp. [G]	6
Modulation Freq. [kHz]	100
Microwave Freq. [GHz]	9,725 – 9,727
Microwave Power [mW]	6,392 (15 dB)
Receiver Time Constant [ms]	5,12
Number Of Points	1024
Sweep Width [G]	200
Receiver Gain [dB]	60

6.2 MD-Parameter

Parameter G	MBP1	MBP2	MBP3	MBP4	MBP5	MBP6	MBP7
minimization steps	20597	7500	2500	5196	542	639	6500

Weitere **Parameter G**:
model:

RMS-Gradient: 0,1; dielectric constant: 1; implicit solvent
Generalized Born; implicit solvent dielectric constant: 80.

Parameter H:

heating temperature: 300 K
cooling temperature: 0 K
heating/cooling steps: 2000 – 10000
heating time step: 0,001 ps
heating initial temperature: 50 K
implicit solvent model: Generalized Born
Born- λ -constant: 0,75
dielectric constant: 1
implicit solvent dielectric constant: 80.

6.3 Vierpuls-DEER:

6.3.1 Parameter für MBP bei pH 7,0 (native Zustand)

Parameter I	MBP1	MBP2	MBP3	MBP4	MBP5	MBP6	MBP7
c_{MBP} [mg/ml]	3						
c_{MTS} [μ M]	147,42						
T [K]	$50,00 \pm 0,02$						
ν_{obs} [GHz]	9,6869	9,6153	9,6836	9,6100	9,6023	9,6677	9,4723
Q_L	300	400	400	-	400	-	400
Video bandwidth [MHz]	50	50	50	50	50	50	50
Video gain [dB]	45	48	48	52	45	48	45
HPP-attenuation [dB]	10	11	11	13	12	12	10
B_{Obs} [G]	3422,3	3396,4	3422,7	3395,7	3393,5	3416,1	3345,9
B_{Pump} [G]	3447,8	3422,4	3446,7	3420,3	3417,8	3441,2	3371,7
ΔB [G]	25,5	26,0	24,0	24,6	24,3	25,1	25,8
$\Delta\nu$ [MHz]	71,48	72,88	67,27	68,95	68,11	70,35	72,32
ν_{ELDOR} [GHz]	9,6154	9,5424	9,6164	9,5411	9,5342	9,5974	9,4001
Pulse length $(\pi/2)_{obs}$ [ns] (p_0)	16	16	16	16	16	16	16
Pulse length $(\pi)_{obs}$ [ns] (p_1)	32	32	32	32	32	32	32
Pulse length π_{ELDOR} [ns] (p_3)	16	20	20	20	20	20	16
ELDOR delay t [ns] (d_3)	100	100	100	100	100	100	100
τ_1 [ns] (d_1)	200	200	200	200	128	200	128
τ_2 [ns] (d_2)	1200	1500	1200	2500	1200	1200	1200
Aquisition trigger d_0 [ns]	364	364	372	388	392	372	356
Integrator gate pg [ns]	160	160	160	140	140	160	120
d_{ELDOR} [ns] (d_{30})	8	8	8	12	8	8	8
SPP	200	1024	300	512	512	1024	1024
SRT [μ s]	1999,20	1999,20	1999,20	3999,42	1999,20	1999,2	1998,18
No. of points	160	197	160	215	151	160	151
No. of averages	257	116	142	46	292	53	174

6.3.2 Parameter für MBP bei pH 3,3 (*moten globule Zustand*)

Parameter J	MBP1	MBP2	MBP3	MBP4	MBP5	MBP6	MBP7
ν_{obs} (GHz)	9,238	9,272	9,272	9,326	9,248	9,282	9,370
Video bandwidth (MHz)	50						
Video gain (dB)	66						
ν_{ELDOR} (GHz)	9,3						
Pulse length $(\pi/2)_{obs}$ (ns)	32						
Pulse length $(\pi)_{obs}$ (ns)	32						
Pulse length $(\square)_{ELDOR}$ (ns)	16						
ELDOR delay t (ns)	80						
τ_1 (ns)	200						
τ_2 (ns)	2000	1500	1200	1500	1200	1200	1500
Aquisition trigger d_0 (ns)	484						
Integraor gate pg (ns)	200						
dx_{ELDOR} (ns)	8						
No. of points	255	193	155	193	155	155	193

6.4 Tikhonov Regularisierung bei pH 7, 0 (Native Zustand)

Parameter K	MBP1	MBP2	MBP3	MBP4	MBP5	MBP6	MBP7
Zero time [ns]	120	104	120	120	48	112	48
Raw data cutoff [ns]	1200	1520	864	2568	528	1144	1064
Phase correction [°]	-13,6	1,9	22,0	11,3	22,7	-13,7	54,9
Background dimensionality	3						
Long pass filter [nm]	1,6						
Excitation bandwidth [MHz]	16						
Background correction start [ns]	366	512	358	990	156	198	324
Regularization Parameter α	1000	100	100	1000	10	1	1000
Distance r [nm]	2,97	3,45	2,33	4,31	1,81	2,40	2,80
Standard deviation σ_r [nm]	0,41	0,32	0,34	0,44	0,36	0,10	0,39
No. of coupled spins	2,01	2,00	2,01	2,01	2,00	1,98	2,00

6.5 ITC Parameter:

Parameter verwendet für MBP-Wt bei pH 7,0 mit 20 bzw 40 Injektionen

Experimental parameters		Injection parameters	
Total injections	20 bzw. 40	Volume (µl)	2
Cell temperature (°C)	5	Duration (s)	4
Reference power (µcal/s)	1	Spacing (s)	240
Initial delay (s)	120	Filter period (s)	5
Syringe concentration (mM) (pH)	0,33 (pH 7,19)		
Cell concentration (mM) (pH)	0,0331 (pH 7,17)		
Stirring speed (rpm)	1000		

Verwendete Parameter für MBP-Wt bei pH 3,0 mit 20 Injektionen

Experimental parameters		Injection parameters	
Total injections	20	Volume (µl)	2
Cell temperature (°C)	5	Duration (s)	4
Reference power (µcal/s)	1	Spacing (s)	240
Initial delay (s)	120	Filter period (s)	5
Syringe concentration (mM) (pH)	0,2572 (pH 3,32)		
Cell concentration (mM) (pH)	0,02572 (pH 3,29)		
Stirring speed (rpm)	1000		

Verwendete Parameter für MBP-Wt bei pH 3,0 mit 20 Injektionen bei zweiter Versuch.

Experimental parameters		Injection parameters	
Total injections	20	Volume (µl)	2
Cell temperature (°C)	5	Duration (s)	4
Reference power (µcal/s)	1	Spacing (s)	240
Initial delay (s)	120	Filter period (s)	5
Syringe concentration (mM) (pH)	1,6 (pH 3,31)*		
Cell concentration (mM) (pH)	0,0535 (pH 3,31)		
Stirring speed (rpm)	1000		

6.6 Masterplan

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Plan zur Übersichtlichkeit der Herstellung aller MBP-Biradikale aufgestellt, um den aktuellen Stand des Vorankommens im Auge zu behalten können. In Zusammenarbeit mit Jörg Reichenwallner wurden sämtliche Mutanten mit den in Kap. 5 beschriebenen Methoden hergestellt. Die folgende Tabelle enthält Mengenangaben über den Anteil an MBP-Mutanten die ausschliesslich für ESR-Messungen eingeplant wurde ($V_{0,MBP}$ = Volumen der Biradikal-Stammlösungen; c_{MBP} = Konzentration der Biradikal-Stammlösungen).

Arbeitsschritt	Mutante	MBP1	MBP2	MBP3	MBP4	MBP5	MBP6	MBP7
P298C X MBP, X = Plasmid		T31C	D82C	N124C	K175C	K313C	Q325C	S238C
Transformation		x	x	x	x	x	x	x
Kleinkultur		x	x	x	x	x	x	x
Glycerinkultur		x	x	x	x	x	x	x
Plasmidisolierung		x	x	x	x	x	x	x
Großkultur á 500 ml		4	4	4	2	2	4	2
Lysat á 25 ml		8	6	7	4	4	7	4
Aufr. Amylosesäule		8	6	7	4	4	7	4
Aufr. Hydroxyapatitsäule		6	6	3	4	4	7	4
Aufkonzentration [ml]		5,5	2,8	3,8	10,5	3,2	2,9	5,0
BCA-Test [mg/ml]		6,40	6,87	7,40	7,78	3,64	8,00	6,38
MBP ohne Maltose [mg]		35,2	19,2	36,7	81,7	11,7	23,2	31,9
Aliquotierung in 1 ml		x	x	x	x	x	x	x
Reinheit [%] aus disk-SDS-PAGE		> 99	> 99,9	100	99,9	98,3	97,1	96,7
Spinlabeling mit 1 ml Aliquot		x	x	x	x	x	x	x
c_{MBP} [mg/ml]		6,12	10,44	11,30	7,20	10,30	15,60	8,37
$V_{0,MBP}$ [μ l]		400	325	340	220	300	450	385

Abbildung 6.1: Masterplan der Arbeit bis zur Modifizierung der MBP mit MTS.

6.7 MBP wt-Sequenz

Das MBP Sequenz mit Signalpeptid (in rot) (26 +370 = 396 Aminosäuren).

MKIKTGARILALSALTTMMFSASALAKIEEGKLVIIWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVT
 VEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDHFRGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVR
 YNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIA
 ADGGYAFKYENGYDIKDVGVNDNAGAKAGLTFLVDLIKHKHMNADTDYSIAEAAFNKGET
 AMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYL
 LTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRT
 AVINAASGRQTVDEALKDAQTRITK

**ATGAAAATAAAAACAGGTGCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAACGACGATGATGTTT
 TCCGCCTCGGCTCTCGCC**

AAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATAACGGTCT
 CGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAGTCACCGTTGAGCATC
 CGGATAAACTGGAAGAGAAATTCACAGGTTGCGGCAACTGGCGATGGCCCTGACATT
 ATCTTCTGGGCACACGACCGCTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCA
 CCCCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACCTGGGATGCCGTACGTTACA
 ACGGCAAGCTGATTGCTTACCCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAAG
 ATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTGGATAAAGAACTG
 AAAGCGAAAGGTAAAGAGCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCTGGCC
 GCTGATTGCTGCTGACGGGGTATGCGTTCAAGTATGAAAACGGCAAGTACGACATTAA
 AGACGTGGGCGTGGATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCTGGTTGACCTGAT
 TAAAAACAAACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAA
 AGGCGAAACAGCGATGACCATCAACGGCCCGTGGGCATGGTCCAACATCGACACCAGCA
 AAGTGAATTATGGTGTAAACGGTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCC
 TTGGCGTGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAAGAGCTGGCAAAAGAG
 TTCCTCGAAAACATCTGCTGACTGATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCG
 CTGGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGGCGAAAGATCCACGTATTGCC
 GCCACCATGGAAAACGCCCAGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCCGC
 TTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCCGCCAGCGGTCGTCAGACTGTCTGA
 TGAAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTCGTATCACCAAGTAA

7 LITERATURVERZEICHNIS

7.1 Literatur

A.D. Milov, A.B. Ponomarev, Yu.D. Tsvetkov (1984): Electron–electron double resonance in electron spin echo: model biradical systems and the sensitized photolysis of decalin. *Chem. Phys. Lett.* 110, 67–72.

A.D. Milov, K.M. Salikhov, M.D. Shirov, Fiz. Tverd. Tela (1981): Application of ELDOR in electron-spin echo for paramagnetic center space distribution in solids. (Leningr) V.23,P. 975–982.

A.J. Sharff, L.E. Rodseth, J.C. Spurlino, F.A. Quioco (1992): Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry* 31, 10657–10663.

A.R. Berengian, M. Parvenova, H.S. Mchaourab: Site-directed Spin Labeling Study of Subunit Interactions in the α -Crystallin Domain of Small Heat-shock Proteins: COMPARISON OF THE OLIGOMER SYMMETRY IN α A-CRYSTALLIN, HSP 27, and HSP 16.3. 1999. *J. Biol. Chem.* 274, 6305–6314.

Altenbach, C., Marti, T., Khorana, H., Hubbell, W. (1990): Transmembrane protein structure: spin labeling of bacteriorhodopsin mutants. *Science* 248, pp.1088-92.

Altenbach, C., Oh, K. J., Trabanino, R. J., Hideg, K. and Hubbell, W. L. (2001): Estimation of inter-residue distances in spin labeled proteins at physiological temperatures experimental strategies and practical limitations. *Biochemistry*,40: 15471-15482.

Aune, K. C., and C. Tanford (1969): Thermodynamics of the denaturation of lysozyme by guanidine hydrochloride. II. Dependence on denaturant concentration at 25 degrees. *Biochemistry*.

B.N. Dominy, C.L. Brooks, C.L. III. (1999): Development of a generalized Born model parameterization for proteins and nucleic acids. *Phys. Chem. B* 103, 3765–3773.

Balbach, J., and Schmid, F. X. (2000): Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding. In: Pain, R. H. (Hrsg.) *Mechanisms of Protein Folding*. Oxford University Press, Oxford. 212–237.

Berengian, A. R., Parfenova, M., Mchaourab, H. S. (1999): Site-directed Spin Labeling Study of Subunit Interactions in the α -Crystallin Domain of Small Heat-shock Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 274, 10, 6305 – 6314.

Bergmann Schaefer (Hg.) (1992): *Lehrbuch der Experimentalphysik*. Unter Mitarbeit von Walter de Gruyter. 1. Aufl. (4Teilchen).

Berliner, L. J., Eaton, S. S., and Eaton, G. R., eds (2000): *Distance Measurements in Biological systems by EPR*, EPR. *Biol. Magn. Reson.* 19.

Berliner, L., Hankovyzky J. u. H., Hideg, K. (1982): A novel reversible thiol-specific spinlabel: papain active site labeling and inhibition. *Anal. Biochem.* 119 ,pp. 450-55.

Boos, W. & Lucht, J. M. (1996): Periplasmic binding protein-dependent ABC transporters. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Washington, DC. *cellular and molecular biology*. American Society of Microbiology, (1:1175-1209.).

Boos, W., Peist, R., Decker, K. & Zdych, E. (1996): *The maltose system of Escherichia coli*. Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. E. Landes Company, Austin, Texas., S. 201-229.

Bradford, M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,. *Analytical Biochemistry*, 72, 248 – 254.

- Branden, C.; Tooze, J. (1999): *Introduction to Protein Structure* (2. ed.). New York. Garland Publishing Inc., New York, 89-120, ISBN: 0-8153-2305-0 Copyright: 1999 Garland Publishing Inc.,
- Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., Karplus, M. (1983): CHARMM - A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations., *Journal of Computational Chemistry*, 4, 2, 187 – 217.
- C. Ganesh, Faisal. N. Zaidi, Jayant. B. Udgaonkar, and Raghavan (2001): Reversible formation of on-pathway macroscopic aggregates during the folding of maltose binding protein. In: *Biochemistry (Mosc)*, (36), S. 5020 – 5028.
- C. Ganesh, A.N. Shah, C.P. Swaminathan, A. Suriola, R. Varadarajan (1997): Thermodynamic Characterization of the Reversible, Two-State Unfolding of Maltose Binding Protein, a Large Two-Domain Protein. *Biochemistry* 36, 5020–5028.
- Chan HS, Dill KA. (1997): Solvation: how to obtain microscopic energies from partitioning and solvation experiments. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1997;26:425-59.
- Chapon, C. & Kolb, A. (1983): Action of CAP on the malT promoter in vitro. *J. Bacteriol.* 156, 1135-1143.
- Chimienti, M., Moizi, M., Salerno, J. A., Klersy, C., Guasti, L., Previtali, M., Marangoni, E., Montemartini C., and Bobba, P. (1987): Electrophysiologic and clinical effects of intravenous and oral encainide in patients with Wolff-Parkinson-white syndrome and paroxysmal atrial fibrillation., *Eur. Heart J.* 8, 282-290.
- Clark, E. D. B. (1998): Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin. Biotechnol* 9:157-63.
- Clarke, J., and L. S. Itzhaki (1998): Hydrogen exchange and protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 8:112-8. (8), S. 112–118.
- D. Rentsch (1998): Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. *J. Membrane Biol.* 162, S. 177–190.
- D.A. Dolgikh, R.I. Gilmanishin, E.V. Brazhnikov, V.E. Bychkova, G.V. Semisotnov, S.Yu. Venyaminov (1981 Dec 28): Alpha-Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett.* 136, 311–315.
- Debarbouille, M., Shuman, H. A., Silhavy, T. J. & Schwartz, M. (1978): Dominant constitutive mutations in malT, the positive regulator gene of the maltose regulon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 124(2), 359-71.
- Demtröder, Wolfgang (Hg.) (2005): *Experimentalphysik 3-Atome, Moleküle und Festkörper*. 3. Aufl.: Springer Berlin Heidelberg New York.
- Dev IK, Ray PH. (1990 Jun): Signal peptidases and signal peptide hydrolases. *J Bioenerg Biomembr.* 22(3), S. 271–290.
- Dietzel, I., Kolb, V. & Boos, W. (1978): Pole cap formation in *Escherichia coli* following induction of the maltose-binding protein. *Arch. Microbiol.* 118, 207-218.
- Dill K.A., Fiebig K.M., Chan H.S.: Cooperativity in protein-folding kinetics. 1993. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:1942–46.
- Drago, R.S (Hg.) (1992): *Physical Methods for Chemists*. 2nd edition. Saunders.
- Duan, X. & Quioco, F.A (2002 Jan 22): Structural evidence for a dominant role of nonpolar interactions in the binding of a transport/ chemosensory receptor to its highly polar ligands. *Biochemistry (Mosc)* (41, 3), S. pp. 706-712, 0006-2960.
- Duplay, P., H. Bedouelle, A. Fowler, I. Zabin, W. Saurin, M. Hofnung (1984): Sequence of the malE gene and of its product, the maltose -binding protein of *Escherichia coli* K12. *J.Biol.Chem.* 259:10606-10613.

- Ehrmann, M., Ehrle, R., Hofmann, E., Boos, W. & Schlosser, A. (1998): The ABC maltose transporter. *Mol Microbiol*, 29: 685- 694.
- Evgeny I. Shakhnovich and Alexey V. Finkelstein (October 1989): Theory of cooperative transitions in protein molecules. I. Why denaturation of globular protein is a first-order phase transition. Volume 28, Issue 10, pages 1667–1680.
- F. A Quiocho, J. C Spurlino and L. E Rodsteh (15.08.1997): Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor. *Strc.*, Pages 997–1015.
- FA Quiocho (1990): Atomic structures of periplasmic binding proteins and the high-affinity active transport systems in bacteria. In: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 326 341-352, S. 341–352.
- Feher, G. (1970): *Electron Paramagnetic Resonance with Applications to Selected Problems in Biology*. Gordon & Breach.
- Fersht, Alan (Hg.) (1999): *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding*. Unter Mitarbeit von W.H. Freeman. (New York) (xxi, 631 p.).
- Fiebig K.M., Dill K.A. (1993): Protein core assembly processes. *J. Chem. Phys.* ;98:3475–87.
- Fink, A. L. (1995): Compact intermediate states in protein folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24, S. 495–522.
- Fontana, A., P. Polverino de Laureto, V. De Filippis, E. Scaramella, and M. Zambonin (1997): Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Fold Des* 2:R17-26.
- Friedrich Lottspeich,, Zorbas, v. Solodkoff (Hg.) (1998): *Bioanalytik: Spektrum Akademischer Verlag*.
- G. Jeschk (2002): “Determination of the Nanostructure of Polymer Materials by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy,”. *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 23, pp. 227–246.
- G. Jeschke; H. W. Spiess (1998): *Einführung in die ESR-Spektroskopie, Skript zur Vorlesung von H. W. Spiess an der Johannes-Gutenberg-Universit. Mainz, 1998*.
- G. Jeschke, M. Pannier, A. Godt, H. W. Spiess (2000): Dipolar spectroscopy and spin alignment in electron paramagnetic resonance. *Chem. Phys.* 331, 243 - 252.
- G. Jeschke, V. Chechik, P. Ionita, A. Godt, H. Zimmermann, J. Banham, C. R. Timmel, D. Hilger, H. Jung (2006): DeerAnalysis2006 - A Comprehensive Software Package for Analyzing Pulsed ELDOR Data. *Appl. Magn. Reson.* 30, 473 - 498.
- G.E. Uhlenbeck and S. Goudsmit (1925): *Spinning Electrons and the Structure of Spectra*. Instituut voor Theoretische Natuurkunde, Leyden.
- H. Primas, U. Müller-Herold (1990): *Elementare Quantenchemie*. B.G. Teubner, Stuttgart.
- H.J. Steinhoff, N. Radzwill, W. Thevis, V. Lenz, D. Brandenburg, A. Antson, G. Dodson (1997 December): Determination of interspin distances between spin labels attached to insulin: comparison of electron paramagnetic resonance data with the X-ray structure. *Biophys. J.* 73, 3287–3298.
- Haken, H., Wolf, H.C. (Hg.) (2004): *Atom- und Quantenphysik*. 8. Aufl.: Springer Berlin Heidelberg New York (S. 214 f.).
- Hamada, D., Kidokoro, S., Fukada, H., Takahashi, K., and Goto, Y. (1994): Salt-induced formation of the molten globule state of cytochrome c studied by isothermal titration calorimetry,. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10325-10329.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166 ,S. 558 – 580.
- Hardy, S.J.S., and Randall, L.L. ((1991): A kinetic partitioning model of selective binding of non-native proteins by the bacterial chaperone SecB. *Science* 251:439-443.

- Heidary DK, Gross LA, Roy M, Jennings PA (1997): Evidence for an obligatory intermediate in the folding of interleukin-1 β . *Nat Struct Biol* 4: 725-731.
- Hemminga, M. A., Berliner, L. J. (2007): *ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics*. Springer-Verlag, New York.
- Higgins, C. F. (1992): ABC Transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev. Cell.Biol.* (8), S. 67–113.
- Hinderberger, D., Spiess, H. W., Jeschke, G. (2004): Dynamics, Site Binding, and Distribution of Counterions in Polyelectrolyte Solutions Studied by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 108, 3698 – 3704.
- Hofnung M, Hatfield D, Schwartz M. (1974 Jan): malB region in Escherichia coli K-12: characterization of new mutations. *J Bacteriol.*(117(1):40-7).
- Holtzhauer M and Volkmar Hahn (Hg.) (1988): *Biochemische Labormethoden: Arbeitsvorschriften und Tabellen*. 1. Aufl. Berlin: Springer-Verlag (249). Online verfügbar unter 978-3-642-07111-2.
- Hubbel, W., Altenbach, C. (1994): Investigations of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin-labeling. *Curr. Opin. Struc. Biol* 4 (pp.566-73).
- Hustedt, E. J., A. I. Smirnov, C. F. Laub, C. E. Cobb, and A. H. Beth. (1997): Molecular distances from dipolar coupled spin-labels: the global analysis of multifrequency continuous wave electron paramagnetic resonance data. *Biophys. J.*
- Hustedt, E.J., Beth, A.H. (1999): Nitroxide Spin-Spin Interactions: Applications to Protein Structure and Dynamics. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28 129-53.
- HW van Veen & WN Konings (1997): Drug efflux proteins in multidrug resistant bacteria. In: *Biol. Chem.* 378, S. 769–777.
- Ikeguchi M, Kuwajima K, Mitani M, Sugai S. (1986): Evidence for identity between the equilibrium unfolding intermediate and a transient folding intermediate: A comparative study of the folding reactions of α -lactalbumin and lysozyme. *Biochemistry* 25: 6965-6972.
- J.C. Spurlino, G. Lu, F.A. Quioco (1991 Mar 15): The 2.3-Å Resolution Structure of the Maltose- or Maltodextrin-binding Protein, A Primary Receptor of Bacterial Active Transport and Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 266, 5202–5219.
- J.M. Crane, C. Mao, A.A. Lilly, V.F. Smith, Y. Suo, W.L. Hubbell, L.L. Randall (2005 Oct 21): Mapping of the docking of SecA onto the chaperone SecB by site-directed spin labeling: insight into the mechanism of ligand transfer during protein export. *J Mol Biol.* ;353(2):295-307.
- Jamin M, Baldwin RL. (1998): Two forms of the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin. *J Mol Biol* 276: 491-504.
- Jasco T., Schneider E., Rupp B., Reif B. (2012): Substrate Transport Activation Is Mediated through Second Periplasmic Loop of Transmembrane Protein MalF in Maltose Transport Complex of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 287(21):17040-17049,
- Jeschke, G. (05.01.2006): *DeerAnalysis 2006 User's Manual*.
- Jeschke, G., Chechik, V., Ionita, P., Godt, A., Zimmermann, H., Banham, J., Timmel, C. R., Hilger, D., Jung, H. (2006): *DeerAnalysis2006 - a Comprehensive Software Package for Analyzing Pulsed ELDOR Data*. *Appl. Magn. Reson.* 30, 473 – 498.
- Johnson, W. C., Jr. (1990): Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* 7:205-14.
- Jörg Reichenwallner (2011): *Strukturuntersuchungen am Maltose-Bindungsprotein mit Hilfe der gepulsten Elektron-Elektron-Doppelresonanz-Spektroskopie*, Fachbereich Biophysik, TU Kaiserslautern. Diplomarbeit.

- Jörg Reichenwallner, Mohammed Chakour, S. Indu, Raghavan Varadarajan, Wolfgang E. Trommer (28.02.2013): Maltose Binding Protein Is Partially Structured in Its Molten Globule State. *Applied Magnetic Resonance*, DOI 10.1007/s00723-013-0468-4.
- Junk, Matthias J. N.; Spiess, Hans Wolfgang; Hinderberger, Dariush (2010): Die Verteilung gebundener Fettsäuren enthüllt die funktionelle Struktur von menschlichem Serumalbumin. *Angewandte Chemie*. DOI 10.1002/ange.201003495
- Keller S., Vargas C., Zhao H., Piszczek G., Brautigam C.A., Schuck P. (2012): High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. *Anal. Chem.* 84:5066-5073.
- Kelly, S. M., and N. C. Price (2000): The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. In: *Curr Protein Pept Sci* 1 (1:349-84).
- Kernphysik: Eine Einführung (Hg.) (2002): Mayer-Kuckuck. Theo. Teubner. 7. Aufl.
- Kim, P. S., and R. L. Baldwin (1990): Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu Rev Biochem* 59: (59:631-60).
- Koiwai, O. & Hayashi, H. (1979): Studies on bacterial chemotaxis. IV. Interaction of maltose receptor with a membrane-bound hemosensing component. *J Biochem (Tokyo)* 86 (1),27-34.
- Kramer, R. (1997): Bacterial transport systems: paradigms for the variety of options to catalyze solute transfer. *Biol.Chem.H.-S.* 378, S7.
- Kumamoto, C. A., and Beckwith, J. (1985): Evidence for specificity at an early step in protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 163, 267-274.
- Kumamoto, C. A., and Pamela M. Gannon (1988): Effects of *Escherichia coli* secB Mutations on Pre-maltose Binding Protein Conformation and Export Kineti. *J. Biol.Chem.* Vol. 263, No. 23, PP. 11554-11558.
- Kuwajima, K. (1989): The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular protein structure. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 6, 87-103.
- Kuwajima, K. and M. Arai. (2000): The molten globule state: the physical picture and biological significance. *Mechanisms of Protein Folding*. In: Oxford University. Press, New York. (Hg. R. H. Pain) Kap. 6), S. 138–174.
- L.J. Berliner, J. Grunwald, H.O. Hankovszky, K. Hideg (1982 Jan 15): A novel reversible thiol-specific spin label: papain active site labeling and inhibition. *Anal Biochem* ;119(2):450-5.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly. *MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge. (Nature 227)*, S. 680–685.
- Layne, Ennis (1957): Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for measuring Proteins. *Methods in enzymology*, vol.3. p.447.
- Leavitt, S., Freire, E (2001): Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 560–566.
- Linge, J. P. (1997): Zeitaufgelöste UV/VIS-, FTIR- und ESR-spektroskopische Untersuchung der Faltung von Cytochrom c. Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Bio-.
- M Ehrmann, Ehrle R, Hofmann E, Boos W, Schlösser A. (1998 Aug): The ABC maltose transporter. *Mol. Microbiol.* 29, S. 685–694.
- M. Holtzhauer (Hg.) (1988): *Basic Methods for the Biochemical Lab*: Springer, Berlin (1st German edn.).
- M. Ohgushi, A. Wada, *FEBS J.* (1983): "'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains.". *FEBS Lett.* 164 (1): 21–24. doi:10.1016/0014-5793(83)80010-6. PMID 6317443.
- M. Pannier, S. Veit, A. Godt, G. Jeschke, H.W. Spiess, J. Magn (2000 Feb): Dead-time free measurement of dipole-dipole interactions between electron spins. *J Magn Reson.* ;142(2):331-40.

- M.D. Rabenstein, Y. Shin, Proc. Natl. (1995 August 29): Determination of the distance between two spin labels attached to a macromolecule. Proc Natl Acad Sci U S A. ; 92(18): 8239–8243.
- Magnusson, U., Salopek-Sondi, B., Luck, L. A., and Mowbray, S. L. (2004): X-ray structures of the leucine-binding protein illustrate conformational changes and the basis of ligand specificity. J. Biol. Chem. 279, 8747-8752.
- Maki K, Ikura T, Hayano T, Takahashi N, Kuwajima K: Effects of proline mutations on the folding of staphylococcal nuclease. 1999. Biochemistry 38: 2213-2223.
- Markossian, K. A., and B. I. Kurganov (2004): Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggregates. Biochemistry (Mosc), S. 69:971-84.
- Mayer-Kuckuck, Theo (Hg.) (2002): Kernphysik: Eine Einführung. 7. Aufl. Teubner (S. 56 f).
- Morozova-Roche, L. A., C. C. Arico-Muendel, D. T. Haynie, V. I. Emelyanenko, H. Van Dael, and C. M. Dobson (1997): Structural characterisation and comparison of the native and A-states of equine lysozyme. In: *Mol Biol* 1997, S. 268:903-21.
- Nakamura, S., and Kidokoro, S. (2005): Direct observation of the enthalpy change accompanying the native to molten-globule transition of cytochrome c by using isothermal acid-titration calorimetry,. Biophys. Chem. 113, 161-168.
- New England BioLabs Inc: expression and purification of proteins from cloned genes—instruction manual ; pMALTM protein fusion and purification system). instruction Manual, version 5.1.
- Nikaido, H. (1994): Maltose transport system of Escherichia coli: an ABC-type transporter. FEBS Lett. 346, 55–58.
- Nozaki, Y., and C. Tanford (1963): The Solubility of Amino Acids and Related Compounds in Aqueous Urea Solutions. J Biol Chem 238:4074-81.
- Nozaki, Y., and C. Tanford (1970): The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions. J Biol Chem 245:1648-52.
- O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951 Nov): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
- Orengo, C.A., Jones, D.T., and Thornton, J.M. (1994): Protein superfamilies and domain superfolds. Nature 372: 531-634 1994 (372), S. 531–634.
- Otto Stern (1921): Ein Weg zur experimentellen Prüfung der Richtungsquantelung im Magnetfeld. Frankfurt am Main.
- P.G. Fajer, L. Brown, L. Songin Biological Magnetic Resonance 27– (Hg.) (2007): ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics. Unter Mitarbeit von ed. by M.A. Hemminga, L.J. Berliner: Springer, New York (pp. 95–128).
- P.P. Borbat, E.R. Georgieva, J.H. Freed, J. (2013): Improved Sensitivity for Long-Distance Measurements in Biomolecules: Five-Pulse Double Electron-Electron Resonance. J. Phys. Chem. Lett. 4 170.175.
- Pake, G. E. (1948): Nuclear resonance absorption relaxation. J.Chem.Phys.16,327-336.
- Perozzo, R.; Folkers, G. & Scapozza, L. (2004): Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. J Recept Signal Transduct Res, 24,1-52.
- Prajapati Ravindra Singh, Indu S., Varadarajan Raghavan: Identification and Thermodynamic Characterization of Molten Globule States of Periplasmic Binding. 2007. Proteins, Biochemistry 46(36):10339-10352.
- Privalov, P. L. (1996): Intermediate states in protein folding. J Mol Biol (258:707-25).
- Ptitsyn, O. B. (1987): Protein folding: Hypotheses and experiments. J. Protein Chem. 6:273–293.
- Ptitsyn, O. B. (1995): Molten globule and protein folding. Adv Protein Chem 1995 (47:83-229).

- Ptitsyn, O. B., R. H. Pain, G. V. Semisotnov, E. Zerovnik, and O. I. Razgulyaev (1990): Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett* 262:20-4.
- Quioco FA, Ledvina PS. (1996): Review Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis. *Mol Microbiol.* Apr (20(1)), S. 17–25.
- Quioco FA, Spurlino JC, Rodseth LE. (1997 Aug 15): Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor. *Structure*;5(8):997-1015.
- R. Krämer (1994): Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1185, S. 1–34.
- R.E. Martin, M. Pannier, F. Diederich, V. Gramlich, M. Hubrich, H.W. Spiess (1998): Determination of End-to-End Distances in a Series of TEMPO Diradicals of up to 2.8 nm Length with a New Four-Pulse Double Electron-Electron Resonance Experiment. *Angew. Chem.*37, (20)2834-2837, P-98-204.
- R.S. Prajapati, M. Sirajuddin, V. Durani, S. Sreeramulu, R. Varadarajan (2006): Contribution of cation-pi interactions to protein stability. *Biochemistry* 45, 15000–15010.
- Roder, H., and W. Colón (1997): Kinetic role of early intermediates in protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 8:112-8.
- S. Sheshadri, G.M. Lingaraju, R. Varadarajan (1999): Denaturant mediated unfolding of both native and molten globule states of maltose binding protein are accompanied by large ΔC_p 's. *Protein Sci.* 8, 1689–1695.
- Schwartz, M. (1987): The maltose regulon. *Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology*, 2nd ed. p. 1482-1502. Washington D. C. American Society of Microbiology.
- Schwartz M. (1967): Phenotypic expression and genetic localization of mutations affecting maltose metabolism in *Escherichia coli* K 12. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* (112), S. 673–698.
- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A. F., and Gilmanshin, R. I. (1991): Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* 31, 119-128.
- Sharf, A. J. Rodseth, L. E. Spurlino, J. C. and Quioco, F. A (1992): Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry (Mosc)* (31), S. 10657–10663.
- Shilton, B. H., Flocco, M., Nilson, M. and Mowbray, S. L. (1996): conformational change of three periplasmic receptors bacterial chemotaxis and transport: the maltose-, glucose-, and ribose-binding proteins. *J Mol Biol.* (267), S. 530.
- Shuman, B.M., Vancour, R.P., Smiddy, M., Saflekos, N.A. and Rich, F.J. (1981): Field-aligned current, convective electric field, and auroral particle measurements during a major magnetic storm. *Journal of Geophysical Research* 86: doi S. 148–227.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985 Oct): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* ;150(1):76-85.
- Spurlino JC, Lu GY, Quioco FA. (1991 Mar 15): The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. In: *J. Biol. Chem.* 266, S. 5202–5219.
- Spurlino, J. C., Lu, G. Y. & Quioco, F. A (1991): The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* (5202–5219).
- Steinhoff, H.J. and W.L. Hubbell (1996): Calculation of electron paramagnetic resonance spectra from Brownian dynamics trajectories: application to nitroxide side chains in proteins. *Biophys. J.*, 71:2201-2212.

- Steinhoff, H.-J., Dombrowsky, O., Karim, C. and Schneiderhahn, C. (1991): Two dimensional diffusion of small molecules on protein surfaces: an EPR study of the restricted translational diffusion of protein-bound spin labels. *Eur. Biophys. J.* 20.
- Steinhoff, H.J., M. Müller, C. Beier, M. Pfeiffer (2000): Molecular dynamics simulation and EPR spectroscopy of nitroxide side chains in bacteriorhodopsin. *J. Mol. Liq.* 84:17-27.
- Stryer, L. (1965): The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J. Mol. Biol.* 13: 482–495.
- Thornton, J.M., Orengo, C.A., Todd, A.E., and Pearl, F.M. (1999): Protein folds, functions and evolution. In: *J. Mol. Biol.* 293: 333–342.
- TOPPING, T. B.; RANDALL, L. L. (1994): Determination of the binding frame within a physiological ligand for the chaperone SecB. *Protein Science.* 3, S. 730 – 736.
- Trakhanov, S., Vyas, N. K., Luecke, H., Kristensen, D. M., Ma, J., and Quioco, F. A. (2005): Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the Escherichia coli ABC leucine/isoleucine/valine transport system: trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity, *Biochemistry* 44, 6597-6608.
- Treptow, N. A. & Shuman, H. A. (1985): Genetic evidence for substrate and periplasmic-membrane components of the Escherichia coli maltose transport system. *J Bacteriol* 163(2), 654-60.
- TROMMER, W. E. (Fassung vom Januar 2013): Biochemisches Praktikum. Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie. URL http://www.chemie.uni-kl.de/wcms/fileadmin/chemie/Dokumente/Dokumente_BC/fuer_stud/bc-skript201201.pdf.
- U.K. Laemmli (1970 15 August): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685, ; doi:10.1038/227680a0.
- Uversky, V. N., S. Winter, and G. Löber. (1998): 1998. Self-association of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate molecules: spectroscopic characterization and application to the investigation of protein folding. *Biochim Biophys Acta* 1388:133-42.
- V.G. Panse, K. Beena, R. Philipp, W.E. Trommer, P.D. Vogel, R. Varadarajan (2001): Electron spin resonance and fluorescence studies of the bound - state conformation of a model protein substrate to the chaperone SecB. *J. Biol. Chem.* 276, 33681-33688.
- V.V. Khramtsov, L.B. Volodarsky, in *Biological Magnetic Resonance* (Hg.) (1998): 14–Spin Labeling, *The Next Millenium*. ed. by L.J. Berliner (Plenum Press, New York, London).
- van Veen, H. W. & W.N. Koninhs (1997): Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 72 : 299 - 315.
- Voss, J., He, M., Hubbell, W., Kaback, H. (1996): Site-directed spin labeling demonstrates that the transmembrane domain XII in the lactose permease of Escherichia Coli is an alpha-helix. *Biochemistry* 35 pp.1215-18.
- Walkenhorst WF, Green SM, Roder H. (1997): Kinetic evidence for folding and unfolding intermediates in staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 36: 5795-5805.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969): The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138, USA. *J.Biol. Chemistry*, Vol.244, No,16, pp.4406-4412.
- Weber, R. T. (2005): Elexsys E 580 User’s Manual. Bruker Biospin Corporation, Manual Version 2.0.
- Weber, R. T. (2006): Pulsed ELDOR Option – User’s Manual. Manual version 1.0, Bruker Biospin Cor-.
- Weber, K., Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. 1969. *J. Biol. Chem.*, 244, 16, 4406 – 4412.

- Wedler, G. (Hg.) (1997): Lehrbuch der Physikalischen Chemie. 5.Auflage: Wiley-VCH.
- Wertz & Bolton (1986): Electron paramagnetic resonance. Chapman and Hall (New York). Book (ISBN 0412011816).
- Wertz, J.E., Bolton, J.R (1972): Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications. Online verfügbar unter McGraw Hill. Methods. Enzym. (246), S. 536–554.
- Wolynes P.G., Onuchic J.N., Thirumalai D. (1995): Navigating the folding routes. Science 267: 1619–1620.
- Wolynes, PG, Eaton, WA (1999): The physics of protein folding. Physics world; 12.39-44.
- Woody, R.W. and Dunker, A.K. (1995): in Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. Plenum Press, New York. (Fasman, G.D., ed.). pp.109-157,
- Wu, J. W., and Z. X. Wang (1999): New evidence for the denaturant binding model. Protein Sci. 8:2090-2097.
- Z. Li, Y. Li, C. Guo, Y. Shi, M. Xu, W.E. Trommer, J. Yuan (2004): Soluble expression and affinity purification of functional domain of human acetylcholine receptor α - subunit by the modulation of maltose binding protein. Biotechnol. Lett. 26, 1765–1769.
- Zhang, Y., Conway, C., Rosato, M., Suh, Y. & Manson, M. D. (1992). Maltose chemotaxis (1992): Maltose chemotaxis involves residues in the N-terminal and C-terminal domains on the same face of maltose-binding protein. J Biol Chem 267 (32), 22813-20.

7.2 Internet

- Sartorius: <http://www.sartorius-stedim.com>;
- AppliChem: <http://www.applichem.com>
- RCSB: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=1OMP>

DANKSAGUNG

Mit der Fertigstellung der Dissertationsschrift ist es an der Zeit, nochmals denjenigen zu danken, die mich begleitet und unterstützt haben. Besonderer Dank gilt dabei zunächst Herrn Prof. Dr. W.E. Trommer, der nicht nur die wissenschaftliche Betreuung meines Dissertationsprojekts übernommen und dessen Fortgang durch kritische wie inspirierende Fachdiskussionen bereichert, sondern mich auch im Hinblick auf meine fachliche, berufliche und persönliche Weiterentwicklung stets gefördert hat. Die drei und halb Jahre Assistententätigkeit an seinem Lehrstuhl waren für mich eine glückliche Zeit nicht zuletzt aufgrund der ausgesprochen angenehmen und kollegialen Atmosphäre.

Nicht weniger zu danken gilt es Herrn Dr. Reinhard Philipp für die Unterstützung bei den MD Rechnungen und für die Hilfe als Korrekturleser sowie für die wohlwollende Begleitung meines Promotionsverfahrens.

Für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. John Cullum und Herrn Prof. Dr.-Ing. C. Ernst danke ich für die Mitwirkung an der Disputation. Mein besonderer Dank gilt an Herren Prof. Dr. Raghavan Varadarajan vom Indian Institute of Science in Bangalore für die Bereitstellung der MBP-Plasmide, die als Ausgangspunkt für meine Arbeit dienten.

Prof. Dr. Dariush Hinderberger und Dipl. -Biophys. Jörg Reichenwallner für die Einführung in die 4-Puls-DEER-Messungen am MPIP Mainz und für den Rat bezüglich der eigenen Puls-Messungen und für die fröhliche Zusammenarbeit bei der Durchführung der EPR Messungen.

Dr. Badr Mohamed für seine spontane und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der ersten Schritte meiner Arbeit und für das lustige Arbeitsklima. Sowie an Frau Dipl.-Chem. Chen Chen für ihre engagierte und erfolgreiche Mitarbeit im Rahmen dieses Forschungsprojekts, Frau Carolin Fluck und dem gesamten Arbeitskreis der Biochemie möchte ich für die kreative Zusammenarbeit und die vielen unterhaltsamen Stunden während der Arbeiten im Labor danken.

Mein Dank gilt auch meinen Freunden, meinen Kollegen und Kolleginnen während meiner Zeit an der technischen Universität Kaiserslautern.

Nicht zuletzt meinen Eltern bin ich für die unentwegte, gleichermaßen moralische wie tatkräftige Unterstützung sowohl während meines Studiums als auch während meines Dissertationsprojektes.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die für das Gelingen dieser Arbeit ihren Teil dazu beigetragen haben.

Meiner kleinen Familie dafür, dass sie mich in dieser Zeit tapfer begleitet und in meinem Tun bekräftigt und unterstützt hat.

PUBLIKATIONEN

Veröffentlichungen

- **Maltose Binding Protein is Partially Structured in its Molten Globule State**

Jörg Reichenwallner, Mohammed Chakour, S. Indu, Raghavan Varadarajan & Wolfgang E. Trommer

Applied Magnetic Resonance ISSN 0937-9347

Appl Magn Reson DOI 10.1007/s00723-013-0468-4

Received: 28 February 2013 / Revised: 16 May 2013

©Springer-Verlag Wien 2013

Tagungsbeiträge

- **A Partially Structured Molten Globule Protein**

Chakour M., Reichenwallner, J., Indu, S.² Varadarajan, R., Trommer, W.E.

The VIII International Workshop on EPR (ESR) in, Biology and Medicine, Krakow, Poland, October 4-7, 2010

- **Maltose binding protein (MBP) is partially structured in its molten globule states**

Chakour M., Reichenwallner, J., Indu, S.² Varadarajan, R., Trommer, W.E.

52nd RMCAC- August 1-5, 2010 (Snowmass, Colorado)

Rocky mountain conference on magnetic Resonance

- **Maltose binding protein (MBP) is partially structured in its molten globule states**

M. Chakour, Jörg Reichenwallner, R. Varadarajan and W. E. Trommer

54th Annual Meeting Biophysical Society, Salt Lake City, Utah (USA)

18. - 23.02.2011.

- **A Partially Structured Molten Globule Protein**

Chakour M., Reichenwallner, J., Indu, S.² Varadarajan, R.,

Trommer, W.E.

Jul 19, 2012, 54th Rocky mountain conference on magnetic Resonance

- **A Partially Structured Molten Globule Protein**

M. Chakour, W.E. Trommer, Department of Chemistry, TU Kaiserslautern,
SPIN 2011, Marseille (F) 26. - 29.09.2011.

- **A Partially Structured Molten Globule Protein**

Chakour M., Reichenwallner, J., Indu, S. Varadarajan, R., Trommer, W.E.
8th Asia-Pacific EPR/ESR Symposium (APES 2012).
October 11-15, 2012, Beijing, China

- **A Partially Structured Molten Globule Protein**

Chakour M., Reichenwallner, J., Indu, S.² Varadarajan, R.,
Trommer, W.E.
July 28 - August, 2013 Denver, Colorado.

- **The Molten Globule State of Maltose Binding Protein: DEER Measurements at pH 3**

M. Chakour, J. Reichenwallner, B. Selmke, S. Theison, R. Chakraborty, S. Indu,
R. Varadarajan, D. Hinderberger, and W. E. Trommer
International Conference "Modern Development of Magnetic Resonance-2013"
September 25-28, 2013 Kazan, Russia

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Mohammed Chakour

Promotion

03/2010 bis heute Promotionsstudium an der TU Kaiserslautern, FB Chemie
Thema: Strukturuntersuchungen verschiedener Mutanten des Maltose-Bindeproteins (MBP) mit Hilfe der ESR-Spektroskopie

Hochschulstudium

04/2002 - 11/2009 Studium der Biologie an der TU Kaiserslautern
Abschluss des Studiums als Diplom-Biologe
Diplomarbeit in der Fachrichtung Biologie
Thema: „Top-down Annotation von Genen“

09/1994 - 06/1998 Studium der Biologie an der Universität Sidi Mohamed ben Abdellah
Fes/Marokko
Abschluss des Studiums als Diplom- Biologe

Schulbildung

06/1994 Abitur mit den Leistungskursen Biologie, Physik und Mathematik
Fes/Marokko

09/1991 - 06/1994 Moulay Rchid Gymnasium

09/1979 - 06/1991 Grundschule Sidi Boujida

Stipendium

02/2009 - 11/2009 Stipendiat der TU Kaiserslautern (Diplomarbeit)

03/2010 - 08/2013 Stipendiat der TU Kaiserslautern (Promotion)

Sprachen Arabisch, Französisch und Englisch

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Strukturuntersuchungen verschiedener Mutanten des Maltose-Bindungsproteins (MBP) mit Hilfe der ESR-Spektroskopie“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Kaiserslautern, den 07.Mai 2015

Mohammed Chakour