

**Untersuchungen zur Struktur und Funktion  
des Maltose bindenden Proteins  
Radikalnachweis unter Verwendung  
einer neuartigen Spin trap**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern

zur Erlangung des akademischen Grades

“Doktor der Naturwissenschaften”

genehmigte

**Dissertation**

(D 368)

vorgelegt von

Dipl.-Biophys. Benjamin Selmke

unter Anleitung von:

Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

Kaiserslautern 2017

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer im Zeitraum von April 2013 bis November 2017 im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern angefertigt.

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 11.01.2017

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 21.12.2017

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing S. Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. E. Trommer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. J. Pierik

*Meinen Eltern*





*Wer dauerhaften Erfolg haben will,  
muß sein Vorgehen ständig ändern.*

Niccoló Machiavelli (1469 - 1527)

Italienischer Staatsmann und Schriftsteller



## Abstract

Ziel im ersten Teil dieser Arbeit ist die Untersuchung der offenen und geschlossenen Konformation des Maltose bindende Proteins (MBP) im nativen und *Molten-Globule*-(*MG*)-Zustand mit Hilfe der ESR-Spektroskopie.

Die komplexen Mechanismen der Proteinfaltung und Proteindynamik bilden schon seit Langem ein wichtiges Forschungsziel in der Untersuchung biochemischer Prozesse und der Enzymkinetik.

MBP bietet sich in diesem Zusammenhang als geeignetes Forschungsobjekt an, da die Konformationsunterschiede des MBP gut erkennbar sind und sich der *MG*-Zustand genügend lang für Untersuchungen stabilisieren lässt. Die Fähigkeit zur reversiblen Faltung ist für ein Protein dieser Größe ebenso wie die Ausbildung eines hoch geordneten *MG*-Zustands mit hoher Affinität zu seinem Zielsubstrat ungewöhnlich.

Der besondere Vorteil der ESR-Spektroskopie ist die geringe Störung der Messung durch das Messsystem, was die Möglichkeit liefert, das Protein unter nativen Bedingungen, selbst innerhalb von Membranen oder biologischen Systemen, zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit verwendete *site-directed spin-labeling* (*SDSL*)-Methode, bei der eine kovalente Bindung von Nitroxid-Spinlabel (NSL) an das Protein eingesetzt wird, löst kaum Störungen im System aus und schränkt die Flexibilität der Proteine kaum ein.

Als Grundlage der ESR-spektroskopischen Untersuchungen dienen im Haus durchgeführte *cw*-ESR-Messungen und *DQC*-Messungen, welche bei unserem Kooperationspartner J. Freed im ACERT Institut, Ithaca, New York, durchgeführt wurden.

Die *double quantum coherence* (*DQC*)-ESR beschreibt eine spezifische Messmethode zur Analyse der dipolaren Elektron-Elektron-Wechselwirkungen durch Isolierung des Elektron-Spin-Echos und somit der Abstandsbestimmung zweier NSL unter Verwendung einer spezifischen Pulsabfolge. Der größte Vorteil dieser Methode ist die Minimierung störender Hintergrundsignale, ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis und die mögliche Bestimmung von Abständen zwischen 10 und 80 Å.

Über Molekulare-Dynamik-(MD)-Simulation lässt sich ein guter Einblick in die Struktur von Proteinen gewinnen und ein Model der gelabelten Proteine entwickeln.

Die These, dass MBP bereits ohne seinen Liganden beide Konformationen einnimmt, kann durch die *DQC*-Messungen und die Korrelation mit der MD-Simulation bestätigt werden. Weiterhin kann nachgewiesen werden dass eine Grundstruktur von MBP und ein funktionell ausgebildetes aktives Zentrum bereits im *MG*-Zustand vorliegt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Möglichkeit untersucht freie Radikale in verschiedenen Systemen, auch innerhalb von Zellen, mittels ESR-Spektroskopie zu detektieren und zu analysieren. Die Zielsetzung dabei ist es, die Radikalbildung bei verschiedenen medizinischen Behandlungen zu untersuchen.

Die Lebensdauer einer Zelle wird durch das Zusammenspiel von freien Radikalen mit Antioxidantien, Proteinen, Cofaktoren und sonstigen Zellbestandteilen bestimmt. Durch bessere Kenntnis dieses Zusammenspiels können große Fortschritte in Medizin und Gesundheitsvorsorge erreicht werden.

Sollte die Bildung der Sauerstoffradikale das natürliche antioxidative Potential der Zelle überschreiten, spricht man von dem "oxidativem Stress" der Zelle. Zu den möglichen Folgen des oxidativen Stresses gehört die Schädigung aller zellulären und extrazellulären Makromoleküle bis hin zur Apoptose, also dem Absterben der Zelle. Die primären Folgen sind vor allem die Lipidperoxidation, die Proteinoxidation und die Schädigung der DNA.

Durch die Verwendung von ESR-spektroskopischen Methoden ist es möglich Untersuchungen innerhalb lebender Zellen durchzuführen.

Zur Detektion der Radikale wird dabei ein Radikalfänger (*Spin trap*) eingesetzt, welcher a priori kein ESR-Signal liefert, sondern erst durch den Kontakt mit dem freien Radikal ein ungepaartes Elektron und somit ein ESR-Signal aufweist.

Die Verbindung 2-Ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (EMPO) ist ein Derivat des DMPO, in welchem die Nitroxidgruppe zusätzlich stabilisiert wird. Hierdurch kommt es zu einer deutlich längeren Lebensdauer der Spin-Addukte und einer besseren Auflösung der ESR-Messung.

Die entstehenden Signale der einzelnen EMPO-Addukte lassen sich mit geeigneten Methoden simulieren. Dies ermöglicht die Analyse der entstandenen Radikale.

Während unter der Strahlenbelastung von CT- und MRT-Untersuchungen keine Radikalbildung in den Proben festgestellt werden kann, liefert die Strahlentherapie mittels Linearbeschleuniger ein breites Spektrum gebildeter Radikale.

Die Ausbildung dieser Radikale zeigt sich dabei von verschiedenen Faktoren abhängig. So zeigt sich die Ausbildung von H-, OH- und OOH-Addukten durch Luftsauerstoff begünstigt, die Zugabe von NaCl fördert die Ausbildung von Wasserstoffradikalen und organische Pufferbestandteile, wie z.B. Tris oder HEPES, führen zur erhöhten C-Addukt-Bildung.

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>I. Untersuchungen zur geöffneten und geschlossenen Form des Maltose bindenden Proteins</b> | 5  |
| <b>1. Einleitung</b>  | 7  |
| <b>2. Theoretische Grundlagen</b>   | 9  |
| 2.1. Das Maltose bindende Protein (MBP)   | 9  |
| 2.2. Der <i>Molten-Globule</i> -Zustand   | 11 |
| 2.3. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie   | 12 |
| 2.3.1. Strukturanalyse von Proteinen  | 12 |
| 2.3.2. Physikalische Herleitung   | 14 |
| 2.3.2.1. Zeeman-Effekt  | 14 |
| 2.3.2.2. Gleichgewichts-Verteilung  | 15 |
| 2.3.2.3. <i>cw</i> -Messung   | 17 |
| 2.3.2.4. Hyperfeinstruktur  | 18 |
| 2.3.2.5. Dipol-Dipol-Wechselwirkung   | 19 |
| 2.3.2.6. <i>Pulsed dipolar spectroscopy</i>   | 22 |
| 2.3.3. <i>Site-directed spin-labeling</i> (SDSL)  | 27 |
| 2.4. Mutagenese   | 30 |
| <b>3. Aufgabenstellung</b>  | 31 |
| <b>4. Ergebnisse und Diskussion</b>   | 33 |
| 4.1. Mutagenese und Kontrolle der MBP-Mutanten  | 33 |
| 4.2. Reinheitsnachweis des Maltose bindenden Proteins   | 37 |
| 4.2.1. SDS-PAGE   | 37 |
| 4.2.2. MALDI-Messung  | 38 |
| 4.2.3. ANS-Fluoreszenz-Messung  | 40 |
| 4.2.4. Circulardichroismus  | 43 |
| 4.3. Simulation von MBP   | 44 |
| 4.3.1. Design neuer Mutanten  | 44 |
| 4.3.2. MMM-Simulation der MTS-Abstände  | 44 |
| 4.3.3. MD-Simulation der MTS-Abstände   | 47 |
| 4.3.4. Vergleich der simulierten Abstände   | 53 |
| 4.4. ESR-Messungen  | 55 |
| 4.4.1. Untersuchung des <i>Molten-Globule</i> -Zustands                                       | 60 |
| 4.4.2. Vergleich der simulierten und gemessenen Abstände von MBP                              | 62 |
| <b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b>  | 65 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>II. Radikalnachweis unter Verwendung einer neuartigen Spin trap . . . . .</b> | <b>67</b>  |
| <b>6. Einleitung . . . . .</b>   | <b>69</b>  |
| <b>7. Theoretische Grundlagen . . . . .</b>                                      | <b>71</b>  |
| 7.1. Reaktive Sauerstoff-Spezies . . . . .                                       | 71         |
| 7.2. Elektronenspinresonanz: <i>Spin trap</i> . . . . .                          | 73         |
| 7.2.1. Grundlagen . . . . .  | 73         |
| 7.2.2. Spektren-Simulation . . . . .   | 75         |
| 7.2.3. EMPO . . . . .  | 77         |
| <b>8. Aufgabenstellung . . . . .</b>   | <b>79</b>  |
| <b>9. Ergebnisse . . . . .</b>   | <b>81</b>  |
| 9.1. Simulation der EMPO-Spektren . . . . .                                      | 81         |
| 9.2. Versuche zur Detektion von ROS in Zellen . . . . .                          | 86         |
| 9.2.1. Voruntersuchungen EMPO . . . . .  | 86         |
| 9.2.2. Erstes Experiment "ROS-Nachweis" . . . . .                                | 89         |
| 9.2.3. Zweites Experiment "ROS-Nachweis" . . . . .                               | 91         |
| 9.2.4. Drittes Experiment "ROS-Nachweis" . . . . .                               | 93         |
| 9.3. Versuche zur Bestimmung von ROS in verschiedenen Puffersystemen . . . . .   | 96         |
| 9.3.1. Untersuchung zur Stabilität des EMPO . . . . .                            | 96         |
| 9.3.1.1. Zeitkinetik bei Raumtemperatur . . . . .                                | 97         |
| 9.3.1.2. Zeitkinetik bei höheren Temperaturen . . . . .                          | 100        |
| 9.3.1.3. Auswertung der Zeitkinetiken . . . . .                                  | 105        |
| 9.3.2. Viertes Experiment "ROS-Nachweis" . . . . .                               | 106        |
| 9.3.3. Fünftes Experiment "ROS-Nachweis" . . . . .                               | 112        |
| <b>10. Zusammenfassung und Ausblick . . . . .</b>                                | <b>117</b> |

|   |     |
|---|-----|
| <b>III. Anhang</b> . . . . .  | 119 |
| <b>11. Material und Methoden</b> . . . . .  | 121 |
| 11.1. Methoden . . . . .  | 121 |
| 11.1.1. Methoden für die Untersuchungen des Maltose bindenden Proteins              | 121 |
| 11.1.2. Methoden für die Radikalnachweisuntersuchungen . . . . .                    | 126 |
| 11.2. Ansatz der Stammlösungen . . . . .  | 128 |
| 11.2.1. Stammlösungen für die Untersuchung des Maltose bindenden Proteins . . . . . | 128 |
| 11.2.2. Stammlösungen für die Radikalnachweisuntersuchungen . . . . .               | 132 |
| <b>12. Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien</b> . . . . .                  | 135 |
| 12.1. Chemikalien . . . . .   | 135 |
| 12.2. Gentechnische Arbeitsmaterialien . . . . .                                    | 137 |
| 12.2.1. Chemikalien . . . . .   | 137 |
| 12.2.2. Enzyme . . . . .  | 137 |
| 12.2.3. Bakterienstämme . . . . .   | 137 |
| 12.2.4. Primer . . . . .  | 138 |
| 12.3. Geräte . . . . .  | 139 |
| 12.4. Verbrauchsmaterialien . . . . .   | 141 |
| <b>13. Einfluss der Savitzky-Golay-Filterfunktion</b> . . . . .                     | 143 |
| <b>14. MD-Parameter</b> . . . . .   | 145 |
| <b>15. DQC-ESR-Spektren</b> . . . . .   | 147 |
| <b>16. WinSIM-Fit-Simulationen</b> . . . . .  | 157 |
| 16.1. Ergebnisse der ROS4-Simulation . . . . .                                      | 157 |
| 16.2. Ergebnisse der ROS5-Simulation . . . . .                                      | 161 |
| <b>17. ESR-Parameter</b> . . . . .  | 165 |
| 17.1. ESR-Parameter für die Untersuchung des Maltose bindenden Proteins . .         | 166 |
| 17.1.1. <i>cw</i> -ESR-Parameter bei RT-Messung (MBP) . . . . .                     | 166 |
| 17.1.2. <i>cw</i> -ESR-Parameter bei TT-Messung (MBP) . . . . .                     | 166 |
| 17.2. ESR-Parameter für die EMPO-Messungen . . . . .                                | 167 |
| 17.2.1. <i>cw</i> -ESR-Parameter der Messreihen ROS 1-3 . . . . .                   | 167 |
| 17.2.2. <i>cw</i> -ESR-Parameter der Messreihen ROS 4, 5 . . . . .                  | 167 |
| <b>Literaturverzeichnis</b> . . . . .   | 169 |
| <b>Weblinks</b> . . . . .   | 175 |
| <b>Danksagung</b> . . . . .   | 177 |
| <b>Eidesstattliche Erklärung</b> . . . . .  | 179 |
| <b>Curriculum Vitae</b> . . . . .   | 181 |





## Fundamentale Konstanten (*Wedler, 1997*)

|                                   |         |   |
|-----------------------------------|---------|---|
| Gaskonstante                      | $R$     | $8,31451 J K^{-1} mol^{-1}$             |
| Elementarladung                   | $e$     | $1,602177 \cdot 10^{-19} C$             |
| Landé-Faktor des freien Elektrons | $g_e$   | 2,002319134                             |
| Planksche Konstante               | $h$     | $6,62608 \cdot 10^{-34} J s$            |
| Planksches Wirkungsquantum        | $\hbar$ | $1,0545887 \cdot 10^{-34} J s$          |
| Ruhemasse des Elektrons           | $m_e$   | $9,10939 \cdot 10^{-31} kg$             |
| Magnetische Feldkonstante         | $\mu_0$ | $4\pi \cdot 10^{-7} m kg s^{-2} A^{-2}$ |
| Bohrsches Magneton                | $\mu_B$ | $9,284831 \cdot 10^{-24} J T^{-1}$      |

## Abkürzungsverzeichnis

|              |   |
|--------------|---|
| ANS          | 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure                               |
| AS           | Aminosäuren   |
| ASP          | Amylosesäule-Puffer   |
| BCA          | Bicinchoninsäure  |
| BSA          | <i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserum-Albumin)               |
| CD           | Circulardichroismus   |
| CGH          | Natriumcitrat-Glycin-Hepes                                      |
| <i>cw</i>    | <i>continuous wave</i>  |
| <i>DEER</i>  | <i>Double Electron-Electron Resonance</i>                       |
| DEPMPO       | Diethyl-(2-methyl-1-oxido-3,4-dihydro-2H-pyrrol-2-yl)phosphonat |
| DHB          | 2,5-Dihydroxybenzoesäure  |
| Disk         | diskontinuierlich   |
| DMF          | Dimethylformamid  |
| DMPO         | 2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid                       |
| <i>DSDSL</i> | <i>double site-directed spin-labeling</i>                       |
| DTNB         | 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure                               |
| DTT          | Dithiothreitol  |
| DMPO         | 5,5-Dimethyl-1-pyrrol-N-oxid                                    |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid  |
| DNA          | Desoxyribunukleinsäure  |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <i>DQC</i>            | <i>double quantum coherence</i>                         |
| <i>E. coli</i>        | <i>Escherichia coli</i>                                 |
| EDTA                  | Ethylendiamintetraessigsäure                            |
| EMPO                  | 2-Ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid  |
| ESR                   | Elektronenspinresonanz                                  |
| Fn                    | Fenton-Reagenz  |
| FS                    | Fluoreszenz-Spektroskopie                               |
| GdnHCL                | Guanidinhydrochlorid                                    |
| H $\alpha$ LA         | humanes $\alpha$ -Lactalbumin                           |
| HCl                   | Salzsäure   |
| HEPES                 | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure   |
| IPTG                  | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid                    |
| IR                    | Infrarot  |
| Iso-NaCl              | Isotonische Kochsalzlösung                              |
| ITC                   | Isotherme Titrationskalorimetrie                        |
| LB                    | <i>lysogeny broth</i>                                   |
| <i>LN<sub>2</sub></i> | Flüssiger Stickstoff                                    |
| MALDI                 | Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation         |
| MBP                   | Maltose bindendes Protein                               |
| <i>MEM</i>            | <i>maximum entropy method</i>                           |
| MD                    | Molekulare Dynamik                                      |
| MMS                   | Maltose/Maltodextrin-System                             |
| MS                    | Massenspektrometrie                                     |
| MTS                   | 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methylthiosulfonat |
| <i>MWCO</i>           | <i>molecular weight cutoff</i>                          |
| NMR                   | Kernspinresonanz  |
| NSL                   | Nitroxid-Spinlabel                                      |
| OD                    | Optische Dichte   |
| PBN                   | N-tert-Butyl- $\alpha$ -Phenylnitron                    |
| PBS                   | Phosphatgepufferte Salzlösung                           |
| <i>PDS</i>            | <i>pulsed dipolar spectroscopy</i>                      |
| PP                    | Phosphatpuffer  |
| PSD                   | Phasen-sensitiver Detektor                              |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| PCR                   | Polymerase-Ketten-Reaktion                            |
| ROS                   | Reaktive Sauerstoffspezies                            |
| Roti                  | Rotationsverdampfer                                   |
| rpm                   | <i>revolutions per minute</i>                         |
| RT                    | Raumtemperatur  |
| SDC                   | Standard-Dynamik-Kaskade                              |
| <i>SDSL</i>           | <i>site-directed spin-labeling</i>                    |
| SDS-PAGE              | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |
| <i>SOC</i>            | <i>super optimal broth with catabolite repression</i> |
| <i>TB</i>             | <i>terrific broth</i>                                 |
| TBS                   | Tris-NaCl-Pufferlösung                                |
| TBS-T                 | Tris-NaCl-Tween20-Pufferlösung                        |
| TEMPO                 | 2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxyl                 |
| TKN                   | Tikhonov-Regularisierung                              |
| TNC                   | Tris-Natrium-Chlorid                                  |
| TOF                   | Flugzeitanalysator                                    |
| TT                    | Tieftemperatur  |
| V.C                   | Ascorbinsäure (Vitamin C)                             |
| WT                    | Wildtyp   |
| XO                    | Xanthinoxidase  |
| <i>X-ray-analysis</i> | Röntgenstrukturanalyse                                |



**Teil I.**

**Untersuchungen zur geöffneten und  
geschlossenen Form des Maltose  
bindenden Proteins**



# 1. Einleitung

Die komplexen Mechanismen der Proteinfaltung und Proteindynamik bilden schon seit Langem ein wichtiges Forschungsziel in der Untersuchung biochemischer Prozesse und der Enzymkinetik. 1969 wies Cyrus Levinthal theoretisch nach, dass ein Protein nicht zufällig aus dem ungefalteten Zustand in die richtige Konformation übergehen kann, indem es alle möglichen Faltungen ausprobiert [Levinthal, 1969]. Diese Tatsache wurde als das Levinthal-Paradoxon bekannt.

Faktoren wie die Polarität und Viskosität des Lösungsmittels sowie sterische und polare Wechselwirkungen zwischen den AS, wie beispielsweise die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, führen schon bei der Proteinsynthese zur Ausbildung der Sekundärstruktur [Alberts et al., 2002, Wedler, 1997]. Während und nach der Proteinbiosynthese führen diese und weitere Faktoren, wie zum Beispiel der Einfluss etwaiger Liganden oder Hilfsproteine, meistens Chaperone, zur Ausbildung der Tertiärstruktur. Nach Ausbildung seiner Tertiärstruktur ist ein Protein vollständig funktionsfähig [Wedler, 1997].

Mittlerweile geht man davon aus, dass die Proteinfaltung gemäß sogenannter *folding pathways* erfolgt, in welchen einzelne Übergangszustände bei der Proteinfaltung zu erkennen sind, jedoch sind diese häufig zu schnell, um tatsächlich detektiert werden zu können, und nur in theoretischen Berechnungen und Simulation der molekularen Dynamik (MD) erkennbar [Alberts et al., 2002]. Hierzu wurde in den letzten Jahren der *Molten-Globule*-Zustand als funktionellen Übergangszustand zwischen der Sekundär- und der Tertiärstruktur erforscht, in welchem dies möglich ist [Kuwajima, 1989, Sheshadri et al., 1999]. Die Schwierigkeit hierbei besteht darin, diesen Übergangszustand genügend zu stabilisieren, um ihn gründlich untersuchen zu können [Kuwajima, 1989]. Besonders interessant ist die Vermutung, dass ein Protein bereits im *Molten-Globule*-Zustand, also ohne vollständige Ausbildung der Tertiärstruktur, einige seiner Funktionen erfüllen kann [Prajapati et al., 2007, Reichenwallner et al., 2013].

Allein schon die Wechselwirkung zwischen Substrat und Protein löst häufig eine Konformationsänderung im Protein aus, welche Einfluss auf die Funktion des Letzteren hat [Wedler, 1997]. Entsprechend führt die Bindung des Liganden zu Aktivierung bzw. Inaktivierung funktioneller Abschnitte der Proteine, wodurch der Aufbau der komplexen Regelkreise und Kontrollmechanismen innerhalb der Zellen ermöglicht wird [Alberts et al., 2002].

Das Maltose bindende Protein (MBP) bietet sich in diesem Zusammenhang als geeignetes Forschungsobjekt an, da sich sowohl sein *Molten-Globule*-Zustand für Untersuchungen genügend stabilisieren lässt, als auch die Konformationsunterschiede von an den Liganden freiem und gebundenen MBP gut erkennbar sind [Reichenwallner et al., 2013, Spurlino et al., 1991, Sheshadri et al., 1999].

Auch scheint das MBP in der Lage zu sein selbst im *Molten-Globule*-Zustand seinen Liganden binden zu können, was auf eine sehr frühe Ausbildung einer funktionellen Struktur schließen lässt [Chen, 2013].

Durch die Verwendung von ESR-spektroskopischen Untersuchungsmethoden lassen sich Proteine störungsfrei in biologischen Systemen unter verschiedenen Bedingungen untersuchen und Informationen über Struktur und Dynamik gewinnen [Berliner et al., 2000, Berliner, Hemminga, 2007, Borbat, Freed, 2013, Hustedt, Beth, 1999, Jeschke, 2008, Rabenstein, Shin, 1995, Steinhoff, Hubbell, 1996, Steinhoff et al., 1997].



## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Das Maltose bindende Protein (MBP)

Das Maltose bindende Protein, oftmals auch als Maltodextrin bindendes Protein bezeichnet, ist ein globuläres periplasmatisches Transportprotein aus dem Maltose/Maltodextrin-System (MMS) von *E. coli*, welches der Kontrolle des Maltodextrin-Metabolismus dient. Es spielt eine entscheidende Rolle beim energieabhängigem Transport von Maltose und Maltodextrin über die Cytoplasmamembran [Duplay et al., 1984] und ist in der Lage, sowohl lineare als auch zyklische Maltodextrine hoch affin zu binden [Spurlino et al., 1991]. Bemerkenswert hierbei ist, dass MBP eine deutliche Selektivität für Maltodextrine aufweist und die Bindungsaffinität zu Maltotriose den höchsten Wert annimmt [Spurlino et al., 1991].

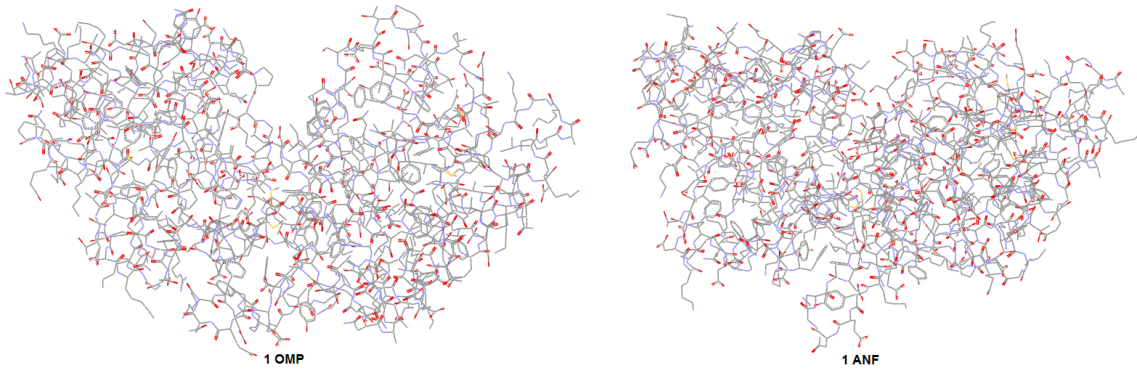
Der Zuckertransport über das MMS wird hauptsächlich von dem Membran-gebundenen Komplex aus MalF, MalG und MalK sowie MBP gesteuert [Spurlino et al., 1991]. Dabei nimmt MBP die Rolle als initialer, nicht Membran-gebundener Carrier ein und bindet an die periplasmatische Schleife P2 des MalF-Proteins [Jacso et al., 2012].

Der gesamte MalFGK<sub>2</sub>-Komplex dient als ein weiteres Paradebeispiel eines ABC-Transportsystems und findet sich auch aus diesem Grund regelmäßig im Mittelpunkt der Forschung [Stockner et al., 2005].

MBP ist ein aus 370 Aminosäuren (AS) aufgebautes und 40.7 kDa schweres Monomer mit zwei globulären Domänen, welche durch eine breite Kluft, die auch als Bindungsspalte bezeichnet wird, voneinander getrennt sind [Spurlino et al., 1991]. Diese Bindungsspalte ist reich an aromatischen sowie polaren Gruppen und stellt das aktive Zentrum der hoch affinen Maltose/Maltodextrin-Bindung dar [Duplay et al., 1984, Spurlino et al., 1991]. Im substratfreien Zustand liegt MBP in der geöffneten Konformation vor, in der beide Domänen weiter voneinander entfernt sind als in der geschlossenen Konformation [Ganesh et al., 1997]. Sobald MBP an Maltose oder Maltodextrin bindet, klappen die beiden Domänen aufeinander zu und umschließen den Zucker, wodurch dieser durch intramolekulare Wechselwirkung vollständig vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt wird [Spurlino et al., 1991]. Dieser Klappmechanismus erinnert stark an eine Venus-Fliegen-Falle.

Die geöffnete und geschlossene Konformation sind zur besseren Übersicht in Abbildung 2.1 mit Hilfe der Software "Accelrys Discovery Studio" auf Basis von Röntgenstrukturanalysen aus der "RCSB"-Proteindatenbank dargestellt [www.rcsb.org, 1ANF, 1OMP].

Die Synthese von MBP findet im Cytoplasma statt, wo das 396 AS lange preMBP synthetisiert und in einem denaturierten Zustand durch das Chaperon SecB gebunden wird. Sobald der preMBP/SecB-Komplex an die Cytoplasmamembran bindet, wird die 26 AS lange N-terminale Präsequenz abgetrennt und MBP in den periplasmatischen Raum abgegeben [Duplay et al., 1984].



**Abb. 2.1:** Struktur des Maltose bindenden Proteins [www.rcsb.org, 1ANF, 1OMP]

1999 veröffentlichte Sheshadri seine Arbeit über den *Molten-Globule*-Zustand von MBP und berichtete über dessen Fähigkeit zur reversiblen Faltung und Bindung von Maltose selbst im stabilisierten *Molten-Globule*-Zustand bei pH 3 [Sheshadri et al., 1999]. Das heißt, schon vor kompletter Ausbildung der Tertiärstruktur weist MBP eine Bindungsaffinität zu Maltose und Maltodextrin auf. Zudem weist MBP eine der höchsten chemischen Entfaltungsenthalpien auf, die jemals für ein globuläres Protein gemessen wurden [Sheshadri et al., 1999].

Neue Forschungsergebnisse deuten auf eine semi-geöffnete Konformation von MBP hin, die sowohl unter An- als auch Abwesenheit von Maltose nachweisbar ist, sobald MBP an MalF gebunden ist [Jacso et al., 2012]. Man geht davon aus, dass MBP in dieser Konformation zwar Maltose binden kann, diese allerdings nicht den Klappmechanismus auslöst und diese Konformation für die Entstehung des Komplexes aus MalF, MalG, MalK und MBP wichtig ist [Jacso et al., 2012].

MBP stellt einen interessanten Untersuchungsgegenstand zur Faltungskinetik dar. Seine Fähigkeit zur reversiblen Faltung ist für ein Protein dieser Größe ebenso wie die Ausbildung eines hoch geordneten *Molten-Globule*-Zustands mit hoher Affinität zu seinem Zielsubstrat ungewöhnlich [Sheshadri et al., 1999]. Als Forschungsobjekt eignet es sich, da es schon im nativen Zustand keine Disulfidbrücken, prosthetische Gruppen, gebundene Metallionen noch Cofaktoren aufweist und aufgrund der reversiblen Faltung und hohen Stabilität unter einer großen Vielfalt von Versuchsbedingungen beobachtet werden kann [Ganesh et al., 1997].

## 2.2. Der *Molten-Globule*-Zustand

Allgemein unterteilt man die Strukturebenen der Proteine in die Primärstruktur, welche die Reihenfolge der AS enthält, die Sekundärstruktur, welche den Aufbau der Helices und Faltblattstrukturen beschreibt, die Tertiärstruktur, welche die komplette räumliche Struktur des fertigen Proteinmonomers umfasst, und die Quartärstruktur, welche das Zusammenspiel der Monomere kennzeichnet.

Als *Molten-Globule*-Zustand eines globulären Proteins wird der stabilisierte Faltungszustand bezeichnet, in dem ohne vollständige Ausbildung der Tertiärstruktur strukturelle Elemente vorhanden sind [Ohgushi, 1983]. Der *Molten-Globule*-Zustand bezeichnet somit einen funktionellen Übergangszustand vom entfalteten Zustand zur Tertiärstruktur.

Der Begriff “*Molten-Globule*-Zustand” formte sich 1982 auf einem Symposium in Padova, Italien und wurde erstmals 1981 von Dolgikh et al. vorgeschlagen [Ohgushi, 1983].

Durch die Analyse der “*Molten-Globule*-Struktur” globulärer Proteine erhofft man Rückschlüsse auf die Faltungspfade und Wirkungsmechanismen des Proteins ziehen zu können [Ku wajima, 1989].

Ebenso möchte man die bisher geltende *two-state*-Theorie der Proteinfaltung, die von einem nicht-zufälligen, bisher jedoch unverstandenen Faltungspfad zwischen dem entfalteten Zustand und dem vollständig gefalteten Zustand ausgeht, auf eine *three-or-more-state*-Theorie erweitern, in der ein teilweise funktionsfähiger Zustand vor der vollständigen Faltung erreicht wird. Man vermutet einen schrittweisen Übergang über mehrere Zustände bis zum Ausbau der Tertiärstruktur, also so genannte Teil-Faltungspfade, die es zu entdecken gilt [Ku wajima, 1989].

Zudem lässt sich mit Hilfe der *three-state*-Theorie die Möglichkeit der Membranpermeabilität und Einbindung sonst nicht permeabler Proteine erklären [Ohgushi, 1983].

Die Untersuchung des *Molten-Globule*-Zustand erweist sich als kompliziert, da es keinen allgemeinen Weg gibt, diesen Übergangszustand zu stabilisieren. Meist führt man eine Teilentfaltung des Proteins durch ein geeignetes Zusammenspiel von pH-Wert, Konzentration von Denaturierungsmittel und angepassten Reaktionsbedingungen durch und kann den *Molten-Globule*-Zustand für den Zeitraum einiger Stunden stabilisieren [Ku wajima, 1989]. Allerdings ist der Übergang vom *Molten-Globule*-Zustand in den entfalteten Zustand fließend und sollte regelmäßig kontrolliert werden.

Der *Molten-Globule*-Zustand eines Proteins lässt sich durch Zugabe von ANS über CD- oder Fluoreszenz-spektroskopische Methoden nachweisen, da die zunehmende Ausbildung der Tertiärstruktur die ANS-Bindung verhindert. Der *Molten-Globule*-Zustand wird auch als der Punkt definiert, an dem die Fluoreszenz des ANS-Protein-Komplexes maximal ist [Ku wajima, 1989, Ohgushi, 1983, Sheshadri et al., 1999].

Im Falle des Maltose bindenden Proteins wird die Stabilisierung des *Molten-Globule*-Zustands durch die schrittweise Einstellung eines pH-Werts von 3 im CGH-Puffer ohne die Verwendung von Denaturierungsmitteln erreicht [Sheshadri et al., 1999].

## 2.3. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

### 2.3.1. Strukturanalyse von Proteinen

Die Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie stellt heute neben der Röntgenstrukturanalyse (*X-ray-analysis*), der Fluoreszenz-Spektroskopie (FS) und der Kernspin-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie) eine der bekanntesten Methoden zur Strukturanalyse von Proteinen dar. Da jede dieser Methoden ihre eigenen Vor- und Nachteile aufweist, werden die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen mit denen von Simulationen verglichen, um ein möglichst natürliches Modell des nativen Proteins zu erhalten [Berliner et al., 2000]. Die jeweiligen Simulationstechniken reichen von stochastischer Dynamik-Simulation über Simulationen der Brown'schen Molekularbewegung bis hin zu dem komplexen molekularen Modeling, auch molekulare Dynamik-Simulation genannt, in der je nach Rechenkapazität ein Modell der Kraftfelder auf atomarem Level inklusive sämtlicher wahrscheinlichen Umgebungselemente erzeugt wird und die Newton'schen Bewegungsgleichungen gelöst werden [Berliner, Hemminga, 2007, Steinhoff, Hubbell, 1996]. Ziel der Simulation ist dabei die Minimierung der Gesamtenergie, was dem natürlichen Zustand entspricht.

Wenn möglich werden als vorläufige Grundlage der Simulation die Daten von *X-ray-analysis*-Messungen, beispielsweise aus der "RCSB"-Proteindatenbank [www.rcsb.org], verwendet, da diese in einer Vielzahl vorhanden sind und recht genaue Strukturen mit Auflösungen von 1 - 2,5 Å bieten. Jedoch lassen sich mittels *X-ray-analysis* nur kristallisierte Proteine untersuchen. Insbesondere bei Untersuchungen von membrangebundenen Proteinen gestaltet sich daher die *X-ray-analysis* als schwierig und es empfiehlt sich, andere Methoden wie zum Beispiel die ESR-Spektroskopie zu nutzen [Steinhoff et al., 1997, Berliner et al., 2000].

Der besondere Vorteil der ESR-Spektroskopie ist die geringe Störung der Messung durch das Messsystem, was die Möglichkeit liefert, das Protein unter nativen Bedingungen, selbst innerhalb von Membranen oder biologischen Systemen, zu untersuchen [Berliner et al., 2000, Jeschke, 2008, Rabenstein, Shin, 1995, Steinhoff, Hubbell, 1996]. Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie lässt sich ein Protein sowohl in Pufferlösungen als auch in organischem Material sowie in kristallisierter Form, bei beliebigen Temperaturen, selbst im immobilisierten Zustand bei Tieftemperaturen untersuchen. Nahezu jedes beliebige Medium eignet sich, sofern es keine paramagnetischen Eigenschaften besitzt.

Über den ESR-Effekt lässt sich nur die Wechselwirkung ungepaarter Elektronen detektieren, diese finden sich vor allem in Komplexverbindungen von Übergangsmetallen oder organischen Radikalen [Steinhoff, Hubbell, 1996, Wedler, 1997]. Dass die meisten Proteine solche nicht aufweisen ist Vor- und Nachteil dieser Methode, da einerseits die Radikale künstlich in Form von Nitroxid-Spinlabeln (NSL) in das System eingeführt werden müssen. Vorteile sind andererseits, dass die NSL gezielt in das Protein eingebracht werden können und keine sonstigen Signale die Messung stören [Berliner, Hemminga, 2007, Junk, 2010].

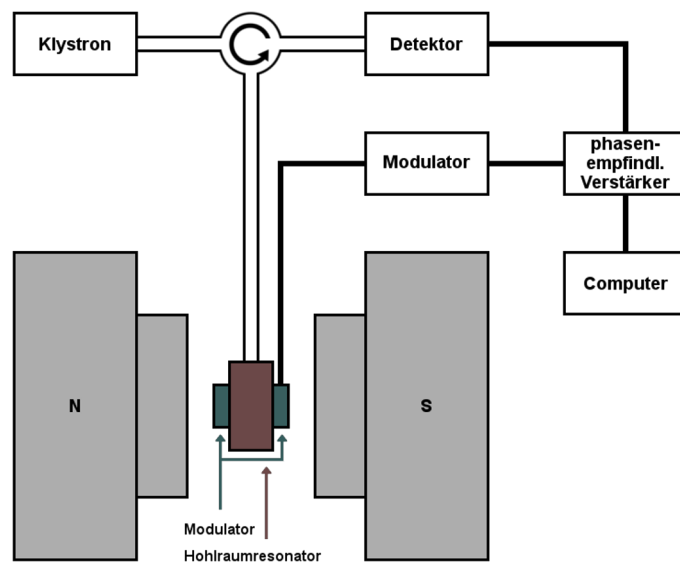
Die in der ESR-Spektroskopie am häufigsten verwendete Methode des Labelns ist die 1994 von Hubbell entwickelte Methode des *site-directed spin-labeling* (*SDSL*), das heißt die gezielte, kovalente Anbindung des NSL an eine bestimmte Aminosäure des Proteins. Hierbei wird zumeist ein Methanthiosulfonat als NSL an die Sulfhydrylgruppe eines Cysteins gebunden [Berengian et al., 1999, Berliner, Hemminga, 2007, Berliner et al., 1982, Hustedt, Beth, 1999].

Die ESR-Spektroskopie wird in der Proteinstrukturanalyse oft im Bereich der Membranproteine eingesetzt, da diese schwer über andere Methoden zugänglich sind und daher bis jetzt auch den am schlechtesten erforschten Bereich der Proteine einnehmen, obwohl 30-40 % aller bekannten Proteine membrangebundene Proteine sind [Berliner, Hemminga, 2007, Klare, Steinhoff, 2009].

Schon die technisch einfach umsetzbare Variante der *cw*-Messung einer an zwei Stellen markierten Probe (*DSDSL*) liefert gute Ergebnisse im Bereich von bis zu 20 Å und kann daher in Verbindung mit geeigneten Simulationen für Aussagen über die Tertiärstruktur genutzt werden [Steinhoff, Hubbell, 1996, Hustedt, Beth, 1999, Berliner, Hemminga, 2007].

Ein herkömmliches ESR-Spektrometer ist in Abbildung 2.2 skizziert.

Das äußere Magnetfeld wird durch einen starken Elektromagnet, hier mit N für magnetischen Nordpol und S für magnetischen Südpol gekennzeichnet, produziert und durch lineare Änderung der Stromstärke im Magnet variiert. Aus messtechnischen Gründen wird es zusätzlich durch den Modulator moduliert. Die für die Anregung benötigte Mikrowellenstrahlung, näheres hierzu in Abschnitt 2.3.2, wird durch ein Klystron (oder eine Gunn-Diode) erzeugt. Die Strahlung wird in den Hohlraumresonator geleitet, in dem es zur Wechselwirkung mit der Probe kommt. Die reflektierte Welle wird durch den nachgeschalteten Detektor registriert und nach Frequenz- und Phasen-abhängiger Verstärkung gemessen. Die digitalisierten Messwerte werden durch einen PC analysiert und ausgewertet [Berliner, Hemminga, 2007, Weber, 2005, Wedler, 1997].



**Abb. 2.2:** Allgemeiner Aufbau eines ESR-Spektrometers

## 2.3.2. Physikalische Herleitung

### 2.3.2.1. Zeeman-Effekt

Als Elektronenspinresonanz wird die Absorption von Energie durch ungepaarte Elektronen in einem äußeren Magnetfeld bezeichnet. Diese Absorption ist jedoch nicht beliebig, sondern kann nur für Strahlung der passenden Resonanzfrequenz, welche die Energiedifferenz der möglichen Zustände beschreibt, stattfinden. In der ESR-Spektroskopie wird diese Absorption detektiert [Berliner, Hemminga, 2007, Jeschke, 2008, Rabenstein, Shin, 1995].

Ein Elektron erzeugt aufgrund seines Spinnmoments, auch Spinvektor  $\vec{S}$  genannt, ein magnetisches Moment  $\vec{\mu}$ :

$$\vec{\mu} = \hbar \cdot \gamma_e \cdot \vec{S} = -g_e \cdot \mu_B \cdot \vec{S}$$

$\gamma_e$ : gyromagnetisches Verhältnis des Elektrons

$\mu_B$ : Bohr'sches Magneton

Befindet sich ein ungepaartes Elektron in einem äußeren Magnetfeld  $\vec{B} = (0, 0, B_0)$ , so richten sich die Spins gemäß der magnetischen Spinquantenzahl  $m_s = \pm \frac{1}{2}$  in zwei verschiedenen Energiezuständen  $E_{1,2}$  aus:

$$E_{1,2} = \pm \frac{1}{2} \cdot g_e \cdot \mu_B \cdot B_0$$

Diese Aufspaltung wird auch als Zeeman-Effekt bezeichnet.

Ein Übergang beider Energieniveaus benötigt die Energie  $\Delta E$ :

$$\Delta E = E_1 - E_2 = 2 \cdot |E|.$$

Für die Energie eines Photons gilt:

$$E_{Photon} = h \cdot \nu = h \cdot \frac{\omega}{2\pi} = \hbar \cdot \omega$$

$\nu$ : Frequenz

$\omega$ : Kreisfrequenz

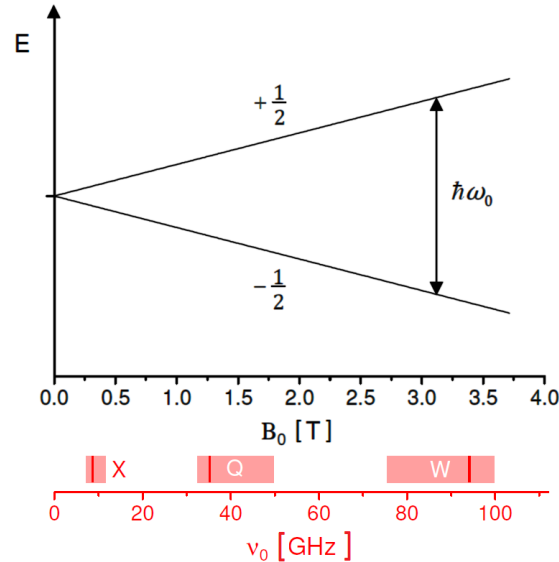
Die Resonanzfrequenz  $\omega_0$ , auch Larmorfrequenz genannt, erhalten wir also über folgende Energiegleichsetzung:

$$\begin{aligned} \hbar \cdot \omega_0 &= 2 \cdot \left| \pm \frac{1}{2} \right| \cdot g_e \cdot \mu_B \cdot B_0 \\ \implies \omega_0 &= \frac{g_e \cdot \mu_B}{\hbar} \cdot B_0 = -\gamma_e \cdot B_0 \end{aligned}$$

Abbildung 2.3 veranschaulicht die möglichen Übergänge bei zunehmender Feldstärke  $B$  bzw. der zugehörigen Frequenz der Strahlung im Mikrowellenbereich.

Der Bereich der Mikrowellenstrahlung wird auch in Bänder eingeteilt, dabei gilt folgende Konvention [Junk, 2010]:

X-Band ( $\sim 9.5$  GHz); Q-Band ( $\sim 36$  GHz); W-Band ( $\sim 95$  GHz)



**Abb. 2.3:** Energieaufspaltung der Elektronenspins in einem äußeren Magnetfeld  $B_0$

### 2.3.2.2. Gleichgewichts-Verteilung

Das Besetzungsverhältnis der verschiedenen Energieniveaus ist abhängig von der Gesamtenergie des Systems und lässt sich über die Boltzmann-Verteilung darstellen:

$$\frac{n_\alpha}{n_\beta} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{k \cdot T}\right) = \exp\left(-\frac{g_e \cdot \mu_B \cdot B_0}{k \cdot T}\right)$$

$n_\alpha$ : Relative Anzahl der Spins im höheren Energieniveau ( $m_s = +\frac{1}{2}$ )

$n_\beta$ : Relative Anzahl der Spins im niedrigeren Energieniveau ( $m_s = -\frac{1}{2}$ )

Eine weitere Größe die sich aus der Boltzmann-Verteilung ergibt ist die Polarisation  $P$ :

$$P = \frac{n_\alpha - n_\beta}{n_\alpha + n_\beta} = \frac{n_\alpha - n_\beta}{N} = \frac{1 - \exp(-\Delta E/kT)}{1 + \exp(-\Delta E/kT)} = \tanh\left(\frac{g_e \cdot \mu_B \cdot B_0}{2 \cdot k \cdot T}\right)$$

Für hohe Temperaturen ( $\Delta E \ll kT$ ) gilt die Kleinwinkelnäherung:

$$P = \tanh\left(\frac{g_e \cdot \mu_B \cdot B_0}{2 \cdot k \cdot T}\right) \approx \frac{g_e \cdot \mu_B \cdot B_0}{2 \cdot k \cdot T}$$

Gemäß dem Larmor-Theorem ergibt sich die Bewegung eines Spins  $\vec{S}$  in einem äußeren Magnetfeld als:

$$\hbar \cdot \frac{d\vec{S}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{B}$$

Die Magnetisierung  $\vec{M}$  ergibt sich daher zu:

$$\hbar \cdot \frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \times \gamma_e \cdot \vec{B}$$

Im Falle eines statischen Magnetfelds  $\vec{B} = (0, 0, B_0)$  ergibt sich die Magnetisierung  $\vec{M}_0$  als:

$$\vec{M}_0 = \frac{1}{V} \sum \vec{\mu}_i = \frac{1}{2} \cdot N \cdot \hbar \cdot \gamma_e \cdot P \cdot \vec{e}_z$$

Um ein rauscharmes Signal im ESR-Spektrometer zu erhalten, wird zudem ein zweites, oszillierendes Magnetfeld  $\vec{B}_\omega$  in der x-y-Ebene über den Modulator aufgebaut. Das gesamte Magnetfeld wird durch  $\vec{B}$  beschrieben:

$$\vec{B} = \begin{pmatrix} B_1 \cdot \cos(\omega_{mod} \cdot t) \\ B_1 \cdot \sin(\omega_{mod} \cdot t) \\ B_0 \end{pmatrix}$$

Die Berechnung der Magnetisierung  $\frac{d\vec{M}}{dt}$  ist über die von Felix Bloch gefundene Bloch-Gleichung möglich [Junk, 2010].

Die Präzessionsfrequenz  $\Omega$  der Kreisbewegung um die z-Achse ergibt sich aus der Überlagerung der Larmorfrequenz und der Frequenz des oszillierenden Magnetfelds  $\vec{B}_\omega$ :

$$\Omega = \omega_0 - \omega_{mod}$$

Wird das System durch Anregung, also Absorption von Mikrowellenstrahlung, aus dem Gleichgewicht gebracht so stellt sich dieses gemäß der Boltzmann-Verteilung erneut ein. Durch Relaxation fallen die angeregten Zustände wieder in das niedrigere Energieniveau zurück. Man unterscheidet zwischen der longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  und der transversalen Relaxationszeit  $T_2$ .

$T_1$  beschreibt die Zeit, welche das System benötigt um ohne Emission über Wärmeabgabe an die Umgebung die Gleichgewichtsverteilung einzustellen [Berliner, Hemminga, 2007]. Man bezeichnet diesen Vorgang auch als Spin-Gitter-Relaxation. Die strahlungslose Abgabe der Energie durch Wärme lässt sich als Reaktion erster Ordnung charakterisieren,  $T_1$  ist demnach der Reziprokwert der Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktion.

$T_2$  beschreibt die Zeit für die Dämpfung der oszillierenden Magnetisierung in der x-y-Ebene [Wedler, 1997], also den Ausgleich der Orientierung der einzelnen Spins [Berliner, Hemminga, 2007].

Dieser Vorgang wird als Spin-Spin-Relaxation bezeichnet.



### 2.3.2.3. cw-Messung

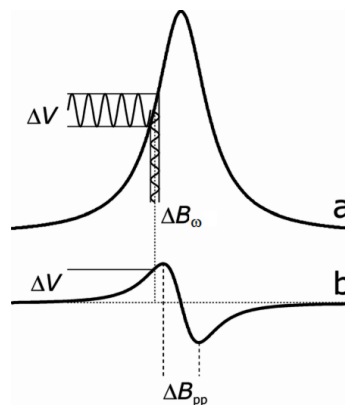
Bei der cw-ESR-Spektroskopie wird die Absorption einer kontinuierlichen Mikrowelleneinstrahlung unter Modulation des Magnetfelds in der x-y-Ebene gemessen.

Die Erzeugung von Mikrowellenstrahlung variabler Frequenz mit annähernd gleicher Amplitude ist technisch schwer umsetzbar, weshalb die Mikrowelleneinstrahlung konstant gehalten wird und nur das Magnetfeld variiert wird.

Die Strahlung wird über eine Mikrowellen-Diode mit breitem Frequenzspektrum detektiert [Berliner, Hemminga, 2007, Feix, Klug, 2008].

Die detektierte Absorption weist daraufhin ein Lorentzprofil auf [Junk, 2010, Berliner, Hemminga, 2007] und oszilliert mit der Frequenz der Feldmodulation  $\omega_{mw}$  und der Ausgangsspannung  $\Delta V$  der Diode. Dieses Signal wird nun mit der sinusförmigen Modulation des Magnetfelds Frequenz- und Phasen-sensitiv detektiert, das heißt nur die Modulation des Diodensignals wird als Gleichspannung aufgezeichnet. Dies entspricht einer Ableitung der ersten Ordnung des ursprünglich detektierten Signals und führt zu einer drastischen Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses.

Beide Signale sind in Abbildung 2.4 dargestellt.



**Abb. 2.4:** a) Signal der Detektor-Diode (Absorption im Lorentzprofil)  
b) Signal nach Lock-In-Verstärker (Erste Ableitung der Absorption)

Die "Peak-to-Peak"-Linienbreite  $\Delta B_{PP}$  ergibt sich aus der Lösung der Bloch Gleichung durch die Differenz der Mikrowellenkreisfrequenz  $\Delta\omega_{PP}$  [Junk, 2010]:

$$\Delta\omega_{PP} = \frac{2}{\sqrt{3} \cdot T_2} \implies \Delta B_{PP} = \frac{2}{\sqrt{3} \cdot T_2} \cdot \frac{\hbar}{g \cdot \mu_B}$$

Die Modulation des Magnetfelds  $\Delta B_\omega$  sollte für eine klare Auftrennung der Linien keinesfalls  $\frac{1}{3} \cdot \Delta B_{PP}$  übersteigen.

### 2.3.2.4. Hyperfeinstruktur

Während der Zeeman-Effekt auf der Wechselwirkung des Elektronenspin  $\vec{S}$  mit dem äußeren Magnetfeld  $\vec{B}$  basiert, kommt es ebenfalls zur Wechselwirkung des Kernspins  $\vec{I}$  mit dem äußeren Magnetfeld  $\vec{B}$ .

Als Hyperfeinstruktur bezeichnet man die Aufspaltung der Zeeman-Energieniveaus aufgrund des Kernspins [Wedler, 1997].

Die durch den Kernspin erzeugte magnetische Flussdichte  $|\vec{B}_I|$  lässt sich über die Kernspinquantenzahl  $m_I$  und die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante  $a_{iso}$  berechnen [Junk, 2010]:

$$|\vec{B}_I| = |\vec{B}_0| + a_{iso} \cdot m_I$$

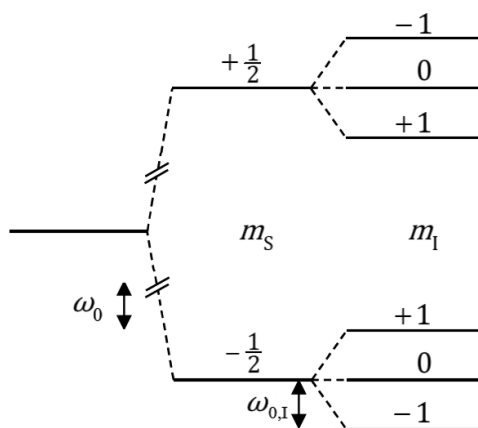
Parallel zu Abschnitt 2.3.2.1 lassen sich daraus die Energieniveaus der Hyperfeinstruktur und die zugehörige Larmorfrequenz  $\omega_{0,I}$  berechnen:

$$\begin{aligned} \hbar \cdot \omega_{0,I} &= g \cdot \mu_B \cdot (B_0 + a_{iso} \cdot m_I) \\ \implies \omega_{0,I} &= \frac{g \cdot \mu_B}{\hbar} \cdot (B_0 + a_{iso} \cdot m_I) \end{aligned}$$

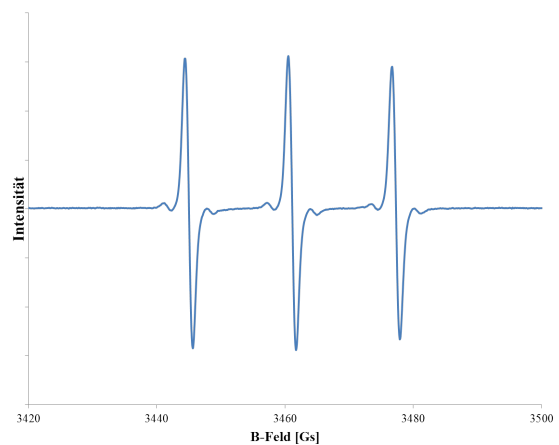
In Abbildung 2.5 ist der Zeeman-Effekt und die Hyperfeinstruktur im Energieschema für das Isotop  $^{14}\text{N}$  exemplarisch dargestellt.

$^{14}\text{N}$  besitzt die Kernspinquantenzahlen  $m_I = +1, 0, -1$ .

Das aus der Hyperfeinstruktur resultierende Spektrum des NSL MTS ( $^{14}\text{N}$ ) bei RT ist in Abbildung 2.6 gezeigt, in der man deutlich die 3 Resonanzlinien, den Tieffeld-, Mittelfeld- und Hochfeldpeak, erkennen kann.



**Abb. 2.5:** Energieschema des Stickstoffisotops  $^{14}\text{N}$  mit Zeeman-Effekt ( $\omega_0$ ) und Hyperfeinstruktur ( $\omega_{0,I}$ )



**Abb. 2.6:** ESR-Spektrum des ungebundenen MTS-Spinlabels bei Raumtemperatur

### 2.3.2.5. Dipol-Dipol-Wechselwirkung

Jeder ungepaarte Elektronenspin in einem äußeren Magnetfeld nimmt das Verhalten eines Dipols an [Wedler, 1997]. Die Wechselwirkung dieser miteinander ist mit der *cw*-ESR-Methode nur für geringe Abstände von 12 bis 25 Å messbar, kann jedoch über andere Methoden auf 10 bis 80 Å erweitert werden [Jeschke et al., 2006, Steinhoff et al., 1997]. Um dies zu erreichen werden sogenannte Pulstechniken eingesetzt, welche allgemein als *pulsed dipolar spectroscopy (PDS)*-Methoden bezeichnet werden. Die ersten *PDS*-Methoden wurden vor über 30 Jahren erstmals eingeführt, um auch schwache dipolare Wechselwirkungen unter Ausschluss anderer Überlagerungssignale ungestört detektieren zu können [Borbat, Freed, 2007]. Die bekannteste *PDS*-Methode ist die *double electron-electron resonance (DEER)*, die nach wie vor in der Proteinforschung eine entscheidende Rolle spielt [Borbat, Freed, 2007, Jeschke, 2008]. Da in dieser Arbeit die *DQC*-Methode verwendet wird, wird diese in Abschnitt 2.3.2.6 näher erläutert.

Im Falle einer ESR-Messung eines Moleküls oder Proteins mit zwei NSL bei tiefen Temperaturen  $< 200$  K lassen sich die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der einzelnen Elektronenspins erkennen.

Die tiefe Temperatur wird benötigt um die Eigenbewegung der Proteine und NSL zu verhindern, die ansonsten das Dipol-Potential überlagern würde [Berliner, Hemminga, 2007, Steinhoff et al., 1997]. Die Verwendung eines Lösungsmittels mit hoher Viskosität unterstützt die Immobilisierung ebenfalls [Klare, Steinhoff, 2009].

Im gefrorenen Zustand überwiegen bei sehr kleinen Abständen ( $< 8$  Å) der NSL die Einflüsse der dipolaren Elektron-Elektron Wechselwirkungen und der J-J-Kopplung, welche über die ESR kein differenzierbares Signal ergeben.

Erst ab einem Abstand von  $\geq 8$  Å treten die dipolaren Wechselwirkungen der ungepaarten Elektronenspins im Spektrum hervor.

Durch diese Wechselwirkung kommt es zu einer Aufspaltung der Absorptionslinien im ESR-Spektrum, die durch folgende Gleichung beschrieben wird:

$$2 \cdot B = \left(\frac{3}{2}\right) \cdot g_e \cdot \mu_B \cdot (3 \cdot \cos^2(\theta) - 1) \cdot \frac{1}{r^3}$$

$\theta$ : Winkel zwischen dem äußeren Magnetfeld  $\vec{B}$  und dem Spinvektor  $\vec{S}$

Für biologische Systeme kann von folgender Annahme ausgegangen werden:

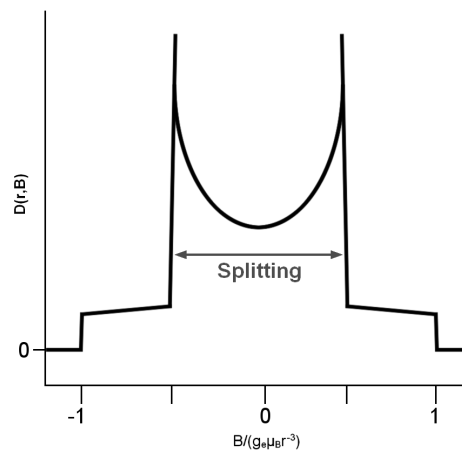
Annahme:  $\theta$  sei isotrop verteilt und für jedes gegebene  $\theta$  sei die axiale Rotation um den Spinvektor  $\vec{S}$  sowie sämtlich bewegliche Bindungen zwischen den Nitroxidgruppen und dem restlichen Peptid isotrop verteilt

Diese Annahme würde für ein System von Spins mit gegebenem  $\theta$  ohne Beachtung der dipolaren Wechselwirkungen zu einem Pulverspektrum führen [Rabenstein, Shin, 1995].

Das tatsächliche ESR-Spektrum würde sich dann aus einer Superposition dieses Pulverspektrums mit der entsprechenden dipolaren Linienenerweiterungsfunktion, die auch als *Pake-Pattern* bekannt ist, ergeben.

*Pake-Pattern* ist eine Verteilungsfunktion die in diesem Fall durch folgende Gleichung beschrieben werden kann und in Abbildung 2.7 gezeichnet ist [Rabenstein, Shin, 1995]:

$$\langle 2 \cdot B \rangle = (0.75) \cdot \left(\frac{3}{2}\right) \cdot g_e \cdot \mu_B \cdot \frac{1}{r^3}$$



**Abb. 2.7:** *Pake-Pattern* Funktion

Über eine Fouriertransformation lassen sich aus diesen Funktionen daraufhin Rückschlüsse auf die Positionen beziehungsweise den Abstand der NSL schließen [Rabenstein, Shin, 1995].

Zur technischen Umsetzung wird dabei die Fast Fouriertransformation verwendet [Berliner, Hemminga, 2007, Steinhoff et al., 1997].

Zur Simulation des Dipol-Dipol Spektrums wird das oben beschriebene Pulverspektrum über die Superposition einer Gauss- und Lorentzfunktion mit den Parametern des g-Tensors ( $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$ ,  $g_{zz}$ ), A und den 3 Linienbreiten, der Breite des Gaussprofils, der Breite des Lorentzprofils und der jeweiligen Anteile im Gesamtspektrum berechnet [Steinhoff et al., 1997]. A bezeichnet hierbei die Hyperfeinstrukturkonstante und wird durch folgende Gleichung definiert [Junk, 2010]:

$$A = \frac{g_i \cdot \mu_K \cdot B_J}{\sqrt{J \cdot (J+1)}}$$

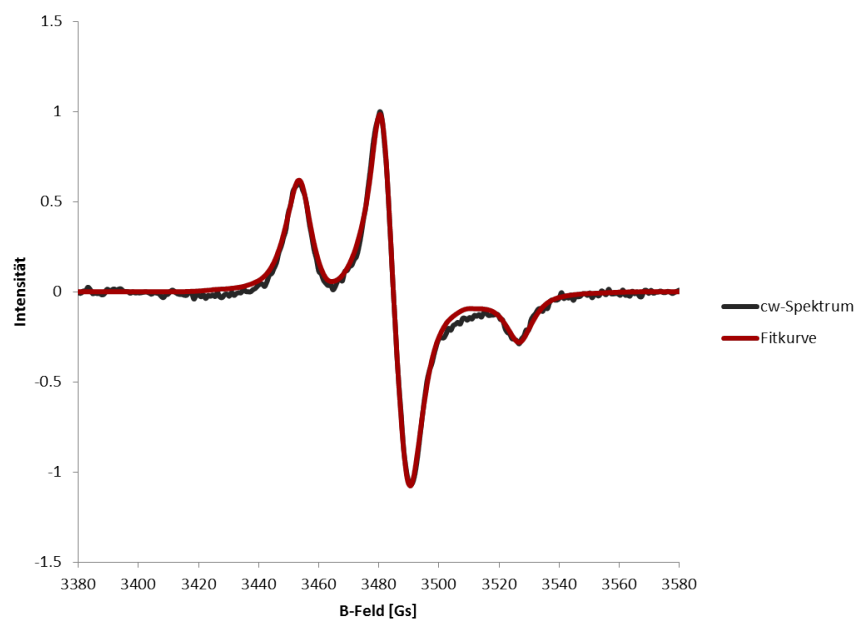
- $g_I$ : Landé-Faktor des Kerns
- $\mu_K$ : Kernmagneton
- $B_J$ : Das durch den Kern erzeugte Magnetfeld
- $J$ : Hüllendrehimpuls

Dieses simulierte Spektrum kann daraufhin anhand experimenteller Daten einer Messung mit nur einem NSL (also ohne dipolare Wechselwirkung) verglichen werden und die Parameter der Simulation über einen Fit entsprechend angepasst werden. Aufgrund der komplexen Berechnung wird dabei ein iterativer, nicht-linearer Fit über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt bis die Überschneidung mit dem experimentellen Spektrum maximal ist [Steinhoff et al., 1997].

Nun kann das Gesamtspektrum über Superposition des simulierten “*Powder-Spektrums*” und der dipolaren Linienverbreiterungsfunktion berechnet werden und über Anpassung des Abstands  $\varrho$  beider NSL und der Verteilungsbreite  $\sigma$  des *Pake-Pattern* an das experimentelle Gesamtspektrum gefittet werden [Steinhoff et al., 1997].

In Abbildung 2.8 sieht man ein über das Programm “Dipfit2” berechnetes simuliertes *cw*-ESR-Spektrum für eine Tieftemperaturmessung einer MBP-Doppelmutante an die der NSL MTS gebunden wurde.

Die Fitkurve wird in Rot dargestellt, das gemessene *cw*-ESR-Spektrum in Schwarz. Der kalkulierte Abstand in diesem Beispiel entspricht 1,5 nm.



**Abb. 2.8:** Experimentelles und simuliertes *cw*-ESR-Spektrum zweier, an MBP gebundener MTS-Moleküle (Abstand beider Label 1,5 nm)

### 2.3.2.6. Pulsed dipolar spectroscopy

Die Methode der *pulsed dipolar spectroscopy* (*PDS*) wurde vor über 30 Jahren eingeführt und findet seit der kommerziellen Implementation von *DEER*-ESR-Spektrometern rege Anwendung in der Forschung [Borbat, Freed, 2007].

Im Allgemeinen detektiert man in der *PDS* den Abfall des Elektron-Spin-Echos, aus welchem sich die dipolare Elektron-Elektron Wechselwirkung zweier Spins  $S_1$  und  $S_2$  berechnen lässt.

Dieses Echo wird im Gegensatz zu der *cw*-Methode über einen Puls entlang der x-Achse des rotierenden Laborsystems mit resonantem Mikrowellenfeld  $\vec{B}_1$  für einen kurzen Zeitraum  $\tau_P$  erzeugt, der die Magnetisierung der paramagnetischen Probe in die x-y-Ebene auslenkt [Jeschke, 2008]. Diese Auslenkung  $\delta$  wird auch als Kippwinkel der Magnetisierung bezeichnet und ist folgendermaßen definiert [Junk, 2010]:

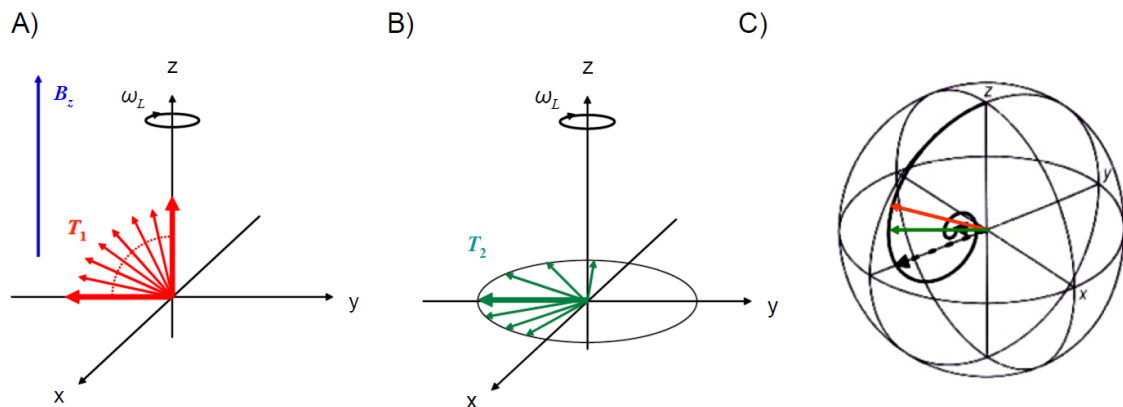
$$\delta = \omega_1 \cdot \tau_P = \frac{g_e \mu_B}{\hbar} \cdot B_1 \cdot \tau_P$$

In der praktischen Anwendung werden Pulse im Bereich von Nanosekunden und Mikrowellenstrahlung sehr hoher Intensitäten verwendet um möglichst das komplette Spektrum erfolgreich anregen zu können.

Im Falle von  $\delta = 90^\circ$  spricht man von einem  $(\pi/2)_x$ -Puls und entsprechend gilt für einen  $(\pi)_x$ -Puls eine Auslenkung von  $\delta = 180^\circ$ .

Da die Spins direkt nach der Anregung beginnen sich zu ihrem Ursprungsort (parallel zum äußeren Magnetfeld  $\vec{B}_0$ ) zurückzubewegen, spielen nun die longitudinale Relaxationszeit  $T_1$ , die Zeit in der sich die Spins zur z-Achse bewegen, und die transversale Relaxationszeit  $T_2$ , die Zeit in der sich die Spins in der x-y-Ebene sammeln, eine entscheidende Rolle.

Zum besseren Verständnis sind  $T_1$  und  $T_2$  sowie eine Darstellung der überlagerten Bewegung der Spins in einer Kugel in Folge eines  $(\pi/2)_x$ -Pulses in Abbildung 2.9 dargestellt [Schweiger, Jeschke, 2001].



**Abb. 2.9:** Graphische Darstellung der Relaxationsprozesse nach einem  $(\pi/2)_x$ -Puls. A) longitudinale Relaxation; B) transversale Relaxation; C) Überlagerung beider Relaxationsprozesse nach [Schweiger, Jeschke, 2001]

Durch die starken Pulse und die vergleichsweise langsame Dissipation der Mikrowellenenergie im Resonator ist es technisch nicht möglich, direkt nach der Anregung ein störfreies Spektrum aufzuzeichnen, dies wird auch als Resonator-Ringing mit der Totzeit  $\tau_R$  bezeichnet [Schweiger, Jeschke, 2001]. Um eine tatsächliche Messung des Spektrums zu ermöglichen wird daher eine Pulsfolge benötigt, welche das relevante Signal auf einen Zeitpunkt außerhalb dieser Totzeit verschiebt.

Hierbei greift man auf Kenntnisse zurück, die erstmals 1950 von Erwin Hahn in der NMR-Spektroskopie gewonnen wurden [Berliner et al., 2000].

Damals wurde folgendes Phänomen entdeckt:

Bei Einsatz einer geschickt gewählten Pulssequenz tritt ein Wiederauftauchen der initialen Magnetisierung des Spinsystems auf, man spricht in diesem Fall von einem Spin-Echo.

Die zeitliche Evolution des Spin-Echos wird durch die Spin-Spin-Relaxation, die dipolare Elektron-Elektron-Wechselwirkung, die Elektron-Kern-Hyperfeinaufspaltung und das Quadrupolmoment des Kerns bestimmt. Im Falle der *PDS* wird nun nicht die dipolare Linienverbreiterung approximiert, sondern durch Wahl einer geschickten Pulsfolge das Spektrum auf den Einfluss des Heisenberg-Austauschs und der dipolaren Kopplung beschränkt [Borbat, Freed, 2013, Jeschke et al., 2006]. So können beispielsweise auch Proben mit geringer Spin-Label-Effizienz untersucht werden, da die Anteile der einfach gelabelten Proben nur zu dem Hintergrundrauschen beitragen [Borbat, Freed, 2007].

Die *double quantum coherence*-ESR beschreibt eine spezifische Messmethode zur Analyse der dipolaren Elektron-Elektron-Wechselwirkungen durch Isolierung des Elektron-Spin-Echos und somit der Abstandsbestimmung zweier Spinlabel unter Verwendung einer spezifischen Pulsabfolge [Borbat, Freed, 2013].

Der größte Vorteil dieser Methode ist die Minimierung störender Hintergrundsignale, ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis und die mögliche Bestimmung von Abständen zwischen 10 und 80 Å zwischen 2 NSL [Borbat, Freed, 2007, Yang et al., 2012].

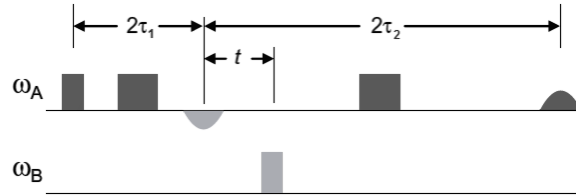
Die wohl am häufigsten verwendete *PDS* Methode ist die *double electron-electron resonance* (*DEER*) in der eine 4-Pulssequenz verwendet wird. Das besondere hierbei ist die Unterteilung in Observer- und Pumpspin, welche jeweils über eine separate Mikrowellenquelle erzeugt werden müssen [Jeschke, 2008].

Mittels *DEER*-ESR-Spektroskopie können Abstände in einem Bereich von 20 bis 80 Å detektiert werden [Berliner, Hemminga, 2007].

## Die 4-Puls-*DEER*-Sequenz

$$\pi/2(\omega_A)x - \tau_1 - \pi(\omega_A)x - t - \pi_{ELDOR}(\omega_B)x - (\tau_1 + \tau_2 - t) - \pi(\omega_A)x - \tau_2$$

ist in Abbildung 2.10 dargestellt [Junk, 2010].



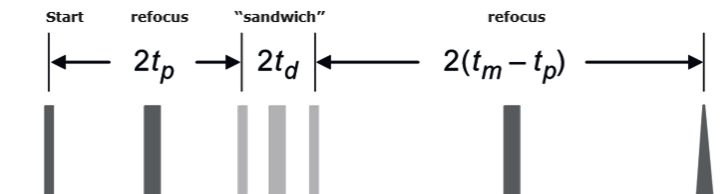
**Abb. 2.10:** Darstellung der Pulssequenz für eine *DEER*-Messung

Im Gegensatz hierzu wird für die *DQC*-Methode nur eine Pulsfrequenz mit einer 6-Puls-Sequenz verwendet. Für die Anregung der Probe werden hierbei deutlich intensivere Pulse verwendet, wodurch das detektierte Echo exakter bestimmbar ist. Im Vergleich zur *DEER*-Messung benötigt man für dieselbe Signalintensität einen zehnfach stärkeren Puls mit einem Zehntel der Pulsdauer [Borbat, Freed, 2007].

Die *DQC*-Pulssequenz lautet

$$\pi/2 - t_p - \pi - t_p - \pi/2 - t_d - \pi - t_d - \pi/2 - (t_m - t_p) - \pi - (t_m - t_p)$$

und findet sich in Abbildung 2.11 [Borbat, Freed, 2007].



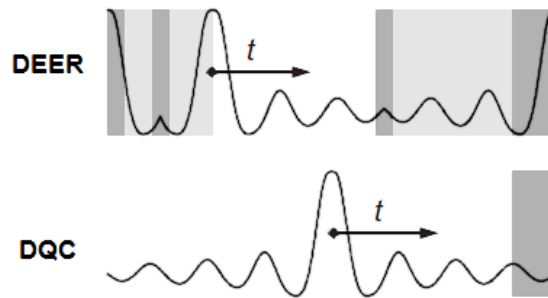
**Abb. 2.11:** Darstellung der Pulssequenz für eine *DQC*-Messung

Wie bereits erwähnt ist es technisch nicht möglich, im Anschluss an einen Puls ein störungsfreies Signal zu detektieren. Im Falle einer Pulssequenz unterscheidet man zwei Fälle.

Die absolute Totzeit, in der aufgrund von Überladung kein Signal detektiert werden kann, und die relative Totzeit, in der das Signal durch Überlappung der Pulse im Verstärker, bichromatische Effekte oder schrittweisen Phasenwechsel des Signals Störungen aufweisen kann [Borbat, Freed, 2007].



In Abbildung 2.12 sieht man das theoretische Signal einer *DEER*- bzw. *DQC*-Messung und die Totzeitbereiche. Der Bereich der absoluten Totzeit ist in dunklem Grau unterlegt, die relative Totzeit hingegen ist hellgrau markiert.



**Abb. 2.12:** Theoretisches *DEER*- (oben) bzw. *DQC*- (unten) Signal in der „Zeit-Domäne“ [Borbat, Freed, 2007].  
 Der dunkelgraue Bereich entspricht der absoluten Totzeit;  
 Der hellgraue Bereich stellt die relative Totzeit dar

Man erkennt in Abbildung 2.12 im Falle der *DQC*-Methode einen deutlich größeren freien Messbereich des Signals, was auf eine höhere Auflösung dieser Methode schließen lässt. Betrachtet man Abbildung 2.13 wird klar, dass man zur vollständigen Analyse des Spektrums aufgrund der Symmetrie nur eine Hälfte des Spektrums benötigt und daher auch die *DEER*-Methode alle relevanten Daten liefert. Der Bereich relevanter Information ist in Abbildung 2.12 mit  $t$  gekennzeichnet.

Häufig wird auch für die *DQC*-Messung der Datensatz auf eine Hälfte beginnend bei dem globalen Maximum reduziert, um keine überschüssigen Daten mitzuführen und die Auswertung zu erleichtern [Borbat, Freed, 2007].

Um mit dem nun detektierten Signal tatsächlich Rückschlüsse auf die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zweier NSL ziehen zu können, gilt folgende Überlegung equivalent zu Abschnitt 2.3.2.5:

Da alle Spins parallel zum magnetischen Feld  $\vec{B}_z$  ausgerichtet sind, gilt für den Spin-Hamiltonoperator der Dipol-Dipol-Kopplung  $\vec{H}_{DD}$  folgende Näherung [Berliner, Hemminga, 2007, Jeschke et al., 2006, Borbat, Freed, 2013]:

$$H_{DD} = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar r_{12}^3} \cdot g_1 \cdot g_2 \cdot \mu_B^2 \cdot (1 - 3 \cdot \cos^2(\theta))$$

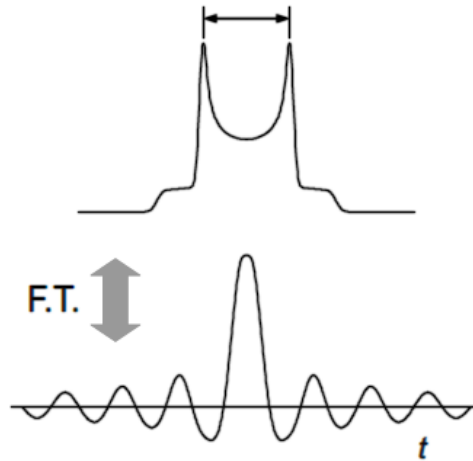
$r_{12}$ : Abstand der beiden NSL

$\theta$ : Winkel zwischen dem  $\vec{r}_{12}$  und dem magnetischen Momenten  $\vec{\mu}_1$  bzw.  $\vec{\mu}_2$

Diese Näherung bildet die Grundlage zur Berechnung der Abstandsfunktion [Junk, 2010].

Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben führt ein solches Verhältnis für Temperaturen  $< 200$  K und unter Annahme isotroper Verteilung von  $\theta$  zur Ausbildung eines Pulverspektrums wie in Abbildung 2.7 dargestellt.

Durch Fourier-Transformation dieses *Pake-Patterns* erhält man das Signal in der „Zeit-Domäne“, welche in diesem Fall auch als dipolare Oszillation bezeichnet wird [Yang et al., 2012]. Dies ist in Abbildung 2.13 dargestellt:



**Abb. 2.13:** Fourier Transformation des dipolaren Pulverspektrums von der „Frequenz-Domäne“ in die „Zeit-Domäne“

Anhand dieser Oszillation kann draufhin, beispielsweise mittels Tikhonov-Regularisierung, der Abstand der NSL berechnet werden [Junk, 2010, Rabenstein, Shin, 1995].

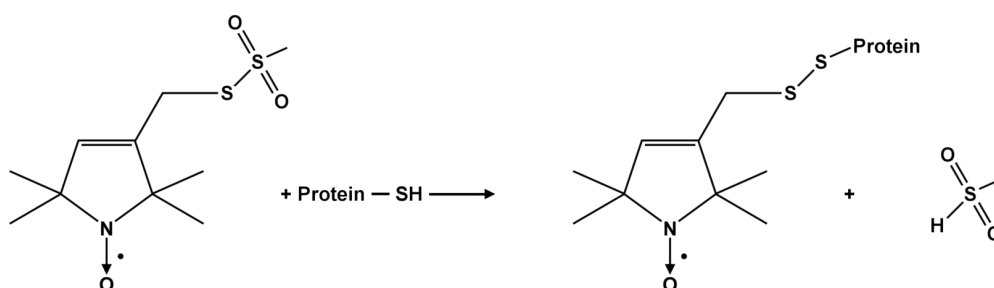
### 2.3.3. Site-directed spin-labeling (SDSL)

Die Methode des *SDSL* wurde 1994 von W. Hubbell und Kollegen vorgestellt und findet seither zunehmend Verwendung, vor allem in Kombination mit der Mutagenese des Zielproteins [Berliner, Hemminga, 2007].

Wie bereits erwähnt stellt das *SDSL* eine Methode zur kovalenten Bindung von Labeln an Moleküle oder Proteine da, wodurch kaum Störungen im System ausgelöst werden und die Flexibilität der Proteine erhalten bleibt. Aufgrund der kleinen Nitroxidringe und der hohen Signalstärke der Nitroxide im ESR-Spektrum werden zumeist NSL-Moleküle als Label verwendet [Berliner, Hemminga, 2007, Hustedt, Beth, 1999].

Die häufigste Anwendung als NSL finden dabei die Methanthiosulfonate, wie beispielsweise MTS [Berliner et al., 1982, Berliner, Hemminga, 2007, Berengian et al., 1999, Hustedt, Beth, 1999, Klare, Steinhoff, 2009, Rabenstein, Shin, 1995]. Grund hierfür ist zum einen die hohe Stabilität der Nitroxid-Radikale und zum anderen die hohe Selektivität für Thiol-Gruppen, die den NSL zielsicher an Cysteine bindet. Die entstandene Disulfidbindung bietet zudem den Vorteil, dass sie durch Reduktionsmittel wie beispielsweise DTT reversibel gelöst werden kann [Berliner et al., 1982].

Die Bindung von MTS an die Cysteingruppe eines Proteins ist in Abbildung 2.14 skizziert. In der praktischen Durchführung wird die Reaktivität der Cysteingruppe durch vorherige Inkubation mit einem Reduktionsmittel gewährleistet [Berliner, Hemminga, 2007].



**Abb. 2.14:** Bindung von MTS an eine Cysteingruppe

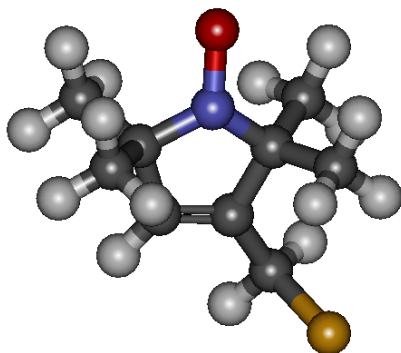
Durch die zielsichere Bindung der Methanthiosulfonate lässt sich jede beliebige Stelle der Proteinstruktur untersuchen, indem die Cysteinpositionen der Aminosäuresequenz über Mutagenese entsprechend angepasst werden. Ziel der Mutagenese ist eine AS-Sequenz, die jeweils nur ein oder zwei Cysteine an gewünschter Stelle aufweist, wohingegen weitere Cysteine nur an für das Label unzugänglichen Stellen vorhanden sein dürfen [Berliner, Hemminga, 2007]. Dabei werden je nach Situation AS ergänzt, gelöscht oder ausgetauscht. Hierbei ist jedoch darauf zu achten, dass keine für die Proteinfunktion entscheidenden Bindungsstellen verändert werden und genügend Platz für den NSL in der Proteinstruktur vorhanden ist [Berliner et al., 1982]. Selbst schwer zugängliche Stellen lassen sich durch vorherige Entfaltung des Proteins erreichen, dies setzt jedoch die reversible Faltung des Proteins voraus.

Vor allem für die Abstandsmessung zweier Spinlabel bietet das *SDSL* entscheidende Vorteile, da die jeweiligen Aminosäurepositionen bekannt sind. Dadurch lassen sich auch effektiv Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur der Proteine ziehen [Hustedt, Beth, 1999, Berliner, Hemminga, 2007, Feix, Klug, 2008].

Die Bindung zweier NSL über *SDSL* wird auch als *Double-SDSL* bezeichnet und häufig als *D-SDSL* abgekürzt.

Der Nitroxid Spinlabel MTS wird aufgrund seiner geringen Größe und hohen Stabilität häufig verwendet. Durch die geringe Größe wird die natürliche Proteinstruktur nur minimal gestört und aufgrund der Stabilität kann die Probe in einer Vielzahl von Umgebungen untersucht werden, wodurch die Funktionalität des Proteins nicht beeinträchtigt werden sollte. Durch einen möglichst kleinen Abstand der Nitroxidgruppe von der AS wird der Fehler bei der Kalkulation des Aminosäure-Abstands minimiert. Im Falle des MTS beträgt der Abstand des Nitroxid-Radikals vom  $C_{\beta}$ -Atom der Cysteingruppe je nach Konformation des Rings 5-8 Å und eignet sich daher für die Strukturuntersuchung von Proteinen [Klare, Steinhoff, 2009].

Um eine bessere dreidimensionale Vorstellung des MTS zu vermitteln, ist die Struktur des Spinlabels mit Hilfe der Software "Accelrys Discovery Studio 2.5.5" als eigens designtes Molekül erstellt worden und in Abbildung 2.15 dargestellt. In der Abbildung erkennt man deutlich den Abstand und die mögliche Bewegungsfreiheit der Nitroxidgruppe (N-Atom: Blau; O-Atom: Rot) zu der an das Cystein bindenden Schwefelgruppe (S-Atom: Gelb).



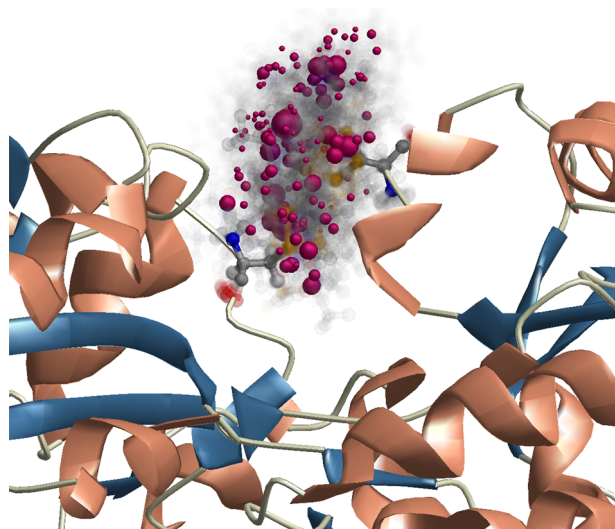
**Abb. 2.15:** Dreidimensionale Darstellung des MTS

Um die tatsächliche Cysteinpositionen im Protein und nicht nur den Abstand der Label bestimmen zu können werden verschiedene Methoden eingesetzt.

Die einfachsten Methoden beziehen sich dabei auf die Verwendung von bereits bekannten Strukturdaten wie beispielsweise durch Röntgenstrukturanalyse und einer Analyse mit geeigneten Programmen.

Um ein schnelles Ergebnis zu erhalten eignen sich vor allem so genannte “*library-approach*” Programme in denen alle möglichen bekannten Labelausrichtungen (“*rotamers*”) hinterlegt sind und sterisch deren möglicher Einsatz an der gewählten Stelle überprüft wird. Als Ergebnis erhält man eine Wahrscheinlichkeitsdichte der vorraussichtlichen Labelposition und eine entsprechende Berechnung des NSL-Aminosäure-Abstands [Polyhach 2013].

In Abbildung ist eine solche Simulation mit der Software “MMM 2015” für die Doppelmutante MBP 08 exemplarisch dargestellt. Es kommt in diesem Beispiel zu einer Überlagerung der möglichen Aufenthaltsorte (Wahrscheinlichkeitsdichte) der jeweiligen Nitroxidgruppe (lila), da das Programm die gegenseitige Beeinflussung der Spin-Label nicht beachtet.



**Abb. 2.16:** Dreidimensionale Darstellung des MTS

Ein weiteres Manko dieser Herangehensweise ist die absolut starre Proteinstruktur, da durch den “*approach*” nur die Positionen des NSL-Cystein-Rests untersucht werden, eine Bewegung innerhalb der restlichen Struktur aber unbeachtet bleibt.

Die wohl effektivste jedoch auch sehr zeit- und rechenaufwendige Methode ist die vollständige Simulation der Proteinstruktur inklusive des Labels und eine ausführliche MD-Simulation zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Labelposition.

Bekannte Fehlerquellen des *D-SDSL* sind die ungewünschte Bindung des NSL an natürlich vorkommende Cysteine oder etwaiger Funktionsverlust bei deren Entfernung und eine unterschiedliche Reaktivität beider Labelpositionen, beispielsweise bedingt durch sterische Hinderungen, wodurch ein störender Anteil einfach gelabelter Spezies entsteht. Beide Fehlerquellen lassen sich durch geschickte Wahl der Reaktionsbedingungen minimieren.

## 2.4. Mutagenese

Allgemein bezeichnet man mit Mutagenese eine Veränderung im genetischen Code einer Zelle, d. h. in der DNA.

Zufällige Mutationen werden durch Energiezufuhr meist in Form von Strahlungsenergie ausgelöst. Je kleiner die Wellenlänge der einfallenden Strahlung, umso wahrscheinlicher ist der mutagene Effekt aufgrund des höheren Energiegehalts. Daher eignet sich UV- oder radioaktive Strahlung besonders gut als Mutationsquelle.

Über 95% der zufälligen Veränderungen im Ablauf der Nukleotidsequenz eukaryotischer Zellen spielen physiologisch keine nachweisliche Rolle, da diese im nicht-kodierenden Bereich geschehen oder durch Reparaturmechanismen der Zelle korrigiert werden [Alberts et al., 2002, Mattick, Makunin, 2006].

Wenn man im Zusammenhang mit gentechnischen Arbeiten wie beispielsweise SDSL von Mutagenese spricht, so meint man meist die gezielte Mutagenese, also eine zielgerichtete Veränderung in einem kodierenden Abschnitt der DNA [Alberts et al., 2002].

Über die gezielte Mutagenese lassen sich Zellen mannigfaltig beeinflussen.

Beispielsweise lässt sich die Synthese eines Proteins abstellen, indem man das zugehörige Start-Codon in der DNA verändert und die Translation somit verhindert. Dieses vorgehen wird als Knock-Out-Mutation bezeichnet.

In den meisten Fällen wird bei der gezielte Mutagenese die Punktmutation eingesetzt. Das heißt es wird nur eine Nukleobase gegen eine andere ausgetauscht, ohne das Leseraster zu verändern [Stratagene, 2004].

Müssen für die gewünschte Änderung mehrere Nukleobasen ausgetauscht werden, so ist es meist sinnvoll diese jeweils in einzelnen Punktmutationen auszuführen.

Verwendet man Deletion oder Insertion so ist stets darauf zu achten, keinen "frame-shift" zu erzeugen, durch den das gesamte Leseraster verschoben wird [Alberts et al., 2002].

Im Rahmen dieser Arbeit werden Punktmutationen zur spezifischen Veränderung der Aminosäuresequenz von MBP eingesetzt, um Cysteine in das Protein einzubringen und dadurch die Bindung des Labels MTS und somit die Strukturuntersuchung mittels ESR-Spektroskopie zu ermöglichen.

Die gängigste Methode, Punktmutationen zu erzeugen, ist das Erzeugen passender Primer für jeden DNA-Einzelstrang, die an den Mutationspunkt binden. Die Primer stellen dabei den passenden Gegenstrang mit Ausnahme der veränderten gewünschten Zielbase dar und sollten gemäß den Kriterien für geeignete Mutagenese-Primer synthetisiert werden [Stratagene, 2004]. Anhand dieser Primer wird dann mit Hilfe der PCR das Ausgangsplasmid kopiert, die Ausgangs-DNA enzymatisch verdaut und das Zielpasmid erhalten.

### 3. Aufgabenstellung

MBP stellt ein geeignetes Forschungsobjekt aufgrund seiner hohen Entfaltungsenthalpie, der hohen Zuckeraffinität und der Stabilisierung des *Molten-Globule*-Zustands dar [Sheshadri et al., 1999].

Durch die Verwendung der *SDSL*-Methode mit MTS als NSL lässt sich ein deutliches Signal schon bei geringen Proteinkonzentrationen empfangen und das Signalverhalten von MTS ist durch die Literatur bereits bekannt, wodurch eine Analyse der Messdaten möglich ist [Berliner, Hemminga, 2007, Klare, Steinhoff, 2009, Steinhoff, Hubbell, 1996, Steinhoff et al., 1997].

Die Eigenschaften von MBP, die Methode der Proteingewinnung sowie das *spin-labeling* und die Stabilisierung des *Molten-Globule*-Zustands sind durch vorangegangene Arbeiten bereits bekannt [Chen, 2013, Selmke, 2013].

Die Sequenz der vorhandenen älteren Mutanten MBP 01 - 07 sollte über Sequenzierung verifiziert, die Reinheit des maltosefreien Proteins über MALDI-Massenspektrometrie bestätigt und die Stabilisierung des *Molten-Globule*-Zustands für alle Mutanten überprüft werden.

Die Fähigkeit des MBP, selbst im *Molten-Globule*-Zustand seinen Liganden zu binden soll für verschiedene Mutanten, insbesondere nahe der MBP Bindungsstelle untersucht werden. Hierfür sollen weitere Doppelmutanten durch gezielte Mutagenese erzeugt werden.

Es soll untersucht werden, ob substratfreies MBP im nativen sowie im *MG*-Zustand sowohl in offener als auch geschlossener Konformation vorliegen kann.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der offenen und geschlossenen Konformation von MBP im nativen und *MG*-Zustand mit Hilfe der ESR-Spektroskopie.

Als Grundlage der ESR-Spektroskopie dienen im Haus durchgeführte *cw*-ESR-Messungen und *DQC*-Messungen die bei unserem Kooperationspartner J. Freed im ACERT Institut an der Cornell University, Ithaca, New York, durchgeführt werden.

Um präzisere Rückschlüsse auf die tatsächlichen Abständen der Aminosäuren mittels der ESR-Spektroskopie erhalten zu können, sollen die jeweiligen Mutanten über MD-Simulationen auf die Position und Ausrichtung der NSL kalkuliert werden.





## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Mutagenese und Kontrolle der MBP-Mutanten

Zu Beginn dieser Arbeit lagen die Plasmide der Mutanten MBP 01 - 07 sowie P298C, die uns seitens unseres Kooperationspartners R. Varadarajan aus Indien zur Verfügung gestellt wurden, weiterhin das Plasmid des MBP-Wildtyps und die während meiner Diplomarbeit auf Basis der Einfachmutante P298C erzeugten Mutanten MBP 08 und 09 vor. Die Mutagenese wurde dabei entsprechend des Quick Change Protokolls in Abschnitt 11.1.1 durchgeführt.

Eine Übersicht über die einzelnen Plasmide sowie die Bezeichnung der jeweiligen Mutanten sind Tabelle 4.1 zu entnehmen.

**Tab. 4.1:** Übersicht verwendeter Plasmide und Bezeichnung der entsprechenden Mutante

| Plasmid              | Mutante   |
|----------------------|-----------|
| pMAL.c2x.P298C.T031C | MBP 01    |
| pMAL.c2x.P298C.D082C | MBP 02    |
| pMAL.c2x.P298C.N124C | MBP 03    |
| pMAL.c2x.P298C.K175C | MBP 04    |
| pMAL.c2x.P298C.K313C | MBP 05    |
| pMAL.c2x.P298C.Q325C | MBP 06    |
| pMAL.c2x.P298C.S238C | MBP 07    |
| pMAL.c2x.P298C.S233C | MBP 08    |
| pMAL.c2x.P298C.R316C | MBP 09    |
| pMAL.c2x.N234C.D296C | MBP 10    |
| pMAL.c2x.N234C.K015C | MBP 11    |
| pMAL.c2x.S233C       | MBP S233C |
| pMAL.c2x.N234C       | MBP N234C |
| pMAL.c2x.D296C       | MBP D296C |
| pMAL.c2x.P298C       | MBP P298C |
| pMAL.c2x.R316C       | MBP R316C |
| pMAL.c2x             | MBP Wt    |

Um Fehler während der häufigen Vervielfältigung der Plasmide über Transformation, Kultivierung und Plasmidpräparation auszuschließen und die niedrige Proteinexpressionsrate von MBP 03 und MBP 05 zu untersuchen, wurden die Plasmide MBP 01 - 07 sowie das des Wildtyps, in ausreichenden Mengen synthetisiert und zur Sanger-Sequenzierung in der Firma "Seq-it", Kaiserslautern, mit den Primern M13\_for und M13\_rev(-48) geschickt.

Die Sequenzierung der Mutanten MBP 08, 09 und P298C wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführt.

Die vollständige Sequenz ergibt sich dabei durch Überschneidung der beiden sequenzierten Abschnitte, da das verwendete "OS"-Verfahren eine Reichweite von ca. 800 Basenpaaren aufweist und die Gesamtlänge der MBP Basensequenz 1113 Basenpaare beträgt. Die Basensequenz und die Bindungsstelle im Plasmid pMAL\_c2x dieser Primer lässt sich im Anhang 11.1 finden.

Die komplette Basensequenz des Plasmids pMAL\_c2x ist Quelle [www.addgene.com] zu entnehmen. Sämtliche nachfolgenden Positionsangaben beziehen sich auf diese Sequenz.

Diese Basensequenz entspricht der von New England Biolabs präsentierten Sequenz des pMAL\_c2x Plasmids bis auf 3 Veränderungen.

Zwischen Position 3323 und 3324, also im nicht relevanten Bereich des Plasmids, erfolgte seitens NEB die Insertion einer Thymin Base.

An den Positionen 3607 und 3608 wurden die Basen "T" und "C" gegen "C" und "T" ausgetauscht, diese liegen im Ampicillin-Resistenz-codierenden Bereich des Plasmids.

Die Sequenzierung lieferte folgende Ergebnisse:

- Die Sequenzierung des MBP Wt verlief erfolglos, da keine Bindung mit dem Primer M13\_for eintrat.
- Die Mutanten 01, 02, 04, 06-09 entsprechen zu hundert Prozent der erwarteten Basensequenz im MBP codierenden Bereich
- Sämtliche Mutanten weisen eine Deletion der Base Cytosin an Position 1481 auf, durch die die Funktion des Plasmids nicht beeinflusst wird.
- In allen Fällen konnten an den Positionen 2358 und 2490 folgende Punktmutationen "A"->"G" und "T"->"C" beobachtet werden.  
Diese liegen zwar innerhalb des MBP codierenden Bereichs, verändern aber die Aminosäuresequenz nicht, da in diesen Fällen die gleiche AS codiert wird.
- Bei allen Mutanten konnte die erfolgreiche Insertion des 81 Basenpaare langen Abschnitts "ATTATGAAAA·TAAAAACAGG·TGCACGCATC·CTCGCATTAT·-CCGCATTAAC·GACGATGATG·TTTTCCGCCT·CGGCTCGCGC·C" an der NdeI-Schnittstelle des Plasmids nachgewiesen werden.

Damit liegt dieses Insert direkt vor dem Startcodon 1528 - 1530 der MBP-Sequenz und ergänzt die Basensequenz des MBP-Signalpeptids "MKIKTGARIL·ALSALTTMMF·SASALA", welches in *E. coli* für den Transport des Proteins in das Periplasma zuständig ist. Hierdurch soll der Transport des MBP in das Periplasma gefördert und dadurch eine höhere Proteinausbeute gewährleistet werden. Primär liegt diese Sequenz im Plasmid nicht vor da MBP im pMAL System als Fusionsprotein verwendet wird, um die Löslichkeit des Zielproteins zu erhöhen und eine Aufreinigung über Affinitätschromatographie zu ermöglichen.

- Bei der Mutante MBP 03 waren außer der gewünschten Mutation der Abschnitt "CATATG" an der Position 1525 - 1530 deletiert und folgende Punktmutation 2434 "G"->"A" wurde detektiert.

Durch diese Veränderungen fehlen die Aminosäuren Histidin und Methionin an der Verbindungsstelle der MBP-Signalsequenz zum Protein selbst.

Außerdem kommt es zur Mutation von Valin zu Isoleucin an der AS-Position 302. Es wäre in diesem Fall also eigentlich von einer Dreifachmutante N124C\_P298C\_V302I zu reden.

- Im Falle von MBP 05 zeigt sich neben der gewünschten Mutation eine Punktmutation "A"->"G" an der Stelle 2488. Diese Mutation führt zum Austausch von Threonin durch Alanin, was ebenfalls die Entstehung einer Dreifachmutante P298C\_K313C\_T320A zur Folge hat. Die geringere Expressionrate der MBP 05 Mutante kann durch den Austausch der polaren Aminosäure gegen eine hydrophobe Aminosäure erklärt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, die Mutanten MBP 01, 02, 04, 06, 07, 08 und 09 entsprachen der gewünschten Basensequenz und können so für die nachfolgenden Arbeiten eingesetzt werden.

In den nachfolgenden Absätzen wird häufig die Bezeichnung der „erfolgreichen“ Mutation verwendet, zur Begriffsklärung sei gesagt dass dies die positive Bestätigung der Plasmidlänge über Agarose-Gelelektrophorese und den Nachweis der erwünschten Sequenz über Sanger-Sequenzierung mit den Primern M13\_for und M13\_rev(-48) in der Firma "Seq-it", Kaiserslautern, beinhaltet. Die in den jeweiligen Punktmutationen verwendeten Primern sind im Anhang im Abschnitt 12.2.4 aufgeführt.

Die Mutanten MBP 03 und MBP 05 konnten auf Basis der Singlemutante P298C über eine entsprechende Punktmutation hergestellt werden. Die Mutagenese wurde entsprechend des Phusion-Protokolls in Abschnitt 11.1.1 erfolgreich durchgeführt.

Zur weiteren Analyse des MBP Wt-Plasmids wurde eine vergleichende Agarose-Gelelektrophorese der Plasmide P298C und Wt nach BamHI-Verdau durchgeführt. Man konnte erkennen, dass das MBP-Plasmid eine um 800-1000 Basenpaare kürzere Sequenz aufweist. Um den Verdacht zu bestätigen, dass es sich bei diesem Plasmid um den Vektor pMAL\_c5x [NEB, 2007] handeln könnte, wurde eine Sequenzierung mit dem Tac Promotor Primer und dem hierfür im „Clone Manager 9.0“ designten Primer pMAL\_c5x.for durchgeführt. Die verwendeten Primer führten zu einer erfolgreichen Sequenzierung des Plasmids und bestätigten im Messbereich die erwartete Sequenz des pMAL\_c5x-Vektors. Der vollständige Vektor wurde für diese Arbeit nicht sequenziert und aufgrund der fehlenden MBP-Signalsequenz und einer Mutation der Aminosäure Valin an Position 312 zu Alanin im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verwendet.

Um das gewünschte MBP Wt-Plasmid zu erhalten, wurde an der Mutante P298C eine Punktmutation ausgeführt, bei der direkt das gesamte Codon “TGC” an Position 2422-2424 gegen das ursprüngliche Codon “CCG” ausgetauscht wurde. Die entsprechenden Primer sind im Anhang 12.2.4 dargestellt.

Auf Basis der neuen Mutante MBP Wt wurden im Anschluss die Einfachmutanten MBP S233C und R316C mit den bereits für die Mutation der Mutanten MBP 08 und 09 vorhandenen Primern erfolgreich hergestellt.

Diese Einfachmutanten werden für die exakte Bestimmung der Dipfit-Parameter mittels *cw*-ESR-Messung der Mutanten MBP 08 und 09 benötigt [Steinhoff, Hubbell, 1996]. Die Ergebnisse dieser verbesserten *cw*-ESR-Abstandskalkulation werden im Rahmen dieser Arbeit nicht präsentiert.

Um die geöffnete und geschlossene Konformation des Maltose bindenden Proteins schlüssig untersuchen zu können, wurden weitere Mutanten benötigt, deren Cysteinpositionen nahe dem aktiven Zentrums liegen, die Funktion von diesem jedoch nicht behindern.

Durch MD-Simulationen im „Accelrys Discovery Studio 2.5” auf Basis der Röntgenstrukturdaten beider Zustände [1ANF, 1OMP] und Analyse der möglichen Mutationsstellen und der entsprechenden Primereigenschaften im „Clone Manager 9.0” wurden Asparagin an Positionen 234 und Asparaginsäure an Position 296, sowie Arginin an Position 316 für die Mutagenese gewählt.

Zuerst wurden die Einfachmutanten MBP N234C, D296C und R316C sowie anschließend auf Basis von MBP N234 die Doppelmutanten MBP 10 und 11 erfolgreich hergestellt.

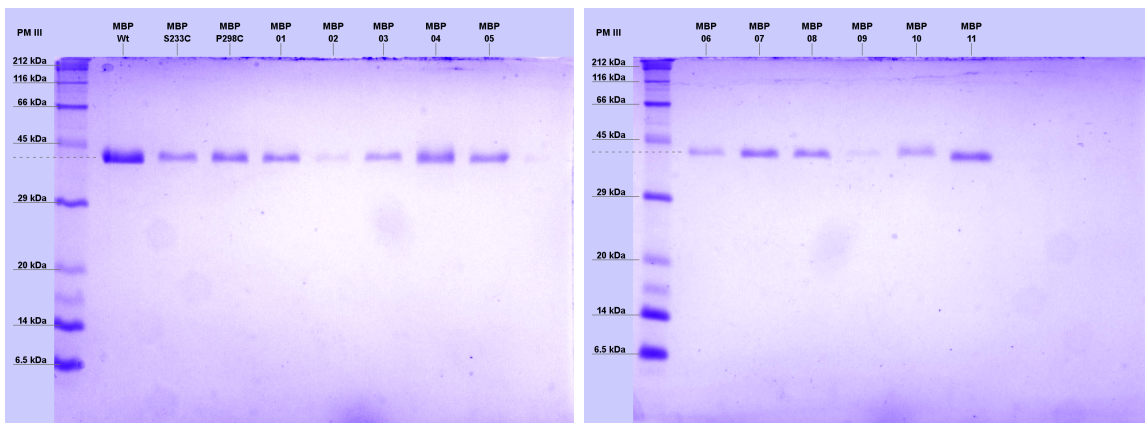
## 4.2. Reinheitsnachweis des Maltose bindenden Proteins

Um die Effizienz der Proteinreinigung, die Entfernung der Maltose und die Stabilisierung des *Molten-Globule*-Zustands für alle Mutanten zu überprüfen, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt.

### 4.2.1. SDS-PAGE

Zur Kontrolle der Reinheit der MBP-Mutanten nach der Aufreinigung durch die Amylose-Resin-Säule wurden alle Mutanten in einem 15%-Acrylamidgel mit dem AppliChem Protein-Marker III [AppliChem PM III] aufgetragen.

In Abbildung 4.1 sind von rechts nach links der Marker und die Mutanten MBP Wt, S233C, P298C, 01, 02, 03, 04, 05 sowie in Abbildung 4.2 der Marker und die restlichen Mutanten MBP 06, 07, 08, 09, 10, 11 aufgetragen.



**Abb. 4.1:** 15%-Acrylamidgel der SDS-PAGE.

Von links nach rechts:  
Marker, MBP Wt, S233C,  
P298C, 01, 02, 03, 04, 05

**Abb. 4.2:** 15%-Acrylamidgel der SDS-PAGE.

Von links nach rechts:  
Marker, MBP 06, 07,  
MBP 08, 09, 10, 11

Neben der erwarteten Bande von MBP bei ungefähr 41 kDa (MBP + Maltose) ist in keiner Probe eine weitere Bande zu erkennen, somit ist die Effizienz der Aufreinigung mittels der Amylose-Resin-Säule bestätigt.

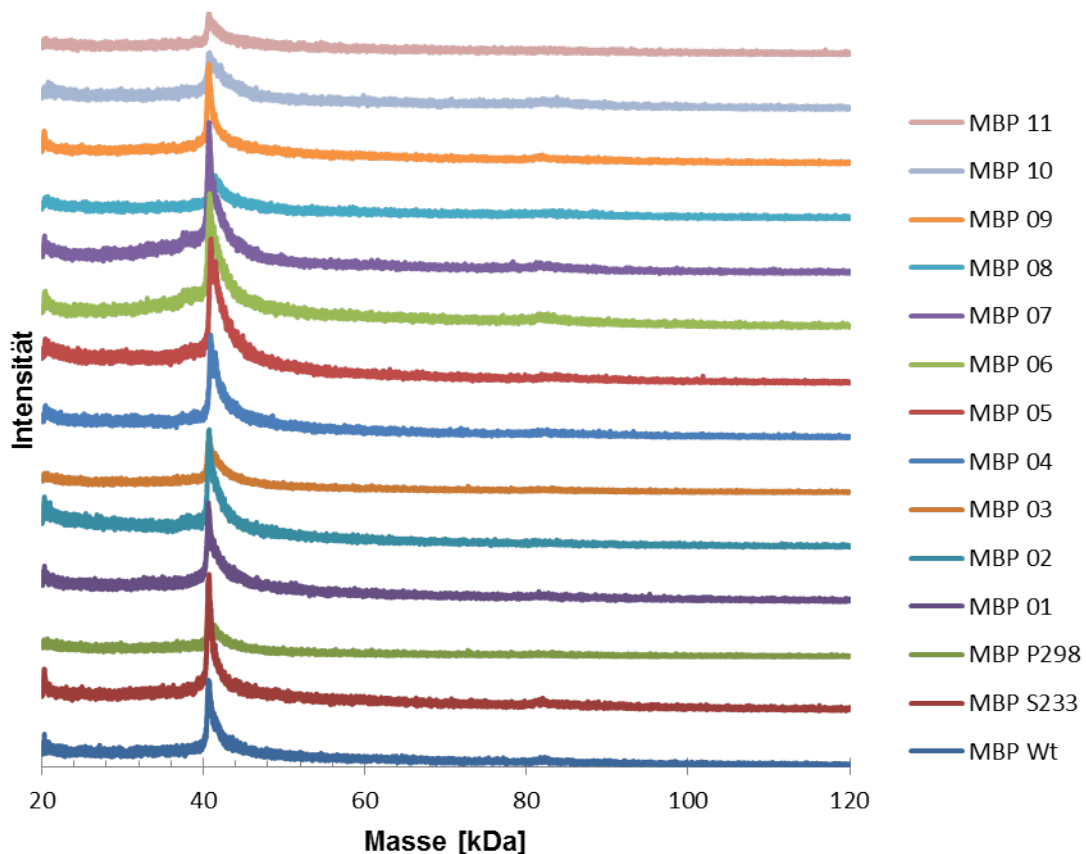
## 4.2.2. MALDI-Messung

Unter der Bezeichnung MALDI versteht man die Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisierung, welche eine Methode zur Massenanalyse chemischer Verbindungen beschreibt. Zur Messung wurde das MALDI-TOF-Massenspektrometer aus dem Arbeitskreis von Prof. Niedner-Schatteburg verwendet. Die Abkürzung TOF steht dabei für *time-of-flight*-Detektion der ionisierten Partikel.

Ziel dieser Messung war einerseits eine weitere Reinheitsuntersuchung der MBP-Proben sowie die Kontrolle der erfolgreichen Maltose-Entfernung durch die mehrstufige Urea-Dialyse, welche im Abschnitt 11.1.1 näher beschrieben ist. Die Messung wurde in einem Bereich von 20-80 kDa durchgeführt, um eine Verunreinigung durch anderen Proteine ausschließen zu können.

Alle abgebildeten Mutanten wurden entsprechend Abschnitt 11.1.1 aufgereinigt und für die MALDI-Messung angesetzt. Die detektierten Spektren der aufgereinigten MBP-Proben sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

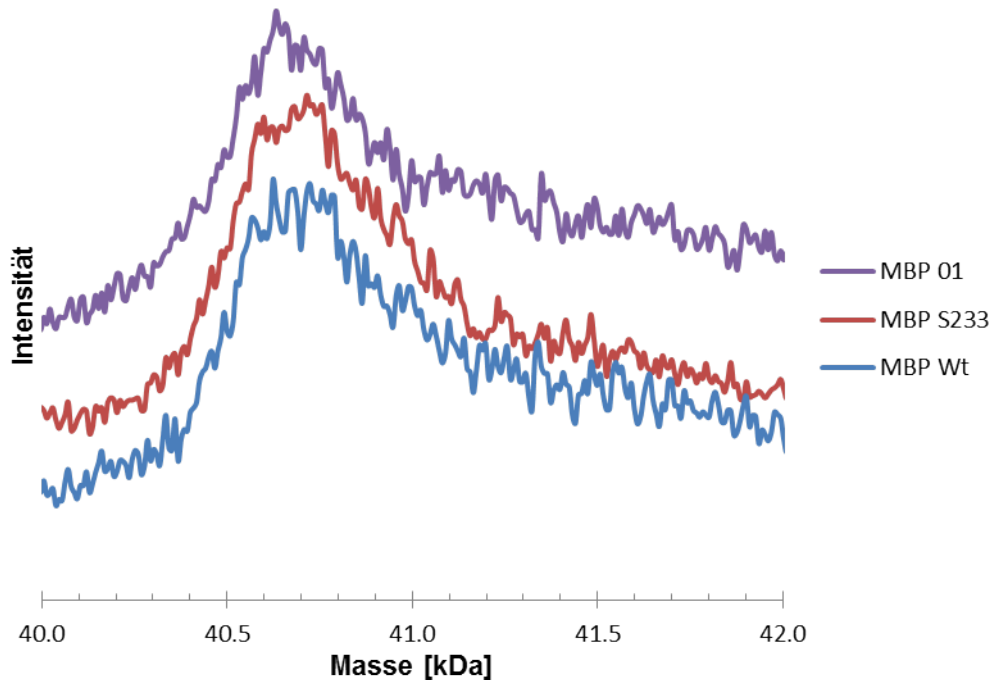
Zur besseren Datenbearbeitung und Darstellung wurden die Spektren zweimal mit einer Savitzky-Golay-Filterfunktion (Polynomialglättung) dritter Ordnung mit 7 Werten (Koeffizienten 7, 6, 3, -2) geglättet und auf den jeweils dritten Messwert reduziert. Durch diese Methode werden die Peaks nicht verschoben und der Datenverlust durch die Reduktion der Datenpunkte wird minimiert, eine graphische Darstellung der Glättung ist in Kapitel 13 zu finden.



**Abb. 4.3:** MALDI-Spektren verschiedener MBP-Mutanten  
Von unten nach oben geordneten: MBP Wt, S233C, P298C sowie 01 - 11

Man erkennt deutlich, dass in keinem der Spektren eine Verunreinigung der Proben durch Fremd-Proteine vorliegt.

Zur besseren Übersicht werden die Mutanten MBP Wt, S233C und 01 in Abbildung 4.4 im Bereich von 38-44 kDa dargestellt.



**Abb. 4.4:** MALDI-Spektren im Bereich von 38-44 kDa  
Von unten nach oben geordnet: MBP Wt, S233C sowie 01

In Abbildung 4.3 und 4.4 wird ersichtlich, dass die Spektren jeweils einen Peak im Bereich um 40.7 kDa aufweisen, was der Größe des reinen MBP-Proteins entspricht.

Das in der Basensequenz vorkommende MBP-Signalpeptid würde die MBP-Aminosäuresequenz um 26 AS verlängern und auf ein Gesamtgewicht von 43.4 kDa (Kalkulation durch das *ProtParam-Tool* von ExPasy) bringen. Da bei keiner Mutante ein Peak an dieser Stelle detektiert werden konnte, ist die erwartete Entfernung des Signalpeptids in der Proteinprozessierung eingetreten

Auch die erfolgreiche Entfernung der Maltose kann durch diese Messungen bestätigt werden, denn durch das zusätzliche Gewicht der gebundenen Maltose würde man eine Verschiebung um ungefähr 0.34 kDa erwarten, welche wie in den Abbildungen ersichtlich bei keiner der Mutanten feststellbar ist.

Zusammenfassend mit der SDS-PAGE kann gesagt werden, die Aufreinigung der Mutanten verlief erfolgreich und das Maltose bindende Protein liegt in maltosefreier Form vor.

Als weitere Bestätigung der vollständigen Maltose-Entfernung wurde ein enzymatischer Maltose-Assay durchgeführt, bei dem der Zucker durch  $\alpha$ -Glucosidase zu Glucose, anschließend über Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat umgesetzt und das dabei entstehende NADH detektiert wird. Auch hierbei konnte die Entfernung der Maltose belegt werden [Nickolaus, 2017].

### 4.2.3. ANS-Fluoreszenz-Messung

Zur Bestätigung des stabilisierten *Molten-Globule*-Zustands der MBP-Mutanten wurde die ANS-Bindung für alle Mutanten bei pH 7 und pH 3 untersucht.

Der *Molten-Globule*-Zustand ist ein Übergangszustand bei der Proteinfaltung, in dem strukturelle Elemente ohne die Ausbildung der Tertiärstruktur vorhanden sind.

Die zunehmende Ausbildung der Tertiärstruktur eines Proteins verhindert die ANS-Bindung an die zuvor zugänglichen hydrophoben Seitenketten, wodurch die Intensität der ANS-Fluoreszenz deutlich abnimmt.

Der *Molten-Globule*-Zustand wird auch als der Punkt definiert, an dem die Fluoreszenz des ANS-Protein-Komplexes maximal ist [Sheshadri et al., 1999]. Die ANS-Bindung von MBP wurde bereits 1999 von Sheshadri et al. untersucht und der stabilisierte *Molten-Globule*-Zustand bei pH 3 entdeckt. Die Stabilisierung des *MG*-Zustands der Mutanten MBP 01 - 07 wurde bereits erfolgreich durch Reichenwallner et al. nachgewiesen [Reichenwallner et al., 2013].

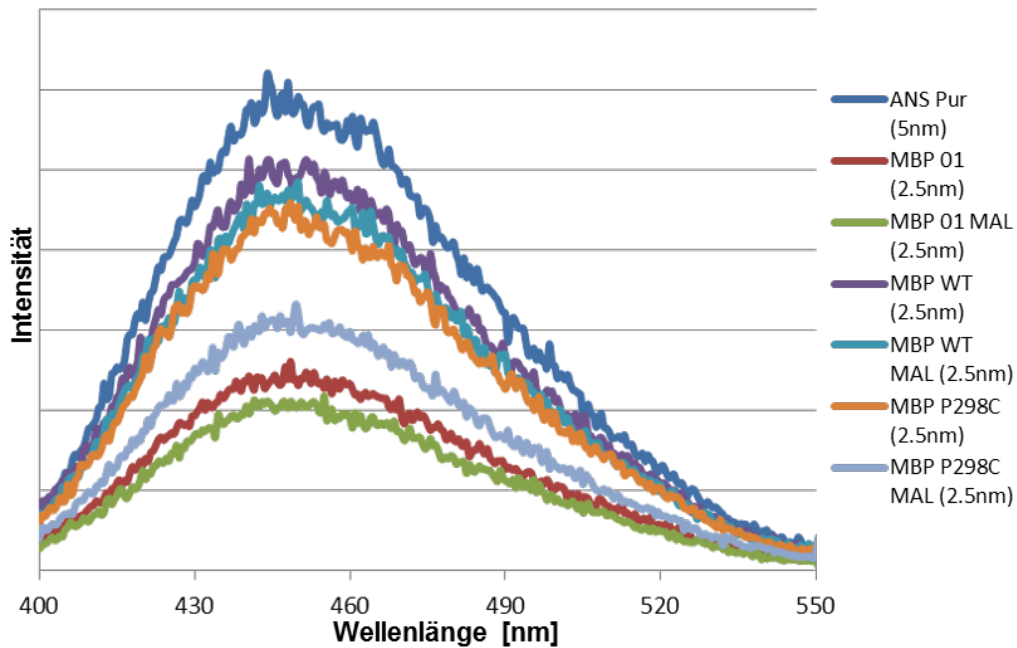
In dieser Arbeit wurden im Hinblick auf den möglichen Einfluss der Maltose-Bindung im *MG*-Zustand alle aufgereinigten maltosefreien Mutanten mit und ohne Zugabe von 20 mM Maltose (Maltose-Überschuss) entsprechend der in Abschnitt 11.1.1 beschriebenen Methode untersucht.

Zur besseren Übersicht werden die Intensität und die Verschiebung des Absorptionsspektrums getrennt voneinander betrachtet.

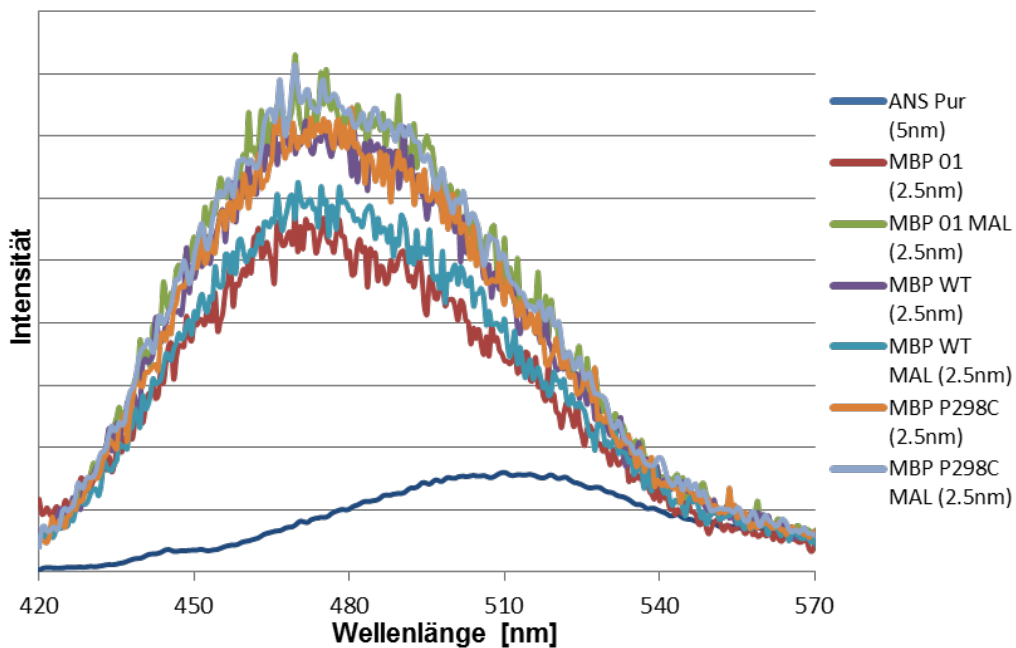
Zum Vergleich der gemessenen Intensität der ANS-Spektren sind in den Abbildungen 4.5 (pH 7) und 4.6 (pH 3) exemplarisch jeweils der Wildtyp, eine Einzel- und eine Doppelmutante mit und ohne Maltose abgebildet, um die Zunahme der Intensität durch die Bindung des ANS an das Protein zu bestätigen, welche im Falle des *Molten-Globule*-Zustands eintritt. Hierbei ist es wichtig den Einfluss der verwendeten Spaltbreite zu beachten, welcher jeweils in Klammern in der nebenstehenden Legende angegeben ist.

Um die Verschiebung des Absorptionsspektrums beobachten zu können, wurden alle gemessenen Spektren auf den Wertebereich von 0 bis 1 normiert und in den Abbildungen 4.7 (pH 7) und 4.8 (pH 3) überlagert dargestellt.





**Abb. 4.5:** ANS-Fluoreszenz-Messung des MBP-Wildtyps, der Einzelmutante P298C und der Doppelmutante 01 bei pH 7



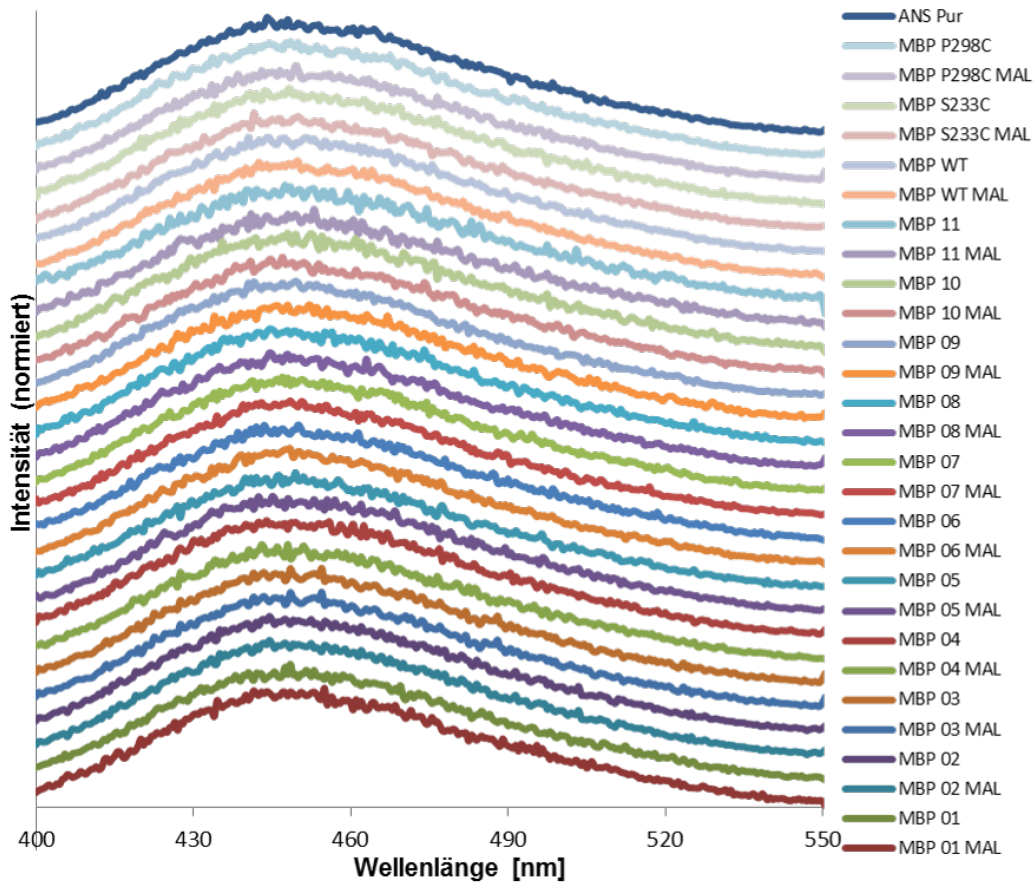
**Abb. 4.6:** ANS-Fluoreszenz-Messung des MBP-Wildtyps, der Einzelmutante P298C und der Doppelmutante 01 bei pH 3

In beiden Abbildungen ist eine deutliche Zunahme der Intensität zwischen der reinen 0.1 mM ANS-Lösung und den Proteinproben erkennbar.

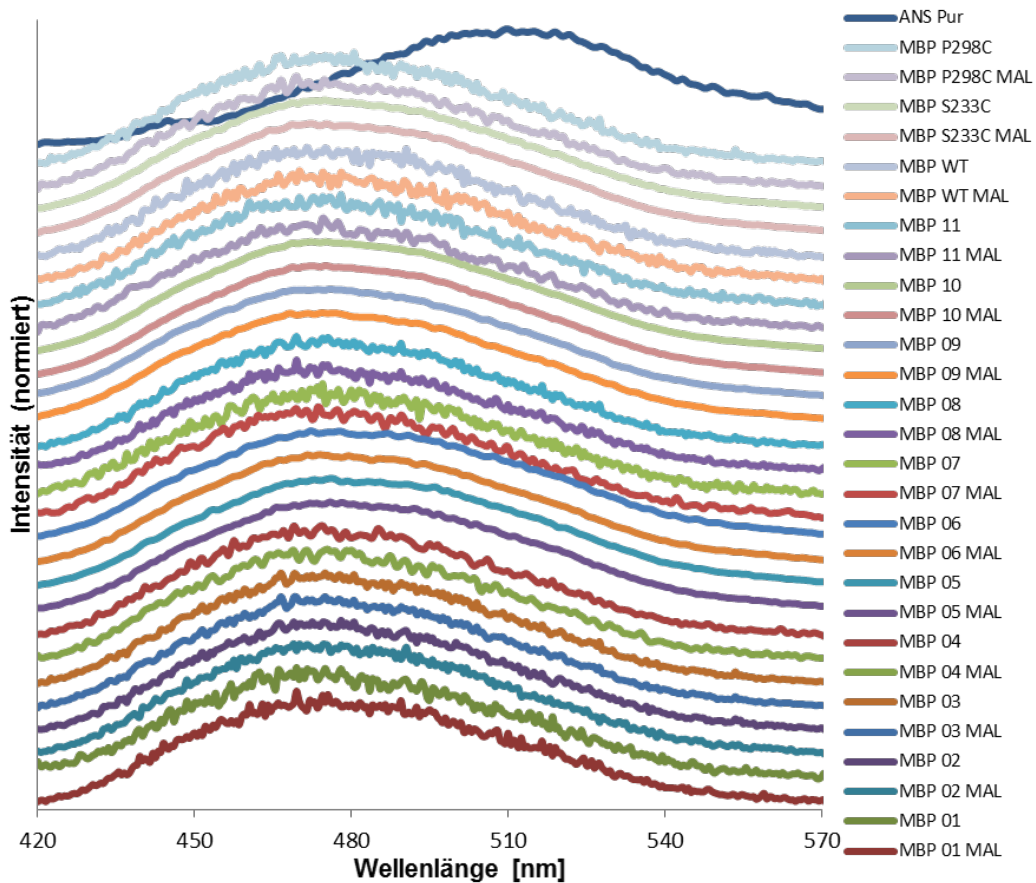
Im Falle der Messungen bei pH 7 (Abb. 4.5) zeigt sich die Intensität der Doppelmutante mit Spaltbreite 2.5 nm halb so hoch wie die Intensität der reinen ANS-Probe mit einer Spaltbreite von 5 nm.

Die Messungen bei pH 3 hingegen weisen für die Proteinproben eine fünffach höhere Intensität bei dem gleichen Unterschied der Spaltbreiten auf.

Die Zunahme der gemessenen Intensität in Abbildung 4.6 bestätigt die vermehrte Bildung des ANS-Protein-Komplexes bei pH 3 und somit die Stabilisierung des *Molten-Globule*-Zustands.



**Abb. 4.7:** Normierte Spektren der ANS-Fluoreszenz-Messung bei pH 7. Von unten nach oben geordnet: ANS-Lösung pur, MBP 01 - 11, Wt, S233C, P298C



**Abb. 4.8:** Normierte Spektren der ANS-Fluoreszenz-Messung bei pH 3. Von unten nach oben geordnet: ANS-Lösung pur, MBP 01 - 11, Wt, S233C, P298C

In den Abbildungen 4.7 und 4.8 erkennt man deutlich das gleichmäßige Verhalten aller MBP-Mutanten in Bezug auf das Absorptionsmaximum.

Deutlich erkennt man im Vergleich der ANS-Pur-Probe mit den MBP-Mutanten den hypsochromen Effekt der ANS-Protein-Bindung im Falle der Messungen bei pH 3, wohingegen keine Änderung des gemessenen Absorptionsmaximum bei pH 7 auftritt.

Die ANS-Fluoreszenz-Messungen bestätigen, dass der *MG*-Zustand für alle Mutanten bei pH 3 stabilisiert wird und die jeweiligen Cysteine keinen störenden Einfluss auf die Ausprägung des Zustands haben.

Ein Unterschied der jeweiligen Spektren für die Messreihen mit und ohne Maltose kann weder bei pH 3 noch bei pH 7 festgestellt werden.

Durch die Zugabe der Maltose wird die Ausbildung des *MG*-Zustands nicht eingeschränkt.

Weitere ANS-Fluoreszenz-Messungen im Arbeitskreis belegen auch die langfristige Stabilisierung des *Molten-Globule*-Zustands bei pH 3 nach mehrstündiger Inkubation und Inkubation über Nacht ohne Rückfaltung oder Zerfall des MBP [Chakour, 2015, Nickolaus, 2017].

#### 4.2.4. Circular dichroismus

Eine weitere Möglichkeit zur Strukturuntersuchung von Proteinen im nativen und *MG*-Zustand bietet die nah- und fern-UV-Circular dichroismus-Messung (nah-/fern-CD).

Bei dieser Untersuchungsmethode wird die Ablenkung und Absorption eines links- und eines rechts-zirkulierenden Lichtstrahls mit gleicher Wellenlänge und Intensität durch eine optisch aktive Substanz gemessen. Im Falle einer Proteinlösung kommt es im nah-UV-Bereich (300 bis 250 nm) zur Absorption durch aromatische Aminosäuren und Disulfidbrücken, im fern-UV-Bereich (250 bis 190 nm) finden die Übergänge aufgrund der Peptidbindungen statt.

Spezifische Erkenntnisse über die Tertiärstruktur eines Proteins können mit dieser Methode nicht erhalten werden. Der Vergleich verschiedener Spektren lässt jedoch deutliche Rückschlüsse auf Veränderungen in der Proteinstruktur zu.

In Quelle [Chen, 2013] sind verschiedene Messungen von MBP bei pH 7, pH 3 und im Fall der vollständigen Denaturierung durch 8 M Harnstoff bei pH 7 aufgeführt und zeigen eindeutig die Ausprägung eines teilweise entfalteten Zustands bei pH 3.

Durch Zugabe von Maltose konnte in diesen Messungen eine deutliche Stabilisierung der Sekundärstruktur im *Molten-Globule*-Zustand bei pH 3 beobachtet werden.

## 4.3. Simulation von MBP

### 4.3.1. Design neuer Mutanten

Um die möglichen Cysteinpositionen für die Untersuchung der Konformationsänderung des MBP bestimmen zu können, wurde das Protein über die Software “Accelrys Discovery Studio 2.5.5” auf Basis von Röntgenstrukturdaten simuliert. Zur Grundlage der Simulationen wurden die geöffnete Konformation [1FQB, 1OMP] und die geschlossene Konformation [1ANF, 1FQC] verwendet [www.rcsb.org].

Um die bei der Erfassung der Röntgenstrukturdaten typischen Grundfehler zu korrigieren, wurden die Strukturen 1ANF, 1FQB, 1FGC und 1OMP mit dem “CHARMm”-*forcefield* typisiert [Brooks et al., 1982, MacKerell, 2012] und eine vollständige Energieminimierung mit den im Anhang 14 beschriebenen Parametern durchgeführt.

In allen weiteren Abschnitten werden die minimierten Strukturen verwendet, aus denen etwaige Wassermoleküle entfernt wurden. Die Strukturen werden als “\_Min” bezeichnet. Das für diese Simulationen verwendete Kraftfeld “CHARMm” ist eine kommerzielle Version des bekannten “CHARMM”-Kraftfelds und findet hier kongruente Anwendung, insbesondere da in der verwendeten Software die Verwendung eigens designerter Moleküle nur mit Verwendung dieses Kraftfeldtyps erlaubt wird.

Es wurden jeweils einzelne, äußere Aminosäuren auf beiden Seiten der Bindungsspalte des MBP gewählt und die Änderung des Abstands dieser in den Strukturen 1ANF\_Min gegenüber 1OMP\_Min sowie 1FQB\_Min gegenüber 1FQC\_Min analysiert.

Die möglichen Mutanten, die in dieser Gegenüberstellung eine möglichst große Abstandsänderung und einen für spätere ESR-Messungen geeigneten Mindestabstand aufwiesen, wurden mit dem Programm “Clone Manager Suit 9.0” auf die Durchführbarkeit der benötigten Punktmutationen untersucht und anschließend in “MMM 2015” auf die Labelleffizienz untersucht. Die Ergebnisse der “MMM”-Simulation sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Die Labelleffizienz wird dabei hauptsächlich durch die Anzahl der möglichen bindenden Rotamere und deren Freiheitsgrade durch Kalkulation einer Partitionsfunktion berechnet [Polyhach 2013].

Für die weitere Untersuchung der Konformationsänderung des Maltose bindenden Proteins wurden die Mutanten N234C&D296C (MBP 10) und N234C&K015C (MBP 11) gewählt.

### 4.3.2. MMM-Simulation der MTS-Abstände

Um für alle MBP-Mutanten schnell die erwarteten MTS-Abstände und die Labelleffizienz der jeweiligen Aminosäurepositionen zu bestimmen, wurde der unter 2.3.3 beschriebene “library-approach” mit dem Programm “MMM 2015” verwendet.

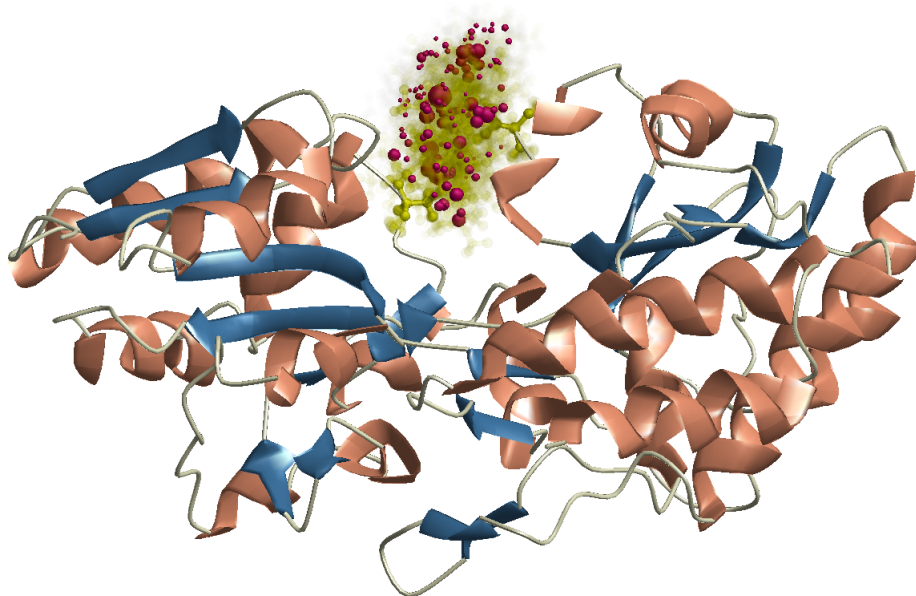
Als Grundlage der Simulation dienen auch hier wiederum die Röntgenstrukturen 1OMP der geöffneten und 1ANF der geschlossenen Konformation des Maltose bindenden Proteins.

Zur Kalkulation des MTS-Abstands wurden die pdb-files in “MMM 2015” über die Biochemistry-Funktion mit dem “SCRWL4”-Tool bearbeitet, um die entsprechenden Mutationen in der Aminosäuresequenz durchführen zu können. Anschließend wurde das gesamte Protein mit der EPR-Scan-Funktion auf mögliche Bindungen des Nitroxidlabels MTS analysiert und der entsprechende Bericht gespeichert. Die in Tabelle 4.2 aufgeführten Daten entsprechen den Ergebnissen dieser Analyse.

Im Abschnitt 4.3.4 werden diese Daten mit den aus der MD-Simulation gewonnen Abständen verglichen.

Zur graphischen Veranschaulichung wurden die berechneten MTS-Rotamere angebunden und die Dichteverteilung begutachtet. Exemplarisch ist in Abbildung 4.9 die Gesamtstruktur von 1OMP\_MBP 08 mit allen möglichen MTS-Rotameren (gelb) und der Wahrscheinlichkeitsdichte der Nitroxidgruppe (lila) dargestellt. Die blauen Pfeile markieren den Bereich der  $\beta$ -Faltblatt- sowie die orangenen Wirbel die  $\alpha$ -Helixstrukturen.

In Abbildung 2.16 (Abschnitt 2.3.3) findet sich ein näherer Ausschnitt der Bindungsspalte derselben Mutante ohne die gelbe Hervorhebung der MTS-Rotamere.



**Abb. 4.9:** MMM-Simulation von 1OMP\_MBP 08 mit MTS.

Gelb: MTS-Rotamere

Lila: Wahrscheinlichkeitsdichte der Nitroxidgruppen

Die Ergebnisse der MMM-Simulation sind für alle 11 Mutanten in Tabelle 4.2 aufgeführt. Die Labeleffizienz der einzelnen Positionen wurde für beide Konformationen bestimmt, wobei die geöffnete Konformation 1OMP als der für das Spinlabeling entscheidende Zustand betrachtet wird, da die Mutanten im maltosefreien Zustand gelabelt werden. Die Bewertung “*tight*” bedeutet keinesfalls, dass eine Bindung an dieser Position nicht möglich wäre, sondern nur eine entsprechende Wahrscheinlichkeit, dass das Labeling fehlschlägt.

Hierbei wären vor allem auch die in Abschnitt 2.3.3 erwähnten Einschränkungen der “MMM”-Methode zu beachten.

Die Mutanten 01 - 07 wurden bereits in vergangenen Arbeiten vielfach erfolgreich gelabelt und ESR-spektroskopisch vermessen, obgleich die Bestimmung der Labeleffizienz für Position C298 einen sehr geringen Wert aufweist.

**Tab. 4.2:** Ergebnisse der “MMM”-Simulation

| Mutante | Konformation | MTS-Abstand [nm] |             | Position 1 |              | Position 2 |              |
|---------|--------------|------------------|-------------|------------|--------------|------------|--------------|
|         |              | NO-Abstand       | <i>rmsd</i> | AS         | Bewertung    | AS         | Bewertung    |
| MBP 01  | 1OMP         | 3.74             | 0.15        | 031        | <i>tight</i> | 298        | <i>good</i>  |
|         | 1ANF         | 3.23             | 0.14        |            | <i>tight</i> |            | <i>tight</i> |
| MBP 02  | 1OMP         | 3.92             | 0.21        | 82         | <i>good</i>  | 298        | <i>good</i>  |
|         | 1ANF         | 3.52             | 0.20        |            | <i>good</i>  |            | <i>tight</i> |
| MBP 03  | 1OMP         | 2.93             | 0.33        | 124        | <i>good</i>  | 298        | <i>good</i>  |
|         | 1ANF         | 2.85             | 0.32        |            | <i>good</i>  |            | <i>tight</i> |
| MBP 04  | 1OMP         | 4.13             | 0.28        | 175        | <i>tight</i> | 298        | <i>good</i>  |
|         | 1ANF         | 4.23             | 0.30        |            | <i>good</i>  |            | <i>tight</i> |
| MBP 05  | 1OMP         | 1.99             | 0.33        | 298        | <i>good</i>  | 313        | <i>good</i>  |
|         | 1ANF         | 1.70             | 0.35        |            | <i>tight</i> |            | <i>good</i>  |
| MBP 06  | 1OMP         | 2.78             | 0.22        | 298        | <i>good</i>  | 325        | <i>tight</i> |
|         | 1ANF         | 2.76             | 0.26        |            | <i>tight</i> |            | <i>good</i>  |
| MBP 07  | 1OMP         | 1.99             | 0.19        | 238        | <i>tight</i> | 298        | <i>good</i>  |
|         | 1ANF         | 2.02             | 0.21        |            | <i>good</i>  |            | <i>tight</i> |
| MBP 08  | 1OMP         | 0.78             | 0.23        | 233        | <i>good</i>  | 298        | <i>good</i>  |
|         | 1ANF         | 0.57             | 0.11        |            | <i>tight</i> |            | <i>tight</i> |
| MBP 09  | 1OMP         | 1.40             | 0.17        | 298        | <i>tight</i> | 316        | <i>good</i>  |
|         | 1ANF         | 1.00             | 0.14        |            | <i>tight</i> |            | <i>tight</i> |
| MBP 10  | 1OMP         | 2.15             | 0.37        | 234        | <i>good</i>  | 296        | <i>good</i>  |
|         | 1ANF         | 1.20             | 0.19        |            | <i>good</i>  |            | <i>good</i>  |
| MBP 11  | 1OMP         | 1.54             | 0.40        | 015        | <i>tight</i> | 234        | <i>good</i>  |
|         | 1ANF         | 2.37             | 0.15        |            | <i>tight</i> |            | <i>good</i>  |

### 4.3.3. MD-Simulation der MTS-Abstände

Als Grundlage dieser Arbeit wurden die Strukturen 1ANF\_Min für die geschlossene und 1OMP\_Min für die offene Konformation verwendet. Die in der Struktur 1ANF gebundene Maltose wurde für alle Simulation in der Bindungsspalte belassen [1ANF] und mit der übrigen Proteinstruktur in die Kalkulationen mit einbezogen. Die offene Konformation 1OMP hingegen wurde ohne den Liganden simuliert [1OMP].

Um die gelabelten Mutanten mit “Accelrys Discovery Studio 2.5.5” vollständig darstellen zu können, wurde ein theoretisches Model der MTS-Gruppe entsprechend Abbildung 2.14 erzeugt und das Schwefelatom als Bindungspunkt gewählt um die Disulfidbrücke mit Cystein ausbilden zu können.

Für jede der 11 Doppelmutanten wurde eine eigene Datei erstellt und die jeweiligen Aminosäuren durch Cystein ersetzt und mit der MTS-Gruppe verbunden.

Der Abstand der MTS-Stickstoffmoleküle wurde markiert, mit dem “*Distance Monitor*” verfolgt und wird in dieser Arbeit als MTS-Abstand betrachtet.

Die entstandene Struktur wurde im Anschluss mit dem “CHARMm”-*forcefield* neu typisiert und eine weitere vollständige Energieminimierung durchgeführt.

Die Position des Spin-Labels wurde daraufhin durch direkte Drehung der S-S-Einfachbindung in eine neue Position bewegt und jeweils erneut minimiert. Die Ergebnisse werden verglichen und im Anschluss wird die energetisch günstigste Position als Ausgangsposition der weiteren Simulation verwendet.

Sobald eine plausible Ausgangslage gefunden wurde, wurde das System im relevanten Bereich mit einer expliziten Wasserumgebung über die “*Solvation*”-Funktion ergänzt. Hierfür wurde der Mittelpunkt des Cystein-MTS-Komplexes gesucht und von einer Sphäre mit Radius 15 Å eingeschlossen, welche als Ausgangspunkt der radialen “*Solvation*” genutzt wurde.

Die restliche Umgebung wird weiterhin im impliziten Wassermmodell “GBSW” simuliert welches in Quelle [MacKerell, 2012] oder dem “Accelrys Discovery Studio”-Handbuch näher erläutert wird.

Das nun “teilweise-explizite” Modell wird im weiteren als “\_2Sphere” bezeichnet.

Die Verwendung eines nur “teilweise-expliziten” Systems reduziert die für die Berechnung benötigten Systemressourcen und die Kalkulationsdauer erheblich, ohne auf die äußerst wichtige, explizite Darstellung der Wassermoleküle zur Kalkulation der Proteinoberflächenbewegung zu verzichten [White, 2006]. Dadurch ist es möglich, eine vollständige Simulation der “Dynamik-Kaskade“ ohne einen Supercomputer auf einem System mit genügend Arbeitsspeicher und ausreichend hoher Prozessorleistung durchzuführen.

Als Dynamik-Kaskade bezeichnet man im *molecular modeling* die spezifische Abfolge von Energieminimierung, Erhitzen (und Abkühlen) des Systems, anschließender Equilibrierung

und abschließender Produktionsphase. Die Energieminimierung wird durchgeführt um eine möglichst energiearme und relaxierte Proteinstruktur als Ausgangsstruktur zu finden. Durch die Energieminimierung beträgt die theoretische Temperatur des Systems  $0^\circ$  Kelvin und es muss für eine dynamische Betrachtung des Proteins schrittweise erwärmt werden. Je kleiner dabei die einzelnen Schritte der Erwärmung sind, umso geringer ist die Fehlerrate, jedoch steigt damit auch die benötigte Rechenzeit.

Durch das Erhitzen des Systems werden mögliche lokale Minima in der “Energielandschaft” verlassen und dem System die Möglichkeit gegeben eine günstigere neue Konformation einzunehmen und mögliche “energetische Hürden” zu überspringen. Um eine möglichst “barrierefreie” Umgebung zu schaffen ohne die Struktur zu beschädigen empfiehlt es sich, die Temperatur nicht unbegrenzt weit zu erhöhen.

Anschließend muss die Temperatur des Systems durch eine weitere Dynamik-Simulation wieder auf die spätere Zieltemperatur abgekühlt werden.

Durch die Equilibrierung sorgt man für ein Gleichgewicht des Systems, in welchem die zugeführten Energiebeträge dynamisch auf das ganze System verteilt wurden, und ermöglicht die anschließende Produktionsphase bei der sich das Protein “frei” bewegen darf.

In der Produktionsphase wird die Bewegung des Proteins im Kraftfeld modelliert und zu verschiedenen, gewählten Zeitpunkten als einzelne Konformation gespeichert. Ein Bild der tatsächlichen Bewegung erhält man nun indem man diese Konformationen mit einer geeigneten Verzögerung nacheinander einblendet (“bewegte Bilder”).

Natürlich empfiehlt es sich auch im Falle dieser “freien” Bewegung geeignete Beschränkungen zu wählen und nur relevante Teile vollständig freizugeben, um die Rechenzeit zu minimieren. Im Falle der MBP-Simulation werden fünf verschiedene Beschränkungen gewählt und in den verschiedenen Phasen eingesetzt. Diese Beschränkungen werden im Anhang 14 beschrieben.

Die komplette schrittweise Reihenfolge der verwendeten Dynamik-Kaskade ist in Abschnitt 14 aufgeführt. Diese Dynamik-Kaskade (SDC) basiert auf der von Accelrys vorprogrammierten “*standard dynamic cascade*”, wurde jedoch um mehrere Phasen der Energieminimierung, Aufheizen und Abkühlen des Systems und längere Equilibrationsphasen ergänzt. Die verwendete SDC wurde mit dem Programm “Pipeline Pilot 2.5” auf Basis der “*standard dynamic cascade*” programmiert und als “SDC Final” bezeichnet.

Die Dynamik des Proteins während des abschließenden “Production”-Schrittes wurde als Grundlage zur Bestimmung des MTS-Abstands sowie der möglichen Abweichung (*rmsd*) verwendet.

Zur einfachen Betrachtung dieses Bereichs wurde eine weitere Version des Ergebnisses, die nur die gespeicherten Konformationen des “Production”-Schrittes enthält, als “\_SDC Prod” erzeugt und gespeichert.

Für die Dynamik-Simulation des Maltose bindenden Proteins wurde eine Dauer von 40 ps für die Produktionsphase gewählt, welche zur Beobachtung von Oberflächen-, Seitenketten-, Seitenschleifen- und Gesamt-Bewegung von Proteinen ausreicht.



Exemplarisch wird der Verlauf der theoretischen Temperatur (Abb. 4.10), der kinetischen ( $E_{kin}$ ), potenziellen ( $E_{pot}$ ) und totalen Energie ( $E_{tot}$ ) des Systems (Abb. 4.11), sowie des MTS-Abstands (Abb. 4.12) für 1ANF\_MBP01 in den entsprechenden Abbildungen aufgeführt. Die einzelnen Phasen der Kaskade lassen sich dabei deutlich erkennen. Zur Bestimmung des MTS-Abstands wird der Bereich von 45-80 ps verwendet, in diesem Fall liegt der Abstand zwischen 3.09-3.18 nm.

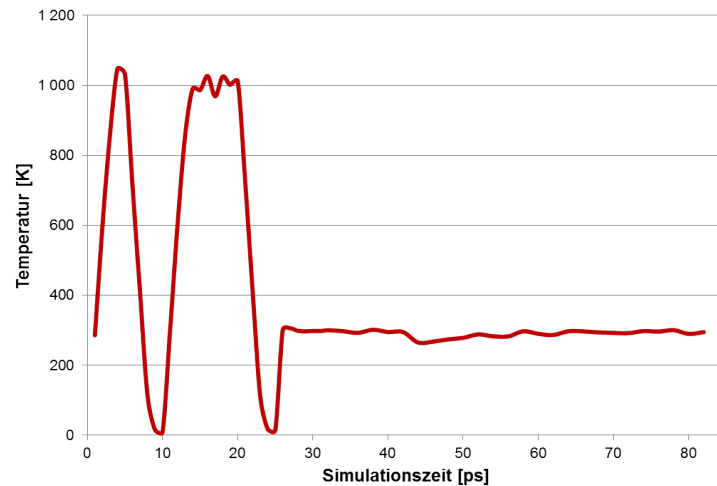


Abb. 4.10: Verlauf der Temperatur: MD 1ANF\_MBP01 2Sphere SDC

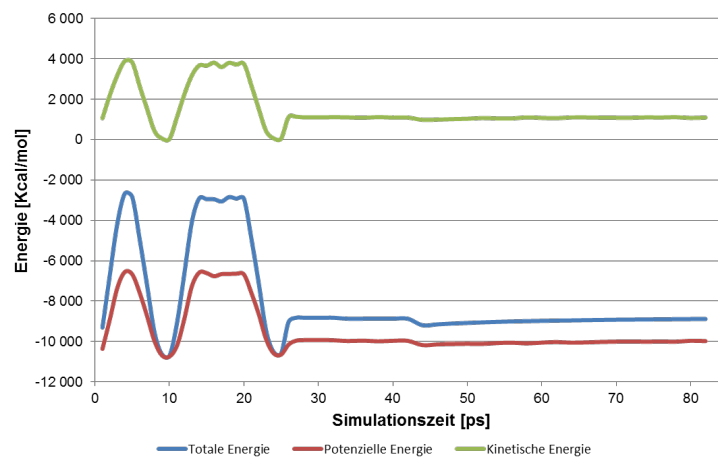


Abb. 4.11: Verlauf der  $E_{kin}$ ,  $E_{pot}$  und  $E_{tot}$ : MD 1ANF\_MBP01 2Sphere SDC

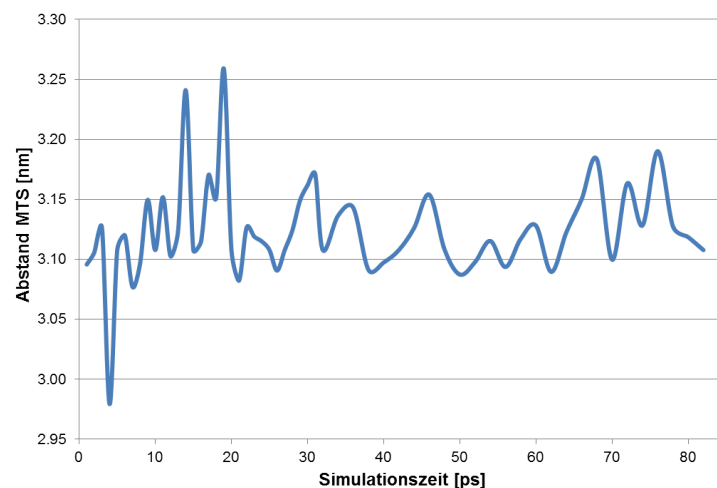
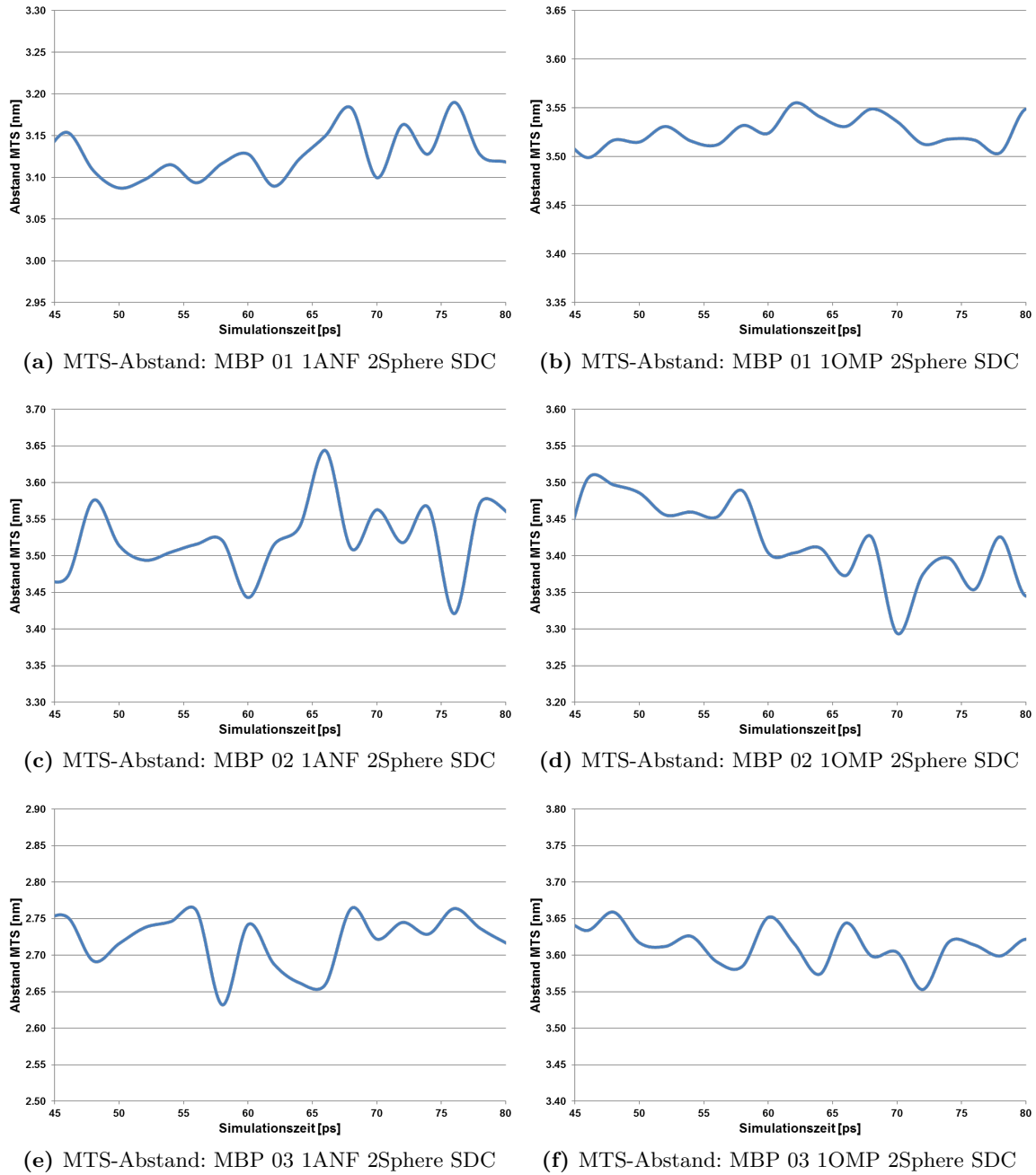


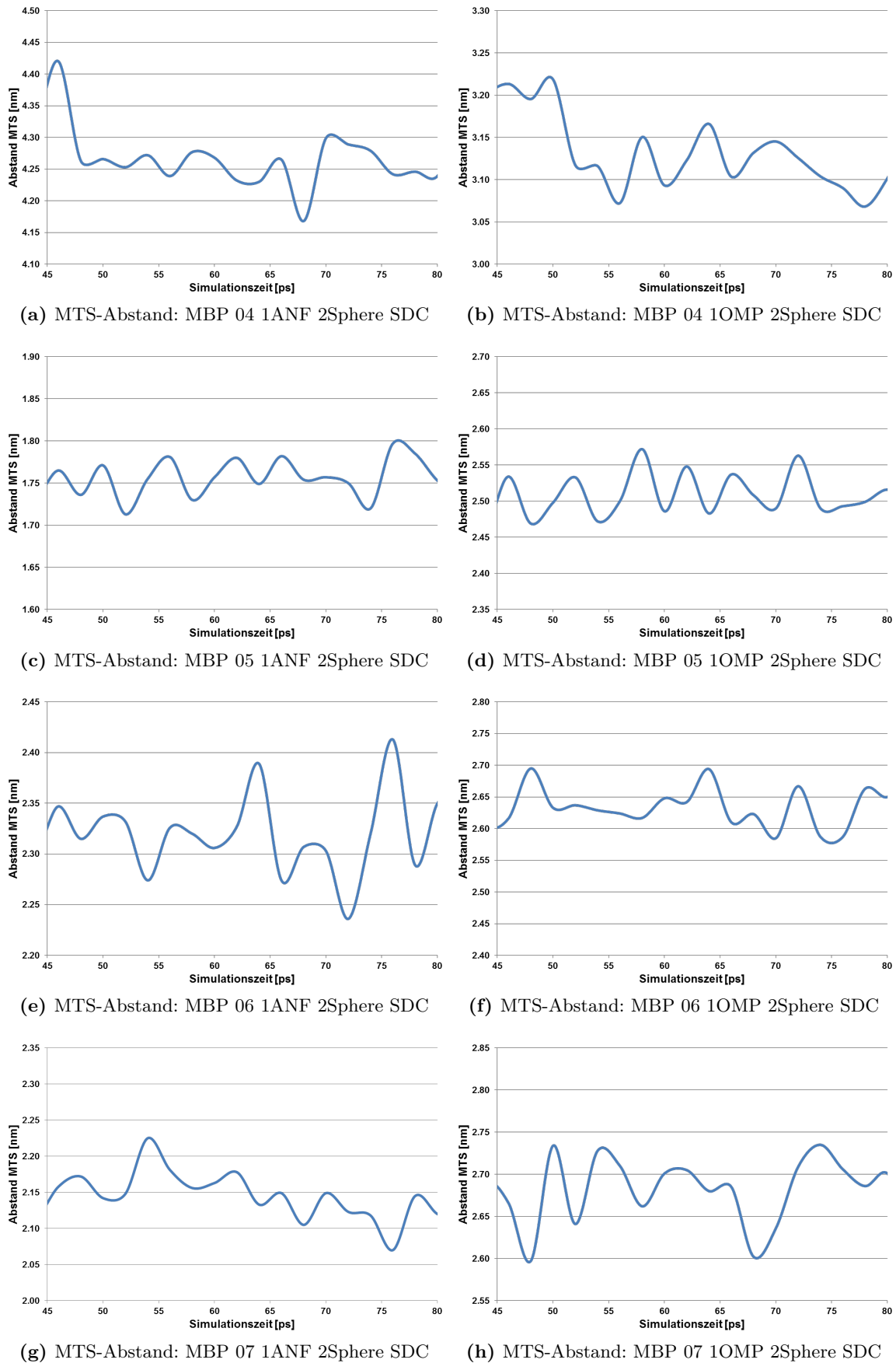
Abb. 4.12: Verlauf des MTS-Abstands: MD 1ANF\_MBP01 2Sphere SDC

In den restlichen MD-SDC-Simulationen wird auf die Darstellung der Energien und der Temperatur verzichtet.

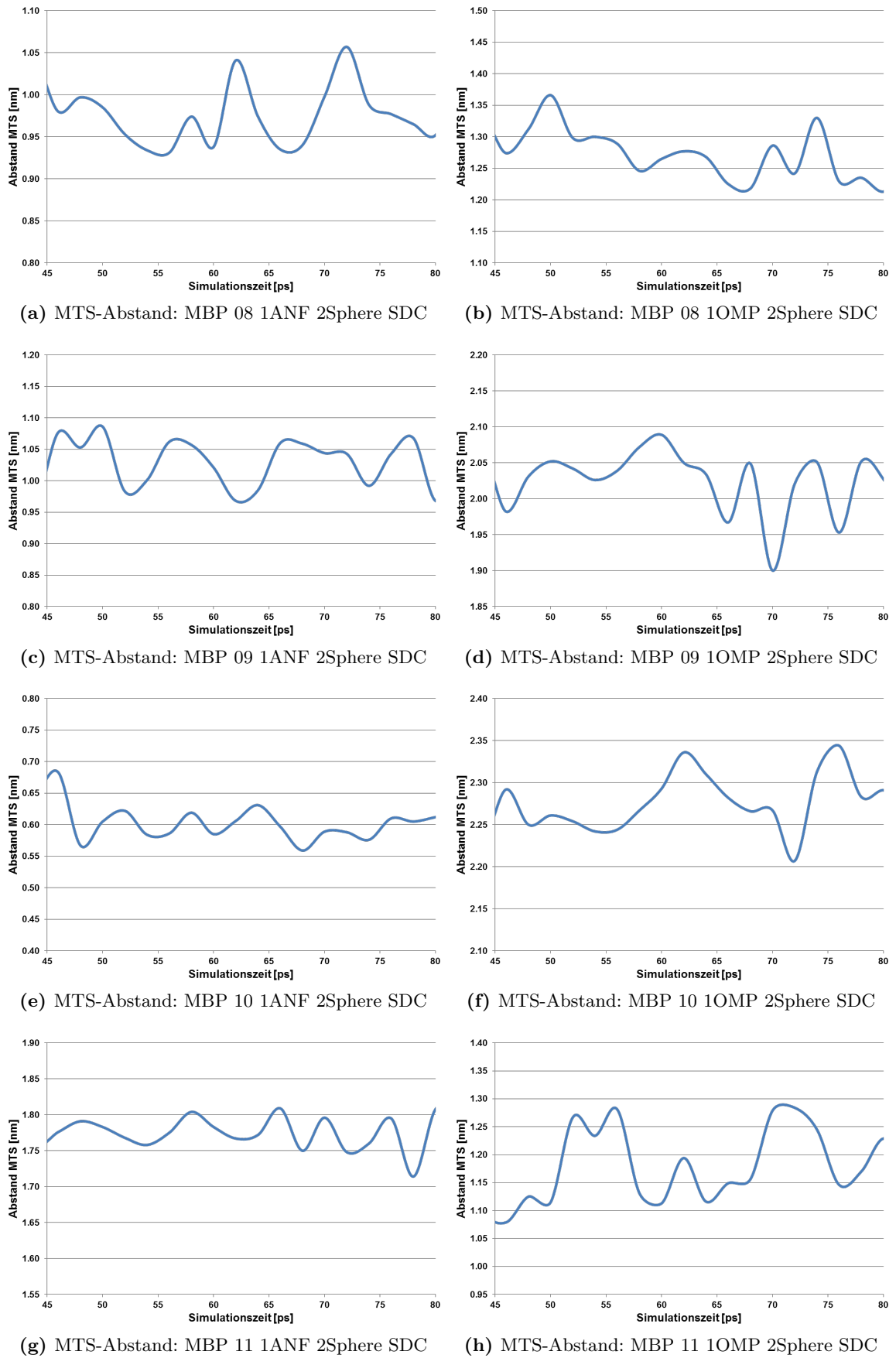
Die Ergebnisse für den simulierten MTS-Abstand im relevanten Bereich der Mutanten 01 - 11 werden in Abbildungen 4.13, 4.14, 4.15 und Tabelle 4.3 zusammengefasst.



**Abb. 4.13:** Verlauf des MTS-Abstands der Simulationen “MBP 01 - 03 1ANF/1OMP 2Sphere SDC” in der Produktionsphase (45-80 ps)



**Abb. 4.14:** Verlauf des MTS-Abstands der Simulationen “MBP 04-07 1ANF/1OMP 2Sphere SDC” in der Produktionsphase (45-80 ps)



**Abb. 4.15:** Verlauf des MTS-Abstands der Simulationen “MBP 08-11 1ANF/1OMP 2Sphere SDC” in der Produktionsphase (45-80 ps)

#### 4.3.4. Vergleich der simulierten Abstände

In diesem Abschnitt werden die über “MMM”-Simulation kalkulierten MTS-Abstände mit den über die zuvor beschriebene SDC-Simulation ermittelten MTS-Abständen verglichen. Als Ausgangsstruktur der jeweiligen Simulation dienten die Röntgenstrukturdaten 1OMP für die geöffnete und 1ANF für die geschlossene Konformation des Maltose bindenden Proteins.

Beim Vergleich der beiden Ergebnisse ist zu beachten, dass im Falle der “MMM”-Simulation ein spezifischer Abstand mit einer möglichen Abweichung (*rmsd*) geliefert wird, im Fall der Dynamik-Simulation hingegen der gesamte Bereich des gefundenen MTS-Abstands notiert ist. So liefert der direkte Vergleich der Ergebnisse für 1OMP\_MBP01 den Bereich “3.59-3.89” (MMM) gegenüber “3.1-3.2” (SDC).

**Tab. 4.3:** Ergebnisse der “MMM”- und “SDC”-Simulation

| Mutante | Konfor-<br>mation | “MMM”-MTS-Abstand [nm] |             | “SDC”-MTS-Abstand [nm] |      |
|---------|-------------------|------------------------|-------------|------------------------|------|
|         |                   | NO-Abstand             | <i>rmsd</i> | Bereich: NO-Abstand    |      |
| MBP 01  | 1OMP              | 3.74                   | 0.15        | 3.5                    | 3.55 |
|         | 1ANF              | 3.23                   | 0.14        | 3.1                    | 3.2  |
| MBP 02  | 1OMP              | 3.92                   | 0.21        | 3.3                    | 3.5  |
|         | 1ANF              | 3.52                   | 0.20        | 3.4                    | 3.65 |
| MBP 03  | 1OMP              | 2.93                   | 0.33        | 3.45                   | 3.6  |
|         | 1ANF              | 2.85                   | 0.32        | 2.65                   | 2.8  |
| MBP 04  | 1OMP              | 4.13                   | 0.28        | 3.05                   | 3.15 |
|         | 1ANF              | 4.23                   | 0.30        | 4.15                   | 4.3  |
| MBP 05  | 1OMP              | 1.99                   | 0.33        | 2.5                    | 2.55 |
|         | 1ANF              | 1.70                   | 0.35        | 1.7                    | 1.8  |
| MBP 06  | 1OMP              | 2.78                   | 0.22        | 2.6                    | 2.7  |
|         | 1ANF              | 2.76                   | 0.26        | 2.25                   | 2.4  |
| MBP 07  | 1OMP              | 1.99                   | 0.19        | 2.6                    | 2.75 |
|         | 1ANF              | 2.02                   | 0.21        | 2.05                   | 2.2  |
| MBP 08  | 1OMP              | 0.78                   | 0.23        | 1.2                    | 1.35 |
|         | 1ANF              | 0.57                   | 0.11        | 0.9                    | 1.05 |
| MBP 09  | 1OMP              | 1.40                   | 0.17        | 1.9                    | 2.1  |
|         | 1ANF              | 1.00                   | 0.14        | 0.95                   | 1.1  |
| MBP 10  | 1OMP              | 2.15                   | 0.37        | 2.2                    | 2.35 |
|         | 1ANF              | 1.20                   | 0.19        | 0.55                   | 0.7  |
| MBP 11  | 1OMP              | 1.54                   | 0.40        | 1.1                    | 1.3  |
|         | 1ANF              | 2.37                   | 0.15        | 1.7                    | 1.85 |

Deutlich erkennt man größere Differenzen in den über die verschiedenen Methoden kalkulierten MTS-Abständen.

Es gilt hierbei zu beachten, dass die “MMM” Methode wie bereits in 2.3.3 erwähnt einige Schwachstellen aufweist und nur einen groben, dafür schnellen, Überblick über die möglichen Messdaten liefert.

Allein durch die ersten Korrekturen der Röntgenstrukturdaten durch Energieminimierung und Einführung eines beweglichen Proteinmodells sowie die explizite Einbindung von Wassermolekülen im Bereich der NSL-Bindung liefert die MD-Simulation deutliche Vorteile gegenüber der “MMM”-Simulation.

Die über die vollständige SDC simulierten Werte des MTS-Abstands werden daher für die weiteren Betrachtungen und den Vergleich mit den ESR-Daten verwendet.

Als besonders interessant sei an dieser Stelle noch bemerkt, dass sowohl die “MMM”- als auch die SDC-Simulation für die Mutante MBP 02, 04 und 11 im Falle der geöffneten Konformationen einen kleineren Abstand der Spinlabel gegenüber der geschlossenen Konformation des MBP aufweisen. Betrachtet man die jeweiligen Simulation genauer, zeigt sich, dass dies den räumlichen Ausbreitungsmöglichkeiten des MTS an diesen Positionen entspricht und es durch Maltosebindung tatsächlich zu einer Vergrößerung des Nitroxidgruppen-Abstands kommen sollte.

## 4.4. ESR-Messungen

Zur Untersuchung der geschlossenen und geöffneten Konformation und des *Molten-Globule*-Zustands von MBP wurden im Rahmen dieser Dissertation alle 11 MBP-Mutanten durch *DQC*-ESR-Messungen bei unserem Kooperationspartner J. Freed im ACERT Institut der Cornell University, Ithaca, NY, vermessen. Die Vorbereitung der entsprechend Abschnitt 11.1 aufgereinigten und erfolgreich gelabelten Proben (Kontrolle über *cw*-ESR) wurde während eines Aufenthalts im ACERT Institut durchgeführt.

Die Proteinproben wurden im Eisbad in einem lichtgeschützten Behälter nach Amerika überführt.

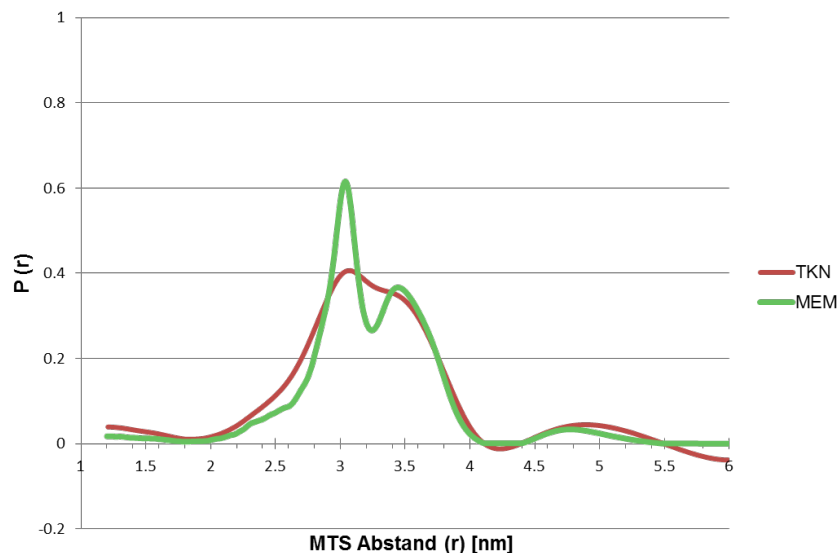
Die erfolgreiche Proteinaufreinigung, die Entfernung der Maltose und Stabilisierung des *MG*-Zustands bei pH 3 wurde in den vorangegangenen Abschnitten belegt.

Die in Abschnitt 2.3.2.6 beschriebene *DQC*-Methode wurde gewählt, da sie einen Messbereich von 1-8 nm und somit den erwarteten Bereich unserer MTS-Abstände abdeckt. Gerade im Bereich der Detektion von Abständen von 1-2 nm liegt ein sehr großer Vorteil dieser Methode gegenüber der *DEER*-Technik und exakt in diesem Bereich liegen auch die erwarteten Abstände der neuen Mutanten in Nähe der MBP-Bindungsspalte. Außerdem sollte die Probe im Falle des *MG*-Zustands bei pH 3 zur besseren Stabilisierung in geringer Proteinkonzentration vorliegen, um eine Präzipitation der Proteine zu verhindern, und die für eine *DQC*-Messung benötigte, gebundene NSL-Konzentration ist sehr gering.

Für alle Proben wurden Testweise ebenfalls *DEER*-Messungen durchgeführt um die Signalintensität und Probeneigenschaft zu bestimmen, diese wurden in den meisten Fällen jedoch nicht gespeichert und sind im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeführt oder von Interesse. Die *DQC*-Messungen wurden über Nacht durchgeführt, um ein möglichst gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erlangen.

Die hier dargestellten Abstandsverteilungen wurden von P. Borbat mit dem "*MEM2L*"-Algorithmus, einer Weiterentwicklung der klassischen "*Maximum Entropy Method*", bestimmt [Chiang et al., 2005]. Diese Methode stellt eine Verbesserung gegenüber der klassischen Tikhonov-Regularisierung (TKN) dar. Dennoch wurden alle erhaltenen Spektren ebenfalls mit der Software "*DEER Analysis 2016*" geladen und eine Tikhonov-Regularisierung zum Vergleich der Ergebnisse beider Methoden durchgeführt.

Beide Spektren liefern sehr ähnliche Werte wie in Abbildung 4.16 am Beispiel der Messung von MBP 01 pH 7 ersichtlich wird. Aufgrund der höheren Genauigkeit wurde für die Auswertung der Daten jeweils auf die "*MEM2L*"-Kalkulationen (*MEM*) zurückgegriffen.



**Abb. 4.16:** Vergleich der Tikhonov-Regularisierung (TKN) mit der Maximum-Entropy-Methode (*MEM*) am Beispiel MBP 01 pH 7

Im Folgenden werden die Proben, denen in der Vorbereitung ein Überschuss von 20 mM Maltose zugesetzt wurde als MAL bezeichnet, für die maltosefreien Proben fällt diese Bezeichnung weg.

Für die Proben MBP 09 pH 3 MAL, MBP 09 pH 7 MAL und MBP 10 pH 3 MAL liegt leider keine “*MEM2L*” Kalkulation vor und es werden für diese drei Messungen die über Tikhonov-Regularisierung bestimmten Abstandsverteilungen verwendet.

Die Probe MBP 04 pH 7 MAL konnte nicht erfolgreich vermessen werden, jedoch wurde auf einen Neuanatz der Probe verzichtet, da bereits genügend Messdaten vorliegen.

Die Proben der Mutante MBP 08 lieferten in keinem der 4 Fälle ein messbares Signal, was entweder auf nicht erfolgreiches Spinlabeling oder einen Abstand unter ein Nanometer im geöffneten und geschlossenen Fall schließen lässt. Da sich das erfolgreiche Spinlabeling über *cw*-ESR-Messungen für die jeweiligen Einzelmутanten S233C und P298C und MBP 08 weiterhin bestätigen ließ, lässt dies nur den Schluss auf die zweite Möglichkeit zu.

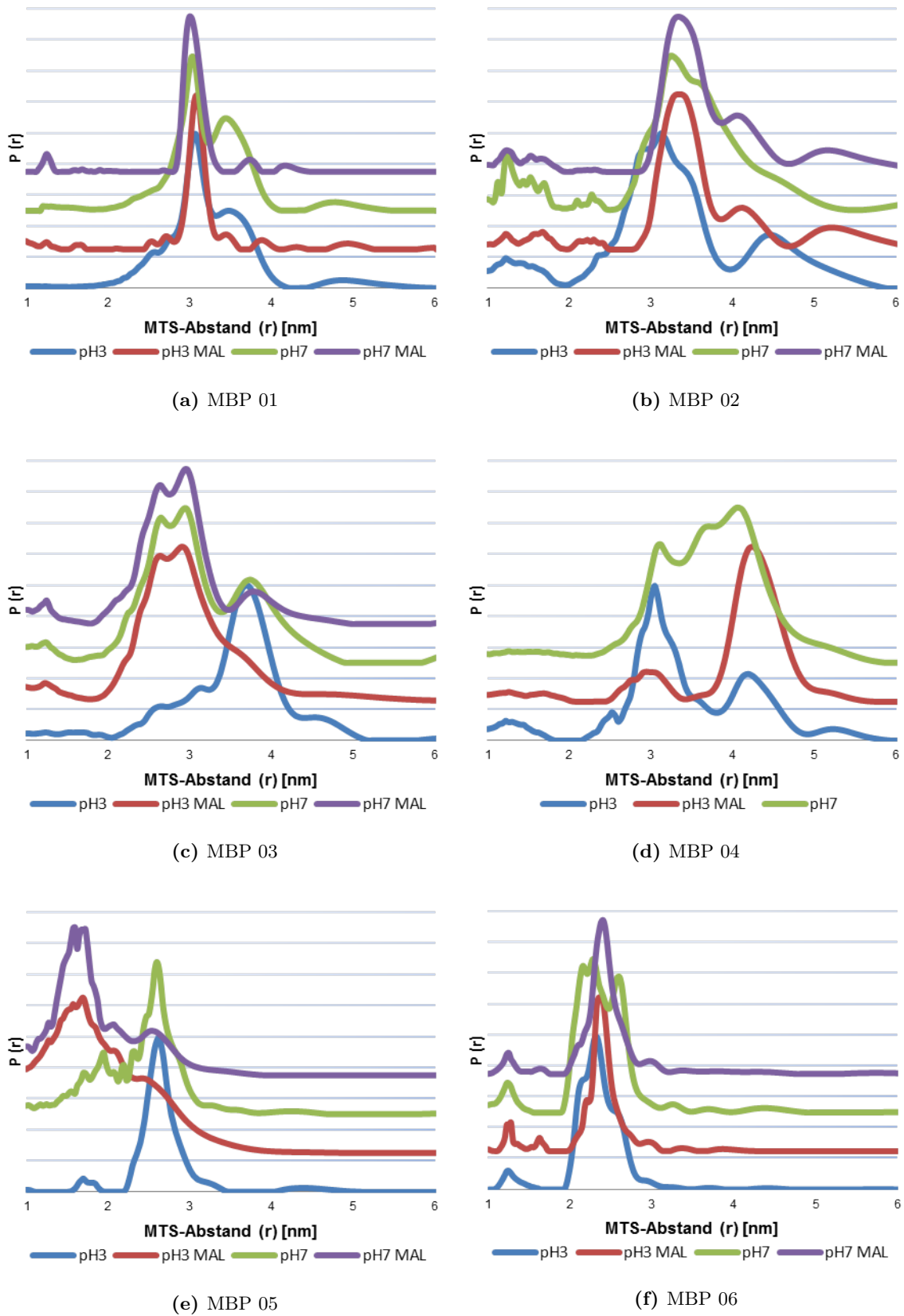
Um eine bessere Darstellung der Spektren zu gewährleisten, wurden die Abstandsverteilungen auf einheitliche x-Werte mit der “*TREND*”-Funktion von Excel interpoliert.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Peaks innerhalb der Messungen der jeweiligen Mutante zu erhalten, wurden die Daten im Anschluss jeweils auf den Wertebereich von 0 bis 1 normalisiert.

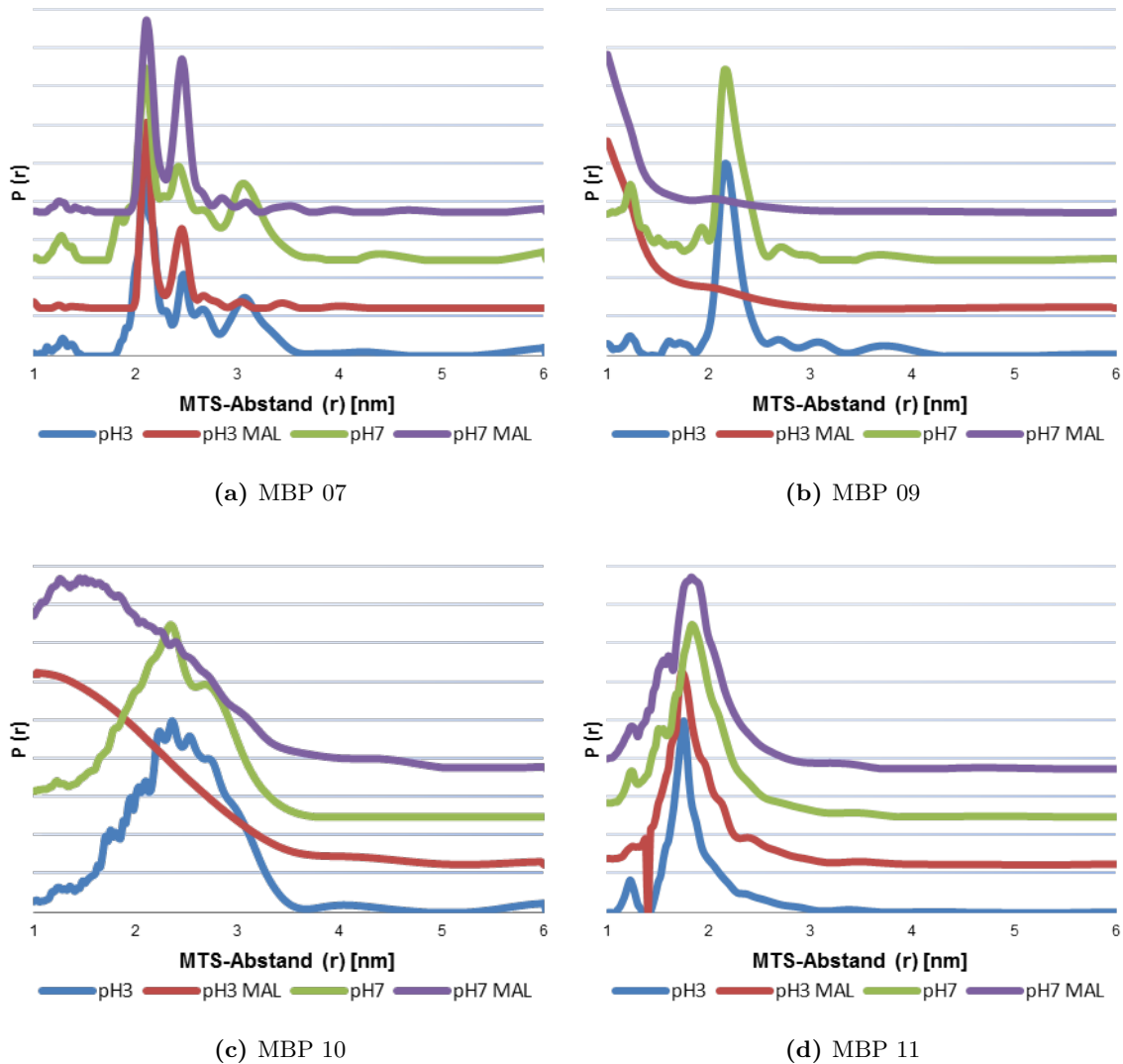
In den Abbildungen 4.17 und 4.18 ist der Vergleich des nativen und *MG*-Zustands mit und ohne Maltose für jede Mutante einzeln aufgetragen.

Die entsprechenden *DQC*-Spektren befinden sich im Anhang-Kapitel 15.





**Abb. 4.17:** Abstandsverteilungen der Mutanten MBP 01-06 im nativen (pH 7) und *MG*- (pH 3) Zustand mit und ohne Maltose



**Abb. 4.18:** Abstandsverteilungen der Mutanten MBP 07, 09 - 11 im nativen (pH 7) und *MG*- (pH 3) Zustand mit und ohne Maltose

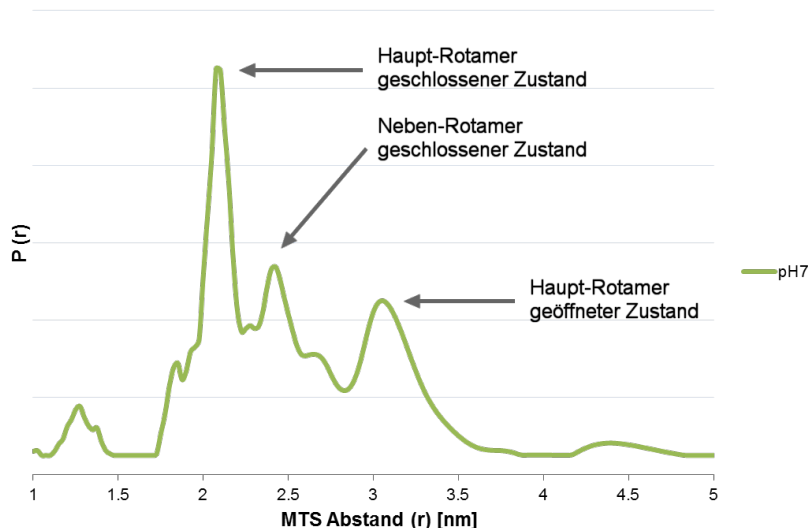
Die in den Abbildungen 4.17 und 4.18 erkennbaren Peaks sind in Tabelle 4.4 übersichtlich zusammengefasst. Dabei werden kleinere Peakintensitäten durch Verwendung einer kleineren Schriftgröße gekennzeichnet.

Generell wird der größte im Spektrum vorkommende Peak als Peak 1 bezeichnet, Peak 2 beschreibt entsprechend den nächstgrößeren.

In den gemessenen Spektren sind nicht mehr als zwei relevante Peaks zu erkennen, daher wurde die Betrachtung auf zwei Peaks beschränkt.

In den Abbildungen werden teilweise sehr nahe beieinander liegende Peaks beobachtet, wie in Abbildung 4.19 hervorgehoben ist. Die Entstehung solcher Rotamere lässt sich durch mehrere energetisch günstige Labelpositionen und die Dynamik des Proteins erklären.

Da diese Rotamere nur bei einigen Mutanten auftauchen und auf den Einfluss des Labels zurückzuführen sind, werden sie daher in Tabelle 4.4 einem gemeinsamen Peak zugeordnet, um die spätere Zuordnung zum geöffneten und geschlossenen Zustand des Maltose bindenden Proteins besser ersichtlich zu machen.



**Abb. 4.19:** Analyse der Abstandsverteilung des *DQC*-Spektrums MBP 07 pH 7 –MAL

Eine nähere Unterscheidung zwischen dem Haupt- und Neben-Rotamer wird in der Auswertung dieser Arbeit nicht getroffen, ist jedoch in den Abbildungen 4.17 und 4.18 ersichtlich. Zum besseren Verständnis werden die Rotamere im Spektrum MBP 07 pH 7 –MAL in Abbildung 4.19 eingezeichnet, die Zuordnung des geöffneten und geschlossenen Zustands erfolgt dabei wie in Abschnitt 4.4.2 näher erläutert.

**Tab. 4.4:** Ergebnisse der *DQC*-ESR-Messungen

| Mutante | pH-Wert | Abstand <i>DQC</i> +MAL [nm] |               |        |               | Abstand <i>DQC</i> –MAL [nm] |               |        |               |
|---------|---------|------------------------------|---------------|--------|---------------|------------------------------|---------------|--------|---------------|
|         |         | Peak 1                       | <i>rmsd</i> 1 | Peak 2 | <i>rmsd</i> 2 | Peak 1                       | <i>rmsd</i> 1 | Peak 2 | <i>rmsd</i> 2 |
| MBP 01  | pH 03   | 3.1                          | 0.1           |        |               | 3.1                          | 0.2           | 3.6    | 0.3           |
|         | pH 07   | 3.0                          | 0.1           |        |               | 3.0                          | 0.2           | 3.5    | 0.3           |
| MBP 02  | pH 03   | 3.3                          | 0.3           |        |               | 3.1                          | 0.4           | 4.5    | 0.2           |
|         | pH 07   | 3.4                          | 0.2           | 4.0    | 0.2           | 3.3 & 3.5                    | 0.3 & 0.3     |        |               |
| MBP 03  | pH 03   | 2.6 & 2.9                    | 0.2 & 0.4     |        |               | 3.7                          | 0.3           |        |               |
|         | pH 07   | 2.6 & 3.0                    | 0.2 & 0.2     | 2.9    | 0.3           | 2.6 & 2.9                    | 0.2 & 0.2     | 3.7    | 0.3           |
| MBP 04  | pH 03   | 4.2                          | 0.3           |        |               | 3.0                          | 0.3           | 4.2    | 0.3           |
|         | pH 07   | n.a.                         |               |        |               | 3.6 & 4.0                    | 0.2 & 0.2     | 3.1    | 0.2           |
| MBP 05  | pH 03   | 1.7                          | 0.6           |        |               | 2.6                          | 0.1           | 1.7    | 0.1           |
|         | pH 07   | 1.6 & 1.7                    | 0.1 & 0.1     | 2.5    | 0.3           | 2.6                          | 0.2           | 1.9    | 0.2           |
| MBP 06  | pH 03   | 2.4                          | 0.1           | 1.2    | 0.1           | 2.3                          | 0.3           | 1.2    | 0.1           |
|         | pH 07   | 2.4                          | 0.1           | 1.2    | 0.1           | 2.3 & 2.6                    | 0.2 & 0.1     | 1.2    | 0.1           |
| MBP 07  | pH 03   | 2.1                          | 0.1           | 2.4    | 0.1           | 2.1 & 2.4                    | 0.1 & 0.2     | 3.0    | 0.2           |
|         | pH 07   | 2.1                          | 0.1           | 2.5    | 0.1           | 2.1 & 2.4                    | 0.1 & 0.2     | 3.0    | 0.2           |
| MBP 09  | pH 03   | < 1.0                        |               |        |               | 2.2                          | 0.1           |        |               |
|         | pH 07   | < 1.0                        |               |        |               | 2.2                          | 0.1           | 1.2    | 0.1           |
| MBP 10  | pH 03   | < 1.0                        |               |        |               | 2.4                          | 0.6           |        |               |
|         | pH 07   | < 1.0                        |               |        |               | 2.3                          | 0.5           |        |               |
| MBP 11  | pH 03   | 1.7                          | 0.3           |        |               | 1.7                          | 0.2           | 1.2    | 0.1           |
|         | pH 07   | 1.8                          | 0.3           |        |               | 1.8                          | 0.3           |        |               |

Deutlich erkennt man eine hohe Übereinstimmung der Spektren im Falle der Messungen bei pH 3 und pH 7, welche im nächsten Abschnitt 4.4.1 näher analysiert werden.

Im Falle der Messungen ohne Maltose ist eine deutlich breitere Verteilung der Abstände zu erkennen, was eindeutig auf die Ausbildung mehrerer Konformationen hinweist. Der direkte Vergleich der Messungen mit Maltose zeigt jeweils einen mit der maltosefreien Messung vergleichbaren Peak, was auf den Abstand der geschlossenen Konformation schließen lässt. Geht man davon aus, so entspricht der andere Peak dem Abstand der geöffneten Konformation.

Im Abschnitt 4.4.2 werden die detektierten Peaks mit den simulierten Abständen verglichen und diese These überprüft.

#### **4.4.1. Untersuchung des *Molten-Globule*-Zustands**

In den Abbildungen 4.17, 4.18 und Tabelle 4.4 wird ersichtlich, dass grundsätzlich für MBP die Abstände der Spinlabel im *Molten-Globule*-Zustand denen des nativen Zustands entsprechen.

Betrachtet man die Spektren genauer, so kann man jedoch vor allem im Falle der –MAL-Messungen häufig eine kleine Verbreiterung der pH3-Messungen erkennen, wie beispielsweise bei MBP 02 sehr gut zu erkennen ist.

Im Falle der Mutanten MBP 01 - 06 liegen die Spinlabelpositionen weiter entfernt von der Bindungsspalte. Aufgrund der partiellen Entfaltung der Proteine wäre eine Verbreiterung der Peaks innerhalb der Abstandsverteilung in den pH3-Messungen zu erwarten. Diese lässt sich jedoch nur geringfügig in den gemessenen Spektren erkennen.

Die partielle Entfaltung der Proteine bei pH 3 wurde über CD- und ANS-Fluoreszenzmessungen bestätigt.

Die hier gemessenen Daten deuten daher auf die Ausbildung einer dem nativen Zustand sehr ähnlichen Struktur im *Molten-Globule*-Zustand hin.

Vorherige *DEER*-ESR-Messungen im Arbeitskreis weisen das Entstehen weiterer Peaks für die Messungen bei pH 3 im Vergleich zu den Messungen bei pH 7 auf [Chakour, 2015, Reichenwallner et al., 2013].

Diese Ergebnisse lassen sich nach neueren Erkenntnissen durch die Ausbildung der geöffneten und geschlossenen Struktur bei den pH3-Messungen erklären, wie im Folgenden erläutert wird.

Die Ursache liegt vermutlich in der damaligen Probenvorbereitung, in welcher die Entfernung der Maltose im Anschluss an die Amylose-Resin-Säulenchromatographie (bei der MBP mittels Zugabe von Maltose eluiert wird) über eine Hydroxyapatit-Säule [Reichenwallner, 2011] durchgeführt wurde.

Von einer vollständigen Entfernung der Maltose kann bei dieser Methode nicht ausgegangen werden [Nickolaus, 2017, Selmke, 2013].

Im Falle der Messungen bei pH 7 wurde daher hauptsächlich die geschlossene Konformation von MBP detektiert.

Im *Molten-Globule*-Zustand kommt es zu einer teilweisen Entfaltung des Proteins und entsprechend schwächeren Bindung der Maltose an MBP.

Bei der damaligen Vorbereitung der pH3-Proben wurde schrittweise der pH-Wert gesenkt und die verdünnte Probe aufkonzentriert, wobei eine weitere Entfernung der zuvor gebundenen Maltose auftritt.

Entsprechend lässt sich die Aufspaltung in mehrere Peaks bei den pH3-*DEER*-Messungen durch die Ausbildung der geöffneten und geschlossenen Form von MBP in Abwesenheit von Maltose erklären.

Eine Zuordnung von den Peaks der pH3-*DEER*-Messung zu den in Abschnitt 4.4.2 bestimmten Abständen der offenen und geschlossenen Konformation erweist sich mit Ausnahme der Probe MBP 05 erfolgreich.

Diese Ausnahme lässt sich durch die Verwendung einer unterschiedlichen MBP-Mutante erklären, welche für diese *DEER*-Messungen verwendet wurde (siehe Abschnitt 4.1).

Darüber hinaus erklärt sich dadurch auch das Ausbleiben der Aufspaltung in zwei Peaks im Falle von MBP 06, da für diese Mutante der MTS-Abstand für die offene und geschlossene Konformation nahezu identisch ist.

Durch die gemessenen Abstände und die hohe Übereinstimmung der Messdaten von pH 3 und pH 7 stellt sich folgendes Ergebnis dar:

Selbst in den weiter von der Bindungsspalte entfernten Bereichen weist MBP eine stabilisierte Struktur auf.

Die Messungen der Mutanten nahe der Bindungsspalte (07-11) weisen ebenfalls eindeutig eine hohe Korrelation zwischen *MG*- und nativem Zustand aus und belegen die frühe Ausbildung des aktiven Zentrums von MBP.

Daraus und vor allem aus dem identischen Einfluss der Maltose auf die gemessenen Abstände in beiden Zuständen kann man ableiten, dass die Maltose-Bindung im *Molten-Globule*-Zustand ebenfalls an der gleichen Position, d.h. im aktiven Zentrum, stattfindet.

Die Unterschiede der Messungen mit und ohne Maltose sind sowohl im *MG*-Zustand als auch im nativen Fall sehr deutlich zu erkennen.

Die eintretende Bindung der Maltose mit MBP im *Molten-Globule*-Zustand ist somit mit dieser Messung eindeutig bestätigt.

#### 4.4.2. Vergleich der simulierten und gemessenen Abstände von MBP

In diesem Abschnitt werden die simulierten Abstände aus Abschnitt 4.3 mit den in Abschnitt 4.4 ermittelten *DQC*-Abständen verglichen.

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 4.5 alle Abstände aufgeführt, im Falle der *DQC*-Messungen wurde die Zuordnung der geöffneten und geschlossenen Konformation entsprechend des Vergleichs der +MAL und –MAL-Messungen getroffen.

Die Übereinstimmung und Nähe der für beide Konformationen simulierten MTS-Abstände mit den tatsächlich gemessenen Abständen bestätigt dabei die Zuordnung der geöffneten und geschlossenen Konformation.

In Tabelle 4.5 lässt sich die Übereinstimmung der gemessenen MTS-Abstände mit den simulierten deutlich erkennen.

**Tab. 4.5:** Ergebnisse der “MMM”- und “SDC”-Simulation

| Mutante | Konformation | “SDC”-MTS-Abstand [nm] |      | Abstand DQC [nm] |             |
|---------|--------------|------------------------|------|------------------|-------------|
|         |              | Bereich: NO-Abstand    |      | Peak             | <i>rmsd</i> |
| MBP 01  | 1OMP         | 3.5                    | 3.55 | 3.6              | 0.3         |
|         | 1ANF         | 3.1                    | 3.2  | 3.0              | 0.2         |
| MBP 02  | 1OMP         | 3.3                    | 3.5  | 3.3 & 3.5        | 0.3 & 0.3   |
|         | 1ANF         | 3.4                    | 3.65 | 3.4              | 0.2         |
| MBP 03  | 1OMP         | 3.45                   | 3.6  | 3.7              | 0.3         |
|         | 1ANF         | 2.65                   | 2.8  | 2.6 & 3.0        | 0.2 & 0.2   |
| MBP 04  | 1OMP         | 3.05                   | 3.15 | 3.1              | 0.2         |
|         | 1ANF         | 4.15                   | 4.3  | 3.6 & 4.0        | 0.2 & 0.2   |
| MBP 05  | 1OMP         | 2.5                    | 2.55 | 2.6              | 0.2         |
|         | 1ANF         | 1.7                    | 1.8  | 1.6 & 1.7        | 0.1 & 0.1   |
| MBP 06  | 1OMP         | 2.6                    | 2.7  | 2.3 & 2.6        | 0.2 & 0.1   |
|         | 1ANF         | 2.25                   | 2.4  | 2.4              | 0.1         |
| MBP 07  | 1OMP         | 2.6                    | 2.75 | 3                | 0.2         |
|         | 1ANF         | 2.05                   | 2.2  | 2.1 & 2.4        | 0.1 & 0.1   |
| MBP 09  | 1OMP         | 1.9                    | 2.1  | 2.2              | 0.1         |
|         | 1ANF         | 0.95                   | 1.1  | x                | x           |
| MBP 10  | 1OMP         | 2.2                    | 2.35 | 2.3              | 0.5         |
|         | 1ANF         | 0.55                   | 0.7  | x                | x           |
| MBP 11  | 1OMP         | 1.1                    | 1.3  | 1.2              | 0.1         |
|         | 1ANF         | 1.7                    | 1.85 | 1.8              | 0.3         |

Durch Zugabe der Maltose verschwinden die anderen Peaks in den Spektren (+MAL) weitestgehend und MBP liegt in der geschlossenen Konformation vor.

Ohne den Liganden hingegen findet sich sowohl die in den +MAL-Messungen dominierende, geschlossene und die geöffnete Konformation des MBP.

Die These, dass MBP bereits ohne die Anwesenheit seines Liganden in offener und geschlossener Konformation vorliegt, ist damit auch über die ESR-Spektroskopie belegt.

Selbst die auf den ersten Blick irreführenden Daten der Messungen von MBP 04 und 11, in denen der Abstand im geschlossenen Falle tatsächlich größer zu sein scheint, ist eindeutig durch die Korrelation der Daten belegt. Im Falle der +MAL-Messung von MBP 04 und MBP 11 findet sich in erster Linie nur der größere Abstand in den maltosefreien Messungen wieder.

Häufig erkennt man in den Ergebnissen der *DQC*-Messungen, dass die gemessenen Abstände einen breiteren Bereich abdecken als in der Simulation zuvor bestimmt, was sich durch die Ausbildung unterschiedlicher Rotamere und die Dynamik des Proteins erklären lässt.

Die Erfassung mehrerer Rotamere in der gewählten SDC-Methode ist nicht möglich, da nur ein energetisch günstiges Rotamer gefunden wird und die Suche nach weiteren eine erneute Energiezufuhr, in diesem Fall Erwärmung des Systems, benötigen würde, welche während der Produktionsphase nicht eintritt. Wie in Abbildung 4.19 ersichtlich, können leicht mehrere stabile Rotamere für den gleichen Zustand vorliegen. Auch werden größere dynamische Vorgänge, wie beispielsweise die Konformationsänderung beim Öffnen und Schließen des MBP, nicht bei der Simulation berücksichtigt.

Dennoch zeigt die hohe Korrelation eindeutig den Nutzen der Simulation bei der Auswertung und Interpretation der gemessenen Daten.

Abschließend kann gesagt werden, die simulierten Strukturen passen sehr gut mit den gemessenen Spektren überein und zeigen die geöffnete sowie geschlossene Konformation der jeweiligen Mutanten.





## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde am Beispiel des Maltose bindenden Proteins gezeigt, dass man mit Hilfe der ESR-Spektroskopie Rückschlüsse auf die Proteinkonformation ziehen kann. Die Ermittlung der offenen und geschlossenen Konformation von MBP verlief erfolgreich.

Die Stabilisierung des *MG*-Zustands bei pH 3, die Reinheit des Proteins und erfolgreiche Entfernung der Maltose konnten durch die Messungen bestätigt werden.

Die Konformation des MBP im nativen und *Molten-Globule*-Zustand ändert sich durch Anwesenheit von Maltose, was auf die Bindung der Maltose zurückzuführen ist und mit den Messdaten aus vorangegangenen Arbeiten [Jacso et al., 2012, Sheshadri et al., 1999, Reichenwallner et al., 2013] übereinstimmt.

Sowohl im Falle der über das Protein verteilten Mutationen (MBP 01-06) als auch für die Mutationen nahe der Bindungsspalte, die Rückschlüsse auf das aktive Zentrum des Proteins erlauben, konnte eine hohe Übereinstimmung der Spektren bei pH 3 und pH 7 festgestellt werden. Dadurch kann eindeutig nachgewiesen werden dass eine Grundstruktur von MBP schon im *Molten-Globule*-Zustand, also ohne die vollständig ausgebildete Tertiärstruktur, vorliegt.

Die gleichen Veränderungen der Spektren mit bzw. ohne Maltosezugabe im *MG*- und nativen Zustand belegen weiterhin die Bindung der Maltose in der Bindungsspalte des MBP. Daraus leitet sich entsprechend ab, dass MBP im *Molten-Globule*-Zustand bereits eine funktionell ausgebildetes aktives Zentrum besitzen muss.

Durch Simulation der molekularen Dynamik eines Systems lassen sich anhand bekannter Strukturdaten mit den richtigen Variablen und Anpassungen unbekannte Teilstrukturen kalkulieren, wie beispielweise die Position und Ausrichtung der Spinlabel in einem Protein. Die Fehlerrate und mögliche falsche Zuordnung der gemessenen Abstände wird somit deutlich minimiert.

Durch die Verwendung eines Systems mit "teilweise-explizitem" Wassermodell und geeigneter Produktionszeit konnte eine realistische Oberflächenbewegung des Proteins erreicht und entsprechend hohe Übereinstimmungen mit den gemessenen Werten erreicht werden.

Mit Hilfe von MD-Simulationen konnten über die Energieminimierung und Dynamik-Simulation auf Basis der Röntgenstrukturdaten der offenen und geschlossenen Konformation übereinstimmende Spinlabel-Abstände gegenüber den gemessenen Spektren bestimmt werden. Die offene und geschlossene Konformation konnte damit in den Abstandsverteilungen der *DQC*-Spektren nachgewiesen und analysiert werden.

Die These, dass MBP bereits ohne seinen Liganden sowohl im geöffneten als auch im geschlossenen Zustand vorliegen kann, also beide Konformationen einnimmt, kann durch die *DQC*-Messungen und die Korrelation mit der MD-Simulation eindeutig bestätigt werden.

Durch Zugabe von Maltose verringert sich der Anteil der geöffneten Konformation erheblich, in vielen Fällen verschwindet er sogar völlig. Jedoch zeigen sich eindeutig beide Abstände in den maltosefreien Spektren.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass MBP auch im *Molten-Globule*-Zustand bereits ohne seinen Liganden den geöffneten und geschlossenen Zustand aufweist und ebenfalls nach Zugabe von Maltose in geschlossener Form vorliegt.

Hierbei kommt es sogar durch die Maltose zu einer Stabilisierung des Systems und einer schmaleren Abstandsverteilung für den Peak der geschlossenen Konformation, wenn man die Spektren mit und ohne Maltose bei pH 3 vergleicht.

Dies bietet zudem eine weitere Bestätigung dafür, dass die Bindung eines Liganden stabilisierend auf die Gesamtstruktur im *MG*-Zustand eines Proteins wirkt. Der stabilisierende Effekt der Maltose wurde mit anderen Methoden in der Arbeit meiner Kommilitonin C. Nickolaus untersucht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Untersuchungen in dieser Arbeit erfolgreich waren und das Ziel der Arbeit erreicht wurde.

**Teil II.**

**Radikalnachweis unter Verwendung  
einer neuartigen Spin trap**



## 6. Einleitung

Die Lebensdauer einer Zelle wird durch das Zusammenspiel von freien Radikalen mit Antioxidantien, Proteinen, Cofaktoren und sonstigen Zellbestandteilen beeinflusst. Durch bessere Kenntnis dieses Zusammenspiels können große Fortschritte in Medizin und Gesundheitsvorsorge erreicht werden. Insbesondere bei der Erforschung des Alterungsprozesses und der Behandlung von altersbedingten Erkrankungen steht dieses Thema im Mittelpunkt der Forschungen [Alberts et al., 2002].

Freie Radikale sind sehr reaktive, typischerweise instabile Atome oder Moleküle mit einem (oder mehreren) ungepaarten Elektronen. Im Zusammenhang mit Zellen und biologischen Prozessen tauchen vor allem Sauerstoffradikale auf, welche unter dem Begriff "Reaktive Sauerstoff-Spezies" zusammengefasst werden [Schmidt et al., 2005].

Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) werden im normalen aeroben Zellstoffwechsel durch biologische und biochemische Katalysatoren, hierzu gehören vor allem Übergangsmetalle wie Eisen oder Kupfer, gebildet, darüber hinaus entstehen auch freie Radikale aufgrund exogener Ursachen. Hier sind vor allem der Einfluss chemischer und physikalischer Faktoren zu nennen. Zu den chemischen Faktoren zählen vor allem Umweltbelastungen und Karzinogene. Physikalische Ursachen sind im allgemeinen eine zu hohe Energiezufuhr, wie beispielsweise durch Strahlung oder Wärme.

Unter physiologischen Bedingungen wird eine übermäßige Bildung von ROS durch Antioxidantien und Cofaktoren abgefangen. Dadurch kann einer schädigenden Wirkung entgegen gewirkt werden [Polovka, 2006, Rahman, 2007].

Sollte die Bildung der Sauerstoffradikale das natürliche antioxidative Potential der Zelle überschreiten, spricht man von dem "oxidativen Stress" der Zelle. Zu den möglichen Folgen des oxidativen Stresses gehört die Schädigung aller zellulären und extrazellulären Makromoleküle bis hin zur Apoptose, also dem Absterben der Zelle. Die primären Folgen sind vor allem die Lipidperoxidation, die Proteinoxidation und die Schädigung der DNA [McCord, 2000, Schmidt et al., 2005].

In der Gesundheitsprophylaxe wird daher schon seit Langem versucht über eine hohe Zufuhr von Antioxidantien und Vermeidung von radikal-fördernden Substanzen vielen altersbedingten Krankheiten vorzubeugen und die Lebensdauer des Menschen zu erhöhen. Dabei kommt es vor allem auch darauf an, dass die zugeführten Antioxidantien auch tatsächlich eine hohe Bioverfügbarkeit aufweisen und somit zum antioxidativen Potenzial der Zellen beitragen.

Durch den Verzehr von Speisen und Getränken, die ein hohes Maß an natürlichen Antioxidantien enthalten, wie Vitamine und Flavonoide, können freie Radikale abgefangen und somit der oxidative Stress reduziert werden [Polovka, 2006].

Um die Bildung freier Radikale und den Einfluss diverser Antioxidantien auf Gewebe untersuchen zu können, kann man entweder sekundär oder tertiär auftretende Effekte wie das Membranpotenzial oder das Absterben von Zellen detektieren oder durch Zugabe geeigneter Radikalfänger direkt die Konzentration der Radikale bestimmen [Lottspeich, Engels, 2012].

Einen solchen Radikalfänger, welcher dem System spezifisch zur Detektion freier Radikale zugesetzt wird, bezeichnet man als "*Spin trap*".

Durch die Verwendung von ESR-spektroskopischen Methoden ist es möglich, Untersuchungen innerhalb lebender Zellen durchzuführen [Berliner, Hemminga, 2007, Jeschke, 2008].

Um instabile reaktive Radikale zu detektieren, bedarf es einer Verbindung, die erst durch Reaktion mit den kurzlebigen paramagnetischen Spezies zu einer Verbindung mit ungepaartem Elektron wird, deren Lebensdauer bei einer *cw*-ESR-Untersuchung größer sein muss als die Messzeit. Zu den bekanntesten Spinfallen zählen Verbindungen aus den Gruppen der Oxazolidine, Piperidine, Pyrrolidine sowie Nitrosobenzole [Lottspeich, Engels, 2012, Todres, 2009].

# 7. Theoretische Grundlagen

## 7.1. Reaktive Sauerstoff-Spezies

Unter dem Begriff “reaktive Sauerstoff-Spezies” (ROS), auch Sauerstoffradikale genannt, fasst man die Gruppe der freien Sauerstoffradikale oder im erweiterten Sinn auch aller für den Organismus schädlicher Formen Sauerstoff-enthaltender Stoffe zusammen [Schmidt et al., 2005].

Prinzipiell unterscheidet man hierbei zwischen den radikalischen und nicht-radikalischen ROS.

Zu den radikalischen ROS zählen das Hyperoxid-Anion-Radikal  $O_2\cdot^-$ , auch Superoxid-Anion-Radikal genannt, das Hydroxyl-Radikal  $\cdot OH$ , das Hydroperoxyl-Radikal  $\cdot OOH$ , das Peroxyl-Radikal  $ROO\cdot$  und das Alkoxy-Radikal  $RO\cdot$ .

Zu den nicht-radikalischen ROS gehören der Singulett-Sauerstoff  $^1O_2$ , das Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$ , das Hydroperoxid  $ROOH$  und Ozon  $O_3$ .

Die ständige Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies im aeroben Stoffwechsel der Zelle ist ein natürlicher Vorgang in der Zelle und grundsätzlich als solcher nicht schädlich, da die entstehenden ROS durch das antioxidative Schutzsystem der Zelle abgefangen und in den Redoxreaktionen der Zelle metabolisiert werden. Der hauptsächliche Bildungsort der ROS sind dabei die Mitochondrien der Zelle. Auch werden ROS gezielt von der Zelle gebildet und zur Abwehr von Viren, Bakterien und anderer Pathogene freigesetzt [McCord, 2000, Rahman, 2007].

Kommt es jedoch zur vermehrten ROS-Produktion, so führt dies zur Überlastung des antioxidativen Schutzsystems. Nun treten die entstehenden ROS in Kontakt mit anderen Molekülen und lösen autokatalytische Reaktionen aus und propagieren radikale Kettenreaktionen. Die Zelle unterliegt oxidativem Stress [Rahman, 2007, Schmidt et al., 2005].

Unterliegt eine Zelle dem oxidativen Stress, sind Schädigungen diverser Makromoleküle die Folge und es kommt zu starken Einschränkungen des Zellstoffwechsels bis hin zur Apoptose der Zelle.

Zu den häufigsten Folgen des oxidativen Stresses gehören die Peroxidation von Lipiden, die Oxidation von Proteinen und die Schädigung der DNA [Schmidt et al., 2005].

Durch die Lipidperoxidation innerhalb der Zelle kommt es zu Schädigungen der Membran und somit Störungen am Aufbau des Membranpotentials der Zelle, wodurch die Zelle einen erhöhten Energiebedarf entwickelt. Als besonders leicht zugängliches Ziel dieser

radikalischen Kettenreaktion gelten dabei ungesättigte Fettsäuren.

Durch die Oxidation diverser Proteine kann die Funktionalität dieser eingeschränkt werden und somit der gesamte Zellstoffwechsel gestört werden.

Schädigungen der DNA können facettenreiche Zellschäden und unterschiedlichste Nachteile zur Folge haben.

Oxidativer Stress kann mehrere Ursachen haben. Einerseits eine erhöhte Bildung von ROS durch chemische oder physikalische Stimulation, andererseits eine Störung des Antioxidativen Schutzsystems, durch beispielsweise Mangelversorgung bzw. Mangelernährung.

Als chemische Stimulation der ROS Bildung zählen vor allem Umweltbelastungen und Karzinogene.

Durch stark erhöhte Energiezufuhr, wie beispielsweise durch ionisierende Strahlung oder Wärme, kommt es zur physikalisch stimulierten ROS-Bildung. Zur ionisierender Strahlung gehört neben der radioaktiven Strahlung auch Röntgen- und UV-Strahlung.

Besonders in Geweben ziehen befallene Zellen durch die vermehrte Entwicklung und Abgabe von ROS auch Nachbarzellen in Mitleidenschaft, was sich auch im Entwicklungsbild einiger Krankheiten, wie beispielsweise Ischämie oder Stoß-Traumata, beobachten lässt, bei denen oxidativer Stress durch Mangelversorgung mit Sauerstoff ausgelöst wird [Murakami et al., 2000].

Durch oxidativen Stress entstandene Schäden können sich auch erst etliche Zellteilungen später bemerkbar machen und somit auf nach wie vor nicht aufgeklärtem Weg Einfluss auf das Altern des Körpers nehmen.

Häufig wird der oxidative Stress im Laufe des Lebens als Ursache für den Alterungsprozess angeführt, allerdings ein bisher noch nicht bewiesener Zusammenhang [Murakami et al., 2000, Polovka, 2006, Rahman, 2007, Schmidt et al., 2005].

Als Schutzmechanismen stehen dem oxidativen Stress neben dem antioxidativen Schutzsystem auch einige Reparaturmechanismen entgegen. Dieser sekundäre Schutz besteht aus den Reparaturmechanismen der DNA und dem gezieltem Abbau defekter Proteine [Schmidt et al., 2005].

Die Zufuhr von natürlichen Antioxidantien und Cofaktoren stärkt die natürlichen Radikal-Abwehrmechanismen und hilft dabei oxidativen Stress abzubauen.

Durch Einsatz entsprechender Therapien ist es möglich die oxidative Belastung der Zellen gezielt zu senken und kann im Zusammenhang mit Alters-Beschwerden und Erkrankungen, wie beispielsweise kardiovaskulären Störungen, Krebs und neurodegenerativen Störungen positive Wirkungen erzielen [Murakami et al., 2000, Rahman, 2007].

Auch findet der Einsatz gezielter Induktion der ROS-Bildung in der Medizin Anwendung. In der Strahlentherapie versucht man durch gezielte Bestrahlung von "erkranktem" Zellgewebe ein Absterben der erkrankten Zellen zu erreichen. Jedoch beschränkt sich die Induktion der ROS-Bildung hierbei nicht auf die gewünschten Bereiche und es kommt ebenfalls zu starken Schädigungen des gesunden Gewebes.



## 7.2. Elektronenspinresonanz: *Spin trap*

### 7.2.1. Grundlagen

Die Grundlagen der ESR-Spektroskopie wurden bereits in Kapitel 2.3 erläutert. Für die Untersuchungen zum Radikalnachweis werden *cw*-ESR-spektroskopische Methoden eingesetzt.

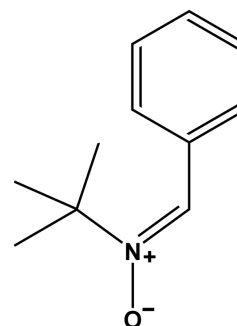
Die *cw*-Messungen erfolgen bei Raumtemperatur und auf die Verwendung von *PDS*-Methoden kann vollständig verzichtet werden, da keine Informationen über die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und damit über den Abstand der ungepaarten Elektronen von Interesse sind.

Zur Detektion der Radikale wird ein Radikalfänger eingesetzt der a priori kein *cw*-ESR-Signal liefert, sondern erst durch den Kontakt mit dem freien Radikal ein ungepaartes Elektron besitzt [Lottspeich, Engels, 2012]. Das bedeutet bereits durch die Detektion eines *cw*-ESR-Signals, welches von dem Grundspektrum (Baseline) abweicht, können freie Radikale nachgewiesen werden.

Verbindungen die zu diesem Zweck geeignete Eigenschaften aufweisen sind meistens Oxazolidin-, Piperidin-, Pyrrolidin- oder Nitrosobenzol-Verbindungen die eine entsprechend zugängliche und stabilisierte Nitroxidgruppe besitzen [Lottspeich, Engels, 2012, Todres, 2009].

Die wohl bekannteste Ausnahme hierbei, bildet das N-tert-Butyl- $\alpha$ -Phenylnitron (PBN), in der die Nitroxidgruppe durch die induktiven Effekte das tert-Butyl- und der Phenyl-Gruppe stabilisiert wird.

Die Struktur dieser Verbindung ist in nebenstehender Abbildung 7.1 dargestellt.



**Abb. 7.1:** Strukturformel des PBN

Die kovalente C-N-Doppelbindung an der Nitroxidgruppe dient hierbei als Ziel des radikalischen Angriffs und das ungepaarte Elektronenpaar wird auf die Nitroxidgruppe übertragen und durch diese stabilisiert. Durch die Nähe des Radikalelektrons zur Nitroxidgruppe, beeinflusst der Stickstoffkern durch Hyperfeinkopplung das *cw*-ESR-Spektrum.

Das durch die kovalente Bindung des Radikals mit der *Spin trap* entstehende Produkt wird als Spin-Addukt bezeichnet. Diese Spin-Addukte werden entsprechend des freien Radikals als C-, N-, OH-, OOH-, NO-..., -Addukt der *Spin trap* bezeichnet und beeinflussen die Form des entstehenden *cw*-ESR-Spektrums deutlich [Duling, 1994, Guo et al., 2003].

Eine graphische Veranschaulichung der häufigsten EMPO-Spin-Addukte findet sich in Abschnitt 7.2.3.

Für häufig verwendete *Spin traps* lassen sich die Parameter verschiedener Spin-Addukte zur theoretischen Kalkulation des entsprechenden *cw*-ESR-Spektrums in Datenbanken finden.

Die wohl bekannteste Datenbank ist die “*Spin Trap Database*” mit über 10.000 Einträgen publizierter *Spin-trap*-Experimente. Sie findet sich unter der Website des “National Institute of Environmental Health Sciences”, kurz NIEHS [www.niehs.nih.gov].

Eine der wohl bekanntesten *Spin-trap*-Verbindungen ist das 5,5-Dimethyl-1-pyrrol-N-oxid (DMPO) [Li et al., 2016], welches bereits in einer Vielzahl von Experimenten eingesetzt wurde. Entsprechend liegt ein breites Spektrum an bekannten Daten vor und DMPO eignet sich für die Analyse von C-, N-, O- und S-radikalischen Verbindungen [Guo et al., 2003, Villamena et al., 2005].

Da vor allem durch eine lange Lebensdauer der gebildeten Spin-Addukte die cw-ESR-Messung entscheidend beeinflusst wird, stellt es ein noch immer aktuelles Ziel der Forschung dar, *Spin traps* im Hinblick auf die Stabilisierung der Nitroxidgruppe zu modifizieren [Hauck, 2007, Leinisch, 2009, Todres, 2009].

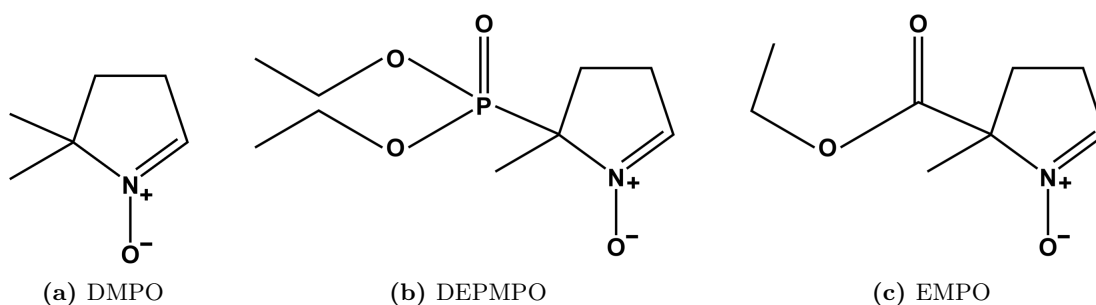
Durch eine gesteigerte Stabilität der Spin-Addukte können längere cw-ESR-Messungen durchgeführt werden und eine höhere Auflösung des Spektrums gewählt werden. Auch steigt die Zeit welche man für die Probenvorbereitung und das Feintuning der Probe zur Verfügung hat.

Die Verbindung Diethyl-(2-methyl-1-oxido-3,4-dihydro-2H-pyrrol-2-yl)phosphonat (DEPMPO) stellt eine solche modifizierte Version des DMPO dar und gilt als eine der effizientesten *Spin traps* zur Detektion und Analyse von C-, N-, O- und S-radikalischen Verbindungen [www.niehs.nih.gov]. Im Vergleich zum DMPO wurde für die Synthese von DEPMPO eine Methyl-Gruppe durch Diethylphosphonat ausgetauscht, wodurch der Pyrrol-Ring stabilisiert wird.

Auch zu der *Spin trap* DEPMPO findet sich eine Vielzahl von veröffentlichten Forschungsdaten in der NIEHS Datenbank [www.niehs.nih.gov].

Die in dieser Arbeit verwendete Verbindung 2-Ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (EMPO) ist ebenfalls ein stabilisiertes DMPO-Derivat, bei dem die Methyl-Gruppe durch eine Ethoxycarbonyl-Gruppe ersetzt wurde, um die Stabilisierung des Pyrrol-Rings zu erreichen. Ebenso wie DEPMPO eignet sich EMPO sehr gut zur Detektion und Analyse von C-, N-, O- und S-radikalischen Verbindungen [Zhang et al., 2000].

DMPO und die Derivate DEPMPO und EMPO sind in Abbildung 7.2 dargestellt.



**Abb. 7.2:** Strukturformel von DMPO, DEPMPO und EMPO

## 7.2.2. Spektren-Simulation

Bei der Simulation der *Spin-trap*-Spektren wird von einer isotropen Verteilung des Systems und freier/hocher Beweglichkeit des paramagnetischen Zentrums der *Spin traps* ausgegangen, da die Messungen jeweils bei Raumtemperatur in Lösung durchgeführt werden.

Die Simulation des gewünschten *Spin-trap*-Spektrums kann anhand der Parameter mit einer geeigneten Software wie “WinSIM” oder dem Matlab<sup>®</sup>-basierten “EasySpin” erfolgen [Duling, 1994, Stoll, Schweiger, 2006].

Die Matlab<sup>®</sup>-basierte Software “EasySpin” bietet breite Anwendungsmöglichkeiten zur Simulationen von ESR-Spektren. So können mit dieser Software sowohl *cw*- als auch *PDS*-ESR-Spektren simuliert werden und Simulationen unter verschiedenen Versuchsbedingungen von RT- bis TT-Messungen unterschiedlicher paramagnetischer Zentren durchgeführt werden. Eine Beschränkung auf Nitroxide als paramagnetische Zentren besteht hierbei nicht. Für die Simulation der *Spin-trap-cw*-ESR-Spektren muss die “garlic”-Funktion verwendet werden. Eine ausführliche Anleitung zur Verwendung der Matlab<sup>®</sup>-basierten “EasySpin”-Software findet sich unter [www.easyspin.org].

Die “WinSIM”-Software wurde 1994 von Duling für die Analyse von Nitroxid-*spin-traps* geschrieben und mit einer Auswahl hierfür angepasster Fit-Algorithmen ausgestattet, die eine Anpassung der simulierten Spektren ermöglichen. Die neueste Version dieser Software wurde 2002 für die Verwendung unter “Windows 95 / NT” aktualisiert und ist in Form der “PEST WinSIM”-Software auf der Website [www.niehs.nih.gov] erhältlich. Eine kurze Beschreibung zur Installation und FAQ von “WinSIM” findet sich unter [www.niehs.nih.gov], eine Beschreibung der jeweiligen Funktionen in Quelle [Duling, 1994].

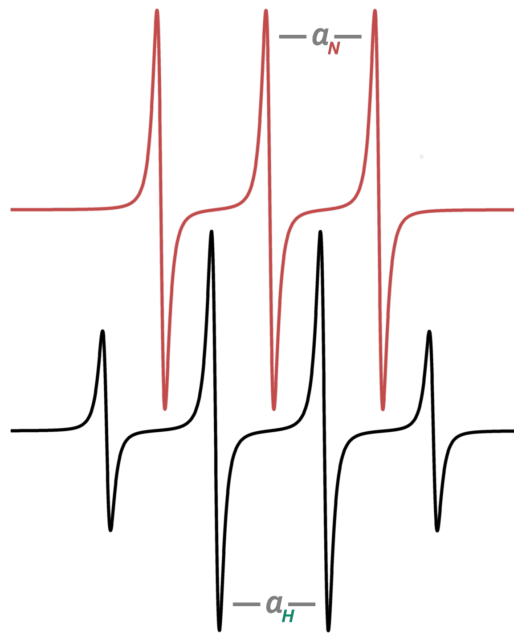
Prinzipiell werden als Grundlage der Simulation die verwendeten Hyperfeinkopplungskonstanten  $a_{iso}$  der für das *cw*-ESR-Spektrum verantwortlichen Elemente benötigt, siehe Abschnitt 2.3.2.4.

Im Falle der Nitroxid-*spin-traps* entspricht dies der Hyperfeinkopplungskonstanten  $a_N$  des  $^{14}\text{N}$ -Stickstoffatoms und  $a_{H_x}$  der nahe benachbarten  $^1\text{H}$ -Wasserstoffatome, sowie weiterer Elemente sofern vorhanden.

Exakt diese Konstanten sind entsprechend in den *Spin-trap*-Datenbanken hinterlegt.

In Abbildung 7.3 wird der Einfluss der Hyperfeinkopplungskonstanten des  $^{14}\text{N}$ -Stickstoffatoms und  $^1\text{H}$ -Wasserstoffatoms an  $\beta$ -Position auf die Ausbildung des charakteristischen EMPO-OH-Addukt-Spektrums (schwarz) dargestellt.

Die Ausbildung eines 4-Linienspektrums lässt sich dabei durch die Aufspaltung der Energieniveaus durch  $^{14}\text{N}$  mit der Kernspinzquantenzahl  $m_I = +1, 0, -1$  und  $^1\text{H}$  mit der Kernspinzquantenzahl  $m_I = +\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}$  und die dabei fast gleich großen Hyperfeinkopplungskonstanten  $a_N$  und  $a_{H_\beta}$  erklären.



**Abb. 7.3:** Charakteristisches *cw*-ESR-Spektrum des EMPO-OH-Adduktes (schwarz) und Einfluss der Hyperfeinstruktur.

Das rote Spektrum stellt die 3-Linien-Aufspaltung durch das  $^{14}\text{N}$ -Isotop dar.

Das typische 1:2:2:1-Spektrum entsteht durch Kombination der Hyperfeinkopplungskonstanten  $a_N$  und  $a_{H\beta}$ .

Sofern die zu untersuchenden Radikale nicht spezifisch über einen entsprechenden experimentellen Aufbau erzeugt werden, wie beispielsweise durch Xanthinoxidase (XO) oder Fenton-Reaktion (Fn), liegen mehrere verschiedene freie Radikale vor. Dadurch bilden sich unterschiedliche Spin-Addukte und es kommt zu einem komplexen Multiliniens-*cw*-ESR-Spektrum.

Um nun Rückschlüsse auf die vorliegenden Radikale ziehen zu können, müssen die Spektren der einzelnen Addukte simuliert werden und durch die Summe dieser das Multilinienspektrum erhalten werden. Dies setzt die quantenmechanische Kalkulation der einzelnen Spin-Addukt-Spektren und die Anpassung aller Parameter durch eine geeignete komplexe Fit-Funktion voraus [Duling, 1994].

Sowohl die Software “EasySpin” als auch “WinSIM” bieten hierfür geeignete Algorithmen und ermöglichen die Kalkulation von Multilinienspektren durch Fit und Summierung der Einzelspektren.

Eine vollständige Simulation für ein Multilinienspektrum mit “EasySpin” für DMPO-Addukte wird in den Dissertationen von S. Hauck und F. Leinisch beschrieben [Hauck, 2007, Leinisch, 2009].

### 7.2.3. EMPO

Die Verbindung 2-Ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (EMPO) ist ein Derivat des DMPO, in welchem die Nitroxidgruppe durch den induktiven Effekt der Ethoxycarbonyl-Gruppe auf den Pyrrol-Ring stabilisiert wird. Hierdurch kommt es zu einer deutlich längeren Lebensdauer der Spin-Addukte [Zhang et al., 2000].

Dadurch ist es möglich, eine bessere Auflösung der cw-ESR-Messung zu erhalten, und es steht mehr Zeit für das Probenhandling zur Verfügung, wodurch auch komplexere Experimente durchgeführt werden können.

Außerdem können auch äußerst instabile und entsprechend kurzlebige Radikale detektiert werden.

Die Nachweisgrenze der freien Radikale wird ebenfalls auf kleinere Konzentrationen gesenkt. Es gilt, insbesondere bei längeren Messungen, zu beachten, dass die Stabilität der einzelnen Spin-Addukte unterschiedlich bleibt und die zeitnahe Messung sowie die Messdauer von großer Bedeutung sind, um tatsächlich das vollständige Spektrum aller Radikale detektieren zu können.

Die in dieser Arbeit untersuchten EMPO-Addukte sind in Abbildung 7.4 dargestellt. Auf die Darstellung der Ethoxycarbonyl-Gruppe wird dabei verzichtet und diese mit "R" abgekürzt. Das vollständige EMPO-Molekül ist in Abbildung 7.2 dargestellt. In den Abbildungen sind dabei die für die Hyperfeinaufspaltung relevanten Wasserstoffatome rot markiert.

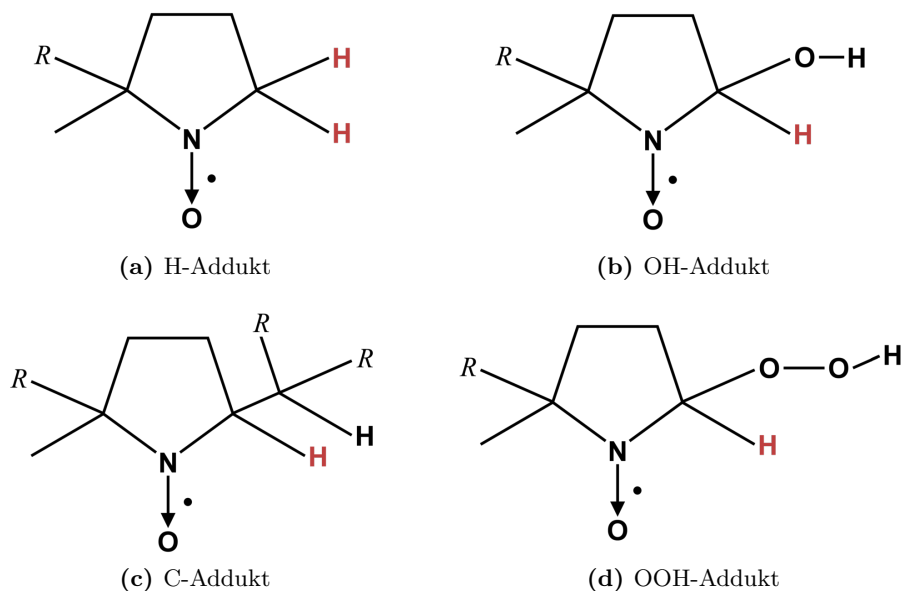


Abb. 7.4: Strukturformel der häufigsten EMPO-Addukte



## 8. Aufgabenstellung

Der Nachweis von Radikalen innerhalb einer Zelle bzw. eines Gewebes ist für medizinische Forschungen, insbesondere auf dem Gebiet des Alterns und altersbedingter Krankheiten, von großem Interesse.

Bei der Tumorthherapie des Menschen wird der Körper mittels eines Linearbeschleunigers einer geringen Dosis ionisierender Strahlung ausgesetzt, um Krankheiten zu heilen oder deren Fortschreiten zu verhindern. Diese Behandlung führt zu einer stark erhöhten ROS-Bildung im Körper.

Auch während einer Röntgen- oder Computertomographie (CT) wird der Körper einer hohen Strahlendosis ausgesetzt, wodurch ebenfalls eine vermehrte Radikalbildung innerhalb der Zellen auftreten könnte.

Neuere Forschungsergebnisse an Mäusen zeigen vermehrte DNA-Einzelstrangbrüche nach MRT-Untersuchungen, welche durch vermehrte Radikalbildung erklärt werden könnten.

Ziel dieser Arbeit ist es die während dieser medizinischen Behandlungen gebildeten Radikale zu detektieren und zu analysieren.

Um den Einfluss der Bestrahlung möglichst praxisnah untersuchen zu können soll ein human-medizinischer Linearbeschleuniger sowie ein human-medizinischer Computertomograph zur Vorbereitung der Proben verwendet werden.

Zur MRT-Behandlung der Proben wird ein Kleintier-MRT gewählt, um der geringen Probengröße gerecht werden zu können und ein bildgebendes Verfahren und somit abgesicherte Bestrahlung für die Probenplatte ermöglichen zu können.

Hierfür sollen die Proben in Kooperation mit Y. Lorat und C. Rube in der Klinik für Strahlentherapie im UKS Homburg vorbereitet, in flüssigem Stickstoff nach Kaiserslautern überführt und am ESR-Spektrometer vermessen werden.

Die durch A. Karbach und P. Schweickert im Arbeitskreis nach einem verbesserten Syntheseverfahren hergestellte Verbindung EMPO soll für Radikalnachweis-Untersuchungen getestet und verwendet werden.

Die Reinheit des synthetisierten Produktes und die Anwesenheit spontan gebildeter Radikale soll durch *cw*-ESR-Spektroskopie überprüft werden. Für die Radikalnachweis-Untersuchungen ist die EMPO-Stammlösung gegebenenfalls frisch aufzubereiten.

Um den Einfluss der Pufferlösung, Temperatur und der Behandlungsdauer der Proben auf die Radikalbildung bei den verschiedenen Probenvorbereitungen abschätzen zu können sollen Langzeitmessungen verschiedener Pufferlösungen durchgeführt und die spontane Radikalbildung sowie der Zerfall der EMPO-Addukte beobachtet werden.

Die erhaltenen EMPO-Spektren sollen näher analysiert und die Anteile verschiedener Radikale bestimmt werden. Hierfür ist ein geeignetes Vorgehen zu bestimmen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Möglichkeit untersucht werden, unter Verwendung der *Spin trap* EMPO, Radikale innerhalb von Zellen zu detektieren.

Als Zellen werden für diese Untersuchungen Lymphozyten und Fibroblasten von unseren Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.



# 9. Ergebnisse

## 9.1. Simulation der EMPO-Spektren

Wie bereits in Abschnitt 7.2.2 beschrieben gibt es diverse Möglichkeiten das cw-ESR-Spektrum einer *Spin trap* zu simulieren.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das OH-Addukt des EMPO wie in Abschnitt 11.1.2 beschrieben über Fenton-Reagenz (Fn) erzeugt und entsprechend der Einstellungen in Kapitel 17 vermessen.

Das erhaltene 4-Linien-Spektrum wurde mittels der Software “EasySpin” und “WinSIM” simuliert und entsprechend gefittet.

Als Grundlage der “EasySpin”-Simulation wurde die “garlic”-Funktion verwendet. Die entsprechenden Parameter wurden der Dissertation von S. Hauck entnommen [Hauck, 2007].

Für die “WinSIM”-Simulation wurden die Hyperfeinkopplungskonstanten des DMPO-OH-Adduktes aus der NIEHS-Datenbank [www.niehs.nih.gov] verwendet, die restlichen Größen werden über den Fit bestimmt.

Deutlich lässt sich in beiden Simulationen das erwartete 1 : 2 : 2 : 1 Verhältnis der Peaks erkennen und dem experimentellen Spektrum anpassen. Die Ausbildung dieses 4-Linienspektrums wird in Abschnitt 7.2.2 hergeleitet.

Um die experimentellen Daten mit den simulierten Spektren fitten zu können, wurde eine Baseline-Korrektur erster Ordnung der jeweiligen Spektren durchgeführt. Um den Einfluss des Grundspektrums, der durch das Grundsignal der Stammlösung, die Kapillare und die Pufferlösung beeinflusst wird, abziehen zu können, wurde anschließend eine Background-korrektur durch Subtraktion des Spektrums “20 mM EMPO in PP pH 8” durchgeführt, welches zur Reinheitskontrolle der jeweiligen Stammlösung vermessen wurde.

Trotz längeren Rechenzeiten lieferte die über die Software “EasySpin” kalkulierte Fit-Kurve deutlich größere Abweichungen zum experimentellen Spektrum als die “WinSIM”-Simulation. Grund hierfür ist die in “EasySpin” nicht separierte Betrachtung der *low*-, *middle*- und *high-field*-Linienbreite, wodurch das simulierte Spektrum die gleiche Höhe und Intensität der Peaks voraussetzt, was in den experimentellen Daten nicht gegeben ist.

In dieser Arbeit werden im Folgenden die Fit-Simulationen mit der “WinSIM”-Software durchgeführt, da diese über einen für Nitroxid-*spin-traps* konzipierten Fit-Algorithmus verfügt und die Kalkulation von bis zu zehn verschiedenen Einzelspektren (“Spezies”), mit jeweils bis zu 16 unterschiedlichen Hyperfeinkopplungen, dabei jeweils eine separate Betrachtung der *low*-, *middle*- und *high-field*-Linienbreite sowie des Gauß/Lorentz-Profiles (inhomogene Linienverbreiterung) unterstützt [Duling, 1994].

Hierdurch stimmen die simulierten Spektren sehr gut mit den Experimentellen überein und es ist möglich Rückschlüsse auf die vorhandenen Spin-Addukte und somit auf die freien Radikale zu ziehen.

Die jeweils gefundenen Fit-Kurven und die dazugehörigen Parameter sowie der Korrelationswert wurden als pdf-Datei exportiert, um die graphische Übereinstimmung der gefitteten Spektren zu belegen.

Die gemessenen Spektren mit den dazugehörigen Fitkurven werden im Anhang 16 dargestellt.

Als Grundlage der Simulation der EMPO-Spin-Addukte werden die Parameter der DMPO-Addukte verwendet. Bereits vorliegende Daten aus der Dissertation von S. Hauck belegen die entsprechende Übereinstimmung der EMPO- mit den DMPO-Spektren in Versuchen mit Generierung freier Radikale über Xanthinoxidase (XO), Fenton-Reagenz (Fn) und Kaliumsuperoxid-Schwefelsäure ( $\text{KO}_2\text{-DMSO-H}_2\text{SO}_4\text{-Fe(II)}$ ) [Hauck, 2007].

Zur besseren Übersicht werden die Daten verschiedener DMPO-Addukte in nachfolgender Tabelle 9.1 zusammengefasst.

Der Wertebereich umspannt dabei die gemessenen Hyperfeinkopplungskonstanten aus verschiedenen Quellen in folgenden Lösungsmitteln:  $\text{H}_2\text{O}$ , PBS, HEPES zwischen pH-Werten von 7.0 - 8.0.

Dabei werden die Dissertation von Hauck, der Übersichtsartikel von Buettner und die NIEHS "Spin Trap Database" als Quellen verwendet [Hauck, 2007, Buettner, 1987, www.niehs.nih.gov].

**Tab. 9.1:** ESR-Parameter der DMPO-Addukte in  $\text{H}_2\text{O}$ , PBS und HEPES

| Addukt                                 | Hyperfeinkopplungskonstanten |                  |
|--|------------------------------|------------------|
|  | $a_N$ [G]                    | $a_{H\beta}$ [G] |
| $\cdot\text{CH}_3$                     | 16.1 - 16.5                  | 23.00 - 23.8     |
| $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$            | 15.8 - 16.0                  | 22.5 - 22.7      |
| $\cdot\text{CH}_2\text{CH}_3$          | 16.2 - 16.3                  | 22.8 - 23.5      |
| $\text{CH}_3\text{C} \cdot \text{HOH}$ | 15.8 - 16.0                  | 22.8 - 23.0      |
| $\text{CO}_2^- \cdot$                  | 15.6 - 15.9                  | 18.6 - 19.1      |
| $\text{H} \cdot$                       | 16.6 - 16.7                  | 22.4 - 22.6 (2)  |
| $\cdot\text{OH}$                       | 14.9 - 15.1                  | 14.9 - 15.1      |
| $\cdot\text{OOH}$                      | 14.2 - 14.3                  | 11.2 - 11.7      |
| $\text{SO}_3^- \cdot$                  | 14.4 - 14.7                  | 15.9 - 16.2      |
| 3 - DMPO - yl<br>&<br>Zerfallsprodukte | 15.3 - 16.6                  | 22.0 - 22.6      |

In Tabelle 9.1 wird ersichtlich, dass der Unterschied zwischen verschiedenen C-Addukten jeweils nur sehr gering ausfällt, weshalb eine Unterscheidung verschiedener C-Addukte für EMPO ohne ausreichende und präzise Messungen der jeweiligen isolierten C-Addukte nicht möglich ist. In dieser Arbeit wird daher nur allgemein die Bildung von C-Addukten untersucht und nicht zwischen den möglichen Typen unterschieden.

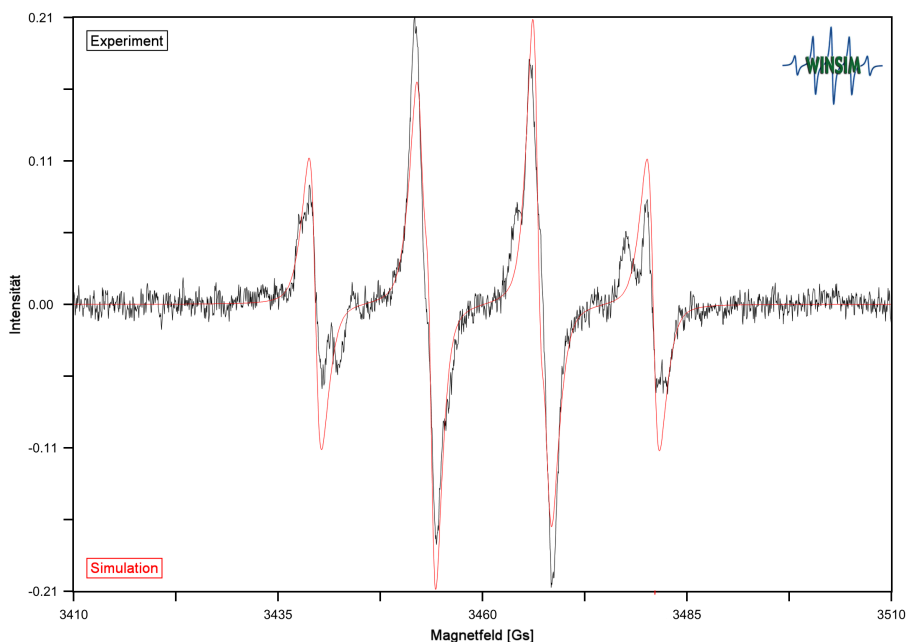
Auch die Parameter der C-radikalischen DMPO-Zerfallsprodukte wie beispielsweise dem 3-DMPO-yl (DMPO-3C $\cdot$ ) bilden hierbei keine Ausnahme und ähneln stark denen anderer C-Addukte.

Es gibt einige weitere mögliche Oxidations- oder Zerfallsprodukte des DMPO, welche in den Arbeiten von Buettner und Villamena beschrieben sind und unterschiedliche Hyperfeinkopplungskonstanten aufweisen [Buettner, 1987, Villamena et al., 2005].

Im Falle des DMPO-H-Addukts liegen jeweils zwei gleichwertige  $H_{\beta}$ -Atome vor, wodurch es zu einer doppelten Hyperfeinaufspaltung durch beide  $a_{H_{\beta}}$  kommt und sich ein 9-Linienspektrum mit Verhältnis 1 : 1 : 2 : 1 : 2 : 1 : 2 : 1 : 1 ausbildet.

Das entsprechend Abschnitt 11.1.2 über Fenton-Ansatz erzeugte EMPO-OH-Addukt--Spektrum wird zur Bestimmung der genauen Hyperfeinparameter des EMPO-OH-Adduktes mittels der Software "WinSIM" analysiert.

Die experimentellen Daten einer solchen EMPO\_Fn-Messung und die entsprechende Fitkurve sind in Abbildung 9.1 dargestellt.



**Abb. 9.1:** Experimentelles (schwarz) und simuliertes (rot) EMPO-OH-Spektrum.

Für die Fitkurven wurden die Parameter  $a_N = 14.1$  und  $a_{H_{\beta}} = 13.0$  ermittelt  
EMPO-Konzentration: 20 mM; Fenton-Ansatz: 10 mM Am-Fe(II) & 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

In Abbildung 9.1 ist zu erkennen, dass das typische 1:2:2:1 Verhältnis des OH-Adduktes auch im Falle der EMPO-Messung auftritt.

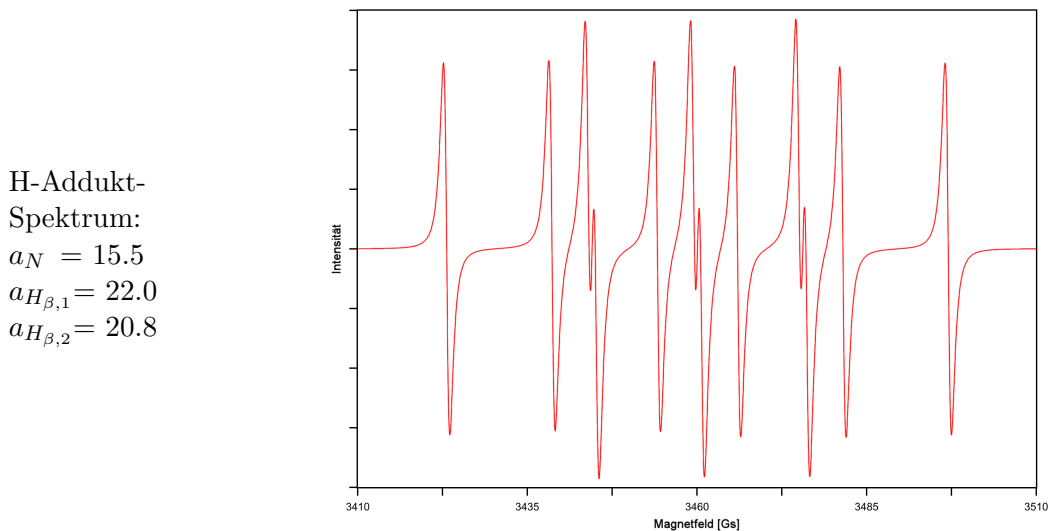
Im Vergleich zu DMPO zeigt sich, dass die Werte  $a_{H\beta}$  und  $a_N$  nicht weiterhin identisch sind, sondern eine Abweichung aufweisen, wodurch es zu einer Verschiebung und Linienverbreiterung kommt. Der Unterschied ist dabei jedoch klein genug, so dass es nicht zu einer weiteren Aufspaltung der Peaks kommt.

Der Unterschied der beiden Hyperfeinkopplungskonstanten im Falle des EMPO lässt sich durch die Ethoxycarbonyl-Seitengruppe erklären, wodurch das Moleküle nicht symmetrisch ist und ein starker Einfluss auf das System ausgeht.

Ein ähnlicher Einfluss ist auch bei allen weiteren EMPO-Addukten zu erwarten und lässt sich durch die WinSIM-Kalkulation bestimmen.

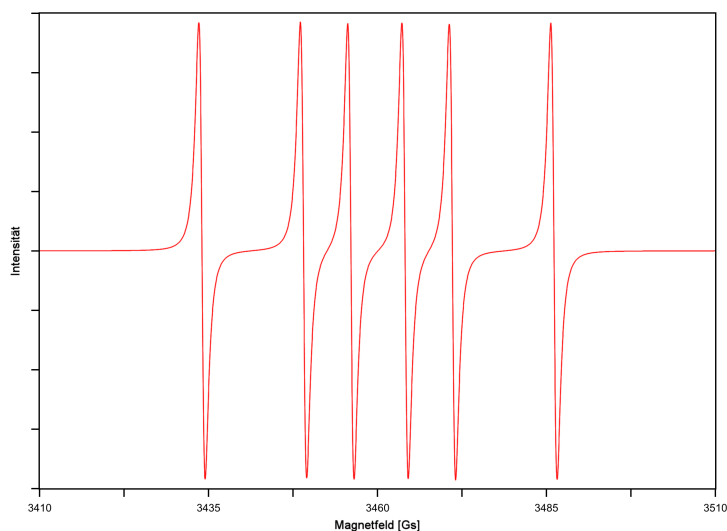
In den folgenden Abbildungen werden die, in dieser Arbeit ermittelten, theoretischen EMPO-Spektren der vier häufigsten Addukte dargestellt. Als Grundlage dieser Bestimmung wurden die Daten aus den Untersuchungen zur ROS-Bildung in verschiedenen Puffersystemen verwendet, welche in Abschnitt 9.3 aufgeführt werden.

Die Hyperfeinkopplungskonstanten der simulierten Addukt-Spektren werden jeweils neben der Abbildung aufgeführt.



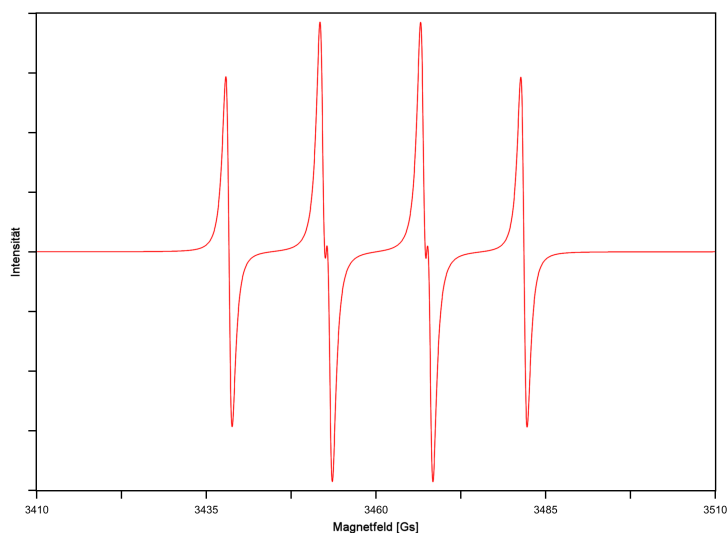
**Abb. 9.2:** Theoretisches ESR-Spektrum des EMPO-H-Adduktes

C-Addukt-  
Spektrum:  
 $a_N = 15.0$   
 $a_{H_{\beta,1}} = 22.0$



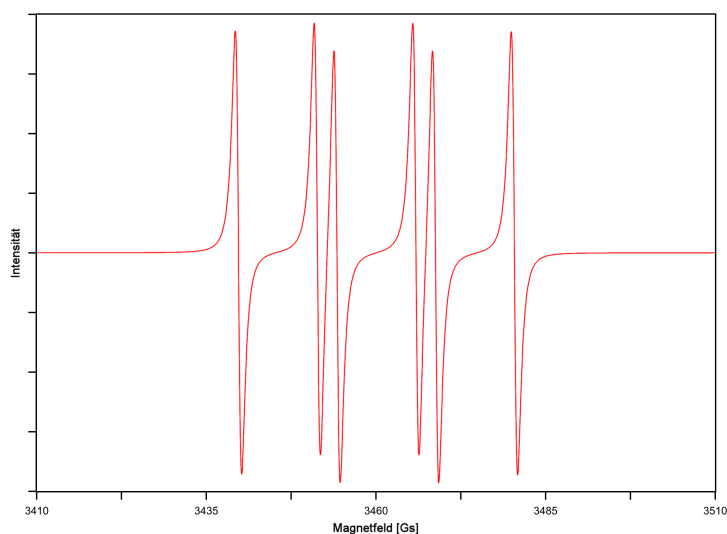
**Abb. 9.3:** Theoretisches ESR-Spektrum des EMPO-C-Adduktes

OH-Addukt-  
Spektrum:  
 $a_N = 14.8$   
 $a_{H_{\beta,1}} = 23.8$



**Abb. 9.4:** Theoretisches ESR-Spektrum des EMPO-OH-Adduktes

OOH-  
Addukt-  
Spektrum:  
 $a_N = 14.5$   
 $a_{H_{\beta,1}} = 12.0$



**Abb. 9.5:** Theoretisches ESR-Spektrum des EMPO-OOH-Adduktes

## 9.2. Versuche zur Detektion von ROS in Zellen

Um zu Testen ob die Detektion von ROS-Bildung innerhalb von Zellen mittels EMPO möglich ist, wurden Kontrolluntersuchungen mit einer intensiven Bestrahlung der Zellen durchgeführt, dabei wurde als sichere Quelle der Radikalerzeugung ein Linearbeschleuniger verwendet.

Um den Einfluss der Bestrahlung möglichst praxisnah untersuchen zu können soll ein human-medizinischer Linearbeschleuniger sowie ein human-medizinischer Computertomograph zur Vorbereitung der Proben verwendet werden.

Zur Behandlung der Zellen werden diese erst kurz vor Beginn der Bestrahlung aus dem Brutschrank genommen und für die Behandlung transportiert und vorbereitet.

### 9.2.1. Voruntersuchungen EMPO

Um die idealen Einstellungen für die ESR-spektroskopischen Untersuchungen und eine geeignete EMPO-Konzentration zur Detektion und Bestimmung von Radikalen zu bestimmen, wurde zu Beginn der Messreihe eine 200 mM EMPO-Stammlösung entsprechend Abschnitt 11.2.2 angesetzt.

Als Positivkontrolle wurde zur Bildung des EMPO-OH-Adduktes ein Ansatz mit Fenton-Reagenz (Fn), entsprechend der in Abschnitt 11.2.2 beschriebenen Methode, mit einer EMPO-Endkonzentration von 20 mM angesetzt (EMPO\_Fn-Ansatz) und direkt in eine Kapillare überführt und im ESR-Spektrometer vermessen.

Es wurden verschiedene Parameter variiert und sehr klare Linien und ein möglichst geringes Hintergrundrauschen mit den in Abschnitt 17.2.1 angegebenen Parametern gefunden.

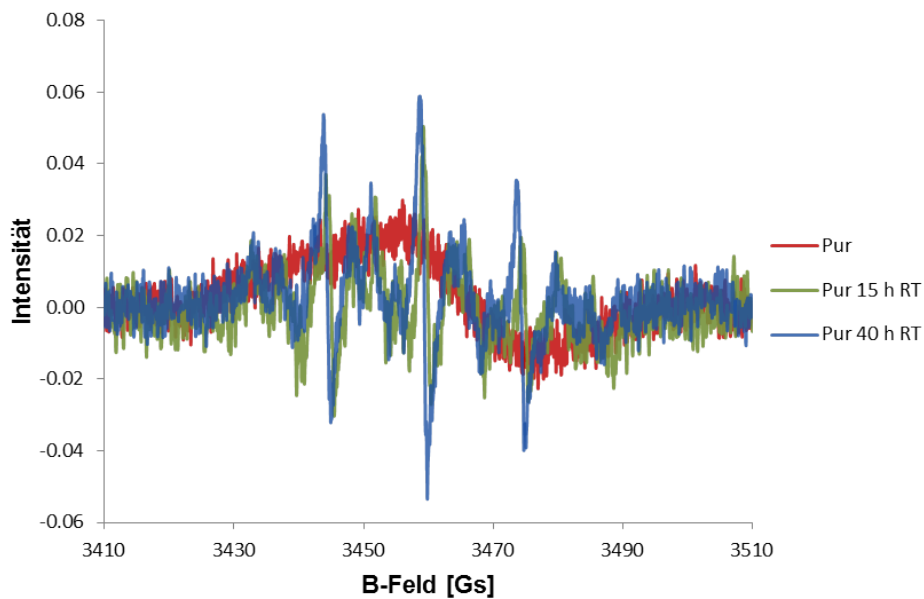
Diese Parameter wurden daher in den ROS-Messungen verwendet.

Aufgrund der hohen *Conversion-* und *Sampling-Time* kommt es hierbei zu einer relativ langen Messdauer. Um einen Fehler aufgrund dieser hohen Messdauer durch beispielsweise Signalabnahme ausschließen zu können, wurde zu Beginn und zum Ende jeder Messung eine Messung mit den *fast*-Parameter durchgeführt.

Die Stabilität des EMPO\_Fn-Ansatzes wurde nach 2, 4 und 6 Stunden bei RT überprüft und zeigt innerhalb dieser Zeit keine Signalabnahme.

Eine längere Kinetik des Signalabfalls über Zeit innerhalb der Messkapillaren wird im nächsten Abschnitt 9.3.1 aufgeführt.

Die Stabilität des puren 20 mM EMPO-Ansatzes unter Raumtemperatur wurde getestet, indem ein 60 µl Ansatz 20 mM EMPO in einem Eppi vorbereitet wurde und von diesem zu Beginn, nach 14 und 40 Stunden jeweils eine Probe entnommen und vermessen wurde. Das Eppi wurde in der Zwischenzeit jeweils verschlossen bei RT gelagert und die Lösung mit Argon überschichtet. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Abbildung 9.6 aufgeführt.

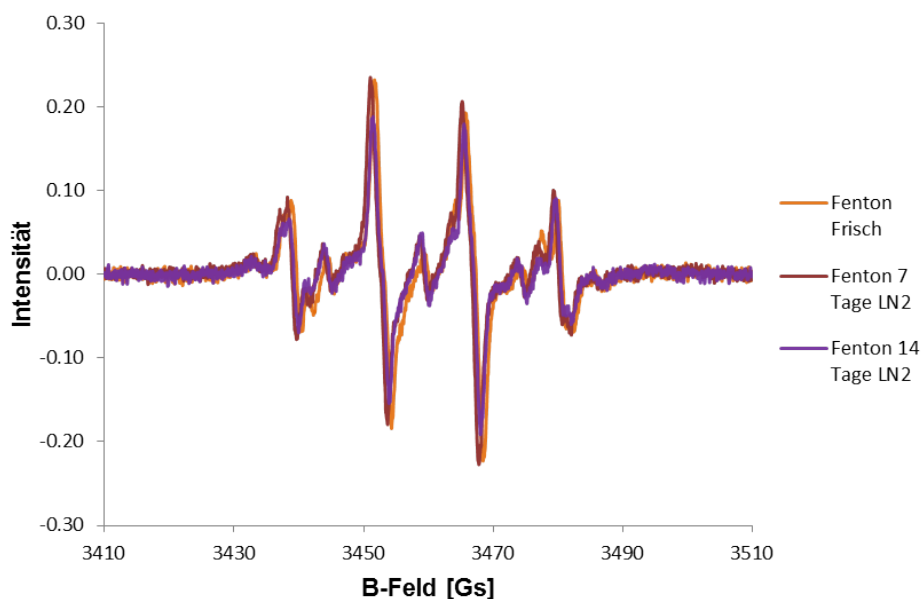


**Abb. 9.6:** Stabilität der 20 mM EMPO-Lösung bei Raumtemperatur

Man erkennt den Zerfall der EMPO-Lösung und die Bildung von Radikal-Addukten. Es ist daher entscheidend wichtig, sämtliche Proben sowie die Stammlösung schnellstmöglich in  $LN_2$  zu überführen und dort zu lagern.

Zur Kontrolle der Stabilität bei Lagerung in  $LN_2$  wurde eine EMPO.Fn-Probe angesetzt und auf 4 Kapillaren verteilt, von denen eine direkt, die zweite nach 12 Stunden, die dritte nach 36 Stunden und die letzte nach 7 Tagen vermessen wurde.

Zur Lagerung wurden diese Proben in dem  $LN_2$ - *dry shipper* überführt und gelagert.



**Abb. 9.7:** Lagerung der EMPO.Fn-Probe in  $LN_2$

Innerhalb dieser Messreihe traten, wie in Abbildung 9.7 gut zu erkennen ist, keine unterschiedlichen Peaks zwischen den gemessenen Spektren auf.

Erst über einen längeren Zeitraum von 14 Tagen ist eine Abnahme der Signalintensität zu beobachten, die geplante Behandlung und Messung der Proben wird jeweils am selben oder nachfolgenden Tag durchgeführt.

Die Lagerung unter  $LN_2$ -Bedingungen stabilisierte die Proben über einen ausreichend langen Zeitraum.

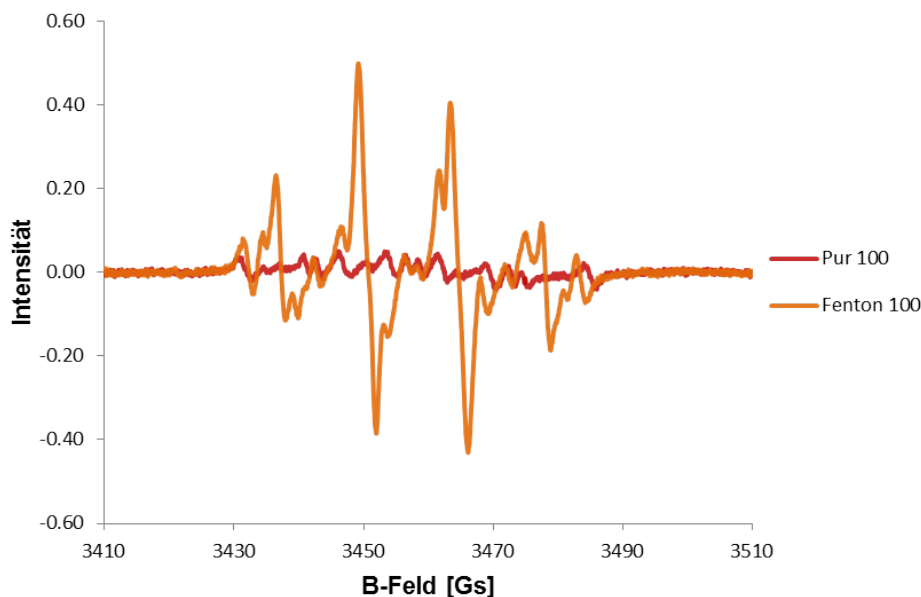
Durch den Transport der Proben von Homburg nach Kaiserslautern ist kein Signalverlust der Messproben zu erwarten.

Zur Bestimmung einer geeigneten EMPO-Konzentration wurden EMPO\_Pur- und EMPO\_Fn-Ansätze mit einer Endkonzentration von 5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM und 100 mM EMPO angesetzt und direkt vermessen.

Die Messungen mit 50 mM und insbesondere 100 mM EMPO weisen trotz Reinigung über Aktivkohle ein deutlicheres Grundsignal des gereinigten EMPO-Ansatzes auf.

Im Falle der EMPO\_Fn-Messung zeigt sich deutlich der störende Einfluss dieses Eigen-signals und es kommt zur Entstehung eines Multilinienspektrums durch unerwünschte Nebenreaktionen, z.B. durch Zerfalls- bzw. Oxidationsprodukte des EMPO selbst.

In Abbildung 9.8 ist der Vergleich der Spektren EMPO\_Pur\_100mM mit EMPO\_Fn\_100mM dargestellt, in dem man dies sehr gut beobachten kann.



**Abb. 9.8:** Vergleich der Spektren EMPO\_Pur (rot) und EMPO\_Fn (orange) mit 100 mM EMPO.

Die Messungen mit einer geringeren Menge EMPO zeigen keine negative Beeinflussung des Spektrums, weisen allerdings eine Abnahme der Signalintensität auf.

Da eine möglichst sensitive Detektion erwünscht ist, stellt sich die Endkonzentration von 20 mM EMPO für die Untersuchungen als geeignet heraus.



### 9.2.2. Erstes Experiment "ROS-Nachweis"

Für die Untersuchung wurden vor Ort in Homburg von Y. Lorat die Lymphozyten aus Vollblut isoliert, gepoolt und über Nacht in RPMI-Medium im Brutschrank inkubiert.

Die Lymphozyten wurden zu Beginn der Behandlung aus dem Brutschrank genommen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss in 15 ml PBS resuspendiert und je 3 ml in eine kleine Zellkulturflasche für die Bestrahlung überführt.

Für die Kontrollproben wurden zweimal 3 ml PBS ebenfalls in Zellkulturflaschen überführt.

Die Bestrahlung der Kontrollen und Proben erfolgte direkt in der Zellkulturflasche.

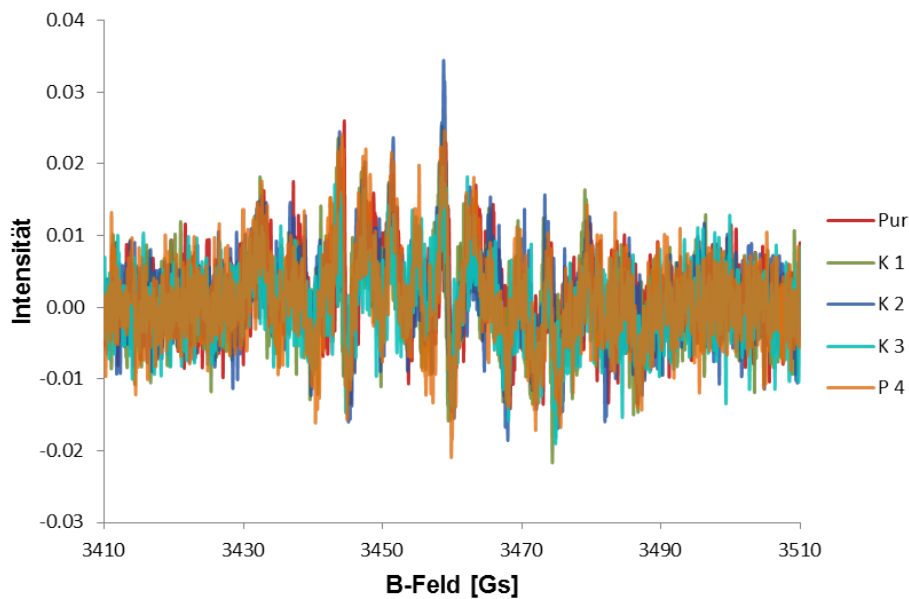
Es wurde jeweils nur eine Flasche bestrahlt, die Probe direkt im Anschluss in ein 15 ml Falcon überführt und mittels Ultra-Turrax aufgeschlossen.

Sofort darauf wurden zweimal 18 µl der Probe in ein Eppi aliquotiert und mit 2 µl der 200 mM EMPO-Stammlösung resuspendiert.

Ein Eppi wurde sofort in  $LN_2$  schock-gefroren und aus dem anderen wurde die Probe in die Messkapillare überführt und ebenfalls eingefroren.

Es wurden drei Kontrollmessungen (K 1 - K 3) und vier Probenmessungen durchgeführt, die relevanten Ergebnisse sind in Abbildung 9.9 aufgeführt:

|      |            |             |                    |
|------|------------|-------------|--------------------|
| K 1: | 20 mM EMPO | mit Zellen  | ohne Bestrahlung   |
| K 2: | 20 mM EMPO | ohne Zellen | ohne Bestrahlung   |
| K 3: | 20 mM EMPO | ohne Zellen | 2.0 Gy Bestrahlung |
|      |            |             |                    |
| P 1: | 20 mM EMPO | mit Zellen  | 0.5 Gy Bestrahlung |
| P 2: | 20 mM EMPO | mit Zellen  | 1.0 Gy Bestrahlung |
| P 3: | 20 mM EMPO | mit Zellen  | 2.0 Gy Bestrahlung |
| P 4: | 20 mM EMPO | mit Zellen  | 6.0 Gy Bestrahlung |



**Abb. 9.9:** Ergebnisse des ersten Experimentes “ROS-Nachweis”

In allen Kontrollen und Proben ist kein Unterschied zum Grundspektrum EMPO\_Pur zu entdecken.

Mit dem hier beschriebenen Versuchsaufbau konnten leider keine ROS detektiert werden. Selbst in der Positiv-Kontrolle K 3 wurden keine Radikale detektiert, auch wenn durch die Bestrahlung mit 2 Gy sicherlich welche entstanden sein mussten.

Die Vermutung liegt in diesem Fall sehr nahe, dass vermutlich zu viele Radikale zum Zeitpunkt der EMPO-Zugabe bereits zerfallen sind.

Es wird ein anderer Versuchsaufbau zur Bestimmung der Radikale in Zellen benötigt.

### 9.2.3. Zweites Experiment “ROS-Nachweis”

Um eine möglichst hohe Sensitivität der Radikaldetektion zu erreichen und gegebenenfalls mit sonstigen Zellbestandteilen, welche die Radikale ebenfalls binden zu können, besser konkurrieren zu können, wird in diesem Versuchsaufbau eine deutlich höhere EMPO-Konzentration von 100 mM sowie 150 mM verwendet. Hierfür wird eine 500 mM EMPO-Stammlösung angesetzt.

Außerdem wird die Zelldichte der Lymphozyten durch Reduktion des PBS-Resuspensionsvolumen auf 1 ml drastisch erhöht und die Dosis der Bestrahlung auf 10 Gy erhöht, um die produzierte “ROS-Menge” zu erhöhen.

Die Probe wurde anschließend in 2 Eppis zu je 0.5 ml aliquotiert.

Die Bestrahlung der Proben erfolgte in einer hierfür angefertigten Probenplatte aus Plexiglas, in der 15 ml-Falcons, 1.5 ml-Eppis und 0.5 ml-Reaktionsgefäße Platz haben.

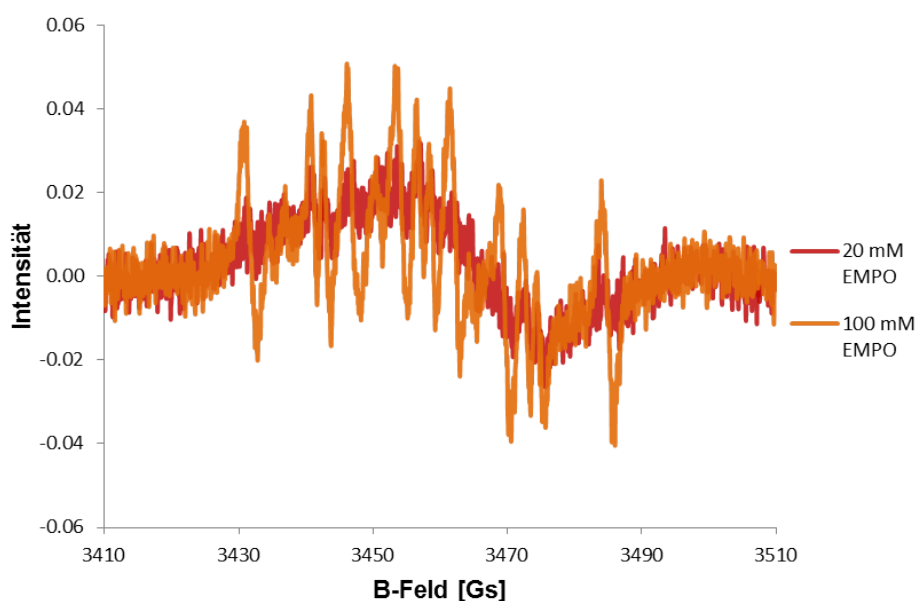
Der Bestrahlungsplan wurde in einem Feld aus 180° berechnet, so dass sich die Zellen innerhalb der 100 %-Isodosis befinden und die gesamte Dosis an der Probe ankommt.

Die Probenplatte und der Bestrahlungsplan wurde von Y. Lorat berechnet und zur Verfügung gestellt.

Im Anschluss an die Bestrahlung wird die Probe sofort mit dem Ultra-Turrax aufgeschlossen und in einem weiteren Eppi mit EMPO vermengt, in die Messkapillare überführt und sofort bis zur Messung in  $LN_2$  verwahrt.

Um die Unterschiede des Grundsignals der verschiedenen EMPO Konzentrationen in der für diesen Versuch aufgereinigten 500 mM Stammlösung zu ermitteln, wurden die reinen EMPO-Spektren mit 20 mM und 100 mM EMPO ebenfalls in Homburg vorbereitet und in  $LN_2$  nach Kaiserslautern überführt.

Ein Vergleich der beiden Spektren findet sich in Abbildung 9.10.



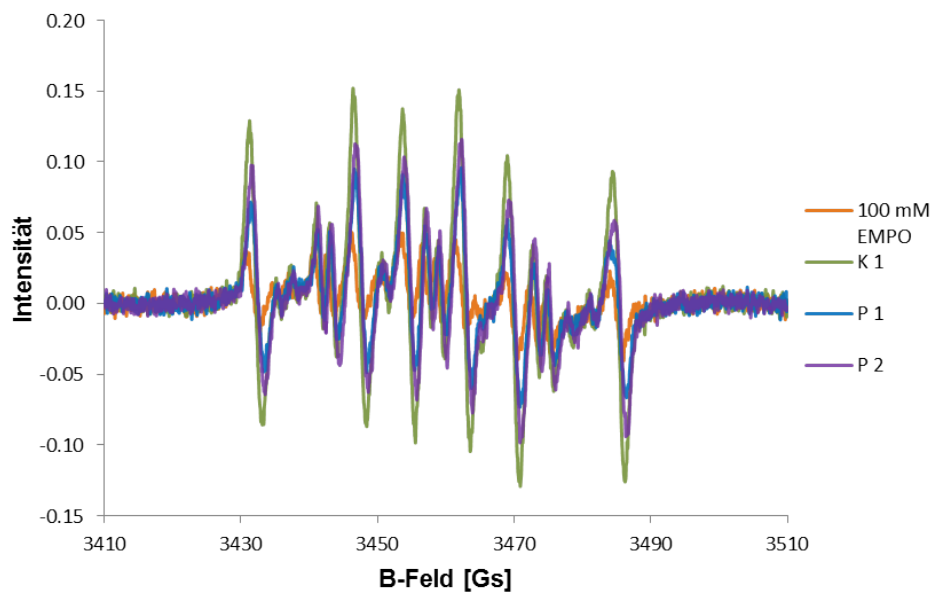
**Abb. 9.10:** Vergleich der EMPO Grundspektren mit 20 mM und 100 mM EMPO für das zweite Experiment “ROS-Nachweis”

Es wurde eine Kontrollmessung und zwei Probenmessungen durchgeführt, die relevanten Ergebnisse sind in Abbildung 9.11 aufgeführt:

K 1: 150 mM EMPO mit Zellen ohne Bestrahlung

P 1: 100 mM EMPO mit Zellen 10 Gy Bestrahlung

P 2: 150 mM EMPO mit Zellen 10 Gy Bestrahlung



**Abb. 9.11:** Ergebnisse des zweiten Experimentes “ROS-Nachweis”

Auch in dieser Messreihe ist kein Unterschied zwischen K 1 und P 1 zu erkennen. Im Vergleich mit dem Grundspektrum EMPO-Pur ist ebenfalls nur eine minimale Verstärkung der Intensität zu erkennen, was durch die hohe EMPO-Konzentration und die Behandlungsdauer der Probe allein zu erklären ist und nicht auf die Bestrahlung zurückgeführt werden kann, da K 1 selbst ohne Bestrahlung die gleiche Intensität wie die behandelte Probe P 1 aufweist.

Deutlich lässt sich das entstehende Signal als C-Addukt des EMPO interpretieren. Dieses kann sowohl durch den Zerfall und die Eigenreaktion des EMPO oder durch die diversen Zellbestandteile des hoch konzentrierten Zellysats entstehen.

Der Einfluss der Bestrahlung auf die Zellen lässt sich auch mit diesem Versuchsaufbau nicht messen.

#### 9.2.4. Drittes Experiment "ROS-Nachweis"

Da in den ersten Versuchen mit EMPO-Zugabe nach Bestrahlung und Zellaufschluss keine messbaren Radikale detektiert werden konnten, erfolgt in diesem Experiment die Zugabe des EMPO bereits vor der Bestrahlung.

Um dabei dennoch intakte Zellen untersuchen zu können, wurde in diesem Versuch keine Zelllysis durchgeführt sondern die Membranpermeabilität durch DMSO-Zugabe erhöht, um Radikale mittels EMPO direkt innerhalb der Zellen stabilisieren und detektieren zu können.

Durch Versuche mit Trypan-Blau wurde eine Dosis von 1 % DMSO und eine Inkubationszeit von 15 Minuten durch Y. Lorat als geeignet ermittelt, um eine hohe Permeabilität zu erhalten und die Zellen nicht zu zerstören.

In diesem Versuchsteil wurde anstelle der Lymphozyten normale humane Hautfibroblasten (NFFh) verwendet, welche mit humaner Telomerase Reverse Transkriptase (hTert) transfiziert und nach dem Protokoll von Toouli et al (2002) immortalisiert wurden.

Es wurden zwei Ansätze mit Fibroblasten vorbereitet. Die Fibroblasten wurden trypsiniert und 2 Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, anschließend wurde der Verdau durch Zugabe von BSA gestoppt, die Zellen abzentrifugiert, das Zellpellet in 0.5 ml PBS resuspendiert und die Zellen erneut für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Zu Beginn des Versuchs wurde den Proben 5 µl DMSO zugesetzt, diese für 15 Min. bei RT inkubiert, zu je 27 µl in Eppis aliquotiert und jeweils 3 µl EMPO-Stammlösung zugesetzt. Nach Ablauf der Bestrahlung wurden alle Proben möglichst zeitgleich in Messkapillaren überführt und sofort bis zur Messung in  $LN_2$  verwahrt.

Es wurden vier Kontrollmessungen und eine Probenmessung durchgeführt, die relevanten Ergebnisse sind in Abbildungen 9.9 aufgeführt:

|      |            |             |           |                   |
|------|------------|-------------|-----------|-------------------|
| K 1: | 20 mM EMPO | mit Zellen  | mit DMSO  | ohne Bestrahlung  |
| K 2: | 20 mM EMPO | ohne Zellen | mit DMSO  | ohne Bestrahlung  |
| K 3: | 20 mM EMPO | ohne Zellen | ohne DMSO | 10 Gy Bestrahlung |
| K 4: | 20 mM EMPO | ohne Zellen | mit DMSO  | 10 Gy Bestrahlung |
| P 1: | 20 mM EMPO | mit Zellen  | mit DMSO  | 10 Gy Bestrahlung |

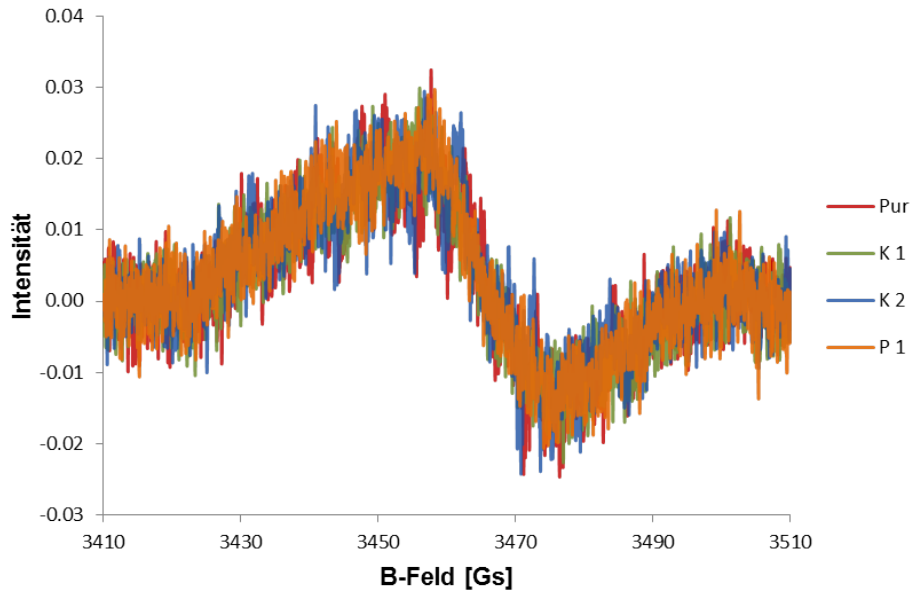


Abb. 9.12: Ergebnisse des dritten Experimentes “ROS-Nachweis”

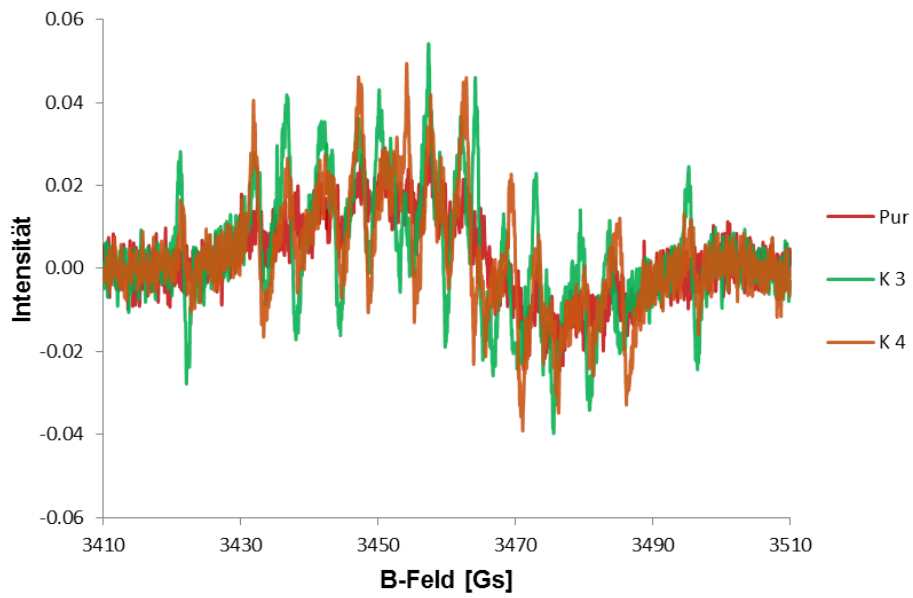


Abb. 9.13: Ergebnisse des dritten Experimentes “ROS-Nachweis”

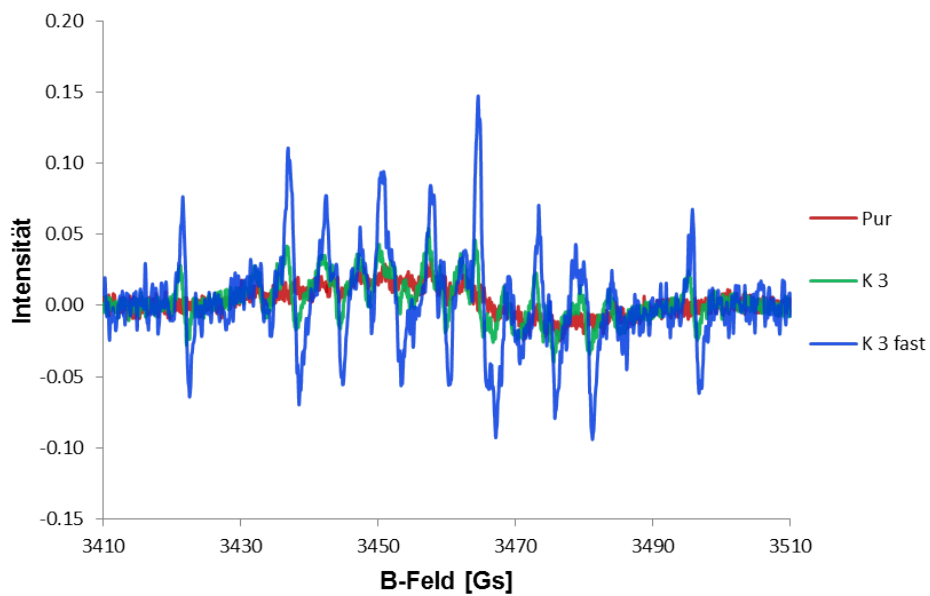


Abb. 9.14: Ergebnisse des dritten Experimentes “ROS-Nachweis”

In den Kontrollproben K 3 und K 4 konnten Radikale detektiert werden, die restlichen Proben zeigten keine Veränderung gegenüber dem 20 mM EMPO Grundspektrum.

Im Falle der Kontrollproben erkennt man ein deutlich intensiveres Signal für die *fast*-ESR-Messung vor Beginn der Messung als für die Messung mit Standard-Parametern.

Die *fast*-Messung im Anschluss hingegen weist kaum noch ein detektierbares Signal auf. Dies deutet eindeutig auf den Zerfall der EMPO-Radikal-Addukte während der Messdauer hin.

Für weitere Messungen erweist es sich daher als sinnvoll, die Parameter entsprechend anzupassen. Die überarbeiteten Messparameter für nachfolgende Messungen sind in Abschnitt 17.2.2 aufgeführt.

Aufgrund der schlechten Auflösung und des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der *fast*-Messungen, sowie der zu geringen Signalintensität der Standardmessung ist eine aussagekräftige Interpretation der einzelnen Addukte nicht möglich und an dieser Stelle nicht notwendig.

Die Bildung von Radikalen innerhalb der Proben unter der Bestrahlung von 10 Grey kann, wie die Kontrollmessungen K 3 und K 4 zeigen, mittels EMPO nachgewiesen werden.

Durch die Zugabe von DMSO mit oder ohne Zellen in den Proben werden entsprechend der Erwartung keine messbaren Radikale erzeugt, wie in den Kontrollmessungen K 1 und K 2 ersichtlich wird.

Im Falle der Probe P 1 konnten entgegen der Erwartung keine Radikale gemessen werden. Dies lässt sich allerdings sehr gut durch die hohe Dichte der Zellbestandteile, welche wie bereits in der Einleitung beschrieben auf diversen Wegen mit Radikalen reagieren können, und die natürlichen Radikalfänger innerhalb der Zelle wie zum Beispiel Ascorbinsäure erklären. Eine höhere Konzentration von EMPO könnte in diesem Fall helfen, allerdings würde dies wiederum auch zu einer Störung durch das EMPO-Grundsignal führen und somit eventuelle Ergebnisse zu stark beeinflussen.

Da eine Detektion der Radikale nur für die Kontrollmessungen ohne Zellen möglich war, kann zusammengefasst werden, dass auch mit diesem Versuchsaufbau keine Detektion von Radikalen innerhalb der Zelle erfolgen kann.

Abschließend kann daher festgestellt werden, mit den in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsmethoden lassen sich keine Radikale innerhalb von Zellen detektieren.

Die Kontrollmessungen K 3 und K 4 zeigen jedoch das Potential, die Generierung von Radikalen unter Bestrahlung nachzuweisen und diese zu analysieren.

## 9.3. Versuche zur Bestimmung von ROS in verschiedenen Puffersystemen

### 9.3.1. Untersuchung zur Stabilität des EMPO

Um Eigensignale und Zerfallsprodukte des EMPO für die ESR-Messungen zur Radikalbildung in verschiedenen Puffersystemen ausschließen bzw. abschätzen zu können, wurden die jeweiligen Proben nach verschiedenen Zeiten bei unterschiedlichen Temperaturen vermessen.

Die für die ESR-Messungen verwendeten Parameter sind in Abschnitt 17.2.2 aufgeführt.

Die Proben wurden jeweils frisch angesetzt und die Messreihe direkt gestartet.

Die Inkubation erfolgte für alle Proben direkt in der von unten mit *Critoseal*-Wachs versiegelten, aufrechten Probenkapillare.

Des Weiteren liefern diese Messreihen Aufschluss über die Radikalbildung innerhalb der Pufferlösungen.

Für die Untersuchungen der spontanen Radikalbildung wurden exemplarisch nachfolgend aufgeführte Puffer verwendet, da diese in der Biochemie und medizinischen Forschung häufig eingesetzt werden.

Die Zusammensetzung der Puffer wird in Kapitel 11.2 beschrieben.

Die verwendeten Puffer werden vor Verwendung entgast, der Ansatz der Proben erfolgt außerhalb des anaeroben Zelts unter Verwendung von Argon für sauerstoffarme Bedingungen.

Als Standardpuffer wurde der Phosphatpuffer PP pH 8 verwendet, der auch zur Lösung des EMPO verwendet und daher als "Pur" bezeichnet wird.

Als salzhaltige und somit stärker ionische Puffer wurden die Puffer TBS und TBS-T verwendet.

Ebenfalls wurde das Verhalten von EMPO in 20 %-iger Ethanol-Lösung (EtOH) untersucht, um den Einfluss verschiedener Lösungsmittel beobachten zu können.

Als Positivkontrolle und zur Untersuchung der Signalabnahme über Zeit wurde ein Fenton-Ansatz (Fn) generiert und bei RT untersucht.



### 9.3.1.1. Zeitkinetik bei Raumtemperatur

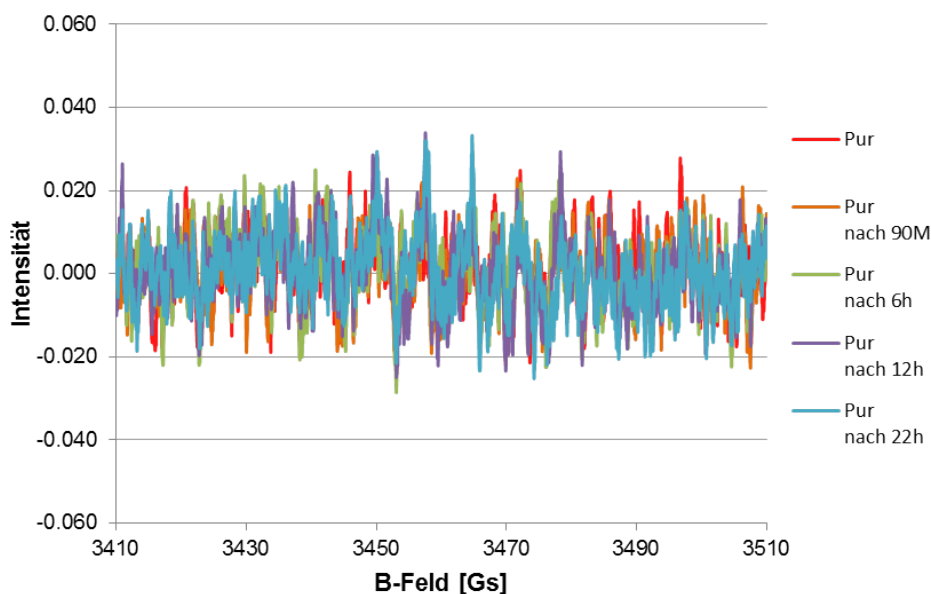


Abb. 9.15: Zeitkinetik 20 mM EMPO in PP pH 8 bei RT

In Abbildung 9.15 erkennt man deutlich, dass kein eigenständiges ESR-Signal durch Inkubation der PP-Probe bei RT entstanden ist.

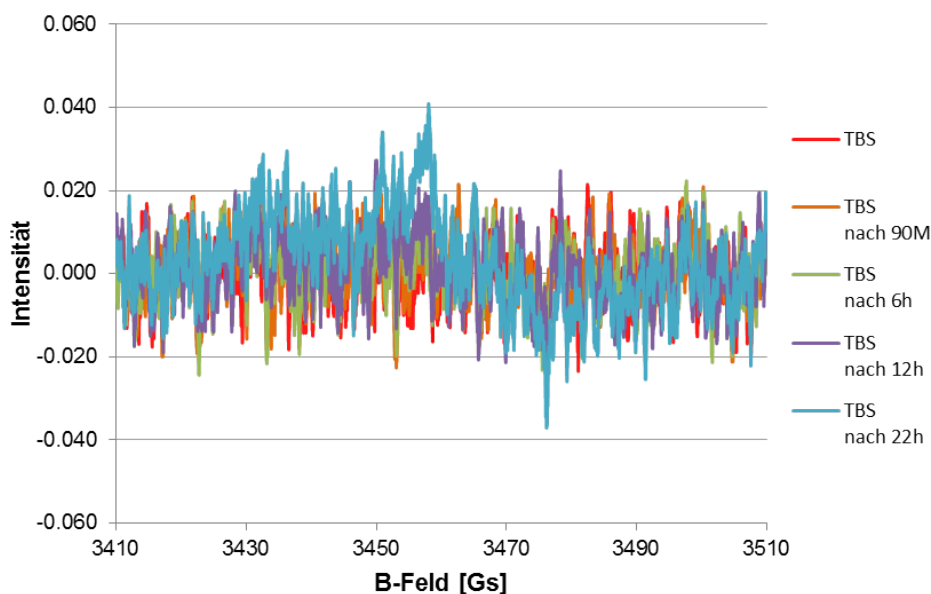
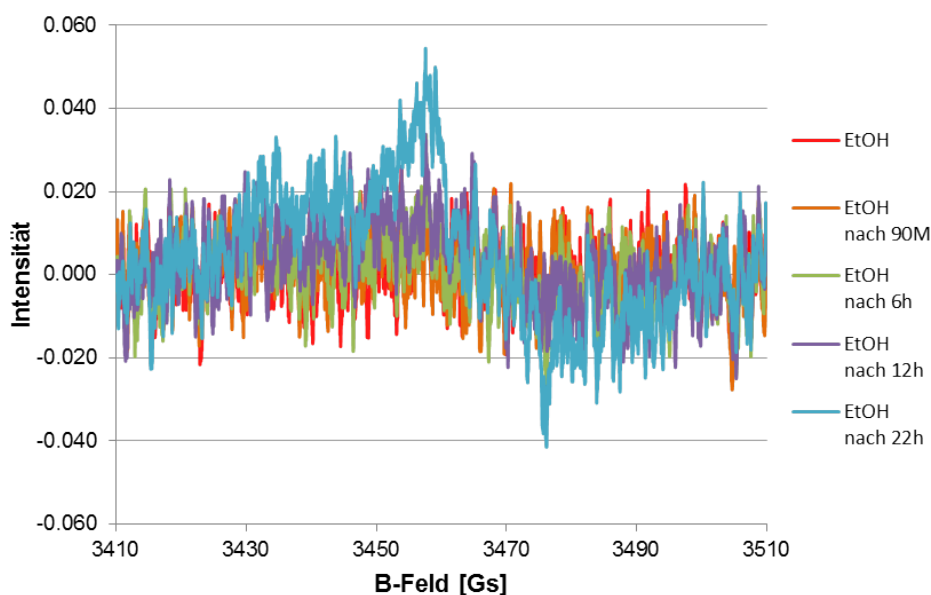


Abb. 9.16: Zeitkinetik 20 mM EMPO in TBS bei RT

Auch im Falle der TBS-Probe in Abbildung 9.16 ist kein ESR-Signal zu erkennen, lediglich eine Verschiebung des Baseline nach Inkubation von 22 Stunden, welche durch den Zerfall des EMPO zu erklären ist.

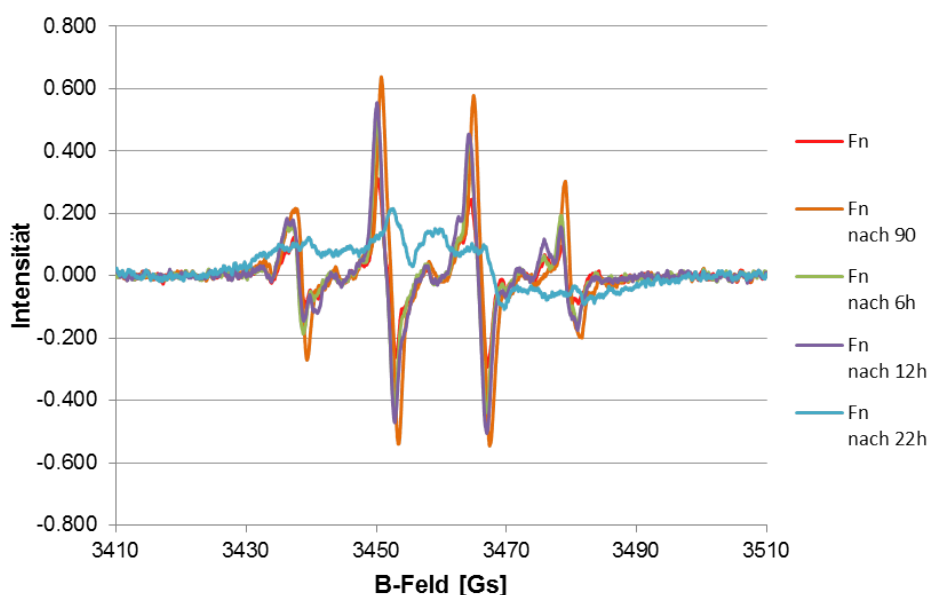
Ein Eigensignal durch die Verwendung von TBS oder ähnlichen Puffern wie z.B. isotonomischer Salzlösung kann somit ausgeschlossen werden.



**Abb. 9.17:** Zeitkinetik 20 mM EMPO in EtOH bei RT

Die Verwendung von EtOH liefert kaum unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich mit der PP- oder TBS-Probe (Abbildungen 9.17, 9.15 und 9.16). Erst nach 22 Stunden Inkubation zeigt sich der Zerfall des EMPO durch eine größere Verschiebung der Baseline leicht deutlicher als in TBS.

Ein Eigensignal ist nicht festzustellen.



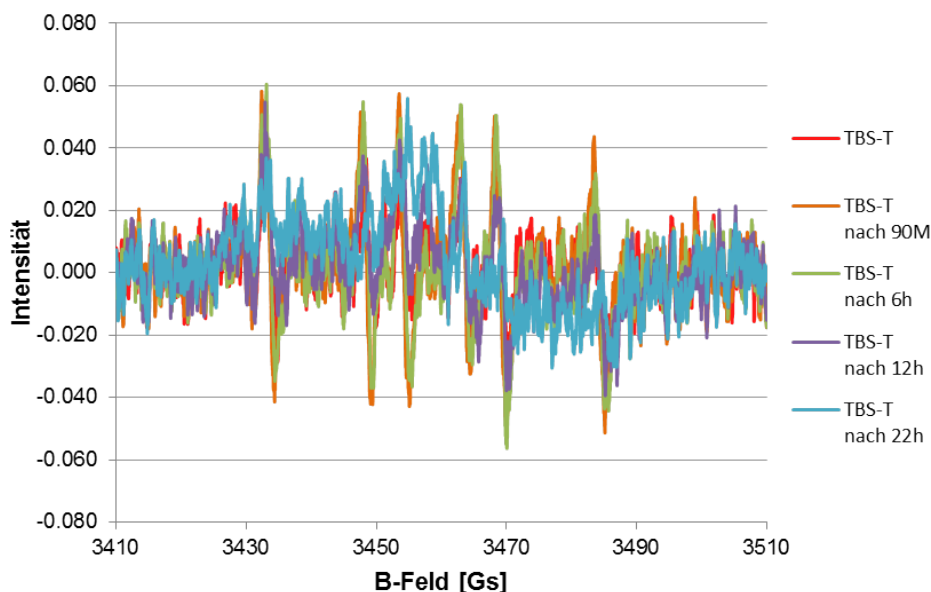
**Abb. 9.18:** Zeitkinetik 20 mM EMPO in Fn bei RT

Die Messung der Fn-Proben in Abbildung 9.18 zeigt anfangs eine deutliche Steigerung des Signals nach 90 Minuten, einen leichten Abfall nach 6 bis 12 Stunden und nach 22 Stunden einen deutlichen Signalverlust, der durch den Zerfall des EMPO und der Addukte zu erklären ist. Das entstehende EMPO-OH-Addukt ist in dem 1 : 2 : 2 : 1 Verhältnis der Peaks deutlich zu erkennen.

Dem Zerfallsspektrum nach 22 Stunden können keine spezifischen Signale mehr zugeordnet werden.

Die anfängliche Zunahme der Signalintensität lässt sich durch die fortwährende Fenton-Reaktion und somit die Ausbildung weiterer Radikale erklären, da diese erst wenige Minuten vor EMPO-Zugabe gestartet wird und nicht durch EMPO unterbrochen oder gestoppt wird. Die Zunahme der Signalintensität entspricht daher der Erwartung.

Die Messung belegt eine Stabilität von 12 Stunden für die gebildeten EMPO-OH-Addukte.



**Abb. 9.19:** Zeitkinetik 20 mM EMPO in TBS-T bei RT

Die Messungen mit TBS-T hingegen (Abbildung 9.19) zeigt bereit nach 90 Minuten eine eindeutige Bildung von C-Addukten des EMPO. Im Vergleich mit den Messdaten von TBS in Abbildung 9.16 wird schnell deutlich, dass diese durch Reaktion mit dem Polysorbat-20, auch als Tween 20 bezeichnet, erzeugt werden.

Polysorbat-20 ist ein nicht-ionisches Tensid, welches auch als Emulgator in Lebensmitteln verwendet wird.

In der biochemischen und medizinischen Forschung wird TBS-T hauptsächlich in Immunoassays zur Minderung unspezifischer Bindungen eingesetzt.

Tween 20 kann auch als starkes Oxidationsmittel wirken (SDS, Sigma-Aldrich).

Durch das Potential, eigenständig unter RT-Inkubation Radikale zu erzeugen, eignen sich Polysorbat-20-haltige Puffer nicht zur Untersuchung der Radikalbildung und der Einsatz anderer Tenside, falls benötigt, empfiehlt sich.

### 9.3.1.2. Zeitkinetik bei höheren Temperaturen

Die Zeitkinetik wurde bei konstanten Bedingungen bei 42 °C und 72 °C durchgeführt, um den Einfluss der Temperatur auf die spontane Radikalbildung zu untersuchen.

Die vermehrte Radikalbildung sowie die Stabilität des EMPO bei höheren Temperaturen soll untersucht werden.

Für die Messungen bei 42 °C und 72 °C wurden die Probenkapillare beidseitig mit *Critoseal*-Wachs versiegelt, um ein Austrocknen der Proben zu verhindern.

Die Inkubation der Kapillare erfolgte im Wasserbad, wobei nur der von der Probe gefüllte Teil der Kapillare in das Wasser eingetaucht wurde.

Während der Messung befanden sich die Proben jeweils unter Raumbedingungen (18 °C) in der ESR-Cavity.

#### Zeitkinetik bei 42 °C

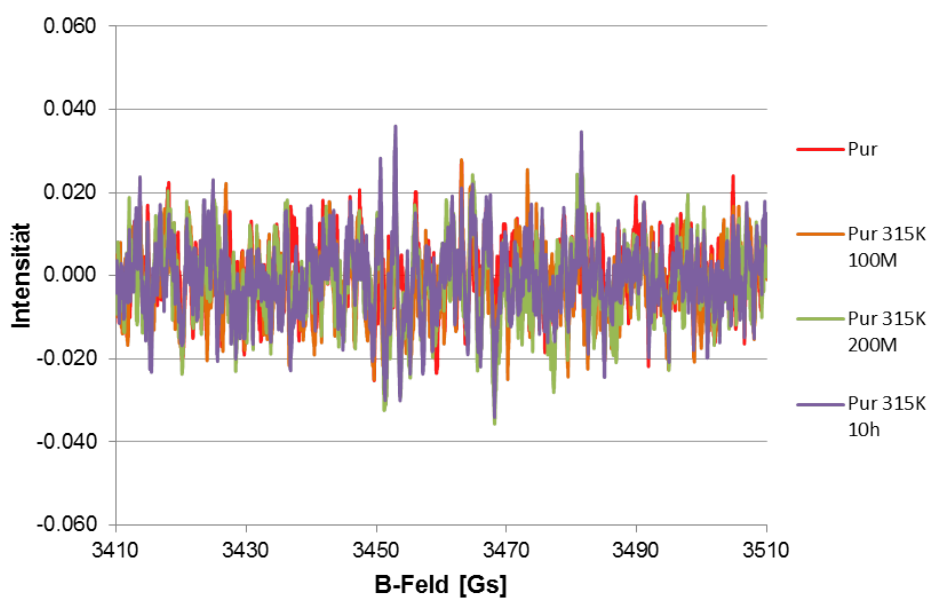
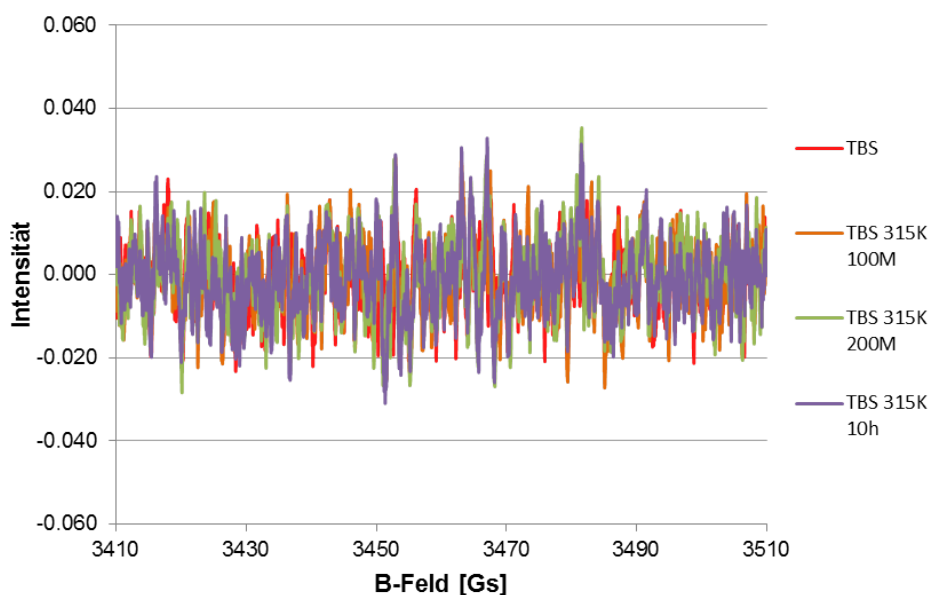


Abb. 9.20: Zeitkinetik 20 mM EMPO in PP pH 8 bei 42 °C

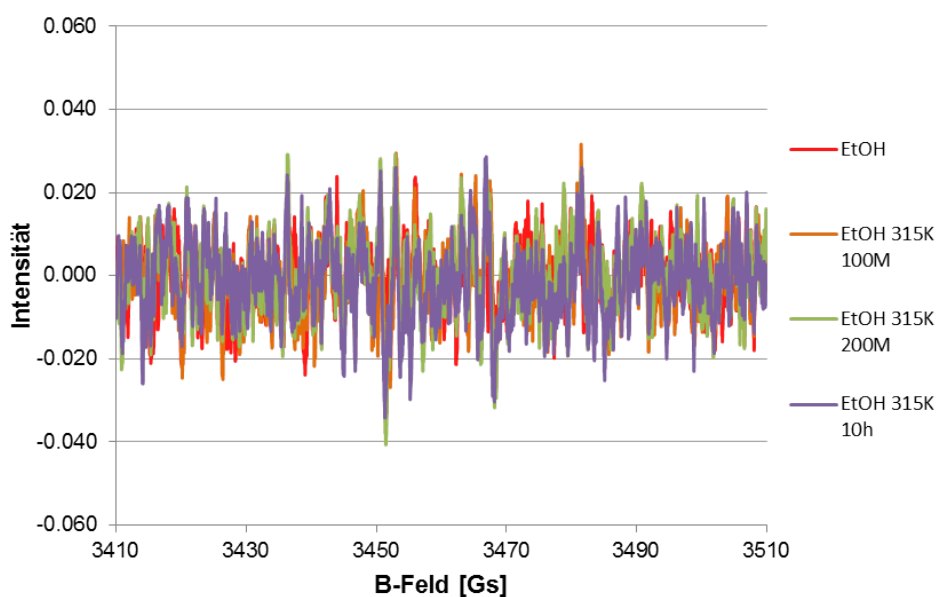


**Abb. 9.21:** Zeitkinetik 20 mM EMPO in TBS bei 42 °C

Auch bei 42 °C zeigen weder der reine Phosphatpuffer (Abb. 9.20) noch der stärker ionische TBS-Puffer (Abb. 9.21) die Entwicklung eines Eigensignals innerhalb des Messzeitraums.

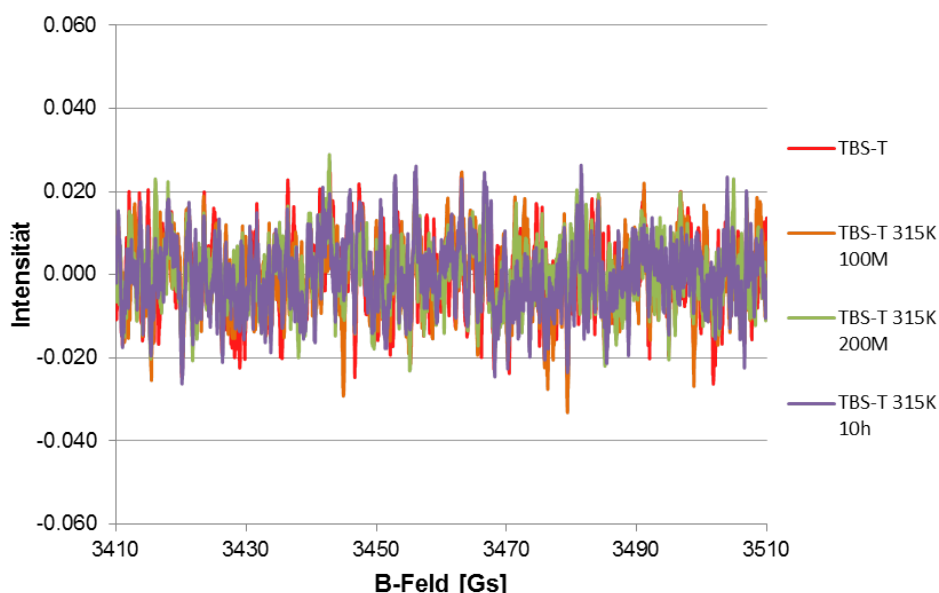
Ein Einfluss durch leichte Erwärmung der Probe für diese Puffer kann daher auch ausgeschlossen werden.

Auch bei 42 °C bleibt EMPO stabil und zeigt keine Entwicklung von messbaren Zerfallsprodukten innerhalb von 10 Stunden.



**Abb. 9.22:** Zeitkinetik 20 mM EMPO in EtOH bei 42 °C

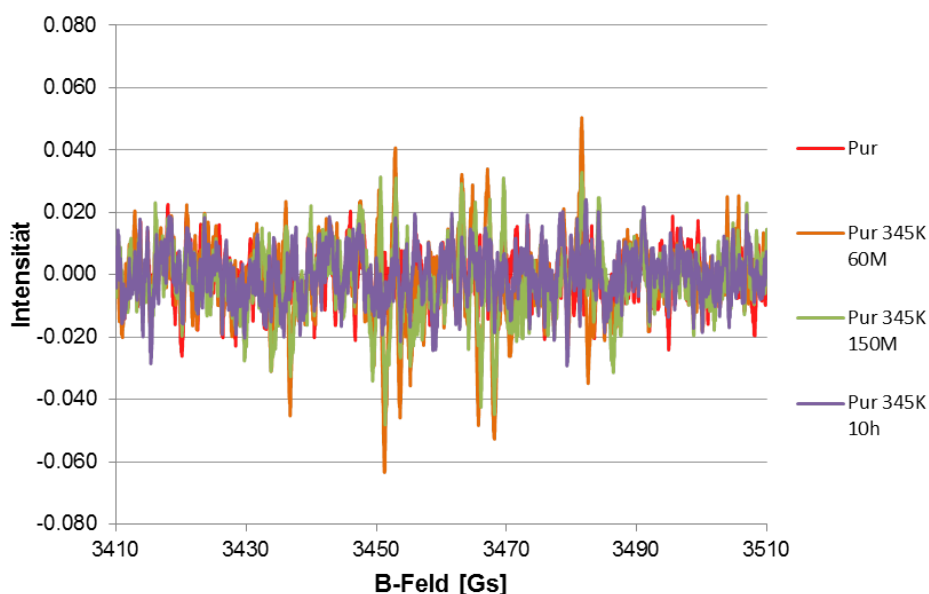
In Abbildung 9.22 sind keine Unterschiede gegenüber der RT-Messung 9.17 zu erkennen. Auch bei 42 °C Inkubation entstehen in ethanolischer Lösung keine mittels EMPO nachweisbaren Radikale.



**Abb. 9.23:** Zeitkinetik 20 mM EMPO in TBS-T bei 42 °C

Die zuvor unter RT detektierten C-radikalischen EMPO-Addukte können in Abbildung 9.23 nicht entdeckt werden. Die unterschiedlichen Spektren lassen sich durch die beidseitige Versiegelung der Probenkapillare mit *Critoseal*-Wachs erklären. Dadurch wird die Probe konstant unter sauerstoffarmen Bedingungen gehalten und es ist von einer geringeren Reaktivität innerhalb der Probe auszugehen.

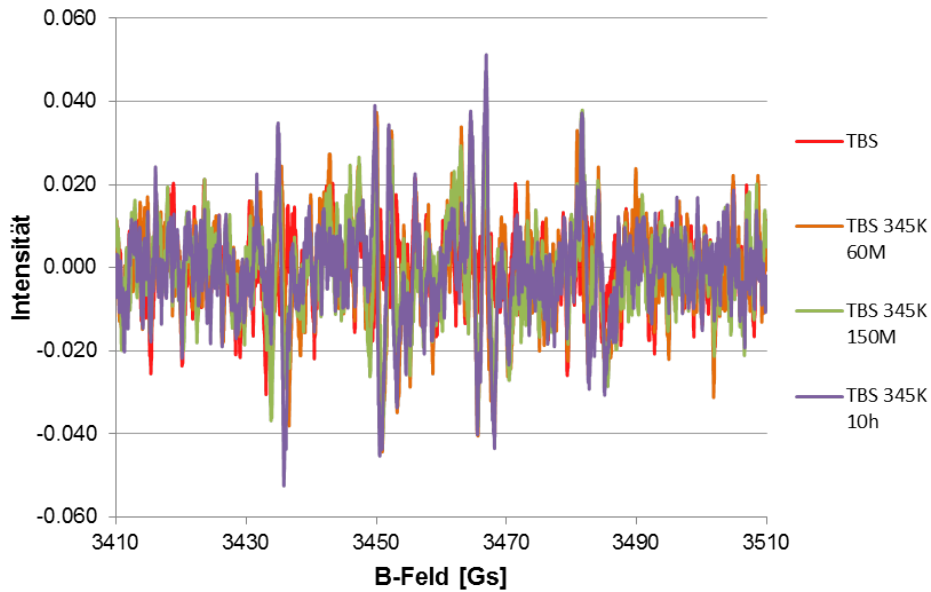
### Zeitkinetik bei 72 °C



**Abb. 9.24:** Zeitkinetik 20 mM EMPO in PP pH 8 bei 72 °C

Bei Erwärmung auf 72 °C lassen sich bereits nach einer Stunde im 20 mM EMPO-Spektrum (Abb. 9.24) Radikale erkennen. Die gebildeten Radikale können dabei nicht spezifischen Addukten zugeordnet werden.

Nach 10 Stunden bei 72 °C lassen sich keine Signale mehr nachweisen, was auf den Zerfall des EMPO schließen lässt.

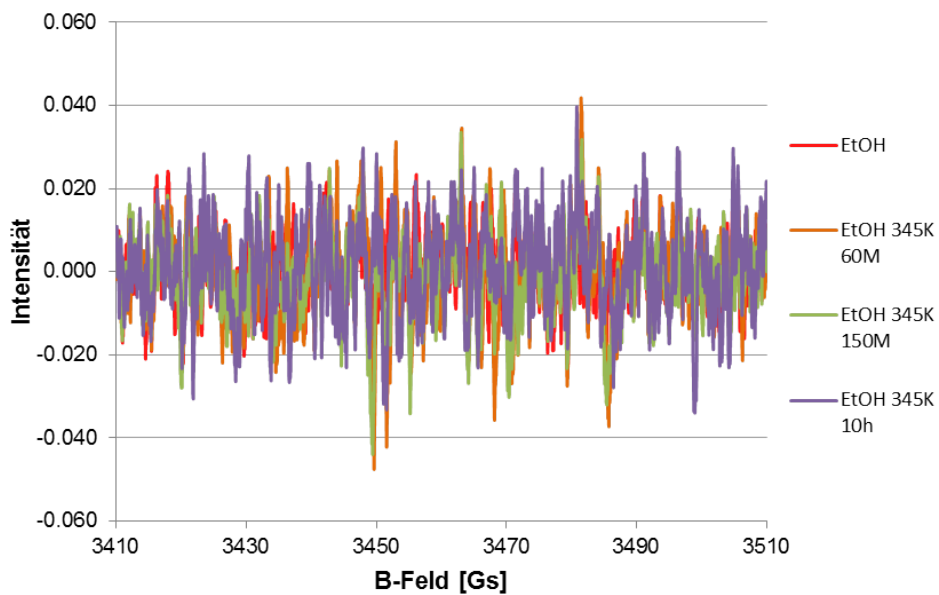


**Abb. 9.25:** Zeitkinetik 20 mM EMPO in TBS bei 72 °C

Auch die ESR-Messungen des TBS bei 72 °C zeigen bereits nach einer Stunde eine Signalzunahme, welche bis zum Ende der Messreihe nach 10 Stunden weiter ansteigt. Auch diese Signale können keinen spezifischen Addukten zugeordnet werden.

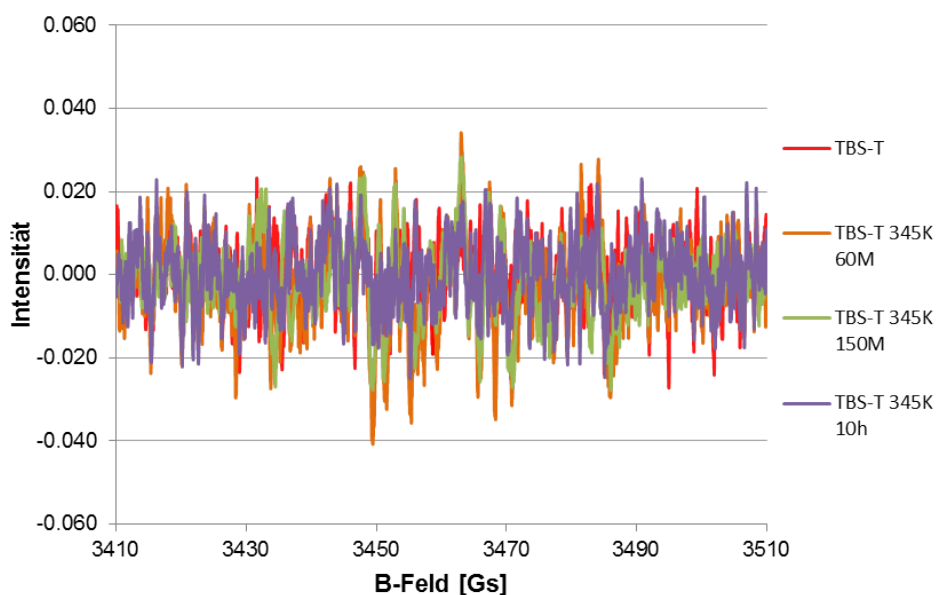
Eine Abnahme des Signals kann bis zur Ende der Messreihe nicht festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass das EMPO im TBS-Puffer eine höhere Stabilität besitzt.

Durch die hohe Temperatur werden spontan Radikale in der TBS-Probe gebildet.



**Abb. 9.26:** Zeitkinetik 20 mM EMPO in EtOH bei 72 °C

Die Erwärmung der EtOH-Probe bei 72 °C zeigt, wenn man Abbildung 9.26 betrachtet, keine erkennbare Ausbildung von Radikalen.



**Abb. 9.27:** Zeitkinetik 20 mM EMPO in TBS-T bei 72 °C

Im Falle der TBS-T-Messung bei 72 °C (Abb. 9.27) lassen sich keine Radikale nachweisen. Es kommt nur zu einer minimalen Steigerung der Signalintensität nach 60 bzw. 150 Minuten, welche allerdings zu gering ist um von einer nachweisbaren Radikalbildung zu sprechen. Im Vergleich mit Abbildungen 9.24 und 9.25 wäre auch für TBS-T die Bildung von Radikalen zu erwarten gewesen.

Das Ausbleiben dieser Radikalbildung lässt den Schluss zu, dass Tween 20 in diesem Experiment die Ausbildung messbarer Radikale unterdrückt haben muss.

Eine Erklärung hierfür wäre, dass zwar auch in diesem Falle Radikale ausgebildet werden, diese allerdings bevorzugt mit dem Polysorbat reagieren und somit nicht vom EMPO detektiert werden können.



### 9.3.1.3. Auswertung der Zeitkinetiken

Die Versuche zur Zeitkinetik konnten erfolgreich durchgeführt werden und liefern zusammenfassend folgende Ergebnisse:

Unter Raumbedingungen in einfachen Puffern wie PP oder TBS bleibt EMPO sowie das EMPO-OH-Addukt für 12 Stunden stabil. Eine Probenvorbereitungsdauer von wenigen Stunden ist also möglich.

Dabei sollte man allerdings bedenken, dass die meisten anderen EMPO-Addukte eine deutlich geringere Stabilität aufweisen und daher die Probe möglichst direkt nach Radikalerzeugung bis zur Messung in  $LN_2$  gelagert werden muss. Dies ist beispielsweise in Abbildung 9.14 gut zu erkennen.

Ebenfalls ist zu berücksichtigen, dass dies nur für die hier gemessene und in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 20 mM EMPO überprüft wurde.

Mit zunehmender Konzentration steigt die Selbstreaktion und die Ausbildung von Zerfallsprodukten des EMPO deutlich an, wie das deutliche Grundsignal der höher konzentrierten EMPO-Proben zeigt (Abb. 9.8).

Bereits bei 72 °C werden nachweisbare Radikale innerhalb der Proben erzeugt. Eine Erwärmung der Probe, wie beispielsweise der Ultraschallaufschluss von Zellen, kann zur Ausbildung von Radikalen führen.

Diesen Einfluss gilt es bei der Auswertung der Experimente zu berücksichtigen.

Die Verwendung von Tween 20 beeinflusst die Detektion der Radikale und eignet sich nicht für Untersuchungen zum Radikalnachweis.

Durch die Verwendung von ethanolischer Lösung wird die Bildung von Radikalen ebenfalls eingeschränkt und beeinflusst wie die Messung bei 72 °C (Abb. 9.26) zeigt.

### 9.3.2. Viertes Experiment "ROS-Nachweis"

In diesem Experiment wurde die Radikalbildung während verschiedenen medizinischen Untersuchungen in Pufferlösungen untersucht.

Auf Verwendung von Zellen wurde aufgrund der unter Abschnitt 9.2 aufgeführten Argumente verzichtet.

Die für diese Messungen verwendeten ESR-Parameter sind in Abschnitt 17.2.2 aufgeführt.

Die Bestrahlung der Proben erfolgte in einer hierfür angefertigten Probenplatte aus Plexiglas, in der 15 ml-Falcons, 1.5 ml-Eppis und 0.5 ml-Reaktionsgefäße Platz haben.

Der Bestrahlungsplan wurde in einem Feld aus 180° berechnet, so dass sich die Zellen innerhalb der 100 %-Isodosis befinden und die gesamte Dosis an der Probe ankommt.

Die Probenplatte und der Bestrahlungsplan wurde von Y. Lorat berechnet und zur Verfügung gestellt.

Die durch die Bestrahlung mit 10 Grey in verschiedenen Puffersystemen erzeugten Radikale wurden anschließend mittels "WinSIM" analysiert und die Unterschiede der verschiedenen Puffer einander gegenüber gestellt.

Auch wird der Unterschied zwischen entgasten und nicht entgasten Proben unter der Bestrahlung von 10 Grey untersucht.

Der Ansatz der benötigten Puffer und die Vorbereitung der Proben erfolgte am Vortag des Versuchs. Mit Ausnahme der Proben für die 4te Messreihe wurden die Puffer im anaeroben Zelt entgast und die Proben jeweils mit Argon beschichtet. Für die vierte Messreihe wurden die Proben nicht entgast.

Es wurden jeweils 27 µl des jeweiligen Puffers direkt im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Zugabe von 3 µl der 200 mM EMPO-Stammlösung erfolgte direkt vor Beginn der jeweiligen Messreihe.

Aufgrund des verfügbaren Platzes wurden die ersten sechs Proben jeweils in 1.5 ml-Eppis und die letzten vier in 0.5 ml-Reaktionsgefäßen vorbereitet.

Die Messreihen wurden nacheinander durchgeführt, die fertigen Proben sofort in die Probenkapillaren überführt und in  $LN_2$  gelagert.

Es wurden jeweils 10 unterschiedliche Puffer für jede Untersuchung vorbereitet, um die Radikalbildung unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen.

Hierzu wurden folgende Puffer gewählt:

|       |                                |       |             |
|-------|--------------------------------|-------|-------------|
| P 01: | Iso-NaCl                       | P 06: | TBS         |
| P 02: | H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> | P 07: | TBS-Tween20 |
| P 03: | PBS                            | P 08: | HEPES-NaCl  |
| P 04: | PP, pH 4                       | P 09: | HEPES       |
| P 05: | PP, pH 8                       | P 10: | EtOH        |

In der ersten Messreihe wurden die Proben in der Probenplatte aufgrund der geringen Größe mit dem Kleintier-MRT untersucht.

Das MRT konnte dabei so eingestellt werden, dass alle Proben vollständig dem Magnetfeld innerhalb des Tomographen ausgesetzt waren.

Die entsprechenden Proben werden als P 01 - P 10 bezeichnet.

In der zweiten Messreihe erfolgte die Bestrahlung der Proben mit 10 Grey am Linearbeschleuniger.

Die entsprechenden Proben werden als P 11 - P 20 bezeichnet.

In der dritten Messreihe erfolgte die Behandlung der Proben über den Computertomographen. Zur Behandlung der Proben wurde dabei die Parameter eines "CT-Schädel-Scans" verwendet, um die Strahlenbelastung während der Untersuchung zu simulieren.

Die entsprechenden Proben werden als P 21 - P 30 bezeichnet.

In der vierten Messreihe wurden die Proben entsprechend der 2ten Messreihe mit dem Linearbeschleuniger bestrahlt.

Die entsprechenden Proben werden als P 31 - P 40 bezeichnet.

In keiner der angesetzten Proben der ersten Messreihe sind dem Grundspektrum der reinen 20 mM EMPO-Lösung abweichende Peaks zu entdecken.

Einzig die Probe P 07 zeigt ein minimales Signal, welches aber auf den Einfluss des Tween 20 zurückzuführen ist, welches bereits in der Zeitkinetik-Untersuchung ein entsprechendes Eigensignal aufweist (Abb.9.19).

Das ESR-Spektrum von Probe P 07 ist in Abbildung 9.28 dargestellt.

Es ist also in keinem der Fälle eine Radikalbildung aufgrund der Bestrahlung durch die Untersuchung am Kleintier-MRT zu detektieren.

Sollten Radikale während der Untersuchung gebildet worden sein, so liegen diese außerhalb des durch EMPO detektierbaren Bereichs.

Jede Probe innerhalb der zweiten Messreihe weist ein ESR-Multilinienspektrum auf. Eine eindeutige Radikalbildung durch die Bestrahlung mit 10 Grey kann also dokumentiert werden.

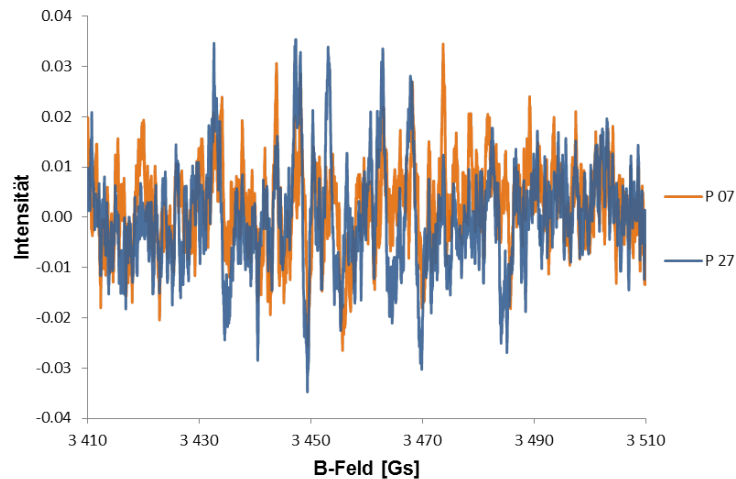
Unterschiede der verschiedenen Puffer sind bereits rein optisch in den ESR-Spektren zu erkennen und werden im Folgenden näher analysiert.

Von den mittels CT behandelten Proben der dritten Messreihe weisen nur in die Proben P 27 ein unterschiedliches ESR-Spektrum auf.

Die CT-Behandlung der Probe führte zur erhöhten Radikalbildung des TBS-T. In P 27 ist eindeutig ein 6-Linien-Spektrum zu erkennen, welches auf das EMPO-C-Addukt zurückzuführen ist. Dies lässt sich erneut durch das Tween 20 erklären.

Der Einfluss des CT-Scans auf die TBS-T Probe lässt sich dadurch bestätigen, dass die Probe trotz der kürzeren Behandlungsdauer des CT-Scans im Vergleich zur MRT-Behandlung bereits ein deutlich stärkeres ESR-Signal liefert. Dies lässt sich in Abbildung 9.28 erkennen.<sup>3</sup>

Ein Einfluss des CT auf die anderen Puffer ist nicht feststellbar.



**Abb. 9.28:** ESR-Spektren des TBS-T Puffer nach Behandlung durch MRT bzw. CT

Die einzelnen Probenspektren der zweiten und vierten Messreihe wurden mittels “WinSIM” analysiert und die Zusammensetzung der Radikale wird in Tabelle 9.2 zusammengefasst. Die entsprechenden EMPO-Addukte werden dabei in der Tabelle mit “\*” abgekürzt. Die angegebenen Werte entsprechen dem prozentualen Anteil des jeweiligen Adduktes.

Die gemittelte Gesamtintensität  $\bar{I}$  der einzelnen Spektren wurde durch Summierung der absoluten Werte und Division durch die Zahl der Messpunkte ermittelt und dient zum Vergleich der Spektrenintensität untereinander.

Die einzelnen WinSIM-Fit-Spektren sind im Anhang unter Kapitel 16 dargestellt.

**Tab. 9.2:** Ergebnisse der “WinSIM”-Analysen für die 2te und 4te Messreihe des vierten ROS-Experimentes

| Probe                          |      | *H   | *C   | *OH  | *OOH | $\bar{J}$ |
|--------------------------------|------|------|------|------|------|-----------|
| Iso-NaCl                       | P 11 | 46.7 | 45.7 | 5.4  | 2.2  | 0.02141   |
|                                | P 31 | 66.5 | 14.6 | 11.6 | 7.3  | 0.01680   |
| H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> | P 12 | 42.6 | 46.3 | 6.5  | 4.6  | 0.02233   |
|                                | P 32 | 45.6 | 17.4 | 33.0 | 4.0  | 0.01865   |
| PBS                            | P 13 | 42.2 | 46.4 | 5.2  | 6.2  | 0.02088   |
|                                | P 33 | 40.6 | 23.9 | 28.1 | 7.4  | 0.01468   |
| PP, pH 4                       | P 14 | 37.7 | 49.9 | 6.6  | 5.8  | 0.01598   |
|                                | P 34 | 37.9 | 20.5 | 37.8 | 3.8  | 0.01634   |
| PP, pH 8                       | P 15 | 37.9 | 51.7 | 6.5  | 3.9  | 0.01598   |
|                                | P 35 | 46.7 | 19.0 | 19.0 | 15.3 | 0.01932   |
| TBS                            | P 16 | 41.7 | 54.9 | 0.8  | 2.6  | 0.01610   |
|                                | P 36 | 44.8 | 44.  | 6.1  | 4.4  | 0.01184   |
| TBS-T                          | P 17 | 23.1 | 60.7 | 12.4 | 3.8  | 0.01376   |
|                                | P 37 | 44.8 | 35.4 | 5.0  | 14.8 | 0.00970   |
| HEPES-NaCl                     | P 18 | 50.5 | 43.0 | 2.5  | 4.0  | 0.01554   |
|                                | P 38 | 63.6 | 19.2 | 11.9 | 5.3  | 0.01345   |
| HEPES                          | P 19 | 41.6 | 48.8 | 4.0  | 5.6  | 0.01781   |
|                                | P 39 | 71.7 | 14.7 | 7.7  | 5.9  | 0.01419   |
| EtOH                           | P 20 | 29.8 | 64.5 | 1.0  | 4.7  | 0.02507   |
|                                | P 40 | 42.3 | 55.7 | 1.0  | 1.0  | 0.02341   |

Durch die Bestrahlung mit 10 Grey wurden erfolgreich Radikale in den Proben generiert. In allen Proben können H-, C-, OH- und OOH-Addukte detektiert werden.

Tabelle 9.2 sind eine Vielzahl von Ergebnissen zu entnehmen, welche im Folgenden aufgeführt werden.

Da in allen Proben C-Addukte detektiert werden können, stellt sich die Frage, woher die entsprechenden Kohlenstoffradikale innerhalb der anorganischen Puffer stammen können. Der Ursprung dieser Radikale beruht vermutlich auf den folgenden beiden Überlegungen: Zum einen enthalten alle Proben EMPO, welches durch Zerfallsreaktionen zur Bildung von C-Addukten beitragen kann.

Zum anderen wäre es denkbar, dass sich Bestandteile der Plastikoberfläche innerhalb der Reaktionsgefäße ablösen und Radikale bilden können.

Es ist bereits nachweislich bekannt, dass durch Plastikgefäße unter Einfluss von UV-Strahlung Radikale erzeugt werden können.

Als Ursache hierfür werden die in dem Plastik enthaltenen Weichmacher oder HALS-Verbindungen aufgeführt.

Eine Ausbildung von Radikalen unter Einfluss von radioaktiver Bestrahlung wäre daher vorstellbar.

Sollten die Plastikbestandteile Ursache der Radikalbildung sein, so kann es eine Rolle spielen, in welchem der Reaktionsgefäße die Probe bestrahlt wurde.

Im nächsten Experiment wird daher eine entsprechende Kontrollprobe mitgeführt.

Der Unterschied von entgasten und nicht entgasten Proben ist deutlich in allen Messungen erkennen.

Durch die sauerstoffarmen Bedingungen in der zweiten Messreihe wurden in allen Proben deutlich mehr C-Addukte detektiert.

In den nicht entgasten Proben lassen sich deutlich mehr OH- und OOH-Addukte erkennen, was auf den Einfluss des Luftsauerstoffs zurückzuführen ist.

Auch die Ausbildung der EMPO-H-Addukte ist mit Ausnahme des PBS-Puffers in den nicht entgasten Proben deutlich höher.

Durch die Anwesenheit des Luftsauerstoffs wird die Bildung der H-, OH- und OOH-Radikale begünstigt.

Ein Einfluss des pH-Werts auf die Radikalbildung ist im Vergleich zwischen den Proben PP pH 4 und PP pH 8 nicht zu erkennen.

Die Proben  $H_2O_{dd}$ , PBS und PP weisen sehr ähnliche Werte auf. Ein größerer Einfluss durch den Phosphat-Anteil in den Puffern kann also ausgeschlossen werden.

Ein einheitlicher Einfluss durch NaCl ist in den Proben nicht feststellbar. Im Vergleich von Iso-NaCl zu PP zeigt sich ein höherer H-Addukt-Anteil, im Falle des HEPES-NaCl zu HEPES zeigt sich dies allerdings nur im entgasten Puffer.

Dies könnte allerdings auch durch einen Einfluss des HEPES erklärt werden. Eine erneute vergleichende Messung von Iso-NaCl und PP wird daher durchgeführt.

Zwischen den Proben TBS und Iso-NaCl fällt ein höherer C-Addukt-Anteil im TBS-Puffer auf, vor allem im nicht entgasten Puffer.

Auch zeigt sich eine geringere Intensität in den Spektren der TBS-Probe.

Das heißt auch Tris beeinflusst die Radikalbildung der Probe.

Tris ist die Abkürzung für Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und ist somit ein primäres Amin mit drei alkoholischen Hydroxygruppen.

Durch die reaktive Aminogruppe weist Tris die Fähigkeit auf, Redoxreaktionen einzugehen, und kann entsprechend Reaktionen mit den innerhalb des Versuchs gebildeten Radikalen eingehen.

Die HEPES-Probe zeigt im Vergleich mit PP eine deutliche Steigerung der H-Addukte und scheint die Ausbildung der OH- und OOH-Addukte zu unterdrücken. Dieser Effekt scheint hingegen im Falle von HEPES-NaCl nicht mehr aufzutreten. Im Vergleich mit Iso-NaCl zeigt sich die HEPES-NaCl-Probe sehr ähnlich. HEPES ist dafür bekannt eigenständige Radikale in Redoxreaktionen aufgrund des Piperazin-Ringsystem ausbilden zu können. Ein Einfluss von HEPES auf die Radikalnachweisuntersuchungen ist daher nicht auszuschließen und sollte vermieden werden.

Die Proben mit TBS-T-Puffer zeigen ein deutlich abweichendes Verhalten. Im Falle des TBS-T wird ein deutlich erhöhter C-Addukte-Anteil detektiert, die Intensität der TBS-T Spektren zeigt sich geringer als die der anderen Proben. Dieses Verhalten lässt sich einerseits durch Reaktionen des Tween 20 mit den Radikalen und andererseits die eigene Radikalbildung des Tween 20 erklären. Auch der zuvor beschriebene Einfluss des Tris sollte dabei berücksichtigt werden.

Auch die EtOH-Proben zeigen ein abweichendes Verhalten. Der Anteil der C-Addukte ist ebenfalls deutlich erhöhte, wohingegen weniger H-, OH- und OOH-Addukte detektierbar sind. Dies lässt sich durch den Einfluss des EtOH erklären, welcher die Ausbildung der C-Addukte deutlich fördert. Dies bedeutet, dass die Ausbildung der Kohlenstoffradikale durch EtOH energetisch der Ausbildung von OH/OOH- oder H-Radikale bevorzugt sein muss. Ein weiterer Belegung dafür ist die deutlich erhöhte Signalintensität der EtOH-Proben gegenüber den restlichen Proben, die auf eine erhöhte Radikalbildung schließen lässt.

Untersuchungen zu verschiedenen Ethanol-Konzentrationen wurden mit der *Spin trap* DMPO von Rehman et al. durchgeführt [Rehman et al., 2016]. Die Ergebnisse dieser Messungen weisen ebenfalls eine Zunahme der DMPO-C-Addukte und die Abnahme der DMPO-OH-Addukte mit steigender Ethanol-Konzentration auf.

### 9.3.3. Fünftes Experiment "ROS-Nachweis"

Ziel des fünften Experimentes ist es die Ergebnisse des vierten Experiments unter medizinisch sinnvollen Bedingungen der Strahlentherapie zu bestätigen.

Dabei wird die Dosis der Bestrahlung auf das medizinisch relevante Maß von 2 Grey reduziert.

Die Bestrahlung erfolgt erneut wie bereits im vierten Experiment beschrieben in der Probenplatte.

Aufgrund der verfügbaren Plätze werden die ersten sechs Proben jeweils in 1.5 ml-Eppis und die letzten drei in 0.5 ml-Reaktionsgefäße vorbereitet.

In diesem Experiment wurden zwei Messreihen angesetzt. In der ersten Messreihe (01 - 09) werden die entgasten Proben verwendet, in der zweiten (11 - 19) die nicht entgasten Proben.

Wie bereits in der Auswertung des vierten Experiments beschrieben, wurde die gleiche PP-Probe in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen angesetzt, um den etwaigen Einfluss der verwendeten Plastikoberfläche des Gefäßes zu untersuchen. Die PP-Probe im 0.5 ml Reaktionsgefäß wird als PP V2 (P 07) bezeichnet.

Um den Einfluss von Tween 20 auf die Messung näher untersuchen zu können, wurde eine Tween20-Probe in Phosphatpuffer pH 8 (PP-T) angesetzt und vermessen.

Auf die erneute Messung von  $H_2O_{dd}$  und PBS wurde verzichtet, da diese identische Werte zu PP lieferten.

Ebenfalls wurde keine HEPES- oder EtOH-Probe angesetzt, da der Einfluss von HEPES und Ethanol nicht weiter untersucht werden soll.

Um die Wirkung eines natürlichen Radikalfängers zu untersuchen, wurden Ansätze mit verschiedenen Ascorbinsäure-Konzentrationen vorbereitet.

Die natürliche Vitamin-C-Konzentration innerhalb der Zelle ist starken Schwankungen unterlegen und abhängig von der Ernährung.

Medizinisch definiert man den Bereich akuter nachweislicher Vitamin-C-Mangelercheinung unter 30  $\mu$ M. Häufig treten Werte zwischen 50 - 300  $\mu$ M im Vitamin-C-Plasmaspiegel des gesunden Menschen auf.

Für die Untersuchungen werden daher 20  $\mu$ M für Mangelerscheinung, 50  $\mu$ M als Normalwert und 25 mM für den absoluten Vitamin-C-Überschuss gewählt.

Alle Puffer wurden frisch am Vortag vorbereitet und gegebenenfalls entgast.

Die Vitamin-C-Lösungen wurden aufgrund der geringen Haltbarkeit erst am Versuchstag angesetzt. Der Ansatz der entgasten Probe erfolgte im anaeroben Zelt in einem am Vortag bereits entgasten NaCl-Puffer.

Die Proben wurden am Versuchstag zu je 27  $\mu$ l in die entsprechenden Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Zugabe von 3  $\mu$ l der 200 mM EMPO-Stammlösung erfolgte direkt vor Beginn der jeweiligen Messreihe.



Die Bezeichnung der Proben für die beiden Messreihen ist in nachfolgender Liste aufgeführt:

|       |                      |       |                 |
|-------|----------------------|-------|-----------------|
| P 01: | PP, pH 8             | P 06: | NaCl, 25 mM V.C |
| P 02: | PP-T, pH 8           | P 07: | PP, pH 8, V2    |
| P 03: | Iso-NaCl             | P 08: | TBS             |
| P 04: | NaCl, 20 $\mu$ M V.C | P 09: | TBS-T           |
| P 05: | NaCl, 50 $\mu$ M V.C |       |                 |

Die Ergebnisse der “WinSIM”-Analysen der beiden Messreihen werden in Tabelle 9.3 zusammengefasst.

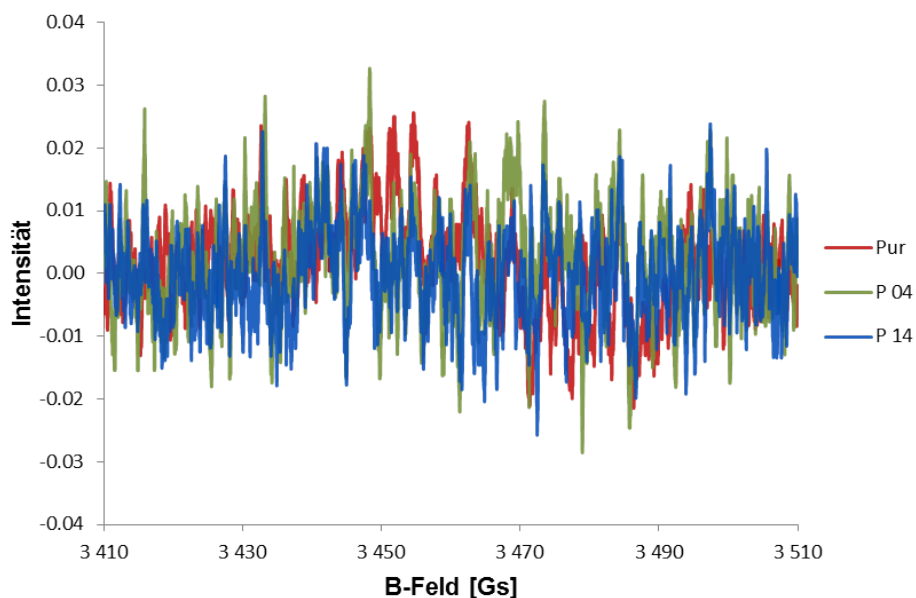
Die entsprechenden Spektren sind im Anhang 16 abgebildet.

Die Messungen mit Vitamin C zeigen bereits in der niedrigsten Konzentration von 20  $\mu$ M eine vollständige Abnahme der Addukt-Signale. Bei höheren Konzentrationen können entsprechend ebenfalls keine Radikal-Addukte detektiert werden.

Ein Vergleich der Spektren entgasten und nicht entgasten 20  $\mu$ M V.C-Probe mit EMPO\_Pur ist in Abbildung 9.29 dargestellt. Auf eine Darstellung der 50  $\mu$ M und 25 mM V.C-Konzentration wird verzichtet.

Im Vergleich mit der 25 mM V.C-Probe ist sogar eine geringere Signalintensität als im reinen EMPO\_Pur-Spektrum zu erkennen, welche auf eine Oxidation des EMPO zurückzuführen ist.

Eine Auswertung der Spektren durch “WinSIM” ist entsprechend nicht möglich.



**Abb. 9.29:** Vergleich der ESR-Spektren P 04 und P 14 mit EMPO\_Pur

Vitamin C ist ein sehr starkes Antioxidationsmittel und ein deutlich effizienterer Radikalfänger als EMPO, denn trotz des 1000-fachen Überschusses des EMPO fängt Vitamin C die gebildeten Radikale vollständig ab.

**Tab. 9.3:** Ergebnisse der “WinSIM”-Analysen des fünften ROS-Experimentes

| Probe    |      | *H   | *C   | *OH  | *OOH | $\bar{J}$ |
|----------|------|------|------|------|------|-----------|
| Iso-NaCl | P 03 | 43.8 | 36.8 | 14.3 | 5.1  | 0.00848   |
|          | P 13 | 49.8 | 36.2 | 6.7  | 7.3  | 0.00820   |
| PP, pH 8 | P 01 | 38.8 | 43.5 | 11.6 | 6.1  | 0.00793   |
|          | P 07 | 33.5 | 51.7 | 10.3 | 4.5  | 0.00960   |
|          | P 11 | 35.5 | 38.5 | 19.3 | 6.7  | 0.00908   |
|          | P 17 | 45.2 | 31.9 | 16.7 | 6.2  | 0.00830   |
| PP-T     | P 02 | 37.1 | 47.7 | 10.2 | 5.0  | 0.01006   |
|          | P 12 | 19.2 | 46.1 | 22.4 | 12.3 | 0.00881   |
| TBS      | P 08 | 8.3  | 71.6 | 11.7 | 8.4  | 0.00899   |
|          | P 18 | 5.9  | 75.6 | 9.6  | 8.9  | 0.01005   |
| TBS-T    | P 09 | 7.2  | 82.0 | 9.0  | 1.8  | 0.01025   |
|          | P 19 | 6.6  | 77.7 | 10.0 | 5.7  | 0.02100   |

Auch unter der Bestrahlung mit 2 Grey bildeten sich in den V.C-freien Proben messbare Radikale aus.

Es können erneut H-, C-, OH- und OOH-Addukte in den Proben detektiert werden.

Tabelle 9.3 liefert folgende Ergebnisse:

Aufgrund der geringeren Strahlendosis wurden deutlich weniger Radikale in den Puffern erzeugt als im vierten ROS-Experiment, was sich durch den Vergleich der gemittelten Intensitäten erkennen lässt.

Hierbei gilt es zu beachten, dass die gemittelten Intensitäten nur für den Vergleich der Proben untereinander sinnvoll sind und keine direkte Korrelation zu den gebildeten Radikalen aufweisen.

Ein einheitlicher Einfluss durch die verschiedenen Reaktionsgefäße auf die Ausbildung der C-Addukte konnte nicht bestätigt werden, da im Falle der entgasten Probe der Anteil der C-Addukte steigt, im Falle der nicht entgasten Probe hingegen sinkt.

Die beiden verschiedenen PP-Proben weisen jedoch Unterschiede auf.

Es kann daher von einem unterschiedlichen Einfluss durch die Reaktionsgefäße ausgegangen werden.

Dieser lässt sich auf verschiedene Ursachen wie zum Beispiel die unterschiedlichen Plattenpositionen, die räumliche Verteilung der Probe oder dem Luftfreiraum im Reaktionsgefäß zurückführen, und kann hier nicht näher bestimmt werden.

In den Proben PP und PP V2 lässt sich der Unterschied zwischen entgastem und nicht entgastem Puffer durch den deutlich erhöhten C-Addukt-Anteil im Falle der entgasten Proben erkennen.

Die Aussage, dass die Bildung der H-, OH- bzw. OOH-Addukte durch Luftsauerstoff begünstigt wird, lässt sich also bestätigen.

Erneut erkennt man den deutlich höheren H-Addukt-Anteil in der Iso-NaCl-Probe im Vergleich zur PP-Probe.

Dies lässt den Schluss zu, dass die Zugabe von NaCl die Ausbildung der Wasserstoffradikale begünstigt.

In der TBS-Probe traten in beiden Messreihen sehr hohe Anteile der C-Addukte auf, welche sich auf den Einfluss von Tris zurückführen lassen.

Insbesondere bei der geringeren Strahlendosis in diesem Experiment führte die Anwesenheit von Tris zur vermehrten C-Addukt-Bildung

Die Eigenschaften von Tris sind bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben.

Der Effekt von Tween 20 zeigt sich durch einen höheren C-Addukt-Anteil in den PP-T- und TBS-T-Proben im jeweiligen Vergleich mit den PP- und TBS-Proben.

Eine Abschwächung der Signalintensität wie im Falle des vierten Experiments tritt durch Tween 20 nicht auf. Die Signalintensität in den T-Proben steigt hingegen an.

Tween 20 weist in der geringeren Strahlendosis radikalfördernde Eigenschaften auf, die in diesem Fall die Reaktionsrate mit ausgebildeten Radikalen übersteigen.

Dies passt ebenfalls zu den vorherigen Beobachtungen, in denen Tween 20 als Ursache der Radikalentstehung ermittelt wurde.

Tween 20 ist also in der Lage, selbst Radikale zu bilden und mit ausgebildeten Radikalen zu reagieren.



## 10. Zusammenfassung und Ausblick

Die Detektion von Radikalen in verschiedenen Puffern verlief erfolgreich und lässt Rückschlüsse auf verschiedene Pufferbestandteile und die Radikalbildung bei medizinischen Behandlungen zu.

Die Analyse der gemessenen ESR-Spektren durch die Software "WinSIM" lieferte die Parameter der einzelnen EMPO-Addukte und ermöglicht die Analyse der entstandenen Radikale.

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich jeweils auf den Radikalnachweis mittels der in dieser Arbeit verwendeten *Spin trap* EMPO. Die Entstehung von Radikalen unterhalb der Nachweisgrenze ist nicht auszuschließen, allerdings gilt der Radikalnachweis durch EMPO als eine sensible ESR-Methode zur Radikaldetektion [Hauck, 2007].

Unter der Strahlenbelastung von CT- und MRT-Untersuchungen konnte keine Radikalbildung in den Proben detektiert werden.

Ausnahme hiervon stellen die Proben mit Tween-20-Zugabe dar, welche eine Ausbildung von EMPO-C-Addukten zeigen. Allerdings ist dies auf den Einfluss von Tween 20 zurückzuführen und daher für die Betrachtung der medizinischen Untersuchung nicht relevant.

Eine vermehrte Radikalbildung innerhalb von Zellen durch ähnliche Effekte kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

Die Radikalbildung unter der Strahlentherapie mittels Linearbeschleuniger konnte bestätigt werden. Bereits mit der medizinischen relevanten Strahlendosis von 2 Grey konnten Radikale nachgewiesen werden.

Die Analyse der ESR-Spektren auf die einzelnen EMPO-Addukte durch die Software "WinSIM" lieferte folgende Ergebnisse:

- Die Bildung von H-, OH- bzw. OOH-Addukten wird durch Luftsauerstoff begünstigt
- Die Zugabe von NaCl fördert die Ausbildung von Wasserstoffradikalen
- Die verwendeten Reaktionsgefäße besitzen einen Einfluss auf die Messung
- Organische Pufferbestandteile wie Tris, HEPES, EtOH und Tween 20 führen zur erhöhten C-Addukt-Bildung
- Tween 20 fördert die Entstehung freier Radikale und reagiert mit freien Radikalen
- Ascorbinsäure ist ein starkes Antioxidans und ein vielfach stärkerer Radikalfänger als EMPO

Die Arbeiten mit Zellen hingegen lieferten keine Möglichkeit des Radikalnachweises mittels EMPO. Die unter Bestrahlung gebildeten Radikale konnten in verschiedenen Untersuchungen mit Zellen nicht nachgewiesen werden.

Gründe hierfür sind die geringe Lebensdauer und Stabilität der Radikale und die hohe Dichte an Zellbestandteilen innerhalb der Zellen, welche ebenfalls mit Radikalen reagieren können.

Hierzu zählen Lipide, Proteine, DNA und das oxidative Schutzsystem der Zelle.

Untersuchungen mit Vitamin C belegen die höhere Reaktivität dieses natürlichen Radikalfängers im Vergleich zu EMPO. Auch in den untersuchten Zellproben ist von einer natürlichen Konzentration an Antioxidantien auszugehen.

Entsprechend ist auch von einem natürlichen Abbau der gebildeten Nitroxidradikal-Addukte innerhalb der Zelle auszugehen.

Allgemein zeigt sich die Verwendung der klassischen Nitroxid-*Spin-traps* für die *in-vivo*-Detektion von Radikalen aus diesen Gründen ungeeignet.

Für die *in-vivo*-Detektion werden Spinfallen benötigt, die mit der hohen Reaktivität der natürlichen Radikalfänger konkurrieren können, eine hohe Membranpermeabilität und bereits in geringer Konzentration messbare Signale aufweisen.

Die Gruppe der zyklischen Hydroxylamine erfüllt diese Voraussetzungen. Allerdings muss dabei auf die Analyse unterschiedlicher Radikale verzichtet werden.

Zyklische Hydroxylamine ermöglichen einen unspezifischen Radikalnachweis, indem durch die Reaktion mit den Radikalen stabile Nitroxide ohne  $H_{\alpha}$ -Atome gebildet werden.

Diese Nitroxide weisen eine relativ hohe Halbwertszeit auf und werden *in-vivo* deutlich langsamer abgebaut.

Die Reaktion von zyklischen Hydroxylaminen mit dem Superoxid-Anion  $O_2^{\cdot-}$  verläuft beispielsweise 100-fach schneller als mit Nitroxid-*Spin-traps* und zur erfolgreichen *in-vivo*-Radikaldetektion genügen bereits Konzentrationen von 0.1 mM [www.enzolifesciences.com].

Die zyklischen Hydroxylamine werden allgemein als *Spin probes* bezeichnet und sind in verschiedensten Verbindungen erhältlich, wodurch Lipophilie, Membranpermeabilität und Ladung der *Spin probe* an die Untersuchungsbedingungen angepasst werden können.

Untersuchungen zum allgemeinen Radikalnachweis durch medizinische Behandlungen innerhalb von Zellen sollten daher unter Verwendung einer geeigneten *Spin probe* wiederholt werden.

Die Durchführung entsprechender Messreihen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, werden aber von unseren Kooperationspartnern am UKS in Betracht gezogen.

**Teil III.**

**Anhang**





# 11. Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind im Anhang 12 aufgeführt.

## 11.1. Methoden

### 11.1.1. Methoden für die Untersuchungen des Maltose bindenden Proteins

Die gesamten biologischen Arbeiten mit *E. coli*-Zellen wurden auf der Sterilbank unter sterilen Konditionen durchgeführt. Der Arbeitsplatz wurde hierbei mit 70 %-Ethanol-Lösung gereinigt und desinfiziert, alle Arbeitsgefäße wurden autoklaviert.

Die Durchführung der folgenden grundlegenden Arbeitsmethoden wird als bekannt vorausgesetzt und kann unter anderem in meiner Diplomarbeit [Selmke, 2013] nachgelesen werden:

- Agarose-Gelelektrophorese
- Ansatz der Klein- und Großkulturen
- Affinitätschromatographie mit der Amylose-Resin-Säule
- BCA-Test
- Dialyse
- Drop-Dilution
- Plasmidpräparation (Mini-, Midi- und Maxiprep)
- Proteinkonzentration von MBP
- SDS-PAGE
- Zellysatextraktion (French Press)
- Zelltransformation XL1-Blue

- ANS-Fluoreszenz-Messung:
  - Zuerst wird die 67 mM ANS-Stammlösung für die spätere Verwendung angesetzt und bei -20 °C gelagert.
  - Dann wird die Messprobe mit einer Konzentration von 1 µM Protein vorbereitet.
    - \* 101.75 /  $c_{MBP}$  ad 2470 µl CGH10
    - \* 5 µl CGH10 bzw. 100 mM Maltose-Lösung (in CGH10)  
für – und + MAL Proben
    - \* ANS-Stammlösung 1 : 6.7 mit CGH10 verdünnt ansetzen
    - \* Zugabe von 25 µl ANS-Lösung und 3 Stunden inkubieren
  - Zu Beginn der Messung wird die reine 0.1 mM ANS-Lösung als Blank gemessen und das Anregungs- sowie Emissionsmaximum ermittelt.  
Messparameter:
    - \* Average of Scans: 4
    - \* Excitation wavelenght: 288 nm
    - \* Measured wavelenght: 420- 550 nm
  - Nach jeder Messung wird die Quarz-Küvette mit Aceton gespült und im Anschluss gründlich mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gespült.  
Acetonreste in der Küvette sorgen für eine starke Intensivierung des gemessenen ANS-Signals und würden zu einer deutlichen Verfälschung des Ergebnisses führen.
  - Die Einstellung der Spaltbreite (*Slit*) wird bei jeder Messung notiert und bei Bedarf angepasst, sämtliche andere Parameter bleiben während der gesamten Messreihe konstant.  
Bei dem verwendeten Spektrometer wird die Spaltbreite halbiert und die Messung wiederholt, sobald die Intensität innerhalb der Messung einen Wert von 500 übersteigt. Eventuelle Anpassungen der Spaltbreite müssen bei der Auswertung der Spektren berücksichtigt werden!
- Entfernung der Maltose und sonstiger Zucker von MBP:
  - Die MBP-Lösung zur Entfaltung mit einer 6- 8 M Konzentration von Harnstoff im ASP1 Puffer versetzen
    - \* Die Proteinkonzentration sollte dabei 2 mg/ml nicht überschreiten
    - \* Quelle [Reichenwallner, 2011] belegt, dass eine 6 M Harnstoff-Lösung zur Entfaltung ausreicht
  - Dialyse in TNC-6U
  - Tropfenweise Verdünnung mittels Drop-Dilution in 1 : 12 Verdünnung
  - Lösung auf ursprüngliches Volumen konzentrieren
  - Dialyse in TNC
  - MBP-Lösung zur Lagerung bei -20 °C einfrieren und lagern

- MALDI-Messung:

- Für den Ansatz der MALDI Proben wird entsprechend der vorhandenen Erfahrungswerte für das Maltose bindende Protein eine 1 : 1 Mischung der 2 mg/ml MBP-Proteinlösung (in TNC pH 7) mit der 10 mg/ml DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure) Matrix verwendet. Auf den Einsatz einer speziellen Spitze zur Konzentration der Probe wird verzichtet.

Zu Beginn wird der MALDI-Probenträger (Platte) für 20 Minuten im Ultraschallbad auf höchster Stufe gereinigt und somit restliche Probenrückstände entfernt. Im Anschluss wird die Platte mit  $H_2O_{dd}$  gespült und abgetrocknet.

Es werden 1  $\mu$ l Probe mit 1  $\mu$ l Matrix in einem PCR-Tube vermengt, mehrfach resuspendiert und dreimal 0.5  $\mu$ l in einen Probenbereich auf die MALDI-Platte aufgetragen und für mindestens 15 Minuten bei RT getrocknet, so dass sich die Probe vollständig kristallisiert.

- Die Platte wird im Anschluss in das MALDI-Spektrometer eingeführt, die Stickstoffzufuhr geöffnet und abgewartet, bis sich das benötigte Vakuum in der Probenkammer gebildet hat.

Der Status des Geräts und die Einstellungen zur Messung werden mit der zum Gerät gehörenden Bruker-Software “Flex Control” überwacht.

Als verwendete Methode wird der Standard “LP\_66kDa.par” geladen und als Suppressionsbereich der Matrix die “*Deflection*” < 20 kDa eingestellt.

Sobald alle Statusanzeigen bereit sind, kann die Kamera eingeschaltet werden und eine geeignete Stelle des Probenkristalls gesucht werden.

- Für die letztlich detektierten Spektren wird die Summe von 5 mal 50 Shots gebildet und dabei Messpunkte aus allen drei Probenbereichen derselben Probe verwendet.

- Mutagenese Phusion Protokoll:

- Es wird folgender Reaktionsansatz vorbereitet

- \* 10  $\mu$ l 5x HF Phusion buffer
- \* 50-200 ng dsDNA
- \* 2.5  $\mu$ l (10 pmol/ $\mu$ l) Primer 01
- \* 2.5  $\mu$ l (10 pmol/ $\mu$ l) Primer 02
- \* 1  $\mu$ l (10 mM jedes NTP Oligomers) dNTP Mix
- \* 1.5  $\mu$ l DMSO
- \* ad 50  $\mu$ l  $H_2O_{dd}$

- Anschließend werden 0.5  $\mu$ l (2 U/ $\mu$ l) Phusion HF Polymerase zugesetzt.

- Der Ansatz wird entsprechend Tabelle 11.1 im PCR-Sprinter behandelt und im Anschluss mit 1  $\mu$ l DpnI Restriktionsenzym für mindestens 3 Stunden bei 37 °C verdaut.

- Zuletzt wird die Probe in NEB<sup>®</sup> 5-alpha kompetenten Zellen transformiert.

**Tab. 11.1:** *PCR-Cycling* Sequenz im Phusion Protokoll

| Phase | Wiederholung | Temperatur | Dauer                                 |
|-------|--------------|------------|---------------------------------------|
| 1     | 1            | 98 °C      | 60 Sekunden                           |
| 2     | 20           | 98 °C      | 30 Sekunden                           |
|       |              | 55-72 °C*  | 45 Sekunden                           |
|       |              | 72 °C      | 30 Sekunden pro Kilobasenpaar Plasmid |
| 3     | 1            | 72 °C      | 07 Minuten                            |

\*Temperatur an die Eigenschaften der verwendeten Primer anpassen.

- Mutagenese Quick Change Protokoll:

- Die Mutagenese wurde entsprechend der Anleitung des “Quick Change<sup>®</sup> II XL, Site-Directed Mutagenesis Kit” durchgeführt [Stratagene, 2004].

Die Funktionalität der verwendeten ultrakompetenten XL10-Gold<sup>®</sup> Zellen wurde durch direktes Aliquotieren der Zellsuspension in tiefgekühlte Reaktionsgefäße und direktes Schock-frieren in flüssigem Stickstoff gewährleistet.

Das zu mutierende Plasmid und die Oligonukleotid-Primer (*Costum Oligos*, *Synthesized by MWG/Operon*) wurden so verdünnt, dass jeweils 1 µl Lösung benötigt wird.

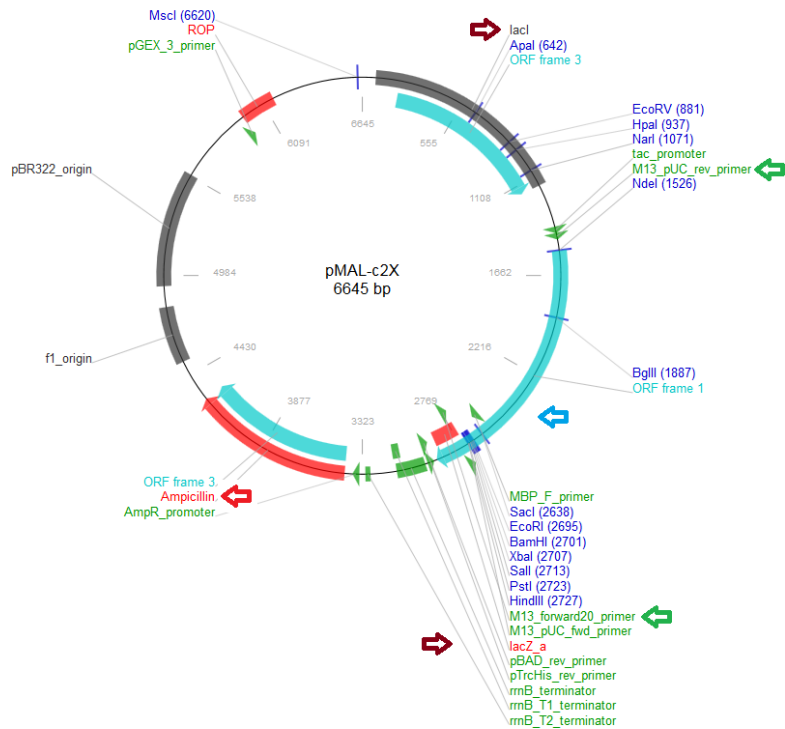
Die im PCR-Sprinter verwendete Wiederholungssequenz ist Tabelle 11.3 zu entnehmen

**Tab. 11.3:** *PCR-Cycling* Sequenz im Quick Change Protokoll

| Phase | Wiederholung | Temperatur | Dauer       |
|-------|--------------|------------|-------------|
| 1     | 1            | 95 °C      | 60 Sekunden |
| 2     | 18           | 95 °C      | 60 Sekunden |
|       |              | 60 °C      | 50 Sekunden |
|       |              | 68 °C      | 10 Minuten  |
| 3     | 1            | 68 °C      | 07 Minuten  |

- Primer-Design:

- Die Primer wurden gemäß den “Quick Change<sup>®</sup> II XL Site-Directed Mutagenesis Kit” “Primer Design Guidelines” und mit Hilfe des Programms “Clone Manager Suit 9.0” designt. Als Grundlage der Mutation stand der Vektor pMAL c2x: P298C zur Verfügung. Zur besseren Übersicht wird der Vektor pMAL c2x in Abbildung 11.1 dargestellt. In der Abbildung sind neben der Ampicillin-Resistenz (Hellrot) und der MBP-Sequenz (Hellblau) die drei Primer-Positionen des “Tac-Promotors”, des “M13\_rev(-48)” Primers und des “M13\_for” Primers dargestellt. Die Primer stellen hierbei einen Ansatzpunkt für die Kontroll-Untersuchung mittels Sequenzierung der erfolgreichen Mutagenese dar.



**Abb. 11.1:** Vektorkarte pMAL c2x [www.neb.com]

Dunkelrot: Lac-Operon  
 Grün: Verwendete Primer  
 Hellblau: MBP-Sequenz  
 Hellrot: Ampicillin Resistenz

• Spin-labeling von MBP:

- Ca. 7.5 mg Protein in einen lichtgeschützten Behälter geben
- Die Proteinlösung auf 10 mM DTT mit 100 mM DTT Stammlösung verdünnen
- 3 Stunden mit 6 rpm inkubieren
- Lösung auf 5-6 ml mit SL1-Puffer verdünnen
- Die Probe in SL1-Puffer in lichtgeschützten Gefäßen dialysieren
- Proteinkonzentration über BCA-Test bestimmen
- $V_{MTS}$  der MTS Stammlösung zusetzen
 
$$* V_{MTS} = \frac{c_{MBP}(mg/ml) * V(ml) * \ddot{U}}{M_{MBP}(mg/mol) * c_{MTS}(mol/L)} ; \ddot{U} = 3$$
- Lösung über Nacht (ca. 14-16 Stunden) bei 2 rpm inkubieren
- Probe in SL2-Puffer in lichtgeschützten Gefäßen dialysieren
- Mittels *cw*-ESR-Messung bei RT erfolgreiche Entfernung des freien MTS untersuchen und bei Bedarf erneut in SL2-Puffer dialysieren.

### 11.1.2. Methoden für die Radikalnachweisuntersuchungen

Bei sämtlichen Arbeiten mit EMPO wird auf sauerstoffarme Bedingungen geachtet.

Jedes nicht im Zelt entgaste Eppi oder Falcon wird vor Verwendung mit Argon geflutet/beschichtet. Argon ist schwerer als Luft und sinkt daher auf die Oberfläche der Lösungsmittel und verdrängt somit die dort vorhandene Luft, dadurch entsprechend auch den Luftsauerstoff.

Die verwendeten Puffer werden nach Möglichkeit im anaeroben Zelt entgast und anschließend mit Argon-Atmosphäre verschlossen.

Bei den Arbeiten mit Eppis und Mikrokapillaren wird das Winesave<sup>TM</sup> System verwendet um einen schwachen und konstanten Argon Fluss zu erhalten.

Allgemein wird darauf geachtet diese Schutzatmosphäre durch pipettieren möglichst wenig zu beschädigen und bei Bedarf zu erneuern.

Beim Umgang mit den Proben und der EMPO-Stammlösung wird darauf geachtet, die Proben bei längeren Wartezeiten in  $LN_2$  zu lagern und erst direkt für die ESR-Messungen aufzutauen.

Um das Auftauen und Einfrieren der Stammlösung zu minimieren wird immer die komplette Probenreihe vorbereitet und in jeweils einem Durchgang pipettiert. Jede einzelne Probe wird direkt in  $LN_2$  schockgefroren und gelagert.

Zum Transport und der längeren Lagerung der Proben wird der “*dry-LN<sub>2</sub>-shipper*” verwendet und regelmäßig  $LN_2$  nachgefüllt. Für den Transport der Box wird darauf geachtet, dass überschüssiges  $LN_2$  abgekippt wurde.

- Aufreinigung des EMPO:
  - Ein 20 ml Spitzkolben (SK) wird über den Rotationsverdampfer bei 40° C im Wasserbad und bei maximalem Unterdruck getrocknet
  - Das Gewicht des SK wird direkt im Anschluss über eine Feinwaage bestimmt und festgehalten
  - Der SK wird bis zur Verwendung mit Parafilm versiegelt
  - Es werden 125 % der benötigten EMPO-Menge aus Kombination von vorhandener restlicher Stammlösung und des synthetisierten EMPO-Vorrats im SK vermengt und erneut im Roti langsam und vollständig getrocknet.
  - Es werden 3 Eppis mit jeweils 7 mg Aktivkohle vorbereitet und bei 4° C im Thermomixer vorgekühlt
  - Das gelbe Öl wird in 1 ml Methanol durch mehrfaches Resuspendieren aufgenommen und in eines der Eppis überführt
  - Der Kolben mit 200 µl Methanol gespült und das Methanol ebenfalls hinzugegeben

- Es folgen drei Reinigungsschritte
    - \* Die Lösung wird für 10 Minuten bei 4° C und 300 rpm inkubiert
    - \* Die Kohle wird im Anschluss abzentrifugiert
    - \* Der Überstand wird ohne Kontakt mit der Kohle abgenommen und in das nächste Eppi überführt
  - Währenddessen wird der SK gründlich gereinigt und erneut im Roti getrocknet
  - Die gereinigte Methanol-Lösung wird in den SK überführt und das Methanol im Roti abgezogen
  - Der Kolben wird gewogen, mit Parafilm versiegelt und in das  $N_2$ -Zelt geschleust
  - Die benötigte Puffermenge wird berechnet und die Stammlösung entsprechend 11.2.2 angesetzt.
- Entgasen der Puffer:
    - Die Puffer werden über Nacht in geöffneten Behältern im anaeroben Zelt inkubiert und anschließend jedes Falcon für mindestens 30 Minuten mit  $N_2$ -Gas geblubbert.
- Probenhandling:
    - Die verwendete Mikrokapillare wird vor Einsatz mit Argon geflutet und direkt darauf verschlossen gehalten, bis sie in Kontakt mit der Probe kommt und diese über Kapillarkräfte aufzieht.  
Sobald die Kapillare genügend weit gefüllt ist wird sie mit einem für ESR-Spektroskopie geeigneten *Critoseal* verschlossen, millimeterweise in  $LN_2$  schockgefroren und bis zur Messung gelagert.
- Reinheitskontrolle der EMPO-Lösung:
    - Zur Kontrolle der Reinheit werden sowohl die reine auf 20 mM verdünnte Stammlösung (PP) sowie ein frischer Fenton-Ansatz (Fn) als Positivkontrolle vermessen
      - \* PP: 2  $\mu$ l EMPO-Stammlösung werden in 18  $\mu$ l  $PP_{entgast}$  pipettiert
      - \* Fn: Je 500  $\mu$ l Lösung 1 und 2 vermengen, 2 Minuten warten und 18  $\mu$ l dieses Ansatzes für 2  $\mu$ l EMPO-Stammlösung vorlegen
    - Proben in einer 25  $\mu$ l Kapillare aufnehmen, mit Siegelwachs (*Critoseal*) verschließen und bis zur Messung in  $LN_2$  lagern
    - Die Probe gilt als rein wenn kaum ein Signal für PP und ein deutliches, relativ ungestörtes 4-Linien-Spektrum für Fn detektiert werden kann.

## 11.2. Ansatz der Stammlösungen

### 11.2.1. Stammlösungen für die Untersuchung des Maltose bindenden Proteins

- Ampicillin Stammlösung:
  - 1.0 g Ampicillin-Natriumsalz ad 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> vortexen
  - Über 0.20 µm Filter filtrieren
  - Zu jeweils 1 ml in Eppis aliquotieren
  - Bei -20 °C lagern
- ANS-Stammlösung:
  - 20 mg ANS in einem lichtgeschützten Eppi abwiegen
  - 1 ml DMF hinzugeben
  - 20 Min. bei 20 °C und 350 rpm im Thermomixer inkubieren
  - Bei -20 °C für maximal 2 Monate lagern
- ASP1-Waschpuffer (Amylose-Resin-Säule):
  - 2.423 g Tris (20 mM) und
  - 11.688 g NaCl (200 mM) auf 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen
  - pH 7.4 mit 37 % Salzsäure (HCl) einstellen
    - \* (ca. 1.5 ml HCl-Lösung auf 1 L auffüllen)
  - Lösung über Wasserstrahlpumpe filtrieren (Filtergröße 0.22 µm)
  - Bei 4 °C lagern
- ASP2-Elutionspuffer (Amylose-Resin-Säule):
  - 2.423 g Tris (20 mM) und
  - 1.461 g NaCl (25 mM) und
  - 3.603 g Maltosemonohydrat (10 mM) auf 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen
  - pH 7.4 mit 37 % HCl einstellen (ca. 1.5 ml)
  - Lösung auf 1 L auffüllen
  - Lösung über Wasserstrahlpumpe filtrieren (Filtergröße: 0.22 µm)
  - Bei 4 °C lagern
- CGH5-Dialysepuffer:
  - 0.736 g Natriumcitrat (5 mM)
  - 0.188 g Glycin (5 mM)
  - 0.596 g HEPES (5 mM) auf 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen
  - pH-Werte je nach Bedarf einstellen
  - Bei 4 °C lagern, wenige Wochen bei RT haltbar



- DTT Stammlösung:
  - 0.3085 g DTT (bei -20 °C gelagert) in 20 ml autoklaviertem H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> vortexen
  - Lösung steril filtrieren
    - \* (Filter 0.20 µm) ; (Spritzenaufsatz-Filter: non-pyrogenic, steril-R)
  - Lösung jeweils zu 1 ml in Eppis aliquotieren und bei -20 °C lagern
  
- Ellman Reaktionspuffer:
  - Es wird ein 0.1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 8 entsprechend 11.2.2 hergestellt
  - 1 mM EDTA hinzugeben
  - Puffer bis zur Verwendung bei 4 °C lagern
  
- IPTG Stammlösung:
  - 1.192 g IPTG (bei -20 °C gelagert) in 5 ml autoklaviertem H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> vortexen
  - Lösung steril filtrieren
    - \* (Filter 0.20 µm) ; (Spritzenaufsatz-Filter: non-pyrogenic, steril-R)
  - Lösung jeweils zu 1 ml in Eppis aliquotieren und bei -20 °C lagern
  
- LB-Medium:
  - 12.5 g LB-Medium in 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen
  - Autoklavieren
  - Versiegeln und bei 4 °C lagern.
  
- LB-Agar-Agar-Platte:
  - 12.5 g LB-Medium und
  - 7.5 g Agar-Agar in 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen
  - Autoklavieren
  - Abkühlen bis ca. 40 °C, dann 500 µl Ampicillin (0.29 M) hinzugeben
  - Lösung in Petrischalen verteilen, so dass diese zu 1/3 - 1/2 bedeckt sind (Ansatz reicht für ca. 20 Schalen)
  - Versiegeln und bei 4 °C lagern
  
- SDS-Sammelgelpuffer:
  - 1 g SDS (14 mM) und
  - 15.15 g (0.5 M) Tris auf 230 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen
  - pH 6.8 mit 37% Salzsäure (HCl) einstellen
  - Lösung auf 250 ml auffüllen
  - Bei 4 °C lagern

- SDS-Trenngelpuffer:
  - 1 g SDS (14 mM) und
  - 45.5 g Tris (1.5 M) auf 230 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen
  - pH 8.8 mit 37 % Salzsäure (HCl) einstellen
  - Lösung auf 250 ml auffüllen
  - Bei 4 °C lagern
  
- SL1-Dialysepuffer (Spinlabel-(Schritt)1):
  - 2.38 g HEPES (10 mM) und
  - 29.44 g Kaliumacetat (300 mM) auf 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen
  - pH 6.7 mit 37 % Salzsäure (HCl) einstellen
  - Lösung auf 1 L auffüllen
  - Lösung über Wasserstrahlpumpe filtrieren (Filtergröße: 0.22 µm)
  - Bei 4 °C lagern, wenige Wochen bei RT haltbar
  
- SL2-Dialysepuffer (Spinlabel-(Schritt)2):
  - 2.38 g HEPES (10 mM) und
  - 29.44 g Kaliumacetat (300 mM) und
  - 1.072 g Magnesiumacetat-Tetrahydrat auf 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen
  - pH 6.7 mit 37 % Salzsäure (HCl) einstellen
  - Lösung auf 1 L auffüllen
  - Lösung über Wasserstrahlpumpe filtrieren (Filtergröße: 0.22 µm)
  - Bei 4 °C lagern, wenige Wochen bei RT haltbar
  
- SOC-Medium:
  - 3 Lösungen die erst vor Gebrauch vermengt werden!
    - \* Lösung 1:
      - 5 g Trypton 2 % (w/v) (20 g/l) und
      - 1.25 g Hefeextrakt 0.5 % (w/v) (5 g/l) und
      - 0.15 g Natriumchlorid (10 mM) und
      - 0.05 g Kaliumchlorid (2.5 mM) in 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen
      - Autoklavieren und bei 4 °C lagern
    - \* Lösung 2:
      - 2.033 g Magnesiumdichlorid-Hexahydrat (1 M)
      - 2.465 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat (1 M) auf 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen
      - Gründlich vortexen und bei -20 °C lagern
    - \* Lösung 3:
      - 1.806 g D-Glucose (1 M) auf 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen
      - Gründlich vortexen und bei -20 °C lagern

- Ansatz des SOC-Mediums:
  - \* Lösungen 2 und 3 bei RT auftauen und gründlich vortexen
  - \* 10 ml Lösung 1 mit 200 µl Lösung 3 und 100 µl Lösung 2 injizieren
  - \* gründlich invertieren und am selben Tag verwenden
- TB-Medium:
  - 25.4 g TB-Medium in 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen
  - 2 ml Glycerin hinzugeben
  - Autoklavieren
  - Versiegeln und bei 4 °C lagern
- TNC-Dialysepuffer (Tris-NaCl):
  - 2.423 g Tris (20 mM) und
  - 11.688 g NaCl (200 mM) auf 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen
  - pH 7.4 mit 37 % Salzsäure (HCl) einstellen
    - \* (ca. 1.5 ml HCl-Lösung pro Liter)
  - Lösung auf 1 L mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> füllen
  - Bei 4 °C lagern, wenige Wochen bei RT haltbar
- TNC-6U-Dialysepuffer (Tris-NaCl-Harnstoff):
  - 2.423 g Tris (20 mM) und
  - 11.688 g NaCl (200 mM) und
  - 360.36 g Harnstoff (6 M) auf 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auffüllen
  - pH 7.4 mit 37 % Salzsäure (HCl) einstellen
    - \* (ca. 1.5 ml HCl-Lösung pro Liter)
  - Lösung auf 1 L mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> füllen
  - Bei 4 °C lagern, wenige Wochen bei RT haltbar

### 11.2.2. Stammlösungen für die Radikalnachweisuntersuchungen

- EMPO-Stammlösung (200 mM):
  - EMPO wird wie im Methodenabschnitt 11.1.2 beschrieben aufgereinigt
  - Der Ansatz der EMPO-Stammlösung erfolgt unter anaeroben Bedingungen im  $N_2$ -Zelt
  - In einem Eppi werden 18  $\mu\text{l}$   $\text{PP}_{\text{entgast}}$  für die spätere Kontrollmessung vorbereitet
  - Das leicht gelbe Öl wird vorsichtig in ca. 70-80 % der Gesamtpuffermenge im Kolben durch mehrfaches Resuspendieren gelöst und in ein lichtgeschütztes Eppi überführt
  - Die restliche Puffermenge wird verwendet um den Kolben erneut auszuspülen und ebenfalls in das Eppi überführt, um die EMPO-Verluste weitestgehend zu reduzieren
  - Pro 1 mg aufgereinigtes EMPO werden 25  $\mu\text{l}$   $\text{PP}_{\text{entgast}}$  verwendet
  - 2  $\mu\text{l}$  der EMPO-Lösung werden in den Ansatz für die Kontrollmessung pipettiert
  - Die Eppis werden unter anaeroben Bedingungen verschlossen und in  $LN_2$  gelagert
  - Die Reinheit der EMPO-Stammlösung wird direkt mittels *cw*-ESR-Spektroskopie kontrolliert, siehe Methodenabschnitt 11.1.2, gegebenenfalls muss die Aufreinigung wiederholt werden
  - Die reine Stammlösung wird vorsichtig auf dem  $LN_2$  genommen und direkt beim Öffnen mit Argon-Gas aus der Winesave-Apparatur geflutet. Dadurch wird das Oxidationsrisiko der Stammlösung gesenkt und somit die Haltbarkeit der Lösung erhöht.
  - Die Probe wird in  $LN_2$  gelagert
- 20 %ige Ethanollösung (EtOH):
  - 200 ml Ethanol absolut ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$  auffüllen
  - Lösung bei RT im Sicherheitsschrank bei RT lagern
- Fenton-Ansatz (Fn):
  - Lösung 1 (0.3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung):
    - \* 255  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung ( $\sim 30\%$ ) ad 25 ml  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$
    - \* Haltbarkeit: 2 Tage in abgeschlossenem Falcon
  - Lösung 2 (10 mM Am-Fe(II) ):
    - \* 84 mg Ammonium-Eisen(II)-sulfat-6-hydrat ad 25 ml  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$
    - \* Täglich frisch ansetzen
  - Direkt vor der Messung 1 : 1 vermengen und kurz resuspendieren

- HEPES-Puffer:
  - 5.958 g HEPES (25 mM) mit 900 ml  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$  lösen
  - den pH-Wert 7.4 einstellen
  - ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$  füllen und steril filtrieren
  - Bei 4 °C lagern, wenige Wochen haltbar
  
- HEPES-NaCl-Puffer:
  - 5.958 g HEPES (25 mM) und
  - 11.688 g NaCl (200 mM) mit 900 ml  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$  lösen
  - den pH-Wert 7.4 einstellen
  - ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$  füllen und steril filtrieren
  - Bei 4 °C lagern, wenige Wochen haltbar
  
- Isotonische NaCl-Lösung (Iso-NaCl):
  - 9 g NaCl (154 mM) ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$  lösen
  - Lösung steril filtrieren
  - Bei 4 °C lagern, einige Wochen haltbar
  
- Natrium-Phosphatpuffer (PP):
  - Es werden 0.5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$  und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Stammlösungen angesetzt und entsprechend des gewünschten pH-Werts vermengt.
    - \*  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung: 7.1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ad 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$
    - \*  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung: 6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ad 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$
  - Ansatz PP pH 8: 93.2 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 6.8 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ad 500 ml  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$  (pH 8.0)
  - Ansatz PP pH 4: 100 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ad 500 ml  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$  (entspricht pH 4.15 - 4.2)
  
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):
  - 8 g NaCl (137 mM) und
  - 0.2 g KCl (2.7 mM) und
  - 1.42 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.27 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (12 mM) ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$
  - Gegebenenfalls den pH-Wert 7.4 einstellen
  - Lösung steril filtrieren
  - Bei 4 °C lagern, wenige Wochen haltbar
  
- Tris-NaCl-Pufferlösung (TBS):
  - 6.057 g Tris (50 mM) und
  - 11.688 g NaCl (200 mM) und mit 900 ml  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$  lösen
  - den pH-Wert 7.4 einstellen
  - ad 1 L  $\text{H}_2\text{O}_{dd}$  füllen und steril filtrieren
  - Bei 4 °C lagern, wenige Wochen haltbar

- Tris-NaCl-Tween20-Pufferlösung (TBS-T):
  - 6.057 g Tris (50 mM) und
  - 11.688 g NaCl (200 mM) mit 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen
  - den pH-Wert 7.4 einstellen
  - 20 mM Polysorbat-20 (Tween 20) hinzugeben
  - ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> füllen und steril filtrieren
  - Bei 4 °C lagern, wenige Wochen haltbar

# 12. Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

## 12.1. Chemikalien

|                                    |                                |
|------------------------------------|--------------------------------|
| 2-Mercaptoethanol                  | Merck, Darmstadt               |
| 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure  | Sigma Aldrich, USA             |
| Aktivkohle                         | Sigma Aldrich, USA             |
| Ammonium-Eisen(II)-sulfat-6-hydrat | Riedel-de Haen, Seelze         |
| Ampicillin-Natriumsalz             | Roth, Karlsruhe                |
| Amylose-Resin                      | New England BioLabs, Frankfurt |
| APS                                | Sigma Aldrich, USA             |
| ANS                                | Sigma Aldrich, USA             |
| Agar-Agar Kobe I                   | Roth, Karlsruhe                |
| Bromphenolblau                     | Fluka, USA                     |
| BCA-Standard & Reagenz             | Interchim, Uptima              |
| BSA-Standard                       | Interchim, Uptima              |
| Cystein-Hydrochlorid Monohydrat    | AppliChem, Darmstadt           |
| D-(+)-Maltose-Monohydrat           | Roth, Karlsruhe                |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat          | AppliChem, Darmstadt           |
| Di-Natriumhydrogenphosphat         | Merck, Darmstadt               |
| DMF                                | Roth, Karlsruhe                |
| DMSO                               | Sigma Aldrich, USA             |
| DTT                                | GERBU Biotechnik               |
| EDTA                               | AppliChem, Darmstadt           |
| Ethanol, abs.                      | AppliChem, Darmstadt           |
| Ethanol, tech.                     | Sigma Aldrich, USA             |
| Glycerin                           | Fluka, USA                     |
| Glycin                             | AppliChem, Darmstadt           |
| Guanidin-Hydrochlorid              | Roth, Karlsruhe                |
| Harnstoff                          | AppliChem, Darmstadt           |
| HCl                                | J.T Backer, Holland            |

|                                 |                              |
|---------------------------------|------------------------------|
| Hefeextrakt                     | AppliChem, Darmstadt         |
| HEPES                           | Roth, Karlsruhe              |
| IPTG                            | Roche Diagnostic, Mannheim   |
| Isopentan                       | AppliChem, Darmstadt         |
| Isopropanol, pur                | AppliChem, Darmstadt         |
| Isopropanol, tech.              | Sigma Aldrich, USA           |
| Kaliumacetat                    | AppliChem, Darmstadt         |
| Kaliumchlorid                   | Merck, Darmstadt             |
| L-Ascorbinsäure                 | Sigma Aldrich, USA           |
| LB-Medium                       | Roth, Karlsruhe              |
| L-Cystein                       | AppliChem, Darmstadt         |
| Magnesiumacetat-Tetrahydrat     | Merck, Darmstadt             |
| Methanol                        | Sigma Aldrich, USA           |
| MTS                             | K. Hideg, University of Pecs |
| Natriumchlorid                  | Roth, Karlsruhe              |
| Natriumcitrat                   | Sigma Aldrich, USA           |
| Natriumdihydrogenphosphat       | Merck, Darmstadt             |
| PH-Eichpuffer                   | AppliChem, Darmstadt         |
| Protein-Marker III              | AppliChem, Darmstadt         |
| SDS                             | ICN Biomedicals              |
| <i>TB</i> -Medium               | Roth, Karlsruhe              |
| TEMED                           | AppliChem, Darmstadt         |
| Tris                            | AppliChem, Darmstadt         |
| Trypton                         | AppliChem, Darmstadt         |
| Tween <sup>®</sup> 20           | Sigma Aldrich, USA           |
| Wasserstoffperoxid 30 % (stab.) | AppliChem, Darmstadt         |



## 12.2. Gentechnische Arbeitsmaterialien

### 12.2.1. Chemikalien

|                                     |                                       |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| DMSO                                | Sigma Aldrich, USA                    |
| Oligonukleotid-Primer               | Eurofins MWG Operon, Ebersberg        |
| Purple Gel-Ladepuffer               | New England BioLabs, Frankfurt        |
| Phusion <sup>®</sup> -HF Puffer     | New England BioLabs, Frankfurt        |
| Roti <sup>®</sup> -Mix PCR 3        | Roth, Karlsruhe                       |
| Quick Change <sup>®</sup> II XL Kit | Stratagene, Agilent Technologies, USA |

### 12.2.2. Enzyme

|                                     |                                       |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| BamHI                               | New England BioLabs, Frankfurt        |
| DpnI                                | New England BioLabs, Frankfurt        |
| Phusion <sup>®</sup> -HF Polymerase | New England BioLabs, Frankfurt        |
| Quick Change <sup>®</sup> II XL Kit | Stratagene, Agilent Technologies, USA |

### 12.2.3. Bakterienstämme

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| XL1 - Blue Competent Cells; 200249              | Stratagene, Agilent Technologies, USA |
| XL10 - Gold Ultracompetent Cells; 200314        | Stratagene, Agilent Technologies, USA |
| NEB <sup>®</sup> 5-alpha Competent Cells; C2987 | New England BioLabs, Frankfurt        |
| NEB <sup>®</sup> 10-beta Competent Cells; C3019 | New England BioLabs, Frankfurt        |

## 12.2.4. Primer

**Tab. 12.2:** Zur Punktmutation verwendete Primer

| Primer         | Sequenz (5'-3')                              |
|----------------|--|
| malE_N124C_for | GCTGCCGtgCCCGCCAAAAACC                       |
| malE_N124C_rev | GGCGGGcaCGGCAGCAGATCTTTG                     |
| malE_S233_1    | CGGCCCGTGGGCATGGTgCAACATCGACACCAGC           |
| malE_S233_2    | GGTGTCGATGTTGcACCATGCCACGGGCCGTTGATGGTCATCGC |
| malE_N234C_for | GGTCCtgCATCGACACCAGCAAAG                     |
| malE_N234C_rev | GGTGTCGATGcaGGACCATGCC                       |
| malE_D296C_for | GGAAGCGGTTAATAAAtgCAAACCTCTGG                |
| malE_D296C_rev | CGGCACCCAGAGGTTTgcATTTATTAACCG               |
| malE_C298P_for | GCGGTTAATAAAGACAAAcctCTGGGTGCCGTAG           |
| malE_C298P_rev | CGGCACCCAGaggTTTGTCTTTATTAACCG               |
| malE_K313C_for | GTTGGCGtgcGATCCACGTATTGC                     |
| malE_K313C_rev | GCAATACGTGGATCgcaCGCCAACTC                   |
| malE_R316_1    | GGCGAAAGATCCAtGTATTGCCGCCACC                 |
| malE_R316_2    | CCATGGTGGCGGCAATACaTGGATCTTTTCG              |

**Tab. 12.3:** Zur Sequenzierung verwendete Primer

| Primer           | Sequenz (5'-3')               |
|------------------|-------------------------------|
| M13_rev          | CAGGAAACAGCTATGAC             |
| M13_for          | GTAAAACGACGGCCAGT             |
| M13_pUC_rev(-48) | AGCGGATAACAATTTTCACACAGG      |
| pMAL_c5x_for     | ACTCAGGAGAGCGTTCAC            |
| Tac_Promotor     | TGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGT |
| T7_Promotor      | TAATACGACTCACTATAGGGAGA       |

### 12.3. Geräte

|                              |  |
|------------------------------|--|
| Autoklav                     | Systec, V-65, Wetztenberg  |
| Brutschrank                  | MEMmert  |
| ESR-Spektrometer             | Applied Systems engineering TWT Amplifier<br>1 KW Model no. 117X<br>BRUKER ELEXSYS E580 Electron<br>Paramagnetic Resonance Konsole<br>BRUKER Pulsed Microwave Bridge E580-1010<br>BRUKER E 580 - 400 U<br>BRUKER Netzteil ER 082 (155/45)  |
| ESR-Resonator                | BRUKER Flexline Resonator ER 4118X MD5<br>BRUKER Flexline Resonator ER 4118X MS3   |
| ESR-Tieftemperatureinheit    | Oxford Instruments Intelligent Temperature Controller ITC 503<br>Oxford Instruments Cryostat CF 935 Proj. 1836<br>Oxford Instruments Diaphragmapumpe GF3/VPZ0233<br>Oxford Instruments Helium-Transfertube LLT 600/13<br>Oxford Instruments Gasfluß-Kontrolleinheit VC 31<br>Vacuubrand Drehschieber-Vakuumpumpe RZ 6<br>Vacuubrand Digitales Manometer VAP5 |
| Gefrierschrank               | Sanyo MDF-U3086S Ultra Low<br>Sanyo MDF-U72V, Ultra Low  |
| Kühlschrank                  | Liebherr   |
| Magnetrührer                 | Janke und Kunkel IKA Motor KMO2  |
| MALDI-Spektrometer           | Bruker ultraflex TOF/TOF   |
| Mini-Electrophoresis-Systems | Bio-Rad, Mini-PROTEAN® Tetra Cell  |
| Minishaker                   | Retsch Mixer   |
| PCR Sprinter                 | Temperatur Cycling System Thermo Electron Corporation,<br>Hybiad Limited SPRT001   |
| pH-Meter                     | Mettler Toledo, Inlab® mirco   |
| Pipetten                     | Eppendorf Research plus<br>Brand Transferpipette®  |
| Pipettier-boy                | Pipettus Brand, Accu-jet® Pro  |

|                     |  |
|---------------------|--|
| Pumpe               | Pharmacia Biotech Pump P-1   |
| Schüttelgerät       | HT Infors AG, Bottmingen<br>New Brunswick Scientific, Innova 4000, Nürtinger<br>Thermo Scientific, MaxQ 400  |
| Software            | Accelrys Discovery Studio 2.5.5<br>Accelrys Discovery Studio 4.1 Visualizer<br>Bruker ELEXSYS Series: Xepr<br>Clone Manager Suite 9.0<br>Datred<br><i>DEER</i> Analysis 2013 & 2016<br>Dipfit2<br>Matlab® 2013<br>Microsoft® Office 2010<br>MMM 2015<br>SCRWL4 (4.0)<br>Visionlite® rate |
| Sterilbank          | Heraeus Instruments, Laminair® HB 2448   |
| Thermo-Mixer        | Eppendorf, Thermomixer comfort   |
| Trockenschrank      | Heraeus Instruments  |
| Ultraschallgerät    | Branson Sonic, Sonifier® B-12, Cell Disruptor  |
| UV/VIS-Spektrometer | Eppendorf, BioPhotometerplus<br>Thermoscientific Genesys 10 uv scanning<br>Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS 50B   |
| Waagen              | Sartorius Typ 1413<br>Sartorius analytic<br>Mettler Toledo, Xs205<br>DualRange Analytical Balance  |
| Zentrifugen         | Beckman® Model J2-21<br>Eppendorf, 5810 R Stuart Rotator SB3<br>Eppendorf, Centrifuge 5415C  |

## 12.4. Verbrauchsmaterialien

|   |  |
|---|--|
| Dialysierschlauch                               | Viking Cellulose, Typ 27/32 inch, Roth |
| Konzentratoren:                                 |  |
| Vivaspin 6 Polythersulfone, 10.000 <i>MWCO</i>  | Sartorius Stedim                       |
| Vivaspin 20 Polythersulfone, 10.000 <i>MWCO</i> | Sartorius Stedim                       |
| Macrosep <sup>®</sup> , 10kDA                   | Pall                                   |
| Küvetten:                                       |  |
| Einmal-Küvette                                  | Brand, Wertheim                        |
| Quarzküvette: 110-QS 01 mm mit Zertifikat       | Hellma <sup>®</sup> Analytics          |
| Quarzküvette: 110-QS 10 mm mit Zertifikat       | Hellma <sup>®</sup> Analytics          |
| UVette <sup>®</sup>                             | Eppendorf, Hamburg                     |
| Pipetten:                                       |  |
| Einmal-Mikropipette 10 µl                       | Brand, Wertheim                        |
| Einmal-Mikropipette 25 µl                       | Brand, Wertheim                        |
| Einmal-Mikropipette 50 µl                       | Brand, Wertheim                        |
| Omnifix <sup>®</sup> -F                         | B Braun, Melsungen                     |
| Pasteur-Pipetten, Glas 150 mm                   | Roth, Karlsruhe                        |
| Pasteur-Pipetten, Glas 230 mm                   | Roth, Karlsruhe                        |
| Pipette 5 ml Steril                             | Greiner Bio-one, Österreich            |
| Pipette 10 ml Steril                            | Greiner Bio-one, Österreich            |
| Pipettenspitzen                                 | Sarstedt, Nürnbergrecht                |
| Quarzkapillare Ø 3 mm                           | Eigenbau                               |
| Research Plus                                   | Eppendorf, Hamburg                     |
| Sterican <sup>®</sup>                           | B Braun, Melsungen                     |
| Transferpette <sup>®</sup> S                    | Brand, Wertheim                        |
| Reaktionsgefäße:                                |  |
| Reaktionsgefäß, 0.2 ml                          | Sarstedt, Nürnbergrecht                |
| Reaktionsgefäß, 0.5 ml                          | Eppendorf, Hamburg                     |
| Reaktionsgefäß, 1.5 ml                          | Sarstedt, Nürnbergrecht                |
| Reaktionsgefäß (lichtgeschützt), 1.5 ml         | Greiner Bio-one, Österreich            |
| Tube 50 ml, 115 x 28 mm, PP                     | Sarstedt, Nürnbergrecht                |
| Tube 15 ml, 120 x 17 mm, PP                     | Sarstedt, Nürnbergrecht                |

Steril Filter:

Filtropur S 0.2

Sarstedt, Nürnberg

Filtropur S 0.45

Sarstedt, Nürnberg

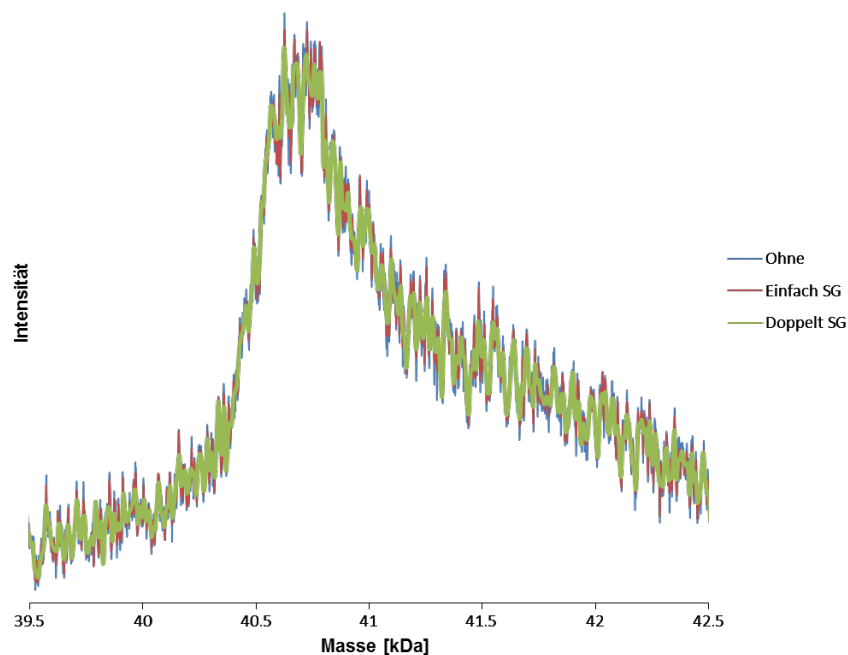
Winesave<sup>TM</sup>: 100 % reines Argon

Wein Total, Rodgau

# 13. Einfluss der Savitzky-Golay-Filterfunktion

Zur Darstellung des Einfluss der Savitzky-Golay-Filterfunktion werden exemplarisch die Messdaten der MALDI-Massenspektrometrie von MBP 01 verwendet.

Es wurde zweimal jeweils eine Polynomialglättung dritter Ordnung mit 7 Werten (Koeffizienten 7, 6, 3, -2) durchgeführt und in der Legende als EinfachSG und DoppeltSG bezeichnet.



**Abb. 13.1:** Darstellung der Savitzky-Golay-Filterfunktion

Man erkennt deutlich dass durch die Savitzky-Golay-Glättung als gewichtete, gleitende Mittelwertbildung verwendet werden kann und keinen Verschiebung oder Verzerrung der Maxima und Minima bewirkt.

Daher eignet sich diese Methode besonders bei der Reduzierung von Datenpunkten zur Reduktion des Informationsverlustes [W. Müller].





# 14. MD-Parameter

Die MD-Simulation wird unter der Software “Accelrys Discovery Studio 2.5.5” durchgeführt. Als Ausgangsstrukturen dienen dabei Röntgenstrukturdaten. Die Simulation erzeugt auf Basis des “CHARMm”-Kraftfelds.

Zur Simulation der Oberflächendynamik wurde ein teilweise explizites System verwendet. D.h. es wurde jeweils eine Wassersphere um die relevanten Bereiche gebildet und in einem impliziten WassermodeLL simuliert, in diesem Fall “Generalized Born with a simple Switching” (GBSW).

Es wurden folgende Fixierungen des Systems eingeführt um die Proteinstruktur zu fixieren, den Rechenaufwand zu minimieren und einen Fokus auf den relevanten Bereich zu legen:

- Fixed: Only Cys/MTS
  - Fixiertes Potential der kompletten Proteinstruktur inklusive etwaiger Liganden ohne Cystein und MTS
- Harmonic: Only Cys/MTS
  - Harmonisches Potential der kompletten Proteinstruktur inklusive etwaiger Liganden ohne Cystein und MTS
  - Harmonische Kraftkonstante: 8
- Harmonic: Hydrophob -Cys
  - Harmonisches Potential für alle hydrophoben Aminosäuren inklusive etwaiger Liganden ohne Cystein
  - Harmonische Kraftkonstante: 4
- Harmonic: Sphere
  - Harmonisches Potential für alle Wassermoleküle (Fixierung des expliziten Bereichs)
  - Harmonische Kraftkonstante: 0,2

Für die vollständige Energieminimierung des Systems wurden jeweils die ersten fünf Schritte der “SDC Final” durchgeführt, jedoch ohne die Fixierung “Harmonic: Sphere”.

Für die Molekulare Dynamik-Simulation “SDC Final” wurden folgende Parameter und Fixierungen für die endgültig und einheitliche Simulation aller Mutanten gewählt:

### Minimization:

Algorithm: Steepest Descent (für Start)  
Max Steps: 5000  
RMS Gradient: 0,01  
Energy Change: 0,0001  
Fix: Only Cys/MTS; Harmonic: Sphere

### Minimization:

Algorithm: Conjugated Gradient  
Max Steps: 10000  
RMS Gradient: 0,01  
Energy Change: 0,0001

### Minimization:

Algorithm: Adopted Basis NR  
Max Steps: 10000  
RMS Gradient: 0,0001  
Energy Change: 0,000001

### Minimization:

Algorithm: Adopted Basis NR  
Max Steps: 10000  
RMS Gradient: 0,0001  
Energy Change: 0,000001  
Fix: Harmonic: Only Cys/MTS; Harmonic: Sphere

### Minimization:

Algorithm: Adopted Basis NR  
Max Steps: 10000  
RMS Gradient: 0,0001  
Energy Change: 0,000001  
Fix: Harmonic: Hydrophob –Cys; Harmonic: Sphere

### Dynamics: Heating or Cooling:

Steps: 10000  
Time Step: 0,0005  
Initial Temp.: 1  
Target Temp.: 1000  
Adjust velocity: 50  
Save result frequency: 2000  
Fix: Harmonic: Hydrophob –Cys; Harmonic: Sphere

### Dynamics: Heating or Cooling:

Steps: 10000  
Time Step: 0,0005  
Initial Temp.: 1000  
Target Temp.: 5  
Adjust velocity: 50  
Save result frequency: 2000

### Dynamics: Heating or Cooling:

Steps: 10000  
Time Step: 0,0005  
Initial Temp.: 5  
Target Temp.: 1000  
Adjust velocity: 50  
Save result frequency: 2000

### Dynamics: Equilibration:

Steps: 10000  
Time Step: 0,0005  
Target Temp.: 1000  
Adjust velocity: 50  
Save result frequency: 2000

### Dynamics: Heating or Cooling:

Steps: 10000  
Time Step: 0,0005  
Initial Temp.: 1000  
Target Temp.: 5  
Adjust velocity: 50  
Save result frequency: 2000

### Dynamics: Heating or Cooling:

Steps: 4000  
Time Step: 0,0005  
Initial Temp.: 5  
Target Temp.: 300  
Adjust velocity: 50  
Save result frequency: 2000

### Dynamics: Equilibration:

Steps: 10000  
Time Step: 0,0005  
Target Temp.: 300  
Adjust velocity: 50  
Save result frequency: 2000

### Dynamics: Equilibration:

Steps: 10000  
Time Step: 0,001  
Target Temp.: 300  
Adjust velocity: 50  
Save result frequency: 2000

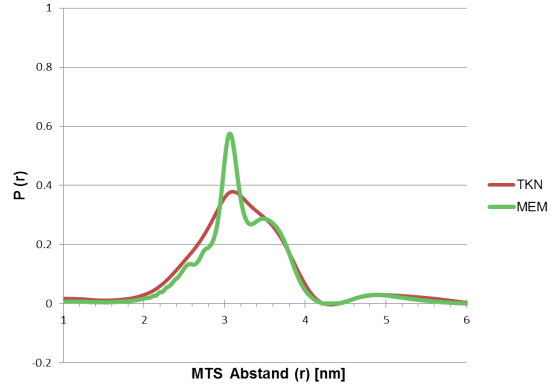
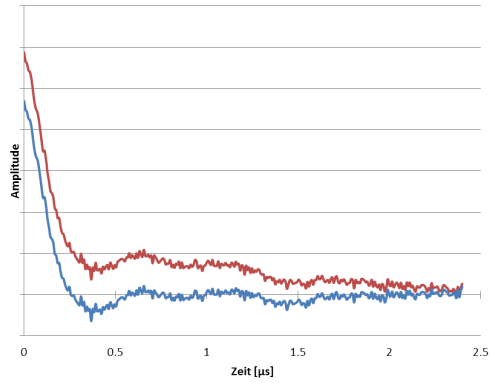
### Dynamics: Production:

Steps: 40000  
Time Step: 0,001  
Target Temp.: 300  
Adjust velocity: 50  
Coupling Decay Time: 5  
Save result frequency: 2000  
Production type: NVT  
Restart Save file: False

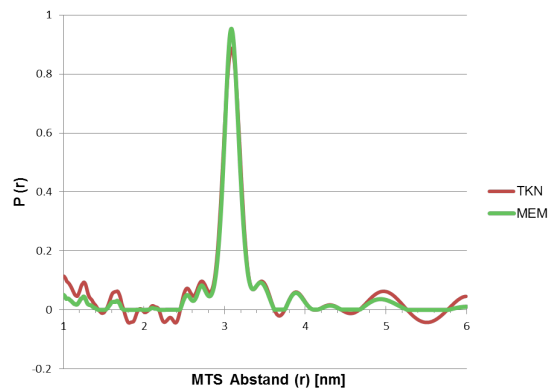
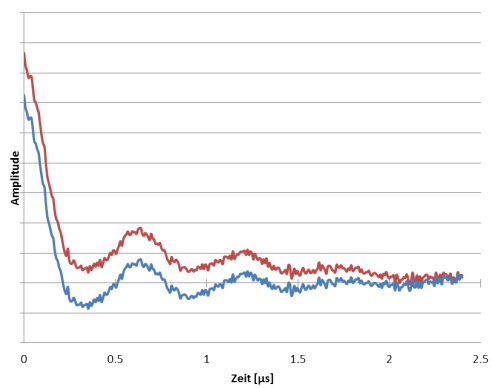
### SDC Parameters:

Implicit Solvation Model: GBSW  
Dielectric Constant: 1  
Implicit Solvent Dielectric Constant: 80  
Use non-polar Surface area: True  
Salt Concentration: 0  
Input atomic Radii: Van-der-Waals-radii  
Use Molecular Surface: True  
Non-bond list radius: 14  
Non-bond higher Cut-off distance: 12  
Non-bond lower Cut-off distance: 10  
Electrostatics: Spherical Cut-off  
Advanced:  
Dynamics Integrator: Leapfrog Verlet  
Apply SHAKE constraint: False  
Random Number Seed: 314159  
Number of Processors: 01

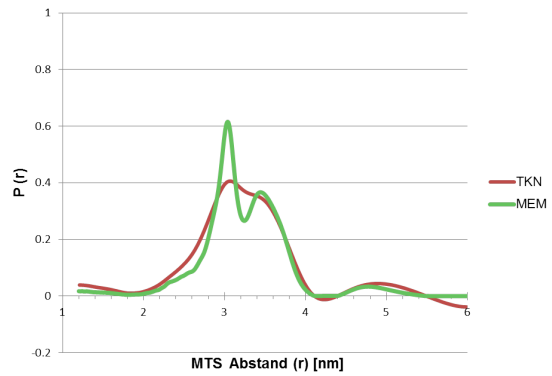
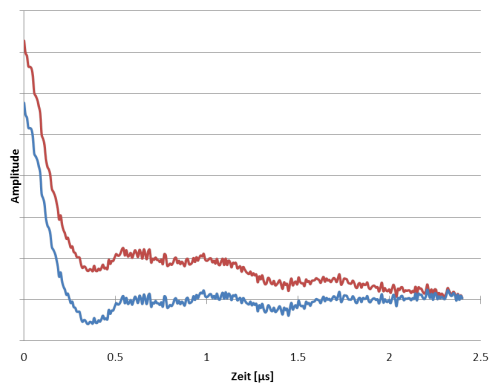
# 15. DQC-ESR-Spektren



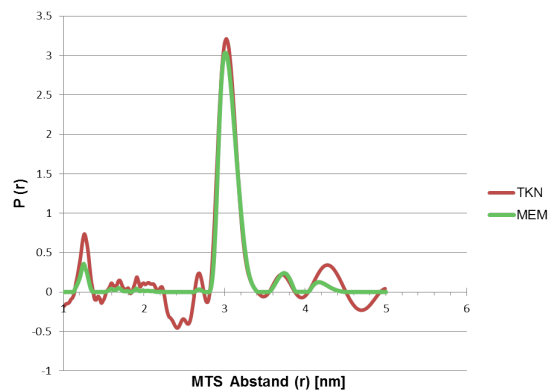
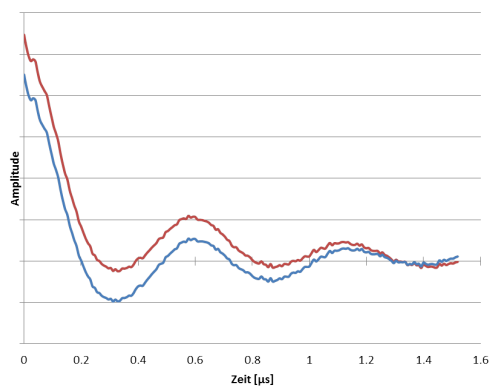
MBP 01 pH3 -MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



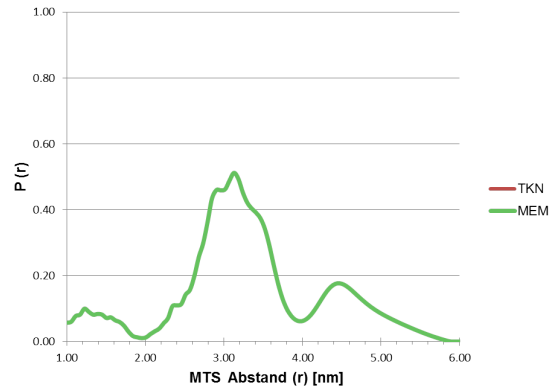
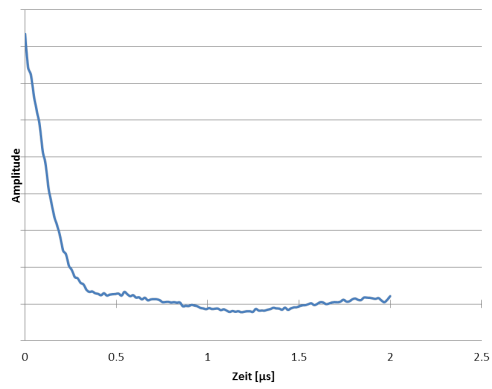
MBP 01 pH3 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



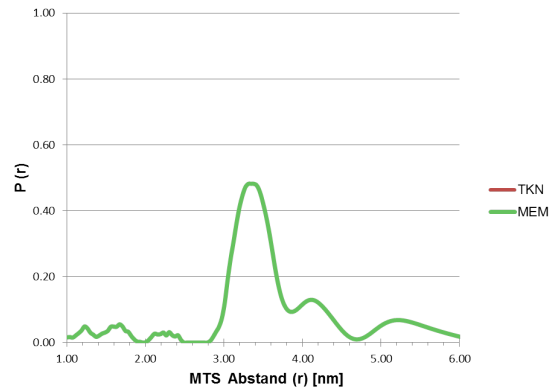
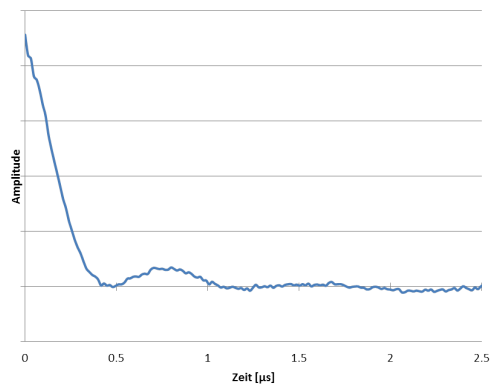
MBP 01 pH7 -MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



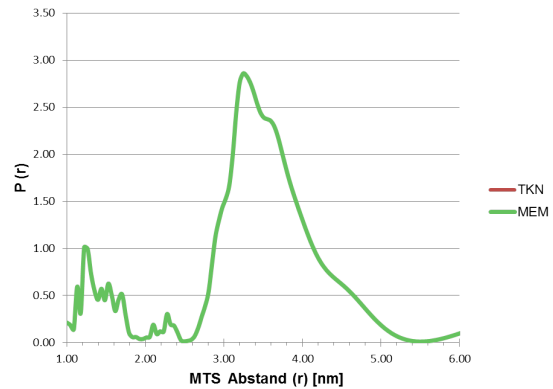
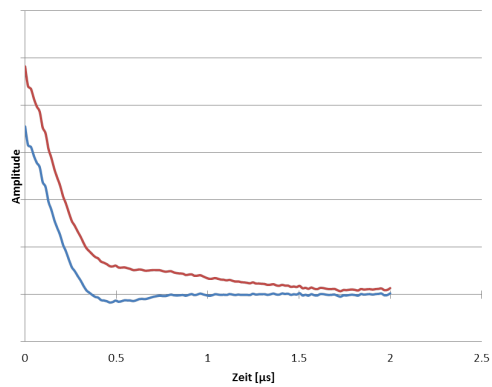
MBP 01 pH7 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



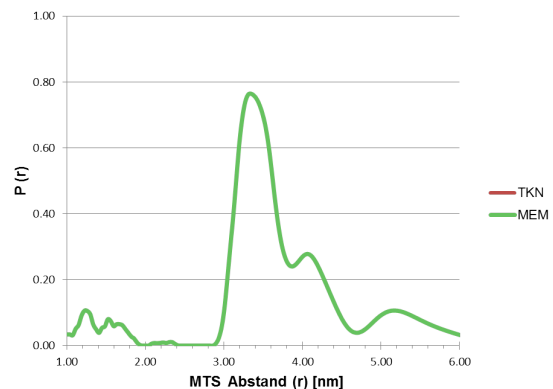
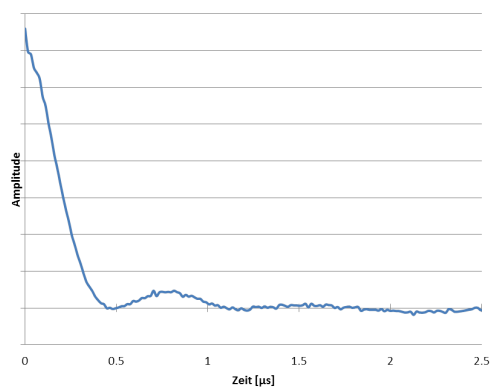
MBP 02 pH 3 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



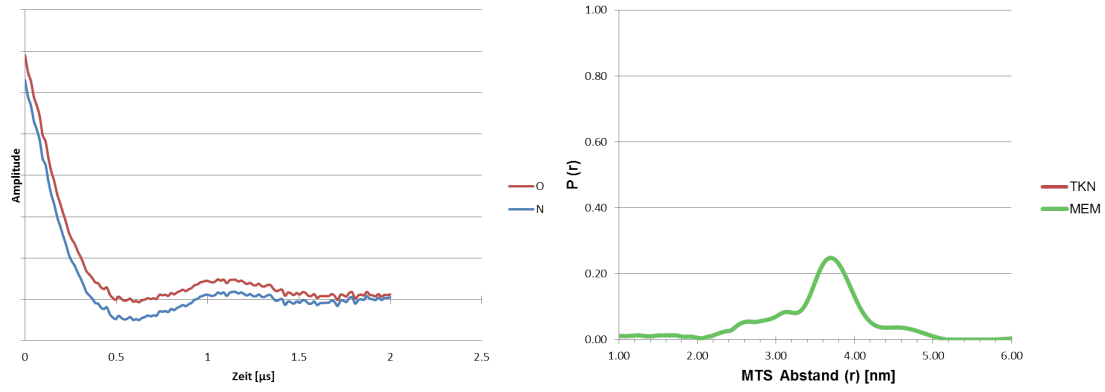
MBP 02 pH 3 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



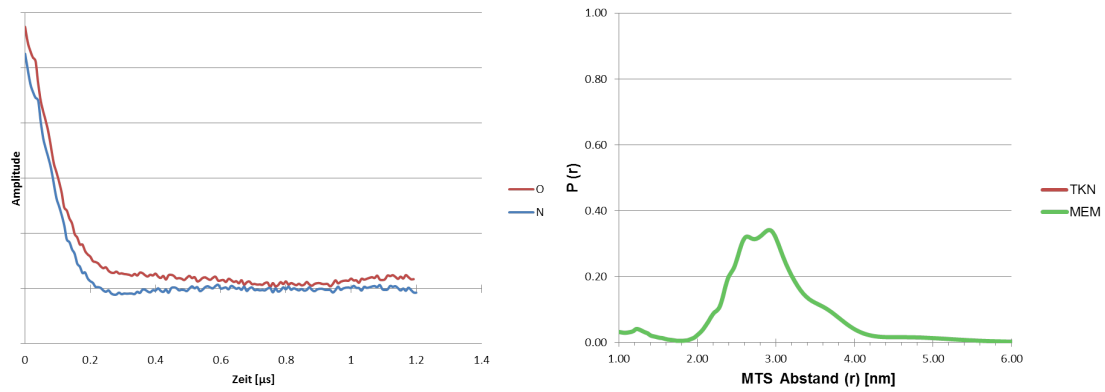
MBP 02 pH 7 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



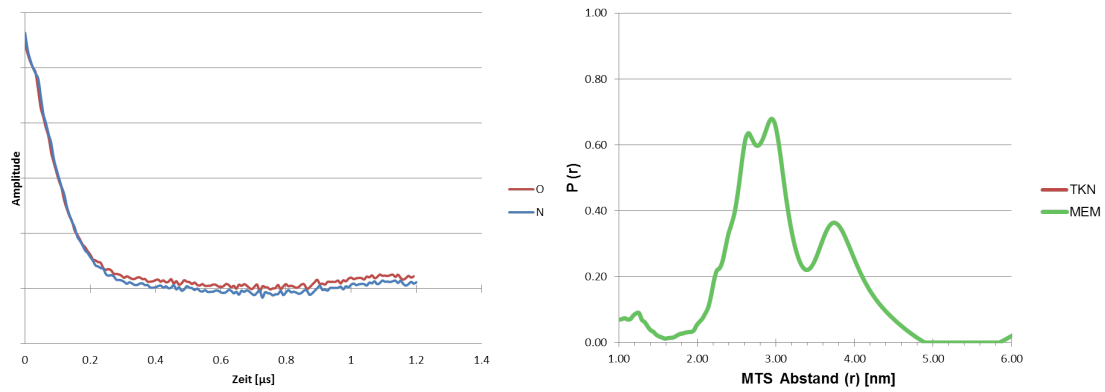
MBP 02 pH 7 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



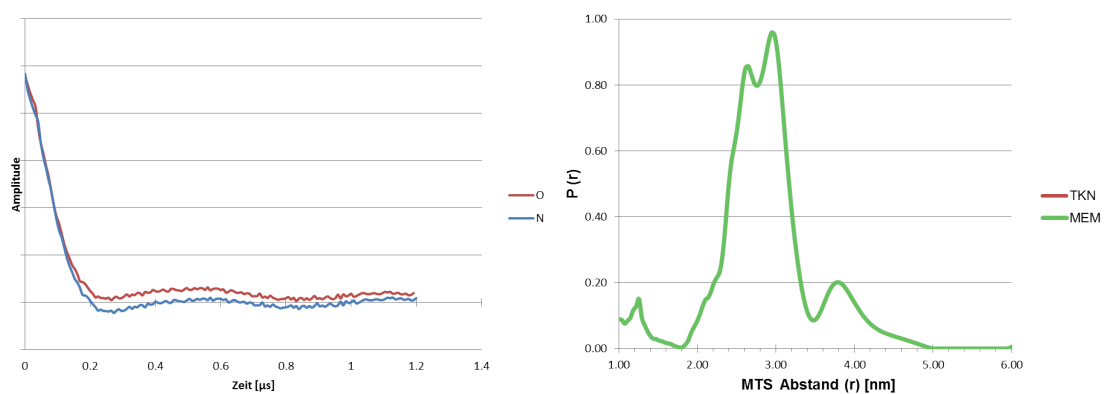
MBP 03 pH 3 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



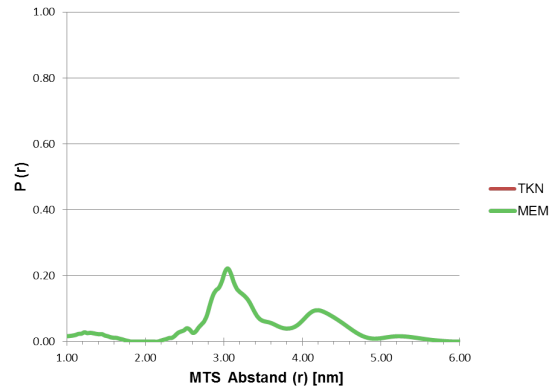
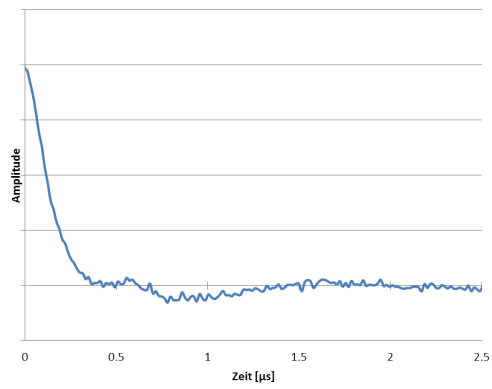
MBP 03 pH 3 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



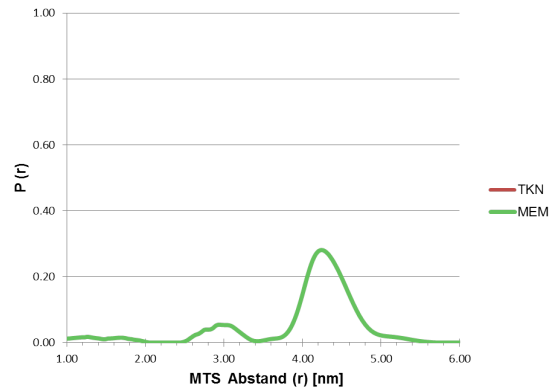
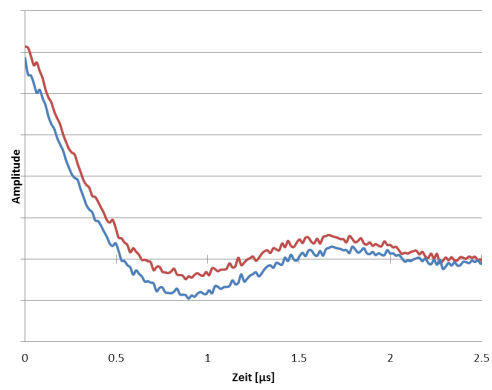
MBP 03 pH 7 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



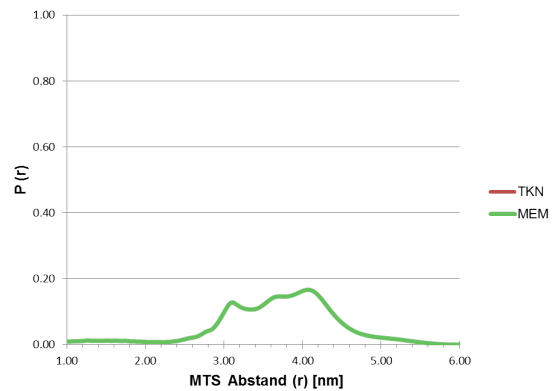
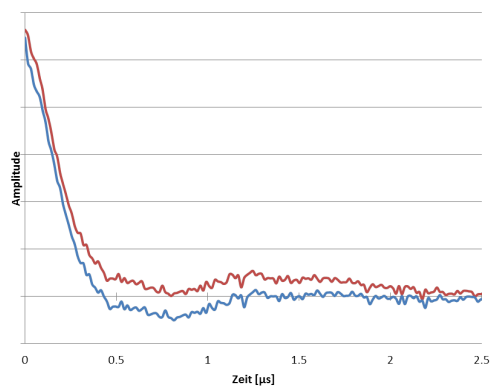
MBP 03 pH 7 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



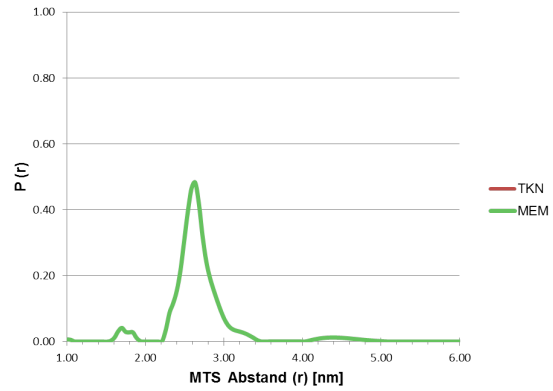
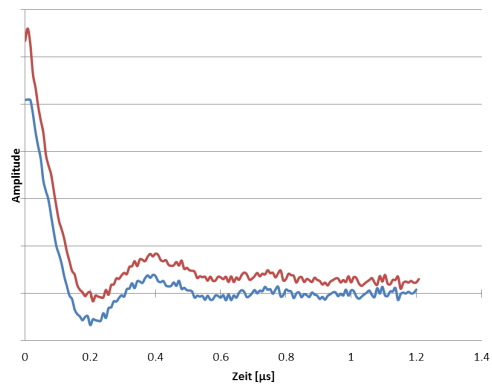
MBP 04 pH 3 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



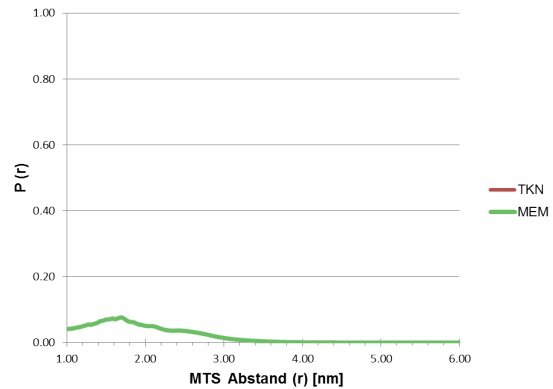
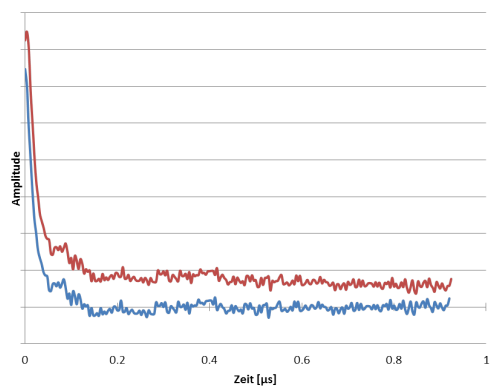
MBP 04 pH 3 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



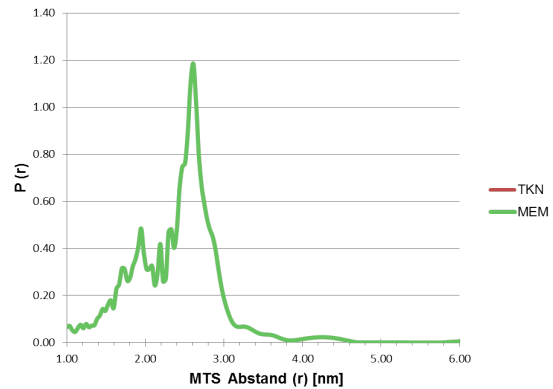
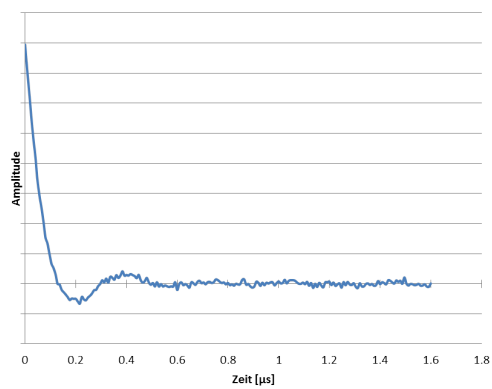
MBP 04 pH 7 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



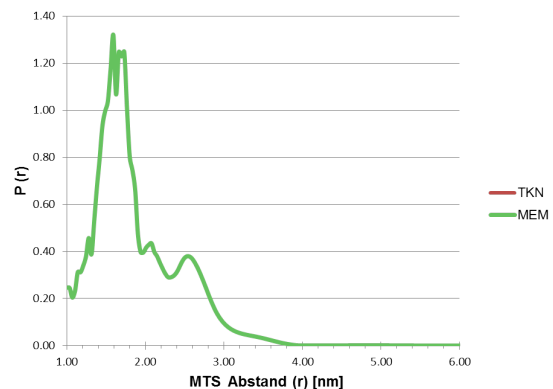
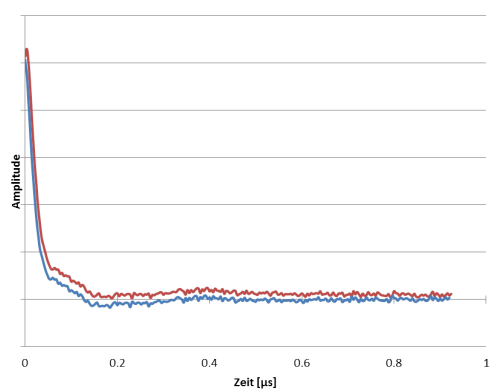
MBP 05 pH 3 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



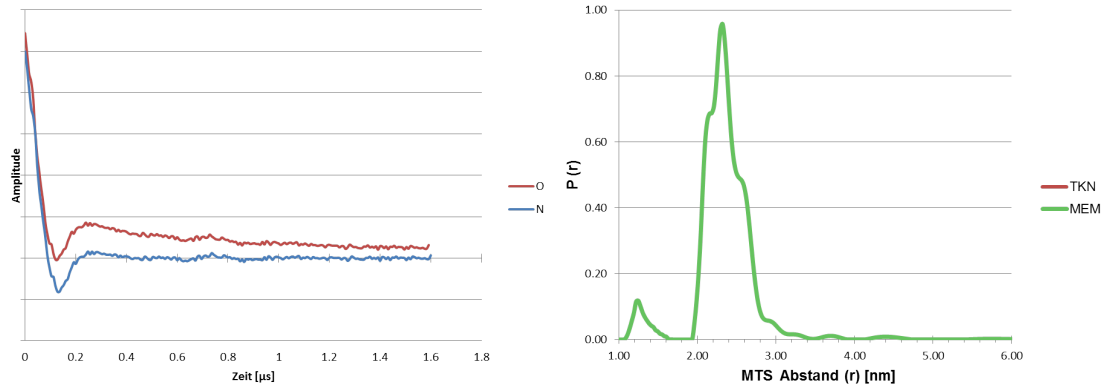
MBP 05 pH 3 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



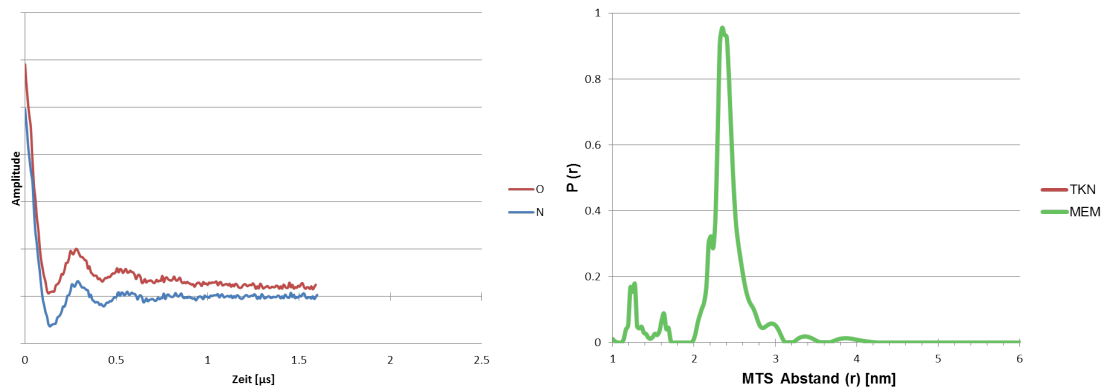
MBP 05 pH 7 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



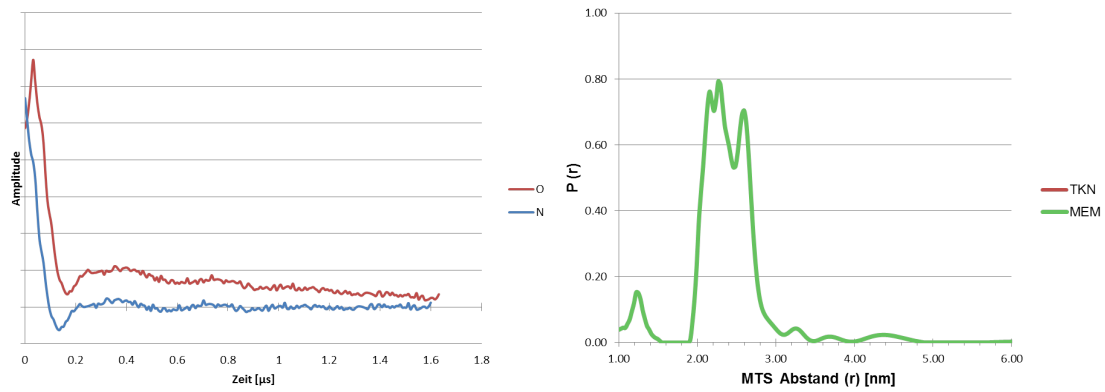
MBP 05 pH 7 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



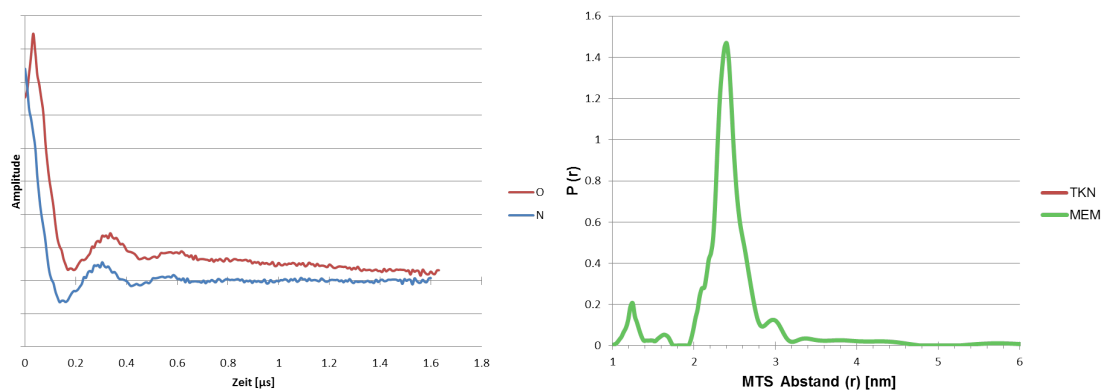
MBP 06 pH 3 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



MBP 06 pH 3 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung

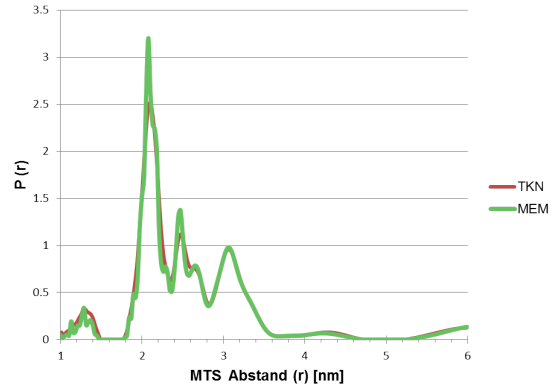
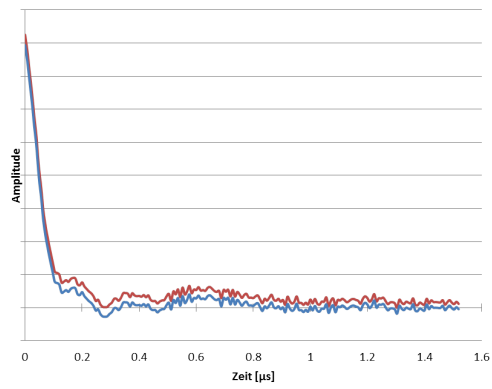


MBP 06 pH 7 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung

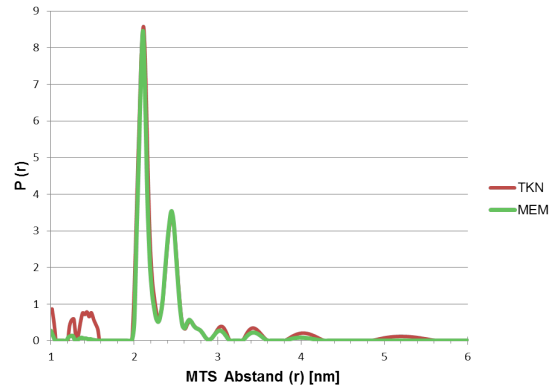
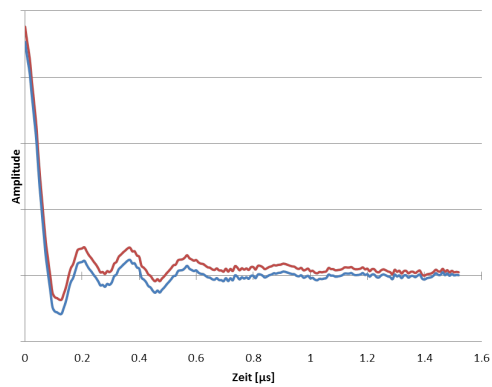


MBP 06 pH 7 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung

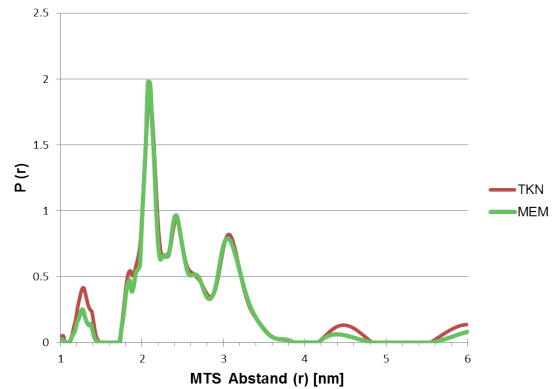
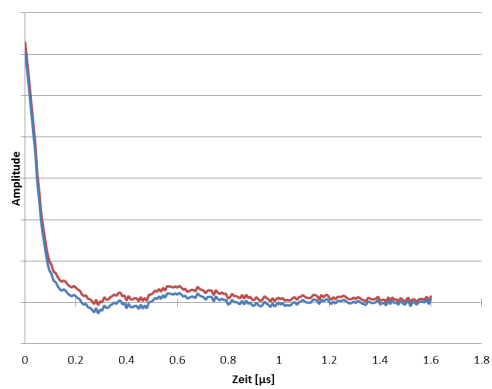




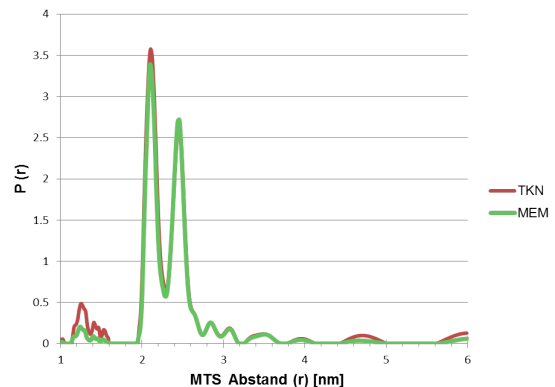
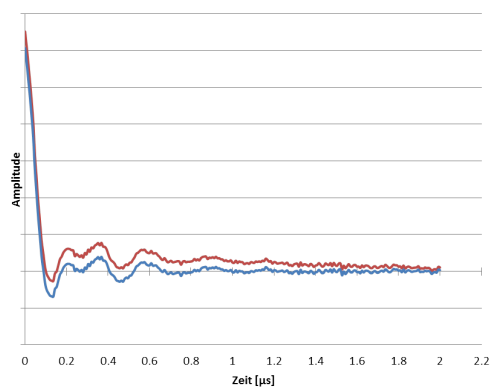
MBP 07 pH 3 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



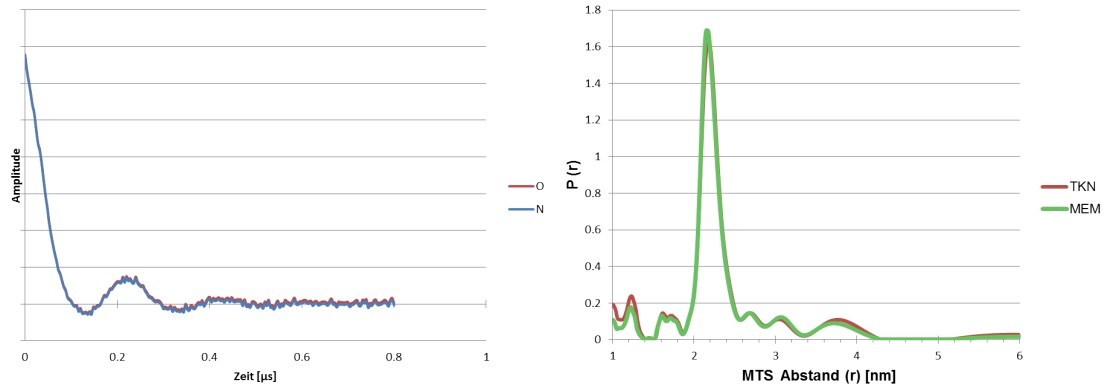
MBP 07 pH 3 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



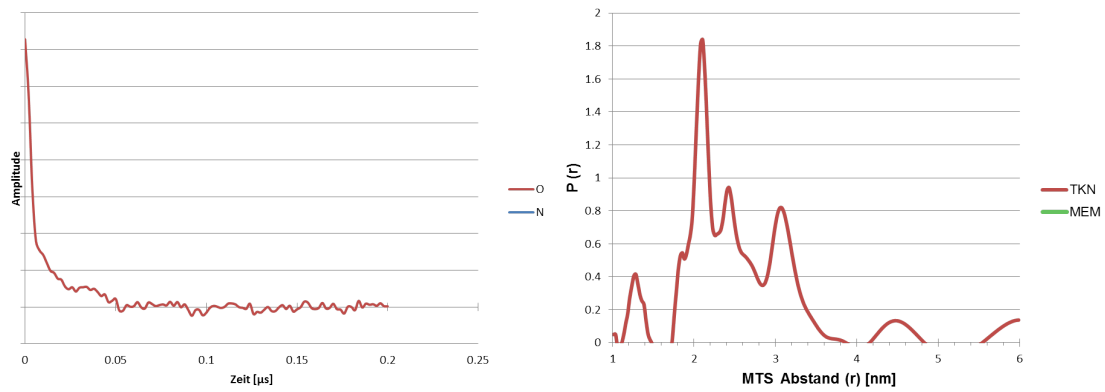
MBP 07 pH 7 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



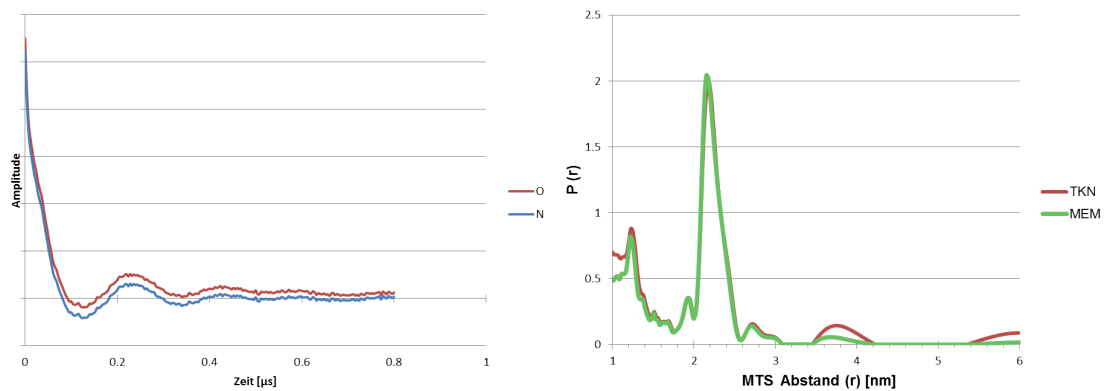
MBP 07 pH 7 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



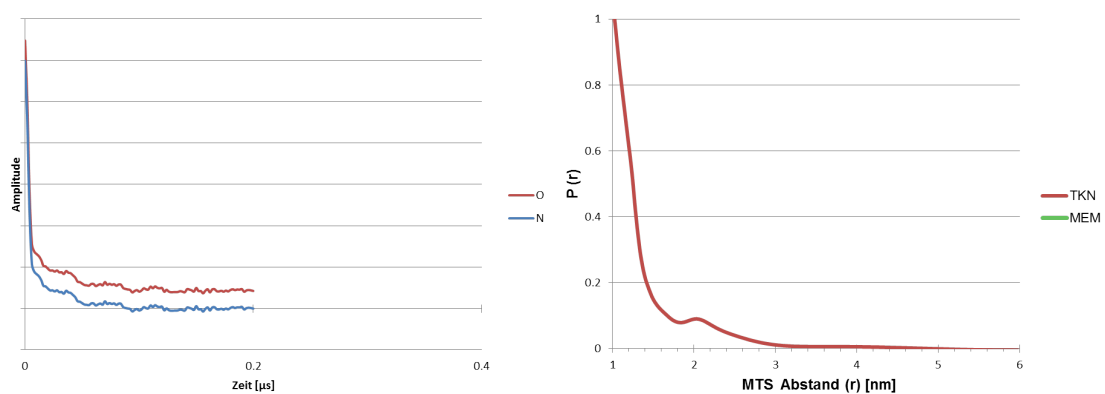
MBP 09 pH 3 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



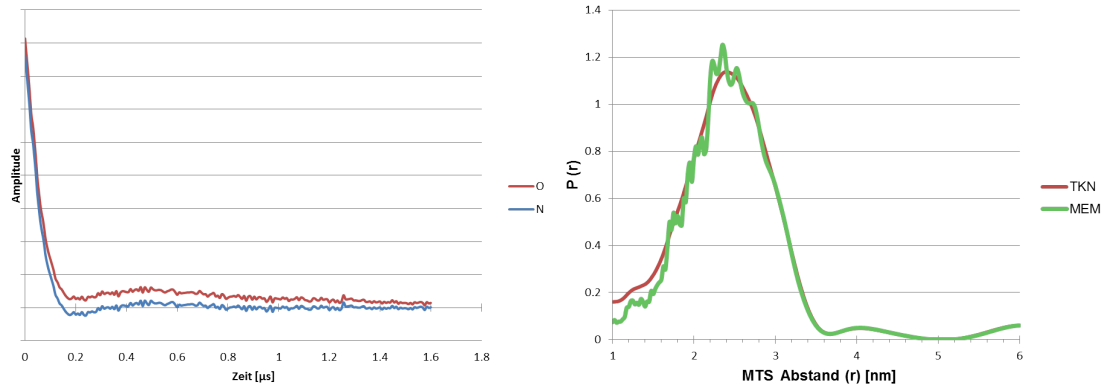
MBP 09 pH 3 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



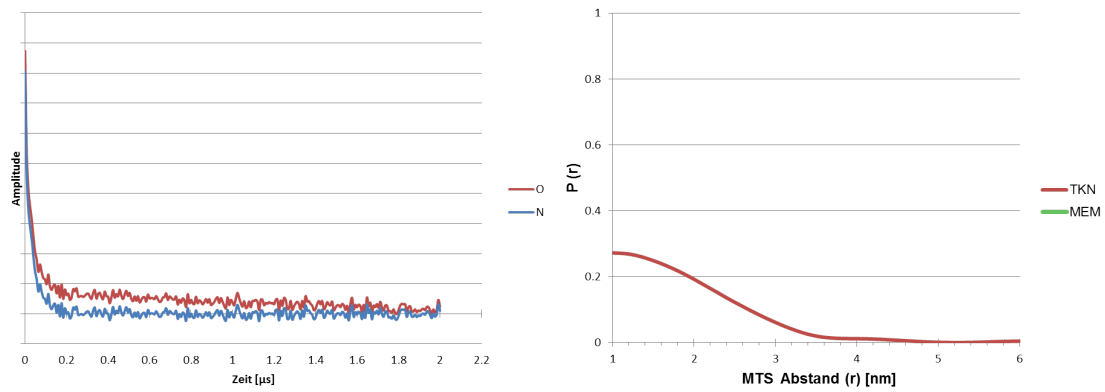
MBP 09 pH 7 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



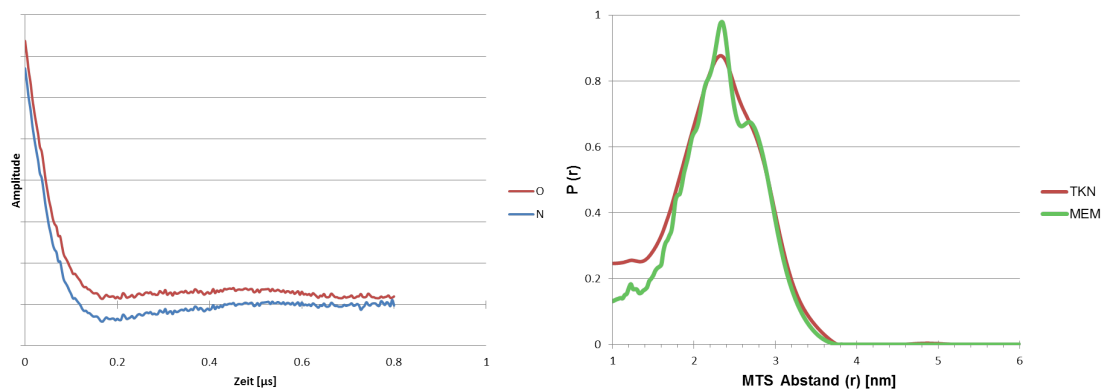
MBP 09 pH 7 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



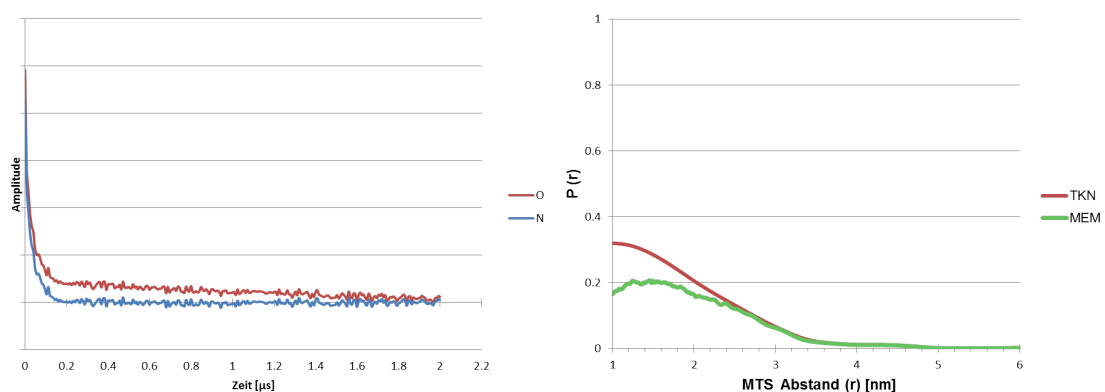
MBP 10 pH 3 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



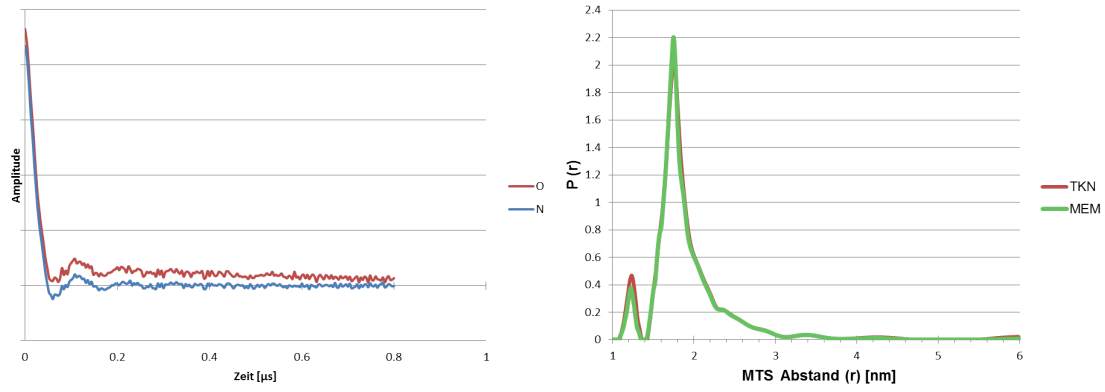
MBP 10 pH 3 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



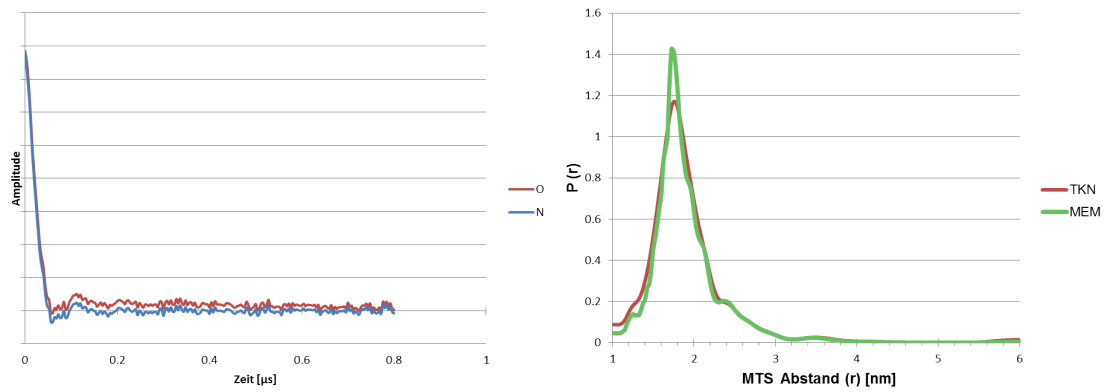
MBP 10 pH 7 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



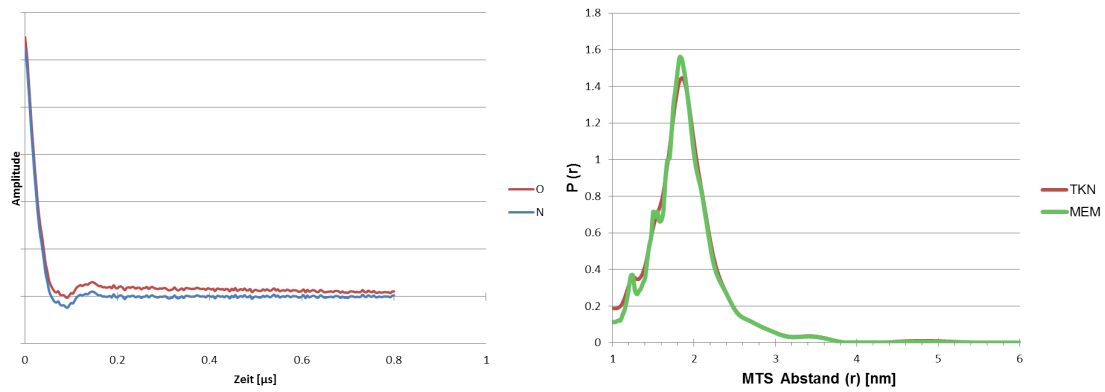
MBP 10 pH 7 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



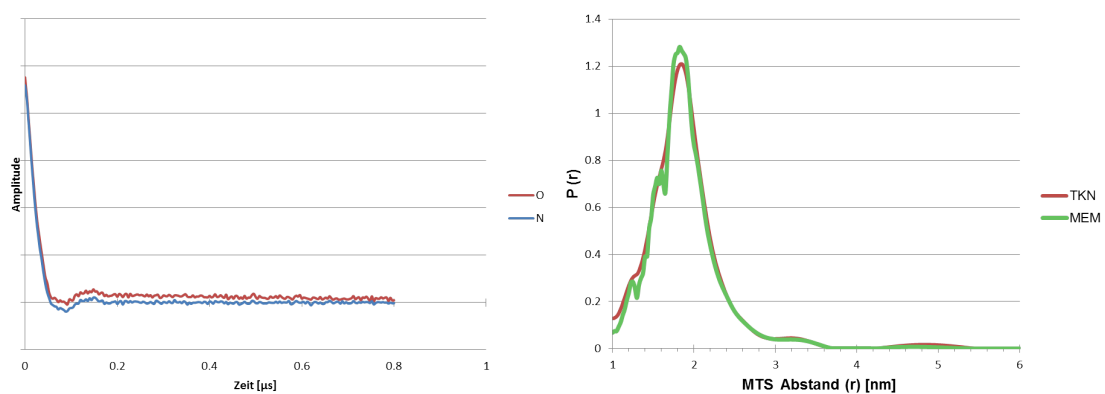
MBP 11 pH 3 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



MBP 11 pH 3 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung



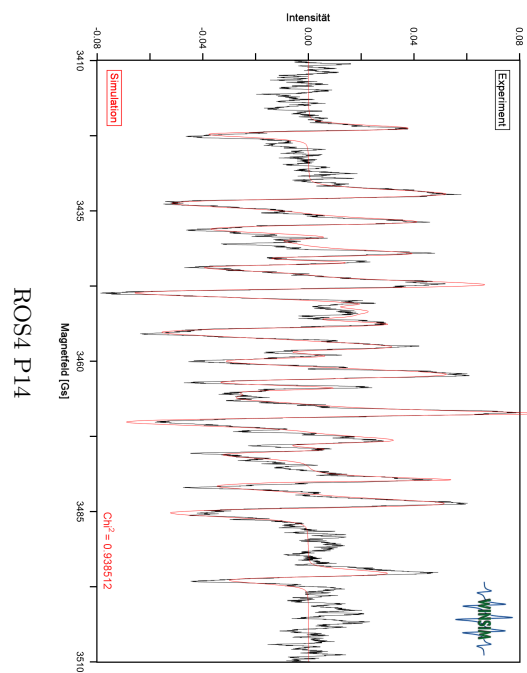
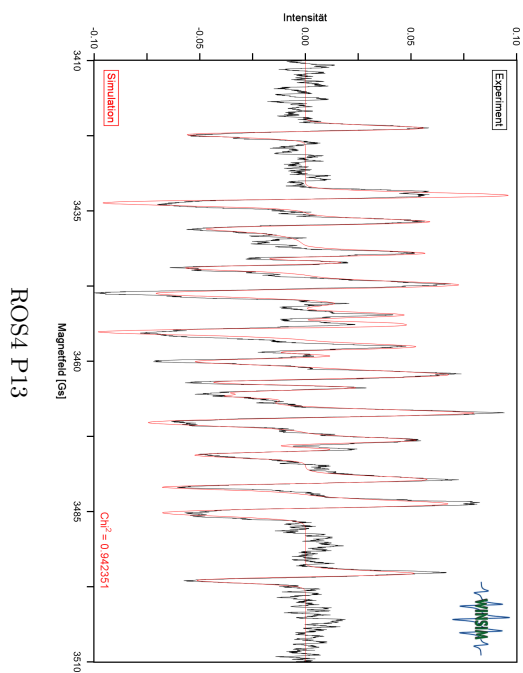
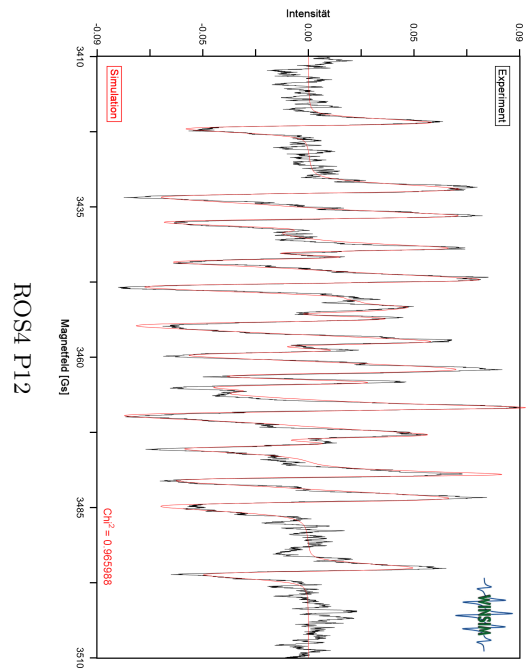
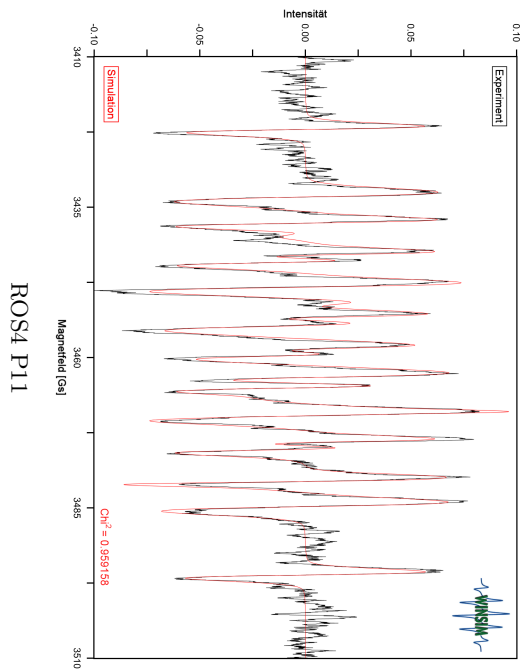
MBP 11 pH 7 –MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung

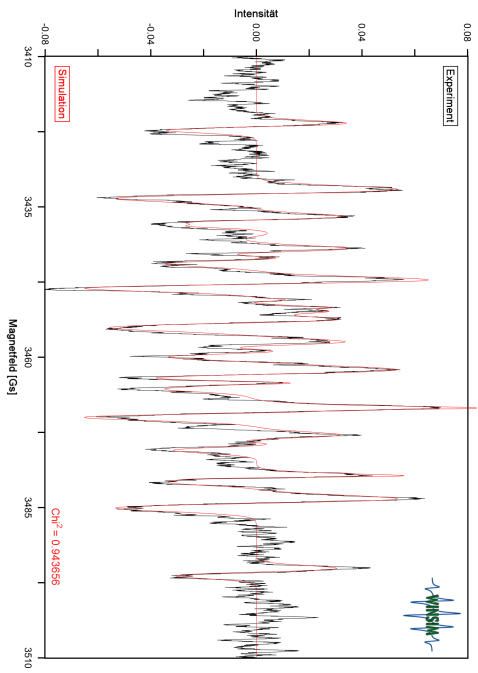


MBP 11 pH 7 +MAL. Links: *DQC*-Signal in Zeitdomäne Rechts: Abstandsverteilung

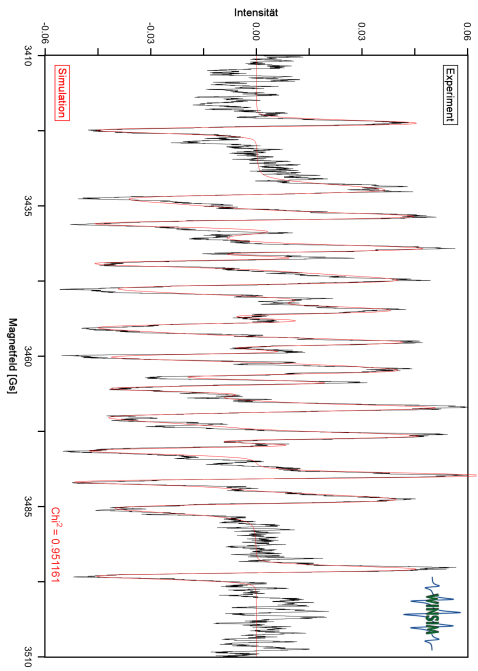
# 16. WinSIM-Fit-Simulationen

## 16.1. Ergebnisse der ROS4-Simulation

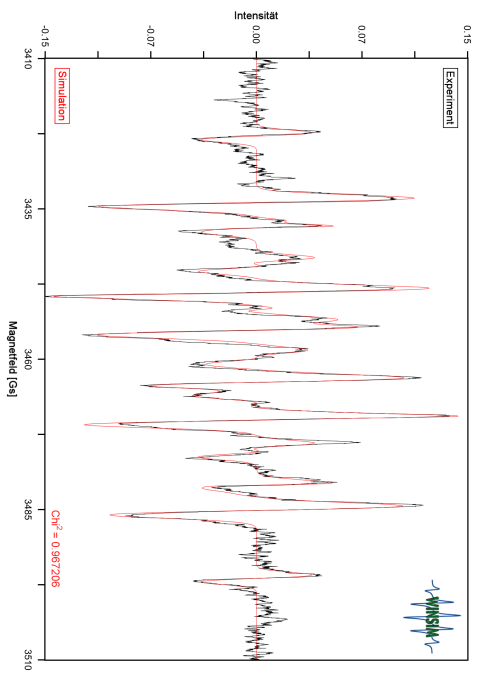




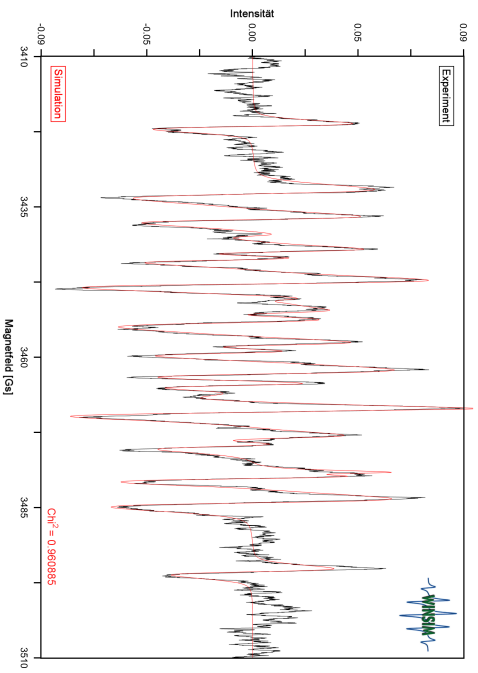
ROS4 P16



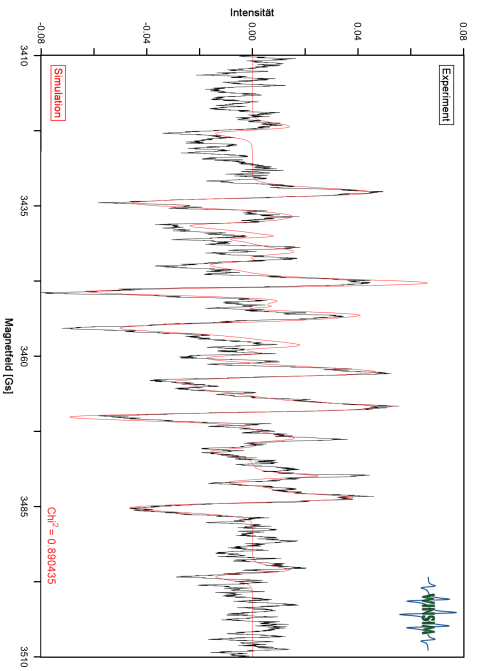
ROS4 P18



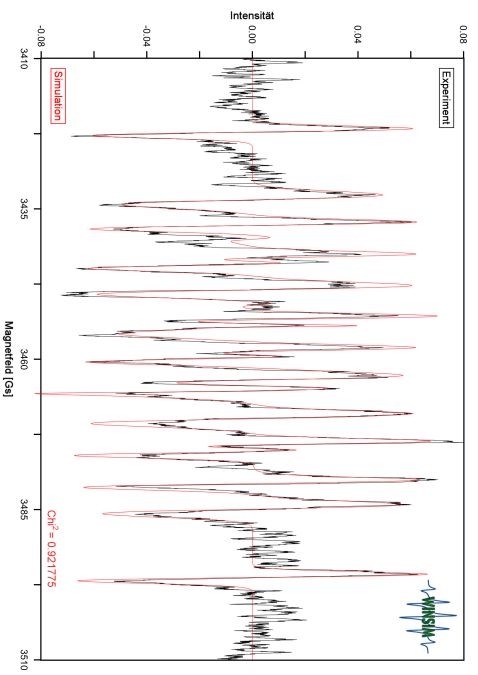
ROS4 P20



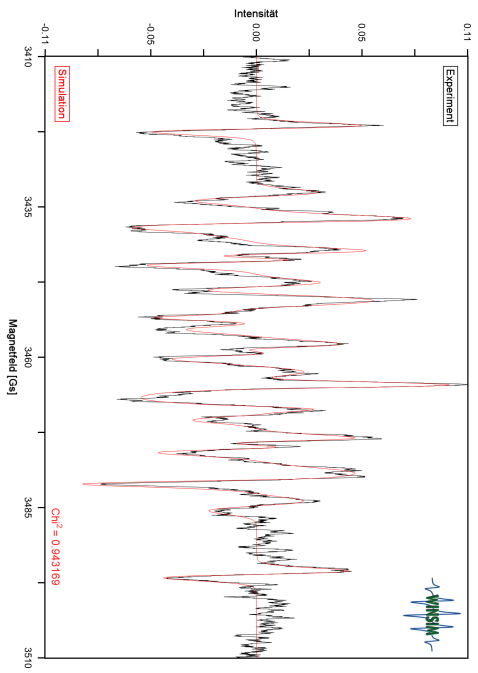
ROS4 P15



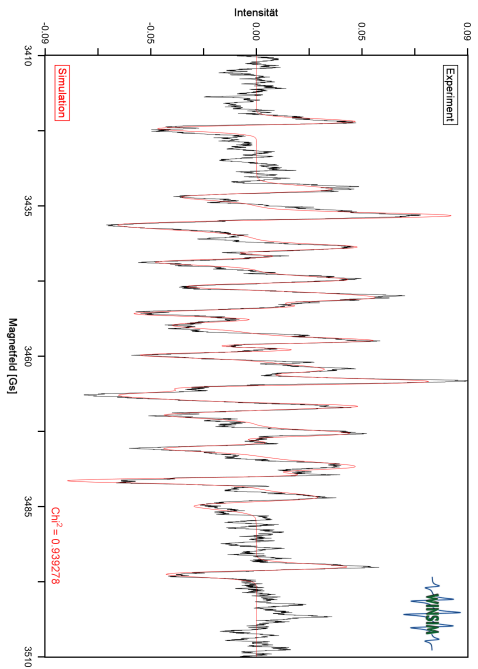
ROS4 P17



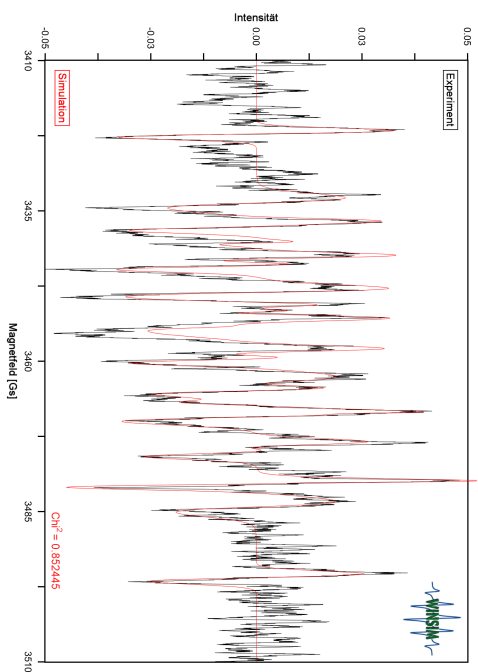
ROS4 P19



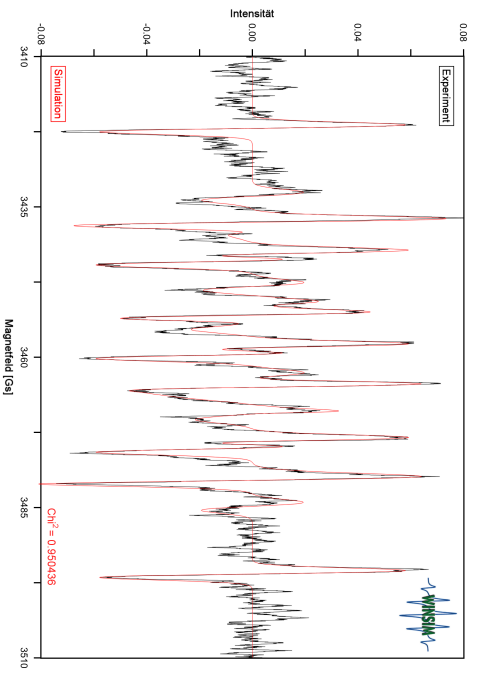
ROS4 P32



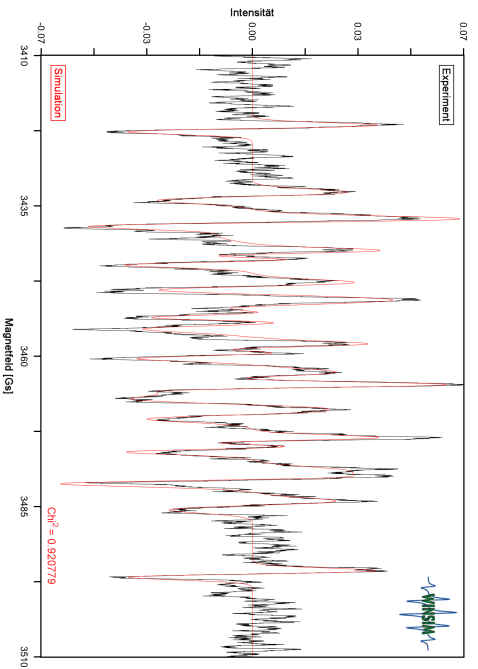
ROS4 P34



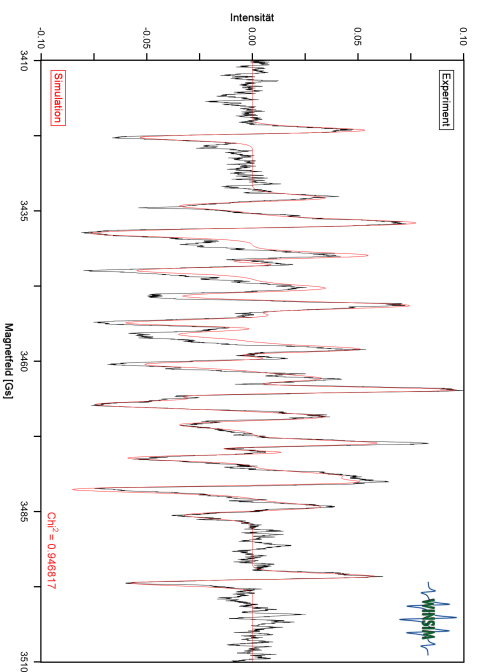
ROS4 P36



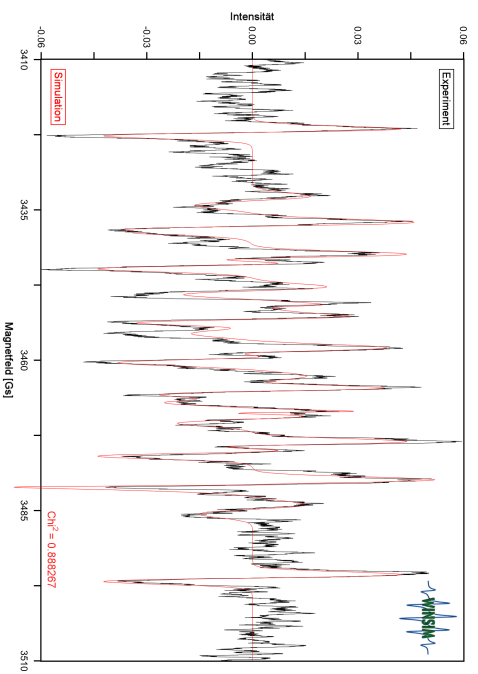
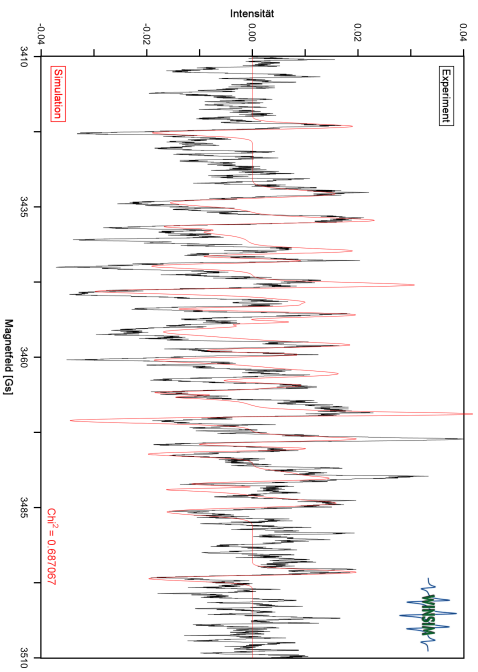
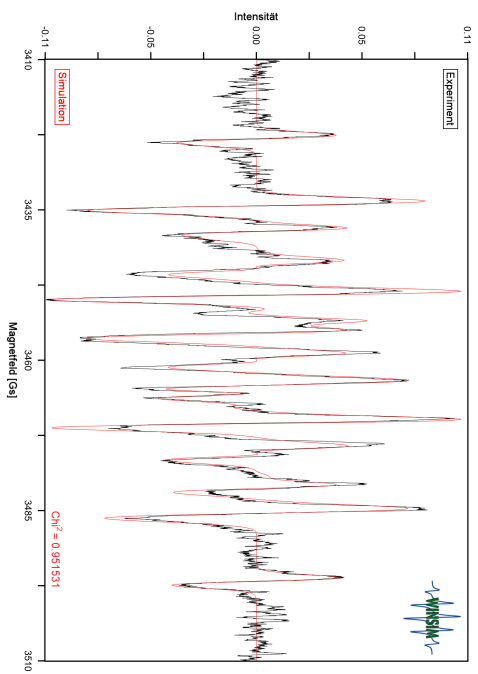
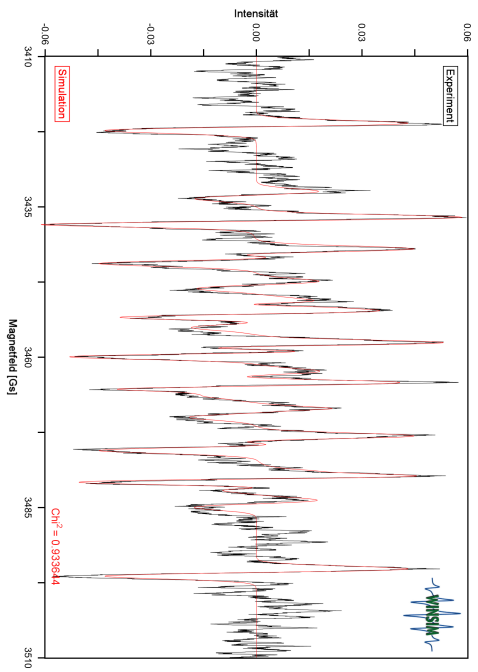
ROS4 P31



ROS4 P33

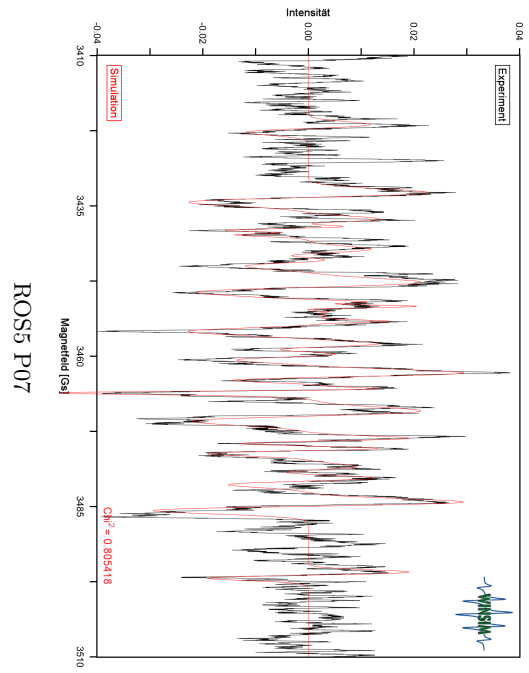
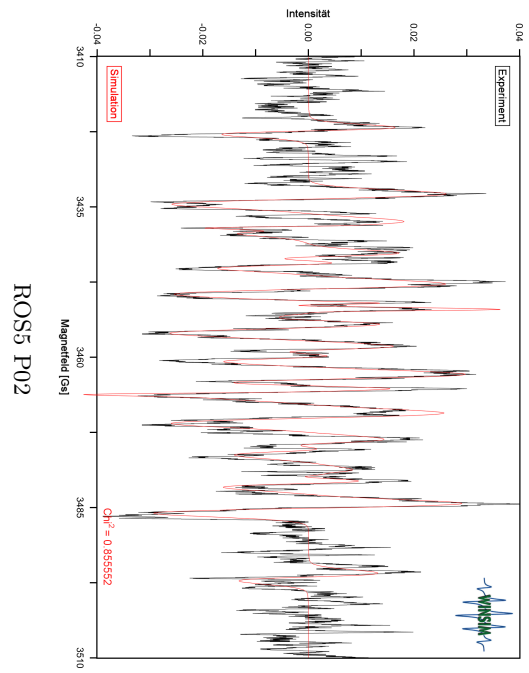
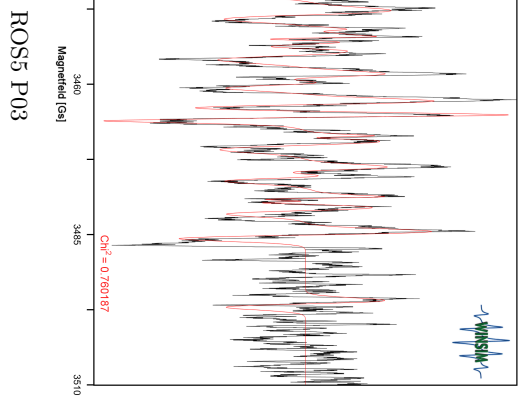
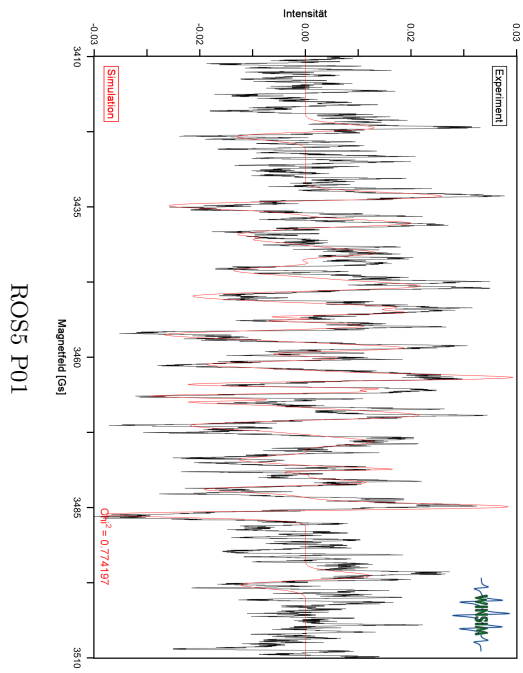


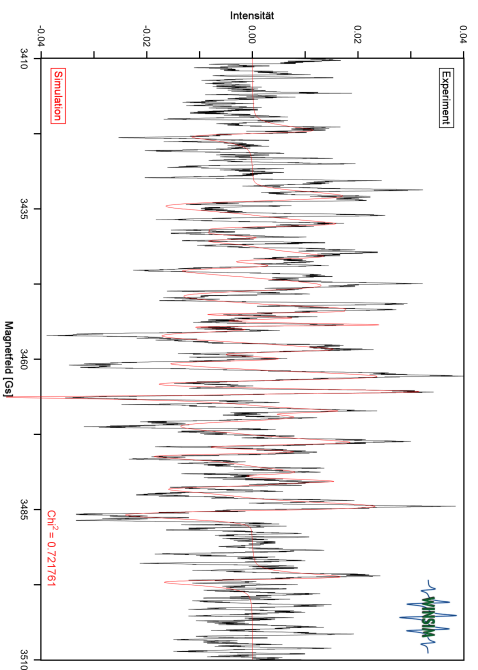
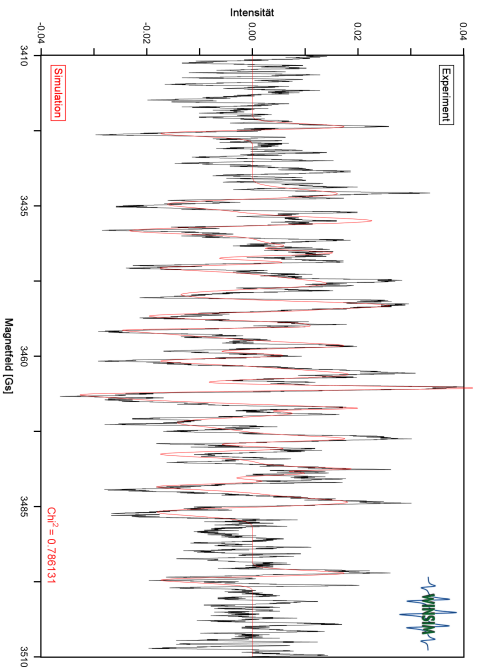
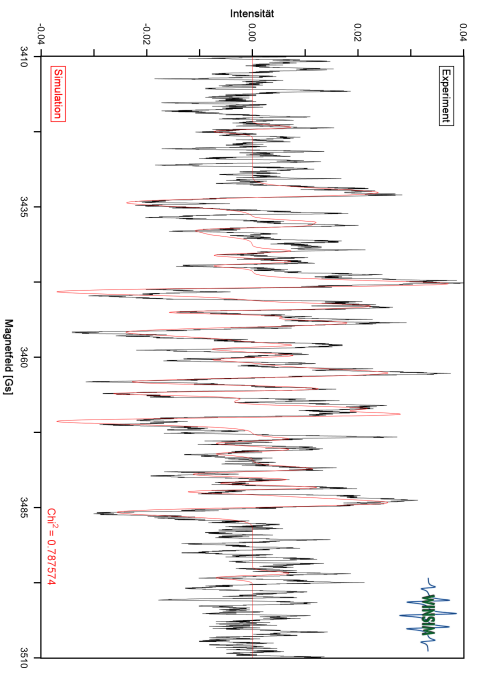
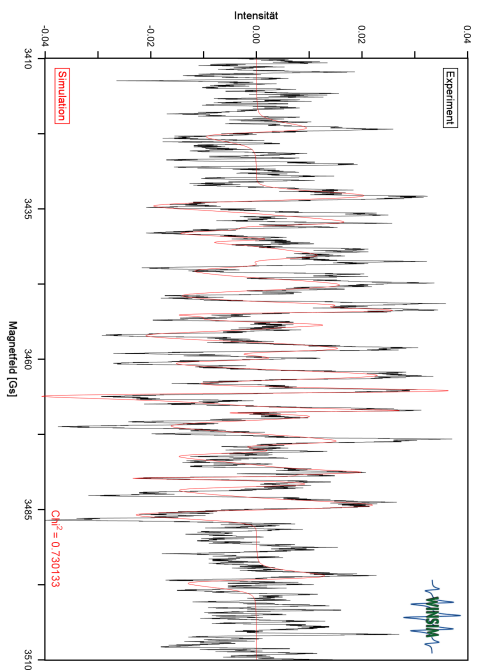
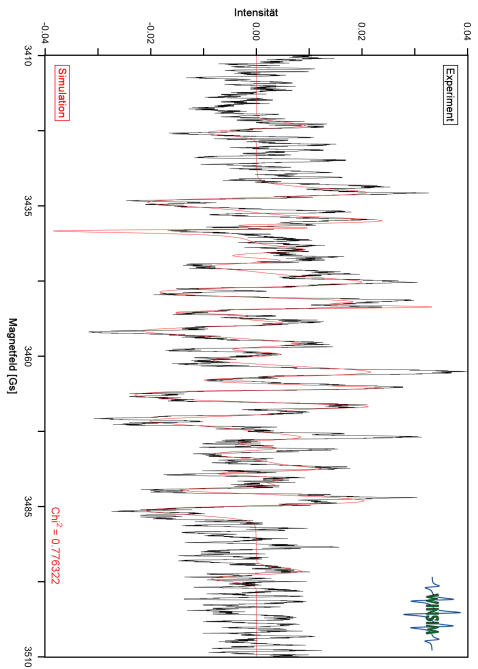
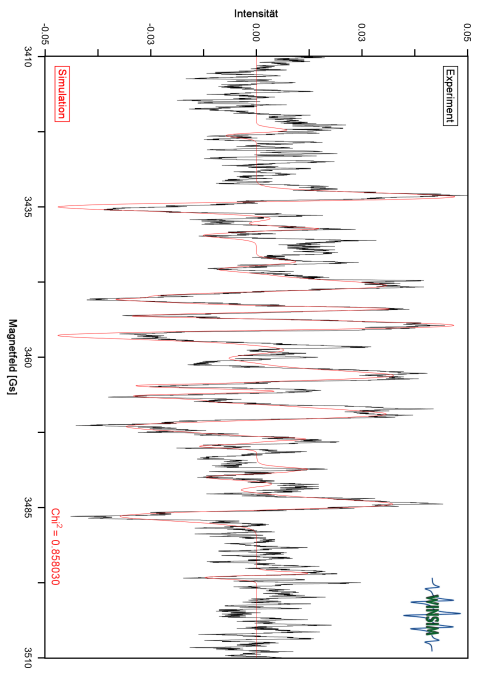
ROS4 P35

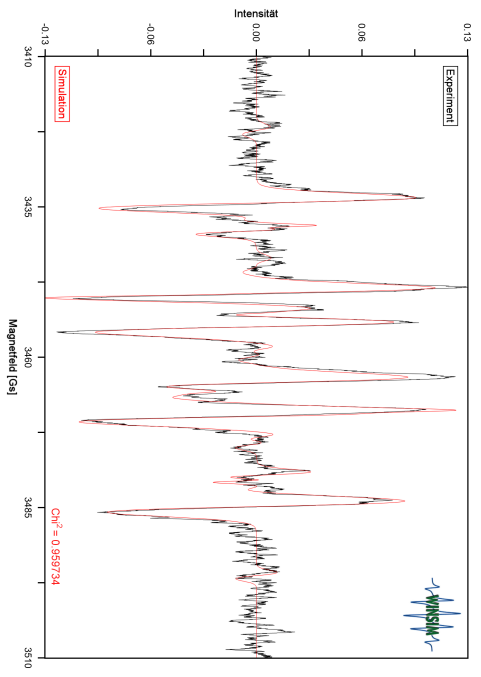




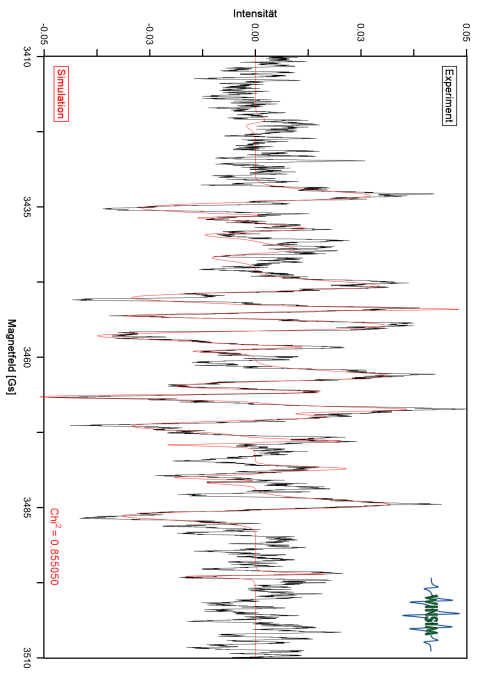
## 16.2. Ergebnisse der ROS5-Simulation







ROS5 P19



ROS5 P18



## 17. ESR-Parameter

Die allgemeinen ESR-Parameter die für jede cw-Messung verwendet wurden, werden in Tabelle 17.1 zusammengefasst.

Die *Sampling*- und *Receiver*-Zeiten, sowie der *Receiver gain*, die *Sweep width* und Anzahl der Messpunkte sind in den Tabellen innerhalb der jeweiligen Abschnitte angegeben.

**Tab. 17.1:** Allgemeine ESR-Parameter der *cw*-ESR-Messungen

|                                 |                    |
|---------------------------------|--------------------|
| Modulation Frequency            | 100                |
| Modulation Amplitude            | 1                  |
| Modulation Phase                | 0                  |
| Field Position                  | Field left, g: 2   |
| Center Field                    | 3460               |
| Microwave Attenuation Panel     | power 0, Acq never |
| Internal-AFC & High Pass Filter |                    |
| No Quadrupole Detection         |                    |
| No External Trigger             |                    |
| No External Lock In             |                    |

## 17.1. ESR-Parameter für die Untersuchung des Maltose bindenden Proteins

### 17.1.1. cw-ESR-Parameter bei RT-Messung (MBP)

Tab. 17.2: ESR-Parameter bei RT-Messung

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| Sampling Time (Conversion)    | 20.48 ms |
| Receiver Time (Time Constant) | 5.12 ms  |
| Receiver Gain                 | 38 dB    |
| Averaged Scans                | 15       |
| Sweep width                   | 120 G    |
| Number of Points              | 1024     |
| Microwave Attenuation         | 15 dB    |

### 17.1.2. cw-ESR-Parameter bei TT-Messung (MBP)

Tab. 17.3: ESR-Parameter bei TT-Messung

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| Sampling Time (Conversion)    | 40.96 ms |
| Receiver Time (Time Constant) | 10.24 ms |
| Receiver Gain                 | 39 dB    |
| Averaged Scans                | 20       |
| Sweep width                   | 200 G    |
| Number of Points              | 1024     |
| Microwave Attenuation         | 35 dB    |

## 17.2. ESR-Parameter für die EMPO-Messungen

### 17.2.1. cw-ESR-Parameter der Messreihen ROS 1 - 3

**Tab. 17.4:** ESR-Parameter der Standard-Messung

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| Sampling Time (Conversion)    | 81.92 ms |
| Receiver Time (Time Constant) | 81.92 ms |
| Receiver Gain                 | 60 dB    |
| Averaged Scans                | 15       |
| Sweep width                   | 100 G    |
| Number of Points              | 2048     |
| Microwave Attenuation         | 10 dB    |

**Tab. 17.5:** ESR-Parameter der *Fast*-Messung

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| Sampling Time (Conversion)    | 10.24 ms |
| Receiver Time (Time Constant) | 10.24 ms |
| Receiver Gain                 | 60 dB    |
| Averaged Scans                | 15       |
| Sweep width                   | 100 G    |
| Number of Points              | 1024     |
| Microwave Attenuation         | 10 dB    |

### 17.2.2. cw-ESR-Parameter der Messreihen ROS 4, 5

**Tab. 17.6:** ESR-Parameter Experimente ROS4 und ROS5

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| Sampling Time (Conversion)    | 5.12 ms  |
| Receiver Time (Time Constant) | 40.96 ms |
| Receiver Gain                 | 60 dB    |
| Averaged Scans                | 15       |
| Sweep width                   | 100 G    |
| Number of Points              | 4096     |
| Microwave Attenuation         | 10 dB    |





# Literaturverzeichnis

- [Alberts et al., 2002] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition, Garland Science, New York
- [Berengian et al., 1999] Berengian A.R., Parfenova M., Mchaourab H.S. (1999): Site-directed Spin-Labeling Study of Subunit Interactions in the  $\alpha$ -Crystallin Domain of Small Heat-shock Proteins, *J. Biol. Chem.*, 274, 10, 6305–6314.
- [Berliner et al., 1982] Berliner L.J., Grunwald J., Hankovszky H.O., Hideg K. (1982): A Novel Reversible Thiol Specific Spin-Label: Papain Active Site Labeling and Inhibition, *Analytical Biochemistry*, 119, 450–455.
- [Berliner et al., 2000] Berliner L.J., Eaton S.S., Eaton G.R. (2000): *Biological Magnetic Resonance: Volume 19: Distance Measurements in Biological Systems by EPR*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 233 Spring Street, New York 10013
- [Berliner, Hemminga, 2007] Berliner L.J., Hemminga M.A. (2007): *ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics*, Volume 27, Springer Science+Business Media, LLC
- [Borbat, Freed, 1999] Borbat P.P., Freed J.H. (1999): Multiple-quantum ESR and distance measurements, *Chem. Phys. Letters* 313, 145-154, Elsevier
- [Borbat, Freed, 2007] Borbat P.P., Freed J.H. (2007): Pros and cons of Pulse Dipolar ESR: DQC & DEER, *EPR Newsletter* 2007, Volume 17, no.2-3
- [Borbat, Freed, 2013] Borbat P.P., Freed J.H. (2013): *Pulse Dipolar Electron Spin Resonance: Distance Measurements*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 10.1007
- [Brooks et al., 1982] Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. (1982): CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization and Dynamics Calculations, *J. Comp. Chem.*, Vol. 4, No. 2, 187-217
- [Buettner, 1987] Buettner G. R. (1987): Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts, *Free Radic. Biol. Med.* 3: 259-303
- [Burgess, Deutscher, 2009] Burgess R.R., Deutscher M.P. (2009): *Guide to protein purification*, Elsevier/Academic Press
- [Chen, 2013] Chen C. (2013): *Untersuchungen zur Struktur des Maltose bindenden Proteins im molten-globule-Zustand*, TU Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Diplomarbeit
- [Chakour, 2015] Chakour M. (2015): *Strukturuntersuchungen verschiedener Mutanten des Maltose-Bindungsproteins (MBP) mit Hilfe der ESR Spektroskopie*, TU Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Dissertation
- [Chiang et al., 2005] Chiang Y.W., Borbat P.P., Freed J.H. (2005): Maximum entropy: a complement to Tikhonov regularization for determination of pair distance distributions by pulsed ESR, *J. Magn. Reson.*, 177 (2) : 184-96

- [DeSensi et al., 2008] DeSensi S.C.C., Rangel D.P., Beth A.H., Lybrand T.P., Hustedt E.J. (2008): Simulation of Nitroxide Electron Paramagnetic Resonance Spectra from Brownian Trajectories and Molecular Dynamics Simulations, *Biophys. J.*, Vol. 94, 3798 - 3809
- [Duling, 1994] Duling D.R. (1994): Simulation of Multiple Isotropic Spin Trap EPR Spectra, *J. Magn. Reson., Series B* 104, 105 - 110
- [Duplay et al., 1984] Duplay P., Bedouelle H., Fowler A., Zabin I., Saurin W., Hofnung M. (1984): Sequences of the malE gene and of its product, the maltose-binding protein of Escherichia coli K12, *J. Biol. Chem.* 259(16):10606-10613
- [Feix, Klug, 2008] Feix J.B., Klug C. (2008): Methods and Applications of Site-Directed: Spin-Labeling EPR Spectroscopy, Elsevier, *Methods in Biology* 84: 617 - 658
- [Ganesh et al., 1997] Ganesh C., Shah A.N., Swaminathan C.P., Suroliya A., Varadarajan R. (1997): Thermodynamic Characterization of the reversible, two-state unfolding of maltose binding protein, a large two-domain protein, *Biochemistry* 36: 5020 - 5028
- [Guo et al., 2003] Guo Q., Qian S., Mason R.P. (2003): Separation and Identification of DMPO Adducts of Oxygen-Centered Radicals Formed from Organic Hydroperoxides by HPLC-ESR, ESI-MS and MS/MS, *Am. Soc. MS.*, Elsevier Inc., 1044 - 0305 / 03 / 00336-2
- [Hanahan, 1983] Hanahan, D. (1983): Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids, *J. Mol. Biol.*, 166, 557 - 580.
- [Hauck, 2007] Hauck S. (2007): Versuche zur Synthese neuartiger fluoreszierender Spin-Traps, TU Kaiserslautern, Dissertation
- [Hemminga, Berliner, 2007] Hemminga M.A., Berliner L.J. (2007): ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics, Springer- Verlag, New York.
- [Hospital et al., 2015] Hospital A., Goni J.R., Orozco M., Gelpi J.L. (2015): Molecular dynamics simulations: advances and applications, *Adv. Appl. Bioninf. Chem.*, 8: 37 - 47
- [Hustedt, Beth, 1999] Hustedt E.J., Beth A.H. (1999): Nitroxide Spin-Spin Interactions: Applications to Protein Structure and Dynamics, *Annual Reviews* 28: 129 - 53
- [Jacso et al., 2012] Jacso 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 et al., 2006] 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
- [Jeschke, Polyhach, 2006] Jeschke G., Polyhach Y. (2006): Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9, 1895 - 1910

- [Jeschke, 2008] Jeschke G. (2008): Kurze Einführung in die elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie, Universität Konstanz, Lehrstuhl PC: Struktur und Dynamik der Materie
- [Junk, 2010] Junk M.J.N. (2010): Assessing the functional structure of molecular transporters by EPR spectroscopy, Universität Mainz, Dissertation
- [Klare, Steinhoff, 2009] Klare, J. P., Steinhoff, H.-J. (2009): Spin-Labeling EPR, *Photosynth Res*, 102, 377–390.
- [Kuwajima, 1989] Kuwajima K. (1989): The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure, *Proteins* 6(2):87-103
- [Leinisch, 2009] Leinisch F. (2009): Untersuchungen am Entkopplerprotein UCP-2: Detektion reaktiver Sauerstoffspezies in biologischen Systemen mit konventionellen und fluoreszierenden nitronbasierten spin traps, TU Kaiserslautern, Dissertation
- [Li et al., 2016] Li F., Xiao L, Liu L. (2016): Metal-Diazo Radicals of  $\alpha$ -Carbonyl Diazo-methanes, *Nature, Sci. Rep.*, 6 : 22876
- [Levinthal, 1969] Levinthal C. (1969): "How to Fold Graciously". *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois: 22–24.*
- [Lottspeich, Engels, 2012] Lottspeich, F., Engels J.W. (2012): *Bioanalytik*, Springer-Verlag, Heidelberg
- [McCord, 2000] McCord J.M. (2000): The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress, *Am. J. Med.*, Jun 1 ; 108 (8) 652-9
- [MacKerell, 2012] MacKerell A.D. (2012): The CHARMM Force Field; CECAM Workshop: Advances in Biomolecular Modelling and Simulations using CHARMM, University College Dublin, Ireland
- [Mattick, Makunin, 2006] Mattick J.S., Makunin I.V. (2006): Non-coding RNA, *Hum. Mol. Genet.* 15 (Review Issue 1): R17-R29
- [Mülhardt, 2009] Mülhardt C. (2009): *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*, Spektrum a.V. Heidelberg, 6. Auflage
- [Murakami et al., 2000] Murakami M., Fukatsu K., Ohkawa S., Kasahara F., Sugawara T. (2000): ESR Study on the Antioxidant Activity of TAK-218 in Biological Model Membranes, *Chem. Pharm. Bull.* 48 (6) 784-792
- [NEB, 2007] New England Biolabs Inc. (2007): pMAL<sup>TM</sup> Protein Fusion and Purification System, Instruction Manual, manualE8200
- [Nickolaus, 2017] Nickolaus C. (2017): The Molten Globule State of Maltose-Binding Protein: Structural Characterization by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, TU Kaiserslautern, Dissertation
- [Ohgushi, 1983] Ohgushi M., Wada A. (1983): 'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains, *FEBS Lett.*, 164 (1): 21–24.

- [Polovka, 2006] Polovka M. (2006): EPR spectroscopy: A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods, *J. Food Nutr. Res.*, Vol. 45, No. 1, pp 1 - 11
- [Polyhach, 2010] Polyhach Y. (2010): Modelling of spin labels with rotamer libraries, ETH Zürich, EPR summer school, Konstanz
- [Prajapati et al., 2007] Prajapati R.S., Indu S., Varadarajan R. (2007): Identification and Thermodynamic Characterization of Molten Globule States of Periplasmic Binding Proteins, *Biochemistry*, 46, 10339 - 10352
- [Rabenstein, Shin, 1995] Rabenstein M.D., Shin Y. K. (1995): Determination of the distance between two spin labels attached to a macromolecule, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 8239 – 8243.
- [Rahman, 2007] Rahman K. (2007): Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors, *Clinical Interventions in Aging*, 2 (2), 219- 236, Dove Medical Press, UK
- [Rehman et al., 2016] Rehman M.U., Jawaid P., Uchiama H., Kondo T. (2016): Comparison of free radicals formation induced by cold atmospheric plasma, ultrasound, and ionizing radiation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, j.abb.2016.04.005
- [Reichenwallner, 2011] Reichenwallner J. (2011): Strukturuntersuchungen am Maltose-Bindungsprotein mit Hilfe der gepulsten Elektron-Elektron-Doppelresonanz-Spektroskopie, TU Kaiserslautern, Diplomarbeit
- [Reichenwallner et al., 2013] Reichenwallner J., Chakour M., Indu S., Varadarajan R., Trommer W.E. (2013): Maltose Binding Protein Is Partially Structured in Its Molten Globule State, *Appl. Magn. Res.* Volume 44, Issue 8, pp 981 - 995
- [Schmidt et al., 2005] Schmidt R.F., Lang F., Heckmann M. (2005): *Physiologie des Menschen*, Springer-Verlag, Heidelberg
- [Schweiger, Jeschke, 2001] Schweiger, A., Jeschke, G. (2001): Principles of pulse electron paramagnetic resonance, Oxford University Press, New York.
- [Selmke, 2013] Selmke B. (2013): Untersuchungen zur geöffneten und geschlossenen Form des Maltose bindenden Proteins mit Hilfe neuer Mutanten, TU Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Diplomarbeit
- [Sheshadri et al., 1999] Sheshadri S., Lingaraju G. M., Varadarajan R. (1999): Denaturant mediated unfolding of both native and molten globule states of maltose binding protein are accompanied by large  $\Delta C_p$ 's, *Protein Science*, 8, 1689 – 1695.
- [Spurlino et al., 1991] Spurlino J.C., Quijcho F.A., Lu G.Y. (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.* 266 (8) : 5202 - 5219
- [Steinhoff, Hubbell, 1996] Steinhoff H.J., Hubbell W.L. (1996): Calculation of Electron Paramagnetic Resonance Spectra from Brownian Dynamics Trajectories, *Biophys. J.*, Vol. 71, 2201 - 2212

- [Steinhoff et al., 1997] Steinhoff H.J, Radzwill N., Thevis W., Lenz V., Brandenburg D., Antson A., Dodson G., Wollmer A. (1997): Determination of Interspin Distances between Spin-Labels Attached to Insulin: Comparison of EPR Data with the X-ray analysis Structure, *Biophysical Journal* 73, 3287-3298
- [Stockner et al., 2005] Stockner T., Vogel H.J., Tieleman D.P. (2005): A Salt-Bridge Motif involved in Ligand Binding and Large-Scale Domain Motions of the Maltose-Binding Protein, *Biophys. J.*, Vol. 89, 3362-3371
- [Stoll, Schweiger, 2006] Stoll S., Schweiger A. (2006): EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR, *J. Magn. Res.*, 178, 42-55
- [Stratagene, 2004] Stratagene (2004): QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit – Instruction Manual, Revision #064001c, 2004
- [TFS, 2009] Thermo Fisher Scientific Inc. (2009): Genesys 10S UV-VIS User Guide, Revision A, 2009
- [Todres, 2009] Todres Z.V. (2009): *Ion-Radical Organic Chemistry - Principles and Applications*, 2nd Edition, CRC Press, Taylor&Francis Group, LLC
- [Villamena et al., 2005] Villamena F.A., Merle J.K., Hadad C.M., Zweier J.L. (2005): Superoxid Radical Anion Adduct of 5.5-Dimethyl-1-pyrroline N-Oxide (DMPO). 1. The Thermodynamics of Formation and Its Acidity, *J.Phys. Chem. A*, 109, 6083-6088
- [Villamena et al., 2005] Villamena F.A., Merle J.K., Hadad C.M., Zweier J.L. (2005): Superoxid Radical Anion Adduct of 5.5-Dimethyl-1-pyrroline N-Oxide (DMPO). 2. The Thermodynamics of Decay and EPR Spectral Properties, *J.Phys. Chem. A*, 109, 6089-6098
- [Weber, 2005] Weber R.T. (2005): Elexsys E 580 user´s manual, manual version 2.0, Bruker BioSpin Corporation
- [Weber, 2006] Weber R.T. (2006): Pulsed ELDOR option user´s manual, manual version 1.0, Bruker BioSpin Corporation
- [Wedler, 1997] Wedler G. (1997): *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, WILEY-VCH Verlag
- [White, 2006] White R.P., Meirovitch H. (2006): Minimalist explicit solvation models for surface loops in proteins, *J. Chem. Theory Comput.*, 2(4): 1135 – 1151.
- [Yang et al., 2012] Yang Z., Liu Y., Borbat P.P., Zweier J.L., Freed J.H., Hubbell W.L. (2012): Pulsed ESR Dipolar Spectroscopy for Distance Measurements in immobilized Spin-Labeled Proteins in Liquid Solution, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 9950 – 9952
- [Zhang et al., 2000] Zhang H., Joseph J., Vasquez-Vivar J., Karoui H., Nsanzumuhire C., Martasek P., Tordo P., Kalyanaraman B. (2000): Detection of superoxide anion using an isotopically labeled nitron spin trap: potential biological applications, *FEBS Letters* 473, 58-62



# Weblinks

|                            |   |
|----------------------------|---|
| [www.addgene.com]          | <a href="https://www.addgene.org/browse/sequence/142418">https://www.addgene.org/browse/sequence/142418</a>   |
| [AppliChem PM III]         | <a href="https://www.applichem.com/fileadmin/produktinfo/-a4402_de.pdf">https://www.applichem.com/fileadmin/produktinfo/-a4402_de.pdf</a>   |
| [www.easyspin.org]         | <a href="http://easyspin.org/easyspin/documentation/">http://easyspin.org/easyspin/documentation/</a>   |
| [www.enzolifesciences.com] | <a href="http://www.enzolifesciences.com/platforms/cellular-analysis/oxidative-stress/spin-traps-&amp;-spin-probes/">http://www.enzolifesciences.com/platforms/cellular-analysis/oxidative-stress/spin-traps-&amp;-spin-probes/</a>   |
| [W. Müller]                | <a href="http://www.ces.karlsruhe.de/culm">http://www.ces.karlsruhe.de/culm</a>   |
| [www.neb.com]              | <a href="https://www.neb.com/~media/NebUs/Page-Images/ToolsandResources/InteractiveTools/DNA-SequencesandMaps/textdocuments/pmalc2xgbk.txt">https://www.neb.com/~media/NebUs/Page-Images/ToolsandResources/InteractiveTools/DNA-SequencesandMaps/textdocuments/pmalc2xgbk.txt</a> |
| [www.neb.com]              | <a href="https://www.neb.com/products/n8108-pmal-c5x-vector">https://www.neb.com/products/n8108-pmal-c5x-vector</a>   |
| [www.niehs.nih.gov]        | <a href="https://tools.niehs.nih.gov/stdb/index.cfm">https://tools.niehs.nih.gov/stdb/index.cfm</a> ;<br>NIEHS Spin Trap Database   |
| [Polyhach 2013]            | Polyhach Y., Jeschke G., Bordignon E., Stoll S. (2013):<br>MMM Version 2013:<br>Multiscale modeling of macromolecular systems;<br><a href="http://www.epr.ethz.ch/software/index">www.epr.ethz.ch/software/index</a>  |
| [www.rcsb.org]             | <a href="http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do">http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do</a>   |
| [1ANF]                     | Maltodextrin binding protein with bound maltose;<br>DOI: 10.2210/pdb1anf/pdb  |
| [1FQB]                     | Structure of maltotriitol bound to open-form maltodextrin binding protein in P2(1)crystal form;<br>DOI: 10.2210/pdb1fqb/pdb   |
| [1FQC]                     | Crystal structure of maltotriitol bound to closed-form maltodextrin binding protein;<br>DOI: 10.2210/pdb1fqc/pdb  |
| [1OMP]                     | Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrine binding protein involved in active transport and chemotaxis;<br>DOI 10.2210/pdb1omp/pdb   |





# Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die mich bei meinen Experimenten und der Arbeit so kräftig unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer bedanken, der mich bereits seit meiner Diplomarbeit betreut und unterstützt hat.

Du hattest jederzeit eine offene Tür für mich und ich bin Dir für all die Möglichkeiten dankbar, die Du mir während dieser Zeit geboten hast.

Auch gebührt mein Dank Prof. Dr. Antonio J. Pierik, der stets für mich ansprechbar war. Für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik zu Vorgehensweisen und Methodik danke ich Dir.

Ich danke Prof. Dr. Jack. H. Freed und Dr. Peter P. Borbat für die gelungene Zusammenarbeit an der Cornell University, Ithaca, NY.

Dr. Yvonne Lorat danke ich für die zahlreichen interessanten Debatten und Ideen zum ROS-Projektes, welche dieses erst möglich gemacht haben.

Für seine fortwährende Unterstützung und die Korrektur meiner Arbeit möchte ich ganz besonders Dr. Reinhard Philipp danken.

Die Zusammenarbeit mit Dir war stets angenehm und bei technischen Problemen konnte ich Dich jederzeit um Rat fragen. Danke dafür.

Auch komme ich nicht umhin meinen Freunden zu danken, denn ohne Eure moralische Unterstützung wäre ich niemals soweit gekommen.

Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei meiner Freundin, welche mich durch die letzte Phase meines Studiums begleitet hat und entsprechend viel Geduld aufbringen musste.

Ein herzliches Dankeschön vor allem an meine Mutter, den jederzeit hattest Du ein offenes Ohr für meine Sorgen.

Ich werde wohl niemals genügend Worte finden können um dir zu danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch bei dem gesamten Arbeitskreis Biochemie für die große Hilfsbereitschaft und die vielen angenehmen Stunden in den Laboren bedanken, welche die Universität zu einem zweiten Zuhause gemacht haben.



# Eidesstattliche Erklärung

Familienname: Selmke

Vorname: Benjamin

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Literaturzitate kenntlich gemacht habe.

Kooperationsprojekte sind ausdrücklich als solche gekennzeichnet und die Mitarbeiter genannt.

Ich erkläre außerdem, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Kaiserlautern, November 2017

Benjamin Selmke



# Curriculum Vitae

## Ausbildung:

---

10/2013 bis 12/2017

### **Promotion** in der **Chemie**

Technische Universität Kaiserslautern

- Fachbereich: Biochemie

Titel der Dissertation:

*“Untersuchungen zur Struktur und Funktion  
des Maltose bindenden Proteins  
Radikalnachweis unter Verwendung  
einer neuartigen Spin trap”*

09/2013

### Abschluss als **Diplom-Biophysiker**

Technische Universität Kaiserslautern

10/2008 bis 09/2013

### **Studium der Biophysik**

Technische Universität Kaiserslautern

- Spezialisierung: Chemie
- Diplomarbeit im Fachbereich Biochemie

Titel der Diplomarbeit:

*“Untersuchungen zur geöffneten und  
geschlossenen Form des Maltose bindenden  
Proteins mit Hilfe neuer Mutanten”*

03/2008

### **Abitur**

Theodor-Heuss-Gymnasium Ludwigshafen