

**Biophysikalische Charakterisierung struktureller,  
dynamischer und funktioneller Eigenschaften  
fluormarkierter Proteine im zellulären Kontext**

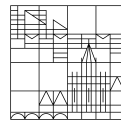
**Dissertation zur Erlangung des  
akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt von

Welte, Hannah

an der

Universität  
Konstanz



Mathematisch-naturwissenschaftliche Sektion

Fachbereich Chemie

Konstanz, 2021

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2022

1. Referent/Referentin: Privatdozent Dr. Michael Kovermann
2. Referent/Referentin: Prof. Dr. Valentin Wittmann
3. Referent/Referentin: Prof. Dr. Elke Deuerling

# Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste .....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 „Molecular Crowding“ und Studien in zellähnlichen Bedingungen .....	2
1.2 Studien in der Zelle .....	7
1.3 Das Protein Cold Shock Protein B aus <i>Bacillus subtilis</i> ( <i>BsCspB</i> ).....	8
2 Verwendete Methoden zur Untersuchung von Proteinen .....	13
2.1 Fluoreszenzspektroskopie .....	13
2.2 NMR-Spektroskopie.....	16
2.2.1 <sup>19</sup> F NMR-Spektroskopie.....	20
3 Aufgabenstellung.....	23
4 Experimentalteil.....	26
4.1 Konstruktion pET24a Vektor mit <i>BsCspB</i> Sequenz .....	26
4.1.1 Konstruktion des pET24a <i>BsCspB</i> Vektors mit Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	26
4.1.2 Konstruktion des pET24a <i>BsCspB</i> Vektors mit enzymatischem Verdau .....	27
4.2 Proteinexpression .....	27
4.2.1 Expression von <sup>19</sup> F-markiertem <i>BsCspB</i> unter Zugabe von Glyphosat.....	27
4.2.2 Expression von <sup>19</sup> F-markiertem <i>BsCspB</i> durch Zugabe von <sup>19</sup> F- markiertem Phenylalanin oder Tryptophan .....	28
4.2.3 Expression von <sup>19</sup> F-markiertem <i>BsCspB</i> aus auxotrophen <i>E. coli</i> Bakterien Stämmen .....	28
4.3 Proteinaufreinigung.....	31
4.3.1 Bakterieller Aufschluss .....	31

4.3.2	Anionenaustauschchromatographie .....	31
4.3.3	Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	31
4.3.4	Größenausschlusschromatographie.....	32
4.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	32
4.4	Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht .....	33
4.4.1	Chemische Denaturierung.....	33
4.4.2	Protein – DNS Interaktionen.....	35
4.5	Kinetische Messungen mittels Stopped Flow Spektroskopie .....	35
4.6	Kristallstrukturanalyse.....	37
4.7	NMR spektroskopische Messungen.....	37
4.7.1	Herstellung Zelllysat .....	38
4.7.2	Eindimensionale $^1\text{H}$ und $^{19}\text{F}$ NMR-Spektroskopie und zweidimensionale $^1\text{H}$ $^{15}\text{N}$ NMR-Spektroskopie.....	40
4.7.3	Temperatur induzierte Denaturierung detektiert mit $^1\text{H}$ und $^{19}\text{F}$ NMR-Spektroskopie.....	41
4.7.4	Chemisch induzierte Denaturierung detektiert mit $^1\text{H}$ und $^{19}\text{F}$ NMR-Spektroskopie.....	42
4.7.5	Protein – DNS Interaktionen.....	45
4.7.6	Zuordnung der $^{19}\text{F}$ Resonanzfrequenzen von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe <i>BsCspB</i>	47
4.7.7	NMRLineGuru.....	47
4.7.8	Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Relaxationsdispersionsmessungen am $^{19}\text{F}$ Kern .....	47
4.7.9	$^{19}\text{F}$ NMR Messungen in <i>E. coli</i> Zellen.....	48
5	Ergebnisse und Diskussion .....	50
5.1	Expression und Aufreinigung von fluormarkierten Varianten des <i>BsCspBs</i> .....	51
5.1.1	Darstellung von fluormarkiertem <i>BsCspB</i> durch die Glyphosat Methode .....	52

5.1.2	Darstellung von fluormarkiertem <i>BsCspB</i> durch Zugabe von fluormarkiertem Phenylalanin oder Tryptophan .....	54
5.1.3	Darstellung von fluormarkiertem <i>BsCspB</i> durch die Verwendung von Phenylalanin- oder Tryptophan-auxotrophen Bakterienstämmen .....	58
5.1.4	Aufreinigung von fluormarkiertem <i>BsCspB</i> .....	66
5.2	Spektroskopische Untersuchungen an fluormarkiertem <i>BsCspB</i> .....	70
5.2.1	Bestimmung der thermischen Stabilität mit Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht .....	70
5.2.2	Bestimmung der thermischen Stabilität mit <sup>1</sup> H und <sup>19</sup> F NMR-Spektroskopie .....	78
5.2.3	Untersuchung von Faltungskinetiken mittels Stopped Flow Fluoreszenz Messungen .....	82
5.2.4	Kristallstrukturanalyse von 4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i> und 4- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> .....	89
5.2.5	Einfluss des pH Werts auf Stabilität.....	90
5.3	Untersuchungen in zellähnlicher Umgebung.....	92
5.3.1	Bestimmung der Stabilität von fluormarkiertem <i>BsCspB</i> in Zelllysat mittels eindimensionaler <sup>19</sup> F NMR Spektroskopie .....	92
5.3.2	Untersuchung der Interaktion zwischen Oligonukleotiden und fluormarkiertem <i>BsCspB</i> in Zelllysat mittels eindimensionaler <sup>19</sup> F NMR-Spektroskopie .....	107
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	133
	Abkürzungsverzeichnis .....	i
	Abbildungsverzeichnis .....	iv
	Tabellenverzeichnis .....	xx
	Literaturverzeichnis .....	xxii
	Anhang.....	xxxiii
	Danksagung.....	lxi

## Publikationsliste

### Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen:

1. Welte, H., & Kovermann, M. (2019). Targeted expression and purification of fluorine labelled cold shock protein B by using an auxotrophic strategy. *Protein expression and purification*, 157, 86-91.
2. Welte, H., Zhou, T., Mihajlenko, X., Mayans, O., & Kovermann, M. (2020). What does fluorine do to a protein? Thermodynamic, and highly-resolved structural insights into fluorine-labelled variants of the cold shock protein. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.
3. Welte, H., & Kovermann, M. (2020). Insights into protein stability in cell lysate by  $^{19}\text{F}$  NMR spectroscopy. *ChemBioChem*, 21(24), 3575.
4. Welte, H., & Kovermann, M. (2021). Fluorine NMR spectroscopy enables to quantify the affinity between DNA and proteins in cell lysate. **(submitted)**

### Weitere Publikation:

1. Muck, C. S., Linseis, M., Welte, H., Weickert, S., Drescher, M., & Winter, R. F. (2018). Electrochemical and Spectroscopic Studies on  $\sigma$ -Phenyl Ruthenium Complexes  $\text{Ru}(\text{CO})\text{Cl}(\text{C}_6\text{H}_4\text{R}-4)(\text{P}i\text{Pr}_3)$  2. *Organometallics*, 37(13), 2111-2122.

# 1 Einleitung

Proteine sind biologische Makromoleküle, die in jeder Zelle zu finden sind und meist mehr als die Hälfte des Trockengewichts ausmachen. Sie sind aus zwanzig unterschiedlichen Aminosäuretypen aufgebaut, deren spezifische Abfolge die Primärsequenz der Proteine bildet. Somit kommt es bei einer Sequenzlänge von 80 Aminosäuren zu  $20^{80}$  verschiedenen Möglichkeiten das Protein zu bilden. Diese hohe Anzahl an möglichen Protein zeigt sich auch in den vielen unterschiedlichen Aufgaben, wie zum Beispiel den Transport von Metaboliten, das Pumpen von Ionen, die Katalyse von Reaktionen und das Erkennen von Signalstoffen, welche die Proteine je nach Struktur in der Zelle erfüllen. Neben der Primärstruktur gibt es drei weitere Betrachtungsebenen, um die räumliche Struktur eines Proteins vollständig zu beschreiben. Durch die Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren kommt es zur Sekundärstruktur. Die Interaktion dieser Sekundärstrukturelemente führt wiederum zu der Tertiärstruktur, welche die gesamte räumliche Struktur der Proteinkette beschreibt. Wenn ein Protein aus mehreren Ketten besteht, bezeichnet man die gesamte räumliche Anordnung als Quartärstruktur.

Proteine sind somit sehr vielfältig und allgegenwärtig. So bestehen unter anderem Muskeln, Haut, Haare und Gehirn größtenteils aus Proteinen und für die Wissenschaft ist es essentiell den Aufbau, die Faltung und Dynamik sowie die Funktion der Proteine zu verstehen. Aus diesem Grund beschäftigen sich seit einiger Zeit viele Studien mit der Untersuchung von Proteinen und deren Funktion [1-4]. Auch gibt es eine zentrale Datenbank, in der alle strukturellen Daten aller Proteine gesammelt werden [5].

Viele biophysikalische Studien, die sich mit der Funktion, Struktur und Dynamik von Proteinen beschäftigen, arbeiten mit Konzentrationen kleiner als 10 g/l [6]. Unter diesen Bedingungen kommt es nur zu Interaktion zwischen Wassermolekülen und dem zu untersuchenden Protein [7]. Betrachtet man jetzt aber Proteine in einem biologischen Kontext, wird klar, dass in Wirklichkeit die intrazelluläre Umgebung sehr inhomogen und voll an Makromolekülen ist. Dabei machen verschiedene Makromoleküle bis zu 40 % des Zellvolumens aus und erreichen eine Konzentration von bis zu 400 g/l in bakteriellen und 50-200 g/l in eukaryotischen Zellen [8-10]. In diesem Zusammenhang zeigen einige Studien, dass diese hohen Konzentrationen an

Makromolekülen einen deutlichen Einfluss auf die Stabilität, Dynamik und Interaktion mit anderen Molekülen des betrachteten Proteins haben kann [11-23]. Diese Interaktion wird auch als quaternäre Struktur bezeichnet [24].

### 1.1 „Molecular Crowding“ und Studien in zellähnlichen Bedingungen

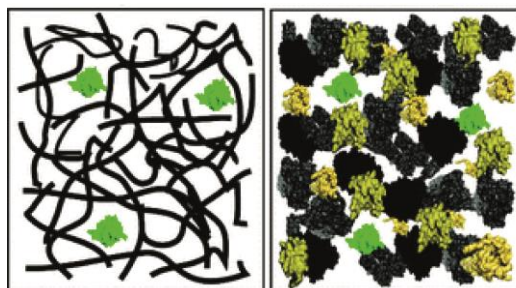
Schon ab den 1940er Jahren zeigten verschiedene Experimente, dass die Zugabe von Polymeren wie Heparin, Hyaluronsäure, Dextran oder Polyethylenglykol (PEG) Proteine aus der Lösung fällen können [25-27]. Der Einfluss der umgebenden Makromoleküle wurde 1977 von Minton *et al.* erkannt, als sie die Gelierung von Hämoglobin bei hochkonzentrierten Lösungen beobachteten [28]. 1981 benutzten Minton und Wilf das erste Mal den Ausdruck „Molecular Crowding“, also die molekulare Verdichtung, um den Einfluss hoher Konzentration an Makromolekülen in Lösung, wie es in der Zelle vorkommt, zu beschreiben. Dabei zeigten sie, dass verschiedene Moleküle, obwohl sie nicht an der Reaktion teilnehmen einen Einfluss auf die Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase haben [29]. Im selben Jahr postulierten sie eine Theorie bei der nicht nur die Konzentration der reaktiven Spezies sondern auch hohe Konzentrationen an Molekülen, die nicht an der Reaktion teilnehmen, einen Einfluss auf die Aktivität eines Enzyms haben [30]. Bei dem sogenannten „excluded volume“ Effekt beanspruchen die umgebenden Makromoleküle so viel Platz, dass für das untersuchte Protein nur ein reduzierter Raum zur Verfügung steht und entropisch günstigere Zustände stabilisiert werden. Aufgrund dieses verringerten Volumens sind alle Reaktionen mit einer Volumenänderung von der molekularen Verdichtung beeinflusst. Zimmerman und Minton führten 1993 Experimente mit Polymeren wie PEG und Dextran durch, um den fällenden Effekt eines verdichteten Hintergrunds auf das Protein zu zeigen [31]. Des Weiteren wandten Wills *et al.* diese Theorie an, um Experimente zu beschreiben, die den Einfluss von PEG und Dextran auf 23 ribosomale Proteine untersuchten [32]. Minton erweiterte 2000 die Theorie mit einem statistisch-thermodynamisches Modell, das den stabilisierenden, durch eine hohe Konzentration von inerten Makromolekülen hervorgerufenen „excluded volume“ Effekt auf die Stabilität eines globulären Proteins in Bezug auf Hitzedenaturierung beschreibt [33]. Außerdem veröffentlichte er thermodynamische Modelle, die Wechselwirkungen zwischen einer ungefalteten Polypeptidkette und einem Hartkugel- bzw. Hartstabmodell beschreiben. Des

Weiteren wird eine allgemeine thermodynamische Beschreibung des Gleichgewichts zwischen einem einzigen nativen Zustand und einer Vielzahl von entfalteten oder teilweise entfalteten Zuständen eines Proteins vorgestellt. Diese Modelle werden verwendet, um die Auswirkungen des „excluded volume“ Effekts auf eine experimentell messbare Konstante für das Gleichgewicht zwischen nativen und nicht nativen Konformationen abzuschätzen [34]. Im Jahr 2008 fassten Zhou, Rivas und Minton die Ergebnisse in einer allgemeinen statistischen Theorie zusammen, die verschiedene Formen von Makromolekülen einbezieht und die Möglichkeit bietet näherungsweise die Beiträge der Volumenbesetzung auf die Stabilität der Proteinfaltung und Assoziationsgleichgewichte vorherzusagen [35]. In diesem Review gingen die Autoren neben dem „excluded volume“ Effekt auch auf andere Effekte, wie den nicht spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem betrachteten Protein und den Crowding Reagenzien, ein. Dabei betonten sie deren Wichtigkeit, konnten diese aber nicht in die Theorie inkludieren [35]. Christiansen *et al.* zeigten in ihrer Studie 2013 ebenfalls die Grenzen der Theorien von Minton auf, da bei Konzentrationen von Crowding Molekülen größer als 200 g/l die Ergebnisse von der Linearität und somit von der Theorie abweichen [36]. Die Unvollständigkeit der Theorie kommt dadurch zustande, da sie nur eine entropische Erklärungen für Effekte durch die Crowding Reagenzien liefert. Nichtsdestotrotz zeigte diese Studie, dass die Modelle, bei denen von harten Kugeln als gefaltete und ungefaltete Proteine und harte Stäbchen als synthetischen Polymere ausgegangen wird, thermodynamische und kinetische Experimente mit Dextran und Ficoll gut widerspiegeln. Des Weiteren deutet der Anstieg der Faltungsgeschwindigkeit und die invariante Entfaltungsgeschwindigkeit bei Zugabe von Dextran auf eine Störung des entfalteten Zustandes hin, was gut mit den Theorien von Minton [33, 34] übereinstimmt. Außerdem liefern Experimente mit chemischer oder thermischer Entfaltung mit Crowding Reagenzien die gleichen Ergebnisse, was zeigt, dass der entfaltete Zustand unabhängig von der Entfaltungsmethode ist [36]. Neben der Änderung der Entfaltungskinetik wird auch der ungefaltete Zustand selber durch die Crowding Reagenzien beeinflusst, dabei wird dieser durch Zugabe von Makromolekülen kompakter, da er weniger Raum zur Verfügung hat. Aus diesem Grund erhöht sich die Stabilität des gefalteten Zustandes [37]. Außerdem führt die Zugabe von PEG oder Dextran zur Fibrillenbildung von  $\alpha$ -Synuclein [38]. Somit sind Studien mit Crowding Reagenzien essentiell, um durch Aggregatsbildung ausgelöste Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson zu

untersuchen. Des Weiteren zeigten Akabayov *et al.* 2013 den Einfluss von Makromolekülen auf enzymatische Aktivitäten [39]. Überdies werden nicht nur Proteine, sondern auch andere Makromoleküle wie Ribonukleinsäuren durch die verdichteten Bedingungen in der Zelle beeinflusst. So zeigten zum Beispiel Dupuis *et al.* den Einfluss von PEG auf die Kinetik und Stabilität der Faltung von RNS [40]. Verschiedene Studien mit synthetischen Polymeren zeigen neben den „excluded volume“ Effekt auch nicht spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Testprotein und den umgebenden Makromolekülen [41, 42].

Neben diesen ausgewählten Beispielen für die Anwendung von synthetischen Polymeren, um die Zellumgebung zu simulieren, wurden noch viele weitere Studien gemacht, die hier nicht erwähnt werden.

Studien mit synthetischen Polymeren als Crowding Reagenz geben erste Einblicke auf den Einfluss der an Makromolekülen reichen Umgebung eines Proteins in der Zelle. Nichtsdestotrotz, muss man dieses System auf eine biophysologisch relevantere Ebene heben, da die Zelle vor allem mit vielen verschiedenen kugelförmigen, meist geladenen Protein und nicht mit chemisch inerten Polymeren gefüllt ist. Proteine und Polymere unterscheiden sich sowohl in der Form als auch in der Oberfläche (Abbildung 1). Während Polymere in hoher Konzentration ein poröses Netz mit einer hohen Viskosität bilden [43], sind kugelförmige Proteine kompakter und haben einen kleineren Effekt auf die makroskopische Viskosität (Abbildung 1). Außerdem fehlt es den Polymeren an den funktionellen Gruppen der Proteine, welche positiv und negativ geladen sein können und untereinander und auch mit dem untersuchten Protein interagieren können. Somit kommt neben der entropischen eine enthalpische Komponente hinzu.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung von Proteinen (grün) in unterschiedlicher, verdichteter Umgebung. Dabei werden als Crowding Reagenzien synthetische Polymere (links) und Proteine (rechts) dargestellt. Die Abbildung wurde von Wang, Y., Li, C., & Pielak, G. J. (2010). Effects of proteins on protein diffusion. *Journal of the American Chemical Society*, 132(27), 9392-9397. entnommen [44].

## 1 Einleitung

Aus diesem Grund ist es unerlässlich neben Studien mit Polymeren auch Proteine als Crowding Reagenzien zu verwenden. Eine der ersten Arbeiten zur Untersuchung von Proteinen in Gegenwart einer hohen Konzentration an anderen Proteinen wurde 1981 von Minton und Wilf durchgeführt. Dabei wurde Myoglobin bei neutralem pH Wert durch die Gegenwart von Lysozym, Ribonuklease A oder  $\beta$ -Lactoglobulin dimerisiert [45]. Der Effekt der Ribonuklease A auf die Dimerisierung von Apomyoglobin wurde von Zorilla *et al.* bestätigt. Des Weiteren zeigten sie, dass Apomyoglobin in Gegenwart von Humanalbumin nicht dimerisiert [46]. Auch Guseman *et al.* zeigten in ihren Studien von 2017 und 2018, dass je nach zugegebenen Crowding Reagenz die Stabilität des betrachteten Systems im Vergleich zu einer Messung in Puffer zu- oder abnimmt [47, 48]. Diese Studien untersuchten die Stabilität von zwei unterschiedlichen Dimeren der Streptokokken B1 Domäne des G Proteins in der Gegenwart von Bovines Serumalbumin (BSA) und Lysozymen und verglichen diese mit Messungen in Puffer Lösungen [47, 48].

Aus diesen Studien wird deutlich, dass es neben den harten, stabilisierenden Wechselwirkungen [30] („excluded volume“) des zu betrachtendem Systems mit der Umgebung auch weitere Wechselwirkungen, die sogenannten weichen Wechselwirkungen (engl.: soft interactions) gibt [7, 49]. Diese chemischen Interaktionen können entweder anziehend oder abstoßend sein. Abstoßende Wechselwirkungen sind stabilisierend, da sie die harten Interaktionen verstärken. Im Gegensatz dazu sind die anziehenden Interaktionen destabilisierend [7]. Dieses Verhalten zeigt sich auch bei der Interaktion mit Urea. Nichtspezifische Wechselwirkungen mit dem Proteinerückgrat begünstigen die Exposition von mehr Oberfläche, was zur Entfaltung führt. Diese attraktiven Wechselwirkungen haben eine enthalpische Komponente [50].

Die weichen Interaktionen kommen oft durch die Ladungen der Crowding Reagenzien und des Testproteins zustande. So kommt es bei gleicher Ladung zu abstoßenden und bei gegensätzlicher Ladung zu anziehenden Wechselwirkungen. In manchen Fällen können aber auch nichtspezifische Wechselwirkungen zwischen Testprotein und Crowding Reagenz die Interaktion aufgrund der Ladung überlagern. So zeigten Sarkar *et al.*, dass die anionischen Proteine aus *Escherichia coli* (*E. coli*) eine destabilisierende Wirkung auf das anionische Protein Chymotrypsin Inhibitor 2 (CI2) trotz gleicher Ladung haben [51]. In dieser und weiteren Studien untersuchten Pielak *et al.* den Einfluss verschiedener Crowding Reagenzien, sowohl von synthetischen

## 1 Einleitung

Polymeren wie PVP40 und Ficoll70 als auch von verschiedenen Proteinen wie BSA und Lysozym, auf verschiedene Testproteine. Dabei zeigten sie, dass je nach Crowding Reagenz die Stabilität des Testproteins unterschiedlich beeinflusst wird [51-53]. Auch die Diffusion des Testproteins wird je nach zugebenen Makromolekül unterschiedlich beeinflusst [44]. Der nächste Schritt, um das zu untersuchende System zellähnlicher zu machen, ist es anstatt nur ein Protein als Crowding Reagenz zu nehmen, wie in der Zelle, viele verschiedene Makromoleküle zum Testsystem hinzuzufügen.

Für die Darstellung einer inhomogenen Umgebung wurde in verschiedenen Studien Zelllysate verwendet. Phillip *et al.* bestimmten zum Beispiel unter anderem die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{on}$  und  $k_{off}$  des TEM1  $\beta$ -Laktamase- $\beta$ -Laktamase Inhibitor Komplexes in HeLa Zelllysate [54]. Eine weitere Untersuchung in Zelllysate wurde 2013 von Sarkar *et al.* gemacht [55]. Dabei untersuchten sie den Einfluss verschiedener *E. coli* Cytosol Konzentrationen auf die Stabilität des Proteins Chymotrypsin Inhibitor 2 (CI2) und verglichen diesen mit dem von verschiedenen Crowding Reagenzien auch aus vorherigen Studien [53]. Dabei verwendeten sie sowohl synthetische Polymere wie PVP40 und Ficoll70 als auch Proteine wie BSA und Lysozym [55]. Es zeigte sich, dass die synthetischen Polymere aufgrund der harten Interaktionen einen unterschiedlich starken stabilisierenden Effekt auf CI2 haben, während das Cytosol sowie die Proteine im Gesamten einen destabilisierenden Effekt haben.

Wang *et al.* zeigten bei Messungen im Zelllysate, dass die Mobilität von Proteinen je nach Proteinoberfläche signifikant und unterschiedlich durch den verdichteten Zelllysathintergrund beeinflusst wird [56].

Weitere wichtige Aspekte des Einflusses durch die molekulare Verdichtung, vor allem der „excluded volume“ Effekt, aber auch die weichen Interaktionen sind unter anderem in diesen Reviews zusammen gefasst [57-59].

Aus den genannten Studien wird deutlich, dass die Umgebung des zu untersuchten Proteins einen signifikanten Einfluss auf die Struktur, Dynamik, Kinetik und Funktion des Proteins haben kann und in Untersuchungen berücksichtigt werden muss. Studien mit synthetischen Polymeren liefern näherungsweise gute Ergebnisse [36], es wird aber auch deutlich, dass sie mit weiteren Analysen in komplexeren Umgebungen kombiniert werden müssen, um ein vollständiges Bild des Proteins oder eines anderen

Makromoleküls in der Zelle zu erhalten. Des Weiteren müssen auch Messungen in der Zelle durchgeführt werden, um alle Aspekte zu betrachten.

Messungen in komplexen Umgebungen sind auf technischer Ebene immer noch eine Herausforderung, da durch einen vielfältigen Hintergrund auch vielfältige Hintergrundsignale zustande kommen. Dennoch wurden einige Studien *in vivo* durchgeführt.

### 1.2 Studien in der Zelle

Viele Studien, die eine zellähnliche Umgebung simulieren, zeigen, dass der Einfluss der Umgebung die Struktur, Funktion, Dynamik und Kinetik eines Proteins signifikant beeinflussen kann. Somit ist es essentiell auch Studien in der Zelle durchzuführen. Im Folgenden sind einige dieser Studien zusammengefasst.

Unter anderem bestimmten in 2001 Ghaemmaghami *et al.* die Stabilität des Modelproteins  $\lambda_{6-85}$  [60]. Dedmon *et al.* untersuchte das intrinsisch ungeordnete Protein FlgM in *E. coli* Zellen. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zu Messungen in Puffer, das Protein FlgM in *E. coli* Zellen eine strukturierte Form annimmt [61]. In 2011 veröffentlichten Schlesinger *et al.* eine Studie, die zeigte, dass die Stabilität einer Variante des Proteins L in *E. coli* Zellen nicht zunimmt und somit nichtspezifische Wechselwirkungen mit dem Cytosol den „excluded volume“ Effekt auslöschen [62]. Die Interaktion mit dem Cytosol der Zelle, der sogenannten quinären Struktur wurde unter anderem von Monteith *et al.* nachgewiesen als sie zeigten, dass eine Oberflächenmutation der B1 Domäne des Proteins G ein zehnfach höheren Stabilitätsverlust in *E. coli* Zellen hervorruft als in Puffer [24]. Des Weiteren zeigte dieselbe Arbeitsgruppe 2016 die pH Abhängigkeit der quinären Struktur in der Zelle [63]. Die Relevanz der quinären Struktur wurde im Detail von Cohen und Pielak in einem Review zusammengefasst [64]. Speer *et al.* bestimmten die Stabilität des A34F GB1 Homodimer Komplex in Puffer, *E. coli* sowie *Xenopus laevis* Oozyten. Dabei zeigte sich, dass der  $K_D$  Wert für Messungen im Puffer um den Faktor 4-6 höher ist, als für die Messungen in den verschiedenen Zellentypen, wobei sich dabei auch deutliche Unterschiede zeigen [65].

Auch Messungen in Säugetierzellen wurden durchgeführt. So zeigten Danielsson *et al.*, dass sowohl Säugetierzellen als auch bakterielle Zellen die Stabilität einer Cu/Zn

Superoxid Dismutase im Vergleich zu der in Puffer herabsetzen. Interessant ist, dass, während die Schmelztemperatur sinkt, sich die kalte Entfaltung gekoppelt mit einer verstärkten Wärmekapazitätsänderung in den physiologischen Bereich verschiebt. Der Effekt scheint durch transiente, sequenzspezifische Wechselwirkungen mit den zellulären Komponenten ausgelöst zu werden, die bevorzugt auf das entfaltete Ensemble wirken. Dies deutet darauf hin, dass der *in vivo* Einfluss abhängig vom gesamten System, also des untersuchten Proteins und der Umgebung, ist [65]. Im Jahr 2009 publizierte Sudhaharam *et al.* eine Studie zu der Interaktion zwischen RhoGTPase Cdc42 und drei ihrer Effektorproteinen in Säugetierzellen. Dabei wird deutlich, dass die Dissoziationskonstante,  $K_D$ , um den Faktor 2 geringer wird als in Puffer [66]. Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie von Shi *et al.*, dass sich der  $K_D$ -Wert der Interaktion von Cdc42 mit einem Actinbindenden Gerüstprotein in Zebrafisch Embryos um den Faktor 5 im Vergleich zu dem Wert in Puffer vergrößert [67].

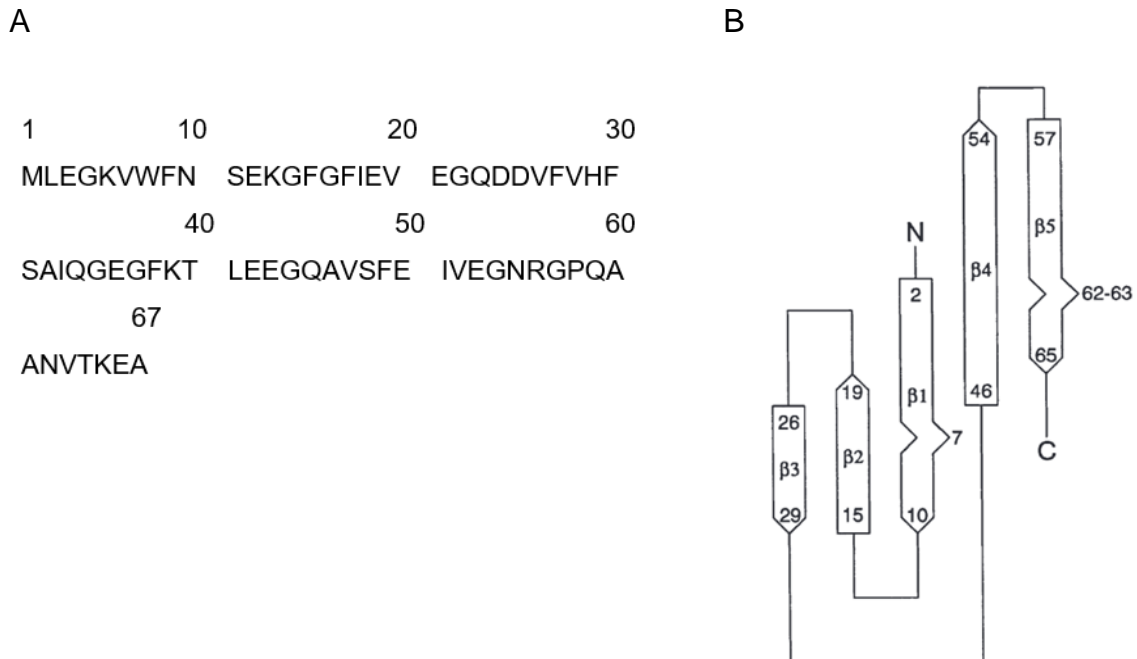
Die genannten Studien machen deutlich, dass auch die Art der Umgebung einen signifikanten Einfluss auf das zu untersuchende Protein hat und jedes System einzeln für sich untersucht werden muss. Nichtsdestotrotz sind Messungen in der Zelle aufgrund der Lebenszeit und technischen Anforderungen limitiert. Aus diesen Gründen müssen Methoden und Systeme entwickelt werden, die die Zellumgebung gut wiedergeben und dennoch messtechnisch leichter zugänglich sind.

### 1.3 Das Protein Cold Shock Protein B aus *Bacillus subtilis* (BsCspB)

Bakterien im Boden sind zahlreichen Veränderungen der Umgebung wie zum Beispiel starken Temperaturschwankungen ausgesetzt. Bei einer abrupten Reduktion der Temperatur von 37 °C zu Temperaturen zwischen 10 °C und 15 °C spricht man von einem Kälteschock [68]. Während die Expressionsrate der meisten anderen Proteine herabgesetzt wird, werden in der Akklimatisierungsphase Kälteschockproteine (engl.: cold shock proteins) intrazellulär gebildet [69]. Eines der am besten charakterisierten Kälteschockproteine ist das Cold Shock Protein B aus *Bacillus subtilis* (BsCspB). Dieses Protein ist 67 Aminosäuren lang (Abbildung 2 A) und weist eine molare Masse von  $M = 7,365$  kDa auf. Außerdem bildet es eine aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Strängen aufgebaute Fassstruktur (engl.:  $\beta$ -barrel), hat eine negative Gesamtladung von -5,8 und einen Isoelektrischen Punkt von  $pI = 4,5$  (Abbildung 2). Für diese Studie

## 1 Einleitung

interessant ist, dass 8 der 67 Aminosäuren des *BsCspB* aromatische Aminosäuren sind, sieben Phenylalanine und ein Tryptophan (Abbildung 2 A).

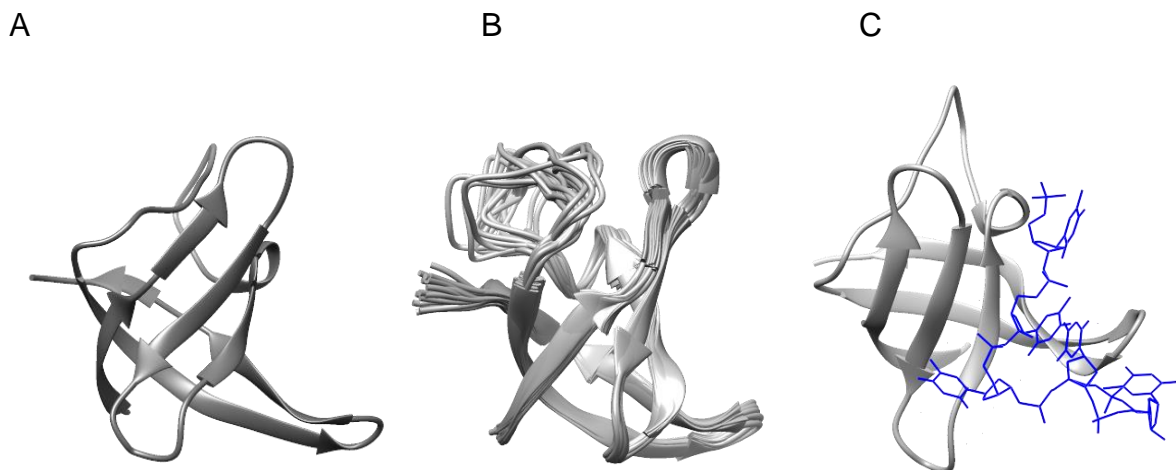


**Abbildung 2: Primärsequenz des *BsCspB*, wobei die Aminosäuren durch den Einbuchstabencode dargestellt sind (A). Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von *BsCspB*, wobei die Positionen der fünf  $\beta$ -Stränge dargestellt sind (B). (B) wurde aus Schindelin, H., Marahiel, M. A., & Heinemann, U. (1993). Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature*, 364(6433), 164-168. entnommen [70].**

Des Weiteren besitzen die gegenüberliegenden Seiten des  $\beta$ -Fasses gegensätzliche Eigenschaften, wobei die Bindestelle für Nukleotide amphiphil ist und aus hydrophoben, positiv geladenen, lösungsmittlexponierten Resten besteht, während die gegenüberliegende Seite der Bindestelle von negativ geladenen Resten bedeckt ist. Genau betrachtet liegt in der Mitte der  $\beta$ -Stränge zwei und drei eine hydrophobe Stelle, die aus der Aminosäure W8 des  $\beta$ -Strangs eins, den Aminosäuren F15, F17, V26, F27, V28 und H29 der  $\beta$ -Stränge zwei und drei sowie F30 und F38 der Schleife zwischen  $\beta$ -Strang drei und vier besteht [71]. Diese Stelle wird durch positiv geladene Reste (K7, K13, D25, H29 und R56) begrenzt, die sich in den Ausstülpungen zweier benachbarter Schleifen zwischen den  $\beta$ -Strängen eins und zwei und  $\beta$ -Strängen vier und fünf befinden [71]. An diese Stelle binden die Nucleinsäuren, wobei das 5'-Ende der Nucleinsäure näher am  $\beta$ -Strang drei und das 3'-Ende näher am  $\beta$ -Strang zwei liegt [72].

## 1 Einleitung

Das *BsCspB* wurde das erste Mal 1992 von Marahiel *et al.* aufgereinigt, kristallisiert (PDB ID: 1CSP) (Abbildung 3 A) und charakterisiert [70, 73, 74], während die erste Struktur in Lösung mittels Kernspinresonanz (engl.: nuclear magnetic resonance, NMR) Spektroskopie 1993 von Schnuchel *et al.* aufgenommen wurde (PDB ID: 1NMF) (Abbildung 3 B) [75]. In *Bacillus subtilis* sind insgesamt drei Kälteschockproteine (CspB, CspC und CspD) bekannt, die etwa eine Übereinstimmung der Sequenz von 70 % aufweisen, wobei das kleine, saure CspB das wichtigste ist [68, 74]. Es weist die für die nukleotidbindende Familie der Kälteschockproteine typische  $\beta$ -Fasstruktur auf und zeigte eine 43 % Übereinstimmung der Sequenzen mit eukaryotischen DNS-Bindeproteinen [74, 76]. Diese zeigen eine hohe Bindeaffinität dem Y-Box Motiv gegenüber, welches eine ATTGG Kernsequenz aufweist [77]. Das *BsCspB* weist dem Y-Box Motiv gegenüber eher eine geringe Affinität mit einem  $K_D$  von  $K_D = 3,9 \mu\text{M}$  auf [78]. Dagegen zeigen Polypyrimidine besonders Polythymidine mit einer Länge von bis zu sieben Nukleotiden dem *BsCspB* gegenüber in einer 1:1 Stöchiometrie eine hohe Affinität mit  $K_D$ -Werten von  $K_D = 362 \text{ nM}$  für dT6 (Hexathymidin) und  $K_D = 1,8 \text{ nM}$  für dT7 (Heptathymidin) [79-81]. Von *BsCspB* im Komplex wurden einige Strukturen bestimmt, unter anderem die Kristallstruktur für *BsCspB* und dT6 (PDB ID: 2ES2) [71] (Abbildung 3 C) und die Struktur von *BsCspB* und dT7 in Lösung (PDB ID: 2F52) [80].



**Abbildung 3:** Die durch Röntgenstrukturanalyse erhaltene Kristallstruktur (PDB ID: 1CSP) (A), die mittels NMR-Spektroskopie erhaltene Struktur in Lösung (PDB ID: 1NMF) (B) von *BsCspB* und die Kristallstruktur eines *BsCspB*/dT6 Komplexes (PDB ID: 2F52) (C).

Die oben näher beschriebene Nukleotidbindungsfläche und der Bindungsmodus wurden durch Mutationsanalyse und Strukturbestimmung von *BsCspB* im Komplex mit Oligonukleotiden bestimmt [71, 78, 80, 82]. Die vorgeschlagene Bindungsfläche besteht aus einer hydrophoben Plattform, die durch aromatische und basische Reste

gebildet wird. Diese Reste (K7, W8, K13, F15, F17, F27, H29, F30 und R56) erwiesen sich als essentiell für die enge Bindung des Liganden. Die meisten von ihnen befinden sich in den Nukleinsäure-Bindungsmotiven RNP-1 (K13 - V20) und RNP-2 (V26 - F30). Die Seitenketten dieser Reste sind oberflächenexponiert und können durch Stapelwechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit den Nukleobasen interagieren.

Betrachtet man die Faltungskinetik und die Stabilität der Kälteschockproteine zeigt sich, dass sie alle eine ähnliche Faltungskinetik ( $k_f \approx 1000 \text{ s}^{-1}$ ), aber unterschiedliche Stabilitäten aufweisen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass für die Stabilität andere Aminosäuren essentiell sind als für die Faltung der Kälteschockproteine [83]. Mirny *et al.* identifizierten die Aminosäuren V8/9, I20/21, V50/51 und V66/67 in fast allen kleinen Oligonukleotidbindenden Proteinen und vermuteten deshalb, dass diese für die Faltung wichtig sind [83]. Für *BsCspB* ist dies aber nicht der Fall, da die Sequenz an diesen Positionen aus den Aminosäuren W8/F9, I51/V52 und E66/A67 besteht. Durch Überlagerung von 250 Csp Sequenzen zeigte sich, dass die Aminosäuren Y6, F9, I18, V26, V28, I33, L41, V47, F49 und V63 im hydrophoben Kern konserviert sind. Außerdem sind die Oberflächen exponierten Aminosäuren K7, W8, F15, F17, D25, F27, H29, F30, F38, K39, R56 und Q59 ebenfalls konserviert und für die Bindung von DNS verantwortlich [84]. Die Aminosäuren F15, F17 und F27 sind im *BsCspB* zusätzlich auch für die Stabilität des Proteins essentiell [85]. Aus diesem Grund ist auch die Stabilität des *BsCspBs* bei der Zugabe von Heptathymidin erhöht [80]. Die Abhängigkeit der Stabilität von der Sequenz in *BsCspB* wurde des Weiteren durch Mutationsanalyse untersucht [84, 86, 87].

Betrachten man die Stabilität und Faltung von *BsCspB* im Detail zeigt sich, dass es, wie für kleine Proteine erwarten, zwei Faltungszustände aufweist [88], wobei der Faltungsübergang nativ-ähnlich ist [89], die  $\beta$ -Faltblätter schon vollständig geformt sind und es zu einer temporären Interaktion zwischen  $\beta$ -Strang eins und  $\beta$ -Strang zwei kommt [87]. Außerdem zeigt es bei Standardbedingungen sehr schnelle Faltungsraten von  $k_f = 690 \text{ s}^{-1}$  und  $k_u = 36 \text{ s}^{-1}$  [88], wobei die Faltung vollständig reversibel ist und eine geringe thermodynamische Stabilität von etwas  $\Delta G^0 = 10 \text{ kJ/mol}$  [11]. Des Weiteren ist sowohl die Bindung von DNS als auch die Stabilität des *BsCspB* abhängig von der Salzkonzentration. So ist zum Beispiel bei einer Konzentration von NaCl von  $c = 1 \text{ M}$  keine Bindung mehr möglich [79]. Ein weiteres Beispiel zeigt, dass bei einer

## 1 Einleitung

Konzentration von  $c = 0,4 \text{ M}$  an Kaliumphosphat es zu einer signifikanten Stabilitätsgewinnung kommt [90].

Zusammengefasst machen die relativ geringe molekulare Masse und die günstigen thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften das Cold Shock Protein B aus *Bacillus subtilis* zu einem idealen Kandidaten für die Durchführung verschiedener Studien nicht nur *in vitro*, sondern auch in zellähnlicher Umgebung.

## 2 Verwendete Methoden zur Untersuchung von Proteinen

In der Strukturbiologie gibt es verschiedene Methoden wie Röntgenkristallstrukturanalyse, Fluoreszenz-, NMR- oder Cirkulardichroismus-Spektroskopie, Kryoelektronenmikroskopie oder Massenspektrometrie [73, 91], um räumlich aufgelöste Informationen über Struktur, Dynamik und Funktion eines Proteins zu erhalten.

In dieser Arbeit werden für die Untersuchung von Proteinen die Röntgenkristallstrukturanalyse, die Massenspektrometrie und verschiedene spektroskopische Techniken (Fluoreszenzspektroskopie, UV/Vis Spektroskopie, NMR-Spektroskopie) verwendet. Bei der Röntgenkristallstrukturanalyse wird der atomare Aufbau des Kristalls durch Beugung von Röntgenstrahlung am Kristallgitter bestimmt, während bei der Massenspektrometrie die zu untersuchenden Moleküle in die Gasphase gebracht und ionisiert werden. Anschließend werden die Ionen mittels eines elektrischen Feldes beschleunigt und nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis  $m/z$  sortiert. Die Spektroskopie generell beruht auf der Untersuchung elektromagnetischer Strahlung, die von der untersuchten Probe emittiert wird (Emissionsspektroskopie) oder die von der untersuchten Probe absorbiert beziehungsweise transmittiert wird (Absorptionsspektroskopie). Die verschiedenen Methoden werden dabei durch den verwendeten spektralen Bereich, die Art der Wechselwirkung der molekularen Struktur, der Kerne oder Elektronen mit der elektromagnetischen Strahlung und durch die elektrischen oder magnetischen Eigenschaften der emittierten und detektierten elektromagnetischen Welle charakterisiert.

Im Folgenden werden die für diese Arbeit wichtigsten verwendeten Methoden, die Fluoreszenzspektroskopie und die NMR-Spektroskopie näher erläutert.

### 2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Um die Fluoreszenzspektroskopie zu beschreiben, müssen zunächst die grundlegenden Prozesse der Fluoreszenz erläutert werden. Bestrahlt man ein Material mit Licht kommt es zur Absorption eines Photons und ein Elektron wird aus dem elektronischen Grundzustand  $S_0$  in einen höheren Zustand  $S_n$  angeregt. Da die Geschwindigkeiten der Atomkerne im Vergleich zu denen der Elektronen

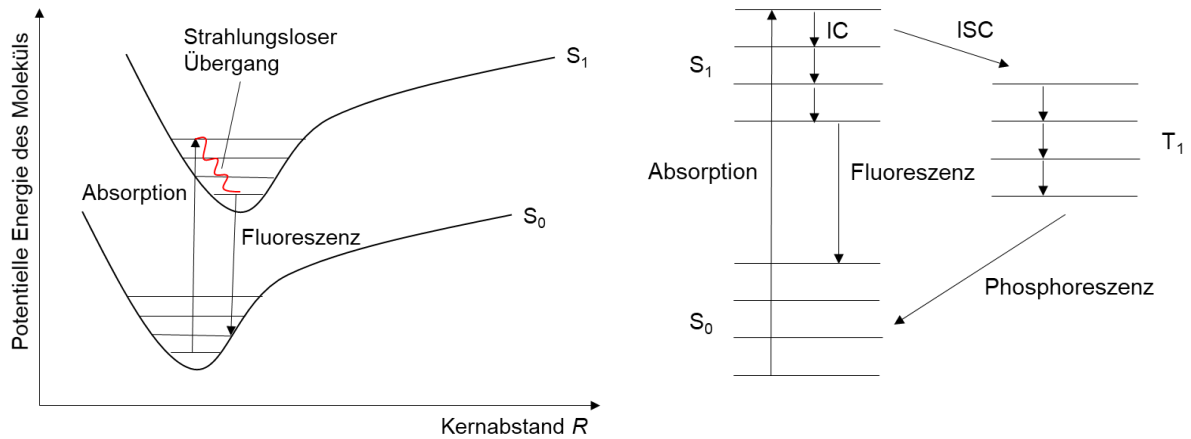
vernachlässigbar klein sind und während des Übergangs als ortsfest angesehen werden können, sind Übergänge bei denen sich die Kernkoordinate nicht ändert, sogenannte vertikale Molekülübergänge deutlich wahrscheinlicher als andere (Franck-Condon-Prinzip) (Abbildung 4 A) [92]. Auf Grund dessen erfolgt die Anregung meist in ein höheres Schwingungsniveau des ersten elektronisch angeregten Zustandes  $S_1$  und nicht in den Schwingungsgrundzustand. Aus dem höheren Schwingungsniveau relaxiert das angeregte Elektron emissionslos in den Schwingungsgrundzustand (IC), da das Molekül Stöße mit seiner Umgebung erfährt. In den elektronischen Grundzustand  $S_0$  geht das Elektron entweder emissionslos über die einzelnen Schwingungsniveaus oder unter spontaner Lichtemission, der sogenannten Fluoreszenz zurück. Wegen dem beschriebenen Franck-Condon-Prinzip und der daraus resultierenden emissionslosen Relaxation aus einem höheren Schwingungsniveau in den Schwingungsgrundzustand ist die Fluoreszenz für alle Übergänge außer dem 0-0 Übergang im Vergleich zu der Absorption rotverschoben. Diese Verschiebung wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet [92].

Der Vollständigkeitshalber muss an dieser Stelle auch der Begriff der Phosphoreszenz geklärt werden.

Das Elektron kann aus dem elektronisch angeregten Singulett Zustand  $S_1$  neben der Relaxation über die Schwingungsniveaus oder durch Fluoreszenzemission auch über einen Triplett Zustand  $T_1$  in den elektronischen Grundzustand übergehen. Bei diesem Übergang erfolgt eine spontane Lichtemission, welche als Phosphoreszenz bezeichnet wird. Die Populierung des Triplett Zustandes  $T_1$  aus den Singulett Zustand  $S_1$  wird als „intersystem crossing“ (ISC) bezeichnet und ist spinverboten. Aus diesem Grund ist der Übergang von  $S_1$  zu  $T_1$  sowie von  $T_1$  zu  $S_0$  deutlich langsamer und man kann nach der Bestrahlung des Materials die Phosphoreszenz deutlich länger beobachten als die Fluoreszenz [92].

Die beschriebenen Übergänge werden in einem Jablonski-Diagramm dargestellt (Abbildung 4 B).

## 2 Verwendete Methoden zur Untersuchung von Proteinen



**Abbildung 4: Frank-Condon-Prinzip (A).** Bei der Anregung eines Moleküls durch Licht erfolgt eine vertikale Anregung eines Elektrons aus dem elektronischen Grundzustand in ein höheres Schwingungsniveau eines elektronisch angeregten Zustandes. Die Relaxation aus den höheren Schwingungsniveau in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands erfolgt emissionslos. Jablonski-Diagramm (B). Die Phänomene der Fluoreszenz und der Phosphoreszenz werden verdeutlicht. Das Jablonski Diagramm veranschaulicht die unterschiedlichen Übergänge von Elektronen nach Anregung mit Licht, wobei  $S_0$  den elektronischen Grundzustand,  $S_1$  den ersten angeregten Singulett Zustand und  $T_1$  den ersten angeregten Triplett Zustand bezeichnet. Der emissionslose Übergang aus höherliegenden Schwingungszuständen wird als innere Umwandlung (englisch: internal conversion) IC und der Übergang zwischen Singulett und Triplett Zustand als „intersystem crossing“ (ISC) bezeichnet [92].

Bei der Fluoreszenzspektroskopie wird nun die intrinsische Fluoreszenz der betrachteten Moleküle angeschaut. Dabei kann bei einer oder verschiedenen Wellenlängen angeregt werden und je nach betrachtetem Molekül werden unterschiedliche Fluoreszenzemissionspektren erhalten. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt im  $90^\circ$  Winkel zum Anregungslicht, damit dieses nicht oder zumindest nur in geringen Teilen detektiert wird.

Bei der Fluoreszenzspektroskopie an Proteinen wird die inhärente Fluoreszenz der Indolgruppe der Aminosäure Tryptophan (Trp, W) genutzt, welche ein Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 278$  nm und ein Emissionsmaximum bei ungefähr  $\lambda = 320$  nm in Abhängigkeit der chemischen Umgebung des Proteins [93]. Auch die anderen aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin) zeigen eine Fluoreszenzemission, welche aber im Vergleich zu der des Tryptophans vernachlässigbar gering ist. Strukturelle Änderungen wie Proteinfaltung und Interaktionen mit Liganden resultierend in einer Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums und/oder in einer Änderung der

Fluoreszenzemissionsintensität und können durch diese dargestellt und quantifiziert werden.

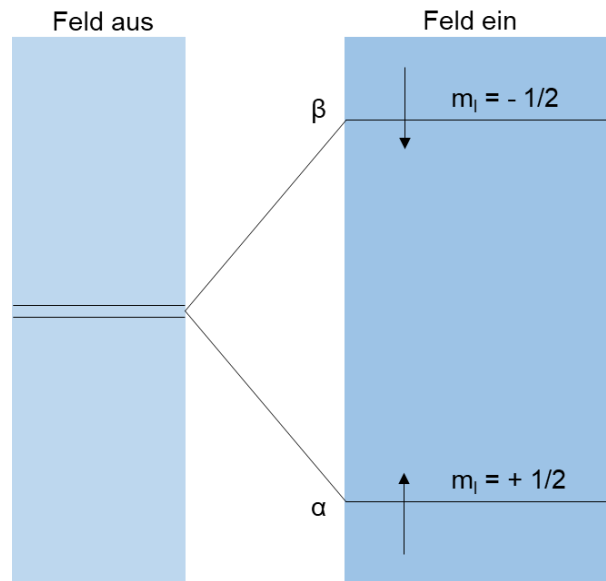
Neben Spektren im Gleichgewicht können auch kinetische Prozesse mittels Fluoreszenzspektroskopie aufgenommen werden. Dabei wird die Fluoreszenzemission während einer chemischen Reaktion wie zum Beispiel das Falten eines Proteins detektiert. Dafür werden sogenannte Stopped Flow Geräte benutzt, bei denen mittels eines pneumatischen Systems der Inhalt zweier Spritzen simultan gemischt wird. Aufgrund der Injektion der Reaktionsmischung in die Messkammer ergibt sich eine Totzeit von ungefähr einer Millisekunde. Somit sind mit dieser Methode Reaktionen auf einer Millisekunden bis Sekunden Zeitskala detektierbar. Für größere Zeitskalen kann ein manuelles Mischen durchgeführt werden.

### 2.2 NMR-Spektroskopie

Grundlage der NMR-Spektroskopie bildet die Magnetresonanz des Atomkerns. Diese wurde das erste Mal von Rabi *et al.* 1938 beschrieben [94]. Ein Atomkern besitzt eine Kernspinquantenzahl  $I$ , die unveränderlich und für jeden Kern spezifisch ist. Jeder Kern mit Kernspinquantenzahl  $I$  weist einen Drehimpuls mit dem Betrag  $[I(I+1)]^{1/2}\hbar$  auf, besitzt eine Komponente  $m\hbar$  des Drehimpulses um eine beliebige Achse und hat bei einer Kernspinquantenzahl  $I > 0$  ein magnetisches Moment mit konstantem Betrag, dessen Orientierung von  $m$  abhängt, wobei die Orientierung des Kernspins  $m = -I, I-1, \dots, -I$  sein kann. Somit können der Kernspin und damit auch das magnetische Moment  $2I+1$  Orientierungen annehmen. So gilt zum Beispiel für Protonen,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{19}\text{F}$ -Kerne  $I = \frac{1}{2}$  und der Kernspin dieser Kerne kann zwei verschiedene Orientierungen annehmen. Für den  $^{14}\text{N}$ -Kern gilt  $I = 1$  und somit hat der Kernspin drei verschiedene Orientierungen [92]. Folgendes wird beispielhaft für  $I = \frac{1}{2}$  Kerne erklärt.

Interagiert das magnetische Moment  $\mu$  eines Kerns mit einem externen Magnetfeld  $B_0$ , hebt es die Entartung der von der Spinorientierung  $m$  abhängigen Energien ( $\alpha$  und  $\beta$  Spins) auf (Abbildung 5). Eine Resonanz tritt auf, wenn der Abstand der Energieniveaus gleich der Energie der Photonen der elektromagnetischen Strahlung ist [92].

## 2 Verwendete Methoden zur Untersuchung von Proteinen



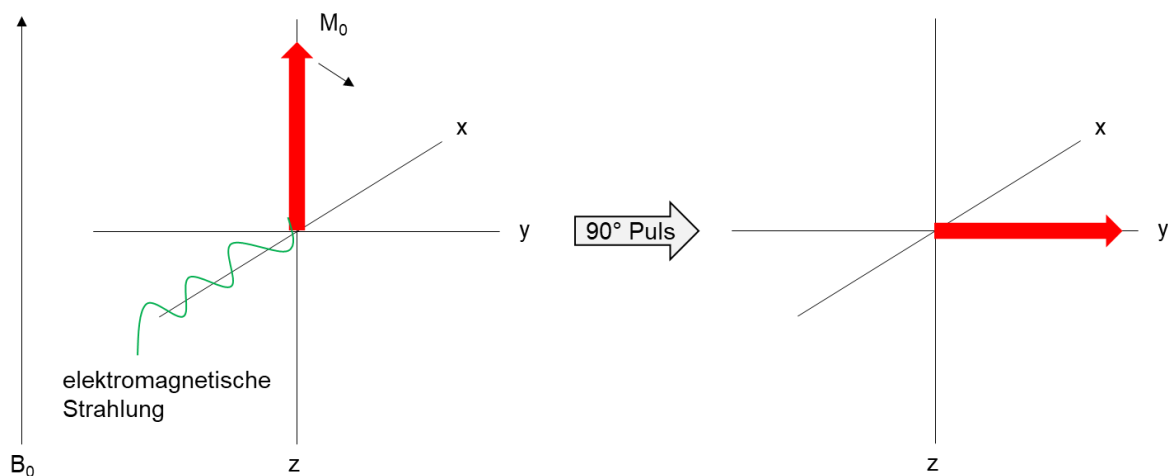
**Abbildung 5: Die Energieniveaus eines Kernspins mit  $I = \frac{1}{2}$  außerhalb und innerhalb eines Magnetfeldes mit unterschiedlicher Spinorientierung  $m_l$  [92].**

Nun betrachtet man nicht nur einen Kern, sondern wie in einer realen Probe viele Kerne. Die Magnetisierung dieser Probe ist die Vektorsumme aller ihrer magnetischen Momente. In Abwesenheit eines äußeren Magnetfeldes liegen gleichviele  $\alpha$  wie  $\beta$  Spins vor. In Anwesenheit eines äußeren Magnetfeldes präzessieren die Spins um die Richtung des Magnetfeldes und die Energien der  $\alpha$  und  $\beta$  Spins sind verschieden (Abbildung 5). Da das niedrige Energieniveau höher besetzt ist, als das höhere Energieniveau, also mehr  $\alpha$  Spins als  $\beta$  Spins vorliegen, kommt es zu einer makroskopischen Magnetisierung  $M_0$  (Nettomagnetisierung). Das bedeutet, dass die Vektorsumme aller magnetischen Momente der Kerne ungleich null ist. Diese makroskopische Magnetisierung präzessiert um die Richtung des Magnetfeldes in ihrer Resonanzfrequenz, der sogenannten Larmor-Frequenz. Die Geschwindigkeit dieser Präzession ist proportional zur Stärke des angelegten Magnetfeldes [92]. In Molekülen spüren die magnetischen Momente ein lokales Magnetfeld  $\delta B$  ( $\delta B = -\sigma B_0$ ,  $\sigma$ : Abschirmungskonstante), welches sich von dem angelegten Feld unterscheidet. Dieses induziert einen elektronischen Bahndrehimpuls, also elektronische Ringströme, welche an den Kernen ein zusätzliches kleines Magnetfeld erzeugen. Die Größe der Ringströme und somit die Stärke des lokalen Magnetfeldes hängen stark von der elektronischen Struktur des Moleküls in der Nähe des Kerns ab. Somit besitzen gleiche Kerne an unterschiedlichen Positionen unterschiedlich große

## 2 Verwendete Methoden zur Untersuchung von Proteinen

Abschirmungskonstanten und damit auch unterschiedliche Resonanzfrequenzen in denen sie um das äußere Magnetfeld  $B_0$  präzessieren [92].

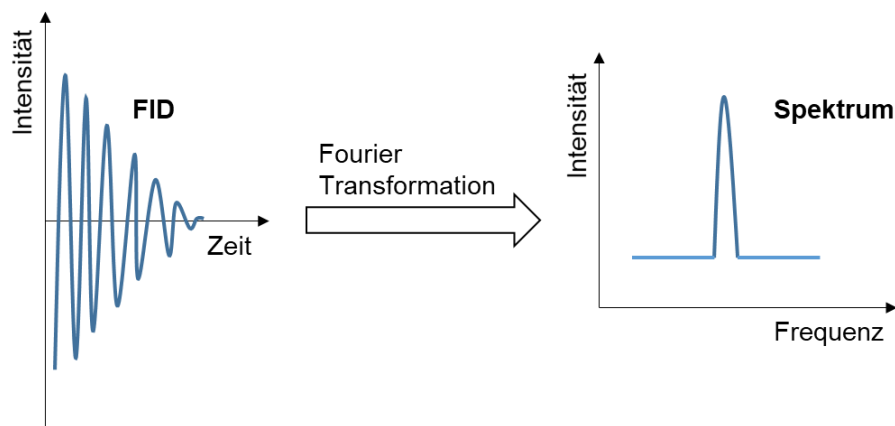
Alle unterschiedlichen Resonanzfrequenzen werden nun für die NMR-Spektroskopie mit einem Radiowellenfrequenz Puls angeregt. Das bedeutet im Falle von  $I = \frac{1}{2}$  Kerne, dass von niedrigen in das höhere Energieniveau angeregt wird, also die Orientierung der  $\alpha$  Spins teilweise umgekehrt wird. Für die makroskopische Magnetisierung  $M_0$  bedeutet dies, dass sie aus der Richtung des Magnetfeldes, der z-Richtung, in die xy-Ebene ausgelenkt wird und keine Magnetisierung mehr in Richtung des Magnetfeldes vorhanden ist ( $M_z = 0$ ) (Abbildung 6) [92].



**Abbildung 6:** Innerhalb eines Magnetfeldes kommt es zu einer makroskopischen Magnetisierung, da mehr  $\alpha$  Spins mit Spinorientierung  $m_I = +1/2$  als  $\beta$  mit Spinorientierung  $m_I = -1/2$  vorliegen. Durch Anregung mittels elektromagnetischer Strahlung kommt zu einer Auslenkung der makroskopischen Magnetisierung in Richtung der  $xy$ -Ebene [92].

Nun wird die Rückkehr aller in der Probe enthalten Kerne (gleicher Art) in den Ausgangszustand in Form des freien Induktionszerfalls (engl.: free induction decay, FID) aufgezeichnet. Dieser ist eine Überlagerung aller Resonanzsignale der in der Probe enthalten Kerne und kann mittels Fourier Transformation in ein NMR Spektrum transformiert werden Abbildung 7 [92].

## 2 Verwendete Methoden zur Untersuchung von Proteinen



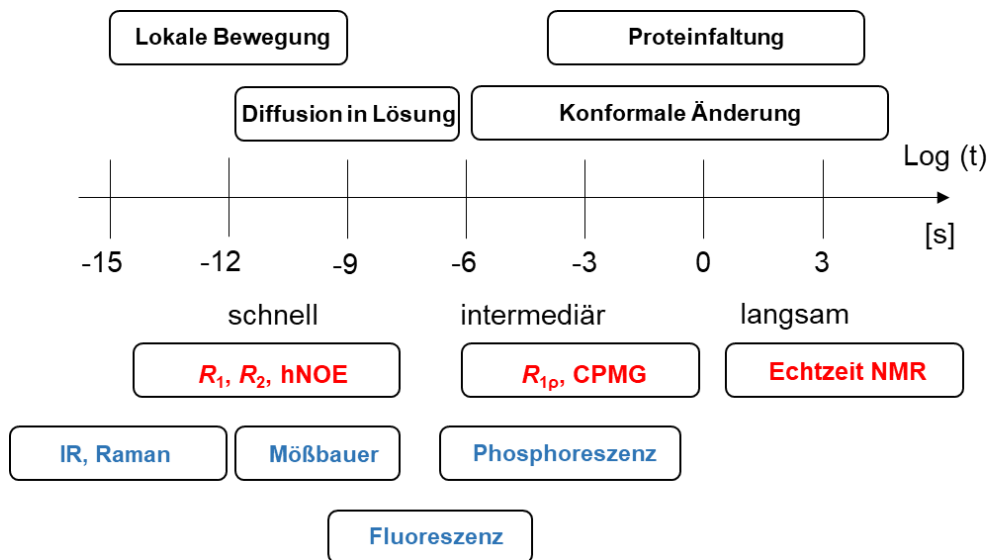
**Abbildung 7:** Die von den angeregten Atomen ausgesandten Signale werden in Form des freien Induktionszerfalls (FID) (Zeit Domäne) aufgezeichnet und mittels Fourier Transformation in das NMR Spektrum (Frequenz Domäne) umgewandelt [92].

Das NMR Spektrum zeigt in Abhängigkeit der Resonanzfrequenz der unterschiedlichen Positionen der Kerne im Molekül unterschiedliche chemische Verschiebungen, die den unterschiedlichen Positionen zugeordnet werden können. Somit ist es mittels NMR-Spektroskopie die Struktur von Molekülen in atomarer Auflösung zu bestimmen. Das erste Mal wurde der NMR Effekt 1946 angewandt um kleine organische Moleküle zu untersuchen [95, 96].

Neben der Untersuchung von kleinen, organischen Molekülen findet die NMR-Spektroskopie auch Anwendung in der molekularen Biologie. So wurde 1957 von Saunders *et al.* das erste Protonenspektrum eines Proteins aufgenommen [97] und 1962 gelang es Kowalsky *et al.* den gefalteten und ungefalteten Zustand eines Proteins zu untersuchen [98]. Mit der Entwicklung mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie Methoden, unter anderem der  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC und  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  HSQC (heteronuclear single quantum coherence) Experimente, war eine detaillierte Untersuchung der Proteinstruktur mittels Zuordnung der Amidprotonen sowie der kohlenstoffgebundenen Protonen möglich [99]. Neben der strukturellen Zuordnung ist es mittels moderner NMR-Spektroskopie Methoden Proteindynamiken auf einer breiten Zeitskala aufzunehmen (Abbildung 8) [100]. Unter anderem ermöglichen Messungen der longitudinalen und transversalen Relaxationsraten,  $R_1$  und  $R_2$ , sowie des heteronuklearen Overhauser Effekt (hNOE) die Aufzeichnung von lokaler Bewegung und Diffusion von Proteinen (Abbildung 8). Außerdem ist es mittels der Carr-Purcell-Meiboom-Gill Spin Echo Puls Sequenz möglich die Dispersion der

## 2 Verwendete Methoden zur Untersuchung von Proteinen

transversalen Relaxationsrate zu bestimmen und somit Proteinfaltung und konformale Änderungen des Proteins zu verfolgen (Abbildung 8) [100].



**Abbildung 8:** Logarithmische Zeitskala auf der Proteinprozesse (schwarz) und die entsprechenden NMR Techniken (rot) eingezeichnet sind. Außerdem sind komplementäre Spektroskopie Techniken gezeigt (blau). Die Zeitskala, die zur Verfügung steht, um Prozesse in Proteinen mittels NMR-Spektroskopie zu betrachten mehr als 18 Größenordnungen. Diese kann dabei in langsame ( $k_{\text{ex}} \ll \Delta\omega$ ), intermediäre ( $k_{\text{ex}} \sim \Delta\omega$ ) und schnelle ( $k_{\text{ex}} \gg \Delta\omega$ ) Prozesse unterteilt werden, wobei  $k_{\text{ex}}$  die Austauschkonstante und  $\Delta\omega$  der Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen den beiden austauschenden Zuständen sind. Die Abbildung wurde aus der Publikation von Kovermann *et al.* von 2016 adaptiert [100].

Somit ist die hochaufgelöste NMR-Spektroskopie eine der leistungsfähigsten Techniken, um Informationen auf atomarer Ebene zu erhalten [101, 102]. Sie ermöglicht die Ermittlung exakter Werte für kinetische und thermodynamische Parameter wie Faltungs- und Entfaltungsgeschwindigkeitskonstanten, Änderungen der Enthalpie,  $\Delta H$ , Änderungen der spezifischen Wärmekapazität  $\Delta c_p$  und auch die Bestimmung von Bindungsaffinitäten [103-105]. Außerdem bietet sie die Möglichkeit Studien unter verdichteten Bedingungen wie unter Zugabe von Crowding Reagenzien [11, 22, 106, 107] als auch in der Zelle durchzuführen [6, 65, 108, 109].

### 2.2.1 <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie

Die meisten Proteinstudien mittels hochaufgelöster NMR-Spektroskopie konzentrieren sich auf <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N oder <sup>13</sup>C Kerne. Aufgrund von Signalüberlagerungen in diesen NMR Spektren ist eine detaillierte Analyse auf Proteine mit einer verhältnismäßig kleinen

## 2 Verwendete Methoden zur Untersuchung von Proteinen

Molekülmasse oder auf einen signalfreien Hintergrund, also einen Hintergrund ohne zusätzliche Protonen,  $^{15}\text{N}$  oder  $^{13}\text{C}$  Signale, beschränkt.

Der  $^{19}\text{F}$  Kern dagegen kommt in Proteinen und anderen biologischen Makromolekülen nicht natürlich vor. Aus diesem Grund ist die  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie eine interessante Methode, um Proteine in zellähnliche Umgebung zu untersuchen. Außerdem hat der  $^{19}\text{F}$  Kern eine natürliche Häufigkeit von 100 %, was Messungen mit Konzentrationen im  $\mu\text{M}$  Bereich zulässt. Des Weiteren zeigt er Signale in einem breiten Spektrum der chemischen Verschiebung [110] und eine hohe Empfindlichkeit für mögliche Änderungen der lokalen van-der-Waals-Umgebung [111], wodurch auch kleine Änderungen der Umgebung deutlich anhand der Änderung der chemischen Verschiebung detektiert werden können [112].

Auch wenn der  $^{19}\text{F}$  Kern nicht standardmäßig genutzt wird, um Proteine zu untersuchen, existieren einige Studien, die sich die Vorteile des  $^{19}\text{F}$  Kerns zu Nutze machen. Im Folgenden sind beispielhaft einige davon aufgelistet.

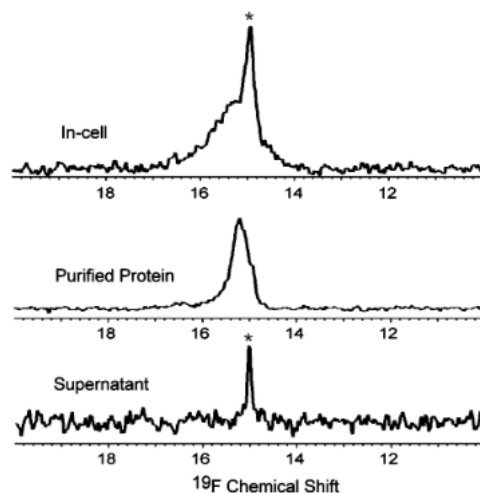
Schuler *et al.* führten 2002 zum Beispiel detaillierte kinetische Studien und Studien im Gleichgewicht an dem Cold Shock Protein aus dem Bakterium *Thermotoga maritima* durch, indem sie  $^{19}\text{F}$ -Tryptophan in das Protein einbrachten und Messungen mittels eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie durchführten [111]. Des Weiteren zeigten Khan *et al.* mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie lokale Konformationsänderungen während der Faltung von GFP (green fluorescent protein) [113]. Außerdem ist es möglich Intermediate in Echtzeit aufzunehmen, da eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften des  $^{19}\text{F}$  Kerns schnell generiert werden können [114, 115]. Neben lokalen Einblicken in das Verhalten von Proteinen, kann aber auch das gesamte Protein mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie betrachtet werden indem man Fluoratome über das gesamte Protein verteilt einbringt. So konnte zum Beispiel die Faltung eines Fettsäure-bindenden Proteins untersucht werden [116]. Des Weiteren konnte auch Protein-Liganden Interaktion mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie verfolgt werden [117, 118]. Dabei konnte die Bindung mit Linienformanalyse quantifiziert werden [117]. Auch Interaktionen von DNS und Proteinen wurden mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie untersucht. Hierfür kann man entweder das Fluoratom in die DNS einbringen und die Interaktion von Seiten der DNA betrachten [119] oder wenn man das Fluoratom in das Protein einbringt die Konformationsänderung des Proteins während der Interaktion verfolgen [120, 121]. So zeigten Song *et al.* die

## 2 Verwendete Methoden zur Untersuchung von Proteinen

Konformationsänderung einer fluormarkierten Variante des Metallregulatorproteins MerR während der Bindung von DNS [121]. Des Weiteren konnten auch Dynamiken von Proteinen mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie verfolgt werden [122-124].

Neben diesen  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie Studien wurden viele weitere durchgeführt. Einige davon sind in folgenden Review Artikeln erwähnt [125, 126].

Außerdem wurden auch Untersuchungen mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie in verdichteter Umgebung durchgeführt. So untersuchten Stadtmiller *et al.* zum Beispiel Protein-Peptid Bindungen in verdichteter Lösung [127]. Dabei verwendeten sie verschiedene Crowding Reagenzien und zeigten den unterschiedlichen Einfluss der Umgebung in Abhängigkeit des zugegebenen Reagenz [127]. Sie führten 5- $^{19}\text{F}$ -Tryptophan in das System ein und verfolgten die Bindung von Protein und Peptid mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie und die Auswertung erfolgte via Linienformanalyse [127]. Des Weiteren wurden auch  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in der Zelle aufgenommen [128]. Dabei wird der große Vorteil der  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie für Aufnahmen in der Zelle deutlich, dass das Spektrum trotz verdichtetem Hintergrund nur Signale für das betrachtete System zeigt (Abbildung 9).

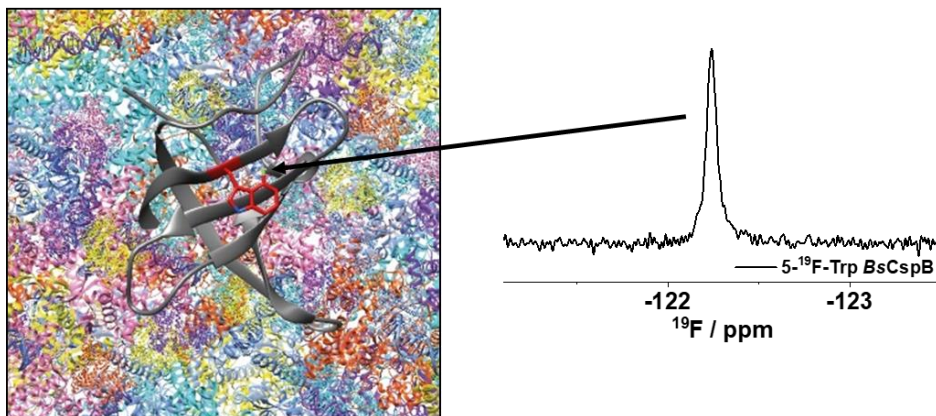


**Abbildung 9:** Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren des Proteins L225tfmF HDH in der Zelle (oben) und in aufgereinigter Form in verdünnter Lösung (Mitte), sowie der Überstand der *in vivo* Probe (unten). Die Abbildung wurde aus der Arbeit *Protein  $^{19}\text{F}$  NMR in Escherichia coli* von Li *et al.* entnommen [128].

Somit ist  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie eine ideale Methode, um Protein Studien nicht nur *in vitro*, sondern auch in komplexeren System wie in der Zelle oder zellähnlicher Umgebung einfach durchzuführen.

### 3 Aufgabenstellung

Die Hochauflösende NMR-Spektroskopie ist ein wichtiger Bestandteil der modernen Strukturbiologie, um Informationen über Struktur, Dynamik und Funktionen von Proteinen auf atomarer Ebene zu erhalten.  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie hat gegenüber NMR-Spektroskopie an anderen Kernen wie  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  viele Vorteile: 1) ein natürliches Vorkommen des  $^{19}\text{F}$  Kerns von 100 %, was Messungen in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen ermöglicht 2) ein großer chemischer Verschiebungsbereich 3) eine hohe Empfindlichkeit für Änderungen in der lokalen van-der-Waals-Umgebung und 4) kein natürliches Vorkommen innerhalb von Proteinen, was hochselektive Untersuchungen ermöglicht [111]. Somit ist sie ein ideales Werkzeug, um in hochkomplexen Umgebungen wie die zelluläre Umgebung Untersuchungen durchzuführen (Abbildung 10).



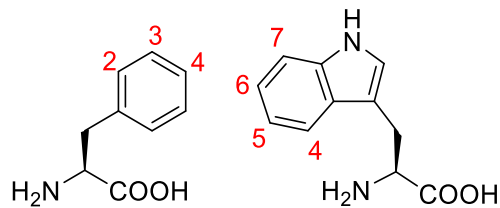
**Abbildung 10: Cartoon Darstellung von fluormarkiertem *BsCspB* (PDB ID: 6SZZ) in komplexer Umgebung und das resultierende  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum. In diesem ist trotz vieler, umgebender Makromoleküle nur ein Signal zu erkennen.**

Ziel dieser Arbeit ist es mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie den Effekt von zellulärer Umgebung auf die Struktur, Stabilität, Kinetik und Funktion eines Modellproteins zu untersuchen. Dabei sollte eine Methode entwickelt werden, die auch auf andere Proteine übertragbar ist. Für die Studie wurde das Cold Shock Protein B aus *Bacillus Subtilis* als Modellprotein gewählt, da es in der Vergangenheit ausführlich untersucht wurde und mit seiner Größe von 7,5 kDa ideal für die NMR-Spektroskopie geeignet ist.

Das erste Zwischenziel dieser Arbeit ist es das *BsCspB* an den aromatischen Aminosäuren selektiv mit Fluor zu markieren, um sieben verschiedene fluormarkierte

### 3 Aufgabenstellung

Proteine zu erhalten. Die verschiedenen Markierungsstellen sind in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Verschiedene Markierungspositionen für Fluor an L-Phenylalanin (links) und L-Tryptophan (rechts).**

Dabei sollen drei verschiedene Möglichkeiten verwendet werden. Für die ersten beiden Ansatzpunkte wird das bekannte Expressionssystem für markiertes *BsCspB* verwendet werden [129], wobei bei einer Methode neben der Zugabe von fluormarkiertem Tryptophan und Phenylalanin Glyphosat zugeben wird, um die Bildung von aromatischen Aminosäuren zu unterdrücken [111]. Für die zweite Methode werden die fluormarkierten Aminosäuren ohne weitere Zusätze zu dem Expressionssystem zugegeben, um eine Inkorporation in das Protein zu erhalten. Diese Methode erwies sich in verschiedenen Studien als sehr erfolgreich [130, 131]. Als dritte Methode wird ein neues Expressionssystem aufgebaut. Dafür werden Tryptophan- beziehungsweise Phenylalanin-auxotrophe Bakterienstämme verwendet. Diese sind nicht in der Lage Tryptophan oder Phenylalanin selber zu bilden und durch Zugabe der fluormarkierten Varianten dieser Aminosäuren sollte eine vollständige Fluormarkierung des *BsCspB* möglich sein.

Das nächste Ziel dieser Arbeit ist es die sieben verschiedenen, fluormarkierten Proteine zu charakterisieren und mit der wildtyp (wt) Variante des *BsCspBs* zu vergleichen, um die Effekte der Fluormarkierung zu validieren. Dies wird durchgeführt, da gewährleistet sein muss, dass Unterschiede, die bei der Untersuchung des Proteins in zellähnlicher Umgebung zu denen unter Standardbedingungen zustande kommen, nicht durch die Fluormarkierung hervorgerufen werden. Dafür werden die Stabilitäten der sieben Proteine zum einen mit einer chemischen Denaturierung mittels Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht und zum anderen mit einer thermischen Denaturierung mittels <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie bestimmt. Außerdem werden kinetische Messungen an einem Stopped Flow Gerät durchgeführt, um Faltungs- und Entfaltungsgeschwindigkeitskonstanten zu bestimmen.

### 3 Aufgabenstellung

Das letzte und auch Hauptziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von einer zellulären Umgebung, generiert durch Zugabe von Zelllysat, auf das Protein zu untersuchen. Dabei soll gezeigt werden, inwieweit eine zellähnliche Umgebung Einfluss auf das Protein hat und validiert werden, ob Studien in verdünnter Lösung oder in Lösungen mit Crowding Reagenzien das Verhalten des Proteins in der Zelle gut wieder spiegeln. Dafür wird zum einen die Stabilität des Proteins in verschiedenen Zelllysat Konzentrationen untersucht. Dabei wird das Protein durch Zugabe von Urea schrittweise entfaltet und bei jeder Urea Konzentration ein eindimensionales  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum aufgenommen. Zum anderen wird die Interaktion von fluormarkiertem *BsCspB* mit Oligothymidinen in verschiedenen Konzentrationen an Zelllysat untersucht. Dafür werden verschiedene Oligothymidine zu fluormarkiertem *BsCspB* titriert und mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie verfolgt.

## 4 Experimentalteil

### 4.1 Konstruktion pET24a Vektor mit *BsCspB* Sequenz

Für die Konstruktion des pET24a Vektors mit der Nukleinsäure Sequenz von *BsCspB* wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), der Verdau sowie die Ligation wurden alle nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Verdau Enzyme, die Taq Polymerase, die T4 DNS Ligase, der pET24a Vektor, Dh5 $\alpha$  *E. coli* Zellen sowie alle nötigen Puffer wurden entweder bei New England Biolabs (NEB) erworben oder von der Arbeitsgruppe Isono zur Verfügung gestellt. Das pET11a Plasmid mit *BsCspB* Sequenz wurde von Birgit Köhn zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.1 Konstruktion des pET24a *BsCspB* Vektors mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als erster Schritt wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Nukleinsäure Sequenz von *BsCspB* aus dem Plasmid pET11a vervielfältigt. Als Vorwärts-Primer wurde der Primer 5'-GCG GAA TTC CAT ATG TTA GAA GGT AAA G-3' mit einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym NdeI verwendet. Als Rückwärts-Primer wurde der Primer 5'-CGC GGA TCC TTA CGC TTC TTT AGT AAC-3' mit einer BamHI Schnittstelle verwendet. Das Produkt wurde mit einem PCR Purifikation Kit (GeneJET PCR Purification Kit, Thermo Fisher Scientific) aufgereinigt. Anschließend wurde ein Verdau mit dem PCR Produkt und einem pET24a Vektor und den Enzymen NdeI und BamHI durchgeführt. Die Produkte des Verdau wurde auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetragen, aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt (GeneJET Gel Extraktion Kit, Thermo Fisher Scientific). Als nächster Schritt wurde eine Ligation mit Vektor und Insert durchgeführt. Dh5 $\alpha$  Zellen wurden mit dem Ligationsprodukt transformiert. Es wurde auf Kanamycin Resistenz bei 37 °C selektiert und die gewählten Klone wurden in LB Medium (Kan) bei 37 °C angezogen. Die Plasmid DNS wurde mittels Plasmid Miniprep Kit (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll isoliert und durch den GATC Service mit Sanger Sequenzierung (eurofins Genomics) vollständig bestimmt. Das isolierte Plasmid wurde bei -20 °C gelagert und in 4.2.3 weiterverwendet.

### 4.1.2 Konstruktion des pET24a *BsCspB* Vektors mit enzymatischem Verdau

Zunächst wurde sowohl der Vektor pET11a mit der *BsCspB* Sequenz als auch der Zielvektor pET24a mit den Enzymen MluI und BamHI verdaut. Die Produkte wurden auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen und aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt (GeneJET Gel Extraktion Kit, Thermo Fisher Scientific). Alle weiteren Schritte wurden, wie unter 4.1.1 beschrieben, durchgeführt.

## 4.2 Proteinexpression

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden verwendet, um <sup>19</sup>F-markiertes *BsCspB* herzustellen.

### 4.2.1 Expression von <sup>19</sup>F-markiertem *BsCspB* unter Zugabe von Glyphosat

Für diese Methode wurde, wie in der Arbeitsgruppe Kovermann etabliert, *BsCspB* exprimiert. Zusätzlich wurde <sup>19</sup>F markiertes Trp oder Phe und Glyphosat zugegeben. Dafür wurden zunächst BL21 (DE3) Zellen (New England Biolabs, NEB) mit einem pET11a Vektor, der die Nukleinsäure Sequenz von *BsCspB* trägt, nach Standardprozedur (NEB) transformiert. Der pET11a Vektor wurde von Birgit Köhn (AG Kovermann, Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt. Um den Erfolg der Transformation zu testen, wurde das Plasmid mit einem Plasmid Miniprep Kit (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific) extrahiert und mit Sanger Sequenzierung (eurofins Genomics) sequenziert. Die transformierten Zellen wurden aliquotiert und mit 50 % Glycerin mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Expression wurden 25 µl der gelagerten Zellen in 5 ml LB Medium (Tabelle 1) und Zusatz von 100 mg/l Carbenicillin über Nacht bei  $T = 37$  °C und ständigem Schütteln angezüchtet. Die Zellen wurden dann pelletiert und in 250 ml M9 Medium oder New Minimal Medium (NMM) (Tabelle 1) resuspendiert. Es wurde 100 mg/l Carbenicillin und bei der Verwendung des NMM zusätzlich 50 mg/l Phe zugegeben. Die Kultur wurde über Nacht bei  $T = 37$  °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Ein bis sechs Liter des entsprechenden Mediums wurden mit der Übernachtskultur bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600nm}$ ) von  $OD_{600nm} = 0,15$  angeimpft und weiter bei  $T = 37$  °C geschüttelt. Außerdem wurden 50 mg/l <sup>19</sup>F-markiertes Tryptophan oder 5 mg/l <sup>19</sup>F-

markiertes Phenylalanin und Glyphosat in Konzentrationen zwischen  $c = 0,5$  g/l und  $c = 0,8$  g/l zugegeben. Als eine  $OD_{600nm}$  von  $OD_{600nm} = 0,8$  erreicht wurde, wurde mit 1 ml 1 M IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranosid) die Proteinexpression induziert. Nach weiteren drei Stunden bei  $T = 37$  °C und ständigem Schütteln wurden die Zellen mit einer Zentrifuge (Beckman Coulter, JA-10 Rotor) bei  $T = 4$  °C und 4000 rpm pelletiert und bei  $T = -20$  °C gelagert.

### 4.2.2 Expression von $^{19}F$ -markiertem *BsCspB* durch Zugabe von $^{19}F$ -markiertem Phenylalanin oder Tryptophan

Für diese Methode erfolgte die Expression wie unter 4.2.1, nur das kein Glyphosat zugegeben wurde. Außerdem wurde ausschließlich M9 Medium und  $^{19}F$ -markiertes Tryptophan verwendet.

### 4.2.3 Expression von $^{19}F$ -markiertem *BsCspB* aus auxotrophen *E. coli* Bakterien Stämmen

Für diese Methode musste das in der Arbeitsgruppe Kovermann etablierte System der Expression von *BsCspB* in *Escherichia coli* BL21 (DE3) Zellen verändert werden. Für die Expression von  $^{19}F$ -Trp-markiertem *BsCspB* wurde der Trp-auxotrophe Bakterienstamm CAG 18455 7371 (The Coli Genetic Stock Center, Yale) genutzt, während für die Expression von  $^{19}F$ -Phe-markiertem *BsCspB* der Phe-auxotrophe DSMZ 12779 Stamm (Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH) genutzt wurde. Da diese Stämme im Gegensatz zu den BL21 (DE3) Zellen keine genomeigene Sequenz haben, die die Nukleotid Sequenz der T7 Polymerase trägt, wurde ein zwei-Plasmid-System eingeführt. Dafür wurde zum einen das Plasmid pAR1219, welches die T7 Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors codiert und eine Carbenicillin Resistenz trägt, gekauft (Merck). Zum anderen wurde die Nukleinsäure Sequenz des *BsCspB* wie unter 4.1.1 beschrieben in einen pET24a Vektor, der eine Kanamycin Resistenz trägt, kloniert.

Calcium-kompetente Zellen wurden nach Standardprozedur erhalten, wobei der gewünschte Bakterienstamm bis zu einer  $OD_{600nm} = 0,6$  in LB Medium (Tabelle 1) angezüchtet, pelletiert und dann mit 0,1 M  $CaCl_2$  Lösung resuspendiert wurde. Anschließend wurden die kompetenten Zellen zunächst mit einem der beiden Plasmide mittels Heatshock transformiert (Anhang 1). Bevor die transformierten Zellen

#### 4 Experimentalteil

erneut kompetent gemacht und mit dem anderen Plasmid transformiert wurden, wurde der Erfolg der Transformation sowohl für Zellen mit dem Plasmid pAR1219 als auch mit dem Plasmid pET24a *BsCspB* mittels Plasmid Extraktion mit einem Plasmid Miniprep Kit (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific) nachgewiesen. Anschließend wurden mit dem GATC Service (eurofins Genomics) die Plasmide mittels Sanger Sequenzierung vollständig sequenziert. Als nächster Schritt wurde das zweite Plasmid in die Calcium-kompetenten Zellen, welche schon das erste Plasmid enthielten, transformiert (Anhang 1). Um den Erfolg dieser Transformation zu testen, wurden die Zellen auf Agarplatten ausgestrichen, die sowohl Kanamycin als auch Carbenicillin enthielten. Ein Wachstum von Zellen auf diesen Platten zeigte, dass beide Antibiotika Resistenzen in den Zellen enthalten sind, was nur durch beide Plasmide zustande kommen kann. Die transformierten Zellen wurden aliquotiert und mit Zugabe von 50 % Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Expression von <sup>19</sup>F-Trp-markiertem *BsCspB* wurde M9 Medium verwendet und 4-,5-,6- oder 7-<sup>19</sup>F-Trp zugesetzt. Für die Expression von <sup>19</sup>F-Phe-markiertem *BsCspB* wurde New Minimal Medium (NMM) unter Zusatz von 2-,3- oder 4-<sup>19</sup>F-Phe verwendet (Tabelle 1). Beiden Medien wurde pro Liter 1 ml 100 mg/ml Carbenicillin (Carb) und 50 mg/ml Kanamycin (Kan) zugesetzt. Des Weiteren wurden alle Medienkomponenten entweder sterilfiltriert oder dampfsterilisiert.

Im Detail wurden zunächst die transformierten Zellen in 100 ml LB Medium (mit 100 mg/l Carb, 50 mg/l Kan) pro 1 L Hauptkultur über Nacht bei  $T = 37\text{ °C}$  unter ständigem schütteln angezüchtet. Diese Vorkulturen wurden in 25 ml Portionen aufgeteilt und mit 50 µl der transformierten Zellen angeimpft. Die Zellen wurden pelletiert und in M9 Medium oder NMM resuspendiert. Die Suspension wurde bei  $T = 37\text{ °C}$  unter ständigem Schütteln bis zu einer  $OD_{600\text{nm}}$  von  $OD_{600\text{nm}} = 0,6-0,8$  inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression mittels Zugabe von 1 ml 1 M IPTG induziert. Nach 30 min bei  $T = 37\text{ °C}$  wurde die Temperatur auf  $T = 25\text{ °C}$  reduziert und die Kultur wurde unter ständigem Schütteln über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen pelletiert indem sie bei 4000 rpm und  $T = 4\text{ °C}$  für 10-15 min in einer Beckman Coulter Zentrifuge (JA-10 Rotor) zentrifugiert wurden. Anschließend wurde das Pellet bei  $T = -20\text{ °C}$  gelagert.

#### 4 Experimentalteil

Um eine zusätzliche  $^{15}\text{N}$ -Markierung zu erhalten wurde  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  als  $^{15}\text{N}$ -Quelle in die 5xM9 Lösung gegeben.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der genutzten Medien. Die einzelnen Komponenten wurden dampfsterilisiert, außer es ist anderes angegeben.**

LB Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
M9 Medium	200 ml 5xM9, 2 ml TS2, 1 ml 1M $\text{MgSO}_4$ , 1 ml 0,1 M $\text{CaCl}_2$ , 1 ml 10 mM Fe(III)citrate (sterilfiltriert), 40 ml 20 % Glukose (sterilfiltriert), 775 ml $\text{H}_2\text{O}$
5xM9 Stammlösung	85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , 15 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,5 g NaCl, 5 g $\text{NH}_4\text{Cl}$ pro 1 l $\text{H}_2\text{O}$
TS2 Stammlösung	100 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 30 mg $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ , 300 mg $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 200 mg $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 20 mg $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 10 mg $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 900 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 20 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ pro 1 l $\text{H}_2\text{O}$ (sterilfiltriert)
NMM	120 ml AS-Lösung, 7,5 ml 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 8,5 ml 1 M NaCl, 55 ml 1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 ml 2 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 20 ml 1 M Glukose (sterilfiltriert), 1 ml 1 M $\text{MgSO}_4$ , 10 ml Spurenelemente 1, 10 $\mu\text{l}$ Spurenelemente 2, 1 ml 10 mg/ml Biotin (sterilfiltriert), 10 mg/ml Thiamin (sterilfiltriert), 730 ml $\text{H}_2\text{O}$
AS-Lösung	30-50 mg der Aminosäuren L-Met, trans-4-OH-L-Pro, Gly, L-Cys-HCl, L-Ile, L-Ala, L-Lys-HCl, L-His-HCl- $\text{H}_2\text{O}$ , L-Tyr, L-Ser, L-Asn, L-Pro, L-Leu, L-Glu, L-Arg-HCl, L-Cys, L-Gln, L-Val, L-Asp, L-Thr, L-Trp pro 1 l $\text{H}_2\text{O}$ (sterilfiltriert)
Spurenelemente 1	368 mg $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 500 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ pro 1 l $\text{H}_2\text{O}$ (sterilfiltriert)
Spurenelemente 2	255 mg $\text{CuSO}_4$ , 356 mg $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ , 204 mg $\text{ZnCl}_2$ , 134 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ pro 1 l $\text{H}_2\text{O}$ (sterilfiltriert)

### 4.3 Proteinaufreinigung

Im Zuge dieser Arbeit wurden alle Varianten des *BsCspB* gleich aufgereinigt. Alle verwendeten Puffer sind in Tabelle 2 dargestellt. Alle Chromatographie Methoden wurden mit einem Äkta pure Chromatographie System (Cytiva, früher GE Healthcare Life Sciences) bei 4 °C durchgeführt.

#### 4.3.1 Bakterieller Aufschluss

Das Zellpellet wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und in 5 ml Aufschlusspuffer pro 1 g Zellpellet resuspendiert. Die Zellen wurden mit einem Ultraschallgerät (Sonifier W-250, Branson) für 800 s/100 ml und 50 % Amplitude auf Eis aufgeschlossen. Dabei wurde ein an/aus Zyklus von 2 s/3 s genutzt. Anschließend wurde durch Zentrifugation (Beckman Coulter, JA-14 Rotor) bei 12000 rpm und  $T = 4\text{ °C}$  für 20-30 min das Zelllysate von Zelltrümmern und weiteren unlöslichen Bestandteilen getrennt. Im nächsten Schritt wurde das Zelllysate durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert.

#### 4.3.2 Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde das klare Zelllysate auf eine mit 100 ml Fractogel EMD TMAE (Merck) gefüllte, auf Puffer A äquilibrierte XK-50 Säule (GE) gepumpt. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0 % bis 100 % Puffer B und wurde mit Konduktivität und Absorbanz bei 214, 260 und 280 nm aufgezeichnet. Die je 12 ml großen Fraktionen mit einer hohen Absorbanz bei 280 nm wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf vorhandenes *BsCspB* untersucht.

#### 4.3.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Alle Fraktionen, die *BsCspB* enthielten, wurden vereinigt und mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bis zu einer Konzentration von  $c = 2,3\text{ M}$  versetzt und anschließend bei 12000 rpm und  $T = 4\text{ °C}$  für 20-30 min (Beckman Coulter, JA-14 Rotor) zentrifugiert. Nachdem die Lösung über einen Filter mit der Porengröße 0,45 µm filtriert wurde, wurde sie auf eine mit Puffer D äquilibrierten 20 ml Butylsepharose Säule (HiPrep Butyl FF 16/10, GE) gepumpt. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0 % bis 100 % Puffer C und wurde dargestellt und analysiert wie oben beschrieben.

## 4.3.4 Größenausschlusschromatographie

Alle Fraktionen, die *BsCspB* enthielten, wurden vereinigt. Der Puffer wurde mit mittels Zentrifugationsfilter (Amicon, Meck) zu Gelfiltrationspuffer ausgetauscht. Die verwendeten Filter haben ein Volumen von 15 ml und einen Cutoff von 3 kDa Molekulargewicht. Nachdem die Probe auf 1,5 ml konzentriert wurde, wurde sie auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600, GE), die auf Gelfiltrationspuffer äquilibriert wurde, gepumpt. Die Elution erfolgte mit Gelfiltration und einer Flussrate von 0,5 ml pro Minute. Analysiert wurden die Fraktionen wie oben beschrieben. Alle Fraktionen, die reines *BsCspB* enthielten wurden auf ein Volumen von  $V = 2$  ml konzentriert und der Puffer zu 20 mM Natrium Cacodylat (NaCac) Puffer ausgetauscht.

**Tabelle 2: Für die Proteinaufreinigung verwendeten Puffer. Alle Puffer wurden vor der Nutzung sterilfiltriert und entgast.**

Aufschlusspuffer	50 mM TRIS/HCl, pH 8,0
Puffer A	50 mM TRIS/HCl, pH 7,8
Puffer B	50 mM TRIS/HCl, 1 M NaCl, pH 7,8
Puffer C	50 mM TRIS/HCl, pH 7,6
Puffer D	50 mM TRIS/HCl, 2,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7,6
Gelfiltrationspuffer	50 mM TRIS/HCl, 100 mM KCl, pH 7,2

## 4.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit UV/Vis Spektroskopie (Agilent 8452 UV-visible Spectroscopy System, Agilent Technologies) bestimmt. Dafür wurde die Probe 1:10 verdünnt, um ein, wie vom Hersteller empfohlenen Absorbanzwert zwischen 0 und 1 zu erreichen. Um die Konzentration zu bestimmen, wurde die Absorbanz bei  $\lambda = 280$  nm und für die  $^{19}\text{F}$ -Phe-markierten Proben ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon^{280} = 5800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [78] verwendet und nach Lambert-Beer wie folgt berechnet [92].

$$E_{\lambda} = \epsilon^{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (1)$$

wobei  $E_{\lambda}$  die Extinktion,  $\epsilon^{\lambda}$  der Extinktionskoeffizient,  $c$  die Stoffmengenkonzentration und  $d$  die Schichtdicke der Küvette ist.

Für die  $^{19}\text{F}$ -Trp-markierten Varianten wurden die verschiedenen Extinktionskoeffizienten bestimmt. Dafür wurden Verdünnungsreihen mit bekannter Konzentration von 4-,5-,6- und 7- $^{19}\text{F}$ -Trp angesetzt und die Extinktionskoeffizienten zu  $\epsilon^{280} = 2705 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (4- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB),  $\epsilon^{280} = 2887 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (5- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB),  $\epsilon^{280} = 2575 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (6- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB) und  $\epsilon^{280} = 2617 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (7- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB) bestimmt.

#### 4.4 Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht

Alle Fluoreszenzspektroskopie Experimente im Gleichgewicht wurden an einen FP-8500 Spectrofluorometer (Jasco) in einer 10 mm Silikatglasküvette (Helma) durchgeführt.

##### 4.4.1 Chemische Denaturierung

Für jeden chemisch induzierten Faltungsübergang wurden 34 Proben mit einem Volumen von  $V = 1,8 \text{ ml}$  und einer Proteinkonzentration von  $1 \mu\text{l}$  in  $20 \text{ mM NaCac}$  Puffer pH 7 oder pH 8 vorbereitet. Alle Proben wurden für 30 min bei  $298 \text{ K}$  äquilibriert und enthielten Konzentrationen von Urea zwischen  $c = 0 \text{ M}$  und  $c = 8 \text{ M}$ . Von allen 34 Messpunkten wurden Fluoreszenzspektren als Triplikate in einem Wellenlängenbereich von  $\lambda = 290 \text{ nm}$  bis  $\lambda = 400 \text{ nm}$  in  $0,5 \text{ nm}$  Schritten aufgenommen. Als Anregungslicht wurde Licht der Wellenlänge  $\lambda = 280 \text{ nm}$  verwendet. Während der Messung wurden die Proben ständig gerührt und auf  $298 \text{ K}$  temperiert. Um den Faltungsübergang darzustellen, wurden die Intensitäten der Wellenlängen zwischen  $\lambda = 320 \text{ nm}$  und  $\lambda = 380 \text{ nm}$  nach folgender Gleichung (2) [132] gemittelt.

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum_{i=1}^N (I_i \lambda_i)}{\sum_{i=1}^N (I_i)} \quad (2)$$

wobei  $\langle \lambda \rangle$  die gemittelte Wellenlänge und  $I_i$  die Intensität bei Wellenlänge  $\lambda_i$  ist.

#### 4 Experimentalteil

Außerdem wurden bei verschiedenen Urea Konzentrationen Hintergrundmessungen durchgeführt und von den Messungen abgezogen. Durch Messen des Brechungsindex konnte die Konzentration von Urea nach folgender Gleichung (3) [133] bestimmt werden.

$$c_{\text{Urea}} = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753 \cdot \Delta n^2 + 185,56 \cdot \Delta n^3 \quad (3)$$

wobei  $c_{\text{Urea}}$  die Urea Konzentration und  $\Delta n$  die Differenz zwischen der Probe mit und ohne Urea ist.

Um den Unterschied der freien Energie zwischen dem gefalteten und ungefalteten Zustand zu bestimmen, wurde folgende Gleichung (4) [134] verwendet.

$$\langle \lambda \rangle = \frac{(g_{\text{N}} + m_{\text{N}} \cdot c_{\text{Urea}}) + (g_{\text{U}} + m_{\text{U}} \cdot c_{\text{Urea}}) \cdot \left( \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right) + \frac{m \cdot c_{\text{Urea}}}{RT} \right)}{1 + \left( \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right) + \frac{m \cdot c_{\text{Urea}}}{RT} \right)} \quad (4)$$

wobei  $g_{\text{N/U}}$  und  $m_{\text{N/U}}$  die Steigungen und Schnittpunkte der Basislinien des gefalteten und ungefalteten Zustand sind,  $\Delta G$  die freie Energie der Entfaltung bei 0 M Urea,  $m$  die Kooperativität,  $T$  die Temperatur und  $R$  die allgemeine Gaskonstante ist. Die Kooperativität,  $m$ , wurde als globaler Fitparameter gewählt, um eine bessere Vergleichbarkeit der freien Energie,  $\Delta G$ , zu erhalten.

Eine weitere Methode die thermodynamische Stabilität zu bestimmen, ist das lineare Anpassen des Übergangsbereichs der Denaturierungskurve [135]. Dafür muss die freie Energie,  $\Delta G$ , für die unterschiedlichen Konzentrationen Urea bestimmt werden. Dies kann man für einen Zweizustandfalter wie in Gleichung (5) bestimmen.

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K \quad (5)$$

Wobei die Gleichgewichtskonstante,  $K$ , wie folgt bestimmt werden kann:

$$K = \frac{\langle \lambda \rangle - (a_{\text{N}} + n_{\text{N}} \cdot c_{\text{Urea}})}{(a_{\text{U}} + n_{\text{U}} \cdot c_{\text{Urea}}) - \langle \lambda \rangle} \quad (6)$$

Dabei ist  $a_{\text{N}} + n_{\text{N}} \cdot c_{\text{Urea}}$  eine lineare Funktion der Basislinie des nativen Zustandes und  $a_{\text{U}} + n_{\text{U}} \cdot c_{\text{Urea}}$  eine lineare Funktion der Basislinie des entfalteten Ensembles. Stellt man nun die freie Energie,  $\Delta G$ , in Abhängigkeit der Urea Konzentration im Bereich des

Faltungsübergangs dar, erhält man die freie Gibbs Energie,  $\Delta G^0$ , bei einer Urea Konzentration von  $c = 0$  M, als Schnittpunkt mit der y-Achse und die Kooperativität der Faltung,  $m$ , als Steigung der Geraden im Übergang.

#### 4.4.2 Protein – DNS Interaktionen

Um die Interaktion zwischen  $^{19}\text{F}$ -markiertem *BsCspB* und Oligonukleotiden darzustellen, wurden zunächst alle Proben auf  $T = 298$  K äquilibriert und unter ständigem Rühren gemessen. Alle Fluoreszenzspektren wurden in 0,5 nm Schritten zwischen  $\lambda = 290$  nm und  $\lambda = 400$  nm als Triplikate bei einem Anregungslicht von  $\lambda = 280$  nm aufgenommen. Für die Titrationsreihen wurden Proteinkonzentrationen an 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* von  $c = 0,5$   $\mu\text{M}$  für die dT7 Titrationsen,  $c = 2,0$   $\mu\text{M}$  für die dT5 und dT6 Titrationsen und  $c = 3,0$   $\mu\text{M}$  und  $c = 3,5$   $\mu\text{M}$  für die dT4 Titrationsen in 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7 verwendet. In 28 bis 33 Titrationschritten wurden nach und nach die Oligonukleotide zugegeben bis ein 10- bis 20-facher Überschuss vorlag. Die Intensitätsauslese der Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 342$  nm durchgeführt. Um die Dissoziationskonstante,  $K_D$ , des 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und des 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* Komplexes zu bestimmen, wurde folgende Gleichung (7) [80] verwendet.

$$Q = Q_{\max} \cdot \frac{A - \sqrt{A^2 - 4n \cdot [P]_0 \cdot [L]_0}}{2 \cdot [P]_0} \quad (7)$$

wobei  $A = K_D + [P]_0 + n[L]_0$ ,  $Q$  die Auslöschung der intrinsischen Fluoreszenz des Trp8 und  $[P]_0$  und  $[L]_0$  die absolute Konzentration von Protein und Ligand sind. Der Wert der Stöchiometrie,  $n$ , wurde auf  $n = 1$  festgesetzt.

#### 4.5 Kinetische Messungen mittels Stopped Flow Spektroskopie

Alle kinetischen Fluoreszenzspektroskopie Daten wurden an einem SX20 Stopped Flow Spektrometer (Applied Photophysics, UK) aufgenommen. Nachdem mit  $\lambda = 280$  nm angeregt wurde, wurden die Faltungs- und Entfaltungskinetiken in Form von der Änderung der Fluoreszenz über  $\lambda = 320$  nm detektiert. Alles Licht der Wellenlänge kleiner  $\lambda = 320$  nm wurde durch einen Cutoff-Filter herausgefiltert. Alle Mischexperimente erfolgten in 20 mM NaCac Puffer bei  $T = 298$  K und pH 7 oder pH

8. Um die Entfaltungskinetiken zu messen, wurde die Proteinlösung mit einer Konzentration von  $c = 15 \mu\text{M}$  11-fach mit verschiedenen konzentrierten Urea Lösungen verdünnt. Somit wurden Konzentrationssprünge von  $c = 0 \text{ M}$  Urea zu  $c = 2,6 \text{ M}$  bis  $c = 7,3 \text{ M}$  aufgezeichnet. Die Rückfaltungskinetiken wurden gemessen indem eine Proteinlösung mit einer Konzentration von  $15 \mu\text{M}$  in  $c = 7 \text{ M}$  Urea ebenfalls 11-fach mit verschiedenen konzentrierten Urea Lösungen verdünnt wurde, um finale Konzentrationen zwischen  $c = 0,6 \text{ M}$  und  $c = 3,9 \text{ M}$  Urea zu erreichen. Alle Konzentrationssprünge wurden unter identischen Bedingungen 12-mal gemessen und gemittelt. Die Ureakonzentrationen wurden, wie unter 4.4.1 beschrieben, korrigiert. Alle Daten wurden mit der Pro Data Viewer Software (Applied Photophysics, UK) prozessiert.

Für die Analyse der Daten, wurden alle kinetischen Daten monoexponential angepasst und Geschwindigkeitskonstante,  $k_{\text{Obs}}$ , logarithmisch gegen die Ureakonzentration,  $c_{\text{Urea}}$ , aufgetragen. Unter Nutzung der Gleichung (8) wurde eine Chevron-Analyse für einen Zwei-Zustands-Faltungsprozess durchgeführt und die Geschwindigkeitskonstanten für die Rückfaltung,  $k_f$ , und die Entfaltung,  $k_u$ , bestimmt.

$$\ln(k_{\text{obs}}) = \exp\left(\ln(k_f) + \frac{m_f \cdot c_{\text{Urea}}}{RT}\right) + \exp\left(\ln(k_u) + \frac{m_u \cdot c_{\text{Urea}}}{RT}\right) \quad (8)$$

Dabei stehen  $m_f$  und  $m_u$  für die Steigungen des Entfaltungs- und Faltungsastes. Aus der Addition dieser Werte lässt sich die Kooperativität der Faltung,  $m$ , bestimmen ( $m_f + m_u = m$ ). Für eine bessere Vergleichbarkeit der Daten wurde die Kooperativität,  $m$ , global angepasst.  $R$  ist die universale Gaskonstante und  $T$  die absolute Temperatur [88].

Abschließend wurde aus den Geschwindigkeitskonstanten  $k_f$  und  $k_u$  die freie Energie,  $\Delta G$ , bei  $c = 0 \text{ M}$  Urea als Maß der der Stabilität des Proteins mit folgender Gleichung (9) bestimmt.

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K = -RT \cdot \ln \frac{[U]}{[N]} = -RT \cdot \ln \frac{k_u}{k_f} \quad (9)$$

Dabei ist  $K$  die Gleichgewichtskonstante,  $R$  die allgemeine Gaskonstante und  $T$  die absolute Temperatur [88].

### 4.6 Kristallstrukturanalyse

Die Kristallstrukturanalyse erfolgte in Kooperation mit Tiankun Zhou der Arbeitsgruppe Mayans (Universität Konstanz).

Eine Kristallstrukturanalyse erfolgte für die Proteine 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* und 4-<sup>19</sup>F-Trp-*BsCspB*. Dafür wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration von  $c = 20$  mg/ml in 20 mM NaCac und 100 mM NaCl bei pH 7 mit einem Gryphon Flüssig-Dispenser auf einer 96-Well-Intelli-Platte mit der Sitting Drop Methode bei 18 C aufgetragen. 4-<sup>19</sup>F-Trp-*BsCspB* Kristalle wuchsen in einer Lösung mit 0,1 M BIS-TRIS Propan, 1,2 M Natriumcitrat tribasisch Dihydrat und einem pH von 7. 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* kristallisierte in einer Lösung mit 100 mM CHES, 1 M tribasisch Natriumcitrat und einem pH von 9,5. Die Tropfen hatten ein Verhältnis von 150 nl:150 nl Proteinlösung zu Kristallisationslösung.

Für die Analyse der Kristalle unter Kryobedingungen wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Als Kryoprotektant wurde 25 % Glycerin zugegeben. Kristallographie Daten wurden am Swiss Light Source Synchrotron (Villingen) aufgenommen und mit XDS/XSCALE [136] prozessiert. Die Kristallstrukturen wurden mittels „Molecular Replacement“ in PHASER [137] mit der Kristallstruktur von wildtyp *BsCspB* (PDB ID: 1CSP) als Grundlage gelöst. Manuelle Modellbildung erfolgte in COOT [138] und wurden mit PHENIX.refine [139] verfeinert. Die Daten für die modifizierten Reste 4-<sup>19</sup>F-Phe (PFF) und 4-<sup>19</sup>F-Trp (4FW) wurden aus der Protein Datenbank entnommen. Visuelle Strukturvergleiche und die Berechnung der Standardabweichung wurden in dem Programm Chimera [140] vorgenommen.

### 4.7 NMR spektroskopische Messungen

Bis auf die im folgenden genannten Messungen wurden alle Messungen an einem 800 MHz Bruker Avance NEO NMR Spektrometer ausgestattet mit einem kryogen gekühlten TCI Probenkopf durchgeführt. Die zu Beginn dieser Arbeit aufgenommenen <sup>19</sup>F NMR Spektren wurden an einem 400 MHz Bruker Avance III HD NMR Spektrometer mit einem TBO Probenkopf gemessen. Eine chemische Denaturierung von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit einer Proteinkonzentration von  $c = 8$   $\mu$ M wurde an einem 600 MHz Avance III NMR Spektrometer, welches ebenfalls mit einem kryogen gekühlten TCI Probenkopf ausgestattet ist, gemessen. Des Weiteren wurden CPMG

Relaxationsdispersionsexperimente nicht nur an dem 800 MHz Bruker Avance NEO NMR Spektrometer ausgestattet mit einem kryogen gekühlten TCI Probenkopf, sondern auch an einem 500 MHz JEOL RESONANCE ECZ500R durchgeführt.

Außerdem wurden alle Messungen, außer die Temperatur-induzierten Denaturierungen, bei einer Temperatur  $T = 298$  K gemessen.

Allen NMR Proben wurde Trimethylsilylpropionat (TMSP) zugegeben. Alle  $^1\text{H}$  NMR Spektren wurden auf die Protonen Resonanzfrequenz von TMSP referenziert. Dieser Wert wurde außerdem für die indirekte Referenzierung der  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren verwendet.

Alle NMR Daten wurden der Software TOPSPIN 4.0.3 (Bruker Biospin, Deutschland) prozessiert.

### 4.7.1 Herstellung Zelllysats

#### 4.7.1.1 Zelllysats für chemisch induzierte Faltungsübergänge

Für Zelllysats für die chemisch induzierten Übergänge mit 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* und 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* wurden, wie unter 4.2.3 beschrieben, Zellen bis zu einer  $OD_{600\text{nm}}$  von  $OD_{600\text{nm}} = 0,55$  für 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* und  $OD_{600\text{nm}} = 0,71$  für 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* angezüchtet und die Expression mit IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in 50 mM TRIS Puffer, pH 8, resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte via Ultraschall (Sonifier W-250, Branson) für 1600 s/100 ml, mit 25 % Amplitude und in einem  $t = 2$  s an,  $t = 3$  s aus Zyklus. Nachdem die Zellwände und andere unlöslichen Bestandteile der Zelle abzentrifugiert wurden, wurde der Überstand für die NMR Messungen genutzt. Die Konzentration des Zelllysats wurde über die Menge an TRIS Puffer, in dem die Zellen resuspendiert wurden, gesteuert. Dabei kann man eine Diskrepanz zwischen Nass- und Trockengewicht feststellen (Tabelle 3) [141]. Die Konzentration des Proteins wurde bestimmt indem das Proteinsignal im  $^{19}\text{F}$  Spektrum mit dem Resonanzsignal von einer bekannten Menge an Trifluoressigsäure (TFA) verglichen wurde (Tabelle 3).

## 4 Experimententeil

**Tabelle 3: Bestimmte Konzentrationen von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB und 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB in verschiedenen Zelllysats Konzentrationen mittels <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie über das Resonanzsignal einer bekannten Menge an TFA. In verdünnter Lösung wurde die Proteinkonzentration mittels UV/Vis Spektroskopie bestimmt. Außerdem das aus dem Nassgewicht bestimmte Trockengewicht des Zellpellets [141].**

Protein	c / $\mu$ M	c <sub>Zelllysats</sub> / g/l	
		Nassgewicht Zellpellet g / l TRIS Puffer	Trockengewicht Zellpellet g / l TRIS Puffer
5- <sup>19</sup> F-Trp BsCspB	200,0	0	0
5- <sup>19</sup> F-Trp BsCspB	~ 5	120	30
5- <sup>19</sup> F-Trp BsCspB	~ 20	240	55
5- <sup>19</sup> F-Trp BsCspB	~ 25	260	60
5- <sup>19</sup> F-Trp BsCspB	~ 70	450	100
4- <sup>19</sup> F-Phe BsCspB	100,0	0	0
4- <sup>19</sup> F-Phe BsCspB	~ 5	150	35
4- <sup>19</sup> F-Phe BsCspB	~ 10	450	100

### 4.7.1.2 Zelllysats für DNS Interaktionsstudien und Relaxationsdispersionsmessungen

Für die Herstellung des Zelllysats dieser Messungen wurden Zellen verwendet, die anstelle mit dem pET24a BsCspB Vektors mit einem leeren pET24a Vektors transformiert wurden. Somit waren diese Systeme nicht in der Lage BsCspB zu exprimieren. Außerdem wurden die Zellpellets in 20 mM Phosphatpuffer bei pH 7 resuspendiert. Alle anderen Schritte bis zum Erhalten des Zelllysats erfolgten wie in 4.7.1.1 beschrieben. Anschließend wurde 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB in Konzentrationen zwischen  $c = 20 \mu\text{M}$  und  $c = 150 \mu\text{M}$  für die DNS Interaktionsstudien und  $c = 1000 \mu\text{M}$  für die Relaxationsdispersionsmessungen zugegeben. Die für die Interaktionsstudien verwendeten Protein Konzentrationen sowie die verwendeten Zelllysats Konzentrationen in Nass- und Trockengewicht sind in Tabelle 4 dargestellt. Für die Relaxationsdispersionsmessungen wurde eine Zelllysats Konzentration von  $c = 200 \text{ g/l}$  Nassgewicht verwendet, was ungefähr  $c = 50 \text{ g/l}$  Trockengewicht entspricht.

## 4 Experimentalteil

**Tabelle 4: Verwendete Konzentrationen an 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* für die Interaktionsstudien mit dT4, dT6 und dT7 in verschiedenen Konzentrationen an Zelllysat angegeben in Nass- und Trockengewicht [141].**

Komplex	$c / \mu\text{M}$	$c_{\text{Zelllysat}} / \text{g/l}$	
		Nassgewicht g / l Phosphat Puffer	Zellpellet Trockengewicht g / l Phospaht Puffer
+ dT4	20	0	0
+ dT4	20	340	80
+ dT4	20	680	160
+ dT6	40	0	0
+ dT6	150	135	30
+ dT6	150	210	50
+ dT7	105	0	0
+ dT7	105	130	30
+ dT7	105	300	70

### 4.7.2 Eindimensionale <sup>1</sup>H und <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie und zweidimensionale <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N NMR-Spektroskopie

Alle Spektren wurden in 20 mM NaCac Puffer bei pH 7 aufgenommen. Eindimensionale <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F NMR sowie zweidimensionale <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von  $c = 650 \mu\text{M}$  gemessen. Von allen sieben fluormarkierten Proteinen wurden eindimensionale <sup>1</sup>H und <sup>19</sup>F NMR Spektren aufgenommen. Zweidimensionale <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC Spektren wurden von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* generiert. Die mittlere, gewichtete Änderung der chemischen Verschiebung wurde wie in Gleichung (10) berechnet.

$$\Delta\omega = \sqrt{\frac{(\Delta^1\text{H})^2 + \frac{1}{25}(\Delta^{15}\text{N})^2}{2}} \quad (10)$$

Dabei sind  $\Delta^1\text{H}$  und  $\Delta^{15}\text{N}$  die Änderungen der chemischen Verschiebungen von Protonen und Stickstoffatomen [142].

#### 4.7.3 Temperatur induzierte Denaturierung detektiert mit $^1\text{H}$ und $^{19}\text{F}$ NMR-Spektroskopie

Alle Proben hatten eine Proteinkonzentration zwischen  $c = 200 \mu\text{M}$  und  $c = 650 \mu\text{M}$  und wurden in einem 20 mM NaCac Puffer bei pH 7 gemessen. Außerdem wurden 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  zugesetzt.

Um die thermodynamische Stabilität der verschiedenen *BsCspB* Varianten zu bestimmen, wurden eindimensionale  $^1\text{H}$  und  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in einem Temperaturbereich zwischen  $T = 291 \text{ K}$  und  $T = 330 \text{ K}$  aufgenommen. Für die Bestimmung des Anteils an ungefalteten Proteins,  $f_U$ , bei den unterschiedlichen Temperaturen, wurden zwei verschiedene Bereiche im Spektrum bestimmt. Zum einen ein Bereich,  $I_N$ , der nur Resonanzfrequenzen des nativen Proteins zeigt. Der andere Bereich,  $I_{N+U}$ , enthält für alle  $^1\text{H}$  NMR Spektren und  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren, der am Phenylalanin markierten Proben, Signale, die sowohl durch natives als auch ungefaltetes Protein zustande kommen. Für die  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren, der am Tryptophan markierten Proben, wurde ein Bereich,  $I_U$ , für die Analyse genutzt, der nur Signale des ungefalteten Proteins enthält.

Für alle  $^1\text{H}$  Spektren liegt der erste Bereich,  $I_N$ , zwischen  $\omega = 0,59 \text{ ppm}$  und  $\omega = 0,14 \text{ ppm}$  und enthält nur Signale, die von nativem Protein hervorgerufen werden. Der zweite Bereich,  $I_{N+U}$ , liegt zwischen  $\omega = 0,697 \text{ ppm}$  und  $\omega = 1,064 \text{ ppm}$  und enthält Signale, die sowohl durch natives als auch ungefaltetes Protein zustande kommen. In dem das Verhältnis  $I_N/(I_N+I_{N+U})$  gebildet wird, kann der Anteil an gefaltetem Protein,  $f_N$ , bestimmt werden. Wenn, wie für *BsCspB* beschrieben [88], von einem Zweizustandsfalter ausgegangen wird, kann man durch  $f_U = 1-f_N$  den Anteil an ungefaltetem Protein,  $f_U$ , bestimmen. In dem man nur den Anteil an ungefaltetem Protein,  $f_U$ , gegen die Temperatur aufträgt, kann man mit folgender Gleichung (11) den Temperatur Mittelpunkt,  $T_M$ , bestimmen.

$$f_U(T) = \frac{\exp\left(-\frac{\Delta H_U(T_M)\left(\frac{T_M-T}{T_M}\right) - \Delta C_P\left(T_M-T+T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_M}\right)\right)}{RT}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta H_U(T_M)\left(\frac{T_M-T}{T_M}\right) - \Delta C_P\left(T_M-T+T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_M}\right)\right)}{RT}\right)} \quad (11)$$

Dabei ist  $\Delta H_U$  die van't Hoff Enthalpie der Entfaltung bei  $T_M$ ,  $\Delta C_P$  die Änderung der spezifischen Wärmekapazität zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand,  $R$  die allgemeine Gaskonstante und  $T$  die Temperatur [103].

#### 4.7.4 Chemisch induzierte Denaturierung detektiert mit $^1\text{H}$ und $^{19}\text{F}$ NMR-Spektroskopie

Alle Zellysatproben enthielten Proteinkonzentrationen zwischen  $c = 5 \mu\text{M}$  und  $c = 70 \mu\text{M}$ . In verdünnter Lösung wurden Konzentrationen von  $c = 8 \mu\text{M}$  und  $c = 200 \mu\text{M}$  für  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp BsCspB}$  und von  $c = 100 \mu\text{M}$  für  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  gewählt. Außerdem wurden allen Proben 5 %  $\text{D}_2\text{O}$  zugegeben.

Die thermodynamische Stabilität von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp BsCspB}$  und  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  wurde sowohl in verdünnter Lösung als auch in Zellysat bestimmt. Dafür wurden eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei verschiedenen Urea Konzentrationen zwischen  $c = 0 \text{ M}$  und  $c = 7 \text{ M}$  aufgenommen. Außerdem wurden in verdünnter Lösung eindimensionale  $^1\text{H}$  NMR Spektren aufgenommen.

Um den Anteil an gefaltetem Protein,  $f_N$ , bei verschiedenen Konzentrationen Urea zu bestimmen, wurden, wie unter 4.7.3 beschreiben, zwei Bereiche im Spektrum integriert. Aus dem Verhältnis dieser Bereiche konnte dann der Anteil an gefaltetem Protein,  $f_N$ , bestimmt werden.

In dem man den Anteil an gefaltetem Protein,  $f_N$ , gegen die Urea Konzentration aufträgt, kann man mit folgender Gleichung (12) zum einen die freie Energie,  $\Delta G$ , zwischen nativen und ungefaltetem Protein und zum anderen die Kooperativität der Entfaltung,  $m$ , bestimmen.

$$f_N = \frac{(g_N + m_N \cdot c_{\text{urea}}) + (g_U + m_U \cdot c_{\text{urea}}) \cdot \left( \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right) + \frac{m \cdot c_{\text{urea}}}{RT} \right)}{1 + \left( \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right) + \frac{m \cdot c_{\text{urea}}}{RT} \right)} \quad (12)$$

Dabei sind  $g_{N/U}$  und  $m_{N/U}$  die Schnittpunkte und Steigungen der Basislinien des Übergangs,  $R$  ist die allgemeine Gaskonstante,  $c_{\text{urea}}$  die Urea Konzentration und  $T$  die Temperatur [134]. Für alle  $^1\text{H}$  und  $^{19}\text{F}$  Daten, sowohl in verdünnter Lösung als auch im Zellysat, wurde die Kooperativität,  $m$ , als globaler Parameter gewählt.

In verdünnter Lösung wurde die Ureakonzentration, wie unter 4.4.1 beschrieben, mit Gleichung (3) bestimmt. Aufgrund der hohen und unterschiedlichen Hintergrundsignalen konnte die Urea Konzentration für die Zellysat Proben nicht nachträglich bestimmt werden. Da aber die Startkonzentrationen der ersten zwei Proben bekannt waren, konnten die Ureakonzentrationen der folgenden Proben aus der Änderung des Probenvolumens bestimmt werden.

Für die Aufnahme der Daten wurden zwei Probenröhrchen mit gleicher Konzentration an Protein vorbereiten. In einem der beiden Röhrchen betrug die Urea Konzentration  $c = 0 \text{ M}$  und im anderen Röhrchen betrug die Urea Konzentration  $c = 6 \text{ M}$  bis  $c = 7 \text{ M}$ . Mit diesen beiden Proben wurden die ersten beiden Messpunkte aufgenommen. Anschließend wurden beide Proben so oft gemischt, dass bis zu 30 verschiedene Proben generiert wurden (Tabelle 5). Mit dieser Methode können Proben mit verschiedenen Urea Konzentrationen, aber mit identischen Proteinkonzentrationen erhalten werden.

## 4 Experimententeil

**Tabelle 5: Experimenteller Aufbau um die chemisch induzierte Entfaltung am Beispiel von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB in verdünnter Lösung mittels NMR-Spektroskopie aufzunehmen.**

Messpunkt	$c_{\text{Urea}} / \text{M}$	Probe
1	5.86	Röhrchen 1 (Startvolumen: 1500 $\mu\text{l}$ )
2	0.00	Röhrchen 2 (Startvolumen: 1500 $\mu\text{l}$ )
3	5.52	Röhrchen 1 + 50 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 2
4	0.13	Röhrchen 2 + 50 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 1
5	5.39	Röhrchen 1 + 55 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 2
6	0.23	Röhrchen 2 + 55 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 1
7	5.20	Röhrchen 1 + 55 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 2
8	0.59	Röhrchen 2 + 55 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 1
9	5.05	Röhrchen 1 + 70 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 2
10	0.82	Röhrchen 2 + 70 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 1
11	4.84	Röhrchen 1 + 70 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 2
12	1.07	Röhrchen 2 + 70 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 1
13	4.58	Röhrchen 1 + 80 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 2
14	1.36	Röhrchen 2 + 80 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 1
15	4.32	Röhrchen 1 + 80 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 2
16	1.57	Röhrchen 2 + 80 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 1
17	4.12	Röhrchen 1 + 90 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 2
18	1.80	Röhrchen 2 + 90 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 1
19	3.88	Röhrchen 1 + 100 $\mu\text{l}$ aus Röhrchen 2

#### 4 Experimentalteil

20	2.05	Röhrchen 2 + 100 µl aus Röhrchen 1
21	3.64	Röhrchen 1 + 110 µl aus Röhrchen 2
22	2.35	Röhrchen 2 + 110 µl aus Röhrchen 1
23	3.45	Röhrchen 1 + 130 µl aus Röhrchen 2
24	2.52	Röhrchen 2 + 130 µl aus Röhrchen 1
25	3.26	Röhrchen 1 + 165 µl aus Röhrchen 2
26	2.70	Röhrchen 2 + 165 µl aus Röhrchen 1
27	3.05	Röhrchen 1 + 220 µl aus Röhrchen 2
28	2.88	Röhrchen 2 + 220 µl aus Röhrchen 1
29	2.98	Röhrchen 1 + 300 µl aus Röhrchen 2
30	2.98	Röhrchen 2 + 300 µl aus Röhrchen 1

---

#### 4.7.5 Protein – DNS Interaktionen

Alle Proben in verdünnter Lösung wurden in 20 mM bei einem pH von 7 gemessen. Außerdem wurden allen Proben 10 % D<sub>2</sub>O zugesetzt. Es wurden Proteinkonzentrationen zwischen  $c = 20 \mu\text{M}$  und  $c = 150 \mu\text{M}$  verwendet (Tabelle 6). Die mittlere, gewichtete Änderung der chemischen Verschiebung für 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* in Zelllysate und verdünnter Lösung sowie für 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* in DNS-gebundenen und -ungebundenen Zustand wurde nach Gleichung (10) berechnet.

**Tabelle 6: Verwendete Konzentrationen an 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB*.**

Protein	Komplex	<i>c</i> / μM
5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	+ dT4	20
5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	+ dT6	40
5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	+ dT6	150
5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	+ dT7	105
4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	+ dT4	150
4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	+ dT5	150
4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	+ dT6	150
4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	+ dT7	150

Für weitere Analysen der DNS Interaktionen wurden acht bis dreizehn eindimensionale <sup>19</sup>F NMR Spektren mit ansteigender Oligonukleotid Konzentration aufgenommen. Aufgrund hoher Bindungsaffinitäten zwischen fluormarkierten *BsCspB* und dT5, dT6 und dT7 konnten diese Daten nur quantitativ ausgewertet werden.

Die Interaktion von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit dT4 wurde bei einer Konzentration von *c* = 20 μM sowohl in Zelllysat als auch in verdünnter Lösung ausgewertet werden. Dafür wurde die chemische Verschiebung, Δ*ω*, des <sup>19</sup>F Signals gegen die Oligonukleotid Konzentration aufgetragen wurde. Mit folgender Gleichung (13) konnte die Dissoziationskonstante, *K<sub>D</sub>*, bestimmt werden.

$$\Delta\omega = \Delta\omega_{\max} \cdot \frac{A - \sqrt{A^2 - 4n \cdot [P]_0 \cdot [L]_0}}{2 \cdot [P]_0} \quad (13)$$

wobei  $A = K_D + [P]_0 + n[L]_0$ , Δ*ω* die chemische Verschiebung des <sup>19</sup>F Signals und [P]<sub>0</sub> und [L]<sub>0</sub> die absolute Konzentration von Protein und Ligand sind. Der Wert der Stöchiometrie, *n*, wurde auf *n* = 1 festgesetzt.

Des Weiteren wurde eine Linienformanalyse mit NMRLineGuru [143] durchgeführt, um mit einer weiteren Methode die Dissoziationskonstante,  $K_D$ , und den Geschwindigkeitskonstante der Liganddissoziation,  $k_{off}$ , zwischen 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* und dT4 zu bestimmen.

### 4.7.6 Zuordnung der $^{19}\text{F}$ Resonanzfrequenzen von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB*

Für die Zuordnung der Fluorsignale von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und dem 4- $^{19}\text{F}$ -Phe-*BsCspB*-ssDNA Komplex in den eindimensionalen  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren wurden sieben F zu Y Punktmutationen mit einem Q5 Site Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) durchgeführt. Die eindimensionalen  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren alle Proteinvarianten wurden in freien und ssDNS (einzelsträngige DNS) gebunden Zustand in Zelllysate aufgenommen. Das Zelllysate wurde, wie unter 4.7.1.1, hergestellt. Für den 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* F49Y-ssDNA Komplex wurde Pentathymidin (dT5) und für den 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* F27Y-ssDNA wurde Tetrathymidin (dT4) verwendet. Für alle anderen Komplexe wurde Hepathymidin (dT7) verwendet. Die eindimensionalen  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren der mutierten Varianten wurden mit den Spektren der unmutierten Variante verglichen, um die fehlenden Signale den entsprechenden Phenylalaninen zu zuordnen.

### 4.7.7 NMRLineGuru

Eine Linienformanalyse wurde mittels NMRLineGuru durchgeführt [143]. Damit wurden die Bindungsaffinität,  $K_D$ , und die Ligandendissoziationskonstante,  $k_{off}$ , zwischen dT4 und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* sowohl in verdünnter Lösung als auch in Zelllysate mit einer Konzentration von  $c = 340 \text{ g/l}$  bestimmt.

### 4.7.8 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Relaxationsdispersionsmessungen am $^{19}\text{F}$ Kern

Für die  $^{19}\text{F}$  CPMG Relaxationsdispersionsexperimente wurde eine eindimensionale CPMG Sequenz  $[90-(T_{CP}-180-T_{CP})_N]$  verwendet. Dabei wurde die Gesamtwaitzeit,  $T_{CPMG}$ , konstant auf  $T_{CPMG} = 5 \text{ ms}$  gesetzt und Relaxationsserien mit Werten für  $\nu_{CPMG} = 1/(4 * T_{CP})$  zwischen  $\nu_{CPMG} = 200 \text{ Hz}$  und  $\nu_{CPMG} = 4000 \text{ Hz}$  generiert indem verschiedenen  $T_{CP}$  und N Werte verwendet wurden. Die effektiven transversalen

#### 4 Experimentalteil

Relaxationsraten,  $[R_{2\text{eff}} = (-1/T_{\text{CPMG}}) \times \ln(I/I_0)]$  wurden durch die aus den eindimensionalen  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren ausgelesenen Intensitäten,  $I$ , berechnet, wobei  $I_0$  die Signalintensität in einem Spektrum ist, welches ohne Wartezeit aufgenommen wurde [123].

Die Relaxationsdispersionskurven, wobei  $R_{2\text{eff}}$  gegen  $v_{\text{CPMG}}$  aufgetragen wurde, wurden mit Gleichung (14) zu einem Zweizustandsaustausch angepasst [144].

$$R_{2\text{eff}}(v_{\text{CPMG}}) = \frac{1}{2} \left( R_{2a} + R_{2b} + k_{\text{ex}} - v_{\text{CPMG}} \cdot \cosh^{-1} \left( D_+ \cosh(\eta_+) - D_- \cos(\eta_-) \right) \right) \quad (14)$$

Mit:

$$D_{\pm} = \frac{1}{2} \left( \frac{\Psi + 2\Delta\omega^2}{\sqrt{\Psi^2 + \Phi^2}} \pm 1 \right)$$

$$\eta_{\pm} = \frac{1}{v_{\text{CPMG}} \cdot \sqrt{2}} \sqrt{\sqrt{\Psi^2 + \Phi^2} \pm \Psi}$$

$$\Psi = (R_{2a} - R_{2b} - p_a k_{\text{ex}} + p_b k_{\text{ex}})^2 - \Delta\omega^2 + 4p_a p_b k_{\text{ex}}^2$$

$$\Phi = 2\Delta\omega (R_{2a} - R_{2b} - p_a k_{\text{ex}} + p_b k_{\text{ex}}) - \Delta\omega^2 + 4p_a p_b k_{\text{ex}}^2$$

Dabei sind  $R_{2a}$  und  $R_{2b}$  die transversalen Relaxationsraten der beiden Zustände in Abwesenheit von Austausch,  $\Delta\omega$  der Unterschied der chemischen Verschiebung zwischen den beiden Zuständen (unter Maßgaben von  $2\pi$ ),  $k_{\text{ex}}$  die Austauschkonstante und  $p_a$  und  $p_b$  der Anteil an beiden Zuständen ( $p_a + p_b = 1$ ) [144].

Die CPMG Relaxationsdaten wurden an zwei verschiedenen Magnetfeldstärken ( $B_0 = 18,8$  T und  $B_0 = 11,7$  T) in verdünnter Lösung sowie bei einer Magnetfeldstärke von  $B_0 = 18,8$  T in Zelllysate mit einer Konzentration von  $c = 200$  g/l generiert. Dabei wurden die Daten in verdünnter Lösung bei zwei verschiedenen Magnetfeldstärken global angepasst.

#### 4.7.9 $^{19}\text{F}$ NMR Messungen in *E. coli* Zellen

Für Messungen von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* in der Zelle wurden, wie unter 4.2.3 beschrieben, Zellen bis zu einer  $OD_{600\text{nm}}$  von  $OD_{600\text{nm}} = 0,55$  angezchtet und die Expression mit IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in 50 mM TRIS Puffer, pH 8, resuspendiert. Zu der Probe wurden 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  zugegeben und

#### 4 Experimentalteil

TMSP zur Referenzierung zugegeben. Anschließend wurden eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren generiert, wobei eine Messzeit von 2 h aufgrund der Zellviabilität nicht überschritten wurde.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

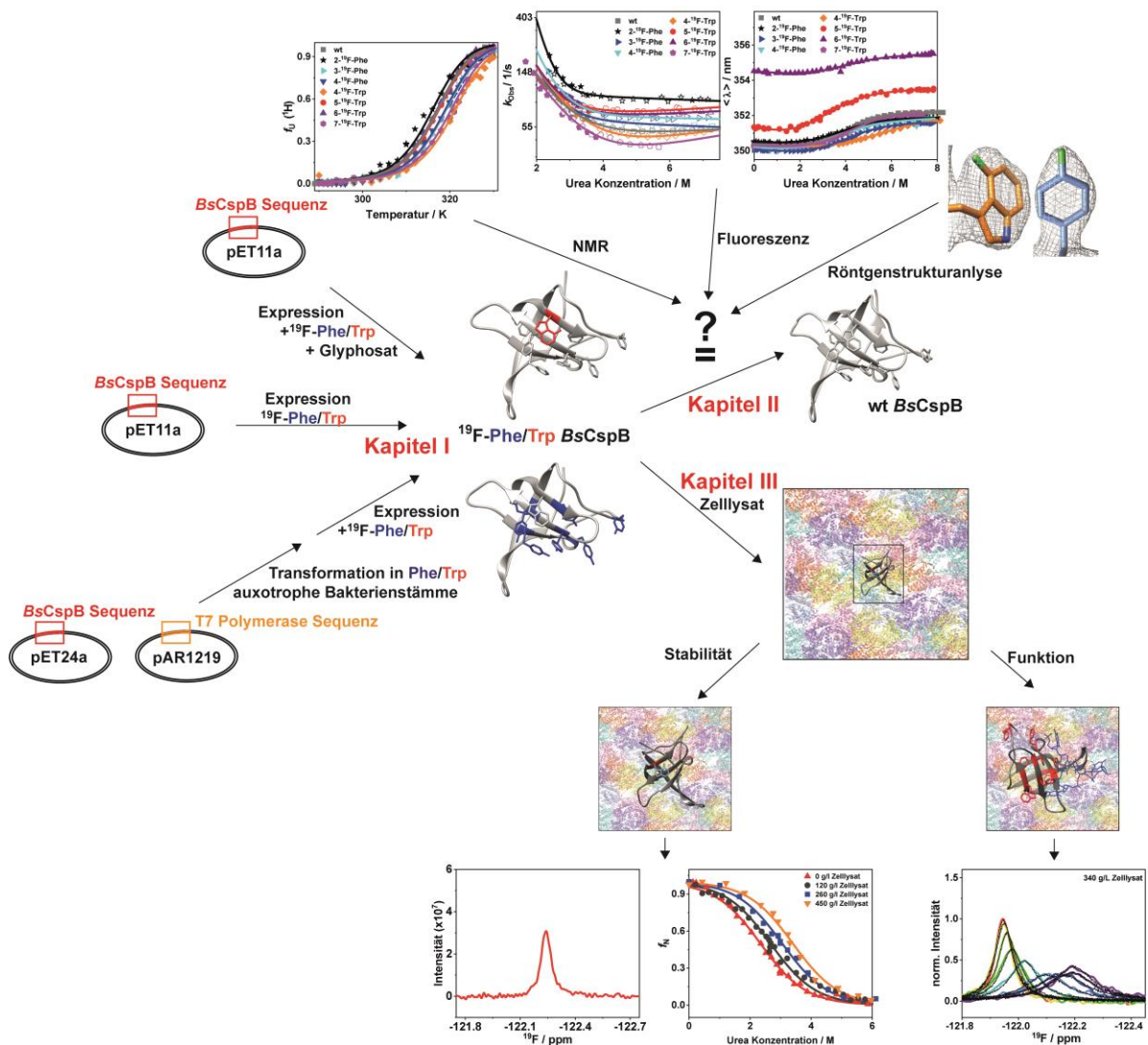


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Aufbaus der Arbeit, wobei diese in drei Kapitel unterteilt ist. Das erste Kapitel befasst sich mit der Herstellung von fluormarkiertem *BsCspB* (PDB ID (4- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB*): 6SZZ, PDB ID (4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB*): 6TOO). Im zweiten Kapitel werden die verschiedenen fluormarkierten Varianten des *BsCspB* charakterisiert und mit der wt Variante (PDB ID: 1CSP) verglichen. Abschließend werden im dritten Kapitel die Funktion und Stabilität des *BsCspB* in Zelllysaten untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in drei Kapitel aufteilen, wobei sich das dritte Kapitel thematisch in zwei Unterkapitel unterteilen lässt. Das erste Kapitel befasst sich mit der Herstellung von sieben, an verschiedenen Stellen mit Fluor markierten Varianten des *BsCspB*s. Im zweiten Kapitel werden die verschiedenen, fluormarkierten Varianten des *BsCspB*s strukturell, thermodynamisch und kinetisch charakterisiert und auf den Einfluss der Fluormarkierung untersucht. Im dritten und letzten Kapitel werden verschiedene Anwendungsmöglichkeiten der Fluormarkierung näher beleuchtet.

Dabei wird der Einfluss von einer komplexeren, zellähnlichen Umgebung auf die Stabilität und Funktion zweier fluormarkierten *BsCspB* Varianten vor allem mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie näher untersucht (Abbildung 12).

### 5.1 Expression und Aufreinigung von fluormarkierten Varianten des *BsCspBs*

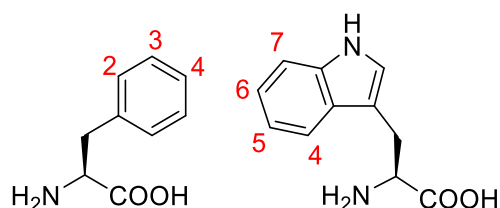
Der erste Schritt dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln das Cold Shock Protein B aus *Bacillus subtilis* mit einem Fluoratom zu markieren. Da sich einige der aromatischen Aminosäuren in der für die Funktion relevanten Bindungstasche befinden, wurde entschieden die Fluormarkierung an den aromatischen Aminosäuren anzubringen. Dabei besteht das *BsCspB* aus 67 Aminosäuren, wobei es ein Tryptophan (Abbildung 13, blau) und sieben Phenylalanine (Abbildung 13, rot) hat.

```

1           10           20           30           40           50
MLEGKVKWFN SEKGFGFIEV EGQDDVFVHF SAIQGEGFFKT LEEGQAVSFE
           60           67
IVEGNRGPQA ANVTKEA
  
```

**Abbildung 13:** Primärsequenz des *BsCspBs*, wobei die sieben Phenylalanine in rot und das Tryptophan in blau gekennzeichnet sind.

Mögliche Fluorierungspositionen sind somit Position 2, 3 oder 4 der Phenylalanine 9, 15, 17, 28, 30, 38 und 49 (Abbildung 14, links) oder Position 4, 5, 6 oder 7 des Tryptophans 8 (Abbildung 14, rechts). Daraus resultierend ist es möglich sieben verschiedene, an den aromatischen Aminosäuren fluormarkierte Varianten des *BsCspB* herzustellen. Im Folgenden würden die verschieden markierten Proteine nach ihrer Markierungsposition benannt. 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* hat somit eine Fluormarkierung an Position 5 des Tryptophans, wohingegen 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* eine Fluormarkierung an Position 4 der sieben Phenylalanine trägt.



**Abbildung 14:** Verschiedene Markierungspositionen für Fluor an L-Phenylalanin (links) und L-Tryptophan (rechts).

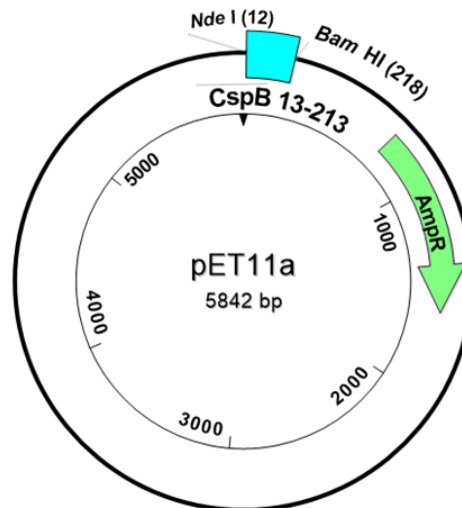
Im Laufe dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden verwendet, fluormarkierte Varianten des *BsCspB* darzustellen. Zunächst wurde versucht mittels Glyphosat die Produktion von aromatischen Aminosäuren zu inhibieren und dann mittels Zugabe von fluormarkiertem Tryptophan oder Phenylalanin die fluormarkierte Variante des *BsCspB* zu generieren [111]. Als nächstes wurden während der herkömmlichen Expression [129] modifizierte Aminosäuren zugegeben, um zumindest eine teilweise Inkorporation der fluormarkierten Aminosäure zu erreichen [130, 131]. Die letzte, vielversprechendste, aber auch komplexeste Methode ist die Verwendung von auxotrophen Bakterienstämmen. Diese sind nicht in der Lage bestimmte Aminosäuren, in diesem Fall Phenylalanin oder Tryptophan, herzustellen. Somit kann durch Zugabe modifizierter Aminosäuren ein nahezu hundertprozentiger Einbau erzeugt werden. Die prägnantesten Ergebnisse dieses Kapitels wurden 2019 in dem Journal *Protein Expression and Purification* veröffentlicht [145].

### 5.1.1 Darstellung von fluormarkiertem *BsCspB* durch die Glyphosat Methode

Die Verwendung von Glyphosat inhibiert den Shikimisäureweg zur Darstellung aromatischer Aminosäuren indem es das Enzym EPSPS (5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Sythase) hemmt [146] und die PEP (Phosphoenilpyruvate) Bindungsstelle blockiert [147, 148]. Das Enzym EPSPS katalysiert die Reaktion zwischen PEP und S3P (Shikimate-3-phosphate) zu EPSP (5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate) [149]. Ist diese Reaktion unterbunden, kann das System nicht mehr selbstständig aromatische Aminosäuren herstellen. Durch Zugabe von modifizierten, aromatischen Aminosäuren zu dem Expressionsmedium können diese zu 100 % in das Protein inkorporiert werden. Schuler *et al.* nutzten 2002 diese Methode um *TmCsp* (Cold Shock Protein aus dem Bakterium *Thermotoga maritima*) mit 5-Fluortryptophan zu 100 % zu markieren [111].

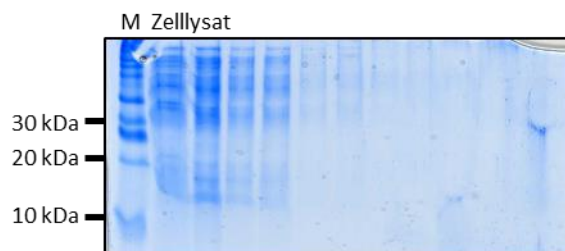
Neben einer hundertprozentigen Inkorporation der modifizierten, aromatischen Aminosäure ist die Möglichkeit der Verwendung des in unserem Labor bestehenden Systems zur Herstellung des *BsCspB* ein weiterer Vorteil der Glyphosat Methode. Bei dieser Herstellung wird Isotopen-markiertes *BsCspB* aus BL21(DE3) *E. coli* Bakterien mit einem pET11a Plasmid (Abbildung 15, Anhang 2), welches die *BsCspB* Sequenz trägt, in M9 Minimalmedium exprimiert [129].

## 5 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 15: Plasmid Map des pET11a Vektors mit den Sequenzen für *BsCspB* und NdeI und BamHI Schnittstellen.**

Um nun fluormarkierte Proben zu erhalten, wurden 50 mg/L der Aminosäure 5-Fluortryptopan oder 5 mg/L der Aminosäure 4-Fluorphenylalanin und verschiedene Konzentrationen zwischen 0.5 g/L und 0.8 g/L an Glyphosat zugeben. Außerdem wurde neben dem bekannten M9 Minimalmedium auch NMM (New Minimal Medium) verwendet und zusätzlich alle Aminosäuren zugegeben. Trotz vieler verschiedener Ansätze konnte zwar teilweise Zellwachstum beobachtet, aber kein fluormarkiertes *BsCspB* gewonnen werden. Diese wurde mittels einer SDS Page (Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese) Analyse nach Zelllysis gezeigt. Dabei wies die SDS Page eindeutig keine Bande bei 7,5 kDa für das *BsCspB* auf (Abbildung 16).



**Abbildung 16: SDS Page Analyse des Zelllysats nach Expression von fluormarkiertem *BsCspB* mittels der Glyphosat Methode.**

Ursache für den Misserfolg dieser Methode könnte darin liegen, dass die verwendeten Mengen an Glyphosat zu hoch sind und sich negativ auf das ganze System auswirken. Würde man nun aber die Glyphosat Konzentration heruntersetzen, besteht die Möglichkeit, dass der Shikimisäureweg nicht vollständig unterdrückt ist und sich neben

der modifizierten *BsCspB* Variante auch unmarkiertes *BsCspB* bildet. Eine weitere Ursache könnte sein, dass die Bakterienkulturen längere Erholungsphasen benötigt hätten. Deutlich längere Wachstumsphasen könnten aber zu einem signifikanten Abbau des Antibiotikums Carbenicillin führen [150, 151], was wiederum zu einem Verlust des pET11a Plasmids, welches die *BsCspB* Sequenz trägt, führen könnte. Dennoch könnte eine Variation der Expressionszeiten und -temperaturen zum Erfolg führen. Eine Möglichkeit wäre unter anderem über Nacht bei  $T = 25\text{ °C}$  zu inkubieren, was bei der Expression aus auxotrophen Bakterienstämmen erfolgreich war. Nichtsdestotrotz wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt, da die weiteren zwei Methoden erfolgreich waren und sich deutlich vielversprechender zeigten.

### 5.1.2 Darstellung von fluormarkiertem *BsCspB* durch Zugabe von fluormarkiertem Phenylalanin oder Tryptophan

Eine weitere Methode zur Herstellung von fluormarkiertem *BsCspB* ist die Zugabe von modifizierten Aminosäuren direkt zu dem Expressionssystem. Durch das Überangebot der fluormarkierten Aminosäure wird diese vermehrt in das Protein eingebaut. So konnte Sinz *et al.* 2015 Photo-Methionin zu 30 % in das Modellprotein Calmodulin einbauen indem sie Photo-Methionin im Überschuss während der Expression zugab [130]. Wright *et al.* konnte sogar eine hundertprozentige Inkorporation von 5-<sup>19</sup>F-Tryptophan und 6-<sup>19</sup>F-Tryptophan in TTR (menschliches Transthyretin) durch Zugabe der modifizierten Aminosäure zeigen [131].

Im Zuge dieser Arbeit wurde sich mit dieser Methode auf die am Tryptophan fluormarkierten Varianten beschränkt. Da im Gegensatz zu Phenylalanin Tryptophan nur einmal im *BsCspB* vorkommt, kann man davon ausgehen, dass eine deutlich höhere Homogenität der an Tryptophan fluormarkierten Varianten als der an Phenylalanin fluormarkierten Varianten erhalten werden kann. Um fluormarkiertes Tryptophan in *BsCspB* zu inkorporieren, wurde zu dem in diesem Labor bekannten Expressionssystem aus BL21(DE3) *E. coli* Bakterien und dem *BsCspB* Sequenztragenden pET11a Vektors in Minimalmedium M9 50 mg/L 4-, 5- oder 6-<sup>19</sup>F-Tryptophan zugegeben. Nach Aufreinigung wie in Kapitel 4.3 und 5.1.4 beschrieben, konnte 4-, 5- und 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* erhalten werden. Um zu zeigen, dass 4-, 5- und 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* erhalten wurde, wurden eindimensionale <sup>19</sup>F NMR Spektren aufgenommen (Abbildung 17 A-C). Wie zu erwarten, zeigen alle Spektren ein scharfes

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Signal für das einzelne Fluoratom im Protein bei  $\omega = -124,30$  ppm für 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Abbildung 17 A), bei  $\omega = -122,24$  ppm für 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Abbildung 17 B) und bei  $\omega = -121,51$  ppm für 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Abbildung 17 C). Zusätzlich wurden eindimensionale <sup>19</sup>F Spektren von 4-<sup>19</sup>F-Tryptophan, 5-<sup>19</sup>F-Tryptophan und 6-<sup>19</sup>F-Tryptophan aufgenommen (Anhang 3). Die Resonanzsignale weisen eine ähnliche, aber nicht identische chemische Verschiebung auf wie die entsprechenden Proteine, was auf einen Einbau der Aminosäuren hindeutet. Des Weiteren zeigt die Linienbreite, FWHM, eine deutliche Verbreiterung. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass die Mobilität des Moleküls, welches die Fluormarkierung trägt, herabgesetzt ist, was unter anderem bei größeren Molekülen der Fall ist. Somit deuten sowohl die Verschiebung als auch die Verbreiterung des Resonanzsignals darauf hin, dass die fluormarkierte Aminosäure in das Protein eingebaut wurde.

Die geringe Intensität der Proben kommt durch die Aufnahme der eindimensionalen <sup>19</sup>F NMR Spektren mittels 400 MHz Spektrometer mit Raumtemperatur-Probenkopf zustande. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die meisten Spektren an einem 800 MHz Spektrometer mit Kryoprobenkopf generiert.

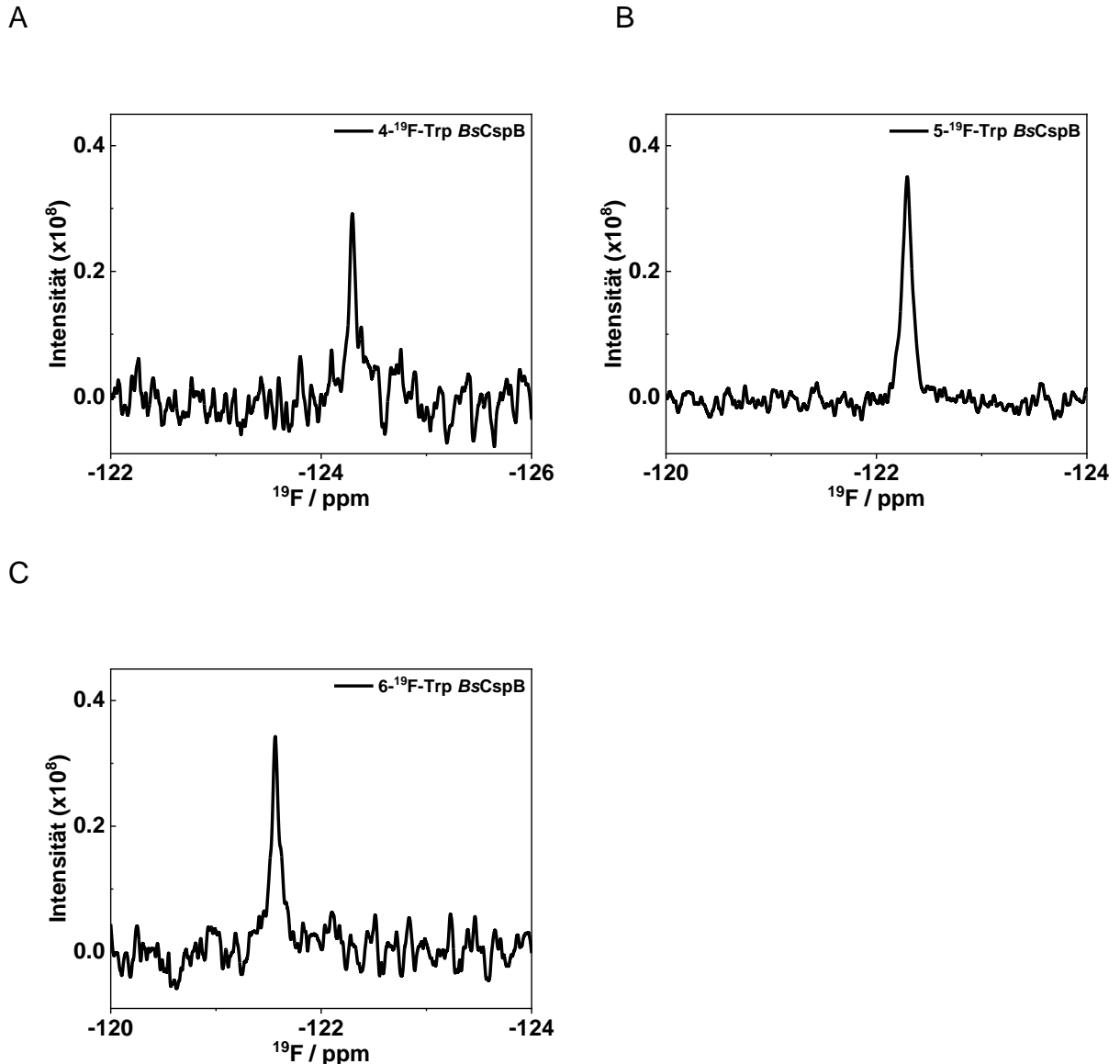
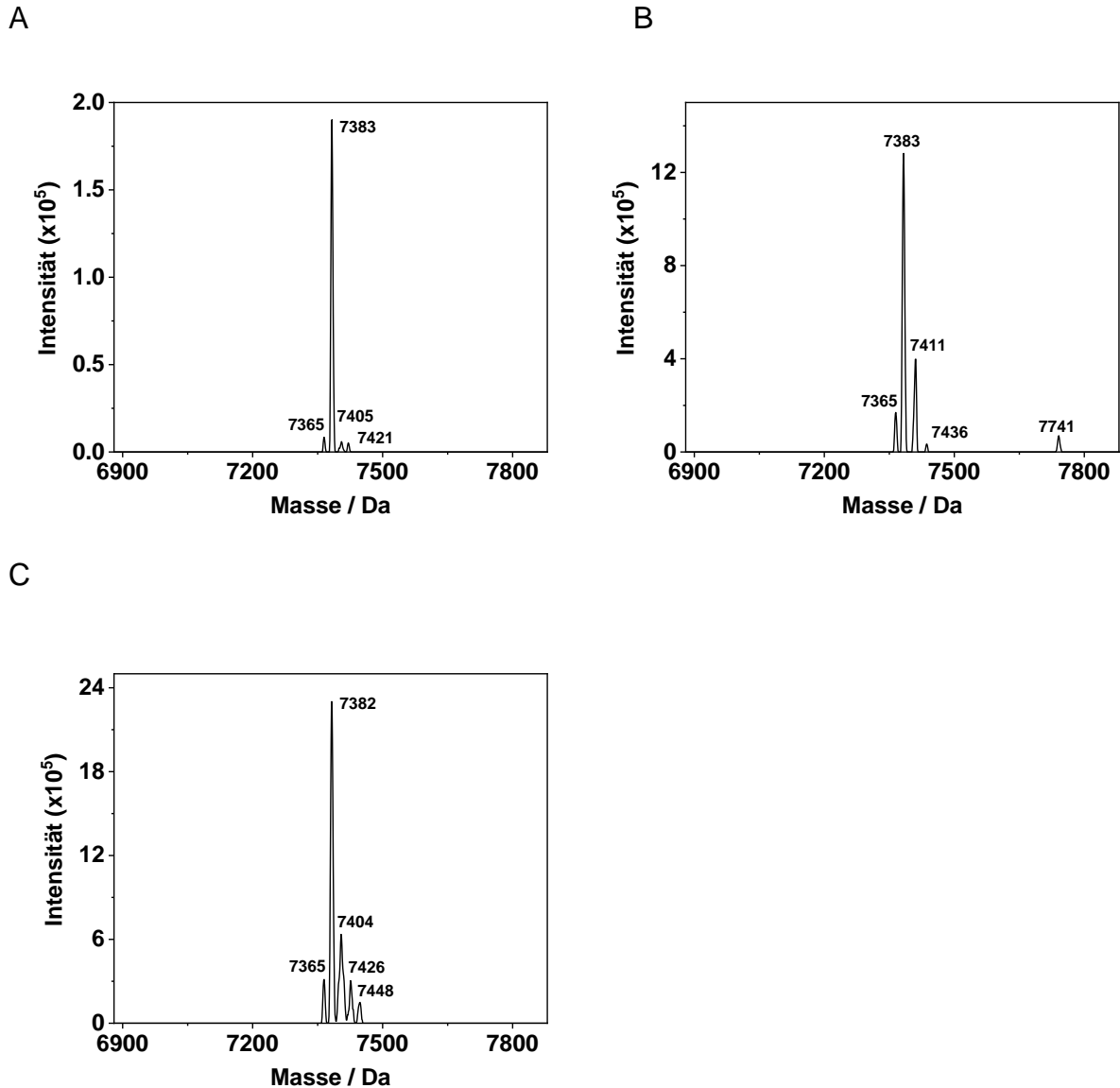


Abbildung 17: 1D  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von 4-, 5- und 6- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB. Die Spektren zeigen ein scharfes Signal für das einzelne Fluoratom im Protein bei  $\omega = -124,30$  ppm für 4- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB (A), bei  $\omega = -122,24$  ppm für 5- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB (B) und bei  $\omega = -121,51$  ppm für 6- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB (C).

Da bei dieser Methode fluormarkiertes Tryptophan zum herkömmlichen Expressionssystem zugegeben wurde, ist es möglich, dass neben fluormarkiertem BsCspB auch wt BsCspB exprimiert wird. Um den Prozentsatz an markiertem und unmarkiertem BsCspB zu bestimmen, wurden ESI MS Spektren aufgenommen. Dabei zeigen die dekonvolvierten Spektren ein dominierendes Signal bei 7382,5 Da für 4- und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB und 7382,3 Da für 6- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB, was zu einer theoretischen Masse von 7382 Da von einem einzelnen fluormarkierten BsCspB passt (Abbildung 18).

## 5 Ergebnisse und Diskussion



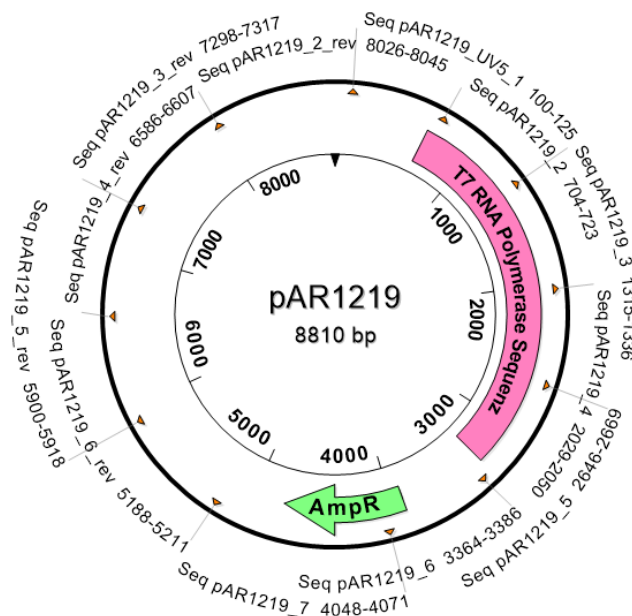
**Abbildung 18:** Dekonvoliertes Massenspektrum von 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (A), 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (B) und 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (C). Dabei zeigt sich ein dominierendes Signal bei 7382,5 Da für 4- und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und 7382,3 Da für 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB*, was zu einer theoretischen Masse von 7382 Da von einem einzelnen fluormarkierten *BsCspB* passt.

Die genauere Analyse der Signale zeigt eine Gesamtmenge von 87 % von 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB*, 64 % von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und 55 % von 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB*, wobei wt auf eine Menge von 4 %, 8 % und 8 % kommt (Anhang 4-Anhang 6). Der restliche Anteil kann auf Fragmentierung, Agglomeration und Oxidation zurückgeführt werden. Somit konnte, auch wenn die fluormarkierte Aminosäure nicht zu 100 % in das Protein inkorporiert wurde, eine Methode dargestellt werden, um fluormarkiertes Protein zu erhalten. Nichtsdestotrotz ist die Anwendung dieser Methode auf Systeme, die an mehreren Stellen im Protein fluormarkiert werden sollen, wie das Phenylalanin fluormarkiertes *BsCspB*, schwierig. Denn durch die verschiedenen Markierungsstellen

erhöht sich auch die Inhomogenität der Probe, da verschiedene Möglichkeiten der Teilmarkierung bestehen. Aus diesem Grund wurde nach weiteren, effizienteren Möglichkeiten der Fluormarkierung gesucht.

### 5.1.3 Darstellung von fluormarkiertem *BsCspB* durch die Verwendung von Phenylalanin- oder Tryptophan-auxotrophen Bakterienstämmen

Die dritte und erfolgreichste Methode fluormarkiertes *BsCspB* zu erhalten, war die Verwendung von Phenylalanin- und Tryptophan-auxotrophen Bakterienstämmen. Dafür musste ein neues System aufgebaut werden, da die auxotrophen Stämme CAG 18455 7371 und DSMZ 12779 keine genomische Verankerung einer T7-Expressionskassette haben. Dies ist aber nötig, da das T7-Expressionssystem genutzt werden soll. Somit musste zusätzlich zu dem *BsCspB* Sequenz tragenden Plasmid ein weiteres Plasmid eingeführt werden, welches die Sequenz der T7 Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors trägt. Dafür wurde der Vektor pAR1219 (Merck) erworben und mittels Sanger Sequenzierung (GATC Service, eurofins Genomics) vollständig sequenziert (Abbildung 19, Anhang 7).

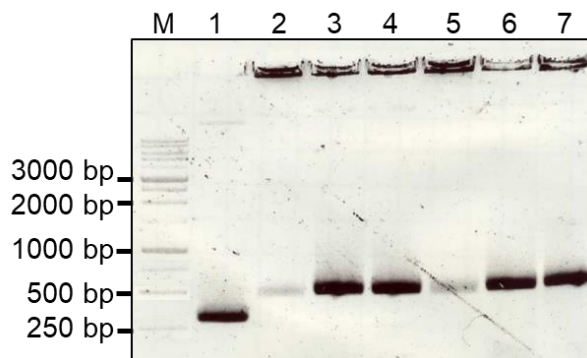


**Abbildung 19: Plasmid Map des pAR1219 Vektors mit den Sequenzen für T7 Polymerase und den Sequenzierungsprimern.**

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Da der pAR1219 Vektor, wie auch der pET11a Vektor, eine Carbenicillin Resistenz trägt, wurde die Nukleotid Sequenz von *BsCspB* in einen pET24a Vektor kloniert, der eine Kanamycin Resistenz trägt. Die *BsCspB* Sequenz wurde mit zwei verschiedenen Methoden ausgeschnitten. Zum einen wurde eine PCR verwendet. Dabei trugen die verwendeten Primer Schnittsequenzen für die Restriktionsenzyme BamHI und NdeI. Nach der Vervielfältigung der *BsCspB* enthaltenden Sequenz folgte die Verdauung mit den beiden Restriktionsenzymen. Als zweite Möglichkeit wurde der pET11a Vektor mit den Restriktionsenzyme BamHI und MluI verdaut, das Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen und das kürzere, *BsCspB* enthaltende Stück aus dem Gel ausgeschnitten. Für beide Methoden ist der leere pET24a Vektor mit den entsprechenden Enzymen verdaut worden und alles zu den zwei verschiedenen Varianten des pET24a-*BsCspB* Vektors ligiert.

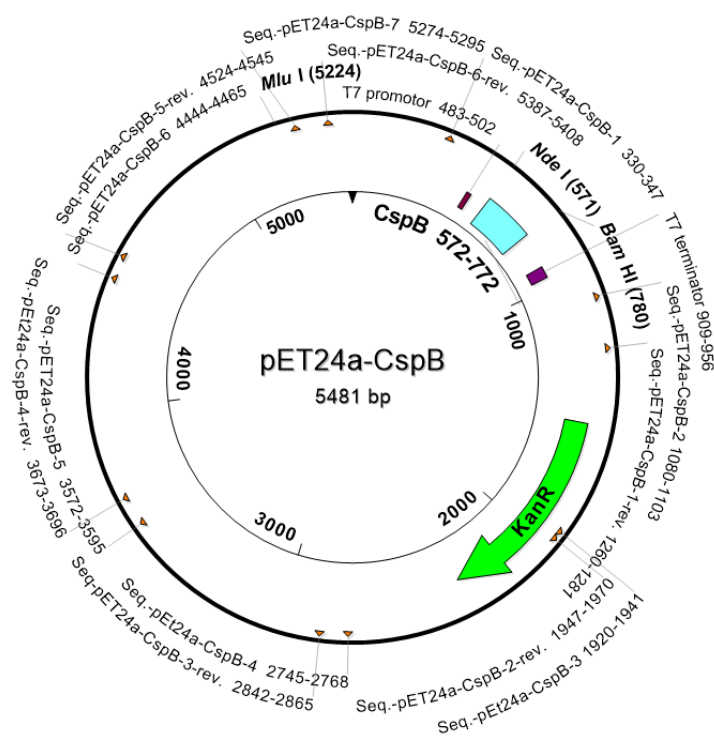
Um die erfolgreiche Klonierung zu verifizieren, wurden *E. coli* Dh5 $\alpha$  mit beiden Vektoren transformiert und auf LB Platten ausgestrichen. Anschließend wurde eine Kolonie Polymerasekettenreaktion (Kolonie-PCR) mit jeweils drei Kolonien und dem leeren pET24a Vektor durchgeführt. Dafür wurden die Primer 5'-GCC GAA ACA AGC GCT CAT-3' und 5'-TTG TTA GCA GCC GGA TCT C-3' verwendet. Die Auswertung angefertigter Agarosegele zeigte den erfolgreichen Einbau für alle Kolonien (Abbildung 20). Dabei zeigten die PCR Produkte die theoretische Länge von 533 Basenpaaren (bp) (Abbildung 20 2-7). Im Vergleich dazu war das PCR Produkt des leeren Vektors deutlich kürzer und zeigte eine vergleichbare Länge zur theoretischen Länge von 360 bp (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Kolonie-PCR Produkt von pET24a (1) und pET24a-*BsCspB* (2-7) mit den Primern 5'-GCC GAA ACA AGC GCT CAT-3' und 5'-TTG TTA GCA GCC GGA TCT C-3'.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Des Weiteren erfolgte eine Sanger Sequenzierung (GATC Service, eurofins Genomics) des Vektors pET24a-BsCspB (Abbildung 21, Anhang 8).



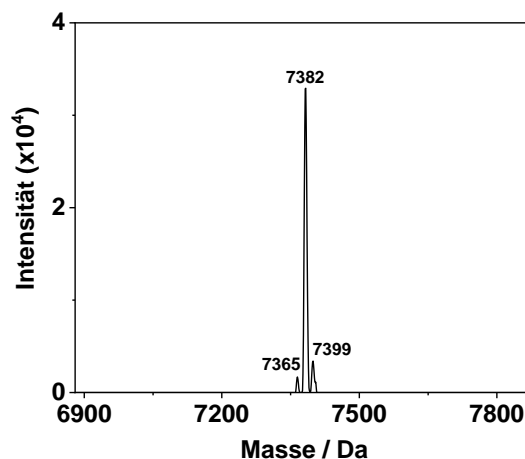
**Abbildung 21: Plasmid Map des pET24a-BsCspB Vektors mit den Sequenzen für BsCspB, T7 Promotor, lac Operator, T7 Terminator, MluI, NdeI und BamHI Schnittstellen und den Sequenzierungsprimern.**

Nachdem die Tryptophan- sowie der Phenylalanin-auxotrophe *E. coli* Stämme mit dem Plasmid pAR1219 sowie mit dem Plasmid pET24a BsCspB transformiert wurden, konnten alle sieben fluormarkierte Varianten des BsCspB, wie unter 4.2.3 beschrieben, exprimiert werden. Durch die Zugabe von IPTG wurde die Expression induziert. Die Variation der Expressionszeit und -Temperatur zeigte, dass eine Inkubation über Nacht bei  $T = 298$  K die besten Ergebnisse lieferte. Die Proteine wurden wie unter 4.3 und 5.1.4 beschrieben aufgereinigt.

Für die Analyse der entstandenen Proteine wurde zunächst ein ESI MS Spektrum von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB aufgenommen. Das dekonvolvierte Spektrum zeigt ein dominierenden Peak bei 7382,3 Da, was sehr gut mit der theoretischen Masse von 7382 Da eines einfach fluormarkiertem BsCspB übereinstimmt (Abbildung 22). Die genaue Analyse der Peaks ergibt eine gesamte Ausbeute von 76 % an 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB, während 3 % wt BsCspB mit einer passenden, theoretischen Masse von 7365 Da erhalten wurde (Abbildung 22, Anhang 9). Im Vergleich mit dem ESI MS

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Spektrum des nach 5.1.2 hergestelltem 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Abbildung 18 B, Anhang 5) zeigt sich, dass mit dieser Methode zum einen 12 % mehr 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* gewonnen werden kann und zum anderen, dass sich die Menge an wt *BsCspB* um 5 % reduziert. Dass trotz Verwendung auxotropher Stämme wt *BsCspB* erhalten wird, liegt daran, dass für die Anzucht der Bakterien zunächst Medium mit unmarkiertem Tryptophan/Phenylalanin verwendet wurde und das fluormarkierte Tryptophan/Phenylalanin erst für die Expression zugeben wurde. Dies kann dazu geführt haben, dass, trotz eines Waschschriffs, Rückstände des unmarkierten Mediums zurückblieben und wt *BsCspB* exprimiert werden konnte. Die Anzucht in fluormarkiertem Medium war aber nicht möglich, da die Zellen sich in diesem nicht vermehrten. Nichtsdestotrotz zeigte diese Variante eine deutliche Verbesserung der Ausbeute an fluormarkiertem *BsCspB* und eine Abnahme an wt *BsCspB*.



**Abbildung 22: Dekonvoliertes Massenspektrum von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB*. Dabei zeigt sich ein dominierendes Signal bei 7382,3 Da, was zu einer theoretischen Masse von 7382 Da von einem einzeln fluormarkierten *BsCspB* passt.**

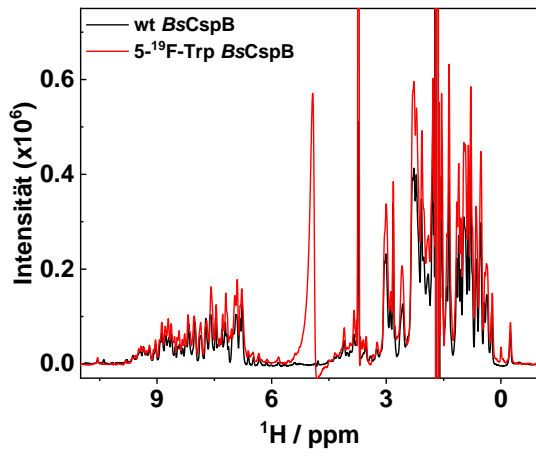
Als nächster Schritt wurden eindimensionale <sup>1</sup>H NMR Spektren (Abbildung 23 A, Anhang 10) aller sieben Varianten sowie ein zweidimensionales <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC NMR Spektrum von <sup>15</sup>N markiertem 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Abbildung 23 B) aufgenommen, um eine Übersicht über die Struktur des fluormarkierten *BsCspB* zu erhalten und mit dem des wt *BsCspB*s zu vergleichen. Die Übereinanderlagerung des eindimensionalen <sup>1</sup>H NMR Spektrums von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit dem der wt Variante zeigt ein vergleichbares Signalpattern der beiden Spektren (Abbildung 23 A). Die restlichen eindimensionalen <sup>1</sup>H NMR Spektren der anderen fluormarkierten Varianten sind in Anhang 10 dargestellt und zeigen ebenso vergleichbare Resonanzsignale. Auch der

## 5 Ergebnisse und Diskussion

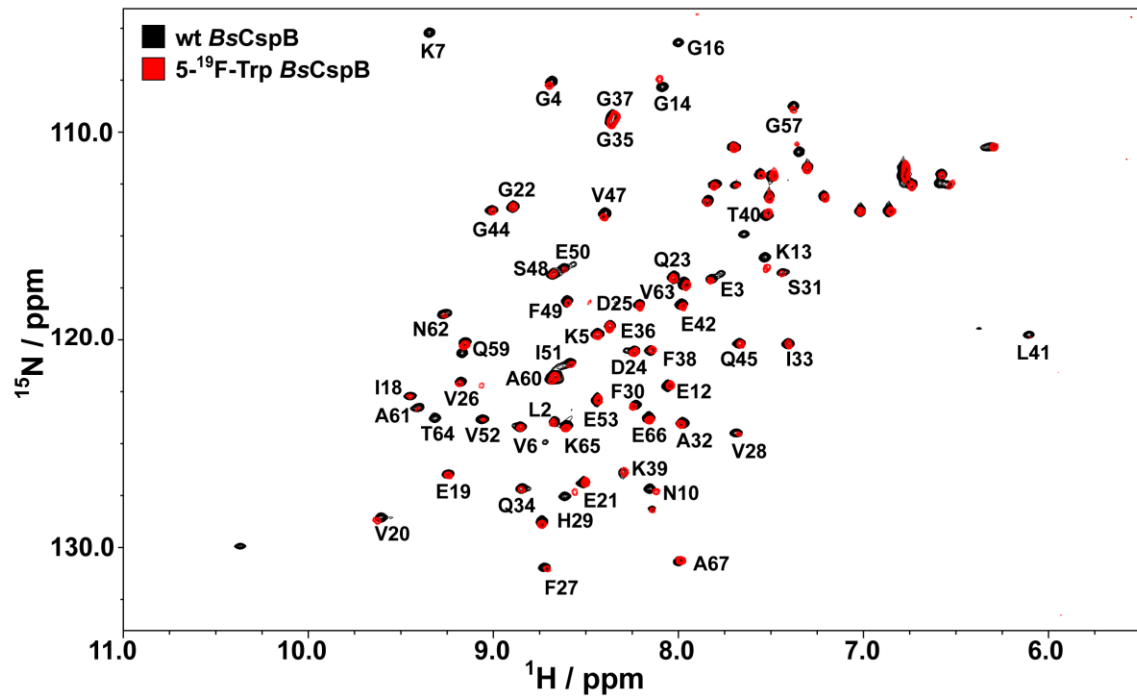
Vergleich zwischen den zweidimensionalen  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC NMR Spektren von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* und wt *BsCspB* (Abbildung 23 B) zeigt, dass die Verteilung der Amidprotonen als auch die Intensität der Signale fast identisch sind und nur kleine Unterschiede in der chemischen Verschiebung,  $\Delta\omega$ , zu erkennen sind, wobei der Mittelwert von  $\Delta\omega$  zwischen 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* und wt *BsCspB*  $\Delta\omega = 0,035 \pm 0,033$  ppm beträgt (Abbildung 23 C). In Abbildung 23 D sind die Aminosäuren markiert, deren Verschiebungen der Resonanzsignale das Mittel überschreiten. Daraus lässt sich erkennen, dass die Einbringung des Fluoratoms nur zu kleinen, lokalen Änderungen in der chemischen Umgebung führt (Abbildung 23 C, D). Das fehlende  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  Signal der Tryptophan Indolgruppe bei  $\omega^{1\text{H}} \sim 10,3$  ppm des 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* lässt sich darauf zurückzuführen, dass während der Expression 5- $^{19}\text{F}$ -Tryptophan eingesetzt wurde, welches nicht  $^{15}\text{N}$  markiert war. Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Einführung des Fluoratoms in das Protein die Struktur und Faltung des Proteins nicht beeinflusst. Des Weiteren zeigt sowohl das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Spektrum als auch das  $^1\text{H}$  Spektrum ein einzelnes Set von Resonanzsignalen, was ein weiterer Hinweis auf die hohe Reinheit der Probe ist.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

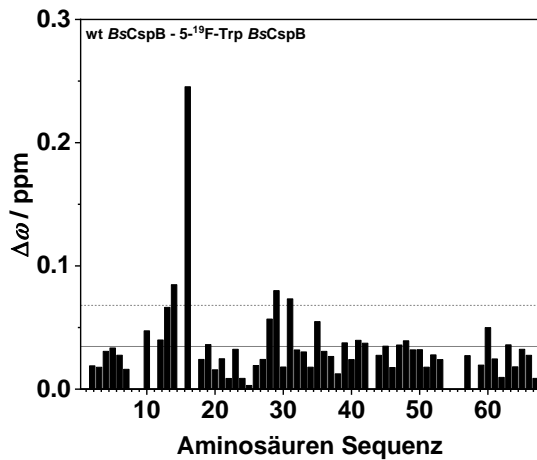
A



B



C



D

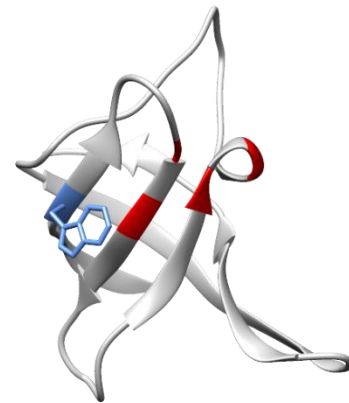


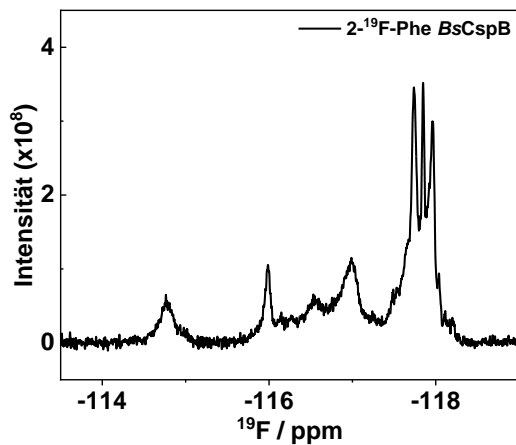
Abbildung 23: Eindimensionales  $^1\text{H}$  Spektrum (A) und zweidimensionales  $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$  HSQC Spektrum (B) von wt *BsCspB* (schwarz) und  $5\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB* (rot). Der Unterschied in der chemischen Verschiebung,  $\Delta\omega$ , in Protonen und Stickstoff Dimension zwischen wt *BsCspB* und  $5\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB*. Die horizontalen Linien zeigen den Mittelwert (durchgezogene Linie) und den Mittelwert + die Standardabweichung (gestrichelte Linie) an (C). Aminosäuren die einen größeren Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen wt *BsCspB* und  $5\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB* als den Mittelwert + die Standardabweichung haben sind rot markiert (D, PDB ID: 1csp). Das Tryptophan ist mit Seitenkette in blau gezeigt.

Neben den  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  Dimensionen wurden auch eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren aufgenommen (Abbildung 24). Die Spektren von  $2\text{-}^{19}\text{F-Phe}$  *BsCspB*,  $3\text{-}^{19}\text{F-Phe}$  *BsCspB* und  $4\text{-}^{19}\text{F-Phe}$  *BsCspB* zeigen Resonanzsignale zwischen  $\omega = -114,39$  ppm bis  $\omega = -118,46$  ppm,  $\omega = -111,03$  ppm bis  $\omega = -114,24$  ppm und  $\omega = -112,91$  ppm bis  $\omega = -117,78$  ppm (Abbildung 24 A, B, C). Das Set an Resonanzsignalen kommt durch die sieben Phenylalanine, die alle fluormarkiert sind, zustande. Dennoch können nicht sieben einzelne Signale identifiziert werden, da es aufgrund ähnlicher chemischer Umgebung zu Signalüberlagerungen und aufgrund von Asymmetrie der Fluormarkierung zu unterschiedlichen Konformationen und somit zu Signaldopplungen kommt. Die Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB*,  $5\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB*,  $6\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB* und  $7\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB* zeigen jeweils ein einzelnes, scharfes Signal bei  $\omega = -124,29$  ppm,  $\omega = -122,24$  ppm,  $\omega = -121,51$  ppm und  $\omega = -131,99$  ppm für das Fluor in Position 4, 5, 6 und 7 im Tryptophanring (Abbildung 24 D, E, F, G). Zusätzlich wurde ein eindimensionales  $^{19}\text{F}$  Spektrum von  $5\text{-}^{19}\text{F-Tryptophan}$  aufgenommen (Abbildung 24 H). Das Resonanzsignal in diesem Spektrum ist um  $\Delta\omega = -2,4$  ppm zu  $\omega = -124,68$  ppm verschoben, was auf eine Veränderung der chemischen Umgebung hindeutet. Des Weiteren zeigt die Linienbreite, FWHM, eine deutliche Verbreiterung

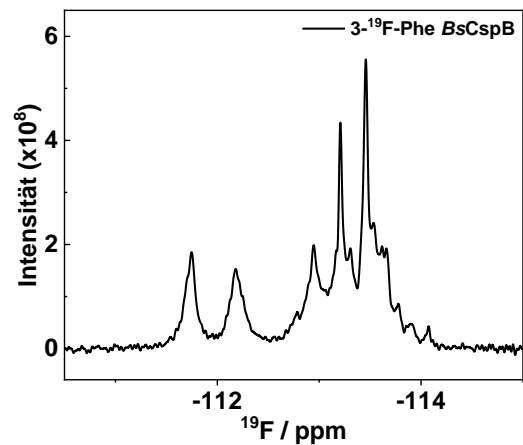
## 5 Ergebnisse und Diskussion

von  $\text{FWHM}^{5-^{19}\text{F-Trp}} = 3,86 \text{ Hz}$  für  $5-^{19}\text{F-Tryptophan}$  zu  $\text{FWHM}^{5-^{19}\text{F-Trp}}_{\text{BsCspB}} = 48,90 \text{ Hz}$  für  $5-^{19}\text{F-Trp}_{\text{BsCspB}}$ . Dies ist ein Anzeichen dafür, dass die Mobilität des Moleküls, welches die Fluormarkierung trägt, herabgesetzt ist. Dies ist unter anderem bei größeren Molekülen der Fall. Sowohl die Verschiebung als auch die Verbreiterung des Resonanzsignals deuten darauf hin, dass die fluormarkierte Aminosäure in das Protein eingebaut wurde. Außerdem sind die  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4-^{19}\text{F-Tryptophan}$ ,  $6-^{19}\text{F-Tryptophan}$  und  $7-^{19}\text{F-Tryptophan}$  in Anhang 3 gezeigt. Dabei zeigen auch hier die Resonanzsignale eine deutliche Verschiebung und Linienverschmälerung im Vergleich zu den Signalen der Protein Spektren.

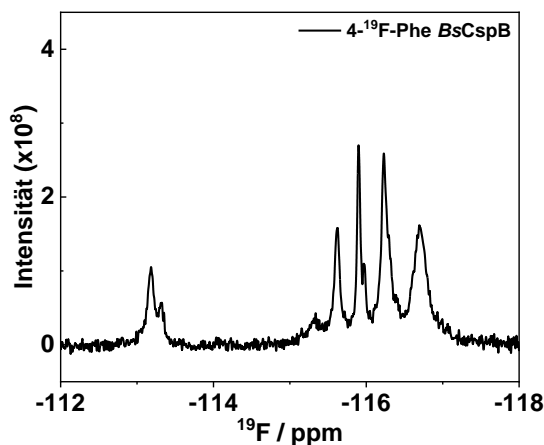
A



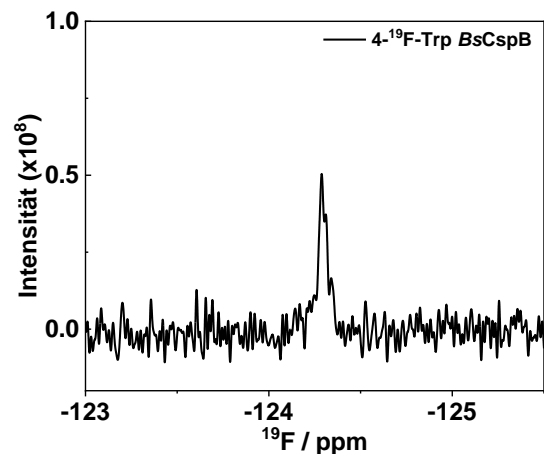
B



C



D



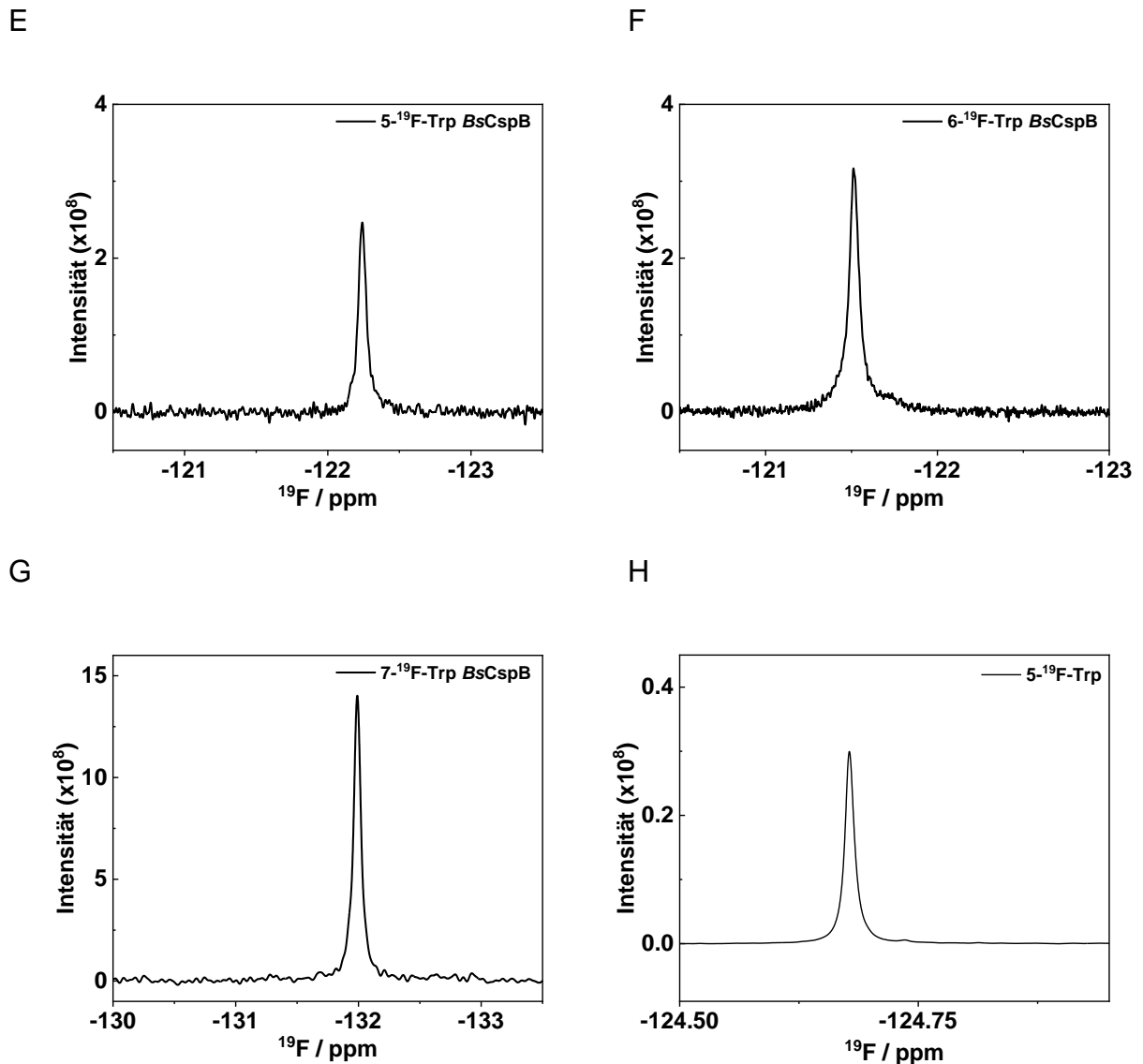


Abbildung 24: Eindimensionale <sup>19</sup>F NMR Spektren von 2-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (A), 3-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (B), 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (C), 4-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (D), 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (E), 6-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (F), 7-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (G) und 5-<sup>19</sup>F-Tryptophan (H).

Somit konnte ein Verfahren entwickelt werden, um fluormarkierte Varianten des BsCspB herzustellen. Dieses Verfahren ist leicht auf andere Proteine oder Labelpositionen übertragbar und konnte für alle sieben, an Tryptophan oder Phenylalanin fluormarkierten Varianten des BsCspB angewandt werden.

#### 5.1.4 Aufreinigung von fluormarkiertem BsCspB

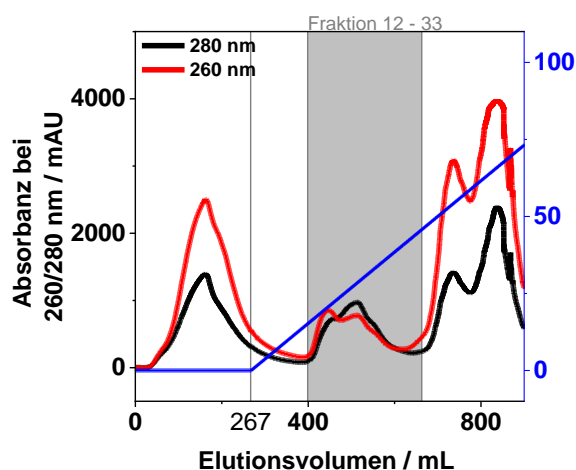
Nachdem die Zellen abzentrifugiert wurden, wurde das Cold Shock Protein für alle drei Methoden aufgereinigt. Diese Aufreinigung erfolgte in drei Schritten, wobei zunächst eine Anionen Austausch Chromatographie, dann eine Hydrophober Austausch

## 5 Ergebnisse und Diskussion

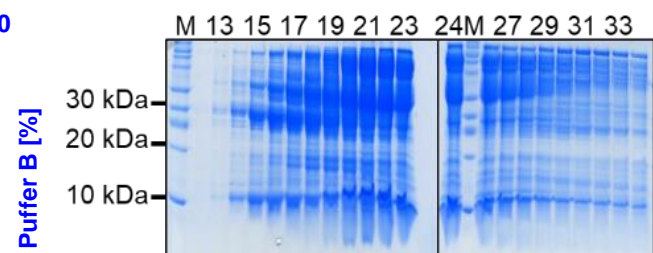
Chromatographie und zum Schluss eine Größenausschluss Chromatographie durchgeführt wurde. Vor der Aufreinigung des Proteins, wurden zunächst die Zellpellets in Lysis Puffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nachdem Zellwandtrümmer und andere unlösliche Bestandteile zentrifugiert wurden, konnte das Zielprotein in Überstand gefunden werden. Die Aufreinigung wird hier anhand von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* exemplarisch dargestellt, erfolgte aber für die anderen Varianten identisch. Die Elutionsprofile und SDS Pages der anderen fluormarkierten Proteine sind im Anhang dargestellt (Anhang 11-Anhang 16). Die Analyse der Proben nach den einzelnen Aufreinigungsschritten erfolgte mittels SDS Page, welche auch dazu dienten die Fraktionen für den nächsten Arbeitsschritt zu bestimmen.

Als erster Schritt der Aufreinigung erfolgte eine Anionen Austausch Chromatographie (Abbildung 25 A, B), wobei die Fraktionen 12-33 vereint wurden und für den nächsten Aufreinigungsschritt, eine Hydrophober Austausch Chromatographie eingesetzt wurde. Während diesen zeigt das Elutionsprofil eine deutlich höhere Reinheit der Probe (Abbildung 25 C, D). Die schlechte Qualität der SDS Page nach dem Hydrophoben Austausch ist auf die, während diesen Schrittes nötige, hohe Salzkonzentration zurück zu führen. Im letzten Schritt der Aufreinigung wurden die Fraktionen 6-17 auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, was zu einer sehr hohen Reinheit der fluormarkierten *BsCspB* führte (Abbildung 25 E, F).

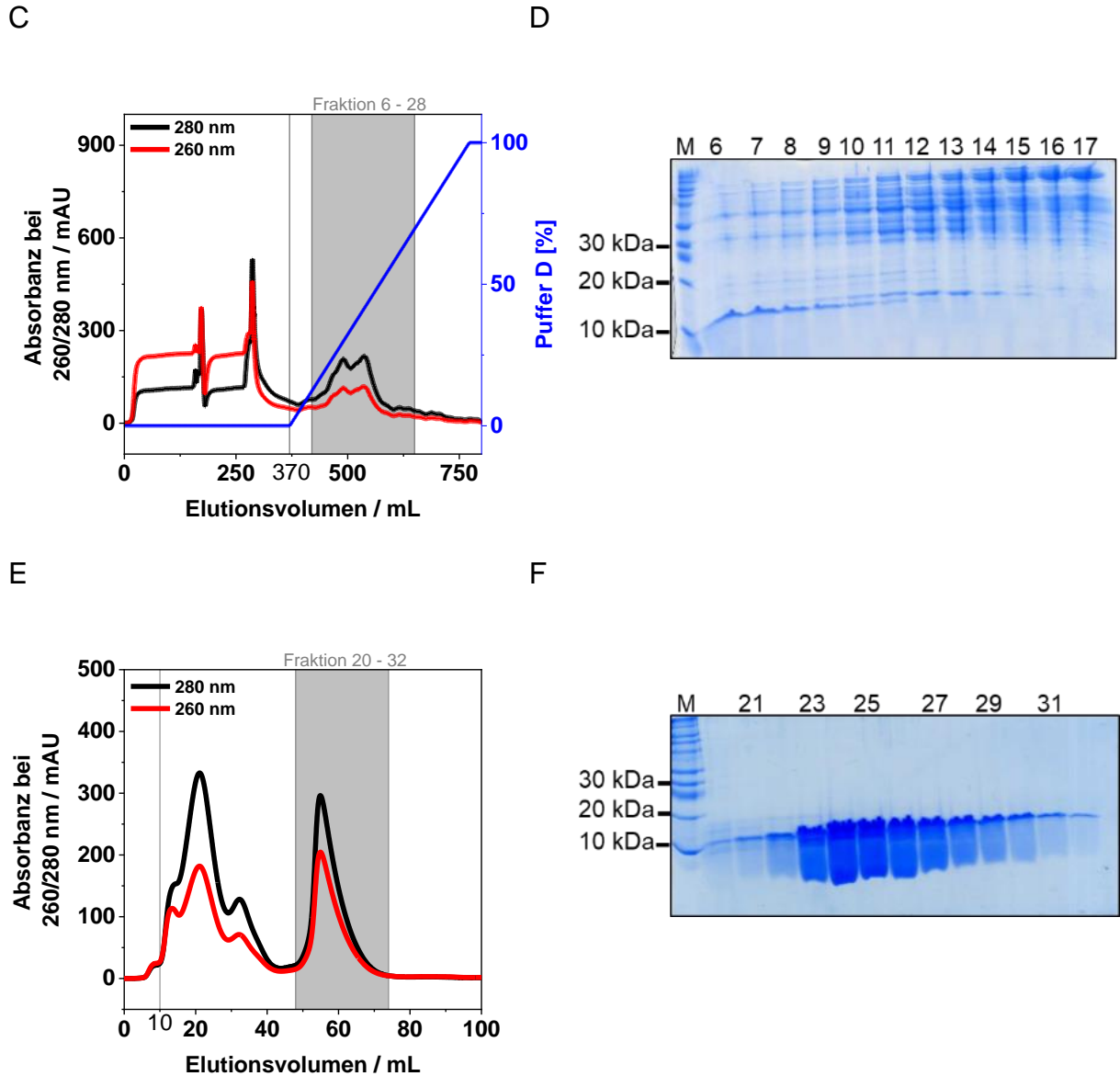
A



B



## 5 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 25:** Elutionsprofile und SDS Page Analysen von  $5\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB*. Für die Aufreinigung wurden drei Reinigungsschritte unternommen: eine Anionen Austausch Chromatographie (A, B), eine Hydrophober Austausch Chromatographie (C, D) und eine Größenausschluss Chromatographie (E, F). Das Protein wurde bei einem Elutionsvolumen  $V = 0$  mL auf die jeweilige Säule geladen. Die graue, vertikale Linie zeigt das Volumen an bei dem mit dem Fraktionssammeln gestartet wurde, während der graue Balken die Fraktionen anzeigt, die für die SDS Pages verwendet wurden. Die sukzessive Zugabe von Puffer B (A) und Puffer D (C) wurde blau dargestellt.

Die Ausbeuten wurden, wie unter 4.3.5 beschrieben, berechnet und in folgender Tabelle 7 dargestellt. Die Ausbeuten an fluormarkiertem Protein sind in der gleichen Größenordnung, wie die Ausbeute für wt *BsCspB*, welche auf 5 mg pro  $V = 1$  l Expressionsmedium (M9 Medium) von Birgit Köhn bestimmt wurde.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 7: Ausbeuten für alle fluormarkierten Varianten des *BsCspB*.**

Protein Variante	Menge in mg pro $V = 1$ l Expressionsmedium
2- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	2 mg
3- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	5 mg
4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	6 mg
4- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	1 mg
5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	9 mg
6- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	10 mg
7- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	3 mg

Aus diesen Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass ein System zum Einbau fluormarkierter Aminosäuren in *BsCspB* entwickelt wurde, welches auch einfach auf andere Proteine übertragbar ist. Diese Methode wurde erfolgreich mit allen sieben verschiedenen fluormarkierten Varianten von Tryptophan und Phenylalanin angewandt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Einbau der fluormarkierten Aminosäuren keinen Einfluss auf die Struktur der Proteine hat.

## 5.2 Spektroskopische Untersuchungen an fluormarkiertem *BsCspB*

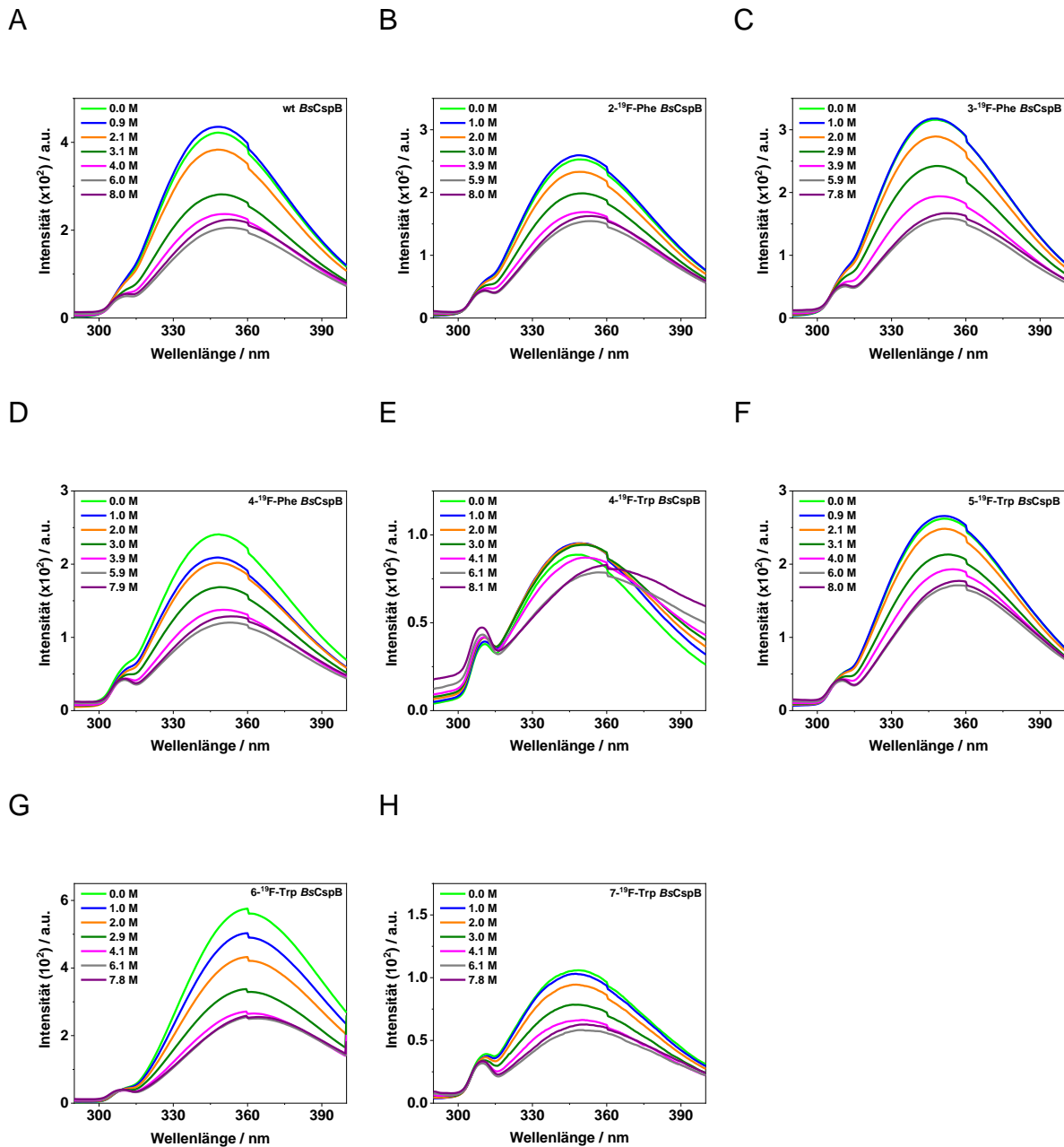
Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der mögliche Einfluss, der durch das Einbringen des Fluoratoms in das Protein zustande kommt, auf die Stabilität, die Faltungsdynamik und die Struktur untersucht. Einige Messungen führte hierbei Xenia Mihajlenko durch. Dafür wurde als erster Schritt die Stabilität der sieben verschiedenen, fluormarkierten Varianten des *BsCspB* mittels Fluoreszenz und NMR-Spektroskopie bestimmt. Während bei den Fluoreszenzmessungen die fluormarkierten *BsCspB* Varianten durch Urea denaturiert wurden, wurde bei den NMR-Spektroskopie eine Temperaturdenaturierung durchgeführt. Durch Anpassen der Entfaltungskurven konnten die Stabilitäten bestimmt werden. Als nächstes wurden Faltungskinetiken der sieben verschiedenen Proteine untersucht, dabei sind Faltung und Entfaltung chemisch induziert und mittels Stopped Flow Fluoreszenz detektiert worden. Als letzter Schritt wurden Kristallstrukturen von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* und 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* untersucht und mit der wt Variante verglichen. Die signifikantesten Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2020 in *Scientific Reports* veröffentlicht [152].

### 5.2.1 Bestimmung der thermischen Stabilität mit Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht

Um die Stabilität der sieben verschiedenen fluormarkierten Varianten des *BsCspB* zu bestimmen, wurde Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht verwendet. Dafür wurde sich die intrinsische Fluoreszenz des Tryptophans zunutze gemacht, welche bei der Entfaltung des Proteins abnimmt. Diese Abnahme kommt dadurch zustande, dass das Tryptophan im gefalteten Zustand des *BsCspBs* exponiert ist, während es dies im ungefalteten Zustand nicht ist. Somit kommt weniger Fluoreszenzemission bei dem Detektor an. Der Faltungsübergang von 2-<sup>19</sup>F-Phe, 3-<sup>19</sup>F-Phe, 4-<sup>19</sup>F-Phe, 4-<sup>19</sup>F-Trp, 5-<sup>19</sup>F-Trp, 6-<sup>19</sup>F-Trp und 7-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* wurde durch chemische Denaturierung mittels Urea induziert und mit Fluoreszenzspektren bei Ureakonzentrationen zwischen  $c = 0 \text{ M}$  und  $c = 8 \text{ M}$  verfolgt. Alle Varianten außer 7-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* wurden zweimal vermessen. Des Weiteren wurden die Rohdaten der wt Variante von Birgit Köhn zur Verfügung gestellt.

Alle Fluoreszenzspektren zeigen, dass mit steigender Ureakonzentration die Fluoreszenzintensität um ungefähr einen Faktor zwei abnimmt (Abbildung 26).

## 5 Ergebnisse und Diskussion

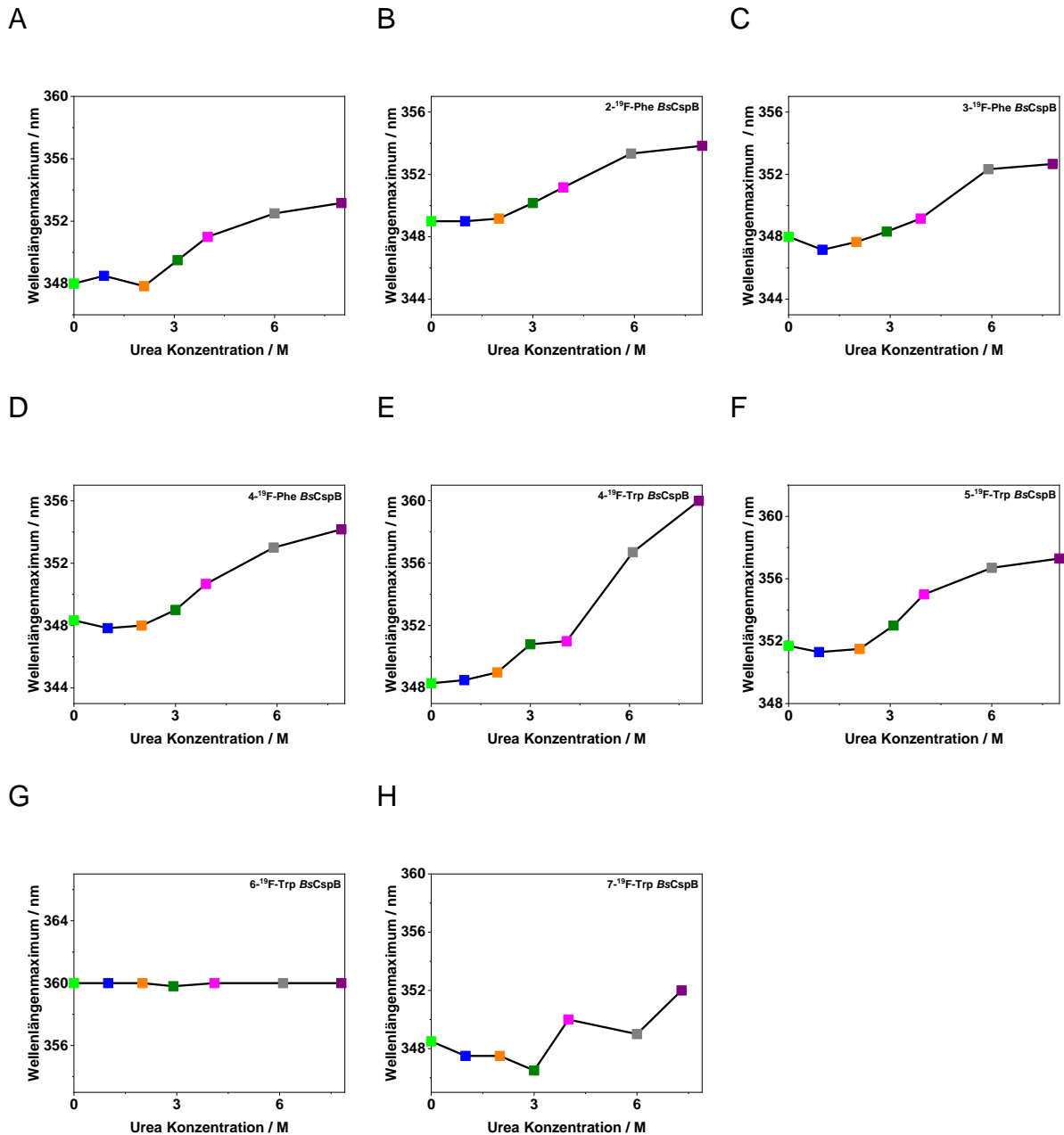


**Abbildung 26:** Fluoreszenzspektrum von wt (A), 2-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (B), 3-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (C), 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (D), 4-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (E), 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (F), 6-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (G) und 7-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (H) bei verschiedenen Urea Konzentrationen. Für die Anregung wurde ein Licht der Wellenlänge  $\lambda = 280$  nm verwendet.

Außerdem zeigt sich mit fortschreitender Entfaltung eine deutliche Verschiebung zu höheren Wellenlängen um maximal  $\Delta\lambda = 12$  nm (Abbildung 27 A-F, H), was darauf zurückgeführt werden kann, dass mit steigender Urea Konzentration, das Tryptophan weniger zu dem polaren Lösungsmittel exponiert ist. Diese Beobachtungen konnten sowohl für die wt Variante als auch für die fluormarkierte Varianten gemacht werden. Alleine für 6-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB konnte keine Verschiebung des Emissionsmaximums bei steigender Urea Konzentration beobachtet werden (Abbildung 27 G). Nichtsdestotrotz

## 5 Ergebnisse und Diskussion

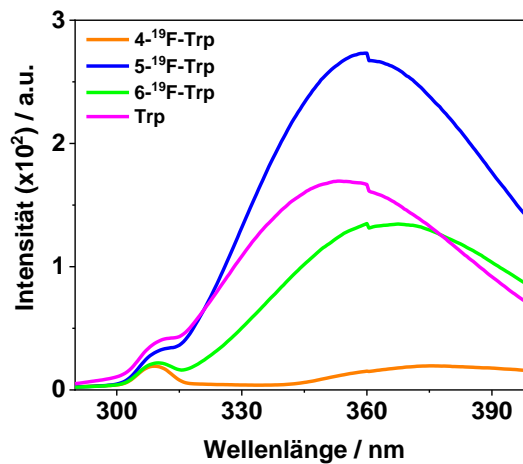
nimmt Fluoreszenzintensität auch für 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit steigender Urea Konzentration ab (Abbildung 26 G).



**Abbildung 27:** Wellenlänge des Fluoreszenzemissionsmaximums von wt (A), 2-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (B), 3-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (C), 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (D), 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (E), 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (F), 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (G) und 7-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (H) bei verschiedenen Urea Konzentrationen.

Die Fluoreszenzintensität für 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* ist im Vergleich zu allen anderen Varianten deutlich geringer (Abbildung 26 E). Diese Beobachtung wurde auch für 4-<sup>19</sup>F-Tryptophan gemacht, welches eine geringe Fluoreszenzquantenausbeute hat [153], wobei diese 100 mal kleiner ist als die für Tryptophan, 5-<sup>19</sup>F-Tryptophan und 6-<sup>19</sup>F-Tryptophan ist (Abbildung 28).

## 5 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 28:** Fluoreszenzmissionsspektren der freien Aminosäure Tryptophan (pink), 4-<sup>19</sup>F-Tryptophan (orange), 5-<sup>19</sup>F-Tryptophan (blau) und 6-<sup>19</sup>F-Tryptophan (grün). Alle Spektren wurden mit einer Aminosäure Konzentration von  $c = 1 \mu\text{M}$  in 20 mM NaCac, pH 7 und  $T = 298 \text{ K}$  aufgenommen. Zur Anregung wurde ein Licht der Wellenlänge  $\lambda = 280 \text{ nm}$  verwendet.

Für die Analyse der Fluoreszenzdaten wurde die gemittelte Emissionswellenlänge  $\langle \lambda \rangle$  nach Gleichung (2) bestimmt (Abbildung 29). Dass die Intensität nicht, wie normalerweise, bei nur einer Wellenlänge ausgelesen wurde [11], sondern ein gesamter Bereich gemittelt wurde, hat zwei Gründe. Zum einen wurde somit die Verschiebung des Emissionsmaximums zu höheren Wellenlängen berücksichtigt und zum anderen wurden auch die unterschiedlichen Emissionsmaxima und die daraus resultierende andere Form der Spektren bei bestimmten Wellenlängen der verschiedenen Proteine berücksichtigt. Mit dieser Methode werden somit sowohl die unterschiedlichen Formen der Spektren als auch eine mögliche Verschiebung des Emissionsmaximums während der Entfaltung beachtet. Die exakte Bestimmung der Urea Konzentration erfolgte über die Bestimmung des Brechungsindex,  $n$ , mittels Gleichung (3).

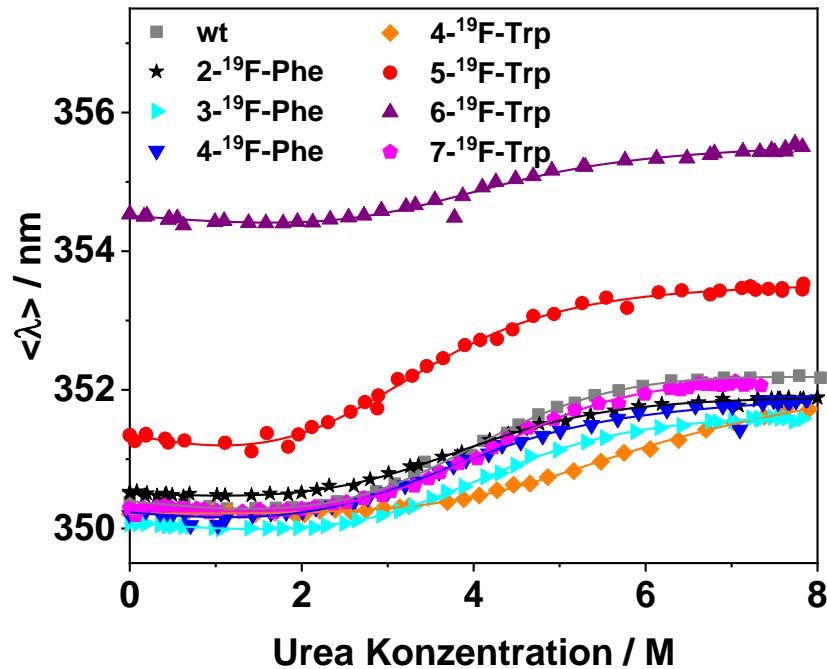


Abbildung 29: Darstellung der gemittelten Emissionswellenlänge,  $\langle \lambda \rangle$ , in Abhängigkeit von der Urea Konzentration. Diese wurde für wt *BsCspB* (Rechtecke/grau) und alle sieben fluormarkierten Varianten, 2-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Sterne/schwarz), 3-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Dreiecke-rechts/blau), 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Dreiecke-unten/cyan), 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Rauten/orange), 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Kreise/rot), 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Dreiecke-oben/lila) und 7-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Fünfecke/pink), aus Fluoreszenzspektren bei verschiedenen Urea Konzentrationen erhalten. Die durchgezogenen Linien zeigen die beste Anpassung der Daten (Gleichung (4)) bei Verwendung eines globalen Wertes für die Kooperativität,  $m$ . Die Ergebnisse der Anpassung sind in Tabelle 8 dargestellt.

Geht man nun, wie in der Literatur bekannt [88], von einem Zweizustandsfalter für die *BsCspB* Varianten aus, kann man mit Gleichung (4) die freie Energie,  $\Delta G^0$ , zwischen gefalteten und entfalten Zustand für die wt und alle sieben fluormarkierten Varianten bestimmen. Die Kooperativität der Entfaltung,  $m$ , wurde als globaler Fitparameter verwendet, um eine bessere Vergleichbarkeit der freien Energie,  $\Delta G^0$ , zu ermöglichen. Dies resultierte in einem Wert für  $m$  von  $m = -2,9 \pm 0,1$  kJ/(mol M), was sehr gut für den Literatur bekannten Wert für die wt Variante von  $m = -3,2 \pm 0,1$  kJ/(mol M) übereinstimmt [11, 88]. Die freie Energie,  $\Delta G^0$ , wurde für die doppelt gemessenen Varianten gemittelt und zwischen  $\Delta G^0 = 9,0 \pm 0,5$  kJ/mol für 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und  $\Delta G^0 = 12,7 \pm 1,1$  kJ/mol für 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* bestimmt (Tabelle 8).

## 5 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 8: Analyse der Faltung im Gleichgewicht von wt *BsCspB* und den sieben fluormarkierten Varianten mittels Fluoreszenzspektroskopie, um die thermodynamische Stabilität,  $\Delta G^0$ , zu bestimmen. Dafür wurde die Gleichung (4) verwendet und die Kooperativität,  $m$ , wurde als globaler Parameter genutzt und zu  $m = -2,9 \pm 0,1$  kJ/(mol M) bestimmt. Der Mittelpunkt des Faltungsübergangs,  $C_M$ , wurde mit  $C_M = \Delta G^0/m$  kalkuliert.**

Protein	$\Delta G^0$ / kJ/mol	$C_M$ / M
wt <i>BsCspB</i>	$11,1 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,2$
2- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	$10,0 \pm 0,7$	$3,5 \pm 0,2$
3- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	$10,5 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,2$
4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	$9,6 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,2$
4- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	$12,7 \pm 1,1$	$4,4 \pm 0,4$
5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	$9,0 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,2$
6- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	$11,0 \pm 0,7$	$3,8 \pm 0,2$
7- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	$11,4 \pm 0,6$	$3,9 \pm 0,2$

Eine weitere Möglichkeit die thermodynamische Stabilität,  $\Delta G^0$ , zu bestimmen, ist die freie Energie,  $\Delta G$ , in Abhängigkeit der Urea Konzentration aufzutragen und im Faltungsübergangsbereich linear anzupassen (Tabelle 9, Abbildung 30) [154].  $\Delta G^0$  ergibt sich aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse und die Kooperativität,  $m$ , ist die Steigung der Geraden, welche für eine bessere Vergleichbarkeit auf den Wert  $m = -2,9 \pm 0,1$  kJ/(mol M), der mittels Gleichung (4) global bestimmt wurde, festgesetzt. Dies wurde für alle Varianten des *BsCspBs* zusätzlich durchgeführt, um sicherzustellen, dass fehlende Basislinien keinen Einfluss auf die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität haben, wie es von Alexander und Pace gezeigt wurde [135]. Diese Anpassung resultierte in Werten für die thermodynamische Stabilität,  $\Delta G^0$ , in derselben Größenordnung wie für die Werte, die mit Gleichung (4) bestimmt wurden. Dabei liegen sie zwischen  $\Delta G^0 = 9,7 \pm 0,2$  kJ/mol für 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und  $\Delta G^0 = 14,1 \pm 0,1$  kJ/mol für 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* liegen und sind generell minimal höher als die, die durch Anpassung mit Gleichung (4) bestimmt wurden. Dies lässt sich auf die unterschiedliche Art der Anpassung zurückführen. Dieser Unterschied ist aber

## 5 Ergebnisse und Diskussion

minimal und die Konsistenz in den beiden unabhängigen Varianten der Anpassung zeigt eine deutliche Validität der Ergebnisse.

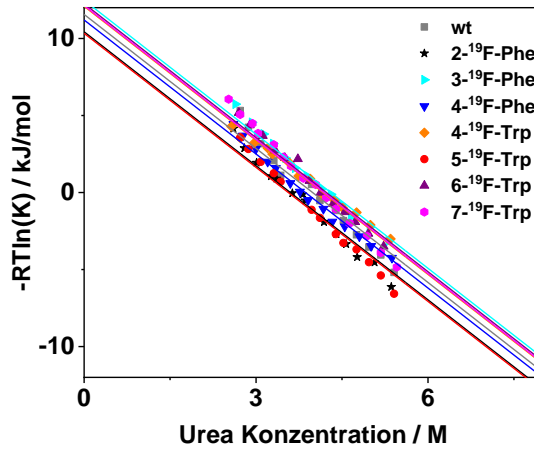


Abbildung 30. Linearer Fit des natürlichen Logarithmuses der Gleichgewichtskonstanten von wt *BsCspB* (Rechtecke/graue) und allen sieben fluormarkierten Varianten,  $2\text{-}^{19}\text{F-Phe}$  *BsCspB* (Sterne/schwarz),  $3\text{-}^{19}\text{F-Phe}$  *BsCspB* (Dreiecke-rechts/blau),  $4\text{-}^{19}\text{F-Phe}$  *BsCspB* (Dreiecke-unten/cyan),  $4\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB* (Rauten/orange),  $5\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB* (Kreise/rot),  $6\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB* (Dreiecke-oben/lila) und  $7\text{-}^{19}\text{F-Trp}$  *BsCspB* (Fünfecke/pink), um  $\Delta G^0$  mit Gleichung (5) und (6) zu bestimmen. Für die lineare Anpassung wurde ein Bereich zwischen  $c = 2,5 \text{ M}$  Urea und  $c = 5,5 \text{ M}$  Urea gewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 gezeigt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 9: Analyse der Faltung im Gleichgewicht von wt *BsCspB* und den sieben fluormarkierten Varianten mittels Fluoreszenzspektroskopie, um die thermodynamische Stabilität,  $\Delta G^0$ , zu bestimmen. Dafür wurden die Gleichungen (5) und (6) und die freie Energie,  $\Delta G$ , im Übergang linear angepasst. Dabei wurde für die Kooperativität,  $m$ , derselbe Wert verwendet, der mittels Gleichung (4) bestimmt wurden. Der Mittelpunkt des Faltungsübergangs,  $C_M$ , wurde mit  $C_M = \Delta G^0/m$  kalkuliert.**

Protein	$\Delta G^0$ / kJ/mol	$C_M$ / M
wt <i>BsCspB</i>	11,6 ± 0,2	4,0 ± 0,1
2- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	10,4 ± 0,2	3,6 ± 0,1
3- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	12,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1
4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	10,9 ± 0,2	3,8 ± 0,1
4- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	14,1 ± 0,1	4,9 ± 0,1
5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	9,7 ± 0,2	3,4 ± 0,1
6- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	11,6 ± 0,2	4,0 ± 0,1
7- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	12,1 ± 0,1	4,2 ± 0,1

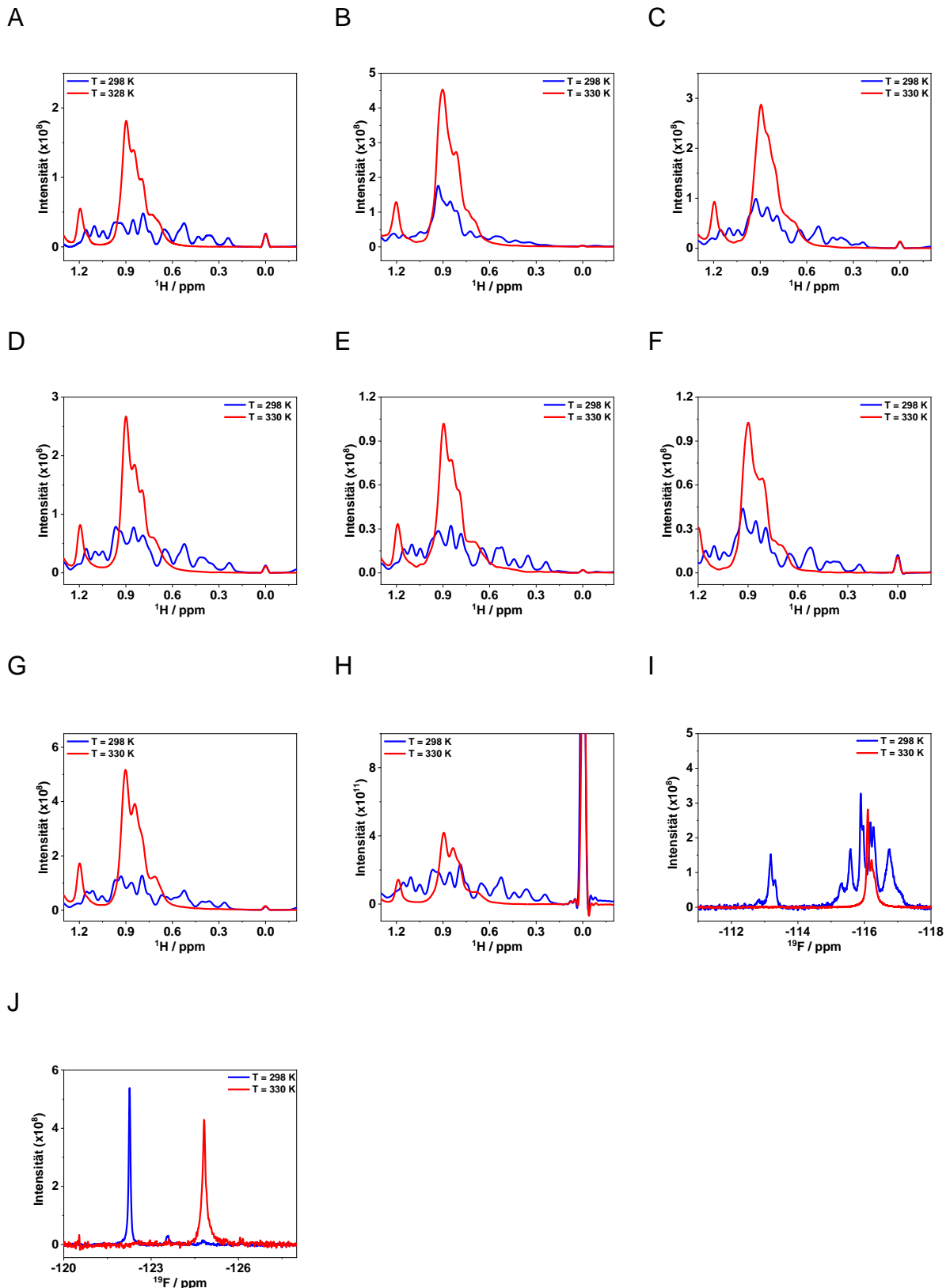
Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass die Einbringung von fluormarkiertem Tryptophan oder Phenylalanin keinen oder nur einen marginalen Einfluss auf die Stabilität,  $\Delta G^0$ , des Cold Shock Protein B hat, wenn diese mittels Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht bestimmt wird. Desweiteren liefert die Anpassung mit zwei verschiedenen Methoden vergleichbare, valide Daten. Die höchste Stabilität zeigt 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB*, wobei diese in  $\Delta G^0$  um 1,6 kJ/mol höher liegt als die wt Variante. Betrachtet man nur die Phenylalanin Varianten zeigt 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* die größte Abweichung, wobei  $\Delta G^0$  um 1,5 kJ/mol kleiner ist als die der wt Variante. Aus diesem Grund wurde entschieden mit diesen beiden Varianten Kristallstrukturen zu bestimmen, um atomar aufgelöste Informationen zu erhalten (Kapitel 5.2.4).

### 5.2.2 Bestimmung der thermischen Stabilität mit $^1\text{H}$ und $^{19}\text{F}$ NMR-Spektroskopie

Im nächsten Schritt wurde eine weitere Methode verwendet, um die Werte der Stabilität mit einer unabhängigen Messung zu bestätigen. Dafür wurde zum einen die Entfaltung thermisch induziert, um etwaige Störungen durch die Zugabe von Urea auszuschließen und mit NMR-Spektroskopie verfolgt, um systematische Fehler bei der Messung mittels Fluoreszenz Spektroskopie auszuschließen. Die temperaturinduzierten Übergänge der wt Variante und aller sieben  $^{19}\text{F}$  Varianten wurden mittels  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie detektiert. Außerdem wurden zusätzlich die Übergänge von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* in der  $^{19}\text{F}$  NMR Dimension dargestellt. Die Rohdaten der wt Variante wurden von Birgit Köhn zur Verfügung gestellt. Neben dem Unterschied, dass hier kein Denaturierungsreagenz verwendet wurde, liegt ein weiterer Unterschied darin, dass bei der Fluoreszenzmessung eine einzelne Aminosäure, Trp8, als Sonde fungierte und bei der Auswertung der  $^1\text{H}$  NMR Spektren das gesamte Protein betrachtet wurde.

Die thermodynamische Stabilität,  $\Delta G^0$ , des Faltungsübergangs wurde bestimmt, indem eindimensionale  $^1\text{H}$  Spektren für alle Varianten inklusive der wt Variante (Abbildung 31 A-H) und eindimensionale  $^{19}\text{F}$  Spektren für 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* in einem Temperaturbereich zwischen  $T = 291\text{ K}$  und  $T = 330\text{ K}$  aufgenommen wurden (Abbildung 31 I, J).

## 5 Ergebnisse und Diskussion

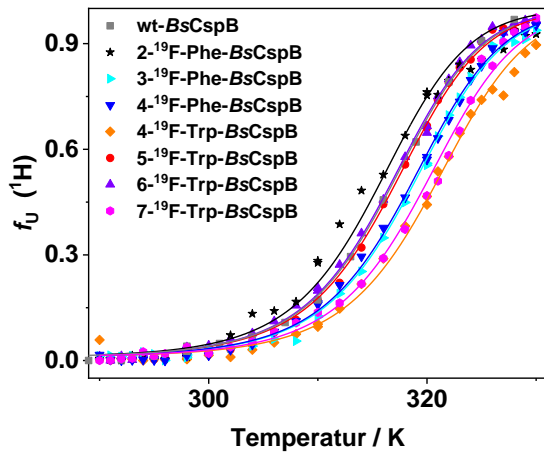


**Abbildung 31:** Eindimensionale  $^1\text{H}$  NMR Spektren der aliphatischen Protonen der wt Variante (A) und der sieben fluormarkierten Varianten, 2- $^{19}\text{F}$ -Phe BsCspB (B), 3- $^{19}\text{F}$ -Phe BsCspB (C), 4- $^{19}\text{F}$ -Phe BsCspB (D), 4- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB (E), 5- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB (F), 6- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB (G) und 7- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB (H) bei  $T = 298\text{ K}$  (blau) und  $T = 330\text{ K}$  (rot). Außerdem eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe BsCspB (I) und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB (J) bei  $T = 298\text{ K}$  (blau) und  $T = 330\text{ K}$  (rot).

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Die Daten, die durch Integration von Bereichen der Spektren, die das gefaltete Protein beziehungsweise gefaltetes und ungefaltetes Protein repräsentieren, erhalten wurden, wurden mit Gleichung (11) angepasst (Abbildung 32 A). Dadurch konnten die Änderung in der Wärmekapazität,  $\Delta C_P$ , die Änderung der Enthalpie,  $\Delta H$  und der Temperaturmittelpunkt,  $T_M$ , des Faltungsübergangs für alle *BsCspB* Varianten bestimmt werden. Dabei wurde die Änderung in der Wärmekapazität,  $\Delta C_P$ , auf  $\Delta C_P = 5,8 \text{ kJ}/(\text{mol K})$  festgehalten. Dieser Wert wurde für *BsCspB* mittels  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie genau bestimmt indem sowohl eine Kälte- als auch Hitzedenaturierung durchgeführt wurde [103]. Des Weiteren wurde die Änderung der Enthalpie,  $\Delta H$ , als globaler Parameter angepasst, um eine bessere Vergleichbarkeit des Temperaturmittelpunkts des Faltungsübergangs,  $T_M$ , als Maß der Stabilität des Proteins zu ermöglichen (Tabelle 10). Daraus erhielt man Werte für die Änderung der Enthalpie von  $\Delta H = 198 \pm 2 \text{ kJ/mol}$  und für  $T_M$  zwischen  $T_M = 315,6 \pm 0,1 \text{ K}$  (2- $^{19}\text{F}$ -Phe-*BsCspB*) und  $T_M = 320,8 \pm 0,1 \text{ K}$  (4- $^{19}\text{F}$ -Trp-*BsCspB*). Der Temperaturmittelpunkt des Faltungsübergangs,  $T_M$ , für die wt Variante wurde auf  $T_M = 316,8 \pm 0,2 \text{ K}$  bestimmt. Daraus lässt sich erkennen, dass auch durch diese Messmethode kein signifikanter Einfluss der Einbringung von fluormarkiertem Tryptophan und Phenylalanin nachweisbar ist. Um die Daten, die aus den  $^1\text{H}$  NMR Spektren erhalten wurden, zu validieren, wurden exemplarisch die  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren der Temperaturübergänge von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* ausgewertet und mit Gleichung (11) angepasst (Abbildung 32 B). Dies resultierte in Werten für die Änderung der Enthalpie von  $\Delta H = 181 \pm 6 \text{ kJ/mol}$  und für den Temperaturmittelpunkt des Faltungsübergangs von  $T_M = 318,4 \pm 0,2 \text{ K}$  für 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und  $T_M = 317,7 \pm 0,3 \text{ K}$  für 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB*, was sehr gut mit den Werten aus der Auswertung der  $^1\text{H}$  Daten übereinstimmt.

A



B

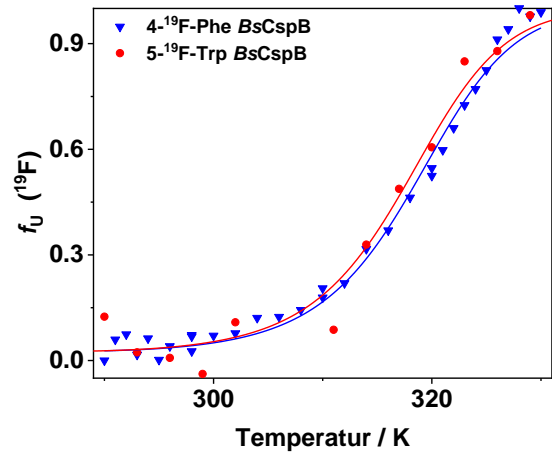


Abbildung 32: Faltungsübergänge detektiert mittels eindimensionaler  $^1\text{H}$  (A) und  $^{19}\text{F}$  (B) NMR-Spektroskopie. Die thermodynamische Denaturierung wurde aufgenommen für wt *BsCspB* (Rechtecke/grau) und allen sieben fluormarkierten Varianten, 2- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (Sterne/schwarz), 3- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (Dreiecke-rechts/blau), 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (Dreiecke-unten/cyan), 4- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (Rauten/orange), 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (Kreise/rot), 6- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (Dreiecke-oben/lila) und 7- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (Fünfecke/pink) aufgenommen. Die durchgezogenen Linien zeigen die Anpassung der Daten mit global fixiertem  $\Delta H$  nach Gleichung (11)

Die thermodynamischen Parameter, die aus der thermischen Denaturierung erhalten wurden (Tabelle 10), stimmen mit den Parametern überein, die aus der chemischen Denaturierung erhalten wurden (Tabelle 8, Tabelle 9). Des Weiteren lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der wt Variante und den fluormarkierten Varianten in der thermodynamischen Stabilität feststellen. Nur 4- $^{19}\text{F}$ -Trp-*BsCspB* zeigt einen kleinen Anstieg in der Stabilität um näherungsweise 4 K, während 2- $^{19}\text{F}$ -Phe-*BsCspB* und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* eine geringe Abnahme in der Stabilität zeigen (Tabelle 10).

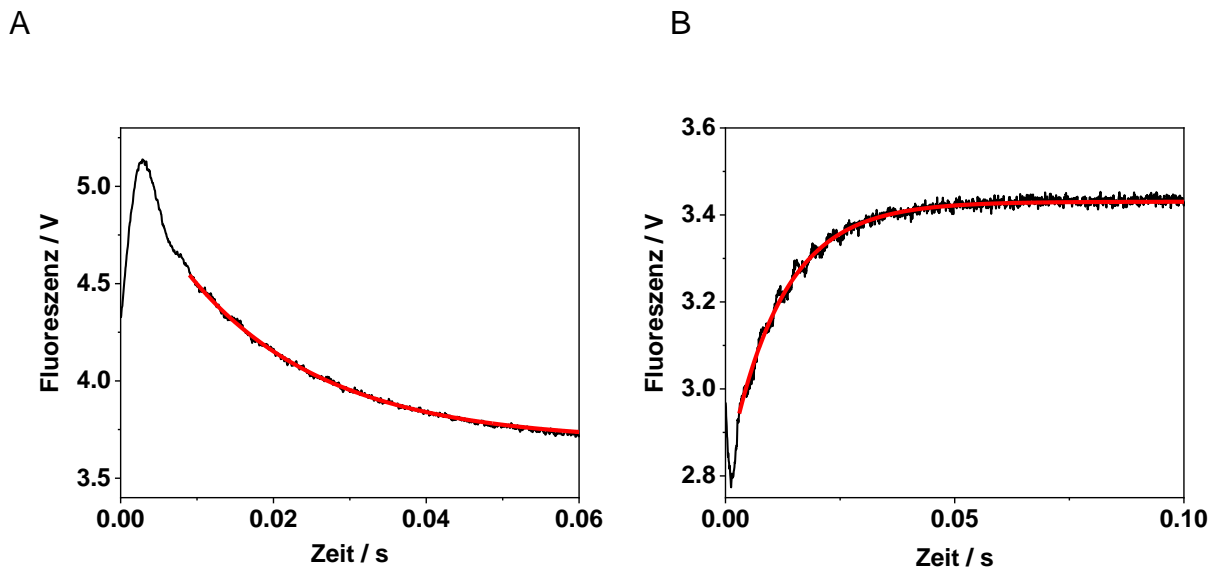
Tabelle 10: Analyse der Faltung im Gleichgewicht der wt Variante und aller fluormarkierten Varianten mittels eindimensionaler  $^1\text{H}$  und  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie, um den Temperaturmittelpunkt des Faltungsübergangs zu bestimmen. Dabei wurde in Gleichung (11) die Änderung in der Enthalpie,  $\Delta H$ , als globaler Parameter für alle Varianten genutzt und zu  $\Delta H = 197 \pm 2$  kJ/mol für die  $^1\text{H}$  NMR Daten und zu  $\Delta H = 181 \pm 6$  kJ/mol für die  $^{19}\text{F}$  NMR Daten bestimmt. Für die Änderung in der Wärmekapazität,  $\Delta C_p$ , wurde der Literaturwert  $\Delta C_p = 5,8$  kJ/(mol K) verwendet [103].

Protein	$T_M / \text{K}$
wt <i>BsCspB</i>	$316,8 \pm 0,2$
2- $^{19}\text{F}$ -Phe <i>BsCspB</i>	$315,6 \pm 0,1$
3- $^{19}\text{F}$ -Phe <i>BsCspB</i>	$318,7 \pm 0,1$
4- $^{19}\text{F}$ -Phe <i>BsCspB</i>	$318,5 \pm 0,1$
4- $^{19}\text{F}$ -Trp <i>BsCspB</i>	$320,8 \pm 0,1$
5- $^{19}\text{F}$ -Trp <i>BsCspB</i>	$317,1 \pm 0,1$
6- $^{19}\text{F}$ -Trp <i>BsCspB</i>	$316,6 \pm 0,1$
7- $^{19}\text{F}$ -Trp <i>BsCspB</i>	$319,9 \pm 0,1$
4- $^{19}\text{F}$ -Phe <i>BsCspB</i> ( $^{19}\text{F}$ )	$318,4 \pm 0,2$
5- $^{19}\text{F}$ -Trp <i>BsCspB</i> ( $^{19}\text{F}$ )	$317,7 \pm 0,3$

### 5.2.3 Untersuchung von Faltungskinetiken mittels Stopped Flow Fluoreszenz Messungen

Neben thermodynamischen Messungen der sieben verschiedenen fluormarkierten *BsCspB* Varianten wurden auch kinetische Experimente mittels Stopped Flow Fluoreszenz durchgeführt und mit der wt Variante verglichen. Die Daten der wt Variante wurde von Birgit Köhn zur Verfügung gestellt. Dieser Aufbau ermöglicht die Nachverfolgung der Änderung der Fluoreszenzintensität auf eine Zeitskala im Millisekunden Bereich [155]. Dafür wurden zwei Lösungen unterschiedlicher Urea Konzentration in eine Messzelle gespritzt und somit Rückfaltung oder Entfaltung

induziert. Aufgrund der exponierten Position des Tryptophans in *BsCspB* im gefalteten Zustand verringert sich die Fluoreszenzintensität bei Entfaltung und steigt bei Rückfaltung an. Mit einer monoexponentiellen Anpassung ( $y(t) = a \cdot \exp(-k \cdot t) + c$ ) der Fluoreszenzintensität wurde sowohl für die Rückfaltung als auch die Entfaltung bei verschiedenen Endkonzentration an Urea die Geschwindigkeitskonstante,  $k_{\text{obs}}$ , bestimmt. Die monoexponentielle Anpassung ist exemplarisch für eine Entfaltung und eine Rückfaltung von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33:** Entfaltungs- (A) und Rückfaltungskinetik (B) von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* induziert durch eine Änderung der Pufferbedingungen. Die Entfaltungskinetik (A) wurde durch ein Urea Konzentrationssprung von  $c = 0,5 \text{ M}$  zu  $c = 6,5 \text{ M}$  induziert, während die Rückfaltungskinetik (B) durch einen Konzentrationssprung von  $c = 7,0 \text{ M}$  zu  $c = 3,0 \text{ M}$  induziert wurde. Angepasst wurde in einem Bereich von  $10 \leq t \leq 40 \text{ ms}$  (A) und  $9 \leq t \leq 60 \text{ ms}$  (B).

Die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten,  $k_{\text{obs}}$ , bei verschiedenen Urea Endkonzentrationen in der Mischzelle zwischen  $c = 2,3 \text{ M}$  und  $c = 7,3 \text{ M}$ , wurden gegen die Urea Konzentration aufgetragen. Die Chevron Plot Analyse mittels Gleichung (8) zeigte, dass alle Varianten zwei Zustände aufweisen und es konnten die Geschwindigkeitskonstanten der Faltung,  $k_f$ , und der Entfaltung,  $k_u$ , in Abwesenheit von Denaturierungsmitteln bestimmt werden (Abbildung 34, Tabelle 11). Des Weiteren kann mittels der Gleichung (8) die Steigung des Entfaltungsasts,  $m_u$ , und die Steigung des Rückfaltungsasts,  $m_f$ , kalkuliert werden. Die Summe aus  $m_u$  und  $m_f$  ergibt die Kooperativität der Faltung,  $m$ , und wurde für alle fluormarkierten Varianten und die wt Variante als globaler Parameter verwendet und zu  $m = -2,8 \pm 0,8 \text{ kJ}/(\text{mol M})$  bestimmt. Dieser Wert stimmt perfekt mit dem mittels Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht, unabhängig bestimmten Wert von  $m = -2,9 \pm 0,1 \text{ kJ}/(\text{mol M})$  überein.

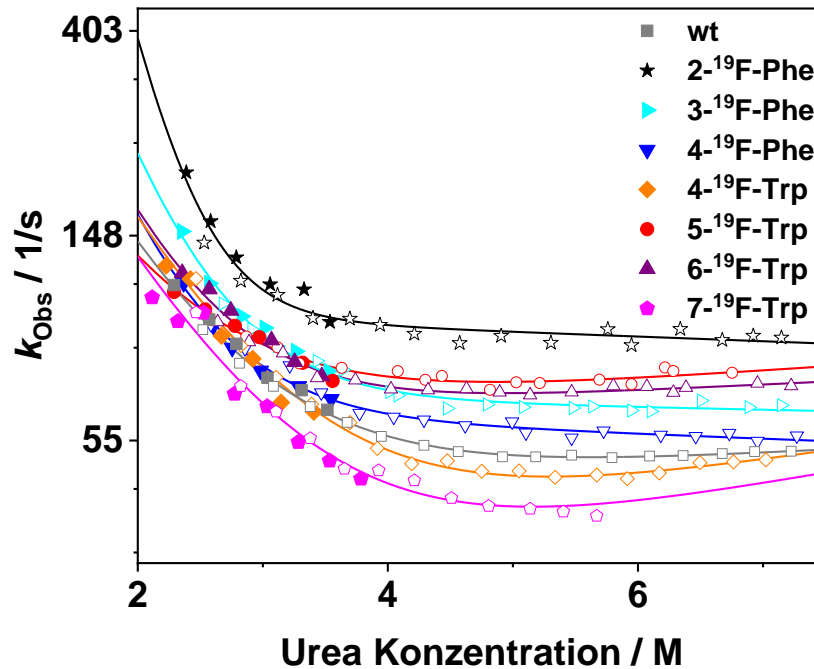


Abbildung 34: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante,  $k_{\text{Obs}}$ , von der Harstoffkonzentration während der Entfaltung (offene Symbole) und Rückfaltung (geschlossene Symbole) für wt BsCspB (Rechtecke/grau) und allen sieben fluormarkierten Varianten, 2-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (Sterne/schwarz), 3-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (Dreiecke-rechts/blau), 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (Dreiecke-unten/cyan), 4-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (Rauten/orange), 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (Kreise/rot), 6-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (Dreiecke-oben/lila) und 7-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (Fünfecke/pink). Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung mittels Gleichung (8) dar, dabei wurde für bessere Vergleichbarkeit mit den Werten aus den Gleichgewichtsmessungen die Kooperativität der Faltung,  $m = m_f + m_u$  global zu  $m = -2,8 \pm 0,8 \text{ kJ}/(\text{mol M})$  bestimmt. Die Ergebnisse dieses Anpassungsverfahrens sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 11: Analyse der Entfaltungs- und Rückfaltungskinetik von wt *BsCspB* und den sieben fluormarkierten Varianten von *BsCspB* mittels Stopped Flow Fluoreszenz. Die Kooperativität der Faltung,  $m = m_f + m_u$  wurde in Gleichung (8) als globaler Parameter verwendet und zu  $m = -2,8 \pm 0,8$  kJ/(mol M) bestimmt. Der Wert von  $\Delta G^0$  wurde mittels Gleichung (9) bestimmt.**

Protein	$k_u / s^{-1}$	$k_f / s^{-1}$	$m_u / \text{kJ}/(\text{mol M})$	$m_f / \text{kJ}/(\text{mol M})$	$\Delta G^0 / \text{kJ}/\text{mol}$
wt <i>BsCspB</i>	$40 \pm 1$	$1050 \pm 20$	0,1	-2,9	$8,1 \pm 0,1$
2- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	$56 \pm 2$	$2000 \pm 100$	0,2	-3,0	$8,9 \pm 0,2$
3- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	$42 \pm 1$	$1600 \pm 40$	0,2	-3,0	$9,0 \pm 0,1$
4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>	$44 \pm 1$	$1050 \pm 30$	0,1	-2,9	$7,9 \pm 0,1$
4- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	$31 \pm 1$	$1450 \pm 30$	0,2	-3,0	$9,5 \pm 0,1$
5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	$57 \pm 1$	$770 \pm 20$	0,1	-2,9	$6,4 \pm 0,1$
6- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	$48 \pm 1$	$1160 \pm 30$	0,2	-3,0	$6,4 \pm 0,1$
7- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	$30 \pm 1$	$1030 \pm 50$	0,1	-2,9	$8,8 \pm 0,1$

Die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für die Entfaltung,  $k_u$ , für alle fluormarkierten Varianten des *BsCspB* liegen in einem Bereich zwischen  $31 \text{ s}^{-1} \leq k_u \leq 57 \text{ s}^{-1}$  und weichen nicht stark von der wt Variante ( $k_u = 40 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ ) ab. Die Rückfaltungsdaten mit einer Urea Endkonzentration von  $c < 2,3 \text{ M}$  konnten nicht ausgewertet werden, da die Faltungskinetik zu schnell war, um auswertbar detektiert zu werden. Nichtsdestotrotz konnten auch die Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung,  $k_f$ , bestimmt werden. Diese sind für alle fluormarkierten Varianten des *BsCspB* außer die 5-<sup>19</sup>F-Trp Variante ähnlich oder minimal höher als die der wt Variante von  $k_f = 1050 \pm 20 \text{ s}^{-1}$ . Mit den Werten für  $k_f$  und  $k_u$  kann mittels Gleichung (9)

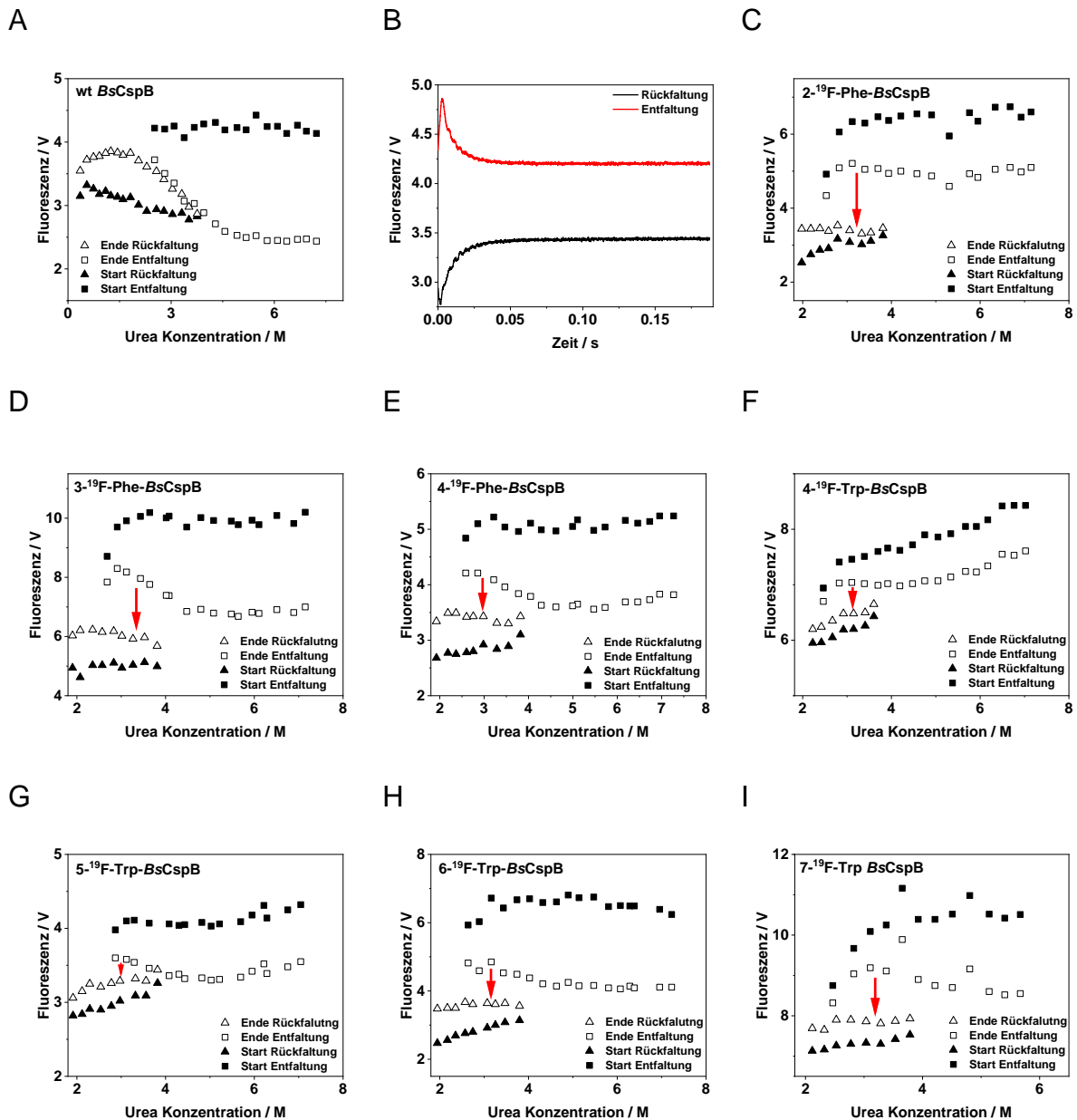
## 5 Ergebnisse und Diskussion

die Änderung der freien Energie zwischen Faltung und Entfaltung,  $\Delta G^0$ , als Maß der Stabilität bestimmt werden. Diese liegen in einem Bereich zwischen  $\Delta G^0 = 6,4 \pm 0,1$  kJ/mol für 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und  $\Delta G^0 = 9,5 \pm 0,1$  kJ/mol für 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und weicht nicht stark von der Änderung der freien Energie der wt Variante ab ( $\Delta G^0 = 8,1 \pm 0,1$  kJ/mol) (Tabelle 11). Auch im Vergleich mit den anderen Experimenten weichen die bestimmten Werte für  $\Delta G^0$  nicht stark voneinander ab und zeigen die gleichen Tendenzen in der Stabilität. Somit weist 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* die kleinste Stabilität auf, während 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* die größte Stabilität zeigt. Schaut man sich die fluormarkierten Phenylalanin Varianten an, zeigt sich, dass 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* die geringste Stabilität hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stabilität aller sieben fluormarkierten Varianten des *BsCspB* konsistent mit drei verschiedenen, unabhängigen Methoden bestimmt wurden und keine signifikant von der wt Variante abweicht.

Darüber hinaus wurden neben  $k_{\text{obs}}$  auch die anderen Parameter der monoexponentiellen Anpassung, die Amplitude,  $a$ , und die Endfluoreszenzintensität,  $c$ , analysiert. Die Summe aus  $a$  und  $c$  entspricht der Startfluoreszenzintensität. Aus der Endfluoreszenzintensität,  $c$ , lässt sich ein Faltungsübergang darstellen, wobei sich die Werte der Rückfaltung mit denen der Entfaltung überlagern, wie hier an der wt Variante gezeigt (Abbildung 35 A). Betrachtet man nun alle fluormarkierten Varianten des *BsCspB* zeigt sich, dass bei gleicher Urea Endkonzentration aus Rückfaltung und Entfaltung nicht die gleichen Fluoreszenzintensitäten resultiert. Dies ist hier am Beispiel von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* bei einer Urea Endkonzentration von  $c = 2,6$  M gezeigt (Abbildung 35 B). Außerdem zeigt sich dieser Unterschied als Lücke im Faltungsübergang dargestellt mittels Endfluoreszenzintensität,  $c$  (Abbildung 35 C-I).

## 5 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 35:** Analyse der Amplituden der zeitabhängigen Änderungen der Fluoreszenzemission nach Entfaltung (Quadrat) und Rückfaltung (Dreieck) von fluormarkierten Varianten von *BsCspB*: wt *BsCspB* (A), 2-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (C), 3-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (D), 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (E), 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (F), 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (G), 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (H) und 7-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (I). Offene Symbole zeigen den endgültigen Fluoreszenzwert und geschlossene Symbole den anfänglichen Fluoreszenzwert. Der rot eingefärbte Pfeil in (C)-(I) zeigt die Lücke in der Fluoreszenzemission an, die beim Vergleich von Rückfaltung mit dem Entfaltungszustand auftritt. (B) Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzemission für die Rückfaltung (schwarz) und Entfaltung (rot) von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* zu einer Endkonzentration Urea von  $c = 2,6$  M.

Ein Grund für diesen Unterschied in der Fluoreszenzintensität nach Entfaltung und Rückfaltung könnte sein, dass zwei Faltungsvorgänge bei der Rückfaltung ablaufen, wobei einer langsam im Minutenbereich verläuft. Dies wurde durch eine Fluoreszenzmessung im Gleichgewicht widerlegt. Hierfür wurden Spektren von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* direkt nach Entfaltung beziehungsweise Rückfaltung und nach 30

Minuten aufgenommen (Abbildung 36 A). Diese Messung zeigt außerdem, dass der Fehler nicht durch das Stopped Flow Gerät zur Stande kommt, da auch bei dieser Messung die Lücke in der Fluoreszenzintensität nach Rückfaltung und Entfaltung zu Tage tritt. Ein weiterer Grund für den Unterschied der Fluoreszenzintensität könnte darin liegen, dass die Proteine sich nicht vollständig reversibel rückfalten. Um diese Möglichkeit zu widerlegen, wurden eindimensionale  $^1\text{H}$  NMR Spektren nach Rückfaltung und Entfaltung bei einer Urea Konzentration von  $c = 3,0\text{ M}$  und  $c = 2,8\text{ M}$  generiert (Abbildung 36 B). Bestimmt man nun den Anteil an gefaltetem Protein,  $f_N$ , wie unter 4.7.3 beschrieben, erhält man für das Verhältnis  $f_N = I_N / (I_N + I_{N+U})$  einen Wert für  $f_N = 0,191$  nach Entfaltung und  $f_N = 0,189$  nach Rückfaltung. Diese nahezu identischen Werte zeigen, dass nach Rückfaltung genauso viel gefaltetes Protein vorhanden ist, wie nach der Entfaltung bei identischen Urea Konzentrationen. Somit kann man ausschließen, dass das Protein nicht vollständig reversibel rückfaltet.

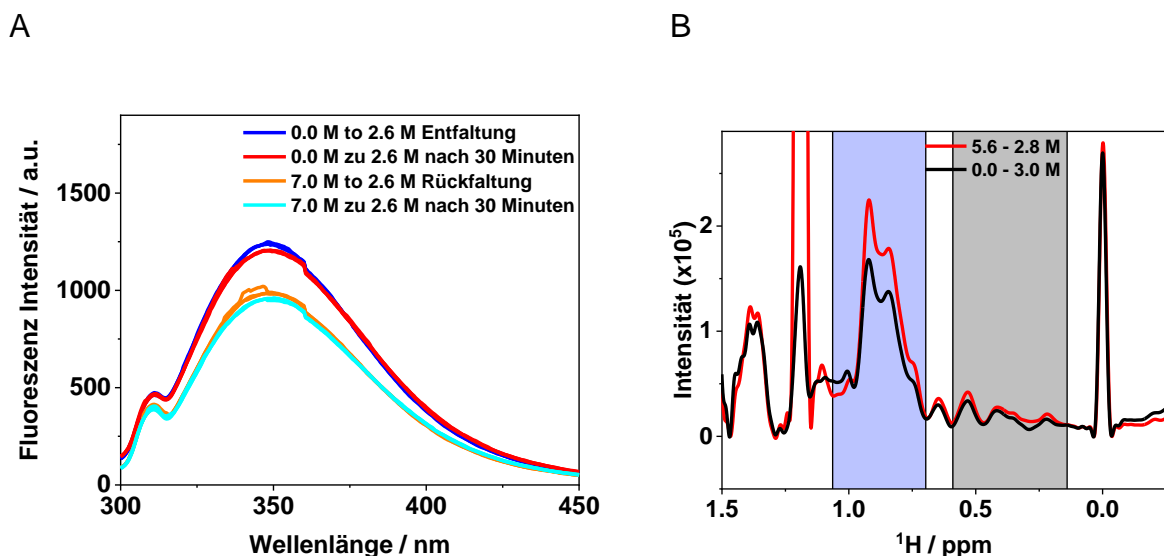
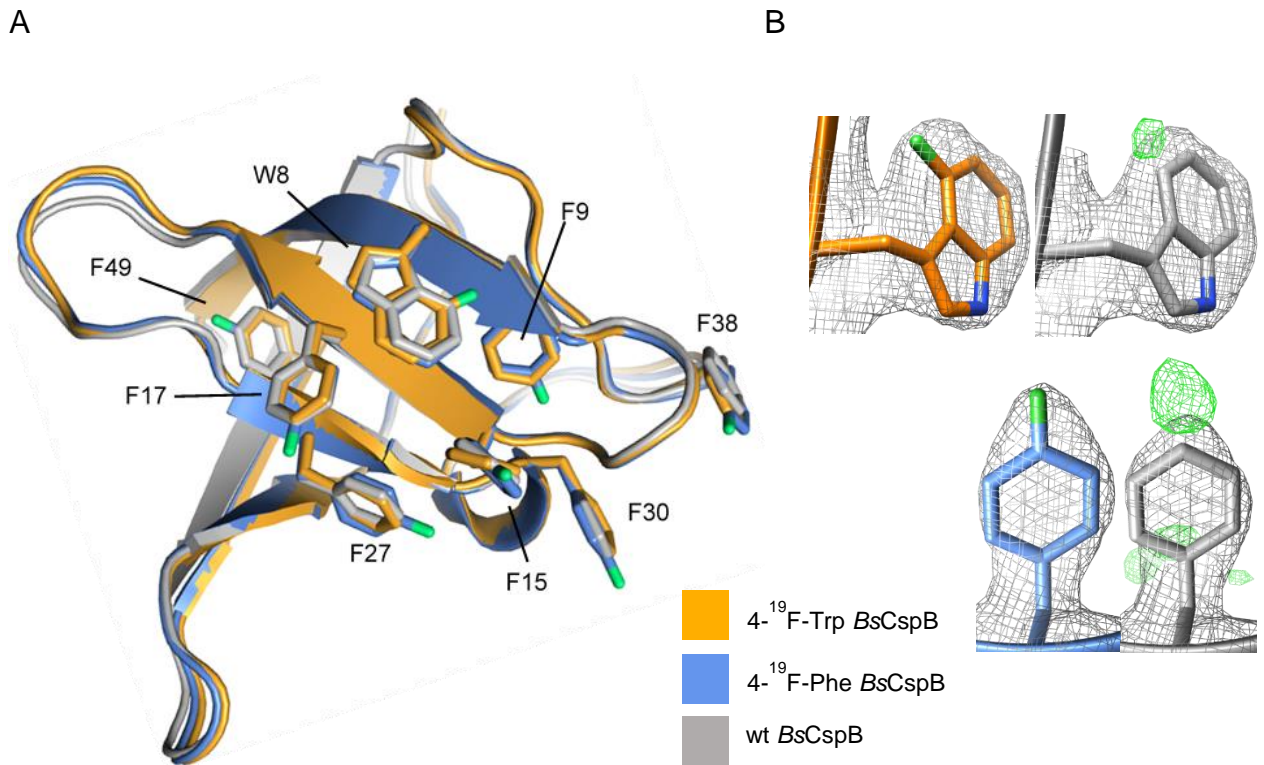


Abbildung 36: Analyse der Proteinrückfaltung und -entfaltung mittels Fluoreszenz- (A) und NMR-Spektroskopie (B). Dafür wurden Fluoreszenzspektren für  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* ( $c = 1\ \mu\text{M}$ ) direkt (blau) bzw. 30 Minuten nach Einleitung der Proteinentfaltung (rot) aufgenommen. Dabei wurde die Entfaltung induziert, indem ein Sprung in der Urea Konzentration von  $c = 0,0\text{ M}$  zu  $c = 2,6\text{ M}$  durch Zugabe einer hochkonzentrierten Urea Lösung erzeugt wurde. Außerdem wurden für die Proteinrückfaltung von  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* ( $c = 1\ \mu\text{M}$ ) Fluoreszenzspektren direkt (orange) und nach 30 Minuten (cyan) aufgenommen. Dabei wurde die Rückfaltung ausgelöst, indem ein Sprung in der Urea Konzentration von  $c = 7,0\text{ M}$  zu  $c = 2,6\text{ M}$  durch Zugabe einer  $0\text{ M}$  Urea Lösung erzeugt wurde. Die Anregungswellenlänge betrug  $\lambda = 280\text{ nm}$ . Es wurden eindimensionale  $^1\text{H}$  NMR Spektren für  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* ( $c = 20\ \mu\text{M}$ ) nach Entfaltung (schwarz) und Rückfaltung (rot) aufgenommen. Die Entfaltung erfolgte durch einen Sprung in der Urea Konzentration von  $c = 0,0\text{ M}$  zu  $c = 3,0\text{ M}$ , während die Rückfaltung durch einen Sprung in der Urea Konzentration von  $c = 5,6\text{ M}$  zu  $c = 2,8\text{ M}$  ausgelöst wurde. Für die Analyse des Anteils des nativen Zustands wurden zwei Bereiche der chemischen Verschiebungen des eindimensionalen  $^1\text{H}$  NMR Spektrums von  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* zur Integration verwendet. Der grau gefärbte Bereich zeigt Resonanzsignale an, die ausschließlich durch den nativen Zustand zustande kommen, während der hellblaue Bereich Resonanzsignale zeigt, die sowohl aus dem nativen Zustand als auch aus dem ungefalteten Proteinensemble stammen.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Einführung von fluormarkiertem Tryptophan oder Phenylalanin in *BsCspB* die Fluoreszenzeigenschaften verändert. Ein eindeutiger Grund konnte noch nicht gefunden werden, aber eine Möglichkeit könnte sein, dass bei der Rückfaltung das Tryptophan oder die Phenylalanine eine andere Konformation einnehmen und dies die Fluoreszenzintensität beeinflusst.

### 5.2.4 Kristallstrukturanalyse von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* und 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB*

Untersuchen der Stabilität mittels Fluoreszenz und NMR-Spektroskopie haben gezeigt, dass die Stabilität von 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* minimal größer und die Stabilität von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* minimal geringer ist als die der wt Variante. Um mögliche strukturellen Unterschiede von 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* im Vergleich zu der wt Variante zu erkennen, wurde eine Kristallstrukturanalyse der beiden Varianten durchgeführt und mit der bekannten Struktur von wt *BsCspB* verglichen (PDB ID: 1CSP) (Abbildung 37). Für die beiden Varianten wurden Auflösungen von 2,05 Å und 2,10 Å erhalten. Die quadratische mittlere Abweichung der C<sub>α</sub> Atome (RMSD<sub>C<sub>α</sub></sub>) beträgt für 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* RMSD<sub>C<sub>α</sub></sub> = 0,52 Å und für 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* RMSD<sub>C<sub>α</sub></sub> = 0,37 Å, was eine perfekte Übereinstimmung der Strukturen bedeutet (Abbildung 37). Auch die Übereinanderlagerung der modifizierten Aminosäuren zeigen eine perfekte Übereinstimmung, wobei der RMSD Wert alle Atome des Tryptophan 8 RMSD = 0,48 Å beträgt. Für alle Atome der Phenylalanine beträgt der RMSD Wert für Phe9 RMSD = 0,35 Å, Phe15 RMSD = 0,30 Å, Phe17 RMSD = 0,15 Å, Phe27 RMSD = 0,43 Å, Phe30 RMSD = 0,20 Å, Phe38 RMSD = 0,65 Å und für Phe49 RMSD = 0,30 Å (Abbildung 37). Diese perfekte Übereinstimmung der Strukturen von 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* mit der Struktur der wt Variante zeigt, dass die Einbringung von Fluoratomen in die aromatischen Aminosäuren des *BsCspB* keinen signifikanten Einfluss auf die Struktur hat. Die Kristallstrukturen von 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* sind unter den PDB IDs 6SZZ und 6T00 zu finden. Die Strukturdaten sind in Anhang 17 gezeigt.



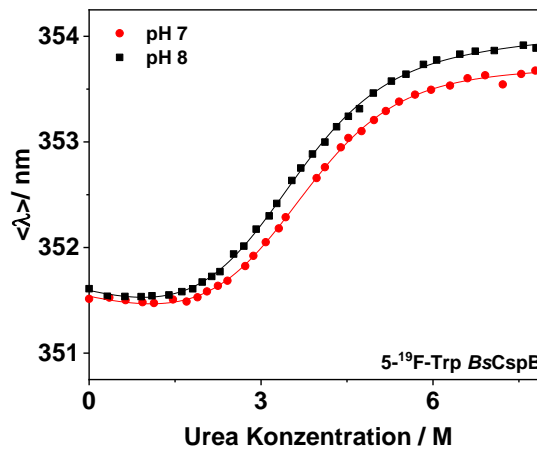
**Abbildung 37:** Übereinanderlagerung dreidimensionaler Kristallstrukturen von wt *BsCspB* (grau, PDB ID: 1NMG), 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (orange) und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (blau) (A). Die Seitenketten der <sup>19</sup>F-markierten Aminosäuren in dieser Studie sind dargestellt und entsprechend ihrer Sequenznummerierung beschriftet (B). Außerdem sind die Elektronendichtekarten der Reste <sup>19</sup>F-Trp8 und <sup>19</sup>F-Phe49 dargestellt (B). ( $2mF_{obs} - DF_{calc}$ ) $_{\alpha_{calc}}$ -Karten, die bei  $1\sigma$  konturiert sind, sind grau eingefärbt. ( $mF_{obs} - DF_{calc}$ )-Karten, die unter Verwendung von Phasen aus verfeinerten Modellen, bei denen die <sup>19</sup>F-markierten Aminosäuren ausgelassen wurden, berechnet wurden, sind in grüner Farbe dargestellt und bei  $3\sigma$  konturiert. Die Strukturen wurden unter Verwendung von Chimera59, Version 1.14 ([www.cgl.ucsf.edu/chimera](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera)) erstellt.

### 5.2.5 Einfluss des pH Werts auf Stabilität

Des Weiteren wurde der Einfluss des pH Werts auf die Stabilität der fluormarkierten *BsCspB* Varianten am Beispiel von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* untersucht. Dafür wurde eine Fluoreszenz Titrationsreihe von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* im Gleichgewicht bei pH 8 aufgenommen und mit der Messung bei pH 7 verglichen.

Für den Vergleich der Stabilität der Proben bei unterschiedlichen pH Werten im Gleichgewicht wurde wie unter 4.4.1 und 5.2.1 beschrieben, Fluoreszenzspekten bei Urea Konzentrationen zwischen  $c = 0$  M und  $c = 8$  M aufgenommen. Die Urea Konzentration wurde exakt bestimmt indem der Brechungsindex gemessen und die Konzentration mit Gleichung (3) kalkuliert wurde. Die Analyse erfolgte indem die gemittelte Emissionswellenlänge  $\langle \lambda \rangle$  nach Gleichung (2) bestimmt wurde und die Daten mit Gleichung (4) angepasst wurden (Abbildung 38). Um die Daten bei pH 8 mit

den schon bestimmten Daten bei pH 7 besser vergleichen zu können, wurde die Kooperativität der Entfaltung,  $m$ , auf den unter 5.2.1 bestimmten Wert von  $m = -2,9 \pm 0,1 \text{ kJ}/(\text{mol M})$  festgesetzt.



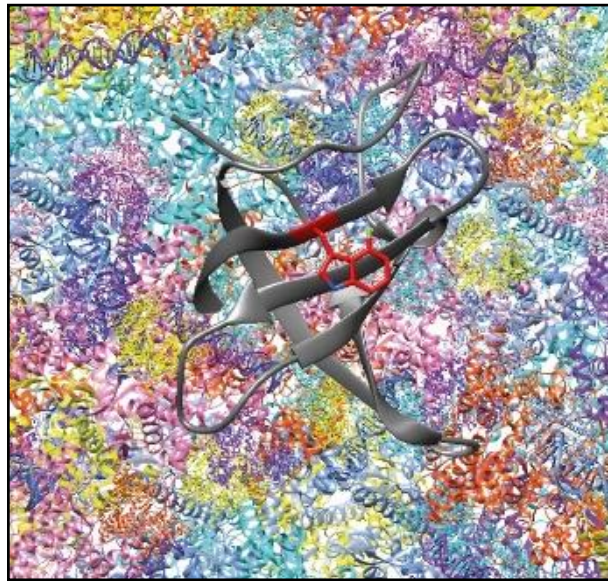
**Abbildung 38:** Darstellung der gemittelten Emissionswellenlänge,  $\langle \lambda \rangle$ , in Abhängigkeit von der Urea Konzentration von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB bei pH 7 (Kreise/rot) und pH 8 (Rechtecke/schwarz). Die durchgezogenen Linien zeigen die beste Anpassung der Daten (Gleichung (4)) bei Verwendung eines globalen Wertes für die Kooperativität,  $m$ .

Mittels der Anpassung nach Gleichung (4) konnte die freie Energie der Entfaltung,  $\Delta G^0$ , zu  $\Delta G^0 = 10,0 \pm 0,1 \text{ kJ/mol}$  bei pH 7 und zu  $\Delta G^0 = 9,3 \pm 0,1 \text{ kJ/mol}$  für pH 8 bestimmt werden. Dies zeigt deutlich, dass bei höherem pH Wert die Stabilität des Proteins abnimmt. Auch aus den Entfaltungskurven kann man erkennen, dass der Wendepunkt der Kurve, der Übergangsmittelpunkt,  $c_M$ , für pH 7 bei gleicher Steigung bei höheren Urea Konzentrationen liegt, was ein Indiz für eine höhere Stabilität ist. Bestimmt man den Übergangsmittelpunkt,  $c_M$ , mit  $c_M = \Delta G^0/m$  erhält man bei pH 7 einen Wert von  $c_M = 3,4 \text{ M}$  und bei pH 8 von  $c_M = 3,2 \text{ M}$ . Konsistent zu den anderen Beobachtungen zeigt dies ebenfalls, dass mit Erhöhung des pH Werts die Stabilität leicht abnimmt. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen aus der Literatur überein, die ebenfalls zeigen, dass BsCspB bei pH 7 stabiler ist als bei pH 8 [156].

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass das Einbringen von Fluoratomen an die aromatischen Aminosäuren des BsCspB keinen signifikanten Einfluss auf die Struktur, die Stabilität und die Kinetik der Proteine zeigt. Aus diesem Grund ist dieses System ideal, um den Einfluss komplexer Umgebung auf das Protein mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie zu untersuchen.

### 5.3 Untersuchungen in zellähnlicher Umgebung

In diesem Kapitel wird der Einfluss von Zelllysate und der daraus resultierenden verdichteten Umgebung auf die Stabilität und Funktion des *BsCspB* untersucht (Abbildung 39). Dafür wurde zunächst mittels eindimensionaler  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie die Stabilität von *BsCspB* bei verschiedenen Konzentrationen Zelllysate bestimmt. Anschließend wurden die Bindungsaffinitäten von Oligothymidinen zu *BsCspB* in unterschiedlichen Zelllysate Konzentrationen untersucht.



**Abbildung 39:** Cartoon Darstellung von 4- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (PDB ID: 6SZZ) in hoch komplexer Umgebung mit verschiedenen Makromolekülen, die das Zelllysate widerspiegeln soll. Das 4- $^{19}\text{F}$ -Trp ist in rot gezeigt, mit Ausnahme des Fluoratoms in Position 4 des Tryptophan Rings, welches in grün dargestellt ist.

#### 5.3.1 Bestimmung der Stabilität von fluormarkiertem *BsCspB* in Zelllysate mittels eindimensionaler $^{19}\text{F}$ NMR Spektroskopie

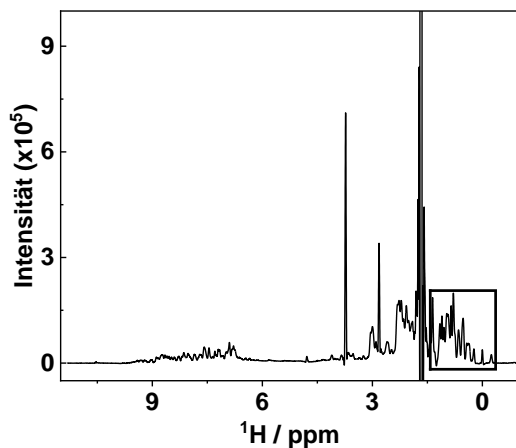
In diesem Kapitel wurde die Stabilität von *BsCspB* in zellähnlicher Umgebung am Beispiel von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* untersucht. Dafür wurden beide Varianten in unterschiedlichen Konzentrationen an *E. coli* Zelllysate sowie unter Pufferbedingungen chemisch denaturiert und mittels eindimensionaler  $^{19}\text{F}$  NMR ihre Stabilität bestimmt. Zusätzlich wurden unter Pufferbedingungen auch anhand der Protonen Spektren Stabilitäten errechnet. Die chemische Denaturierung erfolgte mit Urea, wobei verschiedene Konzentrationen an Urea wie unter 4.7.4 beschrieben generiert wurden. Bei allen erzeugten Urea Konzentrationen wurden sowohl

eindimensionale  $^1\text{H}$  als auch  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren aufgenommen. Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden 2020 in *ChemBioChem* veröffentlicht [157].

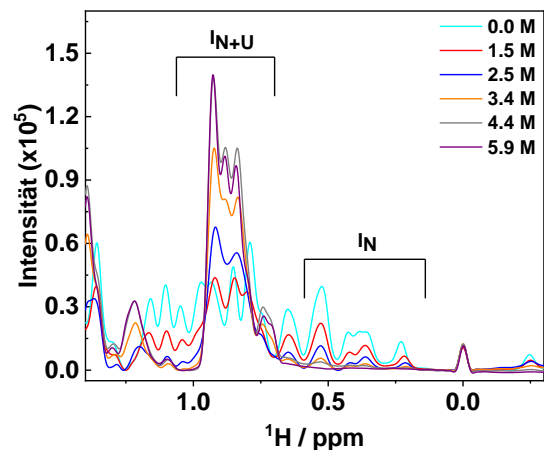
Zunächst wurden sowohl die  $^1\text{H}$  als auch die  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlichen Urea Konzentrationen in verdünnter Lösung wie unter 4.7.4 beschrieben ausgewertet und verglichen. Ein wichtiger Unterschied in der Auswertung der  $^1\text{H}$  und  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren ist nämlich, dass man mittels  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie einen globalen Einblick in das Protein erhält, da durch die Protonen alle Aminosäuren dargestellt werden. Betrachtet man nun die Fluoratome mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie erhält man je nach Markierungsgrad nur einen lokalen Einblick in das Protein. Bei den Varianten, die eine Fluormarkierung am Tryptophan aufweisen, kommt nur ein Fluoratom im Protein vor, da nur ein Tryptophan in *BsCspB* vorkommt. Bei den Phenylalanin Varianten kommen sieben Fluoratome im Protein vor, da in *BsCspB* sieben Phenylalanine vorkommen. Aus diesem Grund ist es wichtig sicherzustellen, dass keine signifikanten Unterschiede der Stabilität durch die unterschiedlichen Auswertungsmethoden zustande kommen.

Für die Auswertung wurde ein Bereich in den Spektren integriert, der nur Signale des gefalteten Zustandes,  $I_N$ ; enthält und ein Bereich,  $I_{N+U}$ , der Signale enthält, die durch den gefalteten sowie den ungefalteten Zustand zustande kommen ( $^1\text{H}$  Spektren,  $^{19}\text{F}$  Spektren der Phe Varianten) (Abbildung 40 A-E) beziehungsweise ein Bereich der nur Signale des ungefalteten Zustandes,  $I_U$ , enthalten ( $^{19}\text{F}$  Spektren der Trp Varianten) (Abbildung 40 F).

A



B



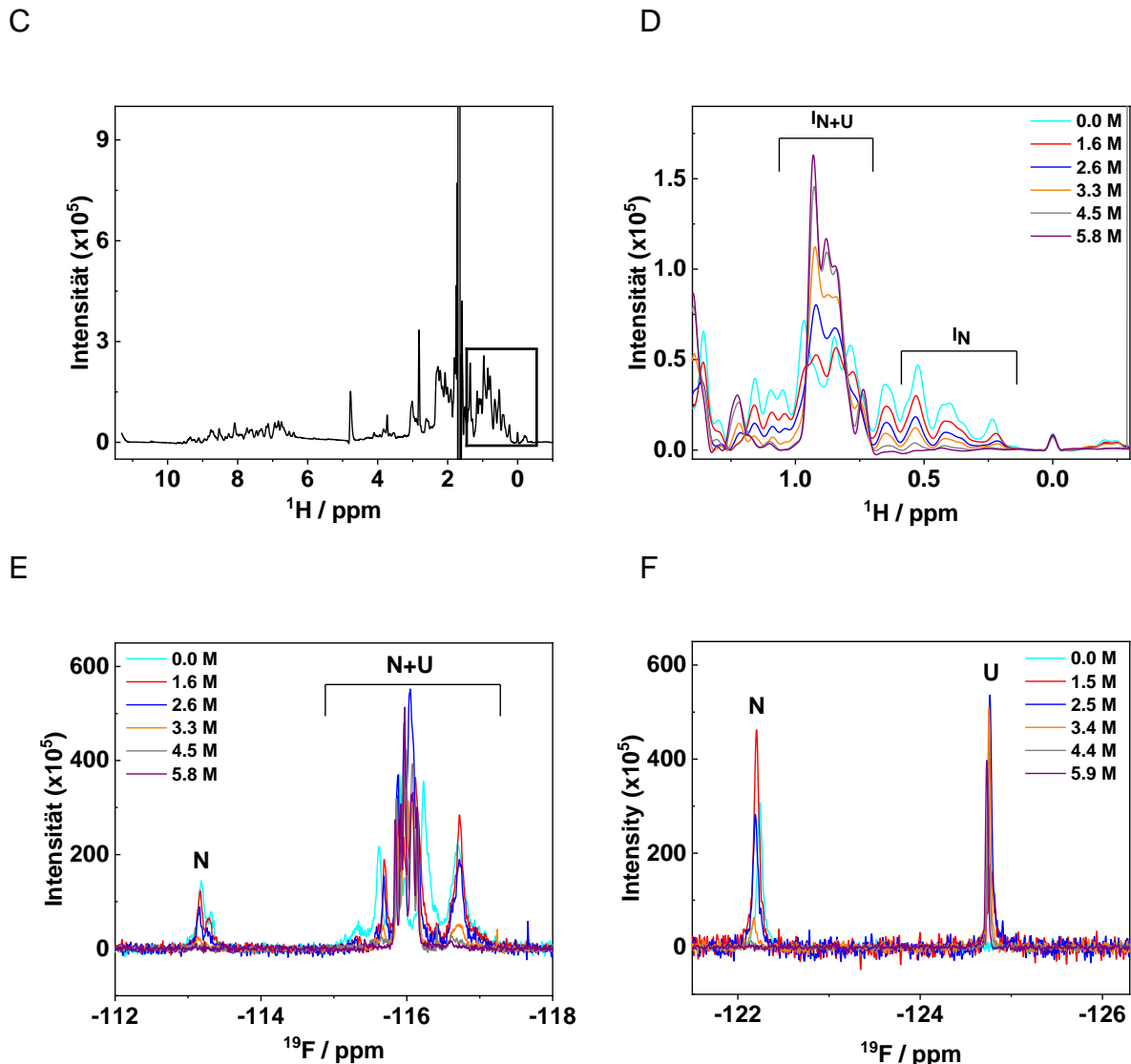
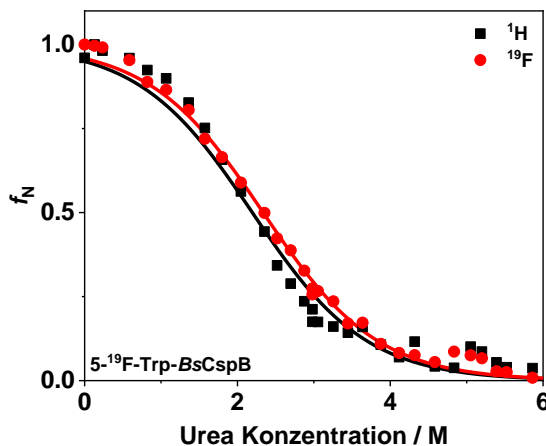


Abbildung 40: Eindimensionales  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB*, welches bei einer Urea-Konzentration von  $c = 0\text{ M}$  bei  $T = 298\text{ K}$  und  $B_0 = 18,8\text{ T}$  in verdünnter Lösung aufgenommen wurde (A). Der Spektrale Bereich der in (B) gezeigt ist, ist in (A) mit einer Box eingerahmt. Die verschiedenen Spektrale Bereiche,  $I_N$  und  $I_{N+U}$ , die für die Bestimmung des Anteils an nativem Protein,  $f_N$ , verwendet wurden, sind gezeigt (B, D). Sowohl die chemische Verschiebung als auch die Intensität der Resonanzsignale der aliphatischen Protonen von  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* sind abhängig von der Urea-Konzentration:  $c = 0\text{ M}$  (cyan),  $c = 1,5\text{ M}$  (rot),  $c = 2,5\text{ M}$  (blau),  $c = 3,4\text{ M}$  (orange),  $c = 4,4\text{ M}$  (grau) und  $c = 5,9\text{ M}$  (lila) (B). Eindimensionales  $^1\text{H}$  NMR Spektrum von  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB*, welches bei einer Urea-Konzentration von  $c = 0\text{ M}$  bei  $T = 298\text{ K}$  und  $B_0 = 18,8\text{ T}$  in verdünnter Lösung aufgenommen wurde (C). Der Spektrale Bereich der in (D) gezeigt ist, ist in (C) mit einer Box eingerahmt. Sowohl die chemische Verschiebung als auch die Intensität der Resonanzsignale der aliphatischen Protonen von  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* sind abhängig von der Urea-Konzentration:  $c = 0\text{ M}$  (cyan),  $c = 1,6\text{ M}$  (rot),  $c = 2,6\text{ M}$  (blau),  $c = 3,3\text{ M}$  (orange),  $c = 4,5\text{ M}$  (grau) und  $c = 5,8\text{ M}$  (lila) (D). Eindimensionales  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum von  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* aufgenommen bei verschiedenen Urea-Konzentrationen ( $c = 0\text{ M}$  (cyan),  $c = 1,6\text{ M}$  (rot),  $c = 2,6\text{ M}$  (blau),  $c = 3,3\text{ M}$  (orange),  $c = 4,5\text{ M}$  (grau) und  $c = 5,8\text{ M}$  (lila)) in verdünnter Lösung bei  $T = 298\text{ K}$  und  $B_0 = 18,8\text{ T}$ . „N“ markiert Resonanzsignale der fluor-markierten Phenylalanine des nativen Zustandes, welche separiert liegen, während „N+U“ einen Bereich markieren, der alle Resonanzsignale des ungefalteten Zustandes und Teile des nativen Zustandes enthält (E). Eindimensionales  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum von  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* aufgenommen bei verschiedenen Urea-Konzentrationen ( $c = 0\text{ M}$  (cyan),  $c = 1,5\text{ M}$  (rot),  $c = 2,5\text{ M}$  (blau),  $c = 3,4\text{ M}$  (orange),  $c = 4,4\text{ M}$  (grau) und  $c = 5,9\text{ M}$  (lila)) in verdünnter Lösung bei  $T = 298\text{ K}$  und  $B_0 = 18,8\text{ T}$ . „N“ markiert das Resonanzsignal des Trp8 des nativen Zustandes während „U“ das des ungefalteten Zustandes markiert (F).

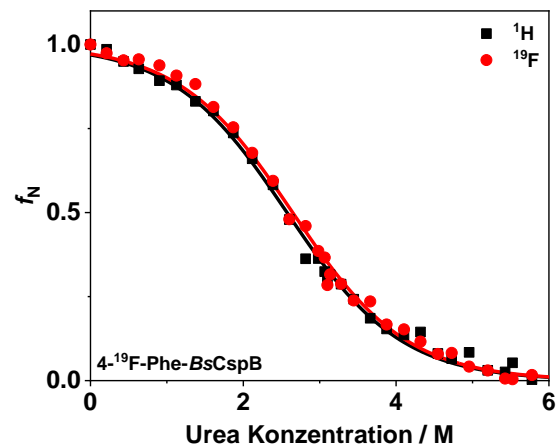
## 5 Ergebnisse und Diskussion

Aus dem Verhältnis der beiden Integrale lässt sich über  $f_N = I_N/(I_N+I_{N+U})$  den Anteil an gefaltetem Protein,  $f_N$ , bestimmen und man erhält eine Denaturierungskurve in Abhängigkeit der Urea Konzentration (Abbildung 41). Durch Anpassung der Kurven mit Gleichung (12) lässt sich die freie Energie,  $\Delta G^0$ , zwischen nativen und ungefaltetem Protein und die Kooperativität der Entfaltung,  $m$ , bestimmen. Für alle, in diesem Kapitel gezeigten Übergänge von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* sowohl in verdünnter Lösung als auch im Zelllysate wurde die Kooperativität,  $m$ , global für eine bessere Vergleichbarkeit von  $\Delta G^0$  also Maß der Stabilität zu  $m = -3,3 \pm 0,1 \text{ kJ}/(\text{mol M})$  angepasst. In verdünnter Lösung wurde die freie Energie,  $\Delta G^0$ , zwischen nativen und ungefaltetem Protein für 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* zu  $\Delta G^0 = 8,5 \pm 0,2 \text{ kJ/mol}$  und  $\Delta G^0 = 7,2 \pm 0,2 \text{ kJ/mol}$  mittels  $^{19}\text{F}$  und zu  $\Delta G^0 = 8,7 \pm 0,2 \text{ kJ/mol}$  und  $\Delta G^0 = 7,7 \pm 0,2 \text{ kJ/mol}$  mittels  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie bestimmt (Abbildung 41). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Auswertungen der  $^1\text{H}$  und  $^{19}\text{F}$  Resonanzsignale vergleichbar sind. Außerdem lässt sich eine hohe Vergleichbarkeit der hier bestimmten Stabilität mit den Ergebnissen aus 5.2 erkennen [152].

A



B

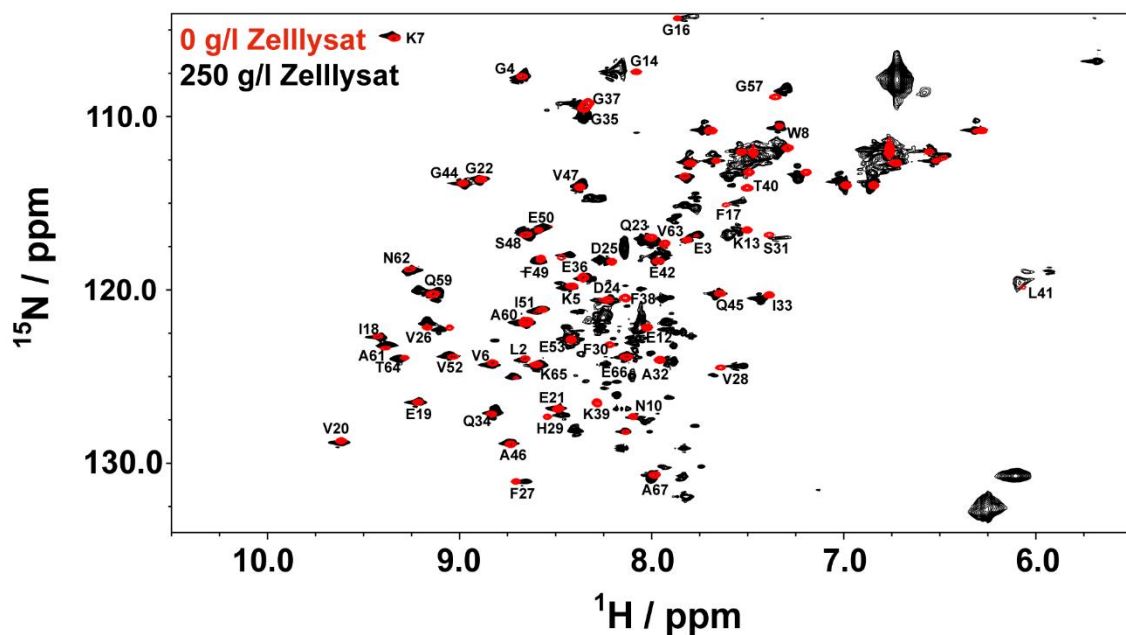


**Abbildung 41:** Faltungsübergang von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (A) und 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (B) induziert mittels Erhöhung der Urea Konzentration und aufgenommen bei  $T = 298 \text{ K}$ . Die Faltungsübergänge wurden mit Protonen (Rechtecke, schwarz) und  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie (Kreise, rot) detektiert. Durch die Anpassung mit Gleichung (12) (durchgezogene Line) konnte die freie Energie,  $\Delta G^0$ , für 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* zu  $\Delta G^0 = 7,2 \pm 0,2 \text{ kJ/mol}$  ( $^1\text{H}$  Datenset) und  $\Delta G^0 = 7,7 \pm 0,2 \text{ kJ/mol}$  ( $^{19}\text{F}$  Datenset) bestimmt werden. Für 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* wurden Werte für  $\Delta G^0$  von  $\Delta G^0 = 8,5 \pm 0,2 \text{ kJ/mol}$  ( $^1\text{H}$  Datenset) und  $\Delta G^0 = 8,7 \pm 0,2 \text{ kJ/mol}$  ( $^{19}\text{F}$  Datenset) erhalten. Die Kooperativität der Faltung,  $m$ , wurde als globaler Parameter genutzt und zu  $m = -3,3 \pm 0,1 \text{ kJ}/(\text{mol M})$  bestimmt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Als nächster Schritt wurden Messungen in verschiedenen Konzentrationen an Zelllysate durchgeführt, um die Stabilität der Proteine in zellähnlicher Umgebung zu bestimmen. Bevor Messungen zur Stabilität wie oben beschrieben durchgeführt wurden, wurden zunächst zweidimensionale  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC Spektren sowohl unter *in vitro* Bedingungen als auch in Zelllysate durchgeführt (Abbildung 42 A). Die Überlagerung der Spektren zeigt, dass die Kreuzsignale der  $^{15}\text{N}$  Atome mit den Amidprotonen unter beiden Bedingungen nahezu für alle Aminosäuren konserviert sind (Abbildung 42 A). Des Weiteren sind auch die relativen Intensitäten der Kreuzsignale in verdünnter Lösung und in Zelllysate vergleichbar (Abbildung 42 B). Zusätzliche Kreuzsignale der Zelllysateprobe können anderen, üblichen Bestandteilen des Cytosols zugeordnet werden [158]. Durch diese Beobachtungen kann man schlussfolgern, dass sich die Struktur von *BsCspB* in Zelllysate nicht von der unter *in vitro* Bedingungen unterscheidet. Aus diesem Grund ist es möglich die thermodynamische Stabilität der Proteine bei unterschiedlichen Zelllysate Konzentrationen mit der in verdünnter Lösung zu vergleichen.

A



B

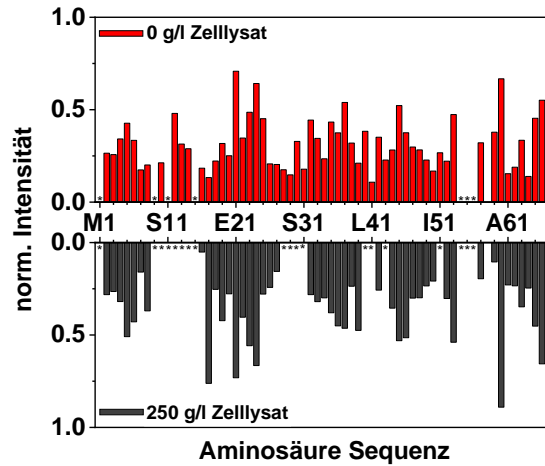
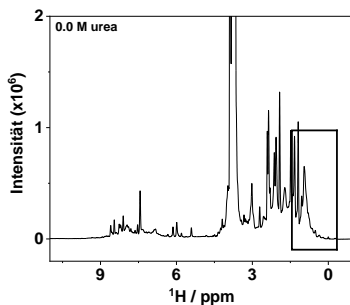


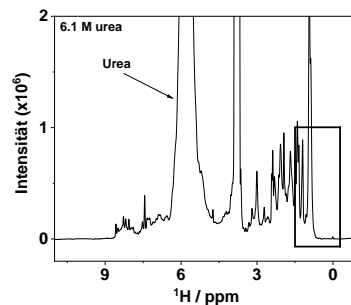
Abbildung 42: Zweidimensionale  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC NMR Spektren von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* in verdünnter Lösung (rot) und in Zelllysats-Lösung (schwarz) mit einer Konzentration von 250 g Zellpellet pro l Puffer (A). Die Zuordnung der Resonanzsignale von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* ist hier im Einbuchstaben Code der Aminosäuren in der Reihenfolge der Primärsequenz dargestellt. Zusätzliche Kreuzsignale der Zelllysatsprobe können anderen, üblichen Bestandteilen des Cytosols zugeordnet werden [158]. Des Weiteren wurden die Intensitäten der Kreuzsignale der  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC NMR Spektren analysiert (B). Die Signalintensitäten der Probe in verdünnter Lösung sind im oberen Teil der Abbildung (rot) dargestellt, während die Signalintensitäten der Zelllysatsprobe im unteren Teil (schwarz) gezeigt werden. Die Intensitäten wurden auf die höchste Signalintensität (A67) normiert. Die 2D  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  NMR Spektren wurden bei  $T = 298\text{ K}$  und  $B_0 = 18,8\text{ T}$  (Zelllysats) und  $B_0 = 14,1\text{ T}$  (dilute) aufgenommen. Die Sterne auf der x-Achse symbolisieren die Aminosäuren, die nicht zugeordnet werden konnten.

Da eindimensionale  $^1\text{H}$  Spektren der Zelllysats-Lösungen wegen der Hintergrundsignale und der Verbreiterung der Resonanzsignale nicht ausgewertet werden konnten (Abbildung 43), wurden, um die Stabilitäten zu bestimmen, eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlichen Urea-Konzentrationen wie weiter oben beschrieben aufgenommen und ausgewertet (Abbildung 44).

A



B



C

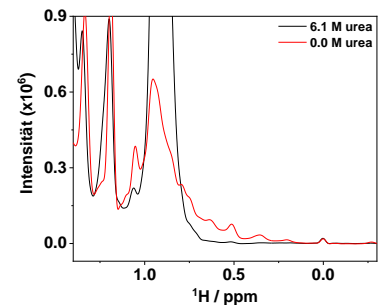
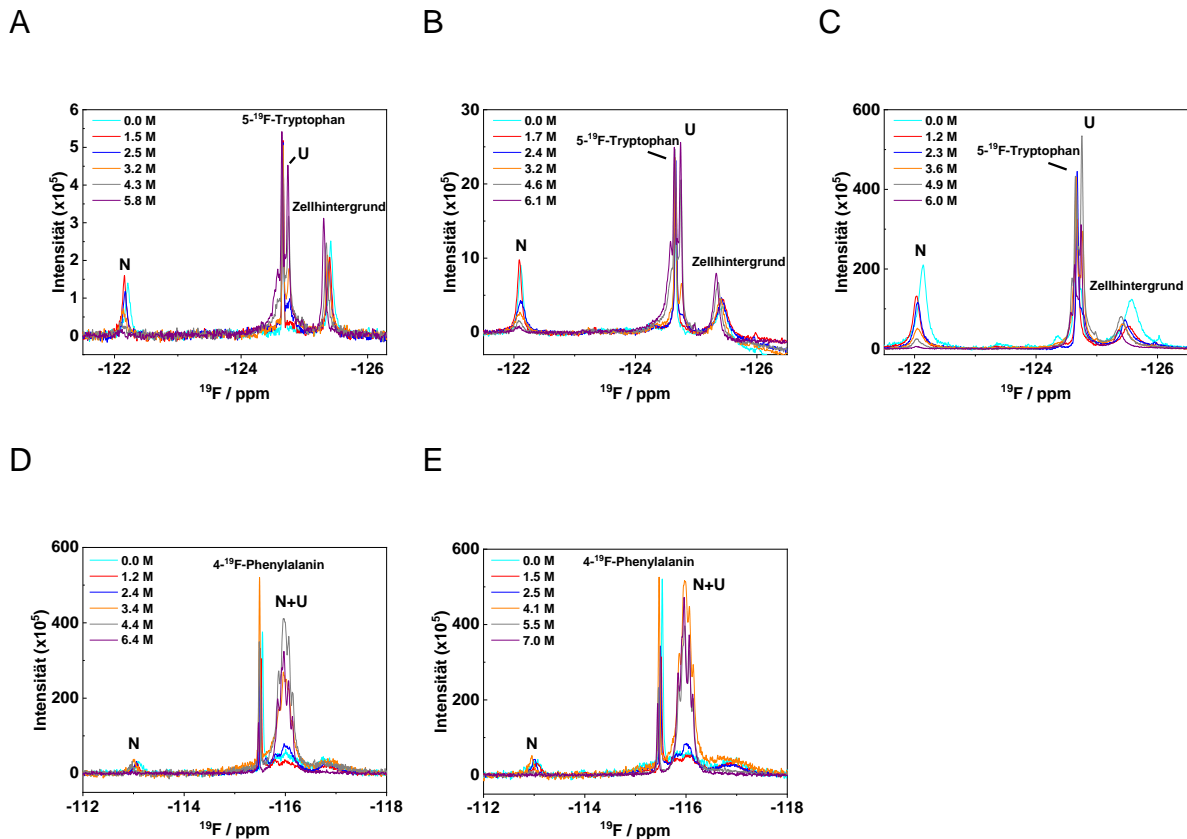


Abbildung 43: Eindimensionale  $^1\text{H}$  Spektren von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* in Zelllysats-Lösung bei einer Urea-Konzentration von  $c = 0,0\text{ M}$  (A) und  $c = 6,1\text{ M}$  (B). Es wurde eine Zelllysats-Konzentration von  $c = 260\text{ g/l}$  verwendet. Der Spektrale Bereich, der in (C) gezeigt wird, ist in (A) und (B) mit Boxen markiert. Das dominierende Signal bei ungefähr  $\omega = 6\text{ ppm}$  ist das Urea-Resonanzsignal.

## 5 Ergebnisse und Diskussion



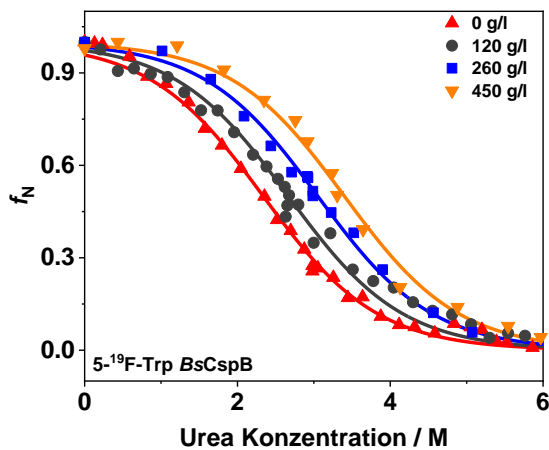
**Abbildung 44:** Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* aufgenommen in Zelllysate bei verschiedenen Urea Konzentrationen und bei  $T = 298\text{ K}$  und  $B_0 = 18,8\text{ T}$ . Folgende Zelllysate Konzentrationen wurden verwendet:  $c = 120\text{ g/l}$  (A),  $c = 260\text{ g/l}$  (B) und  $c = 450\text{ g/l}$  (C). Urea Konzentrationen sind in verschiedenen Farben beginnend bei cyan ( $c = 0\text{ M}$ ) über rot, blau, orange und grau zu lila dargestellt. Die Resonanzsignale von freiem  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$ , des nativen Zustandes („N“) und des entfalteten Zustandes („U“) von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* sind im Spektrum markiert. Des Weiteren ist das Signal, welches aus dem Zellhintergrund stammt, markiert. Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* aufgenommen in Zelllysate bei verschiedenen Urea Konzentrationen und bei  $T = 298\text{ K}$  und  $B_0 = 18,8\text{ T}$ . Folgende Zelllysate Konzentrationen wurden verwendet:  $c = 150\text{ g/l}$  (D) und  $c = 450\text{ g/l}$  (E). Urea Konzentrationen sind in verschiedenen Farben beginnend bei cyan ( $c = 0\text{ M}$ ) über rot, blau, orange und grau zu lila dargestellt. Die Resonanzsignale von freiem  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$ , des nativen Zustandes („N“) und des entfalteten Zustandes plus Teile des entfalteten Zustandes („N+U“) von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* sind im Spektrum markiert. Des Weiteren ist das Signal, welches aus dem Zellhintergrund stammt, markiert.

Durch Analyse des chemisch induzierten Faltungsübergangs mittels Gleichung (12) konnte mit steigender Zelllysate Konzentration ein Anstieg der Stabilität sowohl für  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* als auch für  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* beobachtet werden (Abbildung 45, Tabelle 12). Es zeigt sich, dass bei einer Konzentration von  $120\text{ g/l}$  ( $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB*) beziehungsweise  $150\text{ g/l}$  ( $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB*) Zellpellet in Puffer die freie Energie,  $\Delta G^0$ , um ungefähr  $1\text{ kJ/mol}$  ansteigt, während bei einer Konzentration von  $450\text{ g/l}$  die freie Energie,  $\Delta G^0$ , um  $3,5\text{ kJ/mol}$  ( $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB*) beziehungsweise um  $2,6\text{ kJ/mol}$  ( $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB*) ansteigt (Abbildung 45, Tabelle 12). Bei einer Konzentration von  $260\text{ g/l}$  Zellpellet in Puffer steigt die freie Energie,  $\Delta G^0$ , um

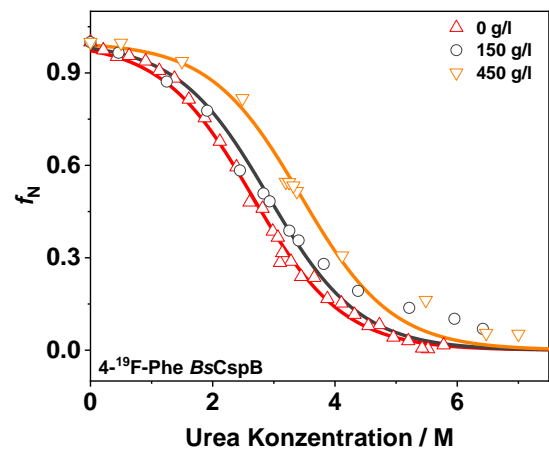
## 5 Ergebnisse und Diskussion

2,3 kJ/mol von  $\Delta G^0 = 7,7 \pm 0,2$  kJ/mol auf  $\Delta G^0 = 10,0 \pm 0,2$  kJ/mol an (5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB). Dabei lassen die Entfaltungskurven erkennen, dass der Zweifaltungszustände-Charakter der Proteine durch das Zelllysate nicht verändert wird (Abbildung 45 A, B).

A



B



C

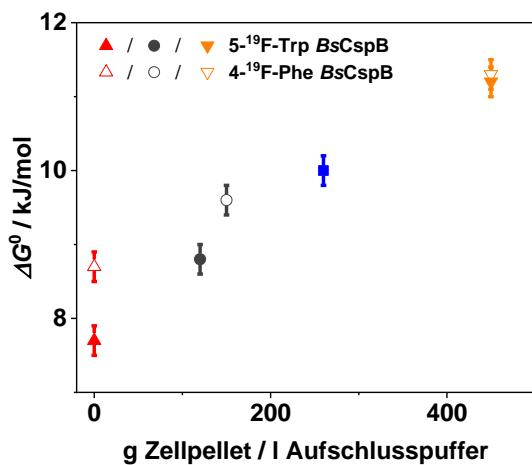


Abbildung 45: Chemisch induzierter Faltungsübergang von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (A) und 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (B) gemessen in verdünnter Lösung und verschiedenen Zelllysate Konzentrationen bei  $T = 298$  K und  $B_0 = 18,8$  T. Die Daten wurden mittels <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie detektiert. Bei folgenden Zelllysate Konzentrationen wurden Messungen durchgeführt:  $c = 0$  g/l (Dreiecke oben, rot),  $c = 120$  g/l (gefüllte Kreise, schwarz),  $c = 150$  g/l (leere Kreise, schwarz),  $c = 280$  g/l (Rechtecke, blau) und  $c = 450$  g/l (Dreiecke unten, orange). Die durchgezogene Linie zeigt den Fit mit Gleichung (12). Die Kooperativität der Faltung,  $m$ , wurde als globaler Parameter angepasst und zu  $m = -3,3 \pm 0,1$  kJ/(mol M) bestimmt. Die Ergebnisse der Bestimmung der Werte für die freie Energie,  $\Delta G^0$ , sind in (C) und Tabelle 12 dargestellt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 12:** Die freie Energie,  $\Delta G^0$ , bei unterschiedlichen Zelllysate Konzentrationen für 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB und 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB bestimmt durch Anpassung der chemisch induzierten Faltungsübergängen mittels Gleichung (12). Die Kooperativität der Faltung,  $m$ , wurde als globaler Parameter angepasst und zu  $m = -3,3 \pm 0,1$  kJ/(mol M) bestimmt.

Protein	g Zellpellet pro Puffervolumen / g/l	$\Delta G^0$ / kJ/mol
5- <sup>19</sup> F-Trp BsCspB	0	7,7 ± 0,2
5- <sup>19</sup> F-Trp BsCspB	120	8,8 ± 0,2
5- <sup>19</sup> F-Trp BsCspB	260	10,0 ± 0,2
5- <sup>19</sup> F-Trp BsCspB	450	11,2 ± 0,2
4- <sup>19</sup> F-Phe BsCspB	0	8,7 ± 0,2
4- <sup>19</sup> F-Phe BsCspB	150	9,6 ± 0,2
4- <sup>19</sup> F-Phe BsCspB	450	11,3 ± 0,2

Des Weiteren zeigen die <sup>19</sup>F Spektren sowohl im nativen als auch im entfalteten Zustand bei unterschiedlicher Zelllysate Konzentration (120 g/l / 150 g/l und 450 g/l) das gleiche Signalpattern. Dies bedeutet, dass die Erhöhung der Zelllysate Konzentration weder einen Einfluss auf Struktur des Proteins in der Region der Fluoratome hat noch, dass durch unterschiedliche Konzentrationen zusätzliche Signale in dem auszuwertenden Bereich hervorrufen (Abbildung 46). Einzig bei der 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB zeigt sich eine Linienverbreiterung der Signale, was auf eine erhöhte Viskosität der Probe zurückzuführen ist (Abbildung 46 A, B).

## 5 Ergebnisse und Diskussion

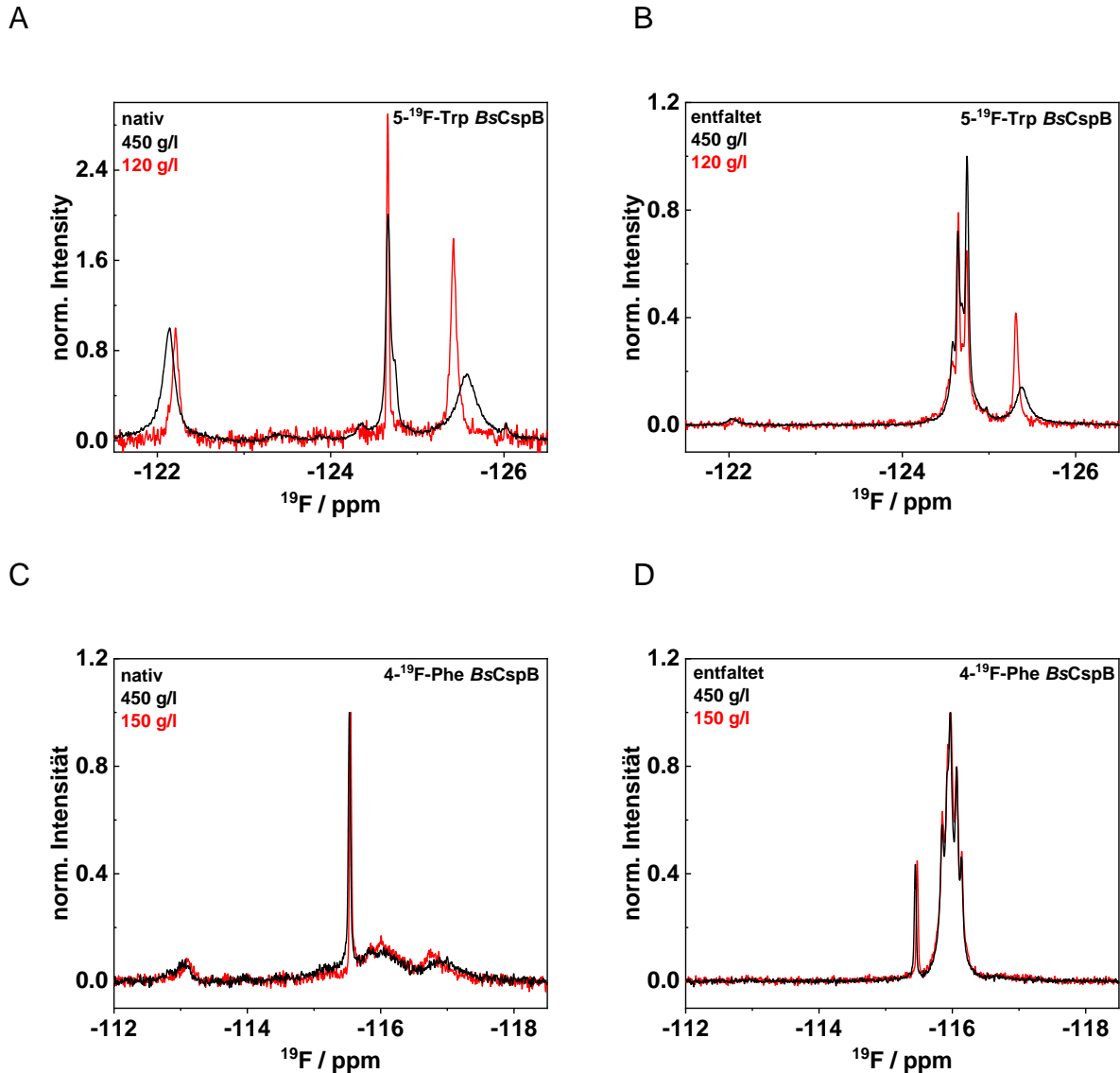


Abbildung 46: Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp BsCspB}$  bei einer Urea Konzentration von  $c = 0\text{ M}$  (A) und  $c = 5,5\text{ M}$  (B) in  $c = 120\text{ g/l}$  (rot) und  $c = 450\text{ g/l}$  Zelllysate (schwarz). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  bei einer Urea Konzentration von  $c = 0\text{ M}$  (C) und  $c = 5,2\text{ M}/5,3\text{ M}$  (D) in  $c = 150\text{ g/l}$  (rot) und  $c = 450\text{ g/l}$  Zelllysate (schwarz).

Außerdem wurde, um den Einfluss des Zelllysats auf das  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum zu prüfen, ein  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum von Zelllysate aus CAG 18455 7371 Stämmen ohne *BsCspB* Varianten aufgenommen (Abbildung 47). Dies zeigt ein Signal für das freie  $5\text{-}^{19}\text{F}$  Tryptophan bei  $\omega = -124,8\text{ ppm}$  und ein breites Signal für den Zellhintergrund bei  $\omega = -125,5\text{ ppm}$ . Im Bereich der chemischen Verschiebung des nativen Zustandes bei  $\omega = -122,24\text{ ppm}$  kommt durch das Zelllysate kein weiteres Signal zustande. Nur das Resonanzsignal des entfalteten Zustands überlappt mit dem des  $5\text{-}^{19}\text{F}$  Tryptophan. Dies ist aber für die Auswertung unerheblich, da sich die Konzentration an  $5\text{-}^{19}\text{F}$  Tryptophan während der Messung nicht verändert.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

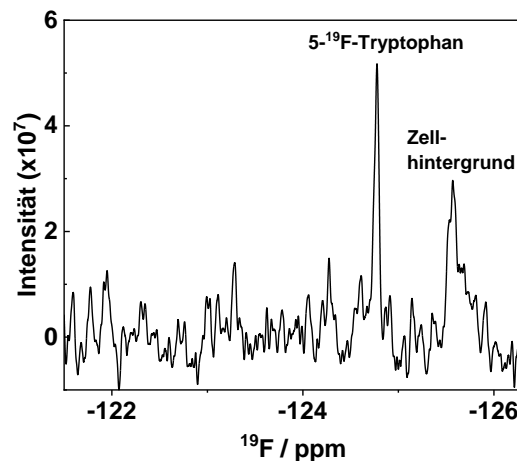


Abbildung 47: Eindimensionales  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum von Zelllysate ohne  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB*. Das Resonanzsignal des freien  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Tryptophans}$  ( $\omega = -124,8$  ppm), sowie das Resonanzsignal des Zellhintergrunds ( $\omega = -125,5$  ppm) sind markiert.

Zusammenfassend führt eine Erhöhung der Zelllysate Konzentration zu einer Erhöhung der Stabilität der zwei *BsCspB* Varianten, hat aber keinen weiteren Einfluss auf die Struktur des Proteins.

Viele Studien mit Makromolekülen wie PEG1, PEG8, Dex20 und PVP40 zeigen denselben Effekt [11, 21, 52, 159]. Die Zugabe von Makromolekülen, also eine Verdichtung der Umgebung des zu betrachtenden Proteins, führt zu einer Erhöhung der Stabilität des Proteins. Auch Studien mit wt *BsCspB* zeigen, dass die Zugabe von 200 g/l PEG1, PEG8 und Dex20 zu einer Erhöhung der Stabilität um 5 bis 6 kJ/mol führen [11]. Im Vergleich dazu zeigt, wie weiter oben beschrieben, eine Zelllysate Konzentration von 260 g/l Zellpellet in Puffer einer Stabilitätserhöhung von nur 2,3 kJ/mol. Grund dafür könnte sein, dass bei einer Zelllysate Umgebung anders als bei der chemisch inerten Umgebung mit PEG oder Dextran es neben den harten Wechselwirkungen („excluded volume“) auch zu leichten Wechselwirkungen (intermolekulare Wechselwirkungen) zwischen der Umgebung und dem Protein kommt, die eine abschwächende Wirkung auf die Stabilität des Proteins haben [7, 51, 52]. Der Hauptgrund könnte aber vor allem sein, dass das Zellpellet nass eingewogen wurde und ein großer Teil des Gewichts Wasser ausmacht. Aus diesem Grund wurde das Trockengewicht aus dem Nassgewicht errechnet (Tabelle 3). Dies erfolgte nach Vorlage von Glazyrina *et al.*, die zeigten dass 1,70 g/l Nassgewicht und 0,39 g/l Trockengewicht zur gleichen optischen Dichte,  $OD_{600\text{nm}}$ , bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600$  nm führen [141].

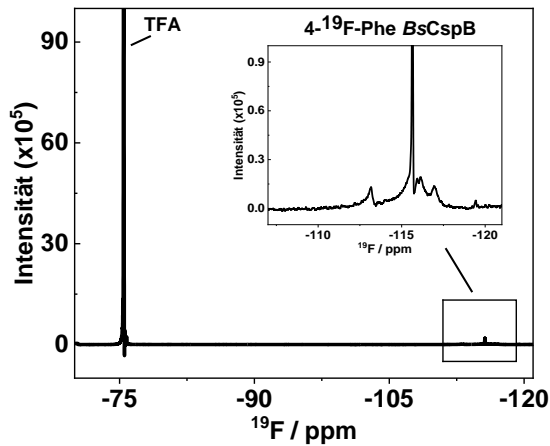
Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass das Trockengewicht der Zellpellets deutlich kleiner ist als das Nassgewicht. Auch wenn hier exakte Zahlen bestimmt wurden, muss darauf hingewiesen werden, dass dieser Wert mit großen Fehlern behaftet ist, da hier nur kleine Mengen an Zellkultur und Zellpellet verwendet wurden und sich kleine Fehler aufsummieren. Dennoch zeigt sich am Beispiel der 260 g/l Zellpellet Probe, dass das Trockengewicht weniger als  $\frac{1}{4}$  des Nassgewichts ausmacht. Somit stimmt auch die Zunahme von 2,3 kJ/mol der Stabilität für dieses Protein bei einem Trockengewicht von 60 g/l Zellpellet besser mit der Zunahme von 5-6 kJ/mol bei einer Zugabe von 200 g/l Crowding Reagenz aus anderen Studien überein [11]. Außerdem kann man deutlich den Trend erkennen, dass bei Erhöhung der Konzentration der umgebenden Makromoleküle in Form von Zelllysat eine deutliche Erhöhung der Stabilität des Proteins erfolgt, auch wenn die absolute Anzahl an Makromolekülen nicht zugänglich ist.

Um Effekte aufgrund unterschiedlicher Proteinkonzentrationen auszuschließen, wurden die Konzentrationen von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* in Zelllysat berechnet indem eine bekannte Konzentration an TFA zu der Probe zugeben wurde (Abbildung 48 A) und die Integrale verglichen wurden (Tabelle 3).

Da die Protein Konzentrationen im Zelllysat deutlich geringer sind als bei den Messungen in Pufferlösungen, wurde in verdünnter Lösung eine Denaturierungskurve von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mittels <sup>1</sup>H NMR Spektren mit einer Protein Konzentration  $c = 8 \mu\text{M}$  dargestellt, um Konzentrationseffekte auszuschließen (Abbildung 48 B). Dabei wurde die Kooperativität,  $m$ , auf  $m = -3,3 \pm 0,1 \text{ kJ}/(\text{mol M})$  festgesetzt und für die freie Energie,  $\Delta G^0$ , ein Wert von  $\Delta G^0 = 7,8 \pm 0,5 \text{ kJ/mol}$  bestimmt. Dieser Wert stimmt im Rahmen des Fehlers mit dem Wert von  $\Delta G^0 = 7,2 \pm 0,2 \text{ kJ/mol}$  überein, der für 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* bei einer Konzentration von  $c = 200 \mu\text{M}$  bestimmt wurde. Somit lässt sich ein Konzentrationseffekt auf die Stabilität des Proteins ausschließen.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

A



B

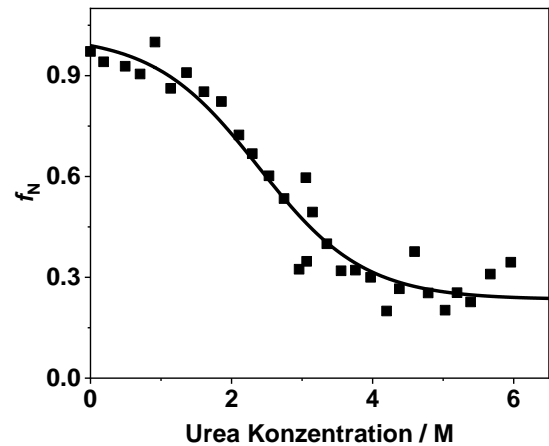
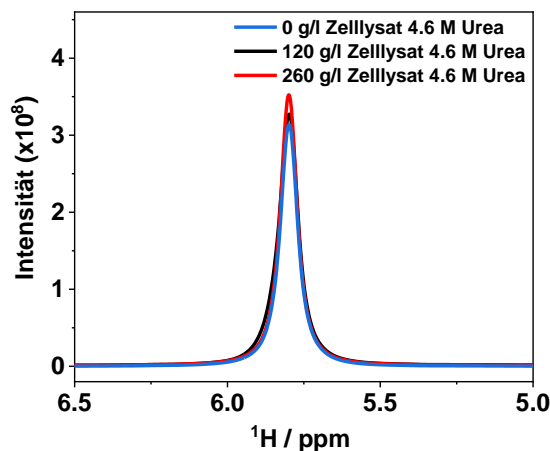


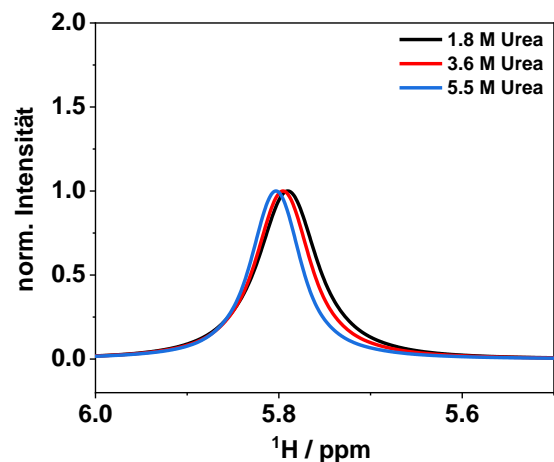
Abbildung 48: A) Eindimensionales  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum von Trifluoressigsäure (TFA) und 4- $^{19}\text{F}$ -Phe BsCspB bei  $T = 298\text{ K}$  und  $B_0 = 18,8\text{ T}$ . Das TFA Resonanzsignal ( $c = 2\text{ mM}$ ) wurde verwendet, um die Konzentration von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe BsCspB in Zelllysate zu bestimmen. B) Chemisch induzierter Faltungsübergang von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB bei einer Konzentration von  $c = 8\text{ }\mu\text{M}$  und  $T = 298\text{ K}$ . die Kooperativität,  $m$ , wurde auf  $m = -3,3 \pm 0,1\text{ kJ}/(\text{mol M})$  festgesetzt und für die freie Energie,  $\Delta G^0$ , ein Wert von  $\Delta G^0 = 7,8 \pm 0,5\text{ kJ}/\text{mol}$  bestimmt.

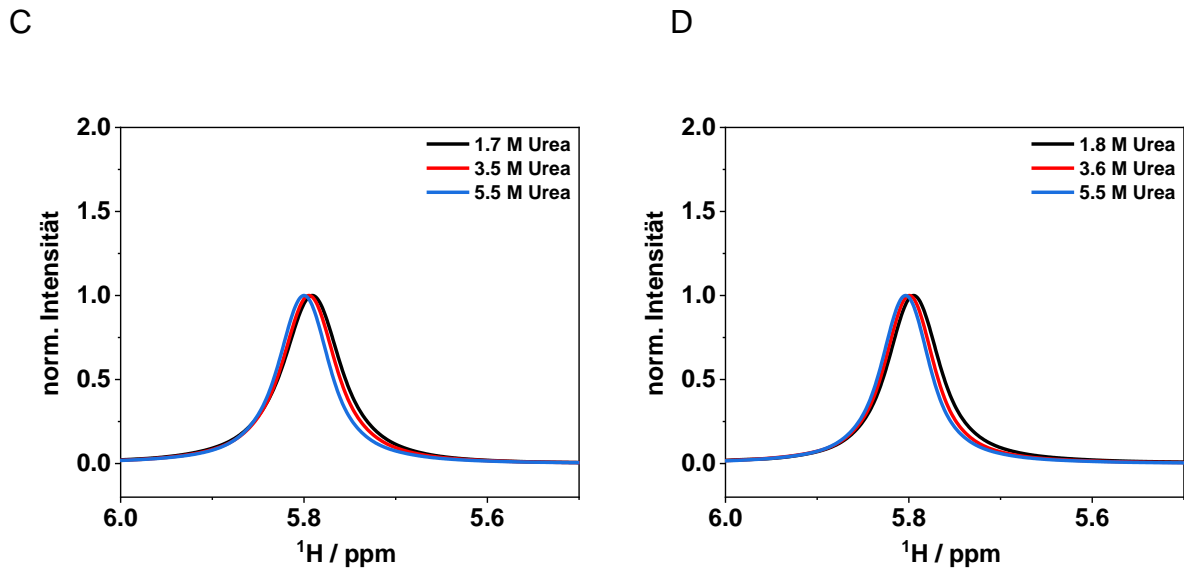
Als nächster Schritt wurde das Urea Signal im Protonen Spektrum untersucht. Zum einen hat die Änderung der Zelllysate Konzentration keinen Einfluss auf die Signalintensität (Abbildung 49A). Zum anderen zeigt das Urea Signal bei steigender Urea Konzentration eine identische Verschiebung bei 0 g/l (Abbildung 49 B), 120 g/l (Abbildung 49 C) und 450 g/l (Abbildung 49 D) Zelllysate Konzentration.

A



B

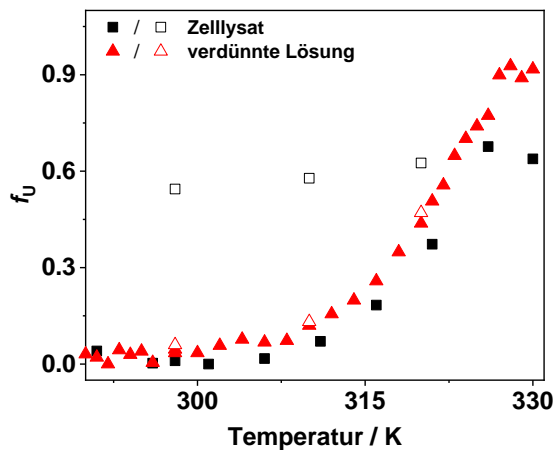




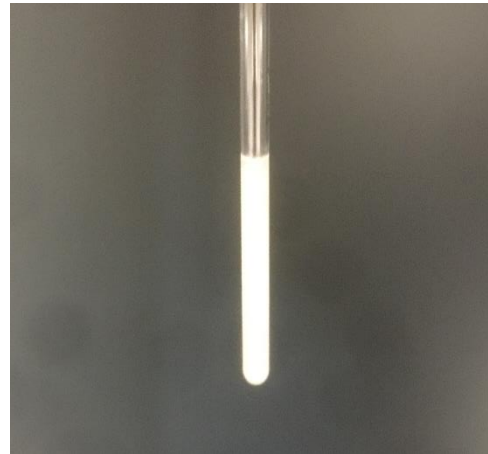
**Abbildung 49:** Analyse des Urea Signals in den eindimensionalen Protonen Spektren. Alle Daten wurden bei  $T = 298\text{ K}$  aufgenommen. A) Urea Protonen Resonanzsignal bei einer Urea Konzentration von  $c = 4,6\text{ M}$  aufgenommen in verdünnter Lösung (blau),  $120\text{ g/l}$  Zelllysate (schwarz) und  $260\text{ g/l}$  Zelllysate (rot). B) Urea Protonen Resonanzsignal in verdünnter Lösung bei verschiedenen Urea Konzentrationen. Datenaufnahmen erfolgten mit Urea Konzentrationen von  $c = 1,8\text{ M}$  ( $\omega = 5,790\text{ ppm}$ , schwarz),  $c = 3,8\text{ M}$  ( $\omega = 5,795\text{ ppm}$ , rot) und  $c = 5,5\text{ M}$  ( $\omega = 5,803\text{ ppm}$ , blau). C) Urea Protonen Resonanzsignal in  $120\text{ g/l}$  Zelllysate bei verschiedenen Urea Konzentrationen. Datenaufnahmen erfolgten mit Urea Konzentrationen von  $c = 1,7\text{ M}$  ( $\omega = 5,791\text{ ppm}$ , schwarz),  $c = 3,5\text{ M}$  ( $\omega = 5,795\text{ ppm}$ , rot) und  $c = 5,5\text{ M}$  ( $\omega = 5,800\text{ ppm}$ , blau). D) Urea Protonen Resonanzsignal in  $450\text{ g/l}$  Zelllysate bei verschiedenen Urea Konzentrationen. Datenaufnahmen erfolgten mit Urea Konzentrationen von  $c = 1,8\text{ M}$  ( $\omega = 5,795\text{ ppm}$ , schwarz),  $c = 3,6\text{ M}$  ( $\omega = 5,800\text{ ppm}$ , rot) und  $c = 5,5\text{ M}$  ( $\omega = 5,804\text{ ppm}$ , blau). Die Daten wurden aufgenommen während der Faltungsübergängen von  $5\text{-}^{19}\text{F-Trp BsCspB}$  ( $c = 200\text{ }\mu\text{M}$  (verdünnte Lösung),  $c = \sim 5\text{ }\mu\text{M}$  ( $120\text{ g/l}$ ),  $c = \sim 25\text{ }\mu\text{M}$  ( $260\text{ g/l}$ ) und  $c = \sim 70\text{ }\mu\text{M}$  ( $450\text{ g/l}$ )).

Abschließend wurde ein Temperatur-induzierter Faltungsübergang aufgenommen. Der Temperatur-induzierter Übergang verdünnter Lösung ist mit roten Dreiecken gekennzeichnet, während der Temperatur-induzierte Übergang in Zelllysate mit schwarzen Rechtecken dargestellt ist (Abbildung 50 A). Die aufgenommene Faltungskurve zeigt deutlich, dass die qualitative Auswertung des Temperatur-induzierten Übergangs in Zelllysate nicht möglich ist, da das Protein bei hohen Konzentrationen abgebaut und die Entfaltung nicht reversibel ist. Dies erkennt man daran, dass die Datenpunkte für Temperaturerhöhung (geschlossene Symbole) und Temperaturniedrigung (offene Symbole) nicht übereinanderliegen (Abbildung 50 A). Die Zersetzung wird auch deutlich, wenn man das NMR Röhren betrachtet, da sich während der Messung ein weißer Niederschlag bildet (Abbildung 50 B).

A



B



**Abbildung 50:** Temperatur-induzierter Faltungsübergang von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* in verdünnter Lösung (Dreiecke, rot) und in Zelllysate (Rechtecke, schwarz). Die Messungen während der Temperaturerhöhung sind mit geschlossenen Symbolen dargestellt, während die offenen Symbole die Messungen während der Temperaturerniedrigung zeigen (A). Foto der Zelllysate Probe nach 14 h NMR Messung (B). Die Zelllysate Konzentration betrug während der Messung 240 g Zellpellet / l Puffer. Die Messdaten wurden erhalten indem bei verschiedenen Temperaturen <sup>19</sup>F Spektren generiert wurden und der Anteil an entfaltetem Protein wie unter 4.7.3 beschrieben bestimmt wurden.

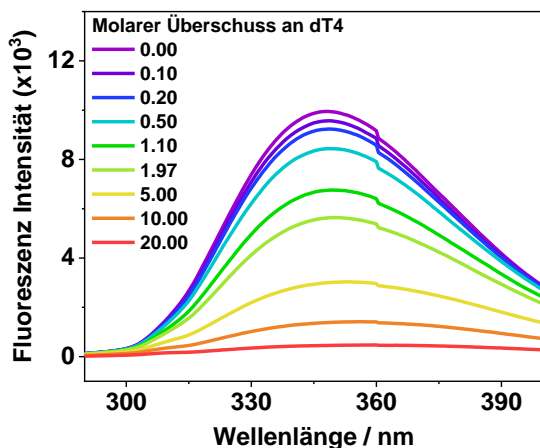
Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die Stabilitäten des *BsCspB* den gleichen, zunehmenden Trend in Zelllysate zeigen wie unter Verwendung von Crowding Reagenzien [11]. Nichtsdestotrotz zeigen Studien mit anderen Proteinen eine Abhängigkeit von den verwendeten Crowding Reagenzien [51, 52, 55]. Aus diesem Grund ist die hier entwickelte Methode der Fluormarkierung und anschließende Verfolgung der Faltung mittels <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie ideal, um die Stabilität von Proteinen in einer hoch komplexen Umgebung zu bestimmen. Besonders attraktiv an dieser Methode ist, dass sie einfach und leicht zugänglich ist, sowie dass in kürzester Zeit Spektren generiert werden können. Außerdem ist es möglich diese Methode einfach auf andere Systeme zu übertragen, um somit jedes System individuell zu untersuchen.

### 5.3.2 Untersuchung der Interaktion zwischen Oligonukleotiden und fluormarkiertem *BsCspB* in Zellysat mittels eindimensionaler $^{19}\text{F}$ NMR-Spektroskopie

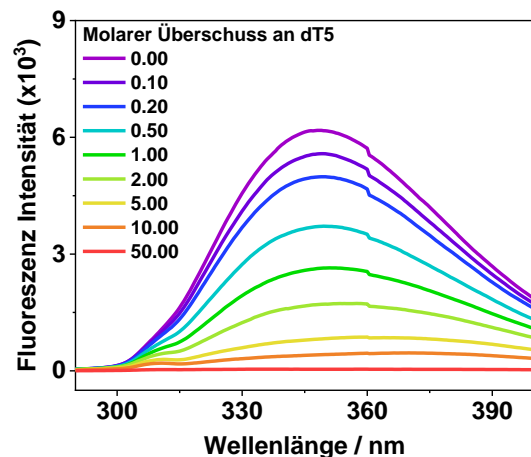
Proteine die, wie das *BsCspB*, eine Cold Shock Domain (CSD) tragen, sind unter anderem dafür bekannt Nukleinsäuren zu binden [160]. Vor allem Oligonukleotide mit den Y-Box Motiv (CTGATTGGC/TC/TAA) werden mit einer hohen Affinität gebunden [77]. Für das *BsCspB* weisen Liganden mit einer Thymidin-reichen Sequenz hohe Bindungsaffinitäten auf, wobei Heptadeoxythymidin (dT7) die höchste Bindungsaffinität besitzt und zu einem Komplex in einem 1:1 Verhältnis bindet [79-81]. In diesem Kapitel wurde zum einen der Einfluss der Fluormarkierung und zum andern der Einfluss zellulärer Umgebung auf die Funktion, Oligothymidine zu binden, untersucht. Dabei wurden alle Messungen mit  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* von Pia Sinn im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Zunächst wurde Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht verwendet, um die Interaktion von einzelsträngiger DNS (ssDNA) mit  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* in verdünnter Lösung zu untersuchen. Mit dieser Methode ist es möglich die Bindungsaffinitäten ( $K_D$  Wert) zu den unterschiedlichen Oligothymidinen (dT4, dT5, dT6 und dT7) exakt zu bestimmen und diese mit den Werten der wt Variante zu vergleichen [79]. Dafür wurde sich zunutze gemacht, dass mit steigendem Anteil an Komplex, die intrinsische Fluoreszenz von Tryptophan abnimmt (Abbildung 51).

A

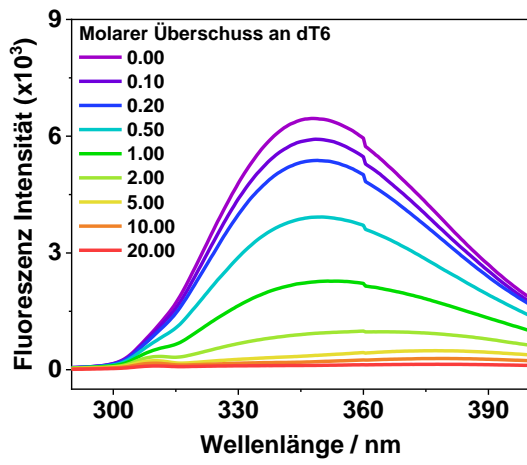


B

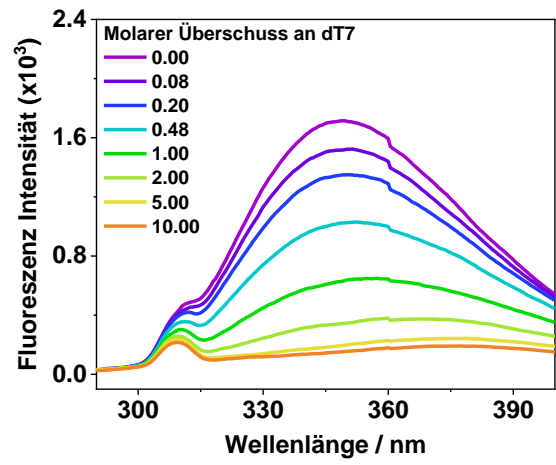


## 5 Ergebnisse und Diskussion

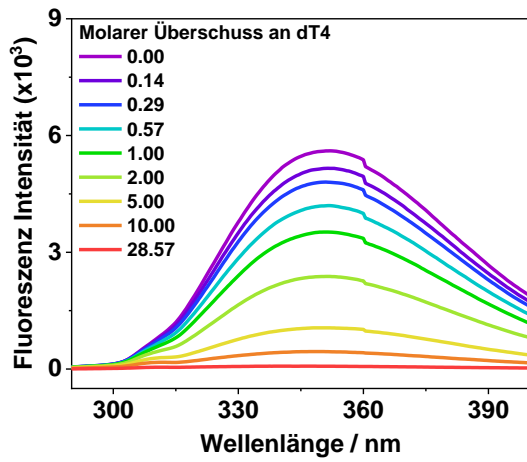
C



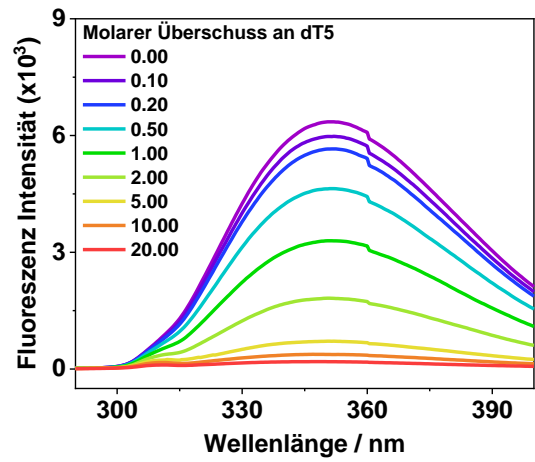
D



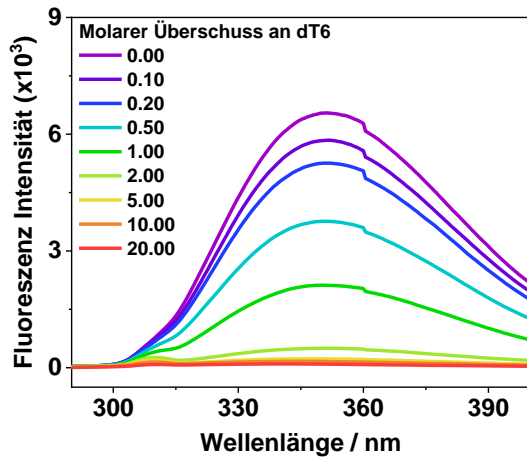
E



F



G



H

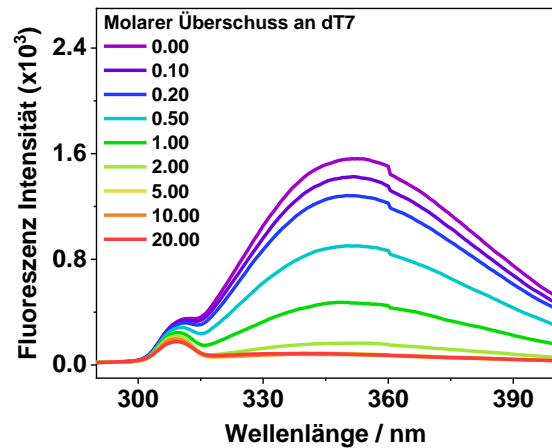


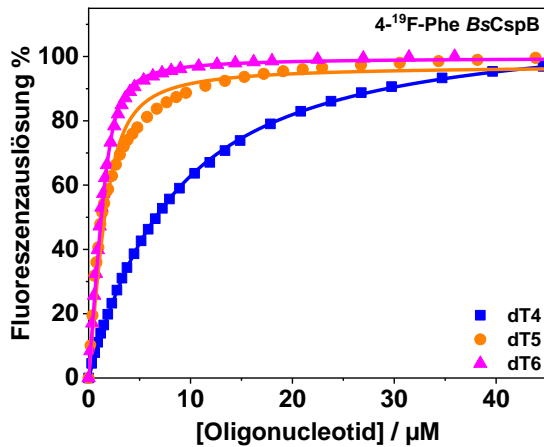
Abbildung 51: Fluoreszenzemissionsspektren von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* in einer Konzentration von  $c = 3 \mu\text{M}$  (A),  $c = 2 \mu\text{M}$  (B),  $c = 2 \mu\text{M}$  (C) und  $c = 0,5 \mu\text{M}$  (D) mit steigender Konzentration an dT4 (A), dT5 (B), dT6 (C) und dT7 (D). Fluoreszenzemissionsspektren von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* in einer Konzentration von  $c = 3,5 \mu\text{M}$  (E),  $c = 2 \mu\text{M}$  (F),  $c = 2 \mu\text{M}$  (G) und  $c = 0,5 \mu\text{M}$  (H) mit steigender Konzentration an dT4 (E), dT5 (F), dT6 (G) und dT7 (H).

Trägt man nur die Abnahme der Fluoreszenzintensität gegen die Oligothymidin Konzentration auf und passt diese mit Gleichung (7) an, können Bindungsaffinitäten bestimmt werden (Abbildung 52). Die Bindungsaffinitäten, die in Form des  $K_D$  Werts für die Interaktion zwischen dT4, dT5, dT6 und dT7 mit 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* erhalten wurden, steigen mit steigender Länge der Oligothymidine (Abbildung 52, Tabelle 13). Dieser Effekt kann auch mit der wt Variante beobachtet werden. Die  $K_D$  Werte für die Interaktion von dT4, dT5 und dT6 mit den fluormarkierten Varianten des *BsCspB* sind in der gleichen Größenordnung wie für die wt Variante (Tabelle 13). Nur für die Interaktion mit dT7 erniedrigt sich der  $K_D$  Wert von  $K_D = 30 \pm 10 \text{ nM}$  und  $K_D = 49 \pm 2 \text{ nM}$  zu  $K_D = 1,8 \pm 0,4 \text{ nM}$ , um eine Größenordnung für die fluormarkierten Varianten im Vergleich zu der wt Variante. Dennoch weist die Interaktion mit dT7 die höchste Affinität aller getesteten Oligothymidine auf und die Reihenfolge der Bindungsaffinitäten der unterschiedlichen Oligothymidine ist für fluormarkierten *BsCspB* Varianten gleich wie für die wt Variante. Die hohe Bindungsaffinität von dT7 könnte auch ein Grund für die relativ große Abweichung zu der wt Variante sein, da bei hohen Affinitäten geringere Proteinkonzentrationen verwendet werden müssen und somit alle systematischen Fehler anteilig größer werden. Außerdem ist die Anpassung mit Gleichung (7) bei hohen Affinitäten ungenauer, da die Affinitätskurve trotz verringerter Konzentration sehr steil ist.

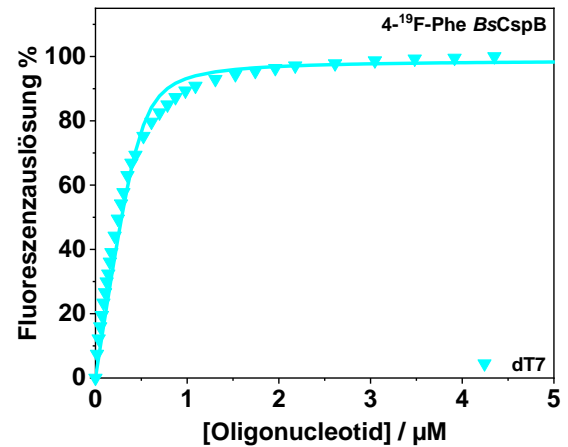
## 5 Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend zeigt sich deutlich, dass die Markierung des *BsCspB* mit Fluor keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Bindungsaffinität des Proteins hat, obwohl sich sowohl Trp8 als auch Phe15, Phe17, Phe27 und Phe30 und somit die Fluormarkierung direkt in Bindungstasche befinden.

A



B



C

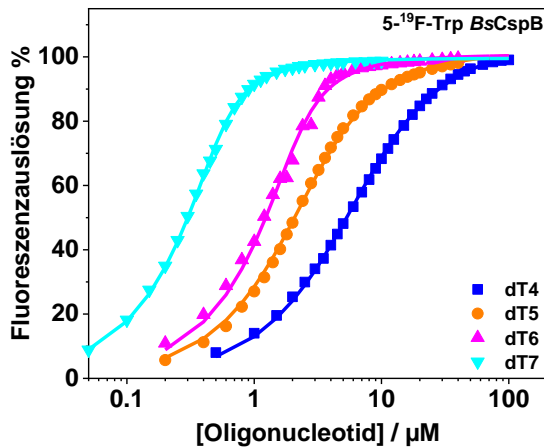


Abbildung 52: Untersuchung der Interaktion verschieden langer Oligothymidine und  $4\text{-}^{19}\text{F-Phe BsCspB}$  (A, B) und  $5\text{-}^{19}\text{F-Trp BsCspB}$  (C) mittels Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht. Die Auslösung der intrinsischen Fluoreszenz wurde für dT4 (Rechtecke, blau), dT5 (Kreise, orange), dT6 (Dreiecke oben, pink) und dT7 (Dreiecke unten, cyan) aufgenommen.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 13: Bindungsaffinität,  $K_D$ , in nM von 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB zu verschiedenen Oligothymidinen wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht bei  $T = 298$  K bestimmt. Dabei wird sich die intrinsische Fluoreszenz von Trp8 zunutze gemacht. Die genutzten Protein Konzentrationen sind in nM angegeben. Die Referenzdaten wurden bei unterschiedlichen Protein Konzentrationen aufgenommen [80].**

	dT4	dT5	dT6	dT7
<i>c</i>	3000/3500	2000	2000	500
4- <sup>19</sup> F-Phe BsCspB	6400 ± 400	500 ± 50	240 ± 20	30 ± 10
5- <sup>19</sup> F-Trp BsCspB	3900 ± 100	1120 ± 30	240 ± 10	49 ± 2
wild type BsCspB	3200 ± 200	940 ± 10	330 ± 20	1.8 ± 0.4
[80]				

Des Weiteren wurden auch Interaktionsstudien in Anwesenheit von PEG1 mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt, um eine zellähnliche Umgebung zu simulieren. Diese sind in Anhang 18 und Anhang 19 gezeigt. Beim Betrachten dieser Daten wird deutlich, dass bei steigender Konzentration an PEG1 die Bindungsaffinität abnimmt.

Als nächster Schritt wurde die Interaktion von <sup>15</sup>N markiertem 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB mit dT4 (Abbildung 53), dT6 (Abbildung 54) und dT7 (Abbildung 55) mittels zweidimensionalen <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC NMR Spektren analysiert. Dafür wurden nach und nach Oligothymidine zu dem Protein zu titriert und an mehreren Titrationspunkten <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC NMR Spektren generiert. Durch die Zugabe von äquimolaren Mengen von Oligothymidinen wurden vor allem die Kreuzsignale von Aminosäuren in der Bindungstasche (K13, V28, F30, S31, F38, K39 und T40) beeinflusst (Abbildung 53C, Abbildung 54C, Abbildung 55C) [80]. Das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung nimmt im Vergleich von der Interaktion mit dT4 zu der Interaktion mit dT6 und dT7 zu. So liegt die mittlere Änderung der chemischen Verschiebung bei einem zweifachen Überschuss an Oligothymidin bei dT6 und dT7 bei  $\Delta\omega^{\text{mean}} = 0,12 \pm 0,13$  ppm (Abbildung 54B, Abbildung 55B) während sie für dT4 bei

$\Delta\omega^{\text{mean}} = 0,07 \pm 0,09$  ppm (Abbildung 53B) liegt. Somit führt eine Verkürzung der Oligothymidine zu einer Verringerung der Änderung der Verschiebung der Kreuzsignale vor allem für F30, S31, K39 und T40 während die Gesamtverteilung der Signale erhalten bleibt. Außerdem zeigen diese Messungen, dass die Bindungstasche, die hier für die Interaktion mit dT4, dT6 und dT7 mit 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* identifiziert wurde (Abbildung 53C, Abbildung 54C, Abbildung 55C), mit der der wt Variante übereinstimmt [80].

Betrachtet man die Spektren im Detail erkennt man, dass die Änderung der chemischen Verschiebung der Kreuzsignale von E12, G14, I33, F38, L41 und E42 sind für die Interaktion mit dT6 und dT7 größer als der Mittelwert während sie für die Interaktion mit dT4 kleiner sind. Dabei weist das Resonanzsignal von G14 für die Interaktion mit dT4 eine Verschiebung in die gleiche Richtung nur kleiner auf, wie für die Interaktion mit dT6 und dT7. Des Weiteren zeigen die Signale H29, A32, G35, G37, E42 und V63 eine Änderung der chemischen Verschiebung, wenn dT6 oder dT7 zugegeben wird. Durch die Zugabe von dT4 ändern sich diese Signale nicht oder nur wenig. Dennoch zeigen einige Signale (K13, D25, V26, V28, F30, S31, K39, T40 und G57) für alle Oligothymidine (dT4, dT6, dT7) Änderungen der chemischen Verschiebung, die größer als der Mittelwert sind. Dabei sind die Änderungen für F30, S31, K39 und T40 geringer für die Interaktion mit dT4. Bei der Zugabe von dT4 verschieben sich einige Kreuzsignale (G16, V20, F27, E53 und Q57), um mehr als den Mittelwert, während sie den Mittelwert bei der Interaktion mit dT6 oder dT7 nicht überschreiten. Dies ist aber darauf zurück zu führen, dass die mittlere Änderung der Verschiebung bei der dT4 Interaktion geringer ist als bei der Interaktion mit dT6 oder dT7 und nicht darauf, dass die Verschiebung signifikant größer ist.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass vor allem Resonanzsignale der Bindungstasche oder in direkter Umgebung zu dieser eine Verschiebung zeigen [78, 80, 82]. Die Unterschiede der Änderung der chemischen Verschiebung zwischen der Interaktion mit dT4 und dT6 oder dT7 treten vor allem an den Seiten der Bindungstasche auf. Das könnte darauf hindeuten, dass dT4 leicht unterschiedlich im Vergleich zu dT6 und dT7 an das Protein bindet, in dem es zum Beispiel nur Teile der Bindungstasche besetzt. Außerdem wird deutlich, dass die Fluormarkierung keinen Einfluss auf die Bindungskapazität mit einzelsträngiger DNS im Vergleich zur wt Variante hat.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

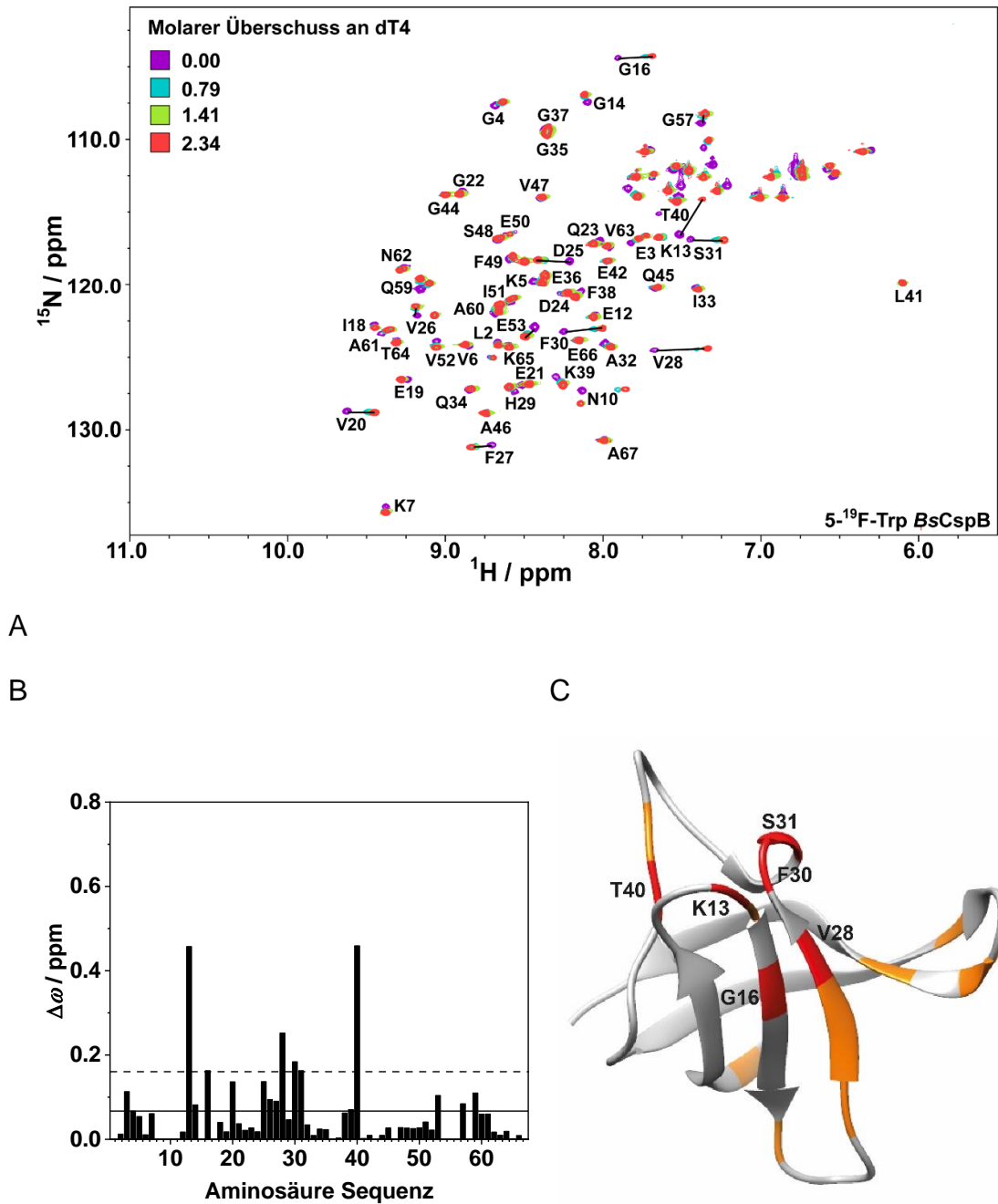


Abbildung 53: Untersuchung der Interaktion von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB und dT4 mittels zweidimensionaler hochaufgelöster NMR-Spektroskopie. Heteronukleares <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC NMR Spektren von freiem und dT4 gebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB in verdünnter Lösung. Die Zuordnung der Rückradssignale von BsCspB ist in dem Einbuchstaben Code der Aminosäuren dargestellt und der Primärsequenz folgend nummeriert. Das steigende molare Verhältnis von dT4 und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB ist mit verschiedenen Farben wie angegeben dargestellt (A). Die Änderung der chemischen Verschiebung,  $\Delta\omega$ , zwischen freiem und dT4 gebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB in verdünnter Lösung, wobei die horizontalen Linien das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung (durchgezogene Linie) und das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung plus die Standardabweichung (gestrichelte Linie) zeigen (B). Das Rückrad von BsCspB (PDB ID: 2es2) ist als Cartoon dargestellt (grau). Die Amidprotonen von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB, die durch dT4 stark beeinflusst wurden sind in orange (größer als der Mittelwert) und rot (größer als der Mittelwert plus Standardabweichung) (C). Gemessen wurde bei einer Protein Konzentration von  $c = 63 \mu\text{M}$ , einer Temperatur von  $T = 298 \text{ K}$  und einem Magnetfeld von  $B_0 = 18,8 \text{ T}$ .

## 5 Ergebnisse und Diskussion

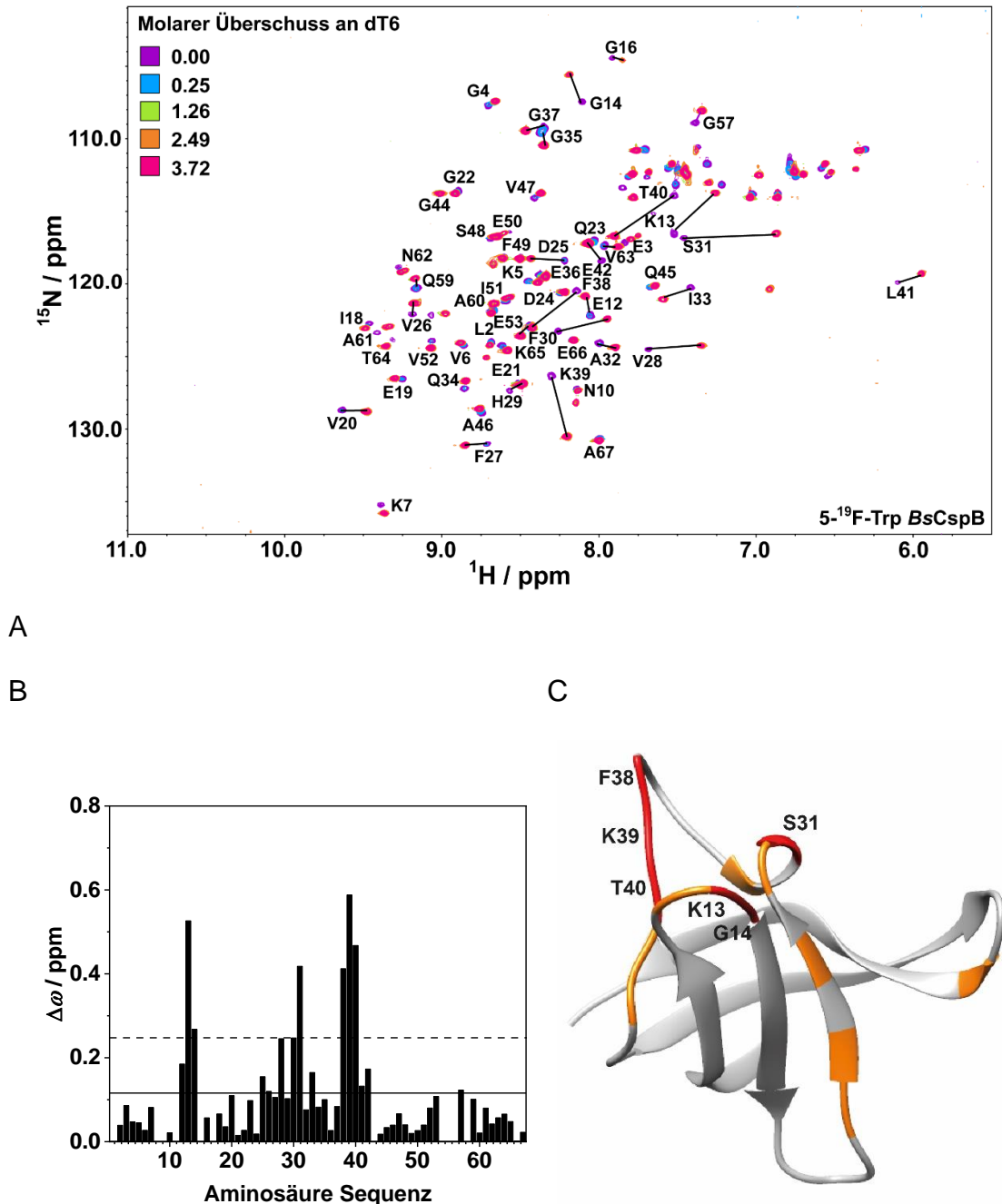


Abbildung 54: Untersuchung der Interaktion von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB und dT6 mittels zweidimensionaler hochauflösender NMR-Spektroskopie. Heteronukleares <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC NMR Spektren von freiem und dT6 gebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB in verdünnter Lösung. Die Zuordnung der Rückradssignale von BsCspB ist in dem Einbuchstaben Code der Aminosäuren dargestellt und der Primärsequenz folgend nummeriert. Das steigende molare Verhältnis von dT6 und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB ist mit verschiedenen Farben wie angegeben dargestellt (A). Die Änderung der chemischen Verschiebung,  $\Delta\omega$ , zwischen freiem und dT6 gebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB in verdünnter Lösung, wobei die horizontalen Linien das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung (durchgezogene Linie) und das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung plus die Standardabweichung (gestrichelte Linie) zeigen (B). Das Rückrad von BsCspB (PDB ID: 2es2) ist als Cartoon dargestellt (grau). Die Amidprotonen von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB, die durch dT6 stark beeinflusst wurden sind in orange (größer als der Mittelwert) und rot (größer als der Mittelwert plus Standardabweichung) (C). Gemessen wurde bei einer Protein Konzentration von  $c = 40 \mu\text{M}$ , einer Temperatur von  $T = 298 \text{ K}$  und einem Magnetfeld von  $B_0 = 18,8 \text{ T}$ .

## 5 Ergebnisse und Diskussion

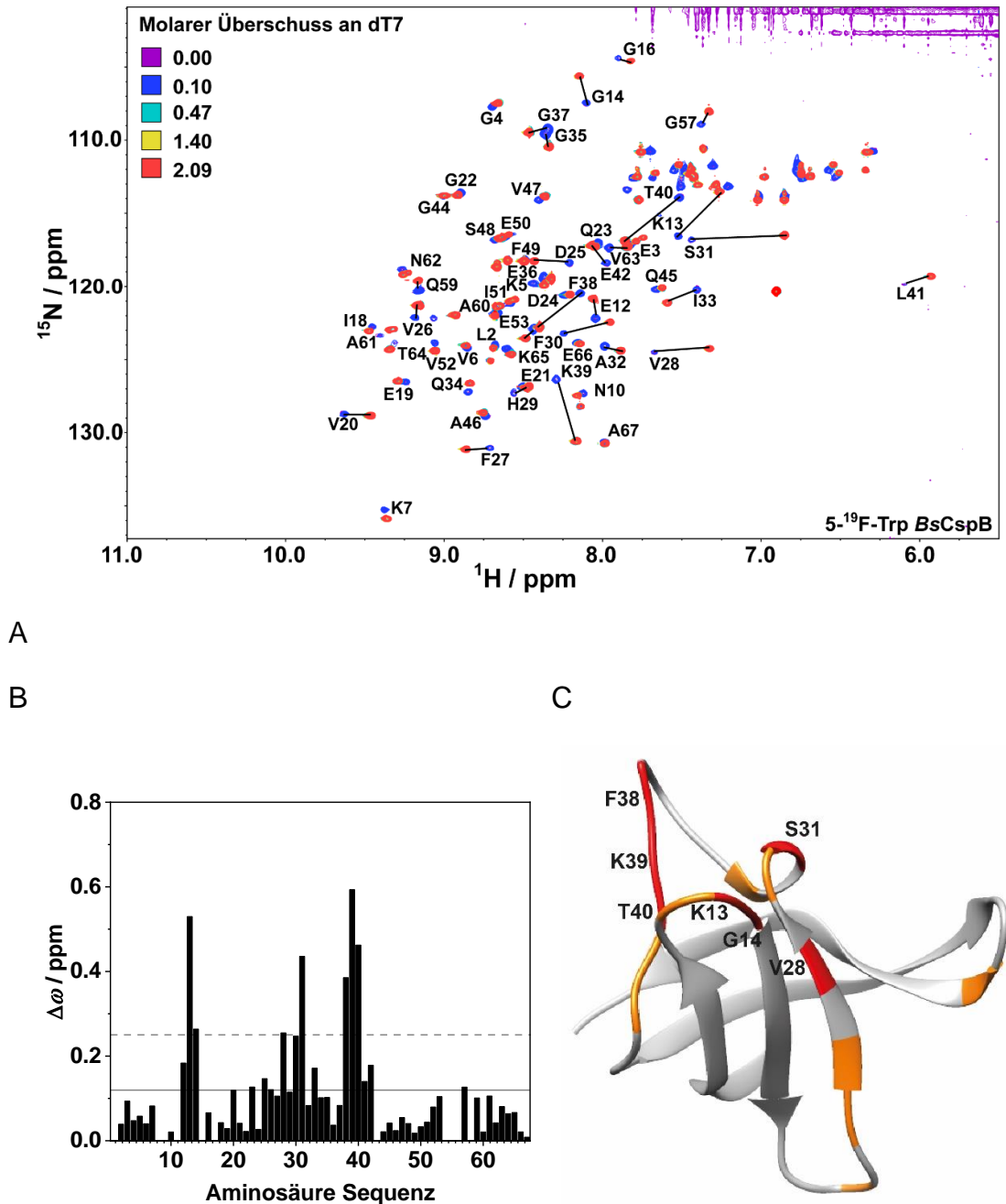


Abbildung 55: Untersuchung der Interaktion von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB und dT7 mittels zweidimensionaler hochaufgelöster NMR-Spektroskopie. Heteronukleares <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC NMR Spektren von freiem und dT7 gebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB in verdünnter Lösung. Die Zuordnung der Rückradssignale von BsCspB ist in dem Einbuchstaben Code der Aminosäuren dargestellt und der Primärsequenz folgend nummeriert. Das steigende molare Verhältnis von dT7 und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB ist mit verschiedenen Farben wie angegeben dargestellt (A). Die Änderung der chemischen Verschiebung,  $\Delta\omega$ , zwischen freiem und dT7 gebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB in verdünnter Lösung, wobei die horizontalen Linien das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung (durchgezogene Linie) und das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung plus die Standardabweichung (gestrichelte Linie) zeigen (B). Das Rückrad von BsCspB (PDB ID: 2es2) ist als Cartoon dargestellt (grau). Die Amidprotonen von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB, die durch dT7 stark beeinflusst wurden sind in orange (größer als der Mittelwert) und rot (größer als der Mittelwert plus Standardabweichung) (C). Gemessen wurde bei einer Protein Konzentration von  $c = 105 \mu\text{M}$ , einer Temperatur von  $T = 298 \text{ K}$  und einem Magnetfeld von  $B_0 = 18,8 \text{ T}$ .

Zweidimensionale  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* konnten nicht ausgewertet werden, da wegen präparativen Gründen keine  $^{15}\text{N}$  markierte Probe generiert werden konnte. Somit sind nur Messungen mit der natürlichen Häufigkeit an  $^{15}\text{N}$  von 0,37 % möglich, welche nur eine unzureichende Signalintensität aufweisen. Hier ist dies mit  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC NMR Spektren von freiem und dT7 gebundenen  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* gezeigt (Abbildung 56). Nichtsdestotrotz zeigen sich für die Signale, die sich zuordnen lassen, ähnliche Änderungen der chemischen Verschiebungen wie für  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* im freien und dT7 gebundenen Zustand.

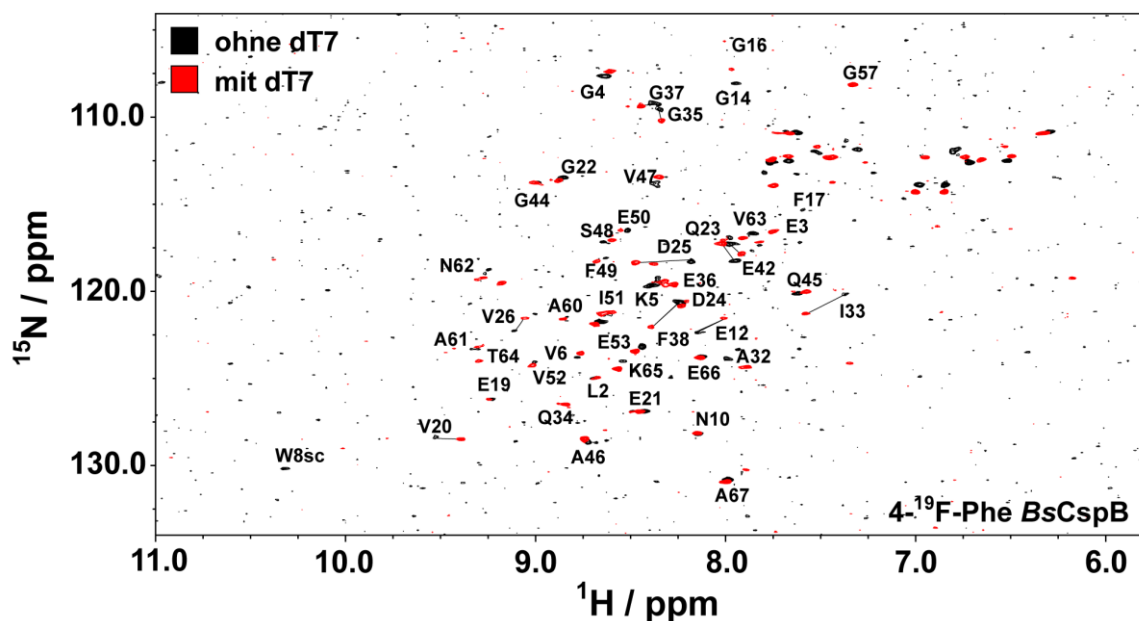


Abbildung 56: Zweidimensionales, heteronukleares  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC NMR Spektren von freiem (schwarz) und dT7 gebundenen (rot)  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* in verdünnter Lösung. Die Messung erfolgte mit natürlicher Häufigkeit an  $^{15}\text{N}$ .

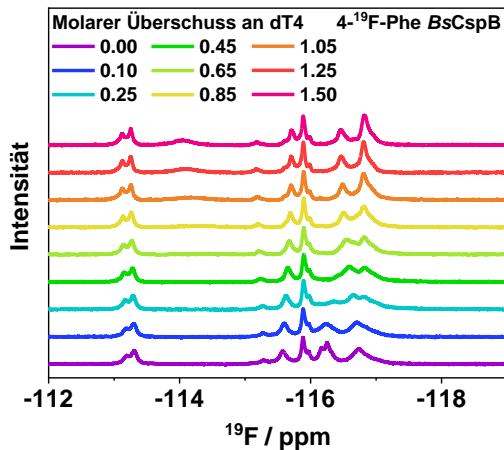
Nachdem mittels  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC NMR Spektren der Einfluss der Zugabe der Oligothymidine auf die gesamte Struktur betrachtet wurde, wurde im nächsten Schritt,  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* sowohl in freien als auch im Oligothymidin gebundenen Zustand aufgenommen. Somit konnte der Einfluss durch die Interaktion lokaler betrachtet werden. Mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde gezeigt, dass die Fluormarkierung keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten hat.

Bei der schrittweisen Zugabe von dT4, dT5, dT6 oder dT7 zu  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* zeigen sich deutliche Veränderungen des Gesamtpatterns der Fluorresonanzsignale (Abbildung 57). Dabei nimmt die Verteilung der Resonanzsignale,  $\omega^{\text{dis}}$ , bei einem 1,5-

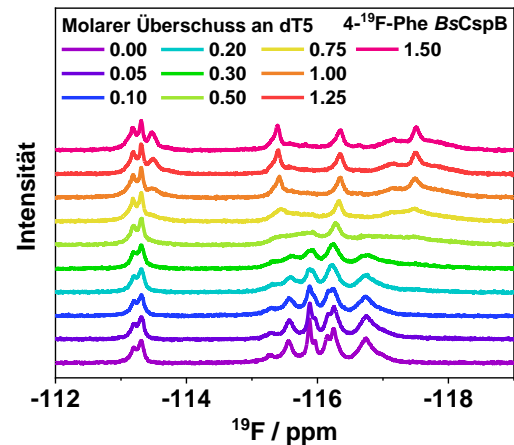
## 5 Ergebnisse und Diskussion

fachen Überschuss an Oligothymidinen von  $\omega^{\text{dis, frei}} = 3.55$  ppm im ungebundenen Zustand bis  $\omega^{\text{dis, dT4}} = 3,71$  ppm (Abbildung 57A),  $\omega^{\text{dis, dT5}} = 4,33$  ppm (Abbildung 57B),  $\omega^{\text{dis, dT6}} = 4,51$  ppm (Abbildung 57C) und  $\omega^{\text{dis, dT7}} = 4,57$  ppm (Abbildung 57D) im gebundenen Zustand zu.

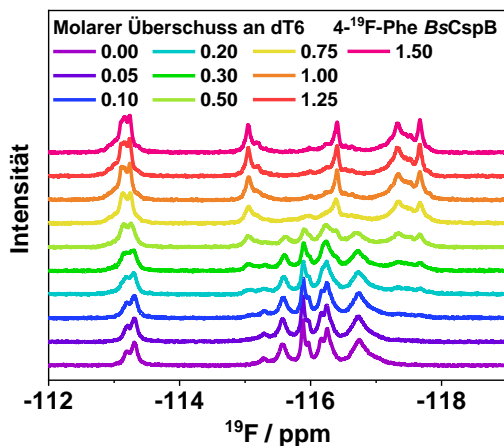
A



B



C



D

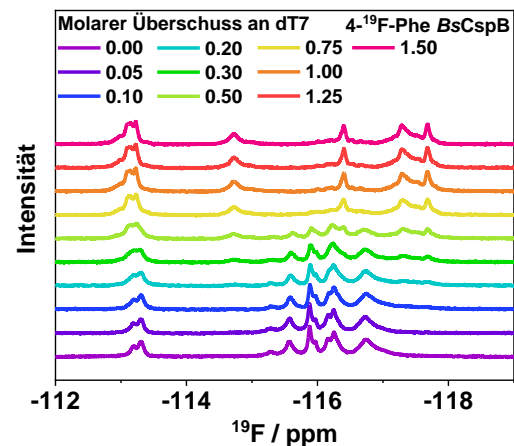
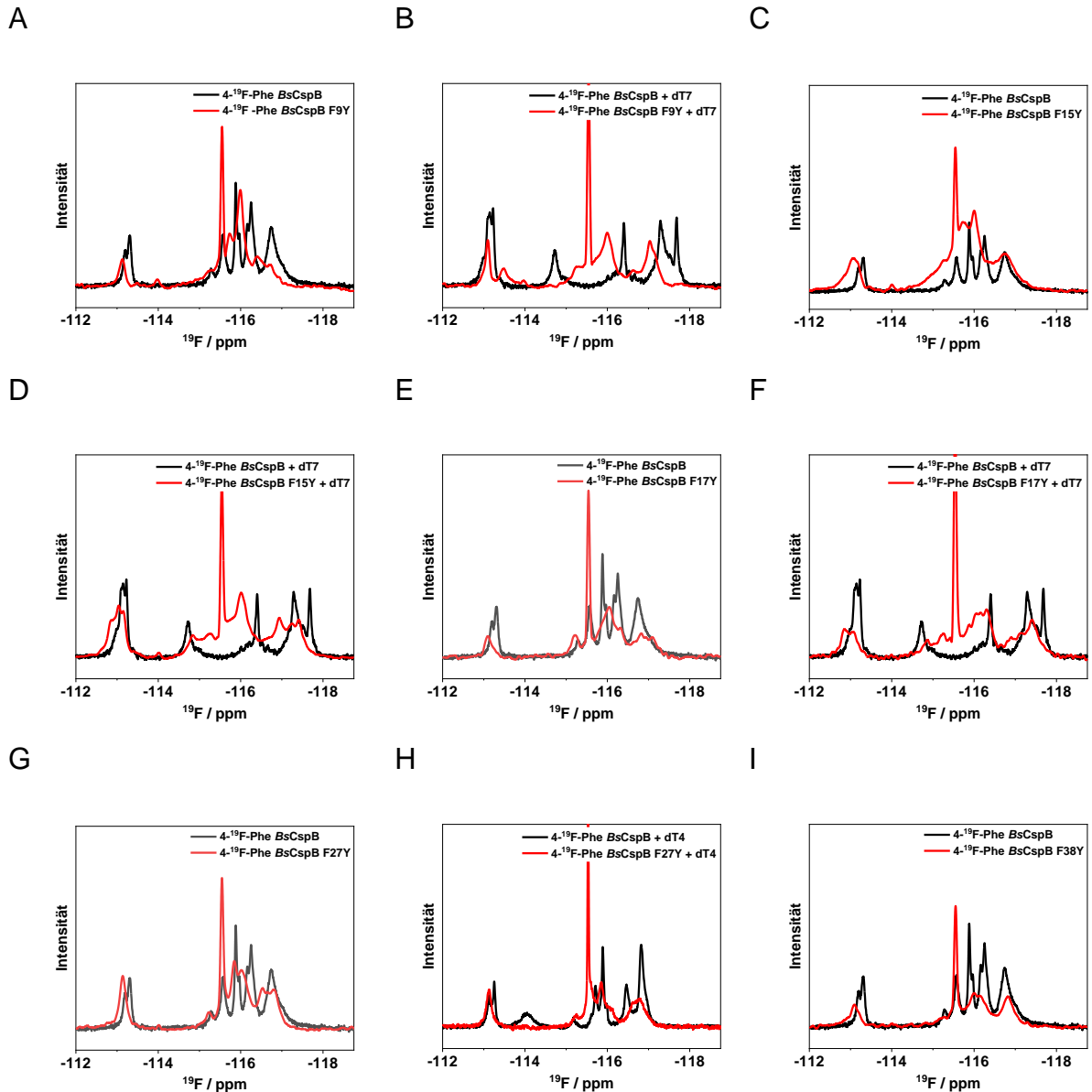


Abbildung 57: Analyse der Interaktion von dT4 (A), dT5 (B), dT6 (C) und dT7 (D) mit 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB mit hochauflöser <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie in verdünnter Lösung. Das ansteigende molare Verhältnis an dT4 zu 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt.

Durch Punktmutationen von sechs der sieben Phenylalanine (F9, F15, F17, F27, F38, F49) konnten die Resonanzsignale zugeordnet werden und einen aminosäurespezifischen Einblick in die Protein-Liganden-Interaktion gewonnen werden (Abbildung 58). Dafür wurden die Phenylalanine in der BsCspB Sequenz einzeln zu Tyrosin mutiert und die unterschiedlichen Proteine mit einer 4-<sup>19</sup>F-Phe Markierung exprimiert. Anschließend wurden <sup>19</sup>F NMR Spektren in Zelllysaten

## 5 Ergebnisse und Diskussion

aufgenommen und die einzelnen mutierten Varianten sowohl im ungebundenen als auch Oligothymidin gebundenen Zustand mit der unmutierten Variante verglichen (Abbildung 58A-L). Somit konnten die Resonanzsignale von F9, F38 und F49 sowohl in gebunden als auch ungebunden Zustand sowie F27 im gebundenen Zustand zugeordnet werden (Abbildung 58M). Die restlichen Phenylalanine (F15, F17, F27 ungebunden und F30) konnten aufgrund von Signalüberlappung nicht genau, sondern nur bestimmten Bereichen zugeordnet werden (Abbildung 58M).



## 5 Ergebnisse und Diskussion

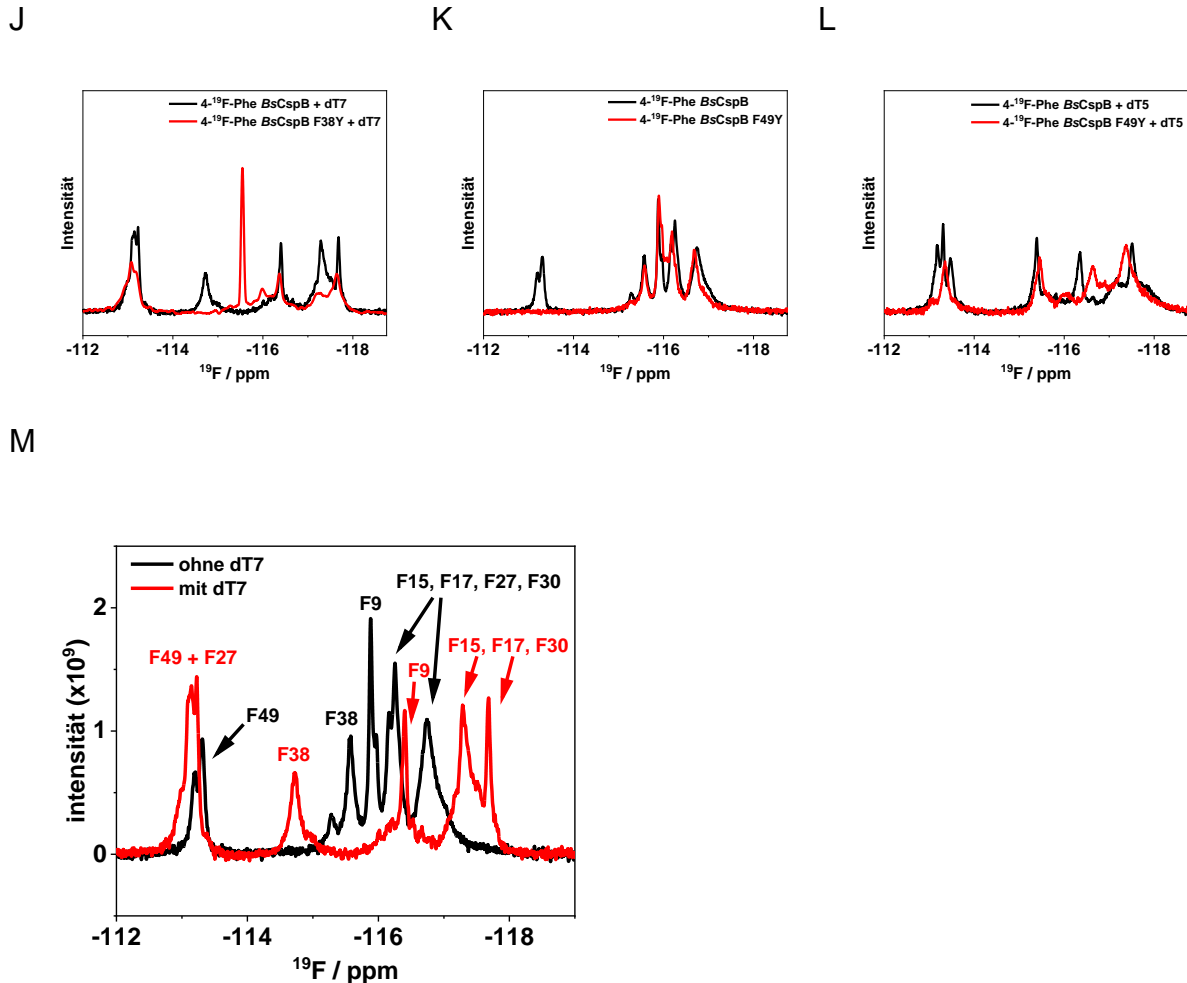
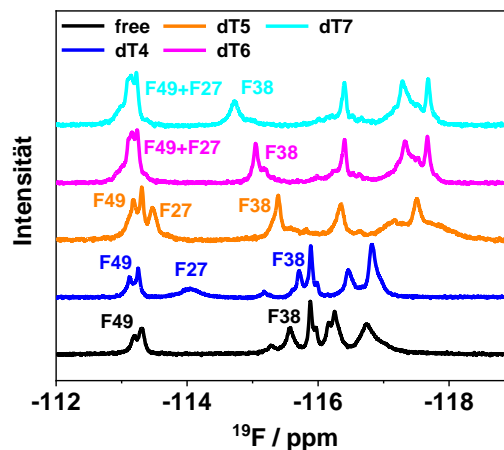


Abbildung 58: Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  (schwarz) und die Mutante  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB F9Y}$  (rot) ungebunden (A) und and dT7 gebunden (B). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  (schwarz) und die Mutante  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB F15Y}$  (rot) ungebunden (C) und and dT7 gebunden (D). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  (schwarz) und die Mutante  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB F17Y}$  (rot) ungebunden (E) und and dT7 gebunden (F). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  (schwarz) und die Mutante  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB F27Y}$  (rot) ungebunden (G) and dT4 gebunden (H). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  (schwarz) und die Mutante  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB F38Y}$  (rot) ungebunden (I) und and dT7 gebunden (J). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  (schwarz) und die Mutante  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB F49Y}$  (rot) ungebunden (K) und and dT5 gebunden (L). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  im freien Zustand (schwarz) und im dT7 gebundenen Zustand (rot) (M). Die Zuordnung ist mit einem F und der Position des Phenylalanins in der Primärsequenz markiert.

Betrachtet man nun die Signale im Einzelnen, zeigt sich, dass F49 unbeeinflusst von der Zugabe der Oligothymidine ist und in einem Resonanzsignal bei  $\omega = -113,2$  ppm resultiert, während sich die Resonanzsignale von F27 und F38 in Abhängigkeit der Länge der Oligothymidine unterschiedlich stark verschieben, wobei sich die Resonanzsignale bei Zugabe von dT4 am wenigsten stark und bei Zugabe von dT7 am stärksten verschieben (Abbildung 59). Dabei zeigt F27 bei der Interaktion von allen

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Oligothymidinen die größte Änderung der chemischen Verschiebung (Abbildung 59). Durch die Zugabe von dT6 und dT7 verschiebt sich das Signal von F27 zu  $\omega = 113,1$  ppm, während die Zugaben von dT5 und dT4 in Verschiebungen zu  $\omega = -113,5$  ppm und  $\omega = -114,0$  ppm resultieren (Abbildung 59). Das Resonanzsignal von F38 ist nach der Zugabe von dT4 im Vergleich zum ungebundenen Zustand um  $\Delta\omega = 0,14$  ppm hochfeldverschoben, während sich das Signal nach Zugabe von dT5, dT6 und dT7 unterschiedlich stark tieffeldverschiebt (Abbildung 59). Am weitesten tieffeldverschoben um  $\Delta\omega = 0,90$  ppm ist das Resonanzsignal von F38 nach der Zugabe von dT7 (Abbildung 59 cyan). Das könnte darin begründet liegen, dass F38 am Rand der Bindungsstelle liegt und je länger das Oligothymidin ist, stärker beeinflusst ist. Des Weiteren ist zu erkennen, dass je länger das Oligothymidin ist, desto größer ist die Verteilung der Resonanzsignale der Phenylalanine. Alles in allem, zeigt sich, dass die chemischen Verschiebungen von F9, F15, F17, F27, F30 und F38 sich in Abhängigkeit von den Oligothymidinen unterschiedlich ändern, somit also diese mit unterschiedlicher Affinität an das Protein binden. Dieses Ergebnis ist konsistent mit denen der Fluoreszenzspektroskopie Messungen und der zweidimensionalen  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  NMR-Spektroskopie Messungen.



**Abbildung 59:** Analyse der Interaktion verschiedener Oligothymidine und 4- $^{19}\text{F}$ -Phe BsCspB mittels hochauflöser  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie. Es sind die eindimensionalen  $^{19}\text{F}$  Spektren des freien (schwarz), dT4 gebundenen (blau), dT5 gebunden (orange), dT6 gebunden (pink) und dT7 gebunden (cyan) Zustands von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe BsCspB in verdünnter Lösung. Die Resonanzsignale der Phenylalanine F27, F38 und F49 sind mit einem F und der Position in der Primärsequenz markiert.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Im nächsten Schritt wurde die Interaktion verschiedener Oligothymidine und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB mittels eindimensionaler <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie verfolgt. Da das <sup>19</sup>F NMR Spektrum von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB nur ein Fluorsignal bei  $\omega = -122,25$  ppm für das Fluoratom an W8 zeigt, ist es einfach möglich die chemische Verschiebung, die Signalhöhe und die Signalbreite exakt zu analysieren. Die schrittweise Zugabe von dT4 resultiert in einer Tieffeldverschiebung des Resonanzsignals von W8 um  $\Delta\omega = 0,26$  ppm, was auf ein schnelles Austauschregime hinweist (Abbildung 60A). Die Analyse von Signalhöhe,  $I$ , und –breite,  $FWHM$ , erfolgt indem man  $I$  beziehungsweise  $FWHM$  an End- und Startpunkt durcheinander teilt, dabei erhält man für die Interaktion mit dT4 ein Verhältnis von  $I^{n=10} / I^{n=0} = 1,4$  und  $FWHM^{n=10} / FWHM^{n=0} = 0,8$  (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Bindungscharakteristika für die Interaktion von dT4, dT6 und dT7 zu 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB erhalten mittels eindimensionaler <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie in verdünnter Lösung und Zelllysät (Konzentrationen in g/l angegeben). Die Proteinkonzentration ist in Tabelle 6 angegeben.**

**$I$ : Signalhöhe,  $n$ : Stoichiometrisches Verhältnis zwischen Oligothymidinen und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB,  $FWHM$ : Linienbreite bei halber Höhe (full width at half maximum),  $A$ :  $FWHM^{ende}/FWHM^{start} * I^{ende}/I^{start}$ ,  $\Delta\omega$ : Unterschied der chemischen Verschiebung zwischen ungebundenem und gebundenem Zustand.**

	$n = 10 / n = 0$	$FWHM^{n=0} / \text{Hz}$	$FWHM^{n=10} / \text{Hz}$	$A$	$\Delta\omega / \text{ppm}$
dT4, 0 g/l	1,4	60	45	1,1	0,26
dT4, 340 g/l	2,4	130	55	1,0	0,25
dT4, 680 g/l	5	240	55	1,1	0,10
	$n = 1.5 / n = 0$	$FWHM^{n=0} / \text{Hz}$	$FWHM^{n=1.5} / \text{Hz}$	$A$	$\Delta\omega / \text{ppm}$
dT6, 0 g/l	0,3	60	160	0,8	0
dT6, 135 g/l	0,5	95	180	0,9	0,05
dT6, 210 g/l	0,5	85	165	1,0	0,04
	$n = 1.4 / n = 0$	$FWHM^{n=0} / \text{Hz}$	$FWHM^{n=1.4} / \text{Hz}$	$A$	$\Delta\omega / \text{ppm}$
dT7, 0 g/l	0,3	60	165	0,8	-0,18
dT7, 130 g/l	0,4	75	165	0,9	-0,28
dT7, 300 g/l	0,6	85	140	1,0	-0,20

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Da die Interaktion von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit dT4 im schnellen Austauschregime stattfindet, kann mittels Gleichung (7) der  $K_D$  Wert bestimmt werden. Dafür wird die Änderung der chemischen Verschiebung gegen die dT4 Konzentration aufgetragen und mit Gleichung (7) angepasst (Abbildung 60B). Dies führt zu einem  $K_D$  Wert von  $K_D = 6,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$ , welcher mit dem übereinstimmt, der durch Fluoreszenzmessungen im Gleichgewicht bestimmt wurde (Tabelle 13). Betrachtet man die Interaktion von dT7 und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mittels eindimensionaler <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie, zeigt sich, dass diese Interaktion im langsamen Austausch stattfindet (Abbildung 60C). Dabei sinkt das Resonanzsignal des ungebundenen Zustands bei  $\omega = -122,25$  ppm, während das Resonanzsignal des gebundenen Zustandes bei  $\omega = -122,44$  ppm ansteigt. Bei einem 0,24-fachen Überschuss an dT7 sind beide Signale im Spektrum zu erkennen (Abbildung 60C). Dass das dT7 gebundene Signal um  $\Delta\omega = 0,19$  ppm hochfeldverschoben ist, macht deutlich, dass strukturelle Unterschiede zwischen dem dT4 und dT7 gebundenen Zuständen existieren und aus diesem Grund die Bindungsaffinitäten unterschiedlich stark sind. Die Analyse der Signalhöhe und –breite resultiert in einem Verhältnis von  $I^{n=10} / I^{n=0} = 0,3$  und  $FWHM^{n=10} / FWHM^{n=0} = 3,1$  (Tabelle 14). Verfolgt man die Zugabe von dT6 zu 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mittels <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie, zeigt sich, dass sowohl der gebundene Zustand als auch der ungebundene Zustand die gleiche chemische Verschiebung von  $\omega = -122,25$  ppm aufweisen (Abbildung 60D). Zusammengefasst, ist das Signal des dT4 gebundenen Zustandes tieffeldverschoben, das Signal des dT6 gebundenen Zustands nicht verschoben und das Signal des dT7 gebundenen Zustands ist hochfeldverschoben. Somit zeigt sich bei der chemischen Verschiebung, wie schon bei den durch Fluoreszenz Spektroskopie bestimmten Bindungsaffinitäten, ein von der Länge der Oligothymidine abhängige Trend. Betrachtet man die Signalhöhe und –breite von Start- und Endpunkt der dT6 Titration erhält man Verhältnisse von  $I^{n=10} / I^{n=0} = 0,3$  und  $FWHM^{n=10} / FWHM^{n=0} = 2,8$ , die vergleichbar mit den Werten sind, die man aus der dT7 Titration erhalten hat (Tabelle 14).

Alles in allem zeigt sich, dass eindimensionale <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie die Möglichkeit bietet, den Bindungsprozess von verschiedenen Oligothymidinen an fluormarkiertes *BsCspB* in verdünnter Lösung darzustellen.

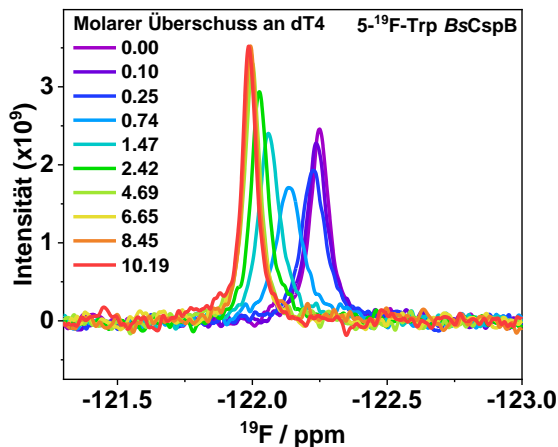
Aufgrund der für die NMR-Spektroskopie nötigen, relativ hohen Konzentrationen und den hohen Bindungsaffinitäten, wobei die  $K_D$  Werte deutlich geringer als die Protein Konzentrationen in den NMR Proben, ist es nicht möglich die  $K_D$  Werte für die

## 5 Ergebnisse und Diskussion

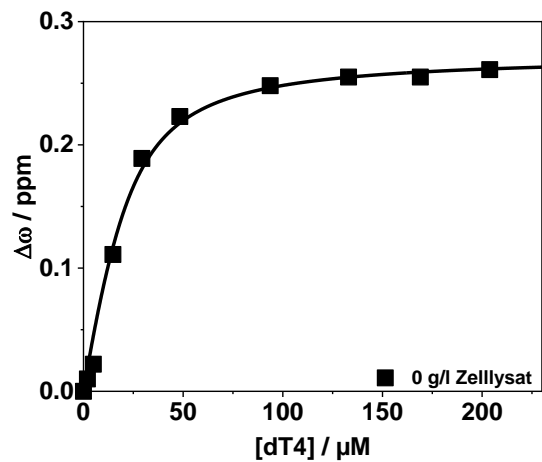
Interaktion von *BsCspB* mit dT5, dT6 und dT7 mittels NMR-Spektroskopie zu bestimmen. Da dT4 eine deutlich schwächere Affinität zu *BsCspB* aufweist, kann man bei geringen Protein Konzentrationen (20  $\mu\text{M}$ ) die Bindungsaffinität quantitativ bestimmen. Somit wurde im Zuge dieser Arbeit die Bindungsaffinität zwischen dT4 und  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* zu einem  $K_D$  Wert von  $K_D = 6,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$  bestimmt. Aufgrund der nötigen geringen Protein Konzentration und Signalüberlappungen, konnte kein  $K_D$  Wert für die Interaktion zwischen dT4 und  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* bestimmt werden.

Der  $K_D$  Wert, der Interaktion zwischen dT4 und  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* stimmt mit dem Wert überein, der mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt wurde und somit auch mit dem Wert von der Interaktion zwischen dT4 und der wt Variante (Tabelle 13).

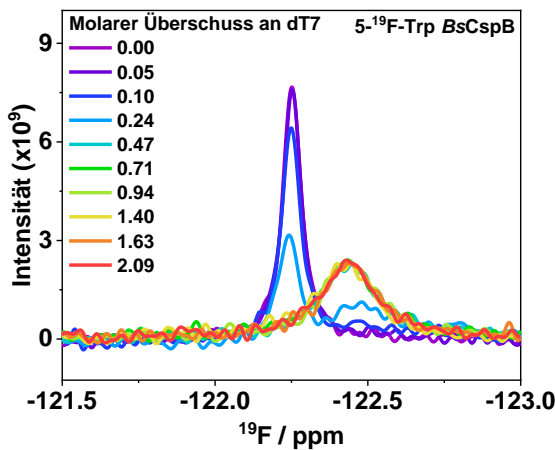
A



B



C



D

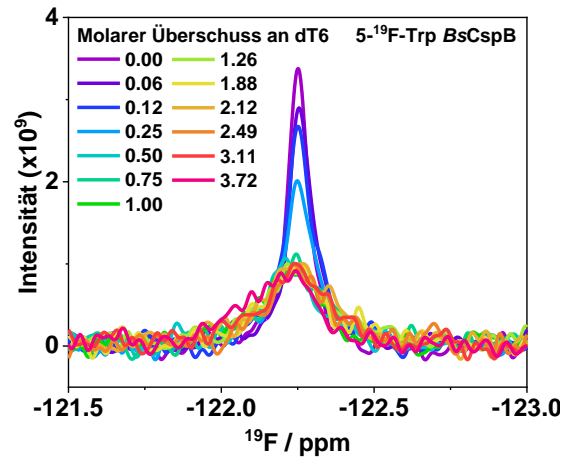


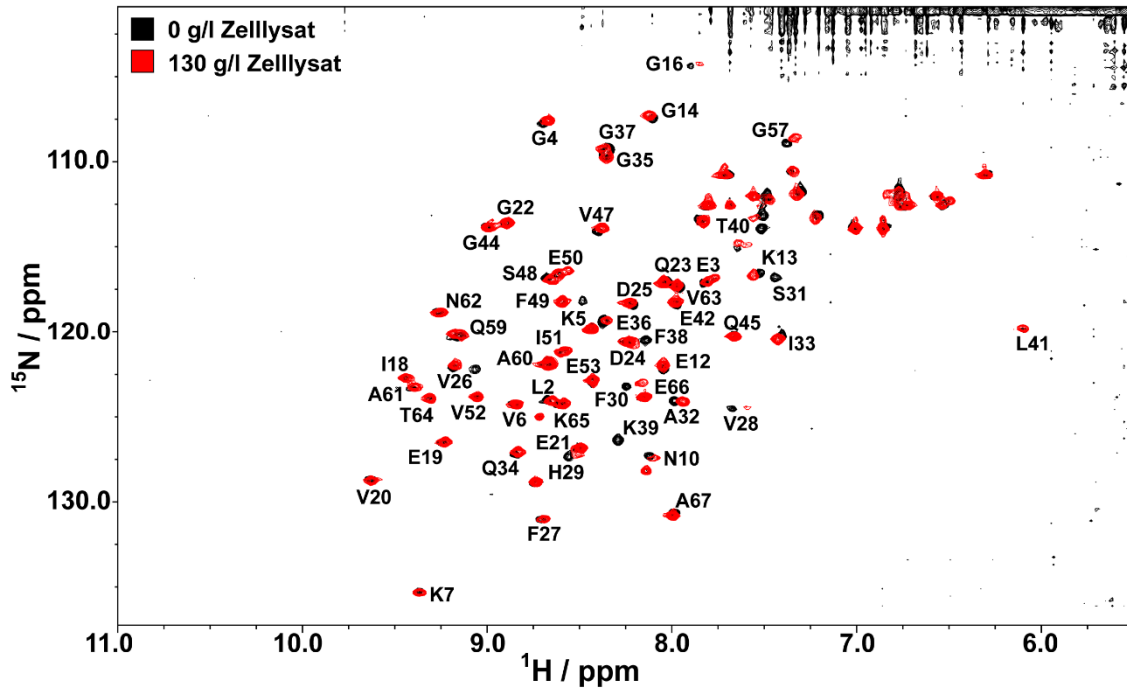
Abbildung 60: Analyse der Interaktion von dT4 und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB mit hochaufgelöster <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie in verdünnter Lösung (A). Das ansteigende molare Verhältnis an dT4 zu 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt. Die Änderung der chemischen Verschiebung des Fluoreszenzsignals,  $\Delta\omega$ , wurde für die schrittweise Zugabe von dT4 in verdünnter Lösung bestimmt (B). Die Datenanpassung erfolgte mittels Gleichung (7) und ist durch die durchgezogene Linie dargestellt und die Bindungsaffinität wurde zu  $K_D = 6,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$  bestimmt. Analyse der Interaktion von dT7 und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB mit hochaufgelöster <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie in verdünnter Lösung (C). Analyse der Interaktion von dT6 und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB mit hochaufgelöster <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie in verdünnter Lösung (D). Das ansteigende molare Verhältnis an dT4 zu 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt.

Nachdem die Interaktion von verschiedenen Oligothymidinen mit fluormarkiertem BsCspB sowohl mit Fluoreszenzspektroskopie als auch ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie in verdünnter Lösung genau untersucht wurde, konnten auch Messungen im Zelllysats durchgeführt werden.

Zunächst wurden zweidimensionale <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC NMR Spektren von freiem und dT7 gebunden 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB sowohl in verdünnter Lösung als auch 130 g/l Zelllysats aufgenommen, um den Einfluss des Zelllysats auf die Gesamtstruktur des Proteins zu untersuchen (Abbildung 61). Dabei wird deutlich, dass sich die chemischen Verschiebungen der <sup>1</sup>H und <sup>15</sup>N Kreuzsignale sowohl im ungebunden als auch gebunden Zustand sich durch Zugabe von 130 g/l Zelllysats nicht stark verändern (Abbildung 61). Das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung zwischen 0 g/l und 130 g/l Zelllysats wurde für den ungebunden Zustand zu  $\Delta\omega = 0,024 \pm 0,020 \text{ ppm}$  und für den dT7 gebunden Zustand zu  $\Delta\omega = 0,015 \pm 0,025 \text{ ppm}$  bestimmt. Somit hat die Änderung der Umgebung zu Zelllysats wenig Einfluss auf die Gesamtstruktur des Proteins und das Bindungsverhalten kann bei den unterschiedlichen Bedingungen verglichen werden.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

A



B

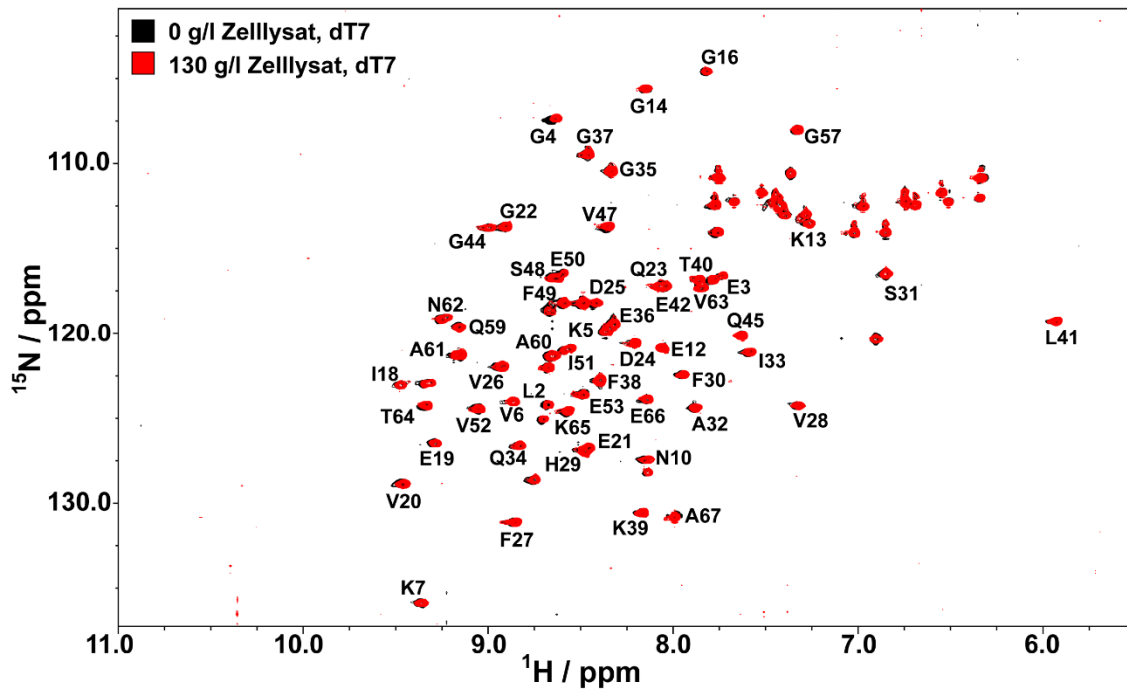


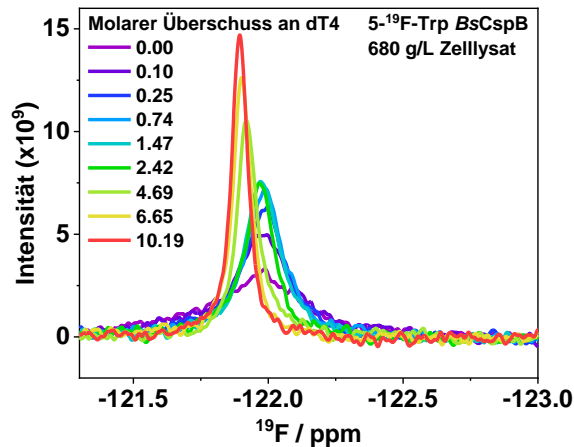
Abbildung 61: Zweidimensionale, heteronukleare  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC Spektren von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* in verdünnter Lösung (schwarz) und in  $c = 130$  g/l Zellysat (rot) in ungebundenen (A) und dT7 gebundenen (B) Zustand.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Betrachtet man nun die Interaktion von Oligothymidinen und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* in Zelllysat mittels eindimensionaler <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie, ist es möglich die Interaktion im Zelllysate im Detail zu betrachten. Die Änderung der chemischen Verschiebung, die Signalhöhe, und Signalbreite sind auch in Zelllysate sehr gut zugänglich, da im <sup>19</sup>F NMR Spektrum nur ein Resonanzsignal, das für das Fluoratom an W8, zu erkennen ist. Dieses Fluorsignal von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* wurde während der schrittweisen Zugabe von dT4 (Abbildung 65A, B), dT6 (Abbildung 65C, D) sowie dT7 (Abbildung 65E, F) bei verschiedenen Zelllysate Konzentrationen (Tabelle 4) betrachtet. Betrachtet man die Interaktion von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit dT4 bei einer Zelllysate Konzentration von 340 g/l (Abbildung 65A) und 640 g/l (Abbildung 65B) zeigt sich eine Änderung des Signalpatterns des Resonanzsignals des 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* im Vergleich zu dem Signalpattern während der dT4 Titration in verdünnter Lösung (Abbildung 60A). Vergleicht man von Start- und Endpunkt der Titration die Signalhöhe und –breite, ergibt sich für das Produkt aus dem Verhältnis der Signalhöhen,  $I^{ende}/I^{start}$ , und aus dem Verhältnis der Linienbreiten,  $FWHM^{ende}/FWHM^{start}$ , für alle drei Bedingungen konstant ungefähr der Wert 1 (A Wert Tabelle 14). Auch für die Experimente die mit dT6 und dT7 durchgeführt wurden, ist das Produkt aus dem Verhältnis der Signalhöhen,  $I^{ende}/I^{start}$ , und aus dem Verhältnis der Linienbreiten,  $FWHM^{ende}/FWHM^{start}$ , sowohl in verdünnter Lösung als auch in Zelllysate konstant bei einem Wert von 1 (A Wert Tabelle 14). Dies zeigt deutlich die Stabilität und Vertrauenswürdigkeit der hier aufgenommenen Daten. Die individuelle Betrachtung der Werte für das Verhältnis der Signalhöhen,  $I^{ende}/I^{start}$ , und das Verhältnis der Linienbreiten,  $FWHM^{ende}/FWHM^{start}$ , zeigt, dass diese sich für alle drei Bedingungen systematisch unterscheiden. Dabei sinkt die Linienbreite, während die Signalhöhe monoton steigt. Die Linienbreite des Fluorresonanzsignals des ungebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* nimmt mit steigender Zelllysate Konzentration zu ( $FWHM^{0\text{ g/l}} = 59\text{ Hz}$ ,  $FWHM^{340\text{ g/l}} = 128\text{ Hz}$ ,  $FWHM^{680\text{ g/l}} = 242\text{ Hz}$ ), was auf die steigende Lösungsmittelviskosität zurückzuführen ist. Im Gegenteil dazu, verbleibt die Linienbreite des Fluorresonanzsignals von dT4 gebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* konstant ( $FWHM^{0\text{ g/l}} = 45\text{ Hz}$ ,  $FWHM^{340\text{ g/l}} = 54\text{ Hz}$ ,  $FWHM^{680\text{ g/l}} = 53\text{ Hz}$ ), was auf eine hochdynamische Ligand-Protein Interaktion sogar im hochkonzentrierten Zelllysate hinweist. Des Weiteren sinkt der Unterschied der chemischen Verschiebung zwischen dem ungebunden und dem dT4 gebundenen Zustands von  $\Delta\omega = 0,26\text{ ppm}$  (Abbildung 60A) in verdünnter Lösung bis zu  $\Delta\omega = 0,10\text{ ppm}$  bei einer Zelllysate Konzentration von

## 5 Ergebnisse und Diskussion

$c = 680$  g/l (Abbildung 62). Aufgrund dieser Abnahme des  $\Delta\omega$ -Werts und die starke Änderung der Linienbreite während der dT4 Zugabe zu  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB bei einer Zelllysats Konzentration von  $c = 680$  g/l verschiebt sich der Bindungsprozess vom schnellen zu einem langsamen bis intermediären Austausch. Deswegen ist es nicht möglich die Bindungsaffinität unter diesen Bedingungen zu bestimmen.



**Abbildung 62:** Analyse der Interaktion von dT4 und  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB mit hochaufgelöster  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie bei einer Zelllysats Konzentration von  $c = 680$  g/l. Das ansteigende molare Verhältnis an dT4 zu  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt.

Außerdem ist es aufgrund der hohen Zelllysats Konzentration von  $c = 680$  g/l möglich, dass andere, im Zelllysats enthaltene Moleküle in Abwesenheit von Oligothymidinen die Bindestelle zum Teil besetzen und somit das Resonanzsignal des  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB in Richtung des gebundenen Zustandes verschieben (Abbildung 63A). Nichtsdestotrotz zeigt sich, dass eine Zugabe von dT4 im Überschuss zu  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB unter allen drei Bedingungen zu vergleichbaren Fluoreszenzsignalen führt (Abbildung 63B). Dies deutet darauf hin, dass die Bindestelle von  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB auch in komplexen Umgebungen vollständig vom Liganden besetzt wird, auch wenn die Bindungsaffinität im mikromolaren Bereich liegt. Dieselben Beobachtungen konnten auch für die dT6 und dT7 gebundenen Zustände gemacht werden, die eine Bindungsaffinität zu  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB im nanomolaren Bereich zeigen (Abbildung 63C, D).

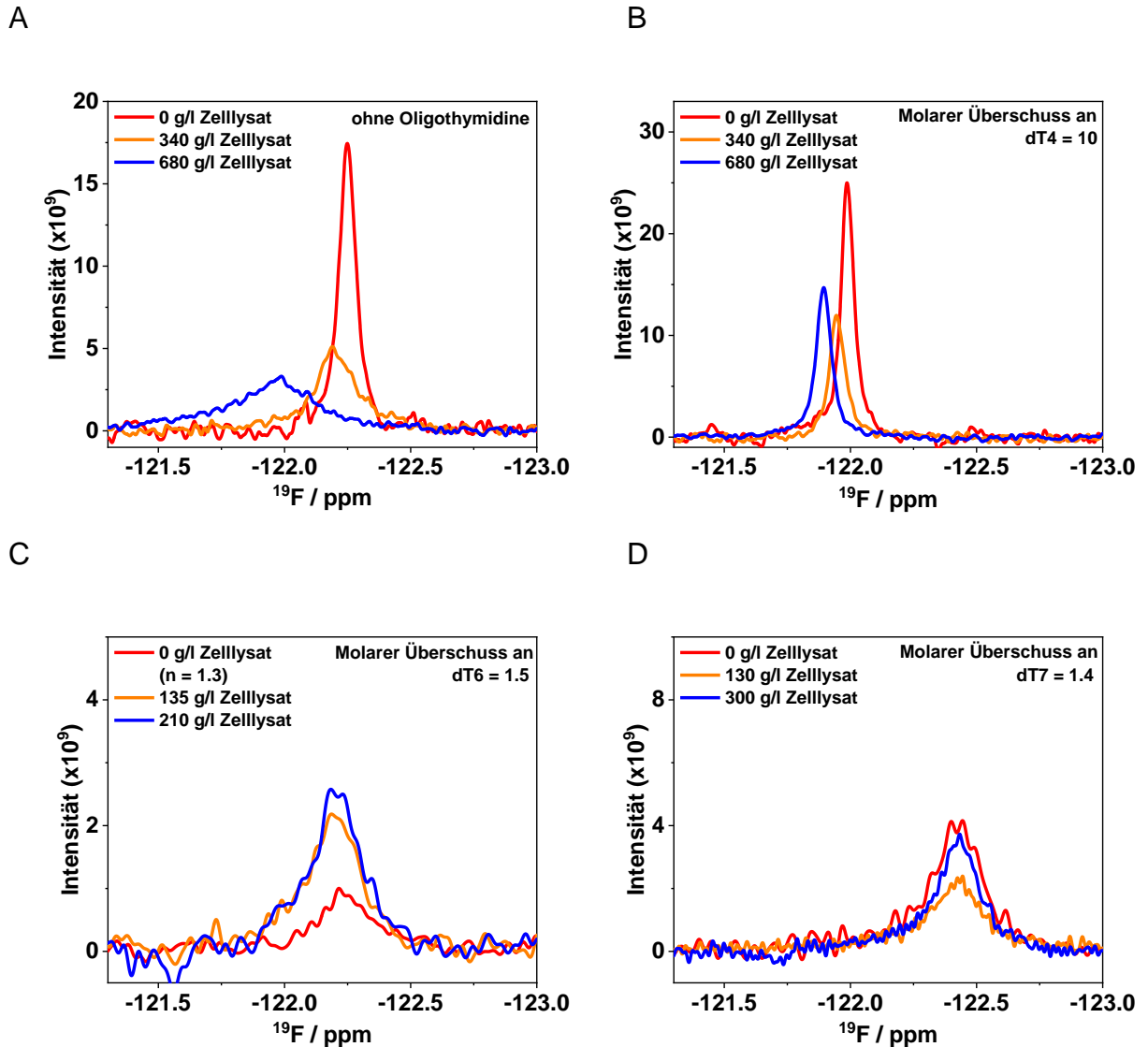


Abbildung 63: Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen.  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in verdünnter Lösung (rot),  $c = 340$  g/l Zelllysatz (orange) und  $c = 680$  g/l Zelllysatz (blau) ohne zugegebene Oligothymidine (A). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen.  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in verdünnter Lösung (rot),  $c = 340$  g/l Zelllysatz (orange) und  $c = 680$  g/l Zelllysatz (blau) bei 10fachem Überschuss an dT4 (B). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen.  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in verdünnter Lösung (rot),  $c = 135$  g/l Zelllysatz (orange) und  $c = 210$  g/l Zelllysatz (blau) bei 1,3 und 1,5fachem Überschuss an dT6 (C). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen.  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in verdünnter Lösung (rot),  $c = 130$  g/l Zelllysatz (orange) und  $c = 300$  g/l Zelllysatz (blau) bei 1,4fachem Überschuss an dT4 (D).

Bei einer Zelllysatz Konzentration von  $c = 340$  g/l befindet sich der Bindungsprozess in einem schnellen Austausch und die quantitative Bestimmung der Bindungsaffinität kann erfolgen indem die Änderung der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit der dT4 Konzentration aufgetragen wird und mit Gleichung (7) angepasst wird (Abbildung 64). Somit konnte der  $K_D$  Wert zu  $K_D = 6,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$  bestimmt werden (Abbildung 64B).

Dieser Wert stimmt mit dem Wert überein, der für die Interaktion von dT4 mit 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB in verdünnter Lösung bestimmt wurde (Abbildung 60B).

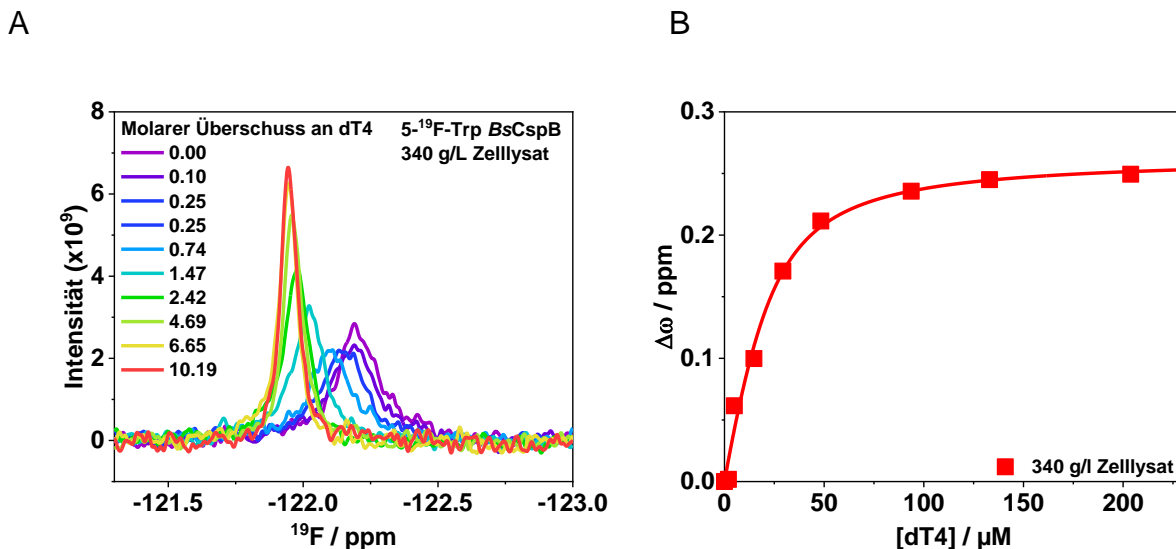


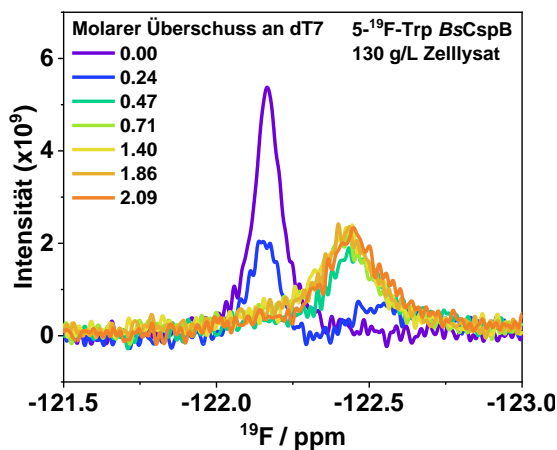
Abbildung 64: Analyse der Interaktion von dT4 und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB mit hochaufgelöster <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie bei einer Zelllysats Konzentration von  $c = 340$  g/l (A). Das ansteigende molare Verhältnis an dT4 zu 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt. Die Änderung der chemischen Verschiebung des Fluorresonanzsignals,  $\Delta\omega$ , wurde für die schrittweise Zugabe von dT4 in  $c = 340$  g/l Zelllysats bestimmt (B). Die Datenanpassung erfolgte mittels Gleichung (7) und ist durch die durchgezogene Linie dargestellt und die Bindungsaffinität wurde zu  $K_D = 6,8 \pm 1,1$   $\mu\text{M}$  bestimmt.

Die Interaktion von dT7 und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB in Zelllysats Konzentrationen von  $c = 130$  g/l und  $c = 300$  g/l zeigte eine Zunahme in der Signalhöhe sowie eine Abnahme der Linienbreite mit steigender Zelllysats Konzentration (Tabelle 14) für den ungebundenen Zustand (Abbildung 65A, B). Die Linienbreite des Resonanzsignals des dT7 gebundenen Zustands ist für alle drei Bedingungen nahezu konstant ( $FWHM^0 \text{ g/l} = 152$  Hz,  $FWHM^{130} \text{ g/l} = 160$  Hz,  $FWHM^{300} \text{ g/l} = 140$  Hz), was vergleichbar mit den Beobachtungen ist, die für den dT4 gebundenen Zustand gemacht wurden (Abbildung 65A, B, (Abbildung 60C)). Die quantitative Bestimmung der Bindungsaffinität ist für die Interaktion von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB mit dT7 nicht möglich, da zum einen der Bindungsprozess in einem langsamen bis intermediären Austauschregime stattfinden und zum andern, da die Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich liegt und die für die NMR-Spektroskopie nötige Konzentration weit darüber im mikromolaren Bereich liegt.

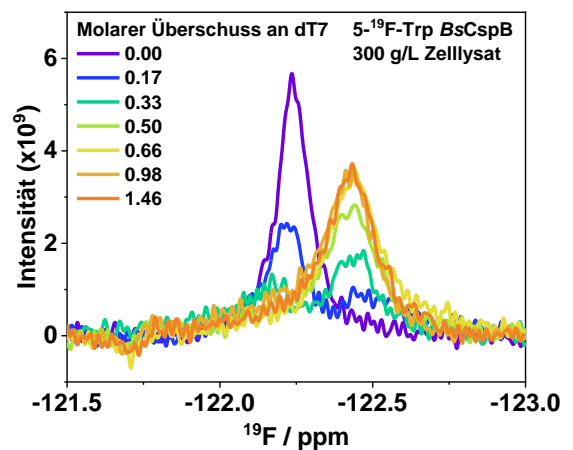
## 5 Ergebnisse und Diskussion

Abschließend wurde die Interaktion von dT6 und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* in Zelllysat Konzentrationen von  $c = 135$  g/l und  $c = 210$  g/l (Abbildung 65C, D) untersucht und mit der Titration in verdünnter Lösung verglichen (Abbildung 60D). Die gleiche chemische Verschiebung des dT6 gebunden und ungebunden Zustandes, die in verdünnter Lösung (Abbildung 60D) beobachtet wurde, zeigt sich auch für Zelllysate Konzentrationen von  $c = 135$  g/l und  $c = 210$  g/l (Abbildung 65C, D). Wie auch für die Interaktion von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit dT4 und dT7 bleibt die Linienbreite für das Resonanzsignal des dT6 gebundenen Zustandes konstant unter allen drei Bedingungen ( $FWHM^{0\text{ g/l}} = 160$  Hz,  $FWHM^{35\text{ g/l}} = 180$  Hz,  $FWHM^{210\text{ g/l}} = 160$  Hz) (Abbildung 60D, Abbildung 65C, D). Die quantitative Bestimmung der Bindungsaffinität ist auch für die Interaktion von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit dT6 nicht möglich, da, wie für die Interaktion mit dT7, die Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich liegt und des Weiteren die Signale von gebunden und ungebundenem Zustand von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* überlappen.

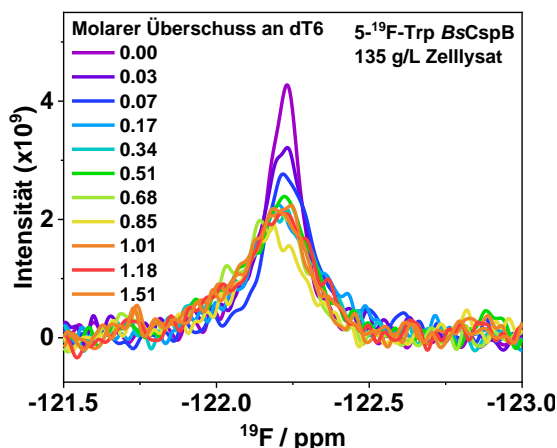
A



B



C



D

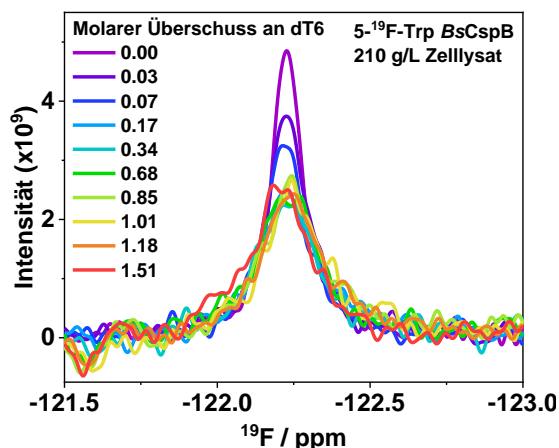


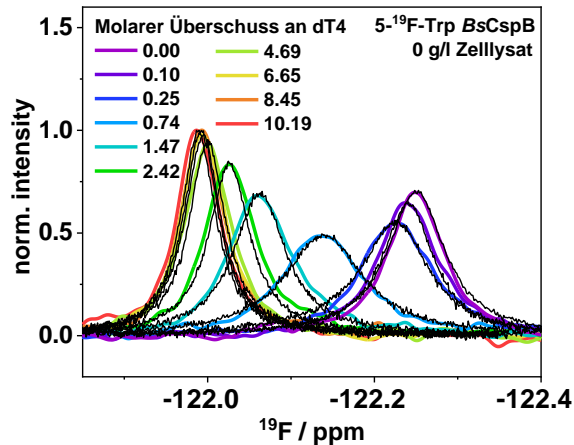
Abbildung 65: Analyse der Interaktion von dT7 und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB mit hochaufgelöster <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie bei verschiedenen Konzentrationen an Zellysat:  $c = 130$  g/l (A) and  $c = 300$  g/l (B). Analyse der Interaktion von dT6 und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB mit hochaufgelöster <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie bei verschiedenen Konzentrationen an Zellysat:  $c = 135$  g/l (C) and  $c = 210$  g/l (D). Das ansteigende molare Verhältnis an dT7 bzw. dT6 zu 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt.

Abschließend wurde eine Linienformanalyse [117] mittels einer dritten, unabhängigen Methode durchgeführt, um die Bindungsaffinität zwischen dT4 und fluormarkiertem BsCspB bei unterschiedlichen Bedingungen zu bestimmen. Dafür wurden die <sup>19</sup>F NMR Daten der Titrations mit dT4 und 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB, die in verdünnter Lösung (Abbildung 60A) und bei  $c = 340$  g/l Zellysat (Abbildung 64) durchgeführt wurden, mit NMRLineGuru ausgewertet [143]. Diese Bedingungen wurden gewählt, da die Analyse bei einem schnellen Austausch zwischen freiem und Liganden gebundenen Zustand die akkuratesten Ergebnisse liefert [161]. Die auf Grundlage der gemessenen Daten, mittels NMRLineGuru simulierten Daten zeigen eine perfekte Übereinstimmung mit den gemessenen Daten (Abbildung 66) und die Bindungsaffinitäten konnten zu  $K_D = 5,7 \mu\text{M}$  in verdünnter Lösung und  $K_D = 5,6 \mu\text{M}$  für eine Zellysat Konzentration von  $c = 340$  g/l bestimmt werden, wenn man von einem Zweizustandsmodell ausgeht. Somit zeigt diese dritte, unabhängige Methode die gleichen Ergebnisse für die Bindungsaffinität, die in dieser Arbeit mittels Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht (Abbildung 52, Tabelle 13) und der Auswertung der Änderung der chemischen Verschiebung (Abbildung 60, Abbildung 64) bestimmt wurden. Des Weiteren erhält man aus der Linienformanalyse der <sup>19</sup>F NMR Daten die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation  $k_{\text{off}}$ . Diese wurde zu  $k_{\text{off}} = 1170 \text{ s}^{-1}$  in verdünnter Lösung und zu  $k_{\text{off}} = 1270 \text{ s}^{-1}$  in einer Zellysat Konzentration von

## 5 Ergebnisse und Diskussion

$c = 340$  g/l bestimmt. Aufgrund des unveränderten  $k_{\text{off}}$  Werts und des  $K_{\text{D}}$  Werts kann man auch von unveränderten Werten für die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation  $k_{\text{on}}$  ausgehen, da sich  $K_{\text{D}}$  aus  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  ergibt.

A



B

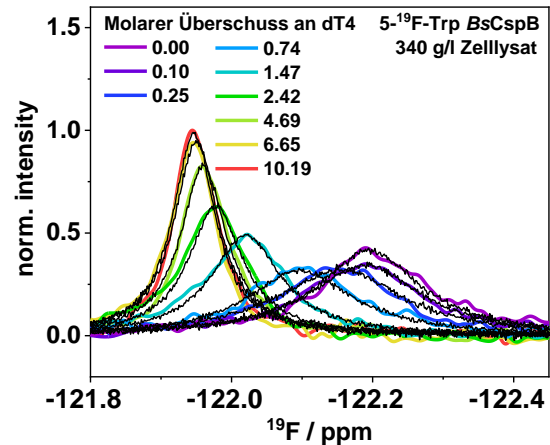
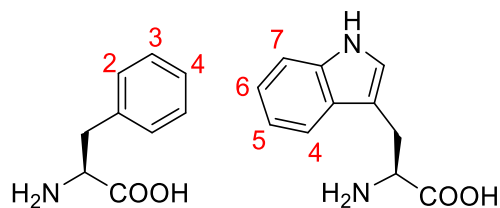


Abbildung 66: Vergleich der simulierten und experimentell erhaltenen  $^{19}\text{F}$  NMR Daten der Interaktion zwischen dT4 und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB in verdünnter Lösung (A) und bei einer Zellysat Konzentration von  $c = 340$  g/l (B). Durch die Analyse mittels NMRLineGuru [143] wurden in verdünnter Lösung ein  $K_{\text{D}}$  Wert von  $K_{\text{D}} = 5,7 \mu\text{M}$  und ein  $k_{\text{off}}$  Wert von  $k_{\text{off}} = 1170 \text{ s}^{-1}$  (A) und bei  $c = 340$  g/l Zellysat ein  $K_{\text{D}}$  Wert von  $K_{\text{D}} = 5,6 \mu\text{M}$  und ein  $k_{\text{off}}$  Wert von  $k_{\text{off}} = 1270 \text{ s}^{-1}$  (B) erhalten. Die  $^{19}\text{F}$  NMR Daten sind in Farbe gezeigt, während die Simulationen in schwarz dargestellt sind.

Zusammengefasst kann man aus den Messungen schließen, dass durch Zugabe von Zellysat keine quantitativ messbaren Unterschiede bei der Bindungsaffinität von BsCspB zu Oligothymidinen auftreten.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden verwendet, fluormarkiertes Phenylalanin oder Tryptophan in *BsCspB* einzubauen und sieben verschiedene fluormarkierte Varianten zu erhalten. Dafür wurden sieben verschiedenen fluormarkierte Varianten von Tryptophan und Phenylalanin verwendet (Abbildung 67). Da Tryptophan nur einmal (W8) in *BsCspB* vorhanden ist, trägt in diesem Fall *BsCspB* nur eine Fluormarkierung, während Phenylalanin siebenmal (F9, F15, F17, F27, F30, F38, F49) vorkommt und *BsCspB* somit sieben Fluorsonden trägt.



**Abbildung 67: Verschiedene Markierungspositionen für Fluor an L-Phenylalanin (links) und L-Tryptophan (rechts).**

Im Rahmen dieser Arbeit erwiesen sich zwei der drei verwendeten Methoden als erfolgreich. Mittels der ersten Methode gelang es 4-<sup>19</sup>F-Trp, 5-<sup>19</sup>F-Trp oder 6-<sup>19</sup>F-Trp zu einem hohen Prozentsatz zwischen 55 % und 87 % in das *BsCspB* einzubauen, indem zu dem, für die Herstellung von markiertem *BsCspB* bekannten, Expressionssystem die fluormarkierten Aminosäuren zugegeben wurden. Diese Methode wurde nicht für die Phenylalanin Varianten verwendet, da ein teilweiser Einbau von fluormarkierten Aminosäuren zu einer sehr hohen Inhomogenität der Probe führen würde und dies weitere Messungen am Protein erschweren würden.

Aus diesem Grund wurde ein Expressionssystem entwickelt, welches es ermöglicht fluormarkiertes *BsCspB* in einem hohen Reinheitsgrad herzustellen. Der hohe Reinheitsgrad wurde vor allem mittels NMR spektroskopische Messungen gezeigt. Dabei enthielten die aufgenommenen Spektren nur ein Signaldatenset, was darauf hindeutet, dass die Proben homogen sind. Außerdem wurden Röntgenkristallstrukturen von 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* generiert, welche nur eine, vollständig markierte Variante der Proteine zeigten. Für das neue Expressionssystem wurden die Tryptophan- oder Phenylalanin-auxotrophe Bakterienstämme CAG 18455 7371 oder DSMZ 12779 verwendet, was dazu führte,

dass das System nicht in der Lage war Tryptophan oder Phenylalanin selber herzustellen und somit die zugegeben, fluormarkierten Aminosäuren einbaute. Die Herausforderung bei der Entwicklung dieses Expressionssystems war es neben dem Finden der optimalen Bedingungen, dass beide auxotrophen Stämme keine genomische Verankerung einer T7-Expressionskassette aufweisen, welche für ein T7-Expressionssystem nötig ist. Aus diesem Grund musste zusätzlich zu dem *BsCspB* Sequenz tragenden Plasmid ein weiteres Plasmid eingeführt werden, welches die Sequenz der T7 Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors trägt. Dieser pAR1219 Vektor trägt, wie auch der pET11a Vektor, welcher die *BsCspB* Sequenz codiert, eine Carbenicillin Resistenz. Deswegen musste die Nukleotid Sequenz von *BsCspB* in einen pET24a Vektor kloniert werden, der eine Kanamycin Resistenz trägt. Beide Plasmide wurden in die auxotrophen Bakterienstämme transformiert und somit wurden zwei System erhalten, die es ermöglichen drei verschiedene <sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* Varianten sowie vier verschiedene <sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* Varianten zu erhalten.

Besonderheiten dieser Methode sind die Möglichkeiten durch geringe Variationen des Systems zum einen andere fluormarkierte Aminosäuren einzubauen und zum anderen auch andere Proteine zu markieren. Somit wäre es möglich unter Verwendung anderer auxotropher Bakterienstämme zum Beispiel fluormarkiertes Leucin und Isoleucin in *BsCspB* einzubauen und das Verhalten des Proteins mittels anderer Sonden zu untersuchen. Außerdem könnte das Expressionssystem auf viele andere Proteine übertragen werden, die sich in *E. coli* Zellen exprimieren lassen. Des Weiteren wäre es möglich über die erstgenannte Methode durch Zugabe von fluormarkierten Aminosäuren zu dem herkömmlichen Expressionssystem viele unterschiedliche, fluormarkierte Aminosäure einzubauen und somit eine Strukturaufklärung über die <sup>19</sup>F Dimension mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie durchzuführen. Dabei wäre die resultierende Probe nicht homogen, eine Zuordnung wäre aber dennoch möglich.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der Fluormarkierung auf Struktur, Stabilität und Faltungskinetik untersucht. Dafür wurden unterschiedliche Messungen an allen sieben verschiedenen, fluormarkierten *BsCspB* Varianten durchgeführt und mit den Werten der wt Variante verglichen. Um die Stabilität der Proteine zu bestimmen, wurden zwei unabhängige Methoden verwendet. Somit wurden systematische Fehler ausgeschlossen. Zum einen wurde die freie Energie zwischen gefalteten und ungefalteten Zustand,  $\Delta G^0$ , als Maß der Stabilität mittels Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht bestimmt. Dafür wurden die Proteine mit

Urea chemisch denaturiert und durch Anpassung der Denaturierungskurve wurden Werte für die freie Energie zwischen gefalteten und ungefalteten Zustand,  $\Delta G^0$ , zwischen  $\Delta G^0 = 9,0 \pm 0,5$  kJ/mol für 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und  $\Delta G^0 = 12,7 \pm 1,1$  kJ/mol für 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* erhalten. Die freie Energie zwischen gefalteten und ungefalteten Zustand,  $\Delta G^0$ , für die wt Variante liegt hierbei in derselben Größenordnung bei  $\Delta G^0 = 11,1 \pm 0,5$  kJ/mol. Als zweite Methode zur Bestimmung der Stabilität der Proteine wurde eindimensionale <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopie verwendet. Hierfür wurden die verschiedenen, fluormarkierten Varianten des *BsCspB* thermisch denaturiert und als Maß der Stabilität der Übergangstemperaturmittelpunkt,  $T_M$ , bestimmt. Dabei wurde der Übergangstemperaturmittelpunkt,  $T_M$ , auf Werte zwischen  $T_M = 315,6 \pm 0,1$  K für 2-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* und  $T_M = 320,8 \pm 0,1$  K für 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* bestimmt. Der Übergangstemperaturmittelpunkt,  $T_M$ , der wt Variante wurde zu  $T_M = 316,8 \pm 0,2$  K bestimmt und liegt somit im selben Bereich, wie die fluormarkierten Varianten des *BsCspBs*. Somit zeigt sich, dass die Einführung von fluormarkiertem Tryptophan oder Phenylalanin keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilität von *BsCspB* hat und im Vergleich zur wt Variante nur geringe Änderungen in der freien Energie zwischen gefalteten und ungefalteten Zustand,  $\Delta G^0$ , und dem Übergangstemperaturmittelpunkt,  $T_M$ , auftreten.

Neben den Messungen der thermodynamischen Stabilität der Proteine wurden auch kinetische Messungen durchgeführt und mit den Werten der wt Variante verglichen. Dafür wurden Stopped Flow Fluoreszenz Messungen mit allen sieben, fluormarkierten Varianten des *BsCspB* durchgeführt und mit der wt Variante verglichen. Dabei wurden mittels Chevron Analyse die Geschwindigkeitskonstanten der Faltung,  $k_f$ , und der Entfaltung,  $k_u$ , in Abwesenheit von Denaturierungsmitteln bestimmt werden. Die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für die Entfaltung,  $k_u$ , für alle fluormarkierten Varianten des *BsCspB* liegen in einem Bereich zwischen  $31 \text{ s}^{-1} \leq k_u \leq 57 \text{ s}^{-1}$  und weichen nicht stark von der wt Variante ( $k_u = 40 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ ) ab, während die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung,  $k_f$ , in einem Bereich zwischen  $770 \text{ s}^{-1} \leq k_f \leq 2000 \text{ s}^{-1}$  liegen. Die Geschwindigkeitskonstante der Faltung,  $k_f$ , für die wt Variante liegt bei  $k_f = 1050 \pm 1 \text{ s}^{-1}$  und somit in dem Bereich, den die fluormarkierten Varianten abdecken. Aus diesen Messungen wird deutlich, dass die Fluormarkierung auch keinen signifikanten Einfluss auf die Faltungskinetik des Proteins zeigt.

Außerdem wurden Röntgenkristallstrukturen von 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* generiert, um mögliche Änderungen in der Struktur des Proteins festzustellen.

Bei dem Vergleich mit der literaturbekannten Struktur des wt *BsCspB* (PDB ID: 1NMG) wird deutlich, dass die Fluormarkierung auch keinen Einfluss auf die Struktur des Proteins hat.

Somit konnte in diesem Kapitel der Arbeit gezeigt werden, dass die Einführung von Fluoratomen an den aromatischen Aminosäuren keinen signifikanten Einfluss auf das Cold Shock Protein B aus *Bacillus subtilis* hat. In dem Fall, dass man das im ersten Kapitel entwickelte Expressionssystem auf andere Systeme übertragen wollte, müssten auch dafür Messungen durchgeführt werden, um den Einfluss der Fluormarkierung zu überprüfen.

Abschließend wurde in dieser Arbeit der Einfluss von einer Umgebung mit hoher Konzentration an Makromolekülen in Form von Zelllysate zum einen auf die Stabilität von *BsCspB* und zum anderen auf die Interaktion mit Oligothymidinen mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie untersucht. Die Verwendung von Zelllysate als Crowding Reagenz hat hierbei den Vorteil, dass, im Gegensatz zu synthetischen Polymeren oder Proteinen, die Umgebung des zu untersuchenden Proteins inhomogen und ähnlich dem Inneren einer Zelle ist.

Die Stabilität von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* und 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* in verschiedenen Konzentrationen an Zelllysate wurden mittels eindimensionaler  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie bestimmt. Dafür wurden die Proteine mit Urea chemisch denaturiert und durch Anpassung der Denaturierungskurve konnten die Stabilitäten in Form der freien Energie zwischen gefalteten und ungefalteten Zustand,  $\Delta G^0$ , bei unterschiedlichen Zelllysate Konzentrationen bestimmt werden. Dabei zeigt sich, dass bei Verwendung einer Zelllysate Konzentration von  $c = 450 \text{ g/l}$  die freie Energie zwischen gefalteten und ungefalteten Zustand,  $\Delta G^0$ , um  $\Delta\Delta G^0 = 2,6 \text{ kJ/mol}$  bei 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* und bis zu  $\Delta\Delta G^0 = 2,6 \text{ kJ/mol}$  bei 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* ansteigt. Bei geringeren Zelllysate Konzentrationen ist ebenfalls zwar ein geringerer, aber dennoch signifikanter Anstieg in der Stabilität zu erkennen. Somit zeigt sich deutlich, dass mit steigender Konzentration an Zelllysate die Stabilität zunimmt.

Betrachtet man die Bindungsaffinität von fluormarkiertem *BsCspB* in Zelllysate zu den Oligothymidinen dT4, dT5, dT6 und dT7, musste zunächst der Einfluss der Fluormarkierung auf das Bindungsverhalten untersucht werden. Dafür wurde mittels Fluoreszenz im Gleichgewicht die Bindungsaffinitäten,  $K_D$ , von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* und 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* zu den verschiedenen Oligothymidinen bestimmt. Dabei wurde

deutlich, dass die Einführung von Fluoratomen in das Protein den  $K_D$  Wert im Vergleich zu der wt Variante zwar beeinflusst, die Abstufung der Bindungsaffinitäten zwischen den einzelnen Oligothymidinen aber gleichbleibt. Die Bindung zu dT7 weist somit die höchste Bindungsaffinität im nM Bereich auf, während die Bindung zu dT4 die schwächste Bindungsaffinität im  $\mu\text{M}$  Bereich zeigt. Die Messungen im Zelllysate wurden mittels  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie durchgeführt. Dabei konnten aufgrund der für die NMR-Spektroskopie nötigen Konzentrationen im zweistelligen  $\mu\text{M}$  Bereich nur die Bindungsaffinitäten von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* zu dT4 quantitativ bestimmt werden. Dafür wurden eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlichen Konzentrationen von dT4 aufgenommen und durch Anpassung der Bindungskurve wurden die Bindungsaffinitäten in Form des  $K_D$  Wertes erhalten. Dabei wurden diese zu einem  $K_D$  Wert von  $K_D = 6,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$  in verdünnter Lösung bestimmt, während dieser bei einer Zelllysate Konzentration von  $c = 340 \text{ g/l}$  zu einem  $K_D$  Wert von  $K_D = 6,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$  bestimmt wurde. Daraus wird deutlich, dass die Verdichtung der Umgebung mit Zelllysate keinen signifikanten Einfluss auf den  $K_D$  Wert der Bindung zwischen 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* und dT4 hat.

Bei diesen Untersuchungen wird deutlich, dass die Verwendung von  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie eine ideale Methode ist, Proteine in komplexer Umgebung zu untersuchen. Da in der natürlichen, zellulären Umgebung keine oder nur wenige Fluoratome vorhanden sind, können  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren einfach detektiert und ausgewertet werden und es müssen keine komplexen Pulsprogramme verwendet werden. Des Weiteren können aufgrund einer natürlichen Häufigkeit von 100 % des Fluorkerns mit geringen Protein Konzentrationen Spektren generiert werden. Aus diesen Gründen können Messungen mit geringem Zeitaufwand durchgeführt werden, was vor allem für Messungen in Zellen oder Zelllysate von Vorteil ist, da diese sich schnell zersetzen und abbauen.

In Zukunft könnten neben Stabilität und Funktion von fluormarkiertem *BsCspB* auch die Dynamik in Zelllysate untersucht werden. Hierfür können wie unter 4.7.8 beschrieben  $^{19}\text{F}$  basierte Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Relaxationsdispersionsexperimente bei verschiedenen Urea Konzentrationen gemacht werden. Durch Auftragen der Austauschkonstanten  $k_{\text{ex}}$  in Abhängigkeit der Urea Konzentration kann mittels der Chevron Analyse die Kinetik des Proteins in verdünnter Lösung als auch in Zelllysate durchgeführt werden. Dafür wurden im Zuge dieser Arbeit schon einige Messungen an 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* bei verschiedenen Urea

Konzentrationen sowohl in verdünnter Lösung bei zwei verschiedenen Magnetfeldstärken sowie in Zelllysate durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Anhang 20 aufgeführt. Diese Vorergebnisse sind sehr vielversprechend und es wird deutlich, dass man mit dieser Methode Zugang zu der Faltungskinetik von Proteinen in Zelllysate hat. Nichtsdestotrotz müssen noch einige Messungen mit mehr Datenpunkten wiederholt und auch zusätzliche Messungen gemacht werden. So müssen zum einen in verdünnter Lösung CPMG Relaxationsprofile bei anderen Urea Konzentrationen und beiden Magnetfeldstärken aufgenommen werden. Zum anderen müssen CPMG Relaxationsdispersionsmessungen in Zelllysate bei verschiedenen Urea Konzentrationen durchgeführt werden, um einen Einblick in die Kinetik des Proteins in Zelllysate zu erhalten.

Neben der Anwendung auf andere Systeme und weiteren Untersuchungen im Zelllysate sind Messungen in der Zelle von größter Wichtigkeit. Dabei kann man sich die vielen Vorteile der  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie zu Nutze machen und schnell und einfach das Protein in der Zelle sichtbar machen. Erste eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in *E. coli* Zellen wurden unter anderem von Li *et al.* aufgenommen und zeigten, dass die  $^{19}\text{F}$  NMR Spektroskopie eine ideale Methode ist, um Proteine in der Zelle darzustellen [128].

Im Zuge dieser Arbeit wurden erste  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* in *E. coli* (CAG 18455 7371) Zellen aufgenommen (Abbildung 68). Das Spektrum zeigt die typische chemische Verschiebung für 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* bei  $\omega = -122,24$  ppm, sowie weitere Resonanzsignale, die auf das freie 5- $^{19}\text{F}$ -Tryptophan und den Zellhintergrund zurück zu führen sind (Abbildung 68 A). Vergleicht man das Resonanzsignal von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* *in vivo* mit *in vitro* Bedingungen wird deutlich, dass das Signal eine deutliche Linienverbreiterung zeigt (Abbildung 68 B). Dies liegt an der geringeren Mobilität des Proteins in der Zelle und ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass tatsächlich  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in der Zelle aufgenommen wurden.

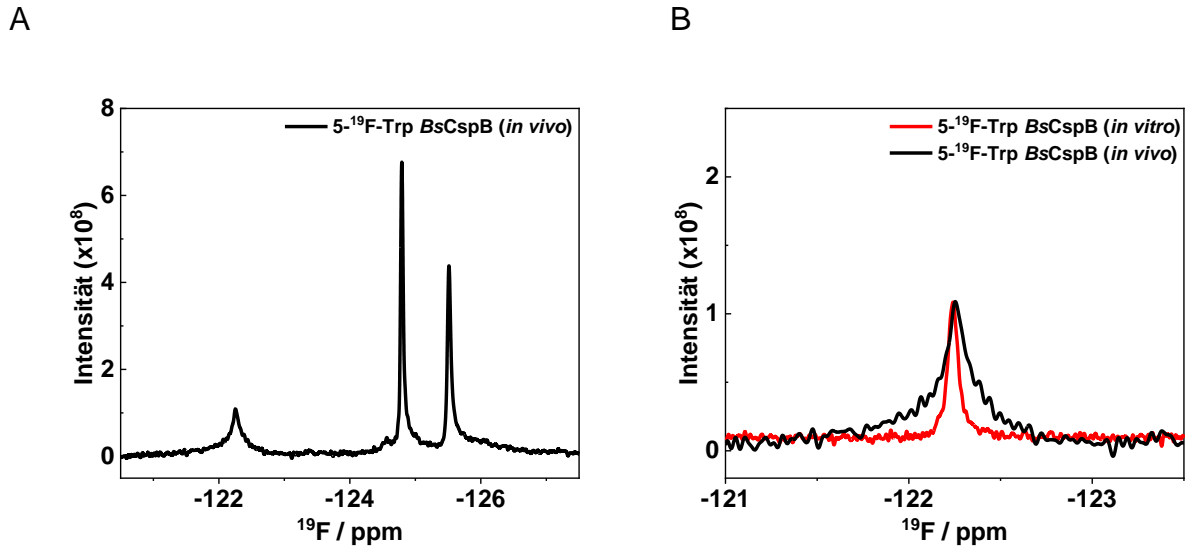


Abbildung 68: Eindimensionales <sup>19</sup>F NMR Spektrum von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB in *E. coli* Zellen (A) mit Resonanzsignal von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB bei  $\omega = -122,24$  ppm. Vergleich des Resonanzsignals von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB bei  $\omega = -122,24$  ppm *in vitro* (rot) und *in vivo* (schwarz) (B).

Mit diesen erfolgreichen Vorergebnissen könnte der nächste Schritt sein, die Stabilität des Proteins in der Zelle zu bestimmen. Dafür müssten <sup>19</sup>F NMR Spektren verschiedener Proben mit Zellsuspension bei unterschiedlicher Urea Konzentration aufgenommen werden. Somit könnte man mit der gleichen Methode, wie unter 4.7.4 beschrieben, der Anteil an gefaltetem Protein bestimmt werden. Unterschiedliche Urea Konzentrationen in der Zelle kann man, da Urea membrangängig ist, durch Zugabe von Urea zur Zellsuspension generieren [60]. Problem bei diesen Messungen ist zum einen, wie auch von Ghaemmaghami *et al.* beschrieben, die Mortalität der Zellen bei Urea Konzentrationen größer als  $c = 3$  M [60]. Ein weiteres Problem ist, dass man wegen der Zellviabilität in den Messzeiten limitiert ist und aus diesem Grund und außerdem wegen der hohen Linienbreite und geringen Protein Konzentration in der Zelle nur geringe Signalintensitäten erhält. Dies macht vor allem die Auswertung der Spektren schwierig, die sowohl den gefalteten als auch ungefalteten Zustand zeigen. Aus diesem Grund sollten alternativ auch Messungen in anderen Zellen in Betracht gezogen werden [162, 163]. So ist es zum Beispiel möglich Protein oder auch Proteinkomplexe mittels Elektroporation oder im Falle von Oozyten mittels Injektion in Zellen einzubringen und so eine höhere, fest definierte Konzentration an Protein in der Zelle zu erhalten.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Neben Messungen der Proteinstabilität unter *in vivo* Bedingungen sollen auch Interaktionsstudien mit Oligothymidinen in der Zelle durchgeführt werden. Wichtig ist hierbei eine volle Kontrolle über die Protein und Oligothymidin Konzentration zu haben.

Zusammenfassend wird deutlich, dass mit  $^{19}\text{F}$  NMR Spektroskopie Proteine einfach und schnell in der Zelle untersucht werden können. Ausgehend von dieser Arbeit ist es möglich viele verschiedene Proteine mit Fluor zu markieren und in eine Zelle einzubringen. Der Anwendung dieses Systems sind dabei kaum Grenzen gesetzt. So sollte es möglich sein die Stabilität, die Funktion sowie die Dynamik von Proteinen in der Zelle zu untersuchen.

## Abkürzungsverzeichnis

### Aminosäuren

A, Ala	Alanin
C, Cys	Cystein
D, Asp	Asparaginsäure
E, Glu	Glutaminsäure
F, Phe	Phenylalanin
G, Gly	Glycin
H, His	Histidin
I, Ile	Isoleucin
K, Lys	Lysin
L, Leu	Leucin
M, Met	Methionin
N, Asn	Asparagin
P, Pro	Prolin
Q, Gln	Glutamin
R, Arg	Arginin
S, Ser	Serin
T, Thr	Threonin
V, Val	Valin
W, Trp	Tryptophan
Y, Tyr	Tyrosin

### Chemikalien

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
BIS-TRIS Propan	1,3-Bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)propan
BSA	Bovines Serumalbumin
$\text{CaCl}_2$	Calciumchlorid
Carb	Carbenicillin
$\text{CoCl}_2$	Kobaltchlorid
$\text{CuCl}_2$	Kupferchlorid
$\text{CuSO}_4$	Kupfersulfat
$\text{D}_2\text{O}$	deuteriertes Wasser
Dex	Dextran
$\text{FeSO}_4$	Eisensulfat
$\text{H}_2\text{O}$	Wasser
$\text{H}_3\text{BO}_3$	Borsäure
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Di-Kaliumhydrogenphosphat

## Abkürzungsverzeichnis

Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Natriummolybdat
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Natriumselenit
NaCac	Natriumcacodylat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NiCl <sub>2</sub>	Nickelchlorid
PEG	Polyethylenglycol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
TFA	Trifluoressigsäure
TMSP	Natriumtrimethylsilylpropionat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfat

### **Elemente**

13C	13 Kohlenstoff
15N	15 Stickstoff
19F	19 Fluor
1H	Proton
2H/D	Deuterium
Cu	Kupfer
Zn	Zink

### **Nukleinbasen – Nukleoside**

A	Adenin - Adenosin
C	Cytosin - Cytidin
G	Guanin - Guanosin
T	Thymin - Thymidin
U	Uracil - Uridin

### **Oligothymidine**

dT4	Tetrathymidin
dT5	Pentathymidin
dT6	Hexathymidin
dT7	Heptathymidin

## Abkürzungsverzeichnis

### Proteine

Csp	Cold Shock Protein
CspB	Cold Shock Protein B
CspC	Cold Shock Protein C
CspD	Cold Shock Protein D
BsCspB	Cold Shock Protein B aus <i>Bacillus subtilis</i>
TmCsp	Cold Shock Protein aus <i>Thermotoga maritima</i>

### Weitere Abkürzungen

DNS	Desoxyribo[se]nukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI MS	Elektrospray-Ionisations Massen Spektrometrie
FWHM	Halbwertsbreite (engl.: Full Width at Half Maximum)
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
LB Medium	lysogeny broth Medium
NMM	New Minimal Medium
NMR	Kernspinresonanz (engl.: nuclear magnetic resonance)
$OD_{600nm}$	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
RNS	Ribonucleinsäure
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
ssDNS	einzelsträngige DNS (engl.: single stranded DNA)
wt	wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung von Proteinen (grün) in unterschiedlicher, verdichteter Umgebung. Dabei werden als Crowding Reagenzien synthetische Polymere (links) und Proteine (rechts) dargestellt. Die Abbildung wurde von Wang, Y., Li, C., & Pielak, G. J. (2010). Effects of proteins on protein diffusion. *Journal of the American Chemical Society*, 132(27), 9392-9397. entnommen [44]. .....4
- Abbildung 2: Primärsequenz des *BsCspB*, wobei die Aminosäuren durch den Einbuchstabencode dargestellt sind (A). Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von *BsCspB*, wobei die Positionen der fünf  $\beta$ -Stränge dargestellt sind (B). (B) wurde aus Schindelin, H., Marahiel, M. A., & Heinemann, U. (1993). Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature*, 364(6433), 164-168. entnommen [70]. .....9
- Abbildung 3: Die durch Röntgenstrukturanalyse erhaltene Kristallstruktur (PDB ID: 1CSP) (A), die mittels NMR-Spektroskopie erhaltene Struktur in Lösung (PDB ID: 1NMF) (B) von *BsCspB* und die Kristallstruktur eines *BsCspB*/dT6 Komplexes (PDB ID: 2F52) (C). ..... 10
- Abbildung 4: Frank-Condon-Prinzip (A). Bei der Anregung eines Moleküls durch Licht erfolgt eine vertikale Anregung eines Elektrons aus dem elektronischen Grundzustand in ein höheres Schwingungsniveau eines elektronisch angeregten Zustandes. Die Relaxation aus den höheren Schwingungsniveau in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands erfolgt emissionslos. Jablonski-Diagramm (B). Die Phänomene der Fluoreszenz und der Phosphoreszenz werden verdeutlicht. Das Jablonski Diagramm veranschaulicht die unterschiedlichen Übergänge von Elektronen nach Anregung mit Licht, wobei  $S_0$  den elektronischen Grundzustand,  $S_1$  den ersten angeregten Singulett Zustand und  $T_1$  den ersten angeregten Triplett Zustand bezeichnet. Der emissionslose Übergang aus höherliegenden Schwingungszuständen wird als innere Umwandlung (englisch: internal conversion) IC und der Übergang zwischen Singulett und Triplett Zustand als „intersystem crossing“ (ISC) bezeichnet [92]. ..... 15
- Abbildung 5: Die Energieniveaus eines Kernspins mit  $I = \frac{1}{2}$  außerhalb und innerhalb eines Magnetfeldes mit unterschiedlicher Spinorientierung  $m_I$  [92]. ..... 17

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 6: Innerhalb eines Magnetfeldes kommt es zu einer makroskopischen Magnetisierung, da mehr  $\alpha$  Spins mit Spinorientierung  $m_l = +1/2$  als  $\beta$  mit Spinorientierung  $m_l = -1/2$  vorliegen. Durch Anregung mittels elektromagnetischer Strahlung kommt zu einer Auslenkung der makroskopischen Magnetisierung in Richtung der xy-Ebene [92]. ..... 18
- Abbildung 7: Die von den angeregten Atomen ausgesandten Signale werden in Form des freien Induktionszerfalls (FID) (Zeit Domäne) aufgezeichnet und mittels Fourier Transformation in das NMR Spektrum (Frequenz Domäne) umgewandelt [92]. ..... 19
- Abbildung 8: Logarithmische Zeitskala auf der Proteinprozesse (schwarz) und die entsprechenden NMR Techniken (rot) eingezeichnet sind. Außerdem sind komplementäre Spektroskopie Techniken gezeigt (blau). Die Zeitskala, die zur Verfügung steht, um Prozesse in Proteinen mittels NMR-Spektroskopie zu betrachten umfasst mehr als 18 Größenordnungen. Diese kann dabei in langsame ( $k_{ex} \ll \Delta\omega$ ), intermediäre ( $k_{ex} \sim \Delta\omega$ ) und schnelle ( $k_{ex} \gg \Delta\omega$ ) Prozesse unterteilt werden, wobei  $k_{ex}$  die Austauschkonstante und  $\Delta\omega$  der Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen den beiden austauschenden Zuständen sind. Die Abbildung wurde aus der Publikation von Kovermann *et al.* von 2016 adaptiert [100]. ..... 20
- Abbildung 9: Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren des Proteins L225fmF HDH in der Zelle (oben) und in aufgereinigter Form in verdünnter Lösung (Mitte), sowie der Überstand der *in vivo* Probe (unten). Die Abbildung wurde aus der Arbeit *Protein  $^{19}\text{F}$  NMR in Escherichia coli* von Li *et al.* entnommen [128]. ..... 22
- Abbildung 10: Cartoon Darstellung von fluormarkiertem BsCspB (PDB ID: 6SZZ) in komplexer Umgebung und das resultierende  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum. In diesem ist trotz vieler, umgebender Makromoleküle nur ein Signal zu erkennen. .... 23
- Abbildung 11: Verschiedene Markierungspositionen für Fluor an L-Phenylalanin (links) und L-Tryptophan (rechts). ..... 24
- Abbildung 12: Schematische Darstellung des Aufbaus der Arbeit, wobei diese in drei Kapitel unterteilt ist. Das erste Kapitel befasst sich mit der Herstellung von fluormarkiertem BsCspB (PDB ID (4- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB): 6SZZ, PDB ID (4- $^{19}\text{F}$ -Phe BsCspB): 6TOO). Im zweiten Kapitel werden die verschiedenen fluormarkierten Varianten des BsCspB charakterisiert und mit der wt Variante (PDB ID: 1CSP)

## Abbildungsverzeichnis

verglichen. Abschließend werden im dritten Kapitel die Funktion und Stabilität des <i>BsCspB</i> in Zellysats untersucht.....	50
Abbildung 13: Primärsequenz des <i>BsCspBs</i> , wobei die sieben Phenylalanine in rot und das Tryptophan in blau gekennzeichnet sind. ....	51
Abbildung 14: Verschiedene Markierungspositionen für Fluor an L-Phenylalanin (links) und L-Tryptophan (rechts). ....	51
Abbildung 15: Plasmid Map des pET11a Vektors mit den Sequenzen für <i>BsCspB</i> und <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> Schnittstellen.....	53
Abbildung 16: SDS Page Analyse des Zellysats nach Expression von fluormarkiertem <i>BsCspB</i> mittels der Glyphosat Methode. ....	53
Abbildung 17: 1D <sup>19</sup> F NMR Spektren von 4-, 5- und 6- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> . Die Spektren zeigen ein scharfes Signal für das einzelne Fluoratom im Protein bei $\omega = -124,30$ ppm für 4- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> (A), bei $\omega = -122,24$ ppm für 5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> (B) und bei $\omega = -121,51$ ppm für 6- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> (C).....	56
Abbildung 18: Dekonvoliertes Massenspektrum von 4- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> (A), 5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> (B) und 6- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> (C). Dabei zeigt sich ein dominierendes Signal bei 7382,5 Da für 4- und 5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> und 7382,3 Da für 6- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> , was zu einer theoretischen Masse von 7382 Da von einem einzeln fluormarkierten <i>BsCspB</i> passt.....	57
Abbildung 19: Plasmid Map des pAR1219 Vektors mit den Sequenzen für T7 Polymerase und den Sequenzierungsprimern.....	58
Abbildung 20: Kolonie-PCR Produkt von pET24a (1) und pET24a- <i>BsCspB</i> (2-7) mit den Primern 5'-GCC GAA ACA AGC GCT CAT-3' und 5'-TTG TTA GCA GCC GGA TCT C-3' . ....	59
Abbildung 21: Plasmid Map des pET24a- <i>BsCspB</i> Vektors mit den Sequenzen für <i>BsCspB</i> , T7 Promotor, lac Operator, T7 Terminator, <i>MluI</i> , <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> Schnittstellen und den Sequenzierungsprimern. ....	60
Abbildung 22: Dekonvoliertes Massenspektrum von 5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> . Dabei zeigt sich ein dominierendes Signal bei 7382,3 Da, was zu einer theoretischen Masse von 7382 Da von einem einzeln fluormarkierten <i>BsCspB</i> passt.....	61

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 23: Eindimensionales  $^1\text{H}$  Spektrum (A) und zweidimensionales  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Spektrum (B) von wt *BsCspB* (schwarz) und  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (rot). Der Unterschied in der chemischen Verschiebung,  $\Delta\omega$ , in Protonen und Stickstoff Dimension zwischen wt *BsCspB* und  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB*. Die horizontalen Linien zeigen den Mittelwert (durchgezogene Linie) und den Mittelwert + die Standardabweichung (gestrichelte Linie) an (C). Aminosäuren die einen größeren Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen wt *BsCspB* und  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* als den Mittelwert + die Standardabweichung haben sind rot markiert (D, PDB ID: 1csp). Das Tryptophan ist mit Seitenkette in blau gezeigt. ....64
- Abbildung 24: Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $2\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (A),  $3\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (B),  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (C),  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (D),  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (E),  $6\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (F),  $7\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (G) und  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Tryptophan (H). .....66
- Abbildung 25: Elutionsprofile und SDS Page Analysen von  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB*. Für die Aufreinigung wurden drei Reinigungsschritte unternommen: eine Anionen Austausch Chromatographie (A, B), eine Hydrophober Austausch Chromatographie (C, D) und eine Größenausschluss Chromatographie (E, F). Das Protein wurde bei einem Elutionsvolumen  $V = 0$  mL auf die jeweilige Säule geladen. Die graue, vertikale Linie zeigt das Volumen an bei dem mit dem Fraktionssammeln gestartet wurde, während der graue Balken die Fraktionen anzeigt, die für die SDS Pages verwendet wurden. Die sukzessive Zugabe von Puffer B (A) und Puffer D (C) wurde blau dargestellt. ...68
- Abbildung 26: Fluoreszenzspektrum von wt (A),  $2\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (B),  $3\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (C),  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (D),  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (E),  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (F),  $6\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (G) und  $7\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (H) bei verschiedenen Urea Konzentrationen. Für die Anregung wurde ein Licht der Wellenlänge  $\lambda = 280$  nm verwendet. ....71
- Abbildung 27: Wellenlänge des Fluoreszenzmissionsmaximum von wt (A),  $2\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (B),  $3\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (C),  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (D),  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (E),  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (F),  $6\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (G) und  $7\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (H) bei verschiedenen Urea Konzentrationen. ....72
- Abbildung 28: Fluoreszenzmissionsspektren der freien Aminosäure Tryptophan (pink),  $4\text{-}^{19}\text{F}$ -Tryptophan (orange),  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Tryptophan (blau) und  $6\text{-}^{19}\text{F}$ -Tryptophan (grün). Alle Spektren wurden mit einer Aminosäure Konzentration von  $c = 1$   $\mu\text{M}$  in 20 mM NaCac, pH 7 und  $T = 298$  K aufgenommen. Zur Anregung wurde ein Licht der Wellenlänge  $\lambda = 280$  nm verwendet. ....73

Abbildung 29: Darstellung der gemittelten Emissionswellenlänge,  $\langle \lambda \rangle$ , in Abhängigkeit von der Urea Konzentration. Diese wurde für wt *BsCspB* (Rechtecke/grau) und alle sieben fluormarkierten Varianten, 2-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Sterne/schwarz), 3-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Dreiecke-rechts/blau), 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Dreiecke-unten/cyan), 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Rauten/orange), 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Kreise/rot), 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Dreiecke-oben/lila) und 7-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Fünfecke/pink), aus Fluoreszenzspektren bei verschiedenen Urea Konzentrationen erhalten. Die durchgezogenen Linien zeigen die beste Anpassung der Daten (Gleichung (4)) bei Verwendung eines globalen Wertes für die Kooperativität,  $m$ . Die Ergebnisse der Anpassung sind in Tabelle 8 dargestellt.....74

Abbildung 30. Linearer Fit des natürlichen Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten von wt *BsCspB* (Rechtecke/grau) und allen sieben fluormarkierten Varianten, 2-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Sterne/schwarz), 3-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Dreiecke-rechts/blau), 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Dreiecke-unten/cyan), 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Rauten/orange), 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Kreise/rot), 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Dreiecke-oben/lila) und 7-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Fünfecke/pink), um  $\Delta G^0$  mit Gleichung (5) und (6) zu bestimmen. Für die lineare Anpassung wurde ein Bereich zwischen  $c = 2,5$  M Urea und  $c = 5,5$  M Urea gewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 gezeigt.....76

Abbildung 31: Eindimensionale <sup>1</sup>H NMR Spektren der aliphatischen Protonen der wt Variante (A) und der sieben fluormarkierten Varianten, 2-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (B), 3-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (C), 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (D), 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (E), 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (F), 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (G) und 7-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (H) bei  $T = 298$  K (blau) und  $T = 330$  K (rot). Außerdem eindimensionale <sup>19</sup>F NMR Spektren von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (I) und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (J) bei  $T = 298$  K (blau) und  $T = 330$  K (rot). .....79

Abbildung 32: Faltungsübergänge detektiert mittels eindimensionaler <sup>1</sup>H (A) und <sup>19</sup>F (B) NMR-Spektroskopie. Die thermodynamische Denaturierung wurde aufgenommen für wt *BsCspB* (Rechtecke/grau) und allen sieben fluormarkierten Varianten, 2-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Sterne/schwarz), 3-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Dreiecke-rechts/blau), 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (Dreiecke-unten/cyan), 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Rauten/orange), 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Kreise/rot), 6-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Dreiecke-oben/lila) und 7-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (Fünfecke/pink) aufgenommen. Die durchgezogenen Linien zeigen die Anpassung der Daten mit global fixiertem  $\Delta H$  nach Gleichung (11).....81

Abbildung 33: Entfaltungs- (A) und Rückfaltungskinetik (B) von 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB induziert durch eine Änderung der Pufferbedingungen. Die Entfaltungskinetik (A) wurde durch ein Urea Konzentrationssprung von  $c = 0,5$  M zu  $c = 6,5$  M induziert, während die Rückfaltungskinetik (B) durch einen Konzentrationssprung von  $c = 7,0$  M zu  $c = 3,0$  M induziert wurde. Angepasst wurde in einem Bereich von  $10 \leq t \leq 40$  ms (A) und  $9 \leq t \leq 60$  ms (B). .....83

Abbildung 34: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante,  $k_{\text{Obs}}$ , von der Harstoff Konzentration während der Entfaltung (offene Symbole) und Rückfaltung (geschlossene Symbole) für wt BsCspB (Rechtecke/grau) und allen sieben fluormarkierten Varianten, 2-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (Sterne/schwarz), 3-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (Dreiecke-rechts/blau), 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (Dreiecke-unten/cyan), 4-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (Rauten/orange), 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (Kreise/rot), 6-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (Dreiecke-oben/lila) und 7-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (Fünfecke/pink). Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung mittels Gleichung (8) dar, dabei wurde für bessere Vergleichbarkeit mit den Werten aus den Gleichgewichtsmessungen die Kooperativität der Faltung,  $m = m_f + m_u$  global zu  $m = -2,8 \pm 0,8$  kJ/(mol M) bestimmt. Die Ergebnisse dieses Anpassungsverfahrens sind in Tabelle 11 zusammengefasst. ....84

Abbildung 35: Analyse der Amplituden der zeitabhängigen Änderungen der Fluoreszenzemission nach Entfaltung (Quadrat) und Rückfaltung (Dreieck) von fluormarkierten Varianten von BsCspB: wt BsCspB (A), 2-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (C), 3-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (D), 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB (E), 4-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (F), 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (G), 6-<sup>19</sup>F-Trp-BsCspB (H) und 7-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB (I). Offene Symbole zeigen den endgültigen Fluoreszenzwert und geschlossene Symbole den anfänglichen Fluoreszenzwert. Der rot eingefärbte Pfeil in (C)-(I) zeigt die Lücke in der Fluoreszenzemission an, die beim Vergleich von Rückfaltung mit dem Entfaltungszustand auftritt. (B) Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzemission für die Rückfaltung (schwarz) und Entfaltung (rot) von 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB zu einer Endkonzentration Urea von  $c = 2,6$  M. ....87

Abbildung 36: Analyse der Proteinrückfaltung und -entfaltung mittels Fluoreszenz- (A) und NMR-Spektroskopie (B). Dafür wurden Fluoreszenzspektren für 4-<sup>19</sup>F-Phe BsCspB ( $c = 1$   $\mu$ M) direkt (blau) bzw. 30 Minuten nach Einleitung der Proteinentfaltung (rot) aufgenommen. Dabei wurde die Entfaltung induziert, indem ein Sprung in der Urea Konzentration von  $c = 0,0$  M zu  $c = 2,6$  M durch Zugabe einer hochkonzentrierten

Urea Lösung erzeugt wurde. Außerdem wurden für die Proteinrückfaltung von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) Fluoreszenzspektren direkt (orange) und nach 30 Minuten (cyan) aufgenommen. Dabei wurde die Rückfaltung ausgelöst, indem ein Sprung in der Urea Konzentration von  $c = 7,0 \text{ M}$  zu  $c = 2,6 \text{ M}$  durch Zugabe einer  $0 \text{ M}$  Urea Lösung erzeugt wurde. Die Anregungswellenlänge betrug  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . Es wurden eindimensionale <sup>1</sup>H NMR Spektren für 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* ( $c = 20 \mu\text{M}$ ) nach Entfaltung (schwarz) und Rückfaltung (rot) aufgenommen. Die Entfaltung erfolgte durch einen Sprung in der Urea Konzentration von  $c = 0,0 \text{ M}$  zu  $c = 3,0 \text{ M}$ , während die Rückfaltung durch einen Sprung in der Urea Konzentration von  $c = 5,6 \text{ M}$  zu  $c = 2,8 \text{ M}$  ausgelöst wurde. Für die Analyse des Anteils des nativen Zustands wurden zwei Bereiche der chemischen Verschiebungen des eindimensionalen <sup>1</sup>H NMR Spektrums von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* zur Integration verwendet. Der grau gefärbte Bereich zeigt Resonanzsignale an, die ausschließlich durch den nativen Zustand zustande kommen, während der hellblaue Bereich Resonanzsignale zeigt, die sowohl aus dem nativen Zustand als auch aus dem ungefalteten Proteinensemble stammen.....88

Abbildung 37: Übereinanderlagerung dreidimensionaler Kristallstrukturen von wt *BsCspB* (grau, PDB ID: 1NMG), 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (orange) und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (blau) (A). Die Seitenketten der <sup>19</sup>F-markierten Aminosäuren in dieser Studie sind dargestellt und entsprechend ihrer Sequenznummerierung beschriftet (B). Außerdem sind die Elektronendichtekarten der Reste <sup>19</sup>F-Trp8 und <sup>19</sup>F-Phe49 dargestellt (B).  $(2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}})\alpha_{\text{calc}}$ -Karten, die bei  $1\sigma$  konturiert sind, sind grau eingefärbt.  $(mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}})$ -Karten, die unter Verwendung von Phasen aus verfeinerten Modellen, bei denen die <sup>19</sup>F-markierten Aminosäuren ausgelassen wurden, berechnet wurden, sind in grüner Farbe dargestellt und bei  $3\sigma$  konturiert. Die Strukturen wurden unter Verwendung von Chimera59, Version 1.14 ([www.cgl.ucsf.edu/chimera](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera)) erstellt.....90

Abbildung 38: Darstellung der gemittelten Emissionswellenlänge,  $\langle\lambda\rangle$ , in Abhängigkeit von der Urea Konzentration von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* bei pH 7 (Kreise/rot) und pH 8 (Rechtecke/schwarz). Die durchgezogenen Linien zeigen die beste Anpassung der Daten (Gleichung (4)) bei Verwendung eines globalen Wertes für die Kooperativität,  $m$ . .....91

Abbildung 39: Cartoon Darstellung von 4-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (PDB ID: 6SZZ) in hoch komplexer Umgebung mit verschiedenen Makromolekülen, die das Zelllysate

wiederspiegeln soll. Das 4-<sup>19</sup>F-Trp ist in rot gezeigt, mit Ausnahme des Fluoratoms in Position 4 des Tryptophan Rings, welches in grün dargestellt ist.....92

Abbildung 40: Eindimensionales <sup>1</sup>H NMR Spektrum von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB*, welches bei eine Urea Konzentration von  $c = 0$  M bei  $T = 298$  K und  $B_0 = 18,8$  T in verdünnter Lösung aufgenommen wurde (A). Der Spektrale Bereich der in (B) gezeigt ist, ist in (A) mit einer Box eingerahmt. Die verschiedenen Spektralen Bereiche,  $I_N$  und  $I_{N+U}$ , die für die Bestimmung des Anteils an nativen Protein,  $f_N$ , verwendet wurden, sind gezeigt (B, D). Sowohl die chemische Verschiebung als auch die Intensität der Resonanzsignale der aliphatischen Protonen von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* sind abhängig von der Urea Konzentration:  $c = 0$  M (cyan),  $c = 1,5$  M (rot),  $c = 2,5$  M (blau),  $c = 3,4$  M (orange),  $c = 4,4$  M (grau) und  $c = 5,9$  M (lila) (B). Eindimensionales <sup>1</sup>H NMR Spektrum von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB*, welches bei eine Urea Konzentration von  $c = 0$  M bei  $T = 298$  K und  $B_0 = 18,8$  T in verdünnter Lösung aufgenommen wurde (C). Der Spektrale Bereich der in (D) gezeigt ist, ist in (C) mit einer Box eingerahmt. Sowohl die chemische Verschiebung als auch die Intensität der Resonanzsignale der aliphatischen Protonen von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* sind abhängig von der Urea Konzentration:  $c = 0$  M (cyan),  $c = 1,6$  M (rot),  $c = 2,6$  M (blau),  $c = 3,3$  M (orange),  $c = 4,5$  M (grau) und  $c = 5,8$  M (lila) (D). Eindimensionales <sup>19</sup>F NMR Spektrum von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* aufgenommen bei verschiedenen Urea Konzentrationen ( $c = 0$  M (cyan),  $c = 1,6$  M (rot),  $c = 2,6$  M (blau),  $c = 3,3$  M (orange),  $c = 4,5$  M (grau) und  $c = 5,8$  M (lila)) in verdünnter Lösung bei  $T = 298$  K und  $B_0 = 18,8$  T. „N“ markiert Resonanzsingale der fluormarkierten Phenylalanine des nativen Zustandes, welche separiert liegen, während „N+U“ einen Bereich markieren, der alle Resonanzsignale des ungefalteten Zustandes und Teile des nativen Zustandes enthalten (E). Eindimensionales <sup>19</sup>F NMR Spektrum von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* aufgenommen bei verschiedenen Urea Konzentrationen ( $c = 0$  M (cyan),  $c = 1,5$  M (rot),  $c = 2,5$  M (blau),  $c = 3,4$  M (orange),  $c = 4,4$  M (grau) und  $c = 5,9$  M (lila)) in verdünnter Lösung bei  $T = 298$  K und  $B_0 = 18,8$  T. „N“ markiert das Resonanzsingal des Trp8 des nativen Zustandes während „U“ das des ungefalteten Zustandes markiert (F). .....94

Abbildung 41: Faltungsübergang von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (A) und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (B) induziert mittels Erhöhung der Urea Konzentration und aufgenommen bei  $T = 298$  K. Die Faltungsübergänge wurden mit Protonen (Rechtecke, schwarz) und <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie (Kreise, rot) detektiert. Durch die Anpassung mit Gleichung (12) (durchgezogene Line) konnte die freie Energie,  $\Delta G^0$ , für 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* zu

$\Delta G^0 = 7,2 \pm 0,2$  kJ/mol ( $^1\text{H}$  Datenset) und  $\Delta G^0 = 7,7 \pm 0,2$  kJ/mol ( $^{19}\text{F}$  Datenset) bestimmt werden. Für 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* wurden Werte für  $\Delta G^0$  von  $\Delta G^0 = 8,5 \pm 0,2$  kJ/mol ( $^1\text{H}$  Datenset) und  $\Delta G^0 = 8,7 \pm 0,2$  kJ/mol ( $^{19}\text{F}$  Datenset) erhalten. Die Kooperativität der Faltung,  $m$ , wurde als globaler Parameter genutzt und zu  $m = -3,3 \pm 0,1$  kJ/(mol M) bestimmt. ....95

Abbildung 42: Zweidimensionale  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC NMR Spektren von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* in verdünnter Lösung (rot) und in Zelllysate (schwarz) mit einer Konzentration von 250 g Zellpellet pro l Puffer (A). Die Zuordnung der Resonanzsignale von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* ist hier im Einbuchstaben Code der Aminosäuren in der Reihenfolge der Primärsequenz dargestellt. Zusätzliche Kreuzsignale der Zelllysateprobe können anderen, üblichen Bestandteilen des Cytosols zugeordnet werden [158]. Des Weiteren wurden die Intensitäten der Kreuzsignale der  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC NMR Spektren analysiert (B). Die Signalintensitäten der Probe in verdünnter Lösung sind im oberen Teil der Abbildung (rot) dargestellt, während die Signalintensitäten der Zelllysate Probe im unteren Teil (schwarz) gezeigt werden. Die Intensitäten wurden auf die höchste Signalintensität (A67) normiert. Die 2D  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  NMR Spektren wurden bei  $T = 298$  K und  $B_0 = 18,8$  T (Zelllysate) und  $B_0 = 14,1$  T (dilute) aufgenommen. Die Sterne auf der x-Achse symbolisieren die Aminosäuren, die nicht zugeordnet werden konnten. ....97

Abbildung 43: Eindimensionale  $^1\text{H}$  Spektren von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* in Zelllysate bei einer Urea Konzentration von  $c = 0,0$  M (A) und  $c = 6,1$  M (B). Es wurde eine Zelllysate Konzentration von  $c = 260$  g/l verwendet. Der Spektrale Bereich der in (C) gezeigt wird, ist in (A) und (B) mit Boxen markiert. Das dominierende Signal bei ungefähr  $\omega = 6$  ppm ist das Urea Resonanzsignal. ....97

Abbildung 44: Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* aufgenommen in Zelllysate bei verschiedenen Urea Konzentrationen und bei  $T = 298$  K und  $B_0 = 18,8$  T. Folgende Zelllysate Konzentrationen wurden verwendet:  $c = 120$  g/l (A),  $c = 260$  g/l (B) und  $c = 450$  g/l (C). Urea Konzentrationen sind in verschiedenen Farben beginnend bei cyan ( $c = 0\text{M}$ ) über rot, blau, orange und grau zu lila dargestellt. Die Resonanzsignale von freiem 5- $^{19}\text{F}$ -Trp, des nativen Zustandes („N“) und des entfalteten Zustandes („U“) von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* sind im Spektrum markiert. Des Weiteren ist das Signal, welches aus dem Zellhintergrund stammt, markiert. Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* aufgenommen in Zelllysate bei verschiedenen Urea Konzentrationen und bei  $T = 298$  K und  $B_0 = 18,8$  T. Folgende

Zelllysate Konzentrationen wurden verwendet:  $c = 150$  g/l (D) und  $c = 450$  g/l (E). Urea Konzentrationen sind in verschiedenen Farben beginnend bei cyan ( $c = 0$  M) über rot, blau, orange und grau zu lila dargestellt. Die Resonanzsignale von freiem 4-<sup>19</sup>F-Phe, des nativen Zustands („N“) und des entfalteten Zustandes plus Teile des entfalteten Zustandes („N+U“) von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* sind im Spektrum markiert. Des Weiteren ist das Signal, welches aus dem Zellhintergrund stammt, markiert.....98

Abbildung 45: Chemisch induzierter Faltungsübergang von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* (A) und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (B) gemessen in verdünnter Lösung und verschiedenen Zelllysate Konzentrationen bei  $T = 298$  K und  $B_0 = 18,8$  T. Die Daten wurden mittels <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie detektiert. Bei folgenden Zelllysate Konzentrationen wurden Messungen durchgeführt:  $c = 0$  g/l (Dreiecke oben, rot),  $c = 120$  g/l (gefüllte Kreise, schwarz),  $c = 150$  g/l (leere Kreise, schwarz),  $c = 280$  g/l (Rechtecke, blau) und  $c = 450$  g/l (Dreiecke unten, orange). Die durchgezogene Linie zeigt den Fit mit Gleichung (12). Die Kooperativität der Faltung,  $m$ , wurde als globaler Parameter angepasst und zu  $m = -3,3 \pm 0,1$  kJ/(mol M) bestimmt. Die Ergebnisse der Bestimmung der Werte für die freie Energie,  $\Delta G^0$ , sind in (C) und Tabelle 12 dargestellt. ....99

Abbildung 46: Eindimensionale <sup>19</sup>F NMR Spektren von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* bei einer Urea Konzentration von  $c = 0$  M (A) und  $c = 5,5$  M (B) in  $c = 120$  g/l (rot) und  $c = 450$  g/l Zelllysate (schwarz). Eindimensionale <sup>19</sup>F NMR Spektren von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* bei einer Urea Konzentration von  $c = 0$  M (C) und  $c = 5,2$  M/5,3 M (D) in  $c = 150$  g/l (rot) und  $c = 450$  g/l Zelllysate (schwarz). ....101

Abbildung 47: Eindimensionales <sup>19</sup>F NMR Spektrum von Zelllysate ohne 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB*. Das Resonanzsignal des freien 5-<sup>19</sup>F-Tryptophans ( $\omega = -124,8$  ppm), sowie das Resonanzsignal des Zellhintergrunds ( $\omega = -125,5$  ppm) sind markiert. ....102

Abbildung 48: A) Eindimensionales <sup>19</sup>F NMR Spektrum von Trifluoressigsäure (TFA) und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* bei  $T = 298$  K und  $B_0 = 18,8$  T. Das TFA Resonanzsignal ( $c = 2$  mM) wurde verwendet, um die Konzentration von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* in Zelllysate zu bestimmen. B) Chemisch induzierter Faltungsübergang von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* bei einer Konzentration von  $c = 8$   $\mu$ M und  $T = 298$  K. die Kooperativität,  $m$ , wurde auf  $m = -3,3 \pm 0,1$  kJ/(mol M) festgesetzt und für die freie Energie,  $\Delta G^0$ , ein Wert von  $\Delta G^0 = 7,8 \pm 0,5$  kJ/mol bestimmt. ....104

Abbildung 49: Analyse des Urea Signals in den eindimensionalen Protonen Spektren. Alle Daten wurden bei  $T = 298$  K aufgenommen. A) Urea Protonen Resonanzsignal

bei eine Urea Konzentration von  $c = 4,6$  M aufgenommen in verdünnter Lösung (blau), 120 g/l Zelllysate (schwarz) und 260 g/l Zelllysate (rot). B) Urea Protonen Resonanzsignal in verdünnter Lösung bei verschiedenen Urea Konzentrationen. Datenaufnahmen erfolgten mit Urea Konzentrationen von  $c = 1,8$  M ( $\omega = 5,790$  ppm, schwarz),  $c = 3,8$  M ( $\omega = 5,795$  ppm, rot) und  $c = 5,5$  M ( $\omega = 5,803$  ppm, blau). C) Urea Protonen Resonanzsignal in 120 g/l Zelllysate bei verschiedenen Urea Konzentrationen. Datenaufnahmen erfolgten mit Urea Konzentrationen von  $c = 1,7$  M ( $\omega = 5,791$  ppm, schwarz),  $c = 3,5$  M ( $\omega = 5,795$  ppm, rot) und  $c = 5,5$  M ( $\omega = 5,800$  ppm, blau). D) Urea Protonen Resonanzsignal in 450 g/l Zelllysate bei verschiedenen Urea Konzentrationen. Datenaufnahmen erfolgten mit Urea Konzentrationen von  $c = 1,8$  M ( $\omega = 5,795$  ppm, schwarz),  $c = 3,6$  M ( $\omega = 5,800$  ppm, rot) und  $c = 5,5$  M ( $\omega = 5,804$  ppm, blau). Die Daten wurden aufgenommen während der Faltungsübergängen von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp BsCspB}$  ( $c = 200$   $\mu\text{M}$  (verdünnte Lösung),  $c = \sim 5$   $\mu\text{M}$  (120 g/l),  $c = \sim 25$   $\mu\text{M}$  (260 g/l) und  $c = \sim 70$   $\mu\text{M}$  (450 g/l)). ..... 105

Abbildung 50: Temperatur-induzierter Faltungsübergang von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp BsCspB}$  in verdünnter Lösung (Dreiecke, rot) und in Zelllysate (Rechtecke, schwarz). Die Messungen während der Temperaturerhöhung sind mit geschlossenen Symbolen dargestellt, während die offenen Symbole die Messungen während der Temperaturniedrigung zeigen (A). Foto der Zelllysate Probe nach 14 h NMR Messung (B). Die Zelllysate Konzentration betrug während der Messung 240 g Zellpellet / l Puffer. Die Messdaten wurden erhalten indem bei verschiedenen Temperaturen  $^{19}\text{F}$  Spektren generiert wurden und der Anteil an entfaltetem Protein wie unter 4.7.3 beschrieben bestimmt wurden. .... 106

Abbildung 51: Fluoreszenzemissionsspektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  in einer Konzentration von  $c = 3$   $\mu\text{M}$  (A),  $c = 2$   $\mu\text{M}$  (B),  $c = 2$   $\mu\text{M}$  (C) und  $c = 0,5$   $\mu\text{M}$  (D) mit steigender Konzentration an dT4 (A), dT5 (B), dT6 (C) und dT7 (D). Fluoreszenzemissionsspektren von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp BsCspB}$  in einer Konzentration von  $c = 3,5$   $\mu\text{M}$  (E),  $c = 2$   $\mu\text{M}$  (F),  $c = 2$   $\mu\text{M}$  (G) und  $c = 0,5$   $\mu\text{M}$  (H) mit steigender Konzentration an dT4 (E), dT5 (F), dT6 (G) und dT7 (H). .... 109

Abbildung 52: Untersuchung der Interaktion verschieden langer Oligothymidine und  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe BsCspB}$  (A, B) und  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp BsCspB}$  (C) mittels Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht. Die Auslösung der intrinsischen Fluoreszenz wurde für dT4

(Rechtecke, blau), dT5 (Kreise, orange), dT6 (Dreiecke oben, pink) und dT7 (Dreiecke unten, cyan) aufgenommen..... 110

Abbildung 53: Untersuchung der Interaktion von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und dT4 mittels zweidimensionaler hochaufgelöster NMR-Spektroskopie. Heteronukleares <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC NMR Spektren von freiem und dT4 gebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* in verdünnter Lösung. Die Zuordnung der Rückradsignale von *BsCspB* ist in dem Einbuchstaben Code der Aminosäuren dargestellt und der Primärsequenz folgend nummeriert. Das steigende molare Verhältnis von dT4 und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* ist mit verschiedenen Farben wie angegeben dargestellt (A). Die Änderung der chemischen Verschiebung,  $\Delta\omega$ , zwischen freiem und dT4 gebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* in verdünnter Lösung, wobei die horizontalen Linien das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung (durchgezogene Linie) und das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung plus die Standardabweichung (gestrichelte Linie) zeigen (B). Das Rückrad von *BsCspB* (PDB ID: 2es2) ist als Cartoon dargestellt (grau). Die Amidprotonen von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB*, die durch dT4 stark beeinflusst wurden sind in orange (größer als der Mittelwert) und rot (größer als der Mittelwert plus Standardabweichung) (C). Gemessen wurde bei einer Protein Konzentration von  $c = 63 \mu\text{M}$ , einer Temperatur von  $T = 298 \text{ K}$  und einem Magnetfeld von  $B_0 = 18,8 \text{ T}$ .  
..... 113

Abbildung 54: Untersuchung der Interaktion von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* und dT6 mittels zweidimensionaler hochaufgelöster NMR-Spektroskopie. Heteronukleares <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC NMR Spektren von freiem und dT6 gebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* in verdünnter Lösung. Die Zuordnung der Rückradsignale von *BsCspB* ist in dem Einbuchstaben Code der Aminosäuren dargestellt und der Primärsequenz folgend nummeriert. Das steigende molare Verhältnis von dT6 und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* ist mit verschiedenen Farben wie angegeben dargestellt (A). Die Änderung der chemischen Verschiebung,  $\Delta\omega$ , zwischen freiem und dT6 gebundenen 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* in verdünnter Lösung, wobei die horizontalen Linien das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung (durchgezogene Linie) und das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung plus die Standardabweichung (gestrichelte Linie) zeigen (B). Das Rückrad von *BsCspB* (PDB ID: 2es2) ist als Cartoon dargestellt (grau). Die Amidprotonen von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB*, die durch dT6 stark beeinflusst wurden sind in orange (größer als der Mittelwert) und rot (größer als der Mittelwert plus Standardabweichung) (C). Gemessen wurde bei einer Protein Konzentration von

$c = 40 \mu\text{M}$ , einer Temperatur von  $T = 298 \text{ K}$  und einem Magnetfeld von  $B_0 = 18,8 \text{ T}$ .  
 ..... 114

Abbildung 55: Untersuchung der Interaktion von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* und dT7 mittels zweidimensionaler hochaufgelöster NMR-Spektroskopie. Heteronukleares  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC NMR Spektren von freiem und dT7 gebundenen  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* in verdünnter Lösung. Die Zuordnung der Rückradsignale von *BsCspB* ist in dem Einbuchstaben Code der Aminosäuren dargestellt und der Primärsequenz folgend nummeriert. Das steigende molare Verhältnis von dT7 und  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* ist mit verschieden Farben wie angegeben dargestellt (A). Die Änderung der chemischen Verschiebung,  $\Delta\omega$ , zwischen freiem und dT7 gebundenen  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* in verdünnter Lösung, wobei die horizontalen Linien das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung (durchgezogene Linie) und das Mittel der Änderung der chemischen Verschiebung plus die Standardabweichung (gestrichelte Linie) zeigen (B). Das Rückrad von *BsCspB* (PDB ID: 2es2) ist als Cartoon dargestellt (grau). Die Amidprotonen von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB*, die durch dT7 stark beeinflusst wurden sind in orange (größer als der Mittelwert) und rot (größer als der Mittelwert plus Standardabweichung) (C). Gemessen wurde bei einer Protein Konzentration von  $c = 105 \mu\text{M}$ , einer Temperatur von  $T = 298 \text{ K}$  und einem Magnetfeld von  $B_0 = 18,8 \text{ T}$ .  
 ..... 115

Abbildung 56: Zweidimensionales, heteronukleares  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$  HSQC NMR Spektren von freiem (schwarz) und dT7 gebundenen (rot)  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* in verdünnter Lösung. Die Messung erfolgte mit natürlicher Häufigkeit an  $^{15}\text{N}$ . ..... 116

Abbildung 57: Analyse der Interaktion von dT4 (A), dT5 (B), dT6 (C) und dT7 (D) mit  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* mit hochaufgelöster  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie in verdünnter Lösung. Das ansteigende molare Verhältnis an dT4 zu  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt. .... 117

Abbildung 58: Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* (schwarz) und die Mutante  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* F9Y (rot) ungebunden (A) und and dT7 gebunden (B). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* (schwarz) und die Mutante  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* F15Y (rot) ungebunden (C) und and dT7 gebunden (D). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* (schwarz) und die Mutante  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* F17Y (rot) ungebunden (E) und and dT7 gebunden (F). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von  $4\text{-}^{19}\text{F}\text{-Phe}$  *BsCspB* (schwarz) und die Mutante

## Abbildungsverzeichnis

4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* F27Y (rot) ungebunden (G) and dT4 gebunden (H). Eindimensionale <sup>19</sup>F NMR Spektren von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (schwarz) und die Mutante 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* F38Y (rot) ungebunden (I) und and dT7 gebunden (J). Eindimensionale <sup>19</sup>F NMR Spektren von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* (schwarz) und die Mutante 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* F49Y (rot) ungebunden (K) und and dT5 gebunden (L). Eindimensionale <sup>19</sup>F NMR Spektren von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* im freien Zustand (schwarz) und im dT7 gebundenen Zustand (rot) (M). Die Zuordnung ist mit einem F und der Position des Phenylalanins in der Primärsequenz markiert..... 119

Abbildung 59: Analyse der Interaktion verschiedener Oligothymidine und 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* mittels hochauflöser <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie. Es sind die eindimensionalen <sup>19</sup>F Spektren des freien (schwarz), dT4 gebundenen (blau), dT5 gebunden (orange), dT6 gebunden (pink) und dT7 gebunden (cyan) Zustands von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* in verdünnter Lösung. Die Resonanzsignale der Phenylalanine F27, F38 und F49 sind mit einem F und der Position in der Primärsequenz markiert. .... 120

Abbildung 60: Analyse der Interaktion von dT4 und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit hochauflöser <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie in verdünnter Lösung (A). Das ansteigende molare Verhältnis an dT4 zu 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt. Die Änderung der chemischen Verschiebung des Fluorresonanzsignals,  $\Delta\omega$ , wurde für die schrittweise Zugabe von dT4 in verdünnter Lösung bestimmt (B). Die Datenanpassung erfolgte mittels Gleichung (7) und ist durch die durchgezogene Linie dargestellt und die Bindungsaffinität wurde zu  $K_D = 6,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$  bestimmt. Analyse der Interaktion von dT7 und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit hochauflöser <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie in verdünnter Lösung (C). Analyse der Interaktion von dT6 und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit hochauflöser <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie in verdünnter Lösung (D). Das ansteigende molare Verhältnis an dT4 zu 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt. .... 124

Abbildung 61: Zweidimensionale, heteronukleare <sup>1</sup>H <sup>15</sup>N HSQC Spektren von 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* in verdünnter Lösung (schwarz) und in  $c = 130 \text{ g/l}$  Zelllysate (rot) in ungebundenen (A) und dT7 gebundenen (B) Zustand. .... 125

Abbildung 62: Analyse der Interaktion von dT4 und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* mit hochauflöser <sup>19</sup>F NMR-Spektroskopie bei einer Zelllysate Konzentration von  $c = 680 \text{ g/l}$ . Das ansteigende molare Verhältnis an dT4 zu 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt. .... 127

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 63: Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen.  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in verdünnter Lösung (rot),  $c = 340$  g/l Zelllysate (orange) und  $c = 680$  g/l Zelllysate (blau) ohne zugegebene Oligothymidine (A). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen.  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in verdünnter Lösung (rot),  $c = 340$  g/l Zelllysate (orange) und  $c = 680$  g/l Zelllysate (blau) bei 10fachem Überschuss an dT4 (B). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen.  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in verdünnter Lösung (rot),  $c = 135$  g/l Zelllysate (orange) und  $c = 210$  g/l Zelllysate (blau) bei 1,3 und 1,5fachem Überschuss an dT6 (C). Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen.  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren in verdünnter Lösung (rot),  $c = 130$  g/l Zelllysate (orange) und  $c = 300$  g/l Zelllysate (blau) bei 1,4fachem Überschuss an dT4 (D). ..... 128
- Abbildung 64: Analyse der Interaktion von dT4 und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* mit hochaufgelöster  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie bei einer Zelllysate Konzentration von  $c = 340$  g/l (A). Das ansteigende molare Verhältnis an dT4 zu 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt. Die Änderung der chemischen Verschiebung des Fluorresonanzsignals,  $\Delta\omega$ , wurde für die schrittweise Zugabe von dT4 in  $c = 340$  g/l Zelllysate bestimmt (B). Die Datenanpassung erfolgte mittels Gleichung (7) und ist durch die durchgezogene Linie dargestellt und die Bindungsaffinität wurde zu  $K_D = 6,8 \pm 1,1$   $\mu\text{M}$  bestimmt..... 129
- Abbildung 65: Analyse der Interaktion von dT7 und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* mit hochaufgelöster  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie bei verschiedenen Konzentrationen an Zelllysate:  $c = 130$  g/l (A) and  $c = 300$  g/l (B). Analyse der Interaktion von dT6 und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* mit hochaufgelöster  $^{19}\text{F}$  NMR-Spektroskopie bei verschiedenen Konzentrationen an Zelllysate:  $c = 135$  g/l (C) and  $c = 210$  g/l (D). Das ansteigende molare Verhältnis an dT7 bzw. dT6 zu 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* ist mittels Farbverlauf wie angegeben gezeigt..... 131
- Abbildung 66: Vergleich der simulierten und experimentell erhaltenen  $^{19}\text{F}$  NMR Daten der Interaktion zwischen dT4 und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* in verdünnter Lösung (A) und bei einer Zelllysate Konzentration von  $c = 340$  g/l (B). Durch die Analyse mittels NMRLineGuru [143] wurden in verdünnter Lösung ein  $K_D$  Wert von  $K_D = 5,7$   $\mu\text{M}$  und ein  $k_{\text{off}}$  Wert von  $k_{\text{off}} = 1170$   $\text{s}^{-1}$  (A) und bei  $c = 340$  g/l Zelllysate ein  $K_D$  Wert von

## Abbildungsverzeichnis

- $K_D = 5,6 \mu\text{M}$  und ein  $k_{\text{off}}$  Wert von  $k_{\text{off}} = 1270 \text{ s}^{-1}$  (B) erhalten. Die  $^{19}\text{F}$  NMR Daten sind in Farbe gezeigt, während die Simulationen in schwarz dargestellt sind..... 132
- Abbildung 67: Verschiedene Markierungspositionen für Fluor an L-Phenylalanin (links) und L-Tryptophan (rechts)..... 133
- Abbildung 68: Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrum von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* in *E. coli* Zellen (A) mit Resonanzsignal von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bei  $\omega = -122,24 \text{ ppm}$ . Vergleich des Resonanzsignals von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bei  $\omega = -122,24 \text{ ppm}$  *in vitro* (rot) und *in vivo* (schwarz) (B)..... 139
- Abbildung 69:  $^{19}\text{F}$  CPMG Relaxationsdispersionsprofile von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bei einer Temperatur von  $T = 298 \text{ K}$ , einer Urea Konzentration von  $c_{\text{Urea}} = 0,0 \text{ M}$  und Magnetfeldstärken von  $B_0 = 11,7 \text{ T}$  (rot) und  $B_0 = 18,8 \text{ K}$  (schwarz). Die durchgezogene Linie zeigt die Anpassung der Daten mit Gleichung (14)..... lvii
- Abbildung 70:  $^{19}\text{F}$  CPMG Relaxationsdispersionsprofile von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bei einer Temperatur von  $T = 298 \text{ K}$ , Urea Konzentrationen von  $c_{\text{Urea}} = 2,5 \text{ M}$  (A) und  $c = 6,0 \text{ M}$  (B) und Magnetfeldstärken von  $B_0 = 11,7 \text{ T}$  (rot) und  $B_0 = 18,8 \text{ K}$  (schwarz). Die durchgezogene Linie zeigt die Anpassung der Daten mit Gleichung (14)..... lviii
- Abbildung 71:  $^{19}\text{F}$  CPMG Relaxationsdispersionsprofile von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bei einer Temperatur von  $T = 298 \text{ K}$ , einer Urea Konzentration,  $c_{\text{Urea}} = 0,0 \text{ M}$  und Magnetfeldstärken von  $B_0 = 18,8 \text{ K}$  in verdünnter Lösung (schwarz) und einer Zelllysate Konzentration von  $c = 200 \text{ g/l}$  (rot) (A). (B) zeigt technische Replikate der  $^{19}\text{F}$  CPMG Relaxationsdispersionsprofile von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* in Zelllysate unter identischen Bedingungen. .... lx

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der genutzten Medien. Die einzelnen Komponenten wurden dampfsterilisiert, außer es ist anderes angegeben. ....	30
Tabelle 2: Für die Proteinaufreinigung verwendeten Puffer. Alle Puffer wurden vor der Nutzung sterilfiltriert und entgast. ....	32
Tabelle 3: Bestimmte Konzentrationen von 5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> und 4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i> in verschiedenen Zellysat Konzentrationen mittels <sup>19</sup> F NMR-Spektroskopie über das Resonanzsignal einer bekannten Menge an TFA. In verdünnter Lösung wurde die Proteinkonzentration mittels UV/Vis Spektroskopie bestimmt. Außerdem das aus dem Nassgewicht bestimmte Trockengewicht des Zellpellets [141]. ....	39
Tabelle 4: Verwendete Konzentrationen an 5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> für die Interaktionsstudien mit dT4, dT6 und dT7 in verschiedenen Konzentrationen an Zellysat angegeben in Nass- und Trockengewicht [141]. ....	40
Tabelle 5: Experimenteller Aufbau um die chemisch induzierte Entfaltung am Beispiel von 5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> in verdünnter Lösung mittels NMR-Spektroskopie aufzunehmen. ....	44
Tabelle 6: Verwendete Konzentrationen an 5- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i> und 4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i> . ....	46
Tabelle 7: Ausbeuten für alle fluormarkierten Varianten des <i>BsCspB</i> . ....	69
Tabelle 8: Analyse der Faltung im Gleichgewicht von wt <i>BsCspB</i> und den sieben fluormarkierten Varianten mittels Fluoreszenzspektroskopie, um die thermodynamische Stabilität, $\Delta G^0$ , zu bestimmen. Dafür wurde die Gleichung (4) verwendet und die Kooperativität, $m$ , wurde als globaler Parameter genutzt und zu $m = -2,9 \pm 0,1 \text{ kJ}/(\text{mol M})$ bestimmt. Der Mittelpunkt des Faltungsübergangs, $C_M$ , wurde mit $C_M = \Delta G^0/m$ kalkuliert. ....	75
Tabelle 9: Analyse der Faltung im Gleichgewicht von wt <i>BsCspB</i> und den sieben fluormarkierten Varianten mittels Fluoreszenzspektroskopie, um die thermodynamische Stabilität, $\Delta G^0$ , zu bestimmen. Dafür wurden die Gleichungen (5) und (6) und die freie Energie, $\Delta G$ , im Übergang linear angepasst. Dabei wurde für die Kooperativität, $m$ , derselbe Wert verwendet, der mittels Gleichung (4) bestimmt	

## Tabellenverzeichnis

wurden. Der Mittelpunkt des Faltungsübergangs, $C_M$ , wurde mit $C_M = \Delta G^0/m$ kalkuliert. .....	77
Tabelle 10: Analyse der Faltung im Gleichgewicht der wt Variante und aller fluormarkierten Varianten mittels eindimensionaler $^1\text{H}$ und $^{19}\text{F}$ NMR-Spektroskopie, um den Temperaturmittelpunkt des Faltungsübergangs zu bestimmen. Dabei wurde in Gleichung (11) die Änderung in der Enthalpie, $\Delta H$ , als globaler Parameter für alle Varianten genutzt und zu $\Delta H = 197 \pm 2$ kJ/mol für die $^1\text{H}$ NMR Daten und zu $\Delta H = 181 \pm 6$ kJ/mol für die $^{19}\text{F}$ NMR Daten bestimmt. Für die Änderung in der Wärmekapazität, $\Delta C_P$ , wurde der Literaturwert $\Delta C_P = 5,8$ kJ/(mol K) verwendet [103]. .....	82
Tabelle 11: Analyse der Entfaltungs- und Rückfaltungskinetik von wt <i>BsCspB</i> und den sieben fluormarkierten Varianten von <i>BsCspB</i> mittels Stopped Flow Fluoreszenz. Die Kooperativität der Faltung, $m = m_f + m_u$ wurde in Gleichung (8) als globaler Parameter verwendet und zu $m = -2,8 \pm 0,8$ kJ/(mol M) bestimmt. Der Wert von $\Delta G^0$ wurde mittels Gleichung (9) bestimmt. ....	85
Tabelle 12: Die freie Energie, $\Delta G^0$ , bei unterschiedlichen Zelllysate Konzentrationen für 5- $^{19}\text{F}$ -Trp <i>BsCspB</i> und 4- $^{19}\text{F}$ -Phe <i>BsCspB</i> bestimmt durch Anpassung der chemisch induzierten Faltungsübergängen mittels Gleichung (12). Die Kooperativität der Faltung, $m$ , wurde als globaler Parameter angepasst und zu $m = -3,3 \pm 0,1$ kJ/(mol M) bestimmt.....	100
Tabelle 13: Bindungsaffinität, $K_D$ , in nM von 4- $^{19}\text{F}$ -Phe <i>BsCspB</i> und 5- $^{19}\text{F}$ -Trp <i>BsCspB</i> zu verschiedenen Oligothymidinen wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht bei $T = 298$ K bestimmt. Dabei wird sich die intrinsische Fluoreszenz von Trp8 zunutze gemacht. Die genutzten Protein Konzentrationen sind in nM angegeben. Die Referenzdaten wurden bei unterschiedlichen Protein Konzentrationen aufgenommen [80]. ....	111
Tabelle 14: Bindungscharakteristika für die Interaktion von dT4, dT6 und dT7 zu 5- $^{19}\text{F}$ -Trp <i>BsCspB</i> erhalten mittels eindimensionaler $^{19}\text{F}$ NMR-Spektroskopie in verdünnter Lösung und Zelllysate (Konzentrationen in g/l angegeben). Die Proteinkonzentration ist in Tabelle 6 angegeben.....	121

## Literaturverzeichnis

1. Vendruscolo, M., et al., *Protein folding and misfolding: a paradigm of self-assembly and regulation in complex biological systems*. Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences, 2003. **361**(1807): p. 1205-1222 DOI: 10.1098/rsta.2003.1194.
2. Tanford, C., *Protein denaturation*. Advances in protein chemistry, 1968. **23**: p. 121-282.
3. Jones, S. and J.M. Thornton, *Principles of protein-protein interactions*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(1): p. 13-20.
4. Edman, P. and G. Begg, *A protein sequenator*, in *European Journal of Biochemistry*. 1967, Springer. p. 80-91.
5. Berman, H.M., et al., *The protein data bank*. Nucleic acids research, 2000. **28**(1): p. 235-242.
6. Barnes, C.O. and G.J. Pielak, *In-cell protein NMR and protein leakage*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2011. **79**(2): p. 347-351 DOI: 10.1002/prot.22906.
7. Sarkar, M., C. Li, and G.J. Pielak, *Soft interactions and crowding*. Biophysical reviews, 2013. **5**(2): p. 187-194.
8. Zimmerman, S.B. and S.O. Trach, *Estimation of Macromolecule Concentrations and Excluded Volume Effects for the Cytoplasm of Escherichia-Coli*. Journal of Molecular Biology, 1991. **222**(3): p. 599-620 DOI: Doi 10.1016/0022-2836(91)90499-V.
9. Fulton, A.B., *How crowded is the cytoplasm?* Cell, 1982. **30**(2): p. 345-347.
10. Cheung, M.C., et al., *Intracellular protein and nucleic acid measured in eight cell types using deep - ultraviolet mass mapping*. Cytometry Part A, 2013. **83**(6): p. 540-551.
11. Köhn, B. and M. Kovermann, *Macromolecular crowding tunes protein stability by manipulating solvent accessibility*. ChemBioChem, 2019. **20**(6): p. 759-763 DOI: 10.1002/cbic.201800679.
12. Olsen, S.N., *Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions*. Thermochemica Acta, 2006. **448**(1): p. 12-18 DOI: 10.1016/j.tca.2006.06.019.
13. Homchaudhuri, L., N. Sarma, and R. Swaminathan, *Effect of crowding by dextrans and ficolls on the rate of alkaline phosphatase-catalyzed hydrolysis: A size-dependent investigation*. Biopolymers, 2006. **83**(5): p. 477-486 DOI: 10.1002/bip.20578.
14. Ellis, R.J., *Macromolecular crowding: obvious but underappreciated*. Trends in Biochemical Sciences, 2001. **26**(10): p. 597-604 DOI: Doi 10.1016/S0968-0004(01)01938-7.
15. Gierasch, L.M. and A. Gershenson, *Post-reductionist protein science, or putting Humpty Dumpty back together again*. Nature Chemical Biology, 2009. **5**(11): p. 774-777 DOI: 10.1038/nchembio.241.

## Literaturverzeichnis

16. Zhou, H.X., *Protein folding in confined and crowded environments*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008. **469**(1): p. 76-82 DOI: 10.1016/j.abb.2007.07.013.
17. Fodeke, A.A. and A.P. Minton, *Quantitative Characterization of Temperature-Independent and Temperature-Dependent Protein-Protein Interactions in Highly Nonideal Solutions*. Journal of Physical Chemistry B, 2011. **115**(38): p. 11261-11268 DOI: 10.1021/jp2049266.
18. Schnell, S. and T.E. Turner, *Reaction kinetics in intracellular environments with macromolecular crowding: simulations and rate laws*. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 2004. **85**(2-3): p. 235-260 DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.012.
19. van den Berg, B., R.J. Ellis, and C.M. Dobson, *Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation*. The EMBO journal, 1999. **18**(24): p. 6927-6933.
20. van den Berg, B., et al., *Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell*. The EMBO journal, 2000. **19**(15): p. 3870-3875.
21. Charlton, L.M., et al., *Residue-level interrogation of macromolecular crowding effects on protein stability*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(21): p. 6826-6830 DOI: 10.1021/ja8005995.
22. Ai, X., et al., *<sup>15</sup>N NMR spin relaxation dispersion study of the molecular crowding effects on protein folding under native conditions*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(12): p. 3916-3917.
23. Elcock, A.H., *Models of macromolecular crowding effects and the need for quantitative comparisons with experiment*. Current Opinion in Structural Biology, 2010. **20**(2): p. 196-206 DOI: 10.1016/j.sbi.2010.01.008.
24. Monteith, W.B., et al., *Quinary structure modulates protein stability in cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(6): p. 1739-1742.
25. Cohen, S.S., *The isolation and crystallization of plant viruses and other protein macromolecules by means of hydrophilic colloids*. Journal of Biological Chemistry, 1942. **144**(2): p. 353-362.
26. Juckes, I., *Fractionation of proteins and viruses with PEG*. Biochim Biophys Acta, 1971. **82**: p. 463-475.
27. Laurent, T., *The interaction between polysaccharides and other macromolecules. 5. The solubility of proteins in the presence of dextran*. Biochemical Journal, 1963. **89**(2): p. 253-257.
28. Minton, A.P., *Non-ideality and the thermodynamics of sickle-cell hemoglobin gelation*. Journal of molecular biology, 1977. **110**(1): p. 89-103.
29. Minton, A. and J. Wilf, *Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Biochemistry, 1981. **20**(17): p. 4821-4826.
30. Minton, A.P., *Excluded Volume as a Determinant of Macromolecular Structure and Reactivity*. Biopolymers, 1981. **20**(10): p. 2093-2120 DOI: DOI 10.1002/bip.1981.360201006.

## Literaturverzeichnis

31. Zimmerman, S.B. and A.P. Minton, *Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 1993. **22**(1): p. 27-65.
32. Wills, P.R., et al., *Measurement of thermodynamic nonideality arising from volume-exclusion interactions between proteins and polymers*. Biophysical chemistry, 1995. **57**(1): p. 37-46.
33. Minton, A.P., *Effect of a concentrated "inert" macromolecular cosolute on the stability of a globular protein with respect to denaturation by heat and by chaotropes: a statistical-thermodynamic model*. Biophysical Journal, 2000. **78**(1): p. 101-109.
34. Minton, A.P., *Models for excluded volume interaction between an unfolded protein and rigid macromolecular cosolutes: macromolecular crowding and protein stability revisited*. Biophysical journal, 2005. **88**(2): p. 971-985.
35. Zhou, H.X., G.N. Rivas, and A.P. Minton, *Macromolecular crowding and confinement: Biochemical, biophysical, and potential physiological consequences*. Annual Review of Biophysics, 2008. **37**: p. 375-397 DOI: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125817.
36. Christiansen, A. and P. Wittung-Stafshede, *Quantification of excluded volume effects on the folding landscape of Pseudomonas aeruginosa apoazurin in vitro*. Biophysical journal, 2013. **105**(7): p. 1689-1699.
37. Hong, J. and L.M. Gierasch, *Macromolecular crowding remodels the energy landscape of a protein by favoring a more compact unfolded state*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(30): p. 10445-10452.
38. Shtilerman, M.D., T.T. Ding, and P.T. Lansbury, *Molecular crowding accelerates fibrillization of  $\alpha$ -synuclein: could an increase in the cytoplasmic protein concentration induce Parkinson's disease?* Biochemistry, 2002. **41**(12): p. 3855-3860.
39. Akabayov, B., et al., *Impact of macromolecular crowding on DNA replication*. Nature communications, 2013. **4**(1): p. 1-10.
40. Dupuis, N.F., E.D. Holmstrom, and D.J. Nesbitt, *Molecular-crowding effects on single-molecule RNA folding/unfolding thermodynamics and kinetics*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(23): p. 8464-8469.
41. Miklos, A.C., et al., *Volume Exclusion and Soft Interaction Effects on Protein Stability under Crowded Conditions*. Biochemistry, 2010. **49**(33): p. 6984-6991 DOI: 10.1021/bi100727y.
42. Benton, L.A., et al., *Unexpected effects of macromolecular crowding on protein stability*. Biochemistry, 2012. **51**(49): p. 9773-9775.
43. Rubinstein, M. and R.H. Colby, *Polymer physics*. Vol. 23. 2003: Oxford university press New York.
44. Wang, Y.Q., C.G. Li, and G.J. Pielak, *Effects of Proteins on Protein Diffusion*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(27): p. 9392-9397 DOI: 10.1021/ja102296k.
45. Wilf, J. and A.P. Minton, *Evidence for protein self-association induced by excluded volume myoglobin in the presence of globular proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1981. **670**(3): p. 316-322.

## Literaturverzeichnis

46. Zorrilla, S., et al., *Protein self - association in crowded protein solutions: A time - resolved fluorescence polarization study*. Protein science, 2004. **13**(11): p. 2960-2969.
47. Guseman, A.J., et al., *Surface charge modulates protein–protein interactions in physiologically relevant environments*. Biochemistry, 2018. **57**(11): p. 1681-1684.
48. Guseman, A.J., et al., *Protein shape modulates crowding effects*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(43): p. 10965-10970.
49. Minton, A.P., *Quantitative assessment of the relative contributions of steric repulsion and chemical interactions to macromolecular crowding*. Biopolymers, 2013. **99**(4): p. 239-244 DOI: 10.1002/bip.22163.
50. Makhatadze, G.I. and P.L. Privalov, *Protein interactions with urea and guanidinium chloride: a calorimetric study*. Journal of molecular biology, 1992. **226**(2): p. 491-505.
51. Sarkar, M., J. Lu, and G.J. Pielak, *Protein Crowder Charge and Protein Stability*. Biochemistry, 2014. **53**(10): p. 1601-1606 DOI: 10.1021/bi4016346.
52. Wang, Y.Q., et al., *Macromolecular Crowding and Protein Stability*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(40): p. 16614-16618 DOI: 10.1021/ja305300m.
53. Miklos, A.C., et al., *Protein Crowding Tunes Protein Stability*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(18): p. 7116-7120 DOI: 10.1021/ja200067p.
54. Phillip, Y., V. Kiss, and G. Schreiber, *Protein-binding dynamics imaged in a living cell*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(5): p. 1461-1466.
55. Sarkar, M., A.E. Smith, and G.J. Pielak, *Impact of reconstituted cytosol on protein stability*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(48): p. 19342-19347 DOI: 10.1073/pnas.1312678110.
56. Wang, Q., A. Zhuravleva, and L.M. Gierasch, *Exploring weak, transient protein–protein interactions in crowded in vivo environments by in-cell nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Biochemistry, 2011. **50**(43): p. 9225-9236.
57. Christiansen, A., et al., *Effects of macromolecular crowding agents on protein folding in vitro and in silico*. Biophysical reviews, 2013. **5**(2): p. 137-145.
58. Kuznetsova, I.M., K.K. Turoverov, and V.N. Uversky, *What macromolecular crowding can do to a protein*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(12): p. 23090-23140.
59. Stadmiller, S.S. and G.J. Pielak, *Protein-complex stability in cells and in vitro under crowded conditions*. Current Opinion in Structural Biology, 2021. **66**: p. 183-192.
60. Ghaemmaghami, S. and T.G. Oas, *Quantitative protein stability measurement in vivo*. Nature Structural Biology, 2001. **8**(10): p. 879-882 DOI: DOI 10.1038/nsb1001-879.
61. Dedmon, M.M., et al., *FlgM gains structure in living cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(20): p. 12681-12684.
62. Schlesinger, A.P., et al., *Macromolecular Crowding Fails To Fold a Globular Protein in Cells*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(21): p. 8082-8085 DOI: 10.1021/ja201206t.
63. Cohen, R.D. and G.J. Pielak, *Electrostatic contributions to protein quinary structure*. Journal of the American Chemical Society, 2016. **138**(40): p. 13139-13142.

## Literaturverzeichnis

64. Cohen, R.D. and G.J. Pielak, *A cell is more than the sum of its (dilute) parts: A brief history of quinary structure*. Protein Science, 2017. **26**(3): p. 403-413.
65. Danielsson, J., et al., *Thermodynamics of protein destabilization in live cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(40): p. 12402-12407.
66. Sudhaharan, T., et al., *Determination of in vivo dissociation constant, KD, of Cdc42-effector complexes in live mammalian cells using single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(20): p. 13602-13609.
67. Shi, X., et al., *Determination of dissociation constants in living zebrafish embryos with single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy*. Biophysical journal, 2009. **97**(2): p. 678-686.
68. Graumann, P., et al., *Cold shock stress-induced proteins in Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 1996. **178**(15): p. 4611-4619 DOI: DOI 10.1128/jb.178.15.4611-4619.1996.
69. Goldstein, J., N.S. Pollitt, and M. Inouye, *Major Cold Shock Protein of Escherichia-Coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(1): p. 283-287 DOI: DOI 10.1073/pnas.87.1.283.
70. Schindelin, H., M.A. Marahiel, and U. Heinemann, *Universal Nucleic Acid-Binding Domain Revealed by Crystal-Structure of the Bacillus-Subtilis Major Cold-Shock Protein*. Nature, 1993. **364**(6433): p. 164-168 DOI: DOI 10.1038/364164a0.
71. Max, K.E., et al., *T-rich DNA single strands bind to a preformed site on the bacterial cold shock protein Bs-CspB*. Journal of molecular biology, 2006. **360**(3): p. 702-714.
72. Dickey, T.H., S.E. Altschuler, and D.S. Wuttke, *Single-stranded DNA-binding proteins: multiple domains for multiple functions*. Structure, 2013. **21**(7): p. 1074-1084.
73. Schindelin, H., et al., *Overproduction, Crystallization, and Preliminary-X-Ray Diffraction Studies of the Major Cold Shock Protein from Bacillus-Subtilis, Cspb*. Proteins-Structure Function and Genetics, 1992. **14**(1): p. 120-124 DOI: DOI 10.1002/prot.340140113.
74. Willimsky, G., et al., *Characterization of Cspb, a Bacillus-Subtilis Inducible Cold Shock Gene Affecting Cell Viability at Low-Temperatures*. Journal of Bacteriology, 1992. **174**(20): p. 6326-6335 DOI: Doi 10.1128/Jb.174.20.6326-6335.1992.
75. Schnuchel, A., et al., *Structure in Solution of the Major Cold-Shock Protein from Bacillus-Subtilis*. Nature, 1993. **364**(6433): p. 169-171 DOI: DOI 10.1038/364169a0.
76. Wolffe, A.P., *Structural and Functional-Properties of the Evolutionarily Ancient Y-Box Family of Nucleic-Acid Binding-Proteins*. Bioessays, 1994. **16**(4): p. 245-251 DOI: DOI 10.1002/bies.950160407.
77. Graumann, P. and M.A. Marahiel, *The major cold shock protein of Bacillus subtilis CspB binds with high affinity to the ATTGG-and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides*. FEBS letters, 1994. **338**(2): p. 157-160.
78. Zeeb, M. and J. Balbach, *Single - stranded DNA binding of the cold - shock protein CspB from Bacillus subtilis: NMR mapping and mutational characterization*. Protein science, 2003. **12**(1): p. 112-123.

## Literaturverzeichnis

79. Lopez, M.M., K. Yutani, and G.I. Makhatadze, *Interactions of the major cold shock protein of Bacillus subtilis CspB with single-stranded DNA templates of different base composition*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(47): p. 33601-33608.
80. Zeeb, M., et al., *Recognition of T-rich single-stranded DNA by the cold shock protein Bs-CspB in solution*. Nucleic acids research, 2006. **34**(16): p. 4561-4571.
81. Morgan, H.P., et al., *Sequence specificity of single-stranded DNA-binding proteins: a novel DNA microarray approach*. Nucleic acids research, 2007. **35**(10): p. e75.
82. Schröder, K., et al., *Mutational analysis of the putative nucleic acid - binding surface of the cold - shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single - stranded DNA containing the Y - box motif*. Molecular microbiology, 1995. **16**(4): p. 699-708.
83. Mirny, L.A. and E.I. Shakhnovich, *Universally conserved positions in protein folds: reading evolutionary signals about stability, folding kinetics and function*. Journal of molecular biology, 1999. **291**(1): p. 177-196.
84. Max, K.E., et al., *Optimized variants of the cold shock protein from in vitro selection: structural basis of their high thermostability*. Journal of molecular biology, 2007. **369**(4): p. 1087-1097.
85. Schindler, T., et al., *Surface-exposed phenylalanines in the RNP1/RNP2 motif stabilize the cold-shock protein CspB from Bacillus subtilis*. Proteins-Structure Function and Genetics, 1998. **30**(4): p. 401-406 DOI: Doi 10.1002/(Sici)1097-0134(19980301)30:4<401::Aid-Prot7>3.0.Co;2-L.
86. Martin, A., I. Kather, and F.X. Schmid, *Origins of the high stability of an in vitro-selected cold-shock protein*. Journal of molecular biology, 2002. **318**(5): p. 1341-1349.
87. Garcia-Mira, M.M., D. Boehringer, and F.X. Schmid, *The folding transition state of the cold shock protein is strongly polarized*. Journal of molecular biology, 2004. **339**(3): p. 555-569.
88. Schindler, T., et al., *Extremely Rapid Protein-Folding in the Absence of Intermediates*. Nature Structural Biology, 1995. **2**(8): p. 663-673 DOI: DOI 10.1038/nsb0895-663.
89. Karanicolas, J. and C.L. Brooks III, *The importance of explicit chain representation in protein folding models: an examination of Ising - like models*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2003. **53**(3): p. 740-747.
90. Jacob, M., et al., *Diffusion control in an elementary protein folding reaction*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(11): p. 5622-5627.
91. Schindler, T., et al., *The family of cold shock proteins of Bacillus subtilis - Stability and dynamics in vitro and in vivo*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(6): p. 3407-3413 DOI: DOI 10.1074/jbc.274.6.3407.
92. Atkins, P.W. and J. De Paula, *Physikalische Chemie*. 2013: John Wiley & Sons.
93. Schmid, F., *Spectroscopic techniques to study protein folding and stability*. Protein folding handbook, 2005: p. 22-44.
94. Rabi, I.I., et al., *A new method of measuring nuclear magnetic moment*. Physical review, 1938. **53**(4): p. 318.

## Literaturverzeichnis

95. Bloch, F., *Nuclear induction*. Physical review, 1946. **70**(7-8): p. 460.
96. Purcell, E.M., H.C. Torrey, and R.V. Pound, *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid*. Physical review, 1946. **69**(1-2): p. 37.
97. Saunders, M., A. Wishnia, and J.G. Kirkwood, *The nuclear magnetic resonance spectrum of ribonuclease I*. Journal of the American Chemical Society, 1957. **79**(12): p. 3289-3290.
98. Kowalsky, A., *Nuclear magnetic resonance studies of proteins*. Journal of Biological Chemistry, 1962. **237**(6): p. 1807-1819.
99. Wider, G. and K. Wüthrich, *NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution*. Current opinion in structural biology, 1999. **9**(5): p. 594-601.
100. Kovermann, M., P. Rogne, and M. Wolf-Watz, *Protein dynamics and function from solution state NMR spectroscopy*. Quarterly reviews of biophysics, 2016. **49**.
101. Jacobsen, N.E., *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. 2007, Hoboken, NJ: Wiley.
102. Cavanagh, J., *Protein NMR spectroscopy: principles and practice*. 2007: Elsevier.
103. Szyperski, T., et al., *Combined NMR-observation of cold denaturation in supercooled water and heat denaturation enables accurate measurement of Delta C-p of protein unfolding*. European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 2006. **35**(4): p. 363-366 DOI: 10.1007/s00249-005-0028-4.
104. Hansen, A.L., et al., *Quantifying millisecond exchange dynamics in proteins by CPMG relaxation dispersion NMR using side-chain 1H probes*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(6): p. 3178-3189.
105. Fielding, L., S. Rutherford, and D. Fletcher, *Determination of protein–ligand binding affinity by NMR: observations from serum albumin model systems*. Magnetic resonance in Chemistry, 2005. **43**(6): p. 463-470.
106. Köhn, B. and M. Kovermann, *All atom insights into the impact of crowded environments on protein stability by NMR spectroscopy*. Nature communications, 2020. **11**(1): p. 1-10.
107. Miklos, A.C., C. Li, and G.J. Pielak, *Using NMR-detected backbone amide 1H exchange to assess macromolecular crowding effects on globular-protein stability*. Methods in enzymology, 2009. **466**: p. 1-18.
108. Freedberg, D.I. and P. Selenko, *Live Cell NMR*. Annual Review of Biophysics, Vol 43, 2014. **43**: p. 171-192 DOI: 10.1146/annurev-biophys-051013-023136.
109. Selenko, P. and G. Wagner, *Looking into live cells with in-cell NMR spectroscopy*. Journal of Structural Biology, 2007. **158**(2): p. 244-253 DOI: 10.1016/j.jsb.2007.04.001.
110. Mason, J., *Multinuclear NMR*. 1987, New York: Plenum Press.
111. Schuler, B., et al., *Role of entropy in protein thermostability: Folding kinetics of a hyperthermophilic cold shock protein at high temperatures using F-19 NMR*. Biochemistry, 2002. **41**(39): p. 11670-11680 DOI: 10.1021/bi0262931.
112. Danielson, M.A. and J.J. Falke, *Use of 19F NMR to probe protein structure and conformational changes*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 1996. **25**: p. 163.

## Literaturverzeichnis

113. Khan, F., et al., *<sup>19</sup>F NMR studies of the native and denatured states of green fluorescent protein*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(33): p. 10729-10737.
114. Bann, J.G., et al., *Real-time and equilibrium <sup>19</sup>F-NMR studies reveal the role of domain–domain interactions in the folding of the chaperone PapD*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(2): p. 709-714.
115. Kitevski-LeBlanc, J.L., et al., *<sup>19</sup>F NMR studies of a desolvated near-native protein folding intermediate*. Biochemistry, 2013. **52**(34): p. 5780-5789.
116. Li, H.L. and C. Frieden, *Observation of sequential steps in the folding of intestinal fatty acid binding protein using a slow folding mutant and F-19 NMR*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(29): p. 11993-11998 DOI: 10.1073/pnas.0705253104.
117. Stadmiller, S.S., et al., *Rapid quantification of protein-ligand binding via <sup>19</sup>F NMR lineshape analysis*. Biophysical journal, 2020. **118**(10): p. 2537-2548.
118. Kim, T.H., et al., *The role of ligands on the equilibria between functional states of a G protein-coupled receptor*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(25): p. 9465-9474.
119. Klimašauskas, S., et al., *Dynamic modes of the flipped - out cytosine during HhaI methyltransferase–DNA interactions in solution*. The EMBO journal, 1998. **17**(1): p. 317-324.
120. Kwon, K., et al., *<sup>19</sup>F NMR studies of vaccinia type IB topoisomerase: conformational dynamics of the bound DNA substrate*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(1): p. 353-358.
121. Song, L., et al., *<sup>19</sup>F-NMR reveals metal and operator-induced allostery in MerR*. Journal of molecular biology, 2007. **371**(1): p. 79-92.
122. Overbeck, J.H., W. Kremer, and R. Sprangers, *A suite of <sup>19</sup>F based relaxation dispersion experiments to assess biomolecular motions*. Journal of biomolecular NMR, 2020. **74**(12): p. 753-766.
123. Hoang, J. and R.S. Prosser, *Conformational selection and functional dynamics of calmodulin: a <sup>19</sup>F nuclear magnetic resonance study*. Biochemistry, 2014. **53**(36): p. 5727-5736.
124. Aramini, J.M., et al., *<sup>19</sup>F NMR reveals multiple conformations at the dimer interface of the nonstructural protein 1 effector domain from influenza A virus*. Structure, 2014. **22**(4): p. 515-525.
125. Cobb, S.L. and C.D. Murphy, *<sup>19</sup>F NMR applications in chemical biology*. Journal of Fluorine Chemistry, 2009. **130**(2): p. 132-143.
126. Gerig, J., *Fluorine NMR of proteins*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1994. **26**: p. 293-370.
127. Stadmiller, S.S., et al., *Protein–Peptide Binding Energetics under Crowded Conditions*. The Journal of Physical Chemistry B, 2020. **124**(42): p. 9297-9309.
128. Li, C.G., et al., *Protein F-19 NMR in Escherichia coli*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(1): p. 321-327 DOI: 10.1021/ja907966n.

## Literaturverzeichnis

129. Sachs, R., *Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an bakteriellen Kälteschockproteinen: Charakterisierung eines durch Kälte denaturierenden Proteins und Bindung einzelsträngiger RNA*, in *Naturwissenschaftliche Fakultät I*. 2010, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
130. Piotrowski, C., C.H. Ihling, and A. Sinz, *Extending the cross-linking/mass spectrometry strategy: Facile incorporation of photo-activatable amino acids into the model protein calmodulin in Escherichia coli cells*. *Methods*, 2015. **89**: p. 121-127.
131. Sun, X., H.J. Dyson, and P.E. Wright, *Fluorotryptophan Incorporation Modulates the Structure and Stability of Transthyretin in a Site-Specific Manner*. *Biochemistry*, 2017. **56**(41): p. 5570-5581 DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00815.
132. Royer, C.A., C.J. Mann, and C.R. Matthews, *Resolution of the Fluorescence Equilibrium Unfolding Profile of Trp Aporepressor Using Single Tryptophan Mutants*. *Protein Science*, 1993. **2**(11): p. 1844-1852 DOI: DOI 10.1002/pro.5560021106.
133. Warren, J.R. and J.A. Gordon, *On Refractive Indices of Aqueous Solutions of Urea*. *Journal of Physical Chemistry*, 1966. **70**(1): p. 297-& DOI: DOI 10.1021/j100873a507.
134. Santoro, M.M. and D.W. Bolen, *Unfolding Free-Energy Changes Determined by the Linear Extrapolation Method .I. Unfolding of Phenylmethanesulfonyl Alpha-Chymotrypsin Using Different Denaturants*. *Biochemistry*, 1988. **27**(21): p. 8063-8068 DOI: DOI 10.1021/bi00421a014.
135. Alexander, S.S. and C.N. Pace, *Comparison of Denaturation of Bovine Beta-Lactoglobulins-a and B and Goat Beta-Lactoglobulin*. *Biochemistry*, 1971. **10**(14): p. 2738-+.
136. Kabsch, W., *Xds*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010. **66**(2): p. 125-132.
137. McCoy, A., et al., *PHASER crystallographic software*. *J. Appl. Cryst.* *J. Appl. Cryst*, 2007.
138. Emsley, P., et al., *Features and development of Coot*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010. **66**(4): p. 486-501.
139. Adams, P.D., et al., *The Phenix software for automated determination of macromolecular structures*. *Methods*, 2011. **55**(1): p. 94-106.
140. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis*. *Journal of computational chemistry*, 2004. **25**(13): p. 1605-1612.
141. Glazyrina, J., et al., *High cell density cultivation and recombinant protein production with Escherichia coli in a rocking-motion-type bioreactor*. *Microbial Cell Factories*, 2010. **9**(1): p. 42.
142. Grzesiek, S., et al., *The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR*. *Biochemistry*, 1996. **35**(32): p. 10256-10261.
143. Feng, C., E.L. Kovrigin, and C.B. Post, *NmrLineGuru: Standalone and User-Friendly GUIs for Fast 1D NMR Lineshape Simulation and Analysis of Multi-State Equilibrium Binding Models*. *Scientific reports*, 2019. **9**(1): p. 1-14.
144. Kovermann, M. and J. Balbach, *Dynamic control of the prolyl isomerase function of the dual-domain SlyD protein*. *Biophysical chemistry*, 2013. **171**: p. 16-23.

## Literaturverzeichnis

145. Welte, H. and M. Kovermann, *Targeted expression and purification of fluorine labelled cold shock protein B by using an auxotrophic strategy*. Protein Expression and Purification, 2019. **157**: p. 86-91 DOI: 10.1016/j.pep.2019.02.006.
146. Steinrücken, H. and N. Amrhein, *The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase*. Biochemical and biophysical research communications, 1980. **94**(4): p. 1207-1212.
147. Motta, E.V., K. Raymann, and N.A. Moran, *Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(41): p. 10305-10310.
148. Funke, T., et al., *Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(35): p. 13010-13015.
149. Funke, T., et al., *Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 → Ile and Pro101 → Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(15): p. 9854-9860.
150. Brouwers, R., et al., *Stability of  $\beta$ -lactam antibiotics in bacterial growth media*. PloS one, 2020. **15**(7): p. e0236198.
151. Korpimäki, T., J. Kurittu, and M. Karp, *Surprisingly fast disappearance of  $\beta$ -lactam selection pressure in cultivation as detected with novel biosensing approaches*. Journal of microbiological methods, 2003. **53**(1): p. 37-42.
152. Welte, H., et al., *What does fluorine do to a protein? Thermodynamic, and highly-resolved structural insights into fluorine-labelled variants of the cold shock protein*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 1-12.
153. Wong, C.-Y. and M.R. Eftink, *Incorporation of tryptophan analogues into staphylococcal nuclease, its V66W mutant, and  $\Delta$ 137–149 fragment: Spectroscopic studies*. Biochemistry, 1998. **37**(25): p. 8938-8946.
154. Pace, C.N., *Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves*, in *Methods in enzymology*. 1986, Elsevier. p. 266-280.
155. Khan, F., et al., *The kinetic pathway of folding of barnase*. Journal of molecular biology, 2003. **333**(1): p. 169-186.
156. De Oliveira, V.M., et al., *pH and Charged Mutations Modulate Cold Shock Protein Folding and Stability: A Constant pH Monte Carlo Study*. Journal of chemical theory and computation, 2019. **16**(1): p. 765-772.
157. Welte, H. and M. Kovermann, *Insights into protein stability in cell lysate by  $^{19}\text{F}$  NMR spectroscopy*. ChemBioChem, 2020. **21**(24): p. 3575.
158. Bryant, J.E., et al., *Protein dynamics in living cells* Biochemistry, 2007. **46**(27): p. 8206-8206 DOI: 10.1021/bi700744h.
159. Minton, A.P., *Excluded Volume as a Determinant of Protein-Structure and Stability*. Biophysical Journal, 1980. **32**(1): p. 77-79 DOI: Doi 10.1016/S0006-3495(80)84917-4.
160. Sommerville, J. and M. Ladomery, *Masking of mRNA by Y-box proteins*. Faseb Journal, 1996. **10**(4): p. 435-443.

## Literaturverzeichnis

161. Furukawa, A., et al., *Quantitative analysis of protein–ligand interactions by NMR*. Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy, 2016. **96**: p. 47-57.
162. Hänsel, R., et al., *Intrazelluläre NMR - und EPR - Spektroskopie von biologischen Makromolekülen*. Angewandte Chemie, 2014. **126**(39): p. 10466-10480.
163. Braun, T.S., et al., *Intracellular Protein–Lipid Interactions Studied by Rapid-Scan Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy*. The journal of physical chemistry letters, 2021. **12**(9): p. 2471-2475.

## Anhang

### Anhang 1: CaCl<sub>2</sub> Transformation von *E. coli* Zellen.

- *E. coli* Kultur bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von ungefähr 0,6 wachsen lassen
- Pro Transformation 1 ml Kultur abzentrifugieren und das Zellpellet in 100 µl 50 mM CaCl<sub>2</sub> (autoklaviert oder sterilfiltriert) resuspendieren (für längeres Lagern der kompetenten Zellen, 50 mM CaCl<sub>2</sub> in 10 % Glycerin verwenden)
- Auf Eis für 20 min inkubieren
- Hinzufügen der DNS (10 pg – 10 ng in 1-20 µl) und vorsichtig aber gründlich mixen
- Auf Eis 3 (-30) min inkubieren
- Heatshock bei 42 °C für 30-45 s (nicht länger!)
- Zugabe von 0,5 ml SOC (oder LB) Medium und bei 37 °C bei leichtem Schütteln für 30 min inkubieren
- Auf LB Platte mit entsprechenden Antibiotika ausplattieren

## Anhang

### Anhang 2: Sequenz des pET11a Vektors mit *BsCspB* Sequenz (rot).

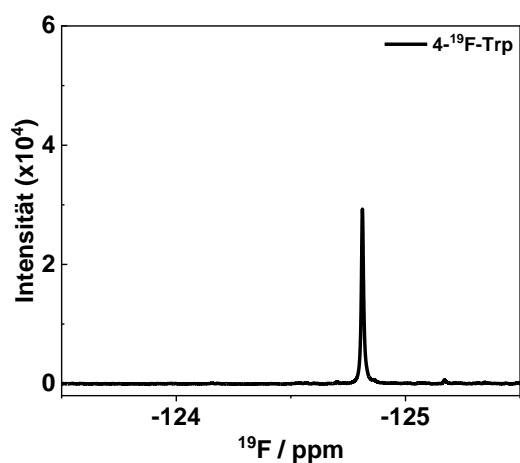
ggagatatacatatgttagaaggtaaagtaaaatggttcaactctgaaaaaggttcggattatcgaagtagaaggtaaacgacgatgtattcgtt  
catttctctgtattcaaggcgaaggctcaaaactttagaagaaggccaagctgtttctttgaaatcgttgaaggaaaccgcgaccacaagct  
gctaacgttactaaagaagcgttaaggatccggctgtaacaaagcccgaaggaaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataacta  
gcataacccttggggcctctaaacgggtctgaggggttttctgtaaaagggaactatatccggatcccgcaagaggcccggcagtac  
cggcataaccaagcctatgcctacagcatccagggtgacggtgccgaggatgacgatgagcgcattgttagattcatacacggctgctgact  
gcgttagcaatttaactgtgataaactaccgcattaagcttatcgatgataagctgcaaacatgagaattctgaagacgaaagggcctcgtg  
atacgcctattttataggtaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcgggaaatgtgcccgaaccctattgtttat  
tctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataattgaaaaaggaagatgagattcaacatt  
ccgtgctgcccttattcccttttgcggcattttgcttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggt  
gcacgagtggttcatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaacggttccaatgatgagcacttttaa  
gttctgctatgtgcccgggtattatccggttgacgcccggcaagagcaactcggctgcccgcatacactattctcagaatgactggttgact  
caccagtcacagaaaagcatctacggatggcatgacagtaagagaattatgacgtgctccataacctgagtgataaactgcccgaac  
ttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgcttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccgga  
gctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccagatgctgacgaatggcaacaacggtgcccgaactattaactggcgaacta  
cttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaaagttgcaggaccacttctgctcggccttccggctggtggtt  
attgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtatctac  
acgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgtaactgtcagacca  
agttactcatatatactttagattgatttaaaacttattttaaagatctaggtaagatccttttgataatctcatgaccaaataccctaa  
cgtgagtttctgctccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgagatccttttctgcccgtaatctgctgctgcaaca  
aaaaaacaccgctaccagcgggtggttggcggatcaagagctaccaactctttccgaaggaactggtcagcagagcgcagatac  
caaaactgctcttagttagcgttagttagccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctgctctgtaactcctgttaccagtg  
gctgctgccagtgccgataagctgcttaccgggtgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctggaacgggggtg  
tcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgaaagcgcacgctcccga  
gggagaaaggcggacaggtatccgtaagcggcaggtcggaaacagagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtat  
ctttatagctctgctgggttccaccctctgactgagcgtcattttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccagcaac  
gccccttttacggttctgcttggcctttgctcacaatgcttctcgttaccctgattctgtgataaccgtattaccgctttgagtg  
agctgataaccgctcggcagccgaacgaccgagcgcagcagtgatgagcaggaagcgggaagagcgcctgatgctgattttctcct  
acgcatctgtgctgattttacaccgcaatggtgactctcagtaaatctgctgatgccatagtttaagccagatacactccgctatcgta  
cgtgactgggtatggctgcccgcaccccgaacaccgctgacgcccctgacgggctgtgctcctccggcatccgcttacagaca  
agctgtgaccgctcgggagctgcatgtgtagaggtttaccgctacaccgaaacgcgcgagggcagctgcccgtaaagctcatcagcgtg  
gtcgtgaagcgattcacagatgtctgctgttaccgctcagctcgtttagtttccaagaagcgttaatgtctgcttctgataaagcgggcca  
tgttaaggcgggttttctggttggctcactgatgctcctgtaaggggatttctgttcatggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatg  
ctcacgatacgggttactgatgatgaacatcccgggttactggaacggtgtgagggtaaaactggcgggtatggatgcccgggaccagag  
aaaaatcactcagggtcaatgcagcgccttcttaatacagatgtaggtgtccacagggtagccagcagcatcctgctgatgagatccggaa  
cataatggtgagggcgtgactccgcttccagactttacgaaacacggaacccgaagaccattcatgtgtgctcaggtcgcagacgcttt  
gcagcagcagctcctcagctcgcctgctatcgggtgattcattctgtaaccagtaaggcaaccggcagcctagcccgggtcctcaacgac  
aggagcacgatcatgcccaccggtgccaggaccaacgctgcccagatgcccgcgctgcccgtgctggagatggcggacgcgatgga  
tatgttctgccaagggtggttgcgcaatcagcttccgcaagaattgattggctcaattcttgagtggtgaatccgttagcagaggtccgccc  
ggcttccattcaggtcaggtgcccggctcctatgaccggcagcgaacgcggggaggcagacaaggtataggcggcgcctacaatcca  
tgcaaccgcttccatgtgctcggcagggcagcgaataatccggtgacgatcagcgggtccaatgatcgaagttaggctggttaagagccgca  
gcatcctgaagctgctcctgatggtcgtcatctacctgctggacagcatggcctgcaacgcgggcatcccgatgcccgggaagcagaa  
gaatcataatggggaaggccatccagcctcgcgtcgcgaacccagcaagacgtagcccagcgcgctgcccggcctatgcccggcgaatg  
gctgcttctcggcgaacggttggggggaccagtgacgaaggctgagcagggcgtgcaagattccaataaccgaagcagcagggc  
cgatcatcgtcgcctccagcgaagcggctcctcggcgaatgaccagagcgtgcccggcactgctcactcaggttgcagataaagaa  
gacagtcataagtgccgacgatagtcaccccgcgccaccggaaggagctgactgggtgaaaggctctcaaggcctcaggtcagat  
cccgggtcctaagtagtgagtaactacattaattgcttgcgctcactgcccgttccagctgggaaacctgctgctcagctcattaatgaa  
tcggccaacgcgcgggagagggcgttgcgtattggcgccagggtggttttctttaccagtgagacgggcaacagctgattgccctcac  
cgcctggcctgagagaggtgacgaagcgttccacgctggttgcggcagcggcaaaaactctgttggatggtggttaacggcgggatata  
acatgagctgcttccgtatcgtcgtatcccactaccgagatataccgaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgattgcccag  
cgccatctgatcgttggcaaccagcatcgcagtggaacgatgccctcattcagcatttgcagttgttggaaaccggacatggcactccagt  
cgccttccgctccgctatcggctgaattgattgagtagatattatgccagccagccagacgcagcgcggagacagaactaatgg  
gcccgtaacagcgcgatttctggtgacccaatgcgaccagatgctccaccccagctcgtaccgttctcatgggagaaaataatactgtt  
atgggtgctggtcagagacatcaagaaataaccggcaacattagtcaggcagcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcggata  
gftaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgacccgcccgttaccaggttcgacgcccgttcttaccatcgacaccacca  
cgctggcaccaggtgatcggcgcgagatttaacgcccgcacaatttgcagcggcgcgtgacgggaccagactggaggtggcaacgccaat

## Anhang

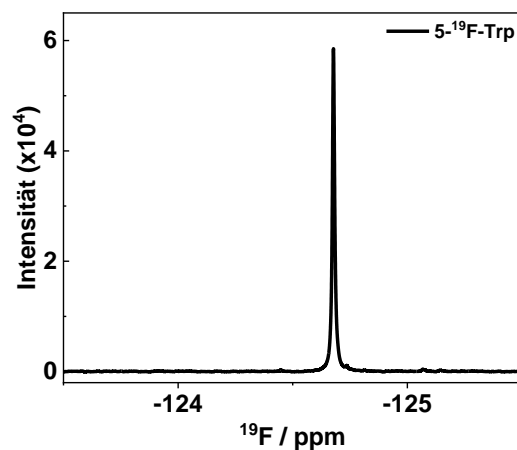
cagcaacgactgtttgcccgccagttgttgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgctccactttttcccgcttttcgag  
aaacgtggctggcctggttcaccacgcgggaaacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgataacgftactggttcacattc  
accaccctgaattgactcttccgggctatcatgccataccgcgaaaggtttgcccattcgatgggtgccgggatctcgacgcttcccttat  
gagactcctgcattaggaagcagcccagtaggtgaggccgtgagcaccgcccgcaaggaaatggtgatgcaaggagatggcgc  
ccaacagtccccggccacggggcctgccaccataccacgcgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatctcccat  
cggatgatcggcgatataggcgcagcaaccgcacctgtggcgggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctc  
gatcccgcaaattaatacgactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaataattttgtaactttaagaa

# Anhang

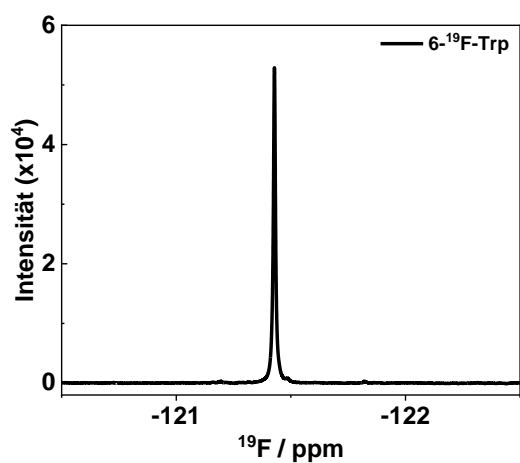
A



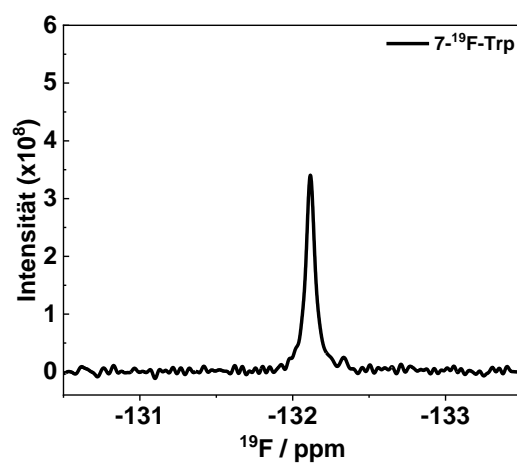
B



C



D

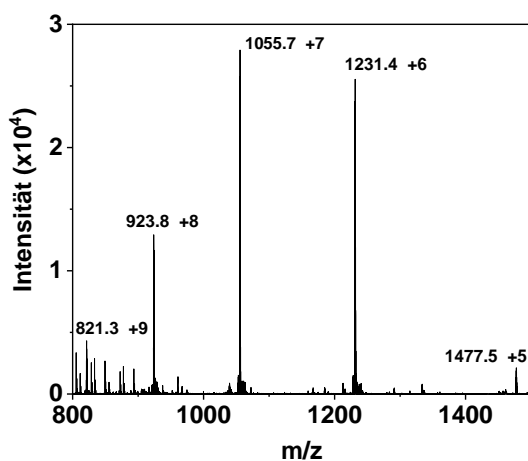


Anhang 3: Eindimensionale  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren von 4- $^{19}\text{F}$ -Trp, 5- $^{19}\text{F}$ -Trp, 6- $^{19}\text{F}$ -Trp und 7- $^{19}\text{F}$ -Trp bei 300 K.

## Anhang

**Anhang 4: ESI MS Analyse von 4-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB. Massenspektrum und Peak Dekonvolution**  
**Bericht des Massenspektrums von 4-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB, hergestellt wie unter 4.2.2 beschrieben.**  
 Die theoretische Masse von einfach <sup>19</sup>F markiertem BsCspB liegt bei 7382 Da (erste Zeile), während die theoretische Masse von wt BsCspB 7365 Da beträgt (zweite Zeile). Das Spektrum zeigt die fünf-, sechs-, sieben-, acht- und neunfach geladenen Ionen für einfach fluormarkiertes BsCspB.

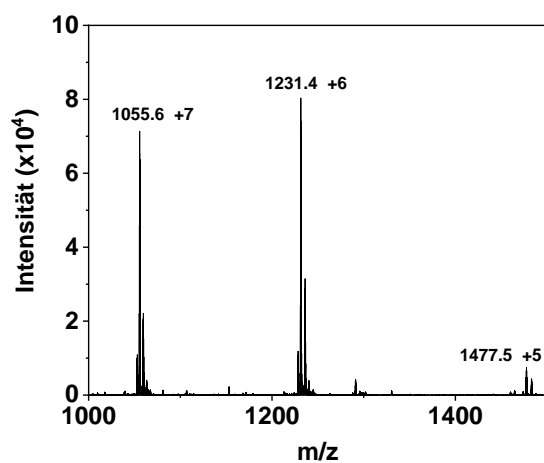
Masse / Da	Intensität	Score	Delta	% relativ	% total
7382,5	$1,97 \cdot 10^6$	11,50	0,0	100,00	86,69
7364,6	$9,87 \cdot 10^4$	3,83	-17,9	5,01	4,34
7420,5	$6,31 \cdot 10^4$	3,17	38,0	3,21	2,78
7404,9	$6,31 \cdot 10^4$	3,09	22,4	3,21	2,78
5792,6	$3,98 \cdot 10^4$	2,34	-1589,9	2,02	1,75
3505,6	$3,76 \cdot 10^4$	2,09	-3876,9	1,91	1,66



## Anhang

**Anhang 5: ESI MS Analyse von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB. Massenspektrum und Peak Dekonvolution**  
 Bericht des Massenspektrums von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB, hergestellt wie unter 4.2.2 beschrieben. Die theoretische Masse von einfach <sup>19</sup>F markiertem BsCspB liegt bei 7382 Da (erste Zeile), während die theoretische Masse von wt BsCspB 7365 Da beträgt (dritte Zeile). Das Spektrum zeigt die fünf-, sechs- und siebenfach geladenen Ionen für einfach fluormarkiertes BsCspB.

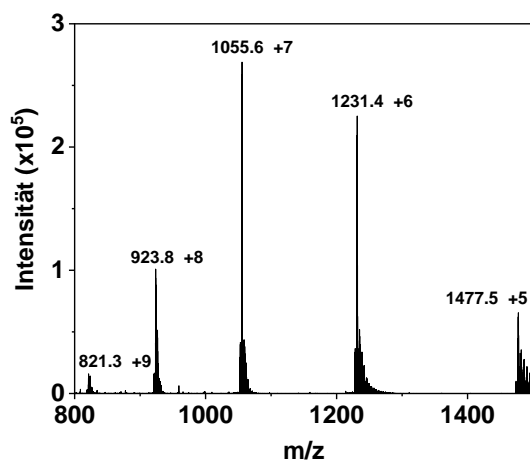
Masse / Da	Intensität	Score	Delta	% relativ	% total
7382,4	$3,93 \cdot 10^6$	6,89	0,0	100,00	64,02
7410,5	$1,27 \cdot 10^6$	5,61	28,1	32,35	20,71
7364,6	$4,90 \cdot 10^5$	4,14	-17,8	12,47	7,98
7740,5	$1,24 \cdot 10^5$	2,73	358,1	3,15	2,02
7435,9	$1,12 \cdot 10^5$	2,25	53,5	2,84	1,82
5761,0	$1,10 \cdot 10^5$	2,76	-1621,4	2,80	1,79
5854,3	$5,13 \cdot 10^4$	2,09	-1528,1	1,30	0,83
8642,3	$5,01 \cdot 10^4$	4,18	1259,9	1,27	0,82



## Anhang

**Anhang 6: ESI MS Analyse von 6-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB. Massenspektrum und Peak Dekonvolution**  
 Bericht des Massenspektrogramms von 6-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB, hergestellt wie unter 4.2.2 beschrieben. Die theoretische Masse von einfach <sup>19</sup>F markiertem BsCspB liegt bei 7382 Da (erste Zeile), während die theoretische Masse von wt BsCspB 7365 Da beträgt (dritte Zeile). Das Spektrum zeigt die fünf-, sechs-, sieben-, acht- und neunfach geladenen Ionen für einfach fluormarkiertes BsCspB.

Masse / Da	Intensität	Score	Delta	% relativ	% total
7382,3	$2,32 \cdot 10^7$	11,07	0,0	100,00	54,61
7404,0	$6,77 \cdot 10^6$	8,95	21,7	29,25	15,97
7364,5	$3,39 \cdot 10^6$	6,80	-17,8	14,63	7,99
7425,8	$3,32 \cdot 10^6$	7,26	43,5	14,36	7,84
7413,4	$2,48 \cdot 10^6$	5,63	31,1	10,72	5,85
7395,8	$1,69 \cdot 10^6$	4,19	13,5	7,31	3,99
7447,5	$1,59 \cdot 10^6$	5,43	65,2	6,86	3,75



**Anhang 7: Sequenz des pAR1219 Vektors mit T7 Polymerase Sequenz (rot).**

cattaatgcagctggcagcagaggttcccactggaaagcgggagtgagcgcacgcaattaatgtaagtagctcactcattaggcacc  
caggctttacactttatgcttccggctcgataatgtgtggaattgagcggataacaattcacacaggaaacagctatgacatgattacggat  
tactggccgtcgttttacaacgctgactgggaaaccctggcgttacccaactaatcgccctgagcacatcccccttccagctggcgt  
aatagcgaagaggcccacccatgcccctccaacagttgagcagcctgaatggcgaatggcgtttccctggttccggcaccagaagc  
ggcgcggaaagctggctggagtgcgatctcctgaggccgatactgctgctcccctcaaactggcagatgacggttacgatgcgccatc  
tacaccaacgtagcctatccattacggtcaatccgccgtttgtcccacggagaatccgacgggtgttactgctcacatthaatgtagtaa  
gctggctacaggaaggccagacgcaatattttgatggcgtcgggatctgatccgatttactaactggaagaggcactaaatgaacacgat  
taacatcgtaagaacgacttctgacatcgaactggctgctatcccgttcaacactctggctgaccattaaggtagcgtttagctcgcgaaca  
gttggcccttgagcatgagtcttacgagatgggtgaagcagcgttccgcaagatgtttgagcgtcaactaaagctggtaggttgcggataacg  
ctgccccaagcctctcatcactaccctactccctaagatgattgacgcatcaacgactggtttgaggaagtgaagctaagcgcggcaagc  
gcccacagccttcagttcctgaagaaatcaagccggaagccgtagcgtacatcaccattaagaccactctggcttccctaaccagtctg  
acaatacaaccgttcaggctgtagcaagcgaatcggctgggcccattgaggacgaggctcgttcgctgctatccgtgacctgaagctaagc  
acttaagaaaaacgttgaggaacaactcaacaagcgcgtagggcacgctctacaagaaacattatgcaagttgtcagggctgacatgctc  
ctaagggtctactcgggtggcagggcgtggtctcgtggcataaggaagactctattcatgtaggagtagcgtgcatcgagatgctcattgagtca  
accggaatggttagcttacaccgcaaaaatgctggcgtagtaggcaagactctgagactatcgaactgcacctgaatacgtgaggctatc  
gcaaccctgtagcgtgctggtggcatctcctgatgttcaacctgctgtagttcctcctaagccgtggactggcattactggtgggtgctatt  
gggctaaccggtcgtcctcctggcgtggtgctgtagtctcacagtaagaaagcactgatgcgctacgaagacgtttacatgctgaggtgataca  
agcgattaacattgcaaaaacaccgcatggaatcaacaagaaagctcagcggctgccaacgtaataccaagtgaagcattgtccg  
gtcagggacatccctgagctgagcgtgaagaactcccgatgaaaccggaagacatcgacatgaatcctgaggctctaccgctggaaac  
gtcgtccgctgctgtgtaccgaaggacaaggctcgaagctcgcgctatcagcctgagttcatgcttgagcaagcaataagttgctaac  
cataaggccatctggtcccttacaacatggactggcgcggctggtttacgctgtgcaatgttcaaccgcaaggaacgatatgcaaaaag  
actgctacgctggcgaaggttaaaccatcggtaaaggaaggttactactggctgaaaatccacggtgcaaacgtgctgggtgctgataaggt  
tccgttccctgagcgtcaagttcattgaggaaaaccacgagaacatcatggtcgtgtaagctcactggagaacacttgggtggctgag  
caagattcctcgttctcctgcttctgcttctgcttctgctgtagtacctgggtacagcaccacggcctgagctataactgctccttccgctggcgtttgac  
gggtctgctggtaccagcacttctccgctgctcctgagatgaggttaggtggtcgcgctgtaactgcttctctagtaaacggctcaggac  
atctacgggattgtgtaagaagcaacgagattctacaagcagacgcaatcaatggaccgataacgaagtagttaccgtgaccgatga  
gaactggtgaaatctgagaaagcaagctgggcaactaaggcactggctggtcaatggctggttactcagctgactgagtaag  
cgttcagctgacgctggttacgggtccaagaggtcggcttccgtaacaagctggtggaagataaccattacgacagcattgattccggcaa  
gggtctgattcactcagccgaatcaggctgctgataatggtaagctgattgggaatctgtgagcgtgacgggtgtagctcgggtgaa  
caatgaactggcttaagctgctgtaagctgctggctgctgaggtcaagataagaagactggagagattctcgaagcgttgcgctgcat  
tggtaactcctgatggttccctgtgtggcaggaatacaagaagcctattcagacgcgctgaaacctgatgttccctcggctcagttccgcttacagc  
ctaccattaacccaacaaagatagcagattgatgcacacaaacaggagctctggtatcgtcctaaactttgtacacagccaagacggtagcc  
acctctgaagactgtagtgggcacacgagaaagtagcgaatcgaatctttgactgattcagcactcctcggctaccattccggctgacgctg  
cgaacctgtcaaacgagctgcgcaaacatggttgacacatagtagtctgtgtagtactggctgatttctacgaccagttcgtgaccagttgca  
cgagtctcaattggacaacatgccagcactcgggctaaaggaactgaaacctcgtgacatcttagagtcggactcgcgttcgctgaaacgcc  
aatcaatacactcggatccacaggacgggtgtggtcgcctgatcgcgtagtgcgatagtggtccaagtagcgaagcagcaggactg  
ggcggcggcgaagcggctcggacagtgctcggagaacgggtgcgcatagaaattgcatcaacgcatatagcgtagcagcagccatagt  
gactggcgtgctgctcggatggacgatatcccgaagagggccggcagtagccgataccaagcctatgctacagcatccagggtgac  
ggcgcggaggtgacgatgagcgcattgttagattcatacacggctgctgactgctgtagcaatttaactgtgataaactaccgcaataagctt  
atcgatgataagctgcaaacatgagaattctgaagcgaagggcctcgtgatacgcctattttataggttaatgtcatgataataatggttctt  
agacgtcaggtggcacttttcgggaaatgtgcgcaaacccctattgttttttaataacattcaaatatgtatccgctatgagacaataac  
cctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagatgagatcaacattccgctgctccttattccctttttgcggtcattttgcttctctgtttt  
gctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaa  
gatcctgagagttttcggccgaagaacggtttccaatgatgacacttttaagttctgctatgtggcgggtattatccggttgacgccggc  
aagagcaactcggctcggcgcatacactattctcagaatgactggttgagtactaccagtcacagaaaagcattacggatggcatgacagt  
aagagaattatgcagtgtccataaccatgagtataactgcccgaactacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccg  
ctttttgcacaacatggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaacgacgagcgtgacacca  
cgatgctcagcaatggcaacaacggtgcgcaactattaactggcgaactacttacttagcttcccggcaacaattaatagactggtgga  
ggcggataaagttgcaggaccacttctgctcggccctccggctggctggttattgctgataaactggagccgggtgagcgtgggtctcgcg  
gtatcattgacgactggggccagatggttaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtagcaggcaactatggtgaacgaata  
gacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtagaccaagttactcatatatacttttagattgatttaaaacttatttta  
atttaaaagatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccccgtagaaa  
agatcaaaagatcttctgagatcctttttctgcgctaatctgctgcttgcacaaaaaaaccacggctaccagcgggtggttgggttccggat  
caagagctaccaactctttccgaaggttaactggctcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagtagcctgtagtagccagtagccacca  
ctcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtcgttaactcgttaccagtggtcgtcgcagtgccagtgccgataagctgcttaccgggtg

## Anhang

gactcaagacgatagttaccggataagggcgcagcgggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctac  
accgaaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggccacgcttccggaaggggagaaagggcagcaggtatccggtaagcggcag  
ggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccaggggaaacgcctggatctttatagctctgctggggttcgccacctctgactgagcgt  
cgattttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatgaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttctggcctttgtgacctttgtca  
catgcttctcgtcgttatccctgattctgtgataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcagccgaacgaccgagcgc  
agcagtcagtgagcaggaagcggagagcgcctgatgcggtaatttctccttacgcatctgtcgggtattcacaccgcatatggtgcaactc  
cagtacaatctgctctgatgccgcatagtaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccgcca  
caccgctgacgcgacctgacgggcttctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgcagagggtt  
tcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgacctttcatccgct  
ccagctcgttgagtttccagaagcgttaatgtctgcttctgataaagcgggcatgtaagggcgggttttctggttgactgactgctccgt  
gtaagggggtatttctgtcatggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaaatgccgggta  
ctggaacgttgtagggtaaaactggcggatgtagcggcgggaccagagaaaaactcagggtaatgccagcgttccgtaatac  
agatgtaggtgtccacagggtagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaacataatggtgcagggcgtgacttccgcttccagactt  
tacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgttctcaggtcgcagacgctttgcagcagcagctcgttccagctcgcgctatcgggtgat  
tcattctgtaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcagcatcatgcgcaccctggccaggaacca  
acgctgcccagatgcgcccgtcgggctgctggagatggcggacgcgatggatattctgccaaggggtggttgcgacttccagcttctccg  
caagaattgatggctccaattctggagtggaatccgttagcaggtgcccggctccattcaggtcgaggtggccggctccatgcacc  
gagcgcgaacgcggggaggcagacaaggtataggcggcgcctacaatccatgccaacccgttccatgtctcgcggaggcggcdataat  
cgccgtgacgatcagcggctcaatgatcgaagtaggctggaagagccgcgagcgcgatcctgaagctgtccctgatggtcgtcatctaccctgc  
ctggacagcatggcctgcaacgcgggcatccgatgccggcggaaagcagagaagaatcataatggggaaggccatccagcctcgcgctgc  
gaacgccagcaagacgtagcccagcgcgtcggccgcatgccggcgataatggcctgcttctcggcgaacggttggggcgggaccagtg  
acgaaggcttagcaggggctgcaagattccgaataccgcaagcagcagggccgatcatcgtcgcgctccagcgaagcggctcctcgcg  
aaaatgaccagagcgtcggccacctgtcctacgagttgatataaagaagacagtcataagtcggcgacgatagtcaccccg  
cccaccggaaggagctgactgggtgaaggctctcaagggcatcggcgcagctctccctatgagactcctgcattaggaagcagcccagta  
gtaggttagggcgttagcaccgcccgcgaaggaatggtgatgcaaggagatggcgcccaacagctccccggccacggggcctgcc  
accatacccacgccgaaacaagcgtcatgagcccgaagtggcagcccgatcttcccatcgggtgatgctggcgatataggcgccagca  
ccgacactgtggcgggtgatgcccggccagatgcgtccggcgtagaggatccagatccggacaccatcgaatggcgcaaaactttcg  
cggatggcatgatagcggcgggaagagagcaattcaggggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacagatgctgcagagatgcccgtg  
ctctatcagaccgttcccgctggtgaaccaggccagccacgttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgcgatggcgagctg  
aattacattccaaccgctggcacaacaactggcgggcaaacagctggtgctgattggcgttccacctccagctgcccctgcacgcgctg  
cgcaaatgtcgcggcgatataatctcgcgcccgatcaactgggtgccagcgtggtggtcgcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgta  
aagcggcgggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtggtgatcattaactaccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgc  
ctgcaactatgtccggcttattctgatgtctctgaccagacaccatcaacagatatttttcccatgaagacggtacgcgactggcgctgg  
agcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcggccattaaagtctctcggcgcgctcgtctggtgctggcgtgataaat  
atctactcgcgaatcaaatcagccgatagcggaaacgggaagggcagctggagtgccatgtccggtttcaaaaaacatgcaaatgctgaatg  
agggcatcgttccactgcgatgctggtgcaacgatcagatggcgtggcgcaatgcgcgcatcaccagctcgggctgcgctggtg  
cggatctcggtagtggtgatacgcgataccgaagacagctcatgttatatcccgcttaaccaccatcaaacaggatcttgcctgctggg  
caaaccagcgtggaccgctgctgcaactctcagggccagggcgtgaaagggcaatcagctgttcccgtctcactggtgaaaagaaaaac  
caccctggcggccaatacgcgaacccgctctcccgcgcttggccgatt

**Anhang 8: Sequenz des pET24a-CspB Vektors mit *BsCspB* Sequenz (rot).**

tcgcagaaacgtggctggcctggtcaccacgcgggaaacggctctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgataacgttactggttt  
 cacattcaccaccctgaattgactctctccggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctc  
 tccttatcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggtgagccgtgagcaccgcccgcgaaggaatggtgatgcaaggaga  
 tggcgccaacagctccccggccacgggctgccaccataccacgcgaaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgagcccgatctt  
 cccatcggtgatgctggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccgggtgatgccggccacgatgctccggcgtagaggatcga  
 gatctcgatccccgaaattaatagactactataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaataaatttggtaacttaagaagg  
 agatatacatatgftagaaggtaaagtaaaatggttcaactctgaaaaaggttccggattcatcgaagtagaaggtaaacgacgatgtattcgttca  
 tttctgctattcaaggcgaaggctcaaaactttagaagaaggccaagctgtttctttgaaatcgttgaaggaaaccgcgaccacaagctgc  
 taacgttactaaagaagcgttaagaaggatccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgactcgagcaccaccaccaccactg  
 agatccggctgtaacaaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataacccttggggccttaaac  
 gggctgtaggggtttttgtgaaaggaggaactataccggattggcgaatgggacgcgcccgtgtagcggcgattaagcgcggcgggtgtg  
 gtggttacgcgcagcgtgaccgctacactgcccagcgcctagcggcctccttctccttctccttctcggcagcttccgggcttccc  
 cgtcaagctctaaatcggggctcccttagggttccgatttagtcttacggcacctcgacccccaaaaaacttgattaggggtgatggttcacgta  
 gtgggccatgcctgatagacggttttgccttggcgttggagctccacgttcttaatagtggaactctgttccaaactggaacaactcaac  
 cctatctcggctctattcttggattataaggatttgcgatttccgctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatgaacgcaatttaac  
 aaaatattaacgtttacaatttcaggtggcactttcgggaaatgtgcgcggaacccctatttggttattttctaaatacattcaaatatgatccgct  
 catgaattaattcttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccataattttgaaaaagccgttct  
 gtaatgaaggagaaaaactcaccgaggcagttccataggtgcaagatcctggtatcggtctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaac  
 ctattaattcccctcgtaaaaaataaggttatcaagtgagaaatcacatgagtgacgactgaatccgggtgagaatggcaaaagtttatgcatt  
 cttccagactgttaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcatcaaccaaccgttattcattcgtgattgcgctgagcgag  
 acgaaatcgcgatcgtgttaaaaggacaattacaacaggaatcgaatgcaaccggcgaggaacactgccagcgcatacaaatattt  
 tcactgaatcaggatattcttaataacctggaatgctgtttccggggatcgagtggtgagtaacctgcatcagcaggtacggataaaat  
 gcttgatggtcgaagaggcataaattccgtcagccagtttagctgacctctcatctgtaacatcattggcaacgctaccttggcatgtttcaga  
 aacaactctggcgcacggttccatacaatcgatagattgctgcacctgattgcccacattatcgcgagcccattataccatataaatca  
 gcatccatgttgaatttaacgcggcctagagcaagacgttcccggtgaatatggctcataacacccttgtattactgttattgtaagcagacag  
 tttattgtcatgacaaaaatccctaacgtgagtttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgatcctttttt  
 ctgcgcgtaactgctgctgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggttggcgggatcaaga gctaccaactctttccgaaggta  
 actggctcagcagagcgcagataccaaatactgcttctagtgtagccgtgattagccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacata  
 cctcgtctgtaaatcctgttaccagtggtgctgcccagtgggcagataagctgcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggc  
 gcagcggctgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagctggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagct  
 atgagaaagcggccacgctcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgaggg  
 agcttccaggggaaacgcctggtatcttatagtcctgctgggttccaccctgactgagcgtcattttgtgatgctcgtcagggggggcgg  
 agcctatgaaaaaacgcccagcaacgcggccttttacggttcccttggccttttctcgcacatgttcttctcgttattcccctgattctgtg  
 gataaccgtattaccgctttgagtgagctgataaccgctgccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtgatgagcaggaagcggaa  
 gagcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtattttcacaccgcataataggtgcaactctcagtaaatctgctctgatccgcatagtt  
 aagccagatatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcccggacaccggccaacaccgctgacgcgcccctgacgggcttgt  
 ctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccggagctgcatgtgacagaggtttaccgctcatcaccgaaacgcgcgagggc  
 agctcggtaaaagctcatcagcgtgctggaagcattcacagatgctgctgctcctgctcagcgtccagctcgttggatttccagaagcgttaa  
 tctctgcttctgataaagcgggcatgtaaggcgggttttctctgttctgactgactcctcgtgtaagggggttctgttcatgggggtaatg  
 ataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaacatcccgggttactggaacgttggagggttaacaactggc  
 ggtatggatcggcgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagcgttcgtaatacagatgtaggtgttccacagggtagccagc  
 agcatcctgcgatcagatccggaacataatggtgcaggcgtgactcggcgttccagactttacgaaacacggaaacccaagaccattc  
 atgttgtgctcaggtcgcagacgtttgacgacgagctcgttccagctcgcgtatcgggtgattcattctgtaaccagtaaggcaaccccg  
 ccagcctagccgggtcctcaacgacagggacgatcatgcgacccggtgggcccggatgccggcgataatggcctgcttctcggcga  
 cgttgggtggcggaccagtgacgaaggctgagcagggcgtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgcgctcc  
 agcgaagcggctcctcggcaaaatgaccagagcgtcggcaccctgctacaggtgcatgataaagaagacgtcataagtggcggc  
 gacgatagtcacccccgcccaccggaaggagctgactgggtgaaaggctcgaaggcattcggatcggatcccggtgctaatgagtgga  
 gtaacttacattaatgctgtgctcactgcccgttccagctcgggaaacctgctgcccagctgattaatgaatcgccaacgcgcgggg  
 agaggcgtttgctgattggggccagggtggttttctttaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttaccgctggccctgagaga  
 gttgacgaaagcgggtccacgctggttggcccagcagggcaaaatcctgttggatgggtggttaacggcgggataacatgagctgcttccggtat  
 cgtcgtatcccactaccgagatataccgaccaacgcgacggcggactcggtaatggcgcgcaatgcccagcggccatctgatcgttggca  
 accagcatcgcagtggaacgatgccctcattcagcatttgcaggttggtaaaaccggacatggcactccagctcgcctcccgttccgctatc  
 ggctgaattgattgagagtgagataattatgccagccagccagacgcgacgcggagacagaacttaatggcccgcctaacagcgcgat  
 ttgctggtgacccaatgagaccagatgctccacgcccagctcgcgtaccgtctcatgggagaaaaataactgttggatgggtgctggtcagaga  
 catcaagaaataacgcccgaacatttagtcaggcagcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcggatgtaaatgatcagcccactga

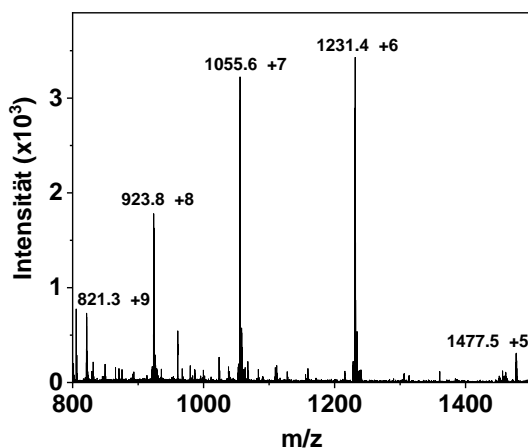
## Anhang

cgcggtgcgcgagaagattgtgcaccgccgctttacaggcttcgacgccgcttcggttctaccatcgacaccaccacgctggcaccagttgatc  
ggcgcgagattaatcgccgcgacaattgacgacggcgcgctgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgttgcc  
gccagttgtgcccacgcggtgggaatgtaattcagctcccatcgccgcttccacttttcccgcgtt

## Anhang

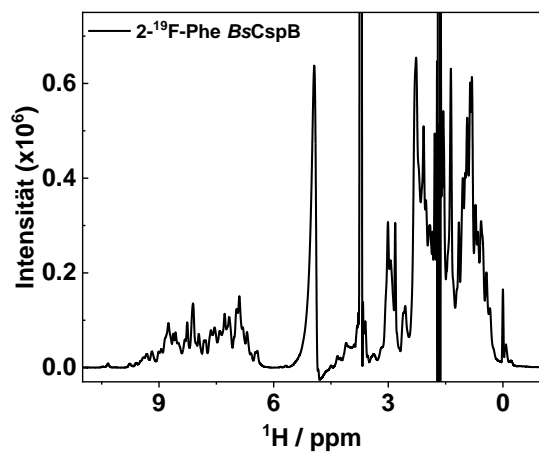
**Anhang 9: ESI MS Analyse von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB. Massenspektrum und Peak Dekonvolution**  
 Bericht des Massenspektrogramms von 5-<sup>19</sup>F-Trp BsCspB, hergestellt wie unter 4.2.3 beschrieben. Die theoretische Masse von einfach <sup>19</sup>F markiertem BsCspB liegt bei 7382 Da (erste Zeile), während die theoretische Masse von wt BsCspB 7365 Da beträgt (zweite Zeile). Das Spektrum zeigt die fünf-, sechs-, sieben-, acht- und neunfach geladenen Ionen für einfach fluormarkiertes BsCspB.

Masse / Da	Intensität	Score	Delta	% relativ	% total
7382,3	$3,35 \cdot 10^5$	10,43	0,0	100,00	76,33
7398,7	$3,67 \cdot 10^4$	4,09	16,4	10,96	8,36
9596,9	$3,09 \cdot 10^4$	2,17	2214,6	9,23	7,04
7365,0	$1,36 \cdot 10^4$	2,84	-17,3	4,05	3,09
5185,6	$9,69 \cdot 10^3$	2,71	-2196,7	2,89	2,21
3331,5	$7,58 \cdot 10^3$	2,38	-4050,8	2,27	1,3
5542,1	$5,43 \cdot 10^3$	3,11	-1840,2	1,62	1,24

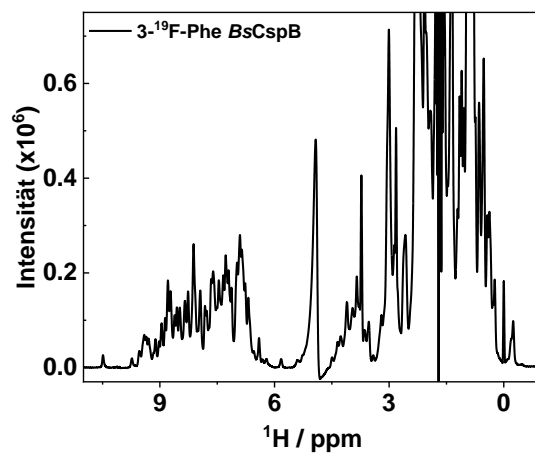


Anhang

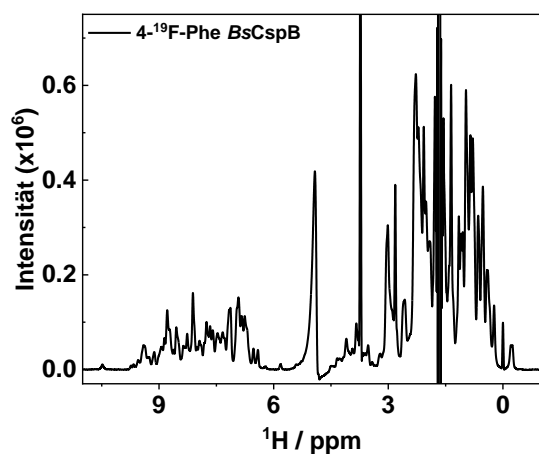
A



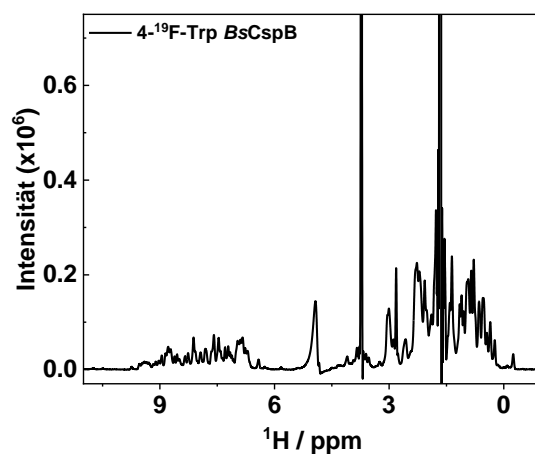
B



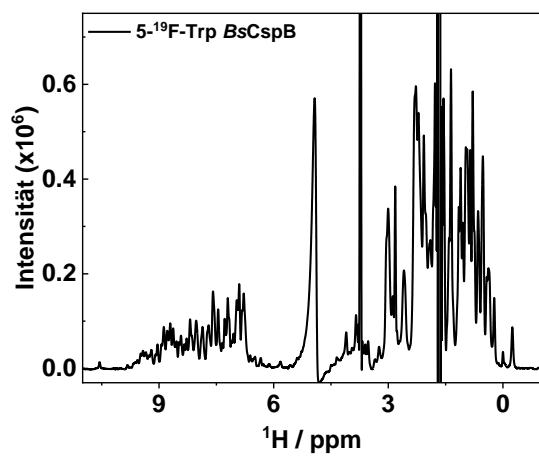
C



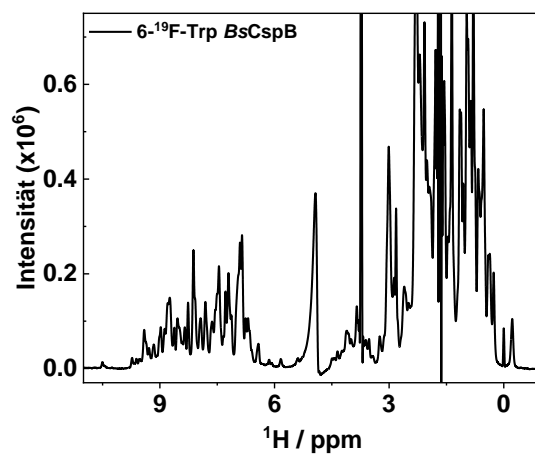
D



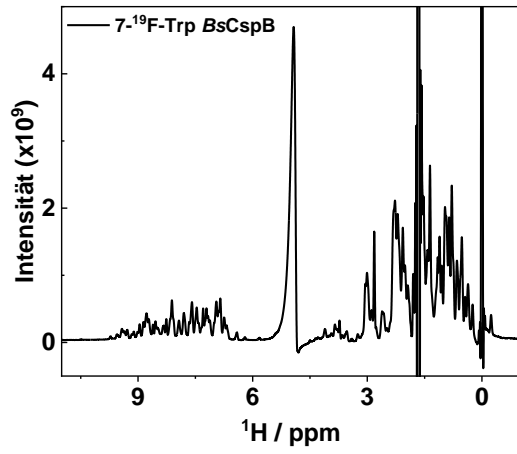
E



F



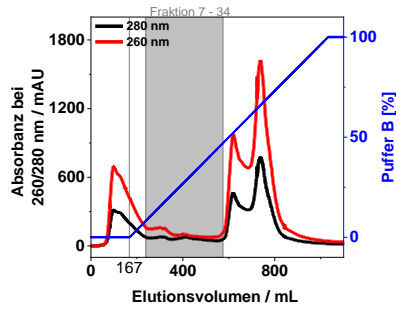
G



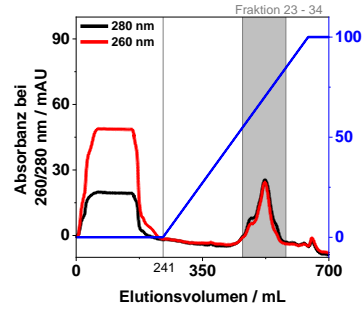
Anhang 10: Eindimensionale  $^1\text{H}$  Spektren von 2- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (A), 3- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (B), 4- $^{19}\text{F}$ -Phe *BsCspB* (C), 4- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (D), 5- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (E), 6- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (F) und 7- $^{19}\text{F}$ -Trp *BsCspB* (G).

## Anhang

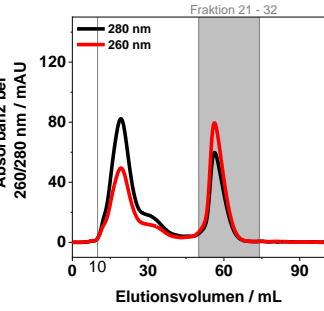
A



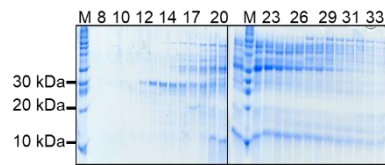
B



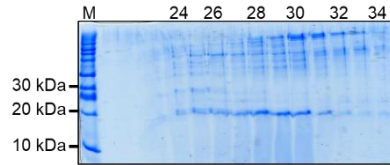
C



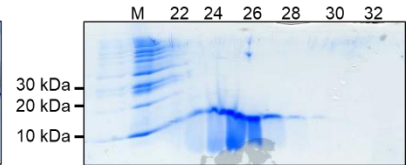
D



E

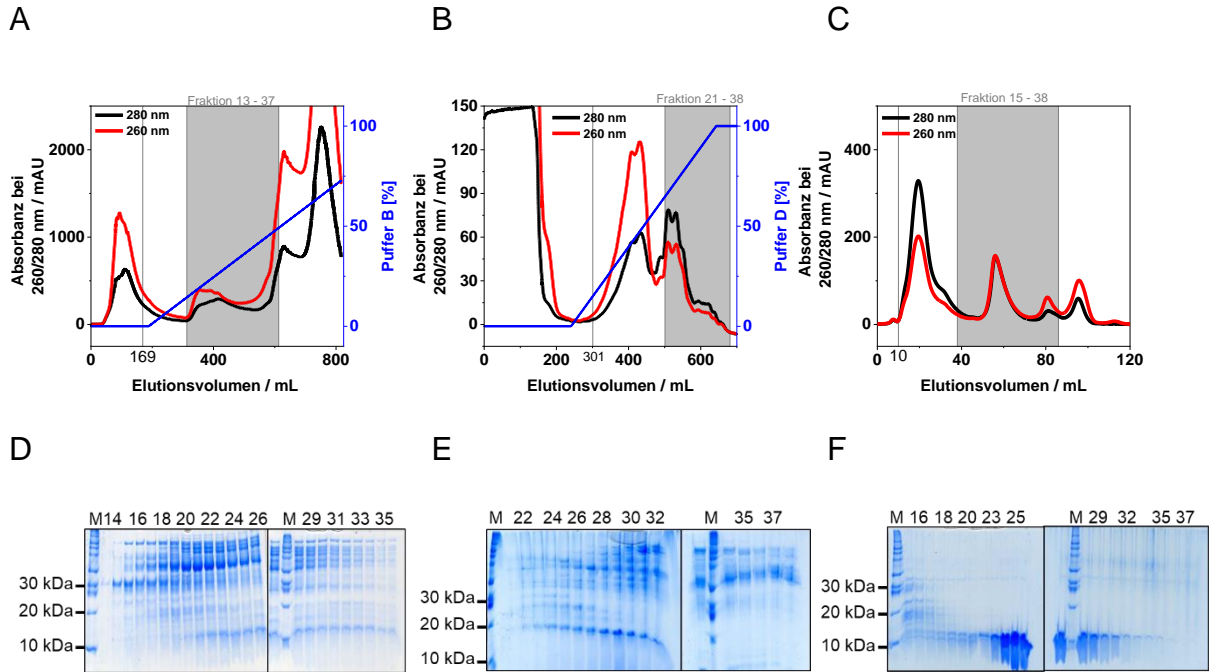


F



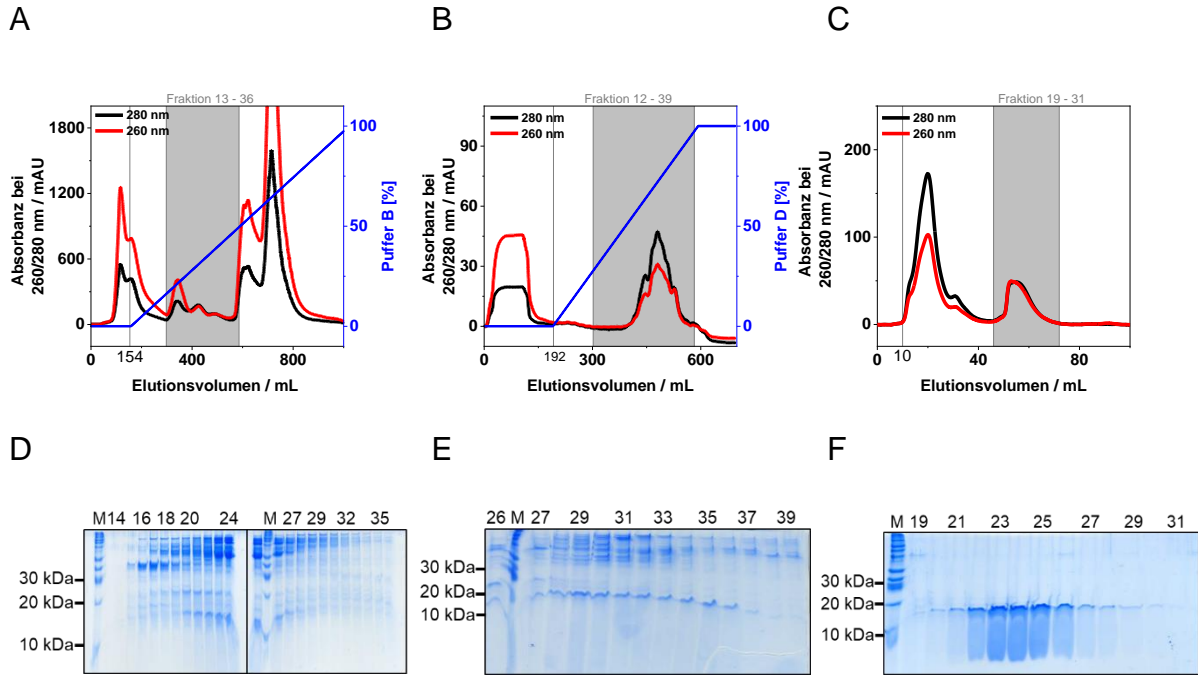
**Anhang 11: Elutionsprofile und SDS Page Analysen von 2-<sup>19</sup>F-Phe-BsCspB.** Für die Aufreinigung wurden drei Reinigungsschritte unternommen: eine Anionen Austausch Chromatographie (A, D), eine Hydrophober Austausch Chromatographie (B, E) und eine Größenausschluss Chromatographie (C, F). Das Protein wurde bei einem Elutionsvolumen  $V = 0$  mL auf die jeweilige Säule geladen. Die graue, vertikale Linie zeigt das Volumen an bei dem mit dem Fraktionssammeln gestartet wurde, während der graue Balken die Fraktionen anzeigt, die für die SDS Pages verwendet wurden. Die sukzessive Zugabe von Puffer B (A) und Puffer D (B) wurde blau dargestellt.

## Anhang



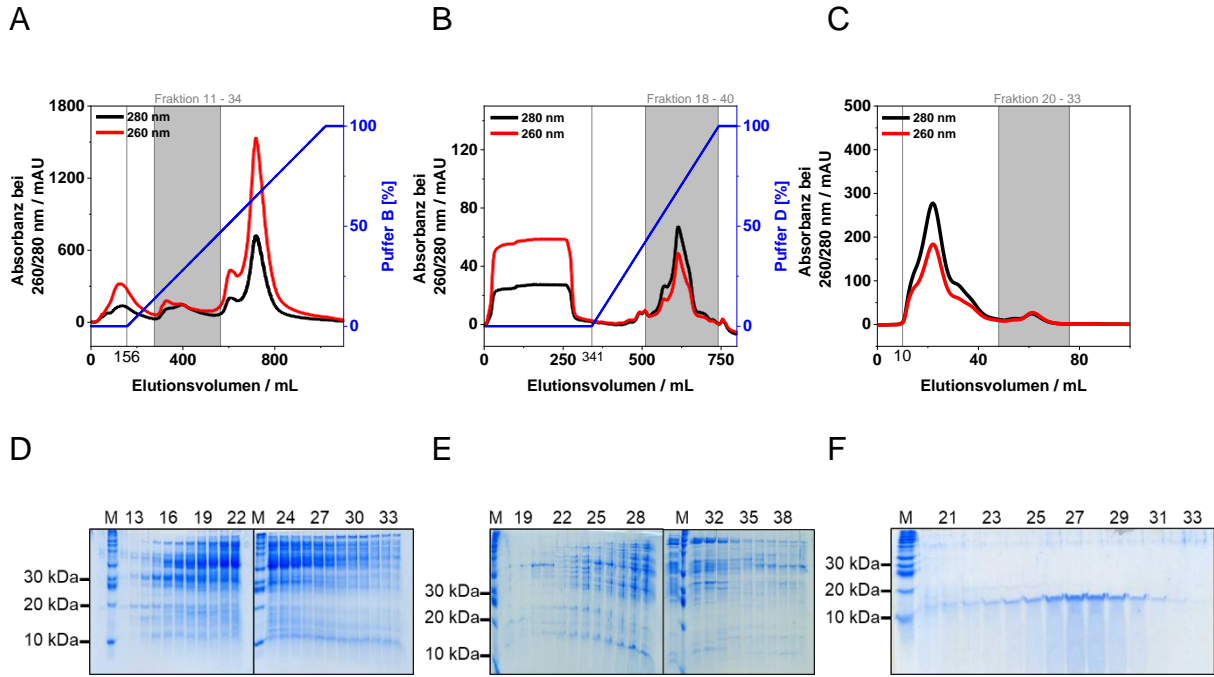
**Anhang 12: Elutionsprofile und SDS Page Analysen von 3-<sup>19</sup>F-Phe-BsCspB.** Für die Aufreinigung wurden drei Reinigungsschritte unternommen: eine Anionen Austausch Chromatographie (A, D), eine Hydrophober Austausch Chromatographie (B, E) und eine Größenausschluss Chromatographie (C, F). Das Protein wurde bei einem Elutionsvolumen  $V = 0$  mL auf die jeweilige Säule geladen. Die graue, vertikale Linie zeigt das Volumen an bei dem mit dem Fraktionssammeln gestartet wurde, während der graue Balken die Fraktionen anzeigt, die für die SDS Pages verwendet wurden. Die sukzessive Zugabe von Puffer B (A) und Puffer D (B) wurde blau dargestellt.

## Anhang



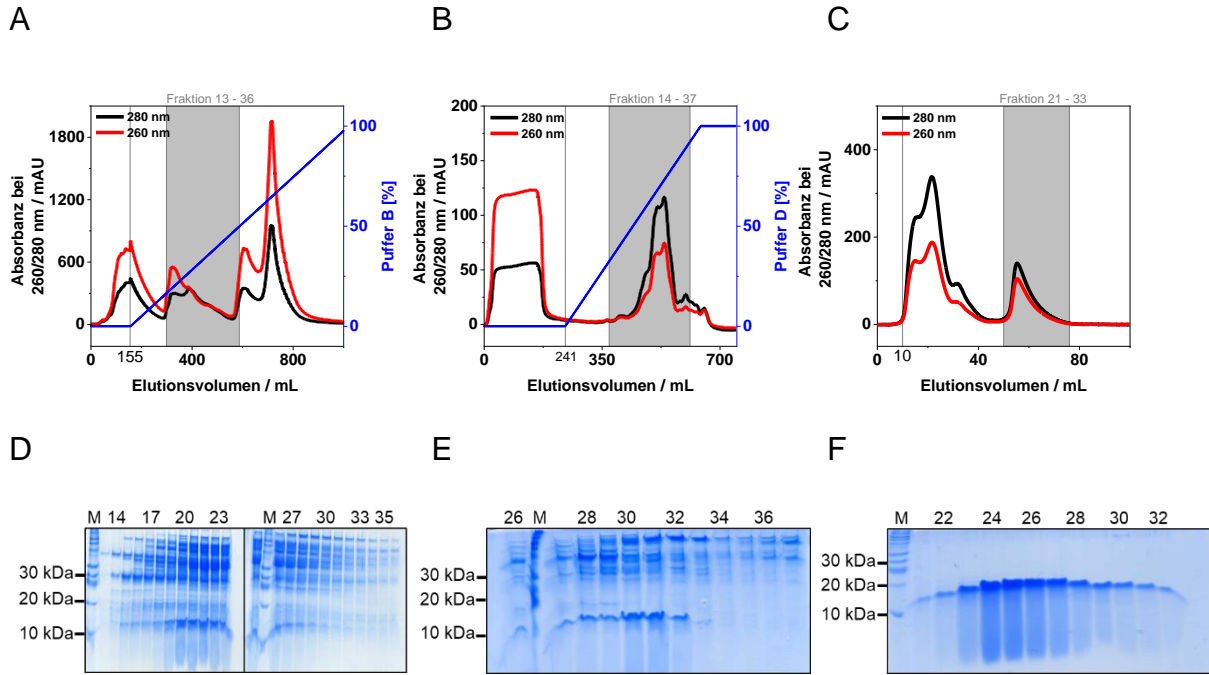
**Anhang 13: Elutionsprofile und SDS Page Analysen von 4-<sup>19</sup>F-Phe-BsCspB.** Für die Aufreinigung wurden drei Reinigungsschritte unternommen: eine Anionen Austausch Chromatographie (A, D), eine Hydrophober Austausch Chromatographie (B, E) und eine Größenausschluss Chromatographie (C, F). Das Protein wurde bei einem Elutionsvolumen  $V = 0$  mL auf die jeweilige Säule geladen. Die graue, vertikale Linie zeigt das Volumen an bei dem mit dem Fraktionssammeln gestartet wurde, während der graue Balken die Fraktionen anzeigt, die für die SDS Pages verwendet wurden. Die sukzessive Zugabe von Puffer B (A) und Puffer D (B) wurde blau dargestellt.

## Anhang



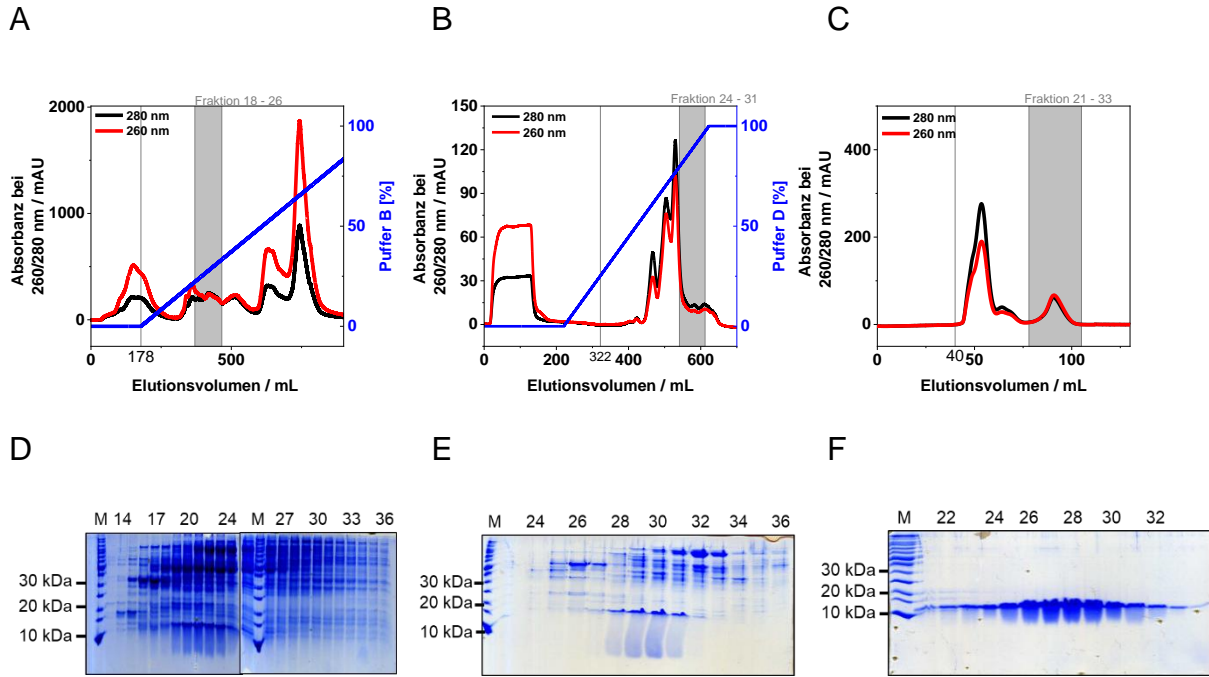
**Anhang 14: Elutionsprofile und SDS Page Analysen von 4-<sup>19</sup>F-Trp-BsCspB.** Für die Aufreinigung wurden drei Reinigungsschritte unternommen: eine Anionen Austausch Chromatographie (A, D), eine Hydrophober Austausch Chromatographie (B, E) und eine Größenausschluss Chromatographie (C, F). Das Protein wurde bei einem Elutionsvolumen  $V = 0$  mL auf die jeweilige Säule geladen. Die graue, vertikale Linie zeigt das Volumen an bei dem mit dem Fraktionssammeln gestartet wurde, während der graue Balken die Fraktionen anzeigt, die für die SDS Pages verwendet wurden. Die sukzessive Zugabe von Puffer B (A) und Puffer D (B) wurde blau dargestellt.

## Anhang



**Anhang 15: Elutionsprofile und SDS Page Analysen von  $6\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp-BsCspB.** Für die Aufreinigung wurden drei Reinigungsschritte unternommen: eine Anionen Austausch Chromatographie (A, D), eine Hydrophober Austausch Chromatographie (B, E) und eine Größenausschluss Chromatographie (C, F). Das Protein wurde bei einem Elutionsvolumen  $V = 0$  mL auf die jeweilige Säule geladen. Die graue, vertikale Linie zeigt das Volumen an bei dem mit dem Fraktionssammeln gestartet wurde, während der graue Balken die Fraktionen anzeigt, die für die SDS Pages verwendet wurden. Die sukzessive Zugabe von Puffer B (A) und Puffer D (B) wurde blau dargestellt.

## Anhang



**Anhang 16: Elutionsprofile und SDS Page Analysen von 7-<sup>19</sup>F-Trp-BsCspB.** Für die Aufreinigung wurden drei Reinigungsschritte unternommen: eine Anionen Austausch Chromatographie (A, D), eine Hydrophober Austausch Chromatographie (B, E) und eine Größenausschluss Chromatographie (C, F). Das Protein wurde bei einem Elutionsvolumen  $V = 0$  mL auf die jeweilige Säule geladen. Die graue, vertikale Linie zeigt das Volumen an bei dem mit dem Fraktionssammeln gestartet wurde, während der graue Balken die Fraktionen anzeigt, die für die SDS Pages verwendet wurden. Die sukzessive Zugabe von Puffer B (A) und Puffer D (B) wurde blau dargestellt.

**Anhang 17: Daten der Röntgenkristallstrukturanalyse und Modell-Verfeinerung.**

	4- <sup>19</sup> F-Trp <i>BsCspB</i>	4- <sup>19</sup> F-Phe <i>BsCspB</i>
<b>PDB</b>	6SZZ	6T00
<b>X-ray data</b>		
X-ray source	SLS-PXIII	SLS-PXI
Detector	PILATUS 2M-F	EIGER 16M X
Wavelength (Å)	1.000	1.000
<b>Data Collection</b>		
Space group	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	56.05, 56.05, 55.12	54.94, 54.94, 57.71
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	39.64-2.05 (2.15-2.05)	39.79-2.1 (2.2-2.1)
Copies in asymmetric unit	1	1
Solvent content (%)	58.15	58.4
Unique reflections	5913 (762)	5551 (692)
Multiplicity	24.75 (24.29)	12.43 (12.9)
Completeness (%)	99.8 (100)	99.9 (100)
<I/σ(I)>	28.89 (1.25)	17.23 (1.23)
R <sub>sym</sub> (I) (%)	7.5 (273.5)	8.7 (225.2)

## Anhang

CC <sub>1/2</sub> (%)	100 (58.4)	99.9 (42.9)
-----------------------	------------	-------------

### Model Refinement

#### AU content

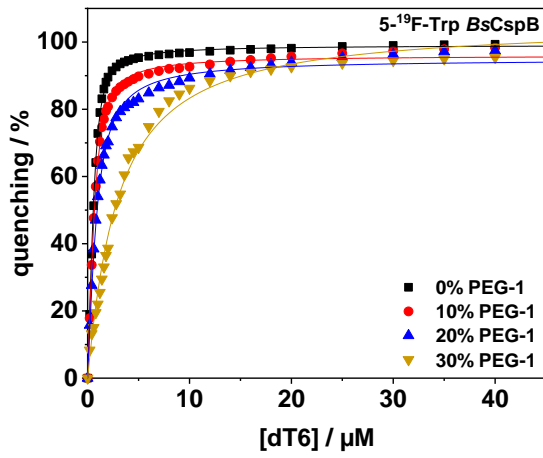
Protein/solvent non-H atoms	518/30	519/36
Ligands <sup>a</sup>	GOL x 2	NHE x 1, GOL x 1
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> <sup>b</sup> (%)	20.83/23.12	19.87/25.07
RMSD bond length (Å)	0.008	0.01
RMSD bond angle (°)	0.922	1.251

---

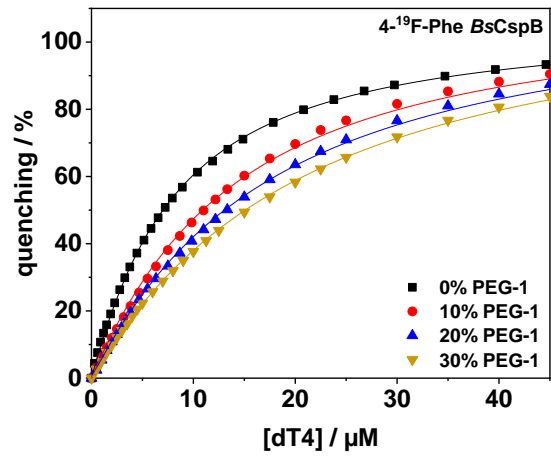
<sup>a</sup>GOL: glycerol; NHE: CHES (*N*-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid); <sup>b</sup>R-free sets corresponded to 5% of total reflections.

## Anhang

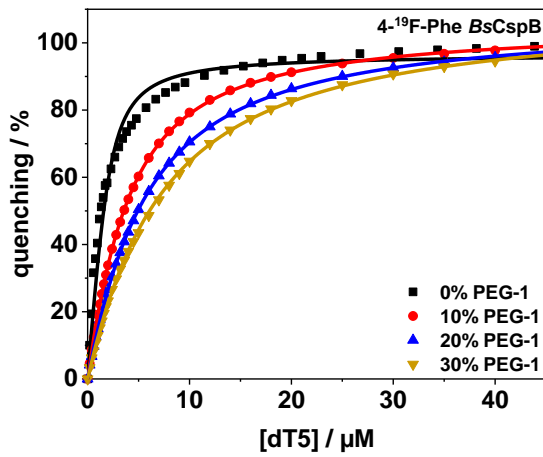
A



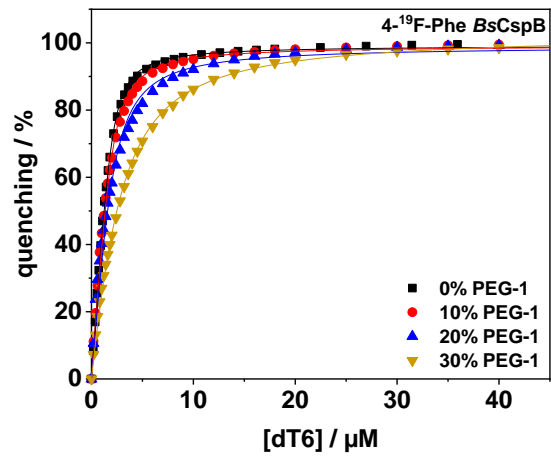
B



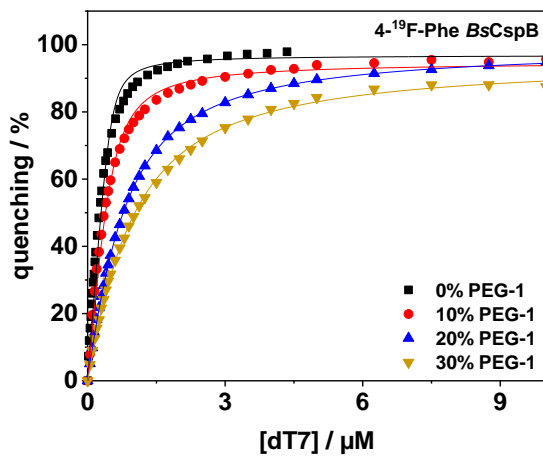
C



D



E



Anhang 18: Untersuchung der Interaktion zwischen  $\text{dT6}$  und  $5\text{-}^{19}\text{F-Trp BsCspB}$  (A) und  $\text{dT4}$  (B),  $\text{dT5}$  (C),  $\text{dT6}$  (D) und  $\text{dT7}$  (E) mit  $4\text{-}^{19}\text{F-Phe BsCspB}$  bei PEG1 Konzentrationen von 0 % (schwarz, Rechtecke), 10 % (rot, Kreise), 20 % (blau, Dreiecke oben) und 30 % (gelb, Dreiecke unten).

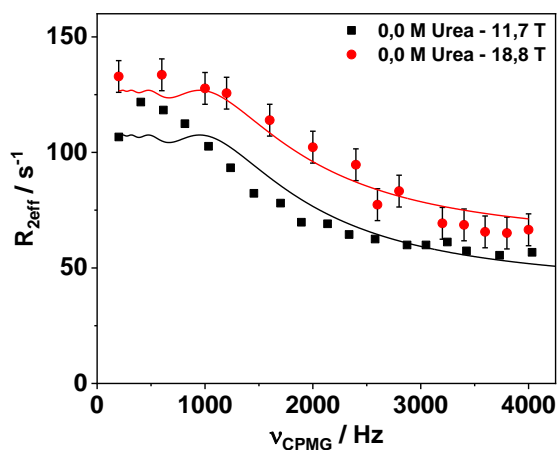
## Anhang

**Anhang 19: Bindungsaffinität,  $K_D$ , in nM von 4-<sup>19</sup>F-Phe *BsCspB* und 5-<sup>19</sup>F-Trp *BsCspB* zu verschiedenen Oligothymidinen bei verschiedenen Konzentrationen an PEG1 wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie im Gleichgewicht bei  $T = 298$  K bestimmt. Dabei wird sich die intrinsische Fluoreszenz von Trp8 zunutze gemacht. Die genutzten Protein Konzentrationen sind in nM angegeben.**

<b>4-<sup>19</sup>F-Phe <i>BsCspB</i></b>		<b>0 % PEG-1</b>	<b>10 % PEG-1</b>	<b>20 % PEG-1</b>	<b>30 % PEG-1</b>
dT7	Protein concentration / nM	500	500	500	500
	$K_D$ / nM	33 ± 5	114 ± 10	520 ± 32	705 ± 45
dT6	Protein concentration / nM	2000	2000	2000	2000
	$K_D$ / nM	237 ± 20	329 ± 24	563 ± 35	1605 ± 75
dT5	Protein concentration / nM	2000	2000	2000	2000
	$K_D$ / nM	507 ± 35	2886 ± 147	4593 ± 240	6228 ± 338
dT4	Protein concentration / nM	3000	5000	5000	5000
	$K_D$ / μM	6.5 ± 0.1	10.9 ± 0.1	14.3 ± 0.3	17.7 ± 0.3
<b>5-<sup>19</sup>F-Trp <i>BsCspB</i></b>		<b>0 % PEG-1</b>	<b>10 % PEG-1</b>	<b>20 % PEG-1</b>	<b>30 % PEG-1</b>
dT6	Protein concentration / nM	1000	1000	1000	1000
	$K_D$ / nM	240 ± 10	250 ± 18	471 ± 26	2522 ± 82

**Anhang 20:  $^{19}\text{F}$  CPMG Relaxationsdispersionsmessungen an  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bei verschiedenen Konzentrationen an Urea in verdünnter Lösung und in Zellysat.**

Zunächst wurden  $^{19}\text{F}$  CPMG Relaxationsdispersionsprofile von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bei Magnetfeldstärken von  $B_0 = 18,8\text{ T}$  und  $B_0 = 11,7\text{ T}$  und einer Urea Konzentration von  $c = 0\text{ M}$  aufgenommen (Abbildung 69). Aus dem Profil wird deutlich, dass man auf einen Austausch im Millisekunden Bereich beobachten kann und der Verlauf bei beiden Magnetfeldstärken vergleichbar ist. Des Weiteren kann man mit Gleichung (14) das Relaxationsdispersionsprofil global bei beiden Magnetfeldstärken anpassen und die Austauschkonstante,  $k_{\text{ex}}$ , den Anteil an gefaltetem und ungefaltetem Protein,  $p_f$  und  $p_u$ , der Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen den beiden Zuständen,  $\Delta\omega$ , und die transversalen Relaxationsraten der beiden Zustände in Abwesenheit von Austausch,  $R_{2,f}$  und  $R_{2,u}$  bestimmen.



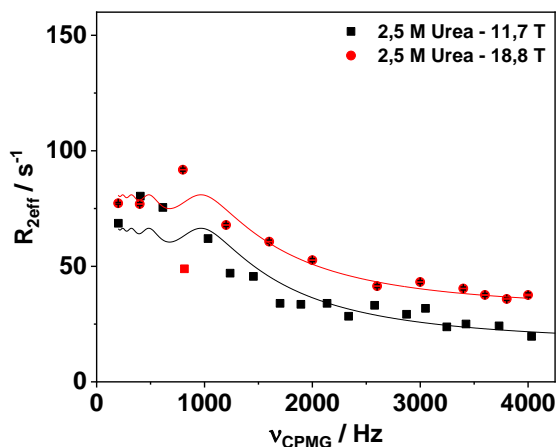
**Abbildung 69:  $^{19}\text{F}$  CPMG Relaxationsdispersionsprofile von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bei einer Temperatur von  $T = 298\text{ K}$ , einer Urea Konzentration von  $c_{\text{Urea}} = 0,0\text{ M}$  und Magnetfeldstärken von  $B_0 = 11,7\text{ T}$  (rot) und  $B_0 = 18,8\text{ T}$  (schwarz). Die durchgezogene Linie zeigt die Anpassung der Daten mit Gleichung (14).**

Aufgrund der vielen Parameter der Fitfunktion und der relativ geringen Anzahl an Datenpunkten vor allem bei geringer CPMG Frequenz,  $\nu_{\text{CPMG}}$ , (vgl. [122-124]) wurden einige Parameter festgesetzt. Zum einen wurde die Austauschkonstante,  $k_{\text{ex}}$ , unter Zuhilfenahme der Stopped Flow Messungen unter 0 über  $k_{\text{ex}} = k_f + k_u$  zu  $k_{\text{ex}} = 830\text{ s}^{-1}$  für  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bestimmt. Zum anderen wurde  $\Delta\omega$  zu  $\Delta\omega = 1903\text{ Hz} \cdot 2\pi = 11960\text{ Hz}$  festgesetzt. Dieser Wert wurde erhalten indem der Abstand zwischen den Resonanzsignalen der beiden Zustände in verschiedenen  $^{19}\text{F}$  NMR Spektren bei unterschiedlicher Urea Konzentration bestimmt wurden. Durch lineare Anpassung dieser Abstände in Abhängigkeit von der Urea Konzentration

konnte der Unterschied in der chemischen Verschiebung der beiden Zustände,  $\Delta\omega$ , bei  $c = 0,0$  M Urea bestimmt werden. Mit dem Festsetzen der Parameter ergibt sich durch die Anpassung mit Gleichung (14) globale Werte für die Anteile an gefaltetem und ungefaltetem Protein von  $p_f = 0,92$  und  $p_u = 0,08$ . Durch den Vergleich der Integrale des gefalteten und ungefalteten Zustandes ergibt sich ein Verhältnis von  $p_f$  zu  $p_u$  von 0,97 zu 0,03, was sich im Rahmen der Ungenauigkeiten der Messungen mit den Ergebnissen der Relaxationsdispersionsmessung deckt. Somit zeigt sich, dass die Datenaufnahme nach dieser Methode valide ist und eine Anpassung der Daten prinzipiell möglich ist. Um auch die Austauschkonstante,  $k_{ex}$ , zu bestimmen, was vor allem in Zellysate oder anderer komplexer Umgebung interessant wäre, müssen mehr Datenpunkte bei niedrigeren CPMG Frequenzen aufgenommen werden.

Neben den Messungen bei einer Urea Konzentration von  $c = 0,0$  M, wurden auch  $^{19}\text{F}$  CPMG Profile von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB bei zwei weiteren Urea Konzentrationen,  $c = 2,5$  M und  $c = 6,0$  M, bei Magnetfeldstärken von  $B_0 = 18,8$  T und  $B_0 = 11,7$  T aufgenommen (Abbildung 70). Auch bei diesen Messungen zeigt sich, dass der Verlauf der Profile bei beiden Magnetfeldstärken für beide Urea Konzentrationen vergleichbar ist.

A



B

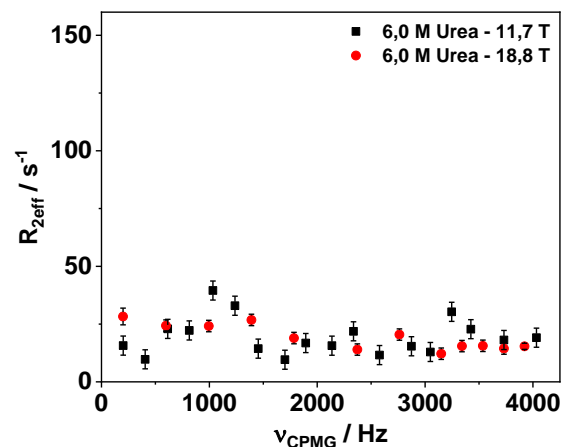


Abbildung 70:  $^{19}\text{F}$  CPMG Relaxationsdispersionsprofile von 5- $^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB bei einer Temperatur von  $T = 298$  K, Urea Konzentrationen von  $c_{\text{Urea}} = 2,5$  M (A) und  $c = 6,0$  M (B) und Magnetfeldstärken von  $B_0 = 11,7$  T (rot) und  $B_0 = 18,8$  T (schwarz). Die durchgezogene Linie zeigt die Anpassung der Daten mit Gleichung (14).

In dem man die  $^{19}\text{F}$  basierten Relaxationsdispersionsprofile bei  $c = 2,5$  M Urea global mit Gleichung (14) anpasst (Abbildung 70 A) und  $\Delta\omega$  auf  $\Delta\omega = 12150$  Hz unter

Zuhilfenahme eines  $^{19}\text{F}$  NMR Spektrums von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* festsetzt, konnte neben den Anteilen an gefalteten und ungefalteten Protein,  $p_f$  und  $p_u$ , auch die Austauschkonstante,  $k_{\text{ex}}$ , bestimmt werden. Dabei wurden die Anteile an gefalteten und ungefalteten Protein,  $p_f$  und  $p_u$ , zu  $p_f = 0,58$  und  $p_u = 0,42$  bestimmt, während die Austauschkonstante,  $k_{\text{ex}}$ , zu  $k_{\text{ex}} = 125 \text{ s}^{-1}$  bestimmt wurde. Die bestimmten Anteile an gefalteten und ungefalteten Protein,  $p_f$  und  $p_u$ , decken sich mit den Werten die aus dem Vergleich der Integrale, wie unter 4.7.4 beschrieben, resultieren ( $p_f = 0,54$  und  $p_u = 0,46$ ). Vergleicht man die mit Gleichung (14) bestimmter Austauschkonstante,  $k_{\text{ex}}$ , von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bei einer Ureakonzentration von  $c = 2,5 \text{ M}$  Urea mit der, die durch Stopped Flow Fluoreszenz Messungen bestimmt wurde ( $k_{\text{obs}} \approx 100 \text{ s}^{-1}$ ), zeigt sich, dass diese vergleichbar sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass es mit  $^{19}\text{F}$  basierten CPMG Relaxationsdispersionsmessungen prinzipiell möglich ist, einen Chevron Plot aufzunehmen und die Kinetik des Proteins zu verfolgen.

Die Relaxationsdispersionsprofile für  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bei einer Urea Konzentration von  $c = 6,0 \text{ M}$  konnten für beide Magnetfeldstärken nicht angepasst werden, da die Amplituden zu gering sind und somit die Unsicherheiten zu groß werden (Abbildung 70 B).

Zusätzlich zu den  $^{19}\text{F}$  basierten CPMG Relaxationsdispersionsmessungen mit  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* bei verschiedenen Magnetfeldstärken und Urea Konzentrationen wurde auch ein CPMG Relaxationsdispersionsprofil von  $5\text{-}^{19}\text{F}\text{-Trp}$  *BsCspB* in einer Zellysats Konzentration von  $c = 200 \text{ g/l}$  aufgenommen ( $c_{\text{Urea}} = 0,0 \text{ M}$ ,  $B_0 = 18,8 \text{ T}$ ) (Abbildung 71). Im Vergleich mit der Messung in verdünnter Lösung zeigt sich ein qualitativ ähnlicher Verlauf des Profils, wobei sich die Daten mit der Gleichung (14) nicht sinnvoll anpassen lassen und somit keine quantitative Aussage über die Faltungskinetik möglich ist. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass gerade bei niederen CPMG Frequenzen,  $\nu_{\text{CPMG}}$ , zu wenig Datenpunkte aufgenommen wurden. Messungen bei einer Magnetfeldstärke von  $B_0 = 11,7 \text{ T}$  ist aufgrund der langen Messdauer und der daraus resultierenden Zersetzung des Zellysats nicht möglich. Außerdem wurden technische Replikate der CPMG Relaxationsdispersionsmessung in Zellysats durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Daten zu demonstrieren, dabei zeigen die Replikate im Rahmen des Fehlers einen identischen Kurvenverlauf (Abbildung 71).

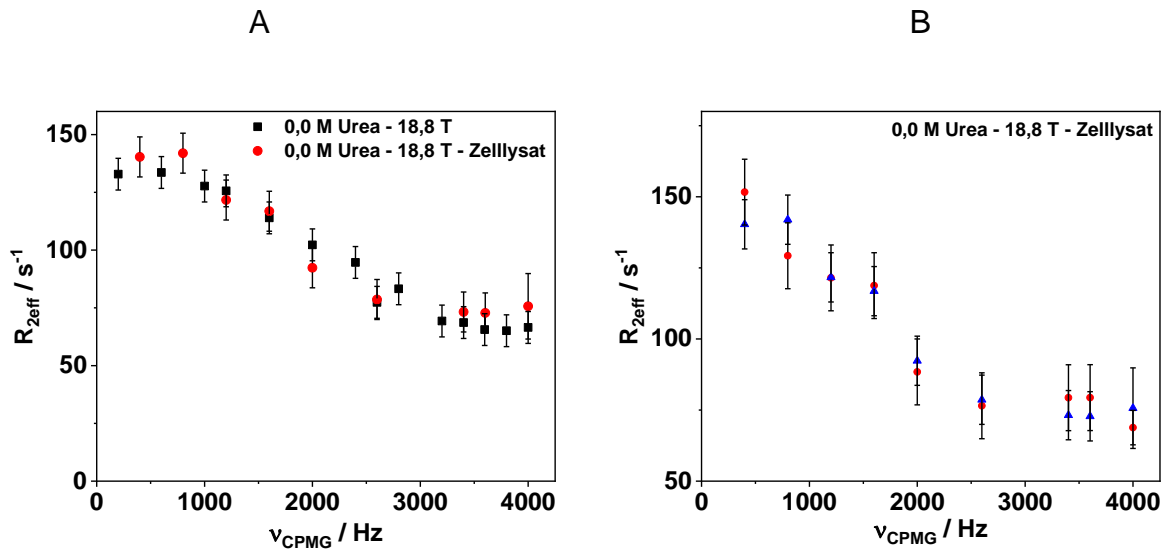


Abbildung 71:  $^{19}\text{F}$  CPMG Relaxationsdispersionsprofile von  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB bei einer Temperatur von  $T = 298 \text{ K}$ , einer Urea Konzentration,  $c_{\text{urea}} = 0,0 \text{ M}$  und Magnetfeldstärken von  $B_0 = 18,8 \text{ T}$  in verdünnter Lösung (schwarz) und einer Zelllysate Konzentration von  $c = 200 \text{ g/l}$  (rot) (A). (B) zeigt technische Replikate der  $^{19}\text{F}$  CPMG Relaxationsdispersionsprofile von  $5\text{-}^{19}\text{F}$ -Trp BsCspB in Zelllysate unter identischen Bedingungen.

## Danksagung

Für die Verfassung dieser Arbeit waren viele helfende Hände nötig. Deswegen möchte ich mich ganz besonders bedanken bei:

Michael. Für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und das Vertrauen in mich, diese Arbeit zu schaffen, obwohl ich vorher nicht einmal wusste was ein Plasmid ist. Außerdem will ich mich für die immer offenen Türen, die vielen Mess- und Lehrstunden am NMR und die riesige Unterstützung bei allen Projekten bedanken. Des Weiteren möchte ich mich auch für den Satz: „Bei allen Herausforderungen ist die Aktivierungsenergie groß, aber ist man einmal über dem Berg hat es sich gelohnt!“ bedanken. Dieser Satz hat mich durch meine ganze Promotion begleiten und am Schluss kann ich sagen: „Es lohnt sich.“

Prof. Valentin Wittmann. Für die Übernahme des Zweitgutachtens und den Input bei den regelmäßigen Treffen zu meinen 6-, 18-, und 30-Monatsberichten.

Prof. Elke Deuerling. Für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und für den, in einer Runde mit Chemikern und Physikern nötigen, biologischen Input bei den regelmäßigen Treffen zu meinen 6-, 18-, und 30-Monatsberichten.

Meinen Kollegen. Besonders Birgit und Tobias, die mich meine ganze Promotion begleitet haben, immer für eine fachliche Diskussion zu haben waren, unendlich viele Fragen beantworteten und mit ihrer Art immer dafür gesorgt haben, dass ich, auch wenn es schlecht lief, immer gerne ins Labor gekommen bin.

Meinen erweiterten Kollegen Uli und Anke, die mich der Welt der NMR-Spektroskopie nähergebracht haben, immer Zeit hatten, sich auch ein tausendstes Mal daneben gesetzt haben, alle Fragen beantwortet haben und selbst am Wochenende erreichbar waren. Das alles war nicht selbstverständlich und ich weiß/wusste es immer sehr zu schätzen.

Illjas Müller, der mich am Anfang an die Hand genommen hat und mir die Welt der Biologie erklärt hat. Ohne ihn hätte ich vermutlich nach dem ersten Monat aufgegeben.

Meinen Studenten Pia, Xenia und Frederike, die mir viel Arbeit abgenommen und einige Biotricks beigebracht haben. Durch ihren Fleiß konnten wir viele neue Erkenntnisse gewinnen.

## Danksagung

Tiankun Zhou, der mir einen kleinen Blick in die Welt der Proteinkristallisation gewährt hat und zwei meiner Proteine kristallisiert und vermessen hat.

Dietmar Funck. Für die immer offenen Ohren bei biologischen Fragen jeglicher Art. Außerdem einen großen Dank an ihn und die restliche Arbeitsgruppe Isono, bei denen ich viele Geräte und Reagenzien benutzen und ausleihen durfte.

Der Arbeitsgruppe Lorbach. Für etliche Liter Flüssigstickstoff und für alles weitere „Chemische“.

Der Arbeitsgruppe Hartig. Für unendlich viele Liter MQ und das Ausleihen und Nutzen vieler Geräte.

Martina Adam von der Arbeitsgruppe Drescher, die für uns den monatlichen Autoklavendienst übernommen hat und uns somit viel Arbeit und Zeit gespart hat.

Dem Autoklaven- und Spülteam von M10, die mindestens eine Millionen Kolben für mich spülen und autokalvieren mussten.

Dem Proteomicsteam für das Messen von ESI Massenspektren.

Vielen weiteren im Fachbereich Chemie und Biologie, die die Infrastruktur an der Uni einzigartig machen.

Ganz besonders meinen Eltern, die mir diesen Weg ermöglichen und mich immer unterstützt, an mich geglaubt und mir den Rücken freigehalten haben. Ohne sie wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

Außerdem dem Rest meiner bunten, großen Familie. Vor allem meinem Bruder Sandi und meinen Patentanten Tanja und Caroline, die jede auf ihre Art große Vorbilder für mich sind. Außerdem meiner Oma, die sich über jeden meiner Erfolge freut als wäre es ihr eigener.

Meinen Freunden, die meine Studien- und Promotionszeit unvergesslich gemacht haben und die, obwohl wir alle so unterschiedlich sind, Freunde fürs Leben geworden sind.

Meinen Freundinnen Laura, Anja, Sarah und Leonie, die schon immer alle wichtigen Ereignisse in meinem Leben mit mir teilen und deren Freundschaft und Unterstützung mir auch aus der Ferne Kraft geben.

Zuletzt meinen Mann Bastian, der mein Ruhepol, größter Unterstützer und Fan im Auf und Ab meines wissenschaftlichen und privaten Leben ist und mich immer wieder

## Danksagung

aufbaut und motiviert. Ich bin dankbar an deiner Seite sein zu dürfen und freue mich riesig auf unsere nächsten, gemeinsamen Herausforderungen.