

NMR-SPEKTROSKOPISCHE STABILITÄTS- UND
STRUKTURUNTERSUCHUNGEN AN PROTEINEN
UNTER HOCHDRUCK

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplom-Physiker
Andi Klamt

geboren am 28.04.1978 in Halberstadt

Tag der Verteidigung: 08.03.2016

Gutachter:

- (1) Prof. Dr. rer. nat. Jochen Balbach
- (2) Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Paul
- (3) Prof. Dr. rer. nat. Werner Kremer (Uni Regensburg)

Andi Klamt: NMR-spektroskopische Stabilitäts- und Strukturuntersuchungen an Proteinen unter Hochdruck, © August 2015

"Größe bedeutet nichts. Sieh mich an. Nach meiner Größe beurteilst du mich, tust du das? Aber das solltest du nicht, denn die Macht ist mein Verbündeter, und ein mächtiger Verbündeter ist sie. Das Leben erschafft sie, bringt sie zur Entfaltung. Ihre Energie umgibt uns, verbindet uns mit allem. Erleuchtete Wesen sind wir, nicht diese rohe Materie. Du musst sie fühlen, die Macht die dich umgibt."

— Yoda, Krieg der Sterne - Episode V —

INHALTSVERZEICHNIS

i	EINLEITUNG	1
ii	METHODEN UND VERWENDETE PROTEINE	7
2	AUFBAU DER HOCHDRUCKANLAGE	9
3	VERWENDETE PEPTIDE UND PROTEINE	13
3.1	Das Modellpeptid Ac-GGXA-NH ₂	13
3.2	Das Kälteschockprotein <i>Bs</i> -CspB	13
3.3	Das Kälteschockprotein <i>Bc</i> -Csp R ₃ E L66E	15
3.4	Das Zinkfingerprotein Kti11p(M ⁻)	16
4	NMR-SPEKTROSKOPISCHE METHODEN ZUR ANALYSE VON PROTEINEN IN LÖSUNG	19
4.1	Bestimmung des entfalteten Proteinanteils	19
4.2	Berechnung der thermodynamischen Parameter	20
4.3	Der Druck-Temperatur Phasenraum eines Proteins	25
4.4	Einfluß von Hochdruck auf die chemische Verschiebung	30
5	NMR PULSPROGRAMME, VERWENDETE HARD- UND SOFTWARE	33
5.1	Verwendete NMR-Pulssequenzen	33
5.1.1	Pulsprogramm zur Bestimmung thermodynamischer Parameter	33
5.1.2	Pulsprogramme zur Identifikation der Rückgrat- und Seitenket- tenatome	33
5.1.3	Pulsprogramm zur Dynamikmessung des H-N Bindungsvektors	37
5.2	Verwendete Hard- und Software	37
iii	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	39
6	ERGEBNISSE	41
6.1	Referenzierung der Spektren	41
6.2	Einfluß von hohen Drücken auf die Proteinstabilität	41
6.2.1	Temperaturübergänge bei unterschiedlichen Drücken	41
6.2.1.1	Ermittlung des Anteils an entfaltetem Protein	41
6.2.1.2	Bestimmung der thermodynamischen Übergangspara- meter	48
6.2.1.3	Untersuchung des enthalpischen und entropischen Anteils	54
6.2.1.4	Druckabhängige Betrachtung der Proteinvolumina an- hand der Temperaturübergangsdaten	55
6.2.2	Druckübergänge bei konstanten Temperaturen	66

6.2.3	Der Druck-Temperatur Phasenraum	73
6.2.3.1	Das Protein-Stabilitätsgebirge über Druck und Temperatur	73
6.2.3.2	Ermittlung der thermodynamischen Parameter aus der Ellipsengleichung	74
6.3	Druckabhängigkeit der NMR-Rückgratresonanzen	82
6.3.1	Druckabhängigkeit der ^1HN -Resonanzen des Modelpeptids Ac- GGXA-NH ₂	82
6.3.1.1	GGXA in Natriumphosphatpuffer	83
6.3.1.2	GGXA in Natriumcacodylatpuffer	85
6.3.2	Zuordnung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der Proteine	87
6.3.2.1	Das Kälteschockprotein <i>Bs</i> -CspB	87
6.3.2.2	Die Kälteschockprotein Doppelvariante <i>Bc</i> -Csp R3E L66E	88
6.3.2.3	Das Zinkfingerprotein Kti11p(M ⁻)	89
6.3.3	Druckabhängigkeit der NH-Rückgratresonanzen von Proteinen . .	90
6.3.3.1	Das Kälteschockprotein <i>Bs</i> -CspB	91
6.3.3.2	Das Zinkfingerprotein Kti11p(M ⁻)	97
7	ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	103
7.1	Proteinstabilität aus eindimensionalen Protonenspektren	103
7.2	Druckabhängigkeit der Rückgratatome	108
7.2.1	Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung von <i>Bs</i> -CspB . .	108
7.2.2	Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung von Kti11p(M ⁻)	112
7.2.2.1	Lineare und nichtlineare Druckkoeffizienten	112
7.2.2.2	Die chemischen Verschiebungen des intermediären Zu- standes von Kti11p(M ⁻)	116
iv	ZUSAMMENFASSUNG	121
	LITERATURVERZEICHNIS	125
	Abbildungsverzeichnis	136
	Tabellenverzeichnis	137
v	ANHANG	139
A	ANHANG A	141
A.1	Übersicht der Hochdruckanlage	141
A.2	Stabilität des Kälteschockproteins <i>Bs</i> -CspB anhand von HSQC-Spektren .	142
A.3	Vergleich der HSQC Spektren von Kti11p(M ⁻) und Kti11p(M ⁺)	143
A.4	Vergleich des hetNOE von Kti11p(M ⁻) und Kti11p(M ⁺)	144
A.5	Abhängigkeit der Stabilität von Kti11p(M ⁻) vom pH-Wert	145
A.6	Zuordnung der ^1H - ^{15}N HSQC Spektren	146
A.7	Übersicht der Druckkoeffizienten	148

B ANHANG B	153
B.1 Koeffiziententransformation der elliptischen Parameter	153
B.2 Konvertierungsskript: Bruker Syntax in NMRView Syntax	154
B.3 Programme zur Analyse der thermodynamischen Eigenschaften von Proteinen	158
B.3.1 <i>Shell-Skript</i> mit Gnuplot Implementierung zur χ^2 -Analyse	158
B.3.2 Fit der Ellipse im Phaseraum	158
B.4 Programme zur Analyse der chemischen Verschiebungen	160
B.4.1 <i>Shell-Skript</i> zur Korrektur der chemischen Verschiebungen von <i>Bs-CspB</i> sowie <i>Kti11p(M⁻)</i> anhand der GGXA Verschiebungen	160
B.4.2 <i>Shell-Skript</i> mit Gnuplot Implementierung zur Ermittlung der Parameter b_0, b_1, b_2 für <i>Bs-CspB</i> und <i>Kti11p(M⁻)</i>	166
Lebenslauf	169
Eidesstattliche Erklärung	171
Danksagung	173

Teil I

EINLEITUNG

Die Natur hat eine Vielzahl von unterschiedlichsten Lebensformen in den verschiedensten und unwirtlichsten Umgebungen der Erde hervorgebracht. Vom Virus über Bakterien und Mehrzellern bis hin zu Pilzen, Pflanzen und Säugern, bestehen alle Lebensformen aus den Grundbausteinen, den Nukleotiden. Diese wiederum bilden in ihrer Abfolge den Aufbau der DNA, welche die Informationen für die lebenserhaltenden Biomoleküle, den Proteinen, codiert. Proteine sind aus 20 natürlichen Aminosäuren aufgebaut, die in ihrer linearen Abfolge ein entfaltetes Protein darstellen. Proteine können allerdings nur im gefalteten, nativen Zustand ihre Funktionen ausführen. Diese reichen von der Regulation des Spurenelementhaushaltes in der Zelle, über Katalysereaktionen als Enzyme bis hin zu Faltungshelfern größerer Proteine, den Chaperonen. Der gefaltete Zustand ist aus Sekundärstrukturelementen, wie der α -Helix und dem β -Faltblatt, aufgebaut, welche sich wiederum zur übergeordneten Tertiärstruktur des Proteins zusammenfügen.

Der Weg von der entfalteten, linearen Aminosäurekette hin zum gefalteten, funktionalen Zustand wird als Proteinfaltung bezeichnet.

Allein die Abfolge der Aminosäuren in der Kette legt auf Grund der vorhandenen Van-der-Waals-Kräfte, der hydrophoben Wechselwirkungen, der sich aufbauenden Wasserstoffbrücken und der elektrostatischen Kräfte einer jeden Aminosäure den gefalteten Zustand fest [Anfinsen, 1973]. Ebenfalls spielt hier die Zusammensetzung des Lösungsmittels eine entscheidende Rolle, da dieses die ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen stark beeinflusst. Wird das Protein auf dem Faltungsweg durch verschiedene Faktoren daran gehindert seinen gefalteten Zustand zu erreichen, so kann es seine Funktion nicht mehr korrekt ausüben. Wenn diese Proteinfehlfaltungen vermehrt auftreten, kann das zu Proteinfehlfaltungserkrankungen führen, wie beispielsweise der Alzheimer-Krankheit, der Parkinson-Krankheit, der Huntington-Krankheit, der Sichelzellenanämie oder Diabetes mellitus Typ 2.

Die Funktion, Arbeitsweise und Faltung von Proteinen besser zu verstehen, ist Gegenstand derzeitiger Forschung. In Vivo ablaufende Prozesse sollen unter Laborbedingungen in In Vitro Systemen möglichst realitätsnah ablaufen. Um die Proteinfaltung qualitativ und quantitativ zu verifizieren, muss das Protein durch äußere Einflüsse von seiner natürlichen, gefalteten Form reversibel in seinen entfalteten Zustand überführt werden. Das kann durch chemische, thermische oder mechanische Einflüsse in Form von Denaturierungsmittelzugabe, pH-Wert Änderung, Temperaturänderung, mechanisches Strecken des Proteins, oder aber durch Druckerhöhung realisiert werden. Der Zusatz von Denaturierungsmitteln ist zu vermeiden, da diese das System zusätzlich stören können. Temperaturübergänge zeigen oft bei zu hohen Temperaturen irreversible Entfaltungsprozesse, bei denen das entfaltete Protein in eine unlöslich, gelartige Phase übergeht, die durch intermolekulare Wasserstoffbrücken gestützt wird [Heremans *et al.*, 1996, Smeller, 2002]. Weiterhin wird bei hohen Temperaturen der Amidprotonenaustausch mit dem umgebenden Lösungsmittel stark begünstigt, so dass nur

noch wenig bis keine Informationen über diese Proteinprotonen vorliegen. Neben den Temperaturübergängen, werden oft pH-Wert Übergänge durchgeführt. Bei hohen pH-Werten kommt es ebenfalls zu erhöhtem Amidprotonenaustausch und somit zu Informationsverlusten. Änderungen des pH-Wertes können nur unter Zugabe von Säuren beziehungsweise Basen umgesetzt werden. Dabei besteht das Problem sehr große pH-Wert Bereiche abzudecken. Ein Gemisch von Puffern zur Abdeckung des pH Bereiches, könnte den Denaturierungsgrad des Proteins fördern. Auch bei pH-Wert Übergängen konnte Irreversibilität beobachtet werden [Zipp und Kauzmann, 1973].

Die Anwendung von Hochdruck zur Untersuchung von Proteinstruktur, -faltung und -stabilität stellt hingegen eine saubere und weitgehend reversible Vorgehensweise dar und wurde in dieser Arbeit angewendet. In dem hier angewendeten Hochdruckbereich bis zu 250 MPa sind sämtliche Entfaltungsvorgänge vollständig reversibel [Akasaka und Tezuka, 1997]. Ein Druck von 250 MPa entspricht einer Wassersäule von etwa 25 km Höhe. Selbst am tiefsten Punkt der Erde, dem Marianengraben mit seinen knapp 11 km Tiefe und dort herrschenden 110 MPa, existieren einzellige Lebewesen. Ein weiterer großer Vorteil der Hochdruckanwendung ist der erniedrigte Gefrierpunkt von Wasser, der im Bereich um 200 MPa bis auf etwa -18°C abfällt. Somit ist es möglich bei konstant gehaltenem Druck das Protein nicht nur einer Hitze- sondern auch einer Kältedenaturierung unterhalb des Gefrierpunktes bei Atmosphärendruck zu unterziehen [Kremer *et al.*, 2003].

Für die Ausübung bestimmter Funktionen glaubte man lange, dass nur der native Proteinzustand die biologisch aktive Form darstellt. Jedoch zeigten eine Vielzahl von Untersuchungen bei verschiedenen Proteinen, dass es aktivierte Zustände gibt, die nicht zwangsläufig dem energieärmsten, nativen Zustand N entsprechen müssen, um bestimmte Aufgaben auszuüben [Weininger *et al.*, 2009, Kalbitzer *et al.*, 2009, Schmidpeter und Schmid, 2015]. Vielmehr kann man von angeregten N' Zuständen oder aber intermediären Zuständen sprechen, die energetisch zwischen dem entfalteten und dem nativen Zustand liegen [Munte *et al.*, 2013]. Im Allgemeinen ist die Energielandschaft für den nativen Zustand nicht absolut glatt, sondern eher rau [Dill und Chan, 1997]. Ein Protein stellt in seiner natürlichen Umgebung kein statisch rigides Biomolekül dar. Befindet sich das System im thermodynamischen Gleichgewicht so koexistiert eine Vielzahl von Konformationen. Diese Vielzahl von Proteinzuständen nehmen für sich jeweils unterschiedliche Volumina ein, wobei zum Volumen selbst mehrere äußere Schalen aus Wassermolekülen beitragen [Kauzmann, 1959]. Durch die Anwendung von hohen Drücken auf ein System ist es nach dem Le Chatelier'schen Prinzip möglich, ein System in den Zustand geringeren Volumens zu überführen. Das ermöglicht beispielsweise den Übergang von einem nativen über einen intermediären bis zum entfalteten Zustand. Bereits unter Normalbedingungen koexistieren verschiedene Zustände nebeneinander, nehmen jedoch einen stark unterschiedlichen Populationsgrad ein. Durch Anwendung von Hochdruck kann diese Populationsverteilung verschoben

werden.

Die Funktionalität von Proteinen lässt sich nicht allein auf ein statisches Konstrukt reduzieren, sondern liegt ebenfalls in der Dynamik zwischen den Zuständen des Biomoleküls begründet. Aus diesem Grund bietet sich zur Untersuchung solcher Phänomene die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) an. Im Gegensatz zur Röntgenkristallstrukturanalyse, die auf zuvor kristallisierte Proteinkonformationen angewiesen ist, können mittels NMR-Spektroskopie Proteine im gelösten Zustand auf statische, dynamische und kinetische Prozesse untersucht werden. Mit Ausnahme von Konzentrationsunterschieden, soll dieser gelöste Proteinzustand möglichst dem natürlichen Milieu in einer prokaryotischen oder eukaryotischen Zelle nachempfunden werden. Die NMR ermöglicht weiterhin, unter bestimmten Voraussetzungen, die Untersuchung nativer und entfalteter Zustände, ohne Überlagerung der Resonanzsignale. Um das Druckverhalten von Biomolekülen mithilfe der Kernspinresonanzspektroskopie zu untersuchen, haben sich in der Praxis zwei unterschiedliche Techniken etabliert. Die Erste verwendet ein spezielles NMR-Spektrometer, in dem der gesamte Probenkopf inklusive Proberröhrchen über eine Druckflüssigkeit unter hohem Druck gesetzt wird [Jonas und Jonas, 1994]. Die zweite Variante beruht auf der Verwendung gängiger NMR-Spektrometer in Kombination mit einem speziellen Hochdruckröhrchen, gefertigt aus dickwandigem Glas, Saphir, Quarz [Yamada, 1974, Yamada *et al.*, 1974, Yamada *et al.*, 2001] oder Keramik [Peterson und Wand, 2005]. In dieser Arbeit wurde die zweite Variante unter Verwendung einer Keramikzelle realisiert.

Um ein Protein von seinem nativen in den entfalteten Zustand zu überführen, muss eine Energiebarriere überwunden werden, die mit der freien Enthalpie ΔG charakterisiert werden kann. Diese freie Enthalpie setzt sich aus enthalpischen ΔH und entropischen Anteilen ΔS zusammen. Je nach Sekundärstruktur des Proteins, ob hohes α -helikales oder β -Faltblatt Vorkommen, lässt sich das Biomolekül bereits unter moderaten Drücken oder erst bei sehr hohen Drücken entfalten. Proteine mit hohem β -Faltblatt Anteil zeigen eine höhere Druckempfindlichkeit als Proteine mit α -helikalem Anteil [Paschek und Garcia, 2004]. Druckanwendungen auf α -Helices können zu einem gewissen Grad sogar stabilisierend wirken [Paschek und Gnanakaran, 2005].

Für das Verständnis der Proteinfaltung ist es essentiell, die thermodynamischen Größen, die zur Proteinstabilität ΔG beitragen, qualitativ und quantitativ zu erfassen. Diese Größen können aus dem Anteil an entfaltetem Protein f_u in Abhängigkeit von Druck und Temperatur ermittelt werden. Daraus lässt sich ein dreidimensionales Stabilitätsdiagramm des druckanfälligen Proteins verifizieren. Aus diesem Stabilitätsdiagramm kann ein Druck-Temperatur-Phasendiagramm projiziert werden, dessen mathematische Beschreibung einen Parametersatz von thermodynamischen Größen zur quantitativen Stabilitätsbeschreibung von Proteinen liefert [Zipp und Kauzmann, 1973, Lesch *et al.*, 2004, Scharnagl *et al.*, 2005].

Es wurde hier eine in dieser Arbeitsgruppe etablierte NMR-Methode [Szyperski *et al.*, 2005] zur Quantifizierung des entfalteten Proteinanteils f_u verwendet. Diese Methode führt im Gegensatz zu anderen NMR-Methoden zu genaueren und reproduzierbareren Ergebnissen. Mit diesem Auswerteverfahren sind bisher noch keine komplexen Analysen zur Stabilität und Struktur unter verschiedensten Druck-Temperaturbedingungen durchgeführt worden. Gleichfalls existiert auf Basis dieses Verfahrens keine umfassende Studie der thermodynamischen Parameter eines Proteins.

Neben den im NMR-Spektrum enthaltenen Informationen über die Proteinstabilität, geben die NMR-Resonanzfrequenzen eines jeden Kernspins Auskunft über die Struktur des Proteins, da diese Frequenzen von der chemischen Umgebung des Kerns abhängen. Ändert sich die chemische Umgebung durch die Anwendung von Hochdruck, so hat das Einfluss auf die chemische Verschiebung des betroffenen Kernspins [Arnold, 2002, Kremer *et al.*, 2003]. Diese Verschiebungsänderung erlaubt Rückschlüsse auf mögliche strukturelle Änderungen im Protein. Von großem Interesse sind hier die Resonanzverschiebungen der in Wasserstoffbrücken integrierten Rückgratprotonen und Stickstoffe, da insbesondere diese Bindungen für die Sekundär- und Tertiärstrukturbildung von Proteinen entscheidend sind.

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine umfassende Druck- und Temperaturstabilitätsanalyse an ausgewählten Proteinen unter Verwendung der NMR-Methode nach [Szyperski *et al.*, 2005] durchzuführen. Mittels diesen Verfahrens wurde aus der ermittelten Proteinstabilität eine umfassende Studie zu den sich ergebenden thermodynamischen Größen durchgeführt und ein Druck-Temperatur-Phasendiagramm der Proteine erstellt. Hierzu zählen auch Hochdruckmessungen bei Temperaturen unterhalb von $T = 0^\circ\text{C}$, um die Kältedenaturierung von Proteinen zu untersuchen. Hierzu war es zunächst notwendig, eine Hochdruckanlage zur Untersuchung biomolekularer, liquider Proben zu konstruieren, die sich zur Verwendung an einem gängigen 600 MHz NMR-Spektrometer der Firma Bruker eignet. Ein weiteres Ziel war es, die chemischen Verschiebungen der Rückgratotope eines Proteins in Abhängigkeit hoher Drücke systematisch zu charakterisieren, um besonders flexible und damit möglicherweise aktive Bereiche des Proteins aufzeigen zu können.

Teil II

METHODEN UND VERWENDETE PROTEINE

AUFBAU DER HOCHDRUCKANLAGE

Im Folgenden soll auf den Aufbau und die Funktionsweise der konstruierten Hochdruckanlage in Kombination mit dem NMR-Spektrometer eingegangen werden. In Abb. 2.0.1 ist eine Übersichtsskizze der konstruierten Hochdruckbank mit Reservoir,

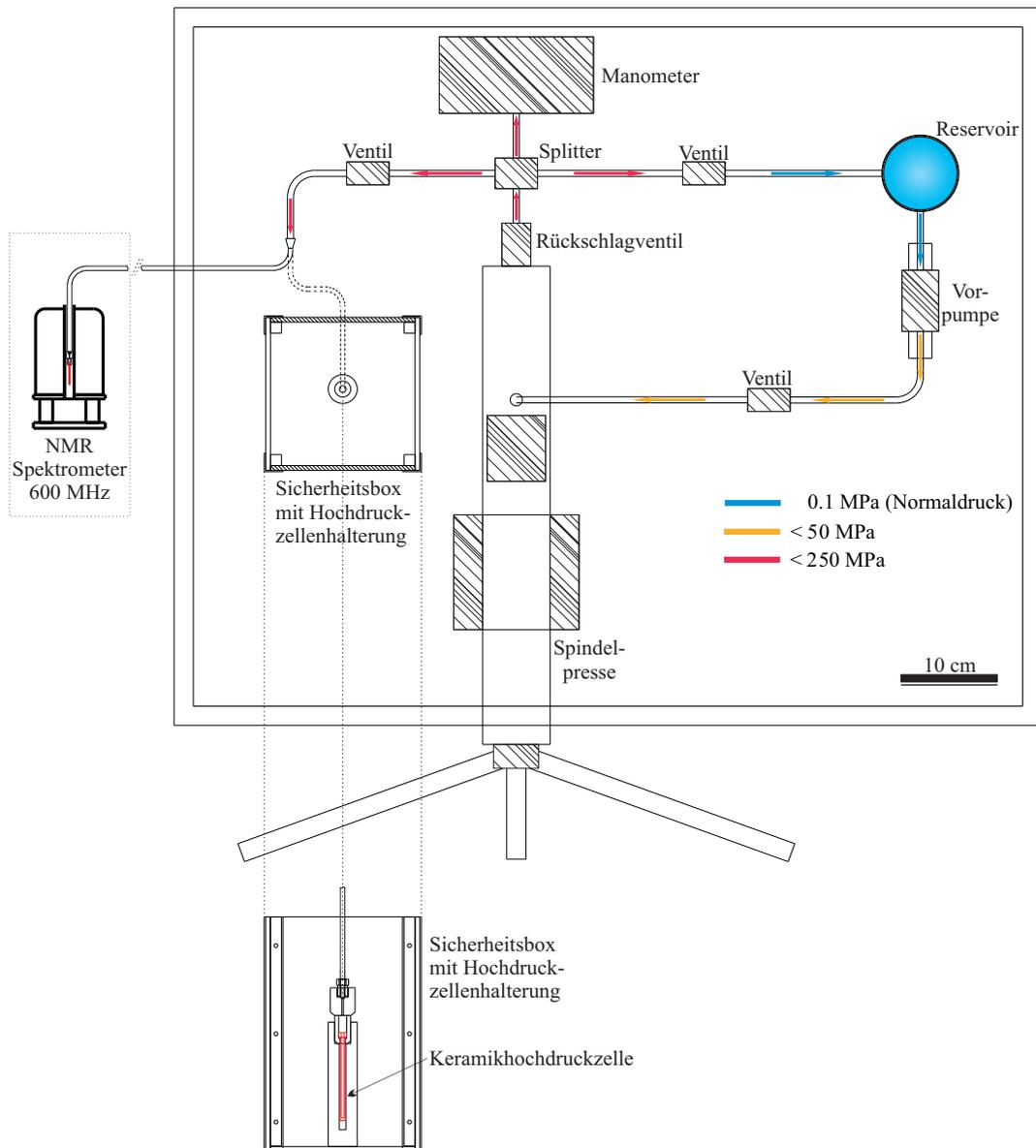


Abb. 2.0.1: Übersichtsskizze zum Aufbau der Hochdruckbank und Zuleitung zum 600 MHz Spektrometer. Separat ist im unteren Teilbereich der Skizze die Sicherheitsbox mit integrierter Hochdruckzellenhalterung und Keramikzelle dargestellt. Diese ist über einen Zelladapter aus Titan an die 1/8" Zuleitung angeschlossen.

Vorpumpe, Spindelpresse, Ventilen, Manometer und Sicherheitsbox mit integrierter Hochdruckzellenhalterung skizziert. Die Vorpumpe, Spindelpresse, Manometer, Ventile und Zuleitungen sind von der Firma SITEC aus nichtmagnetischem, rostfreiem Edelstahl gefertigt. Das Reservoir und die Sicherheitsbox mit integrierter Hochdruckzellenhalterung wurden in der Werkstatt des Instituts gefertigt. Um einen besseren Eindruck vom Aufbau der Hochdruckanlage zu bekommen, befindet sich im Anhang eine Photographie der Druckbank Abb. A.1.1 und der Hochdruckzelle Abb. A.1.2.

Die Zuleitungen besitzen einen Außendurchmesser von $1/4''$ und verjüngen sich zur Hochdruckzelle zu $1/8''$ hin. Die einzelnen Rohre wurden je nach Verbindung auf das entsprechende Maß abgelängt, die Enden auf 60° konisch abgedreht und ein linkslaufendes Gewinde geschnitten. Die Leitungssegmente wurden dann durch eine spezielle Biegevorrichtung in die jeweils benötigte Geometrie überführt. Die konische Passung am jeweiligen Rohrende wird bei Verschraubung in ein 59° Gegenstück gepresst und garantiert so für sehr hohe Belastbarkeit. Das gesamte Rohrsystem von der Druckbank bis zum Spektrometer hat eine Länge von 7 m.

Zur Druckmessung dient das Bourdonfeder-Manometer, welches eine Genauigkeitsklasse von 0.1 aufweist. Das bedeutet eine maximal zu erwartende Abweichung des Messwertes von 10% des Skalenendwertes, was einem Fehler von 4 MPa entspricht.

Die Hochdruckzellenhalterung dient zum Einen als Aufbauhilfe, um das Hochdruckröhrchen mit dem Verschlussystem an die Hochdruckleitung anzuschließen und es mit dem für dieses System vom Hersteller vorgegebenem Drehmoment zu verschrauben. Gleichzeitig dient es als Testplatz, um gewährleisten zu können, ob besagtes Verschlussystem dem angelegtem Druck standhalten kann. Die Sicherheitsbox soll den Experimentator vor möglichen Schäden schützen.

Das Hochdruckröhrchen der Firma *Daedalus Innovations* besteht im Gegensatz zu herkömmlichen Glasröhrchen aus 7068er Aluminum, dem anteilig Zirconiumdioxid zugesetzt wurde [Peterson und Wand, 2005]. Daraus resultiert eine besonders zähe Keramik. Es hat eine Länge von 87 mm, einen Außendurchmesser von 5 mm und einen Innendurchmesser von 3 mm. Somit fasst es ein Vermögen von maximal 0.64 ml. Das Probevolumen selber wurde auf 350 μ l festgelegt. Darüber wurde eine etwa 10 mm dicke Schicht eines niedrigviskosen Öles gebracht, um eine Durchmischung der Probe mit der Druckflüssigkeit zu vermeiden. Ein Röhrchen mit dieser Geometrie und aus genannter Keramik gefertigt, kann Drücken bis zu 250 MPa standhalten.

Mit den Standard Abdichtungen kann laut Herstellerangaben in einem Temperaturbereich von 5°C bis 100°C gearbeitet werden. Die Abdichtungen sind aus einem speziellen Performance Elastomer (Viton) gefertigt. Dieser muss nach jedem Druckeinsatz ersetzt werden. Es gibt weitere Abdichtungelastomere, mit denen Arbeitstemperaturen von

etwa -40°C erreicht werden können.

Das Röhrchen wird über ein aus Titan bestehendes Verschlussystem an eine $1/8''$ Zuleitung an die druckgenerierende Einheit angeschlossen. Als Druckflüssigkeit wird destilliertes Wasser benutzt und in die Zuleitungen eingespeist. Um die Keramikzelle unter Hochdruck zu setzen, wird mit Hilfe der Vorpumpe die Druckflüssigkeit aus dem Reservoir in das Hubvolumen der Spindelpresse befördert, wobei ein Überdruck von maximal 50 MPa aufgebaut werden kann. Der weitere Druckaufbau wird dann ausschließlich über die Spindelpresse generiert. Das Rückschlagventil am Ende der Spindelpresse verhindert einen Rückfluss in das Hubvolumen des Pumpsystems. Mittels der Spindelpresse können innerhalb des $1/4''$ Rohrsystems Drücke bis zu 400 MPa generiert und am Manometer abgelesen werden. Innerhalb des $1/8''$ System sind Drücke bis zu 300 MPa möglich. Die Keramikzelle selber wurde vom Hersteller auf eine Belastung von bis zu 250 MPa getestet.

Eine kontinuierliche Druckerhöhung von 0.1 MPa auf 200 MPa kann innerhalb von etwa 2 Minuten aufgebaut werden. Durch diese Vorgehensweise konnte in der Keramikzelle laut Temperatursensor des NMR-Probenkopfes keine Temperaturänderungen in der Probe ausgemacht werden. Innerhalb der Keramikzelle entsteht bei Drücken um 200 MPa ein Volumenverlust von etwa 7%, was zu einer minimalen Konzentrationserhöhung der Proteinprobe führt. Diese wurde im Weiteren nicht berücksichtigt.

VERWENDETE PEPTIDE UND PROTEINE

3.1 Das Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂

Um druckinduzierte Einflüsse auf eine Proteinstruktur mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersuchen zu können, bedient man sich am besten eines Peptidsystems ohne Sekundärstruktur. Somit ist es möglich, Informationen zur Änderung der chemischen Verschiebung $\Delta\delta$ einer bestimmten Aminosäure zu erhalten, welche allein von der Druckänderung und nicht von einer übergeordneten strukturellen Änderung herrührt. Hierfür wurde das Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ gewählt. Das X steht für eine der 20 natürlichen Aminosäuren. Die Acetylgruppe ist mit Ac- bezeichnet, die Aminogruppe mit -NH. Dieses Peptid wurde bereits in anderen Arbeitsgruppen für solche Zwecke verwendet [Arnold *et al.*, 2002] und eine Zuordnung der Protonenfrequenzen aus [Bundi und Wüthrich, 1979] war vorhanden.

Im TRIS/HCl Puffer als auch im Natriumphosphatpuffer wurde das GGXA Peptid ohne schützende Acetyl- und Aminogruppe bereits auf die Protonenverschiebungen hin in [Arnold, 2002] und [Arnold *et al.*, 2002] in bestimmten pH- und Temperaturbereichen untersucht. Das geschützte Peptid Ac-GGXA-NH₂ wurde in TRIS/HCl Puffer bereits von [Koehler *et al.*, 2012] auf die ¹H-Amidprotonen und den dazugehörigen ¹⁵N-Stickstoffkernen hin untersucht.

Hier soll ein weiterer pH- als auch Temperaturbereich bei pH 6.5 und T = 295 K für den Phosphatpuffer vermessen und analysiert werden, welcher den Bedingungen der hier verwendeten Proteinlösungen am nächsten kommt. Desweiteren soll Ac-GGXA-NH₂ im Natriumcacodylatpuffer, welcher sich für die verwendeten Kälteschockproteine sehr bewährt hat [Sachs *et al.*, 2011], bei pH 6.5 und T = 295 K vermessen werden. Es sollen nur die Amidprotonen untersucht werden, da diese in Wasserstoffbrücken direkt integriert sein können und somit die aussagekräftigsten Informationen zu strukturellen Änderungen liefern [Cordier und Grzesiek, 1999, Nisius und Grzesiek, 2012].

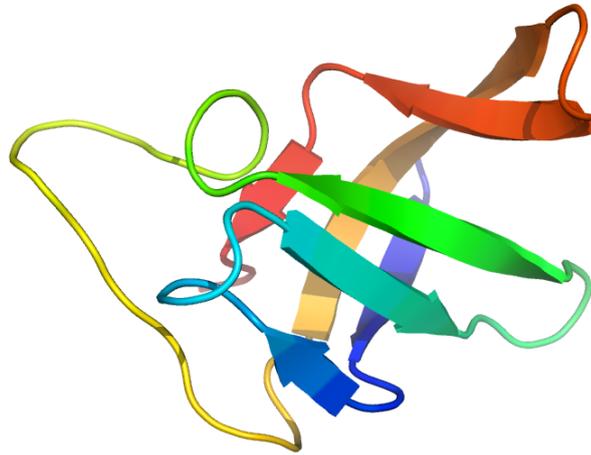
3.2 Das Kälteschockprotein Bs-CspB

Um das thermodynamische Verhalten von Proteinen unter Hochdruck zu studieren, bietet es sich an, solche Proteine auszuwählen, welche sich im verwendeten Druckbereich zu mindestens 50% entfalten lassen. Hier sind diejenigen Proteine von Interesse, deren Sekundärstruktur vorrangig aus β -Faltblättern aufgebaut ist. Im Vergleich zu

α -helikalen Strukturen, brechen β -Strukturen unter hohen Drücken einfacher auf, da die Wasserstoffbrückenbindungen an dieser Stelle kleinere Energien aufzeigen [Nisius und Grzesiek, 2012]. Bei Proteinen mit hohem α -helikalem Anteil kann es bei Druckeinwirkung sogar zu einer Stabilisierung der Struktur kommen [Paschek und Garcia, 2004, Paschek und Gnanakaran, 2005].

Ein geeignetes Protein ist das Kälteschockprotein *Bs-CspB* aus dem Organismus *Bacillus subtilis* (Abb. 3.2.1). Seine Sekundärstruktur besteht aus fünf β -Strängen, die sich zu zwei Faltblättern formen. Jedes β -Faltblatt besitzt drei Stränge, wobei Strang β_1 (blaue Farbkodierung in Abb. 3.2.1) von beiden Faltblättern geteilt wird. Die beiden Faltblätter liegen sich so gegenüber, dass sie zusammen zu einer sogenannten β -Faßstruktur angeordnet sind, welche eine typische Anordnung für Kälteschockproteine darstellt. Es sind innerhalb dieser Struktur keine α -Helices vorhanden, wodurch dieses Protein zu einem idealen Kandidaten für die Hochdruckuntersuchung wird. Bei einem Molekulargewicht von 7.37 kDa besteht es aus 67 Aminosäuren, hat ein Tryptophan, kein Tyrosin und ein Prolin.

Abb. 3.2.1: *Bs-CspB*: Cartoonansicht der Proteindatenbankdatei (pdb) 1NMG [Schnuchel und Holak, 1993] des Kälteschockproteins. Sehr gut ist die β -Faßstruktur der Falblätter zu erkennen. Die unterschiedlichen Farben stellen keine Codierung dar und dienen nur der übersichtlicheren Darstellung.



Das Kälteschockprotein folgt nach [Schindler *et al.*, 1996] streng einem Zwei-Zustands-Modell, wonach das Protein sowohl im Gleichgewicht, als auch in kinetischen Experimenten nur in einer gefalteten oder entfalteten Konformation vorliegen kann. Die Faltungsrates in Wasser liegt bei $689 \pm 34 \text{ s}^{-1}$, wobei die Rückfaltungsrates $9.93 \pm 0.43 \text{ s}^{-1}$ beträgt [Perl und Welker, 1998]. Somit stehen zwischen den einzelnen Druck- und oder Temperaturschritten keine langen Wartezeiten für eine Equilibrierung an. Die thermische Stabilität von *Bs-CspB* beträgt nach [Schindler und Schmid, 1996] unter Normalbedingungen bei $T = 298 \text{ K}$ und in 20 mM Natriumcacodylat und $\text{pH } 7.0$ $\Delta G_u^0 = 8.9 \text{ kJ/mol}$. Die Funktion von Kälteschockproteinen ist bis dato nicht komplett verstanden. Was bekannt ist, ist die Tatsache, dass bei Kälteeinwirkung verschiedene Bakterien wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* oder *Bacillus caldolyticus* vermehrt diese Kälteschockproteine exprimieren [Jones *et al.*, 1987]. Gleichzeitig zeigen diese Proteine eine starke Affinität zu einzelsträngiger DNA [Zeeb und Balbach, 2003] und

RNA [Sachs *et al.*, 2011]. Somit könnten Kälteschockproteine für die Regulation der Translation bei niedrigen Temperaturen verantwortlich sein.

Das Protein *Bs*-CspB wurde einer ausführlichen Temperatur- und Druckstabilitätsmessung mit eindimensionalen Protonenspektren und zweidimensionalen heteronuklearen Spektren unterzogen um einen möglichst kompletten Parametersatz an thermodynamischen Größen bestimmen zu können. Das in dieser Arbeit verwendete Protein wurde in Zusammenarbeit mit Rolf Sachs hergestellt. Das Aufreinigungsverfahren kann detailliert in [Sachs, 2010] nachgelesen werden.

3.3 Das Kälteschockprotein *Bc*-Csp R3E L66E

Die Doppelvariante des Kälteschockproteins *Bc*-Csp R3E L66E aus *Bacillus caldolyticus* besitzt ebenfalls eine fassartige β -Faltblatt Struktur und keine α -Helix. Es hat 66 Aminosäuren mit einem Tryptophan, einem Tyrosin und einem Prolin. Die Aminosäuren an Position drei und 66 sind gegenüber dem Wildtyp ausgetauscht. Dadurch zeigt diese Doppelvariante eine sehr viel geringere Thermostabilität. Die Stabilität des Wildtyps liegt bei einer Temperatur von 70°C immerhin noch bei $\Delta G_u^0 = 4.5$ kJ/mol, wohingegen die freie Enthalpie der Doppelvariante *Bc*-Csp R3E L66E bei dieser Temperatur bereits auf $\Delta G_u^0 = -16.2$ kJ/mol abgesunken ist [Perl *et al.*, 2000]. Die Struktur des Wildtypproteins *Bc*-Csp konnte mittels Röntgenkristallographie bei einer Auflösung von 1.17 Å entschlüsselt werden [Mueller *et al.*, 2000], ist unter der pdb-Kennung 1C9O registriert und als Cartoonansicht in Abb. 3.3.1 dargestellt.

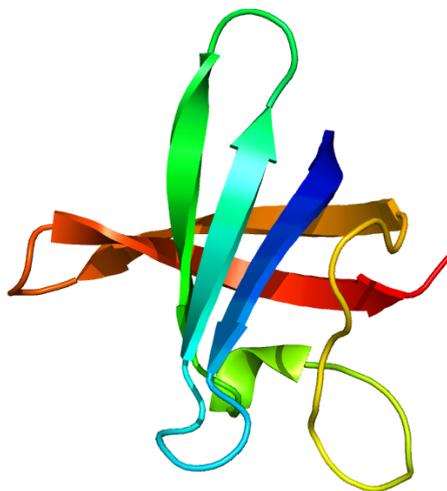


Abb. 3.3.1: *Bc*-Csp: Cartoonansicht der pdb-Datei 1C9O des Kälteschockproteinwildtyps. Sehr gut ist die β -Faßstruktur der Falblätter zu erkennen. Die Farben dienen der übersichtlicheren Darstellung.

Genau wie *Bs*-CspB zeigt auch der Wildtyp *Bc*Csp eine starke Affinität zu einzelsträngiger DNA, dessen Komplexstruktur in Kombination mit dT₆ röntgenkristallographisch von [Max *et al.*, 2007] gelöst werden konnte.

Die Doppelvariante zeigt bereits unter Normalbedingungen einen hohen Populationsanteil der entfalteten Spezies von etwa 8% [Szyperski *et al.*, 2005], in anderen Experi-

menten sogar 13% [Sachs, 2010]. Auf Grund dieser Tatsache und der geringen Stabilität von *Bc-Csp R3E L66E* sollte es mittels Hochdruckanwendung möglich sein, dieses Protein zu fast 100% unter Raumtemperaturbedingungen entfalten zu können. Deswegen wurde *Bc-Csp R3E L66E* einer ausführlichen Temperatur- und Druckstabilitätsmessung mit eindimensionalen Protonenspektren unterzogen. Weiterhin sollte eine Zuordnung der HN Rückgratotope vervollständigt werden. Die Kälteschockproteindoppelvariante *Bc-Csp R3E L66E* wurde von Rolf Sachs bereitgestellt. Weitere Proben konnten von der Arbeitsgruppe um Prof. Thomas Szyperski (Universität Buffalo, New York) bezogen werden.

Die verwendeten Kälteschockproteine zeigten bereits bei früheren Messungen eine hohe Langlebigkeit in 20 mM Natriumcacodylat bei pH 7.0 [Sachs, 2010], weswegen auch in dieser Arbeit auf diese Pufferbedingungen zurückgegriffen wird.

3.4 Das Zinkfingerprotein Kti11p(M⁻)

Das Zinkfingerprotein „killer toxin-insensitive“ Kti11p(M⁺) aus dem Eukaryot der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* besteht aus einer $\alpha_{3,10}$ -Helix, zwei α -Helices und zwei β -Faltblättern, wobei jedes Blatt über drei β -Stränge verfügt. Es ist aus 83 Aminosäuren aufgebaut und besitzt kein Tryptophan, hat jedoch fünf Tyrosine und sieben Proline.

Das metallgebundene Protein Kti11p(M⁺) bildet ein Fingermotiv aus, an dessen Enden die Aminosäuren C26, C28, C48 und C51 das Metallion koordinativ binden.

Das Protein Kti11p ist gleich an mehreren zellulären Prozessen beteiligt. Es spielt eine Rolle bei der Transkriptionsregulation, bei der Elongation während der Translationsphase, bei der Biosynthese von Diphthamid des eEF-2 Protein [Liu *et al.*, 2004] und dient als Elektronendonator bei der Reduktion von Eisen-Schwefel Clustern in Dph1-Dph2 [Dong *et al.*, 2014]. Weiterhin interagiert es mit dem Nukleotid-Austausch-Faktor-Protein DelGEF [Sjolinder *et al.*, 2002, Corda und Di Girolamo, 2003] und ist an weiteren Protein-Protein Interaktionen beteiligt [Sun *et al.*, 2005].

Anhand von Voruntersuchungen bezüglich der Denaturierungsmittelverträglichkeit in Harnstoff und Guanidiniumchlorid der metallgebundenen Variante des Zinkfingerproteins Kti11p(M⁺) aus *Saccharomyces cerevisiae* durch Dr. Amit Kumar, konnte diesem Protein eine enorme thermodynamische Stabilität nachgewiesen werden. Daher konnten beispielsweise aus Temperaturübergängen mittels CD-Spektroskopie keine eindeutigen Informationen zur Stabilität gesammelt werden. Aus diesem Grund sollten Hochdruckmessungen durchgeführt werden, welche Aufschluss über die hohe Proteinstabilität liefern könnten. Es wurde angenommen, dass die hohe Stabilität durch das in der Fingerregion gebundene Zinkion begründet liegen könnte. Deswegen wurde mittels dem Chelatkomplexbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) eine metallfreie Pro-

teinvariante Kti11p(M⁻) hergestellt. Wie neueste, noch unveröffentlichte röntgenkristallographische Untersuchungen zeigen (Proteindatenbankeintrag 5AX2), bildet die metallfreie Form im Zinkfingerbereich je eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C26-C48 und C28-C51 aus.

Zeitgleich zu diesen noch unveröffentlichten Daten (Dr. Amit Kumar) wurden Voruntersuchungen zur NMR-Dynamikmessung im Piko- bis Nanosekundenbereich mittels dem sogenannten hetNOE Experiment durchgeführt (siehe Unterabschnitt 5.1.3), um zu überprüfen, wie flexibel der Zinkfinger der metallfreien Variante gegenüber der metallgebundenen Form ist. Dafür wurde eine Zuordnung der Rückgratresonanzen der metallfreien (apo-) Variante durchgeführt. Für die metallgebundene (holo-) Form des Proteins ist bereits eine Rückgratzuordnung bekannt [Sun *et al.*, 2005]. Erwartet wurde auf Grund der koordinativen Metallbindung eine höhere Flexibilität von Kti11p(M⁻) gegenüber Kti11p(M⁺). Diese Theorie konnte allerdings nicht bestätigt werden. Die Beweglichkeit beider Proteine ist absolut vergleichbar, wie im Diagramm im Anhang Abschnitt A.4 erkennbar wird. Somit ist es naheliegend, dass die Disulfidbrückenbildung bei der röntgenkristallographischen Untersuchung nicht auf Kristallisationseffekte zurückzuführen ist, sondern auch in Lösung existiert. Der *Root-Mean-Square Deviation* Wert (RMSD-Wert) zwischen der in Lösung via NMR ermittelten Struktur des metallgebundenen Proteins 1YOP [Sun *et al.*, 2005] und der mittels Röntgenstrukturaufklärung bestimmten metallfreien Variante beträgt laut dem Programm Pymol 1.75 zwischen den Rückgratatomern der Aminosäuren 5 bis 75. Die Sekundär- und Tertiärstrukturelemente sind sehr identisch und unterscheiden sich nur am N- sowie C-terminalen Ende. In Abb. 3.4.1 ist die noch unveröffentlichte Röntgenkristallstruktur von Kti11p(M⁻) als Cartoonansicht dargestellt.

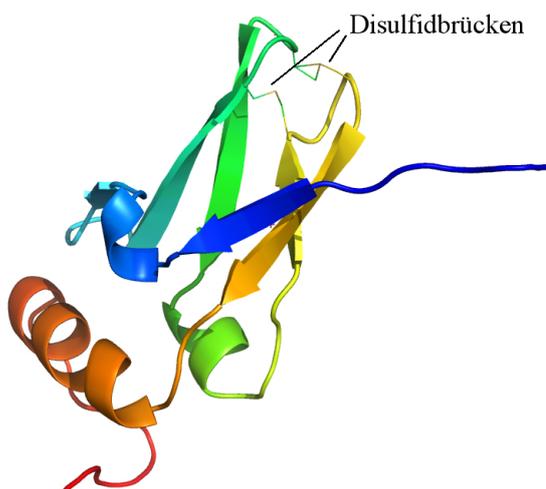


Abb. 3.4.1: Kti11p(M⁻): Aus Röntgenstrukturdaten gewonnene Sekundärstruktur des Zinkfingerproteins aus *Saccharomyces cerevisiae* (pdb-Datei 5AX2). Zu erkennen sind die an den Zinkfingerenden gebildeten Disulfidbrücken der Aminosäuren C26 und C48, sowie C28 und C51.

Die metallfreie (apo-) Form des Proteins sollte auf seine Stabilität gegenüber hohen Drücken und Temperaturen untersucht werden. Ähnlich wie bei den Kälteschockproteinen wurde eine umfassende Temperatur- und Druckstabilitätsmessung mit eindimen-

sionalen Protonenspektren und zweidimensionalen heteronuklearen Spektren durchgeführt.

Manche Puffersysteme zeigen jedoch eine starke pKa-Wert Abhängigkeit bei Änderung der Umgebungstemperatur oder des Umgebungsdruckes. Wird ein stark druckabhängiger Puffer, wie Phosphatpuffer, gewählt und zeigt zusätzlich das zu untersuchende Protein eine starke Stabilitätsabhängigkeit gegenüber pH-Wert Änderungen, so werden die Temperatur- und Druckstabilitätsmessungen stark verfälscht. In weiteren Voruntersuchungen konnte festgestellt werden, dass Kti11p(M⁻) solch eine starke Stabilitätsabhängigkeit gegenüber pH-Wert Änderungen aufzeigt. Im Anhang in Abschnitt A.5 ist diese Abhängigkeit dargestellt.

Der pKa-Wert von Phosphatpuffer zeigt zwar eine starke Druckabhängigkeit [Neuman Jr *et al.*, 1973], aber dafür eine geradezu vernachlässigbare Temperaturabhängigkeit [Ellis und Morrison, 1982]. Hingegen ist der pKa-Wert von TRIS/HCl Puffer im verwendeten Druckbereich nahezu druckunabhängig [Neuman Jr *et al.*, 1973], zeigt aber eine starke Temperaturabhängigkeit [Dawson, 1982]. Somit musste für Druckübergänge bei konstanten Temperaturen das Protein Kti11p(M⁻) in TRIS/HCl Puffer gelöst und je nach Temperatur, der pH-Wert voreingestellt werden. Bei Temperaturübergängen mit fixem Druck wurde Kti11p(M⁻) in Natriumphosphatpuffer gelöst und je nach Druck der pH-Wert voreingestellt.

Die Aufreinigung der holo- und der apo-Form von Kti11p wurden von Dr. Amit Kumar nach [Sun *et al.*, 2005] durchgeführt, womit die Proteine bereits zur Verfügung standen.

NMR-SPEKTROSKOPISCHE METHODEN ZUR ANALYSE VON PROTEINEN IN LÖSUNG

4.1 Bestimmung des entfalteten Proteinanteils

Die thermodynamische Stabilität eines Proteins hängt von vielen Variablen und Faktoren ab. Um diese Stabilität zu ermitteln, muss das Protein von seinem nativen, gefalteten Zustand in den entfalteten, vorrangig unstrukturierten Zustand überführt werden. Hierbei wird zunächst ein Zwei-Zustands-Modell angenommen, so dass keine Intermediate betrachtet werden. Ein wichtiger Parameter bei dieser Analyse ist der Anteil an entfaltetem Protein f_u und der Anteil an gefaltetem Protein f_n , nach Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts unter den entsprechenden Temperatur- und Druckbedingungen. Mittels der Anteile ist es möglich, einen Basissatz an thermodynamischen Parametern zu bestimmen, mit welchem interessierendes Makromolekül eindeutig beschrieben werden kann. Deswegen ist es an dieser Stelle wichtig, eine Methode zu verwenden, mit Hilfe derer eine möglichst exakte Bestimmung von f_n gewährleistet wird.

Dieser Satz an thermodynamischen Parametern (extensive Zustandsgrößen Z_e) variiert von Protein zu Protein, je nach Absättigung der unterschiedlich wirkenden Kräfte im System, welche zur Gesamtstabilität beitragen, wie elektrostatische Wechselwirkung, van-der-Waals Wechselwirkung, hydrophobe Wechselwirkung und Wasserstoffbrückenbildung. Diese hängen zusätzlich von den Umgebungsparametern (oder intensiven Zustandsgrößen Z_i) des Systems ab. Hierzu zählt die Wahl des Lösungsmittels in Kombination mit der Konzentration μ an strukturstärkenden oder schwächenden Salzen, wie beispielsweise Harnstoff, Guanidinhydrochlorid oder Guanidiniumthiocyanat. Hinzu kommt der Stabilitätseinfluß der Wasserstoffionenkonzentration (pH-Wert), dem Druck p und der Temperatur T .

Wird eine dieser intensiven Zustandsgrößen $Z_i [n, pH, T, p]$ variiert, verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen entfaltetem und gefaltetem Proteinanteil $f_n(Z_i)$.

Zunächst soll hier die Abhängigkeit der Proteinstabilität, beziehungsweise der damit einhergehende Anteil an gefaltetem Protein, in Abhängigkeit von der Temperatur $f_n(T)$ untersucht werden.

Mit Hilfe der von Szyperski & Balbach [Szyperski *et al.*, 2005] aufgestellten Formel (4.1.1), kann dieser Anteil aus einem eindimensionalen Protonenspektrum berechnet werden. Hierfür sind die Flächeninhalte zweier Bereiche des Protonenspektrums erforder-

derlich. Dies ist zum einen der Bereich mit Resonanzen, die ausschließlich vom gefalteten Zustand des Moleküls herrühren I_n und zum zweiten ein Bereich mit Resonanzen die den entfalteten Zustand charakterisieren $I_{(n+u)}$. Dabei ist es für den entfalteten Bereich (Protonenverschiebung $\delta^{1H} \approx 0.9$ ppm) nicht relevant, dass nur entfaltete Signale darin auftauchen, eine Mischung aus gefaltetem und entfaltetem Anteil sind von dem hier verwendeten mathematischen Modell berücksichtigt. Für den nativen Frequenzabschnitt des Spektrums werden vorzugsweise die Methylen- und Methylgruppen um 0 ppm verwendet. Der Quotient aus I_n und der Summe aus $I_n + I_{(n+u)} \equiv I_{\text{tot}}^{\text{ali}}$ ist proportional zum Anteil an gefaltetem Protein f_n . Um den Wert für f_n zu bestimmen, müssen an dieser Stelle zwei Skalierungsfaktoren eingeführt werden. Der erste bezieht sich auf den Zustand maximaler Proteinstabilität $f_n(T_{\text{max}})$ bei entsprechender Temperatur T_{max} . Der zweite auf die Relation $I_n / I_{\text{tot}}^{\text{ali}}$ bei dieser Temperatur T_{max} , also $I_n(T_{\text{max}}) / I_{\text{tot}}^{\text{ali}}(T_{\text{max}})$. Das führt zu besagter Gleichung 4.1.1 :

$$f_n(T) = \frac{\left(\frac{I_n(T)}{I_{\text{tot}}^{\text{ali}}(T)} \right) \cdot f_n(T_{\text{max}})}{\left(\frac{I_n(T_{\text{max}})}{I_{\text{tot}}^{\text{ali}}(T_{\text{max}})} \right)} \quad (4.1.1)$$

Die Temperatur T_{max} maximaler Proteinstabilität muss aus anderen Messungen bekannt sein oder kann mittels Temperaturübergang durch auftragen von $I_n / I_{\text{tot}}^{\text{ali}}$ über der Temperatur ermittelt werden. Der Wert maximaler Proteinstabilität $f_n(T_{\text{max}})$ muss ebenfalls aus anderer Quelle bekannt sein oder lässt sich über eine χ^2 -Analyse bestimmen (siehe im Anhang Quellcode 2).

Die Grenzen der integrierten Bereiche I_n und $I_{(n+u)}$ können je nach Druck und / oder Temperaturverschiebung der Resonanzsignale leicht variiert werden. Wichtig ist hierbei, dass sich kein Signal in die integrierten Bereiche hinein oder heraus verschiebt. Für eine möglichst präzise Bestimmung des gefalteten Anteils f_n ist eine sehr genaue Phasenkorrektur und Basislinienanpassung der eindimensionalen Protonenspektren unerlässlich.

4.2 Berechnung der thermodynamischen Parameter

Die Gleichgewichtskonstante $K_u(T)$ steht mit den gefalteten und entfalteten Anteilen in Abhängigkeit von der Temperatur T wie folgt in Beziehung:

$$K_u(T) = \frac{f_u(T)}{f_n(T)} \quad \text{mit } f_u = 1 - f_n \quad (4.2.1)$$

Im Gleichgewicht ist die freie Standardenthalpie $\Delta G_u = 0$, woraus sich die Gibbsche Energie $\Delta G_u^0(T)$ ergibt zu:

$$\Delta G_u^0(T) = -RT \ln(K_u(T)) \quad (4.2.2)$$

Hier steht R für die universelle Gaskonstante.

Somit ergibt sich die Relation zwischen der Änderung der freien Enthalpie $\Delta G_u^0(T)$ und dem entfalteten Proteinanteil $f_u(T)$ zu:

$$\Delta G_u^0(T) = -RT \ln\left(\frac{f_u(T)}{1 - f_u(T)}\right) \quad (4.2.3)$$

Oder umformuliert für $f_u(T)$:

$$f_u(T) = \frac{\exp\left[-\frac{\Delta G_u^0(T)}{RT}\right]}{1 + \exp\left[-\frac{\Delta G_u^0(T)}{RT}\right]} \quad (4.2.4)$$

Die freie Enthalpieänderung teilt sich in einen enthalpischen $\Delta H_u^0(T)$ und einen entropischen Anteil $\Delta S_u^0(T)$ auf (Gibbs-Helmholtz-Gleichung):

$$\Delta G_u^0(T) = \Delta H_u^0(T) - T\Delta S_u^0(T) \quad (4.2.5)$$

Über die Beziehungen $\partial(\Delta H_u^0)/\partial T = \Delta c_p$ und $\partial(\Delta S_u^0)/\partial T = \Delta c_p/T$ kann die Temperaturabhängigkeit der Enthalpie $\Delta H_u^0(T)$ (Gleichung 4.2.6) und die Temperaturabhängigkeit der Entropie $\Delta S_u^0(T)$ (Gleichung 4.2.7) formuliert werden [Privalov, 2007]. Dabei wird davon ausgegangen, dass im interessierenden Temperaturbereich die Änderung der Wärmekapazität Δc_p keine Funktion der Temperatur darstellt, sondern konstant ist.

$$\Delta H_u^0(T) = \Delta H_u^0(T_m) + \int_{T_m}^T \Delta c_p dT \approx \Delta H_u^0(T_m) + \Delta c_p \cdot (T - T_m) \quad (4.2.6)$$

$$\Delta S_u^0(T) = \frac{\Delta H_u^0(T_m)}{T_m} + \int_{T_m}^T \frac{\Delta c_p}{T} dT \approx \frac{\Delta H_u^0(T_m)}{T_m} + \Delta c_p \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) \quad (4.2.7)$$

Die integralen Grenzen in Gleichung 4.2.6 und Gleichung 4.2.7 sind von der Temperatur des Mittelpunktes des Entfaltungsüberganges T_m (bei $f_n = f_u$) bis zu einer beliebigen Temperatur T zu wählen. Die Temperatur des Entfaltungsüberganges, bei der also 50% des Proteins entfaltet vorliegen, kann zum einen den Übergang zum denaturierten Zustand der Hitzedenaturierung T_h als auch der Kältedenaturierung T_c bedeuten. Die Enthalpieänderung $\Delta H_u^0(T_m)$ entspricht der Enthalpieänderung bei $f_n = f_u$ bezie-

ungsweise einem $\Delta G_u^0(T)$ von Null. Unter Verwendung von Gleichung 4.2.5 ergibt sich:

$$\Delta G_u^0(T) = \Delta H_u^0(T_m) \left(\frac{T_m - T}{T_m} \right) - \Delta c_p \left(T_m - T + T \cdot \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right) \quad (4.2.8)$$

Der Anteil an entfaltetem Protein lässt sich mittels Gleichung 4.2.4 und Gleichung 4.2.8 schreiben als:

$$f_u(T) = \frac{\exp \left[- \frac{\Delta H_u^0(T_m) \left(\frac{T_m - T}{T_m} \right) - \Delta c_p \left(T_m - T + T \cdot \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right)}{RT} \right]}{1 + \exp \left[- \frac{\Delta H_u^0(T_m) \left(\frac{T_m - T}{T_m} \right) - \Delta c_p \left(T_m - T + T \cdot \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right)}{RT} \right]} \quad (4.2.9)$$

Somit ist es möglich aus den gewonnen Datensätzen, welche über die Methode aus 4.1 bekannt sind, auf die thermodynamischen Parameter der Enthalpieänderung, Wärmekapazitätsänderung und der Übergangstemperatur zum entfaltetem Zustand zu schließen.

Wenn $\Delta G_u^0(T)$ gleich Null vorliegt, ergibt sich aus Gleichung 4.2.8 die Temperatur der Hitze- als auch der Kältedenaturierung. Im gleichen Zuge ergibt sich ein Wert für die Enthalpieänderung am Punkt der Hitzedenaturierung $\Delta H_u^0(T_h)$ sowie am Punkt der Kältedenaturierung $\Delta H_u^0(T_c)$.

Zusätzlich kann über die Beziehung (4.2.10) die Entropieänderung am Punkt der Hitze- und Kältedenaturierung $\Delta S_u^0(T_h)$ und $\Delta S_u^0(T_c)$ berechnet werden.

$$\Delta S_u^0(T_m) = \frac{\Delta H_u^0(T_m)}{T_m} \quad (4.2.10)$$

Die Temperatur maximaler Stabilität T_{\max} lässt sich bestimmen, indem die freie Enthalpie $\Delta G_u^0(T)$ aus Gleichung 4.2.8 nach der Temperatur abgeleitet und Null gesetzt wird.

$$\frac{\partial \Delta G_u^0(T)}{\partial T} = -\Delta S_u^0(T) = -\Delta S_u^0(T_{\max}) \stackrel{!}{=} 0 \quad (4.2.11)$$

also

$$0 \stackrel{!}{=} \frac{\Delta H_u^0(T_m)}{T_m} + \Delta c_p \cdot \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \quad (4.2.12)$$

womit T zu T_{\max} übergeht und folglich sich die Temperatur maximaler Stabilität ergibt zu

$$T_{\max} = T_m \cdot \exp \left[-\frac{\Delta H_u^0(T_m)}{\Delta c_p \cdot T_m} \right] \quad (4.2.13)$$

Über diese Temperatur läßt sich der darauf bezogene Wert der maximalen Stabilität $\Delta G_u^0(T_{\max})$ durch Gleichung 4.2.8 berechnen.

Der Anteil an entfaltetem Protein f_u hängt nicht nur von der Temperatur ab, sondern auch von Druck, pH-Wert und Denaturierungsmittelkonzentration. Beispielsweise führt eine Erhöhung des angelegten Drucks bei Raumtemperatur zu einer Destabilisierung des nativen Zustandes und ergo zu einem größeren f_u Wert. Temperaturübergänge bei zusätzlicher Variation einer dieser Größen führt somit zu einer Funktionenschar $f_u(T)|_{z_i}$. Zur Veranschaulichung einer solchen Funktionenschar ist in Abb. 4.2.1 der Anteil an entfaltetem Protein über der Temperatur durch Verwendung von Gleichung 4.2.9 für unterschiedlich hohe Umgebungsdrücke $f_u(T)|_p$ skizziert aufgetragen. Hierbei stellt die mit p_1 bezeichnete Kurve die Temperaturabhängigkeit bei Atmosphärendruck dar. Jede weitere Kurve p_{n+1} spiegelt jeweils einen höheren Druck als p_n wieder.

Für einen Temperaturübergang bei Atmosphärendruck beträgt beispielsweise im Punkt maximaler Proteinstabilität bei 290 K $f_n = 0.96$ und somit $f_u = 0.04$. Bei 50% Entfaltung liegt die Temperatur der Hitzedenaturierung T_h bei 315 K. Bei p_1 fällt 50% Entfaltung direkt mit dem Wendepunkt der Funktion zusammen. Das ist bei höheren Drücken nicht mehr der Fall, da hier bereits eine 50% Entfaltung schon durch angelegten Druck herbeigeführt werden kann. Das zeigt sofort die Grenzen des durch Gleichung 4.2.9 umgesetzten Modells auf. Ab einem bestimmten Druck kann es kein T_h oder $\Delta H_u^0(T_h)$ mehr geben, da für keine Temperatur ein f_u Wert kleiner gleich 0.5 existiert.

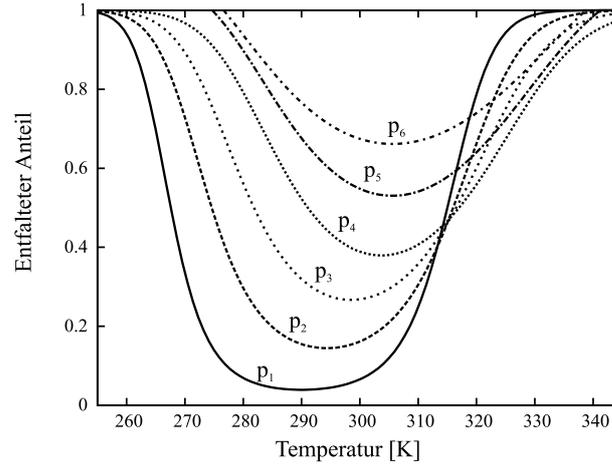


Abb. 4.2.1: Entfalteter Proteinanteil in Abhängigkeit von der Temperatur für unterschiedlich hohe Drücke p_n im System, mit $p_{n+1} > p_n$.

Aus einem Druckübergang bei fester Temperatur kann auf gleiche Weise wie beim Temperaturübergang, der Anteil an entfaltetem Protein $f_u(p)$ ermittelt werden. Hierzu muss auf Gleichung 4.3.5 vorgegriffen werden, die eine Abhängigkeit der freien Enthalpieänderung $\Delta G_u^0(p)$ vom Druck aufweist:

$$\Delta G_u^0(p) = \frac{\Delta \hat{\beta}}{2}(p - p_0)^2 + \Delta V(p - p_0) + \Delta G_0 \quad (4.2.14)$$

Hierbei bedeutet ΔV , für ein Zwei-Zustands-Modell, die Volumenänderung zwischen dem nativen und dem entfaltetem Zustand bezogen auf einen beliebigen Referenzdruck p_0 . Der Parameter $\Delta \hat{\beta}$ korreliert mit der Änderung der Kompressibilität. Durch einsetzen dieser Abhängigkeit in Gleichung 4.2.15

$$f_u(p) \Big|_T = \frac{\exp \left[-\frac{\Delta G_u^0(p)}{RT} \right]}{1 + \exp \left[-\frac{\Delta G_u^0(p)}{RT} \right]} \quad (4.2.15)$$

ergibt sich:

$$f_u(p) \Big|_T = \frac{\exp \left[-\frac{\frac{\Delta \hat{\beta}}{2}(p - p_0)^2 + \Delta V(p - p_0) + \Delta G_0}{RT} \right]}{1 + \exp \left[-\frac{\frac{\Delta \hat{\beta}}{2}(p - p_0)^2 + \Delta V(p - p_0) + \Delta G_0}{RT} \right]} \quad (4.2.16)$$

Analog zum Temperaturübergang ergibt sich hier ein Druckübergangsmittelpunkt p_m , der sich durch Null setzen von Gleichung 4.2.14 wie folgt ermitteln läßt:

$$p_m \Big|_T = p_0 - \frac{\Delta V}{\Delta \hat{\beta}} \pm \sqrt{\left(\frac{\Delta V}{\Delta \hat{\beta}}\right)^2 - 2 \frac{\Delta G_0}{\Delta \hat{\beta}}} \quad (4.2.17)$$

4.3 Der Druck-Temperatur Phasenraum eines Proteins

Ähnlich wie bei einfachen Elementen und Elementverbindungen, wie Wasser, existiert auch für komplexe Biomoleküle, wie Nukleinsäuren, Lipidmembranen, Proteine und sogar Mikroorganismen ein Phasendiagramm [Smeller, 2002]. Im Falle des Proteins zeigt dieses Diagramm an, in welchem Temperatur- und Druckbereich es in seiner nativen, globulären Struktur beziehungsweise im entfalteten Zustand vorliegt. Alle bis heute gefundenen Phasendiagramme von Proteinen zeigen eine elliptische Form [Hawley, 1971, Takeda *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 1995, Panick *et al.*, 1999a, Panick *et al.*, 1999b, Lesch *et al.*, 2002].

Definitionsgemäß befinden sich innerhalb dieser Ellipse sämtliche Proteinanteile mit weniger als 50% Entfaltung, wobei dieser Bereich als nativ beschrieben wird. Außerhalb der Ellipse liegen die Proteinanteile mit mehr als 50% Entfaltung. In Abb. 4.3.1 ist ein solches Phasendiagramm skizzenhaft verdeutlicht.

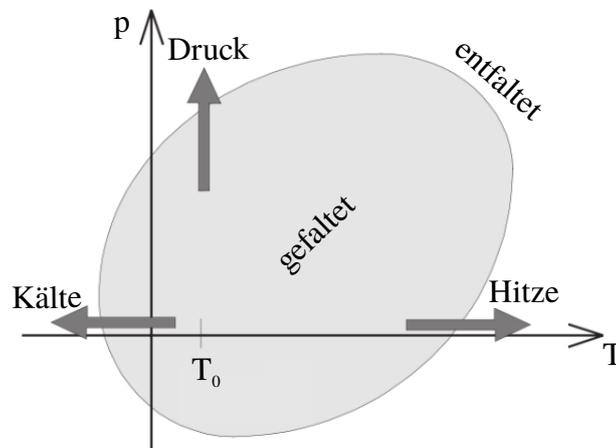


Abb. 4.3.1: Phasendiagramm eines globulären Proteins (Zwei-Zustands-Modell) mit den Übergangsmöglichkeiten der Hitze-, Kälte- und Druckentfaltung. Die Phasengrenze ist definiert durch das Verhältniss $f_n:f_u = 1:1$. Der Wert T_0 entspricht Raumtemperatur. Frei nach [Smeller, 2002].

Mathematisch kann dieser Phasenraum wie folgt beschrieben werden:

$$\begin{aligned}\Delta G_u^0 &= G_u^0 - G_n^0 \\ \Delta G_u^0 &= \Delta H_u^0 - T\Delta S_u^0 \\ d\Delta G_u^0(p, T) &= \Delta V_u^0 dp - \Delta S_u^0 dT\end{aligned}\quad (4.3.1)$$

Nach [Smeller, 2002] folgt durch Integration über Temperatur und Druck von einem Referenzpunkt T_0, p_0 bis zu T, p :

$$\begin{aligned}\Delta G_u^0(p, T) &= \frac{\Delta \hat{\beta}}{2}(p - p_0)^2 + \Delta \hat{\alpha}(p - p_0)(T - T_0) \\ &\quad - \Delta c_p \left[T \cdot \ln \left(\frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] \\ &\quad + \Delta V_0(p - p_0) - \Delta S_0(T - T_0) + \Delta G_0\end{aligned}\quad (4.3.2)$$

Hierbei entspricht $\Delta \hat{\alpha}$ der Änderung der thermischen Expansion, $\Delta \hat{\beta}$ der Änderung der Kompressibilität, Δc_p der Änderung der Wärmekapazität, p_0 einem Referenzdruck, T_0 einer Referenztemperatur, ΔV_0 der Volumenänderung, ΔS_0 der Entropieänderung und ΔG_0 der Änderung der freien Enthalpie. Die Größen $\Delta V_0, \Delta S_0$ sowie ΔG_0 beziehen sich jeweils auf den Zustand $\{p_0, T_0\}$.

Durch festhalten des Druckes in Gleichung 4.3.2 reduziert sich diese Formel zur bereits behandelten Gleichung 4.2.8. Andererseits vereinfacht sich Gleichung 4.3.2 für einen reinen Druckübergang mit fixer Temperatur zu Gleichung 4.3.3 und weist somit einen parabolischen Charakter auf.

$$\Delta G_u^0(p) = \frac{\Delta \hat{\beta}}{2}(p - p_0)^2 + \Delta V_0(p - p_0) + \Delta \hat{\alpha}(p - p_0)(T - T_0) + \Delta G_0 \quad (4.3.3)$$

Mit der Definition:

$$\Delta V \equiv \Delta V_0 + \Delta \hat{\alpha}(T - T_0) \quad (4.3.4)$$

folgt:

$$\Delta G_u^0(p) = \frac{\Delta \hat{\beta}}{2}(p - p_0)^2 + \Delta V(p - p_0) + \Delta G_0 \quad (4.3.5)$$

Hängt $\Delta \hat{\alpha}$ ebenfalls von der Temperatur ab, ergibt sich für ΔV in Gleichung 4.3.4 eine quadratische Temperaturabhängigkeit.

Der natürliche Logarithmus in Gleichung 4.3.2 kann durch eine Taylorreihe ersetzt

werden, welche nach dem zweiten Glied abgebrochen wird, somit erhält man folgende vereinfachte Gleichung:

$$\begin{aligned} \Delta G_u^0(p, T) = & \frac{\Delta \hat{\beta}}{2} (p - p_0)^2 + \Delta \hat{\alpha} (p - p_0) (T - T_0) - \frac{\Delta c_p}{2T_0} (T - T_0)^2 \\ & + \Delta V_0 (p - p_0) - \Delta S_0 (T - T_0) + \Delta G_0 \end{aligned} \quad (4.3.6)$$

Die Phasengrenze verläuft definitionsgemäß bei 50% entfaltetem Proteinanteil, also bei einem Wert der freien Enthalpie ΔG_u^0 von Null. Deswegen wird Formel (4.3.6) auf Null gesetzt:

$$\begin{aligned} 0 = & \frac{\Delta \hat{\beta}}{2} (p - p_0)^2 + \Delta \hat{\alpha} (p - p_0) (T - T_0) - \frac{\Delta c_p}{2T_0} (T - T_0)^2 \\ & + \Delta V_0 (p - p_0) - \Delta S_0 (T - T_0) + \Delta G_0 \end{aligned} \quad (4.3.7)$$

Die Lösungen für diese Formel (4.3.7) entsprechen den Lösungen für Kegelschnitte. Sie beschreibt in Abhängigkeit des Parametersatzes einen Kreis, eine Ellipse, eine Parabel oder Hyperbel. Bis dato sind für Proteine nur elliptische Lösungen beobachtet wurden. Mathematisch läßt sich der Satz an Parametern wie folgt ausdrücken:

$$\left. \frac{\partial \Delta G_u^0}{\partial p} \right|_{T_i} = \Delta V_u^0(p, T_i) \quad \frac{\partial^2 \Delta G_u^0}{\partial p^2} = \Delta \hat{\beta} = \left. \frac{\partial \Delta V_u^0}{\partial p} \right|_T \quad (4.3.8)$$

$$\left. \frac{\partial \Delta G_u^0}{\partial T} \right|_{p_i} = -\Delta S_u^0(p_i, T) \quad \frac{\partial^2 \Delta G_u^0}{\partial T^2} = -\frac{\Delta c_p}{T} = -\left. \frac{\partial \Delta S_u^0}{\partial T} \right|_p \quad (4.3.9)$$

$$\frac{\partial^2 \Delta G_u^0}{\partial p \partial T} = \Delta \hat{\alpha} = \left. \frac{\partial \Delta V_u^0}{\partial T} \right|_p = -\left. \frac{\partial \Delta S_u^0}{\partial p} \right|_T \quad (4.3.10)$$

Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass $\Delta \hat{\alpha}$ und auch $\Delta \hat{\beta}$ hier nicht die echte Änderung der thermischen Expansion bzw. Änderung der Kompressibilität darstellen. Die wahren Größen der thermischen Expansion α und der Kompressibilität β ergeben sich nur unter Einbeziehung des Volumens V . Wobei das Volumen V sich zusammensetzt aus dem Volumen V_{Atom} der Atome des Biomoleküls selber, dem Volumen der eingeschlossenen Kavitäten V_{cav} und dem Anteil der des Biomolekül umgebenden Hydrationshülle ΔV_{hyd} , welches der Volumenänderung des Lösungsmittels entspricht, die entsteht, wenn das Biomolekül in die Lösung eingetaucht wird [Kauzmann, 1959]. Somit ergibt sich für ein nativ gefaltetes Protein ein anderes Volumen V_n als für ein entfaltetes Protein V_u , da es für den entfaltenen Zustand kaum oder keine Kavitätenvolumina gibt und die Hydrationshülle ebenfalls für natives und entfaltetes Protein unterschied-

liche Beiträge liefert [Heremans und Smeller, 1998]. Die thermische Expansion α und die Kompressibilität β ergeben sich zu:

$$\alpha_n = \frac{1}{V_n} \left. \frac{\partial V_n}{\partial T} \right|_p \quad \alpha_u = \frac{1}{V_u} \left. \frac{\partial V_u}{\partial T} \right|_p \quad (4.3.11)$$

$$\beta_n = -\frac{1}{V_n} \left. \frac{\partial V_n}{\partial p} \right|_T \quad \beta_u = -\frac{1}{V_u} \left. \frac{\partial V_u}{\partial p} \right|_T \quad (4.3.12)$$

Bei einem Entfaltungsübergang ergibt sich für die Änderung der thermischen Expansion $\Delta\alpha$ und die Änderung der Kompressibilität $\Delta\beta$:

$$\Delta\alpha = \alpha_u - \alpha_n \quad (4.3.13)$$

$$\Delta\beta = \beta_u - \beta_n \quad (4.3.14)$$

Die Änderung der thermischen Expansion $\Delta\alpha$ und die Änderung der Kompressibilität $\Delta\beta$ stehen mit $\Delta\hat{\alpha}$ und $\Delta\hat{\beta}$ wie folgt in Beziehung:

$$\Delta\hat{\alpha} = \Delta\alpha V \quad (4.3.15)$$

$$\Delta\hat{\beta} = \Delta\beta V \quad (4.3.16)$$

Die Ellipse im Druck-Temperatur Phasenraum hat spezifische Punkte, welche durch Bestimmung des Anstiegs in jedem Punkt der Phasengrenze ermittelt werden kann [Smeller, 2002]. Der Anstieg ergibt sich aus Gleichung 4.3.7 zu:

$$\frac{\partial T}{\partial p} = -\frac{\frac{\partial \Delta G_u^0}{\partial p}}{\frac{\partial \Delta G_u^0}{\partial T}} = \frac{\Delta V_0 + \Delta\hat{\beta}(p - p_0) + \Delta\hat{\alpha}(T - T_0)}{\Delta S_0 - \Delta\hat{\alpha}(p - p_0) + \Delta c_p \frac{T - T_0}{T_0}} \quad (4.3.17)$$

Diese Gleichung entspricht einer modifizierten Clausius-Clapeyron Gleichung, die sich zur bekannten Clausius-Clapeyron Gleichung vereinfacht, falls die Temperatur der Referenztemperatur $T=T_0$ und der Druck dem Referenzdruck $p=p_0$ entspricht. Dieses Verhalten wird nicht bei Proteinen beobachtet, kann aber bei Phasenübergängen von Lipiden festgestellt werden [Winter *et al.*, 1996, Wong, 1996].

Aus dieser Gleichung lässt sich ableiten, dass die Ellipse den Anstieg Null zeigt, wenn die Entropieänderung ΔS_u^0 gerade Null ist. Sie hat den Anstieg unendlich, für den Fall, dass die Volumenänderung ΔV_u^0 gerade Null ist. Somit ergeben sich zwei Geraden $p(T)|_{\Delta S_u^0=0}$ und $p(T)|_{\Delta V_u^0=0}$, welche einen gemeinsamen Schnittpunkt im Ellipsenmittelpunkt haben.

$$p(T) \Big|_{\Delta S_u^0=0} = \frac{\Delta c_p}{\Delta\hat{\alpha}} \frac{T - T_0}{T_0} + \frac{\Delta S_0}{\Delta\hat{\alpha}} + p_0 \quad (4.3.18)$$

$$p(T) \Big|_{\Delta V_u^0=0} = \frac{\Delta \hat{\alpha}}{\Delta \hat{\beta}} (T - T_0) + \frac{\Delta V_0}{\Delta \hat{\beta}} + p_0 \quad (4.3.19)$$

Diese Problematik wird in Abb. 4.3.2 deutlich veranschaulicht.

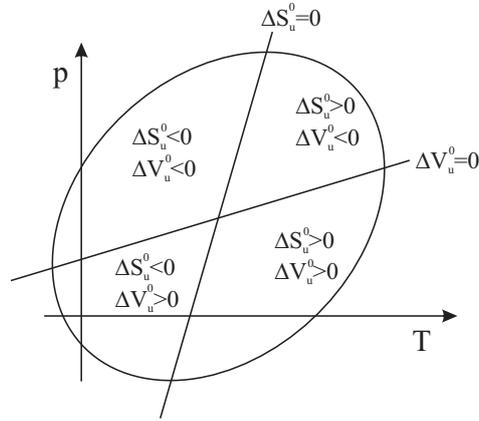


Abb. 4.3.2: Veranschaulichung zur Lage der Funktionen $p(T) \Big|_{\Delta S_u^0=0}$ und $p(T) \Big|_{\Delta V_u^0=0}$ relativ zur Ellipse mit den Schnittpunkten im Anstieg Null, beziehungsweise Unendlich.

Weitere wichtige Punkte auf der Ellipse sind der Denaturierungsdruckpunkt $p_D \Big|_{T_0}$ bei der Temperatur T_0 und die Hitze- und Kältedenaturierungspunkte bei Atmosphärendruck $T_h \Big|_{p_0}$ und $T_c \Big|_{p_0}$. Diese lassen sich aus Gleichung 4.3.7 durch einsetzen von $p=p_0$ beziehungsweise $T=T_0$ ermitteln.

$$p_D \Big|_{T_0} = \frac{\Delta V_0}{\Delta \hat{\beta}} + \sqrt{\left(\frac{\Delta V_0}{\Delta \hat{\beta}}\right)^2 + 2\frac{\Delta G_0}{\Delta \hat{\beta}}} + p_0 \quad (4.3.20)$$

$$T_h \Big|_{p_0} = -\frac{\Delta S_0 T_0}{\Delta c_p} + \sqrt{\left(-\frac{\Delta S_0 T_0}{\Delta c_p}\right)^2 + 2\frac{\Delta G_0 T_0}{\Delta c_p}} + T_0 \quad (4.3.21)$$

$$T_c \Big|_{p_0} = -\frac{\Delta S_0 T_0}{\Delta c_p} - \sqrt{\left(-\frac{\Delta S_0 T_0}{\Delta c_p}\right)^2 + 2\frac{\Delta G_0 T_0}{\Delta c_p}} + T_0 \quad (4.3.22)$$

4.4 Einfluß von Hochdruck auf die chemische Verschiebung

Im Allgemeinen besteht ein Ensemble von N Proteinmolekülen zu einer festen Zeit und unter Voraussetzung eines thermischen Gleichgewichts aus verschiedensten Unterzuständen M . Ein Spin i dieses Systems besitzt die chemische Verschiebung δ_i . Befindet sich das System auf der NMR-Zeitskala im schnellen Austausch, so ergibt sich eine gewichtete chemische Verschiebung $\langle \delta_i \rangle$ für jeden möglichen Zustand s_j . Diese chemische Verschiebung $\langle \delta_i \rangle$ setzt sich nach [Baskaran *et al.*, 2010] wie folgt zusammen:

$$\langle \delta_i \rangle = \sum_{j=1}^M p(s_j) \delta_i(s_j) = \frac{1}{Z} \sum_{j=1}^M \delta_i(s_j) e^{-G(s_j)/RT} \quad (4.4.1)$$

Hierbei bedeutet $p(s_j)$ die Wahrscheinlichkeit für den Zustand s_j . Die Zustandssumme über alle möglichen Zustände von M ist mit Z angegeben. Die freie Enthalpie des Zustandes s_j ist $G(s_j)$.

Schneller Austausch auf der NMR-Zeitskala bedeutet am Beispiel zweier Kerne, dass die Resonanzen δ_1 und δ_2 , welche von zwei chemisch austauschenden Zuständen stammen, nicht zwei unterschiedliche chemische Verschiebungen im NMR-Spektrum zeigen, sondern zu einer populationsgewichteten, gemittelten chemischen Verschiebung übergehen. Ist die Austauschrate k_{ex} zwischen den beiden Zuständen höher als der Frequenzunterschied $\Delta\omega$ zwischen δ_1 und δ_2 , kommt es zu besagtem schnellem Austausch, wodurch im Spektrum nur noch ein zeitlich gemitteltes Signal δ beobachtet werden kann. Für den einfachen Fall eines schnellen Austauschs zwischen zwei Zuständen 1 und 2 mit den intrinsischen chemischen Verschiebungen δ_1 und δ_2 findet man die Gleichgewichtskonstante K zu:

$$K = \frac{\delta_1 - \delta}{\delta - \delta_2} \quad (4.4.2)$$

wobei δ die beobachtete chemische Verschiebung bedeutet. Gleichzeitig steht die Gleichgewichtskonstante K über die freie Enthalpie über folgende Gleichung in Beziehung:

$$\Delta G_u^0 = -RT \cdot \ln(K) \quad (4.4.3)$$

Wird nun Gleichung 4.4.2 mit Gleichung 4.4.3 kombiniert, so folgt für die beobachtete chemische Verschiebung δ :

$$\delta(p) = \frac{\delta_1 + \delta_2 \cdot e^{-\Delta G_u^0/RT}}{1 + e^{-\Delta G_u^0/RT}} \quad (4.4.4)$$

Unter Verwendung der bereits benutzten Gleichung 4.3.5 zur Druckabhängigkeit der freien Enthalpie ΔG_u^0 ergibt sich:

$$\delta(p) = \frac{\delta_1 + \delta_2 \cdot e^{-\frac{\Delta\hat{\beta}/2 \cdot (p - p_0)^2 + \Delta V(p - p_0) + \Delta G_{12}}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta\hat{\beta}/2 \cdot (p - p_0)^2 + \Delta V(p - p_0) + \Delta G_{12}}{RT}}} \quad (4.4.5)$$

Die freie Enthalpie ΔG_{12} bezieht sich auf die Differenz zwischen Zustand 1 und Zustand 2 bei T_0, p_0 . Ein Funktionenplot dieser Gleichung 4.4.5 ist für drei unterschiedliche Volumendifferenzen ΔV in Abb. 4.4.1 dargestellt. In der Grafik ist für kleine $\Delta\hat{\beta}$ Werte das sigmoidale Übergangsverhalten der chemischen Verschiebung δ_1 im Zustand 1 zur chemischen Verschiebung δ_2 des Zustandes 2 zu erkennen. Für eine deutlichere Darstellung ist die Druckachse in den negativen Bereich erweitert.

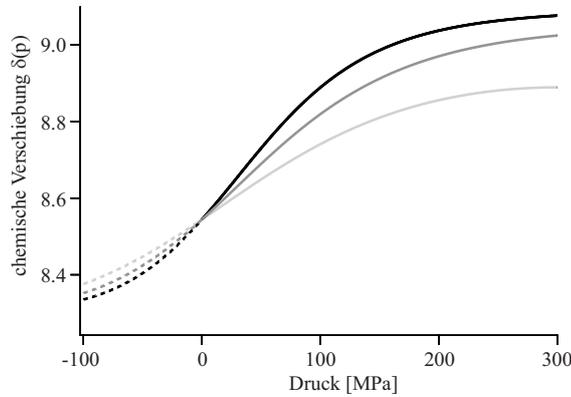


Abb. 4.4.1: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung vom Druck $\delta(p)$ (Gleichung 4.4.5) für drei verschiedene Volumendifferenzen ΔV zwischen Zustand 1 und Zustand 2. Die Parameter für diesen Funktionenplot sind: $\delta_1 = 8.3$ ppm, $\delta_2 = 9.1$ ppm, $\Delta\hat{\beta} = 0.1$ ml/(mol MPa), $\Delta G_{12} = 2000$ J/mol, $T = 293$ K, $p_0 = 0.1$ MPa und $\Delta V = -30$ ml/mol (hellgrau), $\Delta V = -40$ ml/mol (grau), $\Delta V = -50$ ml/mol (schwarz).

Durch Druckeinwirkung kann ein System von einem Zustand 1 in einen anderen Zustand 2 überführt werden. Dabei besagt das Le Chatelier'schen Prinzip, dass das System unter Hochdruck in einen Zustand geringeren Volumens übergeht. Diese strukturellen Änderungen verursachen gleichzeitig eine Änderung der chemischen Umgebung der Kernspins und somit eine Änderung der chemischen Verschiebung δ .

Zusätzlich zur oben gezeigten modellabhängigen Formulierung der chemischen Verschiebung δ , konnten experimentell gefundene Abhängigkeiten empirisch durch ein Polynom zweiten Grades dargestellt werden [Kitahara *et al.*, 2013]. Die chemische Verschiebung eines Kerns in Abhängigkeit vom Druck und bei konstanter Temperatur mit p_0 als Referenzdruck ist:

$$\delta(p) = b_0 + b_1(p - p_0) + b_2(p - p_0)^2 \quad (4.4.6)$$

Man unterscheidet zwischen einer linearen b_1 und einer quadratischen b_2 Druckabhängigkeit. Der Wert b_0 gibt die chemische Verschiebung unter Normaldruck p_0 an. Eine lineare Änderung der chemischen Verschiebung durch Druckeinwirkung führt zu einer linearen Volumenänderung des Systems. Somit bleibt die Kompressibilität des Systems unverändert [Akasaka, 2003]. Zeigt das System jedoch zusätzlich nichtlineare, quadratische Abhängigkeiten der chemischen Verschiebungsänderung, so wird davon ausgegangen, dass es zu einer Änderung der Kompressibilität kommt oder zu einem Übergang in einen anderen Konformationszustand mit einer anderen Kompressibilität als unter Normaldruck [Akasaka und Li, 2001]. Anhand nachstehender Skizze 4.4.2 sollen kurz die Auswirkungen von Hochdruck auf ein molekulares System aufgezeigt werden.

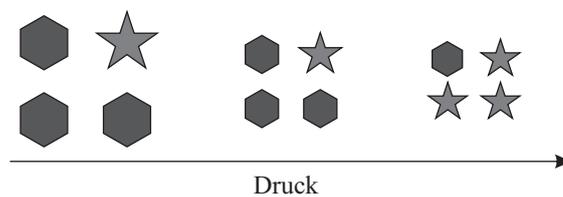


Abb. 4.4.2: Veranschaulichung zur Auswirkung von hohen Drücken auf ein molekulares System. Bei moderaten Drücken findet nur eine Volumenabnahme statt. Bei hohen Drücken verschiebt sich das Gleichgewicht von der nativen zu einer intermediären oder entfalteten Konformation. Die verschiedenen Zustände koexistieren immer nebeneinander. Lediglich werden durch Druckeinwirkung die Populationen verschoben.

Nichtlineare Änderungen der chemischen Verschiebung werden vorrangig in strukturierten Biomolekülen, wie globulären Proteinen gefunden [Kamatari *et al.*, 2001, Kitahara *et al.*, 2001, Akasaka, 2003]. In entfalteten Proteinen und kurzen Peptidketten überwiegen lineare Änderungen [Akasaka und Li, 2001].

Erst kürzlich konnte der Zusammenhang von modellunabhängiger Formulierung und modellabhängiger Formulierung durch [Beck Erlach *et al.*, 2014] gefunden werden. Unter der Annahme schnellen Austausches und

$$\left| \frac{\Delta G_u^0}{2RT} \right| \ll 1 \quad (4.4.7)$$

folgt die Beziehung:

$$\frac{b_2}{b_1} = - \frac{\Delta \hat{\beta}(p_0)}{\Delta V(p_0)}. \quad (4.4.8)$$

NMR PULSPROGRAMME, VERWENDETE HARD- UND SOFTWARE

5.1 Verwendete NMR-Pulssequenzen

Es existiert zahlreiche Literatur, welche die Grundlagen der Kernspinresonanzspektroskopie ausführlich behandelt. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle nicht darauf eingegangen werden. Es werden hier kurz die verwendeten Pulsprogramme erläutert.

5.1.1 Pulsprogramm zur Bestimmung thermodynamischer Parameter

Zur Ermittlung des entfalteten Proteinanteils f_u und der sich daraus ergebenden thermodynamischen Größen, wurden eindimensionale Spektren der Wasserstoffprotonen aufgezeichnet, deren Anregung durch einen $\pi/2$ -Puls bei 4.7 ppm erfolgte. Die Spektren wurden mit einer Bit-Tiefe von 4096 Punkten und 128 Scans aufgenommen. Die spektrale Breite wurde auf 13 ppm festgesetzt, was an einem 600 MHz Spektrometer einer FID Auflösung von 1.9 Hz entspricht. Zur Wasserunterdrückung wurde zu Beginn eines jeden Scans mittels kontinuierlicher Einstrahlung von einer Sekunde Dauer das Wassersignal bei 4.7 ppm vorgesättigt und dieses vor der Detektion nochmals durch ein 3-9-19 Watergate [Piotto *et al.*, 1992] unterdrückt. Je nach Markierungsgrad des Proteins, wurde während der Aufnahme auf dem ^{15}N - und / oder ^{13}C -Kanal mittels GARP [Shaka *et al.*, 1985] entkoppelt.

5.1.2 Pulsprogramme zur Identifikation der Rückgrat- und Seitenkettenatome

Die heteronukleare Einquanten-Kohärenz - das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum

Das ^1H - ^{15}N -HSQC Pulsprogramm ist in der biophysikalisch, hochauflösenden Flüssig-NMR eines der meist verwendeten Pulsprogramme überhaupt und bildet zusätzlich, neben der TROSY-Pulssequenz, die Basis für eine Vielzahl komplexerer Pulsprogramme. Aus diesem Grund soll der ^1H - ^{15}N -HSQC Sequenz etwas mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden. Die später folgenden Tripleresonanzexperimente zur Verifizierung der Rückgrat- und Seitenkettenatome werden nur kurz erläutert.

In der ^1H - ^{15}N -HSQC Sequenz werden alle Protonen, welche über eine kovalente Bindung zu einem ^{15}N -Kern verfügen, miteinander korreliert. Somit werden in einem solchen Spektrum nur Kreuzsignale von stickstoffgebundenen Protonen, also Amidproto-

nen (^1HN), detektiert. Da, bis auf das Prolin, jede der 20 natürlichen Aminosäuren ein ^1HN -Rückgratproton besitzt, ist im Spektrum pro Aminosäure genau ein Resonanzsignal zu erwarten. Hinzu kommen Signale der Seitenketten von Asparagin, Glutamin, Arginin, Histidin und Tryptophan. Damit kann ein simpler NMR-spektroskopischer Fingerabdruck eines Proteins detektiert werden.

In Abb. 5.1.1 ist die graphische Darstellung der verwendeten ^1H - ^{15}N -HSQC Pulssequenz aufgezeigt.

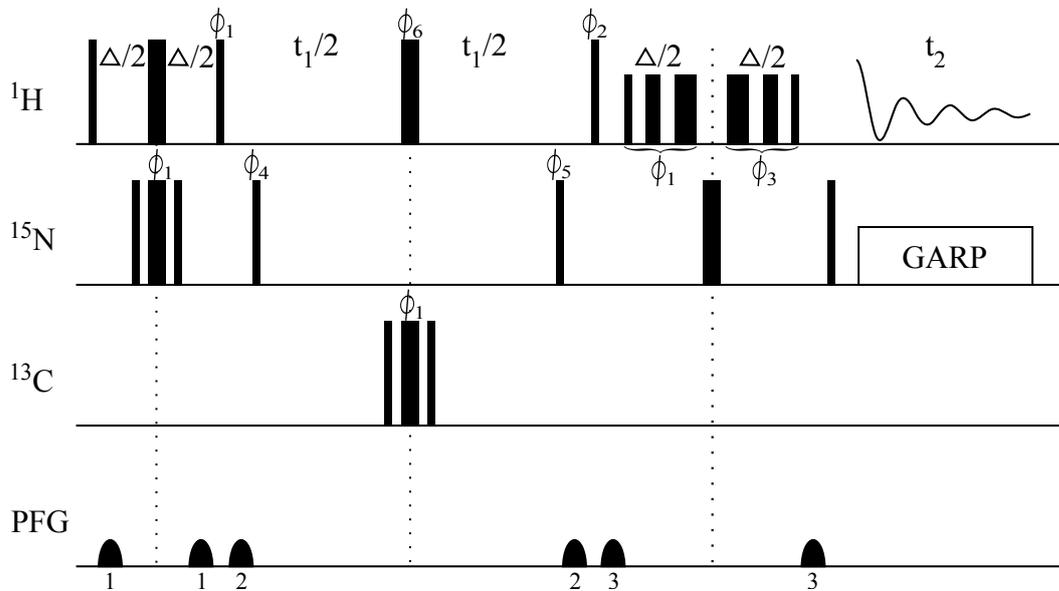


Abb. 5.1.1: Pulssequenz des verwendeten ^1H - ^{15}N -HSQC Programmes nach [Mori *et al.*, 1995] mit Entkopplung auf dem ^{13}C -Kanal während der t_1 -Inkrementierung und GARP-Entkopplung zwischen ^1H und ^{15}N während der t_2 -Aufnahme. Die Wasserunterdrückung wird ohne Vorsättigung auf dem ^1H -Kanal aber mit einem 3-9-19 Watergate realisiert. Schmale Balken repräsentieren $\pi/2$ -Pulse. Breite Balken π -Pulse. Soweit nicht anders angegeben, besitzen die Pulse die Phase ϕ_0 . Der Zyklus der jeweiligen Phasen ist wie folgt: $\phi_0=x$, $\phi_1=y$, $\phi_2=-x$, $\phi_3=-y$, $\phi_4=x,-x$, $\phi_5=x,x,x,x,-x,-x,-x,-x$, $\phi_6=x,x,-x,-x$. Die Empfängerphase hat den Zyklus $\phi_{31}=x,-x,x,-x,-x,x,-x,x$. Die Transferzeit beträgt $\Delta=5.0$ ms. Die Quadraturdetektion erfolgte durch Inkrementierung der Phase ϕ_4 im States-TPPI Modus [Marion *et al.*, 1989]. Die gefüllten Halbellipsen repräsentieren gepulste Feldgradienten entlang der Z-Achse mit den relativen Stärken: $\text{PFG}_1=50\%$, $\text{PFG}_2=80\%$ und $\text{PFG}_3=30\%$.

Am Beispiel des leicht abgewandelten HSQC Programmes nach [Mori *et al.*, 1995], soll unter Anwendung des Produktoperatorformalismus die Sequenz vereinfacht erklärt werden. Die zwei skalar koppelnden Kerne seien I und S, wobei ohne Beschränkung der Allgemeinheit der Kern I dem ^1H -Kern und S dem ^{15}N -Kern entsprechen soll. Ausgehend von der I-Magnetisierung in Z-Richtung wird eine INEPT-Pulsfolge generiert, um die Magnetisierung von Kern I, unter Berücksichtigung der skalaren Kopplungskonstante J_{IS} , zum Kern S zu transferieren. Diese Kopplungskonstante J_{IS} ist reziprok proportional zur Transferzeit Δ . Sie beträgt zwischen ^1H -Kern und ^{15}N -Kern 5,5 ms, wurde aber auf $\Delta = 5.0$ ms festgesetzt, um Relaxationseffekte zu minimieren. Durch

einen $\pi/2$ -Puls wird der Kern I angeregt und in die x-y Ebene geklappt. Um die chemische Verschiebung zu refokussieren und gleichzeitig die entwickelte Kopplung zwischen I und S zu gewährleisten, wird auf beiden Kanälen ein π -Puls eingestrahlt. Nach der Kopplungszeit Δ verschwindet die in-phasen Magnetisierung und erhalten bleibt die anti-phasen Magnetisierung $2I_xS_z$. Ein $\pi/2$ -Puls auf beiden Kanälen transferiert schließlich die Magnetisierung auf den Kern S.

$$I_z \xrightarrow{\frac{\pi}{2}I_x + \pi I_x + \pi S_x + \pi J_{IS}\Delta} 2I_xS_z \xrightarrow{\frac{\pi}{2}I_y + \frac{\pi}{2}S_x} 2I_zS_y \quad (5.1.1)$$

Der Kern S entwickelt in der Zeit t_1 die chemische Verschiebung Ω_S . Während dieser Entwicklungszeit muss bei doppelt markierten Proben, also ^{15}N und ^{13}C markiert, auf dem ^{13}C -Kanal ein 180° Breitbandentkopplungspuls eingestrahlt werden. Somit wird die N-C'- und die N-C $_\alpha$ -Kopplung ausgeschaltet.

Die chemische Verschiebung entwickelt sich nach 5.1.2 wie folgt:

$$2I_zS_y \xrightarrow{\Omega_S S_z t_1} 2I_zS_y \cos(\Omega_S t_1) - 2I_zS_x \sin(\Omega_S t_1) \quad (5.1.2)$$

Danach wird mittels inversem INEPT Schritt die Magnetisierung zurück auf den sensitiven ^1H Kern transferiert, um dort die Aufnahme zu starten.

$$\xrightarrow{\frac{\pi}{2}I_{-x} + \frac{\pi}{2}S_x + \pi I_x + \pi S_x + \pi J_{IS}\Delta} I_x \cos(\Omega_S t_1) - 2I_y S_x \sin(\Omega_S t_1) \quad (5.1.3)$$

Der zweite Term in 5.1.3 ist eine Multiquantenkohärenz und somit nicht observabel. Während des Rücktransfers in der Zeit Δ , wird zur Wassersignalunterdrückung der 3-9-19 Watergate-Block [Piotto *et al.*, 1992] verwendet. Er ist klar an den sechs symmetrischen Pulsen auf dem ^1H -Kanal zu erkennen. Die chemische Verschiebung Ω_I der in-phasen Magnetisierung des Kerns I entwickelt sich während der Aufnahmezeit t_2 wie folgt:

$$I_x \cos(\Omega_S t_1) \xrightarrow{\Omega_S I_z t_2} 2I_x \cos(\Omega_S t_1) \cos(\Omega_I t_2) + I_y \cos(\Omega_S t_1) \sin(\Omega_I t_2) \quad (5.1.4)$$

Während der Aufnahmezeit t_2 wird zwischen ^1H - und ^{15}N -Kern mit Hilfe der Sequenz GARP [Shaka *et al.*, 1985] entkoppelt, um eine diesbezügliche Aufspaltung zu vermeiden.

Mittels Quadraturdetektion wird das Signal als Real- und Imaginärteil aufgenommen und unter Verwendung von $\Omega = 2\pi\delta$ folgt:

$$\begin{aligned} S(t_1, t_2) &= a + ib \\ S(t_1, t_2) &= \cos(\Omega_S t_1) \cos(\Omega_I t_2) + i \cos(\Omega_S t_1) \sin(\Omega_I t_2) \\ S(t_1, t_2) &= \frac{1}{2} \left(e^{2\pi i(\delta_S t_1 + \delta_I t_2)} + e^{2\pi i(-\delta_S t_1 + \delta_I t_2)} \right) \end{aligned} \quad (5.1.5)$$

Somit sind zwei Signale detektierbar. Eines bei $[t_2=\delta_I, t_1=\delta_S]$ und das andere bei $[t_2=\delta_I, t_1=-\delta_S]$. Durch geeignete Wahl des Phasenzyklus, kann eines der beiden Signale eliminiert werden.

Die Aufnahmeparameter der in dieser Arbeit detektierten ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren für die Zuordnung der Rückgratresonanzen, setzten sich zusammen aus 1024 Punkten in der Protonendimension, 256 Inkrementen in der Stickstoffdimension und einem Phasenzyklus aus 16 Wiederholungen. Die spektrale Breite betrug 13 ppm in der ^1H - und 30 ppm in der ^{15}N - Dimension. Für die druckabhängige Untersuchung der Rückgratresonanzen des Proteins *Bs-CspB* wurde der gleiche Parametersatz wie bei den Zuordnungsexperimenten verwendet. Für das Protein *Kti11p(M⁻)* wurde bei den druckabhängigen Rückgratresonanzexperimenten mit 1024 Punkten auf der Protonen- und 96 Inkrementen auf der Stickstofffrequenzachse und einem 128-fachen Phasenzyklus aufgenommen. Die spektralen Breiten wurden von den Zuordnungsexperimenten übernommen.

Um die im ^1H - ^{15}N -HSQC auftauchenden ^1HN -Resonanzsignale der jeweiligen Aminosäure zuordnen zu können, wurden die gängigen TROSY-basierten Tripel-Resonanzspektren aufgenommen. Hierzu müssen die Proben ^{15}N und ^{13}C markiert sein. Verwendet wurde das HNCO in Kombination mit dem HN(CA)CO [Grzesiek und Bax, 1992] und das HNCACB in Kombination mit dem HN(CO)CACB [Wittekind und Mueller, 1993].

Das HNCO-Experiment ist das sensitivste Tripel-Resonanzexperiment, da die großen $^1J_{\text{NC}}$ Kopplungskonstanten einen zeitlich kurzen Magnetisierungstransfer gewährleisten. Die Magnetisierung wird vom Amidproton zum Stickstoff und danach zum Carbonylkohlenstoff CO der Vorgängeraminosäure transferiert. Hier wird die chemische Verschiebung t_1 entwickelt, danach zum Stickstoffkern zurücktransferiert, dort wird t_2 entwickelt. Schlussendlich erfolgt der INEPT Schritt zurück zum Amidproton, wo mit t_3 aufgenommen wird. Ein solches dreidimensionales Spektrum zeigt in der einen Ebene ein gewöhnliches ^1H - ^{15}N -HSQC und in der dritten Dimension alle CO Resonanzen der jeweiligen Vorgängeraminosäure.

Nach diesem Prinzip arbeiten auch die anderen genannten Tripel-Resonanzexperimente. Das HN(CA)CO enthält die gleichen Informationen wie das HNCO und zusätzlich die CO Resonanz der eigenen Aminosäure. Die HNCACB und HN(CO)CACB Spektren liefern Informationen über die C_α und C_β Resonanzen der eigenen und der vorigen Aminosäure. Mit diesen Informationen und der Kenntnis der Aminosäuresequenz des Proteins, ist es möglich die Kreuzsignale eines ^1H - ^{15}N -HSQC der jeweiligen Aminosäure zuzuordnen.

Für die Seitenkettenuordnung der untersuchten Proteine im aliphatischen Bereich wurde ein ^1H - ^{13}C ct-HSQC [Vuister und Bax, 1992] in Kombination mit einem HCCH-TOCSY-Experiment [Bax *et al.*, 1990] aufgenommen. Ein ^1H - ^{13}C ct-HSQC zeigt analog zum ^1H - ^{15}N -HSQC sämtliche kohlenstoffgebundene Wasserstoffe und somit die Seitenketteninformationen einer jeden Aminosäure. Das HCCH-TOCSY korreliert alle in einem Spinsystem gekoppelten Protonen entlang der Kohlenstoffkette. Somit enthält das HCCH-TOCSY-Spektrum, neben der Informationen aus dem ^1H - ^{13}C ct-HSQC, alle zur jeweiligen Resonanz gehörenden Protonen innerhalb ein und derselben Aminosäure.

5.1.3 Pulsprogramm zur Dynamikmessung des H-N Bindungsvektors

Der heteronukleare Overhauser Effekt (hetNOE) beruht auf der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zweier Kernspins wie etwa ^1H und ^{15}N oder ^1H und ^{13}C . Über diese Wechselwirkung ist ein Relaxationsmechanismus gekoppelt, der vom Abstand beider Kernspins und der Rotationskorrelationszeit abhängt. Für die Messungen nach [Dayie und Wagner, 1994] werden zwei ^1H - ^{15}N -Spektren detektiert. Im ersten Experiment wird durch kontinuierliche Pulseinstrahlung der ^1H - ^{15}N -Übergang gesättigt (Signalintensität I_{sat}^i). Im Referenzexperiment wird an dieser Stelle eine äquivalente Wartezeit, jedoch ohne Sättigung, verwendet (Signalintensität I_{ref}^i). Die Sättigung wird experimentell durch Einstrahlung einer Folge von 600 120° -Pulsen mit einer Länge von jeweils 5 ms realisiert.

Die Relation aus gesättigter Signalintensität und Referenzintensität (Gleichung 5.1.6) ergibt für jedes Kreuzsignal i ein Verhältnis, dessen Größe proportional zur Beweglichkeit des HN-Vektors im Piko- bis Nanosekundenbereich ist.

$$hNOE^i = \frac{I_{\text{sat}}^i}{I_{\text{ref}}^i} \quad (5.1.6)$$

In Abhängigkeit des angelegten äußeren Magnetfeldes, mit der magnetischen Flussdichte B_0 , ergibt sich ein definierter hetNOE-Funktionsverlauf mit einem Wertebereich von $-4 \leq \text{hetNOE} \leq 0.9$ [Kovermann, 2011]. Ein kleiner Wert bedeutet hier eine hohe Beweglichkeit. Dieses Pulsprogramm wurde zur Dynamikuntersuchung der apo- und holo-Form des Proteins Kti11p verwendet.

5.2 Verwendete Hard- und Software

Die Zuordnungsexperimente wurden an einem Bruker Avance III 800 MHz Spektrometer mit TCI Cryoprobekopf durchgeführt. Sämtliche Hochdruckmessungen wurden

an einem Bruker Avance III 600 MHz Spektrometer mit TXI oder BBI Probenkopf aufgenommen. Zur Ansteuerung der Spetrometer und Aufnahme der Spektren wurde das Programm TopSpin 2.1 (Bruker) benutzt. Für die Hochdruckmessungen unterhalb einer Temperatur von 0°C wurde die Kühleinheit XRII851 Air-Jet Cooler der Firma FTS Systems, Inc. verwendet.

Die eindimensionalen Protonenspektren wurden mit TopSpin 2.1 und TopSpin 3.1 ausgewertet. Mehrdimensionale Spektren wurden mittels NMRPipe [Delaglio *et al.*, 1995] unter zu Hilfenahme eines *Shell-Skriptes* von der Bruker Syntax in die NMRView Syntax konvertiert. Dieses Skript ist in Abschnitt B.2 aufgeführt. Die Phasenkorrekturen wurden mit NMRDraw durchgeführt. Für die Zuordnung und Auswertung der Spektren wurde NMRView 5.2 und NMRViewJ 8.0 der Firma One Moon Scientific, Inc. [Johnson und Blevins, 1994] verwendet.

Zur räumlichen Darstellung der Proteine und Ermittlung von polaren Kontakten, Kavitäten und atomaren Abständen wurde das Programm PyMol (DeLano Scientific LLC.) benutzt. Zur weiteren Auswertung und Bestimmung thermodynamischer Größen wurden die Programme Igor Pro 6.12 (Wave Metrics), Gnuplot 4.6 und MatLab R2009b (MathWorks, Inc.) verwendet. Die *Shell-Skripte* wurden in der *C-Shell* und der *Bourne-again shell (Bash)* geschrieben.

Teil III

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

ERGEBNISSE

6.1 Referenzierung der Spektren

Sämtliche für diese Arbeit aufgenommenen Spektren sind auf die Protonensignale der deuterierten (CH_3 -Gruppen ausgenommen) Dimethyl-Silapentan-Sulfonsäure DSS(d6) referenziert wurden. Diese Art der Referenzierung geht auf [Wishart *et al.*, 1995] zurück. Analog hierzu kann eine Referenzierung für die ^{15}N und ^{13}C Kerne über das gyromagnetische Verhältnis γ ermittelt werden, womit nicht nur Protonenspektren, sondern auch ^1H - ^{15}N und ^1H - ^{13}C HSQC-Spektren referenziert werden können. Diese Referenzsubstanz ist in dem für diese Arbeit angewendeten Druck- und Temperaturbereich weitestgehend stabil und chemisch inert. Die DSS(d6) Konzentration variierte je nach Proteinkonzentration von 10 μM bis 50 μM .

6.2 Einfluß von hohen Drücken auf die Proteinstabilität

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der Proteinstabilitätsmessungen am Beispiel von drei ausgewählten Biomolekülen in Abhängigkeit von Temperatur und Druck zusammengetragen. Aus diesen Datensätzen lassen sich die in 4.2 und 4.3 erläuterten thermodynamischen Parameter erfassen. Es handelt sich bei den Proteinen um das Kälteschockprotein aus *Bacillus subtilis* (*Bs*-CspB), die Doppelvariante *Bc*-Csp R3E L66E des Kälteschockproteins aus *Bacillus caldolyticus* und um das metallfreie Zinkfingerprotein „killer toxin-insensitive“ Kti11p(M^-) aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.

6.2.1 Temperaturübergänge bei unterschiedlichen Drücken

6.2.1.1 Ermittlung des Anteils an entfaltetem Protein

Zunächst wurden an den ausgewählten Proteinen Temperaturübergänge bei fest eingestelltem Druck durchgeführt. Bei jedem Temperaturpunkt wurde ein Protonenspektrum aufgezeichnet. Der Druckbereich erstreckte sich je nach Protein von 0.1 MPa bis 240 MPa und wurde in Schritten von 20-30 MPa abgerastert. Der Temperaturbereich für das Kälteschockprotein *Bs*-CspB und das Zinkfingerprotein Kti11p(M^-) erstreckte sich von 280 K bis 330 K. Bereits ab 60 MPa konnte der Temperaturmeßbereich für das Kälteschockprotein auf 270 K - 330 K und ab 160 MPa auf 260 K - 330 K erweitert werden. Das liegt im abgesenkten Gefrierpunkt des Wassers bei hohen Drücken begründet.

Das Kälteschockprotein *Bc-Csp R3E L66E* wurde wegen seiner Anfälligkeit für hohe Temperaturen nur in einem Bereich von 280 K bis 320 K vermessen. Das ständige Aufheizen der Proben führt über längere Zeit zum irreversibel aggregierten Zustand der Proteinprobe. Um die Reversibilität der Messungen zu überprüfen, wurde vor und nach jedem Temperaturübergang ein Spektrum unter normalen Umgebungsbedingungen aufgenommen und miteinander verglichen. Zeigten sich zu starke Abweichungen zwischen Vor- und Nachmessung, wurde für die Folgeuntersuchungen eine neue Probe benutzt.

Da es für das NMR-Hochdruckröhrchen keinen internen Temperatursensor gibt, wurden Temperaturkalibrierungskurven aufgenommen. Das wurde realisiert, indem die Differenz der chemischen Verschiebungen $\Delta\delta$ zwischen der OH und der CH₃ Linie von Methanol in Abhängigkeit von der am Spektrometerprobenkopf eingestellten Temperatur aufgetragen wurde. Dieses Kalibrierungsverfahren ist mit Methanol in einem Temperaturbereich von 178 K bis 330 K gültig und wird über folgende Korrekturformel berechnet [Amman *et al.*, 1982]:

$$T[\text{K}] = 409.0 - 36.54 \cdot \Delta\delta - 21.85 \cdot \Delta\delta^2 \quad (6.2.1)$$

Die Kalibrierung wurde beim TXI-Probenkopf bei einem Luftstrom von 535 l/h für Temperaturen von 280 K bis 330 K vermessen. Da für das Protein *Bs-CspB* Messungen bis 260 K durchgeführt wurden, musste, um auf diese niedrigen Temperaturen zu gelangen, die Kühleinheit XR11851 Air-Jet Cooler mit 1 bar Druck Stickstoffstrom benutzt werden. Hierfür wurde eine weitere Kalibrierungskurve für den TXI Probenkopf im Bereich von 260 K bis 330 K vermessen.

In den Abbildungen 6.2.1, 6.2.2 und 6.2.3 sind Spektren der einzelnen Proteine bei verschiedenen Temperaturen für ausgewählte Drücke aufgezeigt. Bei 0 ppm ist die Resonanz des Referenzierungsmittels DSS(d₆) deutlich zu erkennen. Aus diesen Spektren soll nun der Anteil an entfaltetem Protein ermittelt werden. Hierfür sind, je nach Protein, die Signalintensitäten der separierten Methyl- und Methylengruppen im Bereich um etwa -0.5 ppm bis ca. 0.6 ppm von Interesse. Das Absinken dieser Intensitäten deutet auf die Verschiebung des Gleichgewichts vom nativen zum entfalteten Zustand hin. Der Intensitätsverlust der aus dem nativen Zustand stammenden Signale geht einher mit einem Anstieg der entfalteten Resonanzen im Bereich um 0.9 ppm. Es lässt sich für das entfaltete Spektrum ein deutlicher Dispersionsverlust erkennen.

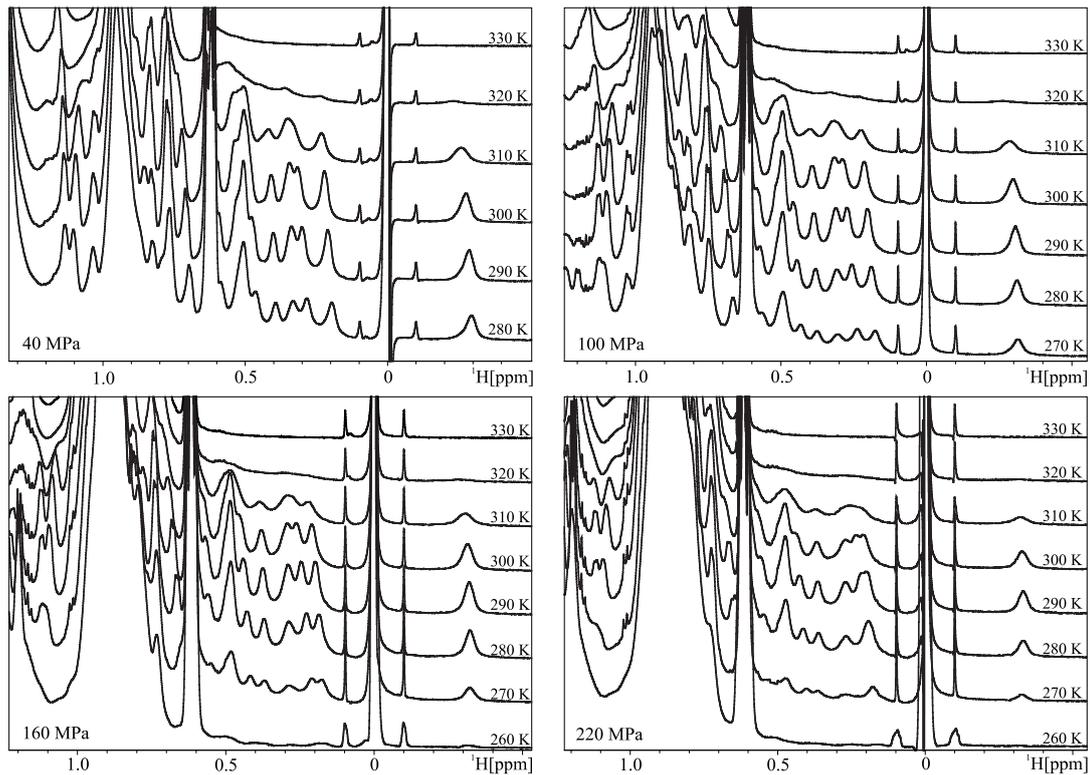


Abb. 6.2.1: *Bs*-CspB: Temperaturabhängigkeit der Protonensignale im aliphatischen Bereich bei ausgewählten Drücken. Bei Drücken ab 160 MPa konnte bereits ab 260 K aufgezeichnet werden. Die 600 mikromolare ^{15}N -markierte Probe enthielt 20 mM Natriumcacodylat Puffer pH 7.0, 10% D_2O , 30 μM DSS(d_6).

Für *Bs*-CspB in Abb. 6.2.1 ist bei Drücken oberhalb von 160 MPa sehr gut die Kältdenaturierung der 270 K und 260 K Protonenspektren zu erkennen, was aus dem Intensitätsverlust der separierten Methylgruppen unterhalb von 0.5 ppm abzulesen ist. Das Auftreten der Hitzedenaturierung kann für *Bs*-CspB bei sämtlichen Drücken bereits ab etwa $T = 310$ K ausgemacht werden.

Das Phänomen der Kältdenaturierung lässt sich anhand von ^1H - ^{15}N -HSQC Aufnahmen sehr viel deutlicher demonstrieren als mit eindimensionalen Protonenspektren. Für einen Überblick dieser Kältdenaturierung bei hohen Drücken sind im Anhang in Abschnitt A.2 ausgewählte ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren bei 160 MPa dargestellt. Für den ausschließlich nativen Anteil von *Bs*-CspB wurde über die isolierten Methyl- und Methylengruppen im Bereich von 0.14 ppm bis 0.59 ppm integriert. Hierzu zählen die Protonenresonanzen von I18[$\text{H}\gamma_{13}$], V28[$\text{H}\gamma_{21/22/23}$], I33[$\text{H}\gamma_{13}$, $\text{H}\delta_{11/12/13}$] und L41[$\text{H}\beta_3$, $\text{H}\delta_{1/2}$]. Die Zuordnung dieser Signale stammt aus [Feng *et al.*, 1998] (BMRB 4296) und wurden an einer doppelt markierten Probe mittels ^1H - ^{13}C *ct*HSQC in Kombination mit einem HCCH-TOCSY-Experiment [Bax *et al.*, 1990] überprüft. Für den entfalteten Anteil wurde bei *Bs*-CspB von 0.697 ppm bis 1.064 ppm integriert. Diese integrierten Bereiche mussten je nach Druckpunkt angepasst werden, so dass weder ein Resonanzsignal in den Bereich hinein oder hinauswandert.

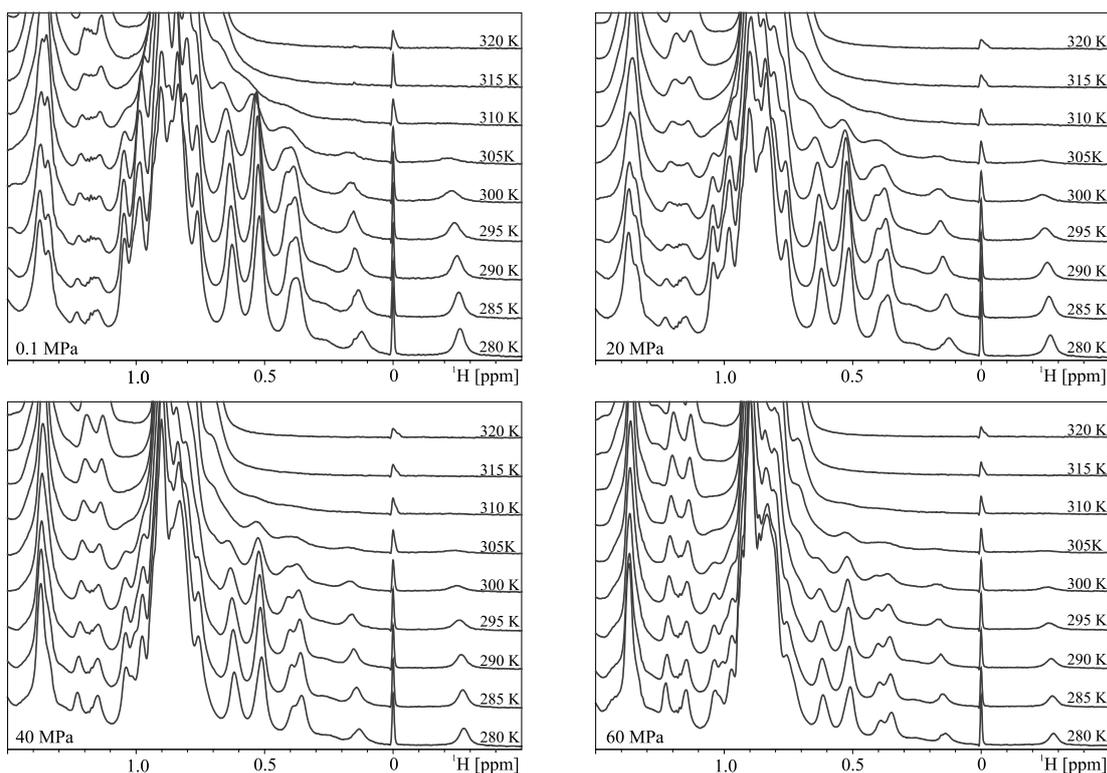


Abb. 6.2.2: *Bc-Csp R3E L66E*: Temperaturabhängigkeit der Protonensignale im aliphatischen Bereich bei Drücken von 0.1 MPa bis 60 MPa. Die 500 mikromolare Probe enthielt 20 mM Natriumcacodylat Puffer pH 7.0, 10% D₂O, 30 μ M DSS(d6).

Für die Doppelvariante des Kälteschockproteins *Bc-Csp R3E L66E* in Abb. 6.2.2 erstreckte sich der zu integrierende Bereich des nativen Anteils von -0.6 ppm bis zu -0.08 ppm und außerdem von 0.035 ppm bis 0.466 ppm. Der entfaltete Anteil erstreckte sich von 0.466 ppm bis 1.49 ppm. An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass der integrierte Bereich für den entfalteten Anteil auch native Signale enthalten darf (siehe Abschnitt 4.1). Für *Bc-Csp R3E L66E* lässt sich schon bei geringeren Drücken um etwa 60 MPa und Raumtemperatur ein deutlicher Abfall der Signalintensitäten im nativen Integrationsbereich erkennen. Selbst bei Atmosphärendruck zeigt sich eine niedrige Temperaturstabilität. Eine Kältedenaturierung ist, unabhängig vom angelegten Druck, kaum zu erkennen. Das DSS(d6) Signal wird hier bei hohen Temperaturen kleiner und auslaufender. Um eine Wechselwirkung zwischen DSS(d6) und *Bc-Csp R3E L66E* auszuschließen, wurde eine Probe ohne DSS(d6) ebenfalls einem Temperaturübergang bei gleichen Druckbedingungen unterzogen. Diese Spektren, hier nicht dargestellt, zeigen gleiches Verhalten wie mit dem Referenzierungsmittel DSS(d6), womit eine Interaktion ausgeschlossen werden kann. Das Zinkfingerprotein *Kti11p(M⁻)* in Abb. 6.2.3 wurde im Bereich von 0.267 ppm bis 0.646 ppm (nativ) und von 0.646 ppm bis 1.236 ppm (entfaltet) integriert. Zum nativen Bereich von *Kti11p(M⁻)* zählen hierzu die Protonensignale der Aminosäuren I8[H γ ₂₁, H γ _{12/13}], M39[H ϵ], I34[H δ ₁₁] und V57[H γ ₂₁]. Diese wurden ebenfalls an einer doppelt markierten Probe via ¹H-¹³C *ct*HSQC in Kombina-

tion mit einem HCCH-TOCSY-Experiment ermittelt. Auch beim Protein Kti11p(M⁻) ist bei hohen Drücken eine Kältedenaturierung in den Protonenspektren zu erkennen. Die Temperaturstabilität bei hohen Temperaturen ist für Kti11p(M⁻) gegenüber den beiden Kälteschockproteinen deutlich höher.

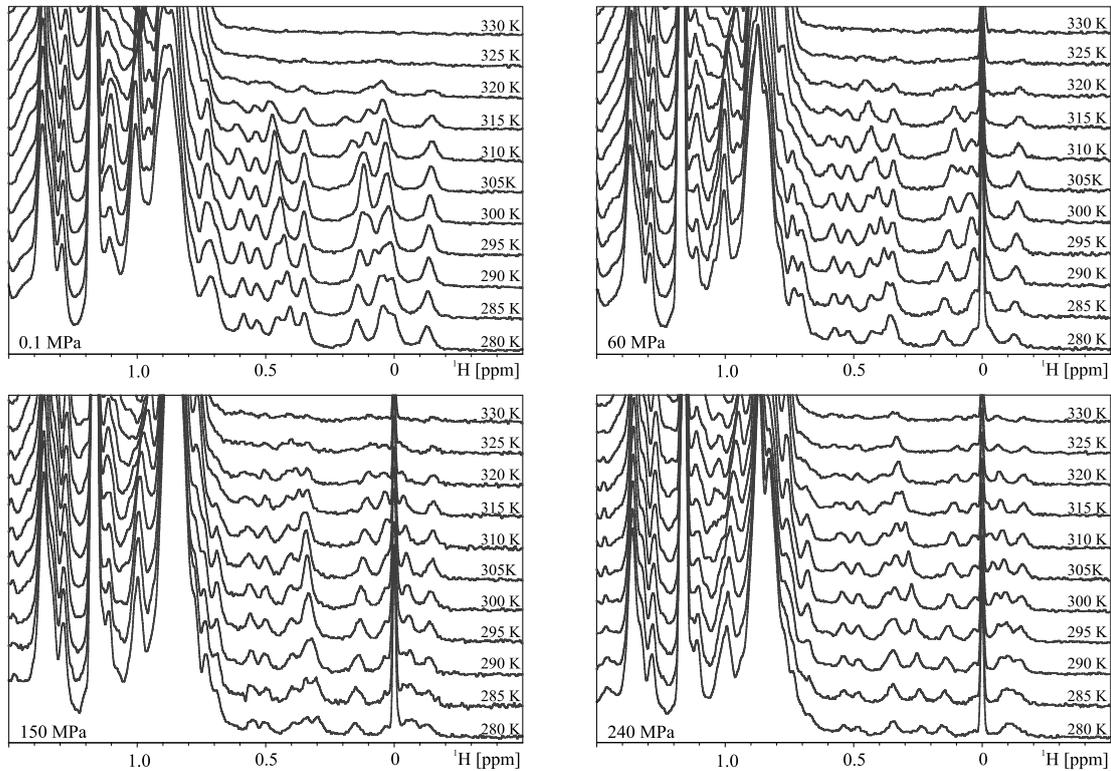


Abb. 6.2.3: Kti11p(M⁻): Temperaturabhängigkeit der Protonensignale im aliphatischen Bereich bei Drücken von 0.1 MPa, 60 MPa, 150 MPa und 240 MPa. Die 800 mikromolare Probe enthielt 50 mM Phosphatpuffer mit druckangepasstem pH 7.5, 50 mM NaCl und 10% D₂O, 30 μM DSS(d₆).

Für eine quantitative Analyse wurden über Gleichung 4.1.1 die Anteile an gefaltetem bzw. entfaltetem Protein ermittelt. Es ergibt sich für jeden Druckpunkt eine Abhängigkeit des entfaltetem Anteils von der Temperatur $f_u(T)|_p$. Diese Abhängigkeiten sind an ausgewählten Druckpunkten für *Bs-CspB* in Abb. 6.2.5, für *Bc-Csp R3E L66E* in Abb. 6.2.6 und für Kti11p(M⁻) in Abb. 6.2.7 dargestellt.

In Gleichung 4.1.1 geht die Temperatur maximaler Proteinstabilität T_{\max} ein. Diese wurde an der Temperaturübergangskurve bei Atmosphärendruck zunächst abgeschätzt. Die Temperaturübergangskurven bei Atmosphärendruck sind für die drei Proteine in Abb. 6.2.4 vergleichend aufgezeigt. Genauer kann T_{\max} über eine χ^2 -Analyse (siehe im Anhang Quellcode 2) festgestellt werden. Somit ergibt sich der Anteil an gefaltetem bzw. entfaltetem Protein für diese Temperatur T_{\max} . Für *Bs-CspB* ergab sich eine optimale Anpassung von Gleichung 4.2.9 an die Messpunkte für den Anteil an gefaltetem Protein zu $f_n(T_{\max}) = 0.98$ bei $T_{\max} = 298$ K. Für *Bc-Csp R3E L66E* ergab sich der

maximal gefaltete Anteil zu $f_n(T_{\max}) = 0.87$ bei $T_{\max} = 288$ K. Kti11p(M⁻) hat seinen maximal gefalteten Anteil bei $T_{\max} = 295$ K mit $f_n(T_{\max}) = 0.88$.

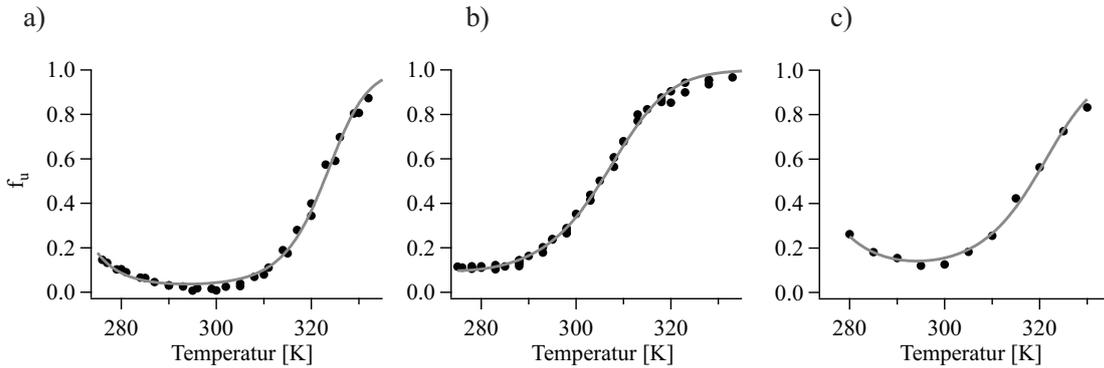


Abb. 6.2.4: Vergleich der entfalteten Proteinanteile $f_u(T)|_p$ in Abhängigkeit von der Temperatur bei Atmosphärendruck für die drei ausgewählten Proteine: a) *Bs-CspB*, b) *Bc-Csp R3E L66E* und c) *Kti11p(M⁻)*. Gleichung 4.2.9 wurde an den jeweiligen Datensatz angepasst, um auf die thermodynamischen Parameter des Proteins zu schließen (durchgezogene Linie).

Sehr gut sind in Abb. 6.2.4 die verschiedenen Temperaturabhängigkeiten bei Normaldruck zu erkennen. Die Kältedenaturierung ist, wie bereits erwähnt, gut für *Bs-CspB* und *Kti11p(M⁻)* zu sehen. Das Protein *Bc-Csp R3E L66E* zeigt eine deutlich gesteigerte Kälteresistenz gegenüber *Bs-CspB* und *Kti11p(M⁻)*, wohingegen es anfälliger für höhere Temperaturen ist.

Der für Entfaltungsübergänge im Zwei-Zustandsmodell typische doppelt-sigmoidale Verlauf von $f_u(T)$ lässt sich sehr gut in sämtlichen hier dargestellten Übergangskurven erkennen (Abb. 6.2.5 bis Abb. 6.2.7). Besonders ausgeprägt ist dieses Verhalten bei hohen Drücken, da hier die Kältedenaturierung stärker ausgeprägt ist. Der tiefe Temperaturbereich wird dem Messverfahren erst bei höheren Drücken ab etwa 80 MPa zugänglich. Für den Temperaturübergang bei Atmosphärendruck wurden ungleich mehr Datenpunkte aufgenommen als bei höheren Drücken, um einen möglichst genauen Wert der Temperatur maximaler Stabilität T_{\max} und den sich daraus ergebenden Anteil an gefaltetem Protein $f_n(T_{\max})$ zu ermitteln. Die Hälfte der Datenpunkte wurde bei Temperaturerhöhung, die zweite bei darauf folgender Temperaturniedrigung aufgenommen. Es konnten keine Hysterese-Effekte verzeichnet werden, was auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Messmethode schließen lässt.

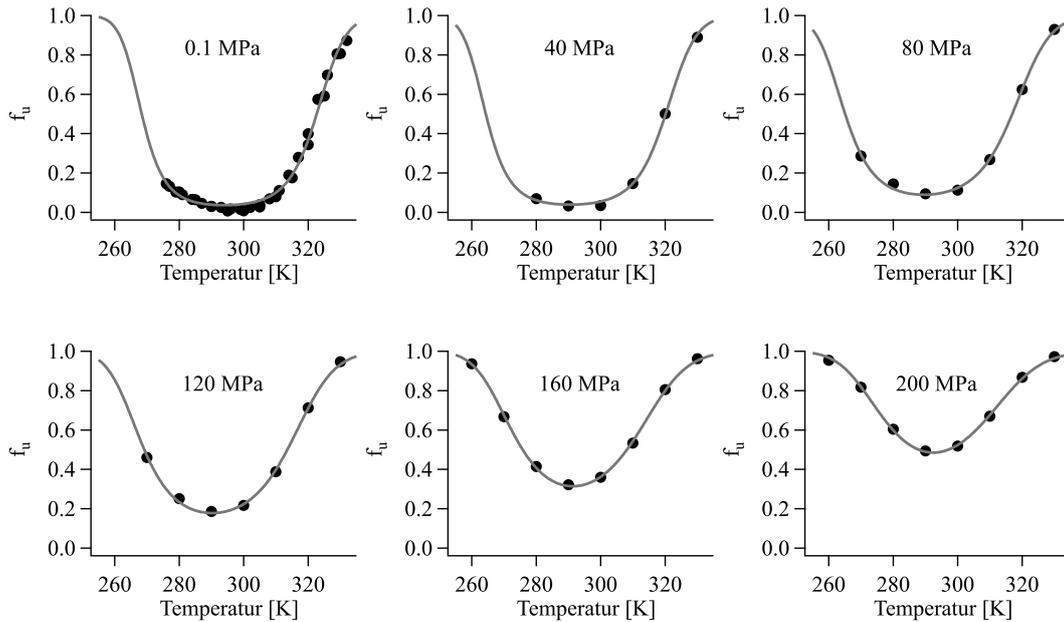


Abb. 6.2.5: *Bs*-CspB: Anteile an entfaltetem Protein $f_u(T)|_p$ in Abhängigkeit von der Temperatur für unterschiedliche Drücke (eine Auswahl). Gleichung Gleichung 4.2.9 wurde an den jeweiligen Datensatz angepasst, um auf die thermodynamischen Parameter des Kälteschockproteins zu schließen (Regressionsergebnisse in Tab. 6.2.1).

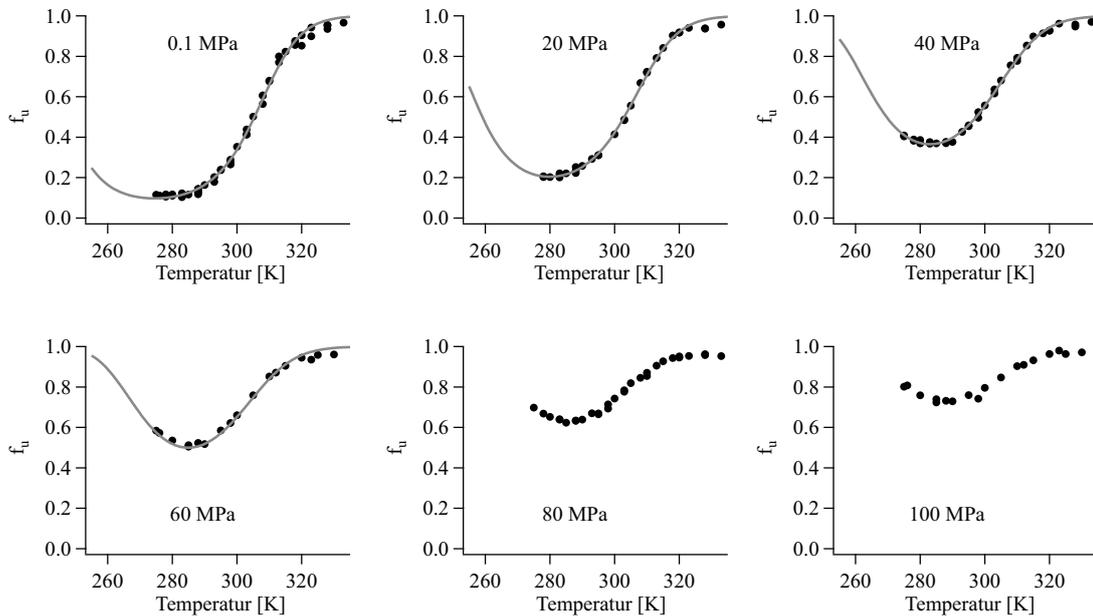


Abb. 6.2.6: *Bc*-Csp R3E L66E: Anteile an entfaltetem Protein $f_u(T)|_p$ in Abhängigkeit von der Temperatur für unterschiedliche Drücke (eine Auswahl). Gleichung Gleichung 4.2.9 wurde an den jeweiligen Datensatz angefitet, um auf die thermodynamischen Parameter des Kälteschockproteins zu schließen (Regressionsergebnisse in Tab. 6.2.2). Liegt das Minimum oberhalb von $f_u = 0.5$ ist keine Anpassung möglich (siehe hierzu auch Abschnitt zur Abb. 4.2.1).

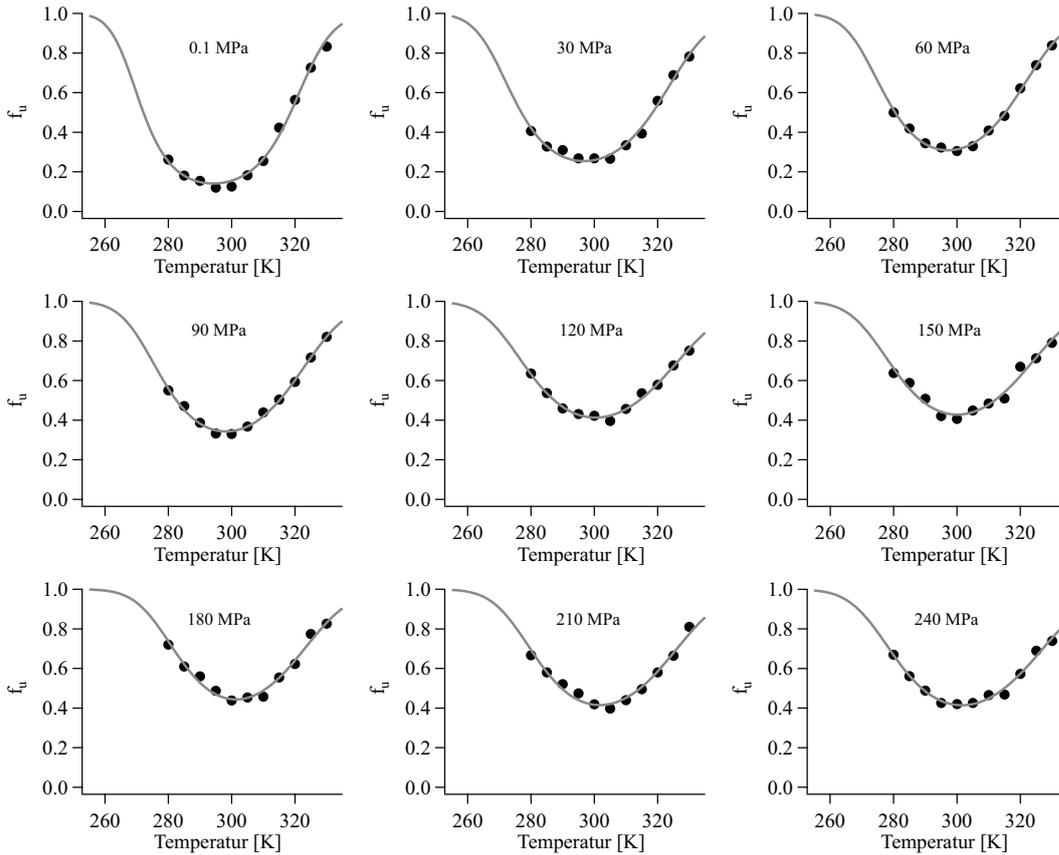


Abb. 6.2.7: Kti11p(M⁻): Anteile an entfaltetem Protein $f_u(T)|_p$ in Abhängigkeit von der Temperatur bei unterschiedlichen Drücken mit jeweils angepasstem pH-Wert für jeden Druckschritt. Die Regressionsergebnisse nach Gleichung 4.2.9 sind in Tab. 6.2.3 aufgelistet.

Bei *Bs-CspB* lässt sich erkennen, dass bei einem angelegten Druck von 200 MPa und stabilster Temperatur etwa die Hälfte der Proteine in den entfalteteten Zustand übergegangen sind. Dieses Gleichgewicht von $f_u=0.5$ ist bei *Bc-Csp R3E L66E* bereits ab 60 MPa erreicht. Bei Kti11p(M⁻) wird die $f_u=0.5$ Marke im angewendeten Druckbereich nicht erreicht. Hier zeigt das Minimum ab etwa 150 MPa einen erneuten Anstieg der Stabilität. Im folgenden wird quantitativ auf die Übergangskurven eingegangen.

6.2.1.2 Bestimmung der thermodynamischen Übergangparameter

Über Gleichung Gleichung 4.2.3 kann die Änderung der freien Enthalpie ΔG_u^0 des Systems für jeden Punkt $f_u(T)|_p$ berechnet werden. Gleichung Gleichung 4.2.8 beziehungsweise Gleichung 4.2.9 wird an die Datenpunkte in Abb. 6.2.5, 6.2.6 und 6.2.7 angepasst. Somit ergeben sich die thermodynamischen Größen der Enthalpieänderung am Übergangspunkt $\Delta H_u^0(T_m)$, die Änderung der Wärmekapazität Δc_p , sowie die Übergangstemperaturen T_m für Hitze- und Kältedenaturierung. Diese Größen können mittels Gleichung 4.2.9 nur bis zu einem Entfaltungsgrad von $f_u=0.5$ ermittelt werden, da es

darüber hinaus keinen Übergang bei einem Gleichgewicht bei 50% gibt und somit die Nebenbedingung für diese Formel nicht mehr greift, wie bereits auf Seite 24 beschrieben. Das wird am Protein *Bc-Csp R3E L66E* ab Drücken höher 60 MPa in Abb. 6.2.6 demonstriert.

Die Änderung der Entropie $\Delta S_u^0(T_m)$ wurde mit Gleichung 4.2.10 bestimmt. Über Gleichung 4.2.13 konnte die Temperatur maximaler Stabilität T_{\max} und der dazugehörige Wert der Gibbs Energie $\Delta G_u^0(T_{\max})$ bei jeweiligem Druck berechnet werden. Die ermittelten thermodynamischen Parameter sind für das Kälteschockprotein *Bs-CspB* in Tab. 6.2.1 aufgelistet, für *Bc-Csp R3E L66E* in Tab. 6.2.2 und für *Kti11p(M⁻)* in Tab. 6.2.3.

p [MPa]	D	T_m [K]	T_{\max} [K]	$\Delta G_u^0(T_{\max})$ [J/mol]	Δc_p [J/(mol·K)]	$\Delta H_u^0(T_m)$ [J/mol]	$\Delta S_u^0(T_m)$ [J/(mol·K)]
0.1	H	322.7 ± 1.2	295.7 ± 2.1	8004 ± 954	6411 ± 274	184670 ± 5990	572.3 ± 18.9
	K	268.4 ± 1.3				-163320 ± 4920	-608.6 ± 18.7
20	H	321.9 ± 1.5	290.8 ± 2.3	9220 ± 1109	5771 ± 1210	188200 ± 18500	584.7 ± 58.4
	K	260.9 ± 1.4				-163590 ± 6542	-627.0 ± 26.3
40	H	320.2 ± 1.3	291.8 ± 1.9	7738 ± 984	5798 ± 537	172120 ± 9290	537.6 ± 29.5
	K	264.4 ± 1.6				-151470 ± 5652	-573.0 ± 22.0
60	H	318.6 ± 1.3	290.9 ± 1.8	6566 ± 798	5117 ± 256	148540 ± 6240	466.2 ± 20.0
	K	264.0 ± 1.3				-131010 ± 4521	-496.3 ± 17.7
80	H	317.0 ± 1.3	290.6 ± 1.8	5584 ± 620	4825 ± 205	132570 ± 4770	418.3 ± 15.4
	K	265.1 ± 1.2				-117810 ± 3190	-444.4 ± 12.5
100	H	315.5 ± 1.3	290.9 ± 1.7	4652 ± 544	4611 ± 182	117910 ± 4060	373.8 ± 13.2
	K	267.0 ± 1.4				-105510 ± 3421	-395.2 ± 13.3
120	H	313.6 ± 1.3	291.1 ± 1.8	3695 ± 498	4369 ± 159	101870 ± 3350	324.9 ± 11.0
	K	269.2 ± 1.3				-91961 ± 2354	-341.6 ± 9.1
140	H	311.1 ± 1.2	291.5 ± 1.6	2773 ± 334	4318 ± 107	87250 ± 2100	280.5 ± 7.0
	K	272.4 ± 1.2				-79853 ± 2841	-293.2 ± 10.6
160	H	308.1 ± 1.2	291.8 ± 1.4	1892 ± 289	4221 ± 90	70795 ± 1730	229.7 ± 5.8
	K	275.8 ± 1.3				-65832 ± 2744	-238.7 ± 10.2
180	H	304.7 ± 1.4	292.2 ± 1.3	1055 ± 145	4052 ± 125	51401 ± 2370	168.7 ± 8.0
	K	280.0 ± 1.5				-48582 ± 2478	-173.5 ± 9.1
200	H	297.1 ± 1.9	292.5 ± 1.5	143 ± 18	3976 ± 115	18401 ± 725	61.9 ± 2.6
	K	287.9 ± 1.8				-18013 ± 2945	-62.6 ± 10.4

Tab. 6.2.1: *Bs-CspB*: Die aus den druckabhängigen Temperaturübergängen ermittelten Werte für T_h , T_c , T_{\max} , $\Delta G_u^0(T_{\max})$, Δc_p , $\Delta H_u^0(T_h)$, $\Delta H_u^0(T_c)$, $\Delta S_u^0(T_h)$ und $\Delta S_u^0(T_c)$. Die mit D markierte Spalte stellt die Denaturierungsart dar: H Hitzedenaturierung, K Kältedenaturierung

p	D	T_m	T_{max}	$\Delta G_u^0(T_{max})$	Δc_p	$\Delta H_u^0(T_m)$	$\Delta S_u^0(T_m)$
[MPa]		[K]	[K]	[J/mol]	[J/(mol·K)]	[J/mol]	[J/(mol·K)]
0.1	H	305.4 ± 0.2	276.0 ± 1.2	5094 ± 612	3363.4 ± 210	104020 ± 2220	340.6 ± 36.3
	K	247.6 ± 0.6				-90436 ± 896	-365.3 ± 18.1
20	H	303.0 ± 0.2	280.7 ± 1.4	3169 ± 323	3690.7 ± 213	85248 ± 2100	281.4 ± 34.7
	K	259.1 ± 0.5				-76812 ± 796	-296.5 ± 15.4
40	H	297.3 ± 0.2	283.3 ± 1.1	1301 ± 145	3830.1 ± 133	54878 ± 1340	184.6 ± 22.5
	K	269.6 ± 0.3				-51408 ± 605	-190.7 ± 11.2
60	H	285.1 ± 28.3	284.9 ± 0.4	0.18 ± 1.2	3981.9 ± 249	641 ± 112000	2.2 ± 1964.4
	K	284.7 ± 23.4				-665 ± 92800	-2.3 ± 1629.6

Tab. 6.2.2: Bc-Csp R3E L66E: Die aus den druckabhängigen Temperaturübergängen ermittelten Werte für T_h , T_c , T_{max} , $\Delta G_u^0(T_{max})$, Δc_p , $\Delta H_u^0(T_h)$, $\Delta H_u^0(T_c)$, $\Delta S_u^0(T_h)$ und $\Delta S_u^0(T_c)$. Die mit D markierte Spalte stellt die Denaturierungsart dar: H Hitzedenaturierung, K Kältedenaturierung

p	D	T_m	T_{max}	$\Delta G_u^0(T_{max})$	Δc_p	$\Delta H_u^0(T_m)$	$\Delta S_u^0(T_m)$
[MPa]		[K]	[K]	[J/mol]	[J/(mol·K)]	[J/mol]	[J/(mol·K)]
0.1	H	318.6 ± 0.4	295.1 ± 0.8	4420 ± 486.22	4831 ± 327	118140 ± 5700	370.8 ± 18.4
	K	272.1 ± 0.4				-106350 ± 5586	-390.8 ± 20.0
30	H	318.4 ± 0.4	297.4 ± 0.8	2653 ± 291.85	3673 ± 228	79671 ± 3930	250.2 ± 12.7
	K	276.9 ± 0.4				-77577 ± 3851	-280.2 ± 13.5
60	H	315.3 ± 0.2	297.7 ± 0.6	1989 ± 218.79	3905 ± 122	70655 ± 1990	224.1 ± 6.5
	K	280.5 ± 0.2				-65299 ± 1950	-232.8 ± 6.8
90	H	315.1 ± 0.3	298.7 ± 0.7	1613 ± 177.48	3646 ± 134	61430 ± 2210	195.0 ± 7.2
	K	282.5 ± 0.3				-57196 ± 2166	-202.5 ± 7.5
120	H	314.2 ± 0.5	300.7 ± 0.9	878 ± 96.55	2931 ± 139	40503 ± 2410	128.9 ± 7.9
	K	287.4 ± 0.5				-38101 ± 2362	-132.6 ± 8.0
150	H	311.9 ± 1.0	300.3 ± 1.4	725 ± 79.74	3256 ± 280	38615 ± 4910	123.8 ± 16.1
	K	288.8 ± 0.9				-36676 ± 4812	-127.0 ± 16.3
180	H	311.1 ± 0.9	301.5 ± 1.3	568 ± 62.49	3778 ± 247	36734 ± 4560	118.1 ± 15.0
	K	292 ± 0.8				-35274 ± 4469	-120.8 ± 15.0
210	H	314.5 ± 0.8	301.9 ± 1.2	861 ± 94.68	3370 ± 241	43003 ± 4220	136.7 ± 13.8
	K	289.6 ± 0.7				-40809 ± 4136	-140.9 ± 13.9
240	H	314.9 ± 0.6	301.8 ± 1	867 ± 95.4	3086 ± 169	41347 ± 2960	131.3 ± 9.6
	K	288.9 ± 0.5				-39008 ± 2901	-135.0 ± 9.8

Tab. 6.2.3: Kti11p(M⁻): Die aus den druckabhängigen Temperaturübergängen ermittelten Werte für T_h , T_c , T_{max} , $\Delta G_u^0(T_{max})$, Δc_p , $\Delta H_u^0(T_h)$, $\Delta H_u^0(T_c)$, $\Delta S_u^0(T_h)$ und $\Delta S_u^0(T_c)$. Die mit D markierte Spalte stellt die Denaturierungsart dar: H Hitzedenaturierung, K Kältedenaturierung

Zur besseren Veranschaulichung der in den Tabellen 6.2.1 bis 6.2.3 gelisteten Parameter, sind die Druckabhängigkeiten von T_h , T_c , T_{max} und Δc_p nochmals grafisch in Abb. 6.2.8 dargestellt. Die Druckabhängigkeit der Enthalpieänderung $\Delta H_u^0(T_m)$ ist in Abb. 6.2.9 zu sehen. Die Abhängigkeit der Entropieänderung $\Delta S_u^0(T_m)$ zeigt einen absolut vergleichbaren Verlauf zur $\Delta H_u^0(T_m)$ Abhängigkeit und soll hier nicht grafisch dargestellt werden.

Beim Protein *Bs-CspB* ergeben sich für die thermodynamischen Größen folgende Druckabhängigkeiten: das Absinken der Stabilität $\Delta G_u^0(T_{max})$ am Punkt T_{max} ist eindeutig zu erkennen, was in den $f_u(T)|_p$ Diagrammen mit einem Anstieg des Minimums der Übergangskurven einher geht. Dieses Phänomen deutet auf die Verschiebung des nativen Zustandes zum entfalteten Zustand bei steigenden Drücken hin. Ab 20 MPa ist die Temperatur maximaler Stabilität T_{max} recht konstant bei ca. 291 K und zeigt bei sehr hohen Drücken einen leichten Anstieg auf 292.5 K. Es gibt einen recht großen, negativen T_{max} -Sprung zwischen 0.1 MPa und 20 MPa, was möglicherweise im besseren Anpassen von Gleichung 4.2.9 bei zunehmendem Druck begründet liegt. Die Hitzedenaturierungstemperatur T_h , unter Normaldruck bei ca. 323 K beginnend, folgt einem nichtlinear abfallenden Verlauf bis sie bei 200 MPa auf 297 K abgesunken ist. Wohingegen die Kältedenaturierungstemperatur T_c , bis auf einen Ausreißer bei 20 MPa, einen nichtlinear ansteigenden Verlauf zeigt, welcher bei 268 K unter Normaldruck beginnt und bei 288 K unter 200 MPa Druck endet. Die Gleichung für f_u kann bei Atmosphärendruck auf Grund des fehlenden Tieftemperaturbereiches nicht so gut angepasst werden, wie bei höheren Drücken. Deswegen macht auch die Kältedenaturierungstemperatur T_c von 0.1 MPa auf 20 MPa einen starken Sprung. Es ist demnach anzunehmen, dass der wahre Wert für T_c bei 0.1 MPa eher um 260 K angesiedelt ist und nicht bei $T = 268$ K, was sich aus dem weiteren Verlauf der Übergangskurven bei höheren Drücken ableiten lässt.

Die Änderung der Wärmekapazität Δc_p bleibt über den verwendeten Druckbereich ebenfalls nicht konstant und zeigt einen linearen Abfall um etwa 40% des Ausgangswertes von 6411 J/(mol K) bei 0.1 MPa auf 3976 J/(mol K) unter Hochdruck. Der positive Δc_p Wert deutet darauf hin, dass die Wärmekapazität des entfalteten Zustandes größer ist als im nativen Zustand. Diese Tatsache lässt sich mit dem sogenannten Eisschalenmodell erklären [S. und W., 1945, Kauzmann, 1959, L., 1960]. Hierbei wird davon ausgegangen, dass bei entfalteten Proteinen die hydrophoben Bereiche stärker dem Lösungsmittel zugewandt sind als im nativen Zustand. Kristallartig orientieren sich an diesen hydrophoben Arealen die Wassermoleküle, was zu einem Anstieg der Wärmekapazität führt. Ein Absinken der Wärmekapazitätsänderung deutet demnach auf einen reduzierten Beitrag des Lösungsmittels zu Δc_p bei hohen Drücken hin. Diese Abnahme der Wärmekapazitätsänderung schlägt sich in einer Verbreiterung der $\Delta G_u^0(T)$ Kurve bei hohen Drücken nieder (Vergleich hierzu auch Abb. 6.2.10a).

Die Druckabhängigkeit der Enthalpieänderung $\Delta H_u^0(T_m)$ von *Bs-CspB* ist grafisch in

Abb. 6.2.9 (links) dargestellt. Es ist ein Absinken der Hitzedenaturierungskurve und ein Anstieg der Kältedenaturierungskurve zu verzeichnen. Die Hitze- und Kältedenaturierungskurven laufen symmetrisch aufeinander zu, um sich bei etwa 200 MPa bei einem $\Delta H_u^0(T_m)$ Wert von Null zu treffen. Sie zeigen einen annähernd linearen Verlauf.

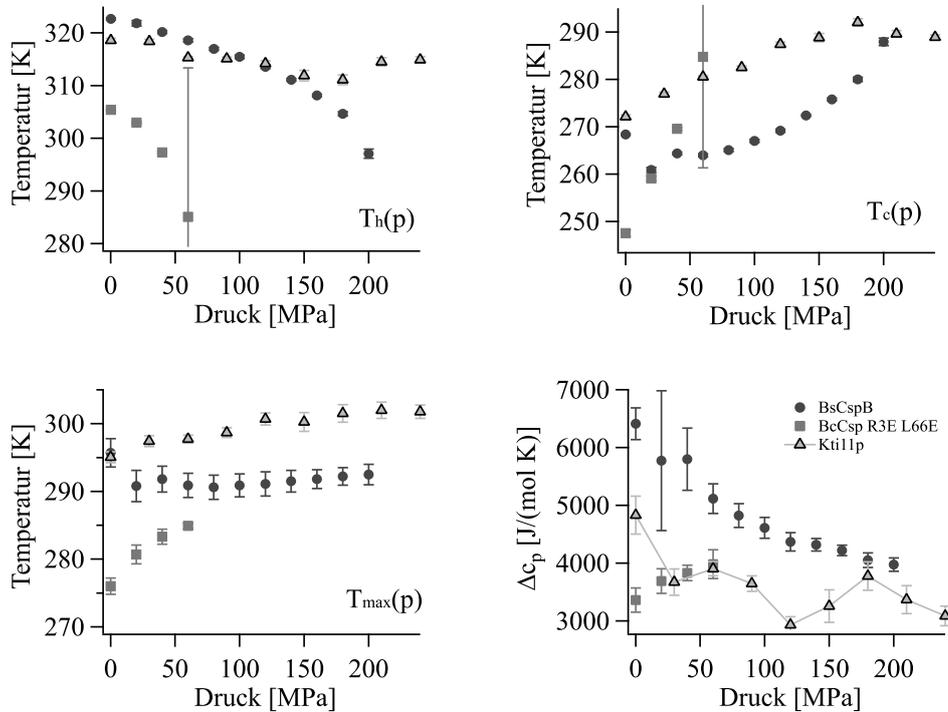


Abb. 6.2.8: Grafische Darstellung der in den Tabellen 6.2.1, 6.2.2 und 6.2.3 aufgezeigten Druckabhängigkeiten für die Hitzedenaturierung T_h , die Kältedenaturierung T_c , die Temperatur maximaler Stabilität T_{max} und der Wärmekapazitätsänderung Δc_p für die Proteine *Bs-CspB*, *Bc-Csp R3E L66E* und *Kti11p(M⁻)*. Die durch die Datenpunkte der Wärmekapazitätsänderung von *Kti11p(M⁻)* gezogene Linie dient zur deutlicheren Darstellung und stellt keine angepasste Funktion dar. Die Fehler sind teilweise kleiner als die Symbole.

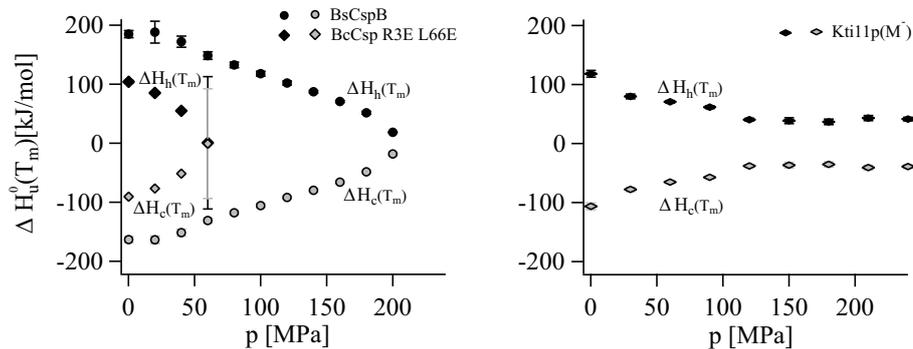


Abb. 6.2.9: Grafische Darstellung der in den Tabellen 6.2.1, 6.2.2 und 6.2.3 aufgezeigten Druckabhängigkeiten für die Enthalpieänderung $\Delta H_u^0(T_m)$ für die Proteine *Bs-CspB*, *Bc-Csp R3E L66E* und *Kti11p(M⁻)*. Die Fehler sind teilweise kleiner als die Symbole.

Wie *Bs*-CspB zeigt auch die Doppelvariante *Bc*-Csp R3E L66E ein breit ausgeprägtes Minimum der Übergangskurve bei Atmosphärendruck. Dieses Verhalten ist typisch für Kälteschockproteine. Für *Bc*-Csp R3E L66E ist es sogar noch ausladender als für *Bs*-CspB. Erst bei Drücken ab 60 MPa ist ein Kältedenaturierungsarm zu erkennen, was eine eindeutigere Anpassung der Gleichung für f_u bedeutet. Allerdings ist bereits ab 60 MPa das Protein bei stabilster Temperatur zu 50% druckentfaltet, der $\Delta G_u^0(T_{\max})$ Wert auf Null abgesunken, was ein Erschließen der thermodynamischen Parameter bei noch höheren Drücken mit dieser Methode unmöglich macht. Deswegen ist für dieses Protein nur ein kleiner Temperaturübergangsdatensatz vorhanden. Die Temperatur maximaler Stabilität nimmt bei steigendem Druck schnell von 276 K auf 285 K bei 60 MPa zu. Die Hitzedenaturierung zeigt einen stark nichtlinearen Abfall von 305 K bei 0.1 MPa auf 285 K bei 60 MPa. Gleiches gilt vice versa für die Kältedenaturierungstemperatur, die von sehr niedrigen 248 K bei Atmosphärendruck auf 285 K bei 60 MPa ansteigt. Die Fehler der beiden Übergangstemperaturen bei 60 MPa sind mit Werten von 23 K - 28 K extrem groß, weil sich das Minimum der Kurve bei diesem Druck fast nur noch auf einen Punkt konzentriert und keine zwei Schnittpunkte mit der $f_u=0.5$ Achse hat. Auffallend ist für dieses Protein die Änderung der Wärmekapazität, welche bei höheren Drücken zu größeren Werten von 3363 J/(mol K) zu 3982 J/(mol K) ansteigt. Das lässt sich nur erklären indem man davon ausgeht, dass die Anpassung der Gleichung bei zu niedrigen Drücken zu ungenau ist. Wahrscheinlicher ist deswegen, dass *Bc*-Csp R3E L66E bereits bei Atmosphärendruck eine Wärmekapazitätsänderung Δc_p von etwa 3900 - 4000 J/(mol K) aufweist und dieser Wert sich in dem relativ kleinen Druckbereich von 60 MPa kaum verändert. Trotzdem kann hier ein ungefähres Δc_p Wert abgeschätzt werden, auch wenn über den Trend mit zunehmendem Druck nur spekuliert werden kann.

Die Druckabhängigkeit der Enthalpieänderung $\Delta H_u^0(T_m)$ von *Bc*-Csp R3E L66E zeigt im Gegensatz zu *Bs*-CspB einen deutlich ausgeprägteren nicht-linearen Verlauf. Die Hitze- und Kältedenaturierungsäste schneiden sich bereits bei etwa 60 MPa.

Das Druck- und Temperaturverhalten des Zinkfingerproteins Kti11p(M⁻) lässt sehr interessante Aspekte erkennen. Bereits bei Atmosphärendruck ist das Minimum der Übergangskurve deutlich schmaler ausgeprägt als bei den Kälteschockproteinen. Bei diesen Druckverhältnissen bildet sich schon deutlich der Kältedenaturierungsast ab unterhalb 290 K aus (Abb. 6.2.7 links oben). Ähnlich wie bei den Kälteschockproteinen ist bei höheren Drücken dieser Kältedenaturierungsast stärker ausgeprägt. Die Stabilität, anhand der $\Delta G_u^0(T_{\max})$ Werte beurteilt und auch in den Grafen aus Abb. 6.2.7 deutlich erkennbar, sinkt mit zunehmendem Druck, bis zwischen 150 MPa und 180 MPa ein Stabilitätsminimum erkennbar wird, um bei noch höheren Drücken wieder an Stabilität zu gewinnen. Dieses Verhalten spiegelt sich nicht in der Temperatur maximaler Stabilität T_{\max} wieder. Diese steigt linear mit dem Druck von 295 K bei 0.1 MPa auf 302 K bei 240 MPa an. Die Hitze- und Kältedenaturierungstemperaturen lassen jedoch

ebenfalls diese interessante Abhängigkeit erkennen. Die Hitzedenaturierungstemperatur T_h sinkt bis 180 MPa von 318.6 K auf 311 K ab, um danach wieder auf 315 K bei 240 MPa anzusteigen. Die Kältedenaturierungstemperatur T_c steigt in den gleichen Druckbereichen von 272 K auf 292 K an, um darauffolgend auf 289 K abzusinken. Dieses Phänomen zeigt sich deutlich in den beiden oberen Grafiken von Abb. 6.2.8.

Die Druckabhängigkeit der Wärmekapazitätsänderung Δc_p lässt kaum einen eindeutigen Trend erkennen. Sie unterliegt starken Schwankungen zwischen 4831 J/(mol K) (0.1 MPa) und 3086 J/(mol K) bei 240 MPa, wie gut in Abb. 6.2.8 (rechts unten) erkennbar. Über den gesamten Druckbereich kann jedoch eine Abnahme der Wärmekapazitätsänderung verzeichnet werden. Im interessantesten Bereich zwischen 150 MPa und 180 MPa kann ein leichter Anstieg von Δc_p beobachtet werden, der mit einem anschließenden, erneuten Abfall einhergeht.

Die Druckabhängigkeit der Enthalpieänderung $\Delta H_u^0(T_m)$ von Kti11p(M⁻) ist in der Abb. 6.2.9 (rechts) dargestellt und zeigt im Gegensatz zu den Kälteschockproteinen einen gänzlich anderen Verlauf. Zwar ist ebenfalls eine quadratische Abhängigkeit bei der Denaturierungsäste zu erkennen, jedoch mit umgekehrter Krümmung. Bei 150 MPa gibt es eine maximale Annäherung beider Äste, wobei sie im weiteren messbaren Druckbereich keinen gemeinsamen Schnittpunkt aufzeigen. Sie vergrößern ihren Abstand zueinander wieder.

6.2.1.3 Untersuchung des enthalpischen und entropischen Anteils

Die in den Tabellen 6.2.1 - 6.2.3 gelisteten Werte für die Enthalpie $\Delta H_u^0(T_m)$ und die Entropie $\Delta S_u^0(T_m)$ geben nur die Werte dieser Größen am jeweiligen Hitze- und Kälteübergangspunkt T_m an. Einen kompletten Verlauf der Temperaturabhängigkeit des enthalpischen als auch des entropischen Anteils lässt sich über Gleichung 4.2.6 und Gleichung 4.2.7 grafisch darstellen. Die Differenz von $\Delta H_u^0(T)$ und $T \cdot \Delta S_u^0(T)$ ergibt die Änderung der freien Enthalpie $\Delta G_u^0(T)$. Für die drei untersuchten Proteine sind diese Abhängigkeiten bei Atmosphärendruck und bei den jeweiligen Denaturierungsbeziehungsweise Maximaldrücken von 200 MPa, 60 MPa und 240 MPa in Abb. 6.2.10 aufgezeigt. Innerhalb des nativen Bereiches von T_c bis T_h ist der enthalpische Anteil stets größer als der entropische Anteil. Vom Punkt maximaler Stabilität ausgehend, steigt in beide Temperaturrichtungen der entropische Anteil $T \cdot \Delta S_u^0(T)$ steiler an als der enthalpische Anteil. Zunehmend überwiegt der entropische Anteil, bis sich entropischer und enthalpischer Anteil bei den Temperaturen T_h und T_c gleichen und somit unterhalb von T_c und oberhalb von T_h das System überwiegend entropisch gesteuert wird. Die Schnittpunkte von $\Delta H_u^0(T)$ mit $T \cdot \Delta S_u^0(T)$ spiegeln jeweils eine Gibbs-Energie von Null wieder und damit den Zustand $f_u = f_n = 0.5$.

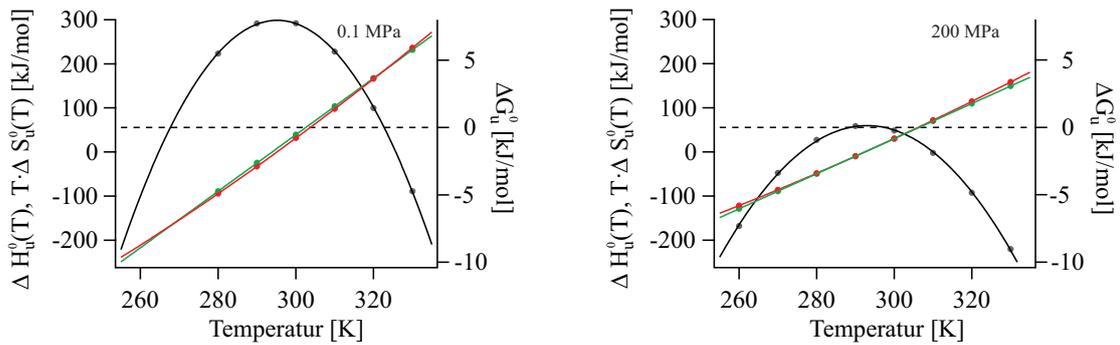
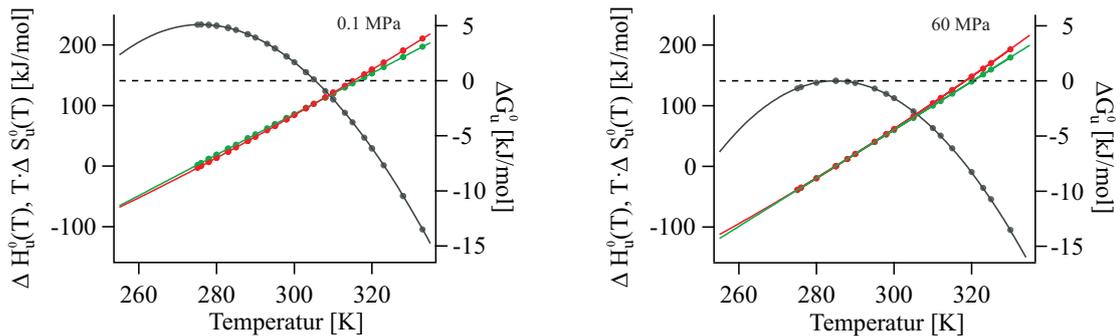
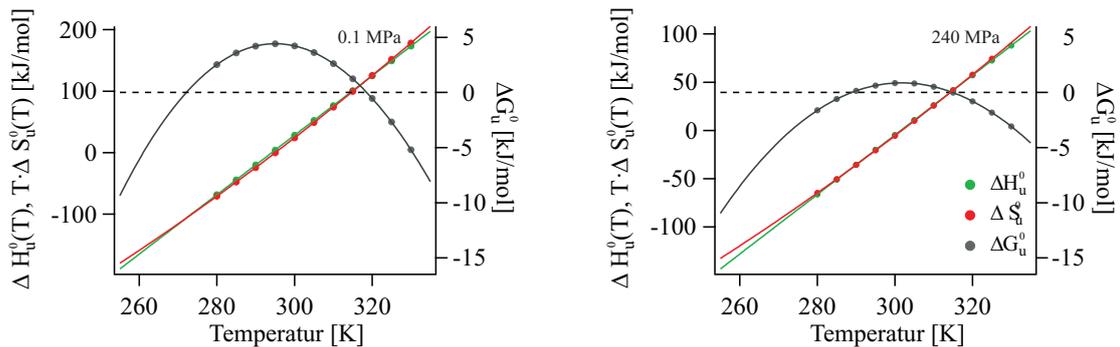
(a) *Bs-CspB* bei 0.1 MPa und 200 MPa(b) *Bc-Csp R3E L66E* bei 0.1 MPa und 60 MPa(c) *Kti11p(M⁻)* bei 0.1 MPa und 240 MPa

Abb. 6.2.10: Temperaturabhängigkeit der Enthalpie $\Delta H_u^0(T)$ (grün), des entropischen Anteils $T \cdot \Delta S_u^0(T)$ (rot) und der Differenz aus beiden $\Delta G_u^0(T)$ (schwarz) für die Proteine *Bs-CspB*, *Bc-Csp R3E L66E* und *Kti11p(M⁻)* (von oben nach unten) jeweils bei 0.1 MPa und bei Maximaldruck bzw. bei 50% Entfaltung. Die Fehler sind teilweise kleiner als die Symbole. Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassung von Gleichung 4.2.6, Gleichung 4.2.7 und die Differenz beider Gleichungen dar.

6.2.1.4 Druckabhängige Betrachtung der Proteinvolumina anhand der Temperaturübergangsdaten

Die aus den Datensätzen der Temperaturübergänge bei unterschiedlichen, festgehaltenen Drücken gewonnenen Gibbs Energien $\Delta G_u^0(T) |_p$ können nicht nur über der Temperatur, sondern auch über den unterschiedlichen (fixen) Drücken $\Delta G_u^0(p) |_T$ aufgetragen

werden. Das ist nur sinnvoll, wenn die Entfaltungsübergänge reversibel sind. Anhand der nachfolgenden Diagramme für *Bs-CspB* in Abb. 6.2.11 kann man erkennen, dass diese Art der Darstellung auf Grund der Kurvenqualität verwendet werden kann.

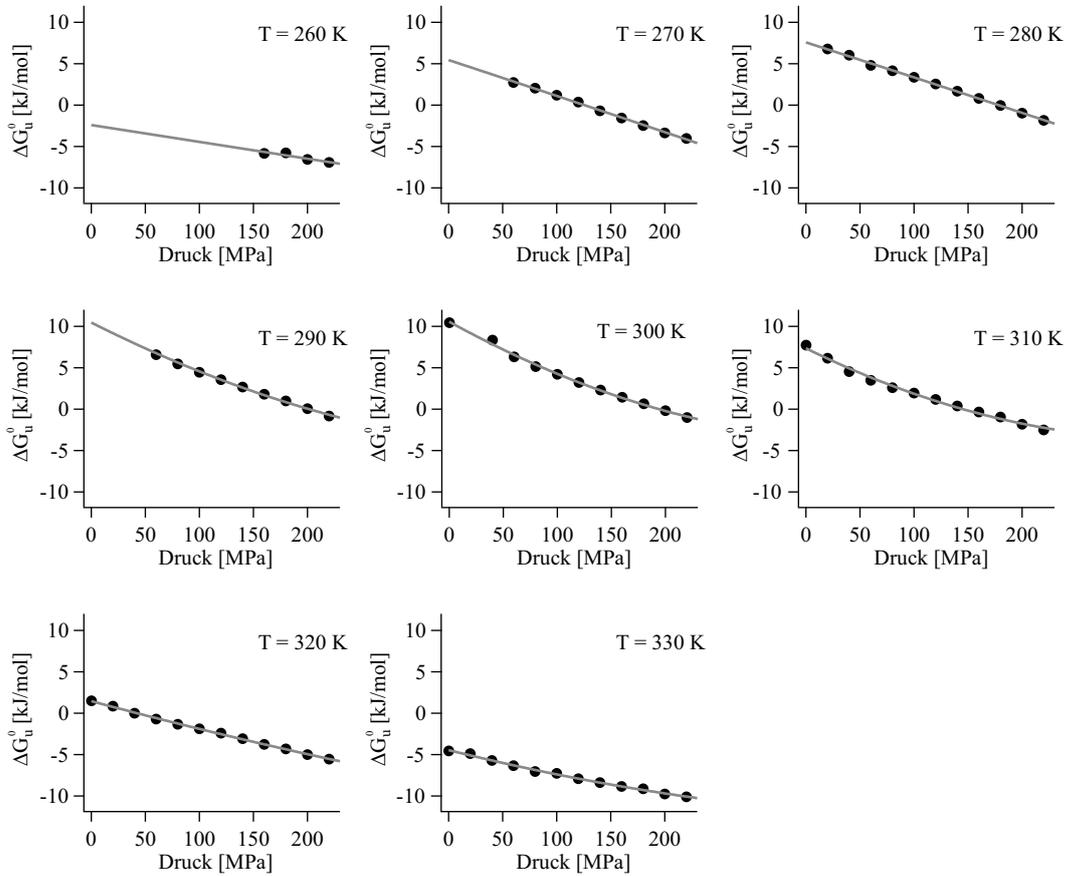


Abb. 6.2.11: *Bs-CspB*: Aus den Temperaturübergängen bei unterschiedlichen Drücken gewonnene freie Energien ΔG_u^0 über den jeweiligen Druck aufgetragen. Die durchgezogene Linie stellt die Anpassung von Gleichung 4.3.5 an die Datenpunkte dar. Die Regressionsergebnisse sind in 6.2.4a zusammengefasst.

Die geringe Anzahl der Messpunkte für *Bs-CspB* bei 260 K liegt darin begründet, dass erst ab 160 MPa bei solch geringen Temperaturen gemessen werden konnte. Gleiches gilt für das 270 K Diagramm, wo ab 60 MPa aufgezeichnet wurde. Diese Quasi-Druckübergangsdaten können mittels quadratischer Abhängigkeit von $\Delta G_u^0(p)$ über Gleichung 4.3.5 angepasst werden. Die so ermittelten Parameter für die Änderung der Gibbs Energie ΔG_0 , die Volumenänderung ΔV und die Kompressibilitätsänderung $\Delta \hat{\beta}$ bezüglich des Druckpunktes p_0 sind für *Bs-CspB* in Tab. 6.2.4a gelistet. Sie spiegeln die Differenz zwischen dem nativen und dem durch Hochdruck entfaltenen Zustand wieder. Die Verläufe zeigen insgesamt nur eine geringe quadratische Abhängigkeit und deuten auf einen sehr kleinen Wert der Kompressibilitätsänderung hin. Dabei wurden für die Temperaturen von 260 K bis 280 K auf Grund des zu geringen Wertes der Kompressibilitätsänderung $\Delta \hat{\beta}$ lineare Abhängigkeiten angenommen. Die größte Stabilität

zeigt sich bei 300 K mit $\Delta G_0 = 10555$ J/mol. Im Gegensatz zur direkten Temperaturübergangsmessung ein um etwa 2500 J/mol größerer Wert. Unterhalb und oberhalb 300 K fällt wie erwartet die Stabilität ab. Auch die Volumenänderung zwischen nativem und entfaltetem Zustand ist bei 300 K mit -72 ml/mol betragsmäßig am größten. Das negative Vorzeichen deutet darauf hin, dass das Volumen der entfalteten Spezies kleiner ist als das der nativen. Betragsmäßig wird die Volumenänderung ΔV unterhalb und oberhalb von 300 K kleiner. Demnach hat das System bei hohen als auch bei niedrigen Temperaturen ein kleineres Volumen als im nativen Zustand bei 298 K, da ΔV schließlich den Volumenunterschied zwischen dem aktuellen Volumen und dem Volumen der entfalteten Spezies aufzeigt. Bei 100% Entfaltung muss ΔV einen Wert von Null annehmen. Die Kompressibilitätsänderung ist ebenfalls bei etwa 300 K mit fast 0.1 ml/(mol MPa) am größten und fällt jenseits dieser Temperatur ab. Der positive Wert lässt eine höhere Kompressibilität im entfalteten Zustand erkennen. Aus diesen so gewonnen thermodynamischen Parametern lässt sich unter Zuhilfenahme von Gleichung 4.2.17 der Druckübergangspunkt p_m für die jeweilige Temperatur ermitteln. Der höchste p_m Wert liegt mit 180.4 MPa bei 280 K, wohingegen sich bei 300 K ein p_m Wert von 163.6 MPa ergibt. Unter hohen Drücken ist die größte Stabilität demnach nicht mehr um 298 K zu finden, sondern bei geringeren Temperaturen. Das steht im Widerspruch zu den vorangegangenen Erkenntnissen, dass sich mit steigendem Druck die Temperatur maximaler Stabilität T_{\max} zu höheren Temperaturen verschiebt (siehe Abb. 6.2.8). Diese kleine Diskrepanz wird nachfolgend auf den Seiten 78 und 105 anhand der thermischen Expansionsänderung $\Delta\hat{\alpha}$ diskutiert.

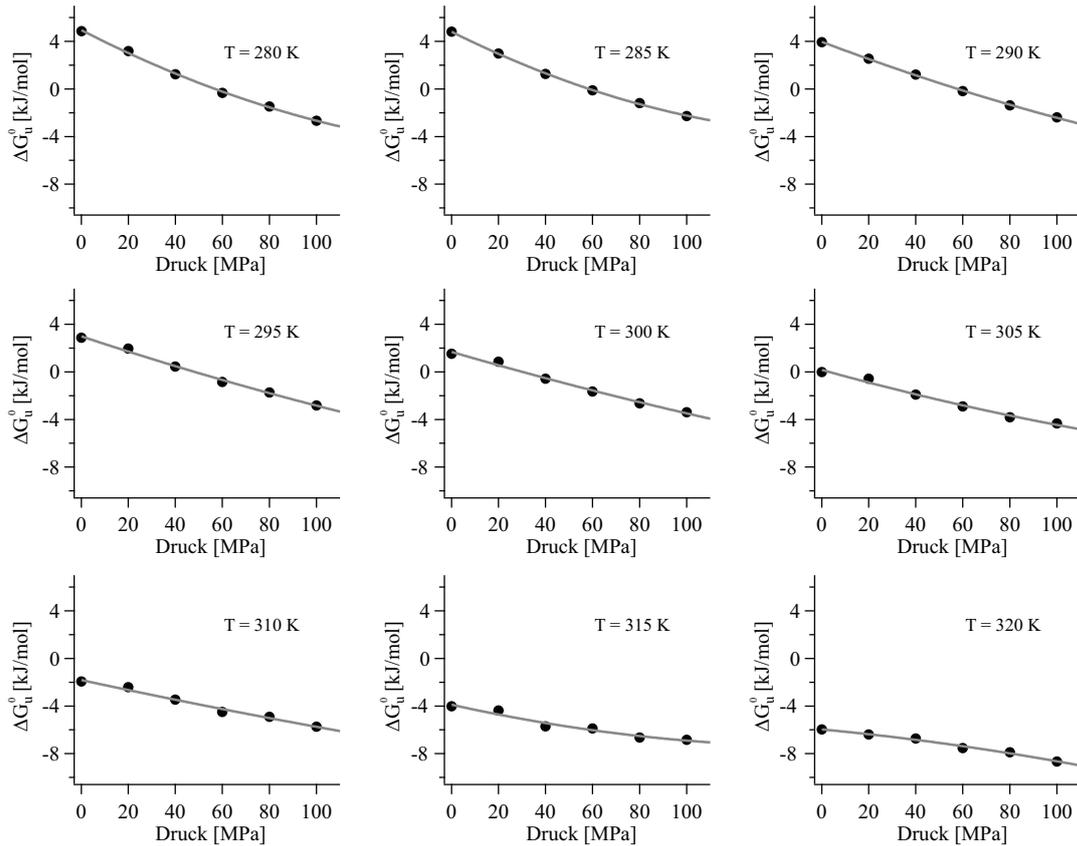


Abb. 6.2.12: *Bc-Csp R3E L66E*: Aus den Temperaturübergängen bei unterschiedlichen Drücken gewonnene freie Energien ΔG_u^0 über den jeweiligen Druck aufgetragen. Die durchgezogene Linie stellt die Anpassung von Gleichung 4.3.5 an die Datenpunkte dar. Die Regressionsergebnisse sind in 6.2.4b zusammengefasst.

Die Quasi-Druckübergänge der Doppelvariante *Bc-Csp R3E L66E* sind in Abb. 6.2.12 dargestellt. Im Gegensatz zum direkten Temperaturübergang, können hier sämtliche Messpunkte $\{T,p\}$ in die quantitative Auswertung aufgenommen werden. Die maximale Stabilität zeigt sich bei etwa 280 K und sinkt zu höheren Temperaturen ab. Hier ist ΔG_0 mit 4944 J/mol sehr vergleichbar mit dem $\Delta G_u^0(T_{\max})$ Wert bei 288 K von 5094 J/mol. Die maximale Volumenänderung liegt mit -101 ml/mol bei 280 K und zeigt bei steigender Temperatur betragsmäßig immer kleinere Werte. Im Gegensatz zum *Bs-CspB* ist die Kompressibilitätsänderung $\Delta \hat{\beta}$ hier um fast einen Faktor sechs größer und liegt zwischen 0.5 bis 0.56 ml/(mol MPa) bei Temperaturen zwischen 280 K und 285 K. Diese Eigenschaft verliert sich bei steigenden Temperaturen bis bei einhundertprozentiger Entfaltung ein $\Delta \hat{\beta}$ von Null vorliegen muss. Das wird durch den leicht negativen Wert von -0.16 ml/(mol MPa) bei 320 K angedeutet.

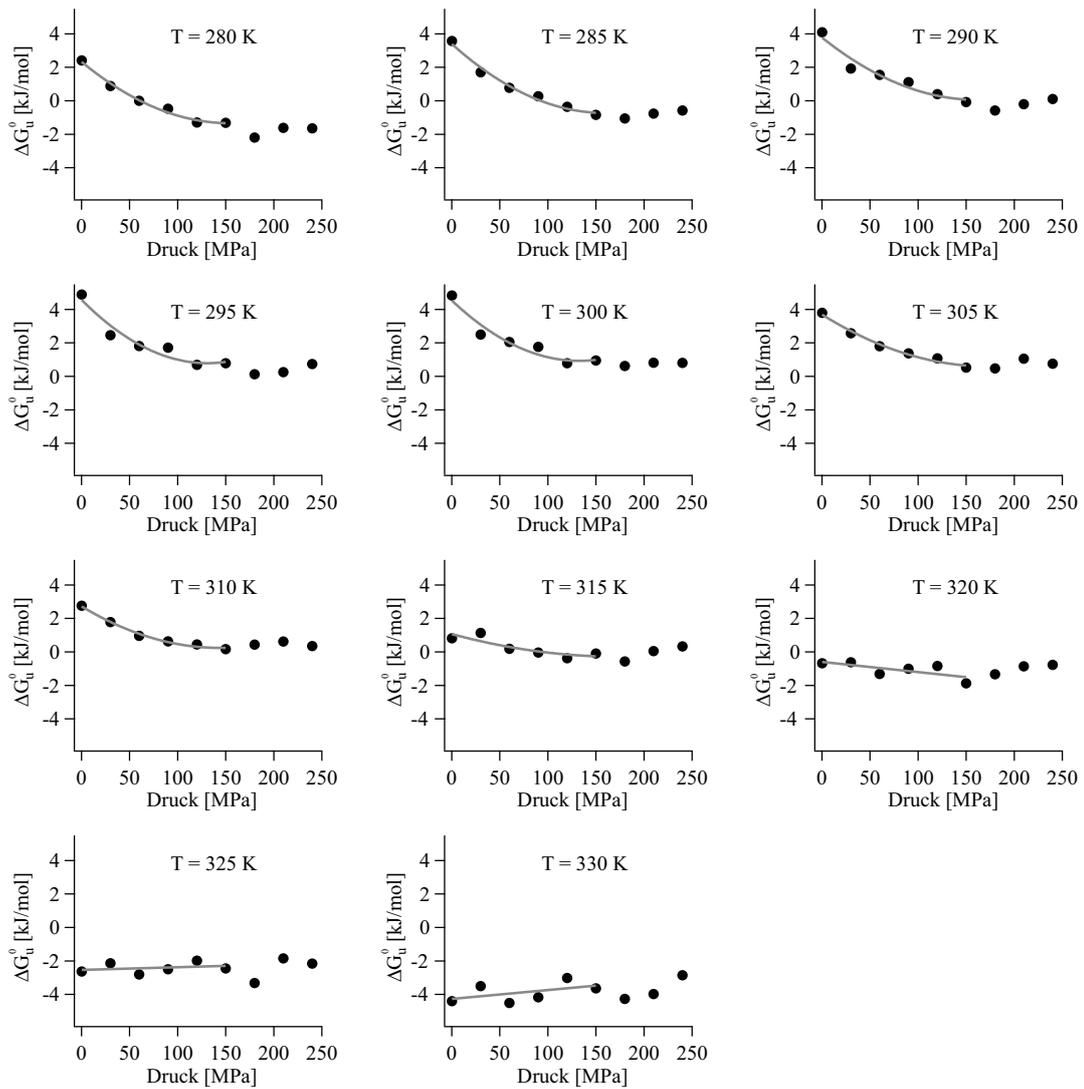


Abb. 6.2.13: Kti11p(M⁻): Druckabhängigkeit der Stabilität von Kti11p(M⁻) aus den in Natriumphosphat durchgeführten Temperaturübergängen. Die durchgezogene Linie stellt die Anpassung von Gleichung 4.3.5 an die Datenpunkte dar. Die Regressionsergebnisse sind in 6.2.4c zusammengefasst.

Das Protein Kti11p(M⁻) weist mit dieser Art Druckübergangsdarstellung ein bereits bei den Temperaturübergangsdarstellungen gezeigtes Phänomen auf. Bis zu einem Druck von etwa 150 MPa bis 180 MPa lässt sich ein Stabilitätsverlust erkennen. Bei noch höheren Drücken gewinnt das System an Stabilität zurück.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den durchgeführten Entfaltungsübergängen bei Kti11p(M⁻) im hohen Druckbereich um keine falsch interpretierten Daten handeln kann und es sich bei dem integrierten Bereich zur Bestimmung des entfaltenen Anteils f_u um ausschließlich native Resonanzsignale handelt, wurde mittels zweidimensionalem, heteronuklearem ¹H-¹³C ct-HSQC überprüft, ob keine Signale der entfalteten Spezies unter Druckeinwirkung hinzukommen. Es konnten keine derartigen Resonanzen beobachtet werden. Im integrierten Bereich verschieben sich in Abhängigkeit vom

Druck lediglich die Resonanzen, wobei kein Signal in den integrierten Bereich hinein- oder herauswandert.

Dieser Druckstabilisierungseffekt bei hohen Drücken könnte ein Anzeichen für einen intermediären Zustand sein. Später wird auf dieses mögliche Intermediat gezielt eingegangen. Es werden hier nur Daten des Systems zwischen nativem und entfaltetem Zustand untersucht. Deswegen wurde die quadratische Anpassung der Gleichung 4.3.5 an dieser Stelle nur bis zu einem Druck von 150 MPa durchgeführt. Die freie Enthalpie ΔG_0 ist bei 295 K mit 4577 J/mol am größten und stimmt somit sehr gut mit dem Wert von $\Delta G_u^0(T_{\max}) = 4420$ J/mol überein. Unter- und oberhalb dieser Temperatur nimmt die Stabilität ab. Sehr gut ist bei Kti11p(M⁻) der mit zunehmendem Druck kleiner werdende Anstieg zu erkennen. Die Volumenänderung ΔV zeigt bei 295 K ihren größten Wert von etwa -58 ml/mol und fällt jenseits dieser Temperatur betragsmäßig ab. Bei 325 K und 330 K kann sogar ein positiver Anstieg verzeichnet werden. Dieser positive Anstieg kann in der schlechten Datenlage bei hohen Temperaturen für dieses Protein begründet liegen oder möglicherweise vom Einfluß des intermediären Zustandes stammen. Die Kompressibilitätsänderung von Kti11p(M⁻) zeigt ein Maximum von 0.44 ml/(mol MPa) bei 295 K und fällt jenseits dieser Temperatur zu kleineren Werten ab.

Werden die Werte der Volumenänderung ΔV der drei Proteine aus Tab. 6.2.4 über der Temperatur aufgetragen, ergeben sich die in Abb. 6.2.14 (links) dargestellten Abhängigkeiten. Nach Gleichung 4.3.10 kann mittels dieser Relation die Änderung der thermischen Expansion $\Delta \hat{\alpha}$ ermittelt werden. Für Bs-CspB und auch für Kti11p(M⁻) lassen sich quadratische Abhängigkeiten $\Delta V(T)$ erkennen. Das Protein Bc-Csp R3E L66E zeigt eine lineare Abhängigkeit im gemessenen Temperaturbereich. Laut Gleichung 4.3.4 ergibt sich für das Volumen ΔV aber nur eine lineare Temperaturabhängigkeit mit Anstieg $\Delta \hat{\alpha}$ und einem Referenzvolumen ΔV_0 für $\Delta V(p_0, T_0)$. Ergänzt man diese Formel um einen quadratischen Term $q(T-T_0)^2$ und benutzt die allgemeine Gleichung 4.3.10 zur Ermittlung des Anstiegs beziehungsweise der Änderung der thermischen Expansion $\Delta \hat{\alpha}$, so ergibt sich für das Kälteschockprotein Bs-CspB die thermische Expansionsänderung bei der Temperatur maximaler Stabilität $T_0=298$ K nach diesem Modell ein Wert von $\Delta \hat{\alpha} = (0.061 \pm 0.15)$ ml/(mol K) und $\Delta V_0 = (-64.5 \pm 4.9)$ ml/mol.

Für Bc-Csp R3E L66E ergibt sich bei $T_0 = 288$ K nach linearer Regression eine thermische Expansionsänderung von (1.898 ± 0.171) ml/(mol K) und eine Volumenänderung $\Delta V_0 = (-84.8 \pm 3.1)$ ml/mol. Auf Grund des breiten Stabilitätsmaximums von Bc-Csp R3E L66E bei niedrigen Temperaturen, ist es nicht auszuschließen, dass bei Temperaturen unterhalb von 280 K die $\Delta V(T)$ Abhängigkeit ebenfalls wie bei Bs-CspB in einen quadratischen Verlauf übergeht. Da für dieses Protein, aus bereits oben genannten Gründen, jedoch keine Messdaten unterhalb dieser Temperaturen vorliegen, kann diese Annahme nicht durch Fakten belegt werden.

Bei $T_0 = 295$ K folgt für Kti11p(M⁻) nach dem quadratischen Modell eine thermische

T [K]	ΔG_0 [J/mol]	ΔV [ml/mol]	$\Delta \hat{\beta}$ [ml/(mol·MPa)]	p_m [MPa]
260	-2420 ± 1050	-20.3 ± 5.5	-	-
270	5438 ± 288	-43.1 ± 4.5	-	126.5 ± 6.5
280	7573 ± 124	-42.1 ± 2.4	-	180.4 ± 4.9
290	10460 ± 284	-65.9 ± 4.9	0.07 ± 0.02	174.8 ± 5.1
300	10555 ± 204	-71.9 ± 3.9	0.09 ± 0.02	163.6 ± 7.2
310	7347 ± 209	-64.3 ± 4.4	0.09 ± 0.02	125.9 ± 7.6
320	1449 ± 64	-34.9 ± 1.3	0.02 ± 0.01	42.0 ± 4.3
330	-4462 ± 91	-32.5 ± 1.9	0.03 ± 0.01	-

(a) *Bs*-CspB.

T [K]	ΔG_0 [J/mol]	ΔV [ml/mol]	$\Delta \hat{\beta}$ [ml/(mol·MPa)]	p_m [MPa]
280	4943 ± 123	-101.1 ± 5.8	0.50 ± 0.1112	57.0 ± 2.8
285	4819 ± 59	-98.8 ± 2.8	0.56 ± 0.05	58.7 ± 2.6
290	3974 ± 57	-75.0 ± 2.3	0.22 ± 0.05	58.0 ± 2.1
295	2992 ± 171	-65.6 ± 8.1	0.15 ± 0.15	48.3 ± 1.9
300	1685 ± 202	-57.6 ± 9.5	0.12 ± 0.18	30.3 ± 2.3
305	170 ± 223	-54.9 ± 10.5	0.17 ± 0.20	3.2 ± 2.6
310	-1815 ± 199	-42.7 ± 9.4	0.07 ± 0.18	-
315	-3885 ± 264	-44.1 ± 12.4	0.28 ± 0.24	-
320	-5965 ± 113	-18.6 ± 5.3	-0.16 ± 0.10	-

(b) *Bc*-Csp R3E L66E.

T [K]	ΔG_0 [J/mol]	ΔV [ml/mol]	$\Delta \hat{\beta}$ [ml/(mol·MPa)]	p_m [MPa]
280	2333 ± 170	-47.6 ± 5.3	0.30 ± 0.06	-
285	3398 ± 239	-51.7 ± 7.5	0.32 ± 0.10	-
290	3782 ± 406	-46.0 ± 12.7	0.28 ± 0.16	-
295	4576 ± 460	-57.9 ± 14.4	0.44 ± 0.18	-
300	4539 ± 435	-54.5 ± 13.7	0.42 ± 0.18	-
305	3693 ± 164	-35.9 ± 5.2	0.20 ± 0.06	-
310	2723 ± 112	-34.6 ± 3.5	0.24 ± 0.04	-
315	1067 ± 333	-15.5 ± 10.4	0.08 ± 0.13	-
320	-600 ± 269	-6.1 ± 2.9	-	-
325	-2541 ± 236	1.6 ± 2.6	-	-
330	-4274 ± 403	5.3 ± 4.4	-	-

(c) Kti11p(M⁻).

Tab. 6.2.4: Aus der quadratischen Anpassung von Abb. 6.2.11, Abb. 6.2.12 und Abb. 6.2.13 gewonnene Parameter für ΔG_0 , ΔV , $\Delta \hat{\beta}$ für *Bs*-CspB, *Bc*-Csp R3E L66E und Kti11p(M⁻). Bei den Proteinen *Bs*-CspB und *Bc*-Csp R3E L66E wurde zusätzlich der Druckübergangspunkt p_m ermittelt.

Expansionsänderung von $\Delta\hat{\alpha} = (0.220 \pm 0.272)$ ml/(mol K) mit einer Volumenänderung $\Delta V_0 = (-49.7 \pm 3.4)$ ml/mol.

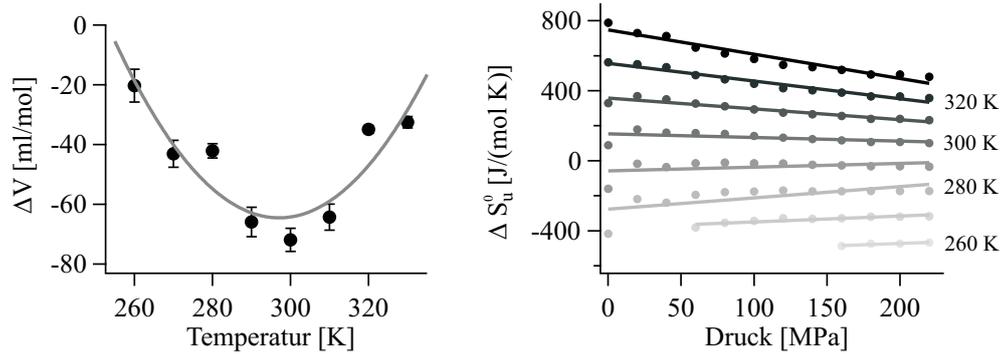
Die Resultate für die Volumina ΔV_0 liefern hier für alle drei Proteine sehr realistische Ergebnisse, für den linearen als auch für den quadratischen Ansatz. Sie sind mit den in Tab. 6.2.4 gelisteten Werten der Volumenänderungen ΔV bei der entsprechenden Temperatur maximaler Stabilität vergleichbar. Dahingegen liefert das Ergebnis für die thermische Expansionsänderung nur beim linearen Lösungsansatz für *Bc-Csp R3E L66E* brauchbare Ergebnisse. Für *Bs-CspB* und *Kti11p(M⁻)* liegen die $\Delta\hat{\alpha}$ Werte im korrekten Größenbereich, liefern aber einen Fehler, der den eigentlichen Wert übersteigt.

Die Änderung der thermischen Expansion $\Delta\hat{\alpha}$ lässt sich laut Gleichung 4.3.10 nicht nur aus dem Anstieg der Volumenänderung über der Temperatur ($\Delta V(T)$ Methode), sondern auch aus dem Anstieg der Entropieänderung ΔS_u^0 gegenüber dem Druck ermitteln ($\Delta S_u^0(p)$ Methode). Unter Verwendung von Gleichung 4.2.7 und Auftragung der Entropiewerte über dem Druck, ergibt sich das in Abb. 6.2.14 (rechts) dargestellte Diagramm. Der negative Anstieg der linearen Funktion ergibt die thermische Expansionsänderung. Die Ergebnisse für alle drei Proteine sind in Tab. 6.2.5 zu finden. Hierbei ist der Offset der linearen Funktion $\Delta S_0|_T$ nicht zu verwechseln mit dem Entropiewert $\Delta S_u^0(T_m)$. Der Wert $\Delta S_0|_T$ gleicht dem Wert $\Delta S_u^0(T_m)$ theoretisch nur bei der Übergangstemperatur T_m , also $\Delta S_0|_{T=T_m}$.

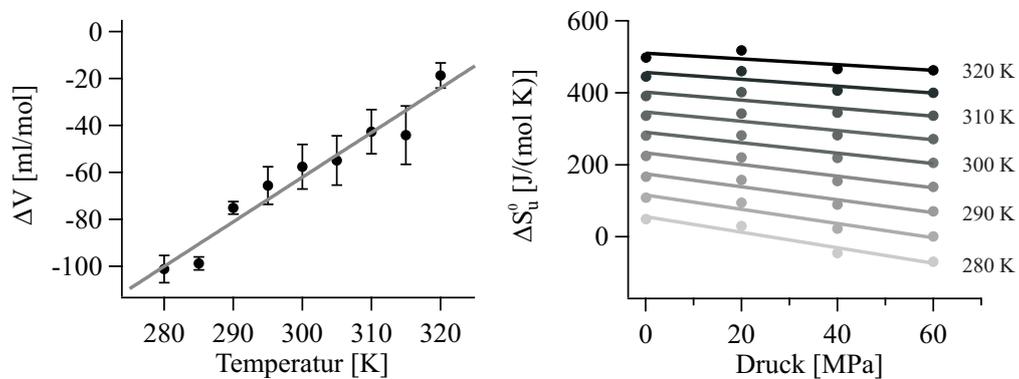
Sehr gut ist für *Bs-CspB* zu erkennen, dass der Anstieg nicht konstant ist, wie auch schon die Abhängigkeit $\Delta V(T)$ erkennen ließ, sondern eine Funktion der Temperatur darstellt. Der Wert der Expansionsänderung reicht von -0.288 ml/(mol K) bei 260 K bis 1.292 ml/(mol K) bei 330 K und liefert bei $T_0 = 298$ K einen $\Delta\hat{\alpha}$ Wert von 0.11 ml/(mol K). Das Resultat ist mit dem Ergebnis aus der $\Delta V(T)$ Methode vergleichbar. Die Fehlerwerte $\Delta\Delta\hat{\alpha}$ sind für *Bs-CspB* bei der $\Delta S_u^0(p)$ Methode um ein vielfaches kleiner als bei der $\Delta V(T)$ Methode.

Bei der Doppelvariante *Bc-Csp R3E L66E* in Abb. 6.2.14b (rechts) ist ein sehr viel kleinerer Anstiegsunterschied zu erkennen als bei *Bs-CspB*, was sich bereits aus der linearen Abhängigkeit aus der $\Delta V(T)$ Methode ableiten ließ. Die Ergebnisse der $\Delta\hat{\alpha}$ Werte liegen ausschließlich im positiven Segment und reichen von 2.151 ml/(mol K) bei 280 K bis 0.793 ml/(mol K) bei 320 K und erreicht bei $T_0 = 288$ K einen Wert von $\Delta\hat{\alpha} = 1.86$ ml/(mol K) und ist sehr gut mit dem Wert aus der $\Delta V(T)$ Methode vergleichbar. Die $\Delta\hat{\alpha}$ Werte sinken bei dieser Proteindoppelvariante mit zunehmender Temperatur ab, im Gegensatz zu *Bs-CspB*, wo sie ansteigen.

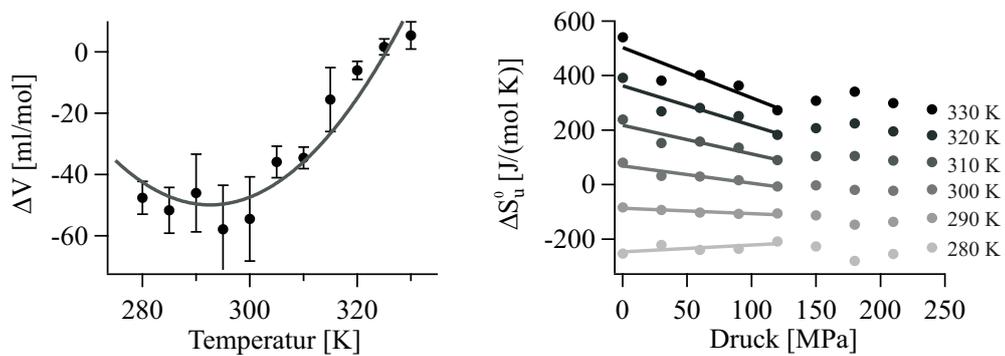
Aus den Verläufen des Proteins *Kti11p(M⁻)* ist ab etwa 150 MPa die für dieses Protein bereits bekannte, besondere Abhängigkeit zu erkennen (Abb. 6.2.14c (rechts)). Deswegen wurde die lineare Anpassung nur bis 120 MPa vorgenommen. Das Protein *Kti11p(M⁻)* zeigt ansonsten in der $\Delta S_u^0(p)$ Methode ähnliches Verhalten wie *Bs-CspB*. Die Expansionswerte reichen von -0.249 ml/(mol K) bei 280 K und 1.848 ml/(mol K) bei 330 K. Bei der Temperatur $T_0 = 295$ K ergibt sich somit ein Wert der thermischen



(a) *Bs-CspB*: Links: Abhängigkeit des Volumens von der Temperatur. Rechts: Die Entropie in Abhängigkeit vom Druck.



(b) *Bc-Csp R3E L66E*: Links: Abhängigkeit des Volumens von der Temperatur. Rechts: Die Entropie in Abhängigkeit vom Druck.



(c) *Kti11p(M⁻)*: Links: Abhängigkeit des Volumens von der Temperatur. Rechts: Die Entropie in Abhängigkeit vom Druck.

Abb. 6.2.14: Zur Ermittlung der thermischen Expansionsänderung $\Delta\hat{\alpha}$ für die drei ausgewählten Proteine *Bs-CspB*, *Bc-Csp R3E L66E* und *Kti11p(M⁻)*. Links: Änderung der Volumina ΔV für unterschiedliche Temperaturen aus den Tabellen 6.2.4a, 6.2.4b und 6.2.4c. Rechts: Auftragung der Entropieänderung bei konstanter Temperatur über dem Druck.

Expansionsänderung von $\Delta\hat{\alpha} = 0.41 \text{ ml}/(\text{mol K})$ und ist mit dem Wert aus der $\Delta V(T)$ Methode vergleichbar.

In Abb. 6.2.15 sind die Temperaturabhängigkeiten der thermischen Expansionsänderung $\Delta\hat{\alpha}(T)$ für alle Proteine nochmals grafisch festgehalten. Während diese Abhängigkeiten für *Bc-Csp R3E L66E* und *Kti11p(M⁻)* definitiv linear sind, treten beim *Bs-CspB* Protein für die Temperaturen 260 K und 270 K zwei Ausreißer vom linearen Verhalten auf. Oberhalb von 280 K zeigt auch *Bs-CspB* einen eindeutig linearen Verlauf. Diese Ausreißer könnten mit den geringen Messwerten bei 260 K und 270 K erklärt werden, da diese Temperaturen dem Messverfahren erst ab einem bestimmten Hochdruck zugänglich sind.

T [K]	$\Delta\hat{\alpha}$ [ml/(mol·K)]	$\Delta S_0 _T$ [J/(mol·K)]
260	-0.288 ± 0.096	-530.3 ± 18.4
270	-0.335 ± 0.064	-383.2 ± 9.5
280	-0.644 ± 0.231	-276.2 ± 30.0
290	-0.209 ± 0.164	-57.4 ± 21.3
300	0.211 ± 0.103	153.9 ± 13.4
310	0.617 ± 0.058	358.3 ± 7.6
320	1.011 ± 0.065	556.2 ± 8.5
330	1.393 ± 0.112	748.0 ± 14.6

(a) *Bs-CspB*.

T [K]	$\Delta\hat{\alpha}$ [ml/(mol·K)]	$\Delta S_0 _T$ [J/(mol·K)]
280	2.151 ± 0.381	55.5 ± 14.3
285	1.971 ± 0.389	115.7 ± 14.5
290	1.794 ± 0.397	174.9 ± 14.9
295	1.620 ± 0.406	233.0 ± 15.2
300	1.449 ± 0.416	290.2 ± 15.6
305	1.281 ± 0.427	346.4 ± 16
310	1.116 ± 0.438	401.8 ± 16.4
315	0.953 ± 0.449	456.2 ± 16.8
320	0.793 ± 0.461	509.8 ± 17.2

(b) *Bc-Csp R₃E L66E*.

T [K]	$\Delta\hat{\alpha}$ [ml/(mol·K)]	$\Delta S_0 _T$ [J/(mol·K)]
280	-0.249 ± 0.149	-246.7 ± 10.9
285	-0.023 ± 0.086	-166.0 ± 6.3
290	0.199 ± 0.045	-86.6 ± 3.3
295	0.417 ± 0.075	-8.6 ± 5.5
300	0.632 ± 0.133	68.1 ± 9.8
305	0.842 ± 0.195	143.5 ± 14.3
310	1.050 ± 0.257	217.7 ± 18.9
315	1.254 ± 0.318	290.7 ± 23.4
320	1.455 ± 0.378	362.6 ± 27.8
325	1.653 ± 0.438	433.3 ± 32.2
330	1.848 ± 0.497	503.0 ± 36.5

(c) *Kti11p(M⁻)*.

Tab. 6.2.5: Aus der linearen Anpassung der Abhängigkeit ΔS_u^0 vom Druck gewonnene Parameter aus Abb. 6.2.14 (rechts) für die thermische Expansionsänderung $\Delta\hat{\alpha}$ und dem Nullpunktwert $\Delta S_0|_T$.

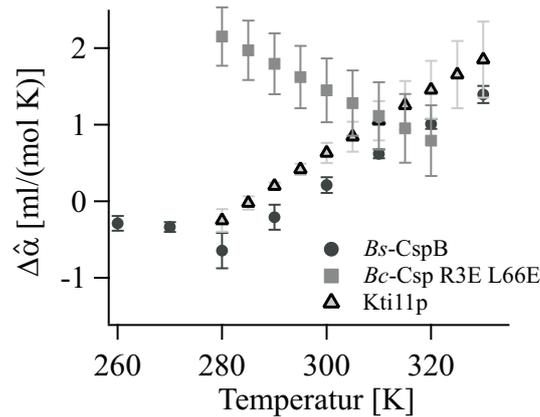


Abb. 6.2.15: Abhängigkeit der thermischen Expansionsänderung $\Delta\hat{\alpha}$ von der Temperatur für die Proteine *Bs-CspB*, *Kti11p*(M⁻) und *Bc-Csp R3E L66E*.

6.2.2 Druckübergänge bei konstanten Temperaturen

Analog zu den Temperaturübergängen bei konstantem Druck, wurden Druckübergänge bei konstanter Temperatur aufgenommen, um die Qualität und Quantität der Quasi-Druckübergänge aus vorangegangenen Abschnitt zu überprüfen. Unter Berücksichtigung von Gleichung 4.3.8 gibt diese Art von Entfaltungsübergang, im Gegensatz zur Temperaturentfaltung, direkt Aufschluß über die Volumenänderung ΔV und Kompressibilitätsänderung $\Delta\hat{\beta}$ zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand.

In den Abbildungen 6.2.16 bis 6.2.18 sind die Protonenspektren der Proteine *Bs-CspB*, *Bc-Csp R3E L66E* und *Kti11p*(M⁻) für verschiedene Drücke und bei unterschiedlichen fixen Temperaturen dargestellt. Wie bereits aus den Temperaturübergängen bei hohen Drücken zu erkennen war, kann hier direkt aus den Protonenspektren verzeichnet werden, dass erhöhter Druck das Gleichgewicht des Systems vom nativen in den entfaltenen Zustand überführt, was sich im Absinken der Signalintensität im nativen Bereich (isolierte Methylgruppen im Hochfeld) bemerkbar macht. Da sich unter Druckerhöhung die einzelnen Kernspinresonanzen anders verschieben als bei Temperaturerhöhung, mussten die integrierten Bereiche entsprechend angepasst werden. Der Anteil an entfaltetem Protein f_u wird dadurch gegenüber den Temperaturübergängen nicht beeinflusst. Das Resultat von f_u ist für beide Übergangsmethoden bei einem bestimmten Messpunkt $\{p, T\}$ identisch. Bei Null ppm sieht man in allen Spektren die DSS(d6) Linie.

Für das Kälteschockprotein *Bs-CspB* liegen Druckübergänge für zwei unterschiedliche Temperaturen bei $T = 293$ K und $T = 298$ K vor. Der Druck wurde hier in 20 MPa Schritten von 0.1 MPa bis 200 MPa erhöht. Ein leichtes Absinken der isolierten Methylgruppen kann bei $T = 293$ K und auch bei $T = 298$ K erkannt werden. Wegen der geringen Temperaturdifferenz unterscheiden sich die Übergänge wenig.

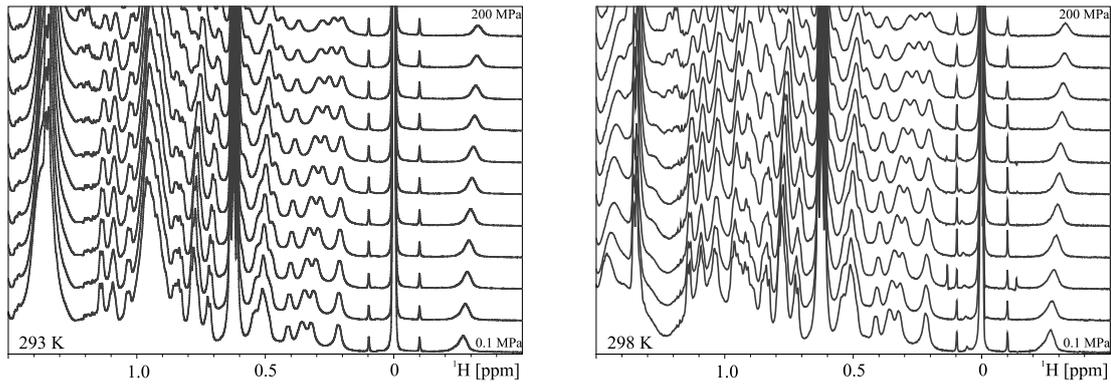


Abb. 6.2.16: *Bs-CspB*: Druckabhängigkeit der Protonensignale im aliphatischen Bereich für die Temperaturen 293 K und 298 K. Der native integrierte Bereich erstreckt sich hier von 0.14 ppm bis 0.45 ppm, wohingegen der integrierte Bereich des entfaltenen Anteils auf 0.45 ppm bis 1.2 ppm festgelegt wurde.

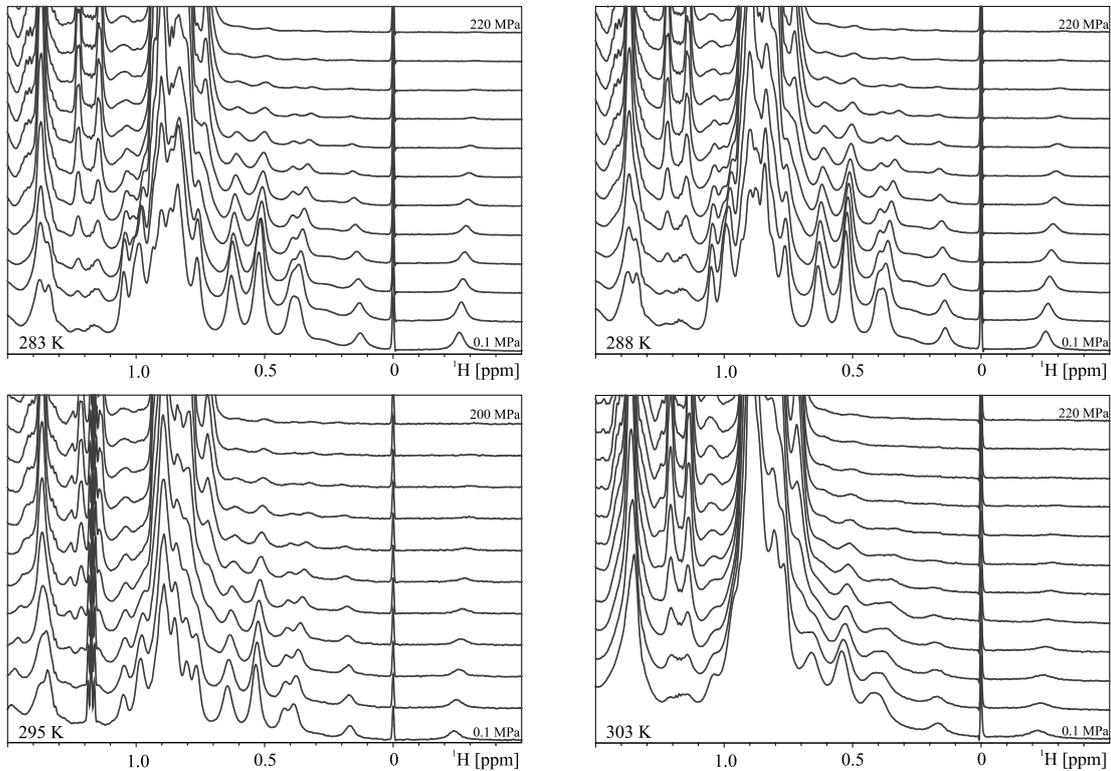


Abb. 6.2.17: *Bc-Csp R3E L66E*: Protonenspektrum in Abhängigkeit vom Druck bei 283 K, 288 K, 295 K und 303 K. Nur der aliphatische Bereich ist dargestellt. Der native integrierte Bereich erstreckt sich hier von -0.7 ppm bis -0.1 ppm und von 0.04 ppm bis 0.465 ppm, wohingegen der integrierte Bereich des entfaltenen Anteils auf 0.465 ppm bis 1.477 ppm festgelegt wurde.

Die Spektren der Druckübergänge des Proteins *Bc-Csp R3E L66E* sind für vier verschiedene Temperaturen bei 283 K, 288 K, 295 K und 303 K in Abb. 6.2.17 dargestellt. Der Druck wurde in 10 MPa Schritten bis 220 MPa erhöht. Der Übersichtlichkeit halber sind in der Abbildung die Spektren in 20 MPa Schritten dargestellt. Sehr deutlich ist

der Intensitätsverlust der nativen Signale bei ansteigendem Druck zu erkennen. Bei höheren Temperaturen tritt der vollständige Signalverlust durch Druckerhöhung entsprechend eher ein als bei der 283 K und 288 K Messung.

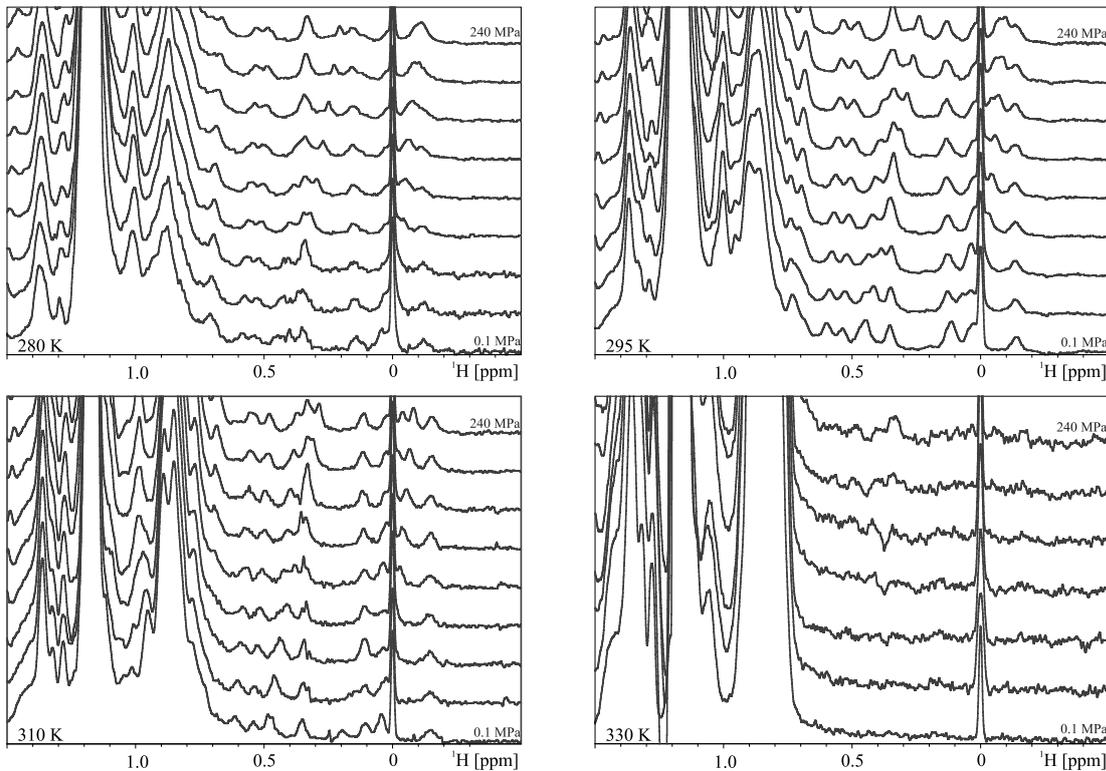


Abb. 6.2.18: Kti11p(M⁻): Protonenspektren bei 280 K, 295 K, 310 K und 330 K in Abhängigkeit des Druckes im TRIS/HCl Puffer mit jeweils voreingestelltem pH-Wert. Der native integrierte Bereich erstreckt sich hier von 0.204 ppm bis 0.629 ppm, wohingegen der integrierte Bereich des entfalten Anteils auf 0.629 ppm bis 0.970 ppm festgelegt wurde.

Für das Zinkfingerprotein Kti11p(M⁻) sind die Protonenspektren der Druckübergänge bei vier unterschiedlichen Temperaturen von 280 K, 295 K, 310 K und 330 K in Abb. 6.2.18 aufgezeigt. Es sei daran erinnert, dass für das Protein Kti11p(M⁻) ein Pufferwechsel gegenüber der Temperaturübergangsmessungen vorgenommen wurde. Die Druckübergangsmessungen wurden nicht in Phosphatpuffer, sondern in TRIS/HCl Puffer durchgeführt. Wie bereits oben erwähnt, weist der Phosphatpuffer sehr druckabhängige pK_a-Werte auf. Da der TRIS/HCl Puffer eine starke Temperaturabhängigkeit bezüglich des pK_a-Wertes zeigt, musste für die jeweilige fest eingestellte Temperatur, der pH-Wert der Lösung voreingestellt werden.

Die Druckübergangsmessungen des Kti11p(M⁻) Proteins wurden in 30 MPa Schritten von 0.1 MPa bis 240 MPa durchgeführt. Bei 295 K lässt sich eindeutig der stabilste Zustand dieses Proteins gegenüber den anderen Messungen erkennen. Anhand der Spektren ist bei 295 K kaum ein Abfallen der Signalintensitäten zu erkennen. Lediglich ist eine Verschiebung der Protonenresonanzen auszumachen. Bei 310 K lässt sich

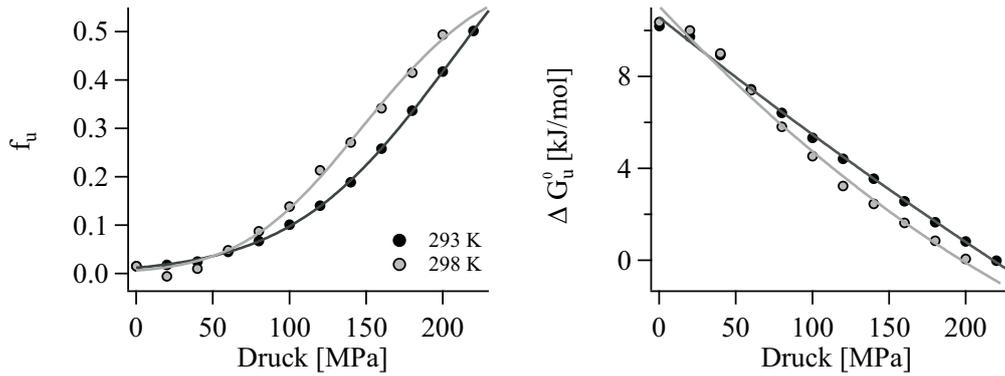
mit steigendem Druck ein erneutes Anwachsen der separierten, aliphatischen Protonensignale ausmachen. Diese Stabilisierung kann bei der 330 K Messung ebenfalls beobachtet werden.

Der aus diesen Spektren ermittelte Anteil f_u des entfalteten Proteins wurde analog zu der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Methode bestimmt. Die Ergebnisse des Kälteschockproteins *Bs-CspB* sind in Abb. 6.2.19a zu sehen. Links ist der aus den Protonenspektren ermittelte Anteil an entfaltetem Protein $f_u(p)$ über dem Druck für die Temperaturen 293 K und 298 K aufgetragen. Die sich daraus ergebende Änderung der freien Enthalpie $\Delta G_u^0(p)$ ist in dieser Abbildung rechts dargestellt. Aus dem $f_u(p)$ Diagramm läßt sich ein sigmoidaler Verlauf erkennen. Bei der Temperatur maximaler Stabilität läßt sich via Druckentfaltung der entfaltete Zustand von *Bs-CspB* bis zu etwa 50% populieren, was einem ΔG_u^0 Wert von Null entspricht. Die Gleichung 4.2.16 zur Bestimmung der Funktion $f_u(p)$ konnte im Fall des Proteins *Bs-CspB* nur unzureichend an den Datensatz der entfalteten Anteile angepasst werden, da die Datenpunktmenge nur bis zum Übergangsmittelpunkt des sigmoidalen Verlaufs reicht. Trotzdem ist der Verlauf der Funktion in Abb. 6.2.19a (links) angedeutet. Die Parameter ΔG_0 , die Volumenänderung ΔV und die Kompressibilitätsänderung $\Delta \hat{\beta}$ wurden aus der Abhängigkeit $\Delta G_u^0(p)$ mittels quadratischer Anpassung über die Gleichung 4.2.14 bestimmt. Aus den so gewonnenen Parametern konnte über Gleichung 4.2.17 der Übergangsdruck p_m ermittelt werden. Die Resultate sind in Tab. 6.2.6a aufgelistet. Die Ergebnisse stimmen sehr gut mit den Ergebnissen aus den Quasi-Druckübergängen (Tab. 6.2.4a) überein. Bei stabilster Temperatur $T = 298$ K ergibt sich ein Wert von $\Delta G_0 = 11052$ J/mol, eine Volumenänderung von -70.5 ml/mol und eine Kompressibilitätsänderung von 0.15 ml/(mol MPa). Diese weist einen recht großen Fehler von etwa 50% auf, ist aber somit vergleichbar mit den Ergebnissen aus den Temperaturübergängen beziehungsweise Quasi-Druckübergängen. Einzig weicht der Druckübergangspunkt p_m innerhalb des Fehlerbereiches etwas vom vorigen Resultat ab. Hier ergibt sich ein etwas höherer Wert von 197.4 MPa, wohingegen der Quasi-Druckübergangswert für 300 K lediglich bei 163.6 MPa liegt.

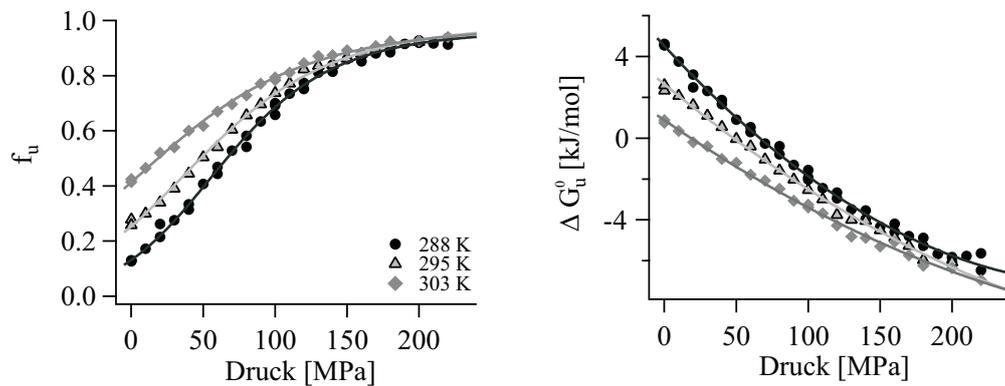
Für die Doppelvariante des Kälteschockproteins *Bc-Csp R3E L66E* ergeben sich sehr aussagekräftige, sigmoidale $f_u(p)$ Übergangskurven, die in Abb. 6.2.19b aufgezeigt sind. Bei den hier angelegten Maximaldrücken von 220 MPa ist eine fast 100%ige Entfaltung zu erkennen. Hier zeigt sich nochmals, dass das Protein selbst unter stabilsten Bedingungen von 288 K und 0.1 MPa zu einem nicht zu vernachlässigenden Anteil von etwa 13% entfaltet vorliegt, da die Übergangskurve kaum ein unteres Plateau aufweist. Auf Grund der guten Datenlage konnte hier zur Ermittlung der Werte ΔG_0 , ΔV und $\Delta \hat{\beta}$ die Gleichung 4.2.16 zur $f_u(p)$ Abhängigkeit verwendet werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.2.6b zu finden. Vergleichsweise wurde zur Bestimmung der Parameter ebenso die Gleichung 4.2.14 zur $\Delta G_u^0(p)$ Abhängigkeit verwendet, deren Resultate in Tab. 6.2.6c aufgezeigt sind. Die aus diesen beiden Abhängigkeiten gewonnene Pa-

parameter sind innerhalb derer Fehlergrenzen vollkommen vergleichbar. Im Vergleich zu den Quasi-Druckübergangsdaten aus Tab. 6.2.4b stimmen die ΔG_0 sehr gut überein und liegen bei der Temperatur höchster Stabilität von $T = 288$ K bei 4751 J/mol. Ebenfalls passen die Volumenänderungen ΔV zu den aus den Temperaturübergängen gewonnenen Werte im zulässigen Fehlerbereich überein. Lediglich bei niedrigen Temperaturen ergeben sich beim direkten Druckübergang etwas kleinere Volumenänderungen (Tab. 6.2.6c). Bei $T = 288$ K ergibt sich hier ein Wert von -79.9 ml/mol. Auch die Kompressibilitätsänderung $\Delta \hat{\beta}$ ist mit den aus den Quasi-Druckübergängen gewonnenen Werten (Tab. 6.2.4b) sehr vergleichbar, nur können auch hier bei niedrigen Temperaturen leichte Abweichungen verzeichnet werden. Bei $T = 288$ K ergibt sich bei direktem Druckübergang $\Delta \hat{\beta} = 0.25$ ml/(mol MPa). Die Druckübergangspunkte p_m weichen etwas von der Temperaturübergangsmethode ab und liegen hier bei etwas höheren Werten. Bei 288 K beträgt der Wert $p_m = 66.4$ MPa.

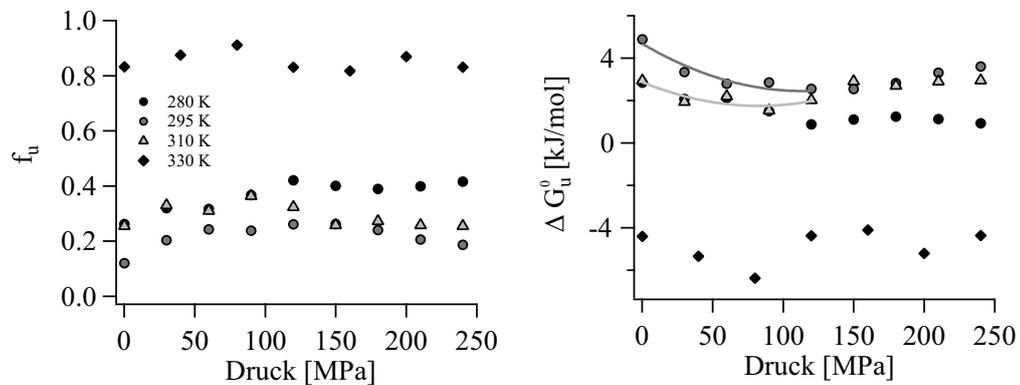
Die Druckstabilität des Proteins Kti11p(M⁻) ist anhand der $f_u(p)$ Werte in Abb. 6.2.19c (links) und bezüglich der freien Enthalpie $\Delta G_u^0(p)$ in diesem Diagramm rechts zu sehen. Der Verlauf der $\Delta G_u^0(p)$ Abhängigkeiten ist qualitativ gleichwertig mit den Quasi-Druckübergängen. Die Qualität ist bei den direkten Druckübergängen jedoch schlechter, weswegen Gleichung 4.2.14 nur an die Übergänge bei 295 K und 310 K angepasst werden konnte. Die Gleichung 4.2.16 zur $f_u(p)$ Bestimmung konnte auch hier nicht verwendet werden. Wie aus den Spektren schon erkennbar, zeigen sich hier recht schwache Druckabhängigkeiten, die aber ab etwa 120 MPa bis 150 MPa wiederum eine Stabilitätssteigerung aufweisen. Aus diesem Grund wurde die Gleichung nur bis 120 MPa angepasst, um den Einfluss eines möglichen Intermediates zu minimieren. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.2.6d zu finden. Somit ergeben sich für ΔG_0 , ΔV und $\Delta \hat{\beta}$ Werte, welche im Rahmen der Fehler mit denen aus den Temperaturübergängen, übereinstimmen (Tab. 6.2.4c). Bei stabilster Temperatur von 295 K hat dieses Protein eine Gibbs-Energie von $\Delta G_0 = 4678$ J/mol, eine Volumenänderung von -39.2 ml/mol und eine Kompressibilitätsänderung von $\Delta \hat{\beta} = 0.32$ ml/(mol MPa). Druckübergangspunkte p_m wurden hier nicht bestimmt.



(a) *Bs-CspB*: Links: Abhängigkeit des entfalteten Anteils vom Druck $f_u(p)$ und Anpassung nach Gleichung 4.2.16. Rechts: Abhängigkeit der freien Enthalpie $\Delta G_u^0(p)$ nach Gleichung 4.2.14.



(b) *Bc-Csp R3E L66E*: Links: Abhängigkeit des entfalteten Anteils vom Druck $f_u(p)$ nach Gleichung 4.2.16. Rechts: Abhängigkeit der freien Enthalpie $\Delta G_u^0(p)$ nach Gleichung 4.2.14.



(c) *Kti11p(M⁻)* im pH angepassten TRIS/HCl Puffer: Links: Abhängigkeit des entfalteten Anteils vom Druck $f_u(p)$. Rechts: Abhängigkeit der freien Enthalpie $\Delta G_u^0(p)$ und Anpassung nach Gleichung 4.2.14.

Abb. 6.2.19: Druckabhängigkeit für ausgewählte Temperaturen der drei Proteine. Links: Abhängigkeit des entfalteten Anteils vom Druck. Rechts: Abhängigkeit der freien Enthalpie. Die Regressionsergebnisse sind in Tab. 6.2.6 gelistet.

T [K]	ΔG_0 [J/mol]	ΔV [ml/mol]	$\Delta \hat{\beta}$ [ml/(mol·MPa)]	p_m [MPa]
293	10574 ± 160	-53.1 ± 3.4	0.04 ± 0.02	217.9 ± 8.3
298	11052 ± 317	-70.5 ± 7.4	0.15 ± 0.07	197.4 ± 9.4

(a) *Bs-CspB* aus $\Delta G_u^0(p)$ Abhängigkeit.

T [K]	ΔG_0 [J/mol]	ΔV [ml/mol]	$\Delta \hat{\beta}$ [ml/(mol·MPa)]	p_m [MPa]
283	4758 ± 46	-79.8 ± 1.3	0.26 ± 0.02	67.0 ± 2.6
288	4457 ± 99	-74.7 ± 2.2	0.23 ± 0.02	66.6 ± 2.7
295	2628 ± 73	-56.1 ± 2.1	0.10 ± 0.03	49.1 ± 1.9
303	819 ± 50	-45.7 ± 1.6	0.08 ± 0.02	18.3 ± 2.0

(b) *Bc-Csp R3E L66E* aus $f_u(p)$ Abhängigkeit.

T [K]	ΔG_0 [J/mol]	ΔV [ml/mol]	$\Delta \hat{\beta}$ [ml/(mol·MPa)]	p_m [MPa]
283	4751 ± 38	-79.9 ± 1.1	0.26 ± 0.01	66.7 ± 2.5
288	4516 ± 95	-76.4 ± 2.0	0.25 ± 0.02	66.4 ± 2.4
295	2646 ± 92	-58.2 ± 2.3	0.13 ± 0.02	48.2 ± 1.8
303	881 ± 85	-48.5 ± 1.9	0.11 ± 0.02	18.7 ± 2.1

(c) *Bc-Csp R3E L66E* aus $\Delta G_u^0(p)$ Abhängigkeit.

T [K]	ΔG_0 [J/mol]	ΔV [ml/mol]	$\Delta \hat{\beta}$ [ml/(mol·MPa)]	p_m [MPa]
295	4678 ± 282	-39.2 ± 8.8	0.34 ± 0.11	-
310	2868 ± 337	-27.1 ± 13.3	0.32 ± 0.21	-

(d) *Kti11p(M⁻)* aus $\Delta G_u^0(p)$ Abhängigkeit.

Tab. 6.2.6: Die aus der quadratischen Anpassung von $\Delta G_u^0(p)$ gewonnenen Parameter für ΔG_0 , ΔV und $\Delta \hat{\beta}$, sowie der Übergangsdruckpunkt p_m .

Aus der Abhängigkeit der Volumenänderung von der Temperatur $\Delta V(T)$ ergibt sich die thermische Expansionsänderung $\Delta \hat{\alpha}$. Das macht auf Grund der geringen Datenlage nur Sinn für das Protein *Bc-Csp R3E L66E*. Zumal hier ein doppelter Satz an Resultaten, einer aus der $f_u(p)$ und einer aus der $\Delta G_u^0(p)$ Beziehung, vorhanden ist. Die grafische Darstellung $\Delta V(T)$ ist in Abb. 6.2.20 zu sehen.

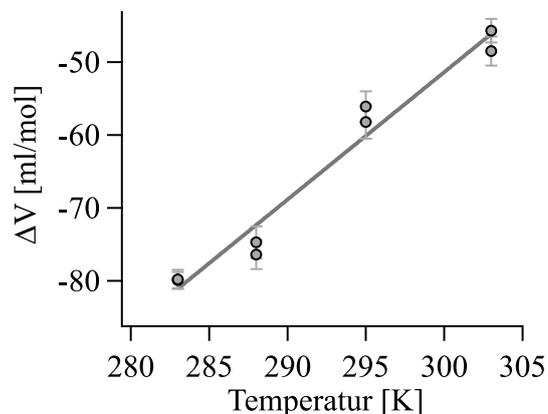


Abb. 6.2.20: *Bc-Csp R3E L66E*: Darstellung der Volumenänderungsabhängigkeit von der Temperatur $\Delta V(T)$ zur Ermittlung der thermischen Expansionsänderung $\Delta \hat{\alpha}$.

Aus der linearen Anpassung der Gleichung 4.3.4 ergibt sich für *Bc-Csp R3E L66E* bei einer Temperatur $T_0 = 288$ K eine Volumenänderung $\Delta V_0 = (-72.3 \pm 1.2)$ ml/mol und eine thermische Expansionsänderung $\Delta \hat{\alpha} = (1.747 \pm 0.136)$ ml/(mol K). Damit ist der $\Delta \hat{\alpha}$ Wert mit den aus der Temperaturmethode ermittelten indirekten Ergebnissen im Rahmen der Fehlergrenzen gleich.

6.2.3 Der Druck-Temperatur Phasenraum

6.2.3.1 Das Protein-Stabilitätsgebirge über Druck und Temperatur

Anhand der nun vorliegenden Datenfülle an Stabilitätswerten für verschiedenste Temperaturen und Drücke in einem weiten Bereich, von der Kälte- zur Hitze- und Druckdenaturierung, kann die Gibbs Energie $\Delta G_u^0(T, p)$ für die drei untersuchten Proteine *Bs-CspB*, *Bc-Csp R3E L66E* und *Kti11p(M⁻)* als dreidimensionales Stabilitätsgebirge dargestellt werden Abb. 6.2.21 (links). Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Punkte in diesem drei-dimensionalen Raum über eine implementierte, farbige Oberfläche miteinander verbunden. Sie ist keine angepasste Funktion der Gleichung 4.3.6. Projiziert man diese Stabilitätslandschaft in den Druck-Temperatur Phasenraum, so ergibt sich der in Abb. 6.2.21 (rechts) dargestellte Konturplot. Die unterschiedlichen Höhenlinien spiegeln die verschiedenen Stabilitätswerte ΔG_u^0 wieder. Wie in Abschnitt 4.3 erwähnt, wird die Phasengrenze eines Proteins per Definition auf den Wert ΔG_u^0 gleich Null festgesetzt. Diese Höhenlinie ist im Diagramm schwarz hervorgehoben.

Für das Kälteschockprotein *Bs-CspB* ist in Abb. 6.2.21a sehr gut zu erkennen, dass im 3-D Plot vom Punkt maximaler Stabilität (p_0, T_0) ausgehend, in alle Richtungen, die Gibbs Energie abnimmt - in die Hochdruckrichtung eher linear, in den niedrigen und hohen Temperaturbereich nichtlinear. Dabei ist die Denaturierung in Richtung hoher Temperaturen eindeutig zu erkennen, wohingegen die Kältedenaturierung erst bei Drücken oberhalb 100 MPa klar hervortritt. Ebenfalls ist die Druckdenaturierung bis zu $f_u = 0.5$ bei etwa 200 MPa zu sehen. Für diese Darstellung wurden nur die Daten aus den Temperaturübergängen verwendet. Aus dem Konturplot lässt sich eine elliptische Form der Kälteschockprotein-Phasengrenze erkennen. Diese elliptische Form ist nicht auf die Phasengrenze bei 50% Entfaltung begrenzt, sondern ist für jede Energie ober- und unterhalb dieses Schwellwertes ersichtlich.

Für den dreidimensionalen Stabilitätsplot der Doppelvariante *Bc-Csp R3E L66E* wurden die Daten der Temperatur- als auch der Druckübergänge verwendet. Sehr deutlich tritt für jeden Druckpunkt die Hitzedenaturierung hervor. Da dieses Protein bereits bei etwa 60 MPa zur Hälfte druckentfaltet vorliegt, wurden bei diesen und höheren Druckmessungen keine Niedrigtemperaturdaten aufgenommen, da diese schlussendlich nicht zur Ellipse der Phasengrenze beitragen können. Aus diesem Grund

kann im Stabilitätsgebirge so gut wie keine Kältedenaturierung erkannt werden, zumal *Bc-Csp R3E L66E* sehr kälteunempfindlich ist, wie aus obigen Resultaten entnommen werden kann. Im Gegensatz dazu ist sehr gut die Druckdenaturierung erkennbar, die bei 220 MPa zu fast 100% vorliegt. Demnach lässt sich auch im Konturplot dieses Proteins bei der Phasengrenze $\Delta G_u^0 = 0$ nur ein kleiner elliptischer Bereich ausmachen. Die Ellipse zeichnet sich auf Grund der unzureichenden Kältedenaturierungsdaten nicht so ausgeprägt ab, wie es bei *Bs-CspB* der Fall ist.

Auch beim Zinkfingerprotein *Kti11p(M⁻)* wurden nur die Daten aus den Temperaturübergängen in das $\Delta G_u^0(p, T)$ Diagramm implementiert. Es lässt sich für alle Drücke eine ausgeprägte Hitzedenaturierung erkennen. Die Kältedenaturierung ist gut ersichtlich und nimmt für steigende Drücke zu. Die Stabilität nimmt zu hohen Drücken hin ab, bis ein Sattelpunkt bei etwa 150 MPa erreicht wird, um dann wieder leicht anzusteigen. Dieses Phänomen wird sehr gut im Konturplot des $\{p, T\}$ Raumes erkennbar. Die Phasengrenze gleicht hier nicht direkt einer Ellipse, sondern zwei übereinanderliegenden Ellipsen. Eine andere Interpretation könnte auch auf eine Hyperbel hindeuten. Die Lösung der Gleichung 4.3.7 kann neben einer Ellipse auch eine Hyperbel sein, je nach Parametersatz. Diese hyperbelartige Struktur lässt sich nicht bei jedem Stabilitätswert ΔG_u^0 finden. Bei niedrigen Drücken ist eine schwache elliptische Form erkennbar, ähnlich ausgeprägt wie beim Kälteschockprotein *Bc-Csp R3E L66E*, mit einer Verschiebung zu höheren Temperaturen hin.

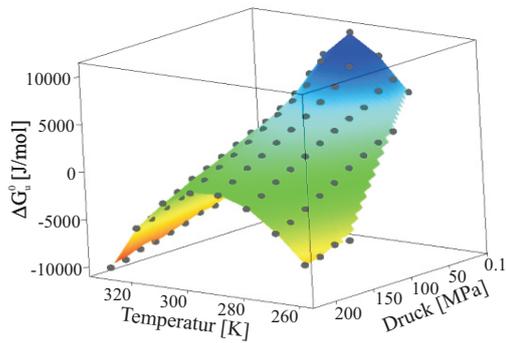
6.2.3.2 Ermittlung der thermodynamischen Parameter aus der Ellipsengleichung

Für eine quantitative Analyse wurden die Denaturierungstemperaturpunkte T_h und T_c beziehungsweise, wenn vorhanden, die Übergangsdrukpunkte p_m bei den entsprechenden Drücken, respektive Temperaturen, im p - T -Diagramm aufgetragen, wie in Abb. 6.2.22 (links) dargestellt. Diese Übergangspunkte stellen einen 50%igen Entfaltungsanteil dar und spiegeln die in Abb. 6.2.21 (rechts) hervorgehobene schwarze Nullmarke wieder. Die Punktmenge des Kälteschockproteins *Bs-CspB* und des Zinkfingerproteins *Kti11p(M⁻)* setzt sich lediglich aus der Menge der Werte T_h und T_c zusammen. Für das Kälteschockprotein *Bc-Csp R3E L66E* wurde zusätzlich die Punktmenge der p_m Druckwerte hinzugezogen.

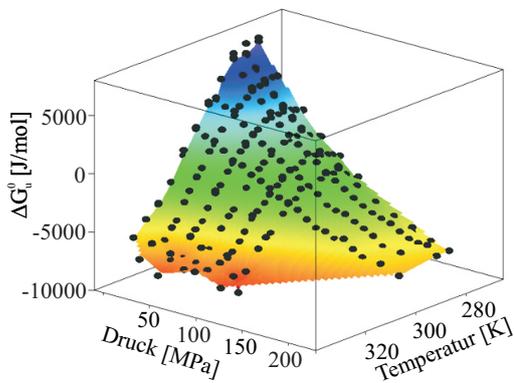
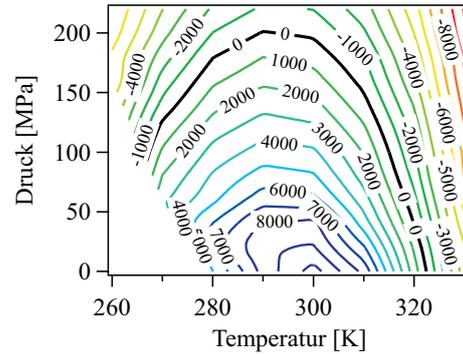
Das Vorgehen zum anpassen der Ellipsengleichung 4.3.7 an die jeweilige Punktmenge T_h , T_c und p_m wurde wie folgt umgesetzt. Die Ellipse wurde mit Hilfe des im Anhang befindlichen Regressions-Programms B.3.2 angepasst. Dieses Programm liefert die Parameter a, b, c, d, e, f der Ellipsenform:

$$0 = ax^2 + bxy + cy^2 + dx + ey + f \quad (6.2.2)$$

Um zu den gesuchten thermodynamischen Parametern von Gleichung 4.3.7 zu gelangen, bedarf es einer Koeffiziententransformation. Diese kann ausführlich im Anhang



(a) Bs-CspB: Stabilitätsgebirge und Konturplot.



(b) Bc-Csp R3E L66E: Stabilitätsgebirge und Konturplot.

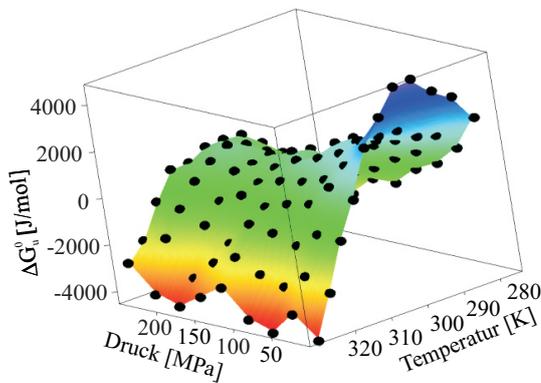
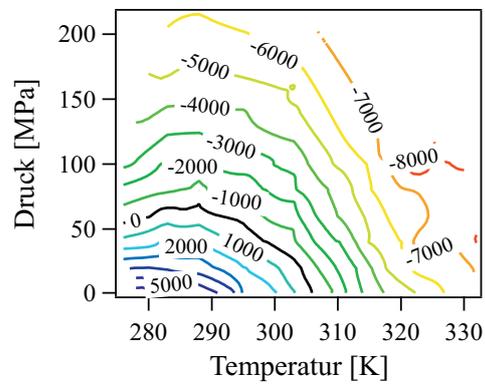
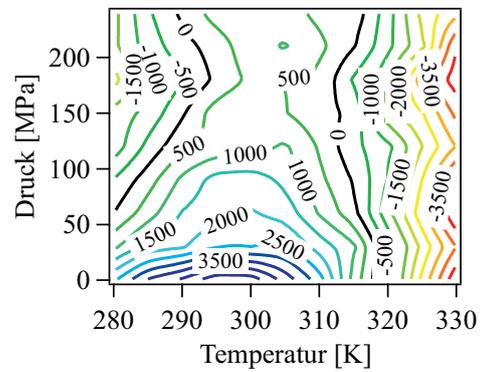
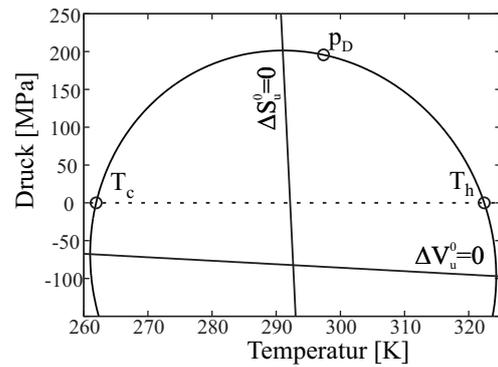
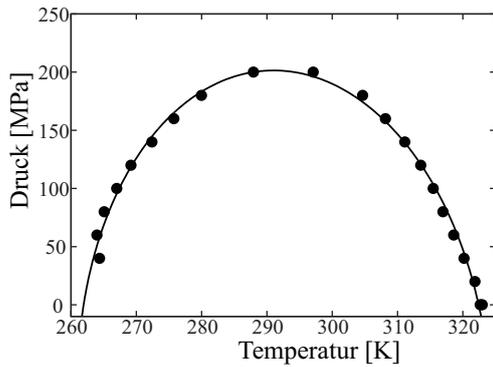
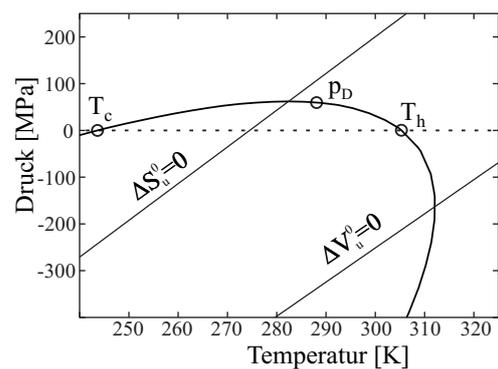
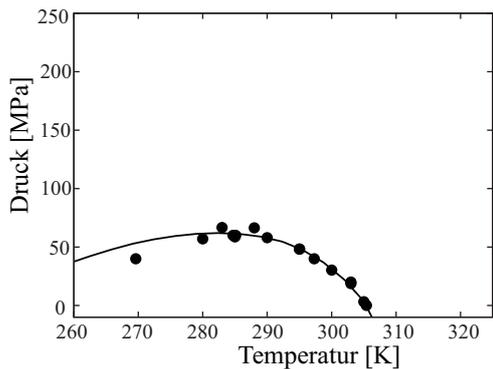
(c) Kti11p(M⁻): Stabilitätsgebirge und Konturplot.

Abb. 6.2.21: Links: Darstellung sämtlicher $\Delta G_u^0(T)$ Werte für verschiedene Drücke p mit implementierter Oberfläche zur besseren Darstellung als Stabilitätsgebirge. Rechts: Aus der dreidimensionalen Stabilitätsdarstellung gewonnener Konturplot im Druck-Temperatur Phasenraum. Die Höhenlinien geben den jeweiligen ΔG_u^0 Wert an. Die $\Delta G_u^0=0$ Linie ist schwarz hervorgehoben und spiegelt die Phasengrenze des Systems wieder.

(B.1) nachgeschlagen werden. Es sei hier erwähnt, dass eine Ellipse in einfacher mathematischer Form durch fünf Parameter (Mittelpunkt x_0 , y_0 , Länge der großen und kleinen Halbachse a , b und eine mögliche Drehung α) vollständig beschrieben werden kann. Die Ellipse in der vorliegenden Form von Gleichung 4.3.7 hat aber sechs Parameter und die Referenzpunkte p_0 , T_0 . Wobei p_0 und T_0 nicht mit dem Ellipsenmittelpunkt zu verwechseln sind. Deswegen ist ein Parameter frei wählbar, aus dem sich dann alle anderen Parameter der Ellipse ergeben. Als frei wählbaren Parameter wurde hier die Gibbs Energie ΔG_0 gewählt, da diese aus den vorangegangenen Messungen am genauesten ermittelt werden konnte. Die Referenzpunkte p_0 und T_0 wurden für alle drei Proteine auf den Punkt höchster Stabilität festgesetzt und für genau diesen Zustand der jeweilige ΔG_0 Wert verwendet. Somit ergibt sich bei $p_0 = 0.1$ MPa und $T_0 = 298$ K für das Kälteschockprotein *Bs-CspB* ein freier Enthalpiewert ΔG_0 Wert von 8004 J/mol. Für die Doppelvariante *Bc-Csp R3E L66E* folgt bei $p_0 = 0.1$ MPa und $T_0 = 288$ K eine Energie $\Delta G_0 = 5094$ J/mol. Die Referenzpunkte $p_0 = 0.1$ MPa und $T_0 = 295$ K ergeben für das Zinkfingerprotein *Kti11p(M⁻)* einen ΔG_0 Wert von 4841 J/mol. Unter diesen Voraussetzungen konnte die Gleichung 4.3.7 an die jeweiligen Datenpunkte im p - T Phasenraum angepasst werden, wie links in Abb. 6.2.22 zu sehen. Die Resultate der sich daraus ergebenden thermodynamischen Parameter sind in Tab. 6.2.7 aufgelistet. An dieser Stelle muss nochmal verdeutlicht werden, dass die Datenpunkte in Abb. 6.2.22 keine einzelnen Messpunkte sind, sondern sich aus den Punkten T_c , T_h , und p_m der Regressionsergebnisse aller Temperatur- beziehungsweise Druckübergänge ergeben.



(a) Bs-CspB



(b) Bc-Csp R3E L66E

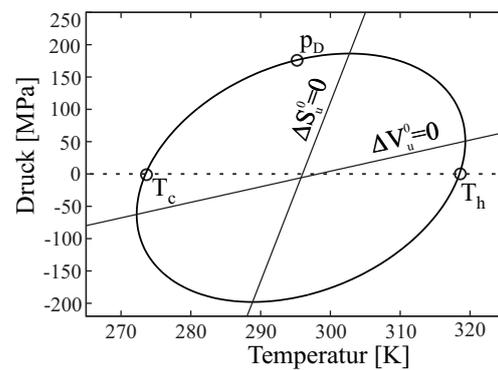
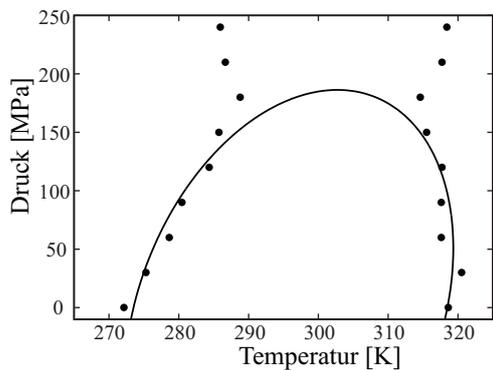
(c) Kti11p(M⁻)

Abb. 6.2.22: Links: Darstellung der Schnittebene aus dem Stabilitätsdiagramm bei $\Delta G_u^0=0$ und Anpassung der Gleichung 4.3.7 an den Datensatz. Rechts: Der p-T-Phasenraum mit Punkten der Druck- und Temperaturdenaturierungen p_D , T_h und T_c , als auch der Geradenfunktionen von $p(T)|_{\Delta S_u^0=0}$ und $p(T)|_{\Delta V_u^0=0}$.

In Abb. 6.2.22 (rechts) ist zur besseren Veranschaulichung die aus dem Datensatz ermittelte Ellipse ohne Datenpunkte und in einem weiteren, nur mathematisch sinnvollen, negativen Druckbereich dargestellt. Gleichzeitig sind die aus Gleichung 4.3.20, 4.3.21 und 4.3.22 ermittelten Punkte der Druckdenaturierung $p_D|_{T_0}$ bei der Referenztemperatur T_0 , sowie der Kälte- und Hitzedenaturierung $T_h|_{p_0}$ und $T_c|_{p_0}$ bei Atmosphärendruck eingetragen. Desweiteren sind die Punkte der Ellipse mit Anstieg Null und

ΔG_0	8004 ± 950	J/mol
Δc_p	5417 ± 712	J/(mol K)
$\Delta \hat{\alpha}$	-0.10 ± 0.12	ml/(mol K)
$\Delta \hat{\beta}$	0.23 ± 0.11	ml/(mol MPa)
ΔS_0	105.5 ± 29.4	J/(mol K)
ΔV_0	-19.2 ± 8.7	ml/mol
(a) <i>Bs</i> -CspB mit Referenzpunkt $T_0 = 298$ K und $p_0 = 0.1$ MPa		
ΔG_0	5094 ± 878	J/mol
Δc_p	3790 ± 174	J/(mol K)
$\Delta \hat{\alpha}$	1.81 ± 0.39	ml/(mol K)
$\Delta \hat{\beta}$	0.25 ± 0.02	ml/(mol MPa)
ΔS_0	178.1 ± 14.7	J/(mol K)
ΔV_0	-76.4 ± 2.0	ml/mol
(b) <i>Bc</i> -Csp R3E L66E mit Referenzpunkt $T_0 = 288$ K und $p_0 = 0.1$ MPa		
ΔG_0	4841 ± 781	J/mol
Δc_p	5663 ± 754	J/(mol K)
$\Delta \hat{\alpha}$	0.69 ± 0.14	ml/(mol K)
$\Delta \hat{\beta}$	0.29 ± 0.09	ml/(mol MPa)
ΔS_0	-19.2 ± 6.38	J/(mol K)
ΔV_0	-2.3 ± 0.8	ml/mol
(c) Kti11p(M ⁻) mit Referenzpunkt $T_0 = 295$ K und $p_0 = 0.1$ MPa		

Tab. 6.2.7: Aus der Anpassung der Ellipsengleichung an die Punktmenge im p - T Phasenraum gewonnene thermodynamische Parameter für *Bs*-CspB, *Bc*-Csp R3E L66E und Kti11p(M⁻).

Unendlich aufgezeigt. Sie lassen sich als Schnittpunkt der Ellipse mit den Geradenfunktionen $p(T)|_{\Delta S_u^0=0}$ und $p(T)|_{\Delta V_u^0=0}$ aus Gleichung 4.3.18 und 4.3.19 berechnen. Für das Kälteschockprotein *Bs*-CspB wurden in Abb. 6.2.22a die Übergangswerte der Kältedenaturierung bei 0.1 MPa und 20 MPa ausgelassen, da bei diesen Drücken nur wenig Datenpunkte für den Kältedenaturierungsast vorliegen, woraus sich ungenaue T_c Werte ergeben. Auch ohne diese zwei Punkte im Phasenraum, sind für eine Anpassung genügend Datenwerte vorhanden. Aus Tab. 6.2.7a können die so ermittelten thermodynamischen Parameter für *Bs*-CspB entnommen werden. Im Rahmen der Fehlergrenzen stimmt der aus der Ellipsenanpassung ermittelte Parametersatz bei der freien Enthalpie $\Delta G_0 = 8004$ J/mol mit den Ergebnissen aus den Temperaturübergängen bis auf die Volumenänderung ΔV_0 überein (siehe Tab. 6.2.1 und 6.2.4a). Wie oben beschrieben, ist für die Neigung der Ellipse die thermische Expansionsänderung $\Delta \hat{\alpha}$ verantwortlich. Aus der Abb. 6.2.22a ist zu erkennen, dass diese Neigung verschwindend klein ist, da die Ellipse kaum eine Drehung im Phasenraum erfährt. Das

spiegelt sich ebenfalls im angepassten Wert $\Delta\hat{\alpha}$'s wieder, der mit seinem großen Fehler, um Null schwankt. Mit $-0.1 \text{ ml}/(\text{mol K})$ ist $\Delta\hat{\alpha}$ leicht negativ, was zu einer Linksneigung der Ellipse führt. Das Protein ist demnach unter sehr hohen Drücken stabiler, wenn die Temperatur etwas unter 298 K sinkt. Auch beim direkten Druckübergang in Abb. 6.2.19a wurde diese Eigenschaft gefunden, was für den leicht negativen $\Delta\hat{\alpha}$ Wert spricht.

Die Änderung der Kompressibilität $\Delta\hat{\beta}$ ist mit $0.23 \text{ ml}/(\text{mol MPa})$ etwa doppelt so groß wie mittels Temperaturübergangsmethode bei 300 K ermittelt. Jedoch weist dieser Wert hier einen Fehler von etwa 50% auf. Die Stabilitätsabhängigkeit entlang der Druckachse kann auf Grund des sehr geringen $\Delta\hat{\beta}$ Wertes als linear angenommen werden. Somit ist die Kompressibilität des Systems im nativen Zustand mit der im entfalteten Zustand vergleichbar.

Die Ellipsenanpassung liefert für die Wärmekapazitätsänderung Δc_p einen Wert von $5417 \text{ J}/(\text{K mol})$ und liegt mit seinem Fehler von 13% innerhalb des durch Temperaturübergang ermittelten Wertes.

Die Entropieänderung ΔS_0 bezogen auf den Referenzpunkt T_0, p_0 stimmt sehr gut mit dem aus der $\Delta S_u^0(p)$ Methode bestimmten Wert überein. Er liegt hier bei $105.5 \text{ J}/(\text{K mol})$. Diese gute Übereinstimmung ist darauf zurückzuführen, da es für jede Temperatur einen wohl definierten Druckübergangspunkt gibt, was zu einer genauen Lagebestimmung der $\Delta S = 0$ Linie führt. Hinzu kommt, dass dieses Protein eine ausgeprägte Kältedenaturierung aufzeigt, wodurch die konvexe Form der Ellipse entlang der Temperaturachse deutlich hervortritt, was ebenfalls die Position der $\Delta S = 0$ Linie fixiert.

Der, im Vergleich zu den Temperatur- und Druckübergangsdaten gefundene, kleine Wert für die Volumenänderung ΔV_0 von lediglich $-19.2 \text{ ml}/\text{mol}$ ist dadurch zu erklären, dass die Werte der Kältedenaturierung T_c bei geringen Drücken nur extrapoliert sind und damit die Lage der $\Delta V = 0$ Linie im Niedrigtemperatursegment des Phasendiagrammes nicht so genau bestimmbar ist, wie im Hitzedenaturierungsbereich. Desweiteren ist die Lage der $\Delta V = 0$ Linie nicht so exakt feststellbar wie die Lage der $\Delta S = 0$ Linie, da keine negativen Drücke existieren unter denen das Protein destabilisiert werden könnte, was die konvexe Form der Ellipse entlang der Druckachse eindeutiger festlegen würde.

Das rechte Diagramm in Abb. 6.2.22a zeigt die Druck- und Temperaturübergangspunkte der Ellipse bei T_0 respektive p_0 auf. Diese ergeben sich zu $p_D |_{T_0} = 194.7 \text{ MPa}$, sowie $T_c |_{p_0} = 262.0 \text{ K}$ und $T_h |_{p_0} = 322.4 \text{ K}$. Der Punkt mit Ellipsenanstieg Null folgt zu $(T, p) |_{\Delta S_u^0=0} = (291.0 \text{ K}, 201.4 \text{ MPa})$ und die Punkte $(T, p) |_{\Delta V_u^0=0}$ mit Ellipsenanstieg Unendlich zu $(260.9 \text{ K}, -67.8 \text{ MPa})$ und $(324.3 \text{ K}, -97.0 \text{ MPa})$.

Die geringe Datenlage der Doppelvariante Bc-Csp R3E L66E im p - T Phasenraum lässt keine vernünftige Anpassung der Ellipsengleichung zu. Dafür ist der Mangel an den sehr niedrig liegenden Kältedenaturierungswerten verantwortlich. Aus diesem Grund wurden die thermodynamischen Parameter aus den Temperatur- sowie Drucküber-

gängen als Ausgangswerte verwendet und die Ellipse manuell an den Datensatz im Phasenraum angepasst. Die Fehler wurden durch Variation des jeweiligen Parameters abgeschätzt, je nachdem wie stark der Einfluss einer kleinen Änderung dieses Parameters sich auf die Ellipsenanpassung ausgewirkt hat.

Die freie Enthalpie ΔG_0 wurde auf 5094 J/mol festgelegt. Ebenfalls sorgt der im Vergleich zu *Bs-CspB* kleinere Wert der Wärmekapazitätsänderung $\Delta c_p = 3790$ ml/(mol K) für eine Streckung der Ellipse entlang der Temperaturachse. Sehr gut stimmt der Wert der Volumenänderung mit den aus Druck- und Temperaturübergang ermittelten Werten überein. Er beträgt hier -76.4 ml/mol. Gleiches gilt für die Entropieänderung mit $\Delta S_0 = 178.1$ J/(mol K) und für die Kompressibilitätsänderung $\Delta \hat{\beta} = 0.25$ ml/(mol MPa). Der im Vergleich zum Kälteschockprotein *Bs-CspB* recht große, positive Wert der thermischen Expansionsänderung $\Delta \hat{\alpha}$ von 1.898 ml/(mol K) lässt eine ausgeprägte Neigung der Ellipse erkennen. Durch diese Schräglage der Ellipse, reicht der native Bereich dieses Proteins extrem weit in den kalten Temperaturbereich hinein, wie in der rechten Darstellung der Abb. 6.2.22b zu erkennen ist.

Aus dem rechten Diagramm in Abb. 6.2.22b ergibt sich der Punkt der Kältedenaturierung bei p_0 zu $T_c |_{p_0} = 240.4$ K und der Hitzedenaturierungspunkt $T_h |_{p_0} = 305.8$ K. Der Druckübergangspunkt bei T_0 liegt bei $p_D |_{T_0} = 60.8$ MPa. Der Punkt an dem die $\Delta S = 0$ Linie die Ellipse beim Anstieg Null schneidet liegt bei 283.1 K und 62.6 MPa. Die $\Delta V = 0$ Linie schneidet die Ellipse im Anstieg Unendlich bei $T = 311.3$ K und $p = -136.6$ MPa.

Die Anpassung der Ellipsengleichung für das Zinkfingerprotein *Kti11p(M⁻)* wurde auf den Datenbereich bis zu Drücken von 150 MPa im p - T Phasenraum beschränkt. Ausgehend von der Gibbs Energie des Temperaturübergangs bei Atmosphärendruck von $\Delta G_0 = 4420$ J/mol, wurde dieser Parameter an die Größe des unteren elliptischen Bereiches im Phasenraum zu 4841 J/mol angepasst. Der im Vergleich zu beiden Kälteschockproteinen etwas größere Wert der bestimmten Wärmekapazitätsänderung von $\Delta c_p = 5663$ J/(mol K) sorgt entlang der Temperaturachse für eine gestauchtere Ellipse. Der Wert der Kompressibilitätsänderung $\Delta \hat{\beta}$ ist hier mit 0.29 ml/(mol MPa) etwas kleiner als der mittels Temperatur- und Druckübergang gefundene Wert. Diese Tatsache könnte damit erklärt werden, dass die Anpassung der quadratischen Funktion bei den Quasidruck- und Druckübergängen jeweils bei 150 MPa abgebrochen werden musste, woraus eine unzureichend festgelegte $\Delta G_u^0(p)$ Abhängigkeit resultiert. Die leichte Rechtsneigung der Ellipse wird durch einen positiven Wert der thermischen Expansion von 0.69 ml/(mol K) bestätigt. Die Größen ΔS_0 und ΔV_0 deuten mit ihren geringen Werten um Null darauf hin, dass der Referenzpunkt T_0, p_0 fast im Ellipsenmittelpunkt liegt, wo die $\Delta S = 0$ Linie sich mit der $\Delta V = 0$ Linie schneidet.

Im rechten Diagramm aus Abb. 6.2.22c ergibt sich der Kältedenaturierungspunkt zu $T_c |_{p_0} = 273.5$ K und der Hitzedenaturierungspunkt zu $T_h |_{p_0} = 318.5$ K. Der Druckdenaturierungspunkt bei $T_0 = 295$ K ergibt sich zu $p_D |_{T_0} = 175.8$ MPa. Der Punkt mit

Anstieg Null liegt bei $(T,p)|_{\Delta S_u^0=0} = (302.7 \text{ K}, 186.3 \text{ MPa})$. Der Punkt mit Anstieg unendlich liegt bei $(T,p)|_{\Delta V_u^0=0} = (272.3 \text{ K}, -62.5 \text{ MPa})$ und $(T,p)|_{\Delta V_u^0=0} = (319.3 \text{ K}, 50.8 \text{ MPa})$.

Ob die Lösung der Kegelschnittgleichung elliptisch, hyperbolisch oder parabolisch ist, hängt von den Parametern Δc_p , $\Delta \hat{\alpha}$, $\Delta \hat{\beta}$ und T_0 ab. Die mathematische Bedingung für die elliptische Lösung der Kegelschnittgleichung ist:

$$1 > \frac{T_0 \cdot \Delta \hat{\alpha}^2}{\Delta \hat{\beta} \cdot \Delta c_p} \quad (6.2.3)$$

Ist diese Relation größer 1, so ist die Lösung hyperbolisch. Ist sie gleich 1, so ist das Resultat eine Parabel. Mit den hier ermittelten thermodynamischen Parametern der Ellipse von *Bs-CspB* ergibt sich für das Verhältnis der Gleichung 6.2.3 ein Wert von 0.0024 und bestätigt somit nochmals den elliptischen Charakter des Phasendiagramms dieses Proteins.

Für das Protein *Bc-Csp R3E L66E* ergibt sich aus den Ergebnissen in Tab. 6.2.7b ein Verhältnis von 0.98. Ein solch hoher Wert kennzeichnet den Übergang zur parabolischen Form und erklärt die langgestreckte Ellipse in Abb. 6.2.22b (rechts). Wenn nicht der aus der Ellipsenanpassung gewonnene Parametersatz verwendet wird, um das Verhältnis zu ermitteln, sondern die aus den Temperatur- und Druckübergängen bestimmten Parameter hinzugezogen werden, ergibt sich ein Wert von 0.9. Beim Zinkfingerprotein ergibt sich ein Verhältnis von 0.085 und ist somit deutlich kleiner als 1, was die eindeutig elliptische Form in Abb. 6.2.22c (rechts) belegt. Der extrem kleine Verhältniswert des Kälteschockproteins *Bs-CspB* im Gegensatz zu den anderen beiden Proteinen, lässt sich durch die kaum vorhandene Änderung der thermischen Expansion erklären. Bei *Bc-Csp R3E L66E* liegt der große Verhältniswert in der Kombination kleine Wärmekapazitätsänderung und große thermische Expansionsänderung begründet, zumal letztere Größe quadratisch in die Verhältnisgleichung eingeht und somit zusätzlich den Verhältniswert erhöht.

6.3 Druckabhängigkeit der NMR-Rückgratresonanzen

Im folgenden wird der Einfluss von hohen Drücken bis 240 MPa auf die chemische Verschiebung der Amidprotonen, und soweit möglich, der daran gebundenen Stickstoffkerne untersucht. Ausgehend von den in Abschnitt 4.4 beschriebenen Phänomenen zur Druckabhängigkeit, lassen sich daraus mögliche strukturelle Änderungen des Proteins ausmachen. Um solche strukturellen Änderungen aufzeigen zu können, muss berücksichtigt werden, dass zum einen diese Proteine unter hohen Drücken ihre strukturellen Eigenschaften ändern können und aber gleichzeitig auf jeden Kernspin dieses Systems der umgebende Hochdruck seinen Einfluss geltend macht und dafür sorgt, dass jedes Protonensignal jeder einzelnen Aminosäure für sich schon allein eine chemische Verschiebung erfährt, ohne Änderung der Proteinstruktur. Diese natürliche Druckabhängigkeit muss von der strukturellen Druckabhängigkeit subtrahiert werden, um aussagekräftige Ergebnisse, bezüglich struktureller Änderungen unter hohen Drücken, zu gewährleisten.

Aus diesem Grund ist es erforderlich die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen an möglichst kleinen, unstrukturierten Molekülen zu untersuchen. Hierfür haben sich in der Vergangenheit GGXA Tetrapeptide als besonders geeignet erwiesen [Arnold *et al.*, 2002, Koehler *et al.*, 2012].

Es soll angemerkt werden, dass sich bei der Untersuchung der Druckkoeffizienten die Einheit ppm/GPa beziehungsweise ppm/GPa² durchgesetzt hat. Zum besseren Vergleich mit der einschlägigen Literatur, wird in dieser Arbeit diesbezüglich der Druck ebenfalls in GPa gerechnet.

6.3.1 Druckabhängigkeit der ¹H-NMR-Resonanzen des Modelpeptids Ac-GGXA-NH₂

Der Einfachheit halber soll im folgenden für die Peptidbezeichnung Ac-GGXA-NH₂ die Bezeichnung GGXA gewählt werden, also ohne Acetylgruppen-Kürzel Ac in der N-terminalen und freies Aminogruppen-Kürzel NH₂ in der C-terminalen Region. Die Messungen des GGXA Peptids können als Prüfmerkmal der NMR Hochdruck Anlage angesehen werden, um diese zu verifizieren und aufzuzeigen, ob die Anlage vergleichbare Ergebnisse liefert wie ähnliche Hochdruckanlagen in anderen Arbeitsgruppen (z.B. Universität Regensburg, AG Kalbitzer) und somit einen Indikator für Reproduzierbarkeit der Messungen darstellt. Die Umgebungsvariablen der Peptide wurden denen der Kälteschockproteine *Bs-CspB* beziehungsweise *Bc-Csp R3E L66E* und des Zinkfingerproteins *Kti11p(M⁻)* weitestgehend angepasst. Somit ergeben sich Messreihen in Natriumcacodylatpuffer und Natriumphosphatpuffer bei einer Temperatur von 295 K und einem pH-Wert von 6.5. Höhere pH-Wert, wie 7.0 oder 7.5 führten auf Grund zu hoher Amidprotonenaustauschraten zu nicht verwertbaren Ergebnissen. Diese Ex-

perimente dienen somit nicht nur als Prüfmerkmal der Hochdruckanlage, sondern können als ergänzende Parameter für einen weiteren Temperatur als auch pH Bereich aufgefasst werden, der an die Arbeiten von [Arnold *et al.*, 2002] anknüpft.

Eine druckabhängige Untersuchung der Stickstoffkerne dieser Tetrapeptide konnte nicht durchgeführt werden. Die ^{15}N -Markierung der Peptide hätte einen zu hohen finanziellen Aufwand bedeutet. Bei sämtlichen GGXA-Messungen wurde die Peptidkonzentration auf 1 mM festgesetzt.

6.3.1.1 GGXA in Natriumphosphatpuffer

Es wurde von jedem Peptid GGXA der jeweiligen Aminosäure X ein Protonenspektrum aufgenommen. Zusätzlich wurde für die dazugehörige Resonanzzuordnung ein homonukleares Protonen-TOCSY mit einer Mischzeit von 100 ms aufgezeichnet. Eine grobe Abschätzung der Resonanzen konnte bereits mit Hilfe von [Bundi und Wüthrich, 1979] erfolgen. Von den verwendeten Peptiden wurden, wie bereits in Abschnitt 3.1 erwähnt, bei $T = 295\text{ K}$ und 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5 in Abhängigkeit vom Druck in 20 MPa Schritten jeweils ein eindimensionales Protonenspektrum aufgenommen. Zur Verdeutlichung ist die Druckabhängigkeit von GGDA in Abb. 6.3.1 (links) im Tieffeld dargestellt.

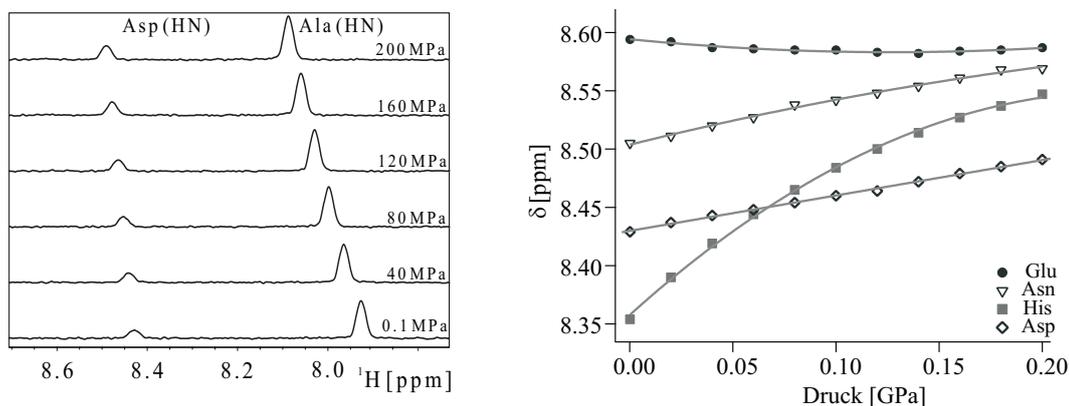


Abb. 6.3.1: Links: Protonenspektrum von GGDA in Abhängigkeit vom Druck. Gut zu erkennen ist die Änderung der chemischen Verschiebung des Amidprotons der Asparaginsäure D₃ und des Alanins A₄. Rechts: Druckabhängigkeit der Protonenrückgratsignale einiger ausgewählter Aminosäuren X₃ in 50 mM Natriumphosphatpuffer bei $T = 295\text{ K}$ und pH 6.5.

Zu erkennen sind hier die Resonanzen der amidgebundenen Protonen von Asparaginsäure D₃ und Alanin A₄ des Peptides. Auf diese Art wurden für alle 20 natürlichen Aminosäuren X aus GGXA, exklusive Prolin, die Druckabhängigkeit der Amidprotonenresonanzen bestimmt. Durch die sich ergebenden Daten wurde eine lineare Funktion angepasst. Für Aminosäuren mit nichtlinearer Abhängigkeit der chemischen Verschiebung vom Druck wurde zusätzlich ein Polynom zweiten Grades verwendet.

Bei Aminosäuren mit starkem nichtlinearem Verhalten wurde die lineare Anpassung nicht angewendet. Das gilt für GGXA und GGHA. Für einige ausgewählte Peptide ist dieser Sachverhalt in Abb. 6.3.1 (rechts) festgehalten. Somit ergeben sich die Druckkoeffizienten für die lineare Regression zu δ_0 und δ_1 , wohingegen die Koeffizienten der nichtlinearen Regressionen mit δ_0' , δ_1' und δ_2' definiert sind. Sämtliche Amidprotonenabhängigkeiten von X_3 in 50 mM Natriumphosphat pH 6.5 sind in Tab. 6.3.1 zusammengetragen.

GGXA	δ_0 [ppm]	δ_1 [ppm/GPa]	δ_0' [ppm]	δ_1' [ppm/GPa]	δ_2' [ppm/GPa ²]
GGAA	8.352 ± 0.002	0.329 ± 0.014	-	-	-
GGCA	8.446 ± 0.001	0.376 ± 0.009	-	-	-
GGDA	8.429 ± 0.001	0.304 ± 0.005	-	-	-
GGEA	-	-	8.594 ± 0.001	-0.175 ± 0.016	0.688 ± 0.077
GGFA	8.268 ± 0.001	0.318 ± 0.006	8.266 ± 0.001	0.391 ± 0.008	-0.308 ± 0.037
GGGA	8.448 ± 0.001	0.129 ± 0.006	-	-	-
GGHA	-	-	8.358 ± 0.002	1.599 ± 0.044	-3.334 ± 0.209
GGIA	8.216 ± 0.001	0.418 ± 0.007	-	-	-
GGKA	8.358 ± 0.001	0.339 ± 0.008	8.355 ± 0.001	0.415 ± 0.017	-0.384 ± 0.079
GGLA	8.346 ± 0.001	0.317 ± 0.006	-	-	-
GGMA	8.434 ± 0.002	0.299 ± 0.013	8.431 ± 0.002	0.401 ± 0.034	-0.506 ± 0.165
GGNA	8.507 ± 0.001	0.334 ± 0.012	8.504 ± 0.001	0.438 ± 0.028	-0.518 ± 0.136
GGPA	-	-	-	-	-
GGQA	8.414 ± 0.001	0.333 ± 0.005	-	-	-
GGRA	8.377 ± 0.002	0.364 ± 0.014	8.374 ± 0.002	0.466 ± 0.041	-0.514 ± 0.196
GGSA	8.403 ± 0.002	0.472 ± 0.015	8.398 ± 0.001	0.625 ± 0.024	-0.766 ± 0.118
GGTA	8.245 ± 0.002	0.607 ± 0.015	8.241 ± 0.001	0.749 ± 0.027	-0.714 ± 0.130
GGVA	8.206 ± 0.001	0.445 ± 0.007	8.204 ± 0.001	0.515 ± 0.014	-0.349 ± 0.065
GGWA	8.071 ± 0.001	0.366 ± 0.009	8.068 ± 0.001	0.457 ± 0.019	-0.456 ± 0.095
GGYA	8.213 ± 0.001	0.339 ± 0.007	-	-	-

Tab. 6.3.1: Lineare und quadratische Druckkoeffizienten der Rückgratprotonen HN von Aminosäure X_3 in 50 mM Natriumphosphatpuffer bei $T = 295$ K pH 6.5 und einer Peptidkonzentration von 1 mM.

6.3.1.2 GGXA in Natriumcacodylatpuffer

Zur Bestimmung der chemischen Verschiebungskorrektur für die Kälteschockproteine, wurde das GGXA Peptid in 20 mM Natriumcacodylatpuffer bei pH 6.5 und 295 K auf seine Druckabhängigkeit hin untersucht. Exakt gleiche pH-Wert Bedingungen wie sie bei den Kälteschockproteinen unter pH 7.0 verwendet wurden, konnten auf Grund der zu starken Austauschverbreiterung der jeweiligen Amidprotonen nicht angewendet werden. Sämtliche Abhängigkeiten sind in Abb. 6.3.2 dargestellt. Eine Auflistung der durch lineare Regression ermittelten Abhängigkeiten ist in Tab. 6.3.2 zu finden.

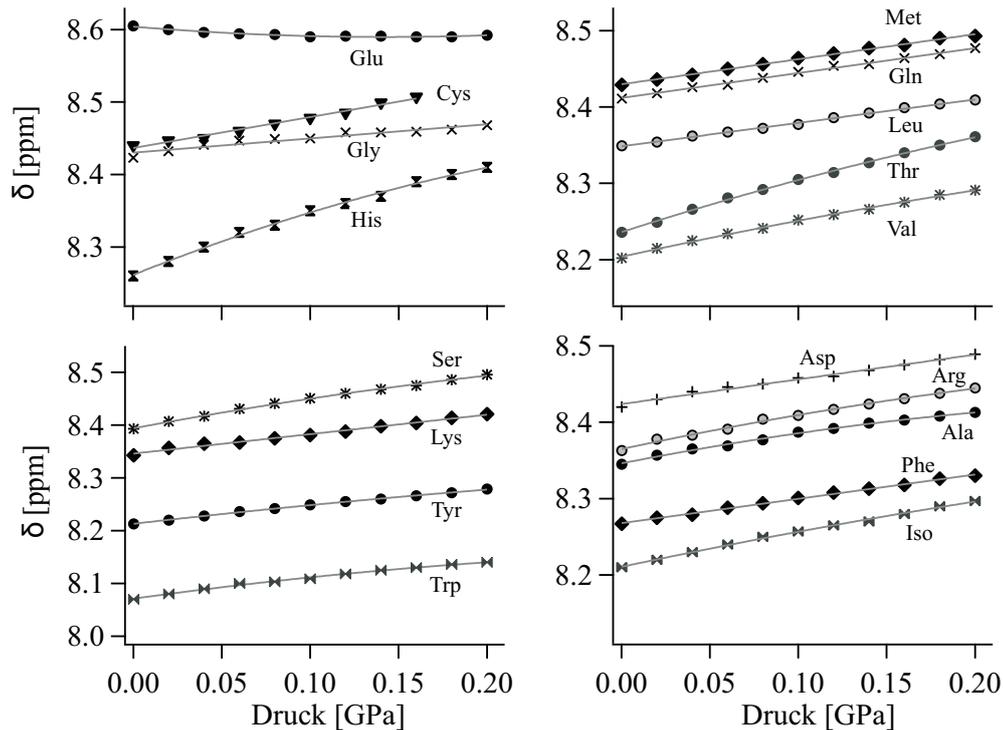


Abb. 6.3.2: Druckabhängigkeit der Protonenrückgratsignale von Aminosäure X₃ aus GGXA in Natriumcacodylat Puffer bei T = 295 K und pH 6.5.

GGXA	δ_0 [ppm]	δ_1 [ppm/GPa]	δ_0' [ppm]	δ_1' [ppm/GPa]	δ_2' [ppm/GPa ²]
GGAA	8.349 ± 0.002	0.333 ± 0.013	8.346 ± 0.001	0.454 ± 0.028	-0.605 ± 0.133
GGCA	8.434 ± 0.002	0.427 ± 0.018	-	-	-
GGDA	8.424 ± 0.001	0.324 ± 0.011	-	-	-
GGEA	8.599 ± 0.002	-0.059 ± 0.014	8.604 ± 0.001	-0.201 ± 0.017	0.707 ± 0.079
GGFA	8.268 ± 0.001	0.318 ± 0.006	-	-	-
GGGA	8.430 ± 0.002	0.196 ± 0.019	-	-	-
GGHA	8.269 ± 0.003	0.741 ± 0.026	8.261 ± 0.002	0.981 ± 0.052	-1.199 ± 0.251
GGIA	8.213 ± 0.001	0.427 ± 0.009	8.211 ± 0.001	0.492 ± 0.028	-0.323 ± 0.134
GGKA	8.346 ± 0.001	0.368 ± 0.012	-	-	-
GGLA	8.349 ± 0.001	0.307 ± 0.005	-	-	-
GGMA	8.429 ± 0.001	0.328 ± 0.006	-	-	-
GGNA	-	-	-	-	-
GGPA	-	-	-	-	-
GGQA	8.412 ± 0.001	0.326 ± 0.008	-	-	-
GGRA	8.368 ± 0.002	0.397 ± 0.012	8.365 ± 0.001	0.495 ± 0.033	-0.488 ± 0.160
GGSA	8.398 ± 0.002	0.499 ± 0.014	8.394 ± 0.001	0.623 ± 0.029	-0.620 ± 0.141
GGTA	8.239 ± 0.002	0.621 ± 0.013	8.236 ± 0.001	0.743 ± 0.028	-0.612 ± 0.134
GGVA	8.206 ± 0.001	0.435 ± 0.009	8.204 ± 0.001	0.508 ± 0.026	-0.366 ± 0.124
GGWA	8.075 ± 0.002	0.345 ± 0.013	8.071 ± 0.001	0.464 ± 0.029	-0.593 ± 0.144
GGYA	8.215 ± 0.001	0.324 ± 0.007	8.213 ± 0.001	0.383 ± 0.014	-0.296 ± 0.066

Tab. 6.3.2: Lineare und quadratische Druckkoeffizienten der Rückgratprotonen HN von Aminosäure X₃ in 20mM Natriumcacodylat bei T = 295 K, pH 6.5 und einer Peptidkonzentration von 1 mM.

Sämtliche Amidprotonenverschiebungen der einzelnen Aminosäuren des GGXA Peptides zeigen unter Hochdruck Tieffeldverschiebungen, also positive, lineare Druckkoeffizienten. Diese gehen mit negativen, nichtlinearen Abhängigkeiten einher. Die negativen, nichtlinearen Werte der Amidprotonen folgen bei sehr hohen Drücken wahrscheinlich einem asymptotischen Verlauf [Koehler *et al.*, 2012]. Eine Ausnahme stellt das Glutamin in GGEA dar. Es zeigt ein negatives lineares und ein positives nichtlineares Verhalten. Dieses Verhalten konnte in beiden Puffern festgestellt und bereits von [Arnold *et al.*, 2002] unter ähnlichen Bedingungen gefunden werden.

Die Tieffeldverschiebungen können mit einer Abstandsverkürzung der Wasserstoffbrückenbindungslänge zu den Wassermolekülen des umgebenden Lösungsmittels erklärt werden. Das trifft besonders für die stark in diese Bindung involvierten Protonen zu. Nach [Asakawa *et al.*, 1998] und [Kalbitzer *et al.*, 2000] konnte auch für die betroffenen ^{15}N Stickstoffkerne eine vergleichbare, wenn auch schwächere Tieffeldverschiebung und eine damit einhergehende Wasserstoffbrückenabstandsverkürzung gefunden werden.

6.3.2 Zuordnung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der Proteine

6.3.2.1 Das Kälteschockprotein *Bs-CspB*

Um druckabhängige Untersuchungen bezüglich der chemischen Verschiebung von komplexen Molekülen, wie Proteinen, durchzuführen, eignen sich sogenannte zweidimensionale, heteronukleare Experimente besser als rein protonenabhängige, eindimensionale Verfahren, da diese bei einer hohen Anzahl an Resonanzlinien sehr komplex werden und die Signale sich überlagern.

Die Druck- und Temperaturübergänge des Kälteschockproteins wurden demnach nicht nur auf Protonenebene aufgezeichnet, sondern auch deren Korrelation zu den kovalent gebundenen Stickstoffatomen. Somit ergibt sich eine heteronukleare Einquanten-Kohärenz (HSQC). Ein solches HSQC von *Bs-CspB* ist in Abb. 6.3.3 unter Normalbedingungen in Natriumcacodylat Puffer bei pH 7, 10% D₂O und T = 298 K aufgezeigt. Um bei späteren Untersuchungen Aussagen zu jeder Aminosäure beziehungsweise über den NH Rückgratvektor jeder Aminosäure machen zu können, ist es erforderlich, die Kreuzsignale in den HSQC Spektren den jeweiligen Aminosäuren zuzuordnen. Für *Bs-CspB* ist diese Zuordnung bereits durch [Schnuchel und Holak, 1993] bekannt und kann in Abb. 6.3.3 nachvollzogen werden.

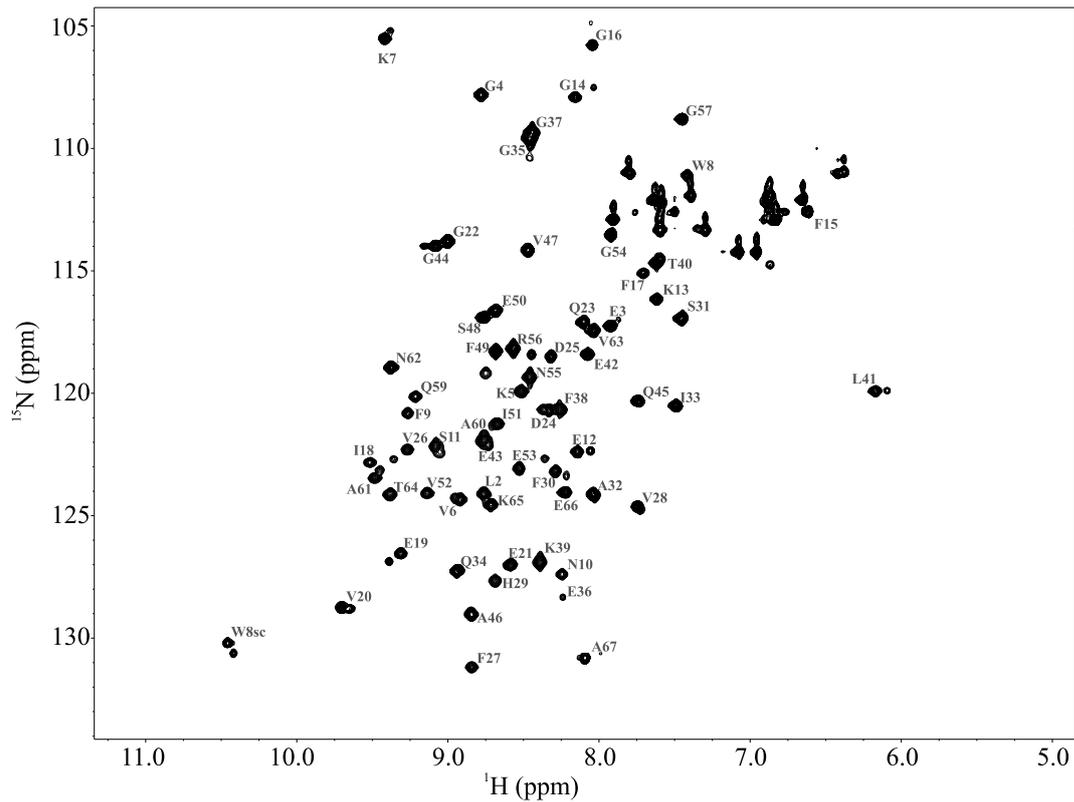


Abb. 6.3.3: *Bs*-CspB: Die Zuordnung des ^1H - ^{15}N -HSQC vom Kälteschockprotein *Bs*-CspB bei $T = 298\text{ K}$ und Atmosphärendruck war durch [Schnuchel und Holak, 1993] bekannt. Die $600\ \mu\text{M}$ Probe war in $20\ \text{mM}$ Natriumcacodylat pH 7 und 10% D_2O gelöst.

Bis auf das Rückgratsignal der Aminosäure M_1 und dem Prolin an Position 58 konnten alle Resonanzen zugeordnet werden. Das Fehlen der ersten Aminosäure im Spektrum beruht auf dem ungeschützten, hohen Amidprotonenaustausch mit dem Lösungsmittel, was eine enorme Signalverbreiterung bis hin zum Verschwinden des Resonanzsignals verursacht.

6.3.2.2 Die Kälteschockprotein Doppelvariante *Bc*-Csp R3E L66E

Die Zuordnung von *Bc*-Csp R3E L66E konnte teilweise von [Sachs, 2010] übernommen werden, wurde aber noch ergänzt. Dafür wurden die für Rückgratzuordnungen gängigen HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO und HN(CA)CO Experimente verwendet. Gemessen wurde in Natriumcacodylat Puffer pH 7 und 10% D_2O bei $T = 288\text{ K}$. Eine Zuordnung der ^1H - ^{15}N Resonanzen von *Bc*-Csp R3E L66E ist in Abb. 6.3.4 aufgezeigt und detailliert im Anhang in Tab. A.6.1 gelistet.

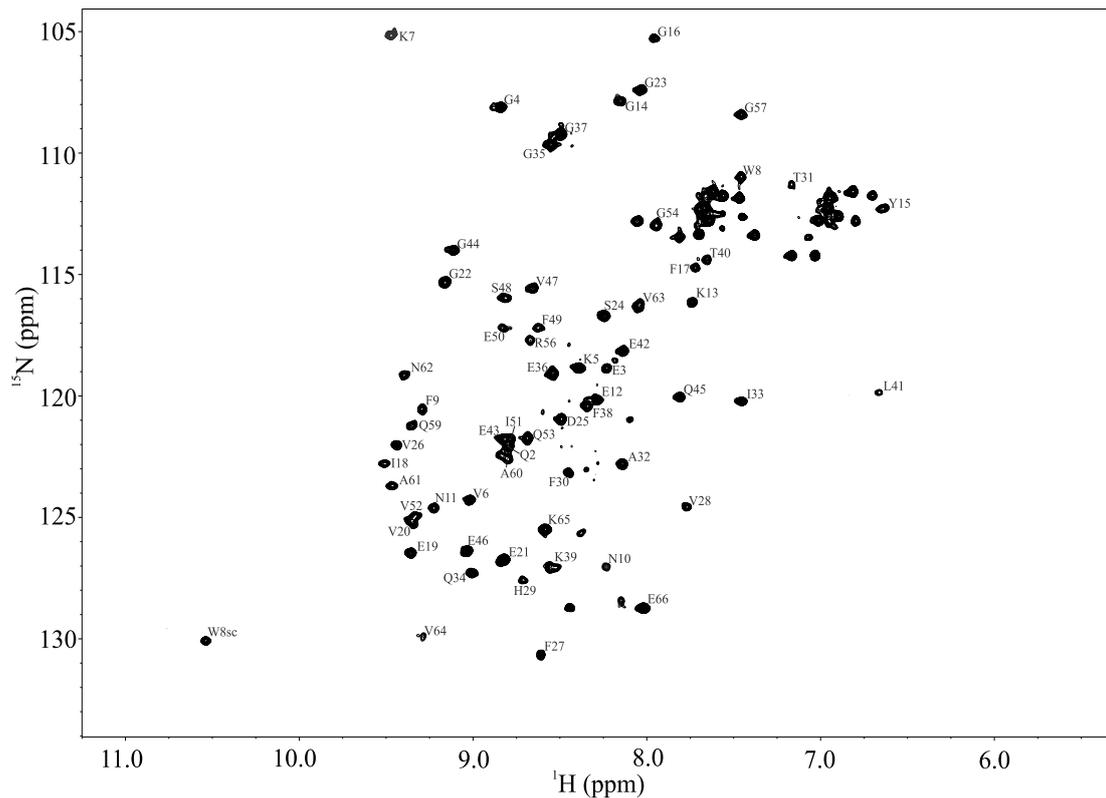


Abb. 6.3.4: *Bc*-Csp R3E L66E: Zuordnung der ^1H - ^{15}N Resonanzen bei $T = 288\text{ K}$ und Atmosphärendruck in 20 mM Natriumcacodylat Puffer pH 7 und 10% D_2O . Die Probenkonzentration betrug $500\ \mu\text{M}$.

Bis auf M1 und N55 konnten für *Bc*-Csp R3E L66E sämtliche Rückgratresonanzen zugeordnet werden. Dieses Protein besitzt selbst unter stabilsten Bedingungen einen entfalteten Anteil von 15% (vergleiche hierzu auch die Ergebnisse in Abb. 6.2.6 und Tab. 6.2.2). Aus diesem Grund sind im Spektrum schwache Signale zu erkennen, welche vom entfalteten Zustand herrühren. Auf der Protonenfrequenzachse sind diese Signale im Bereich um 8.5 ppm zu finden.

6.3.2.3 Das Zinkfingerprotein Kti11p(M^-)

Bei der Zuordnung der Resonanzen von Kti11p(M^-) konnte zunächst auf die bereits veröffentlichten Daten von [Sun *et al.*, 2005] und dem BMRB Eintrag 6555 der metallgebundenen Version dieses Proteins zurückgegriffen werden. Davon ausgehend, wurden wiederum mittels HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO und HN(CA)CO Experimenten die Rückgratsignale in 50 mM Phosphatpuffer bei pH 7.5 mit 50 mM NaCl und 10% D_2O bei $T = 295\text{ K}$ zugeordnet. Die Zuordnung der ^1H - ^{15}N Resonanzen von Kti11p(M^-) ist in Abb. 6.3.5 zu sehen.

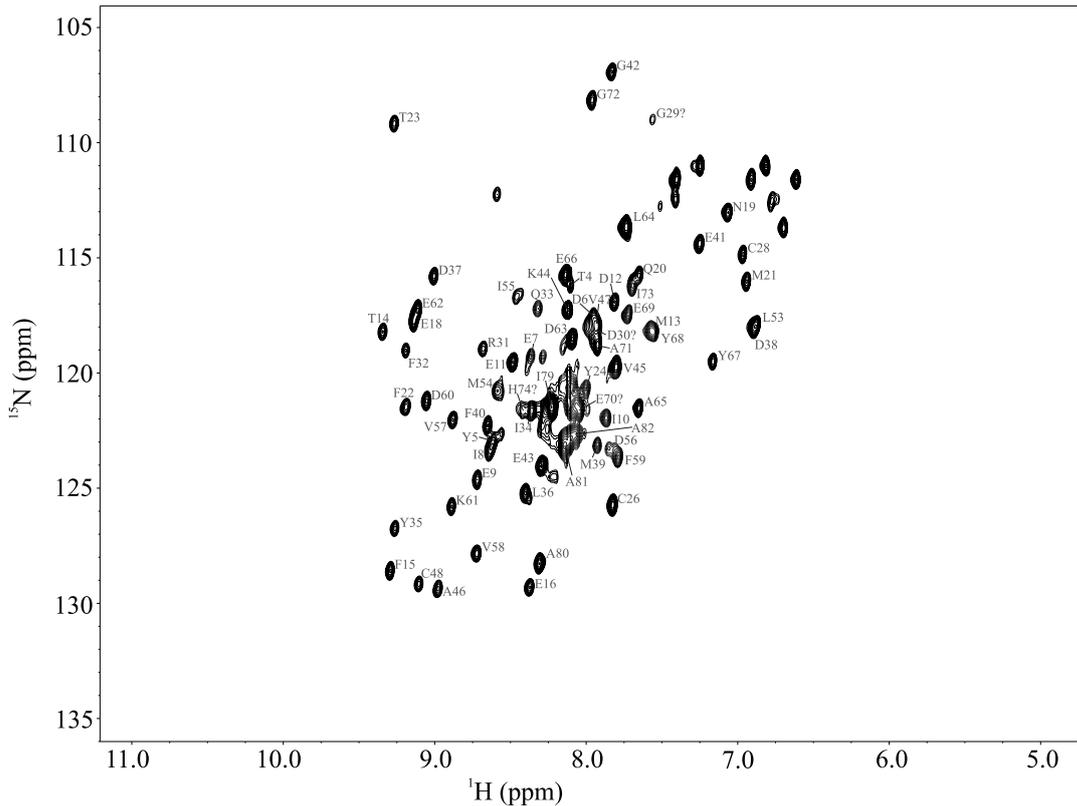


Abb. 6.3.5: Kti11p(M⁻): Zuordnung der ¹H-¹⁵N Resonanzen bei T = 295 K und Atmosphärendruck in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.5 mit 50 mM NaCl und 10% D₂O. Die Probenkonzentration betrug 1500 μM.

Da dieses Protein aus 83 Aminosäuren besteht, davon sieben Proline sind, werden für das HSQC-Spektrum 75 Signale erwartet und sechs zusätzliche Signale, welche von den Seitenketten der Aminosäuren von N19, Q20 und Q33 herrühren. Es konnten sämtliche Resonanzen bis auf die von M1, V2, S3, S50, C51, S52, E77 und A83 zugeordnet werden. Die Aminosäure E77 liegt zwischen dem Prolin 76 und Prolin 78 und ist aus diesem Grund sehr schwer zuzuordnen. Die meisten chemischen Verschiebungen der Amidprotonen von Kti11p(M⁻) sind im Vergleich zu Kti11p(M⁺) für beide Frequenzachsen in den Niedrigfeldbereich (hohe ppm-Werte) des Spektrums verschoben. Das zeigt sich besonders bei C28 und L53. Ein Vergleichsspektrum zwischen der apo- und der holo- Form des Proteins ist im Anhang in Abschnitt A.3 aufgezeigt. Eine Auflistung der Resonanzzuordnung für Kti11p(M⁻) ist im Anhang unter Tab. A.6.2 zu finden.

6.3.3 Druckabhängigkeit der NH-Rückgratresonanzen von Proteinen

Im Folgenden sollen die beiden Proteine *Bs*-CspB und Kti11p(M⁻), genauer die nativen Signale ihrer NH-Rückgratresonanzen, auf die Abhängigkeit ihrer chemischen Verschiebung bei Druckänderung unter Berücksichtigung der GGXA Verschiebungen

untersucht werden. Dabei wird die Temperatur des Systems konstant gehalten.

Da das Protein *Bc-Csp R3E L66E* bereits ab 60 MPa zur Hälfte entfaltet vorliegt, was mit einem entsprechenden Signalverlust der nativen Resonanzen einhergeht, ist eine Untersuchung der chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit vom Druck über einen Druckbereich bis etwa 200 MPa für diese Doppelvariante ungeeignet. Druckschritte unterhalb von 10 MPa sind wegen der Auflösung der Hochdruckanlage von 4 MPa nicht sinnvoll. Somit hätten sich für *Bc-Csp R3E L66E* bei einer Messreihe bis 60 MPa nur sechs Druckschritte ergeben. Aus diesen Gründen wurde von einer Untersuchung der Kälteschockprotein Doppelvariante *Bc-Csp R3E L66E* auf Basis der Rückgratsignalverschiebung bei Druckänderung abgesehen.

6.3.3.1 Das Kälteschockprotein *Bs-CspB*

Das Protein *Bs-CspB* wurde bei der Temperatur maximaler Stabilität $T = 298$ K in Natriumcacodylat Puffer pH 7 und 10% D_2O untersucht. Hierfür ist in Abb. 6.3.6 eine überlagerte Darstellung der druckabhängigen Rückgratsignale bei konstanter Temperatur aufgezeigt. Die Farbkodierung geht von 0.1 MPa (hellblau) bis 200 MPa (dunkelblau). Der Druck wurde in 20 MPa Schritten erhöht.

Es ist zu erkennen, dass bei angelegtem Druck eine Intensitätsabnahme der nativen Signale zu verzeichnen ist. Diese ist hier nicht so gut zu erkennen, wie es bei den eindimensionalen Protonenspektren der Fall ist. Gleichzeitig tauchen bei hohen Drücken um 8.5 ppm auf der Protonenfrequenzachse zunehmend weitere (dunkelblaue) Signale auf, welche von der entfalteten Spezies stammen. Die Resonanzen der entfalteten Spezies zeigen eine sehr viel geringere Abhängigkeit der chemischen Verschiebung vom Druck, als es für die nativen Signale der Fall ist. Das wird verständlich, wenn man bedenkt, dass die chemische Umgebung eines jeden Kernspins im entfalteten Zustand, welcher als lineare Kette angenommen werden kann, kaum eine hohe Variation der Lage seiner räumlich nächsten Nachbarspins durch Druckänderung zulässt, wie es für ein globuläres, natives System der Fall ist.

Die nativen Signale wandern nicht in eine bestimmte Vorzugsrichtung, jedoch verschieben die meisten Signale auf der Protonenfrequenzachse ins Tieffeld, zu hohen ppm-Werten. Die Tieffeldverschiebung kann mit einer Verkürzung der Wasserstoffbrückenbindungen in Abhängigkeit vom Druck erklärt werden [Li *et al.*, 1998, Nisius und Grzesiek, 2012]. Ein verkürzter Abstand bedeutet eine stärkere Polarisierung der Wasserstoffbrückenbindung und führt somit zu einer Abschwächung der magnetischen Abschirmung, was eine Tieffeldverschiebung auf der Protonenachse zur Folge hat. Die Art der Wasserstoffbrückenbindung bestimmt dabei die Stärke der Verschiebung. Jenachdem ob es sich um eine intramolekulare $N-H \cdots O=C$ Wasserstoffbrückenbindung, eine Wasserstoffbrückenbindung zu eingeschlossenen Wassermolekülen oder zu Wassermolekülen zum umgebenden Wasser handelt, wobei letztere die stärksten

chemischen Verschiebungen entlang der Protonenachse aufweisen. Die Verschiebungen der Amidprotonen, die zu diesen externen Wassermolekülen gebunden sind, weisen stärkere Verschiebungen am N- und C-Terminus, sowie in den Schleifen Regionen des Proteins auf [Li *et al.*, 1998].

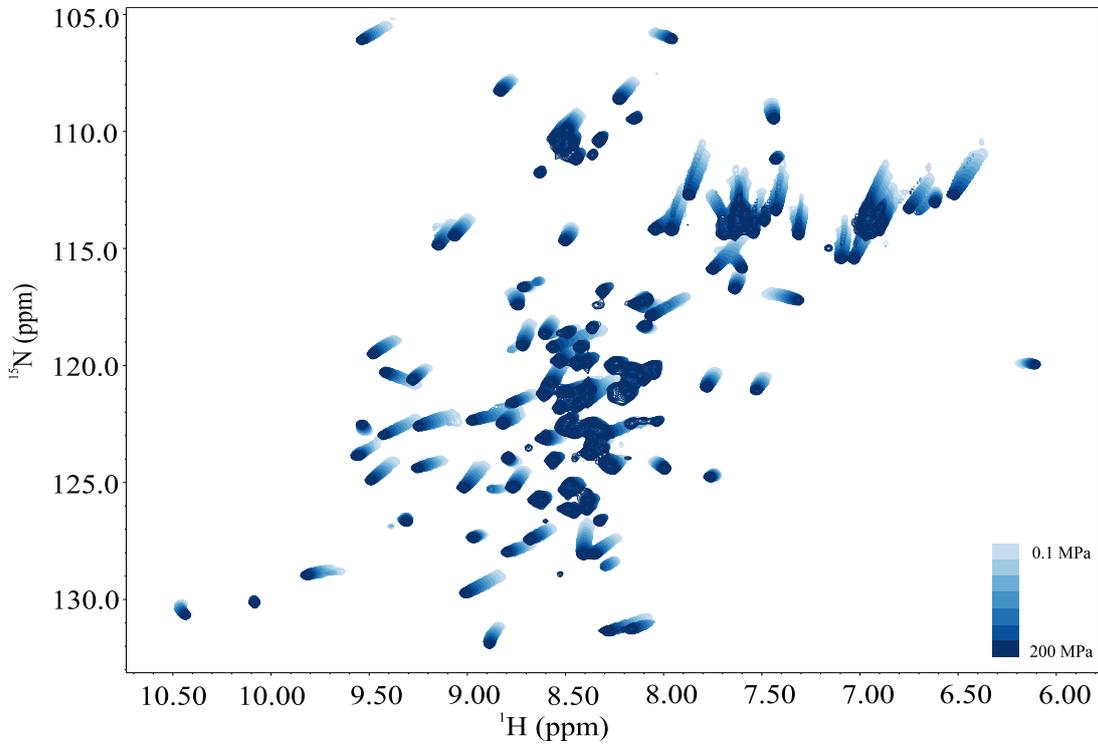


Abb. 6.3.6: *Bs-CspB*: Überlagerte Darstellung der druckabhängigen Rückgratsignale bei 298 K in 20 mM Natriumcacodylat pH 7 von 0.1 MPa bis 200 MPa in Schritten von 20 MPa.

Die Änderungen der chemischen Verschiebungen in Abb. 6.3.6 zeigen eine intrinsische Proteindruckabhängigkeit, da sich durch Druckerhöhung bereits die chemische Umgebung der HN-Resonanzen einer einzelnen Aminosäure ändert, wie in Abschnitt 6.3.1 gezeigt wurde. Die Abhängigkeit der Protonen bzw. Stickstoffsignale der jeweiligen Aminosäure aus dem Tetrapeptid GGXA muss somit von der chemischen Verschiebung der Aminosäuren im Protein abgezogen werden, um quantitative Aussagen über strukturelle Änderungen des Proteins treffen zu können. Für das Kälteschockprotein *Bs-CspB* ist das nur für die Verschiebung entlang der Protonenachse möglich, da es sich bei der GGXA Probe um ein unmarkiertes Tetrapeptid handelte und somit Informationen bezüglich der Stickstoffresonanzen ausgeschlossen sind.

Mit einem *Shell-Skript* wurde der GGXA Einfluss für jede Aminosäure des Proteins bei jedem Druckpunkt korrigiert. Dieses Skript ist im Anhang in Unterabschnitt B.4.1 zu finden.

In Abb. 6.3.7 ist die Druckabhängigkeit der GGXA-korrigierten Amidprotonensignale der NH-Rückgratresonanzen des Kälteschockproteins über dem Druck aufgetragen.

Gleichzeitig wurde die quadratische Gleichung 4.4.6 an die Datenpunkte einer jeden Aminosäure des Proteins angepasst, um den linearen b_1 und den quadratischen b_2 Druckparameter zu bestimmen. Hierfür fand das Skript aus Unterabschnitt B.4.2 Anwendung.

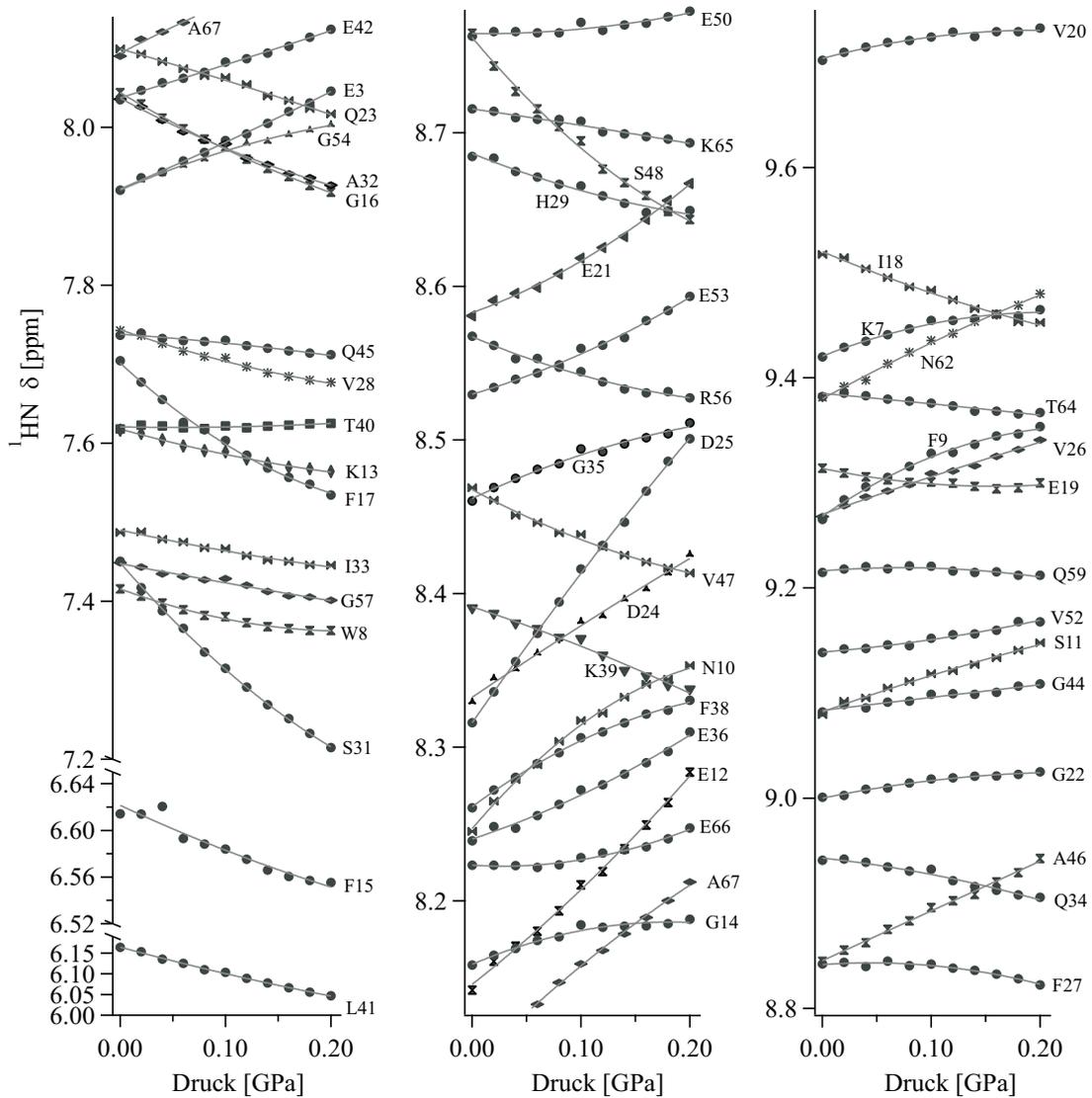


Abb. 6.3.7: *Bs-CspB*: Druckabhängigkeit ausgewählter Amidprotonensignale. Die Datensätze sämtlicher ^1HN Signale jeder Aminosäure des Proteins sind GGXA korrigiert. Zur Bestimmung der Parameter b_1 und b_2 wurde Gleichung 4.4.6 an die Daten angepasst (durchgezogene Linien).

Zur besseren Veranschaulichung der ermittelten Druckkoeffizienten sind in Abb. 6.3.8 und Abb. 6.3.9 die Parameter b_1 und b_2 der Amidprotonen und der Stickstoffkerne über der Aminosäuresequenz dargestellt. Die Protonenresonanzen konnten, wie bereits erwähnt, über die GGXA Parameter in Natriumcacodylatpuffer korrigiert werden, die Stickstoffkerne können an dieser Stelle jedoch nur unkorrigiert ausgewertet werden. In Abb. 6.3.8 sind zusätzlich zu den korrigierten b_1 Werten der Amidprotonen-

nen vergleichsweise die unkorrigierten Parameter grafisch dargestellt. Eine Auflistung sämtlicher Druckkoeffizienten für das Protein *Bs-CspB* ist im Anhang unter Tab. A.7.1 und Tab. A.7.2 zu finden.

Eine Abstandsverringern einer Wasserstoffbrückenbindung geht mit einer Tieffeldverschiebung der ^1HN Signale, also positiven b_1 Werten einher. Somit deuten korrigierte b_1 Parameter, die negative Werte annehmen, auf eine geringere Verkürzung der Wasserstoffbrücke als das GGXA Peptid oder gar auf eine Streckung der Wasserstoffbrückenbindung hin.

Aminosäuren vom selben Typ zeigen in Abb. 6.3.8 beziehungsweise in Tab. A.7.2 sehr unterschiedliche b_1 und b_2 Werte an, welche sich somit auch stark von den jeweiligen GGXA Werten unterscheiden. Somit kann eindeutig von lokalen Strukturänderungen innerhalb des Proteins ausgegangen werden. Beispielsweise zeigen die Amidprotonensignale der Aminosäuren A32 und A46 sehr unterschiedliche b_1 und b_2 Werte. Die lineare Abhängigkeit von A32 hat einen Wert von $b_1 = -0.718 \pm 0.049$ ppm/GPa und eine quadratische Abhängigkeit von $b_2 = 0.831 \pm 0.239$ ppm/GPa². Wohingegen sich die Werte für A46 zu $b_1 = 0.473 \pm 0.038$ ppm/GPa und $b_2 = 0.002 \pm 0.184$ ppm/GPa² ergeben.

Da die Druckverschiebung von Amidprotonen stark mit der Wasserstoffbrückenbindungslänge $\text{H} \cdots \text{O}$ korreliert [Li *et al.*, 1998, Wagner *et al.*, 1983], sind für *Bs-CspB* diejenigen Aminosäuren hervorgehoben werden, welche eine intramolekulare $\text{NH} \cdots \text{O}=\text{C}$ Wasserstoffbrückenbindung aufweisen. Die Druckverschiebungen der ^{15}N Signale hingegen, lassen eine gewisse Drehung der Torsionswinkel Φ und Ψ erkennen [Akasaka *et al.*, 1999].

Die über das Program Pymol aufgezeigten polaren Kontakte der pdb Datei 1NMG des Proteins *Bs-CspB*, lassen für folgende Aminosäuren im Protein intramolekulare $\text{N}-\text{H} \cdots \text{O}=\text{C}$ Wasserstoffbrückenbindungen des NH-Rückgrates erkennen: L2, G4, K5, V6, K7, W8, N10, K13, G16, F17, I18, E19, V20, Q22, V26, V28, A32, I33, V47, S48, F49, V52, G54, G57, Q59, T64 und E66. Der hydrophobe Kern wird innerhalb der β -Fasstruktur von den Aminosäuren L2, V6, F9, I18, V20, V26, V28, L41, V47, F49, I51 und V63 gebildet [Schnuchel und Holak, 1993].

In Abb. 6.3.8 und Abb. 6.3.9 sind HN Rückgratresonanzen von intramolekularen $\text{N}-\text{H} \cdots \text{O}=\text{C}$ Wasserstoffbrückenbindungen in schwarz dargestellt. Hellgrau markierte NH Signale zeigen keine intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, können jedoch Wasserstoffbrückenbindungen zu in Kavitäten eingeschlossenen Wassermolekülen oder Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen des umgebenden Lösungsmittels bilden.

Eindeutig ist der Unterschied zwischen unkorrigierten und korrigierten Protonenresonanzen in Abb. 6.3.8 zu erkennen. Deutlich wird für die unkorrigierten Signale nochmals die Verschiebung fast aller Resonanzen in den Tieffeldbereich.

Auffällig ist, dass positive b_1 Werte oft mit negativen b_2 Werten korrelieren und umgekehrt. Das gilt für die korrigierten Protonenresonanzen genauso wie für die unkorri-

gierten Stickstoffsignale. Für Signalverschiebungen mit kleinem quadratischem Anteil b_2 , fallen die dazugehörigen Fehler entsprechend groß aus, wie aus Tab. A.7.1 und Tab. A.7.2 entnommen werden kann.

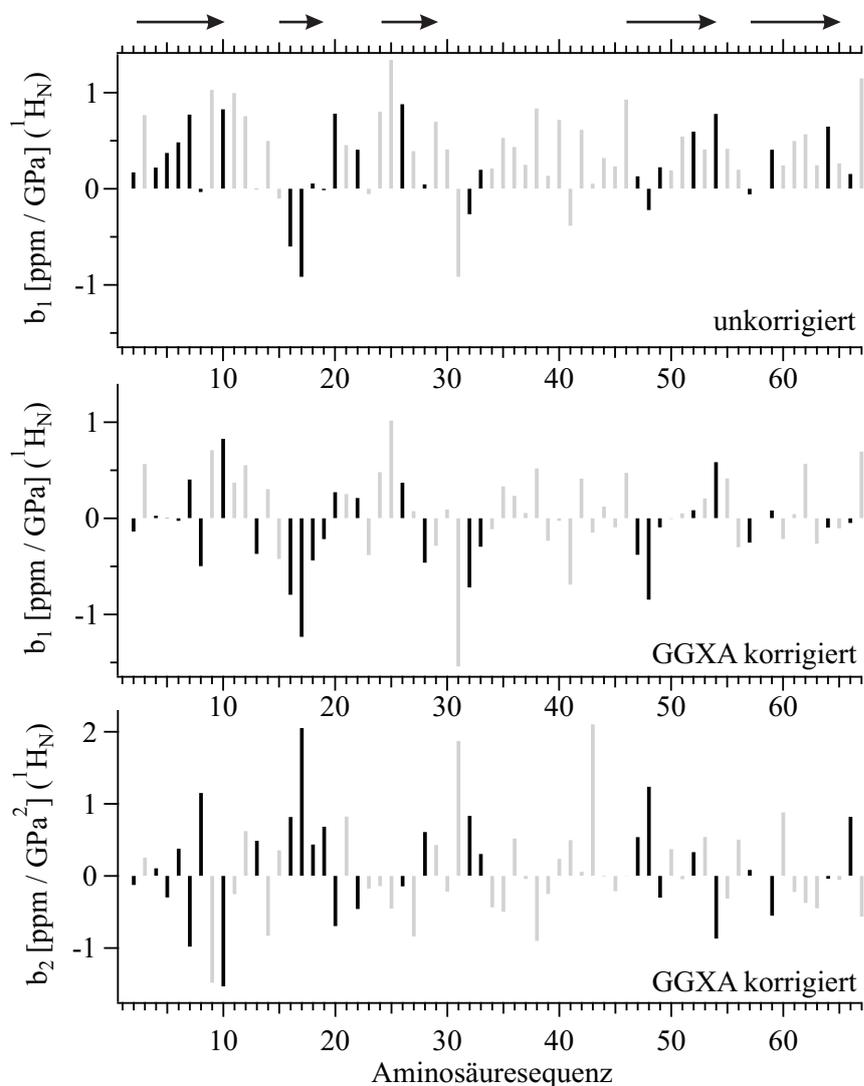


Abb. 6.3.8: *Bs-CspB*: Die nach quadratischer Anpassung ermittelten Werte für b_1 und b_2 der Amidprotonen HN. Oben: sind die unkorrigierten b_1 Werte zum Vergleich aufgezeigt. Mitte: die korrigierten b_1 Werte. Unten: die korrigierten b_2 Werte. Ganz oben sind die β -Faltblattbereiche nach [Schnuchel und Holak, 1993] angedeutet. Die schwarzen Balken markieren diejenigen HN Rückgratatom derjenigen Aminosäuren, welche eine intramolekulare N-H \cdots O=C Wasserstoffbrückenbindung eingehen. Die hellgrauen Balken markieren Amidprotonen, die keine intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen Rückgratatom eingehen, können jedoch Wasserstoffbrückenbindungen zu in Kavitäten eingeschlossenen Wassermolekülen oder Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen des umgebenden Lösungsmittels bilden.

Allein anhand der sekundären Strukturelemente lässt sich kein einfaches Bild von der strukturellen Änderung bei Druckeinwirkung machen. In Schleifenregionen kommt es

per se nicht einfach zu merklich stärkeren Verkürzungen von Wasserstoffbrücken, oder in β -Faltblattbereichen zu geringeren Abstandsänderungen. Erst die Lage und Orientierung einzelner HN Rückgratotope aus der Strukturdatei 1NMG bei Normaldruck zeigt eine gewisse Abhängigkeit, die später in Unterabschnitt 7.2.1 diskutiert wird.

Zu erkennen ist jedoch, dass diejenigen Aminosäuren, welche eine intramolekulare Wasserstoffbrücke bilden (schwarz), meist negative $^1\text{HN } b_1$ Werte aufweisen, was deutlich im zweiten und vierten β -Faltblatt erkennbar ist. Das bedeutet, dass diese Rückgratssignale durch Druckeinwirkung eine geringere Verkürzung der Wasserstoffbrückenbindung erfahren, als die jeweilige Aminosäure im unstrukturierten GGXA Peptid, da intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabiler sind, als diejenigen, welche beispielsweise zum umgebenden Lösungsmittel aufgebaut werden.

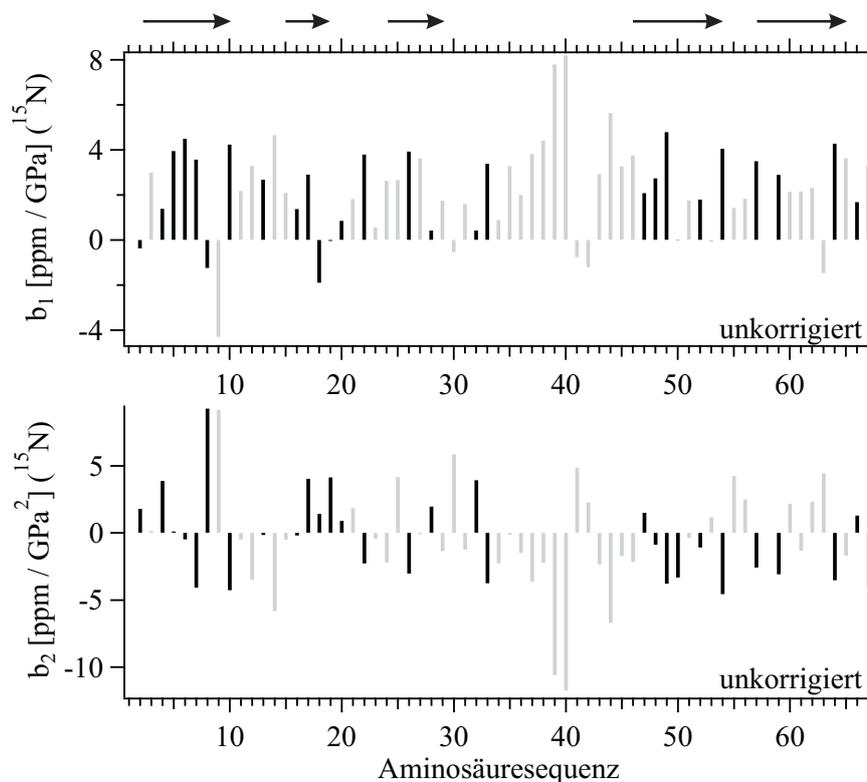


Abb. 6.3.9: *Bs-CspB*: Die nach quadratischer Anpassung ermittelten, unkorrigierten Werte für b_1 und b_2 der ^{15}N Stickstoffkerne. Oben sind die β -Faltblattbereiche angedeutet. Der Farbcode entspricht dem aus Abb. 6.3.8.

Das Programm Pymol ermöglicht es im Protein liegende, eingeschlossene Taschen mit potentiellen Wassereinlagerungen zu ermitteln. Diese Kavitäten wurden hier mit einem Abtastradius von 1.4 Å vermessen. Es konnten drei Kavitäten im Protein *Bs-CspB* gefunden werden, mit Ausdehnungen von etwa 6.2 Å, 3.8 Å und 3.1 Å. Die größte liegt in der Schleifenregion der Aminosäuren von S31 bis E42. Die zweitgrößte befindet sich zwischen den β -Faltblattbereichen der Aminosäuren D25 und P58. Die β -Faltblattbereiche stellen eine Art Zange dar, in welcher die zweitgrößte Kavität eingeschlossen ist. Die

kleinste Kavität liegt zwischen dem hydrophoben Kern des Proteins und der großen Kavität, nahe der Aminosäuren V6 und Q45.

6.3.3.2 Das Zinkfingerprotein Kti11p(M⁻)

Das Protein Kti11p(M⁻) wurde bei der Temperatur maximaler Stabilität $T = 295$ K in 50 mM TRIS/HCl Puffer pH 7.5, 50 mM NaCl und 10% D₂O via HSQC Aufnahmen unter Drücken von bis zu 240 MPa untersucht. Eine überlagerte Darstellung der druckabhängigen Rückgratsignale bei konstanter Temperatur ist in Abb. 6.3.10 aufgezeigt. Die Farbkodierung geht von 0.1 MPa (hellblau) bis 240 MPa (dunkelblau). Der Druck wurde in 40 MPa Schritten erhöht.

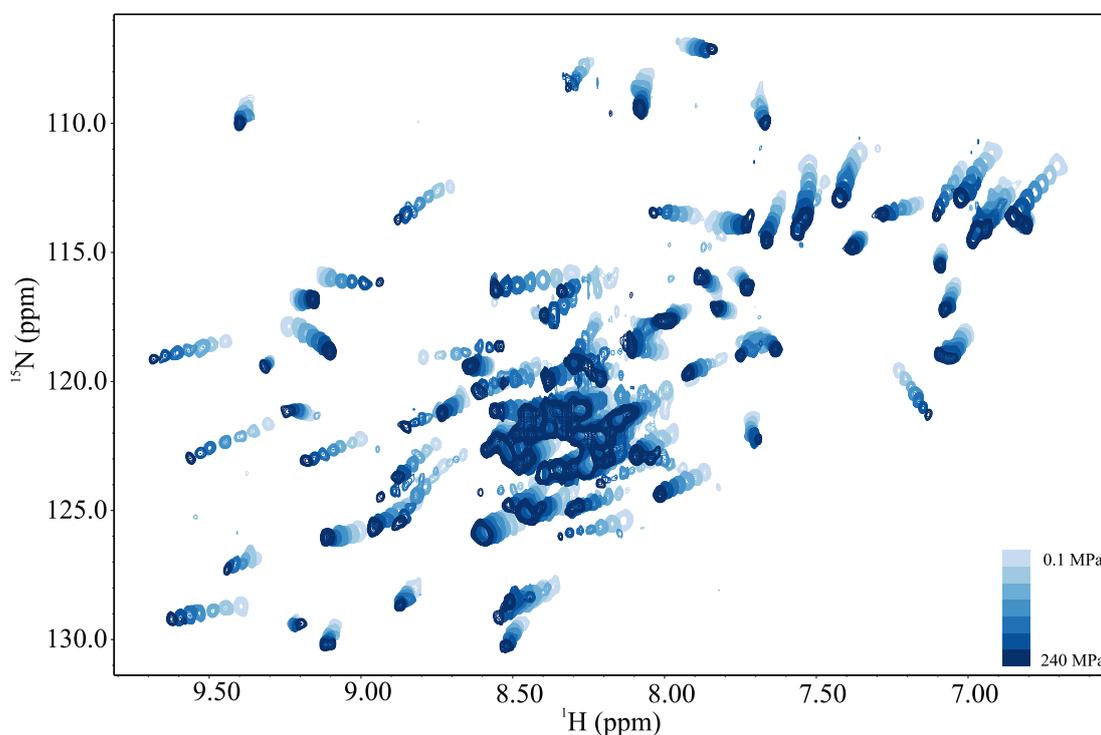


Abb. 6.3.10: Kti11p(M⁻): Überlagerte Darstellung der druckabhängigen Rückgratsignale bei 295 K in 50 mM TRIS/HCl pH 7.5 und 50 mM NaCl mit 10% D₂O von 0.1 MPa bis 240 MPa in Schritten von 40 MPa.

Leider konnten anhand der durch Hochdruck hervorgerufenen Änderungen der chemischen Verschiebung nicht alle Rückgratresonanzen verfolgt werden. Das trifft besonders für Protonenresonanzen zwischen 8 ppm und 8.5 ppm zu, wie im HSQC aus Abb. 6.3.10 ersichtlich, da genau in diesem Resonanzbereich bei Druckerhöhung die Signale der entfalteten Spezies zusätzlich auftreten. Bei *Bs-CspB* ist dieser Effekt nicht so deutlich ausgeprägt. Aus diesem Grund wurde nur die Druckabhängigkeit derjenigen Rückgratresonanzen verfolgt, welche eindeutig nachzuvollziehen waren.

Ähnlich wie bei *Bs-CspB*, verschieben hier die meisten Resonanzen in der Protonen- als

auch in der Stickstoffdimension in Richtung Tieffeld. Es wurden sämtliche Protonen- und Stickstoffresonanzen von Kti11p(M⁻) anhand der für das Peptid Ac-GGXA-NH₂ in TRIS/HCl Puffer bekannten δ'_1 und δ'_2 Werte mittels des Programmes aus Unterabschnitt B.4.1 korrigiert. Die ¹H und ¹⁵N Korrekturwerte wurden aus [Koehler *et al.*, 2012] entnommen. Diese Ac-GGXA-NH₂ Messungen wurden von Koehler *et al.* in 20 mM TRIS/HCl pH 6.7 bei 283 K und 10% D₂O durchgeführt.

In Abb. 6.3.11 sind die korrigierten Protonenverschiebungen ausgewählter Rückgratesonanzen über dem Druck aufgetragen. Gleichzeitig wurde die quadratische Gleichung 4.4.6 an die Datenpunkte einer jeden Aminosäure des Proteins angepasst, um den linearen b_1 und den quadratischen b_2 Druckparameter zu bestimmen.

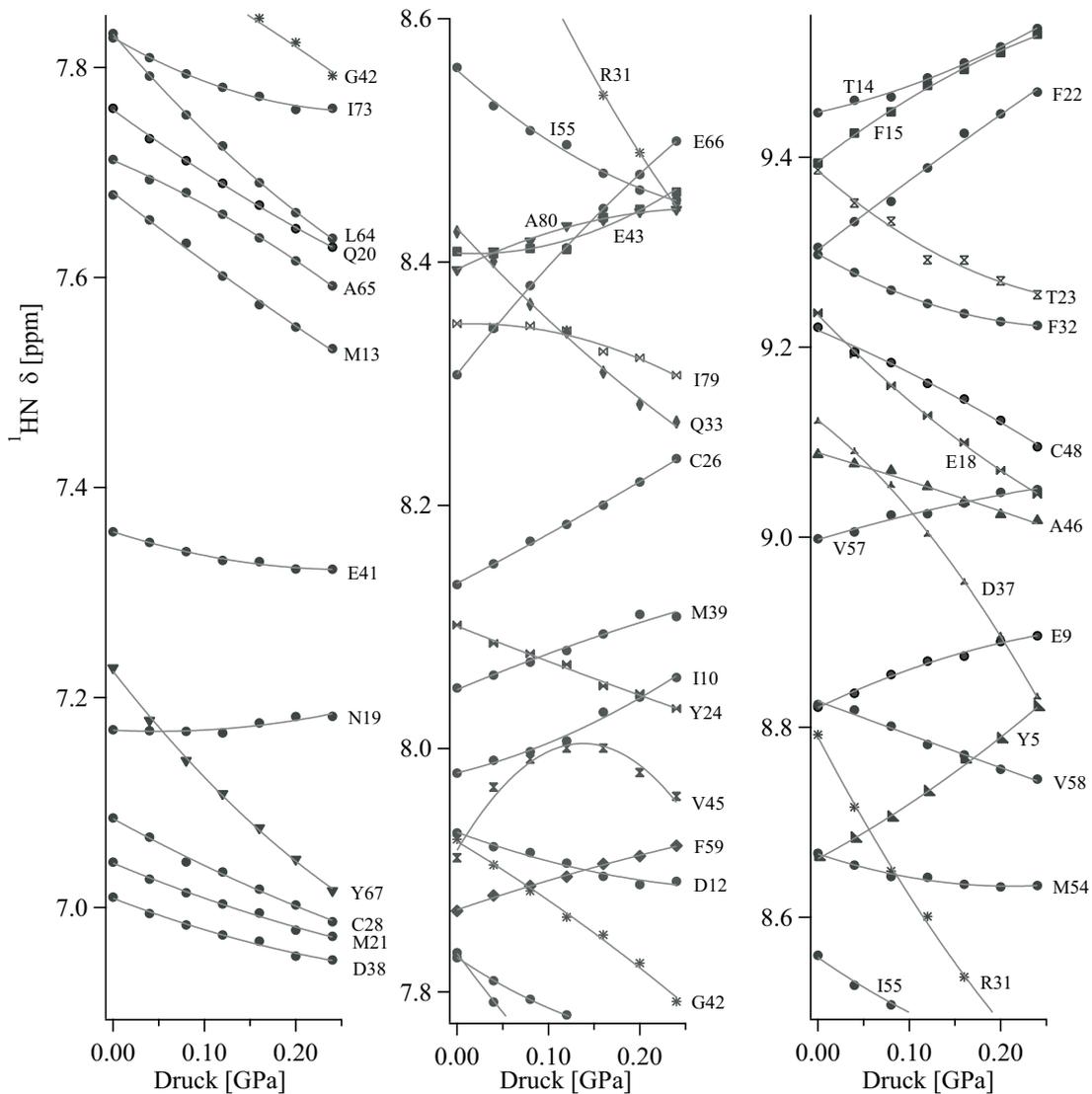


Abb. 6.3.11: Kti11p(M⁻): Druckabhängigkeit ausgewählter Amidprotonensignale und Anpassung der Gleichung 4.4.6 an die Daten (durchgezogene Linien) zur Bestimmung der Parameter b_1 und b_2 .

Die einzelnen korrigierten b_1 und b_2 Werte der Amidprotonen sind in Abb. 6.3.12 über der Sequenz aufgetragen und im Anhang unter Tab. A.7.3 zu finden. Mit dem Programm Pymol konnten polare Kontakte innerhalb von Kti11p(M⁻) anhand der noch unveröffentlichten Röntgenkristallstrukturdatei ermittelt werden. Für folgende ¹HN Rückgratatome wurden polare Kontakte gefunden: I8, I10, D12, M13, T14, E16, N19, Q20, M21, F22, T23, Y24, C26, G29, D30, F32, Q33, I34, L36, D38, M39, F40, E41, E43, A46, V47, C48, S52, I55, D56, V57, V58, D63, L64, A65, Y67, Y68, E69, E70, A71, G72 und I73.

Diese Aminosäuren sind in Abb. 6.3.12 schwarz markiert. Alle anderen sind in hellgrau dargestellt. Wie bereits beim Kälteschockprotein erwähnt, kann es sich hierbei um Wasserstoffbrückenbindungen handeln, die zum umgebenden Lösungsmittel oder zu innerhalb der Proteinstruktur befindlichen Wassermolekülen Brücken aufgebaut haben.

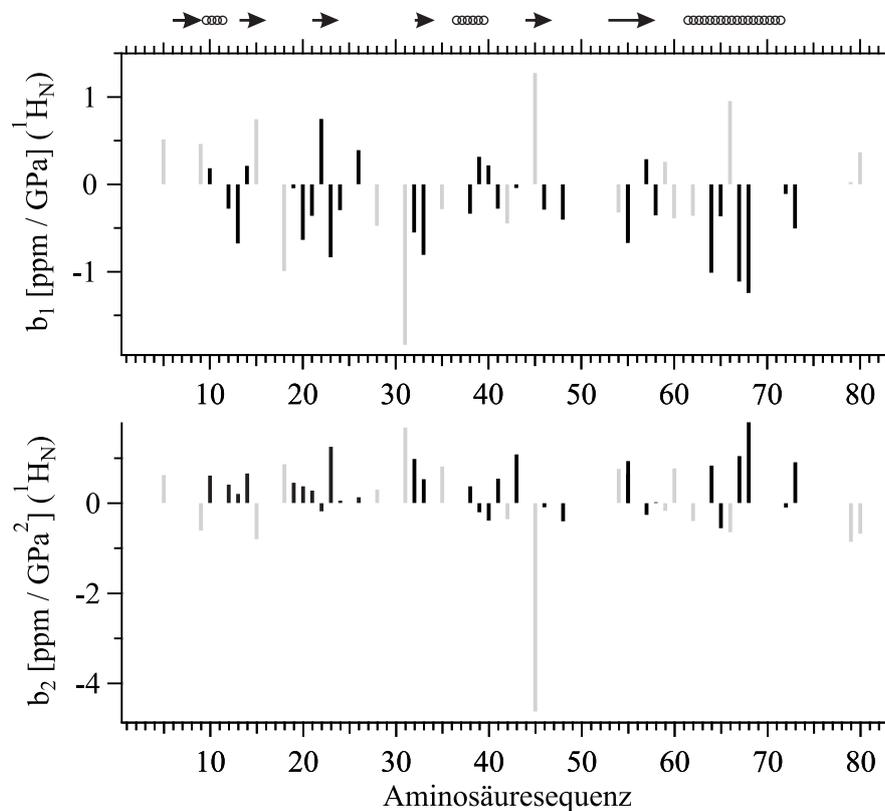


Abb. 6.3.12: Kti11p(M⁻): Die nach quadratischer Anpassung ermittelten Werte für b_1 und b_2 der Amidprotonen HN.

Die meisten intramolekular an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligten ¹HN Resonanzen in Abb. 6.3.12 (schwarz), zeigen negative b_1 Werte. Diese gehen oft mit positiven b_2 Werten einher. Wie bei Bs-CspB zeigt auch Kti11p(M⁻) für den gleichen Aminosäuretypus unterschiedlichste, korrigierte lineare und nichtlineare Druckparameter der Amidprotonen, was als Indikator für lokale und globale strukturelle Ände-

rungen zu interpretieren ist. Beispielsweise zeigen E9 und E18 ein absolut konträres Verhalten. Die modellfreien Druckparameter für E9 sind $b_1=0.462\pm 0.050$ ppm/GPa und $b_2=-0.606\pm 0.202$ ppm/GPa². Für E18 ergibt sich $b_1=-0.993\pm 0.037$ ppm/GPa und $b_2=0.871\pm 0.151$ ppm/GPa².

Mittels Pymol konnte eine einzige Kavität im Inneren von Kti11p(M⁻) ermittelt werden. Diese hat eine Ausdehnung von etwa 3.9 Å. Der Abtastradius betrug 1.4 Å. Die Kavität befindet sich inmitten der sechs Faltblattstränge. In nächster Nähe liegen die Seitenketten von I8, Y24, F32, A46 und I55. Eine detailliertere Betrachtung hinsichtlich der Druckeinwirkung auf einzelne Aminosäuren wird in Unterabschnitt 7.2.2 diskutiert.

Die Druckverschiebungen der Stickstoffkerne wurden analog zu den Protonenverschiebungen korrigiert und über dem Druck aufgetragen, wie in Abb. 6.3.13 aufgezeigt.

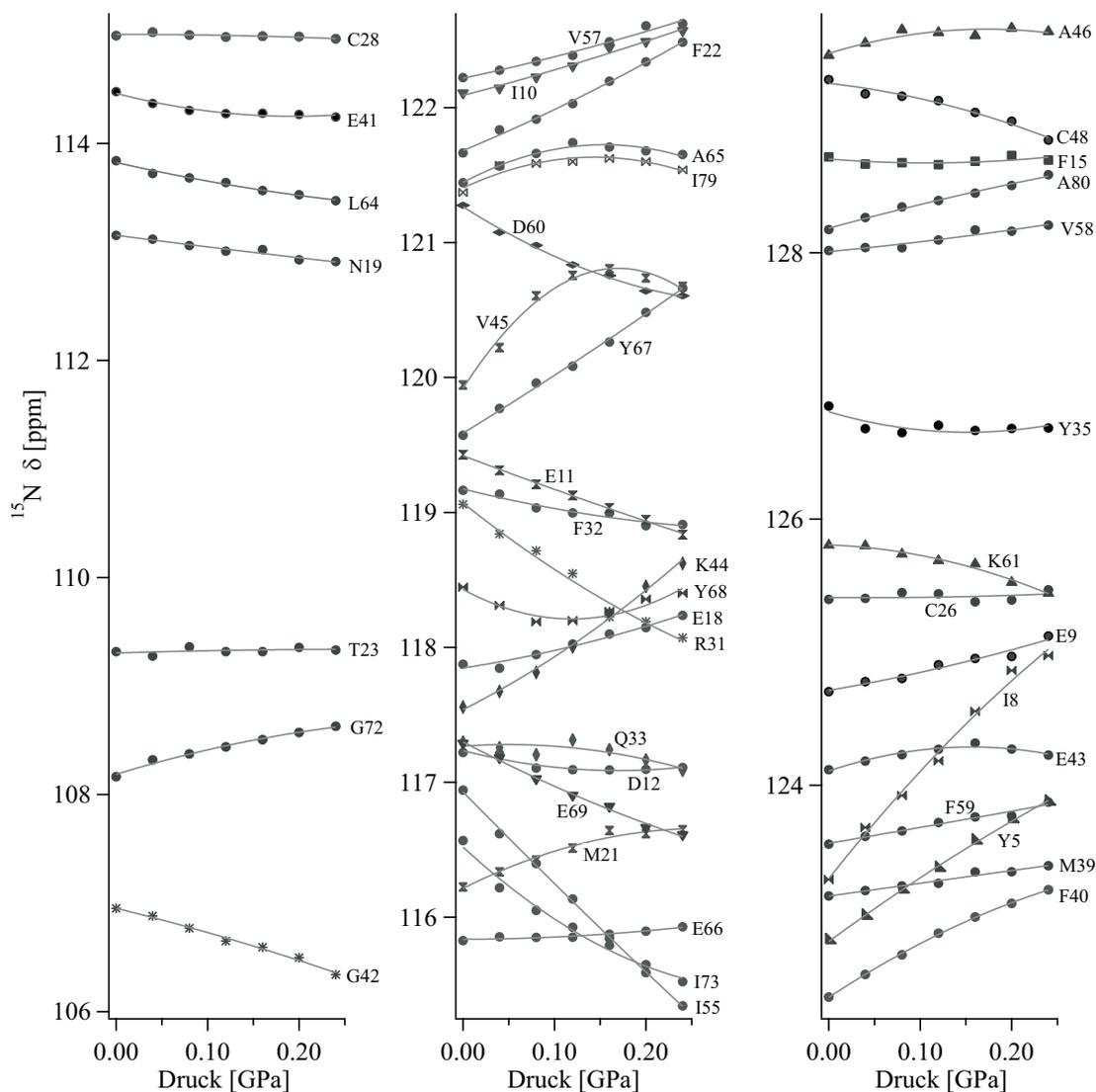


Abb. 6.3.13: Kti11p(M⁻): Druckabhängigkeit ausgewählter Stickstoffsignale und Anpassung der Gleichung 4.4.6 an die Daten (durchgezogene Linien) zur Bestimmung der Parameter b_1 und b_2 .

Die korrigierten b_1 und b_2 Werte der Stickstoffresonanzen sind über der Aminosäuresequenz grafisch in Abb. 6.3.14 dargestellt. Wiederum sind in schwarz die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen hervorgehoben. Eine Auflistung aller ^{15}N Druckkoeffizienten ist im Anhang unter Tab. A.7.4 zu finden.

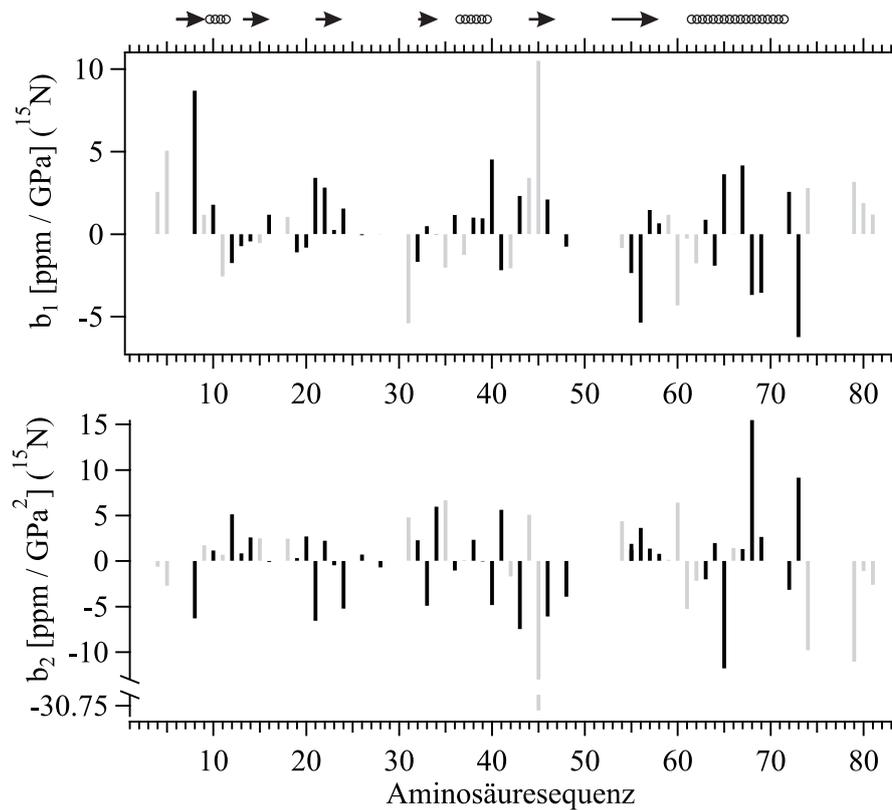


Abb. 6.3.14: Kti11p(M⁻): Die nach quadratischer Anpassung ermittelten Werte für b_1 und b_2 der Stickstoffsignale.

Große positive b_1 Werte gehen oft mit großen negativen b_2 Werten einher und umgekehrt. Im Gegensatz zu den korrigierten Protonenverschiebungen zeigen die korrigierten Stickstoffkernverschiebungen kein eindeutiges Muster bezüglich der intramolekular aufgebauten Wasserstoffbrücken (schwarze Balken).

ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

7.1 Proteinstabilität aus eindimensionalen Protonenspektren

In dieser Arbeit wurde am Beispiel dreier Proteine die thermodynamische Stabilität in Abhängigkeit von Druck und Temperatur unter Verwendung einer NMR-spektroskopischen Methode nach [Szyperski *et al.*, 2005] quantitativ untersucht. Die genaue Bestimmung des entfalteten Anteils f_u stand dabei im Vordergrund. Diese Methode zur Bestimmung der Anteile an entfaltetem Protein f_u aus dem aliphatischen Bereich der eindimensionalen Protonenspektren, zeigt eine sehr gute Reproduzierbarkeit und ist anderen NMR-Methoden vorzuziehen. Das resultiert aus der Einbeziehung von Integralbereichen mit entfaltetem Signalen und der damit einhergehenden Verhältnissbildung der Signalintensitäten. Andere protonenspektrenbezogene Methoden, die sich ausschließlich an der Intensitätsabhängigkeit des nativen Signals von Druck, Temperatur, pH-Wert oder Denaturierungsmittel orientieren, liefern oft eine ungenauere Reproduzierbarkeit der Messung. NMR-Methoden, die auf heteronuklearer Resonanz beruhen, liefern, durch den Amidprotonenaustausch mit dem Lösungsmittel, verfälschte Ergebnisse im ^1H - ^{15}N -Spektrum.

Auch gegenüber optischen Methoden, bei denen es in den Bandenspektren zur Überlagerung von entfaltetem und nativem Anteil kommt, wird der Vorteil eindimensionaler Protonenspektren deutlich.

Die Temperatur- als auch die Druckübergangskurven der drei untersuchten Proteine *Bs-CspB*, *Bc-Csp R3E L66E* und *Kti11p(M⁻)* zeigen ein sehr unterschiedliches Verhalten. Die höhere Temperaturstabilität der Kälteschockproteine ist in den Niedrigtemperaturbereich verschoben, wohingegen die Temperaturstabilität von *Kti11p(M⁻)* im höheren Temperaturbereich zu finden ist. Eine Kältedenaturierung lässt sich für *Kti11p(M⁻)* bereits ab 0.1 MPa erkennen. Bei der Doppelvariante *Bc-Csp R3E L66E* ist dieses Phänomen unter Atmosphärendruck nicht zu finden. In [Szyperski *et al.*, 2005] konnte für *Bc-Csp R3E L66E* mittels extrem gekühltem Wasser (*supercooled water*) bis $T = -12^\circ\text{C}$ bei Atmosphärendruck ein Kältedenaturierungsast aufgezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit zeigt *Bc-Csp R3E L66E* ein stark ausgeprägtes Stabilitätsmaximum bis in einen niedrigen Temperaturbereich, der auch nicht von *Bs-CspB* erreicht wird. Unter den drei Proteinen wurde für *Bc-Csp R3E L66E* die höchste Hitzeanfälligkeit festgestellt.

Gleichzeitig zeigt die Doppelvariante *Bc-Csp R3E L66E* auch die stärkste Drucksensi-

bilität und kann im verwendeten Druckbereich zu über 90% entfaltet werden.

Das Protein Kti11p(M⁻) läßt ein besonderes Phänomen beim Druckübergang erkennen, indem es bei Drücken ab 150 MPa bis 180 MPa an Stabilität gewinnt. Interessanterweise ist dieses Phänomen nicht beim Temperaturübergang zu finden.

Dieses unterschiedliche Stabilitätsverhalten der drei Proteine spiegelt sich entsprechend in dem jeweiligen Satz an thermodynamischen Parametern wider, wobei im Folgenden der Fokus auf den Druckabhängigkeiten dieser Parameter liegen soll.

Bei *Bs-CspB* konnte zwischen nativem und gefaltetem Zustand eine Volumendifferenz von $\Delta V_0 = (-71.9 \pm 3.9)$ ml/mol bei $T = 300$ K aus den Temperaturübergangsdaten und (-70.5 ± 7.4) ml/mol aus den direkten Druckübergängen bei $T = 298$ K bestimmt werden. Die Volumenänderung von *Bs-CspB* konnte bereits von [Jacob *et al.*, 1999] mittels Drucksprung durch Fluoreszenzmessungen abgeschätzt werden. Das Resultat wurde zu $\Delta V_0 = (-60 \pm 20)$ ml/mol bei 298 K und pH 7 in 100 mM Natriumcacodylatpuffer ermittelt.

Die Volumenänderung zeigt eine starke Abhängigkeit von der verwendeten Temperatur. Für *Bs-CspB* als auch für Kti11p(M⁻) ist diese Abhängigkeit nichtlinear (siehe Abb. 6.2.14a und Abb. 6.2.14c links). Bei *Bc-Csp R3E L66E* kann sie im verwendeten Temperaturbereich als linear angenommen werden (siehe Abb. 6.2.14b links). [Maeno *et al.*, 2009] zeigten ebenfalls durch Fluoreszenzmessungen eine lineare Abhängigkeit $\Delta V(T)$ für das Lysozym der Henne auf. Wahrscheinlich ist aber, dass sich bei noch niedrigeren Temperaturen, die der Messmethode oft nicht zugänglich sind, ebenfalls eine quadratische Abhängigkeit zeigen könnte. Nach dem verwendeten mathematischen Modell muss ΔV bei kompletter Entfaltung einen Wert von Null annehmen, da diese Größe die Differenz des aktuellen Volumens zum Volumen des entfalteten Zustands charakterisiert. Das muss für die Hitze- als auch die Kältedenaturierung gelten, was jedoch nicht durch eine lineare Abhängigkeit beschrieben werden kann. Für Proteine, mit einer im verwendeten Temperaturbereich, ausgeprägten Kälte- und Hitzedenaturierung sollte sich demnach eine quadratische Abhängigkeit des Volumens von der Temperatur zeigen, wie es für *Bs-CspB* und Kti11p(M⁻) erkennbar ist.

Die sich aus der $\Delta V(T)$ Methode ergebende Änderung der thermischen Expansion $\Delta \hat{\alpha}$ weist jedoch für *Bs-CspB* und Kti11p(M⁻) recht große Fehlergrenzen auf. Diese Methode liefert nur für *Bc-Csp R3E L66E* sinnvolle Resultate mit geringem Fehler, da im angewendeten Temperaturbereich eine lineare Abhängigkeit besteht. Genauere Ergebnisse liefert dagegen die aufwendigere $\Delta S_u^0(p)$ Methode, bei der die Entropieänderung über dem Druck aufgetragen wird und der negative Anstieg einer jeden Temperatur die thermische Expansionsänderung $\Delta \hat{\alpha}$ ergibt (siehe Abb. 6.2.14 rechts). Gleichzeitig ist dabei zu erkennen, dass $\Delta \hat{\alpha}$ eine Temperaturabhängigkeit zeigt, die auch für *Bc-Csp R3E L66E* nicht zu vernachlässigen ist. Bei *Bs-CspB* liegt $\Delta \hat{\alpha}$ um den Wert Null, da selbst im gefalteten Zustand des Proteins einige hydrophobe Bereiche dem Lösungsmittel zugewandt sind [Schnuchel und Holak, 1993] und somit der Unterschied der

thermischen Expansion entsprechend klein ausfällt.

Bei den direkten Druckübergängen konnte, beim Vorhandensein einer ausreichenden Datenpunktmenge, die den sigmoidalen Verlauf des Übergangs ausreichend beschreibt, zur Bestimmung der Parameter ΔG_0 , ΔV und $\Delta\hat{\beta}$ die sigmoidale Funktion $f_u(p)$ (Gleichung 4.2.16) verwendet werden. Diese fand nur beim Protein *Bc-Csp R3E L66E* Anwendung. Bei *Bs-CspB* und auch bei *Kti11p(M⁻)* reichten die Druckübergänge im verwendeten Druckbereich nicht von Plateau zu Plateau, sondern enden für *Bs-CspB* bei etwa 50 % Entfaltung. Bei einer derartigen Datenlage ist die Verwendung der quadratischen Abhängigkeit $\Delta G_u^0(p)$ vorzuziehen (Gleichung 4.2.14), um auf ΔG_0 , ΔV und $\Delta\hat{\beta}$ zu schließen.

Liegen ausreichend Datenpunkte aus Temperaturübergängen vor, die einen eindeutigen sigmoidalen Verlauf bei unterschiedlichen Drücken aufweisen, so lässt sich daraus ein kompletter Parametersatz ermitteln. Gleiches gilt für Druckübergänge. Eine der beiden Übergangsarten ist dafür ausreichend. Für das Protein *Bs-CspB* sind Temperaturübergänge bei den verschiedenen fixen Drücken ausreichend. Die Parameter ΔV und $\Delta\hat{\beta}$ lassen sich aus den Quasi-Druckübergängen ermitteln. Für die Doppelvariante *Bc-Csp R3E L66E* sind Druckübergänge bei verschiedenen fixen Temperaturen ausreichend. Die Parameter T_m , Δc_p , $\Delta H_u^0(T_m)$ und $\Delta S_u^0(T_m)$ lassen sich aus den Quasi-Temperaturübergängen bestimmen.

Die aus den Proteinstabilitätswerten über Druck und Temperatur gewonnenen Phasendiagramme reihen sich ein in die von [Smeller, 2002] aufgestellte Klassifizierung. Nach dem heutigen Erkenntnisstand existieren nach dieser Klassifizierung zwei generell unterschiedliche Arten von Ellipsen im Proteinphasendiagrammen, wobei beide eine Art Grenzfall darstellen. Sie sind in Abb. 7.1.1 skizzenhaft dargestellt. Es gibt die *hillside*-artigen Ellipsen, wie beim Protein Ribonuclease A [Brandts *et al.*, 1970] und die *tongue*-artigen Ellipsen, wie beim Protein Chymotrypsinogen [Hawley, 1971]. Diese beiden Arten unterscheiden sich dadurch, dass die *tongue*-artigen Ellipsen eine eindeutige Kältedenaturierung erkennen lassen und gleichzeitig einen stabilisierenden Effekt bei mittleren Drücken auf dem Hitzedenaturierungsast zeigen. Für die in der vorliegenden Arbeit verifizierten elliptischen Phasendiagramme fällt nach dieser Klassifizierung die Doppelvariante *Bc-Csp R3E L66E* eindeutig in die *hillside*-artige Klasse (siehe Abb. 6.2.22b). Das Kälteschockprotein *Bs-CspB* fällt dagegen in die *tongue*-artige Klasse, aber ohne den druckstabilisierenden Effekt bei hohen Temperaturen, da der thermische Expansionskoeffizient $\Delta\hat{\alpha} \approx 0$ ist (siehe Abb. 6.2.22a). Die untere Ellipse des Proteins *Kti11p(M⁻)* zeigt eindeutige Indizien der *tongue*-artigen Klasse (siehe Abb. 6.2.22c). Es ist eine klare Kältedenaturierung zu erkennen mit einer thermischen Expansion größer als Null, womit bei hohen Temperaturen und moderaten Drücken

eine Stabilisierung erreicht werden kann. Dieser Fakt kann mit dem Eisschalenmodell und einer positiven Wärmekapazitätsänderung erklärt werden (siehe auch S.51). Die im nativen Zustand im Kern verborgenen hydrophoben Seitenketten treten im (durch Temperaturerhöhung) entfalteten Zustand stärker mit dem Lösungsmittel in Kontakt. Die umgebenden Wassermoleküle orientieren sich kristallartig an diesen hydrophoben Arealen - eine Eisschale entsteht. Diese kann als vergrößertes Volumen angesehen werden, welches durchaus größer sein kann, als das im nativen Zustand. Wird unter diesen Bedingungen erhöhte Temperatur der Druck gesteigert, so sorgt dieser nach dem Le Chatelier'schen Prinzip dafür, dass das System in einen Zustand geringen Volumens übergeht - hier dem nativen Zustand. Nicht nur für das Zinkfingerprotein Kti11p(M⁻), sondern auch für das zinkbindende Cytochrome C [Lesch *et al.*, 2002] konnte dieser Druckstabilisierungseffekt bei hohen Temperaturen mittels Fluoreszenzmessungen gefunden werden.

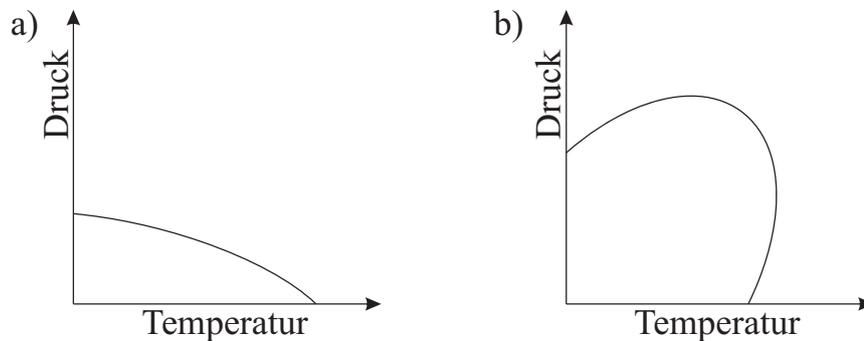


Abb. 7.1.1: Klassifizierung der zwei Ellipsentypen: a) *hillside*-artige Ellipse von Ribonuclease A und b) *tongue*-artige Ellipse von Chymotrypsinogen. Nach [Smeller, 2002].

Die bei der Ellipsenanpassung ermittelten Werte der thermischen Expansionsänderung $\Delta\hat{\alpha}$ bezüglich des jeweiligen Referenzpunktes $\{T_0, p_0\}$ für alle drei in dieser Arbeit untersuchten Proteine, passen sehr gut mit den aus der Einzelmessung bestimmten Werten überein. Obwohl für *Bs-CspB* und Kti11p(M⁻) eine Temperaturabhängigkeit für $\Delta\hat{\alpha}$ aus den Einzelmessungen ersichtlich wird, konnte diese Art der Abhängigkeit nicht in der Form der Ellipse wiedergefunden werden. Nach [Smeller, 2002] würde eine Abhängigkeit $\Delta\hat{\alpha}$'s von der Temperatur eine T^2p Relation in der Ellipsengleichung hervorrufen, die sich in der Ellipsenform zu einer Ausbeulung bei hohen Drücken und zu hohen Temperaturen niederschlagen würde. Das ist bei keinem der untersuchten Proteine beobachtet wurden. Demnach muss die sich aus den Einzelmessungen ergebende Temperaturabhängigkeit von $\Delta\hat{\alpha}$ zu klein sein, als das sie im Phasendiagramm merklich hervortreten könnte.

Die Anpassung der Ellipse an die Menge der Temperatur- und Druckübergangsdaten kann als eine Art globaler Anpassung gesehen werden, die es ermöglicht lokale Ausreißer der berechneten thermodynamischen Parameter aus den Einzelübergängen zu glätten. Ein Beispiel hierfür ist beim Kälteschockprotein *Bs-CspB* zu finden. In der Ein-

zelmessung zeigt es eine Kältedenaturierungstemperatur T_c bei Atmosphärendruck von ungewöhnlich hohen 268.4 K. Alle nachfolgenden, bei höheren Drücken durchgeführten Temperaturübergangsmessungen, liefern eine stetige Kältedenaturierungspunkterhöhung, beginnend bei etwa 261 K. Durch die Ellipsenanpassung ergibt sich ein Wert der Kältedenaturierung bei Atmosphärendruck zu $T_c = 262.0$ K, der sich somit viel besser in die Kältedenaturierungspunkterhöhung bei steigenden Drücken einreicht. Dieses Ergebnis ist mit dem von [Szyperski *et al.*, 2005] für das Kälteschockprotein *Bc-Csp R3E L66E* gefundene Resultat von -11°C absolut vergleichbar.

Bei unzureichender Datenlage, beispielsweise auf dem Kältedenaturierungsast, kann das durch die Ellipsenanpassung auch zu schlechteren Resultaten führen. Für das Kälteschockprotein *Bc-Csp R3E L66E* ergibt sich aus den Daten der Ellipsenanpassung ein Wert von $T_c = 240.4$ K und aus der Temperaturübergangsmessung bei 0.1 MPa folgt $T_c = 247.6$ K. Somit liegen diese weit von den durch [Szyperski *et al.*, 2005] ermittelten -11°C entfernt. Diese starken Abweichungen lassen sich auf die geringe Datenmenge im Kältedenaturierungsbereich zurückführen.

Beim Protein *Bc-Csp R3E L66E* war es nicht möglich die Kältedenaturierung genauer zu untersuchen, da Temperaturen von etwa -11°C der verwendeten Messmethode erst bei hohen Drücken ab 60 MPa und aufwärts zugänglich werden. Allerdings liegt ab diesem Druck das Protein *Bc-Csp R3E L66E* bereits zu etwa 50 % in seiner entfalteten Form vor. Somit würden bei diesen hohen Drücken Temperaturübergänge in den kalten Bereich keine zusätzlichen Informationen für die Ellipse bei $\Delta G_u^0 = 0$ liefern. Der kalte Denaturierungsbereich konnte in [Szyperski *et al.*, 2005] mittels *supercooled water* bis zu einer Temperatur von $T = -12^\circ\text{C}$ bei Atmosphärendruck abgedeckt werden.

Mittels Ellipsenanpassung ist es möglich alle gesuchten thermodynamischen Parameter zu ermitteln, jedoch ergeben sich aus den Einzelmessungen der Druck - oder Temperaturübergänge genauere Werte für die Volumendifferenz ΔV wie es bei *Bs-CspB* und *Kti11p(M⁻)* der Fall ist.

Unter der Annahme, dass die Datenpunkte des Phasendiagramms von *Kti11p(M⁻)* bei Drücken oberhalb von 150 MPa einen intermediären Zustand kennzeichnen, soll im Folgenden mit Hilfe der Ellipsengleichung der Satz an thermodynamischen Größen für diesen Zustand bestimmt werden. Die höchste Stabilität dieses Intermediates liegt im Bereich um $T_0 = 302$ K und $p_0 = 237$ MPa und stellt somit die Referenzkoordinaten für die Ellipsenanpassung dar. In Abb. 7.1.2 ist die angepasste Ellipse für den oberen Bereich des Phasendiagramms aufgezeigt.

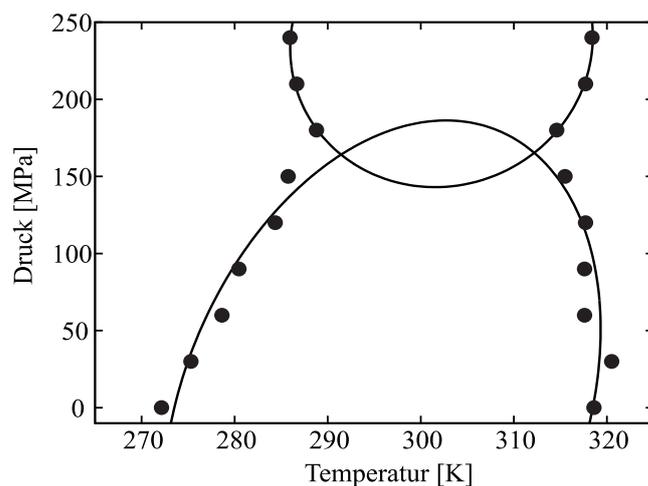


Abb. 7.1.2: Kti11p(M⁻): Anpassung der Ellipsengleichung an die obere und untere Ellipse. Der obere Phasenraumabschnitt kann auf einen intermediären Zustand des Zinkfingerproteins hindeuten.

Durch die Anpassung der Ellipsengleichung 4.3.7 ergeben sich für den obereren Abschnitt die in Tab. 7.1.1 aufgelisteten thermodynamischen Parameter.

ΔG_0	2105 ± 187	J/mol
Δc_p	4832 ± 340	J/(mol K)
$\Delta \hat{\alpha}$	0.117 ± 0.090	ml/(mol K)
$\Delta \hat{\beta}$	0.479 ± 0.050	ml/(mol MPa)
ΔS_0	-3.6 ± 2.1	J/(mol K)
ΔV_0	-0.04 ± 0.8	ml/mol

Tab. 7.1.1: Kti11p(M⁻): Thermodynamische Parameter für die Anpassung an die obere Ellipse mit Referenzpunkt bei $T_0 = 302$ K und $p_0 = 237$ MPa.

Die Fehler dieses Parametersatzes wurden durch Variation der einzelnen Größen und des daraus resultierenden Einflusses auf die Ellipse abgeschätzt. Da ΔV_0 die Differenz zwischen aktuellem Volumen und dem entfalteten Volumen angibt, kann ein Wert von $\Delta V_0 = (-0.04 \pm 0.8)$ ml/mol so interpretiert werden, dass dieser Zustand ein vergleichbares Volumen wie der entfaltete Zustand einnimmt. Diese These wird später in Abschnitt 7.2.2.2 bestätigt. Aus den ermittelten Werten der freien Enthalpie ΔG_0 des nativen und des intermediären Zustandes ergibt sich eine Energiedifferenz von $\Delta G_0 = 2736$ J/mol.

7.2 Druckabhängigkeit der Rückgratatomer

7.2.1 Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung von Bs-CspB

Im Folgenden wird die Auswirkung auf die am stärksten durch Hochdruck beeinflussten Aminosäuren des Kälteschockproteins Bs-CspB diskutiert und Bezug auf die

Ergebnisse von Abb. 6.3.8 und Abb. 6.3.9 genommen.

Die größte lineare ^1HN Verschiebung lässt Aminosäure S₃₁ erkennen, die gleichzeitig eine der größten nichtlinearen Verschiebungen zeigt. Ausschlaggebend dafür ist die unmittelbare Nähe zur großen Kavität. Es konnte bereits in früheren Experimenten festgestellt werden, dass die größten b_2 Werte in räumlicher Nähe von Kavitäten auftauchen [Kremer *et al.*, 2007] und ein Indikator für globale Konformationsänderungen sind. Große lineare ^1HN Verschiebungen sind mit lokalen Kompressibilitätsänderungen zu begründen.

Auch Aminosäure D₂₅ zeigt eine starke, positive lineare Protonenabhängigkeit, da diese sich zum einen in Schlaufennähe befindet, keine intramolekulare Wasserstoffbrücke besitzt und außerdem das Rückgrat dem Lösungsmittel zugewandt ist.

Die Aminosäuren zwischen den ersten beiden β -Faltblattsträngen, also F₉, N₁₀, S₁₁, E₁₂, K₁₃ und G₁₄ befinden sich in einer Schleifenregion und zeigen bis auf K₁₃ allesamt relativ große b_1 Werte. Das lässt auf eine starke Komprimierung ihrer Wasserstoffbrückenbindungen schließen, wobei dieser Vorgang für F₉ und N₁₀ am markantesten ausgeprägt ist. Beide Reste weisen ebenfalls stark negative b_2 Werte auf. Das HN-Rückgrat von F₉ zeigt nach außen, was den hohen b_1 Wert erklären kann. Verständlich wird der große b_1 Wert für N₁₀, da diese Aminosäure am Ende des ersten β -Stranges, kurz vor dem Schleifenumschlagpunkt, liegt, wo der Druck am besten angreifen kann. Der Schleifenumschlagpunkt selber, also E₁₂, K₁₃ und G₁₄, ist innerhalb der Schleife sterisch gehindert, so dass eine Kompression kaum möglich ist und bei K₁₃ sogar zu einer möglichen Streckung führt. Die Abb. 7.2.1 soll diesen Sachverhalt verdeutlichen.

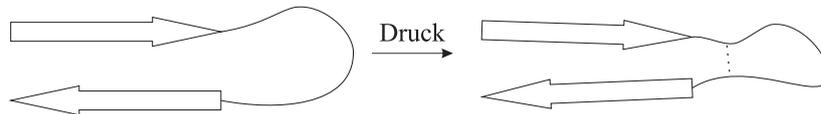


Abb. 7.2.1: Veranschaulichung der Druckeinwirkung auf die Region zwischen den β -Faltblattsträngen und dem Schleifenumschlagpunkt. Die gestrichelte Linie zeigt den Bereich, an dem die größte Wasserstoffbrückenabstandsverringering vorliegt.

Das gleiche Phänomen wiederholt sich in der darauffolgenden Schleife zwischen dem zweiten und dritten β -Strang. Hier zeigen Aminosäure V₂₀, E₂₁ und G₂₂ die stärksten positiven, linearen Verschiebungen und Q₂₃ eine negative Verschiebung. Das HN-Rückgrat von E₂₁ und G₂₂ weisen dabei nach außen. V₂₀ stellt in dieser Schlaufenregion die druckanfälligste Aminosäure dar, die in der Abbildung an einem Ende der gestrichelten Linie angrenzt. Wie auch bei N₁₀ zeigt V₂₀ einen verhältnismäßig großen negativen b_2 Wert. Jedoch befinden sich beide Aminosäuren nicht in unmittelbarer Nähe zu einer Kavität.

Der zweite β -Faltblattstrang selber zeigt stark negative b_1 Werte und entsprechend positive b_2 Werte. Das betrifft vor allem G₁₆ und F₁₇. Der zweite Faltblattstrang ist räum-

lich zwischen dem ersten und dritten Strang angeordnet und ist somit sehr rigide in der Struktur verankert, was nur zu einer sehr kleinen Kompression der Wasserstoffbrücken führt und zu entsprechend stark negativen b_1 Werten.

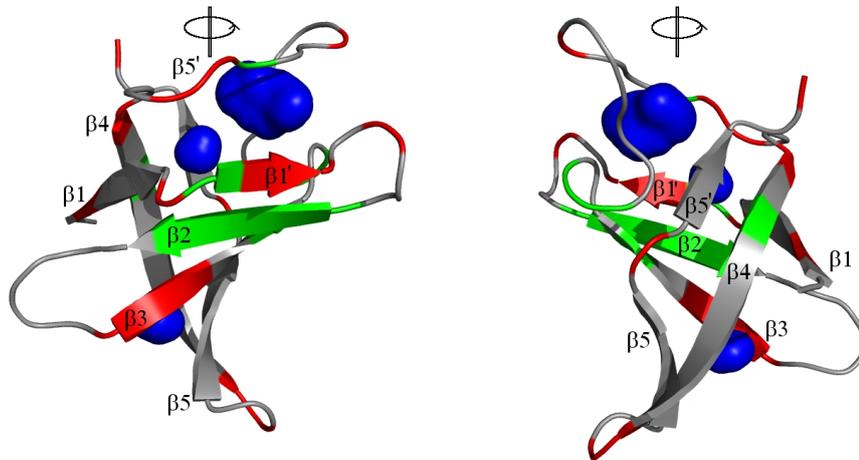


Abb. 7.2.2: *Bs*-CspB: Kavitäten (blau) und Druckeinwirkung auf die chemischen Verschiebungen der ^1HN -Resonanzen verdeutlicht am Model der pdb Datei 1NMG. Rote Bereiche deuten auf besonders druckanfällige Areale hin mit $b_1 > 0.4$ ppm/GPa, wo der Wasserstoffbrückenabstand durch Hochdruck stark verringert wird. In Grün sind die Abschnitte dargestellt, welche einen Wert $b_1 < -0.4$ ppm/GPa aufweisen und somit kaum eine Verkürzung oder gar eine Streckung der Wasserstoffbrücken erfahren. Graue Bereiche deuten auf Werte -0.4 ppm/GPa $< b_1 < 0.4$ ppm/GPa hin.

In Abb. 7.2.2 ist die Proteindatenbankdatei 1NMG von *Bs*-CspB unter Normaldruck farblich codiert dargestellt. Grüne Bereiche zeigen b_1 Werte kleiner -0.4 ppm/GPa. Rote Bereiche b_1 Werte größer 0.4 ppm/GPa und graue Bereiche zeigen b_1 Werte zwischen -0.4 und 0.4 ppm/GPa auf. Zwischen intramolekularen und nicht-intramolekularen Wasserstoffbrücken wurde dabei nicht unterschieden. Zusätzlich sind die drei ermittelten Kavitäten in blau hervorgehoben. Das Programm Pymol zeigt, im Gegensatz zu der von [Schnuchel und Holak, 1993] veröffentlichten Struktur von *Bs*-CspB, zwei unterteilte β_1 und zwei unterteilte β_5 -Faltblätter an. Der jeweils zweite Part wird in Abb. 7.2.2 mit β'_1 und β'_5 bezeichnet.

In der großen Schleifenregion zwischen dem dritten und vierten Faltblattstrang treten zwei Bereiche hervor. Der erste befindet sich direkt am Beginn der Schleife und umfasst Aminosäure S31, A32 und I33. Die b_1 Werte dieser ^1HN -Rückgratresonanzen sind stark negativ. Gleichzeitig zeigen sie stark positive b_2 Werte. Die negativen b_1 Werte können mit einer, in dieser Schleifenregion befindlichen, intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung erklärt werden, die vom ^1HN von A32 und I33 zum O=C der Aminosäure H29 aufgebaut ist. Die zweite interessante Region in der Schleife wird durch den stark positiven b_2 Wert der Aminosäure S31 und E43 gebildet. Da hohe b_2 Werte in der Nähe zu Kavitäten auftreten [Kremer *et al.*, 2007] und gleichzeitig Indika-

toren für globale Konformationsänderungen darstellen, kann man spekulieren, dass in dieser Schleifenregion unter Hochdruck Wassermoleküle in die große Kavität gedrückt werden und dieses Gebiet somit einen möglichen Ausgangspunkt für die Druckentfaltung repräsentiert.

Der vierte β -Strang zeigt in der ersten Hälfte (V₄₇ - E₅₀) negative b_1 Werte und in der zweiten Hälfte (I₅₁ - G₅₄) positive b_1 Werte, mit einem Minimum bei S₄₈ und einem Maximum bei G₅₄. Das lässt sich damit erklären, dass die erste Hälfte des vierten Stranges zwischen dem ersten und fünften β -Strang über Wasserstoffbrücken fixiert ist. Die zweite Hälfte des vierten Stranges ist nur noch an den fünften Strang gebunden, was zu einer einfacheren Komprimierung der Bindungen führt. Desweiteren befindet sich G₅₄ kurz vor dem Schlaufenumschlagpunkt, was den positiven Maximalwert erklärt.

Die stärksten linearen und nichtlinearen ¹⁵N chemischen Verschiebungen finden im großen Schleifenbereich zwischen dem dritten und vierten Faltblattstrang statt. Auffallend stark treten dabei K₃₉ und T₄₀ hervor, die jeweils eine hohe positive lineare und gleichzeitig stark negative quadratische Abhängigkeit zeigen. Diese Aminosäuren liegen in unmittelbarer Nähe zur großen Kavität. In dieser Schleife sind nur geringe Protonenverschiebungen erkennbar. Da Stickstoffverschiebungen mit einer Änderung der Torsionswinkel einhergehen [Akasaka *et al.*, 1999], kann man vermuten, dass die Schleifenregion dem äußeren Druck durch eine Torsionsbewegung ausweicht, um eine Verkürzung der Wasserstoffbrücken zu minimieren. In dieser Region weist nur Aminosäure E₄₃ eine stark nichtlineare Protonenverschiebung auf, was damit erklärt werden kann, dass das HN-Rückgrat zum Lösungsmittel und nicht nach innen gerichtet ist. Ähnliches gilt für F₉, dessen HN-Rückgrat ebenfalls dem Lösungsmittel zugewandt ist und somit eine der größten linearen und nichtlinearen ¹⁵N chemischen Verschiebungen erkennen lässt. Zusätzlich zeigt sich hier eine mittelstarke Protonenverschiebung, die bereits erläutert wurde. Auf die Stickstoffverschiebungen soll hier nicht weiter eingegangen werden, da es sich um unkorrigierte Werte handelt.

Vergleicht man die druckanfälligen Amidprotonen des Rückgrats von *Bs-CspB* mit den Bereichen des Proteins, die mit ssRNA und ssDNA Strängen in Wechselwirkung treten, so können interessante Übereinstimmungen gefunden werden. Bei der Interaktion von *Bs-CspB* mit den Nukleinsäuren kommt es zu zwei verschiedenartigen Verbindungen, den Stapelinteraktionen und den Bindungen über Wasserstoffbrücken [Sachs, 2010]. An den Stapelinteraktionen sind die Aminosäuren W₈, F₁₅, F₁₇, F₂₇, H₂₉ und F₃₀ beteiligt. In die Wasserstoffbrückenbindungen sind die Aminosäuren K₇, F₉, N₁₀, D₂₅ und Q₅₉ involviert [Max *et al.*, 2006, Max *et al.*, 2007, Zeeb *et al.*, 2006, Sachs, 2010]. Das sind genau diejenigen Aminosäuren, die besonders stark negative beziehungsweise besonders stark positive Druckkoeffizienten erkennen lassen. Interessant dabei ist, dass diejenigen Aminosäuren, welche in Stapelinteraktionen involviert sind, sich durch

stark negative lineare b_1 Druckkoeffizienten auszeichnen. Das gilt besonders für F17. In der Region um Stapelinteraktionsregion H29 und F30, sticht ein stark negativer S31 Wert heraus. Für F27 kann ein stark negativer nichtlinearer b_2 Wert gefunden werden. Bei den in Wasserstoffbrückenbindungen integrierten Aminosäuren fallen besonders die stark positiven b_1 Werte von F9, N10 und D25 auf. Gleichzeitig zeigen K7 und Q59 stark negative b_2 Werte.

Das zeigt, dass bestimmte Rückgratbereiche im Kälteschockprotein *Bs-CspB* vorhanden sind, die flexibler sein müssen als andere, um Interaktionen mit ssRNA oder ssDNA Strängen eingehen zu können. Das Kälteschockprotein aus *Thermotoga maritima* zeigt ein ganz ähnliches Verhalten [Kremer *et al.*, 2003].

7.2.2 Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung von Kti11p(M⁻)

7.2.2.1 Lineare und nichtlineare Druckkoeffizienten

Es werden hier die Ergebnisse aus Abschnitt 6.3.3.2 für die Rückgratotope mit den stärksten Druckverschiebungen diskutiert. Nachfolgende Darstellungen beziehen sich auf die Ergebnisse aus Abb. 6.3.12 und Abb. 6.3.14. Die meisten intramolekular über Wasserstoffbrücken gebundene Amidprotonen zeigen negative lineare Druckkoeffizienten b_1 . Somit zeigen diese, gegenüber den direkt dem Lösungsmittel exponierten HN-Rückgratotope der GGXA Peptide, eine geringere Verkürzung der Wasserstoffbrücken oder sogar eine Streckung. Die mit den negativen linearen einhergehenden positiven nichtlinearen Druckkoeffizienten lassen einen asymptotischen Verlauf bei sehr hohen Drücken vermuten [Koehler *et al.*, 2012]. Allerdings kann dieses Verhalten nicht für alle Aminosäuren gefunden werden. Das gilt besonders für Aminosäure V45, welche ein stark nichtlineares Verhalten aufweist und unter Berücksichtigung dieser modellfreien Beschreibung keinen asymptotischen Verlauf einnehmen wird, wie beim GGXA Peptid der Fall. Die räumliche Nähe zur Kavität könnte das nichtlineare Verhalten von V45 erklären [Kremer *et al.*, 2007]. Allerdings ist das HN-Rückgrat eher zum Lösungsmittel orientiert und zeigt nicht zur Kavität. Eine Erklärung wird nachfolgend bei der Behandlung der druckabhängigen Stickstoffverschiebungen diskutiert.

In Abb. 7.2.3 sind die stärksten positiven und negativen Druckkoeffizienten b_1 der Amidprotonen farblich codiert auf der Röntgenkristallstruktur aufgetragen. Rote Bereiche deuten auf besonders druckanfällige Areale hin mit $b_1 > 0.4$ ppm/GPa, wo der Wasserstoffbrückenabstand gegenüber dem GGXA Peptid durch Hochdruck stark verringert wird. In Grün sind die Abschnitte dargestellt, welche einen Druckkoeffizienten von $b_1 < -0.4$ ppm/GPa aufweisen und somit kaum eine Verkürzung oder gar eine Streckung der Wasserstoffbrücken erfahren. Graue Bereiche deuten auf Werte zwischen -0.4 ppm/GPa $< b_1 < 0.4$ ppm/GPa hin.

Eine stark positive lineare Abhängigkeit ist am flexiblen N-Terminus bei den Ami-

nosäuren Y5 und E9 zu finden. Y5 ist direkt vor dem ersten β -Strang positioniert und komplett dem Lösungsmittel ausgesetzt, wobei E9 direkt zwischen dem ersten β -Strang und der $\alpha_{3,10}$ -Helix liegt und somit in nächster Nähe zur Kavität. In und kurz hinter der $\alpha_{3,10}$ -Helix kommt es nur zu geringen Verkürzungen der Wasserstoffbrücken, auf Grund kleiner, negativ linearer Druckkoeffizienten.

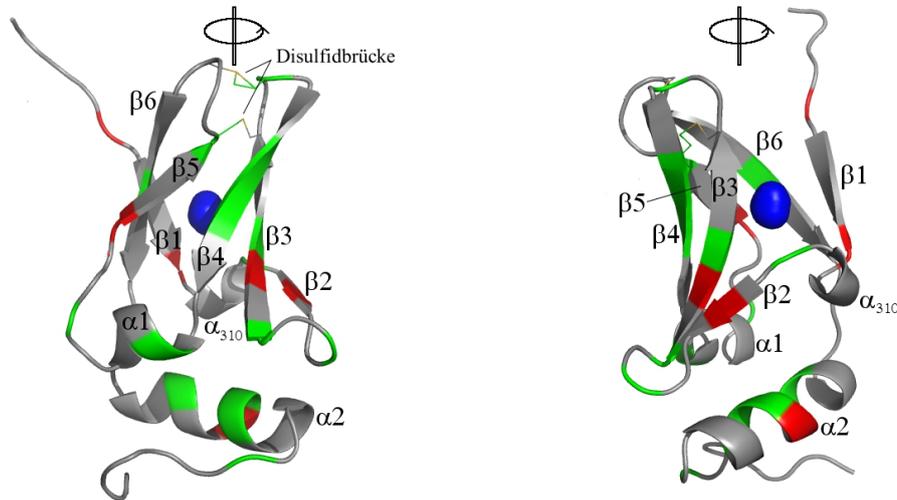


Abb. 7.2.3: Kti11p(M⁻): Kavitäten (blau) und Druckeinwirkung auf die chemischen Verschiebungen der ¹HN-Resonanzen verdeutlicht am Model der Röntgenkristallstruktur. Rote Bereiche deuten auf besonders druckanfällige Areale hin mit $b_1 > 0.4$ ppm/GPa, wo der Wasserstoffbrückenabstand durch Hochdruck stark verringert wird. In Grün sind die Abschnitte dargestellt, welche einen Wert von $b_1 < -0.4$ ppm/GPa aufweisen und somit kaum eine Verkürzung oder gar eine Streckung der Wasserstoffbrücken erfahren. Graue Bereiche deuten auf Werte zwischen -0.4 ppm/GPa $< b_1 < 0.4$ ppm/GPa hin.

In den sich gegenüberliegenden Faltblattsträngen zwei und drei sind besonders F15 und F22 stark druckanfällig. Das Rückgrat von F15 zeigt allerdings keine intramolekularen polaren Kontakte. Es liegt keine Information zu E16 vor, die ein zusammendrücken beider Faltblattstränge untermauern könnte. Zwischen beiden Faltblättern, in der Schlaufenregion, zeigen E18 und Q20 ein stark negatives lineares Druckverhalten. Faltblattstrang vier weist mit den Aminosäuren R31, F32 und Q33 stark negative, lineare Änderungen auf. Das wird verständlich, da sich dieser Faltblattstrang räumlich zwischen Strang drei und Strang fünf befindet und somit rigide in seiner Struktur verankert ist, womit nur geringe Wasserstoffbrückenbindungsverkürzungen eintreten können. Desweiteren ist dieser Faltblattstrang Bestandteil der Innenseite des Zinkfingers und an seinem Ende über Disulfidbrücken mit dem Ende des gegenüberliegenden Fingers kovalent gebunden, was diese Region zusätzlich erstarren lässt. Auch die in die Disulfidbindung involvierten Aminosäuren C28 und C48 zeigen stark negative, lineare Änderungen, also nur geringe Wasserstoffbrückenbindungsänderungen. Aminosäure I55 im sechsten Strang lokalisiert, zeigt stark negative lineare und

nichtlineare Änderungen. Dieser Strang ist räumlich zwischen den Strängen eins und fünf angesiedelt und zeigt dadurch nur eine schwache Druckanfälligkeit. In der großen α -Helix 2 zeigen die Aminosäuren Y64 bis Y68, außer E66 auf Grund ihrer geringen Druckanfälligkeit in der rigiden α -helicalen Struktur sehr negative, lineare Druckkoeffizienten. Diese werden von großen positiven nichtlinearen Druckkoeffizienten begleitet. Aminosäure E66 fällt aus diesem Muster heraus, da das Rückgrat nicht intramolekular über Wasserstoffbrücken verankert und somit leichter dem Lösungsmittel zugänglich ist. Auf Grund der mangelnden Druckinformation einiger Aminosäuren, die aus den druckabhängigen ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren nicht isoliert werden konnten, lassen sich an dieser Stelle keine weiteren Aussagen treffen.

In Abb. 7.2.4 sind die größten positiven und negativen Druckkoeffizienten b_1 der Stickstoffresonanzen des Rückgrates farblich codiert auf der Röntgenkristallstruktur aufgetragen. Rote Bereiche deuten auf besonders druckanfällige Areale hin mit Werten von $b_1 > 2$ ppm/GPa, wo es zu einer möglichen Änderung der Torsionswinkel in der Peptidbindung kommen kann. In Grün sind die Abschnitte dargestellt, welche einen Wert $b_1 < -2$ ppm/GPa aufweisen und die Peptidbindung somit kaum eine Rotationsänderung erfährt. Graue Bereiche deuten auf Druckkoeffizienten zwischen -2 ppm/GPa $< b_1 < 2$ ppm/GPa hin.

Wie bereits erwähnt, ist die Interpretation der Stickstoffverschiebungen schwerer als die der Amidprotonenverschiebungen. Die Protonen sind im Gegensatz zu den Stickstoffkernen direkt an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligt, was die Druckverschiebungen der Protonen aussagekräftiger macht.

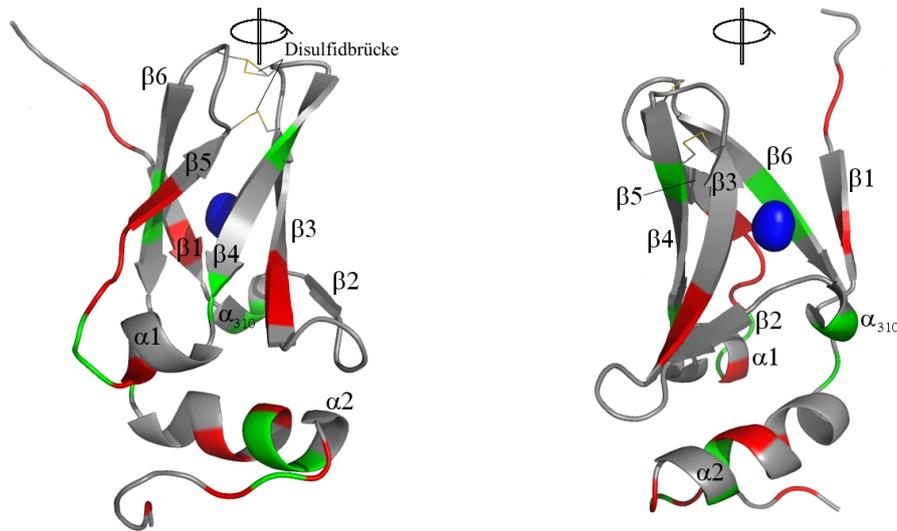


Abb. 7.2.4: Kti11p(M⁻): Kavitäten (blau) und Druckeinwirkung auf die chemischen Verschiebungen der ¹⁵N-Resonanzen verdeutlicht am Model der Röntgenkristallstruktur. Rote Bereiche deuten auf besonders druckanfällige Areale hin mit $b_1 > 2$ ppm/GPa, wo es zu einer möglichen Änderung der Torsionswinkel in der Peptidbindung kommen kann. In Grün sind die Abschnitte dargestellt, welche einen Wert $b_1 < -2$ ppm/GPa aufweisen und die Peptidbindung somit kaum eine Rotationsänderung erfährt. Graue Bereiche deuten auf Werte -2 ppm/GPa $< b_1 < 2$ ppm/GPa hin.

Dennoch treten bei den Stickstoffverschiebungen einige Rückgratsignale in Abhängigkeit vom Druck besonders hervor. Wiederum zeigt V45 ein extrem starkes nichtlineares Verhalten, welches in keinem asymptotischen Verlauf enden kann, wie es beim GGXA Peptid der Fall ist. Aber auch A65, Y68 und I79 zeigen eine derart stark nichtlineare Abhängigkeit. Wobei I79 keine intramolekularen polaren Kontakte zeigt. Auch I8 hat ein sehr stark positives, lineares und negatives, nichtlineares Verhalten, ist im ersten Faltblattstrang lokalisiert und steht in räumlicher Nähe zur Kavität.

Da in der Röntgenstruktur unter Normalbedingungen das HN-Rückgrat von V45 in räumlicher Nähe zu der Kavität liegt und dieser HN-Vektor mehr dem Lösungsmittel zugewandt ist als der Kavität, kann vermutet werden, dass sich das Rückgrat durch Druckeinwirkung leicht zur Kavität hindreht, was die starken Stickstoffverschiebungen erklären würde. Gleichzeitig erfährt das Proton des HN-Rückgrates von V45 anfangs eine Druckbelastung von der Lösungsmittelseite her, wobei die Wasserstoffbrückenbindungslänge sich verringert. Ist das Rückgrat dann eher zur Kavität ausgerichtet, erfährt es von dieser Seite eine andersartige Druckbelastung. Das könnte eventuell das starke nichtlineare Verhalten der Protonen und Amide erklären.

Eine derart extrem nichtlineare Abhängigkeit der Stickstoffsignale stellt allerdings keinen Einzelfall dar. [Munte *et al.*, 2013] konnte dieses Verhalten bereits für Aminosäure F19 des Proteins A β (1-40) zeigen.

Ein Vergleich, der kürzlich in [Glatt *et al.*, 2015] veröffentlichten Interaktionsstellen zwischen Kti11 und Kti13, lässt zwischen den beteiligten Aminosäuren und den hier besonders druckanfälligen Rückgratatomen mit auffallenden Druckkoeffizienten, Übereinstimmungen erkennen. An der Interaktion sind vorrangig die sich im Zinkfingerbereich befindlichen Aminosäuren beteiligt, wie C25, C27, G28, R30, S49, C50, S51 und M53. Außerdem werden auch Y4 und D5 durch die Interaktion mit Kti13 beeinflusst. Zu beachten ist, dass Kti11p im Vergleich zu Kti11 nach der ersten Aminosäure M1 ein zusätzliches Valin besitzt und sich dadurch die Nummerierung um eins verschiebt. Besonders auffallende lineare Druckkoeffizienten b_1 der Protonen zeigen Y5, C26, C28, R31 und I55. Auffallende nichtlineare Druckkoeffizienten b_2 der Protonen zeigen Y5, R31, M54 und I55. Bei den Stickstoffverschiebungen fallen besonders die linearen Druckkoeffizienten von Y5, R31 und D56 auf.

Um eine wichtige Aufgabe bei der Kti11:Kti13 Protein - Protein Interaktion spielen zu können, müssen demnach gerade diese Rückgratbereiche eine gewisse Flexibilität und konformationelle Plastizität aufweisen, die durch die Druckanfälligkeit sichtbar wird. Das Protein Ubiquitin zeigt eine ähnliche Flexibilität in den interessierenden Molekülbereichen [Nisius und Grzesiek, 2012].

7.2.2.2 Die chemischen Verschiebungen des intermediären Zustandes von Kti11p(M⁻)

Unter der Voraussetzung, dass für das Protein Kti11p(M⁻) ein intermediärer Zustand bei hohen Drücken existent ist, wie unter Abschnitt 7.1 diskutiert, und dieser mit dem nativen Zustand in schnellem Austausch steht, lässt sich für die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung $\delta(p)$ die Gleichung 4.4.5 anwenden. Hierbei erweist es sich in der Praxis bei der Anpassung dieser Gleichung an den Datensatz als einfacher, die Kompressibilitätsänderung zu vernachlässigen [Information M. Beck-Erlach].

In den nachstehenden Abbildungen ist die Änderung der chemischen Verschiebung der Amidprotonen als auch Stickstoffkerne für ausgewählte Aminosäuren über dem Druck aufgetragen. Es wurden diejenigen Rückgratresonanzen verwendet, welche einerseits eine starke Änderung der chemischen Verschiebung aufweisen und gleichzeitig eine vernünftige Anpassung von Gleichung 4.4.5 an die Datenpunkte liefern konnten. Die sigmoidal verlaufende Funktion lässt im Niederdruckbereich die Verschiebungen der Resonanzen δ_1 des Zustandes 1 erkennen. Bei hohen Drücken enden die Plateauwerte mit der chemischen Verschiebung δ_2 im Zustand 2. In den Diagrammen ist zur deutlicheren Darstellung der sigmoidalen Funktion die Druckachse in den negativen, physikalisch nicht sinnvollen, Bereich erweitert. Für die ausgewählten Amidprotonen sind die Übergangskurven in Abb. 7.2.5 aufgezeigt und in Tab. 7.2.1 die dazugehörigen ermittelten Parameter gelistet. Bei der Anpassung der Funktion wurde die Kompressibilitätsänderung $\Delta\hat{\beta}$ vernachlässigt. Für die Änderung der freien Enthalpie ΔG_{12} zwischen Zustand 1 und Zustand 2 wurde die Differenz der

Energiewerte aus den Daten bei geringem ($\Delta G_0 = 4841 \text{ J/mol}$) und hohem Überdruck ($\Delta G_0 = 2105 \text{ J/mol}$) verwendet. Somit ergab sich ein fixer Wert der freien Enthalpie zwischen den beiden Zuständen zu $\Delta G_{12} = 2736 \text{ J/mol}$. Es wurde δ_1 , δ_2 und die Volumenänderung ΔV angepasst. Bei Anpassung der Funktion mit zusätzlich variablem Wert der freien Enthalpie konnten keine sinnvollen Ergebnisse bestimmt werden.

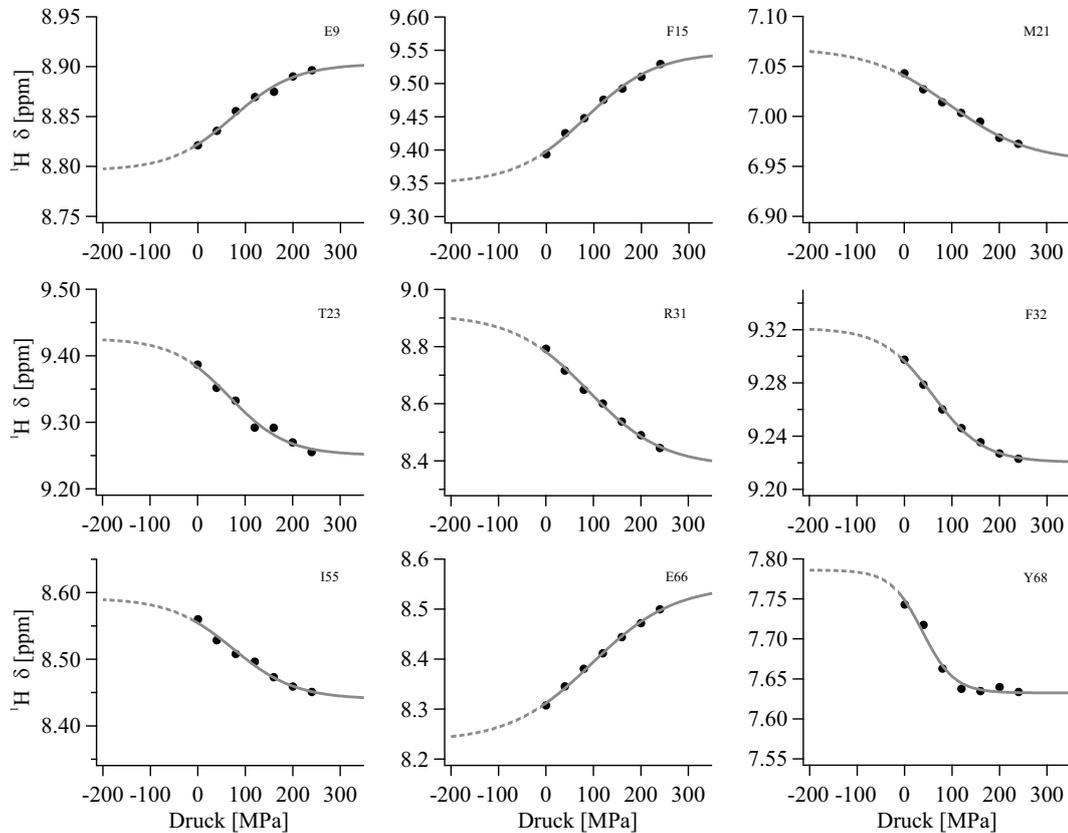


Abb. 7.2.5: Kti11p(M⁻): Ausgewählte Amidprotonenverschiebungen zur Ermittlung der Lage der chemischen Verschiebungen δ_1 , δ_2 des nativen und des intermediären Zustandes.

Im Mittel ergibt sich für die gelisteten Rückgratresonanzen der Amidprotonen eine Differenz zwischen Zustand 1 und Zustand 2 von etwa 0.1 ppm bis 0.2 ppm. Aminosäure R31 fällt mit knapp 0.53 ppm etwas höher aus. Die Volumendifferenz schwankt um den Wert $\Delta V = -39.5 \text{ ml/mol}$. Bei der Betrachtung der Stickstoffresonanzen konnte nur bei sehr wenigen Aminosäuren eine sinnvolle Anpassung von Gleichung 4.4.5 gefunden werden. Diese sind in Abb. 7.2.6 dargestellt und die ermittelten Daten in Tab. 7.2.2 aufgelistet.

Aminosäure	δ_1 [ppm]	δ_2 [ppm]	ΔV [ml/mol]
E9	8.796 ± 0.004	8.903 ± 0.007	-37.44 ± 5.09
F15	9.349 ± 0.005	9.546 ± 0.012	-33.35 ± 4.00
M21	7.068 ± 0.004	6.954 ± 0.012	-28.78 ± 5.41
T23	9.426 ± 0.009	9.250 ± 0.013	-40.90 ± 7.33
R31	8.912 ± 0.012	8.381 ± 0.033	-30.99 ± 3.58
F32	9.321 ± 0.002	9.220 ± 0.002	-45.73 ± 2.13
I55	8.591 ± 0.006	8.440 ± 0.011	-37.12 ± 5.79
E66	8.234 ± 0.006	8.547 ± 0.017	-28.40 ± 2.74
Y68	7.786 ± 0.009	7.632 ± 0.005	-72.87 ± 9.67

Tab. 7.2.1: Kti11p(M⁻): Regressionsergebnisse der angepassten Gleichung 4.4.5 an die Amidprotonendaten zur Druckänderung der chemischen Verschiebung von δ_1 nach δ_2 mit einer Volumenänderung ΔV bei $\Delta G_{12} = 2736$ J/mol.

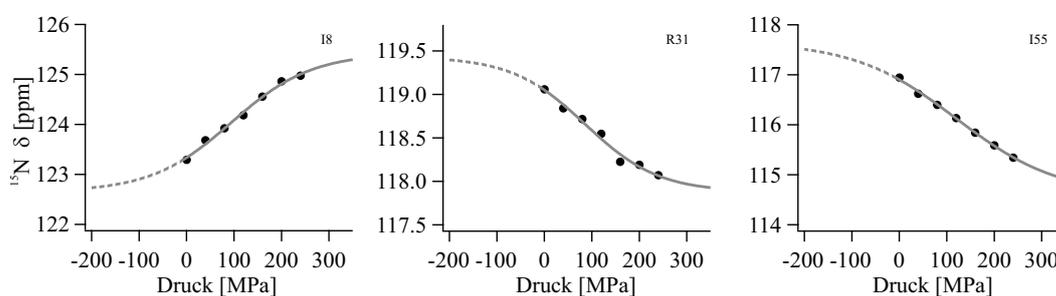


Abb. 7.2.6: Kti11p(M⁻): Einige ausgewählte Stickstoffverschiebungen zur Ermittlung der Lage der chemischen Verschiebungen δ_1 , δ_2 des nativen und des intermediären Zustandes.

Für die Rückgratresonanzen der ausgewählten Stickstoffkerne ergibt sich im Durchschnitt eine Differenz zwischen Zustand 1 und Zustand 2 von etwa 2.5 ppm. Die Volumendifferenz schwankt um den Wert $\Delta V = -27.9$ ml/mol.

Aminosäure	δ_1 [ppm]	δ_2 [ppm]	ΔV [ml/mol]
I8	122.650 ± 0.082	125.420 ± 0.243	-29.03 ± 4.45
R31	119.430 ± 0.067	117.880 ± 0.171	-31.75 ± 6.61
I55	117.660 ± 0.092	114.590 ± 0.306	-22.80 ± 3.34

Tab. 7.2.2: Kti11p(M⁻): Regressionsergebnisse der angepassten Gleichung 4.4.5 an die Stickstoffkerndaten zur Druckänderung der chemischen Verschiebung von δ_1 nach δ_2 mit einer Volumenänderung ΔV bei $\Delta G_{12} = 2736$ J/mol.

Die Volumendifferenzen der druckabhängigen Amidprotonenresonanzen mit einem Wert von $\Delta V = -39.5$ ml/mol und der ¹⁵N-Resonanzen mit $\Delta V = -27.9$ ml/mol sind vergleichbar mit denen der Übergangsdaten vom nativen in den entfalteten Zustand. Somit wird der durch die Ellipsenanpassung im oberen Bereich des Phasendiagramms gefundene Wert $\Delta V_0 = (-0.04 \pm 0.8)$ ml/mol bestätigt. Dieser Wert gibt schließlich die Differenz zwischen intermediärem und entfaltetem Zustand an. Der intermediäre

Zustand muss demnach ein vergleichbares Volumen wie der entfaltete Zustand einnehmen, auch wenn dieser auf Grund der hohen Dispersion im Protonenspektrum, von andersartiger Struktur sein muss. Diese für Kti11p(M⁻) gefundenen lokalen Druckanfälligkeiten lassen erkennen, dass die Energielandschaft im nativen Zustand eher rau und nicht glatt ist und untermauert gleichzeitig die Theorie mehrerer, leicht unterschiedlicher nativer Konformationen, die durch schnellen Austausch in unterschiedlich hohen Populationen nebeneinander koexistieren.

Teil IV

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Hochdruckanlage erfolgreich für ein hochauflösendes Flüssig-NMR-Spektrometer geplant, konstruiert, aufgebaut und eingesetzt werden. Mit diesem Hochdruck-NMR-System sind spektroskopische Untersuchungen an molekularen Proben bis zu einem Druck von 250 MPa möglich.

Es wurde für die hier verwendeten Kälteschockproteine *Bs-CspB* und *Bc-Csp R3E L66E*, als auch für das Zinkfingerprotein *Kti11p(M⁻)*, ein vollständiger Satz thermodynamischer Parameter aus Temperatur- und Druckübergängen ermittelt. Die hierfür angewandte Methode zur Bestimmung des Anteils an entfaltetem Protein aus dem aliphatischen Bereich der eindimensionalen Protonenspektren, zeigt eine sehr gute Reproduzierbarkeit und ist anderen NMR-basierten Methoden vorzuziehen.

Für das Kälteschockprotein *Bs-CspB* konnte die Kältedenaturierung bei Drücken um 200 MPa und Temperaturen bis -13°C beobachtet werden, wodurch das Protein zu über 90% reversibel entfaltete. Für die Proteindoppelvariante *Bc-Csp R3E L66E* konnte bereits bei Umgebungstemperatur mittels Hochdruck-NMR eine zu über 90%ige Entfaltung aufgezeigt werden. Das Zinkfingerprotein *Kti11p(M⁻)* zeigt bei Drücken oberhalb von 150 MPa eine Stabilisierung eines nicht entfaltenen, intermediären Zustandes.

Erstmals konnte ein quadratischer Zusammenhang für die Abhängigkeit des Volumens von der Temperatur $\Delta V(T)$ nachgewiesen werden. Bisher wurde eine lineare Abhängigkeit angenommen [Maeno *et al.*, 2009]. Die thermische Expansionsänderung $\Delta\hat{\alpha}$ konnte erstmals für ein Protein sehr genau über die Druckabhängigkeit der Entropiezunahme während der Entfaltung $\Delta S_{\text{u}}^0(p)$ ermittelt werden.

Für die drei untersuchten Proteine konnte ein Druck-Temperatur Stabilitätsgebirge bestimmt werden. Der sich daraus ergebende Druck-Temperatur Phasenraum beschreibt ein Phasendiagramm, das sich durch eine elliptische Form auszeichnet. Mit Hilfe der Ellipsengleichung konnte für alle drei Phasendiagramme ein vollständiger Satz thermodynamischer Parameter berechnet werden. Beim Protein *Kti11p(M⁻)* zeigt sich das Phänomen der Druckstabilisierung deutlich im Phasendiagramm durch die Ausbildung einer zweiten Ellipse im oberen Druckbereich. Diese kann als Intermediat interpretiert werden. Für dieses Intermediat konnten ebenfalls die thermodynamischen Parameter bestimmt werden.

Durch Tripleresonanzexperimente konnte die Zuordnung der ^1H - ^{15}N -Resonanzen des Proteins *Bc-Csp R3E L66E* zu 97% vervollständigt werden. Bei *Kti11p(M⁻)* erfolgte eine Zuordnung der Resonanzen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum zu 89%.

Weiterhin wurden die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen des Tetrapeptids GGXA in Natriumphosphatpuffer und Natriumcacodylatpuffer in Abhängigkeit vom Druck untersucht und deren lineare und quadratische Druckkoeffizienten als Referenzdatensatz bestimmt. Für das Kälteschockprotein *Bs-CspB* wurden die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum in Abhängigkeit vom Druck untersucht, die Druckkoeffizienten ermittelt und mit den GGXA Druckkoeffizi-

enten gegengerechnet, um die durch Hochdruck hervorgerufenen strukturellen Änderungen zu verifizieren. Diejenigen Rückgratbereiche von *Bs-CspB* mit den am stärksten hervortretenden Druckkoeffizienten, gehören den Aminosäuren an, die, nahe einer großen Kavität, in RNA und DNA Interaktionen involviert sind.

Auch für das Zinkfingerprotein $Kti_{11p}(M^-)$ wurden die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen- und Stickstoffresonanzen im $^1H-^{15}N$ -HSQC-Spektrum in Abhängigkeit vom Druck untersucht, deren Druckkoeffizienten bestimmt und mit den GGXA Druckkoeffizienten gegengerechnet. Ebenfalls treten auch hier diejenigen Aminosäuren durch auffallende Druckkoeffizienten hervor, die eine wichtige Funktion bei der $Kti_{11} - Kti_{13}$ Protein - Protein Interaktion spielen. Gleichfalls konnten für einige apparente Rückgratresonanzen von $Kti_{11p}(M^-)$ die chemischen Verschiebungen des nativen und des intermediären Zustandes, sowie die Volumendifferenz zwischen den beiden Zuständen experimentell bestimmt werden.

Diese für *Bs-CspB* und $Kti_{11p}(M^-)$ gefundenen lokalen Druckerfälligkeiten, die in dieser Arbeit mittels Hochdruck-NMR systematisch charakterisiert wurden, bestätigen, dass die Energielandschaft im nativen Zustand eher rau und nicht glatt ist und untermauert gleichzeitig die Theorie mehrerer, leicht unterschiedlicher nativer Konformationen, die durch schnellen Austausch in unterschiedlich hohen Populationen nebeneinander koexistieren. Die aus den zweidimensionalen $^1H-^{15}N$ -HSQC-Spektren bestimmten druckabhängigen chemischen Verschiebungen $\delta(p)$ zeigen demnach nicht nur Informationen, die von den entfalteten und nativen Zuständen stammen, wie bei der Auswertung der eindimensionalen Protonenspektren, sondern es können gleichzeitig nativähnliche Zustände und intermediäre Zwischenzustände mit funktioneller Relevanz detektiert werden. Durch die regionalen Druckerfälligkeiten zeigt das Protein eine lokale Flexibilität, die es ihm erlaubt, seine Funktion ausüben zu können.

LITERATURVERZEICHNIS

- [Akasaka, 2003] Akasaka, K. (2003). Highly Fluctuating Protein Structures Revealed by Variable-Pressure Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry*, 42:10875–10885. [↗ (32)].
- [Akasaka und Li, 2001] Akasaka, K. und Li, H. (2001). Low-Lying Excited States of Proteins Revealed from Nonlinear Pressure Shifts in ^1H and ^{15}N NMR † . *Biochemistry*, 40:8665–8671. [↗ (32)].
- [Akasaka *et al.*, 1999] Akasaka, K., Li, H., Yamada, H., Li, R., Thoresen, T., und Woodward, C. K. (1999). Pressure response of protein backbone structure. pressure-induced amide ^{15}N chemical shifts in bpti. *Protein Science*, 8(10):1946–1953. [↗ (94 und 111)].
- [Akasaka und Tezuka, 1997] Akasaka, K. und Tezuka, T. (1997). Pressure-induced changes in the folded structure of lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 271:671–678. [↗ (4)].
- [Amman *et al.*, 1982] Amman, C., Meier, P., und Merbach, A. (1982). A simple multinuclear nmr thermometer. *Journal of Magnetic Resonance*, 46:319–321. [↗ (42)].
- [Anfinsen, 1973] Anfinsen, C. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181:223–230. [↗ (3)].
- [Arnold, 2002] Arnold, M. R. (2002). *Hochdruck NMR*. Doktorarbeit., Universität Regensburg. [↗ (6 und 13)].
- [Arnold *et al.*, 2002] Arnold, M. R., Kremer, W., Lüdemann, H.-D., und Kalbitzer, H. R. (2002). ^1H -NMR parameters of common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides gly-gly-x-ala at pressures between 0.1 and 200 MPa. *Biophysical chemistry*, 96(2):129–140. [↗ (13, 82, 83 und 86)].
- [Asakawa *et al.*, 1998] Asakawa, N., Kameda, T., Kuroki, S., Kurosu, H., Ando, S., und Shoji, A. (1998). Structural studies of hydrogen-bonded peptides and polypeptides by solid state. *Ann. Reports NMR Spectr.*, 35:56–137. [↗ (87)].
- [Baskaran *et al.*, 2010] Baskaran, K., Brunner, K., Munte, C. E., und Kalbitzer, H. R. (2010). Mapping of protein structural ensembles by chemical shifts. *Journal of Biomolecular NMR*, 48(2):71–83. [↗ (30)].

- [Bax *et al.*, 1990] Bax, A., Clore, M., und Gronenborn, A. (1990). 1h-1h correlation via isotropic mixing of ^{13}C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning 1h and ^{13}C spectra of ^{13}C -enriched proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, 88(2):425–431. [↗ (37 und 43)].
- [Beck Erlach *et al.*, 2014] Beck Erlach, M., Koehler, J., Moeser, B., Horinek, D., Kremer, W., und Kalbitzer, H. R. (2014). Relationship between Nonlinear Pressure-Induced Chemical Shift Changes and Thermodynamic Parameters. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(21):5681–5690. [↗ (32)].
- [Brandts *et al.*, 1970] Brandts, J. F., Oliveira, R. J., und Westort, C. (1970). Thermodynamics of protein denaturation. effect of pressure on the denaturation of ribonuclease a. *Biochemistry*, 9:1038–1047. [↗ (105)].
- [Bundi und Wüthrich, 1979] Bundi, A. und Wüthrich, K. (1979). ^1H -NMR parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides h-gly-gly-x-l-ala-oh. *Biopolymers*, 18:285–297. [↗ (13 und 83)].
- [Corda und Di Girolamo, 2003] Corda, D. und Di Girolamo, M. (2003). Functional aspects of protein mono-adp-ribosylation. *EMBO*, 23:1953–1958. [↗ (16)].
- [Cordier und Grzesiek, 1999] Cordier, F. und Grzesiek, S. (1999). Direct Observation of Hydrogen Bonds in Proteins by Interresidue $^3\text{h J NC}'$ Scalar Couplings. *Journal of the American Chemical Society*, 121:1601–1602. [↗ (13)].
- [Dawson, 1982] Dawson, R. M. C. (1982). Data for biochemical research (third edition). *Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford, U.K.*, 87. [↗ (18)].
- [Dayie und Wagner, 1994] Dayie, K. und Wagner, G. (1994). Relaxation-rate measurements for ^{15}N - ^1H groups with pulsed-field gradients and preservation of coherence pathways. *Journal of Magnetic Resonance*, (111):121–126. [↗ (37)].
- [Delaglio *et al.*, 1995] Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., und Bax, A. (1995). Nmrpipe: a multidimensional spectral processing system based on unix pipes. *J. Biomol. NMR*, 6:277–293. [↗ (38)].
- [Dill und Chan, 1997] Dill, K. A. und Chan, H. S. (1997). From levinthal to pathways to funnels. *Nature Structural Biology*, 4:10–19. [↗ (4)].
- [Dong *et al.*, 2014] Dong, M., Su, X., Dzikovski, B., Dando, E. E., Zhu, X., Du, J., Freed, J. H., und Lin, H. (2014). Dph3 is an electron donor for dph1-dph2 in the first step of eukaryotic diphthamide biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 136:1754–1757. [↗ (16)].
- [Ellis und Morrison, 1982] Ellis, K. J. und Morrison, J. F. (1982). Buffers of constant ionic strength for studying ph-dependent processes. *Methods Enzymol.*, 87:405–426. [↗ (18)].

- [Feng *et al.*, 1998] Feng, W., Tejero, R., Zimmerman, D., Inouye, M., und Montelione, G. (1998). ^1H , ^{13}C , and ^{15}N chemical shift assignments for *e. coli* cold-shock protein a (cspa). *Biochemistry*, 37:10881–10896. [[↗](#) (43)].
- [Glatt *et al.*, 2015] Glatt, S., Zabel, R., Vonkova, I., Kumar, A., Netz, D. J., Pierik, A. J., Rybin, V., Lill, R., Gavin, A.-C., Balbach, J., Breunig, K. D., und Müller, C. W. (2015). Structure of the Kti11/Kti13 Heterodimer and Its Double Role in Modifications of tRNA and Eukaryotic Elongation Factor 2. *Structure*, 23(1):149–160. [[↗](#) (116)].
- [Grzesiek und Bax, 1992] Grzesiek, S. und Bax, A. (1992). Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance nmr. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:6291–6293. [[↗](#) (36)].
- [Hawley, 1971] Hawley, S. A. (1971). Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry*, 10:2436–2442. [[↗](#) (25 und 105)].
- [Heremans *et al.*, 1996] Heremans, K., Goossens, K., und Smeller, L. (1996). *Pressure-Tuning Spectroscopy of Proteins: Fourier Transform Infrared Studies in the Diamond Anvil Cell. in: High-Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology*. Oxford University Press. [[↗](#) (3)].
- [Heremans und Smeller, 1998] Heremans, K. und Smeller, L. (1998). Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1386(2):353–370. [[↗](#) (28)].
- [Jacob *et al.*, 1999] Jacob, M., Holtermann, G., Perl, D., Reinstein, J., Schindler, T., Gevees, M. A., und Schmid, F. X. (1999). Microsecond Folding of the Cold Shock Protein Measured by a Pressure-Jump Technique. *Biochemistry*, 38(10):2882–2891. [[↗](#) (104)].
- [Johnson und Blevins, 1994] Johnson, B. A. und Blevins, R. A. (1994). A computer program for visualization and analysis of nmr data. *J. Biomol. NMR*, 4:603–614. [[↗](#) (38)].
- [Jonas und Jonas, 1994] Jonas, J. und Jonas, A. (1994). High-pressure nmr spectroscopy of proteins and membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23:287–318. [[↗](#) (5)].
- [Jones *et al.*, 1987] Jones, P. G., VanBogelen, R. A., und Neidhardt, F. C. (1987). Induction of proteins in response to low temperature in *escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology*, 169:2092–2095. [[↗](#) (14)].
- [Kalbitzer *et al.*, 2000] Kalbitzer, H. R., Görler, A., Li, H., Dubovskii, P. V., Hengstenberg, W., Kowolik, C., Yamada, H., und Akasaka, K. (2000). ^{15}N and ^1H NMR study of histidine containing protein (HPr) from *staphylococcus carnosus* at high pressure. *Protein Science*, 9(4):693–703. [[↗](#) (87)].

- [Kalbitzer *et al.*, 2009] Kalbitzer, H. R., Spoerner, M., Ganser, P., Hozsa, C., und Kremer, W. (2009). Fundamental link between folding states and functional states of proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(46):16714–16719. [↗ (4)].
- [Kamatari *et al.*, 2001] Kamatari, Y. O., Yamada, H., Akasaka, K., Jones, J. A., Dobson, C. M., und Smith, L. J. (2001). Response of native and denatured hen lysozyme to high pressure studied by $^{15}\text{N}/^{1}\text{H}$ NMR spectroscopy. *FEBS Journal*, 268(6):1782–1793. [↗ (32)].
- [Kauzmann, 1959] Kauzmann, W. (1959). Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, 14:1–63. [↗ (4, 27 und 51)].
- [Kitahara *et al.*, 2013] Kitahara, R., Hata, K., Li, H., Williamson, M. P., und Akasaka, K. (2013). Pressure-induced chemical shifts as probes for conformational fluctuations in proteins. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 71:35–58. [↗ (31)].
- [Kitahara *et al.*, 2001] Kitahara, R., Yamada, H., und Akasaka, K. (2001). Two folded conformers of ubiquitin revealed by high-pressure NMR. *Biochemistry*, 40(45):13556–13563. [↗ (32)].
- [Koehler *et al.*, 2012] Koehler, J., Beck Erlach, M., Crusca, E., Kremer, W., Munte, C. E., und Kalbitzer, H. R. (2012). Pressure Dependence of ^{15}N Chemical Shifts in Model Peptides Ac-Gly-Gly-X-Ala-NH₂. *Materials*, 5(12):1774–1786. [↗ (13, 82, 86, 98 und 112)].
- [Kovermann, 2011] Kovermann, M. (2011). *NMR-spektroskopische Charakterisierung funktioneller Proteinzustände*. Doktorarbeit., Universität Halle/Wittenberg. [↗ (37)].
- [Kremer *et al.*, 2003] Kremer, W., Arnold, M. R., Brunner, E., Schuler, B., Jaenicke, R., und Kalbitzer, H. R. (2003). *High Pressure NMR Spectroscopy and its Application to the Cold Shock Protein Tm Csp Derived from the Hyperthermophilic Bacterium Thermotoga maritima*. Springer, Berlin. [↗ (4, 6 und 112)].
- [Kremer *et al.*, 2007] Kremer, W., Kachel, N., Kuwata, K., Akasaka, K., und Kalbitzer, H. R. (2007). Species-specific Differences in the Intermediate States of Human and Syrian Hamster Prion Protein Detected by High Pressure NMR Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31):22689–22698. [↗ (109, 110 und 112)].
- [L., 1960] L., P. (1960). *The Nature of the Chemical Bond*. Cornell Univ Press. [↗ (51)].
- [Lesch *et al.*, 2004] Lesch, H., Hecht, C., und Friedrich, J. (2004). Protein phase diagrams: The physics behind their elliptic shape. *The Journal of Chemical Physics*, 121(24):12671. [↗ (5)].

- [Lesch *et al.*, 2002] Lesch, H., Stadlbauer, H., Friedrich, J., und Vanderkooi, J. M. (2002). Stability diagram and unfolding of a modified cytochrome c: What happens in the transformation regime? *Biophysical journal*, 82(3):1644–1653. [[↗](#) (25 und 106)].
- [Li *et al.*, 1998] Li, H., Yamada, H., und Akasaka, K. (1998). Effect of pressure on individual hydrogen bonds in proteins. Basic pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 37(5):1167–1173. [[↗](#) (91, 92 und 94)].
- [Liu *et al.*, 2004] Liu, S., Milne, G. T., Kuremsky, J. G., Fink, G. R., und Leppla, S. H. (2004). Identification of the proteins required for biosynthesis of diphthamide, the target of bacterial adp-ribosylating toxins on translation elongation factor 2. *Mol. Cell Biol.*, 24:9487–9497. [[↗](#) (16)].
- [Maeno *et al.*, 2009] Maeno, A., Matsuo, H., und Akasaka, K. (2009). The pressure-temperature phase diagram of hen lysozyme at low pH. *Biophysics*, 5:1–9. [[↗](#) (104 und 123)].
- [Marion *et al.*, 1989] Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R., und Bax, A. (1989). Rapid recording of 2d nmr spectra without phase cycling. application to the study of hydrogen exchange in proteins. *J. magn. Reson.*, 85:393–399. [[↗](#) (34)].
- [Max *et al.*, 2006] Max, K. E., Zeeb, M., Bienert, R., Balbach, J., und Heinemann, U. (2006). T-rich DNA Single Strands Bind to a Preformed Site on the Bacterial Cold Shock Protein Bs-CspB. *Journal of Molecular Biology*, 360(3):702–714. [[↗](#) (111)].
- [Max *et al.*, 2007] Max, K. E. A., Zeeb, M., Bienert, R., Balbach, J., und Heinemann, U. (2007). Common mode of DNA binding to cold shock domains: Crystal structure of hexathymidine bound to the domain-swapped form of a major cold shock protein from *Bacillus caldolyticus*. *FEBS Journal*, 274(5):1265–1279. [[↗](#) (15 und 111)].
- [Mori *et al.*, 1995] Mori, S., Abeygunawardana, C., Johnson, M., Berg, J., und van Zijl, P. (1995). Improved sensitivity of hsqc spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast hsqc (fhsqc) detection scheme that avoids water saturation. *J. magn. Reson. Series B*, 108:94–98. [[↗](#) (34)].
- [Mueller *et al.*, 2000] Mueller, U., Perl, D., Schmid, F., und Heinemann, U. (2000). Thermal stability and atomic-resolution crystal structure of the bacillus caldolyticus cold shock protein. *J.Mol.Biol.*, 297:975–988. [[↗](#) (15)].
- [Munte *et al.*, 2013] Munte, C. E., Beck Erlach, M., Kremer, W., Koehler, J., und Kalbitzer, H. R. (2013). Distinct Conformational States of the Alzheimer β -Amyloid Peptide Can Be Detected by High-Pressure NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(34):8943–8947. [[↗](#) (4 und 115)].

- [Neuman Jr *et al.*, 1973] Neuman Jr, R. C., Kauzmann, W., und Zipp, A. (1973). Pressure dependence of weak acid ionization in aqueous buffers. *The Journal of Physical Chemistry*, 77(22):2687–2691. [↗ (18)].
- [Nisius und Grzesiek, 2012] Nisius, L. und Grzesiek, S. (2012). Key stabilizing elements of protein structure identified through pressure and temperature perturbation of its hydrogen bond network. *Nature Chemistry*, 4(9):711–717. [↗ (13, 14, 91 und 116)].
- [Panick *et al.*, 1999a] Panick, G., Malessa, R., und Winter, R. (1999a). Differences between the pressure- and temperature-induced denaturation and aggregation of l-lactoglobulin a, b, and ab monitored by ftir spectroscopy and small-angle x-ray scattering. *Biochemistry*, 38:6512–6519. [↗ (25)].
- [Panick *et al.*, 1999b] Panick, G., Vidugiris, G. J. A., Malessa, R., Rapp, G., und Winter, R. (1999b). Exploring the temperature-pressure phase diagram of staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 38:4157–4164. [↗ (25)].
- [Paschek und Garcia, 2004] Paschek, D. und Garcia, A. (2004). Reversible temperature and pressure denaturation of a protein fragment: A replica exchange molecular dynamics simulation study. *Phys. Rev. Lett.*, 93:238105. [↗ (5 und 14)].
- [Paschek und Gnanakaran, 2005] Paschek, D. und Gnanakaran, S. (2005). Simulations of the pressure and temperature unfolding of an alpha-helical peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:6765–6770. [↗ (5 und 14)].
- [Perl *et al.*, 2000] Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U., und Schmid, F. X. (2000). Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(5):380–383. [↗ (15)].
- [Perl und Welker, 1998] Perl, D. und Welker, C. (1998). Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 5:229–235. [↗ (14)].
- [Peterson und Wand, 2005] Peterson, R. W. und Wand, A. J. (2005). Self-contained high-pressure cell, apparatus, and procedure for the preparation of encapsulated proteins dissolved in low viscosity fluids for nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Review of Scientific Instruments*, 76(9):094101. [↗ (5 und 10)].
- [Piotto *et al.*, 1992] Piotto, M., Saudek, V., und Sklenar, V. (1992). Gradient-tailored excitation for singlequantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of biomolecular NMR*, 2:661–665. [↗ (33 und 35)].

- [Privalov, 2007] Privalov, P. L. (2007). Thermodynamic problems in structural molecular biology. *Pure and applied chemistry*, 79(8):1445–1462. [↗ (21)].
- [S. und W., 1945] S., F. H. und W., E. M. (1945). Free volume and entropy in condensed systems iii. Entropy in binary liquid mixtures; partial molal entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes. *Journal of Chemical Physics*, 13:507–532. [↗ (51)].
- [Sachs, 2010] Sachs, R. (2010). *Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an bakteriellen Kälteschockproteinen*. Doktorarbeit., Universität Halle/Wittenberg. [↗ (15, 16, 88 und 111)].
- [Sachs et al., 2011] Sachs, R., Max, K. E. A., Heinemann, U., und Balbach, J. (2011). RNA single strands bind to a conserved surface of the major cold shock protein in crystals and solution. *RNA*, 18(1):65–76. [↗ (13 und 15)].
- [Scharnagl et al., 2005] Scharnagl, C., Reif, M., und Friedrich, J. (2005). Stability of proteins: temperature, pressure and the role of the solvent. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, 1749(2):187–213. [↗ (5)].
- [Schindler et al., 1996] Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. A., und Schmid, F. X. (1996). Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2:16833–16842. [↗ (14)].
- [Schindler und Schmid, 1996] Schindler, T. und Schmid, F. X. (1996). Thermodynamic properties of an extremely rapid protein folding reaction. *Biochemistry*, 35:16833–16842. [↗ (14)].
- [Schmidpeter und Schmid, 2015] Schmidpeter, P. A. und Schmid, F. X. (2015). Prolyl isomerization as a molecular memory in the allosteric regulation of the signal adapter protein c-crkii. *Journal of Biological Chemistry*, 290(5):3021–3032. [↗ (4)].
- [Schnuchel und Holak, 1993] Schnuchel, A. und Holak, T. (1993). Structure in solution of the major cold-shock protein from bacillus subtilis. *Nature*, 364(2):353–370. [↗ (14, 87, 88, 94, 95, 104 und 110)].
- [Shaka et al., 1985] Shaka, A., Barker, P., und Freeman, R. (1985). Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *Journal of Magnetic Resonance*, 64(3):547–552. [↗ (33 und 35)].
- [Sjolinder et al., 2002] Sjolinder, M., Uhlmann, J., und Ponstingl, H. (2002). Delgef, a homologue of the ran guanine nucleotide exchange factor rangef, binds to the exocyst component sec5 and modulates secretion. *FEBS Lett.*, 532:211–215. [↗ (16)].

- [Smeller, 2002] Smeller, L. (2002). Pressure–temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1):11–29. [↗ (3, 25, 26, 28, 105 und 106)].
- [Sun *et al.*, 2005] Sun, J., Zhang, J., Wu, F., Xu, C., Li, S., Zhao, W., Wu, Z., Wu, J., Zhou, C.-Z., und Shi, Y. (2005). Solution Structure of Kti11p from *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Novel Zinc-Binding Module [†] · [‡]. *Biochemistry*, 44(24):8801–8809. [↗ (16, 17, 18 und 89)].
- [Szyperski *et al.*, 2005] Szyperski, T., Mills, J. L., Perl, D., und Balbach, J. (2005). Combined NMR-observation of cold denaturation in supercooled water and heat denaturation enables accurate measurement of ΔC_p of protein unfolding. *European Biophysics Journal*, 35(4):363–366. [↗ (6, 15, 19, 103 und 107)].
- [Takeda *et al.*, 1995] Takeda, N., Kato, M., und Taniguchi, Y. (1995). Pressure and thermally-induced reversible changes in the secondary structure of ribonuclease a studied by ft-ir spectroscopy. *Biochemistry*, 34:5980–5987. [↗ (25)].
- [Vuister und Bax, 1992] Vuister, G. und Bax, A. (1992). Resolution enhancement and spectral editing of uniformly ¹³C-enriched proteins by homonuclear broadband ¹³C decoupling. *J. Magn. Reson.*, 98:428–435. [↗ (37)].
- [Wagner *et al.*, 1983] Wagner, G., Pardi, A., und Wuethrich, K. (1983). Hydrogen bond length and proton nmr chemical shifts in proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 105(18):5948–5949. [↗ (94)].
- [Weininger *et al.*, 2009] Weininger, U., Jakob, R. P., Eckert, B., Schweimer, K., Schmid, F. X., und Balbach, J. (2009). Self-contained high-pressure cell, apparatus, and procedure for the preparation of encapsulated proteins dissolved in low viscosity fluids for nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(30):12335–12340. [↗ (4)].
- [Winter *et al.*, 1996] Winter, R., Landwehr, A., Brauns, T., Erbes, J., Czeslik, C., und Reis, O. (1996). *High Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology*. Oxford University Press. [↗ (28)].
- [Wishart *et al.*, 1995] Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L., und Sykes, B. D. (1995). ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *Journal of biomolecular NMR*, 6(2):135–140. [↗ (41)].
- [Wittekind und Mueller, 1993] Wittekind, M. und Mueller, L. (1993). Hncacb, a high-sensitivity 3d nmr experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonances with the alpha- and beta-carbon resonances in proteins. *J. Magn. Reson. B*, 101:201–205. [↗ (36)].

- [Wong, 1996] Wong, P. (1996). *Correlation field splitting of chain vibrations: structure and dynamics in lipid bilayers and biomembranes*, *High Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology*. Oxford University Press. [↗ (28)].
- [Yamada, 1974] Yamada, H. (1974). Pressure-resisting glass cell for high-pressure, high-resolution nmr measurement. *Review of Scientific Instruments*, 45:640–642. [↗ (5)].
- [Yamada *et al.*, 1974] Yamada, H., Ishihara, T., und Kinugasa, T. (1974). High-pressure high-resolution nuclear magnetic resonance. pressure-dependence of proton chemical shift of chloroform in aromatic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 96:1935–1936. [↗ (5)].
- [Yamada *et al.*, 2001] Yamada, H., Nishikawa, K., Honda, M., Shimura, T., Akasaka, K., und Tabayashi, K. (2001). Pressure-resisting cell for high-pressure, high-resolution nuclear magnetic resonance measurements at very high magnetic fields. *Review of Scientific Instruments*, 72:1463–1471. [↗ (5)].
- [Zeeb und Balbach, 2003] Zeeb, M. und Balbach, J. (2003). Single-stranded DNA binding of the cold-shock protein CspB from *Bacillus subtilis*: NMR mapping and mutational characterization. *Protein science*, 12(1):112–123. [↗ (14)].
- [Zeeb *et al.*, 2006] Zeeb, M., Max, K. E., Weininger, U., Low, C., Sticht, H., und Balbach, J. (2006). Recognition of T-rich single-stranded DNA by the cold shock protein Bs-CspB in solution. *Nucleic Acids Research*, 34(16):4561–4571. [↗ (111)].
- [Zhang *et al.*, 1995] Zhang, J., Peng, X., Jonas, A., und Jonas, J. (1995). NMR study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease A. *Biochemistry*, 34(27):8631–8641. [↗ (25)].
- [Zipp und Kauzmann, 1973] Zipp, A. und Kauzmann, W. (1973). Pressure denaturation of metmyoglobin. *Biochemistry*, 12:4217–4228. [↗ (4 und 5)].

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.0.1	Aufbau der Hochdruckanlage.	9
Abb. 3.2.1	<i>Bs</i> -CspB Cartoonplot	14
Abb. 3.3.1	<i>Bc</i> Csp Cartoonplot	15
Abb. 3.4.1	Kti11p(M ⁻) Cartoonplot	17
Abb. 4.2.1	Modell entfalteter Proteinanteile für unterschiedlich hohe Drücke	24
Abb. 4.3.1	Modell eines Protein Phasendiagrammes	25
Abb. 4.3.2	Modell: Ellipse mit Schnittpunkten	29
Abb. 4.4.1	Funktionenplot $\delta(p)$	31
Abb. 4.4.2	Auswirkung von hohen Drücken auf ein molekulares System . .	32
Abb. 5.1.1	HSQC Pulssequenz	34
Abb. 6.2.1	Protonenspektren <i>Bs</i> -CspB: T-Übergänge bei versch. Drücken. . .	43
Abb. 6.2.2	Protonenspektren <i>Bc</i> -Csp R3E L66E: versch. T-Übergänge.	44
Abb. 6.2.3	Protonenspektren Kti11p(M ⁻): versch. T-Übergänge.	45
Abb. 6.2.4	Entfaltete Proteinanteile bei 0.1 MPa im Vergleich.	46
Abb. 6.2.5	<i>Bs</i> -CspB: f_u Anteile bei unt. Drücken.	47
Abb. 6.2.6	<i>Bc</i> -Csp R3E L66E: f_u Anteile bei unt. Drücken.	47
Abb. 6.2.7	Kti11p(M ⁻): f_u Anteile bei unt. Drücken.	48
Abb. 6.2.8	Darstellung der therm. Parameter über dem Druck p	52
Abb. 6.2.9	Darstellung von $\Delta H_u^0(T_m)$ über dem Druck p	52
Abb. 6.2.10	T-Abhängigkeit von Entropie, Enthalpie und freier Enthalpie. . .	55
Abb. 6.2.11	<i>Bs</i> -CspB: ΔG_u^0 aus T-Trans. über p aufgetragen	56
Abb. 6.2.12	<i>Bc</i> -Csp R3E L66E: ΔG_u^0 aus T-Trans. über p aufgetragen	58
Abb. 6.2.13	Kti11p(M ⁻): ΔG_u^0 aus T-Trans. über p aufgetragen	59
Abb. 6.2.14	Ermittlung der thermischen Expansionsänderung $\Delta\hat{\alpha}$	63
Abb. 6.2.15	Temperaturabhängige Thermische Expansionsänderung der drei Proteine.	66
Abb. 6.2.16	<i>Bs</i> -CspB: Protonenspektren verschiedener Druckübergänge. . . .	67
Abb. 6.2.17	<i>Bc</i> -Csp R3E L66E: Protonenspektren verschiedener Drucküber- gänge.	67
Abb. 6.2.18	Kti11p(M ⁻): Protonenspektren verschiedener Druckübergänge. .	68
Abb. 6.2.19	$f_u(p)$ und $\Delta G_u^0(p)$ der Druckübergangsdaten der drei Proteine. . .	71
Abb. 6.2.20	<i>Bc</i> -Csp R3E L66E: $\Delta V(T)$ aus Druckübergangsdaten.	72
Abb. 6.2.21	Stabilitätsgebirge und Konturplot der drei Proteine	75
Abb. 6.2.22	Anpassung der Ellipsengl. im Phasenraum.	77
Abb. 6.3.1	GGXA in Phosphatpuffer	83

Abb. 6.3.2	GGXA in Natriumcacodylat Puffer	85
Abb. 6.3.3	<i>Bs</i> -CspB Zuordnung ^1H - ^{15}N -HSQC	88
Abb. 6.3.4	<i>Bc</i> -Csp R3E L66E Zuordnung ^1H - ^{15}N -HSQC	89
Abb. 6.3.5	Kti11p(M ⁻) Zuordnung ^1H - ^{15}N -HSQC	90
Abb. 6.3.6	<i>Bs</i> -CspB: Druckabhängigkeit der ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren.	92
Abb. 6.3.7	<i>Bs</i> -CspB: Druckabhängigkeit ausgewählter Amidprotonensignale.	93
Abb. 6.3.8	<i>Bs</i> -CspB: quadratische Anpassung Amidprotonen b_1 und b_2	95
Abb. 6.3.9	<i>Bs</i> -CspB: quadratische Anpassung ^{15}N b_1 und b_2	96
Abb. 6.3.10	Kti11p(M ⁻): Druckabhängigkeit der ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren.	97
Abb. 6.3.11	Kti11p(M ⁻): Druckabhängigkeit ausgewählter Amidprotonensignale.	98
Abb. 6.3.12	Kti11p(M ⁻): quadratische Anpassung Amidprotonen b_1 und b_2	99
Abb. 6.3.13	Kti11p(M ⁻): Druckabhängigkeit ausgewählter Stickstoffsignale.	101
Abb. 6.3.14	Kti11p(M ⁻): quadratische Anpassung Stickstoffsignale b_1 und b_2	102
Abb. 7.1.1	<i>Hillside</i> - und <i>tongue</i> -artige Ellipsen.	106
Abb. 7.1.2	Kti11p(M ⁻): Ellipsenfit des potentiellen Intermediates.	108
Abb. 7.2.1	Skizze Druckeinwirkung zwischen β -Faltblattbereichen.	109
Abb. 7.2.2	<i>Bs</i> -CspB: Kavitäten und Druckeinwirkung.	110
Abb. 7.2.3	Kti11p(M ⁻): Kavitäten und Druckeinwirkung.	113
Abb. 7.2.4	Kti11p(M ⁻): Kavitäten und Druckeinwirkung.	115
Abb. 7.2.5	Kti11p(M ⁻): Ermittlung der chem. Verschiebungen δ_1 , δ_2 der Protonen.	117
Abb. 7.2.6	Kti11p(M ⁻): Ermittlung der chem. Verschiebungen δ_1 , δ_2 der Stickstoffkerne.	118
Abb. A.1.1	Photographie Druckbank.	141
Abb. A.1.2	Photographie NMR Hochdruckröhrchen.	141
Abb. A.2.1	<i>Bs</i> -CspB: HSQC Spektrum Kältedenaturierung.	142
Abb. A.3.1	Kti11p: HSQC Vergleichsspektren der apo- und holo- Form.	143
Abb. A.4.1	Kti11p: hetNOE Vergleich der apo- und holo- Form.	144
Abb. A.5.1	Kti11p(M ⁻): Spektrum pH-Wert Abhängigkeit.	145
Abb. A.5.2	Kti11p(M ⁻): hetNOE Vergleich der apo- und holo- Form.	145

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 6.2.1	Thermodynamische Parameter für <i>Bs</i> -CspB.	49
Tab. 6.2.2	Thermodynamische Parameter für <i>Bc</i> -Csp R3E L66E.	50
Tab. 6.2.3	Thermodynamische Parameter für Kti11p(M ⁻).	50
Tab. 6.2.4	Aus T-Trans gewonnene ΔV , $\Delta\hat{\beta}$ und p_m Werte.	61
Tab. 6.2.5	Fitergebnisse von $\Delta\hat{\alpha}$ aus ΔS_u^0 über p.	65
Tab. 6.2.6	ΔG_0 , ΔV , $\Delta\hat{\beta}$ und p_m aus Druckübergängen.	72
Tab. 6.2.7	Thermodyn. Parameter aus Ellipsenanpassung.	78
Tab. 6.3.1	Ergebnisse GGXA in Phosphatpuffer	84
Tab. 6.3.2	Ergebnisse GGXA in Natriumcacodylat Puffer	86
Tab. 7.1.1	Kti11p(M ⁻): Thermodynamische Parameter der oberen Ellipse. . .	108
Tab. 7.2.1	Kti11p(M ⁻): Druckänderung Amidprotonen von δ_1 nach δ_2	118
Tab. 7.2.2	Kti11p(M ⁻): Druckänderung Stickstoffkerne von δ_1 nach δ_2	118
Tab. A.6.1	<i>Bc</i> -Csp R3E L66E: Zuordnung der ¹ H- ¹⁵ N Resonanzen	146
Tab. A.6.2	Kti11p(M ⁻): Zuordnung der ¹ H- ¹⁵ N Resonanzen	147
Tab. A.7.1	<i>Bs</i> -CspB: ¹ HN Druckkoeffizienten korrigiert.	148
Tab. A.7.1	<i>Bs</i> -CspB: ¹ HN Druckkoeffizienten korrigiert.	149
Tab. A.7.2	<i>Bs</i> -CspB: ¹⁵ N Druckkoeffizienten unkorrigiert.	149
Tab. A.7.2	<i>Bs</i> -CspB: ¹⁵ N Druckkoeffizienten unkorrigiert.	150
Tab. A.7.3	Kti11p(M ⁻): ¹ HN Druckkoeffizienten korrigiert.	150
Tab. A.7.3	Kti11p(M ⁻): ¹ HN Druckkoeffizienten korrigiert.	151
Tab. A.7.4	Kti11p(M ⁻): ¹⁵ N Druckkoeffizienten korrigiert.	151
Tab. A.7.4	Kti11p(M ⁻): ¹⁵ N Druckkoeffizienten korrigiert.	152

Teil V

ANHANG

ANHANG A

A.1 Übersicht der Hochdruckanlage

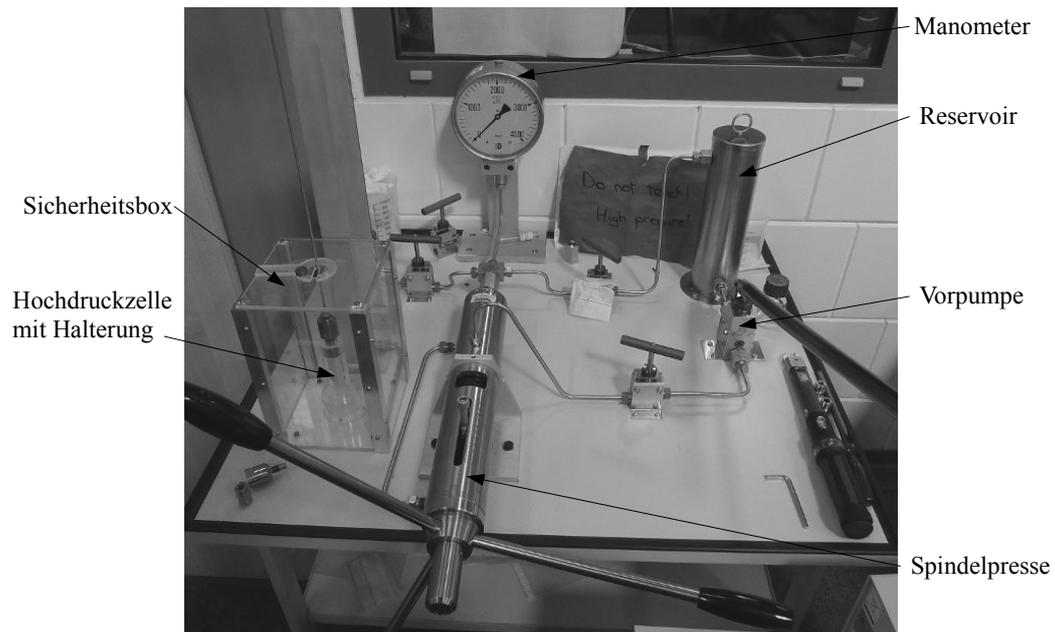


Abb. A.1.1: Photographische Übersicht zum Aufbau der Druckbank mit Reservoir, Vorpumpe, Spindelpresse, Ventilen, Manometer und Sicherheitsbox mit integrierter Hochdruckzellenhalterung.

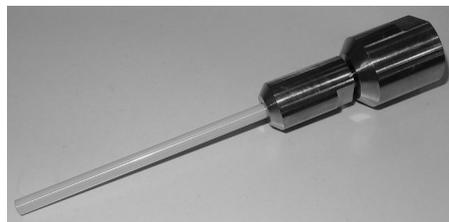


Abb. A.1.2: Die keramische Hochdruckzelle mit den aus Titan gefertigten Anschlüssen an die Hochdruckleitung.

A.2 Stabilität des Kälteschockproteins *Bs-CspB* anhand von HSQC-Spektren

Ein besonderer Aspekt der Hochdruckthematik ist das Phänomen der Kältedenaturierung. Im Ergebnisteil wurden bereits Daten und Auswertungen bei hohen Drücken und Temperaturen bis 260 K aufgezeigt. Dennoch läßt sich die Kältedenaturierung anhand von HSQC Aufnahmen sehr viel eindrucksvoller verfolgen als im eindimensionalen Protonenspektrum. In Abb. A.2.1 sind bei einem angelegten Druck von 160 MPa für vier verschiedene Temperaturen ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren dargestellt.

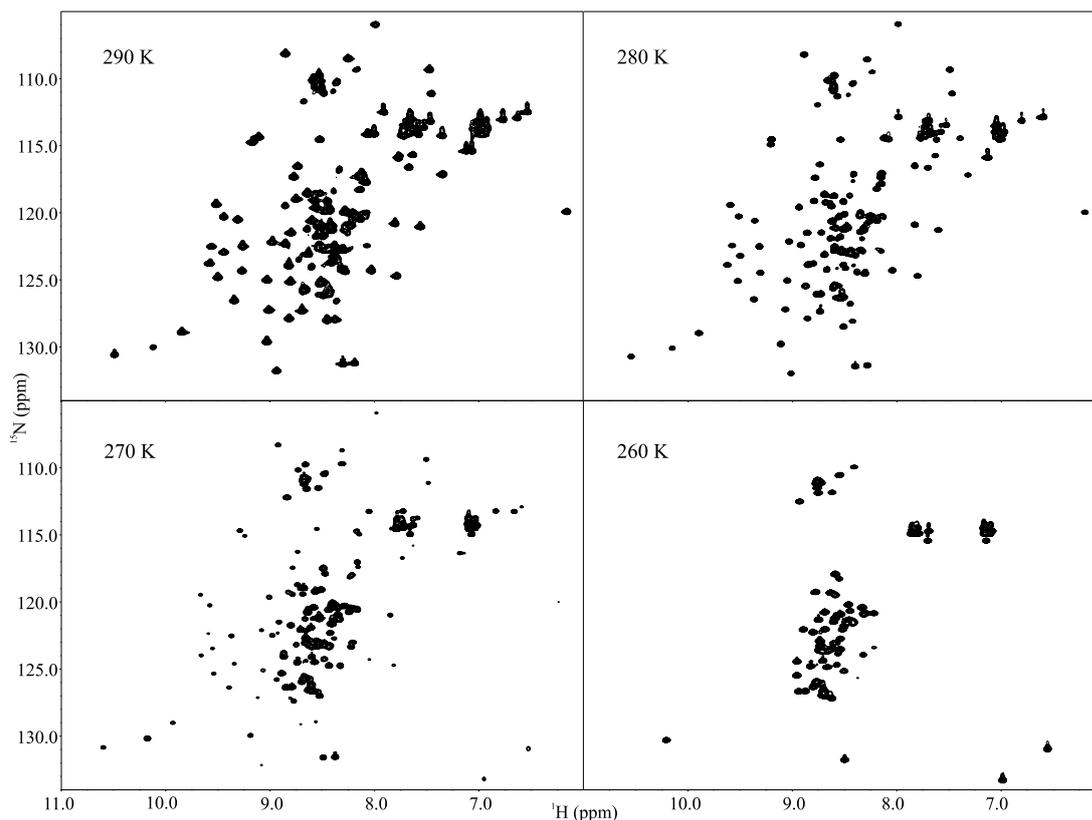


Abb. A.2.1: *Bs-CspB*: Intensitätsverlust der nativen Kohärenzsignale durch Kältedenaturierung für vier verschiedene Temperaturen bei 160 MPa.

Sehr gut läßt sich hier bei Temperaturabnahme das Absinken der nativen Signalintensitäten erkennen und gleichzeitig, durch langsamen Austausch, ein Anwachsen der entfalteten Spezies um 8.5 ppm beobachten. Bei 160 MPa und 260 K wird somit eine Entfaltung von fast 90% erreicht.

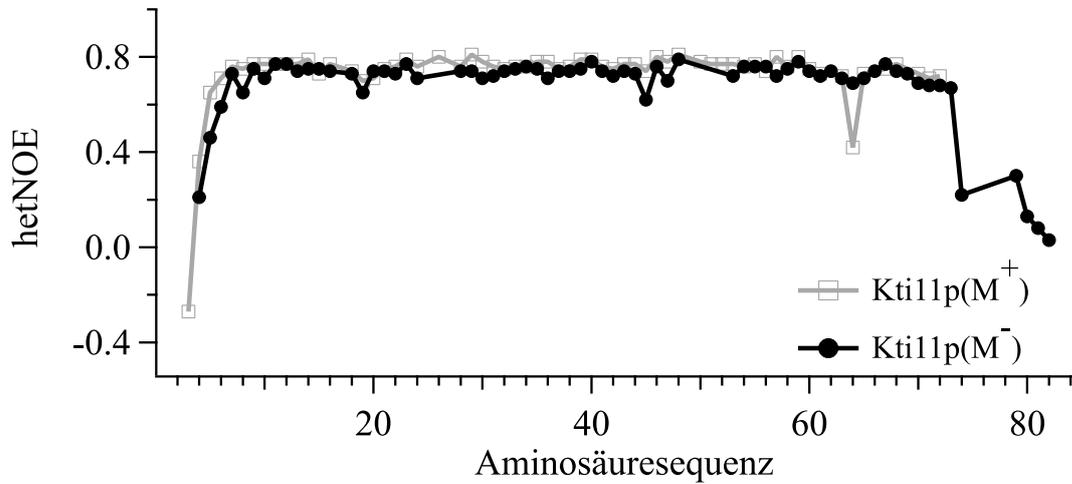
A.4 Vergleich des hetNOE von Kti11p(M⁻) und Kti11p(M⁺)

Abb. A.4.1: Kti11p: Vergleich des heteronuklearen NOE von Kti11p(M⁻) und Kti11p(M⁺). Jeweils bei 295 K in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.5, 50 mM NaCl und 10% D₂O. Kleinere Werte bedeuten eine höhere Beweglichkeit des HN Rückgrates.

Es sind zwischen den beiden Proteinformen mit und ohne Metallion keine signifikanten Dynamikunterschiede auf der Piko- bis Nanosekunden Zeitskala im interessierenden Bereich des Zinkfingers festzustellen.

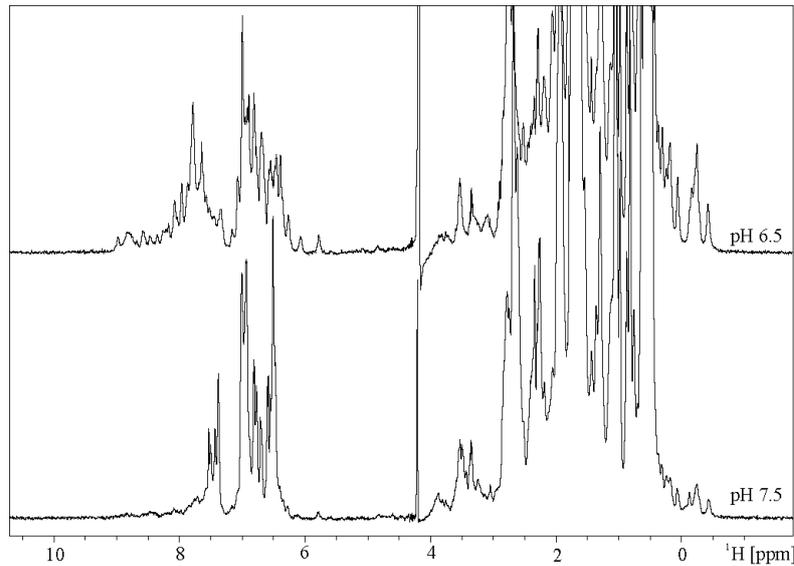
A.5 Abhängigkeit der Stabilität von $Kt_{11p}(M^-)$ vom pH-Wert


Abb. A.5.1: $Kt_{11p}(M^-)$: Protonenspektren bei unterschiedlichen pH-Werten in Phosphatpuffer bei 295 K in 50 mM Phosphatpuffer 50 mM NaCl und 10% D_2O . Eindeutig ist die höhere Stabilität bei pH 6.5 zu finden. Das Spektrum zeigt eine stärkere Dispersion und die nativen Signale im Methylbereich um 0 ppm zeigen höhere Intensitäten. Zusätzlich schlägt bei höheren pH-Werten im Amidbereich der Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel zu, was ein Absinken der Signale verursacht.

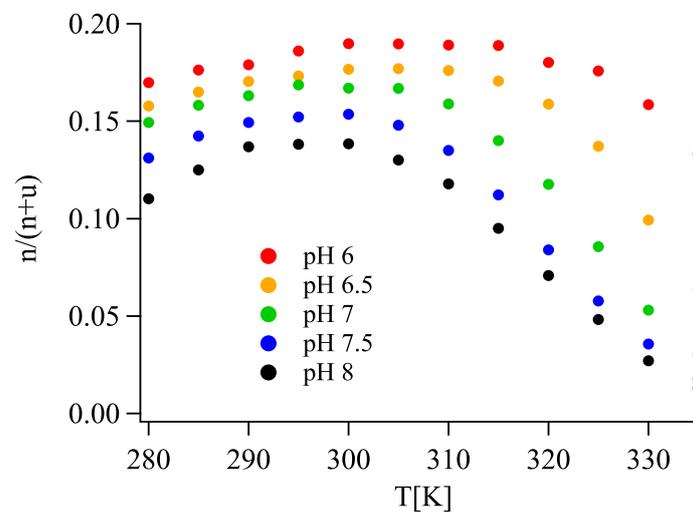


Abb. A.5.2: $Kt_{11p}(M^-)$: Stabilitätskurven aus den Protonenspektren via Temperaturübergang für verschiedene pH-Werte ermittelt. Bedingungen wie in Abb. A.5.1. Die Ordinate gibt das Verhältnis von nativem integralen Bereich zu nativem plus entfaltetem integrierten Bereich an. Dieses Verhältnis ist proportional zur Proteinstabilität, wobei ein größerer Wert eine höhere Stabilität bedeutet. Eindeutig zeigt sich ein Trend für hohe Stabilitäten zu niedrigen pH-Werten hin.

A.6 Zuordnung der ^1H - ^{15}N HSQC Spektren

aa	^1HN [ppm]	^{15}N [ppm]	aa	^1HN [ppm]	^{15}N [ppm]
M1	-	-	G35	8.547	109.651
Q2	8.795	122.071	E36	8.541	119.087
E3	8.231	118.868	G37	8.490	109.220
G4	8.839	108.135	F38	8.338	120.432
K5	8.387	118.868	K39	8.554	127.055
V6	9.015	124.312	T40	7.653	114.398
K7	9.470	105.164	L41	6.662	119.862
W8	7.456	110.975	E42	8.134	118.140
F9	9.292	120.562	E43	8.818	121.786
N10	8.230	127.033	G44	9.108	114.012
N11	9.225	124.613	Q45	7.807	120.054
E12	8.283	120.179	E46	9.032	126.376
K13	7.737	116.129	V47	8.655	115.566
G14	8.156	107.863	S48	8.811	115.967
Y15	6.640	112.267	F49	8.623	117.190
G16	7.955	105.281	E50	8.824	117.206
F17	7.719	114.725	I51	8.781	121.785
I18	9.506	122.776	V52	9.325	124.932
E19	9.356	126.478	Q53	8.686	121.755
V20	9.349	125.131	G54	7.946	112.981
E21	8.816	126.724	N55	-	-
G22	9.160	115.315	R56	8.668	117.710
G23	8.030	107.394	G57	7.455	108.429
S24	8.242	116.697	P58	-	-
D25	8.490	120.945	Q59	9.354	121.245
V26	9.441	122.003	A60	8.801	122.613
F27	8.606	130.652	A61	9.463	123.707
V28	7.768	124.578	N62	9.395	119.153
H29	8.711	127.572	V63	8.039	116.250
F30	8.445	123.189	V64	9.284	129.905
T31	7.167	111.298	K65	8.585	125.519
A32	8.138	122.789	E66	8.013	128.736
I33	7.452	120.225	W8sc	10.535	130.075
Q34	9.003	127.290			

Tab. A.6.1: *Bc*-Csp R3E L66E: Zuordnung der ^1H - ^{15}N Resonanzen

aa	^1HN [ppm]	^{15}N [ppm]	aa	^1HN [ppm]	^{15}N
M1	-	-	E43	8.408	124.208
V2	-	-	K44	8.234	117.446
S3	-	-	V45	7.917	119.920
T4?	8.217	116.400	A46	9.092	129.540
Y5	8.676	122.844	V47	8.047	118.144
D6	8.065	117.841	C48	9.218	129.348
E7	8.481	119.461	P49	-	-
I8	8.747	123.504	S50	-	-
E9	8.833	124.815	C51	-	-
I10	7.983	122.122	S52	-	-
E11	8.599	119.703	L53	7.008	118.185
D12	7.927	117.106	M54	8.700	120.948
M13	7.688	118.201	I55	8.577	116.910
T14	9.457	118.381	D56	7.965	123.445
F15	9.409	128.760	V57	8.994	122.211
E16	8.487	129.491	V58	8.836	128.015
P17	-	-	F59	7.903	123.849
E18	9.251	117.933	D60	9.169	121.399
N19	7.178	113.221	K61	9.004	125.983
Q20	7.767	115.928	E62	9.226	117.425
M21	7.055	116.193	D63	8.207	118.703
F22	9.303	121.634	L64	7.850	113.851
T23	9.380	109.356	A65	7.766	121.703
Y24	8.119	120.889	E66	8.252	115.915
P25	-	-	Y67	7.277	119.690
C26	7.939	125.917	Y68	7.673	118.510
P27	-	-	E69	7.837	117.621
C28	7.079	115.030	E70?	8.161	121.884
G29?	7.679	109.175	A71	8.039	118.956
D30?	8.053	118.540	G72	8.076	108.343
R31	8.794	119.122	I73	7.809	116.422
F32	9.306	119.206	H74?	8.310	120.804
Q33	8.432	117.384	P75	-	-
I34	8.473	121.821	P76	-	-
Y35	9.376	126.923	E77	-	-
L36	8.516	125.395	P78	-	-
D37	9.118	115.966	I79	8.352	121.690
D38	6.985	118.090	A80	8.425	128.432
M39	8.041	123.300	A81	8.259	123.348
F40	8.765	122.448	A82	8.187	122.844
E41	7.364	114.566	A83	-	-
G42	7.944	107.106			

Tab. A.6.2: Kti11p(M⁻): Zuordnung der ^1H - ^{15}N Resonanzen

A.7 Übersicht der Druckkoeffizienten

aa	b_0 [ppm]	b_1 [ppm/GPa]	b_2 [ppm/GPa ²]
L2	8.684 ± 0.001	-0.136 ± 0.022	-0.127 ± 0.108
E3	7.922 ± 0.001	0.566 ± 0.032	0.251 ± 0.154
G4	8.782 ± 0.002	0.027 ± 0.037	0.106 ± 0.176
K5	8.513 ± 0.001	0.006 ± 0.030	-0.298 ± 0.146
V6	8.919 ± 0.002	-0.025 ± 0.041	0.378 ± 0.196
K7	9.421 ± 0.002	0.405 ± 0.035	-0.983 ± 0.170
W8	7.416 ± 0.001	-0.496 ± 0.022	1.151 ± 0.105
F9	9.268 ± 0.002	0.711 ± 0.046	-1.481 ± 0.222
N10	8.247 ± 0.002	0.829 ± 0.039	-1.532 ± 0.187
S11	9.082 ± 0.002	0.372 ± 0.035	-0.254 ± 0.169
E12	8.146 ± 0.002	0.555 ± 0.047	0.620 ± 0.228
K13	7.618 ± 0.001	-0.370 ± 0.031	0.485 ± 0.147
G14	8.159 ± 0.001	0.303 ± 0.033	-0.832 ± 0.159
F15	6.621 ± 0.005	-0.421 ± 0.117	0.355 ± 0.565
G16	8.044 ± 0.001	-0.796 ± 0.025	0.817 ± 0.119
F17	7.701 ± 0.003	-1.233 ± 0.068	2.050 ± 0.328
I18	9.520 ± 0.002	-0.437 ± 0.039	0.435 ± 0.187
E19	9.314 ± 0.001	-0.215 ± 0.028	0.682 ± 0.137
V20	9.704 ± 0.002	0.273 ± 0.036	-0.697 ± 0.171
E21	8.583 ± 0.001	0.254 ± 0.031	0.822 ± 0.147
G22	9.000 ± 0.001	0.213 ± 0.021	-0.459 ± 0.101
Q23	8.099 ± 0.002	-0.381 ± 0.041	-0.176 ± 0.197
D24	8.332 ± 0.002	0.481 ± 0.043	-0.143 ± 0.208
D25	8.316 ± 0.001	1.018 ± 0.029	-0.454 ± 0.141
V26	9.270 ± 0.002	0.372 ± 0.037	-0.145 ± 0.177
F27	8.842 ± 0.001	0.075 ± 0.030	-0.841 ± 0.144
V28	7.744 ± 0.002	-0.462 ± 0.035	0.609 ± 0.171
H29	8.686 ± 0.002	-0.284 ± 0.042	0.430 ± 0.200
F30	8.290 ± 0.002	0.092 ± 0.043	-0.221 ± 0.207
S31	7.449 ± 0.001	-1.539 ± 0.033	1.869 ± 0.159
A32	8.037 ± 0.002	-0.718 ± 0.050	0.831 ± 0.239
I33	7.490 ± 0.002	-0.295 ± 0.043	0.302 ± 0.208
Q34	8.943 ± 0.002	-0.112 ± 0.045	-0.436 ± 0.219
G35	8.462 ± 0.002	0.334 ± 0.039	-0.499 ± 0.186
E36	8.240 ± 0.002	0.235 ± 0.042	0.516 ± 0.200
G37	8.444 ± 0.002	0.056 ± 0.045	-0.043 ± 0.215
F38	8.261 ± 0.001	0.520 ± 0.021	-0.902 ± 0.101
K39	8.391 ± 0.002	-0.231 ± 0.047	-0.252 ± 0.225
T40	7.621 ± 0.001	-0.025 ± 0.031	0.236 ± 0.149
L41	6.164 ± 0.001	-0.689 ± 0.034	0.496 ± 0.164
E42	8.037 ± 0.002	0.413 ± 0.040	0.056 ± 0.195
E43	8.745 ± 0.005	-0.148 ± 0.125	2.100 ± 0.604
G44	9.084 ± 0.002	0.124 ± 0.041	-0.010 ± 0.195
Q45	7.738 ± 0.002	-0.092 ± 0.038	-0.214 ± 0.183
A46	8.845 ± 0.002	0.474 ± 0.038	0.002 ± 0.184
V47	8.468 ± 0.001	-0.379 ± 0.029	0.538 ± 0.138
S48	8.762 ± 0.002	-0.844 ± 0.048	1.237 ± 0.229
F49	8.683 ± 0.001	-0.094 ± 0.030	-0.302 ± 0.146
E50	8.764 ± 0.002	-0.007 ± 0.038	0.370 ± 0.182
I51	8.673 ± 0.002	0.051 ± 0.041	-0.045 ± 0.196
V52	9.139 ± 0.001	0.086 ± 0.033	0.328 ± 0.159
E53	8.530 ± 0.001	0.208 ± 0.031	0.539 ± 0.149

Tab. A.7.1: *Bs-CspB*: Die Druckkoeffizienten b_0 , b_1 sowie b_2 nach quadratischer Anpassung an die druckabhängigen, GGXA korrigierten chemischen Verschiebungen der Rückgratprotonen HN in Natriumcacodylat bei 298 K und pH 7.

aa	b_0 [ppm]	b_1 [ppm/GPa]	b_2 [ppm/GPa ²]
G54	7.920 ± 0.002	0.584 ± 0.035	-0.871 ± 0.169
N55	8.457 ± 0.001	0.417 ± 0.034	-0.316 ± 0.166
R56	8.567 ± 0.001	-0.299 ± 0.034	0.500 ± 0.165
G57	7.448 ± 0.002	-0.251 ± 0.047	0.082 ± 0.224
Q59	9.216 ± 0.001	0.082 ± 0.031	-0.554 ± 0.151
A60	8.760 ± 0.001	-0.212 ± 0.030	0.880 ± 0.144
A61	9.488 ± 0.003	0.045 ± 0.065	-0.223 ± 0.316
N62	9.380 ± 0.002	0.569 ± 0.038	-0.376 ± 0.181
V63	8.076 ± 0.001	-0.264 ± 0.034	-0.451 ± 0.166
T64	9.385 ± 0.002	-0.095 ± 0.036	-0.041 ± 0.173
K65	8.715 ± 0.001	-0.102 ± 0.026	-0.054 ± 0.126
E66	8.223 ± 0.001	-0.047 ± 0.023	0.819 ± 0.109
A67	8.094 ± 0.002	0.696 ± 0.041	-0.565 ± 0.198

Tab. A.7.1: *Bs-CspB*: Die Druckkoeffizienten b_0 , b_1 sowie b_2 nach quadratischer Anpassung an die druckabhängigen, GGXA korrigierten chemischen Verschiebungen der Rückgratprotonen HN in Natriumcacodylat bei 298 K und pH 7.

aa	b_0 [ppm]	b_1 [ppm/GPa]	b_2 [ppm/GPa ²]
L2	116.667 ± 0.010	-0.369 ± 0.225	1.796 ± 1.083
E3	117.263 ± 0.012	3.013 ± 0.272	0.141 ± 1.311
G4	107.842 ± 0.017	1.385 ± 0.394	3.891 ± 1.899
K5	119.972 ± 0.017	3.954 ± 0.401	0.117 ± 1.933
V6	124.359 ± 0.013	4.497 ± 0.313	-0.470 ± 1.510
K7	105.555 ± 0.023	3.570 ± 0.544	-4.076 ± 2.622
W8	111.105 ± 0.020	-1.240 ± 0.471	9.274 ± 2.270
F9	120.812 ± 0.018	-4.297 ± 0.416	9.181 ± 2.004
N10	127.406 ± 0.022	4.235 ± 0.515	-4.261 ± 2.480
S11	122.180 ± 0.015	2.182 ± 0.348	-0.497 ± 1.674
E12	122.402 ± 0.016	3.299 ± 0.362	-3.493 ± 1.743
K13	116.193 ± 0.019	2.678 ± 0.451	-0.146 ± 2.172
G14	107.918 ± 0.016	4.664 ± 0.368	-5.838 ± 1.773
F15	112.646 ± 0.033	2.095 ± 0.760	-0.513 ± 3.663
G16	105.787 ± 0.012	1.376 ± 0.275	-0.189 ± 1.323
F17	115.132 ± 0.010	2.903 ± 0.230	4.034 ± 1.107
I18	122.843 ± 0.014	-1.892 ± 0.334	1.427 ± 1.609
E19	126.528 ± 0.015	-0.036 ± 0.349	4.136 ± 1.682
V20	128.756 ± 0.015	0.857 ± 0.343	0.906 ± 1.654
E21	127.011 ± 0.016	1.821 ± 0.371	1.843 ± 1.789
G22	113.800 ± 0.012	3.801 ± 0.273	-2.267 ± 1.313
Q23	117.083 ± 0.007	0.570 ± 0.161	-0.431 ± 0.778
D24	120.700 ± 0.019	2.632 ± 0.453	-2.197 ± 2.182
D25	118.522 ± 0.016	2.669 ± 0.368	4.176 ± 1.772
V26	122.326 ± 0.019	3.936 ± 0.450	-3.032 ± 2.167
F27	131.196 ± 0.015	3.631 ± 0.349	-0.104 ± 1.682
V28	124.638 ± 0.016	0.421 ± 0.366	1.969 ± 1.766
H29	127.687 ± 0.015	1.747 ± 0.354	-1.361 ± 1.705
F30	123.242 ± 0.008	-0.530 ± 0.193	5.860 ± 0.931
S31	116.930 ± 0.015	1.600 ± 0.351	-1.253 ± 1.693
A32	124.173 ± 0.016	0.428 ± 0.376	3.929 ± 1.811
I33	120.536 ± 0.014	3.383 ± 0.322	-3.755 ± 1.552
Q34	127.272 ± 0.008	0.886 ± 0.187	-2.273 ± 0.902
G35	109.628 ± 0.017	3.289 ± 0.395	-0.132 ± 1.904
E36	128.331 ± 0.016	2.006 ± 0.371	-1.494 ± 1.789
G37	109.324 ± 0.010	3.822 ± 0.236	-3.631 ± 1.139

Tab. A.7.2: *Bs-CspB*: Die Druckkoeffizienten b_0 , b_1 sowie b_2 nach quadratischer Anpassung an die druckabhängigen, unkorrigierten chemischen Verschiebungen der Stickstoffkerne in Natriumcacodylat bei 298 K und pH 7.

aa	b_0 [ppm]	b_1 [ppm/GPa]	b_2 [ppm/GPa ²]
F38	120.689 ± 0.014	4.414 ± 0.319	-2.208 ± 1.536
K39	126.918 ± 0.019	7.796 ± 0.443	-10.611 ± 2.136
T40	114.708 ± 0.013	8.195 ± 0.299	-11.750 ± 1.439
L41	119.949 ± 0.012	-0.755 ± 0.269	4.869 ± 1.298
E42	117.516 ± 0.008	-1.212 ± 0.190	2.261 ± 0.917
E43	122.137 ± 0.015	2.925 ± 0.339	-2.339 ± 1.633
G44	113.999 ± 0.018	5.646 ± 0.417	-6.703 ± 2.008
Q45	120.335 ± 0.023	3.273 ± 0.528	-1.710 ± 2.544
A46	129.061 ± 0.019	3.753 ± 0.437	-2.166 ± 2.104
V47	114.205 ± 0.013	2.082 ± 0.314	1.506 ± 1.511
S48	116.911 ± 0.021	2.740 ± 0.483	-0.879 ± 2.327
F49	118.343 ± 0.017	4.788 ± 0.404	-3.778 ± 1.947
E50	124.076 ± 0.018	-0.010 ± 0.409	-3.324 ± 1.968
I51	121.260 ± 0.020	1.765 ± 0.475	-0.364 ± 2.288
V52	124.071 ± 0.015	1.797 ± 0.355	-1.074 ± 1.711
E53	123.110 ± 0.004	-0.077 ± 0.103	1.184 ± 0.495
G54	113.550 ± 0.017	4.056 ± 0.387	-4.556 ± 1.864
N55	119.357 ± 0.017	1.424 ± 0.387	4.252 ± 1.866
R56	118.199 ± 0.012	1.843 ± 0.273	2.511 ± 1.314
G57	108.837 ± 0.020	3.504 ± 0.473	-2.581 ± 2.277
Q59	120.151 ± 0.008	2.894 ± 0.180	-3.081 ± 0.869
A60	121.946 ± 0.017	2.137 ± 0.391	2.176 ± 1.885
A61	123.484 ± 0.015	2.156 ± 0.351	-1.322 ± 1.691
N62	118.968 ± 0.024	2.320 ± 0.554	2.328 ± 2.671
V63	118.442 ± 0.007	-1.460 ± 0.152	4.450 ± 0.733
T64	124.185 ± 0.014	4.284 ± 0.331	-3.527 ± 1.595
K65	124.560 ± 0.015	3.633 ± 0.338	-1.700 ± 1.631
E66	124.050 ± 0.020	1.689 ± 0.457	1.299 ± 2.203
A67	130.838 ± 0.013	3.308 ± 0.313	-3.967 ± 1.508

Tab. A.7.2: *Bs*-CspB: Die Druckkoeffizienten b_0 , b_1 sowie b_2 nach quadratischer Anpassung an die druckabhängigen, unkorrigierten chemischen Verschiebungen der Stickstoffkerne in Natriumcacodylat bei 298 K und pH 7

aa	b_0 [ppm]	b_1 [ppm/GPa]	b_2 [ppm/GPa ²]
T4	8.178 ± 0.003	0.286 ± 0.062	0.020 ± 0.248
Y5	8.662 ± 0.003	0.515 ± 0.059	0.623 ± 0.237
I8	8.729 ± 0.002	0.253 ± 0.031	-0.731 ± 0.126
E9	8.821 ± 0.003	0.462 ± 0.050	-0.606 ± 0.202
I10	7.980 ± 0.003	0.184 ± 0.061	0.617 ± 0.245
E11	8.581 ± 0.001	-0.131 ± 0.024	0.539 ± 0.097
D12	7.931 ± 0.003	-0.280 ± 0.055	0.416 ± 0.222
M13	7.681 ± 0.003	-0.677 ± 0.057	0.210 ± 0.230
T14	9.447 ± 0.003	0.211 ± 0.053	0.664 ± 0.213
F15	9.395 ± 0.002	0.746 ± 0.042	-0.798 ± 0.169
E16	8.477 ± 0.005	-0.033 ± 0.093	-0.178 ± 0.372
E18	9.234 ± 0.002	-0.993 ± 0.038	0.871 ± 0.151
N19	7.169 ± 0.003	-0.044 ± 0.054	0.456 ± 0.215
Q20	7.760 ± 0.002	-0.636 ± 0.031	0.378 ± 0.125
M21	7.042 ± 0.002	-0.362 ± 0.040	0.285 ± 0.161
F22	9.302 ± 0.005	0.748 ± 0.099	-0.178 ± 0.398
T23	9.386 ± 0.007	-0.836 ± 0.132	1.255 ± 0.527
Y24	8.101 ± 0.002	-0.296 ± 0.047	0.060 ± 0.189
C26	8.136 ± 0.001	0.392 ± 0.029	0.133 ± 0.116
C28	7.085 ± 0.003	-0.476 ± 0.052	0.301 ± 0.206

Tab. A.7.3: *Kti11p*(M⁻): Die Druckkoeffizienten b_0 , b_1 sowie b_2 nach quadratischer Anpassung an die druckabhängigen, GGXA korrigierten chemischen Verschiebungen der Rückgratprotonen HN in TRIS/HCl bei 295 K und pH 7.5

aa	b_0 [ppm]	b_1 [ppm/GPa]	b_2 [ppm/GPa ²]
R31	8.790 ± 0.004	-1.838 ± 0.084	1.684 ± 0.336
F32	9.298 ± 0.001	-0.550 ± 0.012	0.985 ± 0.049
Q33	8.428 ± 0.004	-0.807 ± 0.078	0.537 ± 0.314
I34	8.472 ± 0.005	-0.120 ± 0.088	0.341 ± 0.353
Y35	9.349 ± 0.004	-0.285 ± 0.081	0.819 ± 0.324
L36	8.511 ± 0.002	-0.091 ± 0.034	0.264 ± 0.136
D37	9.123 ± 0.002	-0.745 ± 0.040	-1.964 ± 0.159
D38	7.009 ± 0.002	-0.337 ± 0.041	0.375 ± 0.165
M39	8.049 ± 0.004	0.315 ± 0.074	-0.199 ± 0.296
F40	8.753 ± 0.003	0.218 ± 0.055	-0.383 ± 0.220
E41	7.358 ± 0.001	-0.280 ± 0.027	0.544 ± 0.109
G42	7.924 ± 0.003	-0.448 ± 0.068	-0.354 ± 0.272
E43	8.407 ± 0.005	-0.042 ± 0.098	1.087 ± 0.393
K44	8.222 ± 0.006	-0.304 ± 0.113	0.863 ± 0.453
V45	7.916 ± 0.006	1.275 ± 0.116	-4.627 ± 0.463
A46	9.089 ± 0.003	-0.290 ± 0.068	-0.089 ± 0.273
C48	9.218 ± 0.004	-0.405 ± 0.069	-0.399 ± 0.275
M54	8.667 ± 0.002	-0.321 ± 0.037	0.763 ± 0.147
I55	8.558 ± 0.003	-0.673 ± 0.068	0.940 ± 0.271
D56	7.941 ± 0.002	0.010 ± 0.039	-0.018 ± 0.158
V57	8.998 ± 0.003	0.287 ± 0.061	-0.259 ± 0.244
V58	8.827 ± 0.003	-0.355 ± 0.065	0.024 ± 0.259
F59	7.868 ± 0.001	0.258 ± 0.022	-0.167 ± 0.087
D60	9.178 ± 0.004	-0.387 ± 0.075	0.775 ± 0.302
K61	9.010 ± 0.002	0.013 ± 0.040	-0.118 ± 0.161
E62	9.209 ± 0.002	-0.361 ± 0.033	-0.393 ± 0.133
D63	8.208 ± 0.004	-0.039 ± 0.082	-0.142 ± 0.330
L64	7.832 ± 0.002	-1.012 ± 0.032	0.835 ± 0.127
A65	7.711 ± 0.002	-0.366 ± 0.034	-0.554 ± 0.136
E66	8.308 ± 0.001	0.953 ± 0.015	-0.645 ± 0.061
Y67	7.225 ± 0.003	-1.114 ± 0.059	1.048 ± 0.238
Y68	7.748 ± 0.009	-1.244 ± 0.181	3.280 ± 0.723
E69	7.785 ± 0.003	-0.061 ± 0.067	-0.071 ± 0.269
G72	8.060 ± 0.003	-0.111 ± 0.055	-0.095 ± 0.219
I73	7.828 ± 0.002	-0.506 ± 0.037	0.912 ± 0.150
H74	8.261 ± 0.005	0.463 ± 0.096	-0.241 ± 0.386
I79	8.349 ± 0.003	0.027 ± 0.060	-0.855 ± 0.239
A80	8.394 ± 0.001	0.368 ± 0.025	-0.673 ± 0.100
A81	8.228 ± 0.001	0.161 ± 0.025	-0.433 ± 0.100

Tab. A.7.3: Kti_{11p}(M⁻): Die Druckkoeffizienten b_0 , b_1 sowie b_2 nach quadratischer Anpassung an die druckabhängigen, GGXA korrigierten chemischen Verschiebungen der Rückgratprotonen HN in TRIS/HCl bei 295 K und pH 7.5

aa	b_0 [ppm]	b_1 [ppm/GPa]	b_2 [ppm/GPa ²]
T4	116.218 ± 0.041	2.567 ± 0.796	-0.627 ± 3.189
Y5	122.827 ± 0.013	5.063 ± 0.263	-2.709 ± 1.053
I8	123.300 ± 0.057	8.689 ± 1.110	-6.288 ± 4.444
E9	124.713 ± 0.029	1.180 ± 0.575	1.730 ± 2.303
I10	122.091 ± 0.023	1.777 ± 0.458	1.150 ± 1.834
E11	119.420 ± 0.010	-2.564 ± 0.190	0.688 ± 0.762
D12	117.235 ± 0.020	-1.744 ± 0.400	5.135 ± 1.601
M13	118.308 ± 0.040	-0.722 ± 0.787	0.856 ± 3.151
T14	118.455 ± 0.015	-0.442 ± 0.292	2.593 ± 1.171
F15	128.705 ± 0.022	-0.541 ± 0.432	2.502 ± 1.731

Tab. A.7.4: Kti_{11p}(M⁻): Die Druckkoeffizienten b_0 , b_1 sowie b_2 nach quadratischer Anpassung an die druckabhängigen, GGXA korrigierten chemischen Verschiebungen der Stickstoffkerne in TRIS/HCl bei 295 K und pH 7.5

aa	b_0 [ppm]	b_1 [ppm/GPa]	b_2 [ppm/GPa ²]
E16	129.399 ± 0.010	1.171 ± 0.189	-0.105 ± 0.756
E18	117.847 ± 0.027	1.052 ± 0.532	2.466 ± 2.130
N19	113.154 ± 0.020	-1.102 ± 0.392	0.329 ± 1.569
Q20	115.873 ± 0.012	-0.818 ± 0.234	2.697 ± 0.938
M21	116.214 ± 0.026	3.410 ± 0.516	-6.558 ± 2.066
F22	121.682 ± 0.021	2.816 ± 0.406	2.221 ± 1.628
T23	109.305 ± 0.027	0.252 ± 0.530	-0.464 ± 2.123
Y24	120.788 ± 0.033	1.546 ± 0.653	-5.216 ± 2.614
C26	125.411 ± 0.034	-0.063 ± 0.667	0.719 ± 2.672
C28	115.004 ± 0.012	0.010 ± 0.242	-0.706 ± 0.967
R31	119.069 ± 0.057	-5.398 ± 1.112	4.796 ± 4.454
F32	119.173 ± 0.024	-1.677 ± 0.473	2.270 ± 1.896
Q33	117.267 ± 0.045	0.489 ± 0.878	-4.908 ± 3.517
I34	121.813 ± 0.040	-0.021 ± 0.775	5.954 ± 3.103
Y35	126.806 ± 0.042	-2.026 ± 0.821	6.671 ± 3.288
L36	125.248 ± 0.007	1.168 ± 0.135	-1.033 ± 0.542
D37	115.927 ± 0.021	-1.259 ± 0.402	0.121 ± 1.609
D38	118.192 ± 0.013	1.003 ± 0.263	2.347 ± 1.053
M39	123.168 ± 0.015	0.966 ± 0.301	-0.045 ± 1.206
F40	122.408 ± 0.007	4.519 ± 0.139	-4.827 ± 0.557
E41	114.461 ± 0.020	-2.183 ± 0.383	5.634 ± 1.533
G42	106.952 ± 0.021	-2.067 ± 0.412	-1.693 ± 1.648
E43	124.108 ± 0.016	2.320 ± 0.321	-7.451 ± 1.284
K44	117.539 ± 0.029	3.411 ± 0.569	5.088 ± 2.278
V45	119.921 ± 0.043	10.508 ± 0.848	-31.057 ± 3.398
A46	129.498 ± 0.031	2.104 ± 0.607	-6.086 ± 2.431
C48	129.273 ± 0.027	-0.759 ± 0.533	-3.914 ± 2.133
M54	120.647 ± 0.011	-0.846 ± 0.221	4.384 ± 0.883
I55	116.756 ± 0.004	-2.351 ± 0.001	1.893 ± 0.003
D56	123.394 ± 0.012	-5.349 ± 0.242	3.629 ± 0.967
V57	122.218 ± 0.024	1.460 ± 0.471	1.378 ± 1.886
V58	128.009 ± 0.022	0.661 ± 0.421	0.797 ± 1.684
F59	123.564 ± 0.018	1.182 ± 0.356	0.134 ± 1.425
D60	121.265 ± 0.018	-4.310 ± 0.358	6.405 ± 1.435
K61	125.806 ± 0.020	-0.258 ± 0.382	-5.273 ± 1.531
E62	116.791 ± 0.016	-1.760 ± 0.310	-2.163 ± 1.242
D63	118.609 ± 0.033	0.875 ± 0.639	-2.014 ± 2.561
L64	113.824 ± 0.017	-1.911 ± 0.324	1.967 ± 1.296
A65	121.445 ± 0.018	3.627 ± 0.359	-11.761 ± 1.439
E66	115.836 ± 0.009	0.024 ± 0.182	1.452 ± 0.730
Y67	119.588 ± 0.022	4.158 ± 0.429	1.303 ± 1.717
Y68	118.429 ± 0.035	-3.676 ± 0.683	15.464 ± 2.737
E69	117.299 ± 0.020	-3.557 ± 0.388	2.654 ± 1.553
G72	108.187 ± 0.019	2.566 ± 0.379	-3.145 ± 1.520
I73	116.520 ± 0.044	-6.243 ± 0.860	9.143 ± 3.443
H74	120.562 ± 0.027	2.788 ± 0.522	-9.792 ± 2.089
I79	121.405 ± 0.032	3.175 ± 0.631	-11.040 ± 2.526
A80	128.185 ± 0.013	1.888 ± 0.246	-1.095 ± 0.986
A81	122.756 ± 0.033	1.199 ± 0.645	-2.599 ± 2.582

Tab. A.7.4: Kti11p(M⁻): Die Druckkoeffizienten b_0 , b_1 sowie b_2 nach quadratischer Anpassung an die druckabhängigen, GGXA korrigierten chemischen Verschiebungen der Stickstoffkerne in TRIS/HCl bei 295 K und pH 7.5

ANHANG B

B.1 Koeffiziententransformation der elliptischen Parameter

Zunächst wird die Ellipse:

$$0 = aT^2 + bTp + cp^2 + dT + ep + f \quad (\text{B.1.1})$$

in die Ellipsenform:

$$0 = A(T - T_0)^2 + B(T - T_0)(p - p_0) + C(p - p_0)^2 + D(T - T_0) + E(p - p_0) + F \quad (\text{B.1.2})$$

überführt. Hieraus folgt unmittelbar: $a=A$, $b=B$, $c=C$. Weiterer Koeffizientenvergleich liefert:

$$\begin{aligned} dT &= -2ATT_0 - Bp_0T + DT \\ ep &= -BpT_0 - 2Cp p_0 + Ep \\ F &= f - AT_0^2 - Bp_0T_0 - Cp_0^2 + DT_0 + Ep_0 \end{aligned} \quad (\text{B.1.3})$$

Somit ergibt sich für D und E:

$$\begin{aligned} D &= d + 2AT_0 + Bp_0 \\ E &= e + BT_0 + 2Cp_0 \end{aligned} \quad (\text{B.1.4})$$

Bezogen auf die thermodynamischen Größen in (B.1.5)

$$\begin{aligned} 0 &= \frac{\Delta\hat{\beta}}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\hat{\alpha}(p - p_0)(T - T_0) - \frac{\Delta c_p}{2T_0}(T - T_0)^2 \\ &\quad + \Delta V_0(p - p_0) - \Delta S_0(T - T_0) + \Delta G_0 \end{aligned} \quad (\text{B.1.5})$$

ergeben sich die Relationen, wie sie in (B.1.6) bis (B.1.11) gelistet sind

$$A = -\frac{\Delta c_p}{2T_0} = a \quad (\text{B.1.6})$$

$$B = \Delta \hat{\alpha} = b \quad (\text{B.1.7})$$

$$C = -\frac{\Delta \hat{\beta}}{2} = c \quad (\text{B.1.8})$$

$$D = -\Delta S_0 = d + 2aT_0 + bp_0 \quad (\text{B.1.9})$$

$$E = \Delta V_0 = e + bT_0 + 2cp_0 \quad (\text{B.1.10})$$

$$F = \Delta G_0 = f - aT_0^2 - bp_0T_0 - cp_0^2 + (d + 2aT_0 + bp_0)T_0 + (e + bT_0 + 2cp_0)p_0 \quad (\text{B.1.11})$$

Hierbei entspricht (T_0, p_0) nicht dem Mittelpunkt der Ellipse, sondern einem beliebigen Referenzpunkt. Der Mittelpunkt der Ellipse läßt sich berechnen, indem man die Ellipsengleichung in folgender Form schreibt:

$$0 = A'(T - T_M)^2 + B'(T - T_M)(p - p_M) + C'(p - p_M)^2 + K \quad (\text{B.1.12})$$

mit T_M und p_M als Mittelpunkt. Durch Koeffizientenvergleich dieser Ellipsenform (B.1.12) mit der aus Gleichung (B.1.2) ergibt sich schlußendlich:

$$p_M = p_0 + \frac{2AE - BD}{B^2 - 4AC} \quad (\text{B.1.13})$$

$$T_M = T_0 + \frac{2CD - BE}{B^2 - 4AC} \quad (\text{B.1.14})$$

B.2 Konvertierungsskript: Bruker Syntax in NMRView Syntax

Quellcode 1: Konvertierung mit der Datei readout-bruker.sh

```

1  #!/bin/csh
    echo 'path:'
    set directory = $<
6  echo 'name for output file:'
    set outputfile = $<
    set actual_dir='pwd'

    if ($directory == ".") then
11 set directory=$actual_dir
    endif

    set directory1=${directory}/acqu
    set directory2=${directory}/acqu2
16 set directory3=${directory}/acqu2s
    set directory4=${directory}/acqu2s

    set decim='grep '##$DECIM=' $directory1 | awk -F'=' '{print $2}'

```

```

set grpdly='grep '##$GRPDLY=' $directory4 | awk -F=' '{print $2}''
21 set td_x='grep '##$TD=' $directory1 | awk -F=' '{print $2}''
set td_y='grep '##$TD=' $directory2 | awk -F=' '{print $2}''
set zf_x='echo "scale=1; 4*$td_x" | bc'
set zf_y='echo "scale=1; 4*$td_y" | bc'
set sw_x='grep '##$SW_h=' $directory1 | awk -F=' '{print $2}''
26 set sw_y='grep '##$SW=' $directory3 | awk -F=' '{print $2}''
set sfo_x='grep '##$SFO1=' $directory1 | awk -F=' '{print $2}''
set sfo_y='grep '##$SFO1=' $directory2 | awk -F=' '{print $2}''
set bf_x='grep '##$BF1=' $directory1 | awk -F=' '{print $2}''
set bf_y='grep '##$BF1=' $directory2 | awk -F=' '{print $2}''
31 set o_x='grep '##$O1=' $directory1 | awk -F=' '{print $2}''
set o_y='grep '##$O1=' $directory2 | awk -F=' '{print $2}''
set o1p_x='echo "scale=12; ($sfo_x-$bf_x)/$bf_x*1000000" | bc'
set o1p_y='echo "scale=12; ($sfo_y-$bf_y)/$bf_y*1000000" | bc'
set xT='echo "scale=0; $td_x/2" | bc'
36 set yT='echo "scale=0; $td_y/2" | bc'
set sw_y='echo "scale=4; $sfo_y*$sw_y" | bc'
set fnmodeo='grep 'FnMODE=' $directory2 | awk -F=' '{print $2}''
set aqmodeo='grep 'AQ_mod=' $directory1 | awk -F=' '{print $2}''
set temp='grep 'TE=' $directory4 | awk -F=' '{print $2}''
41
switch ( $fnmodeo )
  case 0:
    set fnmode = 'default'
    breaksw
46  case 1:
    set fnmode = 'QF'
    breaksw
  case 2:
51  set fnmode = 'QSEQ'
    breaksw
  case 3:
    set fnmode = 'TPPI'
    breaksw
56  case 4:
    set fnmode = 'States'
    breaksw
  case 5:
    set fnmode = 'States-TPPI'
    breaksw
61  case 6:
    set fnmode = 'Echo-Antiecho'
    breaksw
endsw
66
switch ( $aqmodeo )
  case 0:
    set aqmode = 'qf'
    breaksw
71  case 1:
    set aqmode = 'qsim'
    breaksw
  case 2:
76  set aqmode = 'qseq'
    breaksw
  case 3:
    set aqmode = 'DQD'
    breaksw
81 endsw

86
if ($#argv == 0) then

set pho_x = '-377'
set phi_x = '47.4'
91 set pho_y = '-50'
set phi_y = '-85'

else
96  switch ($argv[1])

```



```

echo ""
echo "write parameters in files:  $outputfile.ft2 and $outputfile.nv and parameter.tmp"
176 echo "to directory:  $directory"
echo ""

set sfo_y_int = 'echo $sfo_y | awk -F'.' '{print $1}'

181 if ($sfo_y_int <= "100") then
    set xlabel = 'HN'
    set ylabel = '15N'
else
186   set xlabel = 'HC'
    set ylabel = '13C'
endif

191 echo "#!/bin/csh" > $outputfile.com

echo "bruk2pipe -in $directory/ser -bad 0.0 -aswap -DMX -decim $decim -dspfvs 20 -grpdy $grp
dly \" >> $outputfile.com

echo " -xN          $td_x    -yN          $td_y          \" >> $outputfile.com
196 echo " -xT          $xT      -yT          $yT            \" >> $outputfile.com
echo " -xMODE       $aqmode  -yMODE       $fnmode        \" >> $outputfile.com
echo " -xSW         $sw_x    -ySW         $sw_y          \" >> $outputfile.com
echo " -xOBS        $sfo_x   -yOBS        $sfo_y          \" >> $outputfile.com
echo " -xCAR        $oip_x   -yCAR        $oip_y          \" >> $outputfile.com
201 echo " -xLAB        $xlabel  -yLAB        $ylabel         \" >> $outputfile.com
echo " -ndim        2         -aq2D        States         \" >> $outputfile.com
echo " -out ./ $outputfile.fid -verb -ov" >> $outputfile.com
echo "nmrPipe -in $outputfile.fid \" >> $outputfile.com
echo " | nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.0 -c 0.5 \" >> $outputfile.com
206 echo " | nmrPipe -fn ZF -size $zf_x          \" >> $outputfile.com
echo " | nmrPipe -fn FT -auto                  \" >> $outputfile.com
echo " | nmrPipe -fn PS -po $pho_x -p1 $ph1_x -di \" >> $outputfile.com

if ($fnmodeo == "5") then
211 echo " | nmrPipe -fn EXT -left -sw          \" >> $outputfile.com
endif

echo " | nmrPipe -fn TP                      \" >> $outputfile.com
echo "### | nmrPipe -fn LP -fb                \" >> $outputfile.com
216 echo " | nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.0 -c 0.5 \" >> $outputfile.com
echo " | nmrPipe -fn ZF -size $zf_y          \" >> $outputfile.com
echo " | nmrPipe -fn FT -auto                  \" >> $outputfile.com
echo " | nmrPipe -fn PS -po $pho_y -p1 $ph1_y -di \" >> $outputfile.com
echo " | nmrPipe -fn POLY -auto                \" >> $outputfile.com

221 if ($fnmodeo == "6") then
echo " | nmrPipe -fn REV                      \" >> $outputfile.com
endif

226 echo " | nmrPipe -fn TP                      \" >> $outputfile.com
echo " | nmrPipe -fn POLY -auto                \" >> $outputfile.com
echo " -out $outputfile.ft2 -ov -verb" >> $outputfile.com
echo "nmrPipe -in $outputfile.ft2 | pipe2xyz -nv -out $outputfile.nv" >> $outputfile.com

231 if ($actual_dir != $directory) then

mv $outputfile.* parameter.tmp $directory
cd $directory
236 chmod a+rxw $outputfile.com
./ $outputfile.com
cd $actual_dir

endif

241 if ($actual_dir == $directory) then

chmod a+rxw $outputfile.com
./ $outputfile.com

246 endif

```

B.3 Programme zur Analyse der thermodynamischen Eigenschaften von Proteinen

B.3.1 Shell-Skript mit Gnuplot Implementierung zur χ^2 -Analyse

Quellcode 2: χ^2 Analyse mit der Datei gnufitting-chi.sh

```

2  #!/bin/bash
   file='inputfile.dat'
   i=500
   imax=1000

7  echo " fn      chi1      chi2      H      H_err  Th      T_herr  c      c_err" > chi_sq_grid-search.
   dat

   while [ $i -le $imax ]
   do
       filename="gnufit.gp"
12      filename_png="gnupng.gp"
       echo 'set fit logfile "my_log_file"' > $filename
       echo "f(x) = exp(-(H*(Th-x)/Th-c*(Th-x+x*log(x/Th)))/(R*x))/(1+exp(-(H*(Th-x)/Th-c*(Th-x+x*log(x/Th)))/(R*x)))" >> $filename
       echo "R=8.314; c=5000; H=150000;Th=320" >> $filename
       fn='echo "scale=3; $i/1000" | bc'
17      echo "fn=$fn" >> $filename
       echo "fit f(x) '$file' using 1:(1-\$2*fn) via H,Th,c" >> $filename
       gnuplot gnufit.gp
       lines='wc -l my_log_file | awk '{print $1}'
       start='expr $lines - 21'
22      chi1='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "1p" | awk -F' ' '{print $8}'
       chi2='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "6p" | awk -F' ' '{print $9}'
       H='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "11p" | awk -F' ' '{print $3}'
       Herr='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "11p" | awk -F' ' '{print $5}'
       Th='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "12p" | awk -F' ' '{print $3}'
27      Therr='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "12p" | awk -F' ' '{print $5}'
       c='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "13p" | awk -F' ' '{print $3}'
       cerr='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "13p" | awk -F' ' '{print $5}'

       echo " $fn      $chi1  $chi2  $H      $Herr  $Th      $Therr  $c      $cerr" >> chi_sq_grid-search.dat
32      i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment
   done

```

B.3.2 Fit der Ellipse im Phaseraum

Im Folgenden ist das MatLab Programm zum fitten der impliziten Funktion der Ellipse an die Messpunkte im p-T Phasenraum vorgestellt.

Quellcode 3: MatLab Programm fit-P-T.m

```

clear all;
format long;
4  datahys1=importdata('datapoints.txt');

   Vdata1=datahys1(:,1);
   Ydata1=datahys1(:,2);

9  Y1=ellipsefit(Vdata1,Ydata1)# Call function ellipsefit to get the parameter of the ellipse model
   XC=Y1.Xc;
   YC=Y1.Yc;
   a=Y1.A;

```

```

14 b=Y1.B;
    phi=Y1.Phi;
    P=Y1.P;
    i=1;
    x=[];
19 y=[];
    X=[];
    sum=0;
    err=0;
    for t=0:pi/100:2*pi
24     x(i,1)=XC+a*cos(t)*cos(phi)-b*sin(t)*sin(phi);# Draw the ellipse model
        y(i,1)=YC+a*cos(t)*sin(phi)+b*sin(t)*cos(phi);
        i=i+1;
    end
    figure(4);
29 plot(Vdata1,Ydata1,'r');
    xlabel('Voltage (kv)');
    ylabel('Position (mm)');

    hold on;
34 plot(x,y,'b','LineWidth',1.3)

    grid on;

    for i=1:1:size(Vdata1)
39     z=solve('P(1)*(datahys1(i,1))^2+P(2)*datahys1(i,1)+y+P(3)+y^2+P(4)*datahys1(i,1)+P(5)+y+P(6)=0');# Get the y(i)
        on the ellipse
        x1=real(eval(z));
        X=double(x1);
        if ( datahys1(i,2)-(tan(phi)*(0.001*datahys1(i,1)-XC)+YC)>0)# Decide which y(i) to be chosen
44         err=datahys1(i,2)-X(1,1);
        else
            err=(datahys1(i,2)-X(2,1));# Calculate the differences between the given data and the y(i) on the fitting
            ellipse model
        end
        sum=sum+err^2;
    end
49 E1=sqrt(sum/i) # Root mean square error of fitting ellipse model

```

Quellcode 4: Funktion ellipsefit.m

```

function [varargout]=ellipsefit(x,y)
x=x(:); # convert data to column vectors
y=y(:);
5 if numel(x)~=numel(y) || numel(x)<5
    error('X and Y Must be the Same Length and Contain at Least 5 Values.')
end

D1=[x.*x x.*y y.*y]; # quadratic terms
10 D2=[x y ones(size(x))]; # linear terms
S1=D1'*D1;
S2=D1'*D2;

[Q2,R2]=qr(D2,0);
15 if condest(R2)>1.0e10
    warning('ellipsefit',...
        'Data is Poorly Conditioned and May Not Represent an Ellipse.')
end
T=-R2\'(R2'\S2'); # -inv(S3) * S2'
20 M=S1+S2*T;
CinvM=[M(3,:) / 2; -M(2,:); M(1,:) / 2];
[V,na]=eig(CinvM);
c=4*V(1,:).*V(3,:) - V(2,:).^2;
25 A1=V(:,c>0);
P=[A1; T*A1];

# correct signs if needed
P=sign(P(1))*P;
30 Phi=atan(P(2)/(P(3)-P(1)))/2;
c=cos(Phi);
s=sin(Phi);

```

```

35 # rotate the ellipse parallel to x-axis
    Pr=zeros(6,1);
    Pr(1)=P(1)*c*c - P(2)*c*s + P(3)*s*s;
    Pr(2)=2*(P(1)-P(3))*c*s + (c^2-s^2)*P(2);
    Pr(3)=P(1)*s*s + P(2)*s*c + P(3)*c*c;
40 Pr(4)=P(4)*c - P(5)*s;
    Pr(5)=P(4)*s + P(5)*c;
    Pr(6)=P(6);
    Pr

45 # extract other data
    XcYc=[c s;-s c]*[-Pr(4)/(2*Pr(1));-Pr(5)/(2*Pr(3))];
    Xc=XcYc(1);
    Yc=XcYc(2);
    F=-Pr(6) + Pr(4)^2/(4*Pr(1)) + Pr(5)^2/(4*Pr(3));
50 AB=sqrt(F./Pr(1:2:3));
    A=AB(1);
    B=AB(2);
    Phi=-Phi;

55 if A<B # x-axis not major axis, so rotate it pi/2
    Phi=Phi-sign(Phi)*pi/2;
    A=AB(2);
    B=AB(1);
end
60 S.Xc=Xc;
    S.Yc=Yc;
    S.A=A;
    S.B=B;
    S.Phi=Phi;
65 S.P=P;
    if nargin==1
        varargout{1}=S;
    else
        outcell=struct2cell(S);
70     varargout=outcell(1:nargout);
end

```

B.4 Programme zur Analyse der chemischen Verschiebungen

B.4.1 Shell-Skript zur Korrektur der chemischen Verschiebungen von Bs-CspB sowie Kt11p(M⁻) anhand der GGXA Verschiebungen

Quellcode 5: GGXA Korrektur mittels Datei bscspb-chem-shift-cor-per-pressurepoint-NaCaco

```

#!/bin/csh

3 set file = pressure_shift_list_iH
  set nacaco_ggxa = GGXA_chem-shifts_HN_NaCaco_Klamt.dat
  set corfile = pressure_shift_list_iH_nacaco_corrected.dat
  set lines = 'grep -c '#[A-Z]' $file '

8 echo "" > $corfile

  set A_nacaco_b1='grep '^A' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
  set A_nacaco_b2='grep '^A' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

13 set R_nacaco_b1='grep '^R' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
  set R_nacaco_b2='grep '^R' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

  #set N_nacaco_b1='grep '^N' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
  #set N_nacaco_b2='grep '^N' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

18 set N_nacaco_b1=0
  set N_nacaco_b2=0

  set D_nacaco_b1='grep '^D' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
  set D_nacaco_b2='grep '^D' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

```

```

23 set C_nacaco_b1='grep '^C' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set C_nacaco_b2='grep '^C' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

set Q_nacaco_b1='grep '^Q' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
28 set Q_nacaco_b2='grep '^Q' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

set E_nacaco_b1='grep '^E' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set E_nacaco_b2='grep '^E' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'
#set E_nacaco_b1=0.201
33 #set E_nacaco_b2=0.707

set G_nacaco_b1='grep '^G' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set G_nacaco_b2='grep '^G' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

38 set H_nacaco_b1='grep '^H' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set H_nacaco_b2='grep '^H' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

set I_nacaco_b1='grep '^I' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set I_nacaco_b2='grep '^I' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'
43

set L_nacaco_b1='grep '^L' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set L_nacaco_b2='grep '^L' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

set K_nacaco_b1='grep '^K' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
48 set K_nacaco_b2='grep '^K' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

set M_nacaco_b1='grep '^M' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set M_nacaco_b2='grep '^M' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

53 set F_nacaco_b1='grep '^F' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set F_nacaco_b2='grep '^F' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

set S_nacaco_b1='grep '^S' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set S_nacaco_b2='grep '^S' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'
58

set T_nacaco_b1='grep '^T' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set T_nacaco_b2='grep '^T' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

set W_nacaco_b1='grep '^W' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
63 set W_nacaco_b2='grep '^W' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

set Y_nacaco_b1='grep '^Y' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set Y_nacaco_b2='grep '^Y' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

68 set V_nacaco_b1='grep '^V' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $3}'
set V_nacaco_b2='grep '^V' $nacaco_ggxa | awk -F' ' '{print $6}' | awk -F' ' '{print $1}'

set line=2
73 set peak=1
set aa_line=3
#set p_line=4
set p_steps=11

78 while ($peak <= $lines)
set i=1
set lfdnr='sed -n ''$line'p' $file | awk -F'##' '{print $2}'
set aa='sed -n ''$aa_line'p' $file | awk -F'##' '{print $2}' | awk -F'[0-9]' '{print $1}'
set aa_nr='sed -n ''$aa_line'p' $file | awk -F'##' '{print $2}'
83 set p_line='echo "scale=0; $aa_line+1" | bc'

    if ( $aa == "A" ) then
        echo "##" $lfdnr >> $corfile
        echo "#" $aa_nr >> $corfile
88        while ($i <= $p_steps)
set pressure='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}'
set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$A_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$A_nacaco_b2" |
        bc'
set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}'
set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
93 set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
        end
        echo "" >> $corfile
98        echo "" >> $corfile

```

```

endif

if ( $aa == "R" ) then
  echo "##" $lfdnr >> $corfile
  echo "#" $aa_nr >> $corfile
  while ( $i <= $p_steps)
    set pressure='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}'
    set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$R_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$R_nacaco_b2" |
      bc'
    set shift='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}'
    set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
    set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
    set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
    echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
  end
  echo "" >> $corfile
  echo "" >> $corfile
endif

if ( $aa == "N" ) then
  echo "##" $lfdnr >> $corfile
  echo "#" $aa_nr >> $corfile
  while ( $i <= $p_steps)
    set pressure='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}'
    set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$N_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$N_nacaco_b2" |
      bc'
    set shift='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}'
    set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
    set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
    set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
    echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
  end
  echo "" >> $corfile
  echo "" >> $corfile
endif

if ( $aa == "D" ) then
  echo "##" $lfdnr >> $corfile
  echo "#" $aa_nr >> $corfile
  while ( $i <= $p_steps)
    set pressure='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}'
    set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$D_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$D_nacaco_b2" |
      bc'
    set shift='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}'
    set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
    set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
    set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
    echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
  end
  echo "" >> $corfile
  echo "" >> $corfile
endif

if ( $aa == "C" ) then
  echo "##" $lfdnr >> $corfile
  echo "#" $aa_nr >> $corfile
  while ( $i <= $p_steps)
    set pressure='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}'
    set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$C_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$C_nacaco_b2" |
      bc'
    set shift='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}'
    set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
    set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
    set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
    echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
  end
  echo "" >> $corfile
  echo "" >> $corfile
endif

if ( $aa == "Q" ) then
  echo "##" $lfdnr >> $corfile
  echo "#" $aa_nr >> $corfile
  while ( $i <= $p_steps)
    set pressure='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}'
    set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$Q_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$Q_nacaco_b2" |
      bc'

```

```

173     set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}''
        set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
        set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
        set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
        echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
    end
178     echo "" >> $corfile
        echo "" >> $corfile
    endif

    if ( $aa == "E" ) then
183         echo "##" $lfdnr >> $corfile
            echo "#" $aa_nr >> $corfile
            while ( $i <= $p_steps )
                set pressure='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}''
                set p_gpa='echo "scale=4; $pressure*$pressure/10000000*$E_nacaco_b2-$pressure/10000*$E_nacaco_b1" |
                    bc'
                set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}''
                set shift_cor='echo "scale=4; $shift+$p_gpa" | bc'
                set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
                set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
                echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
            end
188         echo "" >> $corfile
            echo "" >> $corfile
        endif

        if ( $aa == "G" ) then
198             echo "##" $lfdnr >> $corfile
                echo "#" $aa_nr >> $corfile
                while ( $i <= $p_steps )
                    set pressure='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}''
                    set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$G_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$G_nacaco_b2" |
                        bc'
                    set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}''
                    set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
                    set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
                    set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
                    echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
                end
203             echo "" >> $corfile
                echo "" >> $corfile
            endif

            if ( $aa == "H" ) then
213                 echo "##" $lfdnr >> $corfile
                    echo "#" $aa_nr >> $corfile
                    while ( $i <= $p_steps )
                        set pressure='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}''
                        set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$H_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$H_nacaco_b2" |
                            bc'
                        set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}''
                        set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
                        set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
                        set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
                        echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
                    end
218                     echo "" >> $corfile
                        echo "" >> $corfile
                endif

                if ( $aa == "I" ) then
228                     echo "##" $lfdnr >> $corfile
                        echo "#" $aa_nr >> $corfile
                        while ( $i <= $p_steps )
                            set pressure='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}''
                            set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$I_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$I_nacaco_b2" |
                                bc'
                            set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}''
                            set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
                            set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
                            set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
                            echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
                        end
223                             echo "" >> $corfile
                                echo "" >> $corfile
                    endif

                    if ( $aa == "I" ) then
233                         echo "##" $lfdnr >> $corfile
                            echo "#" $aa_nr >> $corfile
                            while ( $i <= $p_steps )
                                set pressure='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}''
                                set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$I_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$I_nacaco_b2" |
                                    bc'
                                set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}''
                                set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
                                set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
                                set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
                                echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
                            end
238                                 echo "" >> $corfile
                                    echo "" >> $corfile
                        endif
                    endif
                endif
            endif
        endif
    endif
243

```

```

if ( $aa == "L" ) then
  echo "##" $lfdnr >> $corfile
  echo "#" $aa_nr >> $corfile
248 while ( $i <= $p_steps )
    set pressure='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}''
    set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$L_nacaco_b1-$pressure*$pressure/100000000*$L_nacaco_b2" |
      bc'
    set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}''
    set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
253 set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
    set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
    echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
  end
258 echo "" >> $corfile
  echo "" >> $corfile
endif

if ( $aa == "K" ) then
  echo "##" $lfdnr >> $corfile
  echo "#" $aa_nr >> $corfile
263 while ( $i <= $p_steps )
    set pressure='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}''
    set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$K_nacaco_b1-$pressure*$pressure/100000000*$K_nacaco_b2" |
      bc'
    set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}''
    set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
268 set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
    set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
    echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
  end
273 echo "" >> $corfile
  echo "" >> $corfile
endif

if ( $aa == "M" ) then
  echo "##" $lfdnr >> $corfile
  echo "#" $aa_nr >> $corfile
278 while ( $i <= $p_steps )
    set pressure='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}''
    set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$M_nacaco_b1-$pressure*$pressure/100000000*$M_nacaco_b2" |
      bc'
    set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}''
    set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
283 set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
    set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
    echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
  end
288 echo "" >> $corfile
  echo "" >> $corfile
endif

if ( $aa == "F" ) then
  echo "##" $lfdnr >> $corfile
  echo "#" $aa_nr >> $corfile
293 while ( $i <= $p_steps )
    set pressure='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}''
    set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$F_nacaco_b1-$pressure*$pressure/100000000*$F_nacaco_b2" |
      bc'
    set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}''
    set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
    set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
    set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
303 echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
  end
  echo "" >> $corfile
  echo "" >> $corfile
endif
308

if ( $aa == "S" ) then
  echo "##" $lfdnr >> $corfile
  echo "#" $aa_nr >> $corfile
  while ( $i <= $p_steps )
313 set pressure='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}''
    set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$S_nacaco_b1-$pressure*$pressure/100000000*$S_nacaco_b2" |
      bc'
    set shift='sed -n ''$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}''

```

```

set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
318 set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
end
echo "" >> $corfile
echo "" >> $corfile
323 endif

if ( $aa == "T" ) then
echo "##" $lfdnr >> $corfile
echo "#" $aa_nr >> $corfile
328 while ( $i <= $p_steps )
set pressure='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}'
set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$T_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$T_nacaco_b2" |
bc'
set shift='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}'
set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
333 set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
end
echo "" >> $corfile
338 echo "" >> $corfile
endif

if ( $aa == "W" ) then
echo "##" $lfdnr >> $corfile
echo "#" $aa_nr >> $corfile
343 while ( $i <= $p_steps )
set pressure='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}'
set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$W_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$W_nacaco_b2" |
bc'
set shift='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}'
set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
348 set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
end
echo "" >> $corfile
353 echo "" >> $corfile
endif

if ( $aa == "Y" ) then
echo "##" $lfdnr >> $corfile
echo "#" $aa_nr >> $corfile
358 while ( $i <= $p_steps )
set pressure='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}'
set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$Y_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$Y_nacaco_b2" |
bc'
363 set shift='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}'
set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
368 end
echo "" >> $corfile
echo "" >> $corfile
endif

if ( $aa == "V" ) then
echo "##" $lfdnr >> $corfile
echo "#" $aa_nr >> $corfile
373 while ( $i <= $p_steps )
set pressure='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $1}'
378 set p_gpa='echo "scale=4; $pressure/10000*$V_nacaco_b1-$pressure*$pressure/10000000*$V_nacaco_b2" |
bc'
set shift='sed -n '$p_line'p' $file | awk -F' ' '{print $2}'
set shift_cor='echo "scale=4; $shift-$p_gpa" | bc'
set i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment pressurestep
set p_line='echo "scale=0; $p_line+1" | bc' # increment pressurestep
383 echo "$pressure $shift_cor" >> $corfile
end
echo "" >> $corfile
echo "" >> $corfile
388 endif

```

```

393 set line='echo "scale=0; $line+$p_steps+4" | bc' # increment pressurestep
    set aa_line='echo "scale=0; $aa_line+$p_steps+4" | bc' # increment pressurestep
    set peak='echo "scale=0; $peak+1" | bc' # increment peak
end

```

B.4.2 Shell-Skript mit Gnuplot Implementierung zur Ermittlung der Parameter b_0 , b_1 , b_2 für Bs -CspB und $Kti_{11p}(M^-)$

Quellcode 6: bo b1 b2 Analyse mit der Datei fitting-p-trans-chem-shift-b1-b2-cor

```

#!/bin/bash
4 ##### iH
linecount=61
linecount='echo "scale=0; $linecount-1" | bc'
i=0
aan='echo "scale=0; $i+3" | bc' # increment
9
echo "#i      aa      Bo      Boerr      B1      B1err      B2      B2err" > bo_b1_b2_iH_tris_results_
    ggxa-cor.dat

while [ $i -le $linecount ]
do
14 aa='sed -n ""$aan"p" pressure_shift_list_iH_tris_corrected.dat'
    filename="gnufit.gp"
    filename_png="gnupng.gp"
    echo 'set fit logfile "my_log_file"' > $filename
    echo "f(x)=bo+b1*(x-xo)+b2*(x-xo)*(x-xo)" >> $filename
19 echo "xo=0.0001" >> $filename
    echo "bo=8.0" >> $filename
    echo "b1=0.5; b2=0.5" >> $filename
    echo "n=$i" >> $filename
    echo "fit f(x) './pressure_shift_list_iH_tris_corrected.dat' index n using (\$1/10000):2 via bo,b1,b2" >> $filename
24 gnuplot gnufit.gp
    lines='wc -l my_log_file | awk '{print $1}'
    start='expr $lines - 12'
    Bo='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "2p" | awk -F= '{print $2}' | awk -F' '{print $1}'
    Boerr='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "2p" | awk -F= '{print $2}' | awk -F' '{print $3}'
29 B1='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "3p" | awk -F= '{print $2}' | awk -F' '{print $1}'
    B1err='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "3p" | awk -F= '{print $2}' | awk -F' '{print $3}'
    B2='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "4p" | awk -F= '{print $2}' | awk -F' '{print $1}'
    B2err='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "4p" | awk -F= '{print $2}' | awk -F' '{print $3}'
34 echo "$i      $aa      $Bo      $Boerr      $B1      $B1err      $B2      $B2err" >> bo_b1_b2_iH_tris_results_ggxa-cor.dat

echo "" > $filename_png
echo "f(x)=bo+b1*(x-xo)+b2*(x-xo)*(x-xo)" >> $filename_png
echo "xo=0.0001" >> $filename_png
39 echo "bo=$Bo" >> $filename_png
    echo "b1=$B1; b2=$B2" >> $filename_png
    echo "n=$i" >> $filename_png
    echo "set terminal png" >> $filename_png
    echo "set output 'iH_tris_ggxa-cor_aa_$i.png'" >> $filename_png
44 echo "set ylabel 'chemical shift [ppm]'" >> $filename_png
    echo "set xlabel 'pressure [GPa]'" >> $filename_png
    echo "set title 'peak $i aa $aa'" >> $filename_png
    echo "plot [0:0.3] f(x) notitle, './pressure_shift_list_iH_tris_corrected.dat' using (\$1/10000):2 index n title 'B
        o=$Bo($Boerr) B1=$B1($B1err) B2=$B2($B2err)'" >> $filename_png

49 gnuplot gnupng.gp

i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment
aan='echo "scale=0; $aan+1" | bc' # increment
done
54

```

```

##### 15N
linecount=60
linecount='echo "scale=0; $linecount-1" | bc'
59 i=0
   aan='echo "scale=0; $i+3" | bc' # increment

   echo "#i      aa      Bo      Boerr      B1      B1err      B2      B2err" > bo_b1_b2_15N_tris_results_
      ggxa-cor.dat

64 while [ $i -le $linecount ]
do
   aa='sed -n ""$aan"p" pressure_shift_list_15N_tris_corrected.dat'
   filename="gnufit.gp"
   filename_png="gnupng.gp"
69   echo 'set fit logfile "my_log_file"' > $filename
   echo "f(x)=bo+b1*(x-xo)+b2*(x-xo)*(x-xo)" >> $filename
   echo "xo=0.0001" >> $filename
   echo "bo=8.0" >> $filename
   echo "b1=0.5; b2=0.5" >> $filename
74   echo "n=$i" >> $filename
   echo "fit f(x) './pressure_shift_list_15N_tris_corrected.dat' index n using (\$1/10000):2 via bo,b1,b2" >> $
      filename
   gnuplot gnufit.gp
   lines='wc -l my_log_file | awk '{print $1}'
   start='expr $lines - 12'
79   Bo='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "2p" | awk -F= ' '{print $2}' | awk -F' ' '{print $1}'
   Boerr='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "2p" | awk -F= ' '{print $2}' | awk -F' ' '{print $3}'
   B1='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "3p" | awk -F= ' '{print $2}' | awk -F' ' '{print $1}'
   B1err='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "3p" | awk -F= ' '{print $2}' | awk -F' ' '{print $3}'
   B2='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "4p" | awk -F= ' '{print $2}' | awk -F' ' '{print $1}'
84   B2err='sed "1,$start d" my_log_file | sed -n "4p" | awk -F= ' '{print $2}' | awk -F' ' '{print $3}'

   echo "$i      $aa      $Bo      $Boerr $B1      $B1err $B2      $B2err" >> bo_b1_b2_15N_tris_results_ggxa-cor.dat

   echo "" > $filename_png
89   echo "f(x)=bo+b1*(x-xo)+b2*(x-xo)*(x-xo)" >> $filename_png
   echo "xo=0.0001" >> $filename_png
   echo "bo=$Bo" >> $filename_png
   echo "b1=$B1; b2=$B2" >> $filename_png
   echo "n=$i" >> $filename_png
94   echo "set terminal png" >> $filename_png
   echo "set output '15N_tris_ggxa-cor_aa_$i.png'" >> $filename_png
   echo "set ylabel 'chemical shift [ppm]'" >> $filename_png
   echo "set xlabel 'pressure [GPa]'" >> $filename_png
   echo "set title 'peak $i aa $aa'" >> $filename_png
99   echo "plot [0:0.3] f(x) notitle, './pressure_shift_list_15N_tris_corrected.dat' using (\$1/10000):2 index n title 'B
      o=$Bo($Boerr) B1=$B1($B1err) B2=$B2($B2err)'" >> $filename_png

   gnuplot gnupng.gp

   i='echo "scale=0; $i+1" | bc' # increment
104  aan='echo "scale=0; $aan+11" | bc' # increment
done

```


LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Andi Klamt

Geburtsdatum: 28.04.1978

Geburtsort: Halberstadt (Deutschland)

Werdegang

wissenschaftlicher Mitarbeiter / Promotion

05/2009 - heute

Institut für Physik, Arbeitsgruppe Biophysik / Kernspinresonanzspektroskopie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schwerpunkt:

NMR-spektroskopische Stabilitäts- und Strukturuntersuchungen an Proteinen unter Hochdruck

12/2007 - 03/2008

Praktikum am Institut für Virologie, Universität Leipzig

Schwerpunkt:

Strukturuntersuchungen von Antikörpern, Proteinaufreinigung, Proteinnachweismethoden, genetische Analyse von Antikörper-Paratopen

10/1998 - 09/2004

Student der Physik auf Diplom

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Schwerpunkt:

Aufbau eines hochauflösenden Röntgenspektrometers zur Spektrallinienuntersuchung laserinduzierter Plasmen;

Analyse des Zeeman-Effekts im Röntgenbereich bei extrem hohen Magnetfeldern

Abschluß: Diplom-Physiker

09/1991 - 07/1997

Gymnasium Martineum Halberstadt,

Abschluß: Abitur, allgemeine Hochschulreife

09/1985 - 07/1991

POS Wilhelm-Pieck-Oberschule Halberstadt

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

NMR-spektroskopische Stabilitäts- und Strukturuntersuchungen an Proteinen unter Hochdruck

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), August 2015

Andi Klamt

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Fachgruppe Biophysik am Institut für Physik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Federführung von Prof. Dr. Jochen Balbach angefertigt. Ihm gilt deswegen ein ganz besonderer Dank für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die vielen hilfreichen Ratschläge, die ständige Diskussionsbereitschaft und die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung. Danke für die Einführung in das Gebiet der NMR-Spektroskopie mit seiner zahlreichen Anwendungsvielfalt. Danke für die wissenschaftlichen Freiheiten und das damit einhergehende selbständige Arbeiten, für die Teilnahme an internationalen Konferenzen und nicht zuletzt für die Tätigkeit auf dem Gebiet der universitären Lehre.

Ich danke der gesamten Bio-NMR- und Festkörper-NMR-Fachgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für die vielen außerberuflichen Unternehmungen. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Rolf Sachs, der mir eine Einführung in die Arbeiten im S₁-Labor gab und mich bei der Aufreinigung der Kälteschockproteinproben *Bs-CspB* und *Bc-Csp R3E L66E* unterstützte. Für die Bereitstellung des Proteins *Bc-Csp R3E L66E* bedanke ich mich bei der Fachgruppe um Prof. Dr. Thomas Szyperski von der Universität Buffalo, New York. Dr. Ulrich Weininger danke ich für die Einführung in die Grundlagen der NMR-Spektroskopie. Bei Dr. Michael Kovermann möchte ich mich ganz herzlich für die zahlreichen Diskussionen über NMR-spezifische Themen und die experimentelle Unterstützung bei einer Vielzahl von NMR-Messungen bedanken und ebenfalls für die Einarbeitung in das Gebiet der Protein-Strukturrechnung mittels Aria. Ich bedanke mich bei Stefan Gröger für die zahlreichen Hilfestellungen bei NMR-technischen Problemen. Bei Marianne Cleve bedanke ich mich für die Mitarbeit zur Hochdruckproblematik des Kälteschockproteins *Bs-CspB*. Natalie Breitskopf danke ich für die NMR-Untersuchungen der GGXA Peptide. Monika Baumann und Rica Patzschke danke ich für die Mithilfe beim bewerkstelligen zahlreicher NMR-spektroskopischer Problemchen. Bei Mathias Henze, Dr. Tobias Gruber und Heike Böcker bedanke ich mich für die Unterstützung beim Lösen biochemischer Problemfragen. Bei Dr. Amit Kumar bedanke ich mich für die Bereitstellung der Proteinproben des Zinkfingerproteins Kti11p(M⁻). Dr. Günter Hempel danke ich für den mathematischen Beistand der Ellipsenproblematik. Pengfei Tian vom Niels-Bohr-Institut der Universität Kopenhagen danke ich für die Unterstützung beim Lösen der elliptischen Regressionsproblematik. Prof. Dr. Detlef Reichert danke ich für die ständig gute Laune, die schönen Filmabende und für die Diskussion physikalischer und nichtphysikalischer Probleme. Kathrin Waldheim danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz im S₁-Labor. Bei Pierre Seiboth möchte ich mich für die technische Hilfestellung jeglicher Art bedanken.

Den Werkstattleuten danke ich für die Mithilfe beim Aufbau der Hochdruckanlage. Ein großer Dank geht auch an David Schulze-Sünninghausen für die vielen interessanten Gesprächsthemen und die überaus angenehme Schreibtischnachbarschaft. Dr. Martin Otto danke ich für die schöne Zeit in Halle und den damit verbundenen abwechslungsreichen Konversationen in den Mensen der Stadt und den zahlreichen Baseballspielen. Diese Arbeit wurde finanziert von der Exzellenzinitiative des Landes Sachsen-Anhalt und der Schwerpunktförderung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg des Landes Sachsen-Anhalt.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden bedanken, die mich immerwährend auf verschiedene Art und Weise, direkt und indirekt, unterstützt haben.

Danke!