

**Statische und kinetische Untersuchungen
zur Entfaltung von Phycocyanin
aus *Mastigocladus laminosus***

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Michaela Kupka
aus Wolfratshausen

9. Mai 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scheer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Eichacker

mündliche Prüfung: 18. Juli 2006

Wahrlich beständig
ist allein der Wandel.
(östliche Weisheit, unbekannt)

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Departement Biologie I – Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. H. Scheer angefertigt.

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Scheer für seine immer vorhandene Unterstützung bedanken. Die gewährte Forschungsfreiheit genauso, wie die allzeit „offene Tür“ für Diskussionen, Sorgen und Nöten trugen wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Außerdem möchte ich mich herzlich bedanken bei,

Brigitte Strohmann (LMU, München) für die Einarbeitung in die Proteinisolierung,

Claudia Bubenzer (LMU, München) für die Betreuung der Anzuchtanlage von *Mastigocladus laminosus*,

Dr. Wolfgang Reuter (MPI für Biochemie, Martinsried) für die Einarbeitung in die präparative Gelelektrophorese,

Nicholas Schramek (TU, München) für die Einweisung in die stop-flow Technik.

Ein großer Dank gilt auch meinen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und von denen ich viel gelernt und Unterstützung erfahren habe. Allen voran danke ich dabei Andrea Zehetner für die ausführlichen Unterweisungen in spektroskopischen Messmethoden, Stefan Böhm für das Korrekturlesen dieser Arbeit und Paula Braun für die Ermutigungen zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Ich danke darüber hinaus meiner Mutter, meinen Geschwistern und Wolfgang für die moralische Unterstützung und ihr Vertrauen in mich.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Vorkommen und biologische Funktion der Phycobiliproteine	1
1.2. Aufbau des Phycobiliosoms von <i>Mastigocladus laminosus</i>	2
1.3. Übersicht über die Phycobiliproteine von <i>Mastigocladus laminosus</i>	3
1.4. Funktionelle Gruppen: Die Chromophore.....	4
1.5. Faktoren, die die spektralen Eigenschaften der Chromophore beeinflussen	5
1.6. Beschreibung von Phycocyanin	9
1.7. Proteinfaltung	13
1.8. Spektroskopische Messparameter	15
1.9. Aufgabenstellung	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Material und Geräte.....	21
2.1.1. Material	21
2.1.2. Geräte	21
2.2. Methoden zur Proteingewinnung	22
2.2.1. Aufzucht und Ernte von <i>Mastigocladus laminosus</i> (<i>Fischerella</i> PCC7603).....	22
2.2.2. Isolierung der Biliproteine	23
2.2.2.1. Methode I	24
2.2.2.1.1. Zellaufbruch mit Ultraschall	24
2.2.2.1.2. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (ASF).....	24
2.2.2.1.3. Auftrennung der Biliproteine über eine Anionenaustauschsäule (DEAE – Cellulose)	24
2.2.2.2. Methode II	25
2.2.2.2.1. Zellaufbruch mit der French-Press.....	25
2.2.2.2.2. Inkubation und Reinigungszentrifugation.....	25
2.2.2.2.3. Saccharose Dichtegradientenzentrifugation (15 % und 25 %).....	25
2.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	26
2.2.4. Sepharose-Säule: Entfernen der Biliproteinlinker.....	28
2.2.5. Isoelektrische-Fokussierung: Untereinheiten Trennung	28
2.3. Messreihen zur Proteinfaltung	30
2.3.1. Messreihe für unterschiedliche Kaliumphosphatpuffer-Konzentrationen	30
2.3.2. Extinktionskoeffizienten Bestimmung.....	30
2.3.3. Langzeitmessungen der Entfaltung von PC und Rückfaltung	31

2.3.4.	Statische Dissoziations- und Entfaltungsversuche von PC und den Untereinheiten in Harnstoff, bei verschiedenen Pufferkonzentrationen	31
2.3.5.	Kinetik der Entfaltung von PC, der α - und der β -Untereinheit.....	34
3.	Ergebnisse.....	38
3.1.	Phycocyanin: Beschreibung des Systems für Entfaltungsversuche	38
3.1.1.	Stammlösungskonzentration	38
3.1.2.	Auswirkungen der Konzentration von Kaliumphosphatpuffer auf das Trimer-Monomer-Gleichgewicht von PC	39
3.1.2.1.	Circulardichroismus	39
3.1.2.2.	Absorption.....	42
3.1.2.3.	Emission.....	44
3.1.2.4.	Zusammenfassung der verschiedenen spektralen Parameter	44
3.2.	Extinktionskoeffizienten	45
3.2.1.	Extinktionskoeffizienten vom nativen und entfalteten PC	45
3.2.2.	Extinktionskoeffizienten von PC in 0 bis 8 M Harnstoff.....	46
3.3.	Rückfaltung von PC und Langzeitmessungen der Entfaltung	47
3.3.1.	Langzeitmessungen	47
3.3.2.	Reversibilität der Harnstoffbehandlung von PC	48
3.4.	Auswirkungen der Proteinkonzentration auf das Trimer-Monomer-Gleichgewicht ..	50
3.5.	Dissoziation und Entfaltung von PC mit Harnstoff bei unterschiedlichen Pufferkonzentrationen	51
3.5.1.	Vis-CD	52
3.5.2.	Absorption.....	56
3.5.3.	Emission.....	57
3.5.4.	UV-CD	59
3.6.	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen aus den Vormessungen	62
3.7.	Dissoziation und Entfaltung von PC und den Untereinheiten in 50 mM KPP	65
3.7.1.	Definition von PC Monomer und PC entfaltet, in 50 mM KPP.....	65
3.7.2.	Dissoziation und Entfaltung von PC	67
3.7.2.1.	Dissoziation vom PC Trimer zum Monomer	67
3.7.2.2.	Entfaltung.....	69
3.7.3.	Entfaltung von PC Untereinheiten in steady-state Messungen (0 bis 8 M Harnstoff).....	71
3.7.3.1.	Entfaltung der PC α -Untereinheit	72
3.7.3.2.	Entfaltung der PC β -Untereinheit	73
3.7.4.	Vergleich der Entfaltung vom integralen PC, der α - und der β -Untereinheit	74

3.7.5.	Entfaltung von PC und den Untereinheiten ermittelt an Hand der Sekundärstruktur	76
3.7.5.1.	Vergleich der berechneten Sekundärstrukturanteile aus den UV-CD Spektren mit der der Röntgenstruktur	76
3.7.5.2.	Entfaltung von PC und den Untereinheiten.....	78
3.8.	Zusammenfassende spektroskopische Charakterisierung von PC	80
3.8.1.	Integrales PC	80
3.8.2.	PC α -Untereinheit	83
3.8.3.	PC β -Untereinheit	86
3.9.	Kinetischer Verlauf der Entfaltung von PC und den Untereinheiten.....	90
3.9.1.	Einleitung	90
3.9.2.	Kinetik der Entfaltung vom PC Trimer.....	93
3.9.2.1.	Absorption.....	94
3.9.2.1.1.	Allgemeine Schlussfolgerung für die Dateninterpretation in der Absorption.....	106
3.9.2.2.	Vis-CD	107
3.9.2.2.1.	Allgemeine Schlussfolgerung für die Dateninterpretation im Vis-CD ...	118
3.9.2.3.	Emission	119
3.9.2.4.	UV-CD	122
3.9.3.	Kinetik der Entfaltung von PC Monomer	125
3.9.4.	Kinetik der Entfaltung der Untereinheiten	139
3.9.4.1.	PC α -Untereinheit	141
3.9.4.1.1.	Absorption.....	141
3.9.4.1.2.	Vis-CD	150
3.9.4.1.3.	Emission.....	159
3.9.4.2.	PC β -Untereinheit	161
3.9.4.2.1.	Absorption.....	161
3.9.4.2.2.	Vis-CD	170
3.9.4.2.3.	Emission.....	175
3.9.4.2.4.	UV-CD	177
4.	Diskussion.....	180
4.1.	Vergleich der Messungen der Entfaltungskinetiken von PC	180
4.1.1.	Zusammenfassender Vergleich zwischen der globalen und lokalen Analyse.....	180
4.1.2.	Vergleich der Messparameter der Entfaltung von PC.....	181
4.1.2.1.	PC α -UE.....	181
4.1.2.2.	PC β -UE	184

4.1.2.3. Vergleich der Untereinheiten	187
4.1.2.4. PC Trimer	191
4.1.2.5. Vergleich vom PC-Trimer und den Untereinheiten	194
4.2. Entfaltetes PC	198
4.2.1. Zustand des entfalteten Proteins	198
4.2.2. Veränderung im bereits entfalteten Protein, Reaktionsschritt: $U_f \rightarrow U_s$	199
4.3. Verlauf der Entfaltung von PC	203
5. Zusammenfassung	207
6. Literaturverzeichnis	211
7. Anhang	223
Tabellenverzeichnis	227
Abbildungsverzeichnis	231

Abkürzungen

A	Amplitude, d. h. Intensität des jeweiligen Messparameters
A rel.	Relative Ab- bzw. Zunahme des jeweiligen Messparameters
Absorption _{vis-max}	Absorption im langwelligen Maximum
A _{nuv}	Signalintensität im UV-Nahen Bereich
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Ammoniumsulfat
ASF	Ammoniumsulfatfällung
AS-Rest	Aminosäurereste
A _{vis}	Signalintensität im sichtbaren Bereich
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
CD _{max}	Positives Extremum im Circulardichroismus
CD _{min}	Negatives Extremum im Circulardichroismus
c _{PC}	Konzentration von Phycocyanin
Cys	Cystein
Cys- α 84	Cysteinbindungsstelle 84 in der α -Untereinheit
Cys- β 155	Cysteinbindungsstelle 155 in der β -Untereinheit
Cys- β 84	Cysteinbindungsstelle 84 in der β -Untereinheit
DAD	Dioden-Array-Spektrometer
Emission _{max-rel}	Relative Amplitude der Emission im Maximum
I	Intermediat
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LDAO	N-Dodecyl-N,N-dimethylaminoxid
N	Natives Protein
OD	Optische Dichte
PBS	Phycobilisom
PC	Phycocyanin
PCB	Phycocyanobilin
PCB- α 84	Phycocyanobilin in der α -Untereinheit an der Position 84 der Primärsequenz
PCB- β 155	Phycocyanobilin in der β -Untereinheit an der Position 155 der Primärsequenz

PCB- β 84	Phycocyanobilin in der β -Untereinheit an der Position 84 der Primärsequenz
PC _{denat}	Denaturiertes Phycocyanin
PC _{mono}	Monomeres Phycocyanin
PC _{nat}	Natives Phycocyanin
PC _{tri}	Trimeres Phycocyanin
PE	Phycoerythrin
PEB	Phycoerythrobilin
PEC	Phycoerythrocyanin
PUB	Phycourobilin
PVB	Phycoviolobilin
PXB	Phycobiliviolin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	“unfolded”, denaturiertes Protein
UE	Untereinheiten
U _f	Form des schnell denaturierten Proteins
U _s	Form des langsam denaturierten Proteins
UV-CD	Circulardichroismus im fernen UV
UV-CD _{222-rel}	Relative Amplitude des Circulardichroismus bei 222 nm
Vis-CD	Circulardichroismus im sichtbaren Bereich
Vis-CD _{Amplitude-rel}	Relative Amplitude des Circulardichroismus im sichtbaren Bereich
<i>M. laminosus</i>	<i>Mastigocladus laminosus</i>
α -UE	α -Untereinheit
α -UE _{denat}	Denaturierte α -Untereinheit
α -UE _{nat}	Native α -Untereinheit
β -UE	β -Untereinheit
β -UE _{denat}	Denaturierte β -Untereinheit
β -UE _{nat}	Native β -Untereinheit
ε	Extinktionskoeffizient

1. Einleitung

1.1. Vorkommen und biologische Funktion der Phycobiliproteine

Cyanobakterien, Rotalgen und Kryptophyten besitzen Phycobiliproteine als Antennenpigmente ihres Lichtsammelkomplexes des Photosyntheseapparates. Die Lichtsammelkomplexe der Cyanobakterien und der Rotalgen ähneln sich dabei in ihrem Aufbau sehr. Sie sind organisierte diskrete Einheiten und werden als Phycobilisome (PBS) bezeichnet (Abb. 1-1; Glazer, 1976; Jiang et al., 2001; Adir et al., 2002; Stec et al., 1999). Die Phycobiliproteine (Allophycocyanin (APC), Phycocyanin (PC), Phycoerythrin (PE) bzw. Phycoerythrocyanin (PEC)) besitzen als funktionelle Gruppen die Bilinchromophore (Sidler, 1994; Scheer, 1981, 2003; Glazer, 1976; Bennett & Siegelman, 1979). Der absorbierende Spektralbereich der Phycobiliproteine (500 nm – 650 nm) liegt einerseits in der „Grünlücke“ von Chlorophyll und andererseits dringt Licht dieser Wellenlängen gut in tiefere Wasserschichten ein. Dies bietet einen ökologischen Vorteil für photosynthetische Organismen in tieferen Gewässerschichten und unter einer Schicht grüner Pflanzen (Scheer, 1981).

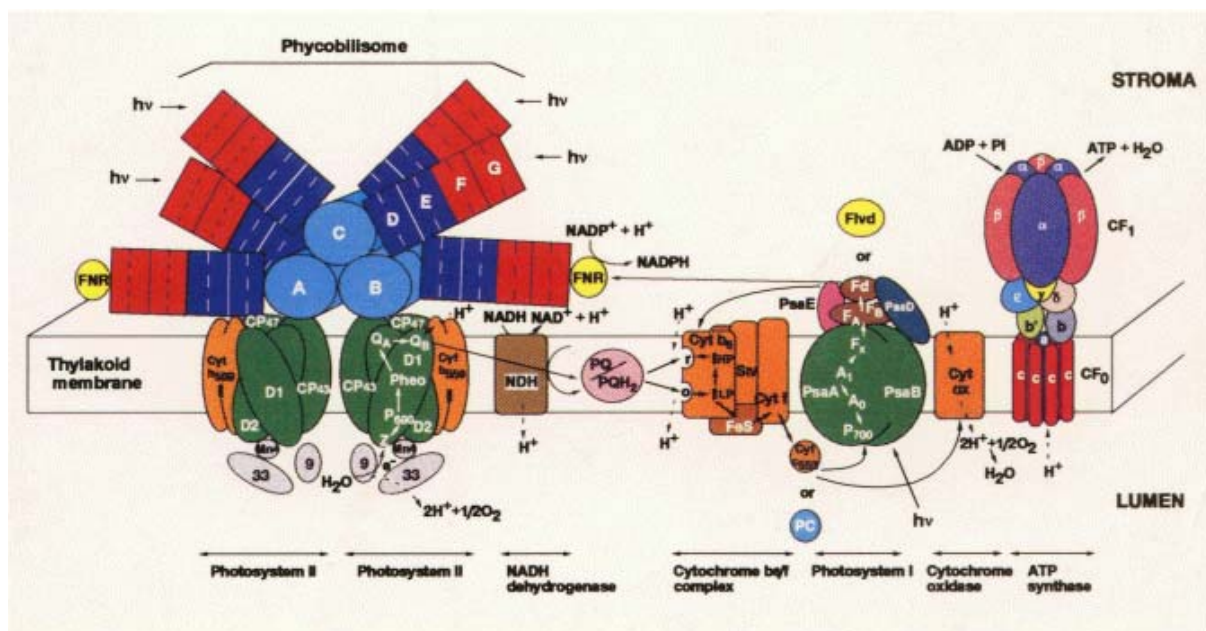


Abb. 1-1: Schematische Darstellung des Photosynthesesystems eines Cyanobakteriums mit dem Grundtypus des hemidiscoidalen Phycobilisoms (Bryant, 1994). A, B, C: Kern aus Allophycocyanin; D – G: Stäbchen, aufgebaut aus Phycocyanin (D, E) und aus Phycoerythrin bzw. Phycoerythrocyanin (F, G). (Grafik aus Bryant, 1994, nach de Marsac & Cohen-Bazire, 1977)

Das PBS sitzt, anders als der Lichtsammelkomplex der grünen Pflanzen, außen auf der Thylakoidmembran auf (Sidler, 1994; Glazer, 1976; Abb. 1-1). Die Antennenstruktur der

Kryptophyten weicht von Aufbau der PBS deutlich ab (Scheer, 1981; Glazer, 1976), es handelt sich dabei eher um diffus zwischen den photosynthetisch aktiven Membranlamellen verteilte Biliproteine (Gantt et al., 1971). Im Folgenden wird der Aufbau des PBS von *Mastigocladus (M.) laminosus (Fischerella PCC 7603)* näher beschrieben (Sidler, 1994). Aus *M. laminosus*, ein fädiges, thermophiles Cyanobakterium, wurde PC, welches für diese Arbeit verwendet wurde, isoliert.

1.2. Aufbau des Phycobilosoms von *Mastigocladus laminosus*

Die PBS sitzen häufig in regelmäßiger, paralleler Anordnung der Thylakoidmembran auf (Abb. 1-1) (Sidler, 1994; Scheer, 1981, 1982; Gantt, 1980; Nies & Wehrmeyer 1980, MacColl 1998, MacColl & Guard-Friar, 1987; Bennett & Siegelman, 1979). Ihre hemidiskoidale Form (Abb. 1-2) besteht im Zentrum aus vier zylindrisch angeordneten Hexameren, dem Kern, darauf können bis zu 8 Stäbchen aufsitzen, bestehend aus je 3 Hexameren. Der Kern wird von verschiedenen APC gebildet (Reuter et al., 1999), die Hexamere der Stäbchen aus je zweimal PC und einmal PEC, wobei letzteres in variabler Menge gebildet wird. Farblose Linkerproteine verbinden die Phycobiliproteine zu den Hexameren und diese zum gesamten PBS. Um die Energie des einfallenden Lichts von der Peripherie der Stäbchen bis zum Kern zu transportieren, sind die Phycobiliproteine entsprechend ihrer maximalen Absorption angeordnet. Native, isolierte Phycobiliproteine weisen eine starke Fluoreszenz auf. Im PBS dagegen wird die aufgenommene Energie des Lichtes an das nächste Phycobiliprotein weiter gegeben. Das höchstenergetische PEC, mit einer Absorption bei 575 nm, sitzt an der Peripherie der Stäbchen und gibt seine aufgenommene Lichtenergie an das nächstfolgende Phycobiliprotein, PC, weiter. Je nach Art der gebundenen Linkerproteine absorbiert dieses zwischen 615 nm – 640 nm, d. h. es erfolgt eine Weitergabe der Energie vom kürzerwellig absorbierendem PC zu längerwellig absorbierendem PC. Von dort wird die Energie auf APC (650 nm – 675 nm), dem Phycobiliprotein des Kerns, übertragen und weiter an das Chlorophyll a des Photosystems II (680 nm) gegeben. Ein geringer Teil der Energie kann bei bestimmten Lichtverhältnissen auch auf Chlorophyll a des Photosystems I (700 nm) übertragen werden (Zhou et al., 1992; MacColl, 1998). Bei der Energieübertragung handelt es sich um einen Resonanz-Transfer (Förster-Transfer) (Bennett & Siegelman, 1979; Glazer, 1976). Insbesondere die Struktur des Kerns ist derzeit noch umstritten, zwei alternative Modelle sind in Abb. 1-2 gezeigt.

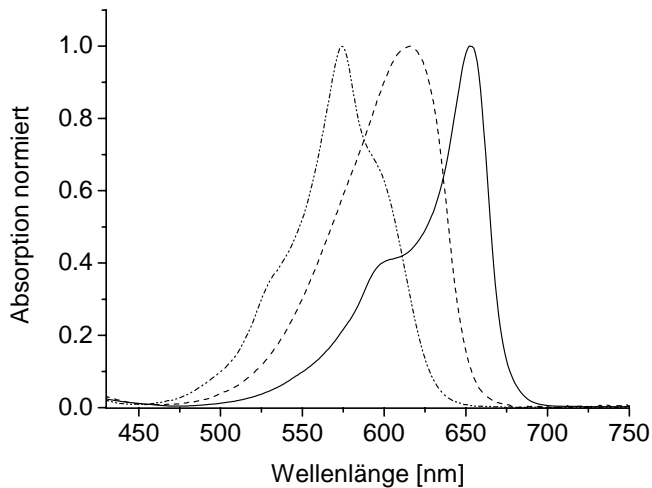


Abb. 1-3: Absorptionsspektren von isolierten, trimeren PEC (·····), PC (---) und APC (—) aus *Mastigocladus laminosus* (normiert).

In Lösung dissoziieren die isolierten Trimere, je nach Proteinkonzentration und Salzgehalt, zu Monomeren (MacColl & Guard-Friar, 1987, 1998). Ein wesentlicher, aber nicht der einzige Grund ihrer unterschiedlichen spektralen Eigenschaften (Abb. 1-3) liegt in den verschiedenen funktionellen Gruppen, den Chromophoren begründet.

Dabei binden an der α -UE von PEC, PC, APC und an der β -UE von APC je ein Chromophor, an der β -UE von PEC und PC je zwei Chromophore. (Sidler, 1994; Tab. 1-1).

1.4. Funktionelle Gruppen: Die Chromophore

Die funktionellen Gruppen der Phycobiliproteine, die Chromophore, gehören zur Klasse der Gallenfarbstoffe. Die Gallenfarbstoffe bei Säugetieren, Abbauprodukte des Häm, können zwar auch an Proteine gebunden sein, aber in der Regel nicht kovalent. Anders bei den Gallenfarbstoffen von Pflanzen und photosynthetisch aktiven Bakterien, hier sind sie mit wenigen Ausnahmen kovalent an das Apoprotein gebunden (Bennett & Siegelman, 1979). Die Chromophore der Phycobiliproteine, die Phycobiline, sind kovalent über Thioetherbrücken an Cysteine des Apoproteins gebunden (Abb. 1-4). Ihr Biosyntheseweg erfolgt über den Häm-Syntheseweg (Scheer, 2003). Es gibt bei Cyanobakterien und Rotalgen vier Arten von Phycobilinen: Phycocyanobilin (PCB), Phycoerythrobilin (PEB), Phycoviolobilin (PVB) (auch Phycobiliviolin (PXB) genannt) und Phycourobilin (PUB) (Bishop et al., 1987; Scheer, 2003). In *M. laminosus* kommen zwei Arten davon vor. In APC und PC binden PCB. In PEC bindet neben PCB noch PVB (Tab. 1-1, Abb. 1-4).

	Bindungsstellen der Phycobiline		
	Allophycocyanin	Phycocyanin	Phycoerythrocyanin
Phycocyanobilin (PCB)	$\alpha 82, \beta 82$	$\alpha 84, \beta 84, \beta 155$	$\beta 84, \beta 155$
Phycoviolobilin (PVB)			$\alpha 84$

Tab. 1-1: Phycobilinbindungsstellen in *M.laminosus* (Sidler, 1994).

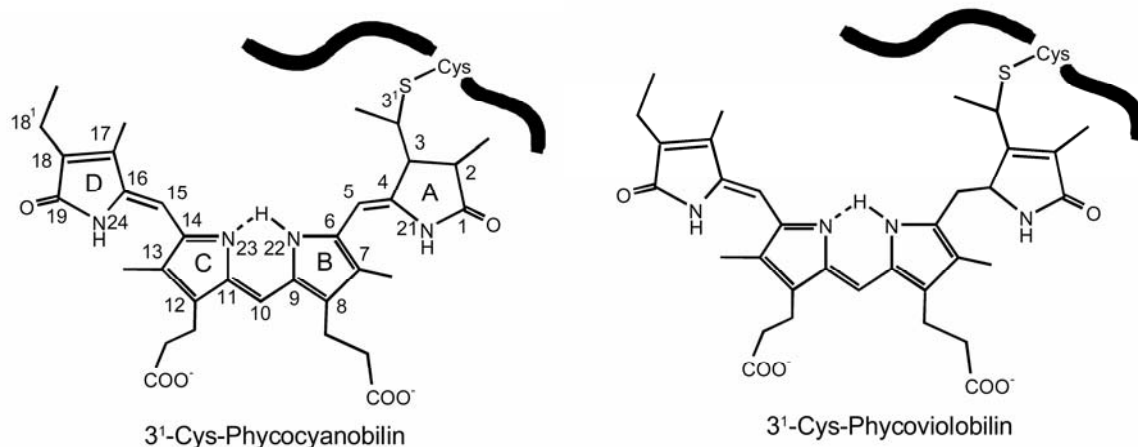


Abb. 1-4: Struktur der gebundenen Chromophore in den nativen Phycobiliproteinen wie sie in *M. laminosus* vorkommen (Scheer, 2003). Das Apoprotein ist mit einer dicken schwarzen Linie angedeutet.

1.5. Faktoren, die die spektralen Eigenschaften der Chromophore beeinflussen

Chemische Struktur

Bei Phycobiliproteinen handelt es sich um offenkettige Tetrapyrrole mit einer unterschiedlichen Zahl an konjugierten Doppelbindungen (Bennett & Siegelman, 1979). Da das π -Elektronensystem verantwortlich für die Absorption der Lichtenergie ist und dieses in seiner Größe von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen herrührt, ist die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen wesentlich für die Absorption. Quasi freie Chromophore in einem denaturierten Biliprotein $\text{pH} < 3$ haben folgende Absorptionsmaxima:

PCB mit 8 konjugierten Doppelbindungen: $\lambda_{\text{max}} = 663 \text{ nm}$ (Glazer & Fang, 1973a)

PVB mit 7 konjugierten Doppelbindungen: $\lambda_{\text{max}} = 594 \text{ nm}$ (Zhao et al., 1995)

PEB mit 6 konjugierten Doppelbindungen: $\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ nm}$ (Glazer & Hixson, 1975)

PUB mit 5 konjugierten Doppelbindungen: $\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$ (Alberte et al., 1984)

Konformation der Chromophore im Protein und deren Beweglichkeit

Die Konformation des Chromophors ist entscheidend für die Absorptionseigenschaften und dabei vor allem für die Intensität. Wie vielfach (diese Arbeit; Brandlmeier et al., 1981;

Guard-Friar & MacColl, 1983; Chen et al., 1977; Murphy & O'Carra, 1970, Scheer, 1981, 1982) gezeigt werden konnte, nimmt die Absorption im langwelligen Absorptionsbereich in einem denaturierten Phycobiliprotein gegenüber einem nativen drastisch (ca. 6-fach) ab. Die wesentliche Ursache der erhöhten Absorption des nativen Proteins gegenüber dem denaturierten Protein liegt darin, dass der Chromophor im nativen Protein in einer leicht verdrehten, gestreckten Konformation gehalten wird (Abb. 1-4). Im denaturierten Protein, in welchem der Chromophor vom Protein entkoppelt und quasi frei ist, liegt er in annähernder Ringform vor (Scheer, 1981, 1982, 1977; Abb. 1-7). Auf die Fluoreszenz hat die Rigidität einen entscheidenden Einfluss. Die Erhöhung der Rigidität z. B. eines Bilindions (Falk, 1989) oder des Biliverdins (Kufer et al., 1982), erhöht drastisch seine Fluoreszenz, und umgekehrt. Die starke Fluoreszenz eines nativen Phycobiliproteins kommt in denaturiertem Zustand zum Erliegen (diese Arbeit; Brandlmeier et al. 1981; Guard-Friar & MacColl, 1983; Chen et al., 1977; Murphy & O'Carra, 1970). Der nun quasi freie Chromophor ist in seiner Beweglichkeit nicht mehr eingeschränkt, was zur Folge hat, dass er die durch Licht aufgenommene Energie schnell durch innere Konversion als Wärme abgibt. Lediglich ein Chromophor, der künstlich stabilisiert wird, zeigt auch im entfalteten Protein noch Fluoreszenz (Falk, 1989). Im gefalteten Protein ist der Chromophor sehr in seiner Beweglichkeit eingeschränkt, damit erhöht sich die Lebensdauer des angeregten Zustandes (von $\approx 10^{-12}$ s auf $\approx 2 \cdot 10^{-9}$ s), und die Energie wird in Form von Fluoreszenz abgegeben (Scheer, 1999). Hier wird auch die physiologische Bedeutung des Apoproteins deutlich. Ein freier Chromophor wäre mit seiner geringen Absorption und dem sehr kurzlebigen angeregten Zustand nicht geeignet, einen effizienten Antennenkomplex zu bilden. Neben der geringen Aufnahme an Lichtenergie ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes zu kurz, um die Energie effizient auf den nächsten Chromophor übertragen zu können. Genauso nimmt das CD-Signal im sichtbaren, nahen und fernen UV Bereich durch die Entfaltung ab (Lehner & Scheer, 1983). Wenn der Chromophor durch die Entfaltung in seine ringartige Form übergeht, reduziert sich das Vis-CD Spektrum in seiner Intensität um etwa die Hälfte. Das UV-CD Spektrum hat, wenn keine Sekundärstruktur mehr vorhanden ist, kein Signal mehr (Lehner & Scheer, 1983). Das noch deutliche Signal im Vis-CD im entfalteten Protein resultiert aus der optischen Aktivität (drei chirale Zentren) der Chromophore (Lehner & Scheer, 1983).

Ein weiterer Faktor, der die Absorption der Chromophore beeinflusst, ist die Torsion der Methinbrücken zwischen den Pyrrolringen (Falk, 1989; Scharnagl & Schneider, 1990). Bei einer Torsion an der formalen Einfachbindung der Methinbrücke kommt es zu einer

Blauverschiebung der Absorptionsbanden. Bei kleinem Torsionswinkel ($<30^\circ$) kann die Verschiebung gelegentlich auch rot sein. Bei einem Torsionswinkel von 90° kommt es zu einer weitgehenden Entkopplung.

Phycobiliproteine können als Z und E Isomere vorkommen (Storf, 2003; Siebzehnrübl, 1990). Falls es bei der Isomerisierung zu einer Veränderung des absorbierenden π -Elektronensystems kommt und/oder zu einer Änderung der Torsionswinkel im Chromophor, führt dies ebenfalls zu deutlichen Absorptionsänderungen.

Protonierung/Deprotonierung und Metallkomplexe

Protonierung und Deprotonierung des Chromophors führen zu einer Veränderung der Absorption (Falk, 1989; Scharnagl & Schneider, 1990). Werden die basischen Stickstoffatome der Pyrrolen-Ringe des Chromophors protoniert führt dies zu einer Rotverschiebung und drastischen Erhöhung der Absorption (Falk, 1989).

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass Tetrapyrrole Metallkomplexe bilden. Dabei ändert sich sowohl die Absorption, als auch die Fluoreszenz (Falk, 1989). Z. B. wird beim Komplexieren von PCB mit Eisen im Phycocyanin die Fluoreszenz reduziert. Die Absorption erhöht, je nach Eisenkonzentration, unterhalb des langwelligen Maximums und reduziert dabei, bei entsprechender hoher Eisenkonzentration, die Intensität des langwelligen Maximums drastisch (Ilani & Berns, 1971). Jedoch gibt es in Phycocyaninproteinen natürlicherweise keine Metallkomplexe.

Chromophorinteraktionen mit dem Protein

Viele der oben aufgeführten Faktoren wie Konformation, Protonierung und Beweglichkeit des Chromophors werden durch die Konformation des umgebenden Proteins bestimmt. Weitere Aspekte, die die spektralen Eigenschaften des Chromophors beeinflussen sind zum einen, die Interaktion des Chromophors mit dem Protein. Und zum anderen, wie in Folge der Proteinfaltung, eine Chromophor-Chromophor-Interaktion ermöglicht wird. Durch die Interaktion des Chromophors mit den AS-Resten des umgebenden Proteins kann es zu Interaktionen kommen, die das π -Elektronensystem modifizieren und somit seine Absorptionseigenschaften deutlich verändern (Scheer, 1982; Mimuro et al., 1986; Scharnagl & Schneider, 1989, 1990). In der β -UE führt nicht nur die Interaktion des Chromophors mit der Proteinumgebung zu einer optischen Aktivität. Diese wird auch über Chromophor-

Chromophor Interaktionen induziert (Scharnagl & Schneider, 1990; MacColl et al., 1994). Aggregieren die Untereinheiten zu Monomeren und diese zu Trimeren kommt es ebenfalls zu Veränderungen in der Absorption und dem Vis-CD (diese Arbeit; MacColl, 1998; Debreczeny et al., 1995b; Glazer et al., 1973b). Im Wesentlichen werden dafür zwei Ursachen diskutiert. Zum einen die bereits oben erwähnte Veränderung in der Interaktion zwischen Chromophor und Protein und zum anderen eine excitonische Kopplung zwischen nahe bei einander liegenden Chromophoren (Debreczeny et al., 1995 a und b; Scheer, 1982; Mimuro et al., 1986; Frank et al., 1978, Sauer & Scheer, 1988). Auf die Emission hat die Aggregation kaum einen Einfluss (Pizarro & Sauer, 2001). Nicht auszuschließen sind für die spektralen Veränderungen noch bisher unentdeckte Prinzipien der Interaktion, die einen Einfluss auf die Absorption und/oder die optische Aktivität haben. Für den konkreten Fall des Phycocyanins werden die Verhältnisse im folgenden Kapitel detaillierter dargestellt.

Es wurde gezeigt, dass viele Veränderungen im Protein den Chromophor derart beeinflussen, das sich sein Spektrum verändert. Dies bedeutet, dass aufgrund spektraler Änderungen im Chromophor Rückschlüsse auf die Konformation des Proteins gemacht werden können. Damit ist der Chromophor geeignet als natürliche Sonde bei Entfaltungsversuchen verwendet zu werden.

Veränderungen der Absorptionseigenschaften der Phycobiliproteine im Phycobilisom

Im Wesentlichen ist hier die Beeinflussung der Absorption der Phycobiliproteine durch die Linkerproteine (Parbel, 1997; Reuter et al., 1999; Pizarro & Sauer, 2001) und die Ausrichtung im PBS zu sehen. Damit kommt es zu einer Veränderung der Interaktion von Chromophor und AS-Resten und Energietransfer, was, wie bereits oben beschrieben, die Absorptionseigenschaften deutlich verändern kann (MacColl, 1998). Zum Beispiel verschiebt sich das Maximum von trimeren PC (PC_{tri}) von ≈ 620 nm auf 638 nm in $PC_{tri} + 27$ kDa-Linker bzw. auf 629 nm in $PC_{tri} + 32,5$ kDa-Linker (Yu et al., 1981).

Die vielfältigen Faktoren, die die Absorption und Fluoreszenz des Chromophors beeinflussen, zeigen, wie in diesem System Eigenschaften gezielt für die Funktion im Antennenkomplex optimiert werden. Die Energieaufnahme und Energieübertragung von einem Phycobiliprotein zum nächsten kann ganz fein abgestimmt werden, um sie möglichst optimal zu gestalten.

1.6. Beschreibung von Phycocyanin

Struktur

Isoliertes PC aus *M. laminosus* (Abb. 1-5, 1-6) liegt im Kristall als Trimer vor (Schirmer et al., 1984). In Lösung besteht ein Trimer-Monomer-Gleichgewicht (MacColl & Guard-Friar, 1987). Das PC Trimer (PC_{tri}) (Abb. 1-5) ist dreieckig bzw. ringförmig konfiguriert. Der äußere Durchmesser beträgt 110 Å, der innere 35 Å, die Dicke 30 Å (Schirmer et al., 1984). Ein PC Monomer (PC_{mono}) (Abb. 1-6) besteht aus einer α - und einer β -UE, die sich strukturell sehr ähnlich sind, obwohl ihre AS-Sequenz nur zu 31% homolog sind (Frank et al., 1978), und auch die Anordnung der Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken differieren (Schirmer et al., 1987).

Die α -UE besteht aus 162 Aminosäuren (AS), davon ein Cystein und 17 aromatische AS (Tab. 1-2; Frank et al., 1978; Glazer 1973a, 1976; Williams & Glazer, 1978). Ihr MW beträgt mit Chromophor 16 kDa. An das Cystein 84 der Primärstruktur ist der Chromophor PCB kovalent über Ring A gebunden (Abb. 1-4) (Schirmer et al., 1985; Byfield & Zuber, 1972; Sidler, 1994; Glazer, 1973a). Die β -UE besteht aus 172 AS, ihr MW beträgt mit den Chromophoren 20 kDa. Sie besitzt drei Cysteine und 9 aromatische AS. An das Cystein 84 und 155 ist jeweils ein Chromophor PCB kovalent über Ring A gebunden (Abb. 1-4). Die Sekundärstruktur beider UE besteht aus 8 α -Helices (X, Y, A, B, E, F, G, H: Globin Nomenklatur Schirmer, 1985) und den verbindenden Loops. Die Helices machen dabei 62% der Sekundärstruktur von PC aus (Schirmer et al., 1985) (Abb. 1-5, 1-6). Die Größe und Lage der Helices ist zwischen den UE zwar sehr ähnlich, aber es gibt doch gewisse Unterschiede. Zum Beispiel ist die Chromophorbinderungsstelle Cys- β 155 in der β -UE ein Teil der Helix H. Die Helix H in der α -UE ist hingegen deutlich kürzer. Es fehlt ihr das Cystein 155 und die sie umgebenden AS. Die Chromophorbinderungsstellen Cys- α 84 und Cys- β 84 befinden sich sowohl in der α - als auch der β -UE in Helix E. In der Tertiärstruktur bilden sich aus 6 Helices (A, B, E, F, G, H) je UE der Globin Teil ähnlich dem Myoglobin (Schirmer et al., 1985) und zusätzlich aus den Helices X und Y ein Element, welches für das Zusammenlagern der α - und β -UE zu den Monomeren (PC_{mono}) verantwortlich ist (Abb. 1-6). Sie sind dabei nicht über Disulfidbrücken stabilisiert (Bennett & Siegelman, 1979). Phycocyanin zeigt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit Globinproteinen (Pastore & Lesk, 1990).

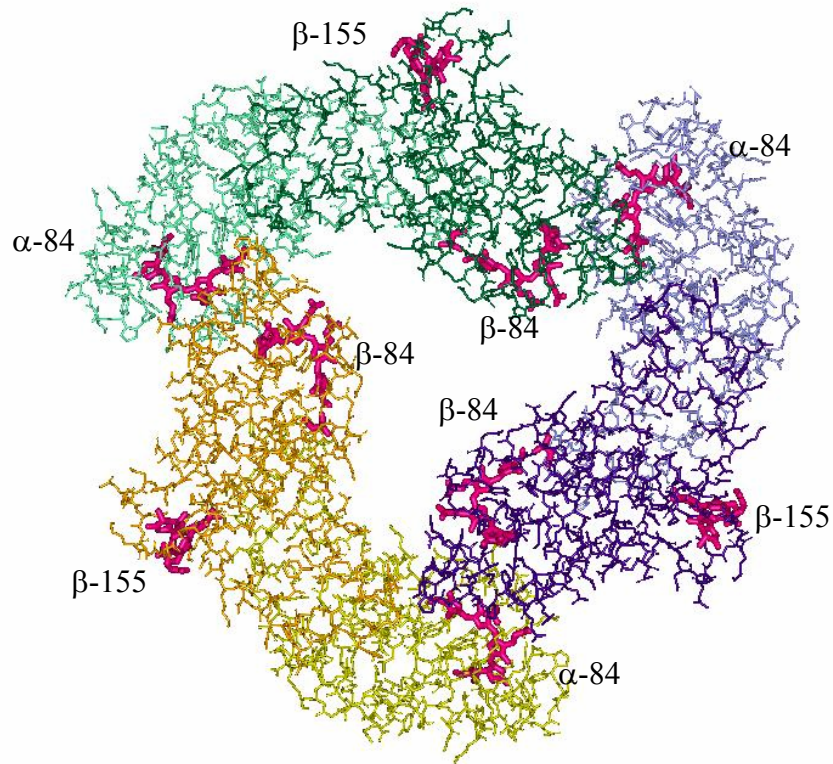


Abb. 1-5: Röntgenstruktur von PC_{tri} aus *Mastigocladus laminosus* (Die Koordinaten sind unveröffentlicht. Dank an R. Huber); PC_{mono} blau: α-UE hellblau, β-UE dunkelblau, grün: α-UE hellgrün, β-UE dunkelgrün, gelb-orange: α-UE gelb, β-UE orange; Chromophore: violett; innerer Durchmesser des PC Trimeren 35 Å, äußerer Durchmesser 110 Å, Dicke 30 Å (Schirmer et al., 1984).

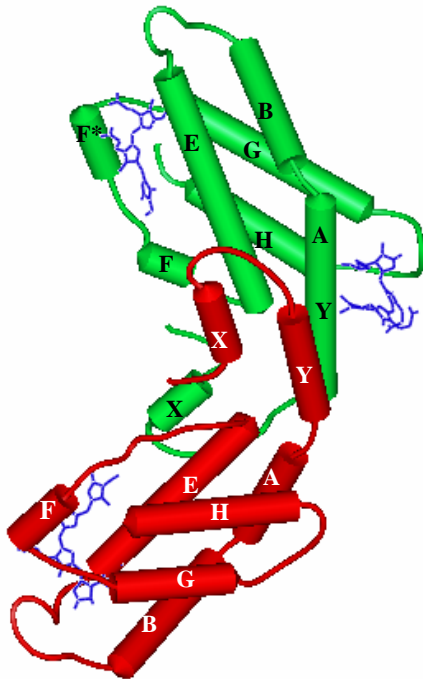


Abb. 1-6: Schematische Darstellung der Kristallstruktur vom PC_{mono} (im Trimeren) von *Mastigocladus laminosus* (Die Koordinaten sind unveröffentlicht. Dank an R. Huber). α-UE (■), β-UE (■), Chromophore (■); Helices je UE: X, Y, A, B, E, F, G, H (Schirmer et al., 1985, 1987), wobei das Programm zur Darstellung der Sekundärstruktur in der β-UE nicht zwischen Helix Y und A unterscheidet, dafür in F und F*, wie es in der Darstellung von Schirmer et al., 1987 ebenfalls erfolgte. 62% von PC besteht aus α-Helix, die Chromophore PCB binden: Cys-α84 und Cys-β84 in Helix E und Cys-β155 in Helix H

Absorptionsspektren der Chromophore und Energietransfer in PC

In der α -UE und der β -UE ist jeweils der gleiche Chromophor, PCB, gebunden (einmal in der α -UE, zweimal in der β -UE, Tab. 1-1), trotzdem variieren die Absorptionsspektren der drei Chromophore (Abb. 1-7, Tab. 1-2; Debreczeny et al., 1993, Demisov & Mimuro, 1995). Durch Tieftemperaturmessungen (77 K) konnten die Chromophore in den Absorptionsspektren des Monomers und der β -UE differenziert werden (Debreczeny et al., 1993). Der PCB- β 155 Chromophor absorbiert und emittiert am kurzwelligsten (Tab. 1-2, Abb. 1-7), gefolgt von PCB- α 84 und anschließend PCB- β 84. Allein durch Konformationsunterschiede zwischen den einzelnen Chromophoren können diese Unterschiede nicht mehr erklärt werden (Scharnagl & Schneider; 1989, 1990; Mimuro et al., 1986; Siebzehnrübl et al., 1987). Zum Beispiel ist ein Absorptionsmaximum von PCB- α 84 bei 620 nm durch keine Geometrie erreichbar (Scharnagl & Schneider, 1989). Erst eine Ausrichtung des Chromophors zum Protein, die die Absorption durch Interaktionen der AS Reste mit dem Chromophor beeinflussen (Kap. 1.5.) ermöglicht eine entsprechende Absorption. Ein weiterer Faktor ist die Protonierung des Chromophors, wie dies im nativen Protein der Fall ist (Foerstendorf et al., 2001; Falk, 1989). Sie führt ebenfalls zu einer Erhöhung und Blauverschiebung der Absorption (Kap. 1.5.). Bei den Untersuchungen der

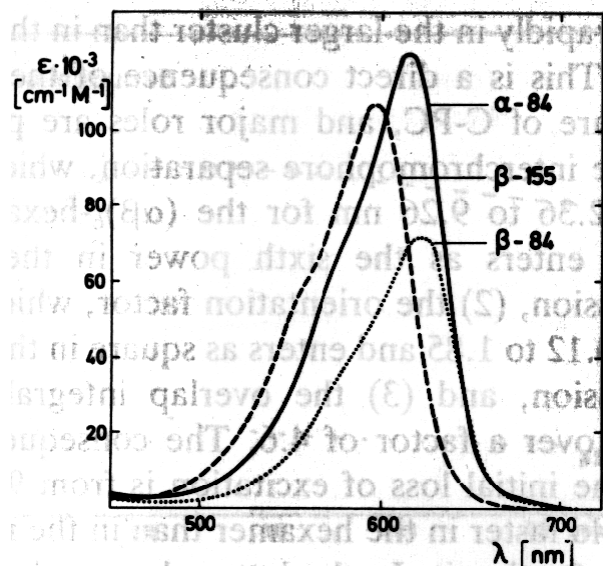


Abb. 1-7: Absorptionsspektren des PCB- α 84, PCB- β 84 und PCB- β 155 Chromophor in PC aus *M. laminosus*. Die Chromophorspektren sind relativ zu ihrem Beitrag im PC_{mono} normiert. Die PCB- β 84 und PCB- β 155 Chromophore wurden durch Auflösung des Spektrums der β -UE berechnet. (Details hierzu in und Grafik aus Sauer et al., 1987)

β -UE, welche zwei Chromophore trägt, zeigt sich, dass hier zusätzlich zu den bereits angesprochenen Aspekten, die die Absorption der Chromophore beeinflussen, eine Chromophor-Chromophor Interaktion auftritt (Scharnagl & Schneider, 1990). Dies bedeutet, die Absorption der β -UE ist nicht nur die Summe von PCB- β 155 und PCB- β 84. Allerdings gibt es dazu auch kontroverse Meinungen, nämlich, dass die Einzelspektren der Chromophore im Protein addiert werden können (Demidov & Mimuro, 1995). Jedoch stellt die Absorption des Monomers eine Summe der UE dar (Debreczeny et al., 1993; Mimuro et al., 1986, Glazer et al., 1973b), diese Aussage

steht auch nicht im Widerspruch zu Demidov & Mimuro (1995).

	A _{max} [nm]	A _{rel}	F _{max} [nm]	Φ _F (rel)
β-155	598	0,89	623	1,0
α-84	617	1	641	1
β-84	622	0,60	644	0,67
PC _{mono} *	611	2,43		

Tab. 1-2: Lagen und Ionenstärken von Absorption und Emission der PCB Chromophore in PC aus *M. laminosus*, mit Intensitäten normiert auf den PCB-α84 Chromophor. (Daten aus Debreczeny et al., 1993; Sauer et al., 1987; *Mimuro et al., 1986)

Bei der Aggregation der Monomere zu Trimeren kommt es zu einer leichten Rotverschiebung (ca. 4 nm). Dass heißt, es finden dabei sowohl bekannte (Kap. 1.5.) als auch nicht näher definierte Interaktionen zwischen Chromophor und Protein statt, die die spektroskopischen Eigenschaften des Chromophors verändern. Nachdem PCB-β155 keine Unterschiede in der Absorption im Monomer zum Trimer zeigt, ist eine Veränderung in der Absorption von PCB-β84 Ursache der Rotverschiebung. Es wird entweder eine Interaktion, unabhängig der excitonischen Kopplung, zwischen der PCB-α84 und PCB-β84 dafür verantwortlich gemacht und/oder eine Veränderung in der PCB-α84/Protein Interaktion (Debreczeny et al., 1995b). Die schwache excitonische Kopplung zwischen PCB-α84 und PCB-β84 der zwei aneinander gelagerten Monomere im Trimer wird als alleinige Ursache ausgeschlossen. Entsprechend der unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren der drei in PC gebundenen PCB Chromophore erfolgt der Energietransfer innerhalb eines PC_{tri} (Mimuro et al., 1986; Debreczeny et al., 1995a und b; Scheer, 1981; Bennett & Siegelmann 1979; Sauer & Scheer, 1988; Schirmer et al., 1985, 1987). Dabei ist für die Kinetik entscheidend, in welchen Abständen und in welcher Ausrichtung die Chromophore zueinander angeordnet sind (Debreczeny et al., 1995a; Schirmer et al., 1987). Der Hauptenergietransfer in PC_{mono} erfolgt von PCB-β155 zu PCB-β84 und von PCB-α84 zu PCB-β84. In PC_{tri} erfolgt der schnellste Energietransfer zwischen den Monomeren, von der PCB-α84 des einen Monomers zu PCB-β84 des nächstgelegenen Monomers. Der Abstand PCB-α84 und PCB-β84 zwischen zwei Monomeren im Trimer ist der kürzeste Abstand zwischen Chromophoren in PC_{tri}. Er beträgt 2,5 nm und damit ist eine excitonische Kopplung zwischen den Chromophoren möglich und auch vorhanden (Sauer & Scheer, 1988), anders als z. B. in ähnlicher Konformation in APC (Sharkov et al., 1994). Abgesehen von dieser excitonischen Kopplung lassen sich alle weiteren Energieübertragungen im PC mit dem Förster-Transfer beschreiben.

1.7. Proteinfaltung

Native Proteinstruktur

Die Primärstruktur eines Proteins bestimmt im Wesentlichen die Sekundärstruktur des Proteins und deren Faltung in die Tertiärstruktur (Baker, 2000; Bieri & Kiefhaber 1999; Anfinsen, 1973; Baldwin, 1986; Creighton, 1988; Richards, 1991; Rupley et al., 1983). In natürlicher Umgebung sind gelegentlich Helferproteine daran beteiligt (Braig et al., 1994; Agard, 1993; Georgopoulos & Welch, 1993), in vitro in verdünnter wässriger Lösung falten sie normalerweise spontan. Die in der Regel nicht kovalenten Bindungen, die dabei ausgebildet werden, und auch für die Bildung der Quartärstruktur verantwortlich sind, umfassen: Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken, π -Bindungen und hydrophobe Bindungen (Alberts et al., 1995). Als kovalente Bindungen kommen Disulfidbindungen zwischen Cysteinen vor. Eine wesentliche Triebkraft bei der Faltung in die native Konformation ist, die hydrophoben AS-Reste im Innern des Proteins zu bergen, und die hydrophilen nach außen ins Wasser zu exponieren (Alberts et al., 1995). Dabei erreicht das Protein, häufig innerhalb von Sekunden, einen thermodynamisch stabilen Zustand (Kyte, 1995; Amzel, 2000). Grundsätzlich erfolgt auch die Faltung und Entfaltung über einen oder wenige thermodynamisch ausgezeichnete Wege und ist damit um viele Größenordnungen schneller, als sich durch bloßes Ausprobieren ergeben würden. Rechnerisch gäbe es dafür meist mehrere geeignete Wege (Nakamura & Sasai, 2001). Auch kann es auf dem sehr komplexen Weg der Faltung zu thermodynamisch relativ stabilen Faltungszuständen kommen (lokale Minima), die für die gesamte Tertiärstruktur nicht die vorteilhafteste sind (Grantcharova et al., 2001). Ebenfalls sind bei der Faltung sterische Hinderungen möglich, die den thermodynamisch bevorzugten Weg behindern. Daraus wird auch klar, dass zwei Aspekte bei der Faltung von Proteinen beachtet werden müssen. Zum einen die Kinetik, die durch die Thermodynamik bestimmt wird und zum anderen, die, die durch die Struktur des Proteins beeinflusst wird. Nach wie vor werden die Faltungsvorgänge nur unzureichend verstanden und sind nur in wenigen Proteinen detailliert untersucht.

Entfaltung eines Proteins: Denaturiertes und natives Protein im Gleichgewicht

Ein Ansatz, die Faltung von Proteinen zu untersuchen, ist das Studium der inversen Reaktion, d. h. der Entfaltung. Im Idealfall entfaltet ein Protein in Faltungsexperimenten vollständig und liegt dann als random coil vor, d. h. in einer großen Zahl unterschiedlicher, aber nahezu isoenergetischer Zustände mit größtmöglicher freier Beweglichkeit aller AS-Reste (Cantor &

Schimmel, 1980). Davon ausgehend lässt es sich idealerweise vollständig rückfalten (Kyte, 1995; Utiyama & Baldwin, 1986). Während der Entfaltung befindet sich nicht alles Protein in einem einheitlichen strukturellen Zustand, sondern es existiert ein dynamisches Gleichgewicht zwischen gefalteten (in dieser Arbeit immer als natives Protein (PC_{nat}) bezeichnet) und entfalteten (in dieser Arbeit immer als denaturiertes Protein (PC_{denat}) bezeichnet) Proteinen (Cantor & Schimmel, 1980; Kyte, 1995; Utiyama & Baldwin, 1986; Eftink & Shastry, 1997). Die während der Entfaltung bzw. Faltung auftretenden Intermediate sind für kurze Zeit thermodynamisch stabile Zwischenzustände und kennzeichnen den Weg der Entfaltung bzw. Faltung. Dabei muss zwischen Gleichgewichtsmessungen und kinetischen Untersuchungen unterschieden werden. Mögliche Intermediate dieser Untersuchungen können, müssen aber nicht die Gleichen darstellen. Bei kinetischen Entfaltungsversuchen kann es durch sterische Hinderungen zu Barrieren in der Entfaltung kommen, bei der es zu einer signifikanten Anhäufung eines kinetischen Intermediates kommt, welches aber kein thermodynamisch, stabiles Intermediat darstellt. Das heißt, es handelt sich hierbei um kinetische Intermediate, die sich in keinem thermodynamischen Minimum befinden. Solche Anhäufungen „falscher“ Intermediate können zu Fehleinschätzungen des Proteinfaltungs- bzw. -entfaltungsweges führen.

Weiter muss bei der Verschiebung des Gleichgewichtes von nativ zu denaturiert bei Ent- und Rückfaltungsexperimenten bedacht werden, dass bei jeder Messung der Proteinlösung (mehr oder weniger) alle Zustände eines Proteins auf dem Weg der Entfaltung (oder auch Faltung) erfasst werden:

$$f_{\text{obs}} = f_{\text{nat}} + f_{\text{denat}} + \sum f_i$$

Dabei ist f_{obs} das gemessene Signal, f_{nat} der native Anteil, f_{denat} der denaturierte Anteil und $\sum f_i$ die Summe der Anteile der Faltungsintermediate des Proteins. Dadurch, dass das Gleichgewicht aber fließend zwischen diesen Zuständen verschoben werden kann, können diese analysiert werden. Beim Vergleich verschiedener Messparameter kann davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche Intermediate bei verschiedenen physikalischen Parametern unterschiedliche Signale aufweisen (Cantor & Schimmel, 1980; Kyte, 1995). Daraus und aus errechneten Intermediaten der Kinetik der Entfaltung (Kap. 2) kann ein Entfaltungsweg des Proteins unter Laborbedingungen postuliert werden. Bei dieser etwas vereinfachten Darstellung darf nicht vergessen werden, dass bei der Proteinfaltung verzweigte

und parallele Faltungswege ablaufen können. Auch werden Missfaltungen beobachtet, die wieder korrigiert werden (Krishna et al., 2003; Utiyama & Baldwin, 1986; Baldwin, 1994). Dabei besteht hier genauso, wie bei den „falschen“ Intermediaten (siehe oben) die Gefahr, dass diese Art der Missfaltungen als echte Faltungsintermediate interpretiert werden und somit das Ergebnis verfälschen.

Harnstoff als Denaturierungsmittel

Es gibt verschiedene chemische und physikalische Methoden, um ein Protein zu entfalten. In dieser Arbeit wurde Harnstoff als Denaturierungsmittel verwendet (Pace, 1986; Lapanje, 1978; Guard-Friar & MacColl, 1983; Santoro & Bolen, 1988; Möglich et al., 2004; Schellmann, 2002). Der wesentliche Effekt von Harnstoff als Denaturierungsmittel ist, dass es die Wasserstruktur des Lösungsmittels zerstört und damit die Kapazität von Wasser für hydrophobe Gruppen erhöht (Lapanje, 1978), oder anders ausgedrückt: Der random coil des Proteins ist in Harnstoff stabiler, als der native Zustand (Kyte, 1995). Ein weiterer Aspekt ist die Interaktion von Harnstoff mit dem Protein, welcher aber in seinen Einzelheiten noch nicht exakt verstanden ist (Möglich et al., 2004; Schellmann, 2002). Dies führt in Folge zur Entfaltung eines Proteins. Disulfidbindungen werden von Harnstoff nicht gelöst. Die Möglichkeit einer vollständigen Rückfaltung von Proteinen mit Disulfidbrücken ist damit erhöht.

1.8. Spektroskopische Messparameter

Es gibt verschiedene Messparameter, mit denen sich Entfaltungsvorgänge in einem Protein verfolgen lassen. Solche, die das Protein als Ganzes sehen und andere, die mit Hilfe von Sonden bestimmte Aspekte und Bereiche eines Proteins widerspiegeln. Ein globaler Parameter ist z. B. der CD im fernen UV (Sreeram & Woody, 1993, 1999, 2000; Unneberg et al., 2001; Chen et al., 1974, Cantor & Schimmel, 1980; Jirgensons, 1973; Kelly & Price, 1996). Als lokale Sonden bieten sich in Biliproteinen die Chromophore an, welche mittels Absorption, Vis-CD und Fluoreszenz komplementäre Informationen zur Struktur und Dynamik ihrer Umgebung liefern können (Kap. 1.5). Die Verwendung der Chromophore von PC ist, wie bereits angesprochen, in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen stellen sie natürliche Sonden dar, d. h. es erfolgt kein störender Einfluss durch eine künstlich eingebaute Sonde. Und zum anderen ist der Chromophor die funktionelle Gruppe von PC und insofern in seinen Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von Interesse. Die wesentlichen

Unterschiede zwischen den Messparametern sind, dass sich im Vis-CD die Chiralität und Verdrillung des Chromophors, in der Absorption seine Konformation allgemein und in der Fluoreszenz seine Rigidität zeigt.

In den vorausgehenden Kapiteln wurde beschrieben wie die Absorption, der CD und die Fluoreszenz im Protein bedingt werden. Im Folgenden werden zusammenfassend die wesentlichen spektroskopischen Daten aus der Literatur aufgezeigt, welche als erste Grundlage für die Untersuchungen dieser Arbeit dienen.

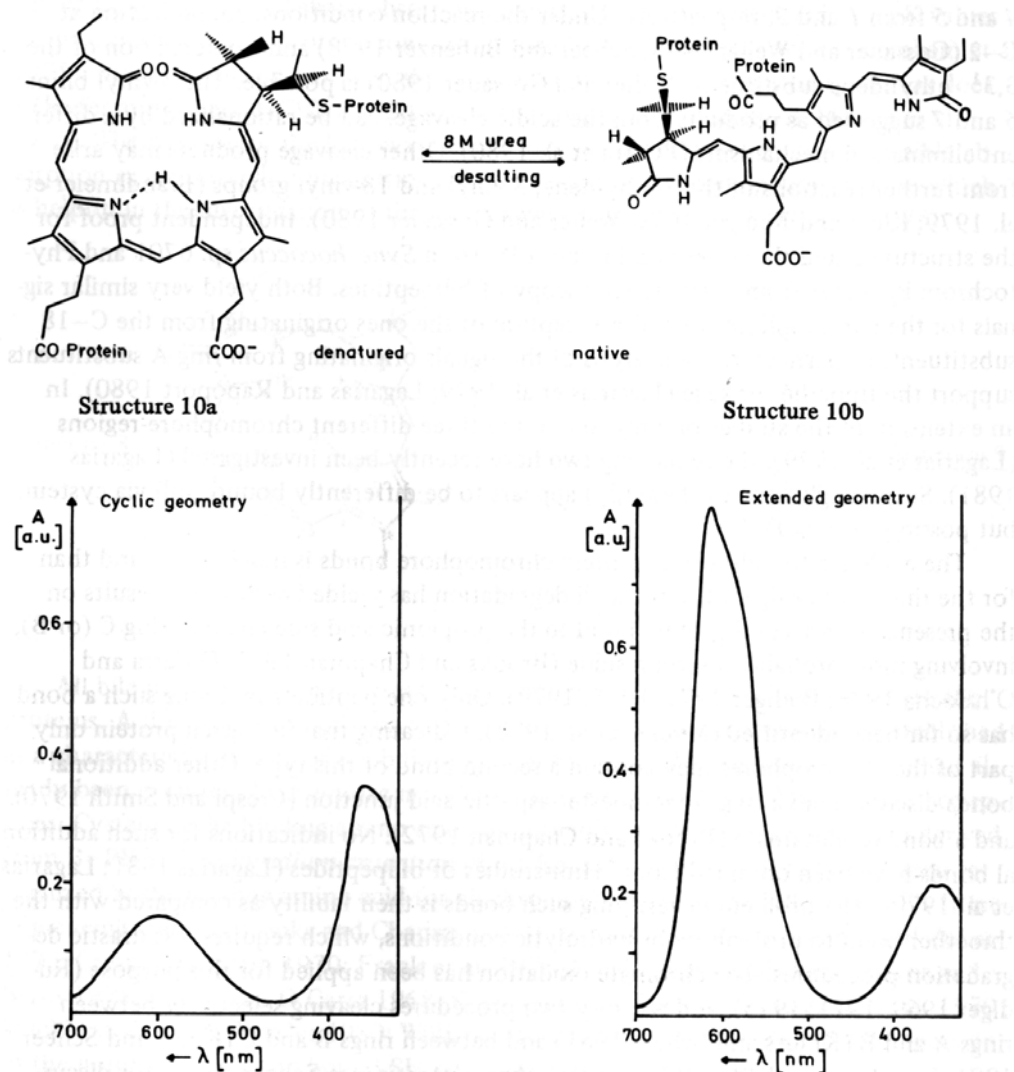


Abb. 1-8: Schematische Struktur der Chromophore (oben) und Absorptionsspektren (unten) von PC aus *Spirulina platensis*. Links: Ringförmigen Chromophor im entfaltenen PC. Rechts: Gestreckter Chromophor im gefalteten PC; jeweils bei gleicher Chromophorkonzentration. (Grafik aus Scheer, 1982).

Die Absorptionsdaten (Tab. 1-3) von PC_{nat} zu PC_{denat} verändern sich bei der Entfaltung drastisch (Abb. 1-8, Tab. 1-3), dabei ist die Konformationsänderung des Chromophors wesentliche Ursache (Scheer, 1982; Kap. 1.5.; Abb. 1-8). Das langwellige Maximum nimmt ca. 6-fach ab und das kurzwellige ca. 2-fach zu. Demnach zeigt das Verhältnis von kurzwelligem zu langwelligem Maximum den Grad der Entfaltung des Proteins, nach den Kriterien der Absorption, an. Dieses Verhältnis wird als Q-Wert ($Q = A_{vis}/A_{nuv}$; Scheer, 1982, 1977) bezeichnet. Bei PC_{nat} beträgt der Q-Wert $\approx 6-7$, für PC_{denat} $\approx 0,4$. Die Absorptionsspektren der UE unterscheiden sich deutlich vom integralen PC (Abb. 1-9, Tab. 1-3). Das Absorptionsmaximum der α -UE ist gegenüber dem PC_{mono} leicht blau verschoben und das der β -UE rot (Siebzehnrübl, 1990; Tab. 1-3). Wie bereits erwähnt stellt das PC_{mono} in der Absorption eine Summe der UE dar (Debreczeny et al., 1993; Mimuro et al., 1986, Glazer et al., 1973b). Das PC_{tri} unterscheidet sich vom PC_{mono} durch eine Rotverschiebung des langwelligen Maximums (Debreczeny et al., 1995b; Siebzehnrübl, 1990; Tab. 1-3) und einer Zunahme von ϵ (Tab. 1-3, MacColl & Guard-Friar, 1987; Siebzehnrübl, 1990).

	λ_{max} [nm]	ϵ [$M^{-1} cm^{-1}$]
PC _{tri}	618-620	
PC _{mono}	612	297.000 ²⁾
PC _{denat}	600	46.200 ²⁾
α -UE _{nat}	616	122.000 ¹⁾
β -UE _{nat}	604	164.000 ¹⁾

Tab. 1-3: Absorptionsspektroskopische Daten von PC bei pH 7 und RT gemessen. Anmerkungen: ¹⁾ nach Sauer et al. 1987; ²⁾ nach Kufer, 1980; Daten sind entnommen aus Siebzehnrübl, 1990.

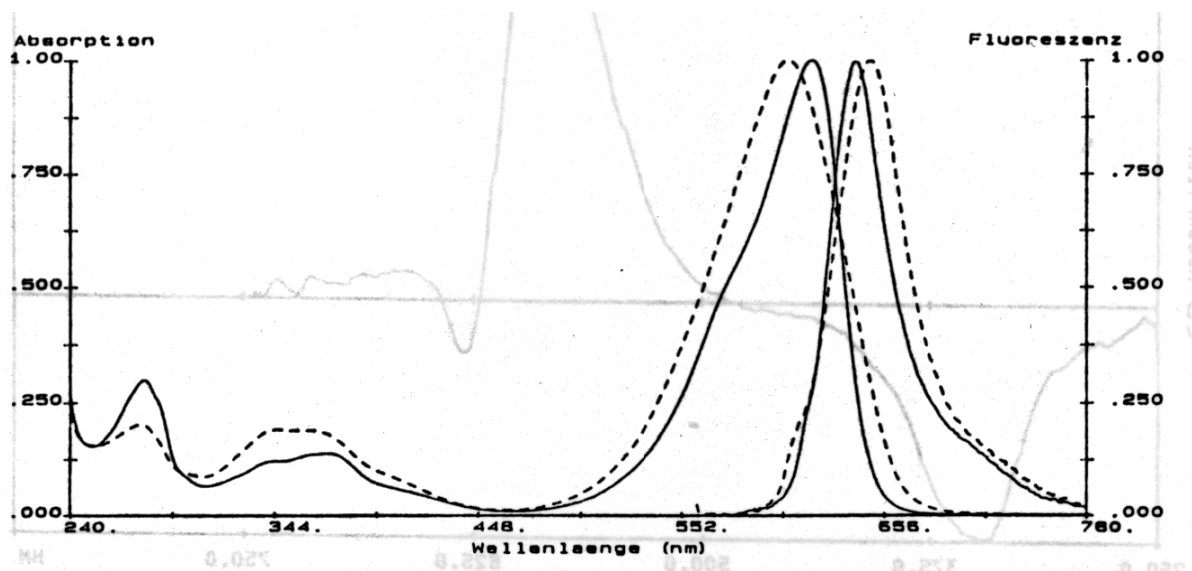


Abb. 1-9: Normierte Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der α - (—) und der β -UE (---) von PC. Messbedingungen: 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7, Anregung für α -UE bei 615 nm, für β -UE bei 610 nm, (Grafik aus Fischer, 1990)

Die Vis-CD Spektren unterscheiden sich zwischen dem PC_{tri} (Abb. 1-10A) und dem PC_{mono} (Abb. 1-10B) im Wesentlichen durch die Schulter an der rechten Flanke des positiven Extremums des PC_{tri}, welche beim PC_{mono} nicht auftritt. Sie entsteht durch die Interaktion

zwischen den Monomeren, wahrscheinlich (Siebzehnrübl, 1990) durch die excitonischen Kopplung zwischen PCB- α 84 und PCB- β 84 zweier benachbarter Monomere im Trimer (Sauer & Scheer, 1988). Die Signalintensität des PC_{denat} ist deutlich geringer, als die des PC_{nat}, auch hier fehlt die Nebenbande (Abb. 1-12). Die Vis-CD Spektren der α und der β -UE verlaufen ähnlich (Abb. 1-11), wie die des integralen PCs. Jedoch ist das positive Extremum der β -UE deutlich rotverschoben gegenüber der α -UE, und beiden fehlt, wie dem Spektrum von PC_{mono}, die Nebenbande.

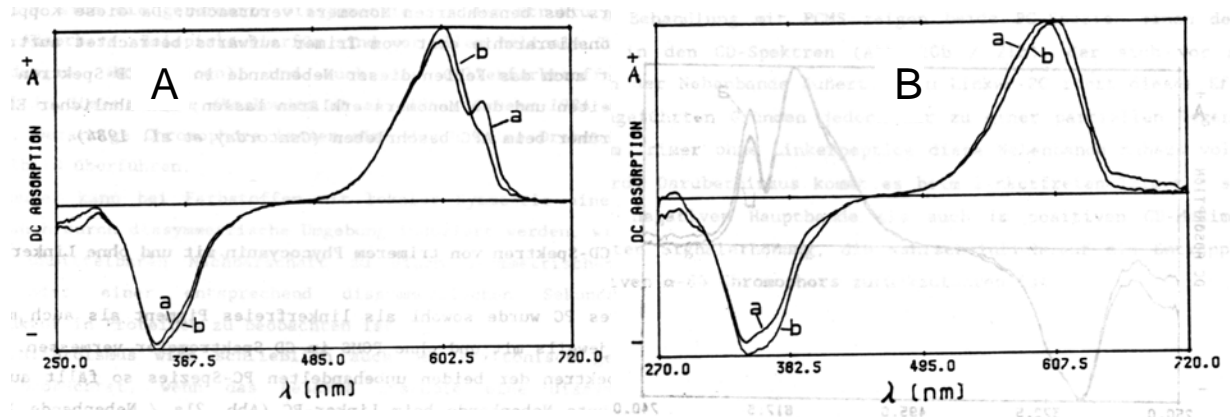


Abb. 1-10: Vis-CD Spektren von PC aus *M. laminosus*, a ohne und b mit PCMS. a ist für diese Arbeit zu beachten. A) PC_{tri}, B) PC_{mono}. (Grafiken aus Siebzehnrübl, 1990)

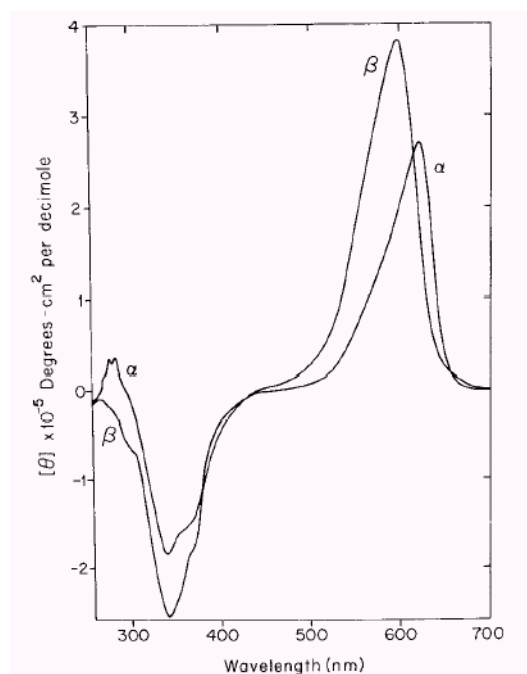


Abb. 1-11: Vis-CD Spektren der α - und der β -UE von PC aus *Synechococcus* sp. (*Anacystis nidulans*)
Messbedingungen: 0,01 M Phosphatpuffer, 0,005 M β -Mercaptoethanol, pH 6,5;
Proteinkonzentration: β -UE = $2,53 \cdot 10^{-5}$, α -UE = $2,65 \cdot 10^{-5}$ M, (Grafik aus Glazer, 1973b).

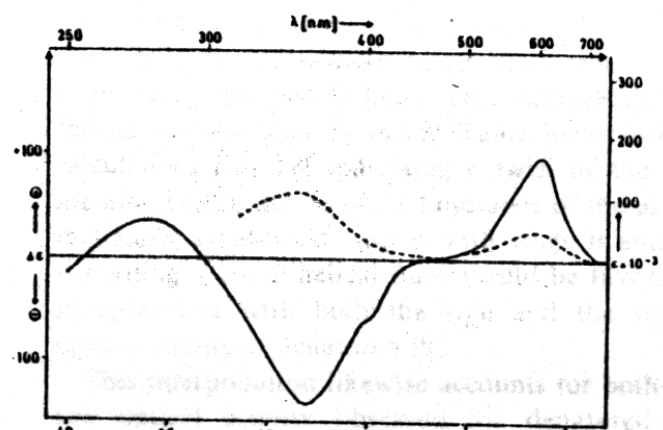


Abb. 1-12: Vis-CD Spektrum (—) und Absorptionsspektrum (.....) von PC_{denat} aus *Spirulina platensis*. Messbedingungen: 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7, 8 M Harnstoff, RT, Proteinkonzentration: $4 \cdot 10^{-6}$ M. (Grafik aus Lehner, 1983)

Die Emissionsspektren von PC_{tri} und PC_{mono} (Abb. 1-13 A, B) zeigen kaum Unterschiede (Pizarro & Sauer, 2001). Lediglich ist in diesem Beispiel das Maximum des PC_{mono} gegenüber dem PC_{tri} um 5 nm, von 650 nm auf 645 nm, rot verschoben. Diese Verschiebung tritt nicht immer auf (siehe auch diese Arbeit). Bei der Emission der UE ist die α -UE (641 nm) in dem dargestellten Beispiel (Abb. 1-9) gegenüber der β -UE (649 nm) 8 nm rot verschoben. Wie bereits erläutert (Kap. 1.5) ist in einem entfaltenen Biliprotein keine Fluoreszenz mehr sichtbar, dies gilt für das integrale PC genauso, wie für die UE.

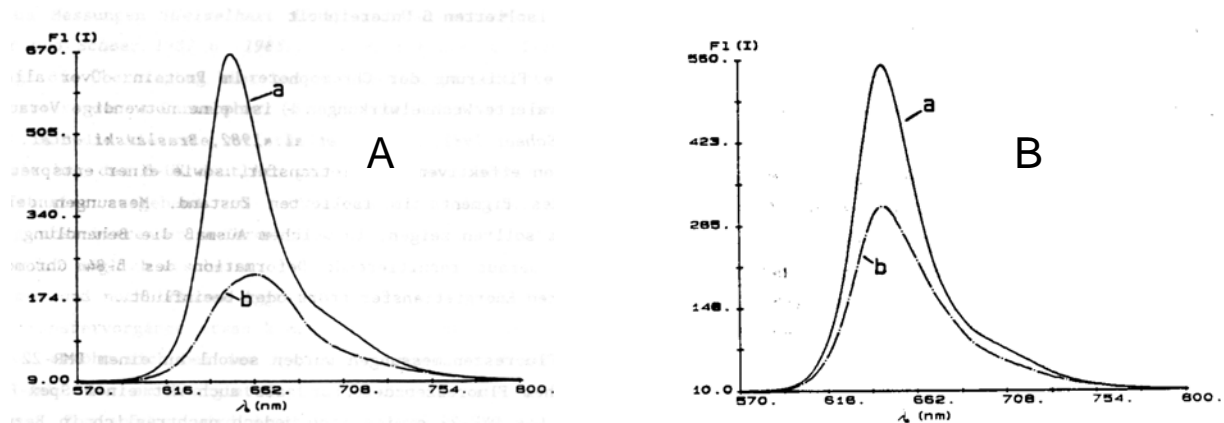


Abb. 1-13: Emissionsspektren von PC aus *Mastigocladus laminosus*. a ohne und b mit PCMS. a ist für diese Arbeit zu beachten. A) PC_{tri}, B) PC_{mono}. (Grafiken aus Siebzehrübl, 1990)

Das UV-CD zeigt von PC_{nat} eine klares α -Helix Spektrum, bei ca. 222 nm hat es bei Lehner & Scheer, 1983 einen ϵ von ca. $2,7 \cdot 10^3$ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]. Im PC_{denat}, bei dem keine Sekundärstruktur mehr vorhanden ist, liegt der Wert nahe Null (Lehner & Scheer, 1983), wie dies grundsätzlich für Proteine gilt (Cantor & Schimmel, 1980; Jirgensons, 1973; Kelly & Price, 1996).

Jedoch muss dabei bedacht werden, dass die Messbedingungen, wie pH-Wert, Puffer, Pufferkonzentration, Proteinkonzentration, verwendete Organismen etc. teilweise von den Messbedingungen dieser Arbeit abweichen und sich zwischen den dargestellten Beispielen unterscheiden. Deshalb ist ein uneingeschränkter absoluter Vergleich der Messwerte nicht möglich. Die Abhängigkeit der Messergebnisse von Messbedingungen wird in dieser Arbeit noch dargestellt.

1.9. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es ein Entfaltungsmodell für PC zu entwickeln. Dafür sollten sowohl steady-state als auch kinetischen Messungen heran gezogen werden. Wie oben gezeigt, existieren zwar eine Reihe von steady-state Entfaltungsversuchen an PC, jedoch sind diese nicht uneingeschränkt als Grundlage für kinetische Experimente zu verwenden. Zum einen wurden die Messungen bei unterschiedlichen, manchmal nicht genau definierten, Bedingungen durchgeführt und PC aus verschiedenen Organismen verwendet (Kap. 1.8.). Zum anderen fanden viele dieser Untersuchungen zu einer Zeit statt (siebziger Jahre) in der die Existenz von Linkerproteinen noch unbekannt war und diese Ergebnisse somit von unklarer Relevanz sind. Kinetische Entfaltungsversuche wurden an Biliproteinen bisher noch nicht durchgeführt, lediglich einige bisher unveröffentlichte Rückfaltungskinetiken. Dies bedeutet für diese Arbeit, dass a) die grundsätzlichen spektroskopischen Eigenschaften von PC in Abhängigkeit bestimmter Messbedingungen definiert werden mussten. b) steady-state Entfaltungsversuche bei definierten Messbedingungen durchgeführt wurden und c) auf diesen Grundlagen aufbauend kinetische Entfaltungsversuche mittels stop-flow Apparatur erfolgten. Abschließend wurden sowohl aus den steady-state, als auch den kinetischen Messungen erste Entfaltungsmodelle für PC entwickelt.

2. Material und Methoden

2.1. Material und Geräte

2.1.1. Material

Chemikalien und Lösungsmittel wurden in der höchstmöglichen Reinheitsstufe und destilliertem bzw. bidestilliertem Wasser verwendet.

Kaliumphosphatpuffer (KPP) und Harnstoff wurden in unterschiedlichen Konzentrationen aus Stammlösungen hergestellt. Alle weiteren verwendeten Materialien sind bei den jeweiligen Methoden aufgelistet.

Stammlösungen

Kaliumphosphatpuffer 1 M pH 7:	1 l von 1 M K_2HPO_4 0,5 l von 1 M KH_2PO_4
Harnstoff 9 M:	540,54 g/l zu H_2O_{dest} oder KPP

2.1.2. Geräte

Zentrifugation

Zentrifugen	Avanti™ J-25I, Beckmann, Krefeld Centrikon H401 von Kontron, Eching
Tischzentrifugen	Sigma 3K18C von B.Braun, Melsungen Biofuge fresco von Kendro, Hanau
Ultrazentrifuge	Sorvall Discovery 90, Kendro, Hanau
Padbergzentrifuge	Typ LE

Elektrophorese

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Elektrophoresekammer	Mini Protean II™ Dual Slab Cell, BioRad, München
Spannungsquelle	Constant Voltage Power Supply 1000/500, BioRad, München

Isoelektrische Fokussierung

Elektrophoresekammer	LKB 2117 Multiphor II, Pharmacia, Karlsruhe
Spannungsquelle	Electrophoresis Power Supply EPS 3500, Pharmacia, Karlsruhe

Säulenchromatographie

FPLC LKB-GP-10, Pharmacia, Karlsruhe
Fraktionensammler LKB-RediFrac, Pharmacia, Karlsruhe

Fotografie

Kamera für Fluoreszenzgele CCD KP161, Hitachi, Maidenhead GB
Kamera für Coomassie Blau gefärbte Gele Camedia C-1400XL, Olympus, Hamburg

sonstige Geräte

Ultraschall Sonifier W-450, Branson Ultraschall,
Dietzenbach
French-Press SLM-Aminco®, SLM Instruments, Urbana
USA
Kryostat K20/DC1, Thermo Haake, Karlsruhe
Schüttler Gyrotory G2, New Brunswick Scientific,
Nürtingen
Gefriertrocknung Micro Modulyo-230, Thermo Savant,
Waltham USA

Spektroskopie

Absorptionsphotometer 2-strahl Lambda 25, Perkin Elmer, Rodgau
UV-2401 PC, Shimadzu, Duisburg
Absorptionsphotometer Dioden Array (DAD) Tidas Spektrometer `19, J&M, Aalen
Fluoreszenzphotometer Spex Fluorolog 1680, Horiba Jobin Yvon,
München
Circular-Dichroismus-Photometer CD6, Horiba Jobin Yvon, München
Kombiniertes Photometer für Absorption, MOS 450, BioLogic, Claix Frankreich
Fluoreszenz und Circular dichroismus 1-strahl
Stop-Flow-Apparatur SFM-300, BioLogic, Claix Frankreich

2.2. Methoden zur Proteingewinnung

Alle Arbeiten mit Biliproteinen erfolgen immer im Dämmer- oder Grünlicht.

2.2.1. Aufzucht und Ernte von *Mastigocladus laminosus* (*Fischerella* PCC7603)

M. laminosus wurde bei 55 °C in Castenholzmedium (Castenholz, 1970) unter Grünlicht angezogen. Die Anzuchtanlage bestand aus 12 x 2,5 l Anzuchtflaschen, welche in einem thermostatisierten Wasserbad seitlich beleuchtet wurden. Der 12-stündige Turnus des Tag-/Nachtrhythmus war von 6 bis 18 Uhr bzw. von 18 bis 6 Uhr eingestellt. Den Anzuchtflaschen wurde eine mit CO₂ angereicherte Pressluft zugeführt (2-3% CO₂). Die Erntezeit wurde nach dem Gehalt an Biliproteinen bestimmt, welche absorptionspektroskopisch ermittelt wurden. Dabei war das Verhältnis der Biliproteinpeaks

(≈ 575 nm für PEC, ≈ 637 nm für PC, ≈ 650 nm für APC) zu den Chlorophyllpeaks (≈ 430 nm und 670 nm) entscheidend. Der Biliproteinpeak zu Chlorophyllpeaks sollte 1:1 oder größer sein. Der Gehalt an Carotinoiden (≈ 500 nm) sollte möglichst gering sein, ein hoher Gehalt zeigt einen schlechten Zustand der Algen an (z. B. CO_2 Mangel). In der Regel betrug die Wachstumszeit 4 bis 6 Wochen, und die Kultur erreichte dabei eine OD von $1,5$ bis 2 cm^{-1} für den PC-Peak.

<u>Castenholzmedium:</u>	in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, pH 7,6	[g/l]
	NaCl	0,008
	$\text{CaSO}_4 * 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,06
	$\text{MgSO}_4 * 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,10
	TitriplexI (Nitrilotriessigsäure)	0,10
	KNO_3	0,103
	Na_2HPO_4	0,111
	NaNO_3	0,689
	FeCl_3	0,2905
	<u>Mikroelementlösungsansatz: 0,5 ml/l Medium</u>	
	$\text{CaSO}_4 * 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{Na}_2\text{MoO} * 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CoCL}_2 * 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,045
	$\text{ZnSO}_4 * 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,50
	H_3BO_3	0,50
	$\text{MnSO}_4 * \text{H}_2\text{O}$	2,28
	H_2SO_4 (konz.)	0,5 ml

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 8,2 eingestellt, beim Autoklavieren stellt sich der pH auf 7,6 ein.

Die Algen wurden mit einer Padbergzentrifuge mit ca. 20.000 U/min abzentrifugiert und in ca. 30 g Portionen bei -20° C , bis zum weiteren Gebrauch, tiefgefroren.

2.2.2. Isolierung der Biliproteine

Die Biliproteine wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden isoliert. Die am Anfang benutzte Methode I wurde später zu Gunsten der Methode II aufgegeben, da diese in der Proteinanalyse (SDS-PAGE) ein PC mit höherem Reinheitsgrad lieferte.

Soweit nicht anders angegeben, erfolgten die Zentrifugationen bei 4 °C und es wurde auf Eis gearbeitet.

2.2.2.1. Methode I

(modifiziert nach Füglistaller et al., 1981)

2.2.2.1.1. Zellaufbruch mit Ultraschall

Die aufgetauten Algen (ca. 30 g) wurden in 100 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP) pH 7 aufgenommen und in ein Rosettenglas für den Ultraschall gegeben. Bei 350 W und 50% Puls wurde die Algensuspension ca. 20 min, unter Eiskühlung, beschallt, bis der Zellbrei rötlich und flüssig war. Er wurde mit 35.000 * g abzentrifugiert, und mit dem Überstand weiter gearbeitet.

2.2.2.1.2. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (ASF)

Die Fällung erfolgte auf Eis unter Magnetrührung. Das gemahlene, feinkörnig bis pulvrige, Ammoniumsulfat (AS) wurde langsam eingetragen. Der Überstand wurde zunächst mit 30% AS gefällt und anschließend noch weitere 30 min gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 35.000 * g abzentrifugiert, und mit dem Überstand weiter gearbeitet. Die AS Konzentration wurde auf 70% erhöht, weitere 30 min gerührt, und anschließend erneut mit 35.000 * g abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Dialyse

Das blaugrüne Pellet, welches die Biliproteine enthält, wurde in 5 mM KPP, pH 7, aufgenommen und drei Mal erschöpfend gegen das 500-fache des Volumens in 5 mM KPP, pH 7, bei ca. 8° C im Dunklen dialysiert und so weiter verarbeitet.

2.2.2.1.3. Auftrennung der Biliproteine über eine Anionenaustauschsäule (DEAE-Cellulose)

Das Säulenmaterial DEAE (Diethylaminoethyl Cellulose, DE 52 von Whatman) wurde auf 5 mM KPP, pH 7, equilibriert. Die Säule, auf die die Biliproteine im 5 mM KPP, pH 7, aufgetragen wurden, wurde an eine FPLC angeschlossen. Mit einer Durchflussrate von 1 ml/min wurden die Biliproteine mit einem kontinuierlichen Gradienten von 5 bis 200 mM

KPP, pH 7, innerhalb von 16 Stunden getrennt und in einem Fraktionensammler (je 10 ml) aufgefangen. Die Biliproteine werden in folgender Reihenfolge von der Säule eluiert: PEC mit Linker, PEC ohne Linker, APC, PC. Die Fraktionen wurden absorptionspektroskopisch identifiziert und entsprechend zusammengefasst. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Proteine in 70% AS gefällt und im Kühlschrank unter Lichtausschluss aufbewahrt.

2.2.2.2. Methode II

(modifiziert von Reuter, 1989 und Wiegand et al., 2002 nach Nies & Wehrmeyer, 1980)

2.2.2.2.1. Zellaufbruch mit der French-Press

Die aufgetauten Algen (ca. 30 g) wurden mit 900 mM KPP, pH 7, auf ca. 180 ml aufgefüllt und bei 1100 * g 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde ein zweites Mal mit demselben Puffer gewaschen. Anschließend wurde es in 900 mM KPP, pH 7, (1 ml/g Pellet) aufgenommen und zweimal durch die French Press, mit $13,8 * 10^6$ Pa, gepresst.

2.2.2.2.2. Inkubation und Reinigungszentrifugation

Ablösen der Phycobilisomen (PBS) von den Zellen

Die Algensuspension wurde mit 2% LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid) versetzt und ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit dem Magnetrührer gerührt.

1. Reinigungszentrifugation (Ultrazentrifuge)

Die Algensuspension wurde mit 47.000 * g bei 17 °C 20 min zentrifugiert; es wurde mit dem Überstand weitergearbeitet.

2. Reinigungszentrifugation

Der Überstand wurde mit 150.000 * g bei 17 °C 30 min zentrifugiert; es wurde mit dem Überstand weiter gearbeitet.

2.2.2.2.3. Saccharose Dichtegradientenzentrifugation (15% und 25%)

Der Überstand aus der 2. Reinigungszentrifugation wurde mit 15% Saccharose (w/v) versetzt. 900 mM KPP, pH 7, wurden mit 25% (w/v) Saccharose versetzt. Jedes Zentrifugenröhrchen (Material: Pollyallomer) wurde mit 24 ml der 25%-igen Saccharoselösung, 900 mM KPP,

pH 7, gefüllt und mit 12 ml der 15%-igen Saccharose-Algensuspension überschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 300.000 * g, 17 °C, über 18 Stunden. Die sedimentierten PBS wurde mit 900 mM KPP, pH 7, versetzt. Zur Reinigung wurde diese Lösung bei 17 °C, 22.000 * g 17 Stunden zentrifugiert. Das Pellet wurde in H₂O_{dest} aufgenommen, dabei dissoziieren die PBS in die Phycobiliproteine. Die Phycobiliproteinlösung kann wahlweise mittels Dialyse (gegen 5 mM KPP oder H₂O_{dest}, pH 7) oder mit einer Entsalzungssäule (Sephadex G25 von Amersham Pharmacia Biotech) entsalzt werden. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die Lösung bei -20° C eingefroren.

Die weitere Auftrennung erfolgt, wie bei Methode I, über eine DEAE-Säule.

2.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

(nach Lämmli, 1970)

Ca. 100µl 3,5 M Biliproteine wurden mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und mit ca. 150 µl SDS-PAGE-Auftragspuffer (4-fach Lämmli-Puffer) versetzt, 10 min in einem Wasserbad gekocht und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Das Mini-Gel, 0,75 mm dick, Laufstrecke 15 cm, bestand aus einem 5%-igen (w/v) Sammelgel und einem 15%-igen (w/v) Trenngel. Die Laufzeit betrug zunächst für das Sammelgel 30 min bei 50 V, dann für das Trenngel ca. 90 min bei 150 V.

Sammelgel (5%)

16,7% (v/v)	rotiphorese® Gel 30 (Roth) (29,2:0,8% w/w Acrylamid/Bisacrylamid)
125 mM	Tris/HCl pH 6,8
0,1% (w/v)	SDS (Roth)
0,05% (w/v)	APS (Roth)
0,05% (v/v)	TEMED (Roth)

Trenngel (15%)

50% (v/v)	rotiphorese® Gel 30 (Roth) (29,2:0,8% w/w Acrylamid/Bisacrylamid)
375 mM	Tris/HCl pH 8,8
0,1% (w/v)	SDS
0,05% (w/v)	APS
0,1% (v/v)	TEMED

2.2.4. Sepharose-Säule: Entfernen der Biliproteinlinker

Das Biliprotein in der 70%-igen AS-Lösung wurde mit 26.000 * g abzentrifugiert, in H₂O_{dest} resuspendiert, und entweder durch Dialyse oder mittels einer Sephadex G-25 Säule entsalzt. Die Biliproteinlösung wird auf 4 M Harnstoff gebracht und 1 Stunde bei RT unter Rühren inkubiert. Das Sepharose-Säulenmaterial (Amersham Pharmacia Biotech) wurde mit 5 mM KPP, pH 7, equilibriert. Die Biliproteinlösung wurde auf die Säule aufgetragen. Mit 5 mM KPP, pH 7 wurden die Biliproteine von der Säule eluiert und aufgefangen, während die Linkerproteine an die Säule binden. Die von Linkern befreite Biliproteinlösung wurde entsalzt (Dialyse gegen 5 mM KPP pH 7 oder über eine Sephadex-G25-Säule) und mit 70% AS gefällt. Bis zum weiteren Gebrauch wird das Protein unter ASF in einem lichtundurchlässigen Gefäß im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.5. Isoelektrische-Fokussierung: Untereinheiten Trennung

(modifiziert nach Köst-Reyes et al., 1987)

Die gesamte Fokussierung findet im Dämmer- oder Grünlicht statt. Die Fokussierapparatur wird während der gesamten Fokussierung mit Argon begast, um Oxidation der Probe zu vermeiden, und auf 4 °C gekühlt. Das Gel ist 16 cm breit und hat eine Laufstrecke von 21 cm.

Gelvorbereitung:

6 g UltrodexTM (Amersham Pharmacia Biotech) wurden in 200 ml 6 M Harnstoff (gelöst in H₂O_{dest}) eingerührt und ü. N. bei RT quellen gelassen. Von der fertig gequollenen, abgesetzten Gelmasse, wurden 50 bis 60 ml überstehendes H₂O abdekantiert. Die restliche Gelmasse wurde mit 2 ml Servalyt pH 3-7 (Serva) verrührt. Die Gelmasse wurde in eine Saugflasche gefüllt und über eine Wasserstrahlpumpe entgast. In die Gelkammer wurden mit 6 M Harnstoff getränkte Filterstreifen (1-1,5 mm dick, 1 cm breit, Whatman Papier) sowohl an der Kathoden, als auch der Anodenseite gelegt. Anschließend wurde die Gelkammer mit der Gelmasse befüllt. Die Gelmasse muss durch Verdunsten (stehen lassen ü. N.) 20 bis 30% an Gewicht verlieren (Gewichtskontrolle!), dabei konzentriert sich der 6 M Harnstoff auf 7 bis 8 M auf. Die Filterstreifen werden dann durch in Anodenpuffer und Kathodenpuffer getränkte Filterstreifen ausgetauscht.

Vorfokussierung:

Um den pH-Gradienten (pH 7 Anodenseite bis pH 3 Kathodenseite), auszubilden, wird die Gelmasse vorfokussiert (1500 V, 40 mA, 15 W und 1100 V/h). Das Ende der Vorfokussierung ist erreicht, wenn die Stromstärke (A) auf ein Drittel gesunken ist bzw. die Stromspannung pro Stunde (V/h) den eingestellten Wert von 1100 V/h erreicht hat.

Probenvorbereitung:

20 bis 30 mg entlinkertes PC aus der 70% ASF wurden bei 26.000 * g abzentrifugiert, in H₂O_{dest} resuspendiert und gegen H₂O_{dest} dialysiert (drei Mal erschöpfend gegen das 500-fache des Volumens). Die völlig entsalzte Probe wurde gefriergetrocknet. Aus der Fokussierapparatur wurde auf der Anodenseite ein 2 cm breiter Streifen über die gesamte Breite der vorfokussierten Gelmasse entnommen. Die gefriergetrocknete Probe wurde mit 1 bis 2 ml 8 M Harnstoff (gelöst in H₂O_{dest}) aufgenommen und mit der entnommenen vorfokussierten Gelmasse ca. 15 min bei RT auf dem Magnetrührer gerührt.

Fokussierung:

Die vorbereitete Probe wurde in den freien Streifen Gelmasse (siehe Probenvorbereitung) gefüllt und bis zur Trennung der Untereinheiten (UE) fokussiert. Das Ende des Laufs ist erreicht, wenn sowohl die α -, als auch die β -UE ihren isoelektrischen Punkt (pI) auf dem pH Gradienten erreicht hat: pI der α -UE: $6,10 \pm 0,05$ und der β -UE: $5,00 \pm 0,05$ (Köst-Reyes et al., 1987) bzw. wenn die V/h Einstellung von 4000 erreicht ist. Einstellungen des Power Supply waren: 1500 V, 40 mA, 15 W und 4000 V/h.

Untereinheitenisolierung aus dem Gel:

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die jeweiligen gut sichtbaren blauen Banden der α und β -UE (β -UE wandert aufgrund des geringeren pI Wertes auf dem pH Gradienten weiter Richtung Kathode, als die α -UE) separat entnommen und jeweils ca. 15 min in etwa 15 bis 20 ml 50 mM KPP pH 7 bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung über einen Faltenfilter gegeben und mit 50 mM KPP gespült, bis die Gelmasse farblos war. Dabei stand das Auffanggefäß mit dem Filter auf Eis. Die filtrierte Probe wurde gegen 50 mM KPP pH 7 erschöpfend dialysiert, wobei der ersten Dialyse 2 bis 4 mM β -Mercaptoethanol als Oxidationsschutz zugegeben wurden. Zum Aufbewahren der Proben, wurden diese wiederum mit ASF bis zu einer 70%-igen Sättigung versetzt und in einem lichtundurchlässigen Gefäß im Kühlschrank aufbewahrt.

2.3. Messreihen zur Proteinfaltung

2.3.1. Messreihen zu unterschiedlichen Kaliumphosphatpuffer-Konzentrationen

Stammlösungen:

PC Stammlösung: $c = 1,71 \cdot 10^{-5}$ M in 1 mM KPP, pH 7

KPP: $c = 1000$ mM, pH 7

H₂O_{dest}

Verdünnungsreihe: Titration von PC mit 1,1 mM KPP bis 900 mM KPP; Verdünnung 1:10

PC Stammlösung ($1,71 \cdot 10^{-5}$ M)	KPP 1000 mM, pH 7	H ₂ O _{dest}
1 Anteil	9 Anteile minus Anteile H ₂ O _{dest}	9 Anteile minus Anteile KPP

Messung:

Gemessen wurden die Absorptions-, Vis-CD- und Emissionsspektren von PC bei verschiedenen Pufferkonzentrationen. Die Pufferkonzentration nahm dabei von 900 mM KPP bis 1,1 mM KPP schrittweise um je ca. ein Drittel ab. Die Messung erfolgt im jeweiligen Spektrometer (Kap. 2.1) in 1 nm Schritten, in 1 cm⁻¹ Quarzküvetten. Bei den Fluoreszenzmessungen erfolgte, sofern die Messungen im Spex Fluorolog 1680, Horiba Jobin Yvon, München durchgeführt wurden, eine weitere Verdünnung von 1:10. Weitere Details der Geräteeinstellungen stehen an entsprechender Stelle im Ergebnisteil.

2.3.2. Extinktionskoeffizienten Bestimmung

Der Extinktionskoeffizient (ϵ) des (quasi freien) PCB im entfalteten Protein in 8 M Harnstoff, pH 1,9 und RT beträgt bei 660 nm $35,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Schluchter & Bryant, 2002). Es befinden sich drei Chromophore in einem PC_{mono} (Kap. 1.4). Aus einer Stammlösung $c_{\text{PC}} = 1,54 \cdot 10^{-5}$ M wurde je ein Aliquot von 300 μl für die interessierende Lösung entnommen und 1:9 mit 50 mM KPP und/oder 9 M Harnstoff pH 7,7 verdünnt. Die Referenzlösung wurde aus dem Aliquot mit 9 M Harnstoff pH 1,9 1:9 verdünnt. Der jeweilige ϵ errechnet sich daraus wie

$$\text{folgt: } \epsilon_{xnm}^{\text{Pr obe}} = \frac{A_{xnm}^{\text{Pr obe}}}{A_{660nm}^{\text{Re f}}} * \epsilon_{660nm}^{\text{Re f}}$$

Dabei ist ϵ_{xnm} der Extinktionskoeffizient bei einer bestimmten Wellenlänge bzw. bei 660 nm der Referenz, A_{xnm} die gemessene Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge bzw. bei 660 nm der Referenz.

Alle weiteren Berechnungen für ϵ von PC bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen bzw. für die Untereinheiten erfolgen daraus mit der Formel: $\epsilon = A/c$. Dabei ist A die Absorptionsintensität und c die Proteinkonzentration.

2.3.3. Langzeitmessungen der Entfaltung von PC und Rückfaltung

Stammlösungen:

PC Stammlösung: $c = 1,54 \cdot 10^{-5}$ M in 50 mM KPP, pH 7

KPP: $c = 50$ mM, pH 7

Harnstoff: $c = 9$ M in 50 mM KPP, pH 7

Verdünnungsreihe: Titration von 4 bis 8 M Harnstoff; Verdünnung 1:9

PC Stammlösung ($1,54 \cdot 10^{-5}$ M)	KPP 50 mM, pH 7	Harnstoff 9 M in 50 mM KPP
1 Anteil	8 Anteile minus Anteile Harnstoff	8 Anteile minus Anteile KPP

Langzeitmessung:

Die Probenlösung wurde bei Raumtemperatur im Grünlicht verschlossen stehen gelassen und in gewissen Zeitabständen absorptionsspektroskopisch gemessen. Die Messung erfolgte in 1 nm Schritten in 1 cm^{-1} Quarzküvetten.

Rückfaltung:

Am Ende der Entfaltung bzw. Dissoziation wurde PC aus den 4, 5, 6, 7 und 8 M Harnstofflösung rückgefaltet, indem die Lösung für einen Tag gegen 50 mM KPP im Kühlschrank erschöpfend dialysiert wurde. Der Anteil an rückgefaltetem Protein wurde dabei quantitativ ermittelt indem die Menge des Dialysats gemessen und die Konzentration des Proteins darin, spektroskopisch ermittelt wurde.

2.3.4. Statische Dissoziations- und Entfaltungsversuche von PC und den Untereinheiten in Harnstoff, bei verschiedenen Pufferkonzentrationen

Stammlösungen:

KPP: $c = 3$ bzw. 50 bzw. 300 mM, pH 7

Harnstoff: $c = 9$ M in 3 bzw. 50 bzw. 300 mM KPP

PC und UE Stammlösung: $c = 1,54 \cdot 10^{-5}$ M in 3 bzw. 50 bzw. 300 mM KPP

Verdünnungsreihe: 0 bis 8 M Harnstoff; Verdünnung: 1:9

Stammlösung ($1,54 \cdot 10^{-5}$ M)	KPP x mM, pH 7	Harnstoff 9 M in x mM KPP
1 Anteil	8 Anteile minus Anteile Harnstoff	8 Anteile minus Anteile KPP

Messungen:

Gemessen wurde das Absorptions-, das Vis-CD, das Emissions- und das UV-CD Spektrum. Die Messung erfolgt im jeweiligen Spektrometer (Kap. 2.1) in 1 nm Schritten. Für die Absorption, das Vis-CD und die Emission in 1 cm^{-1} Quarzküvetten, für das UV-CD in einer 1 mm^{-1} Quarzküvette. Bei den Fluoreszenzmessungen erfolgte, sofern die Messungen im Spex Fluorolog 1680, Horiba Jobin Yvon, München durchgeführt wurden, eine weitere Verdünnung von 1:10. Weitere Geräteeinstellungen stehen im jeweiligen Ergebnisteil.

Mathematische Auswertung:

Korrektur der Spektren:

- Vis-CD Spektren wurden nach der Adjacent Averaging Methode geglättet, je nach Stärke des Rauschens der Messung mit 5 bis 11 Punkten.
- Bei den UV-CD Spektren wurden 3 bis 5 Messungen gemittelt und diese mit der Adjacent Averaging Methode mit 3 Punkten geglättet.

Software: Origin Version 7 SRO (OriginLab Corporation)

Q-Wert Berechnungen:

Definition des Q-Wertes: Absorption des langwelligen Maximums geteilt zur Absorption des UV-Nahen Maximums ($A_{\text{vis}}/A_{\text{nuv}}$); Er stellt ein Maß für den Grad der Entfaltung von Biliproteinen dar (Scheer, 1982, 1977; Kap. 1.8.).

Q-Wert: PC \approx 6-7, PC_{denat} \approx 0,4

Normierung der Signaländerung während des Reaktionsverlaufs:

Vis-CD und Emission: Angegeben ist das Verhältnis des Signals im Maximum bei einer bestimmten Harnstoffkonzentration, zum Signal des Monomers.

Dabei ist der Wert des Monomers auf 1 normiert. $y = \frac{A_{xM}}{A_{\text{mono}}}$

UV-CD: Angegeben ist das Verhältnis des Signals bei 222 nm bei einer bestimmten Harnstoffkonzentration zum Signal des PC_{tri}. Dabei ist der Wert von PC_{tri} (0 M Harnstoff) auf -1 normiert. $y = \frac{A_{xM}}{A_{0M}}$

$$y = \frac{A_{xM}}{A_{0M}}$$

y entspricht dem Wert auf der y-Achse, A_{xM} dem Messwert bei x M Harnstoff und A_{0M} dem Messwert bei 0 M Harnstoff, A_{mono} dem Messwert von PC_{mono}.

Absorption: Angegeben ist der Q-Wert bei der jeweiligen Harnstoffkonzentration.

Berechnung des entfalteten Anteils des Proteins:

Berechnung des Anteils der Signaländerung: $Anteil_{entfaltet} = \frac{A_1 - A_{xM}}{A_1 - Endwert}$,

dabei ist Anteil_{entfaltet} der nach dem Zwei-Zustands-Modell erwartete Anteil des Proteins im entfalteten Zustand nach den jeweiligen Kriterien des Messparameters. A₁ der Wert des jeweiligen Messparameters für das native Protein, A_{xM} der Wert in Gegenwart von Harnstoff in einer Konzentration von x-molar, und ‚Endwert‘ der Wert im entfalteten Zustand am Ende der Entfaltungsreaktion.

Fit der Titrationskurven für die Pufferkonzentrationen 3, 50 und 300 mM:

Für den Verlauf der Titration von PC mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen wurden für die Absorption entweder die langwelligen Maxima, kurzwelligen Maxima oder der Q-Wert, für das Vis-CD positives Extremum, negatives Extremum oder Gesamtamplitude (Summe negatives und positives Extremum), für die Emission die Amplituden und für den UV-CD der Wert bei 222 nm, gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen.

Fit:

Wann welcher Fit verwendet wurde steht bei den jeweiligen Ergebnissen im Ergebnisteil.

Gefittet wurde der sigmoidale Verlauf mit der logistic Funktion: $y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$,

dabei ist A₁ der Anfangswert der Reaktion: Natives Protein; A₂ der Endwert: Entfaltetes Protein; x₀ der Wendepunkt bei einer bestimmten Harnstoffkonzentration, x eine bestimmte Harnstoffkonzentration (x-Achse) und p die Steilheit der Kurve im Wendepunkt x₀.

Der exponentielle Verlauf wurde mit dem exp decay gefittet: $y = y_0 + Ae^{-\frac{(x-x_0)}{t}}$,

dabei ist y_0 der offset der y-Achse, A die Amplitude, x eine bestimmte Harnstoffkonzentration (x-Achse), x_0 der Mittelwert von x und t die Zeitkonstante zur Amplitude A.

Software: Origin Version 7 SRO (OriginLab Corporation)

Sekundärstruktur-Berechnungen aus den UV-CD Spektren

Aus den UV-CD Spektren wurden die Sekundärstrukturanteile von PC und den UE bei der jeweilige Harnstoffkonzentration berechnet. Die Analyse erfolgte nach Sreeram (Sreeram & Woody, 1993, 1999, 2000) mit der Software CDPRO Version Juli 2001.

CDPRO beinhaltet drei Programme zur Analyse der Sekundärstruktur (Selcon3, CDSSTR und CONTIN), aus deren Mittelwert das Endergebnis gewonnen wird. Als Referenzproteine diente IBasis 7 nach Johnson et al., Keiderling et al., Yang et al., Sreeram et al. (keine Jahresangaben, download aus dem Internet 2001). Die Eingaben in das Programm wurden entsprechend der Anleitung „CDPRO User Manual“ von E. Bucci (download aus dem Internet 2001) vorgenommen. Die einzugebenden Werte mussten von der Arbeitseinheit Absorption: ΔE [mm^{-1}] bzw. Elliptizität: Θ [mdeg mm^{-1}] ($\Delta E = \Theta/33$) auf den molaren Extinktionskoeffizienten je Aminosäure $\Delta \epsilon_{AS}$ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$] umgerechnet werden:

$\Delta \epsilon = \frac{\Delta E}{c * AS * d}$; dabei ist c die Konzentration des Proteins [M], AS die Anzahl der

Aminosäuren je Protein und d die Länge des Strahlenganges [cm].

Fit der Titrationskurve der Sekundärstruktur-Berechnung:

Aus den Ergebnissen (sowohl gefaltete Anteile, als auch ungefaltete; Details stehen im Ergebnisteil) wurde eine Titrationskurve von 0 bis 8 M Harnstoff erstellt. Der sigmoidale Fit

erfolgte ebenfalls nach der logistic Funktion: $y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (\frac{x}{x_0})^p} + A_2$ (siehe oben)

2.3.5. Kinetik der Entfaltung von PC, der α und der β -Untereinheit

Stammlösungen:

PC_{tri}: c = $1,54 * 10^{-5}$ M in 50 mM KPP, pH 7, 0 M Harnstoff

PC_{mono}: c = $8,9 * 10^{-6}$ M in 50 mM KPP, pH 7, 4 M Harnstoff

α -UE: $c = 2,13 \cdot 10^{-5}$ M in 50 mM KPP, pH 7, 4 M Harnstoff (für Absorptions- und Emissionsmessungen)
 $c = 4,26 \cdot 10^{-5}$ M in 50 mM KPP, pH 7, 4 M Harnstoff (für Vis-CD Messungen)
 β -UE: $1,29 \cdot 10^{-5}$ M in 50 mM KPP, pH 7, 4 M Harnstoff
Harnstoff: $c = 9$ M in 50 mM KPP, pH 7

Verdünnung je Messung in der stop-flow Apparatur:

Endkonzentration von Harnstoff: 8 M

⇒ für PC_{tri}: 1 Anteil Stammlösung plus 8 Anteile Harnstoff

⇒ für PC_{mono}, α -UE und β -UE: 1 Anteil Stammlösung plus 4 Anteile Harnstoff

Messung:

Die Entfaltungskinetik des Proteins in 8 M Harnstoff, die bei einer Wellenlänge gemessen wurde, erfolgte im Spektrometer MOS 450, mit einer stop-flow Apparatur SFM-300. Dabei wurde die Signaländerung der Absorption, des Vis-CDs, der Emission und des UV-CDs während der Entfaltung des Proteins, über die Zeit erfasst. Die Messungen erfolgten bei charakteristischen Wellenlängen (genaue Angaben in Kap. 3.9.1.). Die absorptionsspektroskopische Messung welche simultan den gesamten Wellenlängenbereich von 320 nm bis 850 nm erfasste, wurde in einem Dioden Array Spektrometer mit der gleichen stop-flow Apparatur SFM-300 gemessen.

Geräteeinstellungen:

Spektrometer MOS-450 mit stop-flow Apparatur: Das Gesamtmessvolumen pro Messung lag, je nach Messreihe, zwischen 202 und 225 μ l, die Flussrate zwischen 5,4 und 7,4 ml/s, die Totzeit betrug dabei 6,6 bis 8,5 ms. Die Time base war, sofern nicht anders angegeben, in drei Bereiche unterteilt, sie stieg von μ s bei Messbeginn zu s Intervalle am Ende der Messung an. Die Schichtdicke betrug für die Absorption, das Vis-CD und die Emission 1 cm, für das UV-CD 2 mm, in Quarzküvetten.

Dioden-Array Detektor mit stop-flow Apparatur: Das Gesamtmessvolumen pro Messung lag bei 211 μ l, die Flussrate bei 7,4 ml/s, die Totzeit betrug dabei 6,1 ms. Die Time base war in drei verschiedene Messintervalle unterteilt, sie reichte von ms bei Messbeginn zu s Intervalle am Ende der Messung an. Der Strahlengang betrug 1 cm in einer Quarzküvette.

Die detaillierten Messangaben stehen bei den jeweiligen Messungen im Ergebnisteil.

Mathematische Auswertung:

Faktorisierung der Absorptionsdaten des DAD:

Um die Messdaten auswerten zu können wurden sie in das Fitprogramm Specfit/32 importiert. Die Daten des DAD wurden dabei nach der Methode der „Singular Value Decomposition (SVD)“ faktorisiert (Binstead et al., 2000-2002).

Fit der Messkurven:

Die Messkurven wurden mit dem Modell einer Reaktionskinetik gefittet. Die verschiedenen Modelle stehen im Ergebnisteil. Entweder erfolgte ein lokaler Fit. Dabei wurden die Messkurven, welche bei einer Wellenlänge erfasst wurden, einzeln gefittet. Oder es erfolgte ein globaler Fit. Dabei wurde die Absorptionsdaten des DAD über den gesamten gemessenen Wellenlängenbereich (≈ 320 nm bis 800 nm) und Zeitbereich global gefittet. Und die Vis-CD Messungen der einzelnen Wellenlängen zusätzlich zu den lokalen Fits, global gefittet. Details zu den Auswertungen stehen zusätzlich an entsprechender Stelle im Ergebnisteil.

Das Ergebnis der mathematischen Analyse war je Reaktionsmodell:

- Ratenkonstanten k_i [s^{-1}]
- Amplituden A_i der jeweiligen Komponenten (Einheit entsprechend des Messparameters)
- Konzentrationsverlauf der einzelnen berechneten Komponenten des Fits
- Residuen: Differenz der Messkurve zum Fit

Fitprogramm: Specfit/32 Version 3.2 von Spectrum Software Associates (Binstead et al., 2000-2002; Gampp et al, 1985a, 1985b, 1985c, 1986, 1987, 1988).

In welchem Größenbereich die errechneten Ratenkonstanten noch eine realistische Größe darstellen hängt von der Messzeit und dem Messintervall ab. Generell gilt, dass für eine Ratenkonstante mindestens 5 Messpunkte vorhanden sein sollten und die Messzeit ca. das 10-fache der Halbwertszeit beträgt. Davon abweichende Ratenkonstanten wurden zwar nicht grundsätzlich verworfen, aber mit entsprechender Vorsicht unter Hinweis verwendet.

Berechnung der relativen Amplitude der Fitkomponenten:

Es gab zwei Varianten von relativen Amplituden ($A_{rel.}$) (relative Ab- bzw. Zunahme des jeweiligen Messparameters). Bei der einen bezieht sich die relative Amplitude immer auf den Anfangswert der Reaktion, bei der anderen auf die jeweilige vorherige Komponente des Fitmodells.

bezogen auf den Anfangswert: $A_{nat / gesrel} = \frac{A_1 - A_x}{A_1 - Endwert}$;

bezogen auf die jeweilige vorherige Komponente: $A_{Fit : i / Fit : i + 1rel} = \frac{A_x - A_{x+1}}{A_1 - Endwert}$,

dabei ist A_1 der Anfangswert der Reaktion (natives Protein). A_x der Amplitudenwert der durch den Fit bestimmten Komponente der Entfaltungsreaktion, und Endwert der Wert, welcher am Ende der Entfaltungsreaktion gemessen wurde. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Messreihen werden an entsprechender Stelle im Ergebnisteil angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Phycocyanin: Beschreibung des Systems für Entfaltungsversuche

Die ersten Versuchsreihen dienten dazu, die Bedingungen für die Denaturierungsversuche fest zu legen und erste Erkenntnisse über die Manipulierbarkeit des Systems Phycocyanin zu erhalten. Darüber hinaus erfolgte eine statische, spektroskopische Beschreibung des Systems, welche als Grundlage für die kinetischen Messungen dient. Als konstante Parameter wurden, falls nicht anders angegeben, pH-Werte von 7,3 bis 7,6 und Raumtemperatur verwendet. Gepuffert wird das System mit Kaliumphosphat. (Reuter, 1989; Parbel, 1997).

3.1.1. Stammlösungskonzentration

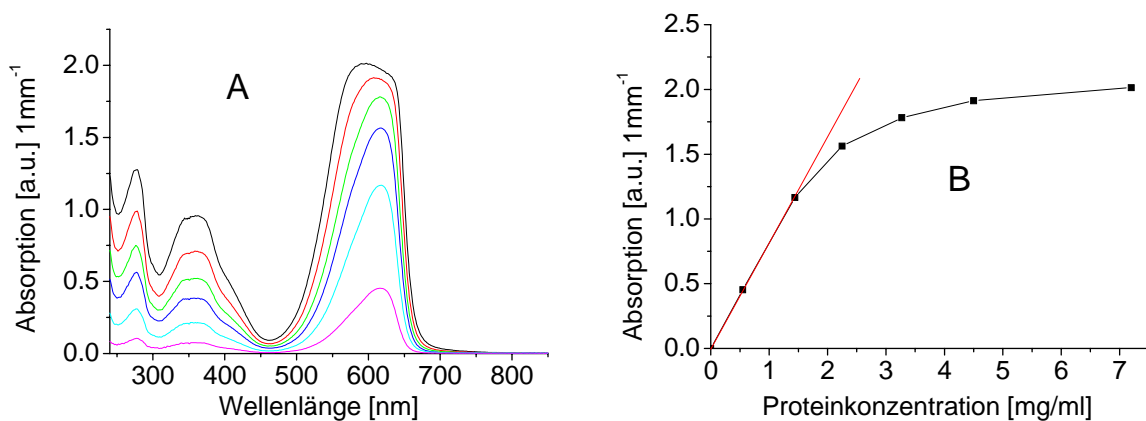


Abb. 3-1: PC Konzentration: A) die Absorptionsspektren in 1mm Küvette, 50 mM KPP, pH \approx 7,3, RT, B) OD in 1 mm Küvette aufgetragen gegen die Proteinkonzentration [mg/ml] (—), theoretischer, linearer Verlauf der Absorptionzunahme bei Proteinkonzentrationszunahme nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz (—).

Da PC ein stark fluoreszierendes Protein ist, sind bereits bei relativ geringen Konzentrationen Abweichungen vom Lambert-Beerschen-Gesetz möglich. Das Licht der Fluoreszenz, auch in Vorwärtsrichtung ausgesandt, mindert die gemessene Absorption. Die Konzentration der Messlösungen muss deshalb in dem Bereich liegen, in welchem die Absorption noch nicht beeinträchtigt wird. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Photometern steigt die Absorption bis zu einer Konzentration von 1,44 mg/ml, gemessen in einer 1mm Küvette, linear an und nähert sich dann der Sättigung (Abb. 3-1). Bei Messungen in 1 cm Küvetten, welche für alle Arbeiten außer im fernen UV verwendet wurden, entspricht das einer maximalen Konzentration von 0,144 mg/ml. Die Konzentrationen bei den Messungen liegt, sofern nicht anders angegeben, beim integralen PC und teilweise bei den UE bei 0,06 mg/ml bzw.

$1,7 \cdot 10^{-6}$ M, und liegt damit weit unterhalb dieser Grenze. Sie ergibt sich aus einer 1:9 Verdünnung der Stammlösung (0,55 mg/ml bzw. $1,54 \cdot 10^{-5}$ M). Die Abweichungen hiervon, bei den kinetischen Messungen der UE, liegen zumeist in ihrem niedrigeren ϵ gegenüber dem integralen PC begründet. (Details siehe Kap. 1, 2 und Ergebnisteil für die UE). Die OD befinden sich dabei ebenfalls deutlich unterhalb der Grenze, ab der das Lambert-Beersche-Gesetz nicht mehr zutrifft.

3.1.2. Auswirkungen der Konzentration von Kaliumphosphatpuffer auf das Trimer-Monomer-Gleichgewicht von PC

Das wasserlösliche Protein PC liegt in KPP gelöst vor. Das Trimer-Monomer-Gleichgewicht lässt sich sowohl durch die Proteinkonzentration, wie auch durch die Pufferkonzentration verschieben (MacColl & Friar, 1987; Mac Coll et al., 1971). Die Auswirkungen des Puffers auf das Trimer-Monomer-Gleichgewicht von PC wurden in einem Konzentrationsbereich von 1,1 bis 900 mM KPP gemessen.

3.1.2.1. Circular dichroismus

Vis-CD

Wie in Kapitel 1.8. gezeigt, unterscheidet sich das Spektrum des Trimers von dem des Monomers durch die Schulter bei etwa 627 nm. Die 1. Ableitung des Vis-CD Spektrums stellt ein sensibles Verfahren dar, um das Signal bei 627 nm zu verstärken (Abb. 3-3), eine weitere Möglichkeit dazu bietet das Differenzspektrum von Trimer und Monomer (Abb. 3-4)

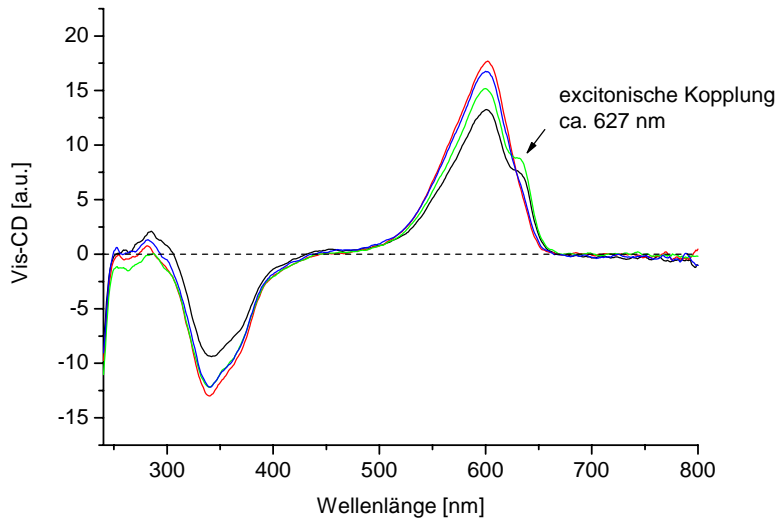


Abb. 3-2: Vis-CD Spektren: PC in 900 mM KPP (—), 30 mM KPP (—), 3,1 mM KPP (—), 1,1 mM KPP (—).

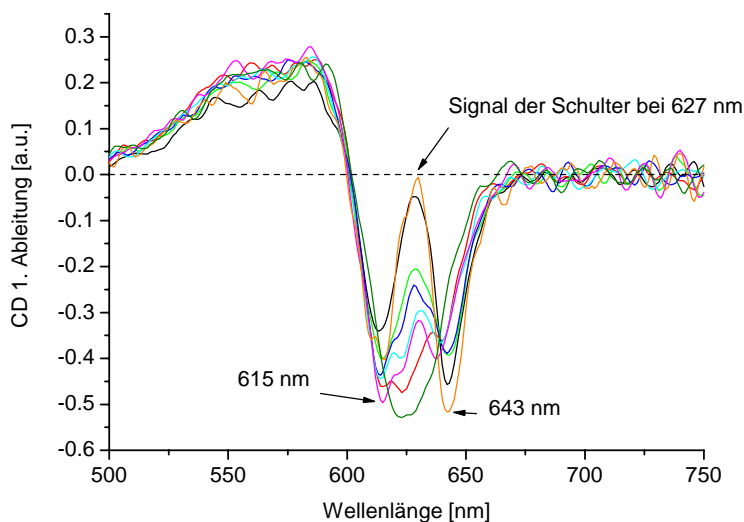


Abb. 3-3: 1. Ableitung der CD-Spektren von PC in 900 mM KPP (—), 30 mM KPP (—), 6,1 mM KPP (—), 4,1 mM KPP (—), 3,1 mM KPP (—), 2,1 mM KPP (—), 1,1 mM KPP (—), PC_{mono} in 900 mM KPP und 4 M Harnstoff (—).

Mit abnehmender Pufferkonzentration verringert sich die Schulter bei ≈ 627 nm bis sie fast völlig verschwindet (Abb. 3-2, 3-3), in Folge nimmt das positive Extremum zu (Abb. 3-2, 3-5). Das charakteristische s-förmige Signal im Differenzspektrum von Trimer und Monomer (Abb. 3-4) nimmt ebenso ab. In der 1. Ableitung des Spektrums (Abb. 3-3) ergibt die Überlagerung beim Trimer ein W-förmiges Signal, welches bei abnehmender Pufferkonzentration in eine breite, negative Bande übergeht. Als Vergleich ist das Spektrum in 4 M Harnstoff gezeigt, bei dem die Schulter bei 627 nm fehlt und somit kein Trimer mehr gesehen werden kann. Das negative Signal bei etwa 643 nm der W-förmigen Bande, ist bis zu

einer Konzentration von 3,1 mM KPP vorhanden, bei niedriger konzentriertem Puffer uneinheitlich blauverschoben. Das Signal bei etwa 615 nm der W-förmigen Bande ist bei allen Pufferkonzentrationen vorhanden, nur in seiner Intensität pufferkonzentrationsabhängig. Jedoch zeigt auch das Spektrum einer 1,1 mM KPP Lösung noch ein Signal in der 1. Ableitung, die auf Reste von Trimeren hindeutet. Das Vergleichsspektrum des Monomers in 4 M Harnstoff hat, im Vergleich zu den Spektren ohne Harnstoff, ein um etwa 3 nm rot verschobenes Signal bei 613 nm. Insgesamt ist die Bande der 1. Ableitung des Spektrums von PC in 4 M Harnstoff schmaler als bei den Banden ohne Harnstoff. Diese letzten beiden Ergebnisse deuten darauf hin, das 4 M Harnstoff nicht nur die Trimere dissoziiert, sondern eine Modifikation im Protein bewirkt, die zu den beschriebenen Veränderungen im Spektrum führen. Ein Phänomen, welches noch in anderen Abschnitten auftaucht und in Kap. 3.6. zusammenfassend diskutiert wird.

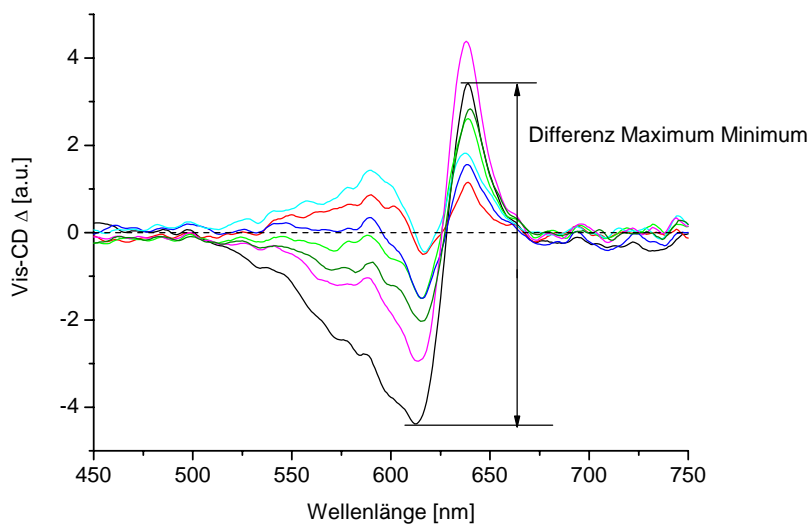


Abb. 3-4: Vis-CD Differenzspektren verschiedener PC-Lösungen: PC_{tri} minus PC_{mono} : (900 mM KPP, 4 M Harnstoff): in 900 mM KPP (—), 30 mM KPP (—), 6,1 mM KPP (—), 4,1 mM KPP (—), 3,1 mM KPP (—), 2,1 mM KPP (—), 1,1 mM KPP (—)

Die Differenzspektren (Abb. 3-4) stützen diese Schlussfolgerung. Von der 900 mM KPP Lösung bis einschließlich 4,1 mM KPP liegt ein eindeutiges Signal der excitonischen Kopplung vor, das als Beweis für den trimeren Zustand von PC angesehen wird. Die Intensität des Signals verringert sich zu niedriger konzentriertem Puffer hin (Abb. 3-4, 3-5), nimmt aber bei weiterer Verdünnung nicht mehr ab und geht in positive Banden über. Das negative Signal ist gegenüber dem Signal aus hochmolarer Lösung von etwa 616 nm um 3 - 4 nm rotverschoben (Abb. 3-5).

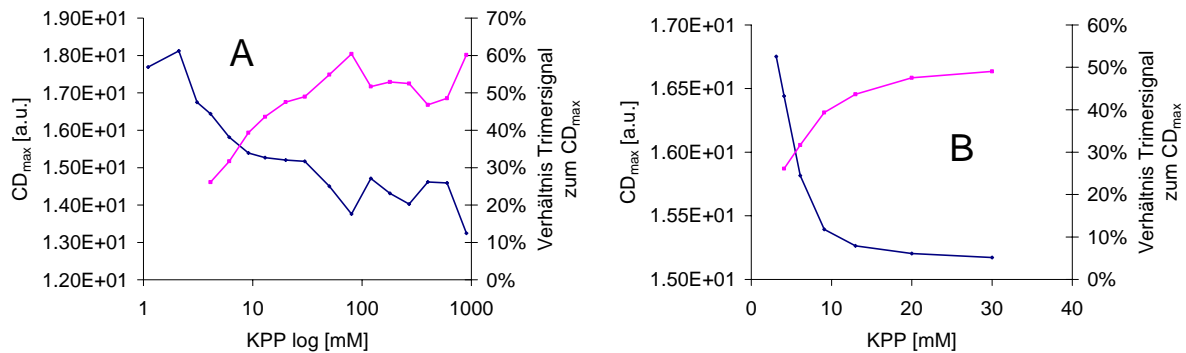


Abb.3-5: A) Abhängigkeit des Vis-CD_{max} von PC, von der KPP-Konzentration (—) und Angabe des prozentualen Anteils des Trimersignals aus dem Differenzspektrum von PC_{tri} und PC_{mono} (Differenz Maximum zu Minimum des Differenzsignals (Abb. 3-4) zum Vis-CD_{max} von PC (—))
 B) Ausschnitt von A) bis 30.1 mM KPP

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ab etwa $\leq 3,1$ mM KPP zwar noch Trimere vorhanden sind, aber nur noch in geringen Mengen. Eine genaue Mengenbestimmung fand nicht statt.

Der Aggregationsgrad in Abhängigkeit der KPP-Konzentration, wird über zwei Parameter verfolgt. Zum einen wird der prozentuale Anteil des Signals der excitonischen Kopplung (Differenz negatives Signal zu positivem Signal des Differenzspektrums (Abb. 3-5)) zum positiven Extremum des Vis-CD Signals aufgetragen, zum anderen die Intensität des positiven CD-Extremums gegen die Pufferkonzentration (Abb. 3-5). Beide Kurven zeigen zwar ein ziemliches Rauschen, jedoch ist im Bereich von 4,1 mM KPP bis etwa 30 mM KPP eine deutliche Zunahme des Signals des Trimers gegenüber dem des Monomers zu erkennen und ab 30 mM KPP erfolgt ein Übergang in die Sättigung. Ähnliches ist beim Verlauf des positiven Extremums (Abb. 3-5) zu beobachten. Auch hier geht die Kurve ab 30 mM KPP in die Sättigung über. Dies bedeutet, dass ab 30 mM KPP das Monomer-Trimer-Gleichgewicht ganz auf der Seite der Trimere liegt.

Im UV-CD konnten keine Auswirkungen der unterschiedlichen Pufferkonzentrationen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.2. Absorption

Die Aggregation wird bei der Absorption an Hand der Rotverschiebung des Maximums vom Monomer (611 nm – 613 nm) zum Trimer (616 nm – 618 nm) verfolgt (Kap. 1.8.) Die

Messung erfolgte in 1 nm Schritten. Der Unterschied der Extinktionskoeffizienten ist so gering, dass er aufgrund der Messfehler und Pipettierungenauigkeiten nicht auswertbar ist.

Aufgrund der geringen Verschiebungen in den Wellenlängen sind die Kurven zwar verrauscht (Abb. 3-6, 3-7), zeigen aber eine ähnliche Tendenz wie die Vis-CD Daten (Kap. 3.1.3). Mit zunehmender KPP-Konzentration verschiebt sich das Maximum von 613 nm auf 617 nm. Von 1,1 mM bis einschließlich 4,1 mM KPP liegt das Maximum bei 613 nm, bis 20 mM KPP verschiebt es kontinuierlich auf 615 nm. Ab 30 mM KPP bis zur maximal gemessenen KPP-Konzentration von 900 mM liegt das Maximum bei 616/617 nm. Für das Monomer-Trimer-Gleichgewicht heißt das, dass bei $KPP \geq 6.1$ mM KPP Trimere in der Absorption sichtbar werden und ab etwa 30 mM KPP die Lösung mit Trimeren gesättigt ist.

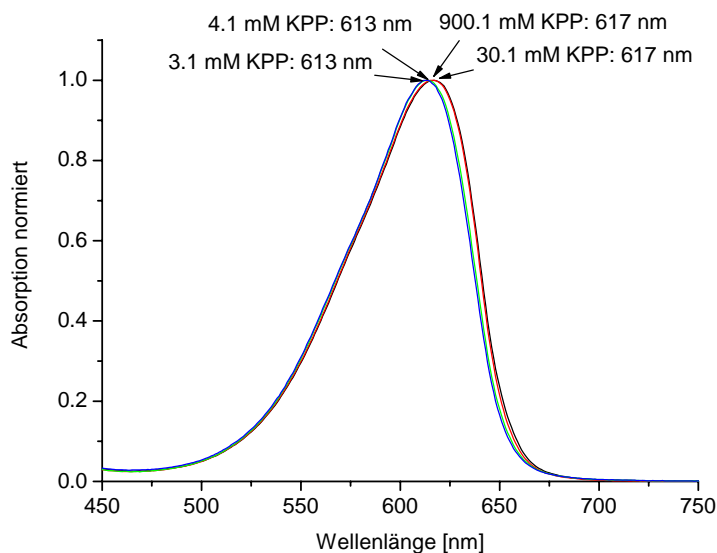


Abb.3-6: Absorptionsspektren im langwelligem Bereich (auf 1 normiert) von PC in 900 mM KPP (—), 30 mM KPP (—), 4,1 mM KPP (—), 3.1 mM KPP (—).

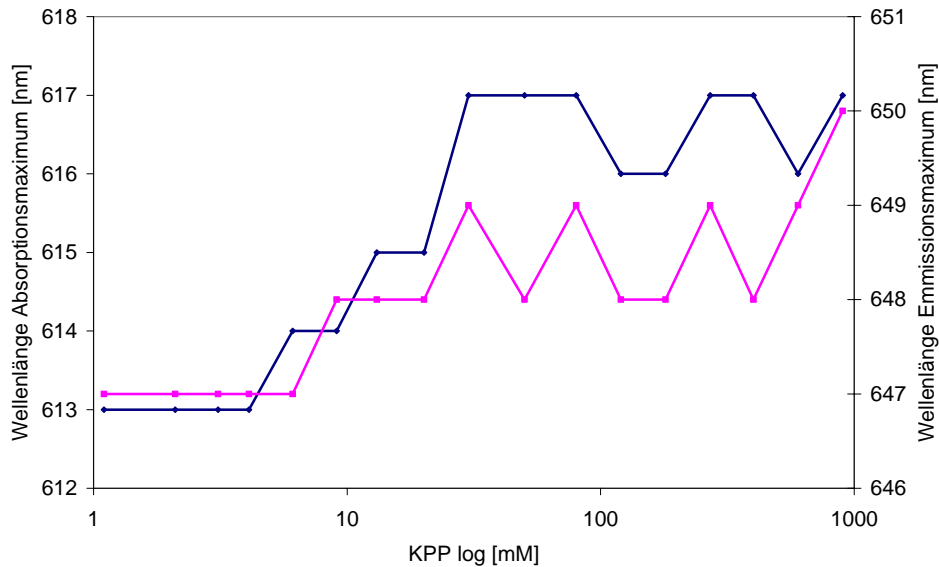


Abb. 3-7: Abhängigkeit des Absorptionsmaximums (—) und Emissionsmaximums (—) von PC von der KPP-Konzentration

3.1.2.3. Emission

Das Emissionsmaximum der PC Lösung liegt bei einer Pufferkonzentration von 1,1 mM bis 6,1 mM KPP bei 647 nm und verschiebt zu höher konzentriertem Puffer hin um ca. 2 nm rot (Abb. 3-7). Damit folgt der Verlauf in etwa dem Verlauf der Absorption beim Übergang vom Monomer zum Monomer/Trimer Gemisch. Die Verschiebung ist aber insgesamt so gering, dass sie nicht eindeutig auswertbar ist. Die Intensität nimmt hingegen deutlich ab, jedoch lässt sich mit diesem Parameter der Übergang von Trimer zu Monomer nicht eindeutig festlegen, da keine charakteristische Veränderung im Spektrum erfolgt. Dies deckt sich mit den bekannten Daten aus der Literatur (Kap. 1.8.)

3.1.2.4. Zusammenfassung der verschiedenen spektralen Parameter

Der Vis-CD detektiert das Auftreten von Trimeren bei zunehmender Pufferkonzentration etwas früher (3,1 mM KPP und weniger), als die Absorption (6,1 mM KPP), während der Übergang zur gesättigten Trimer-Lösung bei beiden spektroskopischen Parametern bei 30 mM KPP zu beobachten ist. Die Emission folgt diesem Trend, eignet sich aber nicht zur quantitativen Auswertung. Aufgrund dieser Daten wurde für Messungen, welche vom Trimeren ausgehen, eine Pufferkonzentration von 50 mM eingesetzt.

3.2. Extinktionskoeffizienten

3.2.1. Extinktionskoeffizienten vom nativen und entfalteten PC

Ausgehend von dem bekannten Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 35,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ vom Cystein gebundenen PCB in saurem Harnstoff (8 M, $\text{pH} \leq 1,9$) (Schluchter & Bryant, 2002) wurde der Extinktionskoeffizient von PC_{mono} und PC_{denat} bestimmt (jedes Monomer enthält drei PCBs (Kap. 1.4, 1.6). Dazu wurde das jeweilige Protein unter definierten Bedingungen mit einer sauren Harnstofflösung entfaltet und die Absorptionsspektren verglichen (Kap. 2). Im Gegensatz zu neutralen Bedingungen wird der Chromophor des entfalteten PCs unter sauren Bedingungen stabilisiert.

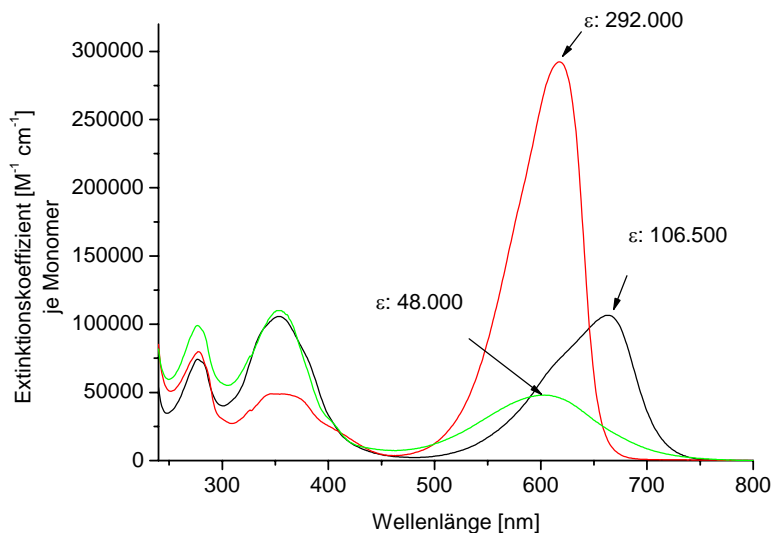


Abb. 3-8: Extinktionskoeffizienten je Monomer PC in 8 M Harnstoff pH 1,73 (—), in 0 M Harnstoff pH 7,7 (—), in 8 M Harnstoff pH 7,7 (—). Alle Extinktionskoeffizienten beziehen sich auf ein Monomer mit drei Chromophoren PCB und wurden relativ zu dem bekannten in saurem Harnstoff (Schluchter/Bryant 2002) bestimmt.

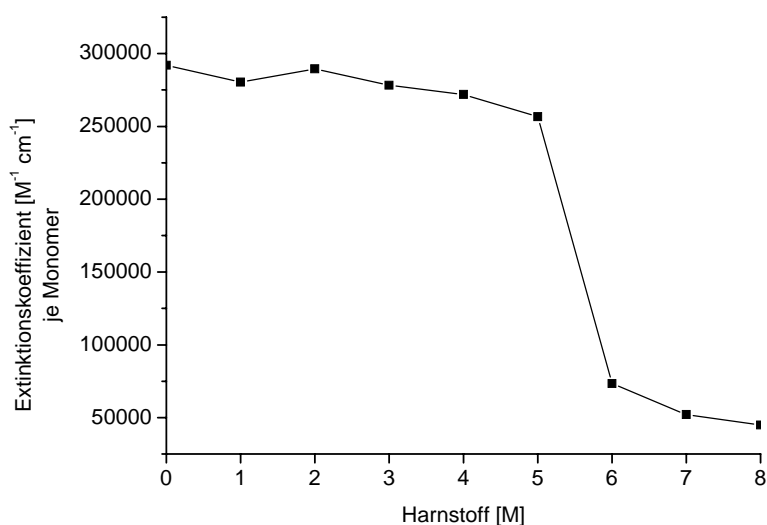
Im sauren Milieu wird der Chromophor des denaturierten PCs protoniert und hat ein Absorptionsmaximum bei 660 nm (Abb. 3-8). PC_{nat} im neutralen pH Bereich hat ein Absorptionsmaximum bei etwa 617 nm, wobei der genaue Wert vom Aggregationsgrad abhängt (Monomer $\approx 613 \text{ nm}$, Trimer $\approx 617 \text{ nm}$, Kap. 1.8., 3.1.2.2.). PC_{denat} im Neutralen hat sein Absorptionsmaximum bei etwa 605 nm. Der Extinktionskoeffizient eines PC_{nat} variiert ebenfalls in Abhängigkeit der Aggregation (Kap. 3.2.2). Der gemessene ε -Wert ($292.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bezogen auf drei Chromophore) dargestellt in Abb. 3-8 entspricht dem des

Trimeren, d. h. $97.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ je Chromophor. Im PC_{denat} ($48.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bezogen auf drei Chromophore) beträgt ϵ etwa $1/6$ von $\epsilon \text{ PC}_{\text{tri}}$, d. h. je Chromophor $16.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2.2. Extinktionskoeffizienten von PC in 0 bis 8 M Harnstoff

Ausgehend von dem ermittelten ϵ -Wert für PC_{tri} ($292.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 50 mM KPP) wurden anschließend die ϵ -Werte für PC in demselben Puffer bei gleicher Proteinkonzentration in Gegenwart von 1 bis 8 M Harnstoff berechnet.

Der berechnete Wert von ϵ (Abb. 3-9, Tab. 3-1) für PC in 8 M Harnstoff weicht um $-3.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ von dem in Kap. 3.2.1 gemessenen ϵ -Wert ab. Mit einer Abweichung von 7% ist er prinzipiell noch im Bereich der Messungenauigkeit, da freie Chromophore im neutralen sehr labil sind. Auch der höhere Extinktionskoeffizient von PC in 2 M Harnstoff gegenüber dem in 1 M Harnstoff liegt im Rahmen der Fehlergrenze. Ein kritisch zu bewertender Wert ist ϵ gemessen in 5 M Harnstoff. In verschiedenen Messreihen gibt es zum Teil Abweichungen von $\pm 4.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Der Übergangsbereich der Entfaltung von PC in der Titrationskurve beschränkt sich auf einen Konzentrationsunterschied von etwa 2 M Harnstoff (Kap. 3.5., 3.7.). 5 M Harnstoff liegt weitgehend in der Mitte des Übergangsbereiches der Titrationskurve, dies hat zur Folge, dass bereits geringe Schwankungen in der Harnstoffzugabe, z. B. durch Pipettierungenauigkeiten, sich verstärkt auswirken.



Harnstoff [M]	ϵ [$\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$] pro PC_{mono}
0	292.000
1	280.000
2	289.000
3	278.000
4	272.000
5	257.000
6	73.400
7	52.100
8	45.000

Tab. 3-1:
Extinktionskoeffizienten je PC_{mono} , d. h. je drei PCBs in 0 bis 8 M Harnstoff in 50 mM KPP

Abb. 3-9: Extinktionskoeffizient von PC je Monomer, in 0 bis 8 M Harnstoff in 50 mM KPP, pH 7.

Die quantitativen Absorptionsspektren über den gesamten Wellenlängenbereich von 240 nm bis 820 nm sind von PC_{tri}, PC_{mono}, den α - und β -UE in Kapitel 3.8. gezeigt.

3.3. Rückfaltung von PC und Langzeitmessungen der Entfaltung

3.3.1. Langzeitmessungen

In dieser Versuchsreihe wird der Fragestellung nachgegangen, wie lange es dauert, bis sich bei einer Zugabe einer bestimmten Harnstoffkonzentration (Endkonzentration 5 bis 8 M) zur PC Lösung das Gleichgewicht der Entfaltungsreaktion eingestellt hat. Die Vorgehensweise ist in Kap. 2 beschrieben.

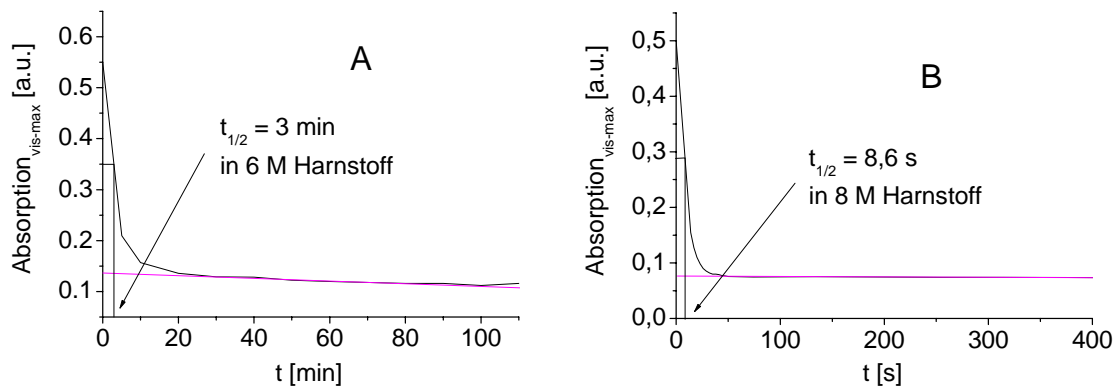


Abb. 3-10: Kinetik der Gleichgewichtseinstellung bei der PC Entfaltung in 50 mM KPP, gezeigt in A) 6 M und in B) 8 M Harnstoff; Absorptionsverlauf im langwelligem Maximum (—) und Baseline (—);

Harnstoff [M]	Endwert der Entfaltung Absorption [a.u.]	$t_{1/2}$ [min]
5	0,33	10
6	0,14	3
7	0,095	0,44
8	0,076	0,14

Tab. 3-2: Halbwertszeiten für die PC Entfaltung in 5 bis 8 M Harnstoff

Beispielhaft wird die Entfaltung von PC in 6 und 8 M Harnstoff grafisch dargestellt (Abb. 3-10). Als Messparameter dient die Abnahme des langwelligem Absorptionsmaximums über die Zeit, welches in bestimmten Zeitabständen

gemessen wurde (Kap. 2). Im Gleichgewicht der Reaktion bewirkt jede Harnstoffkonzentration einen anderen Grad der Entfaltung. Die Halbwertszeit verringert sich dabei drastisch mit zunehmender Harnstoffkonzentration, sie nimmt von 10 min (5 M Harnstoff) auf 0,14 min (8 M) ab (Tab. 3-2). Nach Erreichen des Gleichgewichtes nimmt die Absorption zum Teil weiter linear ab, was ein Hinweis auf Ausbleichen oder Modifikationen unbekannter Art, z. B. durch den Harnstoff, sein kann. Wie bereits im Kap. 3.2.2. erläutert, ist das Ausmaß der Entfaltung bei 5 M Harnstoff bereits durch geringe Abweichungen der zugegebenen Harnstoffkonzentration stark beeinflussbar, welche im Rahmen von

Pipettierungenauigkeiten erfolgen können. Der absorptionsspektroskopische Endwert der Entfaltung (Tab. 3-2) für 6 M Harnstoff und vor allem für 7 und 8 M Harnstoff ist jedoch gut reproduzierbar.

3.3.2. Reversibilität der Harnstoffbehandlung von PC

Zwei Fragestellungen wird in dieser Versuchsreihe nachgegangen. Erstens, eine Voraussetzung zur Durchführung von Faltungsexperimenten ist, dass sich das zu untersuchende Protein nach der Entfaltung rückfalten lässt (Utiyama & Baldwin, 1986; Kyte, 1995; Kap. 1.7). Inwieweit dies bei PC der Fall ist, soll hier quantifiziert werden (Kap. 2). Zweitens, stellte sich während der Entfaltungsversuche die Frage, ob sich PC im entfalteten Zustand irreversibel chemisch verändert, z. B. der Chromophor oxidiert wird (s. o.). Auch dann könnte es nicht reversibel rückfalten. Als Messparameter dient die Absorption.

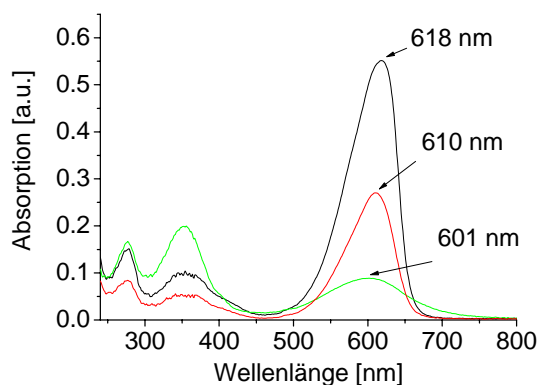


Abb. 3-11: Entfaltung und Rückfaltung von PC in 50 mM KPP (Kap. 2.3.4.); nativ (—), rückgefaltet mittels Dialyse (—) und in 8 M Harnstoff (—);

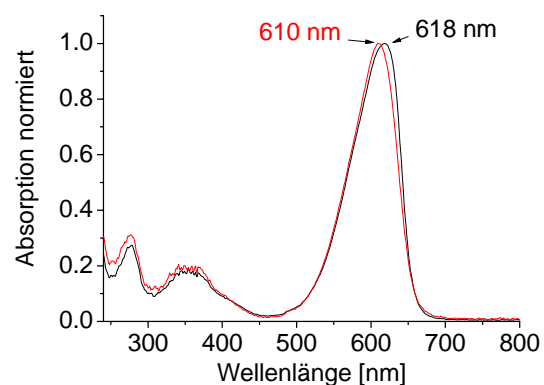


Abb. 3-12: Rückfaltung von PC aus 8 M Harnstoff in 50 mM KPP (Kap. 2.3.4.), nativ (—) und rückgefaltet mittels Dialyse (—);

Für die qualitative Reversibilität aus 4, 5, 6 und 7 M Harnstoff ergibt sich ein fast gleiches Bild, wie für 8 M Harnstoff, welche in den Abbildungen 3-11 und 3-12 exemplarisch dargestellt ist. Nach der Rückfaltung hatte sich das langwellige Absorptionsmaximum auf 610/611 nm gegenüber 618 nm im nativen, trimeren PC, verschoben. Aus 4 M Harnstoff, in welchem PC nicht entfaltet, sondern nur monomerisiert wurde, hat sich das Absorptionsmaximum auf 613 nm verschoben (Tab. 3-3). In beiden Fällen bedeutet dies, dass PC zum Monomer rückfaltet (Maximum Monomer 611 bis 613 nm, siehe Kap. 3.1.2. und 1.8), aber nicht mehr zum Trimer aggregiert. Eine Ursache liegt in der Tatsache begründet, dass das Trimer-Monomer-Gleichgewicht proteinkonzentrationsabhängig ist (Kap. 3.4.).

Durch die Rückfaltung mittels Dialyse liegt PC nach der Rückfaltung in einer fast doppelt so hohen Verdünnung vor (Abb. 3-11). Diese erhöhte Verdünnung in 50 mM KPP verschiebt das Gleichgewicht in Richtung Monomer. Jedoch ist die Verdünnung nicht hoch genug, betrachtet man die Ergebnisse von Kap. 3.4., um damit das vollständige Fehlen von Trimeren zu begründen. Weiter ist aus dem Vergleich der Ergebnisse in 4 M Harnstoff und der Rückfaltung aus höheren Harnstoffkonzentrationen zu sehen, dass das Maximum eines (teilweise) entfalteten (5 bis 8 M Harnstoff) und wieder rückgefalteten PCs um etwa 2 nm, gegenüber dem Monomer, aus 4 M Harnstoff rückdialysiert, blau verschoben bleibt (Tab. 3-3). Dies bedeutet, dass das PC_{mono}, welches stärker entfaltet wurde in nicht ganz den gleichen Zustand rückfaltete, wie das PC_{mono}, welches in 4 M Harnstoff nur monomerisiert wurde. Bei der Berechnung der Q-Werte aus den Spektren des rückgefalteten PCs, ergab sich für alle ein Q-Wert von etwa 6. Dies entspricht einem Monomer (siehe Kap. 3.8.).

Harnstoffkonzentration für PC Behandlung [M]	Eingesetzte PC Menge [μ M]	PC Menge nach Rückfaltung auf das Trimer berechnet [μ M]	PC Menge nach Rückfaltung auf das Monomer berechnet [μ M]	Quantitative Ausbeute auf das Trimer berechnet [%]	Quantitative Ausbeute auf das Monomer berechnet [%]	λ_{max} [nm]
8	4,93	3,70	3,98	75,0	80,1	610
7	4,93	3,83	4,11	77,7	83,3	610
6	4,93	3,29	3,53	66,7	71,6	611
5	5,10	3,71	3,98	72,8	78,1	611
4	4,93	4,01	4,30	81,3	87,2	613
PC _{tri} in 0						618

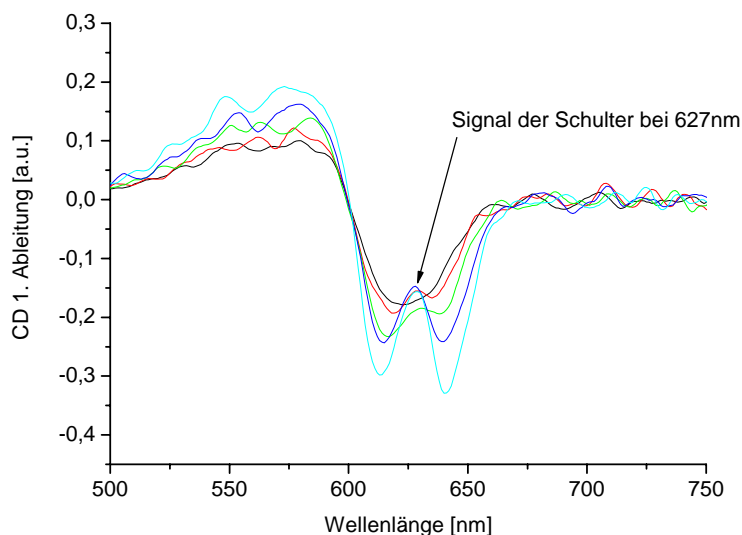
Tab. 3-3: Quantitative Bestimmung von PC nach der Rückfaltung aus verschiedenen Graden der Entfaltung durch unterschiedliche Harnstoffkonzentrationen und Vergleich der Wellenlängen des Maximums im Vis-Bereich nach der Rückfaltung.

Die quantitative Ausbeute der Rückfaltung liegt, je nachdem ob auf das Monomer oder Trimer bezogen, durchschnittlich bei $75\% \pm 6,6\%$ (auf das Trimer bezogen) bzw. bei $80\% \pm 8,5\%$ (auf das Monomer bezogen) (Tab. 3-3). Im Kapitel 3.1.1. wurde deutlich, dass PC zum Teil lange dem Harnstoff ausgesetzt ist, bis die Reaktionen ins Gleichgewicht kommen. Die anschließende Dialyse erstreckt sich über einen ganzen Tag. Diese sehr lange Behandlungszeit von PC mag eine wesentliche Ursache dafür sein, dass 20% (bzw. 25%) des Proteins anscheinend beschädigt werden und somit nicht reversibel falten. Hierbei können Proteolyse während der Dialyse oder vor allem ein Ausbleichen des Chromophors wesentliche Ursachen sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PC nach der Entfaltung zum Monomer rückfaltet und insofern für Faltungsexperimente geeignet ist. Während der Entfaltungsversuche erfolgen keine nennenswerten, chemischen Reaktionen. Ein Teil des Proteins geht zwar während des Versuches kaputt, insofern ist keine vollständige quantitative Rückfaltung gegeben, jedoch erfolgt eine vollständige qualitative Rückfaltung zum Monomer.

3.4. Auswirkungen der Proteinkonzentration auf das Trimer-Monomer-Gleichgewicht

Die Konzentrationsänderung von PC verschiebt das Trimer-Monomer-Gleichgewicht (Kap. 1). Höhere Konzentrationen verschieben das Trimer-Monomer-Gleichgewicht in Richtung Trimer und niedrigere Konzentrationen in Richtung Monomer. In welchem Ausmaß dies bei den verwendeten unterschiedlichen Messbedingungen der Fall ist, soll hier untersucht werden. Als Messparameter dient wiederum die 1. Ableitung des Vis-CD Spektrums mit dem charakteristischen Signal für Trimere bei 627 nm (Kap. 1.8., 3.1.). Die Untersuchungen erfolgen in H_2O_{dest} , um das Trimer-Monomer-Gleichgewicht bereits möglichst weit auf die Seite des Monomers zu schieben (Kap. 3.1.). Die Verdünnungsreihe erfolgte aus einer Stammlösung mit $c = 1,58 \cdot 10^{-5}$ M, mit einer Verdünnung von: 1:9, 1:12, 1:15, 1:18 und 1:21.



Verdünnung von PC	c [μM]	c [mg/ml]
1:9	1,75	0,063
1:12	1,30	0,047
1:15	1,06	0,038
1:18	0,89	0,032
1:21	0,75	0,027

Tab. 3-4: PC Konzentrationen für die Verdünnungsreihe in H_2O

Abb. 3-13: 1. Ableitung des Vis-CD Spektrums von PC verschiedener Verdünnungen in H_2O_{dest} : 1:9 (—), 1:12 (—), 1:15 (—), 1:18 (—), 1:21 (—).

Bei dem hier verwendeten Lösungsmittel Wasser ist das Trimer-Monomer-Gleichgewicht schon zu Beginn der Messreihe erheblich auf die Seite des Monomers verschoben. Bei einer Verdünnung von 1:9 aus einer Stammlösung mit $\pm 1,54 \cdot 10^{-5}$ M (Kap. 3.1.2.) (in diesem Fall

$1,58 \cdot 10^{-5}$ M, ergibt für die Verdünnung 1:9 $\rightarrow 1,75 \cdot 10^{-6}$ M), wie sie für die meisten Messungen in dieser Arbeit verwendet wird, ist noch ein ausgeprägtes Signal für Trimere vorhanden (Abb. 3-13). Erst bei einer Verdünnung von 1:21, d. h. bei einer Reduzierung der Proteinkonzentration um etwa das 2,3-fache auf $7,5 \cdot 10^{-7}$ M, ist kein Signal der Schulter bei 627 nm, mehr zu erkennen (Abb. 3-13, Tab. 3-4). Ein Fazit aus dieser Messreihe für spätere Messungen, in welchen die Entfaltung von PC mit dem Monomer beginnen soll, ist, dass die Verdünnung ein ungeeignetes Mittel ist, Monomere für Messreihen herzustellen. Erstens kann das dafür benötigte Lösungsmittel Wasser den pH-Wert nicht stabilisieren. Stärkere Schwankungen des pH-Wertes verändern das Protein (saures Lösungsmittel führt zur Protonierung, basisches greift den Chromophor an) und verfälschen somit die Messergebnisse. Und zweitens muss sogar in Wasser die Konzentration an PC so gering sein, dass das Signal/Rauschverhältnis schlecht wird. Deshalb wird für Messungen, in denen PC als Monomer vorliegen soll, die Lösung mit 4 M Harnstoff versetzt (Kap. 3.1.2., 3.5., 3.7. und 3.8.).

3.5. Dissoziation und Entfaltung von PC mit Harnstoff bei unterschiedlichen Pufferkonzentrationen

Bei diesen Messreihen wird der Fragestellung nachgegangen, welche Harnstoffkonzentration zur Monomerisierung von PC führt, ab welcher Konzentration die Entfaltung einsetzt bzw. vollständig ist und welchen Einfluss die Pufferkonzentration dabei hat. Die Titration erfolgt in 3 und 300 mM KPP, jeweils von 0 bis 8 M Harnstoff.

Der Verlauf der Titrationskurve wird für die Entfaltung sigmoidal gefittet (Kap. 2.3.4.). Für die Bewertung und den Vergleich der sigmoiden Kurven werden dabei die Lage des Wendepunkts (x_0) und die Steilheit der Kurve im Wendepunkt (p-Wert) heran gezogen. Für die Messparameter, welche für die Dissoziation vom PC_{tri} zum Monomer deutliche Signaländerungen zeigen (Vis-CD, Fluoreszenz), wird die Kurve erst ab dem Monomer (3 bis 4 M Harnstoff) gefittet. Bei den Parametern, bei denen dies nicht der Fall ist (Absorption, UV-CD), wird die Kurve über den gesamten Harnstoffbereich gefittet.

3.5.1. Vis-CD

Monomer-Trimer-Gleichgewicht

Die Dissoziation von PC_{tri} zum Monomer in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration wird mittels der bereits beschriebenen (Kap. 1.8. und 3.1.) Parameter verfolgt, d. h. der Amplitude des s-förmigen Signals des CD-Differenzspektrums des Trimers, der 1. Ableitung der CD-Spektren, durch welche das Signal bei 627 nm hervorgehoben wird, und der Zunahme des positiven Maximums.

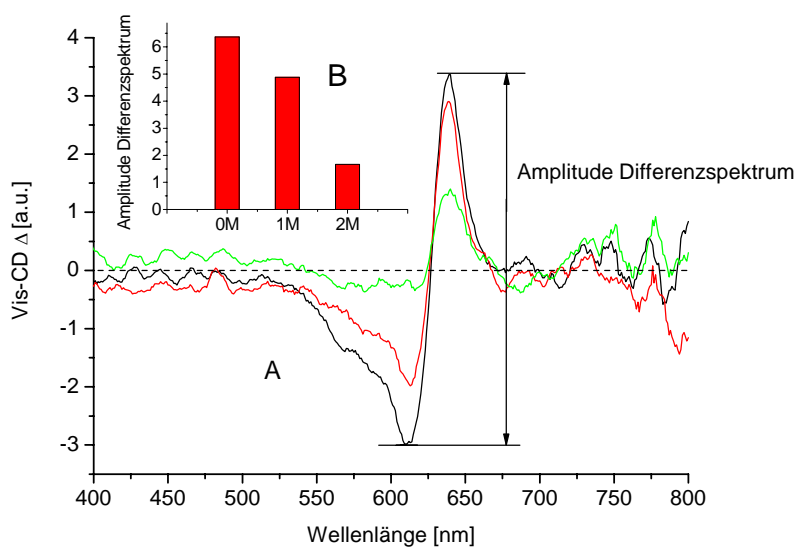


Abb. 3-14: Effekt von Harnstoff auf die Vis-CD Spektren von PC in 3 mM KPP. A) Differenzspektren von PC (Trimer minus Monomer) in 0 M (—), 1 M (—) und 2 M Harnstoff (—); B) Amplituden der sigmoiden Differenzspektren (Minimum-Maximum).

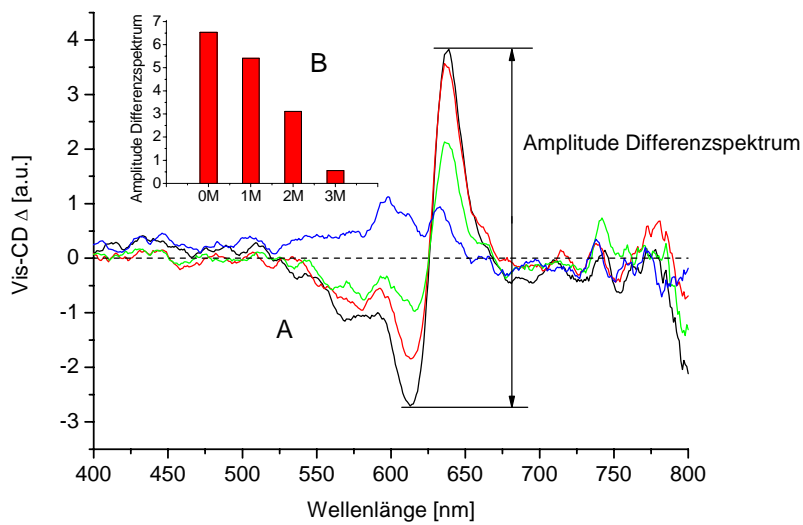


Abb. 3-15: Effekt von Harnstoff auf die Vis-CD Spektren von PC in 300 mM KPP. A) Differenzspektren von PC (Trimer minus Monomer) in 0 M (—), 1 M (—), 2 M (—) und 3 M Harnstoff (—); B) Amplituden der sigmoiden Differenzspektren (Minimum-Maximum).

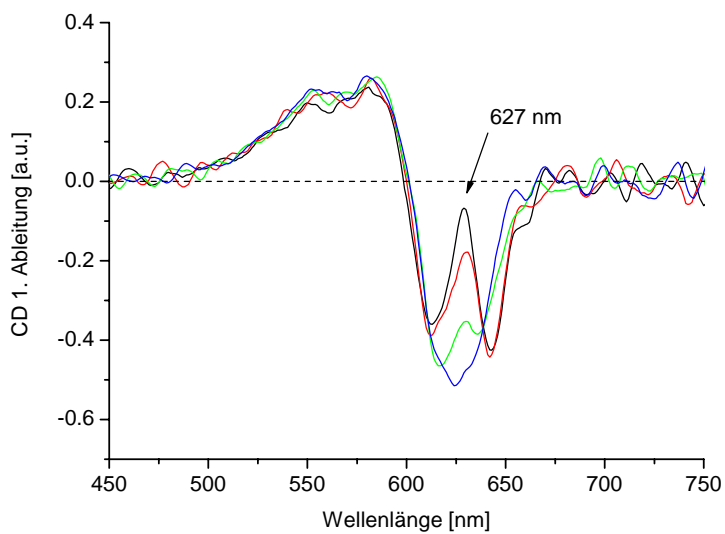


Abb. 3-16: 1. Ableitung des Vis-CD-Spektrums im 3 mM KPP, in 0 M (—), 1 M (—), 2 M (—) und 3 M Harnstoff (—).

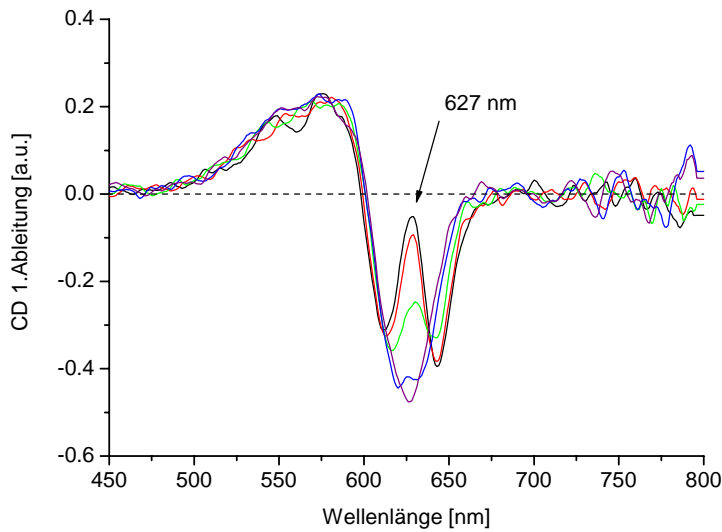


Abb. 3-17: 1. Ableitung des Vis-CD-Spektrums im 300 mM KPP, in 0 M (—), 1 M (—), 2 M (—), 3 M (—) und 4 M Harnstoff (—).

In 3 mM KPP verringert sich die „Delle“ bei 627 nm mit zunehmender Harnstoffkonzentration, bis sie bei einer Harnstoffkonzentration von 3 M nicht mehr nachgewiesen werden kann (Abb. 3-16). In der Titrationskurve (Abb. 3-18) ist eine Zunahme der Signalintensität bis 3 M Harnstoff zu erkennen. Darin zeigt sich der gleiche Vorgang wie bei der Abnahme der „Delle“ bei 627 nm. Das bedeutet, dass bei einer Harnstoffkonzentration von 3 M das Trimer-Monomer-Gleichgewicht auf die Seite des Monomers verschoben ist. Im Differenzspektrum (Abb. 3-14), welches das Gleiche wie die Titrationskurve und die 1. Ableitung widerspiegelt, ist der Verlauf der Dissoziation deutlicher zu erkennen. Er scheint eher sigmoid als linear. Die weitaus größte Signalabnahme, und somit Verschiebung des Trimer-Monomer-Gleichgewichts auf die Seite des Monomerens, findet von 1 M auf 2 M Harnstoff statt (Abb. 3-14B).

In dem höher konzentrierten Puffer (300 mM) ist das Trimer stabiler, dort ist erst bei 4 M Harnstoff in der 1. Ableitung kein Signal bei 627 nm mehr feststellbar (Abb. 3-17). Beim Verlauf der Intensitäten der positiven Extrema liegen zwar Schwankungen aufgrund von Messungenauigkeiten vor, jedoch ist trotzdem die Zunahme der Gesamtamplitude bei niedriger Harnstoffkonzentration bis +/- 4 M zu erkennen (Abb. 3-18). Im Differenzspektrum (Abb. 3-15) zeigt sich das Ausmaß der Dissoziation noch klarer, die Titrationskurve scheint wiederum sigmoid.

Nachdem das Differenzspektrum für 3 M Harnstoff kein eindeutiges Trimer-Signal mehr zeigt (Abb. 3-15), die 1. Ableitung aber noch ein deutliches, wenn auch kleines Signal bei 627 nm (Abb. 3-17), ist davon auszugehen, dass die Harnstoffkonzentration, welche zu einer vollständigen Monomerisierung von PC in 300 mM KPP führt, etwas unterhalb von 4 M Harnstoff liegt.

Zusammenfassung

Die benötigte Harnstoffkonzentration zur vollständigen Dissoziation von PC liegt in 300 mM KPP um fast 1 M höher (4 M), als in 3 mM KPP (3 M). Zwischen 0 M bis 1 M Harnstoff findet in beiden Fällen die gleiche Reduktion des Signals des Differenzspektrums statt (20%); die Stabilisierung von PC durch den höher konzentrierten gegenüber dem geringer konzentrierten Puffer zeigt sich oberhalb einer Harnstoffkonzentration von 2 M. Der Verlauf der sigmoiden Kurve im 300 mM KPP ist flacher, als im 3 mM KPP.

Entfaltung

Die Entfaltung von PC wird über die Abnahme der Gesamtamplitude (= Differenz des positiven, langwelligen und des negativen, kurzwelligen Extremums des CD-Spektrums; Kap. 2.3.4.) (Abb. 3-18) verfolgt. Der Wert für das PC_{mono} wurde in der Titrationskurve auf 1 normiert (in 3 mM KPP bei 3 M Harnstoff, in 300 mM KPP bei 4 M Harnstoff; Kap. 3.5.1.).

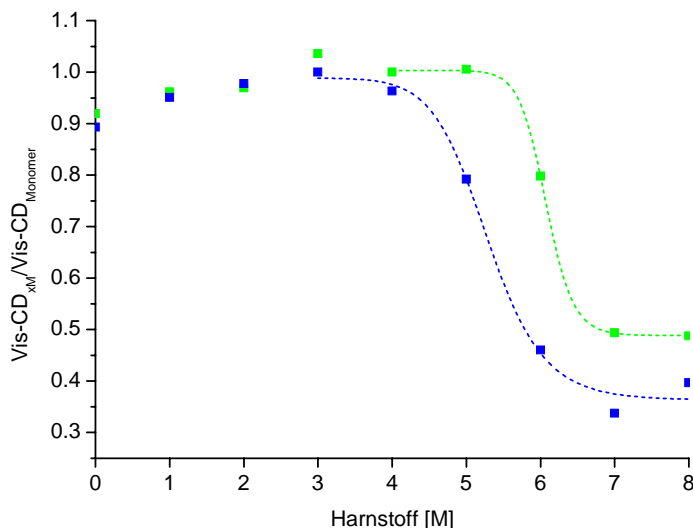


Abb. 3-18: Gesamtamplitude des Vis-CD: Titrationsverlauf von PC_{tri} in 0 bis 8 M Harnstoff mit sigmoidalen Fit (Details Text und Kap. 2.3.4.) (ab 3 M im 3 mM KPP, ab 4 M im 300 mM KPP): in 300 mM KPP (■), dazugehöriger Fit (---), in 3 mM KPP (■), dazugehöriger Fit (.....).

Die Titrationskurve von PC (Abb. 3-18) ist für beide Lösungen (3 mM KPP und 300 mM KPP) sigmoid. Im höher konzentrierten Puffer ist der gefaltete Zustand stabilisiert. Der aus der Fit-Kurve errechnete Wendepunkt (x_0) liegt in 300 mM KPP bei 6,2 M Harnstoff, in 3 mM KPP bei 5,4 M Harnstoff. Die Fit-Kurve ist im höher konzentrierten Puffer zudem signifikant steiler (Abb. 3-18, Tab. 3-5). Das heißt, dass der Vorgang der Entfaltung im 300 mM KPP auf eine geringere Spanne an Harnstoffkonzentration ausgedehnt ist (etwa 5 – 7 M), als im 3 mM KPP (etwa 4 – 7 M). Die Stabilisierung durch den höher konzentrierten Puffer im Vergleich zum niedriger konzentrierten wirkt sich demnach vor allem bei niedrigerer Harnstoffkonzentration aus. In 8 M Harnstoff beträgt das Signal im 300 mM KPP noch 49% des Ausgangswertes, in 3 mM KPP 40%. Entweder ist PC im 300 mM KPP auch bei 8 M Harnstoff noch nicht völlig entfaltet, oder die Konformation des Chromophors, die durch das CD-Differenzsignal erfasst wird, wird durch die Pufferkonzentration so verändert, dass, trotz entfaltetem Zustand, ein erhöhtes Signal hervorgerufen wird (weiteres hierzu siehe auch Kap. 3.6.).

3.5.2. Absorption

Bei den folgenden Versuchen wird die Dissoziation vom PC_{tri} zum Monomer und die Entfaltung über die Abnahme des Q-Wertes, d. h. des Absorptionsverhältnisses der Vis- und UV-Bande, verfolgt (siehe: Kap. 1.8., 2.3.4.).

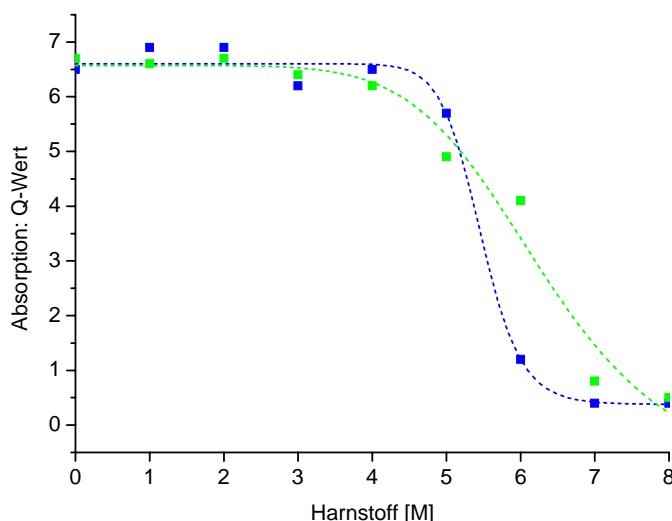


Abb. 3-19: Q-Wert der Absorption: Titrationsverlauf von PC_{tri} in 0-8 M Harnstoff mit sigmoidalen Fit: (Details Text und Kap. 1.8., 2.3.4.) Q-Wert in 300 mM KPP (■), dazugehöriger Fit (-----) Q-Wert in 3 mM KPP (■), dazugehöriger Fit (-----).

Im Gegensatz zum Vis-CD ist der Q-Wert bei der Monomerisierung empfindlicher gegen die Schwankungen im Bereich der Mess- und Pipettierfehler (Abb. 3-19). Deshalb ist er nicht so geeignet die Monomerisierung eindeutig zu verfolgen. Der Entfaltungsvorgang (ab 3 M Harnstoff im 3 mM KPP und ab 4 M Harnstoff in 300 mM KPP) geht aber eindeutig daraus hervor (Abb. 3-19). Es zeigt sich wiederum ein sigmoider Kurvenverlauf (Abb. 3-19). Bei 5 M Harnstoff sind in beiden Fällen, an Hand des kleiner werdenden Q-Wertes (5,7 in 3 mM KPP bzw. 4,9 in 300 mM KPP) sichtbar, erste Entfaltungsvorgänge zu erkennen. Bei 8 M Harnstoff ist das Protein in beiden Fällen entfaltet (Q-Wert $\ll 1$). Im 300 mM KPP zeigt sich wiederum die größere Stabilität von PC gegenüber der 3 mM KPP Lösung. Im 300 mM KPP liegt der errechnete Wendepunkt bei 6,3 M Harnstoff und in 3 mM KPP bei 5,5 (Abb. 3-19, Tab. 3-5). Diese Werte entsprechen, im Rahmen der Fehlergrenze, den Ergebnissen aus dem Vis-CD. Anders der Verlauf der Titrationskurve. In der Absorption verläuft die Kurve im 300 mM KPP signifikant flacher als im 3 mM KPP (Tab. 3-5), was die größere Stabilisierung durch den höher konzentrierten Puffer über die gesamten Harnstoffkonzentrationen widerspiegelt. Dass heißt, dass sich die Stabilisierung durch die höhere Pufferkonzentration bei der Steilheit der Kurve in der Absorption gegenteilig zum Vis-CD auswirkt. Obwohl eine Aussage bei den relative wenigen Punkten der Fits schwierig ist, deutet das darauf hin, dass die beiden Parameter unterschiedliche Eigenschaften des Proteins erfassen.

3.5.3. Emission

Hier wurde die Intensität der langwelligen Fluoreszenz bei der Titration mit Harnstoff verfolgt. Der Wert für das Monomer, das bei einer Pufferkonzentration von 3 mM KPP in 3 M Harnstoff vorliegt, bzw. bei 300 mM KPP in 4 M Harnstoff (Kap. 3.5.1., 3.5.2.) wurde in der Titrationskurve auf 1 normiert (Abb. 3-20).

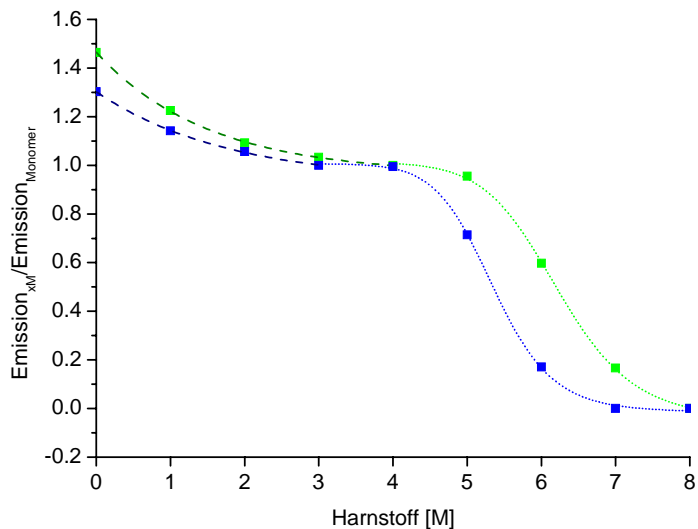


Abb. 3-20: Maximum der Emission: Titrationsverlauf von PC_{tri} in 0-8 M Harnstoff mit dem Fit der Entfaltung (sigmoidal) und Dissoziation (exponentiell) (Details Text und Kap. 2.3.4.): in 300mM (■), dazugehöriger Fit der Entfaltung (●●●●●), dazugehöriger Fit der Dissoziation (----); in 3 mM KPP (■), dazugehöriger Fit der Entfaltung (●●●●●), dazugehöriger Fit der Dissoziation (----).

Wie bereits an anderer Stelle (Kap. 1.9., 3.1.) gesagt, lässt sich der Vorgang der Dissoziation vom PC_{tri} zum Monomer, wie er in der Absorption an Hand der Rotverschiebung des langwelligen Maximums (Kap. 3.1.2.) und dem Vis-CD klar gezeigt werden konnte, mittels Emissionsspektrum nur sehr bedingt verfolgen. Jedoch werden beim Vergleich des Verlaufs der Titrationskurven zwei klar getrennte Reaktionsvorgänge sichtbar (Abb. 3-20). Ein erster, eher exponentiell verlaufender bis 3 M bzw. 4 M Harnstoff, und ein zweiter, sigmoidaler ab 3 M bzw. 4 M Harnstoff.

Trimer-Monomer-Gleichgewicht

Der Übergang vom Trimer zum Monomer kann exponentiell gefittet werden (Kap. 2.3.4.). Im 300 mM KPP sinkt die Fluoreszenzintensität dabei um 32%, im 3 mM KPP um 26%. Bei diesen Harnstoffkonzentrationen findet, zumindest auch, der Übergang vom Trimer zum Monomer statt, und dieser bietet eine mögliche Erklärung für die stärkere Fluoreszenzabnahme in 300 mM KPP gegenüber im 3 mM KPP. 300 mM KPP in einer 0 M Harnstofflösung führt zu einer Sättigung an Trimeren, während in einer 3 mM KPP nur ein kleiner Anteil an Trimeren vorliegt (Kap. 3.1.), infolgedessen sind die Auswirkungen des Harnstoffs auf die Dissoziation den 300 mM KPP größer als im 3 mM KPP. Bei der Emission ist bereits bei geringer Harnstoffzugabe eine starke Auswirkung auf die Intensität zu sehen noch bevor die Dissoziation des Trimeres erfolgt (Kap. 3.5.1.). Dies lässt vermuten, dass hier eine Reaktion mit dem Harnstoff erfolgt, die, unabhängig von der Dissoziation, zu einer

starken Abnahme der Emission führt. Worin diese Reaktion liegen könnte, wurde nicht weiter untersucht. (siehe hierzu Kap. 1.7., 3.1. 3.6. und 4).

Entfaltung

Die Entfaltung lässt sich mit einer sigmoiden Kurve fiten (Abb. 3-20). Der Wendepunkt x_0 (Tab. 3-5) liegt im 300 mM KPP bei 6,3 M Harnstoff und im 3 mM KPP bei 5,4 M Harnstoff. Diese Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenze mit denen überein, welche über die Auswertung des CD-Signals und der Absorption gefunden wurden, und auch hier ist die benötigte Harnstoffkonzentration für die Entfaltung wiederum bei 300 mM KPP um etwa 1 M höher, als im 3 mM KPP. Der Verlauf der Kurve ist beim 300 mM KPP kaum flacher als beim 3 mM KPP (Tab. 3-5). Im 300 mM KPP flacht die Kurve zum hoch konzentrierten Harnstoff hin noch nicht völlig ab, jedoch zeigt die fehlende Emission im 8 M Harnstoff, dass PC nach den Kriterien der Fluoreszenz (Kap. 1.8.) entfaltet ist, in 7 M Harnstoff hingegen noch nicht, hier ist noch deutlich Emission messbar. Im 3 mM KPP tritt der vollständige Verlust der Emission als Indikator für die Entfaltung bereits bei 7 M Harnstoff ein.

3.5.4. UV-CD

Als letzter Parameter wird das CD-Signal bei 222 nm verwendet, welches die Sekundärstruktur, insbesondere den Helix-Gehalt des Proteins, widerspiegelt und lediglich maximal 10% Chromophoranteil (mündliche Mitteilung H. Scheer) beinhaltet.

Wie bereits im Kapitel 3.1. und später noch einmal zusammenfassend in Kap. 3.8. erläutert, lässt sich im UV-CD der Übergang vom Trimer zum Monomer nicht dokumentieren. Jedoch kann die Entfaltung des Proteins oberhalb einer Harnstoffkonzentration von 3 M im 3 mM KPP und von 4 M in 300 mM KPP beobachtet werden (Abb. 3-21).

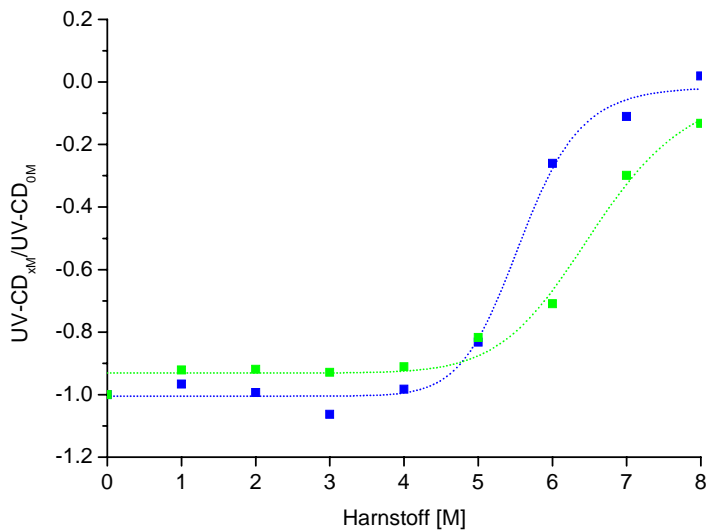


Abb. 3-21: UV-CD bei 222 nm: Titrationsverlauf von PC_{tri} in 0-8 M Harnstoff mit sigmoidalen Fit (Details Text und Kap. 2.3.4.): in 300 mM KPP (■), dazugehöriger Fit (-----) und in 3 mM KPP (■), dazugehöriger Fit (-----).

Sowohl im 300 mM KPP, als auch im 3 mM KPP ist der Kurvenverlauf der PC Entfaltung sigmoid (Abb. 3-21). Der Wendepunkt x_0 (Tab. 3-5) im 300 mM KPP liegt bei 6,6 M Harnstoff, der im 3 mM KPP bei 5,6 M Harnstoff. Auch hier zeigt sich, dass 300 mM KPP das Protein, im Vergleich zu 3 mM KPP soweit mehr stabilisiert, dass eine um 1 M höher konzentrierte Harnstofflösung zur Entfaltung benötigt wird. Die Steilheit (Tab. 3-5) der Kurve im Übergangsbereich ist allerdings zwischen den beiden Pufferkonzentrationen nicht signifikant unterschiedlich. In 8 M Harnstoff bei 3 mM KPP ist keine Sekundärstruktur mehr messbar und PC nach den Kriterien des UV-CDs entfaltet (Kap. 1.8.), während im 300 mM Puffer noch eine Reststruktur vorhanden ist.

Zusammenfassung

Bei allen vier Messparametern zeigt sich eine Verschiebung der benötigten Harnstoffkonzentration, um den Wendepunkt x_0 zu erreichen, um $0,9 \pm 0,1$, von durchschnittlich 5,5 M Harnstoff im 3 mM KPP auf durchschnittlich 6,3 M Harnstoff in 300 mM KPP. Dabei ist der Wert im 300 mM KPP im UV-CD mit 6,6 M Harnstoff am höchsten und weicht von den anderen etwas ab (Tab. 3-5). Eine ähnliche Verschiebung um etwa 1 M Harnstoff zeigt sich auch bei der Dissoziation vom PC_{tri} zum Monomer, von 3 M im 3 mM KPP auf 4 M in 300 mM KPP (Tab. 3-5). Weniger einheitlich ist der Punkt der vollständigen Entfaltung. Nach den Kriterien des Vis-CDs und der Absorption, bei denen im Wesentlichen die Konfiguration des Chromophors und damit auch der ihn beeinflussenden

Proteinumgebung, gesehen wird, zeigt sich ein unterschiedliches Bild. Nach den Kriterien der Absorption (Q-Wert) ist PC in 8 M Harnstoff in beiden Pufferkonzentrationen vollständig entfaltet. 2% Abweichung für PC in 300 mM KPP liegen im Bereich der Fehlergrenzen (Tab. 3-5). Die gemessenen Endwerte (im 8 M Harnstoff) im Vergleich zu den berechneten Endwerten aus dem sigmoidalen Fit, liegen ebenfalls im Bereich der Fehlergrenzen (die starke Abweichung vom gemessenen und errechneten Wert im 300 mM KPP liegt im schlechten Fit begründet) (Tab. 3-5, Abb. 3-19), d. h., dass im 8 M Harnstoff, sowohl im 3 wie auch im 300 mM KPP, das Ende der Entfaltungsreaktion erreicht ist. Im Vis-CD bei 300 mM KPP in 8 M Harnstoff wird der zu erwartende Endwert, wie er in 3 mM KPP vorliegt, nicht erreicht (15% Abweichung). Der gemessene Endwert stimmt aber zu 100% mit dem errechneten überein, der Kurvenverlauf befindet sich bereits in der Sättigung (Abb. 3-18), d. h. auch hier, dass die Entfaltungsreaktion das Ende erreicht hat. Nimmt man deshalb an, dass das Protein dabei bereits völlig entfaltet ist, deutet dies auf eine veränderte Konformation des Chromophors, gegenüber im 3 mM KPP hin, bei der das Vis-CD Signal erhöht ist (Tab. 3-5). Bei der Emission, die die Rigidität des Chromophors und seiner Proteinumgebung widerspiegelt (Kap. 1), zeigt sich für die vollständige Entfaltung das gleiche Bild wie für die Absorption. In 8 M Harnstoff ist PC bei beiden Pufferkonzentrationen entfaltet, die Abweichungen des gemessenen vom errechneten Endwert liegen im Bereich der Fehlergrenzen.

Bei der Betrachtung der Sekundärstruktur, die im UV-CD sichtbar wird, wird deutlich, dass lediglich bei 8 M Harnstoff in 3 mM KPP keine Sekundärstruktur mehr vorhanden ist, im 300 mM KPP hat PC noch deutlich messbaren Sekundärstrukturanteil (Abb. 3-21), gegenüber dem Wert in 3 mM KPP 13% (Tab. 3-5). Das UV-CD Signal in 8 M Harnstoff, 300 mM KPP, liegt zwar im Bereich der Fehlergrenzen des berechneten Endwertes für das UV-CD Signal, jedoch ist die Fehlerabweichung um ein vielfaches größer als der tatsächliche Wert und kann deshalb nicht ernsthaft in die Bewertung mit einbezogen werden. Der Kurvenverlauf, der noch nicht in der Sättigung ist (Abb. 3-21), zeigt, dass die Entfaltungsreaktion in 8 M Harnstoff, 300 mM KPP, das Ende noch nicht erreicht hat.

Auf die Steilheit der Kurve, d.h. auf die Spannweite der benötigten Harnstoffkonzentration für den Übergangsbereich der Titrationskurve, wirkt sich die Pufferkonzentration für das Vis-CD und die Absorption gegensätzlich aus (Tab. 3-5). Im Vis-CD ist die Kurve im höher konzentrierten Puffer steiler als im niedriger konzentrierten, d.h. der Puffer stabilisiert bei den

niedrigeren Harnstoffkonzentrationen dahin gehend, dass das Vis-CD Signal länger stabil bleibt. Das Absorptionssignal legt dagegen nahe, dass der höher konzentrierte Puffer über den gesamten Bereich der Entfaltung das Protein mehr als der niedriger konzentrierte, stabilisiert und die Kurve somit abflacht (Tab. 3-5). Bei der Emission und im UV-CD hat die Pufferkonzentration keinen verändernden Einfluss auf die Steilheit des Kurvenverlaufes. Die vier Messparameter zeigen unterschiedliche Aspekte der Entfaltung, welche nicht gleich auf die Harnstoffkonzentration und die Pufferkonzentration reagieren.

Fitparameter →	A ₁		A ₂		x ₀		p		Abweichung Signal in 8 M Harnstoff zu A ₂ [%]		300 zu 3 mM [%]*
	Messparameter ↓										
c von KPP [mM]	3	300	3	300	3	300	3	300	3	300	300
Vis-CD _{Amplitude-rel}	0,99 ±0,03	1,00 ±0,00	0,36 ±0,03	0,49 ±0,01	5,29 ±0,12	6,08 ±0,02	14,0 ±3,66	35,0 ±9,35	5,3 ±5	0 ±0	15
Absorption _{Q-Wert}	6,60 ±0,12	6,58 ±0,25	0,38 ±0,20	-0,96 ±1,74	5,46 ±0,08	6,29 ±0,54	20,0 ±3,17	6,97 ±2,60	3,7 ±6,5	19,4 ±23	2
Emission _{max-rel}	1,01 ±0,01	1,01 ±0,02	-0,01 ±0,01	-0,04 ±0,03	5,36 ±0,03	6,23 ±0,05	13,5 ±0,74	12,2 ±1,05	1,4 ±1,2	4,2 ±2,6	0
UV-CD _{222nm-rel}	-1,01 ±0,02	-0,93 ±0,02	-0,02 ±0,04	-0,01 ±0,14	5,58 ±0,09	6,57 ±0,27	13,7 ±2,33	10,1 ±2,90	-3,4 ±4	13,3 ±12,3	13

Tab. 3-5: Parameter der sigmoidalen Fits (Kap. 2.3.4.) der Titrationskurven von PC in 0 – 8 M Harnstoff in 3 und 300 mM KPP, aus den Abb. 3-18 – 3-21; *die Werte für 8 M Harnstoff in 3 mM KPP stellen für alle Messparameter, nach den gegebenen Kriterien, den Wert für vollständige Entfaltung des jeweiligen Messparameters dar (siehe Ergebnis Kap. 3.5.). Die prozentualen Abweichungen sind auf den Wert dieser Messung bezogen.

Anmerkung: Aufgrund der geringen Anzahl an Messpunkten, haben die Fitparameter zum Teil relativ große Standardabweichungen. Dies betrifft vor allem den p-Wert. Es wurden jedoch unterschiedliche Fits durchgeführt (Daten nicht gezeigt) und alle bestätigten die angegebenen Werte im Rahmen der Fehlergrenzen.

3.6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen aus den Vormessungen

Parameter für Dissoziations- und Entfaltungsvorgänge

Folgende Parameter, die aus der Literatur (Kap. 1.8.) bereits bekannt waren, wurden in den Vormessungen (Kap. 3.1. bis 3.5.) für die Dissoziation und Entfaltung von PC verwendet. Gleichzeitig wurden sie auf ihre Tauglichkeit getestet und für die gegebenen Versuchsdurchführungen und Messbedingungen genauer definiert.

Parameter für die Dissoziation von PC_{tri} zu PC_{mono}:

- Vis-CD: - Abnahme der Schulter bei etwa 627 nm
 - Zunahme des positiven Extremums, in Folge der Abnahme der Schulter bei 627 nm

- In der 1. Ableitung des Vis-CD Spektrums der Übergang der W-förmigen Bande zu einer V-förmigen
- Abnahme der s-förmigen Bande des Differenzspektrums von PC_{tri} minus PC_{mono} (Kap. 3.1.)
- Absorption: - Übergang des langwelligen Maximums von $\approx 616/617$ nm auf ≈ 612 nm (Kap. 3.1.)
- Fluoreszenz: - Es sind keine charakteristischen Unterschiede zwischen den Spektren eines PC_{tri} zu einem PC_{mono} vorhanden. Jedoch eine deutliche Abnahme in der Intensität. Der Verlauf der Abnahme der Intensität bei der Titration mit 0 – 8 M Harnstoff zeigt eindeutig 2-Phasen an, die Phasen der Dissoziation und der Entfaltung zeigen (Kap. 3.1., 3.5.3.).
- UV-CD: - Keine Dissoziation zu erkennen (Kap. 3.1.)

Parameter für die Entfaltung von PC:

- Vis-CD: Abnahme des negativen und positiven Extremums um etwa die Hälfte
- Absorption: Abnahme des langwelligen Maximums und Zunahme des UV-Nahen Maximums. In Folge eine Abnahme des Q-Wertes von ≈ 6 auf $\approx 0,4$. (Kap. 1.8. und 3.5.)
- Emission: Abnahme der Emission, bis im entfalteten Protein keine mehr messbar ist (Kap. 1.5., 1.8. und 3.5.).
- UV-CD: Abnahme des Signals für α -Helix bis nahe Null im entfalteten Protein (Kap. 1.8. und 3.5.).

Messbedingungen:

Proteinkonzentration: Für integrales PC und UE wurde sie auf $1,54 \cdot 10^{-5}$ M festgelegt. Abweichungen hiervon (UE: Kinetische Messungen) werden an entsprechender Stelle begründet. Sie liegen aber immer deutlich unterhalb einer OD von ca. 1,2 pro mm, welche etwa die Grenze für das Lambert-Beersche-Gesetz darstellt (Kap. 3.1.).

Pufferkonzentration: Es wurde gezeigt (Kap. 3.4.), dass die Pufferkonzentration einen deutlichen Einfluss auf die Entfaltung des Proteins hat. Die Sättigung an Trimeren, bei gegebenen Messbedingungen (pH 7, RT, Proteinkonzentration $1,54 \cdot 10^{-5}$ M) war ab ca. 30 mM KPP aufwärts gegeben. Alle weiteren Messungen werden bei 50 mM KPP durchgeführt, man liegt damit deutlich in dem Pufferkonzentrationsbereich, bei der das Trimer-Monomer-Gleichgewicht von PC ganz auf der Seite der Trimere liegt.

Technische Schlussfolgerung für die weiteren Auswertungen

Gelegentlich nicht zu vermeidende Trübungen in der Proteinlösung, durch ausgefallenes Protein, wirken sich vor allem im UV nahen Bereich auf das Spektrum aus. Dies hat zur Folge, dass die Ergebnisse für den Q-Wert und die Gesamtamplitude des Vis-CDs, wie sie hier als Parameter für die Entfaltung verwendet wurden (s. o. und Kap. 2.3.4.), um den Aussagegehalt über das gesamte Spektrum zu erhalten, einem deutlich höheren Rauschen unterliegen, als bei Verwendung lediglich des langwelligen Absorptionsmaximums im Vis-Bereich und dem positiven Extremum des Vis-CD Spektrums. Deshalb wird bei den folgenden steady-state Untersuchungen in 50 mM KPP normalerweise an Stelle des Q-Wertes und der Gesamtamplitude des Vis-CDs nur das langwellige Absorptionsmaximum und das positive Extremum des Vis-CDs verwendet.

Modifikationen von PC durch den Harnstoff

Im UV-CD kann ein PC_{tri} von einem Monomer nicht unterschieden werden (Kap. 3.1., 3.5.). Jedoch verändert bereits die Zugabe von 1 M Harnstoff die Sekundärstruktur dahingehend, dass die Signalintensität des Spektrums insgesamt geringer wird (Abb. 7-1 im Anhang). Eine weitere Zugabe an Harnstoff bis etwa 5 M führt zu keiner wesentlichen Veränderungen mehr, bis bei höher konzentriertem Harnstoff die Entfaltung einsetzt. Es scheint demnach, dass schon eine geringe Zugabe an Harnstoff das Protein modifiziert ohne dass es dabei bereits dissoziiert. Eine Modifikation durch den Harnstoff ist auch im Vis-CD zu beobachten. Beim Vergleich der 1. Ableitungen der Spektren des Vis-CDs vom PC_{mono} in Harnstoff und in Puffer (Abb. 1-3) bzw. in Wasser (Abb. 3-13) zeigt sich, dass die V-förmige Bande des PC_{mono} in Harnstoff deutlich schmaler ist, als die des PC_{mono} in Wasser bzw. Puffer. Dies bedeutet, dass auch hier wahrscheinlich eine Modifizierung durch den Harnstoff zu sehen ist, welche nicht Dissoziation darstellt. Bei der Fluoreszenz, in der eine starke Abnahme der Intensität bereits bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen erfolgt und dabei die Titrationskurve einen exponentiellen Kurvenverlauf hat (Abb. 3-20) ist ebenfalls nicht auszuschließen, dass eine Reaktion mit Harnstoff zu sehen ist, welche nicht die eigentliche Dissoziationsreaktion anzeigt. Worin die Modifizierung im Detail besteht, ist nicht untersucht worden.

Aus der Literatur (Labhardt, 1986; Pace, 1986; Lapanje, 1978; Guard-Friar & MacColl, 1983; Möglich et al., 2004) ist ebenfalls bekannt, dass Harnstoff zu Modifizierungen des Proteins führt und bei der Entfaltung eine zusätzliche Reaktion hervorrufen kann, die nichts mit der eigentlichen Entfaltungs- bzw. Dissoziationsreaktion zu tun hat. Details hierzu sind noch

nicht gut verstanden (Möglich et al., 2004). Generell haben Salze einen starken Einfluss auf das Protein, sie können dabei sowohl stabilisierend, wie auch destabilisierend wirken (Vogel & Siebert, 2002). Bei der Interpretation der Entfaltungskinetiken muss dies bedacht werden.

3.7. Dissoziation und Entfaltung von PC und den Untereinheiten in 50 mM KPP

Wie im vorherigen Abschnitt (Kap. 3.6.) zusammenfassend gezeigt wurde, beeinflusst die Phosphatpufferkonzentration die Dissoziation und Entfaltung von PC (Kap. 3.1.2.). Eine Sättigung an Trimeren bei 0 M Harnstoff ist ab 30 mM KPP aufwärts gegeben. Deshalb erfolgen alle weiteren Dissoziations- und Entfaltungsversuche in 50 mM KPP, pH 7, RT.

3.7.1. Definition von PC Monomer und PC entfaltet, in 50 mM KPP

In Kap. 3.6. wurde gezeigt, dass PC in 3 mM KPP bzw. 300 mM KPP in 3 M bzw. 4 M Harnstoff als Monomer und in 8 M Harnstoff im 3 mM KPP, nach den Kriterien (Kap. 3.6., 1.8.) der hier verwendeten Messparameter, vollständig entfaltet vorliegt. Im Folgenden soll, als Grundlage für alle weiteren Messungen, untersucht werden ab welcher Harnstoffkonzentration PC in 50 mM KPP als Monomer vorliegt und ob es in 8 M Harnstoff völlig entfaltet ist. Als Messparameter für die Dissoziation dient die Abnahme des Signals des Vis-CD Spektrums bei 627 nm, verdeutlicht durch die 1. Ableitung. (Kap. 3.1., 3.6.). Als Beleg für die Entfaltung in 8 M Harnstoff werden die Endwerte der 4 Messparameter (Q-Wert der Absorption, Vis-CD, UV-CD und Emission) herangezogen und mit den Werten aus den Messungen in 3 mM KPP, 8 M Harnstoff verglichen, in dem PC vollständig entfaltet ist (Kap. 3.5.).

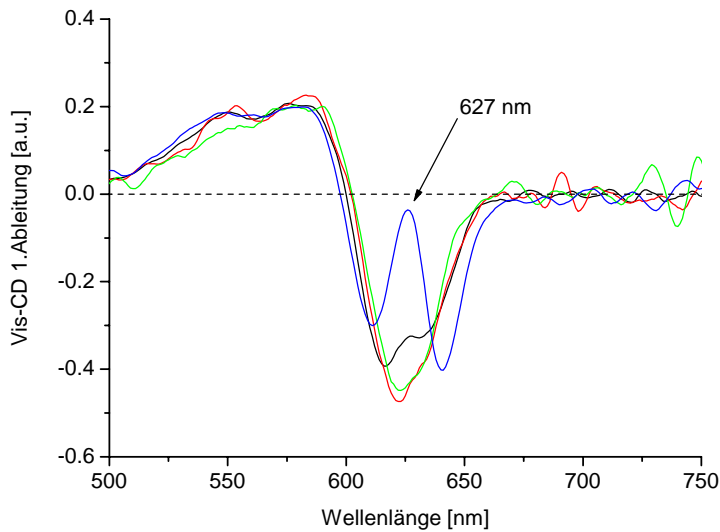


Abb. 3-22: 1. Ableitung der Vis-CD Spektren von PC in 50 mM KPP, pH 7, in 0 M (—), 3 M (—), 4 M (—) und 5 M Harnstoff (—).

In 4 M Harnstoff, 50 mM KPP, ist in der 1. Ableitung des Vis-CD Spektrums bei 627 nm keine Aufspaltung des negativen Signals mehr zu erkennen (Abb. 3-22), in 3 M Harnstoff ist sie noch deutlich vorhanden. Dass heißt, dass PC in 50 mM KPP, 4 M Harnstoff als Monomer vorliegt.

	Absorption: Q-Wert		Vis-CD _{max} [a.u.]			Emission _{max} [a.u.]		UV-CD _{222nm} [a.u.]	
	50	3	300	50	3	50	3	50	3
Messwert in 8 M Harnstoff	0,44	0,43	5,5	5,8	4,4	0	0	0,22	0,24

Tab. 3-6: Vergleich der Messwerte von PC in 8 M Harnstoff in 3 (300) und 50 mM KPP, wobei die jeweiligen Werte in 3 mM KPP den Zustand des entfalteten PCs angeben (siehe Kap. 3.5.)

Beim Vergleich der Messwerte (Tab. 3-6) von PC in 8 M Harnstoff in 3 mM bzw. 50 mM KPP zeigt sich, dass in der Absorption, der Emission und im UV-CD die gleichen Endwerte erreicht werden. Der sigmoide Verlauf der Kurven (Abb. 3-23) zeigt sowohl für die Absorption, als auch die Emission ein Auslaufen in die Sättigung, beim UV-CD ist dieser Kurvenverlauf zwar noch nicht völlig erreicht, aber der Messwert bei 8 M Harnstoff zeigt keine messbare Sekundärstruktur mehr an, d. h., dass für die Kriterien dieser drei Messparameter PC in 8 M Harnstoff auch in 50 mM KPP entfaltet vorliegt.

Gesondert beurteilt werden muss der Vis-CD. Die sigmoide Kurve erreicht zwar bei 8 M Harnstoff einen Sättigungswert, dieser ist jedoch größer als der Vergleichswert von PC in 3 mM KPP. Im Rahmen der Fehlergrenzen ist er mit dem Wert von PC in 300 mM KPP

vergleichbar (Tab. 3-6). Es gelten die gleichen Überlegungen wie für die Ergebnisse der Titration von PC mit 0 bis 8 M Harnstoff in 300 mM KPP (Kap. 3.5.). Nämlich, dass die Reaktion für diese Pufferkonzentration bereits das Ende der Entfaltungsmöglichkeit erreicht hat, dabei aber unklar bleibt, ob noch ein Rest an Proteinstruktur das erhöhte Vis-CD Signal bewirkt, oder ob eine andere Gleichgewichtsformation durch die erhöhte Ionenstärke induziert wird. Nachdem im UV-CD keine Sekundärstruktur mehr nachgewiesen werden kann, scheint Letzteres sehr wahrscheinlich und es wird im Folgenden davon ausgegangen, dass PC in 8 M Harnstoff in 50 mM KPP, pH 7 auch nach den Kriterien des Vis-CDs entfaltet vorliegt.

3.7.2. Dissoziation und Entfaltung von PC

Im Folgenden werden nicht mehr die Puffer- und Protein-Konzentrationen und deren Einfluss auf PC und seine Entfaltung durch Harnstoff betrachtet, sondern bei definierten Bedingungen ($c_{PC} = 1,7 \cdot 10^{-6}$ M, 50 mM KPP, pH $\approx 7,3$, RT; siehe Kap. 3.6.) der Einfluss der Harnstoffkonzentration und die daraus resultierende Dissoziation und Entfaltung von PC. Die verwendeten Messparameter sind wiederum die Selben wie in den vorangegangenen Kapiteln (Kap. 1.8., 2.3.4., 3.6.).

3.7.2.1. Dissoziation vom PC Trimer zum Monomer

Im Überblick (Abb. 3-23) zeigen die physikalischen Parameter (langwelliges Absorptionsmaximum, Vis-CD positives Extremum, Emissionsmaximum und UV-CD bei 222 nm) einen qualitativ ähnlichen, aber quantitativ doch deutlich unterschiedlichen Kurvenverlauf bei der Titration von 0 bis 8 M Harnstoff. Alle Titrationskurven, bei denen der Chromophor als Sonde diente (Absorption, Vis-CD und Emission) lassen sich einigermaßen klar in zwei Bereiche aufteilen: Von 0 bis 4 M Harnstoff findet die Dissoziation statt und von 4 bis 8 M Harnstoff die Entfaltung. Im UV-CD ist dies nicht möglich. (Kap. 3.1., 3.5., 3.6.)

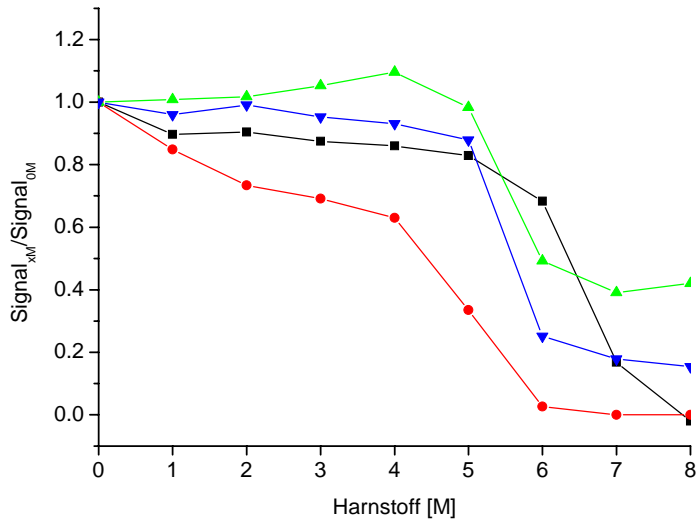


Abb. 3-23: Dissoziation und Entfaltung von PC_{tri} in 50 mM KPP, pH 7: Veränderung der Signalstärke in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration, jeweils normiert auf entsprechenden Wert in 0 M Harnstoff: Vis-CD_{max} (—▲—), Absorption_{vis-max} (—▼—), Emission_{max} (—●—), UV-CD_{222nm} (—■—)

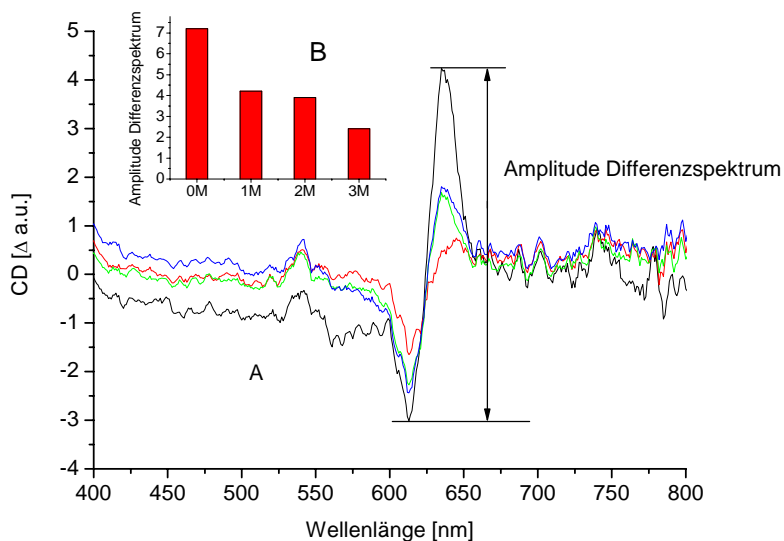


Abb. 3-24: Effekt von Harnstoff auf die Vis-CD Spektren von PC_{tri} in 50 mM KPP. A) Differenzspektren von PC (Trimer minus Monomer) in 0 M (—), 1 M (—), 2 M (—) und 3 M Harnstoff (—); B) Amplituden der Differenzspektren (Minimum – Maximum).

Die Dissoziation vom PC_{tri} zum Monomer wird u. a. mittels des Trimer/Monomer Differenzspektrums der Vis-CD-Spektren verfolgt (Abb. 3-24). Den am stärksten dissoziierenden Einfluss auf PC hat die Zugabe von 0 auf 1 M Harnstoff. Wie im Kap. 3.1.2 gezeigt, hat die Veränderung der Pufferkonzentration teilweise einen verändernden Einfluss auf das Kurvenprofil (z. B. abflachen oder steiler werden des Übergangsbereiches der

Titrationen), weshalb es im 50 mM KPP durchaus etwas von denen in 3 und 300 mM KPP abweichen kann.

Die Abnahme der Fluoreszenz während der Monomerisierung von PC von 0 bis 4 M Harnstoff (Abb. 3-23, 3-25) ist wiederum (entsprechend im 3 und 300 mM KPP in Kap.

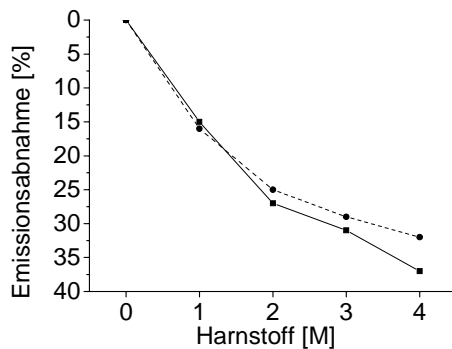


Abb. 3-25: Prozentuale Abnahme des Emissionsmaximums von PC_{Tri} in 0 bis 4 M Harnstoff in 50 mM KPP (—) und 300 mM KPP (.....).

3.1.2.) exponentiell. Die Emission im Maximum reduziert sich dabei um 37%. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, scheinen sich bei der Reduzierung der Emission von 0 auf 4 M Harnstoff, neben der Dissoziation noch weitere, emissionsreduzierende Vorgänge zu zeigen. Bei genauer Betrachtung des Kurvenverlaufs von Abbildung 3-23, Emission, fällt auf, dass der Übergang in die sigmoide Kurve, welche den Entfaltungsvorgang kennzeichnet, bereits bei 3 M Harnstoff einsetzt und nicht erst bei 4 M, in

welchem PC nach den Kriterien des Vis-CD als Monomer vorliegt (Abb. 3-22). Bei 4 M Harnstoff ist die Emissionskurve bereits in der beginnenden Entfaltung, anders als die Kurven der Absorption, des Vis-CDs und des UV-CDs, bei welchen die begonnene Entfaltung erst ab 5 M Harnstoff sichtbar wird (Abb. 3-23). Ebenso fällt auf, dass die Signalabnahme, verglichen mit den Werten aus den Messungen in 300 mM KPP, bis einschließlich 3 M Harnstoff parallel verlaufen, aber bei 4 M Harnstoffzugabe die Signalabnahme im 50 mM KPP vergleichsweise stärker ist (Abb. 3-25). All diese Beobachtungen lassen erkennen, dass im 50 mM KPP erste Entfaltungsvorgänge mittels Fluoreszenz bereits im 3 M Harnstoff gesehen werden können, deshalb wird der Fit für die Kurve der Entfaltung (siehe unten) für die Emission bereits ab 3 M Harnstoff vorgenommen. Die Fluoreszenz, welche die Rigidität von PC widerspiegelt, reagiert offensichtlich empfindlicher auf Entfaltungsvorgänge, die bereits bei niedrigeren Harnstoffkonzentrationen beginnen (Der Übergang vom $Protein_{nat}$ zum $Protein_{denat}$ ist bei reversibler Entfaltung immer eine Gleichgewichtsreaktion, Kap. 1.7.).

3.7.2.2. Entfaltung

Um die Daten der Abb. 3-23 besser vergleichen zu können, wurden die Werte aus dem Bereich der Entfaltungsreaktion (4 bis 8 M Harnstoff, bei der Fluoreszenz 3 bis 8 M

Harnstoff, s. o.) für jeden Messparameter auf einen Anfangswert von 0 und Endwert von 1 normiert (Abb. 3-26), so dass sie den entfalteten Anteil von PC für den jeweiligen Messparameter angeben (Kap. 2.3.4.). Die sigmoidalen Fits (Kap. 2.3.4.) unterscheiden sich dann nur noch im Wendepunkt x_0 , und in der Steilheit des Übergangs (p-Wert).

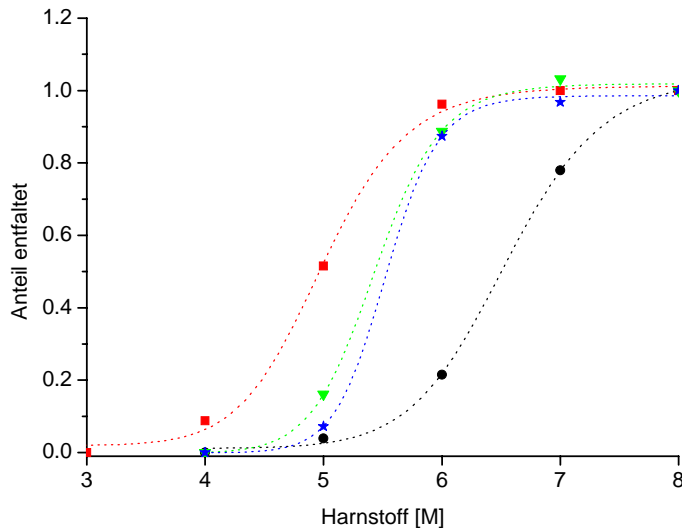


Abb. 3-26: Grad der Entfaltung des PC_{mono} , berechnet aus den Werten von Abb. 3-23, gezeigt in Abhängigkeit zur Harnstoffkonzentration, mit sigmoidalen Fit (Kap. 2.3.4.); Vis-CD (\blacktriangledown) mit Fit (---), Absorption (\star) mit Fit (- - -), Emission (\blacksquare) mit Fit (.....), UV-CD (\bullet) mit Fit (-----).

Fitparameter \rightarrow	A_1	A_2	x_0	p
Messparameter \downarrow				
Vis-CD _{max}	$0,00 \pm 0,03$	$1,02 \pm 0,02$	$5,44 \pm 0,06$	$19,7 \pm 2,12$
Absorption _{vis-max}	$0,00 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,02$	$5,53 \pm 0,05$	$25,1 \pm 2,62$
Emission _{max}	$0,02 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,02$	$4,99 \pm 0,05$	$13,9 \pm 2,56$
UV-CD _{222nm}	$0,01 \pm 0,01$	$1,04 \pm 0,03$	$6,54 \pm 0,05$	$16,0 \pm 1,28$

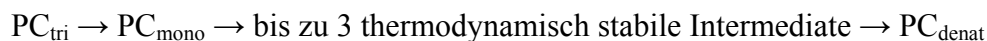
Tab. 3-7: Parameter der sigmoidalen Fits (Kap. 2.3.4.) der Titrationskurven von PC_{mono} in 0 – 8 M Harnstoff in 50 mM KPP, aus Abb. 3-26.

Die Wendepunkte x_0 , Harnstoffkonzentrationen, bei denen die Hälfte des Proteins entfaltet ist, liegen im Bereich von 5 bis 6,5 M Harnstoff (Tab. 3-7), sie unterscheiden sich z. T. signifikant. Es gilt folgende Reihenfolge: UV-CD > Absorption \approx Vis-CD > Emission. Offensichtlich gibt es keinen einheitlichen Entfaltungsvorgang: Die Sekundärstruktur, mittels UV-CD erfasst, geht als letztes verloren. Die Strukturen, die die Konformation der Chromophore beeinflussen und mittels Vis-CD und Absorption verfolgt werden, gehen bereits deutlich früher in einen Endzustand über und entfalten als zweites. Und als erstes nimmt die Rigidität des Chromophors, mittels Emission erfasst, ab. Dies ist ein Hinweis auf das beginnende Aufweichen des Proteins in der Chromophorumgebung.

Die p-Werte, maßgeblich für die Steilheit der sigmoiden Kurve, unterscheiden sich ebenfalls teilweise signifikant, aber es ergibt sich eine andere Reihenfolge (Tab. 3-7): Absorption>Vis-CD>UV-CD≈Emission. Bei der Absorption ist die Harnstoffdifferenz, die für die Entfaltung im Übergangsbereich benötigt wird, signifikant geringer, als für das Vis-CD, obwohl diese sich in ihrem Wendepunkt x_0 nicht signifikant unterscheiden. Die Steilheit ist bei den UV-CD- und den Emissionsspektren noch einmal signifikant geringer als die des Vis-CD, obwohl die in ihren Wendepunkten signifikant differieren. Daraus kann gefolgert werden, dass sie, obwohl sie die gleiche Steilheit haben, doch einen unterschiedlichen Aspekt der Entfaltung zeigen.

Da alle vier Messparameter für verschiedene Harnstoffkonzentrationen einen unterschiedlichen Entfaltungsverlauf von PC anzeigen (Abb. 3-26), kann daraus gefolgert werden, dass die Entfaltung von PC nicht durch ein einfaches Gleichgewicht zwischen PC_{mono} zum PC_{denat} beschrieben werden kann. Es werden vier verschiedenen Übergänge gesehen, daraus kann gefolgert werden, dass drei thermodynamisch stabile Intermediate vorliegen.

Aus den beschriebenen steady-state Untersuchungen wird für die Dissoziation und Entfaltung von PC_{tri} deshalb zunächst folgendes Modell entworfen:



Dabei muss man beachten, dass das Monomer aus zwei Untereinheiten besteht, die sich unterschiedlich verhalten können. Diese werden im Folgenden deshalb separat untersucht.

3.7.3. Entfaltung von PC Untereinheiten in steady-state Messungen (0 bis 8 M Harnstoff)

Bei den bisherigen Messungen mit PC ist immer die Summe der UE betrachtet worden, im Folgenden werden die isolierten Untereinheiten des PC_{mono} getrennt untersucht. Die Messbedingungen und Verdünnungsreihen sind die Selben wie für das integrale PC. Die Titration von Harnstoff erfolgte ebenfalls von 0 bis 8 M Harnstoff. Da die UE bei geringer Harnstoffkonzentration unspezifisch aggregieren (Fischer et al., 1990), wurde nur die Entfaltungsreaktion ab 2 bzw. 3 M Harnstoff (je nachdem, ab welcher Harnstoffkonzentration bei den einzelnen Messparametern die unspezifische Aggregation nicht mehr sichtbar war; Daten nicht gezeigt) gefittet. Verwendet wurde der gleiche sigmoidale Fit, wie bei den

vorherigen Titrationskurven (Kap. 2.3.4.). Auch hier wurden die Daten, damit sie besser vergleichbar sind, für jeden Messparameter für den Anfangswert auf 0 und den Endwert auf 1 normiert (Kap. 2.3.4.). Damit geben sie in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration den jeweiligen Grad der Entfaltung für jeden Messparameter wieder.

3.7.3.1. Entfaltung der PC α -Untereinheit

Die Wendepunkte x_0 der sigmoidalen Fits der Titrationskurven liegen für alle vier Messparameter zwischen 4,8 und 5,9 M Harnstoff (Tab. 3-8, Abb. 3-27). Die Wendepunkte unterscheiden sich dabei, außer für die Emission und die Absorption, signifikant und reihen sich dabei wie folgt: UV-CD>Emission \approx Absorption>Vis-CD. Dies bedeutet, dass auch hier die Sekundärstruktur als letztes verloren geht (UV-CD), dass die Rigidität (Emission) und die Konformation des Proteins (Absorption) bereits früher abnehmen, und die Proteinstrukturen, die den Chromophor in einer verdrillten Position halten (Vis-CD Signal) noch früher.

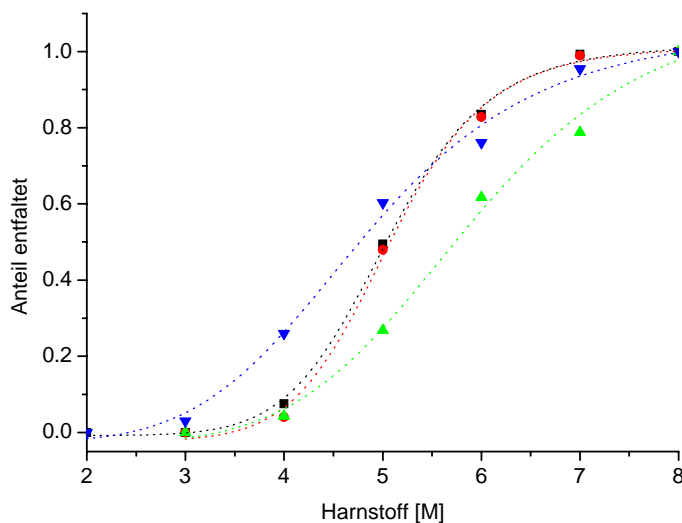


Abb. 3-27: Grad der Entfaltung der α -UE in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration mit sigmoidalen Fit (Kap. 2.3.4.): Vis-CD_{max} (▼) mit Fit (---), Absorption_{vis-max} (■) mit Fit (----), Emission_{max} (●) mit Fit (---), UV-CD_{222nm} (▲) mit Fit (----).

Die Steilheit (p-Wert) der Kurven (Tab. 3-8, Abb. 3-27) unterscheiden sich wie folgt: Emission \approx Absorption>UV-CD \approx Vis-CD; die p-Werte der Absorption und Emission sind dabei sehr ähnlich, diese Parameter zeigen somit, genauso wie für die Wendepunkte, das gleiche Verhalten. Dass der Übergangsbereich der Entfaltung dem gleichen Harnstoffintervall entspricht. Für das UV-CD und das Vis-CD ist der Übergangsbereich der Entfaltung größer,

d. h. er erstreckt sich über einen größeren Harnstoffbereich als für die Absorption und die Emission (Abb. 3-27). Da sie sich aber in ihrem Wendepunkt signifikant unterscheiden, zeigen sie trotzdem verschiedene Aspekte der Entfaltung.

Fitparameter → Messparameter ↓	A ₁	A ₂	x ₀	p
Vis-CD _{max}	-0,03 ±0,04	1,06 ±0,07	4,83 ±0,16	5,41 ±0,96
Absorption _{vis-max}	-0,01 ±0,01	1,02 ±0,02	5,05 ±0,05	9,68 ±0,85
Emission _{max}	-0,02 ±0,03	1,01 ±0,03	5,07 ±0,08	10,1 ±1,59
UV-CD _{222nm}	-0,03 ±0,06	1,12 ±0,15	5,88 ±0,29	6,31 ±1,75

Tab. 3-8: Parameter der sigmoidalen Fits (Kap. 2.3.4.) der Titrationskurven der α -UE, in 0 – 8 M Harnstoff in 50 mM KPP, aus Abb. 3-27.

Da die vier Messparameter für drei Fälle (Absorption und Emission sind in diesem Falle gleich) bei gleicher Harnstoffkonzentration unterschiedliche Grade der Entfaltung zeigen, d. h. drei unterschiedliche Übergangsbereiche zeigen, kann von zwei thermodynamisch stabilen Intermediaten ausgegangen werden.

3.7.3.2. Entfaltung der PC β -Untereinheit

Die Wendepunkte x₀ des sigmoidalen Fits der Titrationskurven, der vier Messparameter, liegen zwischen 5,0 und 5,4 M Harnstoff (Tab. 3-9, Abb. 3-28). Dabei unterscheidet sich lediglich der Wendepunkt der Kurve für das UV-CD, mit dem höchsten Wert von 5,42 signifikant von den anderen: UV-CD > Emission \approx Absorption \approx Vis-CD; Das Gleiche gilt für die Steilheit der Kurven (p-Wert), auch hier unterscheidet sich nur die UV-CD Kurve signifikant von den anderen und hat dabei den höchsten Wert (Tab. 3-9).

Die Messergebnisse zeigen, dass die Sekundärstruktur inklusive der Bereiche, die den Chromophor nicht beeinflussen, als letztes aber dann auch am schnellsten verloren gehen. Da von den vier verschiedenen Messparametern nur das UV-CD einen abweichenden Grad der Entfaltung, bei bestimmten Harnstoffkonzentrationen, gegenüber den anderen drei Messparametern, zeigt, kann im Übergangsbereich der Entfaltung von nur einem thermodynamisch stabilen Intermediat ausgegangen werden.

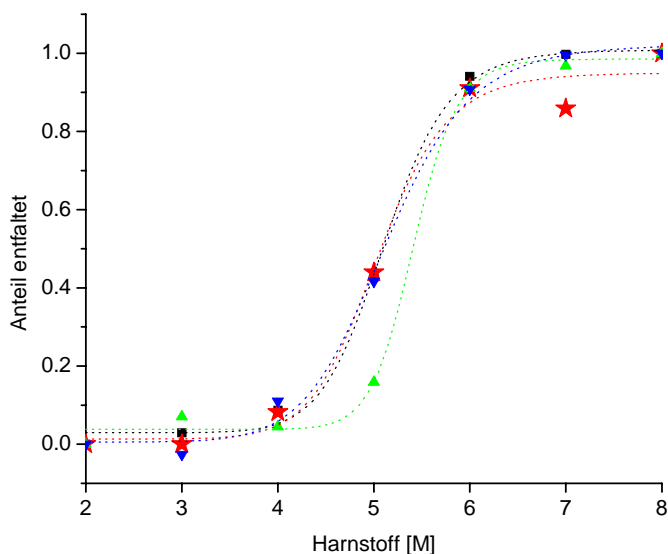


Abb. 3-28: Grad der Entfaltung der β -UE in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration mit sigmoidalen Fit (Kap. 2.3.4.): $\text{Vis-CD}_{\text{max}}$ (★) mit Fit (---), $\text{Absorption}_{\text{vis-max}}$ (■) mit Fit (---), $\text{Emission}_{\text{max}}$ (▼) mit Fit (---), $\text{UV-CD}_{222\text{nm}}$ (▲) mit Fit (---).

Fitparameter →	A_1	A_2	x_0	p
Messparameter ↓				
$\text{Vis-CD}_{\text{max}}$	$0,01 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,05$	$5,04 \pm 0,11$	$14,0 \pm 5,63$
$\text{Absorption}_{\text{max}}$	$0,03 \pm 0,02$	$1,01 \pm 0,02$	$5,12 \pm 0,05$	$15,1 \pm 2,51$
$\text{Emission}_{\text{max}}$	$0,01 \pm 0,03$	$1,02 \pm 0,04$	$5,13 \pm 0,08$	$11,7 \pm 2,29$
$\text{UV-CD}_{222\text{nm}}$	$0,04 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,02$	$5,42 \pm 0,07$	$24,0 \pm 3,47$

Tab. 3-9: Parameter der sigmoidalen Fits (Kap. 2.3.4.) der Titrationskurven der β -UE, in 0 – 8 M Harnstoff in 50 mM KPP, aus Abb. 3-28

3.7.4. Vergleich der Entfaltung vom integralen PC, der α - und der β -Untereinheit

Wie oben gezeigt, zeigen die Messergebnisse für die α -UE zwei mögliche thermodynamisch stabile Intermediate im Übergangsbereich der Entfaltung, die der β -UE einen und die für das integrale PC drei. Dieses Ergebnis deutet an, dass beim integralen PC die Übergänge in den UE überlagern, wird aber im weiteren Verlauf noch genauer analysiert.

Wendepunkte

Für die Wendepunkte x_0 gilt, dass sie für die α -UE über die einzelnen Messparameter breiter gestreut sind (4,8 bis 5,8) als für die β -UE (5 bis 5,4), aber im gleichen Bereich liegen (Tab. 3-8, 3-9, Abb. 3-27, 3-28). Beim integralen PC liegt der Bereich etwas höher (5 bis 6,5) (Tab. 3-7, Abb. 3-26). Soweit sich die Wendepunkte für die Messparameter für eine UE signifikant unterscheiden gilt für beide UE die gleiche Reihenfolge (α -UE:

UV-CD>Absorption≈Emission>Vis-CD, β -UE: UV-CD>Absorption≈Emission≈Vis-CD). Für das integrale PC kehrt sich die Reihenfolge von Vis-CD und der Emission, im Vergleich zu den UE, um (UV-CD>Absorption≈Vis-CD>Emission). Beim Vergleich der Wendepunkte der einzelnen Messparameter zwischen der α - und der β -UE zeigt sich, außer für das UV-CD, kein signifikanter Unterschied. Die Sekundärstruktur der α -UE geht bei einer signifikant höheren Harnstoffkonzentration verloren, als die der β -UE. Die Werte für das integrale PC unterscheiden sich, außer für die Emission der α -UE, in allen Parametern signifikant und sind dabei, außer für die Emission, höher, als der entsprechende Wert der UE. Dies deutet darauf hin, dass sich die UE gegenseitig stabilisieren.

Steilheit

Die Steilheit der Kurven der einzelnen Messparameter für die α -UE (p: 5,4 bis 10,1) (Tab. 3-8, Abb. 3-27) ist deutlich geringer, als die für die β -UE (p: 11,7 bis 24,0) (Tab. 3-9, Abb. 3-28), die Steilheit des integralen PCs liegt im Bereich der Werte für die β -UE (p: 13,9 bis 25,1) (Tab. 3-7, Abb. 3-26). Soweit sich die p-Werte der Messparameter signifikant unterscheiden, zeigen die α -UE (Absorption/Emission>Vis-CD/UV-CD), die β -UE (UV-CD>Absorption/Emission/Vis-CD) und das integrale PC (Absorption>Vis-CD>UV-CD≈Emission) eine unterschiedliche Reihenfolge. Beim Vergleich der p-Werte der Kurven der einzelnen Messparameter zwischen der α - und der β -UE zeigt sich für alle Parameter, außer der Emission, ein signifikanter Unterschied. Das heißt, die α -UE hat für die Absorption, das Vis-CD und das UV-CD einen signifikant breiteren Übergangsbereich der Entfaltung, als die β -UE. Für den Fall des UV-CDs ist dies sogar besonders stark ausgeprägt, die β -UE hat einen 4-mal größeren p-Wert, als die α -UE (α -UE: 6,3 β -UE: 24,0). Das integrale PC hat für alle Messparameter, außer der Emission, einen signifikanten Unterschied zu den UE. Im Fall des UV-CDs ist der Wert kleiner für das Vis-CD und die Absorption größer.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

- a) Die Entfaltung der α -UE unterscheidet sich deutlich von der, der β -UE.
- b) Die Werte des integralen PC stellen nicht einfach einen Mittelwert der UE dar, das bedeutet, dass die Entfaltung des integralen PCs nicht nur eine Summe der Reaktionen der UE ist, sondern eine eigene Dynamik besitzt.

3.7.5. Entfaltung von PC und den Untereinheiten ermittelt an Hand der Sekundärstruktur

(nach Sreeram, 1993, 1998, 2000; Kap. 2.3.4.)

Im Gegensatz zu den vorherigen Auswertungen der UV-CD Spektren wird im Folgenden nicht nur das Signal bei 222 nm betrachtet, sondern das gesamte Spektrum von 190 bis 240 nm auf seine Sekundärstrukturanteile analysiert. Das Analyseprogramm CDPro (Sreeram, 2000, Kap. 2.3.4.) unterscheidet nach α -helix regular (H_r), α -helix distorted (H_d), β -sheet regular (S_r), β -sheet distorted (S_d), turns (Trn) und unordered (Unrd). Je nachdem, inwieweit die Harnstoffkonzentration eine Aufnahme des UV-CD Signals im kürzerwelligen verhindert, konnte nur ein Teil des Spektrums (maximal verkürzt auf 220 bis 240 nm bei 8 M Harnstoff) in die Auswertung einbezogen werden. Wie im Kapitel 2.3.4. beschrieben, wurde aus drei Einzelanalysen ein Mittelwert für die einzelnen Strukturanteile gebildet. Auffällige Abweichungen zwischen den Ergebnissen der Programme wurde lediglich bei ein paar Messungen für das Protein in 5 M und 6 M Harnstoff beobachtet, der Konsistenz wegen wurde trotzdem ein Mittelwert aus allen drei Analysen genommen. Wie aus der Röntgenstruktur von PC bekannt (Schirmer, 1985, 1987; Kap. 1), beinhaltet PC keine β -Faltblattstrukturen, die ermittelten Werte diesbezüglich sind eine Fehlinterpretation des Programms. Sie werden der Vollständigkeit halber aufgelistet, aber nicht nach regular und distorted unterschieden (Tab. 3-10). Der Verlauf der Entfaltung von 0 bis 8 M Harnstoff wird an Hand der α -Helix-Abnahme und der Zunahme der „unordered“ Struktur grafisch dargestellt. Es fällt auf (Tab. 3-10), dass bei Erhöhung der Harnstoffkonzentration, d. h. bei Zunahme der Entfaltung, bei der Berechnung durch das Programm nicht nur die „unordered“ Anteile zunehmen, sondern auch die der Faltblattstruktur und teilweise auch die Turns. Dies ist wahrscheinlich eine weitere Fehlinterpretation des Programms. Deshalb gibt es eine weitere grafische Darstellung, in welcher alle nicht α -helicalen Anteile zusammengefasst und, wie die anderen Kurven, entsprechend sigmoidal gefittet wurden (Abb. 3-29, 3-30, 3-31, Kap. 2.3.4.).

3.7.5.1. Vergleich der berechneten Sekundärstrukturanteile aus den UV-CD Spektren mit der der Röntgenstruktur

Basierend auf den Arbeiten von Schirmer (1985, 1987), wurde die Röntgenstruktur von nativem PC mit den Ergebnissen aus den Sekundärstrukturanteileberechnungen (CDPro) aus

den UV-CD Spektren für natives PC und den nativen Untereinheiten verglichen und entsprechend bewertet (Tab. 3-10).

c Harnstoff [M]	Protein	Strukturanteil					
		H _r	H _d	H _{gesamt}	S _{gesamt}	Trn	Unrd
Röntgenstruktur nativ	Monomer			0,70	0,00	0,20	0,10
	α-UE			0,71	0,00	0,17	0,12
	β-UE			0,69	0,00	0,23	0,08
0 M	Monomer	0,42	0,23	0,65	0,04	0,14	0,15
	α-UE	0,36	0,22	0,58	0,05	0,14	0,20
	β-UE	0,50	0,24	0,73	0,02	0,16	0,13
1 M	Monomer	0,37	0,21	0,58	0,04	0,17	0,20
	α-UE	0,45	0,16	0,61	0,01	0,14	0,13
	β-UE	0,48	0,24	0,72	0,03	0,10	0,13
2 M	Monomer	0,42	0,21	0,62	0,03	0,12	0,20
	α-UE	0,30	0,20	0,50	0,07	0,14	0,23
	β-UE	0,44	0,22	0,65	0,05	0,10	0,14
3 M	Monomer	0,36	0,21	0,57	0,05	0,15	0,20
	α-UE	0,29	0,20	0,49	0,04	0,17	0,22
	β-UE	0,39	0,22	0,60	0,04	0,15	0,15
4 M	Monomer	0,35	0,23	0,59	0,05	0,09	0,24
	α-UE	0,30	0,18	0,48	0,09	0,15	0,21
	β-UE	0,40	0,19	0,56	0,07	0,11	0,20
5 M	Monomer	0,30	0,19	0,49	0,09	0,15	0,18
	α-UE	0,20	0,14	0,34	0,10	0,18	0,28
	β-UE	0,23	0,14	0,36	0,08	0,19	0,28
6 M	Monomer	0,33	0,20	0,52	0,07	0,13	0,24
	α-UE	0,19	0,07	0,26	0,15	0,11	0,33
	β-UE	0,13	0,08	0,21	0,14	0,18	0,32
7 M	Monomer	0,04	0,05	0,09	0,13	0,18	0,45
	α-UE	0,00	0,03	0,03	0,06	0,07	0,75
	β-UE	0,04	0,03	0,07	0,12	0,15	0,55
8 M	Monomer	-0,01	0,01	-0,01	0,12	0,19	0,55
	α-UE	-0,01	0,01	0,00	0,20	0,24	0,38
	β-UE	0,06	0,06	0,12	0,13	0,18	0,44

Tab. 3-10: Sekundärstrukturanteile von PC, α-UE und β-UE aus der Röntgenstruktur (Schirmer, 1985, 1987) und der Analyse der CD-UV Spektren mit CDPro (Sreeram, 2000, Kap. 2.3.4.). Erklärung der Terme siehe Text.

Wie bereits oben erwähnt, berechnet das Programm CDPro einen Faltblattstrukturanteil der faktisch nicht vorhanden ist. Für das native PC und den gefalteten UE ist dieser Wert vernachlässigbar (2 bis 4%). Der α-Helix Anteil wird von CDPro gegenüber der Röntgenstruktur für das PC_{mono} um 5%, im Vergleich zur Gesamtstruktur, und für die α-UE um 13% unterbewertet. Für die β-UE liegt eine Überbewertung von 5% vor. Der Anteil an Turns wird von der Sekundärstrukturanalyse gegenüber der Röntgenstruktur in allen drei Fällen um 5,3% ± 1,7%, unterbewertet, der Anteil an „Unordered“ Struktur um 6% ± 1% überbewertet. Trotz dieser Abweichungen gibt die Analyse der Sekundärstrukturanteile aus den UV-CD Spektren ein einigermaßen stimmiges Bild der Proteine wieder. Sie wird im

Folgenden, mit dem Wissen um ihre Schwächen, weiter verwendet, um die Änderungen in der Sekundärstruktur bei der Zugabe an Harnstoff zu verfolgen.

3.7.5.2. Entfaltung von PC und den Untereinheiten

Die bereits oben beschriebenen, offensichtlichen Fehlinterpretationen des Programms, nahmen mit zunehmender Harnstoffkonzentration zu. Jedoch ist trotzdem bei dieser mathematischen Analyse der UV-CD Spektren ersichtlich, wie die α -Helix Struktur bei höher werdender Harnstoffkonzentration ab und der „unordered“- Anteil zunimmt (Abb. 3-29, 3-30, 3-31, Tab. 3-10, 3-11). Die Wendepunkte für die Analyse der gesamten Sekundärstruktur liegen im gleichen Bereich ($\approx 5 - 6$ M Harnstoff), wie bei den Ergebnissen, bei welchen nur die charakteristische Wellenlänge von 222 nm ausgewertet wurden (Tab. 3-7, 3-9, 3-10). Die Steilheit der Titrationskurve für PC, gemessen bei 222 nm, liegt im unteren Bereich der Fehlergrenze der Messung für die gesamte Sekundärstruktur. Die Steilheit der Kurve der α -UE ist etwa doppelt so groß, wie die für die Gesamtstrukturauswertung, ihre Fehlergrenzen überlappen sich aber. Für die β -UE ist die Steilheit der Titrationskurve der Analyse der gesamten Sekundärstruktur ca. dreimal so gering, wie für die Messung bei 222 nm. Im letzten Fall konnte demnach keinerlei Übereinstimmung gefunden werden (Tab. 3-8, 3-9, 3-10, 3-11).

Protein	Fitparameter \rightarrow	A_1	A_2	x_0	p
	Sekundärstrukturanteil \downarrow				
PC _{mono}	α - Helix	0,59 \pm 0,02	-0,01 \pm 0,06	6,57 \pm 0,19	23,9 \pm 8,72
	unordered	0,19 \pm 0,01	0,56 \pm 0,04	6,68 \pm 0,18	17,9 \pm 6,37
	alle nicht α -Helix	0,38 \pm 0,015	0,87 \pm 0,05	6,56 \pm 0,16	19,3 \pm 5,71
α -UE	α - Helix	0,57 \pm 0,03	-0,55 \pm 1,03	7,69 \pm 4,26	3,23 \pm 1,70
	unordered	nicht fitbar			
	alle nicht α -Helix	0,40 \pm 0,04	0,94 \pm 0,25	6,01 \pm 1,21	5,83 \pm 4,30
β -UE	α - Helix	0,69 \pm 0,03	0,04 \pm 0,08	4,97 \pm 0,35	5,46 \pm 1,76
	unordered	0,14 \pm 0,03	0,52 \pm 0,11	5,51 \pm 0,73	6,55 \pm 4,44
	alle nicht α -Helix	0,30 \pm 0,02	0,81 \pm 0,07	5,06 \pm 0,35	6,41 \pm 2,42

Tab. 3-11: Parameter der sigmoidalen Fits (Kap. 2.3.4.) der Titrationskurven von PC, in 0 – 8 M Harnstoff, 50 mM KPP. Aus den Berechnungen für die Sekundärstrukturanteile (Abb. 3-29, 3-30 und 3-31).

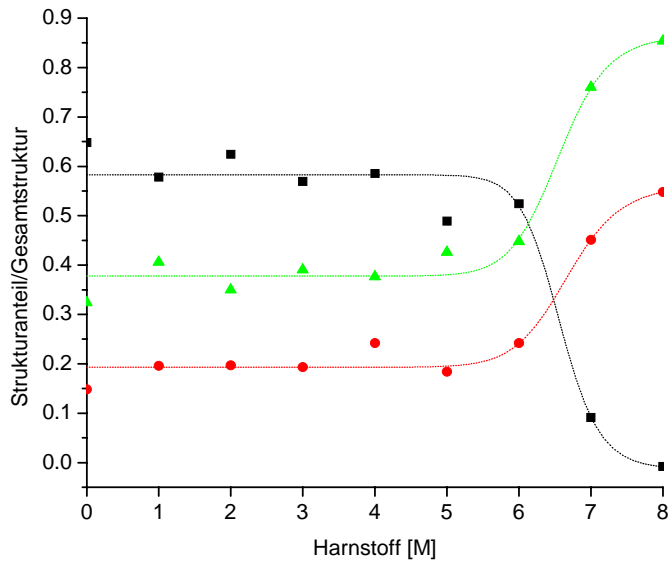


Abb. 3-29: Veränderung der Sekundärstrukturanteile, bei der Entfaltung von PC, berechnet aus den UV-CD Spektren mit CDPro (Kap. 2.3.4. und s. o.); PC α -Helix (■) mit Fit (-----), PC „unordered“ (●) mit Fit (-----), PC Gesamtstruktur außer α -Helix (▲) mit Fit (-----).

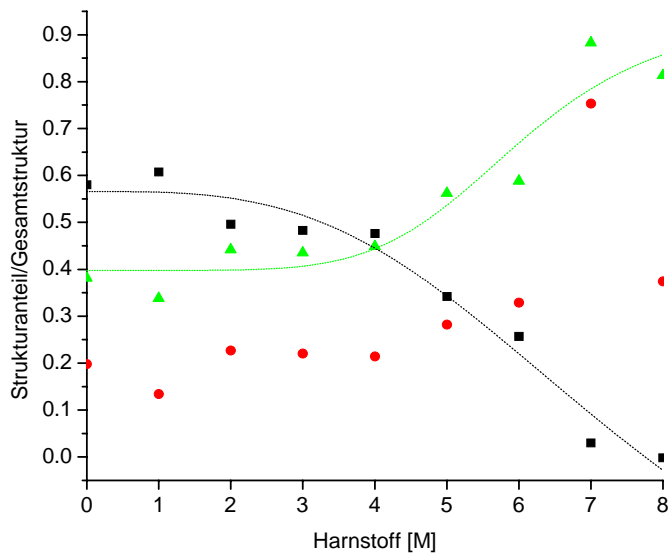


Abb. 3-30: Veränderung der Sekundärstrukturanteile bei der Entfaltung von der α -UE, berechnet aus den UV-CD Spektren mit CDPro (Kap. 2.3.4. und s. o.); α -UE α -Helix (■) mit Fit (-----), α -UE „unordered“ (●) (vernünftiger Fit nicht möglich), α -UE Gesamtstruktur außer α -Helix (▲) mit Fit (-----).

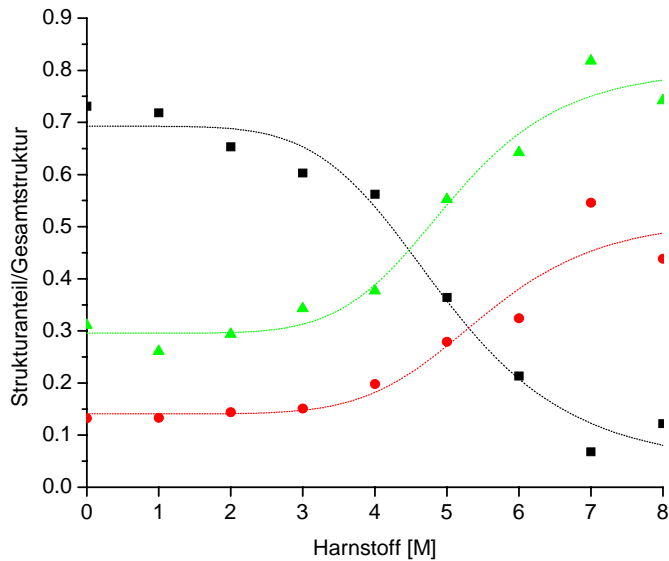


Abb. 3-31: Veränderung der Sekundärstrukturanteile, bei der Entfaltung von der β -UE, berechnet aus den UV-CD Spektren mit CDPro (Kap. 2.3.4. und s. o.); β -UE α -Helix (■) mit Fit (-----), β -UE „unordered“ (●) mit Fit (-----), β -UE Gesamtstruktur außer α -Helix (▲) mit Fit (-----).

3.8. Zusammenfassende spektroskopische Charakterisierung von PC

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den vorausgegangenen Untersuchungen für die definierten Zustände von PC_{tri} , PC_{mono} , PC_{denat} , α -UE_{nat}, α -UE_{denat}, β -UE_{nat} und β -UE_{denat} zusammengefasst. Wie in den Untersuchungen deutlich wurde, haben die Messbedingungen einen Einfluss auf die Messergebnisse, deshalb werden die Werte in Abhängigkeit zu ihren Messbedingungen angegeben. Die Werte (entnommen aus Kap. 3.1., 3.2., 3.7.) für die definierten PC Zustände gelten für Messungen in 50 mM KPP, pH 7, RT, $c_{protein} = 1,7 \cdot 10^{-6}$ M, PC_{mono} in 4 M Harnstoff (sofern nicht anders angegeben) und denaturiertes Protein in 8 M Harnstoff. Weiter werden diese Ergebnisse als Vergleichswerte für die Interpretation der kinetischen Messwerte für die Entfaltung von PC im Folgenden, heran gezogen.

3.8.1. Integrales PC

Monomeres Phycocyanin ist ein Heterodimer (α - und β -Untereinheit). In Lösung liegt es in einem Monomer-Trimer-Gleichgewicht vor. Die α -UE trägt einen Phycocyanobilin (PCB) Chromophor und die β -UE zwei, jeweils kovalent über ein Cystein gebunden (Kap. 1). Integrales PC liegt in 50 mM KPP, pH $\approx 7,3$, RT als Trimer und in 50 mM KPP pH $\approx 7,3$, RT, 4 M Harnstofflösung, als Monomer vor (Kap. 3.7.). Monomere und Trimere weisen

spezifische Unterschiede in der Absorption (Abb. 3-32, Tab. 3-12) und im Vis-CD (Abb. 3-33, Tab. 3-12) auf. Das Maximum in der Absorption ist im Monomer, gegenüber dem Trimer, um 3 bis 4 nm, von ≈ 616 nm auf ≈ 612 nm, blau verschoben. Der Extinktionskoeffizient für ein Monomer sinkt von $292.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ im Trimer auf $276.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ im Monomer. Der Q-Wert ($A_{\text{vis}}/A_{\text{nuv}}$) verringert sich von $\approx 6,8$ auf ≈ 6 . (Abb. 3-32 Tab. 3-12) Das Vis-CD Spektrum des Trimers zeigt aufgrund der excitonischen Kopplung zwischen den Chromophoren der aneinander gelagerten Monomere (Sauer & Scheer, 1988, Kap. 1) eine deutliche Schulter bei 627 nm. Gleichzeitig nimmt im Monomer das Maximum bei ≈ 600 nm gegenüber dem Trimer, durch das Fehlen der excitonischen Kopplung, zu (Abb. 3-33A, Tab. 3-12). Im Differenzspektrum von Trimer und Monomer wird dieses Signal als s-förmige Bande sichtbar (Abb. 3-33B, Tab. 3-12). Die qualitativen Unterschiede von Monomer und Trimer in der Fluoreszenz sind nur gering (Abb. 3-34, Tab. 3-12). Im Trimer liegt das Emissionsmaximum zwischen 643 bis 650 nm (Abb. 3-34, Tab. 3-12), im Monomer ist es im Vergleich dazu etwa 2 nm rot verschoben (vergleiche Kap. 3.1.2.), sofern die Lösung keinen Harnstoff enthält. Im UV-CD Spektrum unterscheidet sich das Monomer vom Trimer durch eine etwas geringere Intensität des Signals (Abb. 3-35, Tab. 3-12). Eine Veränderung in der Form des Spektrums findet nicht statt, eine klare Differenzierung von Trimer und Monomer ist nicht möglich. Die Auswirkungen von Harnstoff, welche nicht zur Dissoziation oder Entfaltung führen, wurden bereits angesprochen (Kap. 3.6.).

Durch Erhöhung der Harnstoffkonzentration auf 8 M in 50 mM wird das Protein vollständig entfaltet, dabei geht der Chromophor, welcher im nativen Zustand in gestreckter Form gehalten wird in eine ringförmige Konformation über, eine wesentliche Ursache, die seine Spektren drastisch verändern (Kap. 1). Das UV-CD Spektrum von PC in 8 M Harnstoff (Abb. 3-35) zeigt, dass PC in 50 mM KPP und 8 M Harnstofflösung völlig entfaltet vorliegt, es ist keine Sekundärstruktur mehr messbar. In der Absorption (Abb. 3-32) nimmt das langwellige Maximum um etwa 84% ab und das Maximum im UV-Nahen Bereich um 174% zu. Der Q-Wert verringert sich damit auf 0,4, was laut Definition einem entfalteten Zustand entspricht (Kap. 1.8). Das negative Extremum im Vis-CD des Monomers nimmt um etwa 30% ab, das positive Extremum um etwa 60%. (Abb. 3-33, Tab. 3-12). Die Fluoreszenz ist beim entfalteten PC nicht mehr messbar. (Abb. 3-34, Tab. 3-12).

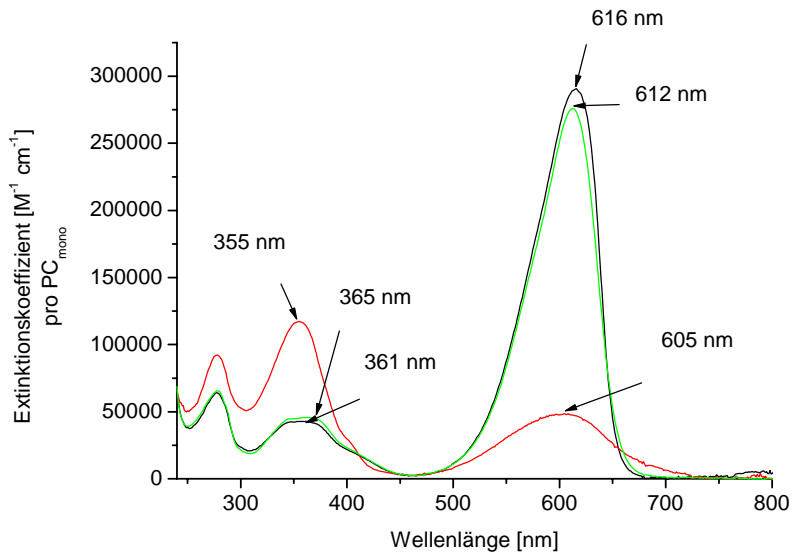


Abb. 3-32: Absorptionsspektren ϵ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] von PC_{tri} (—) (KPP 50 mM, pH \approx 7,3, RT), PC_{mono} (—) (KPP 50 mM, pH \approx 7,3, RT, 4 M Harnstoff), PC_{denat} (—) (KPP 50 mM, pH \approx 7,3, RT, 8 M Harnstoff); ϵ bezieht sich auf ein Monomer, d. h. auf je drei PCB-Chromophore.

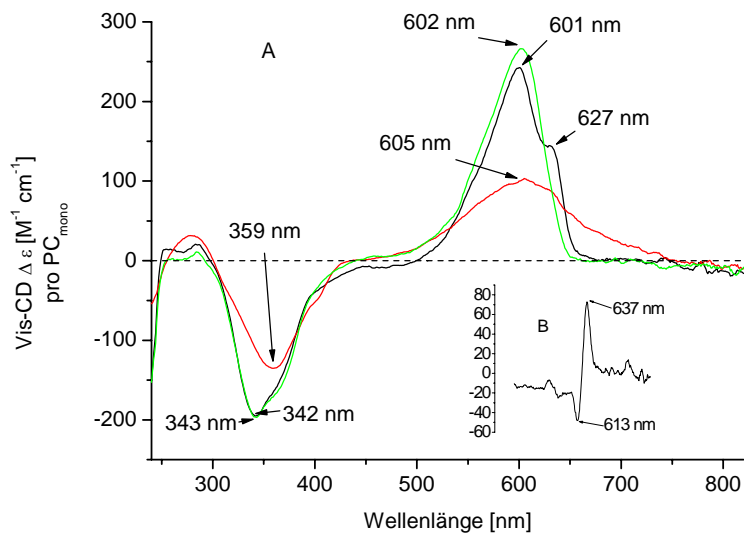


Abb. 3-33: A) Vis-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] von PC_{tri} (—), PC_{mono} (—), PC_{denat} (—); Bedingungen wie in Abb. 3-32; B) Differenzspektrum (Trimer minus Monomer) im langwelligen Bereich;

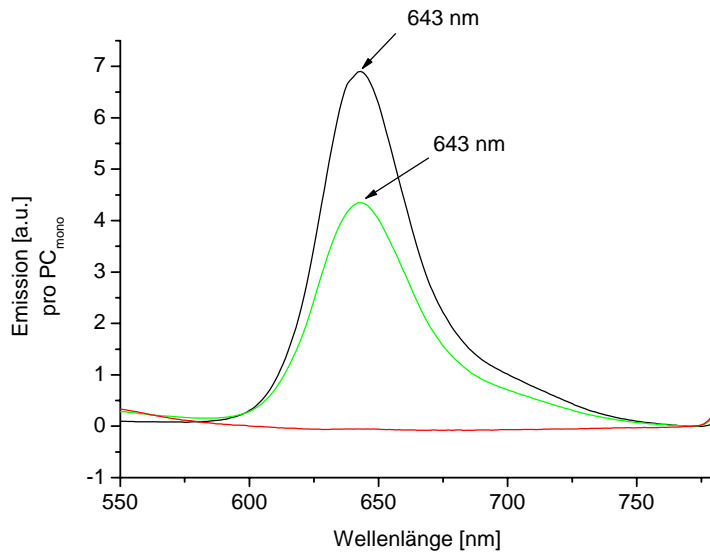


Abb. 3-34: Emissionsspektren von PC_{tri} (—), PC_{mono} (—), PC_{denat} (—); Bedingungen wie in Abb. 3-32, Anregung bei 400 nm;

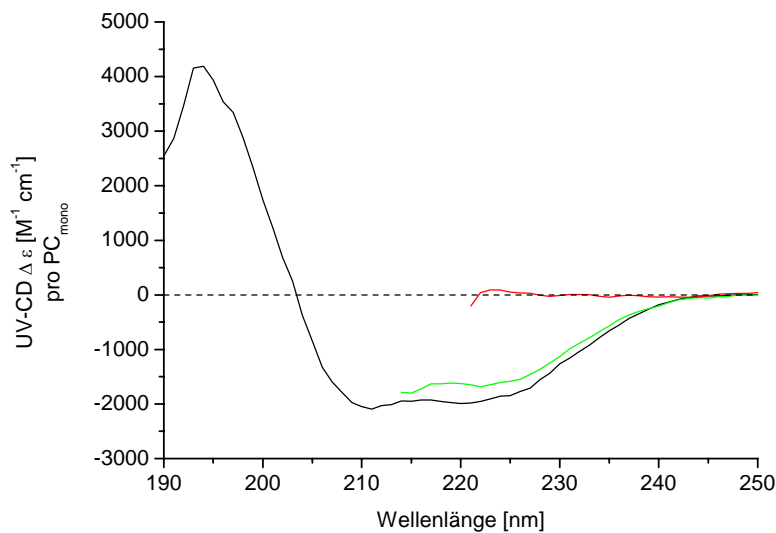


Abb. 3-35: UV-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [$M^{-1} cm^{-1}$] von PC_{tri} (—), PC_{mono} (—), PC_{denat} (—); Bedingungen wie in Abb. 3-32.

Die bisher dargestellten Spektren sind jeweils die Summe der Untereinheiten, im Folgenden werden diese separat dargestellt.

3.8.2. PC α -Untereinheit

Die α -UE trägt einen Chromophor PCB an Position 84 (Kap. 1). Im gefalteten Zustand liegt das langwellige Absorptionsmaximum bei ≈ 619 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von

117.300 M⁻¹ cm⁻¹ je α -UE, der Q-Wert beträgt ≈ 7 (Abb. 3-36, Tab. 3-12). In 8 M Harnstoff ist im UV CD keine Sekundärstruktur mehr messbar, das Signal ist bei Null (Abb. 3-39, Tab. 3-12), die Sekundärstruktur ist demnach aufgelöst (Kap. 1.8). In diesem Zustand verschiebt sich das langwellige Absorptionsmaximum um etwa 10 nm blau auf ≈ 599 nm und nimmt dabei um $\approx 84\%$ auf $\epsilon = 16.100$ M⁻¹ cm⁻¹ ab. Die maximale Absorption im nahen UV Bereich erhöht sich im entfalteten gegenüber der gefalteten α -UE um $\approx 120\%$. Der Q-Wert verkleinert sich dabei auf 0,4. damit ist das Protein per Definition entfaltet (Kap. 1.8.). Das positive Extremum des Vis-CD Signals (Abb. 3-37, Tab. 3-12) liegt in der gefalteten UE bei ≈ 620 nm. In der entfalteten nimmt das Signal um $\approx 60\%$ ab und verschiebt dabei um ≈ 18 nm blau auf ≈ 606 nm. Das negative Extremum des Vis-CD Spektrums verringert sich von der gefalteten α -UE zur entfalteten um $\approx 60\%$. Das Emissionsmaximum liegt bei ≈ 639 nm, in der entfalteten UE ist keine Fluoreszenz mehr messbar (Abb. 3-38, Tab. 3-12).

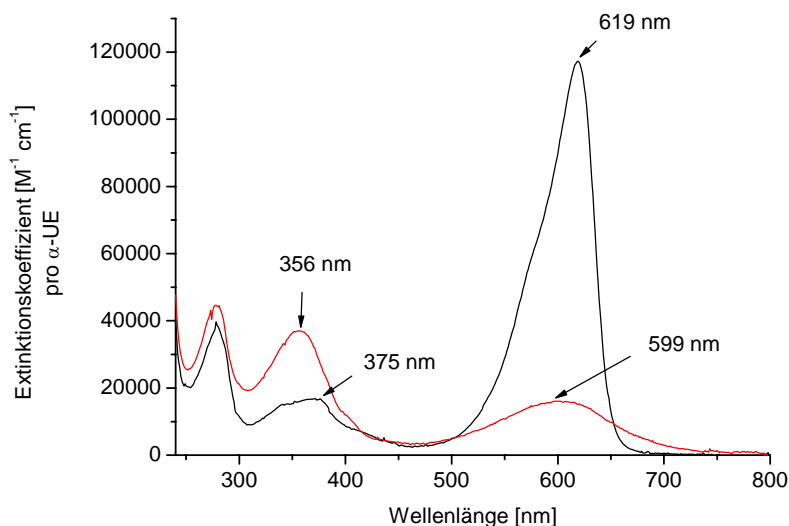


Abb. 3-36: Absorptionsspektren ϵ [M⁻¹ cm⁻¹] der α -UE_{nat} (—) (KPP 50 mM, pH $\approx 7,3$, RT) und α -UE_{denat} (—) (KPP 50 mM, pH $\approx 7,3$, RT, 8 M Harnstoff); ϵ bezieht sich auf eine α -UE, d. h. auf einen PCB-Chromophor.

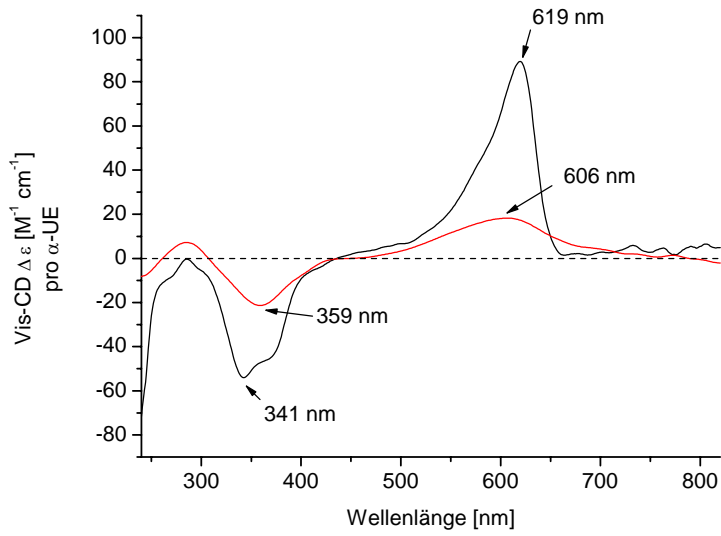


Abb. 3-37: Vis-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] der $\alpha\text{-UE}_{\text{nat}}$ (—) und $\alpha\text{-UE}_{\text{denat}}$ (—); Bedingungen wie in Abb. 3-36

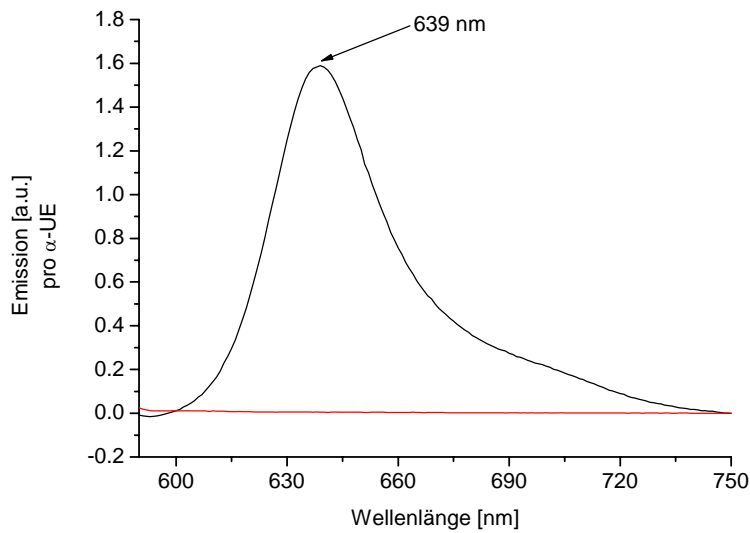


Abb. 3-38: Emissionsspektren der $\alpha\text{-UE}_{\text{nat}}$ (—) und $\alpha\text{-UE}_{\text{denat}}$ (—); Bedingungen wie in Abb. 3-36.

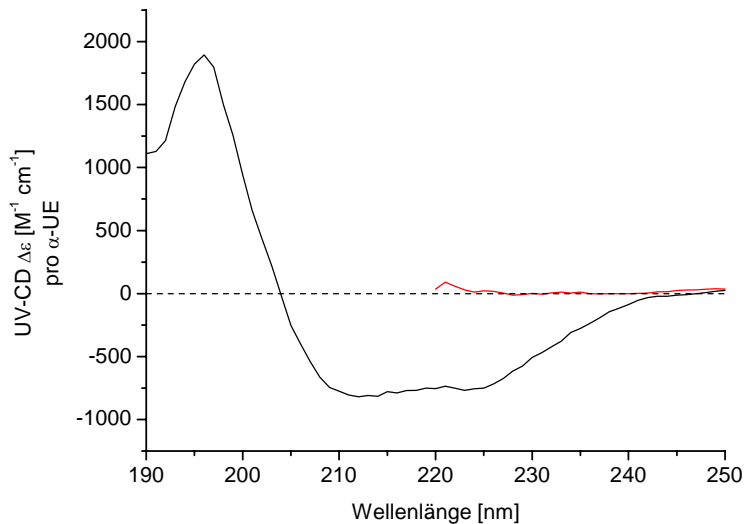


Abb. 3-39: UV-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] der $\alpha\text{-UE}_{\text{nat}}$ (—) und $\alpha\text{-UE}_{\text{denat}}$ (—); Bedingungen wie in Abb. 3-36.

3.8.3. PC β -Untereinheit:

Die β -UE trägt zwei PCBs an Position 84 und 155 (Kap. 1) Im gefalteten Zustand hat sie ihr langwelliges Absorptionsmaximum bei 605 nm mit $\epsilon = 194.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ je β -UE und einen Q-Wert von 5,3 (Abb. 3-40, Tab. 3-12). Wie im UV-CD Spektrum zu sehen ist (Abb. 3-43), ist in 8 M Harnstoff keine Sekundärstruktur mehr messbar und die UE ist demnach aufgelöst (Kap. 1.8). Das langwellige Absorptionsmaximum nimmt im entfalteten Zustand der UE um $\approx 83\%$ auf $\epsilon = 33.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ab. Das Maximum verschiebt dabei um ≈ 3 nm rot auf ≈ 608 nm. Das Absorptionsmaximum im nahen UV Bereich erhöht sich gleichzeitig um $\approx 106\%$. Der Q-Wert verringert sich in Folge auf 0,5, per Definition für die Absorption (Kap. 3.6.) ist das Protein damit entfaltet (Kap. 1-8). Das positive Extremum im Vis-CD der gefalteten β -UE liegt bei ≈ 583 nm (Abb. 3-41, Tab. 3-12), es verschiebt in der entfalteten UE um ≈ 19 nm rot auf 602 nm. Die Signalintensität verringert sich dabei um $\approx 56\%$. Das negative Extremum verringert sich in der entfalteten β -UE gegenüber der gefalteten deutlich weniger ($\approx 10\%$) als in den bisher beschriebenen Fällen (PC und α -UE). Das Emissionsmaximum liegt bei ≈ 644 nm und auch hier ist im entfalteten Zustand keine Fluoreszenz mehr messbar (Abb. 3-43, Tab. 3-12).

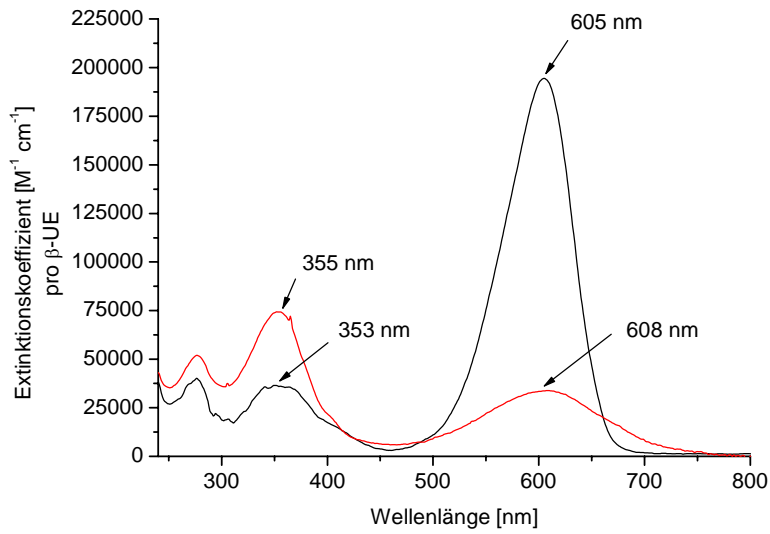


Abb.3-40: Absorptionsspektren ϵ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] der $\beta\text{-UE}_{\text{nat}}$ (—) und $\beta\text{-UE}_{\text{denat}}$ (—); Bedingungen wie in Abb. 3-36; ϵ bezieht sich auf eine $\beta\text{-UE}$, d. h. auf zwei PCB-Chromophore.

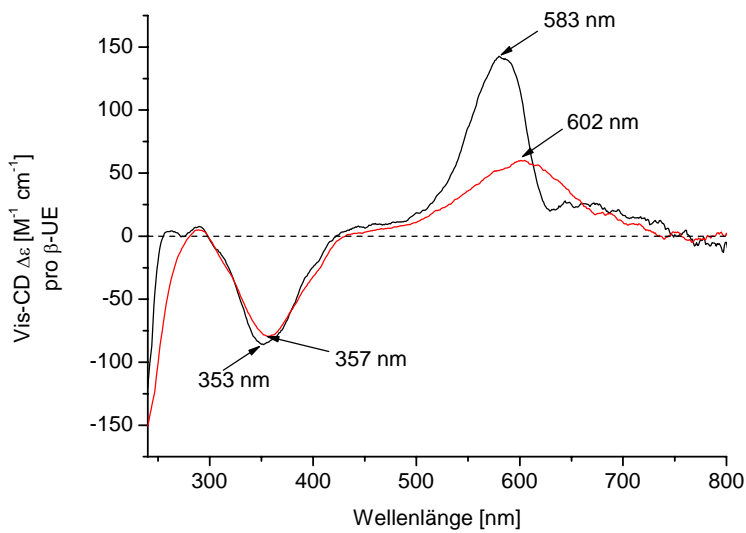


Abb. 3-41: Vis-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] der $\beta\text{-UE}_{\text{nat}}$ (—) und $\beta\text{-UE}_{\text{denat}}$ (—); Bedingungen wie in Abb. 3-36.

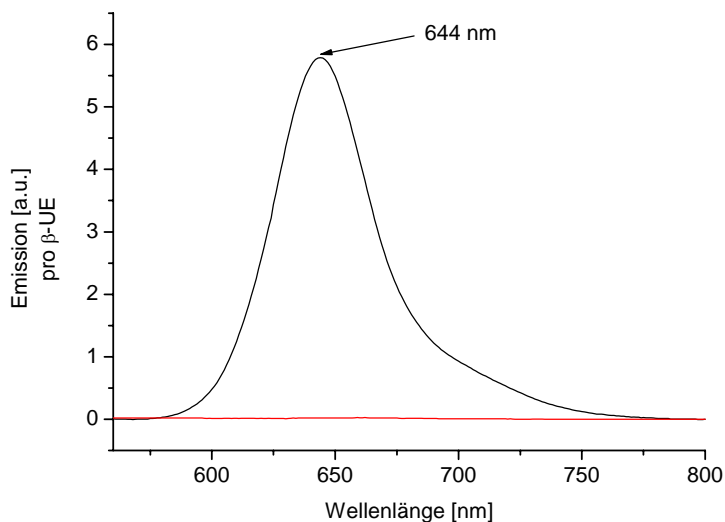


Abb. 3-42: Emissionsspektren der β -UE_{nat} (—) und β -UE_{denat} (—); Bedingungen wie in Abb. 3-36, Anregung bei 540 nm.

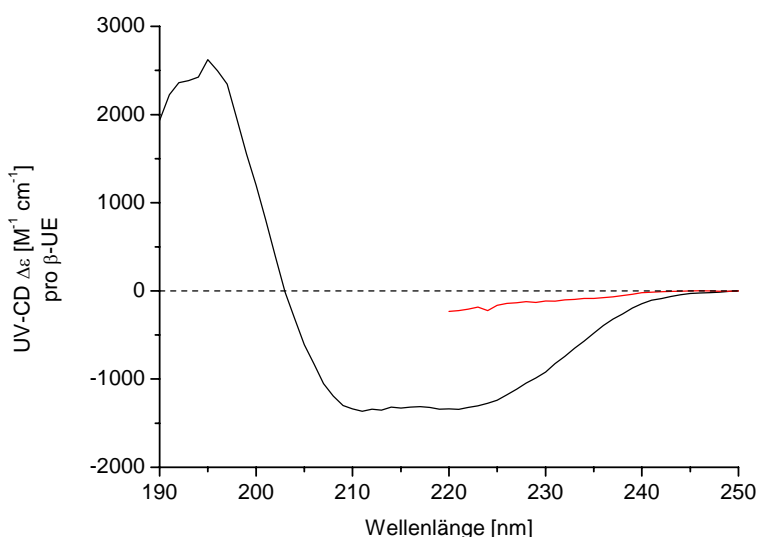


Abb. 3-43: UV-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [$M^{-1} cm^{-1}$] der β -UE_{nat} (—), β -UE_{denat} (—); Bedingungen wie in Abb. 3-36.

Die α - und die β -UE zeigen zum Teil deutlich unterschiedliche Messwerte für einzelne physikalische Messparameter. Im nativen Zustand sind die langwelligen Absorptions- und Vis-CD-Werte der β -UE gegenüber der α -UE allgemein rot verschoben. Im denaturierten Zustand verschieben sie, gegenüber dem nativen, in der α -UE rot, dagegen in der β -UE blau. Auffällig ist noch die vergleichsweise geringe Abnahme des Vis-CD Signals von der β -UE_{nat} zur β -UE_{denat}, vor allem im negativen Extremum.

Protein	Absorption					Vis-CD						Emission λ_{\max} [nm]
	Maximum _{vis}		Maximum _{nuv}		Q-Wert $A_{\text{vis}}/A_{\text{nuv}}$	Positives Extremum		Negatives Extremum		Differenzspektrum Trimer - Monomer		
	λ_{\max} [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{\max} [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]		λ_{\max} [nm]	$\Delta \epsilon$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{\min} [nm]	$\Delta \epsilon$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{\min} [nm]	λ_{\max} [nm]	
PC _{tri}	616-618	292.000	361	42.800	6,8	600-602	242	342-345	-194	613	637	643-650
PC _{mono}	611-613	272.000	362	45.800	6,0	601/602	265	341/342	-196			642-647
PC _{denat}	604/605	48.600	354-357	117.200	0,4	605/606	100	358-360	-106			
α -UE _{nat}	619	117.300	375	16.800	7,0	619	93	341	-53			639
α -UE _{denat}	602-599	16.100	355/356	37.000	0,4	606	18	359	-23			
β -UE _{nat}	604/605	194.500	354/356	36.500	5,3	583	141	353	-86			644
β -UE _{denat}	608/609	33.900	353/354	74.300	0,5	602	60	357	-79			

Tab. 3-12: Spektrale Daten für PC_{tri}, PC_{mono}, PC_{denat}, α - und β -UE nativ und denaturiert; (KPP 50 mM, pH \approx 7,3, RT, PC_{mono} in 4 M Harnstoff, denaturiertes Protein in 8 M Harnstoff; die Werte stammen aus Kap. 3.1., 3.2., 3.7.). Beim integralen PC beziehen sich alle molaren Größen auf das PC_{mono}, d. h. auf drei PCB-Chromophore. Bei den UE jeweils auf die UE, d. h. auf einen PCB-Chromophor in der α -UE und auf zwei in der β -UE.

3.9. Kinetischer Verlauf der Entfaltung von PC und den Untereinheiten

3.9.1. Einleitung

(siehe auch Kap. 2)

Die Kinetik der Entfaltung in 50 mM KPP, 8 M Harnstoff, pH 7, von PC und den Untereinheiten wurde mittels Absorption, Vis-CD, Emission und UV-CD, entsprechend den vorausgegangenen steady-state Untersuchungen (Kap. 3.5. und 3.7.) verfolgt. Bei den steady-state Messungen in Kap. 3.7. wurde deutlich, dass PC und die Untereinheiten in 50 mM KPP, pH 7, bei einer Konzentration von 8 M Harnstoff vollständig entfalten.

Die Absorptionsänderung bei der Entfaltung vom integralen PC und den UE über die Zeit wurde über den gesamten spektralen Bereich von 320 nm bis 850 nm verfolgt und global analysiert (Kap. 2.3.5.). Bei der Messung über den breiten spektralen Bereich und der Auswertung mit einem globalen Fit erhält man eine Aussage der spektralen Änderung während der Entfaltung über den gesamten gemessenen Wellenlängenbereich. Dabei können aber Änderungen, insbesondere geringe, in engen Wellenlängenbereichen, unterdrückt werden. Wie in Abb. 3-44 zu sehen, zeichnen sich für Messungen bei einzelnen Wellenlängen lokale Unterschiede in der Kinetik der Entfaltung von PC deutlich ab. Deshalb erfolgten zusätzlich monochromatische Messungen bei charakteristischen Wellenlängen (siehe unten), die mit einem lokalen Fit ausgewertet wurden (Kap. 2.3.5.). Die Ergebnisse der einzelnen Wellenlängen wurden sowohl untereinander, als auch mit dem globalen Fit verglichen.

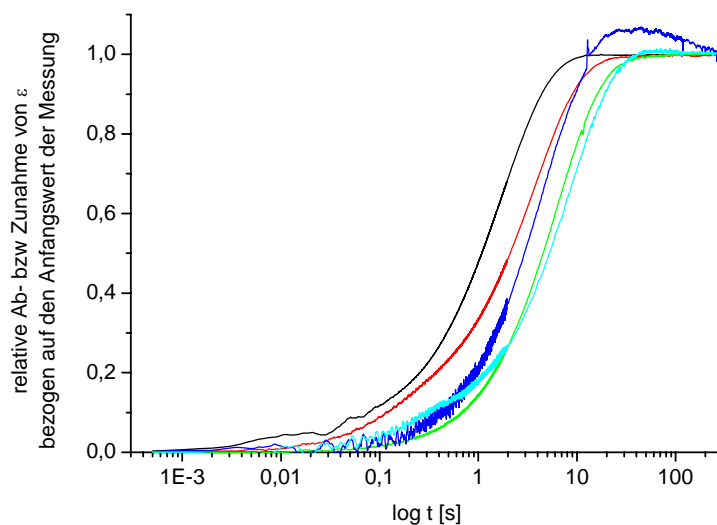


Abb. 3-44: Normierte Absorptionsänderungen ($A_0 = 0$, $A_{\text{end}} = 1$) (Kap. 2.3.5.), während der Entfaltung von PC_{tri} (Abb. 3-52), bei verschiedenen Wellenlängen: 616 nm (—), 613 nm (—), 600 nm (—), 350 nm (—) und 340 nm (—).

Die spektralen Änderungen des Vis-CD Signals während der Entfaltung vom integralen PC und den UE wurden ebenfalls bei den einzelnen charakteristischen Wellenlängen gemessen. Eine Messung über einen breiten spektralen Bereich ist in diesem Fall aus technischen Gründen nicht möglich. Zusätzlich zu den lokalen Fits wurden die einzelnen Wellenlängenmessungen global gefittet (Kap. 2.3.5.) und die verschiedenen Ergebnisse miteinander verglichen. Es gelten die gleichen Überlegungen wie für die Absorption.

Die charakteristischen Wellenlängen für die Absorptions- und Vis-CD Messungen wurden wie folgt ausgewählt:

(siehe Kap. 3.8.)

Integrales Phycocyanin

340 nm: Negatives Extremum im Vis-CD des nativen PC

350 nm: Im UV-Nahen Maximum der Absorption „die Mulde“, des integralen, nativen PC

600 nm: Positives Extremum im Vis-CD des integralen nativen PC

Nahe dem langwelligen Absorptionsmaximum im PC_{denat}

613 nm: Langwelliges Absorptionsmaximum im nativen PC_{mono}

616 nm: Langwelliges Absorptionsmaximum im nativen PC_{tri}

627 nm: Schulter auf der langwelligen Seite des positiven Vis-CD Extremums im nativen PC_{tri} (kein Ergebnis für PC_{tri} Absorption)

PC α -UE

350 nm: Nahe dem negativen Extremum im Vis-CD der α -UE_{nat}

575 nm: Linke Flanke des langwelligen Absorptionsmaximums vom nativen PC und den UE_{nat}

603 nm: Langwelliges Absorptionsmaximum der α -UE_{denat}
(nur für die VIS-CD Messung)

605 nm: Positives Extremum im Vis-CD der α -UE_{denat}
(nur für die Absorptionmessung)

617 nm: Langwelliges Absorptionsmaximum des PC_{tri} und der α -UE_{nat}

PC β -UE

350 nm: Negatives Extremum im Vis-CD der β -UE_{nat}

580 nm: Positives Extremum im Vis-CD der β -UE_{nat}

Linke Flanke des langwelligen Absorptionsmaximums vom nativen PC und den
UE_{nat}

605 nm: Langwelliges Absorptionsmaximum der β -UE_{nat}

Die Kinetik im UV-CD wurde bei 222 nm, dem langwelligen der beiden charakteristischen α -Helix Peaks, verfolgt.

Bei der Emission wurde folgendermaßen angeregt: Integrales PC: 350 nm, α -UE: 580 nm, β -UE 605 nm. Mittels eines Cut-off Filters (für integrales PC: 600 nm, α -UE: 600 nm, β -UE: 630 nm) wurden alle Wellenlängen unterhalb des Emissionsmaximums ausgefiltert. Die Summe der Emission aller Wellenlängen oberhalb des Cut-off Filters wurde detektiert.

Allgemeines zur Vorgehensweise der Dateninterpretation:

Beim Fit der Messdaten wurden verschiedene Modelle der Entfaltung (Utiyama & Baldwin, 1986; Cantor & Schimmel, 1980) getestet, und diejenigen mit den geringsten Fehlerabweichungen und physikalisch sinnvollen Aussagen in Erwägung gezogen. Dabei wurde, wenn die Auswahl nicht eindeutig war, meist das einfachere Modell vorgezogen (Utiyama & Baldwin, 1986).

Nachdem ein geeigneter Fit für eine Messreihe nach obigen Kriterien ausgewählt worden war, wurde folgendermaßen weiter verfahren. Den einzelnen, durch den Fit ermittelten Komponenten, wurden (in alphabetischer Reihenfolge) Kleinbuchstaben zugeordnet. Wie sich zeigte, entsprach die erste ermittelte Komponente nicht immer der tatsächlich ersten Reaktionskomponente. Deshalb erfolgte eine Einordnung des Fits in den Ablauf der Reaktion nach folgenden Überlegungen: Die erste ermittelte Fitkomponente wurde an die Stelle des Reaktionsverlaufes gesetzt, dem sie, soweit dies an dieser Stelle entschieden werden konnte, am besten entsprach. Alle folgenden Werte wurden, ohne weitere Interpretation, weiterlaufend aufgelistet. (Die weitergehende Zuordnung der Fitkomponenten zu Proteinzuständen erfolgte im nächsten Schritt und fand noch keinen Eingang in die tabellarische Auflistung, siehe unten). Dies führte dazu, dass die einzelnen Messreihen besser vergleichbar waren, als wenn alle ermittelten Fitkomponenten ohne Unterscheidung, ob Artefakte vorliegen, oder der Beginn der Entfaltungsreaktion nicht erfasst wurde, gleich nebeneinander gestellt worden wären. Zum Beispiel wurde gelegentlich der ersten ermittelten

Fitkomponente der Buchstabe c zugeordnet. Damit wurde zum Ausdruck gebracht, dass die Entfaltungsreaktion nicht von Anfang an erfasst wurde. Gelegentlich, z. B. wenn die Messergebnisse ein komplettes stimmiges Bild der Entfaltung widerspiegeln, erscheint das Einordnen der Fits trivial. Alles in allem erleichtert es aber, die Komponenten der einzelnen Fits zu vergleichen und ein schlüssiges Bild der Entfaltung von PC zu entwerfen. In weiteren Überlegungen wurden, wie bereits erwähnt, die Komponenten interpretiert und dem Reaktionsverlauf vom nativen Protein zum entfalteten zugeordnet. Dabei dienten, wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, die Werte aus den steady-state Messungen als Vergleichswerte. Wiederholend soll an dieser Stelle noch einmal auf die wesentlichen Kriterien für die Definition für bestimmte Proteinzustände hingewiesen werden (Kap. 3.6.). Der Unterschied zwischen PC_{tri} und PC_{mono} , gemessen in der Absorption, liegt in einer Rotverschiebung des langwelligen Maximums von ≈ 617 nm auf ≈ 612 nm; im Vis-CD bei einer Zunahme des positiven Extremums bei gleichzeitiger Abnahme der Schulter (bei ≈ 627 nm) auf der langwelligen Seite des positiven Extremums. PC und die UE sind, gemessen in der Absorption, per Definition entfaltet wenn der Q-Wert bei 0,5 bis 0,4 liegt (Kap. 1.8.). Nach den Kriterien des UV-CD (Kap. 1.8.) ist das Protein entfaltet, wenn die Messwerte nahe Null liegen. Alle weiteren Vergleichswerte, an Hand derer die Fitkomponenten interpretiert werden, stehen in Kap. 3.8. zusammengefasst. Es handelt sich dabei um die Definitionen für PC_{tri} , PC_{mono} , PC_{denat} , α -UE_{nat}, α -UE_{denat}, β -UE_{nat} und β -UE_{denat}, wie sie für den jeweiligen Messparameter gelten. Es wird im einzelnen nicht mehr jedes Mal betont werden, dass die Definitionen für die jeweiligen Proteinzustände immer nur für den jeweiligen Messparameter wirklich Gültigkeit haben und für das gesamte Protein nur ein Hinweis sein können (Kap. 1.8.). Wie im Einzelnen entschieden und vorgegangen wurde steht bei der jeweiligen Interpretation des Fits.

3.9.2. Kinetik der Entfaltung vom PC Trimer

Die Messzeit beim Verfolgen der Entfaltung vom PC_{tri} betrug 300 s, die Auflösung lag, je nach Messinstrument, im ms oder μ s Bereich zu Beginn der Messung und verringerte sich auf 1 bzw. 2 s während der Messung. Wie aus den Untersuchungen in Kap. 3.3.1. hervorgeht, ist dieser Zeitraum ausreichend, um das Ende der Entfaltungsreaktion verfolgen zu können. Die Details der Messbedingungen stehen bei den einzelnen Messungen.

3.9.2.1. Absorption

Globale Analyse

Der kinetische Verlauf der Entfaltung von PC_{tri}, gemessen in Absorption über den Wellenlängenbereich von 320 nm bis 850 nm (Abb. 3-45), wurde mit einem globalen Fit ausgewertet und unter der Annahme eines multiexponentiellen, irreversiblen Reaktionsmodells analysiert. An Hand der Residuen bei 616 nm wird exemplarisch gezeigt, wie die Auswahl eines Modells für den Entfaltungsweg erfolgte (Abb. 3-46 bis 3-51). Generell gilt, dass sich für ein verzweigtes Reaktionskinetikmodell keine Anhaltspunkte zeigten. Auch wenn die Abweichungen für ein verzweigtes Modell geringe Werte ergaben (s. Beispiel im Anhang Abb. 7-4), so waren die physikalischen Aussagen, wie negative oder mit keiner bekannten Spezies vergleichbare ϵ -Werte (s. Beispiel im Anhang, Abb. 7-5), unsinnig. Insofern wird in dieser Arbeit ein lineares Modell des Entfaltungsweges favorisiert.

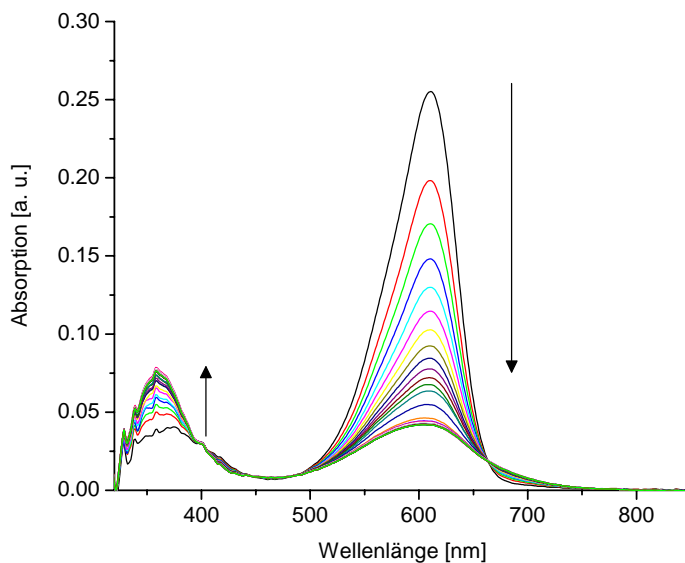


Abb. 3-45: Faktorisierte Rohdaten (Kap. 2.3.5.) der globalen Absorptionsänderung bei der Entfaltung von PC_{tri}.
Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 6,1 ms; Time base: 30 ms Messintervall bis 10 s
Messzeit, dann 300 ms bis 240 s und dann 2 s bis 300 s.

Als ein wesentliches Kriterium für die Auswahl eines passenden Fits für die Messwerte wurden die Residuen heran gezogen. Die Residuen der verschiedenen Modelle bei verschiedenen Wellenlängen (beispielhaft für 616 nm Abb. 3-46 bis 3-49) ergaben ein Ergebnis mit den geringsten Fehlerabweichungen für das vierstufige Modell $a > b > c > d > e$. Die quantitativen Absorptionsspektren erscheinen sinnvoll (Abb. 3-50): Sie zeigen die schrittweise Abnahme von ϵ im langwelligen und die gleichzeitige Zunahme im kurzwelligen

Absorptionsspektrum und folgen damit prinzipiell den spektralen Änderungen bei den statischen Untersuchungen (Kap. 3.5. und 3.8.). Der ϵ -Wert des globalen Fits (Abb. 3-50, Tab. 3-13) für die Komponente a ($303.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 616 nm) liegt in der Größenordnung für $\epsilon \text{ PC}_{\text{tri}}$ ($292.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), der Wert für b ($254.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 616 nm) ist etwas kleiner als fürs PC_{mono} ($272.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und der Wert für e ($47.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 616 nm) deckt sich nahezu mit dem von PC_{denat} ($48.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Tab. 3-13). Der Q-Wert für e liegt bei 0,6. Die Abweichungen von dem zu erwartenden Wert von 0,5 – 0,4 für entfaltetes PC (s. oben und Kap. 1.8.) liegen im Rauschen der Messung im UV-Nahen Bereich begründet. Im Vergleich mit den Spektren aus den statischen Untersuchungen zeigt sich nicht nur eine gute Übereinstimmung mit ϵ im langwelligen Absorptionsmaximum, sondern auch für den gesamten spektralen Bereich (Abb. 3-50 und Abb. 3-32) für PC_{tri} und PC_{denat} . Der ϵ -Wert von d liegt ebenfalls nahe dem Wert für PC_{denat} (Tab. 3-13) mit einem Q-Wert von 0,6. Die Spektren von d und PC_{denat} gleichen sich ebenfalls (Abb. 3-32 und 3-50). Dies bedeutet, dass die Fitkomponente d, nach den oben beschriebenen Kriterien, ebenfalls bereits entfaltetes PC darstellt. Der ϵ -Wert für die Komponente c stellt den Wert für ein nicht näher identifiziertes Intermediat während der Entfaltung, dar. Der Verlauf der Konzentrationen der einzelnen Komponenten a, b, c, d und e sind in Abb. 3-51 dargestellt. Wie in Kap. 1.7. beschrieben, ist die Entfaltung eines Proteins in einem Denaturierungsmittel eine Verschiebung der Gleichgewichte: $\text{PC}_{\text{tri}} \leftrightarrow \text{PC}_{\text{denat}}$ (über alle Zwischenstufen). Dass heißt, dass (mehr oder weniger) alle möglichen Proteinzustände gleichzeitig vorhanden sind, nur in unterschiedlichen Konzentrationen. In der grafischen Darstellung des Verlaufs der Konzentrationen für die einzelnen Zustände während der Entfaltung (Abb. 3-51) werden diese Übergänge von einem Intermediat zum nächsten deutlich. Am Ende der Reaktion liegt das Gleichgewicht ganz auf der Seite von PC_{denat} , zu Beginn sollte es ganz auf der Seite des PC_{tri} (Kap. 3.1.2.) liegen. Wie die Konzentrationsverteilung (Abb. 3-51) und die Originaldaten (Abb. 3-45, aus der Konzentration des Messansatzes wäre zur Zeit $t = 0$ eine Absorption_{max} in [a. u.] von $0,5 \text{ cm}^{-1}$ zu erwarten) zeigen, wird zu Beginn der Messung schon nicht mehr ganz der Zustand erfasst, in dem das Gleichgewicht völlig auf der Seite vom PC_{tri} liegt, da ein Teil der Reaktion bereits während der Totzeit der Apparatur abgelaufen ist. Da es sich aber bei der Entfaltungsreaktion immer um eine Verschiebung der Gleichgewichte handelt (Kap. 1.7.) kann auch bereits bei fortgeschrittenem Reaktionsverlauf PC_{tri} gemessen werden, solange es in einer ausreichend hohen Konzentration vorliegt (Abb. 3-51). Die gute Übereinstimmung der quantitativen Spektren der Fitkomponente a und PC_{tri} (Abb. 3-50, Abb. 3-32) bedeutet,

dass während der Totzeit noch keine signifikante Reaktion stattgefunden hat und zum Zeitpunkt $t = 0$ die Komponente PC_{tri} erfasst wird.

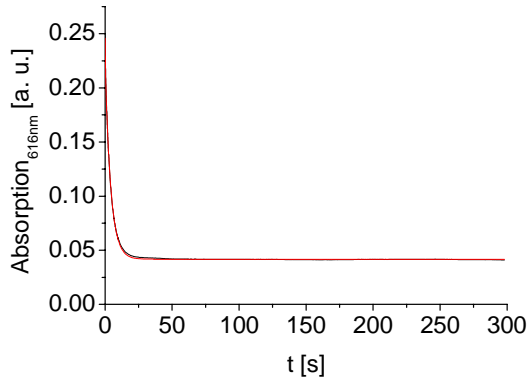


Abb. 3-46: Globaler zweistufiger Fit der Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von PC_{tri} (Abb. 3-45). Gezeigt sind die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell $a>b>c$ (—), gezeigt bei 616 nm.

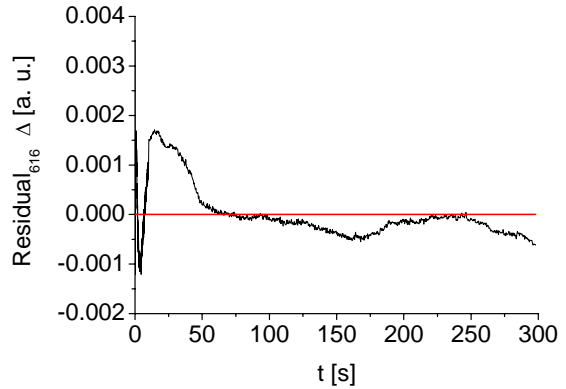


Abb. 3-47: Residuen bei 616 nm des globalen Fits aus Abb. 3-46 mit einem zweistufigen linearen Modell $a>b>c$;

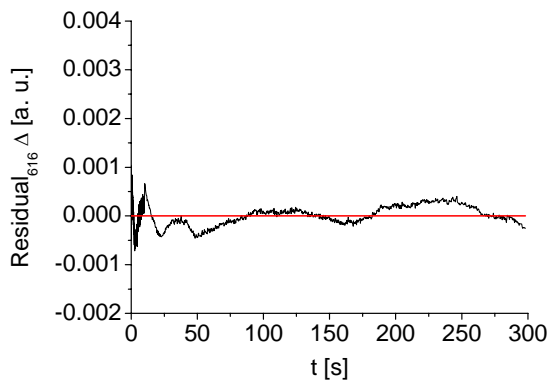


Abb. 3-48: Residuen bei 616 nm des globalen Fits aus Abb. 3-46 mit einem dreistufigen linearen Modell $a>b>c>d$;

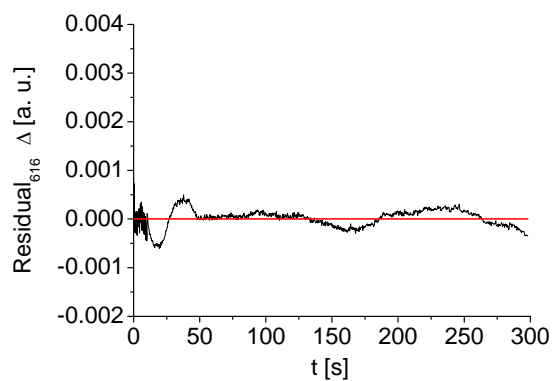


Abb. 3-49: Residuen bei 616 nm des globalen Fits aus Abb. 3-46 mit einem vierstufigen linearen Modell $a>b>c>d>e$;

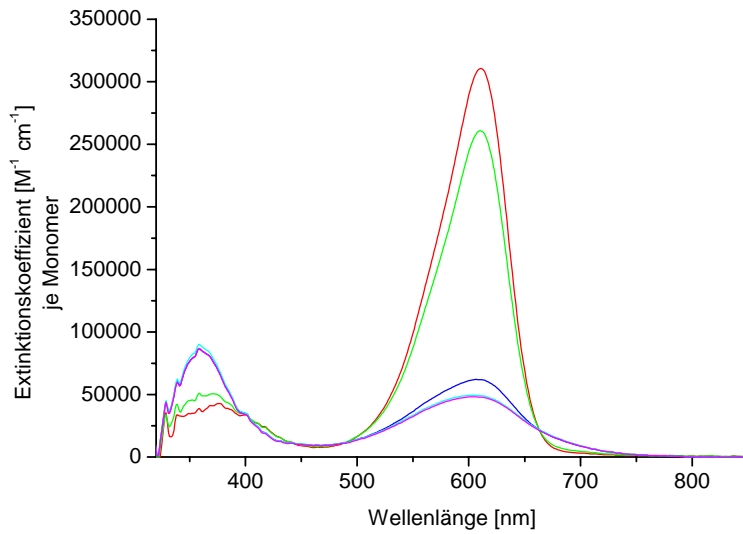


Abb. 3-50: Molare Absorptionsspektren des vierstufigen globalen Fits (Abb. 3-49) der Entfaltungskinetik von PC_{III} (Abb. 3-46). Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—), d (—) und e (—) siehe Text und Tab. 3-13.

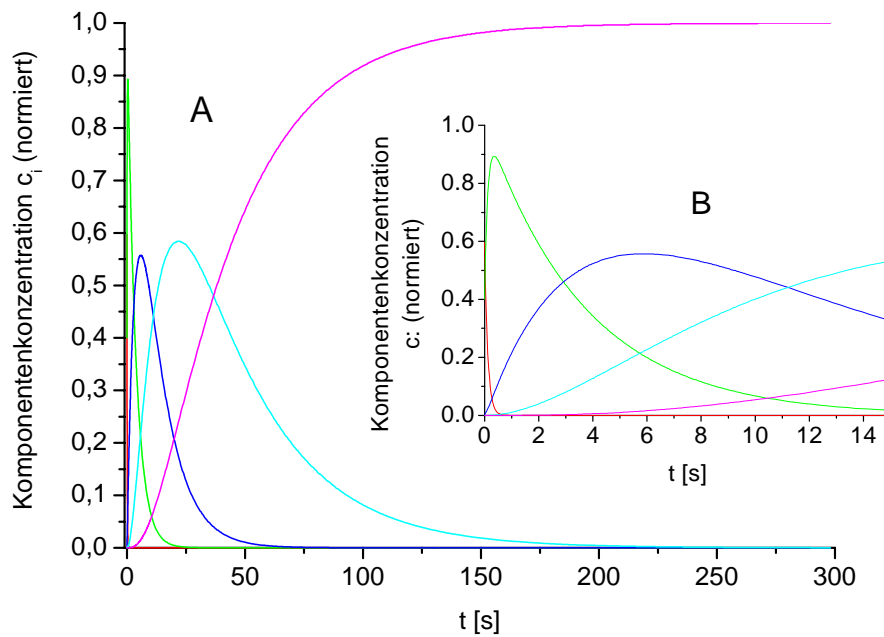


Abb. 3-51: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des vierstufigen globalen Fits (Abb. 3-49) der Entfaltungskinetik von PC_{III} (Abb. 3-46) gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 15 s; Zuordnung der Komponenten a (—), b (—), c (—), d (—) und e (—) siehe Tab. 3-13 und Text.

Ein weiteres Ergebnis der Fits sind die Ratenkonstanten k [s^{-1}] (Kap. 2.3.5.) (Tab. 3-14) für die einzelnen Übergänge während der Entfaltung. Um ein sinnvolles Ergebnis für die ϵ Werte zu erhalten, mussten die k -Werte in der Reihenfolge k_1 größer k_2 etc. angeordnet werden. Eine Ausnahme stellen in ein paar Fällen der Einzelwellenlängenmessung der letzte und vorletzte

k-Wert dar. Hier konnte in Ausnahmefällen der letzte k-Wert schneller als der vorletzte sein und dabei noch sinnvolle Ergebnisse zeigen. Solche Modelle wurden in dieser Arbeit nicht weiter überprüft. Ansonsten gilt, dass eine andere Anordnung oft mathematisch zwar gute Ergebnisse (s. Beispiel im Anhang, Abb. 7-2) brachte, aber sich physikalisch unsinnige Aussagen ergaben, wie negative oder mit keiner bekannten Spezies vergleichbare ε -Werte (s. Beispiel im Anhang; Abb. 7-2, 7-3). Im gezeigten Beispiel wurden für k die gleichen Werte eingesetzt, wie sie sich für das Fitmodell ergaben, welches die Kinetik sinnvoll beschrieben hat (Tab. 3-13, Abb. 3-49), allerdings in einer anderen Reihenfolge ($k_2 > k_1 > k_4 > k_3$). Für das passende Modell aus Abb. 3-49 liegt der schnellste Übergang ($a > b$) bei mehreren reziproken Sekunden ($\approx 9 \text{ s}^{-1}$), er hat nur eine geringe Absorptionsabnahme ($\approx 20\%$) im langwelligen Absorptionsbereich (und eine Zunahme im UV-Nahen Bereich s. u.) (Abb. 3-50, 3-58 und Tab. 3-13, 3-15). Der zweite Schritt ist 30-mal langsamer ($\approx 0.3 \text{ s}^{-1}$), hat aber eine wesentlich größere Absorptionsabnahme um weitere $\approx 75\%$ zur Folge. Der dritte Reaktionsschritt ist noch langsamer ($\approx 0.1 \text{ s}^{-1}$), die Absorption vermindert sich aber nur noch um weitere $\approx 4\%$, und als letztes folgt eine noch langsamere Reaktion ($\approx 0,03 \text{ s}^{-1}$), bei der die Absorption um das restliche 1% abnimmt. Für den UV-Nahen Bereich wurden nur die Werte bei 350 nm verwendet, da die Werte für 340 nm zu verrauscht sind (Grenzen der verwendeten Lampe des Spektrometers erreicht). Der UV-Nahe Bereich unterscheidet sich vom langwelligen Bereich darin, dass die Absorption nicht ab-, sondern zunimmt. Die Absorptionszunahme bewegt sich dabei aber in den gleichen Größenordnungen, wie die Absorptionsabnahme. Ein wesentlicher Unterschied ist beim letzten Reaktionsschritt zu beobachten. Hier nimmt die Absorption nicht weiter zu, sondern wieder ab, allerdings auch mit einer $\approx 1\%$ -igen Änderung. Das bedeutet, dass der Chromophor im letzten Schritt noch einmal eine Veränderung erfährt, die von der Ringbildung des Chromophors während der Entfaltung (Kap. 1), die im Wesentlichen zur Absorptionsabnahme im langwelligen und zur Absorptionszunahme im UV-Nahen Bereich führt, abweicht. Dies deutet darauf hin, dass der letzte Reaktionsschritt keine Entfaltung mehr nach den Kriterien der Absorption, darstellt und demnach eine Veränderung im bereits entfalteteten PC ist. Diese Beobachtung deckt sich mit der Feststellung, dass die Fitkomponente d, wie oben beschrieben, ebenfalls bereits entfaltetes PC darstellt. In Folge ist der Übergang $d > e$ sowohl im UV-Nahen, wie im langwelligen Bereich, eine Veränderung im bereits entfalteteten PC. Dieses Phänomen wird im Folgenden noch öfters beobachtet und in der Diskussion noch einmal aufgegriffen.

	Gemessene Wellenlänge [nm]	$\varepsilon [M^{-1} cm^{-1}]$ der steady-state Messungen			$\varepsilon [M^{-1} cm^{-1}]$ der Komponenten der kinetischen Messungen					
		<i>PC_{tri}</i>	<i>PC_{mono}</i>	<i>PC_{denat}</i>	a	b	c	d	e	f
Lokaler Fit	340	41.900	41.400	101.800	44.200	51.500	99.200	103.600	101.500	
	350	43.900	43.700	115.600			88.000	107.200	121.300	117.400
	600	264.000	248.000	47.700			170.500	61.500	49.300	47.700
	613 (1)	291.000	272.000	47.500	299.400	249.900	174.100	51.500	48.000	
	613 (2)	291.000	272.000	47.500	299.500	250.200	196.500	93.500	50.300	48.000
	616	292.000	269.000	46.900	285.000	266.400	159.200	38.500	37.300	
Globaler Fit	350	43.900	43.700	115.600	34.600	45.200	76.500	79.400	76.600	
	600	264.000	248.000	47.700	289.200	244.300	61.100	49.300	48.000	
	613	291.000	272.000	47.500	309.500	259.600	61.600	48.900	47.700	
	616	292.000	269.000	46.900	303.900	254.300	60.700	48.200	47.100	

Tab. 3-13: Extinktionskoeffizienten der Komponenten der lokalen und des globalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung von PC_{tri} und kursiv die Vergleichswerte aus den steady-state Untersuchungen. (Details siehe Text)

	Gemessene Wellenlänge [nm]	Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden (A _{PC_{tri}/x} rel., Kap. 3.2.5.)										
		A _{PC_{tri}/a} rel.	k ₁ [s ⁻¹]	A _{PC_{tri}/b} rel.	k ₂ [s ⁻¹]	A _{PC_{tri}/c} rel.	k ₃ [s ⁻¹]	A _{PC_{tri}/d} rel.	k ₄ [s ⁻¹]	A _{PC_{tri}/e} rel.	k ₅ [s ⁻¹]	A _{PC_{tri}/f} rel.
Lokaler Fit	340	0,04	6,04 ±0,07	0,16	0,122 ±0,003	0,96	0,040 ±0,092	1,04	0,035 ±0,080	1		
	350					0,60	0,384 ±0,029	0,87	0,169 ±0,005	1,06	0,004 ±0,001	1
	600					0,43	0,175 ±0,003	0,94	0,113 ±0,008	0,99	0,023 ±0,002	1
	613 (1)	-0,04	7,66 ±0,04	0,17	0,770 ±0,032	0,48	0,247 ±0,002	0,99	0,054 ±0,003	1		
	613 (2)	-0,04	7,74 ±0,06	0,17	1,10 ±0,28	0,39	0,366 ±0,135	0,81	0,227 ±0,021	0,99	0,045 ±0,005	1
	616	0,03	23,9 ±0,28	0,10	1,33 ±0,02	0,52	0,468 ±0,001	0,99	0,003 ±0,001	1		
Globaler Fit	320 bis 850	-0,05 (bei 616 nm)	8,61 ±0,95	0,16 (bei 616 nm)	0,271 ±0,007	0,95 (bei 616 nm)	0,101 ±0,028	0,99 (bei 616 nm)	0,030 ±0,006	1 (bei 616 nm)		

Tab. 3-14: Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden (A_{PC_{tri}/x} rel., Kap. 3.2.5.) der lokalen und des globalen Fits, der absorptionsspektroskopischen Messung der Entfaltung von PC_{tri}, mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e \xrightarrow{k_5} f$; die relativen Amplituden beziehen sich auf PC_{tri} aus den steady-state Messungen (Kap. 3.2., 3.8.): A_{PC_{tri}/x} rel. ist die relative Amplitude der Komponente x zu PC_{tri}.

Absorptionsmessung bei einzelnen Wellenlängen

Im Folgenden wird die Kinetik der Entfaltung bei einzelnen Wellenlängen analysiert. Auch hier werden die jeweiligen Messungen (Abb. 3-52) sequentiell gefittet (Kap. 2.3.5.). Exemplarisch wird das Ergebnis des Fits bei 350 nm grafisch dargestellt (Abb. 3-53 bis 3-55), alle weiteren Werte stehen in Tab. 3-13 und 3-14. Die Einordnung der Komponenten des Fits in das lineare Modell a>b>c etc. erfolgt, wie beim globalen Fit, im Wesentlichen durch die Korrelation von ε der einzelnen Fitkomponenten mit den bekannten ε -Werten. Der Wert für die „relative Amplitude“ (A rel.), (Tab. 3-14) berechnet aus den ε -Werten (Kap. 2.3.5.) wurde jeweils auf den bekannten ε -Wert für PC_{tri} (Kap. 3.2. und 3.8.) bezogen. Wie weiter oben

beschrieben (Abschnitt: „Globale Analyse“), wird durch die Totzeit der Apparatur immer der Anfang der Reaktion unterschlagen. Deshalb gibt es den Wert “ A_a rel.” (Tab. 3-13), dieser Wert entspricht der Abweichung des ermittelten Werts der ersten ermittelten Komponente vom bekannten ϵ -Wert für PC_{tri} .

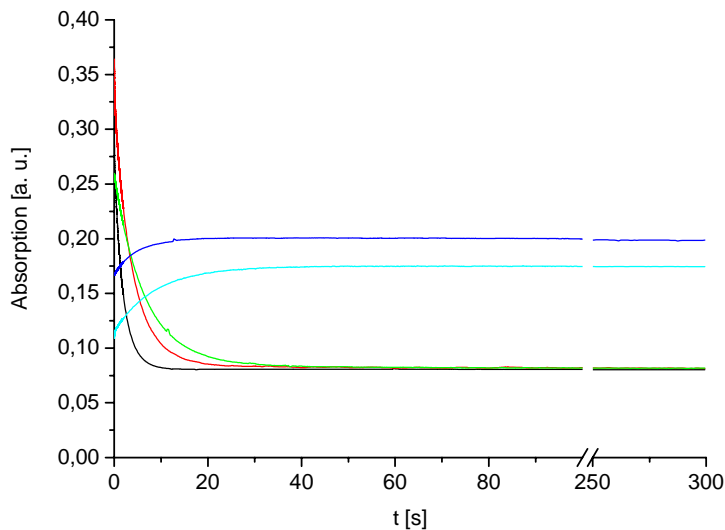


Abb. 3-52: Rohdaten der lokalen Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von PC_{tri} ; Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 6,6 ms (für 616 und 613 nm) bzw. 8,5 ms (für 644, 600, 350 und 340 nm), Time base: 500 μ s Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 100 ms bis 120 s, dann 1 s bis 300 s; Messung bei 616 nm (—), 613 nm (—), 600 nm (—), 350 nm (—) und 340 nm (—)

Einordnen der Fitkomponenten in das lineare Fitmodell $a>b>c$ etc.

Für die Kinetik der Entfaltung, gemessen bei 340 nm, war der vierstufige lineare Fit, der mit den geringsten Fehlerabweichungen und physikalisch sinnvollen Werten. Die 5 Komponenten wurden folgendermaßen in den linearen Reaktionsweg der Entfaltung eingefügt (Tab. 3-14, 3-15): $a>b>c>d>e$; der ϵ -Wert für a ($44.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) liegt in der Größenordnung vom ϵ -Wert des PC_{tri} ($41.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Man könnte ihn aber auch dem ϵ -Wert fürs PC_{mono} zuordnen ($41.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), zumal der Wert b für ein PC_{mono} etwas zu hoch ist, d. h. bereits eine gewisse Entfaltung erfolgt sein muss. Beim Vergleich der Ratenkonstanten mit dem globalen Fit und den lokalen Fits der einzelnen Wellenlängen (Tab. 3-14) und deren Einordnung in den linearen Reaktionsweg der Entfaltung mittels ϵ Werte (Tab. 3-13), zeigt sich aber, dass die schnelle Ratenkonstante ($k \geq 6 \text{ s}^{-1}$) (Tab. 3-14) höchstwahrscheinlich dem Reaktionsschritt $a>b$ zu zuordnen ist. Deshalb wird die erste Komponente dem Reaktionsschritt $a>b$ zugeordnet. Beim Reaktionsverlauf $d>e$ zeigt sich, wie beim globalen Fit auch, eine leichte Abnahme von ϵ und es gelten die gleichen Überlegungen wie dort

(Abschnitt: Globale Analyse und Kap. 3.9.2.1.1.), dass hier eine Veränderung im bereits entfalteten Protein vorliegt.

Beim Verlauf der Entfaltung, gemessen bei 350 nm, wurde der dreistufige Fit als der mit sinnvollen ϵ -Werten und den geringsten Fehlerabweichungen gewählt (im Beispiel Abb. 3-53 bis 3-55 ausführlich dargestellt). Hier liegt der erste ermittelte ϵ -Wert (Tab. 3-13) weit über dem für PC_{tri} und PC_{mono} , er wird demnach der Komponente c zugeordnet, außerdem ist der als erste in der Reaktion vorkommende k-Wert von $\approx 0,4 \text{ s}^{-1}$ viel geringer ist, als der, welcher dem Schritt a>b bisher zugeordnet wurde (Tab. 3-14).

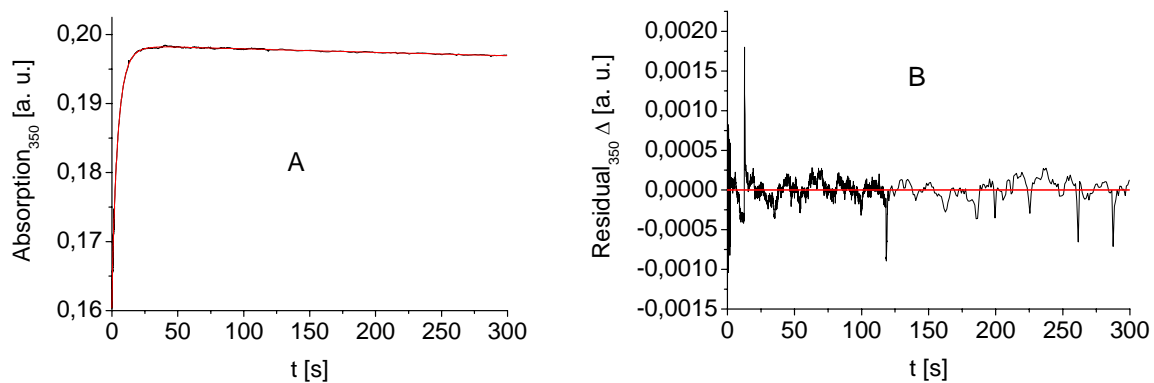


Abb. 3-53: Lokaler dreistufiger Fit der Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von PC_{tri} (Abb. 3-52), bei 350 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell c>d>e>f (—) und in B) Residuen

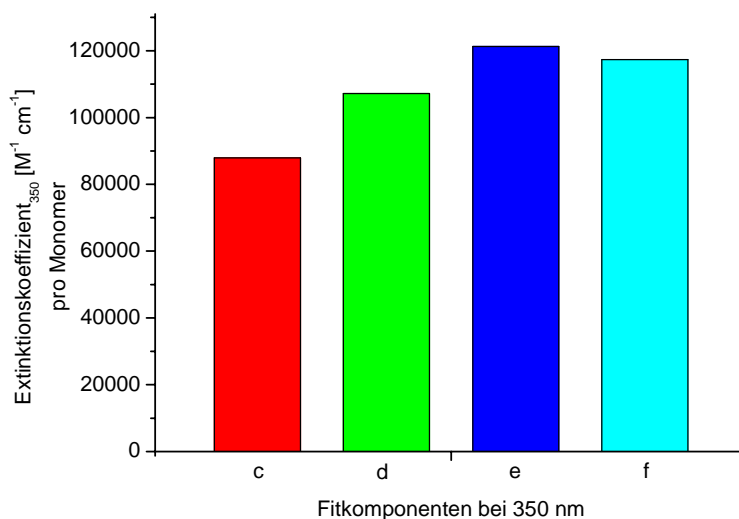


Abb. 3-54: Extinktionskoeffizienten aus dem dreistufigen lokalen Fit (Abb. 3-53) der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-52), bei 350 nm. Zuordnung der Komponenten c (■), d (■), e (■) und f (■) siehe Tab. 3-13 und Text.

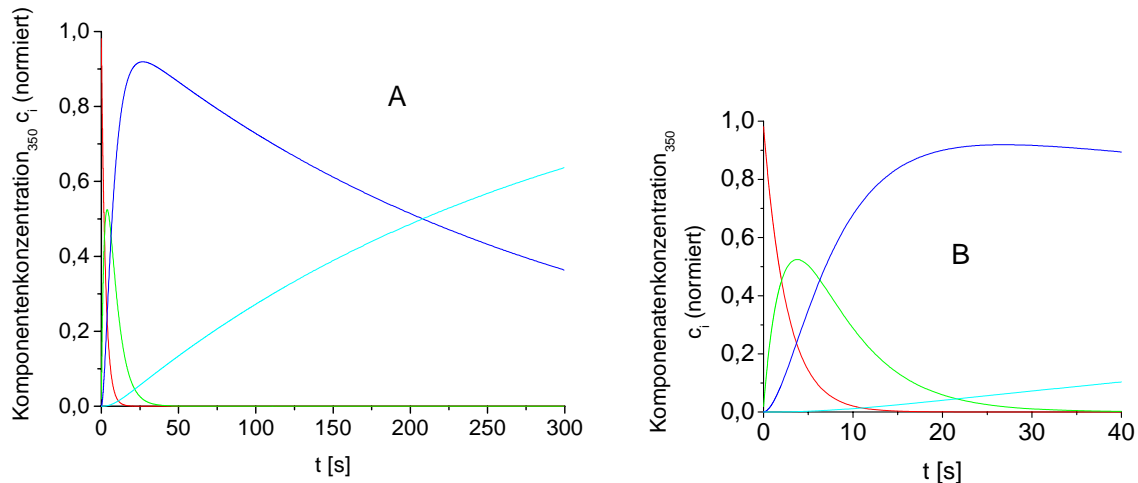


Abb. 3-55: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen lokalen Fits (Abb. 3-53) der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-52), bei 350 nm, gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 40 s; Zuordnung der Komponenten c (—), d (—), e (—) und f (—) siehe Tab. 3-13 und Text.

Bei der Messung bei 600 nm zeigt sich etwas ähnliches, wie bei der Messung bei 350 nm. Der erste ermittelte ϵ -Wert (Tab. 3-13) ist viel zu niedrig, um einem PC_{tri} oder PC_{mono} entsprechen zu können, deshalb wird er der Komponente c zugeordnet. Der erste k-Wert ($\approx 0,2 \text{ s}^{-1}$) liegt ebenfalls weit unterhalb der Größe wie er für den Schritt $a > b$ bisher angenommen wurde (Tab. 3-14).

Für die Kinetik bei 613 nm wurden zwei mögliche Fits in Betracht gezogen, ein vier- und ein fünfstufiger. In beiden Fällen ist der erste ϵ -Wert so groß, dass er der Komponente a zugeordnet wird (Tab. 3-13). Auch entspricht die Schnelligkeit von k ($\approx 8 \text{ s}^{-1}$) (Tab. 3-14) dem Übergang $a > b$, so wie er bis jetzt angenommen wird. Der ϵ -Wert für b ist geringer, als für PC_{mono} zu erwarten wäre, d. h. auch hier ist wahrscheinlich bereits etwas Entfaltung zu sehen.

Die Zuordnung bei 616 nm ist, nach dem bisher angewandten Schema, ziemlich eindeutig. Der ϵ -Wert für die erste Komponente ($285.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) liegt nahe bei dem des PC_{tri} ($292.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Tab. 3-13). Der ϵ -Wert der zweiten Komponente ($266.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ist im Einklang mit dem Wert vom PC_{mono} ($269.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Auch der sehr schnelle Übergang von der ersten zur zweiten Komponente ($k_1 \approx 24 \text{ s}^{-1}$) (Tab. 3-14) passt gut in das bisherige Schema mit dem schnellen Übergang für $a > b$. Der k-Wert ist in diesem Fall allerdings deutlich höher, als die k-Werte der anderen Fits, dies wird weiter unten noch einmal gesondert aufgegriffen und interpretiert. In diesem Fall sieht es so aus, als sei bei der Komponente b im Wesentlichen noch keine Entfaltung, sondern nur Dissoziation, erfolgt (Abb. 3-56). Die Werte

von d und e weichen gegenüber PC_{denat} nach unten ab. Dies lässt sich nur damit erklären, dass die mathematische Auflösung in einzelne Reaktionsschritte ihre Grenzen zur Ermittlung der tatsächlichen Gegebenheiten hat.

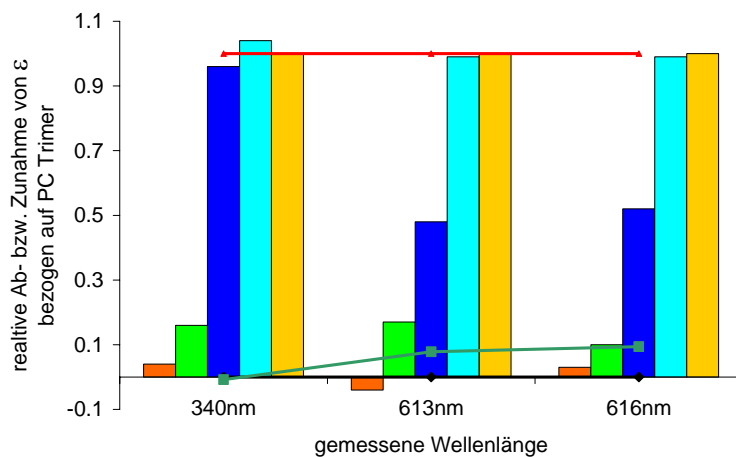


Abb. 3-56: Auf PC_{tri} normierte Absorptionsänderungen der Fitkomponenten, der lokalen Fits der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-52) beim vierstufigen Modell: $a>b>c>d>e$ (Tab. 3-13 und 3-14); Komponente a (■), b (■), c (■), d (■) und e (■); Vergleichswerte aus den steady-state Untersuchungen: PC_{tri} (—), PC_{mono} (—), PC_{denat} (—).

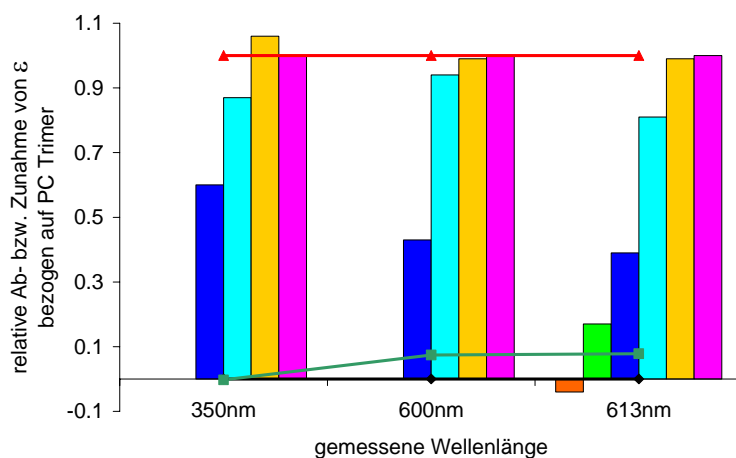


Abb. 3-57: Auf PC_{tri} normierte Absorptionsänderungen der Fitkomponenten, der lokalen Fits der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-52) beim fünfstufigen Modell: $a>b>c>d>e>f$ (Tab. 3-13 und 3-14); Komponente a (■), b (■), c (■), d (■), e (■) und f (■); Vergleichswerte aus den steady-state Untersuchungen: PC_{tri} (—), PC_{mono} (—), PC_{denat} (—).

Interpretation der ermittelten Fitkomponenten

Die lokale Analyse bei einzelnen Wellenlängen ergibt bei 340 nm und 616 nm gute Fits für ein vierstufiges Modell (Abb. 3-56 und 3-58, Tab. 3-13 und 3-14). Für 350 nm und 600 nm für ein fünfstufiges, wobei jedoch die ersten beiden Komponenten a und b bei der Messung nicht mehr erfasst wurden (Abb. 3-57 und 3-58, Tab. 3-13 und 3-14). Für 613 nm ergeben das vier- und fünfstufige Modell vergleichbar gute Fits (Abb. 3-56, 3-57 und 3-58, Tab. 3-13 und

3-14). Beim Vergleich der Absorptionsänderungen des vierstufigen Fits zeigt sich für $a > b$ bei 340 nm und 613 nm ein ähnlich großer Schritt mit einer vergleichbaren Ratenkonstante. Dies gilt auch im Vergleich zum globalen Fit (Tab. 3-13 und 3-14, Abb. 3-50 und 3-58). Im Vergleich zur Absorptionsabnahme bei der Dissoziation vom PC_{tri} zum PC_{mono} ist diese Veränderung zu groß, um sie nur dem Übergang vom Trimer zum Monomer zuzuordnen. Es scheint, dass bereits ein Stück Entfaltung enthalten ist. Anders bei 616 nm, hier entspricht die Größe der Absorptionsabnahme und auch die ε -Werte, wie bereits oben beschrieben, dem Übergang vom Trimer zum Monomer. Die Ratenkonstante ist ebenfalls nicht mit denen von 340 nm, 613 nm und dem globalen Fit vergleichbar, sondern dreifach größer. Es sieht so aus, dass die Dissoziation von PC nur bei 616 nm klar zu sehen ist (Abb. 3-56) und dass diese sehr schnell verläuft. In der etwas größeren Ratenkonstante des globalen Fits, im Vergleich zu 340 nm und 613 nm, macht sich der schnelle Schritt von 616 nm bemerkbar. Beim Übergang $b > c$ bestehen sowohl für die Absorptionsänderungen als auch für die Ratenkonstanten für 340 nm gegenüber 613 nm und 616 nm sehr großer Unterschiede (613 nm und 616 nm weisen nahezu die gleichen Amplituden auf) und in Folge auch bei $c > d$. Die Ratenkonstanten bei 613 nm und 616 nm im $b > c$ Schritt differieren etwas, sind aber im Vergleich zu den k -Werten bei 340 nm um ein vielfaches größer. Ähnliches gilt für den Übergang $c > d$. Der schnellste ist bei 616 nm, etwas langsamer der bei 613 nm, jedoch sind sie beide um ca. das zehnfache schneller, als der bei 340 nm. Dies kann bedeuten, dass bei $b > c$ und $c > d$ bei 340 nm ein anderer Vorgang gesehen wird, als bei 616 nm und 613 nm. Beim globalen Fit entspricht die Größe der Absorptionsänderung der von 340 nm. Die Ratenkonstante k_1 ist mehr als doppelt so groß, wie die von 340 nm, und der k_2 -Wert liegt ebenfalls zwischen denen der lokalen Fits bei 340 nm und von 613 nm bzw. 616 nm, auch hier spiegelt sich der Querschnitt der Analyse über einen breiten spektralen Bereich wieder. Die Absorptionsänderung $d > e$ zeigt in allen Fällen nur noch eine geringe Änderung. Nachdem die Änderung im UV-Nahen Bereich aber eindeutig wieder zu einer Abnahme, nach der vorausgegangenen Zunahme, führt, kann diese Absorptionsänderung nicht vernachlässigt werden. Die Ratenkonstante für den letzten Reaktionsschritt ist in allen Fällen im Bereich 10^{-2} s^{-1} (der k -Wert von 10^{-3} s^{-1} bei 616 nm liegt außerhalb der definierten Grenzen, (Kap. 2.3.5.), und ist deshalb nur ein Anhaltspunkt). Hier scheint, wie bereits bei der Interpretation des globalen Fits beschrieben, eine langsame Veränderung des Proteins im bereits entfalteten Zustand (der Q -Wert der Komponente d liegt bei 0,4), stattzufinden, welche im UV-Nahen Bereich, durch die Absorptionsabnahme, am deutlichsten zu sehen ist.

Beim fünfstufigen Entfaltungsweg (Abb. 3-57) ist die relative Absorptionsänderung für die Komponente c (von b nach c kann nicht interpretiert werden, da für 350 nm und 600 nm die erste ermittelte Komponente c ist) bei 350 nm um ca. 20% größer, als bei 613 nm und 600 nm. Die Ratenkonstanten für 613 nm und 350 nm sind aber fast gleich groß, die für 600 nm ist etwas geringer (Abb. 3-58, Tab. 3-14). Nachdem für 600 nm und 350 nm keine Werte für die Komponenten a und b erfasst werden konnten und die erste c darstellt, müssen diese Werte mit mehr Vorsicht interpretiert werden. Der Reaktionsweg wurde sozusagen „mittendrin“ erfasst und deshalb interpretiert der verwendete Algorithmus möglicherweise Komponenten, die tatsächlich so nicht vorhanden sind. Die weiteren Absorptionsänderungen und dazugehörigen Ratenkonstanten variieren zwischen den einzelnen Wellenlängen. Der letzte Schritt e>f bewirkt, wie der letzte Schritt beim vierstufigen Modell, wieder eine nur geringe Absorptionsänderung (ebenfalls Abnahme im UV-Nahen bei 350 nm, Q-Wert der Komponente e liegt bereits bei 0,4, d. h. Komponente e zeigt entfaltetes PC) mit einer langsamen Ratenkonstante $k_5 \approx 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (der k-Wert von 10^{-3} s^{-1} bei 350 nm liegt außerhalb der definierten Grenzen (Kap. 2.3.5.) und ist deshalb nur ein Anhaltspunkt) und es gelten die gleichen Überlegungen wie beim vierstufigen Fit, dass es sich hierbei um eine Reaktion im bereits entfaltenen Protein handeln muss (Kap. 3.9.2.1.1.). Bei 613 nm wurden auch die Komponenten a und b erfasst und sie lassen sich entsprechend dem vierstufigen Modell, als Dissoziationsschritt mit begonnener Entfaltung, interpretieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Schritt a>b wahrscheinlich der Dissoziation entspricht, er aber nur bei 616 nm klar zu erkennen ist. Der letzte Schritt hat bei beiden Fits die ähnliche Absorptionsänderungen und Ratenkonstanten und zeigt somit den gleichen Vorgang an. Der Unterschied zwischen dem vier- und fünfstufigen Modell besteht darin, dass im fünfstufigen bei der Entfaltung des Monomers ein zusätzliches Intermediat auftritt. Die Kinetiken der einzelnen Wellenlängen unterscheiden sich (Abb. 3-44 und Abb. 3-58). Der deutlichste Unterschied ist bei 340 nm, im Vergleich zum langwelligen Bereich zu sehen. Bei 340 nm (350 nm lässt sich in diesem Fall, aufgrund der fehlenden Komponenten a und b nicht interpretieren) wurden zum Teil rel. Ampl. und Ratenkonstanten gesehen (Tab. 3-14), die von den Werten im langwelligen stark abweichen, was dahingehend interpretiert werden kann, dass unterschiedliche Vorgänge der Entfaltung gesehen werden.

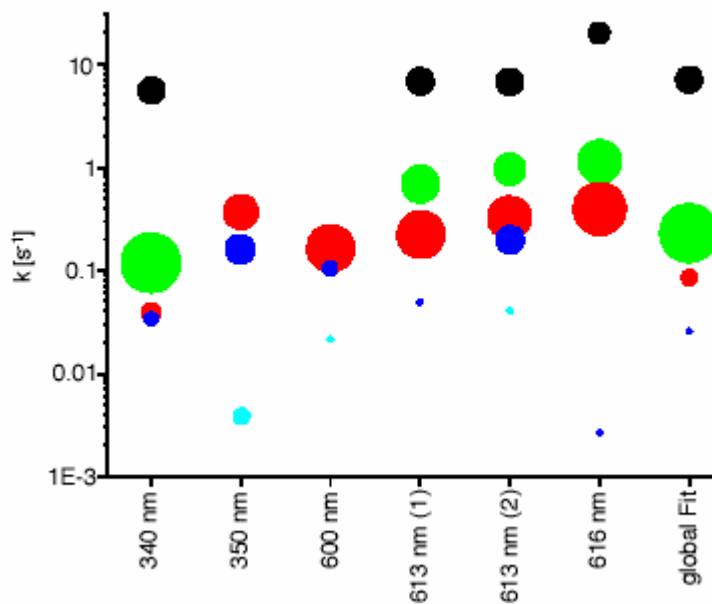
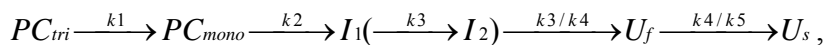


Abb. 3-58: Vergleich des globalen und der lokalen Fits der Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von PC_{tri} (Abb. 3-45 und 3-52). Gezeigt sind die k-Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k₁ (●), k₂ (●), k₃ (●), k₄ (●) und k₅ (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-13, 3-14). Für 613 nm sind der vier- (1) und der fünfstufige (2) Fit gezeigt.

Mit Vorsicht kann folgendes erstes Modell für die Entfaltung von PC_{tri}, gemessen mittels Absorption, aufgestellt werden, wobei lokale Unterschiede bei den Einzelwellenlängenmessungen zu erkennen sind:



dabei ist PC_{tri}, das trimere PC, PC_{mono}, das dissoziierte monomere, I_x ein kinetisches Entfaltungsintermediat, U_f (U: Unfolded, f: Fast) der schnell entfaltete Zustand und U_s (s: Slow) der langsam entfaltete Zustand des Proteins.

3.9.2.1.1. Allgemeine Schlussfolgerung für die Dateninterpretation in der Absorption

Alle weiteren Auswertungen folgten dem im vorausgehenden Abschnitt erläuterten Vorgehen. Als weiteres Kriterium für die Interpretation der Fitkomponenten wird, nach obiger Auswertung, die Absorptionsabnahme im UV-Nahen Bereich genommen. Sie dient als Hinweis für Veränderung im bereits entfaltenen Protein. Liegt der Q-Wert für eine Komponente bei etwa 0,5 bis 0,4, was per Definition (Kap. 1.7.) einem entfaltenen Biliprotein entspricht und es findet noch Veränderung statt, wird dies ebenfalls einer Veränderung im

bereits entfalteten Protein zugeschrieben. Bei zu verrauschten- oder Einzelwellenlängenmessungen wird stattdessen der ϵ -Wert für das langwellige Absorptionsmaximum heran gezogen. Der ϵ -Wert der zu einem bestimmten Q-Wert gehört ist aus den steady-state Messungen bekannt (Kap. 3.8., Tab. 3-12) und kann deshalb ersatzweise für den Q-Wert verwendet werden. Bei den weiteren Untersuchungen wurden in der Regel nur noch die Ergebnisse diskutiert.

3.9.2.2. Vis-CD

Problematik der Datenanalyse:

Die CD Messungen zeigten ein erhebliches Rauschen (Abb. 3-59), vor allem in den ersten Messsekunden mit kleiner Integrationszeit (μ s). Dies und die geringe CD-Änderung zu Beginn der Messung erschwerten es zunächst, die Daten zufrieden stellend zu fitten. Vorbereitend wurden deshalb Messungen mit unterschiedlichen Integrationszeiten (2 - 50 ms über eine Messzeit von 14 s; Anhang Abb. 7-7) und Fits über unterschiedliche Zeitbereiche (bis 2 - 80 s; Anhang Abb. 7-6) mit unterschiedlichen linearen Modellen (2 – 4 stufig) gefittet. Um befriedigende Fitergebnisse, die auch die CD-Zunahme im langwelligen Bereich, während der Dissoziation von PC_{tri} , wiedergaben, zu bekommen, wurde folgendermaßen vorgegangen. Bei den Messungen über 14 s, mit gleich bleibender Time base aber unterschiedlichen Integrationszeiten, ergaben sich für ein einstufiges Modell nur relativ langsame Ratenkonstanten (Tab. 3-15, Mittelwert: $k = 0,165 \text{ s}^{-1}$). Ein mehrstufiger Fit war nicht stabil. Die einstufigen Fits gaben jedoch die zu erwartende CD-Zunahme im positiven Extremum, hervorgerufen durch die Dissoziation von PC_{tri} zu PC_{mono} , nicht wider. Deshalb erfolgte zunächst ein zweistufiger lokaler Fit einer 3 s Messung (Abb. 3-60). Hier ist ansatzweise bei frühen Zeiten eine CD-Zunahme bei 616 nm zu sehen, die mit einer Ratenkonstante von $k = 14 \text{ s}^{-1}$ gefittet wurde. Allerdings ist ein Fit über den ersten Zeitraum der Entfaltungsreaktion mit Vorsicht zu interpretieren, da die Reaktion noch nicht in der Sättigung ist und so leicht, vor allem für die späteren Reaktionen, Fehlinterpretationen aufgrund des verwendeten Programms erfolgen können. Deshalb wurden die oben für die Anfangsphase ermittelten Ratenkonstanten ($k = 14 \text{ s}^{-1}$, $k = 0,165 \text{ s}^{-1}$) zunächst in den Fit über die gesamte Messzeit von 300 s als unveränderliche Zeitkonstante eingesetzt. Diese Fixierung

Integrationszeit der Messung	k [s^{-1}]
2 ms	0,145 \pm 0,008
5 ms	0,151 \pm 0,009
10 ms	0,123 \pm 0,011
50 ms	0,24 \pm 0,028

Tab. 3-15: Ratenkonstanten zu den einstufigen lokalen Kinetikmodellen: $a > b$. Die Analyse basiert aus den Daten der Vis-CD Messungen über 14 s mit unterschiedlichen Integrationszeiten, bei 616 nm. Experimentelle Daten und Fit sind im Anhang gezeigt.

wurde, nachdem sich der Fit stabilisierte, aufgehoben, und anschließend weiter bis zur Stabilisierung der Parameter gefittet. Diese Vorgehensweise brachte, wie im Folgenden zu sehen ist, Fits mit sinnvollen $\Delta\varepsilon$ -Werten und geringen Fehlerabweichungen.

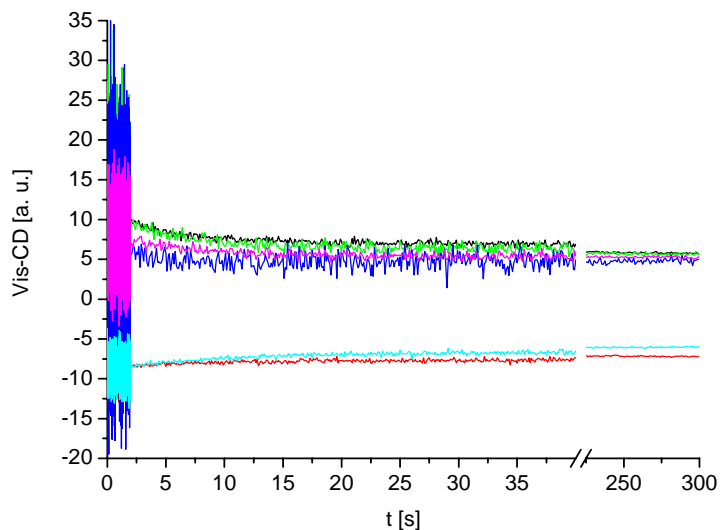


Abb.3-59: Rohdaten der lokalen CD-Änderung bei der Entfaltung von PC_{tri}. Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 6,6 ms (für 350, 600, 613 und 628 nm) bzw. 8,5 ms (für 340 und 616 nm), Time base: 500 μ s Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 100 ms bis 120s, dann 1 s bis 300 s; Messungen bei 600 nm (—), 613 nm (—), 616 nm (—), 628 nm (—), 340 nm (—) und 350 nm (—)

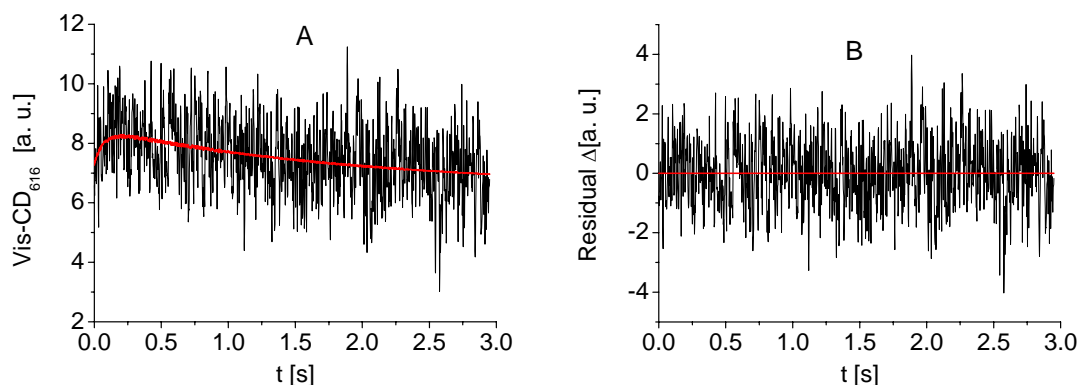


Abb. 3-60: Lokaler zweistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC_{tri}, bei 616 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c (—) in B) Residuen; Messbedingungen: Messzeit 3 s, Integrationszeit 2 ms, Totzeit der stop-flow Apparatur 6,1 ms;

Auswertung der Entfaltungskinetik vom PC Trimer

Globale Analyse

Bei der globalen Analyse der Vis-CD Spektren der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-59) wurden die Messwerte bei allen Wellenlängen gemeinsam gefittet. Das Modell mit den kleinsten Fehlerabweichungen und physikalisch sinnvollen Aussagen ist ein dreistufiger Fit

(s. Beispiel Abb. 3-61). Die Übereinstimmung der $\Delta\varepsilon$ -Werte der Fitkomponente a und b für PC_{tri} und PC_{mono} ist nicht gut (Abb. 3-62, Tab. 3-16). Die Werte sind durchgängig geringer, als die aus den steady-state Messungen erhaltenen. Vergleicht man jedoch die Veränderungen von $\Delta\varepsilon$ (Abb. 3-62, 3-68) während der Entfaltung (zuerst CD-Zunahme, dann -Abnahme; die Besonderheiten bei den einzelnen Wellenlängen werden unten noch einmal diskutiert), kann aufgrund dieses Kriteriums, die Fitkomponente a dem PC_{tri} und die Fitkomponente b dem PC_{mono} zugeordnet werden. Die $\Delta\varepsilon$ -Werte von d und PC_{denat} decken sich im Rahmen der Fehlerabweichungen. Warum bei der mathematischen Analyse der Messkurven die ersten Fitkomponenten in ihrer Größe so unterbewertet werden, ist unklar. Folgende zwei Ursachen sind zumindest daran beteiligt: Zum einen das hohe Rauschen, vor allem zu Beginn der Messung und zum anderen, dass auch hier während der Totzeit der Apparatur bereits ein Teil der Reaktion abgelaufen ist („Burst“ siehe Kap. 3.9.1.2.) Die einzelnen Komponenten wie PC_{tri} und PC_{mono} sind zwar im Reaktionsgleichgewicht noch vorhanden, aber nicht mehr in der Konzentration, wie zu Beginn der Messung. Dies zeigt sich auch beim Konzentrationsverlauf der einzelnen Fitkomponenten (Abb. 3-63), Komponente a wird nur noch zu ca. 60% erfasst. Möglicherweise führt dies zu einer Fehleinschätzung in der Größe der $\Delta\varepsilon$ -Werte.

Im Schritt $a>b$ nimmt das positive Extremum zu (die Besonderheiten bei 628 nm werden weiter unten gesondert betrachtet). Da genau dies für den Übergang von PC_{tri} zu PC_{mono} charakteristisch ist, wurde diesem Schritt eine Monomerisierung zugeordnet. Dieser Übergang ist der schnellste Reaktionsschritt ($\approx 9 \text{ s}^{-1}$). Eine CD-Zunahme bei 340 nm und 350 nm bei der Dissoziation von PC_{tri} , deutet sich bei den steady-state Messungen lediglich an (Tab. 3-17, Abb. 3-62), tritt aber beim globalen Fit der Kinetik deutlich in Erscheinung. Durch die hohe Messgenauigkeit, hervorgerufen durch die sehr hohe zeitliche Auflösung der kinetischen Messung (Messintervall μs bis 3 s Messzeit, siehe Abb. 3-59, 3-60) ist es möglich, dass eine CD-Zunahme im negativen Extremum sichtbar wird, während bei den steady-state Untersuchungen bereits geringe Pipettiergenauigkeiten o. ä. zwischen der Messung von PC_{tri} und PC_{mono} , diese kleine CD-Änderung überlagern. Oder, dass kinetische Intermediate auftreten, die bei den Gleichgewichtsmessungen nicht vorkommen. Der nächste Reaktionsschritt $b>c$ ist durch eine ca. 40-mal langsamere Kinetik gekennzeichnet ($\approx 0,2 \text{ s}^{-1}$) und weist dabei die größte CD-Änderung (Abnahme) auf. Der letzte Reaktionsschritt $c>d$ ist nochmals, ca. 20-mal langsamer und hat eine durchschnittliche CD-Abnahme von $\approx 20\%$. Die CD-Änderungen zwischen den einzelnen Wellenlängen variieren, bis auf den Schritt $c>d$,

zum Teil stark. Diese Unterschiede werden bei der Interpretation mittels lokalem Fit weiter unten eingehend betrachtet.

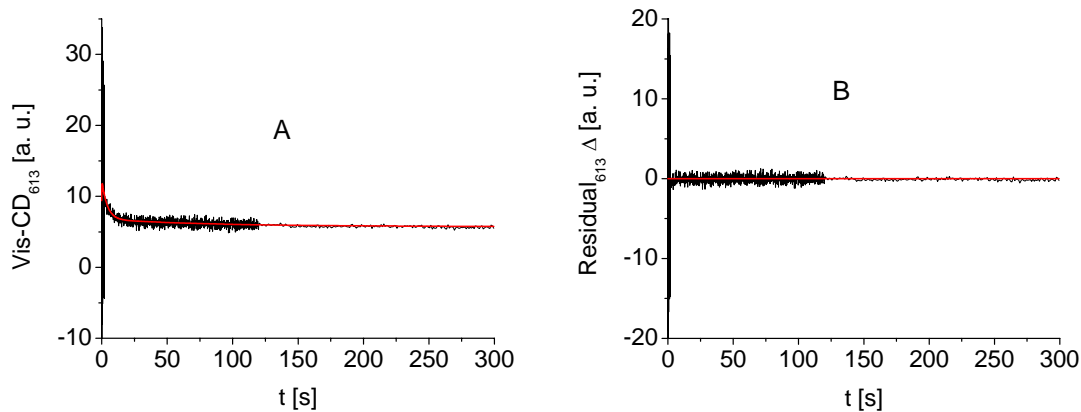


Abb. 3-61: Globaler dreistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC_{tri} (Abb. 3-59). Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c>d (—) und in B) Residuen; gezeigt bei 613 nm

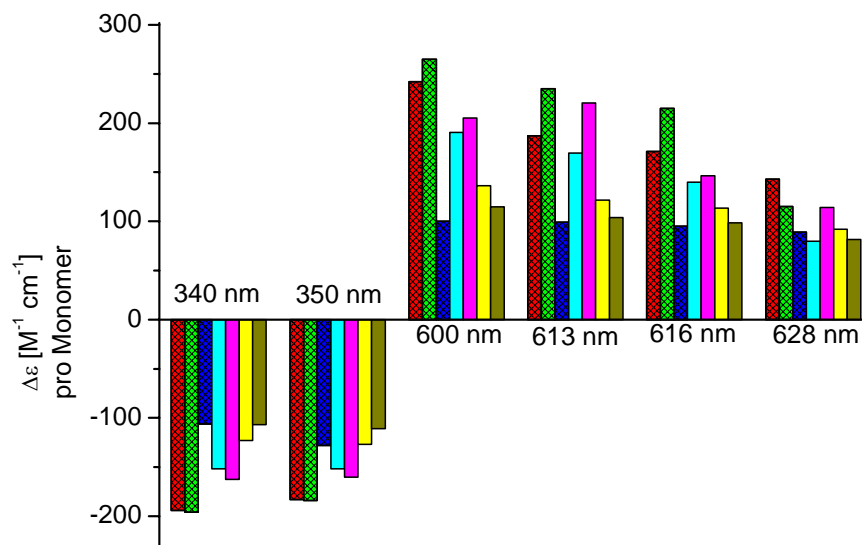


Abb. 3-62: Molarer Circulardichroismus ($\Delta\varepsilon$) des dreistufigen globalen Fits (Abb. 3-61) der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-59). Vergleich der $\Delta\varepsilon$ [M⁻¹ cm⁻¹] der Fitkomponenten der einzelnen Wellenlängen, mit den $\Delta\varepsilon$ [M⁻¹ cm⁻¹] von PC_{tri}, PC_{mono} und PC_{denat}. Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■), c (■) und d (■) siehe Text und Tab. 3-16. Vergleichswerte aus den steady-state Messungen (Kap. 3.8.) für PC_{tri} (■), PC_{mono} (■), PC_{denat} (■);

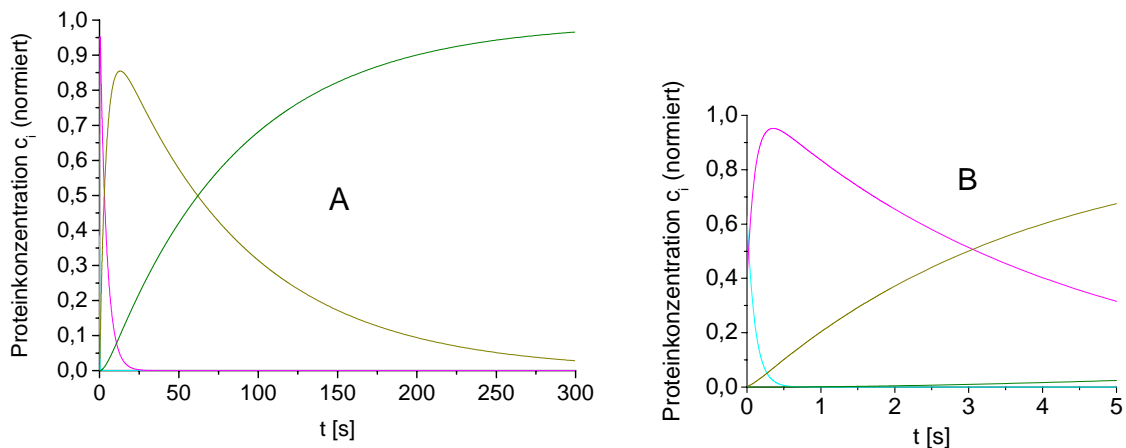
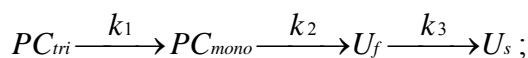
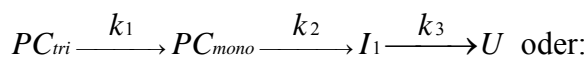


Abb. 3-63: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen globalen Fits (Abb. 3-61) der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-59) gemessen mittels Vis-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 5 s. Zuordnung der Fitkomponente a (—), b (—), c (—), d (—) siehe Text und Tab. 3-16, Abb. 3-62.

Zusammenfassend kann aus den Werten des globalen Fits folgendes Entfaltungsmodell angedacht werden:



diese beiden möglichen Varianten können an dieser Stelle noch nicht unterschieden werden.

	Gemessene Wellenlänge [nm]	$\Delta \epsilon [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ der <i>steady-state</i> Messungen			$\Delta \epsilon [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ der Fitkomponenten der kinetischen Messungen				
		PC_{tri}	PC_{mono}	PC_{denat}	a	b	c	d	e
Lokaler Fit	340	-194	-196	-106		-157	-119	-103	
	350	-183	-184	-128	-140	-157	-143	-132	
	600	242	265	100	207	226	137	101	
	613	187	235	99	164	243	209	114	86
	616	171	215	95	122	149	98		
	628	143	115	89		109	84		
Globaler Fit	340	-194	-196	-106	-152	-162	-123	-107	
	350	-183	-184	-128	-152	-160	-127	-111	
	600	242	265	100	190	205	136	115	
	613	187	235	99	169	220	122	104	
	616	171	215	95	140	146	113	99	
	628	143	115	89	80	114	92	82	

Tab. 3-16: Molarer Circular dichroismus ($\Delta \epsilon$) der Komponenten der lokalen und des globalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung von PC_{tri} , und kursiv die Vergleichswerte aus den *steady-state* Untersuchungen (Details siehe Text);

Gemessene Wellenlänge [nm]	$A_{PC_{tri}/a}$ rel.	k_1 [s^{-1}]	$A_{a/b}$ rel.	k_2 [s^{-1}]	$A_{b/c}$ rel.	k_3 [s^{-1}]	$A_{c/d}$ rel.	k_3 [s^{-1}]	$A_{d/e}$ rel.
340			0,41	0,106 $\pm 0,020$	0,42	0,008 $\pm 0,007$	0,18		
350	0,84	7,64 $\pm 2,88$	-0,33	0,105 $\pm 0,070$	0,27	0,008 $\pm 0,01$	0,22		
600	0,25	4,40 $\pm 2,84$	-0,13	0,364 $\pm 0,063$	0,63	0,005 $\pm 0,005$	0,26		
613	0,23	7,64 $\pm 12,9$	-0,78	3,27 $\pm 8,34$	0,34	0,167 $\pm 0,066$	0,94	0,003 $\pm 0,020$	0,28
616	0,67	8,84 $\pm 5,57$	-0,37	0,159 $\pm 0,035$	0,70				
628			0,58	0,053 $\pm 0,049$	0,42				
Globaler Fit	0,41 (bei 600 nm)	9,25 $\pm 2,57$	-0,12 (bei 600 nm)	0,243 $\pm 0,034$	0,54 (bei 600 nm)	0,012 $\pm 0,008$	0,17 (bei 600 nm)		

Tab. 3-17: Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{x/x+1}$ rel., Kap. 2.3.5.) aus den lokalen und globalen Fits der Vis-CD Messungen der Entfaltung von PC_{tri} , mit dem Fitmodell:

$a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e$; die Werte der Komponenten werden auf PC_{tri} aus den steady-state Messungen (Kap. 3.8.) bezogen, die zum Teil großen Fehler resultieren aus dem starken Rauschen der Vis-CD Daten. Die relativen Amplituden beziehen sich jeweils auf den vorausgehenden $\Delta\varepsilon$ -Wert.

Lokale Analyse

Bei der lokalen Analyse der Messungen bei den einzelnen Wellenlängen waren unterschiedliche lineare Fitmodelle die am besten geeignetsten. An dieser Stelle soll vorweg genommen werden, dass sich in den folgenden Analysen der erste Reaktionsschritt $a > b$ teilweise eine größere relative Amplitude hat, als beim Übergang PC_{tri} und PC_{mono} zu erwarten wäre. Dies liegt, wenn keine anderen Gründe dafür aufgeführt werden, daran, dass die rel. Ampl. immer auf PC_{tri} aus den steady-state Messungen bezogen wird und die Fitkomponenten in ihren $\Delta\varepsilon$ -Werten teilweise eine Unterbewertung erfahren (weitere Erklärungen hierzu stehen an gegebener Stelle im Text).

Bei 340 nm ergab ein zweistufiger Fit die geringsten Fehlerabweichungen bei sinnvollen $\Delta\varepsilon$ -Werten. Nachdem der erste Übergang beim zweistufigen Fit eine relativ große Abnahme des CD-Signals (41%) zeigt (Tab. 3-17), kann er nach dem Wissen aus den steady-state Messungen nicht den Übergang von PC_{tri} zu PC_{mono} zugeordnet werden. Deshalb wird der zweistufige Fit folgendermaßen eingeordnet: $b > c > d$ (Tab. 3-16); zu dieser Zuordnung passt ebenfalls die Größe der ersten Ratenkonstante ($\approx 0,1 s^{-1}$) (Tab. 3-17). Nach den bisherigen Ergebnissen wäre sie viel zu langsam, um die Dissoziation zu beschreiben, sie wird demnach dem ersten Entfaltungsschritt zugeordnet. Der Schritt $c > d$ ist um ein vielfaches langsamer (er liegt außerhalb der definierten Messgrenzen (Kap. 2.3.5.) und ist deshalb nur ein

Anhaltspunkt.) Die zugehörige CD-Abnahme ist nur noch halb so groß, wie die des vorangehenden Schritts.

Bei 350 nm zeigte ein dreistufiger Fit die besten Ergebnisse. Die CD-Änderung im ersten Schritt war positiv (33%) (Tab. 3-17). Aus den steady-state Messungen ist für die Dissoziation keine wesentliche CD-Änderung bei 350 nm zu erwarten (Tab. 3-16). Allerdings, wie bereits beim globalen Fit erläutert, ist es gut möglich, dass bei den steady-state Messungen diese Feinheiten unterdrückt werden, bei der kinetischen Messung, mit der hohen zeitlichen Auflösung aber in Erscheinung treten. Oder, dass bei der Kinetik Intermediate auftreten, die bei den Gleichgewichtsmessungen nicht vorkommen. Ein Entfaltungsschritt hätte ein negatives Vorzeichen. Deshalb wird der Schritt $a > b$ der Dissoziation zugeordnet (Kap. 3.5., 3.7., 3.8.). Die Ratenkonstante von $\approx 8 \text{ s}^{-1}$ spricht ebenfalls für den schnellen Dissoziationsschritt. Die Schritte $b > c$ und $c > d$ haben ähnliche CD-Abnahmen (27 bzw. 22%), sind aber mit unterschiedlichen Ratenkonstanten gekoppelt. k_2 ist ca. 70-mal langsamer ($\approx 0,1 \text{ s}^{-1}$), als k_1 , k_3 ist noch einmal um ca. das 10-fache langsamer (er liegt außerhalb der definierten Messgrenzen (Kap. 2.3.5.) und ist deshalb nur ein Anhaltspunkt).

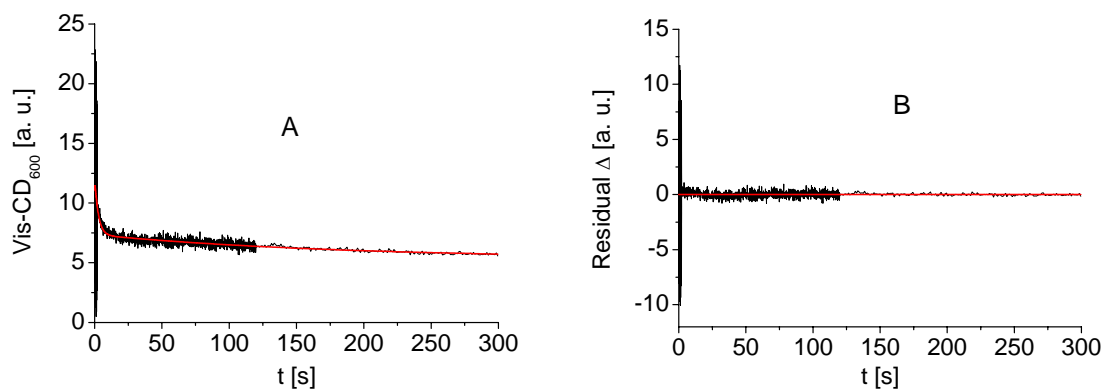


Abb. 3-64: Lokaler dreistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC_{tri} (Abb. 3-59), bei 600 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell $a > b > c > d$ (—) und in B) Residuen

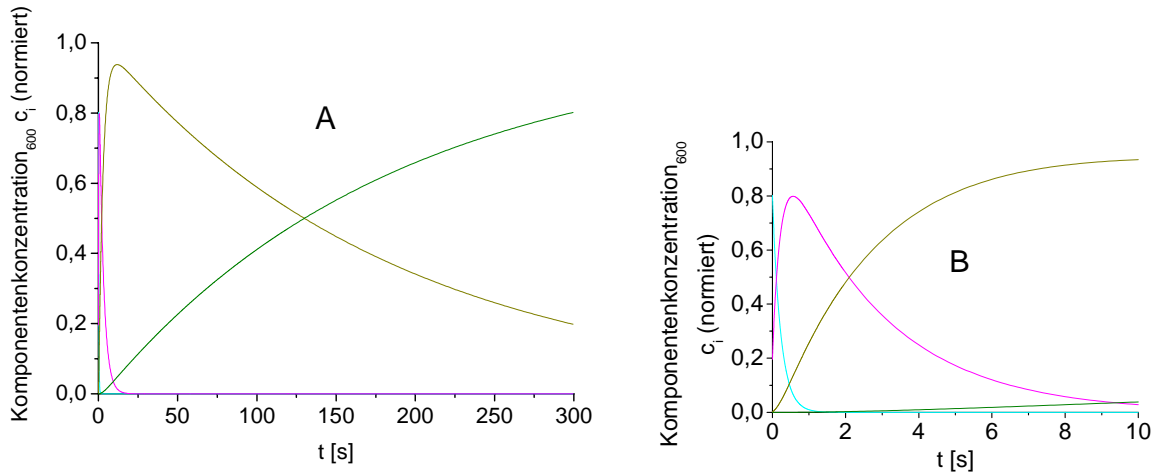


Abb. 3-65: Konzentrationsänderung der Fitkomponenten des dreistufigen lokalen Fits (Abb. 3-64) der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-59), bei 600 nm, gemessen mittels Vis-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—) und d (—) siehe Text, Tab. 3-16 und Abb. 3-66.

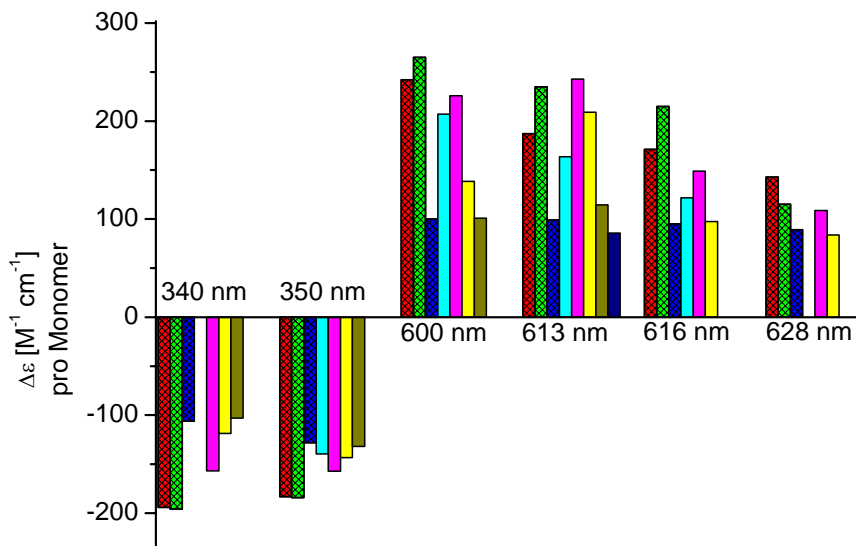


Abb. 3-66: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) der lokalen Fits (Abb. 3-64) der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-59). Vergleich der $\Delta\epsilon$ [$M^{-1} cm^{-1}$] der Fitkomponenten der einzelnen Wellenlängen mit den $\Delta\epsilon$ [$M^{-1} cm^{-1}$] von PC_{tri} , PC_{mono} und PC_{denat} . Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—), d (—) und e (—) siehe Text und Tab. 3-16. Vergleichswerte aus den steady-state Messungen (Kap. 3.8.) PC_{tri} (—), PC_{mono} (—), PC_{denat} (—);

Im langwelligen Bereich wird beispielhaft die lokale Analyse der Messung bei 600 nm grafisch gezeigt (Abb. 3-64 – 3-66). Hier hatte das dreistufige Fitmodell, bei sinnvollen $\Delta\epsilon$ Werten, die geringsten Fehlerabweichungen (Tab. 3-16). Der erste Übergang zeigt eine CD Zunahme (13%), wie sie aus den steady-state Messungen für die Dissoziation erwartet wird. Die Ratenkonstante ($\approx 4 s^{-1}$) ist vergleichsweise klein, entspricht aber in etwa noch

dieser Reaktion (Tab. 3-17). Der Fit wird demnach folgendermaßen in das lineare Entfaltungmodell eingegliedert: $a > b > c > d$ (Tab. 3-16). Die Reaktion $b > c$, mit einer um 12-mal geringeren Ratenkonstante ($\approx 0,4 \text{ s}^{-1}$), hat die größte CD-Abnahme (63%) in diesem Reaktionsmodell. Es schließt sich ein sehr langsamer Schritt mit etwa halb so großer CD-Abnahme (26%), an. (der bereits außerhalb der Messgrenzen liegt (Kap. 2.3.5.) und deshalb nur einen Anhaltspunkt darstellt).

Bei 613 nm, anders als bei allen anderen Wellenlängen, ergab ein vierstufiges Modell den besten Fit (Tab. 3-16). Ein dreistufiger erfasste die langsame Veränderung am Ende der Reaktion nicht und gab schlechte Residuen (Daten nicht gezeigt). Im ersten Reaktionsschritt ($\approx 7 \text{ s}^{-1}$) erfolgt eine vergleichsweise große CD-Zunahme von 78% (Tab. 3-16, 3-17). Er wurde aufgrund der Zunahme wiederum der Dissoziation zugeordnet. Im Differenzspektrum von PC_{tri} zu PC_{mono} (Kap. 3.8., Abb. 3-33) zeigt sich für die excitonische Kopplung ein Spektrum, bei dem bei 613 nm das negative Extremum liegt. Dieses Signal verschwindet bei der Dissoziation. Dies bedeutet, dass die Dissoziation bei dieser Wellenlänge besonders gut sichtbar ist. (Das zugehörige positive Extremum bei 637 nm, liegt in einem Wellenlängenbereich, der aufgrund der Verbreiterung der CD-Bande bei der Entfaltung von PC schlecht interpretierbar ist.). Der Fit wird demnach folgendermaßen eingegliedert: $a > b > c > d > e$ (Tab. 3-16); Der Schritt von $b > c$ ist mit einer CD-Abnahme (34%) verbunden, er ist deutlich schneller ($\approx 3 \text{ s}^{-1}$), als bei den anderen Wellenlängen (Tab. 3-17). Der Schritt $c > d$ zeigt eine sehr große (die größte in dieser Messreihe) CD-Abnahme (94%) mit einer ähnlichen Ratenkonstante ($\approx 0,17 \text{ s}^{-1}$) für den ersten Entfaltungsschritt wie bei 340 nm, 350 nm und 628 nm. Als letztes folgt auch hier eine langsame Reaktion (er liegt außerhalb der Messgrenzen (Kap. 2.3.5.) und kann deshalb nur als Anhaltspunkt dienen) mit geringer CD-Abnahme (28%). Im Vergleich zu den Ergebnissen bei 600 nm zeigt sich, dass die Ratenkonstante bei 600 nm von $\approx 0,4 \text{ s}^{-1}$ bei $b > c$ ebenfalls leicht erhöht gegenüber den anderen Ratenkonstanten der anderen Wellenlängen ist. Eventuell würde sich bei einer weiteren Aufspaltung der Kinetik in ein vierstufiges Modell auch bei 600 nm noch ein schneller Entfaltungsschritt zeigen.

Für 616 nm gibt ein zweistufiges Modell bereits einen guten Fit. Der erste Übergang zeigt eine CD-Zunahme (37%), d. h. auch hier ist wieder die Dissoziation zu sehen. Die Ratenkonstante ($\approx 8,8 \text{ s}^{-1}$) passt ebenfalls zu diesem Schritt (Tab. 3-17). Daraus ergibt sich folgende Zuordnung: $a > b > c$ (Tab. 3-16). Der Schritt $b > c$ zeigt eine CD-Abnahme (70%), die

ähnlich der bei 600 nm bei diesem Reaktionsschritt ist, mit einer Ratenkonstant ($\approx 0,16 \text{ s}^{-1}$), die ähnlich auch bei anderen Wellenlängen gefunden wurde. Eine langsame Reaktion mit geringer CD-Änderung ist bei dieser Wellenlänge nicht zu sehen.

Die Messung bei 628 nm stellt eine Besonderheit dar. Bei ca. 628 nm zeigt sich die excitonische Kopplung im PC_{tri} durch eine Schulter in der langwelligen Flanke des positiven Extremums (Kap. 3.8.). Wie die steady-state Messungen zeigen (Kap. 3.7.), nimmt sowohl bei der Dissoziation als auch bei der Entfaltung der CD ab (Tab. 3-16). Dies bedeutet, dass hier ähnlich wie bei 613 nm, Dissoziation deutlich sichtbar sein sollte. Ein stabiler Fit der Messung bei 628 nm war allerdings nur einstufig möglich. Dabei beträgt die CD-Abnahme 42% und könnte demnach sowohl der Dissoziation, als auch der Entfaltung zugeordnet werden. Der $\Delta\varepsilon$ -Wert für die zweite Fitkomponente stimmt aber mit dem $\Delta\varepsilon$ -Wert von PC_{denat} überein. Außerdem kann aufgrund der Tatsache des Bestehens einer Totzeit der stop-flow Apparatur davon ausgegangen werden, dass der erste Schritt der Messung nicht erfasst wird und nicht einer der folgenden. Aus diesen Gründen wird der einstufige Fit $b > c$ zugeordnet (Tab. 3-16). Mit einer Ratenkonstante von $\approx 0,05 \text{ s}^{-1}$ ist er langsamer als die Ratenkonstanten bei den anderen Wellenlängen und wäre somit für den Dissoziationsschritt auch deutlich zu langsam (Tab. 3-17). Insofern fehlt die schnelle Dissoziation bei dieser Analyse, deshalb wurden weiter verschiedene lokale Analysen (Abb. 3-67, Tab. 3-18) durchgeführt. Drei Varianten eines vierstufigen Fits über unterschiedliche Zeitspannen (bis 2 s, bis 10 s und bis 50 s Messzeit) brachten das Ergebnis, dass der CD zuerst zunimmt, dann abnimmt, wieder zunimmt um dann endgültig ab zu nehmen. Der zweite Test erfolgte über die ersten 2 s Messzeit mit einem zwei- und einem dreistufigen Fit. Auch hier brachten beide Ergebnisse ein ähnliches Bild, erst CD-Zunahme, dann Abnahme und beim dreistufigen wieder Zunahme. Die Ratenkonstanten (vor allem k_1 und k_2) in diesem Zusammenhang waren in allen Fällen schnell und in der Größenordnung, wie sie für die Dissoziation bisher immer auftraten (Tab. 3-17). Allerdings weisen die Fits, wahrscheinlich aufgrund des starken Rauschens der Messung, extrem große Fehler auf, dass sie eigentlich nicht mehr auswertbar wären. Da ihr Ergebnis aber mit Beobachtungen bei der Analyse des globalen Fits, bei 628 nm, übereinstimmen, werden sie doch nicht verworfen, sondern mit entsprechender Vorsicht verwendet. Im globalen Fit, der dreistufig ist, zeigte sich bei 628 nm als erster Schritt ebenfalls eine CD-Zunahme (Abb. 3-62, Tab. 3-16). Möglicherweise ist hier der Dissoziation ein Prozess vorgelagert, der zunächst zu einer Verstärkung des Signals führt. Oder der

Dissoziationsprozess selbst führt zu kurzzeitiger Signalverstärkung, was nur in kinetischen Messungen deutlich wird. Dieses Phänomen wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

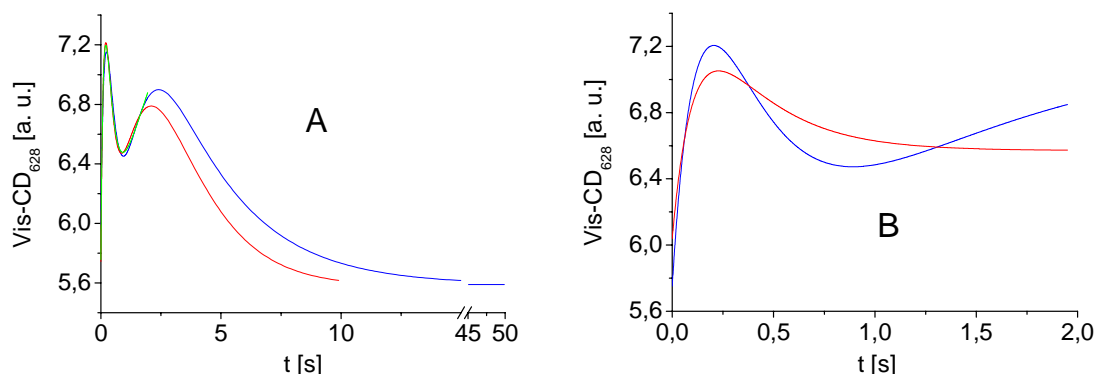


Abb. 3-67: Verschiedene lokale Fits der CD-Änderung bei 628 nm, bei der Entfaltung von PC_{tri}, der Messung in Abb. 3-59. A) Vierstufige Fits über unterschiedliche Zeitspannen: Bis 2 s Messzeit (—), bis 10 s (—), bis 50 s (—); B) verschieden stufige Fits über die ersten 2 s Messzeit: Zweistufig (—), dreistufig (—);

Fitmodell bei 628 nm	k_1 [s ⁻¹]	k_2 [s ⁻¹]	k_3 [s ⁻¹]	k_4 [s ⁻¹]
Vierstufig/2 s Messzeit	4,1 ±82	5,5 ±71	2,0 ±19	0,15 ±0,17
Vierstufig/10 s Messzeit	3,2 ±32	6,5 ±28	0,83 ±36	0,59 ±23
Vierstufig/50 s Messzeit	2,9 ±55	4,2 ±49	1,3 ±15	0,33 ±1
Zweistufig/2 s Messzeit	8,8 ±17	3,3 ±5,8		
Dreistufig/2 s Messzeit	6,9 ±45	3,5 ±56	1,0 ±27	

Tab. 3-18: Ratenkonstanten der verschiedenen Fitmodelle der Entfaltungskinetik von PC_{tri}, bei 628 nm aus Abb. 3-67; die zum Teil sehr großen Fehlerabweichungen resultieren aus dem starken Rauschen der Messung, durch die hohe zeitliche Auflösung der ersten Messzeit (Abb. 3-59).

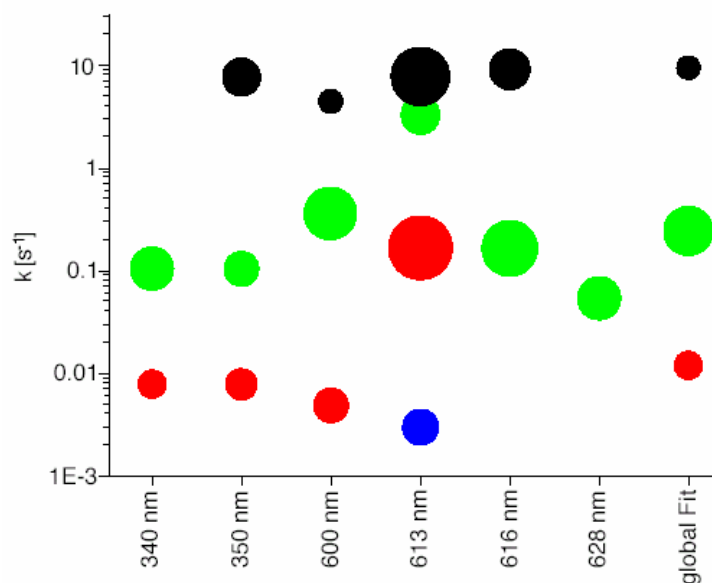
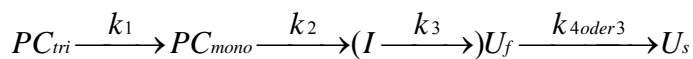
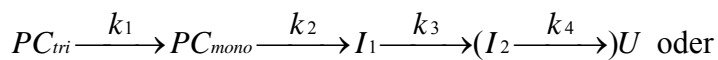


Abb. 3-68: Vergleich des globalen und der lokalen Fits der CD-Änderungen, bei der Entfaltung von PC_{tri} (Abb. 3-59). Gezeigt sind die k -Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k_1 (●), k_2 (●), k_3 (●) und k_4 (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-16., 3-17).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass auch beim CD die schnellste Komponente der Dissoziation zugeordnet werden kann. Die Änderungen sind bei 613 nm wegen der excitonischen Kopplung besonders ausgeprägt (Abb. 3-68, Tab. 3-16, 3-17). Anschließend können (außer bei 628 nm) zwei weitere Entfaltungsschritte gesehen werden, wobei an dieser Stelle noch unklar bleibt, ob der letzte Reaktionsschritt noch Entfaltung darstellt, oder eine Veränderung des Chromophors im bereits entfalteten Zustand des Proteins. Im Vergleich mit den Ergebnissen der steady-state Untersuchungen scheint letzteres wahrscheinlicher (Kap. 3.5., 3.7., 3.8.). Das Ergebnis bei 613 nm deutet darauf hin, dass in einem sensiblen Messbereich noch ein dritter, schneller Entfaltungsschritt gesehen werden kann.

Von 628 nm abgesehen, gibt es, im Gegensatz zur Analyse bei der Absorption, keine Hinweise darauf, dass bei den verschiedenen Wellenlängen teilweise unterschiedliche Vorgänge gesehen werden, sondern, dass die gleichen Entfaltungsvorgänge unterschiedlich ausgeprägt sichtbar werden (Abb. 3-68, Tab. 3-17). Folgende Modelle können vorerst aufgestellt werden:



Es enthält eine späte Komponente mehr, als der globale Fit.

3.9.2.2.1. Allgemeine Schlussfolgerung für die Dateninterpretation im Vis-CD

Da für das Vis-CD keine ganz eindeutige Definition vorliegt bei welchen Werten das Protein vollständig entfaltet ist, ist für das Vis-CD eine Zuordnung zum Reaktionsschritt $U_f \rightarrow U_s$ nicht so eindeutig möglich, wie für die Absorption (Kap. 3.9.2.1.1). Aber über den Vergleich der definierten Zustände für entfaltetes Protein aus der Absorption, der Fluoreszenz und dem UV-CD wurden Rückschlüsse für $\Delta\epsilon$ -Werte die dem entfalteten Protein entsprechen bereits in den steady-state Untersuchungen gemacht (Kap. 3.7.). Daraus resultierend kann eine Ableitung für die rel. Amplituden erfolgen, die dem $U_s \rightarrow U_f$ Schritt entsprechen können. Die maßgeblichen Vergleichswerte für $\Delta\epsilon$ sind in Tab. 3-12 in Kap. 3.8. aufgelistet. Die Zuordnung muss in diesem Fall aber immer etwas spekulativer bleiben, als für die Absorption.

3.9.2.3. Emission

Bei der Fluoreszenzmessung wurde die gesamte Emission oberhalb des Cut-off Filters, ohne nachgeschalteten Monochromator detektiert (siehe Kap. 3.9.1.). Angeregt wurde bei 350 nm.

Für die Emission war ein vierstufiger Fit (Abb. 3-69), der mit den geringsten Fehlerabweichungen und sinnvollen Amplituden (Abb. 3-70). Ein Fit mit weniger Komponenten unterschlug die ersten Amplitudenänderungen (deutlich sichtbar in den Residuen; Daten nicht gezeigt), ein höherstufiger brachte keine Verbesserung. Die Eingliederung in das Schema $a > b > c$ etc. ist bei der Emission nicht so eindeutig, da keine Fluoreszenz Quantenausbeute als absolute Vergleichswerte vorliegen. Allerdings spricht einiges dafür, die Gründe werden in der folgenden Interpretation der Daten erläutert, dass die Reaktion zu Beginn erfasst wurde und nichts, was das Gegenteil belegt. Deshalb wurde der Fit $a > b > c > d > e$ eingeordnet (Tab. 3-19). Aus Ermangelung absoluter Vergleichswerte für bestimmte PC Zustände wurden in diesem Fall die relativen Amplituden (Tab. 3-19) auf die Gesamtamplitude $a > e$ bezogen.

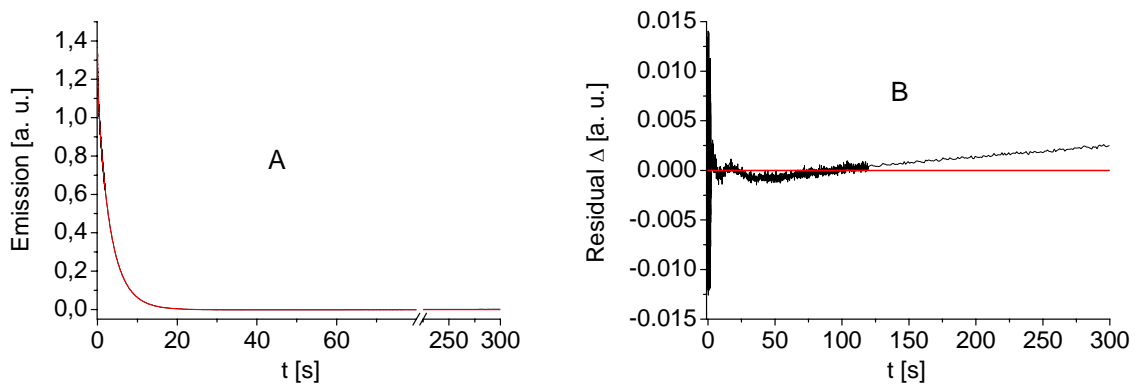


Abb. 3-69: Rohdaten und vierstufiger Fit der Emissionsänderung bei der Entfaltung von PC_{tri} . Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 6,6 ms; Time base: 500 μ s Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 100 ms bis 120 s, dann 1 s bis 300 s, Anregung bei 350 nm, Cut-off Filter bei 600 nm. Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell $a > b > c > d > e$ (—) und in B) Residuen;

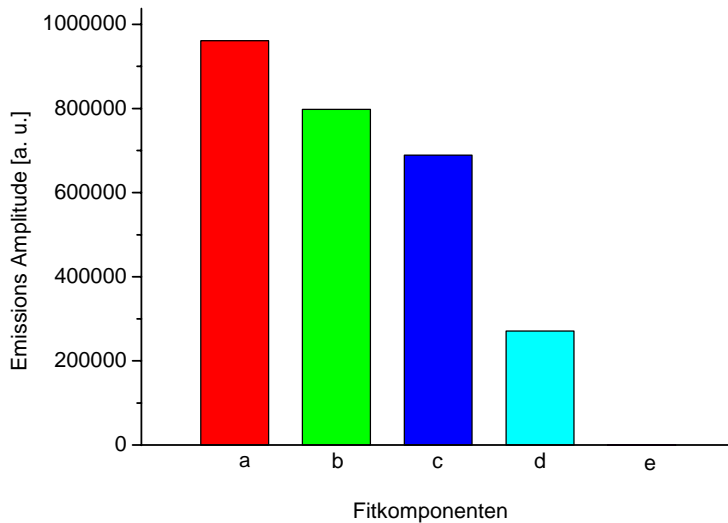


Abb. 3-70: Emissions Amplituden des vierstufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-69). Zuordnung der Komponenten a (■), b (■), c (■), d (■) und e (■) siehe Tab.3-19 und Text.

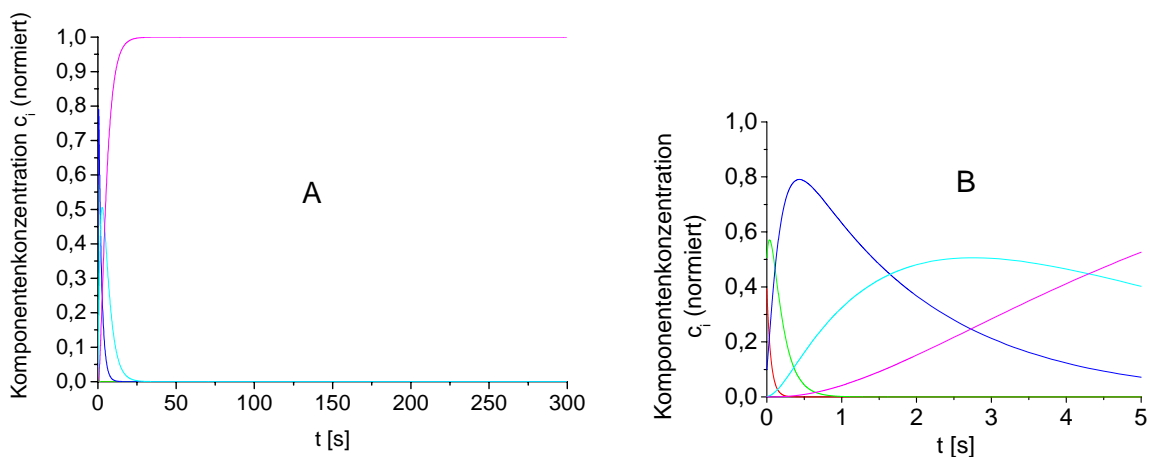
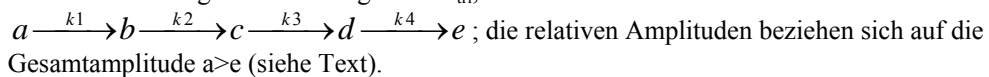


Abb. 3-71: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des vierstufigen Fits (Abb. 3-69) der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-69) gemessen mittels Emission. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 5 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—), d (—) und e (—) siehe Text und Tab. 3-19.

$k_1 [s^{-1}]$	$A_{a/b} \text{ rel.}$	$k_2 [s^{-1}]$	$A_{b/c} \text{ rel.}$	$k_3 [s^{-1}]$	$A_{c/d} \text{ rel.}$	$k_4 [s^{-1}]$	$A_{d/e} \text{ rel.}$
$18,6 \pm 1,60$	0,17	$6,5 \pm 0,32$	0,11	$0,55 \pm 0,04$	0,44	$0,26 \pm 0,004$	0,28

Tab. 3-19: Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{a/b} \text{ rel.}$, Kap. 2.3.5.) aus der Emissionsmessung der Entfaltung von PC_{tri}, mit dem Fitmodell:



Die ersten beiden Reaktionsschritte $a > b$ und $b > c$ zeichnen sich durch sehr schnelle Ratenkonstanten (Tab. 3-19) aus, wobei k_1 noch 3-mal schneller ($\approx 18,6 \text{ s}^{-1}$), als k_2 ($\approx 6,5 \text{ s}^{-1}$) ist. Die Abnahme der Amplituden sind die kleinsten im Reaktionsverlauf und machen zusammen $\approx 28\%$ der Gesamtamplitude aus (Tab. 3-19, Abb. 3-69). Der dritte Schritt $c > d$ ist

ca. 10-mal langsamer ($\approx 0,55 \text{ s}^{-1}$) als der zweite und weist mit 44% die größte Amplitudenabnahme auf. Der vierte und letzte Schritt ist demgegenüber etwa halb so schnell ($\approx 0,26 \text{ s}^{-1}$), mit einer restlichen Amplitudenabnahme von $\approx 28\%$. Dieser Schritt ist deutlich schneller, als die letzten und langsamsten, wie sie in der Absorption und dem Vis-CD beobachtet wurden, entsprechende Komponenten fehlen bei der Fluoreszenz.

Interpretation der Daten

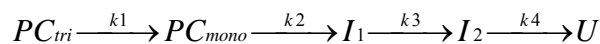
Die erste Ratenkonstante ist sehr schnell ($\approx 18,6 \text{ s}^{-1}$, Tab. 3-19) und liegt in einer Größe, wie sie bei der Absorption und dem Vis-CD bisher nur bei der Dissoziation beobachtet wurden (Tab. 3-14, 3-17). Wie aus der Analyse der Absorptions- und Vis-CD-Messung bekannt ist, ist während der Totzeit der stop-flow Apparatur das Gleichgewicht $\text{PC}_{\text{tri}} \leftrightarrow \text{PC}_{\text{mono}} \leftrightarrow \text{PC}_{\text{denat}}$ bereits etwas nach rechts verschoben und PC_{tri} wurde bei diesen Messungen nur noch zu ca. 50 bis 70% des ursprünglichen Anteils erfasst (vergleiche Abb. 3-51, 3-55, 3-63, 3-65). Im Fall der Emission liegt die erste Komponente zum Zeitpunkt des Messbeginns mit noch ca. 40% vor (Abb. 3-71). Es zeigt sich damit, dass auch hier bereits ein Teil der Reaktion während der Totzeit der stop-flow Apparatur abgelaufen ist. Wurden die Komponenten der Entfaltungsreaktion bei der Absorption und dem Vis-CD erst ab b oder c erfasst, lag deren berechnete Konzentration weit höher, bei fast 100% (Abb. 3-55). Aus diesen Gründen wird die erste ermittelte Fitkomponente dem Beginn der Reaktion, d. h. PC_{tri} , zugeordnet. In den folgenden Messungen, wird diese Vermutung überprüft werden.

Wie bereits bei den steady-state Messungen beschrieben, reagiert die Fluoreszenz auf die Rigidität des Moleküls, d. h. bereits ein beweglicher werdendes Protein führt zur Abnahme der Emission, während eine Veränderung in der Signalstärke bei der Absorption und dem Vis-CD eine Veränderung in der Struktur des Chromophors voraussetzt. Sowohl die Tatsache, dass zu Beginn der Messung PC_{tri} nur zu 40% (Abb. 3-71) und nicht zu 50 bis 70%, wie in der Absorption und dem Vis-CD (siehe oben), erfasst wurde, als auch ein Vergleich mit den steady-state Messungen (Kap. 3.7.) spiegelt dies wider. Hier findet bei 1 bis 4 M Harnstoff bereits eine deutliche Abnahme der Emission statt. Allerdings muss bedacht werden, dass möglicherweise eine nicht näher definierte Reaktion des Harnstoffes mit dem Protein, die nichts mit der eigentlichen Dissoziation zu tun hat (Kap. 1.7., 3.5., 3.6.), die Fluoreszenz von PC herab setzt. Für die weitere Interpretation der Daten sind folgende weitere vorausgehende Überlegungen wichtig. Weder in der Absorption, noch im Vis-CD ist die Dissoziation der UE zu sehen, solange beide UE noch gemeinsam in der Lösung vorhanden sind. Hingegen kann

es sein, dass die Dissoziation der UE in der Fluoreszenz sichtbar wird. Bei der Trennung der UE ist die Zunahme der Flexibilität der UE gut möglich, diese würde sich in einer Fluoreszenzabnahme widerspiegeln. Ein weiterer Unterschied zur Absorption und zum Vis-CD besteht darin, dass PC im entfalteten Zustand keine messbare Emission mehr aufweist (Kap. 1.8. und 3.8.). Dies hat zur Folge, dass Reaktionen im bereits entfalteten Protein, wie sie aufgrund der Absorption und dem Vis-CD postuliert wurden, nicht mehr messbar sind. Dies deckt sich mit der Feststellung, dass bei der Emission keine langsame Reaktion ($k < 10^{-2} \text{ s}^{-1}$), wie sie $U_f > U_s$ zugeordnet wurde, gefunden wurde.

Das Fitmodell $a > b > c > d > e$ kann vorerst folgendermaßen interpretiert werden:

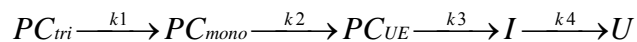
- $a > b$ ist die Dissoziation von PC_{tri} zu PC_{mono} , danach folgen drei Entfaltungsschritte:



- oder $b > c$ zeigt, da der Schritt sehr schnell ist, noch keine Entfaltung an, sondern signalisiert das instabiler werden des Proteins vor dem eigentlichen Entfaltungsschritt, d. h. $a > b > c$ spiegelt die Dissoziation von PC_{tri} differenzierter wieder, als es in der Absorption und dem Vis-CD gesehen wurde:



- oder $a > b$ zeigt die Dissoziation von PC_{tri} nach PC_{mono} an und $b > c$ die Trennung der UE:



Diese drei Möglichkeiten sollen durch die Untersuchungen der UE im Kap. 3.9.4. weiter analysiert werden.

3.9.2.4. UV-CD

Im UV-CD Spektrum wird die Veränderung der Sekundärstruktur während der Entfaltung von PC verfolgt. Diese Messung unterscheidet sich grundsätzlich von den vorausgehenden, da sie vom Chromophor weitgehend unbeeinflusst ist. Der Beitrag des Chromophors zum UV-CD beträgt weniger als 10% (mündliche Mitteilung H. Scheer) Die Ergebnisse können sich demnach deutlich von den Ergebnissen der anderen Messungen unterscheiden.

Wie bereits gezeigt (Kap. 3.1.2., 3.8.) ist im UV-CD Spektrum ein PC_{mono} von einem PC_{tri} nicht eindeutig zu unterscheiden. Zwar ist das Spektrum der α -Helix in 4 M Harnstoff

gegenüber 0 M Harnstoff (Abb. 3-35 und Anhang Abb. 7-1) etwas schwächer, dabei blieb aber unklar, ob das Monomer dieses niedrigere Signal aufweist, oder ob Modifikationen anderer Art durch den Harnstoff, diese Signalreduktion bewirken. Harnstoff führt unabhängig von der Dissoziation zu einer nicht näher untersuchten Modifikation des Proteins (Kap. 3.6.). Deshalb wird bei der Entfaltungskinetik von PC_{tri}, gemessen im UV-CD, die Dissoziation als nicht sichtbar angenommen. Es wird lediglich von einem gefalteten PC ausgegangen.

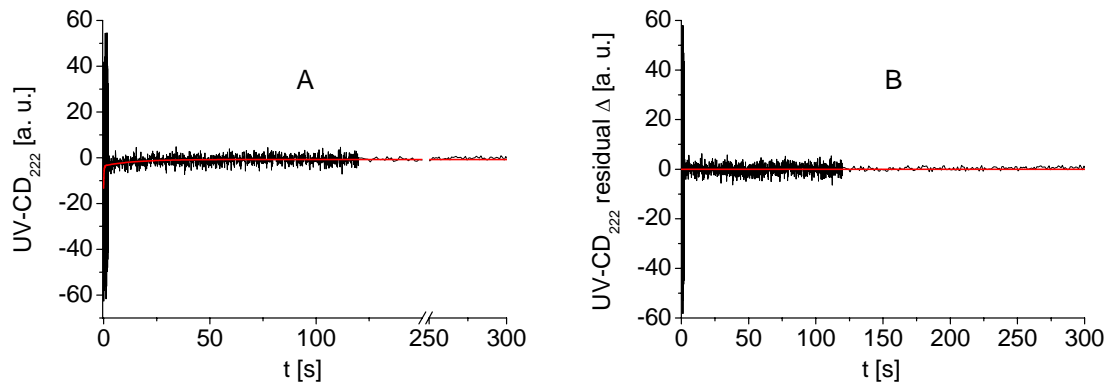


Abb. 3-72: Rohdaten und zweistufiger lokaler Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC_{tri}, bei 222 nm.; Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 6,1 ms, Time base: 500 μ s Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 100 ms bis 120 s, dann 1 s bis 300 s. Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell a>b>c (—) und in B) Residuen.

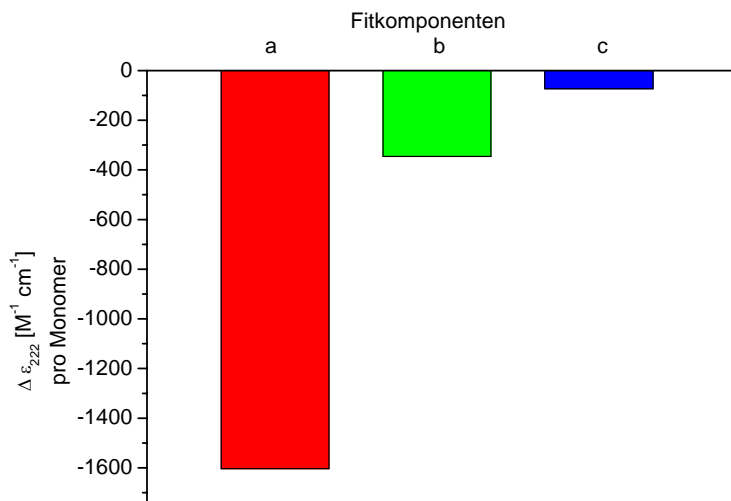


Abb. 3-73: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des zweistufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-72), bei 222 nm. Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■) und c (■) siehe Tab. 3-20 und Text.

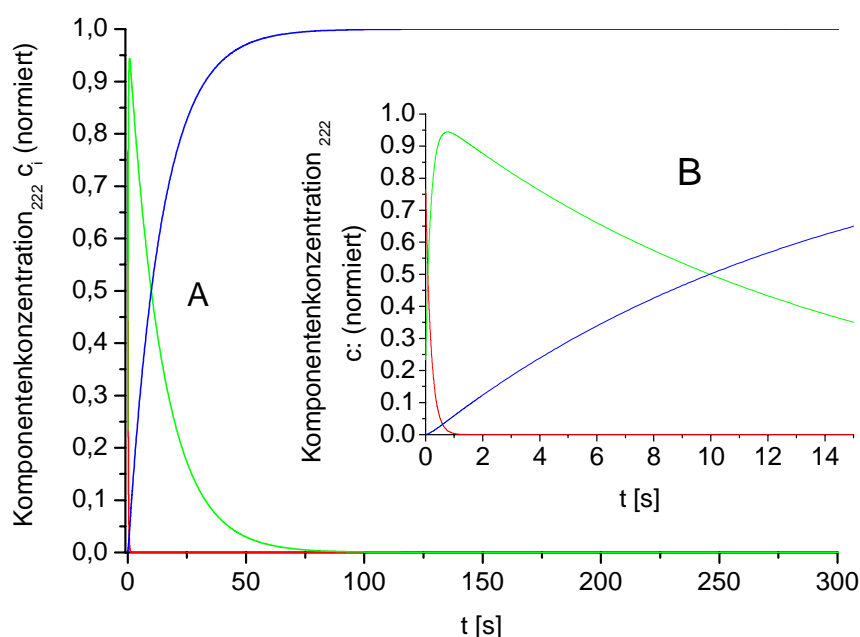


Abb. 3-74: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des zweistufigen lokalen Fits (Abb. 3-72) der Entfaltungskinetik von PC_{tri} bei 222 nm, (Abb. 3-72) gemessen mittels UV-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 15 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—) und c (—) siehe Tab 3-20 und Text.

$\Delta\epsilon [M^{-1} cm^{-1}]$ der steady-state Messungen bei 222 nm			$\Delta\epsilon [M^{-1} cm^{-1}]$ der Fitkomponenten der kinetischen Messung bei 222 nm		
PC_{tri}	<i>PC in 4 M Harnstoff</i>	PC_{denat}	a	b	c
-1960	-1680	40 *	-1600	-350	-70

Tab. 3-20: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) der Komponenten des lokalen Fits der Entfaltung von PC_{tri} und kursiv die Vergleichswerte aus den steady-state Untersuchungen. Wie gezeigt wurde, kann die Dissoziation von PC_{tri} mittels UV-CD nicht unterschieden werden, deshalb wird PC in 4 M Harnstoff hier nicht als PC_{mono} definiert (näheres siehe Text); * der Wert für PC_{denat} beträgt laut Literatur (Lehner & Scheer, 1983, Kap. 1.7.) annähernd Null, die Abweichung von 2% liegt im Rahmen der Messgenauigkeit.

$A_{PC_{tri/a}}$ rel.	$k_1 [s^{-1}]$	$A_{a/b}$ rel.	$k_2 [s^{-1}]$	$A_{b/c}$ rel.
0,19	5,35	0,66	0,07	0,15

Tab. 3-21: Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{x/x+1}$ rel., Kap. 2.3.5) aus dem lokalen Fit der UV-CD Messung der Entfaltung von PC_{tri} , mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c$; die relativen Amplituden beziehen sich auf PC_{tri} aus den steady-state Messungen (Kap. 3.8.).

Beim Vergleich der $\Delta\epsilon$ -Werte der steady-state Messungen mit den Komponenten des Fits (Tab. 3-20) zeigt sich, dass der für die erste Komponente ermittelte Wert, sich mit dem Wert für PC in 4 M Harnstoff gut deckt. Dies bedeutet, dass in dieser Messreihe bereits eine Reaktion mit Harnstoff während der Totzeit der stop-flow Apparatur (Abb. 3-72) erfolgt ist. Trotzdem wird aus obigen Überlegungen heraus der Fit folgendermaßen in den linearen Entfaltungsweg einsortiert: $a > b > c$ (Tab. 3-20). Der Übergang $a > b$ hat eine große CD-

Abnahme ($\approx 66\%$) und dabei eine schnelle Ratenkonstante ($\approx 5 \text{ s}^{-1}$, Tab. 3-21). Der Schritt $b > c$ hat nur noch eine CD-Abnahme von $\approx 15\%$ mit einer um ca. 77-mal langsameren Ratenkonstante ($\approx 0,07 \text{ s}^{-1}$). Der Wert für c weicht etwas von dem erwarteten Wert null, für entfaltetes Protein (Kap. 1.7.) ab, liegt aber noch im Rahmen der Fehlergrenzen. Nachdem im UV-CD keine Dissoziation gesehen werden kann und eine mögliche, nicht näher definierte Reaktion mit Harnstoff (siehe oben) anscheinend bereits während der Totzeit der stop-flow Apparatur abgelaufen ist, stellt der Schritt $a > b$ Entfaltung dar. Nachdem für die Komponente b noch deutlich Sekundärstruktur gemessen wurde, stellt auch $b > c$ noch ein Auflösen der Sekundärstruktur dar.

Vergleich mit den Absorptions-, Vis-CD und Emissionsmessungen

Der erste Schritt des Auflöserns der Sekundärstruktur ist viel schneller, als die Entfaltung der Proteinstrukturen, die den Chromophor sowohl in seiner Konformation als auch seiner Stabilität (Kap. 1) beeinflussen (Kap. 3.9.2.1. bis 3.9.2.3.). Der zweite Schritt hat eine Ratenkonstante in der Größenordnung, wie sie bei der Absorption und dem Vis-CD (noch mit Vorbehalt) einer Reaktion im bereits entfaltetem PC zugeschrieben wurden. Nachdem in der UV-CD Messung für die Komponente b aber noch deutlich messbare Sekundärstruktur ($\approx 20\%$) gefunden wurde, kann der zweite und langsame Schritt hier nur dem zweiten Entfaltungsschritt zugeordnet werden und nicht einer möglichen Reaktion im bereits entfaltetem PC. Der zweite Entfaltungsschritt der Sekundärstruktur ist demnach langsamer als der, der den Chromophor sowohl in seiner Konformation als auch seiner Stabilität beeinflusst. Dies zeigt deutlich, dass in der Absorption, dem Vis-CD und der Emission andere Entfaltungsvorgänge gesehen werden, als im UV-CD. Das Ergebnis zeigt auch, dass die Sekundärstruktur die Konformation des Chromophors nicht, oder nur gering, direkt beeinflusst.

Folgendes Modell wird vorerst aufgestellt: $PC \xrightarrow{k_1} I \xrightarrow{k_2} U$

3.9.3. Kinetik der Entfaltung von PC Monomer

Vorbehandlung der Probenlösung

Um die Dissoziation klarer von Entfaltungsreaktionen zu separieren, wurden Entfaltungsexperimente ausgehend vom Monomeren durchgeführt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten das Trimer-Monomer-Gleichgewicht von PC auf die Seite des Monomers zu

verschieben (Kap. 3.1.2., 3.4., 3.7.1). Für diese Messreihe wurde die PC Stammlösung auf 4 M Harnstoff in 50 mM KPP, pH 7, gebracht. Die Gründe für diese Wahl sind in Kap. 3.4. bereits dargestellt worden. Sie sollen hier noch ergänzt werden. Die Möglichkeit, durch eine sehr geringe Pufferkonzentration oder durch die Verwendung von reinem Wasser als Lösungsmittel das Gleichgewicht auf die Seite des Monomers zu verschieben, hat mehrere Nachteile. Einer ist, dass das System sehr labil wird und dann mögliche pH-Wert Schwankungen nicht mehr oder nicht mehr ausreichend gepuffert werden und somit die Entfaltung unkontrolliert beeinflussen können. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Pufferkonzentration einen Einfluss auf die Kinetik der Entfaltung hat (Kap. 3.5.) und ein Vergleich mit Messergebnissen in 50 mM KPP, Bedingungen wie sie bei den bisherigen und folgenden kinetischen Messreihen verwendet wurden, nicht mehr gut möglich wären. Eine weitere Möglichkeit, das Gleichgewicht auf die Seite des Monomers zu verschieben, ist, eine entsprechend geringe Proteinkonzentration in Lösung zu bringen (Kap. 3.4.). Die Proteinkonzentration müsste dabei aber sehr gering sein, zumal wenn das Protein in 50 mM KPP und nicht in einer niedrigeren KPP Konzentration vorliegt. Vorversuche (Daten nicht gezeigt) haben gezeigt, dass unter diesen Bedingungen die Messsignale zu schwach und das Hintergrund Rauschen zu groß werden, um die Daten noch auswerten zu können. Für die Verwendung einer 4 M Harnstofflösung in 50 mM KPP spricht, dass die Messbedingungen für PC_{mono} mit denen für PC_{tri} und die Untereinheiten weitgehend übereinstimmen und bereits ausführlich begründet wurde (Kap. 3.6.), dass die Messbedingungen zwischen den Messreihen soweit als möglich gleich bleiben sollen, um sie untereinander vergleichen zu können. Die Verschiebung des Gleichgewichtes auf die Seite des Monomers mittels 4 M Harnstoff ist in dieser Arbeit ausführlich charakterisiert (Kap. 3.5. und 3.7.). Allerdings gibt es auch Nachteile bzw. Probleme, wenn die Proteinlösung in 4 M Harnstoff erstellt wird. Es wurde gezeigt und ist auch aus der Literatur bekannt, dass Harnstoff zu einer spektroskopisch messbaren Reaktion mit dem Protein führt, die nichts mit der eigentlichen Dissoziations- bzw. Entfaltungsreaktion zu tun hat (Kap. 3.6.). Bei der Auswertung der Messdaten zeigte sich fast durchgängig (nicht beim UV-CD, siehe unten) ein Artefakt in der Form, dass die zuerst ermittelte Fitkomponente einen physikalisch nicht sinnvollen Wert darstellt, wie z. B. negative oder extrem hohe Extinktionskoeffizienten, wie sie für keine bekannte Spezies von Biliproteinen existieren oder $\Delta\varepsilon$ -Werte mit Vorzeichen, die an dieser Stelle für Biliproteine nicht erklärbar sind usw. (siehe unten). Diese Artefakte sind ziemlich sicher auf die Vorbehandlung mit Harnstoff zurückzuführen. Die Vorbehandlung mit Harnstoff ist die einzige Veränderung im Vergleich zu den Messbedingungen bei der Entfaltung von PC_{tri} .

Nachdem bei den Messungen von PC_{tri} keine derartigen Artefakte beobachtet wurden (Kap. 3.9.2.) scheint es wahrscheinlich, dass die Vorbehandlung mit Harnstoff zu den erwähnten Artefakten führt. Möglicherweise läuft parallel zur eigentlichen Entfaltungsreaktion eine Reaktion, hervorgerufen durch die Modifikation des Proteins mit Harnstoff, ab. Eine weitere mögliche Ursache für die Artefakte ist eine Schlierenbildung durch das Mischen zweier relativ stark viskoser Lösungen (4 M und 8 M Harnstoff).

Um die gleichen Endkonzentrationen des Proteins ($1,7 \cdot 10^{-6}$ M) und des Harnstoffs (8 M) wie bei den Messreihen von PC_{tri} (Verdünnung von 0 auf 8 M Harnstoff \Rightarrow 1:9) zu erhalten, wurde die Proteinlösung in 4 M Harnstoff entsprechend konzentriert gelöst ($8,9 \cdot 10^{-6}$ M; Details siehe Kap. 2.3.5.)

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Entfaltungskinetik von PC_{mono} gestraffter dargestellt als für PC_{tri}, da die Entfaltung von PC_{mono} bereits in der Analyse von PC_{tri} enthalten ist. Bei dieser Messreihe geht es primär darum, die Vermutung zu überprüfen, ob es sich bei der Dissoziation um den ersten und schnellen Reaktionsschritt bei der Entfaltung von PC_{tri} handelt. Deshalb sollte in der Regel jede Messreihe mit dem x-stufigen Fit, abzüglich des Schrittes für die Dissoziation vom Trimer zum Monomer, erfolgen. Da aber (bis auf ganz wenige Ausnahmen) als erste Komponente ein Artefakt ermittelt wurde, musste dies kompensiert werden. Um für die eigentliche Entfaltung von PC_{mono} genauso viele Schritte zur Verfügung zu haben, wie Entfaltungsschritte bei der Entfaltung vom Monomer bei der Entfaltung von PC_{tri} ermittelt wurden, wurde jede Messreihe mit dem x-stufigen Fit analysiert, wie er für PC_{tri} bei der gleichen Wellenlänge ausgewählt wurde. Nur so ist ein direkter Vergleich möglich (Ausnahmen: Nicht extra gefittet wurde entsprechend PC_{tri} 613 (2), zusätzlich gefittet wurde Vis-CD 628 nm (2) und mit einem niedriger-stufigen Fit wurde die Emission gefittet; Erklärung siehe dort).

Absorption

Mit den Absorptionsmessungen von PC_{mono} im Dioden Array, war ein stabiler Fit nicht möglich. Die Gründe hierfür können in den Modifikationen des Proteins durch Harnstoff liegen (Erklärung dazu siehe oben und Kap. 3.6.).

Bei der lokalen Analyse, wie in Tab. 3-22 und 3-23 und beispielhaft für die Messung bei 616 nm in Abb. 3-75 bis 3-77 gezeigt, hat die erste Komponente a, einen extrem hohen

Extinktionskoeffizienten. Im Maximum bei 616 nm liegt er bei $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Abb. 3-76, Tab. 3-22), das ist etwa 10-mal so hoch wie für die Biliprotein-Chromophore von *M. lamosus* und deshalb physikalisch unsinnig. Ähnliches ist bei den anderen Wellenlängen zu beobachten (Tab. 3-22). Da diese Abweichung konstant bei allen Messungen und zugleich diese Komponente in nur geringsten Konzentrationen auftritt (beispielhaft Abb. 3-77) und alle weiteren Werte für die Komponenten b bis e physikalisch sinnvoll sind, wurde sie vernachlässigt. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch das starke Signal des Messartefaktes das Signal eines Entfaltungsschrittes von PC überdeckt wird. Nachdem PC bereits als Monomer vorlag stellt der Schritt von b>c einen Entfaltungsvorgang dar. Der Schritt d>e hat eine geringe Absorptionsänderung mit einer langsamen Ratenkonstante. Hervorzuheben ist dabei die ϵ -Abnahme bei 340 nm und 350 nm. Aus diesen Gründen wird sie, wie in Kap. 3.9.2.1. ausführlich begründet, einer langsamen Reaktion im bereits entfalteten Zustand zugeschrieben. Die Zuordnung der Komponenten des vierstufigen Fitmodells in den linearen Entfaltungsweg erfolgt demnach folgendermaßen (Tab. 3-22): b hat für die Wellenlänge bei 613 nm und 616 nm bereits eine deutliche Abnahme der Absorption gegenüber PC_{mono} erfahren (40% bei 613 nm und 37% bei 616 nm). Insofern ist es sehr wahrscheinlich, dass die Komponente b bereits ein Entfaltungsintermediat darstellt und in der Burstphase und/oder dem Schritt a>b noch, zumindest ein, Entfaltungsschritt verborgen ist. Bei 340 nm und 600 nm ist von PC_{mono} zu b kaum eine Absorptionsänderung erfolgt (in beiden Fällen 7%). Im Rahmen der Fehlerabweichungen kann deshalb bei 350 nm und 600 nm davon ausgegangen werden, dass in Komponente b PC_{mono} erfasst wurde. Bei 350 nm fand eine Absorptionszunahme von 25% statt, danach sollte b ebenso ein Entfaltungsintermediat sein. Die Größe der Ratenkonstante ($\approx 0,3 \text{ s}^{-1}$, Tab. 3-23) im Vergleich zur entsprechenden Ratenkonstante bei 340 nm ($\approx 1,6 \text{ s}^{-1}$, Tab. 3-23) weist ebenfalls darauf hin, dass es sich um ein Entfaltungsintermediat handelt. Fitkomponente c zeigt, im Vergleich der $\Delta\epsilon$ -Werte mit den Ergebnissen der steady-state Untersuchungen (Tab. 3-12), ein Entfaltungsintermediat an und Fitkomponente d PC_{denat} . Zur Fitkomponente e findet wiederum leichte Absorptionsabnahme statt. Der ϵ -Wert von e deckt sich noch besser als der Wert von d mit dem ϵ -Wert von PC_{denat} . Das heißt, nachdem sowohl d, als auch e PC_{denat} entspricht, in d>e ein Vorgang im bereits entfalteten PC gesehen wird, d entspricht U_f und e U_s . Etwas abweichend muss das Ergebnis bei 616 nm bewertet werden (Tab. 3-22). Hier macht die Absorptionsabnahme d>e noch 4% aus. Dies und die Tatsache, dass die Fitkomponente d gegenüber PC_{denat} noch einen 16%-igen höheren Extinktionskoeffizienten hat, deutet darauf hin, dass hier nicht oder nicht nur der Übergang von U_f nach U_s gesehen

wird, sondern noch ein Rest an Entfaltung. Grundsätzlich sind alle Übergänge ab Komponente b deutlich langsamer, als sie bei der Analyse der Entfaltung von PC_{tri} der Dissoziation zugeordnet wurden (Kap. 3.9.2.)

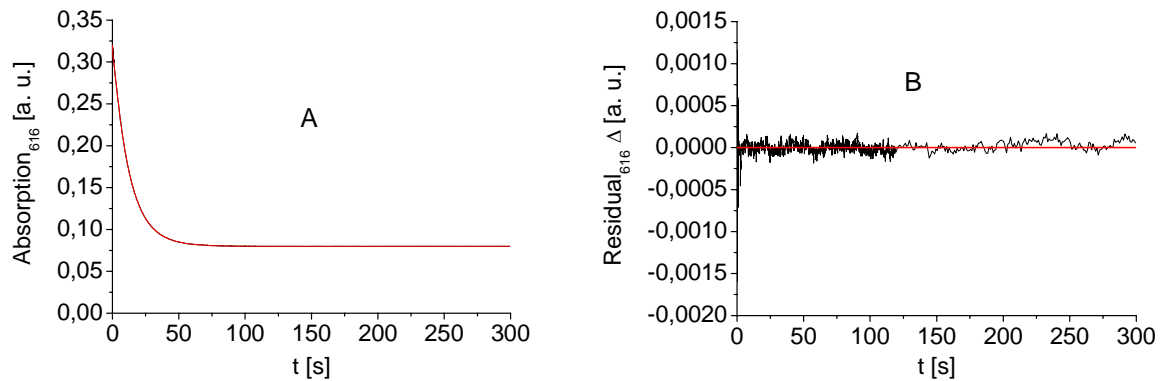


Abb. 3-75: Rohdaten und vierstufiger lokaler Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung von PC_{mono}, bei 616 nm.; Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms, Time base: Messintervall 500 μ s bis 2 s Messzeit, dann 100 ms bis 120 s, dann 1 s bis 300 s; Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell a>b>c>d>e (—) und in B) Residuen.

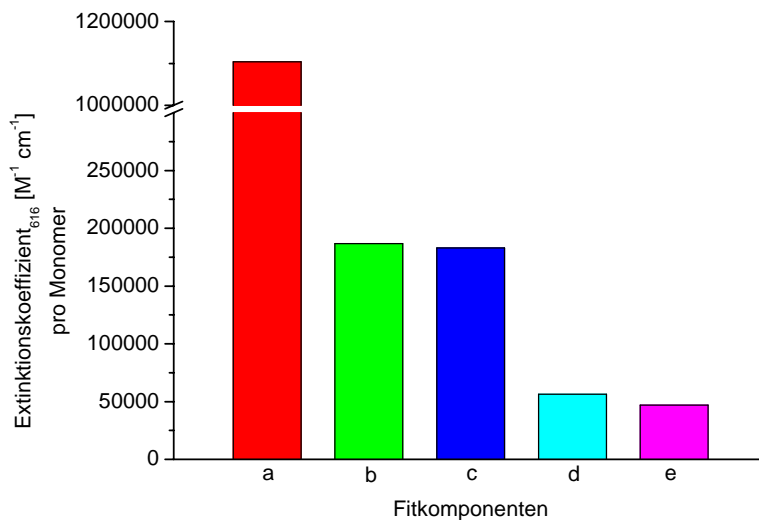


Abb. 3-76: Extinktionskoeffizienten des vierstufigen lokalen Fits der Entfaltung von PC_{mono} (Abb. 3-75), bei 616 nm. Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■), c (■), d (■) und e (■) siehe Text und Tab. 3-22.

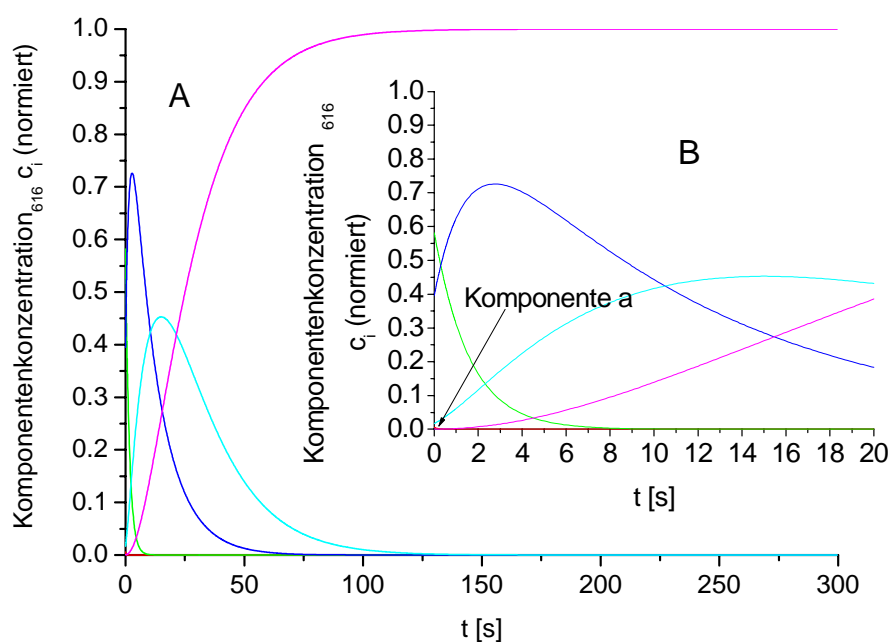


Abb. 3-77: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des vierstufigen lokalen Fits (Abb. 3-75) der Entfaltungskinetik von PC_{mono} (Abb. 3-75), bei 616 nm gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300s, B) Ausschnitt der ersten 20 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—), d (—) und e (—) siehe Text und Tab. 3-22.

Gemessene Wellenlängen [nm]	$\epsilon [M^{-1} cm^{-1}]$ der steady-state Messungen		$\epsilon [M^{-1} cm^{-1}]$ der Komponenten der kinetischen Messungen				
	<i>PC_{mono}</i>	<i>PC_{denat}</i>	a	b	c	d	e
340	41.400	101.800	$-2 * 10^9$	46.000	61.400	103.000	102.000
350	43.700	115.600	$-1 * 10^6$	59.000	95.000	116.500	103.000
600	248.000	47.700	$8 * 10^{10}$	233.000	209.000	51.000	48.000
613	272.000	47.500	$2 * 10^6$	181.400	177.700	51.000	46.500
616	269.000	46.900	$1 * 10^6$	187.000	183.000	56.000	47.000

Tab. 3-22: Extinktionskoeffizienten der Komponenten der lokalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung von PC_{mono} und kursiv die Vergleichswerte aus den steady-state Untersuchungen (Details siehe Text);

Gemessene Wellenlänge [nm]	$k_1 [s^{-1}]$	$k_2 [s^{-1}]$	$k_3 [s^{-1}]$	$k_4 [s^{-1}]$
340	$12,1 \pm 0,12$	$1,62 \pm 0,075$	$0,148 \pm 0,0003$	$0,005 \pm 0,0005$
350	$5,12 \pm 0,06$	$0,348 \pm 0,011$	$0,141 \pm 0,002$	$0,0001 \pm 0,0013$
600	$15,6 \pm 0,001$	$0,769 \pm 0,004$	$0,140 \pm 0,0003$	$0,025 \pm 0,001$
613	$5,24 \pm 0,06$	$0,833 \pm 0,023$	$0,100 \pm 0,0003$	$0,041 \pm 0,001$
616	$4,91 \pm 0,08$	$0,637 \pm 0,017$	$0,089 \pm 0,002$	$0,056 \pm 0,002$

Tab. 3-23: Ratenkonstanten der lokalen Fits, der absorptionsspektroskopischen Messungen der Entfaltung von PC_{mono} mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e$, (Kap. 2.3.5.).

Zusammenfassend kann folgendes Modell aufgestellt werden: $PC_{mono} \rightarrow I_1 \rightarrow (I_2 \rightarrow) U_f \rightarrow U_s$.

Dabei kann der Übergang von PC_{mono} zu I_1 nur bei 340 nm und 600 nm sicher ausgemacht werden, bei den anderen Wellenlängen ist er hinter dem Artefakt und eventuell in der Totzeit

der stop-flow Apparatur verborgen. Ob dieser Schritt oder Schritte eine schnelle Ratenkonstante haben, kann nicht analysiert werden. Insofern wird die Aussage bei der Entfaltung von PC_{tri} , dass die schnelle Reaktion die Monomerisierung von PC_{tri} darstellt nicht widerlegt, teilweise sogar gestützt, aber nicht sicher belegt.

Vis-CD

Die Komponente a, mit den dazugehörigen schnellen Ratenkonstanten, hat auch hier physikalisch unsinnige $\Delta\epsilon$ -Werte (Tab. 3-24, Abb. 3-79) und kommt nur für eine kurze Zeit in einer ganz geringen Konzentration vor (beispielhaft Abb. 3-80). Eine Ausnahme zeigt die lokale Analyse von 350 nm und 628 nm (1). Hier ist die erste ermittelte Fitkomponente physikalisch sinnvoll und wird deshalb, um direkt mit den anderen Messungen verglichen werden zu können, b zugeordnet (Tab. 3-24). Die Komponenten b bis e lassen sich, beim Vergleich mit den $\Delta\epsilon$ -Werten der steady-state Messungen (Tab. 3-24), gut in den linearen Entfaltungsweg von PC einsortieren. Komponente b hat beim globalen Fit bei 616 nm um fast 25% gegenüber PC_{mono} abgenommen. Das deutet darauf hin, dass in diesem Fall bereits ein Entfaltungsintermediat gesehen wird. Durch den Artefakt, welcher in Komponente a deutlich wird, ist nicht auszuschließen, dass auch Komponente b davon noch etwas betroffen ist. Das ist möglicherweise der Grund für die Überbewertung der Komponente b bei 340 nm, 350 nm und 600 nm (bei 340 nm: 26%, 350 nm: 35% und 625 nm: 36%). Bei den Wellenlängen 340 nm, 350 nm, 628 nm und sicher bei 600 nm und 613 nm (Tab. 3-24) ist aufgrund der Höhe der $\Delta\epsilon$ -Werte (Tab. 3-24) davon auszugehen, dass in der Fitkomponente b PC_{mono} erfasst wurde. Ab Komponente b sind alle nachfolgenden Entfaltungsschritte mit einer um ca. 10-mal langsameren Ratenkonstante assoziiert, wie sie der Monomerisierung von PC_{tri} zugeordnet wurden (Kap. 3.9.2.2.) (Tab. 3-25). Das heißt, dass ein schneller Entfaltungsschritt nicht ermittelt werden konnte. Hinter der Reaktion $a > b$ mit einer schnellen Ratenkonstante (Tab. 3-25), verbirgt sich ziemlich sicher (siehe oben) kein früher Entfaltungsschritt von PC_{mono} . Eine Ausnahme diesbezüglich kann die Reaktion bei 616 nm darstellen.

Bei der lokalen Analyse findet vor allem bei 350 nm für die Fitkomponente b eine Überbewertung statt (46% Zunahme gegenüber PC_{mono}). Bei 616 nm hat das CD von b gegenüber PC_{mono} bereits um 26% abgenommen. Es gelten für die beiden vorherigen Feststellungen die gleichen Überlegungen, wie im globalen Fit. Bei 613 nm wurde ein vierstufiger Fit, entsprechend der Analyse der Entfaltung von PC_{tri} durchgeführt. Dabei stellt

nicht nur Komponente a (Tab. 3-24) einen physikalisch unsinnigen Wert dar, sondern auch der Wert für b macht an dieser Stelle der Entfaltungsreaktion keinen Sinn. Im Vergleich zu PC_{mono} hätte bereits zu 50% Entfaltung stattgefunden, gefolgt von Komponente c, die im Rahmen der Fehler aber PC_{mono} zugeordnet werden kann (Tab. 3-24). Ein Vorgang der Rückfaltung kann aber in 8 M Harnstoff, wie allgemein bekannt, ausgeschlossen werden. Bei $c > d$ findet eine CD-Abnahme, wie sie der Entfaltung entspricht, statt. Aufgrund des mehrfach beschriebenen Mess- und Analyseproblems ist davon auszugehen, dass bei der Fitkomponente b bei 613 nm ein Artefakt vorliegt und erst bei Komponente c PC_{mono} ($\Delta\epsilon$ bei c: $220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, bei PC_{mono} : $235 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Tab 3-25) erfasst wird. Für die lokale Analyse bei 628 nm wurden zwei Fits analysiert. Wie aus Kap. 3.9.2.2. hervorgeht, stellt die Vis-CD Messung bei 628 nm eine Besonderheit dar. Zum einen wurde ein einstufiger Fit durchgeführt, der dem Fit über 300 s bei PC_{tri} , entspricht, zum anderen ein zweistufiger Fit. Die Fitergebnisse des einstufigen Fits bei PC_{mono} decken sich im Rahmen der Fehlergrenzen sehr gut mit den Ergebnissen des einstufigen Fits bei PC_{tri} (Kap. 3.9.2.2.). Dies weist darauf hin, dass in beiden Fällen das Gleiche gesehen wird und zwar die Entfaltung und nicht die Dissoziation von PC. Beim zweistufigen Fit von PC_{mono} ergibt sich für die erste Komponente ein physikalisch unsinniger Wert, bei dem unklar bleibt, ob noch ein früher Entfaltungsschritt dahinter verborgen ist (Tab. 3-24).

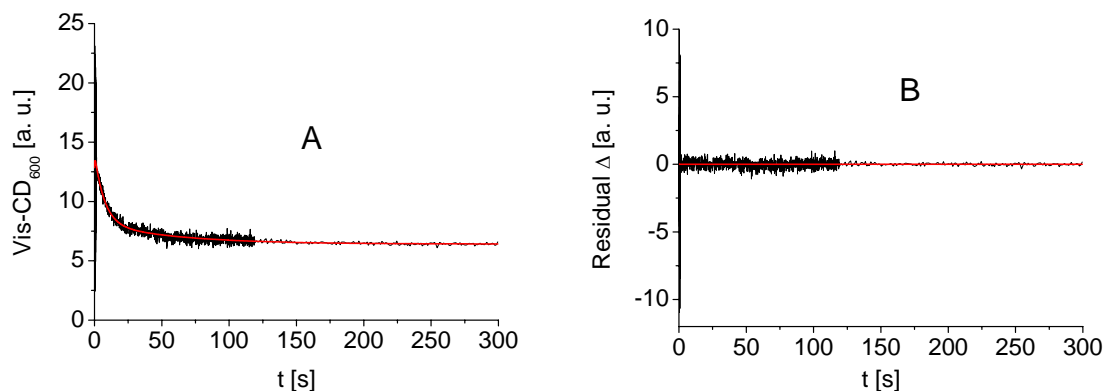


Abb. 3-78: Rohdaten und dreistufiger globaler Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC_{mono} , bei 600 nm; Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms; Time base: 500 μs Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 100 ms bis 120 s, dann 1 s bis 300 s. Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell $a > b > c > d$ (—) und in B) Residuen.

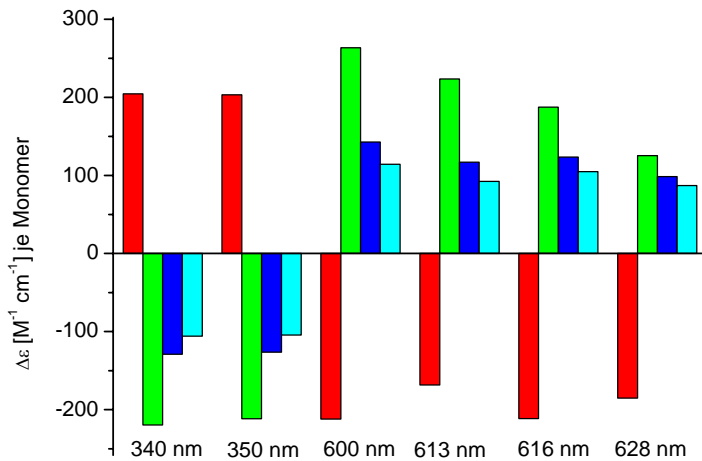


Abb. 3-79: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des globalen dreistufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC_{mono} (Abb. 3-78). Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■), c (■) und d (■) siehe Text und Tab. 3-24.

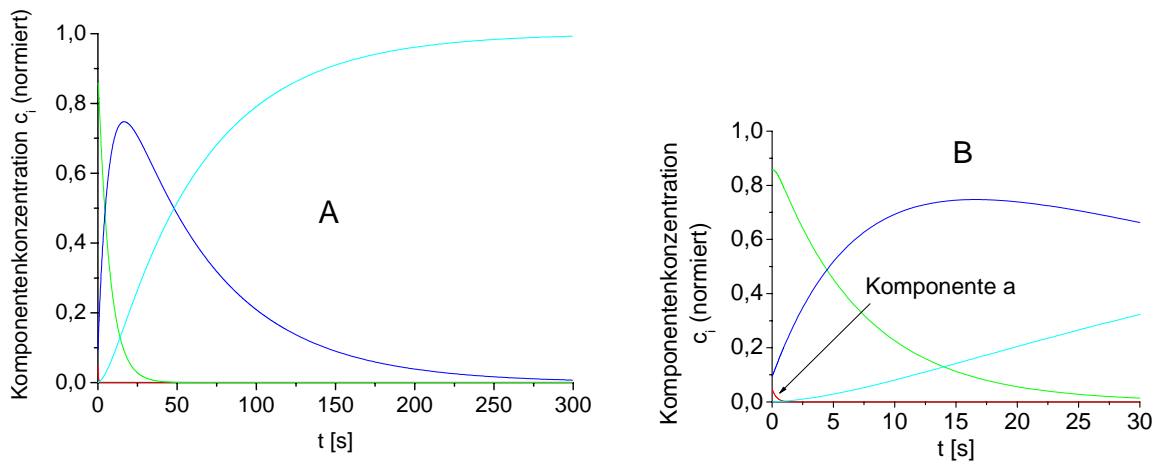


Abb. 3-80: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen globalen Fits (Abb. 3-78) der Entfaltungskinetik von PC_{mono} (Abb. 3-78) gemessen mittels Vis-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s; B) Ausschnitt der ersten 30 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—) und d (—) siehe Text und Tab. 3-24.

Zusammenfassung für die Vis-CD Messungen

Bei der lokalen Analyse gilt das Gleiche, wie bei der globalen, dass, außer bei 616 nm, hinter der Fitkomponente a und dem Schritt $a \rightarrow b$ kein früher Entfaltungsschritt verborgen ist. Beim Vergleich der Ratenkonstanten (Tab. 3-25) zeigt sich, dass bei der vorgelegten Interpretation der Daten kein schneller Reaktionsschritt für die Entfaltung ermittelt wurde. Ab Komponente b sind die Ratenkonstanten um etwa zwei Größenordnungen geringer, wie bei dem Reaktionsschritt, der beim PC_{tri} der Monomerisierung zugeordnet wurde (Kap. 3.9.2.2.). Insofern wird die beim PC_{tri} getroffene Aussage unterstützt, dass die Monomerisierung am schnellsten Schritt beteiligt ist. Grundsätzlich kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass im Burst oder dem Messartefakt noch zumindest ein schneller Reaktionsschritt steckt, obwohl

dies bei der Vis-CD Messung unwahrscheinlich erscheint, da weitgehend PC_{mono} erfasst wurde.

	Gemessene Wellenlängen [nm]	$\Delta\varepsilon [M^{-1} cm^{-1}]$ der <i>steady-state</i> Messungen		$\Delta\varepsilon [M^{-1} cm^{-1}]$ der Fitkomponenten der kinetischen Messungen				
		PC_{mono}	PC_{denat}	a	b	c	d	e
Lokaler Fit	340	-196	-106	-850	-211	-137	-105	
	350	-184	-128		-210	-153	-127	
	600	265	100	$-1 * 10^9$	275	116	102	
	613	235	99	$-8 * 10^9$	162	220	111	97
	616	215	95	$-3 * 10^9$	182	91		
	628 (1)	115	89		117	91		
	628 (2)	115	89	-664	136	93		
Globaler Fit	340	-196	-106	204	-220	-129	-106	
	350	-184	-128	203	-212	-127	-105	
	600	265	100	-213	264	143	114	
	613	235	99	-169	223	117	92	
	616	215	95	-211	187	123	105	
	628	115	89	-185	125	98	87	

Tab. 3-24: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\varepsilon$) der Komponenten des globalen und der lokalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung von PC_{mono} und kursiv die Vergleichswerte aus den steady-state Messungen (Details siehe Text).

Gemessene Wellenlängen [nm]	$k_1 [s^{-1}]$	$k_2 [s^{-1}]$	$k_3 [s^{-1}]$	$k_4 [s^{-1}]$
340	$4,12 \pm 4,21$	$0,143 \pm 0,036$	$0,010 \pm 0,005$	
350		$0,325 \pm 0,088$	$0,019 \pm 0,007$	
600	$15,9 \pm 0,02$	$0,134 \pm 0,030$	$0,012 \pm 0,027$	
613	$18,2 \pm 0,0001$	$0,921 \pm 1,30$	$0,084 \pm 0,061$	$0,017 \pm 0,053$
616	$18,0 \pm 0,0003$	$0,061 \pm 0,011$		
628 (1)		$0,052 \pm 0,029$		
628 (2)	$2,95 \pm 1,94$	$0,188 \pm 0,136$		
Globaler Fit	$2,88 \pm 0,89$	$0,139 \pm 0,021$	$0,017 \pm 0,006$	

Tab. 3-25: Ratenkonstanten der lokalen und des globalen Fits, der Vis-CD Messungen der Entfaltung von PC_{mono} mit dem Fitmodell: $(a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e)$ (Kap. 2.3.5.).

Emission

Bei der Analyse der Entfaltungskinetik von PC_{mono} war lediglich ein dreistufiger Fit möglich, ein Fit mit mehr Komponenten war nicht stabil (Abb. 3-81). Bei der Entfaltung von PC_{tri} wurde ein vierstufiger Fit durchgeführt (Kap. 3.9.2.3.). Die erste Komponente a, assoziiert mit einer schnellen Ratenkonstante (Tab. 3-26), hat eine physikalisch nicht sinnvolle Amplitude. Im Vergleich mit den Ergebnissen von PC_{tri} und weiteren Kontrollmessungen (Daten nicht gezeigt) ist die Amplitude um ca. 3 Größenordnungen zu hoch (Abb. 3-82) und zudem in nur geringster Konzentration (Abb. 3-83) vorhanden. Ausgehend von Komponente b wird deutlich, dass der schnelle ($k_1 \approx 19 s^{-1}$ bei der Entfaltung von PC_{tri}) Reaktionsschritt fehlt. Da die Dissoziation vom Trimer zum Monomer in dieser Versuchsreihe ausgeschlossen wurde,

deutet dies darauf hin, dass der Dissoziation vom PC_{tri} zum Monomer die schnelle Reaktion zugeordnet werden kann. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich hinter der Fitkomponente a und in der Burstphase noch ein Entfaltungsschritt verbirgt.

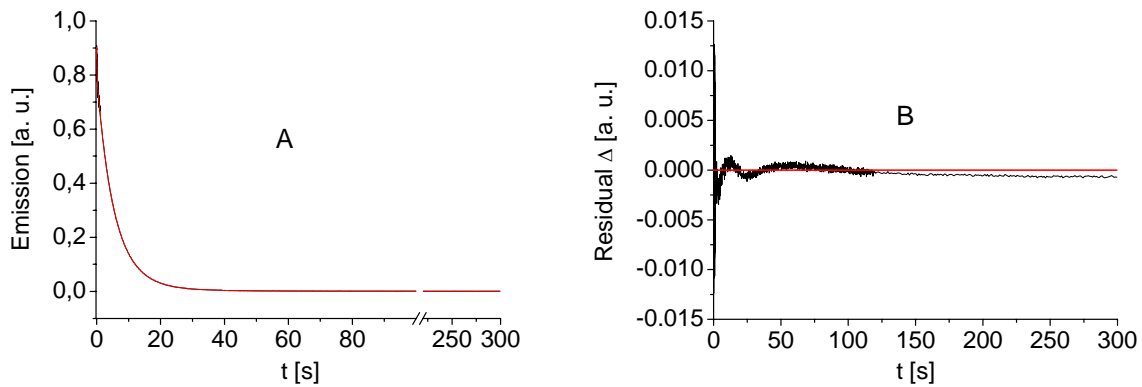


Abb. 3-81: Rohdaten und dreistufiger Fit der Emissionsänderung bei der Entfaltung von PC_{mono} :
 Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms; Time base: 500 μ s Messintervall bis 2 s
 Messzeit, dann 100 ms bis 120 s, dann 1 s bis 300 s; Anregung bei 350 nm, Cut-off Filter bei 600 nm.
 Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell $a>b>c>d$ (—) und in B) Residuen.

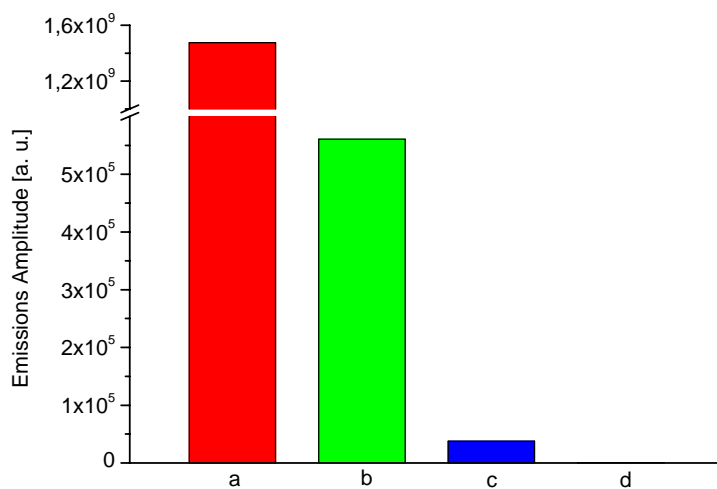


Abb. 3-82: Emissions Amplituden des dreistufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC_{mono} (Abb. 3-81).
 Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■), c (■) und d (■) siehe Text.

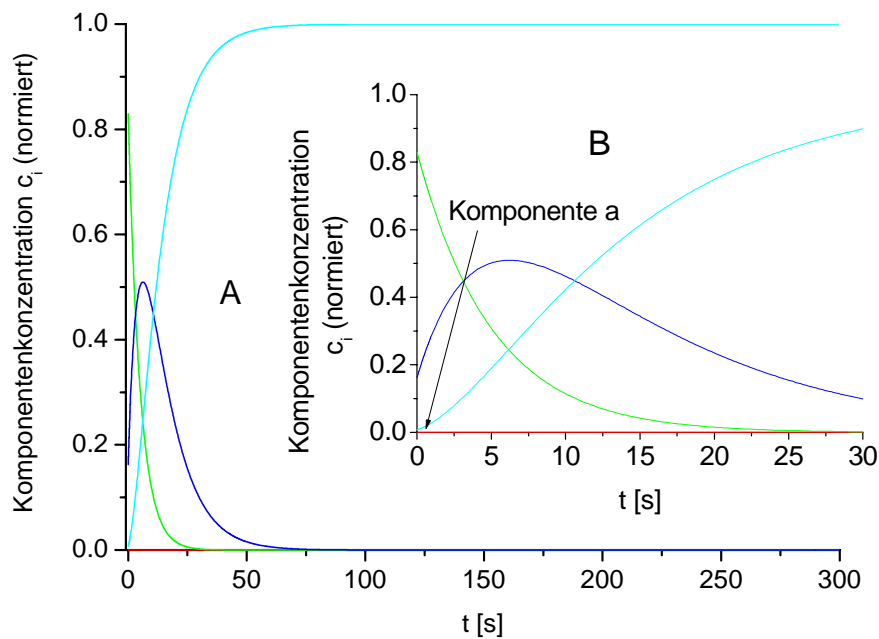
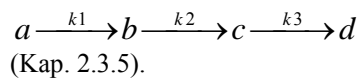


Abb. 3-83: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC_{mono} (Abb. 3-81) gemessen mittels Emission. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s; B) Ausschnitt der ersten 30 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—) und d (—) siehe Text.

$k_1 [s^{-1}]$	$9,62 \pm 0,08$
$k_2 [s^{-1}]$	$0,198 \pm 0,003$
$k_3 [s^{-1}]$	$0,094 \pm 0,006$

Tab. 3-26: Ratenkonstanten des Fits der Emissionsänderung bei der Entfaltung von PC_{mono} mit dem Fitmodell:



Wie oben erwähnt, war ein vierstufiger Fit, wie er vergleichbar mit der Analyse von PC_{tri} gewesen wäre, nicht machbar. In Folge dessen fehlt im Ergebnis des dreistufigen Fits von PC_{mono} , die zweite schnelle Ratenkonstante ($k \approx 7 s^{-1}$, Tab. 3-19) mit der entsprechenden Amplitude, wie sie für PC_{tri} ermittelt wurde. Folgende Überlegungen sind, im

Vergleich mit den Ergebnissen für die Entfaltung von PC_{tri} , für die Interpretation der Daten möglich. Ein vierstufiger Fit ist nicht möglich, da $a > b > c$ beim PC_{tri} tatsächlich die Dissoziation, wie es als Möglichkeit diskutiert wurde, von PC_{tri} beschreibt (Kap. 3.9.2.3.) und dieser Vorgang bei der Entfaltung von PC_{mono} nicht vorhanden ist. Eine andere Möglichkeit ist, dass ein vierstufiger Fit deshalb mathematisch nicht auflösbar ist, da durch die Reaktion des Proteins mit Harnstoff (siehe oben), welche nicht zur Entfaltungsreaktion gehört, die Messergebnisse soweit verändert werden, dass sie mit den für die mathematische Analyse der Entfaltung zu Grunde liegenden linearem Reaktionsmodell nicht mehr zu fitten sind. Dies würde bedeuten, dass die Ergebnisse bei PC_{tri} doch dahingehend interpretiert werden müssen, dass nur der Übergang $a > b$ die Dissoziation beschreibt und $b > c$ bereits Entfaltung, eventuell gemeinsam mit der Untereinheitentrennung. Auch mit den Ergebnissen der Messung der Entfaltung von PC_{mono} lässt sich deshalb dieses Problem nicht weiter auflösen. Die

Untersuchungen an den Untereinheiten sollen u. a. über das Problem der Dissoziation der Untereinheiten, wie sie bei der Emission angesprochen wurde, weiteren Aufschluss ergeben. Eventuell kann dabei ein Hinweis gefunden werden, welche der möglichen Interpretationen des Reaktionsverlaufs von PC_{tri} die wahrscheinlichere ist.

UV-CD

Bei der lokalen Analyse der Entfaltungskinetik von PC_{mono} bei 222 nm, ergab ein zweistufiger Fit (Abb. 3-84), wie er auch für PC_{tri} (Kap. 3.9.2.4.) durchgeführt wurde, für alle drei Fitkomponenten $\Delta\varepsilon$ -Werte, die gut mit den $\Delta\varepsilon$ -Vergleichswerten aus den steady-state Messungen übereinstimmen (Tab. 3-27). Die endlichen Werte für die Komponente c, die für PC_{denat} steht und demnach ein $\Delta\varepsilon = 0$ haben müsste (Kap. 1.8.), liegen im Rauschen der Messung begründet (Abb. 3-84A). Die erste, schnelle Ratenkonstante, wie sie für PC_{tri} ($k \approx 5 \text{ s}^{-1}$, Tab. 3-21) ermittelt wurde, wurde auch für die Entfaltung von PC_{mono} erfasst (Tab. 3-28). Wie bereits in den Kapiteln 3.1.2., 3.6., 3.8. dargestellt, kann im UV-CD ein Monomer nicht von einem Trimer unterschieden werden, d. h. der Übergang von PC_{tri} zu PC_{mono} ist UV-CD inaktiv. Diese Aussage bestätigt sich in den Messergebnissen der Entfaltung von PC_{mono} , die vergleichbar mit den Ergebnissen der Entfaltungskinetik von PC_{tri} sind (Kap. 3.9.2.4.).

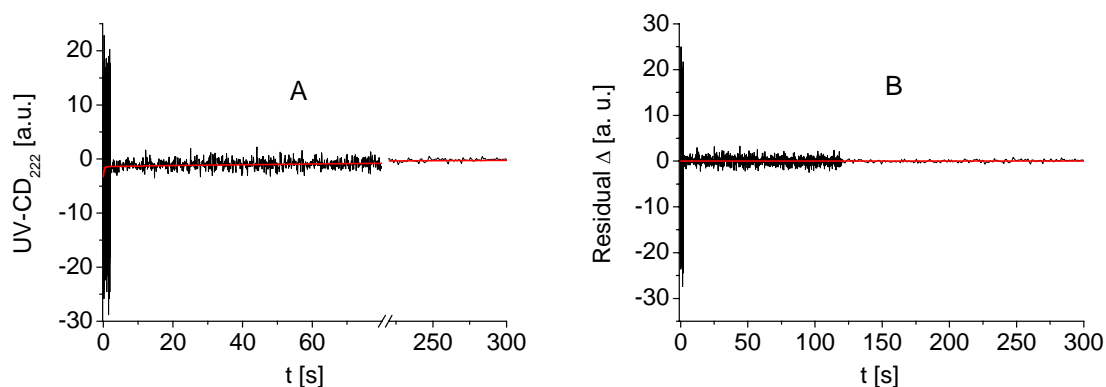


Abb. 3-84: Rohdaten und zweistufiger lokaler Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC_{mono} , bei 222 nm. Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms, Time base: 500 μs Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 100 ms bis 120 s, dann 1 s bis 300 s, Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell $a>b>c$ (—) und in B) Residuen

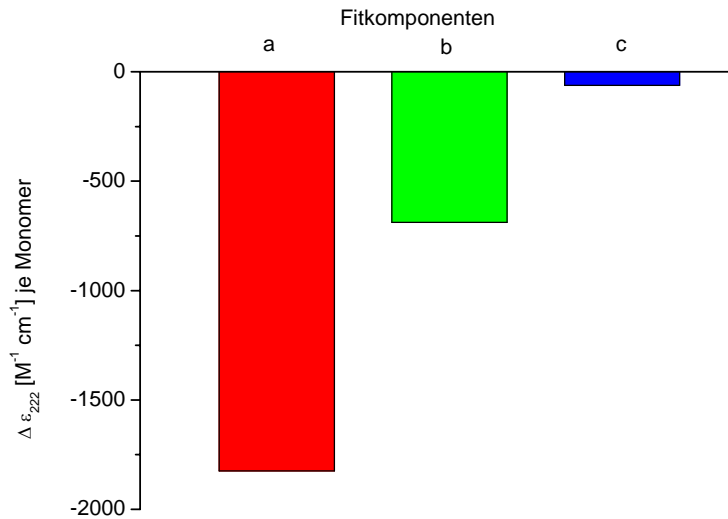


Abb. 3-85: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des zweistufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC_{mono} (Abb. 3-84), bei 222 nm. Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■) und c (■) siehe Text und Tab. 3-27.

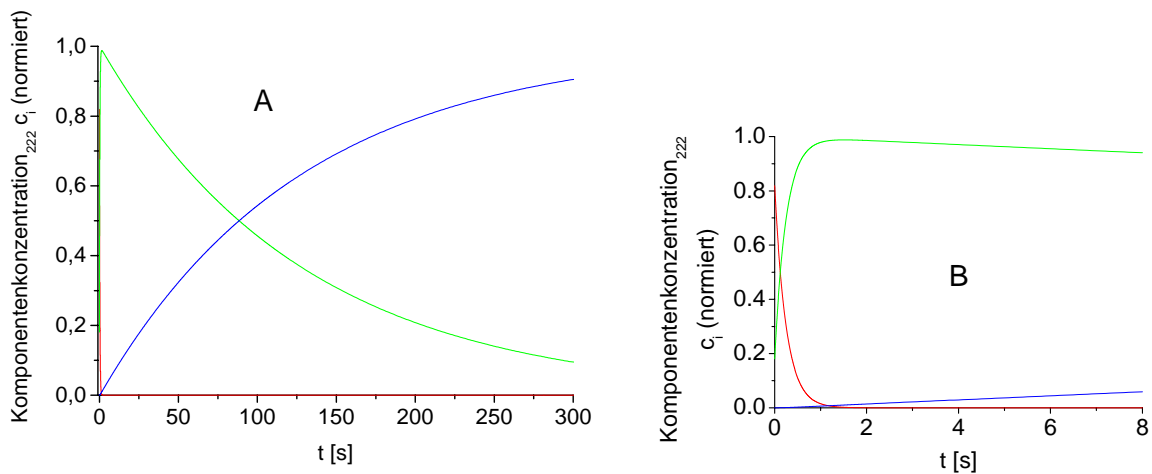


Abb. 3-86: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des zweistufigen Fits, der Entfaltungskinetik von PC_{mono} (Abb. 3-84) bei 222 nm gemessen mittels UV-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s; B) Ausschnitt der ersten 8 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—) und c (—) siehe Text und Tab. 3-27.

$\Delta\epsilon$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] der steady-state Messungen bei 222 nm		$\Delta\epsilon$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] der kinetischen Messung bei 222 nm		
<i>PC</i>	<i>PC_{denat}</i>	a	b	c
-1960	40*	-1800	-690	-60

Tab. 3-27: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) der Komponenten des lokalen zweistufigen Fits der Entfaltung von PC_{mono} und kursiv die Vergleichswerte aus den steady-state Messungen (Details siehe Text) *die Abweichungen von 2% von dem zu erwartenden Wert Null (Kap. 1.7.) liegen im Rauschen der Messung begründet und liegen noch im Rahmen der Fehlergrenzen.

Ratenkonstanten	
k_1 [s ⁻¹]	k_2 [s ⁻¹]
4,00 ± 1,88	0,0079 ± 0,012

Tab. 3-28: Ratenkonstanten des lokalen Fits bei 222 nm, der UV-CD Messung der Entfaltung von PC_{mono} mit dem Fitmodell $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c$, (Kap. 2.3.5.).

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Vis-CD-, der Absorptions- und der Emissionsmessungen an Monomeren sind kompatibel mit der Aussage, die für die Entfaltung von PC_{tri} getroffen wurde, dass die Dissoziation den schnellen Reaktionsschritt bei der Entfaltung von PC_{tri} darstellt. Viele Ergebnisse, vor allem der Vis-CD Messung, bei der weitgehend PC_{mono} erfasst wurde, stützten sogar diese Aussage (siehe oben). Es wurde kein mit der Dissoziation vom Trimer zum Monomer vergleichbar schneller Reaktionsschritt gefunden. Aufgrund des bei den meisten Messungen auftretenden Artefaktes der ersten Fitkomponente kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden, dass sich dahinter noch ein eventuell schneller Entfaltungsschritt verbirgt. Die Ergebnisse der UV-CD Messung sind analog zu denen bei Entfaltung von PC_{tri}: Auf der Ebene der Sekundärstruktur wird ein schneller ($k \approx 4 \text{ s}^{-1}$ bis 5 s^{-1}) Entfaltungsschritt gesehen, gefolgt von einem zweiten, langsamen Schritt. Man kann deshalb davon ausgehen, dass die Auflösung der Sekundärstruktur nicht von dem Aggregationsgrad des Ausgangsproduktes abhängt.

3.9.4. Kinetik der Entfaltung der Untereinheiten

Messbedingungen

Bei den kinetischen Messungen der Entfaltung der UE traten zwei Probleme auf. Die Messbedingungen mussten deshalb etwas verändert werden. Die problematischere der Untereinheiten war dabei die α -UE.

Bei Messungen mit UE in Stammlösungsansätzen entsprechend denen des PC_{tri} (0 M Harnstoff, 50 mM KPP, pH 7) ergaben sich Messkurven, die Drift, Schwankungen, Rauschen etc. aufwiesen. Wie bereits bekannt (Fischer, 1989), neigen die UE, vor allem die α -UE, im isolierten Zustand zur Aggregation. Dies führt wahrscheinlich zu den beschriebenen Messartefakten und die daraus resultierenden Messkurven sind nicht mehr sinnvoll zu interpretieren. Um diese Aggregation zu verhindern, wurden den Stammlösungsansätzen der UE Harnstoff zugesetzt. Nachdem eine Zugabe von bis zu 4 M Harnstoff in 50 mM KPP noch nicht zur Entfaltung führt (Kap. 3.7.), wurden Testreihen mit Stammlösungen durchgeführt, die 1, 3 und 4 M Harnstoff enthielten. Eine Stammlösung von 4 M Harnstoff brachte die besten Messergebnisse, deshalb wird die Stammlösung für die Entfaltungskinetik der UE in 4 M Harnstoff angesetzt. Jedoch führt die Vorbehandlung mit Harnstoff gelegentlich auch hier, wie bei den Experimenten mit PC_{mono} (Kap. 3.9.3.), zur Artefaktbildung. In diesen Fällen

muss die erste ermittelte Fitkomponente mit unsinnigen physikalischen Werten unbeachtet bleiben. Details und Erläuterungen zu diesem Thema stehen im Kap. 3.6. und 3.9.3.

Die β -UE besitzt zwei, die α -UE einen Chromophor (Kap. 1). Beim Ansetzen einer Stammlösung der UE mit der gleichen Proteinkonzentration wie für das integrale PC, reduziert sich damit die Signalstärke für die β -UE auf ca. 2/3 und die der α -UE auf ca. 1/3 der Signalstärke vom integralen PC. Die Folge waren Messergebnisse, welche zu verrauscht und zu gering in der Signalstärke waren um noch gut auswertbar zu sein. Nach verschiedenen Versuchen wurden Proteinkonzentrationen gewählt, die die gleiche ($OD = 4,5 \text{ cm}^{-1}$) oder eine höhere optische Dichte aufwiesen, wie sie für die Messungen mit PC_{tri} verwendet wurden. Dies bedeutet für die α -UE eine Proteinkonzentration von $3,8 * 10^{-5} \text{ M}$ und für die β -UE $2,3 * 10^{-5} \text{ M}$. Für die α -UE waren die Messergebnisse im Vis-CD auch bei dieser Konzentration noch zu verrauscht und die Stammlösung für die Vis-CD Messungen wurde auf eine OD von 9 cm^{-1} gebracht, was einer Proteinkonzentration von $7,6 * 10^{-5} \text{ M}$ entspricht (Kap. 2.3.5.). Ein Vergleich der Kinetiken von den UE und dem integralen PC stellt trotzdem kein Problem dar, da die Entfaltung des Proteins unabhängig von der Proteinkonzentration ist, anders als die Dissoziation. Da durch die Zugabe von Harnstoff eine Aggregation der UE verhindert wird, ist in Folge eine Dissoziation von aggregierten UE bei der kinetischen Messung ausgeschlossen.

Aufgrund der Erfahrungen der kinetischen Messungen von PC_{tri} und PC_{mono} wurden für die UE-Messungen längere Messzeiten (600 s) angesetzt. Bei vielen Messreihen wäre eine deutlich kürzere Messzeit zwar ausreichend gewesen, um aber die Werte besser vergleichen zu können, wurde eine Auswertung der Messung über 600 s für alle nachfolgenden Messreihen durchgeführt (Ausnahme: Bei der UV-CD Messung der β -UE war, aufgrund eines Messdrifts, eine Auswertung nur über die ersten 100 s möglich und auch ausreichend).

3.9.4.1. PC α -Untereinheit

3.9.4.1.1. Absorption

Globale Analyse

Bei der globalen Analyse der Entfaltungskinetik (Abb. 3-87) der α -UE war der dreistufige Fit (Abb. 3-88) der geeignetste. Ein zweistufiger Fit hatte schlechtere Residuen und größere Fehlerabweichungen, ein vierstufiger brachte keine Verbesserung mehr. Der Fit wurde $a > b > c > d$ eingeordnet (Tab. 3-29). Beim Vergleich der ϵ -Werte der Fitkomponenten mit denen aus den steady-state Messungen (Tab. 3-29), welche, wie beim integralen PC, als Vergleichswerte dienen, zeigte sich, dass die erste Komponente vergleichbar mit der der nativen α -UE ist. Der Messbereich bei 350 nm war zu verwaschen (Abb. 3-87), um ausgewertet werden zu können. Beim Vergleich der relativen Amplituden mit den dazugehörigen Ratenkonstanten (Tab. 3-29, 3-30; Abb. 3-95) zeigt sich, dass der erste Schritt ein schneller ($\approx 7 \text{ s}^{-1}$) mit der größten Absorptionsabnahme (Tab. 3-29, 3-30; Abb. 3-89) ist. Der zweite Schritt ist halb so schnell ($\approx 3 \text{ s}^{-1}$) und weist immer noch eine starke Abnahme der Absorption auf. Der letzte Schritt mit einer noch langsameren Ratenkonstante ($\approx 1 \text{ s}^{-1}$) hat nur noch eine ganz geringe relative Amplitude. Der Reaktionsverlauf mit den überwiegend schnellen Ratenkonstanten spiegelt sich auch im Verlauf der Komponentenkonzentration (Abb. 3-90) wider. Die letzte ermittelte Komponente, d, ist bereits nach ca. 13 s zu 100% vorhanden. Die Fitkomponenten können folgendermaßen interpretiert werden: a entspricht α -UE_{nat}, darauf weist nicht nur der ϵ -Wert hin, sondern das gesamte Spektrum der Komponente a (Abb. 3-89) ist dem der α -UE_{nat} aus den steady-state Messungen sehr ähnlich (Abb. 3-36). Komponente b entspricht einem Intermediat, c ist weitgehend entfaltet und d vollständig entfaltet (Tab. 3-29, 3-30; Abb. 3-89). Inwieweit der Übergang $c > d$ eine Veränderung des Chromophors im bereits völlig entfalteten Protein darstellt kann an dieser Stelle nicht entschieden werden. Die Reaktion ist jedoch relativ schnell ($0,99 \text{ s}^{-1}$), so dass es sich wahrscheinlich noch um eine Entfaltungsreaktion handelt. Dieses Problem wird in der Diskussion noch einmal aufgegriffen.

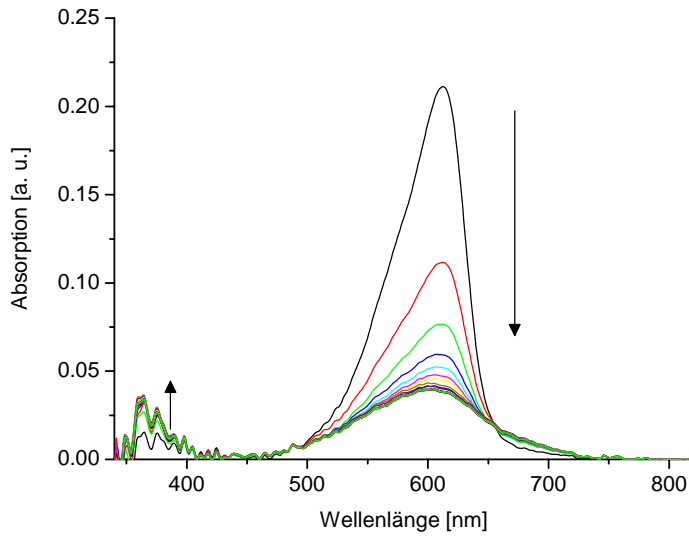


Abb. 3-87: Faktorisierte Rohdaten (Kap. 2.3.5.) der globalen Absorptionsänderung bei der Entfaltung der α -UE. Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 6,1 ms; Time base: 5 ms Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 100 ms bis 120 s, dann 1 s bis 600 s;

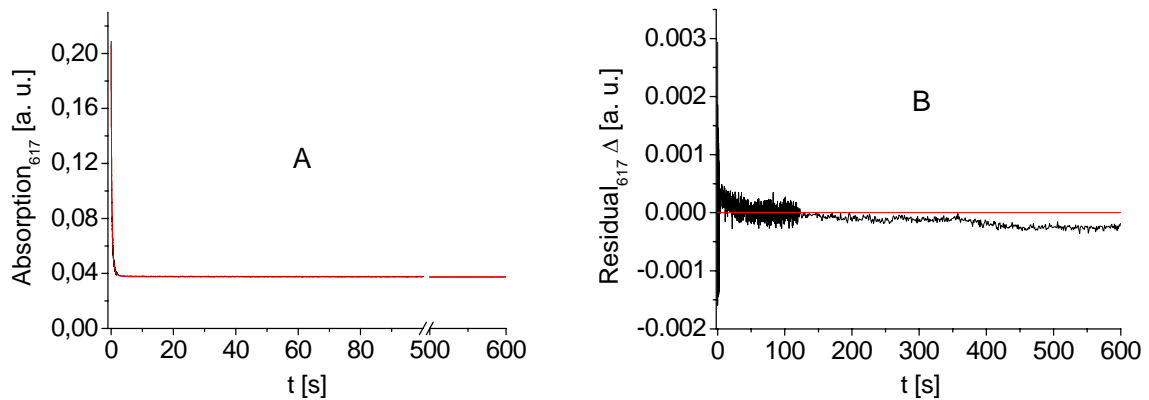


Abb. 3-88: Globaler dreistufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-87). Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell $a>b>c>d$ (—) und in B) Residuen. Bei 617 nm

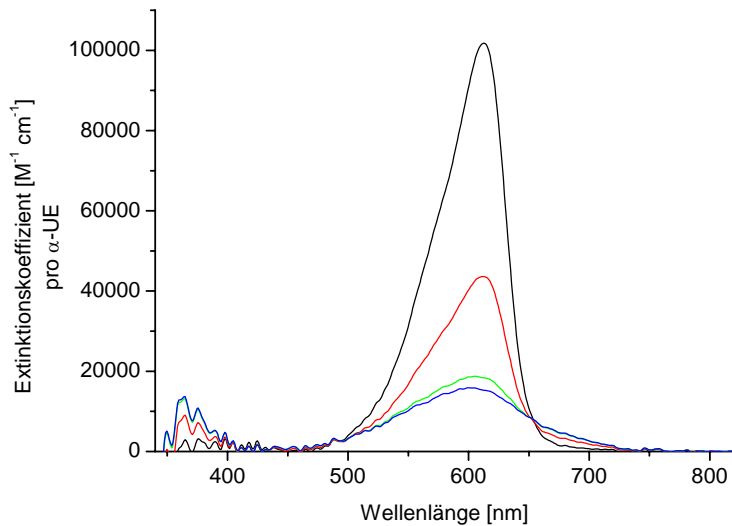


Abb.3-89: Molare Absorptionsspektren des dreistufigen globalen Fits (Abb. 3-88) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-87). Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—) und d (—) siehe Text und Tab. 3-29.

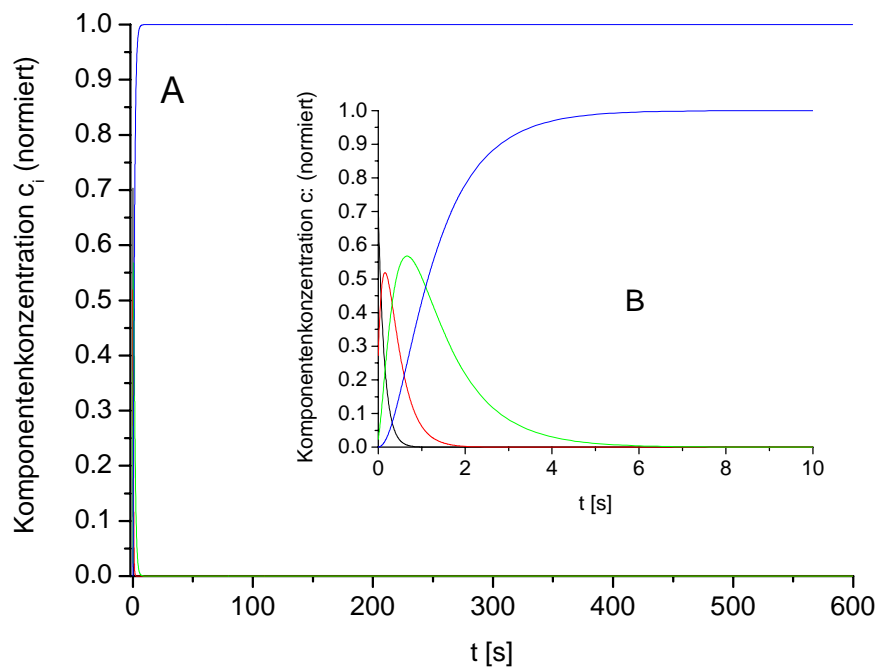


Abb. 3-90: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen globalen Fits (Abb. 3-88) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-87) gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—) und d (—) siehe Text und Tab. 3-29.

	Gemessene Wellenlänge [nm]	$\varepsilon [M^{-1} cm^{-1}]$ der steady-state Messungen		$\varepsilon [M^{-1} cm^{-1}]$ der Fitkomponenten der kinetischen Messungen					
		$\alpha\text{-UE}_{nat}$	$\alpha\text{-UE}_{denat}$	a	b	c	d	e	f
Lokaler Fit	350	15.300	36.400	13.200	31.200	36.100	37.100	37.800	36.200
	580	63.500	14.800		47.400	26.600	12.700	14.300	14.800
	605	99.000	15.700		62.900	16.000	10.900	13.600	15.600
	617	116.600	15.500	99.300	80.800	31.900	15.800	15.700	
Globaler Fit	350	15.300	36.400	*					
	580	63.500	14.800	64.000	30.400	16.200	14.400		
	605	99.000	15.700	97.000	42.400	18.700	15.800		
	617	116.600	15.500	99.800	42.800	18.100	15.000		

Tab. 3-29: Extinktionskoeffizienten je UE, der Komponenten der lokalen und des globalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung der α -UE und kursiv die Vergleichswerte aus den steady-state Untersuchungen (Details siehe Text); * die Werte für 350 nm aus dem globalen Fit konnten wegen des starken Rauschens der Messung nicht ermittelt werden, siehe Abb. 3-87.

Gemessene Wellenlänge [nm]	$A_{\alpha\text{-UE}_{nat/a}}$ rel.	$k_1 [s^{-1}]$	$A_{\alpha\text{-UE}_{nat/b}}$ rel.	$k_2 [s^{-1}]$	$A_{\alpha\text{-UE}_{nat/c}}$ rel.	$k_3 [s^{-1}]$	$A_{\alpha\text{-UE}_{nat/d}}$ rel.	$k_4 [s^{-1}]$	$A_{\alpha\text{-UE}_{nat/e}}$ rel.	$k_5 [s^{-1}]$	$A_{\alpha\text{-UE}_{nat/f}}$ rel.
350	-0,10	10,5 $\pm 0,06$	0,76	3,11 $\pm 0,03$	0,99	0,27 $\pm 0,01$	1,04	0,04 $\pm 0,002$	1,08	0,003 $\pm 0,0001$	1
580			0,33	10,0 $\pm 0,25$	0,76	4,90 $\pm 0,03$	1,04	0,61 $\pm 0,006$	1,01	0,007 $\pm 0,0001$	1
605			0,43	10,4 $\pm 0,05$	0,99	3,48 $\pm 0,09$	1,06	0,89 $\pm 0,02$	1,02	0,04 $\pm 0,0002$	1
617	0,17	34,6 $\pm 1,00$	0,35	5,17 $\pm 0,03$	0,84	2,55 $\pm 0,01$	0,99	0,052 $\pm 0,004$	1		
Globaler Fit	0,16 (bei 617 nm)	7,06 $\pm 0,90$	0,73 (bei 617 nm)	3,20 $\pm 0,52$	0,97 (bei 617 nm)	0,99 $\pm 0,29$	1 (bei 617 nm)				

Tab. 3-30: Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{\alpha\text{-UE}_{nat/x}}$ rel., Kap. 2.3.5.) des globalen und der lokalen Fits, der absorptionsspektroskopischen Messungen Entfaltung der α -UE, mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e \xrightarrow{k_5} f$; die relativen Amplituden beziehen sich auf die native α -UE aus den steady-state Messungen (Kap. 3.8.).

Lokale Analyse

Bei den lokalen Analysen der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-91) war, im Gegensatz zur globalen Analyse, durchgängig Fits mit mehr als vier Komponenten sinnvoll (Tab. 3-29).

Die lokale Analyse bei 350 nm erforderte einen fünfstufigen Fit (Tab. 3-29, 3-30). Ein Fit mit weniger Komponenten ignorierte die Absorptionsabnahme in der letzten Phase der Reaktion. Der Fit wurde $a > b > c > d > e$ eingeordnet. Im Vergleich der ε -Werte ergab sich folgende Interpretation der Fitkomponenten. Die erste Fitkomponente entspricht im Rahmen der Fehlergrenze weitgehend der $\alpha\text{-UE}_{nat}$ aus den steady-state Messungen (Tab. 3-29). Der mit Abstand größte Entfaltungsschritt mit einer Absorptionszunahme von 86% ist der erste, assoziiert mit einer schnellen Ratenkonstante ($\approx 10 s^{-1}$) (Tab. 3-30, Abb. 3-95). Der zweite ca. dreimal langsamere Schritt ($\approx 3 s^{-1}$), hat eine Absorptionszunahme von 23%. Es folgen noch

zwei weitere mit sehr geringer Absorptionszunahme und deutlich langsameren Ratenkonstanten. Der letzte Schritt e>f, mit sehr langsamer Ratenkonstante (sie liegt außerhalb des definierten Messbereiches (Kap. 2.3.5.) und ist deshalb nur ein Anhaltspunkt) bringt eine Absorptionsabnahme mit sich. Dies wird einer Veränderung im Chromophor zugeschrieben, die nichts mehr mit der Entfaltung zu tun hat (Details siehe Kap. 3.9.2.1.), sondern einer langsamen Reaktion im bereits entfalteten Protein darstellt.

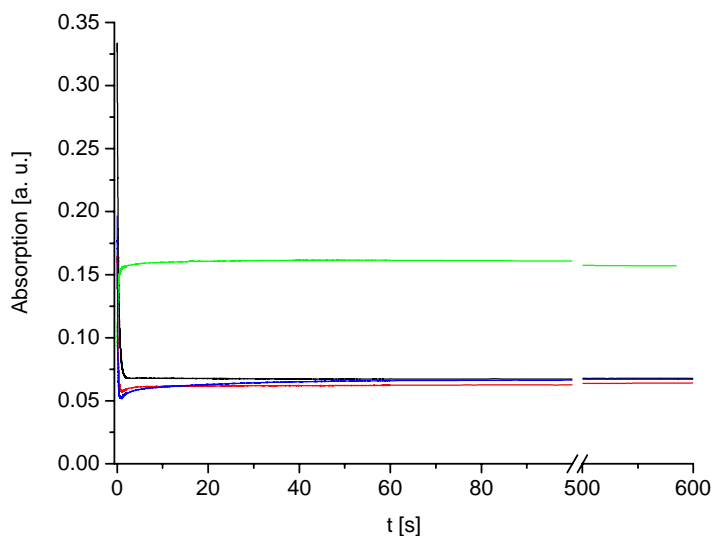


Abb. 3-91: Rohdaten der lokalen Absorptionsänderung bei der Entfaltung der α -UE; Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms; Time base: 500 μ s Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 20 ms bis 60 s, dann 1 s bis 600 s; Messungen bei 580 nm (—), 605 nm (—), 617 nm (—) und 350 nm (—).

Die lokale Analyse im langwelligen erforderte jeweils nur einen vierstufigen Fit. Sowohl bei 580 nm, als auch bei 605 nm erfolgte nach der anfänglichen Abnahme der Absorption wieder eine leichte Zunahme (Tab. 3-29, 3-30).

Bei 580 nm (Abb. 3-92 bis 3-94) ist bereits während der Totzeit der stop-flow Apparatur eine deutliche Abnahme von 33% der Absorption, bezogen auf den Vergleichswert der α -UE_{nat} aus den steady-state Messungen, erfolgt (Tab. 3-29). Jedoch weist die erste schnelle Ratenkonstante ($\approx 10 \text{ s}^{-1}$) auf einen frühen Entfaltungsschritt hin (Tab. 3-30). Aus diesen Gründen wird die erste ermittelte Fitkomponente b zugeordnet, $\Rightarrow b > c > d > e > f$. Ein vergleichbarer k-Wert wurde für den ersten Entfaltungsschritt bei 350 nm und in der globalen Analyse gefunden (der bei 617 nm ist noch einmal deutlich schneller), wobei er hier $a > b$ zugeordnet wurde und nicht $b > c$. Die Komponente b wird zu Beginn der Messung noch mit ca. 60% erfasst (Abb. 3-94). Die Analysen der Entfaltung von PC_{tri} (Kap. 3.9.2.) zeigten, dass

auch 60% Ausgangskonzentration einer Komponente nach dem Burst genügen, um sie und den dazugehörigen Entfaltungsschritt sicher zu bestimmen. Auffällig ist die bislang nicht beobachtete Absorptionszunahme ab Komponente d bis e, die mit langsameren Ratenkonstanten assoziiert sind ($k_3 \approx 0,6 \text{ s}^{-1}$, $k_4 \approx 0,01 \text{ s}^{-1}$). Wie bereits in der Einleitung dargestellt, geht der Chromophor bei der Entfaltung des Proteins von der gestreckten Konformation in eine eher ringförmige Konformation über, was wesentlich zur Absorptionsabnahme im langwelligen Bereich beiträgt (Kap. 1). Bei der Absorptionszunahme am Ende der Entfaltungsreaktion könnte es sich um eine leichte Streckung des Chromophors, im bereits entfalteten Protein, handeln. Auf jeden Fall zeigt die Größe der ϵ -Werte von d, e und f, dass der Chromophor quasi frei ist und das Protein somit nach den Kriterien der Absorption entfaltet vorliegt (Kap. 1)

Der vierstufige lokale Fit bei 605 nm erfasst die erste Komponente ebenfalls nur noch zum Teil (Tab. 3-29). Während der Totzeit der stop-flow Apparatur erfolgte bereits 43% Absorptionsabnahme im Vergleich zur α -UE_{nat} aus den steady-state Messungen (Tab. 3-29). Auch hier deutet die erste ermittelte schnelle Ratenkonstante ($\approx 10 \text{ s}^{-1}$) darauf hin, dass ein früher Entfaltungsschritt analysiert werden konnte (Tab. 3-30). Aus diesen Beobachtungen heraus wird auch dieser Fit einem Modell b>c>d>e>f zugeordnet. Wie bei 580 nm erfolgt auch hier eine Absorptionszunahme ab Komponente d. Es gelten die gleichen Überlegungen wie dort (siehe oben), d. h., d>e>f sind Reaktionsschritte im bereits entfalteten Protein (Tab. 3-29, 3-30;).

Bei 617 nm liegt der ϵ -Wert für die erste ermittelte Fitkomponente, des vierstufigen Fits, im Rahmen der Fehlergrenze bei dem Wert der α -UE_{nat} aus den steady-state Messungen. Hier konnte weitgehend der Beginn der Entfaltungsreaktion erfasst werden (Tab. 3-29, 3-30), deshalb wurde der Fit a>b>c>d>e einsortiert (Tab. 3-29). Der erste Schritt hat eine Absorptionsabnahme von 18% und ist mit einer sehr schnellen Ratenkonstante, ca. dreimal so schnell wie die schnellsten Ratenkonstanten der anderen lokalen Analysen bzw. der globalen assoziiert ($\approx 35 \text{ s}^{-1}$) (Tab. 3-30; Abb. 3-95). Der zweite Schritt, um ca. ein siebenfaches langsamer ($\approx 5 \text{ s}^{-1}$) weist, mit 49% Absorptionsabnahme, die größte Amplitude auf. Es folgt ein immer noch schneller Reaktionsschritt ($\approx 2,5 \text{ s}^{-1}$) mit einer Absorptionsabnahme von 15%. Der letzte Schritt hat um ca. eine 50-fache langsamere Ratenkonstante ($\approx 0,05 \text{ s}^{-1}$) mit nur noch einer ganz geringen Absorptionsabnahme von 1%. Das Maximum der α -UE_{nat} liegt bei 617 nm, demnach ist die Absorptionsabnahme durch die Entfaltungsreaktion hier besonders

ausgeprägt zu sehen. Entweder kann durch die stärkere Absorptionsabnahme bei 617 nm, im Vergleich zu 580 nm und 605 nm der gleiche Entfaltungsschritt mathematisch in kleinere Schritte der Entfaltung aufgeteilt werden. Oder es werden bei 617 nm andere Prozesse beobachtet wie bei 580 nm und 605 nm. Die ermittelte Kinetik bei 617 nm unterscheidet sich demnach deutlich von diesen (Abb. 3-95).

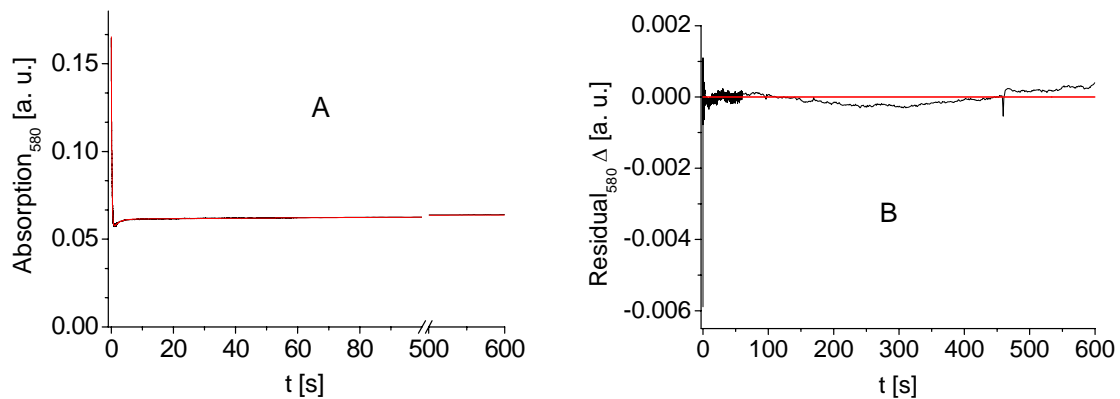


Abb. 3-92: Lokaler vierstufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-91), bei 580 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell: $a>b>c>d>e$; (—) und in B) Residuen.

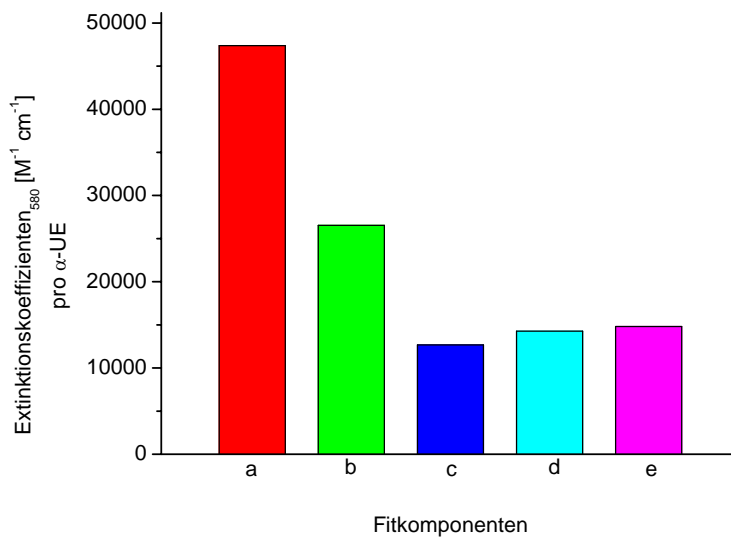


Abb. 3-93: Extinktionskoeffizienten des vierstufigen lokalen Fits (Abb. 3-92), der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-91) bei 580 nm. Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■), c (■) d (■) und e (■) siehe Text und Tab. 3-29;

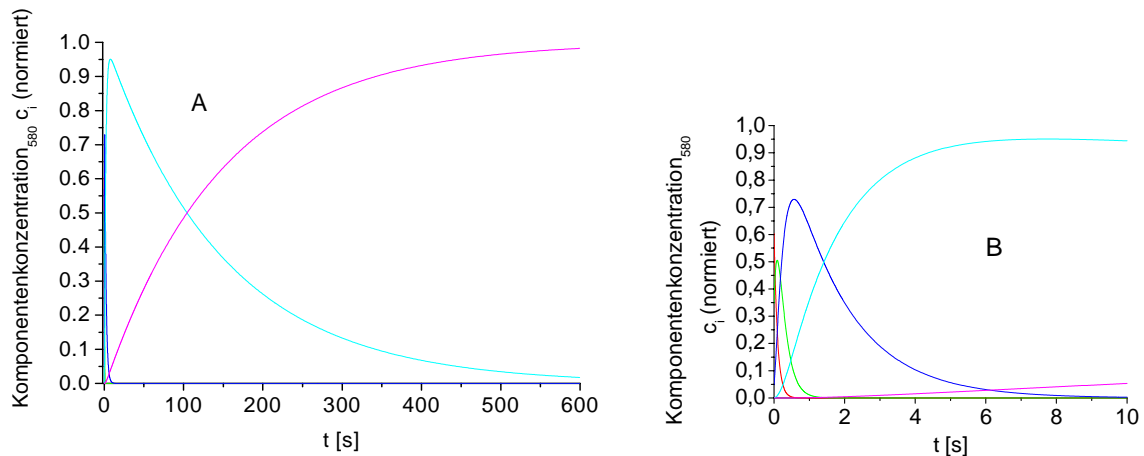


Abb. 3-94: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des vierstufigen lokalen Fits (Abb. 3-92) der Entfaltungskinetik der α -UE (3-91) bei 580 nm gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—), d (—) und e (—) siehe Text und Tab. 3-29.

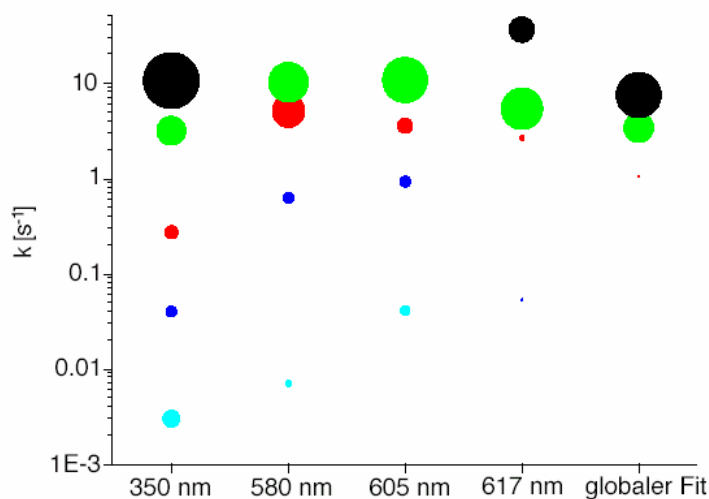


Abb. 3-95: Vergleich des globalen und der lokalen Fits der Absorptionsänderungen bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-87 und 3-91). Gezeigt sind die k -Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k_1 (●), k_2 (●), k_3 (●), k_4 (●) und k_5 (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-29, 3-30)

Zusammenfassung und Vergleich der lokalen und globalen Analysen

Beim Vergleich der lokalen Fits zeigt sich, dass im UV-Nahen Bereich (350 nm) die Absorptionsänderung des ersten Reaktionsschrittes $a > b$ deutlich größer ist, als bei 617 nm und dem globalen Fit (Abb. 3-95, Tab. 3-29 und 3-30). Bei der Annahme, dass sowohl bei 580 nm, als auch bei 605 nm noch ein nicht erfasster früherer Entfaltungsschritt vorliegt, könnte das bedeuten, dass auch die Absorptionsabnahme hier, entsprechend wie bei 350 nm, in zumindest zwei anstatt in einem Schritt erfolgen könnte. Allerdings unterscheiden sich die Ratenkonstanten von 350 nm ebenfalls deutlich von denen der anderen Wellenlängen. Die

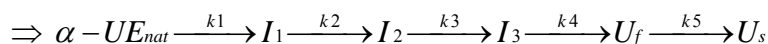
weiteren Entfaltungsschritte haben nur noch eine geringe Absorptionzunahme. Ob es sich dabei, zumindest zum Teil, um eine Änderung im bereits entfaltetem Protein handelt, oder um noch restliche Entfaltung, kann nicht definitiv entschieden werden (siehe Kap. 4). Der Schritt e>f bei 350 nm kann, wie bereits oben geschehen, wegen der Absorptionsabnahme einer Reaktion im bereits entfaltetem Protein zugeordnet werden. Die Analysen bei 580 nm und 605 nm zeigen für die Entfaltung ein fast gleiches Verhalten, sowohl was die Größe der Amplituden, als auch die dazugehörigen Ratenkonstanten anbelangt. Zwei Entfaltungsschritte b>c>d gefolgt von zwei Reaktionsschritten d>e>f im entfaltetem Protein. Die Analyse bei 617 nm deutet dagegen einen anderen Entfaltungsweg an. Der Verlauf der Absorptionsabnahme mit den dazugehörigen Ratenkonstanten bei 617 nm weicht deutlich von dem bei 580 nm und 605 nm ab. Dies bedeutet, dass bei 580 nm und 605 nm die gleiche Entfaltungskinetik gesehen wird, jedoch bei 617 nm eine andere und die Kinetik bei 350 nm weicht wiederum ab. Hier erfolgt ein Splitten in Schritte mit kleinen Absorptionsänderungen von b nach e, wenn das Protein schon weitgehend entfaltet ist.

Der globale Fit ist dementsprechend eine Mittelung aus den lokalen Fits. Weder die Extreme im UV-Nahen noch die bei 617 nm werden deutlich.

Folgende Entfaltungsmodelle scheinen sinnvoll:

350 nm:

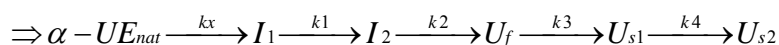
Fitkomponente a entspricht α -UE_{nat}, b, c, d je einem I, e U_f und f U_s



wobei I₂ und/oder I₃ eventuell bereits entfaltetes Protein darstellen (siehe oben)

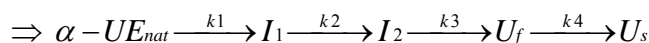
580 nm und 605 nm:

Fitkomponente b und c stellt je ein I dar, d, e und f verschiedene Zustände im entfaltetem Protein.



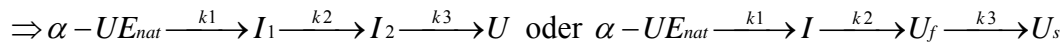
617 nm:

Fitkomponente a stellt α -UE_{nat} dar, b und c je ein I, d U_f und e U_s.



globale Analyse:

Die Komponente a wird ebenfalls als α -UE_{nat} interpretiert, b als I, bei c ist es unklar ob es noch ein I darstellt oder bereits als entfaltet angesehen werden muss (U_f), d ist entfaltetes Protein.



3.9.4.1.2. Vis-CD

Die Auswertung der Vis-CD Daten für die Entfaltung der α -UE war zum Teil problematisch, da meist nur die späteren Entfaltungsschritte gut analysiert werden konnten. Wie auch schon bei der Entfaltung von PC_{mono} aufgetreten, ergaben sich auch hier beim Fitten der Messkurven als erste Fitkomponenten zum Teil physikalisch unsinnige Werte, wie weiter unten im einzelnen gezeigt wird. Diese Artefakte sind wahrscheinlich, wie beim entsprechenden Artefakt bei der Entfaltung von PC_{mono}, auf die Vorbehandlung mit Harnstoff zurück zu führen (Kap. 3.6. und 3.9.3). Für die Auswertung bedeutet dies, dass jeweils diese erste Fitkomponente nicht berücksichtigt werden kann. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass möglicherweise ein früher Entfaltungsschritt durch diesen Messartefakt überdeckt wird. Aufgrund dieses Artefaktes musste auch die Darstellung der relativen Amplituden (Tab. 3-32) auf anderem Weg erfolgen, als sie für die Vis-CD Messung der Entfaltung von PC_{tri} erfolgte. Die relative Amplitude wurde für jeden Entfaltungsschritt auf die α -UE_{nat} bezogen (Kap. 2.3.5.). Bei einer Darstellung der relativen Amplituden des jeweiligen Schrittes (a>b, b>c etc.) zur Gesamtamplitude, wie für das Trimer geschehen, käme für die Komponente b bei fehlerhaften a Werten, falsche Ergebnisse zustande.

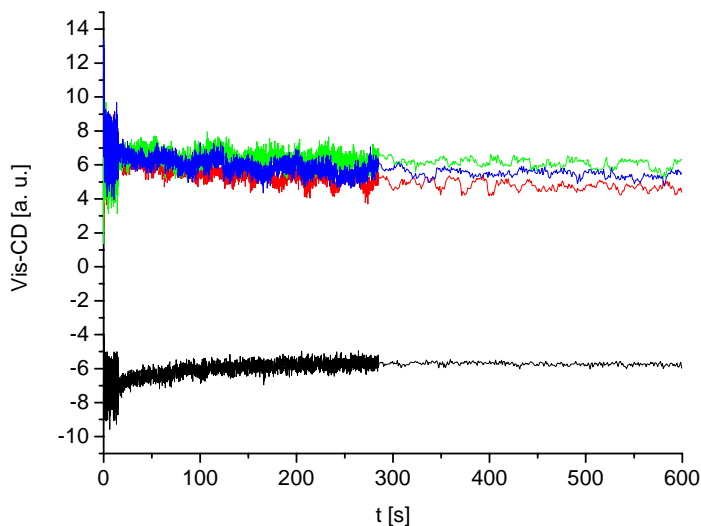


Abb. 3-96: Rohdaten der lokalen CD-Änderungen bei der Entfaltung der α -UE. Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms, Time base: 10 ms Messintervall bis 30 s Messzeit, dann 100 ms bis 300 s, dann 1 s bis 600 s; Messungen bei 575 nm (—), 603 nm (—), 617 nm (—) und 350 nm (—);

Globale Analyse

Bei der globalen Analyse der Vis-CD Daten (Abb. 3-96) wurde ein zweistufiger Fit durchgeführt, ein dreistufiger brachte keine wesentliche Verbesserung mehr (Abb. 3-97). Beim Vergleich der $\Delta\varepsilon$ -Werte der ersten ermittelten Fitkomponenten ergaben sich für die Messungen bei 350 nm, 575 nm und 603 nm physikalisch unsinnige Werte. In allen drei Fällen ist der $\Delta\varepsilon$ -Wert der ersten Fitkomponente geringer, als der Endwert. Grundsätzlich ist dieser Wert damit nicht physikalisch unsinnig. Jedoch zeigen sich im Vergleich mit den steady-state Messungen (Kap. 3.5., 3.7. und 3.8.) keinerlei Anhaltspunkte, dass derart geringe $\Delta\varepsilon$ -Werte bei noch nicht vollständig entfaltetem PC auftreten. Deshalb wird davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Werten um Artefakte handelt, die wahrscheinlich durch die Harnstoffbehandlung im Vorfeld der Messung entstehen (Kap. 3.6. und 3.9.3). Der Wert für die erste ermittelte Fitkomponente bei 617 nm stellt dagegen im Vergleich mit den steady-state Messungen, einen realistischen $\Delta\varepsilon$ -Wert für die α -UE dar (Tab. 3-31). Allerdings ist der $\Delta\varepsilon$ -Wert bei 617 nm für die erste Fitkomponente ($\approx 45 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nur etwa halb so groß, wie der für die α -UE_{nat} ($88 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Damit deutet sich an, dass auch hier in der Burstphase bereits viel an Reaktion erfolgt ist. Jedoch wurde bereits bei den Vis-CD Messungen bei der Entfaltung von PC_{tri} ein entsprechendes Missverhältnis in der Größe der $\Delta\varepsilon$ -Werte für die ersten Fitkomponenten vorgefunden. Trotzdem (Begründung siehe Kap. 3.9.2.2.) wurden die ersten Fitkomponenten bei der Analyse der Entfaltung vom PC_{tri} dem nativen PC_{tri} zugeordnet. Die Ursache dieses Fehlers konnte nicht sicher geklärt werden. Ein Faktor der

sicherlich dazu beiträgt, ist das hohe Rauschen der Messung, vor allem in den ersten Sekunden der Messung. Unbeachtet bleiben kann ebenfalls nicht die Totzeit der stop-flow Apparatur, in der das Gleichgewicht der Entfaltungsreaktion bereits ein Stück in Richtung Entfaltung verschoben wurde. Deshalb kann im Fall der Entfaltung der α -UE nicht sicher entschieden werden, ob die Fitkomponente a bei 617 nm die α -UE_{nat} darstellt, oder bereits ein Entfaltungsintermediat ist. Zweiteres scheint aber wahrscheinlich, da auch bei den anderen Wellenlängen in der Burstphase bereits entscheidendes passiert ist (Abb. 3-98, Tab. 3-31). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei der globalen Analyse kein schneller Entfaltungsschritt $a > b$ ermittelt werden kann. Es besteht aber die Wahrscheinlichkeit, dass sich hinter dem Artefakt von a und in der Totzeit der stop-flow Apparatur ein Entfaltungsschritt verbirgt. Die niedrigen $\Delta\varepsilon$ -Werte für die Komponente a zeigen ebenfalls, dass bereits frühere große Entfaltungsschritte abgelaufen sein müssen. Im zweiten langsamen Schritt ($\approx 0,009 \text{ s}^{-1}$) erfolgt noch ein Rest Entfaltung oder eine Veränderung im bereits entfalteteten Protein.

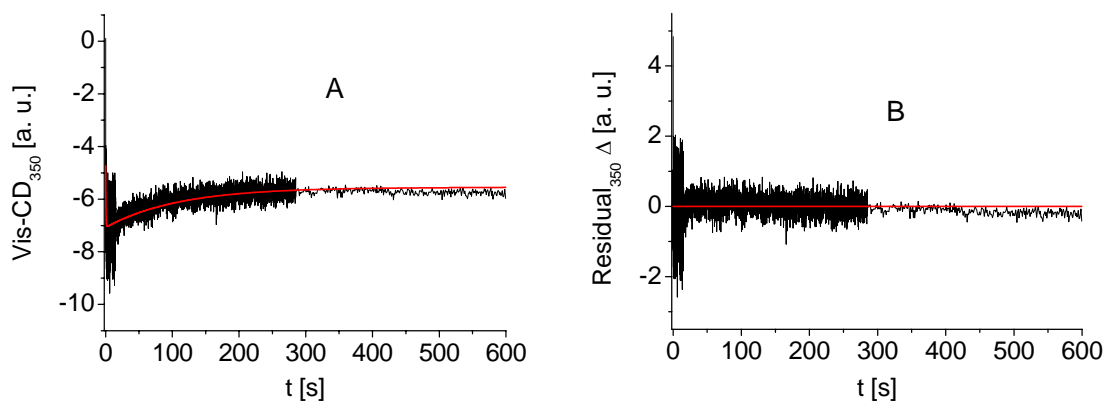


Abb. 3-97: Globaler zweistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-96). Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell $a > b > c$ (—) und in B) Residuen; gezeigt bei 350 nm.

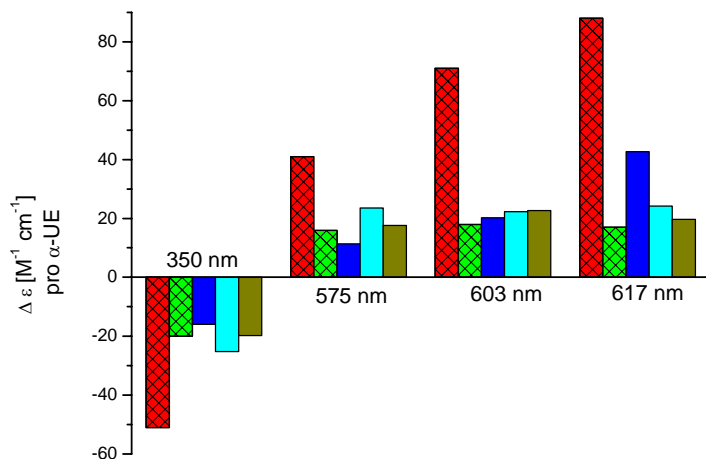


Abb. 3-98: Molarer Circulardichroismus ($\Delta\epsilon$) des zweistufigen globalen Fits (Abb. 3-97) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-96). Vergleich der $\Delta\epsilon$ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] der Fitkomponenten der einzelnen Wellenlängen mit den $\Delta\epsilon$ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] der α -UE_{nat} und α -UE_{denat}. Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■) und c (■) siehe Text und Tab. 3-31. Vergleichswerte aus den steady-state Messungen (Kap. 3.8.) für α UE_{nat} (■) und α -UE_{denat} (■);

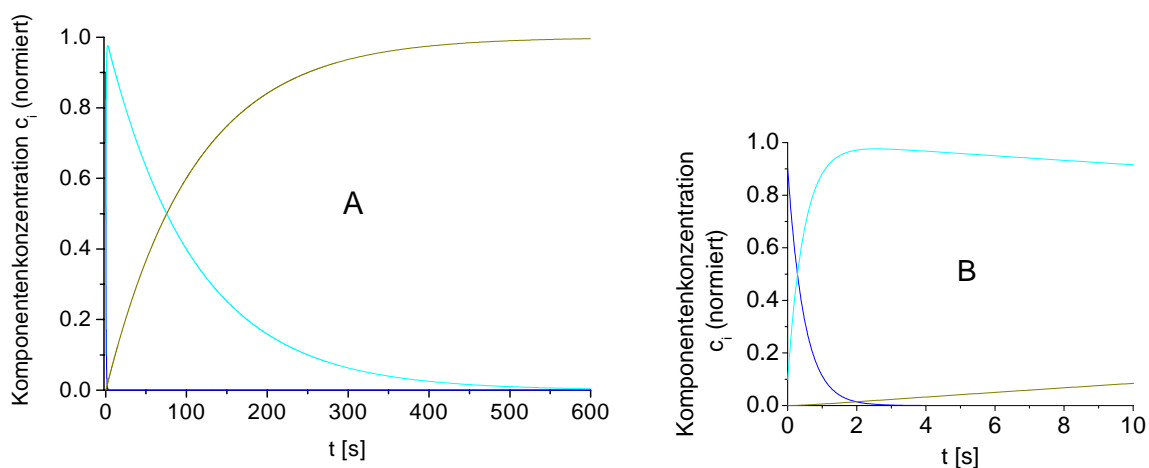


Abb. 3-99: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des zweistufigen globalen Fits (Abb. 3-97) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-96) gemessen mittels Vis-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—) und c (—) siehe Text und Tab. 3-31.

	Gemessene Wellenlänge [nm]	$\Delta\varepsilon [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ der steady-state Messungen		$\Delta\varepsilon [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ der Fitkomponenten der kinetischen Messungen			
		$\alpha\text{-UE}_{nat}$	$\alpha\text{-UE}_{denat}$	a	b	c	d
Lokaler Fit	350	-51	-20	-10	-25	-20	
	575	41	16	16	24	17	
	603	71	18	10	21	20	
	617	88	17	47	27	23	18
Globaler Fit	350	-51	-20	-16	-25	-20	
	575	41	16	11	24	18	
	603	71	18	20	22	23	
	617	88	17	43	24	20	

Tab. 3-31: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\varepsilon$) je UE, der Komponenten der lokalen und des globalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung der α -UE; und kursiv die Vergleichswerte aus den steady-state Messungen. (Details siehe Text);

Gemessene Wellenlänge [nm]	$A_{\alpha\text{-UE}_{nat/a}}$ rel.	$k_1 [s^{-1}]$	$A_{\alpha\text{-UE}_{nat/b}}$ rel.	$k_2 [s^{-1}]$	$A_{\alpha\text{-UE}_{nat/c}}$ rel.	$k_3 [s^{-1}]$	$A_{\alpha\text{-UE}_{nat/d}}$ rel.
350	1,32	3,6 \pm 0,3	0,84	0,14 \pm 0,0006	1		
575	1,04	0,72 \pm 0,05	0,71	0,008 \pm 0,0004	1		
603	1,20	6,3 \pm 1,8	0,98	0,62 \pm 0,28	1		
617	0,58	4,1 \pm 0,6	0,87	0,71 \pm 0,18	0,92	0,007 \pm 0,0005	1
Globaler Fit	0,66 (bei 617 nm)	2,1 \pm 0,08	0,94 (bei 617 nm)	0,009 \pm 0,0003	1 (bei 617 nm)		

Tab. 3-32: Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{\alpha\text{-UE}_{nat/x}}$ rel., Kap. 2.3.5.) des globalen und der lokalen Fits der Vis-CD Messungen der Entfaltung der α -UE mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d$; die relativen Amplituden beziehen sich auf die $\alpha\text{-UE}_{nat}$ aus den steady-state Messungen (Kap. 3.8.);

Lokale Analyse

Wie bereits beim globalen Fit erläutert, stellt die jeweils erste Fitkomponente (außer bei 617 nm) einen physikalisch unsinnigen Wert dar, für die lokalen Analysen gilt dabei die gleiche Argumentation, wie für die globale (siehe oben). Wie ebenfalls bei der globalen Analyse erläutert, könnte es sein, dass die $\Delta\varepsilon$ -Werte für die ersten Fitkomponenten (a, b, ausgenommen die physikalisch unsinnigen) aus messtechnischen Gründen, zu gering gewertet wurden (Kap. 3.9.2.2.). Nachdem es aber bei der Entfaltung der α -UE, im Gegensatz zur Entfaltung von PC_{tri}, dafür keine stichhaltigen Belege gibt, werden die $\Delta\varepsilon$ -Werte aus den steady-state Messungen als direkte Vergleichswerte heran gezogen.

Bei der lokalen zweistufigen Analyse bei 350 nm stellt die erste Fitkomponente, wie oben beschrieben, einen unsinnigen Wert dar, erst die zweite Fitkomponente zeigt einen für die Entfaltungsreaktion, sinnvollen $\Delta\varepsilon$ -Wert (Tab. 3-31). Dabei hat das CD bereits um 84% gegenüber $\alpha\text{-UE}_{nat}$ abgenommen. Der zweite Schritt, mit einer CD-Abnahme mit den

restlichen 16% ist mit einer langsamen Ratenkonstante ($\approx 0,14 \text{ s}^{-1}$) assoziiert (Tab. 3-32). Aufgrund der Stärke der CD-Abnahme von 16% bzw. einem $\Delta\epsilon$ -Wert von $-25 [\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ gegenüber $-20 [\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ für PC_{denat} (Tab. 3-31) kann nicht sicher entschieden werden, ob sie noch Entfaltung oder eine Veränderung im bereits entfalteten Protein darstellt. Möglicherweise ist beides enthalten.

Bei 575 nm stellt die erste Fitkomponente der zweistufigen lokalen Analyse, ebenfalls einen unsinnigen Wert dar (siehe oben) und erst die zweite Fitkomponente zeigt eine physikalisch realistische Größe für die Entfaltungsreaktion (Tab. 3-31). Die CD-Abnahme der Fitkomponente b im Vergleich zur $\alpha\text{-UE}_{\text{nat}}$, beträgt 71%, d. h. auch hier ist bereits der größte Teil der Entfaltungsreaktion abgelaufen. Der zweite Schritt hat noch eine deutliche CD-Abnahme von 29%, assoziiert mit einer sehr langsamen Ratenkonstante ($0,008 \text{ s}^{-1}$) (Tab. 3-32). Die Größe der CD-Abnahme im zweiten Schritt zeigt deutlich noch einen Entfaltungsvorgang des Proteins an, obwohl die sehr langsame Ratenkonstante für eine Veränderung im bereits entfalteten Protein spricht.

Bei 603 nm wiederholt sich die Situation von 350 nm und 575 nm insofern, dass die erste Fitkomponente einen physikalisch unsinnigen Wert darstellt (siehe oben) (Tab. 3-31). Die CD-Abnahme von $\alpha\text{-UE}_{\text{nat}}$ zur Fitkomponente b beträgt 98%, d. h. die Entfaltung ist in diesem Schritt so gut wie abgeschlossen. Die restlichen 2% CD-Abnahme sind mit einer, im Vergleich zu den bisherigen Messergebnissen für eine geringe Amplitudenänderung am Ende der Entfaltungsreaktion, schnellen Ratenkonstante ($\approx 0,6 \text{ s}^{-1}$) assoziiert (Tab. 3-32). Die Größe der CD-Änderung weist auf eine Veränderung im bereits entfalteten Zustand des Proteins hin, die Schnelligkeit der Ratenkonstante, so wie dieser Vorgang bisher interpretiert wurde, nicht.

Die Messergebnisse bei 617 nm erforderten für eine möglichst geringe Fehlerabweichung einen dreistufigen Fit (Abb. 3-100 bis 3-102). Einen Schritt mehr, als bei den bisherigen Analysen dieser Messreihe. Die erste Fitkomponente erbrachte in diesem Fall einen sinnvollen $\Delta\epsilon$ -Wert. Im Vergleich zur $\alpha\text{-UE}_{\text{nat}}$ ist sie aber etwa halb so groß (Tab. 3-31) wie diese. Dies legt nahe, dass bereits ein erheblicher Teil der Entfaltungsreaktion in der Totzeit der stop-flow Apparatur abgelaufen ist. Betrachtet man den Verlauf der Komponentenkonzentration (Abb. 3-102), wird deutlich, dass die erste ermittelte Komponente mit 80% erfasst wird. (Die bisherigen Erfahrungen aus den Analysen waren, dass Fitkomponenten, die in so hoher Ausbeute zu Beginn der Messung erfasst wurden bereits ein

Entfaltungsimmerdiat darstellen.) Die Ratenkonstante für diesen ersten Schritt ($\approx 4 \text{ s}^{-1}$) ist schnell, was auf einen frühen Entfaltungsschritt hinweist (Tab. 3-32). Der zweite Schritt hat eine CD-Abnahme von weiteren 5%, mit einer langsamen Ratenkonstante ($\approx 0,7 \text{ s}^{-1}$). Der letzte und langsamste Reaktionsschritt hat noch deutlich CD-Reduktion von 8%, d. h. auch hier ist wahrscheinlich noch Entfaltung zu sehen. Sollte es einen $U_f > U_s$ Schritt geben, ist er darin enthalten. Die geringe Ratenkonstante weist darauf hin.

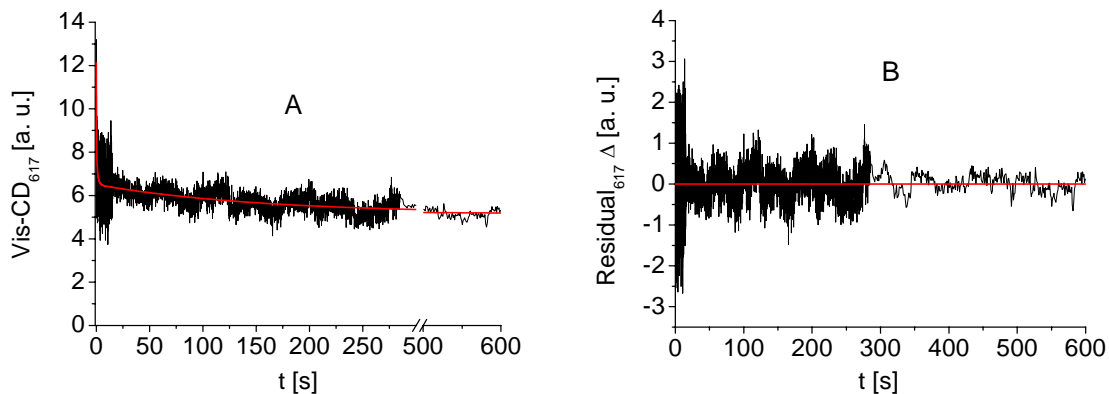


Abb. 3-100: Lokaler dreistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-96), bei 617 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell $a > b > c > d$ (—) und in B) Residuen;

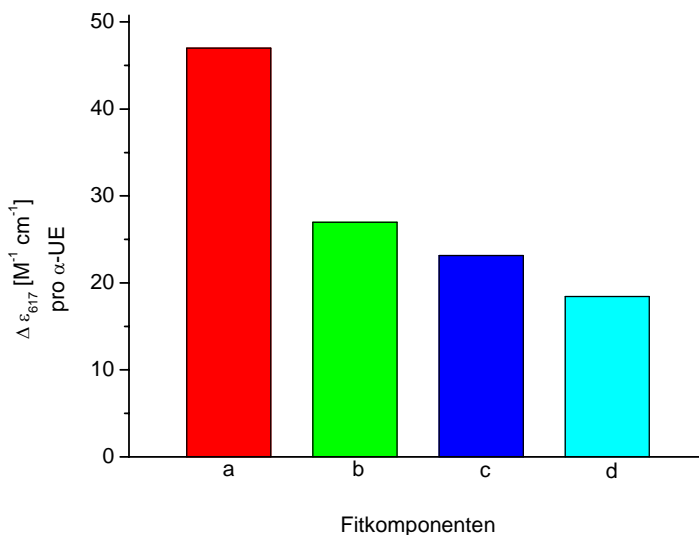


Abb. 3-101: Molarer Circular dichroismus ($\Delta \epsilon$) des lokalen Fits (Abb. 3-100) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-96) bei 617 nm. Zuordnung der Fitkomponenten: a (■), b (■), c (■) und d (■) siehe Text und Tab. 3-31.

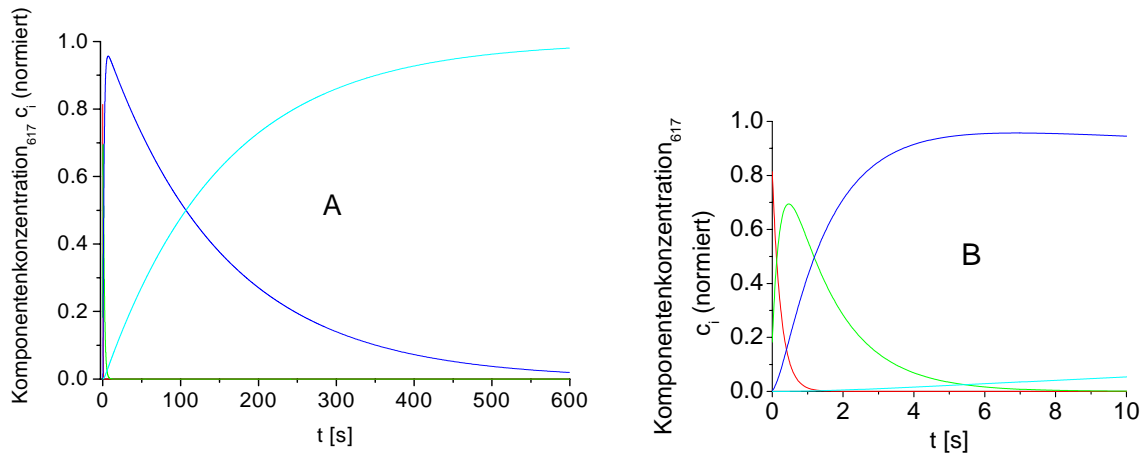


Abb. 3-102: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen lokalen Fit (Abb. 3-100) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-96), bei 617 nm gemessen mittels Vis-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—) und d (—) siehe Text und Tab 3-31.

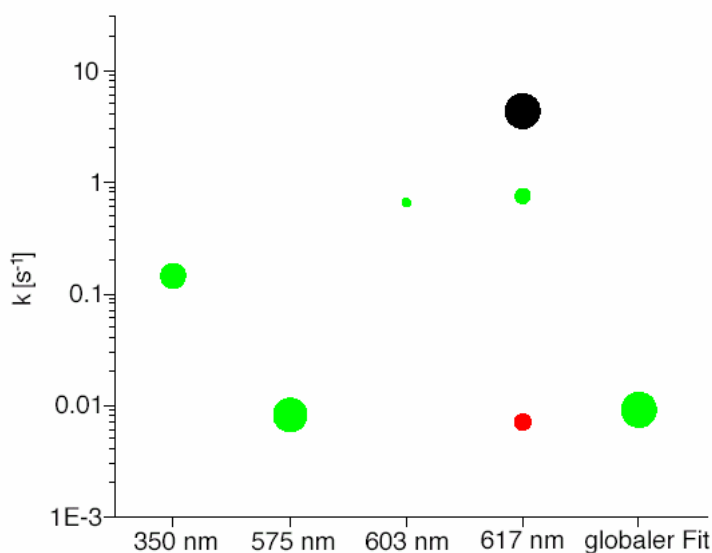


Abb. 3-103: Vergleich des globalen und der lokalen Fits der CD-Änderungen bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-96). Gezeigt sind die k -Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k_1 (●), k_2 (●) und k_3 (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-31, 3-32)

Zusammenfassung und Vergleich der lokalen und globalen Analyse

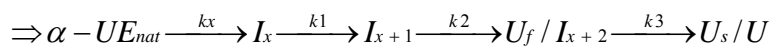
Wie bei der Interpretation der einzelnen Fits gesehen werden konnte, ist in dieser Messreihe die Zuordnung der einzelnen Fitkomponenten zu einem Entfaltungsschritt schwierig. Die Daten weisen eine sehr große Burstphase auf, wonach erst der späte Teil der Entfaltungsreaktion beobachtet wird. Trotzdem können folgende Aussagen gemacht werden. Bei der lokalen Analyse zeigt sich ein schneller, Entfaltungsschritt $a > b$ bei 617 nm. Im Vergleich der $\Delta\varepsilon$ -Werte der Fitkomponenten und der Vergleichswerte aus den steady-state

Messungen zeigt sich, dass die erste ermittelte Fitkomponente bereits ein Intermediat darstellt. Bei 350 nm, 575 nm und 603 nm konnte kein entsprechender Wert ermittelt werden. Wie bereits mehrfach beschrieben, kann jedoch nicht ausgeschlossen und muss in diesem Fall sogar davon ausgegangen werden, dass sich hinter dem Artefakt der Komponente a noch ein oder mehrere Entfaltungsschritte verbergen. Komponente b hat in allen drei Fällen gegenüber α -UE_{nat} stark abgenommen, d. h. es erfolgte eine weitgehende Entfaltung. Um wie viele Entfaltungsschritte es sich dabei in der Burstphase handelt und mit welcher Ratenkonstante diese assoziiert sind, lässt sich nicht sagen. Der Verlauf der Entfaltungskinetik, soweit er erfasst werden konnte, zeigt bei 350 nm 575 nm und 603 nm unterschiedliche Prozesse an, die k_2 Werte differieren deutlich zwischen den Wellenlängen (Tab. 3-32, Abb. 3-103). Bei 617 nm, dem positiven Extremum im Vis-CD Spektrum der α -UE_{nat}, ist die Entfaltungsreaktion besonders ausgeprägt sichtbar. Dies führt dazu, dass mehr Schritte unterschieden werden konnten, als bei den anderen Wellenlängen. Im Vergleich des globalen Fits mit den lokalen zeigt sich, dass der globale Fit die lokalen Unterschiede nicht erkennen lässt und auch bei der Anzahl der Entfaltungsschritte weniger differenziert ist (Abb. 3-103).

Folgende Modelle können unter Einbeziehung vorangegangener Messungen, überlegt werden:

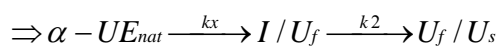
617 nm:

a>b entspricht einem frühen schnellen Entfaltungsschritt, aber höchstwahrscheinlich nicht dem ersten; b>c entspricht einem weiteren Entfaltungsschritt und c>d beinhaltet eventuell eine Veränderung im bereits entfalteten Protein. Im Burst geht die α -UE_{nat} in das Entfaltungsintermediat I_x (entspricht der Komponente a) über, mit wie vielen Schritte bleibt unklar.



575 nm, 603 nm, 350 nm und dem globalen Fit:

Fitkomponente b ist der erste eindeutig zur Entfaltungsreaktion zuordenbare $\Delta\varepsilon$ -Wert (I_x). Auch hier wird der Übergang von α -UE_{nat} zu I nicht erfasst und/oder ist vom Messartefakt überlagert. Wie viele unbekannte Entfaltungsschritte in der Totzeit der stop-flow Apparatur und im Schritt a>b stecken bleibt unbekannt. Komponente b wurde dabei für die unterschiedlichen Analysen unterschiedlich interpretiert, I oder U_f.



3.9.4.1.3. Emission

Für die Analyse der Emissionsdaten der α -UE war ein dreistufiger Fit der passendste (Abb. 3-104). Ein zweistufiger Fit hatte größere Fehlerabweichungen, ein mehr als dreistufiger Fit ist nicht mehr stabil möglich. Die relativen Amplituden $a > b$, $b > c$ etc. beziehen sich auf die Gesamtamplitude (Kap. 2.3.5.). Die entfaltete α -UE hat keine messbare Emission mehr. Es wurden kinetische Vergleichsmessungen, Verdünnung in KPP ohne Harnstoff, durchgeführt. Die ermittelte Intensität ist ähnlich, wie die der Fitkomponente a ($\approx 10^6$), deshalb wurde die Fitkomponente a als natives Protein in die Entfaltungskinetik einbezogen.

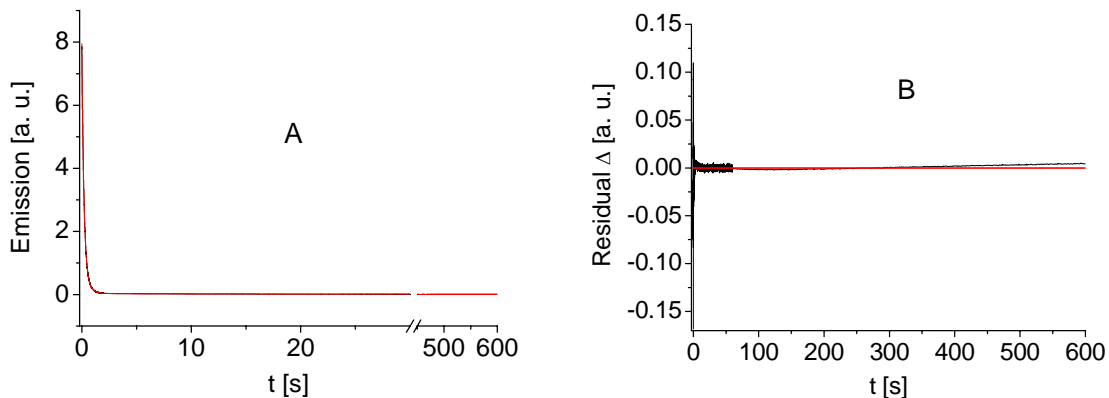


Abb. 3-104: Rohdaten und dreistufiger Fit der Emissionsänderung bei der Entfaltung der α -UE, Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms; Time base: 500 μ s Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 20 ms bis 60 s, dann 1s bis 600 s; Anregung bei 580 nm, Cut-off Filter bei 630 nm. Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell $a > b > c > d$ (—) und in B) Residuen;

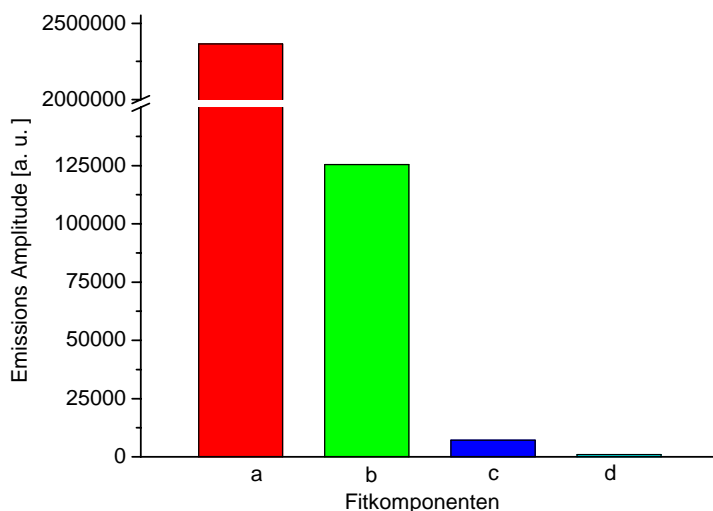


Abb. 3-105: Emissions Amplituden des dreistufigen Fits der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-104). Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■), c (■) und d (■) siehe Text.

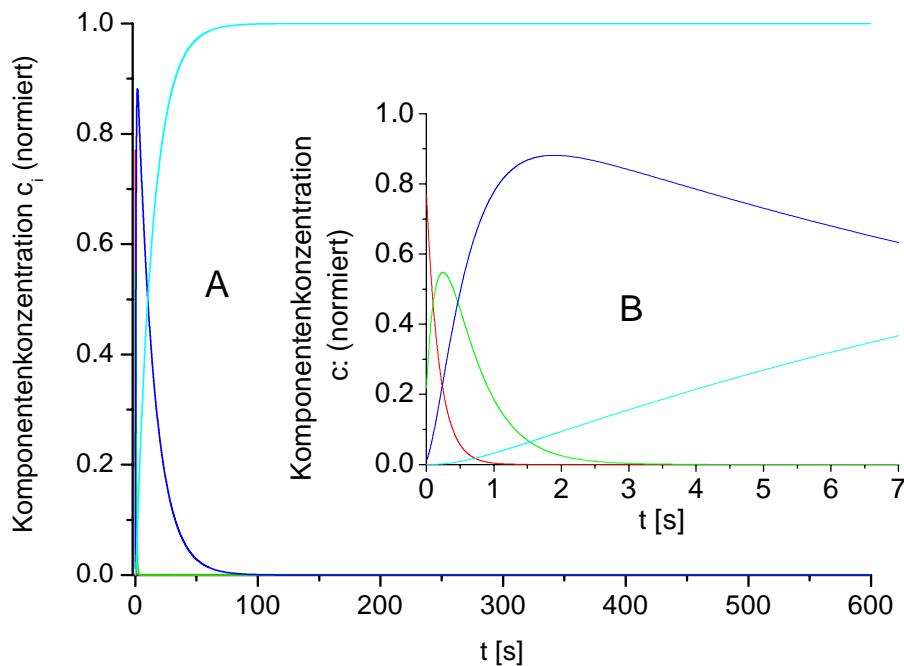


Abb. 3-106: Konzentrationsänderung der Fitkomponenten des dreistufigen Fits der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-104) gemessen mittels Emission. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s; B) Ausschnitt der ersten 7 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—) und d (—) siehe Text.

k_1 [s^{-1}]	$A_{a/b}$ rel.	k_2 [s^{-1}]	$A_{b/c}$ rel.	k_3 [s^{-1}]	$A_{c/d}$ rel.
$5,22 \pm 0,009$	0,947	$2,04 \pm 0,03$	0,050	$0,07 \pm 0,005$	0,003

Tab. 3-33: Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{a/b}$ rel. etc., Kap. 2.3.5.) der Analyse der Emissionsmessungen der Entfaltung der α -UE mit dem Fitmodell:

$a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d$, die relativen Amplituden beziehen sich auf die vorherige Fitkomponente im Verhältnis zur Gesamtamplitude (siehe Text);

Im ersten Schritt, $a > b$, mit einer schnellen Ratenkonstante ($\approx 5 \text{ s}^{-1}$) erfolgt eine Amplitudenabnahme von $\approx 95\%$ (Tab. 3-33, Abb. 3-105). Der zweite und immer noch schnelle Schritt ($\approx 2 \text{ s}^{-1}$) hat nur noch eine geringe Amplitudenabnahme von $\approx 5\%$. Der letzte Schritt mit noch einer minimalen Amplitudenabnahme von $\approx 0,3\%$, ist um ca. das 28-fache langsamer, als der vorherige ($\approx 0,007 \text{ s}^{-1}$). Der Verlauf der Komponentenkonzentration (Abb. 3-106) zeigt, dass die Reaktion nach ca. 100 s abgeschlossen ist. Nachdem in der Emission keine Veränderung im bereits entfaltenen Protein gesehen werden kann, da entfaltetes PC keine messbare Emission mehr aufweist (Kap. 1.8., 3.8., 3.9.2.3.), stellt auch der letzte Schritt, $c > d$ eine Entfaltung dar. Im Verhältnis scheint diese geringe Amplitudenabnahme fast zu gering, um noch als Entfaltungsschritt interpretiert werden zu können. Jedoch ist die Emissions Amplitude für c für sich genommen noch so ausgeprägt vorhanden, dass sie nicht als Rauschen abgetan werden kann. Die Messdrift, welche für die

angebliche Emission der Komponente d (Abb. 3-105) verantwortlich ist, tritt erst zu einem Zeitpunkt auf, zu dem die Komponente c bereits wieder verschwunden ist (Abb. 3-106). Folgende Interpretation der Fitkomponenten ist möglich: a entspricht der α -UE_{nat}, b und c je einem Intermediat und d der entfalteten UE.

Folgendes Reaktionsmodell wird aufgestellt: $\alpha - UE_{nat} \xrightarrow{k_1} I_1 \xrightarrow{k_2} I_2 \xrightarrow{k_3} U$

UV-CD

Für den UV-CD liegen keine auswertbaren Messwerte vor. Wie bereits oben bei der Absorptions- und Vis-CD Messreihe zu sehen ist, ergeben sich bei der isolierten α -UE, aufgrund ihrer Klebrigkeit, schnell Artefakte. Die Zugabe von Harnstoff mindert dies zwar, führt aber seinerseits wieder zur Artefaktbildung. Im UV-CD führte dies zu unauswertbaren Messwerten.

3.9.4.2. PC β -Untereinheit

3.9.4.2.1. Absorption

Globale Analyse

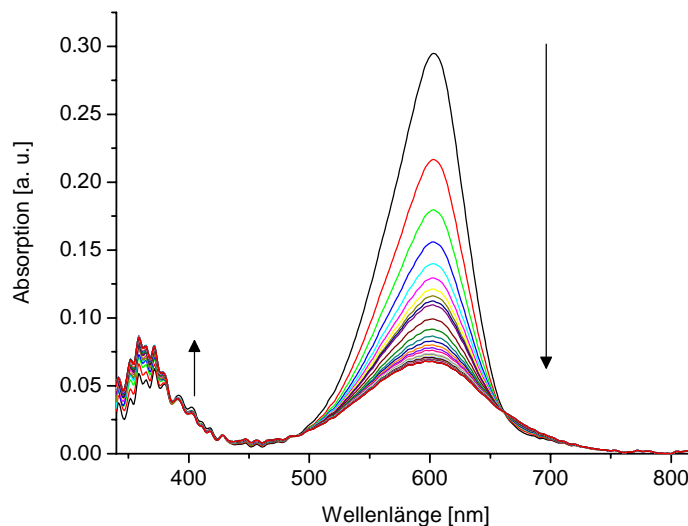


Abb. 3-107: Faktorisierte Rohdaten (Kap. 2.3.5.) der globalen Absorptionsänderung bei der Entfaltung der β -UE; Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms; Time base: 5 ms Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 100 ms bis 120 s, dann 1 s bis 600 s;

Bei der globalen Analyse der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-107) war ein fünfstufiger Fit (Abb. 3-108) nötig, um die Fehlerabweichung, vor allem in den ersten Sekunden der Messung, gering zu halten. Ein Fit mit noch mehr Komponenten brachte keine wesentliche Verbesserung mehr, obwohl die Residuen gezeigt bei 605 nm (Abb. 3-108B) noch systematische Abweichungen zeigen. Der Vergleich der Extinktionskoeffizienten (Tab. 3-34) und der gesamten Spektren (Abb. 3-109 und 3-40) der Fitkomponenten mit den Vergleichswerten aus den steady-state Messungen, ergab, dass die erste Fitkomponente im Rahmen der Fehlerabweichungen der nativen β -UE entspricht (die Abweichungen für 350 nm liegen im starken Rauschen der Messung im UV-Nahen Bereich begründet, Abb. 3-107). Deshalb wird der Fit $a>b>c>d>e>f$ (Tab. 3-34) eingeordnet. Das Spektrum und die Extinktionskoeffizienten der Fitkomponente f decken sich, im Rahmen der Fehlerabweichungen, mit denen der β -UE_{denat.} Die Fitkomponente e (Vergleich Spektren und Extinktionskoeffizienten) stellt die β -UE ebenfalls bereits im weitgehend entfalteten Zustand dar. Das bedeutet, dass der Schritt $e>f$ eine Veränderung im bereits entfalteten Protein widerspiegelt. Die Komponenten b , c und d sind demnach Entfaltungsintermediate. Der erste Schritt $a>b$ ist sehr schnell ($\approx 28 \text{ s}^{-1}$), der zweite um ca. ein fünffaches langsamer (Tab. 3-35).

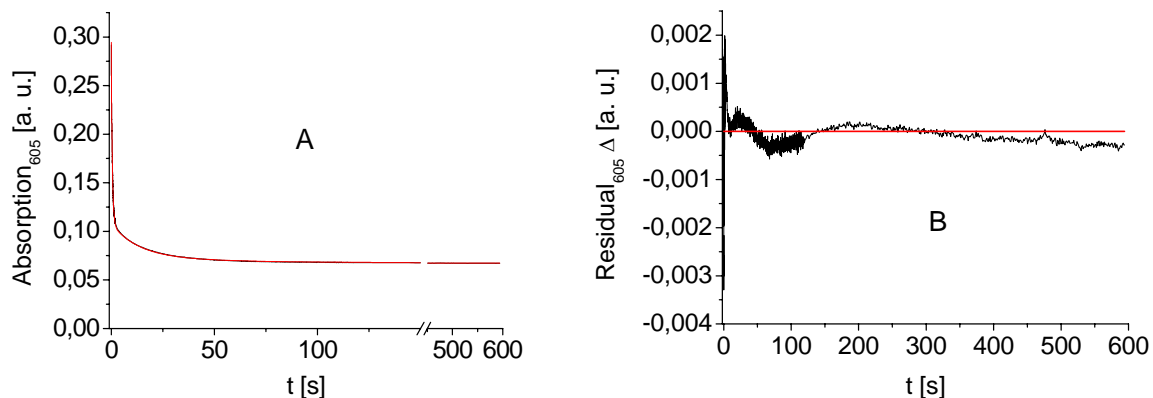


Abb. 3-108: Globaler fünfstufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung der β -UE (Abb. 3-107). Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell $a>b>c>d>e>f$ (—) und in B) Residuen. Gezeigt bei 605 nm.

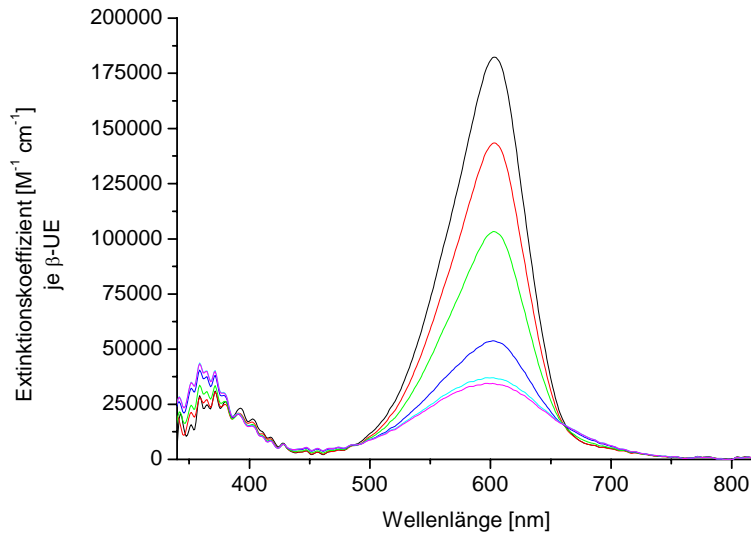


Abb. 3-109: Molare Absorptionsspektren des fünfstufigen globalen Fits (Abb. 3-108) der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-107). Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—), d (—), e (—) und f (—) siehe Text und Tab. 3-34.

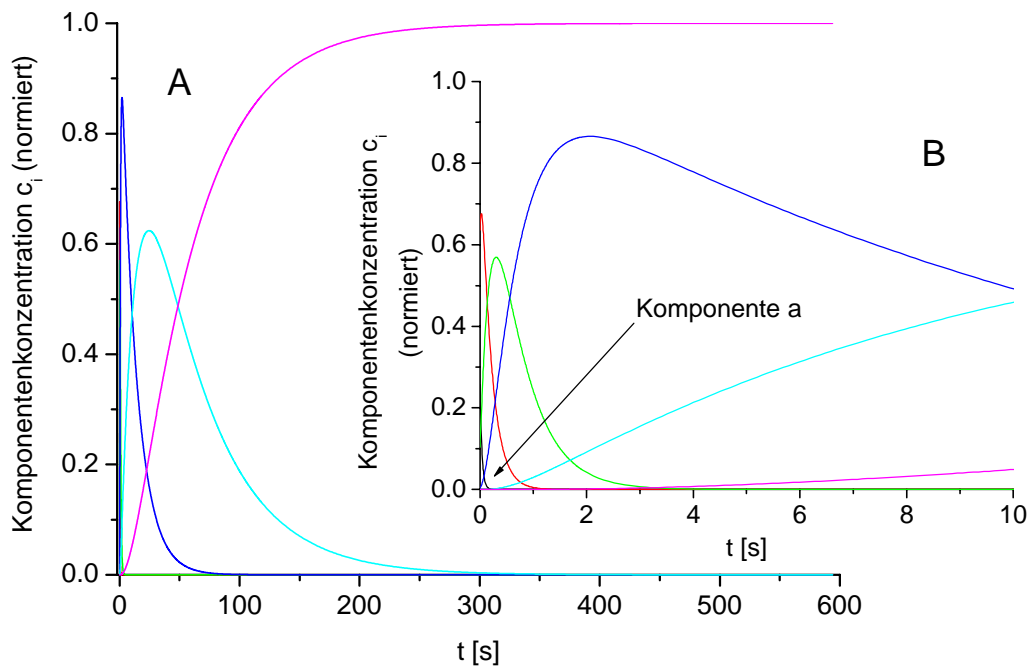


Abb. 3-110: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des fünfstufigen globalen Fit (Abb. 3-108) der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-107) gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—), d (—), e (—) und f (—) siehe Text und Tab. 3-34.

Die relative Absorptionsabnahme im langwelligen Bereich (und die allerdings stark verrauschte Zunahme im UV-Nahen Bereich) sind in den Schritten $a > b$ und $b > c$ ähnlich groß (Abb. 3-109; Tab. 3-34). Der darauf folgende Schritt $c > d$ hat eine etwas größere

Absorptionsabnahme im langwelligen mit einer etwa dreimal kleineren Ratenkonstante ($\approx 1,8 \text{ s}^{-1}$). Die Fitkomponente d ist bereits weitgehend entfaltet, aber nicht vollständig (Q-Wert ≈ 2 , allerdings bei hohem Rauschen in der Messung für den UV-Nahen Bereich, Abb. 3-107). Der Rest an Entfaltung $d > e$ ist noch mit deutlicher Absorptionsabnahme im langwelligen Bereich zu erkennen. Die dazugehörige Ratenkonstante ist dabei um ca. 25-mal geringer ($\approx 0,08 \text{ s}^{-1}$). Die vermutliche Veränderung im bereits entfalteteten Protein, Schritt $e > f$, dauert ca. noch einmal 4-mal so lange wie der vorausgehende Schritt ($\approx 0,02 \text{ s}^{-1}$) mit noch einer geringen Absorptionsabnahme im langwelligen Bereich. Entsprechend zeigt sich bei der Betrachtung der Konzentrationsänderung der Fitkomponenten (Abb. 3-110), dass die Reaktion nach erst ungefähr 350 s abgeschlossen ist.

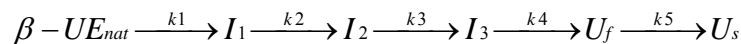
	Gemessene Wellenlänge [nm]	$\varepsilon [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ der steady-state Messungen		$\varepsilon [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ der Fitkomponenten der kinetischen Messungen						
		$\beta\text{-UE}_{\text{nat}}$	$\beta\text{-UE}_{\text{denat}}$	a	b	c	d	e	f	g
Lokaler Fit	350	37.200	73.900	42.600	51.600	68.300	71.400	74.700	73.700	
	580	149.400	30.600		116.000	92.800	70.500	43.000	36.600	30.900
	605	194.500	33.800		109.600	90.100	46.300	40.600	33.700	
Globaler Fit	350*	37.200	73.900	12.900	18.600	21.500	28.700	31.200	31.100	
	580	149.400	30.600	140.000	111.000	82.000	46.400	34.500	32.500	
	605	194.500	33.800	182.100	143.100	103.000	53.400	36.700	34.000	

Tab. 3-34: Extinktionskoeffizienten je UE, der Fitkomponenten der lokalen und des globalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung der β -UE; und kursiv die Vergleichswerte aus den steady-state Untersuchungen, (Details siehe Text). * die Werte für 350 nm aus dem globalen Fit weichen wegen des starken Rauschens der Messung stark von den Vergleichswerten ab, siehe Abb. 3-111.

Gemessene Wellenlänge [nm]	$A_{\beta\text{-UE}_{\text{nat/a}}}$ rel.	$k_1 [s^{-1}]$	$A_{\beta\text{-UE}_{\text{nat/b}}}$ rel.	$k_2 [s^{-1}]$	$A_{\beta\text{-UE}_{\text{nat/c}}}$ rel.	$k_3 [s^{-1}]$	$A_{\beta\text{-UE}_{\text{nat/d}}}$ rel.	$k_4 [s^{-1}]$	$A_{\beta\text{-UE}_{\text{nat/e}}}$ rel.	$k_5 [s^{-1}]$	$A_{\beta\text{-UE}_{\text{nat/f}}}$ rel.	$k_6 [s^{-1}]$	$A_{\beta\text{-UE}_{\text{nat/g}}}$ rel.
350	0,15	40,4 $\pm 1,71$	0,39	2,61 $\pm 0,025$	0,85	1,22 $\pm 0,026$	0,94	0,059 $\pm 0,000$ 3	1,03	0,002 $\pm 0,000$ 2	1		
580			0,28	24,3 $\pm 0,35$	0,48	4,99 $\pm 0,13$	0,67	1,79 $\pm 0,007$	0,90	0,14 $\pm 0,002$	0,95	0,04 $\pm 0,000$ 2	1
605			0,53	12,8 $\pm 0,086$	0,65	2,19 $\pm 0,002$	0,92	0,20 $\pm 0,003$	0,95	0,052 $\pm 0,000$ 2	1		
Globaler Fit	0,08 (bei 605 nm)	27,5 $\pm 2,59$	0,32 (bei 605 nm)	5,25 $\pm 0,46$	0,57 (bei 605 nm)	1,79 $\pm 0,02$	0,88 (bei 605 nm)	0,077 $\pm 0,002$	0,98 (bei 605 nm)	0,020 $\pm 0,001$	1 (bei 605 nm)		

Tab. 3-35: Ratenkonstanten mit dem dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{\beta\text{-UE}_{\text{nat/x}}}$, Kap. 2.3.5.) des globalen und der lokalen Fits der absorptionspektroskopischen Messungen der Entfaltung der β -UE mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e \xrightarrow{k_5} f \xrightarrow{k_6} g$. Die relativen Amplituden beziehen sich auf $\beta\text{-UE}_{\text{nat}}$ der steady-state Messungen (Kap. 3.8.).

Zusammenfassend kann folgendes Modell aufgestellt werden:



Lokale Analyse

Bei der lokalen Analyse der Entfaltung der β -UE (Abb. 3-111) bei 350 nm (Abb. 3-112 bis 3-114) war ein fünfstufiger Fit notwendig, um die Absorptionsabnahme, die der anfänglichen Zunahme folgt, zu erfassen. Anders als beim globalen Fit zeigten die Residuen dabei keine systematischen Abweichungen mehr (Abb. 3-112B). Ein Fit mit noch mehr Komponenten brachte keine weitere Verbesserung. Der Extinktionskoeffizient der Fitkomponente a hat gegenüber dem Extinktionskoeffizienten der β -UE_{nat} aus den steady-state Messungen bereits um 15% zugenommen. Im Rahmen der Fehlerabweichungen kann der ϵ -Wert für a (Tab. 3-34) aber noch β -UE_{nat} zugeordnet werden. Die sehr schnelle Ratenkonstante für den ersten ermittelten Schritt ($\approx 40 \text{ s}^{-1}$) spricht ebenfalls für einen ersten Entfaltungsschritt, deshalb wird der Fit a>b>c>d>e>f eingeordnet (Tab. 3-34). Sie entspricht einer Absorptionszunahme von 24%. Die größte Veränderung in der Absorption findet man im zweiten Schritt (b>c) mit einer weiteren 46%-igen Zunahme. Die Ratenkonstante, obwohl immer noch recht groß ($\approx 2,6 \text{ s}^{-1}$), ist 15-mal geringer (Tab. 3-35). Der dritte Schritt c>d, assoziiert mit etwa einer halb so großen Ratenkonstante ($\approx 1,2 \text{ s}^{-1}$), geht mit einer 9%-igen Absorptionszunahme einher. Im vierten Schritt d>e nimmt die Absorption, mit einer um etwa 20-mal geringeren Ratenkonstante ($\approx 0,06 \text{ s}^{-1}$), um noch einmal 9%, zu. Als letzten Schritt e>f, erfolgt eine Absorptionsabnahme von 3%, die auch nach 600 s Messzeit noch nicht abgeschlossen ist (Abb. 3-114). k_5 ist dementsprechend unsicher. Dieser Übergang kann aufgrund der Absorptionsabnahme einer Veränderung im bereits entfalteten Protein zugeschrieben werden. Alle vorherigen Übergänge stellen, nach den bisher angewandten Kriterien Entfaltungsschritte dar, d. h. a entspricht β -UE_{nat}, b, c und d einem I, e U_f und f U_s.

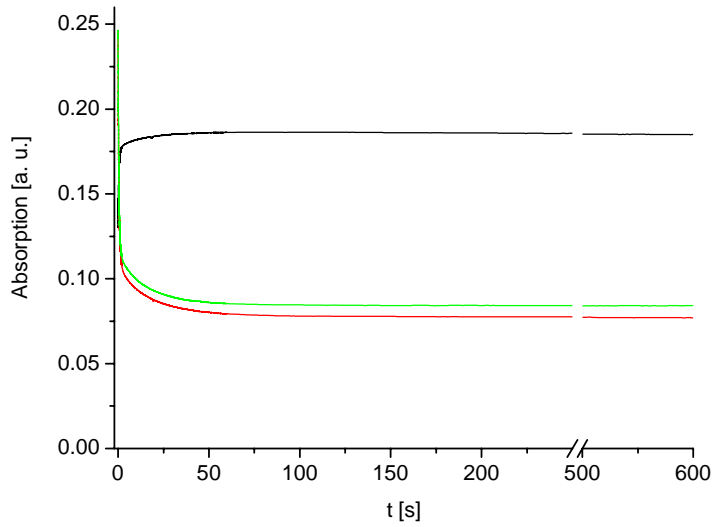


Abb. 3-111: Rohdaten der lokalen Absorptionsänderungen bei der Entfaltung der β -UE; Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms; Time base: 500 μ s Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 20 ms bis 60 s, dann 1 s bis 600 s; Messungen bei 580 nm (—), 605 nm (—) und 350 nm (—).

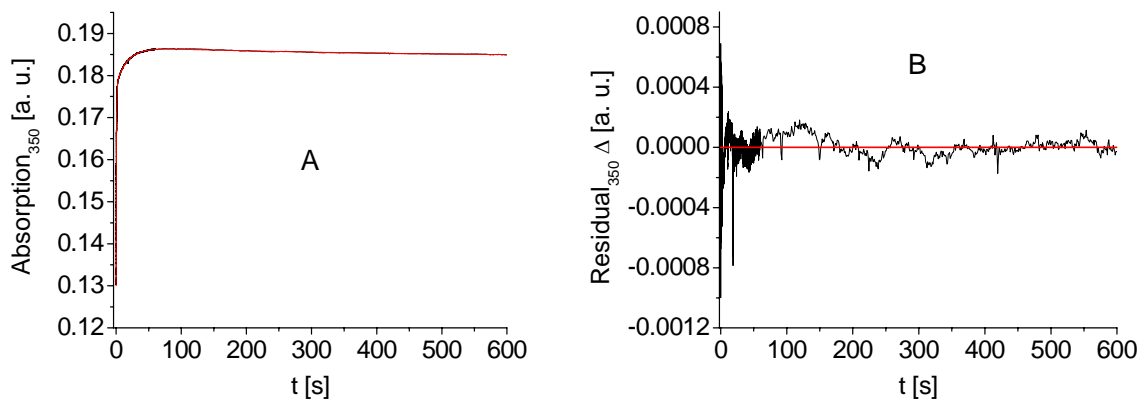


Abb. 3-112: Lokaler fünfstufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung der β -UE (Abb. 3-111) bei 350 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell $a>b>c>d>e>f$ (—) und in B) Residuen.

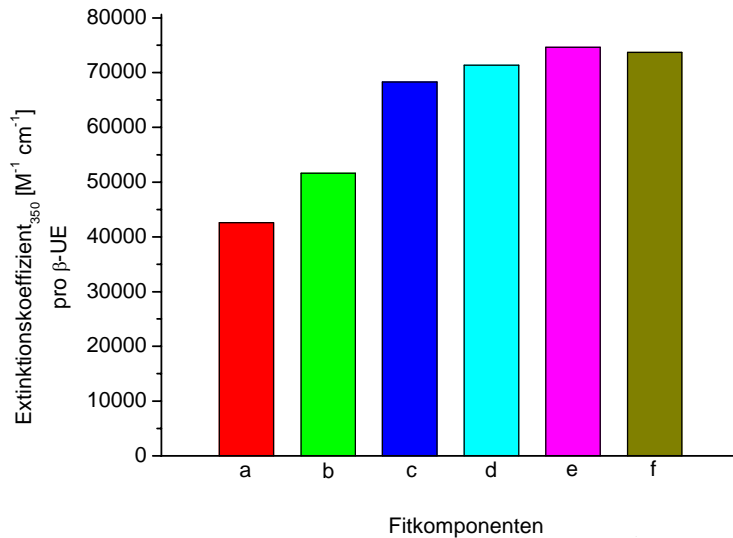


Abb. 3-113: Extinktionskoeffizienten des fünfstufigen lokalen Fits (Abb. 3-112) der Entfaltungskinetik von der β -UE (Abb. 3-111) bei 350 nm. Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■), c (■) d (■) e (■) und f (■) siehe Text und Tab. 3-34.

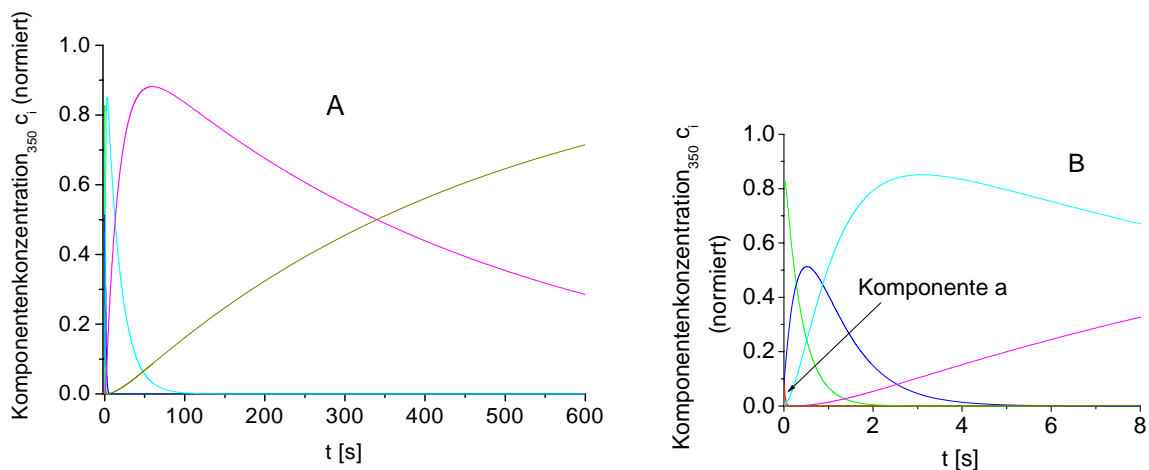


Abb. 3-114: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des fünfstufigen lokalen Fits (Abb. 3-112), der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-111) bei 350 nm gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 8 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—) d (—) e (—) und f (—) siehe Text und Tab. 3-34.

Bei 580 nm sorgte ebenfalls eine fünfstufige Analyse für die besten Fitergebnisse (Tab. 3-34 und 3-35). Der erste ermittelte Schritt ist mit einer sehr großen Ratenkonstante assoziiert ($\approx 24 \text{ s}^{-1}$) und hat dabei eine Absorptionsabnahme von 20%. Die Größe der Ratenkonstante würde auf einen ersten Entfaltungsschritt hindeuten. Dagegen spricht aber die deutlich geringere Absorption der ersten Fitkomponente gegenüber $\beta\text{-UE}_{\text{nat}}$ (28% geringer). Es gibt zwei Möglichkeiten die Daten zu interpretieren. Entweder erfolgt die Orientierung an der Größe der Ratenkonstanten, damit müsste die Abweichung der $\Delta\varepsilon$ -Werte der Fitkomponenten

zu den $\Delta\varepsilon$ -Werten aus den steady-state Messungen, ignoriert werden. Oder der Fit wird an Hand der $\Delta\varepsilon$ -Werte eingeordnet, wie bisher normalerweise geschehen. Nachdem bei unterschiedlichen Wellenlängen durchaus verschiedene Prozesse beobachtet wurden, könnte dies auch hier der Fall sein und die Größe der Ratenkonstanten für die einzelnen Entfaltungsschritte bei den unterschiedlichen Wellenlängen voneinander abweichen. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die $\Delta\varepsilon$ -Werte vertrauenswürdig sind und die erste Fitkomponente bereits ein Entfaltungsintermediat darstellt, deshalb wird der Fit $b > c > d > e > f > g$ eingeordnet. Im zweiten Schritt nimmt die Absorption um weitere 19% ab und ist dabei mit einer um ca. 5-fach langsameren Ratenkonstante assoziiert ($\approx 5 \text{ s}^{-1}$). Der nächste Schritt, um ca. dreimal langsamer ($\approx 1,8 \text{ s}^{-1}$), hat eine Absorptionsabnahme von 23%, gefolgt von einem Entfaltungsschritt mit weiteren 5% Absorptionsabnahme, mit einer ca. 13-mal langsameren Ratenkonstante ($\approx 0,14 \text{ s}^{-1}$). Der letzte Reaktionsschritt, etwa dreimal langsamer ($\approx 0,04 \text{ s}^{-1}$), hat ebenfalls noch eine Absorptionsabnahme von 5%. Die Fitkomponente f kann aufgrund ihres Extinktionskoeffizienten als weitgehend entfaltet angesehen werden. Die geringe Größe der Ratenkonstante k_6 spricht ebenfalls, so wie sie bisher meist interpretiert wurde, für eine Veränderung im bereits entfaltetem Protein. Mit Gewissheit kann dies jedoch nicht belegt werden.

Die lokale Analyse bei 605 nm war mit einem vierstufigen Fit ausreichend, mehr Komponenten brachten keine Verbesserung mehr (Tab. 3-34 und 3-35). Der erste ermittelte Reaktionsschritt hat eine große Ratenkonstante ($\approx 13 \text{ s}^{-1}$), im Vergleich zu bei 580 nm und vor allem 350 nm, ist sie aber deutlich geringer (Tab. 3-35, Abb. 3-115). Die Absorption der ersten Fitkomponente ist gegenüber $\beta\text{-UE}_{\text{nat}}$ 53% geringer. Es gelten die gleichen Überlegungen wie bei 580 nm und es kann davon ausgegangen werden, dass diese Fitkomponente bereits teilweise einem entfaltetem Intermediat entspricht, deshalb wird der Fit $b > c > d > e > f$ eingeordnet. Die Absorption im Schritt $b > c$ reduziert sich um 12%. Bei $c > d$ reduziert sie sich um weitere 27%, assoziiert mit einer etwa 6-mal kleineren Ratenkonstante ($\approx 2 \text{ s}^{-1}$). Gefolgt wird dieser Schritt von nur noch einer geringen Absorptionsabnahme um 3%, mit einer zehnfach kleineren Ratenkonstante ($\approx 0,2 \text{ s}^{-1}$). Der letzte Schritt $e > f$ ist 4-mal langsamer als der vorherige ($\approx 0,05 \text{ s}^{-1}$), mit noch 5% Absorptionsabnahme. Auch hier entspricht die vorletzte Fitkomponente bereits dem weitgehend entfaltetem Protein.

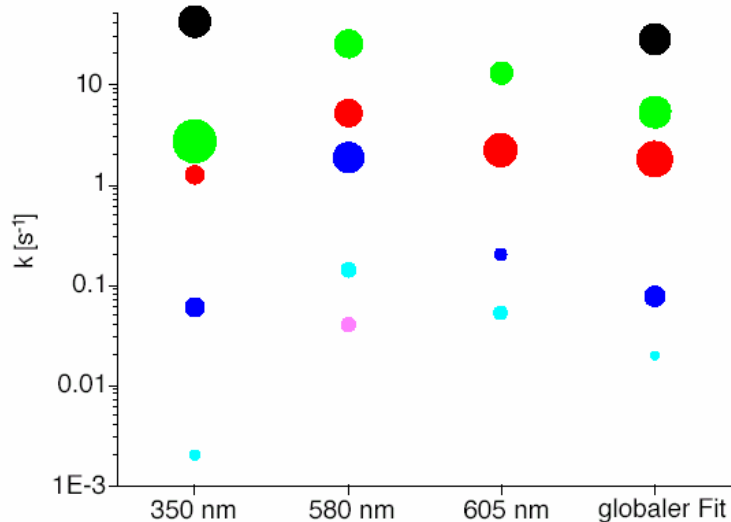
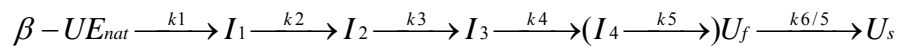


Abb. 3-115: Vergleich des globalen und der lokalen Fits der Absorptionsänderungen bei der Entfaltung der β -UE (Abb. 3-107 und 3-111). Gezeigt sind die k -Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k_1 (●), k_2 (●), k_3 (●), k_4 (●), k_5 (●) und k_6 (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-34, 3-35).

Vergleich der lokalen und globalen Analysen

Davon ausgehend, dass bei der Wellenlänge 580 nm und vor allem 605 nm als erste Fitkomponente bereits ein Entfaltungsintermediat analysiert wurde zeigt sich, dass bei 350 nm andere Prozesse als bei 580 nm und 605 nm gesehen werden (Abb. 3-115, Tab. 3-34). Der schnellste erfasste Schritt bei 580 nm und 605 nm ist demnach der zweite (oder ein noch späterer) Entfaltungsschritt, und damit 5 bis 10-mal schneller als k_2 bei 350 nm (Abb. 3-115, Tab. 3-35). Auch die k -Werte 3-5 sind bei 350 nm deutlich geringer als bei 580 nm und 605 nm. Wie bereits beschrieben sind die Größen der rel. Amplituden ebenfalls anders verteilt (Abb. 3-115, Tab. 3-35). Da bei 580 nm und 605 nm offensichtlich noch, zumindest ein, früher Entfaltungsschritt im Burst verborgen ist, heißt das, dass bei 605 nm zumindest genauso viele Stufen der Entfaltung gesehen werden, wie bei 350 nm und dem globalen Fit. Bei 580 nm ist zumindest ein Entfaltungsschritt mehr zu sehen. Dieser zusätzliche Schritt ist im ersten Drittel des Reaktionsverlaufes angesiedelt (Tab. 3-35: Vergleich der rel. Amplituden bei 580 nm und 605 nm). Im Vergleich der rel. Amplituden und der Ratenkonstanten wird deutlich, dass dieses zusätzliche Intermediat den einzigen Unterschied zwischen 580 nm und 605 nm darstellt. Da aber die erste ermittelte Fitkomponente bei 605 nm um 25% geringer gegenüber β -UE_{nat} ist als die bei 580 nm, ist nicht auszuschließen, dass bei 605 nm das zusätzliche Intermediat, wie es bei 580 nm erfasst wurde, bei 605 nm im Burst steckt.

Für die lokale Analyse kann folgendes Modell aufgestellt werden:



wobei im langwelligen zumindest teilweise andere Prozesse beobachtet werden, als im kurzwelligen.

Beim Vergleich des lokalen und globalen Fits zeigt sich, dass die Unterschiede bei den verschiedenen Wellenlängen beim globalen Fit unberücksichtigt bleiben. Dies wird auch in den systematischen Abweichung der Residuen, gezeigt bei 605 nm des globalen Fits deutlich (Abb. 3-108B). Er zeigt, dass die Entfaltung des Proteins ein komplexerer Vorgang ist, um ihn als nur einen konzertierten Proteinentfaltungsweg zu beschreiben (näheres dazu siehe in der Diskussion).

3.9.4.2.2. Vis-CD

Ein globaler Fit für die Vis-CD Messungen bei der β -UE war aus software-technischen Gründen nicht möglich. Die Baseline der Messung bei 605 nm (Abb. 3-116) musste gegenüber denen bei 350 nm und 580 nm etwas modifiziert werden um gute Messergebnisse zu erhalten. Aufgrund der unterschiedlichen Baselines war es aber nicht mehr möglich, alle drei Messkurven gemeinsam in das Analyseprogramm Specfit zu laden und somit global auszuwerten. Das Auftreten von unsinnigen physikalischen Werten (Begründung erfolgt bei der Analyse der Daten unten) für die erste Fitkomponente, wie sie bei den Vis-CD Messungen der α -UE und bei der Entfaltung von PC_{mono} aufgetreten sind, ist auch bei dieser Messreihe wieder teilweise der Fall. Mögliche Ursachen für diesen Artefakt sind im Kapitel Kap. 3.6. und 3.9.3. ausführlich dargestellt. Die Rohdaten sind in Abb. 3-116 gezeigt.

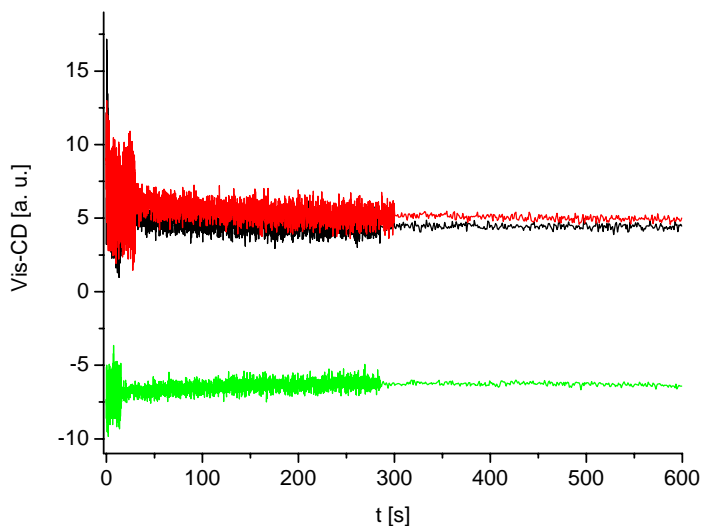


Abb. 3-116: Rohdaten der lokalen CD-Änderung bei der Entfaltung der β -UE. Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms, Time base: 10 ms Messintervall (20 ms bei 605 nm) bis 30 s Messzeit, dann 100 ms bis 300 s, dann 1 s bis 600 s; Messungen bei 580 nm (—), 605 nm (—) und 350 nm (—);

Bei der lokalen Analyse bei 350 nm wurde ein zweistufiger Fit durchgeführt (Tab. 3-36 und 3-37). Bei einem dreistufigen Fit ergab sich keine Verbesserung. Um den Verlauf der Entfaltung mit den Ergebnissen von 580 nm und 605 nm direkt vergleichen zu können, wurde der Fit $b > c > d$ (siehe Tab. 3-36) eingeordnet, da bei 580 nm als erste Fitkomponente a ein unsinniger physikalischer Wert ermittelt wurde (siehe unten). Beim Vergleich der $\Delta\varepsilon$ -Werte der Fitkomponenten (Tab. 3-36) mit den Vergleichswerten aus den steady-state Messungen zeigt sich, dass der $\Delta\varepsilon$ -Wert für die Fitkomponente b gegenüber β -UE_{nat} erhöht ist. Da die erste Fitkomponente bei den Messungen im Vis-CD teilweise auch bei den anderen Messreihen (PC_{tri}, PC_{mono}, α -UE) stärker als bei der Absorption oder dem UV-CD abweichen, wird die Fitkomponente b im Rahmen der Messungenauigkeit als β -UE_{nat} angenommen. Es folgen zwei Entfaltungsschritte: Der erste Schritt ist auffällig langsamer ($\approx 0,9 \text{ s}^{-1}$, Tab. 3-37), als die mittels Absorption und Emission sichtbaren Prozesse. Er hat eine CD-Abnahme von 41% (Tab. 3-37). Der zweite Schritt $c > d$ ($\approx 0,012 \text{ s}^{-1}$) ist 75-fach langsamer. Er liegt dabei in einem Zeitbereich bei dem bisher meist nur noch Veränderungen im bereits vollständig entfalteten Protein angenommen wurden. In diesem Fall reduziert sich der CD noch um 59% und muss deshalb einem Entfaltungsschritt zugeordnet werden.

Bei der lokalen Analyse bei 580 nm (Abb. 3-117 bis 3-119), ist ein dreistufiges Modell erforderlich, um die Entfaltung der β -UE mit möglichst geringer Fehlerabweichung zu fitten. Dabei stellt die Fitkomponente a aufgrund des negativen $\Delta\varepsilon$ -Wertes, (Tab. 3-36, Abb. 3-118)

und des ungewöhnlich ansteigenden Kurvenverlaufs zu Beginn der Messung (Abb. 3-117A) einen unsinnigen physikalischen Wert dar. Deshalb muss der erste Reaktionsschritt unbeachtet bleiben. Der Fit wird demnach $a>b>c>d$ eingeordnet (Tab. 3-36, Abb. 3-118). Auch hier zeigt sich beim Vergleich der $\Delta\varepsilon$ -Werte der Fitkomponenten mit den Vergleichswerten aus den steady-state Messungen (Tab. 3-36), dass mit Fitkomponente b die β -UE_{nat} erfasst wurde. Der $\Delta\varepsilon$ -Wert der Fitkomponente b ist zwar gegenüber β -UE_{nat} erhöht, kann aber im Rahmen der Messungengenauigkeit (siehe oben) der β -UE_{nat} zugeordnet werden. Anschließend folgen zwei Reaktionsschritte: Der erste Entfaltungsschritt $b>c$ hat ebenfalls eine auffällig kleine Ratenkonstante ($\approx 0,8 \text{ s}^{-1}$, Tab. 3-37) im Vergleich zu den mittels in der Absorption und der Emission erfassten Vorgänge. Der CD reduziert sich hierbei um 89%. Der zweite Schritt ist etwa 52-mal langsamer ($\approx 0,016 \text{ s}^{-1}$) hat aber noch eine CD-Abnahme von 11% und wird deshalb ebenfalls der Entfaltung zugeordnet. Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich hinter dem Artefakt der Komponente a noch ein Entfaltungsschritt verbirgt. In diesem Fall kann aber die Komponente b sehr eindeutig der β -UE_{nat} zugeordnet werden, so dass nicht davon auszugehen ist, dass sich hinter dem Artefakt noch Entfaltungsreaktionen verbergen. Die Entfaltungsreaktion ist nach ca. 600 s abgeschlossen (Abb. 3-119).

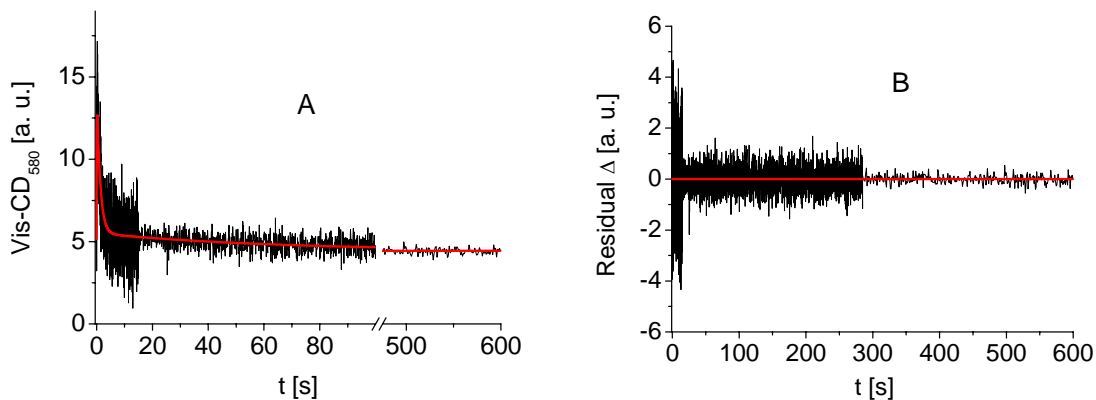


Abb. 3-117: Lokaler dreistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung der β -UE (Abb. 3-116), bei 580 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell $a>b>c>d$ (—) und in B) Residuen.

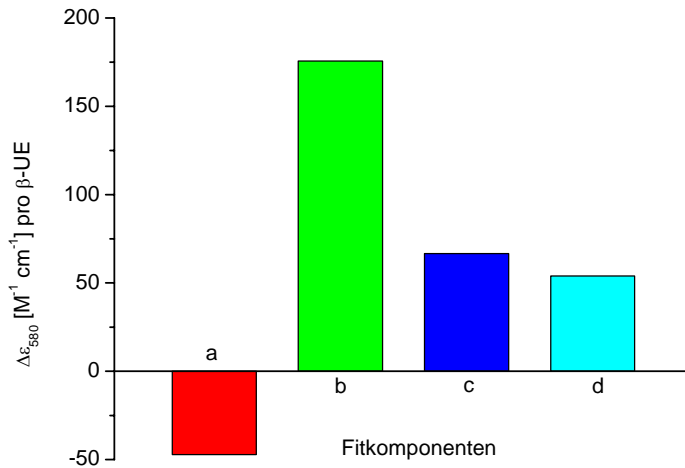


Abb. 3-118: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des dreistufigen lokalen Fits (Abb. 3-117) der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-116) bei 580 nm. Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■), c (■) und d (■) siehe Text und Tab. 3-36.

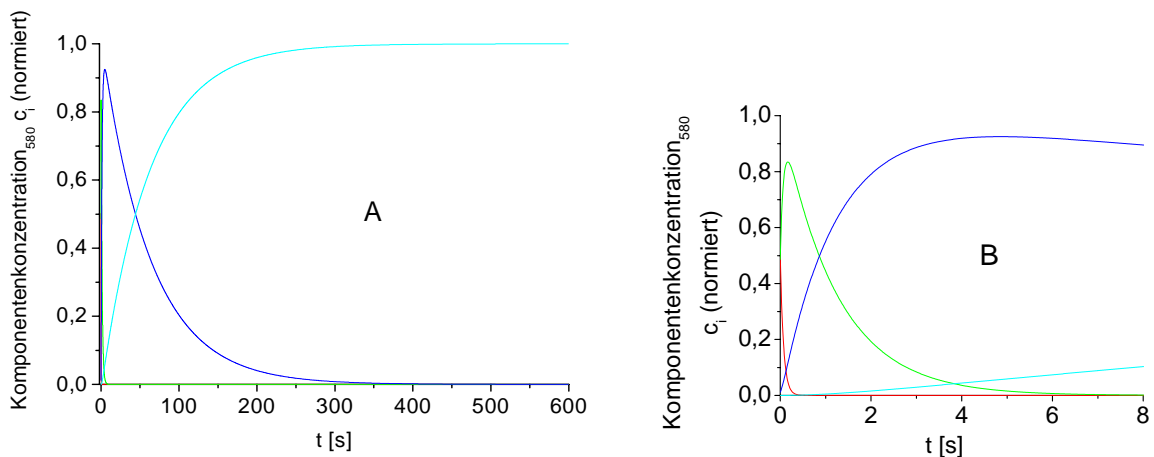


Abb. 3-119: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen lokalen Fits (Abb. 3-117) der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-116), bei 580 nm gemessen mittels Vis-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 8 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—) und d (—) siehe Text und Tab. 3-36.

Bei 605 nm wurde der zweistufige Fit, als der geeignete ausgewählt, um die Entfaltung zu beschreiben (Tab. 3-36 und 3-37). Der dreistufig Fit (Daten nicht gezeigt) schien ebenfalls, unter den bekannten Kriterien, gut geeignet zu sein, die Messkurve zu analysieren. Er brachte eine Differenzierung des ersten Entfaltungsschrittes. Jedoch führte er zu keiner wesentlichen Reduzierung der Fehlerabweichungen, deshalb wurde der zweistufige Fit verwendet. Die erste Fitkomponente ist in ihrem $\Delta\epsilon$ -Wert gegenüber β -UE_{nat}, erhöht (Tab. 3-36), wird aber, entsprechend der Analyse bei 350 nm und der zweiten Fitkomponente bei 580 nm, der β -UE_{nat} zugeordnet. Ein physikalisch unsinniger Wert tritt hier nicht auf. Um die Entfaltungskinetiken der drei Wellenlängen direkt vergleichen zu können, wird der Fit b>c>d

(Tab. 3-36) zugeordnet (Begründung entsprechend der bei 350 nm). Der erste Entfaltungsschritt hat eine ähnlich große Ratenkonstante ($\approx 0,7 \text{ s}^{-1}$, Tab. 3-37) wie bei 350 nm und 580 nm und ist damit ebenfalls um ein Vielfaches langsamer als der erste gemessene Entfaltungsschritt in der Absorption und der Emission. Der CD reduziert sich dabei um 62%. Der zweite Schritt, mit einer CD-Abnahme von weiteren 38%, stellt dabei noch deutlich Entfaltung dar. Er ist mit einer kleinen Ratenkonstante ($\approx 0,008 \text{ s}^{-1}$) assoziiert.

Gemessene Wellenlänge [nm]	$\Delta\epsilon [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ der steady-state Messungen		$\Delta\epsilon [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ der Fitkomponenten der kinetischen Messungen			
	$\beta\text{-UE}_{\text{nat}}$	$\beta\text{-UE}_{\text{denat}}$	a	b	c	d
350	-85	-76		-93	-86	-76
580	143	52	-48	176	67	54
605	93	60		103	77	61

Tab. 3-36: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) je UE, der Fitkomponenten der lokalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung der β -UE; und kursiv die Vergleichswerte aus den steady-state Messungen (Details siehe Text).

Gemessene Wellenlänge [nm]	$A_{\beta\text{-UE}_{\text{nat}}/a}$	$k_1 [s^{-1}]$	$A_{\beta\text{-UE}_{\text{denat}}/b}$	$k_2 [s^{-1}]$	$A_{b/c}$	$k_3 [s^{-1}]$	$A_{c/d}$
350			-0,89	$0,90 \pm 0,26$	0,78	$0,012 \pm 0,001$	1,1
580	2,1	$13,8 \pm 1,50$	-0,34	$0,83 \pm 0,03$	1,2	$0,016 \pm 0,002$	0,15
605			-0,31	$0,66 \pm 0,085$	0,81	$0,008 \pm 0,0001$	0,5

Tab. 3-37: Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{x/x+1}$ rel., Kap. 2.3.5.) der lokalen Fits der CD Messungen bei der Entfaltung der β -UE mit dem Fitmodell:

$(a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d)$. Die relativen Amplituden beziehen sich auf die $\beta\text{-UE}_{\text{nat}}$ aus den steady-state Messungen (Kap. 3.8.).

Vergleich der lokalen Analyse der einzelnen Wellenlängen:

Bei allen drei gemessenen Wellenlängen wurden zwei Entfaltungsschritte analysiert und es konnte keine Veränderung im bereits entfaltenen Protein gesehen werden (Abb. 3-120, Tab. 3-36, 3-37). Die Größe der Ratenkonstanten ist bei den jeweiligen Schritten etwa gleich groß. Dies deutet darauf hin, dass bei allen drei Wellenlängen die gleichen Prozesse der Entfaltung gesehen werden. Die unterschiedliche Ausprägung der CD-Abnahme zeigt, dass sich die einzelnen Schritte bei den verschiedenen Wellenlängen unterschiedlich stark auswirken. Abweichend von den bisherigen Ergebnissen ist, dass die Ratenkonstante in der Größenordnung von 10^{-2} s^{-1} in diesem Fall noch der Entfaltung und nicht einer Veränderung im bereits entfaltenen Protein zugeordnet wird.

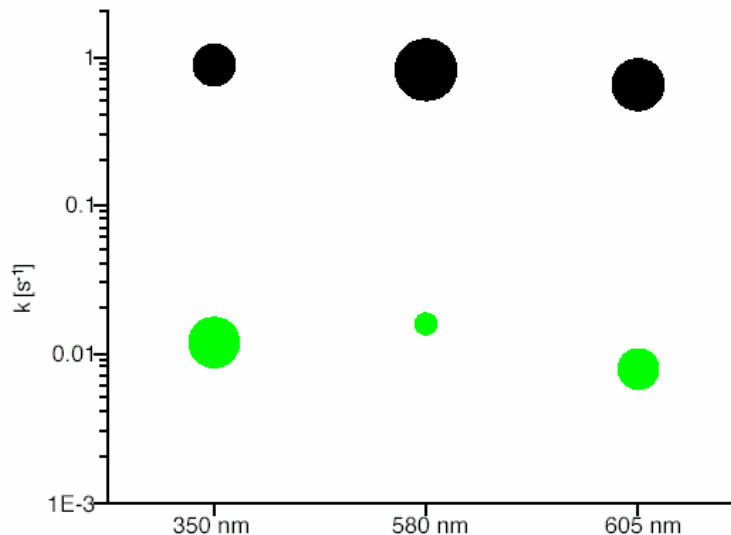


Abb. 3-120: Vergleich des globalen und der lokalen Fits der CD-Änderungen bei der Entfaltung der β -UE (Abb. 3-116). Gezeigt sind die k -Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k_1 (●) und k_2 (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-36, 3-37).

Folgendes Modell kann aufgestellt werden: $\beta - UE_{nat} \xrightarrow{k_x} I_x \xrightarrow{k_2} I \xrightarrow{k_3} U$

3.9.4.2.3. Emission

Bei der Entfaltungskinetik der β -UE, gemessen mittels Emission (Abb. 3-121), war ein fünfstufiger Fit (Abb. 3-121) nötig. Die erste Fitkomponente a wurde aufgrund der Größe ihrer Fluoreszenz (Abb. 3-122) und der sehr großen Ratenkonstante ($\approx 37 \text{ s}^{-1}$, Tab. 3-38) für den Schritt $a > b$, der β -UE $_{nat}$ zugeordnet. Die relative Amplitude $a > b$ beträgt 39%, der etwa 5-mal langsamere ($\approx 7 \text{ s}^{-1}$) zweite Schritt hat eine deutlich geringere Emissionsabnahme von 12% (Tab. 3-38). Der dritte und immer noch vergleichsweise schnelle Entfaltungsschritt ($\approx 2 \text{ s}^{-1}$) weist die größte Emissionsabnahme mit 41% auf. Die letzten beiden Schritte sind viel langsamer mit nur noch einer geringen Amplitudenabnahme. $d > e$ ($\approx 0,17 \text{ s}^{-1}$) nimmt um weitere 4,5% ab und $e > f$ ($\approx 0,05 \text{ s}^{-1}$) um 3%. Da in der Emission keine Veränderung im bereits entfaltenen Protein gesehen werden kann, stellt auch der Schritt $e > f$ noch Entfaltung dar, auch wenn e bereits weitgehend entfaltet ist. Aufgrund ihrer geringen Amplitude (Abb. 3-122) spiegelt die Komponente d die β -UE ebenfalls in bereits stark entfaltetem Zustand wider. Die Fitkomponente f, die nach Fluoreszenzkriterien dem völlig entfaltenen Zustand des Proteins darstellt, liegt nach etwa 150 s (Abb. 3-123) zu 100% vor.

Folgendes Modell kann aufgestellt werden:

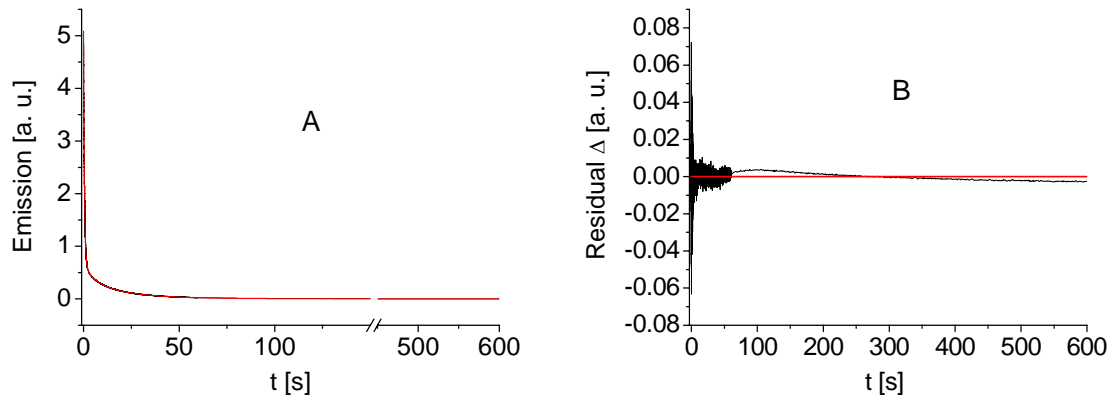
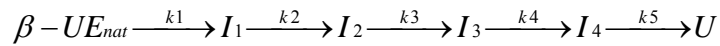


Abb. 3-121: Rohdaten und fünfstufiger Fit der Emissionsänderung bei der Entfaltung der β -UE;
 Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms, Time base: 500 μ s Messintervall über 2 s Messzeit, dann 20 ms über 60 s, dann 1 s über 600 s; Anregung bei 605 nm, Cut-off Filter bei 630 nm. Gezeigt sind in A) die Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c>d>e>f (—) und in B) Residuen

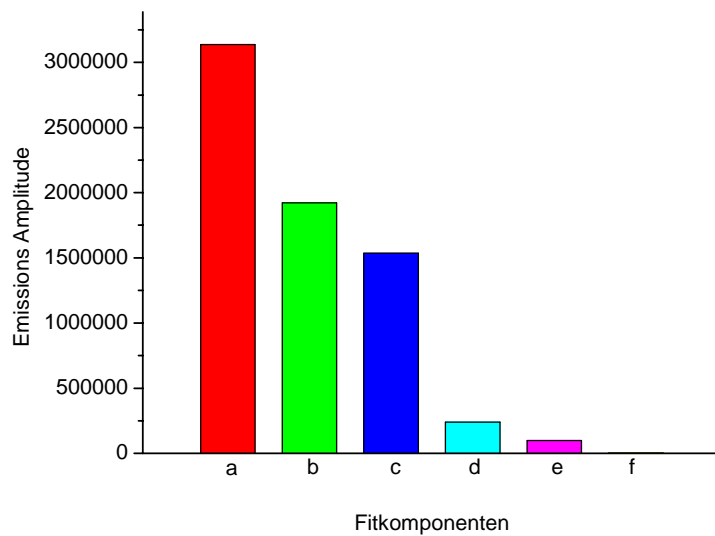


Abb. 3-122: Emissions Amplituden des fünfstufigen Fits der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-121).
 Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■), c (■), d (■), e (■) und f (■) siehe Text.

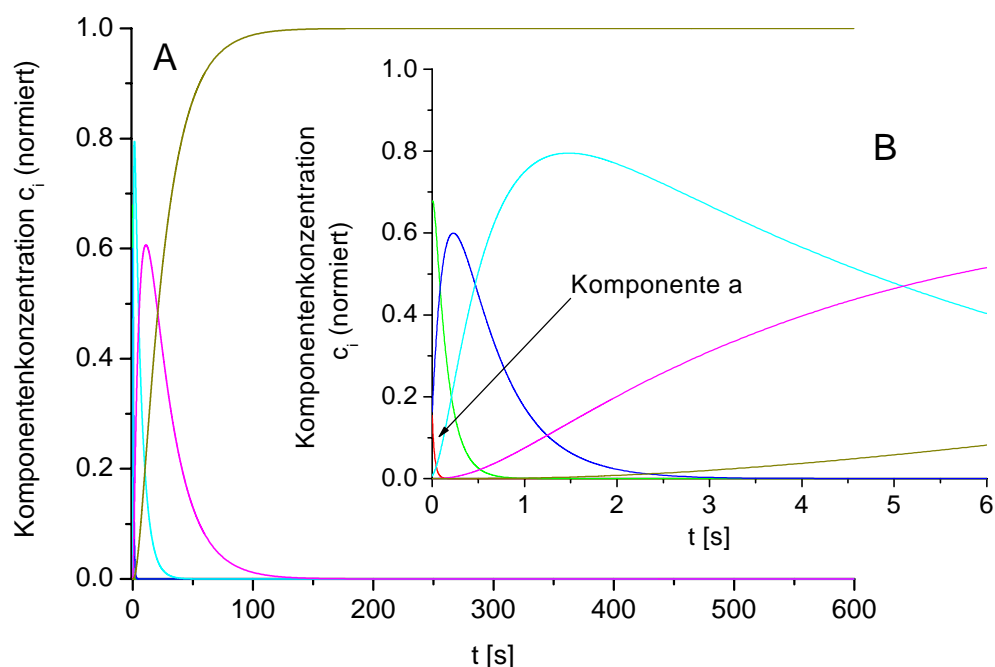


Abb. 3-123: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des fünfstufigen Fits der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-121) gemessen mittels Emission. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 6 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—), d (—), e (—) und f (—) siehe Text.

k_1 [s^{-1}]	$A_{a/b}$ rel.	k_2 [s^{-1}]	$A_{b/c}$ rel.	k_3 [s^{-1}]	$A_{c/d}$ rel.	k_4 [s^{-1}]	$A_{d/e}$ rel.	k_5 [s^{-1}]	$A_{e/f}$ rel.
37,3 $\pm 1,05$	0,39	7,05 $\pm 0,48$	0,12	2,04 $\pm 0,006$	0,41	0,17 $\pm 0,005$	0,045	0,05 $\pm 0,0008$	0,03

Tab. 3-38: Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{a/b}$ rel. etc., Kap. 2.3.5.) des Fits der Emissionsänderung bei der Entfaltung der β -UE mit dem Fitmodell:

$a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e \xrightarrow{k_5} f$. die relativen Amplituden beziehen sich auf die vorherige Fitkomponente im Verhältnis zur Gesamtamplitude (siehe Text).

3.9.4.2.4. UV-CD

Bei der lokalen Analyse der Entfaltung der β -UE, gemessen bei 222 nm, war ein zweistufiger Fit der geeignetste (Abb. 3-124). Ein mehrstufiger Fit war nicht stabil, ein einstufiger hatte eine größere Fehlerabweichung. Der CD der Fitkomponente a hat gegenüber β -UE_{nat} bereits um 27% abgenommen (Tab. 3-39). Es ist demnach anzunehmen, dass ein früher Entfaltungsschritt in der Burstphase steckt. Der Schritt $a \rightarrow b$, mit einer großen Ratenkonstante assoziiert ($\approx 12 s^{-1}$, Tab. 3-40), hat eine CD-Abnahme von 50% (Tab. 3-39) und stellt damit den größten Entfaltungsschritt dar. Der Schritt $b \rightarrow c$, mit einer 8-fach geringeren Ratenkonstante ($\approx 1,5 s^{-1}$), führt zu der restlichen CD-Reduktion von 23% und stellt damit noch deutlich Entfaltung dar.

Folgendes Modell für die Entfaltung der β -UE wird aufgestellt:

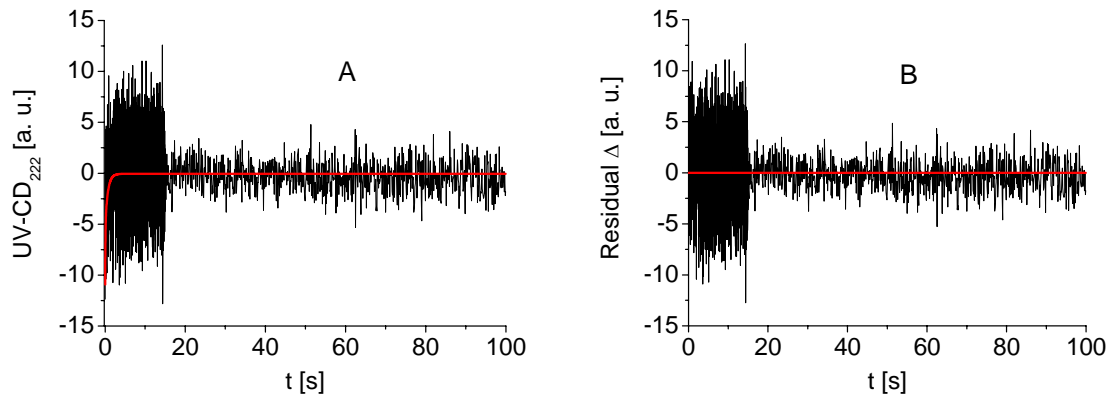
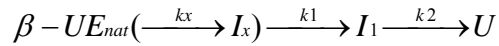


Abb. 3-124: Rohdaten und zweistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung der β -UE, bei 222 nm. Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 6,1 ms, Time base: 500 μ s Messintervall über 2 s Messzeit, dann 20 ms über 60 s, dann 1 s über 600 s. Gezeigt sind in A) die Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c (—) und in B) Residuen.

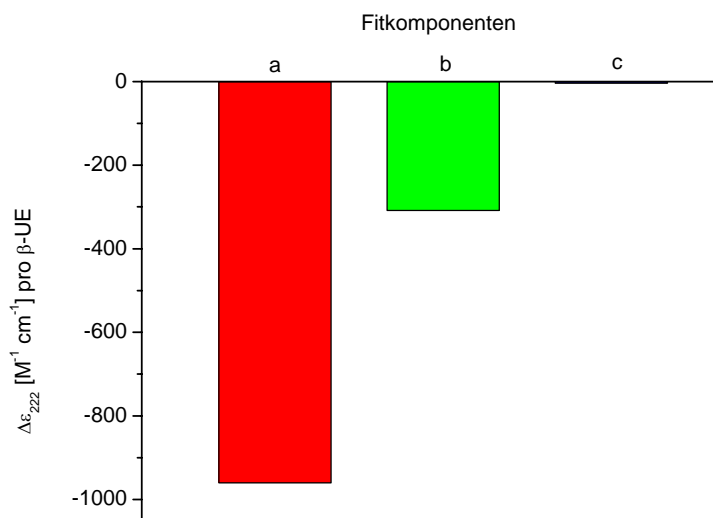


Abb. 3-125: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des lokalen zweistufigen Fits der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-124), bei 222 nm. Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■) und c (■) siehe Text und Tab. 3-39.

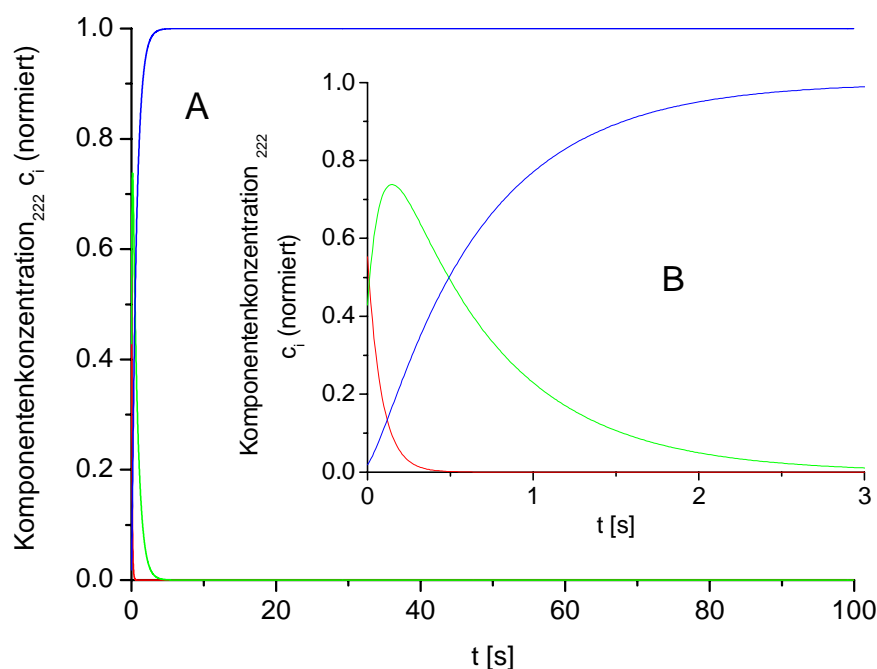


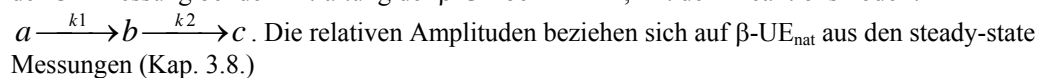
Abb. 3-126: Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des zweistufigen lokalen Fits der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-124), bei 222 nm gemessen mittels UV-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 3 s; Zuordnung der Fitkomponente a (—), b (—) und c (—) siehe Text und Tab. 3-39.

$\Delta\epsilon [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ der steady-state Messungen bei 222 nm		$\Delta\epsilon [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ der Fitkomponenten der kinetischen Messung bei 222 nm			
$\beta\text{-UE}_{nat}$	$\beta\text{-UE}_{denat}$	a	b	c	
-1320	-200*	-960	-308	-4	

Tab. 3-39: Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) je UE der Komponenten des lokalen Fits der Entfaltung der β -UE und die Vergleichswerte aus den steady-state Untersuchungen (Kap. 3.8.); * der Wert für entfaltetes Protein beträgt laut Literatur (Lehner & Scheer, 1983; Kap. 1.7., 1.8.) Null, die Abweichung von 15% liegt im Fehlerbereich;

$A_{\beta\text{-UE}_{nat}/a}$ rel.	$k_1 [s^{-1}]$	$A_{a/b}$ rel.	$k_2 [s^{-1}]$	$A_{b/c}$ rel.
0,27	$11,9 \pm 10,7$	0,50	$1,53 \pm 0,55$	0,23

Tab. 3-40: Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{x/x+1}$ rel., Kap. 2.3.5.) des lokalen Fits der CD Messung bei der Entfaltung der β -UE bei 222 nm, mit dem Reaktionsmodell:



4. Diskussion

4.1. Vergleich der Messungen der Entfaltungskinetiken von PC

4.1.1. Zusammenfassender Vergleich zwischen der globalen und lokalen Analyse

Sowohl in den Absorptions-, als auch die Vis-CD-Daten (Ausnahme β -UE Kap. 3.9.4.2.2.) wurden jeweils lokal und global analysiert (Kap. 2.3.5. und 3.9.). Die Unterschiede zwischen beiden Analysen sollen hier noch einmal zusammenfassend diskutiert werden.

Protein	Messparameter	Gefittete Wellenlängen [nm]								
		340	350	575/ 580	600	605	613	616/ 617	628	global
PC _{tri}	Absorption	5	6		6		5-6	5		4
	Vis-CD	3	4		3		4	2	2	3
α -UE	Absorption		5	4-5		4-5		4		3
	Vis-CD		≥ 2	≥ 2		≥ 2		≥ 4		≥ 2
β -UE	Absorption		5	6		5				5
	Vis-CD		2	≥ 2		2				keine*

Tab. 4-1: Vergleich zwischen der lokalen und globalen Analyse der Entfaltungskinetik von PC, in der Absorption und dem Vis-CD, bezüglich der Anzahl der analysierten Reaktionsschritte, (Analysen siehe Kap. 3.9.). „Von bis“- und mindestens-Angaben erfolgten bei Analysen, die nicht ganz eindeutig waren. * siehe Kap. 3.9.4.2.2.

Die Analysen der kinetischen Messungen zeigen, dass es sowohl bei der Absorption, als auch im Vis-CD, zum Teil deutliche lokale Unterschiede zwischen den einzelnen Wellenlängen bei der Entfaltung von PC und den UE gibt (Kap. 3.9.2. und 3.9.4.). Für die einzelnen Wellenlängenmessungen brachten unterschiedlich stufige Reaktionsmodelle oft die beste Anpassung (Tab. 4-1). Dabei ergaben sich ebenfalls häufig Unterschiede in den Reaktionskonstanten (Abb. 4-1). Beim globalen Fit wurden die Reaktionskonstanten und die Zahl der Reaktionsschritte für alle gemessenen Wellenlängen gekoppelt. Es ergibt sich daraus die Frage, inwieweit signifikante Unterschiede der einzelnen Wellenlängen durch die Kopplung im globalen Fit unterdrückt werden oder in ihm eine Entsprechung finden. Würden im globalen Fit die lokalen Unterschiede sichtbar werden, wären für den globalen Fit zumindest so viele Reaktionsschritte zu erwarten, wie sie der maximalen Anzahl an Reaktionsschritten bei einem lokalen Fit entspricht. Dies ist in keinem Fall gegeben (Tab. 4-1). Entweder entspricht die Anzahl Schritte im globalen Fit in etwa dem Mittelwert aus den lokalen Messungen (z. B. PC_{tri}: Vis-CD Tab. 4-1) oder liegt um 1 bis 2 Schritte darunter (z. B. α -UE: Absorption, Tab. 4-1).

Wie bei der Analyse der kinetischen Daten (Kap. 3.9.) gezeigt wurde, gibt es zwischen den einzelnen Wellenlängenmessungen nicht nur Unterschiede in der Anzahl der Reaktionsschritte, sondern auch deutliche Hinweise darauf, dass bei den einzelnen Wellenlängen teilweise unterschiedliche Vorgänge beobachtet werden können. Z. B. zeigt sich ein lokaler Unterschied bei allen Absorptionsmessungen darin, dass im kurzwelligen Bereich eine andere Kinetik gesehen werden kann, als im langwelligen. Darüber hinaus gibt es noch viele einzelne Unterschiede, welche bei der Analyse im jeweiligen Ergebnisteil aufgeführt sind. Ansatzweise sind diese Unterschiede für die ε -Werte und $\Delta\varepsilon$ -Werte im globalen Fit zu erkennen (Kap. 3.9). Zusammenfassend muss aber trotzdem gesagt werden, dass sich im globalen Fit die lokalen Unterschiede der einzelnen Wellenlängen nicht wieder finden. Im Gegenteil scheint ein Mitteln aus den lokalen Unterschieden zu erfolgen und teilweise sogar noch eine weiter gehende Vereinfachung. Der globale Fit gibt demnach keine Summe der lokalen Analysen wieder, sondern eine eigene Gesamtsicht über die Entfaltung des Proteins bei dem lokale Unterschiede unterdrückt werden. Aber als Gesamtsicht über einen breiten spektralen Bereich hat er seine Berechtigung. Und deshalb wird er auch im Folgenden für die Vergleiche zwischen den Messparametern und den untersuchten Proteinen (integrales PC und UE) heran gezogen.

4.1.2. Vergleich der Messparameter der Entfaltung von PC

Wenn nicht anders angegeben, wird zum Vergleich zwischen den Messparametern für die Absorption und dem Vis-CD überwiegend die globale Analyse heran gezogen. Die lokalen Unterschiede bei den einzelnen Wellenlängen wurden bei der Analyse der einzelnen Parameter heraus gearbeitet und sind aufgrund ihrer Differenziertheit nicht so gut für einen Gesamtvergleich geeignet, wie die globale Analyse.

4.1.2.1. PC α -UE

Kinetische Messungen

Bei der globalen Analyse der Absorptionsdaten ergab sich ein guter Fit mit einem dreistufigen Reaktionsmodell (Tab. 4-2, 4-3; Abb. 4-1). Ob es sich dabei im letzten Schritt noch um einen Entfaltungsschritt handelt oder um einen anderen Reaktionsverlauf im bereits entfalteten Protein kann nicht mit Sicherheit entschieden werden, ersteres ist aber wahrscheinlich (Erklärung siehe globale Analyse Kap. 3.9.4.1. und 4.2.2.). Im Vis-CD (Tab. 4-2, 4-3;

Abb. 4-1) wurden zumindest zwei Reaktionsschritte gefunden, jedoch verdeckt die große Burstphase relativ große Änderungen zu Beginn der Reaktion. Dem letzten Reaktionsschritt kann entweder einer Veränderung $U_{\text{F}} > U_{\text{S}}$ (nach den Kriterien in Kap. 3.9.2.1.1.) zugeordnet werden oder ein letzter Entfaltungsschritt (siehe Kap. 3.9.4.1.2. und 4.2.2.). Er ist etwa 100-mal langsamer, als der letzte Schritt in der Absorption (Tab. 4-4). Das Ende der Gesamtreaktion, gemessen in der Absorption, wird sehr früh nach bereits ca. 13 s (Tab. 4-2) erreicht, im Vis-CD erst nach ca. 600 s (Tab. 4-2), d. h. nach einer ca. 85-mal längeren Reaktionszeit. Geht man aber von der Wahrscheinlichkeit aus, dass im globalen Fit der Absorption kein $U_{\text{F}} > U_{\text{S}}$ Übergang gesehen wird, im Vis-CD dagegen schon, dann sind die Reaktionen im letzten Schritt nicht vergleichbar. Sollten aber beide im letzten Schritt gleichermaßen Entfaltung oder eine Veränderung im bereits entfalteten Protein zeigen, dann wäre hier ein großer Unterschied in den Kinetiken zu sehen. Aufgrund der Analyse in Kap. 4.2.2. wird aber erstere Annahme favorisiert. Dadurch, dass die ersten Entfaltungsschritte im Vis-CD nicht erfasst werden konnten, ist hier ein Vergleich nicht möglich. Die lokalen Unterschiede (Kap. 3.9.4.1.) sind bei der Absorption stärker ausgeprägt, als im Vis-CD (soweit dies mit diesem Datensatz ausgesagt werden kann; Kap. 3.9.4.1.1.). Es gibt dort lokal qualitative Unterschiede, d. h. bei den Messungen der verschiedenen Wellenlängen in der Absorption werden teilweise unterschiedliche Entfaltungsvorgänge, vor allem zwischen dem UV-Nahen und dem langwelligen Bereich, gesehen. Die Anzahl der Reaktionsschritte ist lokal ebenfalls unterschiedlich, was aber nicht unbedingt auf qualitative Unterschiede hinweisen muss (Kap. 3.9.4.). Zudem erfordert die lokale Analyse in der Absorption jeweils ein bis zwei Entfaltungsintermediate mehr als die globale (Tab. 4-1). Die Emission dagegen zeigt die gleiche Anzahl Reaktionsschritte (Tab. 4-1, 4-3; Abb. 4-1) wie die globale Analyse der Absorption, jedoch spiegelt sie einen anderen zeitlichen Verlauf wider (Tab. 4-2, 4-4, Abb. 4-1). Da die Emission keine Änderungen im bereits entfalteten Protein zeigt (Kap. 1.8., 3.8.), ist der langsamste und letzte Reaktionsschritt ($0,07 \text{ s}^{-1}$, Tab. 4-4) noch Entfaltung. Die Gesamtreaktionszeit beträgt dabei 170 s. Mit der Annahme, dass der letzte Reaktionsschritt in der Absorption noch Entfaltung darstellt (siehe oben) heißt dies, dass die Reaktion in der Emission 13-mal länger dauert, als in der Absorption (Tab. 4-2). Die Ratenkonstanten (Abb. 4-1, Tab. 4-4), vor allem k_3 , sind in der Emission, gegenüber der Absorption entsprechend langsamer. Jedoch hat der erste Entfaltungsschritt in der Emission eine wesentlich größere Amplitude (95% im Maximum Tab. 3-33-3, Abb. 3-105) als in der Absorption (57% im Maximum, Tab. 3-32, Abb. 3-33), in beiden Fällen machen sie aber den größten Entfaltungsschritt aus (Abb. 4-1). Folglich sind die verbleibenden Änderungen in der

Emission kleiner, als in der Absorption. Die Emission reagiert vor allem auf die Rigidität des Chromophors, die Absorption auf Konformationsänderungen des Chromophors und/oder des Proteins. Demzufolge würde man erwarten, dass die Emission früher und schneller abnimmt, als die Absorption. Es ist aber auch der Fall vorstellbar, dass zuerst eine Konformationsänderung in einem Proteinbereich stattfinden muss, der die Absorption des Chromophors herunter setzt, damit die Rigidität des Chromophors und somit die Fluoreszenz abnimmt. Für den letzten Reaktionsschritt kann dies z. B. folgendermaßen aussehen: Die Ratenkonstante für den letzten Reaktionsschritt in der globalen Analyse der Absorption beträgt $0,99 \text{ s}^{-1}$, in der Emission $0,07 \text{ s}^{-1}$ und ist damit etwa 14-mal langsamer (Tab. 4-4, Abb. 4-1). Dies bedeutet, dass zwei unterschiedliche Prozesse gesehen werden. Dabei könnte der schnellere in der Absorption zuerst ablaufen, gefolgt von dem langsameren, der in der Emission gesehen wird. Das heißt, dass zuerst eine Konformationsänderung des Chromophors erfolgt und in Folge eine Abnahme seiner Rigidität.

Vergleich der Entfaltungskinetik mit der steady-state Entfaltung (Gleichgewichtsmessung)

Bei der Entfaltung der α -UE durch Titration mit Harnstoff (Kap. 3.7.3.1.) wird für die Absorption und die Emission ein fast identisches Verhalten gefunden (fast gleiche Wendepunkte x_0 und Steilheit (p) im Wendepunkt; Tab. 3-8). Das heißt, die Unterschiede wie sie bei den kinetischen Messungen zu Tage treten (Abschnitt Kinetik oben), werden bei den steady-state Messungen nicht deutlich. Die Änderungen im kinetischen Verlauf im Vis-CD erfolgen deutlich langsamer als in der Absorption und auch der Emission. Dagegen ist in den steady-state Messungen der Wendepunkt für den Vis-CD signifikant früher erreicht, als bei der Absorption und der Emission (Tab. 3-8). Jedoch ist die Steilheit signifikant kleiner und damit der Übergangsbereich der Entfaltung in Bezug auf die Harnstoffkonzentration größer. Dieser flachere Kurvenverlauf weist auf eine größere Heterogenität bei der Entfaltung gemessen im Vis-CD im Vergleich zur Absorption und Emission hin.

Die Ergebnisse der Titration zeigen, dass mindestens zwei thermodynamisch stabile Zustände im Übergangsbereich bei den Gleichgewichtsmessungen bestehen. Bei den kinetischen Messungen werden für die Absorption und die Emission (die Vis-CD Ergebnisse können aufgrund ihrer bedingten Aussagefähigkeit in diesem Fall nicht verglichen werden) je vier analysiert (lokal im Absorptionsmaximum sogar fünf, das Maximum entspricht der gemessenen Wellenlänge für die Titrationskurve entspricht). Grundsätzlich kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Intermediate der Gleichgewichtsmessungen die Gleichen wie

die kinetischen Intermediate sind (Kap. 1.7.). In einigen Fällen kann dies aber ausgeschlossen werden. Ändert sich z. B. die Reihenfolge der Messparameter für den Grad der Entfaltung bei verschiedenen Messreihen, so kann ausgeschlossen werden, dass gleiche Intermediate vorliegen. Der auffälligste Fall ist hierbei das UV-CD wie im Folgenden ausführlich diskutiert wird. Auch kann mit diesen Untersuchungen oft nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob ein Intermediat, welches in der Absorption auftritt z. B. das Gleiche ist, welches im Vis-CD gesehen wird. Es können nur Möglichkeiten und Wahrscheinlichkeiten diskutiert werden, wie dies im Ergebnisteil bereits begonnen wurde und hier in der Diskussion noch weiter ausgeführt wird. Da, wie gezeigt wurde und weiter unten noch diskutiert wird, verschiedene Messparameter bei den kinetischen Messungen zumindest teilweise unterschiedliche Intermediate zeigen, wird dadurch die Zahl der Intermediate bei der Entfaltungskinetik der α -UE (und auch der β -UE und dem integralen PC) drastisch erhöht.

4.1.2.2. PC β -UE

Kinetische Messungen

In Ermangelung (siehe Kap. 3.9.4.2.2.) eines globalen Fits für die Vis-CD Messung für die Entfaltung der β -UE wurde der lokale Fit bei 580 nm heran gezogen. Er entspricht dem positiven Extremum des Vis-CD Spektrums der β -UE. Nachdem die drei gemessenen Wellenlängen (350 nm, 580 nm und 605 nm) ein weitgehend einheitliches Bild der Entfaltung der β -UE wiedergaben (Kap. 3.9.4.2.2.), repräsentieren die Ergebnisse bei 580 nm auch weitgehend die anderen Wellenlängen.

Bei der globalen Analyse der Entfaltung der β -UE, gemessen mittels Absorption, wurde eine fünfstufige Reaktion gefunden. Der letzte Schritt wurde dabei einer Reaktion im bereits entfalteten Protein zugeordnet (Begründung siehe Kap. 3.9.4.2.1.). Im Vis-CD wurde lediglich eine zweistufige Entfaltung analysiert (Tab. 4-2). Im entfalteten Protein konnte keine Reaktion mehr nachgewiesen werden. Absorption und Vis-CD reagieren (siehe Kap. 1) auf Konformationsänderungen des Chromophors, welche indirekt vom umgebenden Protein bestimmt werden. Im Vis-CD wird dabei die Konformation in Bezug auf ihre Verdrilltheit gesehen. Bei dieser (Vis-CD) Betrachtungsweise zeigen sich demnach deutlich weniger Entfaltungsintermediate als bei der, die die Konformationsänderung im allgemeinen (Absorption) zeigt. Im letzten Schritt weisen die Absorption und das Vis-CD zwar eine ähnlich große Ratenkonstante auf (Abb. 4-1, Tab. 4-4), aber mit dem wesentlichen

Unterschied, dass dieser Schritt, nach den Kriterien in Kap. 3.9.2.1.1. und 3.9.2.2.1. in der Absorption einer Veränderung im bereits entfalteten Protein entspricht und im Vis-CD ein Entfaltungsschritt postuliert wurde (Tab. 4-5). Die Ratenkonstante, die jeweils dem ersten Entfaltungsschritt zugewiesen wurde, ist in der Absorption gegenüber dem Vis-CD ca. 32-mal schneller (Abb. 4-1, Tab. 4-4). Sogar k_2 und k_3 sind in der Absorption deutlich größer, als k_1 im Vis-CD. Allerdings ist das Ende der Gesamtreaktion in der Absorption nach 595 s erreicht und im Vis-CD nach 600 s (Tab. 4-2), d. h., in diesem Punkt haben diese beiden Messparameter quasi identische Ergebnisse. In der Emission wird, wie in der Absorption, ein fünfstufiger Reaktionsweg gefunden. Obwohl in der Emission keine Veränderung im bereits entfalteten Protein gesehen werden kann, erfordert ein Fit der Daten die gleiche Anzahl Schritte, wie in der Absorption und drei mehr als der Vis-CD. Die k_1 - k_3 Werte sind, wie in der Absorption, gegenüber dem Vis-CD deutlich größer, sie sind auch größer, als in der Absorption (Abb. 4-1, Tab. 4-4). Die Verteilung der relativen Amplituden differiert zwischen der Absorption und der Emission dahingehend, dass die Amplituden in der Emission im ersten und dritten Schritt stärker abnehmen, als die Absorption. Im zweiten und vierten nimmt die Absorption gegenüber der Emission stärker ab (im letzten Schritt ist kein wesentlicher Unterschied zwischen Emission und Absorption zu sehen) (Abb. 4-1). In der Emission betrachtet man im Wesentlichen die Rigidität des Chromophors, diese kann bereits reduziert sein, ohne dass schon merklich Konformationsänderungen eingetreten sind (Absorption). In diesem Fall reagiert die Emission schneller auf Veränderungen im Chromophor, als die Absorption. Dies zeigt sich in den größeren Ratenkonstanten der Emission gegenüber der Absorption und der kürzeren Dauer der Gesamtreaktionszeit. Das Ende der Gesamtreaktion, gemessen mittels Emission, ist nach etwa 260 s (Tab. 4-2) erreicht. Es dauert damit etwa halb so lange wie für die Absorption und dem Vis-CD. Dieses Verhalten ist deutlich unterschiedlich von der α -UE, bei der zunächst die Konformation geändert wird, ehe die Rigidität abnimmt.

Diese Vergleiche zeigen, dass die Entfaltung der β -UE, wie die der α -UE, nicht einfach in mehr oder weniger viele Entfaltungsintermediate aufgeteilt werden kann, sondern dass dies davon abhängt, welcher Aspekt betrachtet wird: Die Konformation, die Konformation in Bezug auf Verdrilltheit oder die Rigidität des Chromophors. Molekulare Details der Interaktion von Chromophor und Proteinumgebung (Kap. 1.5.) können für die verschiedenen Messparameter ohne gezielte Veränderungen aber derzeit noch nicht unterschieden werden. Dies heißt, je nach Messparameter werden drei, teilweise sehr unterschiedliche Vorgänge der

Entfaltung gesehen. Ein ähnlich komplexes Verhalten wurde bereits im Vergleich der lokalen Analysen gefunden (Kap. 3.9.4.2.).

Der UV-CD ist weitgehend unabhängig vom Chromophor (maximal 10% des UV-CD Signals stammen vom Chromophor, mündliche Mitteilung H. Scheer) und spiegelt direkt die Sekundärstruktur, die in der β -UE ausschließlich aus α -Helices (Kap. 1.6.) besteht, wider. Hier wird eine zweistufige (eventuell \geq dreistufige, siehe Kap. 3.9.4.2.4.) Entfaltung des Proteins gesehen (Tab. 4-2). Der UV-CD weist im Vergleich zum Vis-CD zumindest genauso viele Reaktionsschritte auf. Diese Schritte sind im UV-CD aber mit wesentlich größeren Ratenkonstanten assoziiert als im Vis-CD (Abb. 4-1, Tab. 4-4). Nach diesen Kriterien erfolgt demnach der globale Verlust der Sekundärstruktur sehr viel schneller, als sich der Chromophor und somit seine Umgebung verändert. Diese Reaktion ist bereits nach etwa 8 s abgeschlossen und damit um ein vielfaches (\pm 75-mal schneller gegenüber der Absorption bzw. dem Vis-CD und etwa 30-mal schneller gegenüber der Emission, Tab. 4-2) schneller, als die vom Chromophor abhängigen Messungen.

Vergleich der Entfaltungskinetik mit der steady-state Entfaltung (Gleichgewichtsmessung)

Bei den steady-state Messungen zur Entfaltung der β -UE (Kap. 3.7.3.2.) wurden sowohl für die Wendepunkte x_0 als auch der Steilheiten p keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messparametern, die in Abhängigkeit des Chromophors messen (Absorption, Vis-CD und Emission), ermittelt. Lediglich die Werte des UV-CDs unterscheiden sich signifikant (Tab. 3-9): Die Auflösung der Sekundärstruktur tritt wesentlich später ein, und erstreckt sich über einen signifikant geringeren Harnstoffbereich, was auf eine geringere Heterogenität der beobachteten Entfaltung hinweist. Es zeigt sich, dass die Differenziertheit und Komplexität der Entfaltung der β -UE, wie sie sich in den kinetischen Messungen (siehe oben, Abb. 4-1) zeigt, hier nicht deutlich wird. Gegensätzlich ist, wie gerade beschrieben, das Verhalten der Sekundärstruktur in den kinetischen und Gleichgewichtsmessungen. Beim Einsatz verschiedener Harnstoffkonzentrationen löst sich die Sekundärstruktur als letztes auf, allerdings dann auch mit dem schärfsten Übergang. Bei den kinetischen Experimenten mit einer Harnstoffkonzentration von 8 M, geht sie dagegen als erstes verloren (Tab. 4-2, 4-4). Im Kap. 4.1.2.4. wird ähnliches für PC_{tri} beschrieben, dort erfolgt ein Erklärungsversuch, der für die β -UE genauso gilt. Es handelt sich im UV-CD und den Chromophor abhängigen Messungen offensichtlich um zwei, zumindest weitgehend, unabhängig voneinander

ablaufende Entfaltungsvorgänge. Die globale Sekundärstruktur hat anscheinend keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Konformation des Chromophors.

Protein	Anzahl Reaktionsschritte der Entfaltungskinetik				Gesamtreaktionszeit [s]			
	Absorption	Vis-CD	Emission	UV-CD	Absorption	Vis-CD	Emission	UV-CD
PC _{tri}	4	3	4	2	270	>300 (96% erreicht)	50	175
α -UE	3	2*	3	keine Analyse	13	600	170	keine Analyse
β -UE	5	2	5	2-3**	595	600*** (bei 580 nm)	260	8

Tab. 4-2: Links: Stufigkeit der Modelle, mit denen die Änderungen der verschiedenen Messparameter bei der Entfaltung gefittet wurden. Rechts: Dauer der Gesamtreaktion. *hier wurden mindestens zwei Reaktionsschritte gefunden, da der erste Teil der Entfaltungsreaktion nicht erfasst wurde, kann eine höhere Zahl an Schritten nicht ausgeschlossen werden (siehe dazu auch Text). ** Erklärung siehe Text; *** hier erfolgte kein globaler Fit (Kap. 3.9.4.2.2)

Definition für das Ende der Gesamtreaktionszeit: Das Ende der Reaktion ist erreicht, wenn beim Fit der Daten für die Komponentenkonzentration für die letzte Fitkomponente 99% erreicht wurden (Abb. 3-51, 3-63, 3-71, 3-74, 3-90, 3-99, 3-106, 3-110, 3-119, 3-123 und 3-126).

4.1.2.3. Vergleich der Untereinheiten

Absorption

In der globalen Analyse der Absorption zeigen sich in der β -UE zwei Reaktionsschritte mehr (5) als in der α -UE (3) (Tab. 4-2, 4-3; Abb. 4-1). Beim Vergleich der lokalen Analysen (Kap. 3.9.4.) zeigt sich, dass bei beiden UE qualitative Unterschiede zwischen der beobachteten Entfaltung im UV-Nahen und langwelligen Absorptionsbereich bestehen. In der α -UE werden im langwelligen Absorptionsbereich zusätzlich qualitative Unterschiede in der Entfaltung bei den einzelnen Wellenlängen festgestellt (Kap. 3.9.4.1.1.) (wobei hier einschränkend festgestellt werden muss, dass in der α -UE im langwelligen drei und in der β -UE nur zwei Wellenlängen gemessen wurden). Bei der α -UE wurden bei 580 nm und 605 nm zwei Reaktionsschritte im bereits entfalteten Protein festgestellt, was in dieser Arbeit einzigartig ist (Kap. 3.9.4.1.1.). Dies spiegelt sich im globalen Fit, wie bereits beschrieben, nicht wider (Kap. 4.1.2.1.). Das Ende der Gesamtreaktionszeit tritt für die α -UE bei der globalen Analyse ca. 45-mal schneller (13 s, Tab. 4-2) ein, als für die β -UE (595 s, Tab. 4-2).

Vis-CD

In der Analyse des Vis-CDs (Abb. 4-1) zeigt sich in der β -UE keine Veränderung im bereits entfalteten Zustand während es im Gegensatz dazu in der α -UE (Tab. 4-3) diskutiert wird. Ein Vergleich über die Anzahl der Reaktionsschritte ist hier nicht möglich, da der Datensatz für

die α -UE eine zu große Burstphase aufweist (Kap. 3.9.4.1.2.). Beim Vergleich der lokalen Analysen zeigt sich (Kap. 3.9.4.), dass bei der β -UE keine bei bestimmten Wellenlängen auftretende qualitativen Unterschiede der Entfaltung zu sehen sind, anders als in der α -UE. Hier weichen bei verschiedenen Wellenlängen die beobachtenden Kinetiken lokal zum Teil voneinander ab. Die Gesamtreaktionszeiten sind für beide Fälle ähnlich lang (Tab. 4-2).

Emission

Bei der Analyse der Entfaltungskinetik in der Emission zeigen sich in der β -UE zwei Entfaltungsschritte mehr (5), als in der α -UE (3) (Tab. 4-2, 4-3; Abb. 4-1). Wobei die erste der β -UE um ein mehrfaches schneller ist, als die anderen schnellen Ratenkonstanten (Tab. 4-4). Die Dauer der Gesamtreaktion der β -UE ist dabei etwa 1,5-mal so lange, wie die der α -UE (α -UE \approx 170 s, β -UE \approx 260 s, Tab. 4-2).

Für den UV-CD ist kein Vergleich möglich, da für die α -UE keine Messwerte vorliegen (Kap. 3.9.4.1.3.).

Ursachen der Unterschiede zwischen der α und der β -UE

Ein wichtiger Unterschied zwischen der α - und der β -UE besteht darin, dass in der β -UE zwei PCB-Chromophore gebunden sind und in der α -UE nur einer (Kap. 1, Schirmer et al., 1985; Scharnagl & Schneider, 1989, 1990). Trotz Sequenzunterschieden besteht zwischen den UE eine hohe Homologie (Kap. 1, Schirmer et al., 1984, 1985; Sidler, 1994; Frank et al., 1978; Glazer et al., 1973b; Glazer, 1976). Für die Tertiärstrukturen gilt das Gleiche, sie sind, bis auf den Bereich Cys- β 155, ebenfalls sehr ähnlich (Abb. 1-5, 1-6, Kap. 1.6.). Dadurch, dass bei der Messung der β -UE zwei Chromophore gleichzeitig gesehen werden (Debrezseny et al., 1993; Sauer et al., 1987), und nicht nur einer wie in der α -UE, kommt es zu wesentlichen spektroskopischen Unterschieden (siehe oben). Zwei Aspekte sind beim Vorhandensein von zwei Chromophoren zu differenzieren. Ersterer ist wesentlich messtechnisch begründet. In der β -UE wird eine Überlagerung von zwei Chromophoren gemessen, aber nicht in der α -UE. Und zum zweiten werden in der β -UE, trotz Überlagerung, zwei Bereiche des Proteins während der Entfaltung beobachtet in der α -UE nur einer. Zudem interagieren in der β -UE der PCB- β 155 und PCB- β 84 Chromophor (Scharnagl & Schneider, 1990) miteinander, was in die spektroskopisch beobachtete Kinetik ebenfalls mit hineinfließt. Dass in der β -UE zwei Bereiche des Proteins bei der Entfaltung beobachtet werden und womöglich auch die

Interaktion zwischen den Chromophoren mag eine Erklärung dafür sein, dass in der β -UE durchgängig mehr kinetische Intermediate gefunden werden, als in der α -UE (Kap. 3.9., Tab. 4-3). Gegenteilig stellt sich die Entfaltung in den Gleichgewichtsmessungen (siehe oben und Kap. 3.7.) dar, hier ist sie für die α -UE differenzierter, als für die β -UE. Hier scheint es, dass das Vorhandensein von zwei Chromophoren zu einer Vereinfachung des Entfaltungsprofils führt. Dies ist womöglich auf die Überlagerung der Spektren zurück zu führen. Bei der globalen Analyse führt dies dazu, dass in der α -UE diskretere Schritte der Entfaltung gesehen werden als in der β -UE, die eindeutig dem Bereich der Chromophorumgebung zugeordnet werden können (Abb. 1-5 und 1-6). Was mit diesen Untersuchungen nicht gesagt werden kann, ist, was genau zu diesen Chromophorumgebungen zu rechnen ist. Für Lochbrennversuche wurde ein Radius der Wechselwirkungslänge von Protein und Chromophor von nur 5 Å ermittelt (Lesch et al., 2004). Ein direkter Vergleich mit der Versuchsanordnung dieser Arbeit ist zwar nicht möglich, jedoch stellt es einen ersten Anhaltspunkt dar, der darauf hinweist, dass sich die Wechselwirkungen von Protein und Chromophor auf einen eher kleinen Radius beschränken.

Bei der lokalen Absorptionsmessung der β -UE im langwelligen Maximum bei 605 nm wird im Wesentlichen der PCB- β 155 und dessen Umgebung erfasst (Abb. 1-6, Debreczeny et al., 1993). Das heißt es wird damit eine Stelle des Proteins erfasst, welche die größten Unterschiede zwischen den UE darstellt (siehe oben und Kap. 1.6.). Bei den Messungen im langwelligen Absorptionsmaximum der α -UE bei 617 nm wird im Absorptionsbereich von PCB- α 84 gemessen, welcher an einer anderen Stelle im Protein liegt, als PCB- β 155 (vergleiche dazu Abb. 1-6). In der β -UE wird bei 605 nm zumindest ein Reaktionsschritt mehr (5, Tab. 3-35, Abb. 3-115) als bei 617 nm in der α -UE (4, Tab. 3-30, Abb. 3-95) analysiert. Der zusätzliche Schritt in der β -UE stellt einen langsamen Entfaltungsschritt gegen Ende der Reaktion dar. In der α -UE weicht die Kinetik bei 617 nm von den Kinetiken der anderen Wellenlängen qualitativ ab (Kap. 3.9.4.1.1.). In der β -UE deutet sich lediglich ein qualitativer Unterschied zum UV-Nahen Bereich an. In der globalen Analyse der Kinetik zeigten sich die Unterschiede im Wesentlichen darin, dass in der β -UE mindestens (aufgrund der Burstphase konnte der oder die ersten Intermediate nicht detektiert werden, Tab. 3-34) 5 Reaktionsschritte (Tab. 3-35), in der α -UE hingegen nur 4 (Tab. 3-30) analysiert wurden. Der zusätzliche Schritt in der β -UE ist ebenfalls ein kleiner Entfaltungsschritt gegen Ende der

Reaktion (k_4 : $0,20 \text{ s}^{-1}$, Tab. 3-35). Eine lokale Messung die auf den PCB- β 84 ausgerichtet ist (Abb. 1-7), welcher direkter vergleichbar mit PCB- α 84 wäre, wurde nicht durchgeführt.

Bei den kinetischen Emissionsmessungen wurde die Summe der Emission oberhalb des Cut-off Filters (β -UE: 630 nm, α -UE: 600 nm Kap. 3.9.1.) detektiert und nicht bei einer bestimmten Wellenlänge. Jedoch ist aus der Literatur bekannt dass PCB- β 84 aus *M. laminosus* bei 644 nm fluoresziert und PCB- β 155 bei 623 nm, d. h. PCB- β 84 ist in der β -UE der fluoreszierende Chromophor (Tab. 1-2, Debrezdeny et al., 1993, Sauer et al., 1987). Das Emissionsmaximum der β -UE liegt bei den Messbedingungen dieser Arbeit bei 644 nm (Tab. 3-12). Demnach wird bei den kinetischen Messungen direkt das Emissionsverhalten von PCB- β 84 und nur indirekt das von PCB- β 155 gesehen. Im Gegensatz dazu wird in der α -UE nur der PCB- α 84 gesehen. Laut Literatur hat er sein Emissionsmaximum bei 641 nm (Tab. 1-2), was sich mit den Messungen dieser Arbeit deckt (639 nm, Tab. 3-12). Dies bedeutet, dass zwar bei beiden UE gleichermaßen PCB an Position 84, und damit eine vergleichbare Proteinumgebung beobachtet wird, sie in der β -UE aber noch indirekt dem Einfluss von PCB- β 155 unterliegt. Mit diesen Messungen ist nicht zu unterscheiden worin der Einfluss von PCB- β 155 genau besteht, wie oben beschrieben scheint er aber dazu zu führen, dass in der β -UE mehr Entfaltungsschritte gesehen werden. Es scheint eher unwahrscheinlich, dass die β -UE im Chromophorbereich von PCB- β 84 tatsächlich mehr Intermediate aufweist, als die α -UE, da sie beide sehr homolog sind (Kap.1 und oben). Ausgeschlossen werden kann es aber derzeit noch nicht. Des weiteren lässt sich mit der Tatsache, dass die β -UE über den Chromophor PCB- β 84 fluoresziert erklären, warum in der β -UE eine Verschiebung der Wellenlänge des langwelligen Absorptionsmaximums von $\approx 605 \text{ nm}$ um ca. 40 nm auf $\approx 639 \text{ nm}$ Emissionsmaximum erfolgt, während der shift in der α -UE nur ca. 20 nm von $\approx 619 \text{ nm}$ auf $\approx 639 \text{ nm}$ beträgt. Die Absorption der β -UE stellt eine Summe aus den beiden langwelligen Absorptionsmaxima der PCBs dar (PCB- β 155: 598 nm, PCB- β 84: 622 nm, Tab. 1-2), während die Emission hauptsächlich von PCB- β 84 stammt. In der α -UE, in der nur der PCB- α 84 vorkommt, absorbiert und emittiert dieser. Für die Emission heißt das, dass in beiden Fällen PCB an Position 84 emittiert, was ihr fast identisches Emissionmaximum erklärt (Tab. 3-12).

Messparameter	Protein	Reaktionsmodelle
Absorption	α -UE	$\alpha - UEnat \xrightarrow{k_1} I_1 \xrightarrow{k_2} I_2 \xrightarrow{k_3} U$ oder $a - UEnat \xrightarrow{k_1} I_1 \xrightarrow{k_2} U_f \xrightarrow{k_3} U_s$
	β -UE	$\beta - UEnat \xrightarrow{k_1} I_1 \xrightarrow{k_2} I_2 \xrightarrow{k_3} I_3 \xrightarrow{k_4} U_f \xrightarrow{k_5} U_s$
	PC _{tri}	$PC_{tri} \xrightarrow{k_1} PC_{mono} \xrightarrow{k_2} I_1 \xrightarrow{k_3} U_f \xrightarrow{k_4} U_s$
Vis-CD	α -UE	$\alpha - UEnat \xrightarrow{k_x} I_{x+1} \xrightarrow{k_2} U$ oder $a - UEnat \xrightarrow{k_x} U_f \xrightarrow{k_2} U_s$
	β -UE ₅₈₀ *	$\beta - UEnat \left(\xrightarrow{k_x} I_x \right) \xrightarrow{k_2} I \xrightarrow{k_3} U$
	PC _{tri}	$PC_{tri} \xrightarrow{k_1} PC_{mono} \xrightarrow{k_2} I_1 \xrightarrow{k_3} U$ oder $PC_{tri} \xrightarrow{k_1} PC_{mono} \xrightarrow{k_2} U_f \xrightarrow{k_3} U_s$;
Emission	α -UE	$\alpha - UEnat \xrightarrow{k_1} I_1 \xrightarrow{k_2} I_2 \xrightarrow{k_3} U$
	β -UE	$\beta - UEnat \xrightarrow{k_1} I_1 \xrightarrow{k_2} I_2 \xrightarrow{k_3} I_3 \xrightarrow{k_4} I_4 \xrightarrow{k_5} U$
	PC _{tri}	$PC_{tri} \xrightarrow{k_1} PC_{mono} \xrightarrow{k_2} I_1 \xrightarrow{k_3} I_2 \xrightarrow{k_4} U$ oder $PC_{tri} \xrightarrow{k_1} I \xrightarrow{k_2} PC_{mono} \xrightarrow{k_3} I \xrightarrow{k_4} U$ oder $PC_{tri} \xrightarrow{k_1} PC_{mono} \xrightarrow{k_2} PC_{UE} \xrightarrow{k_3} I \xrightarrow{k_4} U$
UV-CD	α -UE	keine Daten
	β -UE	$\beta - UEnat \left(\xrightarrow{k_x} I_x \right) \xrightarrow{k_1} I_1 \xrightarrow{k_2} U$
	PC _{tri}	$PC^{**} \xrightarrow{k_1} I \xrightarrow{k_2} U$

Tab. 4-3: Vergleich der Entfaltungsmodelle aus den kinetischen Messungen (3.9.). Außer für β -UE Vis-CD (*bei der kein globaler Fit durchgeführt werden konnte, Kap. 3.9.4.2.2.) wurde für die Absorption und das Vis-CD der globale Fit herangezogen. **In der UV-CD Messung kann nicht nach Trimer und Monomer unterschieden werden, Erläuterung siehe Kap. 3.9.2.

4.1.2.4. PC Trimer

Kinetische Messungen

Bei der globalen Analyse der Entfaltungskinetik von PC_{tri}, gemessen mittels Absorption, wurde ein vierstufiger Reaktionsweg gefunden (Tab. 4-2, 4-3, Abb. 4-1; Kap. 3.9.2.). Dem ersten Schritt konnte die Monomerisierung von PC_{tri} zu PC_{mono} zugeordnet werden, dem letzten Schritt eine Veränderung im bereits entfalteten Protein (nach den Kriterien in Kap. 3.6., 3.9.2.1.1. und 3.9.2.2.1.). Im Vergleich dazu wurde für die Entfaltung im Vis-CD global nur ein dreistufiger Reaktionsweg analysiert. Auch hier stellt der erste Schritt

Monomerisierung dar (Tab. 4-2, 4-3, Abb. 4-1, Kriterien Kap. 3.6.). Die Ratenkonstanten sind dabei im Rahmen der Fehlergrenzen gleich (Abb. 4-1; Absorption: $8,61 \pm 0,95 \text{ s}^{-1}$, Vis-CD: $9,25 \pm 2,57 \text{ s}^{-1}$, Tab. 4-4). Beim letzten Schritt bleibt für den Vis-CD unentschieden, ob er noch Entfaltung oder eine Veränderung im bereits entfalteten Protein darstellt, wobei letzteres wahrscheinlicher erscheint (siehe Kap. 3.9.2.2. und Kap. 4.2.2. und Kriterien in Kap. 3.9.2.2.1.). Der letzte Schritt gemessen im Vis-CD ($0,012 \pm 0,008 \text{ s}^{-1}$, Abb. 4-1, Tab. 4-4) dauert ca. 2,5-mal so lange, wie in der Absorption ($0,030 \pm 0,006 \text{ s}^{-1}$, Abb. 4-1, Tab. 4-4), sie liegen dabei aber beide in der Größenordnung 10^{-2} s^{-1} und ähneln sich damit im Vergleich zu den anderen Ratenkonstanten sehr. Sollte der letzte Schritt gemessen im Vis-CD eine Veränderung im bereits entfalteten Protein darstellen, wäre bei dieser Messung kein Faltungsintermediat, im Gegensatz zur Absorption, detektierbar. Die Gesamtreaktionszeit (Tab. 4-2) ist in der Absorption nur geringfügig kürzer (270 s) als im Vis-CD ($>300 \text{ s}$), sie liegen damit im Rahmen der Fehlergrenzen zusammen. Im Vergleich der lokalen Analysen ist davon auszugehen, dass im Vis-CD lokal keine qualitativen Unterschiede der Reaktion zu erkennen sind (Kap. 3.9.2.2.). Etwas abweichend hiervon sind die Ergebnisse bei der Wellenlänge 628 nm. Sie zeigen die Monomerisierung etwas differenzierter, und es gibt Unterschiede in der Ausprägung wahrscheinlich gleicher Entfaltungsvorgänge (Kap. 3.9.2.2.). In der Absorption hingegen gibt es lokal qualitative Unterschiede, vor allem zwischen dem UV-Nahen Bereich und dem langwelligen (Kap. 3.9.2.1.). Dies bedeutet, dass bei der Betrachtung der Konformationsänderung des Chromophors im allgemeinen (Absorption) mehr Entfaltungsschritte gesehen werden, als bei der Betrachtung der Verdrilltheit des Chromophors (Vis-CD), bzw. die Protein-Chromophor- und Chromophor-Chromophor-Interaktion in der Absorption differenzierter, als im Vis-CD deutlich wird. In der Emission wurde, wie in der Absorption, eine vierstufige Reaktion gefunden (Tab. 4-2, 4-3; Abb. 4-1), welche aber bereits nach 50 s (Tab. 4-2) abgeschlossen ist. In der Emission handelt es sich, zumindest zum Teil, um von in der Absorption abweichende Vorgänge. In der Emission können keine Veränderungen im bereits entfalteten Protein gesehen werden, welcher bei der Absorption Bestandteil des vierstufigen Reaktionsweges ist. Zudem sind die Ausprägungen in den relativen Amplituden über die Reaktionsschritte anders verteilt, als in der Absorption (Abb. 4-1). Die Geschwindigkeiten der Reaktionen der einzelnen Reaktionsschritte sind in der Emission durchgängig deutlich schneller, als in der Absorption und auch dem Vis-CD (Tab. 4-4, Abb. 4-1).

Im UV-CD, in der die Auflösung der Sekundärstruktur gesehen wird und die, wie mehrfach beschrieben, weitgehend unabhängig vom Chromophor ist, zeigt einen zweistufigen Entfaltungsweg (Kap. 3.9.2.4., Abb. 4-1). Dabei wird weder die Monomerisierung noch eine Veränderung im bereits entfalteten Protein gesehen. Die Gesamtreaktionszeit beträgt 175 s (Tab. 4-2, 4-3, Abb. 4-1). Sie dauert damit ca. 3-mal länger, als die gemessene in der Emission, ist aber viel kürzer als die Reaktionszeit in der Absorption oder dem Vis-CD (Abb. 4-1; Tab. 4-2). Auch hier zeigt sich, wie bei der β -UE, dass die Chromophorumgebung langsamer entfaltet als sich die globale Sekundärstruktur auflöst. Der Unterschied zur β -UE besteht darin, dass dort sogar die Emission viel länger vorhanden war als das UV-CD Signal. Bei PC_{tri} nimmt die Rigidität hingegen noch deutlich vor der Auflösung der Sekundärstruktur ab. Möglicherweise stabilisieren sich die UE auf der Ebene der Sekundärstruktur im PC_{tri} gegenüber der isolierten β -UE.

Vergleich der Entfaltungskinetik mit der steady-state Entfaltung (Gleichgewichtsmessung)

Bei den Gleichgewichtsmessungen von PC_{tri} in Harnstoff (Kap. 3.7.2.) zeigte sich, dass jeder spektroskopische Parameter (Absorption, Vis-CD, Emission und UV-CD) einen signifikant anderen Reaktionsweg darstellt (Wendepunkte (x_0), Steilheit in x_0 (p), Tab. 3-7), d. h., dass zumindest drei thermodynamisch stabile Intermediate vorliegen. Zusätzlich erfolgt noch die Dissoziation von PC_{tri}. Am ähnlichsten verhalten sich dabei die Absorption und das Vis-CD, die beide die Konformation, allerdings mit unterschiedlichen Aspekten des Chromophors widerspiegeln (Kap. 3.7.2.). Im Vergleich dazu ist die analysierte Anzahl von Reaktionsschritten bei den kinetischen Messungen gering (2-4 je Messparameter, Tab. 4-2, 4-3, Abb. 4-1). Nachdem aber für jeden Messparameter bei der Kinetik der Entfaltung von PC_{tri}, wie auch der UE, voneinander abweichende Entfaltungswege mit zumindest teilweise verschiedenen Intermediaten gefunden wurden, erhöht sich die Anzahl verschiedener Intermediate bei den kinetischen Messungen. Es kann aber nicht genau gesagt werden, wie viele und welche der Entfaltungsvorgänge aller spektroskopischer Messparameter zusammen genommen dabei die Gleichen sind, dies ist nur teilweise möglich und bedürfte weiterer Untersuchungen. Im Vergleich der Kinetik im UV-CD mit der Absorption und dem Vis-CD zeigt sich, wie die Reaktion im UV-CD deutlich schneller als in der Absorption und dem Vis-CD ist, obwohl es bei der steady-state Titration als letztes reagiert. Bei einer direkten Gegenüberstellung der Messparameter der Gleichgewichtsmessungen (Kap. 3.7.2.) und der kinetische Daten (Kap. 3.9.2.) können folgende Schema aufgestellt werden:

- Gleichgewichtsmessung: Emission>Vis-CD>Absorption>UV-CD, d. h. die Rigidität nimmt am schnellsten ab, gefolgt von der Konformationsänderung des PCBs, wobei die Verdrilltheit des Chromophors zuerst reduziert wird. Als letztes löst sich die Sekundärstruktur auf.
- Kinetische Messung: UV-CD>Emission>Vis-CD≈Absorption, d. h. die Sekundärstruktur löst sich bei den kinetischen Messungen als erstes auf, gefolgt von der Abnahme an Rigidität der Chromophore, als letztes verändert sich die Konformation der Chromophore.

Der entscheidende Unterschied besteht darin, dass sich bei den Gleichgewichtsmessungen die Sekundärstruktur als letztes, bei den kinetischen Messungen aber am schnellsten auflöst. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass bei den Gleichgewichtsmessungen eine variable Konzentration an Harnstoff (0 – 8 M) verwendet wird, während in der Kinetik immer mit 8 M Harnstoff gearbeitet wird. Es wird eine Konzentration von 8 M Harnstoff benötigt um die Sekundärstruktur, bei gegebenen Messbedingungen, vollständig auf zu lösen, während die vollständige Entfaltung für die Emission, dem Vis-CD und der Absorption bereits bei ca. 7 M Harnstoff erfolgt (Kap. 3.9.2.4., Abb. 3-26). Ist die Hürde, die Sekundärstruktur aufzulösen aber einmal genommen, und die Kinetik findet in 8 M Harnstoff statt, löst sich die Sekundärstruktur schneller auf, als die Chromophorumgebung. Damit zeigt sich das Gleiche, wie bei der β -UE, nämlich, dass die Entfaltung der Struktur, die den Chromophor beeinflusst und die der Sekundärstruktur, zumindest weitgehend, unabhängig voneinander sind.

4.1.2.5. Vergleich des PC-Trimers mit den Untereinheiten

Absorption

Beim Vergleich der Entfaltungskinetik von PC_{tri} und den UE ist zu bedenken, dass der erste Schritt, die Monomerisierung von PC_{tri}, bei den UE nicht vorkommt. Genauso ist beim Vergleich zu bedenken, dass, wie bei den Messungen dieser Arbeit zu sehen und aus der Literatur bekannt ist, die Absorptionsspektren von PC_{mono} eine Summe der UE sind (Debreczeny et al., 1993; Mimuro et al., 1986, Kap. 1). Dies bedeutet, dass die UE Trennung in der Absorption nicht gesehen werden kann. Nach den vorliegenden Messergebnissen zeigt sich, dass beim globalen Fit sowohl in PC_{tri}, als auch der β -UE der $U_f > U_s$ Schritt detektiert wurde, er aber in der globalen Analyse der α -UE höchstwahrscheinlich nicht gesehen wird (Kap. 4.2.2.) (anders in den lokalen Analysen, Kap. 4.2.2.). Die Entfaltung der UE ist in mehr und in überwiegend wesentlich schnellere Reaktionsschritte unterteilt, als die von PC_{tri} (Abb.

4-1, Tab. 4-4). Beim Vergleich der relativen Amplituden (Abb. 4-1) und der Extinktionskoeffizienten (Abb. 3-50, 3-89 und 3-109) sieht es so aus, als würden die zwei Entfaltungsschritte (nicht Dissoziation und nicht $U_{\bar{f}} > U_s$) von PC_{tri} aus je drei Entfaltungsschritten der α -UE und der vier (nicht $U_{\bar{f}} > U_s$) der β -UE bestehen. Insgesamt wären damit 7 Entfaltungsschritte in den zweien von PC_{tri} verborgen. Wenn dies durch eine Überlagerung der Spektren entstehen würde, wäre zu erwarten, dass die dazugehörigen Ratenkonstanten (Abb. 4-1, Tab. 4-4) der UE im Mittel denen von PC_{tri} entsprächen, dies ist aber nicht der Fall (Mittelwerte: α -UE: $3,8 \text{ s}^{-1}$, β -UE: $8,7 \text{ s}^{-1}$, PC_{tri} : $0,19 \text{ s}^{-1}$). Die Ratenkonstanten für die Schritte der Entfaltung sind für PC_{tri} ca. um eine Größenordnung langsamer. Daraus lässt sich ableiten, dass, auch wenn bis zu einem gewissen Grad das Ergebnis von PC_{tri} aus einer Überlagerung der Daten der UE resultiert und dies zu einer Vereinfachung des Entfaltungsprofils von PC_{tri} führt, doch ein wesentlicher Faktor darin besteht, dass sich die UE anscheinend gegenseitig stabilisieren und PC_{tri} eine eigene Dynamik bei der Entfaltung entwickelt. Bereits beim Vergleich der steady-state Messungen von PC_{tri} und der UE zeigt sich, dass PC_{tri} nicht nur die Summe der UE darstellt, sondern ein eigenes Entfungsverhalten zeigt (Kap. 3.7.4.). In Studien mit GFP zeigte sich ebenfalls, dass die Quartärstruktur einen wichtigen stabilisierenden Faktor für das Protein darstellt. Das Tetramer war deutlich stabiler, d. h. entfaltet langsamer, als das Dimer oder Monomer (Stepanenko et al., 2004).

Vis-CD

Im Vis-CD sind die Datensätze nicht so eindeutig und weisen bei den UE große Burstphasen auf. Was sich aber andeutet, ist, dass sich die Entfaltung von PC_{tri} anscheinend nicht in so viele kleine Entfaltungsschritte in den UE aufteilen lässt, wie in der Absorptionmessung.

Emission

Für die Entfaltung von PC_{tri} , gemessen mittels Emission, wurden drei verschiedene mögliche Entfaltungsmodelle aufgestellt (Tab. 4-3, Kap. 3.9.2.3.). Im Vergleich mit den Ergebnissen der Kinetik der Entfaltung von PC_{mono} (Kap. 3.9.3.) wurde das Modell $PC_{tri} \rightarrow I \rightarrow PC_{mono} \rightarrow I \rightarrow U$ als wahrscheinlich erachtet. Bei der Analyse des Datensatzes, ausgehend von einem PC_{mono} konnte nicht nur der erste und schnellste Reaktionsschritt von PC_{tri} nicht mehr analysiert werden, sondern auch der zweite und zweitschnellste nicht. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass die ersten beiden Schritte von PC_{tri} der Dissoziation zu zuordnen sind, was dem Modell $PC_{tri} \rightarrow I \rightarrow PC_{mono}$ usw. entspräche (Kap.

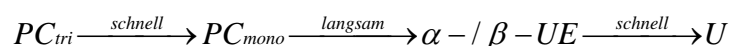
3.9.3.). Mit den Ergebnissen aus den UE Messungen können die verschiedenen Modelle nicht, wie zunächst erhofft, weiter eingengt werden und es müssen weiterhin andere Modelle als möglich erachtet werden, auch wenn obiges favorisiert werden kann. Sollte dieses Modell ($PC_{tri} \rightarrow I \rightarrow PC_{mono} \rightarrow I \rightarrow U$) das stimmige sein, dann wären in den beiden Entfaltungsschritten von PC_{mono} drei Entfaltungsschritte der α -UE und fünf der β -UE enthalten. Wie sich dabei die UE Trennung auswirkt bleibt unklar. Ansonsten gilt das Gleiche wie für die Absorptionsmessungen. Die Ratenkonstanten für die α -UE und die der β -UE sind für das zu erwartende Modell (oben) im Mittel größer, als die von PC_{tri} (Mittelwerte α -UE: $2,4 \text{ s}^{-1}$, β -UE: $9,4 \text{ s}^{-1}$, favorisiertes Modell PC_{tri} : $0,4 \text{ s}^{-1}$). Dass heißt, auch hier sieht es so aus, dass PC_{tri} eine eigene Dynamik bei der Entfaltung entwickelt und eine mögliche Überlagerung der Spektren der UE bestenfalls nur zum Teil die Ergebnisse von PC_{tri} bestimmt. Wie in der Absorption zeigt sich auch in der Emission bereits bei den steady-state Messungen, dass PC_{tri} nicht nur die Summe der UE darstellt, sondern eine eigene Dynamik bei der Entfaltung entwickelt (Kap. 3.7.4.). Auffällig ist, dass die letzten Ratenkonstanten (k_4 von PC_{tri} , k_3 der α -UE und k_4 und k_5 der β -UE) der UE langsamer sind, als die von PC_{tri} .

UV-CD

Für PC_{tri} wurden zwei Entfaltungsschritte analysiert, für die β -UE zwei oder mehr (Kap. 3.9.4.2.4.), für die α -UE liegen keine Daten vor. Die Ergebnisse zeigen, dass die Entfaltung in der β -UE schneller abläuft, als in PC_{tri} (Abb. 4-1, Tab. 4-4). Nachdem für die α -UE keine Daten vorliegen, kann nicht diskutiert werden, ob eine Überlagerung der Daten der UE vorliegt oder PC_{tri} , genauso wie in der Absorption und der Emission, eine eigene Dynamik durch gegenseitige Stabilisierung der UE, bei der Entfaltung hat, was aber wahrscheinlich erscheint.

Zusammenfassende Schlussfolgerung

Wie bereits mehrfach beschrieben scheinen sich die UE im integralen PC gegenseitig zu stabilisieren und sich daraus eine eigene Entfaltungskinetik vom integralen PC zu ergeben, die nicht nur die Summe der Kinetiken der UE ist. Die UE zeigen meist schnellere und mehr Entfaltungsschritte, als das integrale PC. Möglicherweise stellt dabei die Dissoziation der UE einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Im PC_{mono} können die UE intensiv interagieren und sich im Verlauf der Entfaltung am stärksten stabilisieren. Dies würde dann zu der langsameren Entfaltung im integralen PC gegenüber den UE führen, wie dies gemessen wurde. Folgendes Reaktionsmodell scheint aufgrund dieser Überlegungen sinnvoll:



Damit steht auch die Feststellung, dass die Ratenkonstanten der letzten Reaktionsschritte der UE in der Emission langsamer sind, als die von PC_{tri} nicht im Widerspruch. Im bereits entfalteten Protein erfolgt die Stabilisierung der UE, wie sie in PC_{mono} durch den intensiven Kontakt stattfinden kann, nicht mehr. In Folge reagiert das integrale PC nicht mehr zwangsläufig langsamer, als die UE. Die Frage, warum der Vorgang aber in der UE langsamer und nicht gleich schnell abläuft muss offen bleiben.

Messparameter	Protein	Ratenkonstanten zu den Reaktionsmodellen in Tab. 4-3				
		k ₁ [s ⁻¹]	k ₂ [s ⁻¹]	k ₃ [s ⁻¹]	k ₄ [s ⁻¹]	k ₅ [s ⁻¹]
Absorption	α-UE	7,06	3,20	0,99		
	β-UE	27,5	5,25	1,79	0,077	0,020
	PC _{tri}	8,61	0,271	0,101	0,030	
Vis-CD	α-UE		0,009			
	β-UE ₅₈₀ *		0,83	0,016		
	PC _{tri}	9,25	0,243	0,012		
Emission	α-UE	5,22	2,04	0,07		
	β-UE	37,3	7,05	2,04	0,17	0,05
	PC _{tri}	18,6	6,5	0,55	0,26	
UV-CD	α-UE					
	β-UE	11,9	1,53			
	PC _{tri}	5,35	0,07			

Tab. 4-4: Vergleich der Ratenkonstanten aus den kinetischen Messungen der Entfaltung von PC und den UE (Kap. 3.9.). Sie gehören zu den Reaktionsmodellen in Tab. 4-3. Für das Vis-CD (*bei der β-UE für 580 nm Begründung siehe Kap. 3.9.4.2.2.) und die Absorption sind jeweils die Ergebnisse des globalen Fits angegeben. Aufgeführt sind die Ratenkonstanten, die in die Reaktionsmodelle aufgenommen wurden (Tab. 3-14, 3-17, 3-19, 3-21, 3-30, 3-32, 3-33, 3-35, 3-37, 3-38 und 3-40). Die Zuordnung k₁, k₂ etc. gilt nur für das jeweilige Protein mit dem jeweiligen Messparameter, sie können zwischen den einzelnen Messreihen nicht gleich gesetzt werden. Die Interpretationen hierzu stehen in Tab. 4-3, Kap. 3.9. und im Text unten.

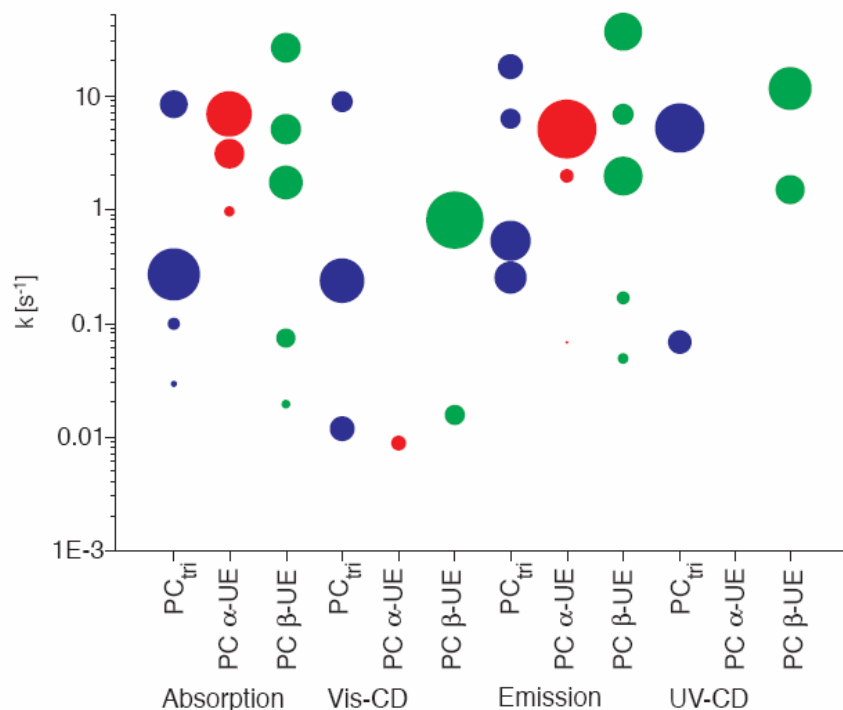


Abb. 4-1: Vergleich der relativen Amplituden und k -Werte der Fits (Kap. 3.9.) der Entfaltungskinetik von PC und den UE und der verschiedenen Messparameter. PC_{tri} (●); α -UE (●) (für den UV-CD gibt es keine Messwerte) und β -UE (●). Die Fläche der Punkte stellt die relative Größe der Amplituden der einzelnen Reaktionsschritte zur Gesamtamplitude dar. Aufgrund des Burst zu Beginn der Messung konnten teilweise die ersten Reaktionsschritte nicht erfasst werden, deshalb ist die Summe der Flächen nicht immer 100% der Gesamtreaktion. Die k -Werte sind folgendermaßen angeordnet: k_1 größer k_2 größer k_3 etc (Tab. 4-4). Für die Absorption und dem Vis-CD wurde der globale Fit aufgetragen (Ausnahme Vis-CD β -UE siehe Text und Tab. 4-3)

4.2. Entfaltetes PC

4.2.1. Zustand des entfalteten Proteins

Es werden verschiedene Zustände von entfaltetem Protein diskutiert (Dobson, 1992). Dabei wird davon ausgegangen, dass nicht immer der ideale Zustand eines random coils vorliegt, sondern, dass es sich durchaus auch um kompaktere entfaltete Zustände handeln kann. Diese können teilweise sogar noch Sekundärstruktur beinhalten. Bei der Entfaltung von PC gilt als ein wesentliches Kriterium für den entfalteten Zustand, wie bereits erläutert (Kap. 2.3.5. und 1.8.), dass der Q -Wert ca. 0,5 bis 0,4 beträgt, d. h., dass die Chromophore quasi frei sind und in annähernder Ringform vorliegen (Kap. 1.). Die kinetischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass das Schmelzen der Sekundärstruktur ein weitgehend eigenständiger Entfaltungsvorgang ist, der die Konformationsänderungen der Chromophore nicht oder unwesentlich beeinflusst. Dies bedeutet, dass mit dem Q -Wert keine Aussage über den Grad der Entfaltung der Sekundärstruktur getroffen werden kann, d. h. demnach auch nur bedingt

über den gesamten Zustand der Entfaltung des Proteins. Dass PC bei dieser Arbeit vollständig entfaltet, inklusive der Sekundärstruktur, zeigen erst die Ergebnisse des UV-CDs bei denen keine Sekundärstruktur mehr gemessen werden konnte (Kap. 3.7. und 3.8.). Demnach liegt PC und die UE im entfalteten Zustand höchstwahrscheinlich als random coil (Kap. 1.7, Cantor & Schimmel, 1980) vor.

4.2.2. Veränderung im bereits entfalteten Protein, Reaktionsschritt: $U_f \rightarrow U_s$

Absorption und Vis-CD deuten auf einen $U_f > U_s$ Reaktionsschritt bei der Entfaltung von PC hin (Tab. 4-3). Die Kriterien dafür sollen hier noch einmal zusammenfassend dargestellt werden. Ganz wesentliche Faktoren waren der Q-Wert (siehe Kap. 3.6.) und die Absorptionsabnahme im UV-Nahen Bereich (Kap. 3.9.2.1.1.). Daraus wurde berechnet bei welchen ϵ -Werten und relativen Amplituden ein $U_f > U_s$ Übergang nach den Kriterien der Absorption vorhanden ist. Im Vergleich der Messdaten wurden daraus für das Vis-CD die $\Delta\epsilon$ -Werte und relativen Amplituden für einen möglichen $U_f > U_s$ Übergang gefolgert (Kap. 3.9.2.2.1.). Absolute Kriterien liegen für die Vis-CD Messung aber nicht vor und deshalb kann ein solcher Übergang für die Vis-CD Messung nicht mit solcher Sicherheit postuliert werden, wie für die Absorption. Anschließend erfolgte ein Vergleich der Größen der Ratenkonstanten, dabei wurde auch die Emission heran gezogen, in der ein $U_f > U_s$ Übergang nicht gesehen werden kann (Kap. 1, 3.8.). Im Folgenden werden die kinetischen Daten des letzten Reaktionsschrittes der Absorption und des Vis-CDs noch einmal verglichen, und in den unklaren Fällen ein möglicher $U_f > U_s$ Übergang diskutiert.

Messparameter	Protein	$U_f \rightarrow U_s$ Übergang vorhanden, nicht vorhanden, unklar	rel. Amplitude des letzten Reaktionsschrittes	Ratenkonstante [s^{-1}]
Absorption _{global}	PC _{tri}	vorhanden	0,01	0,030 ± 0,006
	α -UE	unklar	0,03	0,99 ± 0,29
	β -UE	vorhanden	0,02	0,020 ± 0,001
Vis-CD _{global}	PC _{tri}	unklar	0,17	0,012 ± 0,008
	α -UE	unklar	0,06	0,009 ± 0,0003
Vis-CD ₅₈₀ *	β -UE	nicht vorhanden	0,15	0,016 ± 0,002

Tab. 4-5: Vergleich der letzten Reaktionsschritte der globalen Entfaltungskinetik von PC, gemessen in der Absorption und dem Vis-CD. Diskussion siehe Text. *Erklärung warum hier kein globaler Fit genommen wurde steht bei der Analyse der Daten Kap. 3.9.4.2.2.

In Tab. 4-5 und Kap. 3.9. zeigt sich, dass die Ratenkonstanten für den letzten Reaktionsschritt, sowohl für die lokale, als auch die globale Analyse, wenn er $U_f > U_s$ zugeordnet wurde, durchgängig in der Größenordnung von $10^{-2} - 10^{-3} s^{-1}$ liegen

(Besonderheit bei der lokalen Analyse der Absorption in der α -UE bei 580 nm und 605 nm. Kap. 3.9.4.1.1. und unten).

Für die α -UE im globalen Fit der Absorption ist die Ratenkonstante ca. 2-3 Größenordnungen größer, als die, welche bei den bisherigen Analysen dem $U_f > U_s$ Übergang (siehe oben) zugeordnet wurden (Kap. 3.9., Tab. 4-5). Dies und die folgenden Tatsachen, deuten stark darauf hin, dass im globalen Fit der α -UE in der Absorption keine Veränderung im bereits entfalteten Protein gesehen wird, sondern ein, wenn auch kleiner, Entfaltungsschritt. Die Gesamtreaktionszeit beträgt nur 13 s (Tab. 4-2), in der lokalen Analyse, bei der ein $U_f > U_s$ Übergang gesehen wurde (Kap. 3.9.4.1.1.), dauern sie wesentlich länger (>600 s in Abb. 3-94). Die Emission klingt ca. 14-mal langsamer ab (Tab. 4-2) wie die globale Absorption. Dies ist der einzige Fall, in welchem die Emission nicht die kürzeste Reaktionszeit aufweist. (Der UV-CD wird hier nicht verglichen, da er als einziger Messparameter weitgehend unabhängig vom Chromophor ist. Nach den bisherigen Analysen zeigt er eine von den anderen Messparametern unabhängige Kinetik. Tab. 4-2). Gleichzeitig ist die Emission der einzige Parameter, bei welchem, wie schon öfters beschrieben, keine Veränderung im bereits entfalteten Protein gesehen werden kann, sie sollte deshalb kürzer leben, als Reaktionen, die einer Änderung $U_f > U_s$ entsprechen. Die Absorptionsabnahme der α -UE im letzten Reaktionsschritt ist zwar gering, hat aber im Vergleich mit den letzten Reaktionsschritten bei PC_{tri} und der β -UE, die größte relative Amplitude (Abb. 4-1). Auch bei der Betrachtung der Spektren für die Absorptionsintermediate der α -UE (Abb. 3-89) scheint es durchaus möglich, dass der letzte Schritt noch einen kleinen Entfaltungsschritt darstellt (Q-Wert nicht kleiner 1). Zusammenfassend heißt dies, dass der letzte Reaktionsschritt in der globalen Analyse der α -UE mit sehr großer Wahrscheinlichkeit keinen $U_f > U_s$ Übergang darstellt. Im Vis-CD der α -UE deutet die geringe relative Amplitude (Tab. 4-4), die sehr lange Gesamtreaktionszeit (600 s), deutlich länger, als die der Emission (Tab. 4-2), und die sehr geringe Ratenkonstante ($0,0009 \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$, Tab. 4-5, Abb. 4-1) auf eine $U_f > U_s$ Reaktion hin.

Für die Entfaltung von PC_{tri} , gemessen im Vis-CD, bestand ebenfalls noch Unklarheit darüber, ob es sich im letzten Reaktionsschritt noch um Entfaltung handelt oder nicht. Bereits bei der Analyse im Ergebnisteil wurde die $U_f > U_s$ Version als die wahrscheinlichere angesehen (Kap. 3.9.2.2.). Die Länge der Gesamtreaktionszeit (300 s, Tab. 4-2), welche ebenfalls deutlich länger ist, als die der Emission (30 s, Tab. 4-2) und die Größe der Ratenkonstante von $0,016 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ (Tab. 4-4, Abb. 4-1) deuten ebenfalls stark auf einen

$U_f > U_s$ Übergang hin. Nur die Größe der relativen Amplitude (0,17 Tab. 4-4) lässt Zweifel daran.

Für die Absorption muss als Besonderheit noch die lokale Analyse bei 580 nm und 605 nm bei der α -UE diskutiert werden. Sie zeigt jeweils zwei Schritte für Veränderungen im bereits entfalteten Protein. Die Größe der Ratenkonstante für den letzten Schritt (580 nm: $0,007 \text{ s}^{-1}$ und 605 nm: $0,04 \text{ s}^{-1}$) entspricht der Größe, wie sie allgemein für den letzten Veränderungsschritt im entfalteten Protein (Tab. 4-4, Kap. 3.9.) gefunden wurde. Der vorletzte Schritt, welcher in diesem Fall (Begründung siehe Kap. 3.9.4.1.1.) aber ebenfalls als Veränderung im bereits entfalteten PC interpretiert wurde, ist deutlich schneller (580 nm: $0,61 \text{ s}^{-1}$, 605 nm: $0,89 \text{ s}^{-1}$). Eine Begründung für diesen Unterschied ist beim gegenwärtigen Stand der Untersuchungen noch nicht möglich.

Zusammenfassend soll hier noch einmal darauf hingewiesen werden, dass mit den Kriterien der Absorption (Kap. 3.6. und 3.9.2.1.1.) eine Veränderung im bereits entfalteten Protein ziemlich sicher belegt werden kann. Im Vis-CD dagegen müssen Aussagen darüber spekulativer bleiben. Was in keinem Fall sicher gezeigt werden kann, ist, ob es sich bei der Änderung im bereits entfalteten Protein um eine Veränderung nur im Chromophor handelt, um eine Strukturbildung im Protein, welche bewirkt, dass der Chromophor nicht mehr ganz frei und ringförmig ist oder es durch Protein-Chromophor Interaktion bzw. Chromophor-Chromophor Interaktion (Kap. 1) zu einer Veränderung in der Absorption bzw. dem Vis-CD kommt. In vergleichbaren Untersuchungen an Lysozym wurde gezeigt, dass auch im völlig entfalteten Protein lokale Interaktionen zwischen AS-Resten erfolgen (Bachmann et al., 2002). Es gibt Untersuchungen, die aber ausschließen, dass im entfalteten Protein im Lösungsmittel die Energien der AS-Reste die Diffusion der AS-Reste bewirken, sondern dass dies durch das Lösungsmittel selbst geschieht (Hagen et al., 2001). Ein viel diskutierter Reaktionsschritt im bereits entfalteten Protein ist die cis/trans Isomerisierung von Prolin (Brandts et al., 1975; Brandts & Lin, 1986; Schmid, 1986; Kiefhaber et al., 1990). Dabei stellt sie vor allem für die Faltung einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Prolin ist die einzige AS, welche im nativen Protein auch in der nicht planaren cis-Form vorkommen kann (Brandt & Lin, 1986). In der Röntgenstruktur von PC (Kap.1.6.) konnte kein Prolin in der cis-Form nachgewiesen werden. Jedoch kann die cis/trans Isomerisierung von Prolin als Beispiel für eine Rotation um eine partielle Doppelbindung gelten, wie dies auch im freien Chromophor an einer Methinbrücke der Fall sein kann (Abb. 4-2, 4-3, Falk, 1989; Kap. 1.5.).

Rotation um die Methinbrücke im Chromophor

Wie bereits in der Einleitung erläutert, führt eine Torsion der Methinbrücke im Chromophor zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums (Falk & Höllbacher, 1978; Cullen et al., 1979; Bonfiglio et al., 1982), die in der Regel blau ist, solange der Brunings-Corwin Effekt (Brunings et al., 1942) bei Torsionswinkel unter 30° nicht zum Tragen kommt. Möglicherweise findet eine solche Rotation im quasi freien Chromophor im entfalteten PC statt (Abb. 4-3). Die Größenordnung der Ratenkonstanten, wie sie dem Vorgang im bereits entfalteten Protein zugeordnet wurden (10^{-2} s^{-1} bis 10^{-3} s^{-1} , Kap. 3.9.) bewegen sich in dem Größenbereich, wie sie bei der Rotation an der partiellen Doppelbindung bei der cis/trans Isomerisierung von Prolin gefunden wurden (Abb. 4-2, Brandt et al., 1975). Außerdem konnte im nativen PC eine photochemische Reaktion in Form einer Z/E Isomerisierung des Chromophors nachgewiesen werden (Siebzehnrübl, 1990). In PEC aus *M. laminosus* wurde eine entsprechende Rotation der C-D Methinbrücke zugeordnet (Kneip et al., 1998). Beides sind Hinweise darauf, dass eine Rotation um die Methinbrücke im quasi freien Chromophor im entfalteten PC die beobachtete Veränderung im bereits entfalteten Protein darstellen könnte.

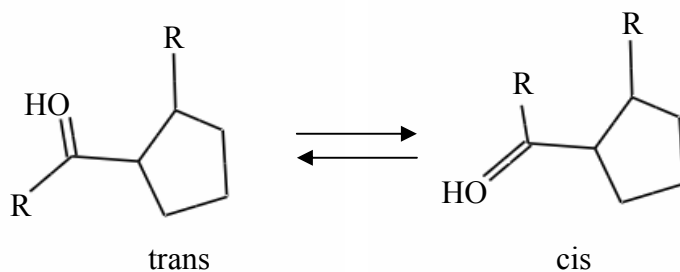


Abb. 4-2: Schematische Darstellung einer cis/trans Isomerisierung von Prolin.

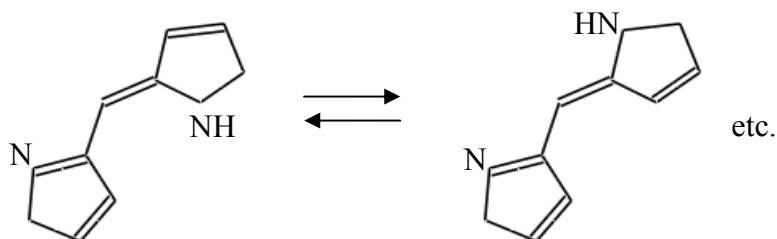


Abb. 4-3: Schematische Darstellung eines Ausschnittes des PCB Chromophors und einer, von mehreren möglichen, Rotationen um die Methinbrücke.

4.3. Verlauf der Entfaltung von PC

In einer zusammenfassenden Interpretation der Ergebnisse der Entfaltungsversuche von PC und den UE scheinen folgende Vorgänge bei der Entfaltung von PC wahrscheinlich. Zuerst erfolgt die Dissoziation des PC_{tri} zu PC_{mono}. Hierbei geschieht noch keine sichtbare Veränderung der Konformation des Chromophors, sondern lediglich eine Veränderung in der Interaktion von Chromophor und Proteinumgebung bzw. der Chromophor-Chromophor Interaktion, was zu entsprechender Signalveränderung führt (Kap. 1.5.). Anschließend entfaltet PC_{mono}. Bei diesem Vorgang erfolgt auch die UE-Trennung, die jedoch nicht isoliert zu erkennen ist. Trotzdem scheint es, wie in Kap. 4.1.2.5. begründet, dass die Dissoziation von PC_{mono} in die UE, ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist.

Wie bereits mehrfach beobachtet ist der Vorgang der Auflösung der Sekundärstruktur mit den Messparametern, die die Veränderung des Chromophors als Sonde messen, nicht zu sehen (Absorption, Vis-CD, Emission). Im UV-CD wird eine andere Kinetik nachgewiesen wie bei der Absorption, dem Vis-CD und der Emission. D. h. die Veränderung des Chromophors ist nicht oder zumindest unwesentlich von der Konformation der Sekundärstruktur beeinflusst, demnach sind dafür maßgeblich lokale Strukturen in der Chromophorumgebung verantwortlich. Inwieweit es sich dabei noch um Tertiärstruktur handelt kann gegenwärtig noch nicht gesagt werden. Wie weiter unten noch detaillierter diskutiert wird, kann der Vorgang der Entfaltung sehr komplex sein und nach neueren Erkenntnissen durchaus von der klassischen Sichtweise abweichen, dass zuerst die Tertiärstruktur entfaltet sein muss, bevor sich die Sekundärstruktur auflöst. Es können auch gewisse Vorgänge parallel verlaufen.

Bei der Absorptionsabnahme während der Entfaltung ist davon auszugehen, dass es sich dabei wesentlich um die Veränderung der Konformation des Chromophors handelt. Jedoch ist auch bekannt, dass die Deprotonierung des Chromophors zu einer starken Absorptionsabnahme führt (Kap. 1.5., 1.6.). Diese Unterscheidung wäre sehr relevant, um die Entfaltungsvorgänge besser verstehen zu können (Staniforth et al., 1999), ist aber mit den verwendeten spektroskopischen Techniken nicht möglich. Eine Entscheidung könnte mittels Raman Resonanz möglich sein (Sawatzki et al. 1990; Siebert et al. 1980, Siebert, 1984).

Der Entfaltungsvorgang von PC und den UE ist sehr differenziert mit womöglich verschiedenen parallel ablaufenden Vorgängen. Dies zeigt sich sowohl im Vergleich der

Kinetik von PC mit den UE (Kap. 4.1.2.5.). Dort wird deutlich wie sich in der offensichtlichen Kinetik des integralen PCs teilweise differenziertere Entfaltungsvorgänge der UE verbergen. Als auch in den zum Teil unterschiedlichen Kinetiken der einzelnen Messparametern (Absorption, Vis-CD, Emission) je Proteinspezies (integrales PC, UE) und den Abweichungen zwischen den lokalen Analysen der Absorption und dem Vis-CD. Diese Komplexität zeigt sich aber erst im Vergleich der einzelnen Messreihen. Für den kinetischen Verlauf bei nur einem Messparameter konnte keine verzweigte Reaktion gefunden werden (Kap. 3.9.2.1.).

In den steady-state Messungen löst sich die Sekundärstruktur als letztes auf. Dies bedeutet, dass es ein Intermediat gibt, bei welchem die Tertiärstruktur bereits weitgehend entfaltet ist, während die Sekundärstruktur noch weitgehend kompakt vorhanden ist (besonders beim integralen PC ausgeprägt) (Abb. 3-26, bei 6 M Harnstoff), dies deutet auf die Möglichkeit eines „molten globule“ hin (Mizuguchi et al., 1998; Ptitsyn et al., 1995). Der „molten globule“ ist typisch für Globinproteine, Phycocyanin zeigt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit diesen (Pastore & Lesk, 1990). Bei den kinetischen Messungen tritt dieser Zustand nicht auf (Kap. 4.1.2.4.). Nach dem „framework“ Modell (Kim & Baldwin, 1982) wurde vorausgesagt, dass ein Protein in zwei hauptsächliche Intermediate faltet (Ptitsyn, 1973, 1987), zuerst in ein Intermediat in dem es Regionen mit Sekundärstruktur gibt, anschließend in einen wesentlich kompakteren Zustand, den „molten globule“ (Dolgikh et al., 1981, 1984; Baldwin, 1993; Jennings & Wright, 1993). Auch wenn die Faltungsvorgänge in einem Protein mittlerweile oft als wesentlich komplexere Vorgänge beschrieben werden, wurde bei dem hier untersuchten Protein gezeigt, wie sich die Sekundärstruktur in ihrer Auflösung von der Entfaltung, die im Wesentlichen der Tertiärstruktur und vergleichbaren lokalen Strukturen der Chromophorumgebung zugewiesen wurden (siehe oben) kinetisch deutlich unterscheidet. Ein Verhalten, dass mit der Bildung eines „molten globule“ übereinstimmen würde. Der „molten globule“ entsteht üblicherweise bei mildereren Entfaltungsbedingungen (Ptitsyn, 1992), dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, warum bei 6 M Harnstoff (Abb. 3-26) Hinweise zu einem „molten globule“ gefunden werden, während bei den kinetischen Studien, bei denen eine höhere Harnstoffkonzentration (8 M) verwendet wird, dieser nicht auftritt.

Der globale Vorgang der Sekundärstrukturauflösung stellt sich in den kinetischen Messungen bei weitem nicht so differenziert dar, wie die lokale Strukturauflösung in der Chromophorumgebung. Er findet höchstwahrscheinlich in nur zwei Schritten statt (Abb. 4-1,

Tab. 4-3). Der Ablauf scheint für die Auflösung der α -Helices insgesamt zu gelten und in der β -UE (α -UE keine Daten) keine weitere wesentliche Differenzierung zu zeigen (Kap. 4.1.2.5.). Aufgrund der schnellen Entfaltung der Sekundärstruktur, die anscheinend bereits erfolgt bevor alle anderen Strukturen vollständig entfaltet sind, sieht es so aus, dass der „hydrophobische Kollaps“ vor bzw. während der Sekundärstrukturbildung erfolgt und nicht nach ihr (Akiyama et al., 2000), wie im „framework“ Modell postuliert. Außerdem sind, wie auch andere Untersuchungen zeigen, sowohl thermodynamisch als auch kinetisch bei ein und demselben Protein oft verschiedene Faltungs- und auch Entfaltungswege möglich (Cannone et al., 2005) welche auch parallel ablaufen können (Grantcharova et al., 2001; Nakamura & Masaki, 2001). Im Vergleich der Messung des integralen PCs mit denen der UE und im Vergleich der globalen und lokalen Analyse zeigte sich, dass durchaus hinter einem einfacher scheinenden Entfaltungsweg differenziertere Vorgänge stehen können. Bei Ribonuclease A wurde vergleichbares gefunden. Ein Mitteln der Messwerte führte zu nur einem Entfaltungsweg, hinter dem sich aber mehrere verzweigte verbargen (Juneja & Udgaonkar, 2002). Selbst die Rückfaltung von Ribonuclease A zeigte wiederum einen von der Entfaltung abweichenden Weg (Hagerman et al., 1979). Die Veränderung im bereits entfalteten Zustand von PC ist der letzte und langsamste Vorgang und er wirkt sich nicht auf die Sekundärstruktur aus. Dies ist auch nicht zu erwarten, falls es sich dabei tatsächlich um eine Torsion der Methinbrücke im Chromophor handelt, wie oben diskutiert (Kap. 4.2.2.). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Entfaltung von PC ein sehr komplexer Vorgang mit vielen verschiedenen Vorgängen und Intermediaten ist. Um diese, sowohl die Vorgänge, als auch die Intermediate, weiter zu bestimmen, sind weitere Untersuchungen nötig.

Folgende weitergehende Untersuchungen würden sinnvoll erscheinen. Der langsame $U_F \rightarrow U_S$ Übergang, sollte, wie bereits erwähnt, von den schnellen Entfaltungsschritten separiert werden um dann noch einmal analysiert zu werden. Der Chromophor sollte direkt auf eine mögliche Rotation der Methinbrücken hin untersucht werden. In der β -UE wäre es sinnvoll zu unterscheiden, welche Vorgänge im PCB- β 155 oder β 84 gesehen werden. Dafür müssten Faltungsexperimente mit Mutanten mit jeweils nur einem Chromophor verwendet werden, wie sie bereits hergestellt wurden (z. B. Zhao et al., 2004). Als Vergleich, inwieweit der Chromophor selbst einen Einfluss auf die Entfaltung hat, könnte eine Mutante der α -UE ohne Chromophor untersucht werden (z. B. Zhao et al., 2006). Wie im Fall von Lysozym gezeigt wurde, hat eine funktionelle Gruppe durchaus einen Einfluss auf die Entfaltung des Proteins (Mizuguchi et al., 1998). Um den Vorgang der Dissoziation vom Trimer sicherer zu belegen,

sollte PC_{mono} ohne Harnstoff hergestellt werden um Messartefakte, wie sie in dieser Arbeit auftraten (Kap. 3.9.3.) aus zuschließen. Sollte dabei mittels einer geringen Proteinkonzentration das Monomer hergestellt werden sollten Messparameter gewählt werden, bei denen ein geringeres Signal/Rauschverhältnis gegeben ist, als bei den hier verwendeten (Kap. 3.4.). Allerdings muss bedacht werden, dass die Messbedingungen, welche, wie gezeigt (Kap. 3.6.) einen wesentlichen Einfluss auf die Messwerte haben, dabei verändert werden. Wie in der Diskussion deutlich wurde, wäre es sinnvoll noch einige Einzelwellenlängen Messungen bei Wellenlängen vorzunehmen, die der Absorption oder der Fluoreszenz eines bestimmten Chromophors zugeordnet werden können. Die Verwendung eines schnelleren Mixgerätes, als die hier verwendete stop-flow Apparatur, mit noch sensibler auf Veränderung reagierenden Messparametern könnte eventuell zu einer noch weiteren Differenzierung der Entfaltungskinetik führen (Teilum et al., 2002; van Amerongen & van Grondelle, 1995). Wie oben bereits für die Protonierung gesagt, wäre es sinnvoll zu unterscheiden, welche der in Kap. 1.5. aufgeführten Möglichkeiten, die das Spektrum vom PC verändern, im Einzelfall gesehen werden und welche Strukturen des Proteins, welchen Einfluss auf die Stabilität und die Entfaltungskinetik haben (Allen et al., 2001; Kim et al., 2001).

5. Zusammenfassung

Das Protein Phycocyanin (PC), ein Biliprotein aus dem Antennenkomplex Phycobilisom von *Mastigocladus laminosus*, trägt Phycocyanobiline (PCB) als Chromophore. Die Konformation und Interaktion von Chromophor und Chromophorumgebung ändert sich bei der Entfaltung des Proteins, was sich in deutlichen Veränderungen seiner spektroskopischen Eigenschaften zeigt. Dies zeichnet PC für Faltungs- und Entfaltungsexperimente aus.

Als spektroskopische Messparameter zum Studium der Entfaltung von PC und den Untereinheiten (UE) wurde die Absorption, das Vis-CD, die Emission und der UV-CD verwendet. Die Absorption, das Vis-CD und die Emission messen den Chromophor als natürliche Sonde (ca. 240 nm bis 820 nm). Dabei unterscheiden sie sich im Wesentlichen darin, dass die Absorption die Konformation des Chromophors detektiert. Dieser geht während der Entfaltung von einer gestreckten, verdrillten Form in eine ringartige über. Der Vis-CD misst diese Verdrilltheit und die Emission gibt die Rigidität des Chromophors wieder. Der UV-CD (190 nm bis 250 nm), weitgehend unabhängig vom Chromophor, misst die Sekundärstruktur, die im Fall von PC ausschließlich aus α -Helices besteht.

Es wurde gezeigt und ist teilweise aus der Literatur bekannt, dass sich die Pufferkonzentration in zweierlei Hinsicht auf PC auswirkt. Zum einen beeinflusst sie maßgeblich das Trimer-Monomer-Gleichgewicht. Bei ≥ 30 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP) liegt das Gleichgewicht auf der Seite des Trimers. Und zum anderen beeinflusst sie den denaturierenden Effekt von Harnstoff. In niedriger konzentriertem Puffer (3 mM KPP) dissoziiert und entfaltet PC um ca. 1 M Harnstoff früher, als in höher konzentriertem (300 mM KPP). Dabei wirkt sich die Veränderung der Pufferkonzentration bei den verschiedenen spektroskopischen Parametern z. T. unterschiedlich aus.

In 50 mM KPP, pH 7, RT wurden die spektroskopischen Eigenschaften von trimeren PC (PC_{tri}), monomeren PC (PC_{mono}), entfaltetem PC (PC_{denat}), nativer α -UE (α -UE_{nat}), entfalteter α -UE (α -UE_{denat}), nativer β -UE (β -UE_{nat}) und entfalteter β -UE (β -UE_{denat}) bestimmt. Dabei liegt PC in 0 M Harnstoff als PC_{tri} bzw. die UE nativ vor, in 4 M als PC_{mono} und in 8 M Harnstoff ist das Protein (PC und UE) entfaltet. Die Absorption reagiert auf die Monomerisierung von PC_{tri} mit einer geringen Signalabnahme ($\epsilon = 292.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ auf $272.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und leichten Rotverschiebung im langwelligen Maximum (≈ 617 nm auf

≈613 nm). Und auf die Entfaltung mit einer sehr starken Signalreduktion um ca. das 6-fache im langwelligen Maximum ($\epsilon = 48.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Das Vis-CD zeigt die Monomerisierung von PC_{tri} durch eine Signalzunahme des positiven Extremums an ($\Delta\epsilon = 242 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ auf $265 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), die Entfaltung zeigt sich durch eine ca. 2,5-fache CD-Abnahme ($\Delta\epsilon = 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die Emission reduziert bei der Monomerisierung ihr Maximum (bei ca. 645 nm) um etwa ein Drittel jedoch zeigen die Spektren keinen qualitativen Unterschied zwischen PC_{tri} und PC_{mono} . Im UV-CD ist die Monomerisierung nicht sichtbar. Entfaltetes Protein zeigt keine Emission und keinen UV-CD mehr. Die Spektren der UE unterscheiden sich vor allem darin, dass sich das langwellige Maximum der Absorption der β -UE um ca. 10-12 nm gegenüber PC_{tri} und der α -UE blau verschiebt und das Signal bei gleicher Proteinkonzentration um ca. 1/3 reduziert (2 PCBs im Gegensatz zu 3 im PC_{tri}). In der α -UE reduziert sich die Signalintensität um ca. 2/3 (1 PCB). Das positive Extremum im Vis-CD ist für die α -UE um ca. 20 nm rot gegenüber dem integralen PC verschoben und bei der β -UE um ca. 17 nm blau. Bei der Entfaltung zeigen beide eine ähnlich starke Abnahme an Signalintensität wie das integrale PC.

Bei Titrationsmessungen von PC_{tri} in 0 bis 8 M Harnstoff (Messbedingungen wie oben) zeigte sich, dass die vier Messparameter in unterschiedlicher Weise auf die Entfaltung reagieren. Die Emission reagiert bei zunehmender Harnstoffkonzentration als erstes, gefolgt von der Absorption und dem Vis-CD, die sich ähnlich verhalten. Als letztes reagiert der UV-CD. Das heißt es liegen bei der Entfaltung (zusätzlich zur Monomerisierung) zumindest drei Intermediate vor. Bei der α -UE gibt es keinen Unterschied in der Emission und der Absorption, die gleichermaßen als erstes reagieren, gefolgt von der Vis-CD-Abnahme. Der UV-CD reagiert auch hier als letztes. Das heißt, es liegen zumindest zwei verschiedene Intermediate vor. Bei der β -UE reagiert ebenfalls der UV-CD bei der höchsten Harnstoffkonzentration. Die Absorption, die Emission und der Vis-CD unterscheiden sich nicht. Es liegt demnach zumindest ein Intermediat vor. Diese Messergebnisse werden dahingehend interpretiert, dass das integrale PC nicht nur die Summe der Reaktionen der UE darstellt, sondern eine eigene Dynamik entwickelt.

Die kinetischen Entfaltungsexperimente fanden bei den gleichen Messbedingungen und mit den gleichen spektroskopischen Messparametern wie die steady-state Messungen statt. Die Entfaltung mittels stop-flow Apparatur, mit einer Totzeit von 6 ms, einer Zeitauflösung von μs bzw. ms zu Beginn der Messung bis zu s zum Ende der Messung, erfolgte über 300 bzw.

600 s Messzeit. In der Absorption und dem Vis-CD wurden sowohl globale Analysen als auch lokale bei einzelnen Wellenlängen durchgeführt. Bei der Fluoreszenz wurde die gesamte Emission oberhalb eines Cut-off Filters detektiert und im UV-CD wurde bei 222 nm gemessen.

Für verschiedene Messparameter wurden bei einer Proteinspezies (PC, UE) häufig unterschiedliche Kinetiken detektiert; dabei reagierte der UV-CD generell am schnellsten. Bei den Messparametern, denen der Chromophor als Sonde dient (Absorption, Vis-CD und Emission) reduzierte sich zumeist zuerst die Emission, gefolgt von Absorption und Vis-CD. In der Absorption wurden tendenziell mehr Intermediate gemessen, als im Vis-CD. Auch zeigen sich zwischen den lokalen Wellenlängenmessungen bei der Absorption überwiegend mehr qualitative Unterschiede, als im Vis-CD. Dabei konnten folgende Reaktionsschritte von PC_{tri} unterschieden werden. Eine schnelle Monomerisierung von PC_{tri} zu PC_{mono} , gefolgt von einer langsameren Entfaltung zu PC_{denat} , die je nach Messparameter eine unterschiedliche Zahl an Intermediaten aufweist. In vielen Fällen wurde noch eine Reaktion im bereits entfalteten PC analysiert, dies gilt auch für die UE. Der wesentliche Unterschied zu den Messungen an den isolierten UE besteht darin, dass bei den UE mehr und deutlich schnellere Entfaltungsschritte gemessen wurden. Dies lässt die Interpretation zu, dass sich die UE im integralen PC gegenseitig stabilisieren und dies zu einer eigenen Dynamik in der Entfaltung von PC_{tri} führt (ähnliche der steady-state Messungen). Eventuell stellt die Dissoziation der UE, die mit diesen Messparametern nicht direkt gemessen werden kann, einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Entfaltung dar. In der Emission zeigt sich die Monomerisierung von PC_{tri} durch eine ausgeprägte Signalabnahme. Im UV-CD wird lediglich Entfaltung gemessen, auch hier zeigt sich, dass sich die UE im integralen PC stabilisieren. Generell zeigt der UV-CD eine deutlich abweichende Kinetik von den anderen Messparametern.

Zusammenfassend lassen die Daten noch folgende weitere Interpretationen zu: Die Konformationsänderung des Chromophors ist, zumindest weitgehend, unabhängig von der Sekundärstruktur. Es gibt Hinweise auf einen „molten globule“. Für die Reaktion im bereits entfalteten Protein wird eine Rotation an einer Methinbrücke im Chromophor diskutiert. Für jeweils einen Messparameter gibt es keinen Hinweis auf ein verzweigtes Reaktionsschema. Im Vergleich der verschiedenen Messparameter sieht es aber so aus, dass die Entfaltung von PC und den UE ein komplexer Vorgang ist, bei dem verschiedene Vorgänge parallel ablaufen.

6. Literaturverzeichnis

- Adir N., Vainer R. and Lerner N. (2002) Refined structure of C-phycoerythrin from the cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 1.6 Å: insights into the role of solvent molecules in thermal stability and co-factor structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1556, 168-174
- Agard D. A. (1993) To fold or not to fold. *Science*, 260, 1903-1904
- Akiyama Sh., Takahashi S., Ishimori K. and Morishima I. (2000) Stepwise formation of α -helices during cytochrome c folding. *Nature Struct. Biol.*, 7, 514-520
- Alberte R. S., Wood A. M., Kursar T. A. and Guillard R. L. (1984) Novel phycoerythrins in marine *Synechococcus* sp. Characterization and evolutionary and ecological implications. *Plant Physiol.* 75, 732-739
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. D. (1995) Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Allen S. J., Kim J.-M., Khorana H. G., Lu H. and Booth P. J. (2001) Structure and Function in Bacteriorhodopsin: The Effect of the Interhelical Loops on the Protein Folding Kinetics. *J. Mol. Biol.*, 308, 423-435
- Amerongen van H. and Grondelle van R. (1995) Transient Absorption Spectroscopy in Study of Processes and Dynamics in Biology. *Meth. Enzymol.*, 246, 201-226
- Amzel M. (2000) Calculation of Entropy Changes in Biological Processes: Folding, Binding and Oligomerization. *Meth. Enzymol.*, 323, 167-177
- Anfinsen C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181, 223-230
- Bachmann A., Segel D. and Kiefhaber Th. (2002) Test for cooperativity in the early kinetic intermediate in lysozyme folding. *Biophys. Chem.*, 96, Issue 2-2, 141-151
- Baker D. (2000) A surprising simplicity to protein folding. *Nature*, 405, 39-42
- Baldwin R. L. (1986) Seeding protein folding. *Trends Biochem. Sci*, 11, 6-9
- Baldwin R. L. (1993) Pulsed H/D-exchange studies of folding intermediates. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3, 84-91
- Baldwin R. L. (1994) The nature of protein folding pathways: The classical view versus the new view. *J. Biomol. NMR*, 5, 103-109
- Bennett A., Siegelman H. W. (1979) Bile Pigments of Plants. In: Dolphin D. (Hrsg.) The Porphyrins Vol. VI. 493-520, Academic Press. Inc., New York
- Berkelman T. R. and Lagarias J. C. (1986) Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 156, 194-201

- Bieri O. and Kiefhaber Th. (1999) Elementary Steps in Protein Folding. *Biol. Chem.*, 380, 923-929
- Binstead R. A., Jung B. and Zuberbühler A. D. (2000-2002) Manual: SPECFIT/32 Global Analysis System, Version 3.0. Global analysis of equilibrium and kinetic systems with singular value decomposition and nonlinear regression modeling by the Levenberg-Marquardt method. Spectrum Software Associates, Boston
- Bishop J. E., Rapoport H., Klotz A. V. Chan C. F. Glazer A. N., Füglistaller P. and Zuber H. (1987) Chromopeptides from Phycoerythrocyanin: Structure and linkage of the three bilin groups. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 857-881
- Bonfiglio J. V., Bonnett R., Buckley D. G., Hamzetash D., Hursthouse M. B., Malik K. M. A., Naithani S. C. and Trotter J. (1982) The meso-reactivity of porphyrins and related compounds. Part VIII. *J. Chem. Soc. Perkin Tans. I*, 1291-1302
- Braig K., Otwinowski Z., Hedge R., Bolsvert D. C., Joachimiak A., Horvich A. L. and Sigler P. B. (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2,8 Å. *Nature*, 371, 578-586
- Brandlmeier Th., Scheer H. and Rüdiger W. (1981) Chromophore Content and Molar Absorptivity of Phytochrome in the P_r Form. *Z. Naturforsch.*, 36c, 431-439
- Brandts J. F. and Lin L.-N. (1986) Proline Isomerization Studied with Proteolytic Enzymes. *Meth. Enzymol.*, 131, 107-125
- Brandts J. F., Halvorson H. R. and Brennan M. (1975) Consideration of the Possibility that the Slow Step in Protein Denaturation Reactions Is Due to Cis-Trans Isomerism of Proline Residues. *Biochemistry*, 14, 4953-4962
- Brunings K. J., Corwin A. H. and Alsoph H. (1942) Pyrrole series. VI. Steric influences on the aromaticity of dipyrromethenes. *Amer. Chem. Soc.*, 64, 593-600
- Bryant D.A. (Hrsg.) (1994) Advances in Photosynthesis: The Molecular Biology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Bucci E. (2001) CDPro User Manual. <http://lamar.ColoState.EDU>
- Byfield P. G. H. and Zuber H. (1972) Chromophor-containing peptide Sequences in C-Phycocyanin from *Mastigocladus laminosus*. *Febs Lett.*, 28, 36-40
- Cannone F., Bologna S., Campanini B., Diaspro A., Bettati St, Mozzarelli A. and Chirico G. (2005) Tracking Unfolding and Refolding of Single GFPmut2 Molecules. *Biophys. J.*, 89, 2033-2045
- Cantor Ch. R. and Schimmel P. R. (1980) Biophysical Chemistry Part III: The behavior of biological macromolecules. W. H. Freeman and Company, New York
- Castenholz R. W. (1970) Laboratory culture of thermophilic Cyanophytes. *Schweizer Z. Hydrol.*, 35, 538-551

- Chen Ch.-H., Kao O. H. W. and Berns D. S. (1977) Denaturation of Phycocyanin by Urea Determination of the Enthalpy of Denaturation by Microcalorimetry. *Biophys. Chem.*, 7, 81-86
- Chen Y.-H. Yang J. T. and Chau K. H. (1974) Determination of the Helix and β Form of Proteins in Aqueous Solution by Circular Dichroism. *Biochemistry*, 13, 3350-3359
- Creighton T. E. (1988) Disulphide bonds and protein stability. *Bioessays*, 8, 57-63
- Cullen D. L., Pepe G., Meyer jr. E. F., Falk H. and Grubmayr K., (1979) Syn- and anti-Conformation in oxodipyrromethenes: crystal and molecular structure of 3,4-dimethyl-2,2'-pyrromethen-5(1H)-one and its N-methyl derivative. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 999-1004
- Debreczeny M. P., Sauer K. Zhou J. and Bryant D. A. (1995a) Comparison of Calculated and Experimentally Resolved Rate Constants for Excitation Energy Transfer in C-Phycocyanin. 1. Monomers. *J. Phys. Chem.*, 99, 8412-8419
- Debreczeny M. P., Sauer K., Zhou J. and Bryant D. A. (1993) Monomeric C-Phycocyanin at Room Temperature and 77 K: Resolution of the Absorption and Fluorescence Spectra of the Individual Chromophores and the Energy-Transfer Rate Constants. *J. Phys. Chem.* 97, 9852-9862
- Debreczeny M. P., Sauer K., Zhou J. and Bryant D. A. (1995b) Comparison of Calculated and Experimentally Resolved Rate Constants for Excitation Energy Transfer in C-Phycocyanin. 2. Trimers *J. Phys. Chem.*, 99, 8420-8431
- Demidov A. A., Mimuro M. (1995) Deconvolution of C-Phycocyanin β -84 and β -155 Chromophore Absorption and Fluorescence Spectra of Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Biophys. J.*, 68, 1500-1506
- Dobson Ch. M. (1992) Unfolded proteins, compact states and molten globules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2, 6-12
- Dolgikh D. A., Gilmanshin R. I., Brazhnikov E. V. et al. (1981) α -Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett.*, 136, 311-315
- Dolgikh D. A., Kolomiets A. P., Bolotina I. A. and Ptitsyn O. B. (1984) Molten globule state accumulates in carbonic anhydrase folding. *FEBS Lett.*, 165, 88-92
- Eftink M. R. and Shastry M. C. R. (1997) Fluorescence Methods for Studying Kinetics of Protein-Folding Reactions. *Meth. Enzymol.*, 278, 258-286
- Falk H. (1989) The Chemistry of linear Ologopyrrols and Bile Pigments. Springer Verlag, Wien
- Falk H. and Höllbacher G. (1978) Contributions to the chemistry of pyrrole pigments, XXIV: The relation between light absorption and structure of bilatrienes-abc. *Monatsh. Chem.*, 109, 1429-1449
- Fischer R. (1990) Struktur-Funktions-Beziehungen in Biliproteinen aus *Mastigocladus laminosus*. Dissertation, LMU München

- Fischer R., Gottstein J. and Scheer H. (1990) Picosecond Time-Resolved Fluorescence of Phycobiliproteins: Subunits of Phycocyanin from *Mastigocladus laminosus*. *Photochem. Photobiol.*, 5, 151-165
- Foerstendorf H., Benda Ch., Gärtner W., Storf M., Scheer H. und Siebert F. (2001) FTIR Studies of Phytochrome Photoreactions Reveal the C=O Bands of the Chromophore: Consequences for Its Protonation States, Conformation, and Protein Interaction. *Biochemistry*, 40, 14952-14959
- Frank G., Sidler W. Widmer H. and Zuber H (1978) The complete amino acid sequence of both subunits of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* *Hoppe-Seyley's Z Physiol. Chem.*, 359, 1491-1507
- Füglistaller P., Suter F. and Zuber H. (1983) The complete amino acid sequence of both subunits of phycoerythrocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Hoppe-Seyley's Z Physiol. Chem.*, 364, 691-712
- Füglistaller P., Widmer H., Sidler W., Frank G, and Zuber H. (1981) Isolation and characterization of Phycoerythrocyanin and chromatic adaption of the thermophilic cyanobacterium *Matigocladus laminosus*. *Arch. Microbiol.*, 129, 268-274
- Gampp H., Maeder M. and Zuberbühler A. D. (1988) Computerized data acquisition and data reduction in spectrophotometric analysis. *Trends Analy. Chem.*, 7, 147-150
- Gampp H., Maeder M., Meyer C. J. and Zuberbühler A. D. (1985a) Calculation of Equilibrium Constants from multiwavelength spectroscopic Data –I. *Talanta*, 32, 95-101
- Gampp H., Maeder M., Meyer C. J. and Zuberbühler A. D. (1985b) Calculation of Equilibrium Constants from multiwavelength spectroscopic Data –II. *Talanta*, 32, 257-264
- Gampp H., Maeder M., Meyer C. J. and Zuberbühler A. D. (1985c) Calculation of Equilibrium Constants from multiwavelength spectroscopic Data –III. *Talanta*, 32, 1133-1139
- Gampp H., Maeder M., Meyer C. J. and Zuberbühler A. D. (1986) Calculation of Equilibrium Constants from multiwavelength spectroscopic Data –IV. *Talanta*, 33, 943-951
- Gampp H., Maeder M., Meyer C. J. and Zuberbühler A. D. (1987) Quantification of a known component in a unknown mixture. *Analy. Chim. Acta*, 193, 287-293
- Gantt E. (1980) Structure and Function of Phycobilisomes: Light Harvesting Pigment Complexes in red and blue-green Algae. *Int. Rev. Cyt.*, 66, 45-80
- Gantt E., Edwards M., R. and Provasoli L. (1971) Chloroplast structure of the cryptophyceae. Evidence for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces. *J. Cell Biol.*, 48, 280-290
- Georgopoulos C. and Welch W. J. (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9, 601-634

- Glazer A. N. and Fang S. (1973a) Chromophore Content of Blue-Green Algal Phycobiliproteins. *J.Biol Chem.*, 248, 659-662
- Glazer A. N. and Hixson C. S. (1975) Characterization of R-Phycocyanin. *J.Biol Chem.* 250, 5487-5495
- Glazer A. N., Fang S. and Brown D. M. (1973b) Spectroscopic Properties of C-Phycocyanin and of its α and β subunits. *J.Biol Chem.*, 249, 5679-5685
- Glazer N. A. (1976) Phycocyanins: Structure and Function. *Photochem. Photobiol. Rev.*, 1, 71-115
- Grantcharova V., Alm E., J., Baker D. and Horwich A. L. (2001) Mechanisms of protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11, 70-82
- Guard-Friar D. and MacColl R. (1983) Spectroscopic Properties of Tetrapyrroles on Denatured Biliproteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 230, 300-305
- Hagen St. J., Carswell C. W. and Sjolander E. M. (2001) Rate of Intrachain Contact Formation in an Unfolded Protein: Temperature and Denaturant Effects. *J. Mol. Biol.*, 305, 1161-1171
- Hagerman P. J., Schmid F., X. and Baldwin R. L. (1979) Refolding Behavior of a Kinetic Intermediate Observed in the Low pH Unfolding of Ribonuclease A. *Biochemistry*, 18, 293-297
- Ilani A. and Berns D. S. (1971) The effect of ferric ion on Phycocyanin fluorescence. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 45, 1423-1430
- Jennings P. A. and Wright P. E. (1993) Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic pathway of apomyoglobin. *Science*, 262, 892-896
- Jiang T., Zhang J.-P., Chang W.-R. and Liang D.-C. (2001) Crystal Structure of R-Phycocyanin and Possible Energy Transfer Pathways in the Phycobilisoms. *Biophys. J.*, 81, 1171-1179
- Jirgensons B. (1973) CD of Proteins. Springer Verlag, Berlin
- Juneja J. and Udgaonkar J. B. (2002) Characterization of the Unfolding of Ribonuclease A by Pulsed Hydrogen Exchange Study: Evidence for Competing Pathways for Unfolding. *Biochemistr,y* 41, 2641-2654
- Kelly Sh., M. and Price N. C. (1996) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta*, 1338, 161-185
- Kiefhaber Th., Grunert H.-P., Hahn U. and Schmid F. X. (1990) Replacement of a Cis-Proline Simplifies the Mechanism of Ribonuclease T1 Folding. *Biochemistry*, 29, 6475-6480
- Kim J.-M., Booth P. J., Allen S. J. and Khorana H. G. (2001) Structure and Function in Bacteriorhodopsin: The Role of Interhelical Loops in the Folding and Stability of Bactiosrhodopsin. *J. Mol. Biol.*, 308, 409-422

- Kim P. S. and Baldwin R. L. (1982) Specific intermediates on the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 459-489
- Kneip Ch., Parbel A., Foerstendorf H., Scheer H., Siebert F. and Hildebrandt P. (1998) Fourier transform near-infrared resonance Raman spectroscopic study of the α -subunit of phycoerythrocyanin and phycocyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 29, 939-944
- Köst-Reyes E., Schneider S., John W., Fischer R., Scheer H. and Köst H.-P. (1987) Fast preparative isoelectric focusing of phycocyanin subunits in layers of granulated gels. *Electrophoresis*, 8, 335-336
- Kufer W. (1980) Untersuchungen zur Protein-Chromophor-Wechselwirkung in Biliproteiden. Reversible Denaturierung und Darstellung und Charakterisierung von Biliproteiden mit chemisch modifizierten Chromophoren. Dissertation, LMU München
- Kufer W., Scheer H. and Holzwarth A. R. (1982) Isophorcarubin-A Conformationally Restricted and Highly Fluorescent Bilirubin. *Israel J. Chem.*, 23, 233-240
- Kyte J. (1995) Structure in Protein Chemistry. Garland Publishing, Inc. New York & London
- Labhardt A. M. (1986) Folding Intermediates Studied by Circular Dichroism. *Meth. Enzymol.*, 131, 126-135
- Lämmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
- Lapanje S. (1978) Physicochemical Aspects of Protein Denaturation. Wiley-Interscience, New York
- Lehner H. and Scheer H. (1983) Circular dichroism of C-Phycocyanin: Origin of Optical Activity in Denatured Biliproteins and Evidence for an Intermediate during Unfolding. *Z. Naturforsch.*, 38c, 353-358
- Lesch H., Schlichter J., Friedrich J. and Vanderkooi J. M. (2004) Molecular probes: what is the range of their interaction with the environment? *Biophys. J.*, 86, 467-472
- MacColl R. (1998) Cyanobacterial Phycobilisomes. *J. Struc. Biol.*, 124, 311-334
- MacColl R. and Guard-Friar D. (1987) Phycobiliproteins, CRC Press, Boca Raton, FL.
- MacColl R., Berns D. S. and Koven N. L. (1971) Effects of salts on C-phycocyanin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 146, 477-482
- MacColl R., Williams E. C., Eisele L. E., McNaughton P. (1994) Chromophore Topography and Exciton Splitting in Phycocyanin 645. *Biochemistry*, 33, 6418-6423
- Martin J. Langer T., Boteva R. et al. (1991) Chaperonin-mediated protein folding at the surface of GroEL through a „molten globule“-like intermediate. *Nature*, 352, 36-42

- Mimuro M., Rübeler R., Füglistaller P. and Zuber H. (1986) The microenvironment around the chromophores and its changes due to the association states in C-phycoerythrin isolated from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 851, 447-456
- Mizuguchi M., Arai M., Ke Y., Nitta K. and Kuwajima K. (1998) Equilibrium and Kinetics of the Folding of Equine Lysozyme Studied by Circular Dichroism Spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 283, 265-277
- Möglich A., Krieger F. and Kiefhaber Th. (2004) Molecular Basis for the Effect of Urea and Guanidinium Chloride on the Dynamics of Unfolded Polypeptide Chains. *J. Mol. Biol.*, 345, 153-162
- Murphy R. F. and O'Carra P. (1970) Reversible Denaturation of C-Phycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 214, 371-373
- Nakamura H. K. and Sasai M. (2001) Population Analyses of Kinetic Partitioning in Protein Folding. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 43, 280-291
- Nies M. and Wehrmeyer W. (1980) Isolation and Biliprotein Characterization of Phycobilisomes from the Thermophilic Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* Cohn. *Planta*, 150, 330-337
- Pace C. N. (1986) Determination and Analysis of Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation Curves. *Meth. Enzymol.*, 131, 266-280
- Parbel A. (1997) Charakterisierung von Phycobiliprotein-Linkerkomplexen aus dem Phycobilisom von *Mastigocladus laminosus*. Vergleich nativer und überexprimierter Linker. Dissertation, LMU München
- Pastore A. and Lesk A. M. (1990) Comparison of the Structures of Globins and Phycocyanins: Evidence for Evolutionary Relationship. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 8, 133-155
- Pizarro Sh. A., Sauer K. (2001) Spectroscopic Study of the Light-harvesting Protein C-Phycocyanin Associated with Colorless Linker Peptides. *Photochem. Photobio.*, 73, 556-563
- Ptitsyn O. B. (1973) Sequential mechanism of protein folding. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 210, 1213-1215
- Ptitsyn O. B. (1987) Protein folding: hypothesis and experiments. *J. Prot. Chem.*, 6, 273-293
- Ptitsyn O. B. (1992) The molten globule state. In Creighton T. E. (Hrsg) Protein folding. W. H. Freeman and Co, 243-300, New York
- Ptitsyn O. B., Bychkova V. E. and Uversky V. N. (1995) Kinetic and equilibrium folding intermediates. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 348, 35-41

- Reuter W. (1989) Spektrale, strukturelle und biochemische Charakterisierung des Phycobilisomenzentrums und einiger Konstituenten der Phycobilisomenperipherie von *Mastigocladus laminosus* unter Berücksichtigung der Funktion. Dissertation, Philipps-Universität, Marburg/Lahn
- Reuter W., Wiegand G., Huber R., and Manuel E. (1999) Structural analysis at 2.2 Å of orthorhombic crystals presents the asymmetry of the allophycocyanin-linker complex, AP•L_C^{7,8}, from phycobilisomes of *Mastigocladus laminosus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1363-1368
- Richards F. M. (1991) Die Faltung von Proteinmolekülen. *Spektrum*, 3, 72-81
- Rupley J. A., Gratton E. and Careri G. (1983) Water and globular Proteins. *Trends Biochem Sci.*, 8, 18-22
- Santoro M. M. and Bolen D. W. (1988) Unfolding Free Energy Changes Determined by the Linear Extrapolation Method. 1. Unfolding of Phenylmethanesulfonyl α-Chymotrypsin Using Different Denaturants. *Biochemistry*, 27, 8063-8068
- Sauer K. and Scheer H. (1988) Excitation transfer in C-Phycocyanin. Förster transfer rate and exciton calculations based on new crystal structure data for C-Phycocyanin from *Agmellum quadruplicatum* and *Mastigocladus laminosus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 936, 157-170
- Sauer K., Scheer H. and Sauer P. (1987) Förster transfer calculations based on crystal structures data from *Agmellum quadruplicatum* C-Phycocyanin. *Photochem. Photobiol.*, 46, 427-440
- Sawatzki J., Fischer J., Scheer H. and Siebert F. (1990) Fourier-transform Raman spectroscopy applied to photobiological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5903-5906
- Scharnagl Ch. and Schneider S. (1989) UV-visible absorption and circular dichroism spectra of the subunits of C-phycocyanin. I: Quantitative assessment of the effect of chromophore-protein interaction in the α-subunit. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 3, 603-614
- Scharnagl Ch. and Schneider S. (1990) UV-visible absorption and circular dichroism spectra of the subunits of C-phycocyanin. II: A quantitative discussion of the chromophore-protein and chromophore-chromophore interactions in the β subunit. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 8, 129-157
- Scheer H. (1981) Biliproteine. *Angew. Chem.*, 93, 230-250
- Scheer H. (1982) Phycobiliproteins: Molecular Aspects of Photosynthetic Antenna Systems. In: Fong F. K. (Hrsg.) Light Reaction Path of Photosynthesis. 7-45, Springer Verlag, Berlin
- Scheer H. (1999) Pigmente und Antennenkomplexe. In: Häder D. P. (Hrsg.) Photosynthese. 65-90, Thieme Verlag, Stuttgart

- Scheer H. (2003) The pigments. In: Green B. R., Parson W. W. (Hrsg.) Light harvesting antennas in photosynthesis. 29-81, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Scheer H. and Kufer W. (1977) Studies of plant bile pigments. IV. Conformational studies on C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. *Z. Naturforsch.*, 32c, 513-519
- Schellman J. A. (2002) Fifty years of solvent denaturation. *Biophys. Chem.*, 96, 91-101
- Schirmer T., Bode W. and Huber W. (1987) Refined three-dimensional Structures of two Cyanobacterial C-phycoyanins at 2.1 and 2.5 Å Resolution: A Common Principle of Phycobilin-Protein Interaction. *J. Mol. Biol.* 196, 677-695
- Schirmer T., Bode W., Huber R. (1984) The crystal and molecular structure of C-Phycocyanin from *Mastigocladus laminosus* and its implications for function and evolution. Preprint; Symposium on optical properties and structure of tetrapyrroles Konstanz
- Schirmer T., Bode W., Huber R., Sidler W. and Huber Z. (1985) X-ray Crystallographic Structure of the Light-harvesting Biliprotein C-Phycocyanin from the Thermophilic Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its Resemblance to Globin Structures. *J. Mol. Biol.* 184, 257-277
- Schluchter W. M. and Bryant D. A. (2002) Analysis and reconstitution of phycobiliproteins: methods for the characterization of bilin attachment reactions. In: Smith A. G., Witty M. (Hrsg.) Heme, Chlorophyll, and Bilins. 293-309, Humana Press Inc. Totowa, N. J.
- Schmid F. X. (1986) Fast-Folding and Slow-Folding Forms of Unfolded Proteins. *Meth. Enzymol.*, 131, 70-82
- Sharkov A. V., Jryukov I. V., Khoroshilov E. V., Kryukov P. G., Fischer R., Scheer H., Gillbro T. (1994) Femtosecond spectral and anisotropy study of excitation energy transfer between neighbouring α -80 and β -81 chromophores of allophycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1188, 349-356
- Sidler W. (1994) Phycobilisome and Phycobiliprotein Structures. In: Bryant D.A. (Hrsg.) Advances in Photosynthesis: The Molecular Biology of Cyanobacteria. 139-216, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Sidler W., Gysi J., Isker E. and Zuber H (1981) The complete amino acid sequence of both subunits of allophycocyanin: a light harvesting protein-pigment complex from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.*, 362, 611-628
- Siebert F. (1984) Static and time-resolved infrared difference spectroscopy applied to rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Spectrosc. Biol. Mol.*, 139, 347-372
- Siebert F., Mantele W. and Kreutz W. (1980) Flash-induced kinetic infrared spectroscopy applied to biochemical systems. *Biophysics of structure and mechanism*, 6, 139-146

- Siebzehnrübl S. (1990) Chromophorzuordnung und reversible Photochemie von C-Phycocyaninen und Phycoerythrocyaninen, Dissertation, LMU München
- Siebzehnrübl S., Fischer R. and Scheer H. (1987) Chromophore Assignment in C-Phycocyanin from *Mastigocladus laminosus* *Z. Naturforsch.*, 42c, 258-262
- Sreerama N. and Woody R. W. (1993) A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Anal. Biochem.*, 209, 32-44
- Sreerama N. and Woody R. W. (1999) Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Prot. Sci.*, 8, 370-380
- Sreerama N. and Woody R. W. (2000) Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Anal. Biochem.*, 287, 252-260
- Staniforth R. A., Dean J. L. E., Zhong Q., Zerovnik E. and Clarke A. R. (2000) The major transition state in folding need not involve the immobilization of side chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5790-5795
- Stec B., Troxler R. F. and Teeter M. M. (1999) Crystal Structure of C-Phycocyanin from *Cyanidium caldarium* Provides a New Perspective on Phycobilisome Assembly. *Biophysical Journal*, 76, 2912-2921
- Stepanenko O. V., Verkhusha V. V., Kazakov V. I., Shavlovsky M. M., Kuznetsova I. M., Uversky V. N. and Turoverov K. K. (2004) Comparative Studies on the Structure and Stability of Fluorescent Proteins EGFP, zFP506, mRFP1, "dimer2", and DsRed1. *Biochemistry*, 43, 14913-14923
- Storf M. (2003) Chromophorbindung und Photochemie der α -Untereinheit des Phycoerythrocyans aus *Mastigocladus laminosus*. Dissertation, LMU München
- Tandeau de Marsac N. and Cohen-Bazire G. (1977) Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 74, 1635-1639
- Teilum K., Maki K., Kragelund B. B., Poulsen F. M. and Roder H. (2002) Early kinetic intermediate in the folding of acyl-CoA binding protein detected by fluorescence labeling and ultrarapid mixing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 9807-9812
- Unneberg P., Merelo J., Chacon P. and Moran F. (2001) SOMCD: Method for Evaluating Protein Secondary Structure from UV Circular Dichroism Spectra. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 42, 460-470
- Utiyama H. and Baldwin R. L. (1986) Kinetic Mechanisms of Protein Folding. *Meth. Enzymol.*, 131, 51-70
- Vogel R. and Siebert F. (2002) Conformation and Stability of α -Helical Membrane Proteins. 2. Influence of pH and Salts on Stability and Unfolding of Rhodopsin. *Biochemistry*, 41, 3536-3545

- Wiegand G., Parbel A., Seifert M. H. J., Holak T. A. and Reuter W. (2002) Purification, crystallization, NMR spectroscopy and biochemical analyses of α -phycoerythrocyanin peptides. *Eur. J. Biochem.*, 269, 5046-5055
- Williams V. P. and Glazer A. N. (1978) Structural Studies on Phycobiliproteins. *J. Biol. Chem.*, 253, 202-211
- Yu M. H., Glazer A. N. and Williams R. C. (1981) Cyanobacterial phycobilisomes. Phycocyanin assembly in the rod substructures of *Anabaena variabilis* phycobilisomes. *J. Biol. Chem.*, 256, 13130-13136
- Zhao K. H., Haessner R., Cmiel E. und Scheer H. (1995) Type I reversible photochemistry of phycoerythrocyanin involves Z/E-isomerization of α -84phycoviolobilin chromophore. *Biochim. Biophys. Acta*, 1228, 235-243
- Zhao K.-H., Wu D., Zhang L., Zhou M., Böhm St., Bubenzer C. and Scheer H. (2006). Chromophore attachment in phycocyanin. Functional amino acids of phycocyanobilin- α -phycoerythrocyanin lyase and evidence for chromophore binding. *FEBS Lett.*, 273, 1262-1274
- Zhao K.-H., Zhu J.-P., Song B., Zhou M., Storf M., Böhm St., Bubenzer C. and Scheer H. (2004) Nonenzymatic chromophore attachment in biliproteins: conformational control by the detergent Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta*, 1657, 131-145
- Zhou J., Gasparich G. E., Stirewalt V. L., de Lorimier R. and Bryant D. A. (1992) The *cpcE* and *cpcF* genes of *Synechococcus* sp. PCC 7002: construction and phenotypic characterization of interposon mutants. *J. Biol. Chem.*, 267, 16138-16145

7. Anhang

UV-CD von PC_{tri} in 0 bis 8 M Harnstoff

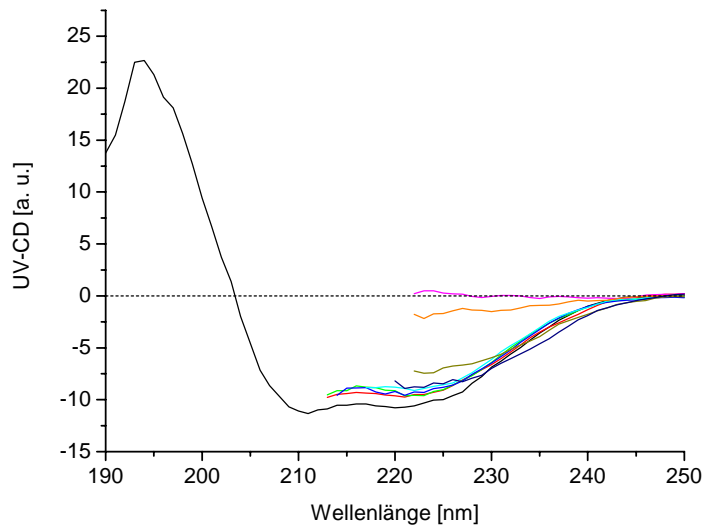


Abb. 7-1: UV-CD Spektren von PC_{tri}: Titration von 0 – 8 M Harnstoff in 50 mM KPP, pH 7; (Messbedingungen Kap. 2.3.4.); in 0 M Harnstoff (—), 1 M (—), 2 M (—), 3 M (—), 4 M (—), 5 M (—), 6 M (—), 7 M (—) und 8 M (—);

Kinetik der Entfaltung vom PC Trimer

Absorption

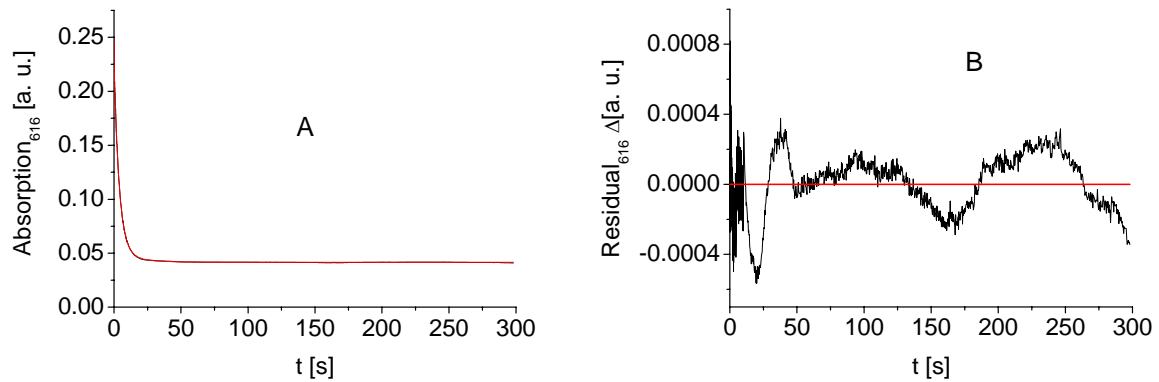


Abb. 7-2: Globaler vierstufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung von PC_{tri}. (Abb. 3-45) Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit Modell a>b>c>d>e (—) und in B) Residuen; gezeigt bei 616 nm. k folgt nicht der Reihenfolge $k_1 > k_2$ etc., sondern $k_2 > k_1 > k_4 > k_3$, siehe Kap. 3.9.2.1.

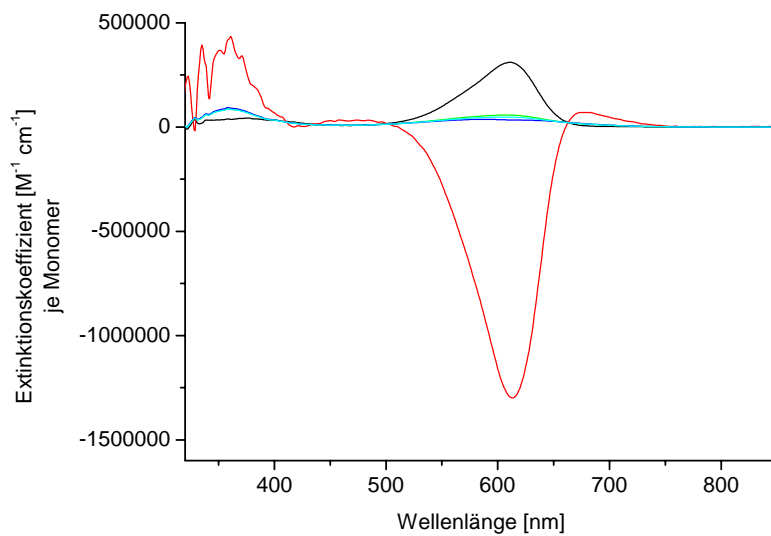


Abb. 7-3: Molare Absorptionsspektren des vierstufigen globalen Fits (7-2) der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-45). Zuordnung der Fitkomponenten steht in Kap. 3.9.2.1. Komponente a (—), b (—), c (—), d (—), e (—), dabei folgt k nicht der Reihenfolge $k_1 > k_2$ etc., sondern $k_2 > k_1 > k_4 > k_3$;

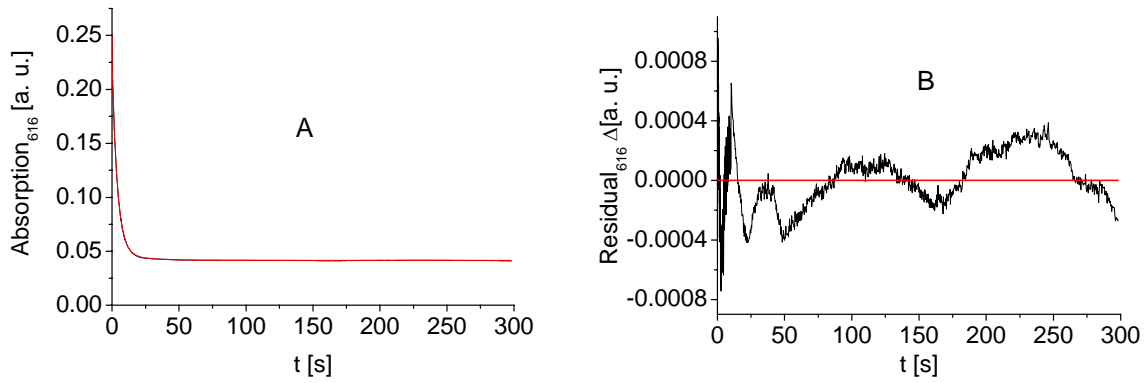


Abb. 7-4: Globaler verzweigter vierstufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung von PC_{tri} (Abb. 3-45). Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c (—) und in B) Residuen. Gezeigt bei 616 nm

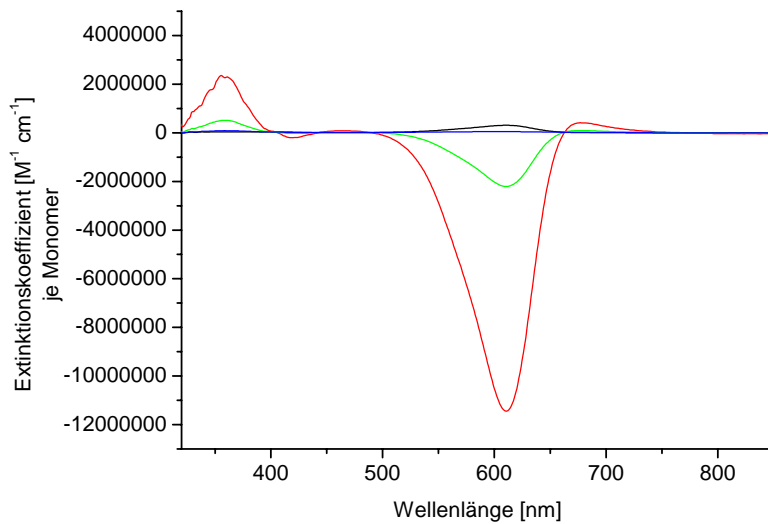


Abb. 7-5: Molare Absorptionsspektren des verzweigten vierstufigen globalen Fits (Abb. 7-4) der Entfaltungskinetik von PC_{tri}; (Abb. 3-45). Zuordnung der Fitkomponenten steht in Kap. 3.9.2.1. Komponente a (—), b (—), c (—), d (—), e (—). Dargestellt ist das verzweigte Modell: a→b→c; mit $k_1: 0,03 \text{ s}^{-1}$, $k_2: 4,5 \text{ s}^{-1}$, $k_3: 3,2 \text{ s}^{-1}$, $k_4: 0,3 \text{ s}^{-1}$;

Vis-CD

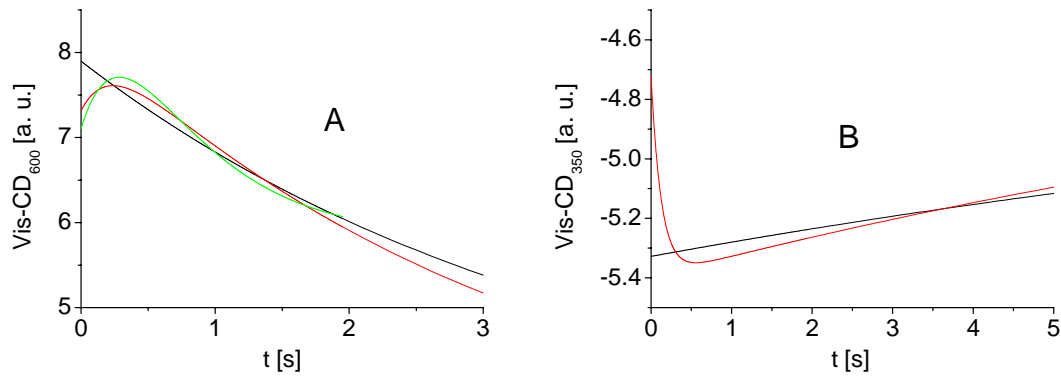


Abb. 7-6: Verschiedene Fits der Vis-CD Daten der Entfaltungskinetik von PC_{tri} (Abb. 3-59) A) lineares, zweistufiges Kinetikmodell bei 600 nm. Gezeigt der Ausschnitt der ersten 3 s; Fitbereich: bis 300 s (—), bis 50 s (—) und bis 2 s (—); B) lineares dreistufiges Kinetikmodell bei 350 nm. Gezeigt der Ausschnitt der ersten 5 s; Fitbereich bis 300 s (—) und bis 50 s (—). (siehe Kap. 3.9.2.2.)

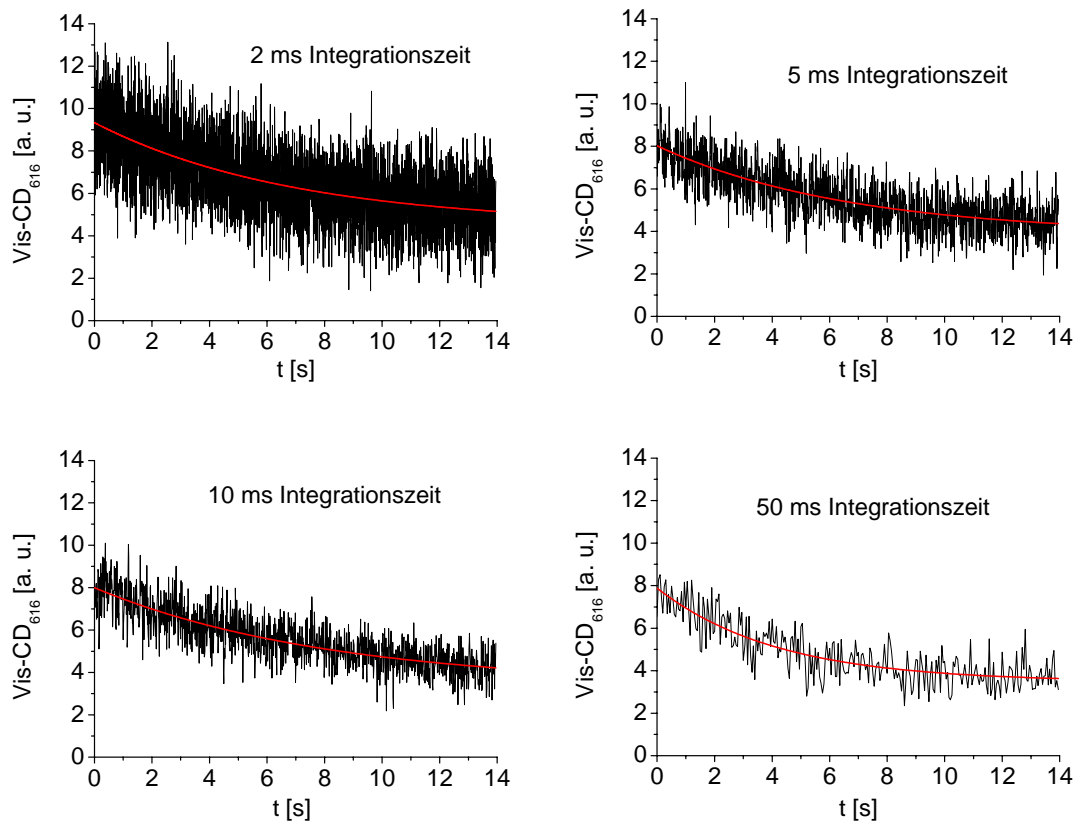


Abb. 7-7: Vis-CD der Entfaltung von PC_{tri} bei 616 nm. Messungen mit verschiedenen Integrationszeiten. jeweils einem einstufigen Fit. Daten (—), Fit (—); Messbedingungen: Messzeit 14 s, Totzeit der stop-flow Apparatur: 6,1 ms. (siehe Kap. 3.9.2.2.)

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1	Phycobilinbindungsstellen in <i>M.laminosus</i> .	5
Tab. 1-2	Lagen und Ionenstärken von Absorption und Emission der PCB Chromophore in PC aus <i>M. laminosus</i> , mit Intensitäten normiert auf den PCB- α 84 Chromophor.	12
Tab. 1-3	Absorptionsspektroskopische Daten von PC bei pH 7 und RT gemessen.	17
Tab. 3-1	Extinktionskoeffizienten je PC _{mono} , d. h. je drei PCBs in 0 bis 8 M Harnstoff in 50 mM KPP.	46
Tab. 3-2	Halbwertszeiten für die PC Entfaltung in 5 bis 8 M Harnstoff.	47
Tab. 3-3	Quantitative Bestimmung von PC nach der Rückfaltung aus verschiedenen Graden der Entfaltung durch unterschiedliche Harnstoffkonzentrationen und Vergleich der Wellenlängen des Maximums im Vis-Bereich nach der Rückfaltung	49
Tab. 3-4	PC Konzentrationen für die Verdünnungsreihe in H ₂ O	50
Tab. 3-5	Parameter der sigmoidalen Fits (Kap. 2.3.4.) der Titrationskurven von PC in 0 – 8 M Harnstoff in 3 und 300 mM KPP, aus den Abb. 3-18 – 3-21.	62
Tab. 3-6	Vergleich der Messwerte von PC in 8 M Harnstoff in 3 (300) und 50 mM KPP, wobei die jeweiligen Werte in 3 mM KPP den Zustand des entfalteten PCs angeben (siehe Kap. 3.5.).	66
Tab. 3-7	Parameter der sigmoidalen Fits (Kap. 2.3.4.) der Titrationskurven von PC _{mono} in 0 – 8 M Harnstoff in 50 mM KPP, aus Abb. 3-26.	70
Tab. 3-8	Parameter der sigmoidalen Fits (Kap. 2.3.4.) der Titrationskurven der α -UE, in 0 – 8 M Harnstoff in 50 mM KPP, aus Abb. 3-27.	73
Tab. 3-9	Parameter der sigmoidalen Fits (Kap. 2.3.4.) der Titrationskurven der β -UE, in 0 – 8 M Harnstoff in 50 mM KPP, aus Abb. 3-28.	74
Tab. 3-10	Sekundärstrukturanteile von PC, α -UE und β -UE aus der Röntgenstruktur (Schirmer, 1985, 1987) und der Analyse der CD-UV Spektren mit CDPro (Sreeram, 2000, Kap. 2.3.4.).	77
Tab. 3-11	Parameter der sigmoidalen Fits (Kap. 2.3.4.) der Titrationskurven von PC, in 0 – 8 M Harnstoff, 50 mM KPP. Aus den Berechnungen für die Sekundärstrukturanteile (Abb. 3-29, 3-30 und 3-31).	78
Tab. 3-12	Spektrale Daten für PC _{tri} , PC _{mono} , PC _{denat} , α - und β -UE nativ und denaturiert; (KPP 50 mM, pH \approx 7,3, RT, PC _{mono} in 4 M Harnstoff, denaturiertes Protein in 8 M Harnstoff; die Werte stammen aus Kap. 3.1., 3.2., 3.7.).	89
Tab. 3-13	Extinktionskoeffizienten der Komponenten der lokalen und des globalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung von PC _{tri} .	99
Tab. 3-14	Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{PC_{tri}/x}$ rel., Kap. 3.2.5.) der lokalen und des globalen Fits, der absorptionsspektroskopischen Messung der Entfaltung von PC _{tri} , mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e \left(\xrightarrow{k_5} f \right);$	99
Tab. 3-15	Ratenkonstanten zu den einstufigen lokalen Kinetikmodellen: $a > b$. Die Analyse basiert aus den Daten der Vis-CD Messungen über 14 s mit unterschiedlichen Integrationszeiten, bei 616 nm.	107
Tab. 3-16	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) der Komponenten der lokalen und des globalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung von PC _{tri} .	111
Tab. 3-17	Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{x/x+1}$ rel., Kap. 2.3.5.) aus den lokalen und globalen Fits der Vis-CD Messungen der Entfaltung von PC _{tri} , mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \left(\xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e \right);$	112

Tab. 3-18	Ratenkonstanten der verschiedenen Fitmodelle der Entfaltungskinetik von PC _{tri} , bei 628 nm aus Abb. 3-67;	117
Tab. 3-19	Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{a/b}$ rel., Kap. 2.3.5.) aus der Emissionsmessung der Entfaltung von PC _{tri} , mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e$;	120
Tab. 3-20	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) der Komponenten des lokalen Fits der Entfaltung von PC _{tri} .	123
Tab. 3-21	Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{x/x+1}$ rel., Kap. 2.3.5.) aus dem lokalen Fit der UV-CD Messung der Entfaltung von PC _{tri} , mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c$;	124
Tab. 3-22	Extinktionskoeffizienten der Komponenten der lokalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung von PC _{mono} .	130
Tab. 3-23	Ratenkonstanten der lokalen Fits, der absorptionsspektroskopischen Messungen der Entfaltung von PC _{mono} mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e$.	130
Tab. 3-24	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) der Komponenten des globalen und der lokalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung von PC _{mono} .	134
Tab. 3-25	Ratenkonstanten der lokalen und des globalen Fits, der Vis-CD Messungen der Entfaltung von PC _{mono} mit dem Fitmodell: $(a \xrightarrow{k_1} b) \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e$.	134
Tab. 3-26	Ratenkonstanten des Fits der Emissionsänderung bei der Entfaltung von PC _{mono} mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d$ (Kap. 2.3.5).	136
Tab. 3-27	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) der Komponenten des lokalen zweistufigen Fits der Entfaltung von PC _{mono} .	138
Tab. 3-28	Ratenkonstanten des lokalen Fits bei 222 nm, der UV-CD Messung der Entfaltung von PC _{mono} mit dem Fitmodell $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c$.	138
Tab. 3-29	Extinktionskoeffizienten je UE, der Komponenten der lokalen und des globalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung der α -UE.	144
Tab. 3-30	Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{\alpha\text{-UE nat}/x}$ rel., Kap. 2.3.5.) des globalen und der lokalen Fits, der absorptionsspektroskopischen Messungen Entfaltung der α -UE, mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e \xrightarrow{k_5} f$;	144
Tab. 3-31	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) je UE, der Komponenten der lokalen und des globalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung der α -UE;	154
Tab. 3-32	Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{\alpha\text{-UE nat}/x}$ rel., Kap. 2.3.5.) des globalen und der lokalen Fits der Vis-CD Messungen der Entfaltung der α -UE mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d$;	154
Tab. 3-33	Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{a/b}$ rel. etc., Kap. 2.3.5.) der Analyse der Emissionsmessungen der Entfaltung der α -UE mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d$.	160
Tab. 3-34	Extinktionskoeffizienten je UE, der Fitkomponenten der lokalen und des globalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung der β -UE;	164
Tab. 3-35	Ratenkonstanten mit dem dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{\beta\text{-UE nat}/x}$, Kap. 2.3.5.) des globalen und der lokalen Fits der absorptionsspektroskopischen Messungen der Entfaltung der β -UE mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e \xrightarrow{k_5} f \xrightarrow{k_6} g$.	164

Tab. 3-36	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) je UE, der Fitkomponenten der lokalen Fits (Kap. 2.3.5.) der Entfaltung der β -UE; und kursiv die Vergleichswerte aus den steady-state Messungen (Details siehe Text).	174
Tab. 3-37	Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{x/x+1}$ rel., Kap. 2.3.5.) der lokalen Fits der CD Messungen bei der Entfaltung der β -UE mit dem Fitmodell: $(a \xrightarrow{k_1} b) \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d$.	174
Tab. 3-38	Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{a/b}$ rel. etc., Kap. 2.3.5.) des Fits der Emissionsänderung bei der Entfaltung der β -UE mit dem Fitmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c \xrightarrow{k_3} d \xrightarrow{k_4} e \xrightarrow{k_5} f$.	177
Tab. 3-39	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) je UE der Komponenten des lokalen Fits der Entfaltung der β -UE.	179
Tab. 3-40	Ratenkonstanten mit den dazugehörigen relativen Amplituden ($A_{x/x+1}$ rel., Kap. 2.3.5.) des lokalen Fits der CD Messung bei der Entfaltung der β -UE bei 222 nm, mit dem Reaktionsmodell: $a \xrightarrow{k_1} b \xrightarrow{k_2} c$.	179
Tab. 4-1	Vergleich zwischen der lokalen und globalen Analyse der Entfaltungskinetik von PC, in der Absorption und dem Vis-CD, bezüglich der Anzahl der analysierten Reaktionsschritte, (Analysen siehe Kap. 3.9).	180
Tab. 4-2	Links: Stufigkeit der Modelle, mit denen die Änderungen der verschiedenen Messparameter bei der Entfaltung gefittet wurden. Rechts: Dauer der Gesamtreaktion (Definition siehe unten).	187
Tab. 4-3	Vergleich der Entfaltungsmodelle aus den kinetischen Messungen (3.9.).	191
Tab. 4-4	Vergleich der Ratenkonstanten aus den kinetischen Messungen der Entfaltung von PC und den UE (Kap. 3.9.). Sie gehören zu den Reaktionsmodellen in Tab. 4-3.	197
Tab. 4-5	Vergleich der letzten Reaktionsschritte der globalen Entfaltungskinetik von PC, gemessen in der Absorption und dem Vis-CD.	199

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Schematische Darstellung des Photosynthesystems eines Cyanobakteriums mit dem Grundtypus des hemidiscoidalem Phycobilisoms (Bryant, 1994).	1
Abb. 1-2	Modell des Phycobilisoms von <i>M. laminosus</i> ;	3
Abb. 1-3	Absorptionsspektren von isolierten, trimeren PEC (-----), PC (----) und APC (—) aus <i>Mastigocladus laminosus</i> (normiert).	4
Abb. 1-4	Struktur der gebundenen Chromophore in den nativen Phycobiliproteinen wie sie in <i>M. laminosus</i> vorkommen (Scheer, 2003).	5
Abb. 1-5	Röntgenstruktur von PC _{tri} aus <i>Mastigocladus laminosus</i>	10
Abb. 1-6	Schematische Darstellung der Kristallstruktur vom PC _{mono} (im Trimeren) von <i>Mastigocladus laminosus</i>	10
Abb. 1-7	Absorptionsspektren des PCB- α 84, PCB- β 84 und PCB- β 155 Chromophor in PC aus <i>M. laminosus</i> . Die Chromophorspektren sind relativ zu ihrem Beitrag im PC _{mono} normiert	11
Abb. 1-8	Schematische Struktur der Chromophore (oben) und Absorptionsspektren (unten) von PC aus <i>Spirulina platensis</i> . Links: ringförmigen Chromophor im entfalteten PC. Rechts: gestreckter Chromophor im gefalteten PC; jeweils bei gleicher Chromophorkonzentration. (Grafik aus Scheer, 1982).	16
Abb. 1-9	Normierte Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der α - (—) und der β UE (•••) von PC. Messbedingungen: 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7, Anregung für α -UE bei 615 nm, für β -UE bei 610 nm, (Grafik aus Fischer, 1990)	17
Abb. 1-10	Vis-CD Spektren von PC aus <i>M. laminosus</i> , a ohne und b mit PCMS. a ist für diese Arbeit zu beachten. A) PC _{tri} , B) PC _{mono} . (Grafiken aus Siebzehnrübl, 1990)	18
Abb. 1-11	Vis-CD Spektren der α - und der β -UE von PC aus <i>Synechococcus</i> sp. (<i>Anacystis nidulans</i>) Messbedingungen: 0,01 M Phosphatpuffer, 0,005 M β -Mercaptoethanol, pH 6,5; Proteinkonzentration: β -UE = $2,53 \cdot 10^{-5}$, α UE = $2,65 \cdot 10^{-5}$ M, (Grafik aus Glazer, 1973b).	18
Abb. 1-12	Vis-CD Spektrum (—) und Absorptionsspektrum (••••) von PC _{denat.} aus <i>Spirulina platensis</i> . Messbedingungen: 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7, 8 M Harnstoff, RT, Proteinkonzentration: $4 \cdot 10^{-6}$ M. (Grafik aus Lehner, 1983)	18
Abb. 1-13	Emissionsspektren von PC aus <i>Mastigocladus laminosus</i> . a ohne und b mit PCMS. a ist für diese Arbeit zu beachten. A) PC _{tri} , B) PC _{mono} . (Grafiken aus Siebzehnrübl, 1990)	19
Abb. 3-1	PC Konzentration: A) die Absorptionsspektren in 1mm Küvette, 50 mM KPP, pH \approx 7,3, RT, B) OD in 1 mm Küvette aufgetragen gegen die Proteinkonzentration [mg/ml] (—), theoretischer, linearer Verlauf der Absorptionzunahme bei Proteinkonzentrationszunahme nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz (—).	38
Abb. 3-2	Vis-CD Spektren: PC in 900 mM KPP (—), 30 mM KPP (—), 3,1 mM KPP (—), 1,1 mM KPP (—).	40
Abb. 3-3	1. Ableitung der CD-Spektren von PC in 900 mM KPP (—), 30 mM KPP (—), 6,1 mM KPP (—), 4,1 mM KPP (—), 3,1 mM KPP (—), 2,1 mM KPP (—), 1,1 mM KPP (—), PC _{mono} in 900 mM KPP und 4 M Harnstoff (—).	40
Abb. 3-4	Vis-CD Differenzspektren verschiedener PC-Lösungen: PC _{tri} minus PC _{mono} : (900 mM KPP, 4 M Harnstoff): in 900 mM KPP (—), 30 mM KPP (—), 6,1 mM KPP (—), 4,1 mM KPP (—), 3,1 mM KPP (—), 2,1 mM KPP (—), 1,1 mM KPP (—)	41
Abb.3-5	A) Abhängigkeit des Vis-CD _{max} von PC, von der KPP-Konzentration (—) und Angabe des prozentualen Anteils des Trimersignals aus dem Differenzspektrum von PC _{tri} und PC _{mono} (Differenz Maximum zu Minimum des Differenzsignals (Abb. 3-4)) zum Vis-CD _{max} von PC (—) B) Ausschnitt von A: bis 30.1 mM KPP	42

Abb.3-6	Absorptionsspektren im langwelligem Bereich (auf 1 normiert) von PC in 900 mM KPP (—), 30 mM KPP (—), 4,1 mM KPP (—), 3,1 mM KPP (—).	43
Abb. 3-7	Abhängigkeit des Absorptionsmaximums (—) und Emissionsmaximums (—) von PC von der KPP-Konzentration	44
Abb. 3-8	Extinktionskoeffizienten je Monomer PC in 8 M Harnstoff pH 1,73 (—), in 0 M Harnstoff pH 7,7 (—), in 8 M Harnstoff pH 7,7 (—).	45
Abb. 3-9	3-9: Extinktionskoeffizient von PC je Monomer, in 0 bis 8 M Harnstoff in 50 mM KPP, pH 7.	46
Abb. 3-10	Kinetik der Gleichgewichtseinstellung bei der PC Entfaltung in 50 mM KPP, gezeigt in A) 6 M und in B) 8 M Harnstoff; Absorptionsverlauf im langwelligem Maximum (—) und Baseline (—);	47
Abb. 3-11	Entfaltung und Rückfaltung von PC in 50 mM KPP (Kap. 2.3.4.); nativ (—), rückgefaltet mittels Dialyse (—) und in 8 M Harnstoff (—);	48
Abb. 3-12	Rückfaltung von PC aus 8 M Harnstoff in 50 mM KPP (Kap. 2.3.4.), nativ (—) und rückgefaltet mittels Dialyse (—);	48
Abb. 3-13	1. Ableitung des Vis-CD Spektrums von PC verschiedener Verdünnungen in H ₂ O _{dest} ;	50
Abb.3-14	Effekt von Harnstoff auf die Vis-CD Spektren von PC in 3 mM KPP. A) Differenzspektren von PC (Trimer minus Monomer) in 0 M (—), 1 M (—) und 2 M Harnstoff (—); B) Amplituden der sigmoiden Differenzspektren (Minimum-Maximum).	52
Abb. 3-15	Effekt von Harnstoff auf die Vis-CD Spektren von PC in 300 mM KPP. A) Differenzspektren von PC (Trimer minus Monomer) in 0 M (—), 1 M (—), 2 M (—) und 3 M Harnstoff (—); B) Amplituden der sigmoiden Differenzspektren (Minimum-Maximum).	53
Abb. 3-16	1. Ableitung des Vis-CD-Spektrums im 3 mM KPP, in 0 M (—), 1 M (—), 2 M (—) und 3 M Harnstoff (—).	53
Abb. 3-17	1. Ableitung des Vis-CD-Spektrums im 300 mM KPP, in 0 M (—), 1 M (—), 2 M (—), 3 M (—) und 4 M Harnstoff (—).	54
Abb. 3-18	Gesamtamplitude des Vis-CD: Titrationsverlauf von PC _{tri} in 0 bis 8 M Harnstoff mit sigmoidalen Fit (Details Text und Kap. 2.3.4.) (ab 3 M im 3 mM KPP, ab 4 M im 300 mM KPP).	55
Abb. 3-19	Q-Wert der Absorption: Titrationsverlauf von PC _{tri} in 0-8 M Harnstoff mit sigmoidalen Fit: (Details Text und Kap. 1.8., 2.3.4.): Q-Wert in 300 mM KPP (■), dazugehöriger Fit (.....) Q-Wert in 3 mM KPP (■), dazugehöriger Fit (.....).	56
Abb. 3-20	Maximum der Emission: Titrationsverlauf von PC _{tri} in 0-8 M Harnstoff mit dem Fit der Entfaltung (sigmoidal) und Dissoziation (exponentiell) (Details Text und Kap. 2.3.4.): in 300 mM (■), dazugehöriger Fit der Entfaltung (.....), dazugehöriger Fit der Dissoziation (-----); in 3 mM KPP (■), dazugehöriger Fit der Entfaltung (.....), dazugehöriger Fit der Dissoziation (-----).	58
Abb. 3-21	UV-CD bei 222 nm: Titrationsverlauf von PC _{tri} in 0-8 M Harnstoff mit sigmoidalen Fit (Details Text und Kap. 2.3.4.): in 300 mM KPP (■), dazugehöriger Fit (.....) und in 3 mM KPP (■), dazugehöriger Fit (.....).	60
Abb. 3-22	1. Ableitung der Vis-CD Spektren von PC in 50 mM KPP, pH 7, in 0 M (—), 3 M (—), 4 M (—) und 5 M Harnstoff (—).	66
Abb. 3-23	Dissoziation und Entfaltung von PC _{tri} in 50 mM KPP, pH 7: Veränderung der Signalstärke in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration, jeweils normiert auf entsprechenden Wert in 0 M Harnstoff: Vis-CD _{max} (—), Absorption _{vis-max} (—), Emission _{max} (—), UV-CD _{222nm} (—)	68
Abb. 3-24	Effekt von Harnstoff auf die Vis-CD Spektren von PC _{tri} in 50 mM KPP. A) Differenzspektren von PC (Trimer minus Monomer) in 0 M (—), 1 M (—), 2 M (—) und 3 M Harnstoff (—); B) Amplituden der Differenzspektren (Minimum – Maximum).	68

Abb. 3-25	Prozentuale Abnahme des Emissionsmaximums von PC _{tri} in 0 bis 4 M Harnstoff in 50 mM KPP (—) und 300 mM KPP (·····).	68
Abb. 3-26	Grad der Entfaltung des PC _{mono} , berechnet aus den Werten von Abb. 3-23, gezeigt in Abhängigkeit zur Harnstoffkonzentration, mit sigmoidalen Fit (Kap. 2.3.4.); Vis-CD (▼) mit Fit (····), Absorption (★) mit Fit (····), Emission (■) mit Fit (····), UV-CD (●) mit Fit (····).	70
Abb. 3-27	Grad der Entfaltung der α-UE in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration mit sigmoidalen Fit (Kap. 2.3.4.): Vis-CD _{max} (▼) mit Fit (····), Absorption _{vis-max} (■) mit Fit (····), Emission _{max} (●) mit Fit (····), UV-CD _{222nm} (▲) mit Fit (····).	72
Abb. 3-28	Grad der Entfaltung der β-UE in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration mit sigmoidalen Fit (Kap. 2.3.4.): Vis-CD _{max} (★) mit Fit (····), Absorption _{vis-max} (■) mit Fit (····), Emission _{max} (▼) mit Fit (····), UV-CD _{222nm} (▲) mit Fit (····).	74
Abb. 3-29	Veränderung der Sekundärstrukturanteile, bei der Entfaltung von PC, berechnet aus den UV-CD Spektren mit CDPro (Kap. 2.3.4. und s. o.); PC α-Helix (■) mit Fit (····), PC „unordered“ (●) mit Fit (····), PC Gesamtstruktur außer α-Helix (▲) mit Fit (····).	79
Abb. 3-30	Veränderung der Sekundärstrukturanteile bei der Entfaltung von der α-UE, berechnet aus den UV-CD Spektren mit CDPro (Kap. 2.3.4. und s. o.); α-UE α-Helix (■) mit Fit (····), α-UE „unordered“ (●) (vernünftiger Fit nicht möglich), α-UE Gesamtstruktur außer α-Helix (▲) mit Fit (····).	79
Abb. 3-31	Veränderung der Sekundärstrukturanteile, bei der Entfaltung von der β-UE, berechnet aus den UV-CD Spektren mit CDPro (Kap. 2.3.4. und s. o.); β-UE α-Helix (■) mit Fit (····), β-UE „unordered“ (●) mit Fit (····), β-UE Gesamtstruktur außer α-Helix (▲) mit Fit (····).	80
Abb. 3-32	Absorptionsspektren ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹] von PC _{tri} (—) (KPP 50 mM, pH ≈7,3, RT), PC _{mono} (—) (KPP 50 mM, pH ≈7,3, RT, 4 M Harnstoff), PC _{denat} (—) (KPP 50 mM, pH ≈7,3, RT, 8 M Harnstoff); ϵ bezieht sich auf ein Monomer, d. h. auf je drei PCB-Chromophore.	82
Abb. 3-33	A) Vis-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] von PC _{tri} (—), PC _{mono} (—), PC _{denat} (—); Bedingungen wie in Abb. 3-32; B) Differenzspektrum (Trimer minus Monomer) im langwelligen Bereich;	82
Abb. 3-34	Emissionsspektren von PC _{tri} (—), PC _{mono} (—), PC _{denat} (—); Bedingungen wie in Abb. 3-32, Anregung bei 400 nm;	83
Abb. 3-35	UV-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] von PC _{tri} (—), PC _{mono} (—), PC _{denat} (—); Bedingungen wie in Abb. 3-32	83
Abb. 3-36	Absorptionsspektren ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹] der α-UE _{nat} (—) (KPP 50 mM, pH ≈7,3, RT) und α-UE _{denat} (—) (KPP 50 mM, pH ≈7,3, RT, 8 M Harnstoff).	84
Abb. 3-37	Vis-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] der α-UE _{nat} (—) und α-UE _{denat} (—);	85
Abb. 3-38	Emissionsspektren der α-UE _{nat} (—) und α-UE _{denat} (—);	85
Abb. 3-39	UV-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] der α-UE _{nat} (—) und α-UE _{denat} (—);	86
Abb. 3-40	Absorptionsspektren ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹] der β-UE _{nat} (—) und β-UE _{denat} (—);	87
Abb. 3-41	Vis-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] der β-UE _{nat} (—) und β-UE _{denat} (—);	87
Abb. 3-42	Emissionsspektren der β-UE _{nat} (—) und β-UE _{denat} (—);	88
Abb. 3-43	UV-CD Spektren $\Delta \epsilon$ [M ⁻¹ cm ⁻¹] der β-UE _{nat} (—), β-UE _{denat} (—);	88
Abb. 3-44	Normierte Absorptionsänderungen (A ₀ = 0, A _{end} = 1) (Kap. 2.3.5.), während der Entfaltung von PC _{tri} (Abb. 3-52), bei verschiedenen Wellenlängen: 616 nm (—), 613 nm (—), 600 nm (—), 350 nm (—) und 340 nm (—).	90
Abb. 3-45	Faktorierte Rohdaten (Kap. 2.3.5.) der globalen Absorptionsänderung bei der Entfaltung von PC _{tri} .	94

Abb. 3-46	Globaler zweistufiger Fit der Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von PC _{tri} (Abb. 3-45). Gezeigt sind die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c (—), gezeigt bei 616 nm.	96
Abb. 3-47	Residuen bei 616 nm des globalen Fits aus Abb. 3-46 mit einem zweistufigen linearen Modell a>b>c;	96
Abb. 3-48	Residuen bei 616 nm des globalen Fits aus Abb. 3-46 mit einem dreistufigen linearen Modell a>b>c>d;	96
Abb. 3-49	Residuen bei 616 nm des globalen Fits aus Abb. 3-46 mit einem vierstufigen linearen Modell a>b>c>d>e;	96
Abb. 3-50	Molare Absorptionsspektren des vierstufigen globalen Fits (Abb. 3-49) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-46).	97
Abb. 3-51	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des vierstufigen globalen Fits (Abb. 3-49) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-46) gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 15 s.	97
Abb. 3-52	Rohdaten der lokalen Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von PC _{tri} ;	100
Abb. 3-53	Lokaler dreistufiger Fit der Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von PC _{tri} (Abb. 3-52), bei 350 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell c>d>e>f (—) und in B) Residuen	101
Abb. 3-54	Extinktionskoeffizienten aus dem dreistufigen lokalen Fit (Abb. 3-53) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-52), bei 350 nm.	101
Abb. 3-55	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen lokalen Fits (Abb. 3-53) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-52), bei 350 nm, gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 40 s;	102
Abb. 3-56	Auf PC _{tri} normierte Absorptionsänderungen der Fitkomponenten, der lokalen Fits der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-52) beim vierstufigen Modell: a>b>c>d>e (Tab. 3-13 und 3-14);	103
Abb. 3-57	Auf PC _{tri} normierte Absorptionsänderungen der Fitkomponenten, der lokalen Fits der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-52) beim fünfstufigen Modell: a>b>c>d>e>f (Tab. 3-13 und 3-14);	103
Abb. 3-58	Vergleich des globalen und der lokalen Fits der Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von PC _{tri} (Abb. 3-45 und 3-52). Gezeigt sind die k-Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k ₁ (●), k ₂ (●), k ₃ (●), k ₄ (●) und k ₅ (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-13, 3-14).	106
Abb. 3-59	Rohdaten der lokalen CD-Änderung bei der Entfaltung von PC _{tri} .	108
Abb. 3-60	Lokaler zweistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC _{tri} , bei 616 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c (—) in B) Residuen;	108
Abb. 3-61	Globaler dreistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC _{tri} (Abb. 3-59). Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c>d (—) und in B) Residuen; gezeigt bei 613 nm.	110
Abb. 3-62	Molarer Circular dichroismus (Δε) des dreistufigen globalen Fits (Abb. 3-61) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-59).	110
Abb. 3-63	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen globalen Fits (Abb. 3-61) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-59) gemessen mittels Vis-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 5 s.	111
Abb. 3-64	Lokaler dreistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC _{tri} (Abb. 3-59), bei 600 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c>d (—) und in B) Residuen.	113

Abb. 3-65	Konzentrationsänderung der Fitkomponenten des dreistufigen lokalen Fits (Abb. 3-64) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-59), bei 600 nm, gemessen mittels Vis-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s;	114
Abb. 3-66	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) der lokalen Fits (Abb. 3-64) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-59).	114
Abb. 3-67	Verschiedene lokale Fits der CD-Änderung bei 628 nm, bei der Entfaltung von PC _{tri} , der Messung in Abb. 3-59. A) Vierstufige Fits über unterschiedliche Zeitspannen: bis 2 s Messzeit (—), bis 10 s (—), bis 50 s (—); B) verschieden stufige Fits über die ersten 2 s Messzeit: zweistufig (—), dreistufig (—);	117
Abb. 3-68	Vergleich des globalen und der lokalen Fits der CD-Änderungen, bei der Entfaltung von PC _{tri} (Abb. 3-59). Gezeigt sind die k-Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k ₁ (●), k ₂ (●), k ₃ (●) und k ₄ (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-16., 3-17).	117
Abb. 3-69	Rohdaten und vierstufiger Fit der Emissionsänderung bei der Entfaltung von PC _{tri} . Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell a>b>c>d>e (—) und in B) Residuen;	119
Abb. 3-70	Emissions Amplituden des vierstufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-69).	120
Abb. 3-71	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des vierstufigen Fits (Abb. 3-69) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-69) gemessen mittels Emission. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 5 s;	120
Abb. 3-72	Rohdaten und zweistufiger lokaler Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC _{tri} , bei 222 nm.; Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell a>b>c (—) und in B) Residuen	123
Abb. 3-73	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des zweistufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-72), bei 222 nm.	123
Abb. 3-74	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des zweistufigen lokalen Fits (Abb. 3-72) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} bei 222 nm, (Abb. 3-72) gemessen mittels UV-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s, B) Ausschnitt der ersten 15 s;	124
Abb. 3-75	Rohdaten und vierstufiger lokaler Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung von PC _{mono} , bei 616 nm; Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell a>b>c>d>e (—) und in B) Residuen	129
Abb. 3-76	Extinktionskoeffizienten des vierstufigen lokalen Fits der Entfaltung von PC _{mono} (Abb. 3-75), bei 616 nm.	129
Abb. 3-77	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des vierstufigen lokalen Fits (Abb. 3-75) der Entfaltungskinetik von PC _{mono} (Abb. 3-75), bei 616 nm gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300s, B) Ausschnitt der ersten 20 s;	130
Abb. 3-78	Rohdaten und dreistufiger globaler Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC _{mono} , bei 600 nm; Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell a>b>c>d (—) und in B) Residuen.	132
Abb. 3-79	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des globalen dreistufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC _{mono} (Abb. 3-78).	133
Abb. 3-80	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen globalen Fits (Abb. 3-78) der Entfaltungskinetik von PC _{mono} (Abb. 3-78) gemessen mittels Vis-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s; B) Ausschnitt der ersten 30 s;	133
Abb. 3-81	Rohdaten und dreistufiger Fit der Emissionsänderung bei der Entfaltung von PC _{mono} . Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell a>b>c>d (—) und in B) Residuen.	135
Abb. 3-82	Emissions Amplituden des dreistufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC _{mono} (Abb. 3-81).	135

Abb. 3-83	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC _{mono} (Abb. 3-81) gemessen mittels Emission. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s; B) Ausschnitt der ersten 30 s;	136
Abb. 3-84	Rohdaten und zweistufiger lokaler Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung von PC _{mono} , bei 222 nm. Messbedingungen: Totzeit der stop-flow Apparatur: 8,3 ms, Time base: 500 μ s Messintervall bis 2 s Messzeit, dann 100 ms bis 120 s, dann 1 s bis 300 s, Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell a>b>c (—) und in B) Residuen	137
Abb. 3-85	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des zweistufigen Fits der Entfaltungskinetik von PC _{mono} (Abb. 3-84), bei 222 nm.	138
Abb. 3-86	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des zweistufigen Fits, der Entfaltungskinetik von PC _{mono} (Abb. 3-84) bei 222 nm gemessen mittels UV-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 300 s; B) Ausschnitt der ersten 8 s;	138
Abb. 3-87	Faktorierte Rohdaten (Kap. 2.3.5.) der globalen Absorptionsänderung bei der Entfaltung der α -UE.	142
Abb. 3-88	Globaler dreistufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-87). Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c>d (—) und in B) Residuen. Bei 617 nm	142
Abb. 3-89	Molare Absorptionsspektren des dreistufigen globalen Fits (Abb. 3-88) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-87).	143
Abb. 3-90	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen globalen Fits (Abb. 3-88) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-87) gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s;	143
Abb. 3-91	Rohdaten der lokalen Absorptionsänderung bei der Entfaltung der α -UE;	145
Abb. 3-92	Lokaler vierstufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-91), bei 580 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell: a>b>c>d>e; (—) und in B) Residuen	147
Abb. 3-93	Extinktionskoeffizienten des vierstufigen lokalen Fits (Abb. 3-92), der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-91) bei 580 nm.	147
Abb. 3-94	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des vierstufigen lokalen Fits (Abb. 3-92) der Entfaltungskinetik der α -UE (3-91) bei 580 nm gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s;	148
Abb. 3-95	Vergleich des globalen und der lokalen Fits der Absorptionsänderungen bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-87 und 3-91). Gezeigt sind die k-Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k ₁ (●), k ₂ (●), k ₃ (●), k ₄ (●) und k ₅ (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-29, 3-30).	148
Abb. 3-96	Rohdaten der lokalen CD-Änderungen bei der Entfaltung der α -UE	151
Abb. 3-97	Globaler zweistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-96). Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c (—) und in B) Residuen; gezeigt bei 350 nm.	152
Abb. 3-98	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des zweistufigen globalen Fits (Abb. 3-97) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-96).	153
Abb. 3-99	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des zweistufigen globalen Fits (Abb. 3-97) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-96) gemessen mittels Vis-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s.	153
Abb. 3-100	Lokaler dreistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-96), bei 617 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell a>b>c>d (—) und in B) Residuen;	156
Abb. 3-101	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des lokalen Fits (Abb. 3-100) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-96) bei 617 nm.	156

Abb. 3-102	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen lokalen Fit (Abb. 3-100) der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-96), bei 617 nm gemessen mittels Vis CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s;	157
Abb. 3-103	Vergleich des globalen und der lokalen Fits der CD-Änderungen bei der Entfaltung der α -UE (Abb. 3-96). Gezeigt sind die k -Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k_1 (●), k_2 (●) und k_3 (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-31, 3-32)	157
Abb. 3-104	Rohdaten und dreistufiger Fit der Emissionsänderung bei der Entfaltung der α -UE, Gezeigt sind in A) experimentelle Daten (—) und Fit: Modell $a>b>c>d$ (—) und in B) Residuen.	159
Abb. 3-105	Emissions Amplituden des dreistufigen Fits der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-104).	159
Abb. 3-106	Konzentrationsänderung der Fitkomponenten des dreistufigen Fits der Entfaltungskinetik der α -UE (Abb. 3-104) gemessen mittels Emission. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s; B) Ausschnitt der ersten 7 s; Zuordnung der Fitkomponenten a (—), b (—), c (—) und d (—) siehe Text.	160
Abb. 3-107	Faktorierte Rohdaten (Kap. 2.3.5.) der globalen Absorptionsänderung bei der Entfaltung der β -UE;	161
Abb. 3-108	Globaler fünfstufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung der β -UE (Abb. 3-107). Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell $a>b>c>d>e>f$ (—) und in B) Residuen. Gezeigt bei 605 nm.	162
Abb. 3-109	Molare Absorptionsspektren des fünfstufigen globalen Fits (Abb. 3-108) der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-107).	163
Abb. 3-110	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des fünfstufigen globalen Fits (Abb. 3-108) der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-107) gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 10 s;	163
Abb. 3-111	Rohdaten der lokalen Absorptionsänderungen bei der Entfaltung der β -UE;	166
Abb. 3-112	Lokaler fünfstufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung der β -UE (Abb. 3-111) bei 350 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell $a>b>c>d>e>f$ (—) und in B) Residuen	166
Abb. 3-113	Extinktionskoeffizienten des fünfstufigen lokalen Fits (Abb. 3-112) der Entfaltungskinetik von der β -UE (Abb. 3-111) bei 350 nm.	167
Abb. 3-114	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des fünfstufigen lokalen Fits (Abb. 3-112), der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-111), bei 350 nm gemessen mittels Absorption. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 8 s;	167
Abb. 3-115	Vergleich des globalen und der lokalen Fits der Absorptionsänderungen bei der Entfaltung der β -UE (Abb. 3-107 und 3-111). Gezeigt sind die k -Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k_1 (●), k_2 (●), k_3 (●), k_4 (●), k_5 (●) und k_6 (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-34, 3-35).	169
Abb. 3-116	Rohdaten der lokalen CD-Änderung bei der Entfaltung der β -UE.	171
Abb. 3-117	Lokaler dreistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung der β -UE (Abb. 3-116), bei 580 nm. Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: Modell $a>b>c>d$ (—) und in B) Residuen	172
Abb. 3-118	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des dreistufigen lokalen Fits (Abb. 3-117) der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-116) bei 580 nm.	173
Abb. 3-119	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des dreistufigen lokalen Fits (Abb. 3-117) der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-116), bei 580 nm gemessen mittels Vis-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 8 s;	173

Abb. 3-120	Vergleich des globalen und der lokalen Fits der CD-Änderungen bei der Entfaltung der β -UE (Abb. 3-116). Gezeigt sind die k -Werte der einzelnen Reaktionsschritte: k_1 (●) und k_2 (●). Die Fläche der Punkte entspricht relativ den Amplituden (Kap. 2.3.5.) des jeweiligen Reaktionsschrittes (Tab. 3-36, 3-37).	175
Abb. 3-121	Rohdaten und fünfstufiger Fit der Emissionsänderung bei der Entfaltung der β -UE; Gezeigt sind in A) die Daten (—) und der Fit: Modell: $a>b>c>d>e>f$ (—) und in B) Residuen	176
Abb. 3-122	Emissions Amplituden des fünfstufigen Fits der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-121). Zuordnung der Fitkomponenten a (■), b (■), c (■), d (■), e (■) und f (■) siehe Text.	176
Abb. 3-123	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des fünfstufigen Fits der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-121) gemessen mittels Emission. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 6 s;	177
Abb. 3-124	Rohdaten und zweistufiger Fit der CD-Änderung bei der Entfaltung der β -UE, bei 222 nm. Gezeigt sind in A) die Daten (—) und der Fit: Modell: $a>b>c$ (—) und in B) Residuen.	178
Abb. 3-125	Molarer Circular dichroismus ($\Delta\epsilon$) des lokalen zweistufigen Fits der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-124), bei 222 nm.	178
Abb. 3-126	Konzentrationsänderungen der Fitkomponenten des zweistufigen lokalen Fits der Entfaltungskinetik der β -UE (Abb. 3-124), bei 222 nm gemessen mittels UV-CD. A) Verlauf über die gesamte Messzeit von 600 s, B) Ausschnitt der ersten 3 s;	179
Abb. 4-1	Vergleich der rel. Ampl. und k -Werte der Fits (Kap. 3.9.) der Entfaltungskinetik von PC und den UE und der verschiedenen Messparameter.	198
Abb. 4-2	Schematische Darstellung einer cis/trans Isomerisierung von Prolin.	202
Abb. 4-3	Schematische Darstellung eines Ausschnittes des PCB Chromophors und einer, von mehreren möglichen, Rotationen um die Methinbrücke.	202
Abb. 7-1	UV-CD Spektren von PC _{tri} : Titration von 0 – 8 M Harnstoff in 50 mM KPP, pH 7;	221
Abb. 7-2	Globaler vierstufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung von PC _{tri} . (Abb. 3-45) Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit Modell $a>b>c>d>e$ (—) und in B) Residuen; gezeigt bei 616 nm. k folgt nicht der Reihenfolge $k_1 > k_2$ etc., sondern $k_2 > k_1 > k_4 > k_3$, siehe Kap. 3.9.2.1	222
Abb. 7-3	Molare Absorptionsspektren des vierstufigen globalen Fits (7-2) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-45). Zuordnung der Fitkomponenten steht in Kap. 3.9.2.1. Komponente a (—), b (—), c (—), d (—), e (—), dabei folgt k nicht der Reihenfolge $k_1 > k_2$ etc., sondern $k_2 > k_1 > k_4 > k_3$.	222
Abb. 7-4	Globaler verzweigter vierstufiger Fit der Absorptionsänderung bei der Entfaltung von PC _{tri} (Abb. 3-45). Gezeigt sind in A) die experimentellen Daten (—) und der Fit: (—) und in B) Residuen. Gezeigt bei 616 nm	223
Abb. 7-5	Molare Absorptionsspektren des verzweigten vierstufigen globalen Fits (Abb. 7-4) der Entfaltungskinetik von PC _{tri} ; (Abb. 3-45).	223
Abb. 7-6	Verschiedene Fits der Vis-CD Daten der Entfaltungskinetik von PC _{tri} (Abb. 3-59). A) lineares, zweistufiges Kinetikmodell bei 600 nm. Gezeigt der Ausschnitt der ersten 3 s; Fitbereich: bis 300 s (—), bis 50 s (—) und bis 2 s (—); B) lineares dreistufiges Kinetikmodell bei 350 nm. Gezeigt der Ausschnitt der ersten 5 s; Fitbereich bis 300 s (—) und bis 50 s (—). (siehe Kap. 3.9.2.2.)	224
Abb. 7-7	Vis-CD der Entfaltung von PC _{tri} bei 616 nm Messungen mit verschiedenen Integrationszeiten. jeweils einem einstufigen Fit. Daten (—), Fit (—);	224

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michaela Kupka

Geburtsort: Wolfratshausen

Geburtsdatum: 2.8.1964

Schulbildung

1971 – 1982 Grundschule Wolfratshausen-Waldram
Gymnasium Geretsried
Abschluss mittlere Reife

1988 – 1991 Berufsoberschule Hauswirtschaft und Sozialpflege in München
Abschluss fachgebundene Hochschulreife

1992 Abschluss allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

1982 – 1987 Ausbildung zur Erzieherin an der Fachakademie für Sozialpädagogik
der Franziskanerinnen in Dillingen
Abschluss als staatlich anerkannte Erzieherin mit der
fachgebundenen Fachhochschulreife

Studium

1992 – 1997 Diplomstudiengang der Biologie an der Technischen Universität
München

1997 – 1998 Diplomarbeit an der limnologischen Station Iffeldorf der
Technischen Universität München
Abschluss als Diplombiologin

Promotion

2000 - 2006 Beginn der Promotion am Lehrstuhl für Biochemie und Physiologie der
Pflanzen, Departement Biologie I – Botanik, LMU München
Abschluss mit Dr. rer. nat.

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt ist.

Hiermit erkläre ich, dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, den 9. Mai 2006

Michaela Kupka