

Partielle Entfaltung von T4-Lysozym auf einer Quarzoberfläche: Analyse der Strukturänderungen adsorbiertener Proteine durch ESR-Spektroskopie**

*Kerstin Jacobsen, Wayne L. Hubbell, Oliver P. Ernst und Thomas Risse**

Die Adsorption von Proteinen auf Oberflächen ist in den vergangenen drei Jahrzehnten nicht zuletzt aufgrund des technologischen Interesses an der Entwicklung biokompatibler Materialien für Implantate und künstliches Gewebe ins Zentrum vieler Untersuchungen gerückt.^[1-4] Eine der wichtigsten Aufgaben bei der Entwicklung biokompatibler Materialien liegt in der Vermeidung der Abwehrreaktionen des Körpers, die durch Adsorption und nachfolgende Denaturierung des Proteins an der Oberfläche der Materialien hervorgerufen werden. Eine Reihe von Strategien ist mittlerweile entwickelt worden, um dieses Problem zu umgehen.^[5-10] Die mikroskopischen Details der Wechselwirkung von Proteinen mit Oberflächen konnten jedoch nur in wenigen Untersuchungen aufgeklärt werden,^[11-14] da ein komplexes Zusammenspiel relativ schwacher Wechselwirkungen die native Faltung des Proteins bestimmt. Die Störung dieser Balance durch eine Wechselwirkung mit einer Oberfläche führt üblicherweise zu Veränderungen der Proteinstruktur. Um einen Einblick in den Adsorptionsprozess auf mikroskopischer Ebene zu erhalten, muss daher die Struktur des Proteins im adsorbierten Zustand bekannt sein. Allerdings liefern nur sehr wenige experimentelle Techniken detaillierte Aussagen über die Struktur adsorbiertener Proteine. So haben die klassischen Methoden der Proteinstrukturanalyse, Kristallstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie bei der Untersuchung

[*] Dr. K. Jacobsen, Dr. T. Risse
Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft
Abteilung Chemische Physik
Faradayweg 4–6, 14195 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-8413-4316
E-mail: risse@fhi-berlin.mpg.de
Prof. Dr. W. L. Hubbell
Jules Stein Eye Institute
and Department of Chemistry and Biochemistry
University of California
Los Angeles, 90095-7008 (USA)
Dr. O. P. Ernst
Institut für medizinische Physik und Biophysik
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Schumannstraße 20/21, 10098 Berlin (Deutschland)

[**] T.R. und K.J. danken Prof. H.-J. Freund für die Unterstützung dieser Arbeit. K.J. dankt der Studienstiftung des deutschen Volkes für ein Stipendium. Die Untersuchungen wurden von der Max-Planck-Gesellschaft, den National Institutes of Health über das Projekt EY05216 (W.L.H.), dem Jules Stein Professorship Endowment (W.L.H.) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 449 (O.P.E.)) unterstützt.

adsorbiertes Proteine bislang nur wenig Anwendung gefunden (z.B. Lit. [15, 16]). Oberflächenempfindliche Schwingungsspektroskopietechniken (ATR-IR-, Raman-, SFG-Spektroskopie),^[17–21] Fluoreszenzspektroskopie,^[22–24] die Bestimmung des Circulardichroismus,^[25–27] Oberflächenkraftmessungen^[28] und -mikroskopie^[29] ebenso wie Neutronenstreuung^[30, 31] wurden bereits zur Analyse von Strukturänderungen in adsorbierten Proteinen verwendet. Diese Methoden führen zu globalen Aussagen über Veränderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine; außerdem können Informationen über spezielle Chromophore gewonnen werden. Eine detaillierte Analyse der Faltung des Proteinrückgrats ist hiermit bisher jedoch nicht möglich.

Am Beispiel des globulären Proteins T4-Lysozym (T4L) auf einer ebenen Quarzoberfläche soll gezeigt werden, dass die Technik der ortsgerichteten Spinmarkierung (site-directed spin labelling, SDSL) geeignet ist, Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur adsorbiertes Proteine zu detektieren.

SDSL hat sich als Analysemethode für Struktur und Dynamik von Proteinen in Lösung sowie von Membranproteinen etabliert.^[32–34] Die Technik beruht auf einer selektiven Mutation des nativen Proteins, die Cystein anstelle einer nativen Aminosäure einführt. Anschließend wird an die Thiolfunktion des Cysteins selektiv eine spinmarkierte Nitroxidseitenkette gekuppelt. Seit kurzem können mit SDSL auch Proteine analysiert werden, die auf ebenen Lipiddoppelschichten adsorbiert sind.^[35, 36] Dabei wurde gezeigt, dass die Sekundärstruktur von T4L bei Adsorption auf einer Doppelschicht eines zwitterionischen Lipids erhalten bleibt, und es wurden Methoden zur Bestimmung der Orientierung adsorbiertes Proteine entwickelt. Im Unterschied zu den dort verwendeten Lipiddoppelschichten ist die in dieser Untersuchung betrachtete Quarzoberfläche bei neutralem pH-Wert^[37] negativ geladen, während T4L positiv geladen ist. Daher sollte die Wechselwirkung zwischen Protein und Oberfläche bei der Adsorption auf einer Quarzoberfläche stärker sein als auf einer Lipiddoppelschicht; daher wird auch eine stärkere Veränderung der Proteinstruktur erwartet. Frühere Untersuchungen zur Adsorption von Lysozymen auf Quarzoberflächen mit unterschiedlichen Analysemethoden wiesen den adsorbierten Proteinen die verschiedensten Konformationen zu: Neben der nativen Konformation^[28, 31] wurden eine Konformation mit höherem β -Faltblatt-Anteil,^[20] eine teilweise entfaltete Konformation^[23, 29] und ein vollständig entfalteter Zustand^[23] vorgeschlagen (Abbildung 1). Die Abweichungen lassen sich nicht mit den unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklären, da die Ionenstärken jeweils gering waren.

Hier diskutieren wir die Konformation von T4-Lysozym, das im neutralen pH-Bereich und bei hoher Salzkonzentration (0.5 M NaCl) auf einer Quarzoberfläche adsorbiert

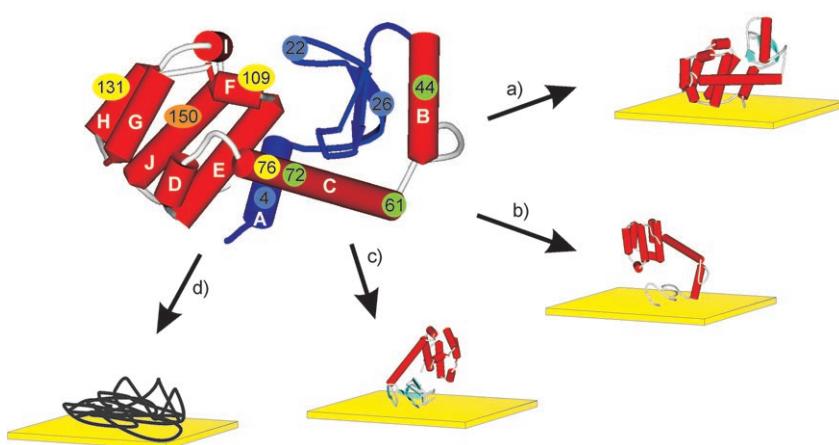


Abbildung 1. Strukturänderungen von T4-Lysozym nach der Adsorption auf einer Quarzoberfläche: a) keine Veränderung, b) teilweise Entfaltung der N-terminalen Domäne, c) Bildung eines β -Faltblatts, d) komplette Entfaltung. Anhand der gekennzeichneten Mutanten wurde die Struktur im adsorbierten Zustand analysiert.

wurde. Unter diesen Bedingungen sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Protein und der negativ geladenen Oberfläche stark abgeschirmt. Durch Vergleichsexperimente bei niedriger Ionenstärke wurde zunächst gezeigt, dass die Struktur des Proteins in Lösung von den elektrostatischen Bedingungen kaum beeinflusst wird. T4L wurde in den verschiedenen Experimenten jeweils einfach an zehn über das gesamte Protein verteilten Positionen (Abbildung 1) mit der spinmarkierten Seitenkette versehen. Zur Analyse der Strukturänderungen wurden die in Lösung erhaltenen ESR-Spektren der einzelnen Mutanten mit denjenigen der adsorbierten Spezies verglichen. Dieser direkte Vergleich ist möglich, da die ESR-Spektren der adsorbierten Mutanten keine Winkelabhängigkeit zeigen.

Die ESR-Spektren der adsorbierten Mutanten können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Im ersten Fall beeinflusst die Adsorption der Mutanten die ESR-Linienform kaum. In Abbildung 2 ist diese Gruppe, bestehend aus den Mutanten 76R1^[*], 109R1 und 131R1 (in Abbildung 1 gelb dargestellt) exemplarisch durch die Spektren mit Markierung am Rest 131 vertreten (Abbildung 2a). Da die ESR-Linienform, die sowohl Informationen zur lokalen Umgebung als auch zur Dynamik des Proteinrückgrats enthält, sich bei der Adsorption nicht ändert, kann im vorliegenden Fall winkelunabhängiger Spektren direkt geschlossen werden, dass die entsprechenden Sekundärstrukturelemente erhalten bleiben. Das Fehlen einer Winkelabhängigkeit zeigt zudem, dass die Proteine auf der Quarzoberfläche makroskopisch ungeordnet vorliegen. Eine lokale Unordnung der Spinmarkierung kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, da für makroskopisch orientierte Ensembles, die eine identische lokale Struktur aufweisen, winkelabhängige Spektren beobachtet wurden.^[35]

[*] Die Bezeichnung der Mutanten ergibt sich aus der Position der Spinmarkierung und dem Suffix R1 für die verwendete markierte MTSI-Seitenkette.

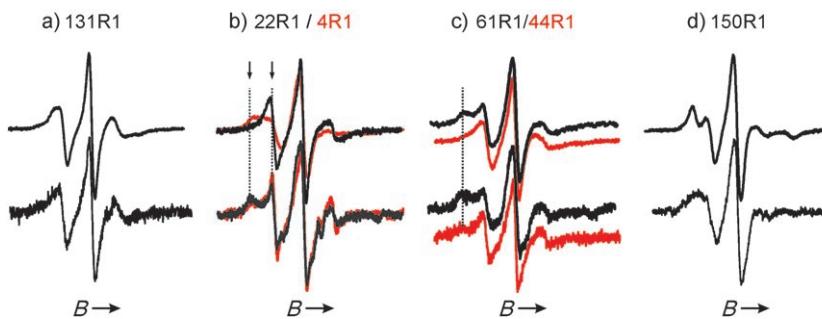


Abbildung 2. Vergleich der ESR-Spektren in Lösung (obere Reihe) mit denen im adsorbierten Zustand (untere Reihe). Die Breite der Spektren beträgt jeweils 100 G.

Die Annahme einer zufälligen Orientierung des Lysozyms auf der Quarzoberfläche wird durch eine summenfrequenzspektroskopische Untersuchung unterstützt, in der für die Adsorption von Hühnereiweiß(HEW)-Lysozym auf einer Quarzoberfläche ebenfalls keine makroskopische Ordnung gefunden wurde.^[17]

Die Spektren der Mutanten der zweiten Gruppe, 4R1, 22R1 und 26R1 (blau in Abbildung 1), weisen dagegen eine drastische Änderung der Linienform bei Adsorption auf. Im nativen Protein weisen diese Mutanten sehr verschiedene ESR-Spektren auf, was auf die stark unterschiedlichen lokalen Strukturen zurückgeführt werden kann. 22R1 befindet sich an einer flexiblen β -Kehre, 4R1 in der N-terminalen Helix und 26R1 in der Mitte des β -Faltblatts. Die beiden Mutanten 22R1 und 4R1 stellen im nativen Protein Extremfälle bezüglich der Beweglichkeit des Spinmarkers dar. Ihre Spektren in Lösung (oben in Abbildung 2b) spiegeln diesen Unterschied der lokalen Umgebung in der Proteinstruktur sehr deutlich wider. Nach Adsorption auf der Quarzoberfläche sind die ESR-Spektren der Mutanten hingegen nahezu identisch. Sie enthalten übereinstimmend jeweils sowohl sehr breite als auch sehr scharfe Linien, was als Überlagerung eines geringen Anteils einer äußerst mobilen Komponente mit einem großen Anteil einer immobilen Komponente interpretiert werden kann.

In den Spektren der Mutanten 72R1, 61R1 und 44R1 (grün in Abbildung 1) wird ein intermediäres Verhalten beobachtet. Bei 61R1 (Abbildung 2c) und 72R1 (Daten nicht gezeigt) weisen geringfügige Linienvielfaltungen als Folge der Adsorption auf eine leichte Einschränkung der lokalen Mobilität hin. Für 44R1 ist die Veränderung wesentlich auffälliger (Abbildung 2c); bei der Adsorption tritt hier eine zweite, immobile Komponente hinzu, was eine stärkere Störung der lokalen Umgebung von R1 andeutet. Das Spektrum von 150R1 wird durch die Adsorption wesentlich stärker modifiziert (Abbildung 2d; diese Mutante ist allerdings ein Sonderfall, siehe unten).

Die Interpretation von ESR-Spektren spinmarkierter Proteine beruht darauf, dass die Dynamik der spinmarkierten Seitenkette eindeutig von deren lokaler Umgebung und der Dynamik des Proteinrückgrats bestimmt wird.^[38,39] Daher spiegeln Veränderungen der ESR-Linienvielfalt unmittelbar die Veränderungen der lokalen Proteinstruktur wider. Die äußerst ähnlichen Linienformen der Mutanten 4R1, 22R1 und

26R1 im adsorbierten Zustand, bestehend aus einer breiten, immobilen Komponente und einem kleinen, zwischen den Mutanten leicht variierenden Anteil einer sehr scharfen, mobilen Komponente (Pfeile in Abbildung 2b) können durch eine Entfaltung dieses Teils des Proteins erklärt werden, die durch die Wechselwirkung mit der Quarzoberfläche verursacht wird. Die Ähnlichkeit der Spektren nach Adsorption lässt sich dadurch verstehen, dass sich die Spinmarker einer Mutante nach Verlust der definierten Struktur innerhalb des Ensembles in unterschiedlichen lokalen Umgebungen befinden können, sich die Zu-

sammensetzung der verschiedenen lokalen Umgebungen aber nur wenig von Mutante zu Mutante unterscheidet. Dagegen kann ausgeschlossen werden, dass das Protein eine neue Struktur einnimmt, in der die lokale Struktur an allen drei Stellen zufälligerweise identisch ist. Die breite, immobile Komponente des Spektrums der entfalteten Spezies deutet auf eine Wechselwirkung der Spinmarkierung mit der Oberfläche oder benachbarten entfalteten Teilen des Proteins hin. Demgegenüber wird die scharfe, mobile Komponente, die auch im Vergleich mit sehr flexiblen Regionen des Proteins, z.B. der β -Kehre, eine erhöhte Mobilität anzeigt, entfalteten Proteinregionen zugeordnet, die in die Lösung weisen und im Gleichgewicht mit adsorbierten Spezies stehen. Die relativen Anteile der Komponenten in den ESR-Spektren zeigen, dass die Adsorption stark bevorzugt ist, die Gleichgewichtslage für die verschiedenen Stellen jedoch geringfügig variiert.

In einer früheren Untersuchung haben wir bereits herausgearbeitet, dass die tertiäre Kontaktstelle 150R1 im C-terminalen Helixbündel besonders empfänglich für adsorptionsinduzierte Strukturänderungen ist.^[35] Eine Interpretation der Veränderungen der Spektren bei der Adsorption von 150R1 auf der Quarzoberfläche (Abbildung 2d) muss berücksichtigen, dass das außergewöhnliche ESR-Spektrum in Lösung auf eine stark anisotrope Bewegung zurückzuführen ist, die von zahlreichen hydrophoben Kontakten der Seitenkette mit der benachbarten Helix G und einer Wasserstoffbrücke zum Nitroxid-Ring bestimmt wird.^[40] Dadurch reagiert das Spektrum sehr empfindlich auf leichte Veränderungen in der Anordnung des Helixbündels, wie bereits in geringem Ausmaß bei der Adsorption von T4L auf der DOPC-Lipiddoppelschicht deutlich wurde.^[35] Das ESR-Spektrum von 150R1 nach Adsorption auf der Quarzoberfläche ist konsistent mit einer Helixoberflächenstelle, in der die spinmarkierte Seitenkette der Lösung zugewandt ist und keine tertiären Kontakte eingeht. Somit werden die Veränderungen in den Spektren von 150R1 nach Adsorption einer Umordnung des Helixbündels (G–J) zugeschrieben, die jedoch keine Veränderung der helicalen Struktur bedingt.

Die Linienformanalyse der ESR-Spektren zeigt, dass sich die N-terminale Domäne von T4L, also die Helix A und das benachbarte β -Faltblatt (blau in Abbildung 1), nach Adsorption auf einer Quarzoberfläche entfaltet, wenn die elektrostatische Wechselwirkung durch Verwendung einer Pufferlösung hoher Ionenstärke stark abgeschirmt wird. Dem-

gegenüber weisen die Spektren nach Markierung der Stellen in der C-terminalen Domäne (Helices H und F sowie die C-terminale Hälfte der Helix C) darauf hin, dass die Sekundärstruktur erhalten bleibt. Der entfaltete Teil des Proteins enthält Aminosäuren, denen eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung zugeschrieben wird.^[41] Eine solche Entfaltung des aktiven Zentrums ist konsistent mit der Abnahme der enzymatischen Aktivität von T4L, die nach Adsorption auf Quarz beobachtet wurde.^[42] Durch Entfaltung der Helix A und des β -Faltblatts sollten sich auch Sekundärstrukturrelemente in der Nähe dieser Region verändern, insbesondere Helix B und der N-terminale Teil von Helix C. Tatsächlich führen Mutationen in genau diesem Bereich dazu, dass kleine Veränderungen des lokalen Umfelds der spinmarkierten Seitenkette beobachtet werden. Einen interessanten Aspekt liefert der Vergleich der Strukturänderungen von T4L bei der Adsorption auf der Quarzoberfläche mit thermodynamischen Untersuchungen der Guanidiniumchlorid-induzierten Entfaltung von T4L.^[43] Dort wurde eine erhöhte Stabilität der C-terminalen Domäne (Helices A, D–J) gegenüber jener der N-terminalen Domäne (das β -Faltblatt sowie die Helix B) gefunden. Es wird somit deutlich, dass das β -Faltblatt, das auf der Quarzoberfläche denaturiert, auch gegenüber Guanidiniumchlorid wenig beständig ist. Dass diese Analogie nicht für die Helices A und B gilt, ist nicht überraschend, sondern wahrscheinlich den unterschiedlichen Entfaltungsmechanismen geschuldet.

In früheren Untersuchungen wurde vorgeschlagen, dass elektrostatische Wechselwirkungen die Bindung des Proteins an die entgegengesetzt geladene Quarzoberfläche beherrschen.^[44] Die beobachtete partielle Entfaltung des Proteins widerspricht dieser Annahme, da in diesem Fall der C-terminalen Teil (mit höherer positiver Ladungsdichte) die größten Strukturänderungen zeigen sollte. Wie eingangs angedeutet, werden Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen generell von einem Zusammenspiel zwischen elektrostatischen, hydrophoben und Van-der-Waals-Wechselwirkungen bestimmt. Unter den hier verwendeten Bedingungen hoher Ionenstärke verlieren die elektrostatischen Wechselwirkungen stark an Bedeutung. Experimente mit geringerer elektrostatischer Abschirmung (niedrigerer Ionenstärke) zeigen, dass diese die Struktur des adsorbierten Proteins wesentlich beeinflusst: In diesem Fall werden auch starke Veränderungen der Linienformen für Markierungen in der C-terminalen Domäne des Proteins beobachtet. Somit wird die partielle Entfaltung bei hoher Ionenstärke nicht wesentlich durch elektrostatische Wechselwirkungen getrieben. Vielmehr wird in Übereinstimmung mit einer neueren thermodynamischen Analyse der Adsorption von HEW-Lysozym auf Quarz den hydrophoben Wechselwirkungen eine maßgebliche Rolle zugeschrieben.^[23]

In der vorliegenden Untersuchung haben wir die ortsgenauige Spinmarkierung (SDSL) zur detaillierten Analyse der Strukturänderungen des kleinen globulären Proteins T4L bei der Adsorption auf einer ebenen Quarzoberfläche verwendet. Auf diese Weise wurden erstmals direkte Beweise für die partielle Entfaltung der N-terminalen Region um das aktive Zentrum des Enzyms erhalten, und es wurde gezeigt, dass hydrophobe Wechselwirkungen an diesem Prozess be-

teiligt sind. Die hier vorgestellte Untersuchung adsorptions-induzierter Strukturveränderungen für beliebige Positionen innerhalb des Proteins verdeutlicht das Potenzial der Methode für zukünftige Untersuchungen der Struktur und Dynamik adsorbiertener Proteine.

Experimentelles

Das cysteinfreie pseudonative Gen für das T4-Lysozym mit den Substitutionen C45T und C97A wurde freundlicherweise von F. W. Dahlquist (University of Oregon) zur Verfügung gestellt. Die Klonierung, Expression, Reinigung und Spinmarkierung der zehn untersuchten T4L-Mutanten (F4C, E22C, T26C, S44, D61C, D72C, D76C, T109C, V131C, I150C) erfolgte wie bereits beschrieben.^[35] Die Proteine wurden an den sorgfältig gereinigten Innenflächen einer ESR-Flachzelle (Bruker ER160FC-Q) adsorbiert. Die Reinigungsprozedur umfasste eine zwölfständige Lagerung in Chloroform, anschließendes Spülen mit Chloroform, Aceton, Ethanol, Wasser und eine Ultraschallbehandlung im Ethanol-/Wasserbad. Vor dem Gebrauch wurden die Zellen 12 Stunden in einem Muffelofen auf 600 °C erhitzt. Zur Adsorption wurde ein Puffer aus 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.5 M NaCl mit pH 7.4 verwendet. Nach vierständiger Adsorption wurde die überstehende Proteinfösung entfernt, und die Zelle wurde mit dem 15-fachen Zellvolumen an Pufferlösung gespült. Die ESR-Spektren wurden mit einem Bruker-EMX-Spektrometer aufgenommen, das mit einem sphärischen SHQ(super-high-Q)-Resonator (Bruker, Karlsruhe) betrieben wurde. Die Mikrowellenleistung betrug 2 mW. Die Modulationsamplitude wurde für die unterschiedlichen Mutanten jeweils so gewählt, dass instrumentelle Linienverbreiterungen vermieden wurden. Um die Bewegungen des gesamten Proteins soweit zu verlangsamen, dass sie außerhalb des dynamischen Zeitfensters des Experiments liegen, wurden die Spektren der Proteine in Lösung in einer 30-proz. Sucrose-Lösung aufgenommen.^[38] In dieser Konzentration hat Sucrose keinen Einfluss auf die Rotationsdynamik der Seitenkette.^[45]

Eingegangen am 2. Januar 2006
Online veröffentlicht am 3. Mai 2006

Stichwörter: Enzyme · ESR-Spektroskopie · Mutagenese · Proteinfaltung · Strukturaufklärung

- [1] B. Kasemo, *Surf. Sci.* **2002**, *500*, 656.
- [2] D. G. Castner, B. D. Ratner, *Surf. Sci.* **2002**, *500*, 28.
- [3] M. Mrksich, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1997**, *2*, 83.
- [4] T. A. Horbett, J. L. Brash, *ACS Symp. Ser.* **1995**, *602*.
- [5] R. G. Chapman, E. Ostuni, S. Takayama, R. E. Holmlin, L. Yan, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8303.
- [6] R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature* **2004**, *428*, 487.
- [7] P. Kingshott, H. J. Griesser, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **1999**, *4*, 403.
- [8] V. Vogel, G. Baneyx, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2003**, *5*, 441.
- [9] B. D. Ratner, S. J. Bryant, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2004**, *6*, 41.
- [10] S. F. Badylak, *Transp. Immunol.* **2004**, *12*, 367.
- [11] P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, P. E. Labinis, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 426.
- [12] K. Feldman, G. Hahner, N. D. Spencer, P. Harder, M. Grunze, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10134.
- [13] K. Glasmastar, C. Larsson, F. Hook, B. Kasemo, *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *246*, 40.
- [14] E. E. Ross, T. Spratt, S. C. Liu, L. J. Rozanski, D. F. O'Brien, S. S. Saavedra, *Langmuir* **2003**, *19*, 1766.
- [15] S. J. Opella, F. M. Marassi, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3587.
- [16] A. Brisson, G. Mosser, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1991**, *220*, 199.

- [17] G. Kim, M. Gurau, J. Kim, P. S. Cremer, *Langmuir* **2002**, *18*, 2807.
- [18] A. Sethuraman, G. Belfort, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 1322.
- [19] J. Wang, Z. Paszti, M. A. Even, Z. Chen, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 3625.
- [20] A. Ball, R. A. L. Jones, *Langmuir* **1995**, *11*, 3542.
- [21] D. H. Murgida, P. Hildebrandt, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 854.
- [22] C. Czeslik, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 235.
- [23] C. Czeslik, Z. *Phys. Chem.* **2004**, *218*, 771.
- [24] S. M. Daly, T. M. Przybycien, R. D. Tilton, *Langmuir* **2003**, *19*, 3848.
- [25] P. Billsten, M. Wahlgren, T. Arnebrant, J. McGuire, H. Elwing, *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *175*, 77.
- [26] M. H. Tian, W. K. Lee, M. K. Bothwell, J. McGuire, *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *200*, 146.
- [27] M. Karlsson, L. G. Martensson, B. H. Jonsson, U. Carlsson, *Langmuir* **2000**, *16*, 8470.
- [28] J. C. Froberg, T. Arnebrant, J. McGuire, P. M. Claesson, *Langmuir* **1998**, *14*, 456.
- [29] D. T. Kim, H. W. Blanch, C. J. Radke, *Langmuir* **2002**, *18*, 5841.
- [30] G. Jackler, R. Steitz, C. Czeslik, *Langmuir* **2002**, *18*, 6565.
- [31] T. J. Su, J. R. Lu, R. K. Thomas, Z. F. Cui, J. Penfold, *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *203*, 419.
- [32] W. L. Hubbell, A. Gross, R. Langen, M. A. Lietzow, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 649.
- [33] W. L. Hubbell, D. S. Cafiso, C. Altenbach, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 735.
- [34] G. E. Fanucci, K. A. Coggshall, N. Cadieux, M. Kim, R. J. Kadner, D. S. Cafiso, *Biochemistry* **2003**, *42*, 1391.
- [35] K. Jacobsen, S. Oga, W. L. Hubbell, T. Risse, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 4351.
- [36] T. Risse, W. L. Hubbell, J. M. Isas, H. T. Haigler, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*.
- [37] P. L. Edmiston, S. S. Saavedra, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 999.
- [38] H. S. McHaourab, M. A. Lietzow, K. Hideg, W. L. Hubbell, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7692.
- [39] L. Columbus, W. L. Hubbell, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 288.
- [40] M. Fleissner, D. Cascio, W. L. Hubbell, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [41] R. Kuroki, L. H. Weaver, B. W. Matthews, *Science* **1993**, *262*, 2030.
- [42] C. K. Bower, Q. Xu, J. McGuire, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 658.
- [43] M. Llinas, B. Gillespie, F. W. Dahlquist, S. Marqusee, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 1072.
- [44] J. McGuire, V. Krisdhasima, M. V. Wahlgren, T. Arnebrant in *Proteins at Interfaces II*, Vol. 602 (Hrsg.: T. A. Horbett, J. L. Brash), American Chemical Society, Washington, **1995**.
- [45] R. Langen, K. Cai, C. Altenbach, H. G. Khorana, W. L. Hubbell, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7918.