

Proteinfaltung

¹³C-markierte Tyrosinreste als lokale IR-Sonden zur Analyse konformativer Änderungen in Peptiden und Proteinen**

Sandra Tremmel, Michael Beyermann,
Hartmut Oschkinat, Michael Bienert, Dieter Naumann
und Heinz Fabian**

Die Fourier-Transformations-Infrarot(FT-IR)-Spektroskopie hat sich zu einer wertvollen Methode für das Studium der Sekundärstruktur von Proteinen und für die Verfolgung konformativer Änderungen bei Proteininfaltung, -entfaltung oder -fehlfaltung entwickelt.^[1–3] Die meisten Studien haben sich dabei auf die intensive Amid-I-Bande (primär eine C=O-Streckschwingung der sekundären Amidgruppe) konzentriert, die im IR-Spektrum zwischen 1610 und 1700 cm⁻¹ auftritt und ein akzeptierter Indikator für Proteinsekundärstrukturen ist. Neben der Amid-I-Bande des Peptidrückgrats

[*] S. Tremmel, Dr. M. Beyermann, Prof. H. Oschkinat, Prof. M. Bienert
Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-9479-3159
E-mail: tremmel@fmp-berlin.de
Prof. D. Naumann, Dr. H. Fabian
Robert-Koch-Institut
Nordufer 20, 13353 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-4547-2606
E-mail: fabianh@rki.de

[**] Die Arbeiten am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG-FOR 299) unterstützt. Wir danken Annerose Klose und Bernhard Schmikale herzlich für ihre Assistenz bei der Peptidsynthese.



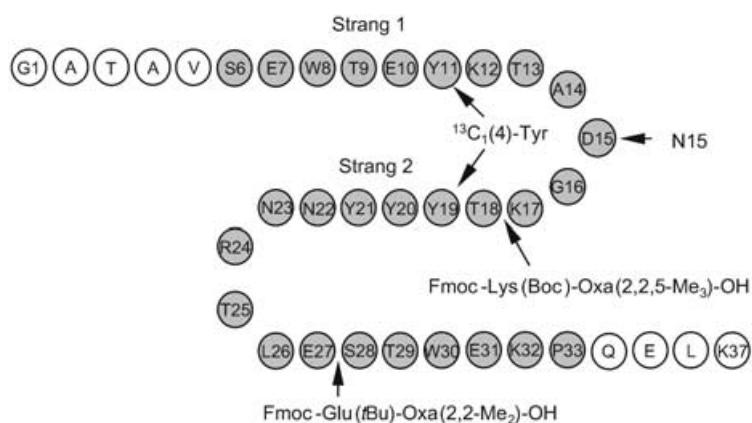
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

tes finden sich im IR-Spektrum aber auch Absorptionsbanden verschiedener Aminosäureseitenketten, die als intrinsische lokale Indikatoren für konformativ Änderungen fungieren können.

Insbesondere die relativ starke Absorptionsbande der Tyrosinseitenkette bei ca. 1515 cm^{-1} (C-C-Streckschwingung des aromatischen Rings) ist in IR-Spektren von Proteinen gut nachweisbar.^[4] Die Frequenz dieser Bande kann sich bei Faltungs-, Entfaltungs- und Assoziationsprozessen in charakteristischer Weise verändern: So wurde bei Proteinen, die sich reversibel entfalten, im Temperaturbereich ihrer Denaturierung eine diskontinuierliche Verschiebung der Tyrosinseitenkette zu höheren Wellenzahlen gefunden.^[5-7] Dagegen zeigte die Tyrosinbande in einem unstrukturierten Peptid bei Temperaturerhöhung nur eine geringe graduelle Verschiebung zu niedrigeren Wellenzahlen, was als genereller Temperatureffekt interpretiert wurde.^[5] Eine relativ große Verschiebung der Tyrosinbande zu niedrigeren Wellenzahlen wurde bei der Proteinaggregation beobachtet, was wahrscheinlich auf die Bildung von Wasserstoffbrücken der Tyrosin-OH-Gruppen mit Acceptor im Proteinaggregat zurückzuführen ist.^[6,8]

Enthält das zu untersuchende Peptid oder Protein mehrere Tyrosinreste, sind die ortsaufgelösten Informationen der IR-Spektroskopie allerdings sehr begrenzt. Die Entfernung von Tyrosinresten durch ortsspezifische Mutagenese könnte dieses Problem lösen; ist der entsprechende Tyrosinrest aber Teil eines hydrophoben Clusters, so kann seine Mutation zur Destabilisierung des Proteins führen. Hier zeigen wir, dass eine ideale Alternative zur ortsspezifischen Mutagenese die ortsspezifische ^{13}C -Isotopenmarkierung individueller Tyrosinreste in der C4-Position des Phenolrings ist. Diese Strategie bewirkt eine Verschiebung der Bande des markierten Tyrosinrestes um ca. 10 cm^{-1} zu niedrigeren Wellenzahlen^[9] und ermöglicht so eine eindeutige ortsspezifische Zuordnung der Messdaten. Zwar ist die Verwendung isotopenmarkierter Tyrosinreste für IR-Studien von Proteinen bereits bekannt, eine wesentliche Neuerung ist hier allerdings ihre Nutzung zur Analyse der Umgebung spezifischer Tyrosinseitenketten und zur gleichzeitigen Verfolgung konformativer Änderungen in verschiedenen Bereichen eines Proteins.

Um das Potenzial der ortsspezifischen Isotopenmarkierung für Konformationsuntersuchungen zu ermitteln, haben wir Änderungen des infrarotspektroskopischen Verhaltens bestimmter Tyrosinreste bei der thermischen Entfaltung der WW-Domäne des Formin-bindenden Proteins 28 (FBP28) untersucht. Dieses Protein enthält vier Tyrosinreste, wobei einer im Strang 1 (Position 11) und drei im Strang 2 (Positionen 19, 20, 21) lokalisiert sind (Schema 1, Peptid 1 in Tabelle 1). WW-Domänen sind die kleinsten natürlich vorkommenden, aus drei Strängen aufgebauten β -Faltblattstrukturen,



Schema 1. Struktureigenschaften der FBP28WW-Domäne. Die Sequenz 6–33 (grau) bildet eine definierte dreidimensionale Struktur mit drei Strängen und zwei Schleifen.^[11] Die Orte des Einbaus von Pseudoprolin-Bausteinen, die eine erfolgreiche Synthese ermöglichen, und die Positionen des Einbaus von $^{13}\text{C}_1(4)$ -Tyrosinresten sind gekennzeichnet (Oxa: Ser/Thr-abgeleitete Oxazolidin-4-Carbonsäure-Bausteine).

Tabelle 1: Sequenzen der FBP28WW-Peptide (*Y = $^{13}\text{C}_1(4)$ -Tyr).

Peptid	Sequenz
FBP28WW	1 GATAVSEWTEYKTADGKTYYNNRTLESTWEKPQELK
[N ¹⁵]-FBP28WW ^[a]	2 GATAVSEWTEYKTANGKTYYNNRTLESTWEKPQELK
[Q ^{9,21,23,26,28} , N ¹⁵]-FBP28WW ^[a]	3 GATAVSEWQEYKTANGKTYYQNQRTQEQTWEKPQELK
[Q ^{9,21,23,26,28} , F ^{11,20} , N ¹⁵]-FBP28WW	4 GATAVSEWQEFKTANGKTYFQNQRTQEQTWEKPQELK
[*Y ¹¹ , Q ^{9,21,23,26,28} , N ¹⁵]-FBP28WW ^[a]	5 GATAVSEWQE *YKTANGKTYYQNQRTQEQTWEKPQELK
[*Y ¹⁹ , Q ^{9,21,23,26,28} , N ¹⁵]-FBP28WW ^[a]	6 GATAVSEWQEYKTANGKT *YYQNQRTQEQTWEKPQELK

[a] C-terminal amidiert.

die bisher identifiziert wurden. Sie wurden nach zwei konservierten Tryptophanresten benannt, erkennen prolinreiche Liganden und sind als nichtkatalytische Proteindomänen an Prozessen der Signaltransduktion beteiligt.^[10] Verschiedene WW-Domänen sind als Modellsysteme zum Studium der Stabilität und der Faltung von β -Faltblattstrukturen genutzt worden,^[11-19] wobei die FBP28WW-Domäne als eine monomere, stabile Struktur beschrieben wurde, die jedoch unter gewissen Bedingungen auch zur Aggregation und Fibrillenbildung neigt.^[18]

Sowohl die Herstellung von WW-Analoga als auch der Einbau isotopenmarkierter Aminosäurebausteine sollten durch Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) möglich sein.^[20] Versuche, FBP28WW (Peptid 1) mittels SPPS herzustellen, schlugen allerdings fehl, was für den Aufbau β -Faltblattbildender Sequenzen nicht unerwartet ist.^[21] Der Syntheseverlauf konnte aber durch den Einbau von zwei X-Ser- und X-Thr-Dipeptideinheiten (X = Pseudoprolin in Form der entsprechenden Pseudoprolin-Derivate^[22]) beträchtlich verbessert werden. Außerdem wurde die hohe Neigung der Asp15-Gly16-Sequenz zur Aspartimid-Bildung^[23] durch Einbau von Asn15 anstelle von Asp15 (Peptid 2) ausgeschaltet (Schema 1; siehe Hintergrundinformationen).

Das IR-Spektrum von 2, aufgenommen im Rahmen thermischer Denaturierungsexperimente in D_2O -Puffer (siehe Hintergrundinformationen) im Bereich von 10–90°C ist bei tiefen Temperaturen (Abbildung 1a, blaue Kurven)

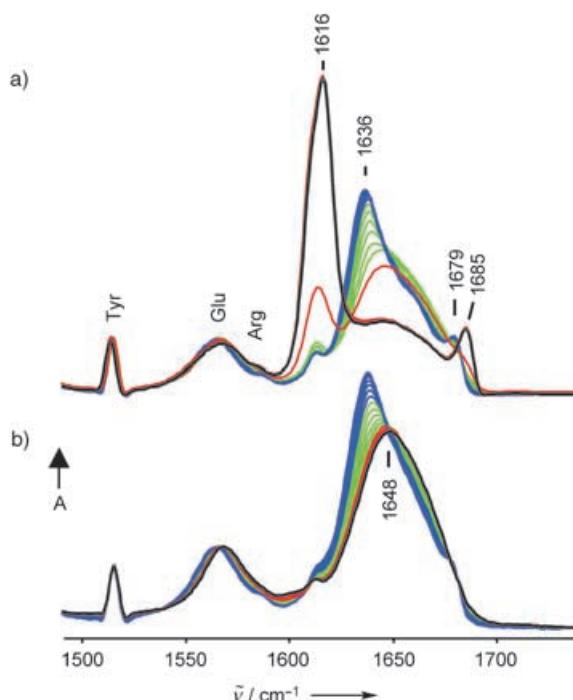


Abbildung 1. Fourier-selbstentfaltete Infrarotspektren von a) Peptid 2 und b) Peptid 3 in D_2O -Puffer (50 mM Phosphat, 50 mM Natriumchlorid, pH 7.6) als Funktion der Temperatur. Blaue Kurven 10–40°C, grüne Kurven 45–70°C, rote Kurven 75–85°C, schwarze Kurve 90°C.

durch eine starke Amid-I-Bande bei 1636 cm^{-1} und eine schwächere Komponente bei 1679 cm^{-1} charakterisiert, was für das Vorliegen einer antiparallelen β -Faltblattstruktur spricht.^[1–3] Die IR-Banden zwischen 1500 und 1612 cm^{-1} sind Absorptionen von Aminosäureseitenketten zuzuordnen: Tyrosin (1515 und 1612 cm^{-1}), Glutamat (1565 cm^{-1}) und Arginin (1587 cm^{-1}).^[4] Bei 90°C wird die Amid-I-Region des Spektrums durch Banden bei 1616 und 1685 cm^{-1} dominiert (Abbildung 1a, schwarze Kurve). Diese Banden sind für intermolekulare β -Faltblattstrukturen charakteristisch^[1–3] und weisen darauf hin, dass die thermische Denaturierung des [Asn15]-FBP28WW-Peptids von einer Aggregation begleitet ist.

Im Rahmen der Synthese von FBP28WW-Analoga fanden wir überraschenderweise, dass der Einbau von Glutaminresten in mehrere Positionen der WW-Domäne die temperaturinduzierte Aggregation sehr effektiv unterdrückt (Tabelle 1, Peptid 3). Für Peptid 3 konnte durch NMR-spektroskopische Studien die für FBP28WW typische Faltung nachgewiesen werden^[27], und das Fehlen der charakteristischen IR-„Aggregat“-Banden bei 1616 und 1685 cm^{-1} zeigt, dass auch bei hohen Temperaturen keine intermolekularen β -Faltblattstrukturen entstehen. Stattdessen wird das IR-Spektrum bei hohen Temperaturen von der Amid-I-Bande bei 1648 cm^{-1} (Abbildung 1b), charakteristisch für unstrukturierte Proteine,^[1–3] dominiert. Diese Befunde gelten auch für Peptid 4 (Spektrum nicht gezeigt), in dem zusätzlich zwei Tyr-Reste gegen Phe ausgetauscht wurden, um eine Zuordnung Tyrosin-vermittelter spektraler Änderungen zu einem einzigen Tyrosinrest zu ermöglichen. Die temperaturinduzierte

Intensitätsverringerung der Amid-I-Bande bei 1636 cm^{-1} (Abbildung 2a) und die Frequenzverschiebung der Bande für die Stretschwung des aromatischen Tyrosinrings bei ca. 1515 cm^{-1} zeigen zwischen 10 und 90°C für beide Peptide einen sigmoidalen Entfaltungsübergang (Abbildung 2b).

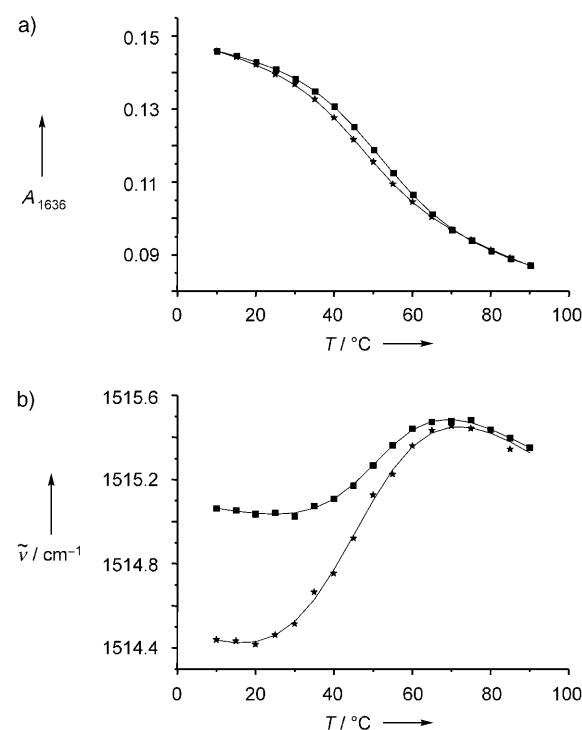


Abbildung 2. a) Temperaturabhängigkeit der Peakintensität der Amid-I-Bande bei 1636 cm^{-1} und b) Temperaturabhängigkeit der Position der Tyrosinbande für Peptid 3 (■) und Peptid 4 (★). Die Peakintensitäten bei 1636 cm^{-1} wurden relativ zum Signal bei 90°C normiert. Die durchgezogene Linie entspricht der Kurvenanpassung an die Messwerte zur Bestimmung der Denaturierungstemperaturen (T_m).

Die Tyr → Phe-Substitution führt allerdings zu einer Veränderung der Denaturierungsstemperatur um ca. 5 K;^[24] dies verdeutlicht die Nachteile der Mutationsmethode zur Erzielung ortsspezifischer Informationen (zumindest im Fall der FBP28WW-Domäne). Aus diesem Grund haben wir das Peptid 3 ortsspezifisch in verschiedenen Positionen mit $^{13}\text{C}_1(4)$ -Tyr-Resten markiert. Dazu haben wir die markierten Peptide 5 und 6 synthetisiert, um gleichzeitig temperaturinduzierte Änderungen in der lokalen Umgebung von Tyr11 im Strang 1 der WW-Domäne (Schema 1) und von Tyr19, einem hoch konservierten Rest im Strang 2 der WW-Domäne,^[11] zu verfolgen. Wie erwartet führt die selektive $^{13}\text{C}_1(4)$ -Markierung von Tyr11 (Abbildung 3, mittlere Kurve) oder von Tyr19 (Abbildung 3, obere Kurve) zu einem Intensitätsverlust der Bande bei 1515 cm^{-1} (Abbildung 3, untere Kurve) und dem Auftreten einer neuen Bande bei 1505 cm^{-1} .

Die Temperaturen der thermischen Denaturierung, erhalten aus den IR-Banden für Tyr11 im Strang 1 und Tyr19 im Strang 2, sind nahezu identisch,^[25] was darauf hindeutet, dass die konformativen Änderungen in den beiden Strängen von

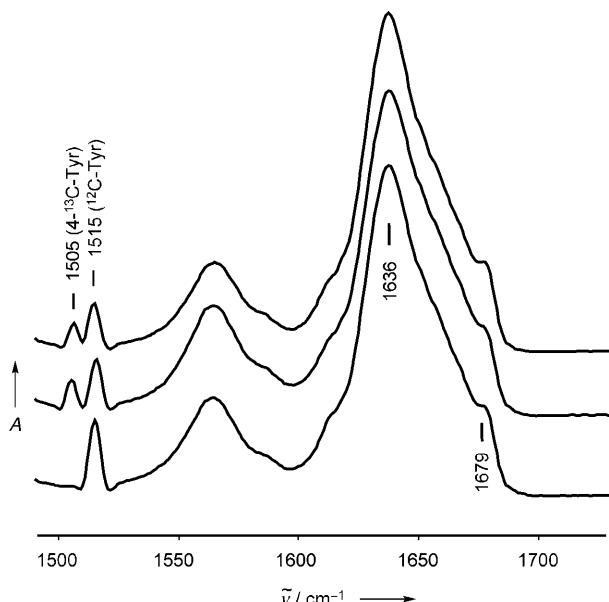


Abbildung 3. Fourier-selbstentfaltete Infrarotspektren von (untere Kurve) unmarkierten (Peptid 3), (mittlere Kurve) ortsspezifisch $^{13}\text{C}_1(4)$ -Tyr11-markierten (Peptid 5) und (obere Kurve) ortsspezifisch $^{13}\text{C}_1(4)$ -Tyr19-markierten (Peptid 6) FBP28WW-Peptiden in D_2O -Puffer (50 mM Phosphat, 50 mM Natriumchlorid, pH 7.6) bei 10°C.

FBP28WW bei sehr ähnlichen Temperaturen stattfinden. Die Analyse des Verlaufs der Schmelzkurven offenbart jedoch große Unterschiede zwischen den markierten Tyr11- und Tyr19-Banden (Abbildung 4b). Während die ^{13}C -Tyr11-

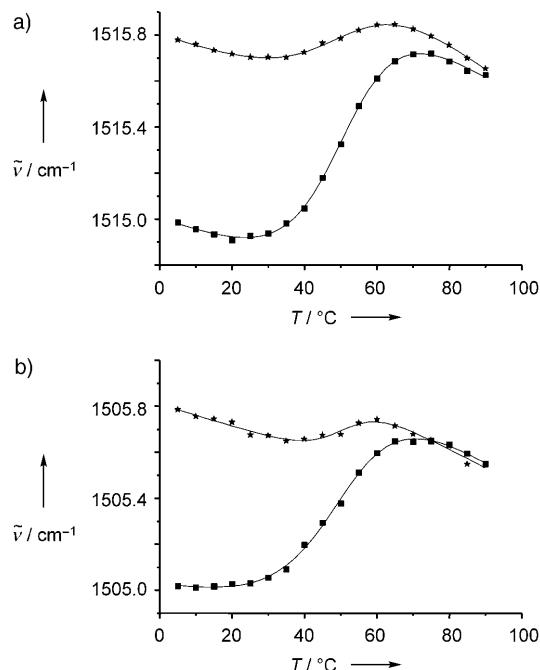


Abbildung 4. Temperaturabhängigkeit der Positionen der Tyrosinbänder von ortsspezifisch $^{13}\text{C}_1(4)$ -Tyr11- und $^{13}\text{C}_1(4)$ -Tyr19-markiertem [$\text{Gln}^{9,21,23,26,28}, \text{Asn}^{15}$]-FBP28WW. a) Positionen der unmarkierten Tyrosinreste in Peptid 5 (■) und Peptid 6 (★). b) Positionen der markierten Tyrosinreste in Peptid 5 (★) und Peptid 6 (■).

Banden nur eine geringe Frequenzveränderung bei Temperaturerhöhung erfährt, wurde für die ^{13}C -Tyr19-Bande eine relativ starke Verschiebung um ca. 0.6 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen beobachtet. Bei hohen Temperaturen sind die Peakpositionen praktisch identisch, wie für ungefaltete Peptide zu erwarten. Die für markiertes Tyr11 gefundenen Änderungen der Wellenzahl von ca. 0.2 cm^{-1} im Temperaturbereich der Denaturierung (Abbildung 4b, Peptid 5) sind mit den geringen mittleren spektralen Änderungen der unmarkierten Tyr11- und Tyr20-Seitenketten in Peptid 6 (Abbildung 4a) vergleichbar, was darauf schließen lässt, dass sich Temperaturänderungen auf Tyr11 und Tyr20 sehr ähnlich auswirken. Insgesamt folgt aus diesen Befunden, dass es im gefalteten Zustand der Peptide beträchtliche Unterschiede in der Mikroumgebung von Tyr19 einerseits und von Tyr11/Tyr20 andererseits geben muss.

Eine plausible Erklärung für die starke Verschiebung der Tyrosinbande zu höheren Wellenzahlen während der Denaturierung könnte eine Stärkung der Tyrosin-O-H-Bindung sein, verursacht durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrücken zu benachbarten Aczeptoren.^[5,6] Die verfügbaren NMR-Informationen zur FBP28WW-Struktur liefern allerdings keine Hinweise auf die Einbindung von Tyrosin-OH-Gruppen in Wasserstoffbrücken. Dies deutet darauf hin, dass auch andere Effekte als Modulatoren der C-C-Schwingung des Phenolrings in Betracht kommen könnten, z.B. Veränderungen von π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Tyrosinring und konjugierten Systemen anderer Aminosäureseitenketten.^[6,26] In der FBP28WW-Domäne sind Trp30 und Tyr19 benachbart^[11] – so könnte die temperaturinduzierte Verschiebung der Tyr19-Bande bei der Entfaltung auf die Trennung von π - π -Wechselwirkungen zwischen Tyr19 und dem Indolring von Trp30 zurückzuführen sein. Damit wäre die IR-Bande von Tyr19 eine lokale Sonde für die Detektion spezifischer Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten der Strände 2 und 3 der WW-Domäne.

Wir haben gezeigt, dass die FT-IR-Spektroskopie in Verbindung mit der ortsspezifischen $^{13}\text{C}_1(4)$ -Markierung von Tyrosinresten eine vielversprechende, neuartige Methode ist, um Informationen über die unmittelbare Umgebung bestimmter Tyrosinseitenketten zu erlangen und um temperaturinduzierte lokale Konformationsänderungen in verschiedenen Regionen eines Proteins nachzuweisen. In Verbindung mit zeitaufgelösten IR-spektroskopischen Techniken eröffnet diese Methode neue Möglichkeiten bei der positionsspezifischen Untersuchung lokaler Faltungs- und Entfaltungsprozesse. Wir führen derzeit sowohl Peptidsynthesen als auch spektroskopische Untersuchungen durch, um unsere Kenntnisse zur Rolle der Tyrosinreste bei der Stabilisierung und Entfaltung der β -Faltblattstruktur von FBP28WW und anderen WW-Domänen zu vertiefen.

Eingegangen am 14. Februar 2005
Online veröffentlicht am 24. Juni 2005

Stichwörter: IR-Spektroskopie · Isotopeneffekte · Peptidsynthesen · Proteinfaltung · WW-Domänen

- [1] M. Jackson, H. H. Mantsch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*, 95–120.
- [2] H. Fabian, W. Mäntele in *Handbook of Vibrational Spectroscopy. Infrared Spectroscopy of Proteins* (Hrsg.: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths), Wiley, Chichester, **2002**, S. 3399–3425.
- [3] A. Barth, C. Zscherp, *Q. Rev. Biophys.* **2002**, *35*, 369–430.
- [4] Y. N. Chirgadze, O. V. Fedorov, N. P. Trushina, *Biopolymers* **1975**, *14*, 679–694.
- [5] H. Fabian, C. Schultz, J. Backmann, U. Hahn, W. Saenger, H. H. Mantsch, D. Naumann, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10725–10730.
- [6] C. Zscherp, H. Aygün, J. W. Engels, W. Mäntele, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1651*, 139–145.
- [7] J. Torrent, P. Rubens, M. Ribo, K. Heremans, M. Vilanova, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 725–734.
- [8] J. L. R. Arrondo, N. M. Young, H. H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *952*, 261–268.
- [9] R. Hienerwadel, A. Boussac, J. Breton, B. A. Diner, C. Berthomieu, *Biochemistry* **1997**, *36*, 14712–14723.
- [10] a) M. Sudol, T. Hunter, *Cell* **2000**, *103*, 1001–1004; b) L. J. Ball, R. Kühne, J. Schneider-Mergener, H. Oschkinat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2852–2869.
- [11] M. J. Macias, V. Gervais, C. Civera, H. Oschkinat, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 375–379.
- [12] R. Kaul, A. R. Angeles, M. Jäger, E. T. Powers, J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5206–5212.
- [13] M. Jäger, H. Nguyen, J. C. Crane, J. W. Kelly, M. Gruebele, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 373–393.
- [14] a) G. T. Ibragimova, R. C. Wade, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2191–2198; b) N. Ferguson, J. R. Pires, F. Toepert, C. M. Johnson, Y. P. Pan, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, V. Daggett, H. Oschkinat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13008–13013.
- [15] N. Ferguson, C. M. Johnson, M. Macias, H. Oschkinat, A. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13002–13007.
- [16] J. Karanicolas, C. L. Brooks III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3954–3959.
- [17] H. Nguyen, M. Jäger, A. Moretto, M. Gruebele, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3948–3953.
- [18] N. Ferguson, J. Berriman, M. Petrovich, T. D. Sharpe, J. T. Finch, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9814–9819.
- [19] S. Deechongkit, H. Nguyen, E. T. Powers, P. E. Dawson, M. Gruebele, J. W. Kelly, *Nature* **2004**, *430*, 101–105.
- [20] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161–214.
- [21] a) M. Beyermann, M. Bienert, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3745–3748; b) M. Dettin, S. Pegoraro, P. Rovero, S. Bicciato, A. Bango, C. Di Bello, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 103–111; c) C. Hyde, T. Johnson, D. Owen, M. Quibell, R. C. Sheppard, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 431–440.
- [22] a) T. Haack, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1589–1592; b) T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218–9227; c) W. R. Sampson, H. Patsiouras, H. J. Ede, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 403–409.
- [23] a) E. Nicolas, E. Pedroso, E. Giralt, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 497–500; b) R. Dölling, M. Beyermann, J. Haenel, F. Kernchen, E. Krause, P. Franke, M. Brudel, M. Bienert, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 853–854; c) Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thornqvist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9689–9692.
- [24] Die Denaturierungstemperaturen (T_m) der FBP28WW-Varianten wurden entweder aus dem Intensitätsverlauf der β -Bande bei 1636 cm^{-1} oder über die Frequenzveränderung der Tyrosinbande bei 1515 cm^{-1} (in Klammern) ermittelt; Peptid 3: 50.9 (52.8) °C, Peptid 4: 46.2 (46.4) °C.
- [25] Die Denaturierungstemperaturen von Strang 1 und Strang 2 der [$\text{Gln}^{9,21,23,26,28}, \text{Asn}^{15}$]FBP28WW-Variante wurden über die Fre-
- quenzveränderungen der entsprechenden Banden der ^{13}C -markierten Tyrosinreste bei 1505 cm^{-1} ermittelt. Zum Vergleich sind auch die T_m -Werte angegeben, die über die Frequenzveränderungen der unmarkierten Tyrosinbanden bei 1515 cm^{-1} bestimmt wurden: Tyr11 (Strang 1): 51.5 °C; Tyr19 (Strang 2): 51.1 °C; Tyr11/20: 52.3 °C; Tyr19/20: 51.1 °C.
- [26] Im Rahmen von IR-spektroskopischen Untersuchungen des Histon-ähnlichen Proteins Hbsu aus *Bacillus subtilis* wurde gefunden, dass auch die Absorptionsbande der Phenylalaninseitenkette bei ca. 1498 cm^{-1} eine ausgeprägte diskontinuierliche Verschiebung zu höheren Wellenzahlen im Temperaturbereich der Denaturierung aufweisen kann (H. Fabian, unveröffentlichte Ergebnisse).
- [27] J. H. Holtmann, H. Oschkinat, unveröffentlichte Ergebnisse.