

Echtzeitnachweis von Änderungen im Protein-Wassernetzwerk während der Proteinfaltung mit Terahertz-Absorptionsspektroskopie**

Seung Joong Kim, Benjamin Born, Martina Havenith und Martin Gruebele*

In letzter Zeit besteht ein verstärktes Interesse, neben der Dynamik selbstorganisierender Makromoleküle auch die Dynamik ihrer Solvathüllen zu untersuchen. Dielektrische, Raman-, Fluoreszenz- und NMR-Spektroskopie, Neutronenstreuung und Kristallographietechniken bieten experimentelle Zugänge, jedoch ist allein die Terahertz-Absorptionsspektroskopie (Wellenlängenbereich 0.1–1 mm; 1 THz = 1 ps^{-1}) in der Lage, die Pikosekundendynamik des Lösungsmittels über jede beliebige Zeitskala nachzuweisen. Die THz-Spektroskopie ermöglicht selbst in großer Entfernung von der Moleküloberfläche einen empfindlichen Nachweis der dynamischen Hydrathülle.^[1]

Die Proteinfaltung ist ein selbstorganisierender Prozess, bei dem die Bewegungen des Lösungsmittels eine Schlüsselrolle spielen. Die Beiträge der freien Energie von Protein und Solvatwasser während der Faltung sind vergleichbar,^[2] wobei die Wasserdynamik durch das Protein jenseits von zwei Solvat-schichten beeinflusst wird.^[3,4] Bisher allerdings lag bei Untersuchungen zur Proteinfaltung der Schwerpunkt auf der Beobachtung der Änderung des Rückgrats und der Seitenketten des Proteins selbst. Es stellt sich nun die Frage, ob nicht auch die Umorientierung des Lösungsmittels direkt während der Bildung von Sekundärstrukturen oder des hydrophoben Kerns untersucht werden kann. Inzwischen sind leistungsstarke THz-Quellen erhältlich, mit denen es gelingt, die Absorption von Biomolekülen in wässrigen Puffern direkt zu messen.^[5–10]

Kürzlich haben wir gezeigt, dass die Absorptionsspektroskopie im THz-Bereich eine empfindliche Methode ist, um die Hydrathülle von Proteinen zu untersuchen.^[11,12] Mithilfe

zeitabhängiger THz-Spektroskopie ist es gelungen, die Absorption und Emission auf der Zeitskala von Pikosekunden zu untersuchen.^[13,14] Zudem ist THz-Absorption verwendet worden, um langsame kinetische Vorgänge zu untersuchen.^[15]

Wir stellen hier Studien der kinetischen THz-Absorption (KITA) zur Untersuchung der Solvatationsdynamik während der Proteinfaltung vor. KITA misst die Änderung der Pulsform des elektromagnetischen Feldes eines THz-Pulses auf der Pikosekunden-Zeitskala Δt , während eine chemische Reaktion auf einer längeren Zeitskala t abläuft.

Wir verwenden KITA, um die Hydratwasserdynamik während der schnellen Rückfaltung von Ubiquitin zu messen. Ubiquitin kann vorwiegend als β -Faltblatt aus 76 Aminosäureresten charakterisiert werden und wurde lange Zeit als Prototyp für Faltungskinetikstudien verwendet.^[16] Die mit KITA gemessene Faltungskinetik wird hier mit den Resultaten von Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS), Tryptophan-Fluoreszenz und Circular dichroismusstudien (CD) verglichen. Die KITA-Messungen belegen, dass die Solvatationsdynamik im Bereich von 0.1–1 THz mit der Umstrukturierung der Sekundärstruktur (verbunden mit einem Wechsel von Solvens-Protein- zu mehr Protein-Protein-Wasserstoffbrücken) und dem Kollabieren der Proteinstruktur korreliert ist, während die Bildung von nativ-ähnlichen Tertiärstrukturen beim Tryptophan auf einer tausendfach langsameren Zeitskala erfolgt.

Die von uns verwendete Messanordnung ist in Abbildung 1 dargestellt. Der THz-Puls wird in ps-Zeitaufösung abgebildet. Die Änderungen im Puls infolge von Änderung in der THz-Absorption der Hydrathüllen und der Proteine während der durch Mischen initiierten Rückfaltung werden mit ms-Zeitaufösung aufgezeichnet. Dazu wurden Puls-spannen im Frequenzbereich von 0.1–1 THz verwendet. Durch das Abtasten der zeitlichen Verzögerung des THz-Pulses relativ zum optischen Puls wird das elektrische THz-E-Feld ausgelesen. Durch die Messung der zeitlichen Änderung der Intensität I des THz-Pulses nach dem Stopped-Flow-Mischen wird die Faltungskinetik gemessen (weitere Einzelheiten des KITA-Aufbaus siehe Hintergrundinformationen).

In früheren Untersuchungen hatten wir festgestellt, dass die fluoreszierende Phe45Trp-Mutante des Ubiquitins in Puffer gelöst (Ub*; 0.5–1.5 mM) bei 2.5 THz eine höhere Absorption aufweist als der reine Puffer oder das natürliche Protein. Wir konnten nachweisen, dass diese erhöhte THz-Absorption durch eine Änderung der Wasserdynamik im Abstand von bis zu 18 Å von der Proteinoberfläche verursacht wird.^[4,11,12] Wir vermuten eine erhöhte Absorption des Hydratwassers bei 2–3 THz und nehmen an, dass durch die Protein-Wasser-Kopplung eine Absorptionsverschiebung von sub-THz- zu höheren Frequenzen induziert wird.^[11]

[*] Prof. Dr. M. Gruebele
Departments of Chemistry, Physics, and Biophysics and Computational Biology, University of Illinois, Urbana, IL 61801 (USA)
Fax: (+1) 217-244-3186
E-Mail: gruebele@scs.uiuc.edu
Homepage: <http://www.scs.uiuc.edu/~mgweb/>

S. J. Kim
Department of Physics, University of Illinois
Urbana, IL 61801 (USA)

B. Born, Prof. Dr. M. Havenith
Lehrstuhl für Physikalische Chemie II, Ruhr-Universität Bochum
44780 Bochum (Deutschland)

[**] Wir danken J. D. McDonald für die Leihgabe eines Photovervielfachers und M. Krüger für die Programmierung der Software zur Erfassung der THz-Daten. Diese Arbeit wurde durch das Human Frontier Science Program (M.H. und M.G.) und die National Science Foundation (MCB-0613643) (M.G.) unterstützt. B.B. dankt dem DAAD und der Research School der Ruhr-Universität Bochum für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200802281> zu finden.

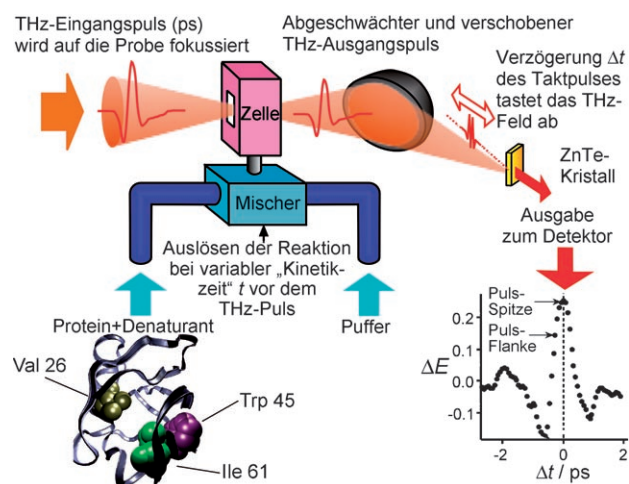


Abbildung 1. Prinzip eines KITA-Experiments: THz-Pulse passieren eine Stopped-Flow-Zelle, in der ein Mischer denaturiertes Ubiquitin mit Puffer (ohne denaturierende Agentien) mischt, um die Rückfaltung zu initiieren. Die Form des transmittierten elektrischen THz-Pulses wird mithilfe eines ZnTe-Kristalls und eines um Δt verzögerten, optischen 800-nm-Pulses detektiert. Die Differenz der Intensität ΔE des elektrischen Feldes zwischen Puffer und 1.5 mm Proteinlösung (ohne denaturierende Agentien) ist dargestellt. Für die kinetischen Messungen wird der THz-Puls nahe dem Maximum des elektrischen Feldes nachgewiesen, und die Änderungen werden als Funktion der Zeit t aufgezeichnet.

In Übereinstimmung mit dieser Annahme finden wir hier, dass die Ubiquitinlösung im Bereich von 0.1–1 THz weniger absorbiert als die reine Pufferlösung. Die Fourier-Transformation des elektrischen THz- E -Feldes vom Orts- in den Frequenzraum ergibt die in Abbildung 2 dargestellte transmittierte Intensität für die Proteinlösung und den reinen Puffer. Das Protein und sein Hydratwasser absorbieren typischerweise 10–20% weniger als der Puffer selbst. Im Bereich von 0.2 bis 0.8 THz ist die Nettodifferenz zwischen der Absorption des Puffers und des Proteins nahezu konstant, sodass in diesem Bereich keine Wellenlängenabhängigkeit der mit KITA detektierten Kinetiken zu erwarten wäre.

Als nächstes untersuchten wir die Änderungen im transmittierten elektrischen THz-Feld beim Übergang von entfaltetem zu gefaltetem Protein (typischerweise 3–5%). Hierzu wurde eine Lösung von entfaltetem Protein in 6M Guanidinium-Puffer auf 0.86M Guanidinium verdünnt, wodurch es zur Rückfaltung des Proteins kommt. Die KITA-Messungen ermöglichen die direkte Beobachtung der Prote-

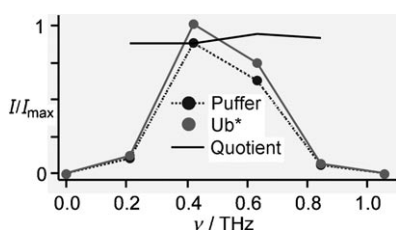


Abbildung 2. Eine 1.5 mm Ub*-Lösung transmittiert mehr THz-Intensität I als reiner Wasser/Ethylenglycol-Puffer. Der Quotient ist nahezu konstant.

in-Solvens-Umorientierung während der Faltung, so etwa das Aufbrechen von Wasserstoffbrücken zwischen dem Proteinerückgrat und dem Solvatwasser und die Bildung von neuen Wasserstoffbrücken innerhalb des Rückgrats. Das in Abbildung 3 links dargestellte Diagramm zeigt, wie KITA die Veränderung der kollektiven Protein-Hydratwasser-Dynamik

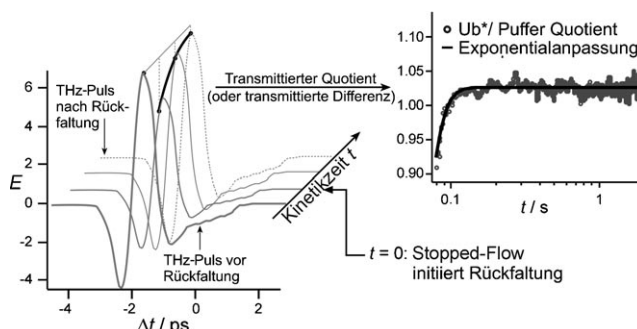


Abbildung 3. Links: Elektrisches E -Feld der THz-Pulse. Das transmittierte E -Feld wird in Abhängigkeit von t gemessen. Dabei ändert sich das E -Feld wegen der Unterschiede in der THz-Absorption und dem Brechungsindex der gefalteten Proteinlösung zur entfaltenen Proteinlösung. Rechts: Der Quotient aus Protein- und Puffertransmission bildet die Rückfaltungskinetik des Ub* ab (-20°C , Wasser/Ethylenglycol-Puffer).

während der Rückfaltung nachweist. Nachdem der Proteinlösung ein niedrig konzentrierter Guanidinium-Puffer zugemischt worden ist, tasten THz-Pulse die Proteinprobe unter Verfolgung der zeitlichen Verzögerungen von 0.05–5 s ab. Der Puffer dient als Referenz. Die Kinetik wird entweder anhand des Quotienten der Protein- und Puffertransmission (Abbildung 3, rechts) oder anhand ihrer Differenz dargestellt (Abbildung 4). Weil die Absorptionsänderung zwischen Proteinlösung und Puffer relativ klein ist, liefern beide Methoden Anpassungskurven mit gleichen Zeitkonstanten. Bei allen von uns angewendeten Messbedingungen sind detektierbare Kinetiken im ms-Bereich zu finden.

Die nahezu wellenlängenunabhängige Absorption in Abbildung 2 impliziert, dass die von uns nachgewiesenen Kinetiken nicht davon abhängen, welchen Teil des THz-Pulses wir untersuchen, was genau unseren Beobachtungen entspricht. Abbildung 4 zeigt die auf und neben dem Schei-

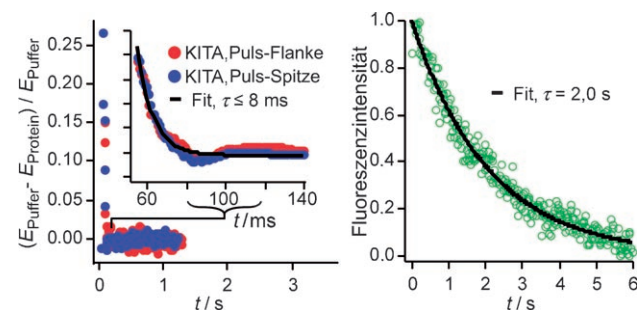


Abbildung 4. Ub*V26A-Kinetiken. Links: THz-Transmission auf und neben dem Scheitelpunkt des transmittierten elektrischen THz- E -Feldes ergibt gleichen ms-Kinetiken bei -20°C . Rechts: Mit Fluoreszenz detektierte Kinetiken sind bedeutend langsamer.

telpunkt des THz-Pulses nachgewiesene Faltungskinetik der Val26Ala-Mutante des Ub*, angezeigt durch die Pfeile in Abbildung 1. Innerhalb unserer Messgenauigkeit sind beide Rückfaltungskinetiken identisch. Für die anderen untersuchten Proteine wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

Die ermittelten Faltungskinetiken des Ub* und seiner Mutanten erweisen sich als hochgradig methodenabhängig. Aus den Zeitskalen in Abbildung 4 wird klar, dass die THz-Transmission den nativen Gleichgewichtswert des Ub*Val26-Ala nahezu zwei Größenordnungen schneller erreicht als die Tryptophan-Fluoreszenz. Innerhalb des erreichten Signal-Rausch-Verhältnisses für Ub* und dessen Mutanten konnten wir mit KITA keine weitere langsame Phase beobachten (z. B. Abbildung 3). Daraus schließen wir, dass KITA unterhalb von 1 THz über Protein-Solvens-Dynamiken Auskunft gibt, die bereits äquilibrieren, bevor Tryptophan in eine nativ-ähnliche Umgebung gepackt wird.

Zusätzlich verglichen wir die KITA-Daten mit CD- und SAXS-detektierten Ub*- und Ub*Ile61Ala-Rückfaltungskinetiken.^[17,18] Zum direkten Vergleich mit früheren CD- und SAXS-Experimenten haben wir KITA unter gleichen Solvensbedingungen (40 mM Phosphatpuffer, 45 % Ethylenglycol in wässrigem Puffer bei pH 5.9) gemessen. Abbildung 5 zeigt KITA-, Fluoreszenz-, CD- und SAXS-Daten für Ub* (Ub*Ile61Ala verhält sich ähnlich, siehe Hintergrundinformationen). Mit KITA wird ausschließlich eine schnelle Phase im ms-Bereich beobachtet, mit Fluoreszenz nur eine langsame Phase. CD und SAXS zeigen beide Phasen. Die bei 0.5 THz detektierten Änderungen in der Dynamik von Hydratwasser und Protein gehen mit einem schnellen Überschwingen des CD-Signals bei 222 nm einher. Das Überschwingen des CD-Signals ist auf die Bildung eines Überschusses an helikaler Struktur relativ zum nativen Zustand von Ubiquitin zurückzuführen. Dies geht mit einer Verringerung der Wasserstoffbrücken zwischen Proteinerückgrat und Hydrathülle einher.^[4,18] SAXS-Messungen belegen, dass Ub* und Ub*I61A innerhalb von Millisekunden kollabieren. SAXS-Daten für Ub* zeigen zusätzlich eine „langsame“ Signatur, deren Zeitkonstante mit der Fluoreszenzmessung übereinstimmt. Demnach treten die mit KITA nachgewiesenen Umoorientierungen des Protein-Wassernetzwerks während des anfänglichen Strukturkollaps und der Bildung früher Sekundärstrukturen auf, wobei die zum Erreichen des nativen Zustands notwendigen weiteren Umoorientierungen nicht mehr mit KITA im Bereich von 0.1–1 THz korreliert sind.

Der Vergleich der KITA-Daten für Ub*, Ub*V26A und Ub*I61A zeigt, dass die Flexibilität des nativen Proteins keine systematischen Auswirkungen auf die schnelle THz-Kinetik hat. Ub*V26A und Ub*I61A entsprechen einzelnen Seitenkettenverkürzungen unpolarer Reste. Valin 26 ist vollkommen unzugänglich, Isoleucin 61 ist weitgehend unzugänglich. Ub*I61A zeigt einen etwas langsameren und Ub*V26A einen etwas schnelleren exponentiellen Abfall als Ub*; alle liegen im Bereich von (18 ± 10) ms. Unter Berücksichtigung der 50-ms-Totzeit der Stopped-Flow-Apparatur sind die Unterschiede nicht signifikant. Mutationen, die den nativen Zustand signifikant destabilisieren, beeinträchtigen die mit KITA nachgewiesenen „frühen“ Kinetiken daher wenig.

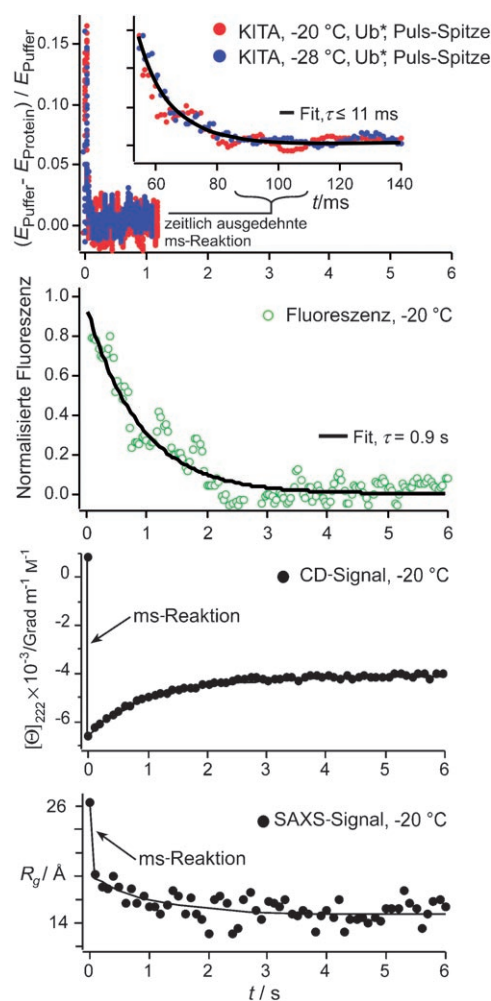


Abbildung 5. Mit KITA, Fluoreszenz, CD und SAXS gemessene Rückfaltungskinetiken von Ub*. Die beiden unteren Diagramme wurden aus Lit. [18] übernommen. Wegen der Totzeit stellt der Angleich an die KITA-Daten eine Obergrenze dar.

Mit KITA nachgewiesene schnelle Ub*-Faltungsdynamiken sind im Wesentlichen temperaturunabhängig. Abbildung 5 (oben) vergleicht die frühe THz-Faltungskinetik des Ub* bei zwei Temperaturen, -20°C und -28°C (zum direkten Vergleich mit vorhandenen SAXS-Daten ausgewählt^[18]). Innerhalb unserer Anpassungsgenauigkeit folgen beide Kurvenverläufe dem gleichen exponentiellen Abfall im ms-Bereich. Das gleiche gilt für die übrigen Mutanten des Ub* (Daten nicht gezeigt). Wir können dies nun nutzen, um Grenzwerte der Aktivierungsenergie für die Umoorientierung des Solvatwassernetzwerks während der frühen Faltungsergebnisse zu bestimmen. Dabei finden wir, dass die mit KITA untersuchten Umoorientierungen des Wassernetzwerks und die Proteinbewegungen hoher Amplitude eine kleine Aktivierungsenergie $< 15 \text{ kJ mol}^{-1}$ haben, während die mit Fluoreszenz beobachtete, spätere Faltung eine Barriere von etwa 27.5 kJ mol^{-1} überwinden muss (Details zu den Berechnungen sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen).

Wir haben folgendes Konzept zur Interpretation der KITA-Experimente entwickelt: Im Bereich von 2–3 THz beobachteten wir einen direkten Einfluss der Proteinflexibi-

lilität auf die gemessene Dynamik der Hydrathülle. Die gemessenen Absorptionen konnten daher durch Seitenkettenverkürzungen im Proteinkern verändert werden.^[12] Dagegen sind KITA-Messungen im Bereich von 0.1–1 THz empfindlich für die Umorientierung während der frühen Faltungsphase. Die Kinetik ändert sich nicht mit Änderungen der Proteinflexibilität infolge von Seitenkettenverkürzungen, weil die Faltung des Proteins gerade erst einsetzt und das Protein daher noch keine wohldefinierte Oberfläche aufweist. Dieser Befund zeigt, dass ein anderer Mechanismus das niederfrequente THz-Spektrum in der frühen Phase der Proteinfaltung beeinflusst.

Ein Vergleich mit CD-Daten erlaubt uns die Angabe eines vorläufigen Mechanismus: Die mit KITA beobachtete Zeitskala ist im Einklang mit der 6-ms-Obergrenze für die schnelle Phase der CD-Spektroskopie, in der ein Überschuss an helikaler Struktur entsteht. Unter der Annahme, dass während dieser Zeitspanne Wasserstoffbrücken zwischen dem Proteintrückgrat und dem Wasser aufgebrochen und zur Ausbildung von Sekundärstrukturen als intramolekulare Wasserstoffbrücken wiederhergestellt werden, ist die Übereinstimmung zwischen CD und KITA vollkommen plausibel. Daher erklären wir die beobachtete KITA-Relaxationskinetik mit der Bildung intermolekularer Wasserstoffbrücken in der frühen Phase der Proteinfaltung.

Wenn diese Interpretation stimmt, wären künftige KITA-Studien in deuteriertem Wasser interessant. Wir vermuten, dass der von uns bei 0.5 THz beobachtete THz-Defekt und der zuvor bei 2.5 THz beobachtete THz-Überschuss rotverschoben und damit sehr empfindlich für deuteriertes Lösungsmittel sein sollte. Ebenso wäre die Beobachtung der Kinetiken in Wasser im höheren Frequenzbereich bei 2–3 THz von Interesse. Weil dieser Wellenlängenbereich empfindlich auf unterschiedliche Proteinflexibilität anspricht, die im nativen Zustand durch Kernmutationen verändert werden kann,^[19] wäre man vielleicht in der Lage, spätere Phasen (zwischen 0.05–2 s) nachzuweisen, in denen sich insbesondere bei hohen Proteinkonzentrationen eine nativ-ähnliche Proteinoberfläche bildet. Zuletzt schlagen wir die Ausführung expliziter Moleküldynamiksimulationen des Solvens vor. Dabei sollte die Solvation denaturierter und gefalteter Zustände des Ubiquitins untersucht werden und die Absorption durch Fourier-Transformation der Dipol-Dipol-Autokorrelationsfunktion bei 0.5 und 2.5 THz berechnet werden.^[1]

Die Übereinstimmung zwischen den Zeitskalen von CD (empfindlich für Sekundärstrukturen) und KITA (empfindlich für Protein-Hydratwasser-Wechselwirkungen) belegt, wie eng die Protein- und die Solvensdynamiken während der Faltung miteinander verknüpft sind. Obwohl unsere Messungen keine direkte Unterscheidung zwischen Protein- und Solvensdynamiken ermöglichen, stimmen unsere Ergebnisse mit der von Frauenfelder et al. formulierten Hypothese überein, dass einige Proteindynamiken direkt an die Lösungsmitteldynamiken gekoppelt sind. Die von uns mit KITA beobachteten Bewegungen entsprächen den von Frauenfelder vorausgesagten Alpha-Fluktuationen.^[20]

Experimentelles

Die Plasmide für die Ubiquitinmutanten wurden wie in Lit. [19] beschrieben aus kommerziell erhältlichem Ub*-Plasmid (Tracy Handel) hergestellt,^[21] das eine Phe45Trp-Mutation aufweist, um eine Fluoreszenzmarkierung einzuführen. Plasmide jeder Mutante wurden in den pET-15b-Vektor eingebracht und in Rosetta-TM(DE3)-pLysS-Zellen (Novagen Inc.) exprimiert. Die Zellen wurden mit einer French Press lysiert. Die vereinigten Überstände wurden an eine CM52-Kationenaustauschersäule gebunden und zur Aufreinigung gegen einen linearen Salzgradienten von 0–1 M NaCl eluiert. Zusätzliche Aufreinigung erfolgte mit Amicon-Membranen (3 kDa und 30 kDa; Fisher Scientific). Die Reinheit der Ubiquitinmutanten wurde mit Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie und SDS-PAGE-Gelelektrophorese überprüft. Proteinkonzentrationen wurden mit UV-Absorptionsspektroskopie (Shimadzu UV-1650 PC) bei 280 nm bestimmt. Die Proteine wurden in Ethylenglycol/Wasser-Puffer (45:55) mit 40 mM Natriumphosphat bei pH 5.9 gelöst. Guanidinium-Denaturierungskurven sind in Lit. [19] dargestellt.

Eingegangen am 15. Mai 2008

Online veröffentlicht am 28. Juli 2008

Stichwörter: Circular dichroismus · Fluoreszenz · Proteinfaltung · Sekundärstrukturen · Terahertz-Spektroskopie

- [1] D. M. Leitner, M. Havenith, M. Gruebele, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2006**, 25, 553.
- [2] M. H. Jacob, C. Saudan, G. Holtermann, A. Martin, D. Perl, A. E. Merbach, F. X. Schmid, *J. Mol. Biol.* **2002**, 318, 837.
- [3] C. Schröder, T. Rudas, S. Boresch, O. Steinhauser, *J. Chem. Phys.* **2006**, 124, 234907.
- [4] B. Born, S. J. Kim, M. Gruebele, M. Havenith, *Faraday Discuss.* **2008**, 141, im Druck.
- [5] J. Knab, J. Y. Chen, A. Markelz, *Biophys. J.* **2006**, 90, 2576.
- [6] J. Xu, K. W. Plaxco, S. J. Allen, *Protein Sci.* **2006**, 15, 1175.
- [7] U. Heugen, G. Schwaab, E. Bründermann, M. Heyden, X. Yu, D. M. Leitner, M. Havenith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 12301.
- [8] S. Dexheimer, *Terahertz Spectroscopy: Principles and Applications*, Taylor & Francis, London, **2007**.
- [9] D. E. Rosenfeld, C. A. Schmittenmaer, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 110, 14304.
- [10] D. F. Plusquellic, K. Siegrist, E. J. Heilweil, O. Esenturk, *ChemPhysChem* **2007**, 8, 2412.
- [11] S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, X. Yu, U. Heugen, M. Gruebele, D. Leitner, M. Havenith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 20749.
- [12] S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, X. Yu, M. Gruebele, D. Leitner, M. Havenith, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2374.
- [13] C. A. Schmittenmaer, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1759.
- [14] G. I. Groma, J. Hebling, I. Z. Kozma, G. Varo, J. Hauer, J. Kuhl, E. Riedle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 6888.
- [15] H.-B. Liu, X.-C. Zhang, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, 429, 229.
- [16] S. Khorasanizadeh, I. Peters, T. Butt, H. Roder, *Biochemistry* **1993**, 32, 7054.
- [17] E. Larios, J. S. Li, K. Schulten, H. Kihara, M. Gruebele, *J. Mol. Biol.* **2004**, 340, 115.
- [18] Z. Qin, J. Ervin, E. Larios, M. Gruebele, H. Kihara, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 13040.
- [19] J. Ervin, E. Larios, S. Osvath, K. Schulten, M. Gruebele, *Biophys. J.* **2002**, 83, 473.
- [20] P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, B. H. McMahon, F. G. Parak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 16047.
- [21] G. A. Lazar, J. R. Desjarlais, T. M. Handel, *Protein Sci.* **1997**, 6, 1167.