

„Zeitaufgelöste Infrarot-Messungen zur Untersuchung  
der Konformationsdynamik von Peptiden mit Laser-  
induziertem Temperatursprung“

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Physik

der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

von

Carsten Krejtschi

aus Dresden

Frankfurt am Main 2007

(D 30)



vom Fachbereich der Physik der  
Johann Wolfgang Goethe–Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. Aßmus

Gutachter: JProf. Dr. K. Hauser

Prof. Dr. W. Mäntele

Datum der Disputation: 17.12. 2007



## PUBLIKATIONEN

### VERÖFFENTLICHUNGEN IN FACHZEITSCHRIFTEN

**Krejttschi, C.**, Huang, R., Keiderling, T.A., Hauser, K.: „Time-resolved temperature-jump infrared spectroscopy of peptides with well-defined secondary structure: a Trpzip beta-hairpin variant as an example”, *unter Revision bei Vibrational Spectroscopy*

Hauser, K., **Krejttschi, C.**, Huang, R., Keiderling, T.A.: „Unfolding dynamics of a tryptophan zipper hairpin peptide variant. Site-specific relaxation kinetics using temperature-jump IR-spectroscopy and isotopic labeling”, *unter Revision bei Journal of the American Chemical Society*

Kopitz, A., Soppa, J., **Krejttschi, C.**, Hauser, K.: „Differential stability of two TBP proteins from archaea with different optimal growth temperatures”, *zur Veröffentlichung eingereicht*

Huang, R., **Krejttschi, C.**, Hauser, K., Kim, J., Keiderling, T.A. (2007): „Thermal unfolding of a beta-hairpin studied with IR spectra enhanced by site-specific isotope labeling”, *Biophys. J.*, 92, 208 A

**Krejttschi, C.**, Hauser, K.: „Subtraction of Temperature-Dependent Water Absorption Changes from Protein Infrared Spectra”, *Manuskript in Vorbereitung*

### KONFERENZBEITRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN

**Krejttschi, C.**, Hauser, K. (2007): „Folding stability of Polyglutamic Acid Studied by IR-Spectroscopy in Thermal Equilibrium and with Temperature-Jumps”; 12<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Bobigny, France

Kopitz, A., **Krejttschi, C.**, Soppa, J., Hauser, K. (2007): „Thermoadaptation of archaeal TATA-box-binding proteins studied by FTIR-spectroscopy”; 12<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Bobigny, France

Hauser, K., **Krejttschi, C.**, Huang, R., Keiderling, T.A. (2007): „Site-Specific Unfolding Dynamics of Beta-Hairpin Peptids Using Temperature-Jump IR-Spectroscopy and Isotopic Labeling”; 12<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Bobigny, France

Hauser, K., **Krejttschi, C.**, Huang, R., Keiderling, T.A. (2007): „Folding dynamics of isotopically labeled beta-hairpin peptids studied with T-jump IR-Spectroscopy”; 233<sup>rd</sup> National Meeting of the American Chemical Society, Division of Physical Chemistry, Symposium “Vibrational spectroscopy as a probe of biomolecular structure and dynamics: theory and experiment” Chicago, USA

Huang, R., Wu, L., Kim, J., Hauser, K., **Krejttschi, C.**, Keiderling, T.A. (2007): „Role of hydrophobic interactions and turn stability in beta-hairpin conformation studied by equilibrium and dynamic (T-jump) IR-spectroscopy of isotopically labeled beta-hairpin peptids“; 4<sup>th</sup> International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Corfu, Greece

**Krejttschi, C.**, Rong, H., Keiderling, T.A., Hauser, K. (2006): „Folding hairpin peptids studied by laser-induced T-jump–dynamics of beta- IR-spectroscopy”; Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Mainz, Germany

Rauscher, A., **Krejttschi, C.**, Soppa, J., Hauser, K. (2006): „Thermal stability of archaeal TATA-binding proteins studied by FTIR-spectroscopy”; Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Mainz, Germany

**Krejttschi, C.**, Keiderling, T.A., Hauser, K. (2006): „Peptide folding dynamics studied by laser-induced T-jump IR-spectroscopy”; Gordon Research Conference on “Vibrational Spectroscopy“; Biddeford, Maine, USA

**Krejttschi, C.**, Mäntele, W., Hauser, K. (2005): „Subtraction of water absorption from protein infrared spectra considering thermally induced changes“; 11<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Aschaffenburg, Germany

Khani, V., **Krejschi, C.**, Mäntele, W., Hauser, K. (2005): „Development of a microcell for rapid heating and IR studies of unfolding collagen peptides“; 11<sup>th</sup> European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Aschaffenburg, Germany

**Krejschi, C.**, Mäntele, W., Hauser, K. (2004): „IR-absorption bands of water as an internal thermometer of proteins“; Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Freiburg, Germany





---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	1
1.1	Überblick.....	1
1.2	Aufgabenstellung der Arbeit.....	9
<b>2</b>	<b>PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN</b> .....	11
2.1	Infrarotspektroskopie .....	11
2.2	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie.....	16
2.3	Laser-induzierter Temperatursprung und IR-Einzelwellendetektion.....	23
2.4	Circular-Dichroismus-Spektroskopie.....	38
<b>3</b>	<b>BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN</b> .....	41
3.1	Proteine .....	41
3.1.1	Hierarchie des Strukturaufbaus .....	41
3.1.2	Infrarot-Absorptionsspektren von Proteinen.....	42
3.1.3	Energierterme zur Stabilisierung der gefalteten Polypeptidstruktur.....	43
3.1.4	Faltungsmodelle .....	44
3.1.5	Zwei-Zustandsmodell der Faltung.....	45
3.2	Experimentell analysierte Polypeptide.....	48
3.2.1	Ribonuklease A .....	49
3.2.2	Polyglutaminsäure .....	50
3.2.3	Tryptophan-Zipper-Peptide .....	52
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	55
4.1	Entwickelte Anpassungsprozeduren .....	55
4.1.1	Algorithmus zur Temperatur-Anpassung unterschiedlicher Proben.....	55
4.1.2	Prozedur zum spektralen Abzug von Lösungsmittelabsorptionen .....	57

---

4.2	Analyse der statischen FTIR- und CD-Spektren.....	60
4.3	Probenpräparation .....	65
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>55</b>
5.1	Statische und zeitaufgelöste Studien der verwendeten Lösungsmittel .....	67
5.1.1	Vergleich der Lösungsmittelspektren bei konstanter Temperatur.....	67
5.1.2	Temperaturabhängigkeit der Absorptionseigenschaften von H <sub>2</sub> O, D <sub>2</sub> O und HDO .....	70
5.1.3	Analyse der temperaturabhängigen Absorptionsänderungen von H <sub>2</sub> O und D <sub>2</sub> O.....	72
5.1.4	Zeitaufgelöste Untersuchungen des D <sub>2</sub> O-Lösungsmittels mit der Temperatursprung-Apparatur.....	74
5.1.5	Zusammenfassung der Untersuchung der Lösungsmittel.....	84
5.2	Thermischer Denaturierungsprozess von Ribonuklease A in D <sub>2</sub> O Lösung .....	86
5.2.1	Zusammenfassung der Untersuchungen an Ribonuklease A .....	92
5.3	Untersuchungen des Homopolymers Polyglutaminsäure (PGS) mittels statischer und zeitaufgelöster Spektroskopie .....	93
5.3.1	pH-Abhängigkeit der Struktur von Polyglutaminsäure.....	93
5.3.2	CD- und FTIR-spektroskopische Untersuchungen von Polyglutaminsäure im thermischen Gleichgewicht und in Abhängigkeit des pD-Wertes .....	99
5.3.3	Zeitaufgelöste Relaxationsdynamiken von Polyglutaminsäure nach Laser-induziertem Temperatursprung .....	115
5.3.4	Zusammenfassung der Untersuchungen an Polyglutaminsäure.....	132
5.4	Untersuchungen eines isotoopenmarkierten eines $\beta$ -Hairpin-Peptids mittels statischer und zeitaufgelöster Spektroskopie .....	134
5.4.1	CD-spektroskopische Untersuchung der Trpzip2C-Peptidvarianten im thermischen Gleichgewicht .....	135
5.4.2	FTIR-Absorptionsspektren der Trpzip2C-Peptidvarianten im thermischen Gleichgewicht .....	141

---

5.4.3	Zeitaufgelöste Temperatursprung-Untersuchungen zur Konformations-dynamik der Trpzip2C-Peptid-Varianten .....	149
5.4.4	Zusammenfassung der Untersuchungen des isotopenmarkierten $\beta$ -Hairpin-Peptids .....	159
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>134</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>163</b>
7.1	Makros .....	163
7.1.1	Makro zur Automatisierung der FTIR-Messungen durch Ansteuerung des Wasserbades und Bewegung des Probenschlittens .....	163
7.1.2	Algorithmus zur Berechnung der zeitaufgelösten Absorptionstransienten .....	165
7.1.3	Entwickelter Algorithmus zur Temperatur- und spektralen Anpassung unterschiedlicher Proben .....	170
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>177</b>

---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Überblick

In der Biophysik sind Untersuchungen zur Struktur und Stabilität von Proteinen von grundlegendem Interesse. Proteine, die aus einer Aneinanderreihung von Aminosäuren bestehen, die kovalent durch Peptidbindungen verknüpft sind, falten sich spontan zu einer genau definierten, durch die Sequenz der Aminosäuren vorgegebenen Raumstruktur. Durch die Ausbildung dieser hochorganisierten Strukturen verfügen die Polypeptide über das Potenzial, ganz spezifische Wechselwirkungen mit anderen Molekülen auszubilden. Die Stabilität der Proteinstruktur muss einerseits energetisch so günstig sein, dass das Protein seine native Konformation finden und diese dauerhaft einnehmen kann. Andererseits muss das Protein die Möglichkeit zu konformellen Änderungen oder Umordnung haben, da diese Strukturänderungen Bestandteil von Proteinaktivität und -reaktionen sind.

Fehlgefaltete Proteine können ihre ursprünglichen Funktionen oft nicht mehr erfüllen. Durch die Fehlfaltung von körpereigenen Proteinen werden Krankheiten wie die Alzheimer'sche Krankheit, Creutzfeldt-Jakob, BSE oder die Traberkrankheit (Scrapie) verursacht. Die Untersuchung der molekularen Ursachen der Fehlfaltung, sowie das Verständnis der Proteinstabilität und des Faltungsprozesses sind deshalb von allgemeinem Interesse.

Zur Beschreibung des Faltungsmechanismus und der Suche nach der nativen, funktionsfähigen Konformation wurden zahlreiche Hypothesen und Modelle entwickelt, auf die in Kapitel 3.1.4 näher eingegangen wird. In Abbildung 1 sind für einen einleitenden Überblick drei mögliche Faltungsmodelle dargestellt, die aktuell diskutiert werden. Prinzipiell wird in den abgebildeten Modellen versucht, die Faltung von Proteinen aus einer komplett entfalteten Struktur bis hin zur nativen Konformation zu beschreiben.

Die Ausbildung einer nativ gefalteten Konformation wird durch die Formierung von Elementen der Sekundärstruktur, in charakteristischer Weise angeordneten lokalen Strukturen, initiiert und bildet einen geschwindigkeitslimitierenden Schritt bei der Faltung des Proteins. Die Erforschung und Analyse dieser ersten Faltungsprozesse ist deshalb von grundlegender Relevanz. Bei der Untersuchung des Faltungsmechanismus kommen vor allem kleine Peptide mit eindeutig ausgebildeten Sekundärstrukturmotiven zum Einsatz. Ihre geringe Größe und strukturelle Eindeutigkeit machen diese kleinen Peptide zu idealen

Modellsystemen, um diejenigen Faktoren zu untersuchen, die die Proteinfaltung steuern und beeinflussen. Viele grundlegende Prozesse der Proteinfaltung, wie bspw. die Ausbildung von Sekundärstrukturen, der hydrophobe Kollaps oder die Wasserstoffbrückenbildung<sup>1</sup>, wurden durch Untersuchungen an Modellpeptiden beobachtet.

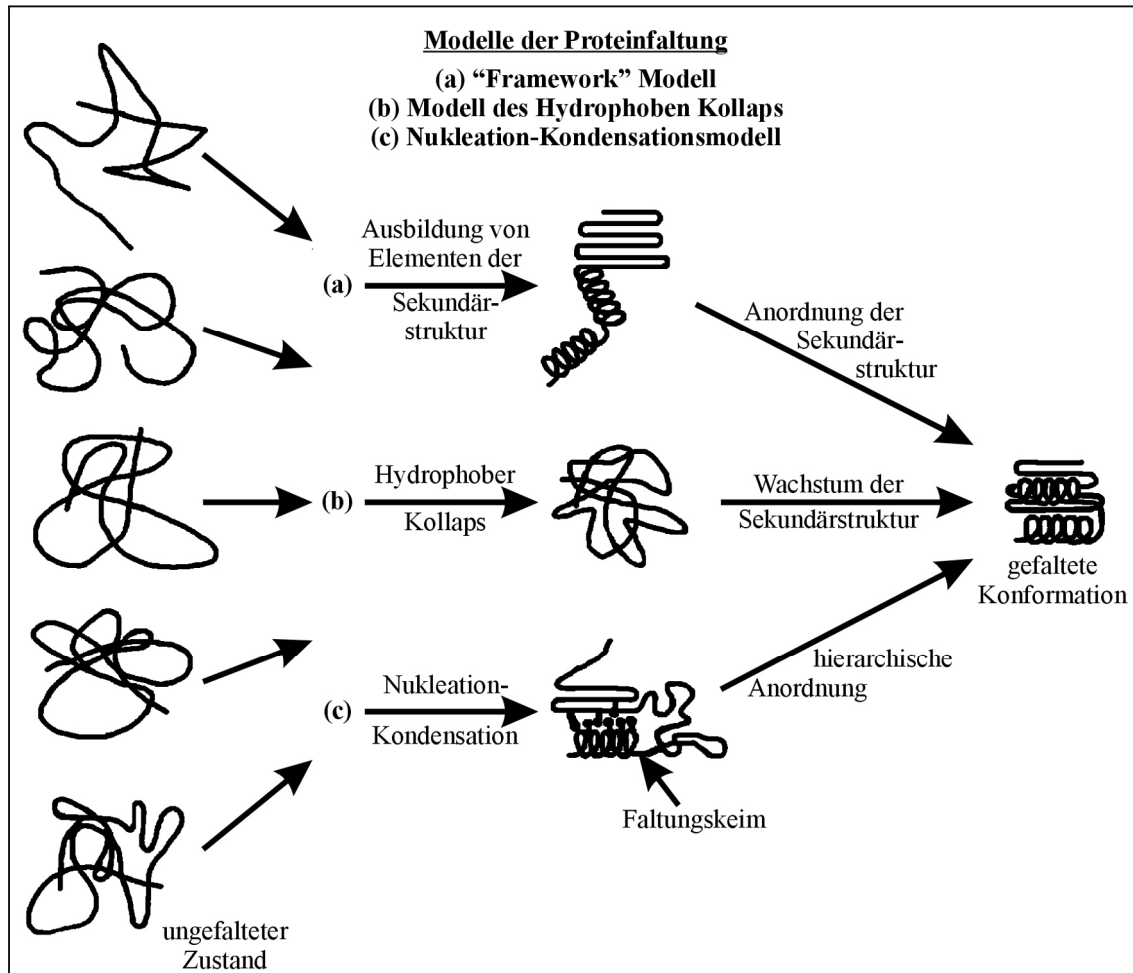


Abbildung 1: Modelle zur Proteinfaltung (nach Nölting und Ander<sup>2</sup>).

Die Möglichkeit eines schnellen Initiierens und Detektierens von Protein-Dynamiken ist von wesentlicher Bedeutung, um die Mechanismen der Proteinfaltung und die Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Proteinen zu verstehen. Experimentelle Untersuchungen wurden für zahlreiche Proteine mit verschiedenen spektroskopischen Techniken durchgeführt. Die beobachtbaren Faltungsgeschwindigkeiten sind dabei überraschend heterogen<sup>3</sup>. Einige Proteine erreichen ihre native Struktur innerhalb von Millisekunden, wohingegen andere für den Faltungsprozess mehrere Stunden benötigen. Eine Veranschaulichung der unterschied-

lichen Zeitbereiche zur Ausbildung von Strukturelementen und zur Faltung in die native Proteinkonformation zeigt Abbildung 2.

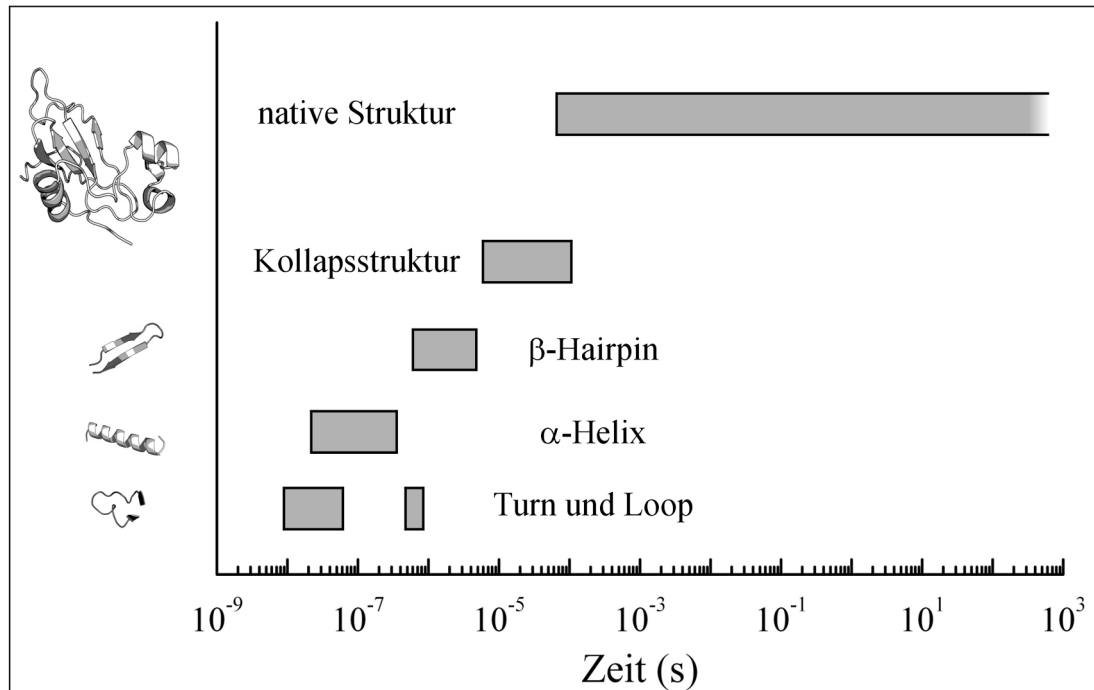


Abbildung 2: Zeitskalen der Ausbildungen von Strukturelementen der Proteinfaltung (nach Bieri und Kiefhaber<sup>3</sup>)

Zur Bestimmung von Enzym- und Proteinfaltungsdynamiken wird häufig die „stopped-flow“ Technik eingesetzt, die auf dem sehr schnellen Vermischen von Reaktanten basiert. Dadurch kann ein Protein in Lösung schnell mit Reagenzien vermengt werden, die chemisch die Denaturierung des Proteins induzieren. Hohe Harnstoffkonzentrationen oder extreme pH-Werte können bspw. erzeugt und die Auswirkungen auf die Struktur oder Funktionalität des Polypeptids untersucht werden. Die beste Zeitauflösung bei „stopped-flow“-Messungen liegt im Bereich von 1-10 ms, der „Totzeit“ einer solchen Anlage. Somit können mit dieser Technik schnellere Prozesse nicht untersucht werden.

Die Faltungsreaktion kann im einfachsten Fall durch ein Zwei-Zustandsmodell beschrieben werden. Dabei geht man davon aus, dass die Proteinstrukturen des nativen und des denaturierten Zustandes eine reversible Gleichgewichtsreaktion eingehen. Durch die Untersuchung der Dynamik dieser Reaktion können thermodynamische Parameter zur Beschreibung der Stabilität eines Proteins ermittelt werden. Eine genauere Beschreibung des

Modelles und seiner Anwendung wird in Kapitel 3.1.5 gegeben. Für die meisten Proteine ist die Faltungsreaktion jedoch sehr komplex und beinhaltet verschiedene kinetische Zwischenschritte. Zusätzlich ereignet sich der Hauptteil der Konformationsänderungen im Submillisekunden-Zeitbereich. Die Untersuchung von Reaktionen in diesem Zeitbereich ist mit der „stopped-flow“-Technik jedoch nicht möglich. Es werden demnach andere Methoden benötigt, die die Denaturierungsbedingungen schneller verändern.

Prinzipiell können Laser-induzierte Veränderungen makroskopische Störungen mit ausreichender Geschwindigkeit und Anholdauer verursachen. Ebenso wie bei den „stopped-flow“-Experimenten können mit dieser Methode bspw. chemische Reagenzien Laser-induziert freigesetzt (Photodissoziation)<sup>4,5</sup> oder auch der pH-Wert der Lösung verändert werden<sup>6</sup>. Für diese Arbeit von besonderem Interesse sind die Laser-induzierten Temperaturänderungen. Dabei wird die Temperatur einer Probe durch Absorption einer intensiven Laserstrahlung sprungartig erhöht. Dadurch können Temperaturerhöhungen in wässriger Lösung von bis zu 30 °C innerhalb der Pulsbreite des Lasers von 50 ps bis ~ 10 ns realisiert werden<sup>7</sup>.

Bei der Untersuchung der Faltungsmechanismen mit der Temperatursprung-Technik erweisen sich kleine Modellpeptide als besonders vorteilhaft, da durch sie der Zusammenhang der Aminosäuresequenz und der gefalteten Struktur analysiert werden kann. Die anfänglichen Studien fokussierten sich auf Peptide, die aus den Strukturen eines nativen Proteins abstammten und deren Aminosäuresequenz aus der gesamten Proteinsequenz herausgeschnitten wurde. Peptide aus Sequenzen von Tendamistat, der B1 Domäne des Proteins G, Ubiquitin und Ferredoxin zeigten, dass sie in monomerer Form existieren konnten, ohne zu aggregieren. Jedoch zeigten sie in den meisten Fällen keine Tendenz, einen gefalteten Zustand ohne tertiäre Kontakte auszubilden. Durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln wurde jedoch eine der nativen Struktur ähnliche Konformation gebildet<sup>8</sup>.

Neben diesen Peptiden, die aus einem Protein isoliert wurden, wurde eine Reihe von *de novo* entworfenen Peptiden untersucht. Durch die *de novo* entwickelten Peptide kann der Einfluss einzelner Aminosäuren innerhalb der Sequenzen auf die Peptidfaltung im Detail betrachtet und die Sekundärstruktur des Peptids systematisch verändert werden. In Abbildung 3 sind typische Peptidstrukturen veranschaulicht



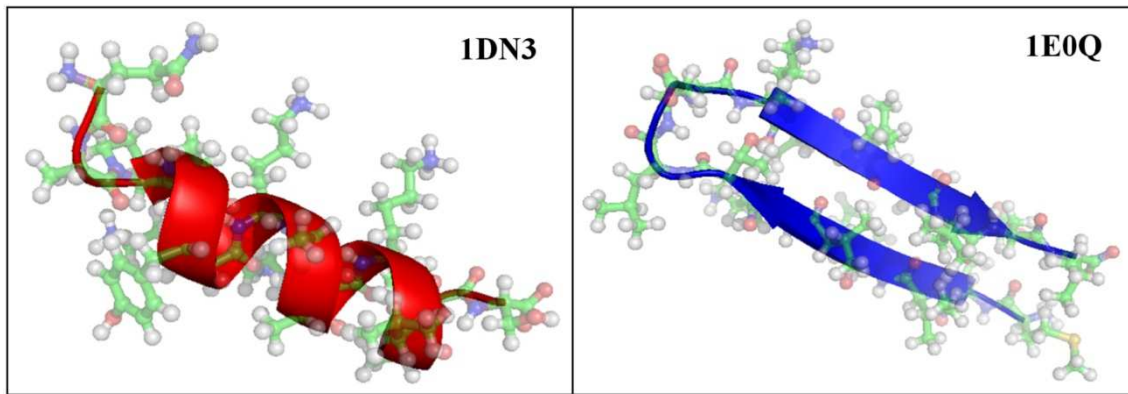


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Strukturen kleiner Peptide mit unterschiedlichen charakteristischen Sekundärstrukturmotiven. Links:  $\alpha$ -helikales Peptid (Quelle: PDB-Datenbank<sup>1</sup> 1DN3); Rechts:  $\beta$ -Hairpin-Peptid (Quelle: PDB-Datenbank 1E0Q).

Generell werden verschiedene Sekundärstrukturelemente auf unterschiedlichen, teilweise überlappenden Zeitskalen ausgebildet (siehe Übersicht in Abbildung 2). Dennoch ist die Faltungsdynamik von Peptiden, die das gleiche Sekundärstrukturmotiv ausbilden, nicht einheitlich, sondern spezifisch für das jeweils untersuchte molekulare System, das durch unterschiedliche Wechselwirkungen stabilisiert wird.

Der Einfluss unterschiedlicher Aminosäuresequenzen auf die Stabilität und Dynamik der Sekundärstrukturausbildung wurde mit der Temperatursprung-Technik zunächst an  $\alpha$ -helikalen Peptiden untersucht. Studien von Williams et al.<sup>9</sup> zur Helix-Knäuel-Faltung wurden an Alanin-reichen Peptiden, mit der Sequenz Suc-(A)<sub>5</sub>-(AAARA)<sub>3</sub>-A-NH<sub>2</sub> (Suc=Succinyl, A=Alanin, R=Arginin) durchgeführt. Dabei wurde die Abnahme des  $\alpha$ -Helix-Anteiles im infraroten Spektralbereich verfolgt und eine bi-phasische Relaxation mit einer schnellen Zeitkonstante von < 10 ns und einer langsameren Zeitkonstante von 160 ns bestimmt. Fluoreszenzuntersuchungen dieser Probe mit einer entsprechenden Fluoreszenzmarkierung am N Terminus MABA-(A)<sub>5</sub>-(AAARA)<sub>3</sub>-A-NH<sub>2</sub> zeigten, dass nur eine einzige schnelle Relaxationszeit von ~ 20 ns gefunden wurde<sup>10</sup>. Weitere Untersuchungen zu  $\alpha$ -helikalen Peptiden wurden an *D*-Arg-Peptiden, Ac-YGG(KAAAA)<sub>3</sub>-CO-*D*-Arg-CONH<sub>2</sub> von Huang et al.<sup>11</sup> durchgeführt. Auch dabei konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Faltungsprozess in zwei Phasen stattfindet, einer schnellen (< 20 ns) und einer langsameren (~ 140 ns). Die Eigenschaften  $\alpha$ -helikaler Peptide bei Änderung einer einzigen Aminosäure

<sup>1</sup> Alle dargestellten Peptidstrukturen sind auf der Protein Daten Bank mit den angegebenen Identifizierungszeichen verfügbar. (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

und deren Auswirkungen auf die Relaxationsdynamik wurde mit einem Peptid mit der Sequenz Ac-(AAXAA)<sub>4</sub>GY-NH<sub>2</sub> von Gooding et al.<sup>12</sup> untersucht, wobei X jeweils durch positiv geladene Arginin (R) und Lysin (K), negativ geladene Glutaminsäure (E) oder neutrale Seitenketten Glutamin (Q) ersetzt wurden. Die Relaxationszeiten lagen im Bereich von 117 ns bis 194 ns<sup>12</sup>. Die schnellste Reaktionszeit wurde für die neutralen Seitenketten bestimmt und die langsameren Relaxationszeiten, die mit der Größe der Gegenionen korrelieren, waren Glutaminsäure, Arginin und Lysin. Damit konnte gezeigt werden, dass durch die Substitution einer einzigen Aminosäure nicht nur die Helix-Stabilität sondern auch die Helix-Knäuel-Relaxation beeinflusst wurde. Die Auswirkungen von unterschiedlichen pH-Werten und Ionenkonzentrationen auf  $\alpha$ -helikale Peptide Ac-(A)<sub>5</sub>-(AAARA)<sub>4</sub>A-NH<sub>2</sub> wurden von Ramajo et al.<sup>13</sup> untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass auch die Relaxationszeiten dieser  $\alpha$ -helikalen Peptide im Bereich von 120 ns bis 180 ns liegen. Jedoch wird in dieser Arbeit<sup>13</sup> explizit hervorgehoben, wie sensitiv diese Relaxationszeiten auf unterschiedliche pH-Werte oder Salzkonzentrationen sind und beim Vergleich von unterschiedlichen Peptiden, aber auch bei der Gegenüberstellung von deren Relaxationsraten berücksichtigt werden müssen. Alle untersuchten  $\alpha$ -helikalen, Alanin-reichen Peptide haben gemein, dass sie Relaxationszeiten im ns-Zeitbereich besitzen. Eine Übersicht der erwähnten unterschiedlichen  $\alpha$ -helikalen Peptide und ihrer Temperatursprung-induzierten Faltungszeiten zeigt Tabelle 1.

Faltungszeiten von $\alpha$ -helikalen Peptiden					
Name	Sequenz	Faltungszeit (ns)	T (K)	Referenz	
Suc-Fs 21-Peptid	Suc-(A) <sub>5</sub> -(AAARA) <sub>3</sub> -A-NH <sub>2</sub>	160	300	<sup>9</sup>	
MABA Fs Peptid	MABA-(A) <sub>5</sub> -(AAARA) <sub>3</sub> -A-NH <sub>2</sub>	~ 20 ‡	303	<sup>10</sup>	
D-Arg Peptid	Ac-YGG(KAAA) <sub>3</sub> -CO-D-Arg-CONH <sub>2</sub>	140	300	<sup>11</sup>	
AR	Ac-(AARAA) <sub>4</sub> GY-NH <sub>2</sub>	184	301	<sup>12</sup>	
AK	Ac-(AAKAA) <sub>4</sub> GY-NH <sub>2</sub>	194	301	<sup>12</sup>	
AE	Ac-(AAEAA) <sub>4</sub> GY-NH <sub>2</sub>	147	301	<sup>12</sup>	
AQ	Ac-(AAQAA) <sub>4</sub> GY-NH <sub>2</sub>	117	301	<sup>12</sup>	
AR4	Ac-(A) <sub>5</sub> -(AAARA) <sub>4</sub> A-NH <sub>2</sub>	128 – 150	297	<sup>13</sup>	

Tabelle 1: Übersicht der Faltungszeiten aus Temperatursprung-Experimenten verschiedener  $\alpha$ -helikaler Peptide, bestimmt durch Infrarot- oder ‡Fluoreszenzmessungen.

Neben den  $\alpha$ -helikalen Peptiden wurde auch eine Reihe von Faltungsstudien an Peptiden mit  $\beta$ -Faltblattmotiv durchgeführt. Dabei ist die kleinstmögliche Einheit einer selbständigen Faltblatt-Sekundärstruktur ein  $\beta$ -Hairpin Peptid, bestehend aus einem Strang-Schleife-Strang-

Motiv<sup>2</sup> (siehe Abbildung 3, rechts). Bei der Ausbildung einer solchen Struktur ist dabei von grundlegendem Interesse, welche Rolle die einzelnen Komponenten, wie bspw. der Turn, die Wechselwirkungen zwischen den Strängen, aber auch die Aminosäuresequenzen des Hairpin-Peptids besitzen. Dass die Stabilität und Faltung eines Hairpin-Peptids von seiner  $\beta$ -Turn-Sequenz abhängt wurde durch zahlreiche Studien von Gellman et al.<sup>14-18</sup> mit NMR-Spektroskopie, aber auch Chen et al.<sup>19</sup> durch photoakustischer Kalorimetrie nachgewiesen. Gai et al.<sup>20,21</sup> zeigten anhand von Temperatursprung-Experimenten an sogenannten Tryptophan-Zipper-Peptiden (siehe Kapitel 0 und 5.3), dass die Turn-Sequenz die endgültige Konformation des Peptids stark beeinflusst. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass ein flexibler Loop aus einer NG-Sequenz (Asparagin-Glycin-Sequenz) besser die optimalen Seitenkettenkontakte ausbilden lässt, als ein Loop, der eine D-Pro-Sequenz (Asparaginsäure-Prolin-Sequenz) enthält<sup>14</sup>. Die Stabilitätseigenschaften eines  $\beta$ -Hairpin-Peptids werden jedoch auch durch die unterschiedlichen Wechselwirkungen der Seitenketten der beiden gegenüberliegenden Aminosäure-Stränge beeinflusst. So wirken sich bspw. Threonin-Threonin oder Tyrosin-Threonin Paare auf gegenüberliegenden Strängen stabilisierend auf die  $\beta$ -Hairpin-Struktur aus<sup>8</sup>. Die Untersuchung von  $\beta$ -Hairpin-Peptiden unterschiedlicher Längen und Sequenzen deutet diejenigen Faktoren an, die die Stabilitäts- und Faltungseigenschaften am stärksten beeinflussen. Durch Peptide gleicher Länge jedoch unterschiedlicher Sequenz können deren Veränderungen an den unterschiedlichen Faltungszeiten<sup>3</sup> und thermodynamischen Parametern beobachtet werden<sup>22</sup>.

Anhand dieser Resultate stellte sich heraus, dass der Turn von entscheidender Bedeutung für die Faltungsrate ist. Eine stabile Turn-Sequenz bewirkt eine Zunahme der Stabilität des  $\beta$ -Hairpin-Peptids, indem die Faltungsrate zunimmt. Eine starke hydrophobe Wechselwirkung zwischen den auf unterschiedlichen Strängen liegenden Aminosäuren verursacht ebenfalls eine Zunahme an Stabilität, jedoch nimmt die Entfaltungsrate ab<sup>21</sup>.

Die Untersuchungen der  $\beta$ -Hairpin-Peptide sollen Faltungseigenschaften zeigen, um hypothetische Modelle zum Faltungsmechanismus entwickeln zu können. Der Vergleich unterschiedlicher  $\beta$ -Hairpin-Peptide zeigte, dass zwei mögliche Modelle für den Faltungs-

---

<sup>2</sup> Im Vokabular zur Beschreibung von Sekundärstrukturen werden einige englische Fachausdrücke benutzt, an dieser Stelle kurz erläutert und im Folgenden verwendet. Als „Loop“ bezeichnet man eine schleifenartige Struktur, wohingegen ein „Turn“ eine kurze Kehre der Polypeptidkette beschreibt.

<sup>3</sup> Prinzipiell können bei Temperatursprung-Experimenten nur Relaxationsraten bestimmt werden, die durch eine reversible Faltungsreaktion eines Faltungs- und Entfaltungsprozesses entstehen. Die einzelnen Reaktionsraten können jedoch durch eine thermodynamische Analyse separiert und entkoppelt werden (siehe Kapitel 3.1.5).

prozess (siehe Kapitel 3.1.4) gegeben werden können<sup>23</sup>. Des Weiteren wurde festgestellt, dass der beobachtete Verlauf der Faltung nicht immer durch zwei Konformationen beschrieben werden kann sondern durch die Anwesenheit mehrerer Zustände erklärt werden muss. Beispiele von Faltungseigenschaften von  $\beta$ -Hairpin-Peptiden, die nicht durch ein Zwei-Zustandsmodell charakterisiert werden können, wurden bspw. bei der Kälte-denaturierung beobachtet<sup>1,24</sup>. Eine Zusammenstellung der erwähnten  $\beta$ -Hairpin-Peptide, ihrer jeweiligen Sequenzen und Faltungszeiten zeigt Tabelle 2.

Faltungszeiten von $\beta$ -Hairpin-Peptiden				
Name	Sequenz	Faltungszeit ( $\mu$ s)	T (K)	Referenz
GB1	GEWTYDDATKTFTVTE	6,0 ‡	297	25
Trpzip1	SWTWEGNKWTWK	6,3 ‡	296	20
Trpzip2	SWTWENGKWTWK	2,5	296	20
		1,8 ‡	296	20
Trpzip3	SWTWE <sup>p</sup> PNKWTWK	1,7	296	21
		0,8 ‡	296	20
Trpzip3-I	SWTWDATKWTWK	52,2	296	21
Trpzip4	GWEWTWDDATKTWTWTE	14,9	297	21
		5,4	318	22
Trpzip4-m1	GWEWTWADATKTWTWTE	46,9	318	22
Trpzip4-m2	GWEWTYDDATKTWTWTE	5,4	318	22
Trpzip4-m5	GWEWTWDAATKTWTWTE	5,6	318	22
Peptide I	SESYINPDGTWTVTE	0,8	303	26
	Ac-KKYTVSINGKKITVSI	$k_{\text{obs}} \sim 5$	< 35°C	24
		$k_{\text{obs}} \sim 2$	> 35°C	24
MrH1	KKYTVS-INGK-KITVSI			1
MrH3a	KKYTVS-INGK-KITVSA			1
MrH4a	KKLTVS-INGK-KITVSA			1
MrH3b	KKYTVS-IpGK-KITVSA			1
MrH4b	KKLTVS-IpGK-KITVSA			1

Tabelle 2: Übersicht der Faltungszeiten verschiedener  $\beta$ -Hairpin-Peptide untersucht mittels Temperatursprung-Experimente durch IR- und Fluoreszenzdetektion.‡.

Ein Vergleich von Tabelle 1 mit Tabelle 2 bestätigt die in Abbildung 2 dargestellten unterschiedlichen Zeitbereiche der Faltungsprozesse von  $\beta$ -Hairpin und  $\alpha$ -helikalen Peptiden. Mit der gegebenen Übersicht wurde quantitativ gezeigt, dass die Ausbildung von  $\alpha$ -Helices in einem Zeitbereich von  $\sim 10^{-7}$  s erfolgt, während die Faltung kleiner Hairpins innerhalb von  $\sim 10^{-6}$  s abläuft<sup>27</sup>.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Untersuchung des Faltungsmechanismus von  $\beta$ -Hairpin-Peptiden und der Eigenschaften, die die Peptidstruktur stabilisieren, ein aktuelles Feld der Forschung ist. Gerade der Austausch von einzelnen Aminosäuren an  $\beta$ -Hairpin-

Peptiden gleicher Länge zeigt die unterschiedlichen Auswirkungen auf die Faltungsdynamiken. Um die Struktur­dynamik innerhalb eines  $\beta$ -Hairpin-Peptids jedoch lokal auflösen zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit Peptide mit  $^{13}\text{C}$ -isotopenmarkierten Aminosäuren, die in der Peptidsequenz an spezifischen Stellen positioniert sind, untersucht werden.

## 1.2 Aufgabenstellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Faltungsdynamiken von Peptiden und Proteinen anhand von Laser-induziertem Temperatursprung und IR-Einzelwellenlängendetektion untersucht werden. Dazu sollte ein bereits bestehender Grundaufbau eines Spektrometers modifiziert, erweitert und optimiert werden, so dass die Detektion von Kinetiken im ns- $\mu\text{s}$  Zeitbereich möglich ist. Des Weiteren sollte die Auswertung der zeitaufgelösten spektralen Daten konzipiert und realisiert werden.

Die Grundlage zum Verständnis von temperaturinduzierten Relaxationsdynamiken soll die Auswertung und Quantifizierung von statischen und zeitaufgelösten temperaturabhängigen IR-Absorptionsmessungen des Lösungsmittels, speziell von  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  und deren Vermischungen, schaffen. Statische Absorptionsmessungen an Peptiden sollten zur Analyse der Strukturveränderungen, der thermodynamische Parameter und der Identifizierung von geeigneten Wellenlängen zur Bestimmung von Faltungsdynamiken verwendet werden. Ein geeignetes Modellpeptid, dessen Faltungszeit im Mikrosekundenbereich liegt, ist Polyglutaminsäure und eignet sich im Rahmen dieser Arbeit zur Evaluierung der entwickelten statischen und zeitaufgelösten Experimente und Analyseverfahren.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand der erarbeiteten Grundlagen die Faltungsdynamik und Stabilität von kleinen  $\beta$ -Hairpin-Modellpeptiden zu untersuchen. Die vorhandenen zu untersuchenden  $\beta$ -Hairpin-Peptidvarianten bestehen aus der gleichen Aminosäuresequenz, die an verschiedenen Positionen im Peptidrückgrat  $^{13}\text{C}$  isotopenmarkiert sind. Durch diese Isotopenmarkierung sollten im Infraroten lokal aufgelöst Konformationsänderungen detektiert werden. Da die Kombination von  $^{13}\text{C}$ -isotopenmarkierten Peptiden und zeitaufgelöster Temperatursprung-IR-Spektroskopie bisher lediglich für Peptide mit  $\alpha$ -helikaler Struktur<sup>28,29</sup> realisiert wurde, stellen die im Rahmen dieser Arbeit durchzuführenden Messungen die erste Anwendung dieser Methode an isotopenmarkierten  $\beta$ -Hairpin-Peptiden dar.

Die vorliegende Arbeit ist folgendermaßen strukturiert: Im Anschluss an die vorangegangene Einleitung werden die Grundlagen der verwendeten spektroskopischen Methoden sowie die benutzten und selbst entwickelten Messapparaturen beschrieben. Des Weiteren wird die thermodynamische Analyse der zeitaufgelösten und statischen Absorptionssignale dargestellt. Die Beschreibungen der verwendeten Polypeptide schließt den Grundlagenteil ab. Im darauffolgenden Abschnitt werden die zum spektralen Anpassen von Absorptionssignalen entwickelten Algorithmen sowie die Probenpräparation beschrieben. Anschließend werden im ersten Ergebnisteil die Lösungsmittel  $D_2O$ ,  $H_2O$  und ihre Mischungen temperaturabhängig, im thermischen Gleichgewicht untersucht und anschließend der Abkühlvorgang zeitaufgelöst nach einem Laser-induzierten Temperatursprung charakterisiert. Zur Überprüfung des Algorithmus zum Abzug von Lösungsmittelabsorptionen von Absorptionen einer Proteinlösung werden Messungen am Modellprotein Ribonuklease A gezeigt. Die anschließenden Studien von Polyglutaminsäure sind so gegliedert, dass zuerst die temperaturabhängigen Faltungseigenschaften im thermischen Gleichgewicht analysiert und dann bei geeigneten Wellenlängen und pH-Werten die Entfaltung zeitaufgelöst untersucht werden. Eine gleiche Gliederung wird für den abschließenden Ergebnisteil, der Studien des untersuchten Tryptophan-Zipper-Peptids und seiner unterschiedlich  $^{13}C$ -isotopenmarkierten Varianten verwendet. Zum Abschluss dieser Arbeit wird eine Zusammenfassung der vorliegenden Arbeit und ihrer Resultate gegeben.

## 2 PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 Infrarotspektroskopie

Mit der Beschreibung von Licht als elektromagnetische Welle können Wechselwirkungen der Strahlung mit Materie erklärt werden. Die Effekte, die durch diese Wechselwirkungen verursacht werden, hängen sowohl von der Wellenlänge als auch von der Intensität des eingestrahnten Lichtes ab. Elastische Streuung, bei der sich die Energie und damit Frequenz des eingestrahnten Lichtes beim Durchdringen der untersuchten Materie nicht ändert, kann z.B. für Röntgenkristallographie zur Strukturanalyse von Proteinen verwendet werden. Dabei wird Röntgenstrahlung genutzt, um die auftretende Beugung an einem Proteinkristall zu untersuchen. Bei der inelastischen Streuung wird ein Teil der Energie des eingestrahnten Lichtes auf die Materie übertragen bzw. von dieser Materie Energie an die Strahlung wieder abgegeben. Dieser Effekt wird als Raman-Streuung und die in ihrer Frequenz verschobene Strahlung als Stokes- bzw. Anti-Stokes-Linien bezeichnet. Wird das gestreute Licht spektral analysiert, so lassen sich mit dieser Methode Rückschlüsse auf die untersuchte Substanz ziehen. Ist die Energie des einfallenden Lichtes gleich der Energiedifferenz zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand des zu untersuchenden Materials, so nimmt dieses die Energie des Photons auf und kehrt nach kurzer Zeit wieder in seinen Ausgangszustand zurück (resonante Absorption/Emission). Dadurch lassen sich die Absorptionseigenschaften der untersuchten Substanzen bestimmen, die von einer Vielzahl von Parametern wie z.B. der Temperatur und Wellenlänge abhängig sind.

Für die resonante Wechselwirkung zwischen der Strahlung und der zu untersuchenden Substanz wird als Messgröße die Transmission  $T(\lambda)$  in Abhängigkeit der jeweiligen Wellenlänge  $\lambda$  bestimmt. Sie ist definiert als das Verhältnis der von einer Probe durchgelassenen Strahlungsintensität  $I_P$  und der Strahlungsintensität  $I_0$  vor dem Eintritt in die Probe.

$$T(\lambda) = \frac{I_P(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (1)$$

Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 4 die Transmission von Strahlung durch eine Küvette.

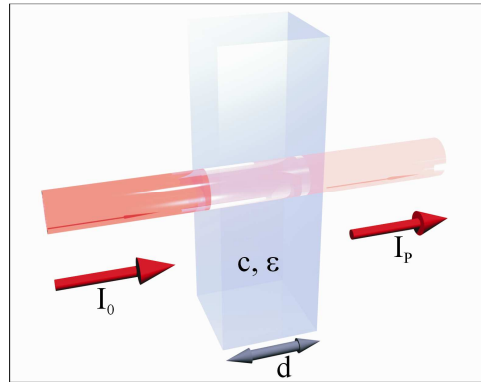


Abbildung 4: Transmission eines Lichtstrahls durch eine Küvette der Schichtdicke  $d$ .

Beim Durchqueren der Küvette - mit einer optische Weglänge  $d$ , gefüllt mit einer Probenlösung der Konzentration  $c$  - nimmt die Intensität des Messlichtes exponentiell ab.

$$I_P(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d} \quad (2)$$

Durch das Gesetz von Lambert Beer, siehe Gleichung (3), wird der Zusammenhang von Transmission und den die Intensität des Messlichtes verringernden Messgrößen beschrieben:

$$-\log(T) = -\log \frac{I_P(\lambda)}{I_0(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d = E(\lambda) \quad (3)$$

Die Extinktion  $E(\lambda)$  einer Probe, auch als Absorption eines Materials bezeichnet<sup>d</sup>, entspricht dabei dem negativen dekadischen Logarithmus der Transmission. Zusätzlich wird die Proportionalitätskonstante der Extinktion zur Konzentration  $c$  und zur optischen Weglänge  $d$  als molarer dekadischer Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  mit der Einheit  $[\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$  bezeichnet. Speziell in der Infrarot-Spektroskopie hat sich die Messgröße der Wellenzahl  $\tilde{\nu}$  mit der Einheit  $\text{cm}^{-1}$  etabliert, die dem reziproken Wert der Wellenlänge  $\lambda$  entspricht.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (4)$$

Durch Infrarotstrahlung (IR) können Molekülschwingungen und -rotationen angeregt werden. Zur Anregung der Molekülschwingungen ist die eingestrahlte Energie normaler Weise so gering, dass keine Elektronenübergänge angeregt werden, wie es im ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS) Spektralbereich der Fall ist. Der infrarote Spektralbereich erstreckt sich von

<sup>d</sup> Die in den Lehrbüchern als Synonyme verwendeten Begriffe der Absorption und Extinktion sollten generell jedoch unterschieden werden. Die Absorption ist über das Lambert-Beer'sche Gesetz direkt mit dem molekularen Prozess der Wechselwirkung von Licht und Materie verknüpft. Als Extinktion wird der Anteil der Strahlung bezeichnet, der dem aus dem ursprünglichen Messstrahl entnommenen Anteil entspricht, unabhängig davon, ob durch Absorption oder durch „scheinbare Absorption“, wie Lichtstreuung.<sup>30</sup>



13000  $\text{cm}^{-1}$  bis 10  $\text{cm}^{-1}$ . Dieser große Bereich wird in kleinere Regionen untergliedert, die in Tabelle 3 zusammengefasst sind.

Bereich	Wellenlänge $\lambda$ ( $\mu\text{m}$ )	Wellenzahl $\tilde{\nu}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
nahes Infrarot	0,76 – 3,0	13000 – 3300
mittleres Infrarot	3,0 – 30	3300 – 330
fernes Infrarot	30 - 1000	330 – 10

Tabelle 3: Übersicht der verschiedenen spektralen Regionen im infraroten Bereich (nach Lottspeich und Zorbas<sup>30</sup>).

Infrarote Strahlung kann jedoch nur dann absorbiert werden, wenn mit der Kernbewegung eine Änderung des Dipolmoments im Molekül einhergeht und die zur Schwingungsanregung passende Energie eingestrahlt wird. In diesem Fall spricht man von Infrarot-Aktivität. Die Stärke des Dipols ist maßgeblich für die Absorptionswahrscheinlichkeit und damit für die Stärke der Absorption.

Um die Schwingungsbewegungen in einem Molekül zu beschreiben, bedient man sich eines einfachen physikalischen Modells, bei dem alle Atome als Massepunkte berücksichtigt werden und durch masselose elastische Federn, die die chemischen Bindungen repräsentieren, zusammengehalten werden. Für ein zweiatomiges Molekül lassen sich die auftretenden Schwingungen durch einen harmonischen Oszillator beschreiben. In diesem Modell lassen sich die schwingenden Atome mit einer jeweiligen Masse  $m$ , die mit einer elastischen Feder mit der Federkonstanten  $k$  verbunden sind, realisieren (Hooke'sches Gesetz). Zur besseren übersichtlicheren Formulierung sind in dem Oszillatormodell bereits die Massen der einzelnen Atome, die um den gemeinsamen Schwerpunkt schwingen, durch die reduzierte Masse  $\mu = m_1 \cdot m_2 / (m_1 + m_2)$  zusammengefasst. Die mathematische Beschreibung eines eindimensionalen harmonischen Oszillators lautet:

$$\mu \cdot \frac{d^2x}{dt^2} + k \cdot x = 0 \quad (5)$$

Die zeitabhängige Lösung dieser Differentialgleichung ist eine periodische Funktion mit der natürlichen Schwingungsfrequenz  $\nu$ :

$$x(t) = x_0 \cdot \cos(2\pi\nu t) \quad (6)$$

Diese Schwingungsfrequenz des zweiatomigen Moleküls ist gegeben durch:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (7)$$

Aus der quantenmechanischen Beschreibung des harmonischen Oszillators kommt die Forderung, dass nur diskrete Energieniveaus möglich sind. Sie werden erhalten durch:

$$E(\nu) = \left(n + \frac{1}{2}\right) \cdot h \cdot \nu \quad (8)$$

Diese Schwingungsenergien beinhalten das Planck'sche Wirkungsquantum  $h$  und die Schwingungsquantenzahl  $n = 0, 1, 2, 3 \dots$ . Der durch diese Gleichung beschriebene Oszillator besitzt mit  $n = 0$  die Nullpunktsenergie  $E = 1/2 \cdot h \cdot \nu$  (Heisenberg'sche Unschärferelation). Zusätzlich sind nach den Auswahlregeln nur Übergänge zum nächst benachbarten Niveau möglich, also  $\Delta\nu = \pm 1$ . Die Anregung einer solchen Schwingung kann jedoch nur geschehen, wenn die eingestrahlte Energie exakt der Energiedifferenz der Schwingungsquantenzustände entspricht.

Für das Modell des harmonischen Oszillators sind alle Differenzen zwischen den benachbarten Energieniveaus äquidistant. Das Potenzial realer Moleküle kann jedoch mit dem Modell des harmonischen Oszillators nicht ausreichend beschrieben werden. Die mit zunehmender Annäherung stärkere Abstoßung der Kerne und die bei großen Atomabständen auftretende Dissoziation von Bindungen werden in dem Modell nicht berücksichtigt. Diese geforderten Schwingungseigenschaften können durch das Modell des anharmonischen Oszillators mit einem asymmetrischen Potenzial besser beschrieben werden. Mit dessen Eigenschaften sind die Energieniveaus nicht mehr äquidistant, sondern werden zur Dissoziationsgrenze hin immer kleiner. Zusätzliche Übergänge mit  $\Delta\nu = \pm 2, \pm 3, \dots$  sind nun möglich. Sie können in Spektren als Obertonschwingungen der zwei- bis  $n$ -fachen Frequenz der Grundschiwingung beobachtet werden. Da die Population dieser Schwingungszustände jedoch gering ist, sind die Intensitäten im Spektrum entsprechend klein.

Die Anzahl der möglichen Schwingungsbewegungen von mehratomigen Molekülen lässt sich durch die für jedes einzelne Atom erforderlichen  $3 \cdot N$ -Raumkoordinaten beschreiben, wenn  $N$  die Anzahl der Atome ist. Diese Anzahl der Raumkoordinaten werden als Freiheitsgrade bezeichnet. Zieht man von diesen  $3 \cdot N$ -Freiheitsgraden drei Freiheitsgrade für die Angabe der Translation und drei Freiheitsgrade für die Rotation des gesamten Moleküls ab, so verbleiben für ein nichtlineares Molekül  $3 \cdot N - 6$  und ein lineares Molekül  $3 \cdot N - 5$  mögliche Schwingungsfreiheitsgrade. Diese werden als Normalschwingungen oder auch Normalmoden bezeichnet.

Es können jedoch nicht alle theoretisch möglichen Normalschwingungsmoden eines Moleküls tatsächlich beobachtet werden. Neben der bereits erwähnten Auswahlregel, dass nur solche Schwingungen messbar sind, die eine Infrarot-Aktivität aufweisen, können zusätzlich einzelne Schwingungen miteinander koppeln. Dadurch können die Frequenzen der Normalmoden verändert werden. Aber auch Obertonschwingungen, Vielfache der Normalmoden, oder Resonanzeffekte können die tatsächlichen messbaren Absorptionsbanden verändern.

Die gegenseitige Beeinflussung von Protein- und Lösungsmittelmoden sowie bspw. der Einfluss von unterschiedlichen Temperaturen auf die Schwingungsmoden zeigen den hohen Informationsgehalt eines Infrarotspektrums. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit die thermische Stabilität und die Faltung von Peptiden mit Hilfe der Infrarot-Spektroskopie untersucht. Dazu wurde die Messtechnik der Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) angewendet. Die Absorptionsmessungen wurden jeweils im thermischen Gleichgewicht der Probe vorgenommen. Um neben den statischen Ergebnissen dynamische Aussagen zum Faltungsmechanismus zu erhalten, wurde ein IR-Spektrometer entwickelt und aufgebaut, mit dem an einzelnen Wellenlängen Messungen mit ns-Zeitauflösung möglich sind. Diese Messtechniken und Apparaturen werden im Folgenden genauer beschrieben.

## 2.2 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Absorption im infraroten Spektralbereich wurde ein kommerzielles Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometer (Equinox 55, Bruker, Ettlingen) mit einem Halbleiterdetektor (HgCdTe) verwendet.

Der wesentliche Bestandteil eines solchen Spektrometers ist das Interferometer. Von einer spektral breitbandigen Lichtquelle, z.B. einem Globar, wird die Strahlung in ein Michelson-Interferometer gekoppelt (Abbildung 5). Die Strahlung der Lichtquelle wird darin durch einen halbdurchlässigen Spiegel (engl.: „beam splitter“) in zwei Teilstrahlen aufgespalten, jeweils an einem feststehenden und einem beweglichen Spiegel reflektiert und durch Rekombination zur Interferenz gebracht. Eine Verschiebung des beweglichen Spiegels verändert die optische Weglänge in diesem Interferometerarm, wodurch eine Phasendifferenz zwischen den beiden Teilstrahlen und somit eine Änderung der Interferenzamplitude resultiert. Der Verlauf der Intensität am Detektor in Abhängigkeit von der optischen Wegdifferenz wird Interferogramm genannt<sup>31</sup>. Eine Auswerteelektronik berechnet mit Hilfe eines Fast-Fourier-Transform-Algorithmus (FFT-Algorithmus) aus dem aufgenommenen Interferogramm das Spektrum der im Strahlengang befindlichen Probe.

Die am Detektor einfallende Intensität  $I(x)$  wird als Funktion des Spiegelweges  $x$  aufgenommen und beinhaltet den Phasenunterschied der beiden Teilstrahlen. Um die Fourier-Transformation, die von  $-\infty < x < +\infty$  definiert ist, für den endlichen Interferometerweg auszuführen, wird dem Integral eine weitere Fensterfunktion  $D(\tilde{\nu})$  (oder auch Apodisationsfunktion) hinzugefügt, die innerhalb der beobachtbaren Intensitäten eins und außerhalb null ist.

$$I(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\tilde{\nu})D(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx \quad (9)$$

Durch die Fourier-Transformation erhält man schließlich die wellenzahlabhängige Intensität  $I(\tilde{\nu})$ , ein Spektrum.

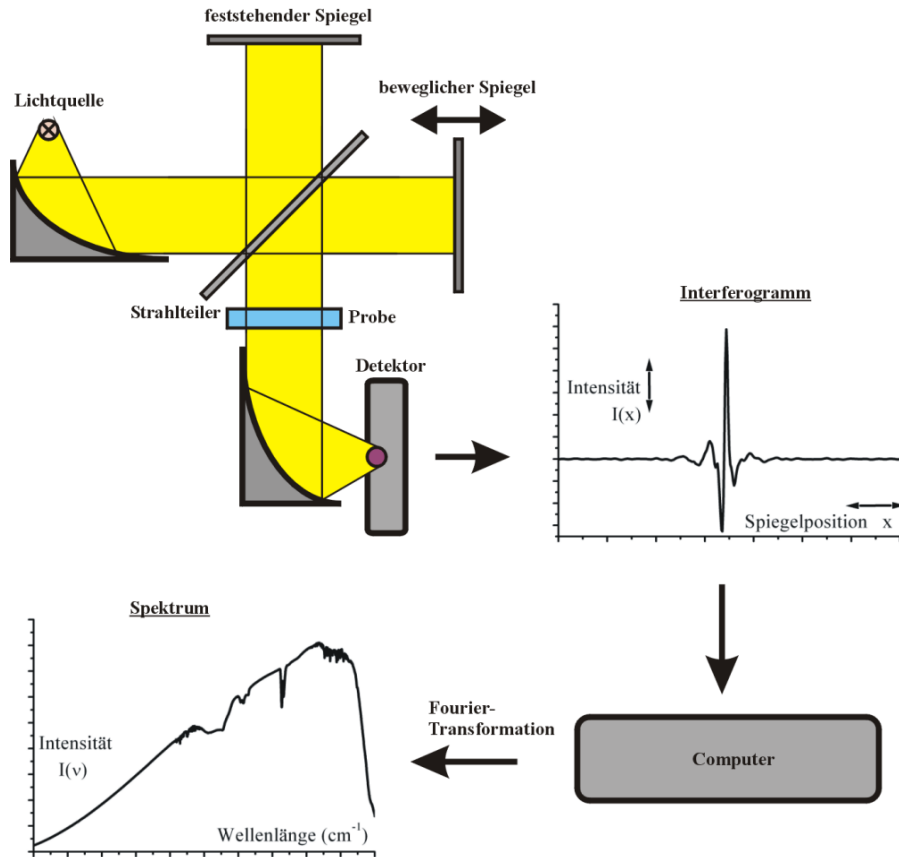


Abbildung 5: Schematische Darstellung des FTIR-Spektrometers.

Der Einsatz eines Fourier-Transform-Spektrometers hat gegenüber dispersiven Geräten eine Anzahl von entscheidenden Vorteilen:

Multiplex- oder Fellgett-Vorteil:

Alle Wellenlängen werden im Interferometer gleichzeitig gemessen. Bei einer dispersiven spektralen Aufspaltung durch einen Monochromator werden die Intensitäten der unterschiedlichen Wellenlängen nacheinander detektiert. Bei gleicher Spektrenmesszeit kann entsprechend der Zahl der zu messenden Spektralelemente  $N = (\tilde{\nu}_{\max} - \tilde{\nu}_{\min}) / \Delta\tilde{\nu}$  für das Fourier-Transform-Spektrometer eine um den Faktor  $N$  längere Messzeit pro Element realisiert werden, womit der Rauschfaktor um den Wert  $\sqrt{N}$  verringert wird.

Lichtleitwert- oder Jacquinot-Vorteil:

Um die spektrale Auflösung eines dispersiven Spektrometers zu erhöhen, muss die Spaltbreite des Monochromators verringert werden. Dadurch nimmt jedoch auch die Intensität des zu

detektierenden Lichtes ab, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis verschlechtert wird. Im Fourier-Transform-Spektrometer hängt die spektrale Auflösung jedoch ausschließlich von der Wegstrecke des beweglichen Spiegels und der Genauigkeit der Bestimmung der Spiegelposition ab. Durch den Einsatz von kreisförmigen Blenden wird eine höhere Lichtintensität auf den Detektor zugelassen. Im Vergleich des dispersiven und des Fourier-Transform-Spektrometers wird beim Letzteren eine um den Faktor  $< 10$  größere Lichtintensität und damit ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erzielt.

#### Connes-Vorteil:

Zur Bestimmung der genauen Spiegelposition des beweglichen Spiegels, wird im Fourier-Transform-Spektrometer ein Helium-Neon-Laser ( $\lambda_{\text{He-Ne}}=633\text{nm}$ ) im optischen Strahlengang mitgeführt. Das Interferenzmuster des Helium-Neon-Lasers wird als Maß der Spiegelposition benutzt. Die Nulldurchgänge der sinusförmigen Laserintensität oder ein Vielfaches dieser Intervalle definieren die optischen Wegunterschiede, zu denen das IR-Interferogramm digitalisiert wird. In der Infrarot-Spektroskopie finden nur stabilisierte Helium-Neon-Laser Verwendung. Durch die geringen Frequenzschwankungen des Laser kann ein sehr hohes Auflösungsvermögen ( $<0.001\text{ cm}^{-1}$ ) erreicht werden. Diese Genauigkeit der Frequenzkalibrierung des Fourier-Transform-Spektrometers geknüpft an die Frequenz des Helium-Neon-Lasers, der die interne Referenz für jedes Interferogramm liefert, wird als Connes-Vorteil bezeichnet.

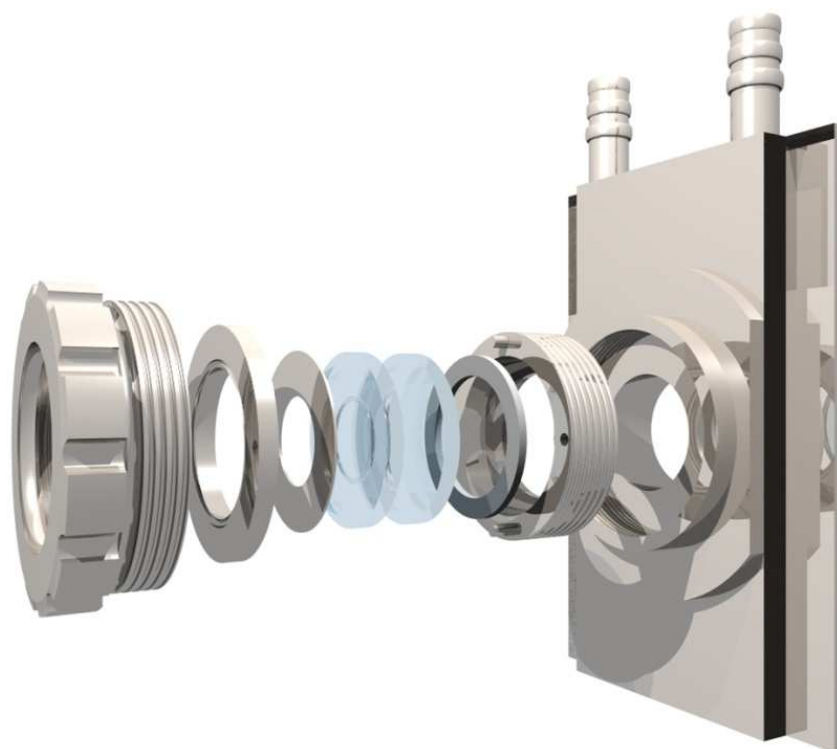
Durch eine Reihe von Umbauten wurden notwendige Modifikationen eingeführt, die die automatisierte Messung der Absorptionen von Lösungsmitteln, Peptiden und Proteinen bei unterschiedlichen Temperaturen und unter Gleichgewichtsbedingungen möglich machten.

Zur Reduzierung von Wasserdampf innerhalb des FTIR-Spektrometers, beispielsweise beobachtbar anhand der infrarotaktiven Rotationsschwingungsbanden im Spektralbereich von  $1800\text{ cm}^{-1}$  bis  $1400\text{ cm}^{-1}$ , wird dieses mit trockener Luft gespült.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Absorptionsmessungen durchgeführt, wobei ein im Institut entwickelter Probenhalter benutzt wurde. Dieser wurde auf einem beweglichen Schlitten montiert, um somit für die Absorption einer Probe das Hintergrund- und Probenspektrum möglichst zeitnah ( $\sim 2$  Minuten Unterschied) zu vermessen und die Proben in den IR-Strahl zu schieben. Dadurch wird die Detektion der Wasserdampfbanden neben dem Spülen der Probenkammer mit Trockenluft zusätzlich reduziert.

Durch diese zeitnahe Messung von Hintergrund- und Probenspektrum wird außerdem eine mögliche Intensitätsveränderung (= Drift)<sup>32</sup> des Messlichtes minimiert, die neben sehr minimalen Schwankungen der stabilisierten IR-Quelle hauptsächlich durch das kontinuierliche Erwärmen des HgCdTe-Detektors verursacht wird. Die Überprüfung des Erwärmens des durch flüssigen Stickstoff gekühlten HgCdTe-Detektorelements und der Stabilität des Infrarotsignals wurde damit überprüft, dass das von einer Proben temperatur unabhängige Globar-IR-Signal über einen längeren Zeitraum (bis zu 10 Stunden) detektiert und analysiert wurde. Einzelkanalspektren, die innerhalb eines Zeitintervalls von 5 Minuten aufgenommen und in Absorptionsspektren umgerechnet wurden, zeigten dabei nur eine geringe Offset-Verschiebung. Erst wenn mehr als 5 Minuten zwischen den einzelnen Messungen liegen, ist eine Verschiebung bemerkbar.

Der benutzte Probenhalter (siehe Abbildung 6) wird sowohl für die statischen FTIR-Messungen als auch für die zeitaufgelösten Temperatursprung-Experimente (siehe Kapitel 2.3) benutzt. Er lässt sich zerlegen in Probenkopf und Halter.



*Abbildung 6: Abbildung des verwendeten thermostatisierbaren Probenhalters. Zur besseren Übersicht der einzelnen Komponenten wurde der Probenhalter in seine einzelnen Bestandteile zerlegt.*

Im Probenkopf wird eine Probe zwischen zwei planparallele  $\text{CaF}_2$ -Fenster gegeben, die über einen Abstandshalter eine definierte Schichtdicke erhält. Als Abstandshalter können dünne Polyethylen-Folien benutzt werden, die eine Probenschichtdicke von  $10\ \mu\text{m}$  bis  $100\ \mu\text{m}$  einstellbar machen. Für sehr dünne Schichtdicken werden  $\text{CaF}_2$ -Fenster verwendet, die eine Vertiefung besitzen (Dünnschichtküvetten), wodurch Schichtdicken im Bereich von  $4\ \mu\text{m}$  bis  $10\ \mu\text{m}$  realisierbar sind. Für Absorptionsmessungen mit  $\text{H}_2\text{O}$  wurden zwei plane  $\text{CaF}_2$ -Fenster aufeinander gelegt, um damit eine noch geringere Schichtdicke von  $1\ \mu\text{m}$  bis  $3\ \mu\text{m}$  zu erreichen. Der Probenkopf wird mit dem Halter verschraubt, wodurch eine gute Wärmeleitung gewährleistet ist.

Der Halter selbst ist aus gut wärmeleitendem Material (Aluminium bzw. Cu-Legierung) gefertigt und wird über zwei Schlauchanschlüsse mit einem Wasserbad (Ecoline RE 306 & E 300, Lauda, Königshofen) verbunden. Die entsprechend temperierte Flüssigkeit (Glysantin/Wasser-Gemisch) kann durch einen gebohrten Kanal, der um den Probenkopf herumreicht, den Probenhalter durchströmen und diesen gleichmäßig erwärmen bzw. abkühlen. Damit kann die Temperatur einer Probe verändert werden. Die Erwärmung einer Probe mit einem Wasserbad liefert stabile Messbedingungen im thermischen Gleichgewicht. Die Überprüfung der Temperaturstabilität wurde mit einem Pt100-Temperaturfühler umgesetzt, der möglichst nahe am Probenort direkt am Probenkopf befestigt wurde.

Die FTIR-Experimente im thermischen Gleichgewicht wurden über eine Software automatisiert angesteuert. Dazu wurde ein Makro in der zur Bedienung des Spektrometers verwendeten Software OPUS (Bruker, Ettlingen) geschrieben, um das Wasserbad und den Probenschlitten anzusteuern und die Absorptionsmessungen zu realisieren. Zur Veranschaulichung der Makroprozedur zeigt das folgende Flussdiagramm (Abbildung 7) die wesentlichen Programmschritte. Das entwickelte komplette Messmakro zur schrittweisen Erwärmung einer Probe und IR-Absorptionsmessung wird im Anhang in Kapitel 7.1.1 wiedergeben.



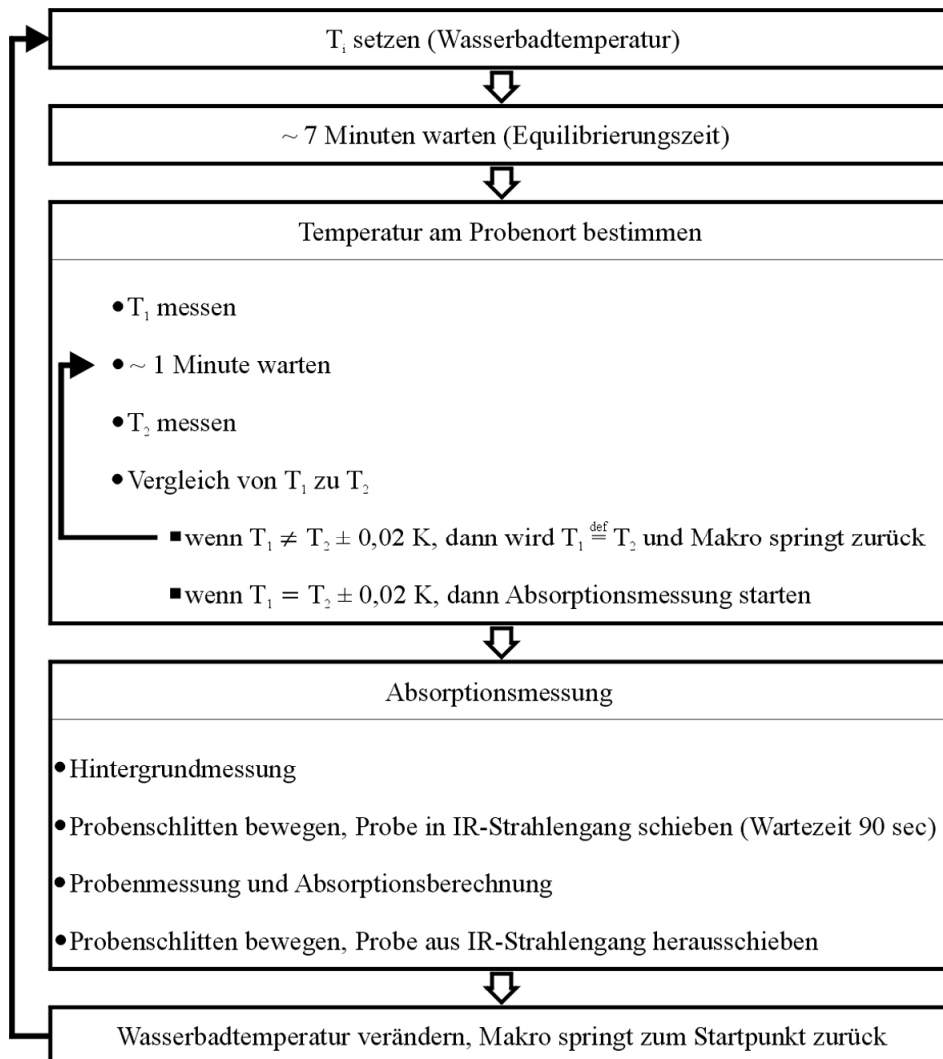


Abbildung 7: Flussdiagramm zur Programmstruktur der automatisierten FTIR-Messungen im thermischen Gleichgewicht. Das Makro steuert die Aufnahme der Spektren, regelt die Temperatur des Wasserbades und verändert die Position des Probenschlittens.

Vor dem Start des Makros wird die jeweilige Ausgangstemperatur  $T_{\text{Start}}$  (typischer Weise  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) im Wasserbad eingestellt. Das Einstellen dieser Temperatur bis zum thermischen Gleichgewicht kann dabei bis zu 2 Stunden dauern. Danach beginnt die in Abbildung 7 gezeigte Programmprozedur.

Zum Programmstart wird die Sollwerttemperatur des Wasserbades angegeben. Diese sollte nicht mehr als  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  von der festgelegten Ausgangstemperatur des Wasserbades  $T_{\text{Start}}$  abweichen. Die darauffolgende Wartezeit von 7 bis 10 Minuten dient dazu, dass die neue Sollwerttemperatur, die möglicherweise von der aktuellen Wasserbadtemperatur  $T_{\text{Start}}$  abweicht, im Wasserbad eingestellt und erreicht wird.

Anschließend wird die Temperatur am Probenort  $T_1$  bestimmt. Die darauf folgende Wartezeit von ca. einer Minute entspricht derjenigen Zeit, in der die IR-Messung erfolgt, und soll gewährleisten, dass während der Messung die Temperatur stabil gehalten wird. Nach dem Ablauf der Wartezeit wird die Probentemperatur  $T_2$  erneut gemessen. Ein Vergleich der beiden eine Minute auseinander liegenden Temperaturwerte gibt Auskunft über die thermische Stabilität. Ist diese nicht gegeben, d.h. ist  $T_1 \neq T_2 \pm 0,02 \text{ K}$ , so wird die zu diesem Zeitpunkt bezeichnete Temperatur  $T_2$  als neue Temperatur  $T_1$  umbenannt und zusätzlich springt das Makro zu dem Programmschritt zurück, an dem die IR-Probenmesszeit abgewartet wird. Diese Prozedur wird so lange wiederholt, bis die thermische Stabilität innerhalb einer Minute  $T_1 = T_2 \pm 0,02 \text{ K}$  beträgt.

Anschließend wird die Absorptionsmessung initiiert. Zunächst wird dazu das Hintergrundspektrum aufgenommen. Danach wird der Probenschlitten in Bewegung gesetzt, um die Probe in den IR-Strahlengang zu schieben. Dieser Vorgang ist mit dem vorhandenen benutzten Probenschlitten nach ca. 90 Sekunden abgeschlossen. Im Anschluss daran wird das Probenpektrum aufgenommen und mit dem Hintergrundspektrum zu einem Absorptionsspektrum verrechnet. Um den Probenschlitten wieder in die Ausgangsposition zu bringen, wird dieser im Folgenden aus dem IR-Strahlengang herausgefahren. Zur Kontrolle der Absorptionsmessungen wird vor der Hintergrundmessung und nach der Probenmessung jeweils die Temperatur am Probenort bestimmt und in einer Tabelle angegeben. Dadurch ist eine Überprüfung der Stabilität der Temperatur während der Messung möglich. Die Genauigkeit der Temperaturangaben wird nach der Anzeigegenauigkeit von 0,01 K des Wasserbades beurteilt. Die Messgenauigkeit dieser Temperaturen beträgt dann 0,1 K und ist somit auch während der Absorptionsmessung gewährleistet.

Nach der Messung der Absorption wird eine neue Temperatur für das Wasserbad gewählt, die sich um 1 °C bis 4 °C von der vorhergehenden Temperatur unterscheidet. Das Makro springt dann zur anfänglichen Temperatur-Equilibrierungszeit zurück und die Prozedur beginnt von vorne.

Mit Hilfe dieser Programmstruktur lassen sich sowohl das kontrollierte Erwärmen einer Probe als auch das Abkühlen verfolgen. Beide Vorgänge können kombiniert und auch mehrmals hintereinander durchgeführt werden.

### 2.3 Laser-induzierter Temperatursprung und IR-Einzelwellendetektion

Die in dieser Arbeit entwickelte Apparatur besteht aus verschiedenen einzelnen Komponenten. In einer groben Klassifikation der Bestandteile kann eine Aufteilung in die Komponenten Messlicht und Anregungslicht vorgenommen werden. Zur Veranschaulichung der Apparatur zeigt Abbildung 8 eine stark vereinfachte schematische Darstellung.

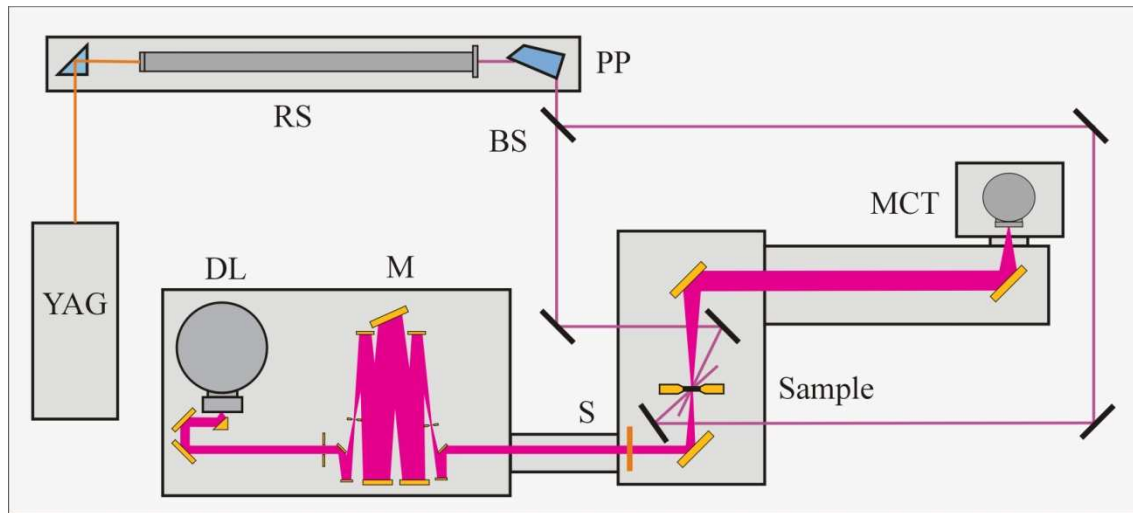


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufbaus des Temperatursprung-Infrarot-Spektrometers mit allen prinzipiellen Komponenten und Strahlengängen von Anregungs- und Messlicht. YAG: gütegeschalteter Nd:YAG-Laser, RS: Raman-Shifter, PP: Pellin-Broca-Prisma, dispersives Element zur spektralen Trennung der Anregungsfrequenz 1909 nm von den anderen Raman-Linien, BS: Strahlteiler, DL: durchstimmbaren Bleisalzlaserdioden, M: Monochromator, S: optomechanischer Verschluss, MCT: HgCdTe Detektor, Sample: Position der Probe.

Mess- und Anregungslicht werden auf jeweils unterschiedlichen Höhen 11,5 cm bzw. 10,5 cm parallel zur Tischplatte über den optischen Aufbau geleitet. Durch diese unterschiedlichen Höhen soll vermieden werden, dass sich beide Strahlengänge überlagern. Erst in der Probe, in der der Fokus des Messlichtes liegt, überlagern sich die beiden Strahlengänge. Dafür wird die Anregungsstrahlung nach oben gerichtet. Zusätzlich trifft durch diese Ablenkung die durch die Probe transmittierte Anregungsstrahlung nicht auf den gegenüberliegenden Spiegelhalter. Diese würde aufgrund der Intensität Schäden an der Halterung verursachen und durch ihre

Divergenz Streulicht verursachen, das zum Detektor reflektiert und als Störsignal aufgenommen werden würde.

Das Messlicht entsteht durch Lasermoden in Bleisalzlaserdioden (siehe Seite 34). Die damit erzeugte infrarote Laserstrahlung, die in einem Spektralbereich von  $1580\text{ cm}^{-1}$  bis  $1700\text{ cm}^{-1}$  durchgestimmt werden kann und kontinuierlich Strahlung (cw<sup>°</sup>) emittiert, wird dann in einen Monochromator (TLS 310, Mütek, Herrsching) geleitet und auf den Probenort fokussiert. Von dort gelangt das Messlichtsignal über einen um ca. 1 m verlängerten Strahlweg über paraboloiden Spiegel zum HgCdTe photovoltaischem Detektor (20 MHz, KMPV-11-1-J2, Kolmar Technologies, Newburyport, USA) mit integriertem Vorverstärker. Die Umwandlung der analogen zeitaufgelösten Intensitätsverläufe zu digitalen Signalen und deren Abspeicherung erfolgt über eine Transientenrekorderkarte (30 MHz, 12 bit, T3012, Imtec, Hochdorf). Die Auslösung der Transientenaufnahme wird über eine externe autonome Photodiode realisiert. Sichtbare Strahlung, der Anti-Stokes verschobenen Laserstrahlung (siehe Raman-Shifter) wird durch diese Photodiode detektiert, die einen Spannungspuls an die Transientenrekorderkarte weitergibt. Durch diesen wird die Aufnahme der analogen infraroten Intensitätssignale ausgelöst. Mit dem Eintreffen des Spannungspulses von der Photodiode wird der zeitliche Nullpunkt  $t = 0\text{ sec}$  der Datenaufnahme und somit auch der Zeitpunkt, an dem der Temperatursprung-induziert, wurde gesetzt.

Zur Justage der infraroten Laserstrahlung wird sichtbare Strahlung eines Helium-Neon-Lasers (633 nm, 1107P, JDS Uniphase Corporation, Milpitas, USA) benutzt, dessen Strahldurchmesser durch einen Strahlaufweiter (20x Beam Expander, Edmund Optics Inc., Karlsruhe) auf 15 mm aufgeweitet wurde und optisch parallel zur infraroten Strahlung in den Strahlengang eingekoppelt. Damit lässt sich der Strahlengang durch den Monochromator verfolgen. Zusätzlich kann eine Kalibrierung des Monochromators erfolgen, da das Interferenzmaximum der 632,8 nm Strahlung in der 10. Ordnung für diesen Monochromator  $1580,3\text{ cm}^{-1}$  beträgt.

Das Anregungslicht wird in einem gepulsten, gütegeschalteten Nd:YAG-Laser (SL454G, Spectron, Rugby, Warwickshire, England) erzeugt. Die fundamentale Strahlung dieses Lasers mit einer Wellenlänge von 1064 nm, einer Pulsbreite von ca. 10 ns, einer Taktfrequenz von 1 Hz und einer Energie von 650 mJ/Puls wird in einen Raman-Shifter (Radiant Dyes, Wermelskirchen) eingekoppelt.

---

<sup>°</sup> Die Abkürzung „cw“ entspricht ausgeschrieben: „continuous wave“ und bedeutet, dass eine Strahlung kontinuierlich emittiert wird.

Der Raman-Shifter besteht aus einem 1 m langem Edelstahlrohr, das mit  $3 \cdot 10^6$  Pa  $H_2$ -Gas befüllt ist. Im Einlass wird die Strahlung durch eine Linse, Brennweite 600 mm, fokussiert, wodurch im Brennpunkt durch die unelastische Streuung der Photonen an den Molekülen des  $H_2$ -Gases Raman-Linien erzeugt werden. Die Eigenfrequenz des im Raman-Shifter angeregten Gases beträgt ca.  $4160 \text{ cm}^{-1}$ <sup>33</sup>. Dadurch wird aus der fundamentalen Strahlung des Nd:YAG Lasers bei 1064 nm eine Stokes-Linie (Frequenzverschiebung durch  $\nu_{\text{Stokes}} = \nu_{1064 \text{ nm}} - 4160 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>f</sup> bei  $5238 \text{ cm}^{-1}$  bzw. 1909 nm erzeugt, und das Photon gibt seine Energie an das Molekül ab. Des Weiteren sind Anti-Stokes-Linien erkennbar (Verschiebung der Anregungsfrequenz durch  $\nu_{\text{Anti-Stokes}} = \nu_{1064 \text{ nm}} + n \cdot 4160 \text{ cm}^{-1}$ , n entspricht der Ordnung der Obertöne), die im sichtbaren Spektralbereich liegen und jeweils eine Wellenlänge von 738 nm, 564 nm und 457 nm besitzen. In diesem Fall nimmt das Photon Vibrations- oder Rotationsenergie des angeregten Moleküls auf. Die Laserfundamentale von 1064 nm und einer Energie von 650 mJ erzeugt im Raman-Shifter eine Stokeslinie bei 1909 nm mit einer Energie von ca. 50 mJ. Mit dieser Energie kann in der Probe ein Temperatursprung von  $10 \text{ °C} - 15 \text{ °C}$  induziert werden. Des Weiteren befindet sich hinter dem Raman-Shifter eine Sammellinse ( $f = 600 \text{ mm}$ ), um den divergent austretenden Strahl wieder parallel auszukoppeln.

Mit einem Laserpuls der Wellenlänge von 1909 nm und genügender Energie lässt sich sowohl in  $H_2O$  als auch  $D_2O$  ein Temperatursprung erzeugen. Dieser Effekt resultiert aus Absorptionsbanden der Oberton der Biegeschwingung von  $H_2O$  bei  $5170 \text{ cm}^{-1}$  und dem Oberton der Streckschwingung von  $D_2O$  bei  $5080 \text{ cm}^{-1}$ <sup>34</sup>. Ihre jeweiligen molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten sind sehr gering mit  $1,05 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für  $H_2O$  und  $0,18 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für  $D_2O$ . Dadurch wird eine homogene Wärme- und Temperaturverteilung innerhalb der Probe erzeugt. Durch Verwendung eines Er:YAG-Lasers, der eine fundamentale Wellenlänge von 2940 nm besitzt, könnte ebenfalls ein Temperatursprung in einer wässrigen Lösung induziert werden. Mit der Er:YAG-Laser-Fundamentalen könnte die OH-Streckschwingung bei  $3404 \text{ cm}^{-1}$  angeregt werden. Aufgrund des hohen Extinktionskoeffizienten dieser Absorptionsbande würde die Probe jedoch ungleichmäßig erwärmt werden, was zu einem Temperaturgradient innerhalb der Probe resultieren würde. Die Veränderung der zum

<sup>f</sup> Zusammenhang zwischen Frequenz  $f$  und Wellenlänge  $\lambda$  am Beispiel der Stokes-Verschiebung:  $f_{\text{Stokes}} = f_{\text{Anregung}} - f_{\text{Eigenfrequenz}}$ , setzt man nun für die Frequenz  $f = c/\lambda$ , so folgt daraus  $c/\lambda_{\text{Stokes}} = c/\lambda_{\text{Anregung}} - c/\lambda_{\text{Eigenfrequenz}} \Rightarrow 1/\lambda_{\text{Stokes}} = 1/\lambda_{\text{Anregung}} + 1/\lambda_{\text{Eigenfrequenz}}$ , in der üblicheren Schreibweise der Wellenzahlen mit  $\tilde{\nu} = 1/\lambda$  folgt:  $\tilde{\nu}_{\text{Stokes}} = \tilde{\nu}_{\text{Anregung}} - \tilde{\nu}_{\text{Eigenfrequenz}}$

Temperatursprung notwendigen Anregungswellenlänge ist auch durch die Variation der Gasbefüllung des Raman-Shifters möglich. So wurden Raman-Shifters mit D<sub>2</sub>- oder auch CH<sub>4</sub>-Gas befüllt, wodurch Raman-Linien von 1,56 μm<sup>33,35</sup> und 1,54 μm<sup>36,37</sup> erzeugt wurden. Auch mit diesen Wellenlängen würden OH-Obertonschwingungen angeregt werden. Ein Vergleich der unterschiedlichen Gasbefüllungen des Raman-Shifters zeigt, dass Temperatursprung-Experimente mit allen drei durchgeführt werden können. Durch die geringe Absorption der OH-Obertonschwingung bei 1,54 μm bzw. 1,56 μm, werden nur Proben mit großer Schichtdicke (~ 2 mm) untersucht<sup>33,36</sup>. Da die Absorption von H<sub>2</sub>O bzw. D<sub>2</sub>O dann im für das Protein spezifischen Amid I Bereich zwischen 1600 cm<sup>-1</sup> und 1700 cm<sup>-1</sup> jedoch zu groß ist und Amidbandenänderungen nicht mehr beobachtet werden können, werden bei den 1,54 μm bzw. 1,56 μm induzierten Temperatursprung-Experimenten die Fluoreszenzrelaxationen untersucht. Für geringere Schichtdicken (≤ 100 μm) wird die H<sub>2</sub>-Gas-Befüllung des Raman-Shifters mit einer resultierenden Wellenlänge von 1909 nm verwendet. Um IR-Absorptionen der Peptide und Lösungen untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit die H<sub>2</sub>-Gas-Befüllung des Raman-Shifters verwendet.

Da zum Erzeugen eines Temperatursprunges in H<sub>2</sub>O- oder D<sub>2</sub>O-Lösung nur die Stokes-Linie mit 1909 nm benötigt wird, müssen sowohl die Anti-Stokes-Linien als auch die Nd:YAG-Fundamentale spektral separiert werden. Dafür wird ein dispersives Prisma, ein Pellin-Broca-Prisma, verwendet. Zusätzlich sind die in der Apparatur eingebauten dichroitischen Spiegel (Laser Components, Olching) speziell für 1909 nm reflexiv und transmittieren sichtbares Licht und 1064 nm Strahlung zum größten Teil. Dadurch ist, zusätzlich zum Pellin-Broca-Prisma, eine spektrale Auftrennung der Raman-Linien und die Isolierung der 1909 nm Anregungsfrequenz gegeben. Hinter dem Pellin-Broca-Prisma trifft der Anregungspuls auf einen Strahlteiler (Laser Components, Olching), der ~50 % der Strahlung transmittiert und ~50 % reflektiert. Dadurch wird der Anregungspuls auf zwei Strahlwege mit jeweils etwa gleicher Intensität geteilt. Beide Strahlengänge werden über die bereits genannten dichroitischen Spiegel in die Probenkammer geführt, um die Probe zu erwärmen. Die Energie der Anregungsstrahlung wurde direkt hinter dem Pellin-Broca-Prisma bestimmt und beträgt ~ 50 mJ. Durch die weitere Strahlführung über die dichroitischen Spiegel resultieren aufgrund der nicht 100 %-igen Reflektionseigenschaften jedoch auch Intensitätsverluste. Diese führen dazu, dass einer der verwendeten Strahlwege eine Intensität von ~ 24 mJ und der andere eine Intensität von ~ 21 mJ besitzt. Beide Intensitätswerte wurden am

Probenort bestimmt. Durch die Umlenkung des Anregungsstrahls gehen also ca. 10 % der Energie der 1909 nm Anregungsstrahlung verloren.

Neben der energetischen Aufspaltung der Anregungsstrahlung, wird einer der Strahlengänge zusätzlich um ca. 3 m verlängert. Dadurch erreicht man eine zeitliche Verzögerung der Pulse am Probenort von ca. 10 ns. Es wird also gewährleistet, dass der verzögerte Puls erst dann die Probe erreicht, wenn der nicht verzögerte Puls diese durchdrungen hat. Zusätzlich werden die beiden zeitlich verzögerten Laserpulse von unterschiedlichen Richtungen von vorn und hinten auf die Probe geleitet. Durch die Anwendung dieser entgegen gerichteten Pulse von ungefähr gleicher Intensität ( $\sim 24$  mJ bzw.  $\sim 21$  mJ) wird ein homogeneres Aufheizen durch die Zelle gewährleistet<sup>33,38,39</sup> und Störsignale vermindert. Des Weiteren wird die 1909 nm Strahlung jedes einzelnen, unterschiedliche gerichteten Anregungsstrahls so fokussiert, dass diese die Probe erst durchdringt, bevor sie ihren Brennpunkt erreicht. Damit wird auf einer Fläche von ca. 1 mm Durchmesser in der Probe der Temperatursprung-induziert. Der Durchmesser der Messlichtstrahlung, die auf die Mitte der thermisch angeregten Fläche fokussiert ist, ist dahingegen mit einem Durchmesser von 0,5 mm kleiner. Die Überlappung garantiert ebenfalls eine homogene Ausleuchtung.

Das Ziel der zeitlichen Puls-Verschiebung und der Fokussierung der entgegengesetzten intensitätsgleichen Pulse hinter die Probe ist die Reduzierung von zu hoher Energiedichte innerhalb der Probe und die Homogenisierung der Probenerwärmung. Bei zu hoher Energiedichte kann sonst die Probe zerstört, zumindest jedoch können innerhalb des Lösungsmittels Luftbläschen (engl.: „cavitation“)<sup>7</sup> erzeugt werden, die große Störsignale im Zeitbereich von 0 bis 200  $\mu$ s verursachen und somit die Aufnahme von Absorptionssignalen der Probe verhindern.

Zur Reduzierung von elektronischen Störsignalen, die bspw. durch die Güteschaltung des Nd:YAG-Lasers verursacht werden, wurde um den Detektor ein Faradaykäfig errichtet. Streustrahlung der Anregungsstrahlung 1909 nm, die beim Durchdringen der Probe entsteht, wurde durch Anbringen von Apparturblenden auf dem Strahlweg zwischen Probenort und Detektor minimiert. Aber auch die thermische Schwarzkörperstrahlung, die beim Erwärmen einer Probe entsteht, musste reduziert werden. Dafür wurde ein schmalbandiger Bandpassfilter (Laser Components, Olching), der infrarote Strahlung im Bereich von  $1550\text{ cm}^{-1}$  bis  $1750\text{ cm}^{-1}$  durchlässt, direkt vor dem Detektor platziert. Dadurch lässt sich das thermische Wärmesignal zwar nicht beseitigen, jedoch so stark reduzieren, dass es mit Hilfe einer Leermessung subtrahiert werden kann.

Die Änderung der Schwarzkörperstrahlung entspricht der Änderung der Temperatur z.B. beim Erwärmen einer Probe. Zur Aufnahme dieser Strahlung mit dem hier benutzten HgCdTe-Detektor, muss das Messlicht, das durch die Probe fällt, ausgeblendet werden. Aus diesem Grund wurde zwischen den Bleisalzdioden und der Probe ein optomechanischer Verschluss zum Blockieren des Messlichtes installiert. Dieser besteht aus einer Metallplatte, die an einem Hebel befestigt ist und durch einen Elektromagneten bewegt wird. Dieser Verschluss wird im Folgenden auch als „Shutter“ bezeichnet. Ein Verschluss an dieser Position bewirkt, dass sowohl mit als auch ohne Shutter im Strahlengang bei gleicher Proben temperatur am Detektor immer die gleiche Hintergrund-Wärmestrahlung der Probe gemessen wird, wenn das Messlicht zur Überprüfung abgeschaltet ist. Beim Verschieben des Shutters zwischen Probenort und Detektor würde sonst ein Unterschied in Form einer Intensitätsveränderung (Offsetverschiebung) bemerkbar werden. Diese Offsetverschiebung würde dadurch verursacht, dass einmal die Intensität der Wärmestrahlung der im Strahlweg befindlichen Metallplatte des Shutters detektiert und nach deren Entfernung aus dem Strahlweg eine andere Wärmestrahlung, nämlich die der temperierten Probe gemessen würde. Mit der Positionierung eines optomechanischen Verschlusses an der beschriebenen Stelle (siehe Abbildung 8), kann also das verbleibende, durch den Bandpassfilter nicht vollends beseitigte Wärmesignal bei der Induzierung des Temperatursprunges innerhalb der Probe detektiert werden, wenn das Messlicht ausgeblendet wird. Bei Messung der Intensitätsänderung an einer bestimmten Wellenlänge (also mit eingeblendetem Messlicht) wird sowohl die Transmissionsänderung als auch das überlappende Wärmesignal zusammen gemessen.

Das verwendete Shutter-System besteht neben ihrer mechanischen Komponente zum Blockieren des Messlichtes auch aus einer eigens entwickelten elektronischen Schaltung. Diese ist auf die Taktfrequenz des Nd:YAG-Lasers von 1 Hz abgestimmt und sorgt dafür, dass der Elektromagnet zur Bewegung der Metallplatte synchronisiert zum Laserpuls an- bzw. ausgeschaltet wird. Dafür wird hinter dem Raman-Shifter eine Photodiode positioniert, die auf die Anti-Stokes-Linien reagiert und einen zum Laserpuls synchronen Puls liefert. Dieser Puls wird in die elektronische Schaltung gegeben, um 500 ms verzögert und schaltet anschließend den Elektromagneten an, wodurch die Metallplatte in den Strahlengang bewegt und das Messlicht blockiert wird. Beim nächsten Laserpuls des Nd:YAG-Lasers wird, nach erneut 500 ms Verzögerung, der Elektromagnet wieder ausgeschaltet. Zur Veranschaulichung dieses Schaltrhythmus dient Abbildung 9.



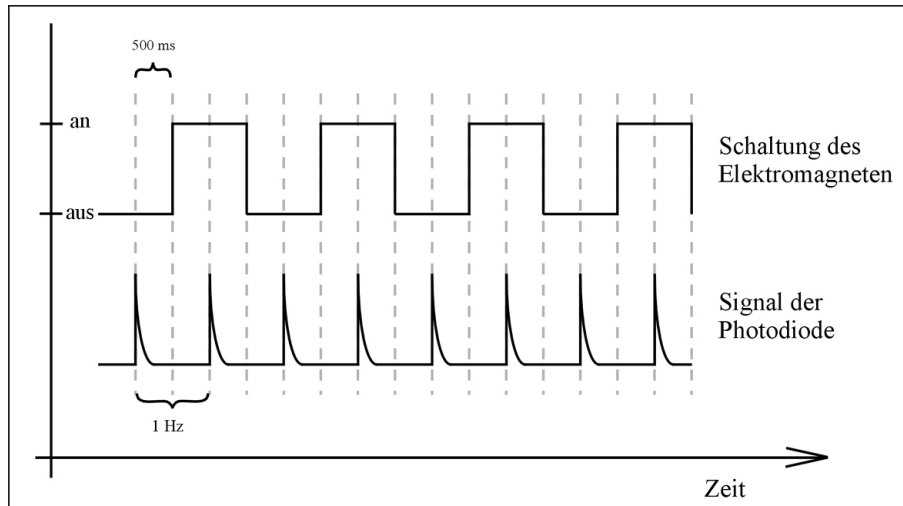


Abbildung 9 : Veranschaulichung der Synchronisierung der einzelnen Komponenten des „Shutter“-Systems. Die Verzögerung zwischen dem Signal der Photodiode und der Schaltung des Elektromagneten wird über eine Elektronik gesteuert. Unten: Zeitabhängiges Signal der Photodiode; Oben: Zeitabhängiges Schalten des Elektromagneten.

Neben dieser Photodiode wird eine zweite bereits erwähnte Photodiode benutzt. Diese zweite Photodiode startet die Datenaufnahme der Transientenrekorderkarte unmittelbar nachdem der Nd:YAG-Laserpuls registriert wurde. Infolgedessen können Signale mit und ohne Messlicht aufgenommen werden. Diese beiden Photodioden synchronisieren somit die Datenaufnahme und das Auslösen der Schaltung des Elektromagneten zum Blockieren des Messlichtes mit der Taktfrequenz des Nd:YAG-Lasers.

Die Datendetektion erfolgt, wie bereits erwähnt, durch eine Transientenrekorderkarte. Die zur Ansteuerung der Karte verwendete Software Insight, v3.50c (IMTEC GmbH, Backnang, Deutschland) speichert die zeitaufgelösten Intensitätssignale in einem binären für diese Software spezifischen Dateiformat (xxx.sdf). Zur weiteren Verwendung der abgespeicherten Daten wurde ein Algorithmus in der Programmiersprache Matlab, Version 7,0 (Release 14, The MathWorks Inc., München) entwickelt, der sowohl die binären Daten in ein ASCII-Format umwandeln, als auch die detektierten Spannungs- in Absorptionssignale umrechnen kann. Der hier benutzte Algorithmus ist im Anhang in Kapitel 7.1.2 wiedergegeben.

Eine Analyse der Signale und die erforderliche Berechnung der Absorptionsänderungen werden im Folgenden beschrieben. Nach dem Gesetz von Lambert-Beer, siehe Gleichung (3), gilt für die Absorption einer Probe für eine feste Wellenlänge:

$$A = -\log \frac{I_P}{I_0} \quad (10)$$

Dabei ist  $I_0$  die Intensität des eingestrahnten Messlichtes mit konstanter Intensität und  $I_P$  die Intensität des Lichtes, die nach dem Durchdringen der Probe noch detektiert wird (siehe Abbildung 4). Werden zwei Absorptionen einer Probe miteinander verglichen, die sich in ihrer Proben temperatur unterscheiden, so hat deren Temperaturunterschied nur Auswirkungen auf die Intensität. Dabei sei  $I_{P1}$  die Intensität der Probe mit Temperatur  $T_1$  und  $I_{P2}$  diejenige mit Temperatur  $T_2$ . Um die Änderungen der Absorption  $A_1$  mit  $T_1$  nach  $A_2$  mit  $T_2$  zu bestimmen, wird die Differenz der Absorptionen berechnet.

$$\Delta A = A_1 - A_2 = -\log \frac{I_{P1}}{I_0} + \log \frac{I_{P2}}{I_0} = \log \frac{I_{P2}}{I_{P1}} \quad (11)$$

Zur Bestimmung des Absorptionsunterschiedes ist demnach die Kenntnis der Messlichtintensität, bevor diese durch die Probe läuft, nicht erforderlich, sofern diese konstant ist. Die unterschiedliche Temperatur der Probe bewirkt eine unterschiedliche Transmission. Beide Intensitäten stehen somit über einen Intensitätsunterschied  $\Delta I$  im Verhältnis zueinander mit:

$$I_{P2} = I_{P1} + \Delta I \quad (12)$$

Damit ergibt sich eine Gleichung zu der Bestimmung des Absorptionsunterschiedes von Temperatur  $T_1$  zu  $T_2$ :

$$\Delta A = \log \left( 1 + \frac{\Delta I}{I_{P1}} \right) \quad (13)$$

Diese Formel zur Berechnung des Absorptionsunterschiedes wird zur Auswertung der experimentell gewonnenen Intensitätstransienten benutzt. Allerdings muss dazu zum Einen der genaue Wert der Intensität durch die Probe  $I_{P1}$  bestimmt werden. Zum Anderen muss die Intensitätsänderung, die nach der Probe durch den Temperatursprung beobachtet wird, ebenfalls genau bestimmt werden.

Aus diesem Grund wurde in der Apparatur der bereits beschriebene optomechanische Verschluss installiert. Dieser ermöglicht es, das Messlicht für jeden Laserimpuls des Anregungslichtes abwechslungsweise an und aus geschaltet wird. Dadurch werden kurz hintereinander zeitabhängige Intensitätsverläufe der Abkühlung einer Probe mit ( $I_{mM}$ ) und ohne ( $I_{oM}$ ) Messlicht aufgenommen. Jede einzelne Transiente wird zu einer weiteren Bearbeitung abgespeichert. Jeweils zwei zeitabhängige, unterschiedliche Intensitätsverläufe

werden kurz hintereinander, innerhalb von zwei Sekunden, aufgenommen. Aus ihnen wird, wie im Folgenden dargestellt, die Absorptionsänderung  $\Delta A$  berechnet.

Die Berechnung der Absorptionsänderung wird mit zwei, innerhalb von 2 Sekunden aufeinander folgenden Intensitätstransienten durchgeführt. Dadurch wirken sich die über mehrere Stunden (3-5 Stunden) beobachteten Intensitätszunahmen der jeweiligen absoluten Messsignale  $I_{mM}$  und  $I_{oM}$ , nicht auf den absoluten Wert der Intensität des Messlichtes aus. Da die Bleisalz-Laserdiode über Stunden eine gleichbleibende Messlichtintensität erzeugt und aber dennoch eine Veränderung der absoluten Messsignale detektiert wird, wird diese Verschiebung den individuellen Eigenschaften des HgCdTe-Detektors zugeschrieben<sup>32</sup>.

Die dargestellte Analyse (Abbildung 10 und Abbildung 11) ist an einer D<sub>2</sub>O Probe mit einer Schichtdicke von 100  $\mu\text{m}$  gezeigt. Die zeitaufgelösten Transienten wurden an einer Wellenlänge von 1638,8  $\text{cm}^{-1}$ , mit einer Anfangstemperatur von 20 °C und mit einer Zeitauflösung von 33 ns gemessen. Die Höhe des Temperatursprunges wird mit 13 °C abgeschätzt (siehe Kapitel 5.1.4).

Nachdem ein Temperatursprung-induziert wurde, werden beide Transienten  $I_{mM}$  und  $I_{oM}$  zur Berechnung der Absorptionsänderung  $\Delta A$  verwendet. In jeder einzelnen Transiente werden einige Intensitätswerte vor dem Ereignis des Temperatursprunges (Zeitverlauf mit negativem Vorzeichen, „Pretrigger“) aufgezeichnet. Diese werden zur Bestimmung der Größe der Intensität des Messlichtes durch die Probe benutzt. In einem Zeitintervall von bspw. -50  $\mu\text{s}$  bis -10  $\mu\text{s}$ , also vor der Induzierung des Temperatursprunges, wird in den jeweiligen Transienten  $I_{mM}$  und  $I_{oM}$  der arithmetische Mittelwert gebildet. Der Mittelwert wird berechnet, um Fluktuationen der Laserstrahlung sowie elektronisches Rauschen des Detektors, die eine exakte Wertbestimmung verhindern, zu reduzieren. Der Intensitätsunterschied der jeweiligen Mittelwerte entspricht der Intensität des Messlichtes durch die Probe  $I_{p1}$ .

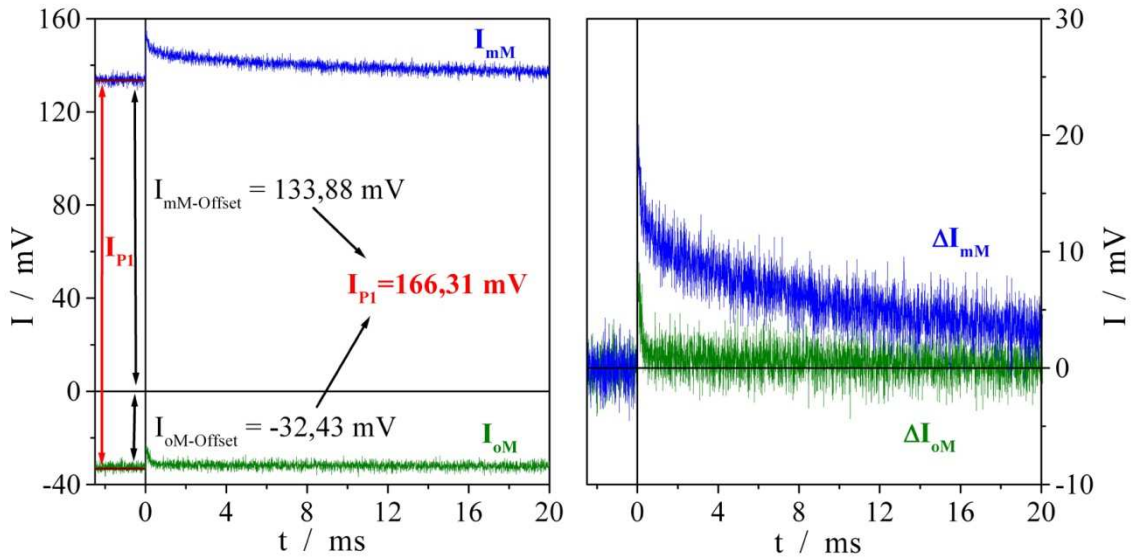


Abbildung 10: Zeitabhängiger Intensitätsverlauf mit  $I_{mM}$  (blau) und ohne  $I_{oM}$  (oliv) Messlicht. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  s wird der Temperatursprung erzeugt. Links: Experimentell gemessene Transienten. Der Unterschied der Intensität zwischen  $I_{mM}$  und  $I_{oM}$  vor dem T-Sprung liefert die Intensität des Messlichtes durch die Probe  $I_{P1}$  bei konstanter Ausgangstemperatur. Rechts: Zeitabhängige Intensitätsverläufe  $\Delta I_{mM}$  und  $\Delta I_{oM}$ , deren Offset auf Null korrigiert wurde.

Die dargestellten Intensitätsverläufe  $I_{mM}$  und  $I_{oM}$  (Abbildung 10, links) werden anschließend um ihren jeweiligen, auf dem begrenzten Zeitintervall berechneten Mittelwert, der hier als „offset“ bezeichnet wurde, verschoben. Die daraus resultierenden Transienten werden als  $\Delta I_{mM}$  und  $\Delta I_{oM}$  bezeichnet. Durch den Abzug des Intensitätsverlaufes ohne Messlicht  $\Delta I_{oM}$ , der durch die detektierbare Wärmestrahlung auftritt, vom Intensitätsverlauf mit Messlicht  $\Delta I_{mM}$ , an dem sich wellenlängenspezifisch die Änderungen in der Probe verfolgen lassen, lässt sich Gleichung (13) umschreiben zu:

$$\Delta A = \log \left( 1 + \frac{\Delta I_{mM} - \Delta I_{oM}}{I_{P1}} \right) \quad (14)$$

Mit dieser Gleichung kann die Absorptionsänderung  $\Delta A$  (siehe Abbildung 11) einer Probe bestimmt werden, die dann unabhängig von der Intensität des Messlichtes ist.

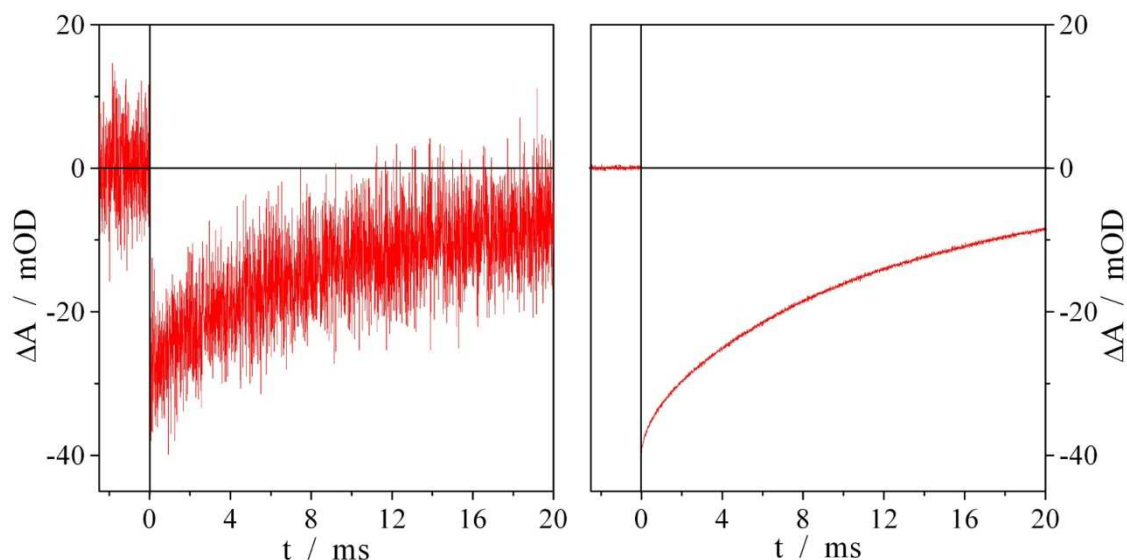


Abbildung 11: Zeitaufgelöste Absorptionsänderung  $\Delta A(t)$  von  $D_2O$  berechnet nach Gleichung (14). Links:  $\Delta A(t)$  bestimmt aus den beiden Intensitätstransienten von Abbildung 10, einer einzigen Sequenz von  $\Delta I_{mM}$  und  $\Delta I_{oM}$ . Rechts: Gemittelte zeitaufgelöste Abkühlungsdynamik aus 2000 einzelnen Absorptionstransienten.

Aus der Sequenz der beiden zeitaufgelösten Intensitätsverläufe mit und ohne Messlicht wird eine Transiente der zeitaufgelösten Absorptionsänderung berechnet. Für eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses werden ca. 2000 einzelne zeitaufgelöste Absorptionstransienten bei der jeweils ausgewählten Wellenlänge und Ausgangstemperatur gemittelt. Das entspricht 4000 sequentiell und in alternierender Reihenfolge aufgenommenen Intensitätssignalen, mit ( $\Delta I_{mM}$ ) und ohne ( $\Delta I_{oM}$ ) Messlicht.

Um die Anfangstemperatur eines Temperatursprung-Experimentes einer Probe zu verändern, wird die Probe in einem thermostatisierten Probenhalter (siehe Abbildung 6) platziert, der mit einem Wasserbad verbunden ist. Bei der Durchführung des Experimentes muss darauf geachtet werden, dass sich die Probe vor dem Induzieren des T-Sprunges im thermischen Gleichgewicht bei der gewählten Anfangstemperatur befindet.

Peptid- oder Proteinproben, die mittels der Temperatursprung-Apparatur untersucht werden sollen, müssen in wässriger Lösung oder Suspension vorliegen, um Oberschwingungen des Lösungsmittels durch den Anregungspuls mit einer Wellenlänge von 1909 nm anzuregen. In den zeitaufgelösten Absorptionstransienten sind neben der Peptiddynamiken deshalb auch Lösungsmittelbeiträge beobachtbar. Um die Dynamik der Peptide untersuchen zu können,

müssen deshalb die Lösungsmittelbeiträge abgezogen werden. Zum Abzug benutzen einige Forschergruppen<sup>9,11,40</sup> komplette zeitaufgelöste Transienten des jeweiligen Lösungsmittels bei identischen Versuchsbedingungen, wie gleicher Wellenlänge, gleicher Anfangstemperatur und gleicher optischer Weglänge. Die Gruppe um Volk et al.<sup>13</sup> modellieren ihre zeitaufgelösten Absorptionsänderungen mit einer mono-exponentiellen Zerfallsfunktion und ziehen diese Funktion von ihren experimentellen Peptiddynamiken ab. Diese Art der Anpassungsfunktion, die auf die Lösungsmitteltransiente angewandt wird, ist jedoch auf wenige Mikrosekunden begrenzt. Auf längeren Zeitskalen erscheint der Abkühlprozess des Lösungsmittels stark nicht-exponentiell<sup>13</sup>. Dieser nicht-exponentielle Verlauf kann durch die Wärmediffusion des die erwärmte Probe umgebenden Materials wie bspw. die CaF<sub>2</sub>-Fenster oder die nicht erwärmte Probe erklärt werden (siehe Kapitel 5.1.4).

Die hier verwendete mathematische Funktion zur Beschreibung des zeitlichen Intensitätsverlaufes wurde auf einem Zeitintervall von 500 ns bis 180  $\mu$ s angepasst. Sie beschreibt sowohl das Abkühlen des Lösungsmittels D<sub>2</sub>O als auch die Peptiddynamik mit einer bi-exponentiellen Zerfallsfunktion. Die unterschiedlichen exponentiellen Beiträge können anschließend aufgrund ihrer Zerfallszeit den Probenkomponenten zugeordnet werden. Das Zeitintervall direkt nach dem Temperatursprung  $t = 0$  sec bis zu 500 ns ist noch von elektronischen und optischen Störungen überlagert, die somit eine direkte Beobachtung von Peptiddynamiken in diesem Zeitbereich verhindern.

### **Bleisalz-Laserdioden, die verwendete IR-Laser-Quelle**

Halbleiterlaser auf der Basis von halbleitenden Verbindungen der Elemente Blei, Zinn, Schwefel, Selen und Tellur, die als Blei- (Zinn-) Chalkogenide bezeichnet werden, sind von großem Interesse für die Peptid- und Protein-IR-Spektroskopie, da sie Strahlung im mittleren Infrarotbereich zwischen 3  $\mu$ m und 30  $\mu$ m emittieren. Bleisalz-Laserdioden sind ähnlich aufgebaut wie konventionelle p-n-Injektionslaser.

Wird ein stark dotierter n-Halbleiter in engen Kontakt mit einem p-Halbleiter gebracht und in Durchlassrichtung Strom angelegt, so können Elektronen und Löcher in der Grenzschicht (wenige  $\mu$ m dick) rekombinieren. Die Rekombinationsenergie wird in Form von Licht ausgestrahlt. Der Spektralbereich der spontanen Emission kann durch die geeignete Wahl des Halbleitermaterials und der jeweiligen Dotierung beeinflusst werden. Die Laserintensität

eines Halbleiters nimmt oberhalb eines materialspezifischen Schwellstromes mit dem Strom stark zu. Unterhalb dieser Grenze erhält man vorwiegend spontane Emission großer spektraler Breite. Oberhalb dieser Schwellstromgrenze ist das emittierte Licht viel stärker gerichtet und die spektrale Breite ist wesentlich schmäler. Bei der Erzeugung der induzierten Emission ist die Ausbreitung der Laserstrahlung innerhalb des Halbleiters senkrecht zur Ebene des p-n-Überganges größer als die Dicke der aktiven Schicht. Da das Licht aus einer wenige  $\mu\text{m}$  breiten Zone ( $20 - 50 \mu\text{m}$ ) emittiert wird, erfolgt die Abstrahlung des Lichtes in einem stark divergenten Kegel mit einem Öffnungswinkel von bis zu  $50^\circ$ <sup>41</sup>. Senkrecht zu der aktiven Zone des Lasers ist der Öffnungswinkel geringer, was zu einem ellipsenförmigen Intensitätsprofil des Laserstrahls führt<sup>42</sup>.

Die Bleisalz-Laser können nur bei tiefen Temperaturen  $T < 150 \text{ K}$  betrieben werden. Bei einer gegebenen Zusammensetzung des Halbleiters können zur Wellenlängendurchstimmung alle möglichen Parameter ausgenutzt werden, die den Energieabstand zwischen den Energieniveaus der p- und n-Halbleiter ändern. Für die verwendeten Bleisalz-Laser wurde eine Temperaturänderung des Diodenmaterials über einen mit flüssigen Stickstoff gekühlten „Kühlfinger“ mit einer Abstimmbarkeit von  $< 1$  bis  $4 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$  benutzt, und zusätzlich eine Feinabstimmung mittels Variation des Diodenstromes gewählt, um eine Wellenlängenschiebung zu bewirken. Um die Dioden auf diese tiefen Temperaturen von unter  $100^\circ \text{K}$  abzukühlen, sind diese in einem Dewar eingebaut. Der Dewar wird mit flüssigem Stickstoff ( $T \sim 77 \text{ K}$ ) gekühlt. Durch den Stickstoff und ein Heizelement wird die benötigte Temperatur an der Diode eingestellt. Am Dewar ist schließlich vor der Diode ein Infrarot-durchlässiges Fenster angebracht, durch das die Laserstrahlung ausgekoppelt wird. Der in dieser Arbeit benutzte Bleisalz-Laser wurde im Dauerstrom (cw: continuous wave) betrieben. Eine schematische Darstellung des Lasers ist in Abbildung 12 wiedergegeben. Da der größte Teil des abgebildeten Diodenlasers den Kühlkörper darstellt, wird der Halbleiter separat vergrößert schematisch veranschaulicht. Bei der Montage des Bleisalz-Lasers wird der Halbleiter mit einem Streifenkontakt und einem Kupferblockkontakt, der Wärmesenke bzw. einem Kühlstift, über eine weiche Indiumschicht mit beiden Materialien kontaktiert, elektrisch verbunden. Diese Indiumschicht ist notwendig, um Spannungen im Bleisalz-Kristall beim Abkühlen bzw. Aufwärmen zu verhindern. Mittels Doppelheterostruktur der Bleisalz-Laserdiode, bei der mehrere Schichten unterschiedlichen Halbleitermaterials mit unterschiedlichen Brechungsindices benutzt werden, wird die aktive Zone, in der die Emission entsteht, eng begrenzt und

zusätzlich die vertikale Laserintensität stark eingengt. Das führt dazu, dass sowohl höhere Ladungsträgerkonzentrationen als auch Betriebstemperaturen erreicht werden können. Dadurch wird außerdem eine drastische Reduktion der Schwellstromdichte erreicht.

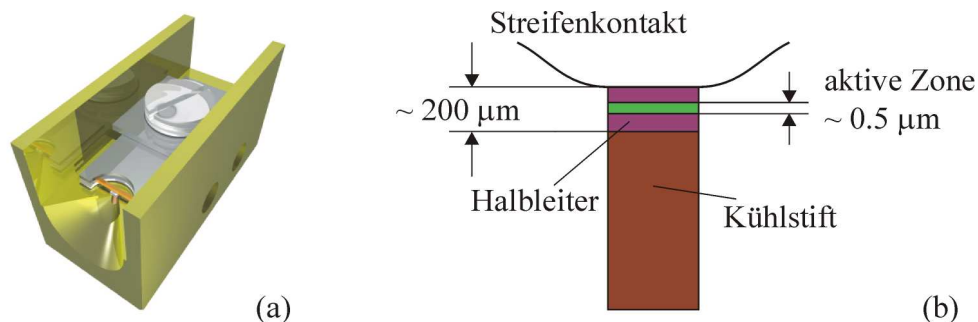


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Bleisalz-Laserdiode. Links: Nachbildung der Bleisalz-Laserdiode in ihrem Kühlkörper. Die Abmessungen des Kühlkörpers betragen  $15 \times 6,5 \text{ mm}$ , Rechts: Skizze der Montage des Halbleiters.

Durch die Temperaturabstimmung ist jedoch keine kontinuierliche Wellenlängenabstimmung möglich, da sowohl der Brechungsindex des Materials als auch der Energieabstand und die damit verbundene Resonatorlänge temperaturabhängig sind<sup>43</sup>. Bei der Temperaturänderung wird im Wesentlichen das Verstärkungsprofil entlang der Frequenzachse verschoben. Es schwingt dabei immer diejenige Resonatoreigenmode an, die die höchste Verstärkung erfährt. Durch simultanes Verschieben von Verstärkung und Eigenfrequenz des Resonators würde immer die gleiche Mode oszillieren. Für ein solches Szenario wäre eine kontinuierliche Wellenlängenabstimmung möglich. Die Resonatoreigenfrequenzen verschieben sich bei Temperaturänderung jedoch nur um wenige Bruchteile der longitudinalen Moden. Das Maximum des Verstärkungsprofils verschiebt sich aber wesentlich stärker als die Resonatorfrequenz. Somit wird bei der Temperaturabstimmung eine benachbarte Mode eine größere Verstärkung erfahren und die Laseroszillation auf diese Mode springen (engl.: „mode jumping“). Der kontinuierliche Abstimmbereich einer einzelnen Mode ist sehr klein und liegt im Bereich von maximal  $5 \text{ cm}^{-1}$ .

Um die Emissionseigenschaften einer Laserdiode zu überprüfen, wurden Modenkarten bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Für jeweils eine feste Temperatur der Dioden wird dazu der Diodenstrom schrittweise variiert. Zu jedem Stromwert wird ein Emissionsspektrum aufgenommen. In einer zweidimensionalen Darstellung der Modenkarte kann dann



der Intensitätsverlauf der Moden abgelesen werden. Je nach Form des Verstärkungsprofils ist das Anschwingen mehrerer Moden möglich. Bei einer bestimmten Temperatur und einem bestimmten Injektionsstrom wird Licht verschiedener Wellenlängen emittiert. Durch die Verwendung eines Monochromators können die auftretenden Nebenmoden unterdrückt werden und die Emission der Diode spektral präzise bestimmt werden. Eine so experimentell bestimmte Modenkarte ist exemplarisch in Abbildung 13 (links) dargestellt. Das beigefügte Modenprofil (Abbildung 13, rechts) verdeutlicht die Notwendigkeit der Verwendung eines Monochromators, um die Nebenmoden zu unterdrücken.

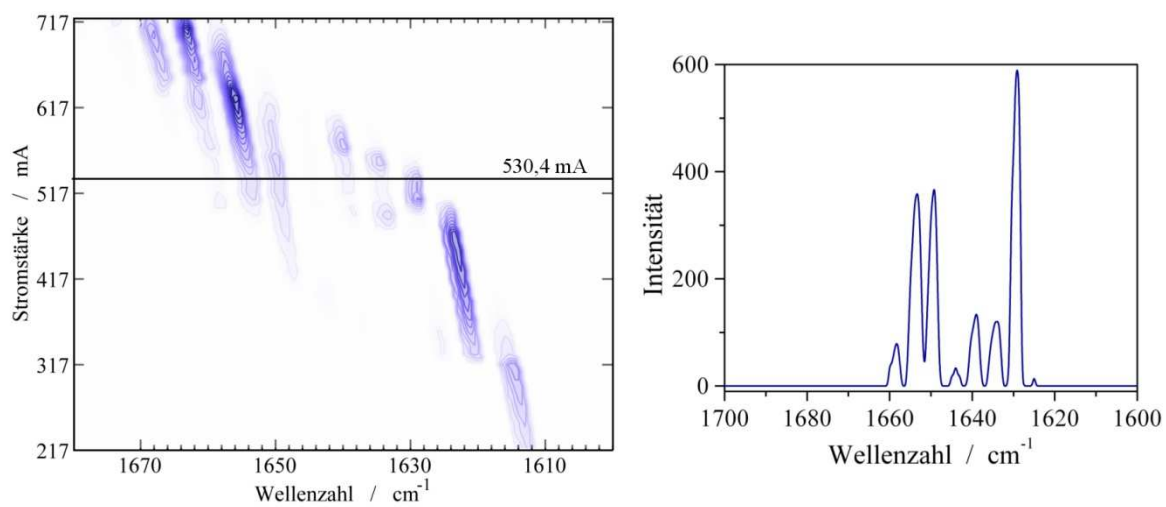


Abbildung 13: Experimentell bestimmte Modenkarte der verwendeten Bleisalzlaserdiodenode. Bei einer festen Temperatur ( $\sim 95\text{ K}$ ) wird der Diodenstrom variiert. Mit einem Monochromator wurde das spektrale Emissionsverhalten der Diode bestimmt. Links: Modenkarte, durch die unterschiedliche Farbintensität wird Stärke der Lasermoden der Diode in Abhängigkeit des angelegten Stromes und der Wellenlänge veranschaulicht. Rechts: Modenprofil, Intensität der Moden in Abhängigkeit der Wellenlänge bei einer Stromstärke (530,4 mA).

## 2.4 Circular-Dichroismus-Spektroskopie

Das im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stehende kommerzielle erhältliche Circular-Dichroismus-Spektralpolarimeter (J-720, Jasco, Tokio) wurde mit einem ähnlichen temperierbaren Probenhalter ausgestattet, wie dieser bereits bei den in Kapitel 2.2 erwähnten FTIR-Messungen zu Einsatz kommt. Eine automatisierte Ansteuerung konnte mit Hilfe der von der Firma Jasco bereitgestellten Software (Spectra Manager) realisiert werden, die ein Wasserbad (F25 & ME, Julabo, Seelbach) ansteuert.

Bei der Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) wird die Polarisation von Licht ausgenutzt. Linear polarisiertes Licht besteht aus der Überlagerung von rechts- und links-zirkular polarisiertem Licht. In optisch aktiven Substanzen ist die Lichtgeschwindigkeit für rechts- und links-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich groß. Nach dem Durchlaufen einer solchen Substanz tritt eine Polarisationskomponente gegenüber der anderen verzögert auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine optisch aktive Substanz für unterschiedliche Polarisierungen des Lichtes unterschiedliche Brechungsindices  $n_L$  und  $n_R$  besitzt. Zusätzlich zu dieser Eigenschaft wird bei der Circular-Dichroismus-Spektroskopie die unterschiedliche Absorption der rechts- und links-zirkular polarisierten Komponente ausgenutzt. In Anlehnung an die molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon$  werden die Absorptionskoeffizienten für rechts- und links-zirkular polarisiertes Licht ( $\epsilon_L$  und  $\epsilon_R$ ) unterschieden. In der CD-Spektroskopie wird deren Differenz  $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$  gemessen und als Elliptizität  $\theta$  angegeben.

$$\theta(\lambda) = \text{const.} \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot d \quad (15)$$

Dabei bezeichnet  $d$  die Schichtdicke der Küvette und  $c$  die Konzentration der Probe. Die Abhängigkeit der Elliptizität  $\theta$  von der Wellenlänge  $\lambda$  wird als CD-Spektrum aufgezeichnet.

Die wichtigste Anwendung der CD-Spektroskopie ist die Analyse von Proteinsekundärstrukturen. Diese werden in einem Spektralbereich von 160 bis 250 nm untersucht. In diesem Spektralbereich liegen die elektronischen  $n \rightarrow \pi^*$  und die  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergänge<sup>7</sup> der Peptidbindung, die im Absorptionsspektrum nur schwach und vor allem überlappt vorliegen.

---

<sup>7</sup> Die elektronischen Übergänge werden nach den beteiligten Molekülorbitalen klassifiziert. Im Grundzustand werden  $\sigma$ -,  $\pi$ - und  $n$ -Orbitale unterschieden. Besetzte einfachbindende  $\sigma$ -Orbitale bilden Einfachbindungen und besetzte  $\pi$ -Orbitale die Mehrfachbindungen eines Moleküls. Bei Heteroatomen wie Stickstoff oder Sauerstoff kommen nichtbindende  $n$ -Orbitale vor, die von einsamen Elektronenpaaren besetzt werden. Von diesen Orbitalen des Grundzustandes kann ein Elektron in die leeren antibindenden Orbitale des angeregten Zustandes angehoben werden. Die energetisch hochliegenden  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ - und  $n \rightarrow \sigma^*$ -Übergänge sind für die Spektroskopie von Biomolekülen nicht von Interesse, sondern die mit hoher Wahrscheinlichkeit auftretenden  $\pi \rightarrow \pi^*$ - und die energetisch am niedrigsten liegenden  $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge<sup>44</sup>.

Aufgrund der Chiralität, also unterschiedlichen Orientierung der Drehspiegelachsen dieser Strukturen, ist aber das CD-Spektrum eines Peptids besonders empfindlich für seine Sekundärstruktur. Beispielhafte Spektren eines Peptids mit unterschiedlicher Sekundärstruktur sind in Abbildung 14 dargestellt.

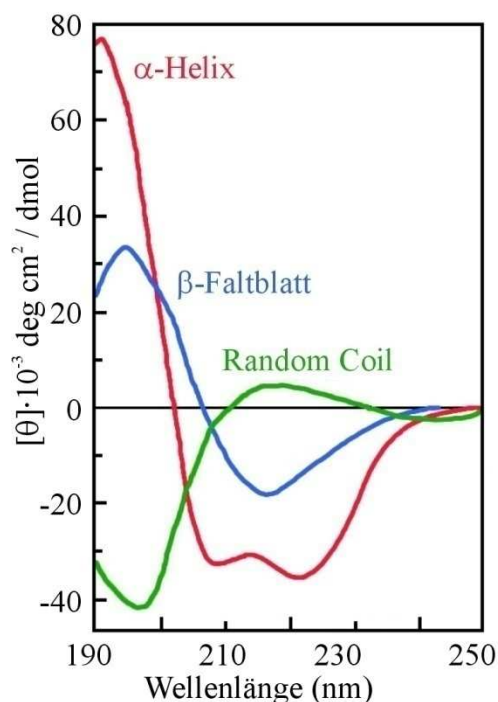


Abbildung 14: Circular-Dichroismus-Spektren von Poly-L-Lysin in  $\alpha$ -helikaler,  $\beta$ -Faltblatt und ungeordneter Knäuel-Konformation (nach Greenfield et al.<sup>45</sup>)

Die unterschiedliche Form der Absorptionsbanden ermöglicht eine Unterscheidung der jeweiligen Sekundärstrukturen (siehe auch Kapitel 3.1.1). So kann ungeordnete Struktur (Knäuelstruktur<sup>8</sup>) aufgrund der positiven Absorptionsbande bei 212 nm und negativen Bande bei 195 nm identifiziert werden.  $\beta$ -Faltblattstrukturen besitzen hingegen eine negative Bande bei 218 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) und eine positive Bande bei 196 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ). Die am deutlichsten ausgeprägte Spektrenform resultiert von der  $\alpha$ -Helix. Diese Sekundärstruktur besitzt eine negative Bande bei 222 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ) und eine zweite negative Bande bei 206 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Des Weiteren gehört zur Spektrengestalt einer  $\alpha$ -Helix eine positive Bande bei 196 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Die in Abbildung 14 dargestellten Spektren zeigen jedoch klar definierte Sekundärstruktur-motive eines Polypeptides aus einer Aneinanderreihung jeweils einer einzelnen Aminosäure

<sup>8</sup> Die Knäuelstruktur wird im Folgenden auch als „random coil“ Konformation bezeichnet.

(Poly-L-Lysin). Für ein gesamtes Protein, das unterschiedliche Sekundärstruktur motive beinhaltet, kann jedoch eine Überlagerung der dargestellten Spektren beobachtet werden.

### 3 BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN

#### 3.1 Proteine

Proteine sind biologische Makromoleküle, die mannigfaltige Aufgaben und Funktionen besitzen. Sie dienen beispielsweise zur Katalyse von Reaktionen, können Transport- und Speicherungsfunktionen besitzen, werden in biologischen Systemen als Stütz- und Gerüstbausteine benutzt oder übernehmen spezielle Aufgaben wie die Immunabwehr oder die Detektion von Licht als Signalrezeptoren.

Alle Proteine sind aus den gleichen Grundbestandteilen aufgebaut, den über Peptidbindungen miteinander verbundenen Aminosäuren. Es gibt 20 unterschiedliche natürliche Aminosäuren, deren Seitenketten sich z.B. bezüglich Größe, Ladung und Polarität unterscheiden und die durch ihre jeweilige Eigenschaft für die einzigartige Funktion der nativ gefalteten Polypeptidkette verantwortlich sind.

##### 3.1.1 Hierarchie des Strukturaufbaus

Die Struktur der Proteine wird auf vier Ebenen charakterisiert. Man unterscheidet die Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Als Primärstruktur wird die Sequenz der Aminosäuren des Proteins bezeichnet. In der hierarchisch nächst höheren Ebene werden lokale Struktur motive dieser Aminosäurekette als Sekundärstruktur zusammengefasst. Beispiele dafür sind  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter, Schleifen (Turns) oder ungeordnete Knäuel („Random Coil“). Eine weitere in dieser Arbeit untersuchte Struktur ist das  $\beta$ -Hairpin. Diese Struktur besteht aus einer einzigen Aminosäuresequenz, die zwei antiparallele Stränge bildet, die über einen Turn miteinander verbunden sind. Die Verbindung der Sekundärstruktur motive und ihre räumliche Anordnung zueinander wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Bestehen Proteine aus mehreren Polypeptidketten, so ordnen sich diese als Untereinheiten eines größeren Proteinkomplexes an. Die Anordnung der Untereinheiten definiert die Quartärstruktur.

### 3.1.2 Infrarot-Absorptionsspektren von Proteinen

Aufgrund der großen Anzahl von Normalschwingungsmoden in einem Polypeptid werden die Schwingungen in sogenannte Gruppen- und Gerüstschwingungen unterteilt. Dabei werden die Annahmen gemacht, dass ein Molekül in einzelne Gruppen und Bindungen zerlegt wird, die in erster Näherung voneinander unabhängig schwingen können. Jede Gruppe oder Bindung schwingt aufgrund der Atommassen und Kraftkonstanten mit einer typischen Frequenz in verschiedenen Moden und kann deswegen im Infrarotspektrum in einem bestimmten Bereich lokalisiert werden. Innerhalb dieser Bereiche ist die Schwingungsfrequenz dieser Gruppe dann abhängig von der Anbindung an den Rest des Moleküls. Bei Proteinen liefern folgende Schwingungsmoden Beiträge zum Infrarotspektrum:

- Polypeptidrückgrat
- Aminosäureseitenketten
- eventuell vorhandene Cofaktoren
- Lösungsmittelbeiträge (z.B. Detergens, Lipide, Wasser)

Das Polypeptidrückgrat der sich repetierenden Peptidgruppe trägt im IR-Absorptionsspektrum eines Proteins am stärksten zu den Absorptionsbanden bei. Deren Schwingungsmoden werden als Amidbanden bezeichnet und sind in einer Übersicht in Tabelle 4 zusammengestellt.

Bezeichnung	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$	Zusammensetzung
Amid A	~ 3300	$\text{NH}_s$ (100 %)
Amid B	~ 3100	$\text{NH}_s$ (100 %)
Amid I	~ 1650	$\text{CO}_s$ (~80 %), $\text{CN}_s$ , $\text{CCN}_d$
Amid II	~ 1550	$\text{NH}_{ib}$ (~ 60 %), $\text{CN}_s$ (~ 40 %)
Amid III	~ 1300	$\text{CN}_s$ (40 %), $\text{NH}_{ib}$ (30 %), $\text{CC}_s$ (30 %)

Tabelle 4: Schwingungsmoden der Peptidbindung<sup>30,46-48</sup>.

Von diesen Schwingungsmoden lässt sich vor allem die Amid I Mode, die hauptsächlich aus der C=O-Streckschwingung hervorgeht, für die Analyse der Sekundärstruktur verwenden. Durch verschiedene Verfahren, wie z.B. Bildung der zweiten Ableitung oder Bandenzerlegung (engl.: „deconvolution“) lassen sich verschiedene Beiträge von Sekundärstruktur-

elementen bestimmen. Einen Überblick über diese verschiedenen spektralen Bereiche, in denen die einzelnen Strukturen absorbieren, gibt Tabelle 5.

Sekundärstruktur	Bandenposition in D <sub>2</sub> O / cm <sup>-1</sup>	
	Durchschnittswert	Absorptionsbereich
α-Helix	1652	1642-1660
β-Faltblatt	1630	1615-1638
	1679	1672-1694
Turns	1671	1653-1691
Ungeordnete Struktur	1645	1639-1654

*Tabelle 5: Bandenzuordnung der Sekundärstrukturelemente im Amid I Bereich in D<sub>2</sub>O Lösung basierend auf experimentellen Daten (nach Goormaghtigh, E. et al.<sup>49</sup>).*

Diese Zuordnung kann jedoch nur als grobe Orientierung zur Interpretation der unterschiedlichen Absorptionsbanden dienen. Beispielsweise wurden von Gooding et al.<sup>12</sup> Absorptionsbanden kleiner α-helikaler, auf Alaninen basierender Peptide, die in D<sub>2</sub>O gelöst wurden, bei einer Position von 1630 cm<sup>-1</sup> identifiziert. Die beobachtbare Aufspaltung der Absorptionsbanden der β-Faltblattstruktur resultiert aus einer Übergangsdipolmomentkopplung (engl.: „transition dipole coupling“)<sup>46,48</sup>. Dennoch ist im Absorptionsspektrum ein Trend zwischen aggregiertem und nativem β-Faltblatt erkennbar. Absorptionsbanden eines β-Faltblattes mit einer niederfrequenten Bande ~1620 cm<sup>-1</sup> und einer hochfrequenten Bande bei ~1685 cm<sup>-1</sup> können mit einer aggregierten Proteinstruktur assoziiert werden, wohingegen bei einer nativen β-Faltblattstruktur die niederfrequente Absorption bei ~1630 cm<sup>-1</sup> liegt<sup>50-52</sup>.

### 3.1.3 Energieterme zur Stabilisierung der gefalteten Polypeptidstruktur

Zur Stabilität und Faltung der Polypeptidkette zur nativen funktionsfähigen Struktur tragen unterschiedliche Energieterme bei. Elektrostatische Wechselwirkungen beeinflussen am meisten langreichweitige Wechselwirkungen mit anderen Proteinen. Van-der-Waals-Wechselwirkungen sind hauptsächlich an der Stabilisierung der Proteinstruktur beteiligt. Auch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen von unpolaren Aminosäureseitengruppen spielen dabei eine Rolle.

### 3.1.4 Faltungsmodelle

Wie bereits erwähnt, wird die Proteinstruktur durch nicht kovalente Wechselwirkungen – Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische-, van-der-Waals und hydrophobe Wechselwirkungen – zusammengehalten. Jede einzelne dieser Wechselwirkungen hat nur einen kleinen Anteil an der Stabilität der Proteinstruktur, jedoch wird durch die große Anzahl dieser Wechselwirkungen die hohe Stabilität der gefalteten Struktur erreicht. Die Energie des gefalteten Zustandes ist größer als die Summe der Energien der beteiligten schwachen Wechselwirkungen.

Um die Faltung eines Proteins zu beschreiben, wurden einige theoretische Faltungsmodelle vorgeschlagen (siehe auch Abbildung 1).

Dabei argumentierte bereits Levinthal 1968, dass eine willkürliche Suche nach der nativen Faltungsstruktur durch alle möglichen Strukturen selbst für sehr kleine Proteine eine unrealistisch lange Zeit benötigen würde (Levinthal-Paradoxon). Diese lange Faltungszeit widerspricht jedoch den experimentell beobachteten Faltungsdynamiken. Dementsprechend wird der Faltungsprozess nicht durch eine willkürliche Suche, sondern durch andere Prozesse gesteuert.

1961 wurde unter anderem durch Lifson et al.<sup>53</sup> versucht, die Faltung durch ein Modell, die „Helix-Knäuel Theorie“, zu beschreiben. Darin wird das Zusammenwirken zwischen Nachbarn einer Polypeptidkette beschrieben. Ein Residuum hat demnach eine höhere Neigung in einer helikalen Konformation zu sein, wenn bereits sein Nachbar innerhalb der Sequenz in einer helikalen Anordnung ist. Wenn einmal einige benachbarte Aminosäuren eine helikale Konformation durch ein Zufallsereignis angenommen haben, kann sich dadurch eine Helix schnell bilden. Das „framework model“<sup>2,54,55</sup> beschreibt einen schrittweisen Mechanismus, um die Konformationssuche anzunähern. Es beinhaltet einen hierarchischen Zusammenbau, wobei lokale Sekundärstrukturelemente je nach ihrer Primärsequenz, jedoch unabhängig von der Tertiärstruktur, gebildet werden. Die Sekundärstrukturelemente breiten sich aus bis sie aneinander stoßen und verbinden sich dann, um die Tertiärstruktur auszubilden. Ein anderes Faltungsmodell, das „nucleation model“<sup>2,55-57</sup>, beschreibt den Ablauf des Prozesses als Bildung der Tertiärstruktur als sofortige Konsequenz der Bildung der Sekundärstruktur. Dabei findet die Bildung der Sekundärstrukturelemente über die Ausbildung von „Sekundärstruktur-Keimen“ von nur wenigen beteiligten Residuen (z.B. ein



$\beta$ -turn oder eine erste Schleife einer  $\alpha$ -Helix) statt. Die gesamte Sekundärstruktur bildet sich dann aus diesen Keimen heraus. Die Hypothese des „hydrophobic collapse model“ besteht darin, dass sich die native Proteinkonformation durch die Neuordnung einer kompakten zusammengefallenen Struktur, dem „molten globule“, bildet. Dieser hydrophobe Zusammenbruch, um den „molten globule“-Zustand auszubilden, stellt somit einen frühen Schritt im Faltungsweg dar.

Der Vergleich der Modelle zeigt, dass sowohl im „framework model“ als auch im „hydrophobic collapse model“ die Bildung eines kinetischen Zwischenzustandes beschrieben werden kann, wohingegen dieses Entstehen nicht durch das „nucleation model“ erklärt werden kann.

Alle beschriebenen Modelle haben jedoch gemeinsam, dass der limitierende Schritt für die Faltungsraten mit der Entstehung der Sekundärstrukturelemente verknüpft ist. Durch die genaue Kenntnis der Dynamik der Ausbildung der einzelnen Strukturen, wie  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt, wäre eine Beschreibung der Faltung des gesamten Proteins möglich. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Faltung von Modellsystemen, die explizit nur aus diesen Sekundärstrukturelementen bestehen, von entscheidender Bedeutung.

### 3.1.5 Zwei-Zustandsmodell der Faltung

Eine Faltungsreaktion eines Proteins kann im einfachsten Fall durch ein Zwei-Zustandsmodell beschrieben werden. Dabei gibt es den nativen Ausgangszustand  $i$ , in dem das Protein funktionsfähig eine bestimmte Faltungsstruktur einnimmt und den denaturierten Endzustand  $f$ , in dem das Protein nicht mehr funktionsfähig ist und eine andere Faltungsstruktur als im nativen Zustand besitzt. Die Geschwindigkeit der Ausbildung eines Produktes ( $k_{i \rightarrow f}$ ) bei einer Faltungsreaktion, wie sie in Abbildung 15 dargestellt wird, kann durch die Gleichung (16) mathematisch beschrieben werden:

$$k_{i \rightarrow f} = (k_B T / h) \cdot \exp(-\Delta G_{i-f} / RT) \quad (16)$$

Dabei ist  $k_B = 1.3807 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$  die Boltzmannkonstante,  $h = 6,6261 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$  die Planck'sche Konstante,  $T$  die absolute Temperatur in Kelvin,  $R = 8,3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  die molare Gas-konstante und  $\Delta G_{i-f}$  die freie Aktivierungsenergie.

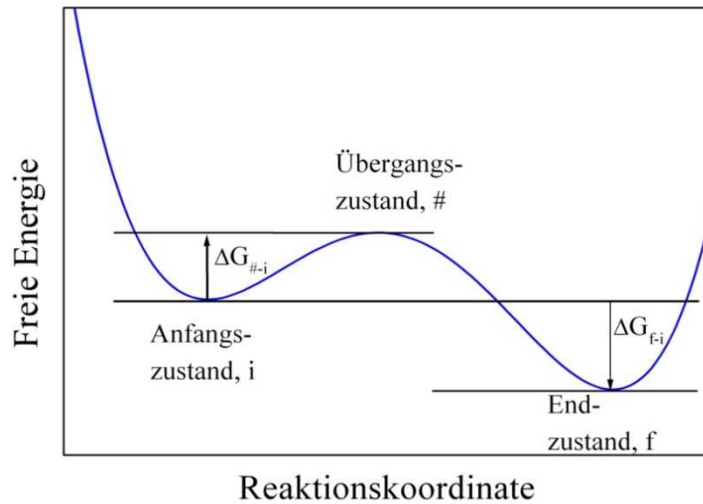
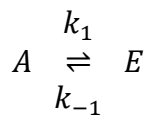


Abbildung 15: Übergangszustandsmodell, Der Übergangszustand besitzt die höchste Energie entlang des Reaktionspfades der vom Anfangszustand (Grundzustand) zum Endzustand (Produkt) führt. Die Höhe der Übergangszustandsbarriere bestimmt die Größe der Reaktionsgeschwindigkeit des Überganges (nach Nölting B. et al.<sup>58</sup>).

Die Änderung der freien Gibbs-Energie,  $\Delta G_{f-i}$ , steht im Zusammenhang mit der Gleichgewichtskonstanten der Reaktion,  $K_{f-i}$ , dem Gleichgewichtsverhältnis von End- zu Ausgangsprodukt durch die Relation:

$$\Delta G_{f-i} = \Delta H_{f-i} - T\Delta S_{f-i} = -RT \cdot \ln(K_{f-i}) \quad (17)$$

Dabei ist  $\Delta H_{f-i}$  die Änderung der Enthalpie und  $\Delta S_{f-i}$  die Änderung der Entropie der Reaktion. Um die Ratengleichung eines reversiblen Zwei-Zustandsüberganges zwischen den Zustand A und E herzuleiten, dient das folgende Reaktionsmodell:



Die Zerfallsgeschwindigkeit eines Ausgangszustandes A ist proportional zur Anzahl der Ausgangszustände. Umgekehrt gilt auch, dass die Zerfallsgeschwindigkeit der Produkte E (Endzustände) proportional zu den Endzuständen ist:

$$\frac{d[E]}{dt} = k_1 \cdot [A] - k_{-1} \cdot [E] \quad (18)$$

$$\frac{d[A]}{dt} = k_{-1} \cdot [E] - k_1 \cdot [A] \quad (19)$$

Dabei werden mit  $[A]$  und  $[E]$  die Konzentrationen von A und E,  $k_1$  die vorwärtsgerichtete Reaktionsrate,  $k_{-1}$  die rückwärtsgerichtete Reaktionsrate und als Parameter  $t$  die Zeit wiedergegeben. Berücksichtigt man, dass die Gesamtkonzentration während der Reaktion erhalten bleibt,  $[AE] \equiv [A] + [E]$ , so lässt sich die Gleichung (18) umformen zu:

$$\frac{d[E]}{dt} = -(k_1 + k_{-1}) \cdot [E] + k_1 \cdot [AE] \quad (20)$$

Eine Lösung dieser Differentialgleichung (20) ist durch eine Exponentialfunktion gegeben:

$$[E](t) = C_1 \cdot \exp(-(k_1 + k_{-1}) \cdot t) + C_2 \quad (21)$$

Dabei können die Konstanten  $C_1$  und  $C_2$  wie folgt bestimmt werden:

$$C_1 = [E_0] - [AE] \cdot \frac{k_1}{k_1 + k_{-1}} \quad (22)$$

$$C_2 = [AE] \cdot \frac{k_1}{k_1 + k_{-1}} \quad (23)$$

Wobei hier  $[E_0]$  die Konzentration von  $[E]$  am Start der Reaktion, z.B. zum Zeitpunkt  $t = 0$  s darstellt. Mit  $[A](t) = [AE] - [E](t)$  wird mit der Lösung von  $[E](t)$  auch Gleichung (19) erfüllt. In der Praxis lassen sich somit zeitaufgelöste Absorptionsänderungen, die einen mono-exponentiellen Zerfall beschreiben, durch die folgende Gleichung mathematisch formulieren:

$$A(t) = A_0 + A_1 \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t) \quad (24)$$

Die darin enthaltene beobachtbare Ratengeschwindigkeit  $k_{obs}$  ist somit, im Vergleich zu Gleichung (21), die Summe aus Hin- und Rückreaktion.

$$k_{obs} = k_1 + k_{-1} \quad (25)$$

Folglich kann die Dynamik einer reversiblen Faltungsreaktion, der ein Zwei-Zustandsmodell zu Grunde liegt, mittels einer mono-exponentiellen Funktion mit einer beobachtbaren Reaktionsrate  $k_{obs}$  beschrieben werden. Zum Anpassen dieser mathematischen Funktionen wurde die Software Microcal Origin, Version 5,0 (Microcal Software, Inc., Northhampton, USA) benutzt.

Um die beobachtbaren Reaktionsgeschwindigkeiten so zu analysieren, dass man schließlich thermodynamische Parameter erhält und somit Aussagen über die Stabilität eine Reaktion zu

treffen, kann Gleichung (16) benutzt werden. Durch Bildung des natürlichen Logarithmus erhält man:

$$\ln k = \ln(k_B T/h) - \Delta G/RT \quad (26)$$

Durch Einsetzen der allgemeinen Beziehung  $\Delta G = \Delta H + T \cdot \Delta S$  erhält man schließlich die Eyring-Gleichung:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S}{R} \quad (27)$$

Durch eine graphische Darstellung von  $\ln(k/T)$  gegen  $1/T$  kann mit dieser Gleichung durch eine lineare Regression die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H$  in Form der resultierenden Steigung, aber auch die Aktivierungsentropie in Form des resultierenden Ordinatenabschnittes bestimmt werden.

Die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten vieler Reaktionen wird häufig auch mit der Arrhenius-Gleichung beschrieben:

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A \quad (28)$$

Dabei beschreibt  $E_a$  die Aktivierungsenergie der Reaktion.

Ein Vergleich der Arrhenius-Gleichung (28) mit der Eyring-Gleichung (27) zeigt, dass die Aktivierungsenergie  $E_a$  und die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H$  bzw.  $\ln(A)$  und die Aktivierungsentropie  $\Delta S$  analoge Größen sind. Für Reaktionen in Lösung stehen die Aktivierungsenergie  $E_a$  und die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H$  in linearer Beziehung<sup>59</sup>:

$$E_a = \Delta H + RT \quad (29)$$

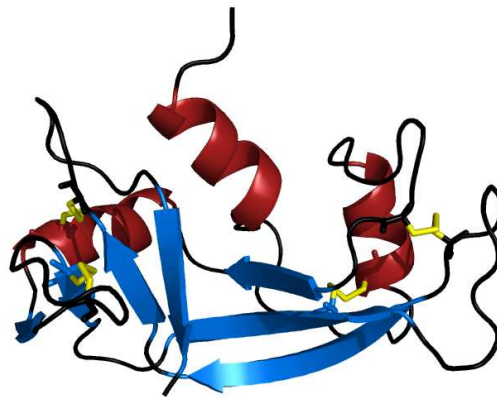
Dadurch unterscheiden sich die Aktivierungsenergie und die Aktivierungsenthalpie innerhalb des Temperaturbereiches von 273 K bis 373 K um  $2,2 \text{ kJ mol}^{-1}$  bis  $3,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

### 3.2 Experimentell analysierte Polypeptide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Polypeptide untersucht, Ribonuklease A, Polyglutaminsäure und Tryptophan-Zipper-Peptide. Ihre Eigenschaften sollen im Folgenden in einem kurzen Überblick beschrieben werden.

### 3.2.1 Ribonuklease A

Ribonuklease A aus dem Rinderpankreas (RNase A) ist ein vielfach untersuchtes, gut charakterisiertes kleines globuläres Enzym, das aus 124 Aminosäuren (Molekularmasse ~ 14 kDa) besteht<sup>60-62</sup>. Es beinhaltet 19 der 20 natürlichen vorkommenden Aminosäuren, wobei die fehlende Aminosäure Tryptophan ist. RNase A war 1960 das dritte Protein überhaupt (nach Insulin und Hämoglobin), für das die Aminosäuresequenz und 1967 bereits das vierte Protein (nach Myoglobin, Lysozym und Carboxypeptidase A), dessen dreidimensionale Struktur durch Röntgenkristallographie bestimmt wurde<sup>62-64</sup>. Eine Darstellung der Struktur von Ribonuklease A ist in Abbildung 16 gezeigt.



*Abbildung 16: Schematische Darstellung der Struktur von Ribonuklease A (Quelle: PDB-Datenbank, 1BEL). Zur Veranschaulichung der Sekundärstrukturelemente sind Bereiche mit  $\beta$ -Faltblatt blau,  $\alpha$ -helikale Bereiche rot und Disulfidbrücken der Cysteine gelb dargestellt.*

Die gesamte Sekundärstruktur von Ribonuklease A besteht zu 33 % aus  $\beta$ -Faltblatt (in Abbildung 16 durch blaue Pfeile gekennzeichnet) und zu 20 % aus  $\alpha$ -helikalen Anteilen (durch rote Spiralen veranschaulicht). Zur Stabilisierung dieser nativen Struktur tragen besonders die vier Disulfidbrücken bei. Der Austausch eines einzelnen Cysteins durch ein Alanin oder Serin reduziert bereits die thermische Stabilität des Enzyms<sup>62</sup>. Zusätzlich tragen zwei der Disulfidbrücken (Cys26-Cys84 und Cys58-Cys110) zwischen einer  $\alpha$ -Helix und einem  $\beta$ -Faltblatt stärker zur thermischen Stabilität bei als die anderen zwei Disulfidbrücken (Cys40-Cys95 und Cys65-Cys72)<sup>62</sup>.

RNase A eignet sich hervorragend als Modellsystem, um neue spektroskopische Methoden zu entwickeln und zu optimieren. Damit wurden bereits Stabilitäts- und Faltungseigenschaften der RNase A mit NMR-<sup>65,66</sup>, CD-<sup>65</sup> aber auch der FTIR-Spektroskopie<sup>60,61,67-70</sup> untersucht. Daher stellt Ribonuklease A im Rahmen dieser Arbeit ein geeignetes Modellsystem dar, um aus den bekannten thermischen Eigenschaften ein neues Auswerteverfahren zur Spektrenanalyse zu etablieren (siehe Kapitel 4.1). Mit dieser Prozedur werden die temperaturabhängigen Absorptionsbanden des Lösungsmittels und der Amid I Bande separiert, wodurch eine einfache Auswertung der Sekundärstrukturänderungen möglich ist.

### 3.2.2 Polyglutaminsäure

Polyglutaminsäure (PGS) ist ein Homopolymer, das aus einer Aneinanderreihung einer einzigen, sich wiederholenden Aminosäure, Glutaminsäure (Glu, E), besteht. Glutaminsäure, deren chemische Strukturformel in Abbildung 17 dargestellt ist, besitzt einen  $pK_S$ -Wert zur Ionisierung der Seitenkette von 4,1. Bei einem pH-Wert unter 4,1 werden die Seitenketten der Polyglutaminsäure protoniert. Zusätzlich nimmt die thermische Stabilität des Polymers ab und führt bei dessen Erwärmung zur Aggregation.

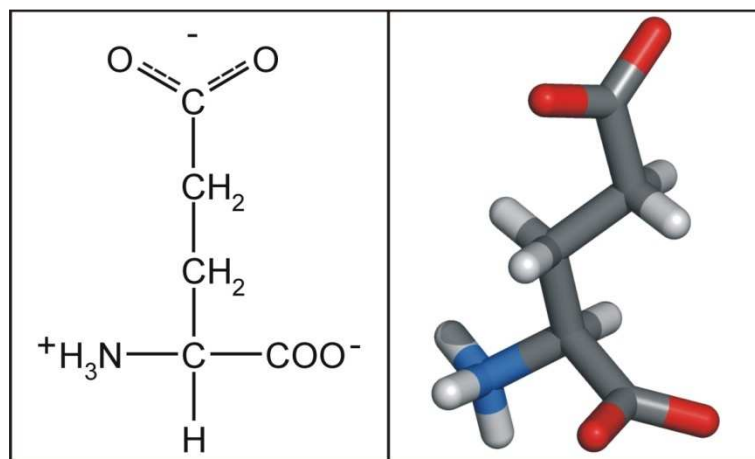


Abbildung 17: Struktur der Glutaminsäure. Links: Chemische Strukturformel (deprotonierte Form). Rechts: Dreidimensionale Anordnung der Aminosäure in protonierter Form (N-blau, C-dunkelgrau, H-hellgrau, O-rot).

Polyglutaminsäure ist ein gut untersuchtes Modellsystem, das durch pH-Wechsel des Lösungsmittels eine Konformationsänderung erfährt. In statischen Messungen konnte gezeigt

werden, dass das Polymer bei niedrigem pH-Wert eine Helix-Konformation und bei hohem pH-Wert eine Knäuel-Konformation einnimmt. In dem Übergangsbereich dieses Konformationswechsels, der im pH-Wertbereich von 5 bis 6 liegt, sind die einzelnen Segmente der Aminosäurekette teilweise in einer  $\alpha$ -helikalen und teilweise in einer ungeordneten Knäuel („random coil“) Struktur<sup>71</sup>.

Auch die Dynamik des Helix-Knäuel-Überganges wurde bereits mit verschiedenen zeitaufgelösten Methoden untersucht. Beispielsweise wurden durch Ultraschall-Absorptionsmessungen an Polyglutaminsäure für pH-Werte größer 5,8 oder kleiner 4,6 keine Helix-Knäuel-Strukturübergänge beobachtet<sup>72</sup>. Innerhalb dieser pH-Region konnten diese Strukturveränderungen beobachtet und Übergangsraten bei einer Temperatur von 37 °C bestimmt werden. Dabei wurde eine pH-Abhängigkeit der Relaxationszeiten festgestellt. Die längste Relaxationszeit von  $\tau = (1,0 \pm 0,1) \mu\text{s}$  liegt demnach bei einem pH-Wert von 5,21.

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wird ein beachtlicher Anteil von Protonen von den Carboxyl-Gruppen der Seitenketten freigesetzt<sup>73</sup>. Die daraus resultierende Ionisierung der Seitenketten verursacht eine Konformationsänderung, die zeitaufgelöst untersucht werden kann. Cummings et al.<sup>74</sup> beobachteten durch die schnelle Veränderung eines angelegten elektrischen Feldes (E-Feld-Sprung) eine Relaxationszeit des Helix-Knäuel-Überganges von  $\tau = 1,7 \mu\text{s}$  (pH 5,9 und T = 24 °C).

In neueren Arbeiten wurde mit Laser-induzierten pH-Sprüngen bei verschiedenen pH-Startwerten die Entstehung der  $\alpha$ -Helix untersucht<sup>6</sup>. Bei einem pH-Sprung von 6,7 nach ~ 5,8 wurde eine Relaxationszeit von  $\tau = 0,625 \mu\text{s}$  bestimmt. Zusätzlich wurde gefolgert, dass die Geschwindigkeit der Helixausbildung vom dem Anteil der gefalteten  $\alpha$ -Helix abhängt, der bereits zu Beginn des Experiments vorhanden ist.

Des Weiteren wurde in T-Sprung-Experimenten das Verhalten von Polyglutaminsäure bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt<sup>75</sup>. Auch darin wurde festgestellt, dass die Relaxationsgeschwindigkeiten am Helix-Knäuel-Übergang, im Bereich von pH 5-6, am größten sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Polyglutaminsäure als Modellsystem gewählt, um mit dem aufgebauten Temperatursprung-IR-Spektrometer Dynamiken im Mikrosekundenbereich zu untersuchen.

### 3.2.3 Tryptophan-Zipper-Peptide

Die Untersuchung von Protein-Fragmenten oder künstlich entworfenen Peptiden mit definierter Sekundärstruktur wurden in einer Vielzahl von Experimenten benutzt, um die Anfangsphasen der Proteinfaltung zu erforschen. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Faltung von  $\alpha$ -helikalen Peptiden unterschiedlicher Größe und Sequenz auf der Submikrosekundenzeitskala ereignet<sup>6,12,13,28,76-78</sup>. Einige Untersuchungen wurden bereits an  $\beta$ -Hairpin-Peptiden durchgeführt<sup>20-24,26,79,80</sup>. Insbesondere die Arbeit von Cochran et al.<sup>81</sup> in der die Synthese von  $\beta$ -Hairpin-Peptiden beschrieben wurde, die durch Tryptophan-Tryptophan-Wechselwirkungen stabil in wässriger Lösung vorliegen, initiierte eine Reihe von Arbeiten, um deren Faltungseigenschaften zu untersuchen. Die Struktur einer Variante dieser Peptide, die als Tryptophan-Zipper-Peptide (Trpzip) bezeichnet werden, wurde durch NMR-Spektroskopie aufgelöst. Es konnte gezeigt werden, dass das Trpzip-Peptid in wässriger Lösung eine  $\beta$ -Hairpin-Konformation einnimmt. Eine solche Struktur ist in Abbildung 18 dargestellt.

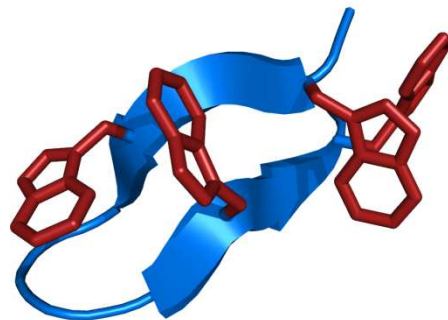


Abbildung 18: Modell der NMR-Struktur des Peptids Trpzip2 in wässriger Lösung (Quelle: PDB-Datenbank 1LE1); Das  $\beta$ -Hairpin ist in blau und die zur Stabilisierung beitragenden Tryptophane sind in dunkelrot veranschaulicht.

Die Struktur des  $\beta$ -Hairpins wird durch die Tryptophan-Tryptophan-Paare zwischen beiden Strängen stabilisiert. Die Trpzip-Peptide sind in bis zu millimolaren Konzentrationen wasserlöslich und formen untereinander keine Komplexe, bilden also monomere  $\beta$ -Hairpin-Peptide aus<sup>81</sup>.

Unterschiedliche Untersuchungen an  $\beta$ -Hairpin-Systemen unterstützen die Hypothese, dass die Aminosäuresequenz der Peptide entscheidenden Einfluss auf die Faltungsdynamik hat<sup>21</sup>. Dennoch ist ihr Faltungmechanismus immer noch aktuelles Forschungsthema. Dabei wird



diskutiert, ob die Faltung des  $\beta$ -Hairpins mit der Ausbildung des Turns beginnt und sich danach in einer Art Reißverschluss (engl.: „zipper“) die  $\beta$ -Stränge formieren oder ob ein hydrophober Kollaps den Faltungsprozess startet<sup>23</sup>. Bei einem hydrophoben Kollaps gruppieren sich alle hydrophoben Seitengruppen der Aminosäuren spontan zusammen. Zur Veranschaulichung dieser zwei möglichen Faltungswege zeigt Abbildung 19 eine schematische Darstellung dieser beiden Hypothesen zum Faltungsmechanismus.

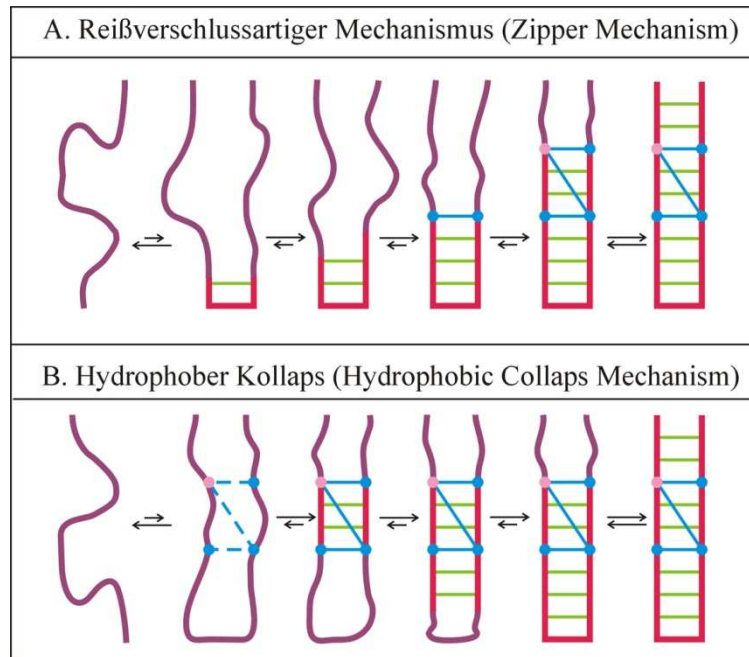


Abbildung 19: Schematische Darstellung zweier Modelle, dem Reißverschluss- oder Hydrophober-Kollaps-Mechanismus, zur Veranschaulichung des Faltungsprozesses eines  $\beta$ -Hairpins (nach Muñoz et al.<sup>23</sup>). Diese Modelle zeigen die ungefaltete Aminosäuresequenz violett, bereits gefaltete Strukturen rot und hydrophobe Gruppen blau. Die grünen Verbindungslinien symbolisieren Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Strängen, während die blauen Linien Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Residuen veranschaulichen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Untersuchung dieser  $\beta$ -Hairpin-Peptide mit statischer FTIR-Spektroskopie und mit zeitaufgelöster Temperatursprung-IR-Spektroskopie durchgeführt werden, um deren Faltungseigenschaften und Dynamiken zu charakterisieren. Zusätzlich in die Struktur eingebrachte  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Isotopenmarkierungen einzelner selektiv ausgewählter C=O-Gruppen im Peptidrückgrat geben die Möglichkeit, lokale strukturelle

Informationen über die Kopplung der Schwingungen der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Amid I Banden zu erhalten. Anhand dieser Banden lassen sich die Veränderungen der  $\beta$ -Hairpin-Struktur lokal verfolgen und nachweisen.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Entwickelte Anpassungsprozeduren

Um die Stabilitätseigenschaften von Proteinen untersuchen zu können, wurden temperaturabhängige Absorptionsmessungen der Polypeptide in wässriger Lösung durchgeführt. Zusätzlich wurden die spektralen Komponenten der verwendeten Lösungsmittel  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  und deren Mischung  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  einzeln vermessen. Um Absorptionsspektren von unterschiedlichen Messungen und Proben miteinander vergleichen zu können, muss ihr jeweiliger Temperaturunterschied minimal sein<sup>82,83</sup>. Dazu wurde ein Algorithmus entwickelt, der die Temperaturunterschiede der zu vergleichenden Proben auf ein zehntel Grad Celsius reduziert. Zusätzlich wurde ein weiterer Algorithmus entwickelt, mit dem Spektren voneinander abgezogen werden können, um z.B. das Lösungsmittel von einer Proteinlösung abzuziehen. Die entwickelten und benutzten Algorithmen werden im praktischen Gebrauch zu einer Gesamtprozedur zusammengefasst, die im Anhang in Kapitel 7.1.3 gezeigt ist.

#### 4.1.1 Algorithmus zur Temperatur-Anpassung unterschiedlicher Proben

Die temperaturabhängigen Absorptionsmessungen der einzelnen Proben wurden unabhängig voneinander durchgeführt. Zu jeder Messung, wie im Kapitel 2.2 beschrieben, wird die Temperatur des Wasserbades verändert und anschließend die Temperatur am Probenort bestimmt. Bedingt durch äußere Einflüsse, können deshalb bei gleicher Wasserbadtemperatur Temperaturvariationen am Probenort zwischen den unterschiedlichen Proben auftreten. Durch die unterschiedlichen Temperaturen werden neben Intensitätsunterschieden auch Bandenverschiebungen hervorgerufen, die in dem Algorithmus, der Absorptionsspektren voneinander abziehen soll, berücksichtigt werden müssen.

Zunächst wird mit Hilfe eines Algorithmus eine thermische Angleichung einer spektralen Komponente  $A(\nu, T_a)$  zu einer spektralen Komponente  $B(\nu, T_b)$  durchgeführt, so dass nach der Angleichung die Komponente A bei der gleichen Temperatur wie Komponente B vorliegt, also  $A(\nu, T_b)$ . Diese Temperaturanpassung ist möglich, da sich mit der monoton steigenden bzw. abfallenden Proben temperatur auch die Absorption stetig ändert. In der folgenden

Abbildung 20 ist ein Flussdiagramm dieses Algorithmus zur Veranschaulichung der einzelnen Prozedurschritte dargestellt.

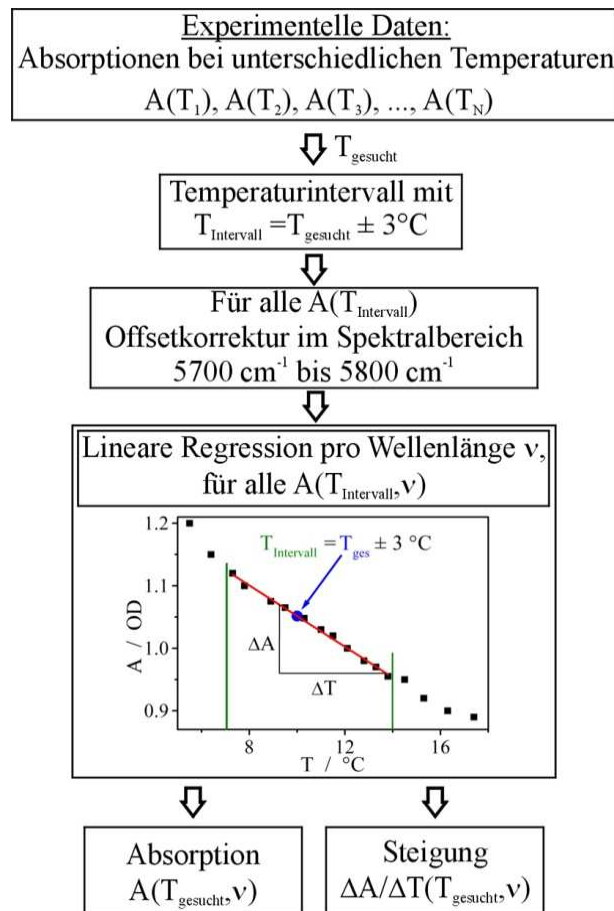


Abbildung 20: Flussdiagramm zum Algorithmus der Temperatur-Angleichung eines Absorptionsspektrums  $A(\nu, T)$  zu einer Temperatur  $T_{\text{gesucht}}$ , zu der kein Spektrum experimentell bestimmt wurde.

Am Beispiel einer Temperatur der Komponente B ( $T_B = T_{\text{gesucht}}$ ) wird der Algorithmus beschrieben. Im ersten Schritt werden aus den temperaturabhängigen Absorptionsspektren der Komponente  $A(\nu, T_A)$  alle Spektren zusammengetragen, die innerhalb eines Temperaturintervalles von  $T_{\text{Intervall}} = T_{\text{gesucht}} \pm 3^\circ\text{C}$  liegen. Anschließend wird eine Basislinienkorrektur („Offsetkorrektur“) der ausgewählten Spektren durchgeführt. Als Kriterium dient dazu der Spektralbereich von  $5700\text{ cm}^{-1}$  bis  $5800\text{ cm}^{-1}$ , da in diesem Bereich keine Absorptionsbanden der verwendeten Lösungsmittel  $\text{H}_2\text{O}$  bzw.  $\text{D}_2\text{O}$  liegen und die Intensität null sein sollte. Im nächsten Schritt werden die Absorptionsintensitäten pro Wellenlänge  $\nu$  aus den einzelnen

Spektren extrahiert. Anschließend wird eine lineare Regression der temperaturabhängigen Intensitäten innerhalb des kleinen Temperaturintervalls durchgeführt. Danach wird die Intensität an der gesuchten Temperatur  $T_{\text{gesucht}}$  aus den angepassten Parametern interpoliert. Dieser Vorgang wird für jede Wellenlänge wiederholt, wodurch sich wieder ein Spektrum ergibt,  $A(\nu, T_{\text{gesucht}})$ . Dieser Vorgang lässt sich auf alle Temperaturen  $T_b$  der Komponente B anwenden, sodass  $A(\nu, T_b)$  berechnet werden kann, sofern in der Komponente A genügend Spektren (geschätzte Minimalanzahl von 3) innerhalb des Temperaturintervalls vorhanden sind.

Der vorgestellte Algorithmus liefert jedoch nicht nur die Berechnung der Absorptionsspektren an einer experimentell nicht bestimmten Temperatur, sondern zusätzlich die Änderung der Absorption bei der Änderung der Temperatur als Funktion der Wellenlänge und Temperatur  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$ . Dieser Wert wird durch die Steigung der jeweiligen Regressionsgerade berechnet.

#### **4.1.2 Prozedur zum spektralen Abzug von Lösungsmittelabsorptionen**

Das Ziel dieses Algorithmus ist eine Subtraktion der einzelnen spezifischen „reinen“ Absorptionskomponenten, wie z.B.  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  oder HDO von ihren jeweiligen Mixturlösungen, wie z.B. von  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  Mixturen oder von wässrigen Polypeptid-Lösungen. Um jedoch von einem Absorptionsspektrum einer Polypeptid- $\text{D}_2\text{O}$ -Lösung sowohl  $\text{D}_2\text{O}$  als auch HDO abziehen zu können, muss man zunächst das HDO-Spektrum aus dem Absorptionsspektrum der Mixtur von  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  bestimmen.

Im Folgenden wird der dafür entwickelte Algorithmus, dessen Prozedurschritte in Abbildung 21 veranschaulicht sind, näher beschrieben. Um das Annähern von Absorptionsintensitäten durchzuführen, muss in einem ersten Schritt gewährleistet sein, dass die Temperaturen der zu vergleichenden Komponenten gleich sind. Generell wurde deshalb der in Kapitel 4.1.1 beschriebene Algorithmus der Temperaturangleichung benutzt. Die Absorptionsspektren werden dabei an die Temperatur derjenigen Probe, hier die Mixtur von  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ , angeglichen, mit der die „reinen“ Komponenten verglichen werden sollen.

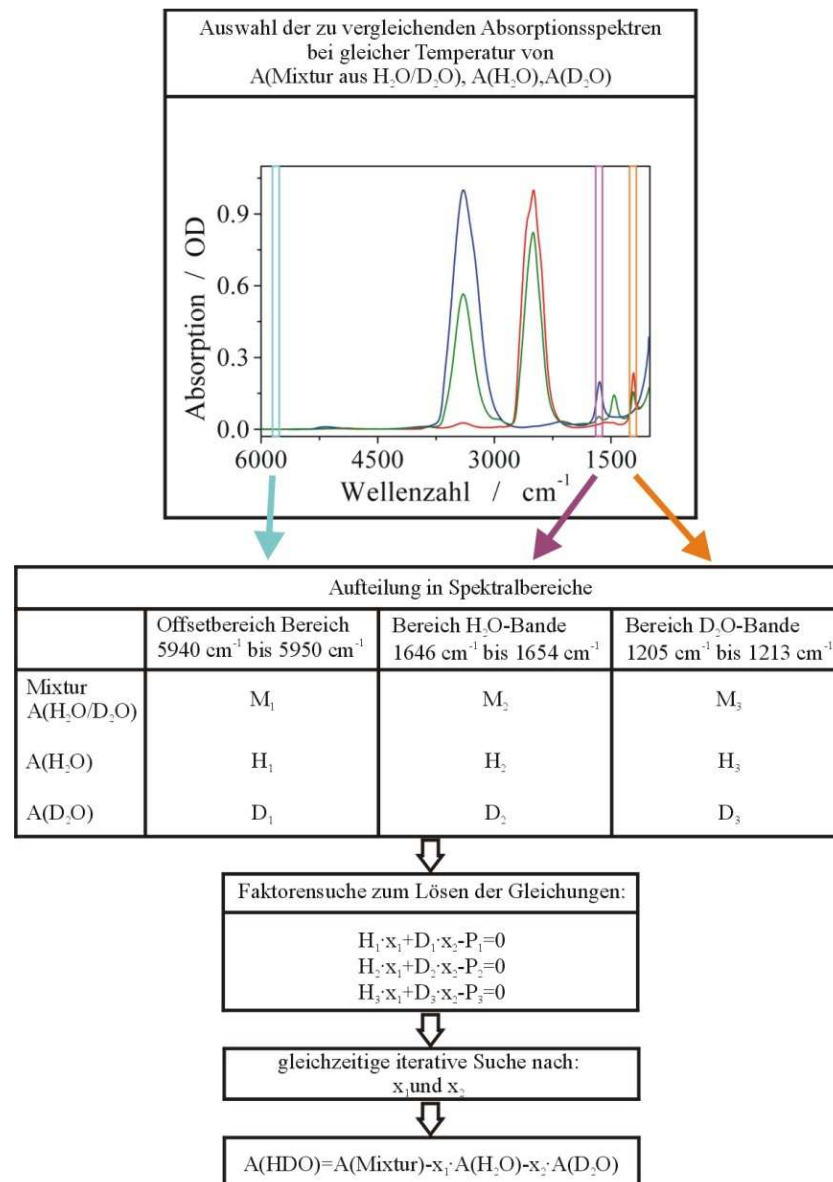


Abbildung 21: Flussdiagramm zum Algorithmus der spektralen Angleichung von Absorptionsspektren. Dargestellt ist die allgemeine Vorgehensweise der simultanen spektralen Angleichung der Absorptionsspektren von H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O an eine Mixtur aus H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O bei gleicher Temperatur. Nach Abzug der angepassten Absorptionen erhält man das Absorptionsspektrum von HDO (siehe Kapitel 5.1).

Nach der Temperaturangleichung werden aus den Absorptionsspektren drei Bereiche gewählt, die charakteristisch für die entsprechenden Komponenten sind. Eine Basislinienkorrektur der Absorptionen wird im Bereich um 5800 cm<sup>-1</sup> durchgeführt, da in diesem Bereich keine Lösungsmittelabsorptionsbanden beobachtet werden. Die Absorptionsbanden von H<sub>2</sub>O werden im Bereich von 1646 cm<sup>-1</sup> bis 1654 cm<sup>-1</sup> und die D<sub>2</sub>O Banden im Bereich von

1205  $\text{cm}^{-1}$  bis 1213  $\text{cm}^{-1}$  an die Banden der Mixtur von  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  angenähert. Eine genaue Beschreibung der  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  Absorptionsbanden wird in Kapitel 5.1 gegeben. Es wird nun für das jeweilige  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  Spektrum ein Faktor gesucht, der die Absorptionen an die Mixtur von  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  auf allen ausgewählten spektralen Bereichen angleicht. Da sich die Absorptionen gegenseitig überlagern, muss die Suche nach beiden Faktoren gleichzeitig erfolgen. Die Annäherung an die jeweiligen Faktoren erfolgt durch eine iterative Anpassungsprozedur. Das endgültige Absorptionsspektrum von HDO erhält man, indem vom gesamten Absorptionsspektrum der Mixtur ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ) die mit ihren Faktoren ( $x_1$ ,  $x_2$ ) gewichteten Absorptionsspektren von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  subtrahiert werden (vergleiche Gleichung (30)).

$$A(\text{HDO})=A(\text{Mixtur})-x_1 \cdot A(\text{H}_2\text{O})-x_2 \cdot A(\text{D}_2\text{O}) \quad (30)$$

Der Abzug des Lösungsmittels vom Gemisch aus Protein gelöst in  $\text{D}_2\text{O}$  erfolgt analog wie für das  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Mixtur-Spektrum beschrieben. Die auftretenden markanten Unterschiede werden im Folgenden dargestellt.

Zum Abzug des Absorptionsspektrums eines Lösungsmittels von dem eines Polypeptides in wässriger Lösung wurden bereits einige Algorithmen vorgestellt<sup>82-87</sup>. Dousseau et al.<sup>85</sup> benutzten die Region von 2800  $\text{cm}^{-1}$  bis 1700  $\text{cm}^{-1}$ , um ihre Subtraktionsprozedur zu optimieren und passten die Intensität der Absorptionsbande von  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $\sim 2125 \text{ cm}^{-1}$  an. Powell et al.<sup>84</sup> berichteten über erfolgreiche Resultate ihres Algorithmus, der den Spektralbereich von 1990  $\text{cm}^{-1}$  bis 1790  $\text{cm}^{-1}$  zerteilt und an jedes Teilstück eine Gerade anpasst, so dass in beiden Geraden eine Steigung von Null erhalten wird. Dong et al.<sup>88</sup> berücksichtigen bei ihrem Wasserabzug zusätzlich Absorptionsbanden des Wasserdampfes. Das Kriterium zur Beurteilung des erfolgreichen Wasserabzuges ist auch hier eine gerade Linie auf einem Spektralbereich von 2000  $\text{cm}^{-1}$  bis 1750  $\text{cm}^{-1}$ . In der Arbeit von Wang et al.<sup>86</sup> werden zwei unterschiedliche Algorithmen vorgestellt, von denen einer beispielsweise zu dem Wasserspektrum einen Skalierungsfaktor multipliziert, der auf iterative Art bestimmt wurde, bis eine flache Basislinie zwischen 1950  $\text{cm}^{-1}$  und 1750  $\text{cm}^{-1}$  erreicht wird.

Der in dieser Arbeit zum Abzug angewandte Algorithmus beinhaltet einige Elemente aus den bereits erwähnten Anpassungsprozeduren. Zum Einen wird jedoch nicht nur das Absorptionsspektrum von  $\text{D}_2\text{O}$  an eine wässrige  $\text{D}_2\text{O}$ -Proteinlösung angepasst, sondern zusätzlich auch der unterschiedliche HDO-Gehalt in der Lösung berücksichtigt. Es müssen also die Faktoren  $x_1$  und  $x_2$  gefunden werden, damit das folgende Gleichungssystem gelöst werden kann:

$$A(\text{Protein})=A(\text{Protein, D}_2\text{O, HDO})-x_1\cdot A(\text{D}_2\text{O})-x_2\cdot A(\text{HDO}) \quad (31)$$

Des Weiteren werden die Spektren nicht im erwähnten Spektralbereich von  $2800\text{ cm}^{-1}$  bis  $1700\text{ cm}^{-1}$  angepasst, sondern bandenspezifisch je nach anzupassender Komponente für HDO bei  $\sim 3404\text{ cm}^{-1}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $\sim 3840\text{ cm}^{-1}$ . Ähnlich wie im beschriebenen Algorithmus zum Erstellen des HDO Spektrum werden die Skalierungsfaktoren der beiden Komponenten simultan und iterativ bestimmt. Zusätzlich wird darauf geachtet, dass im Bereich von  $1850\text{ cm}^{-1}$  bis  $1750\text{ cm}^{-1}$  eine flache Basislinie entsteht. Eventuell auftretende Basislinienverschiebungen werden zum Abschluss der Anpassungsprozedur in dem genannten Spektralbereich minimiert.

## 4.2 Analyse der statischen FTIR- und CD-Spektren

Die Beschreibung der Absorptionsdaten, die im thermischen Gleichgewicht beim Erhitzen einer Probe die Entfaltung eines Peptids oder Proteins wiedergeben, kann im einfachsten Fall über ein Zwei-Zustandsmodell (vgl. Kapitel 3.1.5) erfolgen. Dabei wird ein Modell benutzt, das jeweils die Absorptionen und ihre minimalen Veränderungen im nativen bzw. denaturierten Zustand durch eine lineare Funktion beschreibt, die über eine Sigmoidalfunktion miteinander verbunden sind. Die Breite, Steigung und der Mittelpunkt dieser Sigmoidalfunktion sind ein Maß für die Änderung der Enthalpie  $\Delta H_m$ , der Wärmekapazität  $\Delta C$  und der Übergangstemperatur  $T_m$  des untersuchten Peptids. Eine solche Beschreibung zur thermodynamischen Analyse eines Faltungs- bzw. Entfaltungsprozesses kann sowohl mit den FTIR- als auch CD-Daten durchgeführt werden. Sie ist außerdem universell einsetzbar zur Beschreibung von Absorptionsänderungen bei einer festen Wellenlänge und von Frequenzverschiebungen.

Allgemein kann die folgende Funktion zur Beschreibung der thermischen Entfaltung eines Peptids genutzt werden, wobei  $\theta(T)$  ein Signal bei der Temperatur  $T$  darstellen soll:

$$\theta(T) = (Y_1 + m_1 \cdot T) + (Y_2 + m_2 \cdot T) \cdot \frac{K_{eq}(T)}{1 + K_{eq}(T)} \quad (32)$$

Dabei beschreiben zwei Geraden mit ihrem jeweiligen Ordinatenschnittpunkt  $Y_1$  bzw.  $Y_2$  und die dazugehörigen Steigungen  $m_1$  bzw.  $m_2$  die linearen Verläufe im nativen bzw.



denaturierten Zustände. Der Sigmoidalanteil wird über die Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}(T)$  beschrieben.

$$K_{eq}(T) = \exp\left(-\frac{\Delta G(T)}{R \cdot T}\right) \quad (33)$$

Abbildung 22 zeigt zur Veranschaulichung den temperaturabhängigen Messsignalverlauf und die einzelnen Komponenten der in Gleichung (32) beschriebenen mathematischen Funktion.

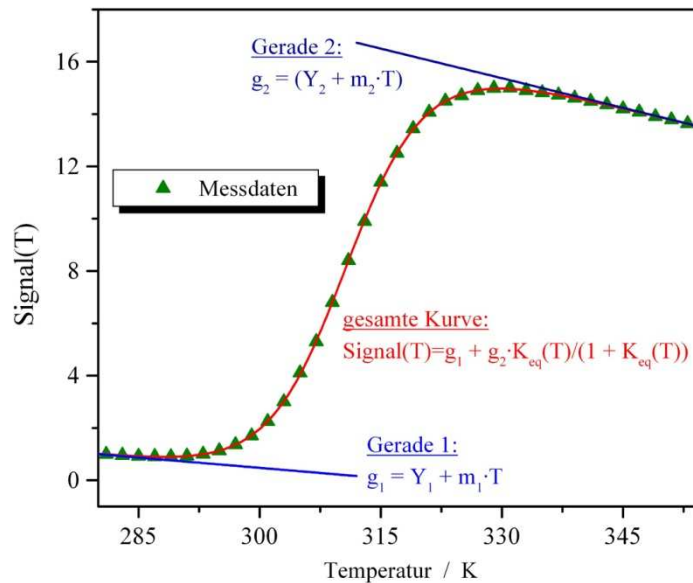


Abbildung 22: Veranschaulichung des Modells aus Gleichung (32) zur thermodynamischen Analyse von temperaturabhängigen Messsignalen.

Durch die Freie Energie, beschrieben durch die Gibbs-Helmholtz-Gleichung, werden die Enthalpieänderung  $\Delta H_m$ , die Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C$  an der Übergangstemperatur und die Übergangstemperatur  $T_m$  beschrieben:

$$\Delta G(T) = \Delta H_m + \Delta C \cdot (T - T_m) - T \cdot \left( \frac{\Delta H_m}{T_m} + \Delta C \cdot \ln \frac{T}{T_m} \right) \quad (34)$$

Insgesamt müssen mit dem hier beschriebenen Modell zur Anpassung des in Abbildung 22 dargestellten temperaturabhängigen Signalverlaufes sieben Parameter ermittelt werden.

Zur thermodynamischen Analyse kann auch die Ableitung der Absorptionen nach der Temperatur  $\frac{d\theta(T)}{dT}$  angewandt werden. Die Berechnung der Absorptionsänderungen  $\frac{d\theta(T)}{dT}$  aus den experimentell zugänglichen Absorptionen  $\theta(T)$  erfolgt nach einem einfachen Prinzip, das unter anderem auch in Kapitel 4.1.1 erklärt wird. Dafür werden alle Absorptionsdaten  $\theta(T)$ ,

die innerhalb eines gewählten Temperaturbereiches, z.B.  $\pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  um eine bestimmte Temperatur  $T_a$  liegen, extrahiert. Anschließend wird mit diesen temperaturabhängigen Intensitäten  $\theta(T_a \pm 3 \text{ }^\circ\text{C})$  eine lineare Regression berechnet, deren Steigung der Absorptionsänderung  $\frac{d\theta(T_a)}{dT}$  entspricht.

Eine Möglichkeit diese temperaturinduzierten Absorptionsänderungen mit einer mathematischen Funktion zu beschreiben, kann über die Ableitung aus der Gleichung (32) hergeleitet werden. Dafür muss jedoch auch die Ableitung der Gleichgewichtskonstanten  $K_{eq}(T)$  gebildet werden. Das Zusammenfassen aller Faktoren, die von  $T$  abhängig sind, ergibt:

$$K_{eq}(T) = \exp\left(-\frac{1}{R}\left[(\Delta H_m + \Delta C - \ln T_m) + (\Delta C \cdot T_m + \Delta H_m) \cdot \frac{1}{T} + \Delta C \ln T\right]\right) \quad (35)$$

Durch Anwendung der Produktregel kann die Ableitung berechnet werden:

$$\frac{dK_{eq}(T)}{dT} = -\frac{\Delta C}{R \cdot T} \cdot K_{eq}(T) + \frac{(\Delta C \cdot T_m + \Delta H_m)}{R \cdot T^2} \cdot K_{eq}(T) \quad (36)$$

Mit diesem Zwischenresultat und durch Anwendung der Quotientenregel bei der Ableitung erhält man für die Ableitung der temperaturabhängigen Intensitäten:

$$\frac{d\theta(T)}{dT} = m_1 + \frac{m_2 \cdot [K_{eq}(T) + K_{eq}(T)^2] + (Y_2 + m_2 \cdot T) \cdot \frac{dK_{eq}(T)}{dT}}{(1 + K_{eq}(T))^2} \quad (37)$$

Eine Veranschaulichung der aus den temperaturabhängigen Signalen berechneten Ableitungsdaten und der mathematischen Funktion, die durch Gleichung (37) beschrieben wird, ist in Abbildung 23 dargestellt.

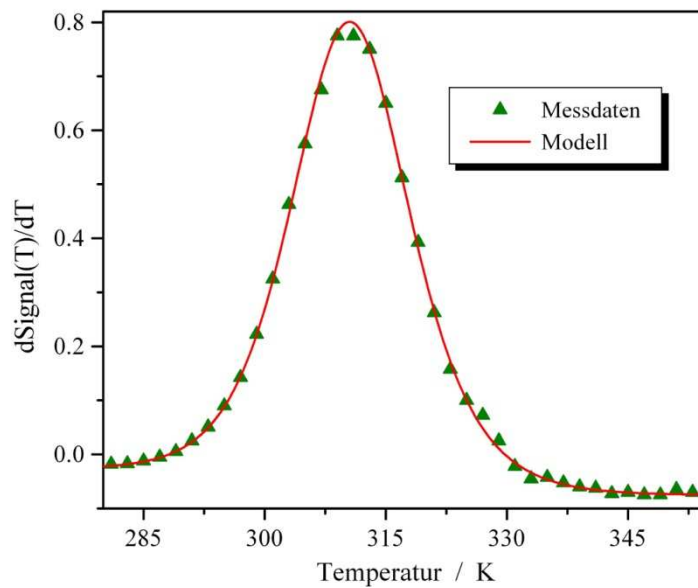


Abbildung 23: Veranschaulichung des mathematischen Modells zur Beschreibung der Ableitung der Messdaten nach der Temperatur.

Der Vorteil der Beschreibung der temperaturabhängigen Absorptionsänderungen  $\frac{d\theta(T)}{dT}$  liegt darin, dass ein Parameter zur Anpassung von  $\frac{d\theta(T)}{dT}$  weniger (sechs Parameter), nämlich kein Ordinatenabschnitt  $Y_1$  der Geraden, die den nativen Zustand beschreibt, bestimmt werden muss, wie bei der Beschreibung der temperaturabhängigen Signale (sieben Parameter). Diese Gerade ist ein kritischer Punkt bei der Beschreibung des Denaturierungsprozesses. Allen und Pielak<sup>89</sup> veranschaulichten die Auswirkungen der Reduzierung der experimentellen Messpunkte, die mit dem nativen Zustand identifiziert werden, auf die thermodynamischen Parameter. Um diese Einflüsse zu reduzieren, zeigten John und Weeks<sup>90</sup>, dass durch eine Beschreibung ohne diese Gerade eine entscheidende Fehlerquelle der Analyse minimiert werden würde. Ihre mathematische Beschreibung der temperaturabhängigen Messsignale wurde ebenfalls auf der Grundlage eines Zwei-Zustandsmodelles gegeben.

$$\frac{d(\text{Signal})}{dT} = A \cdot f \cdot (1 - f) \cdot T^2 \quad (38)$$

Darin wird  $f$  als Anteil der denaturierten Proteine beschrieben, die über die Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{eq}}(T)$  definiert wird.

$$f = \frac{K_{eq}(T)}{K_{eq}(T) + 1} \quad (39)$$

In dieser Gleichung wird die Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}(T)$  durch die van't Hoff Enthalpie  $\Delta H_{vH}$  und die Übergangstemperatur  $T_m$  festgelegt. Es wird lediglich der Einfluss einer Änderung der Wärmekapazität an der Übergangstemperatur außer Acht gelassen.

$$K_{eq}(T) = \exp\left(\frac{\Delta H_{vH}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right) \quad (40)$$

Durch Einsetzen der Gleichung (39) in(38), erhält man eine Gleichung, in der alle anzupassenden Parameter stecken.

$$\frac{d(signal)}{dT} = A \cdot \frac{K_{eq}(T)}{(1 + K_{eq}(T))^2} \cdot T^2 \quad (41)$$

Diese Gleichung besitzt zwar nur drei anzupassende Parameter ( $A$ ,  $\Delta H_{vH}$  und  $\Delta C$ ), ist aber eine durch die Autoren John und Weeks empirisch gefundene Formel. Ein Vergleich mit Gleichung (37), bei der alle Terme, die  $\Delta C$  enthalten, entfernt wurden (oder  $\Delta C=0$  gesetzt wurde), liefert:

$$\frac{d\theta(T)}{dT} = m_1 + \frac{m_2 \cdot [K_{eq}(T) + K_{eq}(T)^2]}{(1 + K_{eq}(T))^2} \quad (42)$$

Dadurch würde sich die Anzahl der anzupassenden Parameter zwar auf vier verringern, eine quadratische Abhängigkeit von der Temperatur, wie in Gleichung (41) beschrieben, ist jedoch nicht offensichtlich.

In dieser Arbeit wurde die Analyse der temperaturabhängigen spektralen Signale und die ihrer Ableitung simultan durchgeführt. Die Parameter, die Gleichung (32) und (37) verbinden, wurden bei deren Bestimmung miteinander verknüpft, so dass bei der Anpassung eines temperaturabhängigen Intensitätsverlaufes und der zugehörigen Ableitung 7 anstelle von 13 verschiedenen Parametern ermittelt wurden. Diese mathematische Anpassung wurde mit der Software IGOR Pro, Version 5.0.3.0 (WaveMetrics, Inc., Oregon, USA) durchgeführt, da damit eine Verknüpfung der Parameter bei der Anpassung der Datenpunkte mit verschiedenen mathematischen Funktionen durch den Programmteil „Global Fit“ möglich ist.

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass die hier dargestellte Methode zur Analyse von thermodynamischen Parametern streng genommen nur für reversibel entfaltende Systeme verwendet

werden darf. Sie basiert auf einem Zwei-Zustandsmodell, das eine Gleichgewichtsreaktion zwischen nativ gefalteten und denaturierten Zustand eines Proteins beschreibt. Bei der Auswertung von irreversiblen Faltungsprozessen, wie der Aggregation eines Peptids wird als bestmögliche Näherung ebenfalls das Zwei-Zustandsmodell verwendet und zur Beschreibung der Gleichgewichtsdaten benutzt.

### 4.3 Probenpräparation

Ribonuklease A aus dem Rinderpankreas (Type I-A) wurde von Sigma (Taufkirchen) erworben, ohne weitere Aufreinigung untersucht und dazu in einem 10 mM Phosphat D<sub>2</sub>O (Reinheit 99,9%, Euriso-Top GmbH, Saarbrücken) Puffer mit einem pD-Wert von 6.7 gelöst. Zum kompletten HD-Austausch von RNase A in D<sub>2</sub>O-Lösung wurde das Protein vor der Untersuchung zunächst auf 60 °C für 20 Minuten erwärmt<sup>67,68</sup>. Bei dieser Temperatur ist die strukturelle Stabilität und Rigidität des Proteins bereits erniedrigt und die Wasserzugänglichkeit erhöht, so dass ein Austausch von den an das Protein gebundenen Protonen mit Deuteronen stattfinden kann. Danach wurde die Proteinlösung lyophilisiert (gefriertrocknet). In einem letzten Schritt wurde wieder so viel D<sub>2</sub>O Pufferlösung hinzugegeben, dass eine Proteinkonzentration von 20 mg/ml in Lösung untersucht werden konnte. Durch diese Art der Probenpräparation wurde versucht, den HDO-Gehalt der Probe zu minimieren.

Polyglutaminsäure mit einer Molekularmassenverteilung von 50.000-100.000 g/mol wurde ebenfalls von Sigma (Taufkirchen) erworben. In einer Peptidbindung beträgt die molare Masse von Glutaminsäure (C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>3</sub>) nach Abspaltung eines Wassermoleküls ~ 128 g/mol. Das somit untersuchte Homopolymer besteht demnach aus 390-780 Residuen. Polyglutaminsäure wurde in einer D<sub>2</sub>O-Lösung bei neutralem pD gelöst. Durch langsame Zugabe von DCl und NaOD (Euriso-Top GmbH, Saarbrücken) wurde der gewünschte pD-Wert eingestellt. Dieser wurde mit einer pH-Elektrode, die durch H<sub>2</sub>O-Pufferlösungen geeicht wurde, bestimmt. Um aus dem mit der verwendeten Elektrode gemessenen pH-Wert den pD-Wert zu erhalten, wurde ein Wert von 0,4 addiert<sup>91</sup>.

$$\text{pD-Wert} = \text{pH-Wert} + 0,4 \quad (43)$$

Die untersuchten Trpzip-Peptide wurden am Research Resources Center der University of Illinois at Chicago in der Arbeitsgruppe von Prof. Timothy A. Keiderling synthetisiert, indem Fmoc Standardtechniken benutzt wurden. Die Aufreinigung der Proben wurde durch HPLC-Verfahren und MALDI MS bestätigt. Um die restlichen Trifluoroacetat (TFA) Gegenionen zu entfernen, die nach der Peptidsynthese noch am Peptid verblieben sind, wurde die jeweilige Peptidprobe in 0,1 M DCl gelöst und anschließend lyophilisiert. Dieser Präparationsschritt wurde drei Mal wiederholt, wodurch nicht nur TFA vom Peptid gelöst wurde, sondern auch ein HD-Austausch erfolgte. Im letzten Lyophilisierungsschritt wurde das Peptid mit der bereits erwähnten DCl-Lösung versetzt, so dass eine Peptidkonzentration von 20 mg/ml untersucht werden konnte. Der pH-Wert der Lösung wurde mit einer pH-Elektrode bestimmt.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Statische und zeitaufgelöste Studien der verwendeten Lösungsmittel

Um Absorptionsbanden eines biologischen Makromoleküls von denen des Lösungsmittels unterscheiden zu können, werden zunächst die Eigenschaften des Lösungsmittels  $H_2O$ ,  $D_2O$  und deren Mixtur untersucht. Dabei soll zunächst der Unterschied der Absorptionsspektren der Substanzen bei einer festen Temperatur und anschließend die Veränderungen in den Absorptionsspektren beim Erhitzen dieser Proben gezeigt werden.

#### 5.1.1 Vergleich der Lösungsmittelspektren bei konstanter Temperatur

Über die Absorptionsbanden und ihre jeweiligen Schwingungsmoden soll hier zunächst ein ganz allgemeiner Überblick gegeben werden. Dazu sind die Absorptionsspektren von  $H_2O$ ,  $D_2O$  und einer Mixtur aus 70 %  $D_2O$  und 30 %  $H_2O$  bei gleicher Temperatur gemeinsam in Abbildung 24 dargestellt.

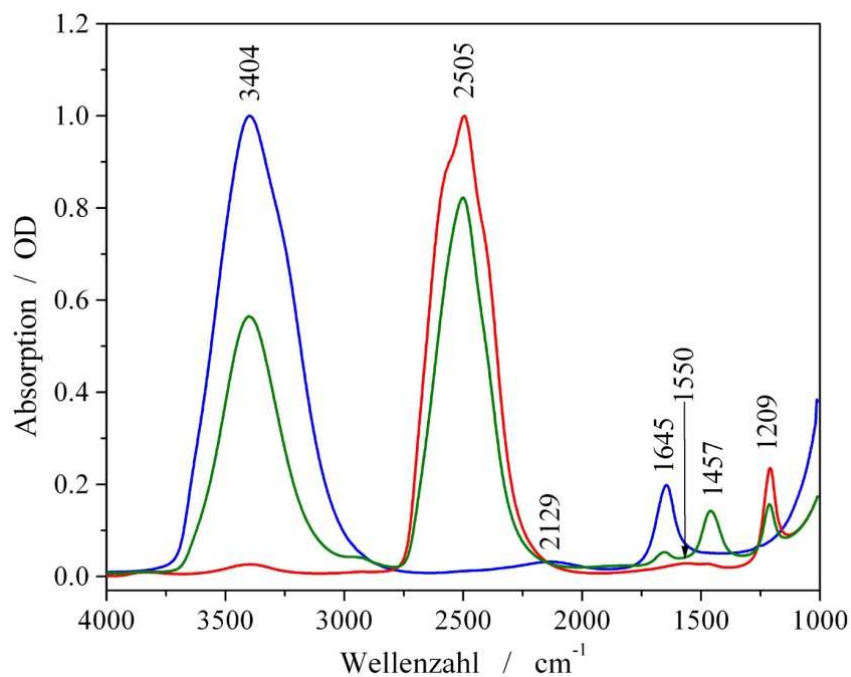


Abbildung 24: Absorptionsspektren von  $H_2O$  (blau),  $D_2O$  (rot) und einer Mixtur von 70 %  $D_2O$  und 30 %  $H_2O$  (grün) bei gleicher Temperatur von 14 °C.

Die in Abbildung 24 dargestellten Absorptionsspektren der Lösungsmittel wurden bei unterschiedlichen Schichtdicken bestimmt. Die nachträgliche Schichtdickenbestimmung wurde mit dem Gesetz von Lambert-Beer nach Gleichung (3) und den molaren Extinktionskoeffizienten, die in Tabelle 6 zusammengestellt sind, durchgeführt. Zur Analyse wurden die Absorptionen der Banden bei  $3404\text{ cm}^{-1}$  und  $2505\text{ cm}^{-1}$  verwendet. Die so ermittelten Schichtdicken sind für  $\text{H}_2\text{O}$   $1,8\text{ }\mu\text{m}$ , für  $\text{D}_2\text{O}$   $2,5\text{ }\mu\text{m}$  und für die Mixtur  $3,5\text{ }\mu\text{m}$ .

Die jeweils auffälligste Absorptionsbande im Spektrum von  $\text{H}_2\text{O}$  bzw.  $\text{D}_2\text{O}$ , dargestellt in Abbildung 24, entstehen durch die OH- bzw. OD-Streckschwingungen und einer Obertonschwingung der OH- bzw. OD-Biegeschwingung der entsprechenden Moleküle bei  $3404\text{ cm}^{-1}$  für  $\text{H}_2\text{O}$  und  $2505\text{ cm}^{-1}$  für  $\text{D}_2\text{O}$ . Im Spektrum der Mixtur sind die Banden, die aus der –OH und –OD -Streckschwingung entstehen, jeweils getrennt voneinander an den benannten Positionen zu erkennen.

Kleinere Banden, die durch die Kombination von Libration und Biegeschwingung entstehen, sind im Absorptionsspektrum von  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $1550\text{ cm}^{-1}$  und von  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $2129\text{ cm}^{-1}$  bemerkbar. Die jeweilige Absorptionsbande, die sich nur durch die entsprechende Biegeschwingung bildet, wird für  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $1209\text{ cm}^{-1}$  und für  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $1645\text{ cm}^{-1}$  offensichtlich. Der auffälligste Unterschied des Absorptionsspektrums der Mixtur zu den jeweiligen reinen Spektren entsteht durch die HDO-Biegeschwingung und wird durch eine zusätzliche Bande bei  $1457\text{ cm}^{-1}$  erkennbar. Durch das Auftreten zusätzlicher Absorptionsbanden in der Mixtur von  $\text{D}_2\text{O}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  lässt sich schlussfolgern, dass weitere spektrale Komponenten von HDO-Moden auftreten. HDO kann nicht als chemisch reine Substanz isoliert werden<sup>34,92</sup>. Es existiert nur in Mixturen von  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{H}_2\text{O}$ , die HDO durch Austauschreaktionen beinhalten. Um das Absorptionsspektrum von HDO zu bestimmen, müssen die Absorptionsspektren von  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{H}_2\text{O}$  von der Mixtur abgezogen werden. Davor muss jedoch sichergestellt sein, dass alle miteinander zu verrechnenden Spektren die gleiche Temperatur aufweisen. Das kann mit dem weiter oben beschriebenen Algorithmus zur spektralen Temperaturangleichung (siehe Kapitel 4.1.1) erreicht werden. Das Kriterium für einen optimalen Spektrenabzug ist die simultane spektrale Anpassung der Absorptionsbanden bei  $1209\text{ cm}^{-1}$  für  $\text{D}_2\text{O}$  und bei  $1640\text{ cm}^{-1}$  für  $\text{H}_2\text{O}$ .

Ein so erhaltenes HDO-Absorptionsspektrum ist in Abbildung 25 dargestellt. Neben den Absorptionsbanden von HDO selbst erkennt man darin Restbeiträge der Absorptionsbanden der „reinen“  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{H}_2\text{O}$  Komponenten mit negativer Intensität. Diese entstehen aufgrund



einer Positionsverschiebung der Absorptionsbanden durch den Isotopeneffekt und können bis zu  $10 \text{ cm}^{-1}$  betragen<sup>93</sup>.

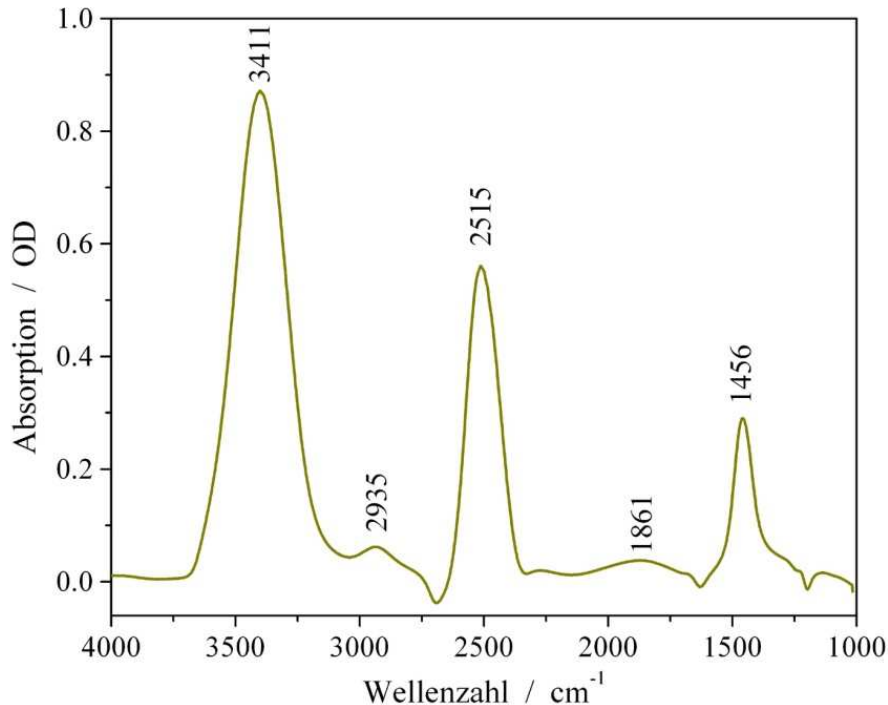


Abbildung 25: Absorptionsspektrum von HDO bei  $14 \text{ }^\circ\text{C}$ , nachdem von einem Absorptionsspektrum einer Mischung aus 70 %  $\text{D}_2\text{O}$  und 30 %  $\text{H}_2\text{O}$  (Schichtdicke von  $7,3 \text{ }\mu\text{m}$ ) die jeweiligen Anteile der „reinen“ Komponenten subtrahiert wurden.

Im dargestellten Absorptionsspektrum sind drei markante Absorptionsbanden erkennbar. Die größte Intensität weist die Bande der  $-\text{OH}$ -Streckschwingung bei  $3411 \text{ cm}^{-1}$  auf, gefolgt von der  $-\text{OD}$ -Streckschwingung bei  $2515 \text{ cm}^{-1}$  und der noch kleineren Bande der HDO-Biegeschwingung bei  $1456 \text{ cm}^{-1}$ . Des Weiteren können zwei in ihrer Intensität schwächere Banden erkannt werden. Zum einen die Absorptionsbande bei  $2935 \text{ cm}^{-1}$ , die aus der Oberton-schwingung der HDO-Biegeschwingung entsteht und zum anderen die breite Bande bei  $1861 \text{ cm}^{-1}$ , die ihren Ursprung in der Kombination von Librations- und Biegeschwingung hat. Eine Übersicht der größten Absorptionsbanden von  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  und HDO und ihrer zugehörigen molaren Extinktionskoeffizienten ist in Tabelle 6 zusammengestellt.

	H <sub>2</sub> O		HDO		D <sub>2</sub> O	
	$\nu_0$ (cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon_0$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	$\nu_0$ (cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon_0$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	$\nu_0$ (cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon_0$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
Kombination von Streck- ( $\nu_3$ ) und Biegeschwingung ( $\nu_2$ )					3840*	0,74*
					3830†	0,67†
Streckschwingung (symmetrisch $\nu_1$ +asymmetrisch $\nu_3$ ) + Oberton der Biegeschwingung ( $2\nu_2$ )	3404	99,9*	3385( $\nu$ -OD)‡		2504( $\nu_1+2\nu_2+\nu_3$ )*	71,5*
	( $\nu_1+2\nu_2+\nu_3$ )*		3410( $\nu$ -OD)†	62,5†	2540 ( $\nu_1+2\nu_2$ )†	59,82†
	3280	54,54†	2490( $\nu$ -OH)‡		2450 ( $\nu_3$ )†	55,21†
	( $\nu_1+2\nu_2$ )†		2500( $\nu$ -OH)†	41,4†		
	3490 ( $\nu_3$ )†	62,7†	2930 ( $2\nu_2$ )‡			
		2920 ( $2\nu_2$ )†	4,34†			
Kombination von Librations- und Biegeschwingung ( $\nu_2+\nu_L$ )	2127*	3,5*	1850‡		1555*	1,91*
	2125†	3,23†	1840†	3,36†	1555†	1,74†
Biegeschwingung ( $\nu_2$ )	1643*	21,8*	1450‡		1209*	17,4*
	1645†	20,8†	1460†	20,7†	1215†	16,1†

Tabelle 6: Positionen und molare Extinktionskoeffizienten von Absorptionsbanden von Wasser (H<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O und HDO) im Spektralbereich von 4000-1000 cm<sup>-1</sup> bei 25 °C (nach \*Venyaminov et al.<sup>94</sup>, †Bayly et al.<sup>34</sup> und ‡Libnau et al.<sup>93</sup>)

### 5.1.2 Temperaturabhängigkeit der Absorptionseigenschaften von H<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O und HDO

Bei der Variation der Temperatur einer wässrigen Lösung verändern sich Position und Intensität der jeweiligen Absorptionsbanden. Dabei wirkt sich die Änderung der Temperatur unterschiedlich stark auf die jeweilige Absorptionsbande aus. Es gibt dennoch vergleichbare qualitative Tendenzen der Absorptionsveränderungen von D<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>O, die durch Abbildung 26 veranschaulicht werden sollen.

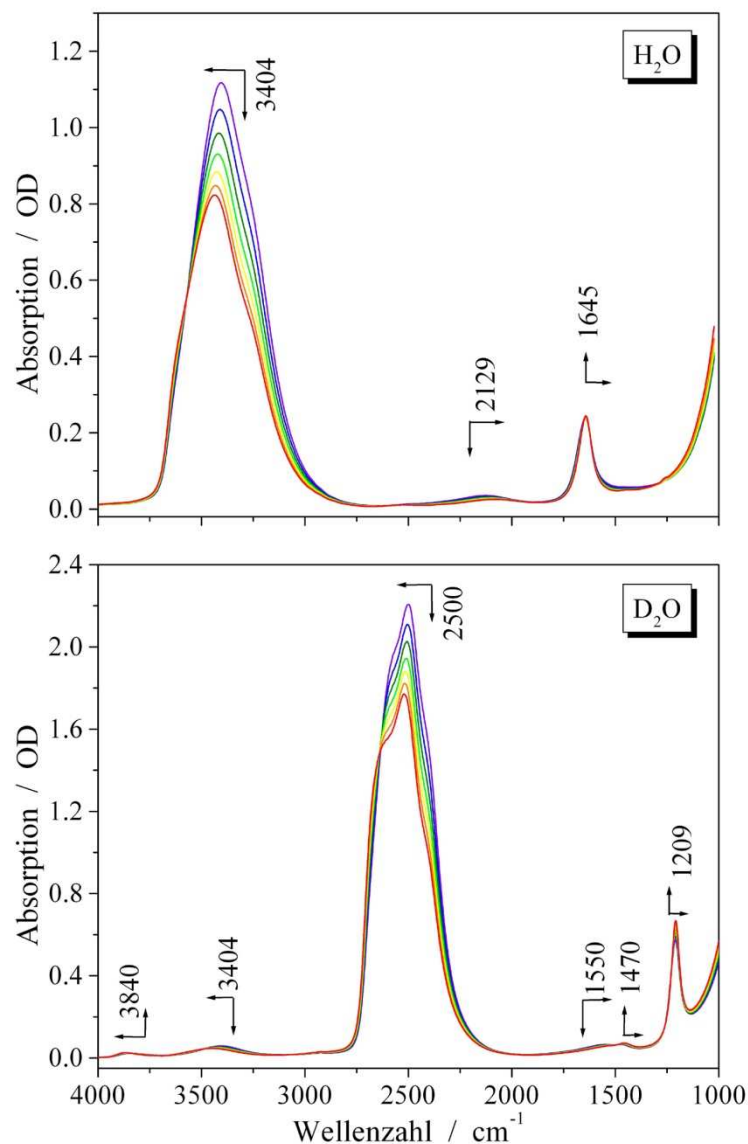


Abbildung 26: Absorptionsspektren von H<sub>2</sub>O (oben) und D<sub>2</sub>O (unten) bei unterschiedlichen Temperaturen beim Erwärmen des Lösungsmittels von 25 °C auf 85 °C (Schichtdicke: H<sub>2</sub>O 2 μm und D<sub>2</sub>O 5,6 μm). Die Richtungen der durch die Temperaturveränderung verursachten Positionsverschiebungen und Intensitätsänderungen sind durch Pfeile angedeutet.

Beim Erhitzen der Lösungen verschiebt sich die Position der Absorptionsbanden der jeweiligen Streckschwingung von D<sub>2</sub>O (2500 cm<sup>-1</sup>) und H<sub>2</sub>O (3404 cm<sup>-1</sup>) zu höheren Wellenzahlen, während gleichzeitig ihre Intensität abnimmt. Im Unterschied dazu verlagert sich das Maximum der Absorptionsbande der Kombination aus Librations- und Biegeschwingung von D<sub>2</sub>O (1550 cm<sup>-1</sup>) und H<sub>2</sub>O (2129 cm<sup>-1</sup>) zu niedrigeren Wellenzahlen. Simultan dazu

vermindert sich die Intensität der jeweiligen Bande. Des Weiteren wurde beobachtet, dass sich die Veränderungen der Absorptionsbanden der sich entsprechenden Schwingungsmoden von H<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O und HDO gleichen. Im Falle der Biegeschwingung sind die Veränderungen jedoch sehr klein. Dennoch ist die Tendenz der Bandenpositionsverschiebung von D<sub>2</sub>O (1209 cm<sup>-1</sup>) und H<sub>2</sub>O (1645 cm<sup>-1</sup>) zu niedrigeren Wellenzahlen und das gleichzeitige Ansteigen der Absorptionsintensität erkennbar.

Die gleichen beschriebenen qualitativen Tendenzen der jeweiligen Schwingungsmoden treffen auch für die Absorptionen von HDO zu, die in Abbildung 27 zur Vervollständigung der Temperaturabhängigkeit der untersuchten Lösungsmittel dargestellt sind.

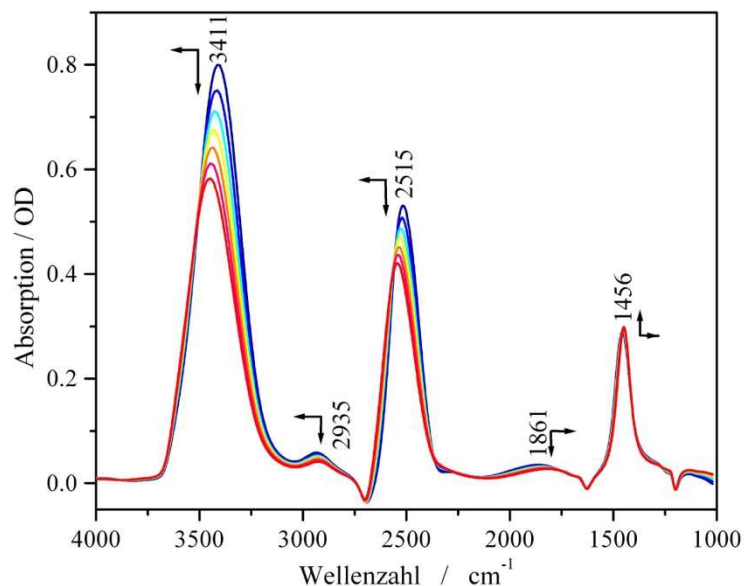


Abbildung 27: Absorptionsspektren von HDO bei unterschiedlichen Temperaturen beim Erwärmen von 25 °C auf 85 °C nachdem der jeweilige Anteil an D<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>O abgezogen wurde (Schichtdicke 7,3 μm). Die durch das Erhitzen verursachten Positionsverschiebungen und Intensitätsänderungen der Absorptionsbanden sind durch Pfeile angedeutet.

### 5.1.3 Analyse der temperaturabhängigen Absorptionsänderungen von H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O

Die Möglichkeit einer zusätzlichen Analyse der temperaturabhängigen Absorptionsänderungen  $\Delta A/\Delta T(T)$  ist durch die Berechnungen, der zur Temperaturangleichung der Absorptionsspektren benutzten linearen Regression, und speziell durch die damit bestimmte

Steigung gegeben. Der Wert der Steigung an einer bestimmten Wellenzahl- Position  $\nu$  im Spektrum bei einer Temperatur  $T$  kann als Absorptionsänderung  $\Delta A(\nu, T)$  beim Erwärmen der Probe um  $1^\circ\text{C}$  interpretiert werden.

Die  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren von  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{H}_2\text{O}$  sind exemplarisch für jeweils drei verschiedene Temperaturen in Abbildung 28 dargestellt. Die Wahl der dargestellten spektralen Region zeigt die Bereiche, in denen auch Schwingungsmoden von Peptiden und Proteinen zu erwarten sind. Die Bandenzuordnung kann dadurch erfolgen, dass man temperaturabhängige Veränderungen im Absorptionsspektrum mit lokalen Extremwerten im  $\Delta A/\Delta T$ -Spektrum vergleicht.

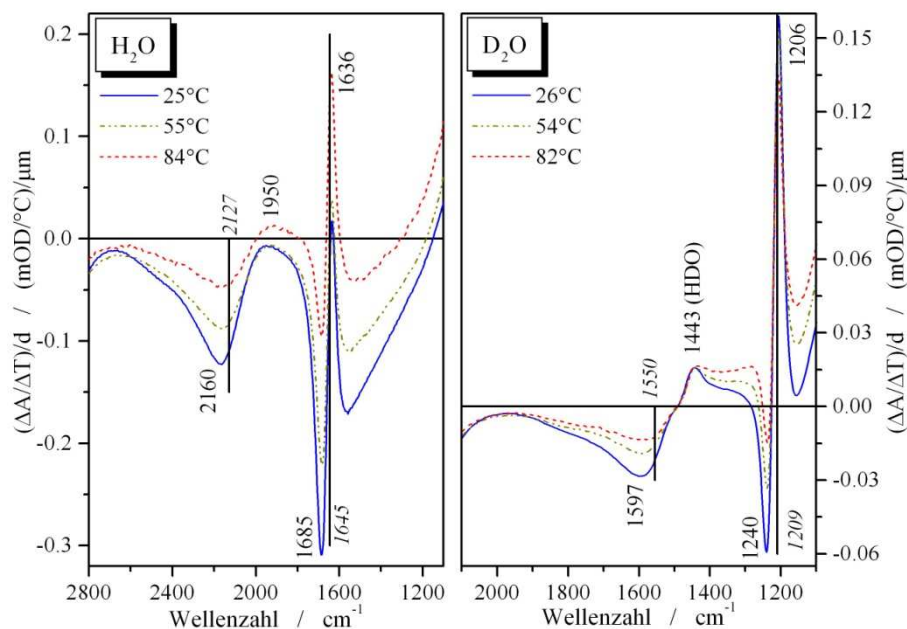


Abbildung 28:  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren von  $\text{H}_2\text{O}$  (links) und  $\text{D}_2\text{O}$  (rechts) veranschaulichen die Änderung der Absorption beim Erwärmen um  $1^\circ\text{C}$  bei verschiedenen Temperaturen. Die dargestellten Spektren sind normiert auf  $1 \mu\text{m}$  Schichtdicke. Zum Vergleich sind die Positionen der jeweiligen Absorptionsbanden im Absorptionsspektrum kursiv dargestellt.

Im dargestellten spektralen Bereich von  $2800\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$  von  $\text{H}_2\text{O}$  ( $2100\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$  von  $\text{D}_2\text{O}$ ) können zwei Absorptionsbanden untersucht werden. Ein Anstieg der Temperatur verursacht, wie bereits erwähnt, eine Intensitätsabnahme der breiten Absorptionsbande bei  $2127 \text{ cm}^{-1}$  ( $1550 \text{ cm}^{-1}$ ), der Kombination von Librations- und Biegeschwingung im Absorptionsspektrum von  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) und verschiebt dessen Frequenz (vergleiche dazu Abbildung 26). Dieser

Effekt bewirkt, dass im  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektrum ein Minimum bei  $2160 \text{ cm}^{-1}$  ( $1597 \text{ cm}^{-1}$ ) und ein Maximum bei  $1950 \text{ cm}^{-1}$  ( $1443 \text{ cm}^{-1}$ ) beobachtbar ist. Eine ähnliche, jedoch stärker ausgeprägte spektrale Veränderung ist für die schmale Absorptionsbande der Biegeschwingung bei  $1645 \text{ cm}^{-1}$  ( $1209 \text{ cm}^{-1}$ ) erkennbar. Die Frequenzverschiebung und Intensitätsänderung führen zu einem deutlichen Minimum bei  $1685 \text{ cm}^{-1}$  ( $1240 \text{ cm}^{-1}$ ) und einem Maximum bei  $1636 \text{ cm}^{-1}$  ( $1206 \text{ cm}^{-1}$ ) im  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektrum. Die beobachtete Absorptionsänderung bei  $1443 \text{ cm}^{-1}$  im  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektrum von  $\text{D}_2\text{O}$  kann eindeutig der Biegeschwingung von HDO zugeordnet werden, dessen Absorptionsbande bei  $1456 \text{ cm}^{-1}$  liegt und das in geringen Anteilen in  $\text{D}_2\text{O}$  vorhanden ist. Zur Ergänzung bleibt, dass ein ähnlicher Kurvenverlauf von  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  mit einem Minimum und Maximum jeweils links und rechts von der Frequenzposition der Bande des Absorptionsspektrums für die Streckschwingung von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  im jeweiligen Spektralbereich von  $3700\text{-}2900 \text{ cm}^{-1}$  und  $2800\text{-}2100 \text{ cm}^{-1}$  beobachtet wird (Daten nicht gezeigt).

In Übereinstimmung mit Rahmelow et al.<sup>82</sup> und Libnau et al.<sup>95</sup> bleibt das Profil des temperaturabhängigen  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren von  $\text{H}_2\text{O}$  im untersuchten Temperaturbereich erhalten. Die gleiche Aussage trifft auch auf jene  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren von  $\text{D}_2\text{O}$  zu. Jedoch wird ersichtlich, dass durch Erwärmen der Probe die Absolutwerte von  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  erniedrigt werden. Im Unterschied zu den Ergebnissen der erwähnten Autoren sind die gezeigten Absorptionsänderungen nicht konstant. Man kann sogar deutlich erkennen, dass die Änderung der Absorption bei Temperaturen von  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  größer ist als diejenigen bei  $82 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Ein Vergleich der  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren von  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{H}_2\text{O}$  zeigt ein fast identisches Kurvenprofil der Spektren. Sie unterscheiden sich lediglich durch eine Frequenzverschiebung, die aufgrund des Isotopeneffektes auftritt.

#### **5.1.4 Zeitaufgelöste Untersuchungen des $\text{D}_2\text{O}$ -Lösungsmittels mit der Temperatursprung-Apparatur**

Um eine Probe innerhalb von ca.  $10 \text{ ns}$  zu Erwärmen, muss die dazu notwendige Energie aufgenommen, d.h. absorbiert werden können. Um außerdem eine möglichst große spektrale Trennung von Anregungslicht und Messlicht ( $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) zu erreichen, wurde deshalb die Obertonschwingung des Lösungsmittels bei  $\sim 5200 \text{ cm}^{-1}$  angeregt. Die Wellenzahl für die Anregung des Temperatursprunghes beträgt  $5238 \text{ cm}^{-1}$ . Damit lassen sich sowohl  $\text{D}_2\text{O}$  als auch

H<sub>2</sub>O Lösungen erwärmen. In Abbildung 29 sind temperaturabhängigen FTIR-Absorptionsspektren von D<sub>2</sub>O im hier betrachteten spektralen Bereich dargestellt. Diese abgebildete Absorptionsbande von D<sub>2</sub>O entsteht aus dem Oberton der Streckschwingung  $2\nu_3$ <sup>92</sup>. Wie bereits gezeigt, ist die Bandenposition stark temperaturabhängig. Bei 5 °C liegt ihr Absorptionsmaximum bei 5030 cm<sup>-1</sup> und wird dann zu höheren Wellenzahlen verschoben, sodass bei 85 °C das Maximum der Absorption bei 5169 cm<sup>-1</sup> liegt. Die Absorptionsbande von H<sub>2</sub>O entsteht aus einer Kombination von Streck-, Biege- und Torsionsschwingung und besitzt ihr Absorptionsmaximum bei 5160 cm<sup>-1</sup><sup>92</sup>. Dadurch lässt sich auch in H<sub>2</sub>O mit der hier benutzten Anregungswellenzahl von 5238 cm<sup>-1</sup> ein Temperatursprung induzieren.

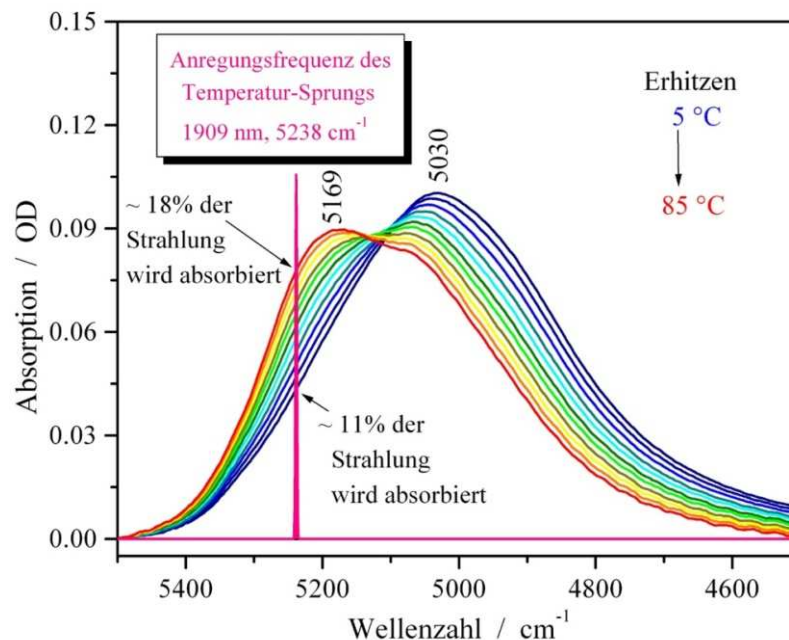


Abbildung 29: Absorptionsspektren von D<sub>2</sub>O bei einer konstanter Schichtdicke von 100 µm und bei unterschiedlichen Temperaturen von 5 - 85 °C. Die Wellenlänge, bei der die Anregung des Temperatursprunges erfolgt (1909 nm  $\approx$  5238 cm<sup>-1</sup>), ist eingezeichnet.

Zur Beurteilung der Größe des Laser-induzierten Temperatursprunges wurden Untersuchungen in Bezug auf dessen Schichtdicken- und Temperaturabhängigkeit durchgeführt. Vergleicht man Proben, die sich in ihrer optischen Schichtdicke unterscheiden, jedoch bei gleicher Anfangstemperatur liegen, so wird ein Temperatursprung-induziert, der unabhängig von der Schichtdicke der Probe ist und immer die gleiche Größe besitzt<sup>96</sup>. Nach dem Gesetz von Lambert-Beer und aus experimentellen statischen IR-Absorptionsdaten geht

hervor, dass die Absorption bei  $5238\text{ cm}^{-1}$  bei einer größeren Schichtdicke stärker ist als bei kleineren Schichtdicken. Das resultiert daher, dass in der Probe mit der größeren Schichtdicke mehr Moleküle in dem durchstrahlten Probenvolumen sind. Jedes einzelne Molekül absorbiert jedoch immer die gleiche Menge an Energie, sofern genügend Anregungsenergie zur Verfügung steht. Dadurch ist der Temperatursprung für die untersuchten geringen Schichtdicken von  $10\text{ }\mu\text{m}$  bis  $100\text{ }\mu\text{m}$  schichtdickenunabhängig. Um diesen Effekt experimentell zu belegen, wurden Temperatursprung-Experimente bei unterschiedlichen Schichtdicken, jedoch mit gleicher Anfangstemperatur durchgeführt.

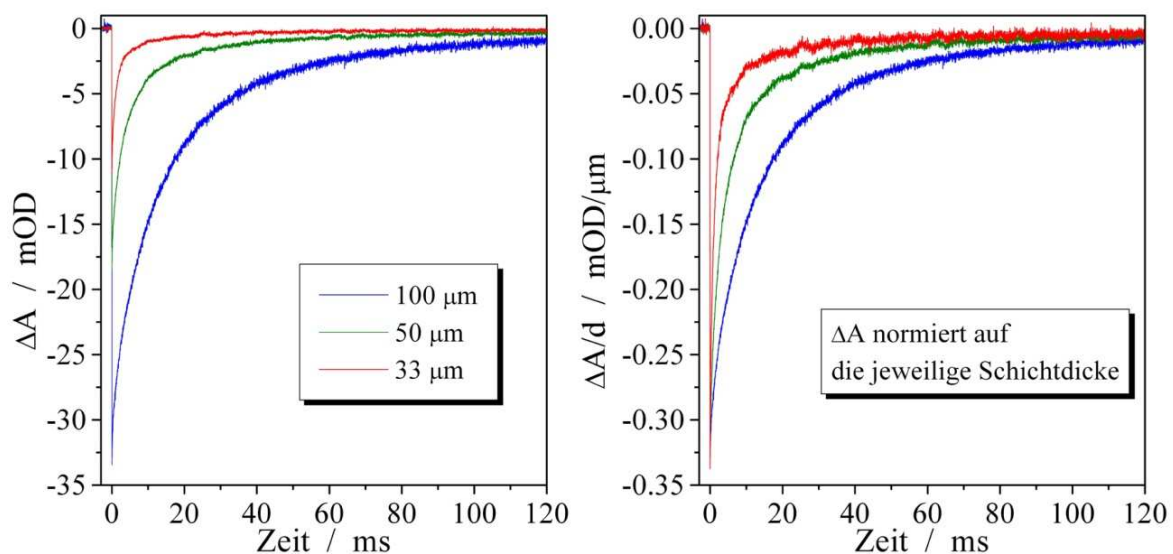


Abbildung 30: Temperatursprung-Experimente zur Untersuchung der zeitaufgelösten Absorptionsänderungen von  $\text{D}_2\text{O}$  bei verschiedenen Schichtdicken und identischer Anfangstemperatur. Links: Experimentell bestimmte Absorptionstransienten von  $\text{D}_2\text{O}$ , Rechts: Absorptionstransienten des Lösungsmittels, die auf ihre jeweilige Schichtdicke normiert sind.

In den experimentell bestimmten Absorptionstransienten (Abbildung 30, links) erkennt man deutlich, dass für die größere Schichtdicke eine stärkere Absorptionsänderung beobachtet wird, als für die kleinere. Dieser Effekt ist durch das Lambert-Beer Gesetz erklärbar, bei dem die Absorption proportional zur Schichtdicke einer Probe ist. Um eine Aussage über eventuell gleich große Temperatursprünge zu treffen, werden die beobachteten Absorptionsänderungen auf die Schichtdicke normiert, indem  $\Delta A$  durch die Schichtdicke geteilt wird. Dann erkennt man (Abbildung 30, rechts), dass die nun schichtdickenunabhängigen Absorptionstransienten



kurz nach dem Temperatursprung tatsächlich einen gleich großen Wert aufweisen. Das bestätigt die Annahme, dass die Größe des Temperatursprunges schichtdickenunabhängig ist. In Abbildung 30 erkennt man jedoch auch, dass der Abkühlprozess schichtdickenabhängig ist. Je dicker die Schichtdicke ist, desto langsamer kühlt die Probe wieder ab. Die erwärmte Probe wird jeweils durch die Materialien ihrer Umgebung, „kaltes“ Lösungsmittel und die CaF<sub>2</sub>-Fenster abgekühlt. Dieser Abkühlprozess, verursacht durch Wärmeleitung, ist umso stärker, je kleiner die Schichtdicke der erwärmten Probe ist<sup>7</sup>. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Wärmeleitung über die Flächen der beiden angrenzenden „kalten“ Komponenten, D<sub>2</sub>O und CaF<sub>2</sub>-Fenster, erfolgt. Durch die Abnahme der Probenschichtdicke, nimmt auch die Fläche der D<sub>2</sub>O-Komponente und somit deren Einfluss auf den Abkühlprozess ab. Dadurch steigt der Einfluss der CaF<sub>2</sub>-Komponente.

Theoretische Betrachtungen der Abkühlung beschreiben den Prozess damit, dass die erwärmte Probenzone von seiner Umgebung, dem kalten Lösungsmittel und dem CaF<sub>2</sub>-Fenster durch Wärmeleitung abgekühlt wird. Zur Beschreibung dieses Prozesses werden die folgenden Annahmen gemacht. Die Intensität des Laserstrahls und somit auch die Verteilung der durch das Lösungsmittel aufgenommenen Energie entspricht einem Gauss'schen Strahlprofil. Deshalb wird die gesamte spezifische Energie Q als eine Funktion des Ortes r beschrieben durch:

$$Q(r) = \frac{E_t}{2\pi\sigma^2\rho L} e^{(-r^2/2\sigma^2)} \quad (44)$$

Die Breite der Verteilung wird mit  $\sigma$ , die Dichte des Lösungsmittels mit  $\rho$ , die Schichtdicke mit L und die durch die vom Lösungsmittel aufgenommene, gesamte Energie mit  $E_t$  bezeichnet. Mit dieser Energieverbreitung ist eine Beschreibung der Temperaturverteilung innerhalb der Probe  $T_0$  direkt nach dem Temperatursprung möglich, bei der auch die spezifische Wärmekapazität  $C_v$  berücksichtigt ist.

$$T_0 = \frac{Q(r)}{C_v} \quad (45)$$

Außerhalb der durch den Laserpuls erwärmten Probe stimmt die Anfangstemperatur des D<sub>2</sub>O-CaF<sub>2</sub>-Systems mit dem thermischen Gleichgewichtswert überein, der über den Probenhalter eingestellt wird. Die achsensymmetrische zeitabhängige Gleichung der Wärmeleitung kann in Zylinderkoordinaten folgendermaßen beschrieben werden:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \alpha \cdot \left( \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial T}{\partial r} + \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \right) \quad (46)$$

mit:

$$\alpha = k / \rho C_v \quad (47)$$

Dabei wird die Diffusionsfähigkeit  $\alpha$  beschrieben durch die Wärmeleitfähigkeit  $k$ , die Dichte  $\rho$  und die spezifische Wärmekapazität  $C_v$ . Durch das Lösen dieser Wärmeleitungsgleichung gaben Wray et al.<sup>7</sup> eine Beschreibung des zeitlichen Temperaturabfalles innerhalb einer Probe durch die Wärmeleitung nach einem Temperatursprung. Bis zu einem bestimmten Zeitpunkt nimmt dabei die Temperatur innerhalb der Probe in zeitlich gleicher Art und Weise ab, unabhängig von der Schichtdicke der erwärmten Probe. Erst ab dem berechneten Zeitpunkt wirkt sich die unterschiedliche Schichtdicke auf die Stärke des Abkühlprozesses aus. Durch ihre theoretische Analyse zeigten Wray et al. unter anderem, dass Temperatursprung-Experimente von Lösungen für 100  $\mu\text{m}$  Schichtdicke innerhalb einer Zeit von  $2,04 \cdot 10^{-4}$  s, für 50  $\mu\text{m}$  Schichtdicke innerhalb von  $5,11 \cdot 10^{-5}$  s und für 20  $\mu\text{m}$  Schichtdicke innerhalb von  $8,13 \cdot 10^{-6}$  s beobachtet und ausgewertet werden können. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Dauer des Temperatursprungs invers proportional zur Wärmeleitfähigkeit des benutzten Fenstermaterials ist. Indem also diese Wärmeleitfähigkeit halbiert werden würde, könnte die Dauer der experimentell auswertbaren Zeit verdoppelt werden.

Die theoretischen Beschreibungen des zeitlichen Intensitätsverlaufes nach einem Temperatursprung werden durch die hier gezeigten experimentellen Ergebnisse bestätigt. Der Prozess der Abkühlung einer Probe verläuft für kleine Schichtdicken schneller als für große (Abbildung 30).

Werden nun Absorptionen mit gleicher optischer Schichtdicke, jedoch unterschiedlicher Temperatur (siehe Abbildung 29) verglichen, so trifft die Argumentation der unterschiedlichen Anzahl von Lösungsmittelmolekülen nicht mehr zu. Ausschlaggebend für die Größe des Temperatursprungs ist dann die Absorption der Energie der Laserstrahlung bei  $5238 \text{ cm}^{-1}$ . Der durch die Erwärmung verursachte Effekt der Verschiebung der Absorptionsbande zu höheren Wellenzahlen ist an der Absorption der zum Temperatursprung benutzten Anregungsfrequenz bemerkbar. Der Vergleich der Absorption bei  $5238 \text{ cm}^{-1}$  verdeutlicht, dass diese für  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  geringer ist als für  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ . Bei höheren Temperaturen kann also mehr der eingestrahnten Energie absorbiert werden als bei tieferen Temperaturen. Für einen

theoretischen T-Sprung von 10 °C bei einer Anfangstemperatur der Probe von 5 °C und einer Absorption von 11 % erhält man bei einer Anfangstemperatur von 85 °C, bei der die Absorption 18 % beträgt, einen Temperatursprung von 16,4 °C.

Zur Bestimmung der effektiven Größe des Temperatursprunges können die  $\Delta A/\Delta T(v,T)$ -Spektren (siehe Abbildung 31) benutzt werden. Die Absorptionsänderung pro 1 °C ist nach dem Gesetz von Lambert Beer proportional zur Schichtdicke. Für eine allgemeine Aussage wird deshalb  $\Delta A/\Delta T(v,T)$  auf eine Schichtdicke von 1  $\mu\text{m}$  normiert.

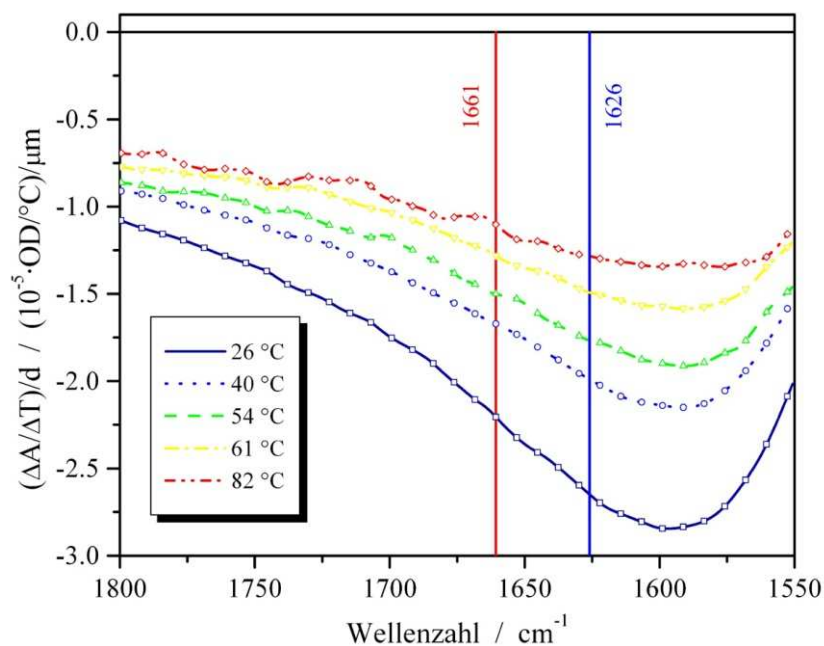


Abbildung 31: Änderung der Absorption pro 1 °C von  $\text{D}_2\text{O}$  im Amid I Bereich bei verschiedenen Temperaturen. Zum Vergleich der Unterschiede sind die Absorptionsänderungen bei der Wellenzahl von  $1661\text{ cm}^{-1}$  (rot) und  $1626\text{ cm}^{-1}$  (blau) markiert.

Durch Abbildung 31 wird der bereits in Kapitel 5.1.3 erwähnte Effekt der größeren Absorptionsänderungen bei tieferen Temperaturen verdeutlicht. In der Darstellung wird offensichtlich, dass die dargestellte Absorptionsänderung bei der Probenerwärmung um 1 °C bei 26 °C größer ist als bei 82 °C. Des Weiteren erkennt man, dass bei gleicher Temperatur, z.B. 26 °C,  $\Delta A/\Delta T(v,T)$  für die Wellenzahl von  $1620\text{ cm}^{-1}$  ebenfalls größer ist als für die Wellenzahl von  $1660\text{ cm}^{-1}$ . Zur Bestimmung der Größe eines Temperatursprunges sind demnach sowohl die Anfangstemperatur der Probe als auch die Wellenlänge des Messlichtes entscheidend.

Generell kann aus den dargestellten Daten abgelesen werden, dass bei der Erwärmung der Probe um 1 °C bei einer Wellenzahl von 1626 cm<sup>-1</sup> und Temperatur von 26 °C die Absorptionsänderung  $-0,027 \frac{mOD}{^{\circ}C \mu m}$  beträgt und bei 1661 cm<sup>-1</sup>  $-0,022 \frac{mOD}{^{\circ}C \mu m}$ . Williams et al.<sup>9</sup> gehen hingegen bei der Kalibrierung ihres Temperatursprunges von einer nahezu linearen Änderung der Absorption bei Temperaturänderung aus und geben für den Bereich von 1700 cm<sup>-1</sup> bis 1632 cm<sup>-1</sup> eine Absorptionsänderung von  $-0,03 \frac{mOD}{^{\circ}C \mu m}$  bis  $-0,04 \frac{mOD}{^{\circ}C \mu m}$  an. Causgrove et al.<sup>6</sup> schätzen den erzeugten Temperatursprung von 1 °C in ihrer D<sub>2</sub>O-Probe mit  $-3,9 \frac{mOD}{^{\circ}C}$  für eine Schichtdicke von 100 μm ab.

Diese an den statischen, im thermischen Gleichgewicht bestimmten Absorptionseigenschaften von D<sub>2</sub>O lassen sich auch anhand von kinetischen Daten überprüfen. In Abbildung 32 sind Transienten von D<sub>2</sub>O bei verschiedenen Anfangstemperaturen, jedoch gleicher optischer Schichtdicke (ca. 100 μm) dargestellt. Um möglichst große Absorptionsänderungen verfolgen zu können, wurde eine Wellenlänge des Messlichtes von 1626 cm<sup>-1</sup> gewählt. Wie bereits im Methodenteil erwähnt (Kapitel 2.3) werden zur Berechnung einer ΔA-Transiente immer zwei zeitabhängige Intensitätsänderungsverläufe ΔI(t) aufgenommen. Eine Intensitätsänderung resultiert daher, dass das Messlicht durch die Probe geht, dort vom Anregungslicht überlagert wird und danach zum Detektor läuft. Das zweite Signal entsteht, indem das Messlicht blockiert wird, und nur das Licht der thermischen Strahlung der Probenerwärmung am Detektor registriert wird. Dieses letztere Signal kann zur Identifizierung unterschiedlich großer Temperatursprünge bei unterschiedlichen Anfangstemperaturen verwendet werden.

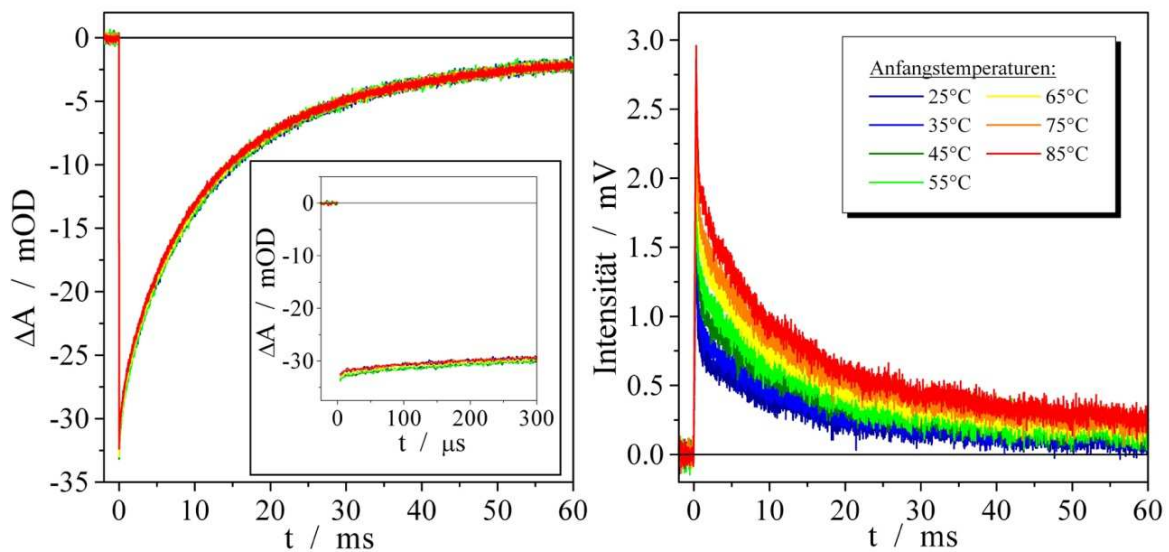


Abbildung 32: Zeitaufgelöste Temperatursprung-Dynamiken von  $D_2O$ . Links: Absorptionsänderung von  $D_2O$  ( $100 \mu m$ ) bei  $1626 \text{ cm}^{-1}$  und verschiedenen Anfangstemperaturen. Rechts: Intensitätsänderungen bei jeweils identischen Anfangstemperaturen wie links (gleiche Farbmarkierung), aber blockiertem Messlicht, so dass nur die durch die Erwärmung der Probe resultierende Wärmestrahlung detektiert werden kann.

Wie in Abbildung 32 (links) erkennbar ist, ist bei allen dargestellten unterschiedlichen Anfangstemperaturen die jeweilige Absorptionsänderung gleich groß. Daraus könnte man die Schlussfolgerung ziehen, dass, wenn  $\Delta A$  für alle Anfangstemperaturen gleich groß ist, auch der Temperatursprung  $\Delta T$  gleich groß sein müsste, falls  $\Delta A/\Delta T$  für alle Temperaturen konstant ist. Wenn jedoch, wie in Abbildung 31 gezeigt, die Änderung der Absorption pro  $1^\circ C$  bei  $25^\circ C$  größer ist als bei  $85^\circ C$ , und  $\Delta A$  für alle Anfangstemperaturen gleich groß ist, so muss der Temperatursprung  $\Delta T$  für  $25^\circ C$  kleiner sein als für  $85^\circ C$ . Beurteilt man die dargestellten Intensitätsänderungen, die rein aus der Wärmestrahlung der Proben entstehen (Abbildung 32, rechts), so sieht man, dass  $\Delta I$  für eine Temperatur von  $25^\circ C$  kleiner ist als für  $85^\circ C$ . Das untermauert die gewonnene Erkenntnis, dass der Temperatursprung bei niedrigen Anfangstemperaturen kleiner ist als bei hohen Temperaturen.

Bei der Induzierung eines Temperatursprungs wird die Energie der Laserstrahlung während eines Zeitintervalls von bis zu 20 ns (zwei Mal die Pulsbreite, entsprechend den zwei entgegen gerichteten Laserpulsen durch die Probe) innerhalb des  $D_2O$  Lösungsmittels absorbiert. Sowohl die Anregung der  $D_2O$  Schwingung als auch die thermische Diffusion

geschehen auf einer Zeitskala von wenigen Pikosekunden<sup>9,97,98</sup>. Die Zeitauflösung der Apparatur ist jedoch auf 33 ns begrenzt. Dadurch kann nur das Abkühlen der D<sub>2</sub>O-Absorption zeitaufgelöst verfolgt werden.

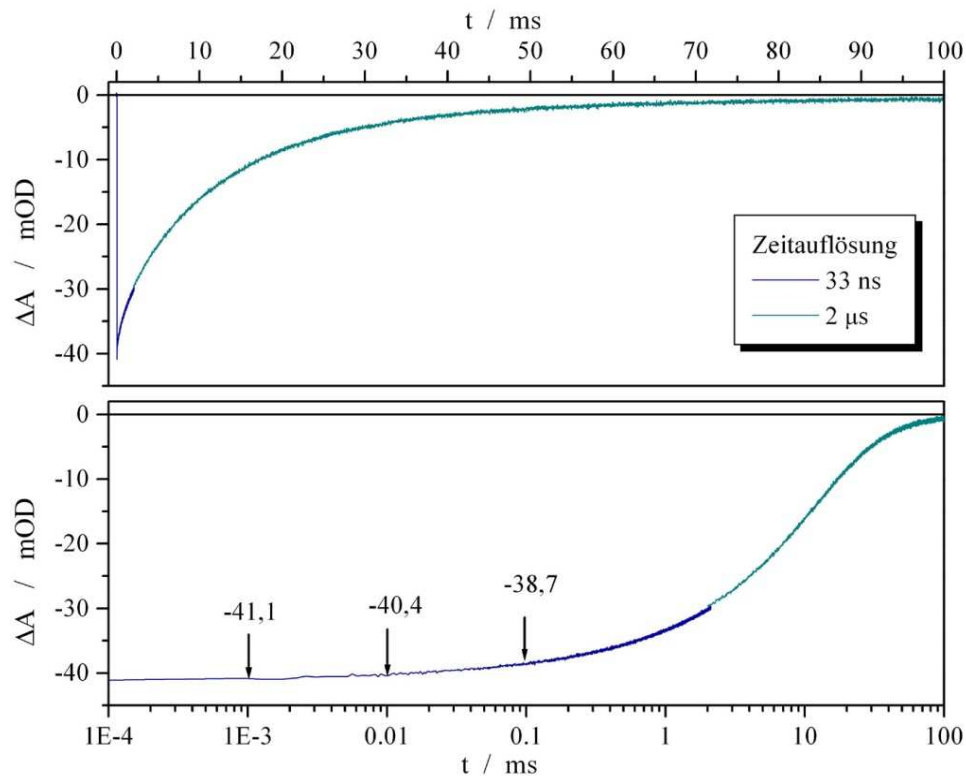


Abbildung 33: Absorptionsänderung von D<sub>2</sub>O bei 1638,8 cm<sup>-1</sup> (optische Schichtdicke 100 μm), detektiert mit unterschiedlicher Zeitauflösung mit 33 ns (blau) und 2 μs (dunkelcyan) und in unterschiedlichen Abszissenachsenkalierungen: linear (oben), logarithmisch zur Basis 10 (unten).

Die in Abbildung 33 dargestellte zeitabhängige Absorptionsänderung zeigt den Abkühlprozess einer D<sub>2</sub>O Probe von 100 μm Schichtdicke bei einer Messwellenlänge von 1638,8 cm<sup>-1</sup> und einer Anfangstemperatur von 20 °C. Zum Zeitpunkt t = 0 s wird ein Temperatursprung von ca. 13 °C initiiert (−3 mOD ≡ 1 °C). Sofort ist eine Absorptionsänderung von -41 mOD detektierbar. Nach dieser schnellen Erwärmung ist lediglich das Relaxieren der Kinetik, das dem Abkühlen der Probe entspricht, beobachtbar. Es ist außerdem erkennbar, dass nach einer Zeitspanne von 100 ms die Probe noch nicht vollständig wieder auf 20 °C abgekühlt ist. Die Darstellung der Kinetik mit einer linearen Abszissenachsenkalierung verdeutlicht den exponentiell-ähnlichen Abkühlprozess. Durch Abszissenachsen-

skalierung in logarithmischer Form wird verdeutlicht, dass in den ersten  $100 \mu\text{s}$  die Temperatur nahezu konstant ist. Nach  $10 \mu\text{s}$  ist die Absorption um  $1,7 \%$  gefallen, was einer Temperaturänderung von ca.  $0,2 \text{ }^\circ\text{C}$  entspricht. Die Absorption ist nach  $100 \mu\text{s}$  auf  $5,8 \%$  des Ausgangswertes abgesunken. Das entspricht einer Temperaturänderung von ca.  $0,8 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Um den Prozess der Abkühlung zu untersuchen, wird der zeitabhängige Absorptionsverlauf mathematisch analysiert. Versucht man die Zeitabhängigkeit des Abkühlprozesses durch ein Zwei-Zustandsmodell, von warm zu kalt, zu beschreiben, so sollten die experimentellen Daten durch eine mono-exponentielle Zerfallsfunktion angepasst werden können. Dazu ist ein solcher Anpassungsprozess in Abbildung 34 beschrieben.

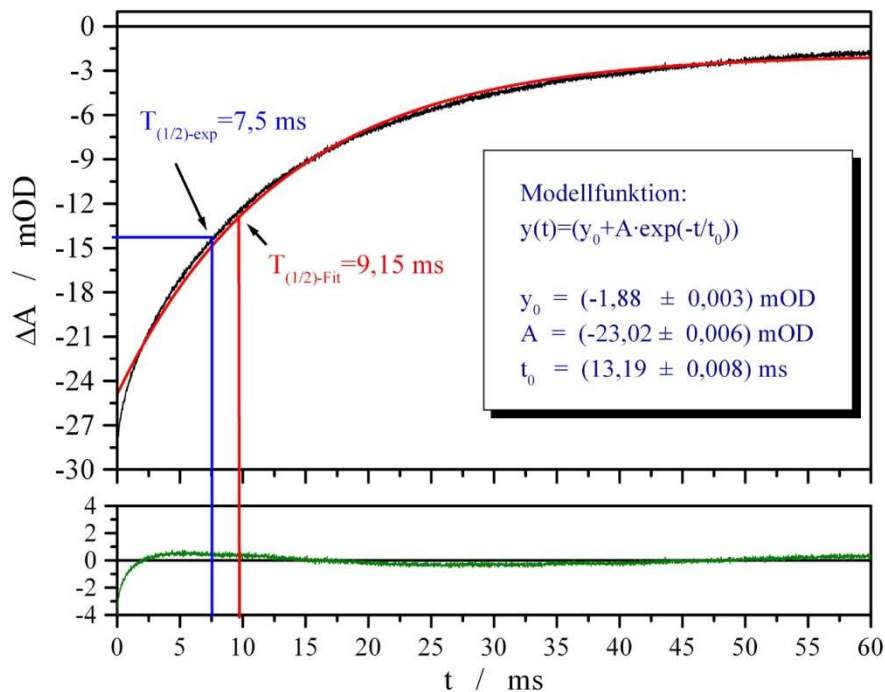


Abbildung 34: Absorptionsänderung von  $\text{D}_2\text{O}$  bei  $1634,4 \text{ cm}^{-1}$  (optische Schichtdicke von  $100 \mu\text{m}$ ) und einer Anfangstemperatur von  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ . oben: Experimentelle Daten (schwarz) und Annäherung der experimentellen Daten durch mono-exponentielle Zerfallsfunktion (rot), unten: Differenz von experimentellen Daten und angepasster Funktion (oliv).

Wie man in der Abbildung 34 (oben) gut erkennt, lässt sich der Abkühlungsprozess nicht mit einer mono-exponentiellen Zerfallsfunktion anpassen. Dass diese mathematische Funktion nicht den tatsächlichen Kurvenverlauf wiedergibt, sieht man deutlich in Abbildung 34 (unten), in einer Transiente, die keinen geraden Verlauf aufweist. Die darin abgebildete

Transiente beinhaltet die Information über den Unterschied von der mathematisch angepassten Funktion zu den experimentell ermittelten Absorptionen. Würde die dargestellte Transiente einen linearen Verlauf darstellen, so würde das verwendete Modell den zeitlichen Verlauf der experimentellen Daten beschreiben. Wie man jedoch erkennt, trifft das nicht zu. Des Weiteren stimmen die durch die Anpassung der mathematischen Funktion gefundenen Werte der vermeintlichen Halbwertszeit von 9,15 ms nicht mit der augenscheinlich ablesbaren Halbwertszeit von 7,5 ms, bei der die Intensität auf die Hälfte abgesunken ist, überein. Schlussfolgernd bleibt, dass der Abkühlprozess nicht über ein einfaches exponentielles Zwei-Zustandsmodell über den gesamten Zeitbereich von 0 bis 60 ms beschrieben werden kann.

Wie bereits festgestellt, wurde tragen zum Prozess der Abkühlung mehrere Komponenten, D<sub>2</sub>O und CaF<sub>2</sub>, bei. Jedoch kann auf einem begrenzten, schichtdickenabhängigen Zeitbereich der Abkühlprozess des Lösungsmittels beschrieben werden<sup>7</sup>. Diese Temperaturstabilität konnte auch experimentell gezeigt werden (Abbildung 33). Eine mono-exponentielle Funktion kann jedoch nur auf den ersten 200 µs angewandt werden um die beobachtbaren Absorptionsänderungen mathematisch zu beschreiben.

### **5.1.5 Zusammenfassung der Untersuchung der Lösungsmittel**

Im vorangegangenen Kapitel wurden die spektralen Eigenschaften von H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O untersucht. Durch Anwendung einer Anpassungsprozedur konnten aus der Mischung von H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O Absorptionsspektren von HDO bestimmt werden. Zusätzlich wurden die Absorptionsänderungen der Lösungsmittel bei Temperaturvariation analysiert. Durch Anwendung des Algorithmus zur Temperaturangleichung (siehe Kapitel 4.1.1) konnte auf einfache Art und Weise ein temperaturabhängiges  $\Delta A/\Delta T$ -Spektrum bestimmt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Änderung der Absorption bei Temperaturvariation nicht linear ist (wie das z.B. von Williams et al.<sup>9</sup> beschrieben wurde), sondern mit zunehmender Temperatur kleiner wird.

Für alle Untersuchungen mit dem in dieser Arbeit verwendeten Laser-induzierten Temperatursprung ist die Gegenwart eines Lösungsmittels wie H<sub>2</sub>O oder D<sub>2</sub>O in der Probe notwendig. Nur durch die Absorption der Laserenergie bei  $\sim 5200 \text{ cm}^{-1}$  durch das jeweilige Lösungsmittel kann die Temperatur erhöht werden.



Temperatursprung-Experimente können bspw. mit H<sub>2</sub>O als Lösungsmittel induziert werden. H<sub>2</sub>O als Lösungsmittel besitzt im Amid I Bereich jedoch eine Absorptionsbande, die eine direkte Untersuchung von Änderungen in der Sekundärstruktur der Peptide erschwert. Aus diesem Grund wurden alle Temperatursprung-Experimente mit dem Lösungsmittel D<sub>2</sub>O durchgeführt.

In umfangreichen Studien wurden Temperatursprung-Experimente mit D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel analysiert. Bei der Induzierung des Temperatursprunghes wird die Temperatur des Lösungsmittels erhöht. Damit überlagert die zeitaufgelöste Absorptionstransiente des Lösungsmittels beim Abkühlprozess jedoch auch immer die Dynamik des untersuchten Peptids. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Größe des Temperatursprunghes von der jeweiligen Anfangstemperatur der Probe abhängig ist. Für die Beurteilung einer Peptiddynamik ist die Beschreibbarkeit der Lösungsumgebung von entscheidender Relevanz. Für Proben in D<sub>2</sub>O-Lösungsmittel und einer Schichtdicke von 100 µm ist der Abkühlprozess des D<sub>2</sub>O innerhalb der ersten 10 µs fast vernachlässigbar und auf einem Zeitbereich von bis zu 200 µs mathematisch beschreibbar. Dementsprechend können Dynamiken von Peptiden innerhalb der ersten 200 µs nach der Induzierung eines Temperatursprunghes zeitaufgelöst beobachtet und analysiert werden.

## 5.2 Thermischer Denaturierungsprozess von Ribonuklease A in D<sub>2</sub>O Lösung

Anhand des Modellproteins der Ribonuklease A soll im Folgenden der Prozess der Faltung und Entfaltung, ausgelöst durch Temperaturveränderungen, untersucht werden. Zur Bestimmung der Stabilität eines Proteins wird dieses im Lösungsmittel belassen, um einen möglichst guten Vergleich von *in vivo* und *in vitro* Umgebungen zu erhalten. Das dadurch entstehende Absorptionsspektrum beinhaltet eine Überlagerung von Protein- und Lösungsmittelbanden und soll zur genaueren Analyse in diese Bestandteile auch spektral zerlegt werden.

Um direkt im Absorptionsspektrum Veränderungen zu untersuchen, die aufgrund von Strukturveränderungen im Protein auftreten, sollte die Überlagerung der Amid I Bande mit Absorptionsbanden des Lösungsmittels minimiert werden. Wie in Kapitel 5.1 bereits erwähnt, überlagert die Absorptionsbande der Biegeschwingung von H<sub>2</sub>O mit ihrem Absorptionsmaximum bei 1645 cm<sup>-1</sup> den spektralen Bereich der Amid I Bande. Zusätzlich sind die beobachtbaren Absorptionsänderungen  $\Delta A/\Delta T$  von H<sub>2</sub>O, die durch das Erhitzen der Probe entstehen (siehe dazu Abbildung 28), zu berücksichtigen. Im Vergleich zu den Absorptionsänderungen im Protein, das im Gegensatz zu H<sub>2</sub>O in sehr geringer Konzentration vorhanden ist, sind die Absorptionsänderungen von H<sub>2</sub>O beim Erwärmen signifikant und nicht zu vernachlässigen. Durch den Austausch des Lösungsmittels H<sub>2</sub>O mit D<sub>2</sub>O wird die intensive Absorptionsbande der Biegeschwingung, aufgrund der unterschiedlichen Isotope, aus dem Amid I Bereich herausgeschoben. Dennoch wird der Amid I Bereich von der Schulter einer breiten Bande des D<sub>2</sub>O überlagert, die ihr Maximum bei 1555 cm<sup>-1</sup> besitzt. Ein Vergleich der molaren Extinktionskoeffizienten von Absorptionsbanden von H<sub>2</sub>O und D<sub>2</sub>O (siehe Tabelle 6, S. 70 und Abbildung 24, S. 67) belegt, dass durch die Verwendung von D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel größere Schichtdicken der Probenzelle als 10  $\mu\text{m}$  benutzt werden können. Aus diesem Grund werden IR-Faltungsstudien an Proteinen in der Regel in D<sub>2</sub>O-Lösungen durchgeführt. Bereits ohne Abzug der D<sub>2</sub>O-Absorption können strukturelle Veränderungen beim Falten bzw. Entfalten der Proteine spektral verfolgt werden. Als Beispiel sind in Abbildung 35 die temperaturabhängigen Absorptionsspektren von Ribonuklease A in D<sub>2</sub>O-Lösung dargestellt.

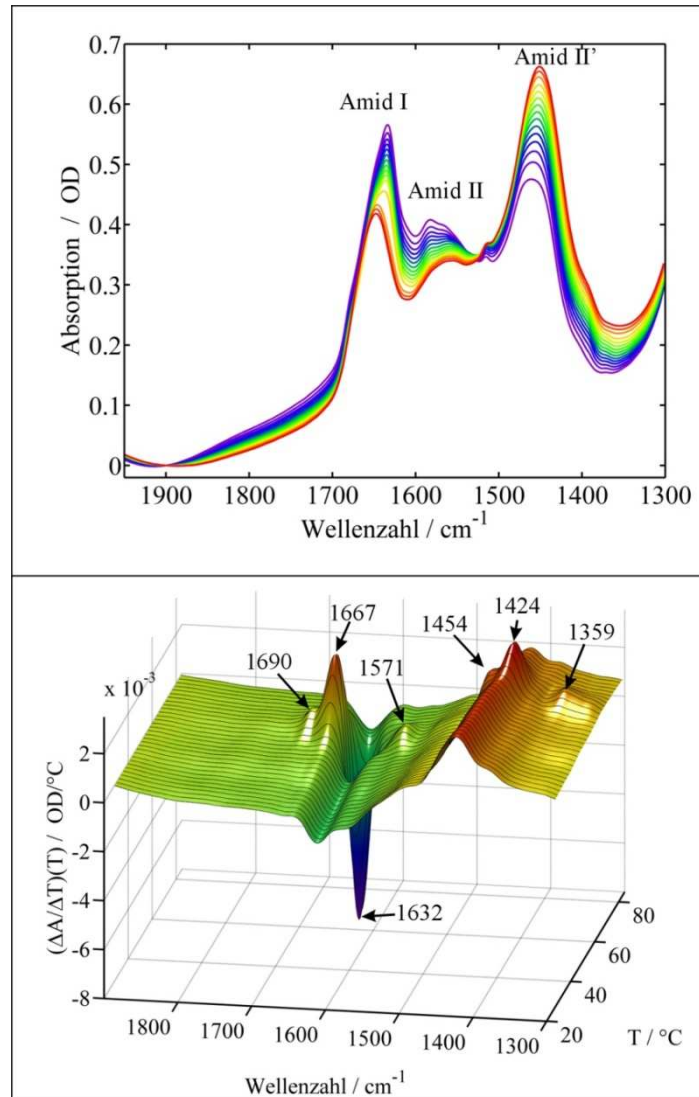


Abbildung 35: Absorption und deren Veränderungen von Ribonuklease A in Phosphat Puffer in D<sub>2</sub>O (pD 6,7) bei unterschiedlichen Temperaturen von 25 °C bis 85 °C und einer Schichtdicke von 50 µm. Oben: Temperaturabhängige Absorption  $A(T)$ . Unten: Temperaturabhängige Absorptionsänderungen  $\Delta A/\Delta T(T)$ .

Man erkennt (Abbildung 35, oben) drei Absorptionsbanden, die aus verschiedenen Amid-Schwingungen des Proteins entstehen. Die Amid II Mode ist von ca. 1550 cm<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O zur Amid II' nach ca. 1450 cm<sup>-1</sup> aufgrund des Isotopeneffekts verschoben. Wie bereits erwähnt, überlappen die Absorptionsbanden des Proteins immer noch die Absorptionsbanden des Lösungsmittels, hier mit D<sub>2</sub>O- und HDO-Absorptionsbanden. Aus diesem Grund sind die beobachtbaren Absorptionsbanden der Amid I und Amid II' Moden von fast gleich großer Intensität. Trotz dieser Überlagerung lässt sich in den temperaturabhängigen Absorptions-

spektren  $A(\nu, T)$  eine spektrale Veränderung im Amid I Bereich bei 62 °C beobachten. Diese kann als thermische Denaturierung des Proteins<sup>60,67</sup> identifiziert werden. Darüber hinaus sind keine weiteren spektralen Veränderungen in den Absorptionsspektren  $A(\nu, T)$  erkennbar.

Betrachtet man aber die in Kapitel 4.1.1 eingeführten  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$ -Spektren, so können daraus offensichtlich auch ohne Abzug des Lösungsmittels mehr spektrale Informationen erhalten werden als aus den Absorptionsspektren (siehe Abbildung 35, unten). Wie im Absorptionsspektrum ist auch hier die Strukturveränderung durch eine spektrale Veränderung bei 62 °C erkennbar. Darüberhinaus beobachtet man noch weitere spektrale Einzelheiten im Amid I Bereich. Bei 62 °C erkennt man jeweils eine Absorptionzunahme bei 1690  $\text{cm}^{-1}$  und 1667  $\text{cm}^{-1}$  und eine Absorptionsabnahme bei 1632  $\text{cm}^{-1}$ .

Wie bereits durch Yamamoto et al.<sup>60</sup> beschrieben wurde, resultiert die Zunahme der Intensität bei 1690  $\text{cm}^{-1}$  und 1667  $\text{cm}^{-1}$  aus der Intensitätszunahme einer einzigen breiten Absorptionsbande, die ihr Maximum zwischen 1600  $\text{cm}^{-1}$  und 1700  $\text{cm}^{-1}$  besitzt. Die Abnahme der Intensität der schmalen Bande bei 1680  $\text{cm}^{-1}$  wird von der breiten positiven Intensitätszunahme überlagert, wodurch das Abbild der Intensitätszunahme von zwei Absorptionsbanden erzeugt wird. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass eine Intensitätsverminderung bei 1632  $\text{cm}^{-1}$  und 1680  $\text{cm}^{-1}$  als Abnahme einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und die gleichzeitige Absorptionzunahme bei 1667  $\text{cm}^{-1}$  als Zunahme der ungeordneten Struktur interpretiert werden kann.

Außerhalb des Amid I Bereiches sind in den  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$ -Spektren in Abbildung 35 (unten) bei 62 °C kleinere Absorptionsänderungen bei 1571  $\text{cm}^{-1}$ , 1454  $\text{cm}^{-1}$ , 1424  $\text{cm}^{-1}$  und 1359  $\text{cm}^{-1}$  erkennbar, die im Absorptionsspektrum  $A(\nu, T)$  nicht bemerkbar sind. Diese spektralen Veränderungen werden durch unterschiedliche Schwingungsänderungen im Peptid verursacht und können bspw. aus Beiträgen der Seitenketten, wie z.B. Glutamat<sup>99</sup> entstehen. Diese Absorptionsänderungen werden genau bei der Temperatur beobachtet, bei der das Protein denaturiert. Wie schon an den  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$ -Spektren der Lösungsmittel  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  gezeigt wurde, können diese Veränderungen nicht nur durch das Entstehen sondern auch durch das Verschieben von Positionen der beteiligten Absorptionsbanden entstehen.

Da die temperaturabhängigen Absorptionsänderungen des Lösungsmittels viel größer sind als diejenigen, die durch die Strukturveränderungen des Proteins verursacht werden, ist eine sorgfältige Methode zum Abzug des Absorptionsspektrums eines Lösungsmittels  $A_{\text{Lös}}(\nu, T)$  von dem Absorptionsspektrum der Mischung des Lösungsmittels mit dem Protein

$A_{\text{Mix}}(A_{\text{Lös}}(v,T), A_{\text{Protein}}(v,T))$  notwendig. Dabei müssen jedoch auch die individuellen Temperaturabhängigkeiten der Lösungsmittel- bzw. Proteinspektren berücksichtigt werden. Die Anwendung des bereits erwähnten Subtraktionsalgorithmus (Kapitel 4.1.2) liefert dann nur noch die temperaturabhängige Absorption des Proteins  $A_{\text{Protein}}(v,T)$ . In Abbildung 36 sind die Absorptionsspektren von Ribonuklease A nach dem Lösungsmittelabzug dargestellt.

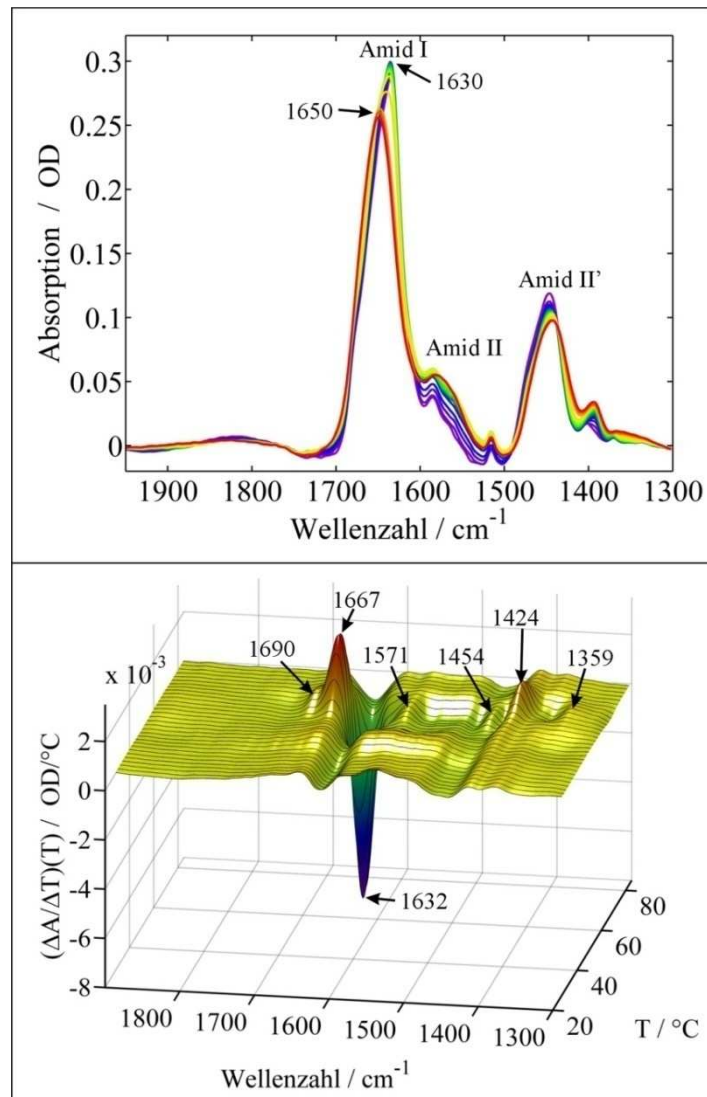


Abbildung 36: Absorption und deren Veränderungen von Ribonuklease A bei unterschiedlichen Temperaturen von 25  $^\circ\text{C}$  bis 85  $^\circ\text{C}$  nach Abzug der jeweiligen temperaturabhängigen Lösungsmittelspektren. Oben: Temperaturabhängige Absorption  $A(T)$ . Unten: Temperaturabhängige Absorptionsänderungen beim Erhitzen  $\Delta A/\Delta T(T)$ .

Ein Vergleich der Absorptionsspektren ohne (Abbildung 35) und nach (Abbildung 36) Lösungsmittelabzug veranschaulicht die Notwendigkeit der Abzugsprozedur. Allgemein gilt, dass die Intensität der Amid II' Mode von Proteinen kleiner ist als diejenige der Amid I Bande. Das kann ohne Wasserabzug nur dann erzielt werden, wenn hochreines D<sub>2</sub>O verwendet wird und die Probenpräparation in einer wasserdampffreien Umgebung erfolgt, was experimentell schwer durchzuführen ist. Die Subtraktion der Absorption des Lösungsmittels kann dafür genutzt werden, das korrekte Intensitätsverhältnis von Amid I zu Amid II' Bande wiederzugeben und thermisch induzierte Strukturveränderungen anhand von Absorptionsänderungen auch in der Amid II' Bande zu beobachten.

Auch in den  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren (siehe Abbildung 36, unten) ist die Minimierung von Lösungsmittelbeiträgen unter Beibehaltung aller Änderungen der Amidbanden nachweisbar. Des Weiteren kann überprüft werden, ob der Algorithmus der Subtraktionsprozedur artifizielle Absorptionsbanden erzeugt. Das ist jedoch nicht der Fall. Die Änderungen der Amidbanden zeichnen sich in den  $\Delta A(\nu, T)$ -Spektren hingegen deutlicher ab als im Absorptionsspektrum  $A(\nu, T)$ . Insbesondere in der Amid II' Region, mit ihrem Absorptionsmaximum um  $1450 \text{ cm}^{-1}$ , ist die Überlappung mit der HDO Absorptionsbande reduziert. Dadurch können auch die kleineren Absorptionsänderungen des Proteins in diesem Spektralbereich untersucht werden.

Neben dem markanten Faltungsübergang können auch noch weitere Absorptionsänderungen außerhalb der Temperatur von  $62 \text{ °C}$  untersucht werden. Die  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren geben dann einen Einblick in die jeweiligen temperaturinduzierten Absorptionsänderungen der Proteine in ihrer nativen bzw. denaturierten Konformation. In Abbildung 37 sind repräsentative  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren mit und ohne Wasserabzug dargestellt, die jeweils charakteristische und repräsentative Spektren aus den Temperaturregionen  $25 - 58 \text{ °C}$  und  $70 - 85 \text{ °C}$  zeigen. Zusätzlich wird zu diesen Spektren  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  das Lösungsmittel D<sub>2</sub>O dargestellt.

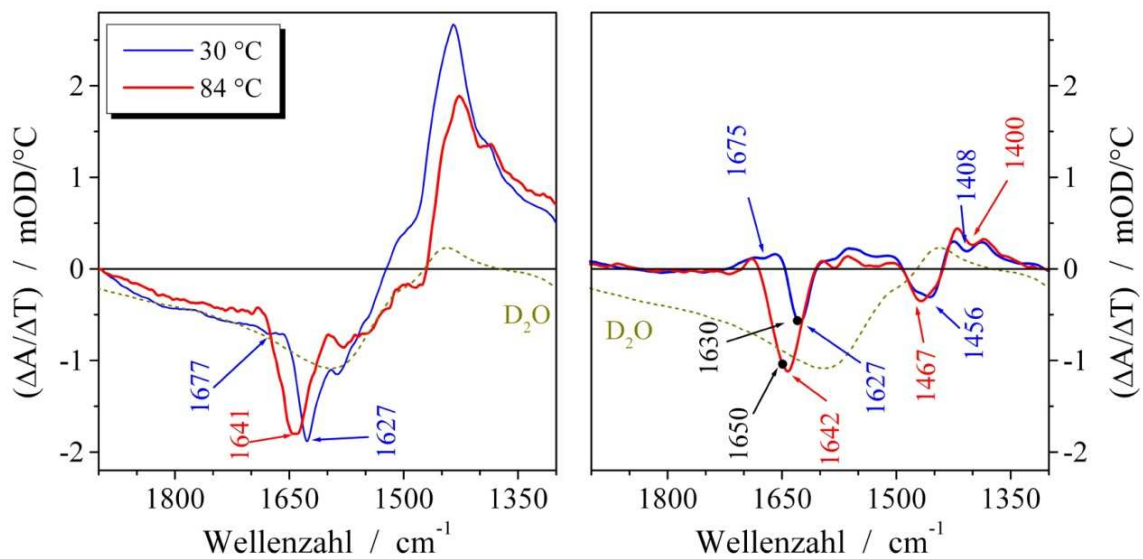


Abbildung 37:  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren von Ribonuklease A (Schichtdicke  $50 \mu\text{m}$ ) außerhalb der Übergangstemperatur bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (blau) und  $84 \text{ }^\circ\text{C}$  (rot) ohne (links) und nach (rechts) dem Lösungsmittelabzug. Zur besseren Vergleichbarkeit ist ein  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektrum von  $\text{D}_2\text{O}$  (gepunktete Linie) beiden Abbildungen hinzugefügt.

In den  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren ohne Wasserabzug (siehe Abbildung 37, links) sind zwei Banden besonders auffällig. Bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  wird ein Minimum bei  $1627 \text{ cm}^{-1}$  und bei  $84 \text{ }^\circ\text{C}$  ein Minimum bei  $1641 \text{ cm}^{-1}$  beobachtet. Der Vergleich der Intensitätswerte weist eine größere Absorptionsänderung bei  $1627 \text{ cm}^{-1}$  auf als bei  $1641 \text{ cm}^{-1}$ . Die hochfrequente Komponente des  $\beta$ -Faltblattes ist bei  $1677 \text{ cm}^{-1}$  nur sehr marginal erkennbar. Positive Absorptionsänderungen können im Amid I Bereich nicht beobachtet werden. Zusätzlich sind in der Amid I Region keine positiven Absorptionsänderungen ersichtlich. Ähnlich zu den Absorptionsspektren  $A(\nu, T)$  und den  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren (vergleiche Abbildung 35) sind ohne Lösungsmittelabzug außerhalb der Amid I Region keine spektralen Unterschiede erkennbar. In diesem spektralen Bereich sind die Intensitäten der Absorptionsänderungen des Proteins im Vergleich zu den starken Absorptionsänderungen von  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{HDO}$  sehr klein und können ohne Lösungsmittelabzug nicht aufgelöst werden.

Nach dem Lösungsmittelabzug können die  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren des Proteins genauer untersucht werden. Wie in Abbildung 37 (rechts) erkennbar ist, sind die größten Absorptionsänderungen, die Position des jeweiligen Minimums im zugehörigen Spektrum auf  $1627 \text{ cm}^{-1}$  und  $1642 \text{ cm}^{-1}$  verschoben. Nun können auch positive Absorptionsveränderungen beobachtet

werden. Zusätzlich ist die Intensität des Minimums bei  $1627\text{ cm}^{-1}$  geringer als diejenige bei  $1642\text{ cm}^{-1}$ . Durch den Abzug des Lösungsmittels hat sich also das Verhältnis der Intensitäten der Minima umgekehrt.

Ein Vergleich der  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren mit den zugehörigen Absorptionsspektren  $A(\nu, T)$  verdeutlicht, dass die größten beobachtbaren Absorptionsänderungen nicht mit den Absorptionsmaxima der  $A(\nu, T)$  Spektren übereinstimmen. Während die Maxima im  $A(\nu, T)$  Spektrum von Ribonuklease A (Abbildung 36) bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  für  $30\text{ °C}$  und bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  für  $84\text{ °C}$  liegen, werden die größten Absorptionsänderungen im  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektrum bei  $1627\text{ cm}^{-1}$  für  $30\text{ °C}$  und bei  $1642\text{ cm}^{-1}$  für  $84\text{ °C}$  beobachtet. In Analogie zu  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  in den Lösungsmittelspektren, sind die im Protein beobachteten Absorptionsänderungen auf Bandenverschiebungen zurückzuführen.

### 5.2.1 Zusammenfassung der Untersuchungen an Ribonuklease A

Im vorangegangenen Kapitel wurden FTIR-Untersuchungen zur thermischen Entfaltung und Stabilität von Ribonuklease A vorgestellt. Anhand dieser Messergebnisse konnte die Notwendigkeit des Lösungsmittelabzuges durch die entwickelten Algorithmen (Kapitel 4.1) und die Auswirkungen auf die Analyse der Daten gezeigt werden.

Vor allem die Spektren der temperaturabhängigen Absorptionsänderungen  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  zeigten hier ihr Einsatzpotenzial. Ohne Lösungsmittelabzug konnten sogar außerhalb des Amid I Bereiches Absorptionsänderungen beim thermischen Entfalten der RNase A beobachtet werden. Da die Berechnung dieser Spektren einfach ist, können  $\Delta A/\Delta T(\nu, T)$  Spektren allgemein zu einer objektiven Beurteilung von spektralen Veränderungen standardmäßig benutzt werden.



---

### 5.3 Untersuchungen des Homopolymers Polyglutaminsäure (PGS) mittels statischer und zeitaufgelöster Spektroskopie

Polyglutaminsäure (PGS) ist ein bereits hervorragend charakterisiertes Homopolymer und dient im Rahmen dieser Arbeit zur Überprüfung und Etablierung der hier entwickelten Messmethode, der Laser-induzierten Temperatursprung-IR-Spektroskopie. Bevor jedoch der Prozess der Faltung bzw. Entfaltung der Peptide dynamisch untersucht werden kann, gibt eine Analyse statischer CD- und FTIR-Spektren Aufschluss über vorhandene Sekundärstrukturelemente. Zusätzlich werden sowohl die pH-Abhängigkeit als auch die jeweilige thermische Stabilität gezeigt. Anhand dieser Ergebnisse werden anschließend an ausgewählten pH-Werten, Temperaturen und Wellenlängen Temperatursprung-Experimente zur Entfaltung von  $\alpha$ -Helices präsentiert.

#### 5.3.1 pH-Abhängigkeit der Struktur von Polyglutaminsäure

Die unterschiedlichen Ladungszustände der ionisierbaren Seitengruppen der Polyglutaminsäure verursachen verschiedene Konformationen des Peptids. Bei neutralem oder basischem pH ist Polyglutaminsäure geladen. Innerhalb dieses pH-Bereiches besitzt PGS ebenso wie Polylysin eine Knäuel-Struktur, die aber teilweise geordnet erscheint, ähnlich einer ausgedehnten helikalen Konformation<sup>100</sup>. Der pH-abhängige Übergang von der Knäuelkonformation zu einer  $\alpha$ -helikalen Struktur ist gut ausgeprägt. Dieser kann mittels CD- und FTIR-Spektroskopie beobachtet werden, wodurch eine Bestimmung der jeweiligen Konformation des Peptids möglich ist. Aus diesem Grund werden zunächst die CD-Spektren (siehe Abbildung 38) von Polyglutaminsäure analysiert. Um einen Vergleich mit den FTIR-Daten zu erhalten, wurden alle benutzten Proben in D<sub>2</sub>O-Lösungen bei gleicher Peptidkonzentration untersucht. Deshalb werden auch alle gemessenen pH-Werte der Lösungen nach Gleichung (43) umgerechnet und im Folgenden als pD-Werte bezeichnet. Um die hohen Peptidkonzentrationen mit der CD-Spektroskopie untersuchen zu können, wurden Dünnschichtküvetten mit einer Schichtdicke von 10  $\mu$ m verwendet und in einem baugleichen Probenhalter, wie er bereits in Abbildung 6 dargestellt wurde, im Strahlengang positioniert.

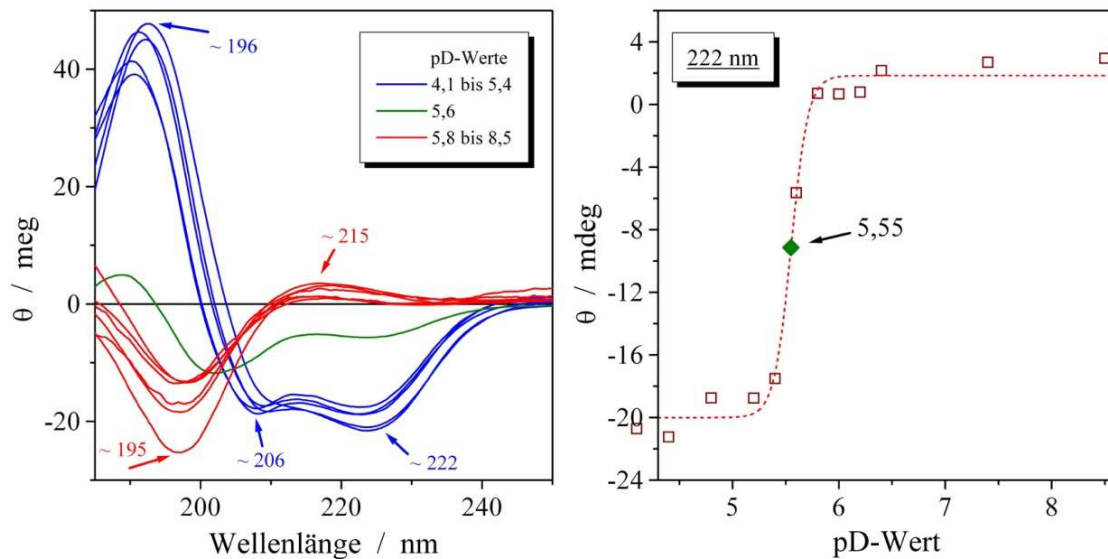


Abbildung 38: *pD-Abhängigkeit der Struktur von Polyglutaminsäure untersucht mit CD-Spektroskopie. Alle dargestellten CD-Spektren wurden bei gleichen Messbedingungen (Probenkonzentration  $\sim 20 \text{ mg/ml}$ , Schichtdicke  $10 \mu\text{m}$ , Raumtemperatur, in  $\text{D}_2\text{O}$ -Lösung) durchgeführt. Links: Die je nach pD-Wert unterschiedliche Form der CD-Spektren deutet auf verschiedene Sekundärstrukturen. Rechts: CD-Signal an der für  $\alpha$ -Helix typischen Wellenlänge von  $222 \text{ nm}$  für unterschiedliche pD-Werte. Durch eine einfache sigmoide Boltzmann-Funktion wird der Strukturübergang von  $\alpha$ -Helix nach ungeordnetem Knäuel beschrieben.*

Anhand der in Abbildung 38 (links) dargestellten CD-Spektren ist ein Unterschied der pD-abhängigen Proben offensichtlich. Bei pD-Werten zwischen 4,1 bis 5,4 ähneln die Spektren von Polyglutaminsäure einander. Die Banden bei  $\sim 196 \text{ nm}$ ,  $\sim 206 \text{ nm}$  und  $\sim 222 \text{ nm}$  weisen auf die  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur hin. Im Kontrast dazu stehen die CD-Spektren für den pD-Bereich 5,8 bis 8,5. Sie weisen eine Bande mit negativer Intensität bei  $\sim 195 \text{ nm}$  und eine positive Bande mit sehr geringer Intensität bei  $\sim 215 \text{ nm}$  auf. Aufgrund dieser Spektren kann davon ausgegangen werden, dass Polyglutaminsäure innerhalb des neutralen und basischen pD-Bereiches eine ungeordnete Knäuel-Struktur einnimmt. Das bei dem pD-Wert von 5,6 beobachtete CD-Spektrum kann als eine Übergangsstruktur interpretiert werden, bei der sowohl  $\alpha$ -Helices als auch ungeordnete Knäuel-Sekundärstrukturen vorhanden sind. Diese pH-abhängigen Untersuchungen von Polyglutaminsäure durch CD-Spektroskopie wurden unter anderem bereits von Bordi et al.<sup>71</sup> durchgeführt. Auch sie berichten von einem durch die Ionisierung der Seitenketten getriebenen Strukturübergang.

Um den Übergang von ungeordnetem Knäuel zur  $\alpha$ -Helix zu analysieren, wurde die Intensität bei der für  $\alpha$ -helikale Strukturen typischen Bande bei 222 nm gegenüber dem jeweiligen pD-Wert aufgetragen (siehe Abbildung 38, rechts). Mit einer einfachen sigmoiden Boltzmann-Funktion ist es möglich, diesen Übergang zu beschreiben. Als Mittelpunkt des pD-abhängigen Strukturüberganges wird ein pD-Wert von 5,55 mit einer Übergangsbreite von 0,08 festgestellt. Anhand der experimentellen CD-Spektren und den durch die Boltzmann-Funktion beschriebenen Parametern wird ersichtlich, dass es einen sehr kleinen pD-Bereich gibt, der als Übergang von  $\alpha$ -Helix nach ungeordnetem Knäuel interpretiert wird. Diese Beobachtung wurde durch Barksdale und Stuehr<sup>72</sup> ebenfalls gezeigt, die die pH-Abhängigkeit des  $\alpha$ -helikalen Peptidanteiles untersucht haben. Ihr beobachteter Mittelpunkt des Strukturüberganges geschieht bei einem pH-Wert von 5,21, wobei ihre Untersuchungen in H<sub>2</sub>O-Lösung und bei 37 °C durchgeführt wurden. Appel und Yang<sup>101</sup> zeigten in ihrer Studie, dass durch die Änderung des pD-Wertes Strukturveränderungen an Polyglutaminsäure beobachtet werden können, deren Übergang in einer D<sub>2</sub>O-Lösung bei pD 5,4 und in H<sub>2</sub>O-Lösung bei pH 4,8 liegen.

Zu weiteren Untersuchungen von Polyglutaminsäure werden FTIR-Absorptionsspektren gemessen. Um diese besser miteinander vergleichen zu können, werden die Lösungsmitteleabsorptionen von dem jeweiligen Spektrum des in D<sub>2</sub>O gelösten Peptids abgezogen. Um zusätzliche kleine Unterschiede der Peptidkonzentration und optischen Schichtdicke zu unterdrücken, wird die Absorption des Amid I Bereiches in allen in Abbildung 39 dargestellten Spektren auf eins normiert.

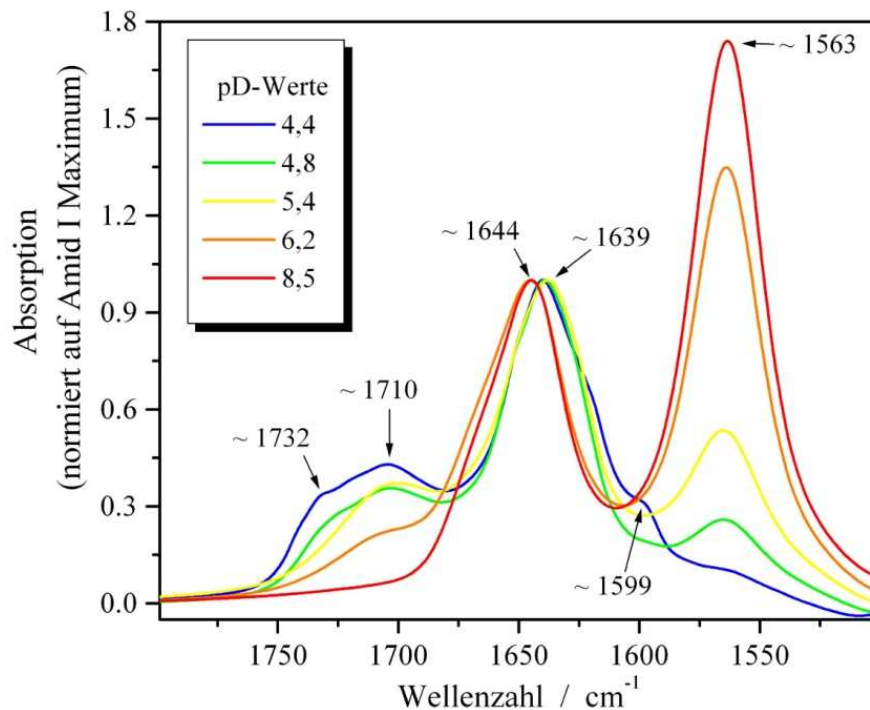


Abbildung 39: Normierte pD-abhängige FTIR-Absorptionsspektren von Polyglutaminsäure in  $D_2O$  nach Lösungsmittelabzug. Alle Spektren wurden mit nahezu identischen Messbedingungen aufgenommen (Probenkonzentration  $\sim 20$  mg/ml, Schichtdicke  $\sim 10$   $\mu m$ , Raumtemperatur  $\sim 20$   $^{\circ}C$ ).

Die in Abbildung 39 dargestellten Absorptionsspektren von Polyglutaminsäure weisen starke pD-abhängige Absorptionsbanden sowohl im als auch außerhalb des Amid I Bereiches auf. Dabei fallen vor allem diejenigen Banden auf, die durch die Carboxyl-Gruppen verursacht werden. Ionisierte Carboxyl-Gruppen  $-COO^-$  absorbieren bei  $\sim 1563$   $cm^{-1}$  und entstehen durch die anti-symmetrische Streckschwingung. Die protonierte Form  $-COOH$  besitzt ein Absorptionsmaximum bei  $\sim 1710$   $cm^{-1}$  der C=O-Doppelbindungsstreckschwingung<sup>75,102,103</sup>. Je nach pD-Wert ändert sich die Intensität der jeweiligen Carboxyl-Gruppen-Banden. Während bei niedrigem pD von 4,4 die Absorptionsbande bei  $\sim 1710$   $cm^{-1}$  ihren Maximalwert besitzt, ist die Intensität der Absorptionsbande bei  $\sim 1563$   $cm^{-1}$  minimal. Die Amid I Bande besitzt bei diesem pD-Wert ihr Absorptionsmaximum bei  $\sim 1639$   $cm^{-1}$  und wird als  $\alpha$ -Helix interpretiert. Zusätzlich werden zwei weitere Banden bei  $\sim 1732$   $cm^{-1}$  und  $\sim 1599$   $cm^{-1}$  beobachtet, die als aggregierte  $\beta$ -Faltblattstruktur interpretiert werden. Die Interpretation dieser Absorptionsbanden als Aggregationsbanden wird durch die Argumentation von Itoh et al.<sup>103</sup> unterstützt. Sie beobachteten bei der Untersuchung von Polyglutaminsäure in  $D_2O$ -Suspensionen mit

geringer Schichtdicke (Filmprobe) eine temperaturinduzierte Aggregation des Peptids, die im Infraroten die typischen Absorptionsbanden bei  $1616\text{ cm}^{-1}$  und  $1681\text{ cm}^{-1}$  aufweist und als  $\beta_1$ -Struktur bezeichnet wurde. Itoh et al.<sup>103</sup> untersuchten die Langzeitwirkung (von bis zu 90 Stunden) der Erwärmung auf das Peptid und beobachteten dabei die Entstehung der Absorptionsbanden bei  $\sim 1732\text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1599\text{ cm}^{-1}$  und gleichzeitig die Intensitätsabnahme bei  $1616\text{ cm}^{-1}$  und  $1681\text{ cm}^{-1}$ . Sie schlussfolgerten daraus, dass es sich um zwei unterschiedliche Aggregationsstrukturen handelt, die in einander überführt wurden. Sie bezeichneten die Konformation mit den weit auseinanderliegenden Absorptionsbanden als  $\beta_2$ -Struktur. Diese Absorptionsbanden bei  $\sim 1732\text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1599\text{ cm}^{-1}$  sind in den hier gezeigten Spektren von Polyglutaminsäure bei pD 4,4 bereits bei Raumtemperatur zu beobachten. Die Argumentation von zwei unterschiedlichen Konformationen konnten Itoh et al.<sup>103</sup> durch Röntgenbeugungsdaten belegen. Die dadurch ermittelte  $\beta_2$ -Struktur deutet auf eine sehr dicht gepackte antiparallele Faltblattstruktur hin, die eine noch kompaktere Konformation als „normale“ antiparallele  $\beta_1$ -Faltblattstruktur ausweist. In dieser Struktur sind die Carboxyl- und die Hydroxyl-Gruppen der Seitenketten optimal orientiert. Dabei verursachen Wechselwirkungen zwischen wasserstoffverbrückten Peptidgruppen eines Aminosäurestranges und den Carboxyl-Gruppen der Seitengruppen, des benachbarten Aminosäurestranges eine sehr kompakte Konformation. In dieser Struktur ist die Entfernung des Carbonyl-Sauerstoffes in der Peptidgruppe und dem Hydroxyl-Sauerstoff der Carboxyl-Gruppe mit  $3,3\text{ \AA}$  sehr gering.

Des Weiteren ist in Abbildung 39 erkennbar, dass mit steigendem pD-Wert die Intensität der Absorptionsbande bei  $\sim 1710\text{ cm}^{-1}$  sinkt, während die Intensität der Bande bei  $\sim 1563\text{ cm}^{-1}$  steigt. Zusätzlich wird eine Frequenzverschiebung der Amid I Bande beobachtet, die zwischen pD 5,4 und 6,2 stattfindet. Dieser pD-Abhängigkeiten sind in Abbildung 40 gezeigt.

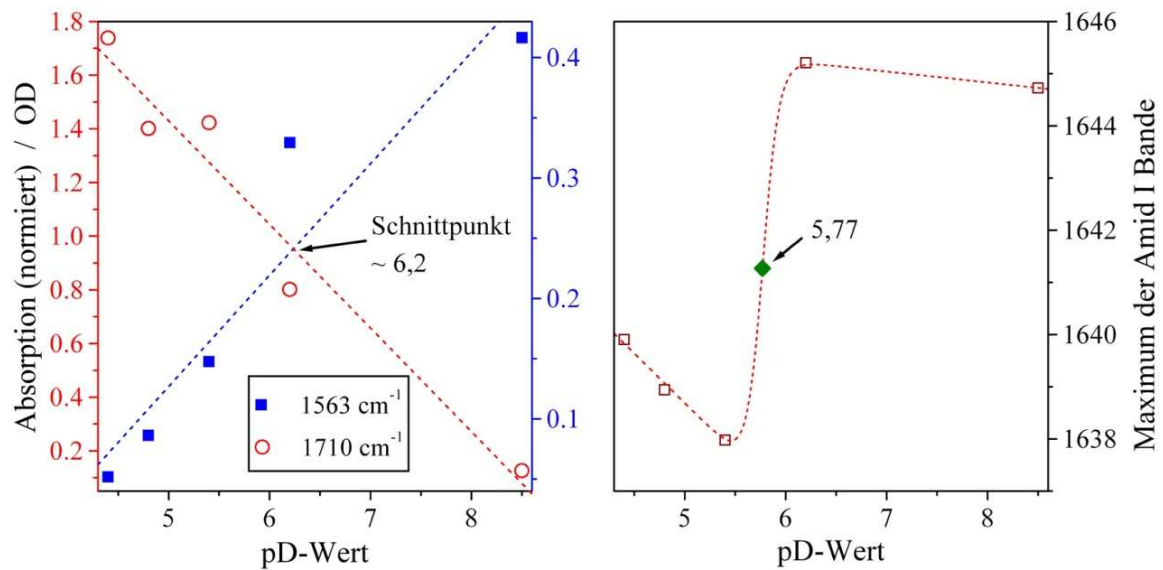


Abbildung 40: Ausgewählte pD-abhängige FTIR-Absorptionssignale von Polyglutaminsäure. Die zur qualitativen Beschreibung angepassten Funktionen sind gestrichelt dargestellt. Links: Absorptionsintensitäten der symmetrischen C=O Streckschwingung bei  $1710\text{ cm}^{-1}$  und antisymmetrischen COO<sup>-</sup> Streckschwingung bei  $1563\text{ cm}^{-1}$  der Carboxyl-Gruppen in Abhängigkeit des pD-Wertes der Probe. Die zugehörigen unterschiedlichen Abszissenachsen sind in der gleichen Farbe dargestellt, wie die jeweiligen Datenpunkte (blau:  $1563\text{ cm}^{-1}$ , rot:  $1710\text{ cm}^{-1}$ ). Rechts: pD-abhängige Verschiebung der Amid I Bande, verfolgt am Maximum der Amid I Absorption.

Wie bereits erwähnt und in Abbildung 40 erkennbar, sinkt die Intensität der Absorption bei  $\sim 1710\text{ cm}^{-1}$  während beim Wechsel des pD-Wertes einer Probe mit Polyglutaminsäure von sauer nach basisch die Intensität bei  $\sim 1563\text{ cm}^{-1}$  steigt. Die ermittelten Datenpunkte können nicht durch eine Titrationskurve nach Henderson-Hasselbach beschrieben werden. Das liegt möglicherweise daran, dass die Zugänglichkeit der Seitenketten für die in Lösung befindlichen Protonen vom Strukturzustand des Peptids abhängt. Zur qualitativen Veranschaulichung des Intensitätsverlaufes der Absorptionsbanden wurden die experimentellen Daten dennoch jeweils durch eine Gerade beschrieben.

Die Positionsverschiebung der Amid I Bande (Abbildung 40, links) wurde, in Analogie zu den pD-abhängigen CD-Daten, durch eine sigmoide Boltzmann-Funktion mathematisch beschrieben, die auf der Annahme eines Zwei-Zustandsmodells basiert. Zur Beschreibung der Positionsveränderungen vor und nach dem strukturellen Übergang wurden qualitativ zwei

Geraden angepasst. Dabei wurden ein Mittelpunkt des pD-abhängigen Strukturüberganges von 5,77 und eine Breite des Überganges von 0,08 ermittelt. Aufgrund der fehlenden Messdaten ist die Breite des Überganges nicht exakt bestimmbar. Die hier angegebenen Werte geben lediglich die Parameter wieder, mit der mit dieser einfachen mathematischen Funktion die experimentellen Daten beschrieben werden konnte.

Die pD-abhängigen Strukturänderungen können also sowohl mit CD- als auch FTIR-Spektroskopie beobachtet werden. Mit beiden spektroskopischen Untersuchungstechniken wurde durch Erhöhung des pD-Wertes ein Strukturübergang von  $\alpha$ -Helix nach ungeordnetem Knäuel beobachtet. Der strukturelle Übergang wurde bei beiden Methoden an ungefähr dem gleichen pD-Wert festgestellt, bei 5,55 (CD-Spektroskopie) bzw. bei 5,77 (FTIR-Spektroskopie). Die bestimmten Werte liegen im Rahmen des Fehlers, der z.B. durch Ungenauigkeiten beim Einstellen des Proben-pH-Wertes, dem Titrieren mit NaOD und DCI und damit mit der Messgenauigkeit der zur pH-Messung verwendeten Elektrode auftritt.

Dennoch kann an dieser Stelle aus den Messdaten der Schluss gezogen werden, dass der beobachtete Übergang schmaler ist als für eine einfache pH-Titration erwartet wird. Die Änderung des Strukturanteils ist dabei nicht proportional zur Änderung des Protonierungsgrades der Seitenketten. Das spricht für einen kooperativen Prozess beim Strukturübergang.

Unter Berücksichtigung der genannten Messfehler stimmen die hier ermittelten pD-Werte des strukturellen Überganges von  $\alpha$ -Helix nach ungeordnetem Knäuel auch mit dem von Appel und Yang<sup>101</sup> bestimmten Wert von 5,4 überein.

### **5.3.2 CD- und FTIR-spektroskopische Untersuchungen von Polyglutaminsäure im thermischen Gleichgewicht und in Abhängigkeit des pD-Wertes**

Neben dem pD-Wert oder der Salzkonzentration beeinflusst auch die Temperatur die Stabilität des untersuchten Peptids. Dazu werden hier Ergebnisse der Untersuchungen von Polyglutaminsäure bei unterschiedlichen pD-Werten und beim Erwärmen gezeigt. Um die CD-Daten mit den FTIR-Daten vergleichen zu können, wurden alle Messungen mit identischer Peptidkonzentration durchgeführt. Lediglich die Schichtdicke wurde zwischen den beiden spektroskopischen Messtechniken verändert, wobei alle CD-Messungen bei  $\sim 10 \mu\text{m}$  und alle FTIR-Messungen bei  $\sim 50 \mu\text{m}$  Schichtdicke durchgeführt wurden. Für einen besseren Überblick werden die Resultate so gegliedert, dass zuerst die Daten bei saurem pD (pD 4,4

und pD 4,8), dann bei pD 5,4 und anschließend bei pD 6,2 und basischem pD 8,5 dargestellt und analysiert werden. Die Bestimmung des jeweiligen pD-Wertes wurde bei Raumtemperatur mit einer Elektrode durchgeführt. Zur Darstellung der strukturellen Änderungen des Peptids wurde die Absorption des D<sub>2</sub>O-Lösungsmittels von allen IR-Spektren abgezogen.

### pD 4,4 und pD 4,8

Zunächst wird Polyglutaminsäure beim Erwärmen in D<sub>2</sub>O Lösung mit saurem pD mit FTIR- und CD-Spektroskopie untersucht. Die jeweiligen Spektren sind in Abbildung 41 dargestellt.

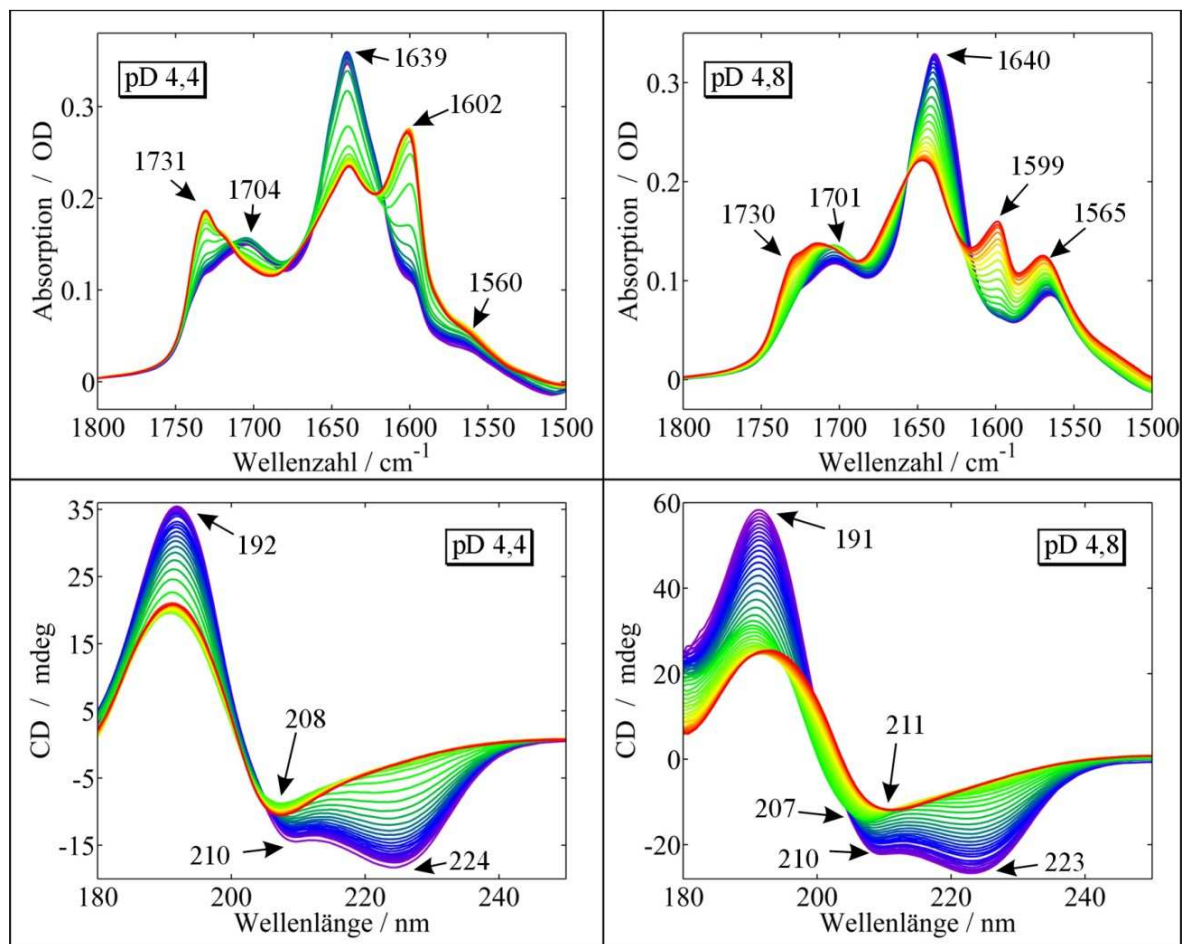


Abbildung 41: CD- (untere Reihe) und FTIR-Spektren (obere Reihe) von Polyglutaminsäure beim Erwärmen von 4 °C (violett) bis 90 °C (rot) bei pD 4,4 (linke Spalte) und pD 4,8 (rechte Spalte).



Bei pD 4,4 sind in den IR-Absorptionsspektren (siehe Abbildung 41, links oben) bei niedriger Temperatur (4 °C bis 30 °C) die Absorptionsbanden der Amid I Bande bei  $1639\text{ cm}^{-1}$  und die Bande der protonierten Carboxyl-Gruppen bei  $\sim 1704\text{ cm}^{-1}$  offensichtlich. Dagegen ist die Absorptionsbande der ionisierte Carboxyl-Gruppen bei  $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$  nur mit sehr schwacher Intensität beobachtbar. Beim Erwärmen der Probe wird jedoch auf einem eng begrenzten Temperaturbereich ( $\sim 50\text{ °C}$ ) eine deutliche Veränderung der Absorptionsspektren ersichtlich. Diese ist an der Intensitätsabnahme der Amid I Bande erkennbar, während bei der gleichen Temperatur die Absorption der Bande bei  $1602\text{ cm}^{-1}$  und bei  $1731\text{ cm}^{-1}$  ansteigt. Diese beiden Absorptionsbanden bleiben beim Abkühlen der Probe erhalten (Daten nicht gezeigt). Daraus folgt, dass die beobachtete Entfaltung der  $\alpha$ -Helix zu einer Aggregation führt.

In den CD-Spektren (siehe Abbildung 41, links unten), die beim gleichem pD bestimmt wurden, wird ebenfalls eine Veränderung bei  $\sim 50\text{ °C}$  beobachtet, deutlich erkennbar durch eine veränderte Spektrenform. Die bei tiefen Temperaturen (unter  $\sim 40\text{ °C}$ ) charakteristischen negativen Banden für die  $\alpha$ -helikale Struktur bei 210 nm und 224 nm und die positive Bande bei 192 nm werden teilweise in ihrer Intensität reduziert. Schließlich wird nur noch eine einzige negative Bande bei 208 nm und eine positive Bande bei 192 nm bei hohen Temperaturen (ab  $\sim 60\text{ °C}$ ) beobachtet. Diese Spektrengestalt ist vergleichbar mit der eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts (siehe Kapitel 2.4) und zeigt ebenso wie die IR-Spektren eine aggregierte Peptidstruktur.

In den IR-Absorptionsspektren von Polyglutaminsäure bei pD 4,8 (siehe Abbildung 41, rechts oben) hat im Vergleich zu pD 4,4 bereits die Intensität der ionisierten Carboxyl-Gruppen bei  $\sim 1565\text{ cm}^{-1}$  zugenommen. Man kann bei diesem pD-Wert von einer intakten  $\alpha$ -helikalen Peptidstruktur ausgehen. Das macht sich daran bemerkbar, dass bei niedriger Temperatur (unter  $\sim 30\text{ °C}$ ) das Maximum der Amid I Bande bei  $1640\text{ cm}^{-1}$  liegt. Beim Erwärmen dieser Probe wird eine Änderung der Absorptionen beobachtet, die im Vergleich zu dem Übergang bei pD 4,4 nicht so eng begrenzt, sondern über einen breiteren Temperaturbereich stattfindet. Dennoch wird ab ca.  $35\text{ °C}$  eine Abnahme der Absorptionsintensität der Amid I Bande beobachtet, während ab ca.  $45\text{ °C}$  eine Intensitätszunahme einer Absorptionsbande bei  $1599\text{ cm}^{-1}$  erkennbar ist. Auch hier ist in den Spektren mit höherer Temperatur eine Absorptionsbande bei  $1730\text{ cm}^{-1}$  bemerkbar. Im Vergleich zu den Absorptionsintensitäten bei pD 4,4 sind jedoch diese als Aggregation des Peptids interpretierten Banden bei pD 4,8

wesentlich kleiner. Es kann also angenommen werden, dass nur ein Teil der Peptidstrukturen aggregiert.

Die temperaturabhängigen CD-Spektren von Polyglutaminsäure bei pD 4,8 (siehe Abbildung 41, rechts unten) wechseln ebenfalls ihre Form auf einem im Vergleich zu pD 4,4 breiten Temperaturbereich. Die charakteristische  $\alpha$ -helikale Spektrenform (negative Banden bei 210 nm und 223 nm und positive Bande bei 191 nm) verschwindet beim Erwärmen der Probe. Dabei wird das Minimum einer negativen Bande von 210 nm nach 207 nm verschoben, bis schließlich ab ca. 52 °C die endgültige Form der Spektren entsteht, die eine negative Bande bei 211 nm und eine positive Bande bei ~ 191 nm aufweist. Diese Bandenverschiebung kann klar gezeigt werden, wenn die Veränderung der Position des Minimums der CD-Spektren gegenüber der Temperatur graphisch dargestellt wird (Abbildung 42).

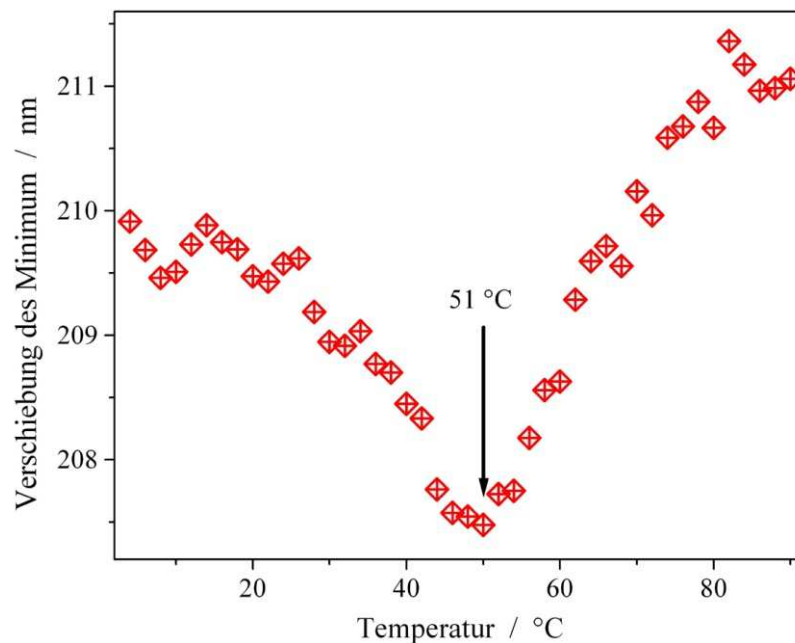


Abbildung 42: Verschiebung eines Minimum in den temperaturabhängigen CD-Spektren von Polyglutaminsäure bei pD 4,8. Die Richtungsänderung der Verschiebung wird bei 51 °C beobachtet.

Aufgrund dieser in Abbildung 42 veranschaulichten Verschiebung des Bandenminimums und deren Richtungsänderung kann angenommen werden, dass neben der  $\alpha$ -helikalen Struktur bei tiefen Temperaturen und der aggregierten Struktur bei hohen Temperaturen ein weiterer Strukturübergang bis zu einer Temperatur von ~ 51 °C stattfindet. Dieser Zwischenzustand ist

jedoch nicht sehr stabil und führt letztendlich beim weiteren Erwärmen der Probe zu der aggregierten Struktur.

Neben den deutlich erkennbaren Absorptionsänderungen, können durch die Analyse der temperaturabhängigen Intensitätsverläufe die Stabilitätseigenschaften der Peptide detaillierter beschrieben werden. Zusätzlich zur Auswertung der temperaturabhängigen Signale wird, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, auch die Ableitung der Signale nach der Temperatur benutzt. Eine mathematische Beschreibung der experimentellen Daten wird durch Gleichung (32) und (37) gegeben. Des Weiteren werden die temperaturabhängigen Signale und abgeleiteten Daten gleichzeitig angepasst. Durch diese Art der simultanen Anpassung („Global Fit“) verschiedener Intensitätsverläufe durch die gleichen Parameter werden die Werte dieser freien Parameter der beiden Funktionen eingeschränkt. Die dadurch schließlich gefundenen Parameter beschreiben dann beide Kurvenverläufe, den temperaturabhängigen Signalverlauf und den temperaturabhängigen Verlauf der Ableitung des Signales. Neben dieser Anpassungsmethode werden zur Analyse der Intensitätsverläufe zusätzlich absolute Temperaturen verwendet. Dadurch können durch die mathematische Funktion reelle thermodynamische Parameter des Strukturüberganges ermittelt werden.

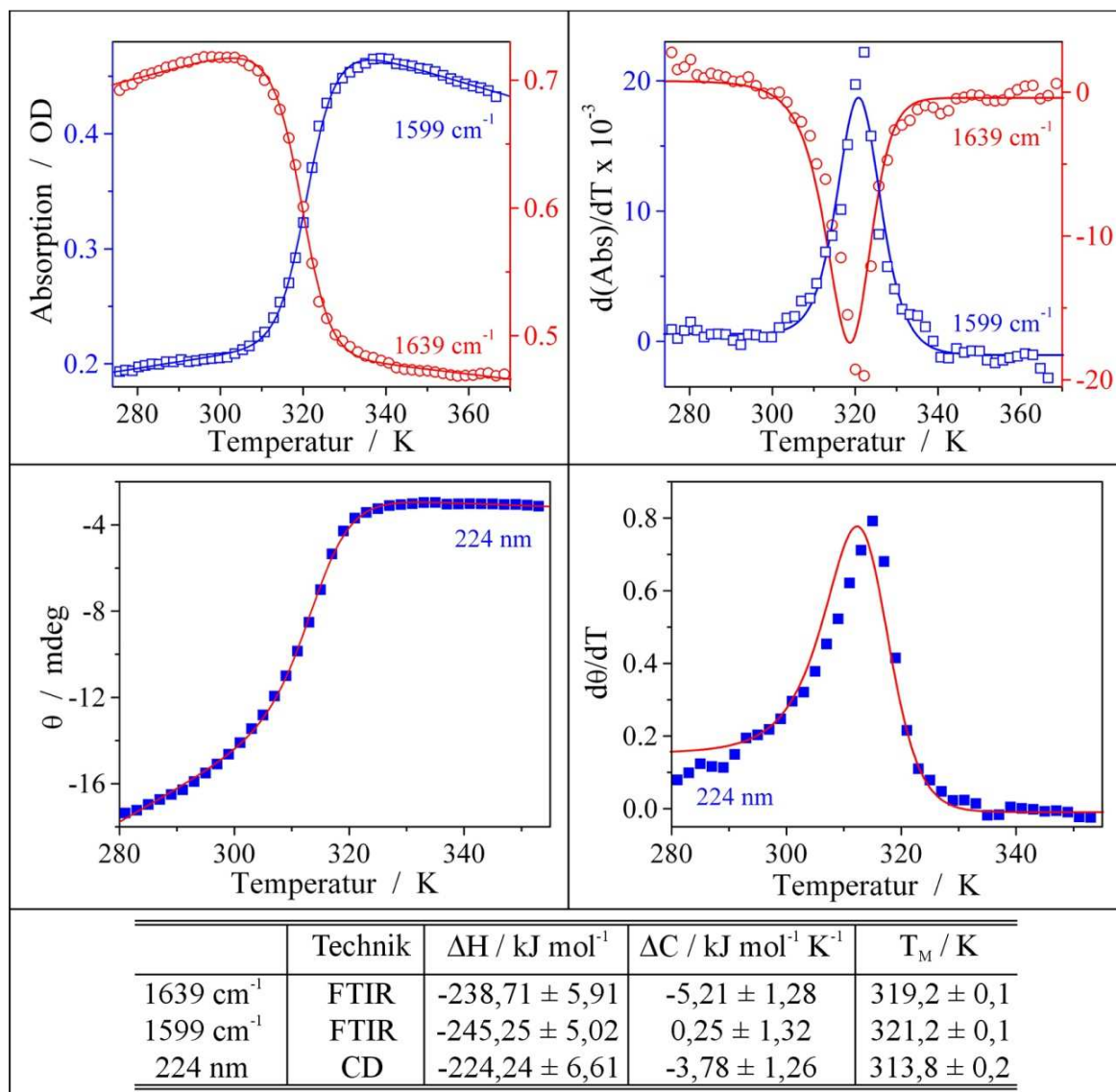


Abbildung 43: Analyse der temperaturabhängigen Intensitätsverläufe der CD- (untere Reihe) und FTIR-Spektren (obere Reihe) (vergleiche dazu Abbildung 41) bei pD 4,4. Die Spektren werden an einigen für Sekundärstrukturen charakteristischen Wellenlängen im Infraroten bei  $1639 \text{ cm}^{-1}$  (rot) und  $1599 \text{ cm}^{-1}$  (blau) und im UV durch die CD-Daten bei 224 nm untersucht. Rechts: Temperaturabhängige Intensitäten. Links: Ableitungen der temperaturabhängigen Intensitätsverläufe. Unten: Tabelle der durch die thermodynamischen Analyse bestimmten Parameter beim gleichzeitigen Anpassen der experimentell bestimmten Intensitäten und Ableitungen an Gleichung (32) und (37).

Zunächst werden die experimentellen Daten untersucht, die bei pD 4,4 bestimmt wurden. Die IR-Daten werden an zwei Wellenlängen analysiert, deren Absorptionsänderung auf die

Abnahme der  $\alpha$ -helikalen Konformation ( $1639\text{ cm}^{-1}$ ) und das Entstehen der Aggregationsstruktur ( $1599\text{ cm}^{-1}$ ) hinweist. Bei der Analyse der temperaturabhängigen IR-Absorptionen (Abbildung 43, links oben) ist ein markanter sigmoider Kurvenverlauf für beide Wellenlängen beobachtbar. Bedingt durch diesen sigmoiden Absorptionsverlauf weisen die Ableitungen einen deutlichen Extremwert auf (Abbildung 43, rechts oben). Bei der gleichzeitigen Anpassung der Gleichung (32) und (37) an die dargestellten Intensitäten und Ableitungen wurde für die Wellenzahl von  $1639\text{ cm}^{-1}$  eine Enthalpieänderung von  $(238,7 \pm 5,9)\text{ kJ mol}^{-1}$  und eine Übergangstemperatur von  $(319,2 \pm 0,1)\text{ K}$  ermittelt, während bei  $1599\text{ cm}^{-1}$  eine Enthalpieänderung von  $(245,2 \pm 5,0)\text{ kJ mol}^{-1}$  und eine Übergangstemperatur von  $(321,2 \pm 0,1)\text{ K}$  festgestellt wurde. Diese leichten Abweichungen der thermodynamischen Parameter entstehen dadurch, dass die beobachteten Absorptionsbanden von umliegenden Banden überlagert werden bzw. sich gegenseitig beeinflussen.

Die Untersuchung der CD-Spektren wurde bei  $224\text{ nm}$  durchgeführt, um auch hier die Abnahme der  $\alpha$ -helikalen Struktur zu untersuchen (Abbildung 43, unten). Der sigmoide Kurvenverlauf ist dabei nicht so ausgeprägt wie in den FTIR-Daten. Mit den dargestellten CD-Daten wurde eine Enthalpieänderung von  $(224,2 \pm 6,6)\text{ kJ mol}^{-1}$  und eine Übergangstemperatur von  $(313,8 \pm 0,2)\text{ K}$  ermittelt.

Diese im Vergleich zu den IR-Daten um ca.  $6\text{ K}$  tiefer liegende Übergangstemperatur ist offenbar ein Ergebnis einer nicht optimalen mathematischen Beschreibung der  $\frac{d\theta}{dT}$  Daten (Darstellung in Abbildung 43, rechts unten). Für die Abweichung der Enthalpieänderung  $\Delta H$  der CD- von den FTIR-Daten gilt ebenfalls, dass sich in den jeweiligen Spektren Banden überlagern und beeinflussen können. Die Abweichungen der Änderungen der Wärmekapazität  $\Delta C$  sind in allen Ergebnissen so groß, dass sie als nicht reell angesehen werden. Generell bleibt festzustellen, dass die markante spektrale Änderung bei einem pD von  $4,4$ , die als Veränderung der Struktur interpretiert wird, mit einer großen Enthalpieänderung von ca.  $236\text{ kJ mol}^{-1}$  (gemittelter Wert) verbunden ist und bei einer Temperatur von ca.  $318\text{ K}$  (gemittelter Wert) zu beobachten ist.

Wie bereits in den Absorptionsspektren ersichtlich ist, ist der temperaturinduzierte spektrale Übergang bei pD  $4,8$  breiter als bei pD  $4,4$ . Die Analyse der temperaturabhängigen Strukturveränderungen bei pD  $4,8$  wird analog zu pD  $4,4$  im Infraroten bei  $1639\text{ cm}^{-1}$  und  $1599\text{ cm}^{-1}$  und im UV mit CD-Spektroskopie bei  $224\text{ nm}$  durchgeführt.

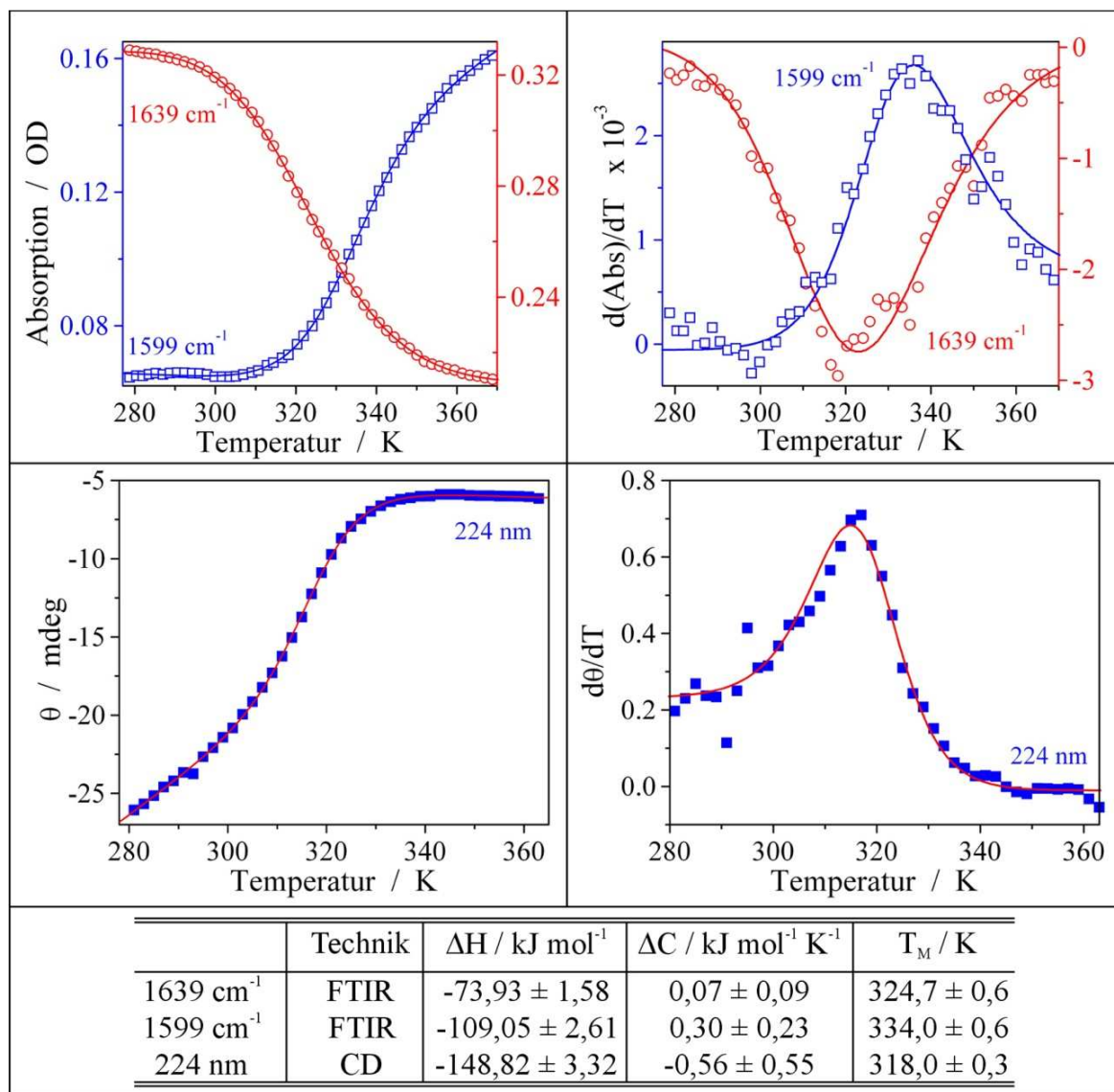


Abbildung 44: Analyse der temperaturabhängigen Intensitätsverläufe der CD- (untere Reihe) und FTIR-Spektren (obere Reihe) (vergleiche dazu Abbildung 41) bei pD 4,8. Links: Temperaturabhängige Intensitäten an ausgewählten Wellenlängen. Rechts: Ableitung der links dargestellten Intensitäten. Unten: Übersichtstabelle der angepassten thermodynamischen Parameter.

Bei der Analyse der Intensitätsänderungen im Infraroten (siehe Abbildung 43, oben) wurde für  $1639 \text{ cm}^{-1}$  eine Änderung der Enthalpie von  $(73,9 \pm 1,6) \text{ kJ mol}^{-1}$  bei einer Übergangstemperatur von  $(324,7 \pm 0,6) \text{ K}$  ermittelt. Die Untersuchung der temperaturinduzierten Absorptionzunahme bei  $1599 \text{ cm}^{-1}$  lieferte eine Enthalpieänderung von  $(109,1 \pm 2,6) \text{ kJ mol}^{-1}$  und eine Übergangstemperatur von  $(334,0 \pm 0,6) \text{ K}$ . Dieser deutliche Unterschied lässt den Schluss zu, dass zwei unterschiedliche Prozesse bei der Entfaltung des

Peptids beobachtet werden. Zuerst wird die  $\alpha$ -helikale Struktur des Peptids gelockert, bis ab einer bestimmten Temperatur eine aggregierte Struktur entsteht. Die schmalere Breite der spektralen Veränderung bei  $1639\text{ cm}^{-1}$  führt zu einer geringeren Enthalpieänderung als bei  $1599\text{ cm}^{-1}$ .

Die Auswertung der CD-Daten bei pD 4,8 und einer Wellenlänge von 224 nm (Abbildung 44, unten) ergibt eine Enthalpieänderung von  $(148,8 \pm 3,3)\text{ kJ mol}^{-1}$  bei einer Übergangstemperatur von  $(318,0 \pm 0,3)\text{ K}$ . Im Vergleich zu den thermodynamischen Daten, die durch die Analyse der FTIR-Daten ermittelt wurden, ist die Enthalpieänderung der CD-Daten größer und die Übergangstemperatur kleiner. Diese Ergebnisse bestärken die Annahme, dass bei der temperaturinduzierten Entfaltung von Polyglutaminsäure bei pD 4,8 kein einfacher Zwei-Zustandsprozess beobachtet wird. Alle Daten weisen jedoch darauf hin, dass die  $\alpha$ -helikale Struktur bis ca. 310 K, also  $\sim 40\text{ }^\circ\text{C}$ , stabil ist.

### pD 5,4

Im Anschluss an die Analyse von Polyglutaminsäure bei pD 4,4 und pD 4,8 werden die temperaturinduzierten IR-Absorptionsänderung und CD-Intensitäten von Polyglutaminsäure bei pD 5,4 untersucht.

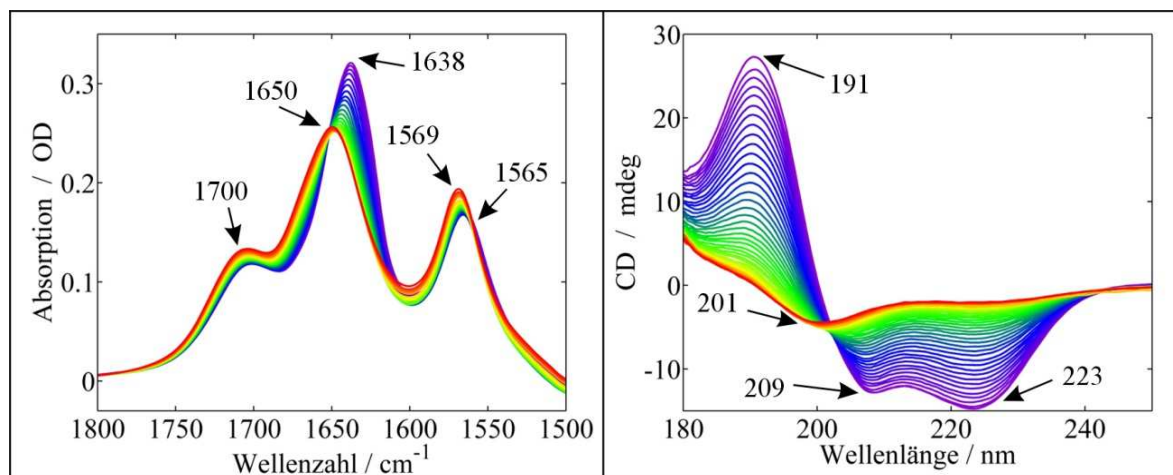


Abbildung 45: CD- (rechts) und FTIR-Spektren (links) von Polyglutaminsäure beim Erwärmen von  $4\text{ }^\circ\text{C}$  (violett) bis  $90\text{ }^\circ\text{C}$  (rot) bei pD 5,4.

Im IR-Absorptionsspektrum von Polyglutaminsäure bei pD 5,4 (siehe Abbildung 45, links) ist die Absorptionsbande der ionisierten Carboxyl-Gruppen bei  $\sim 1565 \text{ cm}^{-1}$  markant. Daran kann beim Erwärmen der Probe die Verschiebung zu höheren Wellenzahlen bis zu  $1569 \text{ cm}^{-1}$  ( $85 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und ihre Intensitätszunahme beobachtet werden. Die Amid I Bande mit ihrem Absorptionsmaximum bei  $1638 \text{ cm}^{-1}$  wird durch die Temperaturerhöhung sogar um ca.  $12 \text{ cm}^{-1}$  zu  $1650 \text{ cm}^{-1}$  verschoben, während die Intensität der Bande abnimmt. Diese Verschiebung und Intensitätsänderung geschieht offensichtlich schon bei tieferen Temperaturen, während ab einer Temperatur von ca.  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  dieser Prozess stagniert.

Die Temperaturabhängigkeit der Stabilität der Peptidstruktur bei pD 5,4 wird auch in den CD-Spektren von Polyglutaminsäure (siehe Abbildung 45, rechts) ersichtlich. Die  $\alpha$ -helikale Struktur, die bei niedrigen Temperaturen ihre markante Spektrengestalt in Form zweier negativer Banden bei 209 nm und 223 nm und einer positiven Bande bei 191 nm verursacht, verschwindet mit zunehmender Temperatur. Sie weicht einer Spektrengestalt, die weder der einer aggregierten Struktur noch der einer ungeordneten Knäuel-Struktur ähnelt, sondern eher einer Überlagerung beider Spektren. Diese Form ist sehr flach, besitzt wenig Intensität und zeigt keine ausgeprägten Extrema. Lediglich bei 201 nm kann eine Bande geringer Intensität beobachtet werden.

Bei der folgenden Auswertung der temperaturinduzierten Absorptionsänderungen werden die spektralen Daten (Abbildung 45) an ausgewählten, charakteristischen Wellenlängen, analog zu pD 4,4 und pD 4,8 untersucht.



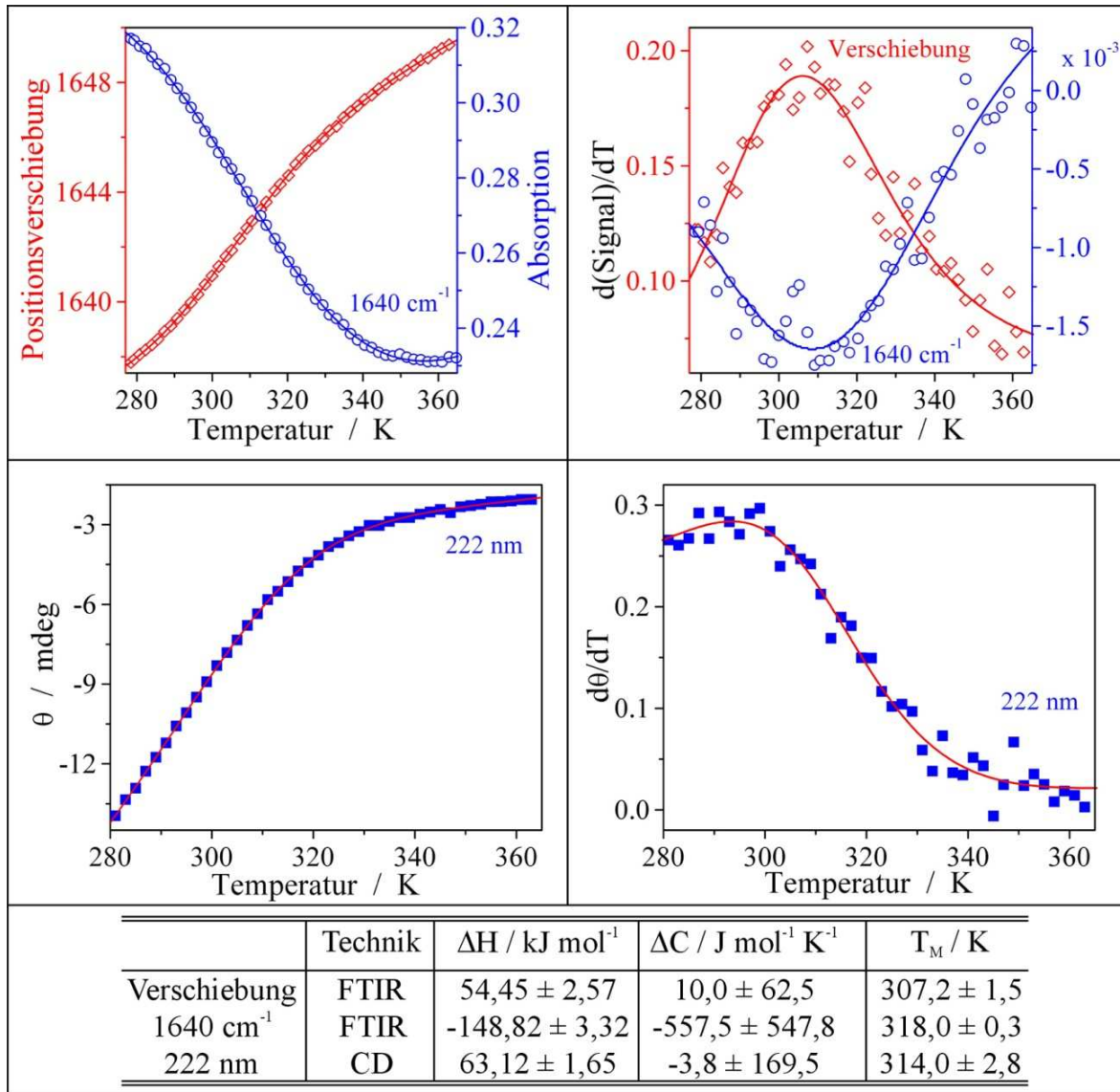


Abbildung 46: Untersuchung der CD- (untere Reihe) und FTIR-Spektren (obere Reihe) (vergleiche dazu Abbildung 45) bei  $pD$  5,4: Im Infraroten bei  $1640 \text{ cm}^{-1}$  (blau) und durch die Verschiebung der Amid I Bande (rot), im UV (CD-Spektren) bei  $222 \text{ nm}$ . Links: Temperaturabhängige Intensitätsänderungen und Frequenzverschiebung. Rechts: Ableitung der links dargestellten temperaturinduzierten Veränderungen. Unten: Übersichtstabelle der angepassten thermodynamischen Parameter.

Im Infraroten wird sowohl die beim Erhitzen induzierte Absorptionsänderung bei der festen Wellenzahl von  $1640 \text{ cm}^{-1}$  als auch die Positionsverschiebung der Amid I Bande analysiert (siehe Abbildung 46, oben). Die Enthalpieänderung und die Übergangstemperatur, ermittelt durch die Absorptionsänderung bei  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , beträgt  $(40,9 \pm 3,9) \text{ kJ mol}^{-1}$  bzw.

(323,9 ± 2,4) K. Für die Positionsverschiebung der Amid I Bande wurde  $\Delta H$  mit (54,4 ± 2,6) kJ mol<sup>-1</sup> bei einer Übergangstemperatur von (307,2 ± 1,5) K bestimmt. Die Abweichung der thermodynamischen Parameter zwischen der Positionsverschiebung und der Intensitätsänderung bei einer festen Wellenlänge ist sehr groß. Sie kann damit interpretiert werden, dass die Amid I Verschiebung die tatsächliche Gruppenschwingung darstellt. Die Analyse der Intensitätsveränderung bei der festen Wellenlänge wird durch die auffallend große Verschiebung der Amid I Bande um 12 cm<sup>-1</sup> beeinflusst und führt zu einer Verfälschung der tatsächlichen thermodynamischen Parameter.

Bei der Analyse der CD-Daten bei pD 5,4 bei der Wellenlänge von 222 nm (siehe Abbildung 46, unten) wird eine Enthalpieänderung von (63,1 ± 1,6) kJ mol<sup>-1</sup> und eine Übergangstemperatur von (314,0 ± 2,8) K bestimmt. Besonders auffallend an der Kurvenform der temperaturabhängigen Intensitäten (Abbildung 46, unten links) ist, dass keine Basislinie existiert, die den nativen Zustand des Peptids beschreibt. Trotzdem können mit der hier angewandten Methode der simultanen Anpassung von  $\theta(T)$  und  $\frac{d\theta(T)}{dT}$  die thermodynamischen Parameter bestimmt werden. Entscheidend dafür ist, dass zur mathematischen Beschreibung der Ableitung  $\frac{d\theta(T)}{dT}$  durch Gleichung (37) keine Basislinie zur Charakterisierung des Intensitätsverlaufes im nativen Zustand benötigt wird.

Diese thermodynamischen Parameter, die anhand der CD-Daten ermittelt wurden, stimmen qualitativ mit den Parametern überein, die bei der Amid I Verschiebung ermittelt wurden. Sie werden somit für eine weitere Analyse der zeitaufgelösten Entfaltungskinetiken benutzt (siehe Kapitel 5.3.3). Zusätzlich bleibt festzuhalten, dass die jeweils ermittelten Änderungen der Wärmekapazitäten  $\Delta C$  sowohl der FTIR- als auch CD-Daten sehr gering sind. Die ermittelten Werte sind dabei fast genauso groß wie ihre Fehler. Die Angabe eines exakten Wertes ist aus diesem Grund nicht möglich.

### **pD 6,2 und pD 8,5**

Ergänzend zu den bereits beschriebenen unterschiedlichen temperaturabhängigen Stabilitätseigenschaften bei pD 4,4, pD 4,8 und pD 5,4 werden nun die temperaturinduzierten Absorptionsänderungen bei pD 6,2 und 8,5 erläutert.

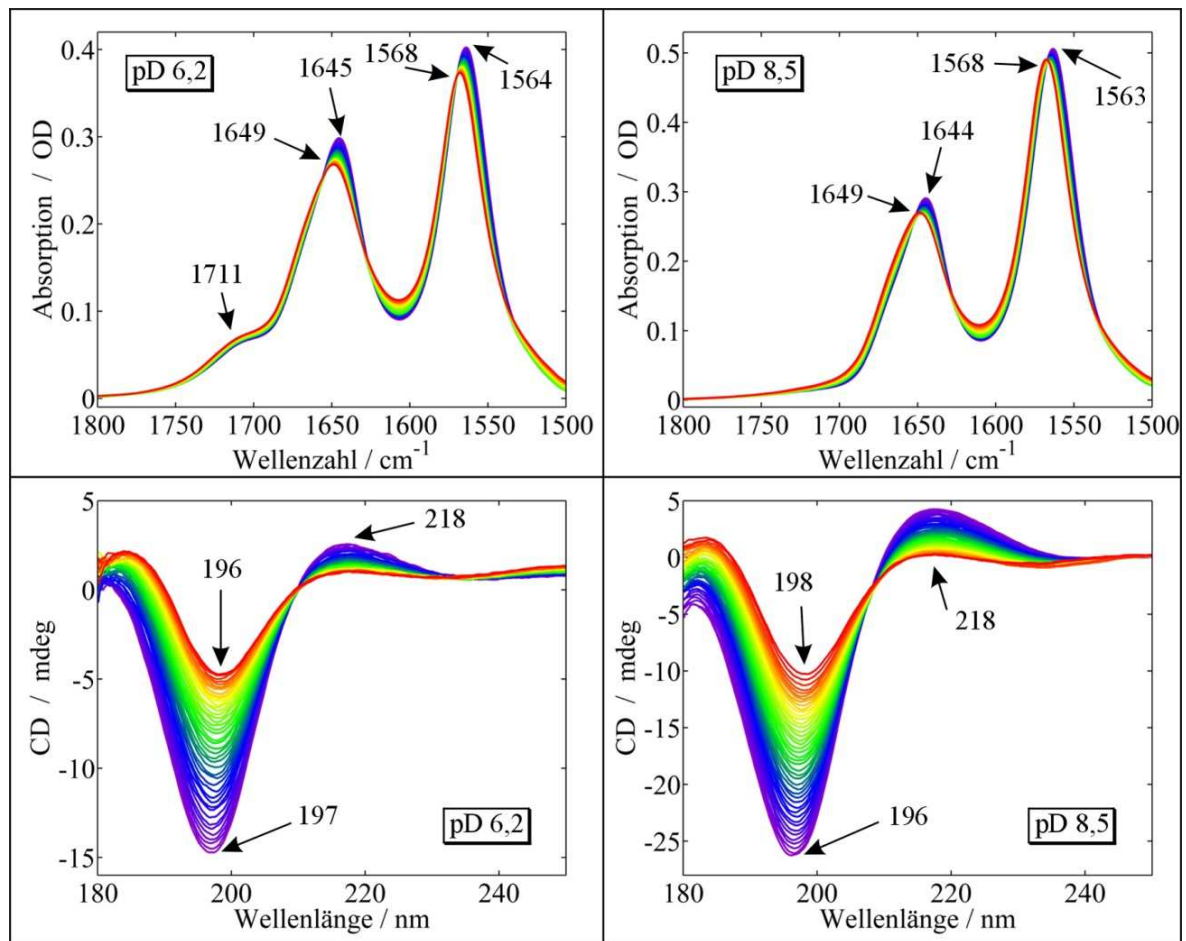


Abbildung 47: CD- (untere Reihe) und FTIR-Spektren (obere Reihe) von Polyglutaminsäure beim Erwärmen von 4 °C (violett) bis 90 °C (rot) bei pD 6,2 (linke Spalte) und pD 8,5 (rechte Spalte).

In den in Abbildung 47 (links oben) dargestellten IR-Absorptionsspektren bei pD 6,2 ist die Absorptionsbande der protonierten Carboxyl-Gruppen bei 1711  $\text{cm}^{-1}$  nur noch als kleine Schulter, also mit sehr niedriger Intensität, erkennbar. Die Bande der ionisierten Form bei 1564  $\text{cm}^{-1}$  ist bereits intensiver als die Amid I Bande bei 1645  $\text{cm}^{-1}$ . Beim Erwärmen der Probe wird das Maximum der Bande ionisierter Carboxyl-Gruppen von 1564  $\text{cm}^{-1}$  bei 4 °C zu höheren Wellenzahlen nach 1568  $\text{cm}^{-1}$  bei 85 °C verschoben. Auch in der Amid I Bande wird eine Positionsveränderung um ca. 4  $\text{cm}^{-1}$  von 1645  $\text{cm}^{-1}$  zu 1649  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet. Im Vergleich zu der Verschiebung der Amid I Bande bei pD 5,4 von ca. 12  $\text{cm}^{-1}$  von 1638  $\text{cm}^{-1}$  zu 1650  $\text{cm}^{-1}$  ist diese jedoch gering. Zusätzlich ist erkennbar, dass die temperaturinduzierten Veränderungen im Absorptionsspektrum kontinuierlich und ohne erkennbaren sigmoiden Verlauf erfolgen.

Die Untersuchung der CD-Daten bei pD 6,2 (siehe Abbildung 47, links unten) zeigt, dass das Peptid bereits zum größten Teil eine ungeordnete Knäuel-Konformation eingenommen hat. Bezeichnend dafür ist die negative Bande bei 197 nm und die positive Bande mit geringer Intensität bei 218 nm. Beim Erwärmen der Probe sinkt die Intensität der beobachteten Banden. Dieser Intensitätsabfall verläuft im untersuchten Temperaturbereich kontinuierlich.

Die IR-Absorptionsspektren bei pD 8,5 zeigen keine Absorptionsbande der protonierten Carboxyl-Gruppen mehr. Die Absorptionsbande der ionisierten Carboxyl-Gruppen bei  $1563\text{ cm}^{-1}$  ist wesentlich intensiver als die Amid I Bande bei  $1644\text{ cm}^{-1}$ . Beim Erwärmen der Probe wird ebenso wie bei pD 5,8 die Position der Banden kontinuierlich verändert, zum einen von  $1563\text{ cm}^{-1}$  nach  $1568\text{ cm}^{-1}$  und zum anderen von  $1644\text{ cm}^{-1}$  nach  $1649\text{ cm}^{-1}$ .

Analog zu den CD-Spektren gleicht die Spektrenform von Polyglutaminsäure bei pD 8,5 derjenigen bei pD 6,2. Durch die vorhandene ungeordnete Knäuel-Struktur sind zwei Banden ersichtlich, eine Bande mit negativer Intensität bei 196 nm und eine Bande mit positiver, geringerer Intensität bei 218 nm. Die Intensität dieser Banden nimmt mit zunehmender Temperatur kontinuierlich ab, wobei sich zusätzlich die Position der negativen Bande minimal von 196 nm nach 198 nm verschiebt.

Anhand der Intensitätsveränderungen sollte eine genauere Analyse der Temperaturabhängigkeiten von Polyglutaminsäure bei den pD-Werten 6,2 und 8,5 ihre Stabilitätseigenschaften besser wiedergeben. Jedoch konnten für die bereits genannten kontinuierlichen Veränderungen keine zuverlässigen, reproduzierbaren thermodynamischen Parameter bestimmt werden. Zur Veranschaulichung dieser Eigenschaften sind sowohl die Verschiebungen der Amid I Bande, die Veränderungen der Absorption bei der festen Wellenzahl von  $1644\text{ cm}^{-1}$  im Infraroten, als auch die Änderung der Intensität der Bande im UV (CD-Daten) bei 196 nm in Abbildung 48 dargestellt.

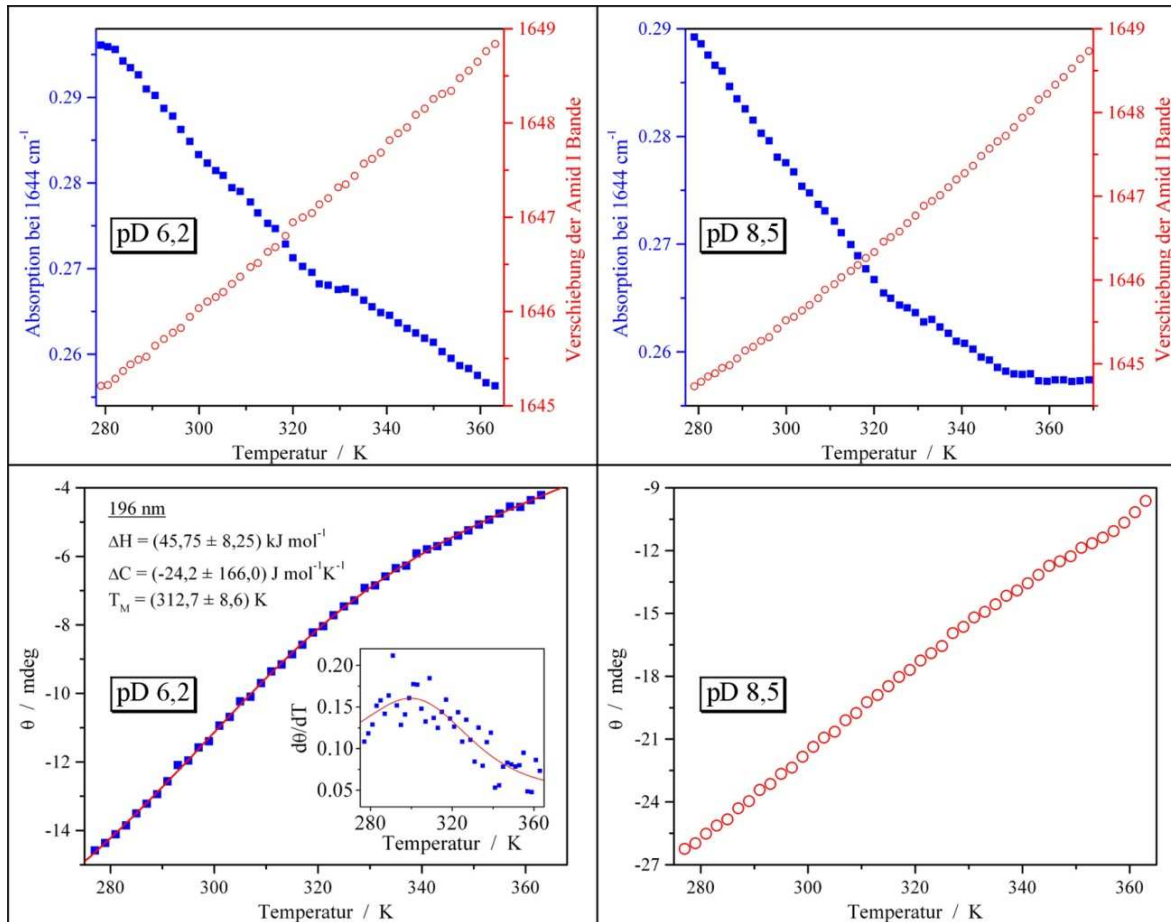


Abbildung 48: Analyse der CD- (untere Reihe) und FTIR-Spektren (obere Reihe) (vergleiche Abbildung 47) bei pD 6,2 (links) und pD 8,5 (rechts). Die temperaturinduzierten Veränderungen, die in den FTIR-Spektren beobachtet werden, sind jeweils bei der Wellenzahl von  $1644\text{ cm}^{-1}$  (blau) und an der Verschiebung der Amid I Bande (rot) untersucht. Bei den CD-Spektren wird die Intensitätsabnahme bei  $196\text{ nm}$  analysiert.

Bei pD 6,2 wird in den IR-Daten sowohl bei der Verschiebung der Amid I Bande als auch der Absorptionsabnahme bei  $1644\text{ cm}^{-1}$  eine nahezu lineare Veränderung beobachtet. Dadurch können mit der hier verwendeten Analyseverfahren keine thermodynamischen Parameter bestimmt werden. Die Intensitätsänderung der  $196\text{ nm}$  Bande im UV, bestimmt durch CD-Messungen, verläuft ebenfalls nahezu linear. Jedoch konnten durch die Ermittlung der Ableitung  $\frac{d\theta}{dT}$  thermodynamische Parameter bestimmt werden. So konnte eine Enthalpieänderung von  $(45,7 \pm 8,2)\text{ kJ mol}^{-1}$  bei  $(312,7 \pm 8,6)\text{ K}$  bestimmt werden. Diese Enthalpieänderung ist sehr gering und kann durch den sehr breiten Übergang erklärt werden. Die

ermittelte Übergangstemperatur von ca. 40 °C ist zwar sehr niedrig, stimmt aber im Vergleich mit den Daten, die bei pD 5,4 bestimmt wurden, größenordnungsmäßig überein.

Analog zu den Daten bei pD 6,2 können im Infraroten bei pD 8,5 keine eindeutigen thermodynamischen Parameter bestimmt werden. Zwar erkennt man in Abbildung 48, dass die Intensitätsabnahme bei 1644 cm<sup>-1</sup> ab ca. 70 °C stagniert, für die Positionsveränderung der Amid I Bande wird jedoch ebenfalls eine lineare Verschiebung beobachtet. Aus den CD-Daten ist eine lineare Intensitätsabnahme bei 196 nm ersichtlich. Dadurch konnten weder für die FTIR- noch für die CD-Daten thermodynamische Parameter bestimmt werden.

Zusammenfassend wird ein Vergleich alle thermodynamischen Daten, die aus den CD-Spektren bei unterschiedlichen pD-Werten bestimmt wurden, in Tabelle 7 gezeigt.

	pD 4,4	pD 4,8	pD 5,4	pD 6,2
$\Delta H / \text{kJ mol}^{-1}$	224,2 ± 6,6	148,8 ± 3,3	63,1 ± 1,6	45,7 ± 8,2
$\Delta C / \text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$	3781,7 ± 1256,3	557,5 ± 547,8	3,8 ± 169,5	24,2 ± 166,0
$T_M / \text{K}$	313,8 ± 0,2	318,0 ± 0,3	314,0 ± 2,8	312,7 ± 8,6

*Tabelle 7: Zusammenstellung der thermodynamischen Größen aus temperaturabhängigen CD-Spektren von Polyglutaminsäure bei unterschiedlichen pD-Werten.*

Man erkennt daran, dass bei pD 4,4 die Strukturveränderung auf einem sehr engen Temperaturbereich begrenzt ist. Mit dieser Strukturveränderung ist auch die größte Enthalpieänderung verbunden. Mit der Verbreiterung des sigmoiden Kurvenverlaufes beim Erhöhen des pD-Wertes nimmt die Enthalpieänderung ab. Bei der Bestimmung der Übergangstemperatur kann kein eindeutiger Trend festgestellt werden. Die Temperaturen schwanken zwischen 312,7 K und 318,0 K.

Zur Beurteilung der Stabilität der Peptidstruktur bleibt festzuhalten, dass eine bestimmte Menge an ionisierten Carboxyl-Gruppen vorhanden sein muss, damit die  $\alpha$ -Helix durch Erwärmen in eine ungeordnete Struktur übergeht und nicht aggregiert. Andererseits muss auch eine bestimmte Menge an protonierten Carboxyl-Gruppen vorhanden sein, damit die  $\alpha$ -Helix gebildet wird und das Peptid nicht bereits bei Raumtemperatur eine ungeordnete Knäuel-Konformation einnimmt.

Weitere Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit von Polyglutaminsäure bei pD-Werten unter 4,8 wurden nicht durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit war nur bedingt von Interesse,

welchen Einfluss die Heizrate auf die Temperatur eines strukturellen Überganges auf langen Zeitbereichen (länger als eine Sekunde) hat oder wie sich eine bereits aggregierte Struktur bei einem zweiten Heiz-/Kühlzyklus verhält. Es sollte vielmehr die Reversibilität des temperaturinduzierten Entfaltungsprozesses der Polyglutaminsäure untersucht werden, welche Voraussetzung dafür ist, die hier entwickelte Temperatursprung-Technik anwenden zu können. Die CD- und FTIR-Messungen im thermischen Gleichgewicht zeigten, dass Polyglutaminsäure bei einem pD-Wert kleiner als 4,8 teilweise aggregiert und nicht reversibel rückfaltet.

Prinzipiell könnte bei der Erwärmung beim Prozess der Entfaltung des Peptids auch eine Änderung des pH-Wertes auftreten. Das wäre möglich, da durch die Entfaltung die Lösungsmittelzugänglichkeit der protonierbaren Seitenketten und somit die Anzahl der in Lösung befindlichen Protonen verändert wird. Die Auswirkungen einer pH-Wertänderung könnte man direkt an der Absorptionsänderung in den IR-Spektren an den Banden der protonierten bzw. ionisierten Carboxyl-Gruppen beobachten. Die bei unterschiedlichen pD-Werten durchgeführten Untersuchungen zur Peptidstabilität (pD 4,4 und pD 4,8 siehe Abbildung 41, pD 5,4 siehe Abbildung 45 und pD 6,2 und pD 8,5 siehe Abbildung 47) zeigten jedoch keine markanten Intensitätsänderungen bei  $\sim 1710 \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $\sim 1563 \text{ cm}^{-1}$ , die auf eine Änderung des Protonierungsgrades des Peptids deuten. Die bei der Entfaltung des Peptids dem Lösungsmittel zugänglichen und somit ionisierbaren Seitengruppen haben demnach keinerlei, mit dieser Untersuchungsmethode erkennbare Auswirkung auf den pH-Wert des Lösungsmittels.

### **5.3.3 Zeitaufgelöste Relaxationsdynamiken von Polyglutaminsäure nach Laser-induziertem Temperatursprung**

Anhand der im vorherigen Kapitel bestimmten Stabilitätseigenschaften der Polyglutaminsäure wurde die Relaxationsdynamik des Strukturüberganges von  $\alpha$ -Helix zu einer ungeordneten Struktur bei einem pD-Wert von 5,4 untersucht. Für das Temperatursprung-Experiment ist es notwendig, die einzelnen Wellenlängen und Anfangstemperaturen zu bestimmen, an denen Absorptionsänderungen zu erwarten sind.

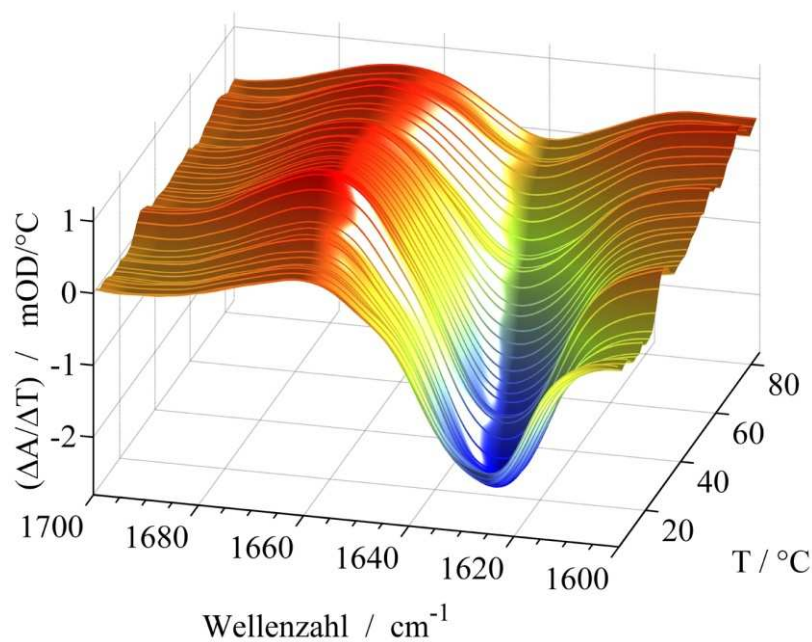


Abbildung 49:  $\Delta A/\Delta T$ -Spektren von Polyglutaminsäure bei  $pD$  5,4 bestimmt aus den Absorptionsdaten aus Abbildung 45.

Dazu wurden die in Abbildung 49 dargestellten  $\Delta A/\Delta T$ -Spektren aus den in Abbildung 45 gezeigten Absorptionsspektren beim Erwärmen von Polyglutaminsäure im jeweiligen thermischen Gleichgewicht berechnet. Eventuelle Lösungsmittelleffekte können in dieser Abbildung vernachlässigt werden, da die Absorptionen des  $D_2O$ -Lösungsmittels bereits im Absorptionsspektrum des Peptids abgezogen wurden. In den  $\Delta A/\Delta T$ -Spektren ist besonders auffällig, dass bei Temperaturen um ca.  $20\text{ }^\circ\text{C}$  bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  eine negative Bande (blau dargestellt) und an der gleichen Temperatur bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  eine positive Bande (rot abgebildet) beobachtet wird. Diese Banden entstehen aus einer Abnahme bzw. Zunahme der Absorption beim Erwärmen der Peptidprobe. Während diese  $\Delta A/\Delta T$ -Banden spektral eng begrenzt sind, ist der Temperaturbereich, innerhalb dessen diese spektralen Veränderungen beobachtet werden, auf circa  $20\text{ }^\circ\text{C}$  verbreitert. Aus diesem Grund werden die folgenden Temperatursprung-Experimente an zwei Wellenzahlen bei  $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$  mit verschiedenen Anfangstemperaturen im Bereich von  $5\text{ }^\circ\text{C}$  bis  $40\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Wie bereits erwähnt wird bei den Temperatursprung-Experimenten das thermische Gleichgewicht einer Probe Laserpuls-induziert sehr schnell verändert. Die Erwärmung des Lösungsmittels erfolgt innerhalb der Pulsbreite des Laserpulses. Der darauf folgende beobachtete Prozess resultiert aus der Abkühlung des Lösungsmittels  $D_2O$  und der Relaxation des Peptids



bis zum anfänglich vorherrschenden thermischen Gleichgewichts. Die Abkühlung des Lösungsmittels, wie bereits in Kapitel 5.1.4 beschrieben, erfolgt bei einer Schichtdicke von  $100\ \mu\text{m}$  auf einer Zeitskala länger als  $100\ \text{ms}$ , also auf einer längeren Zeitskala als die Peptiddynamik, die im ns- $\mu\text{s}$  Bereich erfolgt. Dabei bleibt die Temperatur des Lösungsmittels  $\text{D}_2\text{O}$  innerhalb der ersten  $10\ \mu\text{s}$  nahezu konstant (vergleiche Abbildung 33). Obwohl der Abkühlvorgang von  $\text{D}_2\text{O}$  komplexer verläuft, lässt sich die dadurch resultierende Transiente innerhalb der ersten  $100\ \mu\text{s}$  durch eine mono-exponentielle Funktion beschreiben (vgl. Kapitel 5.1.4). Untersucht man also Peptiddynamiken im ns- $\mu\text{s}$  Zeitbereich, so können die beobachteten Prozesse, die Abkühlung des  $\text{D}_2\text{O}$  einerseits und die Relaxation des Peptids andererseits, sehr gut separiert werden.

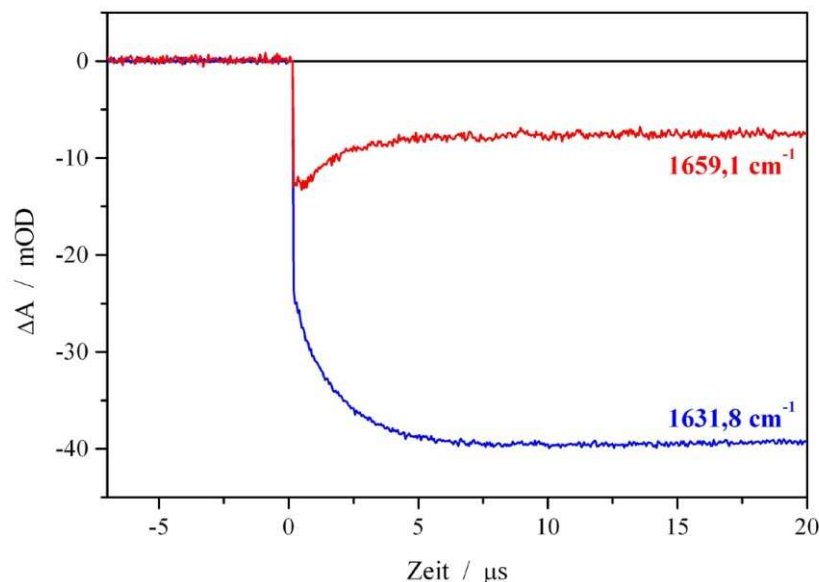


Abbildung 50: Zeitabhängige Absorptionstransienten von Polyglutaminsäure in  $\text{D}_2\text{O}$ -Lösung mit  $pD\ 5,4$  bei gleicher Anfangstemperatur von  $15\ ^\circ\text{C}$ , jedoch unterschiedlicher Wellenlänge:  $1631,8\ \text{cm}^{-1}$  und  $1659,1\ \text{cm}^{-1}$ .

In Abbildung 50 sind Absorptionstransienten von Polyglutaminsäure in  $\text{D}_2\text{O}$ -Lösung bei  $pD\ 5,4$  dargestellt, die an zwei verschiedenen Wellenlängen  $1631,8\ \text{cm}^{-1}$  (blau) und  $1659,1\ \text{cm}^{-1}$  (rot) bestimmt wurden. Die Daten vor dem Zeitnullpunkt entsprechen der Absorption vor der Temperatursprung-Anregung, bei der die Probe im thermischen Gleichgewicht ist. Die nach der Induzierung des Temperatursprunges folgenden zeitaufgelösten Absorptionsänderungen können in zwei getrennte Phasen, eine sehr schnelle und eine

langsamere, gegliedert werden. In der ersten Phase nimmt die Absorption für beide untersuchte Wellenlängen sehr schnell ab und kann mit der vorhandenen Apparatur zeitlich nicht aufgelöst werden. Sie resultiert fast ausschließlich aus der Absorptionsabnahme des Lösungsmittels D<sub>2</sub>O. In der langsameren zweiten Phase ist zu erkennen, dass für die Wellenlänge von 1631,8 cm<sup>-1</sup> die Absorption in einem Zeitbereich bis ca. 10 µs weiter abfällt, während die Absorption bei 1659,1 cm<sup>-1</sup> wieder ansteigt. Zur mathematischen Beschreibung dieser zeitabhängigen Absorptionsänderung wird an die vorhandene Absorptionstransiente eine bi-exponentielle Funktion angepasst.

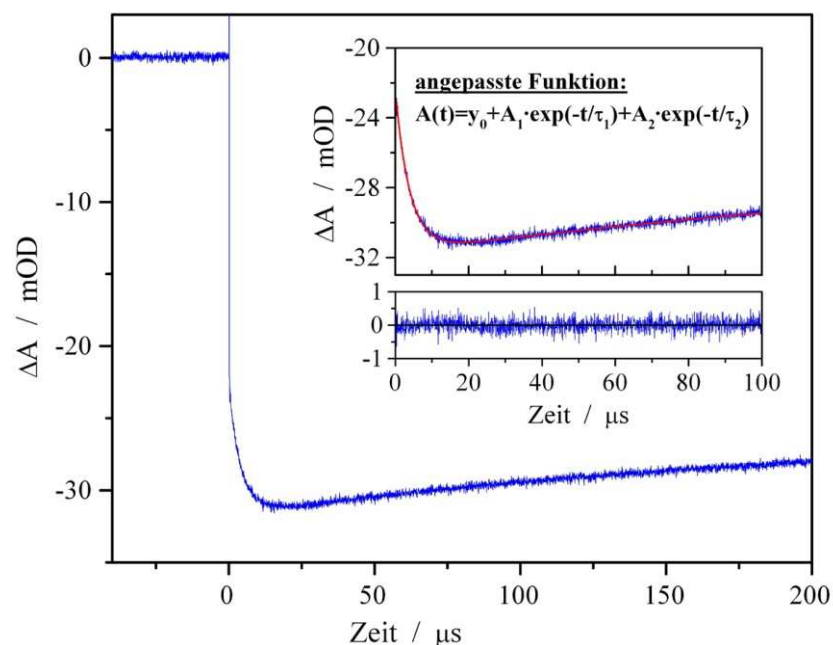


Abbildung 51: Repräsentative Absorptionstransiente von Polyglutaminsäure bestimmt bei 1631,8 cm<sup>-1</sup> und einem Temperatursprung von 3 °C nach 13 °C. Die Dynamik wird mathematisch durch eine bi-exponentielle Funktion beschrieben. Rechts oben: Vergrößerte Detailansicht der Absorptionsänderungen, die als Dynamik der Strukturänderung des Peptids bzw. als Abkühlen des Lösungsmittels interpretiert werden (blau: experimentelle Daten, rot: angepasste Funktion). Die verbleibende Transiente nach Subtraktion der angepassten Funktion von der zeitaufgelösten experimentell ermittelten Absorptionsänderung ist in der Detailansicht dargestellt.

Zur mathematischen Beschreibung der zeitaufgelösten Absorptionsdaten wurde eine bi-exponentielle Funktion, siehe Gleichung (48), an einem Zeitintervall von 0,5  $\mu\text{s}$  bis 200  $\mu\text{s}$  angepasst (siehe Abbildung 51 Detailansicht, rechts oben).

$$A(T) = A_0 + A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2) \quad (48)$$

Für die Beschreibung des in Abbildung 51 dargestellten Absorptionsverlaufes wurden folgende Parameter ermittelt:  $A_0 = -25,6 \cdot 10^{-3}$ ,  $A_1 = 9,2 \cdot 10^{-3}$ ,  $\tau_1 = 4,0 \mu\text{s}$ ,  $A_2 = -6,1 \cdot 10^{-3}$  und  $\tau_2 = 213,2 \mu\text{s}$ .

Diese bestimmten Parameter können sowohl dem Abkühlvorgang des Lösungsmittels als auch der Peptiddynamik zugeordnet werden. Diese Zuordnung ist aufgrund ihres zeitlichen Unterschiedes in den Dynamiken möglich. Der Abkühlvorgang wird durch eine Relaxationszeit von 213,2  $\mu\text{s}$  beschrieben, während die Absorptionsänderung der beobachteten Dynamik des Peptids viel schneller, mit 4,0  $\mu\text{s}$ , abläuft.

Innerhalb des Zeitbereiches der ersten ca. 100  $\mu\text{s}$  nach Induzierung des Temperatursprunges, wird das neue thermische Gleichgewicht der Probe nahezu konstant gehalten, das bei ca. 13  $^{\circ}\text{C}$  liegt. Dazu wurde bei einer Anfangstemperatur von 3  $^{\circ}\text{C}$  ein Temperatursprung von ca. 10  $^{\circ}\text{C}$  induziert. Die Relaxationsreaktion von Polyglutaminsäure zur neuen Gleichgewichtstemperatur von 13  $^{\circ}\text{C}$  wird durch die Absorptionsänderung verfolgt und kann mit einer Zeitkonstante von 4,0  $\mu\text{s}$  oder einer Rate von  $2,5 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  beschrieben werden.

Wie bereits erwähnt, kann die Dynamik des Abkühlvorganges des Lösungsmittels innerhalb des zur Anpassung benutzten Zeitintervalles von 0,5  $\mu\text{s}$  bis 200  $\mu\text{s}$  gut von der beobachteten Dynamik des Peptids getrennt werden. Deshalb liegt ein Abzug der durch die mathematische Anpassung bestimmten Lösungsmitteldynamik von der gesamten Absorptionstransiente nahe. Als Resultat bleibt dann die Absorptionstransiente des Peptids zurück, die sowohl ihre Dynamik in Form der Reaktionszeit  $\tau$  als auch ihre Absorptionsänderung  $A$  beinhaltet. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 52 die Kinetiken von Polyglutaminsäure, nachdem die angepassten Lösungsmitteltransienten subtrahiert wurden. Diese Art der Darstellung wird an den beiden untersuchten Wellenlängen von 1631,8  $\text{cm}^{-1}$  und 1659,1  $\text{cm}^{-1}$  und bei unterschiedlichen Anfangstemperaturen gezeigt.

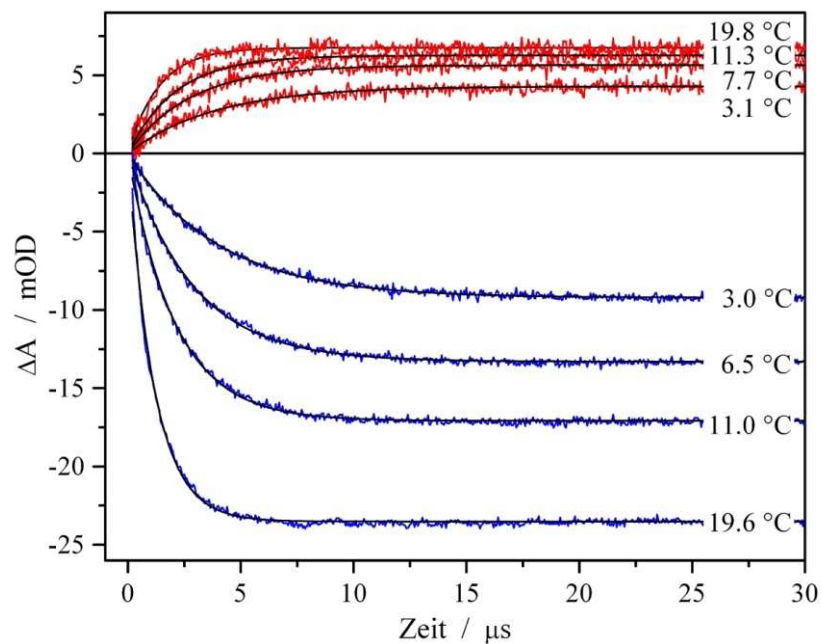


Abbildung 52: Zeitaufgelöste Absorptionstransienten von Polyglutaminsäure bei unterschiedlichen Anfangstemperaturen, detektiert bei 1631,8  $\text{cm}^{-1}$  (blau) und bei 1659,1  $\text{cm}^{-1}$  (rot) nach Trennung und Abzug der Transienten des Abkühlungsprozesses von  $\text{D}_2\text{O}$ . Mit steigender Anfangstemperatur nimmt die beobachtete Geschwindigkeit der Reaktion zu, wobei die Intensitätsabnahme bei 1631,8  $\text{cm}^{-1}$  und -zunahme bei 1659,1  $\text{cm}^{-1}$  erkennbar ist.

Die Transienten in Abbildung 52 weisen den durch die statischen  $\Delta A/\Delta T$ -Spektren (siehe Abbildung 49) beschriebenen gleichen Intensitätsverlauf auf, der durch die positive Absorptionsänderung bei 1659,1  $\text{cm}^{-1}$  und die negative Absorptionsänderung bei 1631,8  $\text{cm}^{-1}$  bei niedrigen Temperaturen ( $< 30\text{ °C}$ ) beobachtet wird. Die positive Absorptionsänderung bei 1659,1  $\text{cm}^{-1}$  wurde durch die negative Absorptionsänderung des Lösungsmittels überlagert. Dadurch gleichen sich die Amplituden der Absorptionsänderungen des Peptids und des Lösungsmittels fast vollständig aus und führen nach ca. 10  $\mu\text{s}$  zu einem im Vergleich zur Amplitude bei 1631,8  $\text{cm}^{-1}$  sehr geringen Absorptionssignal (siehe Abbildung 50). In den Absorptionstransienten in Abbildung 52 ist des Weiteren ersichtlich, dass die Reaktionszeiten mit zunehmender Anfangstemperatur schneller werden. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden in der Darstellung Transienten ausgewählt, die bei ungefähr identischen Anfangstemperaturen bestimmt wurden. Außerdem fällt in den zeitaufgelösten Transienten auf, dass die Amplituden der Peptidkinetiken mit steigender Anfangstemperatur größer werden.

Um einen besseren Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Anfangstemperaturen zu erhalten, sind für beide untersuchten Wellenlängen  $1631,8 \text{ cm}^{-1}$  und  $1659,1 \text{ cm}^{-1}$  die analysierten Reaktionszeiten in Tabelle 8 zusammengefasst dargestellt.

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der jeweiligen Anfangstemperatur, beobachtet an zwei unterschiedlichen Wellenlängen			
$1631,8 \text{ cm}^{-1}$		$1659,1 \text{ cm}^{-1}$	
Temperatur [°C]	Zeitkonstante [ $\mu\text{s}$ ]	Temperatur [°C]	Zeitkonstante [ $\mu\text{s}$ ]
3,0	$4,07 \pm 0,03$	3,1	$3,87 \pm 0,11$
6,5	$2,93 \pm 0,02$	7,7	$2,67 \pm 0,06$
11,0	$2,17 \pm 0,01$	11,3	$1,99 \pm 0,05$
15,0	$1,62 \pm 0,01$	16,0	$1,60 \pm 0,04$
19,6	$1,23 \pm 0,01$	19,8	$1,21 \pm 0,04$
23,4	$0,94 \pm 0,01$	23,7	$0,96 \pm 0,04$
27,4	$0,70 \pm 0,01$	28,1	$0,76 \pm 0,04$
31,8	$0,56 \pm 0,01$		

Tabelle 8: Temperaturabhängige Reaktionsgeschwindigkeiten der Entfaltung von Polyglutaminsäure bei *pD* 5,4 und unterschiedlichen Wellenlängen.<sup>9</sup>

Durch einen Vergleich der Reaktionszeiten wird bereits in Tabelle 8 eindeutig erkennbar, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten mit zunehmender Anfangstemperatur schneller werden. Dieser Effekt wird sowohl für die Wellenzahl von  $1631,8 \text{ cm}^{-1}$  als auch für  $1659,1 \text{ cm}^{-1}$  beobachtet. Des Weiteren erkennt man, dass sich die Reaktionszeiten von beiden Wellenlängen bei identischen Anfangstemperaturen ähneln. Zu einer graphischen Auswertung werden deshalb die in den Kinetiken analysierten Zeitkonstanten der Peptiddynamik in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Anfangstemperatur dargestellt.

<sup>9</sup> Die in der Tabelle angegebenen Fehler der Zeitkonstanten entsprechen dem Fehler, der im Fit gefunden wurde, jedoch nicht den realen Messfehlern.

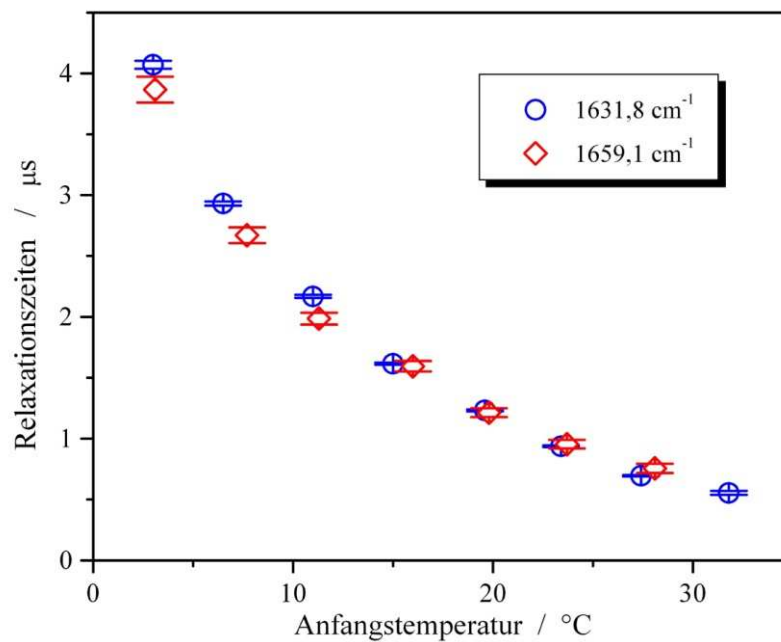


Abbildung 53: Abhängigkeit der Relaxationszeit von der Anfangstemperatur von Polyglutaminsäure bei pD 5,4, untersucht bei  $1631,8 \text{ cm}^{-1}$  (blau) und  $1659,1 \text{ cm}^{-1}$  (rot).

In Abbildung 53 erkennt man, dass sowohl die Relaxationszeiten bei  $1631,8 \text{ cm}^{-1}$  als auch bei  $1659,1 \text{ cm}^{-1}$  den gleichen Verlauf haben. Man erkennt eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeiten mit zunehmender Anfangstemperatur, die sich für beide untersuchten Wellenlängen überlagern und fast identisch sind. Die beobachteten Prozesse der Absorptionsabnahme bei  $1631,8 \text{ cm}^{-1}$  und -zunahme bei  $1659,1 \text{ cm}^{-1}$  erfolgen demnach simultan. Da an diesen Wellenlängen das Entstehen ungeordneter bzw. der Zerfall  $\alpha$ -helikaler Struktur beobachtet wird und diese Prozesse gleichzeitig ablaufen, kann eine weitere Analyse zur Bestimmung der Faltungs- bzw. Entfaltungsraten durchgeführt werden. Zur Beschreibung des Faltungsprozesses kann aufgrund der simultan beobachteten Absorptionsänderungen ein Zwei-Zustandsmodell benutzt werden. Die aus den Daten erhaltene Zeitkonstante  $\tau_{\text{obs}}$  entspricht dem Kehrwert der Reaktionsrate  $k_{\text{obs}} = \tau_{\text{obs}}^{-1}$ , die aus der Summe der Raten der Hin- und Rückreaktion, also hier der Faltung und Entfaltung, besteht.

$$k_{\text{obs}} = k_f + k_u \quad (49)$$

Zusätzlich wurde durch die Analyse der statischen Spektren die temperaturabhängige Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{eq}}(T)$  bestimmt, die proportional zum Verhältnis der Reaktionsraten von Faltung und Entfaltung ist.

$$K_{eq} = \frac{k_u}{k_f} \quad (50)$$

Dadurch, dass sowohl  $K_{eq}(T)$  bereits aus den Absorptionsmessungen im thermischen Gleichgewicht bestimmt (siehe Kapitel 5.3.2) und dass auch die Reaktionsrate  $k_{obs}(T)$  ermittelt wurde, können die Faltungs- und Entfaltungsraten durch Einsetzen der Gleichung (49) in (50) bestimmt werden.

$$k_f = \frac{k_{obs}}{(K_{eq} + 1)} \quad (51)$$

$$k_u = \frac{K_{eq} \cdot k_{obs}}{(K_{eq} + 1)} \quad (52)$$

Mit diesen Beziehungen werden die temperaturabhängigen Raten der Faltung und Entfaltung berechnet. Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}(T)$  erfolgt durch Gleichung (35) und dem Einsetzen der aus den statischen IR-Daten gewonnen thermodynamischen Parameter von  $\Delta H = 54,45 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta C = 10,0 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  und  $T_m = 307,2 \text{ K}$ . Zur Auswertung der beobachteten Reaktionsgeschwindigkeiten wird die absolute Temperatur nach der Laser-Anregung benutzt, die innerhalb des Zeitbereichs von ca.  $10 \mu\text{s}$  stabil ist. Dafür wird der Temperatursprung anhand der beobachtete Absorptionsintensitäten mit einer Größe von  $15 \text{ }^\circ\text{K}$  angenähert. Anhand der Absorptionsänderungen wurde festgestellt, dass der Temperatursprung für die hier analysierte Peptidprobe größer war als derjenige, der in Abbildung 51 dargestellt wurde. Obwohl sich, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, die Größe des Temperatursprunges beim Erwärmen der Probe leicht erhöht, können diese Änderungen des Temperatursprunges im Bereich von  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  bis  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  auf ca.  $1 \text{ K}$  begrenzt werden. Die unterschiedlich großen Temperatursprünge werden unter anderem auch von Schwankungen der Laserpulsenergie beeinflusst, die bei einer präzisen Bestimmung der Größe des Temperatursprunges berücksichtigt werden müssten. Zur Analyse der temperaturabhängigen Reaktionszeiten wurde deshalb zu jeder experimentell bestimmten Anfangstemperatur  $15 \text{ K}$  hinzuaddiert, d.h. eine Größe des Temperatursprunges von  $(15 \pm 1) \text{ K}$  angegeben.

Zu einer graphischen Darstellung werden die durch diese Auswertung bestimmten Reaktionsraten in einer Arrhenius-Darstellung („Arrhenius Plot“) abgebildet. Dabei werden die Raten in logarithmischer Form gegen  $1000/T$  aufgetragen. Anschließend werden diese Reaktionsraten durch die Arrhenius-Gleichung (28) mathematisch beschrieben, um die

Aktivierungsenergie des beobachteten Faltungsprozesses zu ermitteln. Für eine anschaulichere Darstellung werden aus den Raten die Reaktionszeiten berechnet und gegen die Temperatur aufgetragen. Dadurch werden Unterschiede in den Faltungs- und Entfaltungszeiten in Korrelation zur jeweiligen Temperatur offensichtlicher.

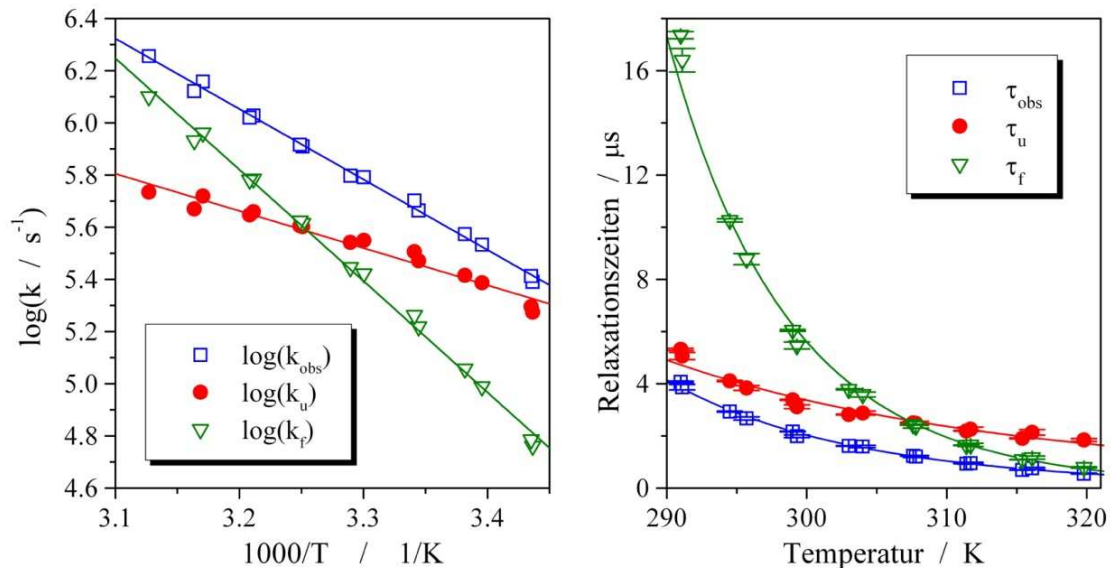


Abbildung 54: Analyse der temperaturabhängigen Relaxationsraten von Polyglutaminsäure bei pD 5,4. Links: Arrhenius-Darstellung der beobachteten Relaxationsraten  $k_{obs}$  und berechneten Faltungs-  $k_f$  und Entfaltungsraten  $k_u$ , Rechts: Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeiten. Die eingezeichneten Linien in beiden Darstellungen sind mathematische Beschreibungen der experimentellen Daten mittels der Arrhenius-Gleichung:  $\ln(k) = \ln(A) - E_a/RT$ , wobei  $E_a$  die Aktivierungsenergie ist.

In Abbildung 54 (links) sind die logarithmierten Raten gegen  $1000/T$  aufgetragen. Man erkennt deutlich einen Unterschied der aus den Absorptionstransienten bestimmten Reaktionsraten und den berechneten Faltungs- und Entfaltungsraten. Die letzteren kreuzen einander in der Übergangstemperatur  $T_m$ . Die Steigung der durch die Datenpunkte der Entfaltung gelegten Ausgleichsgeraden ist außerdem deutlich kleiner als die Steigung der Gerade durch die Faltungsdaten. Durch die Analyse dieser Datenpunkte mit der Arrhenius-Gleichung werden die Aktivierungsenergien und  $\ln(A)$ -Werte bestimmt und in Tabelle 9 dargestellt.



Parameter bestimmt durch die Arrhenius-Gleichung		
	$E_a / \text{kJ mol}^{-1}$	$\ln(A)$
$k_{\text{obs}}$	$51,69 \pm 0,87$	$33,83 \pm 0,34$
$k_u$	$27,26 \pm 1,46$	$23,53 \pm 0,58$
$k_f$	$81,69 \pm 1,45$	$44,84 \pm 0,57$

Tabelle 9: Übersicht der Aktivierungsenergien, die aus den temperaturabhängigen Reaktionsraten  $k_{\text{obs}}$ ,  $k_u$  und  $k_f$  durch die Arrhenius-Gleichung bestimmt wurden.

Durch die Zusammenstellung der Aktivierungsenergien in Tabelle 9 können deren Werte miteinander verglichen werden. Der niedrigste Wert der Aktivierungsenergien wurde für den Entfaltungsprozess bestimmt. Die größte Veränderung in den Reaktionsraten und somit der größte Wert der Aktivierungsenergie wird für die Faltung bestimmt. Die Aktivierungsenergie der aus den Kinetiken direkt ermittelten Raten  $E_a(k_{\text{obs}})$  ist größer als die der Entfaltung  $E_a(k_u)$ , jedoch kleiner als diejenige der Faltung  $E_a(k_f)$ , zusammenfassend:  $E_a(k_u) < E_a(k_{\text{obs}}) < E_a(k_f)$ . Prinzipiell kann aus den Aktivierungsenergien  $E_a(k_u)$  und  $E_a(k_f)$  auch die Enthalpieänderung  $\Delta H_{\text{eq}}$  bei der Übergangstemperatur, die bereits zur Berechnung der Reaktionsraten  $k_f$  und  $k_u$  benutzt wurde, bestimmt werden<sup>26</sup>. Dabei wird die Aktivierungsenthalpie aus der Beziehung  $\Delta H = E_a - RT$  berechnet, um durch die Aktivierungsenthalpie der Faltung  $\Delta H_f$  und Entfaltung  $\Delta H_u$  die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H_{\text{eq}}$  zu erhalten.

$$\Delta H_{\text{eq}} = \Delta H_f - \Delta H_u = 79,13 \text{ kJ mol}^{-1} - 24,71 \text{ kJ mol}^{-1} = 54,42 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Dieser Wert ( $54,42 \pm 2,06$ )  $\text{kJ mol}^{-1}$  stimmt mit ( $54,45 \pm 2,57$ )  $\text{kJ mol}^{-1}$  der Enthalpieänderung, die aus den IR-Daten im thermischen Gleichgewicht ermittelt wurde, sehr gut überein.

Aufgrund der unterschiedlich großen Werte der Aktivierungsenergien können bereits Aussagen über die Änderung der Geschwindigkeit der Reaktionen getroffen werden. Durch den kleinen  $E_a$ -Wert der Entfaltung wird sich die Reaktionsrate viel langsamer verändern als diejenige der Faltung, die einen ca. vierfach größeren Wert der Aktivierungsenergie besitzt.

Berechnet man durch Anwendung von Gleichung (29) aus der Aktivierungsenergie von  $k_{\text{obs}}$  die Aktivierungsenthalpie bei der Übergangstemperatur von ( $307,2 \pm 1,5$ ) K, so beträgt diese:  $\Delta H = E_a - RT = (49,14 \pm 0,87) \text{ kJ mol}^{-1}$ . Im Rahmen der Messgenauigkeit und der Fehler, die beim Anpassen der experimentellen Daten auftreten, ist diese Enthalpie durchaus mit der Enthalpieänderung von ( $54,45 \pm 2,57$ )  $\text{kJ mol}^{-1}$ , die aus den statischen IR-Daten ermittelt wurde, vergleichbar. Zusätzlich beinhaltet der Summand  $\ln(A)$  der

Arrhenius-Gleichung Terme der Aktivierungsentropie  $\Delta S$ . Diese können jedoch nicht hinreichend genau separiert und fehlerfrei bestimmt werden<sup>26,104</sup>.

Zur Beurteilung der Faltungseigenschaften wird ein Vergleich der Reaktionszeiten bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Diese Gegenüberstellung ist graphisch in Abbildung 38 (rechts) und in Tabelle 10 mit exakten Werten an ausgewählten Temperaturen dargestellt.

Temperaturabhängigkeit der Faltungs- und Entfaltungsreaktionszeiten			
T / K	$\tau_{\text{obs}} / \mu\text{s}$	$\tau_{\text{u}} / \mu\text{s}$	$\tau_{\text{f}} / \mu\text{s}$
290	4,14	4,91	17,34
300	2,03	3,37	5,60
307	1,25	2,61	2,60
310	1,04	2,34	1,95
320	0,56	1,70	0,72

*Tabelle 10: Vergleich von Reaktionszeiten des Faltungsprozesses an ausgewählten Temperaturen, die mit den Parametern der angepassten Arrhenius-Gleichungen bestimmt wurden.*

Man erkennt in Abbildung 54 und Tabelle 10, dass die Faltungs- und Entfaltungszeiten langsamer ablaufen als die Reaktionszeiten, die direkt bei der Anpassung der Absorptionstransienten ermittelt wurden. Zusätzlich ist beobachtbar, dass alle Reaktionszeiten mit steigender Temperatur sinken und somit die Reaktion schneller wird. Des Weiteren ist offensichtlich, dass bei niedrigen Temperaturen die Faltung wesentlich langsamer abläuft als die Entfaltung. Die Abnahme der Faltungszeiten ist stärker als die Abnahme der Entfaltungsrelaxation. Das führt schließlich dazu, dass bei der Übergangstemperatur von  $\sim 307$  K beide Prozesse, die Hin- und die Rückreaktion, die gleiche Geschwindigkeit besitzen. Bei höheren Temperaturen beobachtet man, dass die Entfaltung langsamer abläuft als der Faltungsprozess. Aus diesen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass unterhalb der Übergangstemperatur die Rückfaltung der geschwindigkeitslimitierende Schritt ist, während oberhalb der Übergangstemperatur die Entfaltung die gesamte Reaktionsgeschwindigkeit zeitlich eingrenzt.

Die beschriebenen Temperatursprung-Untersuchungen wurden bei einem pD-Wert von 5,4 durchgeführt. Wie jedoch schon an den statischen CD- und FTIR-Spektren erkennbar ist, sind Strukturveränderungen und Veränderungen der Stabilität des Homopolymers Polyglutamin-

säure stark pD-abhängig. Aus diesem Grund wurden Temperatursprung-Experimente bei verschiedenen pD-Werten durchgeführt und jeweils bei einer Wellenlänge von  $1631\text{ cm}^{-1}$  untersucht. In Abbildung 55 sind die jeweiligen Reaktionsraten bei verschiedenen pD-Werten in Abhängigkeit ihrer Temperatur aufgetragen.

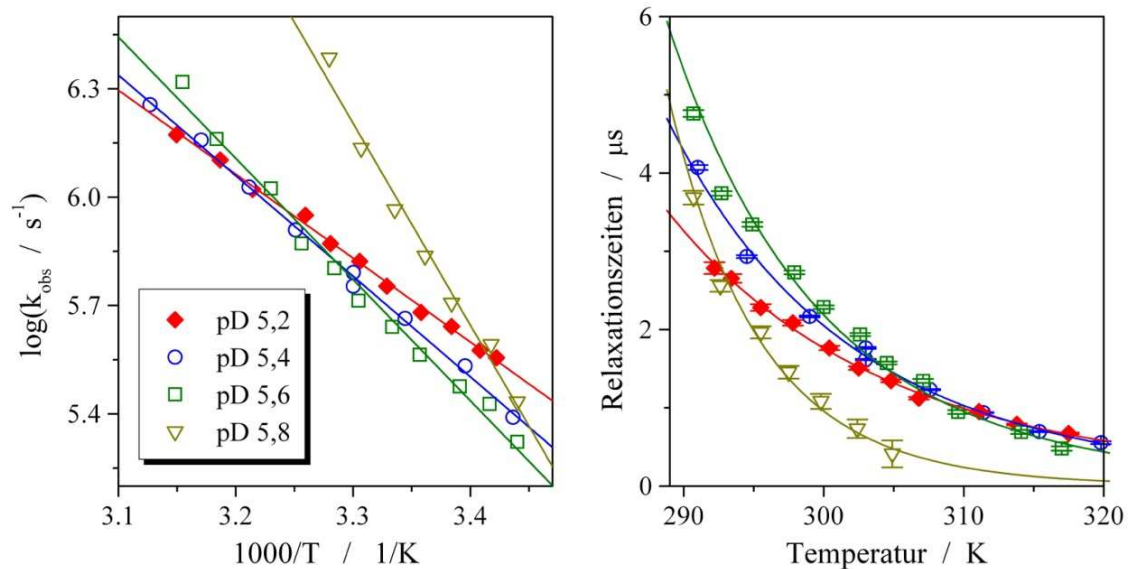


Abbildung 55: pD-Abhängigkeit der Temperatursprung-induzierten Reaktionsraten bei der Konformationsänderung von Polyglutaminsäure in Relation zur Temperatur. Links: Arrhenius-Darstellung der Relaxationsraten, bestimmt aus den zeitaufgelösten IR-Absorptionen, gegen  $1000/T$ . Die durchgezogene Linie wurde durch eine mathematische Anpassung der Arrhenius-Gleichung ermittelt. Rechts: Temperaturabhängige Relaxationszeiten nach dem Temperatursprung von jeweils ca.  $15\text{ }^\circ\text{C}$ .

Die Relaxationszeiten weisen bei allen pD-Werten eine Temperaturabhängigkeit auf. Sie nehmen mit steigender Temperatur ab. Die Änderung der Raten  $k_{\text{obs}}$ , und somit die Steigung der durch die Datenpunkte angepassten Ausgleichsgeraden, steht durch die Arrhenius-Gleichung (28) in Zusammenhang mit der Aktivierungsenergie. Die somit bei verschiedenen pD-Werten bestimmten Aktivierungsenergien geben ein Maß für die unterschiedlich starke Variation der Reaktionsraten wieder. Zum besseren Vergleich sind die durch die Arrhenius-Gleichung bestimmten Aktivierungsenergien  $E_a$  in Tabelle 11 zusammengetragen.

Parameter bestimmt durch die Arrhenius-Gleichung		
pD-Wert	$E_a$ / $\text{kJ mol}^{-1}$	$\ln(A)$
5,2	$44,47 \pm 0,81$	$31,08 \pm 0,32$
5,4	$53,30 \pm 1,04$	$34,46 \pm 0,41$
5,6	$64,23 \pm 2,33$	$38,78 \pm 0,92$
5,8	$107,01 \pm 6,22$	$56,76 \pm 2,51$

Tabelle 11: Übersicht der Aktivierungsenergien  $E_a$  bei verschiedenen pD-Werten, bestimmt durch die Arrhenius-Darstellung (siehe Abbildung 55)

In Tabelle 11 erkennt man, dass die Aktivierungsenergien mit steigendem pD-Wert ebenfalls stark ansteigen. Somit wird bei einem pD von 5,8 bereits die doppelte Aktivierungsenergie wie bei pD 5,4 bestimmt. Das bedeutet, dass die Reaktionszeiten bei höherem pD schneller abnehmen als bei niedrigerem pD. Dieser Effekt lässt sich auch in der graphischen Darstellung der temperaturabhängigen Relaxationszeiten (siehe Abbildung 55, rechts) beobachten. Für pD 5,8 sind die Reaktionszeiten bereits ab  $\sim 303$  K unter  $1 \mu\text{s}$  gesunken. Bei einem pD von 5,4 wird diese Relaxationsgeschwindigkeit erst ab  $\sim 310$  K erreicht. Neben der unterschiedlich starken Abnahme der Reaktionszeiten zeigt ein Vergleich der Relaxationszeiten bei gleicher Temperatur, jedoch bei unterschiedlichem pD-Werten, die unterschiedliche Stabilität der Peptide.

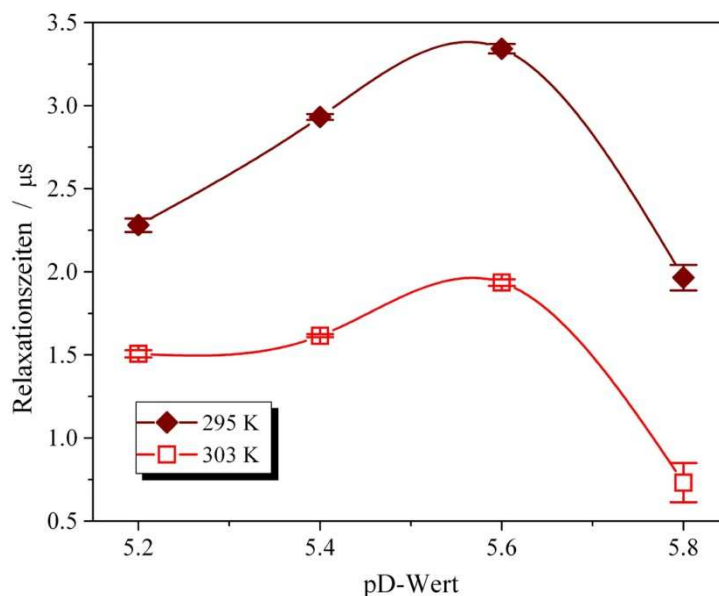


Abbildung 56: Vergleich der pD-abhängigen Relaxationszeiten von Polyglutaminsäure bei jeweils gleicher Temperatur von 295 K bzw. 303 K. Die Linien beschreiben qualitativ den Verlauf der Daten.

In Abbildung 56 wurden die experimentell ermittelten Relaxationszeiten an zwei ausgewählten Temperaturen gegen ihren jeweiligen pD-Wert aufgetragen. Man erkennt dabei, dass die Relaxationsgeschwindigkeit von pD 5,2 bis 5,8 langsamer und schließlich bei pD 5,8 wieder schneller wird. Die Relaxationszeit besitzt demnach einen Maximalwert bei ca. pD 5,6. Unabhängig von der Temperatur wird die längste Relaxationszeit bei diesem pD-Wert gefunden. Dieser Effekt ist in Abbildung 56 an den Temperaturen 295 K und 303 K qualitativ gezeigt. Der so ermittelte pD-Wert der maximalen Relaxationszeit stimmt mit den pD-Werten überein, die bei der pH-Titration sowohl mit der CD- Spektroskopie (5,55) als auch der FTIR-Spektroskopie (5,75) beim Helix-Knäuel-Übergang bestimmt wurden (siehe Kapitel 5.3.1).

Die hier enthaltenen Ergebnisse sollen im Folgenden mit anderen Arbeiten an der Polyglutaminsäure<sup>72-74,105</sup> verglichen werden. Dabei wurde mit unterschiedlichen Messtechniken beobachtet, dass der pH-Wert des Helix-Knäuel-Überganges und der Maximalwert der Relaxationszeit übereinstimmen. Bspw. zeigten Tsuji et al.<sup>73</sup> mit E-Feldsprüngen, dass Polyglutaminsäure im Helix-Knäuel-Übergang bei pH 6,7 bei ~ 15 °C eine Relaxationszeit von ~ 3,3 µs (Daten aus Figure 5<sup>73</sup> abgelesen) besitzt. Der Unterschied des Helix-Knäuel-Überganges im pH-Wert dieser Publikation und den in dieser Arbeit bestimmten pD-Wert kann dadurch begründet werden, dass nicht das exakt gleiche Peptid sondern NaPGA untersucht wurde. Jedoch konnten Yasunaga et al.<sup>105</sup> ebenfalls mit E-Feldsprüngen an in H<sub>2</sub>O gelöster Polyglutaminsäure zeigen, dass der Helix-Knäuel-Übergang bei pH 5,6 beobachtet wird, mit dem Maximalwert der Relaxationszeit übereinstimmt und 2,9 µs bei 20 °C (Daten aus Figure 2<sup>105</sup> abgelesen) beträgt. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die abermals mit E-Feldsprüngen bestimmten Resultate von Cummings und Eyring<sup>74</sup>, die am Helix-Knäuel-Übergang bei pH 5,9 und 24 °C eine Relaxationszeit von 1,7 µs von Polyglutaminsäure in H<sub>2</sub>O ermittelten<sup>74</sup>. Durch Ultraschallmessungen konnten Barksdale und Stuehr<sup>72</sup> zeigen, dass Polyglutaminsäure bei 37 °C und einem pH von 5,21, an dem der Mittelpunkt des Helix-Knäuel-Überganges bestimmt wurde, eine maximale Relaxationszeit von 1,0 µs aufweist. Diese publizierten Relaxationszeiten am Helix-Knäuel-Übergang stimmen qualitativ mit denen in dieser Arbeit ermittelten Werten überein. So wurde bspw. bei einer Temperatur von 20 °C und einem pD von 5,6 eine Relaxationszeit von 3,3 µs ermittelt (siehe Abbildung 56).

Die beobachteten Relaxationsdynamiken können mit dem Helix-Knäuel-Übergangsmodell erklärt werden, das von Schwarz und Seelig<sup>106</sup> gezeigt wurde. Die Konformationsänderungen

eines Biopolymers werden dabei thermodynamisch und kinetisch beschrieben. Sie nutzen die Annahme, dass die Konformationsänderung durch eine kooperative Wechselwirkung zwischen den nächstgelegenen Nachbarsegmenten einer Polypeptidkette entstehen. Nach diesem Modell kann der Helixanteil des beobachteten Polypeptids, also die Anteile  $f$  der helikalen Segmente, beschrieben werden durch:

$$f = \frac{1}{2} \cdot \left[ 1 + \frac{s' + 1}{\sqrt{(s' - 1)^2 + 4\sigma s'}} \right] \quad (53)$$

Dabei beschreibt der Parameter  $s'$  die Gleichgewichtskonstante der Ausbreitung bzw. der Zunahme der helikalen Fragmente einer Peptidkette, wohingegen  $\sigma$  der Nukleationsparameter ist, der die Keimbildung eines ersten helikalen Segments innerhalb einer Knäuel-Region wiedergibt. Die Ausbildung eines ersten Segments wird als Nukleationsprozess und die darauffolgende Zunahme der Strukturen wird als Propagation bezeichnet.

Am Mittelpunkt des Helix-Knäuel-Überganges ist der Anteil der Helix auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes zurückgegangen, also  $f = 1/2$ . Außerdem ist die Gleichgewichtskonstante  $s'$  an diesem Punkt, der das Verhältnis von Ent- und Rückfaltung beschreibt, gleich eins. Die Relaxationszeit  $\tau$  in der Nähe des Übergangspunktes ist dann definiert durch:

$$\frac{1}{\tau} = 4\sigma k_f \quad (54)$$

Der eingeführte Parameter  $k_f$  beschreibt dabei die Rate der vorwärtsgerichteten Reaktion, also der Helixausbildung nach der ersten Phase des Nukleationsprozesses. Durch Snipp et al.<sup>107</sup> wurde der Nukleationsparameter mit  $\sigma = (3 \pm 2) \cdot 10^{-3}$  für Polyglutaminsäure bestimmt. Dadurch kann die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Helixbildung am Übergangspunkt bestimmt werden. Eine Zusammenfassung von Relaxationszeiten und Raten der Ausbildung der Helices von Polyglutaminsäure sind in Tabelle 12 dargestellt.

Relaxations- und Ausbildungenraten am Helix-Knäuel-Übergang				
Temperatur / °C	$\tau_{\text{Relax}} / \mu\text{s}$	$k_f / 10^7 \text{ sec}^{-1}$	$\tau_f / \text{ns}$	Referenz
37	$1,0 \pm 0,1$	$8 \pm 5$	$12,5 \pm 7,8$	<sup>72</sup>
15	$3,4 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$	$41,7 \pm 3,5$	<sup>73,108</sup>
25	$3,2 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$	$38,5 \pm 3,0$	<sup>73,108</sup>
35	$2,9 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,2$	$34,5 \pm 2,4$	<sup>73,108</sup>
45	$2,4 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,2$	$29,4 \pm 1,7$	<sup>73,108</sup>
24	$1,7 \pm 0,6$	$6,0 \pm 3,2$	$16,7 \pm 8,9$	<sup>74</sup>
20	$\sim 2,8$	$2,9 \pm 2,0$	$34,5 \pm 23,8$	<sup>105</sup>

Tabelle 12: Übersicht publizierter Relaxationszeiten und Ausbildungenraten der Helixbildung von Polyglutaminsäure am Helix-Knäuel-Übergang.

Eine Auswertung der in dieser Arbeit bestimmten Relaxationszeiten, die am pH-Wert des Helix-Knäuel-Überganges ermittelt wurden, liefert durch Gleichung (54) die Raten der Helixbildung. Diese Raten sind in Abhängigkeit ihrer Temperatur in Tabelle 13 dargestellt.

Relaxations- und Ausbildungenraten der Helix bei pD 5,6			
Temperatur / °C	$\tau_{\text{Relax}} / \mu\text{s}$	$k_f / 10^7 \text{ sec}^{-1}$	$\tau_f / \text{ns}$
17,7	$4,76 \pm 0,044$	$1,75 \pm 1,18$	$57,12 \pm 38,61$
19,7	$3,74 \pm 0,029$	$2,23 \pm 1,50$	$44,88 \pm 30,27$
21,9	$3,343 \pm 0,029$	$2,49 \pm 1,68$	$40,12 \pm 27,09$
24,9	$2,73 \pm 0,024$	$3,05 \pm 2,06$	$32,76 \pm 22,13$
27	$2,286 \pm 0,022$	$3,65 \pm 2,47$	$27,43 \pm 18,55$
29,6	$1,936 \pm 0,02$	$4,30 \pm 2,91$	$23,23 \pm 15,73$
31,5	$1,573 \pm 0,019$	$5,30 \pm 3,60$	$18,88 \pm 12,81$
34,1	$1,344 \pm 0,025$	$6,20 \pm 4,25$	$16,13 \pm 11,05$
36,6	$0,946 \pm 0,024$	$8,81 \pm 6,10$	$11,35 \pm 7,86$
41,1	$0,691 \pm 0,025$	$12,06 \pm 8,48$	$8,29 \pm 5,83$
44	$0,48 \pm 0,029$	$17,36 \pm 12,62$	$5,76 \pm 4,19$

Tabelle 13: Übersicht der experimentell ermittelten und durch Gleichung (54) bestimmten Relaxationszeiten und Ausbildungenraten der Helixbildung von Polyglutaminsäure am Helix-Knäuel-Übergang.

Die Raten der Helixausbildung liegen je nach Temperatur zwischen  $\sim 57$  ns bis  $\sim 6$  ns. Der auffallend große Fehler bei der Bestimmung der Ausbildungsrate liegt hauptsächlich am sehr großen Fehler des verwendeten Nukleationsparameter  $\sigma$ . Die mit dieser Auswertungsmethode ermittelten und in Tabelle 13 dargestellten Raten stimmen qualitativ mit denen in Tabelle 12 gezeigten Raten überein. Neben der Übereinstimmung erkennt man zusätzlich, dass die Zeitkonstanten der Ausbildung mit steigender Temperatur kleiner werden, dass also die Geschwindigkeit der Reaktion zunimmt. Diese Temperaturabhängigkeit der Reaktionsraten kann zu einer Auswertung durch eine Arrhenius-Darstellung benutzt werden. Da die

ermittelten Reaktionszeit  $\tau_f$  der Helixausbildung proportional zur beobachteten Relaxationszeit  $\tau_{obs}$  sind (nach Gleichung (54) ist  $\tau_{obs} = 4\sigma\tau_f$ ), wurde für beide Reaktionszeiten die gleiche Aktivierungsenergie  $E_a$  mit  $(64,23 \pm 2,33)$  kJ mol<sup>-1</sup> bestimmt. Berechnet man mit Gleichung (29) die Aktivierungsenthalpie, so erhält man bei 310 K mit  $\Delta H = E_a - RT$  einen Wert von  $(61,65 \pm 2,23)$  kJ mol<sup>-1</sup>. Einen vergleichbaren Wert der Aktivierungsenergie liefern Cummings und Eyring<sup>74</sup> bei der Auswertung einer Arrhenius-Darstellung mit  $E_a = 10$  kcal mol<sup>-1</sup> = 41,8 kJ mol<sup>-1</sup>. Dahingegen kann mit den hier ermittelten Daten die geringe Enthalpieänderung von  $(1,5 \pm 0,4)$  kcal mol<sup>-1</sup> bzw.  $(6,27 \pm 1,67)$  kJ mol<sup>-1</sup>, bestimmt durch Tsuji et al.<sup>73</sup> bzw. Sano und Yasunaga<sup>108</sup>, nicht bestätigt werden. Sie untersuchten jedoch die deprotonierte Polyglutaminsäure, Natriumpolyglutamat (NaPGA), was die Abweichung erklären könnte.

### 5.3.4 Zusammenfassung der Untersuchungen an Polyglutaminsäure

In dieser Arbeit wurden statische CD- und FTIR-Experimente durchgeführt, um die Temperatur- und pD-Abhängigkeit der Strukturstabilität von Polyglutaminsäure zu untersuchen. Mit beiden Messmethoden wurde festgestellt, dass bei einem pD-Wert von ca. 5,6 ein Strukturwandel von  $\alpha$ -Helix zu ungeordnetem Knäuel beobachtet werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass Polyglutaminsäure bei niedrigem pD innerhalb eines sehr engen Temperaturbereiches von einer  $\alpha$ -helikalen in eine aggregierte Konformation wechselt. Durch Erhöhung des pD-Wertes nimmt diese thermische Aggregation ab, bis bei pD 5,4 keine Aggregation mehr erkennbar ist. Der dabei beobachtete strukturelle Übergang ist jedoch im Vergleich zum Aggregationsübergang sehr breit. Durch die weitere Erhöhung des pD-Wertes wird schließlich keine wesentliche strukturelle Veränderung mehr detektiert. Ein Vergleich des Homopolymers bei verschiedenen pD-Werten wurde auch anhand der unterschiedlichen thermodynamischen Parameter durchgeführt.

Auf der Basis dieser Resultate im thermischen Gleichgewicht wurden Temperatursprung-Experimente von Polyglutaminsäure bei pD 5,4 durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass zeitaufgelöste Absorptionstransienten an unterschiedlichen Wellenlängen, die als unterschiedliche Strukturkomponenten ( $\alpha$ -Helix bzw. ungeordnetes Knäuel) interpretiert werden, die gleichen Relaxationszeiten besitzen. Bei einer Analyse der Relaxationsraten konnten aus diesen die temperaturabhängige Dynamik der Faltung und Entfaltung separiert werden.



Dadurch wurde gezeigt, dass die Rückfaltung des Peptids der geschwindigkeitsbegrenzende Faktor der beobachteten Reaktion ist.

Abschließend wurden Temperatursprung-Experimente bei verschiedenen pD-Werten durchgeführt. Die langsamsten Relaxationszeiten wurden bei pD 5,6 beobachtet.

Die erhaltenen Ergebnisse können durch Literaturwerte belegt und zu einem Gesamtmodell zusammengefügt werden. Ausschlaggebend für die Struktur und Stabilität des Peptids ist das Verhältnis von protonierten und ionisierten Carboxyl-Gruppen der Seitenketten. Zusätzlich können die Daten bei pD 5,4, die eine schnellere Entfaltung des Peptids und eine langsamere Rückfaltung zeigen, damit interpretiert werden, dass die eingenommene ungeordnete Knäuel-Konformation stabiler ist als die helikale Struktur. Dieser Effekt vergrößert sich bis zu einem pD-Wert von 5,6. Oberhalb dieses pD-Wertes werden die beobachteten Relaxationszeiten, die Summe aus Faltungs- und Entfaltungsraten, schneller.

## 5.4 Untersuchungen eines isotoopenmarkierten eines $\beta$ -Hairpin-Peptids mittels statischer und zeitaufgelöster Spektroskopie

Die in dieser Arbeit untersuchten  $\beta$ -Hairpin-Peptide sind Varianten des ursprünglich von Cochran et al.<sup>81</sup> synthetisierten  $\beta$ -Hairpin-Peptids Trpzip2. Wie bereits in Kapitel 0 erwähnt wurde, werden diese Peptide vor allem durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Tryptophanen stabilisiert. In allen hier verwendeten Peptidvarianten wurden im Vergleich zum Trpzip2 Peptid die ursprünglichen Aminosäuren an drei Positionen durch Alanine ersetzt, an Position 1 das Serin und an Position 3 und 10 das jeweilige Threonin. Die veränderten Peptide werden als Trpzip2C benannt. Die Synthese der untersuchten Trpzip-Peptide wurden am Research Resources Center der University of Illinois at Chicago in der Arbeitsgruppe von Prof. Timothy A. Keiderling durchgeführt (siehe Kapitel 4.3). Die Alanin-Substitutionen wurden vorgenommen, um Isotoopenmarkierungen mit angemessenen, akzeptablen Kosten der Synthesereagenzien durchzuführen.

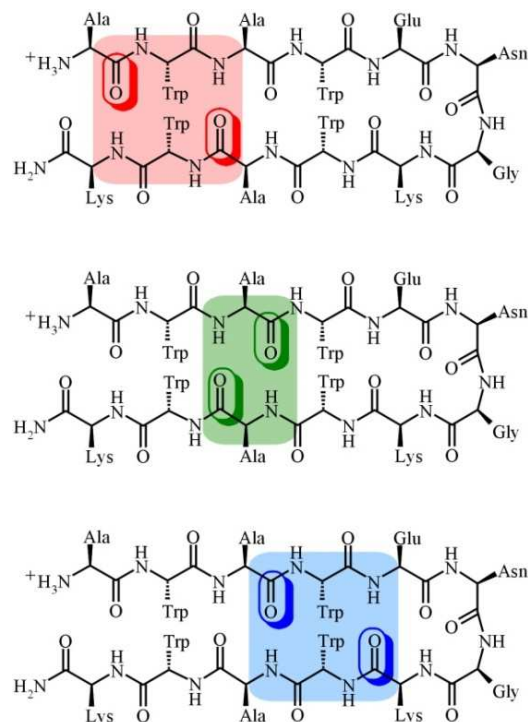


Abbildung 57: Schematische Strukturdarstellung der zweifach isotoopenmarkierten Trpzip2C-Peptide. Die  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Isotoopenmarkierungen befinden sich auf den gegenüberliegenden Strängen des  $\beta$ -Hairpins und sind jeweils in der Peptidgruppe eingebaut. Oben: A1A10; Mitte: A3A10; Unten: A3K8.

Die Abbildung 57 und Tabelle 14 geben einen Überblick über die verwendeten Peptide, die Isotopenmarkierungspositionen und einen Vergleich mit der ursprünglichen Peptid-Sequenz des Trpzip2.

Peptid	Sequenz
Trpzip2	SWTWENKWTWK-NH <sub>2</sub>
Trpzip2C	AWAWENKWAWK-NH <sub>2</sub>
A1A10	<b>A</b> WAWENK <b>W</b> W <b>A</b> WK-NH <sub>2</sub>
A3A10	AW <b>A</b> WENK <b>W</b> W <b>A</b> WK-NH <sub>2</sub>
A3K8	AW <b>A</b> WENK <b>K</b> WAWK-NH <sub>2</sub>

*Tabelle 14: Übersicht der Sequenzen der Trpzip2-Peptidvarianten und den Positionen der <sup>13</sup>C=O Isotopenmarkierungen in der Peptidgruppen der farblich hervorgehobenen Aminosäuren*

Die Entfernungen und Positionen der <sup>13</sup>C=O-Isotopenmarkierungen in der β-Hairpin-Struktur sind innerhalb der Peptidvarianten unterschiedlich. Dabei bilden die <sup>13</sup>C=O Gruppen Wasserstoff-verbrückte Ringe aus, die in Abbildung 57 farblich markiert sind. Die Varianten **A1A10** und **A3K8** besitzen gleich große, aus 14 Atomen bestehende Wasserstoff-verbrückte Ringe, die sich in **A1A10** an den Hairpin-Enden und in **A3K8** in der Nähe des Turns befinden. Die **A3A10** Peptidvariante bildet einen kleineren Wasserstoff-verbrückten Ring aus, der aus 10 Atomen besteht.

#### 5.4.1 CD-spektroskopische Untersuchung der Trpzip2C-Peptidvarianten im thermischen Gleichgewicht

Die Analyse der Trpzip2C-Peptide wurde unter anderem mittels Circular-Dichroismus-Spektroskopie durchgeführt. Im Gegensatz zu den in Kapitel 2.4 gezeigten Spektren eines β-Faltblattes eines Peptids (Abbildung 14) ist die Form der Spektren des in Abbildung 58 dargestellten Trpzip2C-Peptids, hier gezeigt am Beispiel der isotopenmarkierten Variante **A3K8**, verändert.

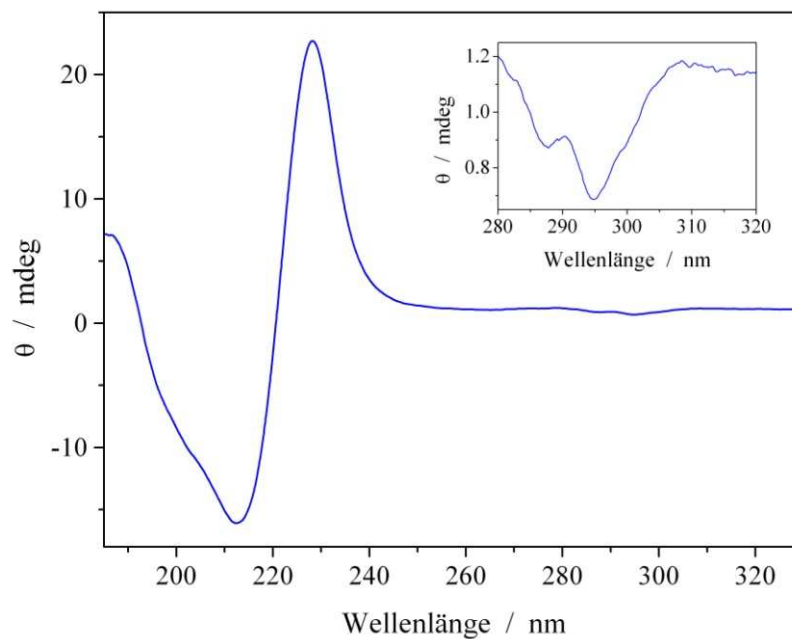


Abbildung 58: UV-CD Spektrum einer A3K8-Probe mit pD 1 bei einer Temperatur von 4 °C, einer Probenkonzentration von 20 mg/ml und einer Schichtdicke von ~ 10  $\mu$ m. Oben rechts: vergrößerter Spektralbereich der gleichen Probe

Im CD-Spektrum im fernen UV-Bereich (180 - 250 nm) werden bei niedriger Temperatur (4 °C) eine positive Bande bei ~ 227 nm und eine negative Bande bei ~ 213 nm beobachtet. Dieses Bandenpaar („couplet bands“) entsteht aus der Excitonenkopplung der benachbarten Tryptophan-Residuen<sup>109</sup>. Jeweils zwei benachbarte Tryptophanresiduen, Trp2-Trp11 und Trp4-Trp9, stehen dabei in hydrophober Wechselwirkung, wobei die jeweiligen Indol-Ringe in einer senkrecht aufeinander stehenden Geometrie („edge-to-face“) räumlich organisiert sind<sup>110</sup>. Diese Art der geometrischen Anordnung kann unter anderem bei der aus den 20 Modellen der NMR-Daten stammenden dreidimensionalen Struktur des Trpzip2- $\beta$ -Hairpin-Peptids<sup>81</sup> beobachtet werden (vergleiche Abbildung 18). Im nahen UV-Bereich (250 - 350 nm) werden negative Banden bei 295 nm und bei 288 nm beobachtet. Diese Spektralform wurde auch für das ursprüngliche Trpzip2<sup>81</sup> gefunden. Konsequenter Weise kann daraus der Schluss gezogen werden, dass bei dem hier untersuchten Peptid Trpzip2C die Tryptophan-Residuen in einer ähnlich gut ausgeprägten Tertiärstruktur angeordnet sind, wie in den ursprünglichen Trpzip2-Peptiden.

Wird bei der thermischen Entfaltung des untersuchten Peptids die Entfernung dieser Indol-Ringe der Tryptophane erhöht, so kann das direkt im CD-Spektrum durch eine Intensitäts-

abnahme beobachtet werden. Da die elektronische Kopplung und damit die Intensität der UV-CD-Banden von der Entfernung ( $1/R^3$ ) abhängig ist, kann diese Kopplung als direktes Merkmal der Entfaltung des Peptids und zur Untersuchung der Stabilitätseigenschaften genutzt werden.

Für einen Vergleich der CD-Spektren werden diese für Trpzip2C und für die isotopenmarkierte Variante **A3K8** in Abbildung 59 dargestellt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden identische Schichtdicken  $\sim 10 \mu\text{m}$  und Probenkonzentrationen  $\sim 20 \text{ mg/ml}$  benutzt.

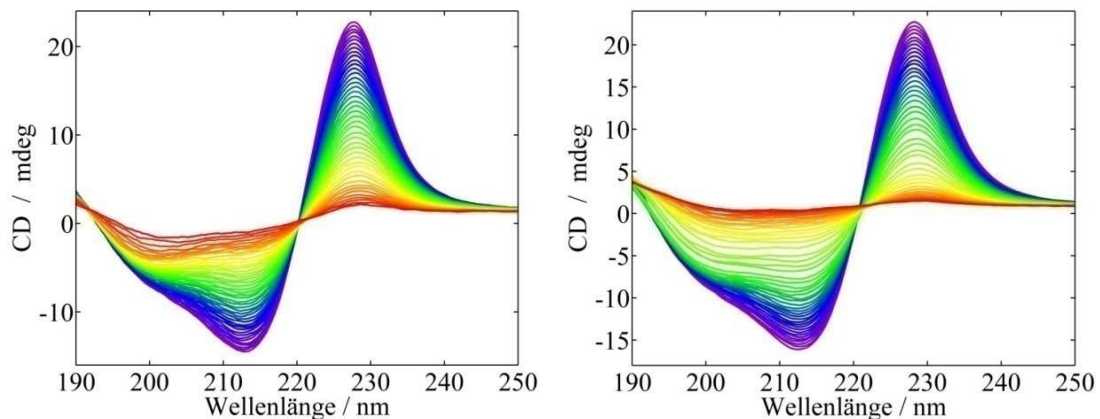


Abbildung 59: Fern-UV-CD Spektren zweier Trpzip2C-Varianten (links: Trpzip2C, rechts: A3K8) mit  $pD$  1 beim Erwärmen von  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (violett) auf  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  (rot).

Bei der thermischen Entfaltung des Peptids (siehe Abbildung 59) nehmen die Intensitäten beider durch Excitonenkopplung verursachten Banden im fernen UV-Bereich ab. Ein Unterschied der Spektren zwischen  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (violett) und  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  (rot) ist deutlich erkennbar. Diese Intensitätsabnahme verläuft kontinuierlich über den gesamten untersuchten Temperaturbereich und wird als thermische Denaturierung des Peptids interpretiert. In den beiden dargestellten Varianten des Trpzip2C-Peptids ist bei der thermischen Denaturierung kein Unterschied erkennbar. Auch im nahen UV-Bereich ist die Abnahme der Intensitäten beim Erwärmen der Probe sichtbar (siehe Abbildung 60).

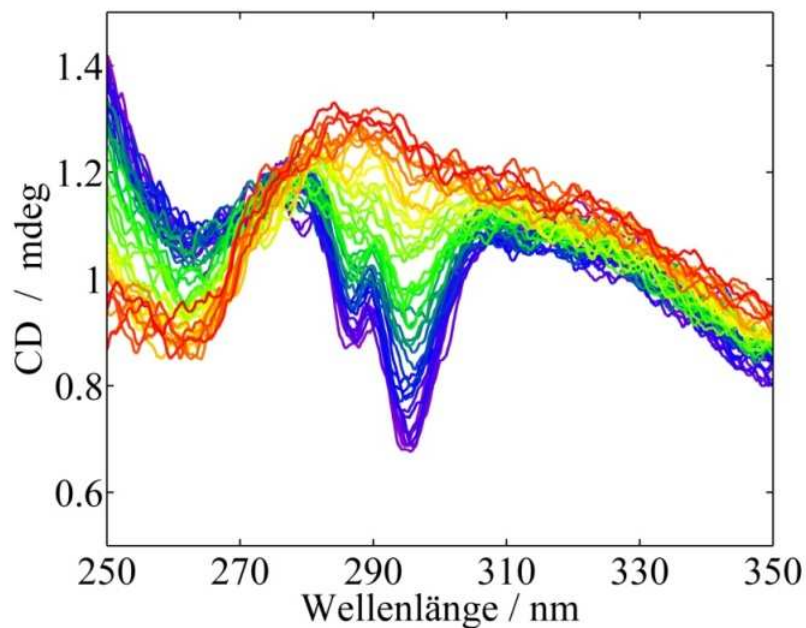


Abbildung 60: Nah-UV-CD Spektren der A3K8-Peptides mit pD 1 beim Erwärmen von 4 °C (violett) auf 90 °C (rot). Dabei wurde dieselbe Probe vermessen, die in Abbildung 59 (rechts) dargestellt ist.

Obwohl die in Abbildung 60 dargestellten Spektren verrauscht<sup>10</sup> sind, ist der Effekt der Intensitätsabnahme der Banden bei 295 nm und bei 288 nm beim Erwärmen der Probe offensichtlich. Diese Bandenverringernung kann als Abnahme der Tertiärstruktur interpretiert werden.

Mittels der CD-Spektren der beiden Trpzip2C-Varianten (siehe Abbildung 59) soll hier beispielhaft die Analyse der experimentellen Daten aus dem fernen UV-Bereich gezeigt werden. Abbildung 61 zeigt deshalb die temperaturabhängige Absorption bei 227 nm, die, wie bereits erwähnt, als Merkmal für die Kopplung der Indol-Ringe gilt und somit bei tieferen Temperaturen (4 °C) als eine intakte  $\beta$ -Hairpin-Struktur interpretiert wird.

<sup>10</sup> Das Rauschen in diesem Spektralbereich könnte durch eine größere Probenschichtdicke verringert werden. Da jedoch die hauptsächliche Analyse im fernen UV-Bereich durchgeführt wurde, wird hier lediglich auf den Effekt der Beobachtung der temperaturinduzierten Entfaltung hingewiesen.

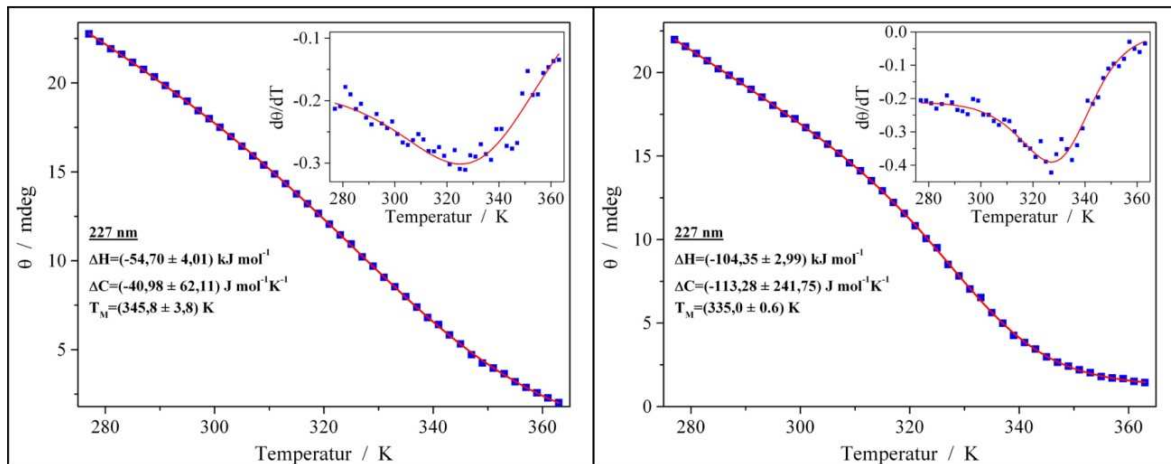


Abbildung 61: Analyse der temperaturabhängigen CD-Intensitäten  $\theta(T)$  und der temperaturabhängigen Intensitätsänderungen  $\frac{d\theta(T)}{dT}$  (jeweils verkleinerter Abbildungseinsatz oben rechts), bei 227 nm beim Erwärmen der Trpzip2C-Peptide von 4 °C bis 90 °C (Links: Trpzip2C, Rechts: A3K8). Die experimentellen Daten  $\theta(T)$  bzw.  $\frac{d\theta(T)}{dT}$  (blaue Quadrate) werden über Gleichung (32) bzw. Gleichung (37) mathematisch beschrieben (rote durchgezogene Linie).

Beim Erwärmen der Trpzip2C-Peptide, sowohl der isotopen- als auch unmarkierten Peptide, nimmt die Intensität der Bande bei 227 nm auf dem gesamten untersuchten Temperaturbereich von 4 °C bis 90 °C ab. Der Kurvenverlauf der isotopenmarkierten Peptidvariante besitzt hingegen eine markantere sigmoide Form als die unmarkierte Trpzip2C-Probe. Die Ableitungen  $\frac{d\theta(T)}{dT}$  der beiden Proben weisen einen ähnlichen Kurvenverlauf auf. Das Minimum beider Kurven liegt bei ca. 325 K. Insgesamt sind die in dieser Arbeit erhaltenen Kurvenverläufe mit den Intensitätsverläufen der CD-Daten  $\theta(T)$  und Ableitungen  $\frac{d\theta(T)}{dT}$  qualitativ vergleichbar, die von Cochran et al.<sup>81</sup> publiziert wurden.

Zur mathematischen Beschreibung der experimentellen temperaturabhängigen Absorptionen  $\theta(T)$  wird Gleichung (32) und zur Beschreibung der von der Temperatur abhängigen Absorptionsänderungen  $\frac{d\theta(T)}{dT}$  wird Gleichung (37) benutzt. Die Anpassung dieser beiden mathematischen Funktionen an die jeweiligen experimentellen Daten wurde über einen „Global Fit“ (siehe Kapitel 4.2) durchgeführt. Die Analyse der in Abbildung 61 dargestellten temperaturabhängigen Intensitäten ergibt für Trpzip2C (links) eine Enthalpieänderung von  $(54,70 \pm 4,08) \text{ kJ mol}^{-1}$  und eine sehr kleine Änderung der Wärmekapazität von

$(40,98 \pm 62,11) \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . Die Übergangstemperatur der Entfaltung wurde mit  $(345,8 \pm 3,8) \text{ K}$  bestimmt. Dieser Wert stimmt mit der von Cochran et al.<sup>81</sup> für Trpzip2 angegebenen Übergangstemperatur von  $(345,0 \pm 0,1) \text{ K}$  überein. Dahingegen weichen die von Cochran et al.<sup>81</sup> angegebene Enthalpieänderung von  $(70,17 \pm 0,25) \text{ kJ mol}^{-1}$  und die Änderung der Wärmekapazität von  $(1175,7 \pm 8,4) \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  von den in dieser Arbeit ermittelten Werten ab. Diese Abweichungen entstehen, da der beobachtete Übergang über einen sehr großen Temperaturbereich stattfindet und nicht besonders ausgeprägt ist. Zusätzlich ist nicht zu vernachlässigen, dass drei polare Aminosäuren (Serin und Threonin) durch hydrophobe Alanine ausgetauscht wurden und dass das Peptid bei einem sehr sauren pH-Wert ( $\text{pH} \sim 1,2$ ) im Vergleich zur Arbeit von Cochran et al.<sup>81</sup> ( $\text{pH} 7$ ) vermessen wurde. Aus diesen Tatsachen resultieren möglicherweise die Abweichungen zu den erwähnten thermodynamischen Parametern. Zudem bleibt anzumerken, dass die mathematisch bestimmten thermodynamischen Parameter modellabhängig sind.

Die für die isotope markierte Peptidvariante **A3K8** aus den CD-Daten ermittelten thermodynamischen Parameter sind eine Enthalpieänderung von  $(104,34 \pm 0,29) \text{ kJ mol}^{-1}$ , eine Änderung der Wärmekapazität von  $(113,3 \pm 241,7) \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  und eine Übergangstemperatur von  $(335,0 \pm 0,6) \text{ K}$ . Die ermittelte Übergangstemperatur liegt  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  tiefer als diejenige des unmarkierten Trpzip2C-Peptids. Zusätzlich wird bei der isotope markierten Variante eine fast doppelt so große Enthalpie- bzw. Wärmekapazitätsänderung bestimmt. Diese Unterschiede sind jedoch auch bereits bei einem Vergleich der Kurvenverläufe der jeweiligen temperaturabhängigen Intensitäten in Abbildung 61 erkennbar. Während für die isotope markierte Peptidvariante ein relativ eindeutiger sigmoider Kurvenverlauf beobachtbar ist, erkennt man für die unmarkierte Peptidprobe eine nahezu lineare Intensitätsabnahme. Diese unterschiedlichen Intensitätsverläufe wirken sich direkt auf die thermodynamischen Parameter aus.

Diese Resultate werden auch durch Huang<sup>111</sup> bestätigt, die durch Studien an den zum Teil auch in dieser Arbeit verwendeten  $\beta$ -Hairpin-Peptiden zeigte, dass sich die Übergangstemperaturen je nach Peptidvariante unterscheiden und dass die thermodynamischen Parameter von der Auswahl des Auswertungsmodelles abhängig sind.



## 5.4.2 FTIR-Absorptionsspektren der Trpzip2C-Peptidvarianten im thermischen Gleichgewicht

Neben der Analyse der CD-Spektren wurden im Rahmen dieser Arbeit IR-Absorptionsspektren der Trpzip2C-Peptide untersucht. Zunächst werden statische Absorptionsspektren der unterschiedlichen Varianten des Trpzip2C-Peptids (siehe Abbildung 62) bei gleicher Temperatur von ca. 20 °C im Amid I Bereich analysiert. Um die Lösungsmittelabsorptionen des D<sub>2</sub>O bei dieser Gegenüberstellung außer Acht zu lassen, wurden diese von den jeweiligen Spektren der Peptide in Lösung abgezogen. Um zusätzlich aufgrund der unterschiedlichen Peptidkonzentrationen und durch unterschiedliche Schichtdicke der Probe auftretenden Absorptionsunterschiede einander anzugleichen, wurden die Flächen der Amid I Bande der zu vergleichenden Spektren auf dem Spektralbereich von 1750 cm<sup>-1</sup> bis 1560 cm<sup>-1</sup> auf eins normiert.

Das nicht isotopenmarkierte Trpzip2C-Peptid besitzt im IR-Absorptionsspektrum (siehe Abbildung 62, oben, schwarze Linie) eine breite Amid I Bande. Diese hat ihr Maximum bei ~ 1637 cm<sup>-1</sup>. Von den Trpzip2C-Peptid-Varianten sind keine NMR-Strukturdaten vorhanden. Dennoch können die vorhandenen IR-spektroskopischen Daten in der Art interpretiert werden, dass sie eindeutig aus der Ausbildung eines antiparallelen  $\beta$ -Strangmotives hervorgehen. Sowohl CD- als auch IR-Spektren stimmen mit denen von Trpzip2 (mit gelöster NMR-Struktur), sowohl bei saurem als auch neutralem pH-Wert, gut überein<sup>112</sup>.

Als zusätzliches Hilfsmittel zur Interpretation des Absorptionsspektrums wird dessen zweite Ableitung benutzt. Dadurch lassen sich kleinere Banden, die zur gesamten Gruppenschwingung der Amid I Bande beitragen, auflösen. Die Minima, die in dieser zweiten Ableitung zu erkennen sind, können zur Auflösung überlappender Absorptionsbanden dienen. In der zweiten Ableitung des Absorptionsspektrums des nicht isotopenmarkierten Peptids (siehe Abbildung 62, unten) erkennt man zwei ausgeprägte Minima an den Positionen 1634 cm<sup>-1</sup> und 1672 cm<sup>-1</sup>. Diese beiden Bandenpositionen können als hoch- und niederfrequente Bande des  $\beta$ -Faltblattes interpretiert werden.

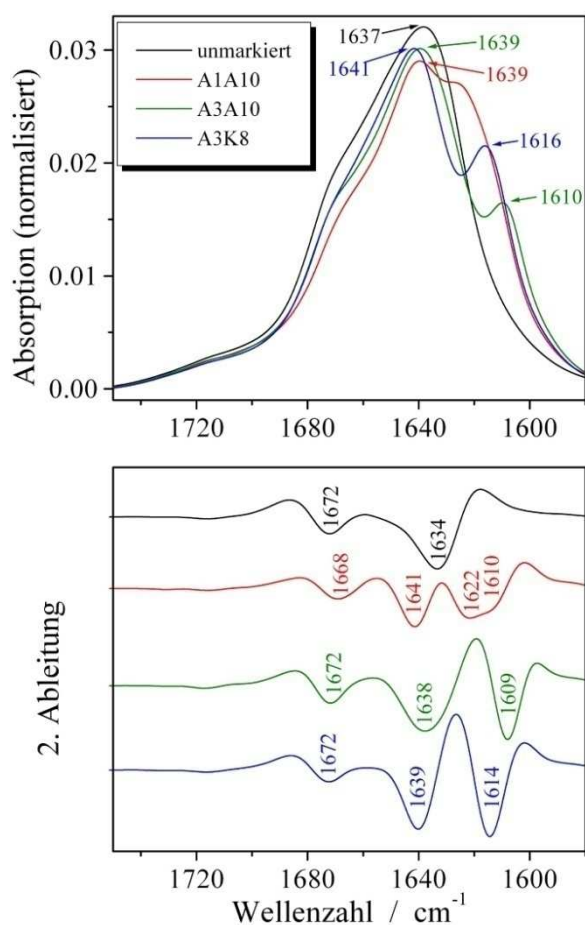


Abbildung 62: Absorptionsspektren der untersuchten Trpzip2C-Varianten (jeweils mit gleicher Farbkodierung). Oben: Absorptionsspektren bei 20 °C. Zum besseren Vergleich wurden die Spektren normiert, um im Bereich von 1750  $\text{cm}^{-1}$  bis 1560  $\text{cm}^{-1}$  eine Fläche von eins zu haben. Unten: 2. Ableitungen der darüber dargestellten Absorptionsspektren (zur besseren Übersicht Basislinien-verschoben) mit Wellenzahl-Markierungen der Minima.

Neben dem gesamten Entfaltungsprozess eines Peptids an sich, ist es auch von großem Interesse, lokale, also örtlich-aufgelöste Entfaltungseigenschaften innerhalb einer Peptidstruktur untersuchen zu können. Dafür wurden  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Isotopenmarkierungen im Peptidrückgrat an unterschiedlichen Positionen vorgenommen.

In Peptiden, in denen selektiv einzelne Aminosäuren durch  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Isotope markiert werden, beobachtet man im Absorptionsspektrum Intensitätsveränderungen und Bandenpositionsverschiebungen im Vergleich zum unmarkierten Peptid. Diese Veränderungen enthalten Informationen über die Einflüsse der lokalen Positionierung der  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Markierung im Peptid, aber auch über unterschiedliche Bindungsstärken. Wie bereits erwähnt wurde, können

diese Frequenzverschiebungen im einfachsten Fall bereits nur durch die unterschiedliche Masse der Isotope verursacht werden, vergleiche dazu Gleichung (7).

Peptide, in denen die Isotopenmarkierung gleichzeitig an zwei unterschiedlichen Positionen hinzugefügt worden ist, beinhalten zusätzlich zu den bereits genannten Ursprüngen der an einzelnen Aminosäuren isotopeninduzierten Frequenzverschiebung auch noch die Effekte der Schwingungskopplungen zwischen den beiden Strängen. Dadurch werden Intensitätszunahmen und Frequenzverschiebungen von Amidbandenkomponenten beobachtet, die sich in Abhängigkeit der Isotopenmarkierungsposition unterschiedlich verhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Stabilitäts- und Faltungseigenschaften von zweifach isotopenmarkierten Trpzip2C-Peptiden untersucht. Die Absorptionsspektren dieser zweifach isotopenmarkierten Peptide sind im Vergleich zu der unmarkierten Peptidvariante in Abbildung 62 dargestellt. Aufgrund der verschiedenen Positionen der  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Markierungen können unterschiedlich starke Frequenzveränderungen und Bandenintensitäten beobachtet werden. In der Peptidvariante **A3K8**, in der ein großer Wasserstoff-verbrückter, aus 14 Atomen bestehender Ring geformt wird (vergleiche Abbildung 57), erscheint die  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Absorptionsbande bei einer Frequenz von  $\sim 1616\text{ cm}^{-1}$ . Im Absorptionsspektrum von **A3A10**, in dem ein kleiner, aus 10 Atomen bestehender Wasserstoff-verbrückter Ring in der Mitte des Hairpins gebildet wird, ist die  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Absorptionsbande bei  $\sim 1610\text{ cm}^{-1}$  erkennbar. Die Aufspaltung der  $^{12}\text{C}=\text{O}$ - und  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Absorptionsbanden können als Indiz zur Stärke der jeweiligen Kopplung, ihrer Entfernung zueinander, aber auch ihrer Orientierung interpretiert werden („exciton coupling“). Studien zu Simulationen<sup>113,114</sup> von IR-Spektren zeigen, dass die beiden durch die Ringe geformten Strukturtypen Kopplungskonstanten mit entgegengesetztem Vorzeichen besitzen. Die antisymmetrische Schwingung besitzt innerhalb der C=O-Kopplung die größte Intensität, da sie das größte Übergangsdipolmoment erzeugt. Die unterschiedliche Entfernung der  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Markierungen und die unterschiedliche stark induzierten Übergangsdipolmomente erzeugen demnach die beobachtete Aufspaltung der Absorptionsbanden. Die Position der  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Absorptionsbanden und ihre Verschiebung von der  $^{12}\text{C}=\text{O}$ -Bande der unmarkierten Peptidgruppen wurden durch unterschiedliche theoretische Modelle analysiert<sup>113-116</sup>. Dadurch kann der Effekt erklärt werden, dass die  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Isotopenmarkierungen, die im **A3A10** Peptid sehr nahe beieinander liegen, eine Aufspaltung der  $^{12}\text{C}=\text{O}$ - $^{13}\text{C}=\text{O}$  Bandenpositionen von  $\sim 29\text{ cm}^{-1}$  erzeugen, wohingegen die Aufspaltung der  $^{12}\text{C}=\text{O}$ - $^{13}\text{C}=\text{O}$  Banden im **A3K8** Peptid kleiner ist,  $\sim 25\text{ cm}^{-1}$  beträgt und durch die größere Entfernung der  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Gruppen erklärt werden kann. Der Einfluss der

Positionierung von  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Wasserstoff-verbrückten Ringen gleicher Größe wurde mit Peptidvarianten untersucht, die ihre  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Markierungen an den Enden des Hairpins (**A1A10**) und in der Nähe des Turns (**A3K8**) des Peptids besitzen. Durch Positionierung des  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Ringes an den Enden des  $\beta$ -Stranges, wie in **A1A10**, wird im Absorptionsspektrum keine markante, eindeutig von der  $^{12}\text{C}=\text{O}$ -Bande trennbare  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Absorptionsbande ersichtlich, sondern eine breite Bande mit zwei „Schultern“ bei ca.  $1622\text{ cm}^{-1}$  und  $1610\text{ cm}^{-1}$ . Diese unterschiedlich starken Frequenzverschiebungen sind ein Indiz dafür, dass die Schwingungskopplungen zwischen den  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Bindungen am Rand des Peptids schwächer sind, als jene zwischen den  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Markierungen im Inneren des  $\beta$ -Stranges (**A3A10**).

Zusätzlich zur unterschiedlich starken  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Frequenzverschiebung ist die unterschiedliche Intensität der Banden auffällig. Im Allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass bei der Induzierung einer großen Änderung des Übergangsdipolmomentes eine intensive Absorptionsbande im Spektrum erkennbar wird. Während für **A3A10** die Frequenz-aufspaltung größer ist als für **A3K8**, ist das Verhältnis der Intensitäten der Amidbanden  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  für **A3A10** kleiner als für **A3K8**. Diese Intensitätsunterschiede sind ein Indiz für die unterschiedlich starke Änderung der Übergangsdipolmomente der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Schwingungen. Aus theoretischen Arbeiten zur Bandenanalyse<sup>113,114</sup>, bei der Kopplungen von Übergangsdipolmomenten berücksichtigt wurden, geht hervor, dass für einen größeren Wasserstoff-verbrückten Ring die  $^{13}\text{C}=\text{O}$ - $^{12}\text{C}=\text{O}$  Aufspaltung der Absorptionsbanden geringer, jedoch das Intensitätsverhältnis der  $^{13}\text{C}=\text{O}/^{12}\text{C}=\text{O}$  Banden größer ist als für einen kleinen Ring<sup>115</sup>.

Eine genauere Analyse der Absorptionsbanden ist durch Bildung der zweiten Ableitung der Absorptionsspektren (siehe Abbildung 62, unten) und Bestimmung der Positionen der Minima möglich. In den Ableitungsspektren ist ersichtlich, dass sich die hochfrequente  $\beta$ -Faltblattkomponente bei  $1672\text{ cm}^{-1}$  aller drei zweifach isotopenmarkierter Peptide nur gering von derjenigen der unmarkierten Trpzip2C Variante unterscheiden. Lediglich bei der **A1A10** Peptidvariante wird eine minimale Verschiebung zu  $1668\text{ cm}^{-1}$  beobachtet. Eine Analyse der niederfrequenten  $\beta$ -Faltblatt-Komponente, die ihren Ursprung in der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Schwingung hat, zeigt, dass das beobachtete Minimum bei allen isotopenmarkierten Varianten im Vergleich zum unmarkierten Peptid zu höheren Wellenzahlen verschoben wird. Ein besonderer Vorteil der zweiten Ableitung ist, dass im Gegensatz zum Absorptionsspektrum die beiden  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Banden des Peptids **A1A10** aufgelöst werden können. Man erkennt ein breites Minimum, dessen niedrigster Wert bei  $1622\text{ cm}^{-1}$  und eine Schulter bei

1610  $\text{cm}^{-1}$  liegt. Die Frequenzverschiebung zwischen  $^{12}\text{C}=\text{O}$ - und  $^{13}\text{C}=\text{O}$ -Amidbande ist in der Peptidvariante **A1A10** mit 19  $\text{cm}^{-1}$  kleiner als im Vergleich zur **A3A10** mit 29  $\text{cm}^{-1}$  und **A3K8** mit 25  $\text{cm}^{-1}$ . Dadurch wird die geringere Kopplung der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Schwingungen von **A1A10** im Vergleich zu **A3A10** und **A3K8** verdeutlicht. Eine Übersicht der experimentell ermittelten Absorptionseigenschaften zeigt Tabelle 15.

Peptid	Maxima der Absorption			Minima der zweiten Ableitung			
	$^{12}\text{C}=\text{O}$	$^{13}\text{C}=\text{O}$	$\Delta\nu$		$^{12}\text{C}=\text{O}$	$^{13}\text{C}=\text{O}$	$\Delta\nu$
Trpzip2C	1637	-		1672	1634		
Trpzip2C A1A10	1639	-		1668	1641	1622	19
Trpzip2C A3A10	1639	1610	29	1672	1638	1609	29
Trpzip2C A3K8	1641	1616	25	1672	1639	1614	25

*Tabelle 15: Vergleich der Absorptionsbanden im Amid I Bereich der unterschiedlichen isotoptenmarkierten Trpzip2C-Peptide. Alle Bandenpositionen sind in  $\text{cm}^{-1}$  dargestellt. In der vierten und achten Spalte sind die jeweiligen Verschiebungen der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  und  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Banden gezeigt.*

Um den Zusammenhang zwischen den Schwingungskopplungen und den durch Temperaturvariation erzeugten konformellen Änderungen zu analysieren, wurden von allen Trpzip2C-Varianten temperaturabhängige FTIR-Absorptionsspektren, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, aufgenommen. Die Absorptionsspektren der Peptide wurden im thermischen Gleichgewicht bei unterschiedlichen Temperaturen detektiert und sind in Abbildung 63 (links) mit den zugehörigen Differenzspektren (rechts) dargestellt. Der Lösungsmittelgehalt ( $\text{D}_2\text{O}$ ) aller temperaturabhängigen Absorptionsspektren wurde, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, für die Analyse der thermischen Eigenschaften der Peptide abgezogen. Der untersuchte Entfaltungsprozess ist für alle Peptide bei niedrigem pH-Wert fast vollständig reversibel (Daten nicht gezeigt). Die markanten Hauptbestandteile der temperaturabhängigen Absorptionsspektren sind die Frequenzverschiebung und Intensitätsabnahme der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Amid I Bande sowie die unterschiedlich starke Intensitätsabnahme der jeweiligen  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Bande.

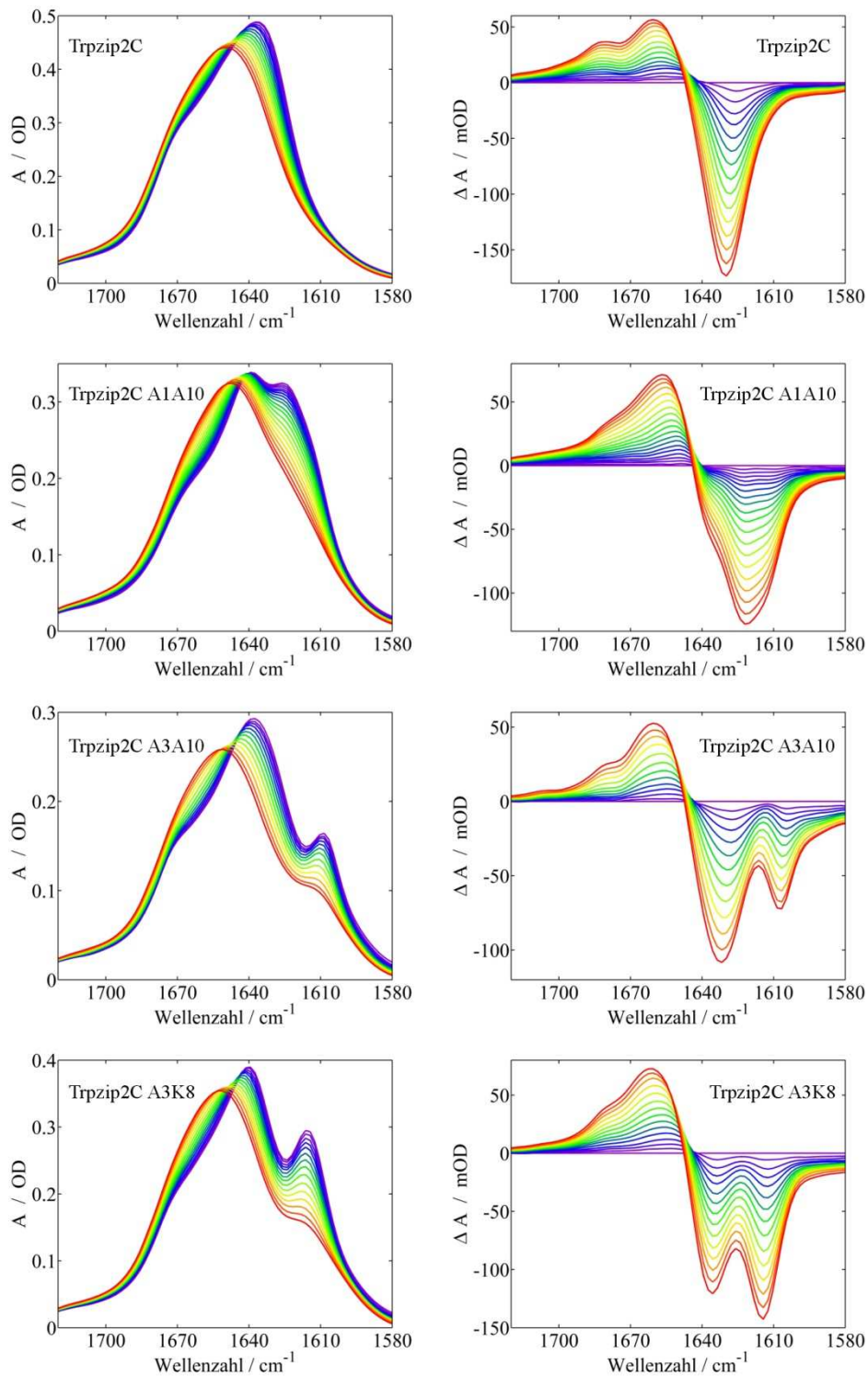


Abbildung 63: Temperaturabhängige Absorptionsspektren des Trpzip2C-Peptids und der isotoopenmarkierten Varianten im Amid I Bereich. Die unterschiedlichen Farben veranschaulichen den Temperaturverlauf der Probe beim Erhitzen von 5 °C (blau) nach 85 °C (rot). Links: Absorptionsspektren, Rechts: Differenzspektren mit Referenzspektrum bei 5 °C.

Am Beispiel des unmarkierten Trpzip2C-Peptids (Abbildung 63, oben rechts) lassen sich Merkmale der thermischen Entfaltung nachvollziehen. Ein Vergleich der Absorptionsspektren bei 5 °C und 82 °C zeigt einen Unterschied in der Form der Amid I Bande auf. Während bei niedriger Temperatur (5 °C) eine  $\beta$ -Faltblattstruktur mit hoch- bzw. niederfrequenter Frequenzkomponente bei 1672  $\text{cm}^{-1}$  bzw. 1632  $\text{cm}^{-1}$  (Bandenpositionen ermittelt durch Analyse der zweiten Ableitung) im Spektrum erkennbar ist, fehlen diese spektralen Bestandteile bei hoher Temperatur (82 °C). Lediglich eine breite Bande bei 1650  $\text{cm}^{-1}$  ist bemerkbar. Der Übergang von einer Bandenform zur anderen erfolgt kontinuierlich. Die Abnahme der Intensität der Absorptionsbanden lässt sich ebenfalls an den Differenzspektren (Abbildung 63, oben links) nachvollziehen. Dabei wird die Differenz der temperaturabhängigen Absorptionsspektren zu einem Referenzspektrum gebildet. Als Referenzspektrum wurde das Absorptionsspektrum bei der niedrigsten vermessenen Proben temperatur ( $\sim 5$  °C) benutzt. Somit können positive bzw. negative Differenzsignale als entstehende bzw. verschwindende Absorptionen bestimmt werden. Die größten Differenzsignale entstehen bei 82 °C, da diese Absorptionsänderungen am stärksten von denen der Referenztemperatur abweichen. In diesen Differenzspektren von Trpzip2C erkennt man vor allem eine Absorptionsbande bei 1631  $\text{cm}^{-1}$ , die kontinuierlich verschwindet, währenddessen eine Absorptionsbande entsteht, die ihr Maximum bei 1661  $\text{cm}^{-1}$  besitzt. Zusätzlich wird das Verschwinden einer kleineren Bande bei 1673  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet, die jedoch in der Schulter der entstehenden breiten Absorption liegt und von dieser teilweise überlagert wird.

Alle isotopenmarkierten Peptide haben die Eigenschaft gemeinsam, dass bei niedriger Temperatur ( $\sim 5$  °C) die charakteristischen Banden der  $\beta$ -Faltblattmotive im Absorptionsspektrum ausgeprägt sind. Unterschiede entstehen aufgrund der Frequenzverschiebungen und Intensitäten sowohl der  $^{12}\text{C}=\text{O}$ - als auch der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Komponenten der Amid I Bande. Bei hoher Temperatur ( $\sim 85$  °C) verschwinden alle  $\beta$ -Faltblatt-Banden ( $^{12}\text{C}=\text{O}$  und  $^{13}\text{C}=\text{O}$ ). Des Weiteren ähnelt sich die Form der Absorptionsbanden der unterschiedlichen Peptidvarianten bei dieser Temperatur. Alle temperaturabhängigen Absorptionsspektren der jeweiligen Peptide haben außerdem gemeinsam, dass die  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Amid I Bande beim Erwärmen zu höheren Frequenzen verschoben wird.

Diese Ergebnisse können dadurch interpretiert werden, dass durch das Erhitzen der Probe das Peptid von einer eher kompakten Struktur ( $\beta$ -Hairpin) zu einer weniger geordneten Struktur (teilweise ungeordnete Struktur, ungeordnetes Knäuel) entfaltet wird.

Wie bereits anhand der unmarkierten Peptidvariante beispielhaft erklärt wurde, können in den Differenzspektren kleine spektrale Absorptionsänderungen wesentlich besser analysiert werden. Alle Differenzspektren haben dabei gemein, dass die durch Probenerwärmung verursachte Absorptionsabnahme bei  $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$  und eine Zunahme der Absorption bei  $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$  aus einer Verschiebung der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Amid I Absorptionsbande resultiert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass in allen Peptiden der gleiche Prozess beobachtet wird. Die  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Banden zeigen jedoch je nach Peptid unterschiedlich starke Absorptionsänderungen. Bei der Peptidvariante **A1A10** lassen sich die Absorptionsänderungen der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  und  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Banden bei Probenerwärmung nicht eindeutig trennen. In der Region von  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  bis  $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$  erkennt man eine Absorptionsabnahme, die nicht aus einer einzigen Bande, wie bei einem Vergleich zur unmarkierten Peptidvariante beobachtet wird, besteht, sondern aus mehreren Unterbanden bei  $1622\text{ cm}^{-1}$  und  $1610\text{ cm}^{-1}$  (siehe Abbildung 62). Dahingegen sind die temperaturbedingten Absorptionsabnahmen der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  und  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Banden in **A3A10** und **A3K8** separiert, wodurch qualitative Unterschiede beobachtet werden können. In der Peptidvariante **A3A10**, bei der die Aufspaltung der Positionen der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  und  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Bande am größten ist, ist die Intensitätsabnahme bei  $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$  größer als bei  $\sim 1608\text{ cm}^{-1}$ . Im Vergleich dazu ist die Intensitätsabnahme der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Bande in **A3K8** bei  $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$  kleiner als die  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Bande bei  $\sim 1615\text{ cm}^{-1}$ .

Die starke temperaturinduzierte Abnahme der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Banden zeigt, dass beim Erwärmen die Schwingungskopplungen stark beeinflusst werden. Die bei niedriger Temperatur ( $\sim 5\text{ }^\circ\text{C}$ ) starken Schwingungskopplungen der beiden sich gegenseitig beeinflussenden  $^{13}\text{C}$  Moden gehen bei der Entfaltung des Peptids dann verloren, wenn deren Entfernung zueinander vergrößert bzw. ihre räumliche Orientierung verändert oder umgeordnet wird. Zusätzlich ist bei hoher Temperatur ( $\sim 85\text{ }^\circ\text{C}$ ) keine Aufspaltung der Amid I Bande erkennbar. Für die Peptide mit Isotopenmarkierungen, die als dipolare Oszillatoren in ge- und entfaltetem Zustand wirken, sind demnach die entscheidenden Änderungen der Entfaltung von der Verminderung der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Strängen („cross-strand coupling“) begleitet. Dadurch werden die  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Banden bei niedriger Temperatur beobachtet, bei hoher jedoch nicht.

Die Untersuchung der temperaturabhängigen Absorptionseigenschaften hat neben der bereits erwähnten Analyse der Entfaltungseigenschaften einen weiteren Zweck. Mit den Absorptionsmessungen im thermischen Gleichgewicht sollen die größten Absorptionsänderungen bestimmt werden. Dabei soll sowohl eine geeignete Anfangstemperatur als auch



die richtige Wellenlänge gefunden werden, bei der Temperatursprung-Experimente (siehe Kapitel 2.3) durchgeführt werden können. Die Temperatursprung-Experimente wurden mit verschiedenen Anfangstemperaturen im Temperaturbereich von  $\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die Wellenlängen zur Untersuchung der Dynamik des Entfaltungsprozess sind vom jeweiligen Peptid abhängig, können aber mit Hilfe der statischen Absorptionsspektren selektiert werden.

### **5.4.3 Zeitaufgelöste Temperatursprung-Untersuchungen zur Konformationsdynamik der Trpzip2C-Peptid-Varianten**

Wie bereits erwähnt, werden die Parameter zur Untersuchung der Entfaltungsdynamiken der Peptide anhand der statischen Absorptionsmessungen bestimmt. Mit den Absorptionsdaten des unmarkierten Trpzip2C-Peptids wird hier (Abbildung 64) beispielhaft dessen zeitaufgelöster Absorptionsverlauf nach dem Temperatursprung bei einer Wellenlänge von  $1625\text{ cm}^{-1}$  dargestellt. Die Temperatur des Peptids im thermischen Gleichgewicht vor der Laser-induzierten Erwärmung war  $7,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Das Peptid wurde in einer  $\text{D}_2\text{O}$  Lösung mit einer Schichtdicke von  $100\text{ }\mu\text{m}$  untersucht.

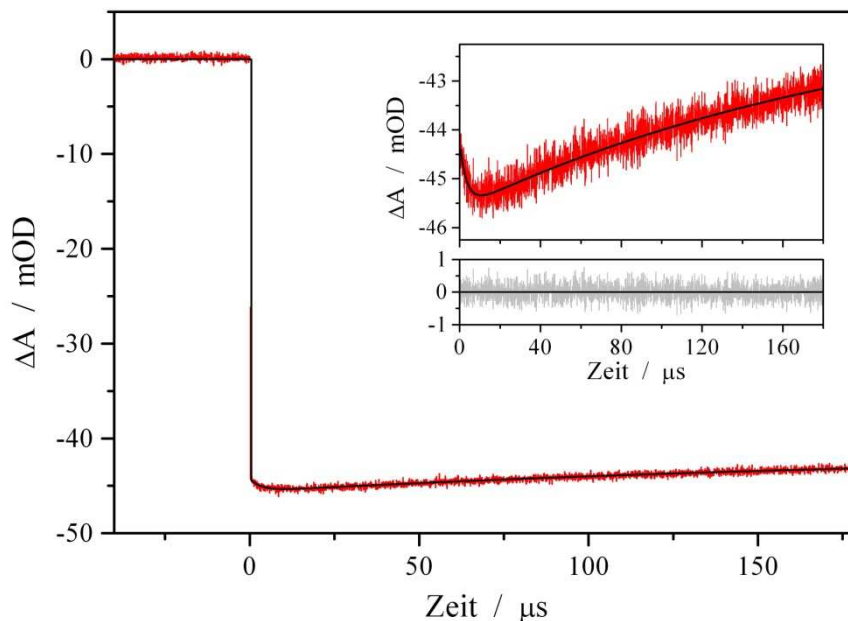


Abbildung 64: Repräsentative zeitaufgelöste Absorptionstransiente eines Temperatursprung-Experimentes mit Trpzip2C bei einer Wellenlänge von  $1625\text{ cm}^{-1}$  und einer Anfangstemperatur von  $7,5\text{ °C}$  (Schichtdicke  $100\text{ }\mu\text{m}$ , Probenkonzentration  $\sim 20\text{ mg/ml}$ , 2000 einzelne Absorptionstransienten gemittelt). Die Absorptionsänderungen werden mathematisch durch eine bi-exponentielle Zerfallsfunktion beschrieben, mit  $A_0 = -41,3 \cdot 10^{-3}$ ,  $A_1 = 1,4 \cdot 10^{-3}$ ,  $\tau_1 = 3,5\text{ }\mu\text{s}$ ,  $A_2 = -4,3 \cdot 10^{-3}$  und  $\tau_2 = 216,1\text{ }\mu\text{s}$ . Rechts oben: Vergrößerte Detailansicht der Absorptionsänderungen. Rechts mittig: Residuendarstellung.

Zunächst befindet sich das Protein-D<sub>2</sub>O-Gemisch im thermischen Gleichgewicht bei einer eingestellten Temperatur. Von dieser ausgehend wird dann der Temperatursprung induziert. Dadurch wird die Peptidlösung aus dem thermischen Gleichgewicht gebracht. Das Lösungsmittel absorbiert die Energie des Anregungspulses und verteilt diese innerhalb des gesamten zur Anregung zugänglichen Volumens. Die Temperatur wird, wie in Kapitel 5.1.4 gezeigt, für nahezu  $\sim 10\text{ }\mu\text{s}$  konstant gehalten. Somit kann das in dieser Lösung befindliche Peptid einer Gleichgewichtsreaktion hin zu dieser neuen Temperatur folgen.

Um die Reaktion des Peptids besser zu veranschaulichen, wurde in Abbildung 64 (rechts, oben) der Ordinatenabschnitt der Absorptionsänderung vergrößert. Der beobachtete Offset von  $\sim 44\text{ mOD}$  wird durch das Lösungsmittel nach dem Temperatursprung verursacht und wird bei der Analyse der Transienten letztlich zur Überprüfung der Größe des Temperatursprungs verwendet.

In dem zeitaufgelösten Absorptionsverlauf erkennt man zunächst eine Absorptionsabnahme bevor die Absorption langsam wieder ansteigt. Beide Vorgänge werden mittels einer bi-exponentiellen Funktion, siehe Gleichung (48), mathematisch beschrieben. Die angepassten Reaktionsgeschwindigkeiten  $\tau_1 = 3,5 \mu\text{s}$  und  $\tau_2 = 216,1 \mu\text{s}$  unterscheiden sich um mehrere Größenordnungen. Somit lassen sich die beobachteten Dynamiken den in der Lösung vorhandenen einzelnen Komponenten zuordnen. Die schnellere Reaktionszeit wird als temperaturbedingte Abnahme der  $\beta$ -Hairpin-Konzentration und die langsamere Relaxationszeit als die Dynamik des langsamen Abkühlens der gesamten Probe interpretiert (siehe Kapitel 5.3.3).

Zu Beurteilung einer ausreichenden Beschreibung der beobachteten Dynamik mit dem mathematischen Modell, wird die Differenz der angepassten Funktion mit den experimentellen Daten berechnet. Bei einer zufriedenstellenden Beschreibung sind die Residuen wie in Abbildung 64 (rechts, mittig) um den Ordinatenabschnitt von null gleichmäßig verteilt.

Um zeitaufgelöste Transienten bei unterschiedlichen Wellenlängen oder unterschiedlichen Anfangstemperaturen miteinander vergleichen zu können, wird die Absorptionsänderung des Lösungsmittels von den zeitaufgelösten Transienten abgezogen. Dazu wird die angepasste Funktion, siehe Gleichung (48), mit den für den Vorgang des Lösungsmittelabkühlens berechneten Parametern  $A_2$  und  $\tau_2$  von den experimentellen Daten subtrahiert.

$$A_{\text{Peptid}}(t) = A_{\text{exp}}(t) - (A_0 - A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2)) \quad (55)$$

Übrig bleibt die Dynamik des Peptids, die die Reaktion des strukturellen Relaxierens zum „neuen“ thermischen Gleichgewicht zeigt.

In Abbildung 65 werden die durch den Temperatursprung-induzierten Kinetiken des Trpzip2C- $\beta$ -Hairpin-Peptids gezeigt. Der zeitaufgelöste Absorptionsverlauf ist bei unterschiedlichen Wellenlängen dargestellt.

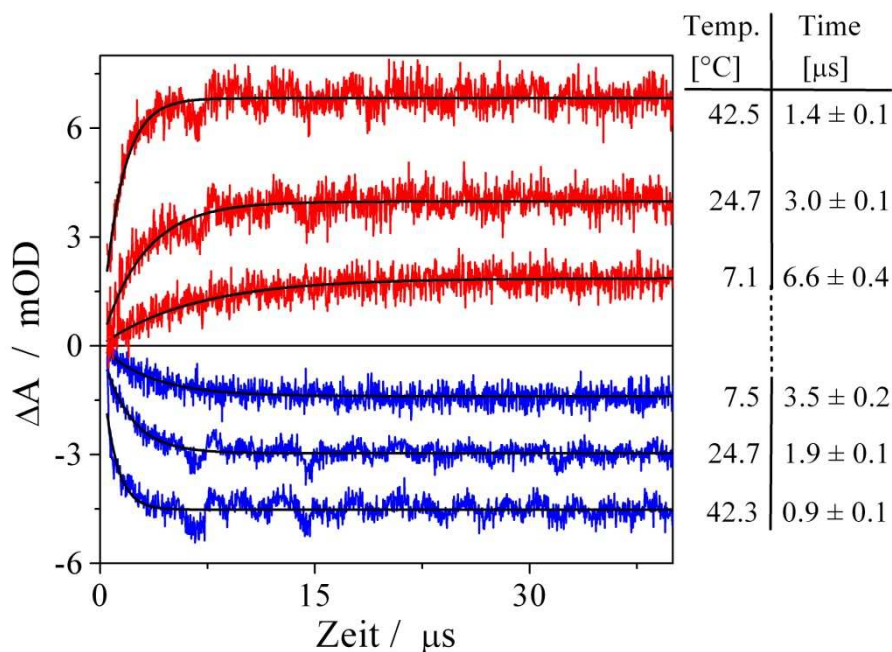


Abbildung 65: Dynamiken von Trpzip2C in Abhängigkeit der Anfangstemperatur, nachdem die jeweiligen Lösungsmittelkomponenten mit Gleichung (55) subtrahiert wurden. Die roten zeitabhängigen Absorptionsverläufe, bestimmt bei  $1661\text{ cm}^{-1}$ , deuten das Entstehen von ungeordneter Struktur an, wohingegen die blauen Transienten, bestimmt bei  $1625\text{ cm}^{-1}$ , die Abnahme der  $\beta$ -Hairpin- $^{12}\text{C}=\text{O}$ -Absorptionsbande abbilden. Tabelle rechts: Veranschaulichung der temperaturabhängigen Raten an drei ausgewählten Anfangstemperaturen in Abhängigkeit von der jeweiligen Wellenlänge.

Man erkennt (Abbildung 65) eine Absorptionzunahme bei  $1661\text{ cm}^{-1}$  und eine Abnahme bei  $1625\text{ cm}^{-1}$ . Diese werden aufgrund der charakteristischen Frequenzlage als Entstehen von ungeordneter Struktur bzw. Abnahme der  $\beta$ -Hairpin-Struktur interpretiert. Zusätzlich ist die Temperaturabhängigkeit der einzelnen Peptiddynamiken offensichtlich. Man kann erkennen, dass z.B. für die Wellenlänge von  $1625\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 65, blaue Transienten) die Reaktionszeiten beim Verändern der Anfangstemperaturen deutlich kürzer werden. Ein ähnlicher Effekt der Zunahme der Reaktionszeiten mit ansteigender Temperatur ist für die Dynamiken bei  $1661\text{ cm}^{-1}$  (rote Transienten) erkennbar. Zusätzlich unterscheiden sich die Reaktionsraten bei gleicher Anfangstemperatur und unterschiedlicher Wellenlänge teilweise erheblich. Für einen vergleichenden Überblick werden deshalb diese Relaxationszeiten gegen ihre jeweilige Anfangstemperatur aufgetragen (Abbildung 66).

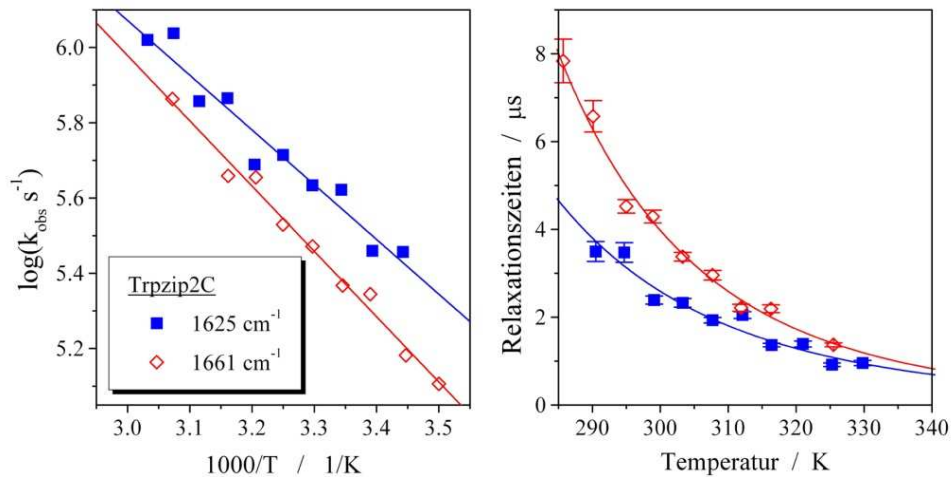


Abbildung 66: Reaktionsraten für Trpzip2C bei unterschiedlichen Anfangstemperaturen. Untersuchung des Zerfalles der  $\beta$ -Hairpin-Struktur bei  $1625 \text{ cm}^{-1}$  (blau) und des Entstehens von ungeordneter Struktur bei  $1661 \text{ cm}^{-1}$  (rot). Links: Arrhenius-Darstellung der beobachteten Raten. Rechts: Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeiten. Die Linien in beiden Darstellungen sind mathematische Beschreibungen der experimentellen Daten mit der Arrhenius-Gleichung.

Anhand der Darstellung der Temperaturabhängigkeit der Reaktionszeiten des Trpzip2C-Peptids kann beobachtet werden, dass für Temperaturen unterhalb von  $\sim 300 \text{ K}$  ein Unterschied in der Geschwindigkeit der Faltungsdynamiken bei unterschiedlichen Wellenlängen beobachtet werden kann. Dafür können die bereits in der Tabelle der Abbildung 65 zusammengestellten Zahlenwerte der Relaxationszeiten herangezogen werden. Beispielhaft wird bei nahezu gleicher Anfangstemperatur von  $\sim 7,5 \text{ }^\circ\text{C}$  für das Entstehen der ungeordneten Struktur bei  $1661 \text{ cm}^{-1}$  eine Reaktionszeit von  $6,6 \pm 0,4 \mu\text{s}$  bestimmt, während für das Verschwinden der  $\beta$ -Hairpin-Struktur bei  $1625 \text{ cm}^{-1}$  eine Reaktionszeit von  $3,5 \pm 0,2 \mu\text{s}$  ermittelt wurde. Allein durch diesen Unterschied kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Entfaltung des  $\beta$ -Hairpin-Peptids nicht durch einen Zwei-Zustandsprozess beschrieben werden kann. Die beobachtete Relaxationszeit basiert jedoch auf einem dynamischen Prozess einer Gleichgewichtsreaktion und besteht im Fall eines Zwei-Zustandsprozesses aus der Summe der Faltungs- und Entfaltungsrate ( $k_{\text{beobachtet}} = k_{\text{Faltung}} + k_{\text{Entfaltung}}$ ). Dennoch kann der Unterschied in der Dynamik bei  $1661 \text{ cm}^{-1}$  und bei  $1625 \text{ cm}^{-1}$  nur durch ein zwischenzeitliches Intermediat erklärt werden.

Mit Temperatursprung-Experimenten an den isotoopenmarkierten Peptidvarianten von Trpzip2C können orts aufgelöst Informationen der Dynamik in der Peptidstruktur bestimmt werden. Dafür wurden Relaxationszeiten der Peptidvarianten miteinander verglichen, die nicht nur an den charakteristischen Wellenlängen der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Amidbanden bestimmt wurden, sondern auch an den jeweiligen  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Amidbandenkomponenten. Einzelne Wellenlängen, an denen die  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Absorptionsänderungen mit der Temperatursprung-Apparatur untersucht werden sollten, wurden anhand der Differenzspektren (Abbildung 63) ausgewählt. Repräsentativ sind die Relaxationszeiten der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Amidbandenkomponenten für **A1A10** bei  $1616\text{ cm}^{-1}$ , **A3A10** bei  $1610\text{ cm}^{-1}$  und **A3K8** bei  $1618\text{ cm}^{-1}$  in Abbildung 67 dargestellt.

Alle Relaxationsdynamiken wurden, wie bei der unmarkierten Peptidvariante bei unterschiedlichen Anfangstemperaturen und unterschiedlichen Wellenlängen bestimmt. Abbildung 67 zeigt den Verlauf der Relaxationszeiten in Abhängigkeit von der Temperatur für die unterschiedlichen isotoopenmarkierten Peptidvarianten. Grün bzw. blau sind in dieser Abbildung die Relaxationszeiten der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Amid I Moden bzw. die  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Amid I Moden gekennzeichnet, die den Komponenten des  $\beta$ -Faltblattes entsprechen und rot die Raten für die Komponente der ungeordneten Struktur. Bei niedrigen Temperaturen sind die Absorptionsänderungen der Peptiddynamiken in den beobachteten Transienten sehr klein. Dadurch wird bei der Anpassung der bi-exponentiellen Funktion, siehe Gleichung (48), ein großer Fehler der Relaxationszeiten bestimmt. Generell erkennt man in Abbildung 67, dass die Relaxationszeiten mit steigender Anfangstemperatur abnehmen. Wie bereits in der unmarkierten Trpzip2C Variante (Abbildung 66) beobachtet wurde, ist auch in allen isotoopenmarkierten Varianten für niedrige Temperaturen, unterhalb von  $\sim 300\text{ K}$ , die Relaxationszeit der abnehmenden  $^{12}\text{C}=\text{O}$   $\beta$ -Hairpin-Komponente geringer, als diejenigen Relaxationszeiten, die die Zunahme der ungeordneten Struktur beschreiben. Die Divergenz der Relaxationszeiten zeigt, dass in diesem Temperaturbereich der Faltungsprozess nicht durch ein Zwei-Zustandsmodell beschrieben werden kann, sondern Intermediate aufgrund der Unterschiede in der Dynamik der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  und  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Amidbandenkomponenten beobachtet werden. Es stellte sich heraus, dass in diesem Temperaturbereich, also von teilweise ungefalteten Intermediatzuständen ausgehend, orts aufgelöste Informationen über die Faltungsdynamiken der Peptide erhalten werden konnten. Diese Unterscheidung in den Relaxationszeiten ist bei Temperaturen oberhalb von  $\sim 300\text{ K}$  nicht mehr möglich.

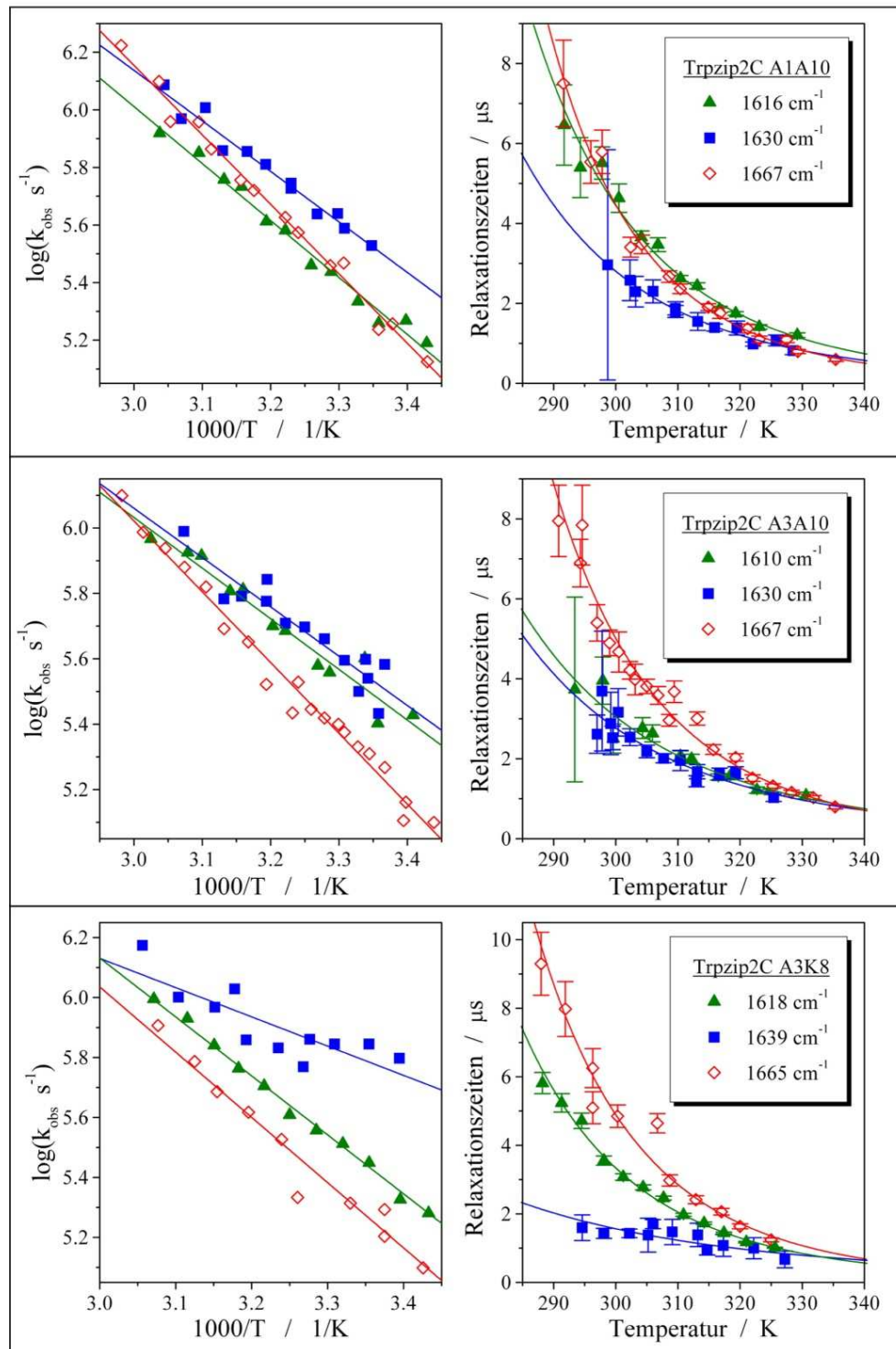


Abbildung 67: Relaxationsraten der unterschiedlich isotopenmarkierten Trpzip2C  $\beta$ -Hairpin-Peptidvarianten in Abhängigkeit von ihren Anfangstemperaturen, gemessen an selektierten Wellenlängen. Links: Arrhenius-Darstellung. Rechts: Relaxationszeiten in Abhängigkeit der Anfangstemperatur. Die Linien sind mathematische Anpassungen der Arrhenius-Gleichung an die Relaxationszeiten.

In der Peptidvariante **A1A10** folgt die Relaxationszeit der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Bande bei  $1616\text{ cm}^{-1}$  dem Verlauf bei  $\sim 1667\text{ cm}^{-1}$ , der für das Entstehen von ungeordneter Struktur charakteristisch ist und unterscheidet sich damit von der geringeren Relaxationszeit der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Bande bei  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Dahingegen sind die Relaxationszeiten der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Bande bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  und der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Bande bei  $1610\text{ cm}^{-1}$  in der **A3A10** Peptidvariante nahezu identisch und gleich groß. Das Entstehen der ungeordneten Struktur, untersucht bei  $1667\text{ cm}^{-1}$ , ist deutlich langsamer als die Abnahme der beiden  $\beta$ -Faltblattkomponenten. In der **A3K8** Variante sind die Relaxationszeiten, an denen die Abnahme der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Absorptionen bei  $1618\text{ cm}^{-1}$  untersucht wurde, langsamer als diejenigen der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Amid I Bande bei  $1639\text{ cm}^{-1}$ . Jedoch sind die Relaxationszeiten der ungeordneten Struktur, die bei  $1665\text{ cm}^{-1}$  bestimmt wurden, noch langsamer als diejenigen bei  $1618\text{ cm}^{-1}$ . Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Relaxationszeiten, die in Abbildung 67 dargestellt sind, ist eine Auswahl dieser Werte in Tabelle 16 zusammengestellt.

Relaxationszeiten ( $\mu\text{s}$ )						
$T \pm 2$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	unmarkiert			A1A10		
	$\beta$ -Faltblatt	ungeordnet		$\beta$ -Faltblatt	ungeordnet	
	$^{12}\text{C}=\text{O}$ $1625\text{ cm}^{-1}$	$^{13}\text{C}=\text{O}$ $1667\text{ cm}^{-1}$		$^{12}\text{C}=\text{O}$ $1630\text{ cm}^{-1}$	$^{13}\text{C}=\text{O}$ $1616\text{ cm}^{-1}$	$1667\text{ cm}^{-1}$
15	$2,39 \pm 0,09$	$4,53 \pm 0,15$		$2,96 \pm 2,88$	$5,40 \pm 0,75$	$5,79 \pm 0,54$
20	$2,33 \pm 0,10$	$4,29 \pm 0,15$		$2,29 \pm 0,38$	$4,64 \pm 0,36$	$3,40 \pm 0,25$
25	$1,93 \pm 0,06$	$3,38 \pm 0,10$		$1,88 \pm 0,17$	$3,47 \pm 0,17$	$2,67 \pm 0,14$
30	$2,05 \pm 0,08$	$2,96 \pm 0,11$		$1,55 \pm 0,22$	$2,44 \pm 0,07$	$1,91 \pm 0,08$
35	$1,36 \pm 0,04$	$2,21 \pm 0,08$		$1,39 \pm 0,18$	$1,75 \pm 0,05$	$1,76 \pm 0,13$
40	$0,92 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,05$		$0,98 \pm 0,05$	$1,41 \pm 0,05$	$1,10 \pm 0,08$

$T \pm 2$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	A3A10			A3K8		
	$\beta$ -Faltblatt	ungeordnet		$\beta$ -Faltblatt	ungeordnet	
	$^{12}\text{C}=\text{O}$ $1630\text{ cm}^{-1}$	$^{13}\text{C}=\text{O}$ $1610\text{ cm}^{-1}$	$1667\text{ cm}^{-1}$	$^{12}\text{C}=\text{O}$ $1639\text{ cm}^{-1}$	$^{13}\text{C}=\text{O}$ $1618\text{ cm}^{-1}$	$1665\text{ cm}^{-1}$
15	$3,69 \pm 1,50$	$3,95 \pm 0,59$	$5,40 \pm 0,45$	$1,43 \pm 0,15$	$3,56 \pm 0,13$	$5,10 \pm 0,47$
20	$2,54 \pm 0,21$	$2,77 \pm 0,26$	$3,98 \pm 0,38$	$1,43 \pm 0,13$	$2,77 \pm 0,08$	$4,85 \pm 0,33$
25	$2,01 \pm 0,11$	$2,64 \pm 0,21$	$2,96 \pm 0,14$	$1,47 \pm 0,37$	$2,46 \pm 0,06$	$2,97 \pm 0,16$
30	$1,44 \pm 0,14$	$1,99 \pm 0,11$	$3,01 \pm 0,17$	$1,38 \pm 0,34$	$1,73 \pm 0,03$	$2,41 \pm 0,12$
35	$1,62 \pm 0,15$	$1,56 \pm 0,07$	$2,03 \pm 0,09$	$1,08 \pm 0,32$	$1,44 \pm 0,03$	$2,06 \pm 0,10$
40	$1,03 \pm 0,10$	$1,22 \pm 0,08$	$1,52 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,31$	$1,18 \pm 0,02$	$1,24 \pm 0,06$

Tabelle 16: Vergleich repräsentativer Relaxationszeiten der untersuchten Trpzip2C Varianten bei gleichen Anfangstemperaturen.

An den in Tabelle 16 dargestellten Werten ist ersichtlich, dass die Relaxationszeiten der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Komponenten bei  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  von **A3A10** und **A3K8** unter Berücksichtigung der Messfehler ungefähr übereinstimmen, wohingegen die Relaxationszeit von **A1A10** der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Mode langsamer ist. Die Relaxationszeiten, die für die Absorptionzunahme bei  $\sim 1667\text{ cm}^{-1}$



bestimmt wurden, sind für alle Peptidvarianten nahezu gleich groß. Die  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Mode besitzt jeweils in allen Varianten die schnellsten Relaxationszeiten. Beim Vergleich der unterschiedlichen Varianten wird jedoch bemerkt, dass diese Komponente in der Isotopenvariante **A3K8** anscheinend schneller ist als in den übrigen Varianten.

Neben der qualitativen Betrachtung der experimentellen Ergebnisse, wurden durch die Arrhenius-Darstellung (Abbildung 66 und Abbildung 67, links) die Aktivierungsenergien bestimmt.

	$\beta$ -Faltblatt				ungeordnet	
	$^{12}\text{C}=\text{O}$		$^{13}\text{C}=\text{O}$		$\nu / \text{cm}^{-1}$	$E_a / \text{kJ mol}^{-1}$
	$\nu / \text{cm}^{-1}$	$E_a / \text{kJ mol}^{-1}$	$\nu / \text{cm}^{-1}$	$E_a / \text{kJ mol}^{-1}$		
Trpzip2C	1625	$27,84 \pm 2,35$			1661	$33,21 \pm 1,36$
A1A10	1630	$33,61 \pm 1,89$	1616	$37,91 \pm 1,43$	1667	$46,22 \pm 1,32$
A3A10	1630	$28,87 \pm 3,10$	1610	$29,65 \pm 2,20$	1667	$41,44 \pm 1,28$
A3K8	1639	$18,67 \pm 4,06$	1618	$37,64 \pm 0,87$	1665	$41,65 \pm 2,55$

Tabelle 17: Aktivierungsenergien der untersuchten Trpzip2C Varianten, berechnet durch Anpassung der Arrhenius-Gleichung  $\ln(k_{obs}) = -E_a/(RT) + \ln(A)$  an die temperaturabhängigen Relaxationszeiten.

Die in Tabelle 17 dargestellten Aktivierungsenergien haben alle gemeinsam, dass der kleinste Wert bei der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Bande, an der die Abnahme der  $\beta$ -Faltblatt-Komponente verfolgt wurde, berechnet wird. Die größten Werte der Aktivierungsenergien werden für alle Peptidvarianten bei der Entstehung der ungeordneten Struktur beobachtet. Ein großer Wert, wie er bspw. für die Relaxationszeiten bei  $1667 \text{ cm}^{-1}$  bestimmt wurde, bedeutet auch immer, dass sich diese Reaktionsgeschwindigkeiten stark ändern. Für die  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Komponente bei  $1639 \text{ cm}^{-1}$  der **A3K8** Variante wurde ein sehr geringer Wert der Aktivierungsenergie ermittelt. Die Relaxationszeiten, die an dieser Wellenlänge bestimmt wurden, ändern sich dementsprechend nur sehr wenig.

Temperatursprung-Experimente wurden bereits an isotopenmarkierten  $\alpha$ -helikalen Peptiden<sup>28,29</sup> und unmarkierten Hairpin Peptiden<sup>20,78,117</sup> durchgeführt. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal isotopenmarkierte  $\beta$ -Hairpin-Peptide mit dieser Technik untersucht. Durch die Isotopenmarkierung im Peptid werden spektrale Frequenzverschiebungen und Intensitätsänderungen im IR-Spektrum induziert, die charakteristisch für die verschiedenen Positionen der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Markierungen sind. Dadurch ist es möglich, spezifisch die Dynamik der  $^{13}\text{C}=\text{O}$

Amidmoden zu untersuchen, die lokal aufgelöste Eigenschaften der  $\beta$ -Hairpin-Strukturen wiedergeben.

Temperatursprung-Studien zum Faltungsmechanismus von unmarkierten  $\beta$ -Hairpin-Peptiden, wurden bereits mit IR-<sup>22,78</sup> und Fluoreszenzspektroskopie<sup>23,25</sup> durchgeführt. Snow et al.<sup>20</sup> bestimmten mit Temperatursprung-Experimenten und IR-Absorptions- bzw. Fluoreszenzdetektion, dass die Faltung des Trpzip2  $\beta$ -Hairpin-Peptids innerhalb von 2,47  $\mu$ s (IR) bzw. 1,80  $\mu$ s (Fluoreszenz) und die Entfaltung innerhalb von 24,7  $\mu$ s bzw. 18  $\mu$ s bei 23 °C stattfindet. Nimmt man diese Werte und bestimmt die Zeit  $\tau_{\text{obs}}^{-1} = \tau_{\text{u}}^{-1} + \tau_{\text{f}}^{-1}$  so erhält man für die IR-Daten bei 23 °C eine Relaxationszeit von 2,25  $\mu$ s. Dieser Wert stimmt sehr gut mit denen in dieser Arbeit bestimmten Relaxationszeiten für die hier untersuchte Trpzip2C-Peptidvariante überein (siehe Tabelle 16).

Die spezifischen Isotopenmarkierungen erlauben nun, lokal aufgelöste Strukturdynamik zu untersuchen. Beim Vergleich der an verschiedenen Positionen isotopenmarkierten Peptide werden Unterschiede in den Relaxationszeiten ihrer jeweiligen  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Banden beobachtet. In der **A3A10** Peptidvariante ist die Isotopenmarkierung in der Mitte des Faltblattes angebracht (vergleiche Abbildung 57). Die  $^{12}\text{C}=\text{O}$  und die  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Relaxationszeiten sowie ihre temperaturabhängige Abnahme sind nahezu identisch. Dadurch wurde auch für beide Banden eine ähnliche Aktivierungsenergie bestimmt. Die Detektion identischer Relaxationszeiten an den beiden Moden kann damit interpretiert werden, dass die  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Markierung, die von vier Tryptophanen umschlossen ist, die große Stabilität in der Mitte des Peptids wiedergibt. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Relaxationsdynamiken der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  und  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Moden in den **A1A10** und **A3K8** Varianten. In **A1A10** sind die  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Relaxationszeiten bei niedriger Temperatur langsamer als diejenigen der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Bande und stimmen nahezu mit den Reaktionszeiten der Dynamiken der ungeordneten Struktur überein. Bereits in den statischen IR-Absorptionsmessungen wurde für die  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Absorptionsbanden in **A1A10** eine geringe Frequenzverschiebung der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Bande festgestellt. Mit den Absorptionsspektren konnte gezeigt werden, dass die  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Kopplung von der Mitte des  $\beta$ -Hairpin-Stranges zu den Enden hin sehr schwach ist. Relaxationsdynamiken, die an dieser Bande bestimmt wurden, zeigen genau die Abnahme der Hairpin-Struktur an den Enden des  $\beta$ -Hairpins. Dieser Prozess geschieht mit nahezu der gleichen Relaxationszeit wie die Zunahme der ungeordneten Struktur des Peptids.

Bei **A3K8** sind die detektierten Relaxationszeiten der  $^{13}\text{C}=\text{O}$  langsamer als die der  $^{12}\text{C}=\text{O}$ , jedoch schneller als diejenigen der ungeordneten Struktur. Die Isotopenmarkierungen von **A3K8** befinden sich in der Mitte und in der Nähe des Turns des  $\beta$ -Hairpins. Durch die Markierung des Peptids mit  $^{13}\text{C}=\text{O}$  am stabilen Turn wird die Amidbandenkopplung stark verändert. Dadurch sind möglicherweise die sehr niedrigen Relaxationszeiten der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  Absorptionen bei  $1639\text{ cm}^{-1}$  erklärbar.

Die Kombination aller Ergebnisse kann zu einer Gesamtdarstellung des Faltungsprozesses zusammengefasst werden. Die ähnlichen Relaxationskinetiken der  $^{12}\text{C}=\text{O}$  und  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Amidkomponenten der **A3A10** Variante zeigen die Unterbrechung des intakten  $\beta$ -Hairpin-Segmentes im Inneren des Stranges. Dabei ist es sogar wahrscheinlich, dass speziell in dem niedrigen Temperaturbereich, in dem diese Untersuchungen durchgeführt wurden, die hydrophoben Wechselwirkungen der Tryptophane erhalten bleiben, während die Peptidrückgrat Kontakte abnehmen. Durch die schnelle  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Relaxation deutet sich an, dass der mittlere Teil des  $\beta$ -Stranges, indem sich die Tryptophane befinden, auch der stabilste Bestandteil des Peptids ist. Das würde aber auch bedeuten, dass der Entfaltungsprozess vom Ende und vom Turn des Stranges in die Mitte verläuft. Bei mikroskopisch betrachteter Umkehrbarkeit, würden diese Ergebnisse dafür sprechen, dass die Faltung durch einen hydrophoben Kollaps ausgelöst wird. Dieser Umkehrschluss kann eigentlich nur für ein Zwei-Zustandsmodell gezogen werden, das auf der Grundlage der experimentellen Resultate nur für hohe Temperaturen ( $> \sim 300\text{ K}$ ) gilt. Lokale Unterschiede in der Konformationsdynamik konnten jedoch nur bei niedrigen Temperaturen gemessen werden. Diese Divergenz in den Relaxationszeiten zeigt jedoch auch, dass Faltungsintermediate gebildet werden und kein einfaches Zwei-Zustandsmodell mehr angenommen werden kann. Auch wenn diese orts aufgelöste Strukturdynamik nur für partiell gefaltete Zustände erhalten wurde, unterstützen diese Daten die Hypothese eines hydrophoben Kollapses für die Faltung des Trpzip2C- $\beta$ -Hairpin-Peptids.

#### **5.4.4 Zusammenfassung der Untersuchungen des isotopenmarkierten $\beta$ -Hairpin-Peptids**

Im Kapitel 5.3 wurden Untersuchungen zur Stabilität und Dynamik von  $\beta$ -Hairpin-Peptiden, die durch die hydrophoben Wechselwirkungen von Tryptophanen stabilisiert werden und als Trpzip2C-Peptide bezeichnet wurden, vorgestellt. Dabei wurde die temperaturinduzierte

Entfaltung dieser Peptide im thermischen Gleichgewicht mit CD- und IR-Spektroskopie analysiert. Zeitaufgelöste Studien zur Dynamik des Faltungsprozesses wurden durch die Laser-induzierte Temperatursprung-Technik mit IR-Einzelwellendetektion durchgeführt. Durch die Verwendung von isotopenmarkierten Trpzip2C-Peptidvarianten, die  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Markierungen an unterschiedlichen Positionen in der Aminosäuresequenz besitzen, konnten lokale ortsaufgelöste Faltungsdynamiken innerhalb des  $\beta$ -Hairpin-Peptids bestimmt werden. Die dadurch erhaltenen Ergebnisse an den untersuchten Tryptophan-Peptiden bestätigen die Hypothese, dass der Faltungsprozess dieser  $\beta$ -Hairpin-Peptide durch einen hydrophoben Kollaps ausgelöst wird.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Funktion eines Proteins ist unmittelbar mit seiner räumlichen Anordnung verbunden. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass Proteine nur dann ihre spezifischen Aufgaben erfüllen können, wenn sie die dafür notwendige Struktur besitzen. Die Untersuchung der Stabilität des nativ gefalteten Zustandes von Proteinen, aber auch der Mechanismus des Faltungs- bzw. Entfaltungsprozesses ist deshalb von allgemeinem Interesse. Die dafür angewandten Techniken müssen sowohl eine Spezifität für die unterschiedlichen Proteinstrukturen als auch eine der Faltungsdynamik angemessene Zeitauflösung besitzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde CD- und FTIR-Spektroskopie zur Charakterisierung der Strukturstabilität unter Gleichgewichtsbedingungen verwendet. Durch Variation von pH-Wert und Temperatur konnten an ausgewählten Peptidsystemen Stabilitätseigenschaften analysiert werden. Um zeitaufgelöste Faltungsdynamiken von Peptiden detektieren zu können, wurde ein Spektrometer mit Laser-induziertem Temperatursprung ( $\Delta T \approx 10 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und IR-Einzelwellendetektion so modifiziert und optimiert, dass Peptiddynamiken im ns- $\mu\text{s}$  Zeitbereich gemessen werden konnten. Neben der Modifikation der Temperatursprung-Apparatur, bei der optische Komponenten ersetzt und Störsignale reduziert wurden, konnte auch die Auswertung der kinetischen Daten durch die Entwicklung eines geeigneten Algorithmus verbessert werden.

Als notwendige Vorarbeit der Faltungsstudien an Peptiden wurden statische temperaturabhängige FTIR-Absorptionsmessungen am Lösungsmittel  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt. Dadurch wurden die durch Temperaturvariation erzeugten Absorptionsänderungen ermittelt, die für die Bestimmung der Größe des Temperatursprungs verwendet werden konnten. Durch zeitaufgelöste Temperatursprung-Experimente mit  $\text{D}_2\text{O}$  wurde der Zeitbereich identifiziert, indem zeitaufgelöste Peptidrelaxationen analysiert werden konnten. Um Lösungsmittelabsorptionen von denjenigen der Peptidlösungen abzuziehen, wurde ein Algorithmus entwickelt, der die temperaturabhängigen Absorptionsänderungen berücksichtigt und anpasst.

Zum Studium zeitaufgelöster Faltungsprozesse im Mikrosekundenzeitbereich wurde als Modellpeptid Polyglutaminsäure verwendet. Zunächst wurden Untersuchungen zur Thermostabilität und der Reversibilität des Ent- und Rückfaltens bei unterschiedlichen pH-Werten mit den Methoden der CD- und FTIR-Spektroskopie durchgeführt. Statische temperaturabhängige IR-Absorptionsmessungen wurden zur Auswahl für die Temperatursprung-Methode geeig-

nerer Wellenlängen benutzt. Mit dem  $\alpha$ -helikalen Peptid Polyglutaminsäure als Modellsystem konnte die Laser-induzierte Temperatursprung-Technik evaluiert und die Faltungsrelaxationen von  $\alpha$ -Helix nach ungeordneter Knäuelstruktur analysiert werden.

Untersuchungen zur Stabilität und Konformationsdynamik wurden an kleinen  $\beta$ -Hairpin-Peptiden durchgeführt, die ideale kleine Modellsysteme sind für  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind. Die in dieser Arbeit untersuchten Trpzip2C-Peptide, die aufgrund hydrophober Wechselwirkungen der Tryptophane eine stabile  $\beta$ -Hairpin-Struktur in wässriger Lösung ausbilden, waren an verschiedenen Positionen innerhalb der Aminosäuresequenz selektiv isotonenmarkiert. Durch diese Markierungen konnten an  $^{12}\text{C}=\text{O}$  und  $^{13}\text{C}=\text{O}$  Amid I Moden Struktur-dynamiken orts aufgelöste untersucht werden. Die hier gezeigten Ergebnisse stellen die erste Anwendung der Kombination von selektiv isotonenmarkierten an  $\beta$ -Hairpin-Peptiden mit der Temperatursprung-Technik dar, um damit lokale Konformationsdynamiken aufzulösen. Zusätzlich konnte für alle untersuchten Trpzip2C Peptidvarianten gezeigt werden, dass der Faltungsprozess in einem Temperaturbereich unter  $\sim 300$  K nicht durch ein Zwei-Zustandsmodell beschrieben werden kann, sondern partiell gefaltete Intermediate gebildet werden. Dennoch unterstützen die Ergebnisse der orts aufgelösten Struktur-dynamiken der hier untersuchten Tryptophan Zipper  $\beta$ -Hairpin-Peptide die Hypothese des „hydrophoben Kollaps“ bei der Faltung.

## 7 ANHANG

### 7.1 Makros

#### 7.1.1 Makro zur Automatisierung der FTIR-Messungen durch Ansteuerung des Wasserbades und Bewegung des Probenschlittens

Zur Automatisierung der temperaturabhängigen IR-Absorptionsmessungen wurde ein Messmakro in der zur Bedienung des FTIR-Spektrometers erforderlichen Software OPUS (Bruker, Ettlingen) geschrieben. Durch dieses Makro werden das Spektrometer, das Wasserbad und des Probenschlittens synchronisiert und angesteuert. Eine übersichtliche Struktur des Makros ist in Abbildung 7 (Kapitel 2.2) dargestellt.

##### VARIABLES SECTION

```

STRING <Titel0> = 'Temperaturserie mit Lauda Wasserbad';
*STRING <Messpfad> = 'Q:\10-02-2005';
*STRING <Dateiname der Messung> = 'KollF';
*STRING <Experimentpfad> = 'c:\carsten';
BUTTON <Weitere Einstellungen> = Goto (Fenster 3);
*NUMERIC <Starttemperatur> = 3.00;
*NUMERIC <Endtemperatur> = 82.00;
*NUMERIC <Schrittweite> = 4.00;
*NUMERIC <Temperaturtolleranz> = 0.02;
*STRING <Probenname> = 'kollagenF';
*STRING <Probenform> = 'Protein in DCI';
*STRING <Dateiname des Experiments> = 'test.xpm';
*NUMERIC <Wiederholung des Temperaturlaufes> = 1.00;
*NUMERIC <Spektren pro Temperatureinstellung> = 1.00;
*STRING <Zeit VBE> = '0';
STRING <Titel1> = 'Weitere Einstellungen';
STRING <T01> = 'Temperatur-Einstellungen';
*STRING <Wartezeit NSE> = '00:07:00';
*STRING <Wartezeit ZTA> = '00:00:50';
*NUMERIC <aktuelle Solltemperatur> = 83.00;
*NUMERIC <Temp1> = 64.76;
*NUMERIC <Temp2> = 64.78;
*NUMERIC <Absolute Differenz> = 0.02;
*STRING <Wartezeit PF> = '00:01:15';
FILE <$ResultFile 1> = AB;
FILE <$ResultFile 2> = Spec;
*STRING <Befehl> = 'OUT_SP_00_79';
*NUMERIC <Temp. vor Messung> = 65.09;
*NUMERIC <Temp. nach Messung> = 65.16;
*STRING <Datei TVM> = 'Temperatur-vor';
*STRING <Datei TNM> = 'Temperatur-nach';
*NUMERIC <count> = 20.00;
*STRING <Text1> = 'Probenname: ';
*STRING <Text2> = 'Probenform: ';

```

```

*STRING <Text3> = 'Speicherort:';
*STRING <Text4> = 'Dateiname';
*STRING <Text5> = 'Temperatur-Sollwert';
*STRING <Text6> = 'Temperatur vor der Messung';
*STRING <Text7> = 'Temperatur nach der Messung';
*STRING <Text8> = 'Dateiname|Temperatur-Sollwert|Temperatur vor der Messung|Temperatur nach der
Messung';
*STRING <InhaltLogfile> = 'KollF.19|79|65.09|65.16';
STRING <Text9> = 'Dateiname für Temperatur vor der Messung';
STRING <Text10> = 'Dateiname für Temperatur nach der Messung';
STRING <Text11> = 'Wartezeit vor Beginn des Experiments(Sekunden)';
STRING <Text12> = 'Wartezeit nach dem der Sollwert eingestellt wurde';
STRING <Text13> = 'Wartezeit zwischen der Temperaturabfrage';
STRING <Text14> = '(00:00:00)';
STRING <Text15> = 'Wartezeit, in der der Probeschlitten fährt';

```

## PROGRAM SECTION

```

Label (Fenster 1);
UserDialog (<Titel0>, STANDARD, EDIT:'<Messpfad>', EDIT:'<Dateiname der Messung>', BLANK,
EDIT:'<Experimentpfad>', EDIT:'<Dateiname des Experiments>', BLANK, BUTTON:'<Weitere
Einstellungen>', EDIT:'<Starttemperatur>', EDIT:'<Endtemperatur>', EDIT:'<Schrittweite>',
EDIT:'<Temperaturtolleranz>', BLANK, EDIT:'<Probenname>', EDIT:'<Probenform>');
SaveVars ();
Label (Fenster 2);
UserDialog ('0', STANDARD, BLANK, EDIT:'<Wiederholung des Temperaturlaufes>', EDIT:'<Spektren pro
Temperatureinstellung>', TEXT:'<Text11>', EDIT:'<Zeit VBE>', BLANK, BLANK, BLANK, TEXT:'<Text9>',
EDIT:'<Datei TVM>', BLANK, TEXT:'<Text10>', EDIT:'<Datei TNM>', BLANK);
SaveVars ();
Goto (Programm-Beginn);
Label (Fenster 3);
UserDialog (<Titel1>, STANDARD, TEXT:'<T01>', BLANK, TEXT:'<Text12>', TEXT:'<Text14>',
EDIT:'<Wartezeit NSE>', BLANK, TEXT:'<Text13>', TEXT:'<Text14>', EDIT:'<Wartezeit ZTA>', BLANK,
TEXT:'<Text15>', TEXT:'<Text14>', EDIT:'<Wartezeit PF>', BLANK);
SaveVars ();
Goto (Fenster 1);
Label (Programm-Beginn);
REM Logfile erstellen
TextToFile (<Messpfad>, '<Dateiname der Messung>.txt', '<Text1><Probenname>', APPEND_TEXT);
TextToFile (<Messpfad>, '<Dateiname der Messung>.txt', '<Text2><Probenform>', APPEND_TEXT);
TextToFile (<Messpfad>, '<Dateiname der Messung>.txt', '<Text3><Messpfad>', APPEND_TEXT);
<Text8> = '<Text4>|<Text5>|<Text6>|<Text7>';
TextToFile (<Messpfad>, '<Dateiname der Messung>.txt', '<Text8>', APPEND_TEXT);
<count> = 0;
<aktuelle Solltemperatur> = <Starttemperatur>;
StartLoop (<Wiederholung des Temperaturlaufes>, 0);
If (<Zeit VBE>, .NE., '0');
Timer (WAITTIME, <Zeit VBE>);
Endif ();
Label (Sprungpunkt);
StartLoop (<Spektren pro Temperatureinstellung>, 1);
If (<Schrittweite>, .LT., 0);
If (<aktuelle Solltemperatur>, .LT., <Endtemperatur>);
Goto (Programm-Ende);
Endif ();
Endif ();
If (<Schrittweite>, .GT., 0);
If (<aktuelle Solltemperatur>, .GT., <Endtemperatur>);
Goto (Programm-Ende);

```



```

Endif ();
Endif ();
REM Solltemperatur setzen
<Befehl> = 'OUT_SP_00_<aktuelle Solltemperatur>';
RS232 (, {CO1='COM2', CO2='9600,N,8,1,p', RSR=3, RTX='<Befehl>', RRL=13, RRT=13, RWT=13,
TIO=20, R00='<Befehl>'});
Timer (WAITTIME, <Wartezeit NSE>);
Label (Temperatur Abwarten);
<Temp1> = RS232 (0, {CO1='COM2', CO2='9600,N,8,1,p', RSR=3, RTX='in_pv_01', RRL=13, RRT=13,
RWT=13, TIO=20, R00='in_pv_01'});
Timer (WAITTIME, <Wartezeit ZTA>);
<Temp2> = RS232 (0, {CO1='COM2', CO2='9600,N,8,1,p', RSR=3, RTX='in_pv_01', RRL=13, RRT=13,
RWT=13, TIO=20, R00='in_pv_01'});
<Absolute Differenz> = (((<Temp1>)-(<Temp2>))^2)^(0.5);
If (<Absolute Differenz>, .GT., <Temperaturtolleranz>);
Goto (Temperatur Abwarten);
Endif ();
MeasureReference (0, {EXP='<Dateiname des Experiments>', XPP='<Experimentpfad>', NAM='<Dateiname
der Messung>', PTH='<Messpfad>', SFM='<Probenform>', SNM='<Probenname>'});
SendCommand (, {UNI='SBT0=1'});
Timer (WAITTIME, <Wartezeit PF>);
<Temp. vor Messung> = RS232 (0, {CO1='COM2', CO2='9600,N,8,1,p', RSR=3, RTX='in_pv_01', RRL=13,
RRT=13, RWT=13, TIO=20, R00='in_pv_01'});
<$ResultFile 1> = MeasureSample (0, {EXP='<Dateiname des Experiments>', XPP='<Experimentpfad>',
NAM='<Dateiname der Messung>', PTH='<Messpfad>', SFM='<Probenform>', SNM='<Probenname>'});
<Temp. nach Messung> = RS232 (0, {CO1='COM2', CO2='9600,N,8,1,p', RSR=3, RTX='in_pv_01', RRL=13,
RRT=13, RWT=13, TIO=20, R00='in_pv_01'});
SendCommand (0, {UNI='sbt0=0'});
TextToFile ('<Messpfad>', '<Datei TVM>.txt', '<Temp. vor Messung>', APPEND_TEXT);
TextToFile ('<Messpfad>', '<Datei TNM>.txt', '<Temp. nach Messung>', APPEND_TEXT);
EndLoop (1);
REM Logfile erweitern
<InhaltLogfile> = '<Dateiname der Messung>.<count>|<aktuelle Solltemperatur>|<Temp. vor
Messung>|<Temp. nach Messung>';
TextToFile ('<Messpfad>', '<Dateiname der Messung>.txt', '<InhaltLogfile>', APPEND_TEXT);
<count> = <count>+1;
(<aktuelle Solltemperatur>) = (<aktuelle Solltemperatur>)+(<Schrittweite>);
Goto (Sprungpunkt);
EndLoop (0);
Label (Programm-Ende);

```

## 7.1.2 Algorithmus zur Berechnung der zeitaufgelösten Absorptionstransienten

Die mit der Transientenrekorderkarte aufgezeichneten zeitaufgelösten Intensitätssignale werden durch die Software *Insight* (Imtec GmbH, Backnang) in ein binäres Dateiformat (xxx.sdf) abgespeichert. Der hier dargestellte Algorithmus, geschrieben mit der Programmiersprache Matlab (The MathWorks Inc., München), wandelt dieses Dateiformat wieder in ein ASCII-Format um. Durch zwei aufeinanderfolgende Intensitätssignale, deren Größe sich dadurch unterscheidet, dass durch einen optischen Verschluss das Messlicht an und aus ge-

schaltet wurde, kann zusätzlich die Absorptionsänderung einer untersuchten Probe bestimmt werden. Diese einzelnen Absorptionsänderungen werden anschließend gemittelt.

Der hier dargestellte Algorithmus bietet des Weiteren die Möglichkeit zu unterscheiden, ob die der jeweilige Schaltrhythmus des Verschlusses funktioniert hat. Sollte das nicht der Fall sein, so werden die zwei aufeinanderfolgenden Intensitätstransienten nicht bei der Berechnung und Mittelung der Absorptionstransienten benutzt. Außerdem ist es mit dem Algorithmus möglich, aus den Intensitätsverläufen diejenigen zu extrahieren, bei denen offensichtlich Störsignale, die durch einen unregelmäßigen Temperatursprung verursacht wurden, beobachtet werden. Dadurch können Effekte, wie bspw. spontan auftretende Luftbläschenbildung (engl.: „Cavitation“), die durch eine unregelmäßige Energieverteilung im Anregungslaserstrahlprofil verursacht werden kann, zwar nicht verhindert werden, sie können jedoch bei der Berechnung der Absorptionsänderungen herausgefiltert werden.

```
clear all;
% Speicherort der Daten
sOrtDaten=['E:\2007-10\03-10-2007\T7'];
% Wie viele Daten werden eingelesen?
Anzahl=4000;
% Fragestellung: Hat die Schaltung funktioniert .oder nicht?
% Überprüfung (type1=1), keine Überprüfung (type1=0)
type1=0;
% Überprüfung auf Cavitation? (ja = 1, nein = 0)
type2=0;
% _____ Programmumfang _____
sOrtaktuell=cd;
% Loading of an INSIGHT 3.50 SDF file into Matlab arguments : output : u = column containing the y-data
% Auslesen der Binärdaten aus einem sdf-file
cd (sOrtDaten);
Anzahl1=Anzahl/2;
Anzahl2=0;
for j1=1 : Anzahl1;
    clear t; t=0;
    for i=(j1*2-1) : (j1*2);
        if i<10;
            s=['T00000',int2str(i),'.sdf'];
        end;
        if (i>9 & i<100);
            s=['T0000',int2str(i),'.sdf'];
        end;
        if (i>99 & i<1000);
            s=['T000',int2str(i),'.sdf'];
        end;
        if i>999;
            s=['T00',int2str(i),'.sdf'];
        end;
        fid=fopen(s,'rb');
        identifier_version=(char(fread(fid,16,'char')));
        board_type=fread(fid,1,'ushort');
        data_type=fread(fid,1,'ushort');
```

---

```

coupling_type=fread(fid,1,'ushort');
trigger_channel=fread(fid,1,'uchar');
master_clock=fread(fid,1,'uchar');
X_min=fread(fid,1,'long');
X_max=fread(fid,1,'long');
X_step=fread(fid,1,'double');
X_unit=fread(fid,8,'char');
Y_min=fread(fid,1,'long');
Y_max=fread(fid,1,'long');
Y_step=fread(fid,1,'double');
Y_unit=fread(fid,8,'char');
uplevel=fread(fid,1,'ushort');
lolevel=fread(fid,1,'ushort');
counter=fread(fid,1,'ushort');
trigger_mode=fread(fid,1,'ushort');
trigger_switch=fread(fid,1,'ushort');
flags=fread(fid,1,'ushort');
bus_config=fread(fid,1,'ulong');
time_slow=fread(fid,1,'ulong');
time_fast=fread(fid,1,'ulong');
averages=fread(fid,1,'ulong');
comment_present=fread(fid,1,'ulong');
comment_length=fread(fid,1,'ulong');
number_of_segments=fread(fid,1,'ulong');
upmask=fread(fid,1,'ushort');
lomask=fread(fid,1,'ushort');
reserved=(char(fread(fid,8,'char')));
data=fread(fid,-X_min+X_max+1,'int16');
comment=fread(fid,comment_length,'char');
fclose(fid);
clear s;
%_____ Umwandeln der Daten in aufgenommene Daten _____
% 1. Spannungssignal
t=t+1;
u(:,t)=(data+Y_min)*Y_step;
% 2. Zeitsignal
if (i == 1);
[x1,x2]=size(u);
u(:,2)=((1:x1)*X_step)-(-X_min+1)*X_step;
clear b; b=0;clear c; c=0;
for j=1 : (-X_min+X_max+1);
    % 1. Bereich 6-50µs
    if u(j,2)>(6E-6);
        if u(j,2)<(50E-6);
            b=b+1;
            b1(b)=j;
        end;
    end;
    % 2. Bereich 50-100µs
    if u(j,2)>(50E-6);
        if u(j,2)<(100E-6);
            c=c+1;
            c1(c)=j;
        end;
    end;
end;
[b2,b3]=size(b1); bb1=b1(1); bb2=b1(b3); bb3=b3;
[c2,c3]=size(c1); cc1=c1(1); cc2=c1(c3); cc3=c3;
zb=0;

```

```

    Abs(1:(-X_min+X_max+1),1)=0;
    mMoA=Abs; oMmA=Abs; mMmA=Abs; Abs2=Abs;
    Zeit(:,1)=u(:,2);
    Zeitb(1:bb3,1)=Zeit(bb1:bb2,1); Zeite(1:cc3,1)=Zeit(cc1:cc2,1);
end;
clear s;
end;
%___ Entscheidung ob die Transienten doppelt sind, hat die Schaltung funktioniert? ___
Zahl1=1;
if (type1==1);
    for t=1 : 2;
        rb1(1:300)=u((-X_min+120):(-X_min+419),t);
        rb2(t)=(mean(rb1)).^2.^(1/2);
        rb3(t,1)=rb2(t)-rb2(t)*(0.05); rb3(t,2)=rb2(t)+rb2(t)*(0.05);
    end; %
    Zahl1=1;
    if rb3(2,1)<rb2(1) & rb2(1)<rb3(2,2);
        Zahl1=2;
    elseif rb3(1,1)<rb2(2) & rb2(2)<rb3(1,2);
        Zahl1=2;
    else;
        Zahl1=1;
    end;
end; %
if (Zahl1==1);
    % Mittelwert des Offset
    for t=1 : 2;
        ra1(1:(-X_min/2))=u(1:(-X_min/2),t);
        ra2(t)=mean(ra1);
    end;
    ra3=min(ra2);
    ta=find(ra2==ra3);
    % Offsetkorrektur und Identifizierung der einzelnen Transienten
    if (ta==1);
        xa1(:,1)=u(:,2)-ra3;
        xa2(:,1)=u(:,1)-ra3;
    elseif (ta==2);
        xa1(:,1)=u(:,1)-ra3;
        xa2(:,1)=u(:,2)-ra3;
    end;
    % _____ in xa3 nach Cavitation suchen _____
    if (type2==1);
        % 1. Bereich
        xa3a(1:bb3,1)=xa1(bb1:bb2,1);
        [qa1,qa2]=polyfit(Zeitb,xa3a,1);
        wa3a=xa3a-(qa1(1)*Zeitb+qa1(2));
        % 2. Bereich
        xa3b(1:cc3,1)=xa1(cc1:cc2,1);
        [qb1,qb2]=polyfit(Zeite,xa3b,1);
        wa3b=xa3b-(qb1(1)*Zeite+qb1(2));
        % Berechnung;
        w=(std(wa3a)-std(wa3b))/(std(wa3b));
        SD=100*(w^2)^(1/2);
        if SD>0.005;
            Zahl1=2;
        end;
        clear xa3a xa3b w SD qa1 qa2 qb1 qb2 wa3a wa3b;
    end;
end;
end;

```

---

```

if (Zahl1==1);
    %_____ Offset unabhängig von xa2 finden _____
    rra1(1:(-X_min-40))=xa1(1:(-X_min-40),1);
    rra2=mean(rra1);
    Intens(:,1)=-log10(1+((xa1-rra2-xa2)./rra2));
    %_____
    oMmA=oMmA+xa2; mMmA=mMmA+xa1;
    Abs=Abs+Intens;
    clear u r1 r2;
end;
if (Zahl1==2);
    Anzahl2=Anzahl2+1;
end;
end;
DeltaAbs=Abs./(Anzahl1-Anzahl2);
oMmA=oMmA./(Anzahl1-Anzahl2);
mMmA=mMmA./(Anzahl1-Anzahl2);
%_____ Offset unabhängig von xa2 finden _____
rt1(1:(-X_min-40))=mMmA(1:(-X_min-40),1);
rt2=mean(rt1);
DeltaAbs2=-log10(1+((mMmA-rt2-oMmA)./rt2));
%_____ Abspeichern der Daten _____
% Absorptionstransiente (aus den einzeln berechneten ΔA und dann gemittelt)
ss=['Kinetik.dat'];
fid=fopen(ss,'a+');
for i=1 : (-X_min+X_max+1);
    sdat=[Zeit(i,1),DeltaAbs(i,1)];
    fprintf(fid,'%6.10f %6.10f \r\n',sdat);
end;
fclose(fid);
%-----
% Absorptionstransiente (gemittelten oMmA und mMmA und dann ΔA berechnet)
ss=['Kinetik2.dat'];
fid=fopen(ss,'a+');
for i=1 : (-X_min+X_max+1);
    sdat=[Zeit(i,1),DeltaAbs2(i,1)];
    fprintf(fid,'%6.10f %6.10f \r\n',sdat);
end;
fclose(fid);
%-----
% gemittelte Intensitäten ohne Meßlicht, mit Anregungslicht
ss=['oMmA.dat'];
fid=fopen(ss,'a+');
for i=1 : (-X_min+X_max+1);
    sdat=[Zeit(i,1),oMmA(i,1)];
    fprintf(fid,'%6.10f %6.10f \r\n',sdat);
end;
fclose(fid);
%-----
% gemittelte Intensitäten mit Messlicht, mit Anregungslicht
ss=['mMmA.dat'];
fid=fopen(ss,'a+');
for i=1 : (-X_min+X_max+1);
    sdat=[Zeit(i,1),mMmA(i,1)];
    fprintf(fid,'%6.10f %6.10f \r\n',sdat);
end;
fclose(fid);
%-----
cd (sOrtaktuell);

```

### 7.1.3 Entwickelter Algorithmus zur Temperatur- und spektralen Anpassung unterschiedlicher Proben

Der dargestellte Algorithmus, ebenfalls geschrieben mit der Programmiersprache Matlab (The MathWorks Inc., München), beinhaltet sowohl die in Kapitel 4.1.1 dargestellte Prozedur zur Temperatur-Angleichung unterschiedlicher Proben (Programmteil 1), als auch den in Kapitel 4.1.2 erwähnten Algorithmus zum spektralen Abzug von Lösungsmittelabsorptionen (Programmteil 2). Für einen besseren Überblick sind in Abbildung 20 und in Abbildung 21 (siehe Kapitel 4.1) die Prozedurstrukturen der Teilprogramme veranschaulicht.

```
%=====Datei-Beschreibung=====
% Teil 1: Wasserdaten an Proteintemperatur anpassen
clear all;
%===== Speicherort der Daten =====
% D2O
sOrtD2O=['C:\WasserRes4Zero8\D2O-100mu'];
% HDO
sOrtHD=['C:\WasserRes4Zero8\HDO-Spektren'];
% Protein
sOrtProt=['C:\statische-Proteindaten\September-2007\20-09-2007-mitD2O5mu'];
% aktuell
sOrtaktuell=cd;
%=====
% _____ Soll Programmteil 1 benutzt oder übersprungen werden? _____
%(benutzen: Teil1=1; überspringen: Teil1=0)
Teil1=1;
Fit1=1;
% _____ ascii-Daten einlesen _____
% Temperatur des D2O-Spektrums
cd (sOrtD2O); z1=load('Temp.dat'); [c,c1]=size(z1);
% Temperatur des H2O-Spektrums
cd (sOrtHD); z2=load('Temp.dat'); [ef,ef1]=size(z2);
% Temperatur des Mixture-Spektrums
cd (sOrtProt); z3=load('Temp.dat'); [b,b1]=size(z3);
clear c1 ef1 b1;
%===== Programmteil 1 =====
% Teil 1: Anpassen der Lösungsmitteltemperaturen an Proteinspektren
if (Teil1==1);
% _____ Steigungsspektren berechnen _____
clear i j1 u; j1=0; j2=0;
% Zunächst die Bereiche der Steigungsspektren wählen [T(Prot)+-3°C]
for u=1 : b;
    x1=z3(u)-3; x2=z3(u)+3;
    for i=1 : c;
        if (z1(i)>x1 & z1(i)<x2);
            j1=j1+1; zahl1(j1)=i;
        end;
    end;
    x3(u,1)=zahl1(1); x3(u,2)=zahl1(j1);
end;
```

---

```

j1=0;
for i=1 : ef;
    if (z2(i)>x1 & z2(i)<x2);
        j2=j2+1; zahl2(j2)=i;
    end;
end;
xa3(u,1)=zahl2(1); xa3(u,2)=zahl2(j2);
j2=0;
end;
% _____ allgemeine Angaben _____
clear vv1 vv2 vv3 j1 g1 n1; j1=0;
cd (sOrtD2O);
st=['D2O1.dat']; xt=dlmread(st,'); [k2,k1]=size(xt);
f(:,1)=xt(:,1);
for i=1 : k2;
    if (f(i,1)<5900 & f(i,1)>5700);
        j1=j1+1; vv1(j1)=i;
    end;
end;
[vv2,vv3]=size(vv1); aa1=vv1(1); aa2=vv1(vv3); aa3=vv3;
clear st xt;
% _____ D2O-Daten _____
for d2ou=1 : b;
    clear g1 n1;
    z=x3(d2ou,2)-x3(d2ou,1)+1;
    a1=x3(d2ou,1);
    cd (sOrtD2O);
    for m=1 : z;
        s=['D2O',int2str(a1),'.dat'];
        x1=dlmread(s,');
        d2o(:,m)=x1(:,2);
        a1=a1+1;
        g1(1:aa3)=d2o(aa1:aa2,m); n1=sum(g1)/aa3;
        % Bereich in jedem Spektrum auf Null setzen
        w1(m,:)=d2o(:,m)-n1;
    end;
    clear a1;
    cd (sOrtProt);
    ss=['D2O-ber',int2str(d2ou),'.dat'];
    fid=fopen(ss,'a+');
    for i=1 : k2;
        clear t q q1 q2 d1 e1; t=0;
        ab1=x3(d2ou,1); ab2=x3(d2ou,2);
        for j=ab1 : ab2;
            t=t+1;
            d1(t)=z1(j);
            e1(t)=w1(j-ab1+1,i);
        end;
        q=polyfit(d1,e1,1);
        q1=q(1);q2=q(2);
        w3=(q1*z3(d2ou))+q2;
        sdat=[f(i,1),w3];
        fprintf(fid,'%6.8f, %6.8f \r\n',sdat);
    end;
    fclose(fid);
    clear w1 w3 d2o;
end;
% _____ HD-Daten _____
for hdu=1 : b;

```

```

clear g1 n1;
z=xa3(hdu,2)-xa3(hdu,1)+1; a1=xa3(hdu,1);
cd (sOrtHD);
for m=1 : z;
    s=['HDO-Spek',int2str(a1),'.dat'];
    x1=load(s,');
    hd(:,m)=x1(:,2);
    a1=a1+1;
    g1(1:aa3,1)=hd(aa1:aa2,m); n1=sum(g1)/aa3;
    % Bereich in jedem Spektrum auf Null setzen
    w1(m,:)=hd(:,m)-n1;
end;
clear a1;
cd (sOrtProt);
ss=['HDO-ber',int2str(hdu),'.dat'];
fid=fopen(ss,'a+');
for i=1 : k2;
    clear t q q1 q2 d2 e2; t=0;
    ab1=xa3(hdu,1); ab2=xa3(hdu,2);
    for j=ab1 : ab2;
        t=t+1;
        d2(t)=z2(j);
        e2(t)=w1(j-ab1+1,i);
    end;
    q=polyfit(d2,e2,1);
    q1=q(1);q2=q(2);
    w3=(q1*z3(hdu))+q2;
    sdat=[f(i,1),w3];
    fprintf(fid,'%6.8f, %6.8f \r\n',sdat);
end;
fclose(fid);
clear w1 w3 hd;
end;
end;
%===== Programmteil 2 =====
% Teil 2 : Wasserdaten an Proteindaten anpassen
%
cd (sOrtProt);
% Bande des D2O
Bande1=3;
% Bande des HOD
Bande2=3;
for g=1 : b;
    count=0; countnull=0;
    clear Int2 r prot x1 x2 x3;
    % _____ Dateien laden _____
    % Protein-Spektrum
    s1=[int2str(g),'.dat']; x1=dlmread(s1,');
    % D2O-Spektrum
    s2=['D2O-ber',int2str(g),'.dat']; x2=dlmread(s2,');
    % H2O-Spektrum
    s3=['HDO-ber',int2str(g),'.dat']; x3=load(s3,');
    cd (sOrtProt);
    [k2,k1]=size(x2);
    clear s1 s2 s3;
    % _____ Wellenzahltable erstellen _____
    if (g == 1);
        f(:,1)=x2(:,1);
        j1=0; j2=0; j3=0; j4=0;

```



```

for i=1 : k2;
    if (f(i,1)<5900 & f(i,1)>5700); % Offset
        j1=j1+1; za1(j1)=i;
    end;
    if (f(i,1)<3900 & f(i,1)>3750); % D2O-Bande
        j2=j2+1; zb1(j2)=i;
    end;
    if (f(i,1)<3500 & f(i,1)>3200); % HDO-Bande
        j3=j3+1; zc1(j3)=i;
    end;
end;
% Banden zur Offsetanfertigung
o1=0;o2=0;o3=0;
for i=1 : k2;
    if (f(i,1)<5950 & f(i,1)>5940); % Offsetbereich
        o1=o1+1; ao1(o1)=i;
    end;
end;
[za2,za3]=size(za1); aa1=za1(1); aa2=za1(za3); aa3=za3;
[zb2,zb3]=size(zb1); bb1=zb1(1); bb2=zb1(zb3); bb3=zb3;
[zc2,zc3]=size(zc1); cc1=zc1(1); cc2=zc1(zc3); cc3=zc3;
[ao2,ao3]=size(ao1); aoo1=ao1(1); aoo2=ao1(ao3); aoo3=ao3;
end;
clear za1 za2 za3 zb1 zb2 zb3 zc1 zc2 zc3 i j1 j2 j3 ao1 ao2 ao3 o1;
% _____ Offset in Spektren verschieben _____
% Bereich zwischen 5900-5700 aufsummieren
g1(1:ao3,1)=x1(ao1:ao2,2); n1=mean(g1);
g2(1:ao3,1)=x2(ao1:ao2,2); n2=mean(g2);
g3(1:ao3,1)=x3(ao1:ao2,2); n3=mean(g3);
% Bereich in jedem Spektrum auf Null setzen
Prot(:,1)=x1(:,2)-n1;
[k4,k3]=size(Prot);
if k4<k2;
    Prot(k2,1)=Prot(k4,1);
end;
d2o(:,1)=x2(:,2)-n2;
hd(:,1)=x3(:,2)-n3;
clear x1 x2 x3 g1 g2 g3 n1 n2 n3;
% _____ Bereich 1 Offsetbereich _____
Prot1(1:ao3,1)=Prot(ao1:ao2,1);
d2o1(1:ao3,1)=d2o(ao1:ao2,1);
hd1(1:ao3,1)=hd(ao1:ao2,1);
p1=mean(Prot1); d1=mean(d2o1); h1=mean(hd1);
% _____ Bereich 2 D2O-Banden Bereich _____
mhd1(1:bb3,1)=Prot(bb1:bb2,1);
mwhd1=find(mhd1 == max(mhd1));
Prot2(1:1+2*Bande1,1)=mhd1(mwhd1-Bande1:mwhd1+Bande1,1);
d2oxt(1:bb3,1)=d2o(bb1:bb2,1);
d2oxta=find(d2oxt == max(d2oxt));
d2o2(1:1+2*Bande1,1)=d2oxt(d2oxta-Bande1:d2oxta+Bande1,1);
hd2a(1:bb3,1)=hd(bb1:bb2,1);
hd2b(1:1+2*Bande1,1)=hd2a(d2oxta-Bande1:d2oxta+Bande1,1);
p2=mean(Prot2); d2=mean(d2o2); h2=mean(hd2b);
% _____ Bereich 3 HD Bereich 3400 _____
mhd2(1:cc3,1)=Prot(cc1:cc2,1);
mwhd2=find(mhd2 == max(mhd2));
if mwhd2==cc3;
    Prot3(1,1)=mhd2(mwhd2,1);
elseif mwhd2==1;

```

```

Prot3(1,1)=mhd2(mwhd2,1);
else;
Prot3(1:1+2*Bande1,1)=mhd2(mwhd2-Bande1:mwhd2+Bande1,1);
end;
hdxt(1:cc3,1)=hd(cc1:cc2,1);
hdxta=find(hdxt == max(hdxt));
d2o3a(1:cc3,1)=d2o(cc1:cc2,1);
if hdxta == cc3;
hd3(1,1)=hdxt(hdxta,1);
d2o6b(1,1)=d2o3a(hdxta,1);
elseif hdxta == 1 ;
hd3(1,1)=hdxt(hdxta,1);
d2o6b(1,1)=d2o3a(hdxta,1);
else;
hd3(1:1+2*Bande1,1)=hdxt(hdxta-Bande1:hdxta+Bande1,1);
d2o3b(1:1+2*Bande1,1)=d2o3a(hdxta-Bande1:hdxta+Bande1,1);
end;
p3=mean(Prot3); d3=mean(d2o3b); h3=mean(hd3);
%=====
if (Fit1==1); % D2O und HD fit
%gesucht:
% c1*x1+d1*x2+off-p1=0 (Offset 5950-5940)
% c2*x1+d2*x2+off-p2=0 (Bandenbereich D2O-Bande 3800)
% c3*x1+d3*x2+off-p3=0 (Bandenbereich HDO-Bande 3400)
%-----
vab=7; vabz=51;
r1Startvora=round(1000*p2/(d2+h2))/1000; % D2O Bande
r1Startvor=round(1000*p2/(d2+h2))/1000-0.2;
r2Startvor=(round(1000*(p3-d3*r1Startvora)/(h3)))/1000-0.2; % HD Bande
for u1=1 : vab;
if (u1 == 1);
xa=0.02;
else
xa=xa*2*(1/10);
end;
r1Start=r1Startvor; r2Start=r2Startvor;
for k1=1 : vabz;
if (k1 == 1);
r1(1)=r1Start;
else
r1(k1)=r1(k1-1)+(xa);
end;
for k2=1 : vabz;
if (k2 == 1);
r2(1)=r2Start;
else
r2(k2)=r2(k2-1)+(xa);
end;
% zu lösen
G1=((h1*r2(k2)+d1*r1(k1))-p1).^2.^(1/2); % Offset 5950-5940
G2=((h2*r2(k2)+d2*r1(k1))-p2).^2.^(1/2); % Bandenbereich D2O-Bande 3800
G3=((h3*r2(k2)+d3*r1(k1))-p3).^2.^(1/2); % Bandenbereich HDO-Bande 3400
Ges=((G1+G2+G3)^2)^.(1/2);
Int1k2(k1,k2)=Ges;
fakd2o1(k1,k2)=r1(k1);
fakhd1(k1,k2)=r2(k2);
end;
end; % Ende von k1
IMin=min(min(Int1k2));posMin1=find(Int1k2 == IMin);

```

```

[tr1,tr2]=size(posMin1);
if tr2>1;
    posMin=posMin1(1);
elseif tr1>1;
    posMin=posMin1(1);
else;
    posMin=posMin1;
end;
fakhd2=fakhd1(posMin);
fakd2o2=fakd2o1(posMin);
Int1=Int1k2(posMin);
clear r1Startvor r2Startvor;
if posMin==1;
    r1Startvor=fakd2o2;
    r2Startvor=fakhd2;
else
    r1Startvor=fakd2o2-((xa));
    r2Startvor=fakhd2-((xa));
end;
clear r2Start r1Start;
end;
fakhdx=fakhd2;
fakd2ox=fakd2o2;
off=0; fakCaFx=0;
end;
%===== Berechnung des Endspektrums =====
x4(:,1)=fakhdx*hd(:,1)+fakd2ox*d2o(:,1);
wasser(:,1)=x4(:,1);
x5(:,1)=Prot(:,1)-wasser(:,1);
[jk1,jk2]=size(x5);
%=====
%_____ Offsetverschiebung bei 1830 _____
[k2,k1]=size(x4);
clear x6 q3 a1 a2 a3 a4 a5 j d e; j=0;
for i=1 : k2;
    % Offset-Ermittlung
    if (f(i,1)<1830 & f(i,1)>1828);
        j=j+1;
        e(j)=x5(i,1);
    end;
end;
tr=mean(e);
x7(:,1)=x5(:,1)-tr;
%_____ Anpassen eines Polynoms 3. Grades im Bereich 2000-1720 und 1320-1300 _____
clear x6 q3 a1 a2 a3 a4 a5 j d e; j=0;
for i=1 : k2;
    if (f(i,1)<2000 & f(i,1)>1720);
        j=j+1;
        d(j)=f(i,1);
        e(j)=x7(i,1);
    end;
    if (f(i,1)<1320 & f(i,1)>1300);
        j=j+1;
        d(j)=f(i,1);
        e(j)=x7(i,1);
    end;
end;
q3=polyfit(d,e,3); x6=polyval(q3,f);
x8(:,1)=x7(:,1);

```

```
% _____ Normierung des Amid I Bereiches (1720-1580) auf 1 _____
clear q3 a1 a2 a3 a4 a5 j d e amid rest; j=0;
for i=1 : k2;
    if (f(i,1)<1720 & f(i,1)>1580);
        j=j+1;
        amid(j)=((x7(i,1))^2)^(1/2);
    end;
end;
Int3=sum(amid); rest=1/Int3;
x9(:,1)=rest*x7(:,1);
%===== Abspeichern der Daten =====
% _____ Amid I-normiertes Proteinspektrum _____
ss=['Prot-Spek',int2str(g),'.dat']
fid=fopen(ss,'a+');
for i=1 : k2;
    sdat=[f(i,1),x9(i,1)];
    fprintf(fid,'%6.8f %6.8f \r\n',sdat);
end;
fclose(fid); clear fid sdat ss;
% _____ resultierendes Proteinspektrum _____
ss=['ProtMin-Spek',int2str(g),'.dat'];
fid=fopen(ss,'a+');
for i=1 : k2;
    sdat=[f(i,1),x5(i,1)];
    fprintf(fid,'%6.8f %6.8f \r\n',sdat);
end;
fclose(fid); clear fid sdat ss;
% _____ resultierendes D2O+HD-Spektrum _____
ss=['D2OMin-Spek',int2str(g),'.dat'];
fid=fopen(ss,'a+');
for i=1 : k2;
    sdat=[f(i,1),wasser(i,1)];
    fprintf(fid,'%6.8f %6.8f \r\n',sdat);
end;
fclose(fid); clear fid sdat ss;
% _____ resultierendes Polynom-korregiertes Proteinspektrum _____
ss=['ProtMin-pk-Spek',int2str(g),'.dat'];
fid=fopen(ss,'a+');
for i=1 : k2;
    sdat=[f(i,1),x7(i,1)];
    fprintf(fid,'%6.8f %6.8f \r\n',sdat);
end;
fclose(fid); clear fid sdat ss;
end;
cd (sOrtaktuell);
```

---

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Dyer, R. B., Maness, S. J., Franzen, S., Fesinmeyer, R. M., Olsen, K. A., und Andersen, N. H. (2005) *Biochemistry* 44, 10406-40415.
- 2 Nölting, B. und Andert, K. (2000) *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 41, 288-298.
- 3 Bieri, O. und Kiefhaber, T. (1999) *Biological Chemistry* 380, 923-929.
- 4 Eaton, W. A., Muñoz, V., Hagen, S. J., Jas, G. S., Lapidus, L. J., Henry, E. R., und Hofrichter, J. (2000) *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29, 327-359.
- 5 Chen, E., Goldbeck, R. A., und Kliger, D. S. (1997) *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 26, 327-355.
- 6 Causgrove, T. P. und Dyer, R. B. (2006) *Chemical Physics* 323, 2-10.
- 7 Wray, W. O., Aida, T., und Dyer, R. B. (2002) *Applied Physics B* 74, 57-66.
- 8 Searle, M. S. (2001) *Perkin Transactions* 2, 1011-1020.
- 9 Williams, S., Causgrove, T. P., Gilmanshin, R., Fang, K. S., Callender, R. H., Woodruff, W. H., und Dyer, R. B. (1996) *Biochemistry* 35, 691-697.
- 10 Thompson, P. A., Eaton, W. A., und Hofrichter, J. (1997) *Biochemistry* 36, 9200-9210.
- 11 Huang, C.-Y., Klemke, J. W., Getahun, Z., DeGrado, W. F., und Gai, F. (2001) *Journal of the American Chemical Society* 123, 9235-9238.
- 12 Gooding, E. A., Ramajo, A. P., Wang, J., Palmer, C., Fouts, E., und Volk, M. (2005) *Chemical Communications* 5985-5987.
- 13 Ramajo, A. P., Petty, S. A., und Volk, M. (2006) *Chemical Physics* 323, 11-23.
- 14 Espinosa, J. F., Syud, F. A., und Gellman, S. H. (2002) *Protein Science* 11, 1492-1505.
- 15 Langenhan, J. M., Guzei, I. A., und Gellman, S. H. (2003) *Angewandte Chemie International Edition* 42, 2402-2405.
- 16 Langenhan, J. M. und Gellman, S. H. (2004) *Organic Letters* 6, 937-940.
- 17 Espinosa, J. F., Syud, F. A., und Gellman, S. H. (2005) *Biopolymers* 80, 303-311.
- 18 Haque, T. S. und Gellman, S. H. (1997) *Journal of the American Chemical Society* 119, 2303-2304.

- 19 Chen, R. P. Y., Huang, J. J. T., Chen, H.-L., Jan, H., Velusamy, M., Lee, C.-T., Fann, W., Larsen, R. W., und Chan, S. I. (2004) *Proceedings of the National Academy of Science* 101, 7305-7310.
- 20 Snow, C. D., Qiu, L., Du, D., Gai, F., Hagen, S. J., und Pande, V. S. (2004) *Proceedings of the National Academy of Science* 101, 4077-4082.
- 21 Du, D., Zhu, Y., Huang, C.-Y., und Gai, F. (2004) *Proceedings of the National Academy of Science* 101, 15915-15920.
- 22 Du, D., Tucker, M. J., und Gai, F. (2006) *Biochemistry* 45, 2668-2678.
- 23 Muñoz, V., Ghilardi, J. R., Blanco, F. J., Jas, G. S., Hofrichter, J., und Eaton, W. A. (2006) *Biochemistry* 45, 7023-7035.
- 24 Xu, Y., Wang, T., und Gai, F. (2006) *Chemical Physics* 323, 21-27.
- 25 Muñoz, V., Thompson, P. A., Hofrichter, J., und Eaton, W. A. (1997) *Letters to Nature* 390, 196-199.
- 26 Xu, Y., Oyola, R., und Gai, F. (2003) *Journal of the American Chemical Society* 125, 15388-15394.
- 27 Eaton, W. A., Muñoz, V., Thompson, P. A., Henry, E. R., und Hofrichter, J. (1998) *Accounts of Chemical Research* 31, 745-753.
- 28 Ramajo, A. P., Petty, S. A., Starzyk, A., Decatur, S. M., und Volk, M. (2005) *Journal of the American Chemical Society* 127, 13784-13785.
- 29 Huang, C.-Y., Getahun, Z., Wang, T., DeGrado, W. F., und Gai, F. (2001) *Journal of the American Chemical Society* 123, 12111-12112.
- 30 Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- 31 Günzler, H. und Heise, H. M. (1996) *IR-Spektroskopie* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- 32 Theocharous, E. (2006) *Photonics Spectra* April 2006, 70-72.
- 33 Yamamoto, K., Mizutani, Y., und Kitagawa, T. (2000) *Applied Spectroscopy* 54, 1591-1604.
- 34 Bayly, J. G., Kartha, V. B., und Stevens, W. H. (1963) *Infrared Physics* 3, 211-223.
- 35 Carnuth, W. und Trickl, T. (1994) *Reviews of Scientific Instruments* 65, 3324-3331.
- 36 Ballew, R. M., Sabelko, J., und Gruebele, M. (1996) *Proceedings of the National Academy of Science* 93, 5759-5764.
- 37 Sentrayan, K., Michael, A., Singh, U. N., und Kushawaha, V. S. (1997) *Optics & Laser Technology* 29, 275-279.

- 
- 38 Chen, E., Wen, Y., Lewis, J. W., Goldbeck, R. A., und Klinger, D. S. (2005) *Reviews of Scientific Instruments* 76, 083120-1-083120-7.
- 39 Ballew, R. M., Sabelko, J., Reiner, C., und Gruebele, M. (1996) *Reviews of Scientific Instruments* 67, 3694-3699.
- 40 Huang, C.-Y., Getahun, Z., Zhu, Y., Klemke, J. W., DeGrado, W. F., und Gai, F. (2002) *Proceedings of the National Academy of Science* 99, 2788-2793.
- 41 Kneubühl, F. K. und Sigrist, M. W. (1995) Aufbau und Charakterisierung der Halbleiter, in *Laser* 4 ed., pp 334-350, B. G. Teubner Stuttgart, Stuttgart.
- 42 Brunner, R. (2005), *Dissertation*, Bayrische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- 43 Demtröder, W. (1993) Halbleiterlaser, in *Laserspektroskopie* 3 ed., pp 202-207, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 44 Galla, H.-J. (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 45 Greenfield, N. und Fasman, G. D. (1969) *Biochemistry* 8, 4108-4116.
- 46 Barth, A. und Zscherp, C. (2002) *Quarterly Reviews of Biophysics* 35, 369-430.
- 47 Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., und Ruyschaert, J.-M. (1994) *Subcellular Biochemistry* 23, 329-362.
- 48 Krimm, S. und Bandekar, J. (1986) *Advances in Protein Chemistry* 38, 181-364.
- 49 Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., und Ruyschaert, J.-M. (1994) *Subcellular Biochemistry* 23, 405-450.
- 50 Arrondo, J. L. R., Young, N. M., und Mantsch, H. H. (1988) *Biochimica et Biophysica Acta* 952, 261-268.
- 51 Dong, A., Prestrelski, S. J., Allison, S. D., und Carpenter, J. F. (1995) *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84, 415-424.
- 52 Panick, G., Malessa, R., und Winter, R. (1999) *Biochemistry* 38, 6512-6519.
- 53 Lifson, S. und Roig, A. (1961) *The Journal of Chemical Physics* 34, 1963-1974.
- 54 Kim, P. S. und Baldwin, R. L. (1990) *Annual Review of Biochemistry* 59, 631-660.
- 55 Fersht, A. R. (1997) *Current Opinion in Chemical Biology* 7, 3-9.
- 56 Wetlaufer, D. B. (1973) *Proceedings of the National Academy of Science* 70, 697-701.
- 57 Abkevich, V. I., Gutin, A. M., und Shakhnovich, E. I. (1994) *Biochemistry* 33, 10026-10036.

- 58 Nölting, B. (2006) *Protein Folding Kinetics* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 59 Atkins, P. W. (1996) *Physikalische Chemie* VCH Verlagsgesellschaft mbG, Weinheim.
- 60 Yamamoto, T. und Tasumi, M. (1991) *Journal of Molecular Structure* 242, 235-244.
- 61 Sosnick, T. R. und Trewhella, J. (1992) *Biochemistry* 31, 8329-8335.
- 62 Raines, R. T. (1998) *Chemical Reviews* 98, 1045-1065.
- 63 Hirs, C. H. W., Moore, S., und Stein, W. H. (1960) *The Journal of Biological Chemistry* 235, 633-647.
- 64 Kartha, G., Bello, J., und Harker, D. (1967) *Nature* 213, 862-865.
- 65 Scholtz, J. M. und Baldwin, R. L. (1993) *Biochemistry* 32, 4604-4608.
- 66 Udgaonkar, J. B. und Baldwin, R. L. (1990) *Proceedings of the National Academy of Science* 87, 8197-8201.
- 67 Reinstädler, D., Fabian, H., Backmann, J., und Naumann, D. (1996) *Biochemistry* 35, 15822-15830.
- 68 Seshadri, S., Oberg, K. A., und Fink, A. L. (1994) *Biochemistry* 33, 1351-1355.
- 69 Fabian, H. und Mantsch, H. H. (1995) *Biochemistry* 34, 13651-13655.
- 70 Stelea, S. D., Pancoska, P., Benight, A. S., und Keiderling, T. A. (2001) *Protein Science* 10, 970-978.
- 71 Brodi, F., Cametti, C., und Paradossi, G. (1999) *Physical Chemistry Chemical Physics* 1, 1555-1561.
- 72 Barksdale, A. D. und Stuehr, J. E. (1972) *Journal of the American Chemical Society* 94, 3334-3338.
- 73 Tsuji, Y., Yasunaga, T., Sano, T., und Ushio, H. (1976) *Journal of the American Chemical Society* 98, 813-818.
- 74 Cummings, A. L. und Eyring, E. M. (1975) *Biopolymers* 14, 2107-2114.
- 75 Nolan, B., Gooding, E., Sharma, S., and Volk, M. (2004) The Helix-Coil Transition in Polyglutamic Acid.
- 76 Petty, S. A. und Volk, M. (2004) *Physical Chemistry Chemical Physics* 6, 1022-1030.
- 77 Doshi, U. R. und Muñoz, V. (2004) *Journal of Physical Chemistry B* 108, 8497-8506.
- 78 Du, D. und Gai, F. (2006) *Biochemistry* 45, 13131-13139.



- 
- 79 Dyer, R. B., Maness, S. J., Peterson, E. S., Franzen, S., Fesinmeyer, R. M., und Andersen, N. H. (2004) *Biochemistry* 43, 11560-11566.
- 80 Xu, Y., Purkayastha, P., und Gai, F. (2006) *Journal of the American Chemical Society* 128, 15836-15842.
- 81 Cochran, A. G., Skelton, N. J., und Starovasnik, M. A. (2001) *Proceedings of the National Academy of Science* 98, 5578-5583.
- 82 Rahmelow, K. und Hübner, W. (1997) *Applied Spectroscopy* 51, 160-170.
- 83 Cameron, D. G., Casal, H. L., und Mantsch, H. H. (1979) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1, 21-36.
- 84 Powell, J. R., Wasacz, F. M., und Jakobsen, R. J. (1986) *Applied Spectroscopy* 40, 339-344.
- 85 Dousseau, F., Therrien, M., und Pézolet, M. (1989) *Applied Spectroscopy* 43, 538-542.
- 86 Wang, S.-L., Wei, Y.-S., und Lin, S.-Y. (2003) *Vibrational Spectroscopy* 31, 313-319.
- 87 Gillette, P. C. und Koenig, J. L. (1984) *Applied Spectroscopy* 38, 334-337.
- 88 Dong, A., Huang, P., und Caughey, W. S. (1990) *Biochemistry* 29, 3303-3308.
- 89 Allen, D. L. und Pielak, G. J. (1998) *Protein Science* 7, 1262-1263.
- 90 John, D. M. und Weeks, K. M. (2000) *Protein Science* 9, 1416-1419.
- 91 Covington, A. K. (1968) *Analytical Chemistry* 40, 700-706.
- 92 Max, J.-J. und Chapados, C. (2002) *Journal of Chemical Physics* 116, 4626-4642.
- 93 Libnau, F. O., Christy, A. A., und Kvalheim, O. M. (1995) *Applied Spectroscopy* 49, 1431-1437.
- 94 Venyaminov, S. Yu. und Prendergast, F. G. (1997) *Analytical Biochemistry* 248, 234-245.
- 95 Libnau, F. O., Toft, J., Christy, A. A., und Kvalheim, O. M. (1994) *Journal of the American Chemical Society* 116, 8311-8316.
- 96 Nazarova, T. (2001), *Diplomarbeit*, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt.
- 97 Anfinrud, P. A., Han, C., und Hochstrasser, R. M. (1989) *Proceedings of the National Academy of Science* 86, 8387-8391.
- 98 Genberg, L., Heisel, F., McLendon, G., und Dwayne Miller, R. J. (1987) *Journal of Physical Chemistry* 91, 5521-5524.

- 99 Chirgadze, Yu. N., Fedorov, O. V., und Trushina, N. P. (1975) *Biopolymers* 14, 679-694.
- 100 Chirgadze, Yu. N., Brazhnikov, E. V., und Nevskaya, N. A. (1976) *Journal of Molecular Biology* 102, 781-792.
- 101 Appel, P. und Yang, J. T. (1965) *Biochemistry* 4, 1244-1249.
- 102 Chirgadze, Yu. N. und Brazhnikov, E. V. (1974) *Biopolymers* 13, 1701-1712.
- 103 Koichi, I., Foxman, B. M., und Fasman, G. D. (1976) *Biopolymers* 15, 419-455.
- 104 Yang, W. Y. und Gruebele, M. (2003) *Nature* 423, 193-197.
- 105 Yasunaga, T., Sano, T., Takahashi, K., Takenaka, H., und Ito, S. (1973) *Chemistry Letters* 4, 405-408.
- 106 Schwarz, G. und Seelig, J. (1968) *Biopolymers* 6, 1263-1277.
- 107 Snipp, R. L., Miller, W. G., und Nylund, R. E. (1965) *Journal of the American Chemical Society* 87, 3547-3553.
- 108 Sano, T. und Yasunaga, T. (1980) *Biophysical Chemistry* 11, 377-386.
- 109 Grishina, I. B. und Woody, R. W. (1994) *Faraday Discussions* 99, 245-262.
- 110 Guvench, O. und Brooks III, C. L. (2005) *Journal of the American Chemical Society* 127, 4668-4674.
- 111 Huang, R. (2007), *PhThesis*, University of Illinois at Chicago.
- 112 Hauser, K., Krejtschi, C., Huang, R., Wu, L., und Keiderling, T. A. (2007) *in Revision*.
- 113 Bour, P. und Keiderling, T. A. (2005) *Journal of Physical Chemistry B* 109, 5348-5357.
- 114 Kim, J., Huang, R., Kubelka, J., Bour, P., und Keiderling, T. A. (2006) *Journal of Physical Chemistry B* 110, 23590-23602.
- 115 Setnicka, V., Huang, R., Thomas, C. L., Etienne, M. A., Kubelka, J., Hammer, R. P., und Keiderling, T. A. (2005) *Journal of the American Chemical Society* 127, 4992-4993.
- 116 Huang, R., Setnicka, V., Etienne, M. A., Kim, J., Kubelka, J., Hammer, R. P., und Keiderling, T. A. (2007) *Journal of the American Chemical Society* 129, 13592-13603.
- 117 Yang, W. Y., Pitera, J. W., Swope, W. C., und Gruebele, M. (2004) *Journal of Molecular Biology* 336, 241-251.

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei:

Juniorprof. Dr. Karin Hauser

für die Vergabe des interessanten Themas sowie für die hervorragende engagierte Betreuung während meiner gesamten Promotion. Gerade durch die gemeinsamen Diskussionen wurden immer wieder neue Möglichkeiten zur Optimierung der vorhandenen Temperatursprung-Apparatur gefunden. Besonders möchte ich mich für die Initiierung der Kooperation mit Prof. Dr. Timothy A. Keiderling bedanken. Zusätzlich gilt mein Dank für die Unterstützung zur Teilnahme an der „Gordon Research Conference on Vibrational Spectroscopy“ in Biddeford, Maine, USA, die neben der fachlichen Bedeutsamkeit für mich persönlich ein unvergessliches Erlebnis bleibt.

Prof. Dr. Werner Mäntele

für die Unterstützung, Beratung und ergebnisreichen, hilfreichen Diskussionen zu meiner Promotion, aber auch für die Bereitstellung der Arbeitsmittel, besonders der Temperatursprung-Anlage.

Prof. Dr. Timothy A. Keiderling

für die Bereitstellung der  $\beta$ -Hairpin-Peptide, aber auch für die wertvollen, hilfreichen Diskussionen zur Optimierung der Temperatursprung-Apparatur und Interpretation der zeitaufgelösten Ergebnisse.

Mein weiterer Dank gilt der Willkom-Stiftung, durch deren gewährte finanzielle Unterstützung meine Konferenzteilnahme an der „Gordon Research Conference on Vibrational Spectroscopy“ in Biddeford, Maine, USA, ermöglicht wurde.

Weiterhin möchte ich dem gesamten Institut für Biophysik danken und dabei besonders:

- Ernst Winter für seine Unterstützung, die mechanischen hervorragenden Arbeiten und die gemeinsamen Gespräche

- 
- Meinem „Großraumbüro“, mit wechselnder Besetzung, vor allem aber Enela Dzafic und Gabriela Schäfer für die gemeinsamen Diskussionen und Unterstützung
  - Dem „Trio Infernale“ bestehend aus Annette Kopitz, Christian Weidemüller, Jürgen Maurer und unserem Institutswachhund und Spielkameraden Otto
  - Aber auch Georg Wille, dem immer wieder ein Kalauer auf den Lippen lag, Filiz Korkmaz, der ich so manches „wichtige“ deutsche Wort beibringen konnte (Zylinderkopfdichtung)
  - Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wachtveitl, mit deren Zusammenarbeit so manche nützliche Anregung für meine Arbeit entstand. Vor allem Lisa Lorenz, Ute Förster, Nina Gildenhoff, Karsten Neumann, Mirka Verhoefen und Thomas Köhler
  - Allen ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biophysik, vor allem Martin Lenz, für die Laufgemeinschaft und anregenden Diskussionen zum Thema meiner Promotion, Andreas Böhm, Tatiana Nazarova, Petra Hellwig und Martina Wolpert

Am Schluss gilt mein Dank besonders meinen Eltern, meiner Schwester und ihrer Familie und meiner Freundin Katja, die mich während dieser langen Zeit unterstützt und motiviert haben.

---

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Carsten Krejtschi  
Anschrift: Amorsbrunner Str. 7  
63916 Amorbach  
Geburtsdatum: 10. Juli 1976  
Geburtsort: Dresden  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig



### SCHULAU SBILDUNG

09/1983-07/1989 114. Polytechnische Oberschule Dresden  
09/1989-06/1997 Karl-Ernst-Gymnasium Amorbach, Abschluss: Abitur

### GRUNDWEHRDIENST

07/1997-04/1998 Luftwaffensicherungsstaffel Mosbach

### STUDIUM

08/1998-08/2003 Studium der Physik, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Schwerpunkt im Hauptstudium: Biophysik  
06/2002-05/2003 Diplomarbeit am Institut für Biophysik  
Thema: „*Infrarotspektroskopische Untersuchungen zum Mechanismus und zur Dynamik der Faltung und Entfaltung von kleinen Proteinen mit bekannter Struktur*“  
25. August 2003 Abschluss: Diplom Physik  
Abschlussnote: sehr gut  
Seit 09/2003 Promotionsstudium am Institut für Biophysik  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Thema: „*Zeitaufgelöste Infrarot-Messungen zur Untersuchung der Konformationsdynamik von Peptiden mit Laser-induziertem Temperatursprung*“

### BERUFLICHE TÄTIGKEITEN:

04/2001-08/2003 Studentische Hilfskraft am Institut für Biophysik  
Praktikumsbetreuung „Physik für Mediziner“

---

Seit 09/2003

Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Biophysik  
Praktikumsbetreuung „Physik für Mediziner“ und  
„Biophysikalisches Praktikum für Fortgeschrittene“

**AUSZEICHNUNG**

01/2005

Philipp-Siedler-Wissenschaftspreis 2004  
des Physikalischen Vereins Frankfurt am Main

---

## **Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die aus benutzten Werken im Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, mit Quellen- bzw. Herkunftsangaben kenntlich gemacht habe.

Frankfurt am Main, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_