
Strukturdynamik eines photoschaltbaren β -Hairpin Modellpeptids

Tobias Erich Schrader



München 2008

Strukturdynamik eines photoschaltbaren β -Hairpin Modellpeptids

Tobias Erich Schrader

Dissertation
an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Tobias Erich Schrader
aus Kaufbeuren

München, den 10. April 2008

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth
Zweitgutachter: Prof. Dr. Hermann E. Gaub
Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2008

Paradox und Wahrheit unterscheiden sich darin, dass das Erste den Gegenstand mit starkem Licht von einer Seite beleuchtet, die Zweite - mit schwachem Licht von vielen.

ALEKSANDER SWIETOCHOWSKI, in
Bedenke, bevor du denkst, Karl Dedecius (Hrsg.),
Suhrkamp Verlag Frankfurt am Main, 1. Aufl. 1995 [Swi95]

Kurzfassung

In lebenden Organismen spielen Proteine eine wichtige Rolle bei Stoffwechselfvorgängen. Für ihre Funktion ist die dreidimensionale Anordnung der Aminosäurekette von entscheidender Bedeutung. Um die frühen Faltungsprozesse von bestimmten Sekundärstrukturelementen zu analysieren, ist die Verwendung von Modellpeptiden nötig, da hier die Bildung solcher Strukturelemente getrennt beobachtet werden kann. Der Einbau eines optischen Schalters wie Azobenzol in Modellpeptide ermöglicht durch dessen lichtgetriebene cis/trans Isomerisierung eine Auslösung der Faltungsprozesse auf ultrakurzer Zeitskala (< 10 ps). Ein wesentliches Merkmal der Kombination dieses Photoschalters mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode der UV-Anreg-Infrarot-Abtast-Spektroskopie ist die Möglichkeit, Zwischenzustände, sogenannte Intermediate, zeitlich einordnen und mittels ihrer Infrarotspektren Aussagen über ihre Struktur treffen zu können.

Als Modell für das Sekundärstrukturelement des β -Faltblatts dient eine β -Hairpin Struktur. Diese Struktur besteht aus zwei anti-parallelen Aminosäuresträngen, welche durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind. Eine Kehre aus vier Aminosäuren schließt die Stränge auf einer Seite ab. Als photoschaltbares β -Hairpin Modellpeptid wurde im Rahmen dieser Arbeit das AzoTrpZip2 mit der Sequenz H-Ser-Trp-Thr-Trp-Glu-AMPP-Lys-Trp-Thr-Trp-Lys-NH₂ eingesetzt, wobei AMPP eine auf Azobenzol basierende pseudo-Aminosäure bezeichnet. Das Peptid AzoTrpZip2 bildet als cis-Isomer zu 45 % im Lösungsmittel Methanol-d₄ eine β -Hairpin Struktur aus. Das cis-Isomer des AMPPs ersetzt dabei zwei Aminosäuren der Kehre. Das Ensemble an trans-Isomeren des AzoTrpZip2 hingegen besitzt eine deutlich weniger definierte Struktur.

Ausgelöst durch die Isomerisierung des Schalters AMPP beginnt die Entfaltung der β -Hairpin Struktur des AzoTrpZip2 mit einem reißverschlussartig sich fortsetzenden Bruch der schalternahen Wasserstoffbrückenbindungen und der Bildung eines desolvatisierten Zustandes mit einer Zeitkonstante von 4,1 ps. Mit 26 ps entsteht ein weiteres Intermediat, das mit einer Zeitkonstante von 630 ps in einer Klappbewegung mit den Strangmitten als Scharnier in einen Zustand übergeht, der dem Endzustand des trans-Ensemble ähnlich ist. Die Entfaltung ist nach 3 ns also weitgehend abgeschlossen.

Auch bei der Faltungsreaktion erfolgt die Isomerisierung des Photoschalters auf der Pikosekundenzeitskala. Somit ist die zentrale Kehre der β -Hairpin Struktur bereits innerhalb weniger Pikosekunden ausgebildet. Ähnlich wie bei der Entfaltung wird mit einer Zeitkonstante von 4,8 ps ein desolvatisierter Zustand erreicht, der mit einer Zeitkonstante von 64 ps in ein Faltungsintermediat übergeht. Daraus wird mit der Faltungszeitkonstante von 30 μ s die β -Hairpin Struktur gebildet. Die in der Literatur kontrovers diskutierte Frage nach dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt konnte für dieses Modellpeptid geklärt werden: Es ist die korrekte Anordnung der Wasserstoffverbrückung der Stränge und nicht die Ausbildung der Schleife.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	vii
Abbildungsverzeichnis	xiii
Tabellenverzeichnis	xix
1 Die Erforschung der Peptiddynamik und ihre Ziele	1
1.1 Entstehungsgeschichte und Bedeutung von Proteinen	1
1.2 Einige Grundlagen zur Struktur von Peptiden	3
1.3 Modellpeptide zur Untersuchung der Peptiddynamik	6
2 Experimentelle Untersuchungsmethoden der Peptiddynamik	9
2.1 Statische Methoden zur Strukturaufklärung von Proteinen	9
2.1.1 Röntgenstrukturanalyse	10
2.1.2 Neutronenstreuung	10
2.1.3 Kernspinresonanz	10
2.1.4 Circular dichroismus	11
2.1.5 Dauerstrich-Infrarotspektroskopie	11
2.2 Zeitaufgelöste Methoden zur Untersuchung der Peptiddynamik	12
2.2.1 Einzelmolekülansätze	13
2.2.2 Analyse der Breiten von Kernspinresonanzlinien	15
2.2.3 Periodische Störung des Gleichgewichts	16
2.2.4 Anregungsenergie transfer	16
2.2.5 Relaxationsmethoden	17
2.3 Kritische Auseinandersetzung mit den verschiedenen zeitaufgelösten Methoden	22
3 Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie	25
3.1 Anreg-Abtastspektroskopie im mittelinfraroten Spektralbereich	25
3.1.1 Erzeugung der fundamentalen Femtosekundenimpulse bei 808 nm	26
3.1.2 Nichtlineare optische Prozesse zur Erzeugung von Anregungs- und Abtastimpulsen	27
3.1.3 Berechnung des Messsignals	30
3.1.4 Polarisationsaufgelöste Messungen	33
3.1.5 Zeitnullpunktmessung zur Dispersionskorrektur	34
3.2 Laserblitz-Photolyse für Peptiddynamiken im Mikrosekundenbereich . . .	35
3.3 Messung der Peptiddynamik mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie	35

3.3.1	Vorüberlegungen und Dauerstrichcharakterisierung	36
3.3.2	Zeitaufgelöste Messung mit infraroten Abtastimpulsen	40
4	Stationäre Charakterisierung und Eigenschaften des Modellpeptids AzoTrpZip2	45
4.1	β -Hairpin Modellpeptide in der Literatur	45
4.1.1	Definition eines β -Hairpins und seiner Bestandteile	45
4.1.2	Erste Modellpeptide mit β -Hairpin Struktur	47
4.1.3	Photoschaltbare Modellpeptide mit β -Hairpin Struktur	48
4.2	Mit dem photoschaltbaren β -Hairpin Modellpeptid verfolgte Ziele	50
4.3	Synthese und Primärstruktur des photoschaltbaren β -Hairpins AzoTrpZip2	51
4.4	Stationäre Charakterisierung des photoschaltbaren β -Hairpins AzoTrpZip2	54
4.4.1	Charakterisierung mittels Circular dichroismus	54
4.4.2	Charakterisierung mittels Kernspinresonanz	55
4.4.3	Charakterisierung mittels Absorptionsspektroskopie	60
4.4.4	Interpretation des Infrarotspektrums des cis-Isomers des AzoTrpZip2	71
4.5	Spektroskopie des AzoTrpZip2 in Abhängigkeit von der Temperatur	81
4.5.1	Circular dichroismus in Abhängigkeit von der Temperatur	81
4.5.2	Infrarotspektroskopie in Abhängigkeit von der Temperatur	82
5	Peptiddynamik und Faltungsvorgänge im β-Hairpin Modellpeptid AzoTrpZip2	85
5.1	Zeitaufgelöste Untersuchungen der Isomerisierung des Chromophors AMPP	85
5.1.1	Anregung bei 404 nm, Isomerisierung von trans nach cis	86
5.1.2	Anregung bei 404 nm, Isomerisierung von cis nach trans	89
5.1.3	Anregung bei 340 nm, Isomerisierung von trans nach cis	91
5.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der zeitaufgelösten Charakterisierung des Photoschalters AMPP	93
5.2	Entfaltung der β -Hairpin Struktur	95
5.2.1	Überblick über die experimentellen Daten	95
5.2.2	Erwartete Signalbeiträge	96
5.2.3	Experimentelle Beobachtungen im Detail	98
5.2.4	Das Differenzspektrum nach 3,1 ns	103
5.2.5	Zusammenfassung und Interpretation der cis nach trans Reaktion	106
5.3	Untersuchungen zur Faltung der β -Hairpin Struktur	110
5.3.1	Vorgänge auf der Pikosekundenzeitskala	110
5.3.2	Vorgänge auf der Mikrosekundenzeitskala	120
5.3.3	Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse zur Faltung der β -Hairpin Struktur	122
6	Diskussion der experimentellen Ergebnisse	123
6.1	Diskussion des Vergleichs zwischen dem Modellpeptid AzoTrpZip2 und dem Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	123
6.2	Modell der Energielandschaft des AzoTrpZip2	124

6.3	Strukturelle Aussagen über die Berechnung von Infrarotspektren	128
6.3.1	Dichtefunktionaltheoretische Methoden	130
6.3.2	Berechnung von Infrarotspektren mittels Übergangsdipolmomentkopplung	134
6.4	Zusammenfassung und strukturelle Interpretation	143
6.4.1	Entfaltung der β -Hairpin Struktur	144
6.4.2	Faltung der β -Hairpin Struktur	146
6.5	Diskussion zur Literatur über die Peptiddynamik in vergleichbaren Modellpeptiden	148
6.5.1	Entfaltung der β -Hairpin Struktur und Bildung des Ensembles aus trans-Konformeren	148
6.5.2	Faltung der β -Hairpin Struktur	151
6.6	Ausblick	155
6.6.1	Spektral aufgelöste Messungen der Faltungsdynamik des AzoTrpZip2 im ns- und μ s-Bereich	155
6.6.2	Temperaturabhängige Messungen der Faltungsdynamik des AzoTrpZip2	156
6.6.3	Zeitaufgelöste Messung der Tryptophanfluoreszenz	156
6.6.4	Transiente zweidimensionale Infrarotmessungen am AzoTrpZip2 .	158
6.6.5	Vergleich mit einer anderen Auslösemethode für die Peptiddynamik	158
7	Zusammenfassung	159
A	Spektren des Modellpeptids AzoTrpZip2 in schwerem Wasser	163
B	Programmcode zur Berechnung von Infrarotspektren	165
	Literaturverzeichnis	171

Abbildungsverzeichnis

1.1	Synthese von Proteinen in der Zelle	2
1.2	Ausbildung einer Peptidbindung	4
1.3	Mesomere Resonanzstruktur der Peptidbindung	4
1.4	Definition der Dihedralwinkel Φ und Ψ	4
1.5	Struktur und Ramachandran-Plot des Sekundärstrukturelements β - Faltblatt	5
	(a) Struktur eines idealen anti-parallelen β -Faltblatts	5
	(b) Ramachandran-Plot der Winkel Φ und Ψ	5
1.6	Zeitskalen in der Molekülphysik	6
1.7	Aminosäuresequenz des untersuchten β -Hairpins AzoTrpZip2	7
2.1	Typische Circular dichroismusspektren von Sekundärstrukturelementen . .	11
2.2	Struktursensitivität der Infrarotspektroskopie	12
2.3	Normalschwingungen von N-Methylacetamid	13
2.4	Proteindynamik: Experimentelle Methoden und deren Zeitskalen	14
2.5	Die Isomerisierung von Azobenzol als Auslöser für die Peptidfaltung . . .	20
3.1	Übersicht über den experimentellen Aufbau	25
3.2	Laserimpulserzeugung bestehend aus Oszillator und regenerativem Ver- stärker	27
3.3	Strahlengang nach der Erzeugung der fundamentalen Impulse	28
3.4	Spektren der Anregungs- und Abtastimpulse	30
3.5	Polarisation des Anregungsimpulses relativ zum Abtastimpuls	34
3.6	Bestimmung der Zeitauflösung und des Zeitnullpunkts für eine transiente Absorptionsmessung	34
3.7	Laserblitz-Photolyseaufbau	36
3.8	Probenkreislauf für die zeitaufgelösten Messungen	37
	(a) Überblick über den gesamten Probenkreislauf	37
	(b) Seitenansicht der Küvette für die zeitaufgelösten Messungen	37
3.9	Anordnung zur Messung von Infrarotspektren bei kleinsten zur Verfügung stehenden Substanzmengen	38
3.10	Dauerstrich-Küvette	39
3.11	Kupferblock zur Temperierung der Küvetten im Infrarotspektrometer . .	40
4.1	Der β -Hairpin und seine Bestandteile	46
4.2	Vier Beispiele für β -Turns	46
4.3	Die natürlich vorkommende β -Hairpin Struktur aus dem Protein GB1P .	47
4.4	Valenzstrichformel des β -Hairpin Modellpeptids trpzip2	48

4.5	Ein zyklischer, photoschaltbarer β -Hairpin mit einem Stilbenmotiv als Schleifensequenz	49
4.6	Vergleich der Primärstrukturen des photoschaltbaren β -Hairpins AzoTrpZip2 und des Modellpeptids trpzip2 nach Cochran et al.	51
	(a) Aminosäuresequenz des photoschaltbaren β -Hairpins AzoTrpZip2	51
	(b) Aminosäuresequenz des Modellpeptids trpzip2	51
4.7	Aminosäuresequenz des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	52
4.8	Vergleich der Valenzstrichformeln des AzoTrpZip2 und seines Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	53
	(a) Valenzstrichformel des β -Hairpin Modellpeptids AzoTrpZip2	53
	(b) Valenzstrichformel des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	53
4.9	Circulardichroismusspektrum des AzoTrpZip2 in Wasser	54
4.10	Circulardichroismusspektrum des AzoTrpZip2 in Wasser/Methanol Mischungen	55
4.11	Überlagerung der zehn energetisch günstigsten Konformere des cis-AzoTrpZip2	56
4.12	Überlagerung des Peptidrückgrats des energetisch günstigsten Konformers des cis-AzoTrpZip2 mit dem originalen Tryptophanzipperpeptid trpzip2	57
4.13	Überlagerung der zehn energetisch günstigsten Konformere des trans-Isomers des AzoTrpZip2	58
4.14	Vergleich zwischen den Strukturen des trans- und cis-AzoTrpZip2	59
4.15	Überlagerung der drei energetisch günstigsten Konformere des cis-Isomers des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	60
4.16	Absorptionsspektrum des trans-Isomers des β -Hairpin Modellpeptids AzoTrpZip2	61
4.17	Absorptionsspektren im sichtbaren Spektralbereich des AzoTrpZip2 und seines Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂ in Methanol-d ₄	62
	(a) Absorptionsspektren des AzoTrpZip2 in Methanol-d ₄	62
	(b) Absorptionsspektren des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂ in Methanol-d ₄	62
4.18	Lösungsmittelkorrektur der Infrarotabsorptionsspektren	64
4.19	Wasserkorrektur der lösungsmittelkorrigierten Infrarotabsorptionsspektren	66
4.20	Deuterierung des Peptidrückgrats des AzoTrpZip2	67
	(a) Spektrale Änderungen aufgrund der Deuterierung des AzoTrpZip2	67
	(b) Zeitlicher Verlauf der Absorption bei 1550 cm ⁻¹	67
4.21	Vergleich der Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	69
	(a) Absorptions- und Differenzspektrum des AzoTrpZip2	69
	(b) Absorptions- und Differenzspektrum des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	69
4.22	Direkter Vergleich der Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	70
4.23	Spektrale Änderungen nach mehrmonatiger Lagerung des AzoTrpZip2 in Lösung	71

4.24	Analyse des Infrarotspektrums des cis-AzoTrpZip2	72
(a)	Anpassung des Spektrums des cis-AzoTrpZip2 mittels zwei Lorentz- kurven	72
(b)	Fourier-Selbstentfaltung des Spektrums des cis-AzoTrpZip2	72
4.25	Absorptionsspektrum des cis-AzoTrpZip2 und dessen zweite Ableitung .	74
4.26	Infrarotspektren des trpzip2 aus der Literatur	77
(a)	Infrarotspektrum des trpzip2 nach Smith et al. [Smi05]	77
(b)	Infrarotspektrum des trpzip2 nach Yang et al. [Yan04b]	77
4.27	Valenzstrichformeln von wichtigen Untereinheiten des AzoTrpZip2	79
(a)	Valenzstrichformel des Azobenzols	79
(b)	Valenzstrichformel des N-Methylacetamids	79
4.28	Absorptionsspektren des Azobenzols und des N-Methylacetamids in Methanol-d4	79
(a)	Absorptions- und Differenzspektrum des Azobenzols in Methanol-d4	79
(b)	Absorptionsspektrum des N-Methylacetamids in Methanol-d4 und dessen zweite Ableitung	79
4.29	Zusammenstellung von Absorptionsspektren	80
4.30	Circulardichroismussignal des cis-AzoTrpZip2 in der Bande bei 228 nm in Abhängigkeit von der Temperatur	81
4.31	Absorptions- und Differenzspektren des cis- und trans-AzoTrpZip2 in Ab- hängigkeit von der Temperatur	83
(a)	Absorptions- und Differenzspektren des cis-AzoTrpZip2 in Abhän- gigkeit von der Temperatur	83
(b)	Absorptions- und Differenzspektren des trans-AzoTrpZip2 in Ab- hängigkeit von der Temperatur	83
4.32	Absorptionsänderungen des cis-AzoTrpZip2 in Methanol-d4 bei 1675 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Temperatur	84
5.1	Dreidimensionale Darstellung der Absorptionsänderungen des AzoTrp- Zip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂ (trans → cis, $\lambda_{ex.}=404\text{ nm}$)	87
(a)	AzoTrpZip2	87
(b)	Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	87
5.2	Amplitudenspektren aus einer globalen Anpassung der Absorptionsände- rungen des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂ (trans → cis, $\lambda_{ex.}=404\text{ nm}$)	88
(a)	AzoTrpZip2	88
(b)	Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	88
5.3	Dreidimensionale Darstellung der Absorptionsänderungen des AzoTrp- Zip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂ (cis → trans, $\lambda_{ex.}=404\text{ nm}$)	90
(a)	AzoTrpZip2	90
(b)	Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	90

5.4	Amplitudenspektren aus einer globalen Anpassung der Absorptionsänderungen des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂ (cis → trans, $\lambda_{ex.}=404$ nm)	90
	(a) AzoTrpZip2	90
	(b) Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	90
5.5	Dreidimensionale Darstellung der Absorptionsänderungen des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂ (trans → cis, $\lambda_{ex.}=340$ nm)	92
	(a) AzoTrpZip2	92
	(b) Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	92
5.6	Amplitudenspektren aus einer globalen Anpassung der Absorptionsänderungen des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂ (trans → cis, $\lambda_{ex.}=340$ nm)	93
	(a) AzoTrpZip2	93
	(b) Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	93
5.7	Zweidimensionale Darstellungen der Absorptionsänderungen bei Anregung des cis-Isomers bei $\lambda_{ex.}=404$ nm	96
	(a) AzoTrpZip2	96
	(b) Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	96
5.8	Transiente Differenzspektren beim Schalten vom cis- in das trans-Isomer	98
	(a) AzoTrpZip2	98
	(b) Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	98
5.9	Amplitudenspektren beim Konformationswechsel vom cis- in das trans-Isomer	100
	(a) AzoTrpZip2	100
	(b) Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	100
5.10	Cis nach trans Reaktion: Zeitverlauf bei den Frequenzen 1600 cm ⁻¹ , 1628 cm ⁻¹ , 1646 cm ⁻¹ , 1655 cm ⁻¹ und 1688 cm ⁻¹	102
	(a) AzoTrpZip2	102
	(b) Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	102
5.11	Vergleich des transienten Spektrums bei 3,1 ns mit einem temperaturkorrigierten stationären Differenzspektrum zwischen der Absorption des trans- und des cis-Isomer des AzoTrpZip2	104
5.12	Zum Begriff des Intermediats	109
5.13	Zweidimensionale Darstellungen der Absorptionsänderungen bei Anregung des entsprechenden trans-Isomers bei $\lambda_{ex.}=404$ nm	113
	(a) AzoTrpZip2	113
	(b) Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	113
5.14	Transiente Differenzspektren nach Anregung des jeweiligen trans-Isomers	114
	(a) AzoTrpZip2	114
	(b) Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	114
5.15	Amplitudenspektren beim Konformationswechsel vom cis- in das trans-Isomer	116
	(a) AzoTrpZip2	116
	(b) Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	116

5.16	Transienten beim Konformationswechsel vom trans- in das cis-Isomer . . .	118
(a)	AzoTrpZip2	118
(b)	Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	118
5.17	Zeitverlauf der Absorptionsänderungen des trans-AzoTrpZips bei 1641 cm ⁻¹ , einen Zeitbereich von Pikosekunden bis Millisekunden überspannend . . .	120
6.1	Modell der Energielandschaft des AzoTrpZip2	126
6.2	Gegenüberstellung der zeitaufgelösten experimentellen Daten mit Struk- turen aus einer typischen Molekulardynamiksimulation	129
6.3	Vergleich zwischen gemessenen und berechneten spektralen Änderungen aufgrund des Deuterierens des Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	132
(a)	Gemessene Spektren beim Deuterieren des Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	132
(b)	Berechnete Spektren des nicht-deuterierten und des vollständig deu- terierten Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	132
6.4	Lage des Übergangsdipolmoments der Amid-I Bande nach Krimm et al. .	135
6.5	Berücksichtigung des ungefalteten Anteils bei der Berechnung des Infra- rotspektrums des cis-AzoTrpZip2	137
6.6	Vergleich zwischen gemessenen und berechneten Absorptions- und Diffe- renzspektren des AzoTrpZip2	137
(a)	Gemessene Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2 . .	137
(b)	Berechnete Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2, gemittelt über 10 Strukturen	137
6.7	Vergleich zwischen gemessenen und einzelnen gerechneten Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2	139
(a)	Gemessene Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2 . .	139
(b)	Gerechnetes Absorptions- und Differenzspektrum der jeweils ener- getisch günstigsten NMR-Struktur des jeweiligen Isomers des AzoTrpZip2	139
6.8	Vergleich zwischen gemessenem und berechnetem Absorptionsspektrum des cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂	140
(a)	Gemessenes Absorptionsspektrum des cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂ .	140
(b)	Berechnetes Absorptionsspektrum des cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂ .	140
6.9	Zweidimensionale Darstellung der gemessenen und berechneten Daten beim Konformationswechsel vom cis- in das trans-Isomer	141
(a)	AzoTrpZip2, cis nach trans, gemessen	141
(b)	AzoTrpZip2, cis nach trans, berechnet	141
6.10	Bestimmung von Abständen aus sechs MD-Simulationstrajektorien	142
6.11	Überblick über die Faltungs- und Entfaltungsreaktion des β -Hairpin Mo- dellpeptids AzoTrpZip2	144
6.12	Unterschied in der Tryptophanfluoreszenz des trans- und cis-Isomers des AzoTrpZip2	157
A.1	Absorptions- und Differenzspektrum des AzoTrpZip2 in schwerem Wasser	163
(a)	Absorptionsspektren im sichtbaren und ultravioletten Spektralbe- reich des AzoTrpZip2	163

(b) Absorptions- und Differenzspektrum des AzoTrpZip2 im infraroten Spektralbereich 163

Tabellenverzeichnis

4.1	Primärstrukturdaten des AzoTrpZip2 und seiner Referenz- und Vergleichs-peptide	53
4.2	Anpassungsparameter für die Anpassung des Spektrums des cis- und des trans-Isomers des AzoTrpZip2 mittels der Summe aus zwei Lorentzfunk-tionen	73
4.3	Korrelation zwischen Sekundärstrukturelementen und Amid-I Frequenz .	76
4.4	Ergebnisse für die Parameter der Boltzmann-Anpassung des Circular-di-chroismus-Signals der Bande bei 228 nm	82
5.1	Zeitkonstanten der globalen Anpassungen an die gewonnenen Datensätze zur Beobachtung der Isomerisierung des Chromophors AMPP	94
5.2	Zeitkonstanten der globalen Anpassungen im Bereich der Amid-I' Bande bei der Isomerisierung von cis nach trans	106
5.3	Zeitkonstanten der globalen Anpassungen im Bereich der Amid-I' Bande bei der Isomerisierung von trans nach cis	119
6.1	Tabellierte gerechnete Normalmoden des undeuterten trans-Isomers des Referenzpeptids	133

1 Die Erforschung der Peptiddynamik und ihre Ziele

1.1 Entstehungsgeschichte und Bedeutung von Proteinen

Wie das Leben auf unserem Planeten entstand, ist für manche eine religiöse Frage, für andere eine wissenschaftliche Problemstellung und Gegenstand moderner Forschung. Ein häufig diskutiertes Szenario ist die primordiale Ursuppe, in der organische Substanzen wie Zuckerbausteine, Elemente der Erbinformationsmoleküle Desoxyribonukleinsäure (DNS) bzw. Ribonukleinsäure (RNS) und Aminosäuren sowie erste Polypeptidketten vorkommen. Katalysiert durch das ultraviolette Licht der Sonne und durch Lichtblitze von Gewittern fand die Synthese dieser Substanzen vor ca. 3 Milliarden Jahren aus den in der frühen Atmosphäre vorhandenen anorganischen Molekülen Kohlendioxid, Kohlenmonoxid, Stickstoff, Wasser und vielleicht Ammoniak, Methan und Wasserstoff statt [Cre93]. Wegen ihrer Fähigkeit zur Selbstreplikation und katalytischen Aktivität war die RNS am Beginn des sich bildenden Lebens allein vorhanden, woraus sich aber schnell die chemisch stabileren DNS-Moleküle und die Proteine als bessere Katalysatoren entwickelt haben [Mun00].

Eine jüngere Theorie zur Entstehung des Lebens auf der Erde geht von einer heißen, vulkanischen Umgebung aus, in der durch katalytische und zum Teil autokatalytische Prozesse aus Aminosäuren an Oberflächen von Übergangsmetallsulfiden kleine Peptide entstanden [Hub98]. Durch diese Oberflächenprozesse tritt das Hauptproblem der Ursuppentheorie nicht auf, das darin besteht, dass sich die in geringen Mengen gebildeten organischen Substanzen im Ozean stark verdünnen und so nicht für weitere Reaktionen zu komplexeren Molekülen zur Verfügung stehen [Wac07]. Baaske et al. schlagen alternativ dazu zur Lösung dieses Hauptproblems der Ursuppentheorie eine durch einen Temperaturgradienten getriebene Anreicherung von für die Synthese von RNS relevanten Molekülen in Porensystemen vor [Baa07]. In ihren Simulationen fanden sie eine $1,7 \cdot 10^9$ -fache Anreicherung bei einem Temperaturgradienten von 30 K in einem natürlich vorkommenden Porensystem.

Heute kodieren jeweils drei DNS Basen eindeutig eine von 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren, den Monomeren, aus denen die Proteine als Biopolymere aufgebaut sind. Unter der Primärstruktur von Proteinen versteht man die Abfolge der Aminosäuren. Die Sekundärstruktur bezeichnet die räumliche Anordnung nahe benachbarter Aminosäuren. Beispiele für Sekundärstrukturelemente sind die α -Helix, eine wendeltreppenartig gewundene Anordnung, und das β -Faltblatt, bei dem die Aminosäurekette antiparallel gestreckt vorliegt. Die Tertiärstruktur bezeichnet die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente zueinander. Wenn ein Protein aus mehreren Aminosäureket-

ten aufgebaut ist, beschreibt die Quartärstruktur die Anordnung dieser Kettenuntereinheiten untereinander. Im Durchschnitt bestehen Proteine aus ca. 450 Aminosäuren, die durchschnittliche molare Masse liegt bei 50 000 g/mol. Proteine werden in der Zelle von sogenannten Ribosomen synthetisiert [Par03, Moo03] ein Vorgang, der als Translation bezeichnet wird (siehe Abbildung 1.1). Nach ihrer Synthese liegen sie im allgemeinen als ungefaltete Kette von Aminosäuren in Form eines entropischen Knäuels vor [Uve03]. Aufgrund der großen Anzahl an Freiheitsgraden, die eine Aminosäurekette besitzt, würde ihre zufällige Faltung zu funktionierenden Proteinen Jahre dauern. Sie läuft aber in Zellen typischerweise auf Sekundenzeitskala oder deutlich schneller ab (Levinthal'sches Paradox) [Zwa92]. Es müssen deshalb Mechanismen vorliegen, die eine gerichtete Faltung ermöglichen.

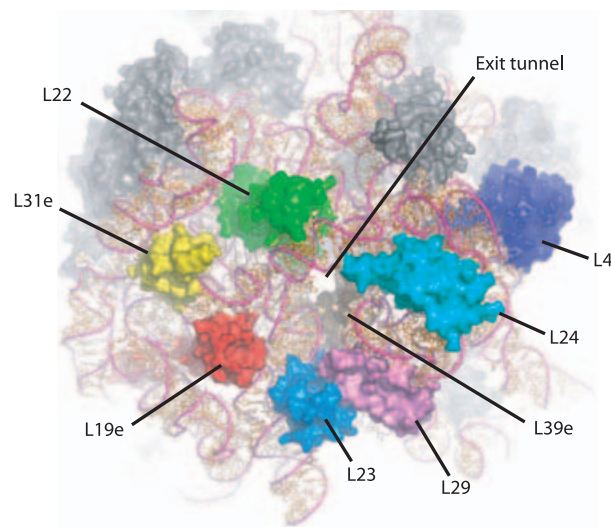


Abbildung 1.1: Durch sogenannte Ribosome werden in der Zelle Proteine synthetisiert. Ribosome bestehen aus einer zentralen rRNA Einheit (im Bild dargestellt durch Bänder und Stäbchen) und unterstützenden Proteinuntereinheiten, die in einer Oberflächenrepräsentation gezeigt sind. In der Mitte des Bildes befindet sich der Ausgangstunnel (Exit tunnel), durch den die neu synthetisierte Peptidkette entweicht. Er wird durch die Peptide L4, L 22 und L 39e gebildet. Die Proteine L 23, L 24, L 19e und L 29 dienen der Auslösung einer Signalkette und der unspezifischen Bindung an Faltungshelferproteine. Bild entnommen aus [Bro05]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Blackwell Publishing, Oxford.

Proteine sind notwendige Bestandteile von tierischen und pflanzlichen Zellen und erledigen dort die wesentlichen Funktionen des Lebens. Unter den vielfältigen Aufgaben der Proteine finden sich neben der enzymatischen Katalyse, dem Transport und der Speicherung von z. B. Sauerstoff, der Bewegung von Muskeln und der mechanischen Stützfunktion auch Aufgaben, bei denen ihre spezifische Wechselwirkung mit anderen Molekülen ausgenutzt wird. Diese Eigenschaft von Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr, wo Proteine als Antikörper Viren und Bakterien erkennen und diese für die Zerstörung markieren [Str91].

In diesem Zusammenhang können kleine Proteine als eine neue Klasse von Medikamenten eine große Bedeutung erlangen. Wegen ihrer intrinsischen Biokompatibilität könnten sie gezielter und vor allem nebenwirkungsfreier in bestimmte Stoffwechselprozesse eingreifen als konventionelle Medikamente. Herkömmliche Medikamente sind im

allgemeinen anorganische oder organische Moleküle mit einer Molmasse von kleiner 1000 g/mol [Aut99], deren Wechselwirkung mit Molekülen im Organismus oft nur schemenhaft verstanden ist. Gelingt es jedoch, kleine Proteine zu entwickeln, die genau in die Bindungstaschen von Enzymen passen und deren Bindungsaffinität fein abgestimmt werden kann, könnte man sehr viel gezielter bei der Medikamentenentwicklung vorgehen. Ein Nachteil dieser neuartigen Medikamente – der Abbau im Verdauungstrakt des Patienten in einzelne Aminosäuren – kann mit verschiedenen Ansätzen behoben werden [Che06].

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Erforschung von Proteinen liegt in deren Rolle bei der Auslösung verschiedener Krankheiten des Menschen wie Creutzfeldt Jakob (CJD), Alzheimer [Har02], Chorea Huntington [Tem03] und Parkinson [Dau03]. Bei Tieren existieren verwandte Krankheiten wie Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) [Agu05] bei Rindern oder etwa die Traberkrankheit (engl.: Scrapie) bei Schafen. Bei all diesen Krankheiten vermutet man falsch gefaltete Proteine als Auslöser. Tragischerweise werden solche falsch gefalteten Proteine nicht immer von Proteasen wieder in ihre Einzelteile zerlegt. Dies führt dazu, dass diese kranken Proteine sich anreichern können. Nach der sogenannten Amyloid Hypothese bilden sich zunächst amyloide β -Strukturen heraus, die für eine Aneinanderlagerung sorgen. Dies führt dann zu stabilen länglichen Eiweißstrukturen wie Fibrillen im Zellinneren oder im Falle von Alzheimer und Parkinson zu sogenannten Lewy-Körpern zwischen den Zellen [Dob03]. Es wird zur Zeit daran geforscht, welche Peptidsequenzen besonders für die Auslösung dieser amyloiden Zwischenzustände verantwortlich sind [EC05, Cru05]. Stanley Prusiner hat für die infektiöse Form von Proteinen den Namen Prionen geprägt [Pru98]. Im Falle von BSE wird intensiv mittels Entfaltungsstudien des natürlich vorkommenden Proteins PrP^C untersucht, wie sich dieses Protein zur infektiösen Form PrP^{Sc} umfaltet und welche Zwischenzustände dabei auftreten [Hos05, Ber01]. Es gibt Hinweise, dass Fragmente des Prion Proteins PrP^C stabile β -Hairpin Strukturen ausbilden, die eine wichtige Rolle bei den entscheidenden Umfaltungsprozessen spielen [Koz01].

1.2 Einige Grundlagen zur Struktur von Peptiden

Mit der Ausnahme von Prolin unterscheiden sich die natürlich vorkommenden Aminosäuren nur in ihren Seitenketten, die kovalent an das sogenannte C _{α} -Atom gebunden sind. In Abbildung 1.2 werden die Seitenketten wie chemische Restgruppen mit R₁ und R₂ bezeichnet. Wegen des Stickstoffatoms (N) in der endständigen protonierten Aminogruppe wird dieses Ende des in Abbildung 1.2 synthetisierten Peptids N-Terminus genannt. Wegen der Carboxygruppe heißt das andere Ende C-Terminus. Der N-Terminus ist bei neutralen pH-Werten positiv, der C-Terminus negativ geladen. Jede Peptidkette hat also einen eindeutigen Richtungssinn. Die Aminosäuresequenz eines Peptids wird in der Literatur immer beginnend mit dem N-Terminus angegeben, wobei entweder ein Drei- oder ein Einbuchstabencode zur Anwendung kommt.

Zur Ausbildung einer Peptidbindung muss Energie aufgewendet werden. Deswegen unterliegt jedes Peptid prinzipiell der Gefahr der Hydrolyse, der Spaltung der Peptidbindung durch Addition von Wasser. Jedoch liegt die Zeitkonstante dieser Spaltung unkata-

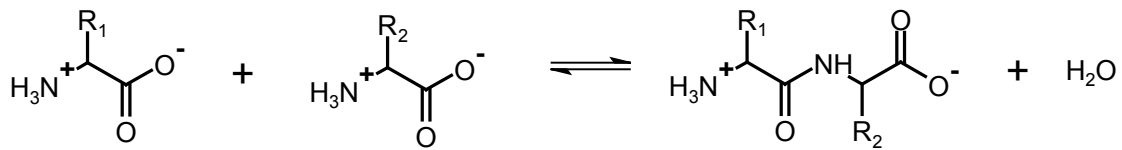


Abbildung 1.2: Ausbildung einer Peptidbindung (hier in Valenzstrichformeldarstellung), wie sie in den Ribosomen katalysiert wird. Bei der Bildung der Peptidbindung wird ein Wassermolekül frei. Der umgekehrte Vorgang der Spaltung einer Peptidbindung heißt Hydrolyse.

lysiert bei 1000 Jahren [Ber02a], so dass die Primärstruktur von Peptiden im allgemeinen als stabil angesehen werden kann. Abbildung 1.3 zeigt zwei mesomere Grenzstrukturen der Peptidbindung. Das hohe Gewicht der mesomeren Grenzformel auf der rechten Seite hat zur Folge, dass die Kohlenstoff-Stickstoff Bindung partiellen Doppelbindungscharakter hat. Sauerstoff- (rot), Kohlenstoff- (schwarz), Stickstoff- (blau) und Wasserstoffatom einer Peptidbindung in einer Aminosäurekette liegen i. a. in einer Ebene (vgl. auch Abb. 1.4). Nur um die Einfachbindungen zum C_α -Atom kann sich das Peptidrückgrat "frei" drehen, wobei die möglichen Winkelbereiche durch sterische Wechselwirkungen eingeschränkt werden. Abbildung 1.4 dient der Definition dieser Dihedralwinkel Φ und Ψ der beiden Einfachbindungen, die dem Peptidrückgrat als Freiheitsgrade zur Verfügung stehen.

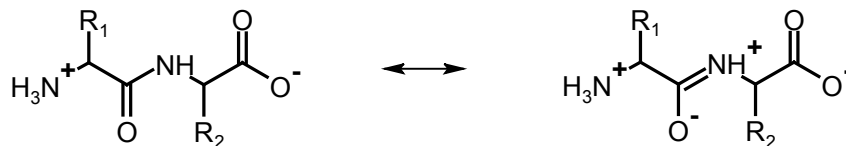


Abbildung 1.3: Mesomere Resonanzstruktur der Peptidbindung. Das relativ hohe statistische Gewicht der zweiten mesomeren Grenzstruktur, welche eine Doppelbindung zwischen dem Stickstoffatom und dem Carbonylkohlenstoffatom aufweist, bedingt die Planarität des Peptidbindungsplättchens. Die Atome O, C, N und H eines Peptidplättchens liegen in einer Ebene [Fis00].

Wie bei jeder ethenartigen Struktur mit vier unterschiedlichen Resten, kann auch bei der Peptidbindung zwischen cis- und trans-Isomeren bezüglich der C-N-Bindung unterschieden werden. Abbildung 1.3 zeigt nur das trans-Isomer, da das cis-Isomer aufgrund sterischer Wechselwirkung eher selten vorkommt.

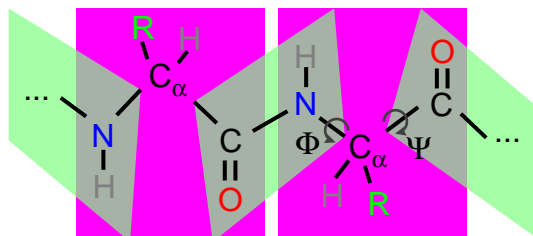


Abbildung 1.4: Definition der Dihedralwinkel Φ und Ψ . Der Dihedralwinkel um die $\text{N}-\text{C}_\alpha$ -Einfachbindung heißt Φ und der um die $\text{C}_\alpha-\text{C}$ -Einfachbindung Ψ . Der Wertebereich liegt in beiden Fällen zwischen -180° und $+180^\circ$. Bild entnommen aus [Sie05].

Die Konfiguration (Abfolge der kovalent gebundenen Atome) eines Peptids ist durch seine Aminosäuresequenz, die Primärstruktur, bestimmt. Die Konformation des Peptidrückgrats ergibt sich eindeutig aus der Angabe aller Winkel Φ und Ψ zwischen den Aminosäuren. Abgesehen von der genauen Form und Lage der Seitenketten, ist damit auch die Sekundärstruktur des Peptids festgelegt.

Greift man beispielhaft das anti-parallele β -Faltblatt als häufiges Sekundärstrukturelement von Proteinen heraus, so zeigt Abbildung 1.5 die Verbindung zwischen Struktur und Winkelverteilung der Dihedralwinkel. Im anti-parallelen β -Faltblatt liegen einander gegenüberliegende Peptidstränge in entgegengesetzter Ausrichtung bezüglich des N- und C-Terminus vor.

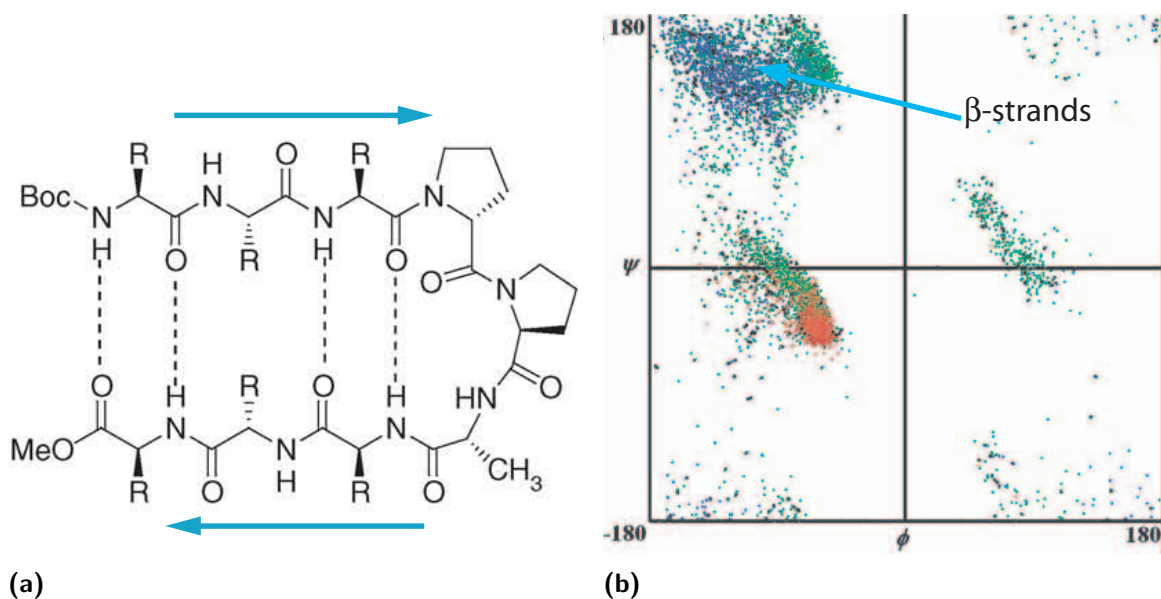


Abbildung 1.5: (a) Beispiel einer Valenzstrichdarstellung eines anti-parallelen β -Faltblatts mit einer Kehre aus drei Aminosäuren. Die gestrichelten Linien deuten Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen an. Die blauen Pfeile geben die Richtung der Aminosäurekette vom N- zum C-Terminus an. Abbildung entnommen aus [Hug06]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Copyright Elsevier (2006). (b) Ramachandran-Plot der Winkel Φ und Ψ von hochaufgelösten Proteinstrukturen (Auflösung besser als 0,1 nm) aus der Proteindatenbank PDB [Ber02b]. Die Farben stehen für die bekannten Sekundärstrukturelemente α -Helix (rot), β -Faltblatt (blau) und für Kehren und andere Strukturen (grün). Die Winkel, die im Ramachandran-Plot nicht vorkommen (weiße Bereiche), sind sterisch und damit energetisch sehr ungünstig und treten deshalb nicht auf. Abbildung entnommen aus [Sim05]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Copyright (2005) National Academy of Sciences, U.S.A.

Stabilisiert wird das anti-parallele β -Faltblatt durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen jeweils einer Aminosäure eines Strangs zu genau einer gegenüberliegenden Aminosäure auf dem anderen, anti-parallelen Strang (siehe Abbildung 1.5(a)). Die Seitenketten zeigen dabei abwechselnd nach oben und nach unten bezüglich der durch die Stränge definierten Ebene. Die Seitenketten einander gegenüberliegender Aminosäuren stehen in die gleiche Richtung, können also miteinander in Wechselwirkung treten.

1.3 Modellpeptide zur Untersuchung der Peptiddynamik

Um die Faltungsprozesse, die zur Ausbildung von Krankheiten führen, verstehen oder Peptide als Medikamente einsetzen zu können, ist ein Verständnis der Relation zwischen der Primärstruktur eines Proteins und seiner räumlichen Struktur unabdingbar. Wichtig sind außerdem die Dynamik der Faltungsprozesse und die dabei auftretenden Zwischenzustände, insbesondere pathogene Intermediate. Abhängig von Größe und Komplexität des Proteins spielt sich seine Faltung zum nativen Zustand auf Zeitskalen von Mikrosekunden bis teilweise Minuten ab. Diese Zeitdauer versteht sich als Spanne zwischen der Synthese der Peptidkette und der Bildung des nativen Zustandes. Es gibt jedoch auch Proteine, bei denen Teile ihrer Peptidkette im ungefalteten Zustand verbleiben oder sich immer wieder umfalten. Bei solchen Proteinen kann keine sinnvolle Faltungszeit definiert werden.

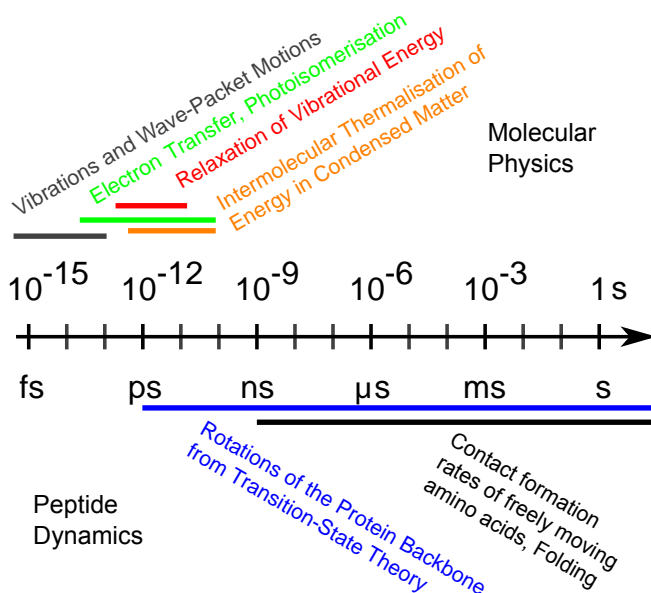


Abbildung 1.6: Zeitskalen in der Molekülphysik und Peptidfaltungsdynamik: In der oberen Hälfte sind typische Vorgänge aus der Molekülphysik zeitlich eingeordnet dargestellt. Die untere Bildhälfte zeigt die Zeitskalen der Peptiddynamik, welche sich über viele Größenordnungen erstreckt [Cre93].

Neben dieser Faltungszeit eines gesamten Proteins ist es auch interessant, die Bildungszeit von Sekundärstrukturelementen wie zum Beispiel einer α -Helix oder eines β -Faltblatts zu kennen, da sie geschwindigkeitsbestimmend für die Faltung des gesamten Proteins sein kann. Um die Dynamik solcher struktureller Untereinheiten untersuchen zu können, muss man zu Modellpeptiden als Untersuchungsgegenstand übergehen. Je kleiner das untersuchte Peptid, desto schneller ist dabei i. a. dessen Dynamik. Der Grund dafür liegt in der bei kleinen Peptiden geringeren trägen Masse, die durch das viskose Lösungsmittel bewegt werden muss, und in der kleineren Anzahl möglicher Konformationen. Abbildung 1.6 gibt einen Überblick über die Zeitskalen molekularer Vorgänge und zeigt, dass sich Peptiddynamik über viele Größenordnungen in der Zeit erstrecken kann. Unter Peptiddynamik sei hier die zeitliche Änderung der Dihedralwinkel Φ und Ψ verstanden. Eine damit verbundene Bewegung der Seitenketten der Aminosäuren werde nicht berücksichtigt.

Unter den beiden wichtigen Sekundärstrukturelementen entfiel ein Großteil der forscherschen Aufmerksamkeit zunächst auf die α -Helix, da alaninreiche Peptide als einfach zu synthetisierende Modellsysteme mit einer großen Tendenz zur Helixbildung zur Verfügung standen [Eat00]. Temperatursprungentfaltungstudien mit Zeitaufösungen im Nanosekundenbereich [Lu97, Vol97] haben mittels des Gleichgewichts zwischen ungefaltetem Zustand und gefalteter Helix Faltungszeiten von einigen 10 ns bestimmt [Wil96, Tho97, Eat98]. Bredenbeck et al. ist es erstmals gelungen, die Bildungsgeschwindigkeit eines photoschaltbaren Modellpeptids einer α -Helix zu 1,2 μ s bei Raumtemperatur zu bestimmen [Bre05b]. Eine Erklärung für die in diesem Fall gemessene längere Faltungszeit könnte in der Tatsache liegen, dass in den Temperatursprungexperimenten das thermische Equilibrium durch den geringen Sprung von typisch 20 K nicht ausreichend gestört wurde, so dass sich beim anschließenden Falten native Wasserstoffbrücken aufgrund von sterisch günstiger Anordnung wieder schnell ausbilden konnten. Die Gruppe um Thomas Kiefhaber hat Kontakttraten frei beweglicher Aminosäureketten gemessen und kam zu einer minimalen Faltungszeit von 20 ns für die Kontaktbildung [Bie99b]. Beat Fierz et al. konnten im Rahmen einer Zusammenarbeit der Gruppen Zinth und Kiefhaber Dynamiken der Schleifenbildung (engl. loop formation) von ungefalteten Peptiden unterschiedlicher Sequenz und Länge über viele Größenordnungen in der Zeit beobachtet werden [Fie07]. War die Ausgangslage der Peptide günstig, konnten Faltungszeiten zwischen 50 ps und 500 ps für eine als barrierefrei angenommene Schleifenbildung nachgewiesen werden. Noch schnellere Peptiddynamiken wurden in zyklischen Peptiden ausgestattet mit einem Azobenzolschalter als Auslöser für die Umfaltung beobachtet [Bre03d]. Hier muss aber auch eine durch diesen Schalter getriebene, beschleunigte Dynamik berücksichtigt werden [Ren06].

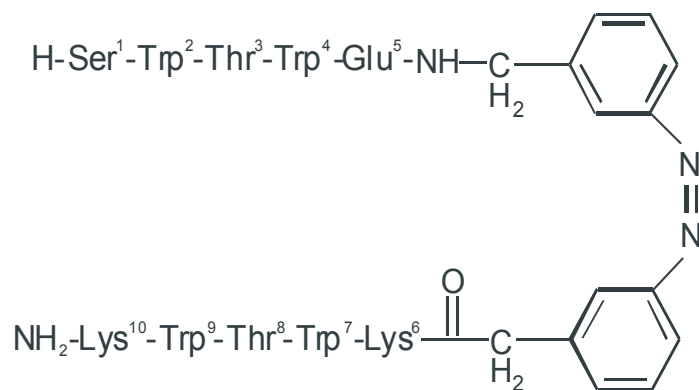


Abbildung 1.7: Aminosäuresequenz des untersuchten β -Hairpins AzoTrpZip2. Rechts ist der Schalter Azobenzol zu sehen, dessen cis/trans-Isomerisierung die Entfaltung/Faltung auslöst.

Während die Faltungsdynamik von α -Helices intensiv untersucht wurde, war bislang die Dynamik der zweiten wichtigen Klasse an Sekundärstrukturelementen, die der β -Faltblätter, der Forschung unzugänglich, da geeignete Modellpeptide fehlten. Das Problem hierbei liegt in der Tatsache, dass β -artige Peptidstrukturen zur Aggregation neigen. Erst Cochran et al. ist es gelungen, ein thermodynamisch besonders stabiles β -Hairpin Modellpeptid zu entwickeln, das sich in ausreichender Konzentration in Wasser löst und dabei als Monomer vorliegt [Coc01]. Ein β -Hairpin kann zum einen als minimales Modellsystem für ein β -Faltblatt angesehen werden und spielt zum anderen als Wendesequenz für die Peptidkette in einem Protein eine eigenständige, wichtige Rolle.

Basierend auf dieser Sequenz gelang es Shou-Liang Dong et al., ein lichtschtbares Modellpeptid herzustellen, bei dem die Struktur eines β -Hairpins für die cis-Konfiguration des Azobenzolschalters realisiert ist. Abbildung 1.7 zeigt die sich ergebende Aminosäuresequenz und die Position des Schaltermoleküls. Im folgenden wird dieses Molekül mit AzoTrpZip2 bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand dieses Modellpeptides zum ersten Mal die Faltungs- und Entfaltungsdynamik einer β -Hairpin Struktur auf ultrakurzer Zeitskala untersucht werden.

2 Experimentelle Untersuchungsmethoden der Peptiddynamik

Analog zu dem Begriff der Peptiddynamik ist die Proteindynamik als Dynamik der Konformationen des Rückgrats der Aminosäurekette eines ganzen Proteins definiert. Sie schließt die Proteinfaltung und -entfaltung als Spezialfälle ein. Die Proteinfaltung ist ein inhärent dynamischer Prozess, bei dem es viele ungefaltete Ausgangszustände und einen definierten, gefalteten Endzustand gibt. Deswegen lassen sich alle experimentellen Methoden zur Untersuchung der Proteinfaltung nach deren Ziel einteilen, entweder einen statischen Zustand zu charakterisieren oder die Dynamik zwischen Ausgangszuständen und Endzustand zu verfolgen.

Häufig wird bei den dynamischen Untersuchungen das einfachste Proteinfaltungsmodell, ein Zwei-Zustands-Modell, zugrunde gelegt [Gru99]. Einer der beiden Zustände ist der gefaltete (F, für engl. folded), der andere der ungefaltete Zustand (D für engl. denatured):



Dabei stehen k_f und k_u für die Raten des Faltens und Entfaltens [Zwa97]. Die Gleichgewichtskonstante $K_{eq.}$ berechnet sich einerseits aus deren Quotient und zum anderen aus dem Verhältnis der Konzentrationen im thermischen Gleichgewicht:

$$K_{eq.} = \frac{k_f}{k_u} = \frac{c(F)}{c(D)} \quad (2.2)$$

Die Gleichgewichtskonstante lässt sich meist leicht bestimmen, indem die Gleichgewichtskonzentrationen $c(F)$ und $c(D)$ gemessen werden. Legt man dieses Modell zugrunde und misst die Gleichgewichtskonstante sowie die Summe aus Entfaltungs- und Faltungsrate k_u z. B. nach thermischer Auslenkung aus dem Gleichgewicht, so kann die Faltungsrate nach Gleichung 2.2 berechnet werden. Komplexere Faltungsmodelle erfordern mehr experimentelle Daten zum Beispiel über Art und Anzahl der Übergangszustände (Intermediate) zwischen gefaltetem und denaturiertem Zustand. Einen guten Überblick über Faltungsmodelle liefern [Gru99, Sat04a, Bre05a].

2.1 Statische Methoden zur Strukturaufklärung von Proteinen

Unter den strukturellen Charakterisierungsmethoden seien hier im weiteren nur diejenigen etwas ausführlicher besprochen, die bei dem in der Einleitung vorgestellten Modellpeptid AzoTrpZip2 zur Anwendung kamen.

2.1.1 Röntgenstrukturanalyse

Die am häufigsten verwendete Methode zur Strukturanalyse eines statischen Proteinzustands, die Röntgenbeugung, setzt voraus, dass sich die zu untersuchenden Proteine kristallisieren lassen [Ber02b, Str68b, Sch07a]. Bei dem weichen β -Hairpin Modellpeptid AzoTrpZip2 ist eine geeignete Kristallisation unwahrscheinlich. Zudem kann die Kristallbildung Einfluss nehmen auf die Struktur der Peptide, so dass die Struktur, die in Lösung vorliegt, nicht mit der im Kristall übereinstimmen muss.

2.1.2 Neutronenstreuung

Wegen ihrer Fähigkeit, Wasserstoffatome sichtbar zu machen, wird die Neutronenstreuung als komplementär zur Röntgenbeugung angesehen, die für Wasserstoff aufgrund dessen geringen Streuquerschnitts blind ist. Aber auch die Strukturanalyse mittels Neutronenstreuung setzt Proteinkristalle voraus, was ihren Einsatz für die vorliegenden Modellpeptide verhindert.

Aus Neutronenstreuung in Lösung kann nur auf den sogenannten Gyrationradius geschlossen werden, der ein Maß für das Volumen ist, das das Protein in Lösung einnimmt [Stu04].

2.1.3 Kernspinresonanz

Saunders et al. berichten über eines der ersten mit der Methode der Kernspinresonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonanz, NMR) aufgenommenen Spektren eines Peptids im Jahre 1957 [Sau57]. Es handelt sich dabei um ein sogenanntes eindimensionales NMR-Spektrum, das bereits Strukturinformationen enthält. Bei Peptiden reichen die Informationen der eindimensionalen NMR-Spektroskopie nicht aus, um auf eine Struktur zu schließen. Hier kommt die zwei- und mehrdimensionale NMR-Spektroskopie zum Einsatz [Wüt86].

Die Vorgehensweise bei der Strukturanalyse eines kleinen Peptids besteht zunächst in der Zuordnung der Banden des eindimensionalen NMR-Spektrums zu Protonen aus den einzelnen Aminosäuren. Über skalare Kopplungen wie der J-Kopplung können dann erste Strukturinformationen entlang der Peptidkette gewonnen werden, die ebenfalls zur Zuordnung der Banden beitragen. Durch die NOESY Impulssequenz erfährt man etwas über die Abstände einzelner Peptidstränge voneinander. Mit diesen Abständen (engl.: restraints) als Randbedingungen wird eine Molekulardynamiksimulation (MD) durchgeführt, wobei die Primärstruktur des Peptids und sinnvolle Bindungslängen und -winkel als Startwerte angenommen werden (engl.: simulated annealing). Die Dihedralwinkel Φ und Ψ des Rückgrats werden in der MD-simulation optimiert, bis sich die Gesamtenergie des Peptids nicht mehr ändert. Die zehn Strukturen mit der niedrigsten Gesamtenergie werden in einer typischen Darstellung überlagert gezeigt. Christian Renner hat für das Molekül AzoTrpZip2 diese Struktur in [Don06] veröffentlicht. Die Stärke der NMR Methode liegt darin, dass die Struktur von Peptiden direkt in Lösung bestimmt werden kann.

2.1.4 Circular dichroismus

Circulardichroismusspektrometer messen die unterschiedliche Absorption von links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht abhängig von dessen Wellenlänge. Angegeben wird häufig nicht die oben erwähnte Absorptionsdifferenz sondern die molare Elliptizität $[\Theta]$, welche mit der Differenz der Extinktionskoeffizienten für links bzw. rechts zirkular polarisiertes Licht $\Delta\varepsilon$ wie folgt zusammenhängt [Joh88]:

$$\Delta\varepsilon = \frac{[\Theta]}{3298} \quad (2.3)$$

Die Einheit von $[\Theta]$ ist dabei $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ oder $\text{deg}\cdot\text{dl}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^{-1}$. Circulardichroismus (CD) Spektren von α -Helices haben ein ausgeprägtes Maximum bei 192 nm und ein Doppelminimum bei 208 und 222 nm. Anti-parallele β -Faltblätter besitzen ein Maximum bei 195 nm und ein Minimum bei 215 nm. Eine ungeordnete Peptidstruktur weist ein Minimum bei 198 nm auf, wie in Abbildung 2.1 gezeigt. Mittels des CD-Spektrums im ultravioletten Spektralbereich kann deshalb zwischen verschiedenen Sekundärstrukturen unterschieden werden. Es gibt vielversprechende Ansätze, CD-Spektren theoretisch zu berechnen und so die Struktur-Spektren-Korrelation zu verbessern [Oak06]. Die Informationen über eine genaue Anordnung der Atome des untersuchten Peptids in Lösung können jedoch nicht gewonnen werden.

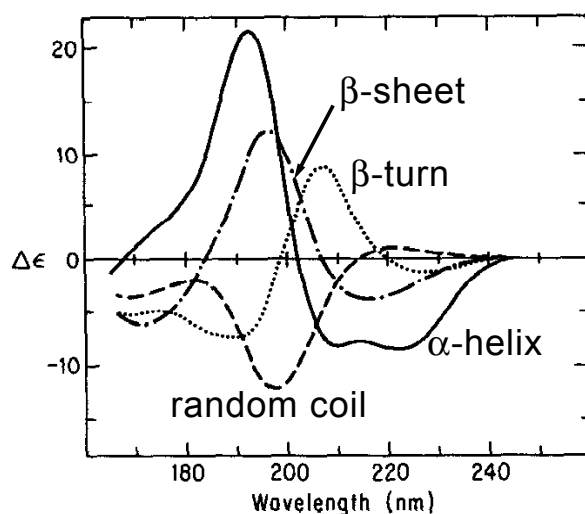


Abbildung 2.1: Typische Circulardichroismusspektren von Sekundärstrukturelementen. Die durchgezogene Linie bezeichnet das CD-Spektrum einer α -Helix, die strichpunktiierte ein solches von einem β -Faltblatt und die gepunktete Linie steht für das CD-Spektrum einer β -Kehre. Die gestrichelte Linie repräsentiert CD-Spektren von zufällig gefalteten Peptiden (engl. random coil). Die Abbildung ist entnommen aus [Joh88]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Copyright 1988 by Annual Reviews (www.annualreviews.org).

Auch im infraroten Spektralbereich kann Circulardichroismus beobachtet werden (engl.: Vibrational Circular Dichroism, VCD). Hieraus können ebenfalls wertvolle Strukturinformationen über Peptide gewonnen werden [Kei02].

2.1.5 Dauerstrich-Infrarotspektroskopie

Abbildung 2.2 zeigt die Abhängigkeit des Infrarotabsorptionsspektrums eines Proteins von seinem Gehalt an unterschiedlichen Sekundärstrukturelementen anhand der Beispiele Porin und Bakteriorhodopsin. Der spektrale Unterschied von 31 cm^{-1} zwischen dem Absorptionsmaximum des α -helikalen Bakteriorhodopsins und dem des Porins, das aus

β -Faltblattstrukturen besteht, lässt sich leicht auflösen. Die Infrarotspektroskopie kann sehr gut zwischen diesen beiden Sekundärstrukturelementen unterscheiden. Zufällig angeordnete Peptidstrukturen haben eine Infrarotabsorption zwischen 1640 und 1648 cm^{-1} [Cre93]. Deren Faltung würde also eine spektrale Verschiebung von mindestens 10 cm^{-1} bedeuten, welche ebenfalls leicht nachweisbar ist.

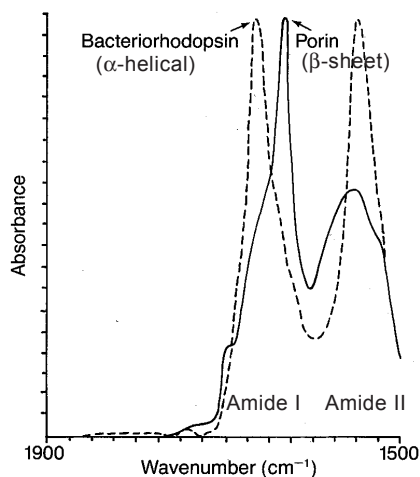


Abbildung 2.2: Infrarotabsorptionsspektren des vorwiegend α -helikalen Bakteriorhodopsins mit einem ausgeprägten Maximum bei 1662 cm^{-1} und des Porins, das hauptsächlich aus β -Faltblatt-Sekundärstrukturelementen besteht und bei 1631 cm^{-1} ein Absorptionsmaximum besitzt. Deutlich sichtbar ist der Unterschied zwischen den beiden Spektren, was die Sensitivität der Infrarotspektroskopie auf die Sekundärstruktur von Proteinen zeigt. Die Abbildung ist entnommen aus [Har92]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Copyright Elsevier (1992).

Der Nachweis der durch die Umfaltungsprozesse verursachten Änderungen im Infrarotspektrum konzentriert sich auf den Bereich der sogenannten Amid-I Schwingung, siehe Abbildung 2.3. Wie Berechnungen am Modellmolekül N-Methylacetamid zeigen, liefert die Streckschwingung der Kohlenstoff-Sauerstoff-Doppelbindung den Hauptbeitrag zu dieser Normalschwingung, die in jeder Peptidbindung einmal auftritt, siehe auch Abbildung 1.2. Tauscht man den am Stickstoff gebundenen Wasserstoff gegen das Isotop Deuterium aus, spricht man von der Amid-I' Schwingung, wobei der kleine Apostroph andeuten soll, dass die Bande frequenzverschoben ist und eine leicht veränderte Bewegungsform besitzt [Kri86]. Die Ursachen für die Struktursensitivität der Amid-I-Bande werden in Kapitel 4.4.4 genauer besprochen.

2.2 Zeitaufgelöste Methoden zur Untersuchung der Peptiddynamik

Da der Aufbau und die Erweiterung einer zeitaufgelösten Messmethode für die Peptiddynamik ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war, seien hier zunächst die verschiedenen in der Literatur vorhandenen methodischen Ansätze bezüglich ihrer Zeitauflösung und ihrer Nähe zum natürlichen Faltungsprozess vorgestellt. Abbildung 2.4 gibt einen Überblick über die Zeitbereiche, die mittels der verschiedensten Messmethoden zugänglich sind. Einige Übersichtsartikel befassen sich mit der Beschreibung verschiedener Methoden zur Messung der Proteindynamik und versuchen die gewonnenen Informationen über bestimmte Modellpeptide zusammenzufügen, um so ein Bild der Proteinfaltung und ihrer initialen Schritte zu entwerfen [Bie99a, Eat00, Rod99, Gre04, Dob04].

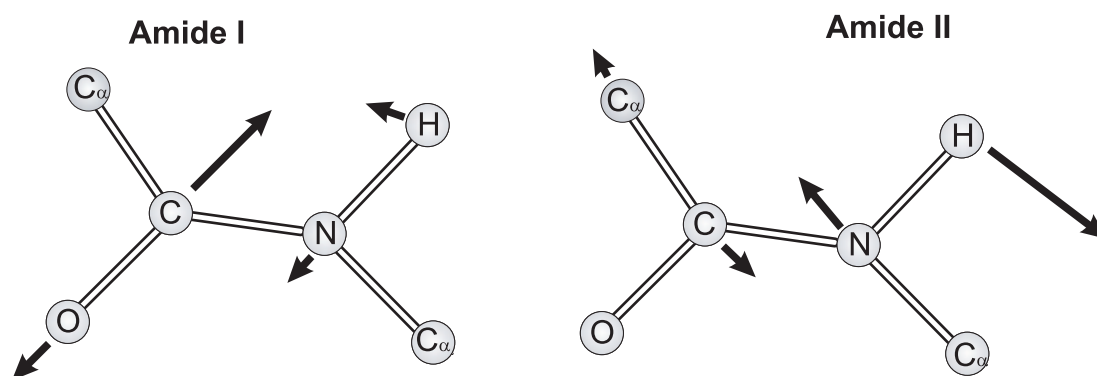


Abbildung 2.3: Normalschwingungen von N-Methylacetamid als Modell für ein Peptidbindungsplättchen (nach [Sch02a, Kri86]). Die Amid-I Schwingung (um 1650 cm^{-1}) besteht hauptsächlich aus einer Streckschwingung des Sauerstoffs (O) zum Kohlenstoff (C) zusammen mit gegenphasigen Anteilen einer Kohlenstoff-Stickstoff (N) Streckschwingung und einer C-C-N Deformation. Ein kleiner Anteil einer N-H Biegeschwingung in der Ebene führt zu einer Verschiebung der Amid-I Bande zu niedrigeren Wellenzahlen, wenn der Wasserstoff gegen Deuterium ausgetauscht wird. Die Amid-II Schwingung (undeutert um 1525 cm^{-1}) setzt sich zusammen aus einer ebenen N-H Biegeschwingung und einer C-N Streckschwingung, die gegenphasig zueinander sind. Wegen des N-H-Anteils dieser Mode verschiebt die Deuterierung die Bande auf ca. 1480 cm^{-1} .

Hier wird eine Einteilung der verschiedenen Messansätze in fünf methodisch unterschiedliche Klassen vorgenommen. Besonderes Augenmerk lag bei dieser Einteilung darauf, auch die Einordnung neuer Verfahren, die bis jetzt noch nicht realisiert wurden, zu ermöglichen.

2.2.1 Einzelmolekülansätze

Einzelmolekülkraftspektroskopie

Eine etwas schwer in dieses Raster einzuordnende, aber durchaus erwähnenswerte Methode ist die Einzelmolekülkraftspektroskopie [Rou04, Sch00]. Typischerweise wird hier ein einzelnes Proteinmolekül zwischen einer Glasoberfläche und einer Blattfeder (engl.: Cantilever) eingespannt, deren Auslenkung in Abhängigkeit ihres Abstandes von der Glasoberfläche als Messgröße dient. Über die Federkonstante der Blattfeder kann aus der Auslenkung auf die Kraft geschlossen werden, die gerade an dem Proteinmolekül anliegt. Arbeiten von Rief et al. haben gezeigt, dass ein Titinmolekül komplett durch Anlegen von Kraft über die Blattfeder entfaltet werden kann. Dabei zeigte sich die aufeinanderfolgende Entfaltung einzelner Titindomänen in einem sägezahnartigen Muster in der Kraft-Ausdehnungskurve. Aus diesen Daten ergab sich ein tieferes Verständnis für die Rolle von Titin bei der passiven Elastizität von Muskeln [Rie97]. Auch einzelne Bakteriorhodopsinmoleküle konnten aus ihrer natürlichen Umgebung, der Purpurchromophore Membran, heraus entfaltet werden, wobei die transmembranen Helices nacheinander einzeln aufgelöst wurden [Oes00, Mul02]. Die Kraftspektroskopie kann zwischen nativem, gefalteten Zustand und einem entfaltetem, ausgedehnten Zustand hin- und herschalten. Somit ist sie keine statische Methode, jedoch weist sie durch hydrodynamische Limitie-

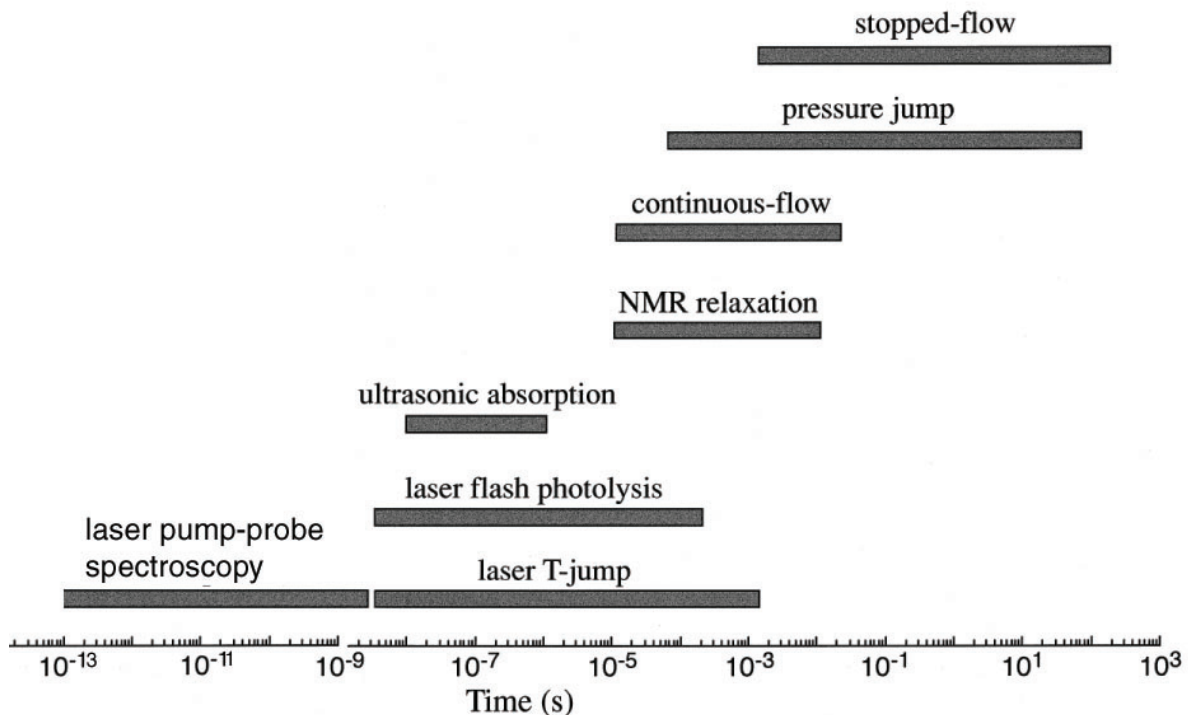


Abbildung 2.4: Zur Untersuchung der Proteindynamik eingesetzte Methoden, sortiert nach deren experimentell zugänglichen Zeitskalen. Die laserbasierte Anreg-/Abtast-Spektroskopie schließt die Lücke hin zu Proteindynamiken auf ultrakurzen Zeitskalen. Bis auf "NMR relaxation" und "ultrasonic absorption" gehören alle dargestellten Methoden zu den Relaxationsmethoden. Sie beruhen also auf einer getrennten Auslösung der Faltung oder Entfaltung eines Proteins und der Detektion seiner Relaxation in das neue Gleichgewicht. Die Abbildung basiert auf [Bie99a]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Walter de Gruyter Scientific Publishers, Berlin und von Prof. Dr. Thomas Kiefhaber.

rungen eine recht geringe Zeitaufösung auf und liefert deswegen kaum Informationen über die Dynamik der Faltung. Dennoch haben Marszalek et al. in einer Studie über Titin Faltungsintermediate identifizieren können [Mar99].

Die Kraftspektroskopie liefert auch wertvolle Aussagen über den Schalter Azobenzol, so wie er in dem β -Hairpin Modellpeptid AzoTrpZip2 eingebaut ist. Thorsten Hugel et al. haben zeigen können, dass ein Polymer aus dem Schalter Azobenzol und den Aminosäuren Glycin und Lysin ab einer angelegten Kraft von 500 pN nicht mehr die für Azobenzol typische trans nach cis Isomerisierung aufweist [Hug02]. Dies gibt eine obere Grenze an, wieviel Kraft der Schalter Azobenzol bei seiner Isomerisierung von trans nach cis auf ein angehängtes Peptid ausüben kann.

Försterresonanzenergietransfer

Beim Försterresonanzenergietransfer (engl. FRET) wird an einer Stelle in einem Protein ein Donorfluoreszenzfarbstoff und an anderer Stelle ein Akzeptorfluoreszenzfarbstoff eingebaut. Licht geeigneter Wellenlänge regt im Fokus eines konfokalen Mikroskops den Donor an. Befindet sich der Akzeptor in ausreichend geringem Abstand zum Donor,

kommt es zum Energietransfer und die Fluoreszenz des Akzeptors wird beobachtet, welche rotverschoben zu der des Donors auftritt. Messgröße ist die sogenannte Förstereffizienz, die als Verhältnis aus der Anzahl der Akzeptorfluoreszenzphotonen normiert auf die Gesamtzahl an Fluoreszenzphotonen gebildet wird. Je näher sich Donor und Akzeptor während des Beobachtungszeitraums (gegeben durch die Diffusion der Probe durch das Beobachtungsvolumen) sind, desto größer ist der aufgezeichnete Wert der Förstereffizienz. Geschieht die Umfaltung eines ungefalteten Proteins auf einer Zeitskala, die größer als der Beobachtungszeitraum ist, führt dies zu einer Verbreiterung der Verteilung der gemessenen Förstereffizienzen. Der Grund dafür liegt darin, dass in diesem Fall durch die Umfaltungsprozesse verschiedene Abstände zwischen Donor und Akzeptor beobachtet werden. Man könnte also für den Grenzfall eines unendlich kurzen Beobachtungszeitraums alle auftretenden Abstände zwischen Null und der gestreckten Länge der Aminosäuresequenz zwischen Donor und Akzeptor messen, hätte also eine sehr breite Verteilung der Förstereffizienzen zwischen 0 % und 100 %. Aus Vergleichen mit einer als stabförmig angenommenen poly-Prolin Sequenz zwischen Donor und Akzeptor konnten Schuler et al. jedoch zeigen, dass sich die Breiten der Verteilungen der Förstereffizienzen für ihr ungefaltetes Protein von den in diesem Fall gemessenen nicht unterscheiden. Sie schlossen daraus, dass sich ihr Protein schnell rekonfiguriert auf einer Zeitskala, die ihrem Beobachtungszeitraum entspricht. Schuler et al. haben so eine obere Schranke von 25 μs für die Rekonfigurationszeit eines ungefalteten Proteins angeben können [Sch02b].

Die Einzelmolekülmethoden haben grundsätzlich das Potential, auch das Falten von Subensembles richtig wiedergeben zu können. Es ist durchaus denkbar, dass es mehrere unterschiedliche Faltungspfade gibt, bei denen verschiedene Intermediate auftreten. Durch über alle Individuen mittelnde Methoden können solche Pfade nicht getrennt wahrgenommen werden. Die Zeitaufauflösung beschränkt sich jedoch bei diesen Methoden auf Angaben von oberen und unteren Schranken für Peptiddynamiken. Auch lässt die notwendige Einführung von Fluoreszenzmarkern eine Beeinflussung der Faltungsgeschwindigkeiten befürchten.

2.2.2 Analyse der Breiten von Kernspinresonanzlinien

Kann von einem Zweizustandsmodell für die Faltung eines Peptids ausgegangen werden, genügen auch Linienbreitenmessungen von austauschverbreiterten NMR-Linien, um auf Faltungszeiten zu schließen [Hua95]. Die spektrale Lage und Breite von NMR-Linien hängen von der Faltungs- und Entfaltungsgeschwindigkeit ab, da während der Aufnahme eines NMR-Spektrums das Peptid beide Zustände einnimmt. Diese Methode ist prinzipiell in einem Zeitbereich von 10 μs bis 10 ms anwendbar. Sie benötigt nur ein starkes äußeres Magnetfeld, um das NMR-Spektrum aufnehmen zu können, welches jedoch die Peptiddynamik potentiell beeinflussen könnte. Als Lösungsmittel kommt häufig deuteriertes Wasser zum Einsatz, das kein störendes NMR-Signal verursacht.

2.2.3 Periodische Störung des Gleichgewichts

In der Methode der Ultraschallabsorptionsspektroskopie fallen Auslösung und Detektion der Störung zusammen [Gru79, Cha96a, Egg73]. Die Ultraschallwelle sorgt durch Druckschwankungen für eine periodische Auslenkung aus dem Gleichgewicht zwischen gefaltetem und ungefaltetem Protein. Wenn die Frequenz der Ultraschallwelle größer als die typische Relaxationsrate des betrachteten Systems ist, kann dieses den induzierten Druck- und Konzentrationsschwankungen nicht mehr folgen und es kommt zu einer Dispersion der Schallgeschwindigkeit und zur Absorption der Schallwelle. Beides kann gemessen werden, um so über die Linearisierung der chemischen Relaxationsgleichungen auf Faltungs- und Entfaltungszeiten zu schließen [Sch68a]. Eine Zeit lang (um 1995) war diese Methode die einzige, welche in den sub- μ s Bereich vordringen konnte und so den Helix-Schleifen-Übergang bei der Entfaltung einer α -Helix messen konnte.

Ein Experiment nach dem gleichen Prinzip, nur mit schnell wechselnden elektrischen Feldern und mit der dielektrischen Relaxation als Messgröße, gelang ebenfalls [Cum75, Sch68b]. Bei beiden Methoden wird jedoch jeweils das Zweizustandsmodell zugrunde gelegt, wenn Zeitkonstanten für das Falten angegeben werden.

2.2.4 Anregungsenergietransfer

Ähnlich wie bei den Einzelmolekülsätzen werden hier frei diffundierende Peptidketten mit einem Donor- und einem Akzeptormolekül markiert, jedoch sind hier die gewählten Konzentrationen der Peptide ungleich höher als im Fall der Einzelmolekülspektroskopie. Ein kurzer Lichtblitz regt das Donormolekül an. Zeitlich aufgelöst wird danach beobachtet, wann im Ensemble die Energie des Donormoleküls auf das Akzeptormolekül übergesprungen ist. In früheren Studien wurde der Singulettenergietransfermechanismus zwischen Donor und Akzeptor angewandt [Bie99a, Haa05], wobei der Nachteil in dem vergleichsweise großen Abstand lag, bei dem es bereits zu einem Energietransfer kommen konnte. Dies hat die Ortsauflösung und damit die Zeitauflösung verschlechtert.

Eine Lösung für dieses Problem liefert der Triplett-Triplett-Energietransfer (TTET) Mechanismus. Der Vorteil vom TTET zur Beobachtung von dynamischen Strukturen beruht auf der Tatsache, dass ein van-der-Waals Kontakt zwischen Donor und Akzeptor nötig ist, um einen Energietransfer zu ermöglichen. Durch die Anwendung dieses Mechanismus konnten Bieri et al. Kontaktraten zwischen Donor und Akzeptor bestimmen in Abhängigkeit von dem Lösungsmittel, der Peptidlänge, und -sequenz [Bie99b].

Lapidus et al. haben als Donor die Seitenkette Tryptophan und als Akzeptor Cystein verwendet, so dass sie auf künstlich eingeführte Moleküle verzichten konnten [Lap00]. Da es jedoch noch parasitäre Lösungsmechanismen (verursacht durch unerwünschte intermolekulare Prozesse oder auch durch Verunreinigungen) für den Triplett des Tryptophans gibt, müssen deren Raten separat bestimmt werden. Die experimentell gemessene Rate muss auf diese Raten korrigiert werden, um auf die Peptiddynamik selbst schließen zu können.

Prinzipiell ist die Zeitauflösung dieser Methode nur durch die Länge der verwendeten Laserimpulse zur Anregung des Donors und zur Abtastung des Akzeptors und durch systemimmanente Zeitkonstanten wie zum Beispiel die Bildungszeit des Triplettzustands

beschränkt. Zeitaufösungen bis in den Nano- und Pikosekundenbereich wurden demonstriert [Fie07]. Zudem kann die Peptiddynamik uneingeschränkt in natürlicher Umgebung studiert werden.

2.2.5 Relaxationsmethoden

Die bei weitem am häufigsten angewendete Methode zur Untersuchung der Peptiddynamik ist die Relaxationsmethode. Hier muss zunächst ein synchronisiertes Auslösen der Faltung oder Entfaltung organisiert werden. Die nachfolgenden Prozesse werden dann mittels einer sinnvoll gewählten Observablen zeitaufgelöst beobachtet [Rod99, Rod04, Vol01]. Dabei können verschiedene Ansätze zum Auslösen der Faltungsprozesse mit unterschiedlichen zeitaufgelösten Detektionsmethoden kombiniert werden, so dass eine Vielzahl von Relaxationsmethoden existieren. Die Zeitauflösung dieser Methoden ergibt sich aus der Zeitauflösung des gewählten Detektionsmechanismus und aus der zeitlichen Präzision in der Synchronisation des Auslösens der Peptiddynamik.

Neben optischen Methoden für die Auslösung der Faltung oder Entfaltung stehen Ansätze zur Verfügung, die jeweils die Umgebungsbedingungen des zu untersuchenden Peptids möglichst schnell ändern. Solche Änderungen können den Druck, die Temperatur oder die Konzentration von Substanzen in der Peptidlösung betreffen. Diese Substanzen können zum Beispiel denaturierend wirken, den pH-Wert der Lösung ändern oder einfach nur die Ionenstärke beeinflussen [Eat00, Bie99a, Sha06]. Denaturierende Chemikalien wie Guanidinium Hydrochlorid (GuHCl) oder Harnstoff besitzen hydrophobe und gleichzeitig hydrophile Anteile, ähnlich wie bei handelsüblichem Spülmittel. In wässriger Lösung lagern sich hydrophobe funktionelle Seitenketten eines Proteins zu einem hydrophoben Kern aneinander. Darauf beruht zum Teil die Strukturstabilität von Proteinen. Die Wirkungsweise der denaturierenden Moleküle liegt darin, sich mit ihrem hydrophoben Ende an die hydrophoben Seitenketten eines Proteins zu binden. Dadurch werden die hydrophoben Wechselwirkungen im Protein abgesättigt und die hydrophilen Enden der denaturierenden Moleküle ragen in die wässrige Lösung hinein. Dadurch wird das Protein im allgemeinen entfaltet.

Zunächst werden die Auslösemethoden besprochen, bei denen sich das Peptid immer im thermodynamischen Gleichgewicht mit seiner Umgebung befindet. Das Auslösen des Faltungs- oder Entfaltungsprozesses besteht lediglich darin, die Umgebungsbedingungen schnell zu ändern und die Geschwindigkeit zu messen, mit der sich das neue Gleichgewicht zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand einstellt. Dabei bleibt das Peptid aber zu jedem Zeitpunkt im thermodynamischen Gleichgewicht mit seiner Lösungsumgebung. Anschließend wird auf optische Auslösemethoden eingegangen, die zu Beginn zu Peptidstrukturen führen, die sich nicht im Gleichgewicht mit der jeweiligen Umgebung befinden.

Auslösemethoden:

- **Durchmischungsverfahren** Um zum Beispiel die Faltung eines Peptids zu studieren, bringt man es zunächst in eine Lösung mit einer denaturierend wirkenden Chemikalie wie zum Beispiel Guanidinium Hydrochlorid (GuHCl). Durch schnelle

Vermischung mit einer neutralen Pufferlösung nimmt die Konzentration von GuHCl stark ab, was dem Peptid die Faltung ermöglicht [Cha97]. Die unvermeidliche Todzeit durch das Durchmischen der Flüssigkeiten versucht man durch spezielle Anordnungen der Mixergeometrien zu minimieren. Turbulente Vermischung hat sich hierbei als eine der schnellsten Methoden erwiesen [Rod04] mit Zeitauflösungen im Bereich von 100 μs . Durch eine hydrodynamische Fokussierung wurde inzwischen bereits eine Durchmischungszeit von unter 10 μs gezeigt [Kni98].

Es gibt drei Betriebsmodi bei den Durchmischungsverfahren. Zum einen wird bei der gestoppten Durchfluss Methode (engl.: stopped flow) nach dem Vermischen der Zustrom von Lösungen unterbrochen, wohingegen zum anderen bei kontinuierlichen Durchflussmethoden (engl.: continuous flow) ein anhaltender Abstrom der vermischten Flüssigkeiten durch eine Kapillare gewährleistet wird. Entlang dieser Kapillaren können mittels Zeilendetektoren gleichzeitig verschiedene Zeitpunkte nach dem Vermischen vermessen werden. Diese historisch früher entwickelte kontinuierliche Durchflussmethode hat den Nachteil, sehr viel Peptidlösung zu verbrauchen, da für eine gewisse Messzeit der Strom in der Kapillaren aufrecht erhalten werden muss. Ein dritter Anwendungsmodus ist das Einfrieren aller weiteren Faltungsschritte (engl.: quenched flow) zu einem definierten Zeitpunkt nach dem Durchmischen. Die weitere Reaktion wird zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Auslösung der Faltung durch geeignete Lösungsmittelbedingungen (z. B. durch hochviskose Lösungsmittel) oder durch schnelles Abkühlen unter den Gefrierpunkt plötzlich unterbrochen, um langsameren Detektionsmethoden wie der Kernspinresonanz eine Strukturanalyse zu erlauben.

- **Drucksprungmethoden** Die meisten Proteine entfalten sich, wenn sie einem Überdruck ausgesetzt werden. Das bedeutet, dass sie ein negatives Reaktionsvolumen besitzen [Jae81]. Dieser Effekt wird in den Drucksprungmethoden ausgenutzt. Jacob et al. beschreiben einen Drucksprungapparat, der mittels Piezokristallstapeln einen Drucksprung von 160 bar in weniger als 100 μs realisieren konnte. Auf der Minutenzeitskala konnten diese Sprünge wiederholt werden, so dass sich die Möglichkeit der Mittelung über viele Sprünge ergab [Jac99].
- **Temperatursprungmethoden** Jeder, der schon einmal ein Hühnerei hart gekocht hat, weiß, dass sich Proteine durch Temperaturerhöhung denaturieren lassen. Ist die Dauer und das Ausmaß der Temperaturerhöhung nicht zu groß, können sich die Proteine wieder in ihre native Form falten. Dies wird bei den Temperatursprungmethoden ausgenutzt. Es gibt jedoch auch den Fall der kalten Denaturierung, bei dem sich das Protein durch Abkühlen unter einen bestimmten Temperaturwert entfaltet. Generell besitzt jedes Protein ein endlich großes Temperaturintervall, in dem es gefaltet vorliegt. Nölting et al. berichten sub-millisekunden Kinetiken in einem kalt denaturierten Protein, dem sie durch einen Temperatursprung mittels Widerstandsheizung das Falten ermöglicht haben [Nol95]. Neuere Verfahren zum Erzeugen eines Temperatursprungs durch elektrische Entladung oder durch Absorption eines ultrakurzen intensiven Laserimpulses ermöglichen

noch höhere Zeitaufösungen bis in den Subnanosekundenbereich, was zugleich zu den optischen Auslösemethoden überleitet.

- **Optische Auslösemethoden, die auf einer Änderung der Umgebungsbedingungen beruhen** Da Lichtimpulse mit Zeitdauern unter einer Pikosekunde technisch machbar sind, haben optische Auslösemethoden das Potential, eine sehr hohe Zeitaufösung zu erzielen. In Analogie zu obigen Auslösemethoden gibt es auch hier Ansätze, die auf eine Veränderung der Lösungsmittelbedingungen abzielen. Zum Beispiel kommen Photosäuren zum Einsatz, die nach optischer Anregung einen Sprung im pH-Wert auslösen, da sie im angeregten Zustand eine andere Säure-Base-Gleichgewichtskonstante (pK_S -Wert) besitzen als im Grundzustand [Vol01]. Optisch angeregte Absorberfarbstoffe hingegen sorgen für einen Temperatursprung in der Lösung [Eat00]. Aber auch die direkte Absorption von nah-infraroten Laserimpulsen durch Obertonbanden von Wasser oder D_2O kann einen Temperatursprung auslösen [Mun97, Du06, Tho97]. Zeitaufösungen von 10 bis 20 ps wurden so bereits realisiert [Cal98]. Ein genereller Nachteil des Temperatursprungs besteht in der Schockwelle, die durch die thermische Ausdehnung des Lösungsmittels erzeugt wird. Die charakteristische Zeitskala, auf der diese Schockwelle auftritt, ist 1 bis $10 \mu s$ [Cal98].
- **Optische Auslösemethoden, die zu Nicht-Gleichgewichtszuständen des Peptids führen** Besondere Glücksfälle für optische Auslösemethoden sind das Cytochrom c und das Myoglobin. Die Faltung von Cytochrom c kann zum Beispiel optisch durch Photodissoziation des darin gebundenen Kohlenmonoxids mit einer Wellenlänge von 532 nm ausgelöst werden, da das Protein ohne Kohlenmonoxid sehr viel stabiler ist [Eat00, Gru99]. Mittels Reduktion durch einen Elektronentransferprozess kann die Faltung des verwandten Cytochrom b_{562} ausgelöst werden [WS99]. Diese Auslösemethoden besitzen im Unterschied zu den vorigen optischen Verfahren das Potential, Nicht-Gleichgewichtszustände als Startstrukturen für die Proteinfaltung zu generieren.

Jedoch besitzen nicht alle Proteine Eigenschaften, die sie von Natur aus für ein optisches Auslösen der Faltung als geeignet erscheinen lassen. Deswegen wurden Moleküle entwickelt, die es erlauben, mittels reversibler Prozesse gezielt das Falten oder Entfalten beliebiger Peptidsequenzen zu studieren. Neben Disulfidbindungsbruch [Lu97, Vol97] und photoinduzierter Dipoländerung [Hua02] spielt hier die Klasse der cis-trans isomerisierenden optischen Schalter eine herausragende Rolle. Sie können in die Peptide eingebaut werden und durch eine Isomerisierung nach Lichtanregung ihre Konformation ändern und somit das angehängte Peptid dazu zwingen, einen anderen Faltungszustand anzunehmen [Ren06]. Abbildung 2.5 zeigt den optischen Schalter Azobenzol, wie er direkt als pseudo-Aminosäure in das Rückgrat eines Modellpeptids eingebaut ist. Ebenso als isomerisierende optische Schalter kommen das Stilben [Erd05] oder Moleküle auf der Basis einer Hemithioindigoeinheit [Cor06] zum Einsatz.

Ein recht reizvoller Ansatz ist die Ausnutzung der cis-trans Isomerisierung der Peptidbindung selbst. Durch Ersetzen des Sauerstoffs in einem Peptidbindungs-

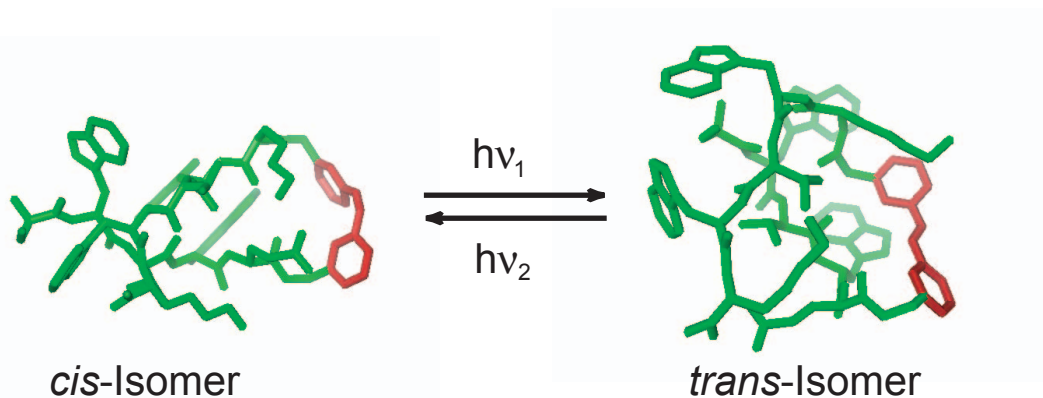


Abbildung 2.5: Der optische Schalter Azobenzol (rot) kann durch seine cis-trans-Isomerisierung für das angehängte Peptid (grün) eine neue konformelle Vorgabe geben, auf die sich das Peptid durch Umfaltung einstellen muss. Diese Umfaltungsprozesse können nach optischer Anregung der Isomerisierung zeitaufgelöst beobachtet werden.

plättchen durch Schwefel kann die trans nach cis Isomerisierung der Peptidbindung mittels Lichtimpulse bei einer Wellenlänge von 266 nm ausgelöst werden [Hel04, Sat05]. Da jetzt das Peptidrückgrat an dieser isomerisierten Stelle stark verändert ist, muss sich das restliche Peptid durch Umfaltung auf diese Störung einstellen.

Detektionsmethoden:

Bei der Wahl geeigneter Observablen für die Peptidfaltung oder -entfaltung steht in erster Linie deren Potential im Vordergrund, Strukturinformation liefern zu können. Zudem spielt die erreichbare Zeitauflösung eine Rolle. Zunächst wird ein Überblick über mögliche Detektionsansätze gegeben, worauf auf die Infrarotspektroskopie als Methode genauer eingegangen wird.

• Überblick über mögliche Detektionsansätze

Detektionsmethoden, die nicht direkt auf Licht beruhen, sind die Elektronenparamagnetische Resonanz (EPR) [Gri00], magnetische Kernresonanz [Zee04, Mok04, Kri04] und auch die Massenspektroskopie, welche die Änderung der Masse des Peptids durch Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium aufgrund von Umfaltungsprozessen in Zeitschritten von Minuten misst [Eyl04]. Unter den oben erwähnten Methoden beinhaltet nur die magnetische Kernresonanz das Potential, nicht nur Abstandsinformationen, sondern auch Strukturinformationen zu liefern. Ihre Zeitauflösung beschränkt sich dabei aber auf einige μs . Es gibt auch Anstrengungen, Elektronenbeugung in der Gasphase als Methode für die Bestimmung der Peptiddynamik zu verwenden [Lin06, Sho05].

Unter den lichtbasierten Detektionsmethoden wird häufig die Fluoreszenz angewendet [Mun97, Str68a, Eng95]. Auch Försterenergietransfer [Tso74] (engl.: FRET), Mössbauer Absorptionsspektroskopie [Par06] und Resonanz Raman Spektroskopie [Tak97] werden erfolgreich eingesetzt.

Die Röntgenstrukturanalyse nach dem Laue-Verfahren erfordert eine erfolgreiche Kristallisation der Proteine. Marius Schmidt et al. haben in solchen Proteinkristallen Zeitaufösungen von unter 10 ns gezeigt [Sch05, Sch04a]. Proteindynamik in Lösung kann mit der Kleinwinkelröntgenstreuung [Lat94] untersucht werden, die jedoch nur eine Abschätzung des Gyrationradius und damit des Volumens des Proteins in Abhängigkeit von der Zeit erlaubt.

Strukturinformation bei Zeitaufösungen von < 100 ps liefern Circular dichroismus [Dar05c, Dar05b, Dar05a] und Infrarotabsorptionsspektroskopie. Neben sehr kleinen Signalen leidet die Methode des Circular dichroismus unter großen Interpretationsproblemen der gemessenen Daten [Che03]. Bei der Infrarotabsorptionsspektroskopie ist die Interpretation der gemessenen Spektren schon weiter fortgeschritten [SS06].

- **Infrarotspektroskopie zur Untersuchung der Peptiddynamik**

Wegen der großen Signaländerungen und deren vergleichsweise einfachen Interpretation wurde die Infrarotspektroskopie in dieser Arbeit als Detektionsmethode gewählt.

Als Auslöser für die Umfaltungsprozesse dient der optische Schalter Azobenzol, der in das Modellpeptid eingeführt wurde. Ein kurzer optischer Anregimpuls (< 1 ps) regt das Schaltermolekül Azobenzol an, woraufhin es mit einer gewissen Quantenausbeute zu einer Isomerisierung, z. B. von cis nach trans, kommt. Daraufhin muss sich das am Schaltermolekül kovalent gebundene Peptid den neuen Gegebenheiten durch Umfaltung anpassen. Zur Detektion durchläuft ein kurzer (< 150 fs) Infrarotabstimpuls das angeregte Probenvolumen mit einer geeigneten zeitlichen Verzögerung, so dass die Umfaltungsprozesse zu diesem Verzögerungszeitpunkt aufgrund dessen Absorption gemessen werden können. Durch Messungen zu vielen verschiedenen Verzögerungszeitpunkten kann so der zeitliche Verlauf der Umfaltung beobachtet werden. Die entsprechende experimentelle Technik wird Anreg-Abtast-Spektroskopie genannt.

Die Kombination aus dem Auslösen der Faltung mittels dem Schaltermolekül Azobenzol mit der Detektion durch infrarote Laserimpulse erlaubt Zeitaufösungen im Pikosekundenbereich und ist nur noch durch die Schaltgeschwindigkeit des Azobenzols begrenzt [Spö01]. Somit steht eine einzigartige Möglichkeit zur Verfügung, einen mit anderen Methoden bislang noch unerreichten Zeitbereich der Peptiddynamik zu erschließen, siehe Abbildung 2.4. Mit dieser Methode wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe um Peter Hamm schon erfolgreich die Faltungsprozesse eines zyklischen Peptids studiert [Bre03d]. Auch die Ausbildung einer α -helikalen Struktur wurde mit dieser Methode untersucht [Bre05b]. Ziel dieser Doktorarbeit war es, diese Methode auf ein β -artiges Modellpeptid anzuwenden.

- **Entwicklungsmöglichkeiten in der zeitaufgelösten Infrarotspektroskopie** Durch Einführung eines weiteren infraroten Anregungsimpulses etwa 1 ps vor dem Abtastimpuls kann sogenannte transiente zwei-dimensionale Infrarotspektroskopie betrieben werden, welche sensitiv auf Kopplungen von Infrarotschwin-

gungen untereinander ist und somit ebenfalls strukturelle Informationen liefert [Wou02, Jon03, Bre03b, Muk06]. Ebenfalls können Photonechotechniken realisiert werden [Muk04, Zan01]. Zusätzlich sind auch mehr als zwei-dimensionale Abtastmethoden denkbar, die Aussagen über die Struktur ermöglichen [Ham06]. Der Phantasie in der Entwicklung immer neuerer und komplexerer Impulsfolgen als strukturell sensitive Detektionsmethoden für die Proteinfaltung sind keine Grenzen gesetzt [Ful04, Zan01].

2.3 Kritische Auseinandersetzung mit den verschiedenen zeitaufgelösten Methoden

An dieser Stelle ist der Überblick über die experimentellen Möglichkeiten und Ansätze zur Untersuchung der Peptiddynamik abgeschlossen. Die verschiedenen Methoden sind durchaus komplementär zueinander. So ist es vorstellbar, bei dem in den Abbildungen 1.7 und 2.5 vorgestellten Modellpeptid die Auslöseverfahren zur Umfaltung zu variieren, um zu testen, ob bei gleicher Detektionsmethode (z. B. über die Infrarotabsorptionsänderung) unterschiedliche Kinetiken auftreten. In Frage kommen hier Durchmischungsverfahren [Fab04] genauso wie Laser-Temperatursprungmethoden [Xu06]. Dabei muss man davon ausgehen, dass bei verschiedenen Auslösemethoden der Umfaltung unterschiedliche Ausgangszustände präpariert werden können. Als Folge davon können auch unterschiedliche Kinetiken auftreten. Dies muss berücksichtigt werden, wenn Beobachtungen aus Experimenten mit unterschiedlichen Auslösemethoden verglichen werden sollen [Win96].

Auch die Variation der Detektionsmethode bei gleicher Methode zum Auslösen der Faltung erscheint interessant. Hier gibt es eine Studie, die verschiedene Sensoren für den Faltungszustand eines Peptids vergleicht [Yan04b, Win04]. Verschiedene Beobachtungsmethoden für die Faltung untersuchen unterschiedliche Elemente der Peptiddynamik (Wasserstoffbrückenbildung, strukturelle Komponenten, etc.). Auf diese Weise kann zum Beispiel entschieden werden, ob sich zuerst Seitenkettenkontakte ausbilden oder die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats an erster Stelle steht.

Die Detektionsmethode mittels Infrarotabsorptionsänderungen in der Amid-I Bande erfordert häufig die Verwendung von deuterierten Lösungsmitteln wie D₂O oder Methanol-d₄, da die undeuterierten Varianten dieser Lösungsmittel eine hohe Absorption im Bereich der Amid-I Bande aufweisen. Dies kann bereits kritisch gesehen werden, da man hier das Medium verlässt, in dem die Peptiddynamik in der Natur abläuft. Das Peptid tauscht in oben genannten deuterierten Lösungsmitteln die Amidprotonen seines Peptidrückgrats gegen Deuteronen aus. Auch in Seitenketten werden bestimmte Wasserstoffatome gegen Deuterium ausgewechselt. Da zum Beispiel die Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen durch die Deuterierung verändert wird, kann durch einen Wechsel des Lösungsmittels die Faltung beeinflusst werden [Fab04].

Die Durchmischungsmethoden bedienen sich häufig der Denaturierung der Peptide mittels spezieller Chemikalien. Dieser denaturierte Zustand dient für viele Experimente als Ausgangspunkt für die Peptidfaltung. Jedoch kommen diese Chemikalien in der

Natur nicht vor. Deswegen ist es zunächst unklar, ob der natürliche Faltungsweg des betrachteten Peptids wirklich von dem durch Chemikalien denaturierten Zustand aus startet. Es gibt nur wenige Studien, die sich mit diesen Fragen eingehend beschäftigen [Mon94].

Jede oben genannte Methode muss sich daran messen lassen, wie nah sie der Faltungssituation des betrachteten Peptids in der Natur kommt. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass auch die natürlichen Bedingungen sich von Zelle zu Zelle unterscheiden, je nachdem, wo der untersuchte Organismus lebt. Eine kanadische Gruppe schlägt als Umgebungs- und Lösungsmittelbedingungen für die kinetische Untersuchung der Peptiddynamik einen pH-Wert von 7 in wässriger Lösung bei einer Temperatur von 25 °C vor. Der Grund für diese Festlegung liegt in der Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der experimentellen Ergebnisse [ZA04]. Generell kann wohl davon ausgegangen werden, dass in einer Zelle die Proteinfaltung in Wasser bei einem pH-Wert von 7 mit einer Salzkonzentration von 150 mM an Kochsalz und einer Konzentration an Makromolekülen stattfindet, die 350 mg/ml übersteigen kann [Dob04]. Jedoch muss für jedes Protein im Prinzip untersucht werden, in welcher natürlichen Umgebung es sich faltet. Erst wenn man diese Bedingungen nachbildet, kann davon ausgegangen werden, dass die natürlichen Faltungspfade eines speziellen Proteins beobachtet werden können. Legt man jedoch den Schwerpunkt auf die frühen Faltungsprozesse, wie in dieser Arbeit angestrebt, so ist es unter Umständen nicht so kritisch notwendig, natürliche Umgebungsbedingungen für die Faltungsdynamik zu gewährleisten. Insbesondere wenn man die Abhängigkeit der Faltungsdynamik von dem gewählten Lösungsmittel zusätzlich untersuchen will, muss man von den natürlichen Bedingungen abweichen.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Anreg-Abtastspektroskopie mit infraroten Abtastimpulsen ist zwar auf deuterierte Lösungsmittel wie D₂O oder Methanol-d₄ angewiesen, besitzt aber zwei wesentliche Vorteile im Vergleich zu anderen Methoden zur Untersuchung der Peptiddynamik:

1. Die Faltungsprozesse beginnen - ausgelöst durch den Schalter Azobenzol - bei Nicht-Gleichgewichtszuständen, die durch andere Auslösemethoden für Peptiddynamik im allgemeinen nicht erreicht werden.
2. Nachdem der Schalter isomerisiert hat, können die schnellsten Elemente der Peptiddynamiken auf der Pikosekundenzeitskala untersucht werden.

3 Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie

Der folgende Abschnitt dient der Darstellung der verwendeten experimentellen Methoden. Er beginnt mit einem Abriss über die Anreg-Abtastspektroskopie im mittelinfraroten Spektralbereich zur Messung von Peptiddynamiken auf der Pikosekundenzeitskala und geht dann auf die Laserblitz-Photolyse ein, die verwendet wurde, um die späteren Prozesse der Peptiddynamik auf der Mikrosekundenzeitskala zu bestimmen. Daran schließt sich ein Kapitel an, das den eigentlichen Messablauf und die begleitende Dauerstrich-Charakterisierung der Peptidproben beschreibt.

3.1 Anreg-Abtastspektroskopie im mittelinfraroten Spektralbereich

In der Anreg-Abtast-Spektroskopie wird mit einem Lichtimpuls die Faltung eines Peptids ausgelöst und mit einem zeitlich dazu verzögerten Abtastimpuls abgefragt. Abbildung 3.1 zeigt einen Überblick über den gewählten experimentellen Aufbau. Ein Lasersystem

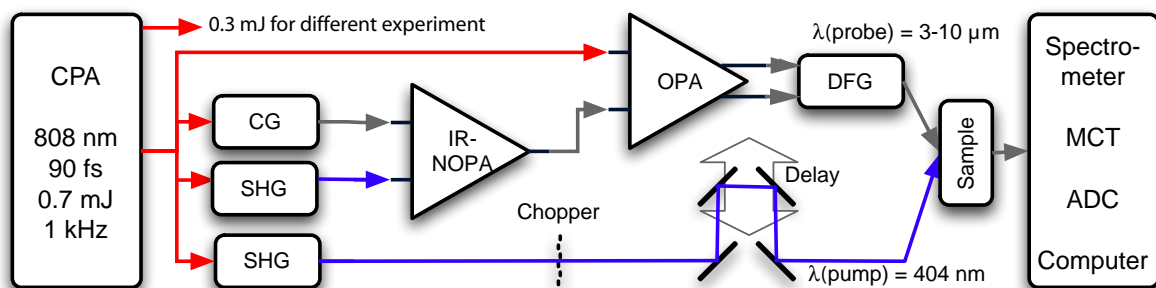


Abbildung 3.1: Übersicht über den experimentellen Aufbau. Links das Femtosekundenlasersystem, das mit einer Repetitionsrate von 1 kHz Lichtimpulse bei 808 nm, der fundamentalen Wellenlänge, mit einer Impulsdauer von 90 fs und einer Energie von 0,7 mJ liefert (rote Linien und Pfeile). Die blauen Linien deuten die verdoppelte Wellenlänge an, also 404 nm. Die grauen Linien stehen für nah- und mittelinfrarote Strahlbündel. Die einzelnen nichtlinearen Prozesse zur Frequenzkonversion des Lichts sind: CG=Weisslichterzeugung (engl.: continuum generation), SHG=Zweite Harmonische Erzeugung (engl.: second harmonic generation), (N)OPA=(nicht-kollinear) optisch parametrischer Verstärker (engl.: non-collinear optical parametric amplifier) und DFG=Differenzfrequenzmischung (engl.: difference frequency generation). Ein Spektrometer dispersiert das mittelinfrarote Abtastlicht auf eine 32-elementige Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektorzeile, engl.: MCT=Mercury-Cadmium-Telluride. Nach einer analogen Vorverstärkung erzeugt ein ladungssensitiver Analog-zu-Digital-Konverter (ADC, engl.: Analog to Digital Converter) aus der integralen Intensität eine rechnerlesbare Zahl mit einer Dynamik von 12 Bit. Bild nach [Sie05].

liefert mit einer Repetitionsrate von 1 kHz Lichtimpulse bei ca. 808 nm (Fundamentale genannt), welche über einen Strahlteiler aufgeteilt werden. Durch Frequenzverdopplung wird aus einem Teil dieser Impulse der Anregimpuls mit einer Wellenlänge von 404 nm

erzeugt. Aus dem anderen Teil des Lichtimpulses entsteht, ebenfalls durch nichtlineare optische Prozesse in Kristallen, der Abtastimpuls im Mittelinfraroten bei ca. $6 \mu\text{m}$ mit einer spektralen Breite von typischerweise $0,5 \mu\text{m}$. Der Weg, den der Anregimpuls relativ zum Abtastimpuls zurücklegt, kann über eine optische Verzögerungsstrecke variabel gewählt werden, so dass sich verschiedene Zeitabstände zwischen Anregung und Abtastung einstellen lassen. Zudem wird im Anregstrahl noch durch einen sogenannten Chopper (engl. für Lichtunterbrecher) jeder zweite Anregimpuls abgeblockt.

Mit geeigneten Linsen oder im infraroten Spektralbereich mittels Paraboloiden werden die beiden Strahlenbündel in eine Durchflussküvette, welche die gelöste Peptidprobe enthält, räumlich überlappend fokussiert. Nach Durchlaufen des Probenvolumens wird das Abtaststrahlenbündel in einem Spektrometer über ein Gitter dispergiert und trifft auf eine 32-elementige Zeile aus Infrarotdetektoren. Die Messung besteht darin, eine geeignete Verzögerungszeit t_D zwischen Anregungs- und Abtastimpuls einzustellen. Zunächst wird mittels eines Abtastimpulses ein Hintergrundspektrum von nicht angeregter Probe aufgenommen. Dabei blockt das Chopperrad den zugehörigen Anregungsimpuls. Darauf regt ein nachfolgender Anregungsimpuls die Probe an und mittels des Abtastimpulses wird ein Spektrum der angeregten Probe aufgenommen. Durch die in Kapitel 3.1.3 dargestellte Berechnung kann daraus ein Spektrum gewonnen werden, das die Absorptionsänderung der Probe ausgelöst durch den Anregungsimpuls darstellt. Durch Variation der eingestellten Verzögerungszeit und Wiederholung der oben aufgeführten Messprozedur kann so die Absorptionsänderung der Probe nach Auslösung der Faltungsprozesse zeitlich und spektral aufgelöst verfolgt werden. Aus den gemessenen Spektren in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit lassen sich über die Struktursensitivität der Infrarotspektroskopie Aussagen machen über die momentane Struktur des gelösten Peptids.

3.1.1 Erzeugung der fundamentalen Femtosekundenimpulse bei 808 nm

Die Laserimpulserzeugung beruht auf dem inzwischen bewährten Prinzip der Verstärkung speziell gestreckter Lichtimpulse und deren nachfolgender Komprimierung, engl.: „chirped pulse amplification“ (CPA), bei der ein Lichtimpuls aus einem Impulszug eines Titan-Saphir-Oszillators erst in einem Expander zeitlich gestreckt wird, damit die Leistungsdichten im nachfolgenden Verstärker nicht zu groß werden und dort die Optiken zerstören [Ché01]. In etwa 15 Umläufen im Resonator eines regenerativen Verstärkers wird dieser Impuls um den Faktor 10^6 auf eine Gesamtenergie von ca. 1 mJ verstärkt und in einem nachfolgenden Kompressor auf ca. 90 fs komprimiert, siehe Schema 3.2. Beim Durchgang durch den Kompressor treten Verluste in Höhe von ca. 30 % auf, so dass insgesamt $700 \mu\text{J}$ an Impulsenergie zur Verfügung stehen.

Die Impulse liegen zentral bei einer Wellenlänge um 808 nm und haben eine Repetitionsrate von 1 kHz bei einem typischen Impuls-zu-Impuls Rauschen von unter 0,3 % einfacher Standardabweichung (gemessen über 640 Impulse). Ca. $400 \mu\text{J}$ davon werden für die Infrarotexperimente verwendet. Die restlichen $300 \mu\text{J}$ stehen für Experimente mit Abtastwellenlängen im sichtbaren Spektralbereich zur Verfügung. Der genaue Strahlen-

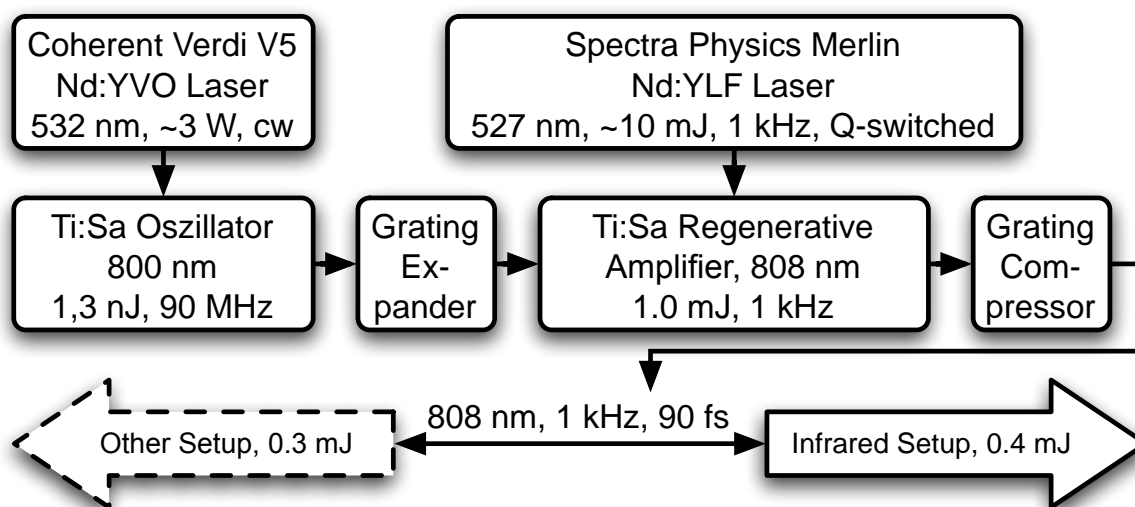


Abbildung 3.2: Überblick über die Erzeugung der fundamentalen Lichtimpulse mit einer Repetitionsrate von 1 kHz, 90 fs Dauer und einer Zentralwellenlänge von 808 nm. In der oberen Zeile sind die beiden kommerziellen Pumpelaser dargestellt. Der Titan-Saphir-Oszillator wird von einem kontinuierlichen Laser Verdi (V5) der Firma Coherent gepumpt. Die Besetzungsinversion des Titan-Saphir Kristalls des regenerativen Verstärkers wird durch einen gütegeschalteten (engl.: Q-switched) gepulsten Laser, Typ Merlin, der Firma Spectra Physics erreicht. Die mittlere Zeile gibt einen schematischen Überblick über das Prinzip der „chirped pulse amplification“. Der Oszillator läuft mit einer Repetitionsrate von 90 MHz. Nach dem Expander, der den Impuls verlängert, wählt eine Pockelszelle mit einer Repetitionsrate von 1 kHz Impulse aus dem Oszillatorimpulszug aus und koppelt diese in den regenerativen Verstärker ein. Dort werden sie millionenfach verstärkt und wieder ausgekoppelt. Ein Gitterkompressor komprimiert den Impuls auf eine Dauer von 90 fs. Der untere Teil zeigt, dass ein Großteil (ca. 400 μJ) der Impulsenergie für das zeitaufgelöste Infrarotexperiment zur Verfügung steht. Bild entnommen aus [Sie05].

gang für Oszillator, Expander, regenerativen Verstärker und Kompressor wird in den Arbeiten [Spö01, Lut01, Hub02] beschrieben.

3.1.2 Nichtlineare optische Prozesse zur Erzeugung von Anregungs- und Abtastimpulsen

Ein Strahlteiler teilt den Laserimpuls in einen Anregungsimpuls und einen Abtastimpuls, wobei auf die Erzeugung des Anregungsimpulses nur ca. 100 μJ entfallen. Durch Frequenzkonversionsprozesse wird zunächst über die Erzeugung der zweiten Harmonischen (engl.: Second harmonic generation, SHG) aus den fundamentalen Lichtimpulsen ein Anregungsimpuls mit einer Zentralwellenlänge von 404 nm erzeugt, siehe dazu auch Abbildung 3.4. Der Anregungsimpuls durchläuft nach seiner Erzeugung eine variable Verzögerungsstrecke, welche die zeitliche Verzögerung zwischen Anregungs- und Abtastimpuls einstellt. Ein 10 cm langer Quarzglasblock sorgt für eine Impulsverlängerung auf ca. 0,7 ps. Bei den verwendeten hohen Anregungsenergie-dichten verhindert eine Verlängerung der Impulse nichtlineare Mehrphotonenprozesse in der Probe oder im Küvettenfenster. Ein nachfolgendes $\lambda/2$ -Plättchen dreht die Polarisation und dient damit

in Kombination mit dem Polarisator zur variablen Einstellung der Anregungsenergie und -polarisation.

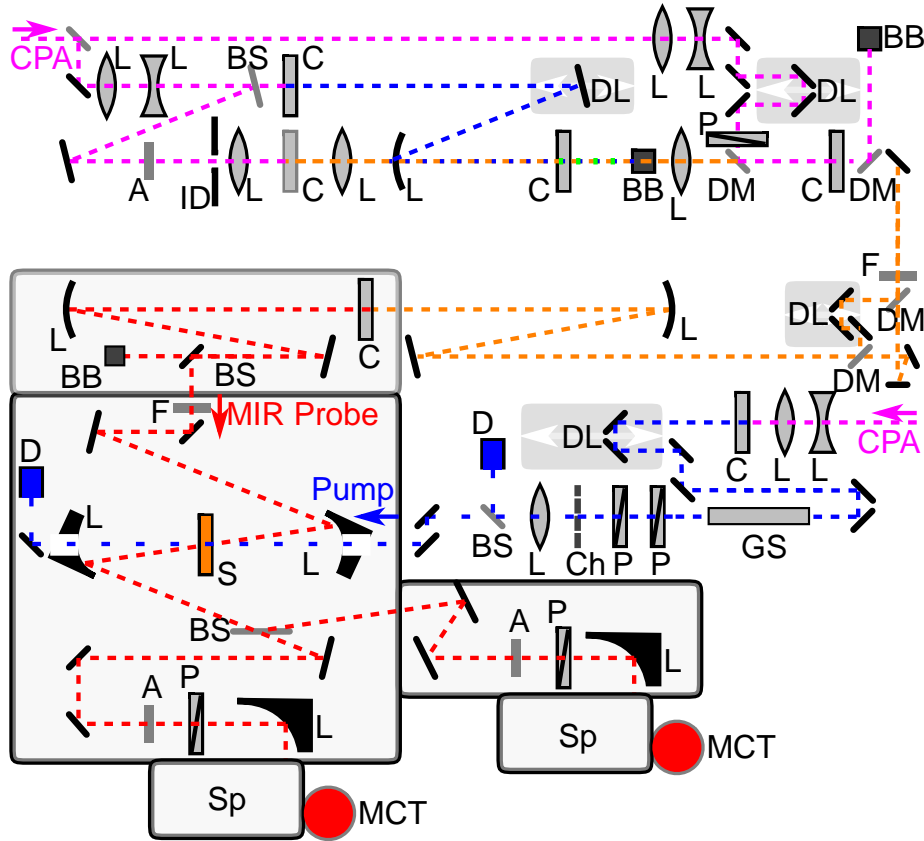


Abbildung 3.3: Von links, vom CPA her, trifft die Fundamentale zur Erzeugung der Abtastimpulse ein. Nach Weißlichterzeugung und Verstärkung dessen Infrarotanteils durch die zweite Harmonische der Fundamentalen in einem NOPA Prozess wird in einem OPA noch einmal die Fundamentale zur stimulierten Differenzfrequenzmischung verwendet. Die entstehenden Nahinfrarotimpulse bei 1400 nm und bei 1800 nm werden in einem Silberthiogalatkristall mittels Differenzfrequenzmischung zur Erzeugung des mittelinfraroten Abtastlichts bei $6 \mu\text{m}$ herangezogen. Ein weiterer Anteil des fundamentalen Impulses aus dem CPA kommt von rechts zur Erzeugung der Anregungsimpulse. Über die Erzeugung der zweiten Harmonischen wird Licht bei 404 nm erhalten, was nach der variablen Verzögerungsstrecke (engl. delay line, DL) zur Einstellung der Verzögerungszeit t_D einen 10 cm langen Glasblock (engl. glass substrate, GS) durchläuft, damit die Impulse auf eine Dauer von ca. 700 fs gestreckt werden. Die weiteren verwendeten Abkürzungen sind im einzelnen: A: Abschwächer, BB: Strahlblock, BS: Strahlteiler, C: Kristall, Ch: Lichtunterbrecher (Chopper), D: Diode, DM: dichroitischer Spiegel, F: Filter, ID: Blende, L: fokussierende Optik, MCT: Detektor, P: Polarisator oder $\lambda/2$ -Plättchen, S: Probe und Sp: Spektrometer. Bild nach [Sie05].

Die Erzeugung der mittelinfraroten Abtastimpulse erfordert vier aufeinanderfolgende nichtlineare optische Prozesse. Sie lehnt sich zum Teil an frühere Aufbauten am Lehrstuhl [Har99] und bei anderen Gruppen an [Kai00, Ham00, Tow03]. Zunächst wird ein kleiner Bruchteil der fundamentalen Impulsenergie von nur $1 \mu\text{J}$ in einen Saphirkristall fokussiert, wodurch über Selbstphasenmodulation und Selbstfokussierung sogenanntes

Weisslicht erzeugt wird, welches eine recht komplexe spektrale Intensitätsverteilung zwischen 480 nm und 1600 nm aufweist [Ree95]. Ein nicht-kollinear optisch parametrischer Verstärkungsprozess (engl. non-collinear optical parametric amplification, NOPA) der durch die zweite Harmonische der fundamentalen Wellenlänge gepumpt wird, verstärkt den infraroten Anteil des Weisslichts [Wil97, Rie00]. Die so entstandenen Impulse haben eine Energie von ca. 400 nJ, eine spektrale Breite von typisch 50 nm FWHM (engl. full width at half maximum) und eine Impulsdauer von 50 fs. Aufgrund der Energieerhaltung bei diesem NOPA Prozess fällt als nicht genutzter Impuls im sichtbaren Spektralbereich der sogenannte IDLER an. Im Gegensatz dazu sei der durch den Prozess verstärkte Impuls SIGNAL genannt. Mit Hilfe eines Faserspektrometers (Ocean Optics) lässt sich die Zentralwellenlänge des IDLER Impulses leicht messen und beim Justieren verfolgen. Dies ist ein Vorteil des NOPAs als erster Verstärkerstufe gegenüber einem mit der Fundamentalen gepumpten kollinearen OPA Prozess, bei dem der IDLER ebenfalls im infraroten Spektralbereich liegt. Durch die nichtkollineare Geometrie lässt sich der IDLER zudem leicht räumlich vom SIGNAL abtrennen. Abhängig von der gewünschten Abtastwellenzahl $\tilde{\nu}_{\text{DFG}}$ zwischen 1000 und 3300 cm^{-1} muss hier eine bestimmte Wellenlänge (oder Wellenzahl $\tilde{\nu}_{\text{NOPA}_{\text{VIS}}}$) eingestellt werden.

$$\tilde{\nu}_{\text{NOPA}_{\text{VIS}}} = 2\tilde{\nu}_{\text{CPA}} - \tilde{\nu}_{\text{NOPA}_{\text{NIR}}} = \frac{3\tilde{\nu}_{\text{CPA}} - \tilde{\nu}_{\text{DFG}}}{2} \quad (3.1)$$

Dabei geht nur noch die aktuelle Wellenzahl $\tilde{\nu}_{\text{CPA}}$ der fundamentalen Wellenlänge ein, die sich ebenfalls leicht mit einem Faserspektrometer messen lässt. Ein Nachteil des NOPAs als erster Verstärkerstufe ist sein hoher Energieverbrauch im Vergleich zu OPA Prozessen, die mit der Fundamentalen gepumpt werden. Da die Energiekonversionseffizienz von der fundamentalen Wellenlänge in die zweite Harmonische nur ca. 30 % beträgt, muss etwa dreimal soviel Impulsenergie der Fundamental-Impulse verwendet werden, um die gleiche Pumpleistung zu erhalten. Ein Vergleich der beiden Konzepte zur Impulserzeugung findet sich in [Hub06].

Der dritte nichtlineare optische Prozess ist ein kollinear optisch parametrischer Verstärkungsprozess, bei dem der nahinfrarote SIGNAL des NOPA-Prozesses als Start-Impuls (engl.: SEED) dient und durch die Fundamentale noch einmal verstärkt wird [Cer03, Ree95]. Als IDLER entsteht dabei ein Lichtimpuls mit einer Wellenlänge um 1800 nm mit einer zum SIGNAL senkrechten Polarisation. Wichtig ist dabei der möglichst parallele Durchgang beider Strahlenbündel (Pumpimpuls und SEED-Impuls) durch den BBO-Kristall. Damit müssen beide Ausgangsstrahlenbündel die gleiche Divergenz aufweisen und kollinear verlaufen. Nur in diesem Fall können SIGNAL und IDLER in einem nachfolgenden Aufbau mit dichroitischen Strahlteilern aufgetrennt und zeitlich wieder korrekt überlappt in den Kristall des vierten nichtlinearen optischen Prozesses, der Differenzfrequenzmischung (engl. difference frequency generation, DFM) fokussiert werden. Bei der Differenzfrequenzmischung entsteht aus den beiden OPA Impulsen ein mittelinfraroter Impuls im Bereich von 5,6 μm und 6,4 μm , siehe auch Abbildung 3.4. Spezielle dielektrische Schichten auf einem nachfolgenden Germaniumsubstrat reflektieren die beiden OPA-Impulse unter einem Winkel von ca. 0° , so dass nur noch der gewünschte mittelinfrarote Impuls als Abtastimpuls transmittiert wird.

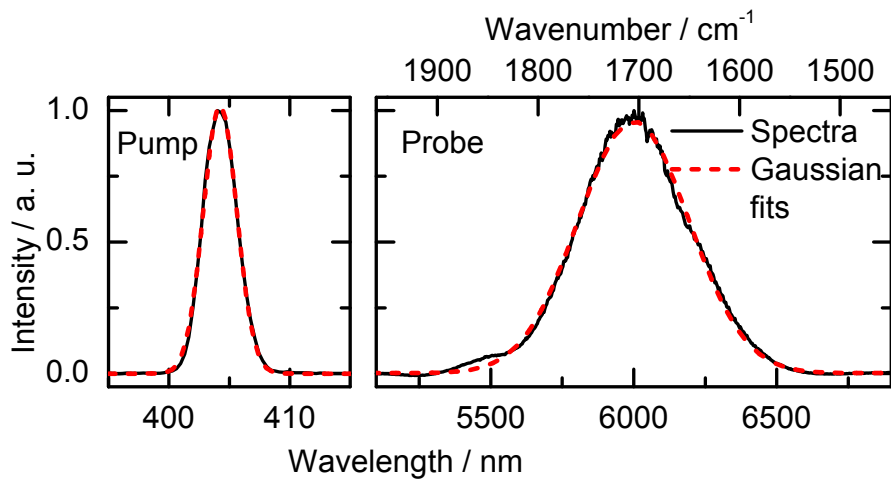


Abbildung 3.4: Der linke Graph zeigt das Anregungsimpulsspektrum zentriert bei 404 nm mit einer Breite von 2,8 nm (FWHM). Rechts ist das Spektrum des Abtastimpulses dargestellt, zentriert bei 6 μm und 460 nm (FWHM) breit. Es ist weder auf die wellenlängenabhängige Transmission des Gitters noch auf die spektral unterschiedliche Empfindlichkeit des Detektorelements korrigiert.

Abbildung 3.4 zeigt das Spektrum eines typischen Abtastimpulses (hier bei 6 μm). Die spektrale Breite von 460 nm bzw. 128 cm^{-1} (FWHM) reicht aus, um die gesamte Amid-I Bande eines typischen Peptids abzudecken.

3.1.3 Berechnung des Messsignals

Ziel der zeitaufgelösten Infrarotspektroskopie ist es, die Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t_D)$ einer Probe erzeugt durch die Absorption eines Anregungsimpulses in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit t_D und Wellenlänge λ zu messen. Typische Signaländerungen aufgrund dieser Absorptionsänderungen liegen im Bereich von unter 0,1 %. Bei einem Impuls-zu-Impuls Rauschen des Abtastlaserimpulses von ca. 0,2 % liegt das Signal-Rauschverhältnis unter 1 und man ist gezwungen, durch Mittelung das Signal statistisch aus dem Rauschen herauszupräparieren.

Dabei wird jeder zweite Anregimpuls durch einen Chopper geblockt. Deswegen trifft jeder zweite Abtastimpuls eine nicht angeregte Probe und liefert ein Infrarotspektrum, das als sogenanntes Hintergrundspektrum dient. Durch geeignete Verrechnung mit dem gemessenen Spektrum mit Anregungsimpuls kann die gewünschte Größe $\Delta A(\lambda, t_D)$ gewonnen werden. Es werden so jeweils N Hintergrundspektren und N Spektren mit angeregter Probe aufgenommen, wobei ein typischer Wert für N etwa 1000 Anregimpulse ist. Dadurch kann eine höhere Messgenauigkeit erzielt werden. Die N Hintergrundspektren und die N Spektren mit angeregter Probe werden getrennt voneinander gemittelt.

Da jedes Detektorelement einen Vorverstärker besitzt, der eine gewisse Sockelspannung auch ohne einfallenden Lichtimpuls liefert, enthalten alle Signale bei der ladungs-sensitiven Digitalisierung einen vom Signal unabhängigen Dunkelstromwert. Dieser Dunkelstromwert wird vor jeder Messung neu ermittelt, indem das Abtastlicht abgeblockt wird und ebenfalls über N Laserimpulse gemittelt wird. Dies geschieht jeweils getrennt

für den Fall mit bzw. ohne Anregung. Dabei entstehen die Werte $\bar{I}_{\text{Dunkelstrom}}^{\text{mit}}(\lambda)$ und $\bar{I}_{\text{Dunkelstrom}}^{\text{ohne}}(\lambda)$, welche nach Gleichung 3.2 bzw. 3.3 berechnet werden.

$$\bar{I}_{\text{Dunkelstrom}}^{\text{mit}}(\lambda) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N I_{\text{Dunkelstrom},j}^{\text{mit}}(\lambda) \quad (3.2)$$

$$\bar{I}_{\text{Dunkelstrom}}^{\text{ohne}}(\lambda) = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N I_{\text{Dunkelstrom},j}^{\text{ohne}}(\lambda) \quad (3.3)$$

$$\bar{I}^{\text{mit}}(\lambda, t_D) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [I_i^{\text{mit}}(\lambda, t_D) - \bar{I}_{\text{Dunkelstrom}}^{\text{mit}}(\lambda)] \quad (3.4)$$

Dabei bezeichnet $\bar{I}_{\text{Dunkelstrom}}^{\text{mit}}(\lambda)$ den über N Schüsse gemittelten Dunkelstrom mit Anregungsimpuls bei der Wellenlänge λ . $\bar{I}^{\text{mit}}(\lambda, t_D)$ entspricht dem gemittelten Intensitätssignal der angeregten Probe bei der entsprechenden Wellenlänge und Verzögerungszeit t_D . Der Zusatz „mit“ bedeutet, dass die entsprechende Größe mit Anregungsimpuls gemessen ist. Durch das Chopperrad wird nach jeder Messung mit Anregungsimpuls eine ohne Anregung durchgeführt, wobei die entsprechenden Messgrößen mit dem Zusatz „ohne“ ermittelt werden. Dabei entstehen die Hintergrundspektren. Diese hängen nicht von der eingestellten Verzögerungszeit ab.

Nach dem Lambert-Beerschen Absorptionsgesetz sind diese Messgrößen verknüpft mit einer Absorption A der Probe und der einfallenden Lichtmenge \bar{I}_0 des Abtastlichts in einem bestimmten Wellenlängenbereich um λ .

$$\bar{I}^{\text{ohne}}(\lambda) = \bar{I}_0 \cdot 10^{-A^{\text{ohne}}(\lambda)} \quad (3.5)$$

$$\bar{I}^{\text{mit}}(\lambda, t_D) = \bar{I}_0 \cdot 10^{-A^{\text{mit}}(\lambda, t_D)} \quad (3.6)$$

Die Absorption ohne Anregungsimpuls A^{ohne} setzt sich aus dem Produkt des Extinktionskoeffizienten ε , der Konzentration c und der Schichtdicke d der gemessenen Probe und des Lösungsmittels zusammen. Durch Absorption von Anregungsphotonen wird ein Teil der Probenmoleküle elektronisch angeregt, und liegt zunächst in einem Zustand vor, der einen anderen Extinktionskoeffizienten aufweist. Um Sättigungseffekte zu vermeiden, werden jedoch nicht alle Probenmoleküle angeregt, sondern nur ein maximaler Anteil von ca. 10 %.

$$A^{\text{ohne}}(\lambda) = \varepsilon_{\text{Probe}}(\lambda)c_{\text{Probe}}d + \varepsilon_{\text{Lösung}}(\lambda)c_{\text{Lösung}}d \quad (3.7)$$

$$\begin{aligned} A^{\text{mit}}(\lambda, t_D) &= \varepsilon_{\text{Probe}}(\lambda)(c_{\text{Probe}} - \sum_i c_{\text{Probe},i}^*(t_D))d + \\ &+ \sum_i \varepsilon_i^*(\lambda, t_D)c_{\text{Probe},i}^*(t_D)d + \varepsilon_{\text{Lösung}}(\lambda)c_{\text{Lösung}}d \end{aligned} \quad (3.8)$$

Die Summation läuft hierbei über eine unbekannt Anzahl von Spezies angeregter Moleküle. Dabei wurde angenommen, dass das Lösungsmittel durch den Anregungsimpuls nicht angeregt wird. Der negative dekadische Logarithmus des Quotienten der bei-

den Größen $\bar{I}^{mit}(\lambda, t_D)$ und $\bar{I}^{ohne}(\lambda)$ liefert einen Wert, der als Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t_D)$ aufgrund des Anregungsimpulses interpretiert werden kann.

$$\begin{aligned} -\log_{10} \frac{\bar{I}^{mit}(\lambda, t_D)}{\bar{I}^{ohne}(\lambda)} &= -\log_{10} \frac{\bar{I}_0 \cdot 10^{-A^{mit}(\lambda, t_D)}}{\bar{I}_0 \cdot 10^{-A^{ohne}(\lambda)}} = -\log_{10} 10^{-(A^{mit}(\lambda, t_D) - A^{ohne}(\lambda))} = \\ &= A^{mit}(\lambda, t_D) - A^{ohne}(\lambda) = \Delta A(\lambda, t_D) \end{aligned} \quad (3.9)$$

Da die Detektionseffizienz des Detektors und die Reflektivität des Spektrometergitters eine teilweise recht komplizierte Abhängigkeit von der Wellenlänge des Abtastlichts besitzen, sind gemessene Größen wie $I_i^{mit}(\lambda, t_D)$ und die davon abgeleiteten gemittelten Größen zunächst nur proportional zur einfallenden Lichtmenge. Durch die Quotientenbildung kürzt sich jedoch der Proportionalitätsfaktor heraus, solange man sich im linearen Bereich des Detektor- und Verstärkersystems befindet [Spö01]. In obiger Berechnung wird zunächst der Mittelwert $\bar{I}^{mit}(\lambda, t_D)$ gebildet und danach wird dividiert. Dies führt im Grenzwert von unendlich vielen Messwerten und nicht vorhandener Anregung zum korrekten Wert von $\Delta A(\lambda, t_D) = 0$. Eine Division der einzelnen Messwertepaare von $I_i^{mit}(\lambda, t_D)$ und $I_i^{ohne}(\lambda)$ und nachfolgende Quotientenbildung konvergiert im allgemeinen Fall nicht immer gegen den korrekten Wert [Ham94].

Die zum Teil komplexen spektralen Veränderungen in der Amid-I Bande erfordern eine hohe spektrale Auflösung von ca. 2 cm^{-1} , so dass mit einer 32-elementigen Detektorzeile nur etwa ein Drittel des gewünschten spektralen Ausschnitts gleichzeitig gemessen werden kann. Mit einem spektralen Überlapp von 6 Kanälen können drei Messungen mit unterschiedlichen Zentralwellenlängen z. B. bei 5758 nm, 6024 nm und 6290 nm durchgeführt werden, ohne das Spektrum des Abtastimpulses verändern zu müssen. Die drei entstehenden Datensätze lassen sich gut zusammenfügen und weisen an den Überlappregionen nur Unterschiede im Rahmen des zu erwartenden Rauschens, jedoch keine zusätzlichen systematischen Fehler auf.

Pro Wellenlängenbereich werden typischerweise über einen Verzögerungszeitbereich von -8 ps bis 3100 ps 140 Messpunkte gewählt. Pro Datenpunkt wird über 1000 Anregungslaserimpulse gemittelt. Dies nimmt aufgrund des alternierenden Abblendens der Abtastlaserimpulse 2 Sekunden Messzeit in Anspruch. Der endgültige Datensatz für einen Wellenlängenbereich setzt sich aus der Mittelung über ein fünfmaliges Durchfahren der Verzögerungsstrecke zusammen. Nach diesem Mittelungsprozess entfällt auf einen Datenpunkt eine Gesamtmesszeit von 10 Sekunden.

Obige Berechnung der Absorptionsänderung geht davon aus, dass sich die Photonenanzahl im Abtastimpuls \bar{I}_0 von einem Impuls zum anderen nicht wesentlich ändert. Mit anderen Worten muss die Korrelation zwischen aufeinanderfolgenden Impulsen groß und positiv sein. Im vorliegenden Fall liegt sie bei ca. 0,5 für aufeinanderfolgende Laserimpulse der fundamentalen Wellenlänge bei 808 nm. Laserintensitätsschwankungen auf längeren Zeitskalen werden deshalb mittels des angegebenen Verfahrens durch den Chopper sehr gut kompensiert.

Eine weitere Möglichkeit, Korrelationen auszunutzen, ist die Messung mit einem Referenzdetektor. Dabei wird ein Teil des Abtastlichts vor der Probe abgespalten und durch einen nicht angeregten Teil der Probe geschickt. Der weitere Strahlengang sollte so ähnlich wie möglich zu dem Strahlengang des Signallichts sein. Wenn das elektronische Rau-

schen der Vorverstärker, der Detektorelemente und der Analog-Digital-Wandlereinheit gering ausfällt gegen das Impuls-zu-Impuls Rauschen des Abtastlichtimpulses, kann eine hohe Korrelation zwischen den Impulsen auf dem Referenz- und Signaldetektor erreicht werden. Diese Korrelation kann nun genutzt werden, um mittels des Referenzdetektors das Signal auf dem Signaldetektor auf die Schwankungen von einem Impuls zum nächsten zu korrigieren.

Durch das vergleichsweise große elektronische Rauschen der kommerziellen Vorverstärker der Quecksilber-Cadmium-Tellurid Detektorzeilen war jedoch eine ausreichend hohe Korrelation nicht erreichbar, so dass die zweite Detektorzeile nicht zu Referenzzwecken sondern für eine polarisationsaufgelöste Detektion eingesetzt wurde. Dabei werden beide Abtastpolarisationen (parallel und senkrecht zur Polarisation des Anregimpulses) gleichzeitig gemessen.

3.1.4 Polarisationsaufgelöste Messungen

Bei den gemessenen Molekülen in Lösung ist die typische Rotationszeitkonstante viel größer als die Dauer des Anregungsimpulses. Dies führt zur bevorzugten Anregung einer Untermenge von Molekülen in Lösung, bei denen die momentane Lage ihres Übergangsdipolmoments zur Zeit der Anregung günstig zur Polarisation des Anregungslichts liegt. Durch die Rotation dieser Moleküle in Lösung wird das Abtastsignal abhängig von der Polarisation des Abtastlichts. Um diesen Effekt zu vermeiden, kann die Polarisation des Anregungslichts in Relation zum Abtastlicht im magischen Winkel von 54° gewählt werden [Lak06]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der gleichzeitigen Messung beider Abtastpolarisationen senkrecht und parallel zur Polarisation des Anregungsimpulses. Dies ermöglicht einerseits eine Berechnung des Signals im magischen Winkel und zusätzlich die der Anisotropie. Zu diesem Zweck wird ein Winkel von 45° zwischen der Polarisation beider Impulse vor deren Durchgang durch die Probe eingestellt, wie in Abbildung 3.5 illustriert. Nach dem Durchgang durch die Probe wird der Abtaststrahl in zwei Strahlenbündel aufgeteilt und beide Polarisationen relativ zum Anregungsimpuls werden in verschiedenen Detektoren gleichzeitig gemessen.

Aus den beiden Datensätzen, dem für parallele Polarisation des Abtaststrahlenbündels relativ zum Anregungsbündels ΔA^{\parallel} und dem für die entsprechende senkrechte Polarisation ΔA^{\perp} , lässt sich mit folgender Formel der Datensatz ΔA^{mag} für den magischen Winkel errechnen:

$$\Delta A^{mag} = \frac{\Delta A^{\parallel} + 2\Delta A^{\perp}}{3} \quad (3.10)$$

Zusätzlich kann die sogenannte Anisotropie r bestimmt werden:

$$r = \frac{\Delta A^{\parallel} - \Delta A^{\perp}}{3\Delta A^{mag}} \quad (3.11)$$

Der Vorteil der gleichzeitigen Messung des parallelen sowie senkrechten Datensatzes liegt darin, dass das Rauschen in beiden Polarisationen gut korreliert ist und damit eine hohe Datenqualität für die Anisotropie zu erwarten ist.

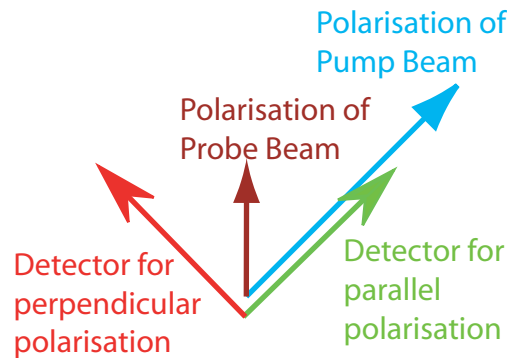


Abbildung 3.5: Um beide Polarisierungseinstellungen von Anregungs- zu Abtaststrahlbündel gleichzeitig zu messen, wird eine Anordnung gewählt, bei der vor dem Durchgang durch die Probe ein Winkel von 45° zwischen der Polarisierung der Anregung und Abtastung eingestellt wird. Nach dem Durchgang durch die Probe teilt sich der Abtaststrahl und beide Polarisierungen relativ zum Anregungsimpuls werden in verschiedenen Detektoren gleichzeitig gemessen.

3.1.5 Zeitnullpunktmessung zur Dispersionskorrektur

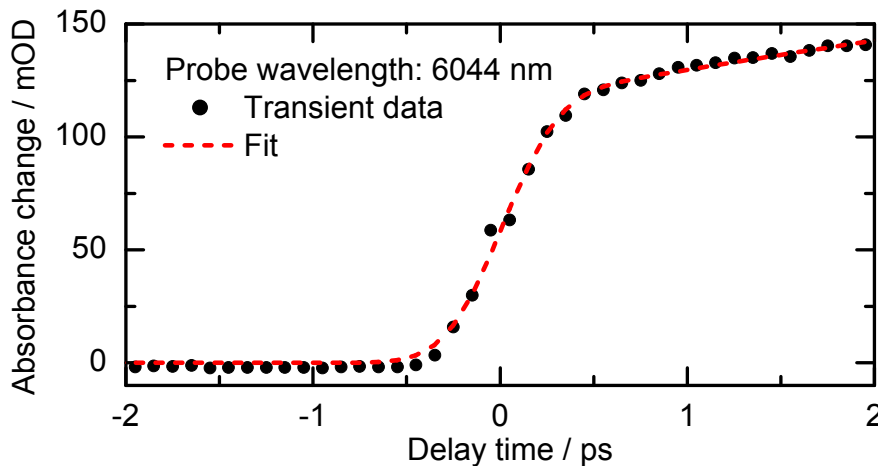


Abbildung 3.6: Transiente Absorptionsmessung an einem Germaniumsubstrat zur Bestimmung der Zeitauflösung und des Zeitnullpunkts. Der Zeitnullpunkt liegt in etwa auf halber Höhe des Signalanstiegs und wurde hier auf 0 ps gesetzt. Die Zeitauflösung bestimmt sich mittels der Anpassungskurve zu 0,7 ps.

Eine Anreg-Abtastmessung an einem Halbleitersubstrat, wie undotiertem Germanium, erlaubt die Bestimmung des Zeitnullpunkts für jede Abtastwellenlänge und liefert die Zeitauflösung des Experiments. Der Anregungsimpuls regt in Germanium Elektronen aus dem Valenzband ins Leitungsband an. Die Elektronen im Leitungsband führen zu einer starken Absorption des Abtastimpulses, welche sich sehr genau messen lässt [Jed87]. Abbildung 3.6 zeigt einen solchen Zeitverlauf bei einer Abtastwellenlänge von 6044 nm. Unter der Annahme, dass sich die Absorption der Elektronen im Leitungsband instantan bildet, lässt sich aus dieser Messung die sogenannte Kreuzkorrelationszeit von Anreg- und Abtastimpuls τ_{cc} und damit die Zeitauflösung zu 0,7 ps ermitteln. Durch den vergleichsweise steilen Anstieg kann der Zeitnullpunkt bei dieser Wellenlänge mit

einer Genauigkeit von ca. 0,1 ps bestimmt werden. Da der Abtastimpuls aufgrund seiner Erzeugung und seines Durchgangs durch dispersive Medien wie z. B. das Küvettenfenster eine zeitliche Verschiebung der Intensitätsmaxima abhängig von der Wellenlänge (engl. chirp) besitzt, ist der zeitliche Überlapp mit dem Anregungsimpuls und damit der Zeitnullpunkt abhängig von der Abtastwellenlänge. Über eine Messung an Germanium bei allen verwendeten Abtastwellenlängen kann eine Korrektur für diesen Zeitnullpunkt ermittelt werden, die auf alle gemessenen Daten bei der entsprechenden Wellenlänge angewendet wird.

Tauscht man das Halbleitersubstrat gegen eine Peptidlösung aus, kann mit dem hier beschriebenen Messprinzip der Anreg-Abtast-Spektroskopie die Peptiddynamik mit einer typischen Zeitauflösung von 0,7 ps beginnend nach der Isomerisierung des Schalters bis zu ca. 3,1 ns verfolgt werden. Das obere Limit von 3,1 ns ergibt sich aus der Länge der optischen Verzögerungsstrecke für den Anregungsimpuls relativ zum Abtastimpuls.

3.2 Laserblitz-Photolyse für Peptiddynamiken im Mikrosekundenbereich

Nachdem die Peptiddynamik viele Größenordnungen in der Zeit überspannt, wurde auch nach Methoden gesucht, die den Zeitbereich ab 3,1 ns der Peptiddynamik abdecken. Im Rahmen dieser Arbeit stand für diesen Zweck ein Laserblitz-Photolyseaufbau (engl.: Laser flash photolysis) zur Verfügung, siehe Abbildung 3.7.

Ein abstimmbarer Dauerstrich-Bleisalzaser diene als Abtastlichtquelle und ein schneller, einkanaliger Infrarotdetektor als Nachweissystem. Mit der dritten Harmonischen eines gepulsten Nd:YAG Lasers als Anregung konnte so der zeitliche Verlauf der Absorptionsänderungen bei einer Abtastwellenlänge mit einer Zeitauflösung von ca. 10 ns aufgenommen werden [vH06].

Ein alternativer Ansatz zur Messung von größeren Verzögerungszeiten ist der von Breidenbeck et al. verfolgte. Auf Basis der Anreg-Abtast-Spektroskopie koppelten sie zwei Lasersysteme elektronisch miteinander, so dass Verzögerungszeiten zwischen Anregungs- und Abtastimpuls von einigen ps bis mehreren 100 μ s elektronisch eingestellt werden konnten [Rei00].

3.3 Messung der Peptiddynamik mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie

Nachdem in den vorigen beiden Kapiteln die verwendeten Messapparaturen für zeitaufgelöste Messungen vorgestellt wurden, wird im folgenden auf den genauen Messablauf und die dafür nötigen Vorüberlegungen und Dauerstrichcharakterisierungen mittels Absorptionsspektroskopie eingegangen. Spezielles Augenmerk liegt hierbei auf den Besonderheiten, welche die Vermessung von Peptidproben erfordern.

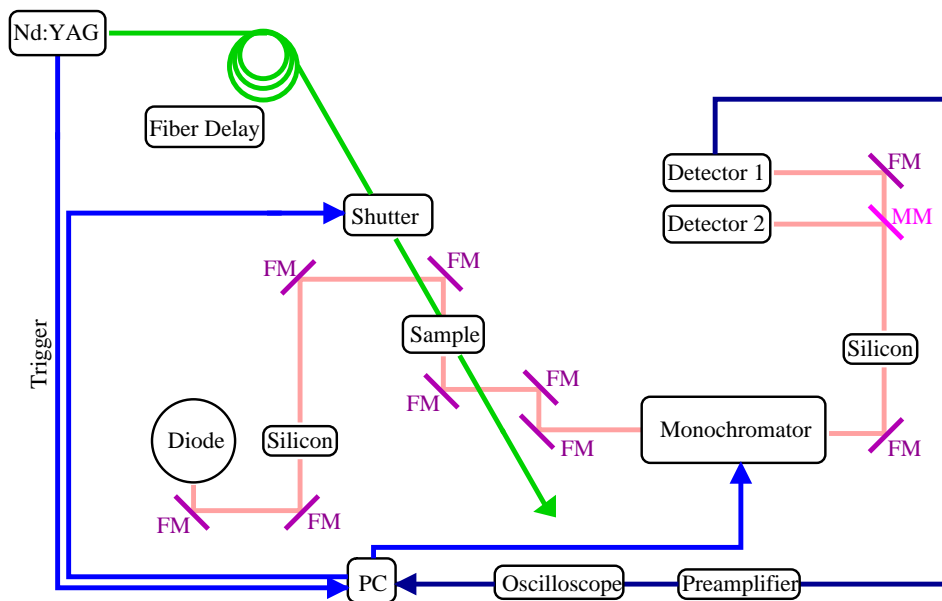


Abbildung 3.7: Laserblitz-Photolyseaufbau zur Messung von Peptiddynamiken zwischen 10 ns und mehreren Millisekunden. Ein YAG-Laserimpuls bei 355 nm löst die Peptidfaltung aus. Die Probe wird konstant von Infrarotlicht einer bestimmten Abtastwellenlänge durchstrahlt. Hinter der Probe werden die Absorptionsänderungen mittels eines MCT-Detektors mit einer Zeitauflösung von ca. 10 ns verfolgt. Die Bezeichnungen in der Abbildung sind im einzelnen: FM: Fester Spiegel, MM: Klappspiegel, Diode: Bleisalzlaserdioden, Silicon: Siliziumscheibe im Brewsterwinkel, Sample: Probenort, Fiber Delay: optische Faser, Shutter: Ansteuerbarer Lichtunterbrecher, Detector1: schneller Infrarotdetektor, Detector2: zweiter, langsamerer Infrarotdetektor, Preamplifier: Vorverstärker, Trigger: Elektronischer Impuls zur Markierung der zeitlichen Lage des Laserimpulses des YAG-Lasers, Oscilloscope: Oszillograph und PC: Rechner zur Steuerung und Datenerfassung. Bild entnommen aus [vH06].

3.3.1 Vorüberlegungen und Dauerstrichcharakterisierung

Am Anfang steht die Wahl des Lösungsmittels. Hier spielen Überlegungen wie Löslichkeit des Peptids und die Ausbildung seiner Sekundärstruktur in dem entsprechenden Lösungsmittel eine Rolle. Im Fall des AzoTrpZip2 fällt die Wahl auf perdeutertes Methanol, kurz Methanol-d₄. Der Vorteil dieses Lösungsmittels gegenüber dem natürlichen Lösungsmittel Wasser liegt in seiner wesentlich besseren Transmission im Bereich der Amid I' und Amid II' Banden. Zusätzlich bildet sich die Struktur des β -Hairpins viel besser in Methanol aus, als in Wasser [Cox93].

Die nächste Überlegung gilt der Schichtdicke des Probenfilms, die über den Teflon-Abstandhalter in Abbildung 3.8(b) gegeben ist. Sie bestimmt letztlich die Absorption des Lösungsmittels im infraroten Spektralbereich, welche über den beobachteten Wellenlängenbereich nicht zu stark variieren sollte, damit ein gleichmäßiges Aussteuern der einzelnen Detektorelemente möglich wird. Zudem sollte die Hintergrundabsorption auch nicht zu groß sein, da sonst Signalbeiträge vom Lösungsmittel, wie dessen Aufheizung durch die absorbierte Energie des Anregungsimpulses, zu befürchten sind.

Anschließend wird der Probenkreislauf aufgebaut und eine Vorcharakterisierung des Modellpeptids in Lösung mittels kommerzieller Dauerstrich-Spektrometer durchgeführt. Für Messungen im sichtbaren Spektralbereich steht dazu das Spektralphotometer Lamb-

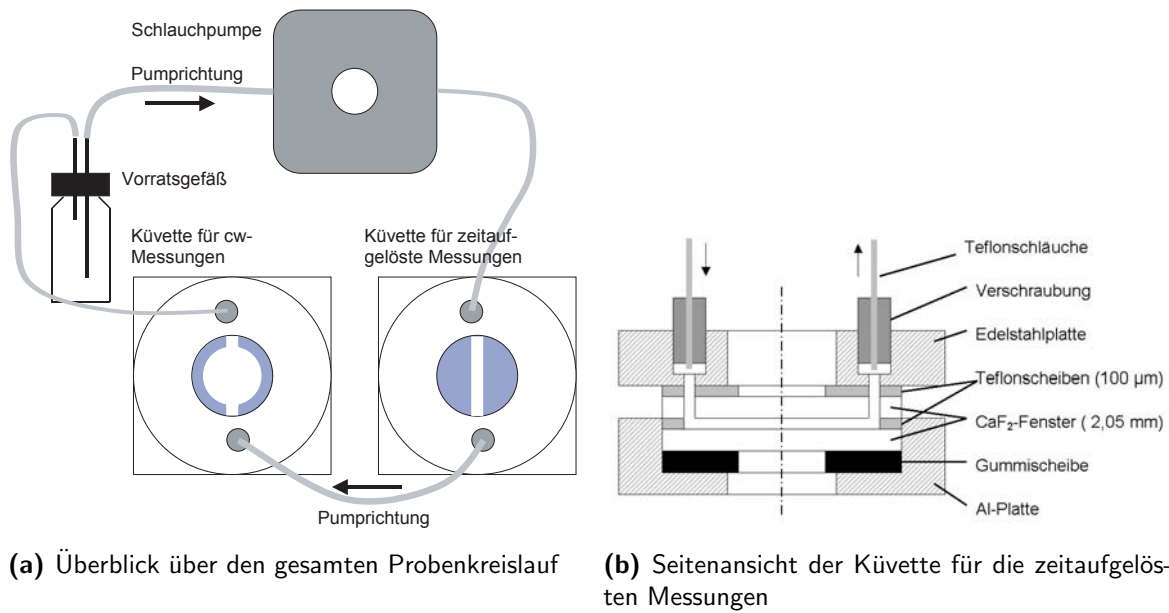


Abbildung 3.8: (a) Probenkreislauf für die zeitaufgelösten Messungen. Die Schichtdicke in den Küvetten ist ca. 220 µm, die Kanalbreite in der Küvette für die zeitaufgelösten Messungen beträgt etwa 1 mm. (b) Küvette für die zeitaufgelösten IR-Messungen. Abbildungen nach [Kol03]

da 19 der Firma Perkin Elmer und für den infraroten Spektralbereich das Fourier-Transform-Infrarotspektrometer (FTIR) IFS66 der Firma Bruker zur Verfügung.

Um ein qualitativ hochwertiges Absorptionsspektrum einer gelösten Substanz im infraroten Spektralbereich zu erhalten, muss zunächst ein Infrarotspektrum des Lösungsmittels $A_{Lsgm.}(\nu/c_0)$ gewonnen werden, welches für die spätere Korrektur der Lösungsmiteleinflüsse benötigt wird. Hierbei steht ν für die Frequenz des Lichts bzw. ν/c_0 für dessen Wellenzahl (engl. wavenumber), wobei c_0 die Vakuumlichtgeschwindigkeit bezeichnet. Dabei ist es entscheidend, dass die zu lösende Substanz in demselben Lösungsmittel, für welches vorher das Korrekturspektrum $A_{Lsgm.}(\nu/c_0)$ gewonnen wurde, aufgelöst wird. Möglichst zeitnah sollte dann ein Infrarotspektrum von gelöster Substanz und Lösungsmittel zusammen $A_{Lsg.}(\nu/c_0)$ aufgenommen werden. Dieses kann dann gut auf das vorher aufgenommene Lösungsmittelspektrum korrigiert werden, womit man nach folgender Beziehung das Absorptionsspektrum der gelösten Probe $A_{Probe}(\nu/c_0)$ erhält:

$$A_{Probe}(\nu/c_0) = A_{Lsg.}(\nu/c_0) - A_{Lsgm.}(\nu/c_0) \quad (3.12)$$

Nur bei diesem Verfahren des Auflöserns der zu messenden Peptidprobe im Kreislauf gelingt also die Aufnahme eines aussagekräftigen Absorptionsspektrums der gelösten Probe $A_{Probe}(\nu/c_0)$. Spätere Versuche, ein anderes Lösungsmittelspektrum zur Lösungsmittelkorrektur heranzuziehen, scheitern, da nie exakt der gleiche Wassergehalt, die gleiche Temperatur und die gleichen Druckverhältnisse wiederhergestellt werden können.

Da Modellpeptide mit einem eingebauten optischen Schaltermolekül wie Azobenzol eine mehrstufige Synthese mit nachfolgenden aufwändigen Aufreinigungsschritten er-

fordern, ist die Menge an zur Verfügung stehender Peptidmasse eng beschränkt. Dies verlangt nach einer Optimierung auf geringste Lösungsmittelvolumina, die für die Messung im Probenkreislauf zur Verfügung stehen. Obiger Probenkreislauf benötigt nur ca. 1 ml Lösungsmittelvolumen. Dies wurde durch folgende Optimierungsschritte erreicht:

1. Für die in Abbildung 3.8(a) grau dargestellten Teflonschläuche wurde ein möglichst kleiner Innendurchmesser von nur 0,5 mm gewählt. Noch kleinere Durchmesser würden den Strömungswiderstand zu stark erhöhen.
2. Da der Innendurchmesser des Pumpenschlauchs in der Teflonschlauchpumpe mit 4 mm relativ groß ist, wurde seine Länge so kurz wie möglich gewählt. Dennoch befindet sich beim Durchpumpen ein Großteil des Probenvolumens im Pumpenschlauch (ca. 600 μl). Ein Pumpenschlauch mit kleinerem Innendurchmesser würde jedoch zu große Umdrehungszahlen der Teflonschlauchpumpe erfordern, um den Austausch des Probenvolumens von einem Abtastimpuls zum nächsten garantieren zu können.

Jedoch steht für eine Vorcharakterisierung der Proben häufig nicht einmal genügend Substanz zur Verfügung, um einen solchen Kreislauf mit sinnvollen Konzentrationen zu befüllen. In diesen Fällen kann man sich mit einem Trick behelfen, der es erlaubt, nur soviel Lösungsmittel zu verwenden, als unbedingt für die Befüllung einer Infrarotküvette und damit zur Aufnahme eines Infrarotspektrums in Transmission nötig ist. Abbildung 3.9 zeigt eine Küvette, die in das Infrarotspektrometer für die Messung der

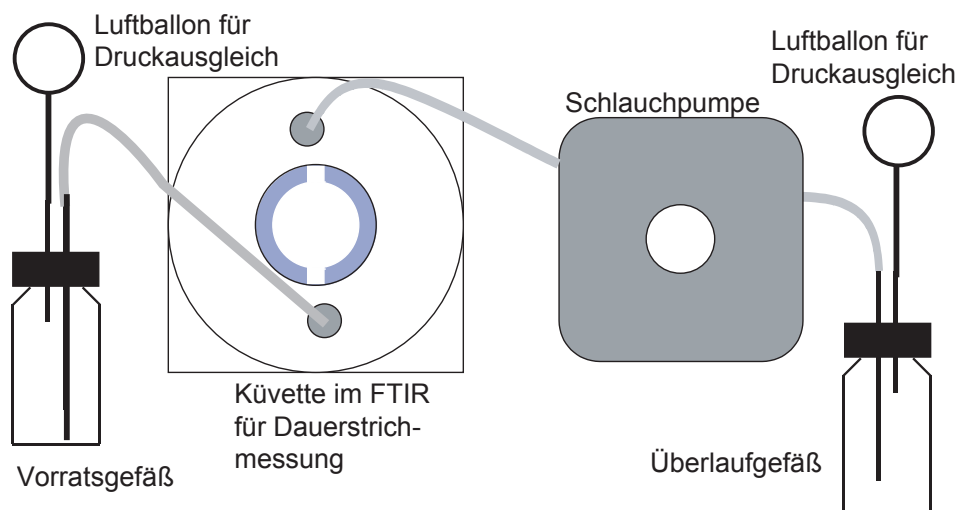


Abbildung 3.9: Stehen nur geringste Mengen an Peptidsubstanz zur Verfügung, kann mit dieser Anordnung auch mit Lösungsmittelmengen von kleiner als 0,2 ml ein Absorptionsspektrum gewonnen werden.

Infrarotspektren eingebaut wird. Die weitere Vorgehensweise kann wie folgt beschrieben werden:

1. Das linke Vorratsgefäß in Abbildung 3.9 wird anfänglich mit genau so viel Lösungsmittel befüllt, wie zur ausreichenden Auffüllung der Infrarotküvette im Spektrometer nötig ist.

2. Diese Lösungsmittelmenge wird nach dem Befüllen in die Infrarotküvette gepumpt und es wird ein Infrarotspektrum von dem Lösungsmittel aufgenommen.
3. Während sich das Lösungsmittel in der Infrarotküvette im Infrarotspektrometer befindet, tauscht man das nun leere Vorratsgefäß gegen ein neues Vorratsgefäß aus, das die zu lösende Substanz enthält.
4. Die Pumpe befördert nun das vermessene Lösungsmittel zurück in das neue Vorratsgefäß, wo sich sofort die Substanz aufzulösen beginnt.
5. Nach vollständiger Auflösung saugt die Pumpe die so entstandene Lösung in die Küvette, worauf sofort ein Infrarotspektrum aufgenommen wird.

Da der zeitliche Abstand zwischen dem Aufnehmen des Infrarotspektrums der Lösung und des Lösungsmittels gering ausfällt, führt eine Subtraktion beider Spektren zu einem qualitativ hochwertigen Absorptionsspektrum der gelösten Probe.

Ein Absorptionsspektrum der gelösten Probe im sichtbaren Spektralbereich kann mit dieser Anordnung ebenfalls leicht gewonnen werden. Auch hier lohnt es sich, zuvor ein Spektrum des reinen Lösungsmittels anzufertigen, welches man zur Korrektur der Lösungsmittelhintergrundabsorption heranziehen kann.

Aufnahme von Infrarotspektren in Abhängigkeit von der Temperatur

Ergänzend zu den zeitaufgelösten Messungen wurden stationäre Infrarotspektren als Funktion der Temperatur aufgenommen.

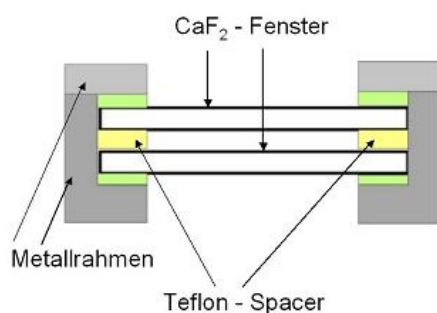


Abbildung 3.10: Infrarotküvette. Außengewinde M43 × 1, Fensterdurchmesser 30 mm, Fensterdicke 2,05 mm, Apertur 20 mm, Gesamthöhe 11 mm. Schichtdicke der Probe: 220 μm (nach [Reh03]).

Da der Faltungszustand von Peptiden von der Temperatur abhängt, wurde der Versuch unternommen, die damit verbundenen Strukturänderungen mit Infrarotspektroskopie zu verfolgen. Hierzu eignen sich geschlossene Infrarotküvetten am besten, da sich dort über die langen Aufheiz- und Abkühlphasen der Lösungsmittelgehalt und dessen Zusammensetzung nicht ändert. Abbildung 3.10 zeigt eine solche Eigenbauküvette. Sie wird in einen temperierbaren Kupferblock (wie in Abbildung 3.11 zu sehen) eingeschraubt und im Infrarotspektrometer vermessen.

Bei diesen Messungen musste vor allem auf eine ausreichend gute Einstellung des thermischen Gleichgewichts zwischen dem Kupferblock und der Probe in der Küvette geachtet werden. Dies wurde unter anderem dadurch erreicht, dass die Temperatur nur

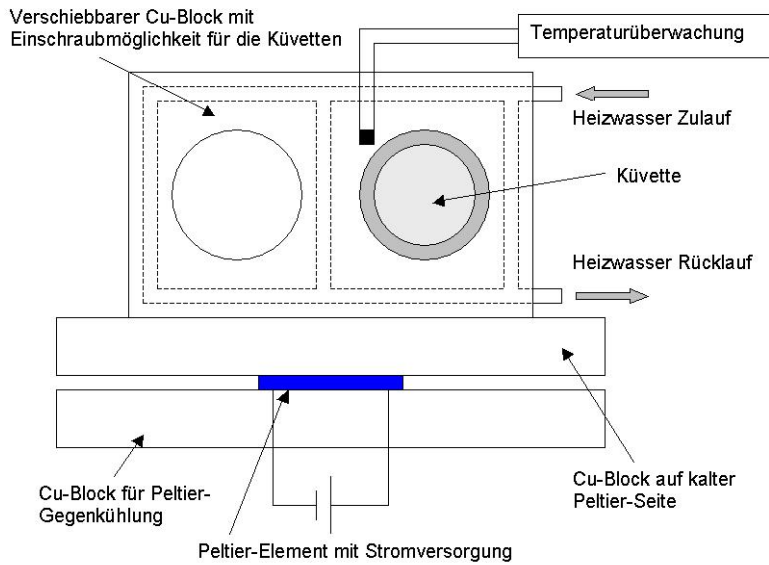


Abbildung 3.11: Schematischer Aufbau des temperierbaren Kupferblocks im FTIR-Spektrometer. Gekühlt wird über ein Peltier-Element, das Heizen erfolgt über den Durchfluss des Kupferblocks mit temperiertem Wasser. Der gesamte dargestellte Aufbau ist von außerhalb des Probenraums des Spektrometers aus verschiebbar gelagert, um auch Vergleichs- und Hintergrundspektren aufnehmen zu können. Abbildung nach [Kol03].

sehr langsam (um 10 °C pro Stunde) geändert wurde und kontinuierlich Infrarotspektren aufgenommen wurden. Ebenso wurde mit dem reinen Lösungsmittel verfahren, um Lösungsmittelspektren bei den entsprechenden Temperaturen zu erhalten. Subtrahiert man von den temperaturabhängigen Spektren der Peptidprobe in Lösung die Spektren des Lösungsmittels (bei gleicher Temperatur und unter gleichen Bedingungen aufgenommen), so erhält man Spektren, welche die Änderungen der Absorption der gelösten Peptidprobe in Abhängigkeit von der Temperatur darstellen. So gewonnene Spektren werden in Abbildung 4.31 gezeigt.

3.3.2 Zeitaufgelöste Messung mit infraroten Abtastimpulsen

Eine wichtige Information ist die Bestimmung der Anregungsenergiedichte am Ort des Anreg-Abtast-Experiments. Die Einhaltung einer oberen Grenze für die Anregungsenergiedichte dient der Vermeidung von Nichtlinearitäten im gemessenen Signal. Zur Bestimmung der Anregungsenergiedichte sind folgende Größen nötig: Die integrale Energie pro Anregungsimpuls E_A und der Anregungsbündeldurchmesser Δl .

Zur Messung des Strahlenbündeldurchmessers des Anregungsimpulses Δl am Ort des Überlapps mit dem Abtastimpuls geht man unter der Annahme gaußförmiger Bündel wie folgt vor:

1. Mittels einer Rasierklinge, die am Ort des Überlapps senkrecht zum Strahlenverlauf bewegt wird, und eines nach der Rasierklinge aufgestellten Detektors, wird zunächst entlang der horizontalen Achse x die Transmission $T(x)$ in Abhängigkeit von der Abdeckung durch die Rasierklinge gemessen.
2. Das Transmissionsprofil $T(x)$ wird numerisch differenziert.

3. Die differenzierte Kurve wird mit einer Gaußschen Glockenkurve angepasst. Unter dem Bündeldurchmesser $\Delta l(x)$ in der horizontalen Achse sei hier die volle Breite auf halber Höhe dieser gaußschen Anpassungskurve verstanden.
4. Die Punkte 1 bis 3 werden wiederholt, wobei die Rasierklinge diesmal vertikal anstatt horizontal bewegt wird. Dabei wird der vertikale Bündeldurchmesser $\Delta l(y)$ erhalten.
5. Stimmen die beiden Werte für die Bündeldurchmesser in vertikaler wie in horizontaler Richtung überein, so sind sie gleich dem Bündeldurchmesser Δl . Ist dies nicht der Fall, ist der Strahl elliptisch und es wird das geometrische Mittel der Werte $\Delta l(x)$ und $\Delta l(y)$ als Bündeldurchmesser angenommen.

Kennt man zusätzlich den Absorptionswirkungsquerschnitt des Absorbers $\sigma = \ln 10 \frac{\varepsilon}{N_A}$ bzw. dessen dekadischen Extinktionskoeffizienten ε , so kann man Berechnungen anstellen, um eine Abschätzung für sinnvolle Anregungsenergien E_A zu bekommen. Als Faustregel gilt zunächst, dass man versucht, nicht mehr als 10 % der im Anregungsvolumen vorhandenen Probenmoleküle anzuregen. Das Anregungsvolumen $V_{Fokus} = Fd$ ergibt sich dabei näherungsweise aus dem Volumen eines Zylinders mit der Stirnfläche aus dem Bündelquerschnitt des Anregungsimpulses $F = \frac{(\Delta l)^2 \pi}{4}$ und der Schichtdicke der Küvette d . Mit der Konzentration der Messlösung c und der Avogadrokonstante N_A läßt sich die Zahl der im Anregungsvolumen vorhandenen Moleküle N berechnen zu: $N = cV_{Fokus}N_A$. Die Zahl der maximal anzuregenden Moleküle beträgt also $N_{10\%} = 0,1N$. Mit der Photonenenergie $E_{Photon} = \frac{hc_0}{\lambda}$ bei der Anregungswellenlänge λ benötigt man dafür eine zu absorbierende Energie pro Anregungsimpuls von $E_A^{abs} = N_{10\%}E_{Photon}$, wobei c_0 für die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und h für das Plancksche Wirkungsquantum stehen. Aufgrund des Lambert-Beerschen Absorptionsgesetzes bedeutet dies, dass die Anregungsenergie maximal zu

$$E_A = \frac{E_A^{abs}}{1 - 10^{-A}} \quad (3.13)$$

eingestellt werden sollte, wobei $A = \varepsilon cd$ die Absorption der Probe bei der Anregungswellenlänge ist.

Eine weitere Faustregel besagt, dass auf die durch den Wirkungsquerschnitt σ des Moleküls gegebene Fläche nur 0,1 Photon einfallen soll. Die Zahl der Photonen im Anregungsimpuls darf also nur maximal $N = 0,1F/\sigma$ betragen. Mit obiger Energie pro Photon bedeutet dies für die Anregungsenergie einen maximalen Wert von

$$E_A = 0,1 \frac{F}{\sigma} E_{Photon} \quad (3.14)$$

unabhängig von der über die Konzentration eingestellten Absorption A der Probe.

Ist darüberhinaus noch eine effektive Relaxationszeitkonstante τ_{eff} aus dem angeregten Zustand der Probenmoleküle heraus bekannt, kann die Sättigungsintensität berechnet werden [Sie86]. Das zugrunde liegende Modell ist ein Zwei-Niveau System bestehend aus Grundzustand und angeregtem Zustand. Strahlt man nun resonant mit diesem

Übergang Licht hoher Intensität ein, so kann es zu Sättigungseffekten kommen, wenn der angeregte Zustand signifikant populiert wird. Im Grenzfall kann die Probe transparent bei der eingestrahnten Wellenlänge werden, wenn die Population von Grundzustand und angeregtem Zustand gleich sind. Die Sättigungsintensität $I_{Sat.}$ ergibt sich zu

$$I_{Sat.} = \frac{E_{Photon}}{\sigma\tau_{eff}}. \quad (3.15)$$

Dies ergibt die Intensität, bei der der Absorptionskoeffizient auf die Hälfte seines Kleinsignalwertes abgesenkt ist. Um die Sättigungsintensität auf eine einzustellende Anregungsenergie umzusetzen, muss sie noch mit dem Bündeldurchmesser des Anregungsimpulses und seiner Dauer multipliziert werden. Unter der Annahme eines in der Zeitdomäne gaußförmigen Anregungsimpulses entspricht dieser Wert dem Maximum dieser Gaußverteilung in der Zeitdomäne.

Experimentell lassen sich Nichtlinearitäten jedoch am besten erkennen und vermeiden, wenn transiente Absorptionsänderungen für verschiedene Anregungsenergien gemessen und auf die Anregungsenergie hierfür normiert werden. Weichen diese skalierten Messkurven nicht voneinander ab, so können Mehr-Photonenprozesse mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Nach erfolgter Vorcharakterisierung einer neuen Peptidsubstanz und den obigen Vorüberlegungen wurde der weitere experimentelle Ablauf für die Anreg-Abtastmessungen mit infraroten Abtastimpulsen wie im folgenden beschrieben durchgeführt. Ausgangszustand dabei ist das in einer neu angesetzten Probe vorliegende trans-Isomer des Modellpeptids.

1. Zunächst wird die gewünschte Abtastwellenlänge eingestellt, sowie die korrekte Justage des Verschiebetisches für die zeitliche Verzögerung zwischen Anregungs- und Abtastimpuls überprüft. Erst wenn das Lasersystem die gewünschten Parameter (Stabilität und Impuls-zu-Impuls Rauschen) aufweist, wird das Experiment fortgesetzt.
2. Der Bündeldurchmesser des Anregungsbündels wird noch einmal überprüft, um obige Bedingungen zur Anregungsenergiegedichte zu erfüllen.
3. Bei den gewünschten Wellenlängenbereichen werden Messungen an einem Germaniumsubstrat durchgeführt, um eine spätere Nullpunktskorrektur zu ermöglichen.
4. Währenddessen wird ein stationäres Infrarotabsorptionsspektrum und ein Spektrum im sichtbaren Spektralbereich des Kreislaufs aufgenommen. Diese Spektren dienen der Charakterisierung der Probe.
5. Es werden bei einem festen Wellenlängenbereich transiente Absorptionsspektren bei verschiedenen Anregungsenergien aufgenommen. Sollten sich Nichtlinearitäten zeigen, wird eine entsprechend niedrigere Anregungsenergie gewählt.
6. Es folgen nun die eigentlichen transienten Absorptionsmessungen in den gewünschten Wellenlängenbereichen in der Isomerisierungsrichtung trans nach cis. Dabei

wird durch laufende Absorptionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich kontrolliert, ob eine störende Akkumulation des cis-Isomers vorliegt.

7. Für Referenzzwecke wird das reine Lösungsmittel in einem zweiten Probenkreislauf bei der gleichen Anregungsenergie und Schichtdicke gemessen.
8. Den Abschluss der Messungen bildet wieder die Aufnahme eines Infrarotspektrums und eines Spektrums im sichtbaren Spektralbereich, wie unter Punkt 4 beschrieben.
9. Während der Lösungsmittelmessungen zu Punkt 7 wird die Umbelichtung der Probe von trans nach cis vorgenommen. Hier kommt eine Quecksilber/Xenon (HgXe) Lampe mit geeigneten Filtern (UG11 und WG320 von Schott, Mainz) zum Einsatz [Reh03, Spö01]. Der Erfolg des Umbelichtens wird mit Spektren im sichtbaren Spektralbereich überprüft. Zum Schluss erfolgt noch die Aufnahme eines Infrarotspektrums, um den Wassergehalt der Peptidlösung beurteilen zu können.
10. Unter konstanter Weiterbelichtung (HgXe Lampe mit Filtern UG11 und WG320) wird die Messung wie in Punkten 5 bis 6 beschrieben von cis nach trans in den gewünschten Wellenlängenbereichen vorgenommen. Zusätzlich wird über Absorptionsspektren im sichtbaren Spektralbereich der Anteil des cis-Isomers überwacht.
11. Bevor die Probe in das Vorratsgefäß des Kreislaufs gepumpt wird, werden noch Kontrollspektren, wie in Punkt 8 oder 4 beschrieben, aufgenommen.

Die Anreg-Abtastexperimente mit sichtbaren Abtastimpulsen wurden nach einem ähnlichen Schema durchgeführt. Es konnten dabei alle relevanten Wellenlängen simultan aufgenommen werden, eine sequentielle Messung verschiedener Wellenlängenbereiche war hier nicht nötig.

4 Stationäre Charakterisierung und Eigenschaften des Modellpeptids AzoTrpZip2

Nach einer kurzen Definition und Begriffserläuterungen rund um das Thema von β -Hairpin Modellpeptiden, wie sie in der wissenschaftlichen Literatur vorgestellt werden, wird im folgenden auf die Motivation eingegangen, die zur Untersuchung und Synthese des Modellpeptids AzoTrpZip2 führte.

Die Synthese des AzoTrpZip2 wird darauf kurz beschrieben und dessen Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie und Circular dichroismus dargestellt. Ein weiterer Abschnitt geht auf die Dauerstrichspektren des AzoTrpZip2 und seines Referenzpeptids im sichtbaren wie auch infraroten Spektralbereich ein. Der Schluss dieses Kapitels beschäftigt sich mit der Variation des Parameters Temperatur, wobei temperaturabhängige Infrarotspektren und Circular dichroismusdaten des AzoTrpZip2 miteinander in Beziehung gesetzt werden.

4.1 β -Hairpin Modellpeptide in der Literatur

4.1.1 Definition eines β -Hairpins und seiner Bestandteile

Ein β -Hairpin besitzt zwei Arme aus anti-parallel angeordneten Aminosäureketten, den Strängen (engl.: β -strands), und eine Kehre (engl.: turn) aus drei oder vier Aminosäuren. Wenn die Kehre nur drei Aminosäuren enthält, wird sie γ -Turn genannt. Im anderen Fall heißt sie β -Kehre, engl. β -Turn. Die nicht intramolekular wasserstoffverbrückten Aminosäuren der Kehre bilden die eigentliche Schleife, engl. Loop. Abbildung 4.1 zeigt für die Anzahl $(n+1)$ an in der Schleife vorhandenen Aminosäuren für den Fall $n=1$ einen β -Turn, der am häufigsten in natürlichen Proteinen vorkommt. Im Loop werden in synthetisch hergestellten β -Hairpins häufig auch künstliche Aminosäuren verwendet, welche die Schleifenstruktur besonders begünstigen. Es eignen sich hier zum Beispiel das sogenannte D Pro, das rechtszirkulare Analog zum natürlichen Prolin, und das Aib, engl. α -aminoisobutyric acid.

Neben dem Turn gibt es auch noch andere für die Stabilität einer β -Hairpin Struktur wesentliche Elemente, wie zum Beispiel die Länge der beiden Stränge, die anziehende Wechselwirkung der Seitenketten und die Interstrang-Wasserstoffbrückenbindungen. Welche Gewichtung diese Beiträge zur Stabilität zueinander haben, ist Gegenstand intensiver Forschung.

Auch die möglichen Strukturen von β -Turns wurden intensiv erforscht. Nach frühen Arbeiten von C. M. Venkatachalam [Ven68] und Sibanda et al. [Sib89, Sib93] unterscheidet man zwischen neun [Hut94] und 13 Standard β -Turn Typen [Cre93]. Sie werden mit

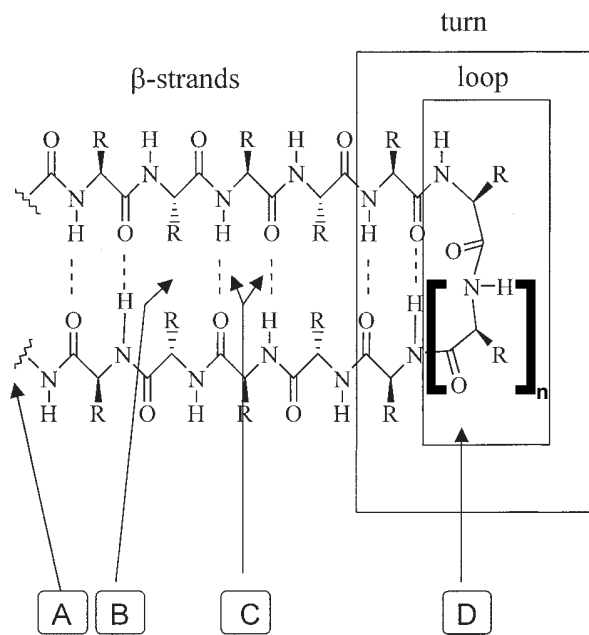


Abbildung 4.1: Schemadarstellung eines β -Hairpins mit seinen Komponenten, den Strängen (engl.: β -strands), der Kehre (engl.: turn) und der Schleife (engl.: loop) als Teil der Kehre. Die Zahl n bezeichnet die Anzahl an zusätzlich zu einer (welche mindestens vorhanden ist) auftretenden Aminosäuren im Loop. Im Fall $n=1$ heißt die Kehre β -Turn, bei $n=0$ handelt es sich um einen γ -Turn. Die Buchstaben bezeichnen die wesentlichen Elemente, die zu einer Stabilisierung der Struktur eines β -Hairpins beitragen: (A) die Länge der beiden Stränge, (B) die Wechselwirkung der Seitenketten, (C) die Interstrang-Wasserstoffbrückenbindungen und (D) die Schleifensequenz. Die Abbildung ist entnommen aus [Sto04]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Copyright (2004 Wiley-Liss, Inc.). Reprinted by permission of Wiley-Liss Inc. a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc.

römischen Zahlen durchnummeriert. Die Unterscheidung läuft über die vier Dihedralwinkel der beiden Aminosäuren des Loops. Abbildung 4.2 zeigt nur die vier für diese Arbeit wichtigen β -Turn Typen.

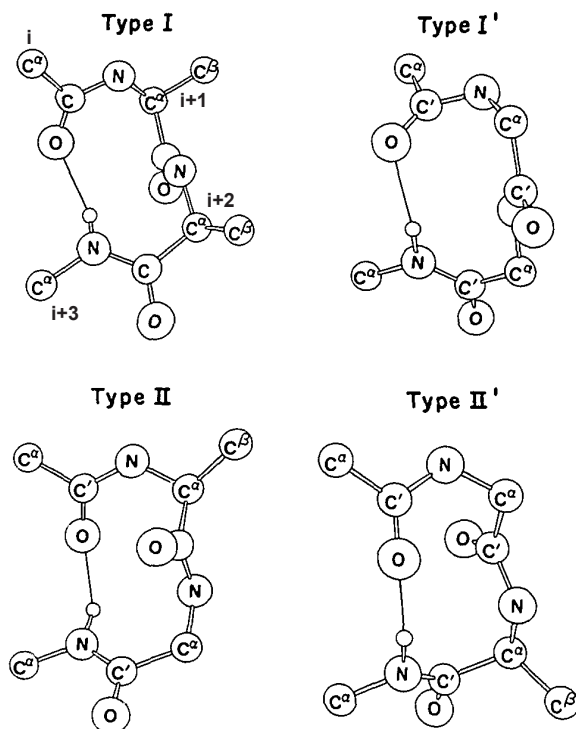


Abbildung 4.2: Häufig vorkommende Typen von β -Turns. Die Abbildung auf der linken Seite ist jeweils spiegelbildlich zur rechten Seite. Der Buchstabe i steht für die Nummer der ersten Aminosäure des Turns, gerechnet vom N-Terminus. Die Durchnummerierung erfolgt allgemein vom N- zum C-Terminus. Die Typen der Turns werden mit römischen Zahlen durchnummeriert, wobei der Beistrich die Spiegelbildlichkeit andeuten soll. Die Abbildung ist entnommen aus [Ros85]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Copyright Elsevier (1985).

Jeder Turn wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoffatom der Aminosäure (i) und dem Amidwasserstoffatom der Aminosäure $i+3$ stabilisiert, wobei i die dem N-Terminus am nächsten liegende Aminosäure des Turns

bezeichnet. Der β I'-Turn ist spiegelbildlich zu dem β I-Turn. Genauso verhält es sich mit dem β II'-Turn.

4.1.2 Erste Modellpeptide mit β -Hairpin Struktur

Zwei Gründe gibt es, warum die Synthese und Untersuchung von β -artigen Modellpeptiden gegenüber derjenigen von α -Helices so viel schwieriger war und deswegen erst in jüngerer Zeit zum Erfolg führte. Der eine Grund liegt in der Tendenz von β -artigen Modellpeptiden zur Aggregatbildung. Dabei lagern sich mehrere Monomere aneinander und bilden intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und Seitenkettenwechselwirkungen aus [Lac99]. Die Aggregation macht eine weitere Untersuchung des Faltens und Entfaltens solcher Peptide unmöglich. Der zweite Grund liegt in der Tatsache, dass β -Stränge eine sie umgebende räumliche Struktur benötigen, um stabil zu sein. Während α -Helices durch lokale Wasserstoffbrückenbindungen ausreichend stabilisiert werden, um als Sekundärstruktureinheit zu existieren, benötigen β -Stränge also einen Tertiärstrukturkontext oder spezielle Seitenkettenwechselwirkungen bzw. Schleifensequenzen, um eine stabile β -Hairpin Struktur auszubilden. Häufig werden deswegen bei β -Hairpin Modellpeptiden der N- und C-Terminus kovalent miteinander verbunden, so dass ein zyklischer β -Hairpin entsteht [Man03, Syu01]. Bei monomeren und nicht-zyklischen β -Hairpins fehlt jedoch ein Tertiärstrukturkontext. Hier müssen andere Wege zur Stabilisierung der Struktur gewählt werden.

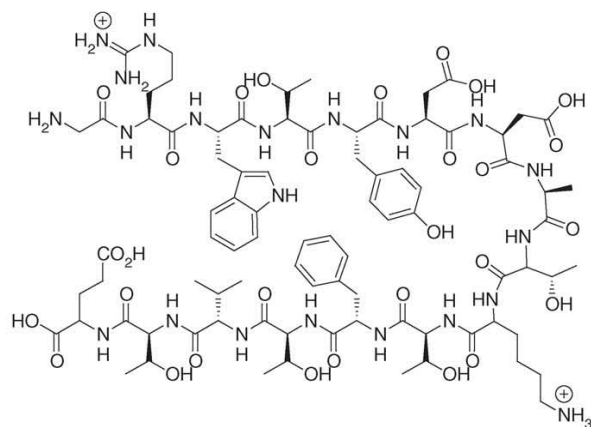


Abbildung 4.3: Valenzstrichformel des β -Hairpins aus dem Protein GB1P. Im Protein bildet diese Sequenz lediglich eine sogenannte β -Ausbuchtung (engl.: β -bulge) aus. Die β -Hairpin Struktur dieses Fragments ist also nicht natürlich und beruht auf einer anderen Registrierung der Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Stränge. Die Abbildung ist entnommen aus [Hug06]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Copyright Elsevier (2006).

Blanco et al. synthetisierte das erste Modellpeptid, das im Lösungsmittel Wasser eine β -Hairpin Struktur aufwies [Bla91]. Es besteht aus den Aminosäuren 12 bis 26 des Proteins Tendaminastat. Dieses Fragment bildet auch innerhalb des Proteins eine β -Hairpin Struktur aus. Es war jedoch nicht klar, ob es dies auch ohne den Kontext der restlichen Aminosäuren tun würde. Um die Stabilität der β -Hairpin Struktur genauer zu untersuchen, wurden weitere Modellpeptide synthetisiert und charakterisiert. Darunter sind Sequenzen, die von der B1-Domäne des Proteins G [Bla94] (siehe auch Abbildung 4.3) oder dem Ubiquitin [Sea95] abgeleitet sind.

Später gingen Cochran et al. und Ciani et al. dazu über, auch künstliche Aminosäuresequenzen zu untersuchen, die ebenfalls in Lösung eine β -Hairpin Struktur zeigen.

Ciani et al. untersuchten den Einfluss von Salzbrücken zwischen Glutaminsäure- und Lysinseitenketten auf die Stabilität der β -Hairpin Struktur [Cia03].

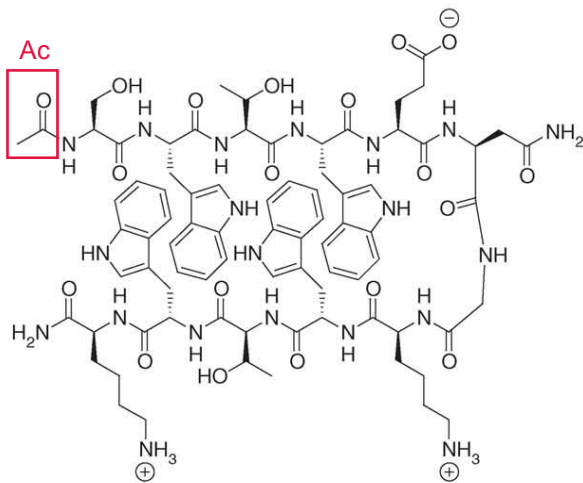


Abbildung 4.4: Valenzstrichformel eines β -Hairpin Modellpeptids mit dem Tryptophanreißverschlussmotiv (engl. tryptophan zipper) und einem Typ I' Turn. In der Literatur wird für dieses Molekül oft die Abkürzung trpzip2 verwendet. Meist versteht man darunter aber das Derivat mit freiem N-Terminus. Das hier gezeigte Molekül hat jedoch einen acetylierten N-Terminus (Ac) und müsste deshalb mit Ac-trpzip2 bezeichnet werden. Die Abbildung ist entnommen aus [Hug06]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Copyright Elsevier (2006).

Cochran et al. testeten den Einfluss von Tryptophanseitenketten auf die Stabilität von β -Hairpin Strukturen. Sie benutzten ein sogenanntes Tryptophanreißverschlussmotiv aus zwei sich gegenüberliegenden Tryptophanen auf jedem Strang, die nur durch eine weitere Aminosäure auf ihrem Strang getrennt sind, siehe Abbildung 4.4. Die Fluoreszenzunterdrückung (engl. fluorescence quenching) bei einer Wechselwirkung gegenüberliegender Tryptophanseitenketten liefert zudem eine Möglichkeit, den Faltungsgrad dieser β -Hairpin Modellpeptide spektroskopisch zu bestimmen. Inzwischen gibt es einige Übersichtsartikel, die sich mit dem Vergleich verschiedener β -Hairpin Modellsysteme beschäftigen und die Informationen zusammenstellen, die mit deren Hilfe über die Faltung von β -Hairpins und β -Faltblattstrukturen gewonnen werden konnten [Sto04, Gel98].

4.1.3 Photoschaltbare Modellpeptide mit β -Hairpin Struktur

Nach dem Vorbild der photoschaltbaren α -Helix [Bre05b, Che03] wurde bald darauf die Idee geboren, durch Einführen eines photoschaltbaren Chromophors an Stelle von den zwei Aminosäuren im Loop das Ausmaß der Faltung zur β -Hairpin Struktur photomodulierbar zu machen.

Im Mittelpunkt stand hierbei die Suche nach dem geeigneten Chromophor, der in einer seiner Konformationen die Ausbildung einer β -Hairpin Struktur erlaubt und in seiner zweiten Konformation diese stark stört. Christian Renner und Kräutler et al. [Krä05] haben unabhängig voneinander Molekulardynamiksimulationen durchgeführt, um ausgehend von Azobenzol als Chromophor das richtige Substitutionsmuster für die Anbindung des Peptids an die beiden Benzolringe des photoschaltbaren Chromophors Azobenzol zu finden. Beide kamen zu dem Ergebnis, dass ein jeweils an der meta-Position substituierter Benzolring eines Azobenzolchromophors in seiner cis Konformation eine β -Hairpin Struktur begünstigt. Die bis dahin häufig verwendete para-Substitution schien dagegen ungeeignet.

Die Gruppe um D. Hilvert in Zürich synthetisierte daraufhin ein photoschaltbares β -Hairpin Modellpeptid mit der Sequenz Arg-Trp-Gln-Tyr-Val-AMPP-Lys-Phe-Thr-

Val-Gln-NH₂ [Aem05]. AMPP steht hierbei für das meta-substituierte Azobenzol, die pseudo-Aminosäure 3-(3-Aminomethyl-phenylazo)-phenyllessigsäure. Abgesehen von der Peptidsequenz ist dieses Peptid identisch mit dem in der Gruppe Moroder synthetisierten AzoTrpZip2, siehe Abbildung 4.6(a). Es gelang Hilvert et al., die β -Hairpin Struktur dieses Peptids in der cis Konformation des Azobenzols mittels 2D-NMR Spektroskopie zu zeigen. Sie fanden heraus, dass die beiden Methylene-Abstandshaltergruppen an den Benzolringen des Azobenzols eine größere Flexibilität des Loops erlauben, als dies mit der Sequenz ^DPro-Gly an Stelle des AMPP möglich wäre. Es gibt zwei Hauptkonformationen, bei denen der Azobenzolchromophor einmal oberhalb und einmal unterhalb der durch die beiden Stränge definierten Ebene liegt.

Hilvert et al. führten ihre Untersuchungen in wässriger Umgebung durch. In der trans-Konformation neigte ihr photoschaltbares β -Hairpin Modellpeptid jedoch zur Aggregation, was eine Bestimmung der trans-Strukturen durch NMR-Spektroskopie verhinderte. Da das trans-Isomer jedoch die thermisch stabilere Konformation ist, muss immer wieder durch Belichten nach cis geschaltet werden, um das Peptid als Monomer in Lösung zu halten. Dies erschwert zeitaufgelöste Messungen der Peptiddynamik dieses Modellpeptids. Eine Lösung dieses Problems wäre möglicherweise im Lösungsmittel Methanol zu suchen, von dem bekannt ist, dass es β -Hairpin Strukturen begünstigt [Cox93].

Neben Azobenzol gibt es noch einige andere Chromophore, die sich zum Einbau in Modellpeptide eignen [Pie01, May06]. Die Gruppe um Adolf Gogoll stellte kürzlich ein photoschaltbares zyklisches Modellpeptid mit einem meta-substituierten Stilben im Rückgrat vor, das in Lösung eine β -Hairpin Struktur ausbildet, siehe Abbildung 4.5.

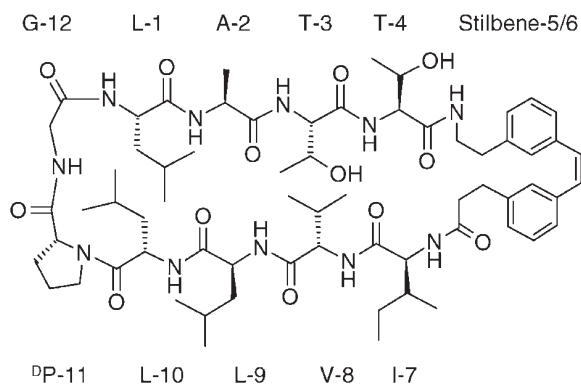


Abbildung 4.5: Ähnlich wie Azobenzol kann auch meta-substituiertes Stilben als Schalter in der Schleife eines β -Hairpins eingesetzt werden. Die Abbildung ist entnommen aus [Erd05]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Durch die Zyklisierung mit der Sequenz ^DPro-Gly existiert jedoch unabhängig von der Konformation des Stilbens ein β -Turn an dieser Stelle, so dass durch Schalten des Stilbens von cis nach trans nur ein β -Hairpin zu β -Turn Übergang induziert werden kann [Erd05], wie mittels CD-Spektroskopie gezeigt werden konnte.

Für beide vorgestellten photoschaltbaren Modellpeptide existieren noch keine Publikationen zu zeitaufgelösten Messungen ihrer Faltungsdynamiken. Jedoch gelang es der Gruppe um Peter Hamm kürzlich, die Entfaltungsdynamik eines durch eine Disulfidbrücke zyklisierten β -Turns durch optisches Aufbrechen dieser Brücke zeitaufgelöst mittels transients zweidimensionaler Infrarotspektroskopie zu beobachten. Sie konnten dabei das Brechen einer Wasserstoffbrückenbindung des Turns nachweisen [Kol06].

4.2 Mit dem photoschaltbaren β -Hairpin Modellpeptid verfolgte Ziele

Der Synthese eines Modellpeptids liegt die Absicht zugrunde, die natürlichen Vorgänge in einem komplexen Protein durch Reduzierung auf kleinere Ausschnitte nachvollziehbar und der experimentellen sowie theoretischen Untersuchung zugänglich zu machen. Dabei muss die Modellhaftigkeit des Modellsystems ebenfalls so genau wie möglich erforscht werden, um beurteilen zu können, in welchen Punkten das Modellsystem die Natur abbildet und richtig wiedergibt und wo es künstlich durch die Modellbildung hervorgerufene Einflüsse auf die natürlichen Prozesse gibt.

Mit einem photoschaltbaren β -Hairpin Modellpeptid sollen erstmals die Faltungs- und Entfaltungsvorgänge einer Hairpinschleife in einem Protein auf ultrakurzer Zeitskala untersucht werden. Ziele hierbei sind die Festlegung von Zeitskalen sowie die Identifikation von wesentlichen Zwischenzuständen, den Intermediaten, und deren Struktur. Bei der Faltung eines β -Hairpins gibt es grundsätzlich verschiedene Ansichten in der Literatur, welche Schritte zuerst erfolgen und welche geschwindigkeitsbestimmend sind. Eaton et al. schlagen vor, dass sich der Turn zuerst bildet und daraufhin erst die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen [Mun97, Mun98]. Dinner et al. argumentieren, dass der hydrophobe Kollaps der Seitenketten zuerst erfolgt, da der so entstehende hydrophobe Kern wesentlich zur Strukturstabilität des β -Hairpins beiträgt [Din99]. Mit Hilfe der Modellpeptide lassen sich hierzu interessante Aussagen machen. Aber auch die Beobachtung der Entfaltung und der nachfolgenden Faltung in einen globulären Zustand lässt wichtige Einblicke in die Peptiddynamik erhoffen.

Erreicht werden diese Ziele durch zeitaufgelöste Messungen mittels Infrarotspektroskopie der Faltungs- und Entfaltungsprozesse des β -Hairpins. Die gemessenen Infrarotspektren werden mittels Molekulardynamiksimulationen und daraus berechneten Infrarotspektren interpretiert. Auf diese Weise kann von den gemessenen Spektren auf eine zugrunde liegende momentane Struktur des Peptids auf seinem Faltungsweg geschlossen werden. Wichtig hierbei ist es zu berücksichtigen, dass immer ein Ensemble aus sich faltenden Peptiden beobachtet wird. Die Ausgangsstrukturen im Moment der Anregung des Chromophors (Auslösen der Faltungsprozesse) können durchaus verschieden sein, wodurch man das Ensemble in Subspezies einteilen muss. Zudem kann es unterschiedliche Faltungspfade geben, auf denen ein Peptid zu seinem Endzustand gelangt. Das gemessene Infrarotspektrum setzt sich also im allgemeinen immer aus der Summe der Infrarotspektren von Subspezies zusammen.

Durch die Einführung des optischen Schalters Azobenzol ist diese Messung erstmals auch auf Zeitskalen bis zu einigen Pikosekunden möglich. Zudem startet der Faltungs- und Entfaltungsprozess aus einem Nicht-Gleichgewichtszustand, der in der Natur durchaus gegeben sein kann. Nach ihrer Synthese in den Ribosomen liegen Peptide in Form eines entropischen Knäuels vor, dessen Struktur nicht unbedingt im thermodynamischen Gleichgewicht mit seiner Lösungsumgebung sein wird. Durch viele der in Kapitel 2.2 vorgestellten Auslösemethoden für die Faltung werden solche Nicht-Gleichgewichtszustände jedoch nicht erreicht.

Durch ergänzende Messungen von Infrarotspektren in Abhängigkeit von der Temperatur lassen sich Aussagen über die thermische Stabilität des photoschaltbaren β -Hairpins im Vergleich zu anderen Modellsystemen machen. Als Beobachtungsmethoden wurden dazu der Circular dichroismus und die Infrarotspektroskopie verwendet und miteinander verglichen.

4.3 Synthese und Primärstruktur des photoschaltbaren β -Hairpins AzoTrpZip2

Beim Entwurf des photoschaltbaren β -Hairpins AzoTrpZip2 stand im Vordergrund, die günstigen Eigenschaften des Photoschalters Azobenzol mit der hohen Stabilität und der vorteilhaften spektroskopischen Charakterisierbarkeit des trpzip2 zu verbinden, siehe Abbildung 4.6. Obwohl die Aminosäuresequenz so in der Natur nicht vorkommt, gibt es doch eine ähnliche Sequenz H-Thr-Trp-Thr-Trp-Asn-Gly-Ser-Ala-Trp-Thr-Trp-Asn-OH aus dem V4-Loop des Glycoproteins GP120 des HIV Virus, die in wässriger Lösung eine stabile β -Hairpin Struktur ausbildet [Coc01]. Da in der Kristallstrukturanalyse des Proteins dieser Bereich jedoch nicht sichtbar ist, kann nicht klar gesagt werden, ob sich diese β -Hairpin Struktur auch in der Natur im Kontext des gesamten Proteins ausbildet [Kwo98].

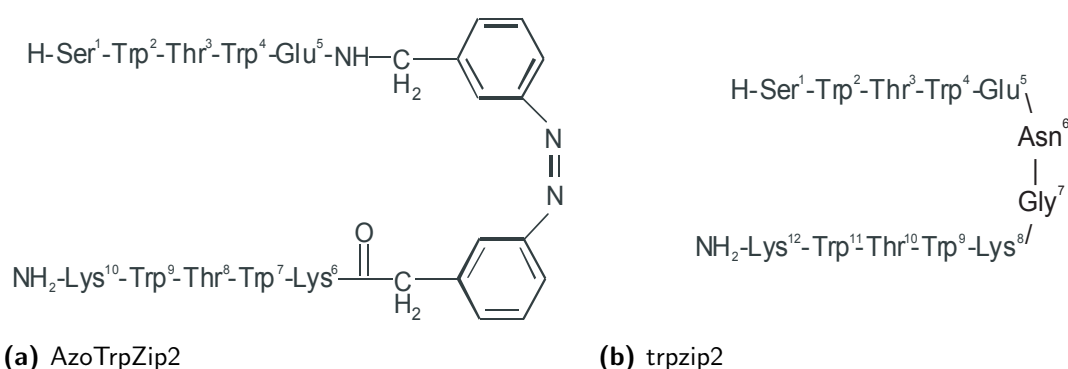


Abbildung 4.6: Vergleich der Primärstrukturen des photoschaltbaren β -Hairpins AzoTrpZip2 und des Modellpeptids trpzip2 nach Cochran et al. [Coc01]. Die Aminosäuren Asparagin (Asn, N) und Glycin (Gly, G) wurden in dem photoschaltbaren β -Hairpin Modellpeptid durch den meta-substituierten Azobenzolschalter ersetzt.

Die Synthese des Modellpeptids AzoTrpZip2 wird in der Doktorarbeit von Markus Löweneck [Löw05] vorgestellt und ist in [Sat04b] veröffentlicht. Sie wurde von Shou-Liang Dong und Markus Löweneck durchgeführt. Zunächst wurde der Chromophor, das AMPP, mit der Schutzgruppe Fmoc am N-Terminus in Lösung in einer dreistufigen Synthese hergestellt. Die weitere Synthese erfolgte mittels eines kommerziellen Peptidsyntheseapparates an einem Harz. Der Vorteil dieser Art der Synthese liegt darin, dass das gewünschte Peptid kovalent am Harz angehängt ist und so alle Kopplungsreagenzien nach deren Einwirkung durch einfaches Spülen entfernt werden können. Eine Aufreinigung nach jedem Syntheseschritt kann also entfallen. Beginnend mit dem C-terminalen

Ende wurden schrittweise die ersten fünf Aminosäuren an das Harz angekoppelt. Die Kopplung der pseudo-Aminosäure AMPP erfolgte darauf manuell. Die restlichen fünf Aminosäuren wurden wieder im Syntheseautomat angekoppelt. Zum Schluss löst ein Trifluoressigsäure/Wasser Gemisch das Peptid vom Harz und entfernt zusätzlich alle Schutzgruppen an den Seitenketten. Die Aufreinigung erfolgt mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie und die Analyse des gewonnenen Produkts mittels Massenspektroskopie.

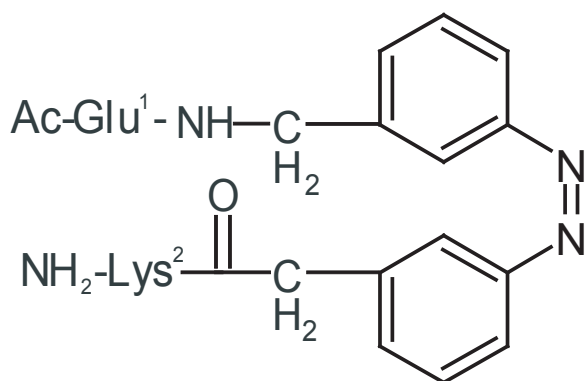


Abbildung 4.7: Aminosäuresequenz des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Die Abkürzung Ac bedeutet, dass das N-terminale Ende acetyliert, also mit Essigsäure verestert ist.

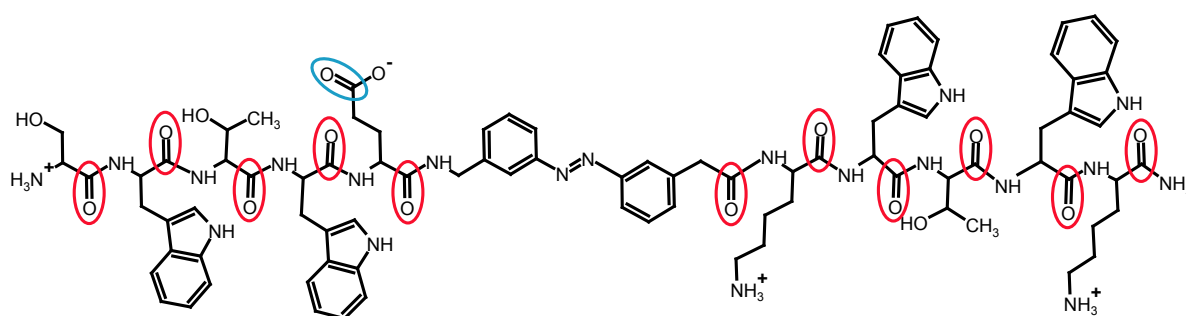
Bei der Synthese des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ wurde analog vorgegangen, wobei jedoch in einem weiteren Syntheseschritt in Lösung noch das N-terminale Ende acetyliert wurde, d. h. mit Essigsäure verestert wurde, siehe Abbildung 4.7 und 4.8(b).

Nach der Synthese liegt der Photoschalter Azobenzol in den Peptiden im allgemeinen zu 100 % als trans-Isomer vor, da dieses das thermodynamisch stabilere Isomer ist. Durch Belichten der Peptidlösungen mit Licht bei 355 nm wird nach wenigen Minuten ein photostationäres Gleichgewicht erreicht, das einen cis Anteil von über 84 % aufweist.

Der Grund für die Synthese eines Referenzpeptids mit demselben Photoschalter und den beiden dem Schalter am nächsten gelegenen Aminosäuren des AzoTrpZip2 liegt darin, das wesentliche Strukturelement des AzoTrpZip2 untersuchen zu können. Zudem kann der Photoschalter auf diese Weise unabhängig von einem größeren Peptidkontext untersucht werden.

Da in der Infrarotspektroskopie die Anzahl und chemische Umgebung der Carbonylgruppen eine große Rolle spielen, gibt Abbildung 4.8 die Valenzstrichformeln der beiden Peptide AzoTrpZip2 und Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ an, in der die Carbonylgruppen farblich hervorgehoben sind.

Die Darstellungen in Abbildung 4.8 gehen von einem pH-Wert von 7 in Wasser aus. Die pK-Werte von Lysin und Glutaminsäure betragen 10,0 bzw. 4,4 [Ber02a]. Im Lösungsmittel Methanol ist zunächst unklar, ob sich diese Ionenzustände ausbilden. Bei dem unvermeidlichen Wasseranteil im Lösungsmittel Methanol kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich ähnliche Verhältnisse einstellen wie in Wasser selbst. Als Gegenionen für die überschüssigen positiven Ladungen des AzoTrpZip2 kommen das negativ geladene Trifluoracetat der Trifluoressigsäure oder ein Hydroxidion in Frage. Als positive Gegenionen dienen Natrium- oder Kaliumionen.



(a) Modellpeptid AzoTrpZip2 (trans-Isomer)

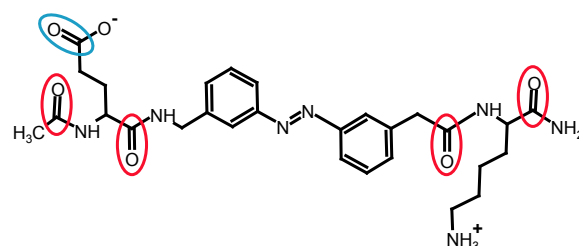

 (b) Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ (trans-Isomer)

Abbildung 4.8: Der β -Hairpin weist als Schutzgruppe nur einen amidierten C-Terminus auf, der N-Terminus ist ungeschützt und liegt als Aminofunktion vor. Das Referenzpeptid hat zusätzlich zu einem amidierten C-Terminus noch einen acetylierten N-Terminus. Die Seitenkettencarbonyle sind mit einem blauen Oval markiert, die der Peptidplättchen mit einem roten.

	AzoTrpZip2	Ac-trpzip2	Ac-Glu-AMPP-Lys-NH ₂
Atomzahl	231	220	78
Rückgratcarbonyle	11	12	4
Seitenkettencarbonyle	1	2	1
Gesamtladung	+2	+2	0
molare Masse	1689,9 g/mol	1609,8 g/mol	567,6 g/mol
Summenformel	C ₈₇ H ₁₀₈ N ₂₀ O ₁₆	C ₇₈ H ₁₀₄ N ₂₀ O ₁₈	C ₂₈ H ₃₇ N ₇ O ₆

Tabelle 4.1: Primärstrukturdaten des AzoTrpZip2 und seiner Referenz- und Vergleichspeptide

Die Tabelle 4.1 liefert einen Überblick über die Primärstrukturdaten des AzoTrpZip2, trpzip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Die beiden Aminosäuren im Loop des originalen Tryptophanzipperpeptids Ac-trpzip2 besitzen keine geladenen Seitenketten, jedoch hat das Asparagin (Asn) eine weitere Seitenkettencarbonylfunktion. Da der Loop aus zwei Aminosäuren besteht, gibt es eine weitere Rückgratcarbonylfunktion. Das Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ besitzt wegen der Acetylierung und Amidierung und zwei natürlichen Peptidbindungen zum AMPP 4 Rückgratcarbonylfunktionen.

4.4 Stationäre Charakterisierung des photoschaltbaren β -Hairpins AzoTrpZip2

4.4.1 Charakterisierung mittels Circular dichroismus

Das Circular dichroismusspektrum (kurz: CD-Spektrum) von Tryptophanzipperpeptiden ist hinlänglich in der Literatur bekannt [Coc01]. Ein ausgeprägtes Maximum bei 228 nm rührt von der speziellen Lage der Tryptophanseitenketten zueinander her. Aus dem Vergleich des cis-AzoTrpZip2 CD-Spektrums (Abbildung 4.9) mit dem des trpzip2 aus der Literatur kann auf einen hohen Anteil an gefalteter β -Hairpin Struktur geschlossen werden.

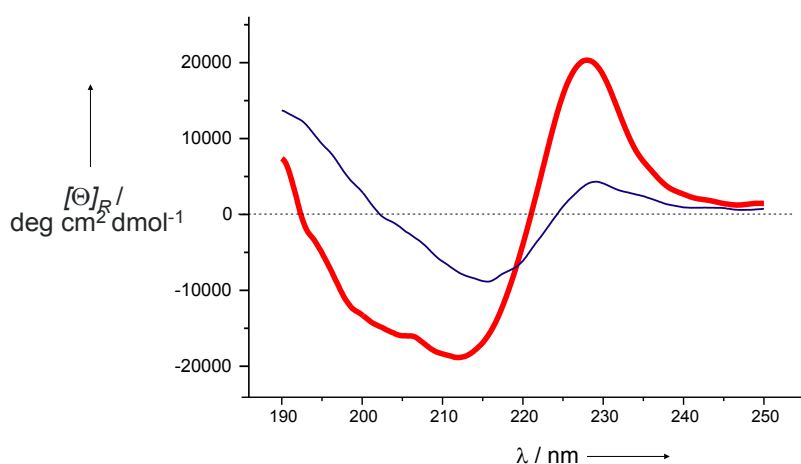


Abbildung 4.9: Circular dichroismusspektrum des AzoTrpZip2 in Wasser bei einer Konzentration von 45 μ M, einem pH-Wert von 3.7 und einer Temperatur von 30 °C im photostationären Zustand des cis-Isomers (dicke rote Kurve) und im trans-Isomer (blaue Kurve). Abbildung aus [Don06].

Durch Variation der Temperatur bei Messungen an den Tryptophanzipperpeptiden konnten CD-Spektren von 100 % gefalteten und gänzlich entfaltenen Peptiden gewonnen werden. Aus der Intensität der Bande bei 228 nm kann mittels dieser Eichspektren nun auf den Faltungsgrad eines Tryptophanzippermotivs geschlossen werden. Im Falle des cis-AzoTrpZip2 konnte im photostationären Zustand (ca. 90 % cis Anteil) bei 5 °C in Wasser ein Faltungsgrad von 50 % bestimmt werden. Dies bedeutet, dass das Peptid ständig zwischen einer ungefalteten und einer gefalteten Struktur wechselt. Im Mittel sind beide Strukturen zu 50 % bevölkert. Durch Belichten mit Licht bei 430 nm wurde das cis-Isomer in das trans-Isomer umgewandelt. Damit konnte der Anteil an gefalteter β -Hairpin Struktur auf 18 % gesenkt werden.

Das trans-Isomer des AzoTrpZip2 zeigt in Wasser bei 30 °C hauptsächlich eine ausgedehnte leicht β -ähnliche Konformation, wie aus den positiven Signalen unterhalb von 200 nm und dem Minimum bei 215 nm geschlossen werden kann. Das cis-AzoTrpZip2 ist zu etwa 25 % gefaltet, wie aus der Intensität bei 228 nm folgt.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass das Lösungsmittel Methanol die β -Hairpin Struktur begünstigt, wurde das Peptid AzoTrpZip2 mittels CD-Spektroskopie auch in Wasser/Methanol Gemischen untersucht, siehe Abbildung 4.10.

Die Zugabe von Methanol führt zu einem Anstieg in der Intensität der Bande bei 228 nm und damit zu einem Anstieg des Anteils an gefalteter β -Hairpin Struktur. Ab einem Volumenverhältnis von 1 zu 1 zwischen Methanol und Wasser war kein weiterer

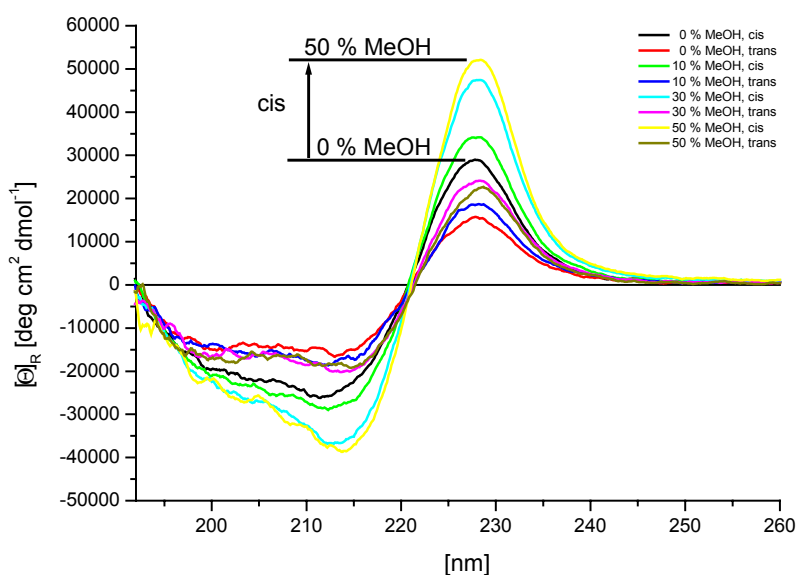


Abbildung 4.10: Circular dichroismspektrum des AzoTrpZip2 in Wasser/Methanol Mischungen. Abbildung entnommen aus [Löw05].

Anstieg der Bande bei 228 nm beobachtbar. Durch CD-Messungen in 100 % Methanol konnte auch gezeigt werden, dass bei 30 °C das cis-Isomer des AzoTrpZip2 zu ca. 45 % in gefaltetem Zustand vorliegt. Bereits mittels CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass das Schalten durch Licht zwischen den cis- und trans-Isomeren reversibel ist, da die zugehörigen CD-Spektren nach mehreren Schaltzyklen deckungsgleich waren.

4.4.2 Charakterisierung mittels Kernspinresonanz

Strukturaufklärung des cis-Isomers des AzoTrpZip2

Die Circular dichroismmessungen deuten darauf hin, dass im Lösungsmittel Methanol die β -Hairpin Struktur für das cis-Isomer des AzoTrpZip2 am ausgeprägtesten auftritt. Jedoch steht die gefaltete Struktur immer im Austausch mit einem ungefalteten Zustand. Die Austauschgeschwindigkeit führte unterhalb von einer Temperatur von 30 °C zu einer Verbreiterung der Linien im NMR-Spektrum, so dass eine Strukturaufklärung unterhalb dieser Temperatur unmöglich war.

Aus den bei 30 °C gemessenen zweidimensionalen NMR-Spektren konnten Abstandsinformationen gewonnen werden. Abbildung 4.11 zeigt die Überlagerung der zehn energetisch günstigsten Konformere des cis-AzoTrpZip2, die durch Molekulardynamiksimulationen unter Verwendung der gemessenen Abstandsbedingungen als Randbedingung gewonnen wurden. Die erreichte Auflösung betrug dabei 1.3 Å (einfache Standardabweichung). In Abbildung 4.11 ist deutlich die Ansammlung der Tryptophanseitenketten auf einer Seite der durch die beiden Stränge definierten Ebene zu erkennen. Durch anziehende van-der-Waals Wechselwirkungen bilden sie einen hydrophoben Kern und stabilisieren so die β -Hairpin Struktur. Ein weiterer Mechanismus, der zu einem hydrophoben Kern führt, ist die Störung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks des Lösungsmittels durch hydrophobe Seitenketten (hydrophobe Wechselwirkung).

Abbildung 4.12 zeigt eine Überlagerung der Struktur des AzoTrpZip2 mit der des ursprünglichen trpzip2 synthetisiert von Cochran et al. [Coc01]. Die Übereinstimmung der

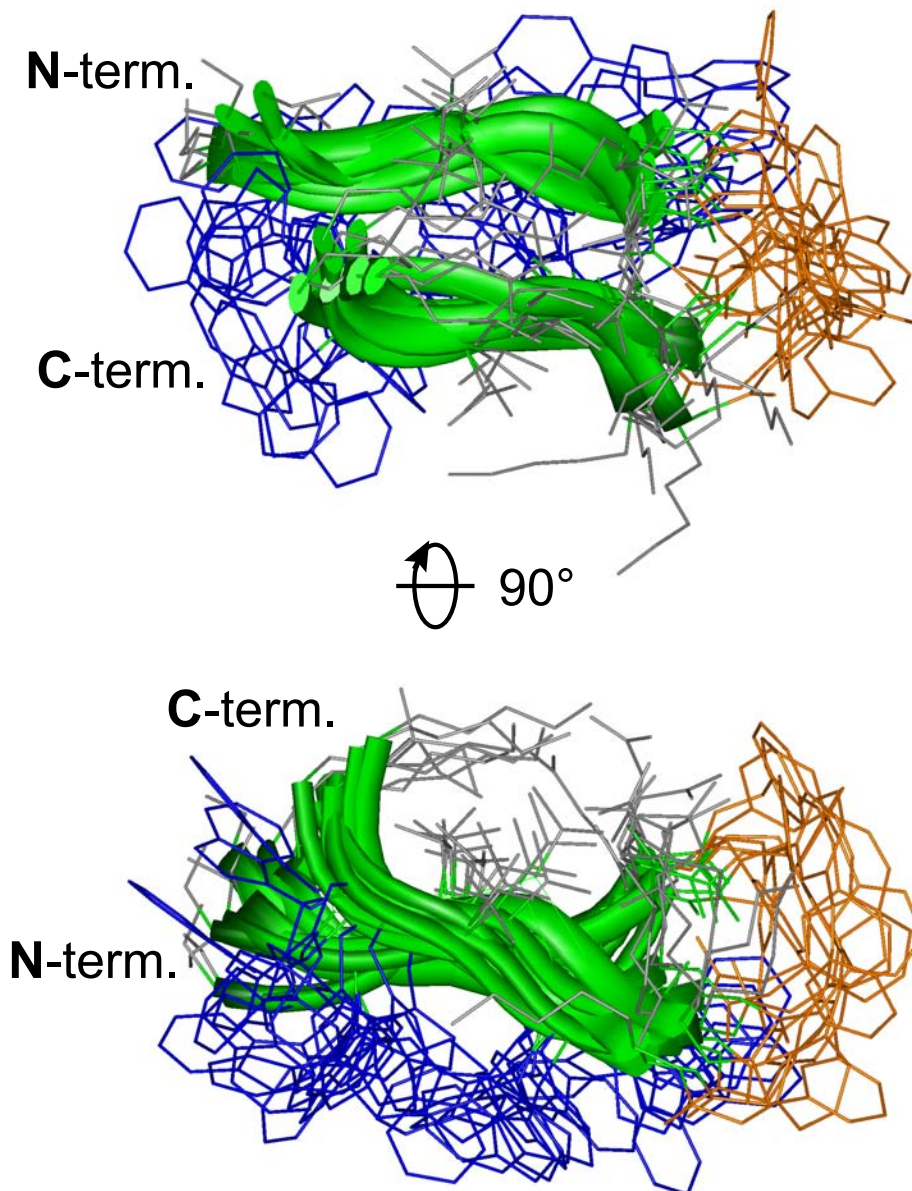


Abbildung 4.11: Überlagerung der zehn energetisch günstigsten Konformere des cis-AzoTrpZip2, welche mit den aus der 2-dimensionalen NMR Spektroskopie gewonnenen Abständen konform sind. Der AMPP Schalter wird in orange dargestellt. Das grüne Band repräsentiert das Peptidrückgrat. Die Tryptophanseitenketten sind blau, alle anderen Seitenketten grau dargestellt. Die Ausbildung der β -Hairpin Struktur ist deutlich erkennbar. Abbildung aus [Don06].

sich entsprechenden Stränge des Peptidrückgrats ist jeweils bemerkenswert gut. Hinzu kommen noch die großen strukturellen Ähnlichkeiten in der Anordnung der Tryptophanseitenketten. Kleinere Unterschiede ergeben sich nur im Bereich des Turns, wo die beiden Aminosäuren Asn-Gly gegen den Azobenzol-Chromophor AMPP ausgetauscht wurden. Dieser Chromophor scheint also den $\beta I'$ Turn des trpzip2 gut nachbilden zu können. Eine mögliche Salzbrücke [Cia03] zwischen der positiv geladenen Seitenkette

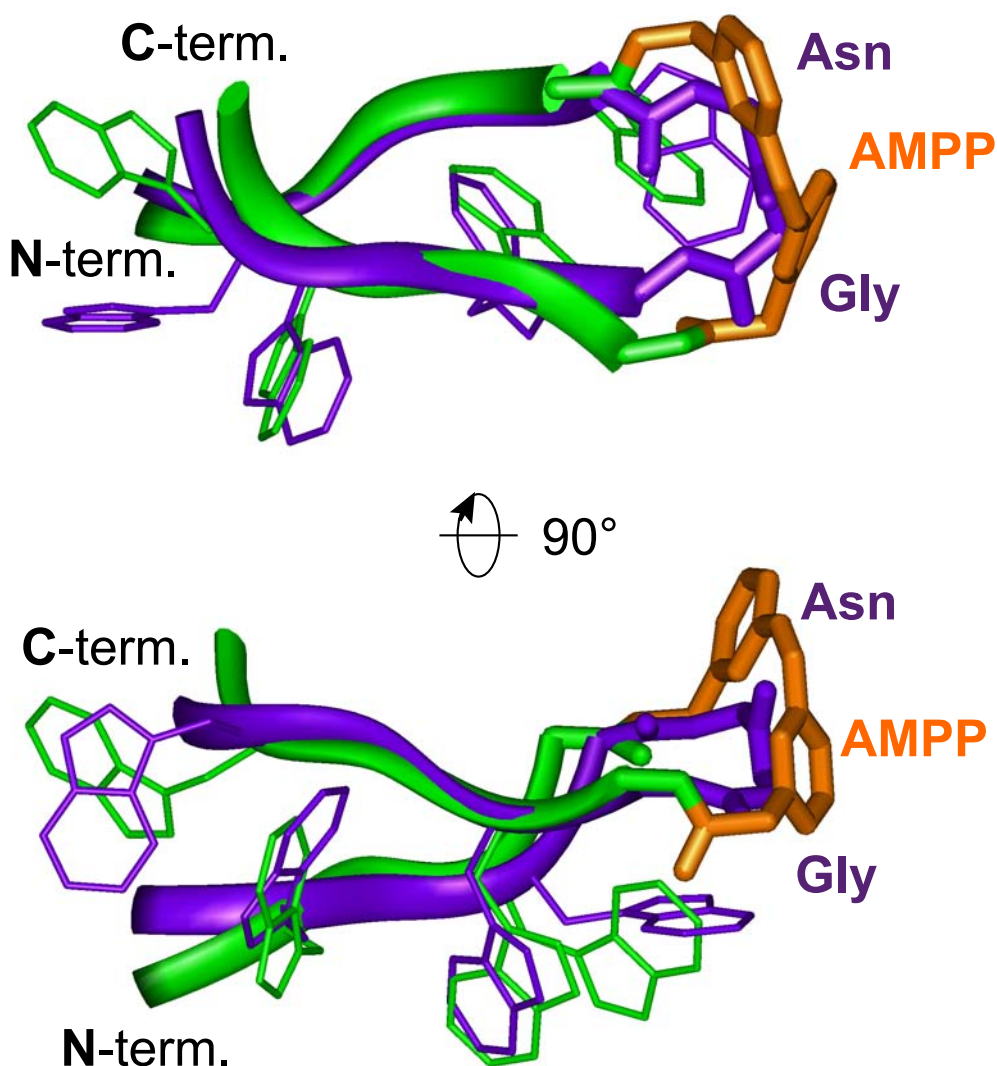


Abbildung 4.12: Überlagerung des Peptidrückgrats des energetisch günstigsten Konformers des cis-AzoTrpZip2 mit dem originalen Tryptophanzipperpeptid trpzip2. Der AMPP Schalter des AzoTrpZip2 wird wieder in orange dargestellt. Das grüne Band repräsentiert das Peptidrückgrat und die zu AzoTrpZip2 gehörenden Tryptophanseitenketten. Die Tryptophanseitenketten und das Rückgrat des trpzip2 sind violett gezeichnet, wie auch dessen Loop-Sequenz. Abbildung aus [Don06].

des Lysins und der negative geladenen deprotonierten Glutaminsäure scheint sich nicht immer auszubilden [Den07].

Der Schalter AMPP des cis-AzoTrpZip2 Modellpeptids ist vergleichsweise flexibel an die Peptid-Stränge angebunden. Nicht zuletzt erfolgt dies durch die beiden Methylengruppen. Es scheint deshalb einige Konformationen zu geben, bei denen das Azobenzol auf der Seite des hydrophoben Kerns ist, und andere, wo das Azobenzol auf der gegenüberliegenden Seite liegt.

Die energetisch günstigste Anordnung der Benzolringe der Tryptophanseitenketten zueinander ist Gegenstand neuerer theoretischer Betrachtungen [Guv05]. Es sind prinzipiell drei verschiedene Lagen zueinander denkbar. Die erste ist die Anordnung, in der ein Benzolring senkrecht auf dem anderen steht. Eine weitere wäre eine genau übereinander

angeordnete, parallele Stellung der Benzolringe zueinander und eine dritte besteht in einer parallelen, jedoch leicht versetzten Lage. Cochran et al. haben ihre NMR-Daten einer fundierteren Analyse unterzogen, und korrigierten ihre Strukturen von einer parallelen Anordnung hin zu einer senkrechten Lage der beiden wechselwirkenden Tryptophanseitenketten. Guvench et al. fanden heraus, dass bei richtiger Beachtung der relevanten Multipole, die senkrechte Anordnung die energetisch günstigste ist. Zudem kamen sie zu dem Ergebnis, dass eine solche Anordnung in einer MD-Simulation über 10 ns stabil war [Guv05].

Strukturaufklärung des trans-Isomers des AzoTrpZip2

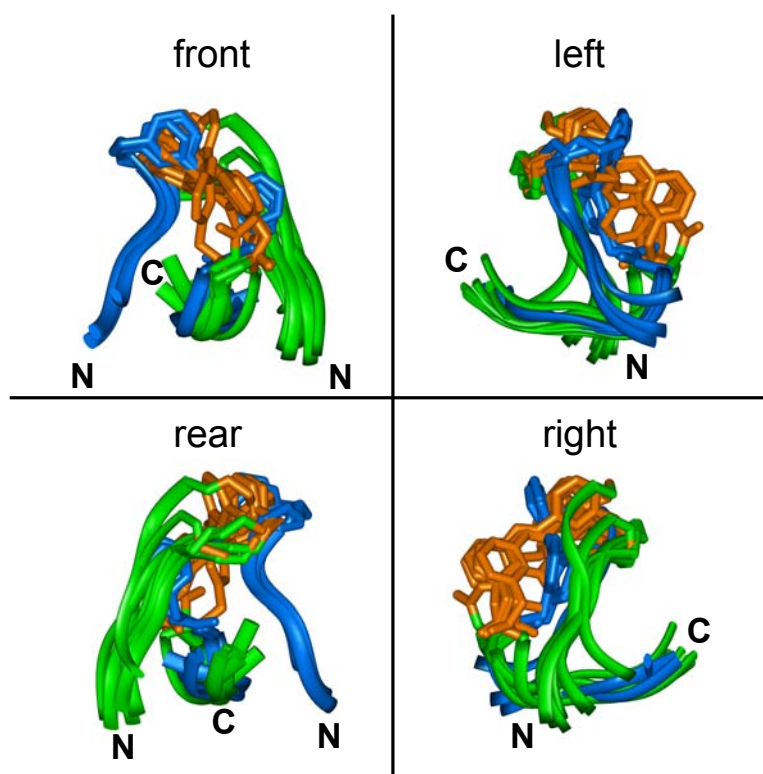


Abbildung 4.13: Überlagerung der zehn energetisch günstigsten Konformere des trans-Isomers des AzoTrpZip2 auf Rückgratome eines der beiden Stränge (genauer: Aminosäuren Lys6 bis Lys10). Bei der zu 75 % angenommenen Hauptkonformation ist die Farbcodierung wie beim cis-Isomer: Der AMPP Schalter ist in orange und das Peptidrückgrat in grün dargestellt. Die blaue Farbe steht für die Nebenkongformation. Gezeigt sind vier Ansichten, einmal von vorne und von hinten und von beiden Seiten. Die Buchstaben N und C stehen jeweils für den N- und C-Terminus der Aminosäurekette. Abbildung aus [Don06].

Die Strukturbestimmung des trans-Isomers des Modellpeptids AzoTrpZip2 gestaltete sich aufgrund vieler Subensembles schwierig und gelang nur bei einer Temperatur von 20 °C. Zwei klar unterscheidbare Subensembles konnten aufgelöst werden. Ihre relative Besetzung zueinander ist 3 zu 1. Die Hauptkonformation ist in Abbildung 4.13 dargestellt, überlagert von der Nebenkongformation in blauer Farbe. Beide Konformationen erfüllen alle 47 Abstandsbedingungen, die aus den NMR-Messungen gewonnen werden konnten. Auch wenn die Überlagerung in Abbildung 4.13 zunächst willkürlich erscheint,

so kann doch, abgesehen von der Lage des Chromophors, entweder der eine Strang korrekt überlagert werden oder der jeweils andere. In der Ausrichtung der beiden Stränge zueinander unterscheiden sich also die beiden Konformationen untereinander. In einer der beiden Konformationen ist die Anordnung der Stränge zueinander anstatt antiparallel fast parallel. Es kann festgehalten werden, dass der Schalter AMPP in seiner trans-Konformation sicher nicht einen guten β I'-Turn abgibt und somit die β -Hairpin Struktur, wie sie im cis-AzoTrpZip2 vorliegt, nicht erlaubt. Wie auch das cis-Isomer befindet sich das trans-Isomer ebenfalls in ständigem Austausch seiner Struktur zwischen der Haupt- und Nebenkongformation und einem unbekanntem Anteil an nicht gefalteten offeneren Strukturen, die in den NMR-Daten nicht nachweisbar sind.

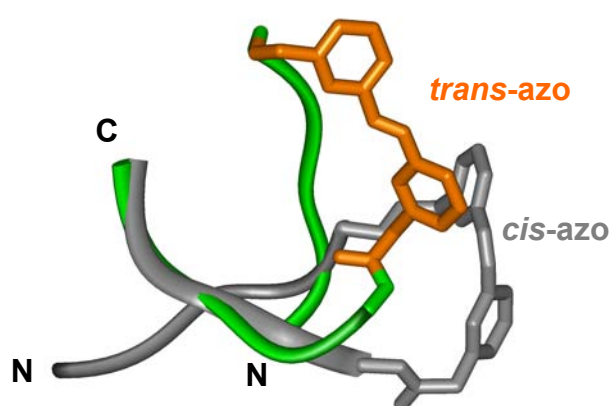


Abbildung 4.14: Vergleich zwischen trans- und cis-AzoTrpZip2. Das trans-Isomer von AzoTrpZip2 ist farbig dargestellt (AMPP orange, Peptidrückgrat grün), wohingegen das cis-Isomer grau gefärbt ist. Abbildung aus [Don06].

In Abbildung 4.14 wird die Überlagerung eines cis-Isomers des AzoTrpZip2 mit dem eines trans-Isomers gezeigt. Hier gelingt eine sinnvolle Überlagerung nur entlang eines Stranges. Deutlich sind die Unterschiede in den beiden Strukturen sichtbar. Aufgrund dieser Unterschiede folgt, dass jede in der β -Hairpin Struktur des cis-AzoTrpZip2 vorhandene Wasserstoffbrückenbindung gebrochen werden muss, um das strukturelle Ensemble des trans-Isomers des AzoTrpZip2 zu erreichen.

Strukturaufklärung des cis-Isomers des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂

Auch das Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ wurde in gleicher Weise mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Für sein trans-Isomer konnten keine strukturellen Präferenzen festgestellt werden. Jedoch gelang es, für das cis-Isomer ein strukturelles Ensemble zu generieren.

Abbildung 4.15 zeigt die drei energetisch günstigsten Konformationen des cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Deutlich erkennbar ist die Ausbildung einer Turn-Struktur, wie sie auch bei dem cis-Isomer des AzoTrpZip2 vorliegt. Die nächst höheren Strukturen auf der Energieskala zeigen zwar auch eine Turn-Struktur, der Chromophor AMPP ist hierbei jedoch etwas anders angeordnet, so dass eine Überlagerung der zehn energetisch günstigsten Konformere zu einer unübersichtlichen Darstellung führen würde.

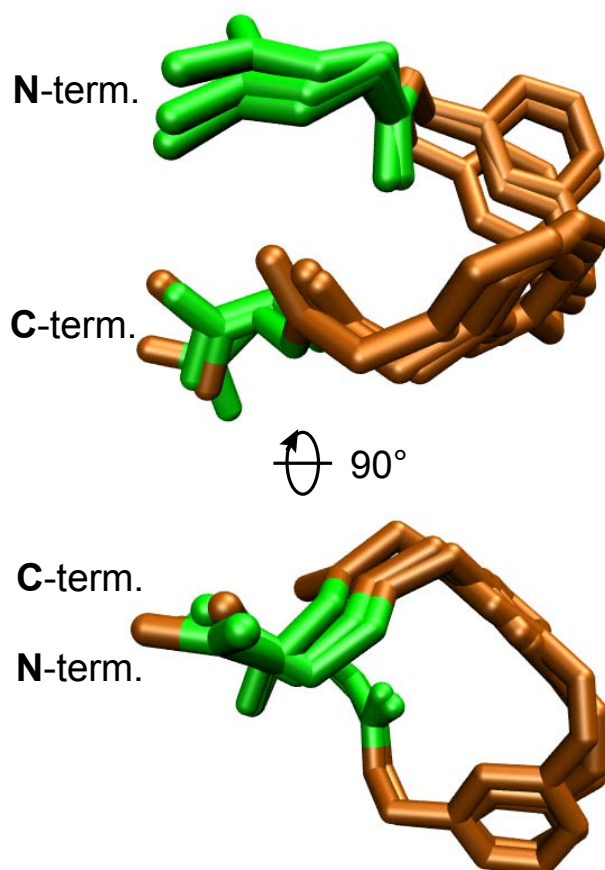


Abbildung 4.15: Überlagerung der drei energetisch günstigsten Konformere des cis-Isomers des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Der AMPP Schalter wird in orange dargestellt. Das grüne Band repräsentiert jeweils das Peptidrückgrat. Die Messungen und Strukturrechnungen wurden ausgeführt von Dr. Sergio Cadamuro in der Gruppe Moroder.

4.4.3 Charakterisierung mittels Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren von Peptiden im ultravioletten Spektralbereich sind gekennzeichnet durch Seitenkettenabsorptionen, hauptsächlich verursacht durch Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan [Sch55]. Die Peptidbindung selbst absorbiert bei 190 nm [Gol51]. Im sichtbaren Spektralbereich sind Peptidlösungen im allgemeinen transparent, mit der Ausnahme von speziellen Chromopeptiden, die einen Farbstoff enthalten wie zum Beispiel Bakteriorhodopsin [Sob07, Pro06], Hämoglobin [Cha96b] und Cytochrome [FM06]. Neben Oberschwingungen im nahinfraroten Bereich ist der mittlere infrarote Spektralbereich von besonderem Interesse, da er markante Banden aufweist.

Abbildung 4.16 gibt einen Überblick über das Absorptionsspektrum des trans-AzoTrpZip2 im Bereich von 1100 bis 43000 cm⁻¹ bzw. 9090 bis 232 nm. Es handelt sich dabei um die Überlagerung zweier gemessener Kurven. Das Spektrum von 232 nm bis 3200 nm wurde im Spektrophotometer Perkin Elmer Lambda 19 aufgenommen, das andere Spektrum zwischen 9090 und 1250 nm stammt vom Fouriertransform-Infrarotspektrometer Bruker IFS 66. Subtrahiert wurde jeweils ein in derselben Küvette aufgenommenes Lösungsmittelspektrum von perdeutertem Methanol, so dass

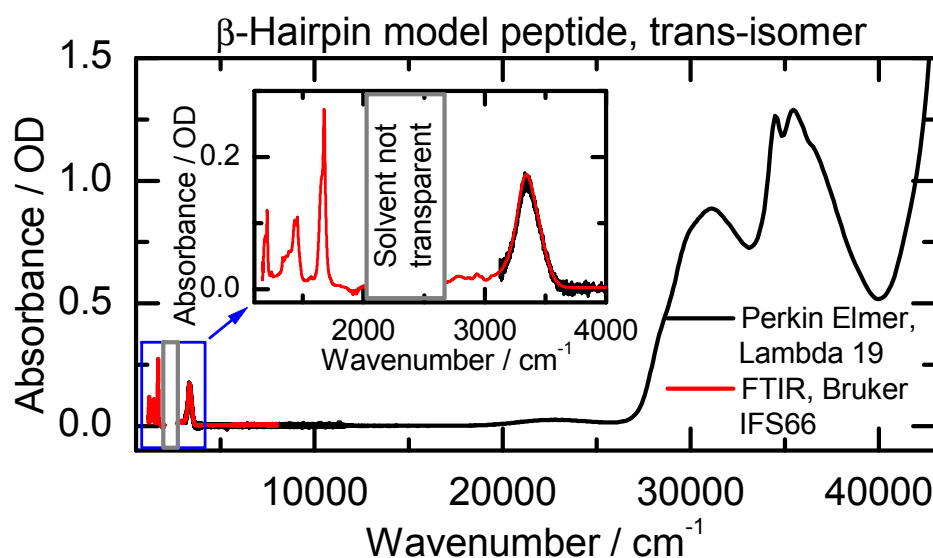


Abbildung 4.16: Das Absorptionsspektrum des trans-Isomers des β -Hairpin Modellpeptids AzoTrpZip2 zusammengesetzt aus den Daten des Perkin Elmer Lambda 19 UV/VIS Spektrometers und des Fouriertransform-Infrarotspektrometers IFS 66 der Firma Bruker. Die Spektren sind jeweils korrigiert auf das Lösungsmittel und auf Küvetteninflüsse. Im Bereich 2000 bis 2700 cm^{-1} ist das Lösungsmittel Methanol-d4 nicht transparent, weswegen diese Daten nicht dargestellt werden. Der eingesetzte innere Graph zeigt eine Vergrößerung des Ausschnitts zwischen 1100 und 4000 cm^{-1} (blauer Kasten). Um 3300 cm^{-1} erscheint die OH-Streckschwingung verursacht durch mit dem Modellpeptid gelöstes Wasser. Erst bei 1670 cm^{-1} und darunter finden sich charakteristische Infrarotbanden des Modellpeptids selbst.

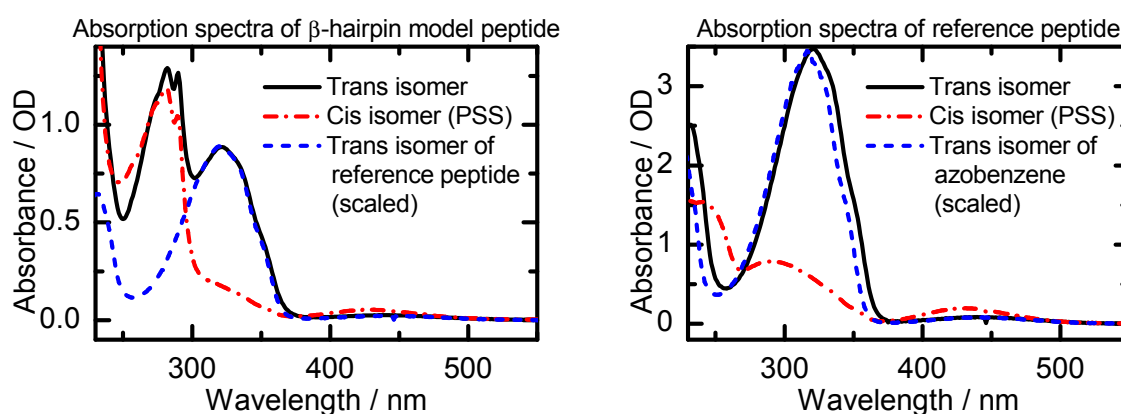
Lösungsmittel- und Küvetteninflüsse (durch Rückreflexe) herauskorrigiert sind. Wenn nicht anders angegeben sind die Spektren jeweils bei Zimmertemperatur aufgenommen und auf das Lösungsmittel korrigiert. Die Angabe der optischen Dichte (OD) bezieht sich in den Graphen dieser Arbeit immer auf eine Schichtdicke von 220 μm .

Die Bande bei ca. 3340 cm^{-1} rührt von einer OH-Streckschwingung von undeuterten Hydroxygruppen her und ist in beiden Spektrometern gut nachweisbar. Auffällig sind auch die auf einer Energieskala vergleichsweise breiten Absorptionsbanden im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich, wohingegen die Banden im mittleren infraroten Bereich deutlich schmaler und strukturierter sind. Zusätzlich wird deutlich, dass erlaubte Übergänge im sichtbaren Spektralbereich, wie die $\pi\pi^*$ -Bande des Azobenzolchromophors bei 30000 cm^{-1} , mehr Oszillatorstärke besitzen als typische Infrarotabsorptionsbanden, wie zum Beispiel die Amid-I' Bande bei 1670 cm^{-1} , welche aus 11 Chromophoren, den CO-Streckschwingungen besteht. Der verbotene Übergang des Azobenzols, die $n\pi^*$ -Bande bei 22500 cm^{-1} , zeigt jedoch eine vergleichsweise niedrige Oszillatorenstärke.

Die untere Grenze in Abbildung 4.16 bei 1100 cm^{-1} liegt in der Absorption der Kalziumfluoridküvettenfenster begründet. Deren hochenergetische Absorptionskante bei ca. 130 nm begrenzt jedoch nicht die Transparenz der Küvette. Hier beginnt die Absorption des Lösungsmittels Methanol-d4 bei ca. 190 nm bzw. 52600 cm^{-1} . Aber auch dies erklärt nicht den starken Absorptionsanstieg hin zu 232 nm oder 43000 cm^{-1} . Dieses Phänomen wird im nächsten Kapitel erklärt.

Spektren im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich

Will man das Absorptionsspektrum des trans-Isomers des AzoTrpZip2 aus Abbildung 4.17(a) verstehen, kann man zunächst davon ausgehen, dass sich die Spektren der einzelnen Chromophore addieren, da deren Wechselwirkung untereinander gering ist. Die Absorption bei 282 nm setzt sich zum Beispiel aus Anteilen des Azobenzols und der Tryptophanseitenketten zusammen. In der Literatur findet man molare Absorptionskoeffizienten ε für Tryptophan von ca. $5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 282 nm und im Lösungsmittel Wasser (pH=6) gemessen [Cre93]. Der entsprechende Wert für den meta-substituierten Azobenzolchromophor beträgt $\varepsilon_{AMPP}=25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 322 nm [Löw05]. Bei einer Schichtdicke von $d=220 \mu\text{m}$ und einer Absorption von $A=0,9$ entspricht dies nach dem Lambert Beerschen Absorptionsgesetz $A=\varepsilon cd$ einer Konzentration von $c=1,6 \text{ mM}$.



(a) Absorptionsspektren des AzoTrpZip2 in Methanol-d4 (b) Absorptionsspektren des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ in Methanol-d4

Abbildung 4.17: Lösungsmittelkorrigierte Absorptionsspektren im sichtbaren Spektralbereich des AzoTrpZip2 und seines Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Gegenüber dem unsubstituierten Azobenzolspektrum (gestrichelte Linie in 4.17(b)) ist die rote Flanke der $\pi\pi^*$ -Bande des trans-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ (durchgezogene Linie) bei 321 nm rotverschoben um 6,5 nm und verschmälert um ca. 3 nm. Dies ist durch die meta-Substituierung des Azobenzols im Referenzpeptid bedingt. Die verbotene $n\pi^*$ -Bande um 430 nm bleibt nahezu unverändert. Die Anbindung weiterer Aminosäuren vom Referenzpeptid hin zum trans-AzoTrpZip2 führt nur noch zu geringen Änderungen an der $\pi\pi^*$ -Bande. Die Absorption der Tryptophanseitenketten des trans-AzoTrpZip2 manifestiert sich in den markant strukturierten Absorptionsbanden bei 282 nm und 290 nm. Die Absorptionsspektren der photostationären Gleichgewichte nach erfolgter Belichtung zum cis-Isomer sind jeweils als strichpunktierte Linien mit eingezeichnet. Die Schichtdicke der Probe in der Küvette war jeweils $220 \mu\text{m}$.

Da jedes Molekül AzoTrpZip2 vier Tryptophane enthält, summiert sich die Seitenkettenabsorption bei 282 nm zu $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Für die folgende Betrachtung muss man noch annehmen, dass sich die Absorptionskoeffizienten in Wasser und Methanol nicht allzu sehr unterscheiden. Die Absorption des meta-substituierten Azobenzolchromophors bei 282 nm beträgt 0,3 OD (gestrichelte Kurve in Abbildung 4.17(a)). Zusammen mit der berechneten Absorption der Seitenketten von 0,8 OD ergibt dies einen Wert von 1,1 OD, was mit dem gemessenen Wert von 1,3 OD mäßig gut übereinstimmt. Der starke Anstieg der Absorption bei 240 nm erklärt sich damit ebenfalls aus der Seitenketten-

absorption, die für ein Tryptophan allein ab 240 nm auf einen Absorptionskoeffizienten von $30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 220 nm zu steigen beginnt. Kleinere Anteile können noch dem Chromophor AMPP zugeschrieben werden.

Vergleicht man das Spektrum des Referenzpeptids mit dem von Azobenzol, gemessen im gleichen Lösungsmittel Methanol-d4 (gestrichelte Kurve in Abbildung 4.17(b)), so fallen einige Unterschiede auf, die wohl auf die Substituierung in der meta-Position durch Methylengruppen zurückzuführen sind. Man beobachtet eine Bandenverschmälerung der $\pi\pi^*$ -Bande des AMPP Chromophors gegenüber dem Azobenzol von 3 nm und deren Rotverschiebung um 6,5 nm.

In Abbildung 4.17(a) ist mit strichpunktierter Linie auch das Spektrum des photostationären Gemisches von cis- und trans-Isomeren des AzoTrpZip2 gezeigt. Es wird durch Belichtung der Küvetten mit Licht einer Quecksilber/Xenon-Lampe und den in Kapitel 3.3.2 genannten Filtern erreicht. Subtrahiert man von diesem Spektrum 16 % des Absorptionsspektrums des reinen trans-Isomers (durchgezogene Linie), so erhält man ein hypothetisches Spektrum des reinen cis-Isomers, das bei einer Wellenlänge von 339 nm bereits leicht negativ wird. Da das cis-Isomer jedoch keine negative Absorption aufweisen kann, ergibt sich, dass das photostationäre Gleichgewicht weniger als 16 % Moleküle in der trans-Konformation enthält. Im Falle des Referenzpeptids findet man mit einem entsprechenden Vorgehen einen maximalen Anteil an trans-Isomeren im photostationären Gleichgewicht von 10 %.

Durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) lässt sich im Lösungsmittel Acetonitril ein Gemisch aus cis- und trans-Isomeren des AzoTrpZip2 auftrennen. Zusätzlich war die Aufnahme eines Spektrums der aufgetrennten Fraktionen im sichtbaren Spektralbereich möglich [Löw05]. Vergleicht man das so gewonnene "reine" Spektrum des cis-Isomers mit dem des photostationären Gleichgewichts aus Abbildung 4.17(a), ergeben sich Unterschiede, die in der Tatsache begründet sind, dass in der HPLC ein anderes Lösungsmittel (Acetonitril) an Stelle von Methanol-d4 verwendet wurde. Dadurch gab es spektrale Veränderungen im Bereich der Tryptophanabsorption und im Bereich der $\pi\pi^*$ -Bande des AMPP Chromophors, so dass eine sinnvolle Skalierung einer geeigneten Summe der "reinen" Spektren auf das des photostationären Gleichgewichts nicht mehr möglich war. Auch die Lage der isosbestischen Punkte war eine andere in den HPLC Spektren, da die $\pi\pi^*$ -Bande der HPLC Spektren um ca. 3 nm rotverschoben zu den Spektren in Methanol-d4 auftrat.

Da das cis-Isomer bei allen Wellenlängen, die verwendet werden können, um das cis-Isomer zu erhalten, ebenfalls eine Absorption aufweist, kann durch Belichtung keine Probe mit 100 % cis-Anteil erhalten werden, da immer auch die Rückreaktion von cis nach trans stattfinden wird. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der cis-Anteil im photostationären Gleichgewicht nach ausreichender Belichtung im Falle des AzoTrpZip2 größer 84 % und im Falle des Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ größer 90 % ist.

Nach Hinweisen aus der NMR-Spektroskopie kann direkt nach dem Auflösen der Probe AzoTrpZip2 im Lösungsmittel Methanol-d4 ein Gemisch vorliegen, das etwas cis-Isomer enthält, obwohl das trans-Isomer das thermodynamisch stabilere Konformer ist. Dieser cis-Anteil kann durch Addition von 10 % des Spektrums im photostationären Gleichgewicht des cis-Isomers auf ein später gewonnenes reines trans Spektrum abgeschätzt werden. Ein solches Spektrum zeigt eine Übereinstimmung mit dem Spektrum in Abbildung

4.17(a), durchgezogene Linie, das direkt nach dem Auflösen aufgenommen wurde. Maximal 10 % der Moleküle des AzoTrpZip2 liegen also nach dem Auflösen als cis-Isomere vor. Durch geeignete Lagerung unter Lichtabschluss wandelt sich dieser cis-Anteil jedoch in das trans-Isomer um. Man kann also davon ausgehen, dass nach mehreren Stunden in Lösung und in Dunkelheit das trans-Isomer in reiner Form vorliegt.

Spektren im mittleren infraroten Spektralbereich

Ziel dieses Abschnittes ist es, Absorptionsspektren des trans- sowie des cis-Isomers des Modellpeptids AzoTrpZip2 im infraroten Spektralbereich zu erhalten, sowie ihre wesentlichen Banden zu verstehen. Abbildungen 4.18 und 4.19 führen durch die Lösungsmittel bzw. Wasserkorrektur der Spektren. Nachfolgend wird auf die spektralen Einflüsse durch das Deuterieren des Peptidrückgrats eingegangen (Abbildung 4.20). Die spektralen Absorptionsunterschiede des cis- und trans-Isomers des AzoTrpZip2 werden in der Abbildung 4.21(a) gezeigt. In weiteren Abbildungen wird auf molekulare Bausteine eingegangen, aus denen sich das Molekül AzoTrpZip2 und damit auch sein Infrarotspektrum zusammensetzt.

Lösungsmiteleinflüsse Der spektrale Einfluss des Lösungsmittels im sichtbaren Spektralbereich ist gering und beschränkt sich in obigen Abbildungen auf eine Konstante, die abgezogen wurde. Nicht so jedoch im mittleren infraroten Bereich. Hier gibt es Bereiche, in denen das Lösungsmittel bei der gewählten Schichtdicke gänzlich lichtundurchlässig ist, also für eine Abschwächung der Intensität des einfallenden Lichts um mehr als drei Größenordnungen sorgt. Abbildung 4.18 zeigt die Korrektur der gemessenen Infrarotabsorptionsspektren auf Lösungsmiteleinflüsse. Die strichpunktierte Linie stellt die Absorption des reinen Lösungsmittels Methanol-d4 dar. Der Absorption zwischen 2000 und 2700 cm^{-1} können symmetrische und asymmetrische CD-Streckschwingungen zugeordnet werden. Auch eine durch Wasserstoffverbrückung verbreiterte OD-Streckschwingung trägt hier zur Absorption bei.

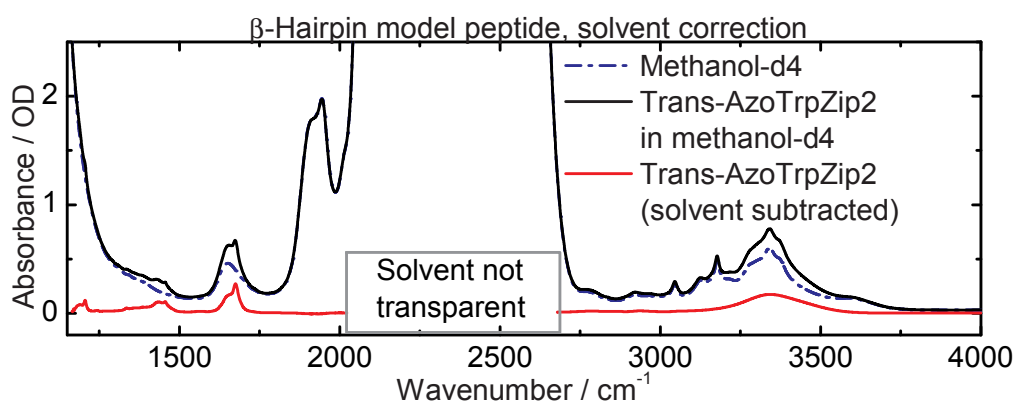


Abbildung 4.18: Lösungsmittelkorrektur der Infrarotabsorptionsspektren. Die strichpunktierte Linie zeigt das Spektrum des reinen Lösungsmittels Methanol-d4, das jeweils von allen folgenden Spektren von gelösten Proben subtrahiert wurde.

Zum Absorptionsanstieg unterhalb von 1200 cm^{-1} tragen CD- und OD-Biegeschwingungen sowie die Streckschwingung einer C-O-Einfachbindung bei. Die Zuordnung dieser Banden erfolgte auf der Basis einer dichtefunktionaltheoretischen (DFT) Berechnung mit dem Funktional B3LYP und dem Basissatz 6-31G** implementiert im Programmpaket Gaussian98 [Fri98]. Im Bereich zwischen 1200 und 2000 cm^{-1} befinden sich keine Fundamentalschwingungen. Insbesondere die Banden bei $1651,5\text{ cm}^{-1}$ und bei 1944 cm^{-1} mit einer Schulter bei $1908,5\text{ cm}^{-1}$ können nur durch Obertöne, Kombinationsschwingungen, Fermiresonanzen oder Verunreinigungen erklärt werden.

Literaturspektren von Methanol-d4 finden sich in [Noe42, Fal61]. Gasspektren und Spektren von Methanol-d4 isoliert in geeigneten Wirtssystemen finden sich in [Ser74]. Auch im Ramanspektrum des flüssigen Methanol-d4 finden sich im Spektralbereich zwischen 1200 und 2000 cm^{-1} keine Banden [Fal61]. In letzterer Veröffentlichung sind im gemessenen Spektrum des flüssigen Methanol-d4 die beiden Banden bei $1651,5\text{ cm}^{-1}$ und bei 1944 cm^{-1} erkennbar, werden jedoch nicht weiter diskutiert. Die Bande bei 3343 cm^{-1} kann zum Teil zumindest auf eine Verunreinigung durch Methanol-d3 zurückgeführt werden.

Subtrahiert man von dem gemessenen Absorptionsspektrum des trans-Isomers des AzoTrpZip2 im Lösungsmittel Methanol-d4 ein kurz vorher aufgenommenes Spektrum des reinen Lösungsmittels, so erhält man ein Absorptionsspektrum des trans-AzoTrpZip2 (rote Kurve in Abbildung 4.18). Dabei geht die Annahme ein, dass die Absorptionsspektren des Lösungsmittels und der gelösten Probe rein additiv sind. Es ist an sich durchaus denkbar, dass die gelöste Probe auch das Infrarotspektrum des Lösungsmittels beeinflusst und zum Beispiel zu Bandenverbreiterungen von Lösungsmittelbanden führt [Sol06]. In einem solchen Fall kann nicht einfach subtrahiert werden. Bei den geringen Konzentrationen der gelösten Probe in dieser Arbeit wurde ein solcher Effekt jedoch nicht beobachtet.

Wasserkorrektur Die synthetisierten Proben an Modellpeptiden enthalten in fester Phase neben dem eigentlichen Peptid noch einen veränderlichen Anteil an Wasser. Dies liegt daran, dass der letzte Schritt zur Herstellung dieser festen Phase der Probe eine Lyophilisierung aus dem Lösungsmittel Wasser ist. Auch geringe Mengen an Trifluoressigsäure (engl. Trifluoroacetic acid, TFA) können vorhanden sein, die noch von der Abspaltung der Peptide vom Harz aus der Festphasensynthese stammen. Trifluoressigsäure besitzt in Methanol-d4 eine relativ dominante Bande bei 1771 cm^{-1} . Eine solche Bande fehlt jedoch im Spektrum aus Abbildung 4.19, rote Kurve. Ein Hinweis, dass sich im Spektrum detektierbare Mengen an TFA in der Lösung des Peptids AzoTrpZip2 befinden, konnte demnach nicht gefunden werden.

Jedoch weist das lösungsmittelkorrigierte Spektrum des trans-AzoTrpZip2 eine breite Bande bei 3343 cm^{-1} auf, die hauptsächlich auf mit dem Peptid in Lösung gegangenes Wasser zurückzuführen ist. In separaten Kontrollexperimenten lässt sich durch Zugabe genau vermessener Volumina von Wasser zu Methanol-d4 und nachfolgender Messung der sich ergebenden Spektren ein Spektrum von Wasser in Methanol-d4 gewinnen. Die strichpunktierte Linie in Abbildung 4.19 zeigt ein solches Spektrum mit 0,07 Volumenprozent Wasser. Bei der gegebenen Konzentration des Modellpeptids von 1,6 mM ergibt

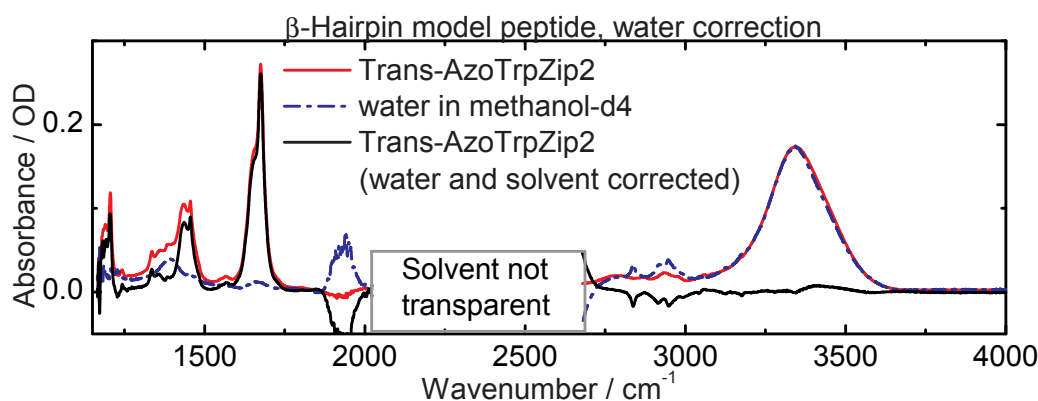


Abbildung 4.19: Wasserkorrektur der lösungsmittelkorrigierten Infrarotabsorptionsspektren. Die rote Kurve repräsentiert das lösungsmittelkorrigierte Spektrum aus Abbildung 4.18. Die Bande bei 3343 cm^{-1} rührt hauptsächlich von mit dem Peptid gelösten Wasser her. Die strichpunktiierte Linie zeigt ein Spektrum von 0,07 Vol. % Wasser in Methanol-d4. Um dieses Spektrum wurden alle im folgenden gezeigten Absorptionsspektren korrigiert (schwarze Linie).

sich ein Verhältnis von ca. 23 Wassermoleküle auf ein Peptidmolekül. Auf Massen umgerechnet bedeutet das für die feste Phase der Peptidprobe einen Peptidgehalt von ca. 80 Gewichtsprozent, was ein realistischer Wert ist. Als Vergleichswert kann auch die Zahl der Lösungsmittelmoleküle pro AzoTrpZip2 zu ca. 14000 angegeben werden.

Die in Methanol-d4 gelösten Wassermoleküle wandeln sich durch Austausch von Protonen gegen die Deuteronen der Hydroxygruppe des Methanol-d4 zunächst in einfach deuteriertes Wasser (HDO) und später in schweres Wasser (D_2O) um. Dabei entsteht Methanol-d3. Bei der strichpunktiierten Linie in Abbildung 4.19 handelt es sich also um das Spektrum eines Gemisches aus HDO, D_2O und Methanol-d3. Die Bande um 3343 cm^{-1} kann also genauer einer OH-Streckschwingung von Methanol-d3 oder HDO zugeordnet werden.

Ein geringerer Anteil der Bande bei 3343 cm^{-1} rührt auch von der Deuterierung des Peptids AzoTrpZip2 selbst her. Durch den Austausch der Protonen der Amidbindungsplättchen mit Deuteronen des Lösungsmittels entstehen einerseits ein deuteriertes Peptidrückgrat und andererseits Methanol-d3. Das Molekül AzoTrpZip2 besitzt 10 gleichberechtigte Protonen am Peptidrückgrat und dazu noch 6 Protonen an den Lysinseitenketten, welche durch Deuteronen ersetzt werden können. Drei weitere Protonen des freien N-Terminus werden wohl ebenfalls gegen Deuteronen ausgetauscht. Ob die Protonen des amidierten C-Terminus austauschen, ist unklar. Da jedes Wassermolekül zwei Protonen besitzt, ein Molekül AzoTrpZip2 jedoch nur zwischen 19 und 21 Protonen austauschen kann, besteht bei einem Wassergehalt von 23 Wassermolekülen pro Molekül AzoTrpZip2 die in Abbildung 4.19 dargestellte Bande bei 3343 cm^{-1} zu etwa einem Drittel aus Methanol-d3, das durch die Deuterierung des AzoTrpZip2 entstanden ist. Um dies noch zu korrigieren, müssten zwei Drittel der Bande durch ein Spektrum von Wasser in Methanol-d3 und ein Drittel davon noch zusätzlich durch ein Spektrum von Methanol-d3 in Methanol-d4 korrigiert werden. Jedoch besitzt das Spektrum von Methanol-d3 zwischen 1500 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} einen spektral flachen Verlauf [Fal61]. Insbesondere die Form der im folgenden intensiv diskutierten Amid-I' Bande würde sich

also durch eine solche Korrektur mit einem Spektrum von Methanol-d₃ nicht wesentlich ändern. Deswegen wurden alle im folgenden gezeigten Spektren nur auf den Wassergehalt hin korrigiert.

Deuterierungseffekte Abbildung 4.20 befasst sich mit den spektralen Änderungen und zeitlichen Abläufen, die mit der Deuterierung des AzoTrpZip2 zusammenhängen. Das strichpunktierte Spektrum in Abbildung 4.20(a) wurde als erstes Spektrum nach dem vollständigen Auflösen der festen Phase der AzoTrpZip2 Probe im Lösungsmittel Methanol-d₄ gewonnen. Danach wurden in festen Zeitabständen immer wieder Spektren aufgenommen, bis keine spektralen Änderungen mehr auftraten. Das letzte Spektrum (durchgezogene Linie in Abbildung 4.20(a)) stellt das Spektrum dar, das auf einer Zeitskala von einer halben Stunde stabil blieb. Durch Differenzbildung der beiden Spektren in Abbildung 4.20(a) findet man als Nulldurchgänge sogenannte isobestische Punkte [Gei05] bei 1490 cm^{-1} , 1615 cm^{-1} und um 1670 cm^{-1} . Sie wurden durch eine unabhängige zweite Messung bestätigt, in der mehr als 20 Spektren nach Beginn der Deuterierung aufgenommen werden konnten.

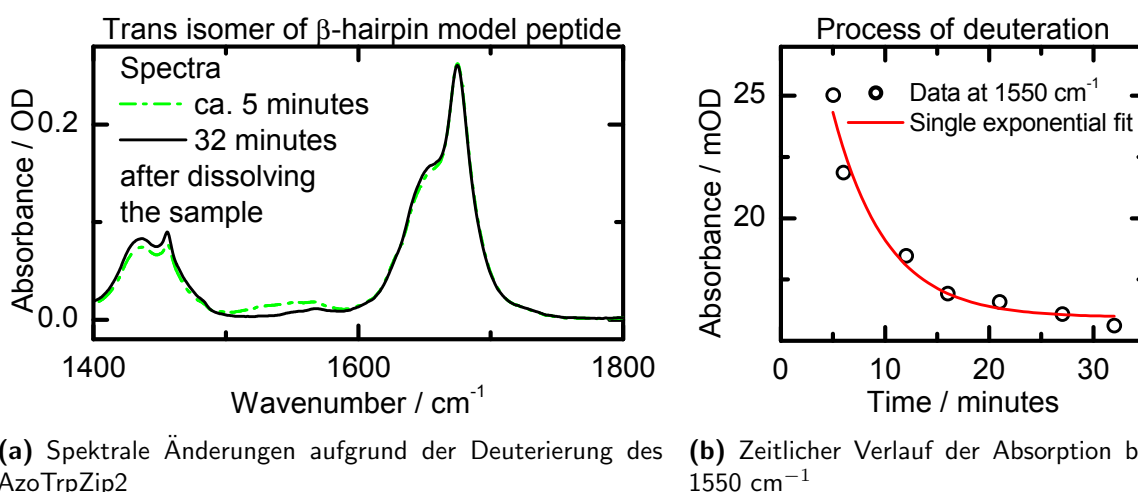


Abbildung 4.20: Deuterierung des Peptidrückgrats des trans-Isomers des AzoTrpZip2. Die spektralen Änderungen in der Amid-I Bande fallen gering aus, jedoch schiebt die Amid-II Bande von 1550 cm^{-1} auf ca. 1420 cm^{-1} . Da der Beobachtungsbeginn erst 5 Minuten nach dem Auflösen des AzoTrpZip2 ist, konnten frühere Deuterierungsprozesse nicht erfasst werden. Die beobachtete Zeitkonstante von ca. 5 Minuten (Abfallzeit auf $1/e$) ist jedoch nicht durch das Lösungsmittel Methanol-d₄ begrenzt, sondern durch Eigenschaften des Peptids, z. B. Entfaltungs- und Faltungsprozesse.

Wegen ihres geringen Anteils einer NH-Biegebewegung (in der Ebene der Peptidplättchen), erfährt die Amid-I Bande nach der Deuterierung eine leichte Rotverschiebung ihrer Frequenz. Dies lässt sich am isobestischen Punkt um 1670 cm^{-1} ablesen. Oberhalb dieser Frequenz nimmt die Absorption mit der Zeit ab und unterhalb davon, jedoch oberhalb des nächsten isobestischen Punktes bei 1615 cm^{-1} steigt sie an. Die größte Frequenzverschiebung erfährt die Amid-II Bande wegen ihres größeren Anteils an der NH-Biegebewegung. Geht man vom Lösungsmittel Wasser über zu schwerem Wasser wird bei Peptiden eine Rotverschiebung von 1550 cm^{-1} nach 1450 cm^{-1} beobachtet

[Sus72]. Mit einem isosbestischen Punkt bei 1490 cm^{-1} kann diese Beobachtung auch für den Fall des AzoTrpZip2 gemacht werden. Die Absorptionzunahme bei 1450 cm^{-1} wird durch eine neu entstehende Bande verursacht, welche man mit Amid-II' bezeichnet, um anzudeuten, dass es sich um eine Bande deuterierter Peptidgruppen handelt. Die verbleibende Absorption im Bereich zwischen 1500 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} kann den Seitenketten des Tryptophans und eines unprotonierten Glutamats sowie dem Azobenzol zugeschrieben werden [Bar00].

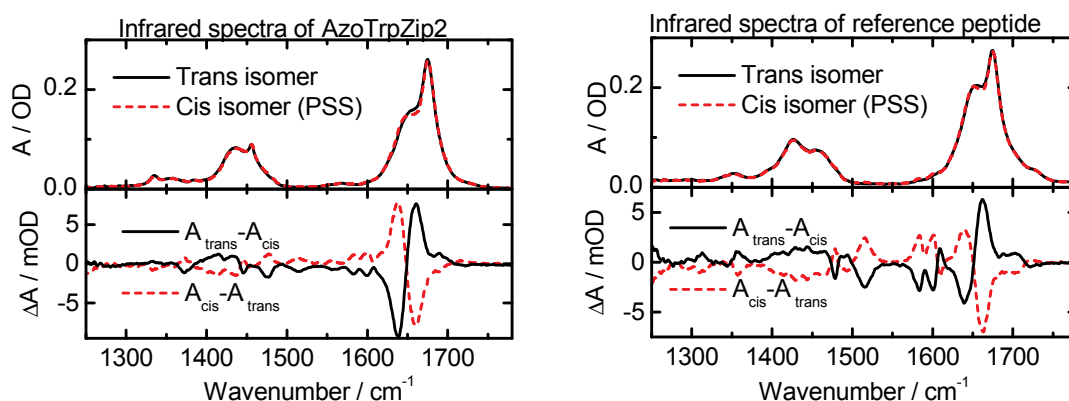
Die zeitlichen Veränderungen der Absorption bei 1550 cm^{-1} , d. h. im Bereich der verschwindenden Amid-II Bande, zeigt Abbildung 4.20(b). Löst man kleinere Moleküle wie zum Beispiel N-Methylacetamid in Methanol-d4 auf, die ebenfalls an ein Stickstoffatom gebundene Protonen gegen Deuteronen des Lösungsmittels austauschen, so beobachtet man keine zeitlichen Veränderungen des Infrarotspektrums auf einer Zeitskala von einer Minute bis fünf Minuten nach dem Auflösen. Im Falle des N-Methylacetamids tritt die Amid-II Bande eine Minute nach dem Auflösen bereits rotverschoben bei 1450 cm^{-1} auf. Dies legt die Interpretation nahe, dass dem Lösungsmittel gut zugängliche Amidprotonen auf einer Zeitskala von kleiner einer Minute in Methanol-d4 zu Deuteronen ausgetauscht werden. Im Lösungsmittel D₂O tauschen frei zugängliche Amidprotonen bei 0 °C und einem pH-Wert von 7 auf einer Zeitskala von einer Sekunde aus [Kri04]. Werden langsamere Austauschprozesse gemessen, wird dies allgemein mit dem Austausch von Amidprotonen in Verbindung gebracht, die dem Lösungsmittel nur durch Faltungs- und Entfaltungsdynamiken zugänglich werden [Sus72]. Lösungsmittelgemische aus schwerem Wasser und Methanol-d4 wurden bereits verwendet, um Peptiddynamiken über Protonenaustauschgeschwindigkeiten zu messen [Pan92].

Die beim Auflösen des AzoTrpZip2 in Methanol-d4 beobachtete Zeitkonstante von ca. 5 Minuten kann also mit Peptiddynamiken auf dieser Zeitskala interpretiert werden. Möglicherweise schirmt der hydrophobe Kern des trans-Isomers des AzoTrpZip2 bestimmte Protonen des Peptidrückgrats ab, so dass deren Austausch auf einer längeren Zeitskala stattfindet. Eine alternative Erklärung könnte ein niedriger pH-Wert im Lösungsmittel Methanol-d4 sein, der den Austausch verlangsamt. Dies scheint auch beim Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ der Fall zu sein, das einen biexponentiellen Zerfall der Bande bei 1550 cm^{-1} mit Zeitkonstanten von ca. 4 min. und 75 min. aufweist.

Spektrale Effekte aufgrund der Isomerisierung des Photoschalters Wenn der Prozess der Deuterierung abgeschlossen ist, kann durch Belichten bei Wellenlängen um 370 nm ein photostationäres Gleichgewicht mit einem cis-Anteil von mehr als 84 % erreicht werden. Abbildung 4.21 zeigt für das AzoTrpZip2 und sein Referenzpeptid, jeweils in den oberen Abschnitten, die zugehörigen Absorptionsspektren des reinen trans-Isomers (durchgezogene Linie) und die des photostationären Gleichgewichts des cis-Isomers (gestrichelte Linie).

Durch Belichten mit Wellenlängen größer 400 nm kann das photostationäre Gleichgewicht mit hoher Konzentration des cis-Isomers in eines mit hoher trans-Konzentration umgewandelt werden. Da das trans-Isomer ebenfalls bei Wellenlängen oberhalb 400 nm absorbiert, kann dabei nicht ein trans-Anteil von 100 % erreicht werden, sondern nur

wieder ein photostationäres Gleichgewicht (trans-Konzentration ca. 75 %). Die unteren Kurven in der Abbildung 4.21 zeigen die spektralen Differenzen zwischen den beiden photostationären Gleichgewichten nach mehrmaligem Umbelichten. Aus der Symmetrie der beiden Differenzen aus 4.21 bezüglich der Nulllinie und deren Reproduzierbarkeit kann darauf geschlossen werden, dass es sich beim Umbelichten um einen zyklischen Prozess handelt, bei dem sich die beiden Isomere ineinander umwandeln, jedoch kein weiteres Produkt auftritt.



(a) Absorptions- und Differenzspektrum des AzoTrpZip2

(b) Absorptions- und Differenzspektrum des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂

Abbildung 4.21: Vergleich der Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Die durchgezogene Linie im oberen Teil der Abbildung (a) entspricht dem auf Lösungsmittel- und Wassereinflüsse korrigierte Absorptionsspektrum des trans-Isomers des AzoTrpZip2, wie es bereits besprochen wurde. Die gestrichelte Linie zeigt das Absorptionsspektrum des photostationären Gleichgewichts nach Belichtung zum cis-Isomer. Im unteren Teil der Abbildung werden die Differenzspektren zwischen den photostationären Gleichgewichten mit hauptsächlich cis- bzw. trans-Anteilen gezeigt. Im Fall der durchgezogenen Linie zum Beispiel zeigen Bereiche, wo das trans-Isomer stärker absorbiert als das cis-Isomer, eine positive Absorptionsänderung. Die Abbildung (b) zeigt die entsprechenden Spektren für das Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Die größten Änderungen in den Differenzspektren finden sich im Bereich der Amid-I' Bande.

Es fällt zunächst die Ähnlichkeit der Absorptionsspektren der beiden trans-Isomere des AzoTrpZip2 und des Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ auf. Beide besitzen im Bereich der Amid-I' Bande ein ausgeprägtes Maximum bei 1675 cm⁻¹ mit einer Schulter um 1648 cm⁻¹. Die Schulter erscheint beim Referenzpeptid jedoch ausgeprägter und die Amid-I' Bande zeigt auch oberhalb 1700 cm⁻¹ mehr Struktur als die des AzoTrpZip2. Die Seitenkettenabsorptionen des AzoTrpZip2 etwas über 1550 cm⁻¹ sind beim Referenzpeptid nicht zu finden, da es die entsprechenden Aminosäuren (Tryptophane) nicht besitzt.

Die Ähnlichkeit der Spektren des cis-AzoTrpZip2 und des cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ weist darauf hin, dass der Schalterchromophor und seine unmittelbare Nachbarschaft in beiden Modellpeptiden eine ähnliche Struktur aufweist, wie sie bei der Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie bereits festgestellt wurde.

Die größten Änderungen in den Differenzspektren finden sich im Bereich der Amid-I' Bande. Hier treten auch markante Unterschiede zwischen dem Referenzpeptid und dem

AzoTrpZip2 auf. Der isosbestische Punkt liegt im Fall des AzoTrpZip2 bei 1648 cm^{-1} , beim Referenzpeptid jedoch bei 1651 cm^{-1} . Der Hauptteil der Änderungen liegt aber in beiden Fällen im Bereich der Schulter der Amid-I' Bande und nicht im Bereich des Maximums.

Einen auf gleiche Konzentration an Molekülen normierten Vergleich der Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids bietet Abbildung 4.22. Die Spektren des AzoTrpZip2 bleiben unverändert, wohingegen die Spektren des Referenzpeptids so skaliert wurden, dass sie im sichtbaren Spektralbereich der Chromophorabsorption möglichst gleiche Werte liefern würden.

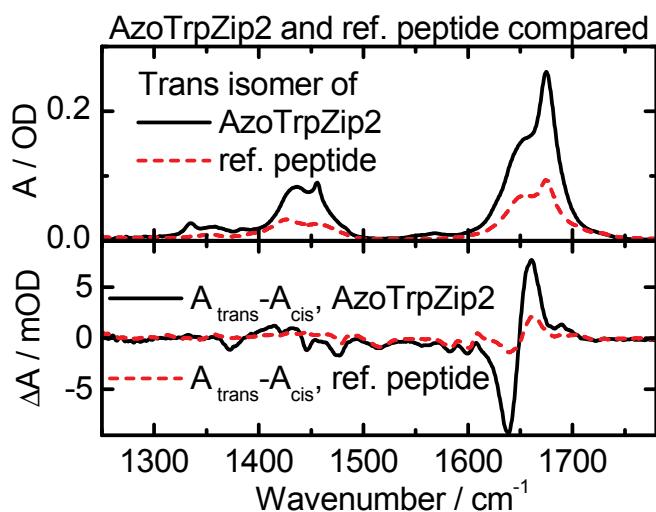


Abbildung 4.22: Vergleich zwischen den Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Die durchgezogenen Linien entsprechen Spektren des AzoTrpZip2, die gestrichelten denen des Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Im oberen Teil sind die Absorptionsspektren der jeweiligen trans-Isomere gezeigt, im unteren Teil die Differenzspektren zwischen dem jeweiligen photostationären Gleichgewicht und dem des trans-Isomers. Alle Spektren wurden so skaliert, dass die zugehörige Absorption des Chromophors im sichtbaren Spektralbereich nominell übereinstimmt. Um 1600 cm^{-1} und 1583 cm^{-1} finden sich Banden, die vom Chromophor AMPP herühren.

Viel deutlicher als in Abbildung 4.21 erkennt man in Abbildung 4.22 bei den Differenzspektren Übereinstimmungen bei 1515 cm^{-1} , 1583 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} . Diese Absorptionsänderungen können Banden des AMPP-Chromophors zugeschrieben werden. Die Änderungen im Bereich der Amid-I' Bande fallen beim Referenzpeptid deutlich geringer aus als beim AzoTrpZip2. Auch die Absorption im Amid-I' Bereich erweist sich im Fall des Referenzpeptids als kleiner. Der Grund liegt darin, dass das Referenzpeptid nur vier Carbonyl-Oszillatoren besitzt im Vergleich zum AzoTrpZip2, wo es elf solche Oszillatoren im Rückgrat gibt.

Probendegradierungseffekte Nach mehr als drei Monaten Lagerung in Lösung entstand im Absorptionsspektrum des AzoTrpZip2 eine Änderung, die im oberen Teil der Abbildung 4.23 mit der gestrichelten Linie gezeigt ist. Die durchgezogene Linie bezeichnet wieder das ursprüngliche Absorptionsspektrum des trans-Isomers des AzoTrpZip2. Bei den spektralen Änderungen handelt es sich um eine markante Bande bei 1625 cm^{-1} mit einer niederfrequenten Schulter bei 1614 cm^{-1} sowie eine schwächere Bande bei 1643 cm^{-1} .

Eine Absorptionzunahme bei 1625 cm^{-1} wird in der Literatur oft einer Aneinanderlagerung mehrerer Peptide zugeschrieben [Sin00]. Insgesamt gesehen steigt die Absorption im Bereich der Amid-I' Bande durch diesen Prozess der Aggregation. Es

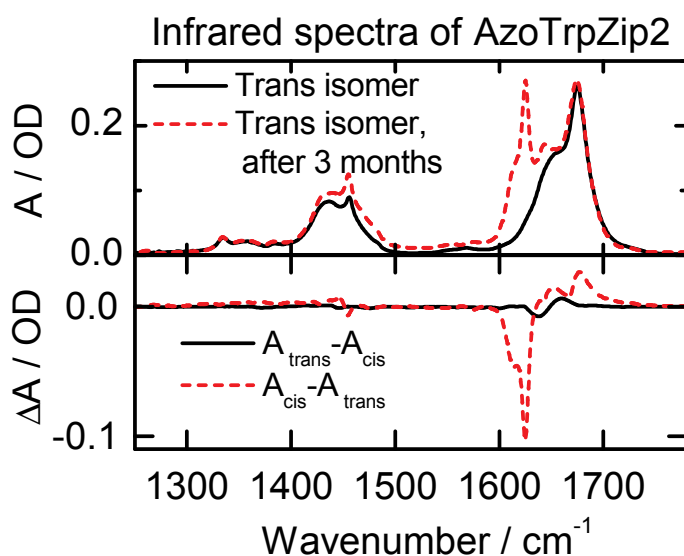


Abbildung 4.23: Spektrale Änderungen nach mehrmonatiger Lagerung des AzoTrpZip2 in Lösung. Der obere Teil der Abbildung zeigt das ursprüngliche Absorptionsspektrum des trans-Isomers des AzoTrpZip2 und das gleiche Spektrum unter gleichen Bedingungen aufgenommen, nur drei Monate später. In der Zwischenzeit war die Lösung unter Lichtabschluss in einem Exsikkator gelagert worden. Die gestrichelte Linie im unteren Teil der Abbildung repräsentiert das erste aufgenommene Differenzspektrum nach Belichtung zum photostationären Gleichgewicht des cis-Isomers. Die durchgezogene Linie zeigt das Differenzspektrum nach erster Belichtung zum trans-Isomer.

handelt sich dabei um einen Effekt, der für β -artige Modellpeptide gut bekannt ist [Coc01, Col00, Arr96]. Für das Modellpeptid AzoTrpZip2 wurde eine Aggregation im Lösungsmittel Wasser bereits bei der NMR-Vorcharakterisierung entdeckt.

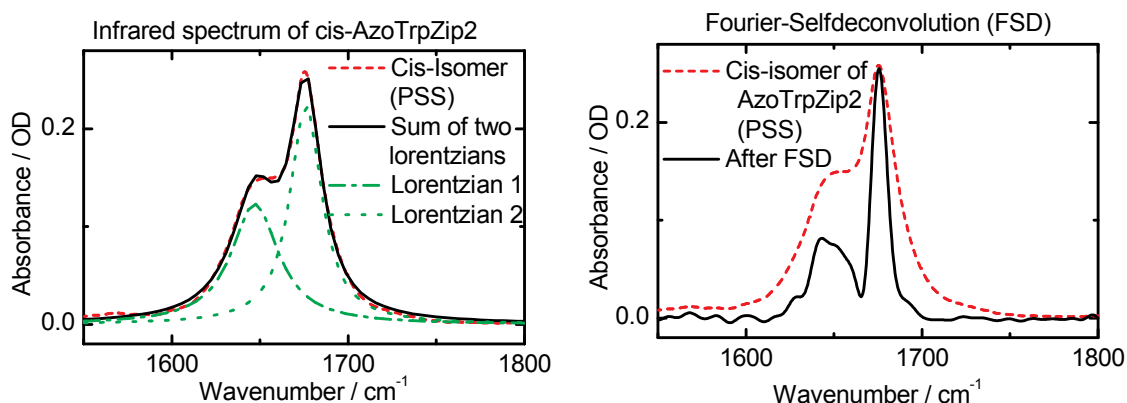
Der untere Teil der Abbildung 4.23 befasst sich mit der Frage, ob man durch Umbelichten zum cis-Isomer die Aggregate wieder auflösen kann. Das Differenzspektrum nach Belichten zum photostationären Gleichgewicht des cis-Isomers weist eine ausgeprägte Abnahme im Bereich der Aggregatbande bei 1625 cm^{-1} auf. Daraus kann auf eine Auflösung von Aggregaten durch Herstellen des cis-Isomers geschlossen werden. Eine Belichtung zum trans-Isomer erzeugt jedoch keine weitere Absorptionsabnahme im Bereich um 1625 cm^{-1} . Mehrfaches Umbelichten zwischen trans- und cis-Isomer erlaubt es, das ursprüngliche Absorptionsspektrum nahezu vollständig wiederherzustellen.

4.4.4 Interpretation des Infrarotspektrums des cis-Isomers des AzoTrpZip2

Der nächste Abschnitt ist dem tieferen Verständnis der Form der Amid-I' Bande des cis-Isomers des AzoTrpZip2 gewidmet. Dabei sei der geringe ($< 16 \%$) trans-Anteil im photostationären Gleichgewicht vernachlässigt. Nicht zu vernachlässigen ist jedoch die Tatsache, dass für das cis-Isomer des Chromophors AMPP nur 45 % des Peptids in der gefalteten Form des β -Hairpins vorliegen. Das in den obigen Abbildung gegebene gestrichelte Spektrum des cis-Isomers des AzoTrpZip2 setzt sich folglich je zur Hälfte aus dem Spektrum einer β -Hairpin Struktur und einer ungefalteten Spezies zusammen. Zur Amid-I' Bande tragen 11 Carbonyl-Oszillatoren bei, welche benachbart zu einem NH-Motiv sind. Die Carbonyl-Streckschwingung der Seitenketten-Carboxylgruppe der Aminosäure Glutamat absorbiert im allgemeinen nicht im Bereich der Amid-I' Bande [Bar00].

Modellunabhängige Analyse des Infrarotspektrums

Zunächst frei von jeder Interpretation gibt es verschiedene Wege, das Infrarotspektrum des cis-AzoTrpZip2 genauer zu untersuchen. Eine Möglichkeit beruht darauf, das Spektrum mittels der Summe aus mehreren lorentzförmigen bzw. gaußförmigen Kurven anzupassen, um es durch die Angabe von wenigen Parametern beschreiben zu können [Byl86]. Komplexe spektrale Änderungen können dann mit Änderungen dieser wenigen Parameter korreliert werden. Abbildung 4.24(a) zeigt das Ergebnis einer Anpassung mit der Summe aus zwei lorentzförmigen Kurven. Der Vergleich zwischen durchgezogener und gestrichelter Linie erlaubt es, die Güte der Anpassung zu bewerten.



(a) Anpassung des Spektrums des cis-AzoTrpZip2 mittels zwei Lorentzkurven

(b) Fourier-Selbstentfaltung des Spektrums des cis-AzoTrpZip2

Abbildung 4.24: Analyse des Infrarotspektrums des cis-AzoTrpZip2 mittels Anpassung durch die Summe aus zwei Lorentzfunktionen (a) und durch Fourier-Selbstentfaltung (b). Die Anpassungsfunktion aus Abbildung (a) wird im Text wiedergegeben, ebenso wie die resultierenden Anpassungswerte. Die Fourier-Selbstentfaltung erfolgte mittels des Programmpaketes "OPUS" der Firma Bruker, wobei für lorentzförmige Bandenformen die Breite zu 10 cm^{-1} und die Auflösungsverstärkung zu 2 gewählt wurden. Dies entspricht einem Entfaltungsfaktor von $1,9 \cdot 10^{27}$ und einer Rauschunterdrückung von 0,1.

Die Anpassungskurve wurde mittels folgender Funktion erzeugt, die sich aus der Summe von zwei Lorentzfunktionen zusammensetzt und noch einen konstanten Anteil A_0 berücksichtigt:

$$A(\tilde{\nu}) = A_0 + \frac{2A_1}{\pi} \frac{w_1}{4(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_{c1})^2 + w_1^2} + \frac{2A_2}{\pi} \frac{w_2}{4(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_{c2})^2 + w_2^2} \quad (4.1)$$

Dabei bezeichnen die Parameter w_1 und w_2 ein Maß für die Breite der Bande. Die Werte A_1 und A_2 dienen der Einstellung der Amplituden und $\tilde{\nu}_{c1}$ bzw. $\tilde{\nu}_{c2}$ stellen die zentralen Wellenzahlen der beiden Banden dar. Die sich ergebenden Werte für diese Parameter aus obiger Anpassung sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Die Tatsache, dass die wesentlichen Änderungen beim Übergang vom cis- in das trans-Isomer des AzoTrpZip2 im Bereich der Schulter bei 1648 cm^{-1} stattfinden, lässt darauf schließen, dass hier auch die strukturell sensitiven Bereiche der Amid-I' Bande liegen. Die Lorentzkurve bei 1676 cm^{-1} scheint sich zwischen den Isomeren nicht zu ändern.

Parameter	cis-Isomer	Fehler	trans-Isomer	Fehler
A_0	0,0 OD	(festgehalten)	0,0 OD	(festgehalten)
$\tilde{\nu}_{c1}$	1647,1 cm^{-1}	0,1 cm^{-1}	1649,4 cm^{-1}	0,2 cm^{-1}
A_1	6,3 OD $\cdot \text{cm}^{-1}$	0,1 OD $\cdot \text{cm}^{-1}$	6,4 OD $\cdot \text{cm}^{-1}$	0,1 OD $\cdot \text{cm}^{-1}$
w_1	32,3 cm^{-1}	0,4 cm^{-1}	33,3 cm^{-1}	0,4 cm^{-1}
$\tilde{\nu}_{c2}$	1676,0 cm^{-1}	0,1 cm^{-1}	1676,0 cm^{-1}	0,1 cm^{-1}
A_2	7,7 OD $\cdot \text{cm}^{-1}$	0,1 OD $\cdot \text{cm}^{-1}$	7,6 OD $\cdot \text{cm}^{-1}$	0,1 OD $\cdot \text{cm}^{-1}$
w_2	21,5 cm^{-1}	0,2 cm^{-1}	21,4 cm^{-1}	0,2 cm^{-1}

Tabelle 4.2: Anpassungsparameter für Anpassung des Spektrums des cis- und des trans-Isomers des AzoTrpZip2 mittels der Summe aus zwei Lorentzfunktionen. Die zweite Lorentzfunktion zentriert bei $1676,0 \text{ cm}^{-1}$ ändert sich beim Übergang vom cis- in das trans-Isomer des AzoTrpZip2 kaum. Die größten Änderungen im Bereich der Schulter um 1648 cm^{-1} liegen in einer Verschiebung der Zentralwellenzahl der ersten Lorentzkurve um ca. 2 cm^{-1} .

Aufgrund ihrer intrinsischen Linienbreite überlappen sich die Infrarotbanden der Carbonyl-Oszillatoren im Spektralbereich der Amid-I' Bande. Durch die Methode der Fourier-Selbstentfaltung (engl. Fourier Self-Deconvolution, FSD) kann der Einfluss der Linienbreiten reduziert und so die spektrale Auflösung um bis zu einen Faktor 3 verbessert werden [Kau81]. Dadurch können die Bandenlagen überlappender Banden getrennt bestimmt werden. Die Annahme, die dabei eingeht, ist, dass das betrachtete Spektrum aus Banden der gleichen Linienbreite besteht, welche in der Messung mit derselben Linienverbreiterungsfunktion gefaltet wurden. Mathematisch kann diese Verbreiterung im Fourierraum rückgängig gemacht werden. Dabei wird jedoch auch das Rauschen verstärkt, was über eine Rauschunterdrückung kompensiert werden muss. Abbildung 4.24(b) zeigt eine Selbstentfaltung der Amid-I' Bande des cis-Isomers des AzoTrpZip2. Das entfaltete Spektrum wurde entlang der Absorptionsachse so skaliert, dass das Maximum bei 1676 cm^{-1} wieder mit dem Ausgangsspektrum übereinstimmt. Auch die Fourier-Selbstentfaltung deutet einen Zerfall des Spektrums in eine Bande bei 1676 cm^{-1} und in mehrere einzelne Banden um 1648 cm^{-1} an, welche die Schulter bilden.

Die Bildung der zweiten Ableitung eines Infrarotspektrums ist ein weiterer Weg, die intrinsisch überlappenden Banden zu trennen. Die Lage eines jeden Minimums der zweiten Ableitung entspricht der Zentralwellenzahl einer Bande. Insbesondere Bandenformen mit ausgeprägten Schultern können so in einzelne lorentzförmige bzw. gaußförmige Einzelbanden zerlegt werden. Abbildung 4.25 zeigt das Infrarotspektrum des cis-AzoTrpZip2 und dazu seine zweite Ableitung. Das Ergebnis dieser Analyse ähnelt dem aus der Fourier-Selbstentfaltung: Es gibt eine eindeutige, ausgeprägte Bande bei 1676 cm^{-1} und im Bereich der Schulter scheinen sich noch einige weitere Einzelbanden zu befinden.

Theoretische Überlegungen zur Bandenform der Amid-I Bande

Ausgehend von der Frequenz der Amid-I Schwingung eines Peptidbindungsplättchens im Vakuum werden im folgenden in einem Gedankenexperiment verschiedene Einflüsse auf die Lage und die Form der Amid-I Bande eines Peptids, wie die des cis-Isomers des

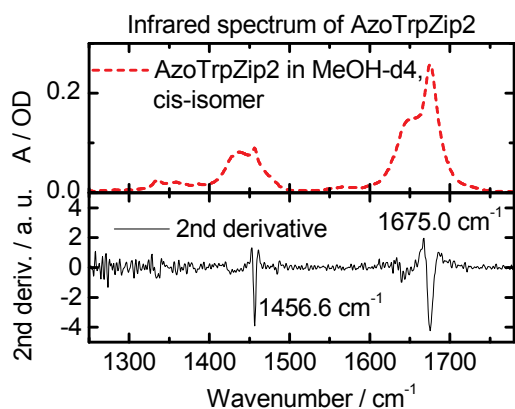


Abbildung 4.25: Absorptionsspektrum des cis-AzoTrpZip2 und dessen zweite Ableitung. Durch die Bildung der zweiten Ableitung eines Infrarotspektrums wird versucht, die Substruktur von Banden mit Schultern sichtbar zu machen. Minima in der zweiten Ableitung lassen auf die Lage und Anzahl von lorentzförmigen Banden schließen, die sich überlappend in einer Bande mit Schulter verbergen [Hum83].

AzoTrpZip2, in Lösung bestimmt. Als Prototyp für ein Peptidbindungsplättchen wird häufig das Molekül N-Methylacetamid verwendet. Prinzipiell kann natürlich nicht nur die spektrale Lage einer Amid-I Schwingung eines Peptidbindungsplättchens variieren, sondern auch dessen Intensität. Die verschiedenen Einflüsse auf Intensität und spektrale Lage einer Schwingung wie der Amid-I Bande sind dabei im einzelnen [Bar02, Kri86]:

1. Die relative Dielektrizitätskonstante ϵ_r des Lösungsmittels. Durch Messung und Berechnung der Amid-I Schwingung von N-Methylacetamid in verschiedenen Lösungsmitteln mit unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten konnten Torii et al. die Abhängigkeit der zentralen Schwingungsfrequenz dieser Schwingungsform von ϵ_r zeigen [Tor98b]. Je größer die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels, desto niedriger die Schwingungsfrequenz der Amid-I Bande. In Argon-Matrix, welcher eine relative Dielektrizitätskonstante von $\epsilon_r=1,0$ zugeordnet wurde, fanden sie eine Frequenz von 1708 cm^{-1} . In Wasser mit einer relativen Dielektrizitätskonstante von 78,5 fanden sie eine Frequenz von 1628 cm^{-1} . Die letztere Frequenzverschiebung von 80 cm^{-1} war größer als die berechnete von ca. 30 cm^{-1} , was die Autoren auf einen zusätzlichen Effekt durch Bildung von Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel erklären.
2. Die Anzahl und Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen. In der Literatur werden drei Bindungsmöglichkeiten für Wasserstoffbrückenbindungen pro Peptidbindungsplättchen diskutiert. Zwei davon am Carbonylsauerstoff und eine am Amidwasserstoff [Eat89]. Letztere hat auf die Frequenz der Amid-I Bande einen etwas geringeren Einfluss, wie schon die kleinen spektralen Veränderungen aufgrund der Deuterierung an dieser Stelle zeigen. Zusätzlich muss zwischen intramolekularen Wasserstoffbrücken und solchen zu Lösungsmittelmolekülen unterschieden werden [Man03]. Darüber hinaus unterscheiden sich auch die Wasserstoffbrückenbindungen zu verschiedenen Lösungsmitteln in ihrer Stärke und Anzahl [Fre01, Van05].
3. Kopplung der Übergangsdipolmomente (engl. Transition Dipole Coupling, TDC). Wenn ein Carbonyl-Oszillator angeregt ist, kann ein resonanter Energietransfer stattfinden zu einem Carbonyl-Oszillator ähnlicher Frequenz. Ist dieser zweite Oszillator mehr als ca. $0,3 \text{ nm}$ entfernt, kann diese Wechselwirkung im Rahmen einer

Multipolentwicklung durch den jeweiligen Übergangsdipol und deren Wechselwirkung untereinander angenähert werden [Tor92]. Sind sich die wechselwirkenden Übergangsdipole näher als 0,3 nm, müssen Terme höherer Ordnung berücksichtigt werden [Mor04]. Die Wechselwirkung wird in erster Näherung also über die aus der Elektrostatik bekannte Beziehung der Wechselwirkungsenergie zweier Dipole beschrieben. Dabei schließt der Übergangsdipolmomentvektor mit dem Vektor vom Sauerstoff- zum Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe einen Winkel von 20° ein. Abhängig von der Struktur des Peptids und damit der Lage seiner Carbonyl-Oszillatoren zueinander ändert sich die Stärke der Kopplung zwischen verschiedenen Amid-I Schwingungen. Das Infrarotspektrum wird damit abhängig von der Struktur des Peptids [Bar02].

4. Kopplungen über die Bindungen zu angrenzenden Atomgruppen. Torii et al. berechneten die Abhängigkeit der Amid-I Frequenz von den Dihedralwinkeln ϕ und ψ einer unendlich langen Peptidsequenz. Dabei fanden sie zusätzlich zur Übergangsdipolmomentkopplung noch einen Effekt der Kopplung durch die Bindungen zwischen nächstgelegenen Peptidbindungsplättchen [Tor98a]. Aber auch die Abweichung der Peptidbindungsplättchen von ihrer Planarität durch sterische Einschränkungen, wie sie in engen Turns eines β -Hairpins auftreten, können zu einer Rotverschiebung der Carbonylschwingung führen [Jac95].
5. Anharmonische Kopplungen zu anderen Normalmoden. Nur in harmonischer Näherung ist die Amid-I Schwingung als Normalmode nicht an Moden anderer Frequenz gekoppelt. Durch Kopplungen an meist niederfrequente Moden kann es zu einer Verschiebung der Zentralfrequenz der Amid-I Schwingung kommen. Steigt die Temperatur, erhöhen sich auch die Besetzungszahlen niederfrequenter Moden. Durch entsprechende anharmonische Kopplung an die Amid-I Schwingung kann sich dadurch auch deren Zentralfrequenz ändern, ohne dass sie selbst thermisch angeregt sein muss, wie es am Beispiel von para-Nitroanilin gezeigt wurde [Sie05].
6. Masseneinflüsse. Neben des schon diskutierten Austausches des Wasserstoffs am Amidstickstoff durch Deuterium gibt es auch Möglichkeiten, gezielt Isotope wie ^{18}O oder ^{13}C in die Carbonylgruppe eines Amidbindungsplättchens einzuführen, um damit die Frequenz der Amid-I Schwingung zu beeinflussen [Bre05b]. Durch gezielte Aufhebung von Kopplungen über solche Isotopeneffekte können manche Infrarotspektren der nicht isotopenmarkierten Spezies erst richtig interpretiert werden [Kub01].

Empirische Regeln zur Interpretation der Infrarotspektren von Proteinen

Die eingangs erwähnte Korrelation zwischen Struktur des Proteins und seinem Infrarotspektrum und dort speziell seiner Amid-I Bande bezog sich auf die Bestimmung des Gehalts an Sekundärstrukturelementen. Durch Vergleich der Infrarotspektren von Proteinen mit bekannter Struktur untereinander konnte man empirische Regeln aufstellen, in welchen Bereichen Banden von α -Helices oder β -Faltblättern auftreten [Sin00, Jac95].

Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über allgemein anerkannte Bandenzuordnungen zu Sekundärstrukturelementen in Proteinen.

Sekundärstruktur	Amid-I Frequenz
anti-paralleles β -Faltblatt, aggregierte Stränge	1675 cm^{-1} -1695 cm^{-1}
3_{10} -Helix	1660 cm^{-1} -1670 cm^{-1}
α -Helix	1648 cm^{-1} -1660 cm^{-1}
ungefaltet	1640 cm^{-1} -1648 cm^{-1}
β -Faltblatt	1625 cm^{-1} -1640 cm^{-1}
aggregierte Stränge	1610 cm^{-1} -1628 cm^{-1}

Tabelle 4.3: Korrelation zwischen Sekundärstrukturelementen und Amid-I Frequenz. Die angegebenen Werte gelten für das Lösungsmittel Wasser. Tabelle nach [Jac95].

Tabelle 4.3 erweist sich als nützlich, wenn man ein Spektrum eines Proteins unbekannter Struktur interpretieren will. Meistens lässt sich der Gehalt an Sekundärstrukturelementen gut bestimmen. Diese Bandenzuordnungen verstehen sich nur als Orientierungshilfen, die aber im Einzelfall unter Umständen hinterfragt werden müssen. Will man die Bandenzuordnungen aus Tabelle 4.3 als Interpretationshilfe für das Absorptionsspektrum des cis-Isomers des AzoTrpZip2 verwenden, muss man noch berücksichtigen, dass hier ein Austausch der Protonen des Peptidrückgrats durch Deuteronen stattfand. Dies führt zu einer Rotverschiebung der Bandenlage der Amid-I Bande. Um nicht auch noch weitere Einflüsse durch den Wechsel in das Lösungsmittel Methanol-d4 diskutieren zu müssen, sind in Anhang A die Spektren des AzoTrpZip2 in schwerem Wasser dargestellt.

Qualitative Interpretation des Infrarotspektrums des cis-AzoTrpZip2

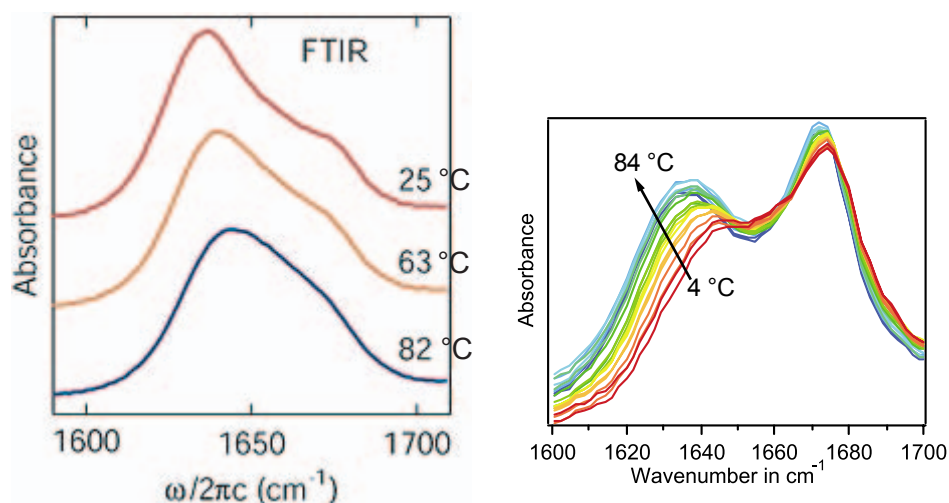
Für eine Interpretation des Maximums der Amide-I' Bande des AzoTrpZip2 bei 1676 cm^{-1} in Methanol-d4 können zwei Möglichkeiten diskutiert werden:

- **Möglichkeit A** Das Maximum bei 1676 cm^{-1} stammt hauptsächlich von der Absorption des ungefalteten Anteils des Ensembles aus cis-Isomeren. Die Übergangsdipolmomentkopplung der Amid-I' Oszillatoren untereinander ist im ungefalteten Zustand durch ständige strukturelle Fluktuationen gering, weswegen die Oszillatoren alle gleichberechtigt sind und bei der gleichen Frequenz absorbieren. Dies summiert sich zu einer ausgeprägten Bande bei 1676 cm^{-1} .
- **Möglichkeit B** Aufgrund der geringen Abhängigkeit des Maximums bei 1676 cm^{-1} vom Lösungsmittel wird es von Amid-I' Oszillatoren hervorgerufen, die nur schwache oder gar keine Wasserstoffbrücken aufweisen.

Es ist durchaus möglich, dass beide Möglichkeiten gleichzeitig richtig sind, denn sie schließen sich gegenseitig nicht aus.

Infrarotspektren von β -Hairpin Modellpeptiden in der Literatur

Strukturell am ähnlichsten zum AzoTrpZip2 ist das Modellpeptid trpzip2, dessen Primärstruktur in Abbildung 4.6(b) gezeigt wird. Eine Valenzstrichformel des acetylierten Derivats, des Ac-trpzip2, zeigt Abbildung 4.4. Die ursprünglich mit NMR-Spektroskopie charakterisierte Variante ist das amidierte Peptid trpzip2 mit freiem N-Terminus [Coc01]. Bei diesem Peptid geht man davon aus, dass es bei Zimmertemperatur in wässriger Lösung zu nahezu 100 % gefaltet auftritt. Abbildung 4.26 zeigt zwei unter vergleichbaren Bedingungen in schwerem Wasser gemessene Sätze von Absorptionsspektren des trpzip2 in Abhängigkeit von der Temperatur. Vergleicht man die Spektren bei Zimmertemperatur, so stellt man fest, dass beide Spektren Absorptionsbanden bei ca. 1670 cm^{-1} und 1630 cm^{-1} bis 1635 cm^{-1} besitzen. Jedoch stimmen die Intensitätsverhältnisse der Banden nicht überein, was die beiden Spektren sehr unterschiedlich aussehen lässt.



(a) Infrarotspektrum des trpzip2 nach Smith et al. [Smi05]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Copyright American Chemical Society (2005).

(b) Infrarotspektrum des trpzip2 nach Yang et al. [Yan04b]. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags: Copyright Elsevier (2004).

Abbildung 4.26: Infrarotspektrum des trpzip2 aus der Literatur. Bei der rechten Grafik beträgt der Temperatursprung zwischen benachbarten Kurven $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. In beiden Fällen handelte es sich um das amidierte Peptid trpzip2 mit freiem N-Terminus. Die Lösungsmittelbedingungen waren ebenfalls gleich: Lösungsmittel war in beiden Fällen schweres Wasser bei einem p^2H -Wert von 7, der über einen Phosphatpuffer (50mM) eingestellt war. Smith et al. geben jedoch an, besonderes Augenmerk auf die Entfernung von Trifluoressigsäureresten aus der Synthese gelegt zu haben. Das beobachtete Maximum bei ca. 1670 cm^{-1} im Spektrum von Yang et al. könnte also von solchen Verunreinigungen stammen [Dye04].

Wang et al. haben ein Infrarotabsorptionsspektrum des Ac-trpzip2 bei einer Temperatur von $5,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen, das jedoch ansonsten unter vergleichbaren Bedingungen entstand wie die Spektren in Abbildung 4.26. Es zeigt ein Absorptionsmaximum bei 1633 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1672 cm^{-1} [Wan04]. Es stimmt also in etwa mit dem von Smith et al. gemessenen überein. Da die Acetylierung des N-Terminus keinen allzu großen Einfluss auf das Infrarotspektrum haben sollte, scheint das von Smith et

al. gemessene Spektrum das vertrauenswürdiger zu sein. Im Spektrum von Yang et al. könnten Verunreinigungen aus der Synthese für das Bandenmaximum bei ca. 1670 cm^{-1} verantwortlich sein [Dye04], zumal deren Peptidprobe nur zu 90 % Reinheit aufgereinigt wurde [Yan04b]. Smith et al. führen die Intensivierung der beiden Banden in ihrem Spektrum des trpzip2 auf Eigenzustände zurück, bei denen gleichphasige Schwingungen von Carbonyl-Oszillatoren auf gegenüberliegenden Strängen auftreten. Zusätzlich sind die Schwingungen der auf dem Rückgrat benachbarten Carbonyl-Oszillatoren ebenfalls in Phase. Die zweite Bande erklären sie durch gleichphasige Schwingungen benachbarter Carbonyl-Oszillatoren auf einem Strang, jedoch durch gegenphasige Schwingungen der Oszillatoren auf unterschiedlichen Strängen. Die spektrale Form der Absorption des trpzip2 im Bereich der Amid-I' spricht für Möglichkeit A, wenn man Lösungsmittelleffekt zunächst außer Acht lässt. Denn Möglichkeit A erklärt das beobachtete Maximum bei 1676 cm^{-1} mit dem ungefalteten Anteil. Die beobachtete Schulter und ein gewisser Teil der Bande bei 1676 cm^{-1} kann gut mit dem Spektrum aus Abbildung 4.26(a) erklärt werden.

Maness et al. beobachten bei zyklischen β -Hairpin Modellpeptiden ebenfalls eine intensive hochfrequente Bande (1658 cm^{-1}) im Amid-I' Bereich mit einer Schulter bei 1636 cm^{-1} . Die niederfrequente Schulter ordnen sie nach innen gerichteten intramolekular wasserstoffverbrückten Carbonylgruppen zu. Den hochfrequenten Anteil interpretieren sie mit nach außen gerichteten Carbonylen, die Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel unterhalten [Man03]. Möglichkeit B von Seite 76 ist diesem Interpretationsansatz angelehnt.

Besonderheiten des Lösungsmittels Methanol-d4

Obige Betrachtungen wurden aufgrund von Spektren gewonnen, die zumeist im Lösungsmittel D_2O gemessen waren. Jetzt soll der Versuch unternommen werden, das Infrarotspektrum des cis-AzoTrpZip2 im Bereich der Amid-I' Bande aus den Spektren seiner Bestandteile aufzubauen, wobei die Seitenketten der Aminosäuren vernachlässigt werden, da sie keine starken Absorptionsbanden zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} aufweisen. Abbildung 4.27 zeigt die Valenzstrichformeln des Chromophors Azobenzol, das den Loop bildet, und des N-Methylacetamids. Letzteres dient als Modellschubstanz zur Repräsentation eines Peptidbindungsplättchens.

Im Falle des photostationären Gleichgewichts des cis-Isomers des Azobenzols in Methanol-d4 kann von einem maximalen trans-Anteil von ca. 10 % ausgegangen werden. Das in Abbildung 4.28(a) gestrichelte Spektrum zeigt also im wesentlichen die Banden des cis-Isomers. Der Infrarotübergang der NN-Streckschwingung der Azokupplung ist im trans-Isomer aus Symmetriegründen verboten, so dass er nur im Infrarotspektrum des cis-Isomers bei 1512 cm^{-1} auftritt. Die Differenzspektren im unteren Teil der Abbildung zeigen die erwartete Symmetrie zur Nulllinie, was einen zyklischen Prozess andeutet. Azobenzol besitzt selbst keine Banden im Bereich 1600 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} .

Das Absorptionsspektrum von N-Methylacetamid (siehe Abbildung 4.28(b), oberer Teil) besitzt eine Doppelstruktur mit Maxima bei 1630 cm^{-1} und bei 1650 cm^{-1} , welche sich auch deutlich als Minima in der zweiten Ableitung findet. Die auf Eaton et al. zurückgehende Erklärung besagt, dass die Bande bei 1650 cm^{-1} einem einfach was-

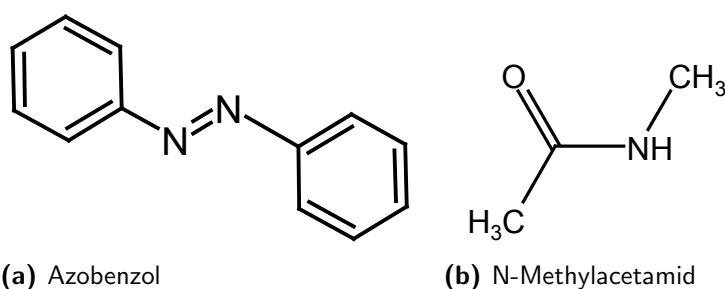
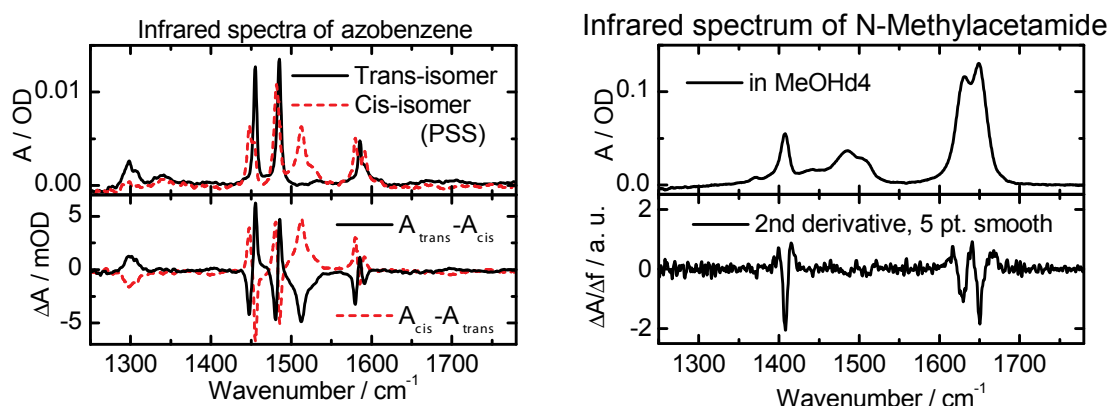


Abbildung 4.27: Valenzstrichformeln von wichtigen Untereinheiten des AzoTrpZip2. Dargestellt sind der Chromophor Azobenzol, der im Bereich des Loops liegt. Das Molekül N-Methylacetamid gilt als Prototyp für ein Peptidbindungsplättchen, da es ebenfalls einen partiellen Doppelbindungscharakter der CN-Bindung aufweist.



(a) Absorptions- und Differenzspektrum des Azobenzols in Methanol-d4

(b) Absorptionsspektrum des N-Methylacetamids in Methanol-d4 und dessen zweite Ableitung

Abbildung 4.28: Absorptionsspektren des Azobenzols und des N-Methylacetamids in Methanol-d4. Im unteren Teil der linken Abbildung sind die Differenzspektren aufgrund der Isomerisierung von trans-Azobenzol nach cis-Azobenzol bzw. umgekehrt dargestellt. Die zweite Ableitung des Spektrums von N-Methylacetamid im unteren Teil der rechten Abbildung zeigt im Bereich der Amid-I' genau zwei Minima bei 1630 cm⁻¹ und bei 1650 cm⁻¹.

serstoffverbrückten Molekül entspricht. Dem Absorptionsmaximum wird eine zweifache Wasserstoffbrücke des Carbonyl-Sauerstoff zum Lösungsmittel zugeordnet [Eat89].

Eine alternative Erklärung für die Doppelstruktur der Amid-I Bande des N-Methylacetamids wird von Hummel et al. vorgeschlagen. Sie fanden im Lösungsmittel CCl₄ bei Zimmertemperatur eine signifikante Population des cis-Isomers des N-Methylacetamids bezüglich der CN-Bindung. Eine dichtefunktionaltheoretische Berechnung mit dem Funktional BP86 und dem Basissatz 6-31G** für den Fall des undeuterten N-Methylacetamids ergibt Frequenzen von ca. 1731 cm⁻¹ für das trans-Isomer und 1738,4 cm⁻¹ für das cis-Isomer. Banden im spektralen Abstand von 9 cm⁻¹ wurden von Hummel et al. beobachtet und den jeweiligen Isomeren zugeordnet [Hum83].

Im Falle des deuterierten N-Methylacetamids ergab eine entsprechende dichtefunktionaltheoretische Berechnung nur noch einen Abstand von 2 cm⁻¹ zwischen den Amid-I' Banden des cis- und trans-Isomers. Es ist also unwahrscheinlich, dass im Fall des in

Abbildung 4.28(b) gezeigten Spektrums die Aufspaltung von 30 cm^{-1} auf ein Isomerenmisch aus allein zurückzuführen ist. Auch Kwac et al. benötigten bei ihrer theoretischen Berechnung der Bandenform des N-Methylacetamid in Methanol zwei verschiedene Solvatisierungsstrukturen [Kwa05]. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass die Peptidbindungsplättchen in Proteinen und Peptiden nur in Ausnahmefällen als cis-Isomer vorliegen [Fis00].

Wären die Infrarotspektren rein additiv, müssten sich die Spektren des cis-AzoTrpZip2 und des cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ durch rechnerisch richtiges Addieren der skalierten Spektren des Azobenzols und des N-Methylacetamids aus Abbildung 4.29 berechnen lassen. Speziell im Bereich der Amid-I' Bande ist dies jedoch nicht möglich, da hier Kopplungen der Carbonyl-Oszillatoren untereinander und die Umgebungseinflüsse eine wichtige Rolle spielen.

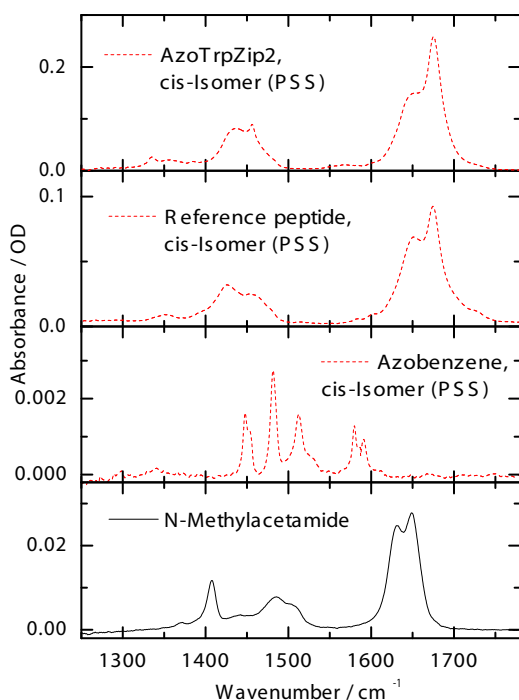


Abbildung 4.29: Zusammenstellung von Absorptionsspektren der cis-Isomere des AzoTrpzip2, des Referenzpeptids und des Azobenzols. Im unteren Abschnitt ist das Absorptionsspektrum des N-Methylacetamids gezeigt. Die Spektren sind jeweils in Methanol-d₄ gemessen und so skaliert, dass sie einer Moleküleinheit, bezogen auf die Absorption des cis-AzoTrpZip2, entsprechen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein genaues Verständnis des Absorptionsspektrums des cis-AzoTrpZip2 im Bereich seiner Amid-I' Bande noch fehlt. Jedoch steht fest, dass der Bereich der Schulter der Amid-I' Bande um 1648 cm^{-1} entscheidend mit der β -Hairpin Struktur zusammenhängt, was aus den hier beobachteten starken Änderungen in den Differenzspektren folgt. Diese Information wird sich als wertvoll erweisen bei der Interpretation der zeitaufgelösten Daten zur Peptiddynamik des AzoTrpZip2.

4.5 Spektroskopie des AzoTrpZip2 in Abhängigkeit von der Temperatur

In den vorherigen Abschnitten waren alle dargestellten Messungen bei Zimmertemperatur (ca. 25 °C) durchgeführt worden, wenn nicht anders angegeben. Da der Faltungsgrad eines Peptids im allgemeinen abhängig von der Temperatur ist, kann versucht werden, das Gleichgewicht zwischen gefaltetem und ungefaltetem Peptid durch Änderung der Temperatur zu verschieben. Als Messgrößen für den Faltungsgrad werden im folgenden der Circular dichroismus und die Infrarotspektroskopie vorgestellt.

4.5.1 Circular dichroismus in Abhängigkeit von der Temperatur

Im Lösungsmittel Wasser konnte für beide Isomere des AzoTrpZip2 bereits gezeigt werden, dass ein Aufschmelzen der jeweiligen Strukturen zu höheren Temperaturen hin stattfindet [Don06]. Als Schmelztemperatur für das cis-Isomer des AzoTrpZip2 wurde 25 °C angegeben. Abbildung 4.30 zeigt das Circular dichroismussignal der Bande bei 228 nm in Abhängigkeit von der Temperatur im Lösungsmittel Methanol. Tendenziell zeigt es ein ähnliches Verhalten wie das Signal in Wasser, jedoch fehlen die ausgeprägten Plateaus, die auf ein vollständig gefaltetes bzw. entfaltetes Peptid hinweisen.

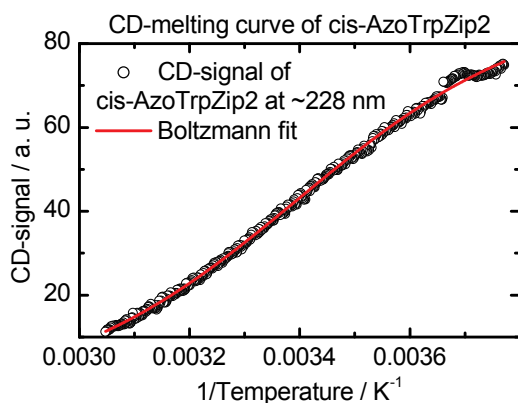


Abbildung 4.30: Circular dichroismussignal des cis-AzoTrpZip2 in der Bande bei 228 nm in Abhängigkeit von der Temperatur, aufgenommen von Markus Löweneck. Die offenen Kreise entsprechen den Messpunkten in einem Temperaturbereich zwischen -8 °C und 55 °C. Die Anpassung mittels einer Boltzmann-Kurve (durchgezogene Linie) setzt die Gültigkeit eines Zwei-Zustandsmodells voraus, das von den Zuständen des gefalteten und ungefalteten Peptids ausgeht.

Eine Andeutung eines Abflachens der Kurve ist jedoch an beiden Enden des aufgenommenen Temperaturbereichs erkennbar. Deswegen kann der Versuch unternommen werden, die Kurve mittels einer Boltzmannfunktion (siehe Gleichung 4.2) anzupassen. Voraussetzung dafür ist die Anwendbarkeit eines zwei-Zustandsmodells (siehe auch 2.1). Gleichung 4.2 stellt den Fall verschwindender Änderungen der Wärmekapazität des Peptids $\Delta C_P = 0$ durch den Übergang vom gefalteten in den ungefalteten Zustand dar [Min94].

$$CD_{signal}(T) = \frac{A_1 - A_2}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)\right)} + A_2 \quad (4.2)$$

Dabei bezeichnen A_2 die Amplitude des CD-Signals des ungefalteten Peptids und A_1 diejenige im vollständig gefalteten Fall. T_m ist die sogenannte Schmelztemperatur, bei der

sich die gefalteten wie auch die ungefalteten Anteile die Waage halten. Mit ΔH_m kann aus dieser Anpassung auch die Schmelzenthalpie gewonnen werden. Die zur gezeigten Anpassung gehörenden Werte für diese Parameter sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. $R = 8,3143 \frac{J}{Kmol}$ bezeichnet die allgemeine Gaskonstante.

Parameter	Wert
A_1	90000
A_2	-4700
ΔH_m	$37,8 \frac{kJ}{mol}$
T_m	294 K

Tabelle 4.4: Ergebnisse für die Parameter der Boltzmann-Anpassung des Circular dichroismus-Signals der Bande bei 228 nm. Die beiden Amplituden besitzen keine Einheitsbezeichnung.

Die Schmelzentropie kann ebenfalls berechnet werden:

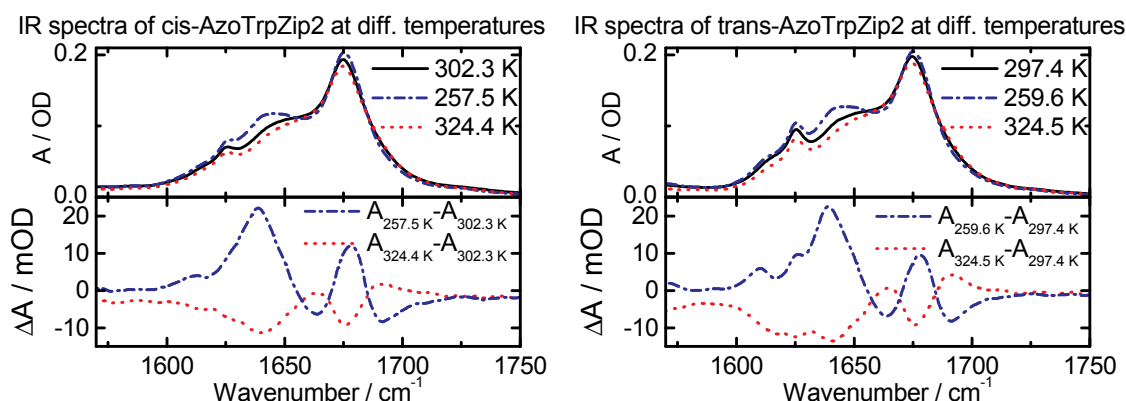
$$\Delta S_m = \frac{\Delta H_m}{T_m} = 128,5 \frac{J}{molK} \quad (4.3)$$

Die so erhaltenen Werte können in Beziehung gesetzt werden zu den Werten von Cochran et al., die sie für das Modellpeptid trpzip2 im Lösungsmittel Wasser gemessen haben [Coc01]. Bei ihrer Anpassung wurde aber noch eine Änderung der Wärmekapazität von $\Delta C_P^{trpzip2} = 1,2 \frac{kJ}{molK}$ berücksichtigt. Ihre Schmelztemperatur liegt mit ca. 72 °C deutlich über derjenigen für cis-AzoTrpZip2. Mit $\Delta S_m^{trpzip2} = 204 \frac{J}{molK}$ ist die Schmelzentropie vergleichbar mit der für den cis-AzoTrpZip2 bestimmten. Die Schmelzenthalpie $\Delta H_m^{trpzip2} = 70,2 \frac{kJ}{mol}$ hat etwa den doppelten Wert als die des cis-AzoTrpZip2.

4.5.2 Infrarotspektroskopie in Abhängigkeit von der Temperatur

Durch Messung von Infrarotspektren des cis-AzoTrpZip2 in Methanol-d4 in Abhängigkeit von der Temperatur wurde versucht, obige Messungen zu ergänzen. Hier tritt jedoch zusätzlich der Effekt auf, dass die Absorptionsspektren des reinen Lösungsmittels Methanol-d4 bereits stark von der Temperatur abhängen. Um diesen Einfluss korrigieren zu können, benötigt man zu jeder Temperatur, bei der die Lösung des cis-AzoTrpZip2 gemessen wurde, ein Infrarotspektrum des Lösungsmittels. Realisiert wurde dies, indem man zunächst einen vollen Temperaturzyklus ausgehend von Zimmertemperatur bis -8 °C, von dort nach +45 °C und wieder zurück mit einer Küvette durchgeführt hat, die nur das reine Lösungsmittel enthielt. Darauf wurde in derselben Küvette ein möglichst identischer Temperaturzyklus der Lösung aus trans-AzoTrpZip2 gemessen (siehe Abbildung 4.31(b)). Zuletzt wurde durch Belichten das photostationäre Gleichgewicht des cis-Isomers hergestellt und dieses einem Temperaturzyklus unterzogen, wobei die Spektren aus Abbildung 4.31(a) entstanden, die bereits auf Lösungsmiteleinflüsse korrigiert sind.

Auffällig ist zunächst die Ähnlichkeit der Differenzspektren in den unteren Teilen der Abbildungen zwischen den cis- und trans-Isomeren. Abgesehen von dem Bereich der Bande um 1625 cm^{-1} scheinen Temperaturänderungen ähnliche Auswirkungen auf



(a) Absorptions- und Differenzspektren des cis-AzoTrpZip2 in Abhängigkeit von der Temperatur (b) Absorptions- und Differenzspektren des trans-AzoTrpZip2 in Abhängigkeit von der Temperatur

Abbildung 4.31: Absorptions- und Differenzspektren des cis- und trans-AzoTrpZip2 in Abhängigkeit von der Temperatur. Im oberen Teil der Abbildungen sind jeweils die Absorptionsspektren des entsprechenden Isomers in Abhängigkeit von der Temperatur gezeigt. Der Referenzpunkt ist jeweils etwa bei Zimmertemperatur (durchgezogene Linie). Die strichpunktiierte Linie steht für das Spektrum heißerer Moleküle und die gepunktete Linie für das kälterer Moleküle. Im unteren Teil der Abbildungen sind jeweils die Differenzen zum Referenzpunkt bei Zimmertemperatur dargestellt. Leider weisen beide Messungen eine zusätzliche Bande bei 1625 cm^{-1} auf, die einer Aggregation mehrerer Moleküle zugeordnet werden kann. Alle gezeigten Spektren sind auf Lösungsmiteleinflüsse bei der entsprechenden Temperatur korrigiert.

die Infrarotspektren beider Isomere des AzoTrpzip2 zu haben. Führt man bei allen in den oberen Teilen der Abbildungen 4.31(b) und 4.31(a) gezeigten Spektren eine Anpassung mittels der Summe dreier lorentzförmiger Funktionen analog zu Abbildung 4.24(a) durch, so erhält man für jeweils steigende Temperaturen gesprochen folgendes Bild:

1. Die Bande bei 1676 cm^{-1} verändert ihre zentrale Frequenz um weniger als $0,5\text{ cm}^{-1}$ und erfährt lediglich eine Verbreiterung über den gesamten Temperaturbereich.
2. Die zentrale Frequenz der Schulter um 1647 cm^{-1} steigt um einige Wellenzahlen, wobei deren Breite bei Zimmertemperatur jeweils ihr Maximum hat.
3. Die dritte Lorentzkurve dient der Anpassung der Bande bei 1625 cm^{-1} und weist eine Verbreiterung mit steigender Temperatur auf.

Betrachtet man in Abhängigkeit von der Temperatur das Infrarotspektrum eines Moleküls wie para-Nitroanilin, das keine Strukturänderungen aufgrund von Temperaturveränderungen erwarten lässt, so beobachtet man ebenfalls Bandenverschiebungen und -verbreiterungen [Sie05]. Die beobachteten Veränderungen der Infrarotspektren des AzoTrpZip2 in Abhängigkeit von der Temperatur lassen also nicht direkt auf strukturelle Änderungen schließen. Dennoch schlugen Maness et al. vor, die Absorptionsänderungen bei einer Wellenlänge aufgetragen in Abhängigkeit von der Temperatur ähnlich anzupassen, wie dies für die Circular dichroismussignale in Abbildung 4.30 geschehen ist [Man03]. Abbildung 4.32 zeigt für das cis-Isomer des AzoTrpZip2 die Absorptionsänderungen aufgetragen gegen die Temperatur. Jedoch sind keine signifikanten Andeutungen

eines Knicks oder eines Plateaus erkennbar. Eine Anpassung dieser Daten mit Hilfe von Gleichung 4.2 unterblieb deshalb.

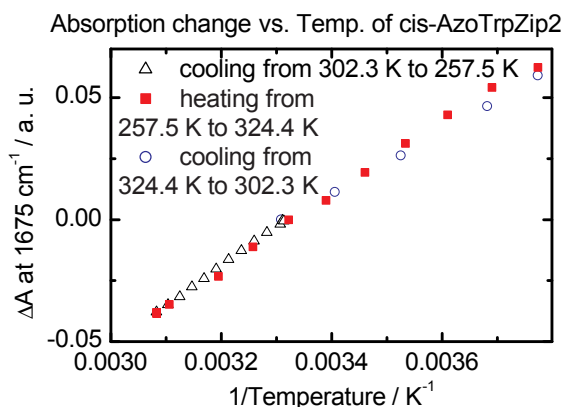


Abbildung 4.32: Absorptionsänderungen des cis-AzoTrpZip2 in Methanol-d4 bei 1675 cm^{-1} in Abhängigkeit von der Temperatur. Der Referenzpunkt ist $302,3\text{ K}$, an dem die Absorption willkürlich auf Null gesetzt wurde. Zunächst wurde von diesem Temperaturreferenzpunkt aus auf $257,5\text{ K}$ abgekühlt (offene Dreiecke). Darauf wurde aufgeheizt bis $324,4\text{ K}$ (geschlossene Quadrate). Durch Abkühlen auf $302,3\text{ K}$ (offene Kreise) wurde wieder der Ausgangspunkt erreicht. Die kleine Hysterese bei höheren Temperaturen liegt wohl an einem Fehler in der Zuordnung der Temperaturen zu den Absorptionswerten im Falle des Aufheizens. Die gezeigten Daten in dieser Abbildung sind nicht auf Lösungsmiteleinflüsse korrigiert. Das Lösungsmittel zeigt jedoch ein ähnlich lineares Verhalten, jedoch mit einer etwas anderen Steigung.

Selbst ein sigmoidaler Kurvenverlauf würde nicht unbedingt auf einen Schmelzübergang schließen lassen, da er auch entstünde, wenn man die Absorptionsänderungen in der Flanke einer Bande aufnimmt, die sich mit der Temperatur verbreitert. In der Literatur werden deshalb verschiedene Vorgehensweisen eingesetzt, um aus Infrarotspektren auf ein Schmelzen eines Peptids zu schließen. Wang et al. werten aus ihren gemessenen Infrarotspektren in Abhängigkeit von der Temperatur nur die hochfrequente Flanke der Amid I' Bande aus und berücksichtigen dabei noch die Bandenverbreiterung der gesamten Amid-I' Bande [Wan04]. Yang et al. tragen das Verhältnis von zweiter und erster Singularwertkomponente der Amid-I' Bande gegen die Temperatur auf und finden so zumindest ein Plateau dieser Kurve bei niedrigen Temperaturen für den trpzip2 gelöst in schwerem Wasser [Yan04b]. Smith et al. konnten jedoch mittels zweidimensionaler Infrarotspektroskopie zeigen, dass selbst bei hohen Temperaturen (82 °C) noch viel von der β -Hairpin Struktur des trpzip2 erhalten bleibt [Smi05, Smi07a]. Darüber hinaus fanden sie eine ähnliche Temperaturabhängigkeit ihres Infrarotspektrums des trpzip2 (siehe Abbildung 4.26(a)) wie für das Modellpeptid AzoTrpZip2 beobachtet: Ihre Bande um 1640 cm^{-1} erfährt ebenfalls eine Blauverschiebung, wohingegen sich die hochfrequente Bande bei ca. 1675 cm^{-1} kaum verändert.

Auch wenn ein Schmelzen des AzoTrpZip2 hier mittels Infrarotspektroskopie nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, deuten die Circular dichroismusdaten doch auf einen Schmelzübergang hin.

5 Peptiddynamik und Faltungsvorgänge im β -Hairpin Modellpeptid AzoTrpZip2

Durch optische Anregung mit einem Lichtimpuls kann eine Isomerisierung des im Modellpeptid AzoTrpZip2 eingebauten Photoschalters AMPP ausgelöst werden. Daraufhin muss sich das Peptidrückgrat auf die neue Konformation des Photoschalters anpassen. Diese strukturellen Änderungen im Peptidrückgrat werden durch Aufnahme von Infrarotspektren mittels eines Abtastimpulses im Bereich der Amid-I' Bande nachgewiesen. Die Isomerisierung des Photoschalters kann durch einen Abtastimpuls im sichtbaren Spektralbereich beobachtet werden. Der Isomerisierung von cis nach trans entspricht hierbei die Entfaltung der β -Hairpin Struktur. Die Faltung wird durch Schalten von trans nach cis ausgelöst.

In Kapitel 5.1 wird zunächst auf die Isomerisierung des Photoschalters und dessen Beobachtung mittels sichtbaren Abtastimpulsen eingegangen. Kapitel 5.2 geht dann auf die Reaktion des Peptidrückgrats nach Isomerisierung des Photoschalters von cis nach trans ein und gibt Einblicke in die Entfaltungsdynamik der β -Hairpin Struktur des hier untersuchten Modellpeptids AzoTrpZip2. Kapitel 5.3 befasst sich mit den Daten zur Faltungsdynamik der β -Hairpin Struktur.

5.1 Zeitaufgelöste Untersuchungen der Isomerisierung des Chromophors AMPP

Ziel der folgenden Messungen ist es festzustellen, auf welchen Zeitskalen der Photoschalter AMPP seine Isomerisierung nach Photoanregung ausführt. Erst wenn diese Isomerisierungsbewegung abgeschlossen ist, kann davon ausgegangen werden, dass die nachfolgend beobachteten Prozesse allein durch die Peptiddynamik hervorgerufen werden. Die Aufklärung des Isomerisierungsmechanismus des AMPP stand hierbei nicht im Vordergrund. Diskutiert werden hier eine Inversionsbewegung, bei der ein Phenylring des Azobenzolschalters durch Veränderung des N=N-C Winkels nahezu in der Ebene bewegt wird, bis die Geometrie des cis-Isomers erreicht wird. Ein weiteres Modell sagt eine Rotation eines Phenylrings voraus. Für eine Zusammenfassung der aktuellen Diskussion sei auf [Sat04a] verwiesen.

Die Ähnlichkeit der Spektren des Azobenzols und des AMPP im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich liefert einen Hinweis darauf, dass im AMPP die Substitution des Azobenzols an den beiden meta-Positionen mit jeweils einer Methylengruppe und die daran anhängenden Peptidketten keinen allzu großen Einfluss auf den Chromophor Azobenzol besitzen. Azobenzol selbst wurde bereits im Rahmen einiger Doktorarbeiten auf seine Eignung hin untersucht, als Photoschalter in Peptiden zu dienen [Näg98, Spö01]. Grundsätzlich zu unterscheiden gilt es hier zwischen der Isomerisierung von cis nach

trans und der umgekehrten Richtung. Zusätzlich bestehen Unterschiede zwischen einer Anregung in der $\pi\pi^*$ -Bande um 320 nm und der $n\pi^*$ -Bande um 430 nm. Thomas Nägelle konnte für Azobenzol gelöst in Ethanol nach Anregung der $n\pi^*$ -Bande (bei 435 nm) Zeitkonstanten von 0,32 ps und 2,1 ps für die Isomerisierung von trans nach cis finden. Für die inverse Isomerisierungsrichtung wurden drei Zeitkonstanten von 0,17 ps, 0,9 ps und etwa 13 ps gefunden. Zusätzlich wurde bei der Anpassung eine Absorptionsänderung im Spektrum mit einer sehr großen Zeitkonstante ($\tau \gg 1$ ns) wegen der Erzeugung des jeweiligen Photoprodukts aufgrund der Isomerisierung berücksichtigt [Näg98]. Die Anregung in der $\pi\pi^*$ -Bande mit Anregimpulsen bei 340 nm wurde von H. Satzger an Azobenzol in Ethanol untersucht. Für die trans nach cis Isomerisierung fand er neben der Änderung des Spektrums aufgrund des erzeugten Photoprodukts vier Zeitkonstanten: 0,13 ps, 0,43 ps, 2,7 ps und 17 ps [Sat04a].

Um jedoch die Einflüsse des Lösungsmittels und der Substitution des Azobenzols unter den gleichen Bedingungen zu untersuchen, unter denen auch die Experimente zur Beobachtung der Faltungsprozesse mittels infraroten Abtastimpulsen durchgeführt wurden, wurde die gleichen Anregungsbedingungen auch bei Messungen im sichtbaren Spektralbereich angewendet.

Die experimentelle Zeitauflösung beträgt bei den gezeigten Daten zwischen 0,2 ps und 0,3 ps. Bei jeder Messung wurde zusätzlich das reine Lösungsmittel unter gleichen Anregungsbedingungen gemessen. Das Lösungsmittel zeigte jedoch nur schwache Signale um den Zeitnullpunkt. Eine Lösungsmittelkorrektur der zeitaufgelösten Datensätze im sichtbaren Spektralbereich erwies sich deswegen als unnötig. Die Wellenlängenabhängigkeit des Zeitnullpunkts aufgrund der Dispersion, die der Abtastimpuls erfahren hat, wurde in allen Datensätzen korrigiert. Die gemessenen Datensätze wurden in einem Zeitbereich von 0,5 ps bis 1600 ps durch eine Funktion aus der Summe von drei bis vier exponentiellen Zerfällen, welche mit einer konstant gehaltenen Kreuzkorrelation von 0,2 ps gefaltet ist, angepasst. Das Ziel dieser Anpassung lag darin, die Datensätze durch Amplitudenspektren und zugehörige Zeitkonstanten zu repräsentieren, um sie mit anderen, auf ähnliche Weise angepassten Datensätzen zu vergleichen.

5.1.1 Anregung bei 404 nm, Isomerisierung von trans nach cis

Da aus der Literatur über Azobenzol bekannt ist, dass die Quantenausbeuten der Isomerisierung für Anregung in die $n\pi^*$ -Bande größer sind als für Anregung in die $\pi\pi^*$ -Bande, wurden als Anregungswellenlänge für die Auslösung der Peptidfaltungsvorgänge Werte in der Nähe des Maximums der $n\pi^*$ -Bande um 435 nm angestrebt [Bor79]. Die zweite Harmonische des Titan-Saphir-Verstärkers bei 404 nm bietet sich deswegen an, da durch die gute Konversionseffizienz der Erzeugung der zweiten Harmonischen hier genügend Anregungsenergie zur Verfügung steht. Dies kompensiert den Effekt, dass bei dieser Wellenlänge die Absorption des trans-Isomers des AzoTrpZip2 nur noch ca. 70 % des Maximums der $n\pi^*$ -Bande beträgt. Abbildung 5.1 gibt einen Überblick über die gewonnenen Daten zur Dynamik des trans-AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ nach Anregung bei 404 nm.

In der hier vorgestellten transienten Absorptionsspektroskopie im sichtbaren und zum Teil ultravioletten Spektralbereich kann man prinzipiell zu frühen Verzögerungszeiten

drei verschiedene Signalbeiträge erwarten. Absorptionsabnahmen stammen entweder von einem Ausbleichen des Grundzustands oder rühren von einer stimulierten Emission aus einem angeregten elektronischen Zustand her. Absorptionszunahmen werden hingegen durch die Absorption des elektronisch angeregten Zustandes in höhere angeregte Zustände verursacht. Zusätzlich können noch Kühlsignaturen beobachtet werden, deren Ursache in der Energieumverteilung innerhalb des angeregten Moleküls und in der Energieabgabe an das Lösungsmittel begründet liegt. Die Kühlsignaturen rufen sigmoidale Kurvenformen in den transienten Spektren und den Amplitudenspektren der globalen Anpassung hervor. Ein letzter Signalbeitrag in den hier vorgestellten Daten findet seine Ursache in der Photoproduktbildung aufgrund der Isomerisierung. Dieser Beitrag ist gekennzeichnet durch eine Signatur, die mit dem stationären Differenzspektrum der isomerisierenden Spezies übereinstimmt.

In den in Abbildung 5.1 gezeigten Daten findet man jedoch zu frühen Verzögerungszeiten nur Absorptionszunahmen bei beiden Modellpeptiden, dem AzoTrpZip2 und dem Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Eine stimulierte Emission kann nicht eindeutig identifiziert werden. Aus ihr ließe sich direkt die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustandes erschließen. Diese Lebensdauer muss daher indirekt aus dem Zerfall der Absorption des angeregten Zustandes ermittelt werden. Bei beiden Modellpeptiden weist diese Absorption zwei Banden auf, eine um 380 nm und eine bei ca. 530 nm. Die Photoproduktbildung führt in beiden Fällen zu Zurückbleiben des Ausbleichens der $\pi\pi^*$ -Bande unterhalb von 380 nm bei Verzögerungszeiten von mehr als einigen 10 ps. Im Falle des Referenzpeptids ist auch noch eine Absorptionszunahme aufgrund Photoproduktbildung im Bereich der $n\pi^*$ -Bande (bei 435 nm) erkennbar.

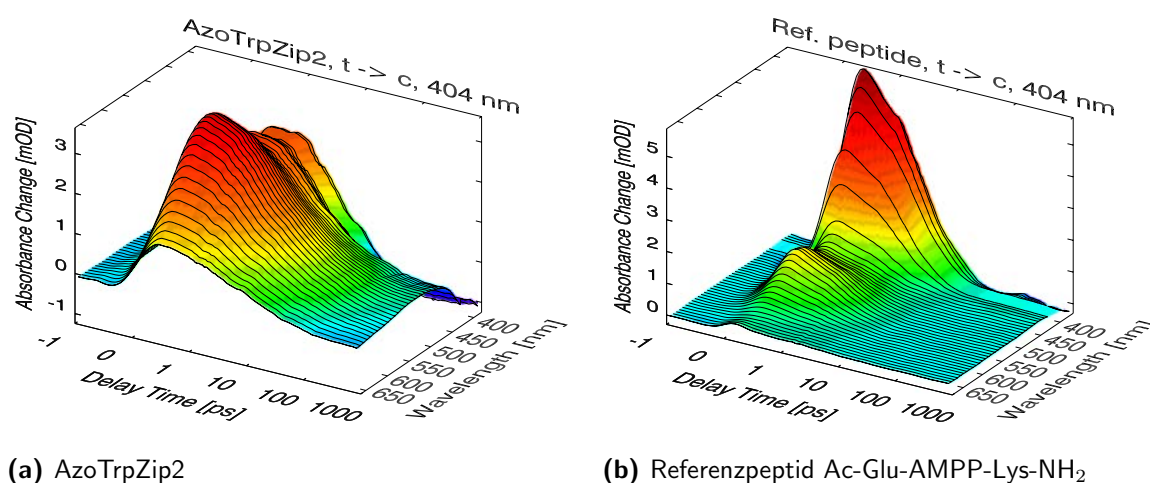


Abbildung 5.1: Dreidimensionale Darstellung der Absorptionsänderungen des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ beim Konformationswechsel vom trans- in das cis-Isomer beobachtet im sichtbaren Spektralbereich ausgelöst durch Anregimpulse bei 404 nm. Die Zeitachse ist zwischen -1 ps und 1 ps linear und von dort an logarithmisch. Absorptionszunahmen sind mit rötlichen Farben, -abnahmen mit blauen Farbtönen kodiert. Für jede gemessene Transiente wurde eine schwarze Linie eingezeichnet. Im Bereich der Anregung um 404 nm waren die Messdaten aufgrund des Streulichts aus den Anregimpulsen nicht verwendbar.

Zunächst fällt auf, dass die induzierte Absorption um 380 nm im Falle des AzoTrpZip2 deutlich geringer ausfällt als in dem Datensatz zum Referenzpeptid. Die induzierte Bande bei 530 nm hingegen ist beim AzoTrpZip2 intensiver und spektral breiter und zeigt auch einen verlangsamten, nicht exponentiellen Zerfall. Bis 100 ps sind die wesentlichen Prozesse im AzoTrpZip2 jedoch abgeschlossen. In der Zeit zwischen 20 ps und 100 ps gibt es noch schwache, aber deutlich sichtbare Signalbeiträge in den Banden um 530 nm und um 400 nm. Im Fall des Referenzpeptids entspricht das transiente Spektrum bei 20 ps bereits dem stationären Differenzspektrum.

Abbildung 5.2 zeigt einen Überblick über die Amplitudenspektren, die durch die globale Anpassung der beiden Datensätze gewonnen wurden. Eine Zeitkonstante wurde jeweils auf einen Wert von 10^7 ps gesetzt (infinity). Das dieser Zeitkonstante entsprechende Amplitudenspektrum trägt der Bildung des Photoprodukts durch den Anregimpuls Rechnung.

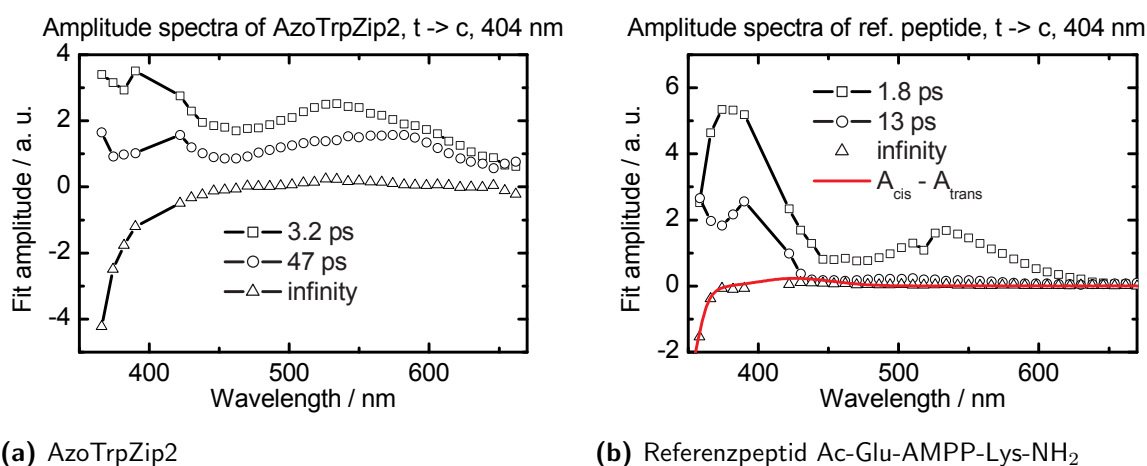


Abbildung 5.2: Amplitudenspektren aus einer globalen Anpassung der Absorptionsänderungen des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ (trans \rightarrow cis, $\lambda_{ex.}=404$ nm). Angepasst wurden die Daten in einem Zeitbereich zwischen 0,5 ps und 1600 ps. Die durchgezogene (rote) Linie im rechten Teil der Abbildung zeigt eine geeignet skalierte Differenz der Spektren des cis-Isomers und des trans-Isomers. Im Fall des AzoTrpZip2 (linker Teil der Abbildung) wurde diese Linie weggelassen, da aufgrund der Form des Amplitudenspektrums zur unendlich großen Zeitkonstante (offene Dreiecke) kein geeigneter Skalierungsfaktor für ein entsprechendes Differenzspektrum gefunden werden konnte.

Die Amplitudenspektren des Referenzpeptids erinnern an die des trans-Azobenzols in Ethanol, angeregt bei 435 nm [Näg98]. Lediglich die Amplitude zur Zeitkonstante 13 ps ist beim Referenzpeptid geringer als die Amplitude der zweiten Zeitkonstante im Falle des Azobenzols. Beide Amplitudenspektren zeigen Maxima um 380 nm und um 530 nm. Jedoch sind die Zeitkonstanten des Referenzpeptids deutlich größer: Der Zeitkonstante $\tau_1 = 1,8$ ps entspricht im Azobenzol einer Zeitkonstante von 320 fs. Die zweite Zeitkonstante des Azobenzols mit 2,1 ps vergleicht sich mit $\tau_2 = 13$ ps des Referenzpeptids. Das Amplitudenspektrum zur unendlich großen Zeitkonstante gibt das von stationären Messungen bekannte Differenzspektrum gut wieder (durchgezogene Linie in Abbildung 5.2(b)).

Eine Interpretation der ersten Zeitkonstante ($\tau_1 = 1,8$ ps) könnte im Übergang vom elektronisch angeregten Zustand in den Grundzustand liegen. Danach verbleibt noch viel Energie in Form von Schwingungsanregung im Molekül, welche nicht für die Isomerisierung benötigt wurde. Die zweite Zeitkonstante ($\tau_2 = 13$ ps) könnte einem Umverteilen dieser Energie und deren Abgabe an das Lösungsmittel entsprechen. Eine alternative Interpretation wäre, dass eine Subpopulation des Referenzpeptids erst mit dieser längeren Zeitkonstante isomerisiert.

Die Zeitkonstanten in den AzoTrpZip2-Daten bei der Isomerisierung des AMPP von trans nach cis sind gegenüber denen des Referenzpeptids noch zusätzlich verlängert. Selbst 1,6 ns nach der Anregung gibt es bei 400 nm und um 530 nm zum stationären Differenzspektrum Unterschiede. Die im Fall des Referenzpeptids auftretende transiente Absorptionzunahme um 380 nm erscheint wesentlich weniger ausgeprägt. Eine Erklärung für die verlängerten Zeitkonstanten könnte in der Rückwirkung des sich umfaltenden Peptids auf den Azobenzol-Chromophor des AMPP liegen, wie sie auch schon bei ähnlichen, zyklischen Modellpeptiden und entsprechenden Chromophoren beobachtet wurde [Spö02, Cor06].

5.1.2 Anregung bei 404 nm, Isomerisierung von cis nach trans

Zum Auslösen der Isomerisierung von cis nach trans des AMPP Chromophors bietet sich eine Anregung einer im photostationären Gleichgewicht präparierten Probe in der $n\pi^*$ -Bande aus zwei Gründen an: Zum einen ist die Quantenausbeute für die Isomerisierung höher als in der $\pi\pi^*$ -Bande und zum anderen absorbiert das cis-Isomer hier jeweils stärker als das trans-Isomer. Als Anregimpulswellenlänge wurde deshalb wieder die zweite harmonische des Titan-Saphir Verstärkers bei 404 nm gewählt.

Da das photostationäre Gleichgewicht des cis-Isomers immer einen gewissen Anteil an trans-Isomer enthält (siehe Seite 63), ist es unvermeidlich, dass parallel zur beobachteten Dynamik angeregter cis-Isomere auch ein gewisser Anteil an Dynamik auf angeregte trans-Isomere zurückzuführen ist. Da diese Dynamik, wie im vorigen Kapitel dargestellt, ebenfalls vermessen wurde, kann der trans-Anteil aus den gemessenen Datensätzen eliminiert werden. Dadurch kann die Dynamik des reinen cis-Isomers gewonnen werden. Die Vorgehensweise bei dieser Korrektur wird genauer in [Spö01] behandelt. Abbildung 5.3 zeigt bereits die entsprechend korrigierten Datensätze der reinen cis-Dynamik des cis-AzoTrpZip2 und des cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂.

Aus der verwendeten Anregungsenergie, dem Bündeldurchmesser des Anregungsimpulses und aus der Absorption der Probenlösung bei der Wellenlänge des Anregungsimpulses kann die Anzahl der angeregten Moleküle abgeschätzt werden. Führt man eine solche Abschätzung für die beiden in Abbildung 5.3 dargestellten Messdatensätze durch, findet man, dass in Abbildung 5.3(b) etwa zehnmal mehr Moleküle als in Abbildung 5.3(a) zum Signal beitragen. Die relative Signalthöhe im Bereich um 550 nm ist also in beiden Datensätzen vergleichbar. Im Fall des cis-AzoTrpZip2 fehlen die Daten mit Abtastwellenlängen kleiner 400 nm, da sie zu starkes Rauschen aufweisen.

Die induzierte Absorption im Falle des AzoTrpZip2 (siehe Abb. 5.3(a)) besitzt ein Maximum bei 500 nm und zerfällt bis zu einer Verzögerungszeit von ca. 1 ns. Die entsprechenden transienten Absorptionsänderungen in Abhängigkeit von der Zeit lassen

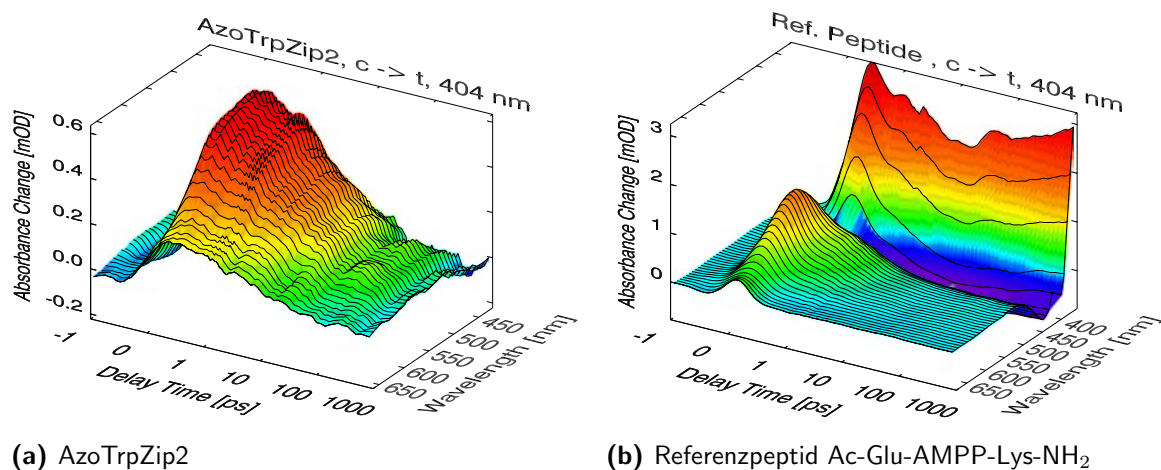


Abbildung 5.3: Dreidimensionale Darstellung der Absorptionsänderungen des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ (cis \rightarrow trans, $\lambda_{ex.}=404$ nm). Beide Datensätze wurden bereits auf die trans nach cis Dynamik korrigiert und stellen somit die reine cis nach trans Dynamik dar.

sich nur schlecht mittels exponentieller Zerfälle anpassen. Eine spektrale Verschiebung des Maximums wird im Rahmen der Messgenauigkeit nicht beobachtet.

Hingegen besitzt im Fall des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ die induzierte Absorption zwei Maxima, eines bei 380 nm und eines um 550 nm. Schon mit einer Zeitkonstante von um 1 ps ist eine negative Absorption bei 430 nm erkennbar, welche einer Photoproduktbildung zugeordnet werden kann. Der Anstieg der Absorption für Wellenlängen im ultravioletten Spektralbereich auf einer Zeitskala von ca. 100 ps wird nur im Falle des Referenzpeptids beobachtet. Die entsprechenden Zeitskalen und Amplitudenspektren daraus sind in Abbildung 5.4 gezeigt.

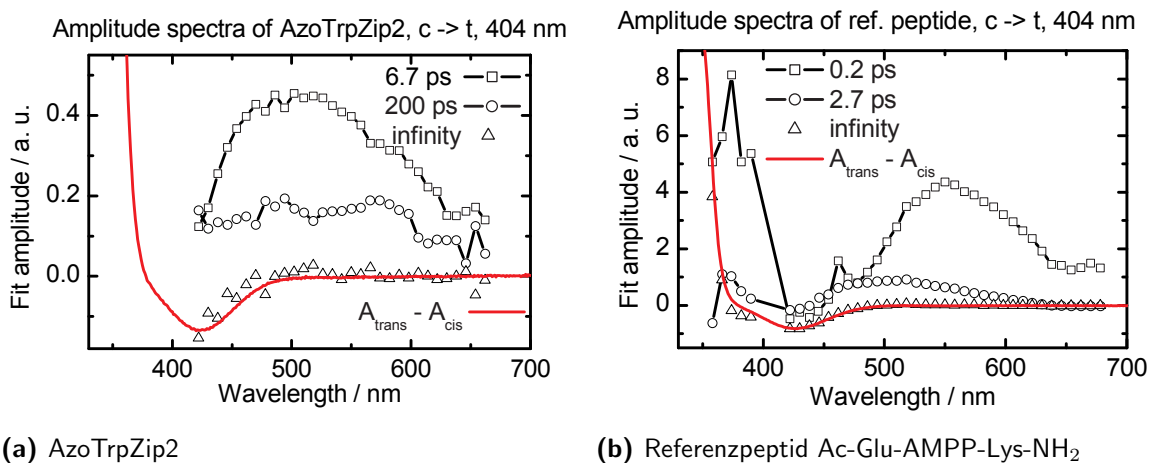


Abbildung 5.4: Amplitudenspektren aus einer globalen Anpassung der Absorptionsänderungen des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ (cis \rightarrow trans, $\lambda_{ex.}=404$ nm). Bei den hier angepassten Daten wurde bereits die trans nach cis Dynamik herauskorrigiert. Weitere Hinweise zur Art der Darstellung finden sich in der Bildunterschrift zu Abbildung 5.2.

Die globale Anpassung des Referenzpeptids weist größere Abweichungen zu den gemessenen Daten bei Abtastwellenlängen unterhalb von 400 nm und Zeiten größer als 10 ps auf. Hier scheint noch eine weitere Zeitkonstante von um die 100 ps nötig zu sein, um den beobachteten Absorptionsanstieg auf dieser Zeitskala nachzubilden, siehe dazu auch Abbildung 5.3(b). Dem Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante 0,2 ps kann der Zerfall des elektronisch angeregten S_1 -Zustands zugeordnet werden. Um 430 nm ist hier auch ein Ausbleichen der $n\pi^*$ -Bande des Grundzustands erkennbar, das mit dieser Zeitkonstante zurückgeht. Ein negativer Bereich in einem Amplitudenspektrum könnte auch von stimulierter Emission verursacht werden, was jedoch bei der geringen Fluoreszenzquantenausbeute von cis-Azobenzol unwahrscheinlich ist [Sat03]. Das Amplitudenspektrum zur zweiten Zeitkonstante von 2,7 ps kann mit einer weiteren Relaxation aus dem angeregten Zustand kombiniert mit einer Kühlsignatur interpretiert werden.

Das Verhalten des Referenzpeptids cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ ähnelt spektral sehr stark dem von cis-Azobenzol in Ethanol [Näg98] oder in Dimethylsulfoxid (DMSO) [Spö01] nach Anregung in der $n\pi^*$ -Bande. Bei letzteren Messungen wurde eine Zeitkonstante von 0,13 ps gefunden, welche abgesehen von dem negativen Bereich um 430 nm einen ähnlichen spektralen Verlauf aufweist wie das hier gefundene Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante 0,2 ps. Das Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante von 2,7 ps des cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ scheint eine Mischung der Amplitudenspektren der 1,1 ps und 11 ps Zeitkonstanten zu sein, wie sie bei der Isomerisierung von cis-Azobenzol in DMSO beobachtet wurden [Spö01].

Die globalen Anpassungen für beide Modellpeptide (cis-AzoTrpZip2 und cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂) führen zu einem Amplitudenspektrum zu einer unendlich großen Zeitkonstante, das spektral gut mit den zu erwartenden Differenzspektren zwischen gebildetem trans-Isomer und isomerisiertem (und damit fehlendem) cis-Isomer übereinstimmt (Abbildung 5.4, jeweils durchgezogene Linie). Die ermittelten Zeitkonstanten im Falle des cis-AzoTrpZip2 sind mit 6,7 ps und 200 ps deutlich größer als die des Referenzpeptids. Hier kann wieder eine Rückwirkung der Umfaltungsprozesse des Peptids auf den Chromophor AMPP nicht ausgeschlossen werden. Auch treten spektrale Unterschiede auf: Das instantane Ausbleichen (negatives Signal am Zeitnullpunkt) der $n\pi^*$ -Bande des cis-AzoTrpZip2 scheint durch eine Absorption des angeregten Zustandes (S_1) in höher angeregte Zustände (S_n) kompensiert zu werden. Das Maximum dieser $S_1 \rightarrow S_n$ Absorption des angeregten cis-AzoTrpZip2 liegt blauverschoben bei 500 nm im Vergleich zum Referenzpeptid, wo diese induzierte Absorption bei 550 nm im Maximum auftritt. Die induzierte Absorption um 550 nm des angeregten cis-AzoTrpZip2 zerfällt auch sehr viel langsamer als die des Referenzpeptids cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂.

5.1.3 Anregung bei 340 nm, Isomerisierung von trans nach cis

Um die Bildung der β -Hairpin Struktur auf Zeitskalen von Mikrosekunden beobachten zu können, wurde dieser Faltungsprozess durch Anregimpulse bei 355 nm durch die dritte Harmonische eines gütegeschalteten Nd:YAG Lasers ausgelöst. Auch hier stellt sich die Frage, wie schnell die Isomerisierung des AMPP Chromophors nach Anregung in die $\pi\pi^*$ -Bande vom trans-Isomer in das cis-Isomer stattfindet. Deswegen wurden Messungen mit einem frequenzverdoppelten Anregimpuls aus einem nicht-kollinearen optisch para-

metrischen Verstärkers (NOPA) durchgeführt, welcher Impulse bei 680 nm erzeugte. Die erzielte Zentralwellenlänge¹ dieser Anregimpulse lag bei ca. 340 nm. Abbildung 5.5 gibt einen Überblick über die gemessenen transienten Spektren nach Anregung des trans-AzoTrpZip2 bzw. des trans-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ bei einer Wellenlänge von 340 nm. Es fällt hier eine große Ähnlichkeit der beiden Datensätze auf.

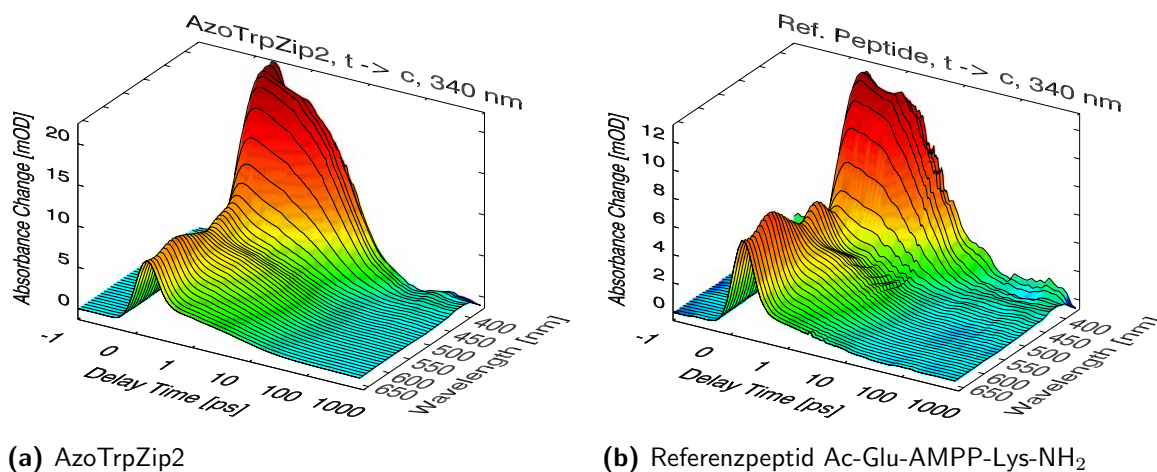


Abbildung 5.5: Dreidimensionale Darstellung der Absorptionsänderungen des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ (trans \rightarrow cis, $\lambda_{ex.}$ = 340 nm).

Der Datensatz des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ (Abbildung 5.5(b)) weist zudem eine große Ähnlichkeit auf zu dem von trans-Azobenzol (gelöst in Ethanol, $\lambda_{ex.}$ = 340 nm [Sat04a]). Diese Ähnlichkeit äußert sich auch in der globalen Anpassung, siehe hierzu Abbildung 5.6.

In den Amplitudenspektren wird deutlich, dass im Falle des trans-AzoTrpZip2 die induzierte Absorption im Bereich um 400 nm relativ zu derjenigen bei 530 nm stärker ausfällt. Im Falle der hier betrachteten Isomerisierungsreaktion von trans nach cis hat dies zur Folge, dass sich die Datensätze des Referenzpeptids und des AzoTrpZip2 bei der Anregung in $\pi\pi^*$ -Bande (S_2 -Zustand) ähnlicher sind als bei Anregung der $n\pi^*$ -Bande. Im folgenden wird deswegen nur noch der Datensatz des Referenzpeptids interpretiert und mit den Daten zur Anregung von trans-Azobenzol in Ethanol bei 340 nm verglichen.

Ein solcher Vergleich der Amplitudenspektren des Referenzpeptids aus Abbildung 5.6 mit der entsprechenden Anpassung der Daten des trans-Azobenzol in Ethanol, angeregt bei 340 nm, liefert eine gute Übereinstimmung [Sat04a]. Insbesondere das Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante von 0,5 ps des Referenzpeptids stimmt spektral gut mit dem zur Zeitkonstante von 0,13 ps im Falle von Azobenzol überein. Letzteres wurde mit dem Zerfall des angeregten S_2 -Zustands und der Bevölkung des S_1 -Zustands interpretiert. Diese Interpretation kann hier für des Referenzpeptid und für das Modell-

¹Da die Impulsenergie des NOPA zu noch längeren Wellenlängen ($\lambda > 600$ nm) hin stark abfällt, konnte nach Frequenzverdopplung nicht die Wellenlänge von 355 nm erreicht werden. Da sich jedoch die Quantenausbeute für die Isomerisierung innerhalb einer Absorptionsbande (hier die $\pi\pi^*$ -Bande) nicht ändert [Bor79], ist dadurch auch keine unterschiedliche Dynamik zwischen einer Anregung bei 355 nm und 340 nm zu erwarten.

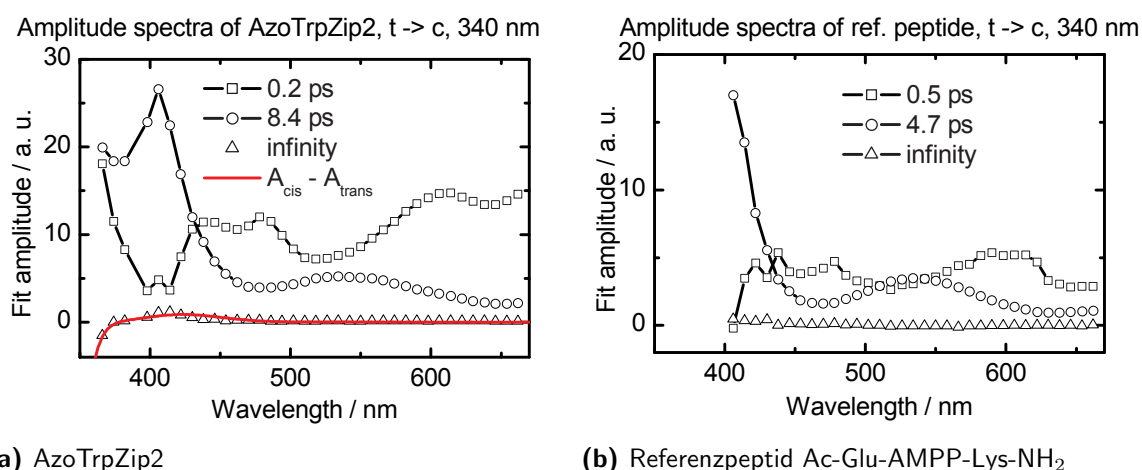


Abbildung 5.6: Amplitudenspektren aus einer globalen Anpassung der Absorptionsänderungen des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ (trans → cis, $\lambda_{ex.}=340$ nm). Weitere Hinweise zur Art der Darstellung finden sich in der Bildunterschrift zu Abbildung 5.2. Die durchgezogene (rote) Linie im linken Teil der Abbildung zeigt eine geeignet skalierte Differenz der Spektren des cis-Isomers und des trans-Isomers des AzoTrpZip2. Im Fall des Referenzpeptids (rechter Teil der Abbildung) wurde diese Linie weggelassen, da aufgrund der Form des Amplitudenspektrums zur unendlich großen Zeitkonstante (offene Dreiecke) kein geeigneter Skalierungsfaktor für ein entsprechendes Differenzspektrum gefunden werden konnte.

peptid AzoTrpZip2 übernommen werden. Das Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante 4,7 ps (Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂) ist vermutlich eine Mischung aus dem Zerfall dieses S₁-Zustands und einem Kühlen des elektronischen Grundzustands.

Vergleicht man die mittels Anregung in die $\pi\pi^*$ -Bande (340 nm) des Referenzpeptids gefundenen Amplitudenspektren mit denen aus Abbildung 5.2(b) für die Anregung in die $n\pi^*$ -Bande (404 nm), so fällt auf, dass das Amplitudenspektrum zur mittleren Zeitkonstante 4,7 ps bei der $\pi\pi^*$ -Anregung eine ähnliche spektrale Form wie das Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante 1,8 ps bei $n\pi^*$ -Anregung besitzt. Jedoch weist das letztere Spektrum deutlich geringere Signalanteile oberhalb von 600 nm auf. Dies kann so interpretiert werden, dass man nach $\pi\pi^*$ -Bande die Potentialfläche des S₁-Zustands mit einer Überschussenergie erreicht, dort also an einem anderen Punkt ankommt als bei der direkten Anregung in die $n\pi^*$ -Bande mit $\lambda_{ex.}=404$ nm. Hierin könnte dann auch der Unterschied in der Isomerisierungsquantenausbeute vom trans- in das cis-Isomer liegen, die bei Anregung in die $n\pi^*$ -Bande größer ist als bei der Anregung in die $\pi\pi^*$ -Bande [Spö01].

5.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der zeitaufgelösten Charakterisierung des Photoschalters AMPP

Ziel dieses Abschnitts war es, einen Überblick darüber zu gewinnen, auf welchen Zeitskalen der Photoschalter AMPP seine Isomerisierung vollzieht. Tabelle 5.1 fasst die durch globale Anpassung der Datensätze gewonnenen Zeitkonstanten zusammen.

Probe	AzoTrpZip2			Referenzpeptid		
	t \rightarrow c	c \rightarrow t	c \rightarrow t	t \rightarrow c	c \rightarrow t	c \rightarrow t
$\lambda_{ex.}$	340 nm	404 nm	404 nm	340 nm	404 nm	404 nm
τ_1	0,2 ps	3,2 ps	6,7 ps	0,5 ps	1,8 ps	0,2 ps
τ_2	8,4 ps	47 ps	200 ps	4,7 ps	13 ps	2,7 ps

Tabelle 5.1: Zeitkonstanten der globalen Anpassungen an die gewonnenen Datensätze zur Beobachtung der Isomerisierungsgeschwindigkeit des Chromophors AMPP. $\lambda_{ex.}$ bezeichnet die Wellenlänge des Anregimpulses. τ_1 und τ_2 sind die beiden Zeitkonstanten aus der globalen Anpassung. Die dritte Zeitkonstante „infinity“ ist jeweils konstant auf einem sehr großen Wert (10^7 ps) gehalten worden und wurde deswegen in der Tabelle nicht extra aufgeführt.

Eine genaue Trennung von den Signalen der stimulierten Emission, des Ausbleichens und der Absorption des angeregten Zustandes kann in den vorliegenden Daten nicht vorgenommen werden, da diese Anteile spektral nicht klar getrennt auftreten. Deswegen ist keine direkte Aussage über die Zerfallszeit des elektronisch angeregten Zustandes möglich. Als Trend kann festgestellt werden, dass der Photoschalter, eingebaut in des Peptid AzoTrpZip2, langsamer isomerisiert als im Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Dieses wiederum isomerisiert in etwa ähnlich schnell wie Azobenzol im Lösungsmittel Ethanol. Es kann festgehalten werden, dass in allen Fällen jedoch die Isomerisierung des Azobenzol-Schalters mit einer sub 10 ps Zeitkonstante abgeschlossen ist.

Die beobachtete lange Zeitkonstante bei der Isomerisierung des cis-AzoTrpZip2 in sein trans-Isomer nach Anregung bei 404 nm bedingt zwar, dass das zu erwartende stationäre Differenzspektrum auch nach 1,6 ns noch nicht erreicht ist, jedoch besitzt sie eine vergleichsweise kleine Amplitude, was darauf hindeutet, dass sie möglicherweise nur eine kleine, langsam isomerisierende Subpopulation repräsentiert.

Eine solche langsame Kinetik kann auch als Rückwirkung der Peptiddynamik auf die Isomerisierungsbewegung des Photoschalters AMPP interpretiert werden. Dies würde die systematisch längeren Zeitkonstanten des AzoTrpZip2 im Vergleich zu dessen Referenzpeptid erklären. Ähnliche Effekte wurden schon in anderen photoschaltbaren Modellpeptiden beobachtet [Spö02, Cor06]. In [Spö02] wurde dieser Effekt dazu benutzt, die experimentellen Ergebnisse mit theoretischen Simulationen zu vergleichen.

Vergleicht man die beiden Datensätze zur Isomerisierung vom trans- in das cis-Isomer bei den beiden Anregungswellenlängen 340 nm und 404 nm untereinander, so fällt auf, dass die Anregung in der $\pi\pi^*$ -Bande (340 nm) zu kürzeren Zeitkonstanten führt, als die Anregung mit 404 nm in der $n\pi^*$ -Bande. Bei beiden Anregungswellenlängen konnte jedoch eine Isomerisierung des Photoschalters vom trans- in das cis-Isomer nachgewiesen werden. Im Fall des AzoTrpZip2 bei Anregung bei 404 nm konnte dieser Nachweis nicht direkt über die Anpassung der zeitaufgelösten Daten aus Abbildung 5.2(a) erbracht werden. Er konnte jedoch mittels Spektren geführt werden, die vor und nach der Aufnahme der zeitaufgelösten Daten aus Abbildung 5.1(a) angefertigt wurden. Sie zeigten eine deutliche Abnahme im Bereich der $\pi\pi^*$ -Bande, welche auf eine Bildung des cis-Isomers zurückgeführt werden kann. Nach Abschluss des Isomerisierungsvorgangs spielt jedoch die Anregungswellenlänge der Anregimpulse, die zur Isomerisierung geführt haben, kei-

ne Rolle mehr, so dass zu erwarten ist, dass die nachfolgende Peptiddynamik für die Reaktionsrichtung von trans nach cis für beide Anregungswellenlängen gleich ausfällt.

5.2 Entfaltung der β -Hairpin Struktur

Bisher wurde der Photoschalter AMPP in den Molekülen AzoTrpZip2 und Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ studiert. Die dabei verwendeten Abtastimpulse lagen im sichtbaren Spektralbereich, in dem die elektronischen Übergänge des Photoschalters liegen. Nun rückt das an dem Photoschalter kovalent angebrachte Peptid in den Mittelpunkt des Interesses. Durch Abtastimpulse im Bereich der Amid-I' Bande der beiden Modellpeptide AzoTrpZip2 und Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ um 1650 cm⁻¹ können Differenzspektren zwischen Ausgangszustand vor der Auslösung der Isomerisierung und dem momentanen Faltungszustand zu einer bestimmten Verzögerungszeit aufgenommen werden. In diesem Kapitel ist dieser Ausgangszustand das cis-Isomer. Dies bedeutet, dass hier eine Entfaltung der im cis-Isomer vorhandenen Struktur beobachtet wird.

Im daran anschließenden Kapitel 5.3 wird auf die Bildung der cis-Strukturen eingegangen, wobei der Ausgangszustand das jeweilige trans-Isomer des AzoTrpZip2 und des Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ ist.

5.2.1 Überblick über die experimentellen Daten

Aus Kapitel 5.1 ist bekannt, dass die Isomerisierung des Photoschalters vom cis- in das trans-Isomer auf einer Pikosekundenzeitskala abläuft und dass Rückwirkungen des Peptids auf den Schalter auf der 100 ps Zeitskala gesehen werden. Nun wird im Detail dargestellt, mit welchen Zeitkonstanten die Reaktion des Peptids auf diese Isomerisierung abläuft.

Zu Beginn der Messung wird die gesamte Probe in das photostationäre Gleichgewicht des cis-Isomers belichtet. In diesem Zustand befindet sich höchstens ein Anteil von 16 % an trans-Isomeren in der Lösung. Durch den Anregimpuls bei 404 nm wird jedoch auch dieser trans-Anteil angeregt und trägt zur beobachteten Dynamik bei. Dieser Beitrag könnte durch Messung der trans \rightarrow cis Dynamik ermittelt, das Signal daraufhin korrigiert und so das Verhalten des reinen cis-Anteils bestimmt werden [Spö01]. Eine solche Korrektur wird sich jedoch als unnötig erweisen, wie der folgende Absatz zeigt.

Die zur Korrektur nötige Dynamik der IR-Absorption nach Anregung der Probe im Zustand des trans-Isomers des AzoTrpZip2 bzw. seines Referenzpeptids wird in Kapitel 5.3 dargestellt. Entsprechend skaliert ergibt diese Dynamik im Maximum ein Differenzsignal von ca. 0,05 mOD. Dies entspricht in etwa dem Rauschen der Signale der cis nach trans Dynamik. Deswegen wurde auf eine solche Korrektur verzichtet. Nachdem der Signalbeitrag der angeregten trans-Isomere somit vernachlässigt wurde, wird dieser Anteil auch in der weiteren Interpretation der Daten ignoriert.

Eine Korrektur auf die Lösungsmittelabsorptionsdynamik unterblieb, da hier nur Signale innerhalb der ersten Pikosekunde um den Zeitnullpunkt betroffen wären. Die Daten im folgenden werden jedoch stets erst ab 1 ps betrachtet, wo diese Korrektur keine Rolle mehr spielt. Die Frequenzabhängigkeit des Zeitnullpunkts wurde jedoch für jede gemess-

sene Transiente korrigiert. Eine zweidimensionale Darstellung der Absorptionsänderung des cis-AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids nach Anregung bei 404 nm zeigt Abbildung 5.7.

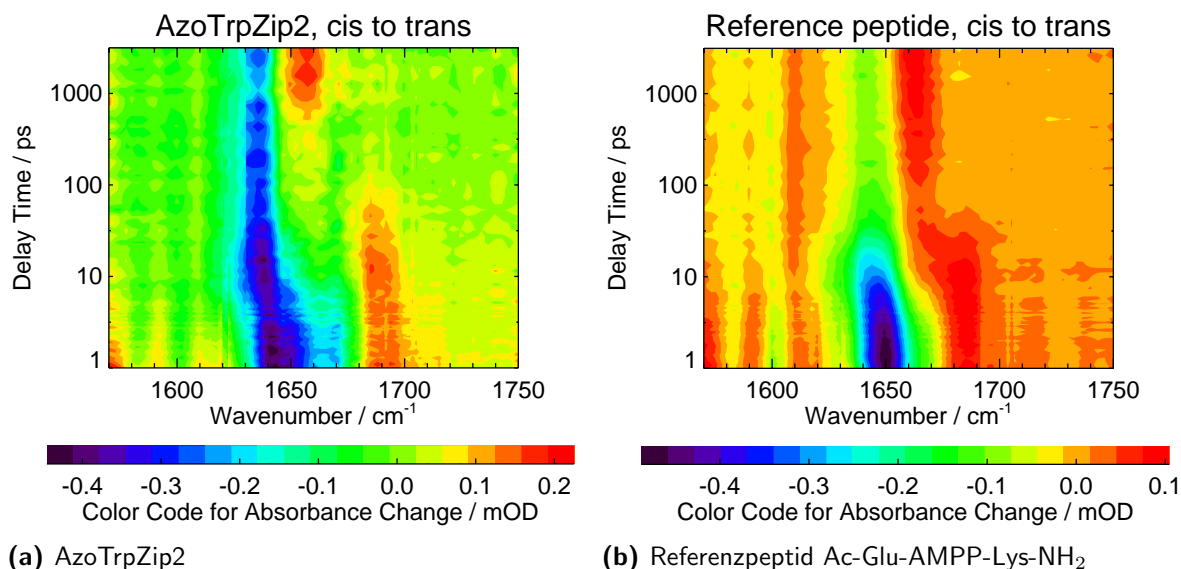


Abbildung 5.7: Zweidimensionale Darstellungen der Absorptionsänderungen bei Anregung des cis-Isomers bei $\lambda_{ex.}=404$ nm. Die Lösung des AzoTrpZip2 bzw. des Referenzpeptids war durch Vorbelichten im photostationären Gleichgewicht des cis-Isomers präpariert. Dargestellt sind Absorptionszunahmen mit rötlichen Farbtönen. Absorptionsabnahmen sind durch bläuliche Farben angedeutet. Die Zeitachse ist jeweils logarithmisch. Eine Skalierung beider Abbildungen auf den gleichen Anteil von angeregten Molekülen wurde zur besseren Vergleichbarkeit durchgeführt.

5.2.2 Erwartete Signalbeiträge

Bei der Diskussion der Beobachtungen sollte man berücksichtigen, dass unterschiedliche Reaktionen in der Probe ablaufen, die darauf zurückzuführen sind, dass zum einen die Ausgangsmoleküle in der cis-Form einen erheblichen Anteil (ca. 55 % bei 30 °C) an ungefaltetem Peptid enthalten. Zum anderen werden durch die endliche Quantenausbeute für die cis \rightarrow trans Isomerisierung (bei Anregung in die $n\pi^*$ -Bande von ca. 51 % [Bor79]) nur etwa die Hälfte der Moleküle in die neue trans-Form geschaltet, während der Rest in den Ausgangszustand zurückkehrt. Somit liegen nach Abschluss der Isomerisierung des Photoschalters vier Spezies zu etwa gleichen Anteilen vor:

1. Ursprünglich gefaltetes Peptid AzoTrpZip2, dessen Schalter nach trans isomerisiert ist.
2. Ursprünglich gefaltetes Peptid AzoTrpZip2, dessen Schalter nicht isomerisierte, das zunächst noch schwingungsangeregt ist.
3. Ursprünglich ungefaltetes Peptid AzoTrpZip2, dessen Schalter nach trans isomerisiert ist.

4. Ursprünglich ungefaltetes Peptid AzoTrpZip2, dessen Schalter nicht isomerisiert ist, das zunächst noch schwingungsangeregt ist.

Die nicht isomerisierenden Spezies (Anteile 2 und 4) lassen nur eine Kühlsignatur erwarten, welche die Umverteilung der Schwingungsanregung und die Abgabe von Schwingungsenergie an das Lösungsmittel zur Ursache hat. Typische Werte für die Zeitkonstanten solcher Kühlprozesse betragen in Methanol wenige Pikosekunden [Sch04b]. Für spätere Zeiten tragen diese beiden Spezies wahrscheinlich kaum mehr zum Differenzsignal bei. Startet man von einem zunächst ungefalteten Peptid, bei dem der Azo-Schalter nach trans isomerisiert (Spezies 3), so lassen sich neben der Kühlsignatur noch Faltungsdynamiken in den trans-Zustand des Peptids beobachten. Da in dem ursprünglich ungefalteten Peptid (Spezies 3) kaum ausgeprägte intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungsmuster vorlagen, sollten dabei die Absorptionsänderungen im infraroten Spektralbereich nur schwach sein. Von Spezies 3 ist also auch hauptsächlich ein Beitrag zur Kühlsignatur zu erwarten. Der Hauptbeitrag zum Signal sollte deshalb vom Anteil 1 stammen, bei dem die Lichtanregung den Schalter nach trans isomerisiert und von gefaltetem cis-AzoTrpZip2 in dessen trans-Isomer führt.

Im Fall des Referenzpeptids, das als cis-Isomer einen β -Turn ausbildet, kann ebenfalls davon ausgegangen werden, dass obige vier Spezies in analoger Weise auftreten. Da hier jedoch nicht eindeutig zwischen gefaltetem und ungefaltetem Peptidanteil unterschieden werden kann, ist hier keine Aussage über die mengenmäßigen Verhältnisse obiger Spezies und damit über die Verhältnisse der zu erwartenden Signalbeiträge möglich.

Azobenzolbanden:

In Abbildung 5.7(a) sind im niederfrequenten Bereich bei 1585 cm^{-1} und bei 1600 cm^{-1} zwei Banden erkennbar, die nach ca. 10 ps eine konstant bleibende Abnahme in der Absorption zeigen. Diese Abnahme tritt ebenfalls im Fall des Referenzpeptids an den gleichen Wellenzahlpositionen auf. Diese Banden können dem Azobenzol-Chromophor zugeordnet werden. Das cis-Isomer des reinen Azobenzols weist Banden bei 1580 cm^{-1} und 1591 cm^{-1} auf, die den eben erwähnten Banden von der Schwingungsform her entsprechen. Auch bei anderen Azobenzolpeptiden werden in diesem Bereich Banden gefunden [Wac04].

Absorptionsänderungen des Peptidteils:

Im Bereich der Amid-I' Bande des AzoTrpZip2 findet man zunächst ein Ausbleichsignal um 1650 cm^{-1} und eine induzierte Absorption bei 1680 cm^{-1} . Letztere verschwindet innerhalb von $< 100\text{ ps}$, dabei ändert sich die spektrale Lage dieser induzierten Absorption kaum. Das Ausbleichsignal zeigt auf der Zeitskala von 10 ps eine spektrale Verschiebung zu kleineren Frequenzen, gefolgt von einer Abnahme der Signalstärke. Für den Zeitbereich zwischen ca. 100 ps und 300 ps ändern sich die Differenzspektren kaum. Erst danach bildet sich eine neue Absorptionsbande bei 1655 cm^{-1} .

Beim Referenzpeptid beobachtet man ebenfalls ein Ausbleichen (1645 cm^{-1}), das jedoch spektral etwas schmaler ist. Diese Ausbleichsbande nimmt innerhalb von ca. 10 ps

weitgehend ab. Auf der gleichen Zeitskala beobachtet man Abnahme und Verschieben einer induzierten Absorption im Bereich von 1685 cm^{-1} - 1655 cm^{-1} . Eine weitere Kinetik dieser Bande tritt auf der Zeitskala von 200 ps auf.

5.2.3 Experimentelle Beobachtungen im Detail

Transiente Spektren

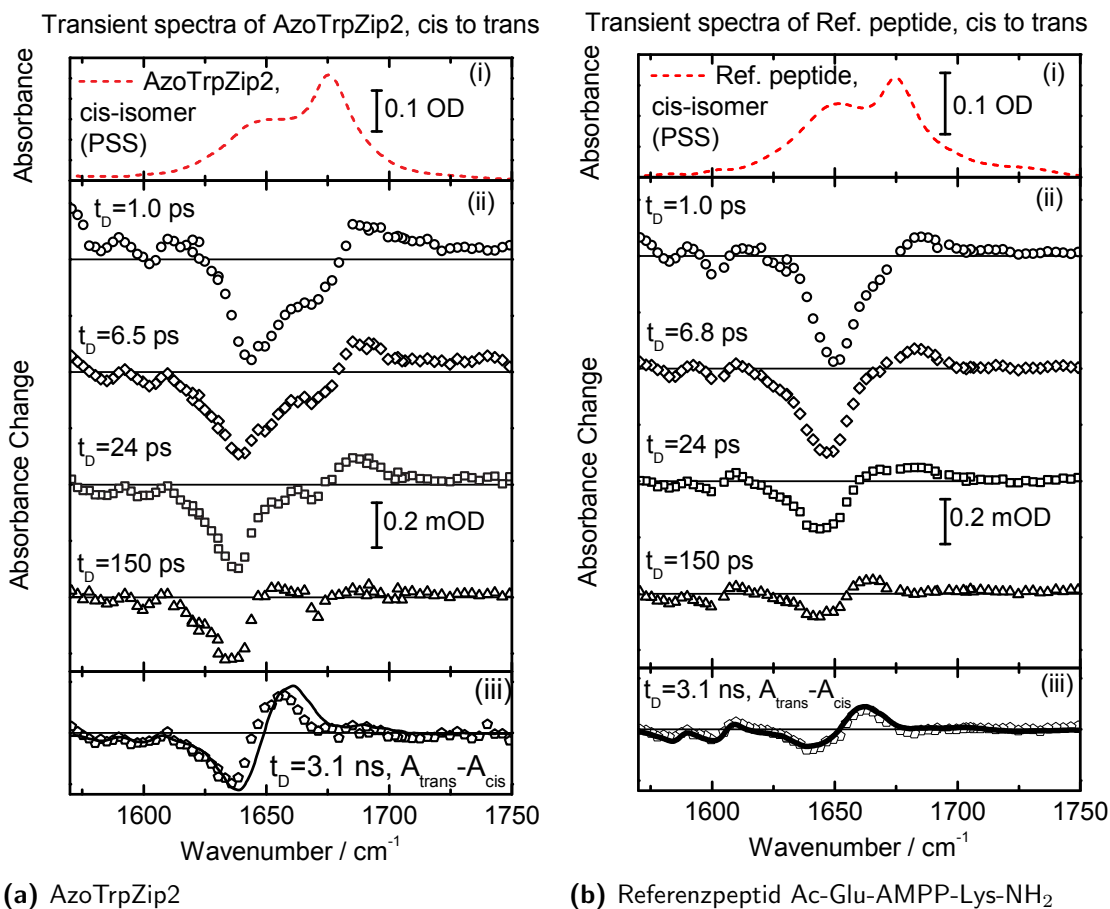


Abbildung 5.8: Transiente Differenzspektren beim Schalten vom cis- in das trans-Isomer. Die beiden oberen Teile der Abbildung zeigen jeweils die Infrarotspektren des photostationären Gleichgewichts des cis-Isomers. Relativ zu diesen Spektren verstehen sich die Änderungen in den Abschnitten (ii) und (iii), wobei die Änderungen in der rechten Abbildung mit einem Faktor 0,5 skaliert wurden. Im Abschnitt (ii) sind die transienten Spektren zu den Verzögerungszeiten 1,0 ps (Kreise), 6,5 ps (Rauten), 24 ps (Quadrate) und 150 ps (Dreiecke) dargestellt. Die Fünfecke im Abbildungsabschnitt (iii) zeigen das transiente Spektrum bei 3,1 ns. Die durchgezogene Linie in (iii) ist jeweils ein geeignet skaliertes Differenzspektrum aus Abbildung 4.21.

Abbildung 5.8 zeigt transiente Spektren zu verschiedenen Verzögerungszeitpunkten nach der Photoanregung des Chromophors im cis-AzoTrpZip2 (5.8(a)) bzw. cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ (5.8(b)). Zur Orientierung zeigt Abschnitt (i) der Abbildung 5.8 jeweils das Spektrum des cis-Isomers im photostationären Gleichgewicht. Die durchgezogene Li-

nie im Abschnitt (iii) ist ein (auf die Bande bei 1600 cm^{-1}) skaliertes stationäres Differenzspektrum aus Abbildung 4.21 und gibt den zu erwartenden Absorptionsunterschied zwischen trans- und cis-Isomer wieder.

In Abbildung 5.8(b) weist das erste für das Referenzpeptid gezeigte transiente Spektrum bei einer Verzögerungszeit von 1 ps ein Ausbleichen bei 1650 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} und bei 1585 cm^{-1} auf. Die beiden letzteren Banden konnten schon dem Chromophor zugeordnet werden. Das größte Ausbleichsignal um 1650 cm^{-1} liegt im Bereich der niederfrequenten Schulter des Absorptionsspektrums des Referenzpeptids.

Überlagert ist dem Ausbleichen eine breite induzierte Absorption vor allem in der niederfrequenten Flanke unterhalb von 1620 cm^{-1} , die wohl auf "heiße" (schwingungsangeregte) Moleküle im Grundzustand zurückzuführen ist [Ham97]. Zusätzlich tritt eine breitbandige induzierte Absorption auch auf der hochfrequenten Seite der Amid-I' Bande bei 1685 cm^{-1} auf, welche auf einer Zeitskala von ca. 15 ps zerfällt.

Das transiente Spektrum bei 150 ps des Referenzpeptids stimmt schon sehr gut mit dem stationären Differenzspektrum überein, das im Teil (iii) der Abbildung 5.8(b) als durchgezogene Linie gezeichnet ist. Dies ist verschieden vom Fall des AzoTrpZip2, bei dem das transiente Spektrum bei 150 ps noch nicht dem stationären Spektrum entspricht. Hier baut sich die induzierte Absorption bei 1660 cm^{-1} erst später auf. Erst bei 3,1 ns stimmt das transiente Spektrum vom AzoTrpZip2 mit dem stationären Differenzspektrum bis auf eine kleine spektrale Verschiebung von 3 cm^{-1} im Bereich der Amid-I' Bande überein. Die verbleibenden Abweichungen des transienten Spektrums bei 3,1 ns von dem zu erwartenden Differenzspektrum werden weiter unten im Zusammenhang mit Abbildung 5.11 besprochen.

Die frühen transienten Spektren des AzoTrpZip2 zeigen Ähnlichkeiten mit denen des Referenzpeptids. Auch hier lassen sich die Banden des Photoschalters AMPP durch Ausbleichsignale bei 1600 cm^{-1} und bei 1585 cm^{-1} lokalisieren. Ebenfalls erkennbar ist eine spektral breite Absorptionzunahme, die im wesentlichen innerhalb von 20 ps verschwindet. Das maximale Ausbleichsignal bei 1647 cm^{-1} liegt in der niederfrequenten Schulter des Absorptionsspektrums des AzoTrpZip2. Im Gegensatz zum Referenzpeptid verbreitert sich dieses negative Ausbleichsignal und verschiebt sich auf 1630 cm^{-1} innerhalb von ca. 24 ps. Auf der gleichen Zeitskala geht auch das Ausbleichen im Bereich des Maximums des Absorptionsspektrums des AzoTrpZip2 bei 1675 cm^{-1} zurück. Die sehr früh gebildete Bande mit induzierter Absorption bei 1690 cm^{-1} zerfällt auf einer Zeitskala von einigen 10 ps. Im transienten Spektrum bei 150 ps findet man keinerlei Absorptionzunahmen. Erst später zwischen 150 ps und 3,1 ns baut sich eine neue Absorption im Bereich von 1660 cm^{-1} auf.

Globale Datenanpassung mittels exponentieller Zerfälle

Photochemische Reaktionen, bei denen ein Molekül durch den Anregimpuls in ein anderes umgewandelt wird, werden häufig gut durch ein Ratengleichungssystem beschrieben. Ein solches Modell beschreibt die Zeitabhängigkeit der transienten Absorptionsänderung als Summe von abfallenden Exponentialfunktionen gefaltet mit der Apparatefunktion [vS04b, vS04a]. Auch im Falle von zeitabhängigen Absorptionsänderungen im infraroten Spektralbereich sind solche exponentiellen Anpassungen sehr erfolgreich. Jedoch

kann es bei inhomogenen Proben wie z. B. während eines Faltungsvorgangs auch nicht-exponentielles Verhalten der Absorptionsänderung geben [Bre05b]. Zum zweiten führen Abkühlprozesse von heißen Molekülen zu Bandenverschiebungen im infraroten Spektralbereich, die sich nicht optimal mit exponentiellen Zerfällen anpassen lassen [Ham97]. Dies ist abhängig vom Lösungsmittel und der beobachteten Bande, wobei Zeitkonstanten in der Größenordnung von 10 ps auftreten können [Koz03, Koz02].

Leider gibt es bisher keine Methode, diese beiden Ausnahmen sinnvoll in der Datenanpassung mit alternativen Modellfunktionen zu behandeln. Deshalb wird eine Anpassung mit exponentiellen Funktionen versucht, mit der die Zeitskalen für die verschiedenen Prozesse festgelegt werden können. Die unten beschriebenen Zeitkonstanten und zerfallsassoziierten Spektren sind innerhalb dieser Rahmenbedingungen zu verstehen.

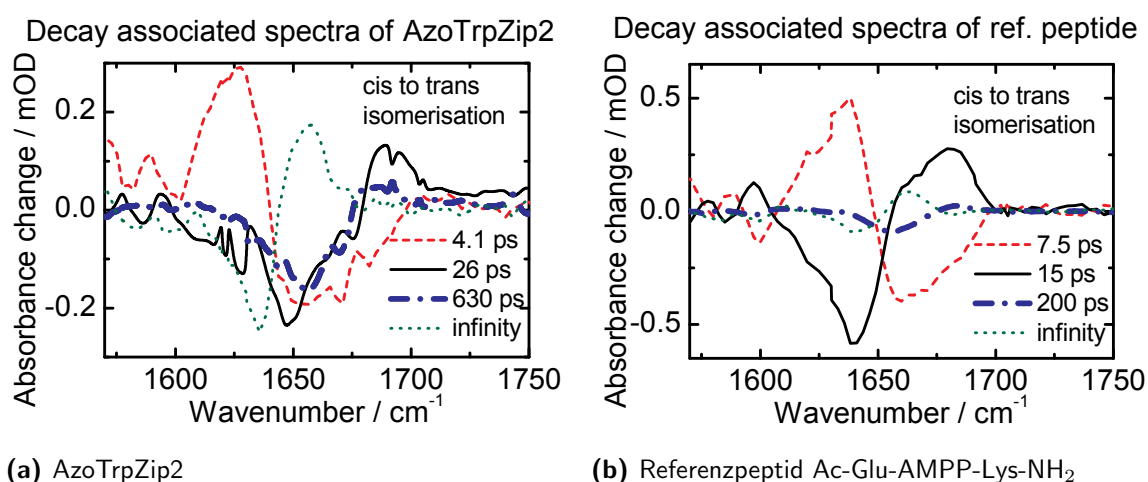


Abbildung 5.9: Amplitudenspektren beim Konformationswechsel vom cis- in das trans-Isomer. Für beide Datensätze (AzoTrpZip2 und Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂) wurde eine globale Anpassung mittels einer Summe aus vier exponentiellen Zerfällen gefaltet mit einer Kreuzkorrelation von $t_{CC}=0,7$ ps durchgeführt. Eine Zeitkonstante ("infinity") berücksichtigt die nach dem Zeitfenster der Messungen vorliegenden Absorptionsänderungen. Die beiden Abbildungen zeigen die mit den angegebenen Zeitkonstanten assoziierten Amplitudenspektren.

Damit Einflüsse in der Nähe des Zeitnullpunkts (nichtlineare Wechselwirkungen zwischen Anregungsimpulsen und Probe, kohärente Wechselwirkungen oder ähnliches) nicht in die Anpassung einfließen, wurden Daten erst ab einer Verzögerungszeit von einer Pikosekunde in der Analyse berücksichtigt. Eine Zeitkonstante mit einem großen Wert (10^7 ps) diente dazu, ein Amplitudenspektrum zu erhalten, das mit dem stationären Differenzspektrum zu vergleichen ist.

Im Fall des AzoTrpZip2 stimmt dieses Amplitudenspektrum jedoch nicht mit dem stationären Differenzspektrum überein, sondern weist eine Rotverschiebung im Bereich der Amid-I' Bande um 3 cm^{-1} auf. Die beiden ersten Amplitudenspektren in Abbildung 5.9(a) zu den Zeitkonstanten 4,1 ps und 26 ps beschreiben das initiale Ausbleichen und dessen Erholung. Die Zeitkonstante von 630 ps kann über ihr Amplitudenspektrum dem Aufbau der induzierten Absorption bei 1660 cm^{-1} zugeordnet werden.

Das Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante 7,5 ps von der globalen Anpassung der transienten Daten des Referenzpeptids (Abb. 5.9(b), gestrichelte Linie) zeigt das Ausbleichen der Banden des Schaltermoleküls AMPP durch Minima bei 1600 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} . Die Form des Amplitudenspektrums zwischen 1607 cm^{-1} und 1696 cm^{-1} mit einem Nulldurchgang bei 1649 cm^{-1} beschreibt eine Rotverschiebung der Amid-I' Bande, welche auf einen Kühlprozess hindeutet. Diese Rotverschiebung geht mit einer Zeitkonstante von 15 ps wieder zurück. Dies wird durch das Amplitudenspektrum dieser Zeitkonstante erkennbar. Das Ausbleichen der Schalterbanden geht ebenfalls mit dieser Zeitkonstante von 15 ps zurück auf den Wert, den es auch bei 3 ns besitzt. Dies folgt aus der Tatsache, dass das Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante von 200 ps nahezu keine Amplitude bei 1600 cm^{-1} und 1580 cm^{-1} besitzt. Das Minimum von letzterem Amplitudenspektrum bei 1655 cm^{-1} (Abb. 5.9(b), strichpunktierte Linie) könnte noch auf strukturelle Umordnungen des Peptidrückgrats des Referenzpeptids auf dieser Zeitskala von 200 ps zurückzuführen sein. Das Amplitudenspektrum zur sehr großen Zeitkonstante "Infinity" stimmt sehr gut mit dem gemessenen Differenzspektrum zwischen dem trans- und cis-Isomer des Referenzpeptids überein (vgl. dazu Abschnitt (iii) in Abb. 5.8(b)).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit Ausnahme der jeweils kleinsten Zeitkonstante die auftretenden Zeitkonstanten beim Referenzpeptid kürzer sind als im Vergleich zum AzoTrpZip2.

Zeitverlauf der Absorptionsänderungen bei ausgewählten Wellenlängen

Abbildung 5.10 zeigt den Zeitverlauf der Absorptionsänderung bei fünf ausgewählten Wellenzahlen für das AzoTrpZip2 und das Referenzpeptid. Die ausgefüllten Punkte in Abb. 5.10(a) am Ende der Skala deuten die Absorptionsänderung des zu erwartenden stationären Differenzspektrums für das AzoTrpZip2 an.

Referenzpeptid Bei einer Wellenzahl von 1600 cm^{-1} liegt eine Absorptionsbande des Schaltermoleküls AMPP. Im Fall des Referenzpeptids scheint dieser Wellenzahlbereich durch ein Ausbleichen geprägt zu sein, das mit einer Zeitkonstante von 7.5 ps zurückgeht (siehe Abschnitt (i) in Abb. 5.10(b)). Ab 10 ps bleibt die Absorption dann im Bereich des Rauschens gesehen konstant. Hierbei muss bemerkt werden, dass die Daten des Referenzpeptids in diesem Kapitel (5.2, Isomerisierung von cis nach trans) so skaliert wurden, dass sie bei einer Verzögerungszeit von 3,1 ns und der Wellenzahl von 1600 cm^{-1} die gleiche Absorptionsänderung von ca. -0,05 mOD aufweisen wie das Modellpeptid AzoTrpZip2 (siehe dazu jeweils die Abschnitte (i) von Abb. 5.10).

Die durchgezogene Linie in Abschnitt (i) der Abb. 5.10(b) stammt aus der globalen Anpassung der Daten und deutet ab 10 ps noch Absorptionsänderungen mit größeren Zeitkonstanten an, deren Amplitude jedoch sehr gering ist. Der Zeitverlauf bei 1628 cm^{-1} zeigt ein anwachsendes Ausbleichen, das bei ca. 10 ps seine maximale Amplitude erreicht. Mit einer Zeitkonstante von 15 ps geht dieses Ausbleichen zurück auf einen Wert, welcher bis zum Ende des Messbereichs von 3,1 ns beibehalten wird. Die beiden Kurven bei 1646 cm^{-1} und bei 1655 cm^{-1} , im Bereich der Amid-I' Bande des Referenzpeptids, weisen ein instantanes Ausbleichen auf, das mit zwei Zeitkonstanten von 7.5 ps und 200 ps zurückgeht. Die Absorptionsänderung in Abhängigkeit von der Zeit bei 1655 cm^{-1}

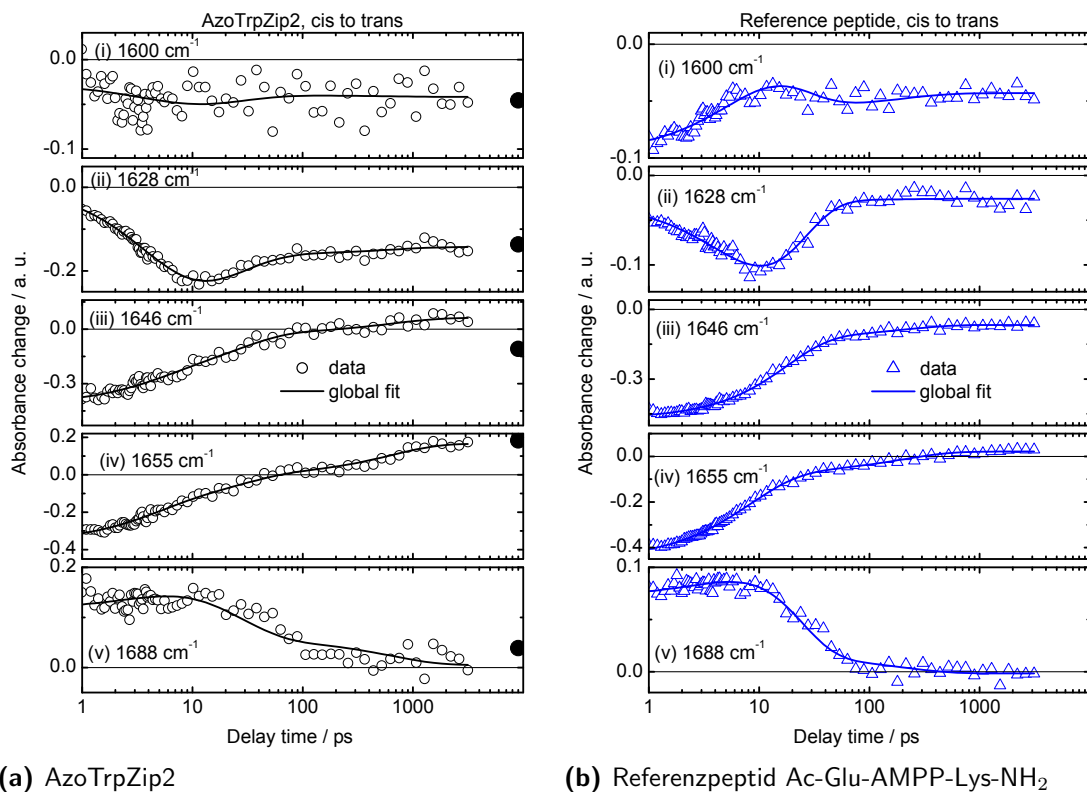


Abbildung 5.10: Cis nach trans Reaktion: Zeitverlauf bei den Frequenzen 1600 cm^{-1} , 1628 cm^{-1} , 1646 cm^{-1} , 1655 cm^{-1} und 1688 cm^{-1} . Die offenen Kreise stehen für die gemessenen Absorptionsänderungen in Abhängigkeit von der Zeit ausgehend von dem cis-AzoTrpZip2. Die Dreiecke sind die entsprechenden Daten für den Fall des cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Die durchgezogenen Linien stammen aus den jeweiligen globalen Anpassungen. Die gefüllten Kreise geben den Wert der stationären Absorptionsänderung (durchgezogene Linie in Abbildung 5.8, Abschnitt (iii)) im Falle des AzoTrpZip2 an.

ändert dabei auch das Vorzeichen, so dass sie bei 3,1 ns positiv ausfällt. Der Zeitverlauf bei 1688 cm^{-1} (Abschnitt (v) in Abb. 5.10(b)) liegt in einem Bereich, wo kein alleiniges Ausbleichen beobachtet wird. Vielmehr wird ein instantaner Anstieg der Absorption beobachtet, der mit einer Zeitkonstante von 15 ps zurückgeht.

Die gezeigten Zeitverläufe für das Referenzpeptid kann man zusammenfassen, indem man feststellt, dass ab ca. 50 ps die Absorptionsänderungen schon gut mit denen übereinstimmen, die bei einer Verzögerungszeit von 3,1 ns vorliegen. Eine Zeitkonstante von 200 ps wird jedoch noch beobachtet, deren Amplitude aber nur bei 1646 cm^{-1} und bei 1655 cm^{-1} in Abbildung 5.10(b) deutlich zu sehen ist.

AzoTrpZip2 Abgesehen von den ersten wenigen Pikosekunden weist der Zeitverlauf der Absorption des AzoTrpZip2 bei seiner Isomerisierung vom cis- in das trans-Isomer bei 1600 cm^{-1} keine Variationen auf, die groß sind gegen das Rauschen. Aufgrund der Quantenausbeute für die Isomerisierung von ca. 50 % würde man ein Zurückgehen des Ausbleichens auf die Hälfte erwarten. Dies liegt darin begründet, dass Schaltermoleküle zur Hälfte nicht isomerisieren, damit in ihren Ausgangszustand (cis-Isomer) zurückkeh-

ren und somit nicht mehr zum hier gemessenen Differenzsignal beitragen. Ein solcher Rückgang des Ausbleichsignals wird jedoch nicht beobachtet. Es könnte überlagert sein von einer Rotverschiebung der Amid-I' Bande, die auf einer ähnlichen Zeitskala stattfindet. Dies ist insbesondere beim Zeitverlauf der Absorptionsänderungen bei der Wellenzahl 1628 cm^{-1} zu beobachten. Hier bildet sich ein Minimum des Ausbleichens der Amid-I' Bande zwischen 10 ps und 20 ps aus, wenn die Rotverschiebung der Amid-I' Bande mit einer Zeitkonstante von 4,1 ps abgeklungen ist (siehe dazu auch das Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante 4,1 ps in Abb. 5.9(a)).

Die Zeitverläufe der Absorptionsänderungen bei den Wellenzahlen 1646 cm^{-1} und 1655 cm^{-1} zeigen ein Ausbleichsignal, das auf mehreren Zeitskalen zurückgeht und hauptsächlich mit einer Zeitkonstante von 630 ps in eine Absorptionszunahme umschlägt. Letztere Zeitkonstante ist auch bei einer Wellenzahl von 1688 cm^{-1} erkennbar, hier jedoch als Rückgang einer anfänglichen Absorptionszunahme. Diese geht vor allem mit der Zeitkonstante von 26 ps zurück.

Die schwarzen Punkte in Abbildung 5.10(a) stellen die Absorptionsänderungen dar, welche im Dauerstrich-Experiment beim Schalten vom cis- in das trans-Isomer des AzoTrpZip2 bei den entsprechenden Wellenlängen auftreten. Sie können auch aus der Abbildung 5.8(a), Abschnitt (iii) an Hand der durchgezogenen Linie abgelesen werden. Die Skalierung dieser Kurve erfolgte so, dass sie bei der Schalterbande um 1600 cm^{-1} gut mit dem gemessenen Spektrum bei 3,1 ns übereinstimmt. Bei den meisten hier gezeigten Zeitverläufen wurde dieser Dauerstrichwert der Absorptionsänderung bei einer Verzögerungszeit von 3,1 ns bereits erreicht. Ausnahmen sind die Wellenzahlen 1646 cm^{-1} und 1688 cm^{-1} . Speziell bei 1646 cm^{-1} muss die beobachtete Absorptionszunahme in eine Absorptionsabnahme umschlagen. Hier könnten sich noch Prozesse mit mindestens einer unbekanntem Zeitkonstante verbergen.

Insgesamt betrachtet zeigen die Zeitverläufe der Absorptionsänderungen des AzoTrpZip2 Zeitkonstanten von 4,1 ps, 26 ps und 630 ps und mindestens eine weitere Zeitkonstante, deren Wert größer ist. Letztere ist jedoch spektral beschränkt auf den Bereich um 1646 cm^{-1} und von 1688 cm^{-1} bis herunter zu 1660 cm^{-1} . Man sieht in den Zeitverläufen, dass es Zeiten gibt, zu denen bestimmte Prozesse beendet sind. Hier sind charakteristische Zwischenzustände gebildet, die charakteristische Spektren besitzen.

5.2.4 Das Differenzspektrum nach 3,1 ns

Abbildung 5.11 befasst sich mit der Frage, wie die Abweichung des transienten Spektrums des AzoTrpZips bei 3,1 ns (Fünfecke) vom stationären Differenzspektrum (durchgezogene Linie) erklärt werden kann. Die Skalierung der beiden Kurven relativ zueinander erfolgte so, dass sie im Bereich der Schalterbande um 1600 cm^{-1} gut übereinstimmen. Die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Differenzspektren sind im einzelnen: Der Nulldurchgang der Absorptionsänderungen im Bereich der Amid-I' Bande ist bei dem transienten Spektrum bei 3,1 ns um ca. 3 cm^{-1} rotverschoben gegenüber dem stationären Differenzspektrum. Weitere Abweichungen finden sich auch in einer bei 3,1 ns noch nicht vollständig ausgebildeten Absorptionszunahme zwischen 1655 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} .

Im folgenden werden drei Erklärungsansätze für diese Abweichungen diskutiert:

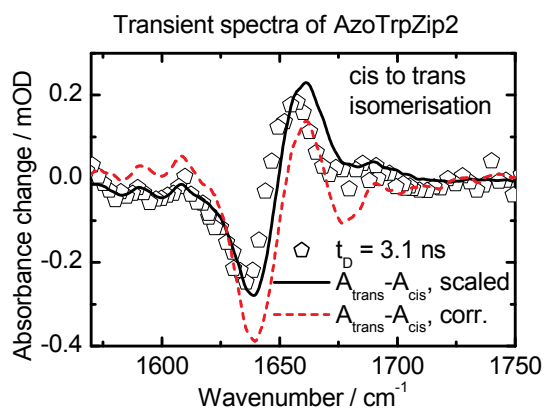


Abbildung 5.11: Vergleich des transienten Spektrums bei 3,1 ns mit einem temperaturkorrigierten stationären Differenzspektrum zwischen der Absorption des trans- und des cis-Isomers des AzoTrpZip2. Diese Abbildung entspricht der Abbildung 5.8(a) (iii). Das zusätzliche temperaturkorrigierte stationäre Differenzspektrum (gestrichelte Kurve) wurde berechnet, indem man obigem stationären Differenzspektrum ein separat gemessenes Temperaturdifferenzspektrum aufaddiert hat, das die Infrarotabsorptionsdifferenz der Probe bei einer Temperaturerhöhung von 22,5 °C auf 22,6 °C repräsentiert.

Eichfehler Prinzipiell würden die durchgezogene Linie in Abbildung 5.11 (stationäres Differenzspektrum) und das gemessene transiente Spektrum bei 3,1 ns wesentlich besser übereinstimmen, wenn die Spektren um ca. 3 cm^{-1} gegeneinander verschoben würden. Diese Verschiebung könnte auf einen Fehler der Wellenlängeichung in den beiden Experimenten zurückzuführen sein.

In direktem zeitlichen Zusammenhang mit den hier dargestellten zeitaufgelösten Messungen wurde jeweils ein Kontrollspektrum der Absorption von gasförmigem Wasser in der Raumluft (aus der natürlichen Luftfeuchtigkeit) zum einen mit der hier benutzten Messanlage zur Messung zeitaufgelöster Infrarotspektren und zum anderen mit dem Fouriertransform-Infrarotspektrometer aufgenommen. Diese beiden Kontrollspektren zeigten eine Abweichung von weniger als einer Wellenzahl von dem mittels eines geeichten FTIR-Spektrometers gemessenen Spektrums der Absorption von gasförmigem Wasser in der Raumluft². Ein solcher Eichfehler der verwendeten Spektrometer kann deshalb ausgeschlossen werden,

Temperaturanstieg Aufgrund der Umwandlung der absorbierten Energie aus dem Anregimpuls in Wärme kommt es zu einem geringen Temperaturanstieg der Probe im Anregungsvolumen. Vernachlässigt man eine Wärmeleitung aus diesem Volumen heraus (die nicht innerhalb von 3 ns erfolgen kann), so berechnet man im Fall des AzoTrpZip2 eine maximal zu erwartende Temperaturerhöhung von 0,1 K.

In einem separaten Experiment, welches in Kapitel 4.5.2 bereits dargestellt wurde, wurden die spektralen Änderungen der Probe AzoTrpZip2 bei einer Temperaturerhöhung von 0,1 K, ausgehend von der Messtemperatur von ca. 22,5 °C, bestimmt. Das Vorgehen dabei war im einzelnen wie folgt:

Zunächst wurde ein Absorptionsspektrum der durch Belichten als cis-Isomer des AzoTrpZip2 präparierten Probe im infraroten Spektralbereich bei einer Temperatur von 22,5 °C aufgenommen. Das so entstandene Spektrum sei $A_{22,5^\circ\text{C}}(\lambda)$ genannt. Darauf

²Für die Eichung von Infrarotspektrometern zur Messung von Infrarotspektren in kondensierter Phase wird von der Firma Bruker (Ettlingen, Deutschland) eine Eichung mittels der Absorption von gasförmigem Wasser in der Raumluft empfohlen und in der Anleitung für das hier verwendete Fouriertransform-Infrarotspektrometer IFS66 beschrieben. Damit kann die Eichung der hier dargestellten Infrarotspektren auf diese empfohlene Eichprozedur zurückgeführt werden.

wurde die Temperatur im Infrarotspektrometer um 6 K auf 28,5 °C erhöht und erneut ein Spektrum aufgenommen: $A_{28,5^\circ C}(\lambda)$. Ein auf eine Temperaturerhöhung von 0,1 K skaliertes Differenzspektrum $\Delta A_{\Delta T=0,1K}(\lambda)$ wurde daraufhin berechnet:

$$\Delta A_{\Delta T=0,1K}(\lambda) = \frac{0,1K}{6K} (A_{28,5^\circ C}(\lambda) - A_{22,5^\circ C}(\lambda)) \quad (5.1)$$

Dieses Temperaturdifferenzspektrum wurde zu dem Differenzspektrum $A_{trans} - A_{cis}$ aufgrund des Schaltens vom cis- in das trans-Isomer des AzoTrpZip2 hinzuaddiert, um ein sogenanntes temperaturkorrigiertes stationäres Differenzspektrum (gestrichelte Linie aus Abbildung 5.11) zu erhalten:

$$(A_{trans} - A_{cis})_{corr.} = (A_{trans} - A_{cis}) + \Delta A_{\Delta T=0,1K}(\lambda) \quad (5.2)$$

Die gestrichelte Linie aus Abbildung 5.11 ist also ein stationäres Differenzspektrum (wie die durchgezogene Linie), das jedoch mittels separat gemessener Daten auf einen Temperatursprung von 0,1 K korrigiert ist.

Die Übereinstimmung mit dem transienten Spektrum bei 3,1 ns erscheint jedoch für die temperaturkorrigierte Kurve schlechter zu sein als für diejenige, welche keinen Temperatursprung berücksichtigt (durchgezogene Linie). Ein Temperaturanstieg im Probenvolumen kann also nicht als Erklärung für die Abweichung des transienten Spektrums bei 3,1 ns von dem zu erwartenden Differenzspektrum dienen.

Dichteeffekt Zusätzlich zu einem Temperaturanstieg ändert sich auch die Dichte des Lösungsmittels bei einem entsprechenden Wärmeeintrag. Auf der Zeitskala von 3 ns kann sich die Dichte des Lösungsmittels jedoch nicht der neuen Temperatur anpassen [Cal98]. In oben beschriebener Korrektur des Temperaturanstiegs fließt dieser Effekt nicht richtig ein, da die verwendeten, in einem Dauerstrichexperiment gemessenen, Korrekturkurven einen Dichteausgleich beinhalten. Im zeitaufgelösten Experiment steigt jedoch nur die Temperatur im Anregungsvolumen, die Dichte bleibt in erster Näherung konstant. Eine solche Situation könnte zu speziellen Peptidstrukturen führen, die eine besondere Absorptionsänderung im Bereich der Amid-I' Bande zur Folge hätten und somit die beobachteten Abweichungen aus Abb. 5.11 erklären könnten.

Im Fall des Referenzpeptids waren die Messbedingungen ähnlich wie im Fall des AzoTrpZip2. Ein vergleichbarer Dichteanstieg und Temperaturanstieg im Anregungsvolumen sind also wahrscheinlich. Da aber das stationäre Differenzspektrum sehr gut mit dem gemessenen transienten Differenzspektrum bei 3,1 ns des Referenzpeptids übereinstimmen (siehe dazu Abb. 5.8(b), Abschnitt (iii)), scheint kein signifikanter Dichte- oder Temperatureffekt aufzutreten. Übertragen auf den Fall des AzoTrpZip2 bedeutet dies, dass auch hier der Dichteeffekt keine Rolle spielen sollte.

Zusammenfassende Bemerkung zu den Effekten Keiner der drei oben genannten Effekte wie Eichfehler, Temperaturanstieg oder Dichteeffekt kann also die beobachtete Abweichung des transienten Spektrums bei 3,1 ns des AzoTrpZip2 bei seiner Isomerisierung vom cis- in das trans-Isomer vom entsprechenden stationären Differenzspektrum (Abb. 5.11) erklären. In einem gewissen spektralen Bereich der Amid-I' Bande muss man

hier auf weitere Dynamiken mit noch mindestens einer längeren Zeitkonstante schließen. Die damit verbundenen spektralen Änderungen sind jedoch vermutlich klein, wie schon aus Abb. 5.11 ersichtlich, so dass die Aussage erhalten bleibt, dass die wesentlichen strukturellen Prozesse bei 3,1 ns abgeschlossen sind.

5.2.5 Zusammenfassung und Interpretation der cis nach trans Reaktion

Vergleich mit der zeitaufgelösten Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich

Referenzpeptid Tabelle 5.2 liefert einen Überblick über die gewonnenen Zeitkonstanten bei der cis nach trans Reaktion. Diese Zeitkonstanten können nun mit denjenigen aus Tabelle 5.1 in Verbindung gebracht werden, welche im sichtbaren Spektralbereich gemessen wurden. Aus den zeitaufgelösten Messungen am Referenzpeptid im sichtbaren Spektralbereich ist bekannt, dass der Photoschalter spätestens mit einer Zeitkonstante von 2,7 ps seine Isomerisierung abgeschlossen hat bzw. sich wieder im Grundzustand befindet. Blickt man auf das transiente Spektrum des Referenzpeptids bei 6,8 ps, so erkennt man, dass das Ausbleichen der Banden bei 1600 cm^{-1} und bei 1585 cm^{-1} etwa zur Hälfte wieder zurückgegangen ist. Dies könnte man so interpretieren, dass bei 6,8 ps etwa die Hälfte der angeregten Chromophore nach trans isomerisiert sind, was gut mit der zu erwartenden Schaltquantenausbeute aus der Literatur für das freie Azobenzol in Ethanol übereinstimmt [Bor79].

Probe	AzoTrpZip2	Referenzpeptid
Isomerisierung	c \rightarrow t	c \rightarrow t
$\lambda_{ex.}$	404 nm	404 nm
τ_1	4,1 ps	7,5 ps
τ_2	26 ps	15 ps
τ_3	630 ps	200 ps

Tabelle 5.2: Gegenüberstellung der Zeitkonstanten der globalen Anpassungen im Bereich der Amid-I' Bande bei der Isomerisierung von cis nach trans für das Modellpeptid AzoTrpZip2 und das Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. $\lambda_{ex.}$ bezeichnet die Wellenlänge des Anregimpulses. Die τ_i sind die Zeitkonstanten aus der globalen Anpassung. Die dritte Zeitkonstante „infinity“ ist jeweils konstant auf einem sehr großen Wert (10^7 ps) gehalten worden und wurde deswegen in der Tabelle nicht extra aufgeführt.

Die im sichtbaren Spektralbereich gemessene Zeitkonstante von 0,2 ps aus der globalen Anpassung der Daten des Referenzpeptids für die Isomerisierung von cis nach trans, ist in Messungen im infraroten Spektralbereich nicht erkennbar, da die Zeitauflösung hier mit 0,7 ps nicht ausreichend war. Umgekehrt findet sich in den zeitaufgelösten Messungen im infraroten Spektralbereich eine Zeitkonstante von 200 ps, welche in den zeitaufgelösten Messungen im sichtbaren Spektralbereich nicht erkennbar ist. Diese Zeitkonstante könnte man also auf strukturelle Relaxationsprozesse der beiden Aminosäuren des Referenzpeptids zurückführen, welche den Schalter AMPP nicht beeinflussen und damit auch zu keinen Absorptionsänderungen im sichtbaren Spektralbereich führen. Ein ähnliches Phänomen (längere Zeitkonstante im infraroten als im sichtbaren Spektralbereich)

wurde an einem anderen Azobenzol-Derivat, dem 4-Nitro-4'-(dimethylamino)Azobenzol, bereits beobachtet [Kol07]. Eine strukturelle Dynamik scheidet in diesem Fall jedoch als Ursache für die lange beobachtete Zeitkonstante im infraroten Spektralbereich aus.

Das transiente Spektrum zur Zeitkonstante 7,5 ps ist geprägt von einer Rotverschiebung der Amid-I' Bande. Diese kann von einem Bruch von Wasserstoffbrückenbindungen herrühren. Es kann sich um intramolekulare Wasserstoffbrücken handeln, die jedoch im Referenzpeptid aufgrund seiner Größe nicht so wahrscheinlich sind. Hauptsächlich handelt es sich wohl um Wasserstoffbrücken zwischen Lösungsmittelmolekülen und dem Referenzpeptid. Die erste Lösungsmittelschale gemessen an der mittleren Lebensdauer einer Wasserstoffbrückenbindung relaxiert typischerweise auf der Zeitskala von einigen Pikosekunden [Kwa05]. Dies stimmt gut mit der Zeitkonstante von 15 ps überein. Deren Amplitudenspektrum zeigt den Rückgang der Rotverschiebung der Amid-I' Bande.

Beim Referenzpeptid ist die wesentliche Dynamik nach wenigen 100 ps abgeschlossen. Eine Peptidfaltungsdynamik in eine definierte Endstruktur wie im Falle des AzoTrpZip2 tritt nicht auf und ist auch nicht zu erwarten.

AzoTrpZip2 Die transienten Spektren für den Fall des AzoTrpZip2 aus Abbildung 5.8(a) zeigen einen Rückgang des Ausbleichens der Schalterbanden bei 1600 cm^{-1} und bei 1585 cm^{-1} auf einer Zeitskala von ca. 7 ps, was gut mit den Daten des AzoTrpZip2 aus dem sichtbaren Spektralbereich übereinstimmt, wo eine Zeitkonstante von 6,7 ps für den Rückgang des Hauptanteils des Signals in dieser Isomerisierungsrichtung ermittelt wurde.

Durch die Anregung mittels des Anregimpulses werden Moleküle vom elektronischen Grundzustand in den angeregten Zustand versetzt. Im allgemeinen absorbieren die Moleküle im angeregten Zustand bei anderen Wellenlängen als im Grundzustand. Als Folge davon tritt durch die Anregung als Signal zumindest ein sogenanntes Ausbleichen auf. Dieses äußert sich wie ein Infrarotabsorptionsspektrum des angeregten Moleküls, das mit einer negativen Zahl skaliert wurde. Das größte Ausbleichsignal in der Amid-I' Bande liegt jedoch im Bereich der Schulter des Absorptionsspektrums bei ca. 1644 cm^{-1} im Fall des AzoTrpZip2 und nicht etwa im Maximum bei 1675 cm^{-1} . Eine Erklärung hierfür findet sich darin, dass durch die Anregung des Chromophors AMPP zunächst dessen Isomerisierung ausgelöst wird. Das angehängte Peptid wird nicht elektronisch angeregt, weswegen die Amid-I' Bande des Peptidrückgrats kein generelles Ausbleichsignal aufweist, das ein Abbild des Absorptionsspektrums des cis-AzoTrpZip2 darstellt. Jedoch wird ein Ausbleichsignal um 1644 cm^{-1} im transienten Spektrum bei einer Verzögerungszeit von 1 ps beobachtet. Dem Spektralbereich um 1644 cm^{-1} können die intramolekular wasserstoffverbrückten Carbonyloszillatoren des Peptidrückgrats zugeordnet werden. Dies bedeutet also, dass Wasserstoffbrücken in der Nähe des Chromophors aufbrechen. Dies sieht man auch aus dem Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante von 4,1 ps, das eine Rotverschiebung aufgrund des Bruchs von Wasserstoffbrücken anzeigt. Auf einer ähnlichen Zeitskala geht die Amplitude des Ausbleichens im Bereich der Amid-I' Bande etwas zurück. Dies kann auf ein Kühlen und Zurückkehren in den Ausgangszustand der Spezies 2 und 4 (siehe Kapitel 5.2.2) zurückgeführt werden, welche beide nicht isomeri-

siert sind und somit ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr zu einem Differenzsignal beitragen.

Im weiteren Verlauf verbreitert sich dieses Ausbleichen speziell im Bereich der roten Flanke noch bis 24 ps, was als weiteres Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen gedeutet werden kann. Um 25 ps liegt dann eine weitgehend entfaltete, offene Struktur vor, mit einer minimalen Anzahl von verbleibenden Wasserstoffbrücken. Ab ca. 25 ps wird nun eine Reorganisation der Lösungsmittelschale und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel die weiteren Prozesse begleiten, ähnlich wie dies in der Veröffentlichung von Zhang et al. für Peptidoberflächen in Wasser gezeigt wurde [Zha07].

Da das trans-Isomer des AzoTrpZip2 ebenfalls eine Struktur aufweist (siehe Abbildung 4.13) kann man nach einer Entfaltung der bestehenden β -Hairpin Struktur des cis-AzoTrpZip2 von einer Faltung hin zur trans-Struktur des AzoTrpZip2 ausgehen. Ein charakteristisches erstes Spektrum entsteht um 150 ps. Es weist hauptsächlich eine Absorptionsabnahme auf. Mit einer Zeitkonstante von 630 ps baut sich darauf die Absorption um 1655 cm^{-1} auf. Auch in den Messungen im sichtbaren Spektralbereich wird eine Zeitkonstante von 200 ps in dieser Isomerisierungsrichtung beobachtet, welche als Rückwirkung dieser Faltungsprozesse auf das Absorptionsspektrum des AMPP Chromophors gedeutet werden kann.

Bei einer Verzögerungszeit von 3,1 ns ist das stationäre Differenzspektrum nahezu erreicht. Die verbleibende spektrale Abweichung zwischen den beiden Spektren kann jedoch, wie in Kapitel 5.2.4 gezeigt, weder auf einen Temperatursprung noch auf einen Dichteeffekt und auch nicht auf einen Eichfehler zurückgeführt werden. Mindestens eine weitere Zeitkonstante wird also bei der Faltung hin zum trans-Isomer des AzoTrpZip2 noch auftreten können. Ihr zugehöriges Amplitudenspektrum wird jedoch eine sehr viel kleinere Amplitude aufweisen als die Amplitudenspektren der anderen Zeitkonstanten. Die wesentlichen Prozesse der Faltung zum trans-Isomer des AzoTrpZip2 sind also bei 3,1 ns weitgehend abgeschlossen.

Identifizierung von Intermediaten

Ein wesentlicher Vorteil der hier verwendeten Methode zur Untersuchung der Peptiddynamik, der sogenannten Anreg-Abtast-Spektroskopie, ist die Möglichkeit, Zwischenzustände im Verlauf der Faltung, sogenannte Intermediate, zu identifizieren und sie zeitlich in den Faltungsprozess einzuordnen. Zudem kann das Infrarotspektrum eines solchen Intermediats angegeben werden, woraus Rückschlüsse auf die Struktur eines Intermediats möglich sind.

Abbildung 5.12 geht auf einen hypothetischen Fall bei der Faltung eines Peptids ein, bei dem zwei Faltungsintermediate vorliegen, die nacheinander durchlaufen werden. Intermediat I_1 wird gebildet mit einer Zeitkonstante von τ_1 und entvölkert mit einer Zeitkonstante von τ_2 . Ist τ_2 größer als τ_1 , so wird das Intermediat zunächst ausreichend bevölkert, bevor es zerfällt. In diesem Fall wird sein Spektrum in den zeitaufgelösten Daten leicht zu finden sein. Ist die Situation umgekehrt, gilt also $\tau_1 > \tau_2$, so wird das Intermediat schneller entvölkert als es gebildet wird. Die Extraktion seines Spektrums aus den Daten ist in diesem Fall sehr viel schwieriger [Zin98].

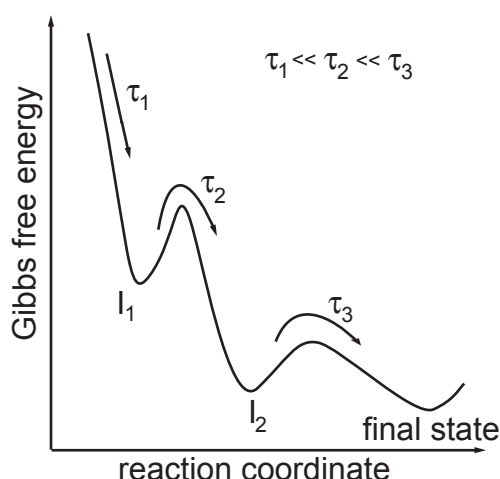


Abbildung 5.12: Zum Begriff des Intermediats. Aufgetragen ist die Gibbsche freie Energie (Ordinate) eines hypothetischen Peptids gegen eine Reaktionskoordinate (Abszisse), die den Faltungsfortschritt misst. Gezeigt ist die Situation von zwei Faltungsintermediaten I_1 und I_2 . Intermediat I_1 wird mit der Zeitkonstante τ_1 bevölkert und entvölkert sich mit Zeitkonstante τ_2 . Mit letzterer Zeitkonstante wird dann das zweite Intermediat gebildet, das mit τ_3 in den Endzustand "final state" übergeht.

Allgemein muss man auch von einem nicht sequentiellen Modell des Faltungsweges eines Peptids ausgehen. Es kann sich also der Faltungspfad verzweigen und zu verschiedenen parallel existierenden Intermediaten führen, welche mit unterschiedlichen Zeitkonstanten gebildet und entvölkert werden. Ohne weitere Informationen kann man aufgrund der spektroskopischen Daten, wie sie zum Beispiel im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, nicht eindeutig auf ein bestimmtes Modell schließen. Da es jedoch vernünftig ist anzunehmen, dass die schnellen Relaxationsprozesse vor den langsamen ablaufen, wird im folgenden von einem sequentiellen Faltungsmodell ausgegangen. Auf die Möglichkeit von verzweigten Modellen mit parallel existierenden unterschiedlichen Intermediaten und deren Nachweis mittels Molekulardynamiksimulationen geht das Diskussionskapitel 6 ein.

Bei der Entfaltung der β -Hairpin Struktur des cis-AzoTrpZip2 und der nachfolgenden Faltung in das Ensemble an trans-Isomeren tritt zunächst ein Intermediat auf, das mit einer Zeitkonstante von 4,1 ps gebildet wird. Sein Differenzspektrum zum Ausgangszustand findet sich am deutlichsten im transienten Spektrum zu den Verzögerungszeiten von 6,5 ps und 24 ps, welche in Abb. 5.8(a) gezeigt sind. Diese werden als Spektren einer weitgehend offenen Struktur mit einer minimalen Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen interpretiert. Dieses offene Intermediat zerfällt mit einer Zeitkonstante von 26 ps. Darauf bildet sich mit eben dieser Zeitkonstante ein weiteres Intermediat, dessen Spektrum am deutlichsten im transienten Spektrum bei 150 ps hervortritt. Hier wird nur eine Absorptionsabnahme beobachtet. Erst mit einer Entvölkerung dieses Intermediats mit einer Zeitkonstante von 630 ps stellt sich eine Absorptionzunahme ein. Bei 3,1 ns wird ein transientes Spektrum erreicht, das weitgehend mit dem entsprechenden stationären Differenzspektrum der beiden Isomere des AzoTrpZip2 übereinstimmt. In einem engen Spektralbereich gibt es aber noch Abweichungen, die vielleicht auf weitere Prozesse hindeuten. Da der Messbereich hier endet, kann deswegen nicht ausgeschlossen werden, dass es noch weitere Intermediate gibt. Eine Messung von Transienten bei bestimmten Wellenlängen über den Verzögerungszeitpunkt von 3,1 ns hinaus hätte mittels des Laserblitz-Photolyseaufbaus erfolgen müssen. Da die Absorption des cis-Isomers des

AzoTrpZip2 jedoch nur im Bereich der $n\pi^*$ -Bande diejenige des trans-Isomers übersteigt, wären Anregimpulse in diesem Spektralbereich um 430 nm dafür nötig gewesen. Diese waren aber zum Zeitpunkt der Messungen noch nicht verfügbar.

5.3 Untersuchungen zur Faltung der β -Hairpin Struktur

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit den Experimenten zur Faltung der β -Hairpin Struktur. Ausgehend von dem trans-Isomer des AzoTrpZip2 wird dazu mit Lichtimpulsen bei 404 nm die Isomerisierung des Photoschalters AMPP aus seiner trans-Form in die cis-Form ausgelöst (umgekehrte Isomerisierungsrichtung wie im vorigen Abschnitt). Mittels Abtastimpulsen im Bereich der Amid-I' Bande werden die Absorptionsänderungen aufgenommen.

Nachdem das verwendete Anreg-Abtast-Experiment aus technischen Gründen auf den Zeitbereich bis 3,1 ns beschränkt ist, wurde für die Untersuchung des weiteren Verlaufs der Faltungsdynamik ein Laserblitz-Photolyseaufbau, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, verwendet. Die Anregimpulse lagen hier bei 355 nm, also in der $\pi\pi^*$ -Bande des Chromophors. Die Ergebnisse dieser Messungen auf der Nano- und Mikrosekundenzeitskala sind im Abschnitt 5.3.2 gezeigt.

5.3.1 Vorgänge auf der Pikosekundenzeitskala

Das Ausgangssystem vor der Anregung durch Lichtimpulse bei 404 nm ist das trans-Ensemble von Konformationen des AzoTrpZip2 bzw. des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Da dieses Ensemble jeweils das thermodynamisch stabilere ist, wird es vollständig nach längerem Lagern der Proben unter Lichtabschluss erreicht. Bei den Messungen in dieser Isomerisierungsrichtung von trans nach cis sind einige Besonderheiten zu beachten, auf die im folgenden eingegangen wird.

Vorbemerkungen

Geringere Absorption bei der Anregungswellenlänge Bei der Anregungswellenlänge von 404 nm besitzt das jeweilige trans-Isomer des AzoTrpZip2 bzw. des Referenzpeptids eine um mehr als den Faktor zwei kleinere Absorption als das entsprechende cis-Isomer (siehe dazu auch Abb. 4.17). Um die gleiche Anzahl von Molekülen pro Anregungsimpuls anregen zu können, wird bei der Isomerisierungsrichtung von trans nach cis also eine höhere Energie des Anregimpulses benötigt als im Falle der Anregung des cis-Isomers. Die hohen Energien des Anregimpulses führen zu unerwünschten Signalbeiträgen, die vom Lösungsmittel stammen.

Isomerisierungsquantenausbeuten Bei der trans nach cis Reaktion ist zu beachten, dass die Isomerisierungsquantenausbeute tendenziell (< 30 % bei $n\pi^*$ Anregung bzw. < 15 % bei $\pi\pi^*$ Anregung, [Spö01]) erheblich kleiner ist als die der cis nach trans Reaktion. Deshalb werden die beobachteten Absorptionssignale bei der trans nach cis

Reaktion verstärkt von Anteilen herrühren, die mit der internen Konversion in den Ausgangszustand und thermischen Relaxationen verknüpft sind.

Signalbeiträge des Lösungsmittels und deren Korrektur Um den Signalbeitrag des Lösungsmittels abschätzen zu können, wurde bei jeder zeitaufgelösten Messung das reine Lösungsmittel unter denselben Bedingungen gemessen wie die gelöste Probe. Prinzipiell ist der Lösungsmittelanteil am Signal im Falle der Messung der gelösten Probe systematisch geringer, da ein gewisser Anteil des Anregimpulses von den Probenmolekülen (in diesem Fall vom Chromophor AMPP) absorbiert wird. Das Lösungsmittel "sieht" also effektiv eine entsprechend geringere Anregimpulsenergie. Ist die Absorption der gelösten Probe jedoch wie im vorliegenden Fall sehr klein, kann das mit gleicher Anregimpulsenergie gemessene Lösungsmittelsignal in voller Höhe unskaliert abgezogen werden. Diese Art der Korrektur wurde für den Datensatz des Referenzpeptids verwendet.

Bei der Messung des Datensatzes des AzoTrpZip2 in der Isomerisierungsrichtung von trans nach cis konnte das Lösungsmittelsignal nicht in dieser Weise unskaliert abgezogen werden. Der Grund dafür liegt darin, dass bei den hier benötigten Anregungsimpulsenergien das Lösungsmittelsignal nicht linear von der Energie des Anregimpulses abhängt und sich über einen Zeitbereich bis zu einigen 100 ps erstreckt. Der spektrale Verlauf des Lösungsmittelsignals zeigt kaum Struktur, sondern ist bei allen detektierten Frequenzen nahezu gleich. Das Lösungsmittelsignal zerfällt exponentiell mit zwei Zeitkonstanten von 2,7 ps und 150 ps, wobei die zweite Zeitkonstante eine doppelt so große Amplitude besitzt wie die erste. Das Lösungsmittelsignal wurde nun so skaliert, dass die Zeitkonstante von 150 ps im resultierenden lösungsmittelkorrigierten Datensatz des AzoTrpZip2 nicht mehr auftritt. Dazu wurde das Lösungsmittelsignal mit einem Faktor 0,36 skaliert, bevor es abgezogen wurde. Diese Korrektur konnte jedoch wegen des nicht-linearen Charakters des Lösungsmittelsignals nicht für alle Zeitbereiche vollständig erfolgen. Insbesondere wird ein verbleibendes Lösungsmittelsignal im Zeitbereich bis ca. 10 ps im lösungsmittelkorrigierten Datensatz des AzoTrpZip2 beobachtet (vgl. dazu Abb. 5.14(a)).

Längere Lebensdauer des angeregten Zustands Die zeitaufgelösten Messungen im sichtbaren Spektralbereich weisen im Fall des Referenzpeptids in der Isomerisierungsrichtung von trans nach cis mit 1,8 ps eine deutlich langsamere Zerfallszeit des angeregten Zustands auf als in der umgekehrten Isomerisierungsrichtung. Dies ist ein typisches Phänomen des Photoschalters Azobenzol, der dem hier vorliegenden Chromophor zugrunde liegt [Spö01]. Für die Beobachtung der Peptiddynamik bedeutet es jedoch, dass die Isomerisierung, welche die Peptiddynamik zunächst auslöst, zeitlich "ausgeschmiert" ist. Die Dynamiken während der ersten Pikosekunden können also nicht als Peptiddynamik allein interpretiert werden.

Anreicherung des cis-Isomers Bei den Untersuchungen wurde von einer Probe ausgegangen, die vollständig aus trans-Isomeren bestand. Nach Photoanregung bei 404 nm durch die Anregungsimpulse isomerisiert ein gewisser Anteil in das entsprechende cis-Isomer. Da die Probe nicht durch eine Dauerstrichbelichtung wieder in das trans-Isomer

umbelichtet wurde, reichert sich das cis-Isomer mit der Zeit an. Dessen Anreicherung wurde beobachtet, indem in regelmäßigen Abständen Spektren im sichtbaren Spektralbereich aufgenommen wurden. Als größter Anteil an cis-Isomeren in Lösung wurde jedoch lediglich 2,6 Mol% ermittelt. Dieser Anteil kann deshalb vernachlässigt werden.

Strukturelle Überlegungen Mittels der NMR-Strukturanalyse wurde versucht, die Struktur des trans-Isomers des Referenzpeptids im Lösungsmittel Methanol-d₄ zu finden. Es konnten zwar einige Abstandsinformationen gewonnen werden (sogenannte NOEs), diese reichten jedoch nicht aus, um ein Ensemble an Strukturen zu generieren. Vielmehr waren die meisten Abstandsinformationen trivialer Natur und rührten von Wasserstoffatomen her, die schon aufgrund der Primärstruktur nahe benachbart waren. Daraus kann gefolgert werden, dass das trans-Isomer des Referenzpeptids keine definierte Struktur besitzt.

Das strukturelle Ensemble des cis-Isomers konnte jedoch gefunden werden und zeigt einen Anteil von einer Turn-Struktur. Jedoch ließ sich dieser Anteil am gesamten Ensemble nicht quantifizieren. Er war aber deutlich in der NMR-Strukturbestimmung zu beobachten.

Ähnlich verhält es sich im Falle des trans-AzoTrpZip2. Auch hier ließ sich der Anteil der gefalteten trans-AzoTrpZip2 Peptide gegenüber der ungefalteten Population nicht eindeutig bestimmen.

In beiden Fällen regt der Anregimpuls ein wenig definiertes Ensemble an trans-Strukturen an, das zu einer breiten Verteilung von unterschiedlichsten Differenzsignalen führen könnte.

Die experimentellen Beobachtungen im Detail

Überblick über die gemessenen Daten Vor dem Hintergrund dieser Vorbemerkungen zeigt Abbildung 5.13 einen Überblick über die lösungsmittelkorrigierten Datensätze.

Ein Vergleich der zeitaufgelösten Daten der Isomerisierungsrichtung von trans nach cis des trans-AzoTrpZip2 (Abbildung 5.13(a)) mit den entsprechenden des Referenzpeptids (Abbildung 5.13(b)) liefert zunächst eine grobe Übereinstimmung beider Datensätze. Auffällig ist jeweils das Ausbleichen um 1650 cm⁻¹ und die induzierte Absorption um 1620 cm⁻¹. Ab 150 ps beobachtet man praktisch keine Absorptionsdynamiken. Die Differenzsignale des AzoTrpZip2 sind dabei etwas rotverschoben gegenüber denen des Referenzpeptids.

Nach einer Interpretation der beobachteten transienten Spektren werden im folgenden die wesentlichen Komponenten der Dynamik mittels einer globalen Anpassung der gemessenen Zeitverläufe der Absorptionsänderungen dargestellt.

Transiente Spektren: Referenzpeptid Zunächst wird auf die Daten des trans-Isomers des Referenzpeptids eingegangen, wenn es von Pumpimpulsen bei 404 nm angeregt wird. Abbildung 5.14(b) zeigt die beobachteten transienten Spektren im Bereich der Amid-I' Bande. Das transiente Spektrum bei 1 ps weist induzierte Absorptionen um 1625 cm⁻¹ und ein Minimum bei ca. 1657 cm⁻¹ auf. Zusammengenommen entspricht dies einer Rotverschiebung der Amid-I' Bande des Referenzpeptids. Diese Rotverschiebung kann

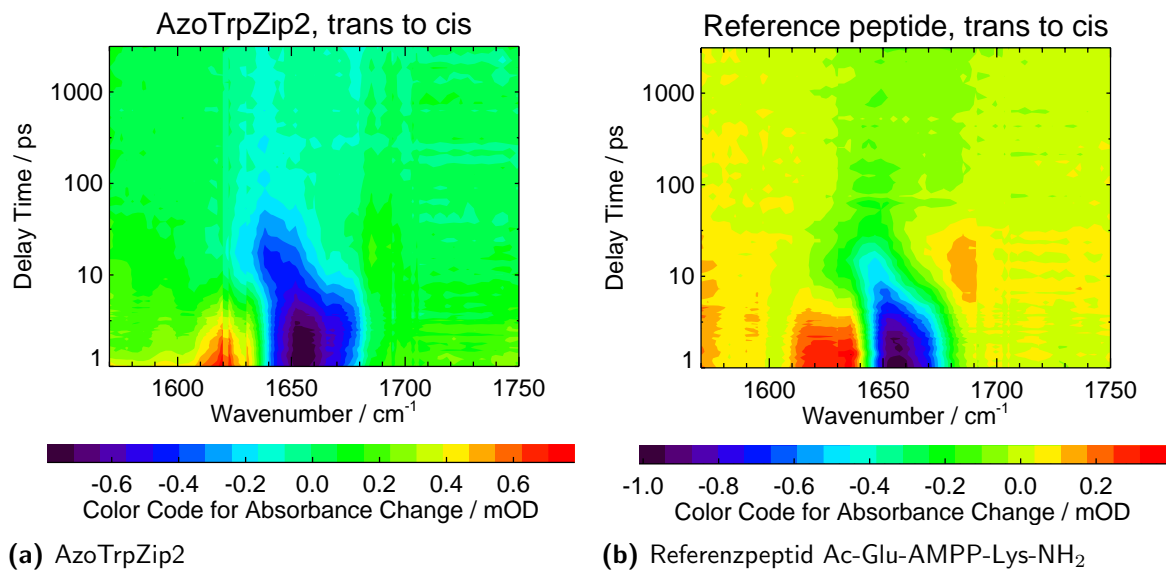


Abbildung 5.13: Zweidimensionale Darstellungen der Absorptionsänderungen bei Anregung des trans-Isomers bei $\lambda_{ex.}=404$ nm. Dargestellt sind Absorptionzunahmen mit rötlichen Farbtönen. Absorptionsabnahmen sind durch bläuliche Farben angedeutet. Die Zeitachse ist jeweils logarithmisch.

zum einen der Besetzung des angeregten Zustandes des Chromophors AMPP und zum anderen einem schwingungsmäßig heißen Peptidteil zugeschrieben werden. Die Schwingungsanregung führt zu einer Rotverschiebung über folgenden Mechanismus: Die Anregung des Chromophors mittels des Anregimpulses und dessen Relaxation führt zu einer Anregung niederfrequenter Moden. Durch deren anharmonische Kopplung mit einer im allgemeinen negativen Kopplungskonstante an die Carbonylstreckschwingungen des Peptidrückgrats führen sie zu einer Rotverschiebung der beobachteten Amid-I' Bande [Sch04b].

Zusätzlich beobachtet man bei den transienten Spektren zu den Verzögerungszeiten 1,0 ps und 6,6 ps Ausbleichsignale bei 1585 cm^{-1} und bei 1605 cm^{-1} , welche von einer breiten induzierten Absorption überlagert sind. Diese Ausbleichsignale sind jedoch bei 24 ps nicht mehr erkennbar. Sie können dem Ausbleichen von Schalterbanden zugeschrieben werden, welches auf einer Zeitskala von einigen Pikosekunden fast vollständig verschwindet. Dies lässt auf eine geringe Isomerisierungsquantenausbeute schließen. Ein weiteres Indiz für eine kleine Isomerisierungsquantenausbeute ist die geringe und damit zu vernachlässigende Anreicherung an cis-Isomer in dem gesamten Messzyklus.

Bis zum transienten Spektrum bei 24 ps verschiebt sich das Minimum des Ausbleichens von 1657 cm^{-1} bis nach 1646 cm^{-1} , wobei eine induzierte Absorption bei 1685 cm^{-1} einsetzt. Dies kann über den Bruch von Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel erklärt werden. Dieser so entstandene desolvatisierte Zustand relaxiert auf einer Zeitskala von 20 ps. Um 150 ps ist ein transientes Spektrum erreicht, das bis auf geringe Abweichungen um 1675 cm^{-1} dem Spektrum nach 3,1 ns gleicht. Die wesentliche Dynamik ist also bis 150 ps abgeschlossen.

Im Fall des Referenzpeptids kann aus den zeitaufgelösten Messungen im sichtbaren Spektralbereich die Isomerisierungsquantenausbeute zu ca. 10 % abgeschätzt werden

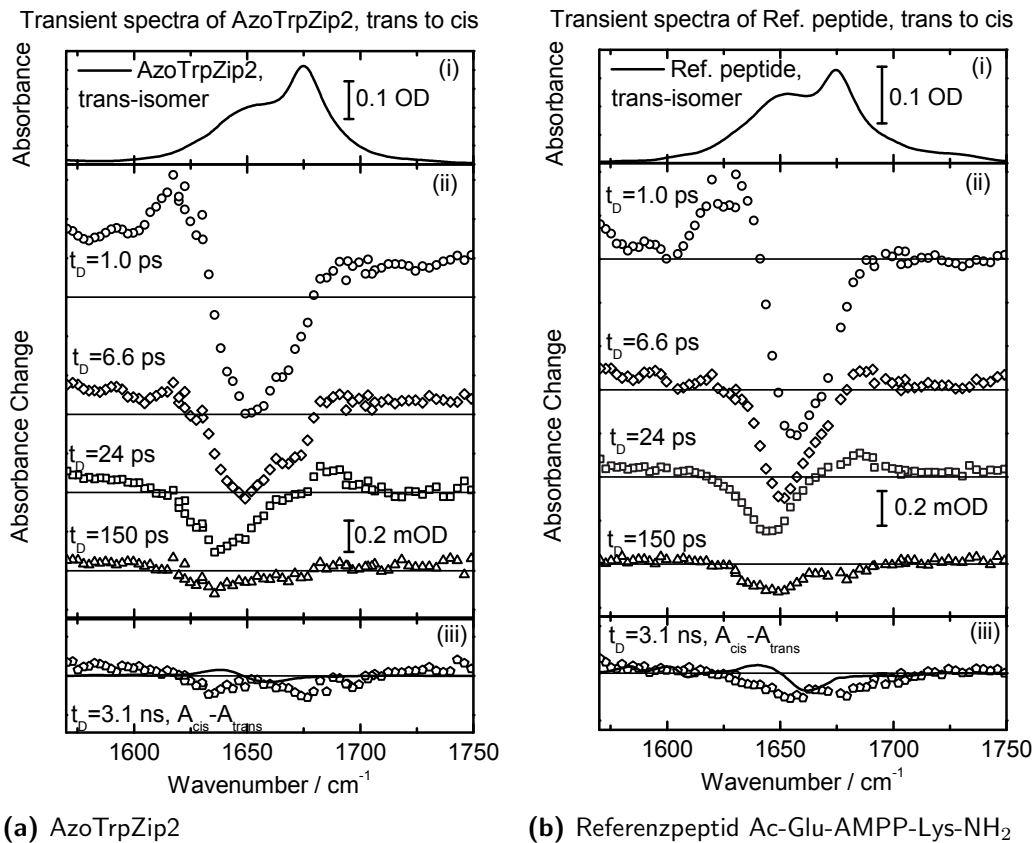


Abbildung 5.14: Transiente Differenzspektren nach Anregung des jeweiligen trans-Isomers. Die beiden oberen Teile der Abbildung zeigen jeweils die Infrarotspektren des Ausgangszustands, des jeweiligen trans-Isomers. Relativ zu diesen Spektren verstehen sich die Änderungen in den Abschnitten (ii) und (iii). Im Abschnitt (ii) sind die transienten Spektren zu den Verzögerungszeiten 1,0 ps (Kreise), 6,6 ps (Rauten), 24 ps (Quadrate) und 150 ps (Dreiecke) dargestellt. Die Fünfecke im Abbildungsabschnitt (iii) zeigen das transiente Spektrum bei 3,1 ns. Die durchgezogene Linie in (iii) ist jeweils ein skaliertes Differenzspektrum aus Abbildung 4.21.

(siehe durchgezogene Linie in Abbildung 5.2(b)) [Spö01]. In der Messung zu Abbildung 5.14(b) wurden ca. 10 % der Moleküle im Anregungsvolumen angeregt. Insgesamt kann als Signal deswegen nur ca. 1 % der Amplitude des vollen Differenzspektrums der Lösung erwartet werden, die im vorliegenden Fall ca. 9 mOD bei 1660 cm⁻¹ beträgt. Das maximal zu erwartende Differenzsignal liegt also bei 90 μ OD. Auf diesen Wert wurde auch das stationäre Differenzspektrum (durchgezogene Linie Abbildung 5.14(b)) skaliert. Dennoch weicht das gemessene Spektrum bei 3,1 ns noch um 1640 cm⁻¹ und um 1675 cm⁻¹ von dem so skalierten stationären Differenzspektrum ab.

Eine Erhöhung der Temperatur im angeregten Volumen kann, wie es schon in Abschnitt 5.2.4 für den Fall der anderen Isomerisierungsrichtung diskutiert wurde, diesen Unterschied nicht erklären. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass noch nachgeschaltete Prozesse existieren müssen, welche die Übereinstimmung herstellen.

Transiente Spektren: AzoTrpZip2 Vergleicht man die beiden Abbildungen 5.14(b) und 5.14(a), so fällt auf, dass sich das zeitaufgelöste Absorptionsverhalten des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids im Bereich der Amid-I' Bande bei der Anregung ihres jeweiligen trans-Isomers ähnelt. Ebenfalls wie im Fall des Referenzpeptids beobachtet man das Ausbleichen der Banden des Schaltermoleküls AMPP bei 1585 cm^{-1} und bei 1600 cm^{-1} , die bis zu einer Verzögerungszeit von 24 ps nahezu vollständig verschwinden. Dies deutet auf eine Isomerisierungsquantenausbeute für das Schalten von trans nach cis in einer ähnlichen Größenordnung wie beim Referenzpeptid hin.

Das transiente Spektrum bei 1,0 ps ist geprägt vom angeregten Zustand des Chromophors mit einem ausgeprägten Ausbleichen bei 1650 cm^{-1} . Das Minimum ist jedoch deutlich rotverschoben im Vergleich zum Referenzpeptid. Im Fall des AzoTrpZip2 schiebt dieses Minimum bis 24 ps bis nach 1636 cm^{-1} , was ebenfalls deutlich rotverschoben gegenüber dem Referenzpeptid ist. Dies könnte man damit interpretieren, dass im Fall des AzoTrpZip2 nicht nur Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel, sondern auch intra-molekulare Wasserstoffbrücken aufbrechen. Die induzierte Absorption bei 1685 cm^{-1} im transienten Spektrum bei 24 ps tritt bei beiden Modellpeptiden auf. Man kann sie Carbonyloszillatoren aus der Amid-I' Bande zuordnen, die nicht über eine Wasserstoffbrückenbindung verfügen. Die Unterschiede zwischen den Spektren bei 150 ps und bei 3,1 ns sind im Fall des AzoTrpZip2 etwas ausgeprägter als im Fall des Referenzpeptids. Dennoch sind auch hier nach ca. 150 ps die dominanten Absorptionsänderungen abgeschlossen.

Die Abschätzung der Isomerisierungsquantenausbeute im Fall des AzoTrpZip2 konnte über die Anreicherung des cis-Isomers während der gesamten Messdauer abgeschätzt werden. Daraus ergibt sich eine Isomerisierungsquantenausbeute von ca. 3 %. Das entsprechend skalierte stationäre Differenzspektrum wurde als durchgezogene Linie in Abschnitt (iii) der Abbildung 5.14(a) eingezeichnet.

Für die Diskrepanz zwischen stationärem Differenzspektrum und dem transienten Spektrum nach 3,1 ns könnte eine Temperaturerhöhung des Probenvolumens verantwortlich sein. Dieser Effekt wird weiter unten ausgeschlossen. Eine weitere Erklärung wäre eine nachgeschaltete Dynamik, welche dann zu dem stationären Differenzspektrum führt. Diese Möglichkeit wird in Kapitel 5.3.2 diskutiert.

Globale Datenanpassung mittels exponentieller Zerfälle Wie schon in Kapitel 5.2.3 für die Isomerisierungsrichtung von cis nach trans vorgestellt, wird hier wieder versucht, die beobachteten Kinetiken mittels einer globalen Anpassung nachzubilden und so auf einige wenige Zeitkonstanten und die zugehörigen Amplitudenspektren zurückzuführen. Wegen der bei der Isomerisierungsrichtung von trans nach cis deutlicher hervortretenden Kühlsignatur wurden die Daten erst jeweils ab 5 ps angepasst. Es wurde jeweils eine Anpassung mit drei exponentiellen Zeitkonstanten durchgeführt, wobei eine Zeitkonstante sehr groß gegen alle auftretenden Zeitkonstanten gewählt wurde, um die konstanten Anteile bei einer Verzögerungszeit von 3,1 ns anzupassen.

Abbildung 5.15 zeigt die entsprechenden Amplitudenspektren zu den einzelnen Zeitkonstanten. Wie gut die Anpassung an die Daten gelungen ist, kann bei fünf verschie-

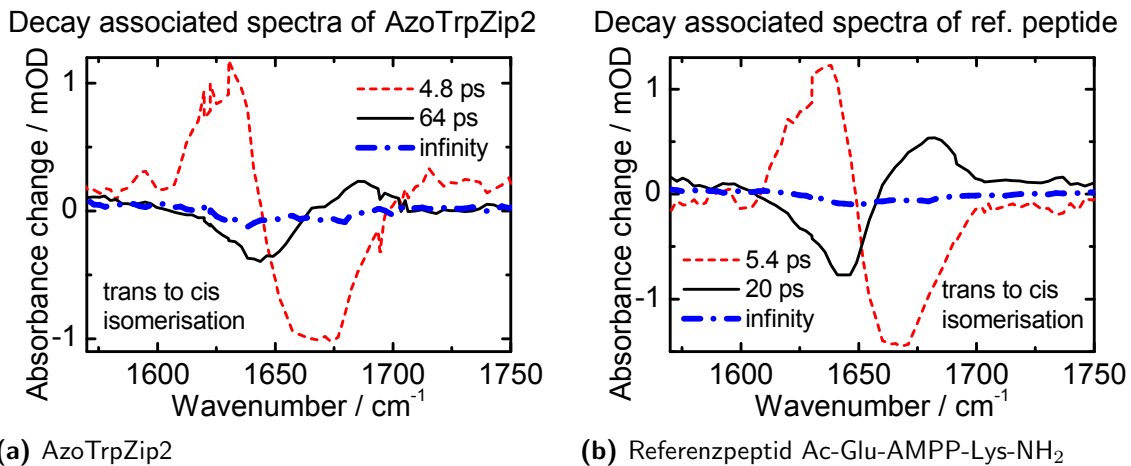


Abbildung 5.15: Amplitudenspektren beim Konformationswechsel vom cis- in das trans-Isomer. Für beide Datensätze (AzoTrpZip2 und Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂) wurde ab 5 ps eine globale Anpassung mittels einer Summe aus drei exponentiellen Zerfällen gefaltet mit einer Kreuzkorrelation von $t_{CC}=0,7$ ps durchgeführt. Eine Zeitkonstante (“infinity”) berücksichtigt die nach dem Zeitfenster der Messungen vorliegenden Absorptionsänderungen. Die beiden Abbildungen zeigen die mit den angegebenen Zeitkonstanten assoziierten Amplitudenspektren.

denen Zeitverläufen der Absorptionsänderungen anhand von Abbildung 5.16 beurteilt werden.

Geht man zunächst auf die globale Anpassung der Daten des Referenzpeptids ein, so fällt das Amplitudenspektrum zur Zeitkonstante 5,4 ps wegen seiner großen Amplitude auf (gestrichelte Linie in Abb. 5.15(b)). Es zeigt eine positive Amplitude bei 1638 cm⁻¹ und ein Minimum bei 1665 cm⁻¹ und repräsentiert damit das Zurückgehen der Rotverschiebung der Amid-I' Bande auf einer Zeitskala von 5,4 ps aufgrund des Kühlens und des Zerfalls des angeregten Zustands des Chromophors. Über die zeitaufgelöste Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich wurden zwei Zeitkonstanten von 1,8 ps (dominant) und 13 ps gefunden.

Der Mechanismus, mit dem der angeregte Chromophor zu einer Absorptionsänderung im Bereich der Amid-I' Bande führen kann, ist folgender: Im angeregten Zustand besitzt der Chromophor eine andere Geometrie und ein anderes Dipolmoment als in seinem Grundzustand. Diese Änderung im Dipolmoment in der näheren Umgebung der Amid-I' Carbonyloszillatoren beeinflusst deren Elektronenverteilung und damit deren Bindungsstärke. Dadurch verschiebt sich auch die Absorptionsfrequenz der Carbonyloszillatoren. Im Experiment wird eine Rotverschiebung der Frequenz der Amid-I' Oszillatoren beobachtet. In der Literatur wird dieser Effekt als “vibrational Stark effect“ bezeichnet [Vol97]. Er wurde bereits dazu benutzt, um aus der Bandenverschiebung eines Carbonyloszillators auf die Lage und Stärke des Dipolmoments eines benachbarten angeregten Chromophors zu schließen [Vol00].

In diesem Zusammenhang findet sich bei 1585 cm⁻¹ und bei 1605 cm⁻¹ im Amplitudenspektrum der Zeitkonstante von 5,4 ps jeweils ein lokales Minimum, das das Abnehmen des Ausbleichens der Schalterbanden des Chromophors AMPP angibt. Dies ordnet

sich ein in den Zerfall des angeregten Zustandes, der auf derselben Zeitskala stattfindet (siehe oben).

Das Amplitudenspektrum der Zeitkonstante 20 ps besitzt ein Maximum bei 1675 cm^{-1} und ein Minimum bei 1644 cm^{-1} . Auf dieser Zeitskala scheinen sich Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel wieder auszubilden, welche durch die strukturellen Umordnungsprozesse nach der Anregung und Isomerisierung des Chromophors gebrochen waren. Dies führt zu einer Rotverschiebung der Frequenz der Carbonyloszillatoren um rund 30 cm^{-1} , was der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung entspricht [Tor98b].

Das Amplitudenspektrum zur unendlich großen Zeitkonstante "infinity" ist extrem schwach. Es zeigt noch keine spektralen Ähnlichkeiten mit dem stationären Differenzspektrum aufgrund der Isomerisierung. Die Gründe hierfür müssen in nachgeschalteten Prozessen gesucht werden, die zu einem entsprechenden stationären Differenzspektrum führen.

Im Fall der Anpassung der Daten des AzoTrpZip2 in der Isomerisierungsrichtung von trans nach cis findet man recht ähnliche Prozesse. Die ersten Zeitkonstanten von 4,8 ps bzw. 5,4 ps sind fast gleich. Die nächst größere Zeitkonstante ist im Fall des AzoTrpZip2 mit 64 ps dreimal so groß wie für das Referenzpeptid. Dies deutet darauf hin, dass es im Fall des AzoTrpZip2 noch länger andauernde strukturelle Peptiddynamikprozesse gibt. Diese scheinen auch eine Rückwirkung auf den Schalter auszuüben und sind möglicherweise ursächlich für die Zeitkonstante von 47 ps, welche in den Experimenten mit sichtbaren Abtastimpulsen auftritt. Das Amplitudenspektrum zur unendlich großen Zeitkonstante stimmt ebenfalls nicht mit dem stationären Differenzspektrum überein. Deswegen kann hier auf weitere Faltungsdynamiken geschlossen werden, deren Zeitkonstante größer als das hier behandelte Messfenster von 3,1 ns ist. Auf diese Faltungsdynamik wird in Kapitel 5.3.2 näher eingegangen.

Abbildung 5.16 zeigt eine Auswahl an Zeitverläufen der Absorptionsänderungen der beiden Datensätze des AzoTrpZip2 (Kreise) und des Referenzpeptids (Dreiecke). Die durchgezogenen Linien stammen von der oben besprochenen globalen Anpassung mittels exponentieller Zerfälle. Bei den gezeigten Zeitverläufen im Fall des Referenzpeptids gibt die globale Anpassung die gemessenen Daten gut wieder. Im Fall des AzoTrpZip2 findet man bei den Wellenzahlen 1638 cm^{-1} und 1652 cm^{-1} geringfügige Abweichungen von den gemessenen Daten bei Verzögerungszeiten von ca. 70 ps. Hier scheint ein zusätzlicher Prozess mit geringer Amplitude eine Rolle zu spielen.

Vergleicht man die Zeitverläufe des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids bei entsprechenden Wellenzahlen fällt zunächst eine qualitative Ähnlichkeit auf.

Im Bereich der Amid-I' Bande bei 1638 cm^{-1} zeigen die Transienten des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids ein verzögertes Auftreten des Maximums des Ausbleichens zwischen 10 ps und 20 ps. Es gibt bei 1652 cm^{-1} jedoch auch einen Anteil der Amid-I' Bande, der instantan ausbleicht. Daraus kann geschlossen werden, dass stärkere Wasserstoffbrücken, die zu den Carbonyloszillatoren mit einer Absorptionsfrequenz in der Nähe von 1638 cm^{-1} gehören, später aufbrechen als solche, die zu Absorptionsfrequenzen bei 1652 cm^{-1} gehören. Die Absorptionsabnahme bis zu einer Verzögerungszeit von 3 ps beim Zeitverlauf bei 1677 cm^{-1} im Fall des AzoTrpZip2 kann zumindest teilweise auf Einflüsse des Lösungsmittels zurückgeführt werden und soll deswegen nicht als verzögertes Ausbleichen der Peptidabsorption gedeutet werden.

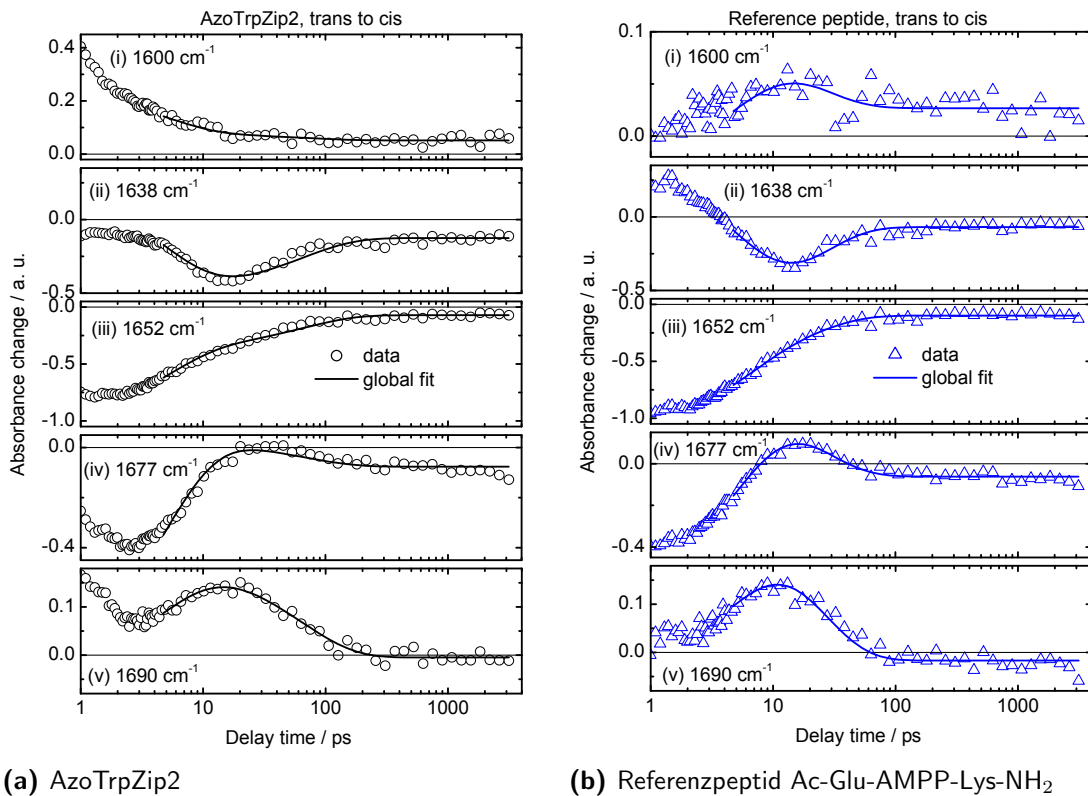


Abbildung 5.16: Ausgewählte Transienten der Isomerisierung von trans nach cis bei den Frequenzen 1600 cm^{-1} , 1638 cm^{-1} , 1652 cm^{-1} , 1677 cm^{-1} und 1690 cm^{-1} . Die offenen Kreise stehen für die Absorptionsänderungen in Abhängigkeit von der Zeit gemessen ausgehend von dem trans-AzoTrpZip2. Die Dreiecke sind die entsprechenden Daten für den Fall des trans-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Die durchgezogenen Linien stammen aus den jeweiligen globalen Anpassungen.

In den transienten Spektren zu den Verzögerungszeiten 150 ps und 3,1 ns aus Abbildung 5.14(a) ist im Fall des AzoTrpZip2 noch ein spektraler Unterschied um 1677 cm^{-1} zu erkennen. Der Zeitverlauf der Absorptionsänderungen bei der Wellenzahl 1677 cm^{-1} zeigt auch tatsächlich ein Absinken der Absorption bei den letzten Messpunkten, welches von der globalen Anpassung nicht erfasst wird. Hier könnte bereits eine nachgeschaltete Dynamik zu erkennen sein mit einer Zeitkonstante von einigen Nanosekunden. Ein ähnlicher Befund existiert auch für das Referenzpeptid.

Der Zeitverlauf der Absorptionsänderungen des AzoTrpZip2 bei 1690 cm^{-1} zeigt (nach dem Rückgang des Einflusses des Lösungsmittels $< 5\text{ ps}$) zunächst eine Zunahme der Absorption bis ca. 20 ps und darauf ein Abnehmen der Absorption auf einer Zeitskala von 64 ps. Dies kann als die Signatur der nicht-wasserstoffverbrückten Carbonyloszillatoren des Peptidrückgrats des AzoTrpZip2 interpretiert werden. Auf einer Zeitskala von 64 ps scheinen sich strukturelle Prozesse zu ereignen und sich die Wasserstoffbrückenbindungen wieder auszubilden. Beim Referenzpeptid geschieht dies ähnlich, jedoch zeigt der entsprechende Zeitverlauf bei 1690 cm^{-1} ein entsprechend schnelleres Ausbilden der Wasserstoffbrückenbindungen.

Zusammenfassung und Interpretation der Pikosekundendynamik

Einfluss von Temperaturänderungen Ähnlich wie in Kapitel 5.2.4 beschrieben, kann man auch bei der hier betrachteten Isomerisierungsrichtung von trans nach cis den Einfluss der Temperaturerhöhung im Probenvolumen durch die Umwandlung der absorbierten Energie aus dem Anregungsimpuls in Wärme berücksichtigen. Aufgrund der verwendeten experimentellen Parameter von Anregungsenergie, Bündeldurchmesser des Anregimpulses am Probenort und Absorption der Probe bei der Wellenlänge des Anregimpulses berechnet sich dieser Temperaturanstieg zu lediglich 80 mK. Das beobachtete transiente Spektrum bei 3,1 ns (siehe Abb. 5.14(a), Abschnitt (iii)) lässt sich jedoch nicht mit einer Temperaturveränderung im Probenvolumen allein erklären. Einzig das Minimum bei 1675 cm^{-1} im transienten Spektrum bei 3,1 ns könnte zum Teil auf eine solche Temperaturerhöhung zurückzuführen sein. Eine Erklärung für die spektralen Diskrepanzen zwischen dem stationären Differenzspektrum und dem transienten Spektrum bei 3,1 ns unterhalb von 1650 cm^{-1} kann also nicht durch diese Temperaturerhöhung herbeigeführt werden. Deswegen wird in Kapitel 5.3.2 bei einer Wellenzahl von 1641 cm^{-1} nach Peptiddynamiken gesucht, die diese Erklärung liefern könnten.

Identifizierung von Intermediaten Mit der Abbildung 5.12 wurde in Kapitel 5.2.5 der Begriff des Intermediats eingeführt. Die Zahl der beteiligten Zustände ist dabei so groß wie die Zahl der Zeitkonstanten, die nötig sind, um einen Datensatz anzupassen [Zin98]. Blickt man auf die in Tabelle 5.3 so können abgesehen von dem Ausgangszustand zwei Intermediate auf der Pikosekundenzeitskala vermutet werden.

Probe	AzoTrpZip2	Referenzpeptid
Isomerisierung	t \rightarrow c	t \rightarrow c
$\lambda_{ex.}$	404 nm	404 nm
τ_1	4,8 ps	5,4 ps
τ_2	64 ps	20 ps

Tabelle 5.3: Gegenüberstellung der Zeitkonstanten der globalen Anpassungen im Bereich der Amid-I' Bande bei der Isomerisierung von trans nach cis für das Modellpeptid AzoTrpZip2 und das Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. $\lambda_{ex.}$ bezeichnet die Wellenlänge des Anregimpulses. Die τ_i sind die Zeitkonstanten aus der globalen Anpassung. Die dritte Zeitkonstante „infinity“ ist jeweils konstant auf einem sehr großen Wert (10^7 ps) gehalten worden und wurde deswegen in der Tabelle nicht extra aufgeführt.

Bei ca. 20 ps ist im Fall des AzoTrpZip2 ein Zwischenzustand erreicht, der gekennzeichnet ist durch das Fehlen von Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel, also ein desolvatisierter Zustand. Dieser entwickelt sich mit einer Zeitkonstante von 64 ps zu einem intermediären Zustand, dessen Spektrum jedoch nicht mit dem stationären Differenzspektrum übereinstimmt. Deshalb kann man hier von einem Faltungsintermediat ausgehen. Das transiente Differenzspektrum dieses Intermediats kann mit dem transienten Spektrum bei 3,1 ns aus Abbildung 5.14(a), Abschnitt (iii) angegeben werden. Beim Referenzpeptid tritt der desolvatisierte Zustand etwas früher um 10 ps auf und relaxiert auf der Zeitskala von 20 ps ebenfalls in einen Zustand, der noch nicht das Differenzspektrum aus cis- und trans-Isomer des stationären Zustands entspricht. In beiden Fällen lässt

diese Tatsache auf nachgeschaltete Prozesse schließen, die Zeitkonstanten aufweisen, die größer sind als das hier diskutierte Messfenster von 3,1 ns. Auf diese nachgeschalteten Prozesse wird im folgenden Kapitel eingegangen.

5.3.2 Vorgänge auf der Mikrosekundenzeitskala

Vorstellung und Interpretation der experimentellen Daten

Mittels des Laserblitz-Photolyseaufbaus, vorgestellt in Kapitel 3.2, wurde nun versucht, die weitere Dynamik der Reaktion von trans nach cis des AzoTrpZip2 auf der μ s-Zeitskala zu verfolgen. Als Abtastwellenlänge wurde 1641 cm^{-1} gewählt, da hier eine große Absorptionzunahme aufgrund des stationären Differenzspektrums zu erwarten ist (siehe Pfeil im Inset der Abbildung 5.17). Die Anregungswellenlänge lag bei 355 nm in der $\pi\pi^*$ -Bande des Chromophors.

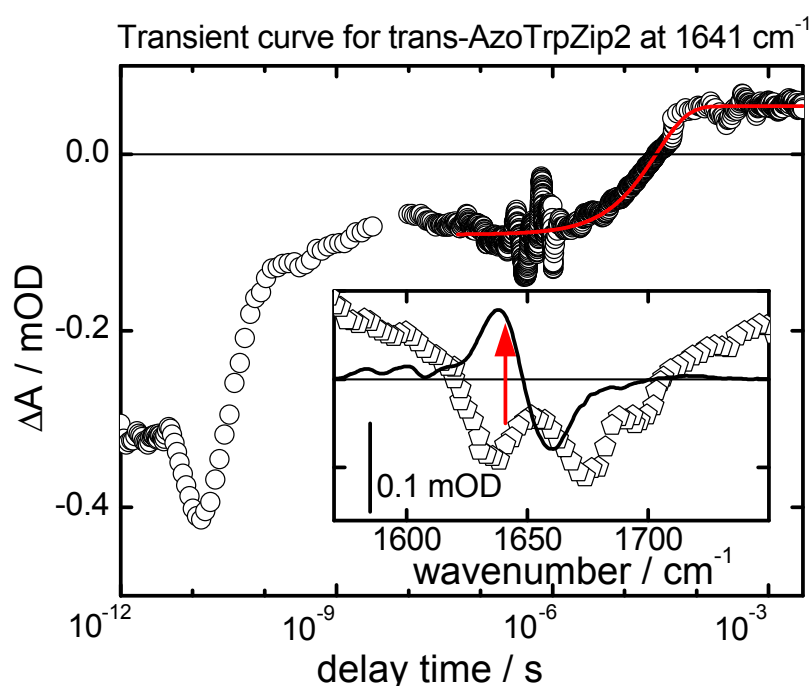


Abbildung 5.17: Zeitverlauf der Absorptionsänderungen des trans-AzoTrpZips bei 1641 cm^{-1} , einen Zeitbereich von Pikosekunden bis Millisekunden überspannend. Die Daten bis 3,1 ns stammen aus Messungen mit einer Anregungswellenlänge von 404 nm, die von 10 ns bis 3 ms aus den Messungen mit einem Laserblitz-Photolyseaufbau mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm. Das Inset entspricht im wesentlichen Abbildung 5.14(a) (iii), wobei der rote Pfeil die spektrale Position des gezeigten Zeitverlaufs markiert.

In Abbildung 5.17 werden für eine Abtastfrequenz von ca. 1641 cm^{-1} die Absorptionsänderungen im gesamten, von der Messung erfassten Zeitbereich von 1 ps bis 3 ms dargestellt. Die Daten im Zeitbereich zwischen 1 ps und 3,1 ns stammen aus dem vorher diskutierten Datensatz³ bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 404 nm. Es handelt sich also um den Zeitverlauf bei 1641 cm^{-1} . Die weiteren Daten ab ca. 10 ns bis 3 ms stammen aus der Messung mittels des Laserblitz-Photolyseaufbaus. Hier war die Anregungswellenlänge 355 nm. Die Kurve aus dem Laserblitz-Photolyseaufbau

³Die Lösungsmittelkorrektur der hier gezeigten Daten unterscheidet sich von derjenigen aus der Veröffentlichung [Sch07b]. In der Veröffentlichung wurde das Lösungsmittelsignal mit dem Faktor 1,0 skaliert und vom Probensignal abgezogen, wohingegen bei den hier zugrunde liegenden Daten das Lösungsmittelsignal mit einem Faktor 0,35 skaliert wurde, bevor es subtrahiert wurde (siehe Kapitel 5.3.1).

wurde so skaliert, dass sie bei 10 ns etwa dieselbe Absorptionsänderung aufweist wie die ps-Transiente bei 3,1 ns. Beide Kurven wurden mit Savitzky-Golay Filterfunktionen geglättet [Sav64, Ste72].

Der Zeitverlauf der Absorption bei einer Wellenzahl von 1641 cm^{-1} zeigt zunächst ein verzögertes Ausbleichen der roten Flanke der Amid-I' Bande, was bereits oben als Aufbrechen weiterer Wasserstoffbrückenbindungen interpretiert wurde. Um 20 ps ist ein Minimum der Absorptionsänderung erreicht. Dies hängt mit einem maximal desolvatisierten Zustand zusammen. Mit einer Zeitkonstante von 64 ps wird ein weiterer Zwischenzustand erreicht. Der leichte Absorptionsanstieg auf der Zeitskala von 1 ns könnte noch auf eine weitere, längere Zeitkonstante im Bereich einiger 100 ps hindeuten, wie sie auch bei den Abtastfrequenzen um 1675 cm^{-1} mit kleiner Amplitude in Erscheinung tritt. Stimmt die Skalierung der beiden Messdatensätze untereinander, so ändert sich die Absorption auf einem Zeitbereich von einigen Nanosekunden bis einigen Mikrosekunden kaum. Im Zeitbereich von einigen 100 ns wird ein schon aus der Literatur bekanntes thermisches Artefakt beobachtet. Zwischen $10 \mu\text{s}$ und $50 \mu\text{s}$ nimmt die Absorption zu und erreicht einen positiven Wert, wie man es aus dem stationären Differenzspektrum erwarten würde. Nach $100 \mu\text{s}$ ist die Reaktion also abgeschlossen. Eine Anpassung der Daten im μs -Bereich mittels einer Exponentialfunktion liefert eine Zeitkonstante von $30 \mu\text{s}$.

Die systematischen Absorptionsänderungen um $1 \mu\text{s}$ stammen von dem durch die absorbierte Energie des Anregungsimpulses ausgelösten Temperatursprung und den dadurch verursachten Druck- und Dichteausgleich [Cal98, Yuz94]. Die durch den Temperaturanstieg im Probenvolumen ausgelöste Druckwelle, welche für den Dichteausgleich sorgt, wird sich in erster Näherung mit der Schallgeschwindigkeit in deuteriertem Methanol ausbreiten. Verwendet man den Wert für die Schallgeschwindigkeit in Methanol von $c_{\text{Methanol}} = 1123 \text{ m/s}$ bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ [Kuc94], so kann man die Ausbreitungszeit τ_{Schall} der Druckwelle im Probenvolumen mit einer typischen Ausdehnung von $d=0,6 \text{ mm}$ berechnen:

$$\tau_{\text{Schall}} = \frac{d}{c_{\text{Methanol}}} \approx 0,5 \mu\text{s} \quad (5.3)$$

Als Ausdehnung wurde ein typischer Bündeldurchmesser der Anregimpulse angenommen. Der berechnete Wert von einer halben Mikrosekunde stimmt gut mit dem beobachteten Zeitbereich für das thermische Artefakt zwischen einigen 100 ns und $1 \mu\text{s}$ überein.

Geschieht die Umwandlung der absorbierten Energie des Anregimpulses typischerweise auf der Zeitskala von 100 ps, stellt sich jedoch die Frage, ob die beobachtete Absorptionszunahme zwischen $10 \mu\text{s}$ und $50 \mu\text{s}$ auch auf eine Abkühlung des Probenvolumens zurückgeführt werden könnte. Eine Temperaturabnahme des Lösungsmittels Methanol-d4 würde in der Tat zu einer Absorptionszunahme bei der Abtastwellenlänge von 1641 cm^{-1} führen.

Die wesentliche Größe, welche die Wärmeausbreitung in einer Flüssigkeit bestimmt, ist die Wärmediffusivität D , welche sich aus der Wärmeleitfähigkeit λ , der Dichte ρ und der spezifischen Wärmekapazität C bestimmen lässt:

$$D = \frac{\lambda}{\rho C} \quad (5.4)$$

Mit den Werten für Methanol aus [Kuc94] errechnet sich daraus ein Wert für die Wärmediffusivität von $D_{Methanol} = 1,0 \cdot 10^{-3} \frac{cm^2}{s}$, der vergleichbar ist mit dem von Wasser $D_{Wasser} = 1,27 \cdot 10^{-3} \frac{cm^2}{s}$ [Lut97].

Für die Absorptionsänderungen aufgrund des Abkühlens des Probenvolumens aufgrund von Temperatursprungeffekten wurden in deuteriertem Wasser bereits Vergleichsmessungen durchgeführt. Die Vorgehensweise war dabei folgende: In deuteriertem Wasser wurde ein Farbstoff (Kristallviolett) aufgelöst, welcher bei einer Wellenlänge von 532 nm absorbiert. Durch Anregung der Farbstoffmoleküle in einem Probenvolumen mittels Anregimpulsen bei 532 nm und der nachfolgenden Umwandlung der Anregungsenergie in Wärme konnte ein Temperatursprung von ca. 8 K erreicht werden. Für das Abkühlen des entsprechenden Probenvolumens aus dem Lösungsmittel D₂O wurde eine Zeitkonstante von ca. $\tau_{kühlen}=1,7$ ms gefunden [Lut97].

Aus obiger Betrachtung zur Größe der Wärmediffusivität in Methanol und in Wasser lässt sich ableiten, dass diese Zeitkonstante von $\tau_{kühlen}=1,7$ ms für das hier verwendete Methanol ähnlich groß sein wird.

Die hier gemessene Zeitkonstante von 30 μ s kann also nicht mit einem Abkühlen des Probenvolumens erklärt werden, da dieses auf einer viel größeren Zeitskala von Millisekunden stattfinden sollte.

5.3.3 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse zur Faltung der β -Hairpin Struktur

Die in Abbildung 5.17 gezeigte Dynamik des AzoTrpZip2 mit einer Zeitkonstante von 30 μ s kann als Faltung der β -Hairpin Struktur interpretiert werden. Die Messung zeigt, dass diese Faltungsreaktion nach ca. 100 μ s abgeschlossen ist.

Betrachtet man die Transienten des AzoTrpZip2 in Abbildung 5.16 so fällt auf, dass die Signale zwischen 1 ns und 3 ns im wesentlichen konstant bleiben. Dies gilt auch für die Daten aus Abbildung 5.17 zwischen 10 ns und ca. 1 μ s. Stimmt die Skalierung der Daten in Abbildung 5.17, lässt dies auf ein Faltungsintermediat im Zeitbereich zwischen 1 ns und 1 μ s schließen, das über einen langen Zeitraum Bestand hat.

Eine weitere bemerkenswerte Tatsache ist der Unterschied in den Zeitkonstanten für die Entfaltung der β -Hairpin Struktur und deren Bildung. Während die Entfaltung auf der Pikosekundenzeitskala stattfindet (siehe Kapitel 5.2), benötigt deren Faltung einige 10 μ s. Auf die Hintergründe für diesen Unterschied geht das Diskussionskapitel 6 ein.

6 Diskussion der experimentellen Ergebnisse

Es gibt zwei Wege, sich den in den vorigen Kapiteln vorgestellten Daten und experimentellen Befunden zu nähern. Zunächst kann man auf qualitativem Niveau die beobachteten Zeitkonstanten für die Bildung der β -Hairpin Struktur sowie deren Entfaltung zu einem Ensemble aus trans-Isomeren des AzoTrpZip2 im Zusammenhang mit den Daten aus der NMR-Spektroskopie (Kapitel 6.1) und der weiteren Literatur über β -Hairpin Modellpeptide diskutieren (siehe hierzu Kapitel 6.2 und 6.5).

Der zweite Ansatz besteht darin, die Beobachtungen mit Ergebnissen aus der Molekulardynamiksimulation zu vergleichen. Dadurch können weitergehende strukturelle Informationen gewonnen werden (Kapitel 6.3).

6.1 Diskussion des Vergleichs zwischen dem Modellpeptid AzoTrpZip2 und dem Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂

Ein wesentliches Thema in dieser Arbeit war der Vergleich der experimentellen Befunde des AzoTrpZip2, dessen cis-Isomer eine β -Hairpin Struktur von besonderem Interesse ausbildet, mit einem Referenzpeptid, dem Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Damit sollte die Eignung des Modellsystems AzoTrpZip2 für die Beantwortung biologisch relevanter Fragestellungen beleuchtet werden. Insbesondere sollte die Frage behandelt werden, inwieweit der Schalter AMPP die Dynamik des Gesamtsystems beeinflusst.

Die NMR-Strukturanalyse ergibt, dass das Referenzpeptid als cis-Isomer eine β -Turn Struktur aufweist, welche in ähnlicher Ausprägung im cis-Isomer des AzoTrpZip2 auftritt. Strukturell gibt es hier also durchaus Ähnlichkeiten. Ein Vergleich der Spektren im sichtbaren Spektralbereich zeigt bei den Banden des Azobenzols ebenfalls eine große Übereinstimmung der beiden Moleküle. Da das Referenzpeptid nur aus den jeweils dem Photoschalter AMPP nächstgelegenen Aminosäuren des AzoTrpZip2 besteht, fehlen ihm trivialerweise die charakteristischen Absorptionsbanden der Tryptophanseitenketten unterhalb von 300 nm (vgl. Abb. 4.17).

Die transienten Daten zeigen im sichtbaren Spektralbereich im Fall des Referenzpeptids ähnliche Zeitkonstanten und Dynamiken wie sie auch beim Azobenzol zu beobachten sind. Ganz im Gegensatz dazu weisen die Dynamiken des AzoTrpZip2 im sichtbaren Spektralbereich auch sehr viel größere Zeitkonstanten auf. Dies kann mit einer Rückwirkung des in einem Umfaltungsprozess begriffenen Peptids auf den Azobenzolschalter erklärt werden. Hier gibt es also die ersten Hinweise auf die Peptiddynamik von Aminosäuren der Stränge, welche diese spektralen Veränderungen auf Zeitskalen verursachen, bei denen das Referenzpeptid keine Dynamik mehr aufweist.

Das Dauerstrich-Infrarotspektrum des Referenzpeptids im Bereich der Amid-I' Bande hat große spektrale Ähnlichkeit mit dem des AzoTrpZip2: Beide weisen ein Maximum bei 1675 cm^{-1} und eine niederfrequente Schulter auf. Das Bandenintegral des Referenzpeptids beträgt jedoch nur etwa die Hälfte desjenigen des AzoTrpZip2, was die geringere Anzahl von dazu beitragenden Carbonyloszillatoren reflektiert. In den Differenzspektren zwischen cis- und trans-Isomer zeigen sich bei beiden Peptiden deutlich die Banden des AMPP-Schalters bei 1585 cm^{-1} und bei 1600 cm^{-1} .

Die zeitaufgelösten Messungen im Spektralbereich der Amid-I' Bande ergaben für die Isomerisierungsrichtung vom trans- in das cis-Isomer des Schalters AMPP für den Zeitbereich bis 3 ns geringe Unterschiede zwischen AzoTrpZip2 und seinem Referenzpeptid. Erst mit einer Zeitkonstante von $30\text{ }\mu\text{s}$ wurde im Fall des AzoTrpZip2 eine Dynamik beobachtet, die der Faltung der β -Hairpin Struktur zugeordnet wurde.

Für die Entfaltung der β -Hairpin Struktur können im frühen Zeitbereich ($< 100\text{ ps}$) nach Auslösen der Isomerisierung des Schalters AMPP von cis nach trans Ähnlichkeiten in den Signalen des AzoTrpZip2 und des Referenzpeptids beobachtet werden, welche auf Prozesse wie zum Beispiel Kühlen und die Anregung von niederfrequenten Moden zurückgeführt werden können, welche in beiden Proben ablaufen. In der hochfrequenten Flanke der Amid-I' Bande finden sich aber auch in diesem Zeitbereich dezidierte Unterschiede in den Signalen. Endet der weitaus größte Teil der Peptiddynamik im Referenzpeptid bei einer Verzögerungszeit von 150 ps , so findet sich im Falle des AzoTrpZip2 noch deutlich der Aufbau einer Bande bei 1660 cm^{-1} mit einer Zeitkonstante von 630 ps . Außerdem ist bei einer Verzögerungszeit von $3,1\text{ ns}$ das Dauerstrichdifferenzspektrum noch nicht vollständig erreicht (verbleibende spektrale Verschiebung von ca. 3 cm^{-1}). Dies deutet darauf hin, dass im AzoTrpZip2 Peptid noch nicht alle strukturellen Reorganisationsprozesse abgeschlossen sind. Diese Unterschiede zum Referenzpeptid erlauben den Schluss, dass man nicht nur die Dynamik der schalternahen Aminosäuren des AzoTrpZip2 beobachtet, sondern dass in der Tat auch in schalterfernen Bereichen Strukturänderungen ablaufen. Dieses Ergebnis ist eine wichtige Voraussetzung, um im Zusammenhang mit dem Modellpeptid AzoTrpZip2 von einer Peptiddynamik der Bildung und Entfaltung einer β -Hairpin Struktur zu sprechen.

6.2 Modell der Energielandschaft des AzoTrpZip2

Besteht das Peptid AzoTrpZip2 aus N Atomen, hängt dessen Energie von $3N-6$ kartesischen Koordinaten und von den Koordinaten der Lösungsmittelmoleküle ab, welche sich in einer Lösungsmittelschale um das Peptid AzoTrpZip2 befinden. Die drei Koordinaten des Schwerpunkts, sowie die drei Eulerschen Winkel der Ausrichtung des gesamten Moleküls AzoTrpZip2 haben bei hinreichend verdünnten Lösungen, in denen keine Wechselwirkungen zwischen einzelnen gelösten Molekülen AzoTrpZip2 auftreten, keinen Einfluss auf die Energie des AzoTrpZip2. Diese Energiefunktion ist aber dennoch hochdimensional. Eine anschauliche Darstellung solcher Energielandschaften ist nur möglich, wenn man sich auf wenige Koordinaten beschränkt, welche als Reaktionskoordinaten bezeichnet werden. Abhängig vom Modellsystem haben diese Reaktionskoordinaten eine unterschiedliche Bedeutung. In der Literatur finden sich solche sogenannten Energie-

landschaften meist in Abhängigkeit von einer [Bre05b, Bre03d] und zwei Reaktionskoordinaten [Zho01].

Die experimentellen Ergebnisse aus den vorigen Kapiteln über das Modellpeptid AzoTrpZip2 sollen durch eine Darstellung der freien Energie in Abhängigkeit von zwei Reaktionskoordinaten zusammengefasst werden. Als System werde hier ein thermodynamisches Ensemble aus Peptiden AzoTrpZip2 mit ihrer Lösungsmittelschale betrachtet. Es befindet sich in thermischen Kontakt mit einem Wärmebad, das durch das weitere umgebende Lösungsmittel Methanol-d4 und letztlich durch die Raumluft gebildet wird. Die Temperatur dieses Wärmebads bleibt konstant bei Raumtemperatur.

Abbildung 6.1(a) zeigt schematisch die freie Energie des Systems für zwei Reaktionskoordinaten. Eine davon bezeichnet die Isomerisierungscoordinate des Chromophors AMPP. Die andere beschreibt den Zustand der Aminosäuren der Stränge des Peptids während der Reaktion. Dabei ist hier unter “cis“ eine Probe zu verstehen, in der zu ca. 45 % ausgebildete β -Hairpin Strukturen der Aminosäuren der Stränge (im Sinne der NMR-Struktur aus Abbildung 4.11) vorliegen und der Rest ungefalteter ist. Mit “trans“ sei die Anordnung der Aminosäuren der Stränge entsprechend dem trans-Ensemble des AzoTrpZip2 gemeint. Der Ort auf der Energielandschaft der freien Energie $G(x_{chrom}, x_{peptide})$, der sich am Ende des gelben Pfeils befindet entspricht also einem cis-Isomer des Chromophors, bei dem jedoch die Stränge des Modellpeptids noch im wesentlichen in der trans-Konformation vorliegen. Erst nach einiger Zeit reagieren die Stränge mit entsprechenden Ausgleichsbewegungen auf die neue Konformation des Chromophors und nehmen auch die cis-Konformation an, was einer Evolution entlang der blauen Linie entspricht.

Die Endzustände der Faltungsprozesse sowie die vermuteten Intermediate sind als lokale Minima in Abbildung 6.1(a) modelliert. Für jeden solchen Zustand i wurde eine zweidimensionale gaußsche Normalverteilung $p_i(x_{chrom}, x_{peptide})$ angenommen:

$$p_i(x_{chrom}, x_{peptide}) = \frac{1}{2\pi\sigma_{chrom}^i\sigma_{peptide}^i} \exp\left(-\frac{(x_{chrom} - x_{chrom}^{i,0})^2}{2(\sigma_{chrom}^i)^2}\right) \exp\left(-\frac{(x_{peptide} - x_{peptide}^{i,0})^2}{2(\sigma_{peptide}^i)^2}\right) \quad (6.1)$$

Dabei werden mit σ_{chrom}^i und $\sigma_{peptide}^i$ die Standardabweichungen entlang der Chromophorreaktionscoordinate bzw. entlang der Peptidreaktionscoordinate der entsprechenden Normalverteilungen bezeichnet. Die zentralen Koordinaten dieser Normalverteilungen sind $x_{chrom}^{i,0}$ und $x_{peptide}^{i,0}$. Insgesamt neun solche Normalverteilungen wurden zur Erzeugung obiger Abbildung verwendet, wobei jedoch nur sieben davon ein signifikantes statistisches Gewicht s_i bekommen haben und deswegen in Abb. 6.1(b) als Minima erkennbar sind. Es sind dies die beiden Intermediate und der Endzustand des cis-Ensembles auf der blauen Linie und der Endzustand (trans-Ensemble) und die beiden Intermediate auf der roten Linie. Dem Endzustand des trans-Ensembles auf der roten Linie wurde ein kleines Energieminimum vorgelagert, das andeuten soll, dass nach 3,1 ns bei der Reaktion von cis nach trans des AzoTrpZip2 das stationäre Spektrum im Bereich

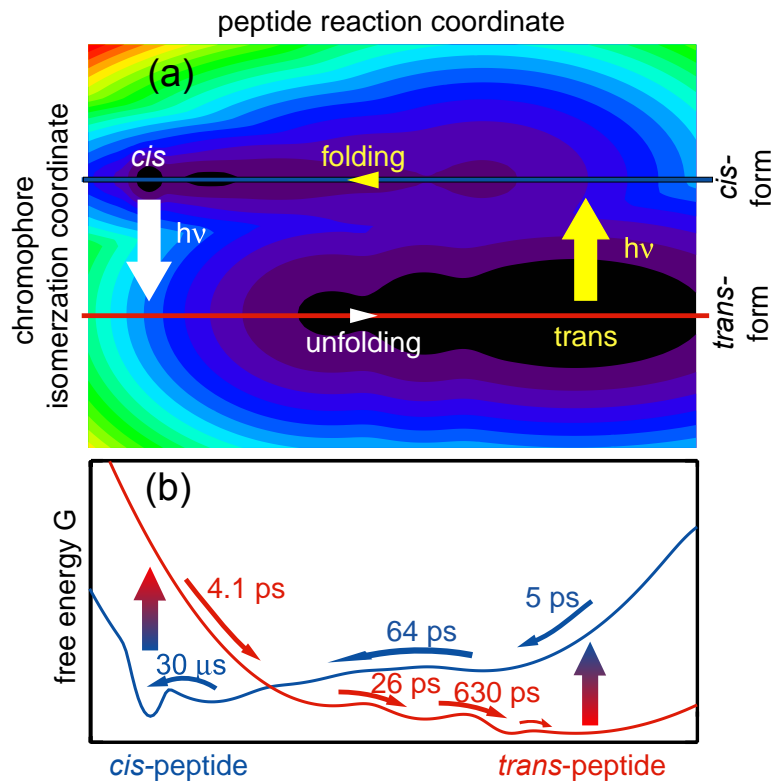


Abbildung 6.1: Modell der Energielandschaft des AzoTrpZip2. Der obere Bildteil zeigt eine zweidimensionale Darstellung der freien Energie des AzoTrpZip2 in Abhängigkeit von Peptid- und Chromophorreaktionskoordinate. Die Ordinate stellt dabei die Peptidreaktionskoordinate dar. Sie beschreibt den Faltungsgrad der Stränge des AzoTrpZip2, wobei "trans" eine Anordnung der Stränge bedeutet, wie sie in den NMR-Strukturen des trans-Isomers des AzoTrpZip2 gefunden werden. "cis" bezeichnet eine ausgebildete β -Hairpin Struktur. Die Abszisse stellt die Isomerisierungskoordinate des Chromophors AMPP dar. Hier bedeutet "trans" einen Chromophor in der trans-Konformation. Durch Photoanregung isomerisiert zum Beispiel der Chromophor von trans nach cis (gelber Pfeil), das Peptid bleibt jedoch zunächst in der trans-Konformation und entwickelt sich im Laufe der Zeit erst zur cis-Konformation (blaue Linie). Der untere Teil der Abbildung zeigt einen Schnitt entlang der blauen Linie der freien Energie aus dem oberen Bildteil (blaue Kurve), entsprechend für die rote Linie. Die Pfeile deuten wieder die Photoanregung an.

der Amid-I' Bande noch nicht ganz erreicht ist. Qualitativ sind sich dieses stationäre Differenzspektrum und das transiente Spektrum bei 3,1 ns jedoch schon recht ähnlich (bis auf eine Verschiebung von 3 cm^{-1}). Die freie Energie $G(x_{chrom}, x_{peptide})$ wurde als natürlicher Logarithmus aus der statistisch gewichteten Summe der Normalverteilungen gewonnen:

$$G(x_{chrom}, x_{peptide}) = \log_e \sum_{i=1}^8 s_i p_i(x_{chrom}, x_{peptide}) \quad (6.2)$$

Alle für die Abbildung nötigen Parameter wurden so gewählt, dass sie für die experimentell beobachteten Zeitkonstanten und Intermediate eine möglichst schlüssige Erklärung liefern. Die Abbildung beruht also nicht direkt auf experimentell gemessenen Parametern, sondern dient lediglich einer Veranschaulichung. Die zu Intermediaten gehörigen

Normalverteilungen wurden so angeordnet, dass kleine Barrieren in der freien Energie zum Endzustand hin existieren. Zudem wurde darauf geachtet, dass der Endzustand des trans-Chromophors zusammen mit einem Peptid in trans-Konformation energetisch niedriger liegt als ein cis-Chromophor mit einem Peptid in der cis-Konformation. Dadurch lässt sich die Tatsache modellieren, dass sich ein cis-AzoTrpZip2 Isomer auf einer langen Zeitskala thermisch in sein trans-Konformer umwandelt, letzteres also thermodynamisch stabiler ist.

Den Schnitt durch die Abbildung 6.1(a) entlang der blauen Linie zeigt die blaue Kurve in Abbildung 6.1(b). Hier wurde ein weitgehend monotoner Potentialverlauf mit zwei Intermediaten modelliert. Die Energiebarriere zum Endzustand ruft die Zeitkonstante von $30 \mu\text{s}$ hervor. Die Tatsache, dass der cis-Zustand des AzoTrpZip2 relativ gut definiert ist, wird durch eine Normalverteilung mit kleinen Werten für die Standardabweichungen σ_{chrom}^i und $\sigma_{peptide}^i$ abgebildet. Die große konformationelle Vielfalt der Endzustände des trans-AzoTrpZip2 wurde durch eine sehr große Standardabweichung der Normalverteilung entlang der Peptidkoordinate wiedergegeben.

Kurz nach Photoanregung des Chromophors befindet sich dieser im elektronisch angeregten S_1 Zustand, d. h. nicht auf der gezeichneten S_0 -Potentialfläche. Erst nach dem Übergang in den elektronischen Grundzustand in wenigen Pikosekunden kann dem Chromophor wieder eine Konformation im Sinne von eher cis oder eher trans zugeordnet werden. Nach Übergang des Chromophors in den elektronischen Grundzustand wird es also so sein, dass die Faltung entlang der blauen Kurve der Abbildung 6.1(a) in der Nähe der Spitze des gelben Pfeils beginnen. Obige Abbildung beschreibt ein stark vereinfachtes Modell. Es berücksichtigt hierbei keine Verzweigung in verschiedene Faltungspfade und auch kein paralleles Auftreten von verschiedenen Intermediaten.

Die bislang dargestellte freie Energielandschaft unterscheidet sich auch grundsätzlich von derjenigen, die durch Erhitzen eines cis-AzoTrpZip2 in Lösung gewonnen werden kann. Beim Erhitzen betrachtet man zwar dasselbe thermodynamische System, jedoch verändert nun auch das Wärmebad seine Temperatur. Erwärmt man das Peptid mit seiner Lösungsumgebung, so werden auch andere Anordnungen des Systems eingenommen, als bei der lichtinduzierten Reaktion. Man befindet sich also auf der Potentialfläche von $G(T,p)$, wobei T die Temperatur und p den Druck bedeuten. Mit anderen Worten: Das langlebige Intermediat (Zerfallszeitkonstante $30 \mu\text{s}$), das in den zeitaufgelösten Messungen zur Faltung der β -Hairpin Struktur auftritt, muss nicht unbedingt identisch sein mit dem offenen Zustand, mit dem sich die β -Hairpin Struktur des cis-AzoTrpZip2 im thermodynamischen Gleichgewicht befindet.

Über die Veranschaulichung experimenteller Daten hinaus können Energielandschaften zum Vergleich mit theoretisch simulierten Daten herangezogen werden. Durch geeignete Molekulardynamiksimulationen können Informationen über die Energie des Systems "Peptid AzoTrpZip2 mit Lösungsmittelschale" in Abhängigkeit von der betrachteten Reaktionskoordinate gewonnen werden. Diese Informationen können ebenfalls als Energielandschaft dargestellt werden und mit den experimentellen Befunden abgeglichen werden.

6.3 Strukturelle Aussagen über die Berechnung von Infrarotspektren

Ein Ziel der zeitaufgelösten Messungen an dem Modellpeptid AzoTrpZip2 war es, dessen Faltung hin zu einer β -Hairpin Struktur zu beobachten. Aber auch die Entfaltung einer β -Hairpin Struktur und die Bildung des Ensembles aus trans-Strukturen des AzoTrpZip2 ist von Interesse. Die Experimente zeigen, dass letzteres auf Zeitskalen geschieht, die für qualitativ hochwertige Molekulardynamiksimulationen (MD-Simulationen) zugänglich sind. Im folgenden werden erste Ansätze gezeigt, wie die experimentellen Daten für die Isomerisierungsrichtung vom cis-Isomer des AzoTrpZip2 in sein trans-Isomer dazu dienen können, entsprechende MD-Simulationen zu verifizieren. Diese Verifikation läuft über die Berechnung von Infrarotspektren aus Strukturen, die aus den MD-Simulationen stammen und deren Vergleich mit den entsprechenden experimentell gemessenen Spektren. Wird daher festgestellt, dass die so berechneten Infrarotspektren gut mit den experimentell gemessenen übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass die Strukturen aus den MD-Simulationen ein gutes Abbild der Realität liefern. In diesem Fall können diese Strukturen analysiert werden, um so Faltungspfade zu identifizieren. Auch die Struktur von Intermediaten lässt sich so angeben. Damit wäre das Ziel erreicht, die Peptiddynamik der Entfaltung einer β -Hairpin Struktur in dem hier betrachteten Modellsystem zu verstehen.

Die experimentell gemessenen Infrarotspektren allein enthalten bei weitem nicht genügend Informationen, um genau auf die Struktur eines Peptids schließen zu können. Bei einem Ensemble von möglichen Strukturen wird diese Möglichkeit noch weiter eingeschränkt. Deshalb müssen in einer erfolgreichen Analyse noch zusätzliche Informationen einfließen, die durch die Molekulardynamiksimulationen geliefert werden.

Leider können bei Molekulardynamiksimulationen eine Reihe von Unzulänglichkeiten auftreten: (i) MD-Simulationen beruhen auf den sogenannten Kraftfeldern, die Potentialverläufe entlang von Bindungswinkeln und -längen vorgeben. Diese Kraftfelder wurden empirisch gewonnen und unterschiedliche Kraftfelder finden in den MD-Simulationen Verwendung. (ii) MD-Simulationen basieren auf der Lösung der klassischen Bewegungsgleichungen mit den Potentialverläufen aus den Kraftfeldern. (iii) Auch die Wahl des Lösungsmittelmodells beeinflusst unter Umständen das Ergebnis der Simulationen. (iv) Nicht alle Wechselwirkungen werden exakt berücksichtigt. (v) Qualitativ hochstehende Simulationen sind nur für kleine Systeme oder kurze Zeiten zugänglich.

Die hier verwendeten MD-Simulationen versuchten eine hohe Qualität durch ein gutes Lösungsmittelmodell für das deuterierte Methanol und Trajektorienlängen von vielen Nanosekunden zu liefern. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten MD-Simulationen wurden von Robert Denschlag durchgeführt und sind Teil seiner Dissertation. Hier soll deswegen nur kurz auf die Details der MD-Simulationen eingegangen werden:

Die Vorgehensweise bei der Simulation der Entfaltungswege eines Peptids wie des AzoTrpZip2 besteht zunächst darin, ein thermodynamisches Ensemble für den Ausgangszustand zu generieren. Es wird dabei durch Berechnung einer ausreichend langen MD-Simulationstrajektorie des cis-Isomers ein sogenanntes NpT-Ensemble an Strukturen erzeugt. Dieses Ensemble wird unter den konstant gehaltenen Parametern Teilchen-

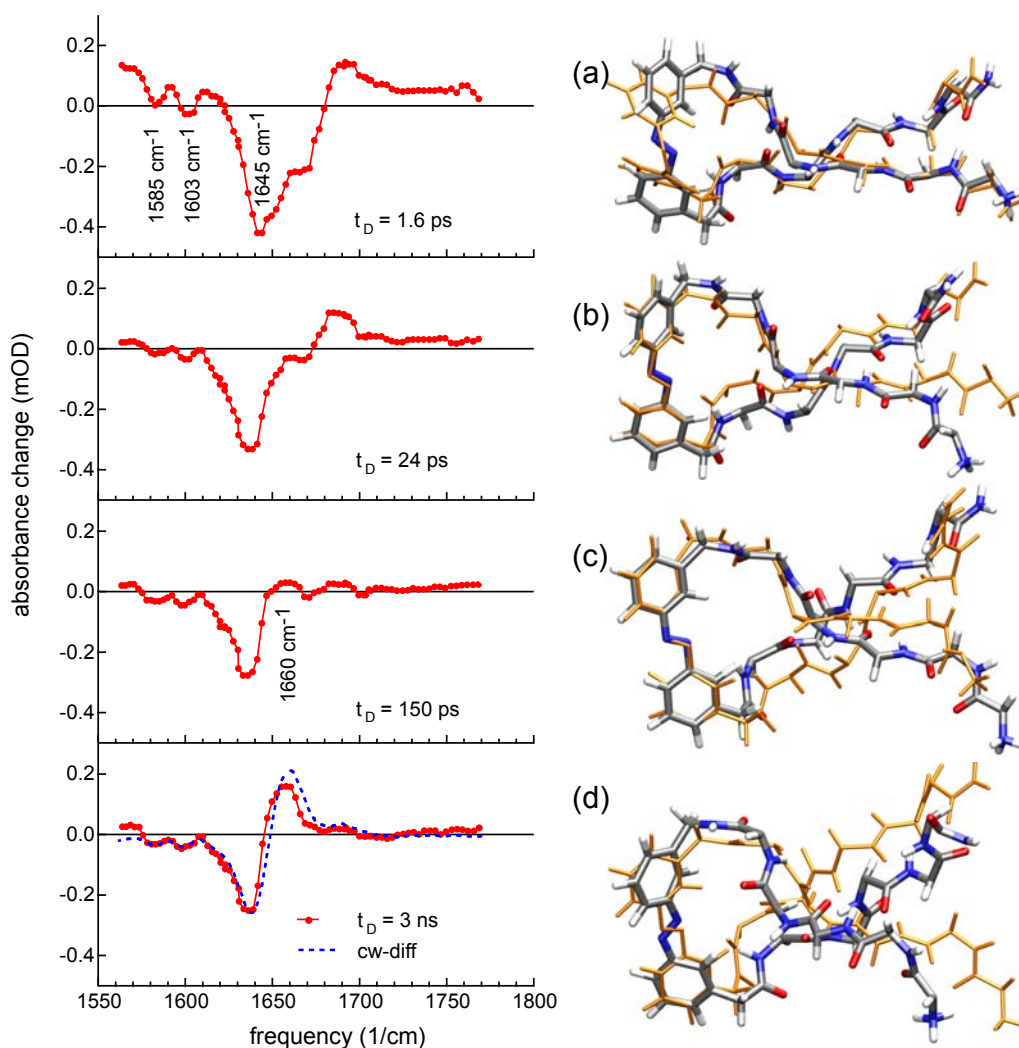


Abbildung 6.2: Gegenüberstellung der zeitaufgelösten experimentellen Daten mit Strukturen aus einer typischen Molekular dynamiksimulation. Links sind jeweils wie in Abbildung 5.8(a) die transienten Spektren zu den angegebenen Verzögerungszeiten gezeigt. Rechts davon wurde in blau/grau/rot/weiß eine typische Struktur eines Moleküls zu einer entsprechenden Zeit nach dem Isomerisieren dargestellt, wobei die vorige Struktur jeweils in braun hinterlegt wurde. Die braune Struktur in der obersten Abbildung ist das cis-Isomer, von dem aus die Isomerisierung startete. Dass die Strukturen auf der rechten Seite auch diejenigen sind, die für die Spektren auf der linken Seite verantwortlich zeichnen, ist jedoch noch nicht nachgewiesen. Diese Abbildung verdeutlicht also mehr das Konzept für die theoretischen Rechnungen, als dass sie eine strukturelle Erklärung für die experimentell gemessenen Spektren liefert.

zahl N , Druck p und Temperatur T gewonnen. Durch Methoden wie “Replica exchange solute tempering“ kann die Simulationszeit für eine solche Trajektorie verkürzt werden [Liu05]. Aus dieser Trajektorie werden zufällig repräsentative Strukturen ausgewählt, für die anschließend eine Isomerisierungstrajektorie berechnet wird¹.

¹Die zufällige Auswahl von Strukturen aus dem NpT -Ensemble kann auch durch eine gezielte Auswahl typischer Strukturen ersetzt werden. Den so entstehenden Repräsentanten muss dann noch ein geeignetes statistisches Gewicht gegeben werden. Im Falle der hier beschriebenen zufälligen Auswahl von Strukturen ist deren statistisches Gewicht untereinander jeweils gleich.

Um eine Isomerisierungstrajektorie nach einer Photoisomerisierung zu erhalten, wird durch ein spezielles Modul in der MD-Simulation eine Isomerisierung des Azobenzol-Chromophors AMPP vom cis- in das trans-Isomer herbeigeführt. Danach wird mit der Simulation fortgefahren. Es handelt sich also zu Beginn um eine Nicht-Gleichgewichts-MD-Simulation.

Aus den Isomerisierungstrajektorien wird zu einer Verzögerungszeit t_D eine gewisse Anzahl n von Strukturen identifiziert (statistisches Gewicht s_i), die das jeweilige Ensemble gut repräsentieren. Aus deren Infrarotspektrum $A_i(\lambda, t_D)$ kann das experimentell zu erwartende Infrarotspektrum des Ensembles $A(\lambda, t_D)$ berechnet werden:

$$A(\lambda, t_D) = \sum_{i=1}^n A_i(\lambda, t_D) \cdot s_i \quad (6.3)$$

Es ist wichtig, hier das Ensemble von Zuständen zu betrachten: Ultrakurzzeitspektroskopische Methoden zur Untersuchung der Peptiddynamik betrachten im allgemeinen ein Ensemble von Molekülen. Alle gemessenen Parameter geben also den Ensemblemittelwert zu einer bestimmten Verzögerungszeit nach Auslösen der Isomerisierung an. Die theoretisch berechneten Isomerisierungstrajektorien geben aber immer den Faltungspfad eines einzelnen Moleküls an. Erst durch Mittelung über Größen aus mehreren solchen Trajektorien lassen sich relevante Aussagen machen.

Um ein Infrarotspektrum des Ensembles $A(\lambda, t_D)$ nach Gleichung 6.3 zu erhalten, müssen also zunächst die Infrarotspektren aus den Einzeltrajektorien $A_n(\lambda, t_D)$ berechnet werden. Im folgenden werden zwei Methoden vorgestellt, Infrarotspektren aus Strukturdaten zu berechnen. Eine Methode geht dabei von einer quantenmechanischen ab initio Berechnung aus, der Dichtefunktionaltheorie. Die zweite Methode berücksichtigt nur die Kopplung der Carbonylzitteratoren der Amid I Bande mittels der Übergangsdipolmomentkopplung (engl. transition dipole coupling, TDC). Der Aufwand für Dichtefunktionaltheoretische Methoden steigt mit der Zahl der Atome eines Systems, für das das Infrarotspektrum berechnet werden soll, stark an. Deswegen wurden die extrem aufwändigen Berechnungen am Modellsystem des AzoTrpZip2 in Methanol-d4 von Galina Babitzki in der Gruppe Tavan durchgeführt und sind Teil ihrer Doktorarbeit. In der vorliegenden Arbeit konnten nur Berechnungen an dem kleineren Referenzpeptid in Vakuum durchgeführt werden. Sie werden im folgenden vorgestellt und diskutiert.

6.3.1 Dichtefunktionaltheoretische Methoden

Die Dichtefunktionaltheorie (DFT) beruht auf dem Hohenberg-Kohn-Theorem [Kin07], wonach zur Beschreibung des Grundzustands eines Moleküls die Kenntnis seiner Elektronendichteverteilung $\rho^0(\vec{r})$ ausreicht. Zugrunde liegt dabei noch die Born-Oppenheimer Näherung, die eine Separierung der Elektronen- von der Kernbewegung erlaubt. Die Elektronendichteverteilung läßt sich mittels der Kohn-Sham-Gleichungen [Koh65] in einem selbstkonsistenten Verfahren berechnen. Durch Verwendung von empirisch parametrisierten Austausch- und Korrelationsfunktionalen ist die DFT Methode in der Lage, auch Elektron-Elektron-Wechselwirkungen (Elektronenkorrelationen) zu berücksichtigen.

sichtigen [Bec93, Lee88]. Einen tieferen Einblick in die Dichtefunktionaltheorie bieten Lehrbücher wie [You01] und [Koc01].

In dieser Arbeit wurde ein Hybridfunktional, B3LYP, verwendet [Bec93]. Das hier zur Berechnung herangezogene Programm gaussian98 der Firma Gaussian, Inc. benutzt gaussförmige Funktionen, um die Elektronendichte zu beschreiben. Der Basissatz der Rechnungen zu Abbildung 6.3(b) wird mit 6-31G** abgekürzt und bedeutet, dass pro Atom 6 Gaussfunktionen die Rumpfelektronen und zwei verschieden ausgedehnte Sätze von Gaussfunktionen die Valenzelektronen repräsentieren. Einer dieser Sätze enthält 3 einfache Gaussfunktionen, der andere eine. Die beiden Sterne deuten an, dass am Wasserstoff p-artige Funktionen und an den Elementen der zweiten Periode auch d-artige Funktionen auftreten können. Dadurch kann erreicht werden, dass die einzelnen Atome auch polarisierbar sind.

Die Rechnungen aus Abbildung 6.3(b) wurden für ein Molekül im Vakuum durchgeführt. Das bedeutet, dass keinerlei Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel berücksichtigt wurden. Zunächst wurde ausgehend von einer im Programm Molden4.0 angefertigten Startkonfiguration die Geometrie des Moleküls mittels des Funktionals B3LYP und des Basissatzes 6-31G** im Programm gaussian98 optimiert. Darauf wurde mit denselben Einstellungen eine Normalmodenanalyse durchgeführt. Alle dargestellten Frequenzen wurden mit dem Faktor 0,9613 skaliert [Plu02].

Da sich ungleichnamige Ladungen im Vakuum sehr stark anziehen würden, wurde nicht die zwitterionische Konfiguration des Moleküls Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ aus Abbildung 4.8(b) bei den Rechnungen angenommen, sondern ein neutrales Molekül, bei dem die Säuregruppe des Glutamats protoniert und die Aminofunktion des Lysins in neutraler Form als NH₂ vorliegt. Die so mittels Dichtefunktionaltheorie berechneten Spektren des nicht-deutერიerten (strichpunktierte Linie) und des vollständig deutერიerten (durchgezogene Linie) Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ in Vakuum sind in Abbildung 6.3(b) gezeigt, wobei für jede berechnete Normalmode eine gaußsche Linienform mit einer Breite von 15 cm⁻¹ (FWHM) angenommen wurde. Das deutერიerte Molekül Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂-d₈ weist acht Deuteriumatome an Stelle von Wasserstoffatomen auf. Es wurde also angenommen, dass alle sieben, an Stickstoffatomen gebundene Wasserstoffatome gegen Deuterium austauschen. Das achte ausgetauschte Wasserstoffatom befindet sich an der Säuregruppe des Glutamats.

Prinzipiell existieren für das trans-Isomer des Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ drei unterscheidbare Konformere, je nach Lage der meta-substituierten Gruppen in Relation zur Azokupplung (N=N). Erst wenn man das Infrarotspektrum aller drei (deutერიerten) Konformere und deren energetische Lage zueinander berechnet, kann man eine gewichtete Mittelung nach Gleichung 6.3 durchführen und einen sinnvollen Vergleich zum experimentellen Spektrum erhalten. Der Aufwand für die Berechnung² erlaubte jedoch keine systematische Bestimmung der Infrarotspektren aller Konformere. Deswegen wurden in Abbildung 6.3(b) exemplarisch nur die Spektren eines Konformers dargestellt.

Abbildung 6.3(a) zeigt ein Infrarotspektrum des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ kurz nach dessen Lösung in Methanol-d₄ (strichpunktierte Linie). Da dieses Spektrum eine Minute nach dem Auflösen aufgenommen wurde, kann davon ausgegangen

²Eine Struktur erforderte ca. 30 Tage Rechenzeit auf einem handelsüblichen Rechner.

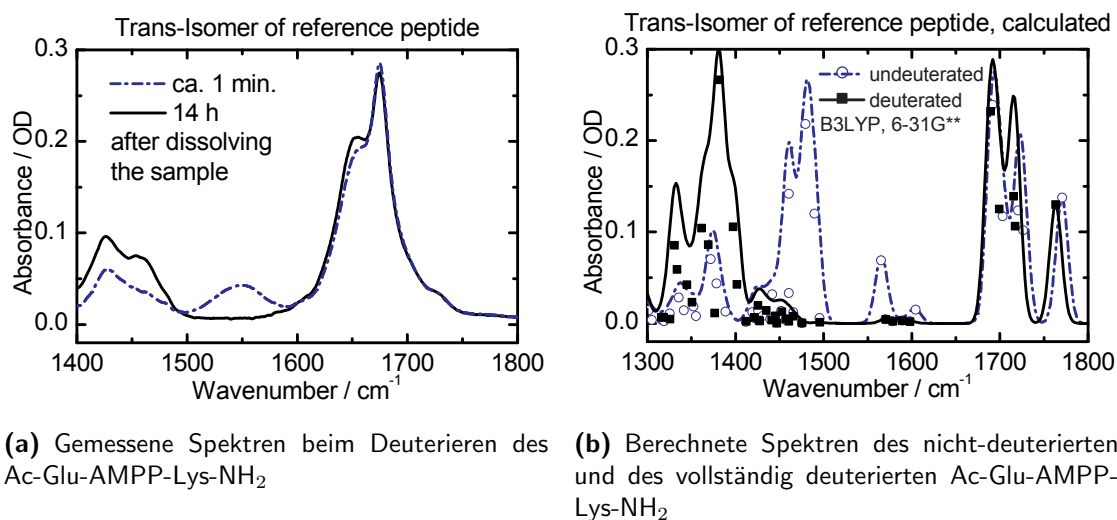


Abbildung 6.3: Vergleich zwischen gemessenen und berechneten spektralen Änderungen aufgrund des Deuterierens des Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Die durchgezogenen Linien bezeichnen jeweils ein gerechnetes bzw. gemessenes Spektrum eines vollständig deuterierten Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Die strichpunktierte Linie in Abbildung 6.3(a) wurde ca. 1 Minute nach dem Auflösen der Probe in Methanol-d₄ gemessen, zeigt also ein weitgehend noch undeutertes Spektrum des Referenzpeptids. Im rechten Teil der Abbildung wurden die strichpunktierte und die durchgezogene Linie (deutert) jeweils durch Faltung der berechneten Schwingungsfrequenzen und -intensitäten mittels gaußschen Linienformen der Breite 15 cm⁻¹ (FWHM) gewonnen. Die offenen Kreise und gefüllten Quadrate deuten die berechneten Schwingungsfrequenzen und -intensitäten ohne eine solche Faltung an.

werden, dass der Deuterierungsprozess noch nicht abgeschlossen ist. Die durchgezogene Linie wurde hingegen 14 Stunden nach dem Auflösen gemessen zu einem Zeitpunkt, ab dem sich keine spektralen Änderungen aufgrund der Deuterierung mehr ergaben. Bei letzterem Spektrum kann also angenommen werden, dass es sich hierbei um das Spektrum eines vollständig deuterierten Moleküls Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂-d₈ handelt. Die Abbildung 6.3(a) entspricht somit der Abbildung 4.20(a), welche die Effekte der Deuterierung auf das Infrarotspektrum des Peptids AzoTrpZip2 darstellt.

Der Deuterierungseffekt bei Schwingungsspektren beruht auf einer Änderung der reduzierten Masse, die an der jeweiligen Normalmode beteiligt ist. Die Kraftkonstanten bleiben in erster Näherung gleich. Über die spektrale Verschiebung, die aufgrund der Deuterierung beobachtet wird, lassen sich also Rückschlüsse auf die beteiligten reduzierten Massen und damit auch auf die Bewegungsform der entsprechenden Normalmode machen. Dies erleichtert eine Bandenzuordnung in den experimentellen Spektren, welche somit unabhängig von theoretisch berechneten Spektren erfolgen kann. Auf diese Weise kann man zum Beispiel eindeutig die Amid-II Schwingung im experimentellen Spektrum im undeuterten Fall der beobachteten Bande bei 1550 cm⁻¹ zuordnen. Diese Bandenlage kann nun mit der theoretisch berechneten verglichen werden. Die Bewegungsformen der theoretisch berechneten Normalmoden wurden mit dem Programm Molden4.0 dargestellt und aufgrund der stärksten beobachteten strukturellen Änderungen bestimmten Schwingungsformen zugeordnet, siehe dazu Tabelle 6.1.

Die Deuterierung weist wenig spektrale Einflüsse auf die berechnete Amid-I Bande um 1700 cm^{-1} auf. Diese Tatsache stimmt mit dem experimentellen Befund überein. Der Haupteinfluss der Deuterierung liegt auf der Amid-II Bande (nicht deuteriert gerechnet zwischen 1450 cm^{-1} und 1500 cm^{-1}): Sie findet sich im deuteriert gerechneten Molekül unterhalb von 1400 cm^{-1} . Der Vergleich mit den experimentellen Werten ca. 1550 cm^{-1} undeuteriert bzw. ca. 1450 cm^{-1} deuteriert zeigt, dass die Bandenlagen von der DFT-Berechnung nicht sehr genau wiedergegeben werden.

Tabelle 6.1 werden die intensiveren berechneten Normalmoden des undeuterierten Referenzpeptids aufgelistet. Wegen ihrer geringen Intensität nicht aufgeführt wurden vier Normalmoden zwischen 1560 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} , welche C=C Streckschwingungen der Benzolringe des Schaltermoleküls zugeordnet werden können. Sie verschieben sich durch die Deuterierung kaum. Da sie aber vermutlich durch die cis-trans-Isomerisierung beeinflusst werden, sind sie Kandidaten für die in Abbildung 4.22 beobachteten Differenzbanden des Schaltermoleküls bei 1583 cm^{-1} und bei 1600 cm^{-1} .

Wellenzahl	Intensität	Bewegungsform
1770 cm^{-1}	0,137	Carbonylstreckschwingung der Glutamatseitenkette
1726 cm^{-1}	0,102	Carbonylstreckschwingung des amidierten C-Terminus
1720 cm^{-1}	0,123	Carbonylstreckschwingung des acetylierten N-Terminus
1703 cm^{-1}	0,117	Carbonylstreckschwingung der Peptidbindung Glu-AMPP
1691 cm^{-1}	0,239	Carbonylstreckschwingung der Peptidbindung Lys-AMPP
1604 cm^{-1}	0,015	Scherenschwingung der Aminogruppe der Lys-Seitenkette
1565 cm^{-1}	0,069	Scherenschwingung der Aminofunktion am C-Terminus
1490 cm^{-1}	0,120	Amid II der Peptidbindung Glu-AMPP
1480 cm^{-1}	0,218	Amid II der Peptidbindung Lys-AMPP
1460 cm^{-1}	0,142	Amid II des acetylierten N-Terminus

Tabelle 6.1: Gerechnete Normalmoden des undeuterierten trans-Isomers des Referenzpeptids. Die Frequenzen wurden mit dem Faktor 0,9613 skaliert. Die Intensitäten sind in willkürlichen Einheiten angegeben (engl. arbitrary units, a. u.). Die Bewegungsformen stellen eine Beschreibung der größten Änderungen von Abständen und Winkeln des Moleküls bei der entsprechenden Normalmode dar.

Die intensivsten Banden, welche in Tabelle 6.1 aufgeführt sind, stammen von den Seitenketten der Aminosäuren oder von den Peptidbindungen, nicht jedoch vom Schaltermolekül Azobenzol. Dies stimmt ebenfalls mit der experimentellen Beobachtung überein, wo die Schalterbanden bei 1583 cm^{-1} und bei 1600 cm^{-1} im Absorptionsspektrum kaum sichtbar sind. Obschon die gerechneten Normalmoden in der Amid-I Bande überwiegend der Streckschwingung einer bestimmten Carbonylfunktion zugeordnet werden können, sind doch weitere Gruppen beteiligt. Zum Beispiel findet man eine Kopplung zwischen der Carbonylstreckschwingung der Peptidbindung Lys-AMPP zu derjenigen des amidierten C-Terminus. Es existieren sogar schwache Kopplungen von einem Strang des Referenzpeptids zum anderen. Zum Beispiel koppelt die Carbonylstreckschwingung des acetylierten N-Terminus mit der des amidierten C-Terminus.

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass die DFT Berechnungen der Banden des Referenzmoleküls Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ im Vakuum zwar eine qualitative Über-

einstimmung mit den experimentellen Daten liefert, jedoch keine zuverlässigen quantitativen Aussagen möglich sind. Insbesondere ist eine präzise Bandenzuordnung mittels der berechneten Spektren nicht sinnvoll.

Die Schwierigkeiten bei den DFT Berechnungen im Vakuum liegen darin, dass man in den Berechnungen keine Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel und auch nicht die korrekte Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels berücksichtigt hat. Auch beinhaltet die Methode der DFT keine anharmonischen Effekte. Auch die Elektron-Elektron-Wechselwirkungen werden nicht exakt berücksichtigt.

Eine gewisse Verbesserung der Situation ist zu erwarten, wenn man bei den DFT-Rechnungen das Lösungsmittel mitberücksichtigt. Jedoch steigt damit auch der Rechenaufwand. Bei der Berechnung von Infrarotspektren von Peptiden, welche mehrere Konformationen annehmen können und auch schnell zwischen diesen Konformationen wechseln, ist es unabdingbar, die Spektren aller Konformere zu berechnen. Dies war aber mittels DFT wegen des großen Rechenaufwands nicht möglich.

6.3.2 Berechnung von Infrarotspektren mittels Übergangsdipolmomentkopplung

Neben der oben behandelten ab initio Methode der Dichtefunktionaltheorie, welche die Normalmoden aufgrund fundamentaler quantenmechanischer Prinzipien zu berechnen versucht, existieren semi-klassische und zum Teil klassische Methoden, Schwingungsfrequenzen zu ermitteln. Hier wird versucht, die wesentlichen Wechselwirkungen und Mechanismen zu berücksichtigen, die Einfluss auf die Lage und Intensität einer Infrarotbande nehmen.

Die Gruppe um Prof. Keiderling stellt hierzu zum Beispiel folgendes Konzept vor: Das Peptid, dessen Infrarotspektrum berechnet werden soll, wird in sinnvolle Untereinheiten aufgeteilt, für die eine Geometrieoptimierung mittels DFT-Rechnungen unter der Nebenbedingung konstant gehaltener Torsionswinkel des Peptidrückgrats durchgeführt wird. Die Kraftkonstanten und atomaren Teilladungen werden anschließend ebenfalls in einer DFT-Rechnung bestimmt. Die so gewonnenen Parameter für die Untereinheiten werden auf das gesamte Molekül übertragen. Zusätzlich werden langreichweitige Wechselwirkungen von Atompaaren durch die Übergangsdipolmomentkopplung berücksichtigt [Kub01]. Mittels dieser Methode konnten wichtige Einsichten in die Bandenform der Amid-I Bande von speziellen Peptiden gewonnen werden [Bou05, Hil03, Kei02, Hil02].

Ein weiterer Ansatz, lineare Infrarot-Absorptionsspektren von Peptiden zu berechnen, wurde kürzlich von der Gruppe Mukamel eingeführt. Hier wird zunächst von einer Amid-I Frequenz (ohne Wasserstoffbrückenbindung) von 1710 cm^{-1} ausgegangen. Für jede Wasserstoffbrücke zu einer Carbonylgruppe (direkte H-Brücke) wird eine Rotverschiebung von 20 cm^{-1} angenommen. Eine Wasserstoffbrücke zum Wasserstoff der Aminofunktion des Peptidbindungsplättchens (indirekte H-Brücke) führt zu einer Rotverschiebung von 15 cm^{-1} . Die Verschiebungen aufgrund der Wasserstoffbrückenbindungen wird als additiv angenommen [Abr04]. Torii et al. bestimmten die Kopplungskonstante der am nächsten benachbarten Amid-I Oszillatoren in Abhängigkeit der Dihedralwinkel ϕ und ψ [Tor98a]. Diese Kopplungen wurden von Mukamel et al. für die am nächsten

benachbarten Amid-I Oszillatoren übernommen [Abr04]. Für weiter entfernte Amid-I Oszillatoren wurde eine Kopplung aufgrund des Übergangsdipolmomentkopplungsmechanismus eingeführt. Dieser Simulationsansatz wurde später von der Gruppe Mukamel ergänzt und auch mit weiteren, alternativen Methoden zur Berechnung von Infrarotspektren verglichen [Hay05, Zhu06].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein vereinfachter Übergangsdipolmomentkopplungsmechanismus (engl. transition dipole coupling, TDC) nach Torii et al. implementiert [Tor92]. Er wird im folgenden vorgestellt.

Vorstellung der Methode

Krimm et al. erkannten bereits 1972 den Mechanismus der Übergangsdipolmomentkopplung und seine Bedeutung für die Berechnung von Infrarotspektren von Proteinen mit β -Faltblattstrukturen [Kri72]. Hier konnte die unterschiedliche Bandenform der Amid-I Bande eines parallelen und eines anti-parallelen β -Faltblatts nur mit Hilfe einer solchen Kopplung erklärt werden.

Basierend auf der Veröffentlichung von Torii et al. [Tor92] wurde ein Programm geschrieben (siehe Abdruck des Programms in Anhang B), das eine Datei im Format der Proteindatenbank (engl. protein data base, pdb) einliest, welches die räumlichen Koordinaten der einzelnen Atome des Peptids enthält. Aus diesen Daten berechnet das Programm die Lage der Übergangsdipolmomentvektoren, welche, wie in Abbildung 6.4 gezeigt, mit der C=O-Bindung einen Winkel von 20° einschließen. Die Carbonyl-Oszillatoren der Seitenketten werden dabei nicht berücksichtigt. Als Programmiersprache für dieses Programm wurde IDL5.4 (CREASO, GmbH, Gilching bei München), eine sogenannte interaktive Datensprache (engl. interactive data language, IDL), gewählt.

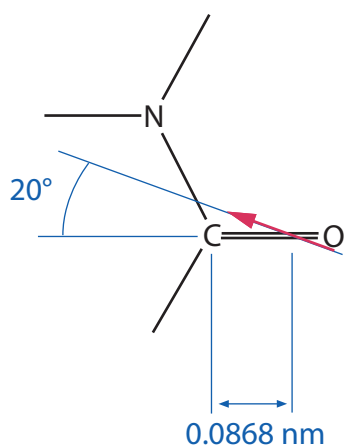


Abbildung 6.4: Lage des Übergangsdipolmoments nach Krimm et al. Diese Wahl der Richtung und Lage des Übergangsdipolmomentvektors hat sich in vielen Berechnungen der Amid-I Bande von α -helikalen Peptiden und β -Faltblättern bewährt [Moo75, Kri72, Kri86, Dwi82, Moo76a, Moo76b, Dwi83].

Der Betrag des Übergangsdipolmomentvektors wurde zu $3,70 \text{ D}\text{\AA}^{-1}\text{amu}^{-1}$ angenommen, wobei D die Einheit Debye des Dipolmoments bezeichnet und amu für die atomare Masseneinheit (engl. atomic mass unit) steht. Für die Kopplungen der Übergangsdipolmomente wurde die aus der Elektrodynamik bekannte Beziehung der Dipol-Dipol-Wechselwirkung herangezogen. Damit wird die Matrix der Kraftkonstanten F_{jk} aufgestellt:

$$F_{jk} = \frac{0,1 \delta\vec{\mu}_j \cdot \delta\vec{\mu}_k - 3(\delta\vec{\mu}_j \cdot \vec{n}_{jk})(\delta\vec{\mu}_k \cdot \vec{n}_{jk})}{\varepsilon R_{jk}^3} \quad \text{für } j \neq k \quad (6.4)$$

$$F_{jj} = 1,605 \text{ m dyn} \text{Å}^{-1} \text{ amu}^{-1} \quad \text{für } j = k \quad (6.5)$$

Dabei bezeichnen $\delta\vec{\mu}_j$ und $\delta\vec{\mu}_k$ die Übergangsdipolmomente des j-ten bzw. k-ten Peptidbindungsplättchens. Mit R_{jk} ist der Betrag des Abstandsvektors gemeint, der die Übergangsdipolmomente j und k verbindet und mit \vec{n}_{jk} ein Einheitsvektor in seine Richtung. Die relative statische Dielektrizitätskonstante ε wird zu 32.6 angenommen [Wal00]. Die Wahl der diagonalen Kraftkonstanten zu $1,605 \text{ m dyn} \text{Å}^{-1} \text{ amu}^{-1}$ wurde direkt der Veröffentlichung von Torii et al. entnommen [Tor92]. Sie entspricht einer Zentralfrequenz von 1650 cm^{-1} . In einer Untersuchung des Einflusses des Lösungsmittels auf die Lage der Amid-I Bande von N-Methylacetamid fanden Torii et al. für Methanol zwei Frequenzen 1660 cm^{-1} und 1637 cm^{-1} [Tor98b], die auf eine unterschiedliche Wasserstoffverbrückung zurückzuführen sind [Eat89]. Da die hier verwendete Methode der Übergangsdipolmomentkopplung zunächst die Wasserstoffbrücken vernachlässigt, erscheint die Wahl der Zentralfrequenz von 1650 cm^{-1} als sinnvoll.

Die Diagonalisierung der obigen Kraftkonstantenmatrix liefert als Eigenwerte die neuen Frequenzen, welche die Übergangsdipolmomentkopplung berücksichtigen. Die Intensität $I(\nu_j)$ zu einer bestimmten Frequenz ν_j berechnet sich aus dem Betrag der Vektorsumme der Übergangsdipolmomentvektoren $\delta\vec{\mu}_k$ multipliziert jeweils mit dem zugehörigen Wert $(\vec{e}_j)_k$ aus dem zu dieser Frequenz gehörigen Eigenvektor \vec{e}_j aus der Diagonalisierung:

$$I(\nu_j) = \left| \sum_{k=0}^N (\vec{e}_j)_k \delta\vec{\mu}_k \right| \quad (6.6)$$

N bezeichnet dabei die Gesamtzahl der koppelnden Carbonyloszillatoren.

Um aus den Intensitäten und Frequenzen Spektren zu erhalten, wurde jeder Normalmode eine lorentzförmige Linienform gegeben mit einer festen spektralen Breite von 15 cm^{-1} (FWHM). Nach Einlesen einer Peptidstruktur liefert das Programm ein berechnetes Infrarotspektrum der Amid-I Bande.

Im Fall des AzoTrpZip2 werden 11 Übergangsdipolmomentvektoren aus den jeweiligen NMR-Struktur Dateien identifiziert einschließlich des amidierten C-Terminus (siehe dazu auch Abbildung 4.8(a)). Um das experimentell gemessene Infrarotspektrum des cis-Isomers des AzoTrpZip2 richtig nachempfinden zu können, muss noch der ungefaltete Anteil berücksichtigt werden, der sich in den NMR-Strukturen aus Abbildung 4.11 nicht wiederfindet. Deren Anteil wurde mittels CD-Spektroskopie zu 55 % bestimmt [Low05]. Hier wird von der Annahme ausgegangen, dass sich durch die in einem ungefalteten Peptid nicht definierte Anordnung der Carbonyl-Oszillatoren relativ zueinander deren Kopplung zu Null mittelt. Deswegen wurde in Abbildung 6.5 mit einer durchgezogenen Linie ein so berechnetes Spektrum eines solchen ungefalteten Peptids angegeben. Es ist zentriert bei 1650 cm^{-1} und besitzt eine spektrale Breite von 15 cm^{-1} (vorgegeben). Die Fläche der Bande repräsentiert also 11 Carbonyloszillatoren, deren zentrale Frequenz jeweils bei 1650 cm^{-1} liegt.

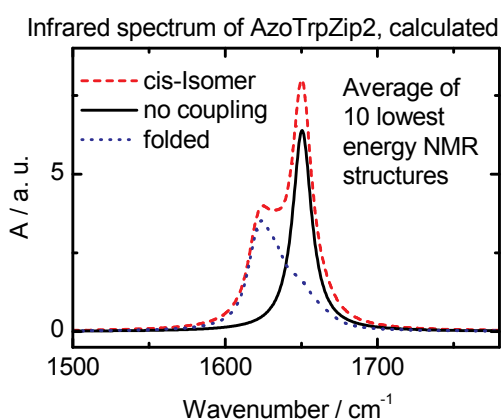
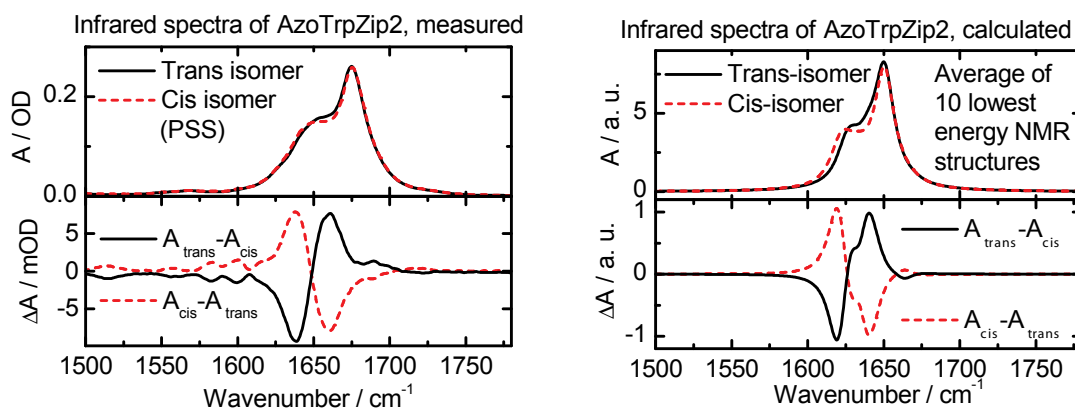


Abbildung 6.5: Berücksichtigung des ungefalteten Anteils bei der Berechnung des Infrarotspektrums des cis-AzoTrpZip2. Für die zehn energetisch günstigsten Konformere des cis-AzoTrpZip2 aus der NMR-Strukturanalyse wurde jeweils das Infrarotspektrum mit der Methode der Übergangsdipolmomentkopplung berechnet. Die punktierte Linie zeigt die Mittelung dieser zehn Spektren. Die durchgezogene Linie repräsentiert ein Spektrum eines ungefalteten cis-AzoTrpZip2. Die gestrichelte Linie zeigt die Summe der beiden Anteile, die somit in etwa dem gemessenen Spektrum des cis-Isomers des AzoTrpZip2 entsprechen sollte.

Die gepunktete Linie in Abbildung 6.5 ist ein gemittelt berechnetes Spektrum aus den 10 energetisch günstigsten Konformeren aus der NMR-Strukturanalyse, welche in Abbildung 4.11 dargestellt sind. Die Summe aus diesem Spektrum und dem eines ungefalteten Peptids (durchgezogene Linie) ergibt das gestrichelte Spektrum, das dem gemessenen Spektrum entsprechen sollte. Im nächsten Abschnitt wird es mit dem gemessenen Spektrum verglichen, um eine Einschätzung zu erhalten, wie gut der Übergangsdipolmomentkopplungsmechanismus in der Lage ist, die gemessenen Spektren zu reproduzieren.

Vergleich mit den experimentellen Spektren

Abbildung 6.6(a) zeigt eine Gegenüberstellung von gerechneten und gemessenen Spektren für den Fall des AzoTrpZip2.



(a) Gemessene Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2

(b) Berechnete Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2, gemittelt über 10 Strukturen

Abbildung 6.6: Vergleich zwischen gemessenen und berechneten Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2. Auf der linken Seite wird Abbildung 4.21(a) mit den gemessenen Infrarotspektren des AzoTrpZip2 noch einmal dargestellt. Ihr gegenübergestellt sind rechts die berechneten Spektren. Darunter sind die entsprechenden Differenzen der gerechneten Spektren dargestellt. Da die Banden des Schaltermoleküls AMPP in der Berechnung nicht berücksichtigt wurden, treten sie auch nicht in den Differenzspektren im Abbildungsteil (b) in Erscheinung.

Um ein Spektrum des trans-Isomers des AzoTrpZip2 zu erhalten, musste eine Annahme gemacht werden bezüglich des Anteils an ungefaltetem Peptid, da dieser sich nicht aus den CD-Messungen bestimmen ließ. Es erschien hier sinnvoll, genauso wie im Fall des cis-Isomers anzunehmen, dass etwa die Hälfte der Peptide in dem durch die NMR-Struktur beschriebenen trans-Ensemble vorliegt und die andere Hälfte ungefaltet sind. Diese Annahme führt zu einem Spektrum des trans-Isomers wie es in Abbildung 6.6(b) gezeigt ist.

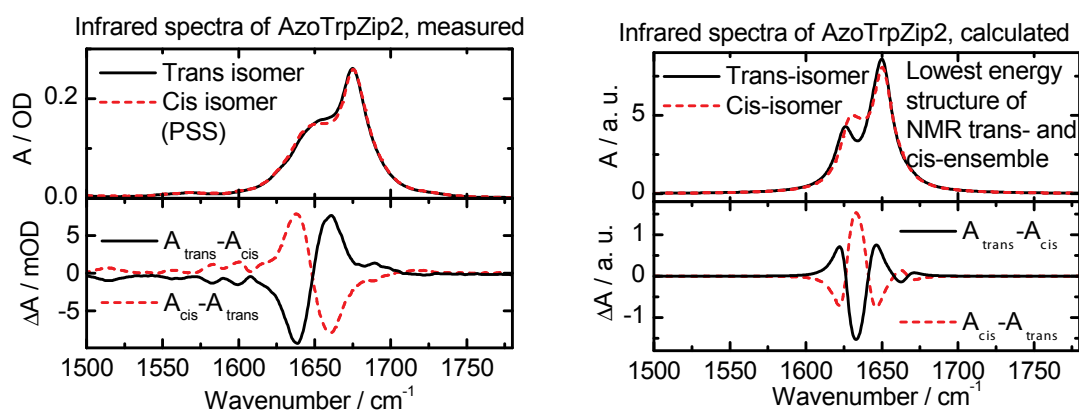
Nun ist es möglich, auch die entsprechenden Differenzspektren aus den gerechneten Spektren zu bilden, um sie mit den experimentell gemessenen zu vergleichen. Die relative Lage des isosbestischen Punktes (1650 cm^{-1} im Experiment und 1625 cm^{-1} in der Theorie) im Verhältnis zum Maximum des Absorptionsspektrums stimmt gut überein. Hier gibt es in beiden Fällen einen spektralen Abstand von 25 cm^{-1} . Frequenzabstände stimmen also zwischen Experiment und Theorie gut überein. Der absolute Wert für das Absorptionsmaximum in der Amid-I' Bande liegt in der Theorie bei 1650 cm^{-1} , im Experiment jedoch bei 1675 cm^{-1} .

Die Wahl der Zentralfrequenz von 1650 cm^{-1} in der Berechnung der Spektren erweist sich somit als nicht sehr günstig. Eine etwas höhere Zentralfrequenz von 1675 cm^{-1} würde eine bessere Übereinstimmung mit den gemessenen Spektren ergeben, jedoch würde man dabei willkürlich vom eben gewählten Literaturwert für Methanol abweichen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte darin liegen, dass das Peptid durch seine hydrophoben und unbeweglichen Seitenketten lokal eine niedrigere relative statische Dielektrizitätskonstante bedingt und dass im Mittel weniger Wasserstoffbrücken zum Methanol gebildet sind. Dies würde nach Torii et al. eine höhere Frequenz der Amid-I Bande bedingen [Tor98b].

Der spektrale Unterschied zwischen dem cis- und dem trans-Isomer wird in den theoretischen Rechnungen überbetont. Die spektrale Breite stimmt auch nur qualitativ überein und fällt im Experiment größer aus als in den theoretisch berechneten Spektren. Hier scheint die Wahl von 15 cm^{-1} für die lorentzförmige Verbreiterung der theoretisch berechneten Linien etwas zu klein zu sein. Abgesehen von diesen Punkten ist die Übereinstimmung zwischen theoretisch berechneten Spektren und experimentell gemessenen jedoch als gut anzusehen.

Abbildung 6.7 zeigt dieselbe Gegenüberstellung wie Abbildung 6.6, jedoch wurde hier bei der theoretischen Berechnung nur jeweils ein Konformer aus dem cis- bzw. trans-Ensemble der NMR-Strukturen berücksichtigt. Es handelt sich dabei um das jeweils energetisch günstigste.

Hier fällt auf, dass die Übereinstimmung nicht so gut ausfällt wie in der vorigen Abbildung. Insbesondere weicht das berechnete Spektrum des trans-Isomers stark vom experimentell gemessenen ab. Daraus lässt sich schließen, dass es wichtig ist, über Spektren aus mehreren Strukturen zu mitteln. Weitere Versuche mit 5, 10, 15, 20, 25 Spektren aus dem trans- bzw. cis-Ensemble aus NMR-Strukturen ergaben, dass sich schon ab einer Mittelung über fünf Spektren eine gute Übereinstimmung mit experimentell gemessenen Spektren ergibt - ähnlich gut wie in Abbildung 6.6 für die Mittelung über 10 Strukturen gezeigt. Eine weitere Hinzunahme von Strukturen in den Mittelungsprozess verändert die gerechneten Spektren kaum mehr.



(a) Gemessene Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2

(b) Gerechnetes Absorptions- und Differenzspektrum der jeweils energetisch günstigsten NMR-Struktur des jeweiligen Isomers des AzoTrpZip2

Abbildung 6.7: Vergleich zwischen gemessenen und einzelnen gerechneten Absorptions- und Differenzspektren des AzoTrpZip2. Im linken Teil der Abbildung sind wieder die gemessenen Spektren des AzoTrpZip2 dargestellt. Im rechten Teil wurde jedoch nur das Spektrum des jeweils energetisch günstigsten Konformers des AzoTrpZip2 aus der NMR-Strukturanalyse dargestellt. In den berechneten Differenzspektren zeigen sich deutliche spektrale Abweichungen zu den gemessenen Spektren.

Auch für das Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ kann ein Versuch unternommen werden, das Infrarotspektrum zu berechnen. Hier ließ sich jedoch nur für das cis-Isomer eine NMR-Struktur angeben. Wieder scheint die Annahme sinnvoll, dass nur etwa die Hälfte der Peptide in dieser Form vorliegen. Deswegen wurde analog zu Abbildung 6.5 das Spektrum des Referenzpeptids gerechnet. Da sich nur das Spektrum des cis-Isomers berechnen lässt, ist zum Vergleich auch nur das gemessene Spektrum des cis-Isomers in Abbildung 6.8(a) gezeigt.

Die Übereinstimmung mit dem gemessenen Spektrum fällt etwas schlechter aus. Die berechnete spektrale Breite ist deutlich kleiner als die gemessene. Beim Referenzpeptid scheint die Wasserstoffverbrückung hauptsächlich die Ursache für die spektrale Breite zu sein. Dennoch wird die relative Intensität der niederfrequenten Schulter gut in der Rechnung wiedergegeben. Dies liegt jedoch an der Wahl des Anteils an ungefaltetem Peptid.

In der Literatur findet man eine Publikation, in der mit der Methode der Übergangsdipolmomentkopplung Spektren für TrpZip4 berechnet wurden [Du04]. Es zeigt sich hier eine qualitative Ähnlichkeit mit dem für das gefaltete Peptid berechnete Spektrum des AzoTrpZip2 aus Abbildung 6.5, punktierte Linie. Ebenfalls wurde in [Du04] über die Spektren aus 20 Strukturen aus der NMR-Strukturanalyse gemittelt. Für ein entfaltetes Peptid wird ein Spektrum angegeben, das der durchgezogenen Linie aus Abbildung 6.5 entspricht, jedoch noch zusätzlich eine niederfrequente Schulter aufweist.

Zusammenfassend kann bemerkt werden, dass Spektren, die mittels des Mechanismus der Übergangsdipolmomentkopplung berechnet wurden, qualitative Ähnlichkeit mit den gemessenen Spektren aufweisen. Manche spektralen Merkmale (isosbestische Punkte) werden sogar quantitativ wiedergegeben. Dabei sollte aber beachtet werden, dass dieses

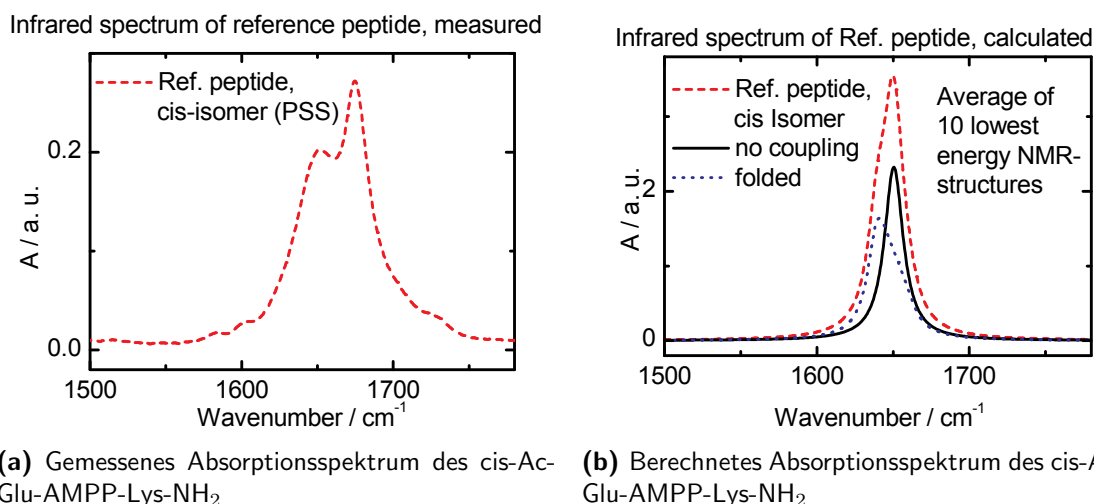


Abbildung 6.8: Vergleich zwischen gemessenem und berechnetem Absorptionsspektrum des cis-Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Da im Fall des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ nur für das cis-Isomer eine NMR-Strukturanalyse vorliegt (siehe Abbildung 4.15), kann hier nur der Versuch gemacht werden, das Infrarotspektrum dieses Isomers zu berechnen. Auch hier wird angenommen, dass im Mittel die Hälfte der Peptide in einem ungefalteten und damit ungekoppelten Zustand vorliegen. Zum Vergleich zeigt wieder der rechte Teil der Abbildung das entsprechende gemessene Spektrum aus Abbildung 4.21(b).

Modell sehr einfach ist und wichtige Aspekte, wie die Existenz von Wasserstoffbrückenbindungen nicht berücksichtigt. Im folgenden wird nun versucht, auch die transienten Spektren nach der Isomerisierung des Schalters des AzoTrpZip2 von cis nach trans durch gerechnete Spektren zu verstehen.

Erste Erkenntnisse aus den MD-Simulationen über die Entfaltung der β -Hairpin Struktur

Mit Hilfe von Isomerisierungstrajektorien, die nach dem oben erwähnten Verfahren aus Nicht-Gleichgewichts-Molekulardynamik-Simulationen (NGMD) gewonnen wurden, kann die Isomerisierung vom cis-Isomer des AzoTrpZip2 in das trans-Isomer nachempfunden werden. Insgesamt sechs solcher NGMD-Trajektorien wurden bis jetzt von Robert Denschlag in der Arbeitsgruppe Tavan angefertigt. Ausgangspunkte waren NMR-Strukturdateien des cis-Ensembles. Diese wurden jeweils in einem Equilibrierschritt dem Lösungsmittel und dem in den MD-Simulationen verwendeten Kraftfeld angepasst. Die Isomerisierung wurde dann, wie in der Doktorarbeit von Heiko Carstens beschrieben, durchgeführt [Car04]. Die MD-Simulation wurde anschließend bis zu einem Zeitpunkt von 3 ns nach der Isomerisierung fortgesetzt. Dabei wurden zu 300 Zeitpunkten Strukturdateien abgespeichert, für welche ein Infrarotspektrum nach oben vorgestelltem Übergangsdipolmomentkopplungsmechanismus berechnet wurde. Für einen Verzögerungszeitpunkt wurden die berechneten Spektren aus den sechs NGMD-Trajektorien mit jeweils gleichem statistischen Gewicht gemittelt.

Zum Vergleich mit dem Experiment, wurde zu allen Verzögerungszeitpunkten von den gemittelten Spektren ein Spektrum abgezogen, das aus einer Mittelung über die Spektren der sechs Ausgangsstrukturen vor der Isomerisierung des Schalters AMPP erzeugt

worden war. Eine zweidimensionale Darstellung dieser Spektren zeigt Abbildung 6.9(b). Diese Abbildung entstand aus insgesamt 1806 berechneten Infrarotspektren, zu deren Berechnung ein handelsüblicher Rechner wenige Minuten benötigte. Die Rechenzeit für die Anfertigung einer von insgesamt sechs MD-Simulationstrajektorien betrug auf einem modernen Rechner etwa 30 Tage.

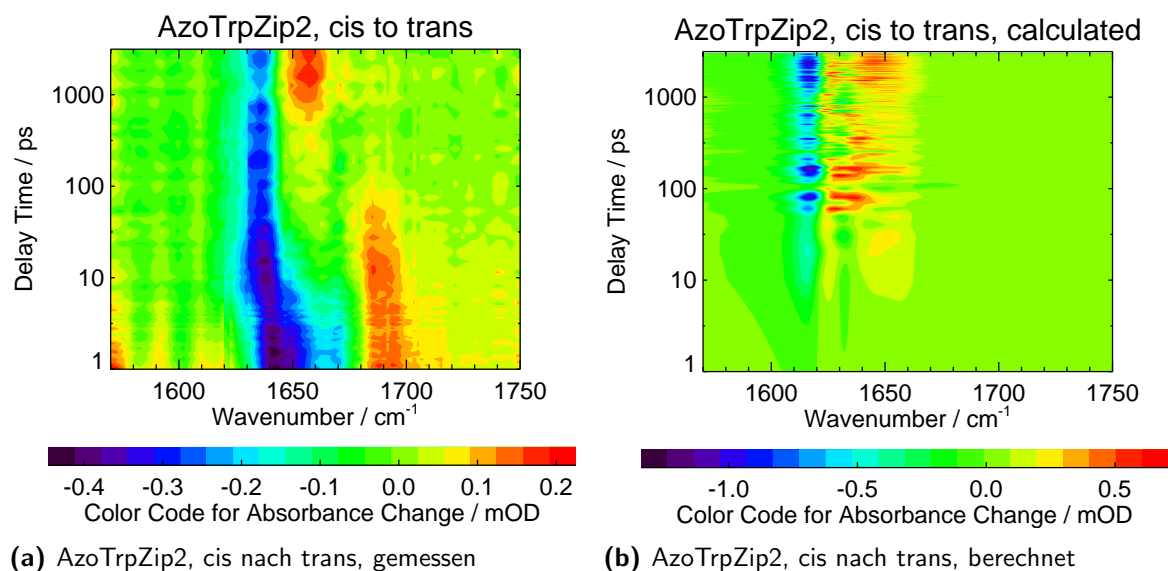


Abbildung 6.9: Zweidimensionale Darstellung der gemessenen und berechneten Daten beim Konformationswechsel vom cis- in das trans-Isomer. Der linke Teil entspricht der Abbildung 5.7(a) und zeigt die gemessenen transienten Spektren des cis-AzoTrpZip2, zu bestimmten Verzögerungszeiten nach dem Auslösen seiner Isomerisierung in das trans-Isomer. Der rechte Teil der Abbildung entstand aus insgesamt 1806 berechneten Infrarotspektren (jeweils logarithmische Zeitachse).

Die in Abbildung 6.9 gezeigte Gegenüberstellung weist große Unterschiede im Bereich von weniger als 100 ps auf. In diesem Zeitbereich ist das experimentelle Signal geprägt vom Bruch von Wasserstoffbrücken, von Kühlprozessen zum Teil nicht isomerisierender Moleküle und von Wärmeleitungseffekten vom Schalter in die angrenzenden Peptidteile hinein. All diese Vorgänge werden in der Berechnung mittels der beschriebenen Übergangsdipolmomentkopplungsmethode nicht berücksichtigt. Dies erklärt die schlechte Übereinstimmung in diesem Zeitbereich.

Im Bereich von 1620 cm^{-1} setzt in dem theoretisch berechneten Datensatz eine Absorptionsabnahme um 100 ps ein. Diese wird um 1635 cm^{-1} auch im experimentell gemessenen Differenzspektrum beobachtet. Etwas früher als in den experimentellen Daten nimmt die Absorption im Bereich um 1650 cm^{-1} schon ab 100 ps merklich zu. Ab 100 ps stellt sich also eine qualitative Übereinstimmung der berechneten und experimentellen Signale ein. Das zu erwartende Differenzspektrum ist nach 3 ns Simulationszeit nach Einführung der Isomerisierung deutlich zu erkennen. Die zu geringe Anzahl der in die Mittelung eingegangenen MD-Simulationstrajektorien kommt durch starke Fluktuationen der gerechneten Spektren zum Ausdruck.

Im folgenden werde davon ausgegangen, dass die sechs gerechneten Molekulardynamiksimulationstrajektorien ein sinnvolles Ensemble bilden. Deswegen können nun aus

den Molekulardynamiksimulationstrajektorien strukturelle Informationen entnommen werden, um Aussagen über die Entfaltung der β -Hairpin Struktur des AzoTrpZip2 zu machen. Die einfachsten strukturellen Informationen sind Abstände zwischen verschiedenen Gruppen: Abbildung 6.10 zeigt gemittelte Abstandsinformationen für drei verschiedene Positionen entlang der Stränge der β -Hairpin Struktur in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit nach der Isomerisierung.

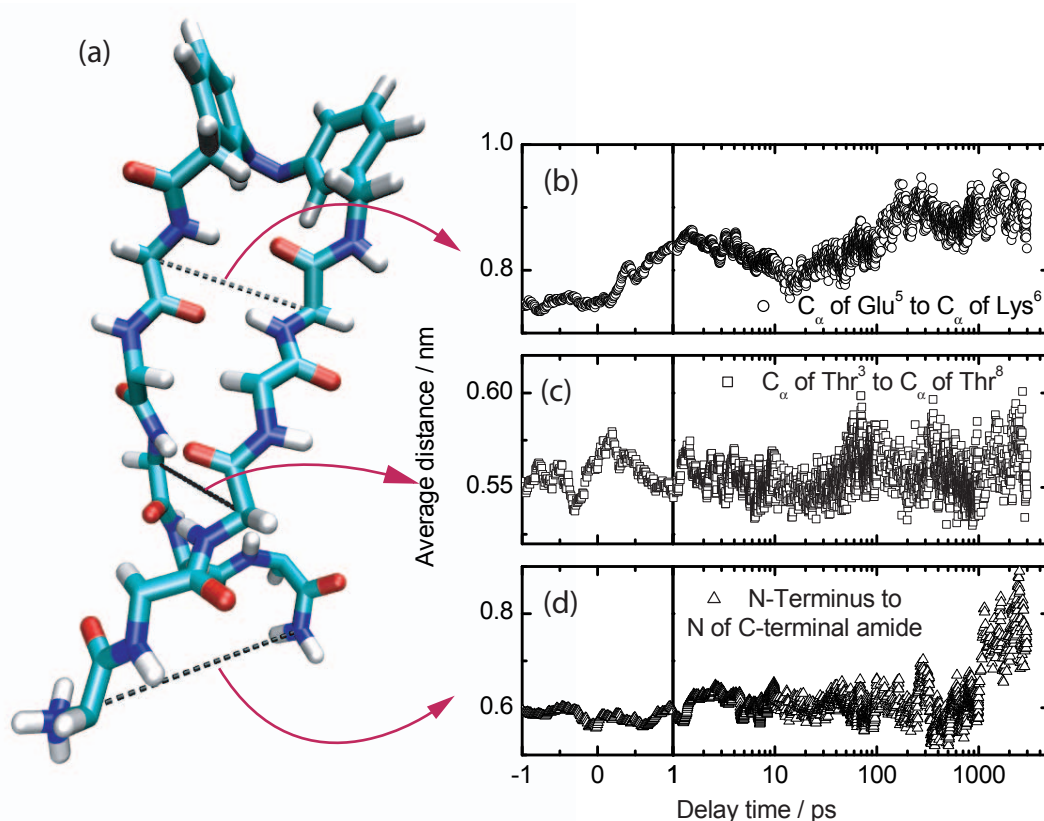


Abbildung 6.10: Bestimmung von Abständen aus sechs MD-Simulationstrajektorien. Der linke Teil der Abbildung zeigt eine beispielhafte Struktur des cis-AzoTrpZip2 aus der NMR-Strukturanalyse, in der drei verschiedene Abstände entlang der Stränge markiert sind. Zu diesen sind auf der rechten Seite die über sechs MD-Simulationen gemittelten Werte dargestellt. Abbildungsteil (b) zeigt den mittleren Abstand des C $_{\alpha}$ -Atoms der jeweils dem Chromophor AMPP am nächsten gelegenen Aminosäure in Abhängigkeit von der Verzögerungszeit nach dem Auslösen der Isomerisierung. In Abbildungsteil (c) ist die zeitliche Entwicklung des mittleren Abstands der C $_{\alpha}$ -Atome der jeweils mittleren der fünf Aminosäuren der Stränge dargestellt. Der mittlere Abstand der Stickstoffatome an den Enden der Stränge des β -Hairpins ist im Abbildungsteil (d) gegen die Verzögerungszeit aufgetragen.

Links (Abb. 6.10(a)) ist modellhaft eine typische Struktur des cis-AzoTrpZip2 abgebildet, in der die jeweilige Lage dieser drei Abstände als gestrichelte Linien eingezeichnet ist. Deren (gemittelte) Entwicklung in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Auslösen der Isomerisierung (Zeitnullpunkt) ist in den Graphen b-d im rechten Teil der Abbildung angegeben. Als erster Abstand wurde jeweils das C $_{\alpha}$ -Atom der ersten Aminosäure auf den Strängen gewählt. Wenige 100 fs nach dem Zeitnullpunkt steigt der mittlere Abstand an, wie man es auch erwarten würde, da der nahe benachbarte Schalter Azobenzol

bei seiner Isomerisierung vom cis- in das trans-Isomer eine Längenänderung verursacht. Die anfängliche Abstandsänderung verkleinert sich zeitweilig (20 ps Bereich), um danach wieder auf einen noch größeren Wert anzusteigen.

In der Mitte der Stränge wurde der mittlere Abstand des C_α-Atom der Aminosäuren Threonin auf beiden Strängen in Abbildung 6.10(b) ausgewertet. Er verändert sich über den gesamten simulierten Zeitbereich hinweg um weniger als 50 pm. Der End-zu-End-Abstand des AzoTrpZip2 wurde über den mittleren Abstand der Stickstoffatome an dem N-Terminus und an der Amidfunktion am C-Terminus vermessen. Hier zeigt sich eine wesentliche Veränderung erst nach 0,5 ns. Als gemeinsames Merkmal aller Abstandsänderungen fällt auf, dass die Fluktuationen bis ca. 100 ps zunehmen und danach in etwa konstant bleiben. Daraus lässt sich schließen, dass das gebildete trans-Ensemble des AzoTrpZip2 weniger definiert ist als das ursprüngliche cis-Ensemble. Dies ist in voller Übereinstimmung mit den Ergebnissen der NMR-Messungen.

Zusammenfassend kann für die Vorgänge bei der Entfaltung der β -Hairpin Struktur folgendes Modell aufgestellt werden: Nach der Isomerisierung des Schalters vom cis- in das trans-Isomer reagieren zunächst die Aminosäuren, die direkt kovalent am Schalter angebunden sind. Der Abstand der beiden Stränge steigt in diesem Bereich innerhalb einer Pikosekunde an, um dann nach dem Rückgang bei 20 ps weiter anzusteigen. Ab ca. 200 ps ergibt sich hier ein annähernd konstanter Wert. Die Strangmitte der β -Hairpin Struktur um die beiden Aminosäuren Threonin herum wirkt als Dreh- und Angelpunkt. Der mittlere Abstand ändert sich hier kaum. Der hydrophobe Kern aus den Tryptophanseitenketten, der in der cis-Form die Hairpinstruktur stabilisiert, bleibt also im wesentlichen erhalten, muss sich aber wahrscheinlich umlagern. Die Aminosäuren am offenen Ende der β -Hairpin Struktur beginnen erst spät zu reagieren. Eine Vergrößerung des End-zu-End-Abstandes wird erst etwa 0,5 ns nach der Isomerisierung signifikant. Dieses Ergebnis stimmt gut mit der experimentell beobachteten Absorptionsänderung überein, welche eine Dynamik mit einer Zeitkonstante von 630 ps ausweisen.

Die Ausbildung der β -Hairpin Struktur bei der trans nach cis Reaktion findet aufgrund der experimentellen Daten auf einer Zeitskala von 30 μ s statt. Leider ist es aufgrund des Rechenaufwandes für qualitativ hochstehende MD-Simulationen mit heutigen Mitteln undenkbar MD-Simulationstrajektorien in ausreichender Anzahl anzufertigen. Hier müssen in der Zukunft alternative Beschreibungsmethoden entwickelt werden.

6.4 Zusammenfassung und strukturelle Interpretation

In Kapitel 6.2 wurde im Zusammenhang mit der Abbildung 6.1 ein Überblick über die gemessenen Zeitkonstanten bei der Entfaltung und der Faltung der β -Hairpin Struktur des AzoTrpZip2 gegeben. Kapitel 6.3 diskutierte Ergebnisse aus MD-Simulationen, die strukturelle Interpretationen der gemessenen Daten für die Entfaltung des cis-AzoTrpZip2 ermöglichen. Abbildung 6.11 fasst nun diese Ergebnisse zusammen und macht zusätzlich Vorschläge für die strukturelle Interpretation der Faltungsintermediate auf dem Weg der Bildung der β -Hairpin Struktur. Dies soll dadurch geschehen, dass eine modellhafte Vorstellung der Vorgänge bei der Faltung und der Entfaltung der β -Hairpin Struktur des AzoTrpZip2 angegeben wird, welche mit den hier vorgestellten

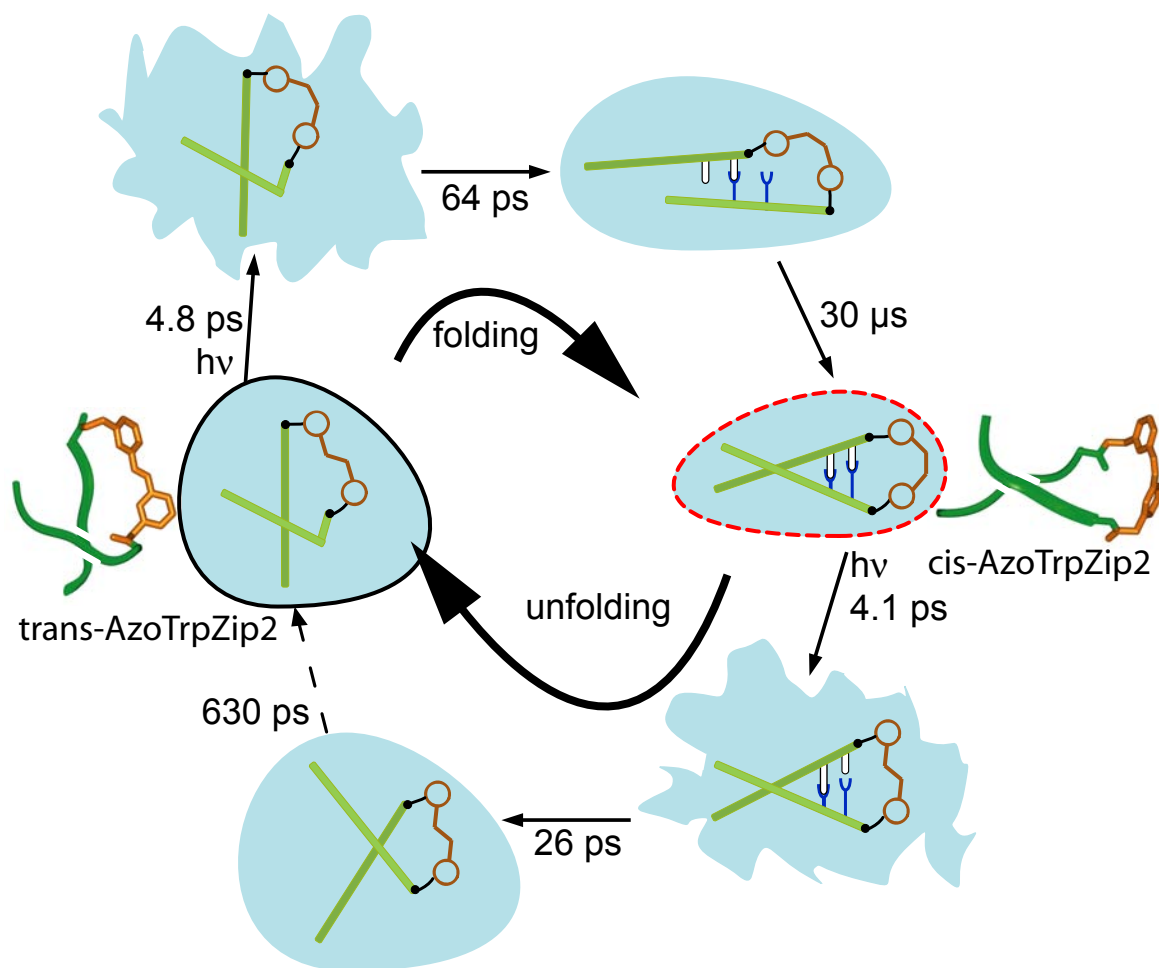


Abbildung 6.11: Überblick über die Faltungs- und Entfaltungsreaktion des β -Hairpin Modellpeptids AzoTrpZip2. Die grüne Farbe steht für die Aminosäureketten der Stränge des AzoTrpZip2 und in braun ist der photoschalter AMPP dargestellt. In weiß und blau sind Wasserstoffbrücken angedeutet. Durch die gezackten Begrenzungslinien des blauen Hintergrunds der schematischen Modelle für das β -Hairpin Modellpeptid AzoTrpZip2 soll ein desolvatisierter Zustand angedeutet werden. Auf der linken Seite ist eine mögliche NMR-Struktur des trans-Isomers des AzoTrpZip2 gezeigt. Ausgangspunkt für die Faltung ist das Ensemble an trans-Isomeren des AzoTrpZip2 (schwarz umrandet). Nach Auslösen der Faltungsreaktion durch den Anregungsimpuls wird ein desolvatisierter Zustand erreicht, der in ein Faltungsintermediat übergeht, aus welchem dann die finale β -Hairpin Struktur des cis-AzoTrpZip2 (rechts, rot gestrichelt umrandet) gebildet wird. Die Entfaltungsreaktion weist ebenfalls einen desolvatisierten Zustand auf, der zu einem Intermediat führt. Daraus entsteht mit einer Zeitkonstante von 630 ps ein Ensemble an trans-Isomeren, das der NMR-Struktur schon in Teilen ähnlich ist.

Daten und MD-Simulationen konsistent ist. Darauf werden diese Ergebnisse mit solchen aus der Literatur verglichen, die mit anderen Modellpeptiden gewonnen wurden.

6.4.1 Entfaltung der β -Hairpin Struktur

Nach der Anregung des Photoschalters AMPP des AzoTrpZip2 mit dem Anregungsimpuls bei 404 nm befindet sich der Photoschalter im elektronisch angeregten Zustand. Im folgenden soll nur auf die Subspezies eingegangen werden, welche zum Zeitpunkt der

Anregung des Photoschalters die strukturelle Form des cis-Isomers aufweist und bei der eine β -Hairpin Struktur vorliegt. Alle anderen Subspezies sind entweder in einem vernachlässigbaren Umfang populiert (trans-Isomere des AzoTrpZip2) oder tragen nur unwesentlich zum Signal bei (ungefaltete cis-Isomere des AzoTrpZip2), siehe dazu Kapitel 5.2.

Der Übergang in den elektronischen Grundzustand erfolgt hauptsächlich auf einer Zeitskala von einigen Pikosekunden. Auf dieser Zeitskala geht auch das Ausbleichen der Schalterbanden um etwa die Hälfte zurück. Dies deutet auf eine Quantenausbeute für die Isomerisierung von ca. 50 %. Das bedeutet, etwa die Hälfte der angeregten Moleküle gehen in den Grundzustand zurück, ohne zu isomerisieren. Sehr wahrscheinlich wird in diesem Fall die β -Hairpin Struktur nur vorübergehend etwas gestört (durch die veränderte Geometrie des Photoschalters im angeregten Zustand und durch das unterschiedliche Dipolmoment). Von diesen Molekülen sind also hauptsächlich Beiträge zu Kühlsignalen zu erwarten, lang andauernde strukturelle Signale werden nicht verursacht.

Bei der anderen Hälfte der angeregten Moleküle isomerisiert der Photoschalter AMPP, was zunächst zu starken strukturellen Veränderung in der Nähe des Photoschalters führt. Der Grund hierfür liegt darin, dass das trans-Isomer des AMPP einen deutlich größeren Abstand der beiden meta-ständigen Methylengruppen aufweist, die als Abstandshalter und Verbindung zu den Aminosäureketten der Stränge fungieren. Da sich die beiden Stränge nicht sofort in eine neue für die veränderte Geometrie des Photoschalters günstige Position bringen lassen, entsteht zusätzlich eine mechanische Spannung. Diese Spannung erlaubt es dem Photoschalter zunächst nicht, die Grundzustandsgeometrie seines trans-Isomers einzunehmen. Dies ist erst möglich, wenn Teile des Peptids soweit relaxiert sind, dass diese Spannung abgebaut ist. Dies erklärt die Zeitkonstante von 200 ps im sichtbaren Spektralbereich, in dem exklusiv der Photoschalter beobachtet wird.

Diese ersten strukturellen Prozesse und auch der veränderte Dipol des Photoschalters im angeregten Zustand führen zu einer Verzerrung des Moleküls und zur Anregung niederfrequenter Moden. Diese Moden koppeln über anharmonische Kopplungselemente an die Amid-I' Schwingungen. Dadurch ergibt sich eine Rotverschiebung der Amid-I' Bande. Mit einer Zeitkonstante von 4,1 ps geht diese Rotverschiebung zurück. Vermutlich durch Rotationen um Einfachbindungen (z. B. um die der meta-ständigen Methylengruppen am Azobenzol) wird ein Teil der Spannung gelöst.

Aufgrund der strukturellen Umordnung werden intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und solche zum Lösungsmittel gebrochen. Dies kann aus den transienten Spektren bei 1,0 ps und bei 6,5 ps geschlossen werden, die ein niederfrequentes Ausbleichen der Amid-I' Bande um 1640 cm^{-1} und eine induzierte Absorption bei 1680 cm^{-1} aufweisen. Der Frequenzabstand von 30 cm^{-1} bis 40 cm^{-1} weist auf den Bruch einer Wasserstoffbrücke hin. Bis 6,5 ps weitet sich das Ausbleichsignal im Bereich der niederfrequenten Flanke aus, was als Aufbrechen von weiteren intra-molekularen Wasserstoffbrückenbindungen gedeutet wird. Man könnte dies als ein beginnendes Aufgehen des „Reißverschlusses“ der Wasserstoffbrückenbindungen der β -Hairpin Struktur interpretieren.

Dieses Verhalten wird auch in den MD-Simulationen beobachtet (siehe dazu den rechten Teil von Abb. 6.2 und Abb. 6.10 (a)). Die β -Hairpin Struktur wird zunächst in der Nähe des Photoschalters aufgebrochen. Etwa 20 ps nach Photoanregung ist ein Zustand

erreicht, der als desolvatisiert bezeichnet wird. Die erste Schale von Lösungsmittelmolekülen befindet sich in der Nähe des Photoschalters und der ersten Aminosäuren in starker Bewegung. Die mittlere Zahl an Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel hat abgenommen. Erste intra-molekulare Wasserstoffbrücken sind gebrochen, welche ursprünglich zur Stabilisierung der β -Hairpin Struktur beigetragen hatten (rechter unterer Teil der Abbildung 6.11).

Mit einer Zeitkonstante von 26 ps wandelt sich dieser Zustand um in eine Struktur, bei der sich in der Nähe des Photoschalters die beiden Peptidzweige weiter voneinander entfernt haben, wie es auch die MD-Simulationen andeuten. Die induzierte Absorption um 1680 cm^{-1} , welche von freien, nicht-wasserstoffverbrückten Carbonyloszillatoren stammte, geht hierbei zurück. Die meisten Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel sind also wieder ausgebildet, so dass diese neue Struktur, die nach ca. 150 ps vollständig vorliegt, nicht mehr desolvatisiert ist. Die β -Hairpin Struktur an den C-terminalen und N-terminalen Enden ist jedoch noch nicht vollständig aufgebrochen, die terminalen Enden liegen noch annähernd parallel, was sich durch das Fehlen der Absorptionszunahme bei 1660 cm^{-1} äußert. Das Aufreißen der Wasserstoffverbrückung scheint also in der Mitte der Stränge zu stoppen, welche dann als „Scharnier“ auf dem Weg zur Bildung des trans-Ensembles an Strukturen wirkt.

Die Absorption bei 1660 cm^{-1} nimmt zunächst mit einer Zeitkonstante von 630 ps zu. Die MD-Simulationen zeigen ab 1 ns auch einen Anstieg des Abstandes im Bereich der Enden des AzoTrpZip2. Um 3,1 ns ist also ein Zustand erreicht, dessen Differenzspektrum im Bereich der Amid-I' Bande nur um eine spektrale Verschiebung von ca. 3 cm^{-1} von dem stationären Differenzspektrum abweicht. Aus der Ähnlichkeit des transienten Spektrums bei 3,1 ns und des stationären Differenzspektrums kann auf die strukturelle Ähnlichkeit der sie verursachenden Ensembles geschlossen werden. Etwa 3,1 ns ist also das strukturelle Ensemble des trans-Isomers des AzoTrpZip2 im wesentlichen erreicht. Aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Messungen kann geschlossen werden, dass es mindestens noch einen weiteren Prozess gibt, mit dem das trans-Ensemble endgültig erreicht wird (angedeutet durch einen gestrichelten Pfeil in Abb. 6.11). Hier sind noch größere diffusive Bewegungen nötig, die erst zur im stationären Fall beobachteten Verteilung von Geometrien des trans-AzoTrpZip2 führen.

6.4.2 Faltung der β -Hairpin Struktur

Ausgangspunkt der Messungen zur Faltung der β -Hairpin Struktur ist ein Ensemble aus trans-Isomeren des AzoTrpZip2. Dieses Ensemble ist geprägt von einer Vielzahl von möglichen Strukturen, welche sich ständig ineinander umwandeln. Nach der Anregung durch den Anregimpuls bei 404 nm befindet sich der Chromophor AMPP in seinem elektronisch angeregten S_1 -Zustand. Mit einer Zeitkonstante von 3,2 ps wird dieser angeregte Zustand zum Teil verlassen. Eine weitere Zeitkonstante von 47 ps, welche in den zeitaufgelösten Messungen im sichtbaren Spektralbereich gemessen wurde, deutet daraufhin, dass es auch hier eine Rückwirkung der Peptidfaltungsprozesse auf den Chromophor gibt. Dieser nimmt also im Grundzustand zunächst nicht seine Gleichgewichtskonformation an, sondern ist teilweise verzerrt.

Im infraroten Spektralbereich wird als erster wesentlicher Prozess der Rückgang der Rotverschiebung der Amid-I' Bande mit einer Zeitkonstante von 4,8 ps beobachtet. Es bildet sich wie bei der Entfaltung zunächst ein desolvatisierter Zustand. Dieser ist gekennzeichnet durch den Bruch von Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel (siehe transientes Spektrum bei 1 ps und 6,6 ps, Abb. 5.8(a)). Auch intramolekulare Wasserstoffbrücken können hier bereits gebrochen sein. Eine induzierte Absorption um 1680 cm^{-1} stammt von den so entstandenen freien Carbonylzittern des Peptidrückgrats. Eine wesentliche Rotverschiebung des Ausbleichens im Bereich der Amid-I' Bande und damit ein Aufbrechen weiterer Wasserstoffbrücken bis zu einer Verzögerungszeit von 24 ps wird anders als beim Entfaltungsprozess nicht beobachtet. Vielmehr findet man einen allgemeinen Rückgang des Ausbleichens auf etwa die Hälfte des Wertes bei 6,6 ps, was auf den großen Anteil an Molekülen mit nicht isomerisierten AMPP-Schalter zurückzuführen ist. Diese sind nach ca. 24 ps im wesentlichen in den Ausgangszustand relaxiert und tragen so nicht mehr zum Differenzsignal bei. Bei der Subpopulation mit isomerisiertem Schalter ist jedoch die Isomerisierung jetzt weitgehend abgeschlossen und der für die Ausbildung der β -Hairpin Struktur nötige Schleife (engl. loop) liegt vor. Die Anordnung der Stränge entspricht aber noch nicht der β -Hairpin Struktur.

Der desolvatisierte Zustand wird mit einer Zeitkonstante von 64 ps verlassen. Die induzierte Absorption bei 1680 cm^{-1} geht auf dieser Zeitskala zurück. Dies deutet darauf hin, dass die freien Carbonylzittern Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel und möglicherweise auch zum gegenüberliegenden Strang ausgebildet haben. Dennoch ist auch 3,1 ns nach Photoanregung des Chromophors das stationäre Differenzspektrum noch nicht erreicht. Es ist offensichtlich, dass als Intermediat ein Zustand ausgebildet wurde, dessen Wasserstoffverbrückung nicht derjenigen der finalen β -Hairpin Struktur entspricht. Dies äußert sich in den Unterschieden zwischen den Differenzspektren und wird durch die Darstellung im rechten oberen Teil der Abbildung 6.11 angedeutet.

Um den weiteren Verlauf der Faltungsreaktion zu verfolgen, wurden Anregimpulse bei 355 nm und eine Abtastwellenzahl von 1641 cm^{-1} verwendet. Man findet mit einer Zeitkonstante von 30 μs die Umwandlung einer Absorptionsabnahme in eine induzierte Absorption, wie sie vom stationären Differenzspektrum her erwartet wird.

Die Bildung der Schleife (engl. loop, siehe Abb. 4.1) durch die Isomerisierung des Photoschalters in sein cis-Isomer (cis-AMPP) ist wie oben schon erwähnt nach wenigen Pikosekunden abgeschlossen. Die korrekte Wasserstoffverbrückung der beiden Stränge stellt sich jedoch erst auf der Zeitskala von 30 μs ein. Offensichtlich gibt es auf der Fläche der freien Energie lokale Minima, in denen das System gefangen wird. Solche lokalen Minima können durch nicht native Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen dargestellt werden oder durch hydrophobe Wechselwirkungen der Tryptophanseitenketten, die erst überwunden werden müssen, bevor die finale β -Hairpin Struktur ausgebildet werden kann.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nicht die Bildung der Schleife, sondern das Arrangieren der Stränge der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Ausbildung einer β -Hairpin Struktur ist.

6.5 Diskussion zur Literatur über die Peptiddynamik in vergleichbaren Modellpeptiden

Angesichts der vielen Studien über die Faltung und Entfaltung einer β -Hairpin Struktur, welche an unterschiedlichsten Modellsystemen durchgeführt wurden, bleibt die Frage offen, ob es so etwas gibt wie Faltungs- und Entfaltungsmotive, welche für alle Peptide mit β -Hairpin Struktur gelten. Angesichts der Vielzahl von Veröffentlichungen rund um den Themenkomplex β -artiger Peptide und der vielen vertretenen Ansichten, welche Einzelschritte bei Faltung und Entfaltung wesentlich bzw. geschwindigkeitsbestimmend sind, besteht im Moment noch kein einheitlicher wissenschaftlicher Konsens über die Dynamik von β -Hairpin Modellpeptiden.

6.5.1 Entfaltung der β -Hairpin Struktur und Bildung des Ensembles aus trans-Konformeren

Die bei der Entfaltung der β -Hairpin Struktur beobachteten Phänomene und Zeitkonstanten sollen im folgenden in Relation gesetzt werden zu verwandten Modellpeptiden und vergleichbaren Beobachtungen aus der Literatur. Die bei der Entfaltung der β -Hairpin Struktur beobachteten Zeitkonstanten lassen sich am besten mit Studien vergleichen, in denen ebenfalls Modellpeptide untersucht wurden, welche weniger als 20 Aminosäuren umfassen.

Vergleich mit zyklischen Modellpeptiden

Unter den vielen mittels zeitaufgelöster Spektroskopie untersuchten photoschaltbaren zyklischen Modellpeptiden sei hier nur das sogenannte bcAMPB herausgenommen. Der Name bcAMPB bezeichnet ein bizyklisches Modellpeptid, wobei ein Ring aus Aminosäuren mit einer pseudo-Aminosäure aus einem Azobenzolschalter geschlossen ist. Der zweite Ring wird erzeugt durch die geschlossene Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen im gleichen Peptidrückgrat. Der Azobenzolschalter besitzt in para-Stellung zur Azokuppung an einem Ende eine Säure- und am anderen Ende eine Aminogruppe und bildet so die pseudo-Aminosäure AMPB (oder: (4-aminomethyl)phenylazobenzolsäure). Nur um die Einfachbindungen zur Methylengruppe zwischen Aminogruppe und Azobenzol sind Drehungen möglich, so dass der Schalter Azobenzol durch seine cis/trans-Isomerisation einen sehr direkten Einfluss auf das Peptidrückgrat besitzt [Ren00].

Durch die lichtinduzierte Isomerisierung vom cis-Isomer in das trans-Isomer wird von einem Ensemble an Peptidkonformationen in eine mehr gestreckte Anordnung geschaltet, die sehr viel besser definiert ist. Innerhalb der ersten Pikosekunden nach Photoanregung wird ebenfalls ein Rückgang einer Rotverschiebung der Amid-I Bande beobachtet [Bre03d, Bre03e]. Die Zeitkonstante für die Relaxation dieser Rotverschiebung wurde zu 4 ps bestimmt [Sie05]. Diese Beobachtungen stimmen gut mit den im Rahmen dieser Arbeit gemachten überein. Auch im Fall des AzoTrpZip2 findet sich für die Isomerisierung von cis nach trans eine Zeitkonstante von 4,1 ps, welche einen Rückgang der Rotverschiebung der Amid-I' Bande andeutet. Beachtet man, dass im Fall der Studie von bcAMPB

das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid war und im Fall des AzoTrpZip2 Methanol-d₄, so scheint dies eine vom Lösungsmittel unabhängige Zeitkonstante zu sein. Sie wird deswegen interpretiert als anharmonische Kopplung von niederfrequenten Moden an die Amid-I' Bande, welche zu einer Rotverschiebung derselben führt. Die Anregung der niederfrequenten Schwingungen ist dabei wohl auf Kühlprozesse und die Isomerisierung des Photoschalters Azobenzol zurückzuführen.

Im Falle des bcAMPBs stellt sich schon 20 ps nach Photoanregung ein transientes Spektrum ein, das dem stationären Differenzspektrum sehr ähnlich ist. Dies unterscheidet sich von dem hier vorgestellten Fall der Entfaltung des AzoTrpZip2, bei dem die gute Übereinstimmung erst nach der 630 ps Kinetik sichtbar wurde. Durch die erfolgte Isomerisierung des Photoschalters scheint bei bcAMPB das Peptidrückgrat bereits weitgehend in der gestreckten Endkonformation vorzuliegen. Aber ähnlich wie im Fall des AzoTrpZip2 beobachtet man hier auch nach 16 ns noch keine vollständige Übereinstimmung des transienten Spektrums und des stationären Differenzspektrums. Hier musste auf eine Zeitkonstante von > 16 ns geschlossen werden, mit der die Endkonformation erreicht wird. Im Falle des AzoTrpZip2 wird nach 3,1 ns ebenfalls ein transientes Spektrum beobachtet, das nicht mit dem stationären Differenzspektrum übereinstimmt, diesem aber qualitativ sehr ähnlich ist. Diese Interpretation wurde durch MD-Simulationen im wesentlichen bestätigt [Ngu06a, Ngu06b].

Auch im Fall der Studie zum bcAMPB wurde zum Vergleich ein Referenzpeptid vermessen. Dies wird als lineares AMPB oder kurz lAMPB bezeichnet. Es besitzt die Sequenz H-Phe-AMPB-Ala-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly-OH, wobei die beiden Cysteine nicht verbrückt (anders als bei bcAMPB), sondern mit einer Schutzgruppe versehen sind. Dieses lineare Vergleichspeptid zeigt bei der cis nach trans Reaktion Dynamiken bis wenige 100 ps nach Photoanregung. Eine sehr ähnliche Zeitkonstante wurde im Rahmen dieser Arbeit für das Referenzpeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂ gefunden.

Vergleich mit Entfaltungsstudien am trpzip2

Das hier vorgestellte photoschaltbare Modellpeptid AzoTrpZip2 wurde von dem β -Hairpin Modellpeptid trpzip2 abgeleitet, das an Stelle des AMPP Schalters die beiden Aminosäuren Asparagin und Glycin in der Schleife besitzt (siehe auch Abb. 4.6). Mittels Temperatursprungmethoden wurde für das Peptid trpzip2 durch Abtasten der Absorptionsänderungen im Bereich der Amid-I' Bande bei 1624 cm⁻¹ im Lösungsmittel D₂O eine Entfaltungszeitkonstante von 24,7 μ s ermittelt [Sno04]. Diese Entfaltungszeitkonstante wurde aus einem zwei-Zustands-Modell berechnet, wobei in die Auswertung auch die Gleichgewichtskonstante zwischen dem gefalteten und ungefalteten Zustand eingeht. Bei den Temperatursprungmessungen ist jedoch nicht klar, ob ein wirklich ungefalteter Zustand durch Temperaturerhöhung erreicht wird. Diese Diskussion wird weiter unten in Abschnitt 6.5.2 vertieft.

Deswegen lässt sich diese Zeitkonstante schwer mit den hier gemessenen Zeitkonstanten für die Entfaltung von 4,1 ps, 26 ps und 630 ps vergleichen. Durch die Isomerisierung des Azobenzolschalters im Modellpeptid AzoTrpZip2 wird das Peptid nicht thermisch aus seinem Gleichgewicht ausgelenkt, sondern mehr mechanisch durch die Schaffung einer neuen Schleifengeometrie, was innerhalb weniger Pikosekunden nach der Anregung

erfolgt. Diese Geometrieänderung stört die Peptidstruktur stärker. Das Peptid wird weit aus seiner Gleichgewichtsgeometrie ausgelenkt und relaxiert anschließend auf der Energielandschaft des trans-Isomers des AzoTrpZip2, siehe Abb. 6.1, rote Linie. Diese Tatsache könnte den Unterschied in den gemessenen Zeitkonstanten erklären.

Vergleich mit dem Entfalten eines β -Turns

Ein dem hier vorgestellten Strukturmotiv des β -Hairpins verwandtes β -artiges Motiv ist der β -Turn. Ein entsprechendes Modellpeptid mit β -Turn Struktur wurde von Kolano et al. vorgestellt [Kol04]. Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten in diesem Tetrapeptid der Sequenz cyclo(Boc-Cys-Pro-Aib-Cys-OMe) führt zu dessen Zyklisierung. Durch NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid bei geschlossener Disulfidbrücke eine β -Turn Struktur ausbildet, welche zusätzlich noch von einer Wasserstoffbrücke zwischen einer Carbonyl- und einer Aminofunktion stabilisiert wird [Kol04].

Durch einen Anregimpuls im ultravioletten Spektralbereich kann die Disulfidbrücke gelöst werden. Dabei konnten Kolano et al. ein Entfalten der β -Turn Struktur mit einer Zeitkonstante von 160 ps beobachten [Kol06]. Langsamere Prozesse konnten Kolano et al. nicht eindeutig verfolgen, da mit einer Zeitkonstante von ca. 2,6 ns eine Rekombination der durch die Photoanregung gebildeten Radikale mit Lösungsmittelmolekülen³ oder mit anderen Reaktionspartnern beobachtet wurde. Die Zeitkonstante von 160 ps kann mit den Entfaltungszeitkonstanten der β -Hairpin Struktur des AzoTrpZip2 verglichen werden. Die Entfaltung der β -Turn Struktur des AzoTrpZip2 findet auf einer Zeitskala von 26 ps statt, also etwas schneller als im Fall des Tetrapeptids von Kolano et al. Dies könnte an der größeren treibenden Kraft des isomerisierenden Azobenol-Schalters AMPP liegen.

Zusätzlich konnten Kolano et al. mittels der Methode der transienten zweidimensionalen Infrarotspektroskopie (siehe dazu Seite 21) zeigen, dass beim Öffnen der β -Turn Struktur auch die oben erwähnte Wasserstoffbrückenbindung stark geschwächt wird, da sich der Abstand zwischen den an der Bindung beteiligten Wasserstoff- und Sauerstoffatomen vergrößert. Jedoch scheint die Bindung nicht vollständig zu brechen. Gleichzeitig wurde eine Blauverschiebung der Absorptionsbande des betroffenen Carbonyloszillators beobachtet.

Vergleich mit einer Energielandschaft des trpzip2

Yang et al. haben temperaturabhängige Circular dichroismus-, Fluoreszenz- und Infrarotspektren des Peptids trpzip2 in gepufferter wässriger Lösung aufgenommen [Yan04b]. Zusätzlich haben sie die Konzentration von Guanidiniumhydrochlorid variiert. Sie fanden drei wesentliche Temperaturregionen (17-32 °C, 48-75 °C und 162 °C). Im niedrigsten Temperaturbereich wurde ein Anstieg der Tryptophanfluoreszenzintensität beobachtet, der mit einer erhöhten Beweglichkeit der Tryptophanseitenketten interpretiert wurde.

³Als Lösungsmittel wurde wegen der guten Löslichkeit des untersuchten Modellpeptids deuteriertes Acetonitril verwendet.

Für alle spektroskopischen Observablen wurde ein breiter Übergang im nächst höheren Temperaturbereich gefunden. Dies wurde als wichtigster Entfaltungsübergang interpretiert und mit der Bildung von nahezu ungefalteten Peptidstrukturen erklärt. Der Übergang bei 162 °C wurde im Experiment nur nach Zugabe von Guadiniumhydrochlorid beobachtet. Er führt zu einer Änderung im Fluoreszenzspektrum, welche durch den Verlust von verbliebenen Kontakten zwischen den Tryptophanseitenketten interpretiert wurde.

Mittels MD-Simulationen bei verschiedenen Temperaturen wurde in [Yan04b] versucht, diese experimentellen Befunde zu erklären. In den Simulationen wurde als Struktur mit minimaler Energie diejenige gefunden, die durch die NMR-Strukturanalyse für das Peptid trpzip2 bestimmt wurde. Bei niedrigen Temperaturen unterhalb von 37 °C zeigt die freie Energie in Abhängigkeit von einer Reaktionskoordinate⁴ ein recht komplexes Verhalten. Als am tiefsten liegendes Minimum tritt annähernd die NMR-Struktur des Peptids auf. In etwas größerem Abstand entlang der Reaktionskoordinate finden sich jedoch einige weitere tief liegende Minima. Entsprechende Minima mussten auch in der im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagenen Energielandschaft des AzoTrpZip2 eingeführt werden (Abb. 6.1).

6.5.2 Faltung der β -Hairpin Struktur

Die wesentliche Zeitkonstante, die bei der Faltung diskutiert werden muss, liegt im Mikrosekundenbereich bei 30 μ s. Für sie gilt es, verschiedene Vergleichs- und Erklärungsansätze zu finden.

Vergleich mit Faltungsstudien am trpzip2 und anderen β -Hairpin Modellpeptiden

Im folgenden soll etwas genauer auf das Experiment von Snow et al. eingegangen werden, da sie eine Faltungszeitkonstante für das dem AzoTrpZip2 verwandte Peptid trpzip2 von 2,47 μ s gefunden haben [Sno04]. Diese ist deutlich kleiner als die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Zeitkonstante von 30 μ s für die Faltung des AzoTrpZip2 in Methanol-d₄.

Snow et al. setzten eine Lösung des nicht-photoschaltbaren Peptids trpzip2 in schwerem Wasser mit einer Konzentration von 50 μ M und einem Phosphatpuffer der Konzentration 20 mM an, um die Relaxation des Peptids in das thermodynamische Gleichgewicht nach einem Temperatursprung zu untersuchen. Der mittels eines Nahinfrarotlichtimpulses bei 1900 nm ausgelöste Temperatursprung betrug 10 °C bis 15 °C [Sno04]. Die Abtastwellenlänge lag bei 1624 cm^{-1} . Da bei 20 °C kaum eine Absorptionsänderung nach einem Temperatursprung zu beobachten war, wurde eine "geringe" Konzentration von 1-3 M Guadiniumhydrochlorid hinzugegeben. Diese Chemikalie tritt in Wechselwirkung mit dem Peptid trpzip2 und soll den gefalteten Zustand destabilisieren. Die gemessene Relaxationsrate war nicht stark von der Konzentration von Guadiniumhydrochlorid abhängig, so dass durch eine Extrapolation auf eine verschwindende Konzentration von Guadiniumhydrochlorid die Relaxationsrate ohne Einsatz einer Denaturierung ermittelt

⁴Als Reaktionskoordinate wurde die mittlere quadratische Abweichung von den C α -Atomen der NMR-Struktur verwendet.

wurde. Über ein Zwei-Zustandsmodell konnte dann mit der aus Circular dichroismmessungen ermittelten Gleichgewichtskonstante eine Faltungszeit von $2,47 \mu\text{s}$ bestimmt werden.

Diese Zeitkonstante ist deutlich kleiner als die in dieser Arbeit ermittelte Faltungszeitkonstante des AzoTrpzip2 von $30 \mu\text{s}$. Diese Diskrepanz kann erklärt werden, wenn man sich die Ausgangsstruktur überlegt, die in den Temperatursprungexperimenten erreicht wird. Smith et al. konnten zeigen, dass ein Temperatursprung von $10 \text{ }^\circ\text{C}$ die β -Hairpin Struktur nicht allzu stark stört [Smi05].

Mittels NMR-Spektroskopie konnten Meier et al. zeigen, dass auch nach Zugabe einer denaturierend wirkenden Chemikalie wie Harnstoff (Konzentration: 8 M) native Wechselwirkungen in einem β -Hairpin Modellpeptid nachweisbar waren [Smi07b]. Durch die Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid konnten Snow et al. möglicherweise die β -Hairpin Struktur des trpzip2 doch nicht wesentlich destabilisieren [Sno04]. Nach einem Temperatursprung findet das Peptid wieder schnell in seine gefaltete Struktur zurück, wodurch sich die schnelle gemessene Zeitkonstante von Snow et al. erklären lässt. In einer weiteren Studie konnten Smith et al. mittels einem Temperatursprung kombiniert mit einer Abtastmethode basierend auf nichtlinearer Infrarotspektroskopie („dispersed vibrational echo“) zeigen, dass ein Temperatursprung nur zu einem Abrastern von Konformationen in der Nähe des gefalteten Zustandes führt. Eine realistische Faltungszeitkonstante kann mittels einer Temperatursprungmethode nicht ermittelt werden, da die Landschaft der Gibbsschen freien Energie deutlich komplexer ist, als durch ein Abrastern von Konformationen in der Nähe des gefalteten Zustandes erfasst werden kann. Weiter entfernt liegende lokale Minima, die beim Faltungsprozess von Bedeutung sind und geschwindigkeitslimitierend wirken können, werden also durch einen Temperatursprung nicht erreicht.

Damit ist die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Zeitkonstante von $30 \mu\text{s}$ offensichtlich ein realistischerer Wert für die Faltung einer β -Hairpin Struktur des trpzip2-Motifs als der bisher in der Literatur dafür etablierte Wert von Snow et al.

Die Untersuchungen des Infrarotspektrums des AzoTrpZip2 in Abhängigkeit von der Temperatur unterstützen diese Interpretation, da sie zeigen, dass durch die Einführung des Schalters AMPP in den Turn, die β -Hairpin Struktur nicht wesentlich destabilisiert wird. Ein Aufschmelzen konnte nicht nachgewiesen werden. Dennoch ist es eine interessante Fragestellung, ob ein Temperatursprungexperiment am AzoTrpZip2 an Stelle des trpzip2 ähnlich schnelle Faltungszeiten um $2 \mu\text{s}$ beobachtet werden. Dies wäre damit der endgültige Beweis für diese Hypothese.

Die Faltungszeiten von anderen β -Hairpin Modellpeptiden mit vergleichbarer Anzahl an Aminosäuren umfassen einen Zeitbereich von $0,8 \mu\text{s}$ für „peptide I“ [Xu03] bis zu ca. $20 \mu\text{s}$ für „ubiquitin“ [Kub04]. Der in Abbildung 4.3 vorgestellte β -Hairpin aus dem Protein GB1P weist eine Faltungszeitkonstante von $6 \mu\text{s}$ auf. Die Faltungszeitkonstante des TrpZip4 ist $13 \mu\text{s}$ [Mun97]. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Faltungszeitkonstante des AzoTrpZip2 von $30 \mu\text{s}$ lässt sich mit diesen Zeitkonstanten also durchaus vergleichen.

Schleifenbildung von kurzen Aminosäureketten

In einer Studie über die Bildung von Loops aus Aminosäureketten unterschiedlicher Länge fanden Fierz et al. eine Separation in zwei Zeitbereiche [Fie07]: Den langen Zeitbereich oberhalb von 50 ns schrieben sie einer diffusiven Suche des Peptids auf der Energielandschaft zu. Der Zeitbereich bis hinunter zu 500 ps repräsentiert eine Suche innerhalb eines Minimums in der Energielandschaft, welche Moleküle betrifft, die beim Start des Beobachtungsvorgangs bereits eine gewisse Nachbarschaft (lokales Minimum der freien Energie) besaßen.

Bei der Faltung des AzoTrpZip2 in seine β -Hairpin Struktur wird der Loop (cis-AMPP) durch die Isomerisierung des Photoschalters in wenigen 10 ps gebildet. Selbst eine diffusive Suche einzelner Bindungen zwischen den beiden Strängen sollte auf einer ähnlichen Zeitskala (50 ns) ablaufen, wie sie auch schon für die in Ref. [Fie07] untersuchten Modellpeptide gefunden wurde. Die wesentlich längere beobachtete Zeitkonstante von 30 μ s für die Faltung der β -Hairpin Struktur des AzoTrpZip2 legt also nahe, dass es Intermediate gibt, die nicht-native Wechselwirkungen aufweisen (siehe Abb. 6.11, rechts oben). Dies können Wasserstoffbrückenbindungen sein, die in der finalen β -Hairpin Struktur nicht vorkommen oder hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Tryptophanseitenketten, welche einen hydrophoben Kern bilden, der den Übergang in die native β -Hairpin Struktur verzögert.

Vergleich mit der Ausbildung einer α -Helix

Bredenbeck et al. untersuchten ein photoschaltbares Modellpeptid für eine α -Helix. Das 16 Aminosäuren umfassende Peptid weist zwei Cysteine auf, die durch einen symmetrisch substituierten auf Azobenzol basierenden Photoschalter verbrückt sind. Dieses Modellpeptid mit der Sequenz Ac-EACAREAAAREAACRQ-NH₂ bildet eine α -Helix aus, wenn der Photoschalter seine trans-Konformation einnimmt [Bre05b]. Liegt der Photoschalter als cis-Isomer vor, kann diese α -Helix nicht entstehen. Zur Untersuchung der Faltung der α -Helix wurde eine wässrige Lösung dieses Peptids mittels Dauerstrichbelichtung im photostationären Zustand des cis-Isomers präpariert. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit wurde die Faltung zum trans-Isomer mit einem Anregimpuls bei 425 nm ausgelöst. Mit einem Abtastimpuls im Bereich der Amid-I' Bande wurden die spektralen Änderungen aufgrund der Faltungsprozesse detektiert. Zunächst wurden große Signaländerungen auf der Pikosekundenzeitskala beobachtet, welche auf ein Ausbleichen der Schalterbanden und eine initiale Rotverschiebung der Amid-I' Bande des Peptids zurückzuführen sind. Zwischen 100 ps und 7 ns wird ein transientes Spektrum erreicht, das geprägt ist durch eine geringe Absorptionsänderung bei fast allen Wellenzahlen in der Amid-I' Bande. Erst mit einer Zeitkonstante von ca. 1,2 μ s bei 20 °C stellt sich eine Absorptionszunahme bei 1630 cm⁻¹ ein, welche mit dem stationären Differenzspektrum übereinstimmt. Diese letzte Zeitkonstante wurde als die Faltungszeitkonstante der α -Helix Struktur interpretiert. Sehr ähnliche Beobachtungen wurden auch bei einem ähnlichen α -Helix Modellpeptid mit leicht veränderter Sequenz gemacht [Iha07].

Im Falle der Faltungsreaktion des AzoTrpZip2 wurde ebenfalls 3,1 ns nach Auslösung der Photoisomerisierung ein transientes Spektrum mit geringer Signalamplitude

erreicht, das nicht mit dem stationären Differenzspektrum übereinstimmt. Mit einer Zeitkonstante von $30 \mu\text{s}$ wurde bei einer Wellenzahl von 1641 cm^{-1} eine Absorptionzunahme beobachtet. Diese Zeitkonstante wurde deswegen als Faltung der β -Hairpin Struktur des AzoTrpZip2 interpretiert. In der Literatur wird allgemein davon ausgegangen, dass α -Helices sich schneller ausbilden als β -Hairpins [Kub04], was für die hier verglichenen Modellpeptide auch zutrifft.

6.6 Ausblick

Die in den vorherigen Kapiteln dargestellten Daten, welche mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie gewonnen wurden, entwerfen ein detailliertes Bild der Faltungsvorgänge in dem Modellpeptid AzoTrpZip2. Das Design dieses Modellpeptids erlaubt jedoch noch weitere interessante Experimente, auf die im folgenden eingegangen wird. Darüber hinaus sei auf eine mögliche Fortführung und Vertiefung der Erforschung der Peptiddynamik dieses Modellsystems eingegangen. Zunächst kann die Untersuchung der Faltung des AzoTrpZip2 im Zeitbereich von Nano- und Mikrosekunden zu einer β -Hairpin Struktur durch die spektral aufgelöste IR-Detektion noch erweitert werden. Darauf eröffnet sich die Möglichkeit, durch Variation von Temperatur oder Dielektrizitätskonstante neue Einsichten in die Abhängigkeit der Peptiddynamik von diesen verschiedenen Parametern zu studieren. Zum Teil in Kooperation mit anderen Forschungsgruppen können auch unterschiedliche Observablen eingesetzt werden, um die Dynamik anderer Komponenten des Modellpeptids zu untersuchen als das Peptidrückgrat, das hier bereits über die zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie beobachtet wurde. Auch andere Auslösemethoden für die Peptiddynamik und ein Vergleich der Ergebnisse mit den hier vorgestellten Daten sollten weitere Erkenntnisse liefern⁵.

6.6.1 Spektral aufgelöste Messungen der Faltungsdynamik des AzoTrpZip2 im ns- und μ s-Bereich

Die Messungen zur Faltungsdynamik des AzoTrpZip2 im Nano- und Mikrosekundenzeitbereich konnten bisher nur bei einer Infrarotabstastwellenlänge durchgeführt werden. Eine genauere Analyse von Intermediaten und die Gewinnung von deren Infrarotspektren ist jedoch nur mit einer spektral aufgelösten Detektion möglich. Deswegen wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Michael Brandl ein weiterer Laser mit einer Impulsdauer von 1 ns und einer Wellenlänge von 1064 nm mit dem bestehenden regenerativen Verstärker elektronisch synchronisiert [Bra07]. Dieser Laser dient zur Erzeugung der Anregungsimpulse, die nun elektronisch gegen den bestehenden Infrarotabstastimpuls verzögert werden können. Durch Frequenzverdopplung und -verdreifung der Fundamentalen bei 1064 nm können zusätzlich noch Anregungsimpulse bei den Wellenlängen 532 nm und 355 nm erzeugt werden. Ein sehr ähnliches Konzept wurde bereits von Towrie et al. vorgestellt [Tow05].

Eine Synchronisation von zwei Ti:Saphir Oszillatoren mit nachgeschalteten regenerativen Verstärkern wurde von Bredenbeck et al. demonstriert [Bre04a]. Letzteres Konzept erlaubt zusätzlich eine im allgemeinen größere Auswahl an Anregungswellenlängen, da auf die bekannten nichtlinearen Prozesse zur Erzeugung von unterschiedlichsten Wellenlängen aus der Fundamentalen bei 800 nm zurückgegriffen werden kann.

Eine weitere, vielversprechende Realisierung eines zeitaufgelösten Infrarotspektrometers mit einer Zeitauflösung von ca. 10 ns wurde von Yuzawa et al. vorgestellt [Yuz94]. Ihr Aufbau ähnelt dem in Abbildung 3.7 vorgestellten, bietet jedoch die zusätzliche

⁵In einem solchen Experiment sollte die Nachweismethode Infrarotspektroskopie der besseren Vergleichbarkeit wegen beibehalten werden.

Möglichkeit der Aufnahme von vollständigen Spektren zu einer bestimmten Verzögerungszeit.

Die hier gewählte Anordnung besitzt im Vergleich zu kommerziell realisierten Methoden zur Messung von transienten Spektren im mittleren infraroten Spektralbereich (wie zum Beispiel der sogenannten Step-Scan-FTIR Spektroskopie [Gri06, Efr06, Mor07] und des Rapid Scans [Fab04, Fab04, Lud06]) den entscheidenden Vorteil einer höheren Zeitauflösung von ca. 1 ns und einer deutlich besseren Amplitudenauflösung bei vergleichbaren Mittelungszeiten. Darüber hinaus erhält man in einem begrenzten Wellenlängenbereich schon innerhalb von ca. 20 Minuten sinnvolle transiente Spektren. Dies reduziert die Anforderungen an die zu messende Probe, welche in der Step-Scan-FTIR Spektroskopie zumeist über Stunden stabil sein muss.

Eine Messung des AzoTrpZip2 bei Raumtemperatur mit einer Anregung bei 355 nm bis zu einer Verzögerungszeit von 200 μ s sollte die Spektren aller auftretenden Faltungsintermediate liefern. Dies würde wichtige Einblicke in die Faltungsdynamik des Peptidrückgrats bei der Ausbildung einer β -Hairpin Struktur ermöglichen.

6.6.2 Temperaturabhängige Messungen der Faltungsdynamik des AzoTrpZip2

Auch wenn im Kapitel 4.5.2 gezeigt wurde, dass es schwierig ist, aus den stationären Infrarotspektren in Abhängigkeit von der Temperatur ein signifikantes Aufschmelzen der β -Hairpin Struktur zu erkennen, heißt das nicht, dass die gemessenen Zeitkonstanten für die Entfaltung bzw. Faltung keine Temperaturabhängigkeit aufweisen. Durch die Messung der Faltungs- und Entfaltungsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Temperatur lassen sich Aussagen über die Existenz von Barrieren und deren energetische Lage machen. Zudem lassen sich thermodynamische Faltungsmodelle zur Erklärung der gemessenen Temperaturabhängigkeit heranziehen und somit auf ihre Gültigkeit hin überprüfen [Bre05b, Iha07].

Eine temperierbare Version des Probenkreislaufs aus Abbildung 3.8 wurde im Rahmen zweier Praktika bereits entwickelt [Sou06, Fel05] und soll in naher Zukunft eingesetzt werden.

6.6.3 Zeitaufgelöste Messung der Tryptophanfluoreszenz

Es besteht in der Literatur eine Unsicherheit darüber, ob sich bei der Faltung eines β -Hairpins zuerst ein hydrophober Kern aus den Seitenketten herausbildet und daraufhin die Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrats entstehen [Din99] oder ob zunächst ein β -Turn vorgegeben wird, der dann für eine sequentielle Ausbildung aller stabilisierenden Wasserstoffbrücken sorgt [Mun97]. Im letzteren Fall wird der hydrophobe Kern erst sehr spät ausgebildet. Um diese Frage zu untersuchen, müsste der Zeitpunkt für die Ausbildung des hydrophoben Kerns gemessen werden. Diese Information kann dann mit den Daten der Dynamik des Peptidrückgrats aus dieser Arbeit verglichen werden.

Ein Sensor für den hydrophoben Kern ist zum Beispiel die Fluoreszenz der Tryptophanseitenketten. Sie wurde bereits benutzt, um die Relaxation des hydrophoben Kerns

des trpzip2 in seinen Gleichgewichtszustand nach einem Temperatursprung als Auslöser zu beobachten [Yan04a]. Die Fluoreszenz wurde dabei alle 14 ns von der verdreifachten Fundamentalen eines modengekoppelten Ti:Saphir Oszillators bei 288 nm angeregt und mit einem Photomultiplier abgetastet [Yan03]. Es wurde eine vergleichsweise geringe Konzentration an Peptidmolekülen von ca. 11 μM und eine geringe Anregungsenergie-dichte gewählt, um das Photobleichen der Tryptophane und intermolekulare Wechselwirkungen zu verhindern [Yan04a]. Die Fluoreszenzlebensdauer von Tryptophanseitenketten in Proteinen liegt im Bereich von einigen Nanosekunden [God93] und ist stark von den Umgebungsbedingungen abhängig.

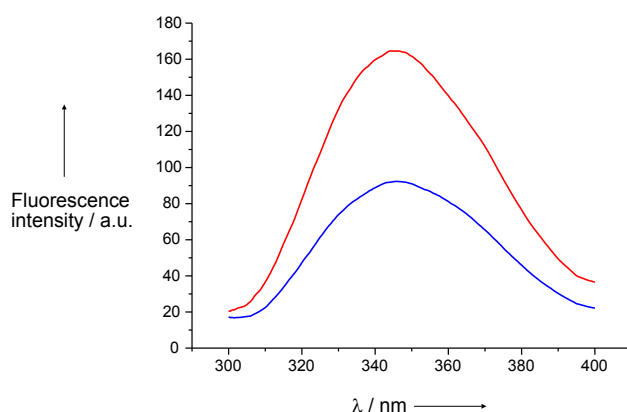


Abbildung 6.12: Tryptophanfluoreszenz vor (trans-AzoTrpZip2, blaue Kurve) und nach Belichtung bei 360 nm (cis-AzoTrpZip2, rote Kurve). Die Anregungswellenlänge war jeweils 280 nm. Bild entnommen aus [Don06].

Abbildung 6.12 zeigt, wie das Fluoreszenzspektrum und die Intensität der Fluoreszenz sich ändern, wenn man vom trans-Isomer des AzoTrpZip2 in sein cis-Isomer wechselt. Es besteht also ein deutlicher Unterschied in den Fluoreszenzeigenschaften der Isomere. Ein entsprechendes Experiment könnte in der Auslösung der Faltung mittels eines Laserimpulses bei 355 nm oder bei 400 nm bestehen, worauf zeitlich korreliert die Fluoreszenz bei ca. 288 nm angeregt und bei ca. 350 nm abgetastet werden müsste. Ausgehen würde man von einem Ensemble an trans-Isomeren des AzoTrpZip2.

Hier gibt es jedoch zwei Probleme: Zum einen absorbiert der Farbstoff Azobenzol auch einen Teil des Anregungslichts zur Erzeugung der Fluoreszenz, siehe dazu Abbildung 4.17. Zum anderen absorbiert das trans-Isomer des AzoTrpZip2 auch im Wellenlängenbereich der zu erwartenden Fluoreszenz. Diese beiden Effekte erschweren eine entsprechende Messung.

Der Vorteil dieser Messung gegenüber den Temperatursprungmethoden unter Verwendung der gleichen Observablen Infrarotspektroskopie liegt jedoch darin, dass durch die optische Isomerisierung des Schalters Azobenzol von trans nach cis innerhalb weniger 100 ps eine geeignete β -Turn-Sequenz erzeugt wird, woraufhin sich die β -Hairpin Struktur ausbilden kann. Die Geschwindigkeitskonstante, mit der sich die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, konnte im Rahmen dieser Arbeit zu 30 μs bestimmt werden. Mit der zeitabhängigen Messung der Tryptophanfluoreszenz ließen sich nun zusätzliche Rückschlüsse über den Zeitpunkt der Ausbildung des entsprechenden hydrophoben Kerns der β -Hairpin Struktur ziehen.

6.6.4 Transiente zweidimensionale Infrarotmessungen am AzoTrpZip2

Die zweidimensionalen Infrarotmessungen von Smith et al. an dem β -Hairpin Modellpeptid trpzip2 in Abhängigkeit von der Temperatur haben gezeigt, dass auch bei hohen Temperaturen noch signifikant die β -Hairpin Struktur vorhanden ist [Smi05]. Dies wurde über eine Kopplung mehrerer Carbonyl-Oszillatoren auf verschiedenen Strängen nachgewiesen, welche auch bei hohen Temperaturen noch erkennbar war. Eine Vergrößerung des Abstandes zwischen den Carbonyl-Oszillatoren, wie sie bei einer Entfaltung zu erwarten wäre, hätte das Kopplungssignal verkleinern müssen, was jedoch nicht gefunden wurde. Im Prinzip lässt sich also mittels zweidimensionaler Infrarotspektroskopie der Abstand zwischen den beiden Strängen ausmessen und somit der Faltungsgrad der β -Hairpin Struktur bestimmen [Bre03a].

Kombiniert man diese Abtastmethode mit dem Auslösen der Entfaltung bzw. Faltung durch einen Laserimpuls, wie es im Falle des Modellpeptids AzoTrpZip2 möglich ist, so kommt man zur sogenannten transienten zweidimensionalen Spektroskopie (engl. transient 2-dimensional infrared spectroscopy, T2dIR) [Bre04b, Bre03c, Chu07, Hoc07]. Ein solches Experiment durchgeführt an der Entfaltung bzw. Faltung des AzoTrpZip2 lässt viele neue Informationen erwarten [Bre05a].

6.6.5 Vergleich mit einer anderen Auslösemethode für die Peptiddynamik

Die Experimentvorschläge des vorigen Kapitels zielen darauf ab, eine neue Observable für die Peptiddynamik des AzoTrpZip2 mit der in dieser Arbeit verwendeten Infrarotspektroskopie als Detektionsmethode zu vergleichen. Es stellt sich aber auch die Frage, ob die Auslösemethode der Faltungsprozesse mittels der Isomerisierung des Azobenzolschalters AMPP einen Einfluss auf die beobachtete Dynamik hat. Nachdem die mittels Temperatursprung gemessenen Zeitkonstanten für die Faltung und Entfaltung des trpzip2 in schwerem Wasser große Abweichungen zeigen von den im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Zeitkonstanten nach Isomerisierung des Schalters des AzoTrpZip2, erscheint es sinnvoll, ebenfalls Temperatursprungmessungen am Modellpeptid AzoTrpZip2 vorzunehmen. Bei Wahl der Infrarotspektroskopie als Nachweismethode sollten sich ähnliche Dynamiken ergeben, falls die verschiedenen Auslösemethoden (Temperatursprung des Lösungsmittels oder Isomerisierung eines Photoschalters) ähnliche Wirkungen entfalten.

Die Messungen von Smith et al. zeigen jedoch schon, dass man mittels der Temperatursprünge vermutlich die β -Hairpin Struktur nicht vollständig zerstören kann [Smi05]. Damit werden die Zeitkonstanten für die Relaxation zurück ins Gleichgewicht kürzer sein, als bei Auslösung der Faltung über eine Isomerisierung des Photoschalters.

7 Zusammenfassung

Die Proteinfaltung ist wegen ihrer Relevanz bei der Entstehung von Krankheiten wie Alzheimer und Creutzfeld-Jacobsen Gegenstand intensiver Forschungen. Es werden Fragestellungen untersucht wie: Gibt es langlebige Intermediate, die bei Fehlfaltungen und daraus resultierenden Aggregationsprozessen eine Rolle spielen könnten? Was sind die initialen Schritte der Proteinfaltung nach der Synthese der Proteine in den Ribosomen der Zelle? Wie schnell können sich Sekundärstrukturelemente ausbilden wie α -Helices und β -Faltblätter? Für letztere Fragestellung greift man am besten auf Modellpeptide zurück, welche als Untereinheiten von natürlichen Proteinen auftreten und die entsprechende Sekundärstruktur ausbilden. Der Vorteil solcher Modellpeptide liegt darin, dass an ihnen die Faltung und Entfaltung dieser Sekundärstrukturelemente getrennt von der Dynamik eines ganzen Proteins studiert werden kann. Zudem bieten diese Modellpeptide die Möglichkeit, durch Molekulardynamiksimulationsrechnungen deren Peptiddynamik auf einer theoretischen Ebene nachzubilden und somit besser zu verstehen.

Während es einige geeignete Modellsysteme zur Untersuchung der Peptiddynamik von α -Helices gibt, war die Auswahl an geeigneten Modellsystemen für β -Faltblätter zunächst begrenzt. Ein Durchbruch gelang mit der Aminosäuresequenz des sogenannten trpzip2. Dieses Modellpeptid bildet in Wasser eine sogenannte β -Hairpin Struktur aus, welche U-förmig ist, wobei vier Aminosäuren eine Kehre bilden und jeweils weitere vier die beiden Stränge (die senkrechten Striche des Us). Eine solche β -Hairpin Struktur dient als Modell für das Sekundärstrukturelement der β -Faltblätter. Es wird vermutet, dass die Ausbildung einer β -Hairpin Struktur Voraussetzung für die Bildung von β -Faltblättern ist. Das Peptid trpzip2 war so entworfen, dass sich ein sogenannter hydrophober Kern aus den Seitenketten von jeweils zwei Tryptophanen gegenüberliegender Stränge ausbildet. Der Gruppe um Professor Moroder gelang es nun, die zwei Aminosäuren der Schleife in der Kehre des trpzip2 durch die pseudo-Aminosäure 3-(3-Aminomethyl-phenylazo)-phenylelessigsäure (kurz: AMPP) zu ersetzen. Das so synthetisierte Modellpeptid wird im folgenden AzoTrpZip2 genannt. Die eingebaute pseudo-Aminosäure ist ein Azobenzolderivat und lässt sich durch Photoanregung vom trans- in das cis-Isomer schalten und umgekehrt.

Der Einbau eines Photoschalters ermöglicht die Untersuchung der schnellsten Faltungsprozesse. Zudem präpariert der Photoschalter zur Auslösung der Peptidfaltungsprozesse die Modellpeptide in speziellen Nicht-Gleichgewichtszuständen, welche durch andere Auslösemethoden (wie z. B. Temperatursprungmethoden) nicht erreicht werden können. Solche Nicht-Gleichgewichtszustände können jedoch in der Natur nach der Synthese des Peptids in den Ribosomen der Zelle eine Rolle spielen. Darüber hinaus ist es nur mittels des eingebauten Photoschalters möglich, Faltungsintermediate zu beobachten. Um Informationen über die Struktur dieser Intermediate zu gewinnen, wurde die Infrarotspektroskopie im Bereich der Amid-I' Bande als Abtastmethode gewählt. Über

die spektrale Form der Absorption des Peptids im Bereich der Amid-I' Bande kann auf dessen momentane Struktur geschlossen werden. Die Untersuchung von Modellpeptiden mit dem Photoschalter AMPP mit der Methode der Anreg-Abtast-Spektroskopie erlaubt Zeitaufösungen von wenigen Pikosekunden und ist limitiert durch die Isomerisierungsgeschwindigkeit des Photoschalters.

Als Lösungsmittel wurde deuteriertes Methanol gewählt: Zum einen, weil es die Bildung eines β -Hairpins begünstigt und eine Aggregation unwahrscheinlicher macht. Zum anderen, weil die Faltungs- und Entfaltungsprozesse zeitaufgelöst mittels Infrarotspektroskopie beobachtet werden sollten. Hierbei eignet sich Wasser wegen seiner hohen Absorption im Bereich der struktursensitiven Amid-I' Bande in Transmission nicht. Deswegen wurde deuteriertes Methanol verwendet, da dessen Absorption hier besonders gering war. Methanol ist ebenso wie Wasser in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Dies erlaubt auch eine realistische Beobachtung der Dynamik der Wasserstoffbrückenbindungen während der Faltungs- und Entfaltungsprozesse.

Mittels NMR- und CD-Spektroskopie konnte die Gruppe Moroder zeigen, dass etwa die Hälfte der Moleküle mit dem Photoschalter AMPP als cis-Isomer (kurz: cis-AzoTrpZip2) in Methanol bei Zimmertemperatur eine β -Hairpin Struktur ausbilden. Das Ensemble an trans-Isomeren des AzoTrpZip2 weist keine β -Hairpin Struktur auf, sondern zeigt eine Verteilung von zwei verschiedenen Strukturklassen. Das Modellpeptid trans-AzoTrpZip2 ist also weniger strukturiert.

Ausgehend vom trans-Isomer kann mittels Anregung durch Lichtimpulse bei 404 nm in das cis-Isomer geschaltet werden. Im Fall des AzoTrpZip2 bedeutet dies ein Auslösen der Faltung der β -Hairpin Struktur. Geht man hingegen von einer Probe aus, die als cis-Isomer präpariert wurde, kann mit einem Lichtimpuls derselben Wellenlänge in das trans-Isomer gewechselt werden, was einem Entfalten entspricht. Mit Abtastimpulsen im sichtbaren Spektralbereich konnte zunächst der Photoschalter und dessen Isomerisierung beobachtet werden. Mit Abtastimpulsen im Spektralbereich der Amid-I' Bande können die Strukturänderungen im Peptidteil verfolgt werden.

Um die ultraschnellen Faltungsvorgänge der in geringer Ausbeute synthetisierten Modellpeptide mit der Methode der zeitaufgelösten Anreg-Abtast-Spektroskopie untersuchen zu können, wurden spezielle Probenkreisläufe mit geringsten Volumina entwickelt. Zusätzlich wurde der Anregimpuls jeweils durch einen Glasblock auf eine Dauer von 0,7 ps gestreckt, um nichtlineare optische Prozesse in der Probe zu vermeiden. Um die geringen Absorptionsänderungen im infraroten Spektralbereich messen zu können, wurde die Empfindlichkeit des Messaufbaus durch Reduktion des elektronischen Rauschens gesteigert.

Um die Vorgänge in der Nähe des Photoschalters von denen des β -artigen Strangsystems unterscheiden zu können, wurde als Referenzpeptid der Photoschalter mit den jeweils diesem am nächsten gelegenen Aminosäuren des AzoTrpZip2 ausgestattet. Über eine NMR-Strukturanalyse konnte gezeigt werden, dass das Referenzpeptid als cis-Isomer eine Turn-Struktur aufweist. Für das trans-Isomer konnte keine Struktur gefunden werden.

Über den Vergleich der Dauerstrichspektren des Referenzpeptids mit denen des β -Hairpin Modellpeptids AzoTrpZip2 lassen sich beide Spektren leichter interpretieren. Zum Beispiel werden im Spektrum des AzoTrpZip2 Banden bei 280 nm gefunden, welche

im Falle des Referenzpeptids fehlen. Diese konnten so den Tryptophanseitenketten zugeordnet werden, welche nur das AzoTrpZip2 besitzt. Im infraroten Spektralbereich der Amid-I' Bande besitzen beide Peptide ein Absorptionsmaximum bei 1675 cm^{-1} und eine Schulter bei 1648 cm^{-1} . Die Absorption des Referenzpeptids ist jedoch integral gesehen entsprechend geringer als die des AzoTrpZip2, da beim Referenzpeptid weniger Carbonylzitteratoren zur Amid-I' Bande beitragen. Im stationären Differenzspektrum zwischen dem jeweiligen cis- und trans-Isomer weisen beide Peptide charakteristische Muster bei 1585 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} auf, welche durch Banden des AMPP-Photoschalters verursacht werden.

Auch durch den Vergleich der Dynamik des Referenzpeptids mit der des AzoTrpZip2 konnten wertvolle Informationen gewonnen werden. Zum Beispiel ist die Dynamik des Referenzpeptids im Bereich der Amid-I' Bande bei der Isomerisierung von cis nach trans nach wenigen 100 ps abgeschlossen, die des AzoTrpZip2 jedoch nicht. Daraus kann geschlossen werden, dass hier die Aminosäuren der Stränge, die dem Referenzpeptid fehlen, eine entscheidende Rolle spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der Übergangsdipolmomentkopplung implementiert, um aus Strukturen des AzoTrpZip2 dessen Infrarotspektrum auszurechnen. Zunächst wurden aus den zehn energetisch günstigsten Strukturen des trans-Isomers des AzoTrpZip2, welche mittels der NMR-Spektroskopie gewonnen wurden, die Infrarotspektren auf diese Weise ausgerechnet. Genauso wurde mit den zehn energetisch günstigsten NMR-Strukturen des cis-Isomers verfahren. Nach Mittelung der so gewonnenen Spektren wurde eine gute Übereinstimmung mit den entsprechenden gemessenen Spektren erzielt. Dies zeigt, dass mit der Methode der Übergangsdipolmomentkopplung in ausreichender Genauigkeit Infrarotspektren ermittelt werden können, wenn man über die Spektren mehrerer Strukturen mittelt.

- **Entfalten der β -Hairpin Struktur des AzoTrpZip2** Der Isomerisierung von cis nach trans entspricht ein Öffnen der β -Hairpin Struktur des AzoTrpZip2. Im Spektralbereich der Amid-I' Bande wurden hier im Zeitfenster bis 3,1 ns nach Photoanregung drei Zeitkonstanten von 4,1 ps, 26 ps und 630 ps gefunden. Im sichtbaren Spektralbereich werden Zeitkonstanten von 6,7 ps und 200 ps gemessen. Erstere Zeitkonstante kann hier auf einen Übergang in den Grundzustand und ein Kühlen des Photoschalters nach Lichtanregung zurückgeführt werden. Die letztere Zeitkonstante stammt von der Rückwirkung des Peptids auf den Photoschalter, der somit seine finale Geometrie erst mit dieser Zeitkonstante einnehmen kann.

In der Gruppe von Professor Tavan hat Robert Denschlag parallel zu dieser Arbeit Nicht-Gleichgewichts Molekulardynamiksimulationen durchgeführt, um den Entfaltungsprozess der β -Hairpin Struktur des AzoTrpZip2 zu simulieren. Aus sechs solcher Isomerisierungstrajektorien wurden Infrarotspektren zu einer bestimmten Verzögerungszeit berechnet. Dies geschah durch Mittelung der berechneten Spektren der jeweiligen Strukturen zu dieser Verzögerungszeit aus den sechs Trajektorien. Ab einer Verzögerungszeit von 10 ps stimmen diese gemittelten Spektren gut mit den experimentell gemessenen überein. Daraus konnte gefolgert werden, dass diese sechs Trajektorien bereits ein Ensemble darstellen, das die Vorgänge bei der Entfaltung hinreichend genau beschreibt. Somit können aus den Trajektorien

Informationen über Faltungsmechanismen gewonnen werden. Als einfachste Strukturinformation wurden beispielhaft drei Abstände auf dem Strang über die sechs Trajektorien gemittelt gegen die Zeit aufgetragen: Eine Abstandsmessung fand direkt am Schalter statt, eine in der Mitte der Stränge und eine an den Enden (C- und N-Terminus).

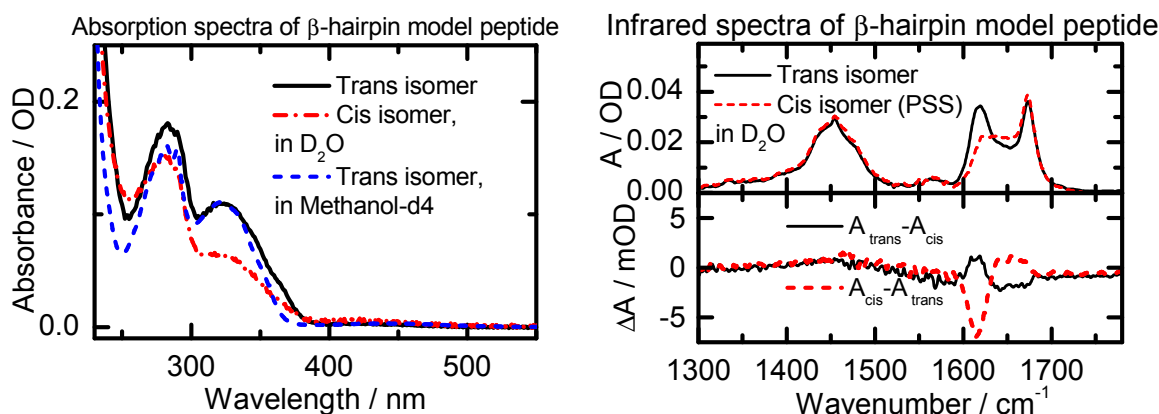
Insgesamt ergibt sich für die Entfaltung der β -Hairpin Struktur folgendes Bild: Nach Photoanregung wird mit einer Zeitkonstante von 4,1 ps ein desolvatisierter Zustand erreicht, der gekennzeichnet ist durch den Bruch von intramolekularen Wasserstoffbrücken und einer noch nicht auf das umgelagerte Peptid angepasste erste Lösungsmittelschale. Die Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel sind also ebenfalls verzerrt. Mit einer Zeitkonstante von 26 ps wird ein weiteres Intermediat gebildet. Das reißverschlussartige Aufreißen der β -Hairpin Struktur stoppt etwa in der Mitte der Stränge, welche als Scharnier fungieren. Erst mit einer Zeitkonstante von 630 ps lagern sich die Enden der Stränge um, um einen Zustand zu erreichen, der dem trans-Ensemble schon recht ähnlich ist. Nach 3,1 ns ist der Prozess der Entfaltung weitgehend abgeschlossen, jedoch wird das finale trans-Ensemble erst auf einer späteren Zeitskala erreicht.

- **Falten der β -Hairpin Struktur des AzoTrpZip2** Auch der umgekehrte Prozess der Ausbildung der β -Hairpin Struktur wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Mit einer Zeitkonstante von 4,8 ps wird ein desolvatisierter Zustand erreicht, der in ein Faltungsintermediat auf einer Zeitskala von 64 ps übergeht. Die Faltung erfolgt daraus auf einer Zeitskala von 30 μ s. Sie ist somit viel langsamer als aus der Literatur für das vergleichbare β -Hairpin Modellpeptid trpzip2 bekannt. Ein Grund dafür liegt darin, dass die bisher durchgeführten Messungen auf Temperatursprungmethoden beruhen. Diese lösen die Faltung über einen Temperatursprung aus, der jedoch die β -Hairpin Struktur nicht ausreichend stört, worauf eine schnelle Zeitkonstante zurück ins Gleichgewicht gemessen wird. Daraus wird mittels eines Zwei-Zustandsmodells deswegen auch eine schnelle Faltungszeit über die Gleichgewichtskonstante zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand ermittelt. Die hier gemessene Zeitkonstante kann somit als realistische Bildungszeit für eine β -Hairpin Struktur betrachtet werden. Da die Ausbildung der Schleife durch die Isomerisierung des Photoschalters in sein cis-Isomer auf der Zeitskala von wenigen Pikosekunden stattfindet, kann als geschwindigkeitsbestimmender Schritt für die Faltung der β -Hairpin Struktur die korrekte Wasserstoffverbrückung der Stränge identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein recht detailliertes Bild der Entfaltungs- und Faltungsdynamik des β -Hairpin Modellpeptids AzoTrpZip2 entworfen werden. Neben den in der Literatur schon diskutierten Modellpeptid für die Ausbildung einer α -Helix konnte nun ein Modellpeptid für eine β -artige Sekundärstruktur untersucht werden. Damit sind nun die wesentlichen Sekundärstrukturelemente von Proteinen anhand von Modellpeptiden untersucht und wesentliche Faltungsintermediate und -prozesse identifiziert worden.

A Spektren des Modellpeptids AzoTrpZip2 in schwerem Wasser

Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die Spektren des AzoTrpZip2 im ultravioletten, sichtbaren und infraroten Spektralbereich zu untersuchen, sind in Abbildung A.1 dessen Spektren in schwerem Wasser dargestellt. Sie können mit den entsprechenden Spektren in Methanol-d4 aus Abbildung 4.17(a) und 4.21(a) in Kapitel 4.4.3 verglichen werden.



(a) Absorptionsspektren im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich des AzoTrpZip2

(b) Absorptions- und Differenzspektrum des AzoTrpZip2 im infraroten Spektralbereich

Abbildung A.1: Absorptions- und Differenzspektrum des AzoTrpZip2 in schwerem Wasser. Im linken Teil der Abbildung erscheint die $\pi\pi^*$ -Bande des Azobenzolchromophors in schwerem Wasser deutlich verbreitert gegenüber seiner Form in Methanol-d4 (gestrichelte Kurve). Die leichte Asymmetrie bezüglich der Nulllinie oberhalb von 1600 cm^{-1} im unteren Teil der rechten Abbildung A.1(b) liegt möglicherweise noch an der Auflösung von Aggregaten durch Isomerisierung des Chromophors AMPP von trans nach cis. Die kleine Absorptionzunahme um 1450 cm^{-1} bei der Aufnahme der Infrarotdifferenzspektren ist zurückzuführen auf einen Erwärmungseffekt des Lösungsmittels D_2O . Dieser wird verursacht durch das zum Belichten verwendete Licht.

Jedoch erscheint das Absorptionsspektrum des trans-Isomers (durchgezogene Linie im oberen Teil der Abbildung A.1(b)) im infraroten Spektralbereich bereits dominiert von der Aggregation der Moleküle in Lösung. Die starke Bande bei 1618 cm^{-1} passt gut mit der in Tabelle 4.3 (Kapitel 4.4.4) angegebenen spektralen Lage für aggregierte Stränge überein. Auch die im unteren Teil gezeigten Differenzspektren scheinen geprägt zu sein von der Auflösung der Aggregate. Die Bande bei 1618 cm^{-1} scheint sich hauptsächlich beim Isomerisieren vom trans- in das cis-Isomer des AzoTrpZip2 zu ändern, wie es auch schon im Lösungsmittel Methanol-d4 der Fall war. Die Differenzspektren, wie sie in Methanol-d4 zu beobachten sind, haben im Vergleich zu denen in schwerem Wasser eine spektrale Signatur mit nahezu umgekehrtem Vorzeichen. Beim Isomerisieren vom cis- in

den trans-Isomer, also beim Auflösen der β -Hairpin Struktur nimmt in schwerem Wasser bei 1650 cm^{-1} die Absorption ab, in Methanol-d4 nimmt sie jedoch zu.

Das Absorptionsmaximum in der Amid-I' Bande erscheint in schwerem Wasser etwas rotverschoben bei $1673,6\text{ cm}^{-1}$ im Vergleich zu 1676 cm^{-1} in Methanol-d4. Die empirischen Regeln für die Interpretation von Infrarotspektren von Proteinen (Kapitel 4.4.4) liefern für anti-parallele β -Faltblätter eine ausgeprägte Bande bei 1625 cm^{-1} und eine weniger intensive Bande bei ca. 1680 cm^{-1} [Sus72, Kub01]. Eine Erklärung für das in schwerem Wasser wie in Methanol-d4 beobachtete Maximum um 1675 cm^{-1} liefern sie nicht.

B Programmcode zur Berechnung von Infrarotspektren

Nachfolgend ist das Programm abgedruckt, welches aus einer Strukturdatei im Format der Proteindatenbank (engl. protein data base, .pdb-files) ein Infrarotspektrum mittels des Übergangsdipolmomentkopplungsmechanismus berechnet. Das Programm wurde in der Sprache IDL5.4 geschrieben. Der Strichpunkt bezeichnet das Kommentarzeichen. Das Zeichen "\$" am Ende einer Zeile bedeutet, dass die nächste Zeile noch zu dieser Zeile hinzugehört.

Nach Aufrufen des Programms muss nur noch in dem Einlesedialog die Zahl, ab der die Zeilen der Strukturdatei gelesen werden sollen berichtet werden. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Strukturdateien ist hier die Zahl "3" einzusetzen.

```
function fit_lorentz, par,x=x,y=y

;Lorentzfunktion mit
; par(0) Offset
; par(1) Amplitude
; par(2) Center
; par(3) width

spectrum=par(0)+2*par(1)/!Pi*par(3)/(4*(x-par(2))^2+par(3)^2)
return,spectrum+y
end

function vectorbetrag,vector
maxcts=n_elements(vector)
betrag=0.0
for r=0, maxcts-1 do begin
betrag=betrag+vector(r)^2
endfor
return, sqrt(betrag)
end

function normvector,vector
return, vector(*)/vectorbetrag(vector(*))
end

function scalarproduct,vector1,vector2
return, vector1(0)*vector2(0)+vector1(1)*vector2(1)+vector1(2)*vector2(2)
end

pro tdc7singlepassfordiss, data

prefilename='cis1'
directoryname1='/home/exp/schrader/WINHOME/Projekte/beta-hairpin/'
```

B Programmcode zur Berechnung von Infrarotspektren

```
directoryname2='pdb-files/HairpinNMRvonChristianueberSergio/Hairpin_MeOH/'
directoryname=directoryname1+directoryname2

TEMPLATE=ASCII_TEMPLATE(directoryname+prefilename+'.pdb')
data = READ_ASCII(directoryname+prefilename+'.pdb', TEMPLATE=TEMPLATE)
;data = READ_ASCII(directoryname+prefilename+'.pdb', DELIMITER=' ', $
;DATA_START=2,/VERBOSE)

data1=data.field02
natoms=n_elements(data1(*,0))
print, 'Number of atoms recognized:'
print,natoms
atomtype=sindgen(natoms)
oind=intarr(natoms)
atomtype=data.field03
koordinaten=dblarr(natoms,3)
koordinaten(*,0)=data.field06
koordinaten(*,1)=data.field07
koordinaten(*,2)=data.field08
asnumber=dblarr(natoms)
asnumber=data.field05
astype=sindgen(natoms)
astype=data.field04
atomnumber=dblarr(natoms)
atomnumber=data.field02

cind=intarr(natoms)
dipolort=0.868
epsilon=40.0
dfc=1.605
td=3.70
amu=1.6605655E-27
mdynincalorie=143.93
calorieinjoule=6.9477E-21
angstrominm=1E-10
cnull=2.99792458e8

covector=dblarr(natoms,3)
cnvector=dblarr(natoms,3)
bvector=dblarr(natoms,3)
avector=dblarr(natoms,3)
a2vector=dblarr(natoms,3)
transdipolaufpunkt=dblarr(natoms,3)
alpha=20.0/180.0*!PI
anzahl=0
; finde ein O Atom
; i wird index von O-Atom

for i=0, natoms-1 do begin

if STRCMP( atomtype(i), "O", 1, /FOLD_CASE) eq 1 then begin
; finde ein C Atom dazu
cindex=1000
for j=0, natoms-1 do begin
```

```

if (STRCMP( atomtype(j), "C", 1, /FOLD_CASE) eq 1) AND $
(asnumber(i) eq asnumber(j)) then begin
if 1.5 ge vectorbetrag(koordinaten(i,*)-koordinaten(j,*))$
  then begin
if cindex eq 1000 then begin
cindex=j
endif else begin
print, "Found strange contacts"
endif
endif
endif
endfor
; finde ein N -Atom dazu
nindex=1000
for j=0, natoms-1 do begin
if (STRCMP( atomtype(j), "N", 1, /FOLD_CASE) eq 1) then begin
if 1.5 ge vectorbetrag(koordinaten(cindex,*)-koordinaten(j,*))$
  then begin
if nindex eq 1000 then begin
nindex=j
endif else begin
print, "Found strange contacts"
endif
endif
endif
endfor
; nur für Amidbindung dipolmoment zuordnen
if (cindex ne 1000) AND (nindex ne 1000) then begin
h1=0.0
h2=0.0
x1=0.0
x2=0.0

oind(anzahl)=i
covector(cindex,*)=koordinaten(i,*)-koordinaten(cindex,*)

transdipolaufpunkt(cindex,*)=koordinaten(cindex,*)+dipolort*$
normvector(covector(cindex,*))

cnvector(cindex,*)=koordinaten(nindex,*)-koordinaten(cindex,*)
bvector(cindex,*)=koordinaten(cindex,*)-transdipolaufpunkt(cindex,*)
gamma=acos(scalarproduct(covector(cindex,*),cnvector(cindex,*))/$
vectorbetrag(cnvector(cindex,*))/vectorbetrag(covector(cindex,*)))

h1=dipolort*tan(alpha)
x1=h1*cos(gamma-!PI/2.0)
h2=h1*sin(gamma-!PI/2.0)
x2=h2/tan(!PI-alpha-gamma)
a2vector(cindex,*)=normvector(bvector(cindex,*)+$
normvector(cnvector(cindex,*))*(x1+x2))
cind(anzahl)=cindex
anzahl=anzahl+1
print, anzahl-1
print, 'Gamma', gamma/!PI*180

```

B Programmcode zur Berechnung von Infrarotspektren

```
print, scalarproduct(covector(cindex,*),cnvector(cindex,*))/$
vectorbetrag(cnvector(cindex,*))/vectorbetrag(covector(cindex,*))
print, scalarproduct(bvector(cindex,*),a2vector(cindex,*))/$
vectorbetrag(bvector(cindex,*))/vectorbetrag(a2vector(cindex,*))
print, cindex,cind(i)
endif
endif
endif

maxj=anzahl
fmatrix=dblarr(maxj,maxj)
nvector=dblarr(3)
for j=0, maxj-1 do begin
for k=j, maxj-1 do begin
if j eq k then begin
fmatrix(j,k)=dfc
endif else begin
;print, j, k
nvector(*)=transdipolaufpunkt(cind(k),*)-transdipolaufpunkt(cind(j),*)
;print, nvector(*)
fmatrix(j,k)=0.1/epsilon*td^2*(scalarproduct(a2vector(cind(j),*),$
a2vector(cind(k),*)))-3.0*scalarproduct(a2vector(cind(j),*),nvector(*))*$
scalarproduct(a2vector(cind(k),*),nvector(*)))/vectorbetrag(nvector(*))^3
;print, vectorbetrag(nvector(*))^3

;print, 3.0*scalarproduct(avector(cind(j)-1,*),nvector(*))*$
;scalarproduct(avector(cind(k)-1,*),nvector(*))
;print, 0.1/epsilon*td^2*scalarproduct(avector(cind(j)-1,*),$
;avector(cind(k)-1,*))
fmatrix(k,j)=fmatrix(j,k)
endelse
endifor
endifor

print, fmatrix(*,*)

eigenvalues=dblarr(maxj)
intensities=dblarr(maxj)
stickintensities=dblarr(maxj)
frequencies=dblarr(maxj)
evecs=dblarr(maxj,maxj)
residual=dblarr(maxj,maxj)
eigenvalues = EIGENQL(fmatrix, EIGENVECTORS = evecs, /DOUBLE,$
RESIDUAL = residual)
frequencies(*)=((eigenvalues(*)*mdynin calorie*$
calorieinjoule/angstrominm^2/amu)^0.5/2/!PI)/cnull/100
;Print the eigenvalues and eigenvectors:
PRINT, 'Eigenvalues: '
PRINT, frequencies(*)
PRINT, 'Eigenvectors: '
PRINT, evecs

; Berechnung der Intensitäten
vectorsum=dblarr(3)
```

```

normevecs=dblarr(maxj,maxj)
for j=0, maxj-1 do begin
vectorsum(*)=0.0
normevecs(*,j)=normvector(evecs(*,j))
;print, normevecs(*,j)
for i=0, maxj-1 do begin
print, a2vector(cind(i),*)
vectorsum(*)=vectorsum(*)+3.7*a2vector(cind(i),*)*normevecs(i,j)
intensities(j)=vectorbetrag(vectorsum(*)^2
print, vectorsum(*)
endfor
endfor
print, "intensities",intensities(*)
x_dim=601
x=dblarr(x_dim)
y=dblarr(x_dim)
x=dindgen(x_dim)*0.5+1500.0
y=dindgen(x_dim)*0
par=dblarr(4)
; offset auf Null setzen
par(0)=0.0
; Breite auf 10 cm-1 setzen
par(3)=10.0
for j=0, maxj-1 do begin
stickintensities(j)=2*intensities(j)/!Pi/par(3)
par(1)=intensities(j)
par(2)=frequencies(j)
y=fit_lorentz(par,x=x, y=y)
endfor
plot, x,y

filename=prefilename+'lorentz.dat'
openw, lun, directoryname+filename, /Get_Lun
for i=0, x_dim-1 do begin
printf, lun, x(i), y(i), Format='(2(F))'
endfor
Free_Lun, lun

filename=prefilename+'stick.dat'
openw, lun, directoryname+filename, /Get_Lun
for i=0, maxj-1 do begin
printf, lun, frequencies(i), stickintensities(i), Format='(2(F))'
endfor
Free_Lun, lun

end

```


Literaturverzeichnis

- [Abr04] D. ABRAMAVICIUS, W. ZHUANG, S. MUKAMEL. *Peptide Secondary Structure Determination by Three-Pulse Coherent Vibrational Spectroscopies: A Simulation Study*. Journal of Physical Chemistry B 108(46):18034–18045, 2004. 134, 135
- [Aem05] A. AEMISSEGGER, V. KRAUTLER, W. F. VAN GUNSTEREN, D. HILVERT. *A photoinducible β -hairpin*. Journal of the American Chemical Society 127(9):2929–2936, 2005. 49
- [Agu05] A. AGUZZI. *Prion Toxicity: All Sail and No Anchor*. Science 308(5727):1420–1421, 2005. 3
- [Arr96] J. L. R. ARRONDO, F. J. BLANCO, L. SERRANO, F. M. GONI. *Infrared evidence of a β -hairpin peptide structure in solution*. FEBS Letters 384(1):35–37, 1996. 71
- [Aut99] H. AUTERHOFF, J. KNABE. *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*. Wiss. Verl. Ges., Stuttgart, 1999. 3
- [Baa07] P. BAASKE, F. M. WEINERT, S. DUHR, K. H. LEMKE, M. J. RUSSELL, D. BRAUN. *Extreme accumulation of nucleotides in simulated hydrothermal pore systems*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(22):9346–9351, 2007. 1
- [Bar00] A. BARTH. *The infrared absorption of amino acid side chains*. Progress in Biophysics And Molecular Biology 74(3-5):141–173, 2000. 68, 71
- [Bar02] A. BARTH, C. ZSCHERP. *What vibrations tell us about proteins*. Quarterly Reviews of Biophysics 35(4):369–430, 2002. 74, 75
- [Bec93] A. D. BECKE. *Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange*. Journal of Chemical Physics 98(7):5648–5652, 1993. 131
- [Ber01] G. BERTHO, S. KOZIN, P. DEBEY, G. H. B. HOA, J. P. GIRAULT. *Solution structure of the sheep prion PrP 142-166 : a possible site for the conformational conversion of prion protein*. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Ii Fascicule C-Chimie/Chemistry 4(10):739–743, 2001. 3
- [Ber02a] J. M. BERG, J. TYMOCZKO, L. STRYER. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, 5. Auflage, 2002. 4, 52

- [Ber02b] H. M. BERMAN, T. BATTISTUZ, T. N. BHAT, W. F. BLUHM, P. E. BOURNE, K. BURKHARDT, L. IYPE, S. JAIN, P. FAGAN, J. MARVIN, D. PADILLA, V. RAVICHANDRAN, B. SCHNEIDER, N. THANKI, H. WEISIG, J. D. WESTBROOK, C. ZARDECKI. *The Protein Data Bank*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 58:899–907, 2002. 5, 10
- [Bie99a] O. BIERI, T. KIEFHABER. *Elementary steps in protein folding*. Biological Chemistry 380(7-8):923–929, 1999. 12, 14, 16, 17
- [Bie99b] O. BIERI, J. WIRZ, B. HELLRUNG, M. SCHUTKOWSKI, M. DREWELLO, T. KIEFHABER. *The speed limit for protein folding measured by triplet-triplet energy transfer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:9597–9601, 1999. 7, 16
- [Bla91] F. J. BLANCO, M. A. JIMENEZ, M. RICO, J. SANTORO, J. HERRANZ, J. L. NIETO. *Tendamistat (12-26) Fragment - NMR Characterization of Isolated β -Turn Folding Intermediates*. European Journal of Biochemistry 200(2):345–351, 1991. 47
- [Bla94] F. J. BLANCO, G. RIVAS, L. SERRANO. *A Short Linear Peptide That Folds into a Native Stable β -Hairpin in Aqueous-Solution*. Nature Structural Biology 1(9):584–590, 1994. 47
- [Bor79] P. BORTOLUS, S. MONTI. *Cis-Trans Photoisomerization of Azobenzene - Solvent and Triplet Donor Effects*. Journal of Physical Chemistry 83(6):648–652, 1979. 86, 92, 96, 106
- [Bou05] P. BOUR, T. A. KEIDERLING. *Vibrational spectral simulation for peptides of mixed secondary structure: Method comparisons with the TrpZip model hairpin*. Journal of Physical Chemistry B 109(49):23687–23697, 2005. 134
- [Bra07] M. BRANDL. *Moleküldynamiken von Pikosekunden zu Mikrosekunden: Aufbau eines Nanosekunden-Anreg-Abtast-Experiments*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2007. 155
- [Bre03a] J. BREDENBECK, P. HAMM. *Peptide structure determination by two-dimensional infrared spectroscopy in the presence of homogeneous and inhomogeneous broadening*. Journal of Chemical Physics 119(3):1569–1578, 2003. 158
- [Bre03b] J. BREDENBECK, J. HELBING, R. BEHRENDT, C. RENNER, L. MORODER, J. WACHTVEITL, P. HAMM. *Transient 2D-IR spectroscopy: Snapshots of the nonequilibrium ensemble during the picosecond conformational transition of a small peptide*. J. Phys. Chem. B 107(33):8654–8660, 2003. 22
- [Bre03c] J. BREDENBECK, J. HELBING, R. BEHRENDT, C. RENNER, L. MORODER, J. WACHTVEITL, P. HAMM. *Transient 2D-IR spectroscopy: Snapshots of the*

- nonequilibrium ensemble during the picosecond conformational transition of a small peptide.* Journal of Physical Chemistry B 107(33):8654–8660, 2003. 158
- [Bre03d] J. BREDENBECK, J. HELBING, A. SIEG, T. SCHRADER, W. ZINTH, C. RENNER, R. BEHRENDT, L. MORODER, J. WACHTVEITL, P. HAMM. *Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(11):6452–6457, 2003. 7, 21, 125, 148
- [Bre03e] J. BREDENBECK, J. HELBING, A. SIEG, T. SCHRADER, W. ZINTH, C. RENNER, R. BEHRENDT, L. MORODER, J. WACHTVEITL, P. HAMM. *Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide (vol 100, pg 6452, 2003).* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(18):10580–10580, 2003. 148
- [Bre04a] J. BREDENBECK, J. HELBING, P. HAMM. *Continuous scanning from picoseconds to microseconds in time resolved linear and nonlinear spectroscopy.* Review of Scientific Instruments 75(11):4462–4466, 2004. 155
- [Bre04b] J. BREDENBECK, J. HELBING, P. HAMM. *Transient two-dimensional infrared spectroscopy: Exploring the polarization dependence.* Journal of Chemical Physics 121(12):5943–5957, 2004. 158
- [Bre05a] J. BREDENBECK. *Transient 2D-IR Spectroscopy - Towards Ultrafast Structural Dynamics of Peptides and Proteins.* Doktorarbeit, Universität Zürich, 2005. 9, 158
- [Bre05b] J. BREDENBECK, J. HELBING, J. R. KUMITA, G. A. WOOLLEY, P. HAMM. *α -Helix formation in a photoswitchable peptide tracked from picoseconds to microseconds by time-resolved IR spectroscopy.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(7):2379–2384, 2005. 7, 21, 48, 75, 100, 125, 153, 156
- [Bro05] D. E. BRODERSEN, P. NISSEN. *The social life of ribosomal proteins.* Febs Journal 272(9):2098–2108, 2005. 2
- [Byl86] D. M. BYLER, H. SUSI. *Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra.* Biopolymers 25(3):469–487, 1986. 72
- [Cal98] R. H. CALLENDER, R. B. DYER, R. GILMANSHIN, W. H. WOODRUFF. *Fast events in protein folding: The time evolution of primary processes.* Annual Review of Physical Chemistry 49:173–202, 1998. 19, 105, 121
- [Car04] H. CARSTENS. *Konformationsdynamik lichtsichtbarer Peptide: Molekulardynamiksimulationen und datengetriebene Modellbildung.* Dissertation, Fakultät für Physik, Ludwig-Maximilians-Universität, 2004. 140

- [Cer03] G. CERULLO, S. DE SILVESTRI. *Ultrafast optical parametric amplifiers*. Review of Scientific Instruments 74(1):1–18, Januar 2003. 29
- [Cha96a] T. V. CHALIKIAN, V. S. GINDIKIN, K. J. BRESLAUER. *Spectroscopic and volumetric investigation of cytochrome c unfolding at alkaline pH: Characterization of the base-induced unfolded state at 25 °C*. The FASEB Journal 10(1):164–170, 1996. 16
- [Cha96b] C. K. CHAN, J. HOFRICHTER, W. A. EATON. *Optical triggers of protein folding*. Science 274(5287):628–629, 1996. 60
- [Cha97] C.-K. CHAN, Y. HU, S. TAKAHASHI, D. ROUSSEAU, W. EATON, J. HOFRICHTER. *Submillisecond protein folding kinetics studied by ultrarapid mixing*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1779–1784, 1997. 18
- [Ché01] G. CHÉRIAUX, J.-P. CHAMBARET. *Ultra-short high-intensity laser pulse generation and amplification*. Measurement Science & Technology 12:1769–1776, 2001. 26
- [Che03] E. F. CHEN, J. R. KUMITA, G. A. WOOLLEY, D. S. KLIGER. *The kinetics of helix unfolding of an azobenzene cross-linked peptide probed by nanosecond time-resolved optical rotatory dispersion*. Journal of the American Chemical Society 125(41):12443–12449, 2003. 21, 48
- [Che06] J. J. CHENG, B. A. TEPLY, S. Y. JEONG, C. H. YIM, D. HO, I. SHERIFI, S. JON, O. C. FAROKHZAD, A. KHADEMHOSEINI, R. S. LANGER. *Magnetically responsive polymeric microparticles for oral delivery of protein drugs*. Pharmaceutical Research 23(3):557–564, 2006. 3
- [Chu07] H. S. CHUNG, Z. GANIM, K. C. JONES, A. TOKMAKOFF. *Multidimensional Ultrafast Spectroscopy Special Feature: Transient 2D IR spectroscopy of ubiquitin unfolding dynamics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(36):14237–14242, 2007. 158
- [Cia03] B. CIANI, M. JOURDAN, M. S. SEARLE. *Stabilization of β -hairpin peptides by salt bridges: Role of preorganization in the energetic contribution of weak interactions*. Journal of the American Chemical Society 125(30):9038–9047, 2003. 48, 56
- [Coc01] A. G. COCHRAN, N. J. SKELTON, M. A. STAROVASNIK. *Tryptophan zip-pers: Stable, monomeric β -hairpins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(10):5578–5583, 2001. 7, 51, 54, 55, 71, 77, 82
- [Col00] C. S. COLLEY, S. R. GRIFFITHS-JONES, M. W. GEORGE, M. S. SEARLE. *Do interstrand hydrogen bonds contribute to β -hairpin peptide stability in solution? IR analysis of peptide folding in water*. Chemical Communications 2000(7):593–594, 2000. 71

- [Cor06] T. CORDES, D. WEINRICH, S. KEMPA, K. RIESELMANN, S. HERRE, C. HOPPMANN, K. RUCK-BRAUN, W. ZINTH. *Hemithioindigo-based photoswitches as ultrafast light trigger in chropeptides*. Chemical Physics Letters 428(1-3):167–173, 2006. 19, 89, 94
- [Cox93] J. P. L. COX, P. A. EVANS, L. C. PACKMAN, D. H. WILLIAMS, D. N. WOOLFSON. *Dissecting the Structure of a Partially Folded Protein - Circular-Dichroism and Nuclear-Magnetic-Resonance Studies of Peptides from Ubiquitin*. Journal of Molecular Biology 234(2):483–492, 1993. 36, 49
- [Cre93] T. E. CREIGHTON. *Proteins*, Band 1. W. H. Freeman, New York, 2. Auflage, 1993. 1, 6, 12, 45, 62
- [Cru05] L. CRUZ, B. URBANC, J. M. BORREGUERO, N. D. LAZO, D. B. TEPLow, H. E. STANLEY. *Solvent and mutation effects on the nucleation of amyloid β -protein folding*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(51):18258–18263, 2005. 3
- [Cum75] A. L. CUMMINGS, E. M. EYRING. *Helix-Coil Transition Kinetics in Aqueous Poly(α ,L-Glutamic Acid)*. Biopolymers 14(10):2107–2114, 1975. 16
- [Dar05a] T. DARTIGALONGUE, F. HACHE. *Calculation of the circular dichroism spectra of carbon monooxy- and deoxy myoglobin: Interpretation of a time-resolved circular dichroism experiment*. Journal of Chemical Physics 123(18):1849011–1849019, 2005. 21
- [Dar05b] T. DARTIGALONGUE, F. HACHE. *Observation of sub-100 ps conformational changes in photolyzed carbonmonooxy-myoglobin probed by time-resolved circular dichroism*. Chemical Physics Letters 416(4-6):313–316, 2005. 21
- [Dar05c] T. DARTIGALONGUE, F. HACHE. *Observation of ultrafast conformational changes in carboxy-myoglobin by time-resolved circular dichroism*. Synthetic Metals 155(2):414–417, 2005. 21
- [Dau03] W. DAUER, S. PRZEDBORSKI. *Parkinson's disease: Mechanisms and models*. Neuron 39(6):889–909, 2003. 3
- [Den07] R. DENSCHLAG. *Persönliche Mitteilung*, 2007. 57
- [Din99] A. R. DINNER, T. LAZARIDIS, M. KARPLUS. *Understanding β -hairpin formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(16):9068–9073, 1999. 50, 156
- [Dob03] C. M. DOBSON. *Protein folding and disease: a view from the first Horizon Symposium*. Nature Reviews Drug Discovery 2(2):154–160, 2003. 3
- [Dob04] C. M. DOBSON. *Experimental investigation of protein folding and misfolding*. Methods Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: Experimental and Theoretical Methods 34(1):4–14, 2004. 12, 23

- [Don06] S.-L. DONG, M. LÖWENECK, T. E. SCHRADER, W. J. SCHREIER, W. ZINTH, L. MORODER, C. RENNER. *A Photocontrolled β -Hairpin Peptide*. *Chemistry - A European Journal* 12(4):1114–1120, 2006. 10, 54, 56, 57, 58, 59, 81, 157
- [Du04] D. G. DU, Y. J. ZHU, C. Y. HUANG, F. GAI. *Understanding the key factors that control the rate of β -hairpin folding*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(45):15915–15920, 2004. 139
- [Du06] D. G. DU, M. J. TUCKER, F. GAI. *Understanding the mechanism of β -hairpin folding via ϕ -value analysis*. *Biochemistry* 45(8):2668–2678, 2006. 19
- [Dwi82] A. M. DWIVEDI, S. KRIMM. *Vibrational Analysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins. XI. β -Poly(L-Alanine) and Its N-Deuterated Derivative*. *Macromolecules* 15(1):186–193, 1982. 135
- [Dwi83] A. DWIVEDI, S. KRIMM. *Corrections: Vibrational Analysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins. XI. β -Poly(L-alanine) and Its N-Deuterated Derivative..* *Macromolecules* 16(2):340–340, 1983. 135
- [Dye04] R. B. DYER, S. J. MANESS, E. S. PETERSON, S. FRANZEN, R. M. FESINMEYER, N. H. ANDERSEN. *The mechanism of β -hairpin formation*. *Biochemistry* 43(36):11560–11566, 2004. 77, 78
- [Eat89] G. EATON, M. C. R. SYMONS, P. P. RASTOGI. *Spectroscopic Studies of the Solvation of Amides with N-H Groups. I. The Carbonyl Group*. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* 85:3257–3271, 1989. 74, 79, 136
- [Eat98] W. A. EATON, V. MUNOZ, P. A. THOMPSON, E. R. HENRY, J. HOFRICHTER. *Kinetics and dynamics of loops, α -helices, β -hairpins, and fast-folding proteins*. *Accounts of Chemical Research* 31(11):745–753, 1998. 7
- [Eat00] W. A. EATON, V. MUNOZ, S. J. HAGEN, G. S. JAS, L. J. LAPIDUS, E. R. HENRY, J. HOFRICHTER. *Fast kinetics and mechanisms in protein folding*. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29:327–359, 2000. 7, 12, 17, 19
- [EC05] A. ESTERAS-CHOPO, L. SERRANO, M. L. DE LA PAZ. *The amyloid stretch hypothesis: Recruiting proteins toward the dark side*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(46):16672–16677, 2005. 3
- [Efr06] R. EFREMOV, V. I. GORDELIY, J. HEBERLE, G. BULDT. *Time-resolved microspectroscopy on a single crystal of bacteriorhodopsin reveals lattice-induced differences in the photocycle kinetics*. *Biophysical Journal* 91(4):1441–1451, 2006. 156

- [Egg73] F. EGGERS, T. FUNCK. *Ultrasonic Measurements with Milliliter Liquid Samples in 0.5-100 Mhz Range*. Review of Scientific Instruments 44(8):969–977, 1973. 16
- [Eng95] M. ENGELHARD, P. A. EVANS. *Kinetics of Interaction of Partially Folded Proteins with a Hydrophobic Dye - Evidence That Molten Globule Character Is Maximal in Early Folding Intermediates*. Protein Science 4(8):1553–1562, 1995. 20
- [Erd05] M. ERDELYI, A. KARLEN, A. GOGOLL. *A new tool in peptide engineering: A photoswitchable stilbene-type β -hairpin mimetic*. Chemistry - A European Journal 12(2):403–412, 2005. 19, 49
- [Eyl04] S. J. EYLES, I. A. KALTASHOV. *Methods to study protein dynamics and folding by mass spectrometry*. Methods Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: Experimental and Theoretical Methods 34(1):88–99, 2004. 20
- [Fab04] H. FABIAN, D. NAUMANN. *Methods to study protein folding by stopped-flow FT-IR*. Methods Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: Experimental and Theoretical Methods 34(1):28–40, 2004. 22, 156
- [Fal61] M. FALK, E. WHALLEY. *Infrared Spectra of Methanol and Deuterated Methanols in Gas, Liquid, and Solid Phases*. Journal of Chemical Physics 34(5):1554–1568, 1961. 65, 66
- [Fel05] F. FELDERER. *Molekulares Thermometer*. Praktikumsbericht, Ludwig-Maximilians-Universität, 2005. 156
- [Fie07] B. FIERZ, H. SATZGER, C. ROOT, P. GILCH, W. ZINTH, T. KIEFHABER. *Loop formation in unfolded polypeptide chains on the picoseconds to microseconds time scale*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(7):2163–2168, 2007. 7, 17, 153
- [Fis00] G. FISCHER. *Chemical aspects of peptide bond isomerisation*. Chemical Society Reviews 29(2):119–127, 2000. 4, 80
- [FM06] J. FARAONE-MENNELLA, F. A. TEZCAN, H. B. GRAY, J. R. WINKLER. *Stability and folding kinetics of structurally characterized cytochrome *c-b(562)**. Biochemistry 45(35):10504–10511, 2006. 60
- [Fre01] P. A. FREY. *Strong hydrogen bonding in molecules and enzymatic complexes*. Magnetic Resonance in Chemistry 39:S190–S198, 2001. 74
- [Fri98] M. J. FRISCH, G. W. TRUCKS, H. B. SCHLEGEL, G. E. SCUSERIA, M. A. ROBB, J. R. CHEESEMAN, V. G. ZAKRZEWSKI, J. J. A. MONTGOMERY, R. E. STRATMANN, J. C. BURANT, S. DAPPRICH, J. M. MILLAM, A. D.

- DANIELS, K. N. KUDIN, M. C. STRAIN, O. FARKAS, J. TOMASI, V. BARONE, M. COSSI, R. CAMMI, B. MENNUCCI, C. POMELLI, C. ADAMO, S. CLIFFORD, J. OCHTERSKI, G. A. PETERSSON, P. Y. AYALA, Q. CUI, K. MOROKUMA, D. K. MALICK, A. D. RABUCK, K. RAGHAVACHARI, J. B. FORESMAN, J. CIOSLOWSKI, J. V. ORTIZ, A. G. BABOUL, B. B. STEFANOV, G. LIU, A. LIASHENKO, P. PISKORZ, I. KOMAROMI, R. GOMPERTS, R. L. MARTIN, D. J. FOX, T. KEITH, M. A. AL-LAHAM, C. Y. PENG, A. NANAYAKKARA, C. GONZALEZ, M. CHALLACOMBE, P. M. W. GILL, B. JOHNSON, W. CHEN, M. W. WONG, J. L. ANDRES, C. GONZALEZ, M. HEAD-GORDON, E. S. REPLOGLE, J. A. POPLE. *Gaussian 98, Revision A.7*. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, , 1998. 65
- [Ful04] E. C. FULMER, P. MUKHERJEE, A. T. KRUMMEL, M. T. ZANNI. *A pulse sequence for directly measuring the anharmonicities of coupled vibrations: Two-quantum two-dimensional infrared spectroscopy*. *Journal of Chemical Physics* 120(17):8067–8078, 2004. 22
- [Gei05] P. L. GEISLER. *Temperature dependence of inhomogeneous broadening: On the meaning of isosbestic points*. *Journal of the American Chemical Society* 127(42):14930–14935, 2005. 67
- [Gel98] S. H. GELLMAN. *Minimal model systems for β -sheet secondary structure in proteins*. *Current Opinion in Chemical Biology* 2(6):717–725, 1998. 48
- [God93] V. I. GODIK, R. E. BLANKENSHIP, T. P. CAUSGROVE, N. WOODBURY. *Time-Resolved Tryptophan Fluorescence in Photosynthetic Reaction Centers from Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Letters* 321(2-3):229–232, 1993. 157
- [Gol51] A. R. GOLDFARB, L. J. SAIDEL, E. MOSOVICH. *The Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins*. *Journal of Biological Chemistry* 193(1):397–404, 1951. 60
- [Gre04] L. H. GREENE. *Investigating protein folding, misfolding and nonnative states: experimental and theoretical methods*. *Methods Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: Experimental and Theoretical Methods* 34(1):1–3, 2004. 12
- [Gri00] V. M. GRIGORYANTS, A. V. VESELOV, C. P. SCHOLLES. *Variable velocity liquid flow EPR applied to submillisecond protein folding*. *Biophysical Journal* 78(5):2702–2708, 2000. 20
- [Gri06] D. C. GRILLS, K. W. HUANG, J. T. MUCKERMAN, E. FUJITA. *Kinetic studies of the photoinduced formation of transition metal-dinitrogen complexes using time-resolved infrared and UV-vis spectroscopy*. *Coordination Chemistry Reviews* 250(13-14):1681–1695, 2006. 156
- [Gru79] B. GRUENEWALD, C. U. NICOLA, A. LUSTIG, G. SCHWARZ, H. KLUMP. *Kinetics of the Helix-Coil Transition of a Polypeptide with Nonionic Side*

- Groups, Derived from Ultrasonic Relaxation Measurements*. Biophysical Chemistry 9(2):137–147, 1979. 16
- [Gru99] M. GRUEBELE. *The fast protein folding problem*. Annual Review of Physical Chemistry 50:485–516, 1999. 9, 19
- [Guv05] O. GUVENCH, C. L. BROOKS. *Tryptophan side chain electrostatic interactions determine edge-to-face vs parallel-displaced tryptophan side chain geometries in the designed β -hairpin "trpzip2"*. Journal of the American Chemical Society 127(13):4668–4674, 2005. 57, 58
- [Haa05] E. HAAS. *The Study of Protein Folding and Dynamics by Determination of Intramolecular Distance Distributions and Their Fluctuations Using Ensemble and Single-Molecule FRET Measurements*. ChemPhysChem 6:858–870, 2005. 16
- [Ham94] P. HAMM. *Femtosekunden Infrarotspektroskopie an bakteriellen Reaktionszentren von Rhodobacter sphaeroides*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, November 1994. 32
- [Ham97] P. HAMM, S. OHLIN, W. ZINTH. *Vibrational cooling after ultrafast photoisomerization of azobenzene by femtosecond infrared spectroscopy*. J. Chem. Phys. 106(2):519–529, 1997. 99, 100
- [Ham00] P. HAMM, A. KAINDL, J. STENGER. *Noise suppression in femtosecond mid-infrared light sources*. Optics Letters 25(24):1798–1800, 2000. 28
- [Ham06] P. HAMM. *Three-dimensional-IR spectroscopy: Beyond the two-point frequency fluctuation correlation function*. Journal of Chemical Physics 124(12):1245061–12450613, 2006. 22
- [Har92] P. I. HARIS, D. CHAPMAN. *Does Fourier-transform infrared spectroscopy provide useful information on protein structures?*. Trends in Biochemical Sciences 17(9):328–333, 1992. 12
- [Har99] I. HARTL. *Sub-Pikosekunden-Spektroskopie*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, February 1999.
URL <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/archive/00000314/> 28
- [Har02] J. HARDY, D. J. SELKOE. *Medicine - The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics*. Science 297(5580):353–356, 2002. 3
- [Hay05] T. HAYASHI, W. ZHUANG, S. MUKAMEL. *Electrostatic DFT map for the complete vibrational amide band of NMA*. Journal of Physical Chemistry A 109(43):9747–9759, 2005. 135

- [Hel04] J. HELBING, H. BREGY, J. BREDENBECK, R. PFISTER, P. HAMM, R. HUBER, J. WACHTVEITL, L. DE VICO, M. OLIVUCCI. *A fast photoswitch for minimally perturbed peptides: Investigation of the trans -> cis photoisomerization of N-methylthioacetamide*. Journal of the American Chemical Society 126(28):8823–8834, 2004. 20
- [Hil02] J. HILARIO, J. KUBELKA, F. A. SYUD, S. H. GELLMAN, T. A. KEIDERLING. *Spectroscopic characterization of selected β -sheet hairpin models*. Biopolymers 67(4-5):233–236, 2002. 134
- [Hil03] J. HILARIO, J. KUBELKA, T. A. KEIDERLING. *Optical spectroscopic investigations of model β -sheet hairpins in aqueous solution*. Journal of the American Chemical Society 125(25):7562–7574, 2003. 134
- [Hoc07] R. M. HOCHSTRASSER. *From the Cover: Multidimensional Ultrafast Spectroscopy Special Feature: Two-dimensional spectroscopy at infrared and optical frequencies*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(36):14190–14196, 2007. 158
- [Hos05] L. L. P. HOSSZU, M. A. WELLS, G. S. JACKSON, S. JONES, M. BATCHELOR, A. R. CLARKE, C. J. CRAVEN, J. P. WALTHO, J. COLLINGE. *Definable equilibrium states in the folding of human prion protein*. Biochemistry 44(50):16649–16657, 2005. 3
- [Hua95] G. S. HUANG, T. G. OAS. *Submillisecond Folding of Monomeric Lambda-Repressor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(15):6878–6882, 1995. 15
- [Hua02] C. Y. HUANG, S. HE, W. F. DEGRADO, D. G. MCCAFFERTY, F. GAI. *Light-induced helix formation*. Journal of the American Chemical Society 124(43):12674–12675, 2002. 19
- [Hub98] C. HUBER, G. WACHTERSHAUSER. *Peptides by activation of amino acids with CO on (Ni,Fe)S surfaces: Implications for the origin of life*. Science 281(5377):670–672, 1998. 1
- [Hub02] R. A. HUBER. *Elektronentransfer an Farbstoff-Halbleiter-Grenzflächen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Juni 2002.
URL <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/archive/00000093/> 27
- [Hub06] M. HUBER. *Femtosekundenimpulse im Infraroten: Aufbau einer Lichtquelle für 2-Dimensionale Infrarot-Spektroskopie*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, 2006. 29
- [Hug02] T. HUGEL, N. B. HOLLAND, A. CATTANI, L. MORODER, M. SEITZ, H. E. GAUB. *Single-molecule optomechanical cycle*. Science 296(5570):1103–1106, 2002. 14

- [Hug06] R. M. HUGHES, M. L. WATERS. *Model systems for β -hairpins and β -sheets*. Current Opinion in Structural Biology 16(4):514–524, 2006. 5, 47, 48
- [Hum83] H. HUMMEL, R. BONART. *IR-Bandenstrukturanalyse der Amidstreckschwingungen von N-Methylacetamid als Modells substanz für Makromoleküle mit Peptidbindungen*. Die Makromolekulare Chemie 184(12):2693–2704, 1983. 74, 79
- [Hut94] E. G. HUTCHINSON, J. M. THORNTON. *A revised set of potentials for β -turn formation in proteins*. Protein Science 3(12):2207–2216, 1994. 45
- [Iha07] J. A. IHALAINEN, J. BREDENBECK, R. PFISTER, J. HELBING, L. CHI, I. H. M. VAN STOKKUM, G. A. WOOLLEY, P. HAMM. *Folding and unfolding of a photoswitchable peptide from picoseconds to microseconds*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(13):5383–5388, 2007. 153, 156
- [Jac95] M. JACKSON, H. H. MANTSCH. *The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein-Structure*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30(2):95–120, 1995. 75, 76
- [Jac99] M. JACOB, G. HOLTERMANN, D. PERL, J. REINSTEIN, T. SCHINDLER, M. A. GEEVES, F. X. SCHMID. *Microsecond folding of the cold shock protein measured by a pressure-jump technique*. Biochemistry 38(10):2882–2891, 1999. 18
- [Jae81] R. JAENICKE. *Enzymes under Extremes of Physical Conditions*. Annual Review of Biophysics and Bioengineering 10:1–67, 1981. 18
- [Jed87] T. M. JEDJU, L. J. ROTHENBERG. *Picosecond time-resolved absorption in the mid-infrared by seeded optical parametric generation*. Appl. Opt. 26(14):2877–2880, 1987. 34
- [Joh88] W. C. JOHNSON. *Secondary Structure of Proteins Through Circular Dichroism Spectroscopy*. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry 17(1):145–166, 1988. 11
- [Jon03] D. M. JONAS. *Two-dimensional femtosecond spectroscopy*. Annual Review of Physical Chemistry 54:425–463, 2003. 22
- [Kai00] R. A. KAINDL, M. WURM, K. REIMANN, P. HAMM, A. M. WEINER, M. WOERNER. *Generation, shaping and characterization of intense femtosecond pulses tunable from 3 to 20 μm* . Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics 17(12):2086–2094, Dezember 2000. 28
- [Kau81] J. K. KAUPPINEN, D. J. MOFFATT, H. H. MANTSCH, D. G. CAMERON. *Fourier Self-Deconvolution - a Method for Resolving Intrinsically Overlapped Bands*. Applied Spectroscopy 35(3):271–276, 1981. 73

- [Kei02] T. A. KEIDERLING. *Protein and peptide secondary structure and conformational determination with vibrational circular dichroism*. *Current Opinion in Chemical Biology* 6(5):682–688, 2002. 11, 134
- [Kin07] M. KINOSHITA, K. KAMAGATA, A. MAEDA, Y. GOTO, T. KOMATSUZAKI, S. TAKAHASHI. *Development of a technique for the investigation of folding dynamics of single proteins for extended time periods*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(25):10453–10458, 2007. 130
- [Kni98] J. B. KNIGHT, A. VISHWANATH, J. P. BRODY, R. H. AUSTIN. *Hydrodynamic focusing on a silicon chip: Mixing nanoliters in microseconds*. *Physical Review Letters* 80(17):3863–3866, 1998. 18
- [Koc01] W. KOCH, M. C. HOLTHAUSEN. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, Band 1. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2 Auflage, 2001. 131
- [Koh65] W. KOHN, L. J. SHAM. *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*. *Physical Review* 140(4A):1133–1138, 1965. 130
- [Kol03] F. KOLLER. *Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie an Azobenzolderivaten im Zeitbereich von Pikosekunden*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Dezember 2003. 37, 40
- [Kol04] C. KOLANO, K. GOMANN, W. SANDER. *Small cyclic disulfide peptides: Synthesis in preparative amounts and characterization by means of NMR and FT-IR spectroscopy*. *European Journal of Organic Chemistry* (20):4167–4176, 2004. 150
- [Kol06] C. KOLANO, J. HELBING, M. KOZINSKI, W. SANDER, P. HAMM. *Watching hydrogen-bond dynamics in a β -turn by transient two-dimensional infrared spectroscopy*. *Nature* 444(7118):469–472, 2006. 49, 150
- [Kol07] F. O. KOLLER, C. SOBOTTA, T. E. SCHRADER, T. CORDES, W. J. SCHREIER, A. SIEG, P. GILCH. *Slower processes of the ultrafast photoisomerization of an azobenzene observed by IR spectroscopy*. *Chemical Physics* 341:258–266, 2007. 107
- [Koz01] S. A. KOZIN, G. BERTHO, A. K. MAZUR, H. RABESONA, J. P. GIRAULT, T. HAERTLE, M. TAKAHASHI, P. DEBEY, G. H. B. HOA. *Sheep prion protein synthetic peptide spanning helix 1 and β -strand 2 (residues 142–166) shows β -hairpin structure in solution*. *Journal of Biological Chemistry* 276(49):46364–46370, 2001. 3
- [Koz02] V. KOZICH, W. WERNCKE, J. DREYER, K.-W. BRZEZINKA, M. RINI, A. KUMMROW, T. ELSAESSER. *Vibrational excitation and energy redistribution after ultrafast internal conversion in 4-nitroaniline*. *J. Chem. Phys.* 117(2):719–726, 2002. 100

- [Koz03] V. KOZICH, W. WERNCKE, A. I. VODCHITS, J. DREYER. *Ultrafast excitation of out-of-plane vibrations and vibrational energy redistribution after internal conversion of 4-nitroaniline*. J. Chem. Phys. 118(4):1808–1814, Januar 2003. 100
- [Kri72] S. KRIMM, Y. ABE. *Intermolecular Interaction Effects in the Amide I Vibrations of β Polypeptides*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 69(10):2788–2792, 1972. 135
- [Kri86] S. KRIMM, J. BANDEKAR. *Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins*. Advances in Protein Chemistry 38:181–364, 1986. 12, 13, 74, 135
- [Kri04] M. M. G. KRISHNA, L. HOANG, Y. LIN, S. W. ENGLANDER. *Hydrogen exchange methods to study protein folding*. Methods Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: Experimental and Theoretical Methods 34(1):51–64, 2004. 20, 68
- [Krä05] V. KRÄUTLER, A. AEMISSEGGER, P. H. HÜNENBERGER, D. HILVERT, T. HANSSON, W. F. VAN GUNSTEREN. *Use of molecular dynamics in the design and structure determination of a photoinducible β -hairpin*. Journal of the American Chemical Society 127(13):4935–4942, 2005. 48
- [Kub01] J. KUBELKA, T. A. KEIDERLING. *The anomalous infrared amide I intensity distribution in C-13 isotopically labeled peptide β -sheets comes from extended, multiple-stranded structures. An ab initio study*. Journal of the American Chemical Society 123(25):6142–6150, 2001. 75, 134, 164
- [Kub04] J. KUBELKA, J. HOFRICHTER, W. A. EATON. *The protein folding 'speed limit'*. Current Opinion in Structural Biology 14(1):76–88, 2004. 152, 154
- [Kuc94] H. KUCHLING. *Taschenbuch der Physik*, Band 1. Fachbuchverlag Leipzig GmbH, Leipzig, 14. Auflage, 1994. 121, 122
- [Kwa05] K. KWAC, M. CHO. *Hydrogen bonding dynamics and two-dimensional vibrational spectroscopy: N-methylacetamide in liquid methanol*. Journal of Raman Spectroscopy 36(4):326–336, 2005. 80, 107
- [Kwo98] P. D. KWONG, R. WYATT, J. ROBINSON, R. W. SWEET, J. SODROSKI, W. A. HENDRICKSON. *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. Nature 393(6686):648–659, 1998. 51
- [Lac99] E. LACROIX, T. KORTEEMME, M. L. DE LA PAZ, L. SERRANO. *The design of linear peptides that fold as monomeric β -sheet structures*. Current Opinion in Structural Biology 9(4):487–493, 1999. 47
- [Lak06] J. R. LAKOWICZ. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 3. Auflage, 2006. 33

- [Lap00] L. J. LAPIDUS, W. A. EATON, J. HOFRICHTER. *Measuring the rate of intramolecular contact formation in polypeptides*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(13):7220–7225, 2000. 16
- [Lat94] E. E. LATTMAN. *Small-Angle Scattering Studies of Protein-Folding*. Current Opinion in Structural Biology 4(1):87–92, 1994. 21
- [Lee88] C. T. LEE, W. T. YANG, R. G. PARR. *Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density*. Physical Review B 37(2):785–789, 1988. 131
- [Lin06] M. M. LIN, D. SHOROKHOV, A. H. ZEWAIL. *Helix-to-coil transitions in proteins: Helicity resonance in ultrafast electron diffraction*. Chemical Physics Letters 420(1-3):1–7, 2006. 20
- [Liu05] P. LIU, B. KIM, R. A. FRIESNER, B. J. BERNE. *Replica exchange with solute tempering: A method for sampling biological systems in explicit water*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(39):13749–13754, 2005. 129
- [Low05] M. LOWENECK, S. L. DONG, T. E. SCHRADER, W. J. SCHREIER, W. ZINTH, L. MORODER, C. RENNER. *A photo-controlled β -hairpin*. Biopolymers 80(4):547–547, 2005. 136
- [Lu97] H. S. M. LU, M. VOLK, Y. KHOLODENKO, E. GOODING, R. M. HOCHSTRASSER, W. F. DEGRADO. *Aminothietyrosine disulfide, an optical trigger for initiation of protein folding*. Journal of the American Chemical Society 119(31):7173–7180, 1997. 7, 19
- [Lud06] S. LUDEKE, V. A. L. FONFRIA, F. SIEBERT, R. VOGEL. *Time-resolved rapid-scan Fourier transform infrared difference spectroscopy on a noncyclic photosystem: Rhodopsin photointermediates from Lumi to Meta II*. Biopolymers 83(2):159–169, 2006. 156
- [Lut97] I. LUTZ. *Aufbau eines IR-Spektrometersystems zur Untersuchung von Konformationsänderungen von Polypeptiden auf der Nano- bis Mikrosekunden-Zeitskala*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, 1997. 122
- [Lut01] I. LUTZ. *Vielkanal-Femtosekunden Spektroskopie der Primärreaktionen von archaebakteriellen Retinalproteinen im sichtbaren Spektralbereich*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Oktober 2001.
URL <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/archive/00000345/> 27
- [Löw05] M. LÖWENECK. *Synthese lichtschtbarer Azobenzol-enthaltender Peptide und deren biophysikalische Charakterisierung*. Doktorarbeit, Technische Universität München, 2005. 51, 55, 62, 63

- [Man03] S. J. MANESS, S. FRANZEN, A. C. GIBBS, T. P. CAUSGROVE, R. B. DYER. *Nanosecond temperature jump relaxation dynamics of cyclic β -hairpin peptides*. *Biophysical Journal* 84(6):3874–3882, 2003. 47, 74, 78, 83
- [Mar99] P. E. MARSZALEK, H. LU, H. B. LI, M. CARRION-VAZQUEZ, A. F. OBERHAUSER, K. SCHULTEN, J. M. FERNANDEZ. *Mechanical unfolding intermediates in titin modules*. *Nature* 402(6757):100–103, 1999. 14
- [May06] G. MAYER, A. HECKEL. *Biologically active molecules with a "light switch"*. *Angewandte Chemie-International Edition* 45(30):4900–4921, 2006. 49
- [Min94] D. L. MINOR, P. S. KIM. *Measurement of the β -Sheet-Forming Propensities of Amino-Acids*. *Nature* 367(6464):660–663, 1994. 81
- [Mok04] K. H. MOK, P. J. HORE. *Photo-CIDNP NMR methods for studying protein folding*. *Methods Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: Experimental and Theoretical Methods* 34(1):75–87, 2004. 20
- [Mon94] O. D. MONERA, C. M. KAY, R. S. HODGES. *Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions*. *Protein Science* 3(11):1984–1991, 1994. 23
- [Moo75] W. H. MOORE, S. KRIMM. *Transition Dipole Coupling in Amide I Modes of β -Polypeptides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(12):4933–4935, 1975. 135
- [Moo76a] W. H. MOORE, S. KRIMM. *Vibrational Analysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins. I. Polyglycine I*. *Biopolymers* 15(12):2439–2464, 1976. 135
- [Moo76b] W. H. MOORE, S. KRIMM. *Vibrational Analysis of Peptides, Polypeptides, and Proteins. II. β -Poly(L-Alanine) and β -Poly(L-Alanyl-glycine)*. *Biopolymers* 15(12):2465–2483, 1976. 135
- [Moo03] P. B. MOORE, T. A. STEITZ. *The structural basis of large ribosomal subunit function*. *Annual Review of Biochemistry* 72:813–850, 2003. 2
- [Mor04] A. MORAN, S. MUKAMEL. *The origin of vibrational mode couplings in various secondary structural motifs of polypeptides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(2):506–510, 2004. 75
- [Mor07] J. E. MORGAN, A. S. VAKKASOGLU, R. B. GENNIS, A. MAEDA. *Water structural changes in the L and M photocycle intermediates of bacteriorhodopsin as revealed by time-resolved step-scan Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*. *Biochemistry* 46(10):2787–2796, 2007. 156

- [Muk04] P. MUKHERJEE, A. T. KRUMMEL, E. C. FULMER, I. KASS, I. T. ARKIN, M. T. ZANNI. *Site-specific vibrational dynamics of the CD3 ζ membrane peptide using heterodyned two-dimensional infrared photon echo spectroscopy*. Journal of Chemical Physics 120(21):10215–10224, 2004. 22
- [Muk06] P. MUKHERJEE, I. KASS, I. ARKIN, M. T. ZANNI. *Picosecond dynamics of a membrane protein revealed by 2D IR*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(10):3528–3533, 2006. 22
- [Mul02] D. J. MULLER, M. KESSLER, F. OESTERHELT, C. MOLLER, D. OESTERHELT, H. GAUB. *Stability of bacteriorhodopsin α -helices and loops analyzed by single-molecule force spectroscopy*. Biophysical Journal 83(6):3578–3588, 2002. 13
- [Mun97] V. MUNOZ, P. A. THOMPSON, J. HOFRICHTER, W. A. EATON. *Folding dynamics and mechanism of β -hairpin formation*. Nature 390:196–199, 1997. 19, 20, 50, 152, 156
- [Mun98] V. MUNOZ, E. R. HENRY, J. HOFRICHTER, W. A. EATON. *A statistical mechanical model for β -hairpin kinetics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(11):5872–5879, 1998. 50
- [Mun00] K. MUNK. *Grundstudium Biologie*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, 1 Auflage, 2000. 1
- [Ngu06a] P. H. NGUYEN, R. D. GORBUNOV, G. STOCK. *Photoinduced conformational dynamics of a photoswitchable peptide: A nonequilibrium molecular dynamics simulation study*. Biophysical Journal 91(4):1224–1234, 2006. 149
- [Ngu06b] P. H. NGUYEN, G. STOCK. *Nonequilibrium molecular dynamics simulation of a photoswitchable peptide*. Chemical Physics 323(1):36–44, 2006. 149
- [Noe42] H. D. NOETHER. *Infra-red and Raman spectra of polyatomic molecules XVII. Methyl-d(3)-alcohol-d and methyl-d(3)-alcohol*. Journal of Chemical Physics 10(12):693–699, 1942. 65
- [Nol95] B. NOLTING, R. GOLBIK, A. FERSHT. *Submillisecond Events in Protein Folding*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(23):10668–10672, 1995. 18
- [Näg98] T. NÄGELE. *Ultraschnelle Photoisomerisierung von Azobenzolen*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, 1998. 85, 86, 88, 91
- [Oak06] M. T. OAKLEY, B. M. BULHELLER, J. D. HIRST. *First-principles calculations of protein circular dichroism in the far-ultraviolet and beyond*. Chirality 18(5):340–347, 2006. 11

- [Oes00] F. OESTERHELT, D. OESTERHELT, M. PFEIFFER, A. ENGEL, H. E. GAUB, D. J. MULLER. *Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins*. *Science* 288(5463):143–146, 2000. 13
- [Pan92] Y. Q. PAN, M. S. BRIGGS. *Hydrogen-Exchange in Native and Alcohol Forms of Ubiquitin*. *Biochemistry* 31(46):11405–11412, 1992. 68
- [Par03] K. M. PARNELL, S. A. STROBEL. *HIS & HERS, magic magnesium and the ballet of protein synthesis*. *Current Opinion in Chemical Biology* 7(5):528–533, 2003. 2
- [Par06] F. G. PARAK, K. ACHTERHOLD, M. SCHMIDT, V. PRUSAKOV, S. CROCI. *Protein dynamics on different timescales*. *Journal of Non-Crystalline Solids* 352(42-49):4371–4378, 2006. 20
- [Pie01] O. PIERONI, A. FISSI, N. ANGELINI, F. LENCI. *Photoresponsive polypeptides*. *Accounts of Chemical Research* 34(1):9–17, 2001. 49
- [Plu02] C. PLUTZER, K. KLEINERMANN. *Tautomers and electronic states of jet-cooled adenine investigated by double resonance spectroscopy*. *Physical Chemistry Chemical Physics* 4(20):4877–4882, 2002. 131
- [Pro06] V. I. PROKHORENKO, A. M. NAGY, S. A. WASCHUK, L. S. BROWN, R. R. BIRGE, R. J. D. MILLER. *Coherent Control of Retinal Isomerization in Bacteriorhodopsin*. *Science* 313(5791):1257–1261, 2006. 60
- [Pru98] S. B. PRUSINER. *Prions*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(23):13363–13383, 1998. 3
- [Ree95] M. K. REED, M. K. STEINER-SHEPARD, M. S. ARMAS, D. K. NEGUS. *Microjoule-energy ultrafast optical parametric amplifiers*. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* 12(11):2229–2236, November 1995. 29
- [Reh03] R. REHO. *FTIR-Spektroskopie an Lichtschaltern und lichtgeschalteten Peptiden*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2003. 39, 43
- [Rei00] J. REICHERT, A. JABS, P. SLICKERS, J. SÜHNEL. *The IMB Jena Image Library of Biological Macromolecules*. *Nucleic Acids Research* 28(1):246–249, 2000. 35
- [Ren00] C. RENNER, J. CRAMER, R. BEHRENDT, L. MORODER. *Photomodulation of conformational states. II. Mono- and bicyclic peptides with (4-aminomethyl)phenylazobenzoic acid as backbone constituent*. *Biopolymers* 54(7):501–514, 2000. 148
- [Ren06] C. RENNER, L. MORODER. *Azobenzene as conformational switch in model peptides*. *ChemBioChem* 7(6):869–878, 2006. 7, 19

- [Rie97] M. RIEF, M. GAUTEL, F. OESTERHELT, J. M. FERNANDEZ, H. E. GAUB. *Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM*. Science 276(5315):1109–1112, 1997. 13
- [Rie00] E. RIEDLE, M. BEUTTER, J. PIEL, S. SCHENKL, S. SPÖRLEIN, W. ZINTH. *Generation of 10 to 50 fs pulses tunable through all of the visible and the NIR*. Applied Physics B-Lasers and Optics 71:457–465, 2000. 29
- [Rod99] H. RODER, M. R. SHASTRY. *Methods for exploring early events in protein folding*. Current Opinion in Structural Biology 9(5):620–626, 1999. 12, 17
- [Rod04] H. RODER, K. MAKI, H. CHENG, M. C. RAMACHANDRA SHASTRY. *Rapid mixing methods for exploring the kinetics of protein folding*. Methods Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: Experimental and Theoretical Methods 34(1):15–27, 2004. 17, 18
- [Ros85] G. D. ROSE, L. M. GIERASCH, J. A. SMITH. *Turns in Peptides and Proteins*. Advances in Protein Chemistry 37:1–109, 1985. 46
- [Rou04] R. ROUNSEVELL, J. R. FORMAN, J. CLARKE. *Atomic force microscopy: mechanical unfolding of proteins*. Methods Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: Experimental and Theoretical Methods 34(1):100–111, 2004. 13
- [Sat03] H. SATZGER, S. SPÖRLEIN, C. ROOT, J. WACHTVEITL, W. ZINTH, P. GILCH. *Fluorescence spectra of trans- and cis-azobenzene - Emission from the Franck-Condon state*. Chemical Physics Letters 372(1-2):216–223, 2003. 91
- [Sat04a] H. SATZGER. *Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung mit Ultrakurzzeitspektroskopie*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, 2004. 9, 85, 86, 92
- [Sat04b] H. SATZGER, C. ROOT, C. RENNER, R. BEHRENDT, L. MORODER, J. WACHTVEITL, W. ZINTH. *Picosecond Dynamics in Water Soluble Azobenzene-Peptides*. Chemical Physics Letters 396:191–197, 2004. 51
- [Sat05] H. SATZGER, C. ROOT, P. GILCH, W. ZINTH, D. WILDEMANN, G. FISCHER. *Photoswitchable elements within a peptide backbone-ultrafast spectroscopy of thioxylated amides*. Journal of Physical Chemistry B 109(10):4770–4775, 2005. 20
- [Sau57] M. SAUNDERS, A. WISHNIA, J. G. KIRKWOOD. *The Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of Ribonuclease*. Journal of the American Chemical Society 79(12):3289–3290, 1957. 10
- [Sav64] A. SAVITZKY, M. J. E. GOLAY. *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. Analytical Chemistry 36(8):1627–1639, 1964. 121

- [Sch55] E. SCHAUENSTEIN, H. BAYZER. *Über die quantitative Berücksichtigung der Tyndall-Absorption im UV-Absorptionsspektrum von Proteinen*. Journal of Polymer Science 16(81):45–51, 1955. 60
- [Sch68a] G. SCHWARZ. *Kinetic Analysis by Chemical Relaxation Methods*. Reviews of Modern Physics 40(1):206–218, 1968. 16
- [Sch68b] G. SCHWARZ, J. SEELIG. *Kinetic Properties and Electric Field Effect of Helix-Coil Transition of Poly(Gamma-Benzyl L-Glutamate) Determined from Dielectric Relaxation Measurements*. Biopolymers 6(9):1263–1277, 1968. 16
- [Sch00] T. E. SCHRADER. *Kraftspektroskopie an polymeren Farbstoffsystemen*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians Universität, München, 2000. 13
- [Sch02a] W. SCHREIER. *Aufbau eines Systems zur Untersuchung von Femtosekunden infrarot Absorptionsänderungen in Chromopeptiden*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Juli 2002. 13
- [Sch02b] B. SCHULER, E. A. LIPMAN, W. A. EATON. *Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy*. Nature 419(6908):743–747, 2002. 15
- [Sch04a] M. SCHMIDT, R. PAHL, V. SRAJER, S. ANDERSON, Z. REN, H. IHEE, S. RAJAGOPAL, K. MOFFAT. *Protein kinetics: Structures of intermediates and reaction mechanism from time-resolved X-ray data*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(14):4799–4804, 2004. 21
- [Sch04b] T. SCHRADER, A. SIEG, F. KOLLER, W. SCHREIER, Q. AN, W. ZINTH, P. GILCH. *Vibrational relaxation following ultrafast internal conversion: comparing IR and Raman probing*. Chemical Physics Letters 392(4-6):358–364, 2004. 97, 113
- [Sch05] M. SCHMIDT, K. NIENHAUS, R. PAHL, A. KRASSELT, S. ANDERSON, F. PARAK, G. U. NIENHAUS, V. SRAJER. *Ligand migration pathway and protein dynamics in myoglobin: A time-resolved crystallographic study on L29W MbCO*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(33):11704–11709, 2005. 21
- [Sch07a] M. SCHMIDT, A. PATEL, Y. ZHAO, W. REUTER. *Structural basis for the photochemistry of α -phycoerythrocyanin*. Biochemistry 46(2):416–423, 2007. 10
- [Sch07b] T. E. SCHRADER, W. J. SCHREIER, T. CORDES, F. O. KOLLER, G. BABITZKI, R. DENSCHLAG, C. RENNER, M. LOWENECK, S.-L. DONG, L. MORODER, P. TAVAN, W. ZINTH. *Light-triggered β -hairpin folding and unfolding*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(40):15729–15734, 2007. 120

- [Sea95] M. S. SEARLE, D. H. WILLIAMS, L. C. PACKMAN. *A Short Linear Peptide Derived from the N-Terminal Sequence of Ubiquitin Folds into a Water-Stable Nonnative β -Hairpin*. *Nature Structural Biology* 2(11):999–1006, 1995. 47
- [Ser74] A. SERRALLACH, R. MEYER, H. H. GUNTARD. *Methanol and Deuterated Species - Infrared Data, Valence Force-Field, Rotamers, and Conformation*. *Journal of Molecular Spectroscopy* 52(1):94–129, 1974. 65
- [Sha06] E. SHAKHNOVICH. *Protein folding thermodynamics and dynamics: Where physics, chemistry, and biology meet*. *Chemical Reviews* 106(5):1559–1588, 2006. 17
- [Sho05] D. SHOROKHOV, S. T. PARK, A. H. ZEWEIL. *Ultrafast electron diffraction: Dynamical structures on complex energy landscapes*. *ChemPhysChem* 6(11):2228–2250, 2005. 20
- [Sib89] B. L. SIBANDA, T. L. BLUNDELL, J. M. THORNTON. *Conformation of β -Hairpins in Protein Structures - a Systematic Classification with Applications to Modeling by Homology, Electron-Density Fitting and Protein Engineering*. *Journal of Molecular Biology* 206(4):759–777, 1989. 45
- [Sib93] B. L. SIBANDA, J. M. THORNTON. *Accommodating Sequence Changes in β -Hairpins in Proteins*. *Journal of Molecular Biology* 229:428–447, 1993. 45
- [Sie86] A. E. SIEGMANN. *Lasers*, Band 1. University Science Books, Sausalito, CA 94965, 1. Auflage, 1986. 41
- [Sie05] A. SIEG. *Femtosekundenspektroskopie im mittleren Infraroten: Energierelaxation in para-Nitroanilin und Konformationsdynamik von Azobenzolpeptiden*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2005. 4, 25, 27, 28, 75, 83, 148
- [Sim05] G. E. SIMS, I. G. CHOI, S. H. KIM. *Protein conformational space in higher order ϕ - ψ maps*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(3):618–621, 2005. 5
- [Sin00] B. R. SINGH. *Infrared Analysis of Peptides and Proteins*, Band 1 von *ACS symposium series*. Oxford University Press, Oxford, 1. Auflage, 2000. 70, 75
- [Smi05] A. W. SMITH, H. S. CHUNG, Z. GANIM, A. TOKMAKOFF. *Residual native structure in a thermally denatured β -hairpin*. *Journal of Physical Chemistry B* 109(36):17025–17027, 2005. xv, 77, 84, 152, 158
- [Smi07a] A. W. SMITH, A. TOKMAKOFF. *Amide I two-dimensional infrared spectroscopy of β -hairpin peptides*. *Journal of Chemical Physics* 126(4):0451091–04510911, 2007. 84

- [Smi07b] A. W. SMITH, A. TOKMAKOFF. *Probing local structural events in beta-hairpin unfolding with transient nonlinear infrared spectroscopy*. *Angewandte Chemie-International Edition* 46:7984–7987, 2007. 152
- [Sno04] C. D. SNOW, L. L. QIU, D. G. DU, F. GAI, S. J. HAGEN, V. S. PANDE. *Trp zipper folding kinetics by molecular dynamics and temperature-jump spectroscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(12):4077–4082, 2004. 149, 151, 152
- [Sob07] C. SOBOTTA. *Retinalbasierte Ionenpumpen - Ultrakurzzeitspektroskopie der Primärreaktion in unterschiedlichen Umgebungen*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2007. 60
- [Sol06] B. N. SOLOMONOV, M. A. VARFOLOMEEV, V. B. NOVIKOV, A. E. KLIMOVITSKII. *New thermochemical parameter for describing solvent effects on IR stretching vibration frequencies communication 2. Assessment of cooperativity effects*. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 64(3):405–411, 2006. 65
- [Sou06] P. SOULISSE. *Conception et optimisation d'une cellule à échantillon destinée à des mesures spectrométriques à différentes températures*. Praktikumsbericht, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2006. 156
- [Spö01] S. SPÖRLEIN. *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Juni 2001.
URL <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/archive/00000456/> 21, 27, 32, 43, 85, 89, 91, 93, 95, 110, 111, 114
- [Spö02] S. SPÖRLEIN, H. CARSTENS, H. SATZGER, C. RENNER, R. BEHRENDT, L. MORODER, P. TAVAN, W. ZINTH, J. WACHTVEITL. *Ultrafast spectroscopy reveals subnanosecond peptide conformational dynamics and validates molecular dynamics simulation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(12):7998–8002, 2002. 89, 94
- [SS06] R. SCHWEITZER-STENNER. *Advances in vibrational spectroscopy as a sensitive probe of peptide and protein structure - A critical review*. *Vibrational Spectroscopy* 42(1):98–117, 2006. 21
- [Ste72] J. STEINIER, Y. TERMONIA, J. DELTOUR. *Smoothing and differentiation of data by simplified least square procedure*. *Analytical Chemistry* 44(11):1906–1909, 1972. 121
- [Sto04] C. E. STOTZ, E. M. TOPP. *Applications of model β -hairpin peptides*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93(12):2881–2894, 2004. 46, 48
- [Str68a] L. STRYER. *Fluorescence Spectroscopy of Proteins*. *Science* 162(3853):526–530, 1968. 20

- [Str68b] L. STRYER. *Implications of X-Ray Crystallographic Studies of Protein Structure*. Annual Review of Biochemistry 37:25–50, 1968. 10
- [Str91] L. STRYER. *Biochemie*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg Berlin New York, 4. Auflage, 1991. 2
- [Stu04] H. B. STUHRMANN. *Unique aspects of neutron scattering for the study of biological systems*. Reports on Progress in Physics 67(7):1073–1115, 2004. 10
- [Sus72] H. SUSI. *Infrared spectroscopy–Conformation*. In C. H. W. H. TIMASHEFF, S. N., Herausgeber, *Enzyme Structure, Part C*, Band 26 von *Methods in Enzymology*, Seiten 455–472. Academic Press, 1. Auflage, 1972. 68, 164
- [Swi95] A. SWIETOCHOWSKI. *Bedenke, bevor du denkst*. suhrkamp taschenbuch 2420, Frankfurt am Main, 1995. v
- [Syu01] F. A. SYUD, H. E. STANGER, S. H. GELLMAN. *Interstrand side chain-side chain interactions in a designed β -hairpin: Significance of both lateral and diagonal pairings*. Journal of the American Chemical Society 123(36):8667–8677, 2001. 47
- [Tak97] S. TAKAHASHI, S. R. YEH, T. K. DAS, C. K. CHAN, D. S. GOTTFRIED, D. L. ROUSSEAU. *Folding of cytochrome c initiated by submillisecond mixing*. Nature Structural Biology 4(1):44–50, 1997. 20
- [Tem03] P. A. TEMUSSI, L. MASINO, A. PASTORE. *From Alzheimer to Huntington: why is a structural understanding so difficult?*. Embo Journal 22(3):355–361, 2003. 3
- [Tho97] P. A. THOMPSON, W. A. EATON, J. HOFRICHTER. *Laser temperature jump study of the helix reversible arrow coil kinetics of an alanine peptide interpreted with a 'kinetic zipper' model*. Biochemistry 36(30):9200–9210, 1997. 7, 19
- [Tor92] H. TORII, M. TASUMI. *Model calculations on the amide-I infrared bands of globular proteins*. Journal of Physical Chemistry 96(5):3379–3387, 1992. 75, 135, 136
- [Tor98a] H. TORII, M. TASUMI. *Ab initio molecular orbital study of the amide I vibrational interactions between the peptide groups in di- and tripeptides and considerations on the conformation of the extended helix*. Journal of Raman Spectroscopy 29(1):81–86, 1998. 75, 134
- [Tor98b] H. TORII, T. TATSUMI, M. TASUMI. *Effects of Hydration on the Structure, Vibrational Wavenumbers, Vibrational Force Field and Resonance Raman Intensities of N-Methylacetamide*. Journal of Raman Spectroscopy 29:537–546, 1998. 74, 117, 136, 138

- [Tow03] M. TOWRIE, D. C. GRILLS, J. DYER, J. A. WEINSTEIN, P. MATOUSEK, R. BARTON, P. D. BAILEY, N. SUBRAMANIAM, W. M. KWOK, C. MA, D. PHILLIPS, A. W. PARKER, M. W. GEORGE. *Development of a broadband picosecond infrared spectrometer and its incorporation into an existing ultrafast time-resolved resonance Raman, UV/visible, and fluorescence spectroscopic apparatus*. Appl. Spectrosc. 57(4):367–380, 2003. 28
- [Tow05] M. TOWRIE, A. GABRIELSSON, P. MATOUSEK, A. W. PARKER, A. M. B. RODRIGUEZ, A. VLCEK. *A high-sensitivity femtosecond to microsecond time-resolved infrared vibrational spectrometer*. Applied Spectroscopy 59(4):467–473, 2005. 155
- [Tso74] T. Y. TSONG. *Trp-59 Fluorescence of Ferricytochrome-C as a Sensitive Measure of over-All Protein Conformation*. Journal of Biological Chemistry 249(6):1988–1990, 1974. 20
- [Uve03] V. N. UVERSKY. *Protein folding revisited. A polypeptide chain at the folding-misfolding-nonfolding cross-roads: which way to go?*. Cellular and Molecular Life Sciences 60(9):1852–1871, 2003. 2
- [Van05] J. M. VANDERKOOI, J. L. DASHNAU, B. ZELENT. *Temperature excursion infrared (TEIR) spectroscopy used to study hydrogen bonding between water and biomolecules*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics 1749(2):214–233, 2005. 74
- [Ven68] C. M. VENKATACHALAM. *Stereochemical Criteria for Polypeptides and Proteins. V. Conformation of a System of 3 Linked Peptide Units*. Biopolymers 6(10):1425–1436, 1968. 45
- [vH06] B. E. VON HOLT. *Zeitaufgelöste Messungen an CdSe Nanopartikeln*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2006. 35, 36
- [Vol97] M. VOLK, Y. KHOLODENKO, H. S. M. LU, E. A. GOODING, W. F. DEGRADO, R. M. HOCHSTRASSER. *Peptide conformational dynamics and vibrational stark effects following photoinitiated disulfide cleavage*. Journal of Physical Chemistry B 101(42):8607–8616, 1997. 7, 19, 116
- [Vol00] M. VOLK, P. GILCH, C. KOMPA, R. HASELSBERGER, P. HARTER, M. STOCKL, W. SCHERER, K. LATZEL, M. E. MICHEL-BEYERLE. *Carbonyl spectator bonds as sensitive sensors for charge transfer reactions on the femtosecond time scale*. Journal of Physical Chemistry A 104(21):4984–4988, 2000. 116
- [Vol01] M. VOLK. *Fast initiation of peptide and protein folding processes*. European Journal of Organic Chemistry 2001(14):2605–2621, 2001. 17, 19
- [vS04a] I. H. M. VAN STOKKUM, D. S. LARSEN, R. VAN GRONDELLE. *Global and target analysis of time-resolved spectra*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics 1657(2-3):82–104, 2004. 99

- [vS04b] I. H. M. VAN STOKKUM, D. S. LARSEN, R. VAN GRONDELLE. *Global and target analysis of time-resolved spectra (vol 1658, pg 82, 2004)*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics 1658(3):262–262, 2004. 99
- [Wac04] J. WACHTVEITL, S. SPÖRLEIN, H. SATZGER, B. FONROBERT, C. RENNER, R. BEHRENDT, D. OESTERHELT, L. MORODER, W. ZINTH. *Ultrafast conformational dynamics in cyclic azobenzene peptides of increased flexibility*. Biophys. J. 86:2350–2362, April 2004. 97
- [Wac07] G. WACHTERSHAUSER, C. HUBER. *Debating evidence for the origin of life on Earth - Response*. Science 315(5814):938–939, 2007. 1
- [Wal00] R. WALSER, A. E. MARK, W. F. VAN GUNSTEREN, M. LAUTERBACH, G. WIPFF. *The effect of force-field parameters on properties of liquids: Parametrization of a simple three-site model for methanol*. Journal of Chemical Physics 112(23):10450–10459, 2000. 136
- [Wan04] T. WANG, Y. XU, D. G. DU, F. GAI. *Determining β -sheet stability by Fourier transform infrared difference spectra*. Biopolymers 75(2):163–172, 2004. 77, 84
- [Wil96] S. WILLIAMS, T. P. CAUSGROVE, R. GILMANSHIN, K. S. FANG, R. H. CALLENDER, W. H. WOODRUFF, R. B. DYER. *Fast events in protein folding: Helix melting and formation in a small peptide*. Biochemistry 35(3):691–697, 1996. 7
- [Wil97] T. WILHELM, J. PIEL, E. RIEDLE. *Sub-20-fs pulses tunable across the visible from a blue-pumped single-pass noncollinear parametric converter*. Optics Letters 22(19):1494–1496, Oktober 1997. 29
- [Win96] J. R. WINKLER, H. B. GRAY. *Response to Optical Triggers of Protein Folding*. Science 274:629, 1996. 22
- [Win04] J. R. WINKLER. *Cytochrome c folding dynamics*. Current Opinion in Chemical Biology 8(2):169–174, 2004. 22
- [Wou02] S. WOUTERSEN, P. HAMM. *Nonlinear two-dimensional vibrational spectroscopy of peptides*. Journal of Physics-Condensed Matter 14(39):R1035–R1062, 2002. 22
- [WS99] P. WITTUNG-STAFSHEDA, J. C. LEE, J. R. WINKLER, H. B. GRAY. *Cytochrome b(562) folding triggered by electron transfer: Approaching the speed limit for formation of a four-helix-bundle protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(12):6587–6590, 1999. 19
- [Wüt86] K. WÜTHRICH. *NMR of Proteins and nucleic acids*, Band 1 von Baker lecture series. John Wiley & Sons, New York, 1. Auflage, 1986. 10

- [Xu03] Y. XU, R. OYOLA, F. GAI. *Infrared study of the stability and folding kinetics of a 15-residue β -hairpin*. Journal of the American Chemical Society 125(50):15388–15394, 2003. 152
- [Xu06] Y. XU, T. WANG, F. GAI. *Strange temperature dependence of the folding rate of a 16-residue β -hairpin*. Chemical Physics 323(1):21–27, 2006. 22
- [Yan03] W. Y. YANG, M. GRUEBELE. *Folding at the speed limit*. Nature 423(6936):193–197, 2003. 157
- [Yan04a] W. Y. YANG, M. GRUEBELE. *Detection-dependent kinetics as a probe of folding landscape microstructure*. Journal of the American Chemical Society 126(25):7758–7759, 2004. 157
- [Yan04b] W. Y. YANG, J. W. PITERA, W. C. SWOPE, M. GRUEBELE. *Heterogeneous folding of the trpzip hairpin: Full atom simulation and experiment*. Journal of Molecular Biology 336(1):241–251, 2004. xv, 22, 77, 78, 84, 150, 151
- [You01] D. C. YOUNG. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*, Band 1. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Weinheim, 2001. 131
- [Yuz94] T. YUZAWA, C. KATO, M. W. GEORGE, H. O. HAMAGUCHI. *Nanosecond Time-Resolved Infrared-Spectroscopy with a Dispersive Scanning Spectrometer*. Applied Spectroscopy 48(6):684–690, 1994. 121, 155
- [ZA04] A. ZARRINE-AFSAR, A. R. DAVIDSON. *The analysis of protein folding kinetic data produced in protein engineering experiments*. Methods Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: Experimental and Theoretical Methods 34(1):41–50, 2004. 23
- [Zan01] M. T. ZANNI, R. M. HOCHSTRASSER. *Two-dimensional infrared spectroscopy: a promising new method for the time resolution of structures*. Current Opinion in Structural Biology 11(5):516–522, 2001. 22
- [Zee04] M. ZEEB, J. BALBACH. *Protein folding studied by real-time NMR spectroscopy*. Methods Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: Experimental and Theoretical Methods 34(1):65–74, 2004. 20
- [Zha07] L. ZHANG, L. WANG, Y.-T. KAO, W. QIU, Y. YANG, O. OKOBIAN, D. ZHONG. *From the Cover: Mapping hydration dynamics around a protein surface*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(47):18461–18466, 2007. 108
- [Zho01] R. H. ZHOU, B. J. BERNE, R. GERMAIN. *The free energy landscape for β hairpin folding in explicit water*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(26):14931–14936, 2001. 125

- [Zhu06] W. ZHUANG, D. ABRAMAVICIUS, T. HAYASHI, S. MUKAMEL. *Simulation protocols for coherent femtosecond vibrational spectra of peptides*. Journal of Physical Chemistry B 110(7):3362–3374, 2006. 135
- [Zin98] W. ZINTH, P. HUPPMANN, T. ARLT, J. WACHTVEITL. *Ultrafast spectroscopy of the electron transfer in photosynthetic reaction centres: towards a better understanding of electron transfer in biological systems*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences 356(1736):465–476, 1998. 108, 119
- [Zwa92] R. ZWANZIG, A. SZABO, B. BAGGHI. *Levinthal’s paradox*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(1):20–22, January 1992. 2
- [Zwa97] R. ZWANZIG. *Two-state models of protein folding kinetics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94:148–150, 1997. 9

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. W. Zinth für die reizvolle und herausfordernde Themenstellung und seine unermüdliche Unterstützung während der Doktorarbeit. Er ließ mir viele Freiheiten bei der Ausgestaltung und Führung vieler verschiedener Forschungsprojekte. Ihm sei auch gedankt dafür, dass ich nahtlos mit einem neuen Projekt der zeitaufgelösten Röntgenspektroskopie Einblicke in die großen Laseranlagen des Max-Planck-Instituts für Quantenoptik gewinnen konnte.

Prof. Dr. Hermann E. Gaub für die Übernahme der Zweitkorrektur der Arbeit.

Prof. Dr. P. Tavan für sein wissenschaftliches Interesse und seine beständige Aufmerksamkeit den experimentellen Daten gegenüber.

Prof. Dr. L. Moroder für seine tiefe Kenntnis der Literatur und der Peptidfaltungsgemeinschaft.

Dr. Christian Renner für seine ausgezeichnete Expertise auf den Gebieten der Peptidchemie, der NMR-Spektroskopie und Peptidfaltung.

Dr. Markus Löweneck und Dr. Shou-Liang Dong für die Synthese des AzoTrpZip2 und ihre Bereitschaft zur Synthese des Referenzpeptids Ac-Glu-AMPP-Lys-NH₂. Zudem bin ich zu Dank verpflichtet für die vielen (z. T. temperaturabhängigen) CD-Messungen.

Dr. Sergio Cadamuro für seine NMR-Charakterisierung des Referenzpeptids und meine Möglichkeit, damit noch mehr über zwei-dimensionale NMR-Spektroskopie zu lernen.

Priv. Doz. Dr. Peter Gilch für seine Idee, para-Nitroanilin als erstes Molekül mit zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie zu untersuchen. Dieses kleine Molekül hat mich sehr viel über die Grundlagen temperatur- und zeitabhängiger Infrarotspektren gelehrt.

Dr. Birgit von Holt für ihre Unterstützung bei den Messungen zur Faltung der β -Hairpin Struktur.

Dr. Arne Sieg, meinem Labormitstreiter der ersten Stunde (es könnte wohl keinen besseren geben), für die vielen z. T. auch nächtlichen Stunden im Labor, wenn mal wieder so gar nichts funktionierte, aber dennoch Ziele erreicht werden mussten. Hoffentlich werden wir uns noch lange freundschaftlich verbunden bleiben.

Dr. Karl-Heinz Mantel für Segelregatten und seine Unterstützung in allen Computerfragen.

Arne Sieg und Constanze Sobotta für ihre Unterstützung bei Computerfragen.

Galina Babitzki und Robert Denschlag, den TheoretikerInnen, die sich auf die eine oder andere Weise (DFT oder MD) mit den Berechnungen rund um das Modellpeptid AzoTrpZip2 parallel zu meinen zeitaufgelösten Daten beschäftigten.

Dr. Thorben Cordes für die gemeinsam durchgeführten zeitaufgelösten Messungen im sichtbaren Spektralbereich und für das Korrekturlesen des entsprechenden Kapitels.

den DiplomandInnen, Wolfgang Schreier, Rossana Reho, Dr. Florian Koller, Michael Brandl und Martha Brennich, die ich (mit-)betreuen durfte.

den WerkstudentInnen, Ursula Zinth, Richard Neher, Anja Gawlik, Sebastian Remi, Ulrich Hoyer, Florian Dehmelt, Adam Muschielok, Tobias Smorodin und Julian Flöther, ohne die ich meine Bastel- und Spektroskopierwut nicht hätte ausleben können.

Nadja Regner, Karin Haiser, Wolfgang Schreier, Florian Koller und Arne Sieg, sowie zu Beginn noch Robert Huber und Helmut Satzger für die gemeinsamen Anstrengungen, den Laser am Laufen zu halten und für die Gesamtteamleistung, ohne die die meisten zeitaufgelösten Messungen nicht entstanden wären.

Jörg Krebs und Isabell Kalbe für ihre Unterstützung in allen Bereichen des Chemielabors.

Harald Hoppe für einige Meisterleistungen im Bearbeiten von Optiken.

Rudolf Schwarz, Alfons Stork und Christian Hausmann für die Anfertigung einer Vielzahl von z. T. komplexen Mechaniken und für die tatkräftige Mithilfe bei der Organisation so mancher Lehrstuhlfeste.

Den Sekretärinnen des Lehrstuhls, als da sind: Barbara Podolski, Alexandra Michaelis, Marianne Widmann und Nicole Klemradt für die unkomplizierte Erledigung von allen verwaltungstechnischen Aufgaben.

Den Korrekturlesern: Florian Koller, Wolfgang Schreier, Verena Schultheis, Robert Denschlag, Rudolf Reichold und Peter Gilch für die unermüdliche Suche nach (Tipp-)Fehlern aller Art.

... allen anderen am Lehrstuhl für das gute Arbeitsklima und interessante Einblicke in ihr Tun!

Karin Beer für die weibliche Sicht auf die Dinge.

Gerlinde und Peter Schrader, meinen Eltern dafür, dass sie mich immer unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Tobias Erich Schrader
geboren am 23.09.1972 in Kaufbeuren
ledig

Ausbildung und Tätigkeiten

9/1979 bis 8/1983	Adalbert-Stifter-Grundschule, Neugablonz
9/1983 bis 7/1992	Staatliches Gymnasium, Kaufbeuren
7/1992	Allgemeine Hochschulreife
8/1992 bis 10/1993	Zivildienst im Kinderzentrum Augsburg
11/1993 bis 08/2000	Bayerisches Hochbegabten Stipendium
11/1993 bis 08/2000	Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München
9/1996 bis 7/1997	Mansfield College, University of Oxford: Entwicklung eines Phasenübergangsthermometers auf Basis von supraleitendem Titan
10/1999 bis 07/2000	Diplomarbeit am Lehrstuhl Prof. H. E. Gaub, Ludwig-Maximilians-Universität München: "Rasterkraftspektroskopie an polymeren Farbstoffsystemen".
08/2000 bis 09/2000	Zusammenführung von Einzelmolekülkraftspektroskopie mit Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie als Werkstudent am Lehrstuhl Gaub
10/2000 bis 12/2000	Praktikum bei "The Boston Consulting Group"
3/2001 bis heute	Dissertationsstudium / Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl Prof. W. Zinth, Ludwig-Maximilians-Universität, München

