

Untersuchung der Faltung und Aggregation von Peptiden über zeitaufgelöste Infrarot- und Fluoreszenzspektroskopie

Andreas Deeg

München 2013



Untersuchung der Faltung und Aggregation von Peptiden über zeitaufgelöste Infrarot- und Fluoreszenzspektroskopie

Dissertation

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

vorgelegt von

Andreas Deeg

aus Starnberg

München, 15. November 2013

Erstgutachter: Prof. Dr. W. Zinth
Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Giese
Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

"für Ulli"

Kurzfassung:

Die Faltungs- und Aggregationsmechanismen von Proteinen und Peptiden sind für das Verständnis biologischer Systeme entscheidend. So wird eine Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen in pathologische Amyloid-Strukturen bei diversen Krankheiten, wie den Prionen-Erkrankungen, Parkinson oder Alzheimer beobachtet. In dieser Arbeit wurden die Faltungs- und Aggregationsmechanismen von Peptiden mittels verschiedener (laser-)spektroskopischer Methoden untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde hierzu der Faltungsmechanismus eines photoschaltbaren β -Haarnadelpeptids auf der Zeitskala von Nanosekunden bis Mikrosekunden über zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie untersucht. Die Faltungs- und Entfaltungsdynamiken eines Peptids wurden hierbei erstmals durch zwei unterschiedliche Mechanismen ausgelöst: zum einen durch die Isomerisierung einer in die Aminosäurekette eingebauten photoschaltbaren Pseudoaminosäure, zum anderen durch einen Temperatursprung im Lösungsmittel. Die Messungen zeigen, dass der wesentlich Prozess, der die Faltungs- und Entfaltungsdynamiken des Peptids bestimmt, unabhängig vom Auslösemechanismus ist. Zudem erlaubt die Kombination der beiden Methoden eine detaillierte Beschreibung des Faltungsprozesses: Die Faltung der β -Haarnadelstruktur wird durch einen Übergangszustand, charakterisiert durch einen hydrophoben Kollaps, bestimmt. Ein diffusiver Faltungsprozess (sog. "downhill-folding") kann für dieses Peptid ausgeschlossen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Aggregation in Amyloid-Strukturen mit photoschaltbaren Peptiden untersucht. Hierbei konnte erstmals gezeigt werden, dass es durch einen in die Aminosäurekette eingebauten Photoschalter möglich ist, den Aggregationsprozess optisch zu kontrollieren und sogar ein Auflösen der Amyloid-Aggregate zu induzieren. Die Aggregations- und Deaggregationsdynamiken der Peptide wurden über Transmissionselektronenmikroskopie, stationäre und zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie untersucht. Bei dem lichtinduzierten Deaggregationsprozess konnten strukturelle Änderungen in den Amyloid-Aggregaten auf der Nanosekunden-Zeitskala beobachtet werden. Der eigentliche Auflöseprozess der Amyloid-Aggregate findet hingegen, ähnlich wie der lichtinduzierte Aggregationsprozess, auf der Zeitskala von Minuten statt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die Photophysik und der therapeutische Wirkmechanismus von Anle138b, einem neuen potentiellen Therapeutikum zur Behandlung von Parkinson und Prionen-Erkrankungen, untersucht. Zur Aufklärung der Photophysik wurden stationäre Fluoreszenzmessungen sowie zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen, unter Verwendung eines Femtosekundenlasersystems in Kombination mit einer Streackamera, durchgeführt. Anle138b in Lösung hat nur eine sehr geringe Fluoreszenzquantenausbeute von $\leq 1\%$. Diese geringe Fluoreszenzquantenausbeute ist vermutlich auf einen ultraschnellen Übergang (~ 40 ps) in einen Tripletzustand zurückzuführen. Bei der Messung von Anle138b mit pathologischen α -Synuclein-Fibrillen, wie sie bei Parkinson beobachtet werden, zeigt sich eine starke Fluoreszenzzunahme, die auf eine Bindung von Anle138b an die Aggregate zurückzuführen ist. Im Gegensatz hierzu zeigen die Daten keine Bindung an monomeres α -Synuclein. Es konnte gezeigt werden, dass Anle138b sehr effizient ($K_B = 1/(170\text{ nM})$) an die Aggregate bindet und erst mehrere (~ 12) α -Synuclein-Proteine zusammen im Aggregat eine Bindungsstelle bilden.

Abstract:

The folding and aggregation mechanisms of proteins and peptides are crucial for the understanding of biological systems. For example, protein misfolding and aggregation into amyloid structures is observed in various neurodegenerative diseases, such as prion diseases, Parkinson's or Alzheimer's disease. In this work, the folding and aggregation of peptides was investigated by various (laser-) spectroscopic techniques.

In the first part, the folding mechanism of a photo-switchable β -hairpin-peptide was studied using time-resolved infrared spectroscopy on the nanosecond to microsecond timescale. Here, for the first time, folding and unfolding dynamics were induced by two different procedures in one peptide system: First, by isomerization of a photo-switchable pseudo-amino acid element substituted in the amino acid chain of the peptide, second, by a temperature-jump in the solvent. The measurements show that the dominant process, determining the folding and unfolding dynamics of the peptide, is independent of the triggering procedure. Moreover, the combination of the two methods allows a detailed description of the folding process: The folding of the β -hairpin structure is determined by a transition state, characterized by a hydrophobic collapse mechanism. A diffusive folding process (so-called "downhill-folding") can be excluded for this peptide.

In the second part, the aggregation process into amyloid structures was studied with photo-switchable peptides. For the first time, it was demonstrated that the aggregation and disaggregation processes of the peptides can be controlled by light-induced isomerization of the photo-switchable backbone element. The aggregation and disaggregation processes of the peptides were investigated using transmission electron microscopy and (time-resolved) infrared spectroscopy. Here, the light-induced aggregation processes were observed on the time scale of minutes. For the light-induced disaggregation processes, structural changes of the amyloid-aggregates were observed on the nanosecond time scale. However, the actual disassembly of the amyloid-aggregates only proceeds on the time scale of minutes.

In the third part of this work, the photophysics and the therapeutic mode of action of Anle138b, a new potential therapeutic agent for the treatment of Parkinson's and prion diseases, was investigated. To elucidate the photophysics, stationary fluorescence measurements and time-resolved fluorescence measurements, using a femtosecond laser system in combination with a streak camera setup, were performed. Anle138b in solution has a very low fluorescence quantum yield of $\leq 1\%$. This low fluorescence quantum yield might be related to an ultrafast transition (~ 40 ps) into a triplet state. Fluorescence measurements on Anle138b, in combination with Parkinson's disease related α -synuclein fibrils, reveal a strong increase in the fluorescence quantum yield, indicating a binding of Anle138b to the aggregates. It was shown that a combination of circa twelve α -synuclein proteins in the aggregate forms one binding site and that Anle138b binds very efficiently ($K_B = 1/(170\text{nM})$) to the aggregates. In contrast, no indications for binding to monomeric α -synuclein could be observed.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	i
Abstract	iii
1 Einleitung	3
2 Proteinfaltung und Aggregation	8
2.1 Das Proteinfaltungsproblem	8
2.2 Faltung von β -Haarnadelstrukturen	14
2.3 Neurodegenerative Erkrankungen und Amyloid-Aggregation	16
2.4 Proteinaggregation als therapeutischer Ansatz: Anle138b	22
3 Experimentelle Methoden	27
3.1 Nanosekunden-Anreg-Abtast-Spektroskopie im mittelinfraroten Spektralbereich	27
3.2 Temperatursprung-Messungen an photoschaltbaren Peptiden	33
3.3 Stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	36
4 T-Sprung- und Isomerisierungs-induzierte Strukturdynamiken eines photoschaltbaren β-Haarnadelpeptids	41
5 Amyloid-Aggregate lichtsichtbarer Peptide	57
5.1 Lichtinduzierte Aggregation und Deaggregation von Amyloid-Strukturen	57
5.2 Lichtinduziertes Auflösen von Amyloid-Aggregaten: Strukturänderungen von ns - min.	68
6 Anle138b und dessen Interaktion mit α-Synuclein-Aggregaten	74
6.1 Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b	74
6.1.1 Materialien und Methoden: Fluoreszenzmessungen an Anle138b	74
6.1.2 Experimentelle Ergebnisse: Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b	76
6.1.3 Diskussion der Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b	80
6.2 Kopplung von Anle138b an monomeres und aggregiertes α -Synuclein	86
6.2.1 Probenpräparationen für die Fluoreszenzmessungen an Anle138b mit α -Synuclein	86
6.2.2 Experimentelle Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen an Anle138b mit α -Synuclein	87
6.2.3 Diskussion: Bindung von Anle138b an α -Synuclein-Fibrillen	89

Inhaltsverzeichnis

7 Zusammenfassung	95
Abbildungsverzeichnis	99
Abkürzungsverzeichnis	101
Literaturverzeichnis	103
Publikationen	116
Danksagung	118

1 Einleitung

Lebende Organismen basieren auf dem komplexen Zusammenspiel zweier Klassen von Biomolekülen: den Nukleinsäureketten und den Aminosäureketten. Die Nukleinsäureketten bilden die DNS (Desoxyribonukleinsäure) und RNS (Ribonukleinsäure) und dienen als Speicher beziehungsweise Überträger von Information. Bei der Translation wird die DNS mithilfe der RNS in eine Aminosäurekette übersetzt, wobei jeweils drei Nukleinsäuren eine Aminosäure festlegen. Die aus Aminosäureketten gebildeten Proteine oder Peptide sind quasi die Arbeiter des Lebens und übernehmen eine Vielzahl von Aufgaben, zum Beispiel bei der Signalweitergabe oder beim Stoffwechsel [1]. Proteine und Peptide können jedoch meistens nur in einer bestimmten dreidimensionalen Struktur ihre biologische Wirksamkeit erlangen. Diese Struktur scheint durch die Abfolge der Aminosäuren in der Kette und somit bereits in der Abfolge der Nukleinsäuren in der DNA genau bestimmt zu sein [2]. Die Bildung dieser nativen dreidimensionalen Struktur aus einer unstrukturierten Aminosäurekette, wie sie u.a. nach der Translation vorliegt, ist jedoch nur durch ein komplexes dynamisches Zusammenspiel verschiedener Prozesse möglich. Bei diesen Prozessen kann es sich um die Rotation einer einzelnen Peptidbindung auf der Zeitskala von Pikosekunden [3] bis hin zur Umstrukturierung ganzer Proteindomänen auf Zeitskalen von Sekunden bis Stunden handeln [4, 2]. Doch nicht nur nach der Translation, auch in biologischen Prozessen wie der Signalweiterleitung spielt die strukturelle Dynamik von Proteinen und Peptiden eine entscheidende Rolle [5, 6]. So werden strukturelle Änderungen durch eine Verschiebung der thermodynamischen Parameter der Protein-Umgebung wie Temperatur oder Druck induziert [7]. Strukturdynamiken können aber auch durch das Andocken eines Liganden oder der Strukturänderung einzelner Aminosäuren in der Aminosäurekette, wie der *cis-trans* Isomerisierung von Prolin ausgelöst werden [8, 9]. Des Weiteren wird die biologische Aktivität einiger Proteine nicht durch eine feste Struktur, sondern durch die Austausch-Geschwindigkeit (auf der Mikro- bis Millisekunden-Zeitskala) zwischen verschiedenen, sich im Gleichgewicht befindenden Strukturen bestimmt [10, 6, 11].

Welche Prozesse bei strukturellen Änderungen oder der Faltung von Proteinen eine Rolle spielen, wird seit einigen Jahrzehnten kontrovers diskutiert: Bei einer Vielzahl von Proteinen wird der Faltungsprozess durch so genannte Übergangszustände und Intermediate beschrieben. Bei relativ schnell faltenden Proteinen wurde jedoch vorgeschlagen, dass kein dominanter Übergangszustand existiert [12, 13]. In diesem Fall wird die Geschwindigkeit der Faltung durch einen "Diffusionsprozess" der ungefalteten Aminosäurekonformationen in die gefaltete Konformation bestimmt [12, 14]. Dieser Diffusionsprozess wird in der Literatur häufig auch als "downhill-folding" bezeichnet [15]. Die Frage, welches der hier nur kurz beschriebene Modelle zur Beschreibung der Faltung für ein bestimmtes Protein herangezogen werden kann, ist vielfach noch nicht geklärt. Selbst bei den häufigsten Strukturelementen von Proteinen, den so genannten Sekundärstrukturelementen wie α -Helices,

β -Faltblätter und β -Haarnadeln, ist in vielen Fällen nicht klar, ob ein Übergangszustand oder ein Diffusionsprozess die Bildung der gefalteten Struktur bestimmt [16, 17, 18, 19]. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass die Faltung über Übergangszustände und das so genannte downhill-folding, obwohl es sich konzeptionell um komplett unterschiedliche Prozesse handelt, experimentell nur sehr schwer voneinander unterschieden werden können [20].

Der Faltungsmechanismus einer β -Haarnadelstruktur ist wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit. Die Faltungs- und Entfaltungsdynamiken einer lichtschtbaren Haarnadelstruktur wurden hierzu mit unterschiedlichen experimentellen Methoden untersucht: Eine in die Schleife des β -Haarnadelpetids eingebaute Pseudo-Aminosäure AMPP kann über UV-Licht zwischen zwei Isomerisationszuständen (*cis* und *trans*) stark unterschiedlicher Geometrie geschaltet werden. Während das Peptid mit AMPP in *trans* keine gefaltete Struktur ausbilden kann, hat das Peptid in *cis* zum Großteil eine gefaltete β -Haarnadelstruktur. Die Faltung des Peptids kann somit durch die Isomerisation des AMPP von *trans* nach *cis*, welche auf der Zeitskala von wenigen Pikosekunden abläuft, initiiert werden. Diese Isomerisierungs-induzierte Faltung wird in dieser Arbeit über Anreg-Abtast-Spektroskopie auf der Zeitskala von Nano- bis Mikrosekunden untersucht. Der Abtast-Puls im mittelinfraroten Spektralbereich erlaubt es hierbei, die strukturellen Änderungen des Peptids zu verfolgen. Des Weiteren wurden Temperatur-Sprung-induzierte Struktur-dynamiken an Peptiden mit AMPP in *cis* untersucht. Hier liegt das Peptid zum Großteil in einer gefaltete β -Haarnadelstruktur vor. Die durch einen Nanosekunden-Laserpuls induzierte Temperaturerhöhung des Lösungsmittels führt zu einem partiellen Entfalten der β -Haarnadelstruktur, wobei das AMPP seine *cis* Form nicht verändert. Diese Struktur-dynamik kann ebenfalls über Absorptionsänderungen im mittelinfraroten Spektralbereich verfolgt werden. Die in dieser Arbeit erstmals verwendete Kombination der beiden Techniken ermöglicht es, ein detailliertes Modell für die Faltung dieser β -Haarnadel vorzustellen. Hierbei wird diskutiert, ob unterschiedliche Auslösemechanismen für strukturelle Änderungen der β -Haarnadelstruktur, das heißt eine Änderung der Umgebungstemperatur oder eine Änderung der Geometrie der Aminosäurekette an einer bestimmten Stelle, zu unterschiedlichen Peptiddynamiken führen.

Doch ein Verständnis der Faltung und Dynamik von Proteinen und Peptiden ist nicht nur entscheidend, um deren biologische Funktion zu verstehen. Bei einer Vielzahl von Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder Creutzfeldt-Jakob wird beobachtet, dass falsch gefaltete Proteine nicht nur ihre Funktion nicht mehr ausführen können, sondern in so genannten Amyloid-Strukturen aggregieren. Diese Amyloid-Proteinaggregate zeichnen sich durch eine faserartige Struktur unter dem Elektronenmikroskop aus. Diese Fasern sind in der Regel um die 10 nm breit, einige 100 nm lang und bestehen aus Proteinen, die sich in einer β -Faltblattstruktur aneinander anlagern [21]. Die genauen molekularen Strukturen der Amyloid-Aggregate und deren Eigenschaften sind jedoch vielfach noch unklar. Da ein Großteil der Krankheiten, bei denen eine solche Proteinaggregation beobachtet wird, erst im fortgeschrittenen Alter auftreten, nimmt deren Relevanz mit einer älter werdenden Gesellschaft stetig zu. Weltweit leiden heute ungefähr 27 Millionen Menschen an

Alzheimer, was einer Prävalenz¹ von ungefähr 0.4 % bei der Weltbevölkerung entspricht. Wegen der steigenden Lebenserwartung der Gesellschaft und der mit dem Alter exponentiell zunehmenden Inzidenz² von Alzheimer wird jedoch erwartet, dass bis 2050 gut 1 % der Weltbevölkerung an dieser Krankheit leiden [22, 23]. Bei Parkinson rechnet man in den industrialisierten Ländern mit einer Prävalenz von ca. 0.3 % [24], wobei die Krankheit durchschnittlich erst im Alter von 60 Jahren ausbricht [25]. Die Prionen-Erkrankungen, zu denen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beim Mensch und die Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind zählen, erlangten große Aufmerksamkeit in den neunziger Jahren während der BSE-Krise. Im Gegensatz zur Alzheimer- und Parkinson-Erkrankung gibt es viele Hinweise, dass diese Erkrankung durch Infektion mit falsch gefalteten und dann aggregierenden Proteinen, den so genannten Prion-Proteinen von Mensch zu Mensch oder auch von Tier zu Mensch übertragen werden können [26]. Die Pathologie der hier genannten Krankheiten unterscheidet sich zum Teil erheblich. Bei Alzheimer wird ein starkes Nachlassen der Gehirnleistung in Verbindung mit einem Verlust der Erinnerung beobachtet. Parkinson-Patienten zeigen hingegen vor allem starke Einschränkungen in der Motorik. Die Prionen-Erkrankungen führen innerhalb kurzer Zeit unweigerlich zum Tod.

Bei jeder dieser Krankheiten wird jedoch die Aggregation bestimmter Proteine und ein Absterben der Nervenzellen in der Umgebung der Proteinaggregate beobachtet. Bei Alzheimer zeigen sich Aggregate des aus 40 oder 42 Aminosäuren bestehenden Peptids Amyloid β vor allem im extrazellulären Bereich der Grosshirnrinde [27]. Bei Parkinson wird die Aggregation von α -Synuclein in der für den Dopamin-Haushalt zuständigen Substantia Nigra im Mittelhirn beobachtet [28]. Für einen Großteil der mit Proteinaggregation assoziierten Krankheiten inklusive Alzheimer, Parkinson oder Creutzfeldt-Jakob ist bisher lediglich eine symptomatische Behandlung möglich [29, 30]. Das Fehlen effektiver Behandlungen ist u.a. darauf zurück zu führen, dass die Krankheiten auf molekularer Ebene bisher nicht vollständig verstanden sind. Es wird jedoch vermutet, dass die Proteinaggregation bei diesen Krankheiten nicht nur einen Nebeneffekt darstellt, sondern mitverantwortlich oder sogar ursächlich für die jeweilige Pathologie ist [28]. Diese These wird unterstützt von der Beobachtung, dass bestimmte, aus nur wenigen Proteinen gebildete, aggregierte Strukturen, so genannte Oligomere, Zellmembranen zerstören und zelltoxisch sind [31, 32, 33]. Diese Oligomere wurden auch im Gehirn von an Parkinson oder Creutzfeldt-Jakob erkrankten Mäusen gefunden. Zudem konnte durch In-vivo-Experimente gezeigt werden, dass Substanzen, welche die Proteinaggregation verändern oder verhindern, zu einer Verlangsamung des Fortschreitens der Krankheiten führen können [34, 30]. Ob die kleinen toxischen Oligomere eine Vorstufe der größeren Amyloid-Aggregate (on pathway), ob sich die Oligomere unabhängig von diesen bilden (off pathway), oder ob sogar die Amyloid-Aggregate eine Art Quelle für die toxischen Oligomere darstellen, ist bisher noch unklar [31, 35]. Eines der Hauptprobleme liegt hierbei darin, dass die Oligomere thermodynamisch sehr instabil sind und sich kaum in einer für die Untersuchungen mit NMR, Röntgenstreuung oder anderen Verfahren ausreichend hohen Konzentrationen anreichern lassen.

Ein von Giese et. al verfolgter Ansatz für die Entwicklung neuer Medikamente besteht

¹Anzahl der Kranken zum Untersuchungszeitpunkt / Anzahl der betrachteten Personen

²Anzahl neu Erkrankter in der untersuchten Zeitspanne/ (untersuchte Zeitspanne*Anzahl der betrachteten Personen)

darin, Substanzen zu identifizieren, welche die Aggregation bestimmter Proteine inhibieren [36, 30]. Diese Substanzen können dann in Maus-Modellen auf ihre therapeutische Wirkung untersucht werden. Mit diesem Vorgehen konnte u.a. eine sehr vielversprechende Substanz für die Behandlung von Parkinson und Creutzfeldt-Jakob gefunden werden: Anle138b zeigt nicht nur eine aggregationshemmende Wirkung bei α -Synuclein und Prion-Proteinen, sondern auch eine starke Verlangsamung des Krankheitsverlaufs bei transgenen Parkinson- und Prion-infizierten Mäusen [30]. Um den Wirkmechanismus und somit auch die Krankheiten selbst besser zu verstehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bindung von Anle138b an Amyloid-artig aggregierte und monomere Strukturen von α -Synuclein untersucht.

Doch in den letzten Jahren hat sich auch ein Interesse an Amyloid-Aggregaten entwickelt, welches über deren Bedeutung bei den Krankheiten hinaus geht. Die speziellen Materialeigenschaften der Amyloid-Aggregate eröffnen eine Vielzahl von Möglichkeiten für die Entwicklung neuer Bio-Nano-Materialien [37, 21]. Die Fasern der Aggregate zeigen einzigartige mechanische Eigenschaften und lassen sich zudem, im Gegensatz zu synthetischen Polymeren, biologisch funktionalisieren [38, 39, 40]. Die möglichen Anwendungen reichen von Amyloid-basierten Nanostrukturen, Anwendungen als Matrix für Zellkulturen bis hin zur Erzeugung von Biofilmen [21, 37]. Die grundlegenden Eigenschaften von Amyloid-Aggregaten und die Mechanismen, über welche sich diese manipulieren oder auch wieder in monomere Strukturen auflösen lassen, sind somit nicht nur für das Verständnis der Proteinaggregation assoziierten Krankheiten relevant. In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein lichtschtbares Peptid, das Amyloid-Aggregate bildet, vorgestellt und untersucht. Der Aggregationsprozess lässt sich hier über ein in die Aminosäurekette eingebautes Azobenzolmolekül beeinflussen. Das Azobenzol kann über Licht zwischen zwei Isomerisations-Zuständen unterschiedlicher Geometrie hin und her geschaltet werden. Die Aggregation des Peptids lässt sich hierdurch nicht nur optisch auslösen, über den optischen molekularen Schalter lassen sich die Aggregate auch teilweise wieder auflösen.

Struktur dieser Arbeit: Zunächst werden die grundlegenden Fragestellungen der Proteinfaltung kurz dargestellt. Hierbei wird vor allem auf die in der Literatur diskutierten Faltungsmechanismen von β -Faltblatt-Sekundärstrukturen eingegangen. Des weiteren wird auf die bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtete Aggregation von Proteinen eingegangen und der von Armin Giese vorgeschlagene Ansatz zur Behandlung dieser Krankheiten mittels aggregationshemmender Substanzen vorgestellt (Kapitel 2).

Einige experimentelle Techniken und Aufbauten, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, werden in Kapitel 3 vorgestellt. Hierbei wird vor allem auf die Anreg-Abtast-Spektroskopie, den laserinduzierten Temperatursprung-Aufbau und den zur zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie verwendete Streackamera-Aufbau eingegangen.

Die Isomerisierungs- und T-Sprung-induzierten Faltungs- und Entfaltungsdynamiken der lichtschtbaren β -Haarnadelstruktur werden in Kapitel 4 vorgestellt. Die experimentellen Ergebnisse und das sich hieraus ergebende Modell für die Faltung und Entfaltung sind in der Publikation "Isomerization and temperature induced dynamics of a photo-switchable β -hairpin." [41] zusammengefasst.

In Kapitel 5 werden lichtsichtbare Peptide, die in Amyloid-Strukturen aggregieren können, vorgestellt. Die Aggregation dieser Peptide, aber auch das Auflösen der gebildeten Aggregate, können hier durch Licht ausgelöst werden. Die Ergebnisse sind in der dargestellten Publikation "Light-Triggered Aggregation and Disassembly of Amyloid-Like Structures" [42] zusammengefasst. Detaillierte Untersuchungen des lichtinduzierten Auflösungsprozesses sind im Rahmen der dargestellten Publikation "Amyloid-Like Structures Formed by Azobenzene Peptides: Light-Triggered Disassembly" [43] diskutiert.

Im letzten Kapitel, vor der Zusammenfassung der ganzen Arbeit, werden in Kapitel 6 fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der Bindung des potentiellen Therapeutikums Anle138b an pathogene α -Synuclein-Aggregate vorgestellt. Ein Teil der diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurde bereits zusammen mit anderen Ergebnissen im Rahmen der Publikation: "Anle138b- a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinsons disease" [30] veröffentlicht.

2 Proteinfaltung und Aggregation

In diesem Kapitel soll zunächst ein kurzer Überblick über die Fragestellungen der Proteinfaltung gegeben werden. Hierbei werden kurz die Modelle vorgestellt, welche in den letzten Jahrzehnten entwickelt wurden, um die Faltung von Proteinen zu beschreiben. Im speziellen werden die Faltungsmechanismen von β -Haarnadelstrukturen diskutiert. Hierbei werden vor allem die in der Diskussion von Kapitel 4 behandelten Proteinfaltungsmodelle und Mechanismen vorgestellt. Die bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtete Aggregation von Proteinen in Amyloid-Strukturen wird im dritten Abschnitte dieses Kapitels behandelt. Im letzten Abschnitt wird das neue potentielle Therapeutikum für die Parkinson- und Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung vorgestellt.

2.1 Das Proteinfaltungsproblem

Für die biologische Funktion von Proteinen ist nicht nur deren Aminosäuresequenz sondern auch die komplexe dreidimensionale Struktur der Aminosäurekette essenziell. Bei der Struktur von Proteinen und Peptiden unterscheidet man die so genannte Primärstruktur, die Sekundärstruktur und die Tertiärstruktur. Unter der Primärstruktur versteht man die Abfolge der einzelnen Aminosäuren in der Aminosäurekette. Diese Kette bildet häufig bestimmte lokale Strukturen, wie α -Helices oder β -Faltblätter, welche als Sekundärstrukturelemente bezeichnet werden. Die Anordnung der Sekundärstrukturelemente in eine komplexe dreidimensionale Struktur wird als Tertiär-Struktur bezeichnet.

Doch wodurch ist die Struktur eines Proteins bestimmt? Diese Fragestellung untersuchte Anfinsen bereits Anfang der sechziger Jahre anhand von Denaturierungsexperimenten am Ribonuclease A Protein. In seinen wegweisenden Experimenten, für die er 1972 den Nobelpreis erhielt, induzierte er die Entfaltung des Ribonuclease A Proteins durch Zugabe von Harnstoff. Hierbei konnte er zeigen, dass nach der Entfernung des Harnstoffs das Ribonuclease A Protein wieder seine native gefaltete Struktur einnimmt [44]. Aus dieser Beobachtung folgerte er, dass die Struktur eines Proteins in einer bestimmten Umgebung durch die Abfolge der Aminosäuren in der Kette genau bestimmt ist. Die Frage, die sich hieraus ergab, war jedoch, wie kodiert die Abfolge der Aminosäuren die Proteinstruktur und wie findet das Protein seine gefaltete Struktur? Diese Fragestellung wird auch als das Proteinfaltungsproblem bezeichnet, welches bis heute kontrovers diskutiert wird [2].

Proteinfaltungsmechanismen: Um 1968 zeigte Cyrus Levinthal, dass die Faltung eines Proteins nicht durch ein rein zufälliges Abrastern aller möglicher Konformationen beschrieben werden kann [46]. Er postulierte, dass die Aminosäurekette bei der Faltung nur bestimmte Konformationen einnehmen kann und die Faltung somit entlang bestimmter so

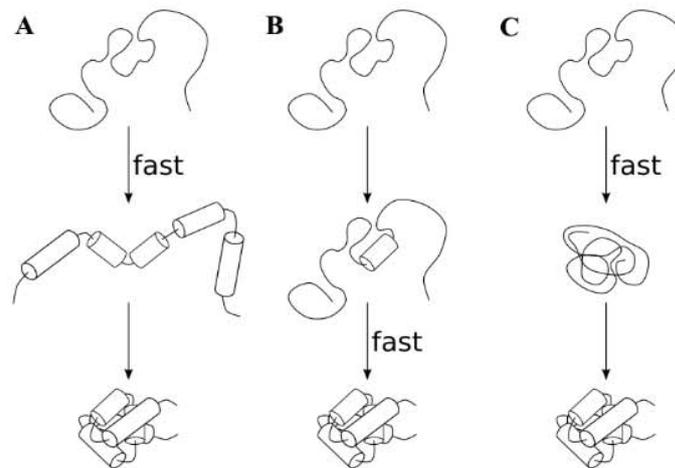


Abbildung 2.1: Proteinfaltungsmechanismen: A) Diffusion-Collision-Model oder auch Framework-Model, B) Nucleation-Growth-Model, C) Hydrophobic-Collapse-Model [45].

genannter "Pfade" verläuft [47]. Auf der Suche nach solchen Faltungspfaden wurden einige einfache Modelle vorgeschlagen, um die Faltung von Proteinen zu beschreiben. Bei dem so genannte "Diffusion-Collision-Model" [48] oder auch dem "Framework-Model" [49] bilden sich im ersten Schritt der Faltung an verschiedenen Stellen der Aminosäurekette lokale Strukturelemente wie zum Beispiel α -Helices oder β -Faltblätter. In dem darauf folgenden, langsameren Prozess entsteht dann durch Diffusion und Kollision dieser lokalen Strukturelemente die endgültige Proteinstruktur (siehe Abbildung 2.1 A) [45]. In dem "Nucleation-Growth-Model" muss sich im ersten vergleichsweise langsamen Schritt an einer Stelle ein lokales Strukturelement ausbilden. Dieses Strukturelement wirkt wie ein Keim, führt zu Strukturänderungen der umliegenden Aminosäuren und induziert über diesen sich entlang der Aminosäureketten ausbreitenden Faltungsprozess relativ schnell die Bildung der gesamten Proteinstruktur (siehe Abbildung 2.1 B) [50, 2]. Ein gänzlich anderer Faltungsprozess wurde im Rahmen des "Hydrophobic-Collapse-Models" [51, 2] vor allem für die Bildung globulärer Proteine vorgeschlagen. Hydrophobe Wechselwirkungen führen hier in einem schnellen Prozess zu einer kompakten, noch nicht nativen Anordnung der Aminosäureketten. Diese kompakte Anordnung wird als "Molten Globule" bezeichnet und ist ein Zwischenzustand, aus dem sich dann in vergleichsweise langsamen Prozessen durch das Aufgehen und Entstehen nichtkovalenter Wechselwirkungen die Sekundärstrukturen ausbilden (siehe Abbildung 2.1 C) [45].

Die verschiedenen hier vorgestellten Proteinfaltungsmechanismen schließen sich jedoch gegenseitig nicht aus. Sie repräsentieren vielmehr verschiedene Aspekte, die bei der Faltung eine Rolle spielen können und werden als solches verwendet, um die Faltung von Proteinen zu beschreiben [2]. Desweiteren stellt sich jedoch die Frage, welche Prozesse die langsamsten und somit geschwindigkeitsbestimmenden Schritte bei der Proteinfaltung darstellen. Bei diesen geschwindigkeitsbestimmenden Prozessen wird vielfach davon ausge-

gangen, dass die Geschwindigkeit der Faltung durch so genannte Übergangszustände und Zwischenzustände bestimmt wird. Ein Zwischenzustand ist eine Konformation, die während des Faltungsvorgangs für einige Zeit von der Aminosäurekette gebildet wird [52]. Übergangszustände sind energetisch ungünstige Konformationen, welche die Aminosäurekette einnehmen muss, um dann sehr schnell in einen Zwischenzustand oder den gefalteten Zustand überzugehen. Andererseits wird jedoch auch diskutiert, dass die Geschwindigkeit der Faltung durch einen "Diffusionsprozess" der ungefalteten Aminosäurekonformationen in die gefaltete Konformation bestimmt wird. Im Folgenden werden die beiden Konzepte und mathematischen Modelle zur Beschreibung von Übergangskinetiken und Diffusionskinetiken dargestellt.

Übergangszustandsmodelle: In Analogie zur klassischen Reaktionskinetik von Eyring [53] und Arrhenius kann die Faltungsdynamik von Proteinen zum Teil durch relative einfache kinetische Modelle beschrieben werden ([54], Vol.1, Chapter 12). Die Dynamik wird hier wie bei der klassischen Reaktionskinetik durch einen oder mehrere Übergangszustände bestimmt. In diesen Modellen werden Strukturen, die schnell ineinander übergehen zu einem kinetischen Zustand zusammengefasst. Der Übergang von einem Zustand (zum Beispiel dem Zustand der ungefalteten Strukturen) in einen anderen Zustand (zum Beispiel den Zustand der gefalteten Struktur) über einen Übergangszustand ist vergleichsweise langsam und bestimmt die Faltungsdynamik. Die Populationen $[i]_{eq}$ der Zustände X_i im thermodynamischen Gleichgewicht werden in diesem Ansatz durch die Boltzmannverteilung und die freie Energie der Zustände $G_i = H_i - TS_i$ bestimmt:

$$[i]_{eq} \sim e^{-G_i/RT}, \quad \sum_{i=1}^N [i]_{eq} = 1 \quad (2.1)$$

Die freie Energie setzt sich aus dem enthalpischen Anteil H und dem entropischen Anteil $-TS$ zusammen [14]. Die entfalteten Konformationen bilden meist Zustände mit relativ hoher Entropie und werden somit durch den Term $-TS$ energetisch begünstigt. Der gefaltete Zustand hingegen hat häufig eine sehr geringe Entropie. Dieser wird jedoch durch den enthalpischen Anteil H , welcher zum Beispiel die gebildeten Wasserstoffbrücken oder $\pi\pi$ -Wechselwirkungen aromatischer Aminosäuren beschreibt, energetisch begünstigt.

Die Geschwindigkeit für den Übergang von einem Zustand X_i in einen Zustand X_j wird über eine Rate $k_{ij} = 1/\tau$ entsprechend der Übergangszustandstheorie beschrieben:



$$k_{ij} = k_0 \cdot e^{-\Delta G_{ij}^{\#}/RT} = k_0 \cdot e^{\Delta S_{ij}^{\#}/R} \cdot e^{-\Delta H_{ij}^{\#}/RT} \quad (2.3)$$

$\Delta G_{ij}^{\#}$ ist hierbei die Differenz der freien Energie des Übergangszustands $\#$ zwischen den Zuständen X_i und X_j und der freien Energie des Zustand X_i . Der prä-exponentielle Fak-

tor k_0 entspricht der Reaktionsrate in Abwesenheit einer Energiebarriere. In der Eyring Theorie, die im wesentlichen für chemische Reaktionen entwickelt wurde, entspricht k_0 der Schwingungsfrequenz einer typischen thermisch angeregten Schwingung ([54], Vol.1, Chapter 12) [53]:

$$k_0 = \kappa \frac{k_B T}{h} \approx 6 \cdot 10^{12} s^{-1} (25 \text{ } ^\circ C) \quad (2.4)$$

Der so genannte Transmissionskoeffizient κ wird hierbei normalerweise gleich 1 gesetzt. Für Proteine ist dieser Ansatz jedoch nicht sinnvoll. Hier hängt der prä-exponentielle Faktor k_0 von verschiedenen Faktoren, wie Intra-Aminosäurekette-Diffusionsprozessen oder auch der Struktur des Übergangszustands ab und liegt vermutlich eher in der Größenordnung von $10^{-8} s^{-1}$ [55] ([54], Vol.1, Chapter 12). Auch die Temperaturabhängigkeit von k_0 bei Proteinfaltungsprozessen wird kontrovers diskutiert [56]. Bei der Analyse von experimentellen Daten entsprechend dem hier vorgestellten Übergangszustandsmodell wird die Temperaturabhängigkeit von k_0 gegenüber der von $e^{-\Delta H_{ij}^\# / RT}$ jedoch meist vernachlässigt [57, 19, 16, 58]. Über die experimentelle Bestimmung der Rate $k_{ij}(T)$ für verschiedene Temperaturen ist es dann möglich, die Höhe der Barriere $\Delta H_{ij}^\#$ für den Übergang vom Zustand X_i in den Zustand X_j zu bestimmen.

Im einfachsten Fall eines so genannten Zweizustandsmodells hat ein Protein nur einen gefalteten Zustand N und einen ungefalteten Zustand U , welche über einen Übergangszustand $\#$ ineinander übergehen können ([54], Vol.1, Chapter 12). Die freie Energie der Zustände, sowie deren enthalpische Anteile H und entropischen Anteile $-TS$ sind exemplarisch in Abbildung 2.2 dargestellt. Im thermodynamischen Gleichgewicht ist die Population $[N]_{eq}$ und $[U]_{eq}$ durch die Boltzmann-Verteilung bestimmt, und die Gleichgewichtskonstante K ergibt sich zu:

$$K := \frac{[N]_{eq}}{[U]_{eq}} = e^{-\Delta G^\circ / RT} \quad (2.5)$$

Hierbei ist $\Delta G^\circ = G_N - G_U$ (siehe Abbildung 2.2). Im Nichtgleichgewichtsfall wird die zeitliche Entwicklung der Populationen $[N]$ und $[U]$ durch die Ratengleichungen bestimmt:

$$\frac{d[N]}{dt} = k_f[U] - k_u[N], \quad \frac{d[U]}{dt} = -k_f[U] + k_u[N] \quad (2.6)$$

$$\Rightarrow \frac{d[N]}{dt} = -(k_f + k_u)[N] + k_f, \quad \frac{d[U]}{dt} = -(k_f + k_u)[U] + k_u \quad (2.7)$$

Bei Gleichung 2.7 wurde $[N] + [U] = 1$ verwendet. Die Raten k_f und k_u sind entsprechend Gleichung 2.3 durch die enthalpische Barriere $\Delta H_{UN}^\#$ bzw. $\Delta H_{NU}^\#$, die entropische Barriere $T\Delta S_{UN}^\#$ bzw. $T\Delta S_{NU}^\#$ und den prä-exponentiellen Faktor k_0 (siehe Abbildung 2.2) bestimmt. Für das thermodynamische Gleichgewicht ($\frac{d[N]}{dt} = \frac{d[U]}{dt} = 0$) ergibt sich aus Gleichung 2.6:

$$K := \frac{[N]_{eq}}{[U]_{eq}} = \frac{k_f}{k_u} \quad (2.8)$$

Die Lösung von Gleichung 2.7 im Nichtgleichgewichtsfall ist eine exponentielle Änderung

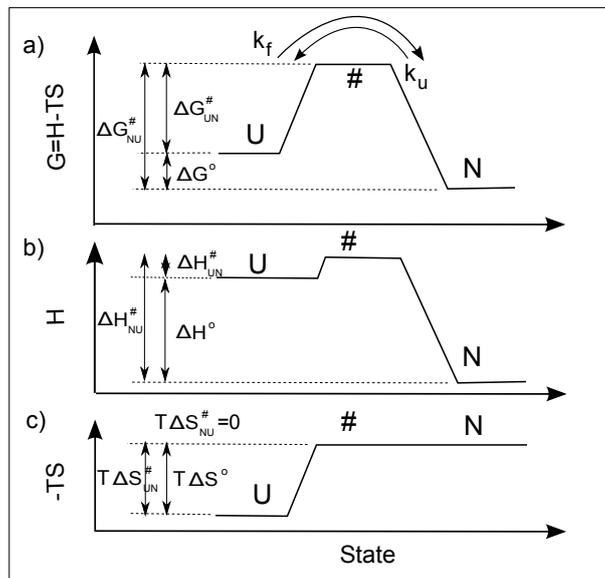


Abbildung 2.2: Schema der freien Energie für ein Protein mit einem gefalteten (N) und einem ungefalteten Zustand (U), welche über einen Übergangszustand $\#$ mit den Raten k_f und k_u austauschen können (a). Die freie Energie der Zustände setzt sich aus einem enthalpischen H und einem entropischen Anteil $-TS$ zusammen (b und c). In dem hier gezeigten Beispiel wird der Faltungsübergang von U nach N zum Großteil durch den entropischen Anteil der Barriere bestimmt ($T\Delta S_{UN}^\# \gg \Delta H_{UN}^\#$). Der Entfaltungsübergang von N nach U wird hingegen nur durch den enthalpischen Anteil der Barriere bestimmt ($\Delta H_{NU}^\# \gg T\Delta S_{NU}^\# = 0$).

der Populationen des gefalteten N und des ungefalteten Zustands U mit ein und derselben Rate $\lambda = k_f + k_u$:

$$[N(t)] \sim e^{-\lambda t}, [U(t)] \sim e^{-\lambda t} \quad (2.9)$$

Diese Zeitkonstante $1/\lambda$ ist unabhängig von den Anfangsbedingungen. Befinden sich die Proteine zu 100% im ungefalteten Zustand U und entwickeln sich dann ins thermodynamische Gleichgewicht mit den Population $[N]_{eq}$ und $[U]_{eq}$, ergibt sich somit eine Kinetik mit der gleichen Zeitkonstante λ wie für die Entwicklung von Proteinen aus einem 100% gefalteten Anfangszustand ins thermodynamische Gleichgewicht. Die hier vorgestellten kinetischen Eigenschaften des Zweizustandsmodells, in dem die Kinetik über einen Übergangszustand $\#$ bestimmt wird, spielen für die in Kapitel 4 diskutierte Faltung der β -Haarnadelstruktur eine entscheidende Rolle. In dem im Folgenden vorgestellten Energielandschaftsbild wird nun ein alternatives Konzept diskutiert. Hier wird die Faltung nicht durch Übergangszustände sondern als Diffusionsprozess modelliert.

Energielandschafts- und Diffusionsmodelle: In den achtziger und neunziger Jahren wurde vermehrt versucht, die Struktur und die Faltung von Proteinen mit statistischen Metho-

den zu beschreiben [59, 52, 60]. Aus diesen Überlegungen wurde ein universelleres Konzept zur Beschreibung der Proteinfaltung entwickelt. Hierbei wird der Faltungsprozess mithilfe einer zweidimensionalen, trichterförmigen freien Energielandschaft beschrieben. Jeder Konformation aus dem, in diesem Modell zweidimensionalen, Konformationsraum des Proteins wird hierbei eine freie Energie zugeordnet. Die ungefalteten Konformationen liegen im oberen Teil dieses Trichters und können über einen einzelnen oder aber auch verschiedene Wege das Minimum des Trichters, welches den gefalteten Zustand repräsentiert, erreichen (siehe Abbildung 2.3 a und b). Dieses Konzept kann auch die experimentelle Beobachtung von Proteinen, die unter bestimmten Bedingungen auf verschiedenen Wegen und über verschiedene Mechanismen falten, erklären [61]. Auch in dem Trichtermodell wird die Geschwindigkeit der Faltung in vielen Fällen durch Übergangszustände und Intermediate bestimmt [62, 12]. Im Rahmen des Trichtermodells ist es jedoch auch möglich, dass kein dominanter Übergangszustand zwischen den ungefalteten Zuständen und dem gefalteten Zustand im Minimum des Trichters existiert (siehe Abbildung 2.3 c). In diesem Fall wird die Geschwindigkeit der Faltung durch das Abrastern einer Vielzahl unterschiedlicher Proteinkonformationen bestimmt. Die einzelnen Konformationen sind hierbei nur durch sehr niedrige energetische Barrieren in der Größenordnung von $k_B T$ voneinander getrennt. Dieser Mechanismus ist konzeptionell vergleichbar mit dem im Rahmen des Levinthal Paradoxons diskutierten Faltungsprozess. Der Energiegradient im Trichter in Richtung des gefalteten Zustandes führt hier dazu, dass der Faltungsprozess auf einer physikalisch sinnvollen Zeitskala ablaufen kann [59]. Dieses Abrastern verschiedener Konformationen entspricht einem Diffusionsprozess, wobei die Diffusionskonstante durch die Rauigkeit der Energielandschaft, sprich der mittleren Höhe der vielen verschiedenen kleinen Barrieren, bestimmt wird [12, 14, 15]. Solch ein Diffusionsprozess wird in der Literatur häufig auch als "downhill-folding" bezeichnet und wurde auch bei der Faltung von Proteinen wie Phosphoglycerate kinase (PGK) [13], Ubiquitin [13], BBL [63, 64] oder $\lambda 6 - 85$ experimentell beobachtet [65].

Analog zur klassischen Diffusion eines Teilchens in einer Lösung oder der Wärmeleitung kann ein solcher diffusiver Faltungsprozess über die Smoluchowski-Gleichung beschrieben werden [66, 67]:

$$\frac{d}{dt}p(\vec{x}, t) = D\nabla^2 p(x, t) - D\beta\nabla((\nabla U(\vec{x})) \cdot p(\vec{x}, t)) \quad (2.10)$$

Hierbei beschreibt \vec{x} den ein- oder mehrdimensionalen Konformationsraum des Proteins, $p(x, t)$ die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Konformation und D die Diffusionskonstante, welche die Rauigkeit der Energielandschaft berücksichtigt. $U(\vec{x})$ bezeichnet die geglättete freie Energielandschaft, bei der die Rauigkeit nicht berücksichtigt ist (siehe Abbildung 2.3 c). Da die Smoluchowski-Gleichung i.a. nicht analytisch lösbar ist, wird vielfach die Master-Gleichung zur Beschreibung dieses Diffusionsprozesses herangezogen und numerisch integriert [20, 68, 69].

Abschließend muss jedoch erwähnt werden, dass downhill-folding und die Faltung über einen Übergangszustand, obwohl es sich um grundsätzlich unterschiedliche Faltungsmechanismen handelt, experimentell relativ schwierig zu unterscheiden sind [20]. So wird bei vielen Peptiden und Sekundärstrukturelementen kontrovers diskutiert, ob sie sich über

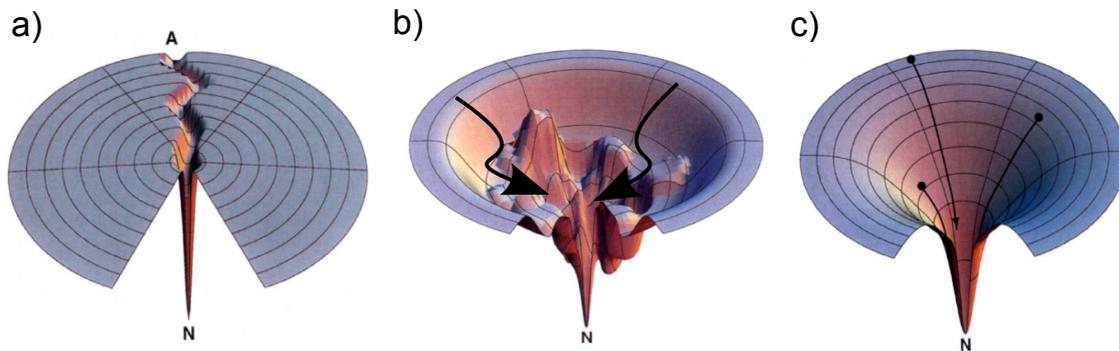


Abbildung 2.3: Zweidimensionale trichterförmige freie Energielandschaften zur Beschreibung der Proteinfaltung. Ungefaltete Konformationen liegen im oberen Teil des Trichters und können über einen einzelnen (a) oder aber auch verschiedene (b) Wege das Minimum des Trichters, welches den gefalteten Zustand (N) repräsentiert, erreichen. c) Beim sogenannten downhill-folding muss das Protein während der Faltung keine große, dafür aber sehr viele kleine Barrieren überwinden. Die Faltung wird hier durch einen Diffusionsprozess in den gefalteten Zustand bestimmt, wobei die mittlere Höhe der vielen, in diesem Bild nicht gezeigten, kleinen Barrieren die Diffusionskonstante festlegt. (Modifiziert von [12])

einen Diffusionsprozess oder einen Übergangszustand falten [20, 70, 16, 19, 18]. Die Fragestellung, ob die Faltung einer β -Haarnadelstruktur durch einen Diffusionsprozess oder einen Übergangszustand bestimmt wird, ist wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit und wird in Kapitel 4 diskutiert.

2.2 Faltung von β -Haarnadelstrukturen

Für das Verständnis der Faltung von Proteinen spielt die Bildung der Sekundärstrukturelemente wie α -Helices oder β -Faltblätter eine entscheidende Rolle. So hängt z.B. die Faltungsgeschwindigkeit größerer Proteine stark davon ab, welche Sekundärstrukturelemente in dem Protein vorliegen. Proteine mit einem hohen Anteil von α -Helixstrukturen falten deutlich schneller als Proteine, in denen hauptsächlich β -Faltblattstrukturen vorliegen [45]. Im Rahmen dieser Arbeit wird vor allem auf den Faltungsmechanismus von β -Haarnadelstrukturen eingegangen. Bei einer β -Haarnadelstruktur bildet die Aminosäurekette eine aus zwei bis fünf Aminosäuren bestehende Schleife, welche auch als "Turn" bezeichnet wird. Die von diesem Turn ausgehenden zwei Aminosäurekettenenden verbinden sich dann über eine antiparallele β -Faltblattstruktur wie in Abbildung 2.4 dargestellt. Die Struktur wird hierbei in der Regel durch Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen und hydrophobe Wechselwirkungen aromatischer Aminosäuren stabilisiert. Die β -Haarnadelsekundärstruktur kommt in vielen Proteinen vor und deren Bildung wird zum Teil auch als initialer Prozess bei der Faltung von Proteinen diskutiert [71, 72].

Bei der experimentellen Untersuchung von β -Haarnadelpeptiden besteht vielfach das Problem, dass diese aggregieren und nicht in ausreichend hoher Konzentration untersucht werden können [71]. Auf Basis zweier, relativ kleiner β -Haarnadelpeptide konnten jedoch eine Vielzahl experimenteller und theoretischer Untersuchungen zu den Faltungsmechanismen dieser Sekundärstrukturelemente durchgeführt werden: Fragmente der B1 Domäne des G-Proteins (PGB1) [72] und die so genannten Tryptophan Zipper (TrpZip, siehe Abbildung 2.4) [73] sind in relativ hoher Konzentration löslich und bilden in wässriger Umgebung stabile β -Haarnadelstrukturen. Die Struktur wird bei diesen Haarnadelpeptiden stark durch hydrophobe Wechselwirkung aromatischer Aminosäuren stabilisiert [71].

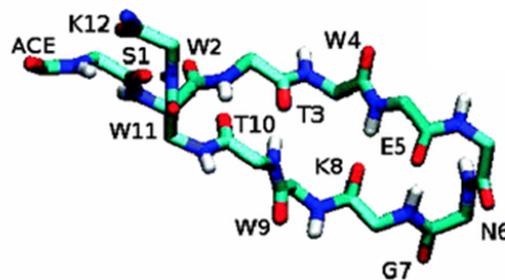


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der β -Haarnadelstruktur des Peptids TrpZip2. Ausgehend von dem durch die zwei Aminosäuren Asparagin (N6) und Glycin (G7) gebildeten Turn verbindet sich die Aminosäurekette in einer anti-parallel β -Faltblattstruktur. (Abbildung aus [74])

An den PGB1- und TrpZip-Peptiden wurden eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen vor allem über NMR, stationäre CD-Spektroskopie und zeitaufgelöste Temperatursprung (T-Sprung) Methoden durchgeführt [71, 72, 73, 75]. Auf Grundlage dieser Untersuchungen und der Kombination mit theoretischen Arbeiten werden vor allem zwei unterschiedliche Faltungsmechanismen diskutiert [71, 75]: Beim so genannten "Zipper-" oder auch "Zip-Out-Mechanismus" bildet sich zuerst der Turn der β -Haarnadel, was die Bildung erster Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen in der Nähe des Turns ermöglicht (siehe Abbildung 2.5 a). Vom Turn ausgehend bilden sich dann, wie beim Schließen eines Reißverschlusses, weitere Wasserstoffbrücken. Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den beiden Strängen bilden sich in diesem Modell erst im letzten Faltungsschritt aus. Dieser Mechanismus hat Ähnlichkeit mit dem bereits vorgestellten Nucleation-Growth-Modell. Beim so genannten "Hydrophoben-Kollaps-Mechanismus" bilden sich hingegen im ersten Schritt die hydrophoben Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäuren aus. Im zweiten Schritt entstehen die Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen, wobei sich diese zuerst, wie in Abbildung 2.5 b dargestellt, in der Mitte (Middle-Zip) oder dem äußeren Bereich der Haarnadel (auch Zip-In-Mechanismus genannt) bilden können [75, 71]. Sowohl für die Fragmente der B1 Domäne des G-Proteins als auch für die Tryptophan Zipper ist bis heute keine endgültige Bild für den Faltungsmechanismus erreicht. Vieles spricht jedoch für eine Kombination von Zipper- und Hydrophoben-Kollaps-Mechanismus [76, 71]. Zum Beispiel wurde vorgeschlagen, dass die hydrophoben Wechselwirkungen in der Nähe der

Turn-Sequenz die Bildung des Turns induzieren, was dann vom Turn ausgehend die Bildung weiterer hydrophober Wechselwirkungen und auch der Wasserstoffbrücken nach sich zieht [77, 71].

Neben dem Faltungsmechanismus wurde vor allem für TrpZip2 auch die Energielandschaft intensiv diskutiert: Auf der Grundlage von stationären CD-Experimenten schlugen Cochrane et al. ein Zweizustandsmodell mit einem gefalteten Zustand und einem Zustand, der die ungefalteten Strukturen beschreibt, vor [73]. Über die Kombination von T-Sprung-Experimenten und Simulationen unterstützten Snow et al. ein solches Zweizustandsmodell und machten relativ detaillierte Aussagen über die Struktur des Übergangszustands [19]. Auf der Grundlage stationärer CD- und Fluoreszenzexperimente in Kombination mit Simulationen konnten Yang et al. zeigen, dass ein einfaches Zweizustandssystem nicht ausreicht, um die Energielandschaft von TrpZip2 zu beschreiben [78]. Detaillierte temperaturabhängige Messungen an mit Isotopen-markierten TrpZip2-Peptiden unterstützten die Interpretation, dass mehr als zwei Zustände in der Faltung und Entfaltung von TrpZip2 involviert sein müssen [79]. Vor kurzem konnte durch die Kombination von Temperatursprung-Messungen mit zweidimensionaler Infrarotspektroskopie ein relativ detailliertes Dreizustandsmodell vorgestellt werden: TrpZip2 liegt vorwiegend in einem Ensemble gefalteter oder falsch gefalteter Strukturen vor. Diese beiden Zustände können in diesem Modell über einen weitgehend ungefalteten dritten Zwischenzustand miteinander austauschen, wobei der Übergang von dem Zustand der gefalteten Strukturen und auch dem Zustand der falsch gefalteten Strukturen in den Zwischenzustand jeweils durch einen Übergangszustand bestimmt wird [76]. Eine Alternative zu diesen Modellen, bei denen Übergangszustände in den Faltungsmechanismus involviert sind, wurde von Naranaian et al. vorgeschlagen [18]. Auf der Grundlage von Temperatursprungmessungen in Lösungsmitteln unterschiedlicher Viskosität modellierte er die Faltung von TrpZip2 als Diffusionsprozess auf einer rauen Energielandschaft. Diese Zusammenfassung zeigt, dass trotz einer Vielzahl experimenteller und theoretischer Untersuchungen die Energielandschaft, ebenso wie der Faltungsmechanismus von TrpZip2, bis heute kontrovers diskutiert werden.

Die Aminosäuresequenz des in Kapitel 4 diskutierten lichtschtbaren β -Haarnadelpeptids basiert auf dem Tryptophan Zipper Peptid TrpZip2 [80]. Wie in Kapitel 4 diskutiert kann bei diesem Peptid durch Licht die Isomerisierung eines in die Aminosäurekette eingebauten AMPP Chromophors induziert werden, was zu strukturellen Änderungen des Peptids führt. Durch die Untersuchung von T-Sprung- und Isomerisierungs-induzierten Dynamiken des lichtschtbaren Peptids ist es hier möglich, ein relativ detailliertes Bild der Energielandschaft und des Faltungsmechanismus der β -Haarnadelstruktur vorzustellen.

2.3 Neurodegenerative Erkrankungen und Amyloid-Aggregation

Unter dem Begriff der neurodegenerativen Erkrankungen werden eine Vielzahl von Krankheiten zusammengefasst, bei denen eine Degradation von Nervenzellen beobachtet wird

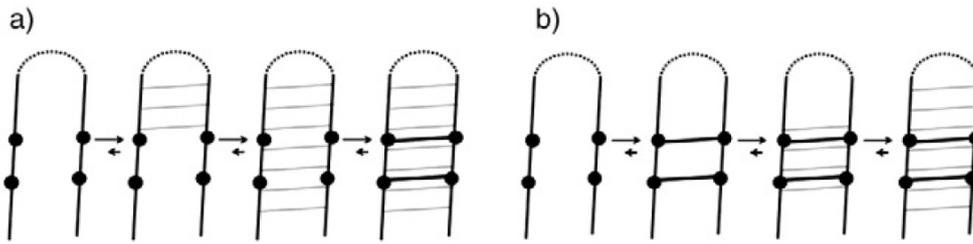


Abbildung 2.5: Faltungsmechanismen einer β -Haarnadel. Wasserstoffbrücken sind als dünne, hydrophobe Wechselwirkungen als dicke Linien dargestellt. a) Beim so genannten Zipper-Mechanismus bildet sich zuerst der Turn. Ausgehend vom Turn bilden sich dann die Wasserstoffbrücken. Im letzten Schritt entstehen die hydrophoben Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäuren, welche durch die Verbindungslinien der schwarzen Punkte dargestellt sind. b) Beim Hydrophoben-Kollaps-Mechanismus bilden sich im ersten Schritt die hydrophoben Wechselwirkungen. (Abbildung aus [71])

[81]. Bei vielen dieser Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Chorea Huntington oder den Prionen-Erkrankungen werden außerhalb oder innerhalb der degradierenden Nervenzellen Ablagerungen von aggregierten Proteinen beobachtet [29].

Bei der sporadisch oder auch erblich bedingt auftretenden Alzheimer-Erkrankung zeigen sich Aggregate des aus ca. 40 Aminosäuren bestehenden Peptids Amyloid β vor allem im extrazellulären Bereich der Hirnrinde [28]. Diese Amyloid β -Peptide sind Fragmente des Amyloid-Precursor-Proteins (APP), wobei die biologische Funktion sowohl des APP als auch der Amyloid β -Peptide im Organismus weitgehend unklar ist [29, 82, 27]. In der Umgebung dieser vielfach auch als Senile-Plaques bezeichneten Amyloid β -Aggregate wird eine Degeneration und ein Absterben der Nervenzellen beobachtet. Zudem werden bei dieser Erkrankung auch pathologische Ablagerungen von aggregiertem Tau-Protein im Inneren der degenerierenden Zellen beobachtet. Der bei Alzheimer-Patienten zu beobachtende starke Rückgang der mentalen Leistung ist auf diese Degeneration der Nervenzellen im Gehirn zurückzuführen [81, 83]. Ob jedoch die beobachtete Proteinaggregation ursächlich für das Absterben der Nervenzellen ist, wird bis heute kontrovers diskutiert.

Bei der ebenfalls sporadisch oder erblich auftretenden Parkinson-Erkrankung wird eine Aggregation von α -Synuclein-Proteinen (α -Syn) und eine Degeneration der für den Dopamin-Haushalt zuständigen Substantia Nigra im Mittelhirn beobachtet (siehe Abbildung 2.6) [28]. Obwohl das aus 140 Aminosäuren bestehende α -Synuclein-Protein in relativ hoher Konzentration in den Nervenzellen gesunder Organismen vorkommt (ca. 1% der Proteine sind α -Synucleine), ist dessen biologische Funktion bisher weitgehend unklar [28]. Tatsächlich zeigen Mäuse ohne α -Synuclein-Proteine keine starken geistigen und körperlichen Einschränkungen [28, 84]. Die α -Synuclein-Ablagerungen bei Parkinson befinden sich innerhalb der Nervenzellen der Substantia Nigra und werden als intrazelluläre Einschlusskörper oder auch Lewis-Körper bezeichnet [29]. Der in der Substantia Nigra synthetisierte Botenstoff Dopamin ist an der Signalweiterleitung der Nerven beteiligt [85]. Bei Parkinson-

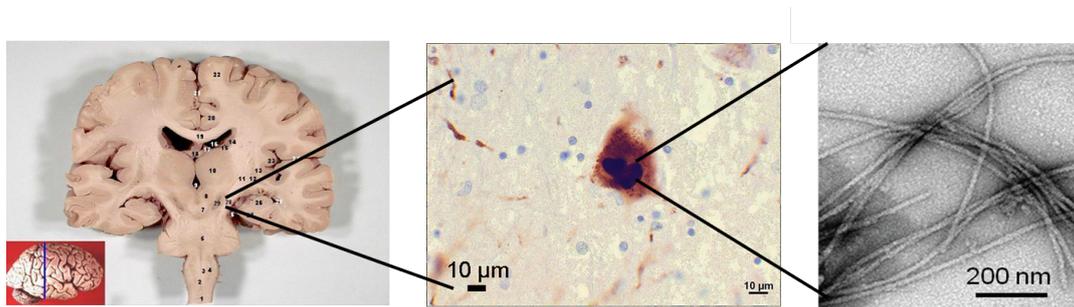


Abbildung 2.6: Protein Aggregation im Gehirn von Parkinson-Patienten: Ort der Substantia nigra gezeigt im Querschnitt des menschlichen Gehirns (links). Rot eingefärbte Proteinaggregate (Lewy Bodies) in der Substantia nigra von Parkinson-Patienten (mitte). Ein wesentlicher Bestandteil der Lewy Bodies sind α -Synuclein Amyloid-Fibrillen (rechts). (Teile des Bildes entnommen aus [89, 90, 91])

Patienten wird, vermutlich aufgrund der Degeneration der Zellen in diesem Gehirnareal, ein Mangel an Dopamin beobachtet, welcher zu den motorischen Fehlfunktionen dieser Patienten führt [28].

Bei den unter dem Begriff der Prionen-Erkrankungen zusammengefassten Krankheiten, zu denen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) beim Menschen oder die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind zählen, wird die Aggregation von Prion-Proteinen (PrP) beobachtet. Die biologische Funktion des beim Menschen aus 253 Aminosäuren bestehenden Prion-Proteins ist weitgehend unbekannt [29]. Bei den Prionen-Erkrankungen wird eine Degeneration von Nervenzellen u.a. im Bereich der Hirnrinde und des Thalamus beobachtet. In diesen Bereichen zeigen auch die aggregierten Prion-Proteine [86]. Im Gegensatz zu Alzheimer und Parkinson führt die Degeneration der Nervenzellen bei den Prionen-Erkrankungen in der Regel innerhalb relativ kurzer Zeit zum Tod [26]. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Prionen-Erkrankungen durch eine fehlgefaltete Form des Prion-Proteins (PrP^{Sc}) verursacht werden. Die PrP^{Sc} induzieren die Umwandlung von nativen Prion-Proteinen PrP^{C} in die fehlgefaltete und zur Aggregation neigende PrP^{Sc} -Struktur [29]. Es wird vermutet, dass durch die Weitergabe von PrP^{Sc} -Proteinen von einem Organismus auf einen anderen eine Übertragung der Prionen-Erkrankungen von Mensch zu Mensch oder auch vom Tier zum Menschen (zum Beispiel durch Verzehr BSE-erkrankter Rinder) möglich ist [87, 26].

Bei jeder der hier genannten neurodegenerativen Erkrankungen wird die Aggregation von Proteinen beobachtet. Hierbei wird vermutet, dass die bei der Aggregation entstehenden Strukturen zelltoxisch und somit die Ursache für das Absterben der Nervenzellen und die Pathologie der Krankheiten sind. Die Größe, Struktur und auch biologische Funktion der bei der jeweiligen Krankheit aggregierenden Proteine ist sehr unterschiedlich. Die beobachteten Proteinaggregate haben hingegen sehr ähnliche strukturelle Merkmale [29, 21, 88]. Aggregate mit diesen strukturellen Merkmalen werden auch als Amyloid-Proteinaggregate bezeichnet und im Folgenden vorgestellt.

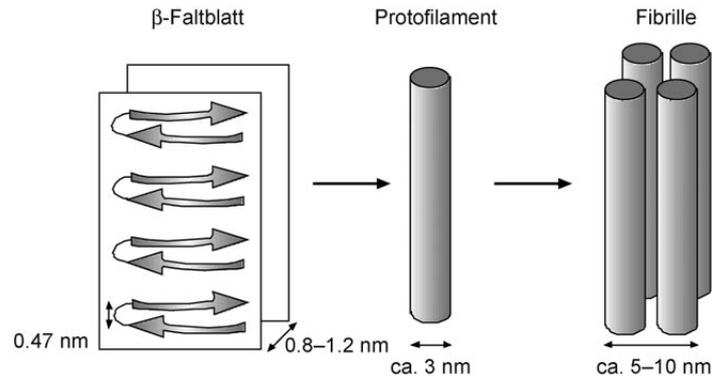


Abbildung 2.7: Hierarchischer Aufbau der Struktur von Amyloid-Fibrillen: Die Peptide aggregieren in eine β -Faltblattstruktur, wobei sich die Peptide übereinander stapeln und durch Wasserstoffbrücken quer zur Stapelrichtung (Faserichtung) aneinanderhängen und eine Faser bilden. Einige dieser Fasern können sich verdrillen und bilden ein so genanntes Protofilament. Der Zusammenschluss einiger Protofilamente bildet eine Fibrille. (Abbildung aus [21])

Amyloid-Proteinaggregate: Proteinaggregate mit einem bestimmten Erscheinungsbild und bestimmten Eigenschaften werden als Amyloide bezeichnet ¹: Charakteristisch für diese Aggregate ist, dass sich die Proteine in einer β -Faltblattstruktur aneinander anlagern und eine faserartige Struktur unter dem Elektronenmikroskop zeigen (siehe Abbildung 2.6 rechts) [21, 92]. Diese auch als Fibrillen bezeichneten faserartigen Strukturen haben typischerweise eine Breite von 5-10 nm und eine Länge von einigen 100 nm. Zudem haben Amyloid-Aggregate die Eigenschaft, dass sie an bestimmte Farbstoffe wie Kongorot oder Thioflavin binden und hierbei die optischen Eigenschaften der Farbstoffe verändern [93, 92, 94]. Die genaue Struktur der Peptide in den Amyloid-Aggregaten ist jedoch selbst für die intensiv untersuchten Amyloid β - und α -Synuclein-Proteinaggregate bis heute umstritten [95, 21]. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass NMR Messungen von Proteinaggregaten in Lösung in der Regel nicht möglich sind. Da sich die Fibrillen zudem nicht kristallisieren lassen, kann auch über Röntgenstrukturanalysen keine detaillierte Struktur bestimmt werden. Wie in Abbildung 2.7 gezeigt kann jedoch die Struktur von Amyloid-Fibrillen schematisch folgendermaßen dargestellt werden [21]: Die Peptide aggregieren in eine β -Faltblattstruktur, wobei sich die Peptide übereinander stapeln, durch Wasserstoffbrücken quer zur Stapelrichtung (Faserrichtung) aneinanderhängen und eine dünne 0,8-1,2 nm breite Faser bilden. Einige dieser Fasern können sich verdrillen und bilden ein so genanntes Protofilament. Der Zusammenschluss einiger Protofilamente bildet dann eine Fibrille. Wie bereits erwähnt, wird bei den genannten Krankheiten vermutet, dass die Aggregation in die Amyloid-Strukturen nicht nur einen Nebeneffekt darstellt, sondern mitverantwortlich oder sogar ursächlich für das Absterben der Nervenzellen und die sich

¹Der Ausdruck "Amyloid" bedeutet "Stärke ähnlich" und bezieht sich auf das Erscheinungsbild, welches zuerst bei Stärke beobachtet wurde [21].

hieraus ergebende Pathologie ist. Im Folgenden wird diskutiert, über welchen Mechanismus die Aggregation von Proteinen die Degeneration von Nervenzellen induzieren kann.

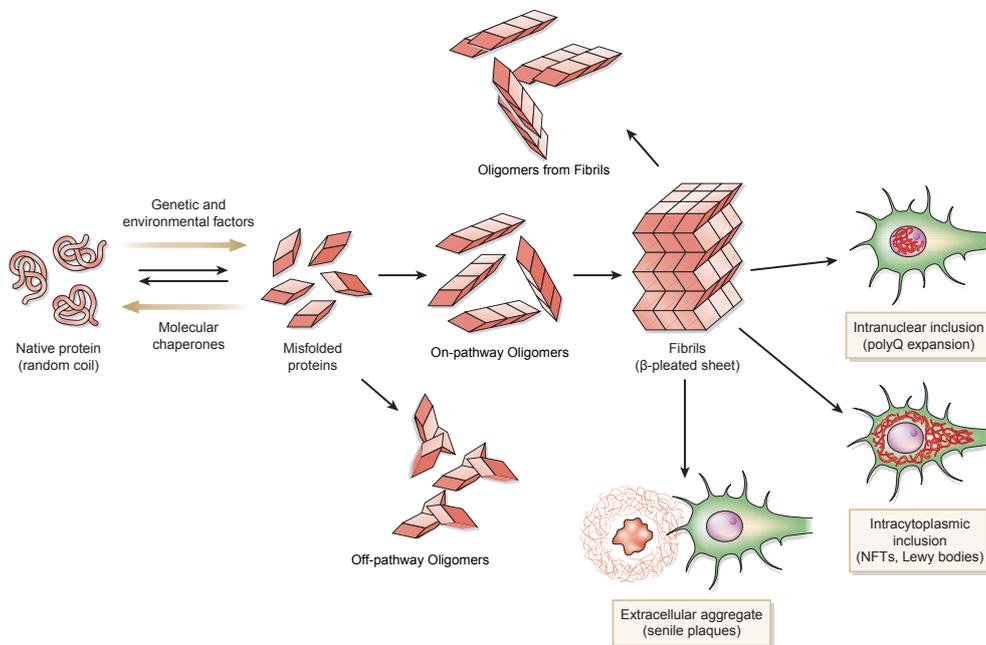


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Aggregation von Proteinen in Oligomere und Fibrillen: Durch genetische Faktoren oder Umwelteinflüsse kann ein Protein in eine falsch gefaltete und zur Aggregation neigende Struktur übergehen. Die falsch gefalteten Proteine können in toxische oder auch nicht-toxische Oligomere aggregieren. So genannte on-pathway-Oligomere aggregieren im Gegensatz zu off-pathway-Oligomeren weiter zu Fibrillen. Möglicherweise können Oligomere auch aus Fibrillen entstehen. Die Fibrillen können sich im Inneren des Zellkerns (Chorea Huntington, polyQ Aggregate), im Inneren der Zelle (Parkinson, α -Synuclein-Aggregate) oder auch im extrazellulären Raum (Alzheimer, Amyloid β -Aggregate) anlagern [96, 29]. (Abbildung modifiziert von [29])

Die Oligomerhypothese: Die beobachteten degenerierten Zellen in der Umgebung von Amyloid-Aggregaten legen die Vermutung nahe, dass diese Aggregate die Ursache für das Absterben der Zellen sind. Histologische Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass auch bei geistig gesunden, älteren Menschen die für Alzheimer typischen Senilen Plaques und Ablagerungen von Tau-Proteinen beobachtet werden können [97]. Des Weiteren konnten an bestimmten transgenen² Alzheimer-Mäusen die typischen geistigen Einschränkungen beobachtet werden, obwohl die typischen Senilen Plaques bei diesen Mäusen fehlten [98]. Eine

²Transgene Alzheimer-Mäuse: Diese Mäuse haben einen Gendefekt, wodurch die Alzheimersche Erkrankung bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt im Leben der Mäuse ausbricht.

Vielzahl von experimentellen Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* deuten hingegen darauf hin, dass nicht die Amyloid-Aggregate, sondern bestimmte kleinere Aggregate, so genannte Oligomere eine toxische Wirkung haben und somit ursächlich für die beschriebenen neurodegenerativen Erkrankungen sind (siehe Abbildung 2.8). Hierbei muss erwähnt werden, dass die Bezeichnung Oligomer im Allgemeinen für alle Proteinaggregate verwendet wird, welche sich nicht über eine Ultrazentrifuge absedimentieren lassen [82]. Als Oligomere werden somit eine Vielzahl verschiedenster kleiner Aggregate bezeichnet. Man geht jedoch davon aus, dass nur bestimmte Oligomere mit einer bestimmten Struktur und Größe für den Verlauf der Krankheiten relevant sind. Man unterscheidet zudem zwischen Oligomeren, welche Vorstufen von Fibrillen sind (*on pathway*) und Oligomeren, welche nicht weiter in Fibrillen aggregieren (*off pathway*) (siehe Abbildung 2.8) [96]. Die Bildung der pathogenen Oligomere, deren Struktur und die darauf basierende Toxizität, aber auch die Rolle der Amyloid-Aggregate ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung und wird kontrovers diskutiert: Bereits in den späten neunziger Jahren konnte gezeigt werden, dass Vorstufen (*on-pathway-Oligomere*) von Amyloid β -Fibrillen die Ionendurchlässigkeit der Zellmembran und somit die Elektrophysiologie von Zellen ändern können, was zum raschen Absterben der Zellen führt [99]. Experimente mit Mäusen ergaben später auch, dass in den Zellen gebildete, lösliche Trimere von Amyloid β -Peptiden direkt die geistigen Fähigkeiten der Mäuse einschränken [100, 101]. In *In-vitro*-Experimenten konnte beobachtet werden, dass mutierte α -Synuclein-Proteine, welche bei genetisch bedingten Parkinson-Patienten vorliegen, zu einer vermehrten Bildung von ring- oder sphärenförmigen Protofilamenten mit einem Durchmesser von ca. 20 nm führen [102]. An dieser Stelle sei erwähnt, dass in verschiedenen Experimenten eine Vielzahl unterschiedlicher, potentiell zelltoxischer Oligomerstrukturen diskutiert wurden. Diese reichen von kleinen Dimeren, Trimeren, Dodecameren über mehrere Nanometer große sphärenförmige Gebilde bis hin zu Protofilamenten mit einer Länge von über 100 nm [82, 101, 100, 102]. Von besonderer Relevanz sind jedoch vermutlich die kleinen Oligomerstrukturen (Dimere, Trimere, Dodecamere ...), da diese auch *in vivo* beobachtet werden. Auch die Frage, ob die Proteine bei toxischen Oligomeren in einer β -Faltblattstruktur aggregiert sind, ist umstritten [103, 104]. Eine detaillierte Studie von Zweckstetter et. al deutet jedoch darauf hin, dass Oligomere mit einer weniger stark ausgeprägten β -Faltblattstruktur toxischer für Zellen sind [104].

Ein vielfach diskutierter Ansatz, die Toxizität der Oligomere zu erklären, ist dass Oligomere zu Poren in der Zellmembran führen. Diese Poren sind durchlässig für Ionen, zerstören das Kontaktpotential der Nervenzellen und führen hierdurch zum Absterben der Zellen [105, 96]. Wie bereits erwähnt müssen jedoch durchaus nicht alle Oligomerstrukturen zelltoxisch sein. Koska et. al konnten zeigen, dass bestimmte Oligomere zunächst nicht zu Poren in der Zellmembran führen. Durch Zugabe von Fe^{3+} -Ionen ändern diese Oligomere jedoch ihre Struktur, können dann das Kontaktpotential von Zellmembranen zerstören und weiter zu Fibrillen aggregieren [96].

In der hier vorgestellten Oligomerhypothese scheinen die Amyloid-Fibrillen selbst eine passive Rolle einzunehmen und eher eine Art "Komposthaufen" für die relevanten Oligomere darzustellen. Es gibt jedoch starke Hinweise, dass auch die Amyloid-Fibrillen eine aktive Rolle bei den genannten Krankheiten spielen und als eine Art Quelle für die Oligomere fungieren können (siehe Abbildung 2.8). Zum einen konnte gezeigt werden, dass

Amyloid β -Fibrillen die Verbindungen zwischen Nervenzellen zerstören [106]. Zum anderen wurde *in vitro* gezeigt, dass sich α -Synuclein-Fibrillen durch Kältedenaturierung in toxische Oligomere umwandeln [89]. Besonders hervorzuheben ist jedoch die Beobachtung, dass *in vivo* in der unmittelbaren Umgebung von Amyloid β -Fibrillen eine stark erhöhte Konzentration von Oligomeren beobachtet wurde [35]. Diese Beobachtung widerspricht der verbreiteten Annahme, dass die Oligomere Vorstufen der Fibrillen darstellen und in diese übergehen, da in diesem Fall eine Abnahme der Oligomerkonzentration in der direkten Fibrillenumgebung zu erwarten wäre. Die Fibrillen scheinen hier vielmehr als eine Quelle für die Oligomere zu fungieren.

Die genaue Struktur der Oligomere, die Frage, ob die toxischen Oligomere eine Vorstufe der größeren Amyloid-Aggregate (on pathway) sind und ob sich die Oligomere unabhängig von diesen bilden (off pathway) oder ob sogar die Amyloid-Aggregate eine Art Quelle für die toxischen Oligomere darstellen, ist bisher jedoch noch nicht beantwortet und Gegenstand der aktuellen Forschung (siehe Abbildung 2.8) [31]. Eine wesentliche Schwierigkeit in diesem Forschungsbereich liegt darin, dass die oligomeren Strukturen in der Regel transiente Spezies sind, die sich schnell in Fibrillen umwandeln oder wieder in Monomere zerfallen können. In diesem Zusammenhang bildet die Entwicklung von Substanzen, die die Aggregation von Proteinen inhibieren und hierdurch den Krankheitsverlauf verändern, eine neue Möglichkeit, die Mechanismen neurodegenerativer Erkrankungen und die Rolle der Proteinaggregation zu untersuchen. Wie im nächsten Abschnitt vorgestellt wird, ermöglicht dieser Ansatz nicht nur die Entwicklung neuer Medikamente, sondern gibt auch Einblicke in die grundlegenden Mechanismen neurodegenerativer Erkrankungen.

2.4 Proteinaggregation als therapeutischer Ansatz: Anle138b

In diesem Abschnitt wird die Entdeckung und Charakterisierung des neuen potentiellen Parkinson- und Creutzfeldt-Jakob-Therapeutikums Anle138b vorgestellt. Diese Ergebnisse sind zum Großteil kürzlich in der Arbeit [30] von Giese et al. veröffentlicht worden. In Kapitel 6 wird dann der Wirkmechanismus dieser Substanz mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden untersucht. Grundlage bei der Entdeckung von Anle138b war ein Screening von 20000 Substanzen auf ihre aggregationshemmende Wirkung bei Prion-Proteinen [36, 30]. Die aggregationshemmende Wirkung der Substanzen wurde hierbei vor allem über konfokale Zwei-Farben-Fluoreszenzspektroskopie untersucht [107].

In der konfokalen Zwei-Farben-Fluoreszenzspektroskopie wird ein konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopaufbau verwendet. Das Mikroskop ist hierbei so aufgebaut, dass Fluoreszenzphotonen in zwei unterschiedlichen Spektralbereichen, zum Beispiel im roten und im grünen, getrennt detektiert werden. Bei der hier vorgestellten Anwendung wird mit diesem Aufbau die Fluoreszenz zweier unterschiedlicher, sich in Lösung befindender Fluoreszenzfarbstoffe, welche zum Beispiel im roten oder im grünen Spektralbereich fluoreszieren, untersucht. Die Farbstoffe sind hierbei so stark verdünnt, dass sich stets nur wenige Farbstoffmoleküle im Fokus des Mikroskops befinden. Um die Prionen-Aggregation mit dieser Technik zu untersuchen wurde rekombinant hergestelltes Maus PrP^C mit einem "grünen" Fluoreszenzfarbstoff (Alexa 488) markiert. Die grün markierten PrP^C-Proteine wurden dann gemischt

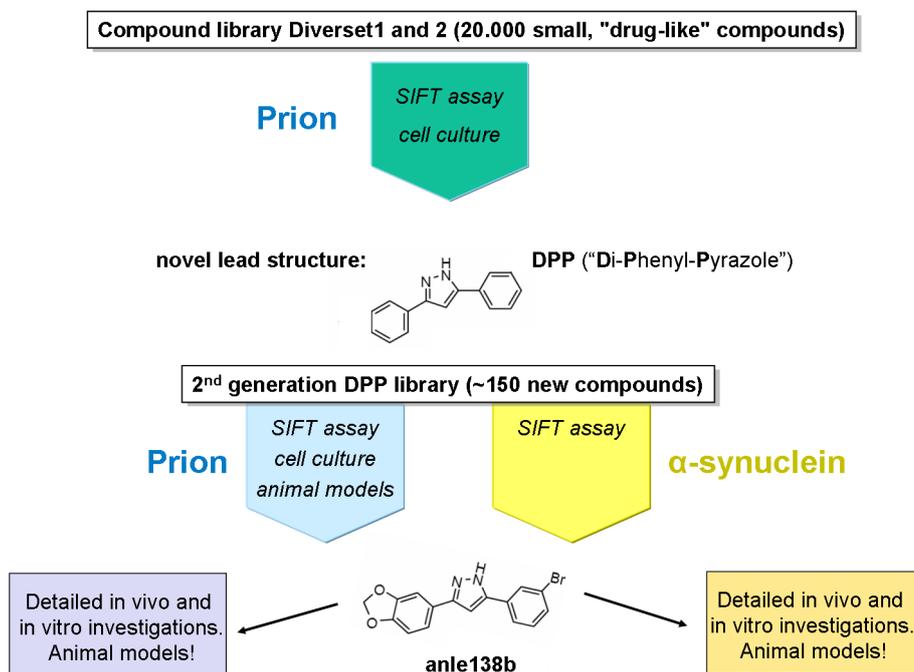


Abbildung 2.9: Vorgehen bei der Entdeckung des neuen potentiellen Therapeutikum Anle138b. Verschiedene Screening-Verfahren wurden verwendet, um zunächst die Grundstruktur DPP und dann die Substanz Anle138b zu identifizieren.

mit humanen, pathologischen und aggregierenden PrP^{Sc}-Proteinen und "rot" markierten Antikörpern (Fluoreszenzfarbstoff Alex 647). Diese Antikörper binden spezifisch auf humane Prion-Proteine und markieren somit die humanen PrP^{Sc}-Proteinaggregaten rot. Bei der Anlagerung der grünen Maus PrP^C-Proteine an die roten PrP^{Sc}-Proteinaggregate werden in der Zwei-Farben-Fluoreszenzspektroskopie Korrelationen von roten und grünen Fluoreszenzphotonen beobachtet. Zudem entstehen bei der Aggregation der grünen PrP^C an die PrP^{Sc}-Proteinaggregate, Strukturen mit gleichzeitig sehr starker grüner und roter Fluoreszenzintensität. Bei der verwendeten SIFT- (Scanning for Intensely Fluorescent Targets) Methode wird die Probe gescannt und die grüne und rote Fluoreszenzintensität an verschiedenen Positionen in der Lösung detektiert. Wird die Aggregation von Maus PrP^C-Proteinen durch aggregationshemmende Substanzen inhibiert, werden im Vergleich weniger Positionen beobachtet, an denen gleichzeitig sehr starke grüne und rote Fluoreszenzintensität auftritt [107, 36].

Neben diesem SIFT-Screening wurde zudem ein Zellkultur basiertes Dot-Plot-Screening durchgeführt. Hierbei wird in PrP^{Sc}-infizierten Zellkulturen mit einer Dot-Plot-Analyse untersucht, ob die Substanzen die Vermehrung von PrP^{Sc} in den Zellen inhibieren. Mit dem SIFT- und Dot-Plot-Screening und einer detaillierten Struktur-Aktivitätsanalyse (SAR) konnte dann eine vielversprechende Klasse aggregationshemmender Substanzen mit einer Di-Phenyl-Pyrazol (DPP) Grundstruktur identifiziert werden (siehe Abbildung 2.9).

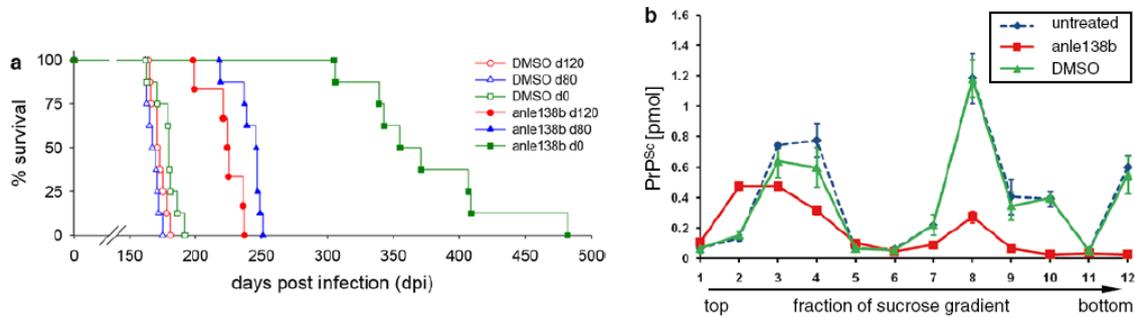


Abbildung 2.10: a) Prozentsatz der lebenden Mäuse nach einer Prionen-Infektion am Tag 0. Die Behandlung mit Anle138b führt zu einer deutlichen Verlängerung der Lebenszeit gegenüber den mit DMSO als Kontrolle behandelten Mäusen. Selbst wenn die Behandlung erst 80 (d80) oder 120 (d120) Tage nach der Infektion begonnen wird, ist eine signifikante Verlängerung der Lebenszeit zu beobachten. b) Im Gehirn der behandelten Mäuse kann im Vergleich zu unbehandelten oder mit DMSO behandelten Mäusen eine signifikante Verminderung großer und auch kleiner Proteinaggregate (Oligomere) beobachtet werden. Die Abbildung zeigt die Proteinkonzentration in verschiedenen Fraktionen einer Sucrose-Gradient-Zentrifuge. Große Proteinaggregate befinden sich im Bereich der Fraktionen 7 bis 10, Oligomere befinden sich im Bereich der Fraktionen 1 bis 5 (aus [30])

Basierend auf dieser Grundstruktur wurden dann weitere ca. 150 Substanzen synthetisiert und mit dem SIFT-Verfahren auf ihre aggregationshemmende Wirkung bei Prion- und α -Synuclein-Proteinen untersucht. Die gut 150 Substanzen wurden zudem in Prion-infizierten Zellkulturen mit der Dot-Plot-Analyse darauf untersucht, ob sie die Vermehrung von PrP^{Sc} inhibieren. 38 viel versprechende Substanzen aus diesen Prion-SIFT- und Zellkultur-Untersuchungen wurden dann in vivo an PrP^{Sc}-infizierten Mäusen untersucht, wobei sich bei all diesen Experimenten die Substanz Anle138b als besonders wirksam herausstellte (siehe Abbildung 2.9).

Weitere detaillierte Experimente an PrP^{Sc}-infizierten Mäusen konnten zeigen, dass Anle138b die Überlebenszeit der Tiere nahezu verdoppelt (siehe Abbildung 2.10 a). Selbst wenn die Verabreichung von Anle138b erst 80 Tage nach der Infektion mit PrP^{Sc} und somit zu einem Zeitpunkt, wo bereits erste Symptome bei den Mäusen auftreten, begonnen wird, kann noch eine ausgeprägte Verlängerung der Überlebenszeit beobachtet werden. Des Weiteren konnte in der Gehirnschubstanz behandelter PrP^{Sc}-infizierter Mäuse eine signifikante Abnahme großer (Fibrillen) und auch kleiner Aggregate (Oligomere) gegenüber unbehandelten Mäusen beobachtet werden (siehe Abbildung 2.10 b). Die Größe der Aggregate wurde hierbei mit einer Viskose-Gradienten-Zentrifuge aufgeschlüsselt.

Anle138b wurde auch in transgenen Parkinson-Mausmodellen untersucht. Hierbei konnte die Lebenszeit ohne Auftreten der typischen Parkinson-Symptome signifikant verlängert werden (siehe Abbildung 2.11 a). Auch bei den transgenen Parkinson-Mäusen konnte in

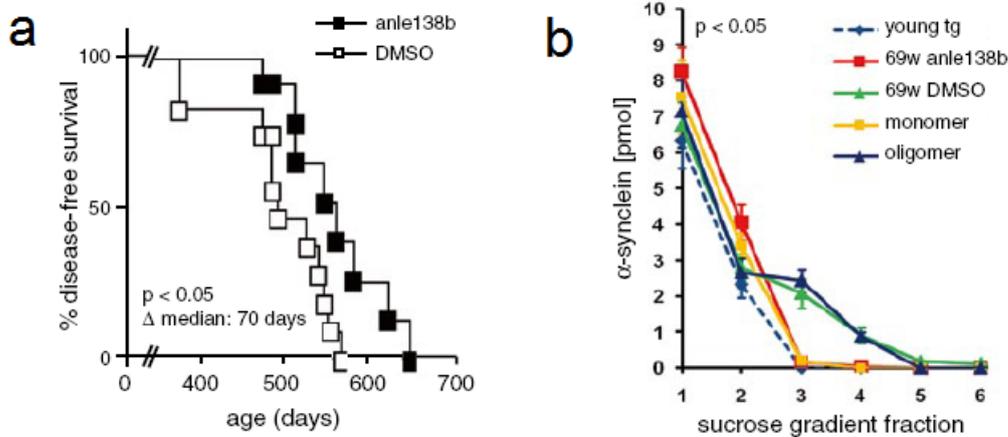


Abbildung 2.11: a) Prozentsatz der symptomfreien transgenen Parkinson-Mäuse nach deren Geburt am Tag 0. Die Behandlung mit Anle138b führt zu einer deutlichen Verlängerung der symptomfreien Lebenszeit gegenüber den mit DMSO als Kontrolle behandelten Mäusen. b) Im Gehirn der behandelten Mäuse kann im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Mäusen eine signifikante Verminderung kleiner Proteinaggregate (Oligomere, Fraktion 3-5) beobachtet werden. (Abbildung aus [30])

der Gehirnschubstanz der behandelten Mäuse eine signifikante Abnahme kleiner Aggregate (Oligomere) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen beobachtet werden (siehe Abbildung 2.11 b). Weitere Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass sich durch die Gabe von Anle138b die Konzentration von monomerem, nicht aggregiertem α -Synuclein und auch Prion-Protein im Gehirn der Mäuse nicht ändert. Die bei den behandelten Mäusen beobachtete geringere Menge pathologischer Proteinaggregate im Gehirn ist somit nicht auf eine verminderte Expression der Proteine zurückzuführen. Des Weiteren konnte in elektrophysiologischen In-vitro-Untersuchungen gezeigt werden, dass die Substanz die Bildung von toxischen, porenbildenden α -Synuclein-Oligomeren blockiert.

All diese Beobachtungen deuten stark darauf hin, dass die Verlängerung der Lebenszeit oder auch der symptomfreien Lebenszeit bei Mäusen durch Anle138b auf die Modulation der Aggregation und vor allem der Oligomerbildung der Prion-, bzw. α -Synuclein-Proteine zurückzuführen ist. Die Ergebnisse unterstützen somit die vorgestellte Theorie, dass die Proteinaggregation ein ursächlicher Vorgang und nicht nur ein Nebeneffekt bei der Pathogenese dieser neurodegenerativen Erkrankungen ist. Die sich hieraus ergebende Fragestellung, über welchen Mechanismus Anle138b die Aggregation moduliert, und ob und wenn ja an welche Proteinstrukturen es bindet, wird in Kapitel 6 untersucht. Da jedoch Anle138b neben der hier vorgestellten Verlängerung der (symptomfreien) Lebenszeiten auch keinerlei toxische Effekte bei Mäusen zeigt und sehr gut oral verabreicht werden kann, ist es auf jeden Fall ein viel versprechendes potentiell neues Therapeutikum. Nach einigen noch ausstehenden toxikologischen Untersuchungen, soll die Substanz deshalb in naher Zukunft

auch in klinischen Studien am Menschen untersucht werden. Hierbei wird sich zeigen, ob Anle138b das neue Therapeutikum für Parkinson, Creutzfeldt-Jakob und eventuell auch andere neurodegenerative Erkrankungen ist. Dies wäre ein Durchbruch, da für alle hier genannten Krankheiten bisher nur symptomatische Behandlungen möglich sind.

3 Experimentelle Methoden

In diesem Kapitel werden kurz einige der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten experimentellen Techniken vorgestellt. Hierbei werden der Anreg-Abtast-Aufbau mit Anregungspulsen im UV und Abfragepulsen im mittelinfraroten Spektralbereich, der T-Sprung-Aufbau und der Streakkamera-Aufbau detailliert vorgestellt. Der Anreg-Abtast-Aufbau wurde bei der Untersuchung der Peptiddynamiken und der lichtschtbaren Amyloid-Aggregate verwendet. Der laserinduzierte T-Sprung-Aufbau wurde hingegen nur bei der Untersuchung der Peptiddynamiken eingesetzt. In Kapitel 6 werden erste mit dem Streakkamera-Aufbau durchgeführte zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an Anle138b vorgestellt. Diese Aufbauten wurden in der Gruppe von Prof. Zinth und Prof. Hauser (T-Sprung-Aufbau) entwickelt und sind in dieser Art nicht kommerziell erhältlich. Im Rahmen der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden jedoch auch eine Vielzahl anderer experimenteller Techniken verwendet: In Kapitel 4 werden neben den Anreg-Abtast- und T-Sprung-Messungen auch Circular dichroismus- (CD) und Fourier-Transform-Infrarot- (FTIR-) Messungen am ATZ-Peptid diskutiert. In Kapitel 5 werden zudem UV-Vis-Absorptionsspektroskopie-, HD Austausch- und Transmissions-Elektronenmikroskopie- (TEM) Untersuchungen verwendet, um die lichtschtbaren Aggregate zu charakterisieren. Die in Kapitel 6 vorgestellten Ergebnisse zur Interaktion von Anle138b mit α -Synuclein basieren zu einem großen Teil auf stationären fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen. Diese Techniken werden jedoch hier nicht im Detail vorgestellt und es wird auf den Methodenteil und Supporting Information der Publikationen oder die einschlägige Literatur verwiesen [108, 109, 110, 111].

3.1 Nanosekunden-Anreg-Abtast-Spektroskopie im mittelinfraroten Spektralbereich

Bei den in Kapitel 4 und 5 untersuchten Peptiden ATZ bzw. AcATZ können durch *trans-cis*-Isomerisierung des in die Aminosäurekette eingebauten Azobenzolfarbstoffs strukturelle Änderungen induziert werden. Die Isomerisierung des Azobenzolfarbstoffs von *trans* nach *cis* kann durch UV-Licht ausgelöst werden. Transiente Absorptionmessungen im sichtbaren und ultravioletten (UV-) Spektralbereich haben hierbei gezeigt, dass diese Isomerisierungsreaktion ein ultraschneller Prozess ist, der bereits einige Pikosekunden (ps) nach der optischen Anregung abgeschlossen ist [112]. In dieser Arbeit werden die Isomerisierungsinduzierten Strukturänderungen der Peptide auf der Nanosekunden- (ns-) bis Mikrosekunden- (μ s-) Zeitskala untersucht. Die Isomerisierung von *trans* nach *cis* wird hierbei durch einen ns UV-Laserpuls induziert. Die Absorptionsänderung der Peptide zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der UV-Anregung wird durch einen Abtastpuls im mittelinfraroten (MIR-) Spektralbereich (ca. 6000 nm) gemessen und ist korreliert zu Änderungen der Peptide-

3 Experimentelle Methoden

struktur. Die Erzeugung der MIR-Abtastpulse über parametrische Prozesse ist ausführlich in [113, 114, 115] beschrieben. Die Grundlagen der Konversion von Lichtfrequenzen mittels parametrischer Prozesse sind im Review von G. Cerullo [116] dargestellt, in dem auch die im Folgenden genannten Begriffe Typ I/II Phasenanpassung ausführlich erklärt werden.

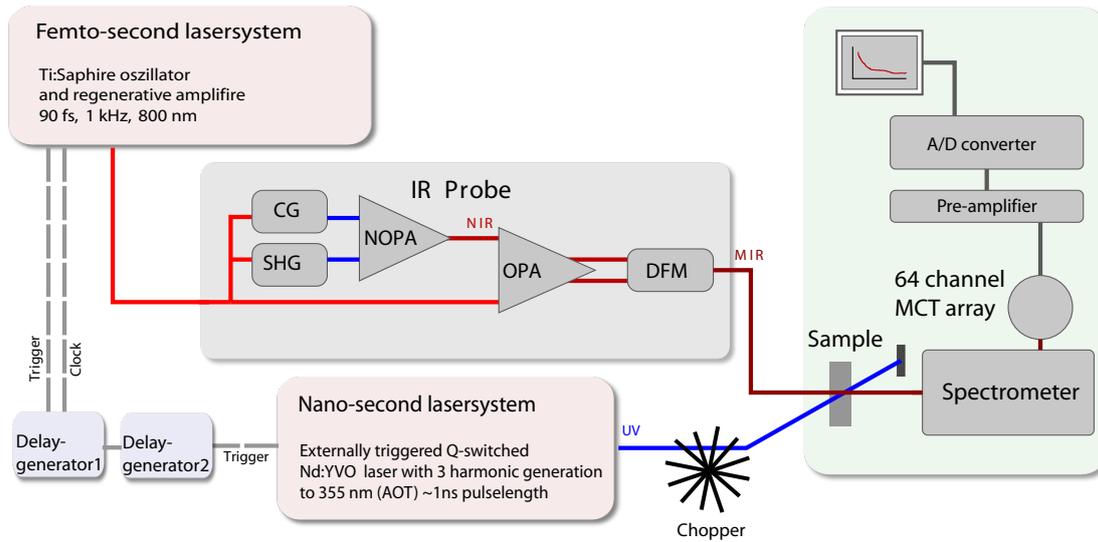


Abbildung 3.1: Nanosekunden-Anreg-Abtast-Spektroskopie mit Abfragspulsen im mittelinfraroten Spektralbereich. Das fs-Lasersystem erzeugt im 1 kHz Takt Pulse bei 800 nm, welche über parametrische Prozesse (NOPA, OPA und DFM) in den mittelinfraroten Spektralbereich (MIR) konvertiert werden. Diese MIR-Abtastpulse werden mit einem Spektrometer und einem 64-Kanal MCT-Detektor detektiert, wodurch die Absorption der Probe bestimmt werden kann. Das Nanosekunden-Lasersystem wird über zwei Verzögerungsgeneratoren mit dem fs-Lasersystem synchronisiert. Hierdurch kann die Probe im Bereich von einigen 100 μs vor bis 10 μs nach dem MIR-Abtastpulse mit einem UV-Puls angeregt werden. Mit dem Chopper-Rad wird jeder zweite UV-Anregungspuls geblockt. Aus der mit dem MCT-Detektor gemessenen Intensität der MIR-Abtastpulse mit angeregter Probe und mit nicht angeregter Probe können die durch die UV-Anregung induzierten Absorptionsänderungen bestimmt werden. (Abbildung abgeändert von [117])

Im Folgenden werden kurz der Aufbau und die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Einstellungen dargestellt. Da der Aufbau im Laufe der Zeit zum Teil verändert wurde, können die hier dargestellten Parameter von denen in [113, 114, 115] genannten abweichen. Zur Erzeugung der MIR-Abtastpulse wurde ein 80 MHz Ti:Sapphire-Oszillator (Spectra Physics, Tsunami) in Kombination mit einem regenerativen 1kHz Ti:Sapphire-Verstärkersystem (Spectra Physics, Spitfire Pro) verwendet (siehe Abbildung 3.1). Bei den verwendeten Einstellungen haben die von diesem System generierten Lichtpulse eine Puls-

länge von 90-110 fs, eine Zentralwellenlänge von ca. 800 nm, eine spektrale Breite von ca. 12 nm (FWHM) und eine Pulsenergie von ca. 3 mJ. Die Polarisation dieser Pulse ist parallel zur Tischebene (p-polarisiert). Da für die Erzeugung der MIR-Abtastpulse insgesamt nur Pulsenergien von 200-300 μJ benötigt werden, werden die Pulse über Strahlteiler entsprechend abgeschwächt. Die MIR-Abtastpulse werden in dem verwendeten Aufbau in drei Schritten erzeugt (siehe Abbildung 3.1 und 3.2): Im ersten Schritt werden mit einem Nichtkollinearen-Optischen-Parametrischen-Verstärker (NOPA) nahinfrarot (NIR-) Pulse einer Wellenlänge von ungefähr 1400 nm und einer Pulsenergie von ca. 500 nJ erzeugt [118, 113]. In dem NOPA-Aufbau wird aus einem Teil (ca. 1 μJ) der 800 nm Pulse in einem 5 mm Saphir-Kristall ein Weißlichtkontinuum (p-polarisiert) erzeugt [113]. Zudem werden 800 nm Pulse (Pulsenergie ca. 100 μJ) in einer Zweiten-Harmonischen-Generation (SHG) mit einem BBO-Kristall (Dicke=0.5 mm, Typ I Prozess, Schnittwinkel¹ $\Theta=29^\circ$) 400 nm Pulse (ca. 30 μJ) mit einer Polarisation senkrecht zur Tischebene (s-polarisiert) erzeugt. Die Weißlichtpulse und die 400 nm Pulse werden dann in einem BBO-Kristall (Dicke=2 mm, Typ I Prozess, $\Theta=32.5^\circ$) nichtkollinear überlagert, wobei der Kristallwinkel so eingestellt wird, dass die 1400 nm Weißlichtanteile durch die 400 nm Pulse verstärkt werden (siehe Abbildung 3.2). Bei diesem Prozess entstehen aufgrund der Energieerhaltung zudem Pulse der Wellenlänge von ca. 560 nm (p-polarisiert), welche auch als Idler-Pulse bezeichnet werden. Die Idler-Pulse sind jedoch nicht kollinear zu den verstärkten 1400 nm Pulsen und können somit leicht von diesen getrennt werden. Im zweiten Schritt werden die 1400 nm NIR-Pulse in einem kollinearen Optischen-Parametrischen-Verstärker (OPA) mithilfe von 800 nm Pulsen (Pulsenergie ca. 150 μJ) verstärkt. Die 800 nm Pulse werden für die Phasen Anpassung im OPA (Typ II Prozess) mit einer $\lambda/2$ -Platte auf s-Polarisation gedreht. In einem BBO Kristall (3 mm, Typ II Prozess, Schnittwinkel $\Theta=26^\circ$) werden dann in einem parametrischen Prozess die 1400 nm p-polarisierten Pulse verstärkt (Pulsenergie ca. 21 μJ) und kollineare 1800 nm s-polarisierte Idler-Pulse erzeugt (ca. 17 μJ) (siehe Abbildung 3.2). Im dritten Schritt werden die 1400 nm und 1800 nm Pulse in einem Silberthiagolat (AgGaS_2) Kristall (2 mm, Typ I Prozess, $\Theta=34^\circ$) kollinear überlagert. In dem Kristall wird in einem Typ I Prozess eine Differenz-Frequenz-Mischung (DFM) der Pulse erzeugt und es entstehen s-polarisierte MIR-Pulse (Zentralwellenlänge 1650 cm^{-1} entspricht ca. 6 μm , ca. 150 cm^{-1} FWHM, Energie 0.5-1 μJ , Pulslänge ca. 150 fs) (siehe Abbildung 3.2) [115, 113].

Mit diesen spektral relativ breiten MIR-Pulsen kann die Absorption der Peptide im Bereich von ca. 1580 cm^{-1} bis 1730 cm^{-1} gemessen werden. Zur spektral aufgelösten Detektion der Pulse wurde ein kürzlich neu eingebautes Imaging-Spektrometer (Brucker Chromex 250 IS) in Kombination mit einem neuen 64 Kanal Quecksilber-Cadmium-Tellurid (Mercury-Cadmium-Telluride, MCT) Detektorsystem (Infrared Systems Development, IR-0144) verwendet (siehe Abbildung 3.1) [120]. Die in Kapitel 5 vorgestellten Messungen auf der ns- μs Zeitskala wurden hingegen noch mit dem Vorgängeraufbau, mit einem Spektrometer von Acton Research und einer 32-Kanal-Detektion aufgenommen [113, 121]. Die Detektorsysteme messen die zeitlich integrierte Intensität des MIR-Pulses. Zur Verbesse-

¹Der Schnittwinkel ist hier definiert als der Winkel zwischen der optischen Achse und der Flächennormalen des Kristalls. Für die hier dargestellten parametrischen Prozesse werden nur uniaxiale Kristalle, sprich Kristalle mit nur einer optischen Achse verwendet, somit ist diese Definition eindeutig.

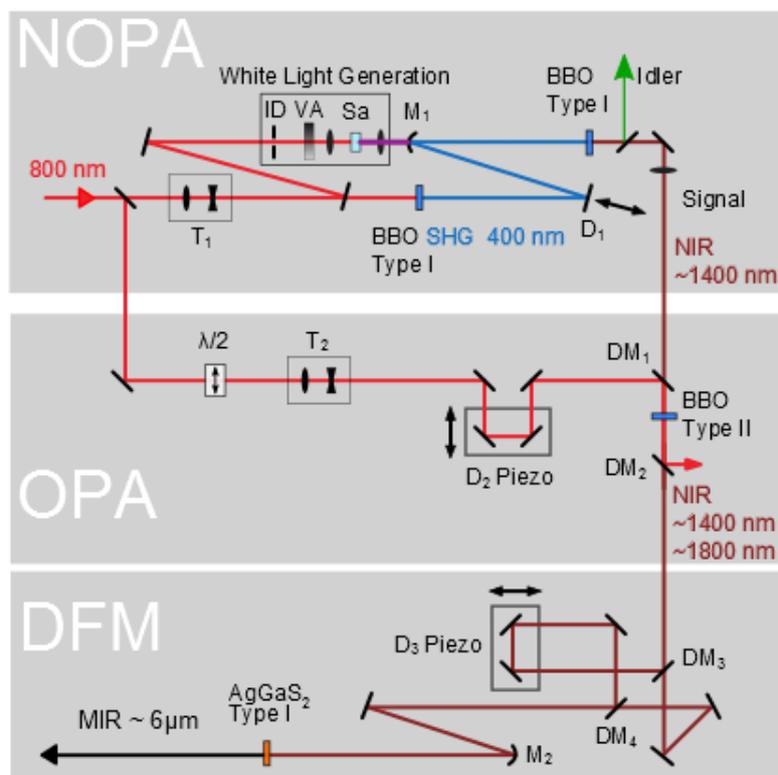


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Erzeugung von MIR-Pulsen über die Kombination eines NOVA-, OPA- und DFM-Aufbaus. Verwendete Abkürzungen: T: Teleskop, D: Verzögerungsstrecke zum Einstellen des zeitlichen Überlappens verschiedener Pulse, DM: Dichroitischer Spiegel, M: Fokussierender Spiegel. (Abbildung abgeändert von [119])

rung der Präzision wird die Intensität nur im Zeitbereich um den MIR-Puls detektiert. Hierzu wird durch die Detektorelektronik nur einmal pro ms ein Zeitfenster von ca. 2 μ s, innerhalb dessen der MIR-Puls den Detektor trifft, registriert (siehe Abbildung 3.3).

Die *trans-cis*-Isomerisierung des Azobenzolfarbstoffs wurde in den vorgestellten Experimenten mit einem 355 nm Puls (Pulslänge ca. 0.6 ns) induziert. Die Anregungspulse wurden hierbei von einem extern-triggerbaren gütegeschalteten Nd:YVO-Laser (AOT, 1064 nm) in Kombination mit einer 3-Harmonischen-Generation erzeugt und elektronisch mit den im Abstand von 1 ms (1 KHz) generierten MIR-Pulsen synchronisiert [122]. Für die Synchronisierung wird ein zum Schaltzeitpunkt der Pockelszelle im regenerativen Verstärkersystem generiertes TTL-Signal als Trigger verwendet (siehe Abbildung 3.3). Da der UV-Anregungspuls vor dem MIR-Abfragepuls eintreffen muss, wird folgendermaßen verfahren: Das Triggersignal von einem Abfragepuls wird aufgenommen, elektronisch um eine Zeit τ verzögert und als Trigger für die Anregung verwendet. Mit dem darauf folgenden Abfragepuls wird dann die Absorption zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Anregung

detektiert. Dieses Vorgehen ist möglich, da das Rauschen in der Zeit (Jitter) zwischen zwei aufeinander folgenden Abfragepulsen weniger als 250 ps beträgt [122]. Da bei elektronischen Verzögerungsgeneratoren häufig das Problem besteht, dass sie nicht gleichzeitig ein Triggersignal empfangen und ein Signal ausgeben können, werden in dem verwendeten Aufbau zwei Verzögerungsgeneratoren verwendet. Der erste Verzögerungsgenerator (Verzögerungsgenerator 1, BME05p2, Bergmann Messgeräte KG) verzögert das zum Zeitpunkt der Pockelszellenschaltung generierte Triggersignal um 900 μs (siehe Abbildung 3.3). Über einen zweiten Verzögerungsgenerator (Verzögerungsgenerator 2, DG535, Stanford Research) kann das Triggersignal weiter um eine variable Zeit, in der Regel zwischen ca. 1 und 110 μs verzögert werden (siehe Abbildung 3.3). Somit kann der Anregungspuls 99 μs vor bis 10 μs nach dem MIR-Abfragepuls ausgelöst werden, ohne dass ein Verzögerungsgenerator gleichzeitig ein Triggersignal empfangen und ausgeben muss. Um die Präzision bzw. das Rauschen in der Zeit des Verzögerungsgenerators 1 zu verbessern, wird das 80 MHz Signal vom Tsunami-Oszillator (aufgenommen mit einer Photodiode, Thorlabs DET 10A/M SI Biased Detector) als Taktgeber für dieses Gerät verwendet [122].

Mit dem hier vorgestellten Aufbau ist es möglich, mit einer absoluten Zeitauflösung von etwa 1 ns Kinetiken bis 99 μs zu untersuchen [122]. Um die Präzision der Absorptionsmessung zu erhöhen, wird jeder zweite Anregungsimpuls durch einen synchronisierten 500 Hz Chopper geblockt. Für jede Verzögerungseinstellung τ werden dann 1000 Anregungspuls-Abtastpuls-Signale (gemessen: MIR-Intensität I_a^i) und Ohne-Anregungspuls-Abtastpuls-Signale (gemessen: MIR-Intensität I_0^i) von der Detektion aufgenommen und die gemittelte Transmissionsänderung entsprechend

$$\Delta T = \frac{\sum_{i=1}^{1000} I_a^i}{\sum_{i=1}^{1000} I_0^i} \quad (3.1)$$

berechnet. Aus der gemittelten Transmissionsänderung ΔT wird dann die gemittelte Absorptionsänderung $\Delta A = -\log(\Delta T)$ berechnet (siehe auch Supporting Information der in Kapitel 4 und 5 dargestellten Veröffentlichungen).

Im Prinzip ist es mit dem vorgestellten Aufbau möglich, Kinetiken bis fast eine 1 ms zu messen. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben (und auch fast allen anderen in der AG Zinth untersuchten Proben) muss jedoch die Probe zwischen zwei aufeinander folgenden Abtastpulsen ausgetauscht werden. Andernfalls würden sich die von *trans* nach *cis* belichteten Peptide am Ort der Messung anreichern. Um einen kompletten Probenaustausch zwischen zwei aufeinander folgenden Anregungs-Abtastpulspaaren zu gewährleisten, wird ein temperierbares Durchflusssystem verwendet [123]. Die Temperatur der Probe im Durchflusssystem am Ort der Anregungs- und Abfragepulse wurde hierbei mithilfe von FTIR-Messungen der temperaturabhängigen Absorption der O-D Biegeschwingung von deuteriertem Methanol im Bereich von 1660 cm^{-1} bestimmt, wie in der Diplomarbeit von M. Rampp [123] beschrieben.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Kinetiken des ATZ-Peptides sind jedoch zum Teil nicht innerhalb des 99 μs Messbereichs des oben beschriebenen Systems abgeschlossen. Um Kinetiken im Zeitbereich bis knapp 400 μs zu messen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Der Messbereich, sprich der maximale zeitliche Abstand zwischen An-

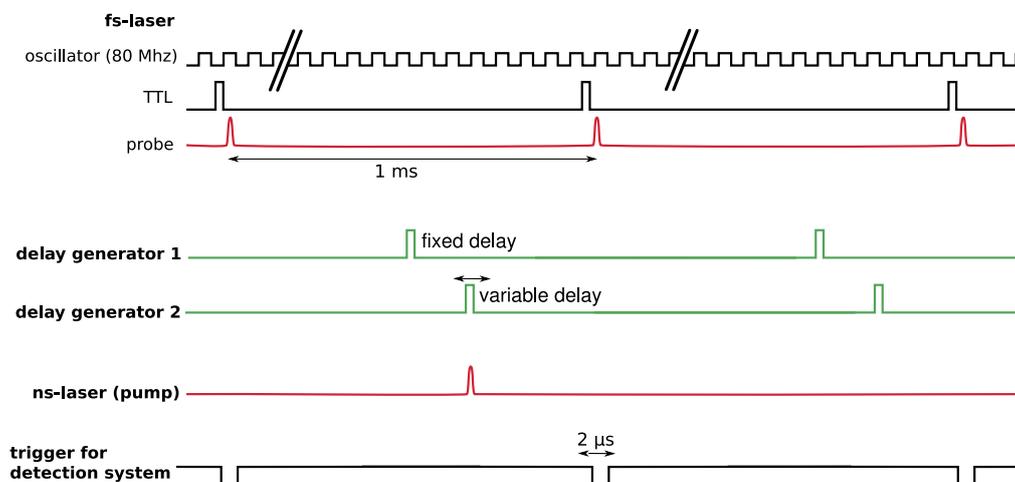


Abbildung 3.3: Schema der Pulsabfolge für die ns-Anreg-Abtast-Spektroskopie. Oberer Teil: Die MIR-Abtastpulse und ein TTL-Signal werden im Takt von 1 kHz erzeugt. Mittlerer Teil: Das TTL-Signal wird zunächst um eine feste Zeit von $900\ \mu\text{s}$ (oder $1600\ \mu\text{s}$) verzögert. Mit dem zweiten Verzögerungsgenerator kann das TTL-Signal noch variabel verzögert werden und dient dann als Trigger für den ns-Anregungspuls. Jeder zweite Anregungspuls wird vom Chopper-Rad geblockt. Im untersten Teil ist das $2\ \mu\text{s}$ Integrationsfenster der Detektion dargestellt. (Bild modifiziert von [122])

regungspuls und Abtastpuls ist dadurch begrenzt, dass die Probe nach dem Anregungspuls nicht aus dem Bereich des Fokus des Abtastpulses herausgepumpt werden darf. Prinzipiell ist es somit möglich, durch ein Herabsetzen der Durchflussgeschwindigkeit, auch deutlich längere Messbereiche als $99\ \mu\text{s}$ zu untersuchen. Die Pumpgeschwindigkeit des Durchflusssystems kann jedoch nicht beliebig herabgesetzt werden, da ein kompletter Austausch der Probe im Fokus des Abtastpulses zwischen zwei aufeinander folgenden Abtastpuls gewährleistet sein muss. Durch eine Optimierung der Durchflussgeschwindigkeit kann mit dem im 1 kHz Takt betriebenen Messaufbau ein Messbereich bis $200\ \mu\text{s}$ untersucht werden. Um den Messbereich weiter zu verlängern, wurde das System so eingestellt, dass nur jeder zweite (sprich alle 2 ms) Abtastpuls von der Detektion registriert wird. Zudem werden auch die Anregungspulse nur noch im Abstand von 2 ms generiert. Bei diesen Einstellungen kann ein Zeitbereich bis $400\ \mu\text{s}$ nach der Anregung gemessen werden, unter Gewährleistung eines kompletten Probenaustausches zwischen zwei aufeinanderfolgenden Abtastpuls. Für das hier beschriebene Heruntertakten der Detektion und der Generation der Anregungspulse kann bei dem beschriebenen Aufbau folgendermaßen vorgegangen werden:

Bei der verwendeten Anordnung kann die konstante Zeitverzögerung des ersten Verzögerungsgenerators von $900\ \mu\text{s}$ auf $1600\ \mu\text{s}$ umgestellt werden. Die Anregungspulse werden hierdurch nur noch im 500 Hz-Takt erzeugt. Da auch die Frequenz des Chopper-Rads und die Auslesefrequenz der Detektionselektronik vom Takt der Anregungspulse vorgege-

ben wird, werden diese hierdurch automatisch auf den langsameren Takt umgestellt. Das Chopper-Rad dreht sich dann mit einer Frequenz von 250 Hz und die Detektionselektronik integriert die Intensität der MIR-Pulse nur noch alle 2 ms (500 Hz). Im Prinzip können mit dem hier beschriebenen Vorgehen, sprich Herabsetzen des Anregungstaktes (auf 500 Hz, 333 Hz, 250 Hz, ...) in Kombination mit der Anpassung der Durchflussgeschwindigkeit der Probe, auch noch langsamere Kinetiken, bis in den ms Bereich, untersucht werden. Bei diesem Vorgehen ist jedoch zu beachten, dass sich durch jede Halbierung der Taktfrequenz die benötigte Messzeit verdoppelt. Für die Messung von Kinetiken im ms Bereich kann somit ein anderes Vorgehen, z.B. mit einem Rapid-Scan FTIR-Spektrometer [124] vorteilhafter werden.

3.2 Temperatursprung-Messungen an photoschaltbaren Peptiden

Mit der im vorherigen Abschnitt dargestellten Methode können über UV-Pulse die Isomerisierung des Azobenzolfarbstoffes induziert und die darauf folgenden strukturellen Änderungen der Peptide untersucht werden. Im Gegensatz hierzu werden bei den nun vorgestellten Temperatursprung- (T-Sprung) Messungen strukturelle Änderungen von *cis*-ATZ-Peptiden durch eine schnelle Erhöhung der Temperatur des Lösungsmittels ausgelöst. Die Erhöhung der Temperatur führt bei den zum Teil gefalteten ATZ-Peptiden mit Azobenzol in *cis* zu einem neuen Gleichgewicht mit einem höheren Anteil entfalteter Peptidstrukturen, wobei sich aber die *cis*-Struktur des Azobenzolfarbstoffes nicht ändert. Die Temperaturerhöhung des Lösungsmittels wird hierbei durch einen 5 ns Laserpuls bei einer Wellenlänge von 1909 nm induziert. Der Laserpuls wird vom Lösungsmittel (Methanol-d₄) absorbiert und führt zu einer Erhöhung der Temperatur des Lösungsmittels und der Peptide um einige Kelvin innerhalb von 5 ns (siehe Supporting Information Kapitel 4). Der Übergang der Peptidstruktur in das neue Gleichgewicht mit einem höheren Anteil entfalteter Strukturen entspricht einer Entfaltungsdynamik. Dieser Prozess läuft auf der Nano- bis Mikrosekunden-Zeitskala ab und kann über die Absorption der Peptide im MIR-Spektralbereich untersucht werden (siehe Kapitel 4). In diesem Abschnitt wird kurz der verwendete experimentelle Aufbau zur Untersuchung der T-Sprung-induzierten Peptiddynamiken vorgestellt. Dieser Aufbau wurde an der Universität Konstanz von Alexander Popp, Benjamin Heck und Karin Hauser entwickelt, ähnliche Aufbauten sind in Arbeiten von M. Gruebele oder K. Hauser beschrieben [79, 125].

T-Sprung-Aufbau: Zur Erzeugung der 1909 nm Pulse wird die Fundamentale (1064 nm) eines gepulsten Nd:YAG Lasers (Continuum, Excel Technology Europe) bei einer Repetitionsrate von 1 Hz, einer Pulslänge von ca. 5 ns und einer Pulsenergie von ca. 800 mJ verwendet. Mit diesen Pulsen wird dann bei einem einzigen Durchgang durch eine H₂-Gaszelle (30 Bar, Raman-Shifter, Radiant dyes, Germany) über stimulierte Raman-Streuung die erste Stokes-Line von H₂ bei 1909 nm erzeugt. Die 1909 nm Pulse haben eine Pulsenergie von ca. 50 mJ und werden über ein Pellin-Broca Prisma von der Fundamentalen und anderen in der Gaszelle erzeugten Frequenzen getrennt (siehe Abbildung 3.4). Zur besseren Unter-

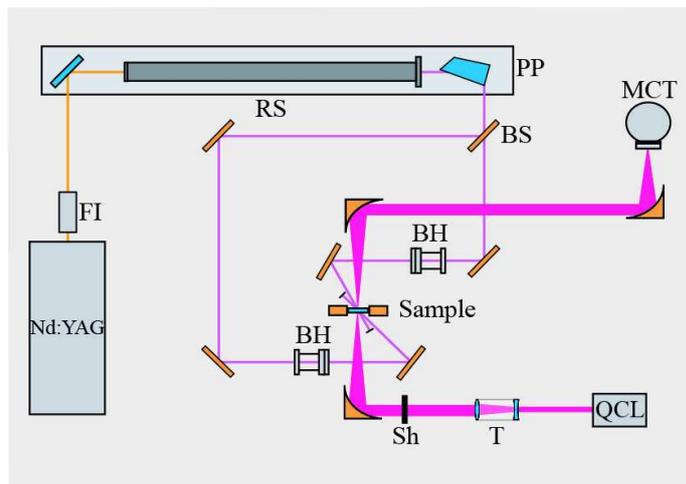


Abbildung 3.4: Aufbau zur Messung laserinduzierter T-Sprung-Kinetiken. Die von einem Nd-YAG-Laser generierten Nanosekundenpulse (1064 nm) werden mit einem H₂-Raman-Shifter (RS) zu einer Wellenlänge von 1904 nm verschoben (erste Stokes-Linie). Die 1909 nm Pulse werden von einem Strahlteiler (BS) in zwei Teile aufgeteilt, um die Probe von beiden Seiten zu belichten. Die Strahlhomogenisierer (BH) werden verwendet, um ein möglichst homogenes räumliches Intensitätsprofil zu erhalten. Die Absorption der Probe im IR wird mit einem cw-Quanten-Kaskaden-Laser (QCL) und einem MCT-Detektor gemessen. Bezeichnungen: Faraday Isolator (FI), Teleskop (T), Shutter (Sh), Pellin-Broca Prisma (PP). Abgebildet mit freundlicher Genehmigung von Alexander Popp, Universität Konstanz.

drückung aller in der Gaszelle erzeugten kurzwelligen Komponenten (Anti-Stokes-Linien) wurden zudem zwei RG 630 Filter (Schott, Dicke=2 mm) in den Strahlengang der 1909 nm Pulse gestellt. Kurzwelliges Licht kann eine Isomerisierung des in die Peptide eingebauten Azobenzols induzieren, was bei den hier vorgestellten T-Sprung-Experimenten vermieden werden muss. Die 1909 nm Pulse werden dann von einem Strahlteiler aufgeteilt, um die Probe von beiden Seiten zu belichten. Zudem werden Strahlhomogenisierer (BH) verwendet, um ein möglichst gleichmäßiges räumliches Intensitätsprofil mit einem Durchmesser von ca. 3 mm zu erzeugen. Eine Belichtung der Probe von beiden Seiten mit einem möglichst homogenen räumlichen Strahlprofil ist entscheidend, um Kavitations-Effekte in der Probe zu minimieren [126].

Zur Messung der durch den T-Sprung-induzierten Absorptionsänderungen wird ein im cw-Modus betriebener Quanten-Kaskaden-Laser (Daylight Solutions, USA) verwendet. Dieser spektral schmalbandige Laser (Frequenzbandbreite ca. 100 MHz FWHM entspricht ca. 0.003 cm^{-1} bei 1600 cm^{-1}) kann auf Frequenzen im Bereich von 1580 cm^{-1} bis 1715 cm^{-1} eingestellt werden. Der Laser wird in die Probe fokussiert (Fokussdurchmesser ca. $200 \mu\text{m}$) und dann von einem MCT-Einkanaldetektor (Kolmar Technologies, USA) detektiert (siehe Abbildung 3.4). Die Detektion des MCT-Signals ist mit den 1909 nm T-Sprung-Pulsen

synchronisiert. Bei den verwendeten Einstellungen wird das MCT-Signal mit einem Analog-Digitalwandler digitalisiert (Spectrum, Germany), wobei in der Regel von ca. 68 μs vor bis ca. 1.2 ms nach dem T-Sprung-Puls alle 10 ns ein Datenpunkt (dieser ist proportional zur am MCT gemessenen Intensität) aufgenommen wird. Zur Korrektur von Messartefakten wird bei jedem zweiten T-Sprung-Puls der Strahl des Quanten-Kaskaden-Lasers vor der Probe mit einem Shutter geblockt (siehe Abbildung 3.4). Die in diesem Fall mit dem MCT-Detektor gemessenen Intensitätsänderungen stammen nicht von Absorptionsänderungen der Probe, sondern von Streulicht der 1909 nm T-Sprung-Pulse und der erhöhten thermischen Strahlung der Probe. Die Probe selbst hat Eigenschaften eines thermischen Strahlers. Diese Eigenschaften ändern sich durch den Temperatursprung und führen zu einer Variation des am MCT-Detektor detektierten Signals.

Aus zwei solcher T-Sprungmessungen, mit Quanten-Kaskaden-Laser und mit geblocktem Quanten-Kaskaden-Laser, lassen sich die durch den T-Sprung-induzierten Absorptionsänderungen der Probe (Lösungsmittel und Peptid) berechnen. Die T-Sprung-induzierten Dynamiken des Peptides können dann wie in Kapitel 4 beschrieben auf der Zeitskala von 2 μs bis 1200 μs analysiert werden.

T-Sprung-Messungen an photoschaltbaren Azobenzolpeptiden: Eine Besonderheit bei den Messungen am ATZ-Peptid mit Azobenzol in *cis* ist, dass während längerer Messungen eine Anreicherung von *trans*-Peptiden durch eine Rückreaktion von *cis* nach *trans* stattfinden kann. Da die *trans*- im Gegensatz zur *cis*-Konformation energetisch günstiger ist, kommt es während längeren Messzeiten zu einer thermischen Rückreaktion von *cis* nach *trans* [114]. Bei den hier vorgestellten T-Sprung-Messungen könnte die Rückreaktion von *cis* nach *trans* unter Umständen auch durch im Raman-Shifter generiertes kurzwelliges Streulicht beschleunigt werden. Zur Unterdrückung kurzweiliger Anteile in den 1909 nm Pulsen wurden wie bereits beschrieben zwei RG 630 Filter in den Strahlengang der 1909 nm Pulse eingesetzt. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass die in der Lösung induzierten Temperatursprünge in geringem Maße die Rückreaktion von *cis* nach *trans* beschleunigen. Hieraus ergibt sich die Frage, ob nicht möglicherweise durch *cis* nach *trans*-Isomerisierung ausgelöste Peptiddynamiken mit den durch die Temperaturänderung ausgelösten Dynamiken zusammenwirken. Zwei Untersuchungen zeigen jedoch, dass eine induzierte Rückreaktion von *cis* nach *trans* bei den in Kapitel 4 gezeigten Kinetiken keine Rolle spielen kann:

Erstens wurden die durch *cis* nach *trans*-Isomerisierung ausgelösten Strukturdaten des ATZ-Peptids bereits in Anreg-Abtast-Experimenten untersucht [117, 114]. Diese Messungen zeigen, dass die durch *cis* nach *trans*-Isomerisierung ausgelösten Peptiddynamiken auf einer Zeitskala von Pikosekunden bis ca. 2 μs (bei 21 °C) ablaufen und somit nicht die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Dynamiken auf der Zeitskala von 2 μs -1200 μs verursachen können.

Zweitens konnte gezeigt werden, dass während der T-Sprung-Messung mit dem hier vorgestellten Aufbau nur ein sehr geringer Teil der Peptide von *cis* nach *trans* isomerisiert. Ein T-Sprung-Puls führt hierbei maximal zu einer Isomerisierung von 0.1% der Peptide im durch den Puls erwärmten Volumen. Die zu erwartende Absorptionsänderung (bei 1640 cm^{-1}) einer ATZ-Probe ($c \sim 2\text{mM}$), bei der 0.1% der Peptide von *cis* nach *trans*

isomerisieren, ist jedoch nur ca. 0.02 mOD. Die im folgenden Kapitel gezeigten T-Sprung-induzierten Absorptionsänderungen des ATZ-Peptids bei 1640 cm^{-1} sind hingegen ein bis zwei Größenordnungen größer und liegen im Bereich von 0.4 - 1 mOD. Eine mögliche temperaturinduzierte Rückreaktion von *cis* nach *trans* spielt somit bei den im folgenden Kapitel gezeigten T-Sprung-Messungen keine Rolle.

Um jedoch während längerer T-Sprung-Messungen eine Anreicherung von *trans*-ATZ-Peptiden zu vermeiden wurde die Probe während der Messungen mit UV-Licht (366 nm) beleuchtet. Hierzu wurde eine Xe-Lampe (LC4 Hamamatsu) in Kombination mit einem UG11- (1 mm) und einem WG320- (2 mm) Filter von Schott verwendet. Vor und nach jedem T-Sprung-Experiment wurde zusätzlich über die UV-VIS-Absorption kontrolliert, dass die ATZ-Peptide im photostationären Gleichgewicht mit ca. 80% Azobenzol in *cis* vorliegen. In Kapitel 4 werden die mit dem in diesem Abschnitt beschriebenen T-Sprung-Aufbau untersuchten Peptiddynamiken der β -Haarnadel ATZ vorgestellt. Zudem werden Isomerisierungs-induzierte Dynamiken des ATZ-Peptids diskutiert. Diese Isomerisierungs-induzierten Peptiddynamiken wurden mit dem in Abschnitt 3.1 vorgestellten Aufbau untersucht.

3.3 Stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

In Kapitel 6 werden die Emissionseigenschaften des potentiellen neuen Therapeutikums Anle138b in stationären Fluoreszenzmessungen und auch zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen untersucht. Über die Fluoreszenzeigenschaften der Substanz ist es dann auch möglich, deren Bindungseigenschaften an α -Synuclein-Proteine und pathologische α -Synuclein-Aggregate zu untersuchen. In diesem Abschnitt werden die bei den stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen verwendeten Aufbauten kurz vorgestellt.

Stationäre Fluoreszenzspektroskopie: Für die stationären Fluoreszenzmessungen wurde ein Fluoreszenzspektrometer "FluoroLog3" der Firma "Horiba Scientific" verwendet. Bei diesem Spektrometer kann eine Probe durch Licht einer 450 W Xe-Lampe in Kombination mit zwei hintereinander geschalteten Gittermonochromatoren bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Das von der Probe emittierte Licht kann dann in 90° Geometrie (Right Angle) oder 22.5° Geometrie (Front Face) über zwei weitere hintereinandergeschaltete Gittermonochromatoren auf einen Photomultiplier abgebildet werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden nur so genannte "Emissionsspektren" diskutiert. Bei diesen wird die Anregungswellenlänge konstant gehalten. Die Emission wird für verschiedene Wellenlängen detektiert. Hierbei wird die Durchlass-Wellenlänge der Emissionsmonochromatoren abgestimmt und für jede Monochromatoreinstellung die Intensität am Photomultiplier gemessen. Die sich hieraus ergebenden Emissionsspektren werden auf die Wellenlängenabhängigkeit des Photomultipliers und die wellenlängenabhängigen Reflektionseigenschaften der Gitterspektrometer korrigiert. Aufgrund der schwachen Fluoreszenz von Anle138b müssen Einstellungen am Fluoreszenzspektrometer verwendet werden, bei denen möglichst viele von der Probe emittierte Fluoreszenzphotonen detektiert werden. Desweiteren müssen jedoch, aufgrund der geringen Photostabilität von Anle138b, Einstellungen am Fluores-

zenzspektrometer verwendet werden, bei denen die Probe mit möglichst geringer Lichtleistung angeregt wird. Gleichzeitig soll jedoch eine ausreichende spektrale Auflösung erreicht werden. Die spektrale Breite und auch die Leistung des Anregungslichts können über die Breite eines sich nach den Anregungsmonochromatoren befindenden Spalts eingestellt werden. Die spektrale Auflösung und auch die Sensitivität der Emissiondetektion kann über die Breite der Spalte der Detektionsmonochromatoren eingestellt werden. Soweit nicht anders erwähnt wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Spektren mit einer Anregung bei 300 nm, Anregungsspalteinstellung von 0.4 nm (entspricht einer spektralen Breite von 0.4 nm) und Emissionsspalteinstellungen von 8 nm aufgenommen. Die Leistung des Anregungslichts beträgt bei diesen Einstellungen nur ca. 2 μW . Die spektrale Auflösung der Emissionsspektren liegt bei ca. 8 nm.

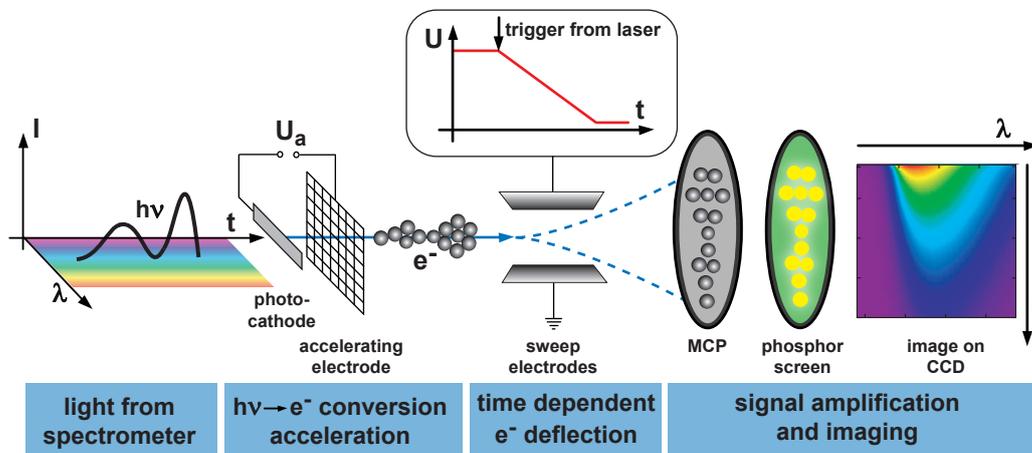


Abbildung 3.5: Schematische Funktionsweise einer Streakkamera: Das vom Spektrometer räumlich aufgetrennte Fluoreszenzlicht trifft auf die Photokathode und löst dort Elektronen aus. Die Elektronen werden durch eine Anode beschleunigt und dann durch einen Plattenkondensator senkrecht zu ihrer Bewegungsrichtung abgelenkt. Die Ablenkung der Elektronen ist aufgrund der am Kondensator anliegenden Spannungsrampe abhängig davon, zu welchem Zeitpunkt diese an der Kathode ausgelöst wurden. Die Elektronen werden dann verstärkt und über einen Phosphorschirm in Kombination mit einer CCD-Kamera detektiert. (Bild aus [127])

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie Zur Untersuchung der zeitaufgelösten Fluoreszenz wurde eine kommerziell erhältliche Streakkamera in Kombination mit einer fs-Anregung verwendet. Eine detaillierte Beschreibung dieser Aufbauten findet sich in [128, 129, 130]. Grundlage für die Erzeugung der Anregungspulse bei 300 nm ist ein Ti:Saphir-CPA-Lasersystem (Clark CPA 2001). Die von diesem System mit einer Repetitionsrate von 1 kHz generierten Lichtpulse haben eine Pulsdauer von 180 fs und eine Zentralwellenlänge von 778 nm. Über die Kombination eines Nichtkollinearen-Optischen-Parametrischen-

Verstärkers (NOPA) mit einer Zweiten-Harmonischen-Generation werden diese Pulse zu einer Zentralwellenlänge von ca. 300 nm konvertiert [130]. Diese 300 nm Anregungspulse haben bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Einstellungen eine Energie von ca. 40 nJ und werden in die Probe fokussiert (Fokusbereich ca. 35 μm). Um einen kompletten Probenaustausch zwischen zwei aufeinander folgenden Anregungspulsen sicherzustellen wird die Probe mit einer Peristaltikpumpe durch eine Quarzglassküvette mit einer Schichtdicke von 200 μm gepumpt. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird von einem UV-Achromat ($f = 80$ mm, Durchmesser 20 mm, Bernhard Halle Nachfl. GmbH Typ OUV 4.20) gesammelt, kollimiert und einem zweiten Achromat ($f = 75$ mm NUV Edmund Optics) auf den Eingangsspalt des Spektrometers (Princeton Instruments, Acton Series SP 2356, $f = 300$ mm, Gitter 50 Linien/mm) abgebildet. Die Fokalebene am Austritt des Spektrometers wird dann von einer Zwischenoptik auf die Photokathode der Streackkamera (Hamamatsu, C5680-24 C) abgebildet (siehe Abbildung 3.5). Die durch das Fluoreszenzlicht auf der Photokathode ausgelösten Elektronen werden in Richtung der Anode beschleunigt und dann durch Elektroden senkrecht zu ihrer Bewegungsrichtung abgelenkt. Die Spannung an diesen Elektroden wird durch einen Funktionsgenerator gesteuert (Hamamatsu, M5677-01), ändert sich linear mit der Zeit und ist synchronisiert mit dem Anregungspuls. Zum Zeitpunkt des Anregungspulses ist die Spannung maximal und nimmt dann linear mit der Zeit ab. Direkt nach dem Anregungspuls vom Fluoreszenzlicht ausgelöste Elektronen werden somit relativ stark abgelenkt. Elektronen, welche durch eine langlebige Fluoreszenz mit einer Verzögerung zum Anregungspuls ausgelöst werden, erfahren hingegen nur eine geringe Ablenkung (siehe Abbildung 3.5). Die Anzahl der Elektronen in einem bestimmten Ablenkungswinkelbereich ist somit korreliert zur Anzahl der Photonen, welche in einem bestimmten Zeitfenster nach der Anregung emittiert wurden. Die Elektronen treffen dann, nachdem sie durch eine Mikrokanalplatte (MCP) vervielfältigt werden, auf einen Phosphorschirm. Das sich auf dem Phosphorschirm ergebende Bild wird von einer CCD-Kamera (Hamamatsu C 9300-508) aufgenommen. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt ergibt sich ein zweidimensionales Bild, wobei die Helligkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit und von der Wellenlänge entspricht. Dieses Bild entspricht somit einem zeitaufgelösten Emissionsspektrum. Bei dem hier vorgestellten Aufbau ist zu berücksichtigen, dass sowohl die Reflektionseigenschaften der im Spektrometer verwendeten Gitter als auch die Sensitivität der Streackkamera von der Wellenlänge abhängen [131] [132]. Die im Spektrometer verwendeten Gitter haben im sichtbaren Spektralbereich eine größere Reflektion als im ultravioletten Spektralbereich. Auch die Sensitivität der Streackkamera ist im sichtbaren Spektralbereich größer. Die in dieser Arbeit gezeigten zeitaufgelösten Emissionsspektren wurden im Wellenlängenbereich von 340 nm bis 560 nm aufgenommen und wurden nicht auf die Wellenlängenabhängigkeit des Photomultipliers und die wellenlängenabhängigen Reflektionseigenschaften der Gitter korrigiert. Die gezeigten Spektren sind somit durch eine Rotverschiebung verfälscht.

Vor allem bei schwachen Fluoreszenzsignalen besteht das Problem, dass das aufgenommene Bild auf der CCD-Kamera mit den Rauschsignalen der CCD-Kamerapixel, des Phosphorschirms und der Microchannelplatte (MCP) überlagert ist. Um diese Störeffekte zu minimieren, kann das im Folgenden beschriebene Verfahren, welches auch als Single-Photon-Counting bezeichnet wird, verwendet werden [109]. Hierbei wird das Fluoreszenzlicht so

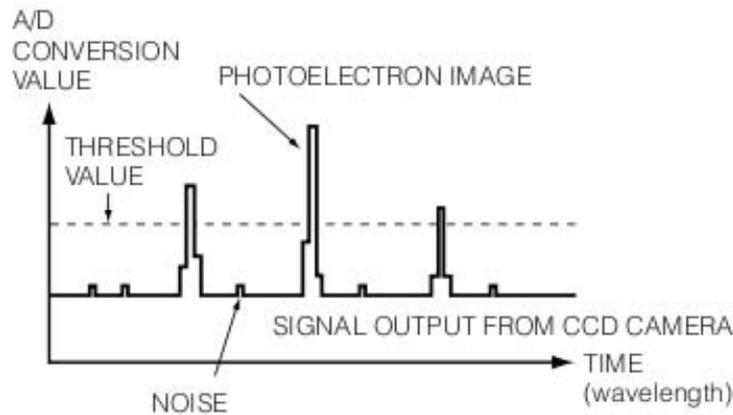


Abbildung 3.6: Zählen einzelner Fluoreszenzphotonen: Das Signal der CCD-Pixel nach der Analog/Digital-Konversion wird nur dann als Photonenergebnis gezählt, wenn es oberhalb eines bestimmten Grenzwertes liegt. Das Rauschen der Kamera, des Phosphorschirms und der MCP liegt unter diesem Grenzwert, und wird unterdrückt. (Abbildung aus [133])

stark abgeschwächt, dass an der Photokathode nur einzelne Elektronen (für jedes Photon ein Elektron) ausgelöst werden. Das von einem Photon ausgelöste Elektron wird dann, nach dem Durchgang zwischen den Elektroden, an der MCP vervielfältigt. Diese, von der MCP generierten, Elektronen erzeugen dann an einer bestimmten Stelle auf dem Phosphorschirm einen hellen Punkt. Das Bild des Phosphorschirms mit einem oder einigen wenigen solcher leuchtenden Punkte wird von der CCD-Kamera aufgenommen und als Bild gespeichert. Durch Wiederholung der hier beschriebenen Messung entstehen eine Vielzahl solcher Bilder, welche dann folgendermaßen analysiert werden: Punkte auf den Bildern, welche in ihrer Helligkeit einen bestimmten Grenzwert überschreiten, werden als Einzel-Photonenergebnis gezählt. Diese Einzel-Photonenergebnisse werden dann, entsprechend ihrer Wellenlängen- und Zeitkoordinate, histogrammiert. Das sich ergebende Histogramm entspricht der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der Zeit. Bei diesem Verfahren werden nur Signale auf der CCD-Kamera berücksichtigt, welche einen bestimmten Grenzwert überschreiten. Schwache Rauschsignale, welche auf das elektronische Rauschen der MCP, des Phosphorschirms oder der CCD-Kamera zurück zu führen sind, werden bei diesem Verfahren nicht berücksichtigt. Dies führt zu einer signifikanten Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der Messung.

Mit dem hier vorgestellten Aufbau kann ein Zeitbereich von ca. 2 ps bis 30 ns untersucht werden [132]. Die Zeitauflösung wird hierbei in erster Linie über den zeitlichen Gradienten der Spannung an den Elektroden bestimmt. Somit wäre theoretisch eine Zeitauflösung bis in den Femtosekunden- (fs) Bereich möglich. Die Coulombabstoßung führt jedoch dazu, dass Elektronen, die von einem kurzen (fs) Fluoreszenzpuls an der Kathode ausgelöst werden, räumlich auseinanderdriften. Dieser Effekt limitiert die erreichbare Zeitauflösung

der Streackamera auf ungefähr 2 ps [132]. Die im Rahmen dieser Arbeit diskutierten Messungen wurden alle in einem Zeitbereich bis 0.5 ns oder 10 ns nach der Anregung durchgeführt. Die zeitliche Auflösung dieser Messungen liegt bei ungefähr 12 bzw. 200 ps.

4 T-Sprung- und Isomerisierungs-induzierte Strukturdynamiken eines photoschaltbaren β -Haarnadelpeptids

In diesem Kapitel werden Messungen von Isomerisierungs- und T-Sprung-induzierten Faltungs- und Entfaltungsdynamiken einer lichtschtbaren β -Haarnadelstruktur vorgestellt und diskutiert. Hierbei werden vor allem die folgenden Fragen adressiert:

- Ist die Strukturdynamik von Peptiden von dem Auslösemechanismus der strukturellen Änderung abhängig?
- Was ist der Faltungsmechanismus und welche Energielandschaft beschreibt die Faltung einer β -Haarnadelstruktur?
- Wird die Faltung der β -Haarnadelstruktur über einen Diffusionsprozess bestimmt?

Die im Folgenden dargestellten experimentellen Ergebnisse erlauben es, diese Fragen zu beantworten. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die erstgenannte Fragestellung, da eine Vielzahl von Gruppen Isomerisierungs-induzierte Peptiddynamiken auf der einen Seite und T-Sprung-induzierte Peptiddynamiken auf der anderen Seite untersuchen. Bisher war jedoch weitgehend unklar, ob und in welcher Weise die mit den unterschiedlichen Auslösemechanismen untersuchten Peptiddynamiken vergleichbar sind. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit werden erstmalig Strukturdynamiken an einem Peptid mit beiden Methoden untersucht. Durch die Kombination ist es möglich, ein detailliertes Verständnis der Prozesse und Mechanismen von Isomerisierungs- und T-Sprung-induzierten Strukturdynamiken zu erlangen. Die experimentellen Ergebnisse und die sich hieraus ergebenden Modelle und Schlussfolgerungen für die Faltung und Entfaltung sind zusammengefasst in der in diesem Kapitel dargestellten Publikation:

”Isomerization and Temperature Jump Induced Dynamics of a Photo-Switchable β -hairpin” von Andreas A. Deeg, Michael S. Rampp, Alexander Popp, Bert M. Pilles, Tobias E. Schrader, Luis Moroder, Karin Hauser, Wolfgang Zinth (Chemistry -A European Journal, 2013, im Druck) [41].

Anm. nach Abgabe: Die dargestellte Arbeit ist die akzeptierte Version des Papers. Diese ist prinzipiell identisch zur Druckversion (Chemistry -A European Journal, 20, 694-703, 2014). Für den Druckprozess wurden jedoch einige kleine Änderungen vorgenommen: Grammatikalisch und orthographisch wurde die Arbeit an einigen Stellen leicht modifiziert, des Weiteren sind Abbildung 1, 3 und 4 in der Druckversion schwarz-weiß dargestellt.

Isomerization and Temperature Jump Induced Dynamics of a Photo-Switchable β -Hairpin

Andreas A. Deeg,^[a] Michael S. Rampp,^[a] Alexander Popp,^[b] Bert M. Pilles,^[a] Tobias E. Schrader,^[a,d] Luis Moroder,^[c] Karin Hauser,^[b] and Wolfgang Zinth*^[a]

Abstract: Conformational changes in proteins and peptides can be initiated by a diversity processes. This raises the question how the variation of initiation mechanisms is connected to differences in folding or unfolding processes. In this work structural dynamics of a photo-switchable β -hairpin model peptide are initiated by two different mechanisms: Temperature jump (T-jump) and isomerization of a backbone element. In both experiments the structural changes are followed by time-resolved IR spectroscopy in the nanosecond to microsecond range. When the photo-isomerization of the azobenzene backbone switch initiates

the folding reaction, pronounced absorption changes related to the folding into the hairpin structure are found with a time constant of about 16 μ s. In a temperature jump experiment one observes kinetics with the same time constant. For both initiation processes the reaction dynamics reveal the same strong temperature dependence of the reaction time. The high similarity of the transients in the microsecond range shows, that the T-jump and isomerization induced peptide dynamics are determined by the same mechanism and excludes a downhill folding process. Furthermore, the combination of both techniques allows

to present a detailed model for folding and unfolding: The isomerization induced folding process ends in a transition state reaction scheme, where a high energetic barrier of 48 kJ/mol separates unfolded and folded structures.

Keywords: Protein folding • Azo compounds • T-Jump • Time resolved IR-spectroscopy • Photoswitchable-peptides

Introduction

In protein folding the arrangement of a polypeptide chain into the three-dimensional structure of a functional protein is determined by structural dynamics which proceed on vastly different time-scales from picoseconds^[1] to many seconds. Folding and the related structural changes occur after the synthesis of the polypeptide chain in the translation process. However, unfolding, refolding and other conformational changes in proteins or peptides are also initiated by a diversity of other processes. A change in the protein environment like temperature or pressure may induce protein folding or unfolding. On the other hand, a local structural change at a single backbone amino acid like the *cis/trans* isomerization of a proline residue can lead to a change of the complete protein structure and function.^[2] From a more general point of view one might ask if the variation of initiation mechanisms will lead to different folding or unfolding kinetics. To the best of our knowledge this question has not been addressed so far. It is strongly related to the folding and unfolding mechanism of a peptide or protein which is often described in terms of an energy landscape.^[3] Here two contradictory concepts of the structural dynamics are discussed: On the one hand the so called downhill-folding where the reaction proceeds as a diffusive process on a rough potential energy landscape.^[3-4] On the other hand transition state models where folded, unfolded and intermediate

- [a] Dipl.-Phys. A. A. Deeg, M. Sc. M. S. Rampp, Dipl.-Phys. B. M. Pilles, Dr. T. E. Schrader, Prof. Dr. W. Zinth
Institute for BioMolecular Optics and Munich Center for Integrated Protein Science CIPSM
University of Munich, Oettingenstr. 67, 80538 Munich (Germany)
Fax: (+49)89-2180-9202
E-mail: wolfgang.zinth@physik.uni-muenchen.de
- [b] Dipl.-Phys. A. Popp, Prof. Dr. K. Hauser
Biophysical Chemistry, Department of Chemistry,
University of Konstanz, Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz, Germany,
- [d] Prof. Dr. L. Moroder
Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, 82152
Martinsried, Germany;
- [d] Dr. T. E. Schrader
Present address:
Jülich Centre for Neutron Science (JCNS) at Heinz Maier-Leibnitz
Zentrum (MLZ),
FZ Jülich GmbH, Lichtenbergstr. 1, 85748 Garching, Germany;

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chemeurj.org/> or from the author: Data analysis; further T-Jump data; calculation of diffusion in a harmonic potential; calculation of a three-state model.

states exist which are separated by energetically unfavorable conformations, the so-called transition states.^[3] Transition state and downhill-folding models are also used to describe the folding and unfolding process of the building blocks of proteins, i.e. the secondary structure elements such as α -helices or β -hairpins. However, even for these defined structures it is difficult to distinguish the two folding models experimentally.^[4b, 5] One of the most extensively used model peptides to investigate β -hairpin formation is TrpZip2 (TZ2).^[6] In many cases the folding and unfolding dynamics of this β -hairpin were investigated by T-jump experiments in combination with stationary spectroscopy and simulations.^[7] The folding of TZ2 was described with two-state models^[6-7a], multi-state models with intermediates^[7b, 7d, 8] and as a diffusion process on a rough potential energy landscape.^[7f] The folding mechanism of TZ2 has been described as a zipper mechanism, where a nucleation event induces rapid formation of native H-bonds.^[7a, 7d, 9] Here the formation of the hairpin turn was often supposed to determine the transition state and to be the rate limiting step for in the folding process.^[7d, 9a, 9c, 10] But also a hydrophobic collapse was proposed, where hydrophobic interactions of the aromatic amino acids precede the formation of the native H-bonds.^[7c, 9a, 11] Eventually a unique interpretation of the energy landscape and the folding mechanism has not been reached yet and additional experiments and techniques seem to be required.

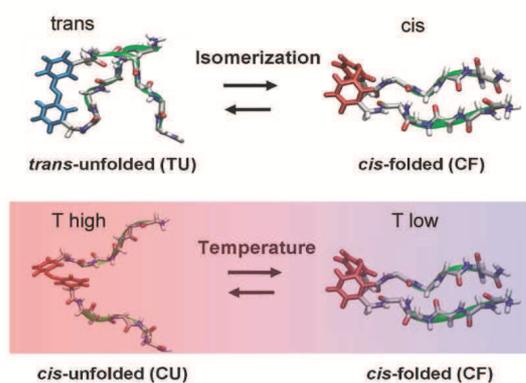


Figure 1. Exemplary structures of ATZ: For AMPP in the trans form no folded hairpin structures are found. These structures strongly deviate from all structures found with AMPP in the cis form. For cis AMPP the peptide may form a folded β -hairpin structure. At higher temperatures cis-ATZ shows an increasing population of unfolded structures.

Recently a modification of TZ2 has been presented where the incorporation of a photoisomerizable azobenzene compound as turn element leads to the photo-switchable hairpin peptide ATZ (H-Ser-Trp-Thr-Trp-Glu-AMPP-Lys-Trp-Thr-Trp-Lys-NH₂).^[12] This peptide shows different structures depending on the isomerization state of the azobenzene chromophore [3-(3-aminomethyl)phenylazo] phenylacetic acid (AMPP), as shown in the upper part of Figure 1: *Trans*-AMPP does not allow the peptide to reach a β -hairpin-like structure and open, unfolded structures dominate. With AMPP in the *cis*-form one finds an ensemble of unfolded and folded β -hairpin structures, where the folded β -hairpin structures are stabilized by hydrophobic interactions between the Trp residues and intra-strand hydrogen bonds.^[13] The relative concentration of unfolded and folded structures depends on the temperature (see Fig. 1, lower part). When the photo-isomerization of the azobenzene backbone switch initiates the folding reaction, ultra-fast absorption changes decaying on the picosecond time scale have been reported. These dynamics

were related to structural changes of the chromophore and directly attached amino acids.^[13a] Indications for the formation of the folded structure were found on the μ s-timescale. However these μ s dynamics were not studied in detail and the folding mechanism as well as the energy landscape of ATZ remained unclear.^[13]

In the last decade many investigations of peptide dynamics have been performed with photo-switchable peptides^[5c, 14] on the one side and by T-jump experiments^[4b, 7, 9b] on the other side. In this paper, for the first time the two different mechanisms - photo-isomerization and T-jump - are used to initiate the structural dynamics of one peptide. For both techniques the reaction dynamics of the ATZ hairpin peptide are investigated by IR spectroscopy on the nano- and microsecond time scale. From the comparison of the two approaches the characteristics of the T-jump and isomerization induced dynamics can be identified. In addition, the combination of the different experimental methods yields an improved understanding of the reaction dynamics, decides between downhill-folding and a transition state model and allows a detailed description of the folding process of this hairpin peptide.

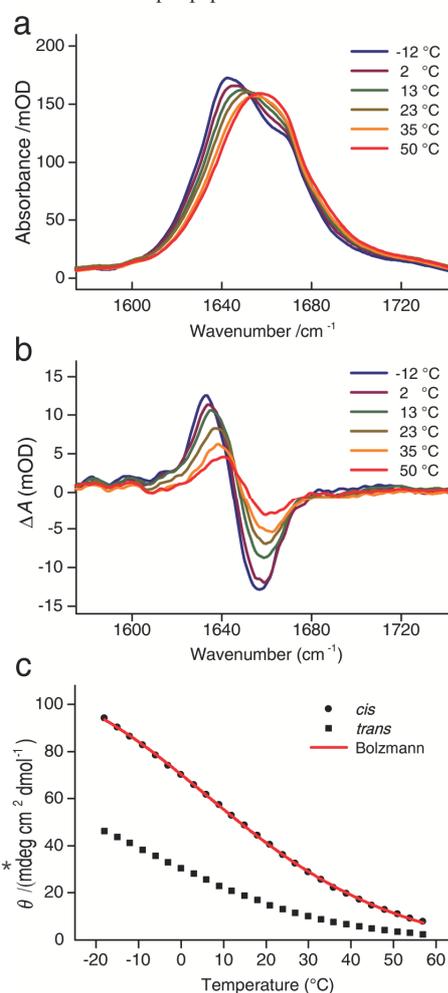


Figure 2. (a) IR absorbance of *cis*-ATZ for different temperatures. The increase in IR absorbance at 1640 cm⁻¹ and the decrease around 1660 cm⁻¹ for lower temperatures is due to the increased population of folded β -hairpin structures at lower temperatures. (b) IR absorbance differences between the photostationary states of *cis*-ATZ and *trans*-ATZ. The increase around 1640 cm⁻¹ and the decrease around 1660 cm⁻¹ after trans to cis isomerization indicates that β -hairpin structures are formed upon illumination. (c) CD-signal at 228 nm of *cis*-ATZ and *trans*-ATZ. The CD signal of *cis*-ATZ was analysed with a Boltzmann distribution of folded and unfolded structures (red line).

* Typing error: Replace mdeg by kdeg!

Results

Stationary spectroscopy. Fig. 2a shows the stationary absorption spectra of *cis*-ATZ in the amide I region at different temperatures. At low temperatures (blue trace for $T = -12$ °C) a pronounced absorption peak at 1640 cm^{-1} is observed in a range where amide groups in β -hairpin structures absorb. At higher frequencies one finds a shoulder around 1660 cm^{-1} . This frequency is representative for amide groups with reduced number of intra-strand hydrogen bonds as found in unfolded or disordered peptide structures. When the sample is heated (see blue to red curves) the absorption decreases at lower frequencies and rises at higher frequencies as expected for a system with folded hairpin structures at low temperatures and unfolding towards higher temperatures (see Fig. 2a). This interpretation is supported by NMR measurements, where significant concentrations of folded β -hairpin structures were found at lower temperatures.^[12]

For a further characterization of the *cis*-ensemble temperature dependent CD measurements were performed at 228 nm (see filled circles in Fig. 2c). The CD signal at 228 nm originates from excitonic coupling of the Trp residues and is characteristic for stacked Trp as found in folded β -hairpin structures.^[6] Figure 2c shows an increase in the 228 nm CD signal towards lower temperatures indicating an increase of folded and a decrease of unfolded peptides. From the temperature dependence of the CD-data the fraction of folded structures can be estimated. A Boltzmann analysis (solid curve) of the temperature dependence using a standard two-state model yields the equilibrium constant $K_{eq}(T)$ and allows to determine the melting temperature to be 12 °C which is considerably lower than the melting temperature of 72 °C found for T22.^[6]

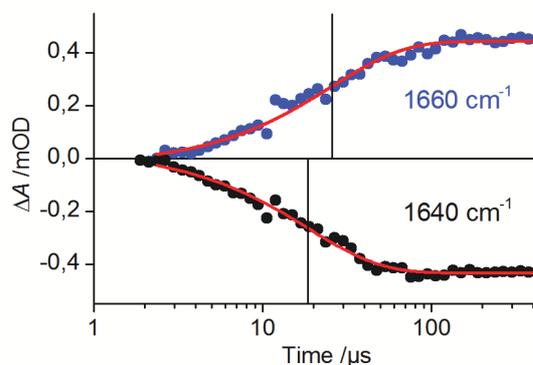


Figure 3. Relaxation kinetics of *cis*-ATZ after a temperature jump of about 2 K to the final sample temperature of about 19 °C. The absorbance decrease at 1640 cm^{-1} and the increase at 1660 cm^{-1} correspond to the disappearance of folded and the formation of unfolded structures respectively. The vertical lines represent the time constant of the fit.

When the AMPP part of the peptide is switched by light from the *cis* to the *trans* conformation, significant changes of the IR-absorption are observed. Figure 2b shows the IR absorbance difference spectrum $\Delta A(\nu/c)$ of the peptide in the *cis*- and *trans*-conformation, $\Delta A(\nu/c) = A_{cis}(\nu/c) - A_{trans}(\nu/c)$. The *cis*-peptides show increased absorption in the red wing of the absorption band at 1640 cm^{-1} (representative for a β -hairpin structure) and reduced absorption around 1660 cm^{-1} (unfolded or disordered peptide structures) as compared to the *trans*-peptides. This observation is in line with NMR measurements showing that peptides in the *trans* conformation do not contain β -hairpin structures.^[12] The amplitudes of the light-induced absorbance difference spectra display a

pronounced temperature dependence. As expected, the amplitudes are larger for low temperatures since higher concentrations of folded β -structures occur in the *cis* ensemble at low temperatures. CD measurements on the peptides with azobenzene in the *trans* form (see black squares in Fig. 2c) show smaller signatures from folded structures and a reduced increase towards low temperatures. These features also point to some stacked Trp at low temperatures. This is in line with NMR measurements where more compact *trans* structures were observed.^[12]

T-jump induced dynamics. The temperature induced unfolding of *cis*-ATZ was investigated in a T-jump experiment. A heating pulse at 1909 nm induces a temperature jump of 2-3 K in the peptide solution resulting in a final peptide temperature of about 19 °C. The response of the peptide, i.e. the relaxation into the equilibrium at the higher temperature is monitored by the IR absorption changes in the amide I region at 1640 cm^{-1} (folded hairpin) and 1660 cm^{-1} (disordered structures). Figure 3 shows the absorption transients as obtained after correction for the pure solvent (see Materials and Methods). At 1640 cm^{-1} (lower trace) the temperature jump induces an absorption decrease that can be fitted with a time constant $\tau_{obs} = 18.4 \pm 0.7\ \mu\text{s}$. Probing the absorption change at 1660 cm^{-1} shows an absorption increase which can be related to the growth of unfolded structures upon temperature rise. The analysis yields a slower time constant of $25.4 \pm 1.2\ \mu\text{s}$. Both time constants depend on the peptide temperature. At lower temperatures (see Table 1) the transients probed at 1640 cm^{-1} and 1660 cm^{-1} can be described (within experimental error) by the same time constant.

Isomerization induced peptide dynamics. Illumination of the *trans*-AMPP in the UV induces rapid photoisomerization to the *cis* form. This process was found to be finished within a few picoseconds.^[13] In the present experiment we use sub-nanosecond pulses at 355 nm for excitation and probe the induced structural changes of the attached peptide via the absorption of the amide I band. Figure 4a shows the transient absorption difference spectra (sample temperature 21 °C) at delay times in the nanosecond to microsecond range. At early times, at $t_D = 6\text{ ns}$ after isomerization one observes only a very weak absorption decrease in the amide I region. In the few microsecond range the absorption changes grow. The increase in absorption at 1640 cm^{-1} as well as the decrease at 1660 cm^{-1} represent the formation of a folded β -hairpin structure and the reduction of unfolded structures respectively. The final difference spectrum recorded at $100\ \mu\text{s}$ resembles closely the stationary *cis-trans* difference spectrum (see Fig. 2b). Figure 4b shows the averaged transient absorption changes around 1640 cm^{-1} (black dots) and 1660 cm^{-1} (blue dots). On the nanosecond time scale one observes a weak increase in absorption at 1640 cm^{-1} whereas a weak decrease is found at 1660 cm^{-1} . Much stronger absorption changes occur in the $20\ \mu\text{s}$ time range. After $100\ \mu\text{s}$ the absorption changes have reached their peak value. There are no indications for further transients. The microsecond transients are modeled by an exponential function with a time constant of $\tau_{obs} = 16.3 \pm 0.8\ \mu\text{s}$ (1640 cm^{-1}) and $14.8 \pm 1.2\ \mu\text{s}$ (1660 cm^{-1}). Within the experimental uncertainties the positive and the negative absorption changes follow the same kinetics.

Temperature dependence of the peptide dynamics. Both types of transient experiments, T-jump and isomerization induced, were performed for a wide range of sample temperatures. T-jump experiments on *cis*-ATZ were performed for temperatures between 2 to 30 °C and isomerization induced experiments between -5 and

37 °C. Figure 5a shows T-jump induced absorption changes at 1640 cm^{-1} characteristic for the folded structures. For all temperatures the kinetics can be well approximated by an exponential function. All time constants obtained for 1640 cm^{-1} and 1660 cm^{-1} are summarized in Table 1 and the Supporting Information (SI)-Table 2. Data on the T-jump induced absorbance changes indicate, that for the higher temperatures the T-jump kinetics at 1660 cm^{-1} are (slightly) slower than those at 1640 cm^{-1} . For the T-jump measurements at the lowest temperature the time constants at 1660 cm^{-1} and 1640 cm^{-1} are the same within the experimental uncertainties. IR absorbance changes triggered by *trans* to *cis* isomerization of AMPP are shown in Figure 5b for 1640 cm^{-1} . The disappearance of the unfolded structures (around 1660 cm^{-1}) was found to occur with the same time constants (see Table 1 and SI-Table 1). An inspection of the temperature dependence of the time constants shows that T-jump induced and isomerization induced absorption changes have very similar time constants and show a pronounced temperature dependence. A more detailed comparison of the time constants recorded around 1640 cm^{-1} can be obtained via the Arrhenius plot given in Fig. 5c. All the experimental points from T-jump (squares) and isomerization (points) induced measurements perfectly fall on one line indicating that the same Arrhenius behavior is observed with both methods.

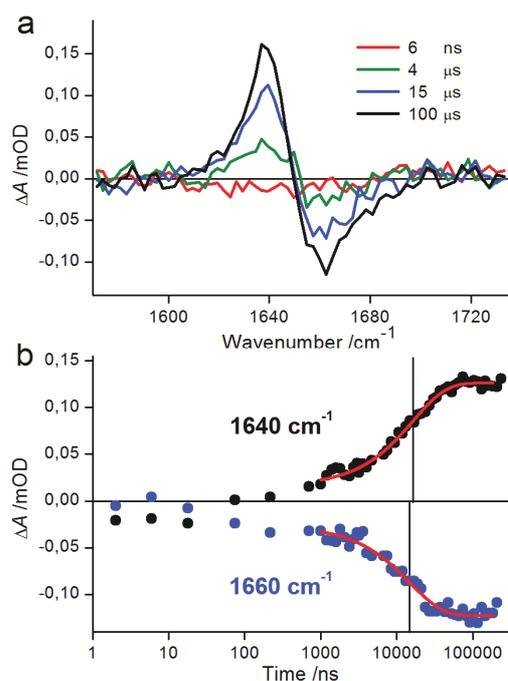


Figure 4. a) IR Absorbance difference spectra of ATZ after laser induced *trans-cis* isomerization of the AMPP switch (sample temperature 21 °C). b) Transient absorbance changes at 1640 cm^{-1} and 1660 cm^{-1} . The data at $t > 1 \mu\text{s}$ can be fitted with an exponential function yielding time-constants of $16.3 \pm 0.8 \mu\text{s}$ (1640 cm^{-1}) and $14.8 \pm 1.2 \mu\text{s}$ (1660 cm^{-1}) respectively indicated by the vertical lines.

Discussion

The AMPP backbone element of the ATZ peptide can be switched by light between stable *cis* and *trans* conformations. The structures of *trans*-AMPP are known to be unfolded. The abbreviation for these *trans*-AMPP, unfolded structures will be TU. Only few intra-strand hydrogen bonds are expected for TU which exhibits a broad

distribution of unfolded structures adapted to the *trans* geometry of the chromophore. TU strongly deviates from all structures found with AMPP in the *cis* form which is due to the different geometry of the AMPP turn.^[12] The stationary experiments on ATZ containing *cis*-AMPP (*cis*-ATZ) show that folded and unfolded structures exist which will be called CF and CU respectively (Fig. 1 lower part and Fig. 2). The populations of the folded structures CF and unfolded structures CU are determined by their free energy $G=H-TS$ which has an enthalpic H and entropic $-TS$ contribution and depends on temperature.^[15] While one can assume that essentially one folded structure CF is present, many unfolded i.e. not completely folded structures are possible forming the ensemble CU. When the interconversion within the structures of CU is fast compared to the transition from CU to CF one can treat CU as one single kinetic state.^[15] The kinetics and states in the thermal equilibrium of *cis*-ATZ are involved in the folding and unfolding process and will be discussed in this section.

Isomerization induced folding dynamics. The isomerization induced experiments start with the *trans*-ATZ ensemble TU (see Fig. 6a) where the peptide is far off a β -hairpin structure.^[12] Excitation of the *trans*-AMPP chromophore by light at 355 nm starts rapid photoisomerization of the chromophore.^[13] Within 150 ps after light absorption the AMPP chromophore has isomerized, peptide groups directly attached to the AMPP have been rearranged and the surrounding solvent has adapted to the new shape of the molecule. At that time the IR-absorption of the amide group, characteristic for the hydrogen bond pattern is essentially unchanged.^[13a] Thus the AMPP switch is isomerized but there are no significant structural changes of the peptide moiety. The peptide structures might still resemble the original unfolded *trans* conformations (TU) however the chromophore is now in the *cis* conformation. We call these transient unfolded structures CU* (Fig. 6).

The experiments reveal that the subsequent reactions occur on the nano- and microsecond time scale and lead to folded and unfolded states CF and CU in the thermal equilibrium of *cis*-ATZ (see Fig. 4). Up to a time of 1 μs one finds only small absorption changes. The subsequent transients are dominated by a strong absorption change with exponential time dependence (Fig. 4b). The formation of the folded (observed at 1640 cm^{-1}) and the disappearance of unfolded structures (at 1660 cm^{-1}) occur with the same time constant τ_{obs} . After this time the stationary difference spectrum is reached. The observation of a single exponential kinetic for the isomerization induced folding reaction is in line with the following reaction models:

- (i) A direct transition with time constant τ_{obs} from CU* to the *cis*-equilibrium where the *cis*-equilibrium, formed by CU and CF, interchanges on a much faster time scale $\ll \tau_{obs}$.
- (ii) An initial fast ($\ll \tau_{obs}$) transition from CU* into the unfolded ensemble CU, followed by the transition into the thermal equilibrium of CU and CF with τ_{obs} .

T-jump experiments. The kinetics between the thermal *cis*-ensemble of CF and CU (see Fig. 6a lower blue part) have been investigated by T-jump experiments. Here the laser induced increase in temperature leads to a decrease of the free energy of the unfolded state CU in relation to the folded state CF (see SI-Fig. 3). The relaxation into the new equilibrium with a higher fraction of unfolded structures is related to an unfolding process which is probed in the IR. For the T-jump measurement performed at room temperature the decrease of the absorption band of the folded hairpin at 1640 cm^{-1} occurs with the same time constant of about 18

μs (19°C) as found in the isomerization induced folding experiment. Furthermore the T-jump induced unfolding kinetics and the isomerization induced folding kinetics observed at 1640 cm^{-1} show the same temperature dependence (see Fig. 5). An Arrhenius type analysis of the kinetics is performed according to^[15]

$$k(T) = \tilde{k}_0 \cdot e^{-\Delta G^\ddagger / RT} = \tilde{k}_0 \cdot e^{\Delta S^\ddagger / R} \cdot e^{-\Delta H^\ddagger / RT} = k_0 \cdot e^{-\Delta H^\ddagger / RT}$$

Here the entropic part of the activation energy $T\Delta S^\ddagger$ is contained in the pre-exponential factor k_0 . The temperature dependence of all the experimental time constants yielded an activation enthalpy of $\Delta H^\ddagger = 47.8 \pm 1.4$ kJ/mol. The activation enthalpy originates from interstrand H-bonds and H-bonds to the solvent molecules. In addition the $\pi\pi$ -interactions between the aromatic groups may contribute.

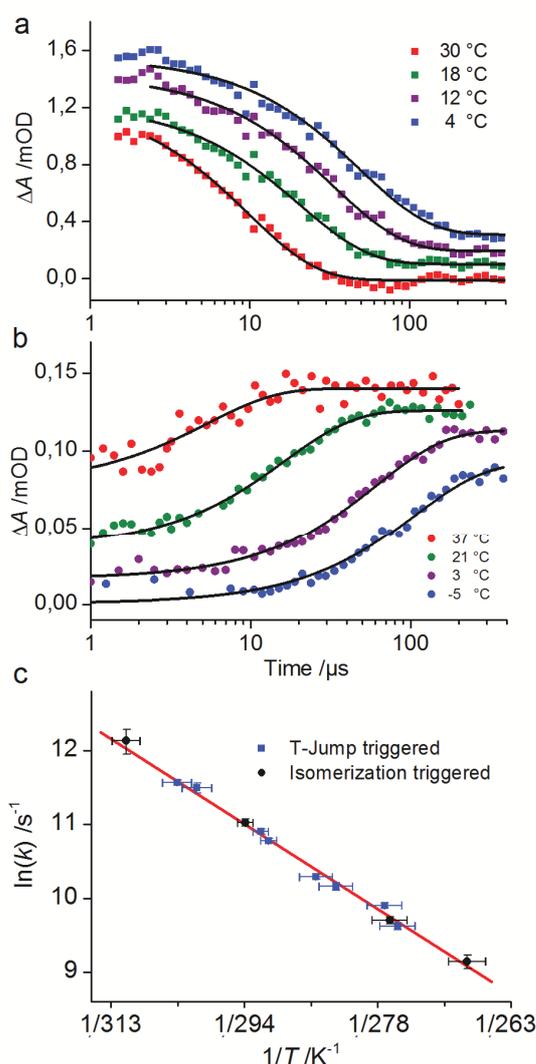


Figure 5. T-jump induced unfolding (a) and isomerization induced folding (b) dynamics investigated for different sample temperatures. The transient absorption changes at 1640 cm^{-1} are related to changes in the population of the folded structure and were fitted in the microsecond range with exponential functions. (c) A pronounced temperature dependence of the time constants is found and the two techniques yield the same temperature dependence.

$T/^\circ\text{C}$	$\tau_{obs} / \mu\text{s} @1640 \text{ cm}^{-1}$	$\tau_{obs} / \mu\text{s} @1660 \text{ cm}^{-1}$
Isomerization induced:		
37.3	5.4 ± 0.9	5.2 ± 2.8
21.0	16.3 ± 0.8	14.8 ± 1.2
3.4	61.0 ± 2.8	67.2 ± 10.8
-5.2	106.7 ± 9.9	122 ± 32
T-jump induced:		
27.4	10.2 ± 0.7	19.3 ± 1.6
19.0	18.4 ± 0.7	25.4 ± 1.2
9.7	38.6 ± 2.0	48.7 ± 2.7
2.5	66.2 ± 3.2	73.0 ± 5.8

Table 1. Isomerization induced dynamics (upper 4 rows) and T-jump induced dynamics (lower 4 rows). The error in the temperature is about ± 2 °C. For the measurements performed at room temperature (19° and 21°C) the error is about ± 1 °C.

Energy landscape and reaction dynamics. At first it might be surprising that two different reactions - isomerization induced folding and T-jump induced unfolding - proceed with the same time constants and show the same temperature dependence. Apparently both kinetics are determined by the same process. Since it is evident that the unfolding reaction observed in the T-jump experiment is related to transitions within the thermal ensemble of *cis*-ATZ also the isomerization induced folding must occur in this ensemble. Therefore only model (ii) mentioned above can explain the observations. Here the transition from CU^* to the unfolded states CU of the thermal ensemble is very fast. It may be assigned to the kinetics found on the 1 ns to 1 μs range. The observed slow folding kinetics with the time-constant $\tau_{obs} \approx 16$ μs (21°C) in the isomerization triggered experiment is due to the transition of the unfolded ensemble CU into the thermal equilibrium of CU and CF (see Fig. 6). The observation of a single time constant for folding and the inverse process unfolding strongly points to a reaction scheme where the unfolded structures within CU interconvert on a fast timescale and are separated by a high energetic barrier (transition region) from the folded structure CF. The kinetics between CU and CF can be described in a two-state-model where only one time constant can be observed which is independent of the direction of the process. This observable time constant τ_{obs} is determined by the microscopic folding and unfolding rates k_f and k_u : $1/\tau_{obs} = k_{obs} = k_f + k_u$. The microscopic folding and unfolding rates k_f and k_u can be calculated directly according to $K_{eq}(T) = k_f/k_u$ where the equilibrium constant $K_{eq}(T)$ can be determined from the CD measurement. An analysis of the data with this model yields microscopic folding and unfolding rates $k_f = 1/40$ μs^{-1} and $k_u = 1/27$ μs^{-1} (21 °C) (see SI-Table 1 for other temperatures). The activation enthalpies for the microscopic folding/unfolding transitions are $\Delta H_f^\ddagger = 32.4 \pm 1.0$ kJ/mol and $\Delta H_u^\ddagger = 63.5 \pm 1.0$ kJ/mol.

The previous discussion was based on the data recorded in the 1640 cm^{-1} range, where the folded structures are probed. The T-jump experiments probed at 1660 cm^{-1} reveal slightly longer time constants (see Table 1 and Fig. 3). At the higher peptide temperatures the difference is well seen and the ratio of the observed time constants $\tau_{obs}(1660 \text{ cm}^{-1}) / \tau_{obs}(1640 \text{ cm}^{-1})$ is above 1.8. At low temperature the ratio approaches 1 and the two time constants cannot be distinguished within the experimental error (see SI-Table 2). The observation of an additional time constant shows that the model with only two states CU and CF is not sufficient to describe the experimental observations for higher temperatures.

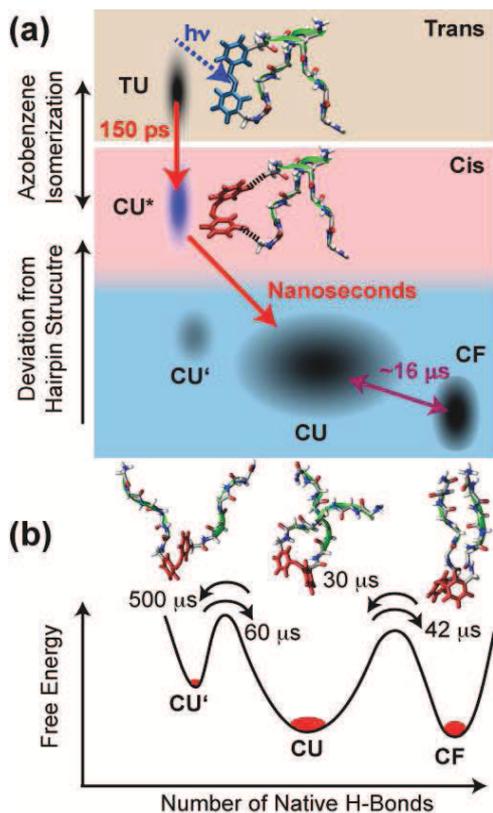


Figure 6. (a) Schematic illustration of the ensembles involved in the T-jump and *trans-cis* isomerization induced dynamics. With AMPP in the *trans*-conformation a broad distribution of unfolded structures adapted to the *trans*-geometry of the chromophore exists (TU). 150 ps after excitation of the chromophore, AMPP has changed from the *trans*- to the *cis*-geometry however no significant structural changes of the amino-acid strands are found. These transient unfolded structures are called CU* and evolve on the ns timescale into the unfolded conformations CU (and maybe to some small extent into CU'). The formation of the folded structure CF in the isomerization induced experiment is determined by a transition-state between CU and CF. In the T-jump experiment the thermal equilibrium populations of CF, CU and CU' (blue area of low energy structures) are redistributed by the heating and the formation of the new equilibrium with a higher population of CU and CU' is observed. (b) Free energy profile of CF, CU and CU', the population in thermal equilibrium (red) and the corresponding structures. The indicated rate constants are obtained from modeling of the transient data as described in the text. The displayed structures are exemplary to illustrate schematically the reaction.

For ATZ at higher temperatures a simple extension of the model by an additional unfolded state CU' allows to describe the experimental data (see Fig. 6, SI-Chapter 5). In the isomerization induced experiment CU* exchanges into the unfolded conformation CU (and maybe to some small extent into CU') on the ns timescale. The formation of the folded structure CF is determined by a transition-state between CU and CF (see Fig. 6 and SI-Fig. 3). In the T-jump experiment the laser induced increase in temperature leads to a decrease of the free energy of the unfolded states CU and CU' in relation to the folded state CF. Directly after the T-jump, CF has an excess population and the formation of the new equilibrium with a higher population of CU and CU' is observed (see SI-Fig. 3). The rates according to this model are presented in Figure 6b for room temperature (21 °C). The model does describe the observed T-jump and isomerization induced dynamics well, including the slightly slower T-jump kinetics at 1660 cm^{-1} (see SI-Chapter 5). The additional unfolded state CU' is considerably higher in energy than CU, has a somewhat higher absorption coefficient at 1660 cm^{-1} and exchanges slowly with CU on the time scale of 50 μs . This third

state is only weakly populated especially at the lower temperatures where all time constant become similar and where the reaction is well described by a model with only two states CU and CF. These properties indicate that CU' corresponds to peptides in strongly unfolded conformations (see Fig. 6b). It should be noted, that in the model with three states CU', CU and CF the microscopic folding and unfolding rate constants of the transition between CU and CF deviate only slightly from the rate constants obtained from the model with only two states CU and CF (two-state: $k_f=1/40 \mu\text{s}^{-1}$, $k_u=1/27 \mu\text{s}^{-1}$, $k_f+k_u=1/16 \mu\text{s}^{-1}$; three-state: $k_f=1/42 \mu\text{s}^{-1}$, $k_u=1/30 \mu\text{s}^{-1}$, $k_f+k_u=1/17 \mu\text{s}^{-1}$). Therefore the activation enthalpies ΔH_f^\ddagger and ΔH_u^\ddagger obtained from the two-state analysis do not change considerably when considering the third state CU'.

In the literature the so-called "downhill folding" was discussed as an alternative to transition state theory in protein folding. Here the kinetics are determined by diffusion on a rough energy landscape.^[3a, 4b, 16] In general "downhill folding" exhibits non-exponential, e. g. stretched exponential dynamics.^[4b, 5c, 17] However, under special conditions exponential kinetics occur.^[5a, 18] "Downhill folding" was used to describe the experimental observations in a number of peptide systems.^[16a, 17, 19] Although downhill folding and transition state folding are conceptually completely different it is in many cases difficult to distinguish them experimentally.^[4b, 5] One might ask if such a diffusion process on a rough energy landscape might also be relevant for the observed folding and unfolding transitions in thermal equilibrium of *cis*-ATZ. In general "downhill folding" kinetics depend on the particular diffusion path and are determined by the gradient of the free energy surface, the local diffusion coefficient and the initial conditions (see ref. ^[7c, 20] and SI-Chapter 4). In particular, "downhill folding" would not lead to identical kinetics for folding and unfolding nor would it lead to the same temperature dependence of the time constants. The experimental observations of very similar kinetics for unfolding and folding (see Fig. 5) argues strongly against a downhill folding reaction model and supports the presented transition state model.

ATZ versus TZ2. The detailed information obtained on the folding reaction for ATZ allows the comparison of this peptide with the widely investigated TZ2. The major structural difference between TZ2 and *cis*-ATZ is the relatively rigid turn formed by the *cis*-AMPP. The presented investigations on ATZ show distinct differences to TZ2. First the folded form of *cis*-ATZ (investigated in H_2O ^[12] and methanol) has a lower stability than TZ2^[6] in H_2O . The smaller stability of *cis*-ATZ could originate from the rigid *cis*-AMPP turn which might deviate from a perfect hairpin loop. Furthermore the kinetics for the ATZ peptide are slower and show stronger temperature dependence than the kinetics for the TZ2 peptide variants.^[7a, 7c] The observable rate constant k_{obs} for TZ2 at room temperature was found to be 3-7 μs with an activation energy of $E_a=27-32 \text{ kJ/mol}$. From a two-state analysis of TZ2 kinetics a microscopic folding rate $k_f=1/2.5 \mu\text{s}^{-1}$ and an activation enthalpy ΔH_f^\ddagger of 15-18 kJ/mol was determined.^[7a] For ATZ τ_{obs} was found to be in the order of 20 μs with an activation enthalpy of $E_a=48 \text{ kJ/mol}$. For ATZ a two-state analysis yields a microscopic folding rate $k_f=1/40 \mu\text{s}^{-1}$ with an activation enthalpy $\Delta H_f^\ddagger=32 \text{ kJ/mol}$. To summarize, the kinetics of TZ2 are much faster and have lower activation energies than the kinetics of ATZ. The changes found for ATZ are surprising: The solvent methanol used here in the kinetic experiments has a lower viscosity than H_2O which should lead to faster folding. Furthermore the pre-formed turn appears to be an ideal starting condition for the sequential closing of the hydrogen bridges of the hairpin as it is discussed for the zipper mechanism.^[7a]

^{7d, 9a, 9b]} The observed slower folding kinetics do not support such a zipper mechanism for the formation of the ATZ hairpin. Furthermore the slower folding kinetics show, that a rapid turn formation will not necessarily speed up folding as it would be expected for folding mechanisms where turn formation plays an important role.^[7d, 9a, 9c, 10] On the other hand, a rigid turn region strongly restricts the conformational space and the flexibility of the peptide and will reduce the accessibility of paths via widely unfolded states. A strong increase of the effective barrier and a slowing down of the kinetics - as observed for *cis*-ATZ - may result. In the following part the folding mechanism, relevant for the formation of the ATZ hairpin, will be discussed in more detail.

Folding mechanism of ATZ: In general two different folding mechanisms, the hydrophobic collapse and the zipper mechanism are discussed for hairpin formation.^[7d, 9a, 9b, 11] For ATZ, the mechanism that determines the formation of the folded structure must be related to the transition state between CU and CF. For this peptide a microscopic folding transition from the unfolded state CU to the folded state CF with an activation enthalpy of $\Delta H_f^\ddagger = 32$ kJ/mol was found. This relatively high activation enthalpy is in the order of the energetic deficit of 4 or 5 H-bonds. In contradiction to this observation a zipper mechanism^[9b] with a preformed turn does not require a simultaneous breaking of 4 or 5 H-Bonds and seems not to be the rate limiting molecular process for ATZ. A hydrophobic collapse mechanism might be more reasonable: Here the formation of hydrophobic interactions of the tryptophanes and the AMPP switch might combine with the simultaneous breaking of several peptide hydrogen-bonds and may account for the observed barrier height.

Conclusion

In this paper structural dynamics of the β -hairpin peptide ATZ are investigated on the nano- to microsecond timescale. Two different processes are used to initiate the structural dynamics. Photo-isomerization of the AMPP backbone element and an increase of solvent temperature (T-jump). When isomerization of the switch AMPP is used to trigger the folding reaction initial force driven transients had been observed on the picosecond time scale followed by rearrangements on the nanosecond time scale. However the dominant absorption transients indicative for the folding of the β -hairpin occur only with a time constant of about 16 μ s. The T-jump experiments are dominated by the same time constant. In addition the same temperature dependence of the reaction rates is found in both types of experiments. These results clearly show that the dominant reaction dynamics initiated by the two different mechanisms - isomerization or T-jump- are determined by the same process. The combination of both techniques allows us to present a detailed model for folding and unfolding: The isomerization induced folding process ends in a transition state reaction scheme, where a high energetic barrier of 48 kJ/mol separates unfolded and folded structures. The T-jump induced dynamics are determined by the same reaction scheme. The formation of the β -hairpin over the energetic barrier might be determined by a hydrophobic collapse mechanism. The experimental results exclude a downhill folding process. However deviations from a model with only one folded and one unfolded state in the thermal *cis*-equilibrium are observed which point to a substructure of the unfolded ensemble. The presented work shows that the simultaneous application of the different initiation techniques opens convincing new possibilities for the investigation of conformational dynamics of peptide systems.

Experimental Section

Sample preparation. The synthesis of the β -hairpin model peptide ATZ has been described previously.^[12] Prior to the experiments the peptide was dissolved in an aqueous 0.1% TFA solution with 40% acetonitrile, lyophilized and redissolved in methanol to reach the high concentration required for the IR experiments. It has been shown previously that this solvent is well suited for the investigation of ATZ since studies on ATZ in water, methanol and water/methanol mixtures have been already performed.^[12] In these solvents no significant structural differences could be observed for the *trans* peptide. Also for the *cis* peptide structural properties were not found to depend strongly on the solvent. However in water the peptide is soluble only up to μ M concentrations, whereas in methanol the peptide remains monomeric even in the mM range. Different illumination techniques have been used to generate photostationary states (PSS): PSS_{trans} containing the AMPP essentially in the *trans*-form was reached by illumination with $\lambda > 400$ nm from a KLC 2500 light source (Schott, Mainz) equipped with a fiber bundle (diameter 5 mm) and a GG 400 (2 mm) long-pass filter (Schott). PSS_{cis} containing the AMPP essentially in the *cis*-form was reached by illumination at 360 nm (Xenon Arc lamp, Mod. 6140 Oriol), equipped with UG11 (2 mm), WG320 (2 mm) filters (Schott) and a liquid lightguide, Series 300, 3 mm diameter (Lumatec). In the CD and T-jump experiments PSS_{cis} was reached by illumination with UV light at 360 nm (Xe-lamp, LC4, Hamamatsu), equipped with UG11 (1 mm) and WG320 (2 mm) filters (Schott).

Stationary spectroscopy. FTIR measurements were performed with a Bruker IFS 66 FT spectrophotometer equipped with a homebuilt temperature control of the sample holder. The temperature of the sample was determined by the spectral position of the O-D bending vibration of methanol-d4 at about 1660 cm^{-1} . The model peptide was dissolved ($c=2$ mM) in methanol-d4 (Sigma Aldrich 99.8%) and sandwiched between two CaF₂ windows with a Teflon spacer (210 μ m). For each temperature the IR absorbance of the sample in the photostationary states PSS_{cis} and PSS_{trans} as well as the background absorbance of the solvent methanol-d4 were recorded. In addition the IR absorbances of N⁻-trifluoroacetate (Sigma Aldrich, 98%, $c=20$ mM) in methanol-d4 were recorded for each temperature. The spectra of N⁻-trifluoroacetate can be used to correct peptide IR-spectra from the absorption of residual TFA as previously described.^[13a] In the absorbance spectra of ATZ (see Figure 2 a) the background absorbance of methanol-d4 and contributions from residual TFA were subtracted.

CD spectra were recorded with a commercial CD spectrometer (AVIV Biomedicals, Model 410) equipped with a temperature control of the sample holder. The dissolved model peptide was kept in a cell with fused silica windows (path length 1 mm). For the CD-measurements the model peptide was dissolved in methanol ($c=95\mu\text{M}$) and stored in the dark to obtain a sample containing all AMPP switches in the *trans* state (*trans* ensemble). The CD signal at 228nm of this 100% *trans* ensemble was measured for temperatures from -19 °C to 58 °C in steps of 2 °C and vice versa (Fig 2c). Subsequently the sample was converted into the photostationary *cis* ensemble and the CD-measurement was repeated (for details see SI-Chapter 1).

Isomerization induced time-resolved experiments. Transient absorption measurements were performed in the UV pump, IR probe scheme as previously described.^[21] To probe the absorption of the sample a 110 fs pulse from a 1 kHz Ti:sapphire regenerative amplifier system (Spectra Physics, Spitfire Pro) was used to generate femtosecond mid-IR probe pulses by optical parametric amplification and difference frequency mixing.^[22] The IR absorption was measured spectrally resolved in the range from 1580 cm^{-1} to 1730 cm^{-1} with a spectrograph (Bruker, Chromex 250 IS) in combination with a 64 Channel MCT array (Infrared Systems Development, IR-0144). The *trans-cis* isomerization of the AMPP was induced by a 355 nm pump pulse with about 0.6 ns pulse length. The pump pulse (~ 4 μ J, beam diameter at sample position ~ 200 μ m) was produced by third harmonic generation of an externally triggered Q-switched Nd:YVO laser (AOT) that was electronically synchronized to the IR probe pulses.^[21] The jitter of the UV pump pulse relative to the subsequent IR probe pulse was less than 1 ns and a total time resolution of the system of better than 1 ns could be reached. To obtain a higher precision of the absorption measurement a chopper was used to block every second pump pulse. For each delay position between pump pulse and IR probe pulse, 1000 of these no-excitation/probe and excitation/probe events were recorded and the averaged absorbance change was determined. Between 8 and 11 scans of the delay settings were averaged and corrected to obtain the absorbance difference spectra for all delay settings (for details see SI-Chapter 2). In these experiments ATZ was dissolved in methanol-d4 (Sigma Aldrich, 99.8%) at $c=2$ mM. To enable complete sample exchange between subsequent laser shots a homebuilt temperature controlled cycle system equipped with a CaF₂ cuvette ($d=240$ μ m) and a sample reservoir was used. The sample reservoir was illuminated by $\lambda > 400$ nm (KLC 2500 light source, equipped with a 2 mm GG400 long-pass filter) to avoid accumulation of *cis*-ATZ. The temperature of the cycled sample in the cuvette was determined in a FTIR measurement via the spectral position of the O-D bending vibration of methanol-d4 at about 1660 cm^{-1} .

T-jump measurements. T-jump experiments were performed with a home-built pump-probe spectrometer. The T-jump in the sample is initiated by rapid heating of the

solvent with a Raman-shifted 5 ns pulse of a Nd:YAG laser (Continuum, Excel Technology Europe). The Raman shifter (Radiant dyes, Germany) is filled with H₂ (30 bar) and shifts the laser fundamental at 1064 nm to 1909 nm (first Stokes line) were the solvent methanol-d₄ absorbs (see SI-Chapter 3). The 1909 nm pump beam is split into two components, in order to excite the sample from the front and back side with two counter-propagating heating pulses, which leads to a more homogeneous heating profile and helps to reduce cavitation effects. A quantum cascade laser (Daylight Solutions, USA) operated in cw mode and tunable in a spectral region between 1580 cm⁻¹ to 1715 cm⁻¹ was used to probe the conformational changes of the peptide in response to the T-jump. To achieve a homogeneously heated probed area, the beam of the quantum cascade laser was first expanded by a telescope and then focused to a diameter of ~ 200 μm in the sample cell where it overlaps with the pump pulse with a much larger diameter of 3 mm. The thermally induced transmission changes were monitored with a photovoltaic 18 MHz MCT detector (Kolmar Technologies, USA) and digitized by a transient recorder board (Spectrum, Germany). The sample cell (220 μm optical path length) was connected to a temperature controlled water bath (Lauda, Germany) and the sample was equilibrated to a defined temperature. The peptide was dissolved in methanol-d₄ (Sigma Aldrich, 99.8%, c=2.5 mM) and converted into the photostationary *cis* ensemble PSS_{cis}. The laser-induced T-jump perturbs the folding equilibrium and relaxation kinetics were monitored at 1640 cm⁻¹ and 1660 cm⁻¹. Between 150 and 500 single absorption transients were averaged and analyzed for several peptide temperatures. The absorption was recorded on linear time intervals (with 10 ns sampling) from about 68 μs before and until 1200 μs after the T-jump. For data analysis on a logarithmic scale, the data points were averaged in a way that finally 20 data points were obtained equally distributed per decade. The cooling of the solvent leads to absorption transients on the ms timescale and can be fitted by an exponential decay. This contribution was subtracted from the absorption data recorded for the peptide solutions. The absorption changes of the peptide were fitted with an exponential function. A data analysis on the sub μs timescale was not performed. The magnitude of the T-jump was determined from the absorption change of the sample directly (~ 2 μs) after the T-jump (see SI-Chapter 3).

Acknowledgements

The authors thank T. Kiefhaber for the possibility to use the CD-spectrometer and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Excellence Cluster CIPSM, and SFB 749 A5) for financial support. The authors thank J. Wachtveitl and K. Neumann for kindly providing us with the computer program for our data acquisition procedures and Martha Brennich for help in the beginning of the project.

- [1] B. Fierz, H. Satzger, C. Root, P. Gilch, W. Zinth, T. Kiefhaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 2163-2168.
- [2] A. H. Andreotti, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9515-9524
- [3] a) J. D. Bryngelson, J. N. Onuchic, N. D. Socci, P. G. Wolynes, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **1995**, *21*, 167-195 ; b) K. A. Dill, H. S. Chan, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1997**, *4*, 10-19
- [4] a) R. Zwanzig, A. Szabo, B. Bagchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 20-22 ; b) J. Sabelko, J. Ervin, M. Gruebele, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 6031-6036
- [5] a) S. J. Hagen, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2007**, *68*, 205-217 ; b) J. A. Ihalainen, J. Bredenbeck, R. Pfister, J. Helbing, L. Chi, I. H. M. van Stokkum, G. A. Woolley, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 5383-5388; c) J. Bredenbeck, J. Helbing, J. R. Kumita, G. A. Woolley, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 2379-2384.
- [6] A. G. Cochran, N. J. Skelton, M. A. Starovasnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 5578-5583.
- [7] a) C. D. Snow, L. Qiu, D. Du, F. Gai, S. J. Hagen, V. S. Pande, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 4077-4082; b) W. Y. Yang, M. Gruebele, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7758-7759; c) K. Hauser, C. Krejtschi, R. Huang, L. Wu, T. A. Keiderling, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2984-2992 ; d) K. C. Jones, C. S. Peng, A. Tokmakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 2828-2833; e) C.-W. Lin, R. M. Culik, F. Gai, *JACS* **2013**, *135*, 7668-7673; f) R. Narayanan, L. Pelakh, S. J. Hagen, *J. Mol. Biol.* **2009**, *390*, 538-546
- [8] a) R. Huang, L. Wu, D. McElheny, P. Bour, A. Roy, T. A. Keiderling, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5661-5674; b) W. Y. Yang, J. W. Pitera, W. C. Swope, M. Gruebele, *J. Mol. Biol.* **2004**, *336*, 241-251.
- [9] a) Y. Xiao, C. Chen, Y. He, *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 2838-2848 ; b) V. Munoz, P. A. Thompson, J. Hofrichter, W. A. Eaton, *Nature* **1997**, *390*, 196-199 ; c) D. Du, Y. Zhu, C.-Y. Huang, F. Gai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 15915-15920
- [10] L. Yang, Q. Shao, Y. Q. Gao, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 803-808.
- [11] a) A. R. Dinner, T. Lazaridis, M. Karplus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 9068-9073; b) J. Zhang, M. Qin, W. Wang, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2006**, *62*, 672-685.
- [12] S.-L. Dong, M. Löweneck, T. E. Schrader, W. J. Schreier, W. Zinth, L. Moroder, C. Renner, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1114-1120.
- [13] a) T. Schrader, T. Cordes, W. Schreier, F. Koller, S.-L. Dong, L. Moroder, W. Zinth, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 5219-5226; b) T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Cordes, F. O. Koller, G. Babitzki, R. Denschlag, C. Renner, M. Loeweneck, S.-L. Dong, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 15729-15734
- [14] a) J. Bredenbeck, J. Helbing, A. Sieg, T. Schrader, W. Zinth, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 6452-6457; b) V. Cervetto, R. Pfister, J. Helbing, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 3540-3544 ; c) B. Buchli, S. A. Waldauer, R. Walsler, M. L. Donten, R. Pfister, N. Bloechliger, S. Steiner, A. Caflisch, O. Zerbe, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 11725-11730; d) M. Blanco-Lomas, S. Samanta, P. J. Campos, G. A. Woolley, D. Sampedro, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6960-6963 ; e) D. Wildemann, C. Schiene-Fischer, T. Aumüller, A. Bachmann, T. Kiefhaber, C. Lücke, G. Fischer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4910-4918 ; f) H. Satzger, C. Root, P. Gilch, W. Zinth, D. Wildemann, G. Fischer, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 4770-4775.
- [15] J. Buchner, T. Kiefhaber, *Protein folding handbook*, Wiley - VCH, **2005**.
- [16] a) M. M. Garcia-Mira, M. Sadqi, N. Fischer, J. M. Sanchez-Ruiz, V. Munoz, *Science* **2002**, *298*, 2191-2195 J; b) W. A. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 5897-5899
- [17] F. Liu, D. Du, A. A. Fuller, J. E. Davoren, P. Wipf, J. W. Kelly, M. Gruebele, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 2369-2374
- [18] M. Gruebele, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2008**, *70*, 1099-1102
- [19] a) F. Liu, M. Gruebele, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 574-584; b) J. Liu, L. A. Campos, M. Cerminara, X. Wang, R. Ramanathan, D. S. English, V. Munoz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 179-184.
- [20] a) D. T. Leeson, F. Gai, H. M. Rodriguez, L. M. Gregoret, R. B. Dyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 2527-2532 ; b) V. Munoz, M. Sadqi, A. N. Naganathan, D. de Sancho, *HFSP Journal* **2008**, *2*, 342-353.
- [21] A. A. Deeg, T. E. Schrader, H. Strzalka, J. Pfizer, L. Moroder, W. Zinth, *Spectros. Int. J.* **2012**, *27*, 387-391.
- [22] T. Schrader, A. Sieg, F. Koller, W. Schreier, Q. An, W. Zinth, P. Gilch, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *392*, 358-364.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Revised: ((will be filled in by the editorial staff))

Published online: ((will be filled in by the editorial staff))

Supporting Information

Isomerization and Temperature Jump Induced Dynamics of a Photo-Switchable β -Hairpin

Andreas A. Deeg,^[a] Michael S. Rammpp,^[a] Alexander Popp,^[b] Bert M. Pilles,^[a] Tobias E. Schrader,^[a,d] Luis Moroder,^[c] Karin Hauser,^[b] and Wolfgang Zinth*^[a]

Outline

- 1) Circular dichroism (CD) measurements
- 2) Isomerization induced time-resolved experiments
- 3) T-jump experiments in methanol-d4
- 4) Diffusion in a harmonic potential
- 5) Model for T-jump and isomerization induced kinetics

1) Circular dichroism (CD) measurements:

CD spectra were recorded with a CD spectrometer (AVIV Biomedicals, Model 410) equipped with a temperature control of the sample holder. The dissolved model peptides were kept in a cell with fused silica windows (path length 1 mm). For the CD-measurements the model peptide was dissolved in methanol at a concentration of 95 μ M (determined via the tryptophan absorbance) and stored in the dark to obtain a sample containing all AMPP switches in the *trans* state (*trans* ensemble). The AMPP absorbance at 340 nm was used to determine the fraction of *trans* AMPP. The CD signal at 228 nm of this 100% *trans* ensemble was measured for temperatures from -19 °C to 58 °C in steps of 2 °C and vice versa. The CD signal for the rising and falling temperatures are identical and no conversion from *trans* to *cis* due to the 228 nm light of the CD-spectrometer was observed. Subsequently the sample was converted into the photostationary *cis* ensemble. In this photostationary state AMPP is predominantly in the *cis*-form (ca. 80% *cis*-AMPP).^[1] With the sample in the photostationary state, the CD-measurement was repeated. In this case the 228 nm light of the CD-spectrometer is leading to a slight conversion from *cis* to *trans*. Measurements of the AMPP absorbance showed a small (10%) change in the concentration of *cis*-molecules during the CD-measurement. In this case the CD-signal for the rising and falling temperature measurement was averaged to obtain a CD melting curve which is representative for a 75% *cis*-sample. The CD signal expected for a 100% pure *cis*-ensemble was calculated by subtraction of 0.25 times the *trans*-CD-signal from this CD-curve of the photostationary *cis*-ensemble (75% *cis*) and appropriate scaling by a factor of 1/0.75 (Figure 2c).

2) Isomerization induced time-resolved experiments:

Rate-constants at 1640 cm^{-1} and 1660 cm^{-1} of the isomerization induced time-resolved experiments are listed in Supporting Table 1. The rate-constants at 1640 cm^{-1} and 1660 cm^{-1} were obtained from the analysis of the experimental data as

[a] Dipl.-Phys. A. A. Deeg, M. Sc. M. S. Rammpp, Dipl.-Phys. B. M. Pilles, Dr. T. E. Schrader, Prof. Dr. W. Zinth
Institute for BioMolecular Optics and Munich Center for Integrated Protein Science CIPSM
University of Munich, Oettingenstr. 67, 80538 Munich (Germany)
Fax: (+49)89-2180-9202
E-mail: wolfgang.zinth@physik.uni-muenchen.de

[b] Dipl.-Phys. A. Popp, Prof. Dr. K. Hauser
Biophysical Chemistry, Department of Chemistry,
University of Konstanz, Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz, Germany,

[c] Prof. Dr. L. Moroder
Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, 82152
Martinsried, Germany;

[d] Dr. T. E. Schrader
Present address:
Jülich Centre for Neutron Science (JCNS) at Heinz Maier-Leibnitz
Zentrum (MLZ),
FZ Jülich GmbH, Lichtenbergstr. 1, 85748 Garching, Germany;

described below. For each temperature the populations of the folded fraction obtained from the CD measurement are shown as well. Furthermore the microscopic folding and unfolding rates k_f and k_u from a two state analysis of the 1640 cm^{-1} rate-constants are shown.

In a previous work the dynamics of ATZ induced by *trans* - *cis* isomerisation of the AMPP were investigated in a laser flash experiment. Here IR-absorbance changes at 1640 cm^{-1} with a time-constant of about 30 μs were observed.^[2] At first it is surprising that this time-constant is somewhat slower than the 16 μs time-constant obtained at 21 °C in the isomerization induced experiment in this work. In the previous work the sample preparation was slightly different, for example a different lyophilisation protocol was used. Furthermore the solvent methanol-d4 was obtained from Merck whereas in the present work all IR experiments were performed in methanol-d4 from Sigma Aldrich. However apart from the differences in the sample preparation the temperature of the sample was not controlled in the original laser flash experiment. In the presented work the *trans* - *cis* isomerization induced dynamics of ATZ were found to depend strongly on the sample temperature (see Figure 5). Already a deviation of some °C will lead to significantly faster or slower kinetics. Finally it should be mentioned that the experimental precision and the signal to noise ratio of the laser flash experiment was limited.

Temp.	Folded fraction (from CD)	1/ k_f (μs) at 1640 cm^{-1}	1/ k_u (μs) at 1660 cm^{-1}	1/ k_f (μs)	1/ k_u (μs)
37.3	25.7%	5.4± 0.9	5.2± 2.8	21.1	7.3
21	40.3%	16.3± 0.8	14.8± 1.2	40.4	27.3
3.4	60.2%	61.0± 2.8	67.2±10.8	101.5	152.9
-5.2	70.0%	106.7±9.9	122 ± 32	152.0	358.1

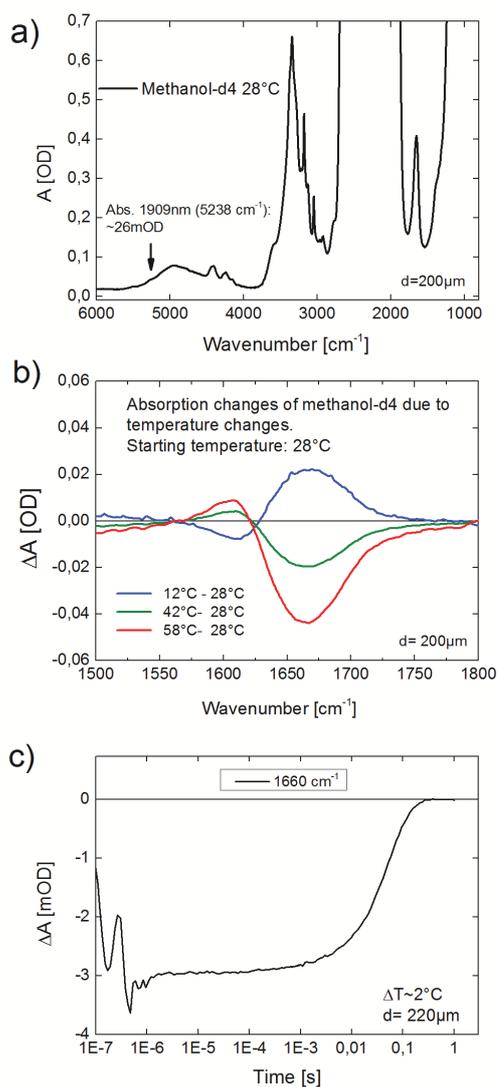
Supporting Table 1: Isomerization induced dynamics, populations of the folded fraction and microscopic folding and unfolding rates k_f and k_u obtained from a two state analysis of the 1640 cm^{-1} rates.

Data analysis of the isomerization induced time-resolved experiments: In the isomerization induced time-resolved experiments the UV-excitation pulse leads to a very small increase of the solvent temperature in the order of 100 mK. This small temperature rise is not relevant for the peptide dynamics, however it can produce thermal lensing effects and disturbs the absorption measurement especially on the ns timescale. The multi-channel detection allows a detailed data analysis where thermal lensing effects can be corrected and a better signal to noise ratio can be achieved. The transient absorption data was analyzed in the following way: From the transient absorbance changes in the range of the folded structures around 1640 cm^{-1} (1635 cm^{-1} - 1645 cm^{-1}) the averaged absorption changes in the range where the peptide does not absorb (between 1580 cm^{-1} and 1600 cm^{-1}) was subtracted. From the transient absorbance changes in the range of the unfolded structures around 1660 cm^{-1} (1660 cm^{-1} - 1665 cm^{-1}) the averaged absorption changes at 1651 cm^{-1} and 1675 cm^{-1} where the peptide shows only small absorbance changes were subtracted. The obtained transient absorption changes for 1640 cm^{-1} and 1660 cm^{-1} were averaged over time intervals to obtain 2 data points per decade, equally distributed on the logarithmic scale from 1 ns – 1 μs . On the μs timescale the transients were averaged over time intervals to obtain 20 data

points per decade and fitted in the interval from 1 μs – 200 μs (for 21 °C and 37 °C) or 1 μs – 400 μs (3 °C and -5 °C) with an exponential function (see Figure 4 and 5). The signature of the thermal lensing on the transient absorption measurement can be measured directly by repeating the described pump-probe experiment using an azobenzene/methanol-d4 solution instead of the ATZ sample. On the ns- μs timescale azobenzene shows no structural dynamics and the measured absorption changes originate only from the weak heating of the sample and the corresponding thermal lensing effects. The transient absorbance spectra of ATZ can be corrected for the absorption changes related to thermal lensing obtained from this azobenzene measurement (see Figure 4a). The transient absorption data of ATZ corrected with this approach were also fitted with exponential functions. Both ways of data analysis, azobenzene correction or averaging and subtraction, yielded the same time constants.

3) T-jump experiments in methanol-d4:

T-jump experiments were performed in methanol-d4. The Raman-shifted Nd:YAG laser pulse at 1909 nm (5238 cm^{-1}) excites an overtone vibration of the solvent thereby causing a fast temperature jump in the peptide-solution within the pulse duration of 10 ns. To the best of our knowledge the performance of T-Jump experiments in methanol-d4 was not reported before. As illustration the absorbance spectra, the temperature dependence of the absorbance spectra and the absorbance changes of Methanol-d4 in a laser induced temperature jump experiments are shown in SI-Figure 1.



Supporting Figure 1: a) FTIR absorption spectrum of Methanol-d4 at 28°C. The absorption at 5238 cm^{-1} can be used to induce a T-jump in the solvent by a short laser-pulse. b) FTIR difference spectra revealing the temperature-dependent absorption changes of methanol-d4 in the amide I region. 28 °C was chosen as reference temperature and difference spectra are shown for 12 °C, 42 °C and 58 °C. c) Absorbance changes of methanol-d4 due to a temperature jump of about 2° C. The temperature jump is induced by a 10 ns laser pulse at $\lambda=1909$ nm. Perturbations in the early time range ($< 1\mu\text{s}$) occur due to cavitation effects and to some small extend to an electronic pick up of the detection electronics.

4) Diffusion in a harmonic potential:

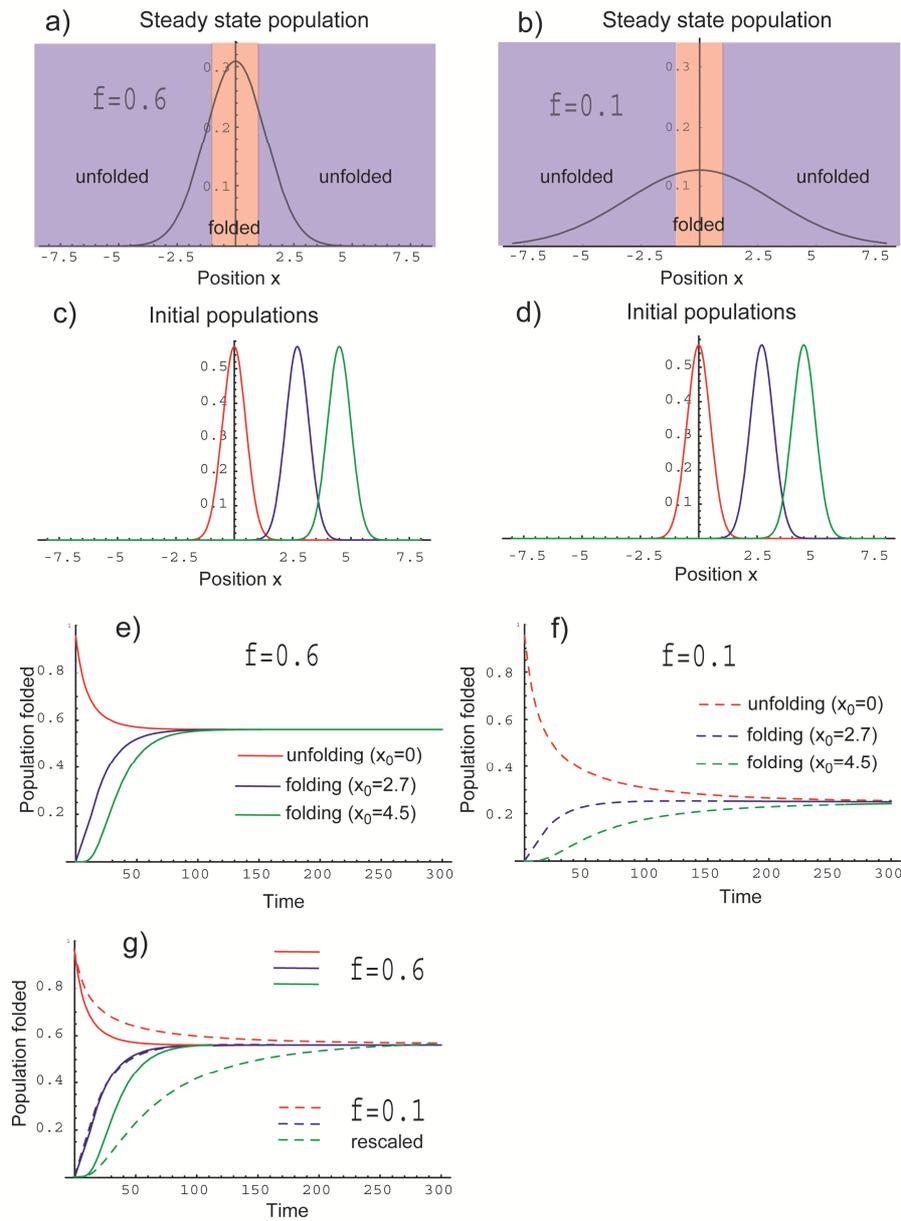
In many cases Downhill folding dynamics are modeled as a diffusion process on a rough potential energy surface.^[3] Here the diffusion kinetics are often described by the Smoluchowski equation although an analytic solution of this equation is rarely possible.^[4] In this approach the roughness of the potential energy surface can be considered by a strongly increased diffusion coefficient.^[5] A harmonic potential can be used as a simple model to describe downhill folding processes.^[4b, 6] In this potential it is possible to calculate analytically the diffusion kinetics for different initial conditions and different gradients towards the potential minimum.^[7]

In this section diffusion in the one-dimensional harmonic potential $G(x) = \frac{1}{2} f x^2$ towards and away from the potential minimum is treated. Since enthalpic (H) and entropic (TS) terms both contribute to the free energy $G(x)$ a change in temperature is related to a change in the curvature f . We interpret the folded ensemble as the systems with relative coordinates x in the vicinity of the potential minimum, $-I < x < I$. The unfolded structures correspond to the region $I < |x|$. In the folding reaction an initial excess population of unfolded states evolves in this potential landscape. In the unfolding reaction the diffusion starts with an excess population of folded states i.e. in the region $-I < x < I$ (see “details of the calculations”). In our example the curvature f of the harmonic potential is chosen to be $f(T_1) = 0.1 k_b T_1$ or $f(T_2) = 0.6 k_b T_2$ leading to a folded population of 25% and 55% respectively. These populations are comparable to the populations of the folded structures at the temperatures 30°C and 8°C. The time-resolved experiments were investigated in this temperature range. The populations of the folded structures are estimated from the CD measurements.

The qualitative presentation here is independent of the explicit value of the diffusion coefficient D , since D only defines the time units.

In SI-Figure 2 a and b steady state populations are given for the two potentials ($f=0.6, f=0.1$) i.e. for the two temperatures. The starting populations are Gaussian distributions with $\sigma_0 = 1/2$ and centered at x_0 . In the calculations identical starting populations were used for both potentials (SI-Figure 2 c and d). For the starting condition $x_0=0$ (Supp. Fig. 2 c and d, red curves) the initial population in the region of the folded structures i.e. in the region $-I < x < I$, is higher than the steady state population. For this starting condition the diffusion process into the steady state distribution is leading to a decrease of the population of the folded structures. In the lower part of SI-Figure 2 (SI- Figure 2 e, f and g, red curve) this decrease of the folded population, which corresponds to a diffusive unfolding process is plotted.

For the starting populations with $x_0=2.7$ and $x_0=4.57$ (SI-Figure 2 c and d, purple and green curves) the initial population in the region of the folded structures is smaller than the steady state population. For this starting condition the diffusion process into the steady state distribution is leading to an increase of the population of the folded structures. This increase of the folded population corresponds to a diffusive folding process and is plotted in the lower part of Supporting Figure 2 (SI-Figure 2 e, f and g, purple and green curves).



Supporting Figure 2: a-b): Steady state populations for two harmonic potentials with $f=0.6$ (~55% folded), and $f=0.1$ (~25% folded). c-d) Initial conditions for unfolding (red) and folding (blue and green) dynamics. e) Population of the folded ensemble (population in the region $-I < x < I$) for the potential $f=0.6$ and different initial conditions. The decrease in population for $x_0=0$ (red curve) corresponds to a diffusive unfolding process. The increase in population for $x_0=2.7$ and $x_0=4.5$ (purple and green curves) corresponds to a diffusive folding process. f) Populations of the folded ensemble for unfolding (red, dashed) and folding (blue and green dashed) dynamics for $f=0.1$. g) Comparison of the folding and unfolding dynamics for $f=0.6$ and $f=0.1$ (corresponding to different temperatures). The amplitudes for $f=0.1$ are scaled.

The modeling reveals that the reaction kinetics show strong differences between folding and unfolding. In addition the unfolding dynamics and the folding reaction show strongly different temperature dependence (SI-Figure 2 g). While the folding kinetics for the initial condition $x_0=2.7$ are almost temperature independent (independent of f), the unfolding reactions show a pronounced temperature dependence. The modeling clearly does not reproduce the experimental trends.

Details of the calculations:

In the modeling we used the following equations:

Potential: $U(x) = \frac{1}{2} f x^2$ with $f=0.1$ or 0.6

Smoluchowski Equation:

$$\partial_t \rho(x,t) = D(\partial_x^2 + \beta f \partial_x) \rho(x,t) \quad \text{with } D=1/20$$

and $\beta=1$

(In ^[7b] analog with: $D\beta f = (\hbar\omega)^2$)

Starting Conditions: Gaussian distribution

$$\rho(x,t=0) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_0} \exp\left\{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma_0^2}\right\}$$

For unfolding: $\sigma_0 = 1/2 \quad x_0 = 0$

For folding: $\sigma_0 = 1/2 \quad x_0 = \{2.7, 4.5\}$

Analytic solution:^[7b]

$$\rho(x,t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma(t)} \exp\left\{-\frac{(x-\chi(t))^2}{2\sigma(t)^2}\right\}$$

$$\sigma(t) = \sigma_0^2 \exp(-2D\beta f t) + \frac{1}{\beta f} (1 - \exp(-2D\beta f t))$$

$$\chi(t) = x_0 \exp(-D\beta f t)$$

Steady state solution $t = \infty$:

$$\rho(x,t = \infty) = \frac{1}{\sqrt{2\pi(1/\beta f)}} \exp\left\{-\frac{x^2}{2/\beta f}\right\}$$

Time dependent population in the “folded state” in the region $-1 < x < 1$:

$$\rho(t) = \int_{-1}^1 \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma(t)} \exp\left\{-\frac{(x-\chi(t))^2}{2\sigma(t)^2}\right\} dx$$

5) Model for T-jump and isomerization induced kinetics:

The T-jump experiments at 19°C are not in line with a model of with only one folded state CF and one unfolded state CU. The kinetics at 1640 cm^{-1} , probing the folded structures CF can be fitted with a time constant of 18.4 μs (+0.7 μs). However a time constant of 25.4 μs (+1.2 μs) is obtained from a fit of the 1660 cm^{-1} data, where the unfolded structures CU are probed (see Figure 3). The observation of two different time constants shows that a model with only two states CF and CU in the thermal *cis*-ensemble is not sufficient to describe the experimental data. However the kinetics from T-jump and isomerization triggered experiments obtained for room temperature (about 20° C) can be described by addition of a second unfolded state CU' as shown in Figure 6 and SI-Figure 3 a. In this model T-jump and isomerization triggered experiments at different wavelengths together with the equilibrium CD measurements can be described. To model the experimental data the additional unfolded state CU' has to be considerably higher in energy than CU i.e. has relatively small population in thermal equilibrium. In the presented model a population of about 6% at 20°C was chosen. The population of CU and the folded structure CF in this model is in line with the temperature dependent CD measurements (see Figure 2 c, SI-Table 1) and is indicated by the purple spots in SI-Figure. 3a. Furthermore a somewhat higher absorption coefficient of CU' at 1660 cm^{-1} than CU is needed for the modeling. The absorption coefficient at 1660 cm^{-1} of CU' is chosen twice as large as the absorption coefficient of CU. The states CU and CU' have no absorption at 1640 cm^{-1} where only the folded β -Hairpin structure CF absorbs. So CU' does not show up in the 1640 cm^{-1} data. The model can be compared to the experimental observations since the variation in the population of CF corresponds to the absorbance change at 1640 cm^{-1} . The absorbance change at 1660 cm^{-1} corresponds to the population changes of CU and twice the population changes of CU' as described previously.

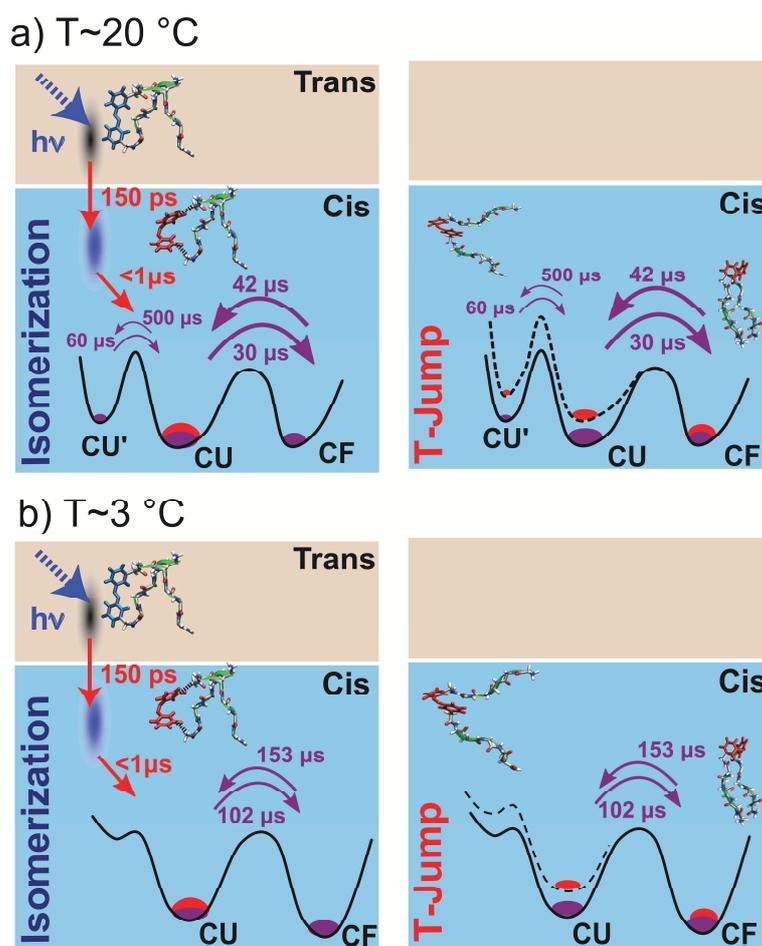
For the simulation of the T-jump experiment the initial condition is an excess population of the folded state CF (indicated by the red spot at CF in SI-Figure 3a) that develops into the thermal equilibrium (steady state population). The absorbance transients obtained from this model with the states CU', CU and CF and the rates shown in SI-Figure 3a do reproduce the kinetics measured in the T-jump experiment at 19 °C very well (see SI-Figure 4a). This model can also display the isomerization induced kinetics on the μs timescale. Here the initial condition is a population of 100% in CU as shown by the red spot in SI-Figure 3a, or a mixture with 6% in CU' and 94% in CU. For both initial conditions the model does approximate the kinetics measured in the isomerization triggered experiment very well (see SI-Fig. 4 b).

For low temperatures the time-constants obtained from the T-jump and isomerization induced experiments at 1660 cm^{-1} and 1640 cm^{-1} are all equal within the experimental errors (see SI-Table 1 and 2). In this low temperature regime a model with one folded state CF and only one unfolded state CU as shown in SI-Figure. 3 b does describe the experimental data well. A fit of the T-jump and isomerization induced data according to this model with an identical time constant at 1660 cm^{-1} and 1640 cm^{-1} is shown in SI-Figure 4 c and d. The second unfolded state CU' seems to be

energetically extremely unfavorable and has a negligible population for low temperatures.

To model the experimental results at about 20 °C and 3 °C the postulated second unfolded state CU' must have a higher absorption at 1660 cm⁻¹ than CU. This indicates that CU' might be a more extended structure with less inter-strand hydrogen-bonds than CU. Furthermore CU' has to be energetically unfavorable for low temperatures (3 °C). An extended unfolded structure with less inter-strand hydrogen-

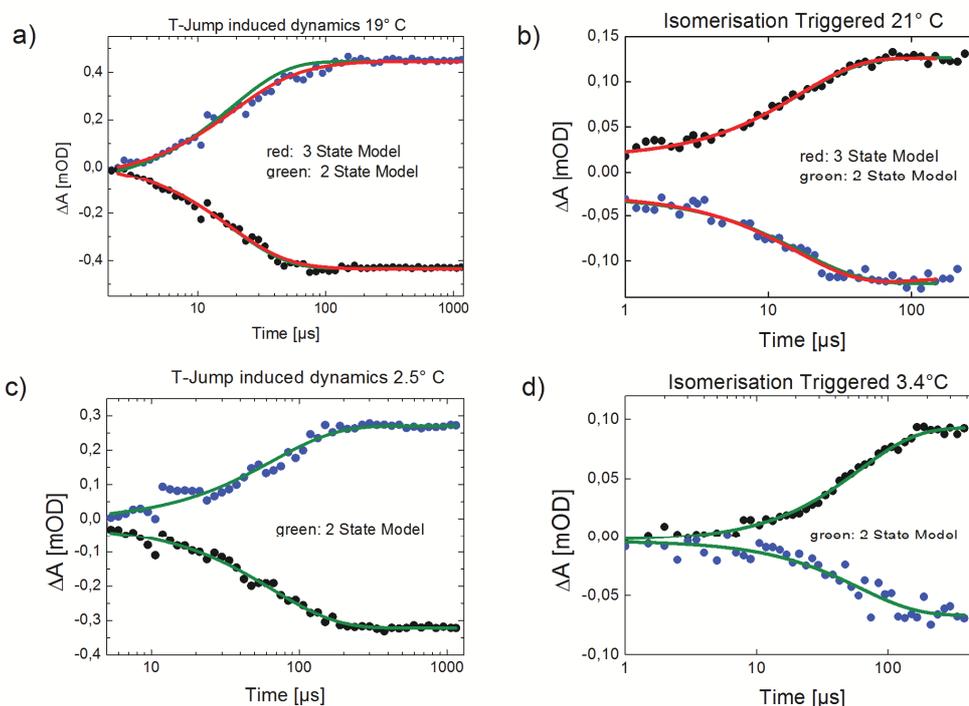
bonds than CU would have a higher entropic contribution TS in the free energy $G=H-TS$ at low temperatures. This entropic contribution would make CU' energetically unfavorable for low temperatures. In summary the proposed model points to an additional unfolded state CU' with more extended structures that have less inter-strand hydrogen-bonds than CU.



Supporting Figure 3: Reaction models for T-jump and isomerization induced peptide dynamics at different temperatures. The Free energy profile of the states CF, CU and CU' are shown not true in scale. a) Modeling of the T-jump and isomerization induced dynamics at about 20 °C with three states CF, CU and CU' in the thermal *cis*-ensemble. The steady state populations are indicated by the purple spots. In the isomerization induced process after 1 μs a population of 100% in CU is reached as indicated by the red spot. In the T-Jump experiment the rapid heating of the solvent leads to a decrease in the Free energy of the unfolded states CU and CU' and an excess population of CF (indicated by the red spot in CF). The formation of the new equilibrium (purple spots) with a higher population of CU and CU' is observed. b) At low temperatures the population of CU' is small. The T-jump and isomerization induced dynamics at about 3 °C can be described in a model with only two states CU and CF in the thermal *cis*-ensemble.

Temp.[C]	1/k (μs) at 1640 cm ⁻¹	1/k (μs) at 1660 cm ⁻¹	$\kappa = \frac{k(1640\text{ cm}^{-1})}{k(1660\text{ cm}^{-1})}$
2.5	66.2 ± 3.2	73.0 ± 5.8	1.10 (+0.15, -0.13)
4	50.0 ± 1.8		
9.7	38.6 ± 2.0	48.7 ± 2.7	1.26 (+0.14, -0.13)
12.1	34.0 ± 1.1	-	-
18.0	20.8 ± 0.6	-	-
19.0	18.4 ± 0.7	25.4 ± 1.2	1.38 (+0.12, -0.11)
27.4	10.2 ± 0.7	19.3 ± 1.6	1.89 (+0.31, -0.27)
30.1	9.5 ± 0.3	-	-

Supporting Table 2: T-jump induced dynamics at 1640 cm⁻¹ and 1640 cm⁻¹. For low temperatures the ratio κ becomes equal to one within the experimental errors.



Supporting Figure 4: a) and b) Kinetics from T-Jump and isomerization triggered experiments at about 20 °C. a) Kinetics at 1640 cm⁻¹ (black) and 1660 cm⁻¹ (blue) from T-jump experiments at 19 °C. An exponential fit with one time-constant of 18 μs according to a two-state model (green curves) deviates from the experimental data. b) Kinetics at 1640 cm⁻¹ (black) and 1660 cm⁻¹ (blue) from isomerization triggered experiments at 21 °C and exponential fit with one time-constant (green) of 16 μs. The red curves in a) and b) represent a fit result for the T-jump and isomerization triggered kinetics according to the presented model with three states CF, CU and CU' and do well approximate the data. According to this model the T-Jump induced dynamics at 1660 cm⁻¹ are approximated by a bi-exponential function which does well approximate the data. c) and d) Kinetics from T-jump experiments and isomerization experiments at about 3 °C. Exponential fits with identical time-constants at 1640 cm⁻¹ and 1660 cm⁻¹ (green) of 66 μs (T-Jump) and 61 μs (isomerization) according to a two-state-model do well approximate the data.

REFERENCES

- [1] S.-L. Dong, M. Loeweneck, T. E. Schrader, W. J. Schreier, W. Zinth, L. Moroder, C. Renner, *Chem. - Eur. J.* **2006**, *12*, 1114-1120.
- [2] T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Cordes, F. O. Koller, G. Babitzki, R. Denschlag, C. Renner, M. Loeweneck, S.-L. Dong, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 15729-15734
- [3] a) J. D. Bryngelson, J. N. Onuchic, N. D. Socci, P. G. Wolynes, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **1995**, *21*, 167-195 ; b) J. Sabelko, J. Ervin, M. Gruebele, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 6031-6036 ; c) W. A. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 5897-5899 ; d) M. M. Garcia-Mira, M. Sadqi, N. Fischer, J. M. Sanchez-Ruiz, V. Munoz, *Science* **2002**, *298*, 2191-2195.
- [4] a) G. Scott, M. Gruebele, *Journal of Computational Chemistry* **2010**, *31*, 2428-2433; b) A. Ansari, *J. Chem. Phys* **2000**, *112*, 2516-2522.
- [5] R. Zwanzig, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 2029-2030.
- [6] S. J. Hagen, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2007**, *68*, 205-217
- [7] a) S. Chandrasekhar, *Rev. Mod. Phys.* **1943**, *15*, 1-89 ; b) S. Xiao-Jun, L. Xiao-Xia, Y. Yu-Liang, D. Jun-Feng, Z. Jing-Shang, *Commun. Theor. Phys.* **2005**, *43*, 1099-1104.

5 Amyloid-Aggregate lichtschtbarer Peptide

In diesen Kapiteln wird eine Modifikation des im vorherigen Abschnitt untersuchten Peptids ATZ vorgestellt: Durch die Acetylierung des N-Terminus von ATZ ändern sich die Eigenschaften des Peptids grundlegend. Bei dem acetylierten Peptid AcATZ mit dem Azobenzolfarbstoff in *trans* wird hier eine Aggregation in die in Abschnitt 2.3 beschriebenen Amyloid-Strukturen beobachtet. Durch die lichtinduzierte Isomerisierung des Farbstoffs von *trans* nach *cis* können diese Aggregate aufgelöst werden. Nach unserem Wissen ist dies die erste Arbeit, in der gezeigt wird, dass die Aggregation von Peptiden in Amyloid-Strukturen über einen in die Aminosäurekette eingebauten Photoschalter kontrolliert und sogar wieder rückgängig gemacht werden kann. Das hier vorgestellte Verfahren kann für die Entwicklung neuer Amyloid-basierter Biomaterialien eine Rolle spielen. Zum anderen wurde es bereits in den letzten zwei Jahren von anderen Gruppen aufgegriffen und bei der Erforschung der Mechanismen der Proteinaggregation und von neurodegenerativen Erkrankungen verwendet [134, 135]. In Abschnitt 5.1 werden die Amyloid-Aggregate der lichtschtbaren Peptide charakterisiert und gezeigt, wie die Aggregation und Deaggregation durch lichtinduzierte Isomerisierung des Farbstoffs von *trans* nach *cis* und vice versa kontrolliert werden kann. Im darauf folgenden Abschnitt 5.2 wird dann der lichtinduzierte Deaggregationsprozess auf Zeitskalen von Nanosekunden bis Minuten genauer untersucht.

5.1 Lichtinduzierte Aggregation und Deaggregation von Amyloid-Strukturen

Die optische Kontrolle der Aggregation und Deaggregation von Amyloid-Strukturen sind zusammengefasst in der in diesem Abschnitt dargestellten Publikation:

”Light-Triggered Aggregation and Disassembly of Amyloid-Like Structures” von Andreas A. Deeg, Tobias E. Schrader, Susanne Kempter, Jose Pfizer, Luis Moroder und Wolfgang Zinth, ChemPhysChem, Band 12, Seiten 559 – 562, 2011 [42].

DOI: 10.1002/cphc.201001012

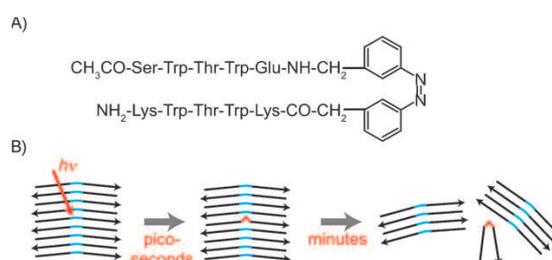
Light-Triggered Aggregation and Disassembly of Amyloid-Like Structures

Andreas A. Deeg,^[a] Tobias E. Schrader,^[b] Susanne Kempter,^[c] Jose Pfizer,^[d] Luis Moroder,^[d] and Wolfgang Zinth^{*[a]}

Self-assembly and aggregation of proteins or peptides into amyloid fibrils have attracted wide attention due to their high relevance for a variety of amyloid-related diseases.^[1–3] Furthermore, amyloids show interesting material properties which make them ideal candidates for the production of nanostructures and molecular nanobiomaterials, where building blocks may be varied by protein engineering techniques.^[4,5] A rapidly emerging field is the control of aggregation by external means such as pH value or illumination of caged compounds, which allows the investigation of the basic principles of amyloid aggregation and the development of new nanobiomaterials.^[6–13] In this context we report on a new peptide system where a chromophore is integrated in the backbone and where illumination not only controls aggregation but the disassembly of amyloid-like structures.

Recently, a model peptide was synthesized containing the azobenzene derivative [3-(3-aminomethyl)phenylazo]phenylacetic acid (AMPP) as a backbone element in the central part of the amino acid sequence.^[14] The design of this molecule, inspired by the TrpZip2 hairpin peptide,^[15] yielded a β -hairpin-like structure when AMPP was in the *cis* form. For the *trans* form of the AMPP switch the peptide exhibits no β -hairpin character. Illumination of AMPP in the *cis* form causes the isomerization of the switch to the *trans* form and rapid unfolding of the hairpin fold within 1 ns.^[16] A solution of AzoTrpZip2 molecules dissolved in perdeuterated methanol ($[D_4]MeOH$) was highly stable. Only after several months did the IR absorption spectra show indications of sample aggregation. The AzoTrpZip2 molecule contained an amidated C-terminus and a free N-terminus which should be positively charged at neutral pH as it was isolated as trifluoroacetate upon HPLC purification.^[14] In order to obtain uncharged ends of the peptide, the N-termi-

nus of AzoTrpZip2 was acetylated for the present work (Scheme 1A). This modified peptide (ac-AzoTrpZip2) tends to aggregate into amyloid-like structures under conditions where the parent AzoTrpZip2 samples remained monomeric.



Scheme 1. A) Structure of the ac-AzoTrpZip2 peptide showing aggregation and light-induced disassembly. B) Model of the light-induced disassembly. After the picosecond isomerization step it takes minutes before the defect formed by the isomerized AMPP disrupts the amyloid-like structure.

Aggregation to amyloids has been studied in the past by the use of various techniques, such as transmission electron microscopy (TEM), circular dichroism (CD), mid-IR spectroscopy, and H–D exchange.^[1,17,18] Information on the size of aggregates was obtained by dynamic light, X-ray, and neutron scattering or by Fourier transform IR (FTIR) spectroscopy.^[1,19] Herein we used FTIR spectroscopy, H–D exchange and TEM to characterize the aggregation of ac-AzoTrpZip2. FTIR yields quantitative information on the secondary structure and aggregation through the absorption bands in the 1615 to 1630 cm^{-1} range.^[19] H–D exchange monitors the accessibility of amide groups to the solvent and thus the degree of aggregation. TEM images are used to obtain a qualitative view of the morphology of the aggregated peptides.

Results of FTIR experiments are shown in Figure 1 for a concentration of ac-AzoTrpZip2 of 3.3 mM in $[D_4]MeOH$. Figure 1A shows the absorbance of the sample approximately 1 h after dissolving the lyophilized sample (black curve) and after seven days (blue curve). The two bands at 1450 cm^{-1} and 1550 cm^{-1} are related to the amide II vibrations of deuterated and undeuterated peptides,^[20,21] respectively, and reflect the ongoing deuteration of the amide group in the $[D_4]MeOH$ solution. The large amplitude of the 1550 cm^{-1} band observed 1 h after dissolution indicates that a considerable amount of undeuterated amide groups is still present. This observation indicates that the sample contains aggregated structures with strongly reduced accessibility of the amide groups to the deuterated solvent, because in the case of monomeric samples of AzoTrpZip2 H–D exchange is completed already within 30 min. The ab-

[a] A. A. Deeg, Prof. Dr. W. Zinth
BioMolecular Optic and Munich Center for Integrated Protein Science
CIPSM
Ludwig-Maximilians-Universität München
Oettingenstr. 67, 80538 Munich (Germany)
Fax: (+49) 89-2180-9202
E-mail: wolfgang.zinth@physik.uni-muenchen.de

[b] Dr. T. E. Schrader
Jülich Centre for Neutron Science
Lichtenbergstr. 1, 85747 Garching, (Germany)

[c] S. Kempter
Center for Nanoscience, LMU Munich,
Geschwister-Scholl-Platz 1, 80539 Munich, (Germany)

[d] Dr. J. Pfizer, Prof. Dr. L. Moroder
Bioorganic Chemistry, Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, (Germany)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201001012>.

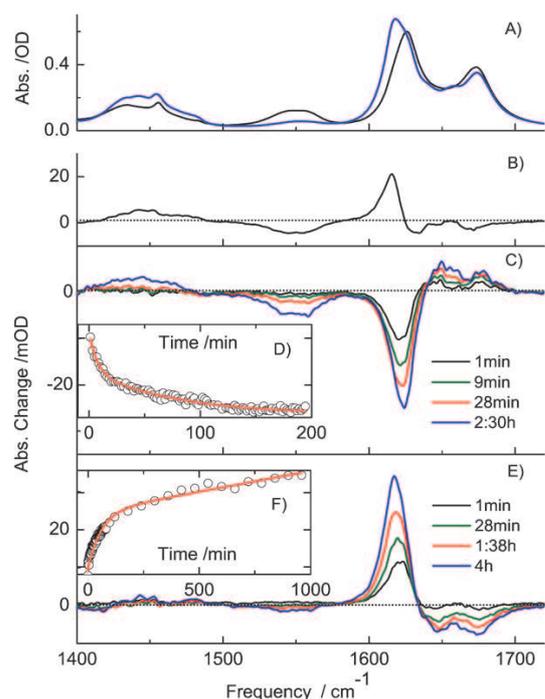


Figure 1. FTIR data of the aggregation and disassembly processes. A) and B) Absorption (difference) spectra recorded during the aggregation process. C) and D) Absorption changes induced by photoisomerization of the AMPP chromophore are related to the disassembly of the amyloid-like structure. E) and F) Processes after reisomerization to the *trans* form during (re)formation of the amyloid-like structure.

sorptions in the range of the amide I band at 1600 cm^{-1} – 1700 cm^{-1} are due to the amide groups of the peptide and due to contributions from trifluoroacetic acid (TFA, 1675 cm^{-1}).

Figure 1A shows pronounced changes in the region at about 1620 cm^{-1} where the absorption peak is shifted from 1626 cm^{-1} to 1618 cm^{-1} with time. The absorption changes during a period of 6 h starting 13 h after initial sample preparation (see Figure 1B), and shows an increase in the absorption at 1616 cm^{-1} and a weaker decrease at higher frequencies. According to the literature a pronounced absorption band at about 1620 cm^{-1} is an indication for aggregation of peptide molecules and for the formation of amyloid-like structures.^[1,19–21] The observed shift of the absorption band to 1618 cm^{-1} and its increase in intensity clearly show that amyloid-like structures are formed and that their size increases with time.^[19] As AMPP is in its *trans* configuration during the whole aggregation process, aggregation occurs for the extended *trans*-azobenzene peptide structure.

Information on the morphology of aggregated peptides is obtained by TEM images taken for ac-AzoTrpZip2 samples (concentration 0.9 mM) at different time intervals after sample preparation. For freshly dissolved samples the TEM images do not show any indication for amyloid-like aggregation. TEM pictures of samples collected 18 h after sample preparation (Figure 2A) indicate formation of linear structures. At later times, for example at $t=68\text{ h}$ (Figure 2B), the TEM image displays

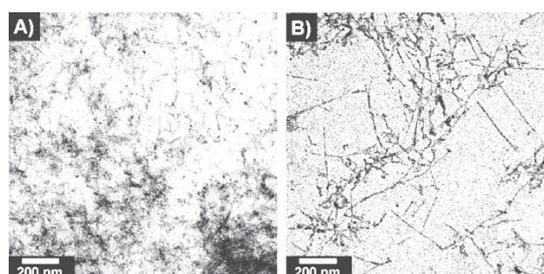


Figure 2. Transmission electron microscopy images recorded A) 18 h and B) 68 h after initial sample preparation, showing clear indications for the formation of amyloid-like structures.

sharp rod-shaped, amyloid-like structures of about 10 nm in width and several 100 nm in length.

Information on the dynamics of light-induced structural changes is obtained by FTIR spectroscopy of samples illuminated by UV light. Figures 1C,D show absorption difference data taken after irradiation of the sample at 365 nm (1 min illumination, 10 mW , sample volume $69\text{ }\mu\text{L}^3$, $c=3.3\text{ mM}$, $t=22\text{ h}$ after sample preparation) which switched a fraction of $\sim 10\%$ of the AMPP molecules to the *cis* form. The difference spectra were obtained by subtracting the reference spectrum recorded immediately prior to UV illumination from spectra recorded at specific times after illumination. Just 1 min after illumination we observe an absorption decrease in the band at 1620 cm^{-1} and a weak increase at higher frequencies. (Qualitatively similar observations have been obtained with strongly aggregated samples, for example, at $t=7\text{ d}$, see the Supporting Information.) The change in absorption demonstrates that isomerization of the AMPP chromophore leads to dissolution of aggregated structures and to formation of (monomeric) peptides absorbing at about 1640 and 1680 cm^{-1} (β -hairpin-like or unstructured peptides).^[19–21] This interpretation is supported by the absorption features in the amide II range which monitor the deuteration of the amide groups. In Figure 3A the absorption at 1550 cm^{-1} is plotted as a function of time before and

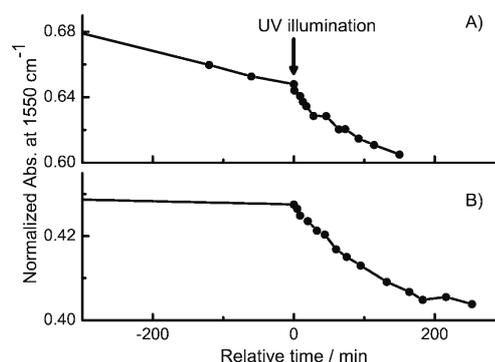


Figure 3. Absorption at 1550 cm^{-1} (normalized to the absorption recorded 1 h after dissolving the solid sample) plotted as a function of time. The absorption signal at 1550 cm^{-1} reflects the amount of amide groups prior to H–D exchange. UV illumination (for 1 min) at A) $t=22\text{ h}$ and B) $t=7\text{ d}$ leads to an increased H–D exchange rate.

after illumination at $t=22$ h (see Figure 1C). The amplitude of the signal represents the amount of undeuterated amide groups. Before illumination the amplitude slowly decays with time due to the small solvent accessibility of amide groups in the aggregates. After illumination the signal decays at higher rates, indicating a strongly accelerated H–D exchange process. This is due to an increased solvent accessibility related to the dissolution of aggregated structures. In Figure 3B the illumination process was repeated at $t=7$ d. Before illumination the signal decrease (i. e. deuteration of amide groups) is very slow. Apparently, the amide groups in the long-time aggregated sample have a very limited solvent accessibility. Illumination of these samples again leads to a strong acceleration of H–D exchange as evidenced by the fast decay of the signal. This observation confirms that light-induced disaggregation occurs even for larger aggregates.

Investigations of the illumination-induced disassembly processes were also performed with TEM imaging (see the Supporting Information). At different degrees of illumination we observe qualitatively the disappearance of aggregated structures. Very long illumination periods, however, do not only decrease the number of aggregates but also lead to the formation of larger precipitates.

Information on disaggregation dynamics is obtained from Figures 1C,D. It is highly surprising that the amplitude of the signal change, indicating the dissolution of aggregates, continues to grow beyond the period of illumination. These processes proceed up to time scales of ~ 200 min as illustrated in Figure 1D, showing the change in absorption recorded at 1623 cm^{-1} . Apparently the isomerization of the AMPP chromophore from *trans* to *cis*, which is known to occur on the time scale of femtoseconds to picoseconds,^[16,22] does not immediately disrupt the aggregated amyloid-like structures in a force-driven process. More likely the modified AMPP conformation induces local strain in the surrounding molecular assembly and leads to a defect, that is, an energetically unfavored location within the aggregate. It is only on a much longer time scale that thermal processes disintegrate the aggregate at the position of the *cis*-AMPP. Finally, the *cis*-peptide is released into the solution where it may form a β -hairpin-like structure. A closer inspection of the difference spectra of Figure 1C reveals that details in the spectral shape change with time. This feature is due to the fact that only a small fraction of the sample was switched by light to the *cis* form and that the remaining *trans* fraction continues to aggregate during the observation time.

Figures 1E,F display data recorded after light-induced reconversion of *cis*-AMPP molecules to the *trans* form (by illumination at longer wavelengths >400 nm for 3 min) at $t=26$ h after initial sample preparation. The switching of AMPP from *cis* to *trans* induces changes in absorption characteristic of aggregation of peptides. This reaggregation process contains a fast component with a time constant of ca. 60 min related to the reaggregation of photo-disassembled amyloids, demonstrating the reversibility of the process. The further linear increase of about 0.01 mOD min^{-1} represents the long-lasting aggregation processes discussed above (see Figures 1A,B).

In a quantitative experiment we investigated the *trans*-to-*cis* isomerization yield of the AMPP chromophore for the nonaggregated AzoTrpZip2 ($c=1.4$ mm) peptide and an aggregated sample of ac-AzoTrpZip2 ($c=3.3$ mm, $t=1$ h and $t=42$ h after preparation). The experiment shows that: 1) Illumination of both samples with light at 365 nm leads to a decrease in the 325 nm *trans*-azobenzene band (see spectrum in the Supporting Information) related to *trans*-to-*cis* isomerization. 2) The absorption remains constant after the illumination period for a time range where the IR spectrum (see Figure 1C) shows pronounced absorption dynamics. 3) The isomerization yield of the aggregated sample was smaller by a factor of 10. This indicates that the rigid environment of the AMPP molecules in the amyloid-like structure exerts constraints that impede isomerization.

The pronounced differences in aggregation propensity between AzoTrpZip2 and ac-AzoTrpZip2 indicate that the charge at the N-terminus of AzoTrpZip2 prevents aggregation. For AzoTrpZip2 the forces promoting aggregation to larger structures, such as hydrophobic interactions and interstrand hydrogen bonding, appear to be balanced by electrostatic repulsion of the charges at Lys, Glu and the N-terminus. For ac-AzoTrpZip2 in an antiparallel arrangement attractive electrostatic interactions may favor aggregate formation. Indeed, the small frequency of 1618 cm^{-1} of the aggregate band supports the interpretation that antiparallel β -structures are present. However, the related weak band at 1680 cm^{-1} , often taken as an additional indication for antiparallel β -sheet structures, could not be identified, presumably due to overlap with other bands.^[1,19–21]

In conclusion, we have presented a light-switchable azobenzene peptide which can aggregate into amyloid-like structures when the azobenzene chromophore AMPP is in the *trans* form. The amyloid-like structure has been confirmed by FTIR and TEM and an arrangement with antiparallel strands is likely. Illumination of the aggregates causes *trans*-to-*cis* isomerization of AMPP which leads to local structural defects that subsequently provoke disaggregation on the time scale of minutes. The specific properties of the presented azobenzene peptide make it an interesting prototype for further studies and suitable for a number of potential applications which rely on light-induced changes in functionality and structure.

Experimental Section

The peptide Ac-Ser-Trp-Thr-Trp-Glu-AMPP-Lys-Trp-Thr-Trp-Lys-NH₂ was synthesized as reported previously for the parent nonacetylated AzoTrpZip2,^[14] which was acetylated on MBHA Rink-Amide resin LL (Novabiochem, L aufelfingen, Switzerland) with 5% Ac₂O/6% 2,4-lutidine in DMF. Upon cleavage/deprotection with 95% aqueous TFA containing 2% TIPS for 3 h, the crude product was precipitated with methyl-*tert*-butyl ether/petroleum ether, dissolved in 20% AcOH/*tert*-butanol and lyophilized. The crude product was purified by HPLC as described for AzoTrpZip2. Yield: 15%; peptide content determined spectroscopically: 68%; ESI-MS (LC-microTOF, Bruker Daltonics, Bremen): $m/z=865.423$ [$M+2H$]²⁺; $M_r=1728.820$ calcd. for C₈₉H₁₀₈N₂₀O₁₇; HPLC (EC 125/4 Nucleosil 100-5 C8; linear gradient from 2% H₃PO₄/AcCN, 95:5, to 2% H₃PO₄/AcCN, 10:90): homo-

geneous as *trans*-azobenzene peptide ($t_r=7.7$ min); upon illumination at 360 nm 82.3% *cis*-azobenzene peptide is formed ($t_r=7.4$ min). Prior to the experiments the sample was dissolved in perdeuterated methanol (Sigma Aldrich, 99.8%) to yield a concentration of 0.9 mM for TEM and 3.3 mM for FTIR spectroscopy, respectively.

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy: IR absorbance spectra were recorded with an IFS66 FTIR spectrometer (resolution 2 cm^{-1} , Bruker). The displayed spectra were corrected for background absorption of the solvent $[D_6]MeOH$.

Transmission Electron Microscopy (TEM): TEM images were obtained using a droplet ($1\mu\text{l}$) of the solution sample placed on a TEM grid, dried and stained by a uranyl acetate water solution. Images were recorded with a TEM JEM-1011 from JEOL, operated at 100 kV.

Acknowledgements

The authors thank M. Brennich, H. Strzalka, U. Zinth for helpful discussions and J. Rädler for the access to TEM. The work was supported by the German Science Foundation SFB749.

Keywords: amyloid-disassembly · azobenzene · nanostructures · peptides · self-assembly

- [1] I. W. Hamley, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8274–8295; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8128–8147.
- [2] E. D. Roberson, L. Mucke, *Science* **2006**, *314*, 781–784.
- [3] P. Westermark, M. D. Benson, J. N. Buxbaum, A. S. Cohen, B. Frangione, S.-I. Ikeda, C. L. Masters, G. Merlini, M. J. Saraiva, J. D. Sipe, *Amyloid* **2007**, *14*, 179–183.
- [4] T. P. Knowles, A. W. Fitzpatrick, S. Meehan, H. R. Mott, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, M. E. Welland, *Science* **2007**, *318*, 1900–1903.
- [5] I. Cherny, E. Gazit, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4128–4136; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4062–4069.
- [6] J. H. Collier, B. H. Hu, J. W. Ruberti, J. Zhang, P. Shum, D. H. Thompson, P. B. Messersmith, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9463–9464.
- [7] J. P. Schneider, D. J. Pochan, B. Ozbas, K. Rajagopal, L. Pakstis, J. Kretzinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15030–15037.
- [8] J. T. Meijer, M. Henckens, I. J. Minten, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. v. Hest, *Soft Matter* **2007**, *3*, 1135–1137.
- [9] K. Pagel, B. Koksich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 730–739.
- [10] T. Muraoka, C.-Y. Koh, H. Cui, S. I. Stupp, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6060–6063; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5946–5949.
- [11] C. J. Bosques and B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7530–7531.
- [12] S. Dos Santos, A. Chandravarkar, B. Mandel, R. Mimna, K. Murat, L. Saucedo, P. Tella, G. Tuchscherer, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11888–11889.
- [13] A. Taniguchi, Y. Sohma, M. Kimura, T. Okada, K. Ikeda, Y. Hayashi, T. Kimura, S. Hirota, K. Matsuzaki, Y. Kiso, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 696–697.
- [14] S.-L. Dong, M. Löweneck, T. E. Schrader, W. J. Schreier, W. Zinth, L. Moroder, C. Renner, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1114–1120.
- [15] A. G. Cochran, N. J. Skelton, M. A. Starovasnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5578–5583.
- [16] T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Cordes, F. O. Koller, G. Babitzki, R. Denschlag, C. Renner, M. Löweneck, S.-L. Dong, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15729–15734.
- [17] M. R. Nilsson, *Methods* **2004**, *34*, 151–160.
- [18] I. Kheterpal, S. Zhou, K. D. Cook, R. Wetzler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13597–13601.
- [19] A. Perálvarez-Marín, A. Barth, A. Gräslund, *J. Mol. Biol.* **2008**, *379*, 589–596.
- [20] H. Hiramatsu, T. Kitagawa, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2005**, *1753*, 100–107.
- [21] M. Jackson, H. H. Mantsch, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*, 95–120.
- [22] T. Nägele, R. Hoche, W. Zinth, J. Wachtveitl, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *272*, 489–495.

Received: December 6, 2010

Published online on December 27, 2010

CHEMPHYSICHEM

Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2010

Light-Triggered Aggregation and Disassembly of Amyloid-Like Structures

Andreas A. Deeg,^[a] Tobias E. Schrader,^[b] Susanne Kempter,^[c] Jose Pfizer,^[d] Luis Moroder,^[d] and
Wolfgang Zinth^{*[a]}

cphc_201001012_sm_miscellaneous_information.pdf

Supporting Information:

Outline:

Methods and experimental details

1. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

a) Technical details

b) Disassembly and aggregation at $t = 7$ d

2. UV/vis Spectroscopy

3. Transmission electron microscopy (TEM)

a) Technical details

b) TEM-images after illumination of aggregates

4. Influence TFA on FTIR-spectra

Methods and experimental details

1. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

a) Technical details

IR absorbance spectra were recorded with an IFS66 FTIR spectrometer (resolution 2 cm^{-1} ; Bruker). The background from the solvent methanol- d_4 was subtracted from the absorbance spectra.

The photo-isomerization state of the azobenzene chromophore was modified in the sample chamber by appropriate illumination via optical fibers. Illumination A: For the switching from *cis* to *trans* light from a KLC 2500 light source (Schott, Mainz) equipped with a fibre bundle (diameter 5 mm) and a GG 400 long-pass filter (Schott) was used. The output power was 1.4 W. The distance from the end of the fiber to the cuvette was approximately 3 cm. It should be noted, that only a minor fraction of the illuminated power was absorbed by the azobenzene peptides. This illumination generated a photostationary state within minutes.

Illumination B: For *trans* to *cis* isomerization the light was obtained from a Xenon arc lamp (Oriel, Mod 6140) equipped with a water filter and UG 11 and WG 320 glass filters (Schott) and transferred to the sample chamber by a liquid lightguide fiber (Lumatec, Series 300, 3 mm). The distance from the end of the fiber to the cuvette (diameter of the irradiated sample of 2 cm) was approximately 3 cm. The illumination power at the sample cuvette was 10 mW.

For this type of illumination the respective photostationary state was reached within more than 10 min.

Sample handling: The lyophilized sample powder was dissolved in per-deuterated methanol at the concentrations given in the text. The solution was sandwiched between two CaF_2 windows (Teflon spacer: 220 μm) and stored at room temperature. The illumination and data recording schedule was as follows: At time $t = 1$ h after the start of sample preparation the first spectrum (Fig 1 A) was recorded. Subsequent to the first spectrum the sample was illuminated by UV light (illumination B) for 1 min, 1 h later, by visible light (illumination A) for 2 min and the induced IR absorbance changes were recorded. Another hour later this procedure was repeated. Subsequently the sample was stored in the dark at room temperature. At $t = 13$ h and 19 h IR spectra were recorded. The difference of these spectra is shown in Figure 1 B. At $t = 22$ h the illumination cycle shown in Fig. 1C to D was recorded: At the beginning an IR absorbance spectrum was taken as a reference. 3 min afterwards the sample was illuminated by UV light (illumination B) for 1 min.

Subsequently IR absorbance spectra (integration time 55 s) were recorded for 190 min. With the help of the reference spectrum the absorption difference spectra given Figure 1 C were calculated. 4 h after the UV illumination of the sample a further reference spectrum was recorded.

Subsequently the sample was exposed to visible light (illumination A) for 3 min and the absorbance was measured for 16 h (55s integration time, Figure 1 E, F). At $t = 42$ h and $t = 162$ h (7 days) after the initial sample preparation the illumination procedure and the measurement of the light induced IR absorbance changes were repeated. Before the final illumination procedure the absorbance spectrum of Figure 1 A, blue curve, was recorded.

b) Disassembly and aggregation at $t = 7$ d

Fig. S1 shows the FTIR absorption difference spectra recorded 7 days after preparation of the sample. The observed absorption changes are similar to the ones observed at $T = 22$ h (see Fig. 1C and E). There are absorption changes characteristic for the light induced disassembly of aggregates (A) as well as the reformation of aggregated peptides (B) observed after back-illumination to the *trans* form. It should be noted, that (i) the observed amplitudes of light induced absorption changes are slightly reduced as compared to those observed at $t = 22$ h and that (ii) aggregation processes (not induced by light) continue during the observation period. These results clearly show that even the arrangement of highly aggregated structures present at $t = 7$ d can be switched by illumination.

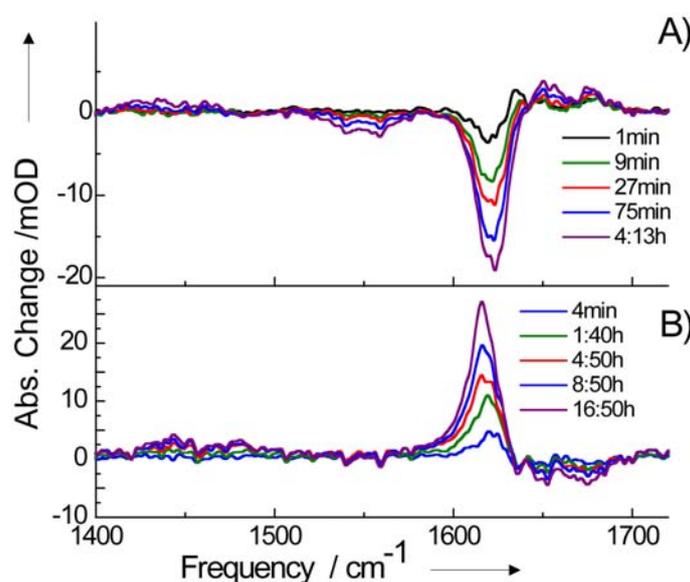


Figure S1: FTIR data from the disassembly and aggregation processes at 7 days after preparation of the sample. (A) Absorption changes induced by photoisomerization of the AMPP chromophore related to the disassembly of the amyloid-like structure. (B) Processes after reisomerization to the *trans*-form during (re)formation of the amyloid-like structure.

2. UV/vis Spectroscopy

UV/vis absorbance spectra were recorded with an PerkinElmer Lambda 750 UV/vis spectrometer in the range of 600 – 200 nm and an resolution of 2 nm.

For each illumination - FTIR detection cycle the visible absorption spectrum of the sample was measured before and after the infrared measurement. At the $t = 42$ h illumination cycle the visible absorption spectrum was measured directly (within 30s) after UV illumination (1 min Illumination B). With 70 s recording time of each spectrum we followed the evolution of the UV/vis absorption spectrum. The first spectrum taken immediately after UV illumination represented absorption changes related to the *trans* to *cis* isomerization.

For the next hour no further absorption change indicative for chromophore isomerization was observed. Typically the UV illumination was leading to an isomerization from *trans* to *cis* of 12 % (experiment 1 h after initial sample preparation) and 8% (at $t = 7$ d).

The percentage of *cis* isomers was calculated using the assumption that the *cis* sample has vanishing absorption at 340nm. Taking into account the total absorbance of the sample of 76% at 365 nm, a 10 mW illumination power and the cuvette volume of 69 μ l, one deduces a quantum yield of ~2% for the *trans* to *cis* isomerization of the aggregated ac-AzoTrpZip2.

In another experiment the quantum yield for the *trans* to *cis* isomerization was measured for a monomeric 1.4 mM AzoTrpZip2 sample. We obtained a quantum yield for the *trans* to *cis* isomerization of ~20% .

UV/vis absorption spectra of ac-AzoTrpZip2 are presented in Fig. S2. They show differences induced by isomerization of the azobenzene chromophore. In addition the spectra indicate that the aggregation process influences the electronic spectrum of the azobenzene chromophore.

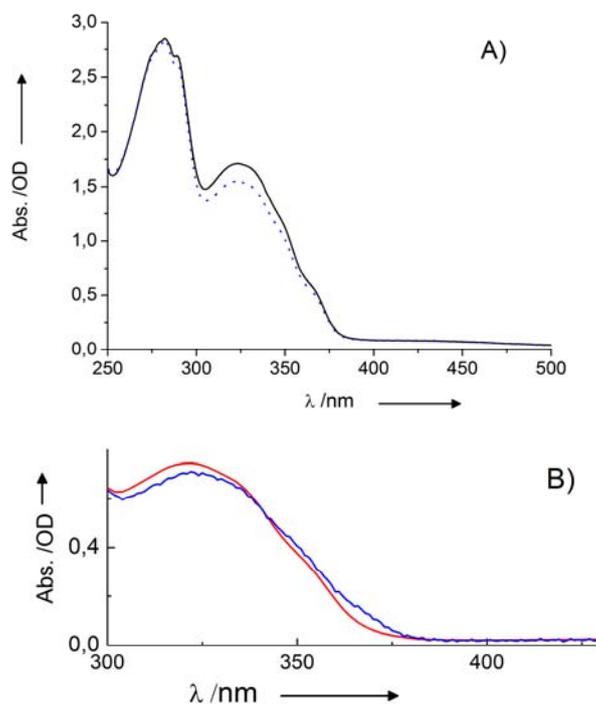


Figure S2: UV/vis absorption spectra (A) of ac-AzoTrpZip2 recorded before ($t=22\text{h}$, black curve) and after ($t=25\text{h}$, blue curve, dotted) illumination by UV light at 370 nm which induces the isomerization to the *cis* form of the azobenzene chromophore. The decrease of the *trans*-absorption band at 325 nm is clearly visible. (B) The absorption spectrum of ac-AzoTrpZip2 ($c=0.9\text{ mM}$, 4 days in solution, blue curve) containing aggregated structures shows deviations from the absorption spectrum of (not aggregated) AzoTrpZip2 (1.4 mM, scaled, red curve). The spectra in (B) indicate that the aggregation process influences the electronic spectrum of the azobenzene chromophore.

3. Transmission electron microscopy (TEM)

a) Technical details

TEM was performed at the Center for Nanoscience, University of Munich. A droplet of the sample ($1\ \mu\text{l}$) was placed on a TEM grid (Formvar/Carbon on 300 MESH Copper, Agar Scientific) and dried. Subsequently the grid was placed on top of a $10\ \mu\text{l}$ droplet of uranyl acetate water solution (1 % w/w) for 30 s, washed with water for 60 s and dried. The stained grids were imaged with the TEM JEM-1011 from JEOL, operated at 100 kV. From the freshly prepared sample ($c=0.9\text{ mM}$) TEM grids were prepared by the procedure given above at $t=1\text{ h}$, 5 h, 10 h, 18 h, 30 h, 42 h, 53 h, 68 h and 94h. FTIR-spectra of this sample at $t=1\text{ h}$, 45 h and 94 h were recorded (Teflon spacer, $90\ \mu\text{m}$, see Figure S3 A, B).

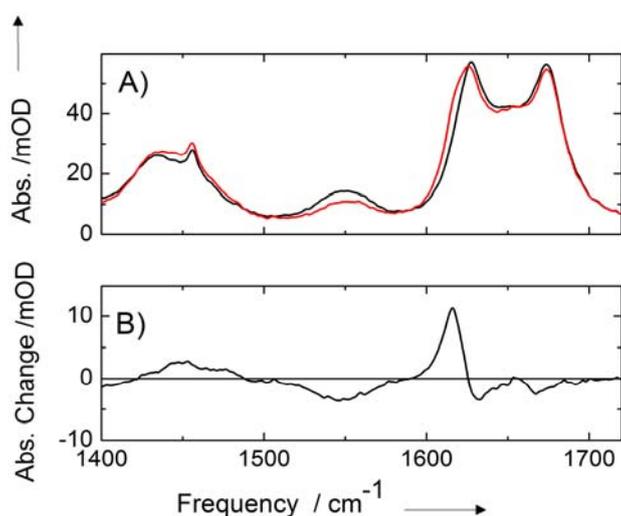


Figure S3: A) FTIR-spectra of the sample used to record TEM images after $t = 1\text{ h}$ (black) and 45 h (red). B) The difference of the spectra of A) shows again the absorption changes indicative of aggregation of ac-AzoTrpZip2 to amyloid-like structures.

b) TEM-images after illumination of aggregates

TEM-images have been recorded to give a qualitative view of the action of extended illumination of the sample. In Fig. S4 we show images on a sample which was investigated four days after initial preparation ($c = 0.9\text{ mM}$). The sample solutions are treated as given above with the only exception that they are diluted by a factor of $1/9$ (in methanol D_4) prior to staining. $1\mu\text{l}$ of this solution was used for each TEM-grid. Fig. S4 A) shows the situation of a sample solution which was not illuminated. It shows the typical amyloid-like structures. Image B) was obtained from a sample illuminated for 6 min by UV-light. Here we observe a reduced frequency of aggregated structures. However the TEM images alone can not be used to quantify the disassembly of amyloid-like structures. Strongly increased illumination times (21 min, C) cause a further decrease of the frequency of the aggregated structures but in addition some larger conglomerates become visible (see Fig. S4 D).

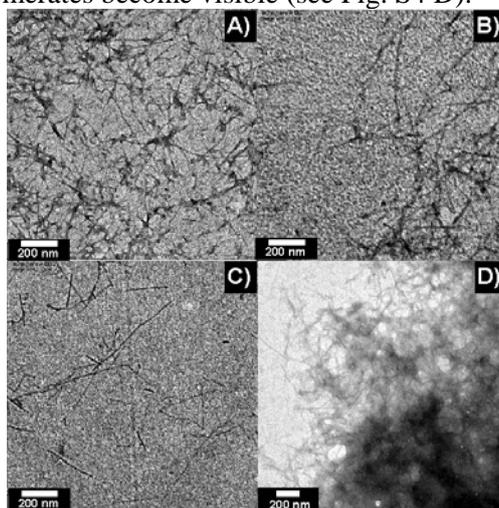


Figure S4: A) TEM image from the solution 4 days after initial preparation. B) Same solution but 6 min UV illumination prior to TEM-grid preparation. C) After 21 min UV illumination the frequency of aggregates decreases further on but some larger conglomerates become visible (D).

4. Influence of TFA

The peak in the IR-absorption spectrum around 1675 cm^{-1} of ac-AzoTrpZip2 in methanol- d_4 (see Fig. S5 A, black cuve) can be attributed to traces of trifluoroacetic acid (TFA) remaining from the synthesis of the peptide.

The amount of TFA in the sample can be deduced from the IR-absorbance peak of TFA around 1200 cm^{-1} (Figure S5 C) and its contribution to the peptide spectrum can be removed by use of a reference spectrum from sodium-trifluoroacetate (98% , Sigma Aldrich) in methanol- d_4 (Figure S5 C). The resulting pure peptide spectrum is shown in Figure S5 A as the blue curve. Fig. S5 B gives a measure for the quality of the subtraction process by showing the spectra before (black) and after the subtraction process in the low frequency range. In this context we should thank Prof. A. Tokmakoff for communicating to us the importance of TFA absorption bands.

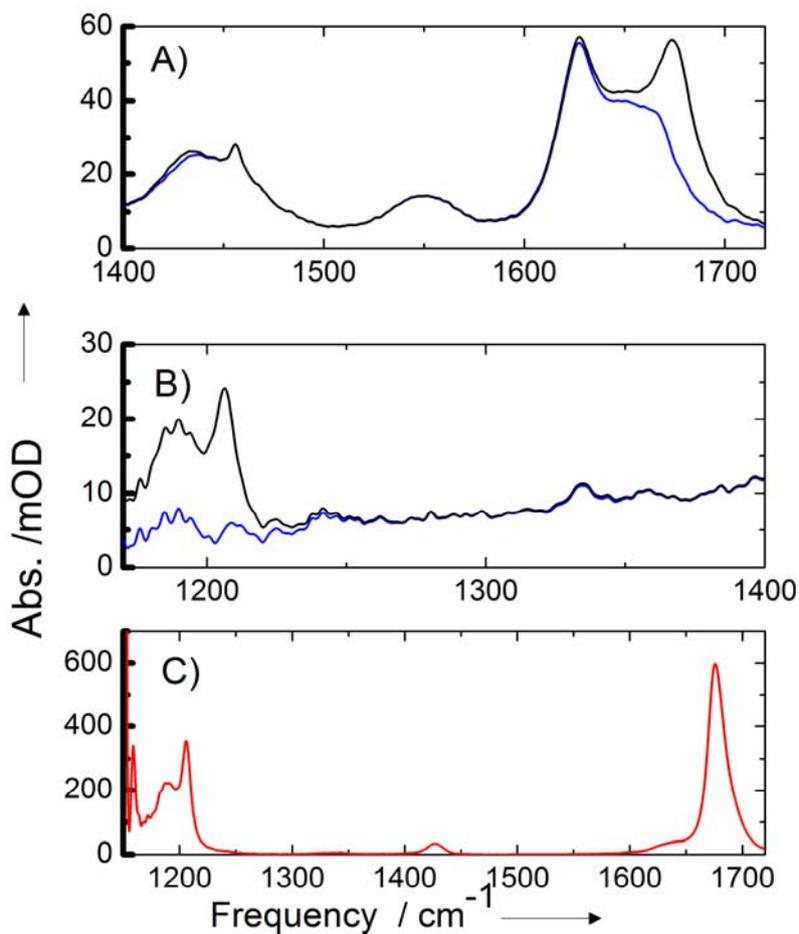


Figure S5: FTIR spectra of the 0.9 mM TEM sample at $t = 1\text{h}$ with (blue) and without (black) TFA correction in the range of peptide (A) and TFA absorption bands (B). C) FTIR spectrum of 20 mM sodium-trifluoroacetate.

5.2 Lichtinduziertes Auflösen von Amyloid-Aggregaten: Strukturänderungen von ns - min.

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Licht- bzw. Isomerisierungs-induzierte Deaggregation der Amyloid-Strukturen auf der Zeitskala von Sekunden bis Minuten abläuft. Die Isomerisierungsreaktion von Azobenzol und auch von in Peptidstrukturen eingebautem Azobenzol ist jedoch ein ultraschneller Prozess, der auf der Zeitskala von Pikosekunden abläuft [136, 137, 112]. Hieraus ergibt sich die Frage, ob und wenn ja, welche strukturellen Änderungen in den Amyloiden kurz nach Anregung des Azobenzolschalters ablaufen. In diesem Abschnitt werden hierzu die lichtinduzierten strukturellen Änderungen der Amyloide auf Zeitskalen von Nanosekunden bis Minuten über MIR-Anreg-Abtast-Spektroskopie und FTIR-Spektroskopie untersucht. Die experimentellen Ergebnisse sind zusammengefasst in der in diesem Abschnitt dargestellten Publikation:

”Amyloid-Like Structures Formed by Azobenzene Peptides: Light-Triggered Disassembly” von Andreas A. Deeg, Tobias E. Schrader, Halina Strzalka, Jose Pfizer, Luis Moroder und Wolfgang Zinth, *Spectroscopy: An International Journal*, Band 27, Seiten 387-391, 2012 [43].

Amyloid-Like Structures Formed by Azobenzene Peptides: Light-Triggered Disassembly

Andreas A. Deeg,¹ Tobias E. Schrader,² Halina Strzalka,^{1,3} Jose Pfizer,⁴ Luis Moroder,⁴ and Wolfgang Zinth¹

¹*Institute of BioMolecular Optics and Munich Center of Integrated Protein Science (CIPSM), Ludwig-Maximilians-University, 80538 Munich, Germany*

²*Jülich Centre for Neutron Science (JCNS), Forschungszentrum Jülich GmbH Outstation at FRM II, 85747 Garching, Germany*

³*Physical Chemistry Institute, University of Zürich, 8057 Zurich, Switzerland*

⁴*Max Planck Institute of Biochemistry, 82152 Martinsried, Germany*

Correspondence should be addressed to Andreas A. Deeg, andreas.deeg@physik.uni-muenchen.de

Copyright © 2012 Andreas A. Deeg et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract. The light-driven disassembly process of amyloid-like structures formed by azobenzene model peptides is studied by time-resolved mid-IR spectroscopy from nanoseconds to minutes. The investigated peptide consists of two amino acid strands connected by the azobenzene switch. The peptides aggregate to amyloid-like structures when the azobenzene chromophore is in the *trans*-conformation. Illumination, resulting in a *trans*- to *cis*-isomerization of the azobenzene, leads to disaggregation of the aggregated structures. After optical excitation and isomerization of the azobenzene, one finds absorption changes which recover to a large extent on the time scale of few nanoseconds. These early absorption transients are assigned to the relaxation of vibrational excess energy (heat) or to structural rearrangements of isomerized azobenzene and the aggregated surroundings. It is only on the time scale of minutes that spectral signatures appear which are characteristic for the disassembly of the aggregated structure.

Keywords: Peptides, amyloid-disassembly, azobenzene, nanostructures, time-resolved-vibrational spectroscopy

1. Introduction

The aggregation of peptides into amyloid structures has obtained wide attention due to its relation to a variety of diseases such as Creutzfeldt Jakob, Parkinson, and Alzheimer. Many studies support aggregation of peptides, and especially oligomeric peptide structures as the cause of cell death and resulting diseases. In this context, the properties of amyloid-like peptide aggregates and their disassembly are of major interest.

The model peptide used in this study contains two amino acid strands with an azobenzene switch in the centre and was derived from the light switchable β -hairpin studied recently [1–3]. In this

compound, photoisomerization of the azobenzene (AMPP) interchanges the structure of the peptide between *trans*- and *cis*-conformations. Mid-IR spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM) have shown that the peptides may aggregate into amyloid-like structures when the azobenzene is in *trans*-conformation. Illumination of the aggregated sample with corresponding isomerization of the azobenzene to the *cis*-form causes a disassembly of aggregates [4]. In the current work, this disassembly process and the performance of the embedded azobenzene are studied by time-resolved mid-IR spectroscopy.

2. Materials and Methods

The synthesis of the model peptide Ac-Ser-Trp-Thr-Trp-Glu-AMPP-Lys-Trp-Thr-Trp-Lys-NH₂ (AcAzoTrpZip) has been reported previously [1]. The peptide was dissolved in deuterated methanol (Sigma Aldrich, 99.8%) at a concentration of about 3.3 mM for FTIR spectroscopy and 1.5 mM for nano- to microsecond IR spectroscopy. For the FTIR experiments, the sample was sandwiched between two CaF₂ windows (Teflon spacer 210 μm) immediately after dissolution of the lyophilized starting material and stored in an exsiccator at room temperature in the dark prior to the specific spectroscopic experiments. Stationary illumination by UV light (Xenon arc lamp, Oriel, Mod 6140 equipped with a water filter and UG 11 and WG 320 glass filters, Schott) was used for the *trans*- to *cis*-conversion. IR absorbance spectra were recorded with a Bruker IFS66 FTIR spectrometer (resolution 2 cm^{-1}). Background absorption from the solvent methanol-d₄ was subtracted.

2.1. Nano- to Microsecond IR Spectroscopy

Transient absorption spectra of the strongly aggregated sample (incubated for 17 days) were measured with a UV pump, IR probe setup. The IR probe pulse was generated by optical parametric amplification and difference frequency generation using a 110 fs pulse out of a 1 kHz Ti: sapphire regenerative amplifier system (Spectra Physics, Spitfire Pro) [5]. IR absorption changes are recorded by a spectrometer (Acton Research) and a 32 Channel MCT Array (Infrared Associates). The UV excitation pulse (355 nm) was the third harmonic of an externally triggered Q-Switched Nd: YVO₄ laser (AOT). It had a beam diameter at the sample position of about 200 μm , energy of 1 μJ , and duration of 0.6 ns and was electronically synchronized and delayed to the IR probe pulse. The jitter between pump and probe pulses was less than 1 ns. To improve the precision of the absorption experiment, every second pump pulse was blocked by a chopper wheel. For each delay time setting, 1000 single-excite/probe events were recorded, and the averaged absorbance difference was calculated. Four scans of the delay settings were averaged to obtain the transient absorption difference spectra shown in Figures 1(b) and 2(a). The sample was cycled through a CaF₂ cuvette (path length: 240 μm) at a speed to ascertain a complete sample exchange between subsequent laser shots. The exchange of the sample avoided that accumulation of disaggregated peptides did influence the measurement.

3. Results and Discussion

Figure 1(a) shows the amide I' band of a peptide preparation after seven days of incubation. There is a strong absorption in the 1610–1630 cm^{-1} range and only weaker absorption at higher frequencies (the peak at 1678 cm^{-1} originates from residual TFA from the synthesis). Amide I absorption between

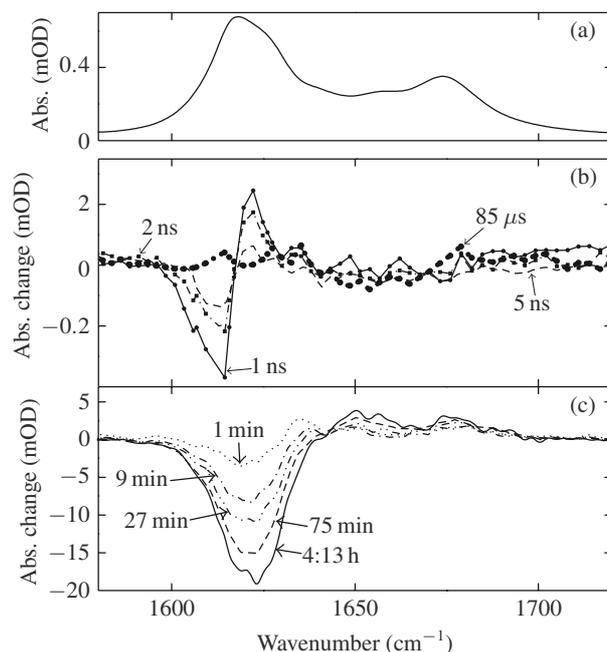


Figure 1: Absorption of the aggregated peptide (incubation time 7 days) in *trans*- (a) and transient absorption changes of this sample recorded on the time scale of minutes after 1 min UV illumination (c). Absorbance changes following UV excitation and *trans*- to *cis*-isomerization of highly aggregated peptides (incubation time 17 days) recorded on the time scale of ns (b).

1640 and 1700 cm^{-1} is well known for free amide groups or random coil peptides and for secondary structures like α -helix or β -sheet [6]. Absorption in the 1610–1630 cm^{-1} range is characteristic for aggregated amyloid-like peptides [7–9]. For the AcAzoTrpZip, an absorption at about 1625 cm^{-1} was found for weakly aggregated or oligomeric peptides, whereas an absorption at about 1615 cm^{-1} was found for strongly aggregated extended fibrils [4]. The sample after seven days in solution is composed of monomeric, weakly aggregated peptides and to a large extent of strongly aggregated amyloid-like fibrils [4].

Figure 1(b) shows the light-induced absorbance changes of a strongly aggregated sample (17 days of incubation) on the nano- to microsecond time scale. At the beginning of the observation period (1 ns after the UV excitation), a dispersive absorption change with a decreased peaking around 1612 cm^{-1} and an increased intensity at about 1622 cm^{-1} is observed. It points to changes of strongly aggregated into weakly aggregated structures. This spectral signature decays on the 5 ns time scale (Figures 1(b) and 2(a)). Later on until the end of the observation period (80 μs), no significant absorption changes were detected.

This observation is in line with the results from illumination experiments on the time scale of minutes presented in Figure 1(c). Illumination of the sample from Figure 1(a) by UV light for 1 min switches a fraction of the azobenzene chromophores from *trans* to *cis* (confirmed by UV/VIS spectroscopy, data not shown). However, immediately after illumination, the IR spectrum in the amide I range shows only weak changes. It is only on the time scale of 10 min after illumination that a decrease

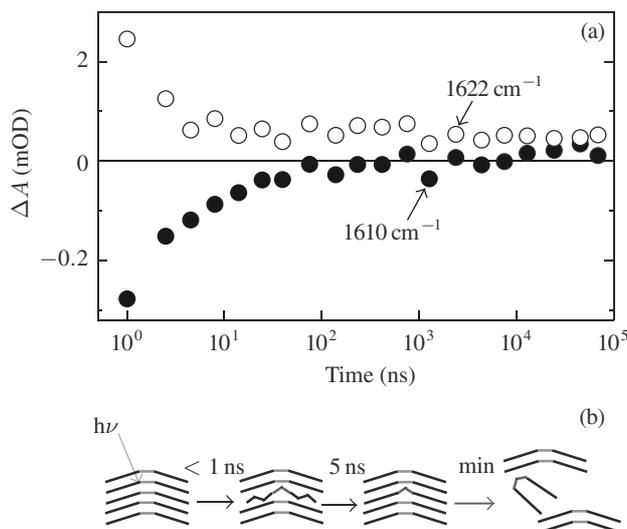


Figure 2: Absorption transients at 1610 and 1622 cm^{-1} on the time scale of ns to μs (a) connected to the change in peptide aggregation. Model for the light-induced disassembly (b).

in IR absorption in the 1610–1630 cm^{-1} range (i.e., over the whole band of aggregated structures) and an absorption increase at higher frequencies (where nonaggregated peptides absorb) take place.

Another observation should be added which may facilitate the interpretation of the transient IR spectra. It has been shown by UV/VIS spectroscopy that the *trans*- to *cis*- isomerization of azobenzene AMPP in the nonaggregated β -hairpin peptide occurs with a quantum yield of 20%. When the peptides are aggregated, stationary experiments point to a strongly reduced quantum yield of ca. 2% (see supplementary materials of [4]).

In the following, we present a simplified model (visualized in Figure 2(b)) of the isomerization/disassembly process which is consistent with the different observations for aggregated and nonaggregated azobenzene hairpin peptides. Absorption of a photon by *trans*-azobenzene leads to motions on the excited state potential energy surface towards the interaction region with the *cis*-state. For azobenzene in solution, this motion is not hindered, and the molecules complete the motion and reach the *cis*-state with high efficiency (20%). When this process is hindered, for example, by constraints deriving from an aggregated peptide, the isomerization yield may be strongly reduced. Apparently, the close packing of the peptide in the aggregates has this effect.

The observed absorption transients on the ns time scale can be explained by two molecular models. (i) After the isomerization of the azobenzene to the *cis*-form, the isomerized chromophore does not fit into the aggregated surroundings, and a considerable strain is built up between the *cis*-azobenzene and the surrounding aggregate. This interaction may be visible as the dispersive absorption changes observed in Figure 1(b). On the 5 ns time scale, the strain is partially released by a rearrangement of the system, and the absorption changes disappear. (ii) A second explanation is based on the transient heating of the azobenzene and its surroundings by the excess energy released upon isomerization and internal conversion. This heating of the peptide may change the equilibrium, with a reduction of the number of highly aggregated molecules and related increase of weakly aggregated molecules. When this excess

heat is transferred away from the aggregated structures to the surrounding solvent (on the few ns time scale), the heat-related population change and the corresponding absorption difference signal decay.

In both models, the excitation of the azobenzene chromophore causes a significant disturbance of the aggregated peptide which decays within a few nanoseconds. Finally the isomerized *cis* azobenzene molecules act as local defects which induce the slow disassembly of the aggregated structures. This disassembly process leads to the broad absorption decrease found in the 10 min time range in the band of aggregated peptides. The time dependence of the absorption clearly shows that the isomerization of the azobenzene switch does not directly disrupt the aggregates. The isomerization leads to distortions of the structures which induce disassembly via thermally driven steps on much longer time scales. The use of azobenzene as a switching element for aggregated structures has also been demonstrated very recently in the context of the Alzheimer related Amyloid β peptide [10]. Apparently the azobenzene switch is well suited for the manipulation of amyloidlike aggregates.

Acknowledgments

The work was supported by the German Science Foundation, SFB 749, and the Munich Center of Integrated Protein Science, CIPSM. The University of Zurich did not contribute to this work.

References

- [1] S. L. Dong, M. Löweneck, T. E. Schrader et al., "A photocontrolled β -hairpin peptide," *Chemistry*, vol. 12, no. 4, pp. 1114–1120, 2006.
- [2] T. E. Schrader, T. Cordes, W. J. Schreier et al., "Folding and unfolding of light-triggered β -hairpin model peptides," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 115, no. 18, pp. 5219–5226, 2011.
- [3] T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Cordes et al., "Light-triggered β -hairpin folding and unfolding," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 40, pp. 15729–15734, 2007.
- [4] A. A. Deeg, T. E. Schrader, S. Kempter, J. Pfizer, L. Moroder, and W. Zinth, "Light-triggered aggregation and disassembly of amyloid-like structures," *ChemPhysChem*, vol. 12, no. 3, pp. 559–562, 2011.
- [5] T. E. Schrader, A. Sieg, F. Koller et al., "Vibrational relaxation following ultrafast internal conversion: comparing IR and Raman probing," *Chemical Physics Letters*, vol. 392, no. 4–6, pp. 358–364, 2004.
- [6] M. Jackson and H. H. Mantsch, "The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 30, no. 2, pp. 95–120, 1995.
- [7] I. W. Hamley, "Bildung von Peptidfibrillen," *Angewandte Chemie*, vol. 119, no. 43, pp. 8274–8295, 2007.
- [8] I. W. Hamley, "Peptide fibrillization," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, no. 43, pp. 8128–8147, 2007.
- [9] A. Perálvarez-Marín, A. Barth, and A. Gräslund, "Time-resolved infrared spectroscopy of pH-induced aggregation of the Alzheimer A β (1–28) peptide," *Journal of Molecular Biology*, vol. 379, no. 3, pp. 589–596, 2008.
- [10] T. M. Doran, E. A. Anderson, S. E. Latchney, L. A. Opanashuk, and B. L. Nilsson, "An azobenzene photoswitch sheds light on turn nucleation in amyloid- β self-assembly," *ACS Chemical Neuroscience*, vol. 3, no. 3, pp. 211–220, 2012.

6 Anle138b und dessen Interaktion mit α -Synuclein-Aggregaten

In Abschnitt 2.4 wurde das neue potentielle Therapeutikum zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen Anle138b vorgestellt. In diesem Kapitel werden zunächst die Absorptions- und die intrinsischen Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b in verschiedenen Lösungsmitteln diskutiert. Im zweiten Abschnitt wird vorgestellt, wie über die Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b die Wechselwirkung dieser Substanz mit monomeren und aggregierten α -Synuclein-Proteinen untersucht werden kann. Über verschiedene konzentrationsabhängige Fluoreszenzmessungen an Anle138b in Kombination mit α -Synuclein-Proteinaggregaten ist es in diesem Zusammenhang möglich, die Bindungseigenschaften von Anle138b an die Aggregate quantitativ zu charakterisieren. Die vorgestellten Ergebnisse werden dann in Bezug auf den Wirkmechanismus von Anle138b diskutiert.

6.1 Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b

Im Folgenden werden zunächst die verwendeten Materialien und Methoden und vor allem die Probenpräparationen kurz vorgestellt. Im Anschluss werden die Ergebnisse der stationären Absorptions- und Fluoreszenzmessungen von Anle138b in DMSO und in Wasser sowie von Sery313b in Wasser beschrieben. Bei dem Molekül Sery313b handelt es sich um eine Modifikation des Anle138b-Moleküls, bei dem das Brom durch eine OH-Gruppe substituiert ist (siehe Abbildung 6.1). Zudem werden zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an Anle138b vorgestellt. In einer Reihe vorhergehender Messungen konnte beobachtet werden, dass eine intensive Belichtung von Anle138b mit UV-Licht zu einer Veränderung des Moleküls führen kann [138, 139]. Für die Messung der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften im UV-Bereich ist es jedoch erforderlich, die Proben zumindest in geringem Maße mit Licht im UV-Bereich zu exponieren. Um zu garantieren, dass die in den stationären und zeitaufgelösten Messungen beobachteten Fluoreszenzsignale nicht von Anteilen vorbeleuchteter Anle138b-Moleküle in der Probe stammen, wurden deshalb zusätzlich Messungen an belichteten Anle138b-Molekülen durchgeführt. Abschließend werden die vorgestellten Ergebnisse ausführlich diskutiert und es wird ein mögliches Modell für die Fluoreszenz von Anle138b vorgestellt.

6.1.1 Materialien und Methoden: Fluoreszenzmessungen an Anle138b

Bei allen in diesem Abschnitt beschriebenen stationären Fluoreszenzmessungen wurde das in Abschnitt 3.3 beschriebene Fluoreszenzspektrometer in "Front-Face"-Konfiguration mit einer Anregungswellenlänge von 300 nm, 0.4 nm Anregungsspalt und 8 nm Emissions-

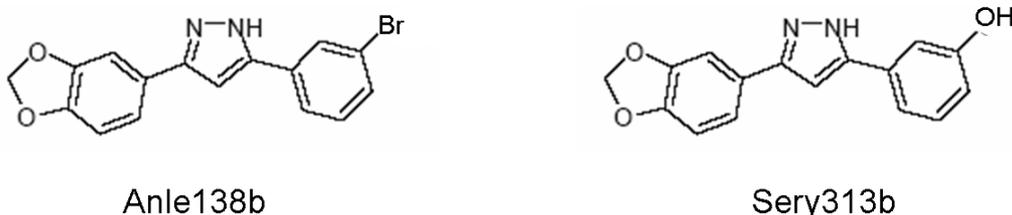


Abbildung 6.1: Struktur der Substanzen Anle138b und Sery313b. Beide Moleküle sind aus einem Benzolring mit einer Ester-Gruppe, einem Pyrazol-Ring in der Mitte und einem weiteren Benzolring aufgebaut. Die drei Teile sind durch zwei Einfachbindungen miteinander verbunden. Die Moleküle unterscheiden sich nur durch das am äußeren Benzolring liegende Brom (Br), welches bei Sery313b durch eine Hydroxygruppe substituiert ist.

spalt verwendet. Die Emission wurde hierbei in 5 nm Schritten im Bereich von 310 nm bis 500 nm aufgenommen. Die stationären Absorptionsmessungen wurden mit einem Spektral-Photometer von Shimadzu (UV 1800) durchgeführt und im Wellenlängenbereich von 600 nm bis 200 nm detektiert. Für alle stationären (das heißt nichtzeitaufgelösten) Messungen wurden 4 mm x 10 mm Quarzglas-Küvetten (Hellma, Typ 117.104F-QS) in Kombination mit einem Magnet-Rührsystem verwendet. Das Rührsystem wurde im Eigenbau entwickelt, führt zu einer kompletten Durchmischung der Probe in der Küvette innerhalb weniger Sekunden und garantiert somit eine homogene Probe in der Küvette während der Absorptions- und Fluoreszenzmessungen [139].

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung wurde mit dem in Abschnitt 3.3 vorgestellten Streackamera-Aufbau durchgeführt. Zur Unterdrückung von Streulicht wurde hierbei ein Kantenfilter (WG345, Schott) im Strahlengang der Emission verwendet. Es wurden Zeitfenster von 10 ns und 0.5 ns untersucht. Die zeitliche Auflösung beträgt hierbei ca. 200 ps bzw. 12 ps.

Die Substanzen Anle138b ($m = 343$ Da) und Sery313b ($m = 282$ Da) wurden synthetisiert von Sergey Ryazanov und Andrei Leonov aus der Gruppe von Prof. Griesinger am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen. Eine detaillierte Beschreibung der Synthese findet sich in [30]. Bei der im Folgenden beschriebenen Probenpräparation von Anle138b wurde die Probe immer unter Ausschluss von UV Licht behandelt. Die gefriergetrockneten Substanzen wurden zunächst in Konzentrationen von 1 mM oder 10 mM in DMSO gelöst und für ca. 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Bei einer Konzentration bis zu 10 mM sind die Proben in DMSO gut löslich. Die Probenkonzentration wurde hierbei immer über das Gewicht der Einwaage und das Molekulargewicht bestimmt.

Für die stationären Absorptions- und Fluoreszenzmessungen der Proben in DMSO wurde der ursprüngliche Ansatz auf eine Konzentration von 10 μ M verdünnt und in die zur

Messung verwendeten Küvetten gegeben. Für die Messungen in Wasser wurden die Proben zunächst auf eine Konzentration von 50 μM in DMSO verdünnt. Für die stationären Messungen in Wasser wurde diese 50 μM DMSO-Lösung dann im Verhältnis 1/100 in eine, mit 1 ml oder 2 ml Wasser gefüllte, Küvette eingespritzt und mit dem Rührsystem gut durchmischt. Somit ergibt sich eine Wasserlösung mit 1% DMSO und einer Molekülkonzentration von 500 nM. In Wasser können die Proben im Gegensatz zu DMSO nur in sehr geringen Konzentrationen gelöst werden. Die Löslichkeitsgrenze von Anle138b liegt hier im Bereich von 500 nM bis 1 μM [140].

Des Weiteren wurden stationäre Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen auch an Proben durchgeführt, welche vorher mit UV-Licht der Wellenlänge von 300 nm belichtet wurden. Hierzu wurden jeweils 2 ml der oben beschriebenen Anle138b-Lösungen in DMSO (10 μM) und in Wasser (500 nM) in die Küvetten gefüllt und für ca. 5 Minuten mit 300 nm Licht beleuchtet. Bei einer solchen Belichtung der Anle138b-Wasser-Lösungen wandeln sich die Anle138b-Moleküle zu nahezu 100% in Sery313b Moleküle um, wie über massenspektroskopische Untersuchungen verifiziert wurde [138]. Wurden die Sery313b-Lösungen auf diese Weise präpariert, wird in der folgenden Arbeit daraufhingewiesen.

Zudem wurden bei allen stationären Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen neben den Spektren der Probe auch Spektren der verwendeten Lösungsmittel (DMSO oder Wasser/1% DMSO) aufgenommen. Alle im Folgenden dargestellten Spektren wurden mit diesen Lösungsmittelspektren korrigiert, um die Anteile des jeweiligen Lösungsmittels zu entfernen.

Für die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen in DMSO wurden 200 ml einer 10 μM Anle138b-Lösung in einem Glasgefäß angesetzt. Diese Lösung (DMSO, 10 μM Anle138b) wurde dann während der Messungen, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, mit einer Peristaltikpumpe durch eine Quarzglas-Durchflussküvette mit einer Schichtdicke von 500 μm in ein (Abfall-) Glasgefäß gepumpt. Auch hier wurden zur Kontrolle zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen des Lösungsmittels DMSO durchgeführt. Des Weiteren wurden diese zeitaufgelösten Messungen auch an Proben durchgeführt, welche vorher mit UV-Licht der Wellenlänge von 300 nm belichtet wurden. Hierzu wurden 2 ml einer Anle138b DMSO-Lösung (10 μM) in eine Küvette gefüllt und wie bei den stationären Messungen beleuchtet. Diese 2 ml Lösung wurde dann in den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen durch die Durchflussküvette zirkuliert.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten wurde zudem eine 4 mm x 10 mm Küvette mit einer 2,5-Diphenyloxazole- (PPO) Methanol-Lösung (10 μM) präpariert. Die Fluoreszenzquantenausbeute Y von PPO ist aus der Literatur bekannt ($Y = 86\%$) [141]. Über den Vergleich der Absorptions- und Fluoreszenzmessungen von PPO, Anle138b und Sery313b kann die Fluoreszenzquantenausbeute von Anle138b und Sery313b bestimmt werden.

6.1.2 Experimentelle Ergebnisse: Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b

Abbildung 6.2 zeigt das Absorptionsspektrum von Anle138b in DMSO im Bereich von 260 nm bis 500 nm. Unterhalb von 260 nm kann aufgrund der hohen Absorption des Lösungsmittels DMSO kein Absorptionsspektrum von Anle138b aufgenommen werden. Das Absorptionsspektrum zeigt ein Maximum bei ca. 270 nm mit einem Extinktionskoeffizien-

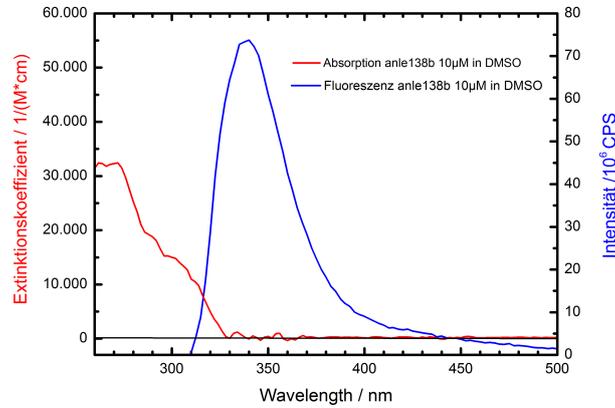


Abbildung 6.2: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Anle138b bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm in DMSO ($c=10 \mu\text{M}$).

ten ϵ von ca. $30000 (\text{M cm})^{-1}$ und eine Schulter bei ca. 300 nm ($\epsilon \sim 15000 (\text{M cm})^{-1}$). Die Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b sollen im Weiteren (siehe Abschnitt 6.2) mit Proteinen untersucht werden, die aromatische Aminosäuren enthalten, deren langwellige Absorption im Bereich von 270 nm liegt. Eine Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm ist in diesem Zusammenhang nicht sinnvoll. Bei 300 nm hingegen ist die Absorption aromatischer Aminosäuren vernachlässigbar klein. Bei einer Wellenlänge von 300 nm ist es somit möglich, in einem Anle138b/Proteingemisch nur Anle138b und nicht die aromatischen Aminosäuren der Proteine anzuregen. In Anbetracht dessen wurden alle in diesem Kapitel vorgestellten Fluoreszenzmessungen an Anle138b und Sery313b bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm durchgeführt. Abbildung 6.2 zeigt auch das Fluoreszenzspektrum von Anle138b in DMSO bei einer Anregung von 300 nm. Das Fluoreszenzspektrum zeigt ein scharfes Maximum bei ca. 340 nm, hat nur eine sehr geringe Stokes-Verschiebung¹ von ca. 10-20 nm und ist nicht spiegelsymmetrisch zum Absorptionsspektrum. Über den Vergleich mit der Absorptions- und Fluoreszenzmessung von PPO kann die Fluoreszenzquantenausbeute $Y = \frac{\text{Zahl der emittierten Photonen}}{\text{Zahl der absorbierten Photonen}} = 1\% \pm 0.5\%$ bestimmt werden.

Die Absorptionseigenschaften von Anle138b in Wasser sind vergleichbar zu den Absorptionseigenschaften in DMSO (siehe Abbildung 6.3). Die Schulter im Absorptionsspektrum bei 300 nm scheint hier etwas schwächer ausgeprägt zu sein als im Lösungsmittel DMSO ($\epsilon \sim 10000 (\text{M cm})^{-1}$). Die Messgenauigkeit der Spektren ist jedoch begrenzt, da aufgrund der beschriebenen Veränderung des Moleküls Anle138b durch UV-Licht die Messdauer eingeschränkt ist und Anle138b im Lösungsmittel Wasser nur in einer geringen Konzentration (500 nM) untersucht werden kann. In Anbetracht der Messgenauigkeit ist der Unterschied in den Absorptionsspektren nicht signifikant. Im unteren Teil von Abbildung 6.3 ist das

¹Verschiebung der Emissionswellenlängen gegenüber der Anregungswellenlänge in den roten Spektralbereich

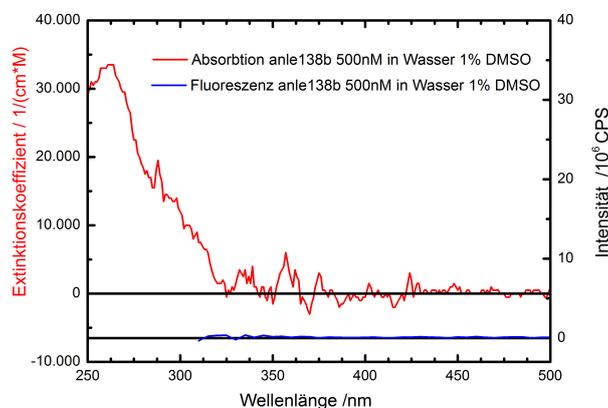


Abbildung 6.3: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Anle138b bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm in Wasser 1% DMSO ($c=0.5 \mu\text{M}$).

Fluoreszenzspektrum von Anle138b in Wasser bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm dargestellt. Unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit entspricht das Fluoreszenzspektrum der Nulllinie. Über eine Abschätzung der Messgenauigkeit und einen Vergleich mit der Absorptions- und Fluoreszenzmessung von PPO kann hierbei abgeschätzt werden, dass für die Fluoreszenzquantenausbeute in Wasser $Y \leq 0.6\%$ gelten muss. Abbildung 6.4 zeigt den Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b mit den Fluoreszenzeigenschaften einer analog präparierten Sery313b Lösung ($c = 500 \text{ nM}$, Wasser/1% DMSO). Die Substitution des Br-Moleküls durch die OH-Gruppe führt hier zu einer stark ausgeprägten ($Y \sim 10\%$) Fluoreszenz mit einer zusätzlichen, rotverschobenen Bande im Bereich von 420 nm. Die Absorptionseigenschaften von Sery313b unterscheiden sich hingegen nicht signifikant von den Absorptionseigenschaften von Anle138b.

Alle hier dargestellten Absorptions- und Fluoreszenzmessungen an Anle138b können mit Absorptions- und Fluoreszenzmessungen an mit UV-Licht bestrahlten Anle138b-Proben verglichen werden (Daten nicht gezeigt, siehe [138]). Vorbelichtete Anle138b-Proben zeigen hierbei stark unterschiedliche Fluoreszenzspektren [138]. Über den Vergleich der Messungen kann somit ausgeschlossen werden, dass die hier dargestellten Spektren von Anle138b durch Anteile belichteter, veränderter Anle138b-Moleküle verfälscht sind.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen: Abbildung 6.5 zeigt die Fluoreszenzintensität von Anle138b in DMSO in Abhängigkeit der Wellenlänge und der Zeit nach einem 300 nm Anregungspuls. Es zeigt sich eine ausgeprägte Fluoreszenzintensität, die innerhalb der ersten 200 ps nach der Anregung abklingt. Die Daten zeigen zudem ein schwaches, auf der Zeitskala von wenigen Nanosekunden abklingendes Fluoreszenzsignal. Die detektierten Fluoreszenzphotonen liegen hauptsächlich im Spektralbereich von ca. 350 nm bis 450 nm.

Das zeitaufgelöste Fluoreszenzspektrum nach dem Anregungszeitpunkt kann über einen

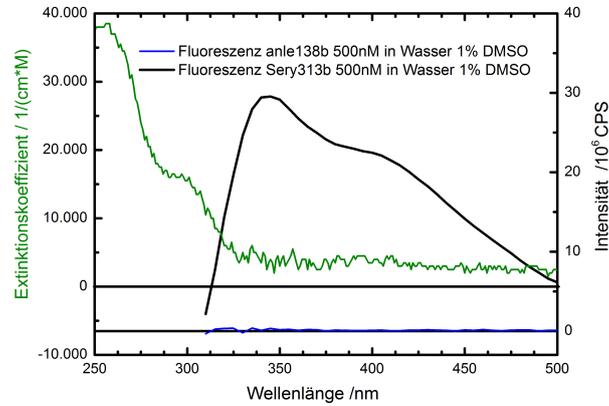


Abbildung 6.4: Fluoreszenzspektrum von Anle138b und Sery313 bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm in Wasser 1% DMSO ($c = 0.5 \mu\text{M}$). Das grün dargestellte Spektrum entspricht dem Absorptionsspektrum von Sery313 (präpariert über Belichtung, siehe 6.1.1) .

globalen Fit mit zwei Zeitkonstanten der Form,

$$A(t, \lambda) = A_1(\lambda) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + A_2(\lambda) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)$$

angepasst werden. Für Anle138b im Lösungsmittel DMSO ergibt sich hierbei eine Zeitkonstante $\tau_1 < 200 \text{ ps}$ und eine Zeitkonstante $\tau_2 = 2.0 \text{ ns}$. Die langsame Zeit τ_2 beschreibt das, in Abbildung 6.5 dargestellte, langlebige Fluoreszenzsignal im Nanosekundenbereich. Die kurze Zeitkonstante τ_1 ist kleiner als die Zeitaufösung der Messung im 10 ns Zeitfenster von ungefähr 200 ps. Zur genaueren Bestimmung von τ_1 wurde die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung auch in einem Zeitfenster bis 0.5 ns durchgeführt. Bei dieser Messung liegt die Zeitaufösung bei ca. 12 ps und es kann die Zeitkonstante der kurzlebigen Fluoreszenz zu $\tau_1 = 40 \text{ ps}$ bestimmt werden. In Abbildung 6.6 sind die transienten Fluoreszenzintensitäten bei 360 nm, für die Messungen im 10 ns und 0.5 ns Zeitfenster dargestellt. Aus den in Abbildung 6.6 gezeigten, transienten Fluoreszenzkurven und aus den Fitamplituden, $A_1(\lambda)$ und $A_2(\lambda)$ von Anle138b in DMSO kann abgeschätzt werden, dass ca. 70 % der Photonen mit einer Zeitkonstante $\tau_1 = 40 \text{ ps}$ und ca. 30 % der Photonen entsprechend einer Zeitkonstante $\tau_2 = 2.0 \text{ ns}$ emittiert werden.

Bei den gezeigten zeitaufgelösten Messungen an Anle138b wurden die Fluoreszenzbeiträge des Lösungsmittels DMSO nicht korrigiert. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an DMSO zeigen jedoch, dass die Fluoreszenzintensität dieses Lösungsmittels auf der untersuchten Zeitskala, im Vergleich zur Fluoreszenzintensität von Anle138b, vernachlässigbar ist. Bei den zeitaufgelösten Messungen an vorbelichteten Anle138b Molekülen in DMSO kann jedoch eine ausgeprägte, langlebige Fluoreszenz beobachtet werden. Die Fluoreszenzlebenszeit dieser langlebigen Komponente ist hierbei ähnlich zur langen Fluoreszenzlebens-

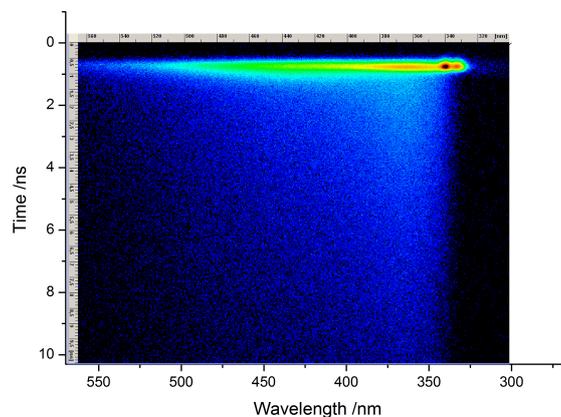


Abbildung 6.5: Fluoreszenzintensität von Anle138b in DMSO in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der Zeit nach dem 300 nm Anregungspuls. Der Zeitpunkt der Anregung liegt bei ca. 0.6 ns. Die Farbskala von blau über grün zu rot entspricht der Fluoreszenzintensität. Blau entspricht geringer Intensität, rot hoher Intensität. Das starke Fluoreszenzmaximum am Nullpunkt im Bereich von 340 nm ist auf Ramanstreuung des Anregungslichts am Lösungsmittel DMSO zurückzuführen. Unterhalb von 340 nm wird aufgrund des verwendeten Kantenfilters kein Fluoreszenzlicht detektiert.

zeit $\tau_2 = 2.0$ ns, welche bei unbelichteten Anle138b-Molekülen in DMSO beobachtet wird. Bei vergleichbaren Einstellungen des Messaufbaus ist die gemessene Fluoreszenzintensität der langlebigen Komponente bei den vorbelichteten Molekülen jedoch ca. 50-mal größer als bei den Messungen an unbelichtetem Anle138b. Es ist somit möglich, dass die gezeigten langlebigen Fluoreszenzkomponenten von Anle138b-Molekülen in DMSO auf einen geringen Anteil (ca. 2%) vorbelichteter Moleküle zurückzuführen ist. Dieser geringe Anteil vorbelichteter Moleküle könnte zum Beispiel daher stammen, dass die Probe bei der zeitaufgelösten Messung zwischen zwei aufeinanderfolgenden 300 nm Anregungspulsen nicht zu 100% durch das Durchflusssystem ausgetauscht wurde. In der folgenden Diskussion wird deshalb nur die Zeitkonstante $\tau_1 = 40$ ps diskutiert, da diese eindeutig den nichtvorbelichteten Anle138b-Molekülen zugeordnet werden kann.

6.1.3 Diskussion der Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b

Im Folgenden werden die gezeigten Messungen an Anle138b und Sery313b diskutiert und ein Modell für die Photophysik von Anle138b vorgestellt. Zunächst werden einige Grundlagen der Photophysik von Molekülen in Lösung vorgestellt, welche für die folgende Diskussion relevant sind.

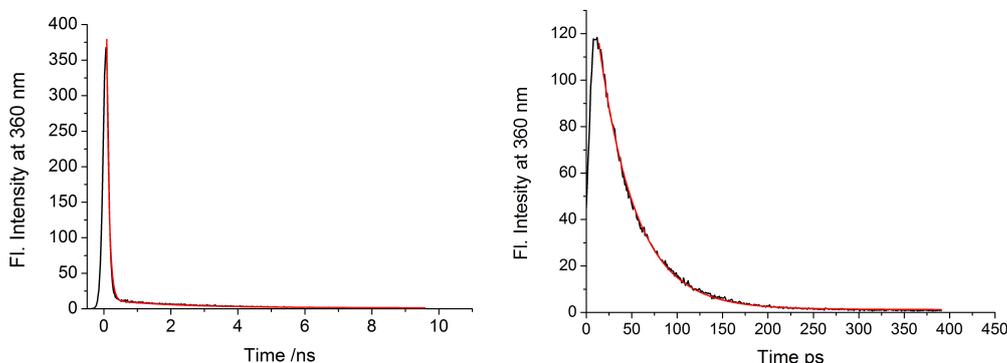


Abbildung 6.6: Änderung der Fluoreszenzintensität über die Zeit von Anle138b in DMSO (Anregung 300 nm) bei einer Emissionswellenlänge von 360 nm. Im linken Teil der Abbildung ist eine Messung im 10 ns Zeitfenster, im rechten Teil der Abbildung im 0.5 ns Zeitfenster, dargestellt. Die roten Kurven zeigen eine biexponentielle Anpassung der Daten mit den Zeitkonstanten $\tau_1 = 40$ ps und $\tau_2 = 2.0$ ns.

Grundlagen der Photophysik: Nach einer Anregung in den ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 oder auch in höhere elektronisch angeregte Zustände S_n geht ein Molekül im Allgemeinen auf der Zeitskala von wenigen Pikosekunden durch interne Konversion (IC) in niedrig liegende Schwingungszustände im S_1 über (siehe Abbildung 6.7). Bei der internen Konversion von Molekülen in Lösung wird die Energie in Form von Schwingungsenergie an die Umgebung abgegeben. Vom S_1 aus kann ein Molekül dann über verschiedene Prozesse in energetisch niedrigere Zustände übergehen: Ein Molekül kann z.B. durch einen strahlenden Prozess den elektronischen Grundzustand S_0 mit einer Rate k_R erreichen. Des Weiteren ist ein Übergang in den S_0 auch über interne Konversion mit einer Rate k_{IC} möglich [142]. Bei relativ flexiblen Molekülen kann auch das Molekül nach der Anregung seine Geometrie verändern. Ein solcher geometrisch veränderter S_1 -Zustand wird im Rahmen dieser Arbeit mit P bezeichnet. Der S_1 -Zustand, der direkt nach der Anregung erreicht wird, ist im Folgenden als S_1^* bezeichnet. Aus dem P -Zustand kann das Molekül ebenfalls nichtstrahlend durch IC oder strahlend in den Grundzustand relaxieren. Der Übergang auf der Potentialfläche des S_1 , vom S_1^* in den P -Zustand kann, wie in Abbildung 6.7 dargestellt, über eine energetische Barriere bestimmt sein und wird durch eine Rate k_{SP} beschrieben. Vor allem bei Molekülen mit Schweratomen wie z.B. Brom wird jedoch, aufgrund der erhöhten Spin-Bahnkopplung der Schweratome, vielfach ein Übergang mit einer Rate k_{ISC} durch sog. Intersystem Crossing (ISC) in Tripletzustände T beobachtet (siehe Abbildung 6.7) [109]. Der Übergang aus einem Tripletzustand in den Grundzustand S_0 ist Spin-verboten. Tripletzustände haben aus diesem Grund in der Regel eine sehr lange Lebensdauer von Mikrosekunden bis Sekunden [109]. Ein strahlender Übergang aus einem Tripletzustand in den Grundzustand wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Bei Molekülen in Lösung wird jedoch in der Regel keine Phosphoreszenz beobachtet [109]. Die Lebensdauer

τ des S_1^* wird somit bestimmt durch:

$$1/\tau = k_R + k_{IC} + k_{SP} + k_{ISC} \quad (6.1)$$

Für den P -Zustand kann die Lebensdauer in Analogie zu Gleichung 6.1 angegeben werden, wobei die für diesen Zustand gültigen Raten zu verwenden sind. Prinzipiell kann auch der Zustand P strahlend in den Grundzustand übergehen, wobei die Fluoreszenz aus diesem Zustand in der Regel stark rotverschoben ist. Eine Fluoreszenzbande mit einem geringen Stokes-Shift kann vielfach einem Übergang vom S_1^* in den Grundzustand zugeordnet werden, während eine rotverschobene Fluoreszenzbande einer Emission aus einem P -Zustand entspricht.

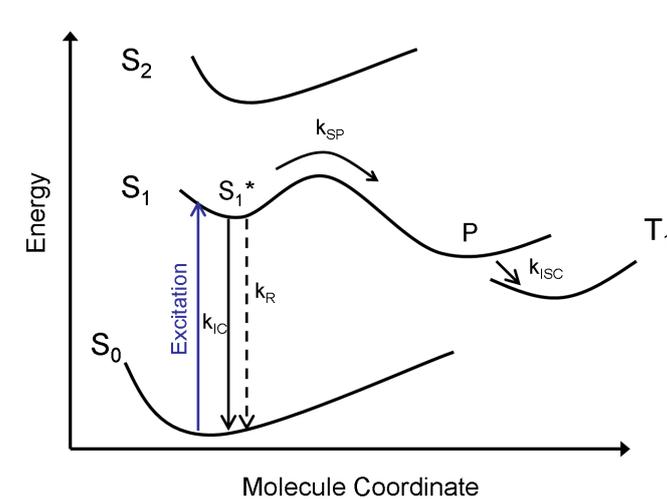


Abbildung 6.7: Schematische Darstellung der Energieflächen eines Moleküls in Abhängigkeit einer Molekülkoordinate (z.B. Rotationswinkel einer Molekülbindung). Eingezeichnet sind die Potenzialflächen für einen Grundzustand S_0 , einen ersten und einen zweiten angeregten Singletzustand S_1 bzw. S_2 und einem Triplettzustand T_1 . Im S_1 hat das Molekül direkt nach der Anregung zunächst die Grundzustandsgeometrie. Dieser Zustand wird hier als S_1^* bezeichnet. Geometrisch flexible Moleküle können durch eine Verformung in eine energetisch niedriger liegende Konformation, hier bezeichnet mit dem Zustand P , auf der S_1 -Potenzialfläche übergehen. Des Weiteren ist ein strahlender Übergang vom S_1^* in den S_0 (Rate k_R), ein nichtstrahlender Übergang vom S_1^* in den S_0 mit einer Rate k_{IC} und der Übergang durch Inter-System-Crossing (ISC) mit einer Rate k_{ISC} in einen Triplettzustand dargestellt.

Photophysik von Anle138b und Sery313b: Die Absorption der Moleküle Anle138b und Sery313b kann, unabhängig vom Lösungsmittel, durch zwei Absorptionsbanden beschrieben werden: Eine stärkere Bande mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 270 nm, und eine schwächer ausgeprägte Bande mit einem Maximum bei ca. 300 nm (siehe Abbildung 6.2, 6.3 und 6.4). Die 300 nm Absorptionsbande kann einer Anregung in den ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 , die 270 nm Absorptionsbande einer Anregung in den zweiten elektronisch angeregten Zustand S_2 zugeordnet werden. Anle138b in DMSO zeigt im Wesentlichen eine charakteristische Fluoreszenzbande, mit einem geringen Stokes-Shift von 10 - 20 nm (spektrale Rotverschiebung der Emissionswellenlänge bezogen auf die Anregungswellenlänge)(siehe Abbildung 6.2). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Fluoreszenz von Anle138b in DMSO auf einen strahlenden Übergang vom S_1^* in den Grundzustand zurückzuführen ist. Wie im Folgenden dargestellt, wird diese Interpretation unterstützt von den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen:

Unter der Annahme, dass die beobachtete Emission von Anle138b in DMSO von einem strahlenden Übergang, vom S_1^* in den S_0 , stammt, lässt sich k_R in diesem Lösungsmittel über die Strickler-Berg-Relation aus dem stationären Absorptions- und Fluoreszenzspektrum ableiten [109, 143]. Eine Analyse der in Abbildung 6.2 dargestellten Absorptions- und Fluoreszenzspektren ergibt eine Rate $k_R = 1/\tau_R = 1/(5 \text{ ns})$.

Die in der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung beobachtete Fluoreszenz von Anle138b in DMSO ist im Wesentlichen durch einen exponentiellen Zerfall mit einer Zeitkonstante $\tau = 40 \text{ ps}$ bestimmt. Unter der Annahme, dass die beobachtete Emission auf einen strahlenden Übergang vom S_1^* in den S_0 zurückzuführen ist, lässt sich aus der gemessenen Zeitkonstante $\tau = 40 \text{ ps}$ in Kombination mit der Quantenausbeute die Rate $k_R = 1/\tau_R$ für den strahlenden Übergang vom S_1^* in den S_0 bestimmen:

$$1/k_R = \tau_R = \tau/Y = 4 \text{ ns}$$

Diese Lebensdauer stimmt gut mit der über die Strickler-Berg Relation ermittelten Fluoreszenzlebenszeit $1/k_R = \tau_R = 5 \text{ ns}$ überein. Diese Übereinstimmung unterstützt die These, dass die beobachtete Fluoreszenz von Anle138b in DMSO, mit der Lebenszeit $\tau = 40 \text{ ps}$, auf einen Übergang vom S_1^* in den S_0 zurückzuführen ist. Würde Anle138b nur über diesen strahlenden Prozess vom S_1^* in den Grundzustand übergehen, wären die 4 ns die Lebensdauer des S_1^* . Es muss deshalb einen anderen Prozess geben, der dazu führt, dass der S_1^* bereits nach einer Zeit von $\tau = 40 \text{ ps}$ entvölkert ist. Über Gleichung 6.1 lässt sich die Rate $k_{NR} = 1/\tau_{NR}$ für diesen nicht strahlenden Prozess bestimmen:

$$1/\tau_{NR} = 1/\tau - 1/\tau_R = 1/(40.4 \text{ ns})$$

Bei diesem nichtstrahlenden Prozess, mit $\tau_{NR} = 40.4 \text{ ps}$, kann es sich prinzipiell um einen Übergang vom S_1^* direkt in den Grundzustand S_0 (Rate k_{IC}), in einen energetisch tiefer liegenden verdrehten S_1 -Zustand (P -Zustand) (Rate k_{SP}) oder auch einen Übergang in einen Tripletzustand T (Rate k_{ISC}) handeln. Diese Fragestellung wird im Folgenden im Zusammenhang mit den Messungen an Sery313b diskutiert und ein Modell für die photophysikalischen Prozesse von Anle138b und Sery313b in Wasser und DMSO vorgestellt:

Zunächst einmal deuten die Daten daraufhin, dass der S_1 -Zustand bei Anle138b und auch Sery313b über die Benzol- und Pyrazolringe delokalisiert ist (siehe Abbildung 6.1). Das Absorptionsspektrum von Anle138b und Sery313b ist nicht zu vergleichen mit dem Absorptionsspektrum von isolierten Pyrazol-Molekülen [144]. Eine Lokalisierung nur am Benzol ist ebenfalls ausgeschlossen, da Benzol vollständig andere Absorptionseigenschaften hat. In Anbetracht eines solchen delokalisierten S_1 -Zustands von Anle138b und Sery313b, und im Zusammenhang mit der in Abbildung 6.1 dargestellten Struktur der Moleküle wäre eine Energieabsenkung durch eine Verdrehung der Moleküle auf der S_1 -Potenzialfläche und somit ein Übergang in einen P -Zustand denkbar. Ein solches Modell könnte auch die zusätzliche, rotverschobene Fluoreszenzbande von Sery313b in Wasser erklären (siehe Abbildung 6.4). Die rotverschobene Fluoreszenz wäre hierbei auf den strahlenden Übergang vom P - in den Grundzustand zurückzuführen.

Für die Photophysik von Anle138b legt das Brom die Vermutung nahe, dass bei diesem Molekülen auch ein Übergang in einen Tripletzustand eine wichtige Rolle spielen könnte. Diese These wird unterstützt von der stark reduzierten Fluoreszenzintensität von Anle138b im Vergleich zu Sery313b (siehe Abbildung 6.4).

Auf Grundlage dieser Überlegungen wird in Abbildung 6.8 ein Modell für die Photophysik von Anle138b und Sery313b vorgestellt. Nach der Anregung mit 300 nm relaxieren die Moleküle in die vibronisch niedrig liegenden Zustände des S_1^* . Diese Population des S_1^* geht dann zu einem geringen Anteil ($\sim 1\%$) strahlend in den Grundzustand über. Der Großteil der Population des S_1^* reagiert jedoch, über eine energetische Barriere auf der Potentialfläche des S_1 , in den P -Zustand, wobei der Zustand P , im Vergleich zum Zustand S_1^* , eine verdrehte Geometrie aufweist. Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass das Anle138b-Molekül im Grundzustand, und somit vermutlich auch im Zustand S_1^* , planar vorliegt [30, 145]. Bei dem Übergang in den P -Zustand könnte sich einer der Benzolringe aus der Molekülebene herausdrehen. Für Sery313b relaxiert die Population des P -Zustands dann strahlend und durch interne Konversion in den Grundzustand und es ergibt sich die beobachtete, stark rotverschobene, zusätzliche Fluoreszenzbande. Bei Anle138b geht die Population des P -Zustands hingegen in einem sehr schnellen Prozess (innerhalb weniger ps) in einen Tripletzustand über, und es zeigt sich keine zusätzliche rotverschobene Fluoreszenz. Über dieses Modell kann auch die beobachtete, höhere Fluoreszenzquantenausbeute von Anle138b im Lösungsmittel DMSO im Vergleich zur Fluoreszenzquantenausbeute in Wasser erklärt werden. DMSO hat eine deutlich höhere Viskosität als Wasser. Der mit einer Verformung des Moleküls verbundene Übergang in den P -Zustand ist im viskosen Lösungsmittel DMSO langsamer als in Wasser. Hieraus ergibt sich eine längere Lebenszeit des S_1^* und somit die beobachtete größere Fluoreszenzquantenausbeute von Anle138b in DMSO. Auf Grundlage der in diesem Abschnitt vorgestellten Messungen ist dieses Modell noch relativ spekulativ. Im nächsten Abschnitt werden jedoch die Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b in Kombination mit α -Synuclein vorgestellt. In diesem Zusammenhang wird das hier vorgeschlagene Modell noch einmal aufgegriffen, wobei die Messungen mit α -Synuclein das hier vorgestellte Modell unterstützen.

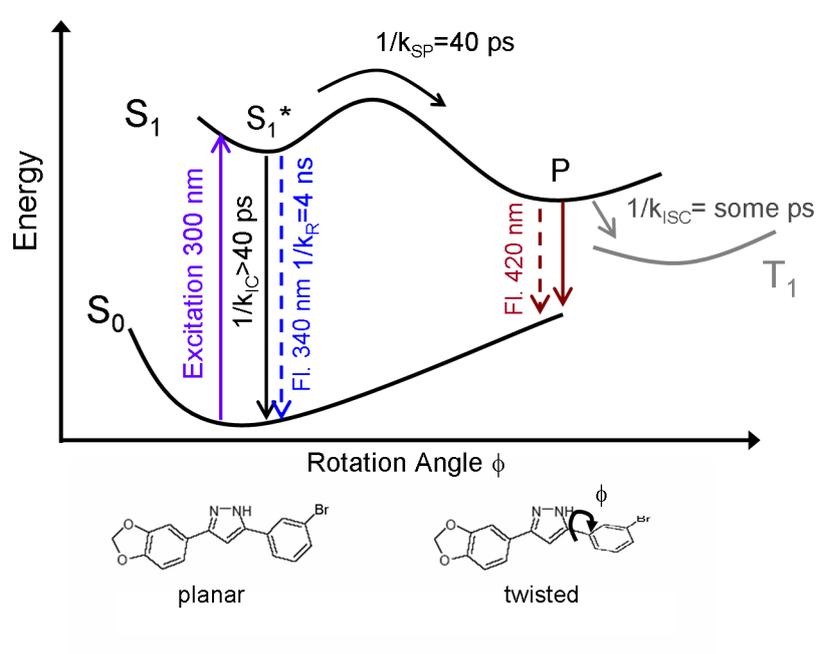


Abbildung 6.8: Modell zur Beschreibung der Photophysik von Anle138b in DMSO: Dargestellt sind die Potenzialflächen von Grund- und erstem angeregten Zustand von Anle138b in Abhängigkeit vom Rotationswinkel einer der Molekülbindungen. Die Daten sind konsistent mit einem radiativen Zerfall vom S_1^* in den S_0 mit $1/k_R = 4$ ns, und einen schnellen ($1/k_{SP} = 40.4$ ps) Übergang, über eine Barriere auf der S_1 -Potenzialfläche, in einen Zustand P . Der nichtstrahlende Übergang vom S_1^* in den S_0 ist in diesem Modell weniger effizient als der schnelle Übergang in den P -Zustand ($1/k_{IC} > 40.4$ ps). Der P -Zustand hat im Vergleich zum Grundzustand und zum S_1^* eine verdrehte Geometrie. Hierbei könnte zum Beispiel einer der Benzolringe aus der Molekülebene herausgedreht sein. Für Anle138b geht der Zustand P schnell, d.h. mit hoher Ausbeute in einen Triplettzustand über (grau dargestellt). Die Photophysik von Anle138b in Wasser ist qualitativ identisch, wobei aufgrund der geringeren Viskosität von Wasser der Übergang in den P -Zustand effizienter ist ($1/k_{SP} < 40.4$ ps). Die Photophysik von Sery313b kann qualitativ auch durch dieses Modell beschrieben werden. Im Gegensatz zu Anle138b geht Sery313b aus dem P -Zustand jedoch nicht in einen Triplettzustand über, so dass man die Fluoreszenz aus P beobachten kann. Die bei diesem Molekül beobachtete, rotverschobene Fluoreszenz entspricht diesem strahlenden Übergang von P in den S_0 , und ist in obiger Abbildung rot dargestellt.

6.2 Kopplung von Anle138b an monomeres und aggregiertes α -Synuclein

In diesem Abschnitt werden die Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b in Kombination mit monomeren und aggregierten α -Synuclein-Proteinen untersucht. Über konzentrationsabhängige Fluoreszenzmessungen ist es hierbei möglich, die Bindung von Anle138b an α -Synuclein-Aggregate genauer zu untersuchen und zu quantifizieren. Im Folgenden werden zunächst die verwendeten Materialien und Methoden sowie die Probenpräparation vorgestellt. Anschließend werden die experimentellen Ergebnisse präsentiert und ein Modell für die Kopplung von Anle138b an α -Synuclein-Aggregate vorgestellt. Aufbauend auf den Ergebnissen wird auch kurz der Wirkmechanismus von Anle138b bei neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert.

6.2.1 Probenpräparationen für die Fluoreszenzmessungen an Anle138b mit α -Synuclein

Die in diesem Abschnitt diskutierten stationären Absorptions- und Fluoreszenzmessungen wurden mit den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Spektrometereinstellungen durchgeführt. Die Proben wurden hierbei immer in den 4 mm x 10 mm Küvetten untersucht. Bei den stationären Fluoreszenzmessungen wurde das bereits beschriebene Rührsystem verwendet, um eine gute Durchmischung der Proben zu garantieren. Für die Messungen der Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b mit aggregierten und monomeren α -Synuclein-Proteinen wurden die Proben folgendermaßen präpariert (siehe auch [30]): Das gefriergetrocknete Anle138b wurde zunächst in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und im Ultraschallbad für 5 min behandelt. 2.5 μ l dieser 10 mM Anle138b-DMSO-Lösung wurden dann in 100 ml Puffer (50 mM Tris-HCl, pH = 7.0) unter Ultraschallbehandlung eingespritzt und gut vermischt. Es ergibt sich eine 250 nM Anle138b-Lösung in Puffer mit einem Anteil von 0.0025 % (v/v) DMSO. Zwei identische Küvetten (Küvette 1 und Küvette 2) wurden dann mit dieser 250 nM Anle138b-Lösung befüllt. Von beiden Küvetten wurde ein Fluoreszenzspektrum (Anregung bei 300 nm) aufgenommen. Anschließend wurden sukzessive kleine Mengen einer 50 μ M α -Synuclein-Monomerlösung und einer 13 μ M α -Synuclein-Fibrillenlösung in Küvette 1 beziehungsweise Küvette 2 pipettiert und Fluoreszenzspektren aufgenommen (siehe Abb. 6.9).

Die Lösungen mit monomeren und aggregierten α -Synuclein-Proteinen wurden von Felix Schmidt aus der Gruppe von Armin Giese am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU (ZNP) entsprechend [30] präpariert. Für die Präparation der Lösung mit aggregiertem α -Synuclein wurde eine 50 μ M α -Synuclein-Monomerlösung (in 50 mM Tris-HCl, pH = 7.0, 100 mM NaCl, 0.02 % NaN₃) unter konstantem Rühren für 96 h bei 37° C gelagert. Unter diesen Bedingungen bilden sich in der Lösung α -Synuclein-Fibrillen². Da sich in dieser Fibrillenlösung auch monomeres α -Synuclein befindet, wurde die Fibrillenlösung direkt vor den Fluoreszenzmessungen zentrifugiert (15 min, 10000 rpm). Das Pellet enthält nur aggregiertes α -Synuclein und wurde in einer 50 mM Tris-HCl Lösung, pH 7.0

²Entsprechend Gespräch mit Armin Giese und Felix Schmidt

resuspendiert. Es ergibt sich eine 13 μ M Lösung mit aggregiertem α -Synuclein ohne α -Synuclein-Monomere. Die Konzentration der Proteine von 13 μ M in dieser Fibrillenlösung (Konzentration bezogen auf das Monomer) wurde über die Tyrosinabsorption bei 280 nm bestimmt.

Die Absorption und Fluoreszenz von α -Synuclein bei 300 nm ist gering. Zur Kontrolle wurden jedoch zwei weitere Küvetten (Küvette 3 und Küvette 4) verwendet. Diese wurden nur mit Puffer (50 mM Tris-HCl, pH = 7.0, 0.0025 % (v/v) DMSO) befüllt. Analog zu den oben beschriebenen Messungen mit Küvette 1 und 2 wurden die α -Synuclein-Monomer- und Fibrillenlösungen auch zu diesen, nur mit Puffer gefüllten Küvetten (3 und 4) zugegeben, und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die Fluoreszenzspektren dieser Referenzlösungen wurden dann von den Spektren der Lösungen mit Anle138b abgezogen und es ergeben sich die in Abbildung 6.9 dargestellten Spektren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Küvetten mit Sery313b präpariert und mit α -Synuclein-Monomer- und Fibrillenlösungen untersucht. Hierzu wurden zwei Küvetten wie oben beschrieben mit 800 μ l, 250 nM Anle138b-Pufferlösungen (0.0025 % (v/v) DMSO) präpariert und für ca. 5 Minuten mit 300 nm Licht beleuchtet. Bei einer solchen Belichtung der Anle138b-Wasser-Lösungen wandeln sich die Anle138b-Moleküle zu nahezu 100% in Sery313b Moleküle um, wie über massenspektroskopische Untersuchungen verifiziert wurde [138]. Diese Sery313b-Lösungen wurden dann in identischer Weise wie Anle138b mit α -Synuclein-Monomeren und Fibrillen untersucht.

Zur Quantifizierung der Bindungseigenschaften von Anle138b an α -Synuclein-Fibrillen wurden konzentrationsabhängige Messungen durchgeführt. Hierzu wurden vier identische Küvetten mit 800 μ l Puffer (50 mM Tris-HCl, pH = 7.0) befüllt. In die erste Küvette wurden 8 μ l einer 10 μ M Anle138b DMSO-Lösung gegeben. In die zweite und dritte Küvette wurden jeweils 8 μ l einer 25 μ M beziehungsweise 50 μ M Anle138b-DMSO-Lösung eingespritzt. Die vierte Küvette wurde für die Referenzmessung verwendet, hierzu wurden nur 8 μ l DMSO zugegeben.

Es ergeben sich vier Küvetten mit Puffer, 1% DMSO: Küvette 1 mit 100 nM Anle138b, Küvette 2 mit 250 nM Anle138b, Küvette 3 mit 500 nM Anle138b und Küvette 4 ohne Anle138b. Von allen vier Küvetten wurde zunächst ein Fluoreszenzspektrum (Anregung bei 300 nm) im Bereich von 320 - 360 nm aufgenommen. Anschließend wurden sukzessive und parallel zu allen vier Küvetten kleine Mengen einer Fibrillenlösung pipettiert und die Fluoreszenz im Bereich von 320 - 360 nm aufgenommen. Die Fibrillenlösung wurde analog zur obigen Beschreibung präpariert, hierbei ergab sich eine Fibrillenlösung mit einer Konzentration (bezogen auf das Monomer) von 52 μ M.

Abbildung 6.10 zeigt die Fluoreszenzintensität bei 340 nm (Anregung 300 nm) von Küvette 1, 2 und 3. Die dargestellten Fluoreszenzwerte wurden auf die Fluoreszenz der Fibrillen (gemessen mit Küvette 4) korrigiert.

6.2.2 Experimentelle Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen an Anle138b mit α -Synuclein

Wie bereits im Abschnitt 6.1 dargestellt, zeigt Anle138b in wässriger Lösung nur eine sehr geringe Fluoreszenzintensität. Abbildung 6.9 A zeigt die Fluoreszenzspektren von An-

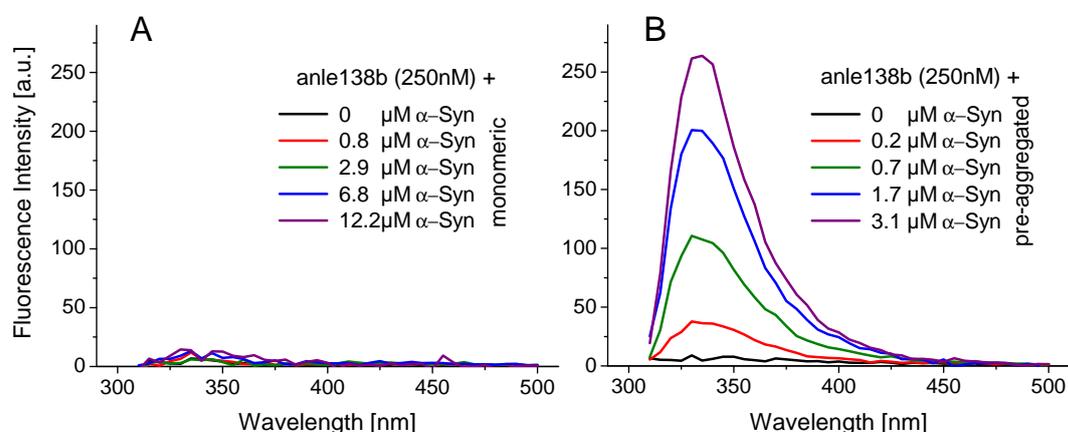


Abbildung 6.9: Fluoreszenzspektren von Anle138b (Anregung 300 nm) nach Zugabe von α -Synuclein-Monomeren (A) und α -Synuclein-Fibrillen (B). Die Zugabe von Monomeren führt zu keiner signifikanten Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b, während die Zugabe von Fibrillen zu einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität mit einem Maximum bei 340 nm führt (aus [30]).

le138b nach Zugabe von monomerem α -Synuclein. Offensichtlich führt die Zugabe von Monomeren zu keiner signifikanten Änderung der Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b. Im Gegensatz hierzu führt die Zugabe von α -Synuclein-Fibrillen zu einer deutlichen Zunahme der Anle138b-Fluoreszenzintensität (siehe Abbildung 6.9 B). Die drastische Änderung der Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b in Kombination mit den Fibrillen deutet hierbei auf eine strukturspezifische Bindung der Substanz an die α -Synuclein-Fibrillen hin [30]. Die Fluoreszenzspektren von Anle138b mit Fibrillen zeigen nur eine geringe Stokes-Verschiebung von ca. 20 nm und ähneln dem in Abbildung 6.2 dargestellten Fluoreszenzspektrum von Anle138b in DMSO. Die Fluoreszenzquantenausbeute von Anle138b, in Kombination mit Fibrillen, ist jedoch deutlich höher (20-30 %) als die von Anle138b im Lösungsmittel DMSO. In den analog durchgeführten Messungen an Sery313b in Kombination mit α -Synuclein-Fibrillen wurde ebenfalls eine starke Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 340 nm beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die bei Sery313b beobachtete rotverschobene Fluoreszenzbande (siehe Abbildung 6.4) nimmt durch die Kopplung an die Fibrillen hingegen stark ab.

Zur Quantifizierung der Bindungseigenschaften von Anle138b an Fibrillen wurden konzentrationsabhängige Messungen durchgeführt, bei denen sowohl die Konzentration der Fibrillen, als auch die Konzentration von Anle138b variiert wurde. Abbildung 6.10 zeigt die Fluoreszenzintensität bei 340 nm für unterschiedlich konzentrierte Anle138b Lösungen (100 nM, 250 nM und 500 nM) nach sukzessiver Zugabe von Fibrillen. Durch die Zugabe der Fibrillen steigt die Fluoreszenzintensität aufgrund der Bindung von Anle138b an die Fibrillen zunächst deutlich an. Bei hohen Fibrillenkonzentrationen (4 - 10 μ M) ist hingegen

ein Großteil der Anle138b-Moleküle an die Fibrillen gebunden und die Fluoreszenzintensität ändert sich nur noch sehr wenig durch weitere Zugabe von Fibrillen. Die Fluoreszenzzunahme erreicht hier ihren Sättigungswert. Wie zu erwarten ist der Sättigungswert der Fluoreszenzintensität bei der 250 nM Anle138b-Lösung ca. um einen Faktor 2.5 höher als der Sättigungswert bei der 100 nM Lösung. Der Sättigungswert der 500 nM Lösung ist ungefähr doppelt so hoch wie der Sättigungswert der 250 nM Lösung. Aus dem Fluoreszenzspektrum der 500 nM Anle138b-Lösung mit 10 μ M α -Synuclein lässt sich die Quantenausbeute für gekoppeltes Anle138b abschätzen. Im Vergleich mit einer PPO-Messung ergibt sich hierbei eine Quantenausbeute im Bereich von 20-30 %. Wie in der folgenden Diskussion gezeigt wird, können über die konzentrationsabhängigen Fluoreszenzmessungen von Anle138b mit Fibrillen die Bindungseigenschaften quantifiziert werden.

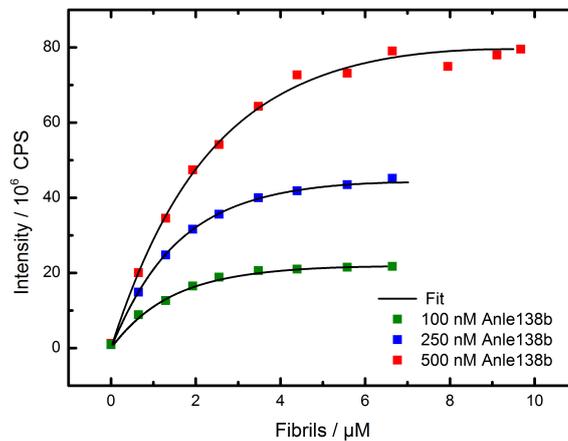


Abbildung 6.10: Fluoreszenzintensität von 100 nM, 250 nM und 500 nM Anle138b bei 340 nm (Anregungswellenlänge 300 nm) in Kombination mit α -Synuclein Fibrillen. Die Zugabe der Fibrillen führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität bis ein Großteil der Anle138b Moleküle an die Fibrillen gebunden ist und die Fluoreszenz absättigt. Die schwarzen Kurven zeigen eine Anpassung der Daten entsprechend dem Massenwirkungsgesetz (siehe Diskussion 6.2.3).

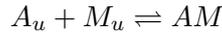
6.2.3 Diskussion: Bindung von Anle138b an α -Synuclein-Fibrillen

Die Messungen zeigen eindeutig eine Bindung von Anle138b an α -Synuclein-Fibrillen, während keine Anzeichen einer Bindung an Monomere beobachtet werden können (siehe Abbildung 6.9). Über die konzentrationsabhängigen Messungen kann die Bindung an die Aggregate genauer untersucht werden.

Für die Quantifizierung der Bindungseigenschaften eines Liganden (hier Anle 138b) an einen Rezeptor (hier α -Synuclein-Fibrillen) wird vielfach die Bindungskonstante K_b oder

die Dissoziationskonstante $K_d = 1/K_b$ herangezogen. Des Weiteren ist von Interesse, wie viele Bindungsstellen der Rezeptor (hier die α -Synuclein-Fibrillen) für den Liganden zur Verfügung stellt. Für die experimentelle Bestimmung der Bindungskonstante und der Anzahl der Bindungsstellen werden vielfach Isotherme Titrationskalorimetrie-Experimente durchgeführt [146, 147]. Für Substanzen, die nur in nanomolarer Konzentration löslich sind (wie Anle138b), sind solche Experimente jedoch nur schwer durchführbar. Des Weiteren sind Isotherme Titrationskalorimetrie-Experimente an Lösungen mit aggregierten Proteinen aufgrund der Inhomogenitäten der Probenlösungen grundsätzlich problematisch. Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften von Anle138b an die α -Synuclein-Fibrillen ist diese Methode unter diesen Gesichtspunkten nicht geeignet (Ergebnis eines Gesprächs mit Anette Bachmann und Tobias Aumüller, TU München). Wie im Folgenden erläutert wird, ist es jedoch möglich, aus den in Abbildung 6.10 dargestellten konzentrationsabhängigen Fluoreszenzmessungen an Anle138b in Kombination mit α -Synuclein-Fibrillen die Bindungskonstante und die Anzahl der α -Synuclein-Proteine, welche im Aggregat eine Bindungsstelle ergeben, zu bestimmen. Die folgende Darstellung ist in ähnlicher Weise in der Masterarbeit von Anne Reiner beschrieben [138].

Die Reaktionsgleichung für die Bindung eines Liganden A an einen Rezeptor M unter Bildung eines Liganden-Rezeptor-Komplexes AM kann allgemein geschrieben werden als:



Im vorliegenden Fall ist A_u die Konzentration von ungebundenen Anle138b Molekülen und M_u beschreibt die Konzentration der unbesetzten Bindungsstellen an den α -Synuclein-Fibrillen. AM steht für die Konzentration der Komplexe, Anle138b gebunden an eine Bindungsstelle. Die Konzentration AM ist gleich der Konzentration der gebundenen Anle138b Moleküle A_g . Das Reaktionsgleichgewicht kann über das Massenwirkungsgesetz beschrieben werden:

$$K_b = 1/K_d = \frac{A_g}{M_u \cdot A_u} \quad (6.2)$$

Die Konzentration der ungebundenen Anle138b Moleküle A_u kann geschrieben werden als $A_u = A_0 - A_g$, wobei A_0 die Gesamtkonzentration von Anle138b in der Lösung darstellt. Die Konzentration der unbesetzten Bindungsstellen M_u kann mit Hilfe der Gesamtkonzentration der Bindungsstellen M_0 ausgedrückt werden über $M_u = M_0 - A_g$. Die Gesamtkonzentration der Bindungsstellen M_0 ist unbekannt. Unter der Annahme, dass eine Anzahl B von α -Synuclein-Proteinen eine Bindungsstelle erzeugen, kann M_0 jedoch ausgedrückt werden durch $M_0 = M/B$. M ist die Proteinkonzentration (bezogen auf das Monomer) in der Lösung. Über diese Beziehungen kann Gleichung 6.2 umgeformt werden zu:

$$K_b = \frac{A_g}{M_u \cdot A_u} = \frac{A_g}{\left(\frac{M}{B} - A_g\right) \cdot (A_0 - A_g)} \quad (6.3)$$

Eine weitere einfach Umformung dieser Gleichung liefert:

$$\frac{A_g}{A_u} = \frac{A_g}{(A_0 - A_g)} = K_b \left(\frac{M}{B} - A_g \right) \quad (6.4)$$

Auftragung von A_g/A_u gegen A_g , bei konstanter Proteinkonzentration M , in einem Diagramm liefert somit eine Gerade mit der Steigung $-K_b$ und dem Ordinatenschnittpunkt $K_b \cdot M/B$ (siehe Abbildung 6.11). Diese Form der Darstellung wird auch als Scatchard-Diagramm bezeichnet und wird, wie im Folgenden dargestellt, zur Auswertung der konzentrationsabhängigen Fluoreszenzmessungen verwendet. Für eine bestimmte Proteinkonzentration (z.B. $M=1.3 \mu\text{M}$) kann über die in Abbildung 6.10 dargestellten Titrationskurven mit 100 nM, 250 nM und 500 nM Anle138b jeweils A_g und A_u bestimmt werden:

Da ungebundenes Anle138b praktisch nicht fluoresziert, ist die gemessene Fluoreszenzintensität F bei 340 nm proportional zur Konzentration der gebundenen Anle138b-Moleküle:

$$F = y \cdot A_g \quad (6.5)$$

Der Wert y kann im Prinzip aus der Fluoreszenzintensität einer Anle138b-Lösung bei einer hohen Fibrillenkonzentration abgeschätzt werden (siehe Abbildung 6.11), da hier ein Großteil der Moleküle an die Aggregate gebunden ist. Für die im Folgenden gezeigte Auswertung wird der Wert y jedoch über das im folgenden Paragraphen vorgestellte Fit-Verfahren bestimmt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten konzentrationsabhängigen Messungen ist zudem zu berücksichtigen, dass die Gesamtkonzentration von Anle138b A_0 durch die Zugabe der Fibrilllösung während des Titrationsexperiments leicht abnimmt. Mit der Konzentration in der Stammlösung der Proteine m_s , der Anle138b-Konzentration a_s zu Beginn der Messung und der jeweiligen Proteinkonzentration in der Lösung M kann jedoch die jeweilige Anle138b-Konzentration A_0 bestimmt werden:

$$A_0 = \left(1 - \frac{M}{m_s}\right)a_s \quad (6.6)$$

Über Gleichung 6.5 und 6.6 ist es somit möglich jeweils, A_g und $A_u = A_0 - A_g$ aus den Titrationskurven zu bestimmen. Für eine bestimmte Proteinkonzentration M können dann A_g/A_u und A_g für a_s gleich 100 nM, 250 nM und 500 nM berechnet und in einem Scatchard-Diagramm aufgetragen werden. Abbildung 6.11 zeigt aus den Titrationskurven berechnete Scatchard-Diagramme für Proteinkonzentrationen $M=0.65 \mu\text{M}$, $M=1.3 \mu\text{M}$ und $M=1.9 \mu\text{M}$. Eine Analyse der gezeigten Scatchard-Diagramme ergibt im Mittel $K_b = 1/(115 \text{ nM})$ und $B = 7$. Die in dieser Messung bestimmten Werte, $K_b = 1/(115 \text{ nM})$ und $B = 7$ können mit den ermittelten Werten aus einer unabhängigen, jedoch identisch durchgeführten Kontrollmessung verglichen werden. Bei dieser Kontrollmessung wurden Werte von $K_b = 1/(160 \text{ nM})$, $B = 19$ und $K_b = 1/(330 \text{ nM})$, $B = 9$ ermittelt [138]. Im Mittel ergibt sich aus diesen Werten: $K_b = 1/(170 \text{ nM} (-55 \text{ nM}, +130 \text{ nM}))$ und $B = 12 \pm 6$. Somit bilden nur mehrere (ca. 12) Proteine zusammen im Aggregat eine Bindungsstelle für ein Anle138b-Molekül (siehe Abbildung 6.12). Die Bindungskonstante liegt ca. bei $K_b = 1/(170 \text{ nM})$, was einer Dissoziationskonstante $K_d = 170 \text{ nM}$ entspricht und zeigt, dass Anle138b hoch affin an die Aggregate bindet. In der Pharmakologie wird vielfach bei Dissoziationskonstanten eines Wirkstoffs an ein Target mit $K_d < 1 \mu\text{M}$ von einer starken Bindung gesprochen.

Der Parameter y wurde, bei der hier vorgestellten Analyse und zur Berechnung der in Abbildung 6.11 dargestellten Scatchard-Diagramme, über eine Anpassung der Titrations-

kurven, wie im folgenden Paragraphen beschrieben, bestimmt.

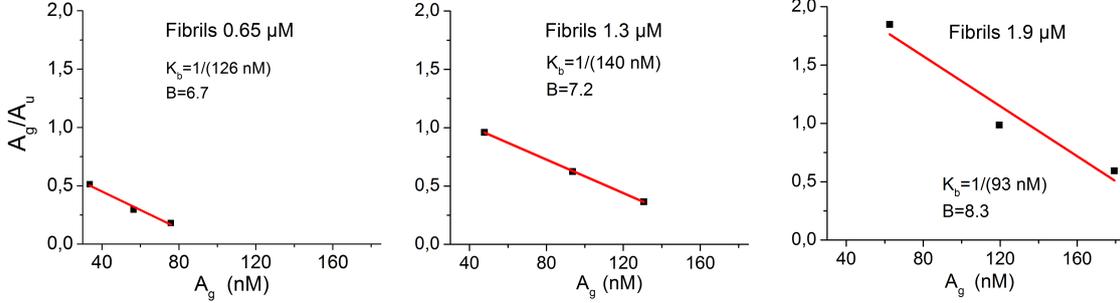


Abbildung 6.11: Scatchard-Diagramme zur Bestimmung der Bindungskonstante K_b und der Zahl B der α -Synuclein-Proteine, die eine Bindungsstelle bilden. Auf der Ordinate ist das Verhältnis der Konzentrationen gebundener durch ungebundener Anle138b Moleküle dargestellt. Die Abszisse zeigt die Konzentration der gebundenen Anle138b-Moleküle. Ein linearer Fit der Punkte liefert im Mittel $K_b = 1/(115 \text{ nM})$ und $B = 7$. Zur Analyse der Daten wurde $y = 2.65 \cdot 10^8 \text{ l}/\mu\text{M}$ verwendet.

Bestimmung von y : Aus den in Abbildung 6.10 dargestellten Messungen kann über eine Anpassung der Daten entsprechend Gleichung 6.3 der Parameter y relativ genau bestimmt werden. Für die Anpassung der Daten kann Gleichung 6.5 und 6.6 in Gleichung 6.3 eingesetzt werden:

$$K_b = \frac{\frac{F}{y}}{\left(\frac{M}{B} - \frac{F}{y}\right) \cdot \left(\left(1 - \frac{M}{m_s}\right)a_s - \frac{F}{y}\right)} \quad (6.7)$$

Diese Gleichung kann wiederum aufgelöst werden nach M , wobei nur das negative Vorzeichen vor der Wurzel physikalisch sinnvoll ist:

$$M(F, K_B, B, y, a_s, m_s) = \frac{1}{2a_s K_B y^2} [K_B y (a_s B F - F m_s + a_s m_s y) \mp \sqrt{K_B y^2 (-4a_s B F m_s (y + a_s K_B y - F K_B) + K_B (a_s B F - F m_s + a_s m_s y)^2)}] \quad (6.8)$$

Über diese Gleichung können die Titrationskurven gefittet werden. Abbildung 6.10 zeigt eine Anpassung der Titrationskurven mit $a_s = 100 \text{ nM}$, 250 nM und 500 nM entsprechend Gleichung 6.8. F entspricht hierbei dem gemessenen Fluoreszenzwert. Der auf der Abszisse aufgetragene Wert der Fibrillenkonzentration entspricht M . Über eine Anpassung entsprechend Gleichung 6.8 können für jede der Titrationskurven die unbekannt Parameter K_b , B und y bestimmt werden. Die erhaltenen Werte für K_b und B sind jedoch stark fehlerbelastet, da diese in Gleichung 6.8 gekoppelt auftreten. Somit kann im Fit ein großer Wert K_b durch einen kleinen Wert B kompensiert werden. Der Wert y , welcher die

Proportionalität zwischen der Konzentration von gebundenem Anle138b und dem Fluoreszenzwert F beschreibt, kann aus der jeweiligen Anpassung der Daten hingegen relativ genau bestimmt werden. Aus der Anpassung der Titrationskurven mit $a_s = 100$ nM, 250 nM und 500 nM ergibt sich ein mittlerer Wert $\bar{y} = 2.65 \cdot 10^8$ $1/\mu\text{M}$.

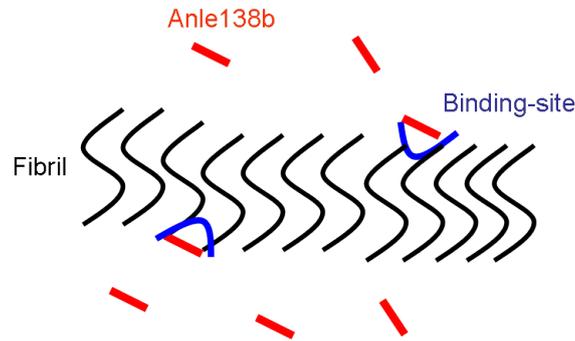


Abbildung 6.12: Schematische Darstellung der Bindung von Anle138b (rot) an α -Synuclein-Fibrillen. Mehrere α -Synuclein-Proteine (schwarz dargestellt) im Aggregat bilden eine Bindungsstelle (blau).

Photophysik von an Aggregate gekoppeltem Anle138b: In der Diskussion des vorherigen Abschnitts 6.1 wurde ein Modell für die Photophysik von Anle138b und Sery313b in Lösung vorgestellt (siehe Abbildung 6.8). In diesem Modell gehen die Moleküle nach der Anregung, über eine Barriere auf der Potenzialfläche des S_1 , in einen Zustand mit einer verdrehten Geometrie über. Dieser verdrehte Zustand auf der Potenzialfläche des S_1 wurde in diesem Modell als P -Zustand bezeichnet. Die bei dem Molekül Sery313b in Wasser beobachtete, rotverschobene Fluoreszenz wurde einer Emission aus dem P -Zustand zugeordnet. Bei Anle138b wird hingegen sowohl in Wasser als auch in DMSO keine rotverschobene Fluoreszenz beobachtet, da bei diesem Molekül der P -Zustand innerhalb weniger ps in einen Triplettzustand übergeht.

Die beobachtete, starke Fluoreszenzzunahme bei 340 nm von Anle138b und Sery313b in Kombination mit Fibrillen ist ebenfalls konsistent mit diesem Modell. Hierbei würde die relativ starre Umgebung der an die Proteinaggregate gekoppelten Sery313b und Anle138b Moleküle eine Verdrehung der Moleküle nach der Anregung und somit den Übergang in den P -Zustand verhindern. Im Rahmen des in Abbildung 6.8 dargestellten Schemas führt die rigide Umgebung zu einer Erhöhung der Barriere zwischen den Zuständen S_{1*} und P , was den Übergang von S_{1*} nach P stark verlangsamt. Als Konsequenz würden die Moleküle Anle138b und Sery313b durch den strahlenden Übergang und durch interne Konversion vom S_{1*} in den S_0 relaxieren und die beobachteten Fluoreszenzspektren mit einem geringen Stokes-Shift, einem Maximum bei 340 nm und einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute zeigen. Auch die bei Sery313b beobachtete Abnahme der rotverschobenen Fluoreszenzbande bei der Interaktion mit den Aggregaten ist konsistent mit dem hier vorgeschlagenen Mechanismus.

Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für das von seiner Struktur und seinen photo-physikalischen Eigenschaften her ähnliche Molekül Thioflavin vorgeschlagen [148, 149]. Durch eine viskositätsabhängige Messung der Fluoreszenzquantenausbeute von Anle138b und Sery313b könnte das hier vorgestellte Modell weiter verifiziert werden. Wäre in der Tat eine Rotation an der Photochemie der Moleküle beteiligt, würde man eine Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von der Viskosität des Lösungsmittels erwarten.

Wirkmechanismus von Anle138b: An dieser Stelle soll kurz der Wirkmechanismus von Anle138b bei neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert werden. Wie bereits in Abschnitt 2.4 vorgestellt führt Anle138b zu einer Abnahme der Konzentration oligomerer α -Synuclein-Aggregate in Gehirnexttrakten von transgenen Parkinson-Mäusen [30]. Auch bei den SIFT-Messungen konnte eine Reduktion der Proteinaggregation durch Anle138b beobachtet werden [30]. Diese Beobachtungen legen zunächst die Vermutung nahe, dass Anle138b an oligomere Strukturen bindet und diese auflöst. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützen diese Interpretation insofern, als keine Interaktion von Anle138b mit monomeren Proteinen beobachtet werden konnte. Erst eine Aggregation von mehreren Proteinen (in etwa 12) führt zur Bildung einer Bindungsstelle. Da sich die Oligomere in ihrer Aggregatsstruktur zum Teil erheblich von der Struktur der Fibrillen unterscheiden können, bleibt die Frage einer spezifischen Kopplung auf oligomere Strukturen jedoch offen. Ob eine Interaktion von Anle138b mit solchen oligomeren α -Synuclein-Aggregaten auftritt, ist Gegenstand der momentanen Arbeit.

Die hier beobachtete Bindung von Anle138b an Fibrillen mit hoher Affinität deutet jedoch darauf hin, dass bei dem Wirkmechanismus von Anle138b auch die pathologischen Fibrillen eine Rolle spielen könnten. In Abschnitt 2.3 wurde bereits beschrieben, dass bei neurodegenerativen Erkrankungen die Fibrillen auch an der Bildung toxischer Oligomere beteiligt sein können. Die an die Fibrillen gebundenen Anle138b Moleküle könnten hierbei die Bildung weiterer toxischer Oligomere durch die Fibrillen inhibieren. Dies würde insgesamt zu einer Abnahme von Oligomeren im Organismus führen und könnte die beobachtete Verlängerung der symptomfreien Lebenszeit von mit Anle138b behandelten transgenen Parkinson-Mäusen erklären.

7 Zusammenfassung

Für ein Verständnis biologischer Systeme sind die Faltungsmechanismen von Proteinen, Peptiden und deren Sekundärstrukturelementen, wie α -Helices oder β -Haarnadeln, von entscheidender Bedeutung. Zum einen können falsch gefaltete, nicht native Proteine ihre biologische Funktion nicht ausführen. Zum anderen wird bei diversen neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer oder den Prionen-Krankheiten (BSE, Creutzfeldt-Jakob) eine Fehlfaltung von Proteinen oder Peptiden beobachtet. Die Fehlfaltung führt dann zur Aggregation der Proteine bzw. Peptide unter Bildung so genannter Amyloid-Aggregate. Diese Aggregationsprozesse und die hierbei entstehenden Aggregatsstrukturen sind in vielen Bereichen noch nicht vollständig verstanden, es wird jedoch vermutet, dass die Aggregation ursächlich für die Pathologie dieser Krankheiten ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Faltungs- und Aggregationsmechanismen von Peptiden mittels verschiedener spektroskopischer Methoden zu untersuchen. Unter anderem wurden hierbei Techniken wie die Anreg-Abtast-Spektroskopie, mit Abtast-Pulsen im mittelinfraroten (MIR-) Spektralbereich und die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie mit einem Streak-Kameraaufbau verwendet. Die Arbeit gliedert sich in drei Teile, deren Ergebnisse im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

T-Sprung- und Isomerisierungs-induzierte Dynamiken einer β -Haarnadelstruktur: In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet, um Strukturdynamiken eines β -Haarnadelpeptids auszulösen. Zum einen wurde die Faltung der β -Haarnadelstruktur durch die Isomerisierung eines in die Aminosäurekette eingebauten Photoschalters induziert. Zum anderen wurden Entfaltungsdynamiken der β -Haarnadelstruktur durch einen laserinduzierten Temperatursprung im Lösungsmittel ausgelöst. Die Strukturdynamik des photoschaltbaren β -Haarnadelpeptids wurde dann jeweils über zeitaufgelöste MIR- Spektroskopie auf der Nano- bis Mikrosekunden-Zeitskala untersucht. In der Isomerisierungs-induzierten Faltungsreaktion wurden strukturelle Änderungen des Peptids auf der Nanosekunden-Zeitskala beobachtet. Die dominanten Absorptionsänderungen, charakteristisch für die Bildung der gefalteten Haarnadelstruktur, zeigten sich auf der Mikrosekunden-Zeitskala und konnten mit einer exponentiellen Kinetik mit einer Zeitkonstante von 16 μ s angepasst werden. In den Temperatursprung-induzierten Messungen wurde für die Entfaltungskinetik ebenfalls eine Zeitkonstante von 16 μ s beobachtet. Messungen der Isomerisierungs-induzierten Faltungs- und Temperatursprung-induzierten Entfaltungsreaktionen für verschiedene Temperaturen zeigten zudem dieselbe Temperaturabhängigkeit der beiden Kinetiken. Aus diesen Beobachtungen folgt, dass die Temperatursprung-induzierten und Isomerisierungs-induzierten Dynamiken auf den selben Mechanismus zurückgeführt werden können. Der wesentliche Vorgang, der die Faltungs- und Entfaltungsdynamiken des Peptids bestimmt, ist somit unabhängig vom Auslösemechanismus, sprich unabhängig

davon, ob die Dynamik durch eine geometrische Änderung einer Peptidgruppe oder durch eine Änderung der Umgebung des Peptids (Temperatursprung) ausgelöst wird. Die Kombination der beiden Methoden erlaubt zudem eine detaillierte Beschreibung des Faltungsprozesses: Die Faltungs- und Entfaltungsdynamiken des β -Haarnadelpeptids werden durch einen Übergangszustand bestimmt. Der Faltungsprozess über diesen Übergangszustand ist vermutlich durch einen hydrophoben Kollaps bestimmt. Das vielfach in der Literatur diskutierte downhill-folding, bei dem die Faltung als Diffusionsprozess modelliert wird, kann für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte β -Haarnadelstruktur eindeutig ausgeschlossen werden [41]. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kombination der beiden experimentellen Ansätze es ermöglicht, ein detailliertes Bild der Peptidfaltungsdynamiken und Mechanismen zu erlangen.

Photoschaltbare Amyloid-Aggregate: Die Aggregation photoschaltbarer Peptide in Amyloid-Aggregate wurde in dieser Arbeit über Infrarotspektroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Hierbei konnte erstmals gezeigt werden, dass es durch eine Isomerisierung des in die Aminosäurekette eingebauten Photoschalters möglich ist, den Aggregationsprozess zu kontrollieren und sogar ein Auflösen der gebildeten Amyloid-Aggregate zu induzieren [42]. Der lichtinduzierte Auflöseprozess wurde dann über zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie genauer untersucht: Nach der Anregung und der Isomerisierung des Azobenzol-Photoschalters zeigen die zeitaufgelösten Mittelinfrarotmessungen Absorptionsänderungen, welche weitgehend auf der Zeitskala von Nanosekunden relaxieren. Diese Absorptionsänderungen können der Relaxation von, durch die Anregung des Photoschalters hervorgerufener, vibronischer Überschussenergie in dem Amyloid-Aggregat oder einer Anpassung des isomerisierten Azobenzol an die aggregierte Umgebung zugeordnet werden [43]. Der eigentliche Auflöseprozess der Amyloid-Aggregate findet hingegen, ähnlich wie die lichtinduzierten Aggregationsprozesse, auf der Zeitskala von Minuten statt. Auf Grundlage dieser Arbeit sind in letzter Zeit einige interessante Arbeiten von anderen Gruppen erschienen [135, 134]: Hierbei wurde ein Azobenzolschalter in das mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierte Amyloid β -Peptid eingebaut. Durch eine Isomerisierung des Photoschalters kann auch bei diesen Peptiden ein Auflösen gebildeter Amyloid-Aggregate induziert werden. Das Auflösen der Amyloid-Aggregate führt hier zur Bildung zelltoxischer Oligomere. Mit dieser Technik ist es somit möglich, durch Belichtung zu einem definierten Zeitpunkt, pathologische Oligomere zu erzeugen [135]. Das in der vorliegenden Arbeit erstmals vorgestellte Verfahren, die Aggregation in Amyloid-Strukturen mit photoschaltbaren Peptiden zu kontrollieren, liefert somit neue Möglichkeiten für die Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen und der mit diesen assoziierten Proteinaggregation.

Anle138b und dessen strukturspezifische Bindung an α -Synuclein-Aggregate: In dieser Arbeit wurden die intrinsischen Fluoreszenzeigenschaften und die Photophysik von Anle138b untersucht. Über die intrinsische Fluoreszenz ist es dann möglich, die Bindung an monomeres oder pathologisch aggregiertes α -Synuclein, wie es bei Parkinson-Patienten beobachtet wird, zu untersuchen und zu quantifizieren. Anle138b in Lösung hat nur eine sehr geringe Fluoreszenzquantenausbeute von $\leq 1\%$. Diese geringe Fluoreszenzquantenausbeute

ist vermutlich auf einen ultraschnellen Übergang (~ 40 ps) in einen Tripletzustand zurückzuführen. Bei dem Übergang in den Tripletzustand könnte eine Verdrehung des Anle138b Moleküls, aus seiner im Grundzustand planaren Geometrie, beteiligt sein. Bei der Messung von Anle138b mit α -Synuclein-Fibrillen zeigt sich eine drastische Zunahme der Fluoreszenzquantenausbeute. Die starke Fluoreszenzzunahme ist auf eine Bindung von Anle138b an die Aggregate zurückzuführen. Bei der Bindung an die Aggregate wird, vermutlich aufgrund der rigiden Umgebung des Moleküls, eine Verdrehung des Moleküls und der Übergang in den Tripletzustand inhibiert, woraus die beobachtete hohe Fluoreszenzquantenausbeute folgt. Über konzentrationsabhängige Fluoreszenzmessungen konnte gezeigt werden, dass ca. 12 α -Synuclein-Proteine im Aggregat eine Bindungsstelle für Anle138b ergeben und dass Anle138b mit einer Bindungskonstante $K_B = 1/K_d = 1/(170 \text{ nM})$ sehr intensiv an die Aggregate bindet. Im Gegensatz hierzu wurden keine Anzeichen für eine Bindung von Anle138b an monomeres α -Synuclein beobachtet. Die spezifische Bindung von Anle138b an pathologische Aggregate unterstützt die These, dass der Wirkmechanismus von Anle138b, bei neurodegenerativen Erkrankungen, auf einer Modulation der Aggregationsprozesse bestimmter Proteine basiert. Es deutet jedoch darauf hin, dass bei dem Wirkmechanismus nicht nur die Modulation von kleinen Aggregaten, den so genannten Oligomeren, eine Rolle spielt, sondern auch die größeren, pathologischen Fibrillen relevant sein könnten.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Proteinfaltungsmechanismen	9
2.2	Schema der freien Energie für ein Protein mit einem gefalteten (N) und einem ungefalteten Zustand (U)	12
2.3	Zweidimensionale trichterförmige freie Energielandschaften	14
2.4	Schematische Darstellung der β -Haarnadelstruktur des Peptids TrpZip2	15
2.5	Faltungsmechanismen einer β -Haarnadel	17
2.6	Protein Aggregation im Gehirn von Parkinson-Patienten	18
2.7	Hierarchischer Aufbau der Struktur von Amyloid-Fibrillen	19
2.8	Schematische Darstellung der Aggregation von Proteinen in Oligomere und Fibrillen	20
2.9	Anle138b-Screening	23
2.10	Anle138b: Prozentsatz der lebenden Mäuse nach einer Prionen-Infektion	24
2.11	Anle138b: Verlängerung der symptomfreien Lebenszeit transgener Parkinson-Mäuse	25
3.1	Nanosekunden-Anreg-Abtast-Spektroskopie	28
3.2	MIR-Pulse über die Kombination eines NOPA-, OPA- und DFM-Aufbaus	30
3.3	Schema der Pulsabfolge für die ns-Anreg-Abtast-Spektroskopie	32
3.4	Aufbau zur Messung laserinduzierter T-Sprung-Kinetiken	34
3.5	Schematische Funktionsweise einer Streakkamera	37
3.6	Zählen einzelner Fluoreszenzphotonen	39
6.1	Struktur der Substanzen Anle138b und Sery313b	75
6.2	Fluoreszenz von Anle138b in DMSO	77
6.3	Fluoreszenz von Anle138b in Wasser	78
6.4	Fluoreszenzspektrum von Anle138b und Sery313 in Wasser	79
6.5	2D-Transiente-Fluoreszenzintensität von Anle138b in DMSO	80
6.6	Transiente Fluoreszenzintensität von Anle138b in DMSO	81
6.7	Schematische Darstellung von Molekül-Potenzialflächen	82
6.8	Schematische Darstellung der Energieniveaus von Anle138b	85
6.9	Fluoreszenzeigenschaften von Anle138b nach Zugabe von α -Synuclein-Monomeren und Fibrillen	88
6.10	Anle138b-Titrationskurven	89
6.11	Scatchard-Diagramme	92
6.12	Schematische Darstellung der Bindung von Anle138b an α -Synuclein	93

Abkürzungsverzeichnis

BBO	Beta-Bariumborat
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
CD	Circulardichroismus
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
DFM	Differenz-Frequenz-Mischung
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
FWHM	Volle Breite bei halbem Maximum
MCP	Microchannelplate
MCT	Mercury-Cadmium-Telluride
MIR	Mittelinfrarot
NIR	Nahinfrarot
NOPA	Nichtkollinearer-Optisch-Parametrischer-Verstärker
OPA	Optisch-Parametrischer-Verstärker
PrP	Prion-Protein
PrP ^c	native Prion-Proteine
PrP ^{sc}	fehlgefaltete Form des Prion-Proteins
ps	Pikosekunden
SHG	Zweite-Harmonische-Generation

Literaturverzeichnis

- [1] Albert L. Lehninger. *Prinzipien der Biochemie*. de Gruyter, Berlin, 1987.
- [2] Osvath Sz Barna L Zavodszky P Szilagyi A, Kardos J. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Chapter 10*, volume 7. Springer, 2007.
- [3] Beat Fierz, Helmut Satzger, Christopher Root, Peter Gilch, Wolfgang Zinth, and Thomas Kiefhaber. Loop formation in unfolded polypeptide chains on the picoseconds to microseconds time scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7):2163–2168, February 2007.
- [4] Rainer Jaenicke. Stability and folding of domain proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 71(2):155–241, February 1999.
- [5] Valda J. Vinson. Proteins in motion. *Science*, 324(5924):197–197, October 2009.
- [6] Robert G. Smock and Lila M. Gierasch. Sending signals dynamically. *Science*, 324(5924):198–203, October 2009.
- [7] S. Rabindran, R. Haroun, J Clos, J Wisniewski, and C Wu. Regulation of heat shock factor trimer formation- role of a conserved leucine zipper. *Science*, 259(5092):230–234, January 1993.
- [8] Hye Yoon Park, Sally A. Kim, Jonas Korlach, Elizabeth Rhoades, Lisa W. Kwok, Warren R. Zipfel, M. Neal Waxham, Watt W. Webb, and Lois Pollack. Conformational changes of calmodulin upon ca² binding studied with a microfluidic mixer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2):542–547, January 2008.
- [9] Amy H. Andreotti. Native state proline isomerization- an intrinsic molecular switch. *Biochemistry*, 42(32):9515–9524, August 2003.
- [10] Virginia A. Jarymowycz and Martin J. Stone. Remote changes in the dynamics of the phosphotyrosine-binding domain of insulin receptor substrate-1 induced by phosphopeptide binding. *Biochemistry*, 47(50):13371–13382, December 2008.
- [11] Nataliya Popovych, Shangjin Sun, Richard H. Ebright, and Charalampos G. Kalodimos. Dynamically driven protein allostery. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(9):831–838, September 2006.
- [12] Ken A. Dill and Hue Sun Chan. From levinthal to pathways to funnels. *Nature Structural and Molecular Biology*, 4(1):10–19, January 1997.

- [13] J. Sabelko, J. Ervin, and M. Gruebele. Observation of strange kinetics in protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11):6031–6036, May 1999.
- [14] J D Bryngelson, J N Onuchic, N D Socci, and P G Wolynes. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins*, 21(3):167–195, March 1995.
- [15] Jose Nelson Onuchic and Peter G Wolynes. Theory of protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(1):70–75, February 2004.
- [16] Jens Bredenbeck, Jan Helbing, Janet R. Kumita, G. Andrew Woolley, and Peter Hamm. Alpha-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, February 2005.
- [17] Carsten Krejtschi and Karin Hauser. Stability and folding dynamics of polyglutamic acid. *European Biophysics Journal*, 40(5):673–685, January 2011.
- [18] Ranjani Narayanan, Leslie Pelakh, and Stephen J. Hagen. Solvent friction changes the folding pathway of the tryptophan zipper TZ2. *Journal of Molecular Biology*, 390(3):538–546, July 2009.
- [19] Christopher D. Snow, Linlin Qiu, Deguo Du, Feng Gai, Stephen J. Hagen, and Vijay S. Pande. Trp zipper folding kinetics by molecular dynamics and temperature-jump spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12):4077–4082, March 2004.
- [20] Stephen J. Hagen. Probe-dependent and nonexponential relaxation kinetics- unreliable signatures of downhill protein folding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(1):205–217, 2007.
- [21] Ian W. Hamley. Bildung von peptidfibrillen. *Angewandte Chemie*, 119(43):8274–8295, 2007.
- [22] Ron Brookmeyer, Elizabeth Johnson, Kathryn Ziegler-Graham, and H. Michael Arrighi. Forecasting the global burden of alzheimers disease. *Alzheimers and Dementia- The Journal of the Alzheimers Association*, 3(3):186–191, July 2007.
- [23] F. Bermejo-Pareja, J. Benito-Leon, S. Vega, M. J. Medrano, and G. C. Roman. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central spain. *Journal of the Neurological Sciences*, 264(1-2):63–72, January 2008.
- [24] Lonneke M L de Lau and Monique M B Breteler. Epidemiology of parkinsons disease. *Lancet neurology*, 5(6):525–535, June 2006.
- [25] Ali Samii, John G Nutt, and Bruce R Ransom. Parkinsons disease. *Lancet*, 363(9423):1783–1793, May 2004.

- [26] Stanley B. Prusiner. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23):13363–13383, November 1998.
- [27] Michel Goedert and Maria Grazia Spillantini. A century of alzheimer’s disease. *Science*, 314(5800):777–781, November 2006.
- [28] G Brent Irvine, Omar M El-Agnaf, Ganesh M Shankar, and Dominic M Walsh. Protein aggregation in the brain- the molecular basis for alzheimer’s and parkinson’s diseases. *Molecular Medicine*, 14(7-8):451–464, 2008.
- [29] Mark S. Forman, John Q. Trojanowski, and Virginia M.-Y. Lee. Neurodegenerative diseases- a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine*, 10(10):1055–1063, October 2004.
- [30] Jens Wagner, Sergey Ryazanov, Andrei Leonov, Johannes Levin, Song Shi, Felix Schmidt, Catharina Prix, Francisco Pan-Montojo, Uwe Bertsch, Gerda Mitteregger-Kretzschmar, Markus Geissen, Martin Eiden, Fabienne Leidel, Thomas Hirschberger, Andreas A. Deeg, Julian J. Krauth, Wolfgang Zinth, Paul Tavan, Jens Pilger, Markus Zweckstetter, Tobias Frank, Mathias Baehr, Jochen H. Weishaupt, Manfred Uhr, Henning Urlaub, Ulrike Teichmann, Matthias Samwer, Kai Boetzel, Martin Groschup, Hans Kretzschmar, Christian Griesinger, and Armin Giese. Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and parkinsons disease. *Acta Neuropathologica*, 125(6):795–813, June 2013.
- [31] Bharathi Shrikanth Gadad, Gabrielle B. Britton, and K. S. Rao. Targeting oligomers in neurodegenerative disorders: Lessons from alpha-synuclein, tau, and amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimers Disease*, 24(0):223–232, January 2011.
- [32] Gal Bitan, Erica A Fradinger, Sean M Spring, and David B Teplow. Neurotoxic protein oligomers -what you see is not always what you get. *Amyloid*, 12(2):88–95, January 2005.
- [33] Felix Schmidt, Johannes Levin, Frits Kamp, Hans Kretzschmar, Armin Giese, and Kai Boetzel. Single-channel electrophysiology reveals a distinct and uniform pore complex formed by alpa-synuclein oligomers in lipid membranes. *PLOS ONE*, 7(8):e42545, 2012.
- [34] Jan Bieschke, Martin Herbst, Thomas Wiglenda, Ralf P. Friedrich, Annett Boeddrich, Franziska Schiele, Daniela Kleckers, Juan Miguel Lopez del Amo, Bjoern A. Gruening, Qinwen Wang, Michael R. Schmidt, Rudi Lurz, Roger Anwyl, Sigrid Schnoegl, Marcus Faendrich, Ronald F. Frank, Bernd Reif, Stefan Guenther, Dominic M. Walsh, and Erich E. Wanker. Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic beta-sheet-rich amyloid fibrils. *Nature Chemical Biology*, 8(1):93–101, January 2012.
- [35] Robert M. Koffie, Melanie Meyer-Luehmann, Tadafumi Hashimoto, Kenneth W. Adams, Matthew L. Mielke, Monica Garcia-Alloza, Kristina D. Micheva, Stephen J.

- Smith, M. Leo Kim, Virginia M. Lee, Bradley T. Hyman, and Tara L. Spires-Jones. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10):4012–4017, 2009.
- [36] Uwe Bertsch, Konstanze F. Winklhofer, Thomas Hirschberger, Jan Bieschke, Petra Weber, F. Ulrich Hartl, Paul Tavan, Jorg Tatzelt, Hans A. Kretzschmar, and Armin Giese. Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *Journal of Virology*, 79(12):7785–7791, June 2005.
- [37] Izhack Cherny and Ehud Gazit. Amyloids: Not only pathological agents but also ordered nanomaterials¹³. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(22):4062–4069, 2008.
- [38] Jeffrey F. Smith, Tuomas P. J. Knowles, Christopher M. Dobson, Cait E. MacPhee, and Mark E. Welland. Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43):15806–15811, October 2006.
- [39] Tuomas P. Knowles, Anthony W. Fitzpatrick, Sarah Meehan, Helen R. Mott, Michele Vendruscolo, Christopher M. Dobson, and Mark E. Welland. Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils. *Science*, 318(5858):1900–1903, December 2007.
- [40] Izhack Cherny and Ehud Gazit. Amyloide- nicht nur pathologische substanzen, sondern auch geordnete nanomaterialien. *Angewandte Chemie*, 120(22):4128–4136, 2008.
- [41] Andreas A Deeg, Michael Rampp, Alexander Popp, Bert Pilles, Tobias E Schrader, Karin Hauser, Luis Moroder, and Wolfgang Zinth. Isomerization and temperature jump induced dynamics of a photo-switchable beta-hairpin. *Chemistry a European Journal*, accepted:1–8, 2013.
- [42] Andreas A Deeg, Tobias E Schrader, Susanne Kempter, Jose Pfizer, Luis Moroder, and Wolfgang Zinth. Light-triggered aggregation and disassembly of amyloid-like structures. *ChemPhysChem*, 12(3):559–562, February 2011.
- [43] Andreas A. Deeg, Tobias E. Schrader, Halina Strzalka, Jose Pfizer, Luis Moroder, and Wolfgang Zinth. Amyloid like structures formed by azobenzene peptides: Light triggered disassembly. *Spectroscopy-An International Journal*, 27(5-6):387–391, 2012.
- [44] C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela, and F. H. White. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47(9):1309–1314, September 1961.

- [45] Shu-Qun Liu, Xing-Lai Ji, Yan Tao, De-Yong Tan, Ke-Qin Zhang, and Yun-Xin Fu. Protein folding, binding and energy landscape: A synthesis. In Pravin Kaumaya, editor, *Protein Engineering*. InTech, February 2012.
- [46] Cyrus Levinthal. How to fold graciously. pages 22–24. University of Illinois Press, 1969.
- [47] Cyrus Levinthal. Are there pathways for protein folding? *Extrait du Journal de Chimie Physique*, 65(1), 1968.
- [48] Martin Karplus and David L. Weaver. Protein-folding dynamics. *Nature*, 260(5550):404–406, April 1976.
- [49] Peter S. Kim and Robert L. Baldwin. Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annual Review of Biochemistry*, 51(1):459–489, 1982.
- [50] Donald B. Wetlaufer. Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(3):697–701, March 1973.
- [51] Ken A. Dill. Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochemistry*, 24(6):1501–1509, March 1985.
- [52] Joseph D. Bryngelson and Peter G. Wolynes. Intermediates and barrier crossing in a random energy model (with applications to protein folding). *J. Phys. Chem.*, 93(19):6902–6915, 1989.
- [53] Henry Eyring. The activated complex in chemical reactions. *The Journal of Chemical Physics*, 3(2):107–115, February 1935.
- [54] Johannes Buchner and Thomas Kiefhaber. *Protein folding handbook*. Wiley - VCH, 2005.
- [55] Florian Krieger, Beat Fierz, Oliver Bieri, Mario Drewello, and Thomas Kiefhaber. Dynamics of unfolded polypeptide chains as model for the earliest steps in protein folding. *Journal of Molecular Biology*, 332(1):265–274, September 2003.
- [56] Florian Krieger, Andreas Moeglich, and Thomas Kiefhaber. Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(10):3346–3352, 2005.
- [57] Deguo Du, Yongjin Zhu, Cheng-Yen Huang, Feng Gai, and Alan Fersht. Understanding the key factors that control the rate of beta-hairpin folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45):15915–15920, November 2004.
- [58] O. Bieri and T. Kiefhaber. Elementary steps in protein folding. *Biological Chemistry*, 380(7-8):923–929, July 1999.

- [59] R Zwanzig, A Szabo, and B Bagchi. Levinthals paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(1):20–22, January 1992.
- [60] J. D. Bryngelson and P. G. Wolynes. Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21):7524–7528, January 1987.
- [61] Alice I. Bartlett and Sheena E. Radford. An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(6):582–588, 2009.
- [62] Hue Sun Chan and Ken A. Dill. Transition states and folding dynamics of proteins and heteropolymers. *The Journal of Chemical Physics*, 100(12):9238–9257, June 1994.
- [63] Maria M. Garcia-Mira, Mourad Sadqi, Niels Fischer, Jose M. Sanchez-Ruiz, and Victor Munoz. Experimental identification of downhill protein folding. *Science*, 298(5601):2191–2195, December 2002.
- [64] Jianwei Liu, Luis A. Campos, Michele Cerminara, Xiang Wang, Ravishankar Ramanathan, Douglas S. English, and Victor Munoz. Exploring one-state downhill protein folding in single molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, December 2011.
- [65] Feng Liu and Martin Gruebele. Tuning lambda 6-85 towards downhill folding at its melting temperature. *Journal of Molecular Biology*, 370(3):574–584, July 2007.
- [66] Sun Xiao-Jun, Lu Xiao-Xia, Yan Yu-Liang, Duan Jun-Feng, and Zhang Jing-Shang. Analytical solution of smoluchowski equation in harmonic oscillator potential. *Communications in Theoretical Physics*, 43(6):1099, June 2005.
- [67] Anjum Ansari. Mean first passage time solution of the smoluchowski equation: Application to relaxation dynamics in myoglobin. *The Journal of Chemical Physics*, 112(5):2516–2522, February 2000.
- [68] Hairong Ma and Martin Gruebele. Low barrier kinetics: Dependence on observables and free energy surface. *Journal of Computational Chemistry*, 27(2):125–134, January 2006.
- [69] Urmi Doshi and Victor Munoz. Kinetics of alpha-helix formation as diffusion on a one-dimensional free energy surface. *Chemical Physics*, 307(2-3):129–136, 2004.
- [70] Janne A. Ihalainen, Jens Bredenbeck, Rolf Pfister, Jan Helbing, Lei Chi, Ivo H. M. van Stokkum, G. Andrew Woolley, and Peter Hamm. Folding and unfolding of a photoswitchable peptide from picoseconds to microseconds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13):5383–5388, March 2007.

- [71] Agnieszka Lewandowska, Stanislaw Oldziej, Adam Liwo, and Harold A. Scheraga. Beta-hairpin-forming peptides; models of early stages of protein folding. *Biophysical Chemistry*, 151(1-2):1–9, September 2010.
- [72] Francisco J. Blanco, German Rivas, and Luis Serrano. A short linear peptide that folds into a native stable beta-hairpin in aqueous solution. *Nature Structural and Molecular Biology*, 1(9):584–590, September 1994.
- [73] Andrea G. Cochran, Nicholas J. Skelton, and Melissa A. Starovasnik. Tryptophan zippers: Stable, monomeric beta-hairpins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10):5578–5583, May 2001.
- [74] Santanu Roy, Thomas L C Jansen, and Jasper Knoester. Structural classification of the amide i sites of a beta-hairpin with isotope label 2DIR spectroscopy. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 12(32):9347–9357, August 2010. PMID: 20596553.
- [75] Yi Xiao, Changjun Chen, and Yi He. Folding mechanism of beta-hairpin trpzip2: Heterogeneity, transition state and folding pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6):2838–2848, June 2009.
- [76] Kevin C. Jones, Chunte Sam Peng, and Andrei Tokmakoff. Folding of a heterogeneous beta-hairpin peptide from temperature-jump 2D IR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, February 2013.
- [77] Agnieszka Lewandowska, Stanislaw Oldziej, Adam Liwo, and Harold A Scheraga. Mechanism of formation of the c-terminal beta-hairpin of the b3 domain of the immunoglobulin-binding protein g from streptococcus. IV. implication for the mechanism of folding of the parent protein. *Biopolymers*, 93(5):469–480, May 2010.
- [78] Wei Yuan Yang, Jed W. Pitera, William C. Swope, and Martin Gruebele. Heterogeneous folding of the trpzip hairpin: Full atom simulation and experiment. *Journal of Molecular Biology*, 336(1):241–251, February 2004.
- [79] Karin Hauser, Carsten Krejtschi, Rong Huang, Ling Wu, and Timothy A. Keiderling. Site-specific relaxation kinetics of a tryptophan zipper hairpin peptide using temperature-jump IR spectroscopy and isotopic labeling. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(10):2984–2992, 2008.
- [80] Shou-Liang Dong, Markus Loeweneck, Tobias E. Schrader, Wolfgang J. Schreier, Wolfgang Zinth, Luis Moroder, and Christian Renner. A photocontrolled beta-hairpin peptide. *Chemistry - A European Journal*, 12(4):1114–1120, 2006.
- [81] Rebecca C. Brown, Alan H. Lockwood, and Babasaheb R. Sonawane. Neurodegenerative diseases: An overview of environmental risk factors. *Environmental Health Perspectives*, 113(9):1250–1256, September 2005.

- [82] Christian Haass and Dennis J. Selkoe. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2):101–112, 2007.
- [83] Robert D. Terry, Eliezer Masliah, David P. Salmon, Nelson Butters, Richard DeTeresa, Robert Hill, Lawrence A. Hansen, and Robert Katzman. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 30(4):572–580, 1991.
- [84] Sreeganga Chandra, Francesco Fornai, Hyung-Bae Kwon, Umar Yazdani, Deniz Atasoy, Xinran Liu, Robert E Hammer, Giuseppe Battaglia, Dwight C German, Pablo E Castillo, and Thomas C SÄEdhof. Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41):14966–14971, October 2004.
- [85] A. Cheramy, V. Leviel, and J. Glowinski. Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature*, 289(5798):537–543, February 1981.
- [86] Stanley B Prusiner, Michael R Scott, Stephen J DeArmond, and Fred E Cohen. Prion protein biology. *Cell*, 93(3):337–348, May 1998.
- [87] John Collinge, Katie C. L. Sidle, Julie Meads, James Ironside, and Andrew F. Hill. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 383(6602):685–690, October 1996.
- [88] Kelly A. Conway, James D. Harper, and Peter T. Lansbury. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry*, 39(10):2552–2563, 2000.
- [89] Hai-Young Kim, Min-Kyu Cho, Dietmar Riedel, Claudio Fernandez, and Markus Zweckstetter. Dissociation of amyloid fibrils of alpha synuclein in supercooled water. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(27):5046–5048, 2008.
- [90] PhD Dep't of Cellular Biology & Anatomy Louisiana State University Health Sciences Center Shreveport, John A. Beal. Frontal (coronal) section of the brain, November 2005.
- [91] Surja Rajan. Lewy bodies.
- [92] Melanie R. Nilsson. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, 34(1):151–160, September 2004.
- [93] Andrea Hawe, Marc Sutter, and Wim Jiskoot. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharmaceutical Research*, 25(7):1487–1499, January 2008.
- [94] Ritu Khurana, Chris Coleman, Cristian Ionescu-Zanetti, Sue A. Carter, Vinay Krishna, Rajesh K. Grover, Raja Roy, and Shashi Singh. Mechanism of thioflavin t binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, 151(3):229–238, September 2005.

- [95] Thorsten Luehrs, Christiane Ritter, Marc Adrian, Dominique Riek-Loher, Bernd Bohrmann, Heinz Doebeli, David Schubert, and Roland Riek. 3D structure of alzheimers amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(48):17342–17347, 2005.
- [96] Marcus Kostka, Tobias Hoegen, Karin M. Danzer, Johannes Levin, Matthias Haebeck, Andreas Wirth, Richard Wagner, Charles G. Glabe, Sabine Finger, Udo Heinzelmann, Patrick Garidel, Wenzhen Duan, Christopher A. Ross, Hans Kretzschmar, and Armin Giese. Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16):10992–11003, April 2008.
- [97] D S Knopman, J E Parisi, A Salviati, M Floriach-Robert, B F Boeve, R J Ivnik, G E Smith, D W Dickson, K A Johnson, L E Petersen, W C McDonald, H Braak, and R C Petersen. Neuropathology of cognitively normal elderly. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 62(11):1087–1095, November 2003.
- [98] Milla Koistinaho, Michael Ort, Jose M. Cimadevilla, Roman Vondrous, Barbara Cordell, Jari Koistinaho, Jan Bures, and Linda S. Higgins. Specific spatial learning deficits become severe with age in beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta-amyloid deposits but do not form plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25):14675–14680, 2001. PMID: 11724968.
- [99] Dean M. Hartley, Dominic M. Walsh, Chianping P. Ye, Thekla Diehl, Sara Vasquez, Peter M. Vassilev, David B. Teplow, and Dennis J. Selkoe. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, 19(20):8876–8884, 1999.
- [100] Dominic M Walsh, Igor Klyubin, Julia V Fadeeva, William K Cullen, Roger Anwyl, Michael S Wolfe, Michael J Rowan, and Dennis J Selkoe. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880):535–539, April 2002.
- [101] James P. Cleary, Dominic M. Walsh, Jacki J. Hofmeister, Ganesh M. Shankar, Michael A. Kuskowski, Dennis J. Selkoe, and Karen H. Ashe. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nature Neuroscience*, 8(1):79–84, January 2005.
- [102] Kelly A. Conway, Seung-Jae Lee, Jean-Christophe Rochet, Tomas T. Ding, Robin E. Williamson, and Peter T. Lansbury. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha synuclein mutations linked to early-onset parkinsons disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2):571–576, 2000.
- [103] Sandra Chimon, Medhat A Shaibat, Christopher R Jones, Diana C Calero, Buzulagu Aizezi, and Yoshitaka Ishii. Evidence of fibril-like beta-sheet structures in a neuroto-

- xic amyloid intermediate of alzheimers beta-amyloid. *Nature structural & molecular biology*, 14(12):1157–1164, 2007.
- [104] Damla Pinar Karpinar, Madhu Babu Gajula Balija, Sebastian Kuegler, Felipe Opa-zo, Nasrollah Rezaei-Ghaleh, Nora Wender, Hai-Young Kim, Grit Taschenberger, Bjoern H. Falkenburger, Henrike Heise, Ashutosh Kumar, Dietmar Riedel, Lars Fichtner, Aaron Voigt, Gerhard H. Braus, Karin Giller, Stefan Becker, Alf Herzig, Marc Baldus, Herbert Jaeckle, Stefan Eimer, Joerg B. Schulz, Christian Griesinger, and Markus Zweckstetter. Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in parkinson’s disease models. *Embo Journal*, 28(20):3256–3268, 2009.
- [105] Hilal A. Lashuel, Dean Hartley, Benjamin M. Petre, Thomas Walz, and Peter T. Lansbury. Neurodegenerative disease: Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, 418(6895):291–291, July 2002.
- [106] Julia Tsai, Jaime Grutzendler, Karen Duff, and Wen-Biao Gan. Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nature Neuroscience*, 7(11):1181–1183, November 2004.
- [107] J. Bieschke, A. Giese, W. Schulz-Schaeffer, I. Zerr, S. Poser, M. Eigen, and H. Kretschmar. Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10):5468–5473, September 2000.
- [108] Helmut Guenzler and Hans-Ulrich Gremlich. *IR-Spektroskopie*. Wiley, April 2012.
- [109] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, December 2007.
- [110] Peter William Atkins. *Physikalische Chemie*. Wiley, February 1996.
- [111] B. David Williams and C. Barry Carter. *Transmission Electron Microscopy 2nd ed.* Springer, 2009.
- [112] Tobias Schrader, Thorben Cordes, Wolfgang Schreier, Florian Koller, Shou-Liang Dong, Luis Moroder, and Wolfgang Zinth. Folding and unfolding of light-triggered beta-hairpin model peptides. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(18):5219–5226, May 2011.
- [113] Arne Sieg. *Femtosekundenspektroskopie im mittleren Infraroten: Energierelaxation in para-Nitroanilin und Konformationsdynamik von Azobenzolpeptiden*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians Universitaet, Muenchen, 2005.
- [114] Tobias Schrader. *Strukturdynamik eines photoschaltbaren beta-Hairpin Modellpeptids*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians Universitaet, Muenchen, 2008.
- [115] Wolfgang Schreier. *UV-Strahlung und DNA-Schaeden*. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians Universitaet, Muenchen, 2008.

-
- [116] Giulio Cerullo and Sandro De Silvestri. Ultrafast optical parametric amplifiers. *Review of Scientific Instruments*, 74(1):1, 2003.
- [117] Carmen Kuebel. *Anreg-Abtast-Experiment zur Entfaltung des schaltbaren Peptids AzoTrpZip2 - Integration eines abstimmbaren ns-Lasersystem*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians Universitaet, Muenchen, 2013.
- [118] J. Piel, M. Beutter, and E. Riedle. 20-50fs pulses tunable across the near infrared from a blue-pumped noncollinear parametric amplifier. *Optics Letters*, 25(3):180–182, February 2000.
- [119] Karin Haiser. *Femtosekunden-Infrarotspektroskopie von UV-induzierten Photoschaden in Nukleinsaeuren*. Doktorarbeit, LMU, June 2012.
- [120] Benjamin Schuster. *Integration einer IR-Vielkanaldetektion in ein bestehendes Anreg-Abtast-Experiment und Femtosekundenspektroskopie an Azobenzol Dabcyll Saeure*. Diplomarbeit, LMU, Muenchen, 2011.
- [121] T Schrader, A Sieg, F Koller, W Schreier, Q An, W Zinth, and P Gilch. Vibrational relaxation following ultrafast internal conversion: comparing IR and raman probing. *Chemical Physics Letters*, 392(4-6):358–364, July 2004.
- [122] Halina Strzalka. *Infrarotspektroskopie von Femtosekunden bis Mikrosekunden an Xanthon und AcAzoTrpZip2*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians Universitaet, Muenchen, 2010.
- [123] Michael Ramppp. *Temperaturabhaengige Faltung des Modellpeptids AzoTrpZip2 von Nano- bis Mikrosekunden*. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians Universitaet, Muenchen, 2011.
- [124] M S Braiman and K J Rothschild. Fourier transform infrared techniques for probing membrane protein structure. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 17(1):541–570, 1988.
- [125] R. M. Ballew, J. Sabelko, C. Reiner, and M. Gruebele. A single -sweep, nanosecond time resolution laser temperature -jump apparatus. *Review of Scientific Instruments*, 67(10):3694 – 3699, 1996.
- [126] W.O. Wray, T. Aida, and R.B. Dyer. Photoacoustic cavitation and heat transfer effects in the laser-induced temperature jump in water. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 74(1):57–66, January 2002.
- [127] Teja Herzog. *Ultraschnelle Isomerisierungsreaktionen - Chromene, Hemithioindigo und Chromopeptide*. PhD thesis, LMU, June 2012.
- [128] Gerald Ryseck, Thomas Schmierer, Karin Haiser, Wolfgang Schreier, Wolfgang Zinth, and Peter Gilch. The excited-state decay of 1-methyl-2(1H)-pyrimidinone is an activated process. *ChemPhysChem*, 12(10):1880–1888, 2011.

- [129] Bernhard Schmidt. *Femtosekunden-Fluoreszenzspektroskopie photoisomerisierender Molekuele*. Doktorarbeit, LMU, February 2005.
- [130] Kristina Nehls. *Pikosekunden Emissionsmessungen mit einer Strekkamera-Charakterisierung und Anwendung*. Diplomarbeit, LMU, Muenchen, 2012.
- [131] Richardson Gratings. Specifications, richardson gratings, blaze 600nm, 50 gr per mm, MN: 10RG050 600 1.
- [132] Hamamatsu. Spezifikationen streakkamera model 5676, SN 030329, hamamatsu, March 2011.
- [133] Hamamatsu. *Guide to Streak Cameras*. 2008.
- [134] Todd M. Doran, Elizabeth A. Anderson, Sarah E. Latchney, Lisa A. Opanashuk, and Bradley L. Nilsson. An azobenzene photoswitch sheds light on turn nucleation in amyloid beta self-assembly. *ACS Chem. Neurosci.*, 2012.
- [135] Christian Hoppmann, Christian Barucker, Dorothea Lorenz, Gerd Multhaup, and Michael Beyermann. Light-controlled toxicity of engineered amyloid beta peptides. *ChemBioChem*, 2012.
- [136] T. Naegele, R. Hoche, W. Zinth, and J. Wachtveitl. Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene. *Chemical Physics Letters*, 272(5-6):489–495, 1997.
- [137] Helmut Satzger. *Untersuchung initialer Schritte der Peptidfaltung mit Ultrakurzzeit-spektroskopie*. Doktorarbeit, LMU, Muenchen, 2004.
- [138] Anne Reiner. *Fluoreszenzspektroskopie zu Photoreaktion und Kopplung von DPP-Substanzen an pathologische Proteinaggregate*. Diplomarbeit, LMU, Muenchen, 2013.
- [139] Florian Schueder. *Fluoreszenz von Anle138b in verschiedenen Loesungsmitteln und quantitative Analyse von Anle138b an aggregiertem alpha Synuclein*. Bachelorarbeit, LMU, Muenchen, 2012.
- [140] Julian Krauth. *Fluoreszenzspektroskopie eines DPP-Derivats in Kombination mit alpha Synuclein Aggregaten*. Bachelorarbeit, LMU, Muenchen, 2011.
- [141] Noel Boens, Wenwu Qin, Nikola Basaric, Johan Hofkens, Marcel Ameloot, Jacques Pouget, Jean-Pierre Lefevre, Bernard Valeur, Enrico Gratton, Martin vandeVen, Norberto D. Silva, Yves Engelborghs, Katrien Willaert, Alain Sillen, Garry Rumbles, David Phillips, Antonie J. W. G. Visser, Arie van Hoek, Joseph R. Lakowicz, Henryk Malak, Ignacy Gryczynski, Arthur G. Szabo, Don T. Krajcarski, Naoto Tamai, and Atsushi Miura. Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 79(5):2137–2149, 2007.
- [142] Nicholas J. Turro. *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books, January 1991.

- [143] S. J. Strickler and Robert A. Berg. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *The Journal of Chemical Physics*, 37(4):814–822, August 1962.
- [144] Irene W. Kimaru. *Characterization of Chiral Interactions by Fluorescence Anisotropy and Development of Fluorescence Sensors for Recognition of Molecular Species*. ProQuest, 2006.
- [145] Jens Wagner. *Kausale Therapie von Prionerkrankungen: Entwicklung und Charakterisierung neuartiger anti-aggregativer Wirkstoffe in vitro und in vivo*. PhDThesis, lmu, October 2010.
- [146] Brigitte Nuscher, Frits Kamp, Thomas Mehnert, Sabine Odoy, Christian Haass, Philipp J. Kahle, and Klaus Beyer. Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane a THERMODYNAMICS STUDY. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21):21966–21975, 2004.
- [147] Yi Liang. Applications of isothermal titration calorimetry in protein science. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(7):565–576, 2008.
- [148] Vitali I. Stsiapura, Alexander A. Maskevich, Valery A. Kuzmitsky, Vladimir N. Uversky, Irina M. Kuznetsova, and Konstantin K. Turoverov. Thioflavin t as a molecular rotor: Fluorescent properties of thioflavin t in solvents with different viscosity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(49):15893–15902, December 2008.
- [149] Leslie S. Wolfe, Matthew F. Calabrese, Abhinav Nath, Dorottya V. Blaho, Andrew D. Miranker, and Yong Xiong. Protein-induced photophysical changes to the amyloid indicator dye thioflavin t. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39):16863–16868, September 2010.

Anmerkung:

Im Rahmen der in dieser Arbeit dargestellten Veröffentlichungen wurden weitere Arbeiten zitiert. Diese Zitate sind in diesem Literaturverzeichnis im allgemeinen nicht ein zweites Mal aufgeführt, und es sei auf das Literaturverzeichnis der in Kapitel 3 und 4 dargestellten Veröffentlichungen verwiesen.

Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit sind im Rahmen der im Folgenden aufgelisteten Artikel in Fachzeitschriften und Präsentationen veröffentlicht worden:

Publikationen in Fachzeitschriften:

- Andreas A. Deeg, Michael Rampp, Alexander Popp, Bert Pilles, Tobias E Schrader, Karin Hauser, Luis Moroder, and Wolfgang Zinth. Isomerization and temperature jump induced dynamics of a photo-switchable beta-hairpin. *Chemistry - A European Journal*, accepted, 1-8, 2013.
- Andreas A. Deeg, Tobias E Schrader, Susanne Kempter, Jose Pzer, Luis Moroder, and Wolfgang Zinth. Light-triggered aggregation and disassembly of amyloid-like structures. *ChemPhysChem*, 12(3):559562, 2011.
- Andreas A. Deeg, Tobias E. Schrader, Halina Strzalka, Jose Pzer, Luis Moroder, and Wolfgang Zinth. Amyloid like structures formed by azobenzene peptides: Light triggered disassembly. *Spectroscopy - An International Journal*, 27(5-6):387391, 2012.
- Jens Wagner, Sergey Ryazanov, Andrei Leonov, Johannes Levin, Song Shi, Felix Schmidt, Catharina Prix, Francisco Pan-Montojo, Uwe Bertsch, Gerda Mitteregger-Kretzschmar, Markus Geissen, Martin Eiden, Fabienne Leidel, Thomas Hirschberger, Andreas A. Deeg, Julian J. Krauth, Wolfgang Zinth, Paul Tavan, Jens Pilger, Markus Zweckstetter, Tobias Frank, Mathias Baehr, Jochen H. Weishaupt, Manfred Uhr, Henning Urlaub, Ulrike Teichmann, Matthias Samwer, Kai Boetzel, Martin Groschup, Hans Kretzschmar, Christian Griesinger, and Armin Giese. Anle138b: A novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and parkinsons disease. *Acta Neuropathologica*, 125(6):795813, 2013.

Ausgewählte Präsentationen/Tagungsbeiträge:

Vorträge:

- A. Deeg, M. Rampp, A. Popp, B.M. Pilles, T.E. Schrader, L. Moroder, K. Hauser, W. Zinth. Temperature jump versus isomerisation induced dynamics of a photo-switchable β -hairpin peptide. Faltertage, Regensburg, 18. bis 20. Oktober 2013
- Andreas Deeg, Michael Rampp, Alexander Popp, Bert Pilles, Tobias Schrader, S. Kempter, Jose Pfizer, Luis Moroder, Karin Hauser, Wolfgang Zinth. Peptide folding and aggregation studied with light-switchable azobenzene peptides. Invited Talk at Riken Institut, Tokio, Japan, 31. Mai 2013

- Andreas Deeg, Michael Rampp, Alexander Popp, Bert Pilles, Tobias Schrader, Jose Pfizer, Luis Moroder, Karin Hauser, Wolfgang Zinth. β -hairpin formation on the ns to μ s timescale: With different techniques towards an understanding of structural dynamics in a light triggered peptide. 11th German Peptide Symposium, München, 18. bis 21. März 2013
- Andreas Deeg, Michael Rampp, Tobias Schrader, Jose Pfizer, Luis Moroder, Wolfgang Zinth. Light triggered Peptide Folding: Beta-hairpin formation on the ns to μ s timescale. Jahreskonferenz der Deutschen physikalischen Gesellschaft, Session: MO11-6, Stuttgart, 12. bis 16. März 2012
- Andreas Deeg, Tobias Schrader, Wolfgang Zinth. Unfolding, folding and aggregation of light-switchable Azobenzene-peptides. Faltertage, Regensburg, 15. bis 17. Oktober 2010

Posterpräsentationen:

- Andreas Deeg, Michael Rampp, Alexander Popp, Bert Pilles, Tobias Schrader, Jose Pfizer, Luis Moroder, Karin Hauser, Wolfgang Zinth. Folding of a light-switched β -hairpin peptide: Comparison of isomerization and temperature-jump induced peptide dynamics. XVI Internationale Conference on Time-resolved Vibrational Spectroscopy, Beppu, Japan, 19. bis 27. Mai, 2013
- Andreas Deeg, Anne Reiner, Felix Schmidt, Florian Schüder, Andrei Leonov, Sergey Ryazanov, Wolfgang Zinth, Christian Griesinger, Armin Giese. Fluorescence spectroscopy shines light on a potential new drug for neurodegenerative diseases. Joint Meeting of the British and German Biophysical Society, Hünfeld, 21. bis 23. März 2013
- A. A. Deeg, T. E. Schrader, S. Kempter, H. Strzalka, A. Radulescu, J. Pfizer, L. Moroder, W. Zinth. Light-triggered aggregation and disassembly dynamics of amyloid-like structures from picoseconds to minutes. XV Internationale Conference on Time-resolved Vibrational Spectroscopy, Ascona, Switzerland, 19. bis 24. Juni, 2011

Auszeichnungen:

- Award for outstanding Poster Presentation, sponsored by the Journal of Physical Chemistry: Andreas Deeg. Comparison of isomerization and temperature-jump induced peptide dynamics. Presented at the XVI Internationale Conference on Time-resolved Vibrational Spectroscopy, Beppu, Japan, 2013

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit sowohl inhaltlich als auch moralisch unterstützt haben. Ohne euch alle wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank gilt hierbei:

- **Professor Wolfgang Zinth** für die gute Betreuung und den tollen Umgang mit all seinen Mitarbeitern. Für seine unermüdliche Geduld bei diversen fachlichen Diskussionen. Und dafür, dass er auch aggressive Mitarbeiter wie die Hündin Chrissi freundlich in seine Gruppe aufgenommen hat.
- **Professor Armin Giese** für die Möglichkeit an dem großen interdisziplinären Projekt Anle138b teilzuhaben. Für die vielen Diskussionen über die Grundmechanismen neurodegenerativer Erkrankungen und nicht zuletzt für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit.
- **Dem Anle-Team:** Anne Reiner, die sich in ihrer netten Art durch nichts hat aus der Ruhe bringen lassen. Florian Schüder mit seinen vielen Ideen, die selbst in langen Messnächten nicht zum Erliegen kamen. Julian Krauth, für die gute Zusammenarbeit bei den ersten Experimenten. Dr. Frits Kamp, Sergey Ryazanov und natürlich Felix Schmidt für die Herstellung der Proteine, die er uns im Notfall auch mit dem Motorrad vorbei gebracht hat.
- **Den Laborkollegen vom Z20:** Michael Rampp für die diversen gemeinsam durchlittenen Messnächte, mit Stromausfällen, nicht funktionierenden Triggerschaltungen und durchgebrannten Steckdosenleisten. Dominik Bucher für die vielen Diskussionen und die tolle Zeit in Japan. Bert Pilles für die Hardware, die Autokorrektoren und seinen manchmal schwarzen Humor. Des Weiteren Lizhe Liu, Alexander Schlüter, Karin Haiser, Benjamin Schuster, Nadja Regner und Halina Strzalka.
- **Professor Luis Moroder** für die Synthese der Peptide und die netten Diskussionen bei Kaffee und Kuchen.
- **Alexander Popp und Professor Karin Hauser** für die gute Zusammenarbeit bei den Temperatursprungmessungen an ihrer Anlage in Konstanz.
- **Susanne Kempter und Professor Joachim Rädler** für die Zusammenarbeit bei den TEM-Messungen der lichtschaltbaren Amyloid-Aggregate.
- **Franziska Graupner und Anne Reiner** für die zeitaufgelösten Messungen am Anle und die Einführung in den Streackkamera-Aufbau.

- **Der ganzen AG-Zinth:** Pablo Dominguez für den Kaffee. Florian Lederer, Julian Schauseil, Florian Trommer, Elena Samoylova, Teja Herzog und Benjamin März für die lustige Atmosphäre.
- **Dr. Tobias Schrader und Dr. Wolfgang Schreier**, den ehemaligen Postdocs, für die Hilfe am Anfang der Doktorarbeit.
- **Dr. Tobias Aumüller und Professor Thomas Kiefhaber**, für die Hilfe und die Möglichkeit CD Messungen an ihrem Spektrometer durchzuführen.
- **Der AG-Riedle:** Hierbei vor allem Max Bradler und Christian Homann für ihr tiefes Wissen im Bereich der nichtlinearen Optik.
- **Der AG-Huber, AG-Tavan und der Gilch-Gruppe:** Für die vielen lustigen gemeinsamen Kaffee und Kuchenpausen.
- **Der Werkstatt:** Rudi Schwarz, Alfons Storck, Christian Hausmann und Harald Hoppe, für die Konstruktion aller möglichen Teile, vom Tischanbau bis zur Beilagscheibe.
- **Dem Lehrstuhl-Sekretariat:** Frau Alexandra Michaelis und Frau Widmann Diermeier für die Hilfsbereitschaft bei vielen Formalien.
- **Dem Computer-Team:** Dr. Karl-Heinz Mantel und Florian Trommer.
- **Allen, die an der Korrektur dieser Arbeit beteiligt waren:** Dominik Bucher, Michael Rampp, Bert Pilles, Alexander Schlüter, Florian Lederer, Florian Schüder, Julian Schauseil, Eva Bertle und Dr. Rolf Deeg.
- **Meinen Freunden:** Vor allem Konrad, Renate, Flo, Jenny und Ola, die mich während dieser Arbeit immer wieder auf den Boden zurückgeholt haben.
- **Meiner Familie:** Rolf und Sonja, aber auch Achim, der kleinen Amaja und der Chrissi.