
**Spektroskopische Untersuchungen
lichtinduzierter, ultraschneller
Konformationsdynamiken von
Modellpeptiden**

Michael Stephan Rampp



München 2016

**Spektroskopische Untersuchungen
lichtinduzierter, ultraschneller
Konformationsdynamiken von
Modellpeptiden**

Michael Stephan Rampp

Dissertation

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

vorgelegt von
Michael Stephan Rampp
aus Coburg.

München, den 18. Juli 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth

Zweitgutachter: PD Dr. Bert Nickel

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 2016

Kurzfassung

Proteine benötigen für ihre korrekte Funktion eine wohldefinierte, räumliche Anordnung, die man den *nativen Zustand* nennt. Den Prozess, der zum Erreichen dieses nativen Zustandes führt, bezeichnet man als Proteinfaltung. Häufig ist mit der Aktivität eines Proteins eine räumliche Umstrukturierung verbunden. Metalloproteine können Ladungen transferieren, worauf die direkte Proteinumgebung der komplexierten Metallionen Geometrieänderungen zeigt.

Teil I dieser Arbeit geht der Frage nach, wie die Faltung von kleinen Proteinen (Peptiden) abläuft. Als Modellsystem für ein β -Haarnadelmotiv wurde ein lichtschtbares Peptid (AzoTrpZip2, kurz ATZ) untersucht, bei dem mithilfe eines Azoschalters (AMPP) die Struktur kontrolliert wird. Im *cis*-Konformer des AMPP bildet das ATZ eine β -Haarnadel aus, wohingegen es im *trans*-Konformer ein Ensemble mit nur wenig definierten Strukturelementen aufweist. In dieser Arbeit wurde ein Aufbau zur zeitaufgelösten Messung der Tryptophan(Trp)-Fluoreszenz realisiert, um die Dynamiken der Trp-Seitenketten sichtbar zu machen. Dabei stellte sich heraus, dass der Zeitverlauf der Trp-Fluoreszenz sehr ähnlich zu dem der von Deeg et. al. durchgeführten Infrarotmessung ist. Es kommt im 100 ns Bereich zu einem Prozess geringer Amplitude. Anschließend erfolgt die Hauptdynamik, die einen monoexponentiell beschreibbaren Anstieg mit einer Zeitkonstanten von 19 μ s zeigt. Diese große Ähnlichkeit wird als Indiz dafür gewertet, dass der ratenlimitierende Schritt der Faltung die Ausbildung des hydrophoben Kerns unter Beteiligung der Trp-Seitenketten ist. Die Untersuchungen der Entfaltung (*cis* \rightarrow *trans*) mit zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie zeigen, dass es sich hier um einen Mehrzustandsprozess handeln muss, bei dem zuerst die Interstrang-Wasserstoffbrücken vom AMPP zu den Termini hin auf Zeitskalen von 600 ps bis 2 μ s aufbrechen. Erst mit 17 μ s löst sich der hydrophobe Kern der Trp-Paare auf und das ATZ liegt vollständig entfaltet vor. Die Messungen legen nahe, dass die Dynamik der Wasserstoffbrücken schneller ist, als die des hydrophoben Kerns und zeigen, dass Faltung und Entfaltung des ATZ zwei grundlegend verschiedenen Reaktionswegen folgen.

Teil II adressiert den lichtinduzierten Ladungstransfer an Modellsystemen für blaue Kupferproteine. Kupfer-Guanidinchinolin (Cu-GuaQu)-Komplexe werden spektroskopisch charakterisiert und der Ladungstransfer vom Kupfer auf das Ligandensystem wird mit ultraschnellen Anreg-Abtast-Methoden untersucht. Die Interpretation der transienten Spektren ermöglicht das Aufstellen eines Reaktionsmodells. Nach der Photoanregung in einen hochliegenden, angeregten Zustand erfolgt eine ultraschnelle (<1 ps) Anpassung der Ligandengeometrie an den elektronischen Cu(II)-Zustand (X_1). Anschließend findet man eine Verzweigung in einen heißen Grundzustand und in einen Zustand mit Tripletcharakter (3 MLCT). Die beobachtete große Ähnlichkeit der Spektren des X_1 - und des 3 MLCT-Zustandes deutet darauf hin, dass es bei diesem Übergang nur zu geringen strukturellen Dynamiken kommt, was eine für derartige Systeme große intersystem crossing-Rate erlaubt (1/4 ps).

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	v
1. Proteine - Biomoleküle mit erstaunlichen Eigenschaften	1
1. Faltung und Entfaltung des lichtschtbaren β-Haarnadel-- Modellpeptids ATZ	3
2. Aufbau und Struktur von Proteinen	5
2.1. Hierarchische Strukturebenen von Proteinen	5
2.2. Säure-Base-Chemie der Aminosäuren	12
2.2.1. Säure-Base-Chemie in Wasser, pH-Berechnungen	12
2.2.2. Puffersysteme	15
2.2.3. Säure-Base-Verhalten in Methanol	17
3. Proteinfaltung	19
3.1. Methoden zur Untersuchung von Proteinfaltung	19
3.2. Allgemeine Theorien	26
3.3. Faltung von β -Haarnadel-Molekülen	35
4. Chromopeptide – Lichtschaltbare β-Haarnadel-Peptide	39
4.1. Azobenzol als Photoschalter in Proteinen und Peptiden	39
4.2. ATZ – Stand der Forschung	45
5. Die Rolle der Seitenketten beim ATZ – Trp-Fluoreszenz-Messung	49
Photoinduzierte Prozesse des Tryptophans	49
5.1. Aufbau zur zeitaufgelösten Messung der Trp-Fluoreszenz des ATZ	51
5.2. Ergebnisse der Tryptophanfluoreszenzmessungen	57
5.3. Molekulare Interpretation der Trp-Fluoreszenzmessung	62
5.4. Ausblick und abschließende Bewertung	65
6. Die Entfaltung des ATZ von Nano- bis Mikrosekunden	67
6.1. Erzeugung und Detektion der Mittelinfrarotimpulse	67
6.2. Einkopplung der Lichtimpulse des NT 242	69
6.3. Entfaltung des ATZ	72
6.3.1. Technische Rahmenbedingungen	72

6.3.2. Artefakte in den ATZ-Daten und Korrektur durch Azobenzol-referenzierung	73
6.3.3. Zeitaufgelöste Absorptionsänderungen im IR	74
6.4. Modelle der Entfaltung des ATZ	82
7. Der komplette Zyklus der lichtinduzierten Strukturänderungen des ATZ	89
8. Evaluation des Chromopeptidansatzes und Ausblicke	93
II. Lichtinduzierter Ladungstransfer in Kupferkomplexen	95
9. Kupferproteine – Redox-Katalysatoren der Biologie	97
10. Guanidinchinolin-Liganden – Modelle aktiver Zentren blauer Kupferproteine	99
10.1. Ligandengeometrien der Cu-GuaQu-Komplexe und entatische Zustände	100
10.2. Spektroskopische Charakterisierung der Cu-GuaQu-Komplexe . . .	102
11. Zeitaufgelöste Messungen an Kupfer-GuaQu-Komplexen	105
11.1. Anreg-Abtast-Anlagen für Messungen im sichtbaren und mittelinfraroten Spektralbereich	105
11.2. Ergebnisse der Messungen	107
11.2.1. Infrarotmessungen	107
11.2.2. UV/Vis-Messung	112
11.3. Interpretation der Messungen und Reaktionsschema	117
12. Vergleich der GuaQu-Komplexe mit anderen Cu-Modellsystemen	121
12.1. Cu-Phenanhtrolin-Komplexe und heiße Grundzustände bei Metallkomplexen in der Literatur	121
12.2. Einordnung der Cu-GuaQu-Komplexe	123
13. Zusammenfassung der Messungen an Cu-Komplexen	125
14. Zusammenfassung	127
Abbildungsverzeichnis	131
Tabellenverzeichnis	135
Literatur	137

1. Proteine - Biomoleküle mit erstaunlichen Eigenschaften

Leben – ganz egal, ob tierisch oder pflanzlich – ist ein erstaunlicher Prozess. Es entsteht im Wesentlichen aus einer Zelle, die sich nach der Befruchtung zu teilen beginnt. Ab einer bestimmten Größe differenzieren sich aus diesem Zellklumpen verschiedene Areale heraus, aus denen später z.B. Gliedmaßen und Organe werden. Dieser Spezialisierungsmechanismus ist hochkomplex, mittlerweile aber dennoch so gut verstanden, dass es gelingt, Gewebearten aus sogenannten induzierten, pluripotenten Stammzellen (für deren Entdeckung 2012 der Nobelpreis in Medizin vergeben wurde, *induced pluripotent stem cells*, kurz: *iPSC*) nachzubilden [LV93].

Hierbei versetzt man die kultivierten iPSC mit einer Mischung verschiedener körpereigener Faktoren, wobei neben deren Konzentrationsverhältnissen auch die Inkubationszeit und die Reihenfolge der Substanzen entscheidend für den Erfolg sind. Dieses Vorgehen ist genau demjenigen nachempfunden, welches die Natur für unser Leben erfunden hat: die Interaktion von Proteinen und der Desoxyribonukleinsäure (DNS). Auf der DNS sind alle Informationen, die unser Körper braucht, in Form von Basenanordnungen codiert. Die Konzentrationen verschiedener vorliegender Proteine entscheiden, welche Information wann abgelesen wird. Eine Informationseinheit auf der DNS nennt man *Gen*. Jedes Gen steht dabei für ein bestimmtes Protein. So werden bei der Zelldifferenzierung durch Protein-DNS-Interaktion diejenigen Gene angeschaltet, die beispielsweise eine Leberzelle braucht.

Proteine dienen jedoch nicht nur als biochemische Signaltransmitter. Einige davon haben erstaunliche Fähigkeiten. So fungiert das Protein *Prestin* als Verstärker, der im Ohr Spannungsänderungen über der Zellmembran in mechanische Bewegung umsetzt und somit einfallende Schallsignale verstärkt [HD11].

In unseren Nervenzellen übernehmen Motorproteine den Transport entlang der langen Axone. So bindet beispielsweise das Kinesin an Mikrotubuli, kann sich durch Hydrolyse von ATP mit Kraftschlägen vorwärts bewegen und so in Vesikeln verpackte Moleküle transportieren [MMM05].

Bei der Photosynthese werden Proteine benötigt, die Elektronentransfer ermöglichen. Ein Beispiel hierfür ist das in Pflanzen und Cyanobakterien vorkommende Plastocyanin. Im aktiven Zentrum wird ein Kupferion komplexiert, das je nach Oxidationsstufe ein Elektron aufnehmen ($\text{Cu}^{2+} + e^- \rightarrow \text{Cu}^+$) oder abgeben ($\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+} + e^-$) kann. Aufgrund dieser Tatsache bezeichnet man Kupferproteine als Redoxkatalysatoren.

So unterschiedlich die Funktionen und Eigenschaften von Proteinen auch sein mögen,

eines haben sie alle gemein: sie funktionieren nur, wenn sie in einer ganz bestimmten, räumlichen Anordnung vorliegen, die man *nativer Zustand* nennt.

Wie ein Protein nun diesen nativen Zustand erreicht, ist bis dato nicht vollständig geklärt. Naiv könnte man meinen, die Zelle besäße Organelle, die das Protein in diese Struktur brächten. Demnach müsste allerdings ein Protein in bloßer Pufferlösung, wenn es seine native Struktur einmal verloren hat, seine Fähigkeiten dauerhaft verlieren. Diesen Versuch unternahm 1954 der Biochemiker Christian Anfinsen [Anf54]. Er stellte fest, dass ein Enzym, das durch Erhitzen denaturiert wurde, selbstständig in seinen nativen Zustand zurückfindet, wenn man es wieder abkühlen lässt. Damit zeigte er, dass einem Protein die Eigenschaft, seinen nativen Zustand zu erreichen, innewohnt und durch dessen chemische Zusammensetzung determiniert ist.

Wie die Beispiele Prestin und Kinesin zeigen, ist jedoch die Faltung von Proteinen nicht der einzige Fall, in dem es zu strukturellen Umlagerungen in Proteinen kommt. Auch bei den blauen Kupferproteinen, zu denen man das oben vorgestellte Plastocyanin zählt, hängt die Geometrie der Liganden des Kupfers von dessen Oxidationsstufe ab.

Die vorliegende Arbeit ist in zwei große Teile gegliedert.

Teil I erläutert den Ansatz, mit Photoschaltern strukturelle Dynamiken bei Peptiden auszulösen. Dazu benötigte Modellsysteme und experimentelle Aufbauten werden dargestellt. Prominente Theorien zur Proteinfaltung werden erklärt, um die gezeigten Ergebnisse und Interpretationen der Messungen einzuordnen. Die hier erläuterten zeitaufgelösten Infrarotspektroskopie-Messungen erlauben die Betrachtung eines kompletten Faltungs- und Entfaltungszyklus des β -Haarnadelpeptids ATZ. Zur Messung der zeitaufgelösten Tryptophanfluoreszenz nach Photoinitiation des Faltungsprozesses wurde ein Messaufbau realisiert. Die erhaltenen Ergebnisse erlauben Einblicke in die Seitenkettendynamiken des ATZ. Abschließend wird der hier vorgestellte Ansatz der Induktion struktureller Dynamiken mittels eines Photoschalters anhand der gewonnenen Erkenntnisse zur Faltung und Entfaltung des ATZ evaluiert.

In **Teil II** wird gezeigt, welche Erkenntnisse man durch Kombination von sichtbarer und infraroter, ultraschneller Anreg-Abtast-Spektroskopie über den lichtinduzierten Ladungstransfer und die damit verbundenen strukturellen Umlagerungen bei Kupfer-Guanidinquinolin-Modellkomplexen gewinnen kann. Das aus den Messungen abgeleitete Reaktionsmodell wird mit anderen Kupferkomplexen aus der Literatur verglichen. Es wird herausgearbeitet, welchen Beitrag Infrarotspektroskopie zum Verständnis des Reaktionsschemas von lichtinduziertem Ladungstransfer bei Kupfer-Komplexen leisten kann.

Teil I.

Faltung und Entfaltung des lichtschaltbaren β -Haarnadel-Modellpeptids ATZ

2. Aufbau und Struktur von Proteinen

Dieses Kapitel gibt zunächst einen Überblick über den Aufbau und die Strukturebenen von Proteinen (s. [Abschnitt 2.1](#)). Man bezeichnet sie als *Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen*. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die ersten beiden Ebenen gelegt, da sie für die in dieser Arbeit untersuchten Modellsysteme von wesentlicher Bedeutung sind. Die Tertiär- und Quartärstrukturen werden der Vollständigkeit halber kurz angerissen.

[Abschnitt 2.2](#) erläutert die Grundzüge der Säure-Base-Gleichgewichte der Aminosäuren und Puffersysteme in Wasser und gibt einen Ausblick auf das Verhalten von Säuren und Basen im Lösungsmittel Methanol.

Anschließend werden in [Kapitel 3](#) die Prozesse beleuchtet, die zum Erreichen dieser Proteinstrukturen führen. Diesen Vorgang nennt man *Proteinfaltung*. Dafür werden zunächst globale Theorien für die Faltung großer Proteine vorgestellt. Im Fokus steht jedoch die Faltung kleiner Proteine (Peptide), wie sie Gegenstand dieser Arbeit sind.

2.1. Hierarchische Strukturebenen von Proteinen

Proteine sind Biopolymere, die aus verschiedenen Einzelbausteinen zusammengesetzt sind – den Aminosäuren. [Abbildung 2.1](#) zeigt den schematischen Aufbau einer Aminosäure als Zwitterion, wie sie bei $\text{pH} = 7$ in wässriger Lösung vorliegt. Jede dieser Aminosäuren hat eine Aminogruppe (**blau**) und eine Carboxygruppe (**rot**) und kann damit sowohl als Säure als auch als Base reagieren. Der in **grün** dargestellte Rest R bestimmt die spezifischen Eigenschaften von Aminosäuren in Proteinen, worauf später noch im Detail eingegangen wird.

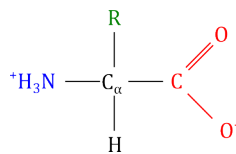


Abbildung 2.1.: Aufbau einer Aminosäure:

Am zentralen Kohlenstoffatom (C_α) befinden sich neben einem Wasserstoffproton eine Aminogruppe (blau), eine Carboxygruppe (rot), und ein Rest, der von Aminosäure zu Aminosäure variiert (grün).

Da vier verschiedene Residuen am zentralen Kohlenstoffatom (C_α) gebunden sind, ist jede Aminosäure chiral. Damit gibt es jeweils die beiden enantiomeren L- und D-Aminosäuren, von denen nur die L-Form proteinogen ist, d.h. zur Biosynthese

2. Aufbau und Struktur von Proteinen

von Proteinen verwendet wird. Insgesamt sind bisher 23 proteinogene Aminosäuren bekannt [MA08], von denen im menschlichen Genom nur 20 codiert sind, weshalb man sie *kanonische* Aminosäuren nennt.

Sie sind in [Tabelle 2.1](#) in alphabetischer Ordnung aufgelistet. Die Carboxygruppe einer Aminosäure kann mit der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure unter Wasserabspaltung eine Peptidbindung bilden, wie es [Abbildung 2.2](#) zeigt.

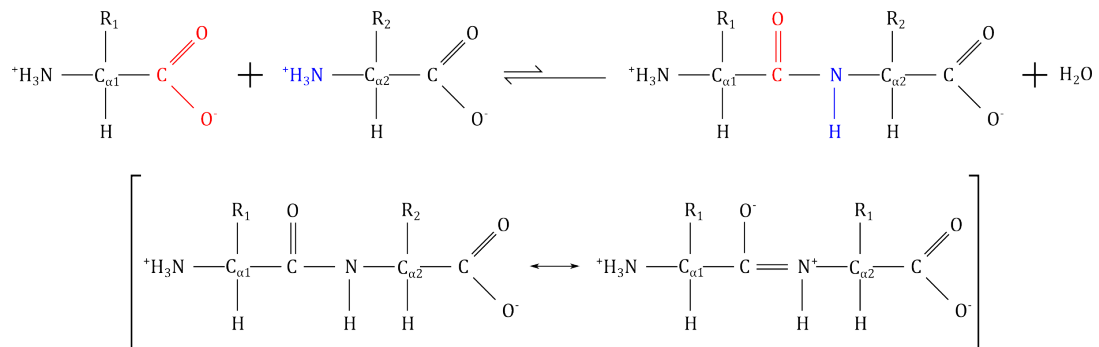


Abbildung 2.2.: Kondensation zweier Aminosäuren zu einem mesomeriestabilisierten Dipeptid nach [Ber13](#).

An beiden Seiten der Kette können nun wiederum Aminosäuren gebunden werden. Die Kohlenstoff- Stickstoffkette nennt man englisch *backbone* ‚Rückgrat‘, die Reste der Aminosäuren *Seitenketten*. Die Abfolge der Aminosäuren eines Proteins bezeichnet man als **Primärstruktur**. Dasjenige Ende einer Aminosäurenkette, das die Caroxygruppe enthält, nennt man C-Terminus, das anderen Ende mit der Aminogruppe N-Terminus. Damit ist die chemische Zusammensetzung eines Proteins festgelegt. Aufgrund der Mesomeriestabilisierung hat die neu gebildete Peptidbindung teilweise π -Charakter und ist somit planar. Es gibt jedoch *cis-trans*-Isomerie, wobei das *trans*-Isomer (wie es in [Abbildung 2.2](#) gezeigt ist) das mit Abstand häufigere ist. Im *cis*-Isomer liegen das Wasserstoffproton und das Sauerstoffatom auf derselben Seite des Rückgrats. Die verbleibenden Freiheitsgrade, die im Wesentlichen über die räumliche Anordnung eines Dipeptids entscheiden, sind die Winkel des Rückgrats am C_{α} . Man bezeichnet sie als Dihedralwinkel und benennt sie gemäß [Abbildung 2.3](#) φ und ψ . Aufgrund von Wechselwirkungen im Rückgrat (sterisch, Wasserstoffbrücken zwischen den Sauerstoffatomen eines Stranges mit Wasserstoffprotonen eines anderen Stranges) und Eigenschaften der Seitenketten (hydrophobe Wechselwirkungen, polare Wechselwirkungen, Disulfidbrücken) können diese Winkel keine beliebigen Werte annehmen. Als energetisch stabil haben sich vor allem zwei Struktur motive herausgestellt: das β -Faltblatt und die α -Helix. [Abbildung 2.4](#) illustriert diese beiden **Sekundärstruktur motive**. Sie erstrecken sich über lokal begrenzte Domänen eines Proteins und haben als einzige Struktur motive zwei besondere Eigenschaften, die für die Faltung von Proteinen von entscheidender Bedeutung sind [[Ros06](#)]: Sie können sich **(i)** ohne sterische Behinderung räumlich unbegrenzt ausdehnen und **(ii)** alle

2.1. Hierarchische Strukturebenen von Proteinen


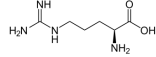



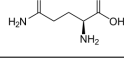
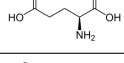

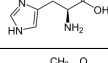
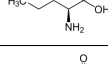
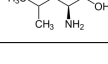
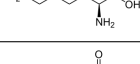
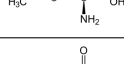
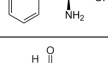



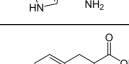
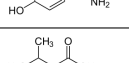

Aminosäure	Abk.	Code	Eigenschaft	pK _S -Wert	V.d.Waals Volumen	Struktur
Alanin	Ala	A			67	
Arginin	Arg	R	basisch	13,2	148	
Asparagin	Asn	N	polar		96	
Asparaginsäure	Asp	D	sauer	3,65	91	
Cystein	Cys	C	polar	8,33	86	
Glutamin	Gln	Q	polar		114	
Glutaminsäure	Glu	E	sauer	4,25	109	
Glycin	Gly	G			48	
Histidin	His	H	polar, arom.	5,97	118	
Isoleucin	Ile	I			124	
Leucin	Leu	L			124	
Lysin	Lys	K	polar, basisch	10,28	135	
Methionin	Met	M			124	
Phenylalanin	Phe	F	aromatisch		135	
Prolin	Pro	P	heterocycl.		90	
Serin	Ser	S	polar		73	
Threonin	Thr	T	polar		93	
Tryptophan	Trp	W	aromatisch		163	
Tyrosin	Tyr	Y	polar, arom.	10,07	141	
Valin	Val	V			105	

Tabelle 2.1.: Übersicht der 20 kanonischen Aminosäuren nach Taylor [Tay86], Zahlenwerte von Wik16. Die pK_S-Werte beziehen sich auf die Seitengruppen. Bei basischen Aminosäuren ist es derjenige der protonierten Seitengruppe.

2. Aufbau und Struktur von Proteinen

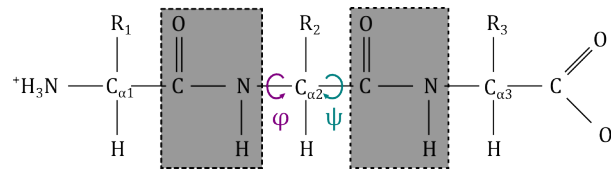


Abbildung 2.3.: Dihedralwinkel am C_α:

Die planaren Peptidplättchen (grau hinterlegt) sind bezüglich des C_α um zwei Rotationsfreiheitsgrade drehbar, die man die Dihedralwinkel φ und ψ nennt.

Wasserstoffbrücken, die sich zwischen den Atomen des Rückgrates ausbilden können, sind auch vorhanden [RS68]. Man unterscheidet zwischen antiparallelen und parallelen β-Faltblättern. Bei den parallelen Falblättern liegen sich die Rückgrate in derselben Orientierung von Carboxy-(C)-Terminus und Amino-(N)-Terminus gegenüber, bei den antiparallelen liegen sich jeweils C- und N-Terminus der Stränge gegenüber. Diese Falblätter findet man vor allem bei kleinen Seitenketten, da sich die Peptidstränge sehr nahe kommen müssen. Bei größeren Seitenketten findet man vornehmlich das Motiv der α-Helix. Beim *Ramachandran-Plot* trägt man die Dihedralwinkel für jede Aminosäure in einem zweidimensionalen Graphen auf. Man findet für bestimmte Struktur motive charakteristische Winkelbereiche (s. [Abbildung 2.5](#)). Für poly-L-Alanin-Proteine ergeben sich die cyanfarbenen Bereiche. Alanin ist eine Aminosäure, deren Methylrest keine spezifischen Bindungseigenschaften aufweist, sondern lediglich sterisch mögliche Dihedralwinkelwerte einnimmt. Es weist eine große Neigung auf, α-Helices auszubilden. Es gibt weitere Aminosäuren, die man bevorzugt in Sekundärstruktur motiven findet. Sie sind in [Abbildung 2.6](#) gezeigt. Lagern sich diese Sekundärstruktur motive nun räumlich zu einer übergeordneten Struktur an, so spricht man von der **Tertiärstruktur**. Eine in der Biologie sehr wichtige Tertiärstruktur ist das β-Fass. Das ist eine tonnenartige Anordnung von β-Faltblättern, die einen Zylindermantel bilden. Beim grün fluoreszierenden Protein (kurz: GFP) ist diese Struktur von immenser Bedeutung für die Emissionseigenschaften und die Stabilität der chromophoren Gruppe. Die Fass-Struktur schützt vor Kontakt mit dem Lösungsmittel, was Photoschäden vermindert und die Rate der Fluoreszenzlöschung niedrig hält [YMP96, YB96].

Die Aminosäure **Glycin** erweitert die stabilen Bereiche der Dihedralwinkel, da Glycin statt der Methylgruppe des Alanins nur ein Wasserstoffproton als Rest hat und somit die sterische Behinderung deutlich vermindert wird. Im Ramachandran-Plot kommen die ocker hinterlegten Bereiche dazu, es sind also mehr Werte für Dihedralwinkel energetisch stabil.

Außer dem Glycin haben noch andere Aminosäuren sehr starken Einfluss auf die räumliche Struktur eines Proteins.

Das **Prolin** hat zwei besondere Eigenschaften. Zum einen hat es durch die zyklische Form kein Wasserstoffproton mehr an der Peptidbindung, es kann also nicht als Wasserstoffbrückendonator wirken und stört dadurch die Ausbildung von Sekundär-

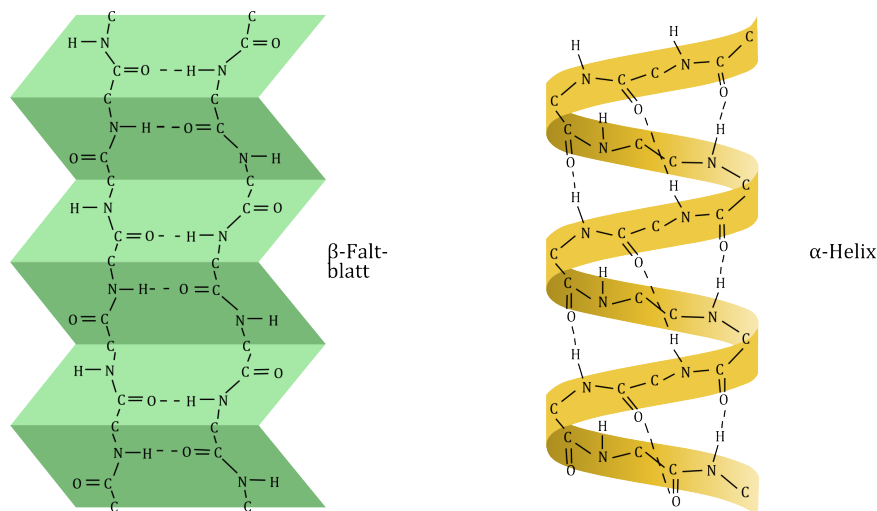


Abbildung 2.4.: Sekundärstrukturmotive von Proteinen nach [Bio15]:

Es werden schematisch die beiden Sekundärstrukturmotive des β -Faltblatts (links, grün hinterlegt) und der α -Helix (rechts, gelb hinterlegt) gezeigt. Die H-Brücken sind gestrichelt eingezeichnet.

strukturen [MT91]. Deshalb findet man es meistens in Schleifensequenzen (engl. *loops*), ungeordneten Bereichen oder an Übergangsstellen von einer Sekundärstruktur zur anderen. Zum anderen weist Prolin eine wesentlich höhere Wahrscheinlichkeit für eine *cis*-Peptidbindung auf als alle anderen Aminosäuren (sie liegt im Bereich von 0,1 bis 0,3, je nach angrenzenden Residuen [BHB75]). Auch deshalb findet man es häufig in Schleifen wieder. Somit spielen sowohl Glycin als auch Prolin eine wichtige Rolle bei der Bildung von Schleifen [KMK05] und bei Übergängen von einem Sekundärstrukturelement zu einem anderen.

Eine weitere Sonderstellung nimmt das **Cystein** ein. Die Thiolgruppen zweier Cysteine können durch Oxidation dimerisieren, es bildet sich eine sogenannte *Disulfidbrücke*. Dadurch entstehen kovalente Bindungen zwischen zwei Aminosäuresträngen, wodurch die native Struktur des Proteins stabilisiert wird. Diese Reaktion ist in [Abbildung 2.7](#) veranschaulicht. Diese Disulfidbrücken sind beispielsweise beim Stoffwechselprotein Insulin von großer Bedeutung [Cha03].

Seine Vorstufe, das Proinsulin, besteht aus einer sog. α -Kette, einer β -Kette und dem C-Peptid („C“ steht für engl. *connecting* ‚verbindend‘). Bei der Insulinausschüttung wird das C-Peptid abgespalten und die beiden Ketten werden nur noch durch die Disulfidbrücken zusammengehalten.

Darüber hinaus bietet Cystein durch die Thiolgruppe die Möglichkeit, funktionale Gruppen oder Moleküle – beispielsweise über Maleimid-Thiol-Kopplung – an ein Protein zu binden. Diese Eigenschaft macht man sich beispielsweise in der Fluoreszenzspektroskopie zunutze [Maj07]. Hier wird eine Aminosäureposition, die man im Protein gezielt markieren will, durch Cystein mutiert und im Folgenden ein an Maleimid gebundener Fluoreszenzfarbstoff über die Thiolgruppe angebunden.

2. Aufbau und Struktur von Proteinen

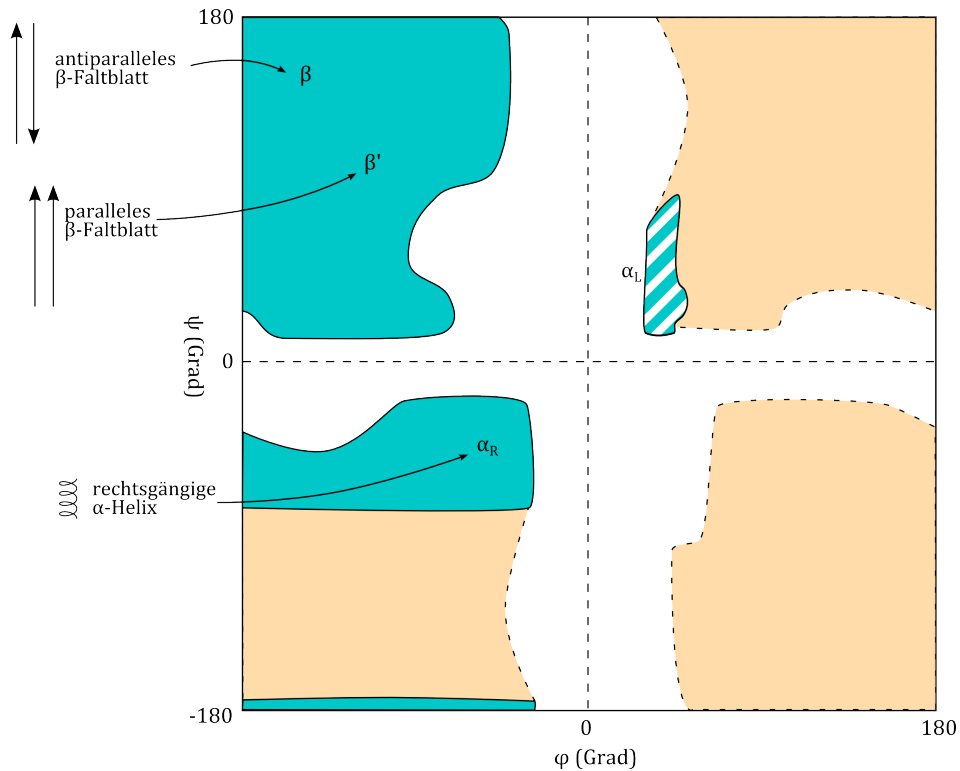


Abbildung 2.5.: Ramachandran-Plot nach Berg et al. [Ber13]:

Die cyanfarbenen Bereiche sind für ein poly-L-Alanin-Protein möglich. Wird zusätzlich Glycin ins Protein integriert, so kommen aufgrund verminderter, sterischer Abstoßungen zusätzlich die ockerfarbenen Bereiche hinzu. Die linksgängige α -Helix α_L (cyan schraffiert) findet man vornehmlich bei Kollagenen.

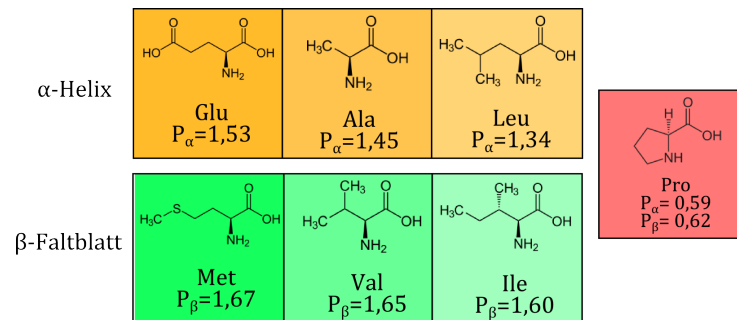


Abbildung 2.6.: Neigung verschiedener Aminosäuren zur Ausbildung von α -Helices (oben) und β -Faltblättern (unten):

Es sind je die drei Aminosäuren mit starker Neigung zur jeweiligen Struktur gezeigt. Je größer der P-Wert für eine Aminosäure und ein bestimmtes Sekundärstrukturmotiv ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, die Aminosäure in diesem Sekundärstrukturmotiv zu finden [CF74]. Prolin bricht beide dieser Strukturen auf.

Schließlich gibt es noch die Gruppe der **aromatischen Aminosäuren**. Hierunter fallen das Phenylalanin aufgrund des Benzylrests, das Tyrosin aufgrund des Phenylrests,

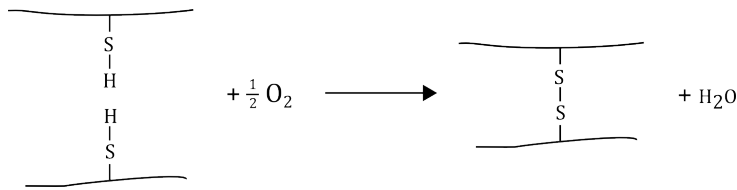


Abbildung 2.7.: Bildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Proteinsträngen mit gegenüberliegenden Cysteinen

das Tryptophan wegen seines Indols und das Histidin, weil es einen Imidazolring aufweist. Aufgrund der planaren Geometrie und des großen Van-der-Waals-Volumens (vor allem bei Trp und Tyr) sind die aromatischen Aminosäuren maßgeblich an hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt. So können beispielsweise die Ringsysteme zweier aromatischer Aminosäuren direkt übereinander gestapelt (engl. *stacking*) oder in T-Form vorliegen, wobei hier die Kante des einen Ringsystems zur Fläche des anderen zeigt. Die T-Form findet man häufig, wenn noch Wasserstoffbrücken zwischen den aromatischen Systemen ausgebildet werden können [Che02]. Die Tatsache, dass die hydrophoben Wechselwirkungen bei den aromatischen Resten wesentlich größer sind als bei den aliphatischen, liegt in der Ladungsverteilung der ausgedehnten π -Systeme. Das Gerüst der σ -Bindungen besitzt eine positive Partiaalladung, da ein Teil der zur Neutralisation der positiven Kernladung benötigten Elektronendichte außerhalb der Bindungsebene in den π -Systemen liegt, welche wiederum eine negative Teilladung aufweisen. Dadurch kommt es beim Stapeln dieser Systeme zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den σ -Gerüsten des einen Moleküls mit den π -Systemen des anderen [HS90]. [Abbildung 2.8](#) veranschaulicht diesen Sachverhalt.

Die hydrophoben Wechselwirkungen dieser aromatischen Aminosäuren spielen eine

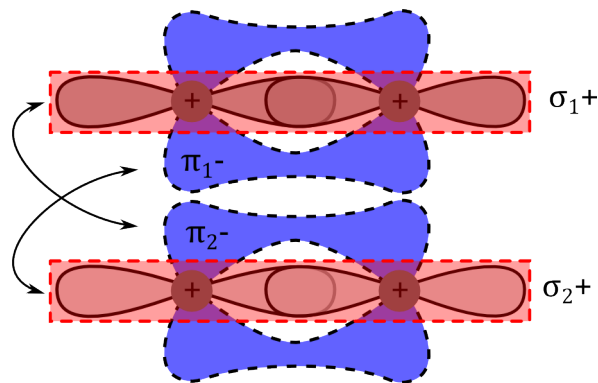


Abbildung 2.8.: Schematische Darstellung der π - π -Wechselwirkung bei aromatischen Aminosäuren

große Rolle für die Faltung und die Stabilität von Proteinen [BP85], worauf später noch genauer eingegangen wird. Die Fluoreszenzeigenschaften der aromatischen Aminosäuren macht man sich in der Untersuchung von Proteinkonformationen zunutze,

was in [Abschnitt 3.1](#) noch genauer erklärt wird.

Die höchste Strukturebene von Proteinen ist die **Quartärstruktur**. Davon spricht man, wenn sich mehrere Proteine zusammenlagern und beispielsweise ein globuläres Protein bilden, wie es beim Hämoglobin der Fall ist. Perutz et al. [[PKW65](#)] haben 1965 durch Röntgenkristallographie dessen Struktur aufgeklärt. Es besteht aus insgesamt vier Proteinen, die zum Großteil aus α -Helices bestehen und sich zu einem Heterotetramer zusammenlagern.

Somit lassen sich die vier Strukturebenen von Proteinen zusammenfassend folgendermaßen charakterisieren:

1. **Primärstruktur:** chemische Zusammensetzung des Proteins: Abfolge der Aminosäuren
2. **Sekundärstruktur:** lokale, regelmäßige Strukturelemente: β -Faltblätter und α -Helices
3. **Tertiärstruktur:** übergeordneter, räumlicher Aufbau einer Aminosäurekette: Anordnung der Sekundärstrukturelemente zueinander
4. **Quartärstruktur:** definierte Anordnung mehrerer Proteine: Faserproteine, globuläre Proteine, Proteinkomplexe

2.2. Säure-Base-Chemie der Aminosäuren

Da einige Aminosäuren Seitenketten mit Säure-Base-Eigenschaften haben, die wesentlichen Einfluss auf die Löslichkeit von Aminosäuren haben, liefert dieses Kapitel einen Abriss über die chemischen Grundlagen von Säuren, Basen und Puffersystemen.

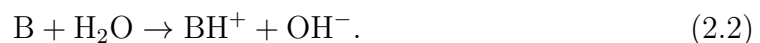
2.2.1. Säure-Base-Chemie in Wasser, pH-Berechnungen

Als Säure bezeichnet man nach Brønsted eine Verbindung, die ein Wasserstoffproton abgeben kann:



Man bezeichnet A^- als *korrespondierende Base* der Säure HA.

Analog dazu ist eine Base als ein Stoff definiert, der ein Proton aufnehmen kann:



Hier nennt man HB^+ die *korrespondierende Säure* zur Base B. In wässriger Umgebung liegen nie isolierte Protonen vor, sondern sie werden vom Wasser aufgenommen oder abgegeben.

Wasser kann sowohl als Säure als auch als Base reagieren (s. [Gleichung 2.3](#)). Solche

Stoffe nennt man *Ampholyte*. Bei der Autoprotolyse des Wassers entstehen das positiv geladene Oxoniumion und das negativ geladene Hydroxidion.



Diese Reaktion ist ein Gleichgewicht. Das bedeutet, sie passiert in Wasser ständig. Im stationären Fall sind Hin- und Rückreaktion gleich schnell, die Konzentrationen der Ionen sind konstant. Im Falle des Wassers sind die Konzentrationen der Ionen bei 25°C jeweils $1,004 \cdot 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$. Damit beträgt das Ionenprodukt des Wassers $K_w = 1,008 \cdot 10^{-14} \frac{\text{mol}^2}{\text{l}^2}$. Daraus folgt für die Gleichgewichtskonstante:

$$K = \frac{(c(\text{H}_3\text{O}^+) \cdot c(\text{OH}^-))}{c(\text{H}_2\text{O})^2} \Bigg|_{\text{GG}} \quad (2.4)$$

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Konzentrationen im Gleichgewichtszustand einzusetzen sind. Da die Konzentration von Wasser in Wasser mit $55,6 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ im Vergleich zu allen anderen Konzentrationen sehr groß ist, gilt in guter Näherung:

$$c(\text{H}_2\text{O}) \approx \text{const.} \quad (2.5)$$

Dadurch kann man davon ausgehen, dass die stärkste Base, die in Wasser vorliegt, das Hydroxidion und die stärkste Säure in Wasser das Oxoniumion ist, da immer genügend Wassermoleküle vorliegen, die protoniert bzw. deprotoniert werden können. Damit lässt sich $c(\text{H}_2\text{O})$ in die Gleichgewichtskonstante multiplizieren und [Gleichung 2.4](#) folgendermaßen schreiben:

$$K_w = c(\text{H}_3\text{O}^+) \cdot c(\text{OH}^-) = 1,008 \cdot 10^{-14} \frac{\text{mol}^2}{\text{l}^2} \quad (2.6)$$

Nun soll die Konzentration von Oxoniumionen im Gleichgewicht ausgerechnet werden, wenn man eine bestimmte Menge an Säure in Wasser löst. Dazu stellt man das Massenwirkungsgesetz für [Gleichung 2.1](#) in Wasser auf und berücksichtigt [Gleichung 2.5](#):

$$K_S := K \cdot c(\text{H}_2\text{O}) = \frac{c(\text{H}_3\text{O}^+) \cdot c(\text{A}^-)}{c(\text{HA})} = \frac{c(\text{H}_3\text{O}^+)^2}{c_0(\text{HA}) - c(\text{H}_3\text{O}^+)}. \quad (2.7)$$

Beim letzten Schritt geht man davon aus, dass zu Beginn der Säurezugabe keine weiteren Ionen im Wasser vorliegen und deshalb die Zahl der korrespondierenden Basenionen gleich der Zahl der Oxoniumionen ist. Da das Ionenprodukt in reinem Wasser sehr gering ist, stimmt das in guter Näherung. $c_0(\text{HA})$ ist die Konzentration an Säure, die man zu Beginn in Wasser gelöst hat. Da Der Zahlenwert von K_S über viele Größenordnungen variiert, definiert man den $\text{p}K_S$ -Wert als negativen, dekadischen Logarithmus der Dissoziationskonstante:

$$\text{p}K_S := -\log K_S. \quad (2.8)$$

Ebenso kann man mit der Basenkonstante K_B für das Gleichgewicht einer Base verfahren. Ist ein $pK_{S/B}$ -Wert also klein, ist die Säure/Base stark, ist er groß, ist die Säure/Base dementsprechend schwach. Für ein Säure/korrespondierende Base-Paar besteht eine Beziehung zwischen den pK_S - und pK_B -Werten. Um sie zu berechnen, stellt man zunächst für die Dissoziation der Säure und die Protonierung der korrespondierenden Base jeweils das Massenwirkungsgesetz auf:

$$K_S = \frac{c(A^-) \cdot c(H_3O^+)}{c(HA)} \quad \text{und} \quad K_B = \frac{c(HA) \cdot c(OH^-)}{c(A^-)}. \quad (2.9)$$

Durch Multiplikation von K_S und K_B erhält man

$$K_S \cdot K_B = c(H_3O^+) \cdot c(OH^-) = K_W \quad (2.10)$$

und durch Logarithmieren entsprechend

$$pK_S + pK_B = -\log K_W = 14. \quad (2.11)$$

Den pH-Wert bzw. pOH-Wert definiert man als negativen, dekadischen Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration bzw. der Hydroxidionenkonzentration:

$$pH/pOH := -\log c(H_3O^+)/c(OH^-). \quad (2.12)$$

Wendet man diese Definitionen auf [Gleichung 2.6](#) an, so findet man folgenden Zusammenhang zwischen pH- und pOH-Wert.

$$pH + pOH = 14 \quad (2.13)$$

Daraus folgt, dass der Neutralpunkt in Wasser, d.h. der Punkt, an dem die Konzentration der Oxoniumionen gleich derjenigen der Hydroxidionen ist, bei $pH = 7$ vorliegt, da $c(H_3O^+) = c(OH^-) = 1,004 \cdot 10^{-7}$.

Will man nun den pH-Wert einer Säure HA in Lösung berechnen, löst man die sich aus [Gleichung 2.7](#) ergebende quadratische Gleichung und man erhält

$$pH = -\log c(H_3O^+) = -\log \frac{\sqrt{K_S^2 + 4 K_S c_0(HA)}}{2}. \quad (2.14)$$

Diese Gleichung gilt für den Fall, dass die durch die eingebrachte Säure entstehende Oxoniumionenkonzentration wesentlich größer als die des Ionenproduktes des Wassers ist, was für die Bereiche dieser Arbeit immer der Fall ist. Sie ist zwar prinzipiell leicht lösbar, allerdings genügen für bestimmte Konzentrations- und pK_S -Bereiche einfachere, sehr gute Näherungen.

1. Sehr starke Säuren, ($pK_S < 1$):

Für starke Säuren nimmt man eine vollständige Dissoziation an, das heißt jedes Säuremolekül gibt sein Proton an das Wasser ab. Deshalb ist die Konzentration der Oxoniumionen in Lösung gleich der Konzentration der anfangs gelösten Säure und es gilt:

$$pH = \log c_0(HA). \quad (2.15)$$

2. Schwache Säuren, ($pK_S > 4,5$):

Bei schwachen Säuren nimmt man eine sehr geringe Dissoziation an, d.h. K_S ist sehr klein. Man kann dann in [Gleichung 2.14](#) alle Terme vernachlässigen, die nicht linear in K_S sind und erhält

$$\text{pH} = \frac{1}{2} \left(pK_S - \log c_0(\text{HA}) \right). \quad (2.16)$$

Dieses Ergebnis entspricht der Näherung, dass die Konzentration der Säure zu Beginn numerisch der Konzentration der Säure im Gleichgewicht entspricht: $c_0(\text{HA}) = c_{\text{GG}}(\text{HA})$.

3. Mittelstarke Säuren ($1 < pK_S < 4,5$):

In diesem Bereich sind beide vorher erwähnten Näherungen unzureichend und führen vor allem bei kleinen Säurekonzentrationen zu Abweichungen. In diesem Fall muss man zur Berechnung des pH-Wertes [Gleichung 2.14](#) direkt lösen.

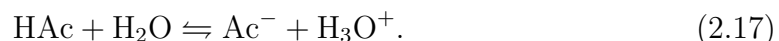
Innerhalb der angegebenen Bereiche sind die Fehler, die man mit den Näherungslösungen macht, bis zu Konzentrationen von $20 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$ maximal im Bereich von $\Delta\text{pH} \approx 0,3$, was für die meisten Anwendungen genau genug ist. Um diese Werte zu ermitteln, wurde ein Programm in Mathematica geschrieben, das die Abweichungen der Näherungen von der exakten Lösung in Abhängigkeit der Konzentration und Säurestärke berechnet.

Will man den pH-Wert einer Base in Lösung wissen, berechnet man zunächst über obige Formeln den pOH-Wert, indem man statt der Säurekonzentration die Basenkonzentration einsetzt und anschließend mit [Gleichung 2.13](#) den pH-Wert bestimmt.

2.2.2. Puffersysteme

Für die Struktur und somit auch die Funktionsfähigkeit von Enzymen ist der pH-Wert entscheidend, da von ihm die Ladungszustände von Seitenketten mit Säure-Base-Eigenschaften und somit die Struktur von Proteinen abhängen. Daher benötigen Lebewesen Systeme, die den pH-Wert konstant halten können. Im Folgenden werden diese Puffersysteme näher beleuchtet.

Die prinzipielle Idee ist es, eine Mischung einer schwachen Säure und ihrer korrespondierenden Base in Lösung herzustellen, sodass Protonen, die in die Lösung eingetragen werden, erst die korrespondierende Base protonieren wodurch die Konzentration der Oxoniumionen konstant bleibt. Als Beispiel ist der Essigsäure/Acetat-Puffer angeführt. Essigsäure hat einen pK_S -Wert von 4,75. Die Reaktionsgleichung der Dissoziation lautet:



[Abbildung 2.9](#) illustriert dieses Verhalten anhand des Verlaufes einer Titrationskurve einer 1-molaren Acetatlösung. Nach [Gleichung 2.16](#) hat die Acetatlösung zu Beginn der

2. Aufbau und Struktur von Proteinen

Titration einen pH-Wert von 9. Zu Beginn sinkt bei Zugabe von H_3O^+ -Ionen der pH-Wert rasch, bis der Pufferbereich erreicht wird. Solange die Lösung Puffereigenschaften besitzt, werden überwiegend Acetat-Moleküle zu Essigsäure umgesetzt, der pH-Wert bleibt nahezu konstant. Erst wenn viele Acetatmoleküle verbraucht wurden, sinkt der pH-Wert weiter.

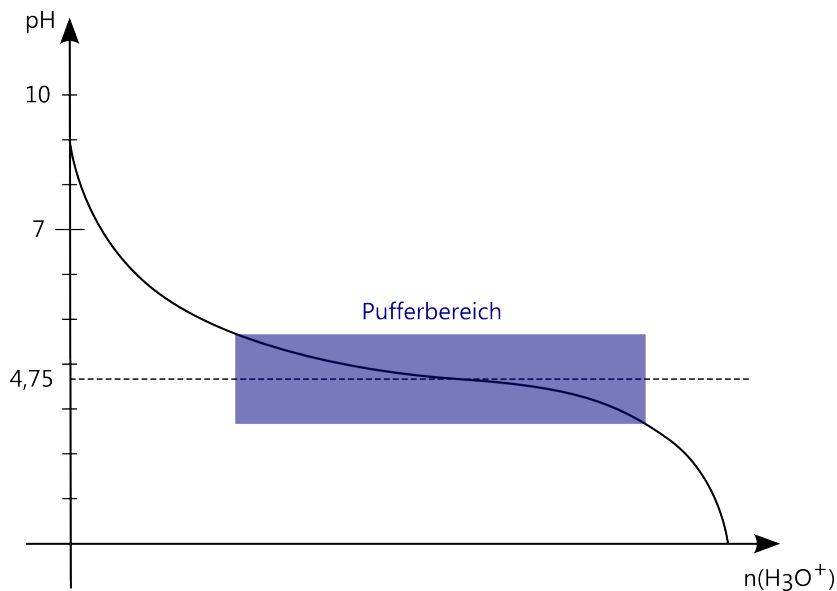


Abbildung 2.9.: Schematische Titrationskurve eines Acetatpuffers, $c=1 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$

Um die Eigenschaften dieses Systems näher zu betrachten, stellt man zunächst wieder das Massenwirkungsgesetz auf:

$$K_S = \frac{c(\text{Ac}^-) \cdot c(\text{H}_3\text{O}^+)}{c(\text{HA})}. \quad (2.18)$$

Ist die Konzentration von Acetat und Essigsäure gleich groß, so folgt direkt:

$$\text{pH} = \text{p}K_S. \quad (2.19)$$

Das bedeutet, dass man sich das Puffersystem so aussucht, dass sein $\text{p}K_S$ -Wert genau dem pH-Wert entspricht, um den man puffern möchte. Ebenfalls kann man mit [Gleichung 2.18](#) den pH-Wert einer Pufferlösung in Abhängigkeit des Verhältnisses von Säure und korrespondierender Base berechnen:

$$\text{pH} = \text{p}K_S + \log \frac{c(\text{A}^-)}{c(\text{HA})}. \quad (2.20)$$

Diese Gleichung ist auch als Henderson-Hasselbalch-Gleichung bekannt. An dieser Stelle sei nochmals betont, dass in der Gleichung nicht die Konzentrationen stehen,

die man zu Beginn in die Lösung gebracht hat, sondern diejenigen nach Erreichen des Gleichgewichtes. Typischerweise wird ein Puffer deshalb so hergestellt, dass man die Pufferpaare im etwa passenden Verhältnis und in der Konzentration einwiegt, dass der Puffer eine ausreichende Kapazität hat. Anschließend stellt man den pH-Wert exakt mit pH-Meter und verdünnten NaOH- bzw. HCl-Lösungen ein.

Als Daumenregel gilt, dass eine Lösung etwa so lange puffert, wie die Konzentrationsverhältnisse von Säure und korrespondierender Base maximal 1/10 sind. Damit folgt aus der Henderson-Hasselbalch-Gleichung 2.20, dass der Pufferbereich

$$\Delta\text{pH}_{\text{Puffer}} = \text{pK}_S \pm 1 \quad (2.21)$$

umfasst. Im menschlichen Organismus findet man neben anderen Systemen im Blut auch den Phosphat-Puffer, der um $\text{pH} = 7$ Pufferwirkung zeigt. Deshalb werden biologische Proben (wie z.B. DNS) meist auch in diesem Puffer gemessen [Buc14]. Diese Überlegungen zur Säure-Base-Chemie haben Folgen für das Verhalten von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen. Bei neutralem pH-Wert liegen Aminosäuren meist als Zwitterionen vor, das heißt die Carboxygruppe hat die Aminogruppe protoniert und beide Gruppen tragen entgegengesetzte Ladungen. Dadurch ist das Zwitterion in Summe ungeladen und löst sich schlecht in Wasser, wenn die Reste groß und hydrophob sind. Drastisch verbessern lässt sich die Löslichkeit, indem man den pH-Wert entweder stark nach oben oder unten schiebt, was eine Nettoladung der Aminosäure bewirkt. Da diese Gruppen aber bei Proteinen ohnehin in der Peptidbindung verbrückt sind, fällt dieser Effekt dort kaum ins Gewicht. Entscheidender sind hier die Seitenketten der Aminosäuren mit Säure-Base-Eigenschaften. Sind in einem Protein überwiegend Säurereste, so werden sie bei $\text{pH} = 7$ entsprechend ihrer pK_S -Werte deprotoniert vorliegen und somit eine negative Ladung des Proteins erzeugen, was wiederum die Löslichkeit in Wasser oder anderen polaren Lösungsmitteln erhöht. Darauf wird auch später noch genauer eingegangen. Da als Lösungsmittel für die Peptide in dieser Arbeit vornehmlich Methanol verwendet wurde, soll anschließend die Säure-Base-Chemie in Methanol angerissen werden.

2.2.3. Säure-Base-Verhalten in Methanol

Da Methanol, wie Wasser, ein Ampholyt ist, zeigt es analog zu Wasser ein Autoprotolysegleichgewicht:

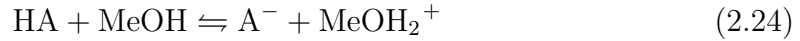


Für das Ionengleichgewicht des Methanols gilt [RW11]:

$$K_{\text{auto}} = c(\text{MeOH}^-) \cdot c(\text{MeOH}_2^+) = 6,31 \cdot 10^{-18} \frac{\text{mol}^2}{\text{l}^2} \quad (2.23)$$

2. Aufbau und Struktur von Proteinen

Damit ist die Autoprotolysekonstante $pK_{\text{auto}} = -\log K_{\text{auto}} = 17,2$ und der Neutralpunkt in Methanol liegt bei einem pH-Wert von 8,6. Ebenso gilt für die Dissoziationsreaktion einer Säure HA in Methanol



das Massenwirkungsgesetz

$$K = \frac{c(\text{MeOH}_2^+) \cdot c(\text{A}^-)}{c(\text{MeOH}) \cdot c(\text{HA})}. \quad (2.25)$$

Die Konzentration von Methanol in Methanol beträgt $24,7 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$. Damit definiert man wiederum eine neue Konstante $K_{\text{SM}} := K \cdot c(\text{MeOH})$. Ebenso führt man zur Diskussion der Säurestärke in Methanol den pK_{SM} -Wert als negativen, dekadischen Logarithmus der MeOH_2^+ -Ionenkonzentration ein. Diese pK_{SM} -Werte unterscheiden sich allerdings von den in Wasser gemessenen pK_{S} -Werten – sie müssen in jedem Lösungsmittel neu bestimmt werden. So beträgt der pK_{SM} -Wert der Glutaminsäureseitenkette in Methanol 9,71 und für die basischen Lysinreste ist $pK_{\text{BM}} = 4,92$ [GH34]. Sind die Lysinreste eines Peptids protoniert, wenn man es ins Methanol bringt, benötigt man zunächst die Beziehung $pK_{\text{SM}} + pK_{\text{BM}} = 17,2$ (s. Gleichung 2.11). Damit beträgt der pK_{SM} -Wert des protonierten Lysins $17,2 - 4,92 = 12,28$. Die Glutaminsäure ist somit zwar eine schwache Säure in Methanol, aber sie ist stärker als protoniertes Lysin. Stellt man nun eine Lösung mit $c = 4\text{mM}$ eines glutaminsäurehaltigen Peptides in Methanol her, kann man aufgrund der schwachen Säure den pH-Wert in Methanol mithilfe von Gleichung 2.16 berechnen: $\text{pH} = \frac{1}{2}(pK_{\text{SM}} - \log c_0(\text{HA})) = \frac{1}{2}(9,71 - \log 0,004) = 6$. Stellt man nun die Henderson-Hasselbalch-Gleichung nach dem Verhältnis von deprotonierter und protonierter Säure um, so erhält man $\frac{c(\text{A}^-)}{c(\text{HA})} = 10^{(\text{pH} - pK_{\text{S}})} \approx \frac{1}{5000}$. Somit ist nur jedes 5000ste Molekül deprotoniert. In Wasser findet man ein Verhältnis von $\frac{c(\text{A}^-)}{c(\text{HA})} \approx \frac{1}{10}$.

Diese Überlegungen werden an späterer Stelle wichtig, wenn es darum geht, den Protonierungszustand von Peptiden in verschiedenen Lösungsmitteln und bei verschiedenen Vorbehandlungen zu bestimmen.

3. Proteinfaltung

Dieses Kapitel gibt zunächst einen Überblick über die Methoden, mit denen Proteinfaltung untersucht werden kann und welche Parameter man damit jeweils charakterisieren kann. Im Anschluss werden allgemeine Theorien der Faltung von Proteinen erläutert und im Speziellen die Faltung von β -Haarnadelpeptiden auseinandergesetzt. Diese Struktur motive sind aus einer Schleifensequenz (engl.: *loop*) und einem β -Faltblattanteil zusammengesetzt.

3.1. Methoden zur Untersuchung von Proteinfaltung

An dieser Stelle werden Methoden der aktuellen Forschung zur Proteinfaltung vorgestellt, bzw. einige der Methoden detaillierter erklärt. Es wird zuerst anhand von stationären Gleichgewichtsexperimenten gezeigt, wie verschiedene Parameter mit geeigneten Spektroskopiearten beleuchtet werden können und welche Möglichkeiten genutzt werden, um den Faltungsgrad von Proteinen zu kontrollieren. Zuletzt wird gezeigt, wie zeitabhängige Messungen durchgeführt werden können.

CD-Spektroskopie

Eine verbreitete Methode zur schnellen Abschätzung der Sekundärstruktur von Proteinen ist die CD (*circular dichroism*)-Spektroskopie. Jedes Sekundärstrukturmotiv hat aufgrund der Symmetrie für rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht unterschiedliche, von der Wellenlänge abhängige Extinktionskoeffizienten und weist damit ein charakteristisches CD-Spektrum auf. Eine detailliertere Beschreibung der Methode geben u.a. Kelly et al. [KJP05]. [Abbildung 3.1](#) zeigt CD-Spektren für die verschiedenen Sekundärstruktur motive. Gibt es zusätzlich π - π -Wechselwirkungen durch das Stapeln von aromatischen Aminosäuren (s. [Abschnitt 2.1](#)), so erscheint noch eine weitere, positive Bande um 230 nm, die durch die exzitonische Kopplung der π -Systeme entsteht [GW94]. Damit kann abgeschätzt werden, welche Sekundärstruktur motive zu welchem Anteil in einem Protein vorkommen [PG81]. Die CD-Spektroskopie hat sich als eine der Standardmethoden der Biochemie auf dem Gebiet der Proteinfaltung etabliert.

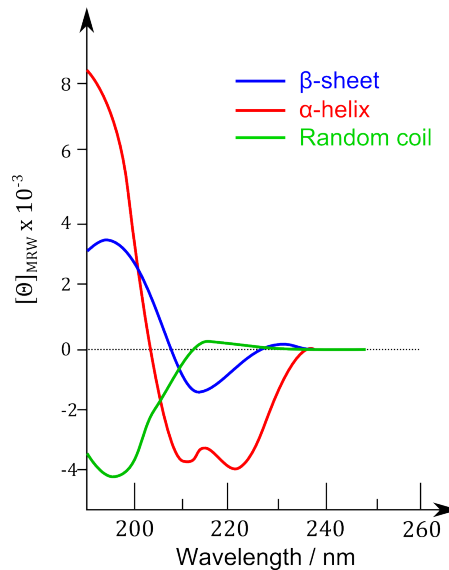


Abbildung 3.1.: CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturen eines Polylysin-Proteins nach [Che15a](#)

Trp-Fluoreszenz

Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin zeigen aufgrund ihres großen konjugierten π -Systems Fluoreszenz im nahen UV-Bereich. Die Fluoreszenzquantenausbeuten (in Wasser, bei einer Anregungswellenlänge von 253 nm) von Tryptophan und Tyrosin betragen jeweils etwa 20 %, diejenige des Phenylalanins beträgt nur 4 % [\[TW57\]](#). Eine ausführlichere Diskussion der Tryptophanfluoreszenz wird in [Kapitel 5](#) angeführt. Da Tyrosin nach der UV-Anregung seine Energie strahlungslos auf das Tryptophan übertragen kann, sieht man im Wesentlichen die Fluoreszenz des Tryptophans, falls beide Aminosäuren in Proteinen vertreten sind [\[KB05\]](#). Sowohl die Intensität als auch die spektrale Position der Fluoreszenz hängen von der Umgebung des fluoreszierenden Restes ab: Wenn es im Inneren eines Proteins liegt, kann das angeregte Tryptophan von zahlreichen Aminosäuren gequenchet werden, was die Fluoreszenzintensität verringert [\[CB98, VC01\]](#). Dies ermöglicht es, Aussagen über die Packungsdichte und den hydrophoben Kern eines Proteins zu treffen.

Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektroskopie gewährt Einblicke verschiedener Art in die Konformation von Proteinen. Hauptsächlich stützt man sich hierbei auf zwei charakteristische Banden: Die Amid-I Bande (größtenteils Streckschwingung der CO-Doppelbindung im Peptidrückgrat) bei etwa 1650 cm^{-1} und die Amid-II Bande (größtenteils NH-Biegeschwingung und CN-Streckschwingung) bei etwa 1550 cm^{-1} [\[Bar07\]](#). Aufgrund der hohen Absorption von Wasser muss deuteriertes Wasser als Lösungsmit-

tel verwendet werden, wenn man Analysen bezüglich der Amid-I Bande durchführen will. Das führt aufgrund des Protolysegleichgewichtes zu einem HD-Austausch am Stickstoff der Peptidbindung, wodurch wiederum die Amid-II Bande in den Bereich von 1450 cm^{-1} verschoben wird. Man bezeichnet sie dann als Amid-II' Bande.

Die genaue Lage der Amid-I Bande hängt von der Sekundärstruktur eines Proteins

Motiv	mittlere Position [cm^{-1}]	extremaler Bereich [cm^{-1}]
α -Helix	1652	1642-1660
β -Faltblatt	1630, 1679	1615-1638, 1672-1694
Schleifen	1671	1653-1691
Ungeordnet	1645	1639-1654

Tabelle 3.1.: Bandenpositionen für Sekundärstrukturmotive in H_2O nach Bar07

ab. [Tabelle 3.1](#) zeigt Werte für die bekannten Sekundärstrukturmotive. Im Fall der β -Faltblätter tritt eine Aufspaltung der Bande auf, die sich auf die Kopplung der Übergangsdipolmomente zurückführen lässt [[Miy60](#)]. Theoretische Studien haben gezeigt, dass diese Aufspaltung nur dann reproduzierbar ist, wenn man die Kopplung für jeden Oszillator mit den vier Oszillatoren im β -Faltblatt berücksichtigt, die jeweils um eine Position entlang des Stranges und um einen Strang nach vorn oder hinten verschoben sind [[MK75](#)]. [Abbildung 3.2](#) veranschaulicht diese Kopplung für einen Oszillator.

Darüber hinaus lassen sich mithilfe von IR-Spektroskopie Aussagen über das Wasser-

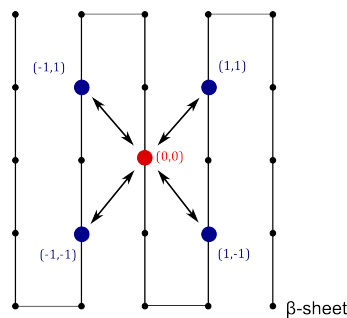


Abbildung 3.2.: Kopplungsterm bei β -Faltblättern:

Die Aufspaltung der β -Faltblattbande im Infraroten tritt nur bei Berücksichtigung der Kopplung eines Oszillators (rot) mit den vier Oszillatoren, die jeweils eine Position entlang des Stranges und einen Strang vorwärts und rückwärts sitzen, auf.

stoffbrückenmuster in Proteinen treffen. Da die CO-Doppelbindungen der Peptidbindung ein Wasserstoffbrückenakzeptor ist, verschiebt sich deren Infrarotabsorption bei Veränderung der Wasserstoffbrücken. In einem denaturierten Protein sind vermehrt schwächere Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel vorhanden, wohingegen im nativen Zustand stärkere Verbrückungen zwischen den Peptidsträngen zu finden

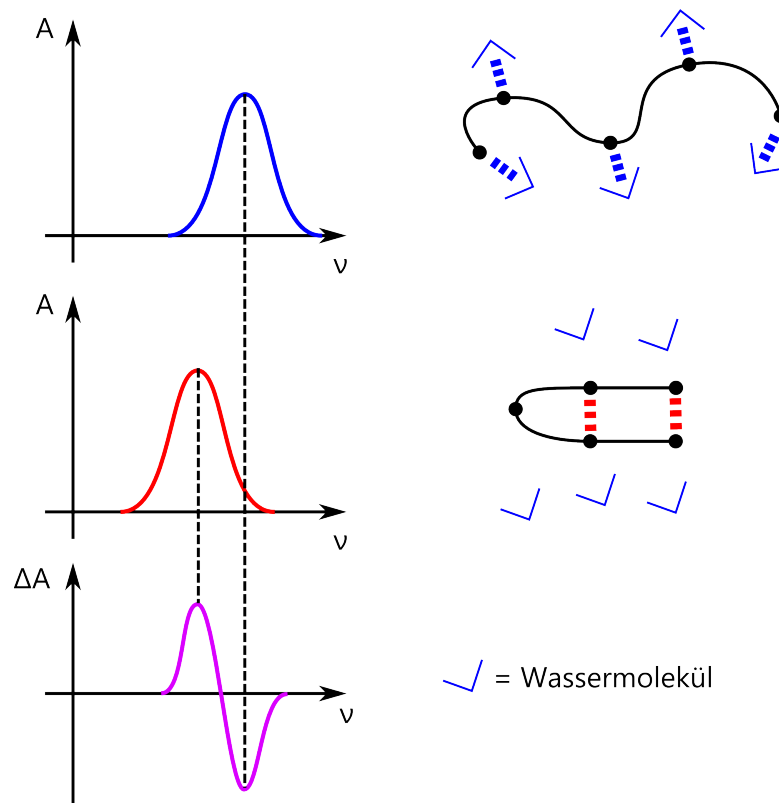


Abbildung 3.3.: Schematische Darstellung des Bandenschiebens bei Änderung der Wasserstoffbrückenkonfiguration bei IR-Spektroskopie:

In der linken Spalte sind die Bandenpositionen gezeichnet, rechts die molekulare Situation. Für Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel (oben) liegt die Amid-I-Bande im blauen Bereich, schiebt aber für Interstrang-Wasserstoffbrücken ins Rote (Mitte). Das Differenzspektrum ist unten links in violett gezeichnet.

sind (vgl. [Abschnitt 3.2](#)). Deshalb ist die Amid-I-Bande des nativen Zustands gegenüber derjenigen des denaturierten Zustands rotverschoben. Da die auftretenden Verschiebungen nur eine sehr geringe Amplitude haben, werden zur genauen Analyse des Bandenschiebens oft Differenzspektren gebildet. [Abbildung 3.3](#) veranschaulicht dieses Vorgehen. Die Vibrationspektroskopie ist eine sehr geeignete Methode, um Sekundärstruktur motive und Wasserstoffbrückenkonfiguration eines Proteins zu betrachten. Eine detaillierte Betrachtung von Infrarotspektroskopie an Proteinen liefert Barth [[Bar07](#)].

Mehrdimensionale Infrarotspektroskopie kann darüber hinaus direkte Informationen zu Kopplungstermen liefern. Eine übersichtliche Darstellung dazu liefern Hamm und Zanni [[HZ11](#)].

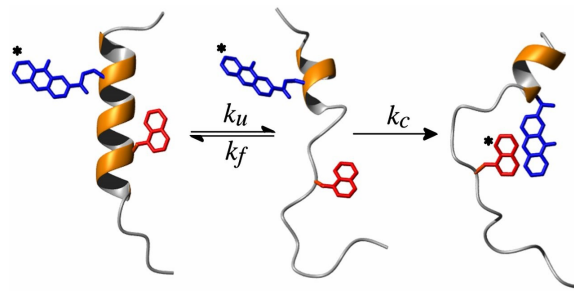


Abbildung 3.4.: Schematische Darstellung der Messung von Proteinstabilität mithilfe von TTET [Neu13](#).

NMR-Spektroskopie

Vor allem bei kleinen Peptiden und in Kombination mit theoretischen Modellen kann die Struktur mithilfe von mehrdimensionaler NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Hierbei löst man vor allem räumliche Kopplungen zwischen Protonen auf und kann so auf die Konformation von Peptiden und wechselwirkende Gruppen schließen. Detaillierte Beschreibungen dieser Methode findet sich in der Literatur [[Fri99](#)].

Energietransfer: FRET und TTET

Die neueren Methoden der Fluoreszenzspektroskopie des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) und des Triplett-Triplett-Energie-Transfers (TTET) finden im Bereich der Proteinfaltung immer häufiger Anwendungen. Sie beruhen im Prinzip darauf, dass man einen Fluoreszenzfarbstoff (Donor) anregt, der Licht eines bestimmten Spektrums emittiert. Befindet sich in räumlicher Nähe ein zweiter Fluoreszenzfarbstoff, dessen Absorptionsspektrum mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappt (Akzeptor), kommt es zu einem strahlungslosen Energietransfer auf den Akzeptor, der dann wiederum zum Spektrum des Donors rotverschoben emittiert. Für ein bestimmtes Donor-Akzeptor-Paar ist damit die Energietransfereffizienz ein Maß für die räumliche Nähe von Donor und Akzeptor. Diese Methode wurde beispielsweise benutzt, um die Stabilität einer α -Helix zu vermessen [[Neu13](#)]. [Abbildung 3.4](#) veranschaulicht das Prinzip: Akzeptor und Donor sind so an die Seitenketten eines α -helikalen Proteins angebracht, dass sie im gefalteten Zustand keinen Kontakt haben. Bei Anregung des Donors misst man vornehmlich dessen Emissionsspektrum. Entfaltet sich die Helix, so kann es durch Diffusion der ungefalteten Polypeptidkette zum Kontakt von Donor und Akzeptor kommen, man misst dementsprechend überwiegend das Emissionsspektrum des Akzeptors. Durch zeitaufgelöste Messungen kann so die Entfaltungsrate k_u ermittelt werden.

Auslösemethoden für strukturelle Dynamiken

Neben diesen verschiedenen Abtastmöglichkeiten sollen nun Möglichkeiten genannt werden, mithilfe derer man die Entfaltung oder Faltung eines Proteins auslösen, bzw. den Faltungsgrad kontrollieren kann. Üblicherweise findet man in der Literatur:

1. **Denaturanzzugabe:** Man fügt der Proteinlösung einen Stoff in hoher Konzentration bei, der an das Protein bindet und den entfalteten Zustand energetisch begünstigt. Beispiele hierfür sind Urea und Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl).
2. **Temperatur:** Durch Temperaturerhöhung wird der Zustand mit höherer Entropie, also der entfaltete Zustand, populiert.
3. **Mutationen:** Durch gezieltes Austauschen von Aminosäuren wird die Stabilität eines Proteins verändert. Mit der sogenannten Φ -Wert-Analyse [FS04] kann man Rückschlüsse darauf ziehen, ob die Mutation die Stabilität des gefalteten Proteins oder des Übergangszustandes ändert.

Die ersten beiden Methoden können auch verwendet werden, um zeitabhängige Messungen der Faltungsdynamik durchzuführen. Generell benötigt man hierbei jeweils einen Prozess, der strukturelle Änderungen auslöst (Anregung) und eine Messmethode (Abtastung). Man spricht deshalb auch von der *Anreg-Abtast-Spektroskopie*. Nicht alle der oben aufgeführten Abtastarten eignen sich für zeitaufgelöste Betrachtungen von Proteinfaltung, da manche von ihnen keine ausreichende Zeitauflösung gewährleisten.

Schnelle Mischungsexperimente

Bei diesen Methoden löst man die Faltung von Proteinen aus, indem man der Proteinlösung mit hoher Denaturanzkonzentration eine Pufferlösung in großem Überschuss beimischt, wodurch Faltungsbedingungen entstehen. Als Detektionsmöglichkeiten werden in der Literatur zahlreiche der oben erwähnten – wenngleich am häufigsten Fluoreszenzmethoden – verwendet [RMC06]. Schnelle Mischungsexperimente haben dadurch zum einen den Vorteil, dass sie viele, verschiedene Parameter sichtbar machen können, indem man ein breites Spektrum an Detektionsmethoden anwendet. Darüber hinaus kann man auch Proteininteraktionen sehr nah an in-vivo-Bedingungen nachvollziehen. Die Zeitauflösung dieser Methode ist jedoch beschränkt: mit einer Auflösung von 2 μ s bis 4 μ s bei modernen Aufbauten [Her06] verbleiben Prozesse im Zeitbereich der Apparatefunktion und können nicht aufgelöst werden. Nichtsdestoweniger haben die schnellen Mischungsexperimente einen großen Beitrag zum Verständnis von Proteinfaltung geliefert (s. [Abschnitt 3.2](#)).

Temperatursprung

Hier macht man sich die thermische Denaturierung von Proteinen zunutze, indem man die Probenlösung mit einem Laserimpuls um wenige Grad aufheizt und typischerweise mit Infrarot- oder Fluoreszenzspektroskopie die Entfaltung des Proteins betrachtet. Der anregende Laser wird dabei auf eine Absorptionsbande des Lösungsmittels eingestellt. Diese Anregemethode ist vor allem in der Infrarotspektroskopie sehr beliebt, da die Probe nicht mit im Amid-I Bereich absorbierenden Denaturanzien bei hohen Konzentrationen verunreinigt werden muss. Die Zeitauflösung ist durch die Impulsdauern der verwendeten Laser begrenzt und liegt bei bis zu 5 ns [JPT13] und ist damit um drei Größenordnungen besser als bei den schnellen Mischungsexperimenten.

Man kann allerdings bei Temperatursprungmessungen (T-Sprung) im allgemeinen nur die Entfaltungsrichtung messen und deshalb nur indirekt Rückschlüsse auf die Faltung ziehen. Da man nur das Lösungsmittel heizt, ist die Wirkung auf das zu betrachtende Protein/Peptid sehr unspezifisch. Das Protein reagiert nur auf seine geänderte Umgebung, es gibt aber keinen definierten Auslöser für die Entfaltungsreaktion.

3.2. Allgemeine Theorien

Wie in der Einleitung erwähnt, haben Anfinsen et al. [Anf61] gezeigt, dass sich Ribonuklease unter Denaturierungsbedingungen (bei einer Konzentration von 8M Urea) zunächst völlig entfaltet, nahezu alle möglichen Kombinationen an Disulfidbrücken der 8 Cysteinreste annimmt und seine biologische Funktion verliert. Entfernt man das Urea und gibt eine kleine Menge an Substanz zu, die das Gleichgewicht der Disulfidbrücken leicht in Richtung der offenen Thiolgruppen verschiebt (z.B. Mercaptoethanol), so findet ein Disulfidbrückenaustausch statt und der biologisch aktive, native Zustand der Ribonuklease stellt sich wieder her. Daraufhin stellte Anfinsen [Anf73] die *thermodynamische Hypothese* auf, nach der der native Zustand eines Proteins derjenige mit der niedrigsten, freien Energie sein muss. Dieser Zustand ist durch die Primärstruktur eines Proteins bestimmt. Bis heute geht man davon aus, dass bis auf wenige, bekannte Ausnahmen [Har96] alle Proteine diese Eigenschaft haben.

Cyrus Levinthal behandelte die Frage, wie ein Protein seinen nativen Zustand findet, also wie die Reaktion



abläuft. Dabei ist U der ungefaltete Zustand und N der native, gefaltete Zustand. Levinthal diskutiert verschiedene Möglichkeiten: Er nahm zunächst einen eratischen Prozess an, in dem das Protein willkürlich alle möglichen Dihedralwinkelwerte abtastet, bis es irgendwann durch Zufall sein energetisches Minimum erreicht. Dazu schätzte Levinthal die Zeit ab, die ein Protein brauchen würde, um sich derart zu falten [Lev69]. Er ging von einem 100 Aminosäuren langen Protein aus, das somit 99 Dihedralwinkelpaare hat, also insgesamt 198 Winkelfreiheitsgrade, von denen jeder drei mögliche Werte annehmen kann (vgl. Ramachandran-Plot [Abbildung 2.5](#)). Damit ergeben sich insgesamt 3^{198} Konformationen. Nimmt man für die Konformationsänderung eine Zeit von 10^{-13} s an, so bräuchte ein Protein etwa 10^{74} Jahre, um den kompletten Konformationsraum abzusuchen. Tatsächlich findet man in der Natur aber Faltungszeiten im Bereich von Sekunden bis Stunden. Diese Diskrepanz wird oftmals als Levinthal-Paradoxon bezeichnet. Für Levinthal selber war dieser Sachverhalt ein Hinweis darauf, dass Proteinfaltung ein gerichteter Vorgang ist und kein Zufallsprozess sein kann.

Genauere Betrachtung der beiden Zustände N und U

Bevor konkrete Faltungsmodelle betrachtet werden, sollen die beiden Zustände aus [Gleichung 3.1](#) näher betrachtet werden.

Der native Zustand **N** ist durch NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie für etwa 35 000 Proteine strukturell aufgelöst worden [Ros06]. Für den den entfaltenen Zustand **U** gibt es keine detaillierten Strukturdaten. Es ist offensichtlich, dass dieser

Zustand allerdings ebenso entscheidend für die Lösung der Faltungsfrage ist wie der native Zustand, da er den Startpunkt der Faltungsreaktion festlegt. Ein erster Ansatzpunkt war, U als strukturlose, zufällige Windung (engl.: *random coil*) zu betrachten. Unter der Annahme, dass es keine Wechselwirkungen zwischen den Strängen dieses *random coil* gibt und sich die Molekülkette lediglich nicht durchdringen darf, stellten Flory und Volkenstein [FV69] eine Theorie auf, die den Gyrationradius R_G eines solchen *random coil* in Abhängigkeit der Kettenlänge ausdrückt. Für eine lineare, verknäulte Kette gilt:

$$R_G := \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N R_{Gi}^2}{N}} = R_0 n^\nu \quad (3.2)$$

Dabei ist R_{Gi} die Entfernung vom i -ten Atom zum Massenschwerpunkt und N die Anzahl der Atome im Molekül. R_0 ist eine Konstante für die intrinsische Steifigkeit der Kette und n ist die Anzahl der Residuen. Die Werte von ν betragen für ein nativ gefaltetes Protein 0,33 und für eine willkürliche Anordnung 0,6. Tanford [Tan68] zeigte, dass Proteine in 6M GdmCl das Skalenverhalten eines *random coil* zeigen, weshalb man lange Zeit davon ausging, denaturierte Proteine wären völlig strukturlose *random coils*. Fitzkee und Rose [FR04] zeigten allerdings, dass auch Proteine mit Sekundärstrukturanteilen $\nu = 0,6$ aufweisen können. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass sich in den denaturierten Zuständen vieler Proteine Reststrukturelemente finden [Ham04, DGP04, Shi06, Pas12, Ham93]. Für manche Proteine gibt es allerdings keine Indizien für Sekundärstrukturelemente im entfalteten Zustand [Cli09, Mok99].

Somit lässt sich feststellen, dass strukturelle Aussagen für den nativen Zustand sehr verlässlich sind und in großer Fülle vorliegen, wohingegen der entfaltete Zustand weiterhin für Kontroversen sorgt. Dieser Sachverhalt könnte auch mit den Bedingungen der jeweiligen Betrachtungen zu tun haben. Für den nativen Zustand sind die Bedingungen eindeutig und oftmals messbar: sie müssen physiologisch sein und bei Enzymen muss Aktivität in biologisch relevanter Größenordnung nachweisbar sein. Für ein denaturiertes Protein gibt es keinen ausgezeichneten Zustand, den man über eine bestimmte Eigenschaft definieren könnte, ohne dabei einen Zirkelschluss einzugehen (so könnte man beispielsweise den entfalteten Zustand als solchen definieren, der keinerlei Sekundärstrukturmotive aufweist, was allerdings schon impliziert, dass man dort weder α -helikale Strukturen noch β -Faltblätter finden wird). Weiterhin entfalten sich Proteine unter verschiedensten Bedingungen. Man kann beispielsweise die Temperatur oder den pH-Wert verändern oder verschiedene, denaturierende Salze zugeben. Zwar gibt es Indizien dafür, dass für manche Proteine unter verschiedenen Denaturierungsbedingungen die entfalteten Zustände thermodynamisch identisch sind [GC65], was aber nicht zwangsläufig heißen muss, dass diese Zustände auch im Detail dieselbe Konformation haben müssen. Das Skalenverhalten des Gyrationradius sagt sicher aus, dass der entfaltete Zustand nicht die hohe Kompaktheit des

nativen Zustandes haben kann. Ob Sekundärstrukturelemente vorhanden sind oder nicht, scheint von Protein zu Protein unterschiedlich zu sein.

Gerichtete Suche – Faltungstrichter

Wie eingangs erwähnt, war bereits nach Levinthals und Anfinsens Überlegungen klar, dass Proteinfaltung kein statistischer Prozess sein kann. Ein physikalisches Modell für die Faltung von Proteinen lieferten Wolynes et al. [BRY95, FSW91]. Dieses

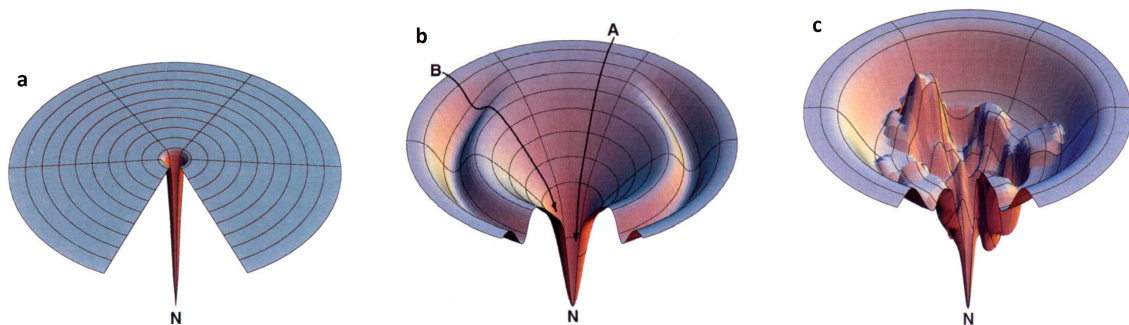


Abbildung 3.5.: Faltungstrichter für verschiedene Faltungsarten:

a) Eine glatte Energielandschaft entspricht der Zufallsfaltung.

b) Im Fall A handelt es sich um downhill-Falten ohne Energiebarriere, Fall B veranschaulicht das 2-Zustandsmodell mit einer Energiebarriere.

c) Dieser Trichter zeigt eine raue Energielandschaft mit vielen lokalen Minima.

Bilder aus DC97.

Modell berücksichtigt Anfinsens thermodynamische Hypothese und vereint sie mit Levinthals Idee der gerichteten Suche: Proteine bewegen sich während ihrer Faltung ständig entlang eines Gradienten der freien Energie. Dabei kann eine Vielzahl von Zuständen eine Rolle spielen und es kommt zu einem Trichterbild. [Abbildung 3.5](#) illustriert dieses Modell. Der linke Trichter a) entspricht der Annahme, die Levinthals Abschätzung zu Grunde liegt. Es gibt keine Eigenschaften der Energielandschaft, die das Protein zu seinem energetischen Minimum leiten würden; der Faltungsprozess ist ein statistisches Absuchen der Energiefläche.

Der mittlere Teil b) beinhaltet zwei Fälle. Beginnt die Faltung in einem Konformationssektor, in dem auch die Trajektorie A liegt, gibt es keine Barrieren. Es gibt für jede Konformation entlang des Faltungspfades einen Zustand geringerer Energie, der näher am nativen Zustand liegt. Diese Faltungsreaktion nennt man *downhill folding* ‚Bergab Faltung‘. Für den Rest des Trichters (z.B. B) ist in jedem Pfad eine Energiebarriere enthalten und es gibt einen stabilen Zwischenzustand im ersten lokalen Minimum. Das bedeutet, dass ein Protein thermische Energie benötigt, um den energetisch höher liegenden *transition state* ‚Übergangszustand‘ zu erreichen, von dem aus es wieder strikt bergab geht.

Im Fall von c) spricht man von einer rauen Energielandschaft. Es gibt keine ausgeprägte Barriere, aber sehr viele Zwischenzustände, die als lokale Minima auch begrenzt stabil sind. Anschaulich bedeutet dies für ein Protein, das sich falten möchte, dass es viele energetische Zustände gibt, in denen Wechselwirkungen vorliegen, die nicht nativ sind und auf dem Weg zum gefalteten Zustand wieder gelöst werden müssen. Es wäre sogar denkbar, dass es kinetische Fallen gibt. Das sind Zustände, die so stabil sind, dass das Protein sie bei Raumtemperatur nicht mehr verlassen kann. Bryngelson und Wolynes beschrieben diese Sachverhalte mithilfe des Spinglas-Modells [BW87]. Wie bei zweidimensionalen Spingläsern gibt es Zustände, die energetisch *frustriert* sind, d.h. es gibt keine Zustände, bei denen alle beteiligten Spinpaare gleichermaßen im Zustand minimaler Energie sind. Ebenso ist es bei Proteinen wahrscheinlich, dass im nativen Zustand nicht alle Aminosäuren für sich genommen im energetischen Minimum sind. Der native Zustand eines Proteins ist vielmehr derjenige, in dem die Frustration minimal ist. Theoretisch gibt es auch die Möglichkeit von Zuständen, die ausgefroren sind (kinetische Fallen). Betrachtet man die Gleichgewichtsentfaltung von Proteinen (z.B. durch Titration mit einem Denaturanz), so stellt man allerdings fest, dass viele Proteine mit einem 2-Zustandsmodell beschreibbar sind, d.h. es gibt nur einen entfalteten und einen gefalteten Zustand und keine stabilen Intermediate [MPS95]. Onuchic und Wolynes [OW04] machen dafür die Evolution verantwortlich. Nur diejenigen Aminosäuresequenzen, die sich ohne kinetische Fallen und nur zu einem energetisch stabilen – dem nativen – Zustand falten können, haben Leben ermöglicht und sich somit gegenüber den Sequenzen mit kinetischen Fallen oder mehreren stabilen Endzuständen durchgesetzt. Obschon dieses Modell die Befunde von Anfinsen und Levinthal erklärt, bleiben zwei fundamentale Fragen offen:

1. Welche **Wechselwirkungen** sind es, die den nativen Zustand stabilisieren?
2. Wie faltet sich ein Protein **mikroskopisch**, d.h. gibt es einheitliche Mechanismen bei der Faltung?

Diese beiden Fragen sind – wie im Folgenden zu sehen sein wird – nicht voneinander unabhängig. Sie werden immer noch diskutiert und es gibt bisher keine allgemein akzeptierte Theorie dazu.

Konkrete Modelle: Wasserstoffbrücken vs. hydrophobe Wechselwirkungen

Es gibt neben den Disulfidbrücken in erster Linie zwei stabilisierende Wechselwirkungen bei der Faltung von Proteinen: Wasserstoffbrückenbindungen (d.h. elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativen Partialladungen am Sauerstoffatom einer Peptidbindung und den positiven Partialladungen an den Wasserstoffprotonen)

3. Proteinfaltung

und hydrophobe Wechselwirkungen (π - π -Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäuren und Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Aminosäuren). Seit Pauling et al. [PCB51] den Energiebeitrag einer Wasserstoffbrücke auf etwa $-8 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ schätzten, waren sie im Fokus der Proteinfaltung. Mitchell und Price [MP91] kommen zu dem Schluss, dass eine komplett ungesättigte Wasserstoffbrücke in einem Protein $5 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ kostet. Die interessantere Fragestellung ist allerdings, wie groß die Energie einer Wasserstoffbrücke zwischen Peptid und Peptid im Vergleich zu einer Wasserstoffbrücke zwischen Peptid und Wasser ist. Die ersten experimentellen Beiträge lieferte dazu Schellman [Sch55]. Er kam zu dem Schluss, dass Peptid-Peptid-Wasserstoffbrücken gegenüber Peptid-Wasser-Wasserstoffbrücken energetisch um etwa $1,5 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ bevorzugt sind. Dieser Wert liegt bemerkenswert nahe an denen, die neuere Untersuchungen gefunden haben [Sch91, Shi92, MP96] und führte dazu, dass man Wasserstoffbrücken einen signifikanten Beitrag zur Stabilität von Proteinen zuwies. Kauzmann [Kau59] lieferte Indizien für eine andere Sichtweise. Er war der Ansicht, dass Wasserstoffbrückenbindungen keine energetische Bevorzugung des gefalteten Zustandes hervorrufen können und deshalb die hydrophoben Wechselwirkungen verantwortlich sein müssen. Von Kauzmans Review losgetretene Untersuchungen ergaben auch experimentell, dass Interamidwasserstoffbrücken keinen energetischen Vorteil gegenüber Wasser-Amid-Wasserstoffbrücken haben [KF62, SA69]. Das führte zu der verbreiteten Ansicht, dass hydrophobe Wechselwirkungen der stabilisierende Effekt für Proteine sein müssten. Neben den eben zitierten Ergebnissen aus den 90er Jahren, die dieses Bild wieder umstürzten, gibt es auch weiterhin Uneinigkeit darüber, ob H-Brücken stabilisierende oder gar destabilisierende Wirkung auf Proteine haben [Ben97, FS93, HY95, LAK95]. Eine Studie der Gruppe Kiefhaber [MJK06] sieht H-Brücken im Protein für den Kollaps des Proteins verantwortlich und schließt daraus, dass H-Brücken stabilisierende Wirkung haben müssen.

Diese Befunde regten G.D. Rose an, eine rückgratbasierte Proteinfaltungstheorie zu entwickeln [Ros06]. Wie bei allen Faltungstheorien geht es hier um die Frage, was den Konformationsraum von Proteinen drastisch einzuschränken vermag. Rose geht davon aus, dass die H-Brücken die treibende Kraft der Proteinfaltung sind. Dazu motivierten ihn die oben genannten Befunde und zudem die Tatsache, dass alle Proteine denselben Stabilitätsbereich von $5-15 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ zeigen [Kum06]. Gewisse Substanzen fördern oder hemmen die Faltung von Proteinen, wenn man sie der Proteinlösung zusetzt. Man nennt sie Osmolyte. Es wurde herausgefunden, dass diese Osmolyte auf den entfalteten Zustand wirken [LT94] und dabei am Rückgrat angreifen [AB04]¹. Auch daraus schloss Rose, dass das Rückgrat eine wichtige Rolle spielt und dass es eine einheitliche Theorie für Proteinfaltung geben muss. Analysen des Aufbaus von Proteinen haben Indizien dafür geliefert, dass es nur etwa 1000 Klassen von Proteinfamilien gibt [CF90, LC76, Mur95]. Diese Klassifizierung beruht auf wiederkehrenden

¹Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Seitenketten ebenso großen Einfluss haben könnten [MH15].

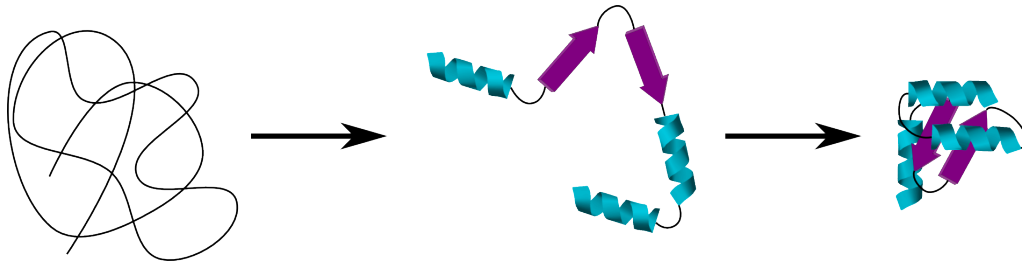


Abbildung 3.6.: Rückgratbasierte Faltung eines Proteins:

Erst findet die Faltung der Sekundärstrukturmotive lokal statt, danach erst orientieren sich die Motive zur Tertiärstruktur um.

Mustern bei verschiedenen Konfigurationen von α -Helices und β -Faltblättern [CF90]. Proteine seien aus Segmenten von α -Helices und β -Faltblättern aufgebaut, die jeweils etwa 10 Aminosäuren beinhalten, die sich untereinander zur Tertiärstruktur reorganisieren². Somit hat ein Protein mit 100 Residuen 2^{10} Möglichkeiten, sich zu falten. Diese Zahl deckt sich sehr gut mit den Klassen, die Chothia und Finkelstein [CF90] und Murzin et al. [Mur95] gefunden haben. Damit muss ein Protein lediglich 1000 mögliche Konformationen abtastern. Man nimmt an, dass die Energielandschaft für die Sekundärstrukturmotive schon vorgeformt ist, d.h. sobald man das Denaturanz wegnimmt, fallen die 10er Segmente in Sekundärstrukturmotive. Diese These wird von Studien an zylinderförmigen Homopolymeren verschiedener Dicken gestützt. Banavar et al. [Ban04] fanden heraus, dass strukturlose Homopolymere α -helikale und β -faltblattartige Strukturen annehmen, wenn man sie von gutem in schlechtes Lösungsmittel transferiert. Welche Struktur sie annehmen, hängt dabei von ihrem Zylinderradius ab. Bei kleinem Durchmesser bilden sich α -Helices. Erhöht man den Durchmesser, kommt es zu β -Faltblattbildung. Maritan et al. [Mar00] zeigten, dass die α -Helix die dichteste Packung für einen flexiblen Zylinder darstellt. Im Bild von Rose wird die aminosäurenabhängige Energielandschaft, die durch Wechselwirkungen der Seitenketten strukturbestimmend ist, von einer zweiten Energielandschaft überlagert, die für alle Proteine gleich ist und die kurzen Segmente dazu bringt, Sekundärstrukturmotive anzunehmen. Dabei entscheiden die Seitenketten lokal, welches Sekundärstrukturmotiv angenommen wird. Danach finden die strukturierten Segmente zur Tertiärstruktur zusammen. [Abbildung 3.6](#) fasst diesen Prozess nach Rose zusammen. In Proteinen, in denen schon der denaturierte Zustand Reststrukturen aufweist, passiert die Faltung noch schneller, da der hemmende entropische Beitrag kleiner wird. Im Modell von Rose wird der eingeschränkte Konformationsraum dadurch erklärt, dass sich unter Faltungsbedingungen sofort Sekundärstrukturmotive in einer vorgeprägten Energielandschaft bilden, die sich anschließend nur reorganisieren

² $\alpha - \alpha - \alpha - \beta - \beta - \alpha$ bedeutet beispielsweise, dass die ersten 30 Aminosäuren eine α -helikale Struktur aufweisen, dann 20 Aminosäuren ein β -Faltblatt bilden und die letzten 10 Aminosäuren wieder als α -Helix vorliegen.

müssen.

Für Rose ist der wasserstoffbrückenstabilisierte Zustand ein kompakter Zustand, der native Wasserstoffbrückenkonfiguration hat und dessen mikroskopische Seitenkettenorientierung erst noch gefunden werden muss. Diesen Zustand interpretiert Rose als den von Ptitsyn [Pti95] postulierten *molten globule*. Neuartige experimentelle Ansätze haben eine andere Sichtweise auf die Proteinfaltung motiviert. Udgaonkar [Udg13] beschreibt in seinem Review Einzelmolekülmessungen, die zeigen, dass der denaturierte Zustand großen Konformationsschwankungen unterworfen ist. Hierzu wurden Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)-Messungen durchgeführt, bei denen z.B. Tryptophanmoleküle angeregt wurden, die bei Kontakt mit Cystein strahlungslos relaxieren [WBL10] oder bei denen externe Farbstoffe in Proteine gebracht werden [CEF05, Che07]. Unter Verminderung der Denaturanzkonzentration (allerdings immer noch im Bereich von entfaltenen Zuständen) werden intramolekulare Abstände kleiner [Voe12, KHN06, SLE02, Hof08, SH06, Hof07]. Interessant ist nun, in welchem Maße sich bei diesen kontrahierten, aber noch entfaltenen Zuständen auf dem Weg zum nativen Zustand bereits fixe Sekundärstrukturen ausgebildet haben. Die ersten Mischungsexperimente (d.h. Proteinlösung mit denaturierenden Zusätzen wird in reine Pufferlösung geleitet und die Proteine falten sich unter den neuen Bedingungen) auf der Millisekundenzeitskala zeigten, dass bereits außerhalb der Zeitauflösung Zustände mit geringen Volumina und einem hohen Maß an Sekundärstrukturmotiven vorlagen, was das Vorkommen des molten globule Zustandes als kinetisches Intermediat nahelegte [JW93, AK00, FP02]. Da es, wie oben erwähnt, Zustände gibt, die noch keine oder wenig Sekundärstrukturmotive aufweisen, kann dieser kinetische molten globule nicht der erste Zwischenzustand sein, der auf den völlig denaturierten Ausgangszustand folgt. Experimentelle Belege dafür lieferten schnelle Mischungsaufbauten mit einer Zeitauflösung bis $4 \mu\text{s}$ [Her06]. Diese Experimente zeigen, dass es innerhalb der ersten Millisekunde bei vielen Proteinen eine erste Phase innerhalb der Totzeit des Experimentes ($4\text{-}150 \mu\text{s}$) gibt, in der es zu einem nichtspezifischen Kollaps des Proteins kommt und sich erst danach der kinetische molten-globule-Zustand mit definierten Sekundärstrukturelementen bildet [Udg13]. Als unspezifische Wechselwirkungen kommen hydrophobe Wechselwirkungen in Frage, die im Inneren des Proteins einen hydrophoben Kern bilden, bei dem hydrophobe Gruppen möglichst wenig Wasserkontakt haben. Diese Modellvorstellung von Proteinfaltung ist auch als *hydrophober Kollaps* bekannt und wird in [Abbildung 3.7](#) illustriert.

Weitere Indizien für das Entstehen eines hydrophoben Kerns vor dem Ausbilden von Sekundärstrukturen fanden Rami und Udgaonkar [RU02]. Sie maßen die Fluoreszenzanisotropie der Tryptophane und stellten fest, dass vor dem Auftreten erster CD-Signale für Sekundärstrukturen die Anisotropie und damit die Steifigkeit des hydrophoben Kerns zunahm.

Allerdings lässt sich der erste, unspezifische Kollaps noch nicht kinetisch auflösen. Hierzu werden Methoden mit wesentlich besserer Zeitauflösung benötigt. Im Modell

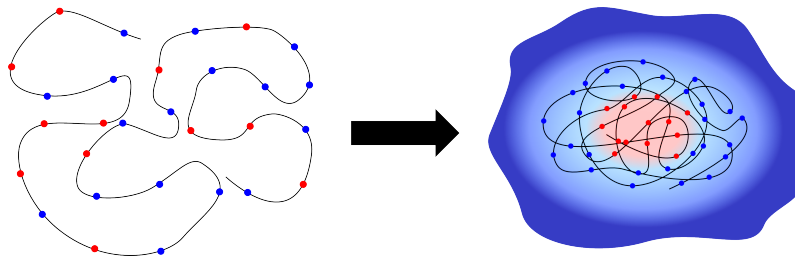


Abbildung 3.7.: Hydrophober Kollaps: Im Wasser lagert sich das Protein so um, dass alle hydrophilen Aminosäuren (blau) an der Protein-Wasser-Grenzfläche liegen und alle hydrophoben Aminosäuren (rot) im Inneren einen hydrophoben Kern bilden.

des hydrophoben Kollaps wird die zur schnellen Faltung nötige Einschränkung des Konformationsraums durch die drastische Volumenverringerung bei der Bildung des hydrophoben Kerns erklärt. [Abbildung 3.8](#) veranschaulicht das Modell von Udgoankar. Unter völlig denaturierenden Bedingungen liegt das Protein als strukturloses Knäuel mit großem Gyrationradius vor. Erniedrigt man die Konzentration an Denaturanz, so findet zunächst ein nichtspezifischer Kollaps statt, die Packung des Proteins wird dichter. Anschließend bilden sich Sekundärstrukturmodule, die Kompaktheit nimmt weiter zu. Dieser Zustand wird als molten globule interpretiert. Unter nativen Bedingungen nimmt die Dichte nochmals zu, die Seitenketten reorientieren sich und der gefaltete Zustand ist erreicht.

Neben den Theorien von Rose (hierarchische, wasserstoffbrückenbasierte Faltung) und Udgoankar (unspezifischer Kollaps) gibt es noch eine dritte Vorstellung, das Nukleationsmodell. Hierbei geht man davon aus, dass die Faltungsreaktion von einem Punkt des Proteins ausgeht und sich – sobald sich dieser sogenannte Nukleationskeim gebildet hat – über das ganze Protein ausbreitet. Diese Modelle werden vornehmlich für die Beschreibung von strikten Zweizustandfaltern verwendet [[JF91](#)]. Auch hier wurden hydrophobe Wechselwirkungen für die Bildung einer Nukleationstasche verantwortlich gemacht [[DFC93](#)]. Ebenso kann man davon ausgehen, dass Sekundärstrukturmodule solche Nukleationstaschen bilden. Bei α -Helices kann dieser Prozess sogar an mehreren Stellen gleichzeitig ablaufen, worin man einen Grund für das schnelle Falten mancher Proteine mit sehr hohem Helixanteil sieht [[GOD07](#)]. Der ratenbegrenzende Schritt ist in diesem Modell die Bildung des Nukleationskeims. Unabhängig davon, welche der Theorien man betrachtet, spielen Sekundärstrukturmodule immer eine zentrale Rolle. Die α -Helix ist den Experimenten schon seit längerem zugänglich, da es viele α -helikale Proteindomänen gibt, die isoliert stabil sind. Auf deren Faltungsverhalten soll in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden, es gibt zahlreiche Literatur dazu.

Da β -Faltblattstrukturen Gegenstand dieser Arbeit sind, wird der aktuelle Forschungsstand zu deren Faltung im folgenden Kapitel dargestellt.

3. Proteinfaltung

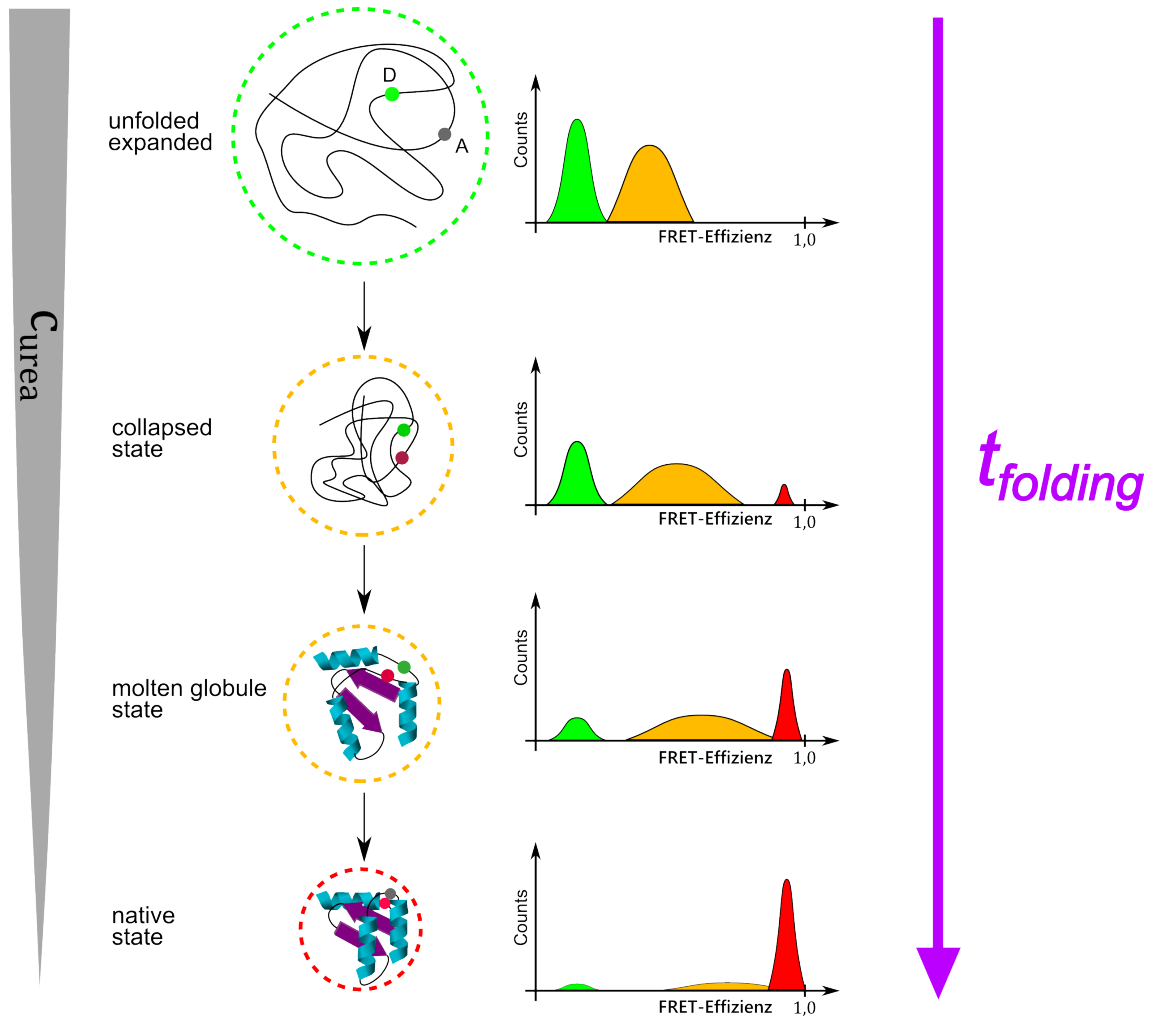


Abbildung 3.8.: Modellvorstellung von Udgoankar nach KHN06:

Von oben nach unten sinkt die Denaturanzkonzentration C_{Urea} . In der ersten Spalte wird die molekulare Struktur eines Proteins bei der jeweiligen Denaturanzkonzentration gezeigt. Für eine FRET-Messung sind Donor (D) und Akzeptor (A) eingezeichnet. Die Emission des Donors liegt im grünen Spektralbereich, die des Akzeptors im roten Spektralbereich. In der rechten Spalte ist die Anzahl der mit einem Mikroskop gemessenen Fluoreszenzintensität bei verschiedenen FRET-Effizienzen gezeigt. Für niedrige FRET-Effizienz misst man hauptsächlich grünes Fluoreszenzlicht, bei hoher FRET-Effizienz vornehmlich rotes Fluoreszenzlicht. Liegt das Protein bei hoher Denaturanzkonzentration ungefaltet vor, so zeigt die hohe Intensität von grünem Licht, dass Donor und Akzeptor voneinander entfernt vorliegen und das Protein deshalb ein großes Volumen einnehmen muss. Ein weiterer, breiter Peak bei etwas größeren FRET-Effizienzen (gelb) deutet auf ein Ensemble mit breiter Abstandsverteilung hin. Wird die Denaturanzkonzentration verringert, nimmt die FRET-Intensität im grünen Spektralbereich ab, die Verteilung im gelben Spektralbereich mit höherer FRET-Effizienz wird breiter und schiebt zu größeren FRET-Effizienzen. Das bedeutet, dass das Volumen des Proteins geringer wird. In diesem Zustand findet man noch keine Sekundärstrukturen. Diese bilden sich erst bei weiterer Erniedrigung der Denaturanzkonzentration. In der FRET-Verteilung nimmt die Intensität im grünen Bereich weiterhin ab, es kommt ein deutlicher Peak im roten Spektralbereich hinzu, der auf eine kompakte Struktur schließen lässt. Dieser Zustand wird als molten globule identifiziert. Ohne Denaturanz erreicht das Protein schließlich den nativen Zustand. Da man hier eine sehr hohe FRET-Effizienz findet, muss er kompakt sein. Es treten keine nennenswerten Intensitäten für andere FRET-Effizienzen auf, was auf eine strukturelle Eindeutigkeit des gefalteten Zustandes hinweist.

3.3. Faltung von β -Haarnadel-Molekülen

Die Untersuchung von β -Faltblattstrukturen gestaltete sich lange Zeit als schwierig, da man keine stabilen, monomeren Modellproteine entdeckte, die weniger als 30 Aminosäuren haben. Dieses Forschungsfeld eröffnete sich der Wissenschaft erst, als Cochran et al. [CSS02] 2002 die Tryptophanzipper (TrpZip) entwickelten und charakterisierten. Dabei handelt es sich um 12–16 Aminosäuren lange, durch Tryptophan-Tryptophan-Wechselwirkungen stabilisierte β -Haarnadelmotive. Sie sind bei Raumtemperatur stabil. Vor allem das TrpZip2 (was sich nur durch die Aminosäuren in der Schleife der Haarnadel vom TrpZip1 unterscheidet) wurde zu einem intensiv vermessenen Modellsystem. [Abbildung 3.9](#) zeigt die Primärstruktur des TrpZip2 in einer schematischen Haarnadelanordnung, wie sie das NMR-Modell rechts zeigt.

Das TrpZip2 zeigt in wässriger, 20 mM Phosphatpufferlösung bei einer Konzen-

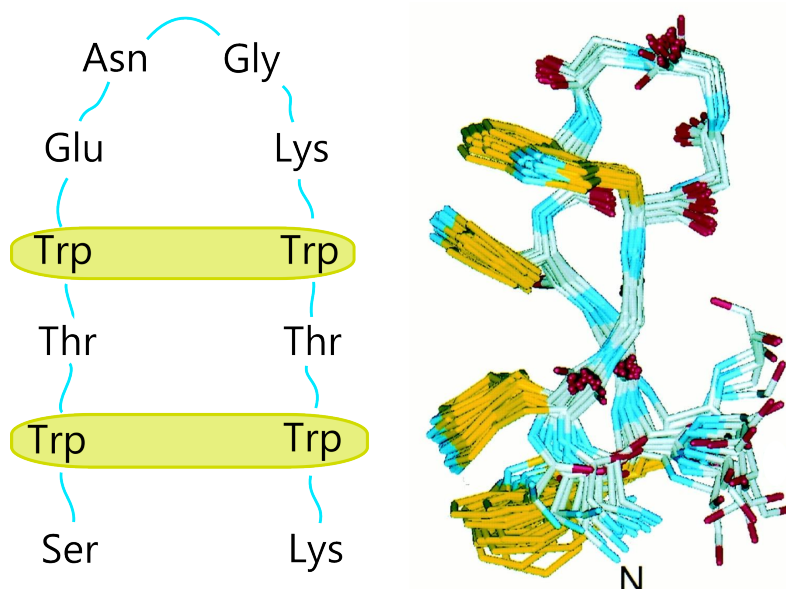


Abbildung 3.9.: Sequenz des TrpZip2 und NMR-Struktur des TrpZip1 [CSS02]:
Grünelb hinterlegt sind die hydrophob wechselwirkenden, gegenüberliegenden Tryptophane.

tration von $20 \mu\text{M}$ eine durch CD-Spektroskopie bestimmte Schmelztemperatur von 345 K. Damit liegt es bei Raumtemperatur unter obigen Bedingungen zum größten Teil gefaltet vor.

Zahlreiche experimentelle und theoretische Studien haben sich mit der Faltungsdynamik des TrpZip2 auseinandergesetzt.

Faltung des TrpZip2

Ebenso wie bei großen Proteinen sind die Art der stabilisierenden Wechselwirkungen und des Faltungsmechanismus beim TrpZip2 von Interesse. Allein schon die

Primärstruktur lässt aufgrund der vier Tryptophane vermuten, dass hydrophobe Wechselwirkungen eine zentrale Rolle für die Stabilität und die Faltung des TrpZip2 spielen. Eine der ersten experimentellen Untersuchungen von Yang et al. [Yan04] lieferte durch thermisch induzierte Entfaltung (s. Abschnitt 3.1) Indizien dafür, dass es mehrere stabile Intermediate des TrpZip2 gibt. Die Prozessführung verlief adiabatisch. Man misst thermische Gleichgewichte bei verschiedenen Temperaturen. Als Analyse wurden folgende Arten von Spektroskopie verwendet, die jeweils eine andere Art der Wechselwirkungsänderung widerspiegeln:

1. **Trp-Fluoreszenz:** Umgebung der hydrophoben Tryptophane
2. **IR-Spektroskopie:** Intermolekulare Wasserstoffbrücken
3. **CD-Spektroskopie:** Sekundärstruktur des β -Faltblattanteils

Ergebnisse dieser Studie sind: Bei Erhöhung der Temperatur steigt zuerst die Tryptophanfluoreszenz leicht an. Daraufhin folgt eine Bandenverschiebung der Amid-I' Bande zu höheren Wellenzahlen und zuletzt eine erneute Änderung des Fluoreszenzspektrums. Daraus schloss man, dass sich zunächst die Packung der Tryptophane leicht ändert, was zu einer erhöhten Mobilität der Peptidstränge führt. Danach brechen die intermolekularen Wasserstoffbrücken auf und erst zum Schluss des Entfaltungsprozesses löst sich der hydrophobe Kern auf und das TrpZip2 ist komplett entfaltet. Diese Interpretation wurde durch replica-exchange-Molekulardynamiksimulationen untermauert [ZQW06, Nym09].

Weitere experimentelle Studien heben die stabilisierende Wirkung der hydrophoben Wechselwirkungen auf die Hairpinstruktur hervor. Da die Tryptophane maßgeblich für die Stärke der aromatischen, hydrophoben Wechselwirkungen verantwortlich sind, lag es nahe, diese durch Mutation des Tryptophans zu Valin zu entfernen [Wu09]. So zeigte eine paarweise Mutante mit Valin (jeweils an den Stellen 2 und 11 oder 4 und 9) eine Erniedrigung der Schmelztemperatur des TrpZip2 um etwa 10 °C. Gemessen wurde jeweils mit IR- und CD-Spektroskopie. Indizien für einen zipping-Mechanismus (engl. *zipper* ‚Reißverschluss‘) fanden Snow et al. Sie kombinierten Molekulardynamiksimulationen und Temperatursprung-Messungen mit Infrarot- und Trp-Fluoreszenzdetektion. Ihre Experimente beleuchten die Dynamik der Wasserstoffbrücken im TrpZip2. Es stellte sich heraus, dass die H-Brücken an der Schleife zuerst gebildet werden und dann nach und nach zu den Termini hin fortsetzen, was allerdings im Experiment nicht auflösbar ist. Als Faltungszeit erhielten sie 2 μ s. Die Simulationen unterstrichen wiederum die Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkungen. Die letzten H-Brücken bildeten sich erst aus, nachdem die Anordnung der Tryptophane nativ geworden war.

Eine weitere temperaturabhängige T-Sprung-Infrarotabtaststudie am TrpZip2 führte die Gruppe von K. Hauser durch. Zur örtlichen Auflösung der H-Brücken entlang des Stranges führten Hauser et al. [Hau08] Isotopenmarkierungen ein. Es wurden jeweils

drei schwingungsgekoppelte Paare von H-Brücken mit ^{13}C markiert, wodurch die Absorptionsfrequenz dieser Paare im Vergleich zu den anderen spektral rotverschoben ist und getrennt untersucht werden kann. Dabei zeigte sich eine sehr starke Kopplung im Bereich der Schleife, was auf große räumliche Nähe der gegenüberliegenden Amid-Bindungen schließen lässt. Entsprechend deutete die schwache Kopplung der Termini auf schwache bis keine H-Brücken in diesem Bereich hin. Es treten vor allem bei niedrigen Temperaturen deutliche Unterschiede für Dynamiken der verschiedenen Positionen in der Haarnadel auf, was ein Mehrzustandsmodell nahelegt. Die am längsten bestehende H-Brücke befindet sich im Zentrum des Hairpins, da sie durch den hydrophoben Kollaps stabilisiert werde, so die Interpretation von Hauser et al. Damit schließen sie auf einen Faltungsmechanismus, bei dem hydrophobe Wechselwirkungen eine wesentliche Rolle spielen. Der hydrophobe Kern bleibe bestehen, nachdem die H-Brücken schon aufgebrochen sind. Die Zeitkonstante für die Faltung ist ebenfalls im Bereich von 2-5 μs .

Eine T-Sprung-induzierte 2D-IR Messung von Jones et al. [JPT13] bestätigt diese Zeitkonstante (hier 1,2 μs) und liefert weitere Indizien für ein Mehrzustandssystem. Die Daten seien konsistent mit einem zip-out-Mechanismus der Entfaltung. Wie auch bei Hauser et al. zeigen die Messungen von Jones, dass die Termini des TrpZip2 schwach verbrückt sind und strukturell weniger geordnet sind wie der Rest des Peptides. Ein weiterer Prozess liegt innerhalb der zeitlichen Apparatefunktion des Messaufbaus und kann nicht aufgelöst werden. Jones' Modell der Entfaltung des TrpZip2 ist wie folgt: Man startet im gefalteten Ensemble F_0 mit nativen H-Brücken, das mit einer Zeitkonstanten <5 ns in ein thermisch angeregtes Ensemble übergeht. Hier sind Indizien für ein Brechen weniger H-Brücken zu verzeichnen. Danach folgen mit 1,2 μs Übergänge in einen ungeordneten Zustand, der keine nativen H-Brücken mehr aufweist und schließlich in ein fehlgefaltetes Ensemble mit nicht-nativen H-Brücken. Spektrale Vergleiche zwischen dem Zustand direkt nach der Anregung ($\Delta t < 5$ ns) und dem Zustand nach der Hauptkinetik legen nahe, dass es sich um einen unzipping-Mechanismus von den Termini zur Schleife handelt.

Zusammengefasst ergeben diese Studien folgendes Bild der Entfaltung des TrpZip2, wie es [Abbildung 3.10](#) veranschaulicht:

1. Zuerst nimmt die Packungsdichte des hydrophoben Kerns etwas ab, er stabilisiert die Struktur aber immer noch hinreichend.
2. Danach kommt es zu einem Aufreißen der H-Brücken von den Termini zur Schleife. Die hydrophoben Wechselwirkungen bleiben immer noch bestehen.
3. Erst zuletzt löst sich der hydrophobe Kern auf, die Entfaltung ist abgeschlossen.
4. Die letztgenannte Studie von Jones legt nahe, dass es danach wieder zu einer Bildung von nicht-nativen H-Brücken und einer fehlgefalteten Struktur kommt. Da es nach Wissen des Autors keine weitere Studie gibt, die diesen Sachverhalt

3. Proteinfaltung

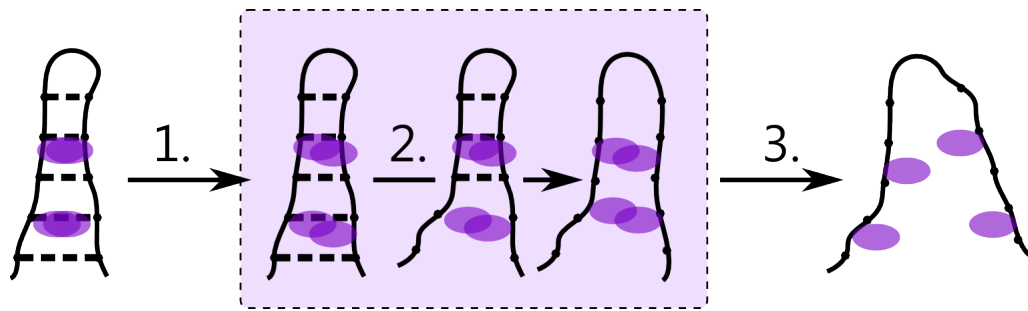


Abbildung 3.10.: Zusammenfassendes Modell der Entfaltung des TrpZip2: Die Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidsträngen sind gestrichelt eingezeichnet, die Tryptophane als violette Ovale angedeutet.

belegt, ist er in [Abbildung 3.10](#) nicht gezeigt, wengleich er sehr glaubhaft ist. In Denaturanzexperimenten ist es sehr unwahrscheinlich, eine fehlgefaltete Struktur zu finden, da das Denaturanz generell Faltung hemmt, sei sie nun nativ oder fehlorientiert.

Auch wenn sich die Literatur in vielen Punkten über die Faltung und Entfaltung des TrpZip2 einig ist, gibt es noch offene Fragen bzw. Punkte, die Klärung fordern:

- Jones' Untersuchung liefert Hinweise darauf, dass es Prozesse geben muss, die auf sehr kurzer Zeitskala (< 5 ns) ablaufen. Die in [Abschnitt 3.2](#) angesprochenen Theorien suchen aber gerade nach diesen initialen Schritten.
- Bisher wurde in Dynamikmessungen nur die Entfaltungsreaktion ausgelöst. Gibt es einen Weg, die Entfaltung **und** die Faltung separat zu adressieren?
- Der T-Sprung induziert die Entfaltung durch Entropiezufuhr. In vivo passiert das bei Proteinfaltung oder bei Konformationsdynamiken aber nicht. Gibt es eine Möglichkeit, die Faltung durch eine wohldefinierte Kraft bzw. Konformationsänderung innerhalb der Haarnadel auszulösen?

Eine mögliche Antwort auf diese offenen Fragen könnte das Auslösen von Faltung und Entfaltung mithilfe von Lichtschaltern sein. Das nächste Kapitel stellt das Vorgehen und die Möglichkeiten dieser Methode vor.

4. Chromopeptide – Lichtschaltbare β -Haarnadel-Peptide

Wie im letzten Kapitel erwähnt, könnten Lichtschalter Auslöser von struktureller Proteindynamik sein. Dafür müssen sie folgende Eigenschaften haben:

- **Konformationsänderung:** Damit der Schalter eine strukturelle Dynamik auslöst, muss er selbst zwischen zwei Zuständen unterschiedlicher Konformation schaltbar sein.
- **Schnelles Schaltverhalten:** Die Dauer des Schaltprozesses bestimmt die Zeitauflösung des Experimentes und muss somit kürzer sein als die schnellsten zu untersuchenden Prozesse.
- **Bistabilität:** Die beiden Zustände des Schalters müssen thermisch, zumindest für die Zeitskala des Experimentes, stabil sein.
- **Reversibilität:** Der Schaltvorgang soll sehr häufig nacheinander in beide Richtungen ablaufen können, damit Experimente sinnvoll durchgeführt werden können (s. [Abschnitt 6.3](#)). Weiterhin darf der Schalter nur eine geringe Rate für Photoschädigungen aufweisen, damit er während der Messungen nicht zerstört wird.
- **Selektivität:** Beide Zustände des Schalters müssen möglichst getrennt voneinander adressiert werden können, damit man selektiv von einem Zustand in den anderen schalten kann.

Diese Eigenschaften vereinen lichtschaltbare Moleküle wie z.B. Hemithioindigo (HTI) oder Azobenzol in sich. Sie ändern ihre Konformation unter Belichtung mit bestimmten Wellenlängen. Obwohl es Ansätze gibt, strukturelle Umlagerungen bei Proteinen mit HTI zu induzieren [[Reg12](#)], ist Azobenzol besser charakterisiert, dementsprechend in der wissenschaftlichen Literatur prominenter und findet auch in den Molekülen dieser Arbeit Anwendung.

4.1. Azobenzol als Photoschalter in Proteinen und Peptiden

Das Schaltverhalten von Azobenzol wird in [Abbildung 4.1](#) gezeigt. Es kommt bei der Photoisomerisierung zu großen Abstandsänderungen. Thermisch stabil ist das *trans*-

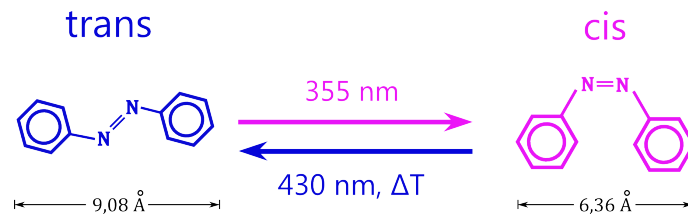


Abbildung 4.1.: Schaltverhalten des Azobenzols nach Löw05

Isomer. Bei Lagerung im Dunklen beträgt die Rückisomerisationsrate des thermisch instabilen *cis*-Isomers mehrere Tage. Sämtliche Prozesse der photoinduzierten Isomerisation sind für beide Wege nach 20 ps beendet [Näg97]. Dabei zeigen die beiden Isomere unterschiedliche Absorptionsspektren im UV/Vis-Bereich (s. [Abbildung 4.2](#)). Die $\pi\pi^*$ -Bande des *trans*-Isomers weist dabei eine wesentlich höhere Absorption auf

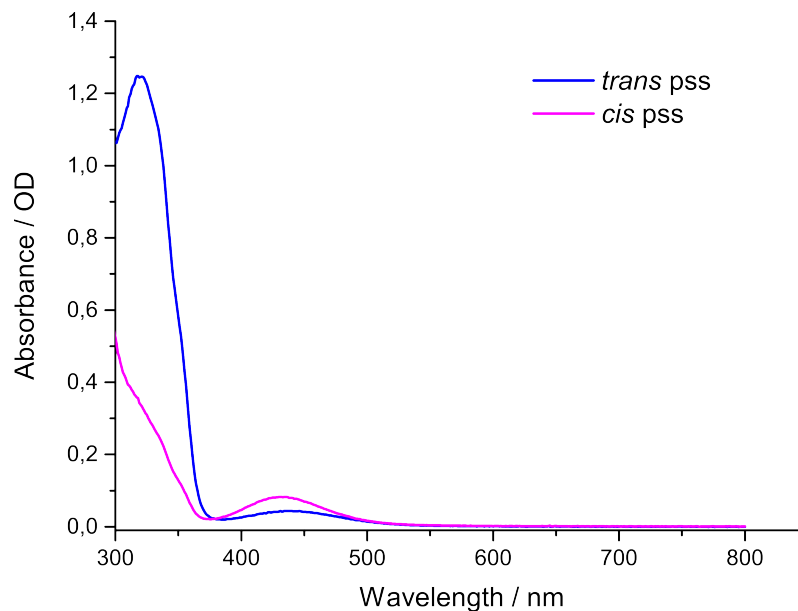


Abbildung 4.2.: UV/Vis-Spektren der photostationären Gleichgewichte der Azobenzolisomere

als diejenige des *cis*-Isomers. Dafür absorbiert das *cis*-Isomer bei der $n\pi^*$ -Bande um 430 nm deutlich stärker als das *trans*-Isomer. Mit den Quantenausbeuten der Schaltprozesse lässt sich abschätzen, wie groß die Anteile der jeweiligen Isomere im photostationären Gleichgewicht (PSS) sind. Für Belichtung bei einer Wellenlänge λ_1 ist das Verhältnis zwischen *cis*- und *trans*-Molekülen:

$$\left(\frac{cis}{trans}\right)_{\pi\pi^*}^{\lambda_1} = \frac{\Phi_{\lambda_1, trans \rightarrow cis}}{\Phi_{\lambda_1, cis \rightarrow trans}} \cdot \frac{\epsilon_{\lambda_1, trans}}{\epsilon_{\lambda_1, cis}}. \quad (4.1)$$

Um die Wellenlänge zu finden, bei der man am meisten *cis*-Azobenzol im PSS findet, dividiert man für den Fall von wellenlängenunabhängigen Quantenausbeuten das

trans-Spektrum durch das *cis*-Spektrum. Das Maximum dieses Quotienten ist die gesuchte Wellenlänge mit $\lambda_1 = 355$ nm. Mit den Quantenausbeuten aus der Literatur [BB12, BM79] (s. Tabelle 4.1) ergibt sich dort etwa 75% Akkumulation für das *cis*-Isomer. Analog erhält man bei $\lambda_2 = 430$ nm ebenfalls 75% *trans*-Moleküle im PSS. Experimentelle Abschätzungen gehen von etwa 85% *cis*-Anreicherung im PSS aus [Sch08a]. Da also im PSS immer auch ein Anteil des anderen Isomers vorhanden

	$\pi\pi^*$	$n\pi^*$
$\Phi_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}$	0,14	0,28
$\Phi_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$	0,35	0,56*

Tabelle 4.1.: Schaltquantenausbeuten von Azobenzol in Methanol bei Belichtung mit 313 nm bzw. 436 nm [BB12], der Wert für die mit * gekennzeichnete Quantenausbeute ist in Methanol nicht gemessen worden und anhand von Vergleichen der Verhältnisse der Quantenausbeuten in anderen Lösungsmitteln geschätzt.

ist, muss man abschätzen, welchen Signalbeitrag diese Anteile bei dynamischen, lichtinduzierten Reaktionen jeweils liefern. Dazu soll zunächst vom PSS in *trans* ausgegangen werden, das heißt es liegen 25% der Moleküle in *cis* und 75% der Moleküle in *trans* vor und man möchte mit einem Lichtimpuls bei 355 nm eine Isomerisierung starten. Es soll nun abgeschätzt werden, wie viele Moleküle dabei jeweils von *trans* nach *cis* schalten und umgekehrt. Die relativen Signale S sind Produkte aus der Absorption des Isomers bei 355 nm, $A^{355\text{nm}}$ (s. Tabelle 4.2), der Schaltquantenausbeute Φ und der relativen Anzahl der Moleküle N . Damit sind die beiden Beiträge für die Isomere

$$\begin{aligned}
 S_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}} &= A_{\text{trans}}^{355\text{nm}} \cdot \Phi_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}^{355\text{nm}} \cdot N_{\text{trans}} & S_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} &= A_{\text{cis}}^{355\text{nm}} \cdot \Phi_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}^{355\text{nm}} \cdot N_{\text{cis}} \\
 S_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}} &= 0,43 \cdot 0,14 \cdot 0,75 = 0,045 & S_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} &= 0,097 \cdot 0,35 \cdot 0,25 = 0,0085
 \end{aligned}
 \tag{4.2}$$

Damit ist das Verhältnis der nach *trans* schaltenden Moleküle und der nach *cis* schaltenden Moleküle 5,3:1. Durch eine entsprechende Rechnung findet man für das mit 430 nm belichtete *cis*-Ensemble ein Verhältnis von $\frac{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}{\text{trans} \rightarrow \text{cis}} = \frac{11,7}{1}$. Es ist also möglich, beide Schaltrichtungen über die Wahl der Anregungswellenlänge und entsprechende Belichtung ins PSS selektiv zu adressieren. Für die *cis* \rightarrow *trans* Richtung kann der umgekehrt schaltende Anteil in sehr guter Näherung vernachlässigt werden. Im Fall der *trans* \rightarrow *cis* Richtung gilt das in erster Linie auch, wenngleich das Verhältnis etwas ungünstiger liegt.

Damit erfüllt Azobenzol die geforderten Eigenschaften und wurde deshalb schon sehr früh verwendet, um Konformationsänderungen in Biomolekülen zu kontrollieren. Pieroni et al. [Pie80] hatten schon 1980 die Idee, Azobenzole an die Seitenketten eines Polyglutaminsäureproteins anzubinden und konnten zeigen, dass sich durch Schalten des Azobenzols ebenfalls die Sekundärstruktur des Proteins ändert. Zur

	<i>trans</i>	<i>cis</i>
430 nm	0,042	0,082
355 nm	0,43	0,097

Tabelle 4.2.: Optische Dichten der Azobenzolisomere im PSS bei den optimalen Belichtungswellenlängen für konformationsinduzierte Messungen. Küvettendicke $d = 200 \mu\text{m}$, $c = 2,5 \text{ mM}$

Jahrtausendwende folgten einige Untersuchungen, die ähnliche Ergebnisse für zyklische Modellpeptide lieferten [Beh99, Wac04, Bre03]. In diesen Studien wurde das Azobenzol an die Termini eines Peptidstranges von wenigen Aminosäuren gekoppelt. Die veränderten Abstandsbedingungen bei der Isomerisierung des Azobenzols wirkten sich auch auf die Struktur des Peptids aus. Ein ähnliches Vorgehen wurde zur Untersuchung der Faltungsdynamik einer α -Helix angewandt. Bredenbeck et al. [Bre05] fanden mithilfe eines an Seitenketten einer α -Helix angebrachten Azobenzols durch zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie Indizien dafür, dass es sich bei der Faltung einer α -Helix um eine thermisch aktivierte Diffusion auf einer rauen Energielandschaft handeln könnte, d.h. es gibt mehrere Zwischenzustände auf dem Weg vom entfalteten zum nativen Zustand, die nur durch sehr geringe Energiebarrieren im Bereich von $k_B T$ getrennt werden.

Auch in der Photopharmakologie (also in der lichtkontrollierten, biologischen Wirksamkeit von Enzymen oder Medikamenten) findet das Azobenzol Anwendungen [BFT15].

Diese Informationen deuten darauf hin, dass auch die Struktur des TrpZip2 durch den Azobenzolschalter AMPP ([3-(3-Aminomethyl)phenylazo]phenylelessigsäure) kontrollierbar sein könnte, wenn man den Schalter in die Schleifenregion des Peptidrückgrates integriert. Das TrpZip2 und das ATZ sind in [Abbildung 4.3](#) als Fischerprojektion vereinfacht gezeigt. Die Synthese wurde in der Gruppe von Prof. L. Moroder durchgeführt und das so entstandene lichtschaltbare Modellpeptid ATZ charakterisiert [Don06]. Die dort gezeigten NMR-Daten lassen darauf schließen, dass das *cis*-AMPP ein geeigneter Ersatz für die native Schleifensequenz im TrpZip2 ist (s. [Abbildung 4.4](#)). Das trifft sowohl für Wasser als auch für Methanol als Lösungsmittel zu. In Wasser neigt das ATZ bei höheren Konzentrationen zur Aggregation, weshalb für die später gezeigten Infrarotmessungen deuteriertes Methanol als Lösungsmittel verwendet werden muss. Man erkennt, dass das ATZ in der *cis*-Konformation des AMPP-Schalters dem TrpZip2 strukturell sehr ähnlich ist und eine β -Haarnadel bildet. Falls das AMPP in *trans* vorliegt, findet man keine Haarnadelform, es liegt vielmehr auch ein Ensemble verschiedener, teilweise offener Konformationen vor, bei denen man Stapelung von je einem Tryptophan und dem im *trans* planaren Azobenzolschalter finden kann. CD-Messungen unterstreichen diese Befunde. Für *cis*-ATZ zeigt das CD-Spektrum eine deutliche Bande bei 230 nm, was durch die paarweise, exzitonsche Kopplung der Tryptophane hervorgerufen wird (s. [Abschnitt 3.1](#)). Ansonsten weist das CD-Spektrum die typischen Merkmale eines β -Faltblattes auf, im *trans*-

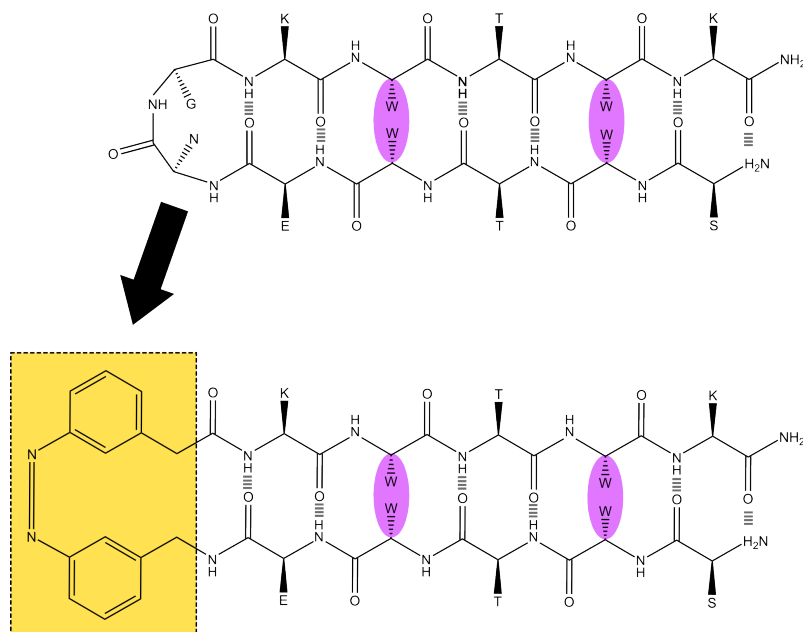


Abbildung 4.3.: Vereinfachte Strukturformeln des TrpZip2 (oben) und des ATZ (unten). Gelb hinterlegt ist der AMPP-Schalter. Die Paarbildung der Tryptophane aufgrund der π - π -Wechselwirkungen sind mit violetten Ovalen gekennzeichnet.

Konformer gehen beide Indizien für einen gefalteten Zustand deutlich zurück. Durch temperaturabhängige Messungen bei 228 nm wurde die Schmelztemperatur des *cis*-ATZ mit 25°C bestimmt.

Betrachtet man die Tryptophanfluoreszenz der beiden Isomere, so verdoppelt sich von *trans* nach *cis* die Fluoreszenzintensität (s. [Abbildung 4.5](#) oben, gemessen wurde mit einem Fluorolog, 1 cm Quarzküvette, $c = 2,7 \mu\text{M}$, Anregungswellenlänge 266 nm). Durch Vergleichsmessungen mit 2,5-Diphenyloxazol lässt sich die Fluoreszenzquantenausbeute des ATZ in der *cis*-Konformation abschätzen und man erhält einen Wert von $\Phi_{ATZ} = 0,5\%$.

Für infrarotspektroskopische Charakterisierungen der beiden Isomere musste aufgrund der hohen benötigten Konzentration von 2 mM deuteriertes Methanol als Lösungsmittel verwendet werden, da sich das ATZ in Wasser nicht so konzentriert lösen lässt. Es gibt jedoch keine Anzeichen dafür, dass es in Methanol wesentlich andere strukturelle Eigenschaften aufweist als in Wasser. Methanol erhöht zusätzlich die Stabilität des gefalteten Zustandes. Bis zu einer 1:1-Mischung von Methanol und Wasser findet man einen Anstieg der Merkmale gefalteter Zustände im CD-Spektrum [[Löw05](#)]. Im Infrarotspektrum des ATZ (s. [Abbildung 4.5](#); $c = 2 \text{ mM}$, Küvettendicke 200 μm , Bruker IFS66) sieht man zunächst die breite Amid-II' Bande um 1450 cm^{-1} und die Amid-I Bande bei 1650 cm^{-1} . Die scharfe Bande bei 1675 cm^{-1} lässt sich auf das von der Synthese und der Vorbehandlung in der Probe vorhandene Trifluoressigsäure zurückführen. Beim Belichten des Azobenzolschalters zeigt sich ein deutliches

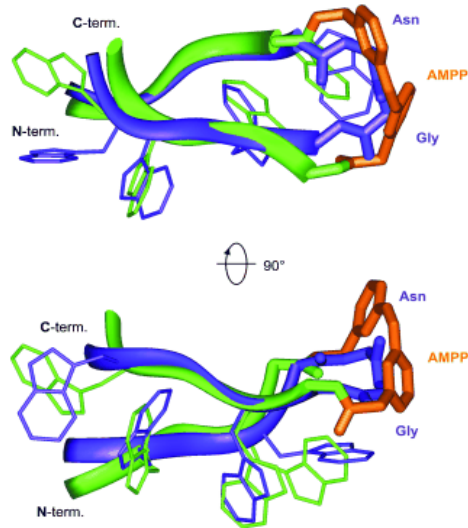


Abbildung 4.4.: Überlagerung der energieärmsten NMR-Strukturen des ATZ und des Trpzip2: Die Struktur des ATZ (grün-orange) ist nahezu identisch mit der des Trpzip2 (blau). Als Seitenketten sind nur die vier Tryptophane gezeigt [Don06].

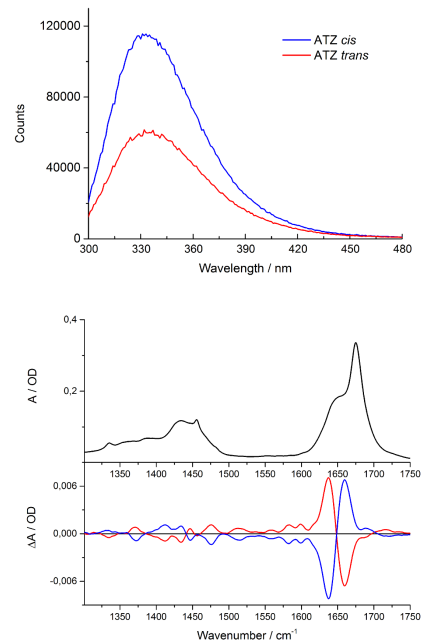


Abbildung 4.5.: oben: stationäre Trp-Fluoreszenzspektren für beide Isomere, unten: Infrarotabsorptionspektren des ATZ (schwarz) und Schaltspektren. Die rote Kurve zeigt das Differenzspektrum für die Belichtung nach *cis*, die blaue das Differenzspektrum der Rückbelichtung nach *trans*

Bandenschieben im Bereich der Amid-I Bande. Im gefalteten *cis*-Isomer (Belichtung mit einer Hg-Dampf Lampe, Hamamatsu LC4, WG320 Filter, 2 mm und UG11 Filter 1 mm, $\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$) nimmt die Absorption bei 1640 cm^{-1} zu, was auf Bildung von H-Brücken zwischen den Strängen hindeutet. Im *trans*-Isomer hingegen (Belichtung mit Kaltlichtlampe Schott, GG400 Filter, 2 mm) findet man eine Zunahme bei 1660 cm^{-1} , was auf H-Brücken zum Lösungsmittel hindeutet [Sch07]. Aufgrund dieser Befunde eignet sich das ATZ sowohl für zeitaufgelöste Infrarotmessungen, als auch für zeitaufgelöste Trp-Fluoreszenzmessungen. Der folgende Abschnitt fasst die bereits veröffentlichten, zeitaufgelösten Experimente zusammen und motiviert die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche.

4.2. ATZ – Stand der Forschung

Die ersten zeitaufgelösten Infrarotspektroskopie-Experimente wurden von Schrader [Sch08a] durchgeführt. Die Messungen im Ultrakurzzeitbereich bis zu einer Verzögerungszeit von 3 ns wurden mit Anreg-Abtast-Spektroskopie durchgeführt. Dabei wurden jeweils Faltungs- sowie Entfaltungsreaktion mit der zweiten Harmonischen eines Ti:Sa-Kurzpulslasers bei 400 nm angeregt. Um dennoch eine Selektivität der betrachteten Prozesse zu erreichen, wurde die Probe durch Belichtung während der Messungen im PSS des jeweiligen Startisomers gehalten.

Als Abtastimpuls wurden parametrisch erzeugte, breitbandige Mittelinfrarotimpulse verwendet. Eine detaillierte Beschreibung der Anlage folgt in dieser Arbeit zu einem späteren Zeitpunkt, bzw. kann Sch08a entnommen werden. Die Schlüsselergebnisse dieser Studien [Sch07] sind wie folgt:

Faltung: *trans* → *cis*

Für die Faltungsreaktion des ATZ zeigten sich innerhalb der ersten Nanosekunden keine signifikanten Änderungen im Bereich der Amid-I Bande, die auf eine Faltung des ATZ schließen lassen. Das transiente Spektrum am Ende der Messzeit zeigt deutliche Unterschiede zum stationären Differenzspektrum. Eine Einkanalabtastmessung bis 100 μs bei 1641 cm^{-1} ergab eine Dynamik mit einer Zeitkonstanten von 30 μs . Von A. Deeg durchgeführte, spektral aufgelöste Messungen von Nano- bis Mikrosekunden bei unterschiedlichen Temperaturen zeigten in Kombination mit T-Sprung Messungen der AG Hauser äußerst interessante Ergebnisse [Dee14]. Die Faltung wurde durch einen Nd:YLF-Laser (AOT, dritte Harmonische, s. Kapitel 5) bei 355 nm angeregt und wiederum mit Breitbandinfrarotimpulsen abgefragt. Dabei war der anregende Lichtimpuls bei 355 nm elektronisch mit dem abtastenden IR-Impuls synchronisiert. Zusätzlich wurde ein zweites IR-Abtastexperiment durchgeführt, bei dem die Entfaltung des *cis*-Isomers durch einen Temperatursprung induziert wurde. Beide Experimente zeigten sowohl dieselben, exponentiellen Dynamiken mit identischen Zeitkonstanten (17 μs bei Raumtemperatur) als auch dieselbe, starke Temperaturabhängigkeit. Die Zeitkonstanten aus beiden Experimenten ließen sich in einem Arrheniusplot gemeinsam anpassen und ergaben eine Energiebarriere für die Faltung von $48\frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$. Aus diesen Befunden schlossen Deeg et al., dass die isomerisierungsinduzierte Faltung des ATZ nicht kraftgetrieben sein kann, sondern thermisch aktiviert sein muss, wie es auch beim T-Sprung der Fall ist. Weiterhin konnte der Mechanismus des downhill-folding ausgeschlossen werden, die Daten sind konsistent mit einem 2-Zustandsmodell. Eine schwache Absorptionsänderung im Bereich von Nanosekunden könnte allerdings ein Indiz für schnellere Konformationsdynamiken sein, ließ sich aber aufgrund ihrer geringen Amplitude und eines thermischen Artefakts nicht zuverlässig auswerten. Somit ergibt sich für die isomerisierungsinduzierte Faltung des ATZ folgendes Bild (s. Abbildung 4.6): Nach der ultraschnellen Photoisomeri-

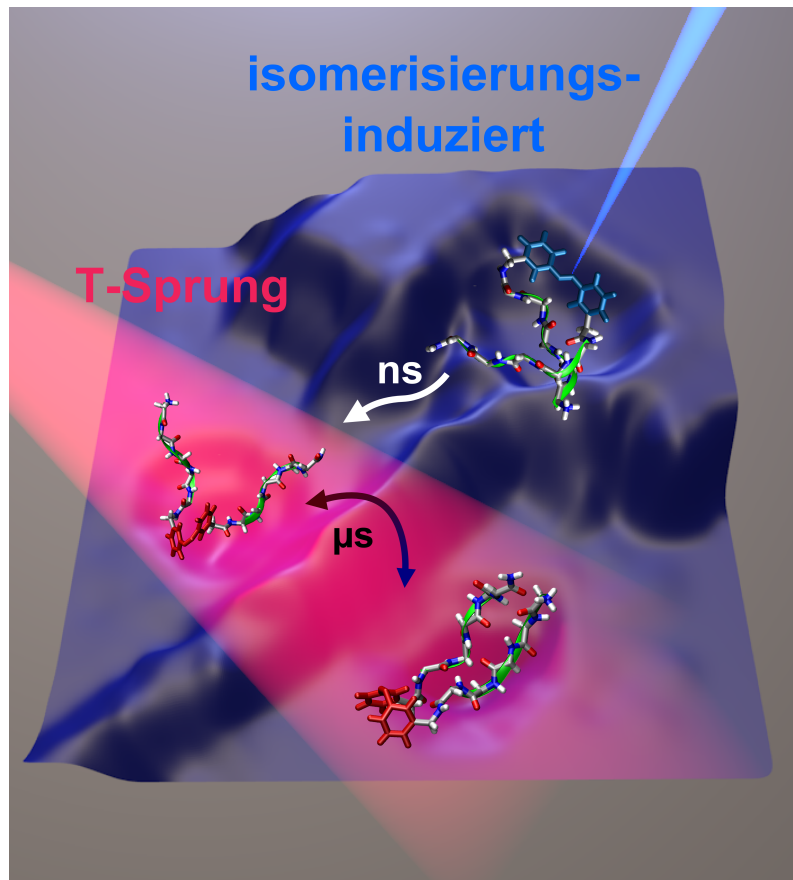


Abbildung 4.6.: Energielandschaft der isomerisierungsinduzierten Faltung des ATZ [Dee14]

sierung des Azobenzols kommt es zu einer schnellen Umwandlung des Peptids in das thermische Ensemble, wobei nur der thermisch entfaltete Zustand besetzt wird. Erst auf der Mikrosekundenzeitskala bildet sich die vollständig gefaltete Haarnadel aus. Die Energiebarriere liegt dabei zwischen den beiden thermischen Zuständen. Der Azobenzolschalter dient wie gewünscht nur zum Auslösen des Faltungsprozesses, beeinflusst dessen Dynamik aber weiterhin nicht mehr. Da durch die Infrarotabfrage nur der Zustand des Rückgrats abgebildet wird, ist es ein Ziel dieser Arbeit, die Dynamik der Seitenketten des Peptids durch zeitaufgelöste Trp-Fluoreszenzmessungen zu verfolgen. Aufbau, Durchführung und Ergebnisse dieser Experimente werden in Kapitel 5 dargestellt.

Entfaltung: *cis* \rightarrow *trans*

Im Gegensatz zur Faltungsreaktion zeigen sich im Falle der Entfaltungsreaktion (Konformationsänderung des AMPP von *cis* nach *trans*) schon zu sehr frühen Zeiten (< 1 ns) [Sch07] Absorptionsänderungen, die mit strukturellen Peptiddynamiken

assoziiert werden können. Zusätzlich werden in dieser Studie Peptidstrukturen aus MD-Simulationen gezeigt, die mit den folgenden Interpretationen gut übereinstimmen.

Schon nach 1,6 ps sieht man ein Ausbleichen auf dem gesamten Amid-I Bereich mit einem leichten Anstieg bei 1690 cm^{-1} . Diese Befunde wurden als Brechen der H-Brücken zwischen den Peptidsträngen und Vorliegen der Carbonyle in unpolarer Umgebung interpretiert. Die Rotverschiebung der charakteristischen Azobenzolbanden bei 1603 cm^{-1} und 1585 cm^{-1} deutet auf ein heißes Molekül hin, d.h. es sind höhere, vibratonische Zustände angeregt, deren Energieabstände zum nächst höheren Niveau geringer sind, als vom Grundzustand in den ersten angeregten Zustand.

Nach 25 ps brechen noch weitere Wasserstoffbrücken auf, die Carbonyle liegen immer noch isoliert vor. Erst gegen Ende der Messzeit wurde mit einer Zeitkonstanten von 630 ps eine Absorptionzunahme bei 1660 cm^{-1} beobachtet, die auf eine Resolvatisierung der Carbonylgruppen hindeutet. Es bilden sich Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel, wie sie im *trans*-ATZ auftreten. Allerdings ist das transiente Spektrum zu dieser Zeit noch um einige Wellenzahlen gegenüber dem stationären Spektrum verschoben, was Indizien dafür liefert, dass auf längerer Zeitskala weitere Prozesse im Peptid zu erwarten sind. Da jedoch für die Auslösung des Entfaltungsprozesses kurze Laserimpulse eines elektronisch synchronisierten, zweiten Lasersystems mit einer Wellenlänge von 430 nm benötigt werden, konnten diese Messungen zum damaligen Zeitpunkt nicht durchgeführt werden. Erst die Beschaffung eines durchstimmbaren Nanosekundenlasersystems (NT 242, Ekspla) machte diese Messungen möglich. Der Aufbau wird in [Kapitel 6](#) erklärt, die Messungen und deren Interpretation werden in [Abschnitt 6.3](#) erläutert.

5. Die Rolle der Seitenketten beim ATZ – Trp-Fluoreszenz-Messung

Die Faltungstheorie von G. Rose illustriert, wie es möglich sein kann, dass sich das Wasserstoffbrückenmuster in einem Peptid zuerst ausbildet, bevor sich die Seitenketten rearrangiert haben und der native Zustand erreicht ist (vgl. molten globule). Im Speziellen können die vorhergehenden Messungen nicht klären, welcher Schritt auf molekularer Ebene für die Faltung des ATZ ratenlimitierend ist. Es wäre denkbar, dass sich erst die Tryptophanpaare finden müssen und die Wasserstoffbrücken dann sehr schnell ausgebildet werden. Es ist ebenso plausibel, dass erst die Wasserstoffbrücken gebildet werden müssen und sich danach auf längerer Zeitskala die Tryptophane zusammenfinden können. Um Dynamiken der Tryptophane untersuchen zu können, wird ein Aufbau benötigt, mit dem man die zeitabhängige Fluoreszenzintensität der Tryptophane nach der Anregung der Faltung durch Photoisomerisation des AMPP messen kann. Da die Intensität der Fluoreszenz im *cis*-Konformer doppelt so groß ist wie im *trans*-Konformer [Don06], erwartet man ein Ansteigen des Signals, das die Dynamiken der fluoreszierenden Trp-Seitenketten wiedergibt.

Für die Durchführung dieses Experimentes benötigt man einen Laserimpuls bei 355 nm, der die Photoisomerisation des AMPP-Schalters und somit die Faltung des ATZ auslöst. Daraufhin muss ein elektronisch variabel verzögerter, zweiter Laserimpuls folgen, der die Tryptophanfluoreszenz anregt. Als Wellenlänge für diesen Impuls wird 266 nm gewählt. Zur Detektion der Fluoreszenzintensität des ATZ benötigt man schließlich einen Detektor, der auf den 266 nm-Impuls synchronisiert ist. Ein Aufbau, der diese Art von Experimenten ermöglicht, wurde im Rahmen dieser Arbeit realisiert. Er wird in [Abschnitt 5.1](#) erläutert.

Da die Ionisationsschwelle des Tryptophans bei 4,5 eV oder 275 nm liegt [ABG79], kann es schon durch Belichtung mit 266 nm ionisiert werden – die Quantenausbeute ist aber sehr gering. Deshalb sind einige Vorüberlegungen nötig, um unerwünschte Prozesse auszuschließen oder – wenn dies nicht möglich ist – zu wissen, welche Signaturen sie erzeugen können.

Photoinduzierte Prozesse des Tryptophans

Um Einzelphotonenionisationen zu unterdrücken, muss zunächst die Impulsenergie des 266 nm-Impulses möglichst gering gehalten werden. Darüber hinaus soll die Probenlösung ständig umgepumpt werden, um eine Akkumulation von geschädigten

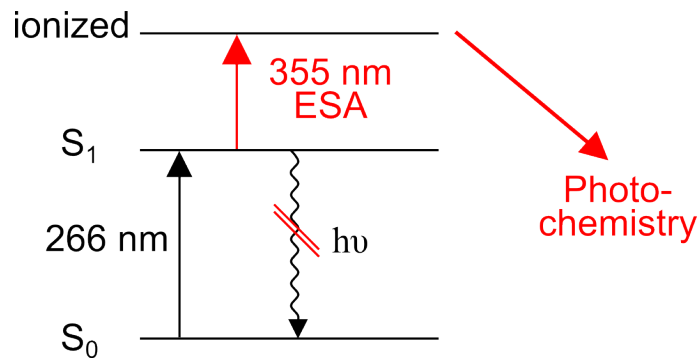


Abbildung 5.1.: Schematische Darstellung der ESA des Trps:

Tryptophan absorbiert zunächst ein Photon mit 266 nm und wird dadurch in den angeregten Zustand überführt. Im Abwesenheit des zweiten 355-nm-Photons zerfällt der angeregte Zustand strahlend, es wird Fluoreszenzlicht emittiert (schwarz). Kommt es zu ESA, so werden nichtstrahlende Kanäle eröffnet, die einen Rückgang der Fluoreszenzintensität mit sich bringen (rot).

Molekülen zu vermeiden und für jeden Anregungsimpuls mit 355 nm photostationäres ATZ in der *trans*-Konformation bereitzustellen. Dabei muss die Umpumpgeschwindigkeit so gewählt werden, dass innerhalb einer Millisekunde das gesamte, angeregte Probenvolumen ausgetauscht wird, aber zugleich das angeregte Probenvolumen während des Messzeitintervalls (bis 100 μ s) nicht aus dem abgetasteten Bereich herausgepumpt wird.

Einen weiteren kritischen Punkt stellt die Zweistufenionisation dar, die eine wesentlich größere Ausbeute hat [FTL80]. Bei diesem Prozess wird das Tryptophan durch Absorption eines Photons in den (S₁)-Zustand angeregt, welcher wiederum ein Photon absorbieren kann. Diese Absorption des angeregten Zustandes (engl.: *excited state absorption*, kurz: ESA) eröffnet nichtstrahlende Reaktionspfade (z.B. Photoionisation oder Photochemie) (s. [Abbildung 5.1](#)), was zu einem Rückgang der detektierten Fluoreszenzintensität führt. Da das Tryptophan oberhalb von 310 nm keine Absorption aufweist, kann die ESA nur eine Rolle spielen, wenn zuerst der Laserimpuls mit 266 nm absorbiert wird und innerhalb der Lebenszeit des angeregten Zustandes ein zusätzliches Photon mit 355 nm eintrifft. Das ist bei negativen Verzögerungszeiten der Fall, d.h. für $\Delta t < 0$. Die Lebensdauer des S₁ beträgt etwa 3 ns. Damit ist ab einer Verzögerungszeit von -3 ns mit einem Signlrückgang der Fluoreszenz aufgrund der ESA des Tryptophans zu rechnen.

Weitere Prozesse wie z.B. Triplett-Bildung oder irreversible, photochemische Schädigung der Probe durch Zweiphotonenabsorption sind bei den verwendeten Parametern und in Methanol nicht zu erwarten [SPL00].

Anhand dieser Überlegungen kann man abschätzen, welchen Signalverlauf man bei der oben dargestellten Messung erwarten würde (s. [Abbildung 5.2](#)). Da auch das *trans*-Isomer des ATZ fluoresziert, gibt es einen konstanten Untergrund an Fluoreszenzlicht. Für negative Verzögerungszeiten sollte es ab 3 ns vor dem Nullpunkt zu

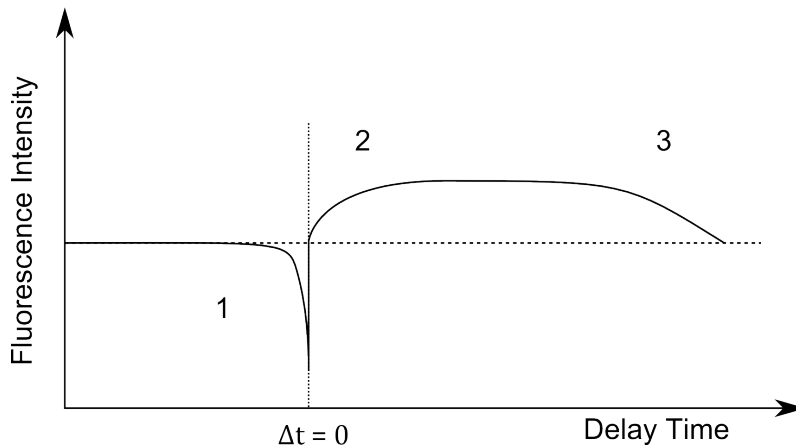


Abbildung 5.2.: Erwarteter Verlauf der Fluoreszenzintensität für die Trp-Fluoreszenzmessung am ATZ:

Die Grafik zeigt den Verlauf, wie er für eine wie oben erläutert durchgeführte Tryptophan-Fluoreszenz-Messung erwartet wird. Eine Beschreibung der einzelnen Phasen **1,2** und **3** liefert der Fließtext.

einem Rückgang der Fluoreszenzintensität aufgrund der oben diskutierten ESA der Tryptophane kommen (**1**), der sich direkt am Zeitnullpunkt erholen sollte, weshalb er dazu verwendet wird, um den Zeitnullpunkt der Messung zu korrigieren. Danach ist mit einem Anstieg der Fluoreszenzintensität aufgrund struktureller Dynamiken des ATZ zu rechnen (**2**). Erst nach Ende des Messintervalls für Verzögerungszeiten $\Delta t \gg 100 \mu\text{s}$ erreicht das Signal wieder den ursprünglichen Wert, da die angeregte Probe aus dem Abtastvolumen gepumpt wird (**3**), bevor der nächste Laserimpuls die Probe erreicht.

Nach diesen Vorüberlegungen wird nun der Versuchsaufbau vorgestellt.

5.1. Aufbau zur zeitaufgelösten Messung der Trp-Fluoreszenz des ATZ

Abbildung 5.3 zeigt eine schematische Skizze des Aufbaus. Der Abtastimpuls stammt aus einem fs-Ti:Sa-System (Libra, Coherent). Ein kleiner Teil der Ausgangsleistung dieses Systems wird zur dritten Harmonischen (266 nm) konvertiert und zur Anregung der Tryptophanfluoreszenz benutzt. Der Bündelradius wird durch das Teleskop T1 angepasst, um die gewünschte Fokusgröße am Probenort zu erreichen.

Die Lichtquelle für die Anregung des AMPP ist die dritte Harmonische eines Nanosekunden-Nd:YVO-Lasers (AOT-YVO-25QSP MOPA) mit 355 nm bei einer Pulsdauer von etwa 0,5 ns. Dieser Impuls wird „Anregungsimpuls“ genannt. Der räumliche Überlapp am Probenort wird mithilfe eines Pinholes hergestellt. Die Bündelradien werden so gewählt, dass der des Anregimpulses größer ist als der des Abtastimpulses, sodass sicher gestellt wird, dass man nur angeregtes Probenvolumen

5. Die Rolle der Seitenketten beim ATZ – Trp-Fluoreszenz-Messung

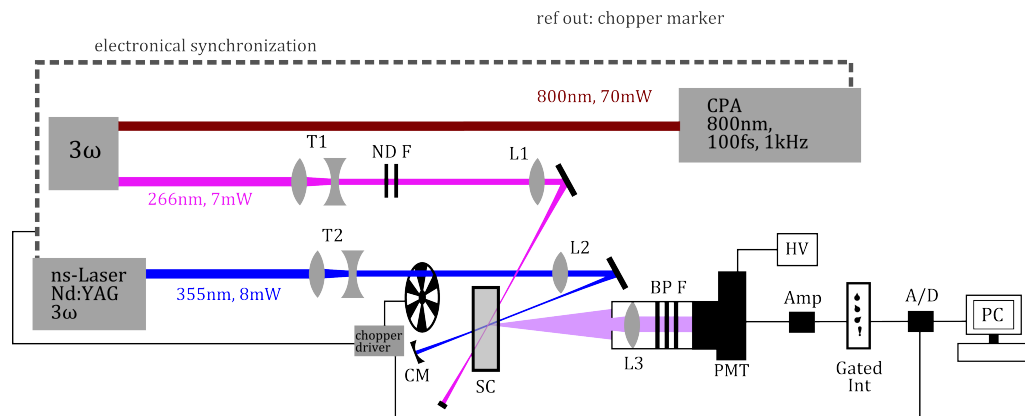


Abbildung 5.3.: Aufbau zur zeitabhängigen Messung der Tryptophan-Fluoreszenz am ATZ:

Die 800 nm-Impulse des Libra-Systems werden zur dritten Harmonischen konvertiert und zum Anregen der Tryptophanfluoreszenz benutzt („Abtastimpuls“). Den Anregungsimpuls mit 355 nm zur Isomerisation des AMPP liefert ein AOT-Nanosekundenlaser. Die Bündelradien beider Impulse werden mit Teleskopen angepasst (T1 und T2: jeweils $f = +150$ mm und $f = -100$ mm). Anschließend werden die beiden Impulse überlappend auf die Probe fokussiert ($f_{L1} = +500$ mm, $f_{L2} = +300$ mm). Der Anregungsimpuls wird mit einer 1:1-Abbildung durch einen gekrümmten Spiegel ($f_{CM} = +50$ mm) ein zweites Mal auf die Probe fokussiert, damit mehr AMPP zur Isomerisierung gebracht wird. Das Fluoreszenzlicht des Tryptophans wird kollimiert ($f_{L3} = +35$ mm), zur Reinigung von Streulicht der beiden Laserimpulse durch Bandpassfilter geleitet und von einem Photomultiplier detektiert. Das Messsignal wird verstärkt, integriert und im PC verarbeitet. Durch ein Chopperrad wird jeder zweite Anregungsimpuls geblockt. Diese Messpunkte können direkt als Hintergrund abgezogen werden.

abtastet. Typische Werte für die Bündeldurchmesser sind 150 μ m für den Abtast- und 200 μ m für den Anregungsimpuls. Aufgrund der Photophysik des Tryptophans wird die Impulsenergie des Abtastimpulses möglichst gering gewählt ($<0,1$ μ J). Damit das detektierte Signal durch Konformationsänderungen des ATZ möglichst groß wird, werden für die Anregung des AMPP Impulsenergien von 6 μ J–8 μ J verwendet. Darüber hinaus wird der Anregungsimpuls mithilfe eines gekrümmten Spiegels mit einer 1:1-Abbildung nochmals durch die Probe geschickt. Die Brennweite des Spiegels CM beträgt 50 mm, wodurch sich ein Zusatzweg des zweiten Anregungsimpulses zum ersten von 20 cm ergibt, was einer Verzögerung von etwa 0,7 ns entspricht. Die dadurch resultierende Verschlechterung der Zeitauflösung ist vernachlässigbar, da die erwarteten Prozesse hauptsächlich auf der Mikrosekundenskala stattfinden. Die variable Abschwächung der Laserimpulse geschieht mit speziell beschichteten Neutraldichtefiltern für den UV-Bereich (Thorlabs). Zur Detektion wird das Fluoreszenzlicht durch die Linse L3 kollimiert. Zur Unterdrückung von Streulicht der beiden Laserimpulse werden drei Bandpassfilter (BrightLine HC 320/40, Semrock) verwendet, die hohe optische Dichten sowohl für 266 nm ($OD = 3,9$) als auch für 355 nm ($OD = 5,6$) aufweisen und eine hohe Transmission im Bereich von 320 nm haben (Spektren s. [Abbildung 5.4](#)). Der transmittierte Spektralbereich (s. [Abbildung 5.5](#)) wird mit einem Photomultiplier (1P28, Hamamatsu) detektiert. Um externes Streulicht abzuschir-

5.1. Aufbau zur zeitaufgelösten Messung der Trp-Fluoreszenz des ATZ

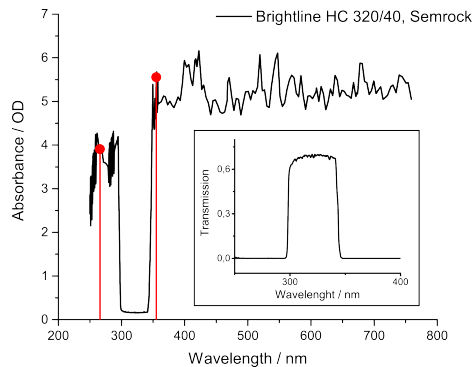


Abbildung 5.4.: Optische Dichte und Transmission (Inlay) des BrightLine 320/40 [Sem16]

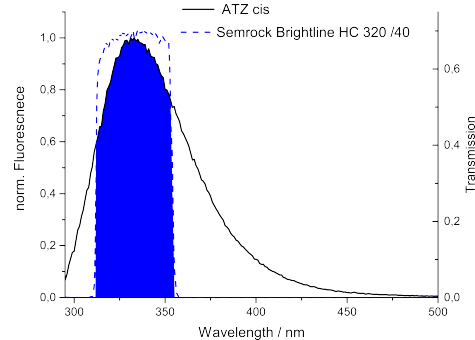


Abbildung 5.5.: Vom BrightLine 320/40 transmittierter Bereich der Fluoreszenz des ATZ

men, befinden sich diese Elemente in einem eloxierten Metallrohr, das mit dem Photomultiplier verschraubt ist und zur Intensitätsregulation an der Vorderseite mit einer variable Irisblende versehen ist. Anschließend wird das Signal durch einen Emitterfolger verstärkt und mit einem Gated Integrator (SR 250, Stanford Research) integriert. Zur automatisierten Datennahme wird es über einen A/D-Wandler (USB 6009, NI) in einen PC eingespeist und mit einem Messprogramm verarbeitet. Die Verzögerung der Anregungsimpuls wird ebenfalls mit diesem Messprogramm gesteuert und mit einem Verzögerungsgenerator (DG 535, Stanford Research) umgesetzt.

Abbildung 5.6 illustriert die Synchronisation der beiden Lasersysteme. Der Anregungsimpuls für den n -ten Messpunkt muss durch den $(n-1)$ -ten Abtastimpuls getriggert werden. Das Femtosekundenlasersystem gibt bei jedem Laserschuss einen Triggerimpuls aus (QS sync out), der von einer Verzögerungskarte in einem PC (Bergmann BME SG05P) um konstant $900 \mu\text{s}$ verzögert wird. Hinzu kommt eine variable Verzögerung vom Verzögerungsgenerator DG 535, welcher wiederum den Nanosekundenlaser triggert. Jeder zweite Nanosekundenimpuls wird vom Chopper geblockt. Der Ausgang des Choppers (Ref out) wird ebenfalls mit dem A/D-Wandler verarbeitet und dient dazu, die Messpunkte mit Anregungslicht von denen ohne Anregungslicht zu trennen. Der Gated Integrator und der Chopper werden ebenfalls mit fester Zeitverzögerung vom Verzögerungsgenerator getriggert. Der zeitliche Überlapp der beiden Laserimpulse wird mithilfe einer schnellen Diode (Thorlabs DET 10A, 1 ns Anstiegszeit) eingestellt.

Durch einen Chopper wird jeder zweite Anregungsimpuls geblockt, sodass jeder zweite detektierte Messpunkt von photostationärer *trans*-Probe stammt und als Hintergrund von den Messpunkten mit Anregungsimpuls abgezogen werden kann. Anhand des Referenzausgangs des Choppers wird im Messprogramm entschieden, bei welchen Messpunkten die Probe angeregt wurde (S_{Signal}) und bei welchen Messpunk-

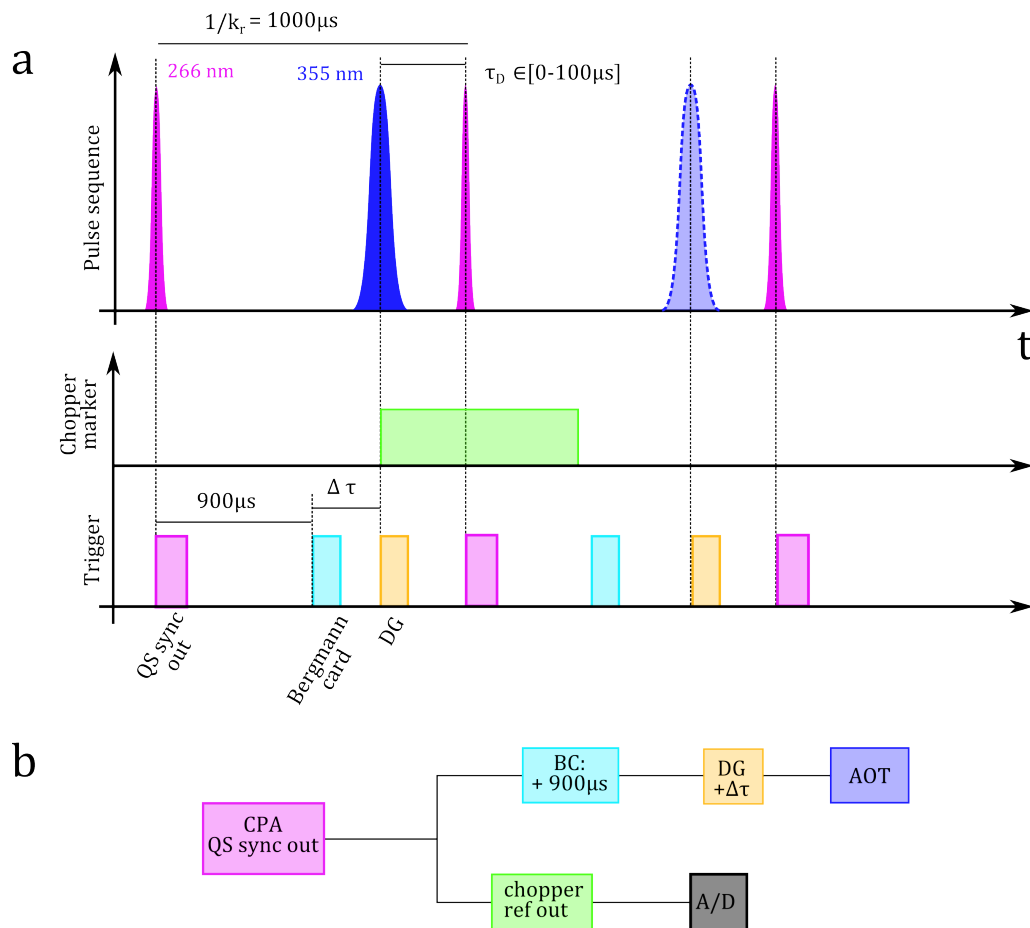


Abbildung 5.6.: Triggerschema der Trp-Fluoreszenzanlage:

(a): Der obere Teil der Grafik zeigt die Pulssequenzen der Anreg- (blau) und Abtastimpulse (violett). Der jeweils zweite Anregungsimpuls wird vom Chopper geblockt und ist gestrichelt dargestellt. Darunter ist der Referenzausgang des Choppers (grün) dargestellt. Im unteren Teil ist die zeitliche Abfolge der Triggerpulse der einzelnen Bauteile gezeigt.

(b) zeigt das Verkabelungsschema der einzelnen Elemente.

ten der Anregungsimpuls vom Chopper geblockt wurde und sie somit als Hintergrund dienen ($S_{\text{background}}$). Das Fluoreszenzdifferenzsignal S_{Fl} berechnet man wie folgt:

$$S_{Fl} = \sum_{i=1}^N S_{\text{Signal}} - \sum_{i=1}^N S_{\text{background}} \quad (5.1)$$

Es hat sich gezeigt, dass diese Methode des Messens elektronische Artefakte im Bereich $< 1 \mu\text{s}$ signifikant reduziert. Darüber hinaus wird durch diese Methode des Auswertens der Fluoreszenzhintergrund des *trans*-Isomers des ATZ abgezogen.

Die Probe wird zwischen zwei aufeinanderfolgenden Abtastimpulsen mithilfe einer Schlauchquetschpumpe (Ismatec MCP Standard, PTFE-Walkstück) vollständig ausgetauscht, um für jeden Messpunkt frische Probe im photostationären *trans*-Isomer zu gewährleisten. Die Küvette (Hellma, QS) weist eine Schichtdicke von $200 \mu\text{m}$ und eine Kanalbreite von 1 mm auf. Für die Pumpgeschwindigkeit wird entsprechend vorhergehender Überlegungen und Berechnungen [Ram11] eine Umlauffrequenz von 20-30 rpm gewählt.

Probenpräparation und Durchführung der Messung

Damit das ATZ monomerisch vorliegt, wird es vorher nach dem in Ram11 entwickelten Protokoll lyophilisiert. Dazu werden 20 mg ATZ abgewogen und in 32 ml eines Gemisches aus 40% ACN, 60% Wasser mit $0,1\%$ Trifluoressigsäure (TFA) im Wasseranteil gelöst. Das TFA soll dabei sicherstellen, dass alle Lysine und der N-Terminus des ATZ protoniert vorliegen. Für die zeitaufgelösten Trp-Fluoreszenz-Messungen wird die vorbehandelte Probe mit einer Konzentration von $0,5 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ in deuteriertem Methanol (MeOH-d_4) gelöst. Das deuterierte Lösungsmittel wird verwendet, um exakt die Probenbedingungen der Infrarotmessungen zu reproduzieren. Gemäß den Überlegungen in Abschnitt 2.2 ändert sich der Protonierungszustand beim Lösen in Methanol nicht mehr. Während der Messung wird die Probe im Vorratsgefäß ständig belichtet (Schott KL 2500 LCD, GG 400, 2 mm), um sie im PSS des *trans*-Isomers zu halten. Vor der Messung wird jeweils ein Infrarot- und ein UV/Vis-Schaltpektrum genommen, um das einwandfreie Schaltverhalten zu überprüfen.

Parameter der Detektion

Der Photomultiplier wird mit einer Betriebsspannung von -550 V betrieben. Für die Messung wird nach Einstellen des räumlichen und zeitlichen Überlapps das Signal mit der Irisblende und den Neutraldichtefiltern so geregelt, dass es bei einer Sensitivitätseinstellung von $0,2 \text{ V}$ am Gated Integrator nach dem A/D-Wandler unter 1 V liegt. Dieser Bereich zeigt noch gute Linearität und geringes Rauschen.

5. Die Rolle der Seitenketten beim ATZ – Trp-Fluoreszenz-Messung

Die Linearität der gesamten Detektionseinheit wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit für verschiedene Betriebsspannungswerte am Photomultiplier überprüft [[Fre13](#)].

5.2. Ergebnisse der Tryptophanfluoreszenzmessungen

Die Ergebnisse der wie oben beschrieben durchgeführten Messungen am ATZ zeigt [Abbildung 5.7](#). Zunächst zeigt sich ein konstanter Verlauf für große, negative Verzögerungszeiten $\tau_D \ll 0$ mit geringem, negativem Offset, der allerdings vernachlässigbar ist. Ab Verzögerungszeiten von etwa -10 ns kommt es zu einem raschen Rückgang

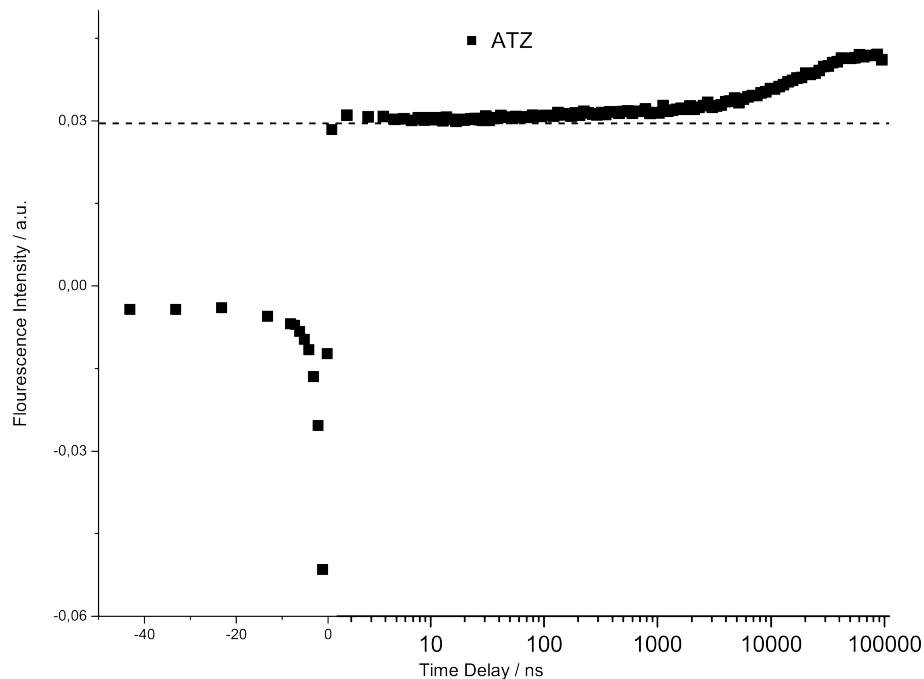


Abbildung 5.7.: Zeitaufgelöste Tryptophanfluoreszenzdaten des ATZ:

Der gesamte Messbereich ist im Bereich von -50 ns bis 1 ns linear und von 1 ns bis 95 000 ns logarithmisch dargestellt. Die gestrichelte Linie ist für die Fluoreszenzintensität nach dem sprunghaften Anstieg am Zeitnullpunkt eingezeichnet.

der Fluoreszenz, der sich am Nullpunkt wieder sprunghaft erholt und instantan (innerhalb der Zeitauflösung der Anlage) bis zu einem Wert von 0,03 ansteigt, was etwa $2/3$ des gesamten Signalanstieges ausmacht. Das verbleibende Drittel verteilt sich auf zwei Prozesse. Der erste findet mit einer Zeitkonstanten von etwa 100 ns statt, der zweite erfolgt im zweistelligen Mikrosekundenbereich.

Diese Signaländerungen werden nun im Einzelnen diskutiert.

1. Verhalten vor dem Zeitnullpunkt – ESA des Tryptophans

Dieser Prozess findet vor dem Zeitnullpunkt des Experimentes statt. In der Regel erwartet man bei Anreg-Abtast-Experimenten keine Signaländerungen vor dem Zeitnullpunkt. Damit man einen Zeitverlauf für positive Verzögerungszeiten erhält, muss man die Zeitachse invertieren, was einem Vertauschen des Anreg- und des

Abtastimpulses entspricht. Das bedeutet, man würde diesen Verlauf bei einem Anreg-Abtast-Experiment messen, bei dem man zuerst mit 266 nm-Impulsen anregt und mit 355 nm-Impulsen abfragt. Für diesen Fall absorbiert das Tryptophan, wie in den Vorüberlegungen dieses Kapitels dargelegt wurde, ein 266 nm-Photon und wird dadurch in den S_1 -Zustand angeregt, von wo es unter Fluoreszenz in den Grundzustand relaxiert. Trifft während der Bevölkerung des S_1 -Zustandes ein Photon mit 355 nm ein, so kann es vom angeregten Zustand absorbiert werden, was nicht strahlende Folgeprozesse (z.B. Ionisation) ermöglicht. Damit sinkt in diesem Fall die Fluoreszenzintensität, was man als Signlrückgang sieht. Dieser Prozess setzt am Zeitnullpunkt ein, da dort eine maximale Bevölkerung des S_1 -Zustandes vorliegt. In der Trp-Fluoreszenzmessung am ATZ bedeutet dies, dass der Zeitpunkt, an dem sich der Signlrückgang instantan erholt, der Zeitnullpunkt (gleichzeitiges Eintreffen von 266 nm-Impuls und 355 nm-Impuls) sein muss. Die Erholung des Signals im Zeitverlauf spiegelt den Zerfall des S_1 -Zustandes des Tryptophans wider. Sobald dieser komplett zerfallen ist, kann es auch keine ESA mehr geben. Damit liefert die ESA des Tryptophans eine Erklärung für den Signlrückgang vor dem Zeitnullpunkt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine reine Tryptophanlösung in Methanol

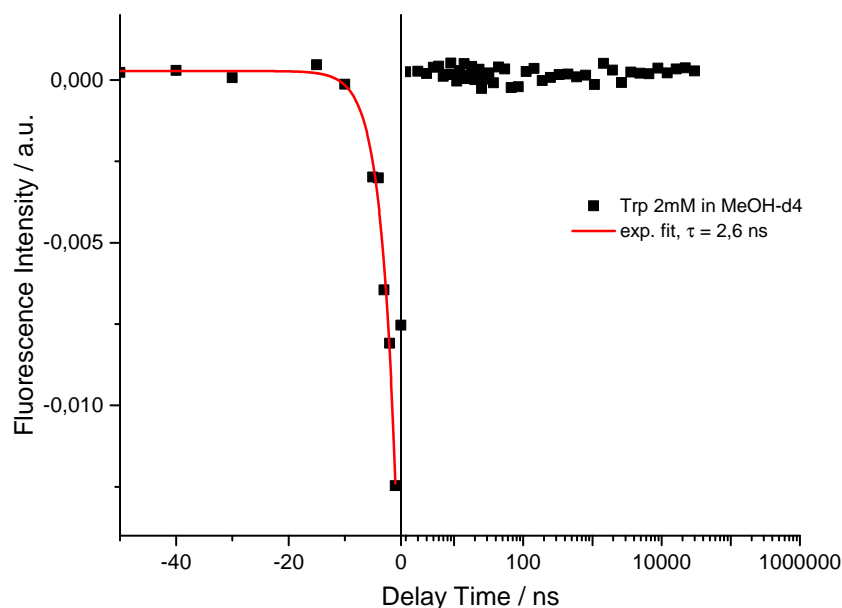


Abbildung 5.8.: Zeitaufgelöste Fluoreszenzdaten einer Trp-Lösung:

Die Messbedingungen sind analog zur ATZ-Messungen gewählt. Die Konzentration des Tryptophans betrug 2 mM. Der Signlrückgang vor dem Zeitnullpunkt lässt sich gut durch eine monoexponentielle Anpassung (rote Kurve) beschreiben. Als Zeitkonstante ergibt sich 2,6 ns. Nach dem Zeitnullpunkt zeigen sich keine weiteren Signaländerungen.

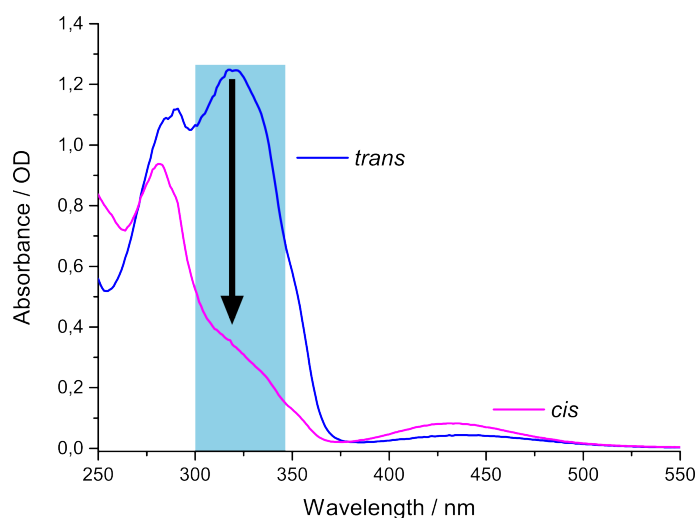


Abbildung 5.9: UV/Vis-Spektren der Azobenzolisomere im Bereich der detektierten Emission des Trps:

Gezeigt sind UV/Vis-Absorptionsspektren des AMPP im *trans*-Konformer (blau) und im *cis*-Konformer (violett). Blau hinterlegt ist der Durchlassbereich der Brightline 320/40-Filter.

vermessen (Abbildung 5.8). Wie beim ATZ sieht man den Signlrückgang bei kleinen, negativen Verzögerungszeiten und das instantane Erholen am Zeitnullpunkt. Da eine ESA des Tryptophans nur auftreten kann, wenn der angeregte Zustand besetzt ist, spiegelt die Zeitkonstante der exponentiellen Anpassung (2,6 ns) die Lebensdauer des angeregten Zustandes wider. In der Literatur wird die Lebensdauer des S_1 -Zustandes bei Tryptophan mit 3 ns angegeben [FTL80]. Da der im Rahmen dieser Messungen bestimmte Wert mit 2,6 ns gut mit dem Literaturwert übereinstimmt, kann angenommen werden, dass es sich beim Signlrückgang vor dem Zeitnullpunkt tatsächlich um die erwartete ESA des Tryptophans handelt. Das sprunghafte Erholen des Signals kann zur Überprüfung und Korrektur des Zeitnullpunktes genutzt werden.

2. Instantaner Anstieg unmittelbar am Zeitnullpunkt

Aus den Messdaten der reinen Trp-Lösung (s. Abbildung 5.8) ist ersichtlich, dass das Fluoreszenzsignal des Trp vor und nach der ESA äquivalent ist. Das liegt daran, dass Trp außerhalb der Lebensdauer des S_1 nicht mit Photonen von 355 nm wechselwirkt. Im ATZ ist dieser Sachverhalt jedoch anders. Abbildung 5.7 zeigt, dass das Trp-Fluoreszenzsignal unmittelbar nach dem Zeitnullpunkt deutlich höher ist, als vor der ESA. Mögliche Ursachen für diese Diskrepanz sollen nun diskutiert werden. Da das AMPP im Pikosekundenbereich schaltet und sich dessen Absorptionsspektrum dabei deutlich ändert, liegt es nahe, dass die Ursache des Anstiegs mit dem Schaltprozess korreliert ist. Aufgrund des deutlichen Absorptionsrückganges des AMPP bei der Isomerisierung vom *trans*- in das *cis*-Konformer (s. Abbildung 5.9) kommen zwei mögliche Erklärungen in Betracht.

- Erniedrigung der Reabsorption des Fluoreszenzlichtes durch Azobenzol
- FRET von Tryptophan auf Azobenzol

Diese beiden Prozesse werden nun diskutiert.

Erniedrigung der Reabsorption des Fluoreszenzlichtes durch Azobenzol

Da die $\pi\pi^*$ -Absorptionsbande des Azobenzols mit dem Emissionsspektrum des Tryptophans großen Überlapp hat, kann man davon ausgehen, dass ein Teil des Fluoreszenzlichtes, das im detektorfernen Bereich der Küvette emittiert wird, auf dem Weg durch die Küvette vom Azobenzol reabsorbiert wird und somit nicht mehr detektiert werden kann. Da beim Schaltprozess von *trans* nach *cis* die Absorption des Azobenzols im Bereich des vom Tryptophan emittierten Fluoreszenzlichtes deutlich abnimmt, sinkt auch die Reabsorption. Damit erreicht mehr Fluoreszenzlicht den Detektor und es kommt zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignales. Wenn die Änderung der Reabsorption des Azobenzols für den Anstieg am Zeitnullpunkt verantwortlich wäre, müsste er auch bei einer Mischung aus Azobenzol und Tryptophan auftreten. Zur Überprüfung der Hypothese wurde dieses Kontrollexperiment durchgeführt (s. [Abbildung 5.10](#)). Man sieht in den Daten nur den durch die ESA des Tryptophans her-

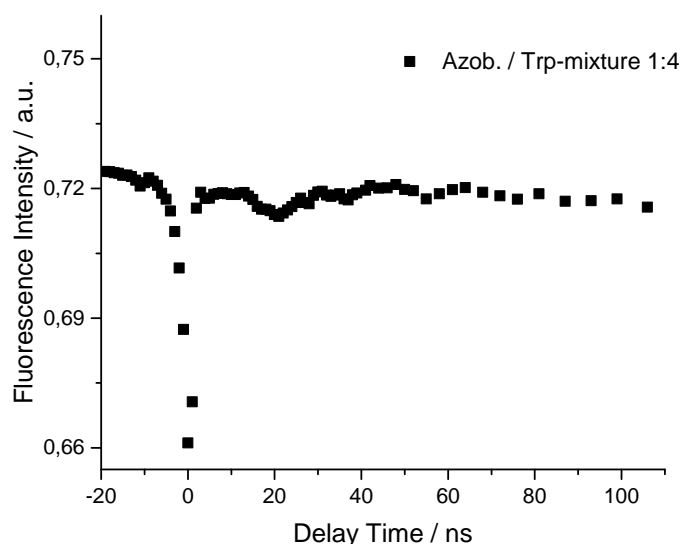


Abbildung 5.10: Trp-Fluoreszenzmessung einer Azobenzol-Tryptophan-Mischung: Die Konzentration des Azobenzols beträgt 0,5 mM, damit die optische Dichte des Azobenzols bei 320 nm derjenigen des ATZ entspricht. Diese Messung wurde nicht gepchoppt durchgeführt, weswegen die Daten einen Fluoreszenzoffset zeigen.

vorgerufenen Fluoreszenzrückgang vor dem Zeitnullpunkt. Der sprunghafte Anstieg wie bei der ATZ-Messung ist nicht vorhanden. Damit kann die Erklärung des Anstiegs am Nullpunkt durch eine Erniedrigung der Reabsorption des Fluoreszenzlichtes durch das Azobenzol nicht zutreffen.

FRET von Tryptophan auf Azobenzol

Eine weitere Erklärung für den instantanen Anstieg der Fluoreszenz beim ATZ ist ein FRET von Tryptophan auf das Azobenzol. Hierbei wird die Anregungsenergie der Tryptophane strahlungslos auf das Azobenzol übertragen, welches selbst nicht fluoresziert. Je höher also die FRET-Effizienz ist, desto niedriger ist die detektierte

Fluoreszenzintensität.

Damit es zu einem FRET kommen kann, muss zum einen der spektrale Überlapp der Emission der Tryptophane und der Absorption des Azobenzols gewährleistet sein. Weiterhin müssen sich beide Residuen sehr nahe kommen. Einige durch NMR-Spektroskopie bestimmte Strukturen des *trans*-ATZ zeigen eine große räumliche Nähe zwischen einem der Tryptophane und dem *trans*-Azobenzol. Es ist bekannt, dass Azobenzol durch FRET die Tryptophanfluoreszenz in Proteinen quenchen kann [HFW14]. Übertragen auf das ATZ ist davon auszugehen, dass im *trans*-Konformer die Tryptophanfluoreszenz durch das nahe liegende Azobenzol teilweise gequencht wird. Durch die Photoisomerisierung in das *cis*-Konformer kann sich das Tryptophan durch die gekrümmte Geometrie des Azobenzols nicht mehr so gut anlagern und der für FRET wichtige spektrale Überlapp wird kleiner (s. [Abbildung 5.9](#)). Dadurch sinkt die FRET-Effizienz, wodurch weniger Tryptophane gequencht werden. Die Fluoreszenzintensität erhöht sich. Diesen Effekt kann man in einer Azobenzol-Tryptophan-Lösung nicht beobachten, da sich dort Azobenzol und Tryptophan nicht genügend nahe kommen, um eine messbare FRET-Effizienz zu gewährleisten. Somit ist die eben erläuterte Hypothese konsistent mit allen durchgeführten Messungen und wird zur Erklärung des Anstiegs des Fluoreszenzdifferenzsignals am Zeitnullpunkt herangezogen.

3. Weitere Prozesse im Zeitbereich von 1 ns bis 95 μ s

Um die nachfolgenden Prozesse besser betrachten zu können, ist der Verlauf des Fluoreszenzdifferenzsignals für die ATZ-Messung in [Abbildung 5.11](#) im Bereich von 1 ns bis 95 μ s vergrößert dargestellt. Es treten deutliche Kinetiken auf, die mit einer Summe aus zwei exponentiellen Zerfällen angepasst werden können. [Tabelle 5.1](#) zeigt die Zerfallszeiten mit den dazugehörigen Amplituden.

	Zeitkonstante	Amplitude Trp-Fl	Amplitude IR
τ_1	120 ns	0,001	0,04
τ_2	19 μ s	0,01	0,11

Tabelle 5.1.: Zerfallszeiten und relative Amplituden der Trp-Fluoreszenzdaten ([Abbildung 5.11](#), links) im Vergleich mit den Daten der IR-Faltungsmessung [Dee14] ([Abbildung 5.11](#), rechts).

Da die beiden Prozesse deutlich später auftreten als das Schalten des AMPP, können sie nicht direkt mit dem Schaltprozess in Verbindung stehen und sind strukturellen Änderungen der Peptidstränge zuzuschreiben. Die Amplitude des Nanosekunden-Prozesses ist 0,1 mal so groß, wie die des Mikrosekundenprozesses, aber deutlich erkennbar. Ein Vergleich mit dem Zeitverlauf der IR-Messung der Faltung des ATZ ([Abbildung 5.11](#), rechts) zeigt, dass eine Modellfunktion, deren Zeitkonstanten identisch zu denen sind, die die Anpassung des Fluoreszenzverlaufes liefert, die Daten gut beschreibt. Eine Anpassung der Nanosekündendynamik der

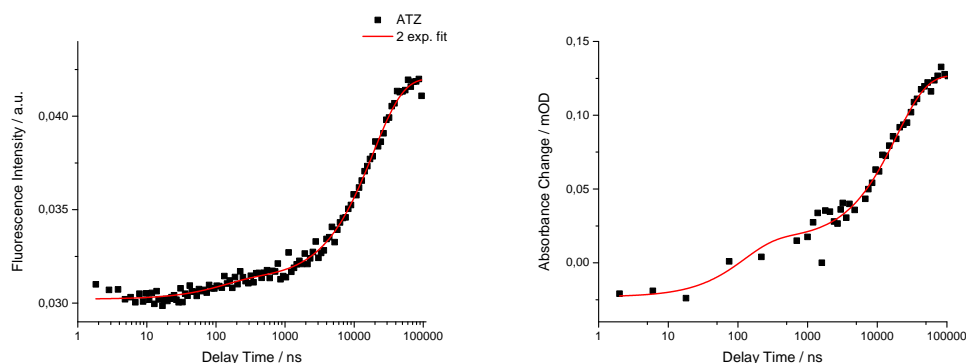


Abbildung 5.11.: Zeitverläufe der Faltung ATZ von 1 ns - 95 µs aus der Tryptophanfluoreszenzmessung (links) im Vergleich mit den IR-Daten (rechts): Für die Tryptophanfluoreszenzmessung ist neben den Datenpunkten (schwarz) eine Anpassungskurve mit zwei exponentiellen Zerfallsprozessen (rot) eingezeichnet. Die Anpassung ergibt Zeitkonstanten von 120 ns und 19 µs. Im Vergleich dazu ist der Zeitverlauf der IR-Faltungsmessung von A. A. Deeg bei 1640 cm^{-1} gezeigt. Die dort eingezeichnete Kurve ist ebenfalls biexponentiell. Die Zeitkonstanten sind als feste Parameter mit 120 ns und 19 µs gewählt worden.

IR-Daten mit freier Zeitkonstante ist nicht sinnvoll, da in diesem Zeitbereich zu wenig Datenpunkte vorliegen. Das Amplitudenverhältnis der Infrarotmessung von τ_2 und τ_1 ist mit 2,8 deutlich kleiner, als dasjenige für die Fluoreszenzmessung (10). Das bedeutet, dass sowohl für die IR-Messung als auch für die Fluoreszenzmessung Prozesse mit identischen Zeitkonstanten beobachtbar sind. Bei der IR-Messung tritt der Nanosekundenprozess in der Amplitude vergleichsweise deutlicher hervor.

5.3. Molekulare Interpretation der Trp-Fluoreszenzmessung

Nach der Photoanregung des AMPP kommt es zu einem ultraschnellen Schaltprozess in die *cis*-Konformation [Näg97]. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals am Zeitnullpunkt durch die Erniedrigung der FRET-Effizienz kann zwei molekulare Ursachen haben. Zum einen trägt die Absorptionsänderung des AMPP beim Schaltprozess (s. [Abbildung 5.9](#)) dazu bei. Weiterhin ist es möglich, dass sich der Abstand des Tryptophans zum AMPP direkt nach dem Schaltprozess ändert. Es könnte sein, dass durch die Geometrieänderung des Azobenzols von planar nach gewinkelt effektiv weniger hydrophobe Fläche für eine Anlagerung an das Azobenzol im *cis*-Konformer verfügbar ist. Dadurch könnte sich das Tryptophan direkt mit der Isomerisierungsänderung vom Azobenzol lösen, wodurch die FRET-Effizienz ebenfalls sinken würde. Das weitere Anwachsen des Fluoreszenzsignals während der Faltung des ATZ lässt sich durch die damit verbundene Ausbildung von Tryptophanpaaren erklären. Die

Tryptophane schirmen sich gegenseitig durch ihre aprotische Umgebung vor Quenchern wie zum Beispiel Lysin und Glutaminsäure ab [CB98].

Aufgrund des monotonen Ansteigens der Signale kann man zunächst davon ausgehen, dass sich das Peptid dem gefalteten Zustand nach der Isomerisierung des AMPP stets annähert; es gibt keine Hinweise auf einen anfänglichen Entfaltungsprozess eines fehlgefalteten *trans*-Zustandes.

Die Tryptophanfluoreszenz zeigt einen Zeitverlauf, der den Ergebnissen aus der Infrarotmessung sehr ähnlich ist. Daher ist davon auszugehen, dass die hydrophoben Wechselwirkungen und die stabilisierenden Interstrang-Wasserstoffbrücken an beiden Prozessen beteiligt sind. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Wasserstoffbrücken nach einem zipping-Prozess nacheinander schließen müssten¹, wenn sie den dominanten Beitrag zur Stabilisierung des gefalteten Zustandes liefern würden. Da sich die Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen des ATZ größtenteils zeitgleich schließen (s. Abschnitt 4.2), scheint die Ausbildung der hydrophoben Trp-Paare der ratenlimitierende Schritt der Faltung des ATZ zu sein.

Aufgrund der Heterogenität des *trans*-Ensembles sind zwei mögliche Szenarien denkbar:

1. Modell: Faltung aus verschiedenen *trans*-Zuständen:

Bei dieser Modellvorstellung geht man davon aus, dass mehrere *trans*-Zustände des ATZ parallel Startpunkte der Faltungsreaktion darstellen. Es gibt sowohl solche Ausgangsstrukturen, die der Haarnadel-Konformation sehr ähnlich sind und nur geringer, räumlicher Umlagerungen bedürfen, um in den vollständig gefalteten Zustand zu gelangen. Diese Zustände zeigen sich in den kurzen Nanosekundenprozessen und müssen den geringen Amplituden entsprechend nur untergeordnet vorliegen. Es existieren aber ebenso Zustände, die einen großen Entfaltungsgrad aufweisen und sich folglich weitreichend umlagern müssen, um den gefalteten Zustand zu erreichen. Es ist anzunehmen, dass dabei eine große Energiebarriere überwunden werden muss, weshalb diese Zustände Mikrosekunden zum Falten benötigen.

2. Modell: Aufeinander folgende Faltung eines *trans*-Zustandes:

Dieser Möglichkeit liegt die Annahme zugrunde, dass an der Faltungsreaktion nur ein Ausgangszustand maßgeblich beteiligt ist und es somit aufgrund des biexponentiellen Verhaltens der Messdaten einen Zwischenzustand der Faltung geben muss. Dieser Zustand zeigt bereits einen erhöhten Faltungsgrad gegenüber dem ursprünglichen *trans*-Zustand, was sich durch die Fluoreszenzzunahme im Nanosekundenbereich äußert. Da die Amplituden für τ_2 deutlich größer sind

¹Bei einem zipping-Prozess geht man davon aus, dass die zur Faltung nötige Einschränkung des Konformationsraumes durch die topologische Nähe erreicht wird, die nach dem Kontakt eines Wasserstoffbrückenpaares für das direkt nachfolgende Paar erzielt wird. Deshalb sollten sich die H-Brücken bei einem reinen zipping-Prozess nacheinander schließen und nicht zeitgleich.

als diejenigen von τ_1 , erfolgt auf der Mikrosekundenzeitskala der Hauptbeitrag zur Faltungsreaktion.

Anhand der hier präsentierten Daten kann nicht entschieden werden, welches der beiden Modelle zutrifft, sie sind gleichermaßen plausibel.

Im von Deeg et al. [Dee14] aufgrund von IR-Messungen vorgeschlagenen Modell kommt es aus einem *trans*-Zustand mit einer Zeitkonstanten von etwa 100 ns zu einer Diffusion entlang eines Energiegradienten in den thermisch entfalteten *cis*-Zustand. Danach muss dieses entfaltete *cis*-Konformer eine Energiebarriere überwinden, um mit einer Zeitkonstanten von 17 μ s in den gefalteten Zustand zu gelangen (s. Abschnitt 4.2). Es handelt sich demnach um Modell 2.

Der Fluoreszenzanstieg mit $\tau_1 = 120$ ns lässt sich im Rahmen dieses Modells durch eine Abstandsvergrößerung zwischen Tryptophan und Azobenzol beim Übergang in den thermisch entfalteten Zustand erklären, die mit der strukturellen Änderung abläuft und die FRET-Effizienz erniedrigt. Sowohl bei der Fluoreszenzmessung als auch bei der Infrarotmessung folgt ein dominanter Prozess mit sehr ähnlichen Zeitkonstanten (Trp-Fluoreszenz: 19 μ s und IR: 17 μ s). Im Rahmen der Messgenauigkeit sind diese Zeitkonstanten gleich, d.h. das Schließen der Wasserstoffbrücken und die Paarung der Tryptophane erfolgt mit derselben Zeitkonstanten und lässt sich mit einem Zwei-Zustandsmodell beschreiben.

Damit sind die durch die Trp-Fluoreszenzmessung gewonnen Ergebnisse konsistent mit dem Faltungsmodell von Deeg et. al. Sie unterstützen insbesondere die Theorie der Trp-Paarung als ratenlimitierenden Schritt für die Faltung des ATZ.

5.4. Ausblick und abschließende Bewertung

Der in dieser Arbeit vorgestellte Versuchsaufbau wurde zur zeitabhängigen Messung der Tryptophanfluoreszenz in lichtschtbaren Modellpeptiden entwickelt. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Aufbau voll funktionsfähig ist und den an ihn gestellten Anforderungen genügt. Störeffekte – wie z.B. thermische Linsen, wie sie bei den Infrarotmessungen auftreten (s. [Abschnitt 6.3](#)) – sind aufgrund der hier gewählten, unkritischen Detektion mithilfe des Photomultipliers nicht wichtig. Darüber hinaus ist der hier gezeigte Aufbau in der Justage weniger aufwendig und unkritischer bezüglich der Laborbedingungen als der Infrarotaufbau.

Im Rahmen der Spektroskopie an lichtschtbaren Modellpeptiden wurde gezeigt, dass der Aufbau durch die Betrachtung der Trp-Seitenketten weitere Einblicke in die Dynamiken gewähren kann. Im Falle des ATZ konnte die Messung das von Deeg et al. vorgeschlagene Modell unterstützen und insbesondere weitere Indizien dafür liefern, dass der ratenlimitierende Schritt für die Faltung des ATZ die Ausbildung eines hydrophoben Kerns durch Paarung der gegenüberliegenden Tryptophane ist. Mit der Realisierung dieser Anlage eröffnen sich zahlreiche Messungen, die tiefere Einblicke in die strukturellen Dynamiken von Peptiden gewähren können. Temperaturabhängige Messungen können Informationen über die Energielandschaft der Dynamiken liefern. Weiterhin könnte es möglich werden, Fluoreszenzmessungen in Wasser durchzuführen, da die für Fluoreszenzmessungen benötigte Konzentration wesentlich niedriger ist als für Infrarotmessungen (\approx mM).

Für die Messung der Entfaltung am ATZ müsste aufgrund der benötigten Wellenlänge von 430 nm wiederum ein anderer Laser zur Isomerisierung benutzt werden (z.B. Ekspla NT 242). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies aufgrund der apparativen Gegebenheiten nicht durchgeführt werden.

6. Die Entfaltung des ATZ von Nano- bis Mikrosekunden

Wie in [Kapitel 4](#) erläutert, gibt es Indizien dafür, dass die Entfaltung zum Ende der Kurzzeitmessung (3 ns) noch nicht abgeschlossen ist [[Sch08a](#)]. Die Entfaltung des ATZ konnte auf der langen Zeitskala von Nano- bis Mikrosekunden bisher nicht gemessen werden. Somit fehlt für die Diskussion des vollständigen Zyklus der Faltung und Entfaltung des ATZ noch dieser letzte Teilbereich. Erst die Anschaffung eines in

	ps - ns	ns - μ s
Faltung		
Entfaltung		

Tabelle 6.1.: Status der Datenlage zum ATZ

der Wellenlänge von 213 nm bis 2600 nm lückenlos durchstimmbaren Lasers (Ekspla, NT 242) eröffnete die Möglichkeit, diese Lücke zu schließen und damit den Zyklus der Faltung und Entfaltung des ATZ zu vervollständigen.

Der gesamte Anreg-Abtast-Aufbau für Messungen im Bereich von Nano- bis Mikrosekunden wird hier nur soweit erläutert, wie es für das Verständnis der Messungen notwendig ist. Details zum Aufbau finden sich in vorhergehenden Arbeiten [[Sch08b](#), [Sch08a](#)]. Insbesondere liegt bei der Darstellung in dieser Arbeit der Fokus auf den Besonderheiten des NT 242. [Abbildung 6.1](#) zeigt anhand einer schematischen Darstellung der gesamten Infrarotanlage deren Möglichkeiten. Im Rahmen dieses Kapitels werden die Erzeugung der mittelinfraroten Abtastimpulse ([Abbildung 6.1](#) orange, [Abschnitt 6.1](#)) und die Einkopplung der Anregungsimpulse des NT 242 für Nano- bis Mikrosekundenmessungen ([Abbildung 6.1](#) blau, [Abschnitt 6.2](#)) erklärt.

6.1. Erzeugung und Detektion der Mittelinfrarotimpulse

Als Lichtquelle dient ein fs-Ti:Sa-Lasersystem (Spectra Physics, Spitfire) mit Impulsen bei einer Wellenlänge von 800 nm, einer Repetitionsrate von 1 kHz und einer Impulsdauer von etwa 100 fs. Für Spektroskopie an Proteinen im Amid-I-Bereich werden Wellenlängen im Bereich von 6,06 μ m benötigt. Diese lassen sich mithilfe von Differenzfrequenzmischung (DFM) aus 1400 nm und 1800 nm Lichtimpulsen

6. Die Entfaltung des ATZ von Nano- bis Mikrosekunden

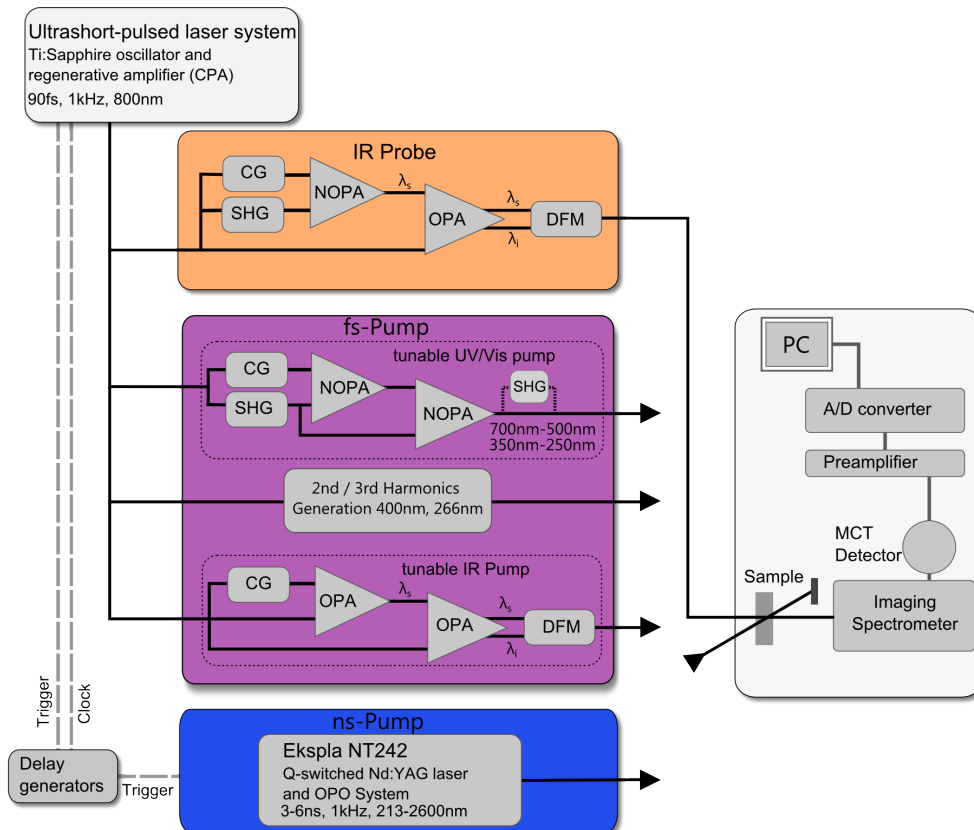


Abbildung 6.1.: Schematische Übersicht des gesamten Anreg-Abtast-Aufbaus im mittelinfraroten Spektralbereich

in einem Silberthiogallat-Kristall erzeugen. Um diese Wellenlängen zur Verfügung zu stellen, bedient man sich eines nichtkollinearen, optischen Verstärkers (NOPA). Hierzu wird zunächst ein Superkontinuum mithilfe eines Saphir-Plättchens erzeugt, um Photonen bei 1400 nm bereitzustellen. Da die Ausbeute bei dieser Wellenlänge sehr gering ist, benötigt man eine Verstärkung durch einen mit 400 nm (zweite Harmonische der Laserwellenlänge) gepumpten optisch parametrischen Prozess in einem BBO-Kristall. Bei diesem Prozess wird ein Photon bei 400 nm in je ein Photon bei 1400 nm und eines im grünen Spektralbereich (etwa 560 nm) umgesetzt. Läuft dieser Prozess gut, so erhält man eine mittlere Leistung von etwa 0,6 mW bei 1400 nm. Dieses Licht wird durch einen optisch parametrischen Verstärker (OPA) verstärkt, der mit 800 nm gepumpt wird. Somit wird zum einen das *signal*-Licht (1400 nm) verstärkt, zum anderen ein *idler*-Licht bei 1800 nm erzeugt. Die mittlere Leistung beider Wellenlängen zusammen beträgt etwa 23 mW. Wie oben erwähnt, können diese beiden Teilbündel in der DFM überlagert werden, um die gewünschte Wellenlänge im Mittelinfraroten (MIR) zu erzeugen. Durch Anpassen der Kristallwinkel (und des Winkels zwischen Weißlichtkontinuum und Pumpbündel beim NOPA) kann die

Wellenlänge von etwa 3 μm bis 10 μm durchgestimmt werden [Sch08b].

Ab der DFM müssen aufgrund der Wasserdampfabsorption für MIR-Pulse alle Anlagenteile mit Trockenluft gespült werden. Nach der DFM wird das Bündel in zwei Teile aufgespalten: den Referenzarm und den Probenarm. Der Referenzarm durchstrahlt die Probe in einem Bereich, der nicht vom Anregungsimpuls belichtet wird und dient später dazu, das Rauschen drastisch zu reduzieren. Der Probenarm trifft ausschließlich auf angeregte Probe. Er muss räumlich mit dem Anregungsimpuls überlappen und gibt das eigentliche Messsignal. Beide Lichtimpulse werden über Parabolspiegel auf die Küvette fokussiert, erneut durch einen Parabolspiegel kollimiert und über ein Imaging-Spektrometer (Bruker Chromex i250) auf jeweils eine Zeile eines stickstoffgekühlten MCT-Detektors abgebildet und spektral aufgelöst. Dessen Signal wird über einen Gated Integrator aufsummiert und durch einen A/D-Wandler im PC verarbeitet.

Bisher konnten auf Nano- bis Mikrosekundenzeitskala nur Experimente durchgeführt werden, deren Anregungswellenlängen mit den Harmonischen eines Nd:YVO-Nanosekundenlasers zusammenfielen. Erst durch die Erweiterung des Aufbaus durch den spektral durchstimmbaren NT 242-Nanosekundenlaser wurden Messungen mit Anregung in einem breiten Spektralbereich möglich, wie beispielsweise die Entfaltung des ATZ bei $\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$.

6.2. Einkopplung der Lichtimpulse des NT 242

Der NT 242 erreicht seine immense Bandbreite über nichtlinear-optische Prozesse. Dabei wird ein gütegeschalteter Nd:YAG-Laser (1 kHz Repetitionsrate, 8 mJ Impulsenergie, 3 ns Impulsdauer) zunächst frequenzverdreifacht. So erreicht man Laserimpulse bei 355 nm mit einer Impulsenergie von etwa 2,7 mJ, mit denen ein optisch-parametrischer Oszillator (OPO) mit zwei BBO-Kristallen gepumpt wird. Die Kristallwinkel, die die erzeugte Wellenlänge bestimmen, sind über einen Schrittmotor veränderbar, wodurch sich die erzeugte Wellenlänge durchstimmen lässt. Im OPO „zerfällt“ ein Pumpphoton in jeweils ein *signal*- und ein *idler*-Photon. Dabei deckt der *signal*-Teil einen Bereich von 400 nm - 709 nm und der *idler*-Teil einen Bereich von 709 nm - 2600 nm ab. Für die Erzeugung der UV-Impulse wird das *signal*-Licht entweder frequenzverdoppelt (213 nm - 299 nm) oder mit der Fundamentalen summenfrequenzgemischt (300 nm - 399 nm). Die so erzeugten Impulse haben eine Dauer von 3 - 6 ns und variieren in der Energie stark über den spektralen Bereich. [Abbildung 6.2](#) zeigt das vom NT 242 abgedeckte Spektrum.

Damit die Messungen der Entfaltung des ATZ sinnvoll durchgeführt werden können, müssen einige Punkte berücksichtigt werden. Zum einen muss der NT 242 fest mit dem Lasertisch der vorhandenen Anlage verbunden sein, damit der räumliche Überlapp zwischen Anreg- und Abtastimpuls während der gesamten Messung gewährleistet ist. Weiterhin ist es möglich, dass die hohen, zeitlich stark variablen, elektrischen

6. Die Entfaltung des ATZ von Nano- bis Mikrosekunden

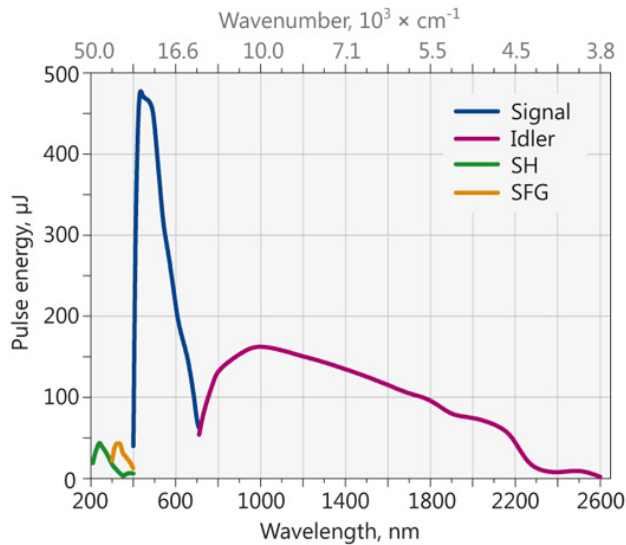


Abbildung 6.2: Spektrale Energieverteilung des NT 242 [Eks15]

Feldstärken der Güteschaltung elektromagnetische Wellen aussenden, die von den Kabeln der Detektion aufgefangen werden können und so Artefakte in der Messung verursachen. Im Rahmen einer Masterarbeit wurden sowohl die Einkopplung des Ekspla mittels optischer Fasern als auch die herkömmliche Bündelführung über hochreflektierende Spiegel gegeneinander abgewogen [Kue13]. Dabei stellte sich heraus, dass selbst hochgradig UV-beständige Fasern unterhalb von 300 nm durch die hohe Intensität bereits zum Leuchten angeregt werden und ein deutlicher Rückgang der transmittierten Leistung innerhalb weniger Minuten zu verzeichnen ist. Darüber hinaus verschlechtern die Fasern die Bündel Eigenschaften des Lasers, was eine Abbildung auf die Probe äußerst schwierig gestaltet. Da der NT 242 ebenfalls für Experimente im fernen UV-Bereich benötigt wird, wurde die Idee der Fasereinkopplung des NT 242 zugunsten der herkömmlichen Bündelführung aufgegeben. Um eine möglichst gute Abschirmung der Detektion von den starken Feldern der Güteschaltung zu erreichen, wurde der NT 242 unter den Lasertisch gehängt.

Ein weiteres Problem stellt das elliptische und divergente Strahlprofil des NT 242 dar. Um das Laserbündel bis zum Probenort führen zu können, wurde nach dem Laserausgang ein Zylinderteleskop eingebaut, dessen vertikale und horizontale Vergrößerungen so abgestimmt sind, dass das Bündel möglichst nah an einem Gauß-Profil ist und nur wenig Divergenz aufweist. Details zur Strahlführung finden sich andernorts [Kue13]. Um bei den zeitaufgelösten Messungen keine Signalbeiträge durch Rotation der angeregten Moleküle zu erhalten, werden die Laserimpulse des NT 242 vor dem Auftreffen auf die Probe durch eine $\lambda/2$ -Platte und einen Polarisator in den *magic angle* ‚magischen Winkel‘ zur Polarisation der Abtastimpulsen gedreht. Dabei kann mit der $\lambda/2$ -Platte auch die Energie der Anregungsimpulse eingestellt werden. Anschließend wird das Bündel mit einer Linse auf die Probe fokussiert, deren Brennweite so gewählt

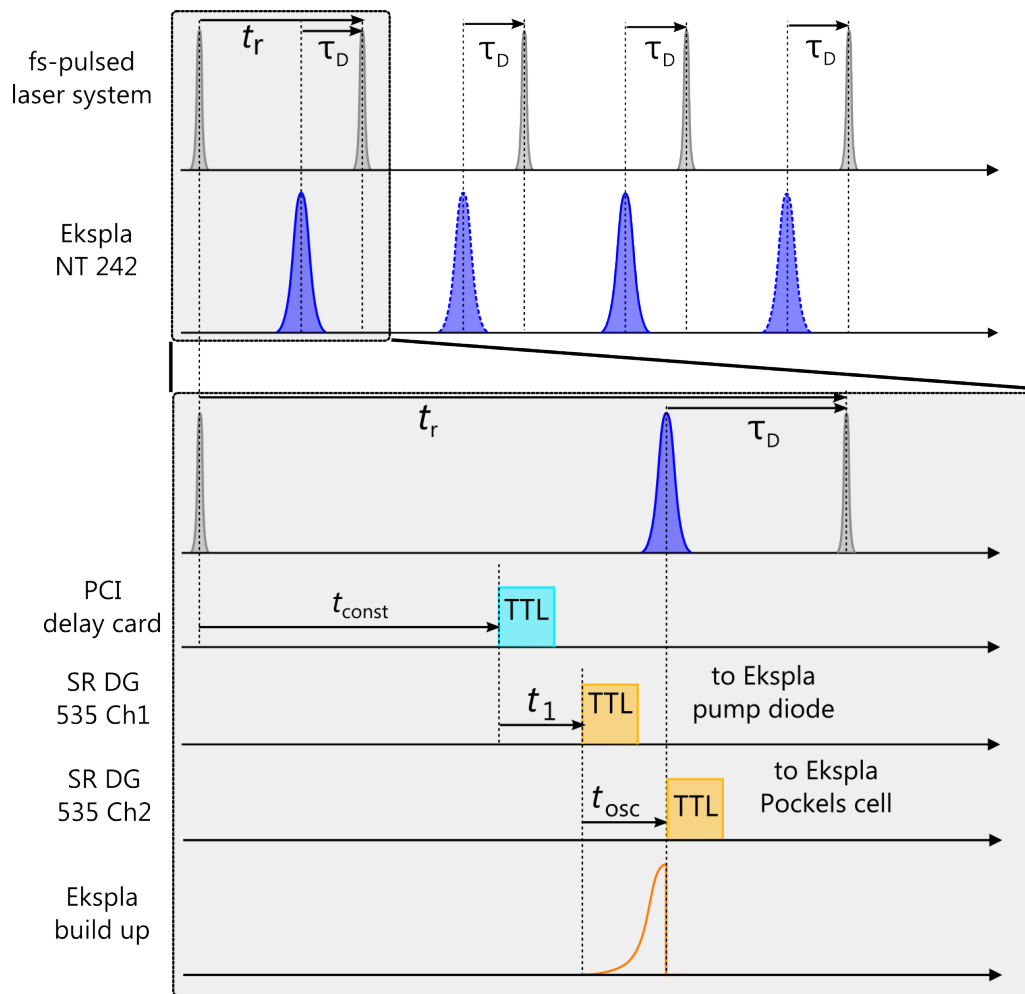


Abbildung 6.3.: Triggerschema des NT 242: Der Anregungsimpuls (blaue Impulse) für den n-ten Abtastimpuls (graue Impulse) wird vom (n-1)-ten Abtastimpuls getriggert. Dazu wird der Synch-Out-Trigger des Spitfire an eine Verzögerungskarte (Bergmann BME SG05P) ausgegeben, welche eine konstante Verzögerung von etwa 700 μs gewährleistet und wiederum den Verzögerungsgenerator (SR DG 535) triggert, der die Verzögerungszeiten für das Experiment PC-gesteuert variiert und nach einer Zeit t_1 die Pumpdioden des NT 242 anschaltet. Nach der Zeit t_{osc} wird die Pockelszelle des NT 242 ebenfalls vom variablen Verzögerungsgenerator geschaltet und der Anregungsimpuls (blaue Impulse) wird ausgekoppelt. t_{osc} ist dabei ein fester Parameter des NT 242, t_1 wird so eingestellt, dass die effektive Verzögerungszeit τ_D erreicht wird: $t_1 = t_r - t_{const} - t_{osc} - \tau_D$. Bei den aktuellen Laserparametern des NT 242 ist $t_{osc} = 207,2 \mu\text{s}$. Der Wert für die feste Verzögerung der BME SG05P ist durch die maximale, effektive Verzögerungszeit $\tau_{D,max}$ bestimmt. Die Summe $t_{const} + t_1 + t_{osc} + t_{D,max}$ muss kleiner sein als t_r . Jeder zweite Anregungsimpuls wird mit einem Chopper geblockt, um eine Hintergrundmessung für jeden Datenpunkt zu erhalten. Um im Messprogramm zu entscheiden, welcher Schuss angeregt und welcher nicht angeregt ist, wird ein schwacher Reflex einer Glasplatte auf eine Diode geleitet, deren Signal über eine elektronische Schaltung so verzögert wird, dass sie in das Integrationsfenster des A/D-Wandlers fällt.

wird, dass das Bündelprofil am Probenort einen Durchmesser von etwa 160-200 μm aufweist. Für die Faltungsmessungen wurden Anregungsenergien von etwa 6-8 μJ eingestellt. Das entspricht im Fall des ATZ einer Photoanregung von etwa 10% der Moleküle.

Für die zeitaufgelösten Messungen muss der NT 242 auf das fs-Ti:Sa-System, das den Abtastimpuls erzeugt, synchronisiert werden. Um einen Jitter im Subnanosekundenbereich zu erreichen, muss der NT 242 mit zwei Eingangskanälen getriggert werden. Der erste Kanal bestimmt dabei den Zeitpunkt, zu dem die Pumpdioden des Nd:YAG-Oszillators eingeschaltet werden. Dann wird nach einer festen Verzögerung die Pockelszelle geschaltet, die den verstärkten Impuls auskoppelt. Die Trigger müssen dabei bestimmte Eigenschaften haben, damit sie die Elektronik des NT 242 korrekt verarbeiten kann. Es müssen jeweils positive Pulse zwischen 2,5 V und 5 V sein. Die Länge des ersten Pulses darf zwischen 1 μs und 10 μs liegen. Der zweite Puls, der die Pockelszelle triggert, muss mit 200-500 ns deutlich kürzer sein und eine Anstiegszeit von weniger als 20 ns haben. [Abbildung 6.3](#) zeigt das Schema der Synchronisation des NT 242. Eine genaue Beschreibung gibt die Bildunterschrift. Der genaue zeitliche Überlapp wird bei jeder Messung mithilfe eines Germaniumplättchens kontrolliert, das durch die Anregungsimpulse freie Ladungsträger bildet, die im MIR-Bereich absorbieren.

Die genauen Parameter für die Messungen werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

6.3. Entfaltung des ATZ

6.3.1. Technische Rahmenbedingungen

Die Abtastimpulse im Mittelinfraroten sollen spektral bei 1650 cm^{-1} zentriert sein, was einer Zentralwellenlänge von 6,06 μm entspricht und eine gesamte spektrale Abdeckung zwischen 1570 cm^{-1} und 1730 cm^{-1} erlaubt. Dieser Bereich ist ausreichend für die Beobachtung aller Amid-I Änderungen, die das FTIR-Schaltpektrum des ATZ erwarten lässt. Das ATZ wurde wie in [Kapitel 5](#) angegeben lyophilisiert. Um eine Probenkonzentration von ca. 2 mM zu erhalten, wurden 7 mg ATZ in 2 ml deuteriertem Methanol (Sigma Aldrich, >99,6%, bzw. Deutero, >99,6%) gelöst und jeweils vor und nach der Messung im FTIR- und UV/Vis-Spektralphotometer charakterisiert. Dann wurde die Probe wie in [Kapitel 4](#) beschrieben ins PSS des *cis*-Isomers belichtet. Dies wurde mithilfe des UV/Vis-Spektralphotometers überprüft. Zur Messung wurde die Probe in den in [Ram11](#) vorgestellten Temperierkreislauf gepumpt. Vormessungen haben gezeigt, dass das thermische-Linsen-Artefakt in einer Küvette mit $d = 100 \mu\text{m}$ deutlich geringer ausfällt, als in einer Küvette mit $d = 200 \mu\text{m}$ [[Kue13](#)], weswegen auch die dünnere Küvette für die Entfaltungsmessung verwendet wurde. Während der Messung wurde die Probe in der Vorratsküvette ständig mit UV-Licht ($\lambda \approx 365 \text{ nm}$)

bestrahlt, um eine durch die Anregungsimpulse hervorgerufene Anreicherung des *trans*-Isomers zu vermeiden. Zur Temperaturbestimmung der Probe hat es sich als ausreichend herausgestellt, einen Temperaturfühler im Metallrahmen der Küvette zu verwenden, der mithilfe eines wärmeleitenden Silikonklebers in eine Bohrung nah an die CaF_2 -Fenster geklebt wurde. Als Umpumpgeschwindigkeit wurden 30 rpm eingestellt. Bei dieser Pumpgeschwindigkeit wurde die Temperaturmessung mithilfe des temperaturabhängigen Bandenschiebens der Methanolbanden im FTIR-Spektrometer geeicht.

Die Verzögerungszeiten wurden so gewählt, dass zwischen -5 ns und 10 ns 15 Punkte

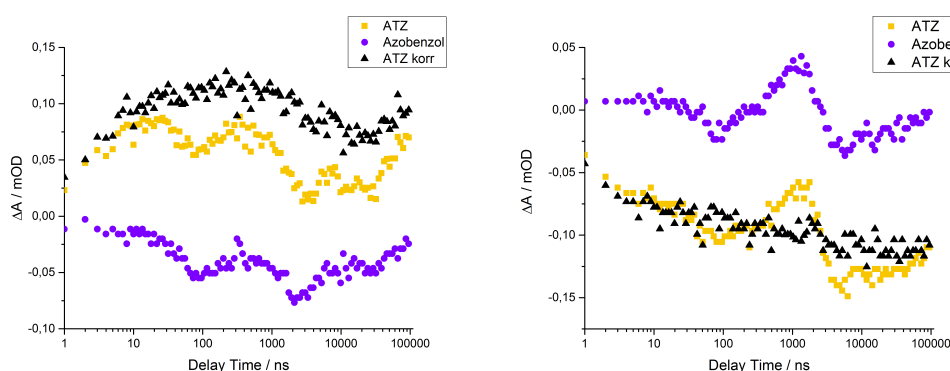


Abbildung 6.4.: Azobenzolreferenzierung zur Kompensation des thermischen Linsen-Artefaktes:

Die Abbildungen zeigen die Zeitverläufe der Rohdaten des ATZ (ocker), des Azobenzols (violett) und die Differenz aus ATZ und Azobenzolverläufen (schwarz) bei einer Temperatur von 4 °C bei 1650 cm^{-1} und 1624 cm^{-1} . Man erkennt, dass die Artefakte in den ATZ-Zeitverläufen gut durch die Subtraktion der Azobenzolzeitverläufe korrigiert werden.

mit festem Abstand und von 11 ns - 95 000 ns insgesamt 100 Punkte mit exponentiell wachsendem Abstand gemessen wurden. Das ergibt 25 Messpunkte pro Dekade. Die Messungen wurden jeweils gestartet, nachdem die Luftfeuchtigkeit in der Probenkammer so gering war, dass die Wasserabsorption des MIR vernachlässigbar ist. Das entspricht etwa einem Taupunkt von -40 °C. Am Thermostat des Temperierkreislaufer (Huber, ministat 3cc) wurden die Temperaturen so eingestellt, dass an der Küvette jeweils etwa 4 °C, 10 °C und 22 °C vorherrschten.

6.3.2. Artefakte in den ATZ-Daten und Korrektur durch Azobenzolreferenzierung

Bei der Messung traten Artefakte im Messsignal zwischen 100 ns und 10 μs auf. Sie lassen sich wie folgt erklären:

Durch die Absorption des Anregungsimpulses heizt sich die Probe auf und es kommt

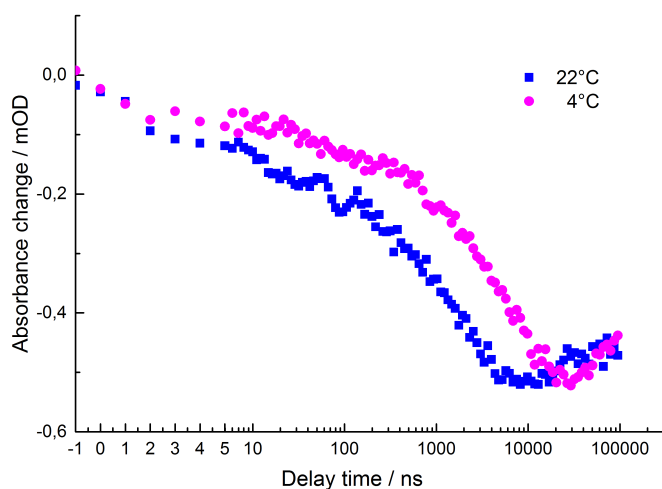


Abbildung 6.5: Zeitverläufe der ATZ-Entfaltungsmessung bei 1642 cm^{-1} für 4°C (violett) und 22°C (blau)

zu einem Dichtegradienten in der Küvette, der eine Schockwelle induziert. Dadurch ändert sich zeitabhängig das Dichteprofil der Probe und es kommt zu einer Brechung am angeregten Volumen in der Küvette, wodurch die MIR-Impulse leicht abgelenkt werden und die Detektorelemente nicht mehr optimal treffen. Dadurch misst man kleine Signaländerungen. Diese Artefakte sollen durch eine Referenzierung mit Azobenzol korrigiert werden. Dieses Vorgehen wird nun geschildert. Zu jeder Temperatur wurde nach der Probenmessung eine Azobenzollösung mit derselben optischen Dichte bei der Anregungswellenlänge vermessen. Das Azobenzol absorbiert genauso viel Anregungslicht wie das ATZ, zeigt aber auf der Nanosekundenzeitskala keinerlei molekulare Dynamiken. Damit sind alle Änderungen, die man misst, auf thermische Effekte zurückzuführen und können von den ATZ-Daten abgezogen werden. Da diese Artefakte von der Justage der Anlage abhängen, darf diese zwischen der ATZ- und der Azobenzolmessung keinesfalls verändert werden.

Das Vorgehen und die Ergebnisse dieser Referenzierungsmethode veranschaulicht [Abbildung 6.4](#). Die Artefakte in den ATZ-Zeitverläufen (gelb) sind nach Subtraktion der Azobenzoldaten (violett) kaum mehr sichtbar (schwarz).

Alle in diesem Kapitel gezeigten Daten sind azobenzolkorrigiert.

6.3.3. Zeitaufgelöste Absorptionsänderungen im IR

[Abbildung 6.5](#) zeigt die Zeitverläufe der Entfaltung bei 1642 cm^{-1} 22°C und 4°C . Man erkennt, dass die Entfaltung mehrere Prozesse zeigt. Am Zeitnullpunkt kommt es bereits zu einer Änderung des Signals, was zu den von T. Schrader gemessenen Daten passt. Danach folgt eine weitere Dynamik mit geringer Amplitude im Bereich einiger hundert Nanosekunden. Die größte Amplitude entfällt auf einen Prozess, der

mit wenigen Mikrosekunden abläuft. Zum Ende des beobachteten Zeitbereichs folgt eine weitere Dynamik mit geringer Amplitude. Dieses Verhalten zeigt sich bei allen gemessenen Temperaturen. Dabei zeigt sich eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der letzten beiden Dynamiken. Bei der letzten Dynamik findet man für die Messdaten bei 22° C ein Abflachen der Datenpunkte, wohingegen bei der Messung bei 4° C am Ende des Messbereiches noch kein Ende der letzten Dynamik erkennbar ist.

Einen tieferen Einblick in die stattfindenden Prozesse gewähren die transienten Spektren (s. [Abbildung 6.6](#)). Es treten bei den beiden Temperaturen keine grundlegenden,

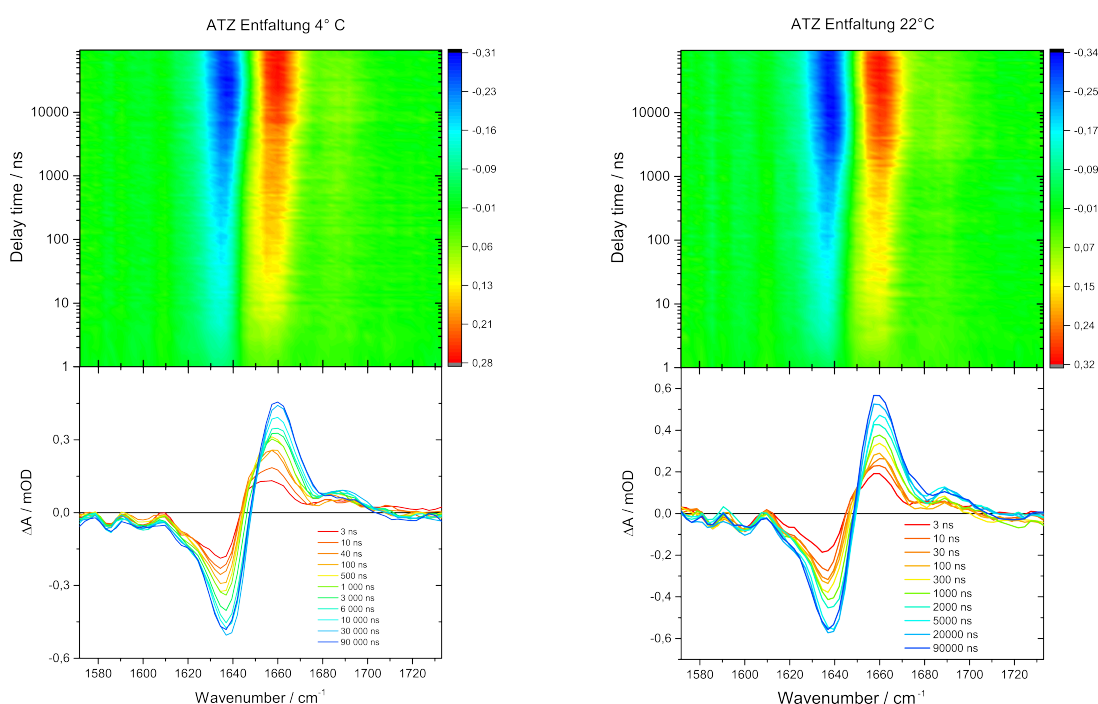


Abbildung 6.6.: Absorptionsänderungen als Funktion von Verzögerungszeit und Wellenlänge (oben) und transiente Spektren (unten) der Entfaltung des ATZ für 4° C (links) und 22° C (rechts)

spektralen Unterschiede auf, lediglich die Zeiten der Dynamiken sind unterschiedlich. Man sieht schon bei den ersten transienten Spektren (3 ns) die beiden Azobenzolbanden bei 1583 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} ausbleichen, wie man es bei der Isomerisierung nach *trans* erwartet. Anschließend zeigt sich hauptsächlich das Ausbleichen um 1640 cm^{-1} und ein Absorptionsanstieg bei 1660 cm^{-1} , was sich auf ein Brechen der H-Brücken zwischen den Peptidsträngen zugunsten von Lösungsmittel-Amid-H-Brücken zurückführen lässt. Dabei beobachtet man von kurzen zu langen Zeiten eine Blauverschiebung des Nulldurchgangs der Absorptionsänderung. Nur die transienten Spektren zum Ende der Messung zeigen ein leichtes Zurückschieben ins Rote. Um die auftretenden Dynamiken und deren spektrales Verhalten genauer verstehen und molekularen Prozessen zuordnen zu können, wurden für die Datensätze globale,

6. Die Entfaltung des ATZ von Nano- bis Mikrosekunden

multi-exponentielle Anpassungen vorgenommen. Die Gleichung für die Anpassung der zeit- und wellenlängenabhängigen Absorptionsänderung $\Delta A(\lambda, t)$ lautet:

$$\Delta A(\lambda, t) = A_\infty(\lambda) + \sum_{i=1}^N A_i(\lambda) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (6.1)$$

Man wählt die Anzahl N der exponentiellen Zerfallsprozesse mit den Zeitkonstanten τ_i so klein wie möglich und so groß wie nötig. Die *decay associated difference spectra* (DADS) $A_i(\lambda)$ zeigen, welche spektrale Verteilung der Zerfall mit der Zeitkonstante τ_i aufweist. Gleichung 6.1 gibt an, dass eine positive Amplitude $A_i(\lambda)$ einer Abnahme

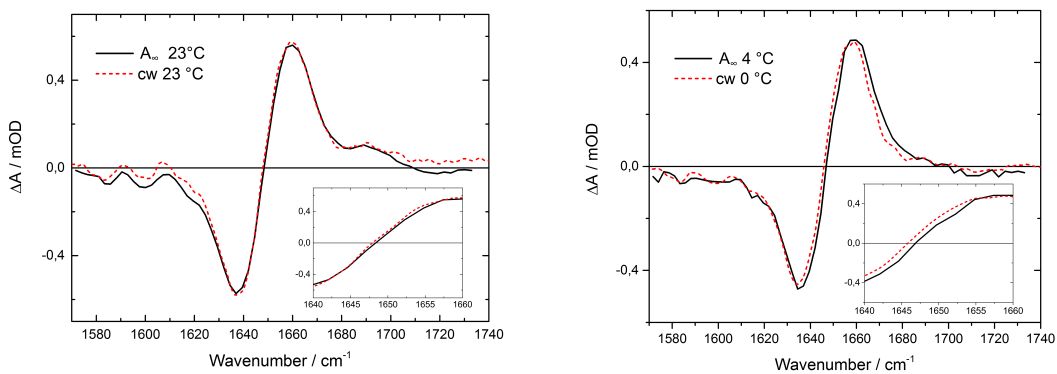


Abbildung 6.7.: Vergleich der Unendlich-Spektren mit den cw-Spektren:

Für die Messung bei 22 °C (links) sind die Spektren im Rahmen der Messgenauigkeit identisch. Bei den Messungen bei 4 °C (rechts) ist das Unendlich-Spektrum leicht zu kleineren Wellenzahlen verschoben ($\Delta\nu \approx 1 \text{ cm}^{-1}$), stimmt sonst aber sehr gut mit dem cw-Spektrum überein. Die Inlays zeigen den Bereich von 1640 cm^{-1} bis 1660 cm^{-1} vergrößert.

der Absorption mit Zeitkonstante τ_i entspricht. Betrachtet man den Limes $t \rightarrow \infty$, erschließt sich die Bedeutung von A_∞ , da alle Beiträge der Summe Null werden und es bleibt $\Delta A(\lambda, t = \infty) = A_\infty(\lambda)$. Somit fasst $A_\infty(\lambda)$ alle Beiträge zusammen, deren Zerfallszeit deutlich größer ist als die maximale Verzögerungszeit $\tau_{D,max}$.

Im Fall des ATZ sollte dieses Spektrum (im Folgenden: Unendlich-Spektrum) dem FTIR-Schalterspektrum gleichen, falls das Zeitfenster der Messung alle Prozesse der Entfaltung erfasst. Diesen Vergleich zeigt [Abbildung 6.7](#). Man sieht, dass cw-Spektrum und Unendlich-Spektrum bei 22 °C nahezu identisch sind. Es werden nach dem Messfenster von 95 μs keine Absorptionsänderungen mehr erwartet. Für die Messung bei 4 °C ist das Unendlich-Spektrum gegenüber dem cw-Spektrum um etwa 1 cm^{-1} blauverschoben. Das ist auf den Temperaturunterschied zurückzuführen. Messungen von Deeg et al. [[Dee14](#)] zeigen, dass man für einen Temperaturunterschied von 4 °C eine Frequenzverschiebung des Nulldurchgangs der Absorptionsänderung von 0,7 cm^{-1} erwartet. Somit kann man davon ausgehen, dass es auch für 4 °C keine weiteren Dynamiken nach 95 μs gibt.

Für die Anpassung der Daten sind jeweils 3 Zerfallszeiten nötig. Die längste Dynamik

ϑ [°C]	τ_1 [ns]	τ_2 [μ s]	τ_3 [μ s]
4	15	6,0	90 \pm 20
10	20	4,6	40 \pm 15
22	24	1,9	17

Tabelle 6.2.: Zeitkonstanten aus globaler Anpassung der Entfaltungsdaten bei verschiedenen Temperaturen:

Die Zeitkonstanten für τ_3 konnten nur bei der Messung bei 23 °C durch eine freie Anpassung bestimmt werden. Für die anderen Temperaturen wurden die Zeitkonstanten festgehalten. Für diese Zeiten sind auch Fehlerbereiche angegeben.

kann nur für die Messung bei 22 °C als freier Parameter angepasst werden, bei den tieferen Temperaturen ist die längste Zeitkonstante so groß, dass eine freie Anpassung nicht mehr konvergiert. Für diese Fälle wird die Zeitkonstante „von Hand“ variiert und der Wert mit dem kleinsten χ^2 gewählt. Diese Bestimmung ist sehr unsicher, weshalb die Fehlerbereiche entsprechend groß sind. Für die Bestimmung der Fehler wurden Zeitkonstanten im Abstand von jeweils 5 μ s in beide Richtungen der Zeitkonstanten mit kleinstem χ^2 gewählt und diejenigen als Fehlergrenzen festgesetzt, bei denen die Anpassungsgerade erkennbare Abweichungen von den Zeitverläufen auftraten. Einen Vergleich der Spektren zu Beginn der Langzeitmessung (3 ns) und des

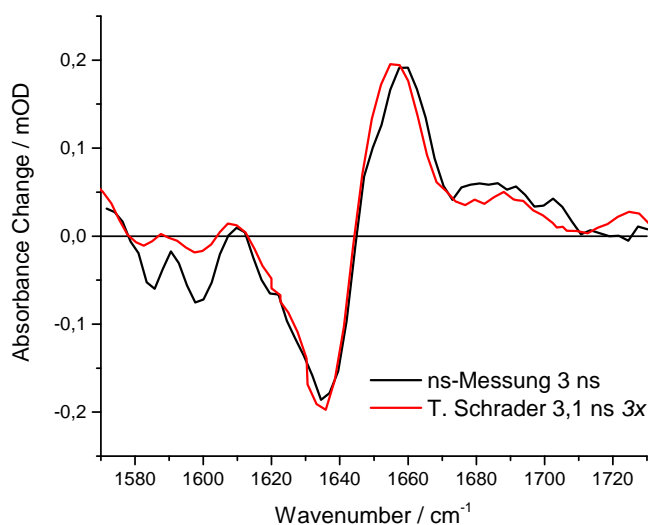


Abbildung 6.8: Vergleich der transienten Spektren der Entfaltung des ATZ zu Beginn der Langzeitmessung und am Ende der Kurzzeitmessung (3 ns) von T. Schrader:

Das transiente Spektrum von T. Schrader bei 3,1 ns wurde 3-fach vergrößert. Es zeigt große Ähnlichkeit mit dem berechneten Spektrum direkt nach der Anregung der Langzeitmessung. Die Azobenzolbanden treten beim transienten Spektrum am Ende der Kurzzeitmessung weniger deutlich hervor.

letzten, transienten Spektrums der Kurzzeitmessung bei 3,1 ns von T. Schrader zeigt (s. [Abbildung 6.8](#)). Die Spektren sind bezüglich der Amid-I-Bande im Rahmen der Messgenauigkeit identisch. Es zeigen sich lediglich im Bereich der Azobenzolbanden Unterschiede. Beim transienten Spektrum der Kurzzeitmessung sind sie deutlich weniger ausgeprägt, da man mit 400 nm eine im Vergleich zur Anregung mit 430 nm bei der Langzeitmessung kleinere Quantenausbeute der *cis* \rightarrow *trans*-Reaktion erreicht (s. [Kapitel 4](#)). Der Vergleich der transienten Spektren zeigt, dass die Messungen zeitlich

überlappen und man keine Prozesse durch die Zeitauflösung der Nanosekundenanlage verliert.

Abbildung 6.9 zeigt die DADS zu τ_1 und τ_2 , sowie die berechneten transienten Spektren direkt nach der Anregung. Man sieht in den DADS deutliche Änderungen im Bereich der Amid-I Bande bei jedem Zerfallsprozess. Die Prozesse τ_1 und τ_2 zeigen ein Ausbleichen um 1640 cm^{-1} (Auflösen der H-Brücken zwischen den Peptidsträngen) und eine Zunahme der Absorption um 1660 cm^{-1} (Bildung von Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel). Wie die transienten Spektren (Abbildung 6.6) zeigen, kommt es zu einer Blauverschiebung der DADS von schnellen zu langsamen Dynamiken. Wie erwartet sind die Azobenzolbanden bei 1583 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} bereits unmittelbar nach der Anregung ausgeprägt und zeigen im weiteren Verlauf keinerlei Dynamik. Die Hälfte der gesamten Absorptionsänderung ist nach τ_1 erreicht. Der verbleibende Teil der Absorptionsänderungen läuft zum Großteil mit τ_2 ab. Die Amplitude von τ_3 ist sehr klein. Vergleicht man die Temperaturen miteinander, so fällt auf, dass die Spektren direkt nach der Anregung und das DADS zu τ_1 bei der 4°C -Messung zur Messung bei 22°C um einige Wellenzahlen rotverschoben sind. Dies könnte ein Indiz für eine stärkere Wasserstoffverbrückung bei tieferen Temperaturen sein.

Die DADS der späten Mikrosekundendynamik (τ_3) zeigt Abbildung 6.10. Bei 22°C fällt zunächst ein starker Anstieg der Absorption um 1653 cm^{-1} auf, der von zwei Absorptionsrückgängen um 1631 cm^{-1} und 1689 cm^{-1} flankiert wird. Weiterhin erkennt man ein Ausbleichen bei 1711 cm^{-1} . Bei 4°C liegt das Maximum der Absorptionzunahme bei 1647 cm^{-1} . Die Flanke bei 1689 cm^{-1} zeigt ein deutlicheres Ausbleichen als bei 22°C . Es fehlt jedoch die Ausbleichsbande bei 1631 cm^{-1} . Die Zeitkonstanten sind denen der Faltung des ATZ sehr ähnlich [Dee14]. Die Amplituden beider Spektren sind gering, es finden sich keine Indizien für eine Änderung von Wasserstoffbrücken. Wie Abbildung 6.7 zeigt, sind diese Absorptionsänderungen nötig, um das cw-Differenzspektrum zu erreichen.

Um einen Einblick in die Energielandschaft der Entfaltung zu gewinnen, wird das Arrheniusverhalten der Dynamiken zu τ_2 und zu τ_3 untersucht. Aufgrund der Einflüsse der thermischen Linse und der geringen Signalamplitude wurde die Nanosekundendynamik außer Acht gelassen. Für eine thermisch aktivierte Reaktion geht man davon aus, dass die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit, d.h. der Lebensdauer der einzelnen Zustände, der Arrhenius-Gleichung gehorcht:

$$\tau = \tau_0 \cdot e^{\frac{\Delta H}{RT}} \quad (6.2)$$

Logarithmiert man diese Gleichung, so erhält man

$$\ln \tau = \frac{1}{T} \cdot \frac{\Delta H}{R} + \ln \tau_0. \quad (6.3)$$

Im Arrhenius-Plot trägt man die Logarithmen der Lebensdauern gegen den Kehrwert der Temperatur in Kelvin auf. Es ergibt sich eine Gerade mit der Steigung

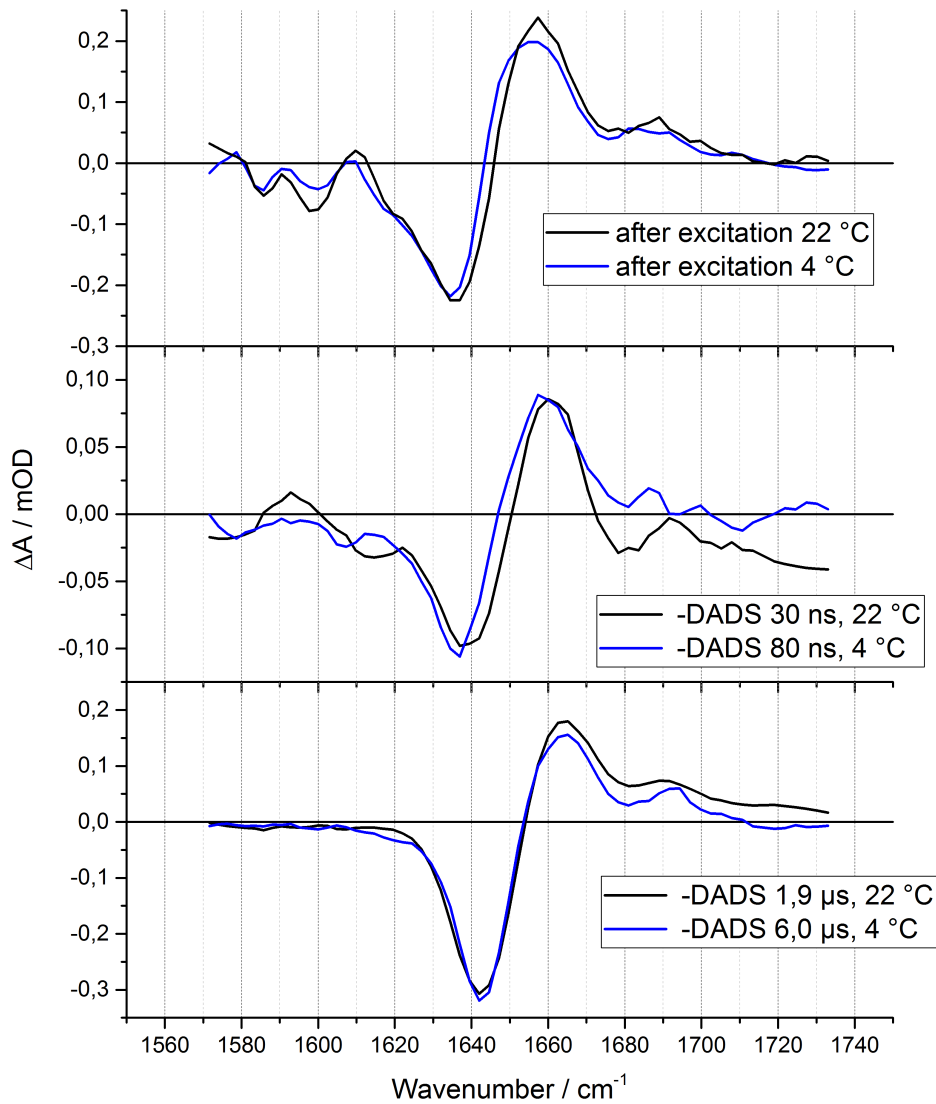


Abbildung 6.9.: DADS und berechnete Spektren direkt nach der Anregung: Das Spektrum unmittelbar nach der Anregung (oben) lässt sich als Summe aller DADS berechnen. Wie im Fließtext erläutert wurde, sind die negativen DADS gezeigt, damit sie direkt die Absorptionsänderungen widerspiegeln. Die DADS in der Mitte und unten zeigen die Prozesse mit den Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 .

6. Die Entfaltung des ATZ von Nano- bis Mikrosekunden

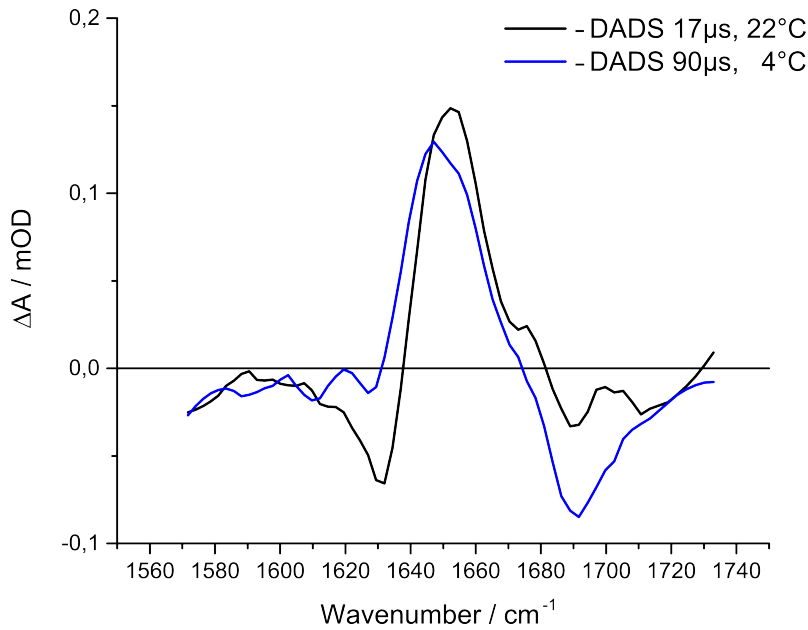


Abbildung 6.10: Inverse DADS der Mikrosekundendynamiken: Die schwarze Kurve zeigt das Spektrum zur Zeitkonstanten 17 μs , deren Wert aus der freien Anpassung der Messung bei 22°C bestimmt wurde. Bei der blauen Kurve für 4°C wurden 90 μs als feste Zeitkonstante vorgegeben und nur das Spektrum durch die Anpassung bestimmt.

$m = \Delta H/R$. ΔH ist dabei die Energiebarriere, die überwunden werden muss. Der Achsenabschnitt ist $\ln \tau_0$. Die Zeit τ_0 entspricht der Lebensdauer des Zustandes für den Grenzwert unendlich hoher Temperaturen oder einer verschwindenden Energiebarriere. Man kann damit $\frac{1}{\tau_0}$ als die Frequenz interpretieren, mit der das System gegen die Barriere anläuft. Der Arrhenius-Plot für die beiden Mikrosekundendynamiken ist in [Abbildung 6.11](#) gezeigt. Die verwendeten Werte für Lebensdauern und Temperaturen sind in [Tabelle 6.2](#) zusammengestellt. Die dort aufgeführten Zeitkonstanten sind aus den gemittelten Daten aller Messungen entstanden. Aus

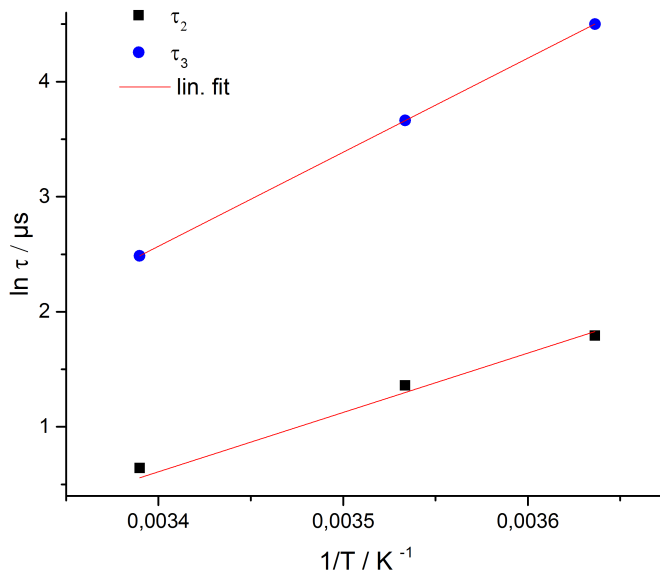


Abbildung 6.11: Arrhenius-Plot der Mikrosekundendynamiken der ATZ-Entfaltung: Eine lineare Anpassung der Daten liefert Steigungswerte von 5200 K für τ_2 (Quadrate) und 8200 K für τ_3 (Kreise).

den Steigungen lassen sich die Energiebarrieren im Arrhenius-Bild für die beiden Mikrosekundenprozesse zu $(43,2 \pm 10) \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ für den ersten Prozess und $(68,1 \pm 20) \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ berechnen. Die Fehler sind aus den sich ergebenden Steigungen für die Minimal- bzw. Maximalwerte der Zeitkonstanten abgeschätzt worden. Die Energiebarrieren liegen in ähnlichen Bereichen wie die der Faltung. Auch wenn große Unsicherheiten vorliegen kann man feststellen, dass es für beide Prozesse signifikante Energiebarrieren geben muss und dass der Prozess τ_3 eine höhere Energiebarriere aufweist als τ_2 .

6.4. Modelle der Entfaltung des ATZ

Am Startpunkt der Entfaltung liegt das ATZ als *cis*-Konformer vor. Wie Deeg et al. [Dee14] gezeigt haben, gibt es für die *cis*-Konformation des AMPP zwei Peptidstrukturen: das **thermisch** ungefaltete *cis*-ATZ (*cis_u*) und das als β -Haarnadel vorliegende *cis*-ATZ (*cis_f*). Diese beiden Strukturen stehen miteinander im thermischen Gleichgewicht und sind durch eine Energiebarriere getrennt (s. [Abbildung 6.12](#), oben). Die Besetzung der beiden Zustände hängt von der Temperatur ab. Bei niedrigen Temperaturen liegt hauptsächlich *cis_f* vor, bei hohen Temperaturen wächst der Anteil von *cis_u*. Das *cis_u* weist wenige Wasserstoffbrücken auf, das *cis_f* zeigt einen

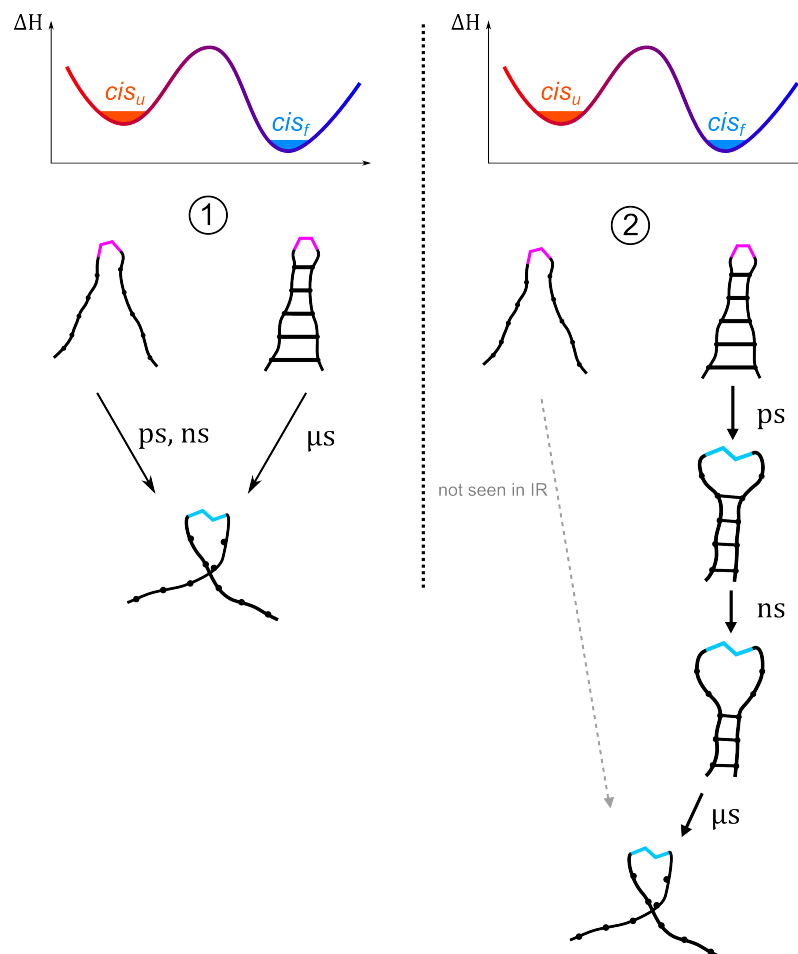


Abbildung 6.12.: Modelle der ATZ-Entfaltung:

Modell 1 (links) erklärt das Vorkommen mehrerer Zeitskalen durch das thermische Ensemble im *cis*-Isomer.

Modell 2 (rechts) ist sequentiell, d.h. es gibt, nacheinander ablaufende Prozesse auf verschiedenen Zeitskalen.

hohen Grad an Wasserstoffverbrückung.

Nach der Induzierung der Entfaltung durch Photoisomerisierung des AMPP nach *trans* können beide dieser Strukturen Absorptionsänderungen im Mittelinfraroten liefern. Das *cis_u* weist kaum stabilisierende Wechselwirkungen auf. Man erwartet nur geringe, räumliche Umordnungen beim Übergang *cis_u* → *trans*, weshalb dieser Prozess schnell ablaufen sollte.

Das *cis_f* muss aufgrund der stabilisierenden Wechselwirkungen eine große Energiebarriere überwinden. Es sind große Konformationsänderungen nötig, um die entfaltete *trans*-Struktur zu erreichen. Deshalb ist davon auszugehen, dass die für diesen Prozess gemessenen Zeiten deutlich länger sind, als diejenigen für das *cis_u*. Der Übergang *cis_f* → *trans* sollte massive Absorptionsänderungen im IR zeigen. Es gibt daher zwei denkbare Szenarien.

Modell 1: Die Absorptionsänderungen für den Übergang *cis_u* → *trans* sind klein aber messbar. Man sieht bei den IR-Messungen deshalb beide Prozesse. Im Rahmen dieses Szenarios lassen sich die gemessenen Dynamiken im Bereich der Wasserstoffbrücken (ρ_s , τ_1 und τ_2) folgendermaßen zuordnen (s. [Abbildung 6.12](#), links):

$$\begin{aligned} cis_u \rightarrow trans: \rho_s, \tau_1 \\ cis_f \rightarrow trans: \tau_2 \end{aligned}$$

Modell 2: Die Absorptionsänderungen für den Übergang *cis_u* → *trans* sind so klein, dass sie in den IR-Messungen nicht auflösbar sind. Damit müssen alle beobachteten Prozesse vom Übergang *cis_f* → *trans* stammen, was bedeutet, dass sich das *cis_f* **sequentiell** entfaltet (s. [Abbildung 6.12](#), rechts).

Es soll nun geprüft werden, inwiefern sich ein Modell anhand der gemessenen Daten ausschließen lässt. Da das Verhältnis der Besetzungswahrscheinlichkeit der beiden Ausgangszustände *cis_u* und *cis_f* temperaturabhängig ist, muss für Modell **1** auch das Verhältnis der Amplituden von (ρ_s , τ_1) zu τ_2 temperaturabhängig sein. Für niedrige Temperaturen sollte vergleichsweise mehr Amplitude auf τ_2 entfallen als bei hohen Temperaturen, da sie von *cis_f* herrührt, das bei niedrigen Temperaturen stark besetzt ist.

Dazu werden nun die Besetzungsverhältnisse von *cis_u* und *cis_f* bei 22 °C und bei 4 °C aus der CD-Schmelzkurve (s. [Abbildung 6.13](#)) abgeschätzt. Die Datenpunkte werden mit einem Boltzmann-Fit angepasst (s. [Gleichung 6.4](#)).

$$y(T) = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{T - T_m}{dT}}} \quad (6.4)$$

T_m bezeichnet man als Schmelztemperatur, bei der genau die Hälfte des ATZ gefaltet vorliegt. dT ist ein Maß für die Breite des Übergangs. Für $T \rightarrow +\infty$ findet man $y(T \rightarrow +\infty) = A_2$, was dem CD-Signal für 100% entfaltetes ATZ entspricht. Für $T \rightarrow -\infty$ findet man $y(T \rightarrow -\infty) = A_1$, was einem CD-Signal für 100% gefaltetes

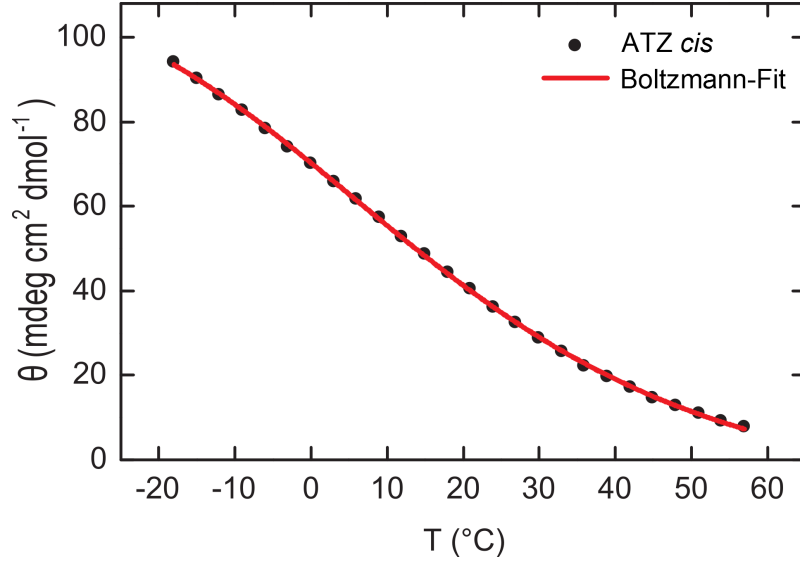


Abbildung 6.13.: CD-Schmelzkurve des ATZ in Methanol: Gezeigt ist das temperaturabhängige CD-Signal des *cis*-ATZ bei 228 nm mit Boltzmann-Anpassung (rot, s. Gleichung 6.4), die folgende Parameter liefert: $A_1 = 91\,000 \text{ mdeg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, $A_2 = -1000 \text{ mdeg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, $T_m = -4,4 \text{ }^\circ\text{C}$, $dT = 22,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Messung von Deeg et al. [Dee14].

ATZ entspricht. Die Maximalamplitude zwischen diesen beiden extremalen Werten ist damit $\Delta y_{max} = A_1 - A_2 = 92\,000 \text{ mdeg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$. Für das Verhältnis von gefaltetem zu ungefaltetem ATZ $\frac{N_f}{N_u}$ gilt dann bei einer Temperatur T_x :

$$n(T_x) := \left. \frac{N_f}{N_u} \right|_{T_x} = \frac{y(T_x)}{\Delta y_{max} - y(T_x)} \quad (6.5)$$

Mit $y(T = 22 \text{ }^\circ\text{C}) = 20\,000 \text{ mdeg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ und $y(T = 4 \text{ }^\circ\text{C}) = 36\,000 \text{ mdeg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ ergeben sich die Besetzungsverhältnisse von $n(T = 22 \text{ }^\circ\text{C}) = 0,28$ und $n(T = 4 \text{ }^\circ\text{C}) = 0,64$. Diese Besetzungsverhältnisse müssen im Fall von Modell 1 folgendermaßen mit den Amplitudenverhältnissen der IR-Messung zusammenhängen:

$$n(T_x) = \left. \frac{N_f}{N_u} \right|_{T_x} = \left. \frac{A_{cis_f}}{A_{cis_u}} \right|_{T_x} = \left. \frac{A_{\tau_2}}{A_{\text{after } \tau_1}} \right|_{T_x} \quad (6.6)$$

Dabei ist A_{τ_2} die Amplitude des DADS zu τ_2 . $A_{\text{after } \tau_1}$ ist die Amplitude des transienten Spektrums nach Beendigung des Prozesses zu τ_1 . Dieses Spektrum wurde durch Addition der DADS A_∞ , A_{τ_3} und A_{τ_2} berechnet. Für den Quotienten der Besetzungsverhältnisse und demjenigen der Amplitudenverhältnisse bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $22 \text{ }^\circ\text{C}$ muss

$$\frac{n(T = 4 \text{ }^\circ\text{C})}{n(T = 22 \text{ }^\circ\text{C})} \stackrel{!}{=} \frac{A_{\tau_2}^{4 \text{ }^\circ\text{C}}}{A_{\text{after } \tau_1}^{4 \text{ }^\circ\text{C}}} / \frac{A_{\tau_2}^{22 \text{ }^\circ\text{C}}}{A_{\text{after } \tau_1}^{22 \text{ }^\circ\text{C}}} = \frac{A_{\tau_2}^{4 \text{ }^\circ\text{C}}}{A_{\tau_2}^{22 \text{ }^\circ\text{C}}} / \frac{A_{\text{after } \tau_1}^{4 \text{ }^\circ\text{C}}}{A_{\text{after } \tau_1}^{22 \text{ }^\circ\text{C}}} \quad (6.7)$$

gelten. Zur Abschätzung der Amplitudenverhältnisse wird für *cis_u* die Amplitude der Absorptionsänderung nach τ_1 und für *cis_f* die Amplitude des DADS zu τ_2 verwendet

(s. [Abbildung 6.14](#)). Dabei wird als Maß für die Änderung jeweils der Abstand von Maximum zu Minimum betrachtet. Damit kann man den zum Vergleich mit den

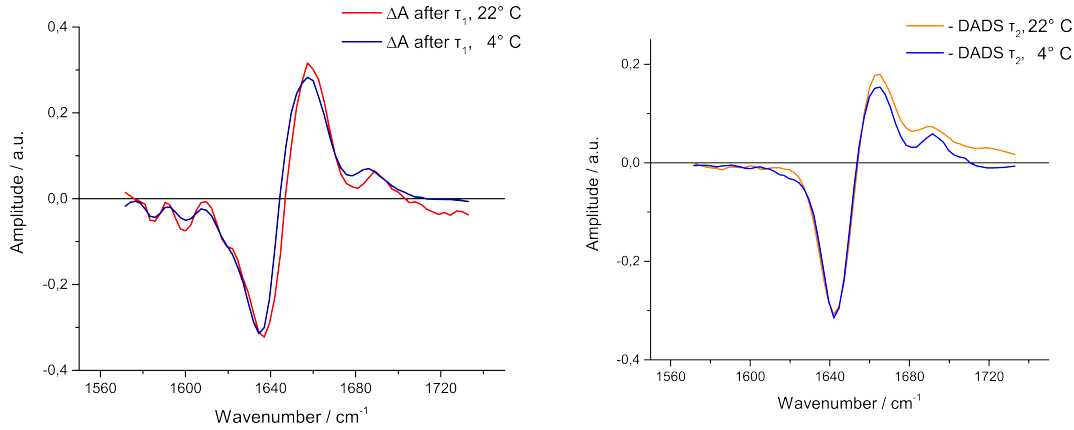


Abbildung 6.14.: Amplituden der Absorptionsänderung nach τ_1 (links) und der DADS zu τ_2 (rechts) bei 4 °C und 22 °C:

Für die einzelnen Kurven betragen die als Maß verwendeten Abstände von Maximum zu Minimum: $\Delta A_{\text{after } \tau_1}^{4^\circ\text{C}}$: 0,59, $\Delta A_{\text{after } \tau_1}^{22^\circ\text{C}}$: 0,64, $\Delta A_{\tau_2}^{4^\circ\text{C}}$: 0,48, $\Delta A_{\tau_2}^{22^\circ\text{C}}$: 0,48.

thermischen Besetzungswahrscheinlichkeiten benötigten Amplitudenquotienten aus [Gleichung 6.7](#) berechnen:

$$\frac{A_{\tau_2}^{4^\circ\text{C}}}{A_{\tau_2}^{22^\circ\text{C}}} / \frac{A_{\text{after } \tau_1}^{4^\circ\text{C}}}{A_{\text{after } \tau_1}^{22^\circ\text{C}}} = \frac{0,48}{0,48} / \frac{0,59}{0,64} = 1,08 \neq 2,29 = \frac{0,64}{0,28} = \frac{n(T = 4^\circ\text{C})}{n(T = 22^\circ\text{C})} \quad (6.8)$$

Die Amplitudenverhältnisse ändern sich mit der Temperatur kaum, obwohl die Änderung der Besetzungswahrscheinlichkeit von 22 °C nach 4 °C eine Amplitudenerhöhung um einen Faktor 2,3 zugunsten der cis_f Übergänge mit τ_2 vorhersagen.

Aufgrund dieses Widerspruches muss Modell 1 falsch sein. Die Entfaltung des ATZ ist somit durch das sequentielle Modell 2 (a. [Abbildung 6.12](#), rechts) passender zu beschreiben. Es soll nun eine molekulare Interpretation im Rahmen dieses Modelles für die Entfaltung des ATZ gegeben werden.

Molekulare Interpretation der sequentiellen Entfaltung des ATZ

Zunächst werden die frühen Dynamiken bis in den Bereich weniger Mikrosekunden betrachtet (ps, τ_1 und τ_2). Aufgrund des Bandenschiebens von etwa 1640 cm^{-1} zu etwa 1660 cm^{-1} sind diese Prozesse auf ein Brechen von Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidsträngen zurückzuführen [[Sch07](#)].

Während der Entfaltung beobachtet man eine spektrale Verschiebung des Nulldurchgangs der transienten Spektren (s. [Abbildung 6.15](#)). Es zeigt sich zunächst ein monotoner Anstieg der Wellenzahl des Nulldurchgangs bis $\tau_D \geq 2 \mu\text{s}$, d.h. die Blauverschiebung ist erst nach τ_2 beendet. Später (während des Prozesses zu τ_3) fällt die

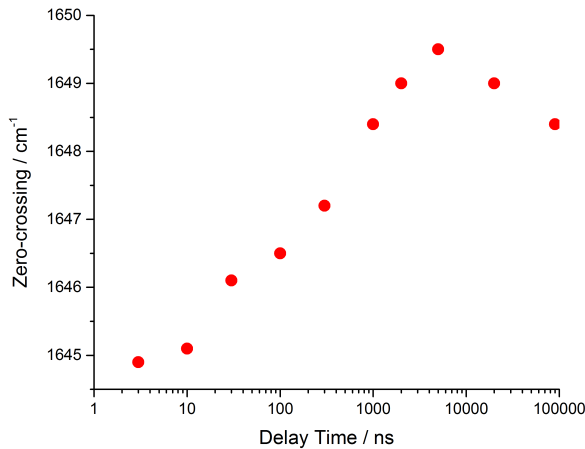


Abbildung 6.15: Nulldurchgang der transienten Spektren bei der Entfaltung des ATZ in Abhängigkeit der Verzögerungszeit:

Die Nulldurchgänge der in [Abbildung 6.6](#) gezeigten transienten Spektren bei 22 °C sind gegen die Verzögerungszeit aufgetragen.

Wellenzahl wieder ab. Es kommt somit bis nach τ_2 zu einer mit der Verzögerungszeit zunehmenden Blauverschiebung im Bereich der für Wasserstoffbrückenänderungen charakteristischen Absorptionsänderungen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die spektrale Position der Amid-I-Bande in guter Näherung indirekt proportional mit der Stärke der beteiligten Interstrang-Wasserstoffbrücken skaliert [[Bar07](#)]. Das bedeutet, dass bis zum Prozess τ_3 zuerst starke Wasserstoffbrücken aufgebrochen werden und im weiteren Verlauf der Entfaltung des ATZ schwächere Wasserstoffbrücken aufbrechen. Die Studien von Hauser et al. [[Hau08](#)] haben gezeigt, dass im Bereich der Schleife des TrpZip2 stärkere Wasserstoffbrücken vorliegen, als im Bereich der Termini. Damit liegt nahe, dass es bei der Entfaltung des ATZ zu einem *unzipping* der Wasserstoffbrücken vom AMPP zu den Termini auf einer Zeitskala von mehreren hundert Pikosekunden bis etwa zehn Mikrosekunden kommt.

Für τ_3 gestaltet sich eine Interpretation schwieriger. In [Abbildung 6.15](#) zeigt sich ein deutliches Zurückschieben des Nulldurchgangs der transienten Spektren.

[Abbildung 6.16](#) zeigt das DADS für τ_3 . Rot markiert sind Bereiche, die man bei ungeordneten Peptidstrukturen erwartet und blau markiert ist die Doppelbande bei β -Motiven. Diese Bereiche gelten für Proteine in Pufferlösung. Entsprechende Angaben für Peptide in Methanol sind nicht bekannt. Theoretische Studien lassen ein Schieben der Amid-I Bande von Wasser zu Methanol von nur $\Delta\nu = +8 \text{ cm}^{-1}$ vermuten [[Pas08](#)]. Damit stimmen die Bandenpositionen des DADS zu τ_3 gut mit den für β -Strukturen erwarteten Positionen überein. Diese Doppelbande kommt wie in [Abschnitt 3.1](#) erwähnt durch die Kopplung der Übergangsdipolmomente der CO-Bindungen benachbarter β -Stränge (s. [Abbildung 3.2](#)) zustande [[Bar07](#)]. Eine mögliche Interpretation für den Prozess zu τ_3 ist somit ein Auflösen der β -Struktur motive zugunsten einer ungeordneten Struktur. Gestützt wird diese Interpretation auch durch die Tatsache, dass die Zeitkonstanten für diese Dynamik denen der Faltung sehr ähnlich sind.

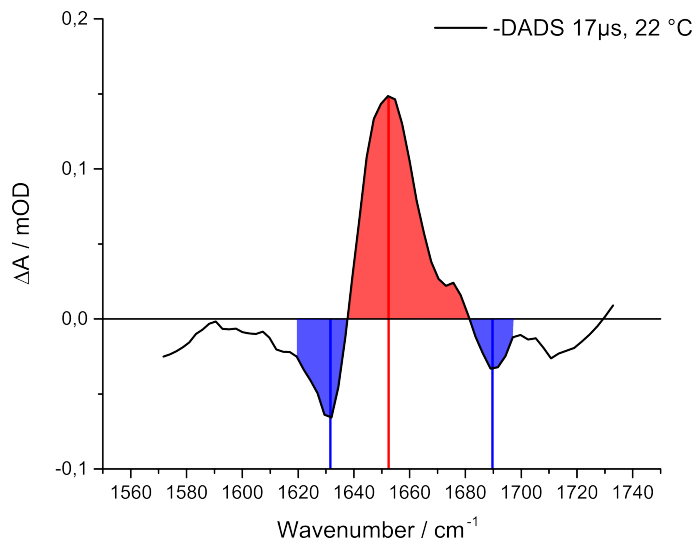


Abbildung 6.16: Inverses DADS zu 17 μ s bei Raumtemperatur: Markiert sind die nach Bar07 bestimmten Bereiche für ungeordnete Peptidstrukturen (rot) und β -Faltblatt-Motive (blau), vgl. Tabelle 3.1.

Nach dieser Vorstellung wären vor dem Prozess zu τ_3 auf molekularer Ebene die Peptidstränge bereits so weit voneinander entfernt, dass die Wasserstoffbrücken nicht mehr ausgeprägt sind. Trotzdem liegen die Stränge noch β -faltblattartig antiparallel beieinander und werden durch die immer noch bestehenden Trp-Trp Wechselwirkungen stabilisiert. Erst nach dem Auflösen des hydrophoben Kerns bewegen sich die Stränge ganz auseinander und verlieren so die für die typischen β -faltblattartigen Infrarotbanden nötige Dipolkopplung. Die Trp-Fluoreszenzmessungen haben die These untermauert, dass bei der Faltung der ratenlimitierende Schritt die korrekte Packung der Tryptophane ist. Damit liegt nahe, dass auch die hydrophoben Wechselwirkungen bei der Entfaltung zu Dynamiken im selben Zeitbereich führen wie bei der Faltung.

Das aus obigen Interpretationen folgende Modell für die Entfaltung des ATZ fasst

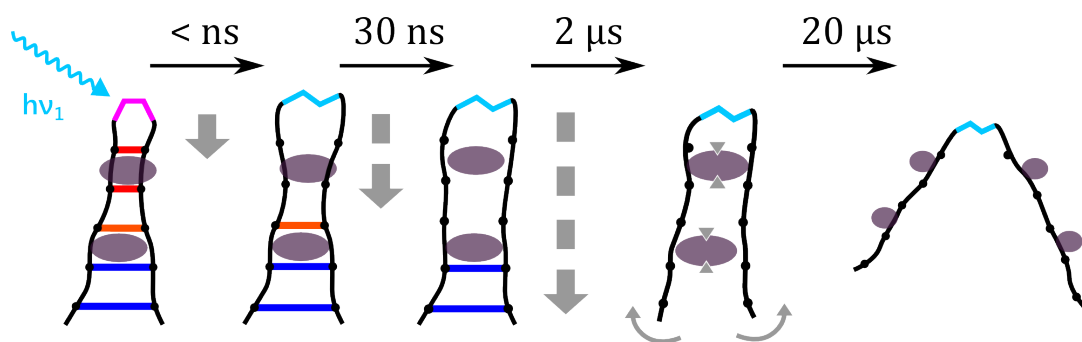


Abbildung 6.17.: Modell der Entfaltung des ATZ, Zeitkonstanten für Raumtemperatur:

Nach der Photoisomerisation des Azobenzolschalters brechen zunächst die Wasserstoffbrücken von der Schleifenregion (rot) bis zu den Termini (blau). Die Farbwahl spiegelt die oben beschriebene Bandenlage in den transienten Spektren wider. Erst nachdem sich die Tryptophanpaare (violette Ovale) getrennt haben, kann sich das ATZ ganz entfalten.

[Abbildung 6.17](#) zusammen. Nach der Photoisomerisation kommt es innerhalb einiger hundert Pikosekunden zu einem Aufbrechen der ersten Wasserstoffbrückenbindungen nahe am Azobenzolschalter. Die weiteren Wasserstoffbrücken brechen dann mit Zeitkonstanten von 30 ns und 2 μ s auf. Die nun vorliegende Struktur weist keine Wasserstoffbrücken mehr auf, die auf dem Weg zum komplett entfalteten Zustand noch gebrochen werden müssten, ist aber durch die hydrophoben Wechselwirkungen stabilisiert, sodass die Peptidstränge noch antiparallel zueinander liegen. Erst nachdem sich der hydrophobe Kern aufgelöst hat, können sich die Peptidstränge ganz voneinander lösen und das ATZ ist vollständig entfaltet.

Dieses Bild ist mit der in [Abschnitt 3.3](#) behandelten Entfaltung des TrpZip2 konsistent: Auch im TrpZip2 kommt es zunächst zu einem *unzipping* der Wasserstoffbrücken. Der hydrophobe Kern besteht bis zum Schluss der Entfaltung [[Yan04](#), [Nym09](#)]. Dieser hydrophobe Kern stabilisiert die β -Haarnadel-Struktur auch nachdem die ersten Wasserstoffbrücken bereits aufgebrochen sind [[Hau08](#)].

7. Der komplette Zyklus der lichtinduzierten Strukturänderungen des ATZ

Dieses Kapitel führt die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse mit den bisher publizierten Daten anhand des gesamten Zyklus des ATZ zusammen. Eine mit allen Daten konsistente Darstellung der molekularen Prozesse zeigt [Abbildung 7.1](#). Beginnt man im *cis*-Konformer und induziert die Entfaltungsreaktion durch Belichtung des Azobenzols mit Licht bei 430 nm, so isomerisiert das Azobenzol innerhalb weniger Pikosekunden vollständig. Nachdem die von Schrader et al. [[Sch11](#)] beschriebenen

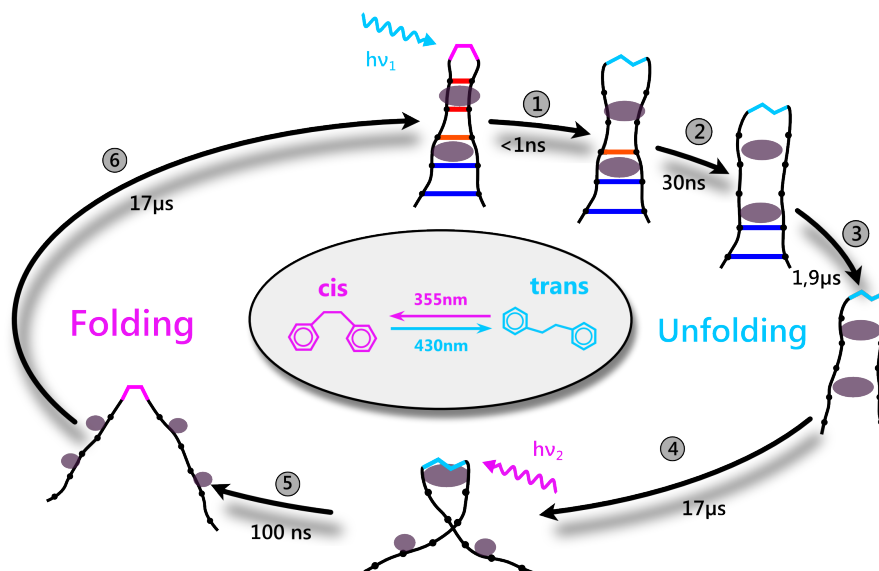


Abbildung 7.1.: Zyklus des ATZ: Faltung und Entfaltung

ersten molekularen Umlagerungsprozesse der Wasserstoffbrücken in der Nähe des Azobenzolschalters mit etwa 630 ps (1) abgelaufen sind, setzt sich das Öffnen der weiteren H-Brücken vom zentralen Teil der Haarnadel (2) zu deren Enden (3) bis zu einigen Mikrosekunden fort. Die hydrophoben Wechselwirkungen bestehen zu diesem Zeitpunkt noch und bewahren eine antiparallele Ordnung der Peptidstränge. Erst mit dem Auflösen des hydrophoben Kerns mit dem 17 μs Prozess geht diese Anordnung verloren (4) und die Entfaltung des ATZ ist abgeschlossen. Belichtet man nun das *trans*-Konformer mit Licht der Wellenlänge von 355 nm, um

7. Der komplette Zyklus der lichtinduzierten Strukturänderungen des ATZ

die Faltung auszulösen, so findet ein ultraschneller Übergang des AMPP in das *cis*-Konformer statt. Das ATZ erreicht damit die thermisch entfaltete *cis*-Struktur. Bei diesem Prozess gibt es geringe Änderungen der Wasserstoffbrücken (5). Der Großteil der Wasserstoffbrücken bildet sich jedoch erst mit der nativen Packung der Tryptophane aus, was die Kombination der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen mit den IR-Messungen nahelegt (6). Man sieht deshalb nur eine Hauptdynamik mit

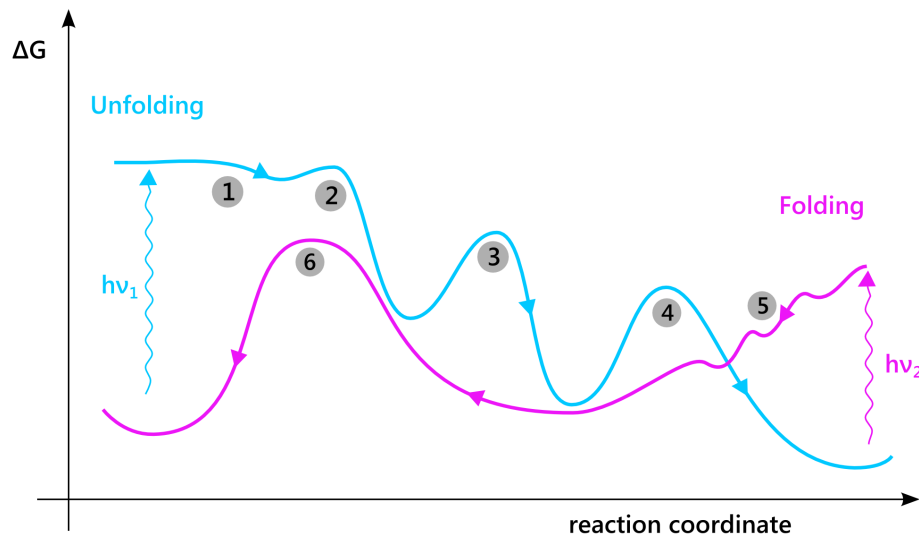


Abbildung 7.2.: Energielandschaft der Faltung und Entfaltung des ATZ, Nummerierung der Prozesse analog zu [Abbildung 7.1](#)

großer Amplitude (17 μ s).

Eine mögliche Erklärung für das mono-exponentielle Verhalten bei der Faltung ist, dass die Dynamiken des Rückgrates im Vergleich zu denen der hydrophoben Wechselwirkungen eine Größenordnung schneller sind, was die Entfaltungsmessung zeigt. Selbst wenn diese schnellen Prozesse nach dem Ausbilden der hydrophoben Wechselwirkungen folgen, würde man nur die Zeitskala des ratenlimitierenden Schrittes sehen – nämlich die 17 μ s. Man hat keine Möglichkeit, die mit Bildung der Wasserstoffbrücken assoziierten Dynamiken direkt aufzulösen. Bei der Entfaltung finden diese schnellen Prozesse der Wasserstoffbrücken jedoch vor der langsam Dynamik des hydrophoben Kerns statt und sind so auflösbar.

Einen Vorschlag für die Energielandschaft der Entfaltung und Faltung des ATZ zeigt [Abbildung 7.2](#). Die Energielandschaft der Faltung wurde von Deeg et al. vorgeschlagen [[Dee14](#)] (s. [Abbildung 4.6](#)). Nach der Photoisomerisation des AMPP kommt es zu einem schnellen Diffusionsprozess auf einer rauen Energielandschaft in das thermisch entfaltete *cis*-Ensemble (5). Danach muss eine große Energiebarriere von etwa $48 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ überwunden werden, um die korrekte Haarnadelstruktur zu erreichen (6).

Im Falle der Entfaltung gibt es für das Aufbrechen der ersten Wasserstoffbrücken (1) keine Energiebarriere [Bre08]. Da der direkt nachfolgende Prozess ebenfalls sehr schnell (≈ 30 ns, 2) erfolgt, kann man davon ausgehen, dass eine eventuell vorhandene Energiebarriere klein sein müsste. Danach folgt mit einer signifikanten Energiebarriere von etwa $40 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ das Aufbrechen der letzten H-Brücken auf einer Zeitskala von $\tau_2 \approx 2 \mu\text{s}$ (3). Der hydrophobe Kern der Trp-Paare besteht zu diesem Zeitpunkt noch. Seine Auflösung erfordert eine relativ hohe Energiebarriere von rund $60 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ (4). Durch die beiden, großen Energiebarrieren für τ_2 und τ_3 bei der Entfaltung sind die Zwischenzustände in der Messung unterscheidbar.

Diese Modellvorstellungen konnten nur durch die getrennte und zeitaufgelöste Untersuchung von Faltungs- und Entfaltungsreaktion sowie die Kombination von Infrarot- und Trp-Fluoreszenzmessungen gewonnen werden.

8. Evaluation des Chromopeptidansatzes und Ausblicke

Die vorherigen Kapitel haben zunächst den Ansatz motiviert, einen Lichtschalter zum Studium struktureller Dynamiken in das β -Haarnadelpeptid TrpZip2 einzubauen, die bisherigen Ergebnisse dargestellt und die in dieser Arbeit hinzukommenden Messungen in das bestehende Bild des ATZ eingeordnet. Dieses Kapitel schließt den ersten Teil dieser Arbeit ab, indem es diese Methode einer kritischen Betrachtung unterzieht.

Die Studien von Schrader [Sch08a], Bredenbeck et al. [Bre05] und Spoerlein [Spo01] haben gezeigt, dass mithilfe von Chromopeptiden bereits Prozesse aufgelöst und sinnvoll interpretiert werden können, deren Zeitskala deutlich unterhalb der Zeitauflösung von Temperatursprungmessungen liegt. Damit war bereits eines der in [Abschnitt 3.3](#) formulierten Ziele erreicht.

Die Faltungsstudien von Deeg et al. [Dee14] belegen, dass das Azobenzol nicht nur direkt kraftgetriebene Strukturänderungen auslöst, sondern auch die thermodynamische Stabilität ändert. Die Faltung des Peptides wird dabei durch seine Energielandschaft bestimmt.

Diese Arbeiten zeigten, dass der Ansatz, einen Azobenzolschalter in das Rückgrat eines Peptides zu integrieren, sinnvoll verwendet werden kann, um Peptidfaltung mit einer Zeitauflösung im Bereich der Schaltvorgänge des Azobenzols (20 ps) zu studieren. Darauf aufbauend ergänzt die vorliegende Arbeit das Bild des ATZ, indem es die noch fehlenden Messungen der Entfaltung auf der Mikrosekundenzeitskala liefert. Damit ist es erstmals möglich, sowohl die Faltung als auch die Entfaltung eines β -Haarnadelpeptids vom Piko- bis Mikrosekundenbereich separat zu adressieren und spektroskopisch zu untersuchen. Wie [Kapitel 7](#) erläutert, erlaubt diese umfassende Datenlage interessante Einblicke in die Thermodynamik und Kinetik des ATZ.

Beim Studium der Strukturänderungen nativer Peptide und Proteine sind jedoch weitere Aspekte zu berücksichtigen. So greift man mit der hier vorgestellten Methode in die Sekundärstruktur eines Proteins/Peptides ein, weshalb eine genaue Charakterisierung des so entstandenen Chromopeptides notwendig ist, um zu gewährleisten, dass das entstandene Chromopeptid auch die Struktur des Wildtyps aufweist. Es kommen außerdem nur Segmente zum Austausch mit Azobenzol in Frage, deren Geometrie und Abstände einem der Azobenzolkonformere entsprechen. Weiterhin ändert man die Löslichkeit vor allem kleiner Peptide drastisch. Durch den Einbau des Azobenzols werden im Allgemeinen aus der Aminosäuresequenz zwei Aminosäuren (z.B. Asn und Gly beim TrpZip2) durch das hydrophobe Azobenzol ersetzt, was die

Wasserlöslichkeit des Peptides so weit herabsetzen kann, dass es nicht mehr mittels Infrarotspektroskopie in Wasser gemessen werden kann.

Da die Fähigkeit des Azobenzols, Proteinstrukturen selektiv und reversibel zu beeinflussen, mit den vorliegenden Arbeiten einwandfrei unter Beweis gestellt wird, könnten nun in größeren Proteinen die Stabilität einzelner Domänen mithilfe des Azobenzols kontrolliert werden. Damit kann man untersuchen, inwiefern die Struktur dieser einzelnen Domänen die Gesamtstruktur des Proteins beeinflusst. Derartige Messungen können einen großen Beitrag zu allgemeinen Faltungstheorien (s. [Abschnitt 3.2](#)) und zum Verständnis der frühen Stadien der Proteinfaltung liefern. Geeignete Modellsysteme könnten größere β -Systeme oder das Protein Ubiquitin sein.

Ein anderer Weg, die Schaltvorgänge des Azobenzols zur Faltung von β -Haarnadeln auszunutzen, könnte sich aus der Änderung der hydrophoben Fläche und der Geometrie des AMPP von planar im *trans* nach gewinkelt im *cis* ergeben. Wird das Azobenzol als Seitenkette so in ein Peptid eingebaut, dass es mit einer hydrophoben Aminosäure (beispielsweise Trp) wechselwirken kann, könnte es so möglich sein, hydrophobe Wechselwirkungen lichtschtaltbar zu gestalten.

Die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse zeigen, das Lichtschalter geeignet sind, um strukturelle Dynamiken von Peptiden auf verschiedene Arten sinnvoll zu untersuchen und Konformationen lichtgesteuert zu kontrollieren.

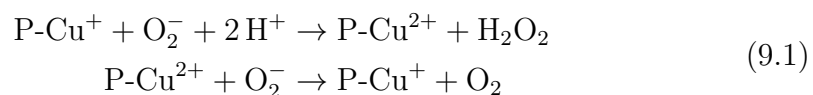
Teil II.

Lichtinduzierter Ladungstransfer in Kupferkomplexen

9. Kupferproteine – Redox-Katalysatoren der Biologie

Kupfer wird als Spurenelement vor allem von Pflanzen und niederen Lebewesen benötigt und befindet sich in aktiven Zentren von Proteinen. Die Grundlage für ihre biologische Funktionalität verdanken diese Kupferproteine der Fähigkeit des Kupfers, Elektronen abzugeben und wieder aufzunehmen. Dabei geht es bei der Oxidation von der einfach positiv geladenen Oxidationsstufe Cu(I) in die zweifach positiv geladene Oxidationsstufe Cu(II) über. Die Kupferionen werden dazu von der Proteinmatrix als Ligand im aktiven Zentrum komplexiert. Kupferproteine werden in drei Typen kategorisiert und übernehmen unterschiedliche Aufgaben, wie z.B.:

- **Sauerstofftransport:** Gliederfüßer und Weichtiere besitzen zum Transport von Sauerstoff das Protein Hämocyanin. Dabei handelt es sich um ein Typ-3 Kupferprotein. Charakteristisch für diesen Typ ist die Komplexierung zweier Kupferionen durch je drei Histidin-Reste. Im unbeladenen Zustand haben beide Kupferionen die Oxidationsstufe +1, das Protein ist farblos. Beim Beladen mit Sauerstoff wird dieser zunächst reduziert. Dabei geht jedes Kupferion in den +2-Zustand über und das Sauerstoffmolekül liegt zweifach negativ geladen vor, wodurch es von den Kupferzentren gebunden werden kann [HM95]. Die dabei entstehende blaue Farbe ist Namenspatron für das Hämocyanin.
- **Katalytischer Abbau reaktiver Spezies:** Die im menschlichen Körper vorkommende Superoxiddismutase (SOD) zählt zu den Typ-2 Kupferproteinen. Diese Klasse von Kupferproteinen zeichnet sich durch eine quadratisch-planare Ligan- dengeometrie aus. Die SOD kann in beiden Oxidationsstufen O_2^- katalytisch abbauen [Tai83]:



So schützt die SOD Zellen vor dem hochreaktiven und cytotoxischen Superoxid O_2^- . Kupfer dient hierbei als Redox-Katalysator.

- **Elektronentransfer bei der Photosynthese** Eine zentrale Rolle beim Elektronentransfer der pflanzlichen Photosynthese spielt das Plastocyanin. Dabei wird durch Absorption von Licht Wasser oxidiert und die frei werdenden Elektronen

am Ende einer Reaktionskette auf NADH^+ übertragen. Eines der Transferproteine ist das Plastocyanin. Eine detailliertere Darstellung der ablaufenden Prozesse geben Gorman und Levine [GL65]. Beim Plastocyanin wird das Kupferion im aktiven Zentrum durch zwei stark donierende Histidine und ein ebenfalls stark donierendes Cystein trigonal-planar komplexiert. Dazu kommt ein axiales Methionin. Aufgrund dieser Geometrie ist das Plastocyanin ein Typ-1 Kupferprotein.

Die einzelnen Typen der Cu-Proteine unterscheiden sich bezüglich der chemischen Zusammensetzung der Liganden und deren Geometrie. Vor allem die Geometrie der Liganden ist von Interesse. Sie weicht in vielen Fällen von der Anordnung ab, die man aufgrund der elektronischen Konfiguration des zentralen Kupferions erwarten würde [Zon07]. Dafür ist die um das aktive Metallzentrum liegende Proteinmatrix verantwortlich. Sie verzerrt die Geometrie, indem sie den Liganden bestimmte geometrische Randbedingungen vorgibt. Dabei verändert sich auch die Energiebarriere für den Redox-Prozess des komplexierten Metallions. Diese Zustände nennt man *entatische Zustände* oder *rack-induced-states*. Sie sind entscheidend für die Funktionalität (also den Elektronentransfer) der blauen Kupferproteine [Sol04].

Zum Verständnis der Rolle des entatischen Zustandes bei blauen Kupferproteinen wurden zahlreiche Modellsysteme entwickelt, die das aktive Zentrum nachbilden sollen. Eines dieser Modellsysteme sind Kupfer-Guanidinchinolin(Cu-GuaQu)-Komplexe [Hof14]. Sie werden im folgenden Kapitel charakterisiert, [Kapitel 11](#) zeigt und erklärt die zeitaufgelösten Messungen. Anschließend werden die Ergebnisse und daraus abgeleiteten Erkenntnisse in bestehende Modelle aus der Literatur eingeordnet (s. [Kapitel 12](#)).

10. Guanidinchinolin-Liganden – Modelle aktiver Zentren blauer Kupferproteine

Neben den in [Teil II](#) erwähnten Cu-Proteinen finden werden auch Cu-Komplexe untersucht. Es gibt Ansätze, sie als Katalysatoren für biochemische Reaktionen zu verwenden wie beispielsweise für die Phenylhydroxylierung [[Hof13](#)]. Weiterhin wird versucht, Cu-Komplexe mit langlebigen Triplettzuständen und hoher Konversionsrate von Singulett-Zuständen in Triplett-Zustände (engl.: *intersystem crossing*, kurz ISC) zu entwerfen. Sie sollen als kostengünstiger und leicht verfügbarer Ersatz für Rutheniumkomplexe in der Solartechnik dienen [[MFC15](#)].

Als Modellsysteme aktiver Cu-Zentren in Typ-I-Kupferproteinen wurden in der Gruppe von S. Herres-Pawlis sogenannte Kupfer-Guanidinchinolin-Komplexe (Cu-GuaQu-Komplexe) entworfen. Die chemische Synthese dieser Komplexe ist in [Sta14](#) beschrieben. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit mit unterschiedlichen, zeitaufgelösten Methoden studiert. Das Ziel ist, deren Reaktionsschemata durch Kombination verschiedener Methoden weitestmöglich aufzuklären. Es werden zwei verschiedene Liganden untersucht: das Tetramethylguanidinchinolin (TMG) und das Dimethylethylguanidinchinolin (DMEG) (s. [Abbildung 10.1](#)). Jeweils zwei dieser Liganden

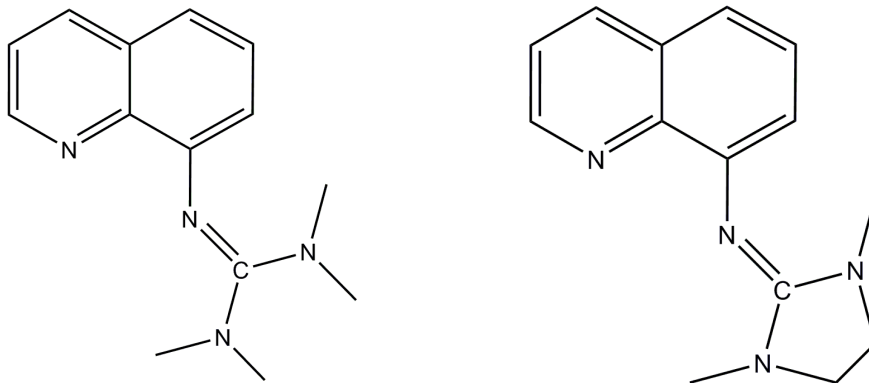


Abbildung 10.1.: TMG- und DMEG-Liganden:

Beim Dimethylethylguanidinchinolin (rechts) wurde im Vergleich zum Tetramethylguanidinchinolin (links) jeweils eine Methylgruppe an den Stickstoffatomen des Guanidins durch eine Ethylenbrücke ersetzt. Damit ist das DMEG flacher als das TMG, da die Rotationsfreiheit der Guanidin-Stickstoffatome eingeschränkt ist.

können ein Kupferion komplexieren. So entstehen die Komplexkationen $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ und $[\text{Cu}(\text{DMEG})_2]^+$ mit der Oxidationsstufe +1 des Kupfers und $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^{2+}$

sowie $[\text{Cu}(\text{DMEG})_2]^{2+}$ mit der Oxidationsstufe +2. Es wurde gezeigt, dass die Guanidinchinolinliganden geeignet sind, um die Umgebung des aktiven Zentrums von Typ-I-Kupferproteinen zu modellieren [Sta14, Hof14]. Sie sollen als Modellsysteme für Elektronentransferreaktionen vom Kupfer zum Liganden (engl.: *metal to ligand charge transfer*, kurz MLCT) im Rahmen dieser Arbeit zeitaufgelöst vermessen werden.

10.1. Ligandengeometrien der Cu-GuaQu-Komplexe und entatische Zustände

Die TMG-Komplexe wurden bereits detailliert charakterisiert [Hof14]. Dabei zeigte sich, dass sich die Geometrien der Ligandenanordnungen zwischen $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ und $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^{2+}$ deutlich unterscheiden. Für den Komplex mit Cu^+ würde man eine tetraedrische Ligandenumgebung (mit 90° -Winkel zwischen den durch die koordinierenden Stickstoffatome und das zentrale Kupferion aufgespannten Ebenen) und für denjenigen mit Cu^{2+} eine quadratisch-planare Ligandenumgebung (entsprechend wäre der Winkel hier 0°) erwarten. Man findet allerdings Winkelwerte von etwa 67° für Cu(I)- und 43° für Cu(II)-Komplexe. Die sterischen Wechselwirkungen der Liganden und die elektronische Konfiguration beeinflussen somit die Anordnung des aktiven Zentrums, es kommt wie bei blauen Kupferproteinen zu entatischen Zuständen. Sie beeinflussen die Redoxpotentiale der Kupferkomplexe, was [Abbildung 10.2](#) veranschaulicht. Für die Winkel zwischen den Ligandenebenen 90° für Cu(I) bzw. 0° für Cu(II), ist die Energiebarriere für den MLCT sehr groß (ΔE_0). Aufgrund der bereits in den Grundzuständen durch die Liganden verzerrten Geometrien wird diese Energiebarriere deutlich kleiner ($\Delta E_{\text{entatic}}$).

Beim MLCT-Übergang der GuaQu-Komplexe von Cu^+ zu Cu^{2+} kommt es zu einer Abflachung der Liganden zueinander, Hoffmann et al. [Hof14] haben gezeigt, dass sich dabei der Cu-N_{Gua} Abstand um $0,1 \text{ \AA}$ verkleinert. In dieser Studie wurde weiterhin durch Raman-Spektroskopie und zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie(DFT)-Simulationen gezeigt, dass es Vibrationsmoden gibt (Torsion der Liganden und Streckschwingung der Cu-N_{Gua} -Bindung), die bei beiden Oxidationsstufen optisch anregbar sind. Daraus schlossen Hoffmann et. al., dass beim Übergang von einer Ligandenstruktur in die andere die beiden Schwingungsmoden beteiligt sind und die Struktur des optisch angeregten MLCT-Zustands des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ derjenigen des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^{2+}$ -Grundzustandes ähnlich ist. Diese räumliche Umordnung aufgrund einer elektronischen Konfigurationsänderung nennt man *Jahn-Teller-Verzerrung* (s. [Abbildung 10.3](#)).

Der DMEG-Ligand ist planarer als der TMG-Ligand. Die Ethylenbrücke schränkt die Rotationsfreiheit der freien Guanidinstickstoffatome ein. So zeigt sich beim TMG-Liganden eine Verdrehung der Methylgruppen zur Chinolinebene von 33° . Sie liegt

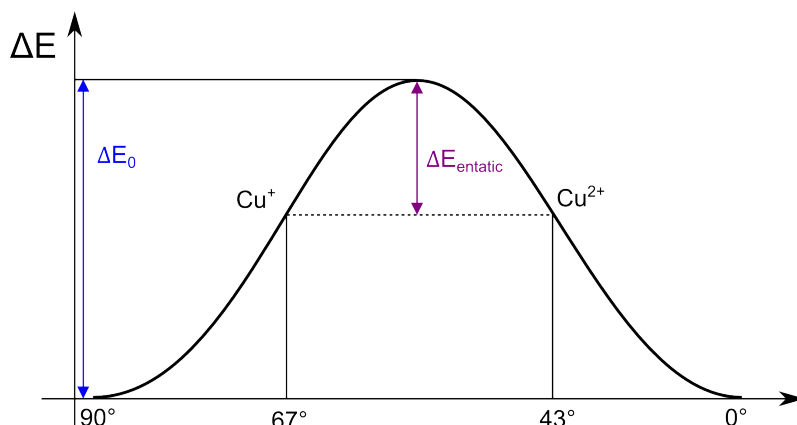


Abbildung 10.2.: Absenkung der Energiebarriere durch entatische Zustände:

Die Abbildung zeigt die Energiebarriere für den Ladungstransfer in Abhängigkeit vom Ligandenwinkel für Kupferkomplex-Redoxpaare (Cu(I) links, Cu(II) rechts). Je ähnlicher sich die Winkel zwischen den Ligandenebenen sind, desto kleiner ist die Energiebarriere, die beim MLCT überwunden werden muss. Grafik nach [Hof14].

beim DMEG-Liganden bei lediglich 10° bis 12° .

Somit sind die Cu-GuaQu-Komplexe geeignet, um entatische Zustände zu untersuchen und Rückschlüsse auf Cu-Proteine zu ziehen. Diese Arbeit soll durch zeitaufgelöste IR- und UV/Vis-Spektroskopie zusätzliche Informationen zur Rolle der entatischen Zustände beim lichtinduzierten MLCT der Cu(I)-Komplexe liefern. Dazu wird untersucht,

- welche Reaktionen nach der Photoanregung des MLCT stattfinden, welche Zustände eine Rolle spielen und auf welchen Zeitskalen diese Prozesse stattfinden,
- ob es eine Lösungsmittelabhängigkeit der beobachteten Prozesse gibt,
- ob eine Abhängigkeit der Anregungswellenlänge auftritt
- und welche Rolle unterschiedliche Liganden spielen.

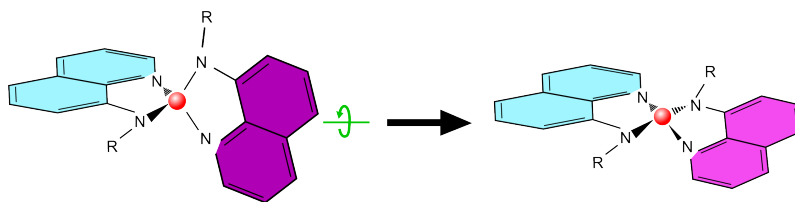


Abbildung 10.3.: Jahn-Teller-Verzerrung:

Kommt es aufgrund der elektronischen Konfiguration in einem Molekül zu einer Verzerrung der Geometrie, bezeichnet man das als Jahn-Teller-Effekt. Im Falle der Kupferkomplexe kommt es nach der optischen Anregung zu einer Abflachung der Winkel zwischen den Ligandenebenen. Der Guanidinrest wird hier als R bezeichnet.

10.2. Spektroskopische Charakterisierung der Cu-GuaQu-Komplexe

Eine Voraussetzung für die Untersuchung des MLCT durch sichtbare Anreg- und MIR- sowie UV/Vis-Abtast-Spektroskopie ist, dass sich die Cu(I)-Grundzustände von den transienten Cu(II)-MLCT-Zuständen spektral unterscheiden lassen. Da die transienten Cu(II)-MLCT-Zustände große Ähnlichkeit mit den Cu(II)-Grundzuständen haben, lässt sich anhand der stationären Absorptionsspektren der Cu(I)- und Cu(II)-Grundzustände abschätzen, welche Differenzsignale man bei den zeitaufgelösten Messungen erwartet. [Abbildung 10.4](#) zeigt die Absorptionsspektren beider Ligan-

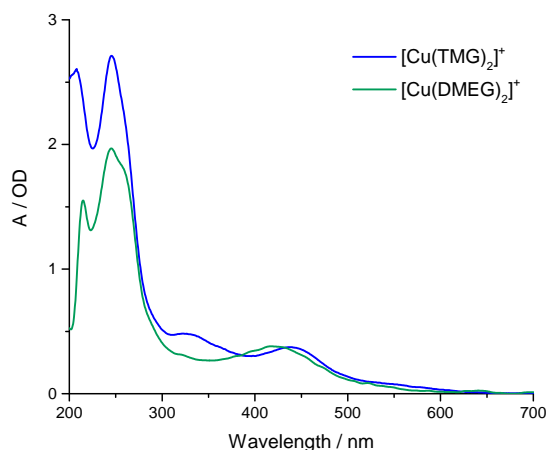


Abbildung 10.4: Absorptionsspektrum des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ und des $[\text{Cu}(\text{DMEG})_2]^+$ im sichtbaren Spektralbereich:

Die Absorptionsspektren wurden in einem UV/Vis-Spektrometer gemessen. Die Schichtdicke der Küvette betrug $500\ \mu\text{m}$, die Konzentration jeweils $1,6\ \text{mM}$.

den mit Cu(I)-Ionen im sichtbaren Bereich. Die starken Absorptionsbanden im UV-Bereich ($<300\ \text{nm}$) sind auf die direkte Absorption des Chinolin-Systems zurückzuführen und spielen für diese Arbeit keine Rolle. Beide Komplexe zeigen eine breitbandige, bei etwa $600\ \text{nm}$ beginnende Absorption im sichtbaren Spektralbereich. Beim TMG-Komplex findet man eine Absorptionsbande bei $448\ \text{nm}$ und eine weitere, kleinere Bande bei $332\ \text{nm}$. Im Fall des DMEG-Komplexes ist nur die langwellige Absorptionsbande ausgeprägt und gegenüber dem TMG-Komplex blauverschoben, sie liegt bei $419\ \text{nm}$. DFT-Rechnungen aus der Gruppe von Prof. Dr. Herres-Pawlis zeigen, dass es sich bei den Absorptionsbanden des TMG-Komplexes um die Anregung höherer Singulett-Zustände handelt. Bei einer Anregungswellenlänge von $400\ \text{nm}$ erreicht man den S_{14} -Zustand, bei $320\ \text{nm}$ den S_{19} -Zustand. Es kommt dabei zu einem $d\pi^*$ -Übergang vom Kupfer auf den Chinolinrest des Liganden.

Für Anreg-Abtast-Messungen mit sichtbarem Abtastimpuls kann ein Wellenlängenbereich von etwa $330\ \text{nm}$ - $720\ \text{nm}$ abgedeckt werden. In diesem Bereich zeigen sich spektrale Signaturen beim Übergang von Cu(I) nach Cu(II) (s. [Abbildung 10.5](#)). Die Cu(II)-Spektren zeigen für beide Liganden eine ausgeprägte Bande bei etwa $388\ \text{nm}$,

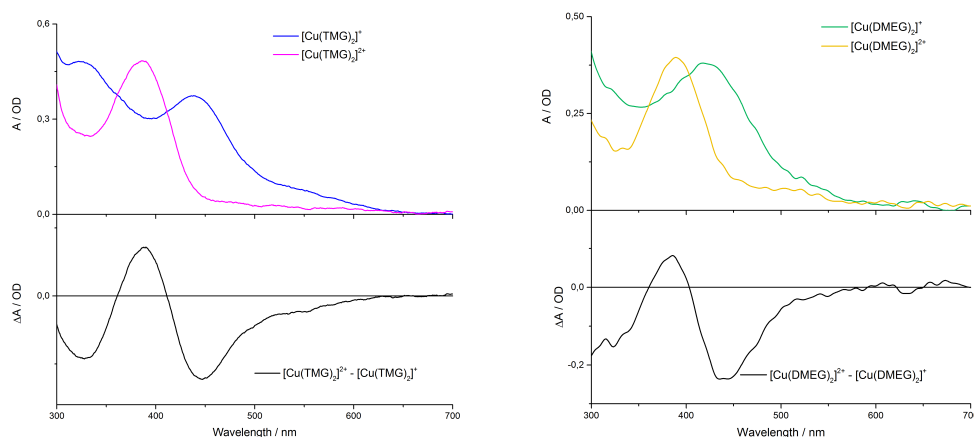


Abbildung 10.5.: Absorptionsspektren der TMG- (links) und DMEG-Komplexe (rechts) im sichtbaren Spektralbereich (oben) und deren Differenzspektren (unten):

Die Oxidation des zentralen Kupfers ändert die Absorptionsspektren grundlegend. Die in [Abbildung 10.4](#) erwähnten Absorptionsbanden der Cu(I)-Spezies verschwinden, es bildet sich bei beiden Komplexen eine Bande um 386 nm. Die Differenzspektren (unten) verdeutlicht diese Änderung der Absorptionsspektren.

die auch in den Differenzspektren (s. [Abbildung 10.5](#), unten) deutlich auftritt. Beim TMG-Komplex kommt es darüberhinaus bei einem Wechsel von Cu(I) nach Cu(II) zu Ausbleichsignaturen bei 447 nm und bei 328 nm. Für den DMEG-Komplex treten ähnliche Signaturen auf. Eine Bande liegt bei 440 nm. Im nahen UV Bereich zeigen sich spektrale Änderungen, aber keine definierte Bande. Beim TMG-Komplex zeigen sich oberhalb von 550 nm nur geringe, spektrale Änderungen beim Übergang von Cu(I) nach Cu(II). Beim DMEG-Komplex sind die spektralen Änderungen in diesem Wellenlängenbereich vernachlässigbar klein.

Diese Befunde legen nahe, dass die sichtbare Abtastung des MLCT-Prozesses Dynamiken aufzeigen kann, eine detaillierte, molekulare Interpretation allerdings nur begrenzt ermöglicht. Im infraroten Spektralbereich (s. [Abbildung 10.6](#)) gibt es jedoch eine Vielzahl von Banden, die eine molekulare Interpretation stützen können. Sowohl die DMEG- als auch die TMG-Komplexe zeigen in beiden Oxidationsstufen zahlreiche, scharfe Banden. Die im unteren Teil von [Abbildung 10.6](#) farbig hinterlegten Banden dienen zur Identifikation der jeweiligen Cu(II)-Spezies. Negative Banden im Differenzspektrum geben die Positionen an, wo Cu(I)-Spezies erhöhte Absorption aufweisen. Ein Vergleich der Spektren zeigt auch, dass es wenige Banden gibt, die sich bei der Änderung der Oxidationsstufe nicht ändern. Es ist zu erwarten, dass auch die transienten Differenzspektren eines MLCT-Überganges den cw-Differenzspektren sehr ähnlich sind. Beim TMG-Komplex ist die Bande des Cu(I)-Komplexes bei 1535 cm^{-1} besonders stark ausgeprägt. Banden, die nach der Subtraktion des Cu(I)-Spektrums deutlich hervortreten sind: eine breite Bande um 1632 cm^{-1} , bei der das Cu(I) eine sehr geringe Absorption aufweist, eine scharfe Bande bei 1406 cm^{-1} , eine Doppelbande bei 1505 cm^{-1} und 1519 cm^{-1} , eine breite Bande um 1580 cm^{-1} und eine Bande bei

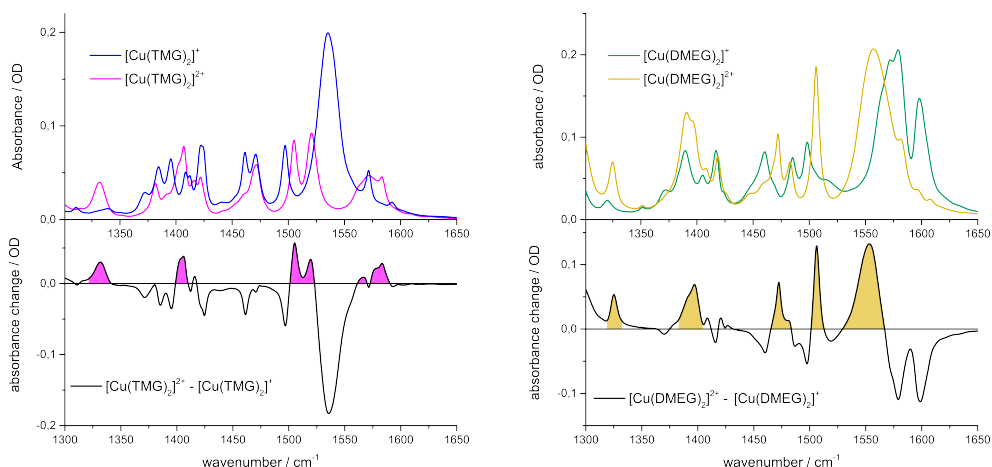


Abbildung 10.6.: FTIR-Spektren der TMG- (links) und DMG-Komplexe (rechts):

Es wurde bei einer Konzentration von 5 mM in Dichlormethan (DCM) in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 200 μm gemessen. Alle Spektren sind lösungsmittelkorrigiert. Oben sind jeweils die Absolutspektren für beide Oxidationsstufen der Kupferionen gezeigt, in den unteren Teilen sind die Differenzspektren zu sehen. Farbig hinterlegt sind die Markerbanden der Cu(II)-Spezies.

1330 cm^{-1} . Beim DMEG-Komplex sind die Cu(II)-Markerbanden noch ausgeprägter. Damit ist der mittelinfrarote Spektralbereich hervorragend geeignet, um transiente Zustände zuweisen zu können. Messungen mit sichtbaren Abtastimpulsen sind zwar diesbezüglich weniger aussagekräftig, zeigen aber aufgrund der kürzeren Impulse eine bessere Zeitauflösung. Die beiden Messmethoden sollen kombiniert werden, um möglichst tiefe Einblicke in das Verhalten der Cu-Komplexe nach optischer Anregung zu erhalten.

Bei den Messungen wurde jeweils die Cu(I)-Spezies angeregt und der MLCT und der damit verbundene Übergang zu einem transienten Cu(II)-Zustand untersucht. Dabei wurden Infrarot-Abtastmessungen für beide TMG- und DMEG-Komplexe in DCM und eine Messung des TMG-Komplexes in ACN durchgeführt. Um eine Abhängigkeit der Anregungswellenlänge zu ermitteln, folgten die Messungen mit Abtastimpuls im sichtbaren Spektralbereich in DCM bei 400 nm und 320 nm Anregungswellenlänge. Da sich keine deutliche Wellenlängenabhängigkeit zeigte, wurde für die Messungen in Acetonitril (ACN) nur bei 400 nm angeregt.

11. Zeitaufgelöste Messungen an Kupfer-GuaQu-Komplexen

Dieses Kapitel erläutert zunächst die Messapparaturen sowie die gewählten Parameter ([Abschnitt 11.1](#)) und stellt im Anschluss die gemessenen Daten vor ([Abschnitt 11.2](#)). Für alle Messungen müssen die Proben mit besonderer Vorsicht behandelt werden: Die Cu(I)-Spezies können in der Gegenwart von Wasser und Luft sehr leicht oxidiert werden, was zu verfälschten Messergebnissen führen kann. Daher werden die Proben unter Schutzgasatmosphäre in mit Septen verschließbare Braunglasfläschchen gefüllt. Während der Messung wird die Probe so umgepumpt, dass für jeden Abtastimpuls frisches Probenvolumen zur Verfügung steht. Zusätzlich wird die Probe ständig an ein mit Stickstoff gefülltes Ausgleichsvolumen angeschlossen, um Sauerstoff- und Wassereintrag minimal zu halten.

Die Lösungsmittel wurden nach Literaturverfahren über Calciumhydrid getrocknet und unter Stickstoffatmosphäre destilliert [[LLP96](#)].

11.1. Anreg-Abtast-Anlagen für Messungen im sichtbaren und mittelinfraroten Spektralbereich

Die Erzeugung der Mittelinfrarot-Abtastimpulse ist in [Abschnitt 6.1](#) erklärt. Da aufgrund der FTIR-Spektren (s. [Abbildung 10.6](#)) Banden im Bereich von 1300 cm^{-1} bis 1650 cm^{-1} erwartet werden, müssen Bereiche um vier Zentralwellenlängen (1550 cm^{-1} , 1470 cm^{-1} , 1388 cm^{-1} und 1325 cm^{-1}) vermessen werden.

Im Fall der Kupferproteine soll ein Zeitbereich von wenigen Piko- bis etwa 3 Nanosekunden abgedeckt werden. Deshalb verwendet man Anregungsimpulse des fs-Ti:Sa-Systems, welche über eine mechanische Verzögerungsstrecke geschickt und danach frequenzverdoppelt werden (s. [Abbildung 6.1](#), violetter Bereich, Mitte). Anschließend werden die so erzeugten Anregungsimpulse bei 400 nm durch eine $\lambda/2$ -Platte und einen Polarisator in den magischen Winkel zu den MIR-Abfragimpulsen gedreht, um Rotationsdynamiken der Kupferkomplexe in den Messdaten zu vermeiden. Zur Unterdrückung von Mehrphotonenprozessen werden die Anregungsimpulse durch einen Quarzglasblock ($l = 20\text{ cm}$) dispersiv in der Pulsdauer verlängert ($\tau \approx 1,5\text{ ps}$). Danach werden die Anregungsimpulse mit einer Linse ($f = 300\text{ mm}$) auf die Probe fokussiert (Bündelradius am Probenort $100\text{ }\mu\text{m}$). Die Schichtdicke der Durchflussküvette beträgt $200\text{ }\mu\text{m}$ und die Konzentration der Probe 4 mM . Die Anregungsenergie wird mit der $\lambda/2$ -Platte auf 500 nJ eingestellt, was einer Anregung von etwa 1% der

Moleküle entspricht. Bei Anregungsenergien oberhalb von $1 \mu\text{J}$ zeigt sich bereits ein nichtlinearer Signalanstieg. Vor und nach jeder der zeitaufgelösten Messungen wird jeweils ein FTIR- und ein UV/Vis-Spektrum genommen, um den Oxidationsstatus der Probe zu überprüfen. Für jeden Wellenlängenbereich wird frische Probe verwendet.

Der Aufbau für die Abtastmessungen im sichtbaren Spektralbereich ist in [Her08](#) beschrieben. Für die Anregung bei 400 nm wird ebenfalls die zweite Harmonische des fs-Ti:Sa-Systems verwendet. Die Anregungsimpulse bei 320 nm werden über einen zweistufigen NOPA mit anschließender Frequenzverdopplung erzeugt. Die Zeitauflösung der Anlage beträgt etwa 200 fs .

Gemessen wird in einer Durchflussküvette mit $500 \mu\text{m}$ Schichtdicke (QS, Hellma Analytics) und bei einer Konzentration von $1,6 \text{ mM}$. Die Anregungsenergien betragen 300 nJ bis 500 nJ . Wie bei den MIR-Messungen wird in der *magic angle*-Geometrie gemessen.

11.2. Ergebnisse der Messungen

Alle in diesem Abschnitt gezeigten Messungen an Cu-Komplexen wurden im Lösungsmittel DCM durchgeführt.

11.2.1. Infrarotmessungen

Die Infrarotdaten sind in [Abbildung 11.1](#) als Konturplot gezeigt.

Beim TMG-Komplex ist das Ausbleichen der Cu(I)-Grundzustandsbanden (blau, dunkelgrün) bei 1536 cm^{-1} , 1497 cm^{-1} , 1462 cm^{-1} und 1425 cm^{-1} deutlich ausgeprägt. Zudem sind die positiven Banden (gelb, rot) bei 1329 cm^{-1} und 1404 cm^{-1} , die für das Auftreten eines Cu(II)-Zustandes sprechen, schon in der ersten Pikosekunde der Messung sichtbar. Die beiden Doppelbanden bei (1504 cm^{-1} , 1519 cm^{-1}) und (1565 cm^{-1} , 1578 cm^{-1}) deuten sich zwar schon unmittelbar nach der Anregung an, differenzieren sich aber erst nach etwa 10 ps aus. Nach einigen hundert Pikosekunden haben sich die Ausbleichsbanden wieder erholt und die Cu(II)-Banden sind zerfallen. Zum Ende der Messzeit findet man praktisch keine wohldefinierten Absorptionsänderungen. Anhand der wenigen, noch verbleibenden Banden kann abgeschätzt werden, dass am Ende der Messzeit fast alle angeregten Moleküle ($>95\%$) bereits in den Grundzustand zurückgekehrt sind.

Ähnliche Phänomene lassen sich beim DMEG-Komplex beobachten. Hier sind die Ausbleichsbanden des Cu(I)-Grundzustandes bei 1459 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} sofort erkennbar. Im Bereich der Cu(II)-Banden zeigen sich Banden bei 1546 cm^{-1} , 1506 cm^{-1} , 1470 cm^{-1} , 1396 cm^{-1} und 1326 cm^{-1} . Ebenso wie beim TMG-Komplex lässt sich für den DMEG-Komplex eine Veränderung des Bandenmusters im Bereich von 10 ps beobachten. So engt sich die Bande um 1545 cm^{-1} spektral ein, die Bande bei 1506 cm^{-1} entsteht erst auf dieser Zeitskala. Die Bandenlagen für $\tau_D > 10\text{ ps}$ stimmen sehr gut mit denen der FTIR-Differenzspektren (s. [Abbildung 11.1](#), unten) überein.

[Abbildung 11.2](#) gibt detaillierte Informationen über die Absorptionsänderungen beider Proben. Teile **a** und **d** zeigen für beide Komplexe jeweils transiente Spektren zu bestimmten Verzögerungszeiten. Die DADS für eine globale Anpassung (s. [Abschnitt 6.3](#), [Gleichung 6.1](#)) mit drei freien Zerfallszeiten sind in den Teilen **b** und **e** gezeigt. In den Teilen **c** und **f** finden sich Zeitverläufe für ausgewählte Wellenzahlen. Die Zeitverläufe des TMG-Komplexes ([Abbildung 11.2](#), **c**) zeigen, dass die Daten mit einer Summe aus drei exponentiellen Zerfällen gut beschreibbar sind. Der Zeitverlauf bei 1332 cm^{-1} zeigt im wesentlichen nur eine Amplitude für $\tau_3 = 240\text{ ps}$. Bei 1376 cm^{-1} verschwindet die Amplitude dieser langen Zeitkonstanten, dafür sind Dynamiken mit Zeitkonstanten von 13 ps und 3 ps sichtbar. Die Zeitkonstante von 3 ps liegt nahe bei der Zeitauflösung der Anlage (etwa 1,5 ps), weshalb sie mit einem gewissen Fehler behaftet ist. Der Zeitverlauf bei 1545 cm^{-1} beinhaltet alle drei Dynamiken. Das legt nahe, dass bei den Zerfällen verschiedene Zwischenzustände

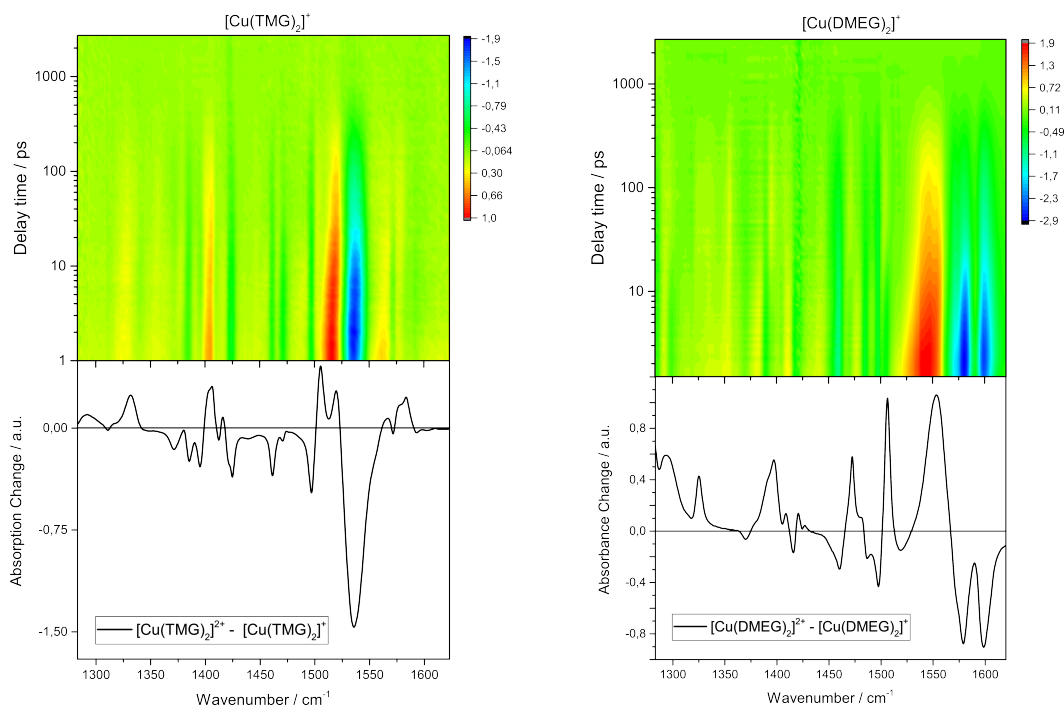


Abbildung 11.1.: Absorptionsänderungen als Funktion der Wellenzahl und Verzögerungszeit der MIR-Daten des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ (links) und des $[\text{Cu}(\text{DMEG})_2]^+$ (rechts) in DCM:

Oben: zeit- und wellenzahlauflösten Absorptionsänderungen der IR-Messungen. Zum Vergleich der Banden sind unten jeweils die Differenzspektren der stationären FTIR-Spektren zwischen den Cu(I)- und Cu(II)-Spezies gezeigt.

involviert sind.

Einen tieferen Einblick in die spektralen Verschiebungen gewähren die DADS ([Abbildung 11.2](#), Mitte links). Sie können herangezogen werden, um die gemessenen Dynamiken mit molekularen Prozessen zu assoziieren.

Diskussion der DADS des TMG-Komplexes

Das DADS zu $\tau_3 = 240$ ps (s. [Abbildung 11.2](#), **b**) zeigt eine sehr große Ähnlichkeit mit dem FTIR-Differenzspektrum von $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^{2+}$ und $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$, welches schwarz gestrichelt in [Abbildung 11.2](#) zum DADS eingezeichnet ist. Die für die Cu(I)-Spezies charakteristischen Banden regenerieren sich und die Cu(II)-spezifischen Banden zerfallen. Damit ist dieser Prozess als Übergang einer Cu(II)-Spezies in eine Cu(I)-Spezies zu deuten. Die spektralen Unterschiede lassen sich dadurch erklären, dass im transienten Cu(II)-Zustand nach dem Ladungstransfer eine negative Ladung auf dem Chinolinsystem verteilt ist, was beim $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^{2+}$ nicht der Fall ist.

Zum DADS zu $\tau_2 = 13$ ps ist das inverse $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ -Spektrum entsprechend skaliert eingezeichnet (schwarz, gepunktet). Es fällt auf, dass zu jeder wiederkehrenden

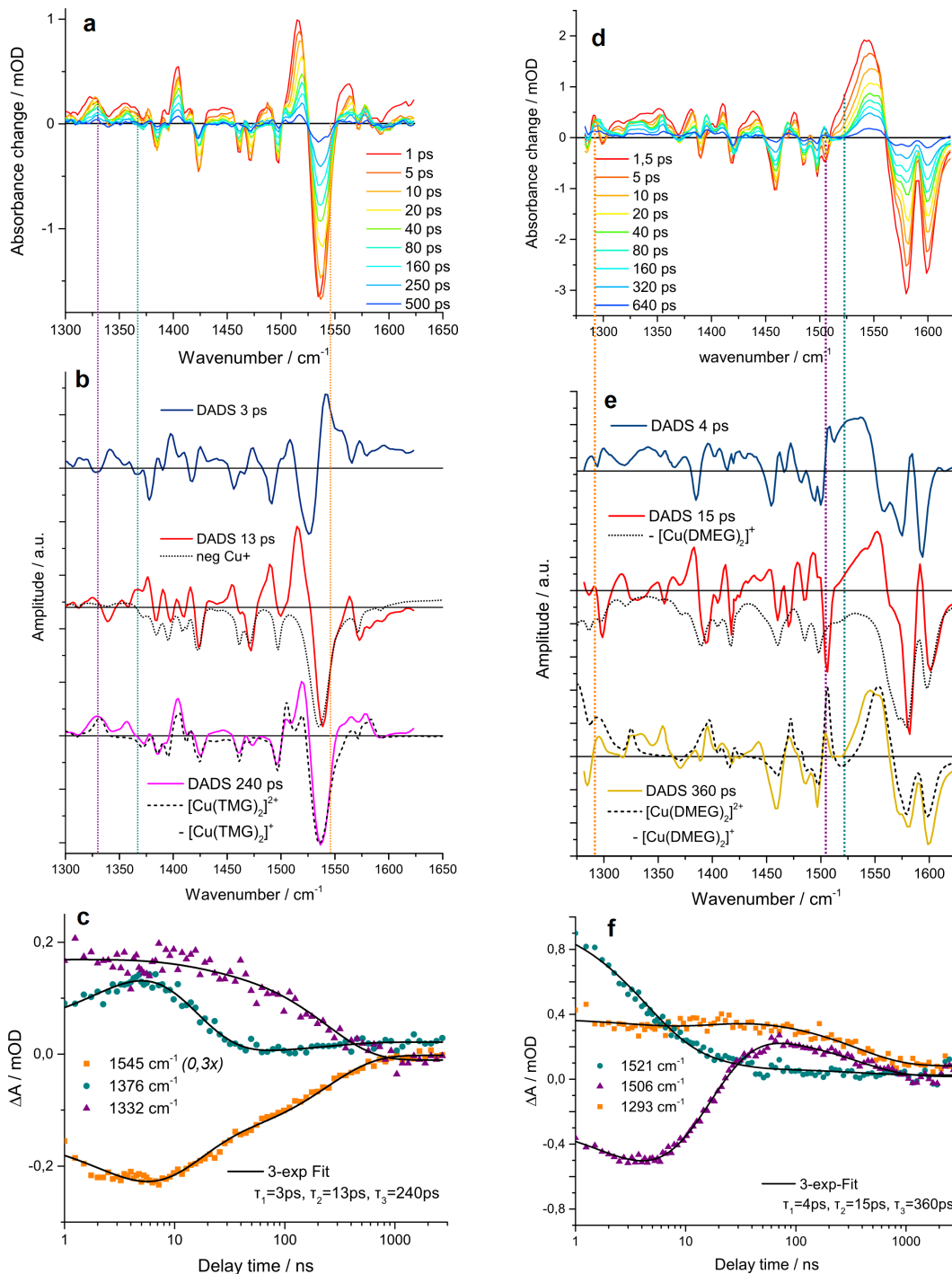


Abbildung 11.2.: Transiente MIR-Daten des [Cu(TMGG)₂]⁺ (links) und des [Cu(DMEG)₂]⁺ (rechts)

Im oberen Teil (**a** und **d**) sind jeweils transiente Spektren zu verschiedenen Verzögerungszeiten geplottet. In den Teilen **b** und **e** sind die DADS zu den aus der globalen Anpassung ermittelten Zerfallszeiten gezeigt. Sie ermöglichen eine molekulare Interpretation derjenigen Zustände, die den Zerfällen zugrunde liegen. In den Teilen **c** und **f** finden sich ausgewählte Zeitverläufe für bestimmte Wellenzahlen (gestrichelte, vertikale Linien). Die Anpassungskurven mit den Zeitkonstanten aus der globalen Anpassung sind in den Zeitverläufen eingezeichnet. Die Zeitverläufe zeigen, dass sich die Daten mit drei Zerfallszeiten gut beschreiben lassen.

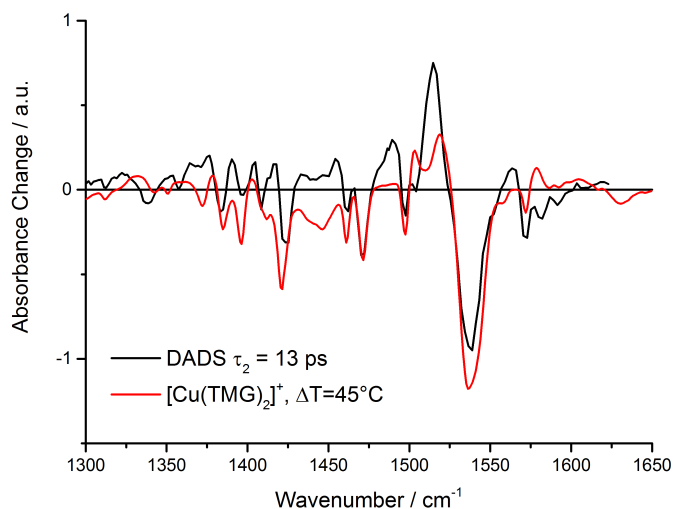


Abbildung 11.3: DADS zu τ_2 (schwarz) und Temperatur-Differenzspektrum des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ für $\Delta T = 45^\circ\text{C}$ (rot) in DCM: Die Positionen der Banden bei beiden Spektren stimmen sehr gut überein. Die unterschiedlichen Amplitudenverhältnisse zwischen den Spektren sind durch die verschiedene Temperaturdifferenz erklärbar. Die Temperatur heißer Grundzustände kann umgerechnet mehrere hundert Grad Celcius betragen. Daher können die Spektren aufgrund verschiedener Anregungszustände Unterschiede zeigen.

Cu(I)-Bande (negative Amplitude) eine dazu rotverschobene Bande zerfällt. Dieser Befund legt nahe, dass es sich bei diesem Prozess um das Kühlen eines heißen Grundzustandes handelt. Das ist ein elektronischer Grundzustand, der schwingungsmäßig angeregt ist. Aufgrund der Anharmonizität des Bindungspotentials werden die Energieabstände der Schwingungsniveaus für höhere Anregungszustände immer geringer. Das bringt eine Rotverschiebung jeder Schwingungsbande des Grundzustandes mit sich, wie es beim DADS zu τ_2 der Fall ist. Die beobachtete Zerfallszeit von 13 ps deckt sich gut mit Kühlzeiten, die in verschiedenen molekularen Systemen beobachtet wurden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden temperaturabhängige, stationäre IR-Spektren des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ gemessen. [Abbildung 11.3](#) zeigt das DADS zu τ_2 und zum Vergleich das Differenzspektrum des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ zwischen -20°C und $+25^\circ\text{C}$. Die Bandenpositionen stimmen gut überein, was nahe legt, dass es sich beim Prozess zu τ_2 um das Kühlen eines heißen Grundzustandes handelt.

Viele der Banden des heißen Grundzustandes, die wie eben gezeigt mit τ_2 zerfallen, finden sich auch im DADS zu $\tau_1 = 3$ ps, allerdings mit umgekehrter Amplitude. Das kann als Indiz dafür gedeutet werden, dass dieser Prozess mit der Bildung des heißen Grundzustandes assoziiert werden kann. Eine genaue Zuweisung dieses Prozesses ist an dieser Stelle noch nicht möglich und wird im nachfolgenden Abschnitt gegeben. Für den DMEG-Komplex ist die Zuweisung der Zustände sowohl in Vorgehen als auch Ergebnis analog, weshalb hier auf die Diskussion verzichtet wird. Der einzige, signifikante Unterschied ist die Lebensdauer des Cu(II)-Zustandes, die mit 360 ps 1,5 mal so groß ist wie beim TMG-Komplex.

Interpretation der Ergebnisse aus den IR-Messungen

Anhand der Bandenpositionen lassen sich sowohl der heiße Grundzustand als auch der langlebige Zustand mit einer Cu(II)-Geometrie eindeutig zuweisen. Da das DADS

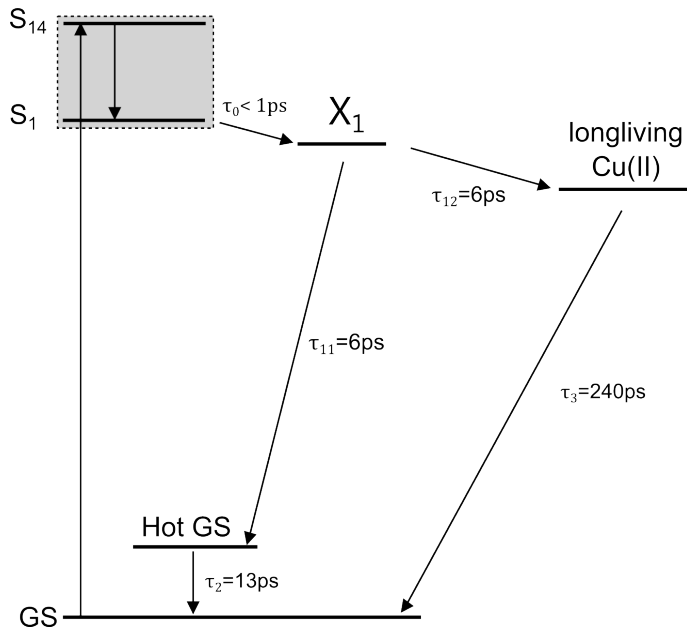


Abbildung 11.4: Reaktionsmodell der Cu-GuaQu-Komplexe aufgrund der IR-Messungen:

Nach der Photoanregung in den S_{14} -Zustand kommt es zu Prozessen jenseits der Zeitauflösung der Infrarotapparatur ($< 1 \text{ ps}$), die in einem Zustand X_1 enden. Von X_1 kommt es zu einer Verzweigung mit τ_{12} in den langlebigen Cu(II)-Zustand, der mit $\tau_3 = 240 \text{ ps}$ in den Grundzustand (GS) zerfällt. Ein zweiter Kanal aus X_1 führt mit τ_{11} in den heißen Grundzustand, der mit τ_2 kühlt und ebenfalls in den GS führt.

des langlebigen Zustands zu τ_3 spektral nahezu identisch mit dem Differenzspektrum von Cu(II)- und Cu(I)-Komplex ist, muss es sich dabei um einen Übergang von einem Zustand mit Cu(II)-Ligandengeometrie zu einem Cu(I)-Zustand handeln. Deshalb wird dieser Übergang als LMCT vom langlebigen, abgeflachten Cu(II)-Zustand in den Cu(I)-Grundzustand interpretiert.

Beim Zerfall des heißen Grundzustandes mit $\tau_2 = 13 \text{ ps}$ sieht man keine Banden, die auf Cu(II)-Spezies schließen lassen, es kommt lediglich zu einer Erholung der Cu(I)-Banden und zu einem Ausbleichen derjenigen Banden, die rotverschoben neben jeder Cu(I)-Bande liegen und somit deutlich für einen heißen Grundzustand sprechen. Damit muss dieser Zustand eine Cu(I)-Ligandengeometrie aufweisen, er ist lediglich schwingungsmäßig angeregt. Da dieser Prozess eine wesentlich kleinere Zerfallszeit aufweist, als der Prozess zu τ_3 und bezogen auf die Ausbleichsbande des Cu(I) bei 1536 cm^{-1} etwa genauso viel Amplitude aufweist, kann der Prozess zu τ_2 nicht nach dem Prozess mit τ_3 ablaufen. Es muss demnach eine Verzweigung geben. Die Summe der beiden Einzelraten sollte dabei $1/\tau_1$ ergeben. Da die Amplitudenverhältnisse des Kühlens des heißen Grundzustandes und der Cu(II)-Zerfalls etwa gleich groß sind, müssen auch die Zerfallszeiten der einzelnen Kanäle (τ_{11} und τ_{12}) etwa gleich groß sein. Damit lässt sich ein erstes Modell aufstellen, dass [Abbildung 11.4](#) zeigt. Für dieses Modell ist es möglich, durch eine Linearkombination der DADS die Spektren zu berechnen, die den jeweiligen Zuständen zuzuordnen sind (*species associated*

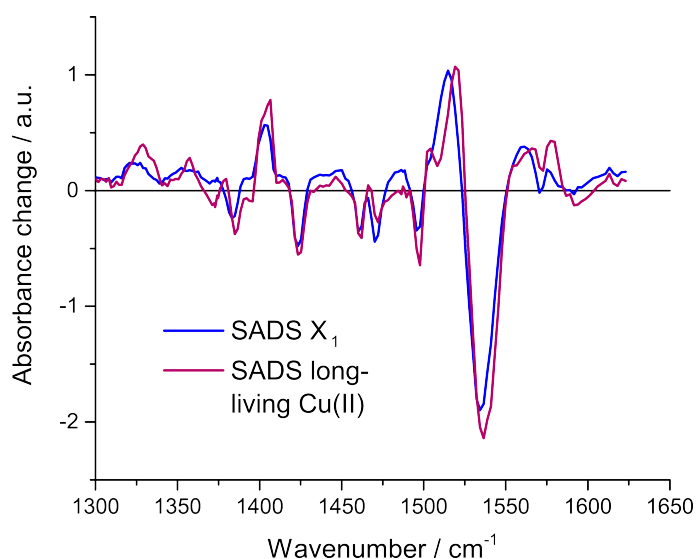


Abbildung 11.5: Vergleich der SADS von X_1 und des langlebigen Cu(II)-Zustandes:

Das SADS von X_1 zeigt eine sehr große Ähnlichkeit zum SADS der langlebigen Cu(II)-Spezies. Deutliche Unterschiede zeigen sich im Bereich der Cu(I)-Ausbleichsbände bei 1530 cm^{-1} , in der Doppelbande um 1575 cm^{-1} und bei der Cu(II)-Bande um 1330 cm^{-1} .

difference spectra oder kurz SADS). Damit soll das Wesen des bisher noch nicht zugeordneten X_1 -Zustandes aufgeklärt werden. [Abbildung 11.5](#) zeigt sowohl für den X_1 -Zustand als auch für den langlebigen Cu(II)-Zustand die SADS. Es ist eine hohe Ähnlichkeit der Spektren zu erkennen, was darauf hindeutet, dass der Zustand X_1 starken Cu(II)-Charakter aufweist. Da es kleine aber signifikante Unterschiede in den Spektren gibt, liegt nahe, dass die Ligandengeometrie des X_1 -Zustandes derjenigen des Cu(II)-Zustandes sehr ähnlich ist, sich beim Übergang aber geringfügig ändert. Eine Ligandenabhängigkeit manifestiert sich ausschließlich in der Lebensdauer des langlebigen Cu(II)-ähnlichen Zustandes. Der DMEG-Ligand verlängert dessen Lebensdauer um einen Faktor 1,5 (s. [Abbildung 11.7](#)). Ansonsten ist die Zuweisung der Zustände identisch zu der hier präsentierten Darstellung des TMG-Komplexes.

11.2.2. UV/Vis-Messung

Aufgrund der hohen spektralen Ähnlichkeit der TMG- und DMEG-Komplexe im sichtbaren Spektralbereich wird beispielhaft nur die Messung des TMG-Komplexes in DCM behandelt. [Abbildung 11.6](#) zeigt die transienten Spektren (**a**) sowie die DADS (**b**) und für das später diskutierte Modell berechnete Spektren der transienten Zustände (**d,e**). Die transienten Spektren ([Abbildung 11.6, a](#)) zeigen zunächst ein Ausbleichen der Cu(I)-Bande bei 448 nm und ein Entstehen der Cu(II)-Bande bei 385 nm . Aus den stationären Spektren erwartet man derartige Signaturen bei einem Übergang von Cu(I) nach Cu(II) (vgl. [Abbildung 10.5](#)). Zusätzlich zeigen sich der Zerfall einer sehr breiten Absorptionsbande von etwa 550 nm bis zum rotwelligen Ende des Spektrums und zu frühen Zeiten eine Dynamik im Bereich von etwa 475 nm bis 550 nm . Die breite Absorptionzunahme mit einem Maximum bei 680 nm stimmt mit dem Absorptionsspektrum des Radikalanions des Chinolins überein [[Cha68](#)].

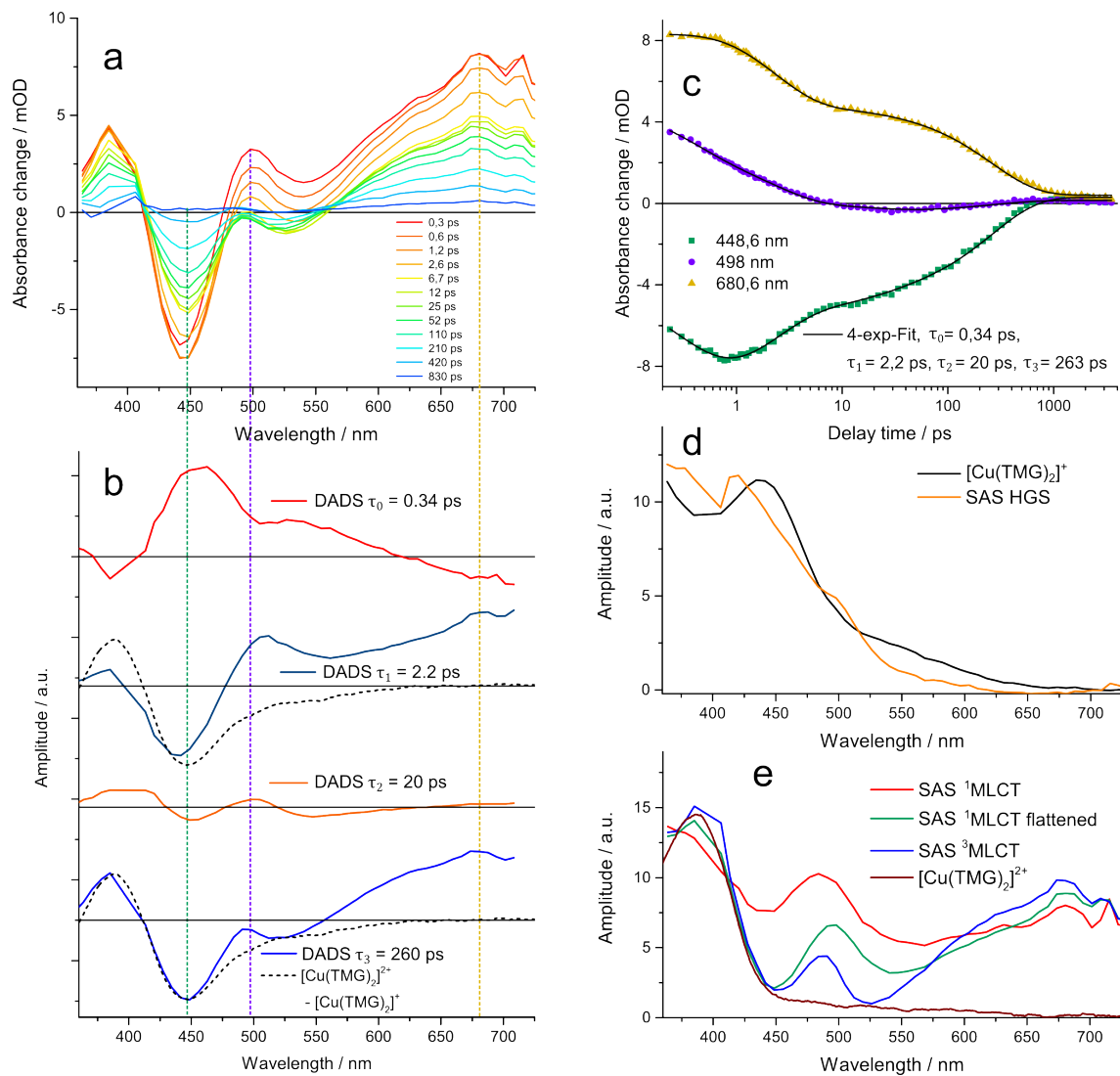


Abbildung 11.6.: Daten und Auswertungsansätze der UV/Vis-Abtastmessung des Cu(I)-TMG-Komplexes:

Teil **a** zeigt transiente Spektren zu ausgewählten Verzögerungszeiten, Teil **b** die DADS zu den aus der globalen Anpassung erhaltenen Zeitkonstanten. Das stationäre Differenzspektrum zwischen Cu(II) und Cu(I) ist gestrichelt eingezeichnet. Zeitverläufe zu bestimmten Wellenlängen sind Teil **c** zu entnehmen; die gestrichelten Linien zeigen die Bandenpositionen in den transienten Spektren und DADS. Graphen **d** und **e** zeigen die *species associated spectra* (SAS) zum Modell in [Abbildung 11.8](#).

Aufgrund der besseren Zeitauflösung der UV/Vis-Anlage musste für die exponentiellen Anpassungen eine zusätzliche Zeit im Subpikosekundenbereich gewählt werden. [Abbildung 11.6, c](#) zeigt drei Zeitverläufe mit Anpassungskurven für vier exponentielle Zerfälle. Dabei ergeben sich Zeiten von $\tau_0 = 0,34$ ps, $\tau_1 = 2,2$ ps, $\tau_2 = 20$ ps und $\tau_3 = 263$ ps. Im Gegensatz zu den Zeitverläufen aus den Infrarotmessungen sind die Zeitverläufe spektral weniger entkoppelt. Die DADS zu den Zerfallszeiten sind in ([Abbildung 11.6, b](#)) gezeigt. Der längste Prozess mit einer Zerfallszeit von $\tau_3 = 263$ ps zeigt spektrale Signaturen eines Zerfalls von Cu(II) und der Wiederherstellung der Cu(I)-Spezies. Als gestrichelte Kurve ist in [Abbildung 11.6, b](#) das cw-Differenzspektrum der Komplexe beider Oxidationsstufen eingezeichnet. Das DADS stimmt mit dem cw-Differenzspektrum für $\lambda < 475$ nm gut überein. Hinzu kommt ein breiter Zerfall im rotwelligen Spektralbereich mit einem Maximum bei 680 nm und eine Abweichung um 500 nm.

Das DADS zu $\tau_2 = 20$ ps hat nur geringe Amplitude. Man erkennt Absorptionsabnahmen um 500 nm und um 400 nm. Es bildet sich dabei eine Bande bei 448 nm und eine weitere, breite Bande um 547 nm aus. Die Bande bei 448 nm liegt spektral an der Position der Cu(I)-Grundzustandsbande des cw-Spektrums.

Das DADS zum Zerfallsprozess mit $\tau_1 = 2,2$ ps zeigt große spektrale Ähnlichkeiten mit dem DADS des Zerfallsprozesses zu τ_3 . Analog zum DADS zu τ_3 zerfällt eine Bande im Bereich der Cu(II)-Absorption bei 385 nm und es bildet sich eine Bande bei 438 nm, die relativ zur Cu(I)-Bande leicht rotverschoben ist. Ebenso ist der Zerfall einer breiten Absorption im rotwelligen Bereich zu verzeichnen, deren Maximum bei 680 nm liegt.

Das DADS zu $\tau_0 = 0,34$ ps zeigt Zerfälle für eine Bande, die mit einem Maximum bei 460 nm leicht rotverschoben und verbreitert gegenüber der Grundzustandsbande des Cu(I) liegt und für eine weniger intensive, spektral breite Schulter bei etwa 525 nm. Leichte Absorptionszunahmen zeigen sich im Bereich der Cu(II)-Bande bei 385 nm und im rotwelligen Bereich jenseits von 625 nm.

Liganden- und Lösungsmittelabhängigkeit

Die Zeitkonstanten aller durchgeführten Messungen werden in [Abbildung 11.7](#) zusammengefasst. Eine Abhängigkeit der untersuchten Prozesse von der Anregungswellenlänge kann bei den Messungen nicht beobachtet werden.

Bezüglich der Ligandenabhängigkeit stellt man eine Verlängerung der Lebensdauer des langlebigen Cu(II)-Zustandes beim DMEG-Liganden gegenüber dem TMG-Liganden um einen Faktor 1,5 fest. Sonst fallen im Rahmen der Messgenauigkeit keine Unterschiede auf.

Weiterhin sind die Zerfallszeiten des langlebigen Cu(II)-Zustandes lösungsmittelabhängig. In ACN zerfallen diese Zustände doppelt so schnell, wie in DCM.

	TMG		DMEG	
	DCM	ACN	DCM	ACN
IR	@ 400nm Zeiten: 3,7 ps 12,7 ps 241 ps	@ 400nm Zeiten: 3,6 ps 11 ps 120 ps	@ 400nm Zeiten: 3,7 ps 15 ps 360 ps	
UV/ Vis	@ 400nm Zeiten: 0,35 ps 2,2 ps 20 ps 263 ps	@ 400nm Zeiten: (0,2 ps) 1,4 ps 10,5 ps 117 ps	@ 400nm Zeiten: 0,43 2,5 ps 14 ps 409 ps	@ 400nm Zeiten: 0,3 ps 1,3 ps 23 ps 178 ps
	@ 320nm Zeiten: 0,37 ps 2,1 ps 17 ps 243 ps		@ 320nm Zeiten: 0,37 ps 3,1 ps 25 ps 382 ps	

Abbildung 11.7.: Ergebnisse aller am BMO durchgeführten Messungen:

Die durch die globale Anpassung ermittelten Zeitkonstanten sind aufgezeigt. Die einzigen signifikanten Unterschiede liegen bei den Zerfallszeiten der langlebigen Cu(II)-Zustände (violett) vor. Eine Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge ist nicht beobachtbar.

Diskussion der UV/Vis-Daten

Die hohe Ähnlichkeit des DADS zur langen Zeitkonstanten τ_3 mit dem Differenzspektrum der Komplexe beider Oxidationsstufen in Kombination mit dem Zerfall der breiten Chinolinradikalbande bei 680 nm [Cha68] legen nahe, dass es bei diesem Prozess zu einem LMCT kommt. Das Kupferion wird reduziert und der Ligand oxidiert. Der Komplex relaxiert wieder in den Grundzustand.

Die Signaturen des DADS zu $\tau_2 = 20$ ps gleichen einer spektralen Einengung einer verbreiterten Cu(I)-Bande. Dieses Verhalten ist charakteristisch für das Kühlen heißer Grundzustände [PPK01]. Damit deckt sich die Interpretation dieses Zerfallsprozesses mit dem Modell der Infrarotdaten. Die Zeitkonstante unterscheidet sich von derjenigen, die durch die IR-Messungen bestimmt wurde. Aufgrund der geringen Amplitude und der dadurch reduzierten Präzision bei der UV/Vis-Messung kann man die beiden Zeitkonstanten innerhalb des Fehlers als identisch betrachten. Aufgrund der wesentlich präziseren IR-Messung wird diesem Prozess die hier bestimmte Zeitkonstante von 13 ps zugewiesen.

Beim DADS zu $\tau_1 = 2,2$ ps deutet sich wie beim DADS zu $\tau_3 = 263$ ps der Zerfall eines Cu(II)-Zustandes in einen Zustand mit Cu(I)-Charakter an, bei dem allerdings die entstehende Cu(I)-Bande leicht blauverschoben ist. Da ebenfalls ein Zerfall des Chinolinradikals zu beobachten ist, kann bei diesem Zerfall ein Übergang eines

Zustandes mit MLCT-Charakter in den (heißen) Grundzustand auftreten. Aus dem Modell der IR-Messungen ist bekannt, dass bei diesem Prozess ebenso der Übergang von \mathbf{X}_1 in den langlebigen Cu(II)-Zustand erfolgen. Eine Interpretation des Prozesses zu τ_0 ist anhand des DADS schwierig, es werden noch weitere Informationen aus theoretischen Rechnungen benötigt.

Weitere Erkenntnisse aus DFT-Rechnungen und XAS-Messungen

Die hier gezeigten Messungen können keine Aussagen über die genaue Geometrie der in obigem Modell diskutierten Zustände treffen. Dazu müssen sie mit weiteren Methoden kombiniert werden.

DFT-Rechnungen aus der Gruppe Herres-Pawlis zeigen, dass bei Anregung mit 400 nm ein höherer, angeregter Zustand erreicht wird (S_{14}). Dieser Zustand weist einen Winkel zwischen den Ligandenebenen von $70^\circ - 75^\circ$ auf, was einer Grundzustandsgeometrie des Cu(I)-Komplexes entspricht. Demnach haben sich die Kernkoordinaten noch nicht geändert und der S_{14} -Zustand liegt im Franck-Condon-Regime. Es liegen keine experimentellen Ergebnisse vor, die diesen Befunden widersprechen.

Es finden sich in den Rechnungen weiterhin Indizien für S_1 -Zustände, deren Ligandengeometrie ebenfalls der Grundzustandsgeometrie des Cu(I)-Komplexes entsprechen. Ebenso gibt es aber Hinweise auf Singulett-Zustände, bei denen der Winkel zwischen den Ligandenebenen kleiner ist und mit einem Wert von etwa 45° im Bereich der Cu(II)-Spezies liegt. Das bedeutet, dass es auf der Energiehyperfläche des S_1 -Zustandes zu einer Jahn-Teller-Verzerrung kommen muss. Damit ist bereits der Winkelwert der Cu(II)-Geometrie erreicht, was die spektrale Ähnlichkeit des \mathbf{X}_1 Zustandes mit dem langlebigen Cu(II)-Zustand bei der IR-Messung erklärt (s. [Abbildung 11.5](#)). Deshalb liegt es nahe, den Prozess zu τ_0 mit der Ligandenabflachung in einen Jahn-Teller-Zustand zu verknüpfen. Die Bildung der für Cu(II)-Geometrie charakteristischen Bande bei 385 nm im DADS unterstützt diese Interpretation. Der Zustand \mathbf{X}_1 wird deshalb als ein abgeflachter $^1\text{MLCT}$ -Zustand interpretiert.

DFT-Rechnungen zeigen, dass der langlebige MLCT-Zustand Triplett-Charakter aufweist. Er wird deshalb als $^3\text{MLCT}$ -Zustand bezeichnet. Im Vergleich zum abgeflachten S_1 zeigt er eine verkleinerte Cu- N_{Gua} -Bindungslänge. Strukturauflösende Anreg-Abtast-Röntgenabsorptionsexperimente (XAS, von der AG um Prof. M. Rübhausen durchgeführt) stützen diesen Befund. Sie liefern Indizien dafür, dass der Abstand der Cu- N_{Gua} -Bindungen in ACN nach spätestens 50 ps demjenigen des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^{2+}$ entspricht. Diese Abstandsänderung könnte die geringen, spektralen Unterschiede des abgeflachten $^1\text{MLCT}$ -Zustandes und des $^3\text{MLCT}$ -Zustandes erklären.

Die Rechnungen liefern Indizien dafür, dass die lose Koordination eines Lösungsmittelmoleküls die Relaxation des $^3\text{MLCT}$ -Zustand beschleunigt und dass es mit geringer

Wahrscheinlichkeit zur Bildung eines stabilen Lösungsmittel-Exciplexes kommt, dessen Lebensdauer im Nanosekundenbereich liegen sollte. Es ist möglich, dass dieser Exciplex die kleinen Absorptionsänderungen am Ende der Messzeit hervorruft. Wie in [Unterabschnitt 11.2.1](#) erläutert kann als obere Grenze für die Population dieses Zustandes 5% aller angeregten Moleküle abgeschätzt werden.

11.3. Interpretation der Messungen und Reaktionsschema

Die vorgestellten Ergebnisse und Interpretationen führen zu folgendem Reaktionsschema der Cu-Guanidinquinolin-Komplexe (s. [Abbildung 11.8](#)): Nach Photoanregung mit 400 nm wird direkt ein Ladungstransfer vom Kupferzentrum auf das Ligandensystem induziert. Der angeregte S_{14} -Zustand zeigt noch dieselbe Ligandengeometrie wie der Grundzustand. Mit einer Zeitkonstanten von 0,3 ps muss der Jahn-Teller-verzernte S_1 -Zustand gebildet werden. Es ist wahrscheinlich, dass dieser Zustand nicht direkt aus dem S_{14} gebildet wird, sondern dass zunächst Singulett-Zustand entsteht, bei dem die Geometrie noch derjenigen des S_{14} -Zustandes entspricht. Durch Relaxation auf der S_1 -Energiehyperfläche kommt es dann zur Jahn-Teller-Verzerrung. Dieser entastische Zustand weist einen Winkel von 45° zwischen den Ligandenebenen auf. Von diesem Zustand aus gabelt sich das Reaktionsschema. Zu etwa gleichen Teilen werden der heiße Grundzustand und der Triplett-MLCT-Zustand mit einer Rate von je 1/4,4 ps gebildet. Der heiße Grundzustand zeigt sowohl bezüglich der Ligandengeometrie

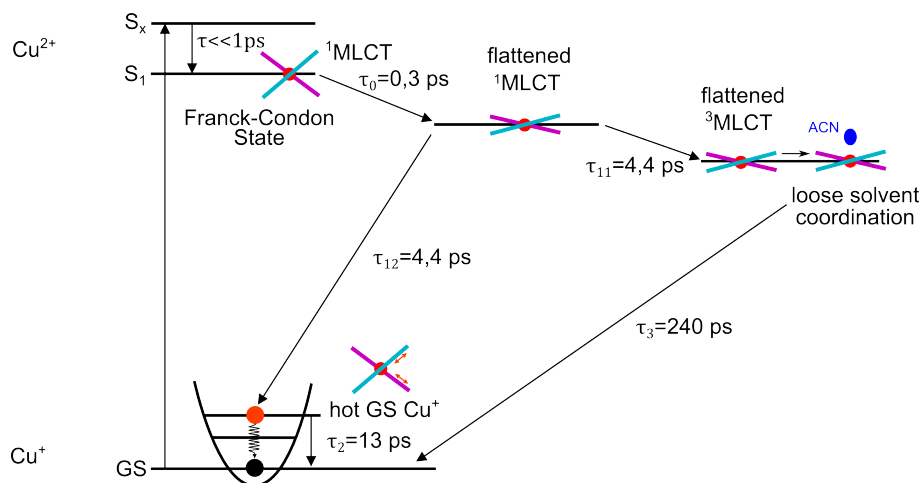


Abbildung 11.8.: Reaktionsmodell der Kupferkomplexe nach den Messungen am BMO:

Die Kupferkomplexe sind als roter Kreis (Cu) sowie violette und türkise Striche (Liganden) dargestellt. Im heißen Grundzustand sind höhere Schwingungsmoden angeregt, die als orange Pfeile angedeutet sind.

als auch bezüglich des elektronischen Zustandes Cu(I)-Grundzustandskonfiguration.

Er ist lediglich schwingungsmäßig angeregt und kühlt mit einer Zeitkonstanten von 13 ps.

Beim ISC in den $^3\text{MLCT}$ -Zustand findet keine weitere Ligandenverdrehung statt. Die Bindungslängen Cu-N_{Gua} verkleinern sich. Dieser Zustand kann Lösungsmittelmoleküle koordinieren, was wie in [Abschnitt 11.2.2](#) erwähnt zur Relaxation in den Grundzustand und zur Bildung von Exciplexen führen kann. Die Unendlich-Spektren der globalen Anpassung liefern keine eindeutigen Hinweise für die Existenz langlebiger Spezies am Ende der Messung. Man kann anhand der Spektren abschätzen, dass maximal 5% der angeregten Moleküle einen Zustand mit einer Lebensdauer im Nanosekundenbereich bilden können.

Die Zeit- und Lösungsmittelabhängigkeiten lassen sich folgendermaßen erklären: TD-DFT Rechnungen der Gruppe Herres-Pawlis zeigen, dass es im $^3\text{MLCT}$ -Zustand zu einer losen Koordination von Lösungsmittelmolekülen kommen kann. Kurz nach der losen Koordination eines ACN-Moleküls kommt es zum Ladungstransfer vom Liganden zurück zum Kupferion und die Ligandengeometrie dreht in die des Grundzustandes zurück. Der Zerfall des $^3\text{MLCT}$ -Zustandes erfolgt also unter loser Koordination eines Lösungsmittelmoleküls an das Kupferzentrum. Die Koordination ist in ACN stabiler als in DCM [[Pen13](#)] und beschleunigt somit die Reaktion in den Grundzustand [[MFC15](#)].

Die Verlängerung der Lebenszeit des $^3\text{MLCT}$ -Zustandes beim DMEG-Liganden (400 ps) gegenüber dem TMG-Liganden (260 ps) kann folgendermaßen erklärt werden: Als Gegenion befinden sich PF_6^- -Ionen in den Lösungen der Komplexe. Der DMEG-Ligand ist aufgrund der Ethylbrücke planarer als der TMG-Ligand. Daher könnten sich die PF_6^- -Ionen an den abgeflachten $^3\text{MLCT}$ -Zustand mit DMEG-Liganden besser anlagern und so die Lösungsmittelmoleküle abschirmen. Dadurch wird die Relaxation über die Koordination der Lösungsmittelmoleküle verringert.

Für dieses Modell (s. [Abbildung 11.8](#)) können nun durch eine entsprechende Linearkombination der DADS die Differenzspektren der transienten Zustände (SADS) berechnet werden. Durch Addition der reskalierten Grundzustandsspektren können dann auch die Absolutspektren der transienten Zustände (SAS) abgeschätzt werden. Dieses Verfahren wurde für die UV/Vis-Messungen angewendet. [Abbildung 11.6 d](#) zeigt das Grundzustandsspektrum des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ -Komplexes (schwarz) und das SAS des heißen Grundzustandes (orange). Man erkennt grundsätzlich eine große Ähnlichkeit der beiden Spektren. Im SAS des heißen Grundzustandes ist allerdings die Cu(I)-Bande verbreitert, wie man es für vibratonisch angeregte Zustände erwartet [[PPK01](#)]. In [Abbildung 11.6 e](#) sind die SAS des S_{14} -Zustandes (rot), des S_1 -Zustandes (grün), des abgeflachten $^3\text{MLCT}$ -Zustandes (blau) und des Cu(II)-Grundzustandes (braun) gezeigt. Man erkennt eine deutliche Abnahme der Absorption vom hoch angeregten S_{14} -Zustand über S_1 - bis zum abgeflachten Triplett-Zustand. Ab dem S_1 -Zustand ist die Cu(II)-Bande bei 385 nm voll ausgeprägt. Zusätzlich ist die breite Chinolinradikalabsorption im roten Bereich bei allen SAS vorhanden. Neben der zu niedrigen, angeregten Zuständen verschwindenden, breiten Absorption zwischen

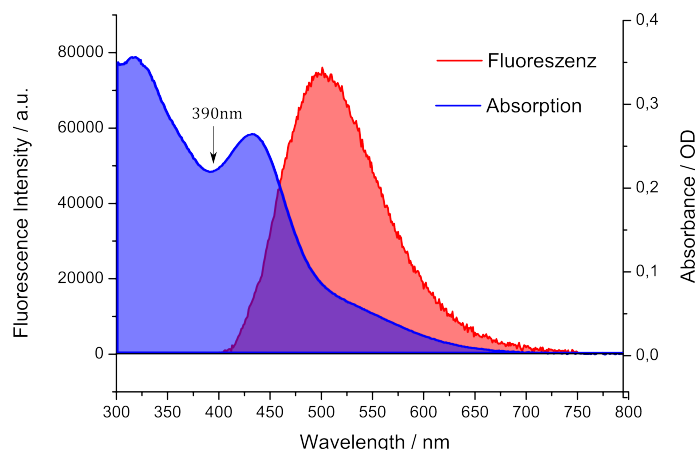


Abbildung 11.9: Emissions- und Absorptionsspektrum des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ -Komplexes in ACN: Das Spektrum wurde in einem Fluorimeter (Horiba, Fluorolog 3) in *right angle*-Geometrie gemessen. Die optische Dichte bezüglich der Anregung betrug 0,1 OD bei 390 nm.

420 nm und 550 nm ist eine Bande um 490 nm präsent. Diese Signaturen könnten folgendermaßen erklärt werden:

Man würde normalerweise eine breite ESA der angeregten Zustände von 420 nm bis 550 nm erwarten. Die verringerte Absorption bei 450 nm lässt sich durch das Ausbleichen des Grundzustandes erklären. Beim Absorptionsminimum bei 525 nm könnte es sich um stimulierte Emission fluoreszierender Zwischenzustände handeln. Das Emissionsspektrum des Cu(I)-Komplexes (s. [Abbildung 11.9](#)) weist ein Maximum bei 500 nm auf, was diese Interpretation stützt. Der S_1 -Zustand kann direkt fluoreszieren, beim $^3\text{MLCT}$ -Zustand könnte es sich um die sog. *delayed fluorescence* handeln, wie sie bei anderen Liganden in der Literatur bekannt sind [[Ber16](#)]. Ein strahlender Übergang aus dem Triplett-Zustand in den Grundzustand ist verboten. Liegen Triplett und S_1 aber energetisch so nah beieinander, dass der Triplett thermisch in den S_1 überführt werden kann, so misst man die Emission vom S_1 in den Grundzustand. Ob diese Erklärung auch auf die hier betrachteten Komplexe zutrifft, könnte nur mithilfe von zeit- und spektral aufgelösten Emissionsmessungen geklärt werden, welche allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar waren.

Zusammenfassend lässt sich mit großer Sicherheit annehmen, dass die Kinetik mit $\tau_3 = 240$ ps durch den Zerfall des $^3\text{MLCT}$ -Zustandes hervorgerufen wird und dass parallel zum ISC ein heißer Grundzustand bevölkert wird, der mit 13 ps kühlt. Deutliche Signaturen für diese beiden Zustände finden sich in beiden Messungen, d.h. in transienten Absorptionsspektren im UV/Vis- und IR-Bereich. Die UV/Vis-Messungen liefern Hinweise darauf, dass es noch schnellere Prozesse unterhalb der Zeitauflösung der Infrarotmessung gibt, bei denen es sich um die interne Konversion in den S_1 -Zustand und die Jahn-Teller-Verzerrung handeln könnte. Dies soll anhand der Literatur auf Plausibilität überprüft werden.

12. Vergleich der GuaQu-Komplexe mit anderen Cu-Modellsystemen

Neben den hier vorgestellten Komplexen werden in der Literatur zahlreiche Systeme mit anderen Liganden untersucht und diskutiert. Bestehende Modellvorstellungen aus der Literatur sollen in diesem Kapitel vorgestellt werden, damit die in [Kapitel 11](#) vorgestellten Modelle eingeordnet werden können.

12.1. Cu-Phenanthrolin-Komplexe und heiÙe Grundzustände bei Metallkomplexen in der Literatur

Zu den am besten untersuchten Systemen zählen aufgrund ihres Potentials als Energiewandler in der Solarindustrie die Kupferkomplexe mit Phenanthrolinderivaten (phen) als Liganden. Mara et al. [[MFC15](#)] fassen die lichtinduzierten Reaktionen in Abhängigkeit verschiedener phen-Liganden zusammen. Dabei gehen sie von folgendem Reaktionsschema aus (s. [Abbildung 12.1](#)): Nach der Photoanregung in einen höher gelegenen Zustand (S_2) wird ein Elektron vom Kupfer-Zentrum auf das Ligandensystem übertragen. Die folgende interne Konversion in den 1MLCT -Zustand erfolgt ultraschnell (<50 fs). Danach kommt es auf der Subpikosekundenskala zur Jahn-Teller-Verzerrung und anschließend zum intersystem crossing in den Triplett-Zustand. In diesem Zustand kann die Koordination eines Lösungsmittelmoleküles erfolgen, wodurch ein Exciplex gebildet wird. Dieser relaxiert in den Cu(I)-Grundzustand. Die Zuweisung der Zustände basiert auf zeit- und spektral aufgelöster Fluoreszenzspektroskopie und transientser Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Spektralbereich [[ITT15](#)] sowie älteren Untersuchungen der temperaturabhängigen Emissionslebensdauer [[Kir83](#)].

Die von Mara et al. [[MFC15](#)] dargestellten Liganden- und Lösungsmittelabhängigkeiten der einzelnen Schritte werden nun näher betrachtet.

1. **Grundzustandsgeometrie:** Bei Substitutionen an den Positionen 2 und 9 des Phenanthrolins mit Alkylresten wird die Geometrie des Grundzustandes mit zunehmender Größe der Substituenten tetraederförmiger und die Länge der Cu-N-Bindungen nimmt zu. Bei kleinen Substituenten ist schon der Grundzustand deutlich abgeflacht. Bei aromatischen Resten sind aufgrund von π -

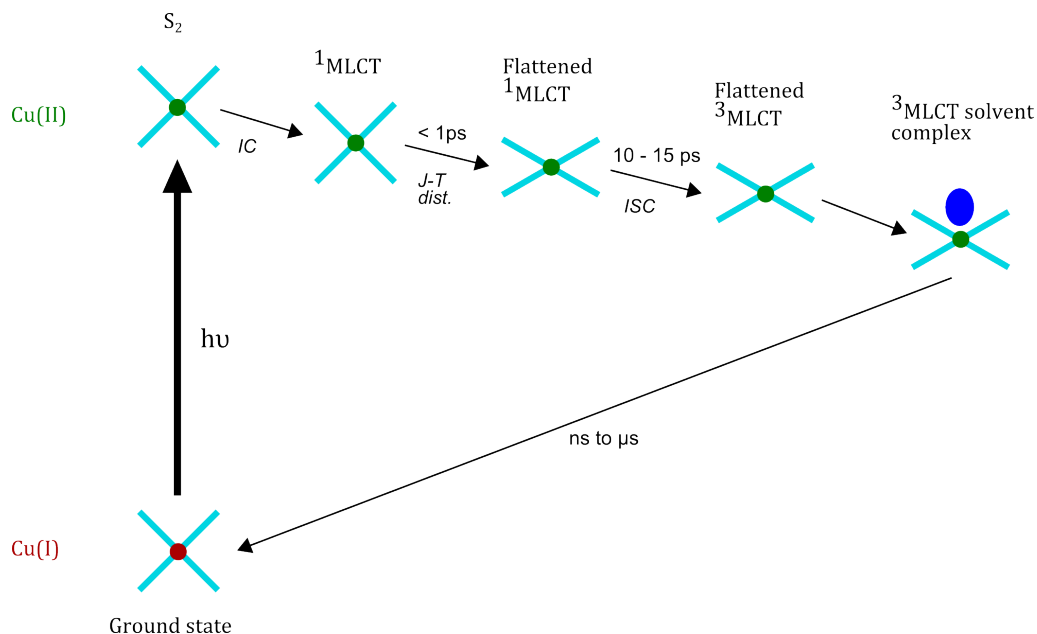


Abbildung 12.1.: Reaktionsschema für Cu-Phenanthrolinkomplexe nach MFC15:

Nach der Photoanregung in den Franck-Condon-Zustand S_2 kommt es zur internen Konversion (IC) in den $^1\text{MLCT}$ -Zustand. Danach flacht die Ligandengeometrie durch eine Jahn-Teller Verzerrung ($J-T$ dist.) ab und es kommt zum intersystem crossing (ISC) in den $^3\text{MLCT}$ -Zustand. Durch Koordination eines Lösungsmittelmoleküls wird die Relaxation in den Grundzustand beschleunigt.

π -Wechselwirkungen globale Aussagen nicht möglich und erfordern jeweils gesonderte Betrachtungen [MGK98, Kle90]. Für eine tetraedrische Grundzustandsgeometrie ist die Oszillatorstärke für den $S_0 \rightarrow S_1$ Übergang sehr gering [Zgi03].

2. **Jahn-Teller-Verzerrung:** Da die Elektronenkonfiguration nach der Anregung durch den MLCT einem Cu(II)-Zustand entspricht, passt sich die Ligandengeometrie entsprechend an und der Winkel zwischen den Phenanthrolinebenen wird kleiner. Nur im Fall sterisch sperriger Liganden bleibt die tetraedrische Koordinationsgeometrie erhalten. Die Verzerrungsprozesse erfolgen schneller als eine Pikosekunde.
3. **Intersystem Crossing:** Die Übergangsrates in den Triplett-Zustand hängt von der eben beschriebenen Geometrieänderung ab [MFC15]. Mit der Abflachung der Ligandengeometrie wird die für die ISC-Rate verantwortliche Spin-Bahn-Wechselwirkung kleiner und die ISC-Rate sinkt. Bei kleineren Liganden, die eine deutlich abgeflachte Geometrie nach der Jahn-Teller-Verzerrung zeigen, ist dementsprechend die Bildungsrate des Triplett-Zustandes klein im Vergleich zu sperrigen Liganden, die eine Tetraedergeometrie aufweisen und dementsprechend hohe Spin-Bahn-Wechselwirkung aufweisen.

Studien von Chergui [Che15b] zeigen, dass neben den strukturellen Dynamiken auch die Zustandsdichten einen wesentlichen Beitrag zum Betrag der ISC-Rate darstellen.

4. **Exciplex-Bildung:** Der nach dem ISC vorliegende abgeflachte $^3\text{MLCT}$ -Zustand kann Lösungsmittelmoleküle koordinativ binden, wodurch ein Exciplex entsteht. Dadurch wird die Energiebarriere zum Grundzustand abgesenkt und eine Relaxation erfolgt schneller [MFC15]. Für die Wahrscheinlichkeit, dass ein Exciplex gebildet werden kann, sind zwei Faktoren wesentlich: die Lösungsmittelzugänglichkeit des Kupferzentrums und die Donorenstärke der Lösungsmittelmoleküle. Sperrige Liganden schirmen das aktive Zentrum gut ab, wodurch die Exciplexbildung verschlechtert und die Lebensdauer des $^3\text{MLCT}$ -Zustandes erhöht wird. Ebenso stabilisieren schwach koordinierende Lösungsmittel wie DCM den $^3\text{MLCT}$ -Zustand.

Die Lumineszenzlebensdauern betragen beispielsweise für $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ in ACN 16 ps [Loc10] und für den Di-2,9-Tertbutylphenanthrolin-Liganden in DCM 3260 ns [GGB09].

Nach Wissen des Autors wurden an Phenanthrolin-Systemen weder Messungen im mittelinfraroten Abtastbereich durchgeführt, noch heiße Grundzustände diskutiert. Letztere wurden aufgrund transientser Absorptionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich allerdings für andere Kupferproteine und Modellkomplexe vorgeschlagen.

Ultraschnelle transiente Absorptionsmessungen am blauen Kupferprotein Umecyanin zeigen Indizien für das Kühlen eines heißen Grundzustandes mit 2 ps [Del06]. Die Zuweisung des heißen Grundzustandes wurde mittels transientser Absorptionsspektroskopie durch die spektrale Einengung der Grundzustandsbande während des Kühlprozesses (s. Kapitel 11) vollzogen. Eben solche Hinweise auf einen heißen Grundzustand, der mit 760 fs kühlt, wurden für das Protein Rusticyanin diskutiert [Biz12]. Bei Photoanregung des Plastocyanins wird von Nagasawa et al. [Nag10] ausschließlich die Relaxation über einen heißen Grundzustand beobachtet.

Weiterhin werden heiße Grundzustände bei Cu(II)-Chloro-Komplexen diskutiert. Sie stellen auch hier wichtige Relaxationswege in den Grundzustand dar [Mer15, Mer14, Mer12]. All diese Studien zeigen, dass heiße Grundzustände bei der Betrachtung von Kupfersystemen berücksichtigt werden müssen.

12.2. Einordnung der Cu-GuaQu-Komplexe

Die in Kapitel 11 gezeigten IR-Messungen liefern starke Indizien dafür, dass ein Übergang in einen heißen Grundzustand beim Reaktionsschema des MLCT von Cu(I)-Guanidinquinolin-Komplexen in Konkurrenz zum ISC tritt. Dies ist ein grundlegender Unterschied zum Reaktionsschema der Phenanthrolin-Komplexe (s. Abbildung 12.1).

Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte die höhere Mobilität der GuaQu-Liganden im Vergleich zu den Phenanthrolin-Liganden sein. Durch die geringere sterische Abstoßung der Liganden untereinander können sie leichter abflachen. Durch diese Einnahme des energetisch herabgesetzten, entatischen Zustandes wird die Energiebarriere zum Grundzustand kleiner und die Rate der Relaxation in den heißen Grundzustand nimmt zu.

Das intersystem crossing ist für die GuaQu-Komplexe mit 4,4 ps etwas schneller als es bei den Phenanthrolin-Komplexen der Fall ist (5 ps - 10 ps [MFC15]). Diese schnelle Triplett-Bildung ist bemerkenswert, da man aufgrund der größeren Abflachung im Vergleich zu den Phenanthrolin-Komplexen eine Verringerung der Spin-Bahn-Wechselwirkung und somit eine kleinere ISC-Rate erwarten würde. Andererseits muss für die Triplettbildung keine Abflachung mehr erfolgen. Lediglich die Cu-N_{Gua}-Bindungslänge muss sich verringern, was durch eine kleine geometrische Umlagerung schnell ablaufen kann. Dieser Befund legt analog zu den Ergebnissen von Chergui [Che15b] nahe, dass bei Kupferkomplexen für die ISC-Rate neben der Spin-Bahn-Wechselwirkung auch geometrische Faktoren von großer Bedeutung sind. Man kann deshalb den abgeflachten ¹MLCT-Zustand als entatischen Zustand sehen, der die ISC-Rate erhöht. Solche entatischen Zustände bezüglich der Spinmultiplizität wurden bisher in der Literatur noch nicht diskutiert.

Bezüglich der Lösungsmittelabhängigkeit stimmen beide Schemata überein. Das stark koordinierende Lösungsmittel ACN erhöht die Relaxationsrate des ³MLCT-Zustandes.

13. Zusammenfassung der Messungen an Cu-Komplexen

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden die ersten transienten Absorptionsmessungen im infraroten Spektralbereich zur Beobachtung des lichtinduzierten Ladungstransfers in Kupferkomplexen durchgeführt. Aufgrund der ausgeprägten, spezifischen Infrarot-Banden für beide Oxidationsstufen des Kupfers erlauben die Infrarotmessungen die Zuweisung von Zwischenzuständen. Im Detail konnten das Kühlen eines heißen Grundzustandes mit 13 ps und der Zerfall des $^3\text{MLCT}$ -Zustandes nachgewiesen werden. Die Bildung eines heißen Grundzustandes wurde bisher für andere Kupferproteine vermutet, aber nicht im Detail untersucht. Sie stellt einen zur Triplet-Bildung konkurrierenden Kanal dar und muss bei der Entwicklung neuer Energietransfersysteme für Solarenergiekonversion möglichst gering gehalten werden. Zusätzlich wurden transiente Absorptionsmessungen im sichtbaren Spektralbereich durchgeführt, deren bessere Zeitauflösung schnellere Prozesse zugänglich macht. Die Ergebnisse dieser Messungen legen zusammen mit DFT-Rechnungen nahe, dass zusätzlich zu den aus den Infrarotmessungen bekannten Zuständen noch eine Jahn-Teller-Verzerrung des S_1 -Zustand mit 0,3 ps abläuft.

Die Kombination der transienten Absorption für verschiedene Spektralbereiche, der XAS-Messungen und der DFT-Rechnungen ermöglichte es, ein detailliertes Bild des lichtinduzierten Ladungstransfers bei Kupfer-Guanidinquinolinkomplexen aufzustellen. Es finden sich Indizien für die Existenz eines entastischen Zustandes bezüglich der Spinmultiplizität, der ein schnelles ISC begünstigt. Dieser entastische Zustand könnte ein Grund für die effiziente Bildung langlebiger Elektronentransferzustände in Kupferproteinen sein und hohe Relevanz in biologischen Systemen haben.

14. Zusammenfassung

Proteine ermöglichen das Leben, wie wir es kennen. Sie erfüllen unterschiedlichste Aufgaben in Organismen: sie dienen als Signaltransmitter, erlauben in unseren Muskeln die Umsetzung von chemischer Energie in mechanische Arbeit, grenzen als Bindegewebe Körperregionen ab, wandeln äußere Signale wie z.B. Lichtreize in elektrische Impulse um, katalysieren Redox-Reaktionen und vieles mehr. Bei all diesen unterschiedlichen Aufgaben ist ihnen eines gemein: Sie funktionieren nur, wenn sie eine definierte, räumliche Anordnung – den nativen Zustand – aufweisen. Anfinens Experimente haben gezeigt, dass dieser native Zustand in der Aminosäuresequenz eines Proteins codiert ist. Welchen Weg ein ungefaltetes Protein zum gefalteten, nativen Zustand nimmt und zu welchen Prozessen es dabei in welcher Reihenfolge kommt, ist bis heute nicht abschließend geklärt. Einige Theorien gehen davon aus, dass es zuerst zur Bildung von Sekundärelementen (α -Helices und β -Faltblätter) kommt, die sich anschließend zur nativen Struktur reorganisieren.

α -helikale Modellsysteme sind schon seit längerem Gegenstand der Forschung, wohingegen stabile, β -faltblatt-artige Systeme erst mit der Entdeckung des TrpZip2 im Jahre 2004 zugänglich wurden. Diese durch hydrophobe Trp-Paare stabilisierte, β -Haarnadeln-bildende Struktur wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Durch die dort verwendeten Methoden war es nicht möglich, eine Zeitauflösung unterhalb weniger Nanosekunden zu erreichen. Es konnte zudem nur die temperatur-sprunginduzierte Entfaltung direkt beobachtet werden. Eine definierte Adressierung der Faltungsreaktion war nicht möglich. Um diese Probleme anzugehen, wurde die Schleifensequenz des TrpZip2 durch einen Photoschalter (AMPP) ausgetauscht, der photokontrollierbare *cis-trans*-Isomerie zeigt [Aem05, Don06]. Das so entstandene Molekül trägt den Namen AzoTrpZip2 (ATZ). Im *cis*-Konformer bildet das ATZ stabile, monomere β -Haarnadeln aus. Dagegen findet man für das *trans*-Konformer des AMPP ein Ensemble mehrerer, ungefalteter und offener Strukturen. Liegt das AMPP im *trans*-Isomer vor, kann man es durch Belichtung in das *cis*-Konformer überführen (355 nm) und umgekehrt (430 nm). Da beide Konformere des AMPP-Schalters für die Dauer der Experimente stabil sind¹, lassen sich mithilfe dieses Ansatzes die Faltungsreaktion (*trans* \rightarrow *cis*) und die Entfaltungsreaktion (*cis* \rightarrow *trans*) getrennt untersuchen. Vorhergehende Arbeiten über Infrarotspektroskopie im Amid-I-Bereich haben bereits ultraschnelle Vorgänge für beide Reaktionen sowie die Faltung des ATZ vom Femtosekundenbereich bis zu mehreren hundert Mikrosekunden untersucht.

¹Das *trans*-Konformer ist thermisch stabil, das *cis*-Konformer geht thermisch auf der Zeitskala mehrerer Tage in das *trans*-Konformer über

Bei der Faltungsreaktion konnte beobachtet werden, dass es hauptsächlich auf der Mikrosekundskaala zur Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidsträngen kommt. Eine geringe Amplitude entfällt auf eine Nanosekundsndynamik. Ein Vergleich von isomerisierungsinduzierter Faltung und temperatursprunginduzierte Entfaltung zeigte, dass die Faltung des ATZ ein thermisch aktivierter Prozess sein muss und man bei der isomerisierungsinduzierten Faltung auf der Mikrosekundszeitkala im Wesentlichen den Übergang aus dem entfalteten *cis*-Konformer in das gefaltete *cis*-Konformer beobachtet. Die beiden Zustände werden von einer relativ großen Energiebarriere von $40 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ getrennt. Im Rahmen dieser Messungen war es nicht möglich, die Dynamik der Seitenketten aufzulösen, die die β -Haarnadelstruktur durch die hydrophoben Wechselwirkungen der Tryptophane wesentlich stabilisieren. Dazu wurde in dieser Arbeit ein Aufbau realisiert, der die Messung der zeitabhängigen Fluoreszenzintensität nach Auslösen der *cis* \rightarrow *trans* Isomerisierung des AMPP erlaubt. Diese Messungen zeigten für die Faltung des ATZ zunächst einen spontanen Anstieg am Zeitnullpunkt, der auf eine Änderung der FRET-Effizienz von Tryptophan auf Azobenzol zurückgeführt werden konnte. Die weitere Dynamik zeigte dieselben Zeitkonstanten, wie die vor dieser Arbeit durchgeführten Infrarotmessungen (100 ns und 17 μ s). Daher ist anzunehmen, dass sich die hydrophoben Wechselwirkungen zusammen mit den Wasserstoffbrücken ausbilden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Paarung der Tryptophane den ratenlimitierenden Schritt der Faltung des ATZ darstellt.

Bei den Infrarotmessungen der Entfaltungsreaktion zeigten sich bereits auf der Piko-sekundskaala Signaturen für einen beginnenden Entfaltungsprozess. Allerdings ist die Entfaltung nach 3 ns noch nicht abgeschlossen. Messungen auf längeren Zeitskalen sind erst mit der in dieser Arbeit vorgestellten Integration des NT 242-Lasers in den bestehenden Aufbau möglich geworden, der die nötige Wellenlänge von 430 nm zur Verfügung stellen kann und elektronisch mit der Abtastanlage synchronisierbar ist. Diese Messungen ergaben drei weitere Prozesse ($\tau_1 = 30$ ns, $\tau_2 = 1,9$ μ s, $\tau_3 = 17$ μ s). Durch spektrale Analysen der zu diesen Prozessen gehörigen Zerfallsspektren konnte ein sequentielles Modell der Entfaltung des ATZ vorgeschlagen werden:

Nach der Photoisomerisierung des AMPP beginnt mit etwa 600 ps ein *unzipping* der Interstrang-Wasserstoffbrücken vom AMPP zu den Termini, das bis etwa 2 μ s dauert. Danach sind alle Wasserstoffbrücken auf dem Weg zum entfalteten *trans*-ATZ gebrochen, die Peptidstränge liegen aber aufgrund des noch bestehenden hydrophoben Kerns der Trp-Paare immer noch parallel nebeneinander in einer β -faltblattartigen Anordnung vor. Diese geht erst mit dem Auflösen der hydrophoben Trp-Trp-Wechselwirkung (17 μ s) verloren. Mit diesen Ergebnissen kann der gesamte Zyklus der strukturellen Änderungen des ATZ diskutiert werden. Diese Betrachtung unterstreicht die Wichtigkeit der getrennten Adressierbarkeit von Faltung und Entfaltung, da beide Reaktionen grundlegend unterschiedlichen Pfaden folgen. Die kombinierte Betrachtung deutet darauf hin, dass die Dynamiken der Wasserstoffbrücken um eine Größenordnung schneller sind, als diejenigen der hydrophoben

Wechselwirkungen. Für die Faltung größerer Proteine könnte das bedeuten, dass sich β -Faltblattregionen dann schnell falten können, wenn ihre Umgebung bereits eine Struktur geschaffen hat, die die räumliche Nähe der Stränge fördert.

Diese Arbeit ermöglicht detaillierte Einblicke in die Dynamiken der Wasserstoffbrücken und der hydrophoben Wechselwirkungen während der Faltung und der Entfaltung des β -Haarnadelmodellpeptids ATZ, da mit den hier durchgeführten Messungen der gesamte Schaltzyklus des ATZ diskutiert werden kann.

Einen besonderen Einfluss hat die Proteinstruktur auf die Klasse der blauen Kupferproteine. Dort wird ein Kupferion im aktiven Zentrum von Aminosäuren (z.B. Histidin) komplex gebunden. Diese Proteine fungieren als Redox-Katalysatoren und sind am Elektronentransfer beteiligt. Dabei ändert sich die Oxidationsstufe des Kupfers. Es wurde gezeigt, dass die Struktur der umliegenden Proteinmatrix großen Einfluss auf das Redoxpotential hat, indem sie die Geometrie der Liganden verändert. Diese geometrisch verzerrten Zustände liegen energetisch näher am Elektronentransferzustand, wodurch dieser effektiver erreicht werden kann. Man nennt sie *entatische Zustände*. Kupfer-Guanidinchinolin(GuaQu)-sind Modellsysteme für das aktive Zentrum blauer Kupferproteine. Diese Komplexe zeigen entatische Zustände in beiden Oxidationsstufen. Regt man die Cu(I)-Spezies mit einer Wellenlänge von 400 nm an, so kommt es zu einem Ladungstransfer vom Kupfer zum Liganden (MLCT), der in dieser Arbeit zeitaufgelöst untersucht wurde. Durch Kombination verschiedener spektroskopischer Methoden und dichtefunktionaltheoretischen Rechnungen konnte gezeigt werden, dass es etwa 0,3 ps nach der Photoanregung des MLCT zu einer Abflachung der Liganden zu einer Cu(II)-typischen Geometrie kommt. Mit etwa 2 ps wird zum einen ein heißer Grundzustand bevölkert, der mit 13 ps abkühlt. Zum anderen erfolgt die Bildung eines Triplett-Zustandes. Bei diesem Übergang findet keine Ligandenabflachung mehr statt – es verkürzt sich lediglich der Abstand der Cu-N_{Gua}-Bindung um etwa 0,1 Å. Damit kann der abgeflachte MLCT-Zustand mit Singulettcharakter als entatischer Zustand für den Triplett-Zustand interpretiert werden, da er bereits die korrekte Verdrehung der Liganden aufweist. Der so entstandene Triplett-Zustand zerfällt mit einer Zeitkonstanten von 240 ps in den Cu(I)-Grundzustand. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen liefern keine Hinweise auf transiente Zustände am Ende der Messzeit (3 ns).

Die an den Cu-GuaQu-Komplexen durchgeführten Messungen erlauben das Aufstellen eines Reaktionsschemas für diese Modellsysteme und unterstreichen die Wichtigkeit des Konzeptes des entatischen Zustandes. Zusammen mit anderen Methoden legen sie nahe, dass es nicht nur für elektronische Übergänge, sondern ebenfalls für den Wechsel der Spinmultiplizität entatische Zustände gibt, was bisher noch nicht diskutiert wurde.

Abbildungsverzeichnis

2.1. Aufbau einer Aminosäure	5
2.2. Kondensation zweier Aminosäuren	6
2.3. Dihedralwinkel am C_α	8
2.4. Sekundärstruktur motive von Proteinen	9
2.5. Ramachandran-Plot	10
2.6. Neigung verschiedener Aminosäuren zur Ausbildung bestimmter Sekundärstruktur motive	10
2.7. Bildung einer Disulfidbrücke	11
2.8. Schematische Darstellung der π - π -Wechselwirkung bei aromatischen Aminosäuren	11
2.9. Schematische Titrationskurve eines Acetatpuffers	16
3.1. CD-Spektren verschiedener Sekundärstrukturen	20
3.2. Kopplungsterm bei β -Faltblättern	21
3.3. IR-Bandenschieben bei Änderung der Wasserstoffbrücken	22
3.4. Schematische Darstellung der Messung von Proteinstabilität mithilfe von TTET Neu13.	23
3.5. Faltungstrichter für verschiedene Faltungsarten	28
3.6. Rückgratbasierte Faltung eines Proteins	31
3.7. Hydrophober Kollaps der Proteinfaltung	33
3.8. Modellvorstellung der Proteinfaltung von Udgoankar	34
3.9. Sequenz des TrpZip2 und NMR-Struktur des TrpZip1	35
3.10. Zusammenfassendes Modell der Entfaltung des TrpZip2	38
4.1. Schaltverhalten des Azobenzols	40
4.2. UV/Vis-Spektren der photostationären Gleichgewichte der Azobenzol isomere	40
4.3. Vereinfachte Strukturformeln des TrpZip2 und des ATZ	43
4.4. NMR-Strukturen des ATZ und des TrpZip2	44
4.5. Infrarot- und Fluoreszenzspektren des ATZ	44
4.6. Energielandschaft der isomerisierungsinduzierten Faltung des ATZ	46
5.1. Schematische Darstellung der ESA des Trps	50
5.2. Erwarteter Verlauf der Fluoreszenzintensität für die Trp-Fluoreszenzmessung am ATZ	51

5.3.	Aufbau zur zeitabhängigen Messung der Tryptophan-Fluoreszenz am ATZ	52
5.4.	Optische Dichte und Transmission des BrightLine 320/40	53
5.5.	Vom BrightLine 320/40 transmittierter Bereich der Fluoreszenz des ATZ	53
5.6.	Triggerschema der Trp-Fluoreszenzanlage	54
5.7.	Zeitaufgelöste Tryptophanfluoreszenzdaten des ATZ	57
5.8.	Zeitaufgelöste Fluoreszenzdaten einer Trp-Lösung	58
5.9.	UV/Vis-Spektren der Azobenzolisomere im Bereich der detektierten Emission des Trps	59
5.10.	Trp-Fluoreszenzmessung einer Azobenzol-Tryptophan-Mischung	60
5.11.	Zeitverläufe der Faltung ATZ von 1 ns - 95 μ s aus der Tryptophanfluoreszenzmessung im Vergleich mit den IR-Daten	62
6.1.	Schematische Übersicht des gesamten Anreg-Abtast-Aufbaus im mittelinfraroten Spektralbereich	68
6.2.	Spektrale Energieverteilung des NT 242	70
6.3.	Triggerschema des NT 242	71
6.4.	Azobenzolreferenzierung zur Kompensation des thermischen Linsen-Artefaktes	73
6.5.	Zeitverläufe der ATZ-Entfaltungsmessung bei 1642 cm^{-1} für 4 °C (violett) und 22 °C (blau)	74
6.6.	Absorptionsänderungen als Funktion von Verzögerungszeit und Wellenlänge und transiente Spektren der Entfaltung des ATZ für 4 °C und 22 °C	75
6.7.	Vergleich der Unendlich-Spektren mit den cw-Spektren	76
6.8.	Vergleich der transienten Spektren der Entfaltung des ATZ zu Beginn der Langzeitmessung und am Ende der Kurzzeitmessung (3,1 ns) von T. Schrader	77
6.9.	DADS und berechnete Spektren direkt nach der Anregung	79
6.10.	Inverse DADS der Mikrosekundendynamiken	80
6.11.	Arrhenius-Plot der Mikrosekundendynamiken der ATZ-Entfaltung	80
6.12.	Modelle der ATZ-Entfaltung	82
6.13.	CD-Schmelzkurve des ATZ in Methanol	84
6.14.	Amplituden der Absorptionsänderung nach τ_1 und der DADS zu τ_2 bei 4 °C und 22 °C	85
6.15.	Nulldurchgang der transienten Spektren bei der Entfaltung des ATZ in Abhängigkeit der Verzögerungszeit	86
6.16.	DADS zu 17 μ s bei Raumtemperatur	87
6.17.	Modell der Entfaltung des ATZ	87
7.1.	Zyklus der Entfaltung und Faltung des ATZ	89

7.2. Energielandschaft der Faltung und Entfaltung des ATZ	90
10.1. TMG- und DMG-Liganden	99
10.2. Absenkung der Energiebarriere durch entatische Zustände	101
10.3. Jahn-Teller-Verzerrung	101
10.4. Absorptionsspektrum des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ und des $[\text{Cu}(\text{DMEG})_2]^+$ im sichtbaren Spektralbereich	102
10.5. Absorptionsspektren der TGM- und DMEG-Komplexe im sichtbaren Spektralbereich	103
10.6. FTIR-Spektren der TMG- und DMEG-Komplexe	104
11.1. Absorptionsänderungen als Funktion der Wellenzahl und Verzöge- rungszeit der MIR-Daten des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ und des $[\text{Cu}(\text{DMEG})_2]^+$.	108
11.2. Transiente MIR-Daten des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ und des $[\text{Cu}(\text{DMEG})_2]^+$. .	109
11.3. DADS zu τ_2 und Temperatur-Differenzspektrum des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ für $\Delta T = 45^\circ\text{C}$	110
11.4. Reaktionsmodell der Cu-GuaQu-Komplexe aufgrund der IR-Messungen	111
11.5. Vergleich der SADS von \mathbf{X}_1 und des langlebigen Cu(II)-Zustandes . .	112
11.6. Daten und Auswertungsansätze der UV/Vis-Abtastmessung des Cu(I)- TMG-Komplexes	113
11.7. Ergebnisse aller am BMO durchgeführten Messungen	115
11.8. Reaktionsmodell der Kupferkomplexe nach den Messungen am BMO	117
11.9. Emissions- und Absorptionsspektrum des $[\text{Cu}(\text{TMG})_2]^+$ -Komplexes in ACN	119
12.1. Reaktionsschema für Cu-Phenanthrolinkomplexe nach MFC15	122

Tabellenverzeichnis

2.1. Übersicht der 20 kanonischen Aminosäuren	7
3.1. Bandenpositionen für Sekundärstrukturmotive in H ₂ O nach Bar07 . .	21
4.1. Schaltquantenausbeuten von Azobenzol in Methanol	41
4.2. Optische Dichten der Azobenzolisomere im PSS	42
5.1. Zerfallszeiten und relative Amplituden der Trp-Fluoreszenzdaten (Ab- bildung 5.11, links) im Vergleich mit den Daten der IR-Faltungsmessung [Dee14] (Abbildung 5.11, rechts).	61
6.1. Status der Datenlage zum ATZ	67
6.2. Zeitkonstanten aus globaler Anpassung der Entfaltungsdaten bei ver- schiedenen Temperaturen	77

Literatur

- [AB04] M. AUTON und D. W. BOLEN. *Additive Transfer Free Energies of the Peptide Backbone Unit That Are Independent of the Model Compound and the Choice of Concentration Scale*. *Biochemistry* 43(5) (Feb. 2004), S. 1329–1342.
- [ABG79] E. AMOYAL, A. BERNAS und D. GRAND. *On the Photoionization Energy Threshold of Tryptophan in Aqueous Solutions*. *Photochemistry and Photobiology* 29(6) (Juni 1979), S. 1071–1077.
- [Aem05] A. AEMISSEGGER, V. KRÄUTLER, W. F. van GUNSTEREN und D. HILVERT. *A Photoinducible β -Hairpin*. *Journal of the American Chemical Society* 127(9) (März 2005), S. 2929–2936.
- [AK00] M. ARAI und K. KUWAJIMA. *Role of the molten globule state in protein folding. Advances in Protein Chemistry; Protein folding mechanisms*. Bd. 53. Arai, Munehito; Kuwajima, Kunihiro; Department of Physics, School of Science, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan, 2000, S. 209–282.
- [Anf54] C. ANFINSEN, R. REDFIELD, W. CHOATE, J. PAGE und W. CARROLL. *Studies on the Gross Structure, Cross-Linkages, and Terminal Sequences*. *Journal of Biological Chemistry* 207(1) (1954), S. 201–210.
- [Anf61] C. ANFINSEN, E. HABER E., M. SELA und F. WHITE. *Kinetics of formation of native Ribonuclease during oxidation of reduced polypeptide chain*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 47(9) (1961), S. 1309–&.
- [Anf73] C. ANFINSEN. *Principles that govern Folding of Protein Chains*. *Science* 181(4096) (1973), S. 223–230.
- [Ban04] J. R. BANAVAR, T. X. HOANG, A. MARITAN, F. SENO und A. TROVATO. *Unified perspective on proteins: A physics approach*. *Physical Review E* 70(4) (Okt. 2004), S. 041905.
- [Bar07] A. BARTH. *Infrared spectroscopy of proteins*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767(9) (Sep. 2007), S. 1073–1101.
- [BB12] H. M. D. BANDARA und S. C. BURDETTE. *Photoisomerization in different classes of azobenzene*. *Chemical Society Reviews* 41(5) (Feb. 2012), S. 1809–1825.

- [Beh99] R. BEHRENDT et al. *Photomodulation of the Conformation of Cyclic Peptides with Azobenzene Moieties in the Peptide Backbone*. *Angewandte Chemie International Edition* 38(18) (Sep. 1999), S. 2771–2774.
- [Ben97] N. BENTAL et al. *Free energy of amide hydrogen bond formation in vacuum, in water, and in liquid alkane solution*. *Journal of Physical Chemistry B* 101(3) (Jan. 1997), S. 450–457.
- [Ber13] J. M. BERG, J. L. TYMOCZKO, L. STRYER und G. J. GATTO. *Stryer Biochemie*. 7. Aufl. Lehrbuch. Berlin: Springer Spektrum, 2013.
- [Ber16] L. BERGMANN, G. J. HEDLEY, T. BAUMANN, S. BRASE und I. D. W. SAMUEL. *Direct observation of intersystem crossing in a thermally activated delayed fluorescence copper complex in the solid state*. *Science Advances* 2(1) (Jan. 2016), e1500889–e1500889.
- [BFT15] J. BROICHHAGEN, J. A. FRANK und D. TRAUNER. *A Roadmap to Success in Photopharmacology*. *Accounts of Chemical Research* 48(7) (Juli 2015), S. 1947–1960.
- [BHB75] J. BRANDTS, H. HALVOR und M. BRENNAN. *Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues*. *Biochemistry* 14 (22 Nov. 1975), S. 4953–4963.
- [Bio15] BIOCHEMANICS. *Time for enzymes*. 23. Juli 2015. URL: <https://biocheganics.wordpress.com/author/brandonm0hd/page/3/>.
- [Biz12] A. R. BIZZARRI, D. BRIDA, S. SANTINI, G. CERULLO und S. CANNISTRARO. *Ultrafast Pump-Probe Study of the Excited-State Charge-Transfer Dynamics in Blue Copper Rusticyanin*. *The Journal of Physical Chemistry B* 116(14) (Apr. 2012), S. 4192–4198.
- [BM79] P. BORTOLUS und S. MONTI. *Cis-trans photoisomerization of azobenzene. Solvent and triplet donors effects*. *The Journal of Physical Chemistry* 83(6) (März 1979), S. 648–652.
- [BP85] S. K. BURLEY und G. A. PETSKO. *Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization*. *Science* 229(4708) (Mai 1985), S. 23–28.
- [Bre03] J. BREDENBECK et al. *Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(11) (Mai 2003), S. 6452–6457.

- [Bre05] J. BREDEBECK, J. HELBING, J. KUMITA, G. WOOLLEY und P. 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 102(7) (Feb. 2005), S. 2379–2384.
- [Bre08] M. BRENNICH. *Aggregation und temperaturabhängige Entfaltung des Modellpeptids AzoTrpZip2*. Masterarbeit. LMU, 2008.
- [BRY95] J. BRYNGELSON, J. ONUCHIC, N. SOCCI und P. WOLYNES. *Funnels, Pathways, and the Energy Landscape of Protein-Folding - a Synthesis*. Proteins-Structure Function and Genetics 21(3) (März 1995), S. 167–195.
- [Buc14] D. B. BUCHER, A. SCHLUETER, T. CARELL und W. ZINTH. *Watson-Crick Base Pairing Controls Excited - State Decay in Natural DNA*. Angewandte Chemie International Edition 53(42) (Okt. 2014), S. 11366–11369.
- [BW87] J. BRYNGELSON und P. WOLYNES. *Spin glasses and the statistical-mechanics of protein folding*. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF 84(21) (Nov. 1987), S. 7524–7528.
- [CB98] Y. CHEN und M. D. BARKLEY. *Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins*. Biochemistry 37(28) (Juli 1998), S. 9976–9982.
- [CEF05] K. CHATTOPADHYAY, E. L. ELSON und C. FRIEDEN. *The kinetics of conformational fluctuations in an unfolded protein measured by fluorescence methods*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(7) (Feb. 2005), S. 2385–2389.
- [CF74] P. Y. CHOU und G. D. FASMAN. *Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins*. Biochemistry 13(2) (Jan. 1974), S. 211–222.
- [CF90] C. CHOTHIA und A. V. FINKELSTEIN. *The Classification and Origins of Protein Folding Patterns*. Annual Review of Biochemistry 59(1) (1990), S. 1007–1035.
- [Cha03] S.-G. CHANG, K.-D. CHOI, S.-H. JANG und H.-C. SHIN. *Role of Disulfide Bonds in the Structure and Activity of Human Insulin*. Molecules and Cells 16(3) (2003), S. 323–330.
- [Cha68] J. CHAUDHURI, S. KUME, J. JAGUR-GRODZINSKI und M. SZWARC. *Chemistry of radical anions of heterocyclic aromatics. I. Electron spin resonance and electronic spectra*. Journal of the American Chemical Society 90(23) (Nov. 1968), S. 6421–6425.

- [Che02] R. CHELLI, F. L. GERVASIO, P. PROCACCI und V. SCETTINO. *Stacking and T-shape Competition in Aromatic-Aromatic Amino Acid Interactions*. Journal of the American Chemical Society 124(21) (Mai 2002), S. 6133–6143.
- [Che07] H. CHEN, E. RHOADES, J. S. BUTLER, S. N. LOH und W. W. WEBB. *Dynamics of equilibrium structural fluctuations of apomyoglobin measured by fluorescence correlation spectroscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(25) (Juni 2007), S. 10459–10464.
- [Che15a] CHEMGAPEDIA. *Circulardichroismus und Sekundärstruktur*. 6. Okt. 2015. URL: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteindynamik/circulardichroismus.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteindynamik/cd2.vscml.html>.
- [Che15b] M. CHERGUI. *Ultrafast Photophysics of Transition Metal Complexes*. Accounts of Chemical Research 48(3) (März 2015), S. 801–808.
- [Cli09] M. J. CLIFF et al. *The Denatured State of N-PGK Is Compact and Predominantly Disordered*. Journal of Molecular Biology 385(1) (Jan. 2009), S. 266–277.
- [CSS02] A. COCHRAN, N. SKELTON und M. STAROVASNIK. *Tryptophan zippers: Stable, monomeric beta-hairpins (vol 98, pg 5578, 2001)*. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF 99(13) (Juni 2002), S. 9081–9081.
- [DC97] K. A. DILL und H. S. CHAN. *From Levinthal to pathways to funnels*. Nat Struct Mol Biol 4(1) (Jan. 1997), S. 10–19.
- [Dee14] A. A. DEEG et al. *Isomerization- and Temperature-Jump-Induced Dynamics of a Photoswitchable β -Hairpin*. Chemistry – A European Journal 20(3) (2014), S. 694–703.
- [Del06] I. DELFINO et al. *Ultrafast Pump-Probe Study of Excited-State Charge-Transfer Dynamics in Ume cyanin from Horseradish Root*. The Journal of Physical Chemistry B 110(34) (Aug. 2006), S. 17252–17259.
- [DFC93] K. A. DILL, K. FIEBIG und H. CHAN. *Cooperativity in protein-folding kinetics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(5) (März 1993), S. 1942–1946.
- [DGP04] A. N. DROZDOV, A. GROSSFIELD und R. V. PAPPU. *Role of Solvent in Determining Conformational Preferences of Alanine Dipeptide in Water*. Journal of the American Chemical Society 126(8) (März 2004), S. 2574–2581.
- [Don06] S.-L. DONG et al. *A Photocontrolled β -Hairpin Peptide*. Chemistry – A European Journal 12(4) (2006), S. 1114–1120.

- [Eks15] EKSPLA. *Nanosecond systems*. 23. Nov. 2015. URL: <http://www.ekspla.com/wp-content/uploads/2011/06/nt242-series-nanosecond-tunable-dpss-lasers-operating-at-khz-repetition-rates.pdf>.
- [FP02] A. V. FINKELSTEIN und O. B. PTITSYN. *Protein physics: a course of lectures*. Soft condensed matter, complex fluids and biomaterials series. Amsterdam ; Boston: Academic Press, 2002.
- [FR04] N. C. FITZKEE und G. D. ROSE. *Reassessing random-coil statistics in unfolded proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(34) (Aug. 2004), S. 12497–12502.
- [Fre13] J. FREUDENFELD. *Optimierungen und Messungen an einem Anreg-Abtast-Spektrometer*. Bachelorarbeit. LMU, 2013.
- [Fri99] H. FRIEBOLIN. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: eine Einführung*. 3. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH-Verl, 1999.
- [FS04] A. R. FERSHT und S. SATO. *Φ -Value analysis and the nature of protein-folding transition states*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(21) (Mai 2004), S. 7976–7981.
- [FS93] A. FERSHT und L. SERRANO. *Principles of Protein Stability Derived from Protein Engineering Experiments*. Current Opinion in Structural Biology 3(1) (Feb. 1993), S. 75–83.
- [FSW91] H. FRAUENFELDER, S. G. SLIGAR und P. G. WOLYNES. *The energy landscapes and motions of proteins*. Science 254(5038) (Dez. 1991), S. 1598–1603.
- [FTL80] B. FINNSTRÖM, F. TFIBEL und L. LINDQVIST. *One-and two-photon ionization of aqueous tryptophan by the harmonics of the Nd laser*. Chemical Physics Letters 71(2) (Apr. 1980), S. 312–316.
- [FV69] P. J. FLORY und M. VOLKENSTEIN. *Statistical mechanics of chain molecules*. Biopolymers 8(5) (Nov. 1969), S. 699–700.
- [GC65] A. GINSBURG und W. R. CARROLL. *Some Specific Ion Effects on the Conformation and Thermal Stability of Ribonuclease**. Biochemistry 4(10) (Okt. 1965), S. 2159–2174.
- [GGB09] O. GREEN, B. A. GANDHI und J. N. BURSTYN. *Photophysical Characteristics and Reactivity of Bis(2,9-di-tert-butyl-1,10-phenanthroline) copper(I)*. Inorganic Chemistry 48(13) (Juli 2009), S. 5704–5714.
- [GH34] L. D. GOODHUE und R. M. HIXON. *Electron-Sharing Ability of Organic Radicals. VII. Dissociation Constants of a Series of Organic Acids and Amines in Water, Methanol and Ethanol*. Journal of the American Chemical Society 56(6) (Juni 1934), S. 1329–1333.

- [GL65] D. GORMAN und R. LEVINE. *Cytochrome F and Plastocyanin - Their Sequence in Photosynthetic Electron Transport Chain of Chlamydomonas Reinhardi*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 54(6) (1965), S. 1665–&.
- [GOD07] K. GHOSH, S. B. OZKAN und K. A. DILL. *The ultimate speed limit to protein folding is conformational searching*. Journal of the American Chemical Society 129(39) (Okt. 2007), S. 11920–11927.
- [GW94] I. GRISHINA und R. WOODY. *Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: exciton couplets and coupled oscillators*. Faraday Discussions 99 (1994), S. 245–262.
- [Ham04] J. B. HAMBURGER, J. C. FERREON, S. T. WHITTEN und V. J. HILSER. *Thermodynamic mechanism and consequences of the polyproline II (P-II) structural bias in the denatured states of proteins*. Biochemistry 43(30) (Aug. 2004), S. 9790–9799.
- [Ham93] D. HAMADA, M. HOSHINO, M. KATAOKA, A. FINK und Y. GOTO. *Intermediate Conformational States of Apocytochrome-C*. Biochemistry 32(39) (Okt. 1993), S. 10351–10358.
- [Har96] F. U. HARTL. *Molecular chaperones in cellular protein folding*. Nature 381(6583) (Juni 1996), S. 571–580.
- [Hau08] K. HAUSER, C. KREJTSCHI, R. HUANG, L. WU und T. A. KEIDERLING. *Site-specific relaxation kinetics of a tryptophan zipper hairpin peptide using temperature-jump IR spectroscopy and isotopic labeling*. Journal of the American Chemical Society 130(10) (März 2008), S. 2984–2992.
- [HD11] K. HOMMA und P. DALLOS. *Evidence That Prestin Has at Least Two Voltage-dependent Steps*. Journal of Biological Chemistry 286(3) (Jan. 2011), S. 2297–2307.
- [Her06] D. E. HERTZOG, B. IVORRA, B. MOHAMMADI, O. BAKAJIN und J. G. SANTIAGO. *Optimization of a Microfluidic Mixer for Studying Protein Folding Kinetics*. Analytical Chemistry 78(13) (Juli 2006), S. 4299–4306.
- [Her08] T. HERZOG. *Charakterisierung und Ultrakurzzeitspektroskopie von neu-synthetisierten Schaltfarbstoffen*. Dissertation. LMU, 2008.
- [HFW14] G. HAN, N. FENG und G. WANG. *Fluorescence Quenching of Hen Egg Lysozyme and Bovine Serum Albumin by Azobenzene Polymer at Different pH*. Chemistry Letters 43 (2014), S. 1499–1501.
- [HM95] K. E. van HOLDE und K. I. MILLER. *Hemocyanins. Advances in Protein Chemistry*. Hrsg. von F. M. R. C.B. ANFINSEN John T. Edsall and David S. Eisenberg. Bd. 47. Academic Press, 1995, S. 1–81.

- [Hof07] A. HOFFMANN et al. *Mapping protein collapse with single-molecule fluorescence and kinetic synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(1) (Feb. 2007), S. 105–110.
- [Hof08] H. HOFMANN, R. P. GOLBIK, M. OTT, C. G. HUEBNER und R. ULBRICH-HOFMANN. *Coulomb forces control the density of the collapsed unfolded state of barstar*. Journal of Molecular Biology 376(2) (Feb. 2008), S. 597–605.
- [Hof13] A. HOFFMANN et al. *Katalytische Phenolhydroxylierung mit Sauerstoff: Substratvielfalt jenseits der Proteinmatrix von Tyrosinase*. Angewandte Chemie 125(20) (Mai 2013), S. 5508–5512.
- [Hof14] A. HOFFMANN et al. *Catching an Entatic State—A Pair of Copper Complexes*. Angewandte Chemie International Edition 53(1) (Jan. 2014), S. 299–304.
- [HS90] C. A. HUNTER und J. K. M. SANDERS. *The nature of .pi.-.pi. interactions*. Journal of the American Chemical Society 112(14) (Juli 1990), S. 5525–5534.
- [HY95] B. HONIG und A. YANG. *Free-Energy Balance in Protein-Folding*. Advances in Protein Chemistry, Vol 46 46 (1995), S. 27–58.
- [HZ11] P. HAMM und M. T. ZANNI. *Concepts and Methods of 2D Infrared Spectroscopy*. Cambridge University Press, 2011.
- [ITT15] M. IWAMURA, S. TAKEUCHI und T. TAHARA. *Ultrafast Excited-State Dynamics of Copper(I) Complexes*. Accounts of Chemical Research 48(3) (März 2015), S. 782–791.
- [JF91] S. JACKSON und A. FERSHT. *Folding of Chymotrypsin Inhibitor-2 .1. Evidence for a 2-State Transition*. Biochemistry 30(43) (Okt. 1991), S. 10428–10435.
- [JPT13] K. C. JONES, C. S. PENG und A. TOKMAKOFF. *Folding of a heterogeneous β -hairpin peptide from temperature-jump 2D IR spectroscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110(8) (Feb. 2013), S. 2828–2833.
- [JW93] P. A. JENNINGS und P. E. WRIGHT. *Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin*. Science 262(5135) (Mai 1993), S. 892–896.
- [Kau59] W. KAUZMANN. *Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation1*. Advances in Protein Chemistry. Hrsg. von M. L. A. C.B. ANFINSEN Kenneth Bailey and John T. Edsall. Bd. 14. Academic Press, 1959, S. 1–63.

- [KB05] T. KIEFHABER und J. BUCHNER. *Protein Folding Handbook*. .1. Weinheim: Wiley, 2005.
- [KF62] I. KLOTZ und J. FRANZEN. *Hydrogen Bonds Between Modelpeptide Groups in Solution*. *Journal of the American Chemical Society* 84(18) (1962), S. 3461–&.
- [KHN06] E. V. KUZMENKINA, C. D. HEYES und G. U. NIENHAUS. *Single-molecule FRET study of denaturant induced unfolding of RNase H*. *Journal of Molecular Biology* 357(1) (März 2006), S. 313–324.
- [Kir83] J. R. KIRCHHOFF et al. *Temperature dependence of luminescence from Cu(NN)2+ systems in fluid solution. Evidence for the participation of two excited states*. *Inorganic Chemistry* 22(17) (Aug. 1983), S. 2380–2384.
- [KJP05] S. M. KELLY, T. J. JESS und N. C. PRICE. *How to study proteins by circular dichroism*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1751(2) (Aug. 2005), S. 119–139.
- [Kle90] F. KLEMENS et al. *The Crystal and Molecular-Structures of the Dpp Ligand and [cu(dpp)2][cucl2].2/3 Ch3cn*. *New Journal of Chemistry* 14(2) (Feb. 1990), S. 129–133.
- [KMK05] F. KRIEGER, A. MOEGLICH und T. KIEFHABER. *Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains*. *JACS* 127 (März 2005), S. 3346–3352.
- [Kue13] C. KUEBEL. *Anreg-Abstast-Experiment zur Entfaltung des schaltbaren Peptids AzoTrpZip2 - Integration eines abstimmbaren ns-Lasersystems*. Masterarbeit. LMU, 2013.
- [Kum06] M. D. S. KUMAR et al. *ProTherm and ProNIT: thermodynamic databases for proteins and protein-nucleic acid interactions*. *Nucleic Acids Research* 34 (Jan. 2006), S. D204–D206.
- [LAK95] T. LAZARIDIS, G. ARCHONTIS und M. KARPLUS. *Enthalpic contribution to protein stability: Insights from atom-based calculations and statistical mechanics*. *Advances in Protein Chemistry*, Vol 47 47 (1995), S. 231–306.
- [LC76] M. LEVITT und C. CHOTHIA. *Structural Patterns in Globular Proteins*. *Nature* 261(5561) (1976), S. 552–558.
- [Lev69] C. LEVINTHAL. *How to Fold Graciously*. *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois* (1969), S. 22–24.
- [LLP96] J. LEONARD, B. LYGO und G. PROCTER. *Praxis der organischen Chemie*. Weinheim: VHC, 1996.

- [Loc10] J. V. LOCKARD et al. *Influence of Ligand Substitution on Excited State Structural Dynamics in Cu(I) Bisphenanthroline Complexes*. Journal of Physical Chemistry B 114(45) (Nov. 2010), S. 14521–14527.
- [Löw05] M. LÖWENECK. *Synthese lichtschtbarer Azobenzol-enthaltender Peptide und deren biophysikalische Charakterisierung*. dissertation. TUM, 2005.
- [LT94] T.-Y. LIN und S. N. TIMASHEFF. *Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein*. Biochemistry 33(42) (Okt. 1994), S. 12695–12701.
- [LV93] R. LANGER und J. VACANTI. *Tissue Engineering*. Science 260(5110) (Mai 1993), S. 920–926.
- [MA08] K. MUNK und C. ABRÖLL, Hrsg. *Biochemie, Zellbiologie*. Taschenlehrbuch Biologie. Stuttgart: Thieme, 2008.
- [Maj07] D. S. MAJUMDAR et al. *Single-molecule FRET reveals sugar-induced conformational dynamics in LacY*. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(31) (Juli 2007), S. 12640–12645.
- [Mar00] A. MARITAN, C. MICHELETTI, A. TROVATO und J. R. BANAVAR. *Optimal shapes of compact strings*. Nature 406(6793) (Juli 2000), S. 287–290.
- [Mer12] A. S. MERESHCHENKO, S. K. PAL, K. E. KARABAEVA, P. Z. EL-KHOURY und A. N. TARNOVSKY. *Photochemistry of Monochloro Complexes of Copper(II) in Methanol Probed by Ultrafast Transient Absorption Spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry A 116(11) (März 2012), S. 2791–2799.
- [Mer14] A. S. MERESHCHENKO et al. *Photochemistry of copper(II) chlorocomplexes in acetonitrile: Trapping the ligand-to-metal charge transfer excited state relaxations pathways*. Chemical Physics Letters 615 (Nov. 2014), S. 105–110.
- [Mer15] A. S. MERESHCHENKO et al. *Mechanism of Formation of Copper(II) Chloro Complexes Revealed by Transient Absorption Spectroscopy and DFT/TDDFT Calculations*. The Journal of Physical Chemistry B 119(28) (Juli 2015), S. 8754–8763.
- [MFC15] M. W. MARA, K. A. FRANSTED und L. X. CHEN. *Interplays of excited state structures and dynamics in copper(I) diimine complexes: Implications and perspectives*. Coordination Chemistry Reviews. Proceedings from the 20th International Symposium on the Photophysics and Photochemistry of Coordination Compounds 282–283 (Jan. 2015), S. 2–18.

- [MGK98] M. T. MILLER, P. K. GANTZEL und T. B. KARPISHIN. *Structures of the copper(I) and copper(II) complexes of 2,9-diphenyl-1,10-phenanthroline: Implications for excited-state structural distortion*. Inorganic Chemistry 37(9) (Mai 1998), S. 2285–2290.
- [MH15] B. MOESER und D. HORINEK. *The role of the concentration scale in the definition of transfer free energies*. Biophysical Chemistry 196 (Jan. 2015), S. 68–76.
- [Miy60] T. MIYAZAWA. *Perturbation Treatment of the Characteristic Vibrations of Polypeptide Chains in Various Configurations*. The Journal of Chemical Physics 32(6) (Juni 1960), S. 1647–1652.
- [MJK06] A. MÖGLICH, K. JODER und T. KIEFHABER. *End-to-end distance distributions and intrachain diffusion constants in unfolded polypeptide chains indicate intramolecular hydrogen bond formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(33) (Aug. 2006), S. 12394–12399.
- [MK75] W. H. MOORE und S. KRIMM. *Transition Dipole Coupling in Amide I Modes of β Polypeptides*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 72(12) (Dez. 1975), S. 4933–4935.
- [MMM05] A. MARX, J. MÜLLER und E. MANDELKOW. *The structure of microtubule motor proteins*. *Advances in Protein Chemistry*. Hrsg. von a. D. A. D. P. JOHN M. SQUIRE. Bd. 71. Fibrous Proteins: Muscle and Molecular Motors. Academic Press, 2005, S. 299–344.
- [Mok99] Y. K. MOK, C. M. KAY, L. E. KAY und J. FORMAN-KAY. *NOE data demonstrating a compact unfolded state for an SH3 domain under non-denaturing conditions*. Journal of Molecular Biology 289(3) (Juni 1999), S. 619–638.
- [MP91] J. B. O. MITCHELL und S. L. PRICE. *On the relative strengths of amide... amide and amide... water hydrogen bonds*. Chemical Physics Letters 180(6) (Juni 1991), S. 517–523.
- [MP96] J. K. MYERS und C. N. PACE. *Hydrogen bonding stabilizes globular proteins*. Biophysical Journal 71(4) (Okt. 1996), S. 2033–2039.
- [MPS95] J. MYERS, C. PACE und J. SCHOLTZ. *Denaturant M-Values and Heat-Capacity Changes - Relation to Changes in Accessible Surface-Areas of Protein Unfolding*. Protein Science 4(10) (Okt. 1995), S. 2138–2148.
- [MT91] M. MACARTHUR und J. THORNTON. *Influence of proline residues on protein conformation*. Journal of Molecular Biology 218 (2 März 1991), S. 397–412.

- [Mur95] A. G. MURZIN, S. E. BRENNER, T. HUBBARD und C. CHOTHIA. *SCOP: A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures*. Journal of Molecular Biology 247(4) (Apr. 1995), S. 536–540.
- [Nag10] Y. NAGASAWA et al. *Coherent dynamics and ultrafast excited state relaxation of blue copper protein; plastocyanin*. Physical Chemistry Chemical Physics 12(23) (2010), S. 6067–6075.
- [Näg97] T. NÄGELE, R. HOICHE, W. ZINTH und J. WACHTVEITL. *Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene*. Chemical Physics Letters 272(5-6) (Juli 1997), S. 489–495.
- [Neu13] S. NEUMAIER, A. REINER, M. BÜTTNER, B. FIERZ und T. KIEFHABER. *Testing the diffusing boundary model for the helix-coil transition in peptides*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110(32) (Aug. 2013), S. 12905–12910.
- [Nym09] H. NYMEYER. *Energy Landscape of the Trpzip2 Peptide*. The Journal of Physical Chemistry B 113(24) (Juni 2009), S. 8288–8295.
- [OW04] J. N. ONUCHIC und P. G. WOLYNES. *Theory of protein folding*. Current Opinion in Structural Biology 14(1) (Feb. 2004), S. 70–75.
- [Pas08] D. PASCHEK et al. *The Solvent-Dependent Shift of the Amide I Band of a Fully Solvated Peptide as a Local Probe for the Solvent Composition in the Peptide/Solvent Interface*. Chemphyschem 9(18) (Dez. 2008), S. 2742–2750.
- [Pas12] C. L. PASHLEY et al. *Conformational Properties of the Unfolded State of Im7 in Nondenaturing Conditions*. Journal of Molecular Biology 416(2) (Feb. 2012), S. 300–318.
- [PCB51] L. PAULING, R. COREY und H. BRANSON. *The Structure of Proteins - 2 Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 37(4) (1951), S. 205–211.
- [Pen13] T. J. PENFOLD et al. *Solvent-Induced Luminescence Quenching: Static and Time-Resolved X-Ray Absorption Spectroscopy of a Copper(I) Phenanthroline Complex*. Journal of Physical Chemistry A 117(22) (Juni 2013), S. 4591–4601.
- [PG81] S. PROVENCHER und J. GLOCKNER. *Estimation of Globular Protein Secondary Structure from Circular-Dichroism*. Biochemistry 20(1) (1981), S. 33–37.

- [Pie80] O. PIERONI, J. HOUBEN, A. FISSI und P. COSTANTINO. *Reversible Conformational-Changes Induced by Light in Poly(l-Glutamic Acid) with Photochromic Side-Chains*. Journal of the American Chemical Society 102(18) (1980), S. 5913–5915.
- [PKW65] M. PERUTZ, J. KENDREW und H. WATSON. *Structure and function of haemoglobin: II. Some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence*. Journal of Molecular Biology 13 (3 Okt. 1965), S. 669–678.
- [PPK01] J.-M. L. PECOURT, J. PEON und B. KOHLER. *DNA Excited-State Dynamics: Ultrafast Internal Conversion and Vibrational Cooling in a Series of Nucleosides*. Journal of the American Chemical Society 123(42) (Okt. 2001), S. 10370–10378.
- [Pti95] O. PTITSYN. *How the Molten Globule Became*. Trends in Biochemical Sciences 20(9) (Sep. 1995), S. 376–379.
- [Ram11] M. S. RAMPP. *Temperaturabhängige Faltung des Modellpeptids AzoTrp-Zip2 von Nano- bis Mikrosekunden*. Masterarbeit. LMU, 2011.
- [Reg12] N. REGNER et al. *Light-Switchable Hemithioindigo-Hemistilbene-Containing Peptides: Ultrafast Spectroscopy of the Z -> E Isomerization of the Chromophore and the Structural Dynamics of the Peptide Moiety*. Journal of Physical Chemistry B 116(14) (Apr. 2012), S. 4181–4191.
- [RMC06] H. RODER, K. MAKI und H. CHENG. *Early events in protein folding explored by rapid mixing methods*. Chemical Reviews 106(5) (Mai 2006), S. 1836–1861.
- [Ros06] G. D. ROSE, P. J. FLEMING, J. R. BANAVAR und A. MARITAN. *A backbone-based theory of protein folding*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(45) (Juli 2006), S. 16623–16633.
- [RS68] G. N. RAMACHANDRAN und V. SASISEKHARAN. *Conformation of Polypeptides and Proteins. Advances in Protein Chemistry*. Hrsg. von M. L. A. C.B. ANFINSEN John T. Edsall and Frederic M. Richards. Bd. 23. Academic Press, 1968, S. 283–437.
- [RU02] B. R. RAMI und J. B. UDGAONKAR. *Mechanism of formation of a productive molten globule form of barstar*. Biochemistry 41(6) (Feb. 2002), S. 1710–1716.
- [RW11] C. REICHARDT und T. WELTON. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. 4th, updated and enl. ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2011.

- [SA69] H. SUSI und J. ARD. *Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding of Epsilon-Caprolactam in Aqueous Solution*. Journal of Physical Chemistry 73(7) (1969), S. 2440–&.
- [Sch07] T. E. SCHRADER et al. *Light-triggered β -hairpin folding and unfolding*. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(40) (Okt. 2007), S. 15729–15734.
- [Sch08a] T. SCHRADER. *Strukturdynamik eines photoschaltbaren beta-Hairpin Modellpeptids*. Dissertation. LMU, 2008.
- [Sch08b] W. SCHREIER. *UV-Strahlung und DNA-Schäden - Untersuchung UV-induzierter Prozesse in Nukleinsäuren mit Femtosekunden-Infrarotspektroskopie*. Dissertation. LMU, 2008.
- [Sch11] T. E. SCHRADER et al. *Folding and Unfolding of Light-Triggered β -Hairpin Model Peptides*. The Journal of Physical Chemistry B 115(18) (Mai 2011), S. 5219–5226.
- [Sch55] J. SCHELLMAN. *The stability of hydrogen-bonded peptide structures in aqueous solution*. C.R. Trav. Lab Carlsberg Ser. Chim. 29 (1955), S. 230–259.
- [Sch91] J. M. SCHOLTZ et al. *Calorimetric determination of the enthalpy change for the alpha-helix to coil transition of an alanine peptide in water*. Proceedings of the National Academy of Sciences 88(7) (Jan. 1991), S. 2854–2858.
- [Sem16] SEMROCK. *320/40 nm BrightLine single-band bandpass filter*. 27. Jan. 2016. URL: <https://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=FF01-320/40-25>.
- [SH06] E. SHERMAN und G. HARAN. *Coil-globule transition in the denatured state of a small protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(31) (Jan. 2006), S. 11539–11543.
- [Shi06] Z. SHI, K. CHEN, Z. LIU, T. R. SOSNICK und N. R. KALLENBACH. *PII structure in the model peptides for unfolded proteins: Studies on ubiquitin fragments and several alanine-rich peptides containing QQQ, SSS, FFF, and VVV*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 63(2) (Mai 2006), S. 312–321.
- [Shi92] B. SHIRLEY, P. STANSSENS, U. HAHN und C. PACE. *Contribution of Hydrogen-Bonding to the Conformational Stability of Ribonuclease-T1*. Biochemistry 31(3) (Jan. 1992), S. 725–732.
- [SLE02] B. SCHULER, E. A. LIPMAN und W. A. EATON. *Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy*. Nature 419(6908) (Okt. 2002), S. 743–747.

- [Sno04] C. D. SNOW et al. *Trp zipper folding kinetics by molecular dynamics and temperature-jump spectroscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences 101(12) (März 2004), S. 4077–4082.
- [Sol04] E. I. SOLOMON, R. K. SZILAGYI, S. DEBEER GEORGE und L. BASUMALLICK. *Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins*. Chemical Reviews 104(2) (Feb. 2004), S. 419–458.
- [SPL00] K. L. STEVENSON, G. A. PAPADANTONAKIS und P. R. LEBRETON. *Nanosecond UV laser photoionization of aqueous tryptophan: temperature dependence of quantum yield, mechanism, and kinetics of hydrated electron decay*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 133(3) (Mai 2000), S. 159–167.
- [Spo01] S. SPOERLEIN. *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen*. Dissertation. LMU, 2001.
- [Sta14] J. STANEK. *Untersuchung des Charge- und Elektronen-Transfers in Kupfer-Guanidinchinolin-Systemen*. Masterarbeit. LMU, 2014.
- [Tai83] J. TAINER, E. GETZOFF, J. RICHARDSON und D. RICHARDSON. *Structure and Mechanism of Copper, Zinc Superoxide-Dismutase*. Nature 306(5940) (1983), S. 284–287.
- [Tan68] C. TANFORD. *Protein Denaturation. Advances in Protein Chemistry*. Hrsg. von M. L. A. C.B. ANFINSEN John T. Edsall and Frederic M. Richards. Bd. 23. Academic Press, 1968, S. 121–282.
- [Tay86] W. R. TAYLOR. *The classification of amino acid conservation*. Journal of Theoretical Biology 119(2) (März 1986), S. 205–218.
- [TW57] F. W. J. TEALE und G. WEBER. *Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids*. Biochemical Journal 65(3) (März 1957), S. 476–482.
- [Udg13] J. B. UDGAONKAR. *Polypeptide chain collapse and protein folding*. Archives of Biochemistry and Biophysics. Protein Folding and Stability 531(1–2) (März 2013), S. 24–33.
- [VC01] J. T. VIVIAN und P. R. CALLIS. *Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins*. Biophysical Journal 80(5) (Mai 2001), S. 2093–2109.
- [Voe12] V. A. VOELZ et al. *Slow Unfolded-State Structuring in Acyl-CoA Binding Protein Folding Revealed by Simulation and Experiment*. Journal of the American Chemical Society 134(30) (Aug. 2012), S. 12565–12577.
- [Wac04] J. WACHTVEITL et al. *Ultrafast conformational dynamics in cyclic azobenzene peptides of increased flexibility*. Biophysical Journal 86(4) (Apr. 2004), S. 2350–2362.

- [WBL10] S. A. WALDAUER, O. BAKAJIN und L. J. LAPIDUS. *Extremely slow intramolecular diffusion in unfolded protein L*. Proceedings of the National Academy of Sciences 107(31) (März 2010), S. 13713–13717.
- [Wik16] WIKIPEDIA. *Aminosäuren*. 7. März 2016. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Aminos%C3%83%C2%A4uren>.
- [Wu09] L. WU, D. MCELHENY, R. HUANG und T. A. KEIDERLING. *Role of Tryptophan-Tryptophan Interactions in Trpzip beta-Hairpin Formation, Structure, and Stability*. Biochemistry 48(43) (Nov. 2009), S. 10362–10371.
- [Yan04] W. Y. YANG, J. W. PITERA, W. C. SWOPE und M. GRUEBELE. *Heterogeneous Folding of the trpzip Hairpin: Full Atom Simulation and Experiment*. Journal of Molecular Biology 336(1) (Feb. 2004), S. 241–251.
- [YB96] D. C. YOUVAN und M. E. BEYERLE. *Structure and fluorescence mechanism of GFP*. Nature Biotechnology 14(10) (Okt. 1996), S. 1219–1220.
- [YMP96] F. YANG, L. G. MOSS und G. N. PHILLIPS. *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nature Biotechnology 14(10) (Okt. 1996), S. 1246–1251.
- [Zgi03] M. Z. ZGIERSKI. *Cu(I)-2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline: Density functional study of the structure, vibrational force-field, and excited electronic states*. Journal of Chemical Physics 118(9) (März 2003), S. 4045–4051.
- [Zon07] C. ZONG et al. *Establishing the entatic state in folding metallated Pseudomonas aeruginosa azurin*. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(9) (Feb. 2007), S. 3159–3164.
- [ZQW06] J. ZHANG, M. QIN und W. WANG. *Folding mechanism of β -hairpins studied by replica exchange molecular simulations*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 62(3) (Feb. 2006), S. 672–685.

Danksagung

Einer allein kann kein Dach tragen – Afrikanisches Sprichwort

... und promovieren wohl auch nicht. Deshalb möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Wolfgang Zinth für die Möglichkeit, meine Promotion in sehr angenehmer und zugleich fordernder Atmosphäre durchführen zu können, dafür, dass er mir sein immenses Wissen im Bereich der Laserspektroskopie immer zur Verfügung stellte, wenn ich es gebraucht habe und nicht zuletzt dafür, dass er sich stets für uns Doktoranden eingesetzt hat.

PD Dr. Bert Nickel für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder und ihrer Arbeitsgruppe für die Kooperation im Bereich der lichtschtbaren Peptide, für viele neue Ideen und fruchtbare Diskussionen und für die Versorgung mit zahlreichen Proben.

Prof. Dr. Sonja Herres-Pawlis und ihrer Arbeitsgruppe für die sehr interessanten Fragestellungen der Kupferkomplexe, deren Synthese, ihren unermüdlichen Einsatz, viele Wissenschaftler unter einen Hut zu bringen, die zahlreichen Nachhilfestunden zum Thema der Komplexchemie und den offenen, sehr angenehmen Umgang.

Prof. Dr. Michael Rübhausen und seiner Arbeitsgruppe für die transienten XAS-Messungen an den Kupferkomplexen.

Bert M. Pilles für seine Hilfe beim Erstellen des Messprogrammes für die Tryptophanfluoreszenzmessungen, seine große Unterstützung und Weisheiten beim Justieren der Anlage und seine Expertise in allen technischen Belangen.

Benjamin März für die Durchführung der transienten UV/Vis-Absorptionsmessungen an den Kupferkomplexen und die Diskussionen bezüglich möglicher Reaktionsmodelle.

den Masterstudentinnen Carmen Kübel und Ilvana Turkanovic dafür, dass ich sie bei ihren Masterarbeiten betreuen durfte, für die vielen Stunden Arbeit, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beitrugen.

den Sekretärinnen des BMO für Hilfe bei allen bürokratischen Belangen.

der Werkstatt Rudolf Schwarz, Alfons Storck und Christian Hausmann für die Umsetzung schwieriger Laborutensilien.

den weiteren Kollegen am BMO für das angenehme Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft.

Dorothea dafür, dass sie mich immer unterstützt hat, wo es ging und mir über vieles hinweg geholfen hat.

Dieter und Brigitte (†) Rampp meinen Eltern, für die immerwährende Unterstützung, die liebevolle Zuwendung, den sicheren Hafen, den sie mir immer gegeben haben. Ohne Euch wäre ich nicht der, der ich bin.