

---

**Faltung und Entfaltung eines neu entwickelten  
lichtschaltbaren  $\beta$ -hairpin Modellpeptids und  
Untersuchung seiner hydrophoben  
Wechselwirkungen**

**Stefan M. Hofmann**

---



München 2017



---

**Faltung und Entfaltung eines neu entwickelten  
lichtschaltbaren  $\beta$ -hairpin Modellpeptids und  
Untersuchung seiner hydrophoben  
Wechselwirkungen**

**Stefan M. Hofmann**

---

Dissertation

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

vorgelegt von  
Stefan Michael Hofmann  
aus Nördlingen.

München, den 19. Dezember 2017

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Zinth

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Zacharias

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>vii</b>
<b>Kurzfassung</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Proteine</b>	<b>3</b>
2.1 Aminosäuren und Primärstruktur . . . . .	3
2.2 Sekundärstruktur . . . . .	5
2.3 Tertiärstruktur . . . . .	7
2.4 Quartärstruktur . . . . .	8
2.5 Proteinfaltung . . . . .	9
<b>3 <math>\beta</math>-hairpin Modellpeptide</b>	<b>13</b>
3.1 Chignolin . . . . .	13
3.2 Lichtschaltbare $\beta$ -hairpin Modellpeptide . . . . .	14
3.2.1 AzoChignolin . . . . .	15
3.2.2 Y2V-, Y2W- und W9V-AzoChignolin . . . . .	16
3.2.3 P4T-AzoChignolin . . . . .	17
<b>4 Experimentelle Untersuchungsmethoden</b>	<b>21</b>
4.1 Stationäre Untersuchungsmethoden . . . . .	21
4.1.1 UV/vis-Absorptionsspektroskopie . . . . .	21
4.1.2 Infrarotspektroskopie . . . . .	22
4.1.3 Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	23
4.1.4 CD-Spektroskopie . . . . .	24
4.1.5 NMR-Spektroskopie . . . . .	25
4.2 Zeitaufgelöste Untersuchungsmethoden . . . . .	26
4.2.1 Lasersysteme . . . . .	26
4.2.2 Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie . . . . .	27
4.2.3 Zeitaufgelöste Tryptophan-Fluoreszenz . . . . .	31
<b>5 Stationäre Charakterisierungen</b>	<b>37</b>
5.1 Probenvorbereitung . . . . .	37
5.2 Chignolin . . . . .	37
5.3 AzoChignolin . . . . .	39
5.4 Y2V-, Y2W- und W9V-AzoChignolin . . . . .	52

5.5	P4T-AzoChignolin . . . . .	55
<b>6</b>	<b>Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie</b>	<b>57</b>
6.1	AzoChignolin . . . . .	57
6.1.1	Faltung . . . . .	57
6.1.2	Entfaltung . . . . .	68
6.2	Faltung von Y2V- und Y2W-AzoChignolin . . . . .	72
<b>7</b>	<b>Zeitaufgelöste Trp-Fluoreszenz von AzoChignolin</b>	<b>83</b>
7.1	Faltung . . . . .	83
7.2	Entfaltung . . . . .	86
7.3	Streak-Kamera Messungen . . . . .	88
<b>8</b>	<b>Modell der Faltung und Entfaltung</b>	<b>95</b>
8.1	AzoChignolin . . . . .	95
8.1.1	Faltung . . . . .	95
8.1.2	Entfaltung . . . . .	99
8.1.3	Energielandschaften . . . . .	100
8.2	Die Rolle der hydrophoben Wechselwirkungen bei der Faltung . . . . .	104
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>111</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>121</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>125</b>
	<b>Literatur</b>	<b>127</b>

# Abkürzungen

AB	Azobenzol
ACN	Acetonitril
AMPP	3-(3-Aminomethyl-phenylazo)-phenylelessigsäure
Asp	Asparaginsäure
ATZ	AzoTrpZip2
BBO	$\beta$ -Bariumborat
CCD	Charge-coupled Device
CD	Circulardichroismus
CG	Weißlicht Erzeugung
CPA	Chirped Pulse Amplification
DADS	Decay Associated Difference Spectra
DAS	Decay Associated Spectra
DFM	Differenz-Frequenz Mischung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESA	Excited State Absorption
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GSB	Ground State Bleach
GVD	Gruppengeschwindigkeitsdispersion
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IR	infrarot
MCP	Microchannel Plate
MCT	Quecksilber-Cadmium-Tellurid
MD	Molekulardynamik
MeOH	Methanol

## Abkürzungen

---

Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NMR	Kernspinresonanz
NOPA	Non-colinear Optical Parametric Amplifier
OPA	Optical Parametric Amplifier
OPO	Optical Parametric Oscillator
Pro	Prolin
ps	photostationär
SHG	Zweite-Harmonische Erzeugung
SVD	Singulärwertzerlegung
TFA	Trifluoressigsäure
TFAc <sup>-</sup>	Trifluoracetat
THG	Dritte-Harmonische Erzeugung
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolett
Val	Valin
vis	sichtbar
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat

# Kurzfassung

Proteine sind in allen Zellen von Lebewesen enthalten und führen hier die verschiedensten Funktionen des Lebens aus. Damit jedes Protein seine spezielle Aufgabe wahrnehmen kann, muss es in der richtigen dreidimensionalen Struktur vorliegen, der nativen Struktur. Proteine werden als lineare Aminosäureketten synthetisiert. Nach der Synthese formen sich zuerst die Sekundärstrukturelemente, die sich dann in die richtige Tertiärstruktur umlagern [Ros06]. Über den ersten Schritt, der Bildung der Sekundärstrukturelemente und insbesondere von  $\beta$ -Faltblättern, ist bis heute noch wenig bekannt.

Diese Arbeit befasst sich mit der Bildung des einfachsten  $\beta$ -Faltblatt, dem  $\beta$ -hairpin. Dazu wurde auf der Grundlage des  $\beta$ -hairpin Peptids Chignolin ein lichtschtbares Peptid mit dem Azobenzol-Photoschalter AMPP in der Turnsequenz entwickelt (Gly1-Tyr2-Asp3-Pro4-AMPP-Gly7-Thr8-Trp9-Gly10) [Pod15].

Es wurde gezeigt, dass im trans-Zustand des AMPP ungeordnete random coil Strukturen vorliegen, während für cis-AMPP die  $\beta$ -hairpin Struktur eingenommen wird. Die Entstehung sowie die Auflösung dieser  $\beta$ -hairpin Struktur wurde mit zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie und zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie verfolgt. Es stellte sich heraus, dass AzoChignolin nach der Isomerisierung nach cis schon mit 54 ns die  $\beta$ -hairpin Struktur bildet. Dabei entstehen die Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen nach dem Zipper-Modell. Sie werden zuerst in der Nähe des Schalters gebildet und schließen sich dann zu den Termini.

Die Entfaltung der  $\beta$ -hairpin Struktur geschieht noch schneller. So beginnt das Aufbrechen der Interstrang-Wasserstoffbrücken bereits mit 600 ps und ist nach wenigen Nanosekunden vollständig abgeschlossen. Auf der 100 ns Zeitskala finden nur noch Diffusionsprozesse im Lösungsmittel statt.

Der Einfluss der hydrophoben  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan auf die Faltungsreaktion wurde ebenfalls untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hydrophoben Wechselwirkungen einen großen Einfluss auf die Stabilität und die Faltungszeit der  $\beta$ -hairpin Struktur haben. Werden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Strängen in der Y2V-Mutante ausgeschaltet, so ist das gefaltete Peptid weniger stabil, aber faltet sehr schnell mit 25 ns. Bei einer Verstärkung der Wechselwirkungen (Y2W) ist die  $\beta$ -hairpin Struktur am stabilsten und die Faltungszeit steigt auf 73 ns.

Alle Faltungsmessungen lassen sich mit einer gestreckten Exponentialfunktion anpassen. Daraus konnte gefolgert werden, dass AzoChignolin ein downhill folder ist, das seinen nativen Zustand findet, indem es auf einer rauen Energielandschaft diffusiv zum globalen Minimum gelangt. Es konnte gezeigt werden, dass Y2V-AzoChignolin die glatteste und Y2W-AzoChignolin die raueste Potentialfläche hat. AzoChignolin liegt zwischen diesen beiden Mutanten.

Mit dieser Arbeit konnte für ein sehr kompaktes  $\beta$ -hairpin Modellpeptid die Dynamik von Faltungs- und Entfaltungsprozess aufgeklärt und Modellvorstellungen für die Strukturbildung durch Messungen bestätigt werden.



# 1 Einleitung

Proteine gehören zu den wichtigsten Molekülen, die Leben ermöglichen. Sie sind in allen Zellen von Lebewesen enthalten und machen rund 50 % des Trockengewichts einer Zelle aus. Proteine haben die verschiedensten Aufgaben. So verleiht beispielsweise das Strukturprotein Collagen [MG82] den Zellen Stabilität. Enzyme, die meist Proteine sind, kontrollieren und katalysieren nahezu jede biochemische Reaktion.

Alle menschlichen Proteine sind aus 20 Aminosäuren aufgebaut, den proteinogenen Aminosäuren. Die Proteine unterscheiden sich lediglich in der Anzahl und der Abfolge der Aminosäuren und ihrer dreidimensionalen Struktur, die wiederum alleine durch die Abfolge bestimmt ist [Anf61]. Proteine können ihre speziellen Aufgaben nur wahrnehmen, wenn sie in der richtigen, funktionellen nativen Struktur vorliegen.

Alle Proteine werden als lange Aminosäureketten nach der Vorlage der DNA<sup>1</sup> synthetisiert. Die Bauanleitung in der DNA für ein Protein wird als Gen bezeichnet. Innerhalb eines Gens sind die einzelnen Aminosäuren jeweils durch drei Basen kodiert. Die Proteinbiosynthese ist heute sehr gut verstanden. Jedoch ist es noch weitgehend unbekannt wie die synthetisierten Aminosäureketten ihre dreidimensionale native Struktur finden [DM12].

Wird die vorhergesehene funktionelle Struktur nicht gefunden und stattdessen eine andere fehlgefaltete Struktur eingenommen, so kann dies ganz gravierende Konsequenzen für den Organismus haben. Fehlgefaltete Proteine sind der Auslöser vieler neurodegenerativer Erkrankungen, deren Merkmal der Verlust von Nervenzellen ist. Die fehlgefalteten Proteine aggregieren zu großen unlöslichen Proteinklumpen, welche sich in Nervenzellen ablagern und somit zu deren Absterben führen. Fehlgefaltete Proteine werden normalerweise durch ein sehr effektives Kontrollsystem erkannt und vom zytosolischen Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut [PVD14]. Mit zunehmendem Alter gelingt dies immer schlechter und die Gefahr neurodegenerativer Erkrankungen nimmt zu. Neurodegenerativer Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson, betreffen besonders die alternde Bevölkerung. Durch die aktuelle demografische Entwicklung, der Überalterung der Bevölkerung, nehmen diese Krankheiten zu. Alle diese Erkrankungen sind nicht heilbar.

Es ist heute noch nicht bekannt, wie die Proteinfaltung im Detail funktioniert oder welche Faktoren zur Fehlfaltung eines korrekt synthetisierten Proteins führen [Dob03]. Das Verständnis dieser sehr komplexen Prozesse liefert möglicherweise neue therapeutische Ansätze mit denen sich die Bildung fehlgefalter Proteine verhindern lassen oder sich die unlöslichen Aggregate wieder auflösen und abbauen lassen [Dee15].

---

<sup>1</sup>Desoxyribonukleinsäure

Mit diesem Wissen könnten zumindest die Symptome, wie Demenz, oder sogar die Krankheitsursache selbst bekämpft werden.

Natürliche Proteine bestehen oft aus vielen hundert Aminosäuren und falten zu komplexen Strukturen. Es finden sich aber wiederkehrende, einfache Motive, die in nahezu allen Proteinen anzutreffen sind, vor allem Helices und Faltblätter. Die Faltung von  $\alpha$ -Helices wurde bereits sehr intensiv erforscht [Tak90, CR92, SB92], die von  $\beta$ -Faltblättern ist momentan Gegenstand der Forschung. Das einfachste Faltblatt ist das sogenannte  $\beta$ -hairpin. Es besteht aus zwei antiparallelen Strängen, die durch eine Schleife verbunden sind.

Um detailreiche Aussagen über die Faltung einer  $\beta$ -hairpin-Struktur treffen zu können ist es hilfreich ein möglichst kleines System zu untersuchen in dem die Faltungsreaktion gezielt angesteuert werden kann. Um das zu erreichen, kann in das Proteinrückgrat ein Photoschalter eingebaut werden, der die Faltungsreaktion initiiert.

In dieser Arbeit wird die Faltung und Entfaltung eines solchen lichtschtbaren  $\beta$ -hairpin Peptids untersucht. Basierend auf dem Dekapeptid Chignolin, das in eine  $\beta$ -hairpin-Struktur faltet, wurde das Molekül AzoChignolin synthetisiert. In die Turnregion wurde der bekannte Photoschalter Azobenzol eingebaut. Damit lässt sich gezielt zwischen der gefalteten  $\beta$ -hairpin-Struktur und der ungefalteten random coil Struktur hin und her schalten.

Nach der Isomerisierung des Photoschalters lässt sich mit der zeitaufgelösten Infrarot-Spektroskopie die Bildung und das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen am Peptidrückgrat, im Zeitbereich von Pikosekunden bis hundert Mikrosekunden verfolgen. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie liefert zusätzliche Informationen über intramolekulare Abstände zwischen dem Azobenzolschalter und dem enthaltenen Tryptophan. Durch diese spektroskopischen Methoden lässt sich ein vollständiges Bild der Faltung und Entfaltung gewinnen. Da AzoChignolin ein sehr kleines Peptid ist, kann die Faltungs- und die Entfaltungsreaktion auch vollständig simuliert werden. Die Experimente lassen sich so direkt mit den theoretischen Modellen vergleichen und liefern einen wichtigen Beitrag zur theoretischen Forschung in diesem Gebiet.

Chignolin und AzoChignolin werden durch hydrophobe Interstrang-Wechselwirkungen zwischen Tyrosin und Tryptophan stabilisiert [Hon04, Pod15]. In Faltungssimulationen von Chignolin wurde beim Einfluss dieser Wechselwirkungen auf die Faltung gegensätzliche Ergebnisse erzielt [Xu08, ER12]. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird der Einfluss dieser Wechselwirkung auf die Faltung von AzoChignolin untersucht. Durch Punktmutationen wird diese hydrophobe Wechselwirkung gezielt manipuliert und die Auswirkungen auf die Stabilität und Faltung im zeitaufgelösten IR Experiment beobachtet.

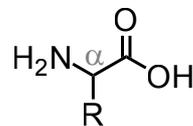
Aus diesen Messungen kann dann ein Modell für die Faltung und die Entfaltung von AzoChignolin hergeleitet werden, das sowohl die beobachteten Stabilitätsunterschiede und Faltungsgeschwindigkeiten der Mutanten erklären kann.

## 2 Proteine

Die erste dreidimensionale Struktur eines Proteins wurde von Kendrew et al. veröffentlicht [Ken58, Ken60]. Er klärte die dreidimensionale Struktur von Myoglobin auf und erhielt dafür 1962 den Nobelpreis für Chemie [Nob62]. Im Folgenden sollen der Aufbau, die Organisation sowie die Faltung von Proteinen kurz erläutert werden.

### 2.1 Aminosäuren und Primärstruktur

Es gibt 20 proteinogene Aminosäuren, aus denen menschliche Proteine aufgebaut sind. Diese sind immer  $\alpha$ -Aminosäuren. Eine  $\alpha$ -Aminosäure besteht aus einer Aminogruppe ( $-\text{NH}_2$ ) und einer Carboxygruppe ( $-\text{COOH}$ ), die durch das zentrale  $\text{C}_\alpha$ -Atom verbunden sind. Am  $\text{C}_\alpha$ -Atom befindet sich die Seitengruppe oder Rest R, durch den sich die Aminosäuren unterscheiden und ihre unterschiedlichen chemischen Eigenschaften erhalten. Der Aufbau ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Von diesen 20 Aminosäuren sind nur die L-Enantiomere proteinogen. Sie werden je nach Seitengruppe in unpolar/hydrophob<sup>1</sup>, polar/neutral<sup>2</sup>, sauer<sup>3</sup> und basisch<sup>4</sup> eingeteilt.



**Abbildung 2.1: Aufbau von  $\alpha$ -Aminosäuren** Eine  $\alpha$ -Aminosäure besteht aus einer Aminogruppe ( $-\text{NH}_2$ ) und einer Carboxygruppe ( $-\text{COOH}$ ), die durch das zentrale  $\text{C}_\alpha$ -Atom verbunden sind. Am  $\text{C}_\alpha$ -Atom befindet sich die Seitengruppe oder Rest R, durch den sich die Aminosäuren unterscheiden.

Zwei Aminosäuren können unter Abspaltung eines Wassermoleküls eine Peptidbindung eingehen. Dabei verbindet sich die Carboxygruppe der einen mit der Aminogruppe der anderen Aminosäure zu einem Dipeptid. Der umgekehrte Vorgang, die Aufspaltung einer Peptidbindung, heißt Hydrolyse. Da die Aminogruppe zu schwach nukleophil ist, um direkt mit der Carboxygruppe zu einem Amid zu reagieren, liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der Hydrolyse. Die Kondensation zweier

<sup>1</sup>unpolar/hydrophob: Ala, Val, Met, Leu, Ile, Pro, Trp, Phe

<sup>2</sup>polar/neutral: Tyr, Thr, Gln, Gly, Ser, Cys, Asn

<sup>3</sup>sauer: Glu, Asp

<sup>4</sup>basisch: Lys, Arg, His

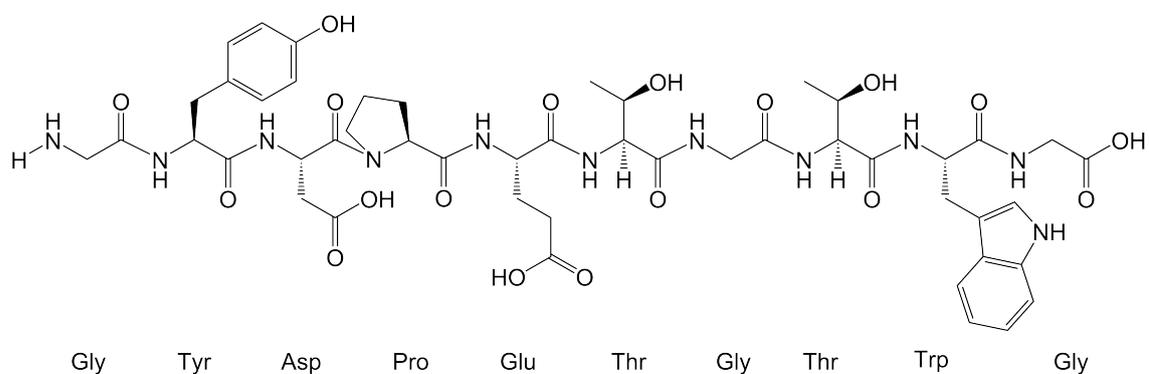
## 2 Proteine

Aminosäuren ist eine endergone Reaktion. Peptidbindungen sind dennoch als stabil anzusehen, da ihre Lebensdauer bei etwa 1000 Jahren liegt. Abbildung 2.2 illustriert die Kondensation von Alanin und Glycin zum Dipeptid AG, sowie dessen Hydrolyse.



**Abbildung 2.2: Peptidbindung und Hydrolyse** Zwei Aminosäuren (Alanin und Glycin) kondensieren zu einem Dipeptid unter Abspaltung eines Wassermoleküls. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite der Hydrolyse. Der Aminoterminus ist rot, der Carboxyterminus blau und die Peptidbindung grün markiert.

Auf diese Art entstehen lineare Aminosäureketten, die mehrere tausend Aminosäuren lang sein können (das größte menschliche Protein ist Titin mit einer Masse von über 3 MDa [LK95] und über 30 000 Aminosäuren in der Primärstruktur). Bestehen Proteine aus weniger als hundert Aminosäuren, so werden sie Peptide genannt. Die Primärstruktur eines Proteins ist die Reihenfolge der Aminosäuren entlang des Proteinrückgrats vom Amino- (N-Terminus) zum Carboxy-Terminus (C-Terminus). Die Primärstruktur des Dekapeptids Chignolin [Hon04] ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

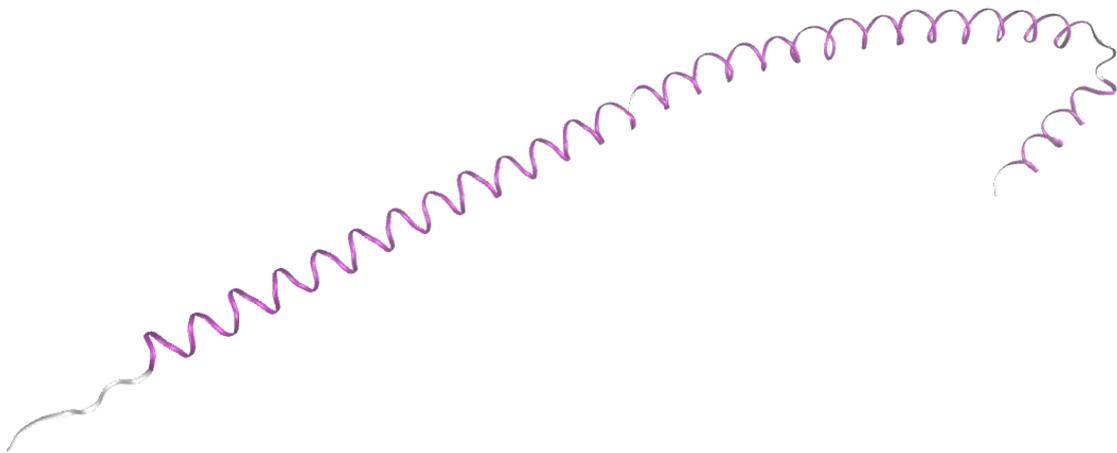


**Abbildung 2.3: Primärstruktur von Chignolin** Das Peptid besteht aus den Aminosäuren GYD-PETGTWG. Gezeigt ist die Primärstruktur in der Keilstrichformel, sowie im Drei-Buchstaben-Code. Die Abkürzungen im Ein- und Drei-Buchstaben-Code sind der Tabelle A.1 im Anhang zu entnehmen.

## 2.2 Sekundärstruktur

Unter der Sekundärstruktur versteht man die lokale räumliche Anordnung des Proteinerückgrats. Die häufigsten in der Natur vorkommenden Sekundärstrukturelemente sind rechtsdrehende  $\alpha$ -Helices (Abb. 2.4), parallele  $\beta$ -Faltblätter und antiparallele  $\beta$ -Faltblätter (siehe Abb. 2.5), sie wurden von Pauling und Corey 1951 entdeckt<sup>5</sup>.

$\alpha_R$ -Helices sind rechtsdrehende Spiralen, die durch Wasserstoffbrücken zwischen allen CO- und NH-Gruppen des Rückgrates stabilisiert werden. Jede CO-Gruppe bildet mit der NH-Gruppe eine Wasserstoffbrücke, welche vier Aminosäuren weiter in der Primärstruktur liegt. Die Aminosäurereste zeigen dabei nach außen. Jeder Rest ist zum nächsten entlang der Achse um 0,15 nm verschoben und um  $100^\circ$  verdreht. Das bedeutet, dass eine vollständige Umdrehung der Helix nach 3,6 Aminosäuren erreicht ist [BST12].



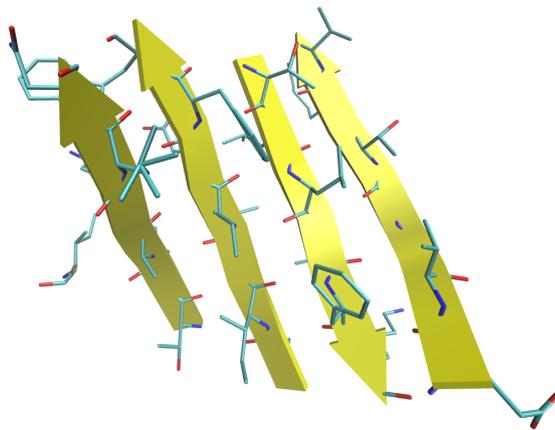
**Abbildung 2.4: Beispiel einer  $\alpha$ -Helix** Gezeigt ist eine der zwei  $\alpha$ -Helices aus dem Protein Myosin [Rop16]. (Gezeichnet nach 5hmo.pdb)

Linksdrehende  $\alpha_L$ -Helices sind in der Natur sehr selten zu finden, da sie energetisch ungünstiger sind als rechtsdrehende  $\alpha$ -Helices. Als weitere Helixformen gibt es noch  $\pi$ -Helices und  $3_{10}$ -Helices, die aber nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden. Die mit großem Abstand häufigste Helixform ist die rechtsdrehende  $\alpha$ -Helix.

$\beta$ -Faltblätter bilden im Gegensatz zu  $\alpha$ -Helices keine stabförmigen, sondern breite flächige Strukturen.  $\beta$ -Faltblätter entstehen durch mehrere nahezu vollständig gestreckte  $\beta$ -Stränge, die über Wasserstoffbrücken am Rückgrat verbunden sind. Zwei aufeinander folgende Aminosäuren sind 0,35 nm voneinander entfernt und ihre Seitenketten weisen in entgegengesetzte Richtungen. Die zwei verbundenen Stränge können nun in die gleiche Richtung laufen, dann spricht man vom parallelen  $\beta$ -Faltblatt, oder

<sup>5</sup> [PC51a, PC51b, PC51c, PC51d, PC51e, PC51f, PC51g]

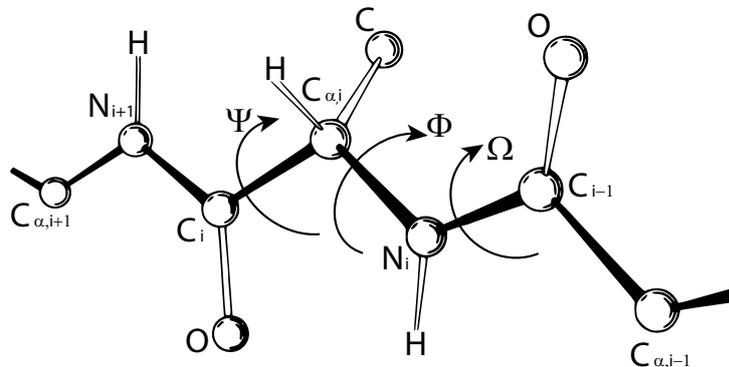
sie laufen in entgegengesetzte Richtung, so spricht man vom antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt (siehe Abb. 2.5) [BST12]. Die einzelnen Stränge antiparalleler  $\beta$ -Faltblätter sind durch Schleifen miteinander verbunden. Je nach Wasserstoffbrückenmuster werden sie als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - oder  $\pi$ -Schleife bezeichnet. Das am häufigsten vorkommende Schleifenmotiv ist die aus vier Aminosäuren bestehende  $\beta$ -Schleife, bei der die Carboxygruppe der ersten Aminosäure mit der Aminogruppe der vierten Aminosäure verbrückt ist [Tre07]. Schematisch werden  $\beta$ -Faltblätter mit breiten Pfeilen dargestellt, deren Spitzen in Richtung des Carboxyendes zeigen. Das einfachste antiparallele  $\beta$ -Faltblatt ist ein  $\beta$ -hairpin, das nur aus zwei Strängen besteht. Ein solches  $\beta$ -hairpin Peptid wird in dieser Arbeit genauer untersucht.



**Abbildung 2.5: Beispiel einer  $\beta$ -Faltblattstruktur** Gezeigt ist eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aus dem Protein Thioredoxin [KLE90]. Es ist die molekulare 3D-Struktur und die vereinfachte Cartoon-Struktur (Pfeile) über dem Rückgrat gezeigt. Die zwei Pfeile links, die in die gleiche Richtung zeigen repräsentieren ein paralleles  $\beta$ -Faltblatt, die drei rechten Pfeile mit alternierender Richtung stehen für ein antiparalleles Faltblatt. (Gezeichnet nach 2trx.pdb)

In einer Aminosäurekette sind drei Rückgrat-Dihedralwinkel  $\Phi$ ,  $\Psi$  und  $\Omega$  definiert.  $\Phi$  ist der Winkel im Peptidrückgrat zwischen den Atomen  $C_{i-1}-N_i-C_{\alpha,i}-C_i$ ,  $\Psi$  ist der Winkel zwischen  $N_i-C_{\alpha,i}-C_i-N_{i+1}$  und  $\Omega$  ist der Winkel zwischen  $C_{\alpha,i-1}-C_{i-1}-N_i-C_{\alpha,i}$ , wobei  $\Omega$  aufgrund des mesomeriebedingten, partiellen Doppelbindungscharakters der C-N Bindung auf  $180^\circ$  (energetisch günstigere, häufige trans Form) oder  $0^\circ$  (seltene cis Form) beschränkt ist. Die Winkel sind zur besseren Verständnis in Abbildung 2.6 dargestellt.

Das Ramachandran-Diagramm ( $\Psi$  gegen  $\Phi$ ) zeigt welche Dihedralwinkelpaare in einer Aminosäurekette erlaubt und welche sterisch verboten sind. Abbildung 2.7 zeigt für welche Dihedralwinkelpaare die Sekundärstrukturen zu finden sind. Weiße Bereiche sind sterisch verbotene Bereiche, in denen sich die van-der-Waals-Radien der Residuen überschneiden. Die dunkelroten (allowed) und roten Bereiche (outer



**Abbildung 2.6: Dihedralwinkel im Proteinrückgrat** Es ist die Lage der Dihedralwinkel  $\phi$ ,  $\psi$  und  $\omega$  im Proteinrückgrat dargestellt. Um die Übersichtlichkeit zu erhöhen, wurden die Aminosäurereste nicht gezeichnet. Abgeändert entnommen aus [Wik16].

limit) sind erlaubte Bereiche je nach Wahl der van-der-Waals-Radien, welche RRS63 entnommen werden können.

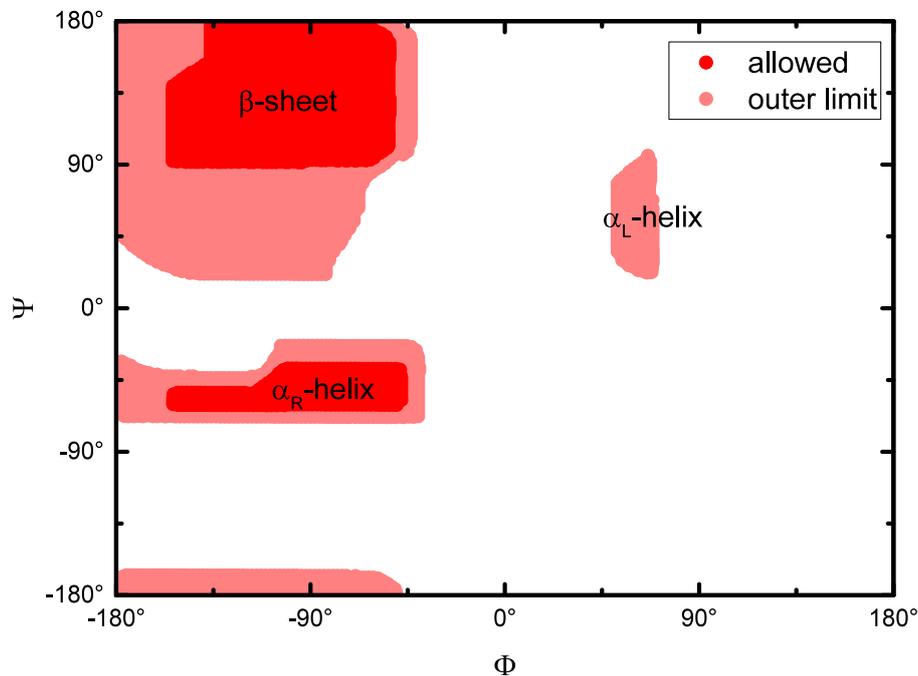
Gruppieren sich mehrere Sekundärstrukturelemente, so bilden sie eine Supersekundärstruktur. Beispiele für Supersekundärstrukturelemente sind  $\beta$ -hairpins, Helix-Turn-Helix-Motive oder Coiled-Coils (Doppelwendel).

## 2.3 Tertiärstruktur

Die Tertiärstruktur eines Proteins ist die dreidimensionale Anordnung der Sekundärstrukturelemente. In Abbildung 2.8 sind  $\alpha$ -Helixstrukturen als blaue Tonnen,  $\beta$ -Faltblattstrukturen als gelbe Pfeile und random-coil-Strukturen (also ungefaltete Strukturen) als dünne Schläuche dargestellt. Es handelt sich um eine Aminosäurekette des HIV-1 Nef Proteins.

In wasserlöslichen Proteine finden sich meistens die hydrophoben Seitenketten zu einem unpolaren Kern in der Mitte zusammen. Die Oberfläche besteht aus einer Mischung aus polaren und geladenen Aminosäuren. Dies hat den Vorteil, dass die hydrophoben Gruppen nicht der wässrigen Umgebung ausgesetzt sind und dadurch das System thermodynamisch stabilisiert wird. [BST12].

Porine im Gegenzug, sind Proteine die in der äußeren Membran vieler Bakterien vorkommen. Da die Membran viele Alkanketten enthält, ist sie eine hydrophobe Umgebung. Deshalb ist die Verteilung der Reste genau andersherum. Das bedeutet, dass die polaren und geladenen Reste sich im Inneren der Porine befinden und die hydrophoben Reste an der Außenseite [For98].



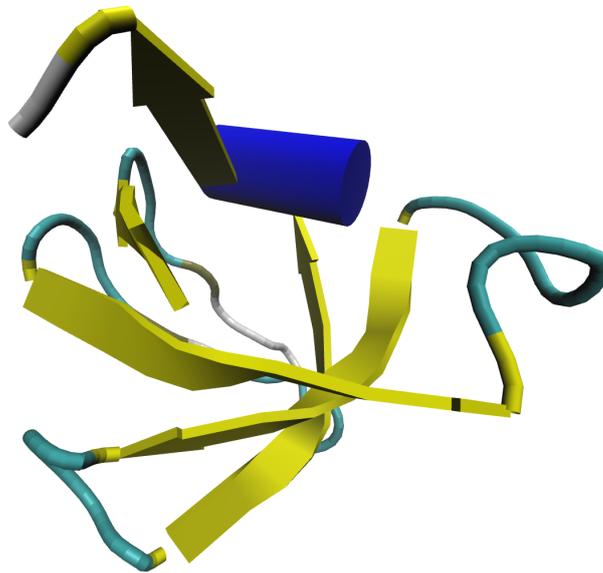
**Abbildung 2.7: Ramachandran-Diagramm** Im Ramachandran-Diagramm sind die Sekundärstrukturelemente in Abhängigkeit der Dihedralwinkel gezeichnet. Weiße Bereiche sind sterisch verboten. Die dunkelroten (allowed) und roten (outer limit) Bereiche zeigen die erlaubten Bereiche je nach Wahl des van-der-Waal-Radius. (Gezeichnet nach [RRS63])

Hat ein Bereich innerhalb der Tertiärstruktur eine festgelegte Funktion oder Konformation, die von der Umgebung unabhängig ist, so handelt es sich um eine Domäne. Innerhalb einer Domäne gibt es mehr Wechselwirkungen als zwischen verschiedenen Domänen. Solche Domänen können auch aus Aminosäuren gebildet werden, die in der Primärstruktur weit voneinander entfernt liegen [Ric81].

Die Tertiärstruktur ist die native, biologisch relevante Struktur für Proteine, die aus nur einer Aminosäurekette bestehen.

## 2.4 Quartärstruktur

Besteht die native Struktur eines Proteins aus mehreren Aminosäureketten, so wird deren Anordnung als Quartärstruktur bezeichnet. Bei solch einem Protein ist die Quartärstruktur die native Struktur. Die Quartärstruktur beschreibt die räumliche



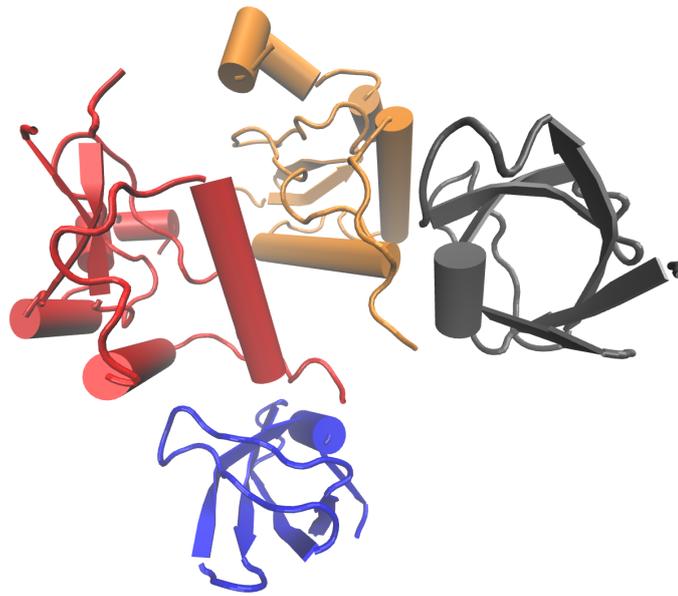
**Abbildung 2.8: Beispiel einer Tertiärstruktur**  $\alpha$ -Helixstrukturen sind als blaue Tonnen,  $\beta$ -Faltblattstrukturen als gelbe Pfeile und random-coil-Strukturen (also ungefaltete Strukturen) als dünne Schläuche dargestellt. (Gezeichnet nach 1efn.pdb)

Anordnung und die Wechselwirkungen von verschiedenen Tertiärstrukturen, die dann Untereinheiten genannt werden. In Abbildung 2.9 ist die gesamte Struktur des HIV-1 Nef Proteins gezeigt [Lee96]. Es besteht aus vier Untereinheiten, welche in verschiedenen Farben dargestellt sind. Die Tertiärstruktur aus Abbildung 2.8 ist in blau dargestellt.

## 2.5 Proteinfaltung

Die Frage, die sich nun stellt, ist: Wie finden die langen ungefalteten Aminosäureketten ihre native Struktur?

Anfinsen et al. fanden heraus, dass die native Struktur von Ribonuklease allein durch die Aminosäuresequenz bestimmt ist [Anf61, Whi61]. Für diese Entdeckung wurde Anfinsen 1972 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt [Nob72]. Die Erkenntnis, dass die native Struktur von Proteinen nur von der Primärstruktur abhängt, wird als thermodynamische Hypothese oder Anfinsen-Dogma bezeichnet. Sie sagt aus, dass es für jede Aminosäurekette eine ausgezeichnete Struktur gibt, für die die freie Enthalpie  $G$  minimiert wird: die native Struktur. Diese Struktur muss unempfindlich gegen kleine Änderungen der Umgebung sein und es darf keine großen Energiebarrieren bei ihrer Faltung geben. Heute geht man davon aus, dass die thermodynamische Hypothese für alle Proteine, bis auf wenige Ausnahmen [Har96], gilt.



**Abbildung 2.9: Protein mit Quartärstruktur** Die vier verschiedenen Untereinheiten des HIV-1 Nef Proteins wurden in verschiedenen Farben dargestellt. (Gezeichnet nach 1efn.pdb)

Das Levinthal-Paradox ist ein Gedankenexperiment, das zeigt, dass Proteinfaltung kein zufälliger Prozess sein kann [Lev68, ZSB92]. Betrachtet man ein hypothetisches Protein mit 101 Aminosäuren, bei dem jede Peptidbindung 3 verschiedene Konformationen einnehmen kann, so gibt es  $3^{100} = 5,15 \cdot 10^{47}$  mögliche Strukturen für dieses Protein. Wird ein unrealistisch schneller Übergang zwischen zwei Konformationen von  $1 \text{ ps} = 1 \cdot 10^{-12} \text{ s}$  angenommen, so würde es rein statistisch  $1,6 \cdot 10^{28}$  Jahre dauern alle Konformationen abzurastern. Aus Experimenten ist jedoch bekannt, dass die Proteinfaltung für viele Proteine in weniger als einer Sekunde abläuft [Kar97, DC97]. Das bedeutet, dass Proteinfaltung kein zufälliger Prozess sein kann, sondern thermodynamisch getrieben auf bestimmten Faltungspfaden abläuft [Anf73].

Das Proteinfaltungsproblem wird in der Literatur seit vielen Jahren diskutiert und besteht hauptsächlich aus drei Fragen [Dil08]:

- Was ist der Faltungscode?

Diese Frage behandelt das thermodynamische Kräftegleichgewicht, das die Struktur für eine Aminosäurekette vorgibt.

- Wie kann man die dreidimensionale Struktur aus der Aminosäuresequenz vorhersagen?

Dies ist die Suche nach einer Berechnungsmethode, um aus einer gegebenen Aminosäuresequenz ihre zugehörige native Struktur zu berechnen.

- Was ist der Faltungspfad?

Hier wird nach der Kinetik und den Pfaden gesucht, die ein Protein auf seiner Energielandschaft wählt, um die großen, in der Natur vorkommenden Faltungsraten zu erreichen.

In einer Zelle läuft die Proteinfaltung vereinfacht folgendermaßen ab: In den Ribosomen werden die Aminosäureketten nach der Vorlage der DNA synthetisiert. In der DNA ist jede Aminosäure durch drei Basen kodiert. Schon während der Synthese bilden sich die ersten Sekundärstrukturen. Die Sekundärstrukturen bilden dann mit der restlichen Aminosäurekette den sogenannten Molten Globule, ein Intermediat, bei dem die unpolaren Seitenketten von der wässrigen Umgebung abgeschirmt sind [OW83]. Das unpolare Innere des Molten Globule stabilisiert zudem gebildete  $\alpha$ -Helices. Im Molten Globule finden sich die Sekundärstrukturen zu Faltungsmotiven und Supersekundärstrukturen. Schließlich bilden sich stabilisierende Wechselwirkungen, wie Disulfidbrücken, und große Proteinteile finden ihre endgültige Position in ihren Domänen und bilden das native Protein. Bis heute ist über den ersten Schritt, die Bildung der ersten Sekundärstrukturen, insbesondere über die Bildung von  $\beta$ -Faltblätter wenig bekannt.

Für die Faltung von  $\beta$ -hairpin Peptiden, den einfachsten antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern mit nur zwei Strängen, haben sich in der Literatur drei Theorien etabliert, wie diese ablaufen kann [Lew10a].

1. **Der Zipper-Mechanismus:** Als erstes bildet sich die Schleifenregion, indem das Rückgrat eine gebogene Struktur formt. Dadurch nähern sich die gegenüberliegenden Aminosäuren in der Nähe der Schleife an und bilden Wasserstoffbrücken. Die Wasserstoffverbrückung setzt sich nun zu den Termini fort (wie ein Reißverschluss, *engl.: zipper*). Nachdem sich das Wasserstoffbrückennetzwerk ausgebildet hat, stabilisieren hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Seitenketten die Hairpinstruktur [Muñ97, Muñ98].
2. **Der hydrophobe Kollaps:** Dinner et al. haben vorgeschlagen, dass die  $\beta$ -hairpin Faltung mit einem hydrophoben Kollaps startet. Dabei bilden sich zu Beginn der Faltung möglichst viele Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Seitenketten, die sich dann zu einem organisierten hydrophoben Cluster umarrangieren. Von diesem hydrophoben Kern bilden sich nun Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen in beide Richtungen entlang des  $\beta$ -hairpin Peptid aus [DLK99], bis schließlich die native Form erreicht ist. Der hydrophobe Kollaps benötigt nicht die Bildung der Schleifenregion zu Beginn der Faltung.
3. **Der Broken-Zipper-Mechanismus:** Der Broken-Zipper-Mechanismus ist eine Mischung aus dem Zipper-Mechanismus und dem hydrophoben Kollaps. Zuerst bildet sich die Schleifenregion wie beim Zipper-Mechanismus. Anschließend finden sich unpolare Seitenketten in Schleiennähe zu einem hydrophoben Cluster.

Das Cluster wächst in Richtung der Termini, indem weitere unpolare Reste wechselwirken, die weiter von der Schleifenregion entfernt sind. Nachdem sich der komplette hydrophobe Kern ausgebildet hat, entstehen die Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen des Hairpins [Lew10b]. Der Broken-Zipper-Mechanismus kann als einziges dieser drei Modelle die Wichtigkeit der Schleifensequenz und der hydrophoben Wechselwirkungen für die Faltung zum Ausdruck bringen.

## 3 $\beta$ -hairpin Modellpeptide

In der Frühzeit der Erforschung der Proteinfaltung wurden hauptsächlich  $\alpha$ -Helix Motive untersucht, da es relativ einfach ist, reine  $\alpha$ -helikale Peptide zu finden [Eat02, Wil96, TEH97].  $\beta$ -hairpin Peptide neigen jedoch in Lösung, bei den benötigten Konzentrationen oft zur Aggregation und sind dann für Faltungsexperimente ungeeignet.

Die Faltung von  $\beta$ -hairpin Peptiden wird erst seit Anfang der 90er Jahre experimentell untersucht, nachdem es Blanco et al. gelungen ist das erste stabile  $\beta$ -hairpin Modellpeptid zu synthetisieren. Blanco et al. haben mithilfe der NMR-Spektroskopie gezeigt, dass das isolierte (12-26) Fragment aus dem Protein Tendamistat in wässriger Lösung eine stabile  $\beta$ -hairpin Struktur bildet und damit  $\beta$ -hairpin Strukturen zur Keimbildung der Proteinfaltung beitragen können [Bla91].

Weitere sehr gut untersuchte  $\beta$ -hairpin Modellpeptide basieren auf der GB1 Domäne des Protein G [EG00, Aem05], wie die Familie der Tryptophan-Zipper (TrpZip), daraus vor allem das TrpZip2 [CSS02] und das photoschaltbare Äquivalent AzoTrpZip2 (ATZ) [Don06]. Diese Moleküle wurden mit zeitaufgelösten infrarotspektroskopischen Methoden untersucht (Temperatursprung-, Anrege-Abtast- und 2D-IR-Spektroskopie [Dee14, JPT13, Hau08, Sch54]). Diese Peptide falten abhängig von der Temperatur im Zeitbereich einiger zehn Mikrosekunden.

Im folgenden Kapitel werden das  $\beta$ -hairpin Peptid Chignolin sowie sein photoschaltbares Äquivalent AzoChignolin und Mutanten davon vorgestellt.

### 3.1 Chignolin

Chignolin ist das kleinste stabile  $\beta$ -hairpin Peptid, welches bis heute synthetisiert wurde. Seine Primärstruktur besteht aus nur zehn Aminosäuren (Gly-Tyr-Asp-Pro-Glu-Thr-Gly-Thr-Trp-Gly) und wurde mit statistischen Methoden aus dem zentralen Teil des G-Peptids abgeleitet [Hon04]. Das G-Peptid besteht aus dem (41-56) Fragment der B1 Domäne des Protein G [HKM00]. Chignolin wurde so entworfen, dass die acht zentralen Aminosäuren statistisch das stabilste  $\beta$ -hairpin formen. Die zwei terminalen Glycine wurden gewählt, um unerwünschte attraktive oder auch repulsive Wechselwirkungen zwischen den Termini zu vermeiden. Das gefaltete Peptid wird durch fünf Wasserstoffbrücken zwischen Asp3:N-Thr8:O, Gly7:N-Asp3:O <sup>$\delta$</sup> , Thr8:N-Asp3:O, Glu5:N-Asp3:O <sup>$\delta$</sup>  und Thr6:N-Asp3:O <sup>$\delta$</sup>  [Pod15] sowie durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Aminosäuren Tyr2-Pro4 und Tyr2-Trp9 stabilisiert. Die Interstrang-Wechselwirkungen zwischen Tyrosin und Tryptophan stabilisieren dabei die  $\beta$ -hairpin Struktur. Der Phenylring des Tyrosin liegt dabei senkrecht auf der Seitenkette von Tryptophan (*edge-to-face*) im  $\pi$ -System.

Dabei kommt es zu einer elektrostatischen Anziehung zwischen den partial positiv geladenen  $\sigma$ -Gerüsten des Tyrosin und den partial negativ geladenen  $\pi$ -Systemen des Tryptophan [HS90, Hon04].

Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Tyr2 und Pro4 sorgen dafür, dass der N-terminale Strang in seiner nativen Position festgehalten wird und das Prolin den Strang zusätzlich verbiegt, sodass sich die Asparaginsäure in zentraler Position im Wasserstoffbrückennetzwerk befindet [ER12].

Molekulardynamik-Simulationen (MD) weisen darauf hin, dass Chignolin seine native Struktur wesentlich schneller findet, als die bisher bekannten  $\beta$ -hairpin Peptide. Suenaga et al. fanden eine Faltungszeit von 0,4  $\mu$ s [Sue07]. Xu et al. fanden sogar Zeiten von 20 ns bis 40 ns [Xu08].

Suenaga et al. haben einen vollständigen Faltungspfad mit MD Simulationen gefunden. Die Faltung von Chignolin läuft dabei in drei Schritten ab. Als erstes findet ein hydrophober Kollaps statt, der von der Bildung der Schleifenstruktur gefolgt wird. Zuletzt rearrangieren sich die Seitenketten, um das native Wasserstoffbrückennetzwerk herzustellen [Sue07].

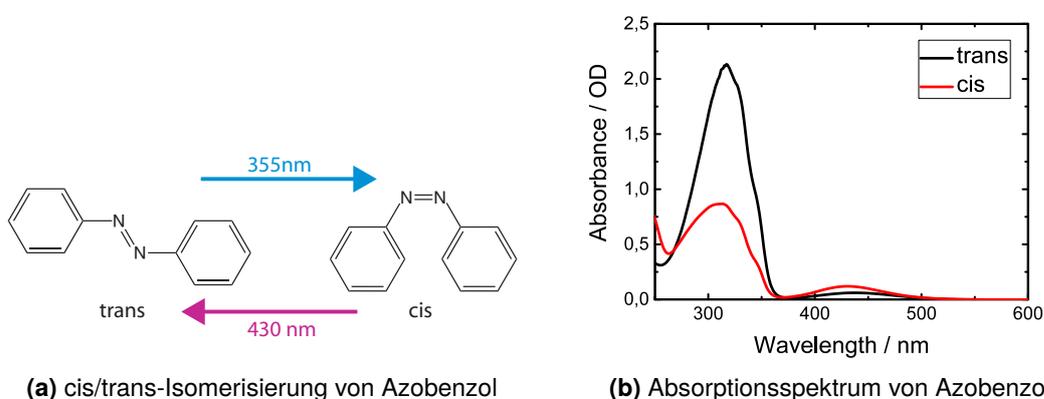
Davis et al. haben das ebenfalls zur Chignolin-Familie gehörende Dekapeptid CLN025 (Tyr-Tyr-Asp-Pro-Glu-Thr-Gly-Thr-Trp-Tyr, an den Termini befinden sich anstelle der Glycine Tyrosine) [Hon08] mit Temperatursprung- und Tryptophan-Fluoreszenz-Messungen untersucht. Dabei hat sich herausgestellt, dass CLN025 bei Raumtemperatur mit etwa 200 ns faltet [Dav12].

## 3.2 Lichtschaltbare $\beta$ -hairpin Modellpeptide

Will man die Faltungs- und Entfaltungsdynamiken von Peptiden untersuchen, hat es sich als günstig erwiesen, einen reversiblen Konformationsschalter in das Peptidrückgrat zu integrieren. Ein solcher Schalter soll in seinen zwei Zuständen verschiedene Konformationen besitzen, um im Peptid Strukturänderungen hervorzurufen. Des Weiteren soll der Schalter ultraschnell sein, da man nur Dynamiken untersuchen kann, die langsamer sind als der Schalter und er soll reversibel schaltbar sein um ihn experimentell sinnvoll nutzen zu können. Eine weitere Voraussetzung ist, dass die beiden Zustände separat voneinander angesprochen werden können, um ihn selektiv von einem in den anderen Zustand zu bringen.

Dafür hat sich das seit 1834 bekannte Molekül Azobenzol als guter Schalter erwiesen [Mit34, Bri12, Aem05, Don06, BW11]. Azobenzol macht eine große Konformationsänderung (siehe Abb. 3.1a). Die Ausdehnung im trans-Zustand beträgt 9,0 Å, im cis-Zustand dagegen nur 5,5 Å [WZ11].

Das UV/vis-Absorptionsspektrum von trans-Azobenzol (siehe Abb. 3.1b) zeigt eine starke Bande vom  $\pi\pi^*$ -Übergang bei 317 nm und eine schwache Bande vom dipolverbotenen  $n\pi^*$ -Übergang bei 431 nm [BW11]. Photostationäres cis-Azobenzol



**Abbildung 3.1: Struktur und Spektren von Azobenzol** (a) Mit Licht der Wellenlänge 355 nm lässt sich Azobenzol vom trans- in das cis-Isomer schalten. Diese Reaktion lässt sich mit Licht der Wellenlänge 430 nm oder thermisch rückgängig machen.

(b) trans-Azobenzol (schwarz) zeigt eine starke Absorption bei 317 nm und eine schwache bei 438 nm. Photostationäres cis-Azobenzol zeigt eine deutlich verminderte Absorption bei 313 nm und dafür eine ungefähr doppelt so starke bei 431 nm.

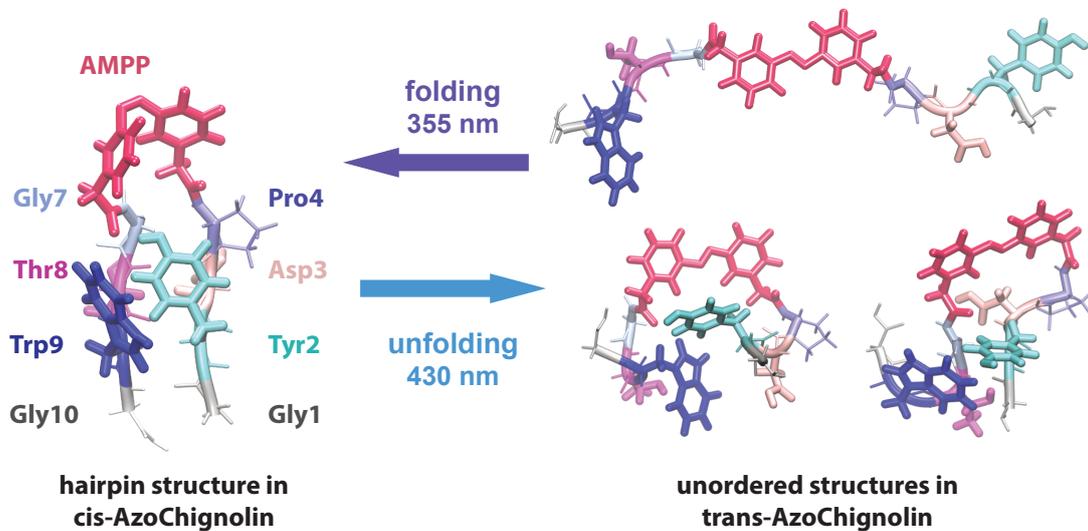
zeigt aufgrund der Strukturänderung eine deutlich geringere Absorption bei 313 nm vom  $\pi\pi^*$ -Übergang und eine stärkere Absorption vom  $n\pi^*$ -Übergang bei 438 nm.

Azobenzol kann durch Anregung des  $\pi\pi^*$ -Übergangs mit Licht der Wellenlänge 355 nm vom stabilen trans-Isomer in das metastabile cis-Isomer überführt werden [Har37]. Die Rückreaktion wird entweder thermisch (langsam) oder durch Anregung des  $n\pi^*$ -Übergangs mit Licht der Wellenlänge 440 nm ausgelöst (siehe Abb. 3.1). Bei diesen Wellenlängen kann man die jeweils maximale Ausbeute des gewünschten Isomers erreichen. In den jeweiligen photostationären Ensembles erreicht man jeweils einen trans-Anteil von etwa 95 % und einen cis-Anteil von ca. 80 %.

### 3.2.1 AzoChignolin

Um die Faltungs- und Entfaltungsdynamiken von Chignolin zu untersuchen, wurde im Rückgrat anstelle der Schleifensequenz Glu5 und Thr6 das Azobenzolderivat AMPP<sup>1</sup> eingebaut [Pod15]. Das resultierende Molekül AzoChignolin ist in Abbildung 3.2 als 3D-Struktur und in Abbildung 3.3a als Keilstrichformel dargestellt. Die Primärstruktur von AzoChignolin ist Gly1-Tyr2-Asp3-Pro4-AMPP-Gly7-Thr8-Trp9-Gly10. In der trans-Konformation soll das AzoChignolin eine ungeordnete random-coil-Struktur zeigen, da durch trans-Azobenzol der Abstand zwischen den Strängen zu groß ist, um eine  $\beta$ -hairpin Struktur auszubilden. Cis-AzoChignolin soll im Gegensatz

<sup>1</sup>3-(3-Aminomethyl-phenylazo)-phenylelessigsäure: eine auf Azobenzol basierende Pseudo-Aminosäure



**Abbildung 3.2: 3D-Strukturen von AzoChignolin** Azobenzol (AMPP) wird in das Proteinerückgrat anstelle von Glu5 und Thr6 eingebaut. Die Strukturen stammen aus MD Simulationen, welche am Lehrstuhl für Theoretische Biophysik (T38) der TU München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Zacharias durchgeführt wurden. cis-AzoChignolin (links) zeigt gefaltete  $\beta$ -hairpin-Strukturen, während trans-AzoChignolin (rechts) keine geordneten Strukturen zeigt.

eine gefaltete geordnete  $\beta$ -hairpin Struktur zeigen, da cis-Azobenzol den Ansprüchen eines  $\beta$ -Schleifen-Mimetikums genügt.

In Simulationen zeigt trans-AzoChignolin (Abb. 3.2 rechts) tatsächlich ungeordnete Strukturen, wobei es keine herausragenden definierten Strukturen gibt.

Im cis-AzoChignolin ist deutlich die  $\beta$ -hairpin-Struktur zu erkennen (Abb. 3.2 links). Die zwei Stränge verlaufen antiparallel zueinander. Es ist auch die räumliche Nähe der Seitenketten von Tyrosin und Tryptophan zu erkennen, die auch im photoschaltbaren Molekül senkrecht aufeinander stehen.

Die stationären Charakterisierungen an AzoChignolin werden in Kapitel 5.3 vorgestellt.

### 3.2.2 Y2V-, Y2W- und W9V-AzoChignolin

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Strängen einen großen Beitrag zur Stabilität von nativen  $\beta$ -hairpin Strukturen beitragen [SJ10, Gel98, Sea01, Ser00].

Die hydrophoben Wechselwirkungen von Chignolin wurden in Simulationen untersucht. Dabei wurden aber unterschiedliche Ergebnisse erzielt, ob die Wechselwirkungs-

en zwischen Tyrosin und Tryptophan die  $\beta$ -hairpin-Struktur stabilisieren. Xu et al. haben gefunden, dass die exzitonsche Kopplung zwischen Tyr2 und Trp9 wichtig sind und die native Struktur stabilisieren [Xu08]. Enemark und Rajagopalan dagegen sehen in ihren Simulationen, dass hauptsächlich der Kontakt zwischen Prolin und Tyrosin von Bedeutung ist und das Tryptophan bei der Faltung sogar stören kann, da es Wechselwirkungen mit Prolin eingehen kann, und so relativ stabile fehlgefaltete Strukturen bildet, die eine Lebensdauer von etwa 50 ns haben und zur Aggregation neigen [ER12].

Um experimentelle Untersuchungen der hydrophoben Wechselwirkungen zu ermöglichen, wurden lichtschaltbare Mutanten von AzoChignolin synthetisiert.

Bei **Y2V-AzoChignolin** wurde das Tyrosin an zweiter Stelle (Y2) durch Valin (V) ersetzt. Valin hat als Seitenkette eine hydrophobe Isopropyl-Gruppe. Da es kein aromatisches Elektronensystem besitzt, kann es mit Tryptophan keine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingehen. Die stabilisierenden  $\pi$ - $\pi$ -Kopplungen zwischen den Strängen, sowie die hydrophobe Intrastrang-Wechselwirkungen mit Prolin sollten bei diesem Molekül ausgeschaltet sein.

Bei **Y2W-AzoChignolin** wurde das Tyrosin durch ein weiteres Tryptophan (W) ersetzt. Bei dieser Mutante werden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Strängen im Vergleich zum Wildtyp deutlich verstärkt. Aus Experimenten mit anderen  $\beta$ -hairpin Modellpeptiden ist bekannt, dass zwei gegenüberliegende Tryptophane im  $\beta$ -hairpin stark wechselwirken (siehe TrpZip) [Dia15, Kob00].

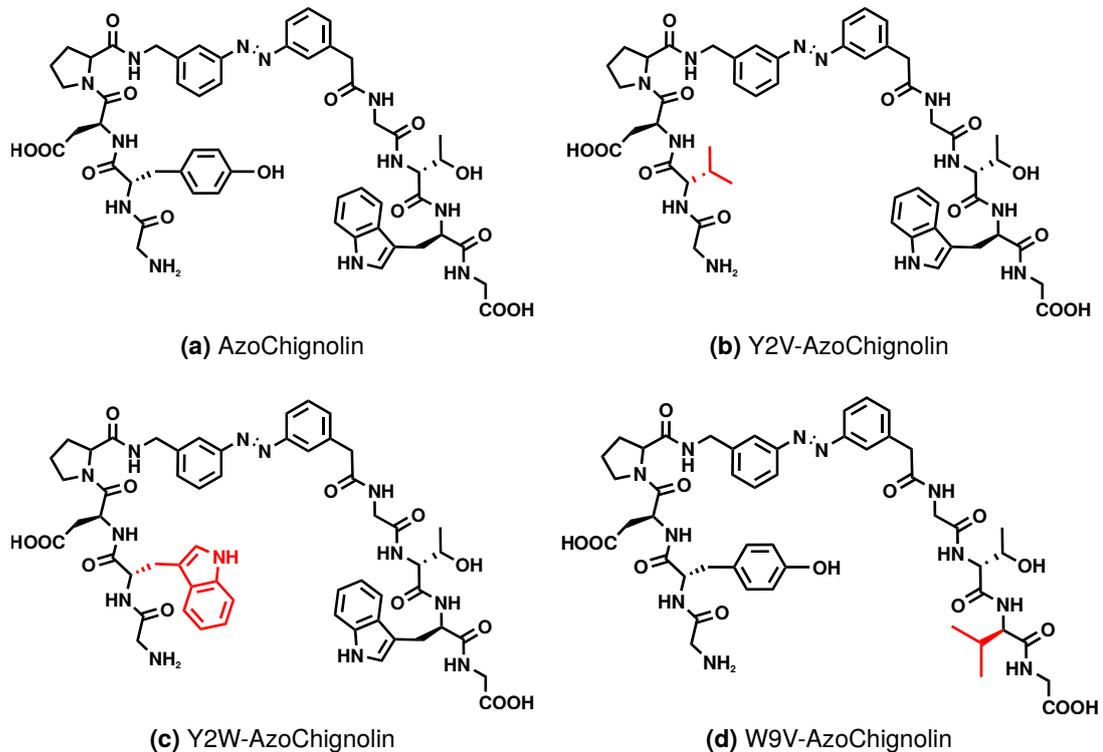
**W9V-AzoChignolin** wurde synthetisiert, um die Rolle des Tryptophan zu untersuchen. Bei dieser Mutante wurde das Tryptophan durch Valin ersetzt. Somit fehlen die Interstrang-Wechselwirkungen zwischen Tyr und Trp, aber die Wechselwirkungen zwischen Tyrosin und Prolin sollten noch intakt sein. Des Weiteren wird ausgeschlossen, dass sich fehlgefaltete Strukturen bilden, wie sie Enemark und Rajagopalan in ihren Simulationen gesehen haben.

Die Strukturen als Keilstrichformeln von AzoChignolin, Y2V-, Y2W- und W9V-AzoChignolin sind in Abbildung 3.3 dargestellt, wobei die Änderungen zu AzoChignolin rot markiert sind.

### 3.2.3 P4T-AzoChignolin

Prolin induziert wegen seiner einzigartigen Struktur einen Knick in der Aminosäurekette in Proteinen. Durch seine zyklische Struktur ist der  $\Phi$ -Dihedralwinkel im Ramachandran-Diagramm auf  $-65^\circ$  festgelegt [Mor92]. Es ist deshalb oft am Ende von  $\alpha$ -Helices als Helixbrecher und in den Schleifen von antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern zu finden.

In den hier vorgestellten lichtschaltbaren Peptiden übernimmt das Azobenzol die Funktion der  $\beta$ -Schleife. Da das Prolin an vierter Stelle nun zusätzlich einen Knick induziert und gleichzeitig in 10 % bis 20 % der Fälle in der cis-Konformation vorliegt,

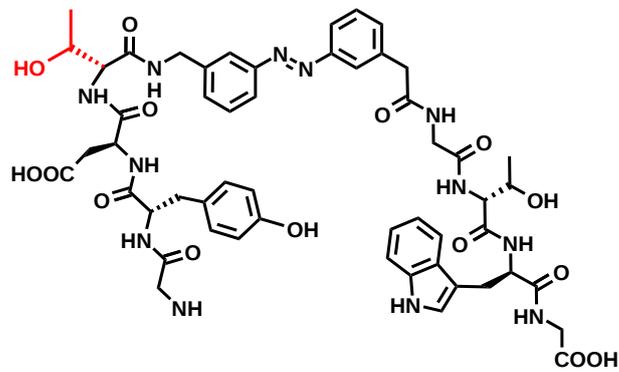


**Abbildung 3.3: Strukturen von AzoChignolin, Y2V-, Y2W- und W9V-AzoChignolin** Die Seitenketten der mutierten Aminosäuren sind in rot dargestellt.

ist es möglich, dass in AzoChignolin das Prolin der Ausbildung einer  $\beta$ -hairpin Struktur eher hinderlich ist [And03].

Aus diesem Grund wurde noch P4T-AzoChignolin synthetisiert (Struktur in Abb. 3.4), in dem das Prolin durch ein Threonin ersetzt wurde.

Des Weiteren kann hier beobachtet werden wie sich das Peptid verhält, wenn die Wechselwirkung zwischen Prolin und Tyrosin ausgeschaltet ist ohne die Tyrosin-Tryptophan-Kopplung zu beeinflussen.



**Abbildung 3.4:** Keilstrichformel von P4T-AzoChignolin Anstelle von Pro4 wird ein Threonin (rot markiert) eingebaut.



# 4 Experimentelle Untersuchungsmethoden

## 4.1 Stationäre Untersuchungsmethoden

### 4.1.1 UV/vis-Absorptionsspektroskopie

Proteine und Peptide absorbieren Licht im ultravioletten Spektralbereich. Die Absorption des Amid-Chromophors im Bereich von 190 nm bis 220 nm ist in allen Proteinen zu finden und kann bei der Strukturaufklärung helfen (siehe Abschnitt 4.1.4).

Die drei aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin besitzen aufgrund der konjugierten  $\pi$ -Elektronensysteme ebenfalls Absorptionen im ultravioletten Spektralbereich. Tryptophan besitzt ein Absorptionsmaximum bei 280 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von  $\varepsilon_{\text{Trp}} = 5800 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  [Ede67]. Tyrosin absorbiert maximal bei 274,25 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von  $\varepsilon_{\text{Tyr}} = 1404 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  [Fas76]. Die Absorption der Phenylalaninseitenkette ist deutlich kleiner und beträgt im Maximum bei 257,5 nm nur noch  $\varepsilon_{\text{Phe}} = 190 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  [Dem86].

Die Absorption der drei aromatischen Seitenketten kann mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes [Bee52] zur Bestimmung der Peptidkonzentration  $c$  genutzt werden. Mit der optischen Dichte der Probe  $A$ , der Schichtdicke  $d$  und der Extinktion  $\varepsilon$  gilt:

$$c = \frac{A(\lambda)}{\varepsilon_{\text{ges}}(\lambda) \cdot d} \quad (4.1)$$

wobei  $\varepsilon_{\text{ges}}(\lambda) = n_{\text{Trp}}\varepsilon_{\text{Trp}}(\lambda) + n_{\text{Tyr}}\varepsilon_{\text{Tyr}}(\lambda) + n_{\text{Phe}}\varepsilon_{\text{Phe}}(\lambda)$ , mit  $n_i$  der Anzahl der jeweiligen Aminosäure in der Primärstruktur. Auf diese Weise wurde in dieser Arbeit die Konzentration des Peptids Chignolin in Abschnitt 5.2 kontrolliert (mit  $n_{\text{Trp}} = n_{\text{Tyr}} = 1$  und  $n_{\text{Phe}} = 0$ ).

Im UV/vis-Spektrum lichtschtbarer Peptide ist zusätzlich zur Absorption der aromatischen Seitenketten und des Amid-Chromophors noch die Absorption des Azobenzol-Photoschalters zu finden. trans-Azobenzol hat im Peptid eine, zu freiem Azobenzol, leicht verschobene, starke Absorptionsbande vom  $\pi\pi^*$ -Übergang bei 322 nm und eine schwache bei 440 nm vom verbotenen  $n\pi^*$ -Übergang. cis-Azobenzol zeigt eine deutlich geringere Absorption vom  $\pi\pi^*$ -Übergang bei etwa 320 nm und eine starke Absorption vom  $n\pi^*$ -Übergang bei 428 nm.

Das lichtschtbare Peptid ATZ, mit dem gleichen AMPP Photoschalter, hat bei 322 nm einen Extinktionskoeffizienten von  $\varepsilon = 25\,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  [Löw05]. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Extinktionskoeffizient bei AzoChignolin gleich groß ist.

**Tabelle 4.1: Amid Banden im infraroten Spektralbereich** Für die strukturelle Aufklärung von Proteinen sind besonders die Amid-I und Amid-II Bande von Bedeutung. [EA50, KB86, Ban92, MSM56]

Name	Frequency / $\text{cm}^{-1}$	Description
Amid-A	3300	NH-stretching
Amid-B	3100	NH-stretching
Amid-I	1600-1690	CO-stretching
Amid-II	1480-1575	CN-stretching, NH-bending and CC-stretching
Amid-III	1229-1301	CN-stretching and NH-bending
Amid-IV	625-767	OCN-bending
Amid-V	640-800	Out-of-plane NH-bending
Amid-VI	537-606	Out-of-plane CO-bending
Amid-VII	200	Skeletal torsion

Alle in dieser Arbeit gemessenen UV/vis-Spektren wurden mit den Spektralphotometern Lambda 750 von PerkinElmer oder UV-1800 von Shimadzu gemessen.

#### 4.1.2 Infrarotspektroskopie

Proteine haben im infraroten Spektralbereich 9 Schwingungsmoden, die mit abnehmender Energie als Amid-A, -B und Amid-I bis -VII Banden bezeichnet werden. Die Schwingungsbanden sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Die Schwingungsfrequenz berechnet sich, im Modell des harmonischen Oszillators, aus der reduzierten Masse  $\mu = \frac{m_1+m_2}{m_1 \cdot m_2}$  der beteiligten Atome, mit den Massen  $m_i$ , und der Kraftkonstante  $k$  folgendermaßen [GH96]:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (4.2)$$

Für die strukturelle Aufklärung sind dabei besonders die Amid-I und Amid-II Bande von Bedeutung. Die Amid-I Bande besteht hauptsächlich aus Streckschwingungen der CO-Bindung im Peptidrückgrat und befindet sich bei etwa  $1650 \text{ cm}^{-1}$ . Die Amid-II Bande besteht größtenteils aus der NH-Biegeschwingung (40 % bis 60 %), der CN-Streckschwingung (18 % bis 40 %) und der CC-Streckschwingung (10 %) und befindet sich bei  $1550 \text{ cm}^{-1}$  [Bar07].

Da OH-Biegeschwingungen in vielen Lösungsmitteln zu finden sind und im Bereich der Amid-I Bande stark absorbieren [VP97], muss bei der Infrarotspektroskopie auf deuterierte Lösungsmittel, wie  $\text{D}_2\text{O}$  oder  $\text{CD}_3\text{OD}$ , zurückgegriffen werden. Da

Deuterium ( $^2\text{H}$  oder D) die doppelte Masse von Wasserstoff ( $^1\text{H}$ ) besitzt, sind die Absorptionsbanden vom Lösungsmittel nach Gleichung 4.2 um etwa  $1/\sqrt{2} \approx 0,7$  zu kleineren Energien bei ca.  $1200\text{ cm}^{-1}$  hin verschoben.

Im deuterierten Lösungsmittel kommt es auch zu einer (langsamen) Deuterierung der Stickstoffatome im Peptidrückgrat. Dabei tauschen das, an das Stickstoffatom gebundene, Wasserstoffatom mit einem Deuteriumatom aus dem Lösungsmittel die Position. Dieser H/D-Austausch der Peptidbindung führt in deuterierten Lösungsmitteln zu einem Verschieben der Amid-I und -II Banden. Die Amid-I Bande schiebt in deuterierter Form nur um wenige Wellenzahlen und wird dann Amid-I' genannt. Die Amid-II Bande, die hauptsächlich aus NH-Biegeschwingungen und CN-Streckschwingungen besteht, enthält in deuterierter Form nur noch die CN-Streckschwingung bei  $1450\text{ cm}^{-1}$  und heißt dann Amid-II'. Die deuterierte ND-Biegeschwingung hat eine deutlich kleinere Frequenz und koppelt deshalb nicht mehr mit der CN-Streckschwingung, sie mischt mit anderen Moden im Frequenzbereich um  $1000\text{ cm}^{-1}$  [Bar07].

Die Infrarotspektroskopie ist eine der wenigen Methoden, die direkt die Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen messen kann. Als Faustregel gilt, dass Wasserstoffbrückenbindungen die Frequenz von Streckschwingungen verringern, da sie die Rückstellkraft verringern, und die Frequenz von Biegeschwingungen erhöhen, da sie eine zusätzliche Rückstellkraft erzeugen [CDW90].

Da die Änderungen im Spektrum, die von einer geänderten Wasserstoffbrückenumgebung kommen, sehr klein sind, wird auf Differenzspektren zurückgegriffen. Dann werden nur die Änderungen im Spektrum betrachtet, die durch die Isomerisierung des Photoschalters und die darauffolgende Faltung des Peptids stattfinden.

Alle stationären Infrarotspektren in dieser Arbeit wurden mit einem IFS66v/s FTIR-Spektralphotometer von Bruker gemessen.

### 4.1.3 Fluoreszenzspektroskopie

Im Gegensatz zur Infrarotspektroskopie, bei der hauptsächlich das Proteinrückgrat beobachtet wird, können mit der Fluoreszenzspektroskopie Aussagen über Aminosäureseitenketten getroffen werden [Lak06]. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin besitzen aufgrund der konjugierten  $\pi$ -Elektronensysteme Fluoreszenz im nahen ultravioletten Spektralbereich. Die Fluoreszenzquantenausbeuten betragen für Tryptophan und Tyrosin ca. 13 % bis 20 % und von Phenylalanin etwa 2 % bis 4 % [TW57, Che67]. Tyrosin kann nach Anregung mit UV-Licht, seine Energie strahlungslos auf Tryptophan übertragen, falls sich die zwei Seitenketten in direkter Umgebung befinden, darum sieht man nur die Fluoreszenz von Tryptophan in nativen Proteinen [BK05].

Da die Intensität und Wellenlänge der Fluoreszenz von Tryptophan stark von seiner direkten Umgebung beeinflusst wird, eignet es sich gut als Marker für Konformation, Dynamik und intermolekularer Wechselwirkungen von Proteinen [GC14, CB98].

Tryptophan kann aus den zwei nahezu isoenergetischen Zuständen  $^1L_a$  und  $^1L_b$  emittieren. Emission aus  $^1L_b$  tritt aber nur in komplett unpolaren Umgebung, wie in Cyclohexan, auf, da  $^1L_b$  energetisch abgesenkt wird und somit die Emission dominiert. Das Fluoreszenzspektrum zeigt dann eine starke Strukturierung [Lak06]. In polaren Lösungsmitteln wie Methanol oder Wasser findet die Emission dagegen nur aus dem  $^1L_a$  Zustand statt [Pet83, Cal97] und zeigt keine Struktur. Die Fluoreszenz von Tryptophan ist bei pH-Werten  $< 7$  biexponentiell mit einer sub-nanosekunden Komponente [GLW81].

Bei Anregung der Tryptophanfluoreszenz mit UV-Licht besteht die Gefahr der Photoionisation [FTL80] oder eines electron-to-solvent Transfers [Sob02]. Da diese Prozesse irreversibel sein können, muss die Anregungsenergie so gering wie möglich gewählt werden, um deren Wahrscheinlichkeit zu minimieren.

### 4.1.4 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus beschreibt die unterschiedliche Absorbanz von links- und rechts zirkular polarisiertem Licht. Das gemessene Signal ist mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz [Bee52] demnach:

$$\Delta A(\lambda) = A_L(\lambda) - A_R(\lambda) = [\varepsilon_L(\lambda) - \varepsilon_R(\lambda)] lc,$$

wobei  $A_L(\lambda)$  und  $A_R(\lambda)$  die Absorbanz von links und rechts zirkular polarisiertem Licht,  $\varepsilon_L(\lambda)$  und  $\varepsilon_R(\lambda)$  der Extinktionskoeffizient von links und rechts zirkular polarisiertem Licht,  $l$  die Schichtdicke und  $c$  die Konzentration ist.

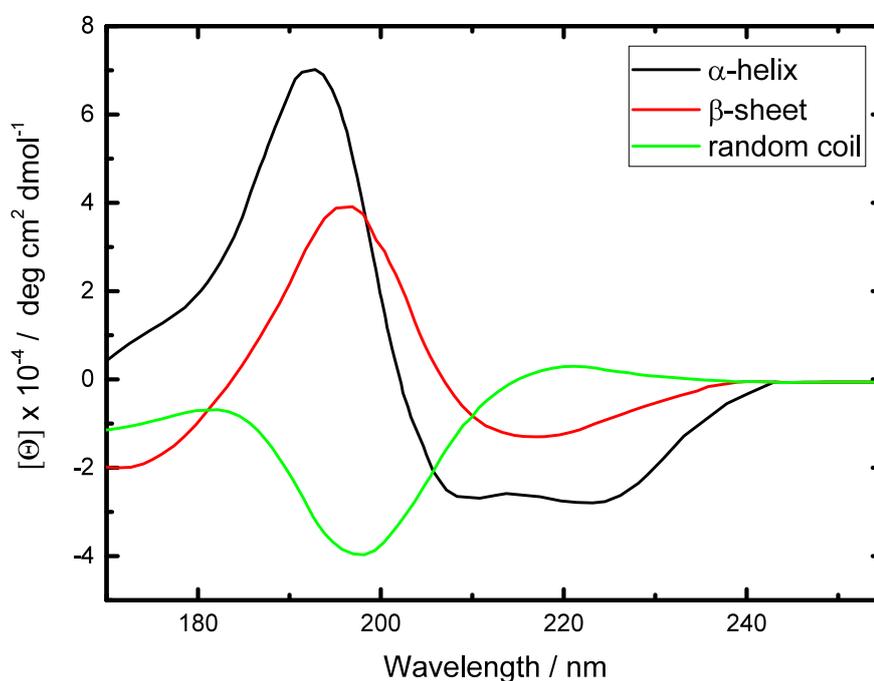
Es lässt sich auch äquivalent zur Absorbanz die Elliptizität der entstehenden Polarisationsellipse messen:

$$\Theta(\lambda) = \tan^{-1} \left( \frac{b(\lambda)}{a(\lambda)} \right),$$

wobei  $a$  und  $b$  die große bzw. kleine Halbachse der Ellipse sind.  $\Delta A$  und  $\Theta$  haben den einfachen numerischen Zusammenhang  $\Theta[^\circ] = 32,98 \cdot \Delta A$  [KP00].

CD-Spektroskopie im tiefen UV-Bereich (170 nm bis 250 nm) erlaubt es Strukturinformationen für Proteinen zu erhalten. Jede Sekundärstruktur hat aufgrund ihrer Symmetrie ein charakteristisches CD-Spektrum (siehe Abb. 4.1). Durch Linearkombination dieser Spektren der Sekundärstrukturen, lässt sich die Zusammensetzung der Sekundärstruktur nativer Proteine bestimmen [GF69, Joh88].

Die im fernen UV absorbierenden Gruppen in Proteinen sind die Peptidbindungen. Der  $\pi\pi^*$ -Übergang befindet sich bei ca. 190 nm und der  $n\pi^*$ -Übergang bei ca. 220 nm. Bei  $\alpha$ -Helizes gibt es zwei Banden vom  $\pi\pi^*$ -Übergang, da sich der angeregte Zustand aufgrund exzitonischer Resonanzen in zwei Zustände aufspaltet [Dav64, BTW63]. In der Absorption lässt sich dies als ein Anteil der parallel zur Helixachse absorbiert wird und einer der senkrecht dazu absorbiert wird, beobachten [BTW63]. (In Abb.



**Abbildung 4.1: CD-Spektren der Sekundärstrukturen** CD-Spektren von  $\alpha$ -Helix (schwarz) aus Pottwal Myoglobin mit 0,1 m NaF bei pH = 7,  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (rot) von Poly(Lys<sup>+</sup>-Leu-Lys<sup>+</sup>-Leu) mit 0,1 m NaF bei pH = 7 und random coil Strukturen (grün) von Poly(Lys<sup>+</sup>-Leu-Lys<sup>+</sup>-Leu) in salzfreier Lösung. gezeichnet nach [BB80]

4.1 der  $\alpha$ -Helix stammt das Maximum bei ca. 190 nm vom senkrechten Anteil und das Minimum bei 210 nm vom parallelen Anteil.)

Gibt es exzitonische Kopplungen zwischen den  $\pi$ -Elektronensystemen aromatischer Seitenketten, so befindet sich im CD-Spektrum eine positive Bande bei 230 nm [GW94].

#### 4.1.5 NMR-Spektroskopie

Mithilfe der mehrdimensionalen Kernspinresonanzspektroskopie (kurz: NMR<sup>1</sup>) ist es möglich die dreidimensionale Struktur von Peptiden in Lösung zu bestimmen.

Das erste NMR-Spektrum eines Proteins wurde von Saunders et al. veröffentlicht [SWK57]. Auch dort waren schon Information über die Struktur enthalten.

<sup>1</sup>engl: nuclear magnetic resonance

Soll die gesamte dreidimensionale Struktur aufgeklärt werden, so muss man zur mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie übergehen. Dabei werden die aus der NMR-Spektroskopie erhaltenen Informationen über die Abstände und Kopplungen im Molekül, mit Molekulardynamik Simulationen in Einklang gebracht, um so die vollständige dreidimensionale Struktur zu errechnen. (Für eine genaue Beschreibung der NMR-Spektroskopie siehe zum Beispiel Fri13). In der Literatur werden oft die zehn Strukturen mit der niedrigsten Energie übereinander gezeichnet.

### 4.2 Zeitaufgelöste Untersuchungsmethoden

Die bis jetzt vorgestellten Untersuchungsmethoden zeigen nur Gleichgewichtszustände. Um die schnellen Änderungen zwischen den Gleichgewichtszuständen und eventuelle Intermediate zeitlich verfolgen zu können, hat sich die Anrege-Abtast-Spektroskopie als gute Methode erwiesen [Zew93, Zew00]. Die Anrege-Abtast-Spektroskopie erlaubt es transiente Änderungen einer Probe nach Photoanregung mit einer sub-Pikosekunden Zeitauflösung zu verfolgen. In dieser Arbeit werden zeitaufgelösten Absorptionsänderung im mittelinfraroten Spektralbereich der Amid-I' Bande, sowie die Änderungen der Emission des Tryptophans während der Faltung und Entfaltung von AzoChignolin beobachtet. Im Folgenden wird kurz der Aufbau der verwendeten Anlagen, sowie die Auswertung der erhaltenen Daten beschrieben.

#### 4.2.1 Lasersysteme

Die zur Anrege-Abtast-Spektroskopie verwendeten Lasersysteme basieren auf dem Prinzip der *chirped-pulse-amplification* (CPA). Dabei erzeugt ein Titan-Saphir Oszillator mit dem *Kerr-lense-modelocking*-Effekt ultrakurze Impulse mit einer Zentralwellenlänge von 800 nm und einer Repetitionsrate von etwa 80 MHz. Bevor diese Impulse verstärkt werden können, muss deren Intensität reduziert werden, um Schäden an den optischen Komponenten im Verstärker zu vermeiden [SM85, Che96]. Dazu durchlaufen die Impulse einen Strecker. Durch die Kombination eines Gitters und reflektiver Optik erfahren die Impulse eine große Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) [Tre69] und ihre Impulsdauer wird dadurch um vier Größenordnungen erhöht.

Die so gestreckten Impulse werden nun mit einer Rate von 1 kHz in einen Titan-Saphir Resonator eingekoppelt und verstärkt. Die Impulse werden zum Abschluss wieder komprimiert, um kurze Impulsdauern zu erhalten. Die Funktion des Kompressors kehrt das Prinzip des Streckers um und induziert eine negative GVD.

Die so erhaltenen Impulse haben eine Impulsdauer von 100 fs, eine Impulsenergie von über 3 mJ, eine Repetitionsrate von 1 kHz und eine Zentralwellenlänge von 800 nm.

Das Licht aus den Lasersystemen wird nun in einen Anrege- und einen Abtast-Arm aufgespalten, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

Für die ps-Experimente wurde das Lasersystem Libra HE von Coherent und für die  $\mu\text{s}$ -Experimente das System Tsunami (Oszillator) und Spitfire Pro (Verstärker) von Spectra Physics benutzt.

### 4.2.2 Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie

Mit der Anrege-Abtast-Spektroskopie können zeitabhängige Absorptionsänderungen mit einer Zeitauflösung von  $<1$  ps beobachtet werden. Ein Anregungsimpuls erzeugt in der Probe elektronische Übergänge und die Isomerisierung des Azobenzol-Chromophors, welche zeitabhängige Absorptionsänderungen verursachen. Nach einer bestimmten Verzögerungszeit  $t_D$  transmittiert der mittelinfrarote Abtastimpuls das zuvor angeregte Probenvolumen und wird von einem Spektrometer spektral aufgelöst auf einen MCT<sup>2</sup>-Detektor abgebildet. Ein A/D-Wandler digitalisiert die Messwerte und übergibt diese zur Weiterverarbeitung an einen PC. Abb. 4.2 zeigt einen Überblick des Aufbaus.

#### Abtastimpuls

Der mittelinfrarote Abtastimpuls wird durch eine dreistufige, nichtlineare Frequenzkonversion erzeugt. Im ersten Schritt wird der infrarote Anteil eines Weißlichts (CG,  $\lambda_s = 1400$  nm) in einem *nicht-kollinear optischen parametrischen Verstärker* (NOPA) [WPR97, CD03] verstärkt. Das Weißlicht entsteht durch Selbstphasenmodulation bei der Fokussierung der 800 nm Impulse aus dem Lasersystem in einen 5 mm dicken Saphirkristall [Zhe03]. Der NOPA wird mit 400 nm Impulsen gepumpt, die aus einer zweiten Harmonischen Erzeugung (SHG) in einem BBO<sup>3</sup>-Kristall (Typ I,  $\Theta = 29^\circ$ , Dicke 0,5 mm) entstehen. Im NOPA selbst, bestehend aus einem weiteren BBO-Kristall (Typ I,  $\Theta = 32,5^\circ$ , Dicke 2 mm), werden die Pumpimpulse mit den Weißlichtimpulsen räumlich und zeitlich, unter einen Winkel von ca.  $4^\circ$ , überlagert. Unter dem richtigen Phasenanpassungswinkel wird nur der 1400 nm Anteil des Weißlichts verstärkt, zusätzlich entstehen Impulse mit einer Wellenlänge von 560 nm, die zur Diagnostik benutzt werden.

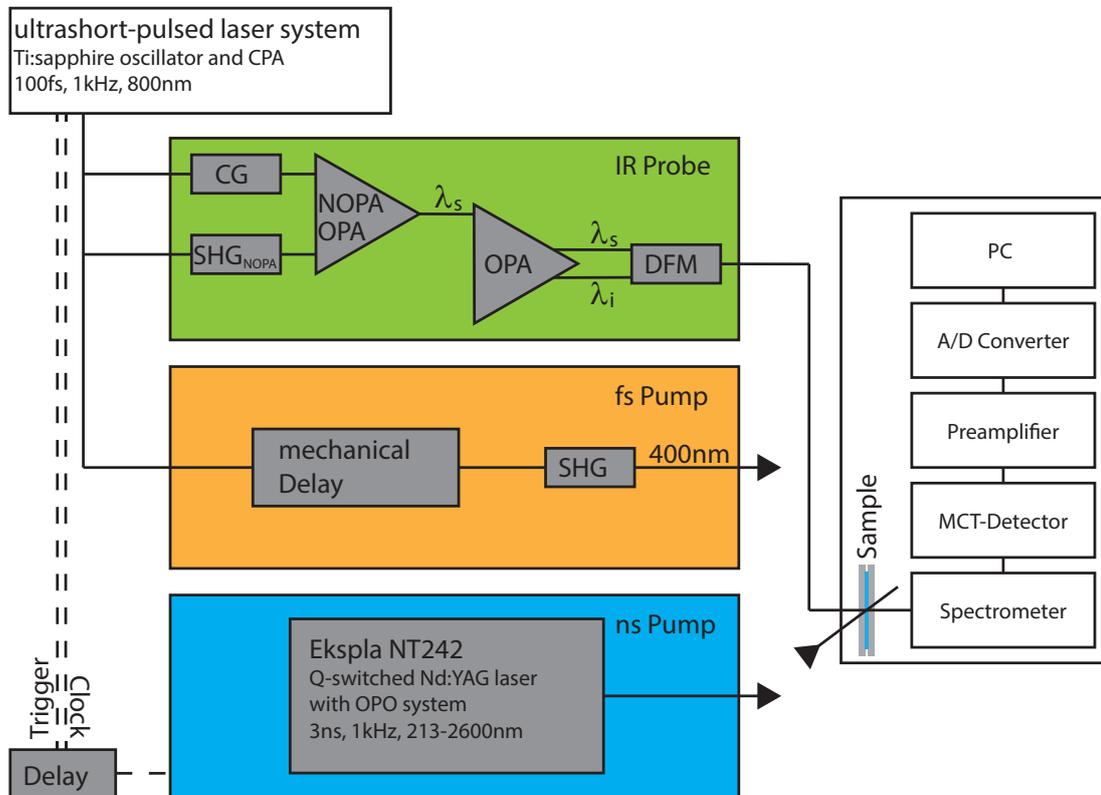
Bei der ps-Anlage findet die Erzeugung des Weißlichts in einem 5 mm dicken YAG<sup>4</sup>-Kristall statt. Die erste Verstärkung des infraroten Anteils aus dem Weißlicht geschieht in einem *optischen parametrischen Verstärker* (OPA). Dieser wird kollinear mit 800 nm Impulsen gepumpt. In einem BBO-Kristall (Typ II,  $\Theta = 27^\circ$ , Dicke 4 mm) wird das Weißlicht mit den Pumpimpulsen räumlich und zeitlich überlagert. Wieder werden unter dem richtigen Phasenanpassungswinkel die 1400 nm Impulse verstärkt, allerdings entstehen zusätzlich Impulse mit einer Wellenlänge von 1800 nm, welche zur Diagnostik benutzt werden.

---

<sup>2</sup>Quecksilber-Cadmium-Tellurid

<sup>3</sup> $\beta$ -Bariumborat

<sup>4</sup>Yttrium-Aluminium-Granat



**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des transienten Infrarot-Absorptions-Aufbaus**

Im grünen Kasten ist die Erzeugung der infraroten Abtastimpulse dargestellt. Vom CPA System wird in einem NOPA oder OPA Licht der Wellenlänge  $\lambda_s = 1400 \text{ nm}$  erzeugt. Im nächsten OPA wird dieses Licht verstärkt sowie Licht der Wellenlänge  $\lambda_i = 1800 \text{ nm}$  erzeugt. In der DFM wird aus diesen Wellenlängen die Differenzfrequenz im Mittelinfraroten erzeugt.

Im orangen Kasten ist die mechanische Verzögerungsstrecke sowie die anschließende Frequenzverdopplung für den Anregungsimpuls für Verzögerungszeiten bis 3 ns abgebildet.

Der blaue Kasten zeigt das Ekspla NT242 Lasersystem, das die Anregungsimpulse für Verzögerungszeiten bis  $100 \mu\text{s}$  zur Verfügung stellt, sowie links unten die elektronischen Verzögerungsgeneratoren.

Für eine genaue Beschreibung siehe Fließtext.

Im zweiten Schritt wird die Energie der 1400 nm Impulse, aus dem NOPA (oder OPA), in einem weiteren OPA, welcher mit 800 nm Impulsen gepumpt wird, weiter erhöht. Der OPA besteht aus einem BBO-Kristall (Typ II,  $\Theta = 27^\circ$ , Dicke 3 mm).

In diesem Prozess entstehen aufgrund der Energieerhaltung zusätzlich Impulse mit einer Wellenlänge von  $\lambda_i = 1800$  nm.

Im letzten Schritt wird in einem Silberthiogallat Kristall ( $\text{AgGaS}_2$ , Typ I,  $\Theta = 34^\circ$ , Dicke 2 mm) die Differenzfrequenz (DFM) durch räumliche und zeitliche Überlagerung der 1400 nm und 1800 nm Impulsen erzeugt. Die resultierenden mittelinfraroten Impulse haben eine Zentralwellenlänge von 6080 nm ( $= 1645 \text{ cm}^{-1}$ ), eine Impulsdauer von  $\tau_{IR} = 100$  fs bis 200 fs, eine Impulsenergie von 0,5  $\mu\text{J}$  bis 1  $\mu\text{J}$  und eine spektrale Breite von  $150 \text{ cm}^{-1}$ .

### Anregungsimpuls

Die Wellenlänge des Anregungsimpuls wird durch eine SHG in einem BBO-Kristall (Typ I,  $\Theta = 29^\circ$ , Dicke 0,5 mm) von 800 nm nach 400 nm konvertiert. Mit einer Linse werden die Impulse auf die Probe fokussiert. Mit der mechanischen Verzögerungsstrecke können kontinuierliche Verzögerungszeiten zwischen dem Anrege und dem Abtastimpuls bis 3 ns eingestellt werden.

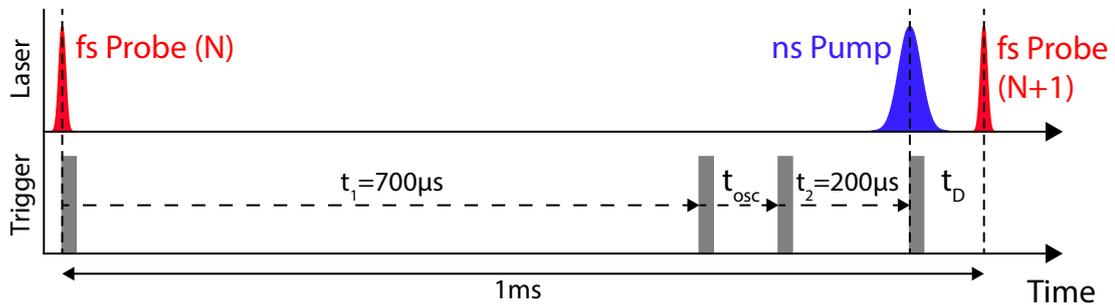
Sollen größere Verzögerungen, bis 100  $\mu\text{s}$ , gemessen werden, steht der Nd:YAG<sup>5</sup> Laser NT242 von Ekspla zur Verfügung. Mit dem integrierten optischen parametrischen Oszillator (OPO) können Wellenlängen im Bereich von 213 nm bis 2600 nm kontinuierlich eingestellt werden. Die Impulsdauer beträgt 3 ns. Die Synchronisation zum CPA-Lasersystem wird über zwei elektronische Verzögerungsgeneratoren hergestellt. Das Triggersignal läuft synchron zum Spitfire Pro Lasersystem. In den Messungen muss der Anregungsimpuls um bis zu 100  $\mu\text{s}$  vor dem Abtastimpuls die Probe durchlaufen. Weil das ganze System, einschließlich Detektion, synchron zum Spitfire läuft, wird der Anregungsimpuls vom vorhergehenden Abtastimpuls ausgelöst. Dazu muss das Triggersignal, das den Anregungsimpuls auslöst um 900  $\mu\text{s}$  bis 1000  $\mu\text{s}$  verzögert werden. Die zeitliche Abfolge der Triggersignale ist in Abb. 4.3 schematisch dargestellt.

Das Triggersignal vom Spitfire wird konstant um  $t_1 = 700 \mu\text{s}$  von einer PCI Verzögerungskarte (Bergmann BME SG05p) verzögert. Um die Genauigkeit der PCI Karte zu erhöhen, wird ihr noch das 80 MHz Signal (*Clock*) des Oszillators zur Verfügung gestellt. Der Ausgang der PCI Karte dient als Trigger für den zweiten Verzögerungsgenerator (Stanford Research DG535). Dieser erzeugt zwei Triggersignale. Das erste Signal wird um  $t_{osc}$  nach  $t_1$  erzeugt. Dieses Signal löst die Pumpdioden des Oszillators im Ekspla Laser aus.  $t_{osc}$  ist eine veränderliche Zeit, die vom Messprogramm eingestellt wird. Das zweite Triggersignal  $t_2$ , das der Verzögerungsgenerator erzeugt, kommt systembedingt zum Zeitpunkt  $t_2 = 200 \mu\text{s}$  nach  $t_{osc}$ . Dieses Signal steuert die Auskopplung der Impulse aus dem internen Resonator des Ekspla-Systems.

Die im Experiment beobachtete Verzögerungszeit  $t_D$  ist also (siehe Abbildung 4.3):

$$t_D = 1000 \mu\text{s} - t_1 - t_{osc} - t_2 = 100 \mu\text{s} - t_{osc}$$

<sup>5</sup>Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser



**Abbildung 4.3: Triggerschema für Messungen bis 100  $\mu\text{s}$**  Der Anregungsimpuls wird vom vorhergehenden Abtastimpuls getriggert. Die resultierende Verzögerungszeit ist  $t_D = 1000 \mu\text{s} - t_1 - t_{osc} - t_2 = 100 \mu\text{s} - t_{osc}$ .

### Messprinzip, Detektion und Datenverarbeitung

Da Wasserdampf in der Luft mittelinfrarotes Licht stark absorbiert, befinden sich der Strahlengang nach der DFM in einer geschlossenen Kammer, die mit Trockenluft gespült wird.

Der Anregungsimpuls wird mit einer Linse auf die Probe fokussiert, so dass der Bündeldurchmesser am Ort der Probe etwa  $200 \mu\text{m}$  aufweist. Um die Qualität der Messung zu erhöhen, wird mit einem Chopperrad jeder zweite Anregungsimpuls geblockt.

Das mittelinfrarote Licht wird mit einem Strahlteiler in einen Probe- und einen Referenzarm aufgespalten. Die zwei Bündel werden von einem Goldparabolspiegel ebenfalls auf die Probe fokussiert und von einem zweiten Parabolspiegel nach der Probe wieder kolimiert. Der Probestrahl durchläuft dabei die Probe an der Stelle, die zuvor vom Anregungsimpuls getroffen wurde und liefert das eigentliche Messsignal. Der Referenzstrahl transmittiert die Probe an einer nicht-angeregten Stelle und wird zur Korrektur des Messsignals benutzt. Beide Bündel werden dann mit einem dritten Parabolspiegel auf den Eintrittspalt des Gitterspektrographen (Bruker, Chromex 250is) fokussiert. Der Spektrograph arbeitet in der Czerny-Turner-Anordnung [CT30] und bildet dann die zwei Bündel, spektral aufgelöst, auf einen zweizeiligen MCT-Detektor, mit je 64 Pixel, ab. Das benutzte Gitter hat 110 Striche/mm.

Die Probe befindet sich einer  $100 \mu\text{m}$  dicken Durchflussküvette mit 2 mm starken  $\text{CaF}_2$ -Fenstern, welche mit einem Chiller mit Wasser temperiert werden kann. Mit einer Quetschpumpe wird sichergestellt, dass das gesamte Probenvolumen zwischen zwei Laserschüssen komplett ausgetauscht wird. So wird bei jedem Schuss frische Probe belichtet.

Bei jeder Verzögerungszeit werden  $N = 1000$  Schüsse gemessen, bevor eine neue Verzögerungszeit eingestellt wird und wieder 1000 Schüsse gemessen werden. Diese

Prozedur wird solange wiederholt, bis der gesamte zur Verfügung stehende Zeitbereich (3 ns oder 95  $\mu$ s) abgetastet wurde. Anschließend wird die gesamte Messreihe etwa 20 mal wiederholt und die Signalkurven gemittelt, um das Rauschen zu reduzieren.

Auf diese Art entstehen 4 verschiedene Messsignale (Probestrahl mit Anregung geblockt  $P_c$ , Probestrahl mit Anregung  $P$ , Referenzstrahl mit Anregung geblockt  $R_c$  und Referenzstrahl mit Anregung  $R$ ) aus denen die Transmissionsänderung der Probe berechnet wird:

$$\Delta T(\lambda, t) = \frac{\sum_i^N P_i(\lambda, t) \cdot \sum_i^N R_{c,i}(\lambda, t)}{\sum_i^N P_{c,i}(\lambda, t) \cdot \sum_i^N R_i(\lambda, t)} \quad (4.3)$$

Die Transmissionsänderung wird anschließend in eine Absorptionsänderung  $\Delta A$  umgerechnet. Mit einer globalen multiexponentiellen Datenanpassung werden anschließend Zerfallszeiten  $\tau_i$  und die zugehörigen Amplitudenspektren  $a_i$  (DADS<sup>6</sup>) gefittet. Um der endlichen Zeitaufösung des Experiments gerecht zu werden, wird die Fitfunktion mit der Kreuzkorrelationsfunktion  $C(t_D - t)$  aus dem Anrege- und Abtastimpuls gefaltet:

$$\Delta A(\lambda, t_D) = \sum_{i=1}^n \int_0^{\infty} a_i(\lambda, \tau_i) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \cdot C(t_D - t) dt \quad (4.4)$$

Unter der Annahme von gaußförmigen Anrege- und Abtastimpulsen wird die Kreuzkorrelationsfunktion zu einem Gaußimpuls mit der Breite  $\tau_{cc}$ . Die Fitfunktion wird dann zu:

$$\Delta A(\lambda, t_D) = \sum_{i=1}^n a_i(\lambda, \tau_i) \cdot \exp\left(\frac{\tau_{cc}^2}{4\tau_i^2} - \frac{t_D}{\tau_i}\right) \cdot \frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t_D}{\tau_{cc}} - \frac{\tau_{cc}}{2\tau_i}\right)\right], \quad (4.5)$$

wobei  $\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp(-\xi^2) d\xi$  die Fehlerfunktion ist.

### 4.2.3 Zeitaufgelöste Tryptophan-Fluoreszenz

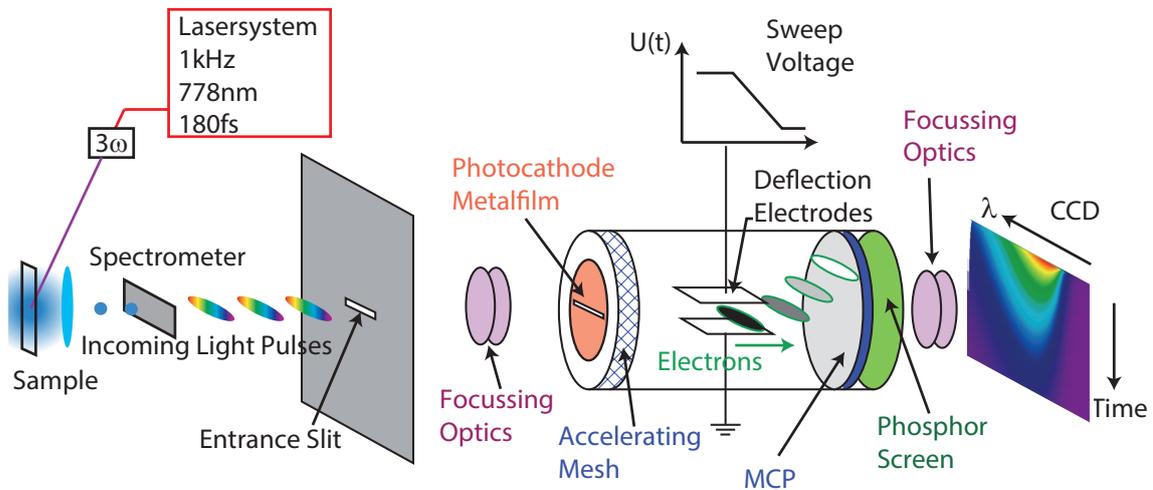
#### Streak-Kamera: Emission von Tryptophan

Mithilfe einer Streak-Kamera ist es möglich Fluoreszenz zeitaufgelöst zu detektieren. Sie wird in Abschnitt 7.3 benutzt, um an Informationen über die Umgebung der aromatischen Aminosäuren in AzoChignolin zu gelangen.

Der Aufbau des Streak-Kamera Experiments ist schematisch in Abb. 4.4 dargestellt.

---

<sup>6</sup>decay associated difference spectra



**Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des Aufbaus der Streak-Kamera** Die Probe wird durch frequenzverdreifachtes Licht der Wellenlänge  $\lambda = 260 \text{ nm}$  angeregt. Das entstehende Fluoreszenzlicht wird von einer kurzbrennweitigen Linse kollimiert und in einem Spektrometer dispergiert. In der Photokathode lösen die Photonen Elektronen aus, die durch eine Gitterelektrode beschleunigt werden. Im darauf folgenden Plattenkondensator wird eine Spannungsrampe angelegt, wodurch die Elektronen in Abhängigkeit der Zeit in der sie die Platten passieren, abgelenkt werden. Anschließend findet eine Verstärkung in einer Microchannel Plate (MCP) statt, bevor die Elektronen von einem Phosphorschirm wieder in Licht umgewandelt und von einem CCD-Detektor detektiert werden.

Die vom CPA-Lasersystem (1 kHz Repetitionsrate, 778 nm Zentralwellenlänge, 180 fs Pulsdauer) ausgehenden Impulse werden mithilfe einer THG frequenzverdreifacht und somit nach 260 nm konvertiert. Diese UV-Impulse werden mit einer Linse in die Probe fokussiert. Am Probenort beträgt der Bündeldurchmesser ca.  $70 \mu\text{m}$  bei einer Impulsenergie von 80 nJ. Die Probe befindet sich in einer 0,5 mm dicken Durchflussküvette aus Quarzglas von Hellma Analytics. Mit einer Quetschpumpe wird sichergestellt, dass das gesamte Probenvolumen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Laserschüssen vollständig ausgetauscht wird. Die Konzentration der Probe wird so eingestellt, dass die maximale Absorbanz  $< 0,1 \text{ OD}$  ist, um Reabsorptionseffekte zu vernachlässigen.

Das entstehende Fluoreszenzlicht wird von einer Linse ( $f = 80 \text{ mm}$ ) kollimiert und anschließend auf ein Spektrometer (Princeton Instruments, Acton SP2356) abgebildet. Die spektral aufgelösten Impulse werden nun auf eine Photokathode im Streak-Kamera System abgebildet, aus der sie Elektronen auslösen. Diese Elektronen werden von einer Gitterelektrode beschleunigt und durchlaufen einen Bereich zwischen zwei Ablenkelektroden. An diesen Ablenkelektroden wird eine Spannungsrampe angelegt,

die synchron zum Lasersystem läuft. Da sich die Ablenkspannung zeitlich ändert, ist der Auftreffort der Elektronen im Detektorsystem mit dem Emissionszeitpunkt verknüpft. Die Elektronen werden nun mit einer MCP vervielfacht und von einem Phosphorschirm wieder in Licht umgewandelt, welches von einer CCD-Kamera detektiert wird. Es ergibt sich eine zweidimensionale Intensitätsverteilung, in der von links nach rechts die Wellenlänge und von oben nach unten der Zeitpunkt der Emission kodiert ist.

Durch Variation der Spannungsrampe können unterschiedliche Zeitfenster mit verschiedenen Zeitauflösungen gefahren werden. In dieser Arbeit wurden nur das 2 ns sowie das 10 ns Zeitfenster, mit Zeitauflösungen von 20 ps und 300 ps, benutzt.

### **Anrege-Fluoreszenz-Abtast Messungen**

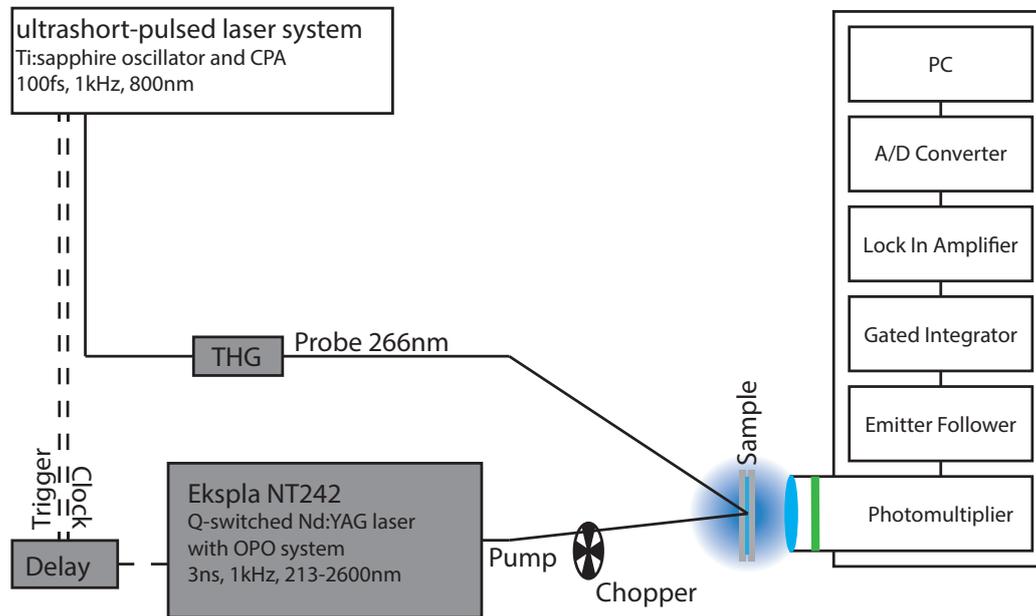
Da die Infrarotspektroskopie hauptsächlich für Änderungen der Wasserstoffbrückenumgebung des Proteinrückgrats sensibel ist, wurden zusätzlich zeitaufgelöste Emissionsmessungen der aromatischen Aminosäuren durchgeführt. Der Aufbau dazu ist in Abb. 4.5 dargestellt.

Der Anregungsimpuls, welcher die Isomerisierung des Azobenzol auslöst stammt wie bei der transienten Absorption vom Ekspla NT242 Lasersystem, welches über die selbe elektronische Verzögerung getriggert wird. Jeder zweite Anregungsimpuls wird von einem Chopper geblockt, damit ist eine Referenzierung möglich, die die Messgenauigkeit erhöht.

Der Abtastimpuls, der die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan anregt, stammt vom Tsunami/Spitfire fs-Lasersystem. Die 800 nm Impulse werden über eine Dritte-Harmonische-Erzeugung (THG) nach 266 nm konvertiert. Dazu werden die 800 nm Impulse zuerst in einem BBO-Kristall (Typ I,  $\Theta = 29^\circ$ , Dicke 0,5 mm) frequenzverdoppelt. Eine Zwei-Wellen-Verzögerungsplatte dreht die Polarisation der Zweiten-Harmonischen (400 nm) um  $90^\circ$  und die der Fundamentalen (800 nm) um  $180^\circ$ , so dass beide gleich polarisiert sind. Mit einem  $\alpha$ -BBO-Kristall (Dicke 1,3 mm) wird der Unterschied der Gruppengeschwindigkeit in den Kristallen kompensiert. Zuletzt wird die Summenfrequenz aus der Fundamentalen und der Zweiten-Harmonischen in einem weiteren BBO-Kristall (Typ I,  $\Theta = 44^\circ$ , Dicke 1 mm) erzeugt. Die resultierende Dritte-Harmonische hat eine Wellenlänge von 266 nm. Der Abtastimpuls wird vor der Probe auf eine Impulsenergie von 50 nJ abgeschwächt.

Die Probe befindet sich einer 100  $\mu\text{m}$  dicken Durchflussküvette aus Quarzglas von Hellma Analytics. Mit einer Quetschpumpe wird sichergestellt, dass das gesamte Probenvolumen zwischen zwei Laserschüssen komplett ausgetauscht wird. So wird bei jedem Schuss frische Probe belichtet.

Der Anrege- und Abtastimpuls werden nun in die Probe fokussiert und dort räumlich überlagert. Die Bündeldurchmesser in der Probe sind  $d_{\text{pump}}(355 \text{ nm}) = 150 \mu\text{m}$  und  $d_{\text{probe}}(266 \text{ nm}) = 70 \mu\text{m}$ . So wird sichergestellt, dass nur im zuvor angeregten



**Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des zeitaufgelösten Tryptophan-Fluoreszenz-Aufbaus** Das Azobenzol wird vom Ekspla NT242 isomerisiert. Ein Chopperrad blockiert jeden zweiten Anregungsimpuls. Nach einer bestimmten Verzögerungszeit  $t_D$  wird von einem 266 nm Impuls die Tryptophan-Fluoreszenz angeregt. Mit einer kurzbrennweitigen Sammellinse wird möglichst viel Fluoreszenzlicht durch einen Notchfilter (grün) auf den Photomultiplier geleitet. Die Messelektronik, bestehend aus Emitter Folger, Gated Integrator und Lock In Verstärker isoliert das Signal, welches nach der A/D Wandlung im PC weiterverarbeitet wird.

Probenvolumen das Fluoreszenzlicht emittiert wird. Die Energie der Impulse beträgt  $E_{\text{pump}}(355 \text{ nm}) = 5 \mu\text{J}$  und  $E_{\text{probe}}(266 \text{ nm}) = 50 \text{ nJ}$ .

Der Anregungsimpuls löst dabei die Isomerisierung des AMPP-Chromophors und damit die Faltung des Peptids aus. Nach einer gewissen Verzögerungszeit  $t_D$  regt der Abtastimpuls die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan an, welche Fluoreszenzlicht emittieren. Eine kurzbrennweitige Sammellinse ( $f = 35 \text{ mm}$ ) kollimiert das Fluoreszenzlicht, das von einem Photomultiplier (Hamamatsu, 1P28) detektiert wird. Ein Notchfilter (Brightlight, 320/40 nm) transmittiert nur Licht der Wellenlängen von 300 nm bis 340 nm und verhindert so, dass Streulicht der Laserimpulse auf den Detektor trifft. Das Signal aus dem Photomultiplier wird von einem selbstgebauten Emitterfolger verstärkt und von einem Gated Integrator (Stanford Research, SR250) aufsummiert. Mit einem Lock-In-Verstärker (393 Lock-in

Amplifier, Ithaco Dynatrac), dessen Referenzsignal die Chopperfrequenz ist, werden die Änderungen der Fluoreszenzintensität aufgenommen. Mit einem Analog-Digital-Wandler werden die Signale digitalisiert und mithilfe eines PCs abgespeichert. Pro Verzögerungszeit werden 1000 Schüsse aufgenommen, bevor der nächste Zeitschritt gemessen wird. Der ganze, zur Verfügung stehende, Zeitbereich wird mehrmals abgetastet und anschließend gemittelt.

Die erhaltenen Fluoreszenzänderungen  $\Delta F$  werden, analog zur zeitaufgelösten Absorption, mit einem multiexponentiellen Zerfall angepasst, um Zerfallszeiten  $\tau_i$  zu erhalten. Als Fitfunktion wird, analog zur Absorption, Gleichung 4.6 benutzt:

$$\Delta F(t_D) = \sum_{i=1}^n a_i(\tau_i) \cdot \exp\left(\frac{\tau_{cc}^2}{4\tau_i^2} - \frac{t_D}{\tau_i}\right) \cdot \frac{1}{2} \left[ 1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t_D}{\tau_{cc}} - \frac{\tau_{cc}}{2\tau_i}\right) \right] \quad (4.6)$$



## 5 Stationäre Charakterisierungen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der stationären Charakterisierungen der zuvor beschriebenen Moleküle vorgestellt.

### 5.1 Probenvorbereitung

Alle Peptide, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind gleich vorbehandelt worden. Nach der Synthese werden die Peptide mit einer HPLC<sup>1</sup> aufgereinigt und mittels Massenspektrometrie auf ihre korrekte Synthese überprüft. Anschließend werden sie aus einer 0,3 mM Lösung in 40 % Acetonitril (ACN) und 60 % Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) lyophilisiert, um sicher monomere Strukturen zu erhalten [Kat54].

Das Lyophilisat wird im Dunkeln bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Kurz vor der jeweiligen Messung wird daraus eine 5 mM Lösung hergestellt. Als Lösungsmittel wird für die IR-Spektroskopie deuteriertes Methanol von Deutero ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , Isotopenreinheit  $>99,96\%$ ) oder Deuteriumoxid von Merck Millipore ( $\text{D}_2\text{O}$ , Isotopenreinheit  $>99,96\%$ ) verwendet. Für die Tryptophan-Fluoreszenz und für die CD-Spektroskopie wird die Probe in Methanol von Merck Millipore (MeOH) gelöst.

### 5.2 Chignolin

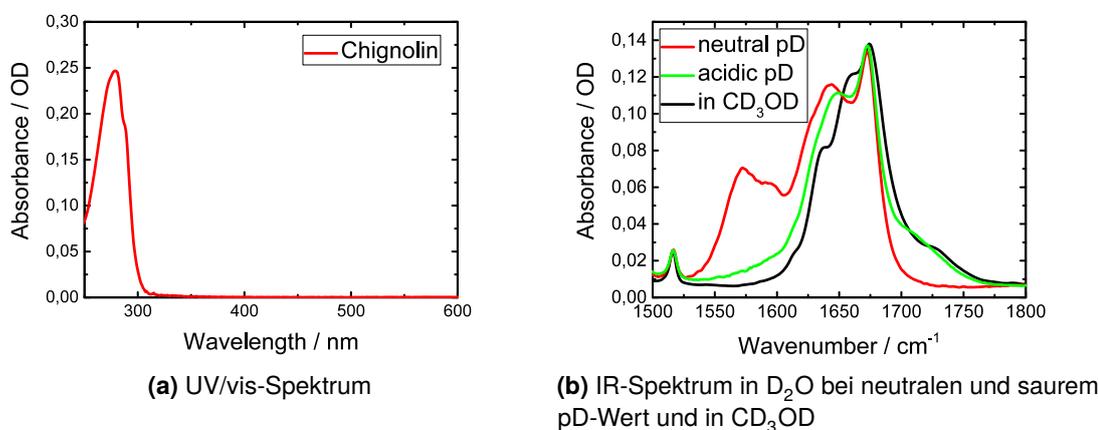
Als erstes wird das wildtyp Molekül Chignolin untersucht, in dem die lichtschtbaren Peptide ihren Ursprung haben. Sie werden anschließend mit Chignolin verglichen.

Das UV/vis-Spektrum von Chignolin (siehe Abb. 5.1a) zeigt die starke Absorption von Tryptophan bei 280 nm mit einer Schulter bei 288 nm. Die deutlich schwächere Absorption von Tyrosin bei 275 nm ist nur als sehr schwache Schulter zu erkennen.

Das IR-Spektrum im Bereich der Amid-I' Bande (siehe Abb. 5.1b) wurde in verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen: in  $\text{D}_2\text{O}$  mit  $\text{pD} = 7,2$  (rot), in  $\text{D}_2\text{O}$  mit  $\text{pD} \approx 4$  (grün) und in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (schwarz). Es wurde zusätzlich Methanol als Lösungsmittel gewählt, da die vorgestellten lichtschtbaren Moleküle selbst bei kleinsten Konzentration in Wasser stark aggregieren, während sie in Methanol als Monomere vorliegen. In allen drei Lösungsmitteln zeigt sich bei  $1517\text{ cm}^{-1}$  die Absorption der Ringschwingung der Tyrosin Seitenkette [VK90]. Bei  $1613\text{ cm}^{-1}$  befindet sich die kleine Absorptionsschulter von  $\text{NH}_3^+$  des N-Terminus (nur im sauren  $\text{D}_2\text{O}$  und in

---

<sup>1</sup>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie



**Abbildung 5.1: Stationäre UV- und IR-Spektren von Chignolin** Im UV/vis-Spektrum (a) von Chignolin ist nur die Absorption der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sichtbar. In den Lösungsmittel korrigierten IR-Spektren (b) ist Chignolin in CD<sub>3</sub>OD (schwarz) und D<sub>2</sub>O mit Phosphat-Puffer bei saurem (pD = 4, rot) und neutralen (pD = 7,2, grün) pD-Wert abgebildet. Die Absorption um 1575 cm<sup>-1</sup> und 1720 cm<sup>-1</sup> stammt von der antisymmetrischen Streckschwingung der deprotonierten bzw. protonierten Carboxygruppe der Asparaginsäure, Glutaminsäure und des C-Terminus.

Methanol zu erkennen). Die Amid-I' Bande (1600 cm<sup>-1</sup> bis 1700 cm<sup>-1</sup>) ist von der Absorption des TFAc<sup>-</sup>-Anion<sup>2</sup> bei 1675 cm<sup>-1</sup>, aus der Lyophilisation, überlagert.

Die Spektren in saurem und neutralem D<sub>2</sub>O unterscheiden sich deutlich. Im sauren D<sub>2</sub>O fehlt die breite Bande zwischen 1550 cm<sup>-1</sup> und 1600 cm<sup>-1</sup>. Dafür gibt es in der sauren Umgebung eine schwächere Bande zwischen 1700 cm<sup>-1</sup> und 1750 cm<sup>-1</sup>. Grund für diese Unterschiede ist der unterschiedliche Protonierungsgrad der vorhandenen Carboxygruppen (-COOH). In Chignolin gibt es drei solche Gruppen, die Seitengruppen der Glutaminsäure und Asparaginsäure, sowie den C-Terminus. Die pK<sub>s</sub>-Werte der Seitengruppen sind für Asparaginsäure pK<sub>s</sub>(Asp) = 3,90 und für Glutaminsäure pK<sub>s</sub>(Glu) = 4,07. Der pK<sub>s</sub>-Wert des C-Terminus liegt ungefähr bei 2 [BBH08]. Das bedeutet, dass die Unterschiede im Spektrum hauptsächlich von der (De-)protonierung der Carboxygruppen der sauren Seitenketten stammen, da der pK<sub>s</sub>-Wert des C-Terminus deutlich kleiner ist als 4 (= pD-Wert der sauren Lösung) und deshalb bei beiden pD-Werten deprotoniert (-COO<sup>-</sup>) vorliegen sollte. Bei neutralem pD-Wert liegen alle Carboxygruppen deprotoniert vor. Bei pD = 4 liegen die Carboxygruppen der sauren Aminosäuren in etwa zur Hälfte protoniert (-COOH) vor und ändern deutlich ihre Schwingungsfrequenz von ca. 1575 cm<sup>-1</sup> nach 1720 cm<sup>-1</sup>.

Das Spektrum in CD<sub>3</sub>OD hat große Ähnlichkeiten mit dem Spektrum in saurem D<sub>2</sub>O. Die Amid-I' Bande ist im Vergleich zu den Spektren in D<sub>2</sub>O blauverschoben.

<sup>2</sup>Trifluoracetat

Zusätzlich zeichnet sich eine deutliche Schulter in der niederfrequenten Flanke der Amid-I' Bande ab. Da die breite Absorption zwischen  $1550\text{ cm}^{-1}$  und  $1600\text{ cm}^{-1}$ , wie im sauren  $\text{D}_2\text{O}$ , nicht vorhanden ist, sind die Carboxygruppen der Asparaginsäure und Glutaminsäure auch in  $\text{CD}_3\text{OD}$  protoniert.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Chignolin in Wasser eine stabile  $\beta$ -hairpin Struktur ausbildet [Hon04]. Das CD-Spektrum von Chignolin in Methanol ist in der Form nahezu identisch zu dem von Honda et al., das in Wasser aufgenommen wurde, siehe Abbildung 5.2. Hieraus folgt, dass Chignolin auch in MeOH eine  $\beta$ -hairpin-Struktur bildet, die der in Wasser sehr ähnlich ist. Die Amplituden im Spektrum in Methanol sind jedoch um den Faktor 6 kleiner als in Wasser. Das bedeutet, dass in Methanol nur etwa ein sechstel der Moleküle eine  $\beta$ -hairpin Struktur bilden wie in Wasser. Dies könnte eine Folge der kleineren Polarität von Methanol im Vergleich zu Wasser sein, wodurch in Wasser die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Aminosäuren stärker zur Stabilität der  $\beta$ -hairpin Struktur beitragen.

In den CD-Spektren in Wasser und Methanol in Abbildung 5.2 befindet sich ein Maximum bei 230 nm sowie ein starkes Minimum bei 200 nm. Beide Extrema stammen von der exzitonischen Kopplung zwischen Tyrosin und Tryptophan [GW94]. Das Minimum bei 218 nm stammt von der Symmetrie der antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt Struktur [Gre06].

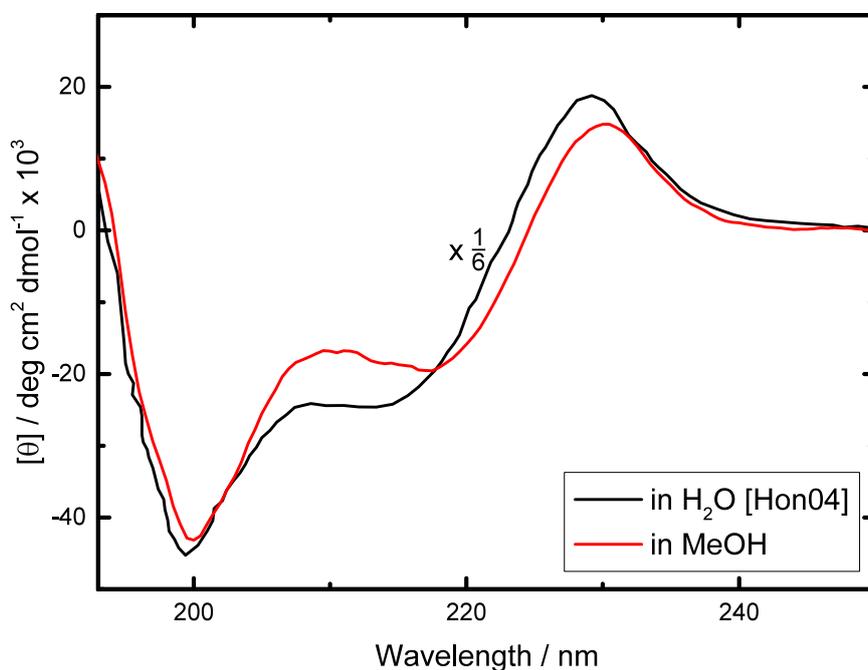
## 5.3 AzoChignolin

Im folgenden Abschnitt wird nun das auf Chignolin basierenden lichtschtbare Peptid AzoChignolin mit stationären Methoden analysiert. Dies dient der Vorcharakterisierung für zeitaufgelöste Experimente, mit denen die Faltungsdynamiken des Peptids untersucht werden.

### UV/vis Absorptionsspektroskopie

Das Schaltverhalten von AzoChignolin zeigt im UV/vis Spektrum, wie erwartet, große Ähnlichkeiten mit Azobenzol (siehe Abb. 5.3). Im reinen trans-, sowie im photostationären trans-Ensemble, das durch Belichtung mit Licht der Wellenlänge 430 nm erreicht wird (schwarz und rot in Abb. 5.3), sind dominant die Bande vom  $\pi\pi^*$ -Übergang bei 322 nm und die schwache Bande vom  $n\pi^*$ -Übergang bei 430 nm zu erkennen.

Wird ungefaltetes trans-AzoChignolin mit Licht der Wellenlänge 355 nm ins cis-Ensemble umbelichtet, so stellt sich nach einigen Minuten der photostationäre cis-Zustand ein (grün in Abb. 5.3). Dies ist der Zustand mit dem größten cis-Anteil (etwa 80% cis), der im Experiment zugänglich ist. Das reine cis-Spektrum in Abb. 5.3 wurde direkt während der HPLC aufgenommen, da hier trans- und cis-AzoChignolin voneinander getrennt werden kann. Wie bei reinem Azobenzol verringert sich im cis



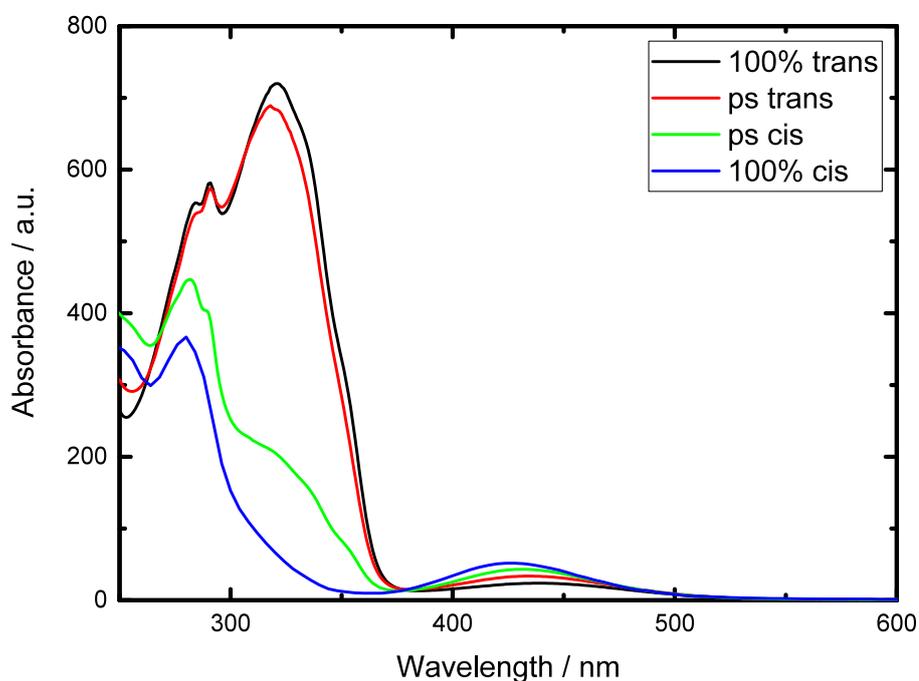
**Abbildung 5.2: CD-Spektren von Chignolin in H<sub>2</sub>O von Honda et al. und in MeOH** Die CD-Spektren in H<sub>2</sub>O und MeOH sind sehr ähnlich. Das bedeutet, dass Chignolin in MeOH fast die gleiche Struktur wie in H<sub>2</sub>O hat. Die Daten von Honda et al. sind aus [Hon04] entnommen und um den Faktor 6 verkleinert.

die Absorption des  $\pi\pi^*$ -Übergangs, dafür nimmt die Absorption des  $n\pi^*$ -Übergangs zu.

Der photostationäre trans-Zustand wird durch Belichtung der  $n\pi^*$ -Bande mit Licht der Wellenlänge 430 nm erreicht, der trans Anteil beträgt im photostationären trans etwa 94 %.

In allen UV/vis-Spektren sind auch die Absorptionsbanden von Tryptophan, bei 280 nm und 288 nm deutlich zu erkennen. Die schwache Tyrosin Absorption bei 275 nm ist dagegen nur leicht im photostationären cis-Spektrum als Schulter zu sehen. Im reinen cis-Spektrum ist die spektrale Auflösung nicht gut genug um diese Banden aufzulösen.

Die Rate der thermischen Rückreaktion von cis zum thermisch stabilen trans wurde über die Zunahme der Absorbanz der  $\pi\pi^*$ -Bande des AMPP-Chromophors ermittelt. Dazu wurde eine AzoChignolin-Lösung ins photostationäre cis belichtet und anschließend jede Sekunde die Absorbanz bei 322 nm bei Raumtemperatur gemessen.

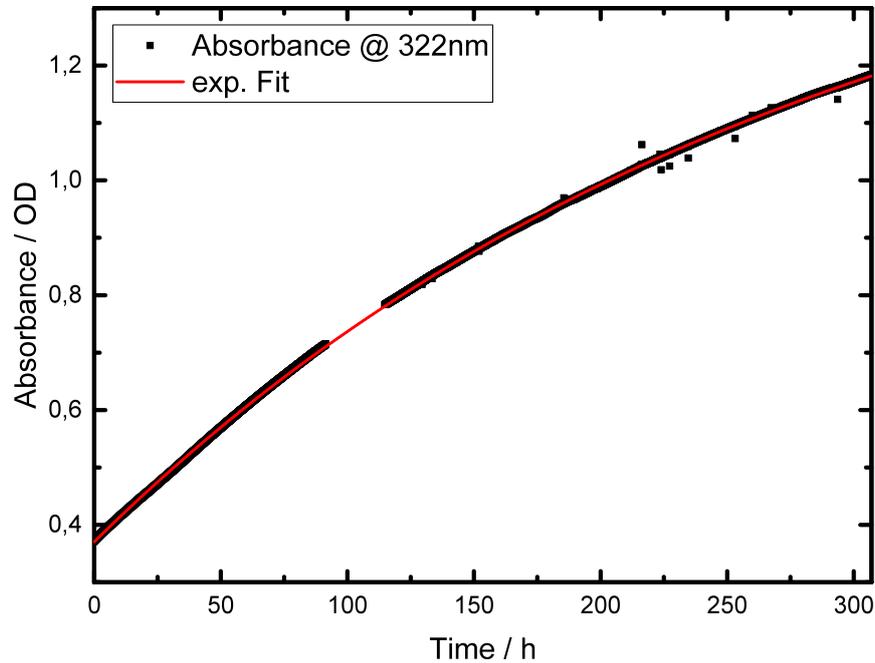


**Abbildung 5.3: UV/vis-Spektren von trans- und cis-AzoChignolin** Gezeigt sind die UV/vis-Absorptionen von reinem trans-AzoChignolin (schwarz), photostationärem trans-AzoChignolin (rot), photostationärem cis-AzoChignolin (grün) und reinem cis-AzoChignolin (blau). Reines trans-AzoChignolin absorbiert maximal bei 322 nm, diese Bande verschwindet nahezu komplett im cis-AzoChignolin. Im cis-AzoChignolin bildet sich eine Absorptionsbande bei 428 nm. Bei ca. 280 nm befinden sich die kleinen Absorptionen von Tryptophan und Tyrosin.

Während sich die Probe langsam ins trans umwandelt, nimmt die Absorbanz der  $\pi\pi^*$ -Bande stark zu. Die Messung ist in Abb. 5.4 dargestellt. Die Daten wurden anschließend monoexponentiell angepasst. Als Zeitkonstante liefert die Anpassung  $\tau_{\text{therm}} = 280 \text{ h} \approx 12 \text{ d}$ . Damit ist im Rahmen dieser Arbeit auch das cis-Isomer als thermisch stabil anzusehen, da zwischen Belichtung und Messung nur wenige Minuten vergehen.

### CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren von trans- und cis-AzoChignolin in Methanol sind in Abb. 5.5 dargestellt. Das cis-Spektrum (rot) zeigt ebenso wie für Chignolin ein starkes Maximum bei etwa 230 nm aufgrund der exzitonischen Kopplungen zwischen Tyrosin

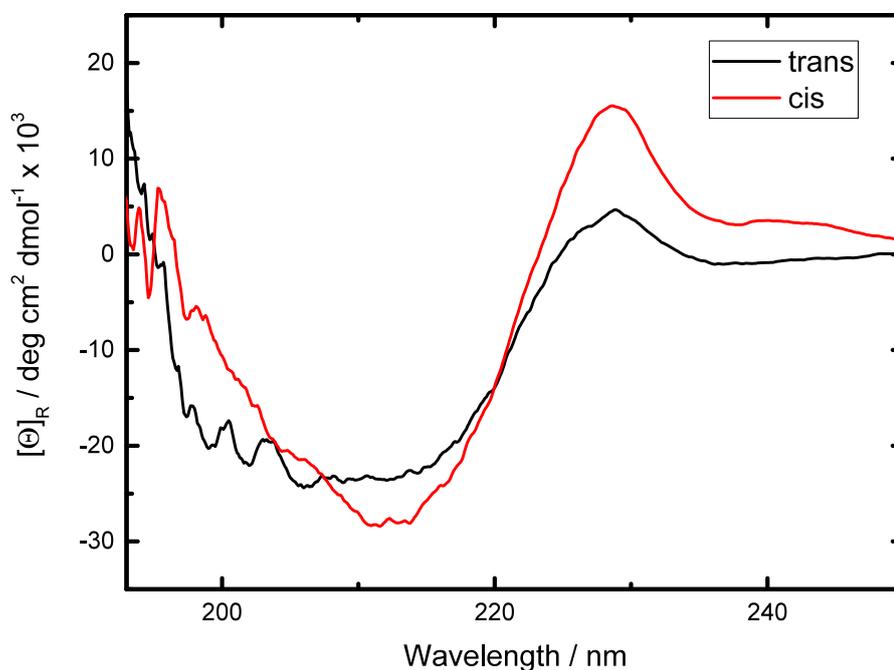


**Abbildung 5.4: Thermische Rückreaktion von cis nach trans** Die gefalteten cis-Strukturen gehen bei Raumtemperatur mit einer Zeitkonstante von  $\tau_{\text{therm}} = 280 \text{ h} \approx 12 \text{ d}$  in ungefaltete trans-Strukturen über.

und Tryptophan. Das Minimum bei 200 nm fehlt in diesem Fall. Die Ursache hierfür könnte eine leicht andere Orientierung von Tyrosin und Tryptophan zueinander sein, da der CD stark von der Lage und Orientierung der beteiligten Seitengruppen zueinander abhängt. Das Minimum bei ca. 215 nm deutet hingegen wieder auf eine  $\beta$ -hairpin-Struktur hin.

Im trans-Spektrum (schwarz) sind das Maximum bei 230 nm und das Minimum bei 215 nm weniger stark ausgeprägt. Das bedeutet, dass im trans weniger  $\beta$ -hairpin-Strukturen vorliegen. Dafür ist bei 200 nm das Messsignal deutlich niedriger als im cis-Spektrum. Bei 200 nm werden in CD-Spektren auch ungeordnete Peptidstrukturen gefunden. Das für AzoChignolin gefundene Verhalten deutet also auf vorwiegend ungeordnete Strukturen im trans hin.

Die CD-Spektren zeigen eine große Ähnlichkeit von AzoChignolin in cis und Chignolin. Wie Chignolin nimmt AzoChignolin im cis eine  $\beta$ -hairpin Struktur mit  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Tyrosin und Tryptophan ein. Im trans gibt es dagegen



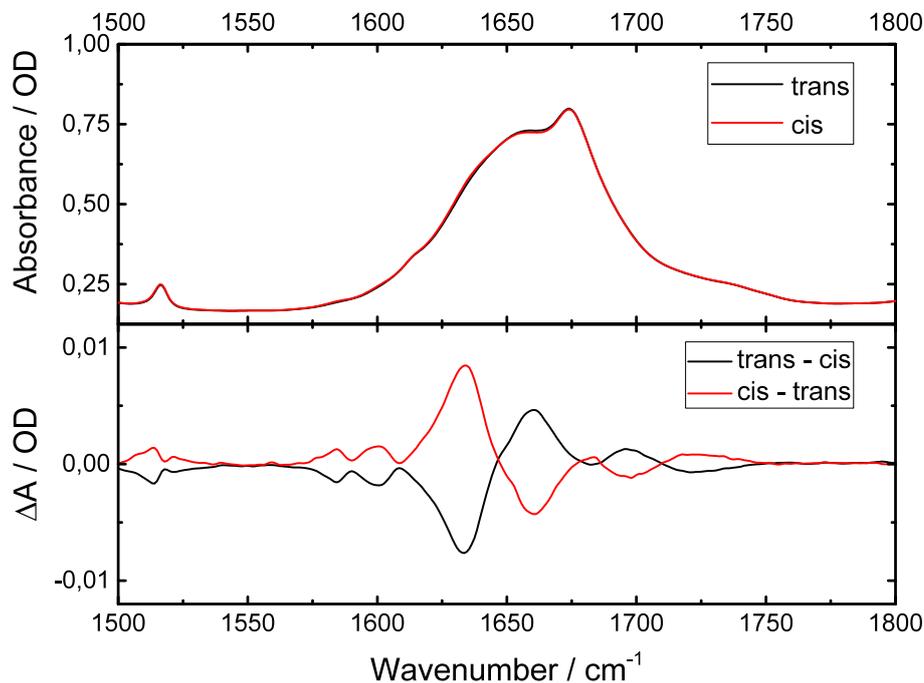
**Abbildung 5.5: CD-Spektren von AzoChignolin in Methanol in trans und cis** cis-AzoChignolin zeigt eine deutliche Bande bei 228 nm, welche von den  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen der hydrophoben Aminosäuren stammt. Diese Bande ist in trans-AzoChignolin sehr viel schwächer. Bei 213 nm ist im cis das Minimum der antiparallelen  $\beta$ -hairpin Struktur stärker ausgeprägt als im trans.

keine geordneten Strukturen. Diese Beobachtungen konnten auch mithilfe von NMR Messungen bestätigt werden [Pod15].

### IR-Spektroskopie

AzoChignolin kann nicht in Wasser vermessen werden, da es aufgrund des stark hydrophoben AMPP-Schalters bereits bei sehr geringen Konzentration im Bereich weniger  $\mu\text{M}$  stark aggregiert. Aus diesem Grund können in Wasser mit AzoChignolin keine Faltungsexperimente durchgeführt werden. Darum wurde auf das Lösungsmittel Methanol zurückgegriffen, welches wie Wasser polar und protisch ist.

Die IR-Spektren im Bereich der Amid-I' Bande von AzoChignolin (siehe Abb. 5.6 oben), haben große Ähnlichkeit mit denen von Chignolin in  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Wie bei Chignolin befindet sich bei  $1517\text{ cm}^{-1}$  die Absorptionsbande von Tyrosin und die



**Abbildung 5.6: IR-Spektren von AzoChignolin in trans und cis und Differenzspektren** In den Absolutspektren ist der Unterschied zwischen dem trans- und cis-Isomer schwierig auszumachen, deshalb wird auf die Differenzspektren trans–cis und cis–trans zurückgegriffen. Im cis-Ensemble ist eine Rotverschiebung der Amid-I' Bande zu beobachten. Dies lässt sich auf starke interstrang Wasserstoffbrücken zurückführen. Im trans-Ensemble ist die Amid-I' Bande, aufgrund der schwachen Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel, blauverschoben.

Amid-I' Bande wird von der Absorption der  $\text{TFAc}^-$ -Anionen aus der Lyophilisation bei  $1675\text{ cm}^{-1}$  überlagert.

Um die Unterschiede in der Absorption zwischen ungefaltetem trans- und gefaltetem cis-AzoChignolin zu verdeutlichen, werden die Differenzspektren 'trans–cis' und 'cis–trans' betrachtet (siehe Abb. 5.6 unten). Das trans–cis Spektrum zeigt die Änderungen bei der Entfaltung der  $\beta$ -hairpin Strukturen und das cis–trans Spektrum zeigt die Änderungen bei der Faltung. Im Bereich der Tyrosin Absorption gibt es kleine Änderungen: im trans ist die Absorption etwas kleiner als im cis, dies kann von der Wechselwirkung zwischen Tyrosin und Tryptophan im gefalteten Zustand kommen. Bei  $1585\text{ cm}^{-1}$  und  $1600\text{ cm}^{-1}$  liegen zwei kleine Banden, welche nur im cis zu finden sind und von cis-Azobenzol stammen.

Im Bereich der Amid-I' Bande ist beim Übergang von trans nach cis, also der Faltung der  $\beta$ -hairpin-Strukturen, (entspricht dem cis–trans Spektrum (rot in Abb. 5.6 unten)) eine Abnahme der Absorption bei  $1662\text{ cm}^{-1}$  und eine Zunahme bei  $1633\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Im umgedrehten Fall beim cis nach trans Übergang, also der Entfaltung der  $\beta$ -hairpin-Strukturen (trans–cis) ist eine Zunahme der Absorption bei  $1662\text{ cm}^{-1}$  und eine Abnahme bei  $1633\text{ cm}^{-1}$  sichtbar.

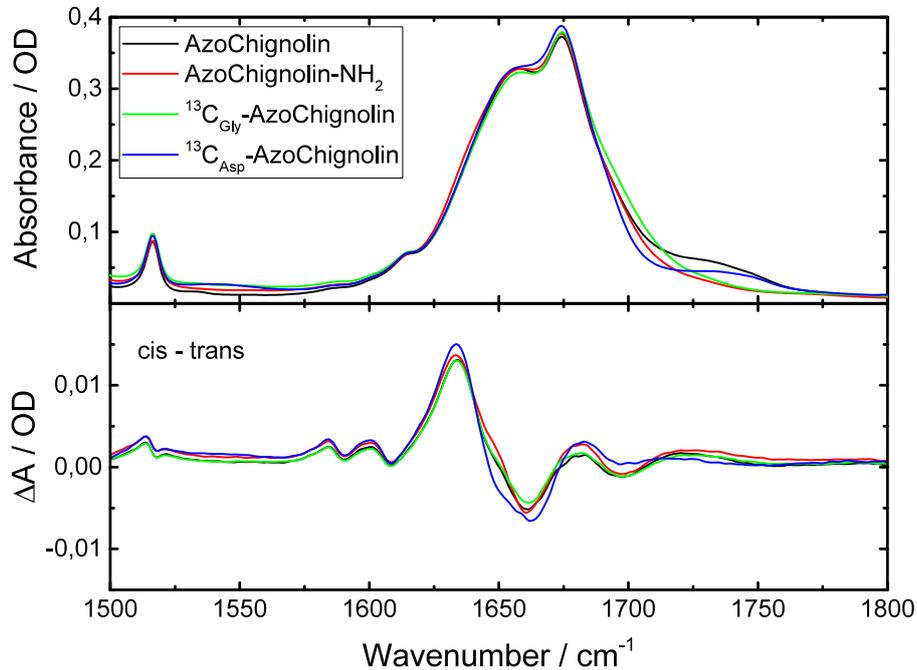
Dieses Verschieben der Absorptionsbande wird auf eine Änderung der Wasserstoffbrückenumgebung zurückgeführt. Im trans-Zustand, wenn das Peptid entfaltet ist, bilden die Carbonyle im Peptidrückgrat Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel. Im cis-Zustand dagegen, bilden sich in der  $\beta$ -hairpin-Struktur Interstrang-Wasserstoffbrücken zwischen den zwei Peptidsträngen. Diese Wasserstoffbrücken sind deutlich stärker als solche zum Lösungsmittel. Da die Amid-I' Bande hauptsächlich aus der CO-Streckschwingung der Rückgrat-Carbonyle besteht, schiebt sie ins Rote, je stärker die Wasserstoffbrücken sind (siehe Abschnitt 4.1.2). Die Zunahme der Absorption bei  $1633\text{ cm}^{-1}$  wird mit der Bildung von starken interstrang Wasserstoffbrücken erklärt, die Abnahme bei  $1662\text{ cm}^{-1}$  dagegen, mit dem Aufreißen von schwachen Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel.

Bei größeren Frequenzen, zwischen  $1680\text{ cm}^{-1}$  und  $1750\text{ cm}^{-1}$  findet ebenfalls ein Bandenschieben statt. Bei der Faltung der  $\beta$ -hairpin-Struktur nimmt die Absorption bei  $1696\text{ cm}^{-1}$  ab, dafür findet eine Zunahme bei  $1720\text{ cm}^{-1}$  statt. Bei der Entfaltung ist entgegengesetztes Verhalten zu beobachten. Eine Blauverschiebung von  $25\text{ cm}^{-1}$  in diesem Bereich deutet auf den Verlust einer Wasserstoffbrücke einer Carboxygruppe hin [Bar00].

Für das Bandenschieben im Bereich von  $1680\text{ cm}^{-1}$  bis  $1750\text{ cm}^{-1}$  gibt es bei AzoChignolin zwei Carboxygruppen, die dafür in Frage kommen. Die Seitenkette der Asparaginsäure (Asp3) enthält eine Carboxygruppe, sowie der C-Terminus (Gly10). Aus MD Simulationen ist bekannt, dass die Seitenkette der Asparaginsäure in AzoChignolin bei gefalteten als auch bei ungefalteten Strukturen immer vom Lösungsmittel umgeben ist. Das hydrophobe Cluster mit Tyrosin und Tryptophan befindet sich auf der anderen Seite der hairpin-Struktur und scheint in den Simulationen keinen Einfluss auf die Seitenkette der Asparaginsäure zu haben (siehe auch Abb. 3.2 linke Seite: Tyrosin und Tryptophan befinden sich bei cis-AzoChignolin auf der Vorderseite, während die Asparaginsäure auf der Rückseite des Hairpins liegt). Darum ist davon auszugehen, dass die Seitenkette der Asparaginsäure keine neuen Wasserstoffbrücken ausbildet oder sich die Stärke der vorhandenen ändert.

Dennoch wird im Folgenden durch Isotopenmarkierungen mit  $^{13}\text{C}$  an beiden Carboxygruppen und Amidierung des C-Terminus versucht, den Ursprung des Signals experimentell zu lokalisieren.

Zuerst wird der C-Terminus von AzoChignolin modifiziert. Dazu wurde ein AzoChignolin-NH<sub>2</sub> mit amidiertem C-Terminus (–CONH<sub>2</sub>) und ein  $^{13}\text{C}_{\text{Gly}}$ -AzoChignolin mit einem  $^{13}\text{C}$ -Isotop in der C-terminalen Carboxygruppe von Gly10 (– $^{13}\text{COOH}$ )



**Abbildung 5.7:** IR-Spektren von AzoChignolin, AzoChignolin-NH<sub>2</sub> und <sup>13</sup>C<sub>Gly</sub>- und <sup>13</sup>C<sub>Asp</sub>-AzoChignolin. Im Vergleich zu AzoChignolin gibt es bei den modifizierten Molekülen Änderungen im Spektrum zwischen 1700 cm<sup>-1</sup> bis 1770 cm<sup>-1</sup>. In den Differenzspektren gibt es bei <sup>13</sup>C<sub>Asp</sub>-AzoChignolin Abweichungen im Vergleich zu AzoChignolin zwischen 1700 cm<sup>-1</sup> und 1750 cm<sup>-1</sup>. Die Amplituden sind in diesem Bereich bei <sup>13</sup>C<sub>Asp</sub>-AzoChignolin kleiner. Das ist ein starker Hinweis darauf, dass die Seitenkette der Asparaginsäure bei der Faltung von AzoChignolin beteiligt ist.

synthetisiert. Die Absolut- und cis–trans Differenzspektren sind in Abbildung 5.7 zusammen mit unmodifiziertem AzoChignolin dargestellt.

In den Absolutspektren (Abb. 5.7 oben) ist bei AzoChignolin-NH<sub>2</sub> und bei <sup>13</sup>C<sub>Gly</sub>-AzoChignolin die Bande bei 1740 cm<sup>-1</sup> schwächer als bei AzoChignolin. Bei AzoChignolin-NH<sub>2</sub> ist dafür auf der niederfrequenten Flanke der Amid-I' Bande eine leichte Absorptionzunahme zu erkennen, welche vom modifizierten C-Terminus stammt.

Bei <sup>13</sup>C<sub>Gly</sub>-AzoChignolin schiebt die Bande, aufgrund der größeren Masse des <sup>13</sup>C nach Gleichung 4.2, leicht ins Rote nach 1700 cm<sup>-1</sup>, wo eine Absorptionzunahme im Vergleich zu AzoChignolin zu erkennen ist.

In den Differenzspektren (Abb. 5.7 unten) zeigen sich, bei den Peptiden, bei denen der C-Terminus modifiziert wurde, keine Unterschiede zu AzoChignolin. Das Bandenschieben im Bereich von 1696 cm<sup>-1</sup> nach 1720 cm<sup>-1</sup> ist bei AzoChignolin-

$\text{NH}_2$  und  $^{13}\text{C}_{\text{Gly}}$ -AzoChignolin unverändert zu beobachten. Das bedeutet, dass das Bandenschieben nicht von der C-terminalen Carboxygruppe verursacht wird.

Die andere Carboxygruppe, die für das Bandenschieben verantwortlich sein könnte, ist die der Seitenkette der Asparaginsäure. Um dies experimentell zu untersuchen, wurde ein  $^{13}\text{C}_{\text{Asp}}$ -AzoChignolin synthetisiert. Bei diesem Molekül wurde das Kohlenstoffatom der Carboxygruppe der Seitenkette von Asp3 durch ein  $^{13}\text{C}$ -Isotop ersetzt.

In den Absolutspektren von  $^{13}\text{C}_{\text{Asp}}$ -AzoChignolin in Abbildung 5.7 ist die Absorption bei  $1715\text{ cm}^{-1}$  im Vergleich zu AzoChignolin geringer, dafür nimmt sie leicht im Bereich von  $1650\text{ cm}^{-1}$  zu. Dies entspricht der Rotverschiebung der Absorption der Carboxygruppe durch das  $^{13}\text{C}$ -Isotop.

In den Differenzspektren sind im Vergleich zu AzoChignolin im Bereich von  $1700\text{ cm}^{-1}$  bis  $1750\text{ cm}^{-1}$  kleinere Amplituden vorhanden. Die schwache Absorptionzunahme, die bei AzoChignolin bei  $1720\text{ cm}^{-1}$  zu finden ist, schiebt bei  $^{13}\text{C}_{\text{Asp}}$ -AzoChignolin um  $7\text{ cm}^{-1}$  ins Rote nach  $1713\text{ cm}^{-1}$ .

Beim Übergang in den gefalteten Zustand gibt es also eine Blauverschiebung der Carboxygruppe der Seitenkette der Asparaginsäure, die im isotopensubstituierten Molekül bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  eine Absorptionsabnahme und im Bereich von  $1700\text{ cm}^{-1}$  zu einer relativen Absorptionzunahme führt.

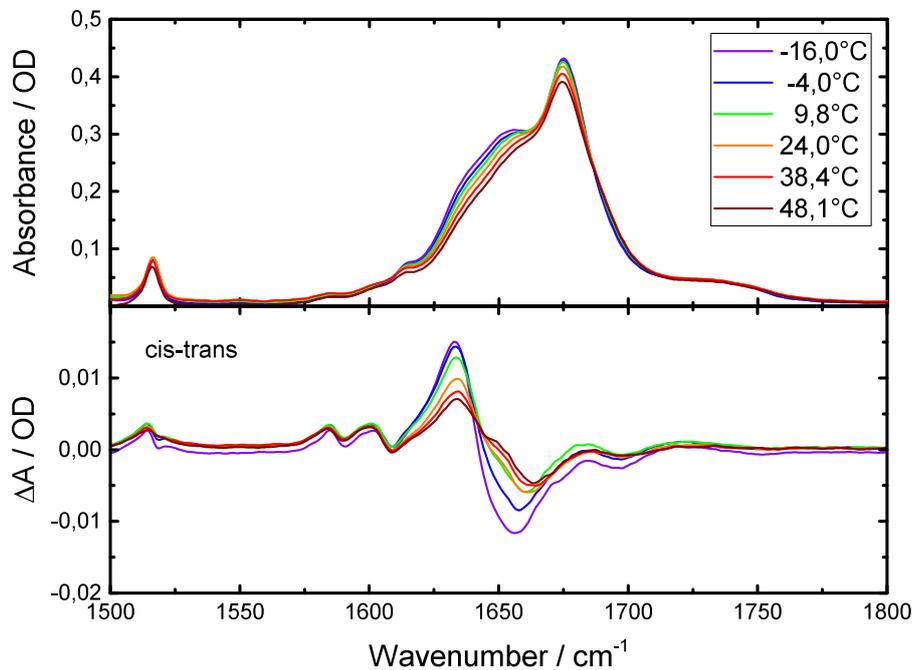
Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass tatsächlich die Asparaginsäure an der Faltung beteiligt ist und die Seitenkette bei der Faltung eine Wasserstoffbrücke verliert, oder eine vorhandene sehr viel schwächer wird. Offensichtlich verhindert das hydrophobe Cluster aus Tyrosin und Tryptophan die Ausbildung einer starken Wasserstoffbrücke im gefalteten Zustand.

Da auf dem Faltungspfad von Proteinen auch Energiebarrieren liegen können und diese mithilfe von zeitaufgelösten temperaturabhängigen Messungen bestimmbar sind, werden auch die stationären Spektren zur vollständigen Charakterisierung temperaturabhängig aufgenommen.

Abb. 5.8 zeigt Absolut- und cis–trans Differenzspektren von AzoChignolin bei verschiedenen Temperaturen von  $-16\text{ }^\circ\text{C}$  bis  $48\text{ }^\circ\text{C}$ . In den Absolutspektren ist mit steigender Temperatur ein Abnehmen der Amplitude, sowie eine leichte Blauverschiebung zu beobachten.

Die cis–trans Differenzspektren zeigen ebenfalls eine Abnahme der Amplituden im Bereich der Amid-I' Bande. Bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  ist eine sehr schwache Blauverschiebung mit steigender Temperatur zu erkennen, welche bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  deutlicher stärker auftritt. Die Azobenzolbanden bei  $1585\text{ cm}^{-1}$  und  $1600\text{ cm}^{-1}$  zeigen keine Temperaturabhängigkeit.

Die Amplituden in den Differenzspektren nehmen mit steigender Temperatur ab, da die Zahl der gefalteten Peptide mit steigender Temperatur abnimmt [Lew27]. Die Stärke der interstrang Wasserstoffbrücken scheint im Gegensatz zu den Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel (fast) nicht temperaturabhängig zu sein, da es bei



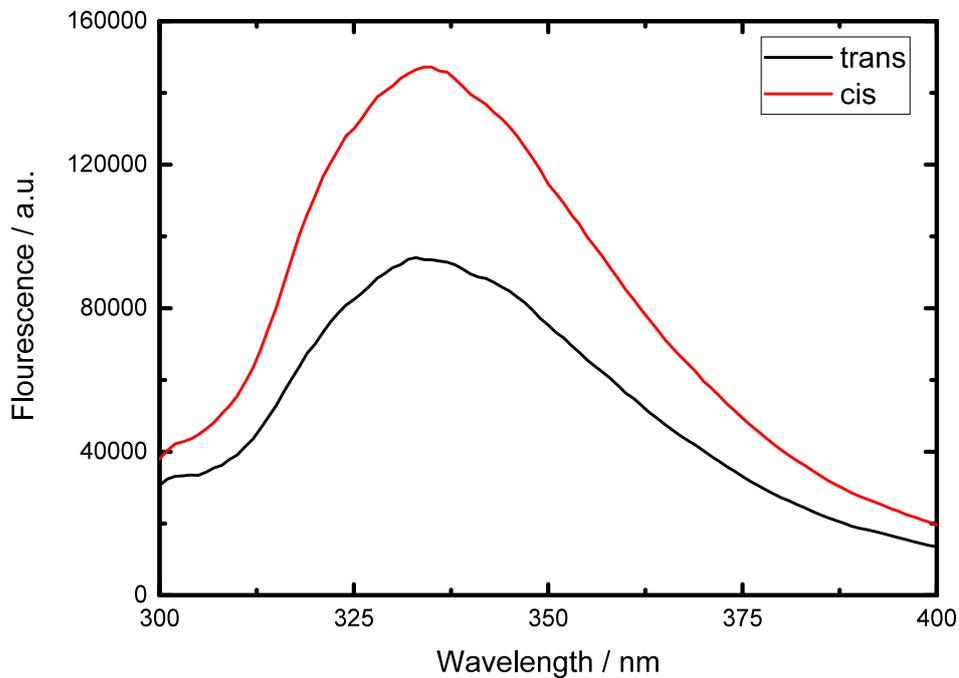
**Abbildung 5.8: Temperaturabhängige IR-Spektren von AzoChignolin** Die lösungsmittelkorrigierten Absolutspektren (oben) von cis-AzoChignolin zeigen eine Abnahme der Amplitude und eine Blauverschiebung mit steigender Temperatur. Die cis–trans Differenzspektren (unten) im Bereich der Amid-I' Bande zeigen ebenfalls eine Abnahme der Amplitude. Die Blauverschiebung ist bei der  $1632\text{ cm}^{-1}$  Bande deutlich geringer als bei  $1660\text{ cm}^{-1}$ .

$1630\text{ cm}^{-1}$  nur ein sehr schwaches Bandenschieben mit Erhöhung der Temperatur gibt. Die Blauverschiebung der Bande bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  ist dagegen mit steigender Temperatur deutlich stärker.

### Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Infrarotspektroskopie im Bereich der Amid-I Bande ist sensitiv auf die Struktur und auf die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen. Es ist jedoch bekannt, dass die hydrophoben Aminosäuren eine wichtige Rolle bei der Faltung von Proteinen spielen können. Die Emission dieser Aminosäuren, vor allem von Tryptophan, ist sehr sensitiv auf ihre Umgebung und eignet sich als Marker für Strukturänderungen.

Die stationären Fluoreszenzspektren von trans- und cis-AzoChignolin sind in Abb. 5.9 dargestellt. Die Spektren wurden in Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) bei einer Konzentration



**Abbildung 5.9: Fluoreszenzspektren von AzoChignolin** Gezeigt sind die Fluoreszenzspektren des trans- und cis-Isomers von AzoChignolin. Die Proben wurden mit Licht der Wellenlänge 266 nm angeregt. In beiden Spektren ist hauptsächlich die Emission von Tryptophan zu sehen, welches aufgrund von Quenching im trans eine verminderte Intensität zeigt.

on von  $1,7 \mu\text{M}$  aufgenommen. Diese Konzentration entspricht bei der verwendeten Schichtdicke von 5 mm einer Absorption im Maximum von 0,084 OD, und damit ist die Reabsorption des Fluoreszenzlichtes zu vernachlässigen. Die Fluoreszenz wurde mit  $\lambda_{ex} = 266 \text{ nm}$  angeregt.

Die Fluoreszenz von cis-AzoChignolin ist bei Raumtemperatur ungefähr 1,6 mal so stark wie die des trans-Isomers. Die Maxima der Fluoreszenzspektren liegen bei 335 nm.

Die deutlich stärkere Emission von cis-AzoChignolin ist mit der geänderten Struktur zu erklären.

Durch die räumliche Nähe und den großen spektralen Überlapp, zwischen der Emission von Tryptophan und der Absorption von trans-AMPP, kann es zu den Dipol-Dipol-Wechselwirkungen FRET<sup>3</sup> [För48] oder sogar zu einem Dexter-Transfer [Dex53] kommen. Dabei wird die Energie vom elektronisch angeregten Trypto-

<sup>3</sup>Förster-Resonanz-Energietransfer

phan strahlungslos auf das Azobenzol übertragen, welches kaum fluoresziert und strahlungslos in den Grundzustand zurückkehrt. Durch diesen weiteren Zerfallskanal des angeregten Zustandes findet ein effektives quenching der Tryptophan-Fluoreszenz statt.

Diese Überlegungen lassen sich mit dem Förster-Radius quantifizieren. Der Förster-Radius  $R_0$  gibt an, bei welchem Abstand die FRET-Effizienz auf 50 % abgefallen ist und berechnet sich folgendermaßen [Lak06]:

$$R_0^6 = \frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 Q_D}{128 \pi^5 N_A n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (5.1)$$

wobei  $\kappa^2$  ein Orientierungsfaktor zwischen 0 und 4 ist,  $Q_D$  ist die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors ohne Akzeptor,  $n$  der Brechungsindex des Lösungsmittels,  $F_D(\lambda)$  das intensitätsnormierte Emissionsspektrum des Donors und  $\varepsilon_A(\lambda)$  das Extinktionsspektrum des Akzeptors.

Nimmt man trans-Azobenzol als Akzeptor und Tryptophan als Donor an, so ergibt sich nach Gleichung 5.1 mit  $Q_D = 13\%^4$  [Che67],  $n_{\text{MeOH}} = 1,33$  [Hay14] und  $\kappa^2 = 2/3$  ein Förster-Radius von  $R_{0,trans} = 23,9 \text{ \AA}$ .  $\kappa^2 = 2/3$  steht für eine isotrope Orientierung der Übergangsdipolmomente zwischen Donor und Akzeptor.

Für den Förster-Radius zwischen cis-Azobenzol und Tryptophan erhält man aufgrund des viel kleineren spektralen Überlapps ein  $R_{0,cis} = 17,1 \text{ \AA}$ .

Aus MD-Simulationen, die von Christina Frost am Lehrstuhl für Theoretische Biophysik (T38) der TU München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Zacharias durchgeführt wurden, konnten die Abstandsverteilungen vom Massenschwerpunkt des Indolring von Trp9 zum gemeinsamen Massenschwerpunkt der Phenylringe von AMPP in cis und trans berechnet werden (siehe Punkte in Abbildung 5.10).

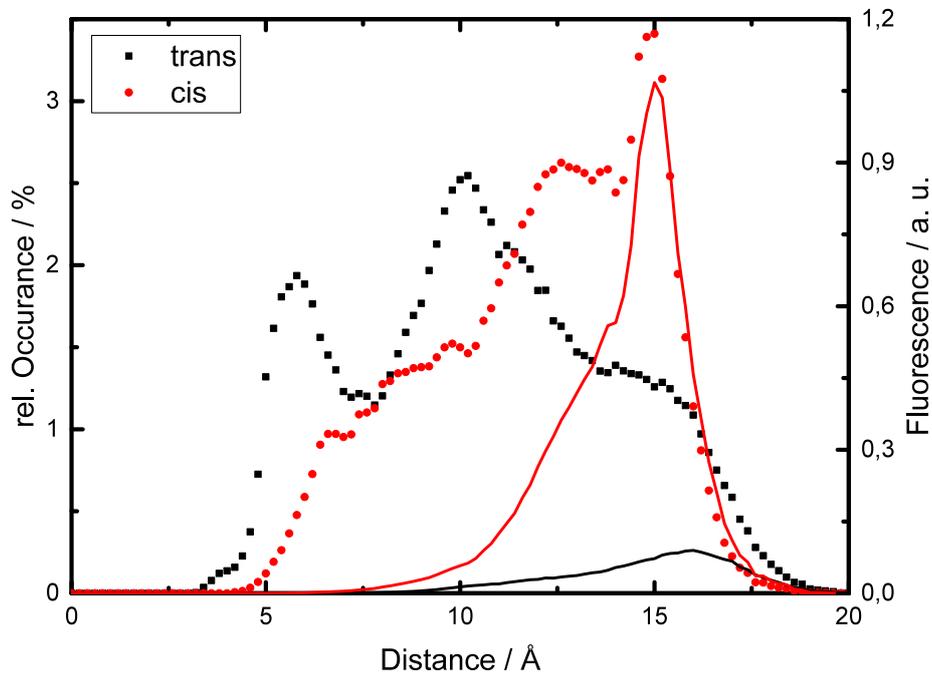
Es zeigt sich, dass bei den ungefalteten Strukturen im trans der Abstand zwischen Tryptophan und AMPP kleiner ist als im cis. Die trans-Verteilung zeigt auch eine ausgeprägte Häufung bei etwa  $6 \text{ \AA}$ . Diese stammt von Tryptophanen, die direkt mit einem Phenylring von AMPP  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingehen. Aus den Simulationen ergibt sich dass etwa 38 % der Moleküle eine entsprechende Wechselwirkung eingehen. Diese Wechselwirkungen konnte auch experimentel in NMR-Spektren beobachtet werden.

Mit den Abstandsverteilungen aus Abbildung 5.10 lässt sich zusammen mit dem jeweiligen Förster-Radius und der FRET-Effizienz [Lak06]

$$E(r) = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (5.2)$$

---

<sup>4</sup>Diese Quantenausbeute gilt für Tryptophan in Wasser, aber Indol (Seitenkette von Tryptophan) hat in Wasser und Methanol die gleiche Quantenausbeute [TK75]. Deshalb wird davon ausgegangen, dass die Quantenausbeute für Tryptophan in Methanol ähnlich groß ist wie in Wasser.



**Abbildung 5.10: Abstandsverteilung von Tryptophan und AMPP aus MD-Simulationen in cis und trans sowie die Fluoreszenzsignale** Mit Punkten ist die Abstandsverteilung zwischen dem Massenschwerpunkt der Indolseitenkette von Tryptophan und dem gemeinsamen Schwerpunkt der Phenylringe von AMPP dargestellt. Die errechnete Fluoreszenzen sind als durchgezogenen Linien eingezeichnet. (Datenpunkte der Abstandsverteilung aus MD-Simulationen von Christina Frost, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Zacharias, Lehrstuhl für Theoretische Biophysik (T38) - Molekulardynamik, TU München)

die Fluoreszenz berechnen. Die Fluoreszenz in Abhängigkeit des Abstandes von Tryptophan und AMPP ist dann (siehe Linien in Abbildung 5.10)

$$F(r) = (1 - E(r)) \cdot N(r) \quad (5.3)$$

wobei  $N(r)$  die Wahrscheinlichkeit ist, den Abstand  $r$  zwischen Tryptophan und AMPP zu finden.

Wie erwartet wird die Fluoreszenz von denjenigen Molekülen dominiert, bei denen der Abstand zwischen Tryptophan und AMPP sehr groß ist und damit der FRET klein.

Das erwartete stationäre Fluoreszenzsignal ist nun die integrierte abstandsabhängige Fluoreszenz. Für cis erhält man einen Wert von  $F_{cis} = 15,6$  und für trans  $F_{trans} = 2,1$ . Dies entspricht einer Zunahme der Fluoreszenz um den Faktor 7,4.

Im Experiment wurde eine deutliche moderatere Zunahme um den Faktor 1,6 beobachtet.

Dieser Unterschied kann an geringen Fehlern in der Abstandsverteilung aus den MD-Simulationen liegen und auch an einem Fehler bei der Bestimmung des Förster-Radius. Beide Größen gehen in die Berechnung der FRET-Effizienz und damit der Fluoreszenz mit der sechsten Potenz ein. Das bedeutet, dass kleine Fehler in diesen Größen eine große Änderung in der Berechnung der Fluoreszenz bewirken. Würde die trans-Abstandsverteilung bei großen Abständen höhere Werte haben, oder wäre der Förster-Radius für trans-AMPP etwas kleiner, so würde man für trans-AzoChignolin wesentlich mehr Fluoreszenz berechnen und die Differenz zwischen der Berechnung und Experiment wäre sehr viel kleiner.

Trotz des Unterschiedes zwischen Theorie und Experiment konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Fluoreszenz im trans gegenüber cis durch ein starkes Quenching der Fluoreszenz von Tryptophan durch AMPP aufgrund von FRET zu erklären ist.

In Kapitel 7 wird die Fluoreszenzzunahme der gefalteten cis Strukturen genutzt, um die Rolle der aromatischen Aminosäuren bei der Faltung durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen aufzuklären.

### 5.4 Y2V-, Y2W- und W9V-AzoChignolin

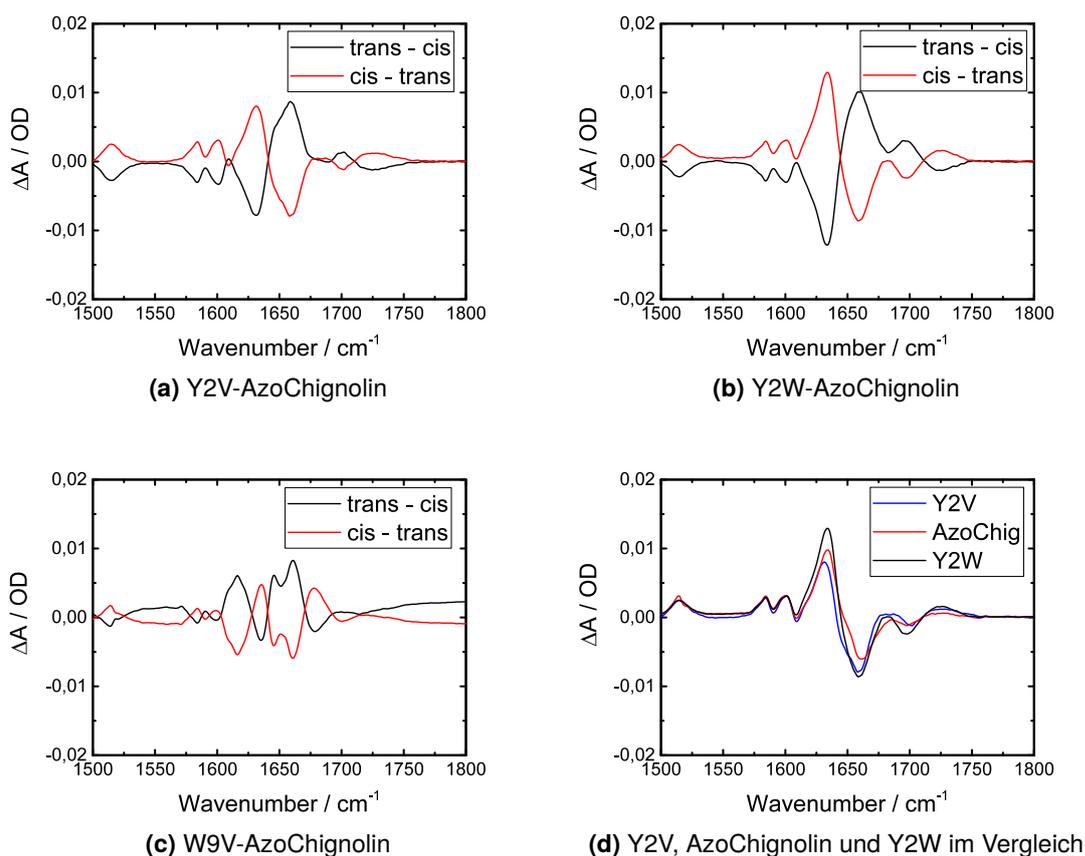
Stationäre Charakterisierungen wurden ebenfalls für die Mutanten von AzoChignolin mit unterschiedlichen hydrophoben Wechselwirkungen durchgeführt.

Da im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich nur der AMPP-Chromophor, sowie die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin absorbieren, gibt es nur geringe Abweichungen der Mutanten im Vergleich zu AzoChignolin, sie werden deshalb im Anhang A.2 gezeigt.

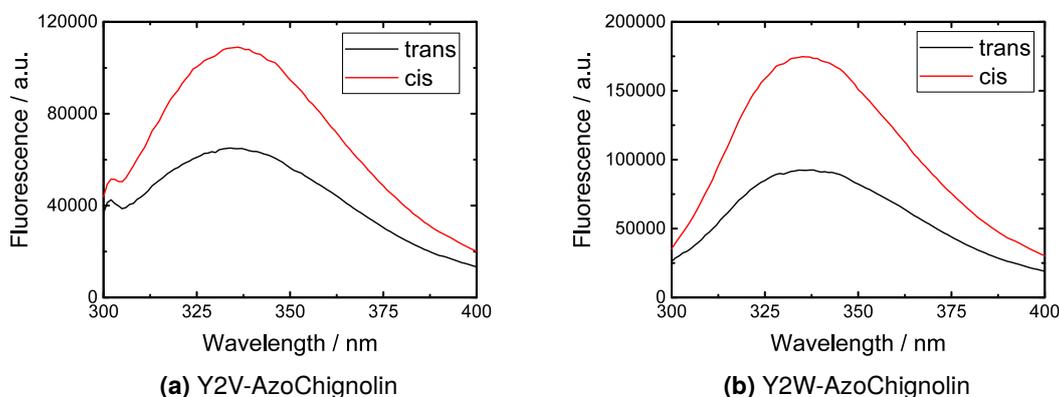
Die IR-Differenzspektren von Y2V-, Y2W- und W9V-AzoChignolin, sowie zum Vergleich AzoChignolin sind in Abb. 5.11 dargestellt. Alle gezeigten Spektren wurden bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  auf eine Absorptionsänderung von 3,1 mOD normiert. Damit wird erreicht, dass bei allen Spektren gleich viel Azobenzol geschaltet wurde und so die Änderungen durch die Wasserstoffbrückenumgebung direkt vergleichbar ist.

#### Y2V- und Y2W-AzoChignolin

Die Differenzspektren von Y2V- und Y2W-AzoChignolin (Abb. 5.11a und 5.11b) sehen dem von AzoChignolin sehr ähnlich. Bei Y2V-AzoChignolin sind die Schaltamplituden bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  und  $1660\text{ cm}^{-1}$  ungefähr gleich groß, bei Y2W und bei AzoChignolin ist die von  $1630\text{ cm}^{-1}$  etwas größer. Im Y2V-AzoChignolin ist eine Schulter bei



**Abbildung 5.11: Differenzspektren von Y2V-, Y2W- und W9V-AzoChignolin** Es sind die IR Differenzspektren von Y2V- (a), Y2W- (b) und W9V-AzoChignolin (c) gezeigt. Alle gezeigten Spektren sind mithilfe der Azobenzolbande bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  auf die gleiche Anzahl geschalteter Moleküle normiert. In (d) sind Y2V, AzoChignolin und Y2W überlagert gezeichnet. Anhand der Bande bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  kann man in (d) von der Amplitude direkt auf die Stabilität der  $\beta$ -hairpin Struktur schließen.



**Abbildung 5.12: Fluoreszenzspektren von Y2V- und Y2W-AzoChignolin** Gezeigt sind die normierten Fluoreszenzspektren des trans- (schwarz) und cis-Isomers (rot) von Y2V- und Y2W-AzoChignolin. Die Proben wurden mit Licht der Wellenlänge 266 nm angeregt und haben eine Konzentration von etwa  $1,7 \mu\text{M}$ .

$1645 \text{ cm}^{-1}$  zu erkennen die bei AzoChignolin kleiner und bei Y2W-AzoChignolin kaum mehr vorhanden ist. Das Bandschieben des C-Terminus, das bei AzoChignolin von  $1720 \text{ cm}^{-1}$  nach  $1696 \text{ cm}^{-1}$  zu beobachten ist, ist bei Y2V weiter blau verschoben.

Die Schaltamplitude bei  $1630 \text{ cm}^{-1}$  in Abb. 5.11d nimmt mit abnehmender Hydrophobizität der Tyrosin-Mutation ab. Die stärkste Amplitude, und damit am meisten gefaltete Strukturen, hat Y2W-AzoChignolin, gefolgt von AzoChignolin und Y2V-AzoChignolin. Durch die Normierung auf die Azobenzolbande bei  $1600 \text{ cm}^{-1}$  sind in jedem Graph gleich viele Moleküle isomerisiert und es ist somit möglich von der Schaltamplitude auf die Stabilität zu schließen. Damit lässt sich sagen, dass wie erwartet die  $\beta$ -hairpin-Struktur von Y2W-AzoChignolin stabiler ist als die von AzoChignolin, und die von AzoChignolin stabiler als die von Y2V-AzoChignolin.

In Abbildung 5.12 sind die trans- (schwarz) sowie cis-Fluoreszenzspektren (rot) von Y2V-AzoChignolin und Y2W-AzoChignolin nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 266 nm zu sehen. Alle Spektren wurden bei einer Konzentration von  $1,7 \mu\text{M}$  aufgenommen.

Bei Y2V- und Y2W-AzoChignolin ist die Fluoreszenz wie bei AzoChignolin im gefalteten cis-Zustand deutlich stärker als im trans. Dies liegt wie oben beschrieben am unterschiedlichen Quenching der Fluoreszenz in cis und trans.

### W9V-AzoChignolin

Die Differenzspektren von W9V-AzoChignolin (Abb. 5.11c) haben auf den ersten Blick nur wenig mit denen von AzoChignolin gemein.

Bei  $1646\text{ cm}^{-1}$  ist im trans-Spektrum eine deutliche Bande zu erkennen, welche im Differenzspektrum bei Y2V- und AzoChignolin nur als leichte Schulter vorhanden ist. Diese Bande weist auf Wasserstoffbrücken hin, die stärker sind als solche zum Lösungsmittel, aber deutlich schwächer als native Interstrang-Wasserstoffbrücken.

Im cis-Spektrum ist bei  $1635\text{ cm}^{-1}$  eine Bande zu erkennen, die mit den relativ starken interstrang Wasserstoffbrücken interpretiert wird. Diese Bande ist aber möglicherweise von der starken Bande des trans-Isomers bei  $1617\text{ cm}^{-1}$  überlagert. Diese Absorption weist auf sehr starken Wasserstoffbrücken im trans-Isomer hin, die von der Bildung von ausgedehnten parallelen  $\beta$ -Faltblättern stammen können. Dieses Verhalten ist charakteristisch für eine Aggregation [PBG08]. Da diese starken Wasserstoffbrücken nur im trans-Isomer zu finden sind, scheint es sich um ähnliche Prozesse zu handeln, wie sie schon von Deeg et al. im lichtschtaltbaren  $\beta$ -hairpin-Peptid ATZ beobachtet wurden [Dee11].

Aufgrund der starken Hinweise auf Aggregation bei der W9V-Mutante werden mit diesem Molekül keine weiteren Messungen durchgeführt.

## 5.5 P4T-AzoChignolin

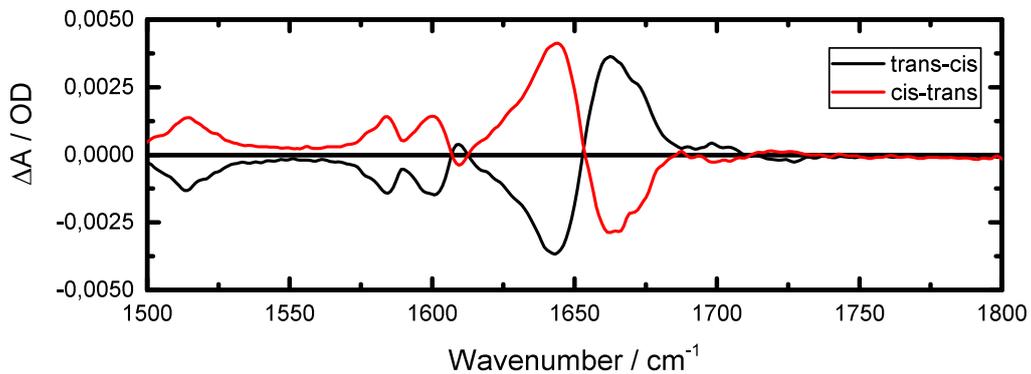
P4T-AzoChignolin wurde synthetisiert, um die Tyrosin-Prolin-Wechselwirkungen auszuschalten, ohne die Tyrosin-Tryptophan-Wechselwirkung zu beeinflussen. Des Weiteren kann Prolin an seiner Position die Ausbildung der  $\beta$ -hairpin Struktur stören [And03].

Überraschenderweise liegt die Löslichkeitsgrenze von P4T-AzoChignolin in  $\text{CD}_3\text{OD}$  nur bei  $1,9\text{ mM}$ . Bei dieser Konzentration gibt es im Infrarotspektrum keine Hinweise auf Aggregation. Die anderen Peptide wurden für die Infrarotmessungen ohne Probleme mit  $5\text{ mM}$  gelöst. Da Threonin polarer ist als Prolin, ist der Grund für die geringe Löslichkeit nicht ersichtlich. Diese Grenzkonzentration von  $1,9\text{ mM}$  ist nicht hoch genug um das Peptid mit der Anrege-Abtast-Spektroskopie zu untersuchen.

Werden die IR-Differenzspektren betrachtet (Abb. 5.13), so weisen diese Ähnlichkeiten zu denen von AzoChignolin auf. Wie die anderen Mutanten, zeigt auch P4T-AzoChignolin eine Absorptionsänderung bei  $1662\text{ cm}^{-1}$ , die vom Aufreißen oder der Neubildung schwacher Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel stammt.

Die niederfrequente Bande, durch Bildung oder Aufreißen starker Interstrang-Wasserstoffbrücken ist allerdings bei  $1644\text{ cm}^{-1}$  zu finden und damit (im Vergleich zu AzoChignolin) um  $11\text{ cm}^{-1}$  blau verschoben. Das bedeutet, dass die Interstrang-Wasserstoffbrücken in P4T-AzoChignolin deutlich schwächer sind als in AzoChignolin und den anderen Mutanten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Prolin in AzoChignolin sehr wichtig für die Struktur und auch für die Löslichkeit ist. Da die Y2V-Mutante ähnlich starke Interstrang-Wasserstoffbrücken wie AzoChignolin ausbildet, können die schwachen



**Abbildung 5.13: Differenzspektren von P4T-AzoChignolin** Die Differenzspektren zeigen Änderungen bei  $1662\text{ cm}^{-1}$  aufgrund der Änderung der Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel. Die Änderungen der interstrang Wasserstoffbrücken sind bei  $1644\text{ cm}^{-1}$  zu finden, was auf schwache Interstrang-Wasserstoffbrücken schließen lässt.

Interstrang-Wasserstoffbrücken bei P4T-AzoChignolin nicht durch das Ausschalten der Tyrosin-Prolin-Wechselwirkung erklärt werden.

## 6 Zeitaufgelöste Infrarotspektroskopie

Mithilfe der zeitaufgelösten Infrarotspektroskopie lassen sich die Bildung sowie das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen am Peptidrückgrat verfolgen. In diesem Kapitel werden die Messungen an AzoChignolin, Y2V-AzoChignolin und Y2W-AzoChignolin vorgestellt.

Vor und nach jeder zeitaufgelösten Messung wurde mit stationären Spektren (UV/vis und IR) überprüft ob Verunreinigungen vorhanden waren, oder ob während der Messung Schäden am Molekül entstanden sind.

### 6.1 AzoChignolin

Zuerst werden die Ergebnisse der Faltung und Entfaltung von AzoChignolin jeweils im Zeitbereich bis 3 ns und bis 100  $\mu$ s präsentiert.

#### 6.1.1 Faltung

Hier werden die Ergebnisse der Faltungsreaktion (trans  $\rightarrow$  cis) vorgestellt. Bei den Messungen im Pikosekundenbereich wurde die Faltungsreaktion bis 3 ns mit 400 nm ps-Lichtimpulsen induziert. Im Nano- und Mikrosekundenbereich wurde mit 355 nm ns-Impulsen gearbeitet.

##### ps-Zeitbereich

Trifft der Anregungsimpuls ( $\lambda_{exc} = 400$  nm) auf photostationäres trans-AzoChignolin, so findet die Isomerisierungsreaktion nach cis-AzoChignolin statt. Da im photostationären Ensemble auch cis-AzoChignolin enthalten ist, findet auch die umgekehrte Reaktion cis nach trans statt. Die relativen Signalbeiträge beider Reaktionen (siehe Gleichungen 6.1) lassen sich mithilfe der Schaltquantenausbeuten (siehe Tab. 6.1) abschätzen [Ram16].

Der Signalbeitrag  $S$  ist das Produkt aus der Absorbanz bei der Anregungswellenlänge  $A$ , der Schaltquantenausbeute  $\Phi$  und der relativen Anzahl der Moleküle im entsprechenden Isomer  $N$ .

$$\begin{aligned} S_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}} &= A_{\text{trans}}(\lambda) \cdot \Phi_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}} \cdot N_{\text{trans}} \\ S_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} &= A_{\text{cis}}(\lambda) \cdot \Phi_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} \cdot N_{\text{cis}} \end{aligned} \quad (6.1)$$

Berechnet man nun das Verhältnis der Signalbeiträge des trans-Ensembles so ergibt sich  $\frac{S_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}}{S_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}} = 0,29$ . Das bedeutet, dass etwa ein Viertel bis ein Drittel des

**Tabelle 6.1: Schaltquantenausbeuten für Azobenzol in Methanol** Gezeigt sind die Schaltquantenausbeuten für die zwei Isomerisierungsrichtungen bei Belichtung der  $\pi\pi^*$ - und  $n\pi^*$ -Bande. [BB12, Ram16]

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

Gesamtsignals bei der Faltungsmessung aus der anderen Isomerisierungsrichtung stammt. Dies wird durch Subtraktion der skalierten Messung des cis-Ensembles korrigiert (bei letzterem ist eine solche Korrektur nicht nötig, siehe Abschnitt 6.1.2).

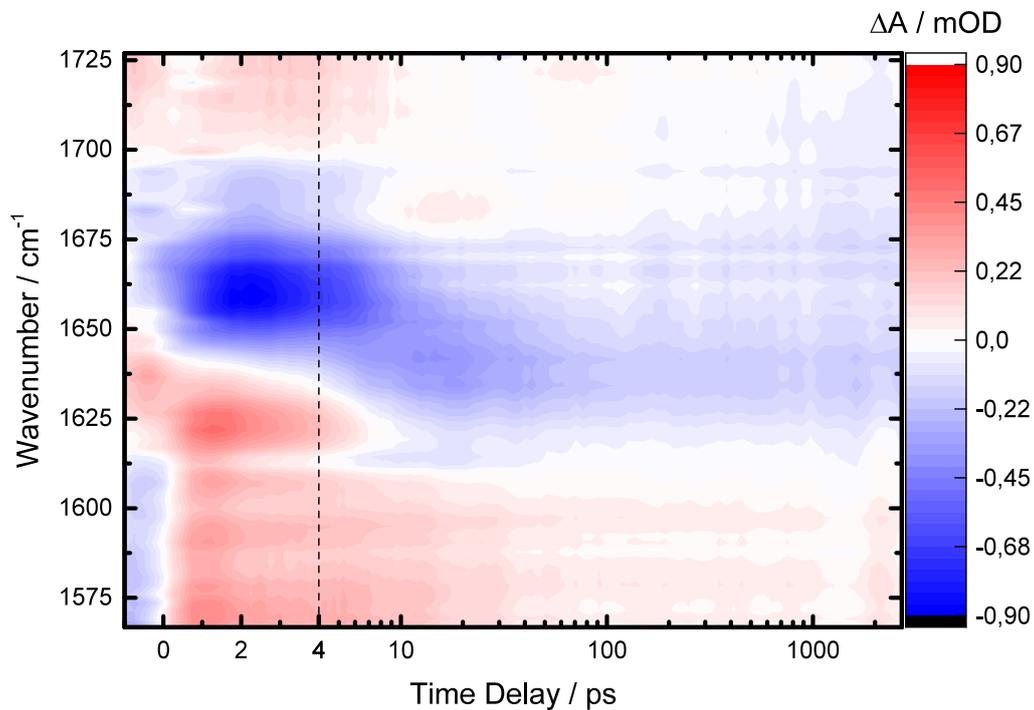
Das Ergebnis der korrigierten, zeitaufgelösten Absorptionsmessung bis 2,7 ns ist in Abb. 6.1 dargestellt.

Nach der Anregung sind in den ersten Pikosekunden (bis 10 ps) ein starkes, breites Ausbleichen bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  und rotverschoben dazu eine breite induzierte Absorption zu erkennen. Zusammengenommen entspricht dies einer Rotverschiebung der Amid-I' Bande. Die Rotverschiebung basiert auf dem elektronisch angeregten AMPP-Chromophor, sowie einem heißen Peptidteil bei dem hohe Schwingungsmoden angeregt sind [Sch04]. Aufgrund des 'vibrational Stark effect' [Vol97] führt das angeregte Chromophor zu einer Rotverschiebung der Amid-I' Bande. Die große Änderung des Dipolmoments bei der Isomerisierung von Azobenzol, von 0 D im trans nach 3 D im cis [HF39], führt zu einer Änderung der Elektronenverteilung der benachbarten Carbonyle. Dies führt zu einer Änderung der Bindungsstärke und damit zu der beobachteten Rotverschiebung der Amid-I' Bande [Sta13, Vol00].

Unmittelbar nach dem Zerfall des angeregten elektronischen Zustandes bei der Photoisomerisation (ca. 2 ps) liegt ein Großteil der ursprünglichen Anregungsenergie in Form von Schwingungsenergie im AMPP und im umgebenden Peptid vor. Dies äußert sich ebenfalls in einer Rotverschiebung der Amid-I' Bande. Diese Überschussbesetzung von Schwingungszuständen wird auf der Zeitskala von 5 ps abgebaut und erklärt die Dynamiken in diesem Zeitbereich.

Bei  $1585\text{ cm}^{-1}$  und  $1600\text{ cm}^{-1}$  ist die induzierte Absorption noch zusätzlich von zwei schmalen Absorptionsbanden überlagert, die bis zum Ende des Messbereichs zu sehen sind. Dabei handelt es sich um Absorptionsbanden von cis-Azobenzol. Diese Banden sind nach wenigen Pikosekunden bereits voll ausgebildet. Daraus kann man schließen, dass der Schaltvorgang des Azobenzols nach wenigen Pikosekunden ( $< 10\text{ ps}$ ) bereits vollständig abgeschlossen ist.

Nach 10 ps bildet sich für kurze Zeit (bis 30 ps) eine induzierte Absorption bei  $1685\text{ cm}^{-1}$ . Parallel dazu beginnt ein breites Ausbleichen bei  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Dies ist mit



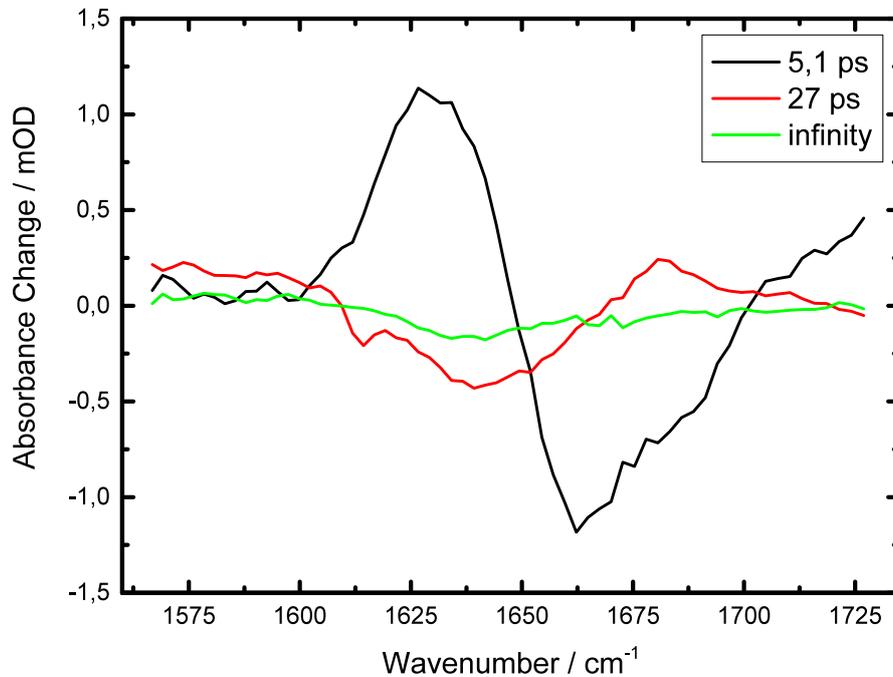
**Abbildung 6.1: Absorptionsänderungen bei der Faltung von AzoChignolin bis 2,7 ns** Es sind die Absorptionsänderungen von AzoChignolin gegen die Zeit aufgetragen. Von  $-1$  ps bis 4 ps ist die Zeitachse linear, danach ist sie logarithmisch (mit gestrichelter Linie markiert). Absorptionszunahmen sind in rot und -abnahmen in blau dargestellt.

einem Aufreißen von Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel zu erklären [Sch07]. Diese freien, nicht verbrückten Carbonyle absorbieren nun blauverschoben bei  $1685 \text{ cm}^{-1}$ . Dieser desolvatisierte Zustand relaxiert auf einer Zeitskala von 20 ps. Innerhalb dieser Zeit werden neue Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel gebildet und die induzierte Absorption bei  $1685 \text{ cm}^{-1}$  sowie das Ausbleichen bei  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , zerfallen wieder.

Nach 100 ps ist ein transientes Spektrum erreicht, welches sich bis zum Ende des Messfensters nicht mehr ändert.

Die Absorptionsänderungen nach 2 ps wurden mit einer globalen multiexponentiellen Funktion (Gleichung 4.5), mit zwei veränderlichen Zeitkonstanten und einem Offset (unendliche Zeitkonstante  $\tau_{\infty} = 10^8$  ps) angepasst. Die dazugehörigen Amplitudenspektren sind in Abbildung 6.2 dargestellt. Als Zeitkonstanten ergaben sich  $\tau_1 = 5,1$  ps und  $\tau_2 = 27$  ps. Eine positive Amplitude im DADS entspricht einer

Verringerung der Absorption, eine negative Amplitude im DADS entspricht einer Erhöhung der Absorption.



**Abbildung 6.2: DADS aus der globalen Anpassung der ps-Faltungsmessung** Mit 5,1 ps findet das Kühlen heißer vibronischer Zustände statt und damit die Erholung des Grundzustandes. Mit 27 ps resolvatisiert die neue Geometrie des Moleküls und es werden neue Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel gebildet. Das Offset-Spektrum zeigt nur ein breites und schwaches Ausbleichen im Bereich von  $1640\text{ cm}^{-1}$ .

Das Spektrum des Zerfalls mit 5,1 ps (schwarz in Abb. 6.2), zeigt eine positive Amplitude bei  $1625\text{ cm}^{-1}$  und eine negative Amplitude bei  $1660\text{ cm}^{-1}$ . Dieser Zerfall ist der Erholung des Grundzustandes zuzuordnen, da die Rotverschiebung der Amid-I' Bande nach der Anregung mit dieser Zeit zerfällt. Das Kühlen heißer vibronischer Zustände findet typischerweise mit wenigen Pikosekunden statt.

Das zweite Spektrum, des Zerfalls mit 27 ps (rot in Abb. 6.2), zeigt eine negative Amplitude bei  $1640\text{ cm}^{-1}$  und eine positive bei  $1680\text{ cm}^{-1}$ . Mit dieser Zeitkonstante werden die desolvatisierten Carbonyle resolvatisiert. Sie bilden mit dieser Zeitkonstante neue Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel und absorbieren wieder bei  $1640\text{ cm}^{-1}$ .

Der Offset (grün in Abb. 6.2) zeigt das Spektrum, das am Ende der Messung zu sehen ist. Es ist nur das leichte Ausbleichen bei  $1640\text{ cm}^{-1}$  zu sehen, welches sich bereits nach 100 ps vollständig ausgebildet hat. Dieses Spektrum hat keine Ähnlichkeit mit dem stationären cis–trans Differenzspektrum. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Faltungsreaktion später, d. h. auf der Nano- bis Mikrosekunden Zeitskala stattfindet.

### ns-Zeitbereich

Bei Messungen mit einer Verzögerungszeit bis  $100\text{ }\mu\text{s}$  gibt es im Zeitbereich um 100 ns, aufgrund von Dichte- und Brechungsindexänderungen im Lösungsmittel ein störendes Messsignal. Dieses Signal kann nach Messung einer Azobenzollösung, mit gleicher optischer Dichte bei der Anregungswellenlänge, durch Subtraktion von den Peptiddaten entfernt werden. Dies ist möglich, da Azobenzol keine Dynamiken auf der ns oder  $\mu\text{s}$  Skala zeigt [HOZ97]. Bei der Messung der Faltungsreaktion ist die Azobenzolkonzentration etwa  $13,5\text{ mM}$  und bei der Entfaltungsreaktion ca.  $5\text{ mM}$ . Die genaue Konzentration der Azobenzollösung wurde jeweils mit stationären UV/vis-Spektren überprüft und auf die gleiche optische Dichte bei der Anregungswellenlänge, wie bei der Peptidlösung eingestellt.

Die korrigierten Absorptionsänderungen bei der Faltung von AzoChignolin bei  $25\text{ }^\circ\text{C}$  sind in Abbildung 6.3 dargestellt.

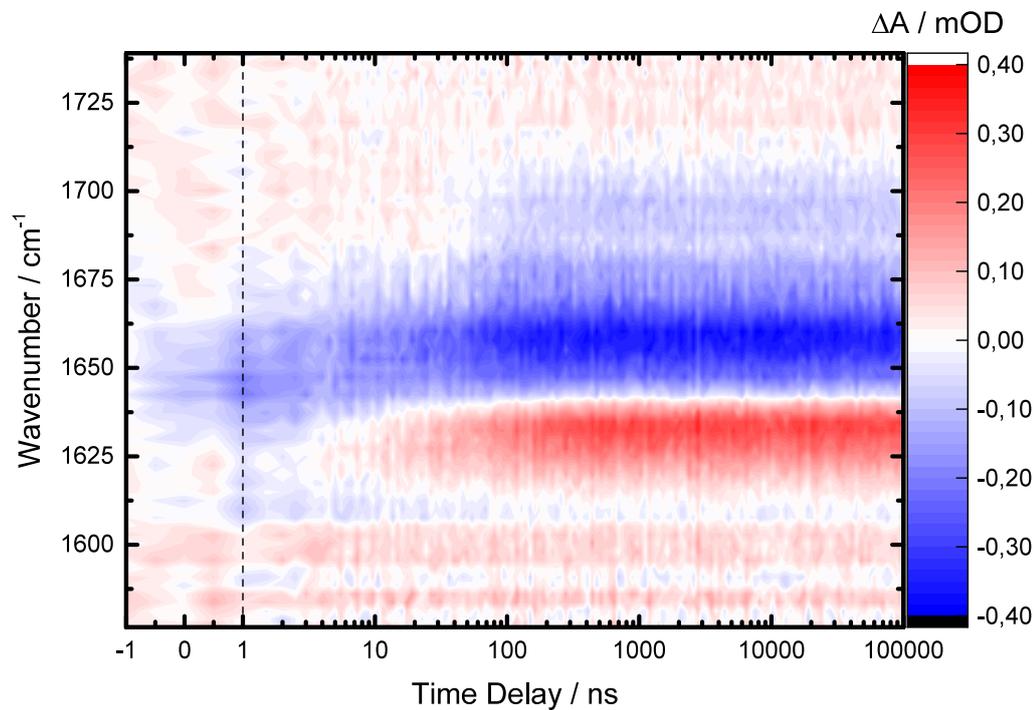
Direkt nach der Anregung ist ein Ausbleichen bei  $1640\text{ cm}^{-1}$  zu sehen, welches innerhalb der ersten 10 ns nach  $1660\text{ cm}^{-1}$  schiebt. Dieses initiale Ausbleichen ist auch im Offset der ps-Faltungsmessung zu sehen. Bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  und  $1585\text{ cm}^{-1}$  sind die induzierten Absorptionsbanden des cis-Azobenzolchromophors zu erkennen, die innerhalb der Zeitauflösung des Experiments voll ausgebildet sind und keine weitere Dynamik zeigen.

Nach etwa 10 ns beginnt eine starke induzierte Absorption bei  $1630\text{ cm}^{-1}$ , gleichzeitig verstärkt sich das Ausbleichen bei  $1660\text{ cm}^{-1}$ . Dies entspricht einer Rotverschiebung der Amid-I' Bande. Das Aufbrechen schwach gebundener Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel (Ausbleichen bei  $1660\text{ cm}^{-1}$ ) sowie die Bildung starker Interstrang-Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidsträngen (induzierte Absorption bei  $1630\text{ cm}^{-1}$ ) sind für diese Rotverschiebung verantwortlich.

Nach 100 ns findet eine Blauverschiebung von  $1696\text{ cm}^{-1}$  nach  $1720\text{ cm}^{-1}$  statt. Diese Blauverschiebung wird mit dem Verlust einer Wasserstoffbrücke an der Seitenkette der Asparaginsäure interpretiert.

Nach 1000 ns sind alle Dynamiken abgeschlossen und es sind keine Änderungen im Spektrum mehr zu erkennen.

Bei der Quantifizierung der Zerfallszeiten mit einer globalen biexponentiellen Anpassung und einem Offset (mit Gleichung 4.5) fanden sich viele Sets an Zeitkonstanten, mit denen sich die Daten anpassen lassen. Alle diese Anpassungen hatten eine sehr



**Abbildung 6.3: Absorptionsänderungen bei der Faltung von AzoChignolin bei 25 °C bis 95 μs** Es sind die Absorptionsänderungen von AzoChignolin gegen die Zeit aufgetragen. Von -1 ns bis 1 ns ist die Zeitachse linear, danach ist sie logarithmisch (mit gestrichelter Linie markiert). Absorptionszunahmen sind in rot und -abnahmen in blau dargestellt.

ähnliche  $\chi^2$ -Abweichung, die sich jeweils nur um wenige Prozent unterschieden hat. Es fanden sich Zeiten, die im Intervall von etwa 10 ns bis 180 ns lagen.

Um dieses Problem näher zu betrachten, wurde eine SVD<sup>1</sup>-Analyse durchgeführt, die im Folgenden kurz erklärt wird.

Eine reelle Matrix  $M \in \mathbb{R}^{m \times n}$  (ohne Beschränkung der Allgemeinheit:  $m > n$ ) lässt sich folgendermaßen zerlegen:

$$M = U \Sigma V^T$$

$M$  ist die Matrix, in der die zeitaufgelösten Absorptionsänderungen aus der Messung eingetragen sind.  $U$  ist eine orthogonale  $m \times n$  Matrix, deren Spaltenvektoren  $u_i$  normierte Zeitverläufe darstellen,  $V^T$  ist die Transponierte einer  $n \times n$  Matrix, deren

<sup>1</sup>Singulärwertzerlegung

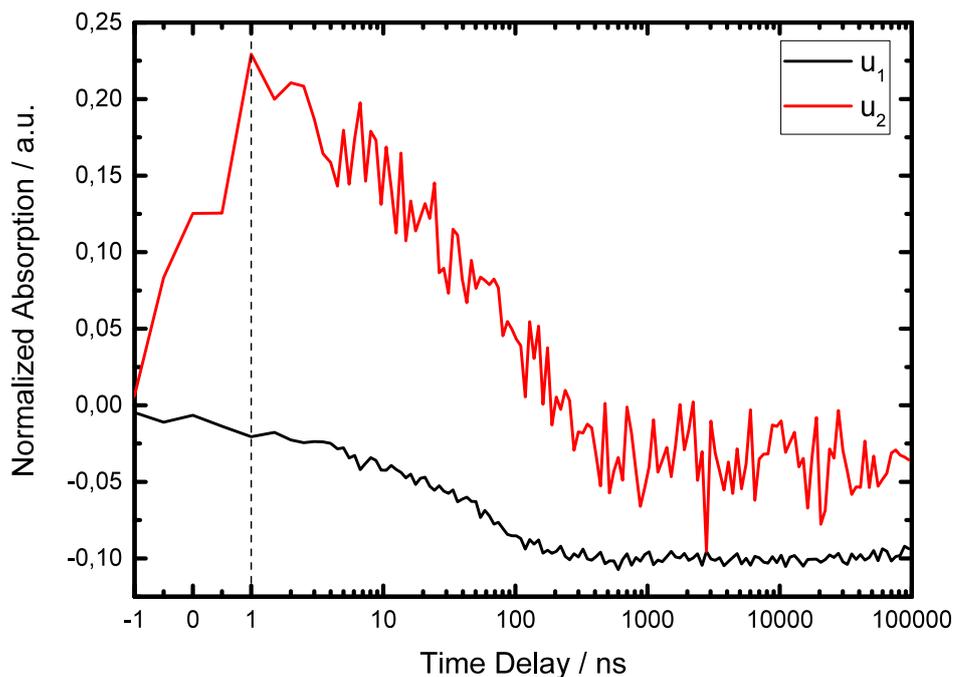
Zeilenvektoren  $v_i^T$  normierte Spektren darstellen und  $\Sigma$  ist eine  $n \times n$  Matrix, die wie folgt aussieht:

$$\Sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{11} & \dots & 0 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & \dots & \sigma_{ii} \end{pmatrix}$$

mit den  $i = \text{rk}(M)$  Singulärwerten  $\sigma_{11} \geq \sigma_{22} \geq \dots \geq \sigma_{ii} \geq 0$  und  $\sigma_{ij} = 0$  für  $i \neq j$ .

Dies ist die Singulärwertzerlegung von  $M$ .

Betrachtet man nun die normierten Zeitverläufe der ersten beiden Spaltenvektoren von  $U$  der Singulärwertzerlegung der Faltungsmessung in Abbildung 6.4, so fällt auf, dass diese zu kurzen Zeiten einen sehr linearen Verlauf auf der logarithmischen Zeitachse haben.  $u_1$  ist etwa von 5 ns bis 60 ns linear und  $u_2$  ist etwa von 3 ns bis 100 ns sehr linear.



**Abbildung 6.4:** Die ersten zwei Links-Singulärvektoren der SVD der Faltungsmessung von AzoChignolin bei 25 °C. Es sind die normierten Zeitverläufe des ersten und zweiten Singulärwertes der Faltungsmessung von AzoChignolin bei 25 °C auf einer logarithmischen Zeitachse dargestellt.  $u_1$  ist etwa von 5 ns bis 60 ns linear und  $u_2$  ist etwa von 3 ns bis 100 ns sehr linear.

**Tabelle 6.2: Zusammenhang zwischen Streckfaktor  $\beta$  und biexponentiellen Zeitkonstanten  $\tau_i$**  Es wurden gestreckte Exponentialfunktionen mit Streckfaktor  $\beta$  und Zeitkonstante  $\tau_{\text{str}} = 1$  mit einem biexponentiellen Zerfall ab 0,1 angepasst. Dabei ergaben sich die nachfolgendenfolgenden Zerfallszeiten  $\tau_i$ .

$\beta$	$\tau_1$	$\tau_2$
0,5	0,8	5
0,6	0,7	3,2
0,7	0,6	2,1

Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass sich die Dynamiken nicht mit einer Summe weniger exponentieller Zerfälle beschreiben lassen. In diesen Daten ist eine breite Verteilung exponentieller Zerfallszeiten zu finden, die sich mit einer gestreckten Exponentialfunktion

$$\Phi(t) = A \cdot \exp \left[ - \left( \frac{t}{\tau} \right)^\beta \right],$$

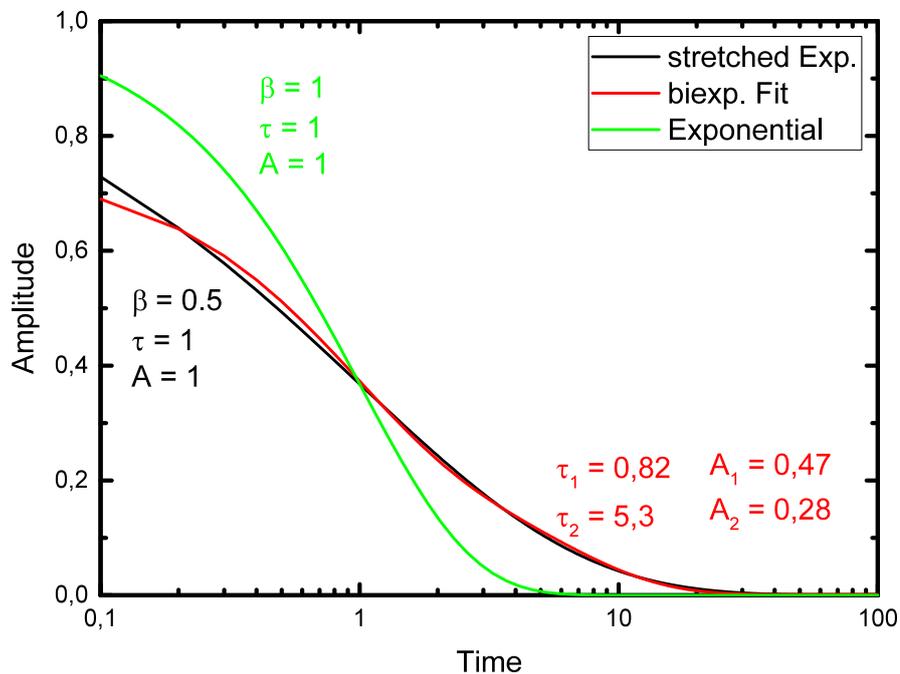
mit der Amplitude  $A$  und dem Streckparameter  $\beta > 0$ , beschreiben lässt.

In den Daten ist zu frühen Zeiten ( $\sim 10$  ns) die Amid-I' Bande im Vergleich zu späten Zeiten deutlich rotverschoben. Dieses Schieben lässt sich nicht mit einer gestreckten Exponentialfunktion anpassen. Um dennoch die spektralen Änderungen betrachten zu können, werden diese Daten als Näherung auch global biexponentiell angepasst um die Dynamiken auf der zehn Nanosekunden Zeitskala von denen der hundert Nanosekunden Zeitskala qualitativ zu trennen.

In Abbildung 6.5 sind ein monoexponentieller Zerfall (mit  $A = 1$ ,  $\beta = 1$  und  $\tau = 1$ ), ein gestreckt exponentieller Zerfall (mit  $A = 1$ ,  $\beta = 0,5$  und  $\tau = 1$ ) und eine biexponentielle Anpassung von 0,1 bis 100 an die gestreckte Exponentialfunktion zur Veranschaulichung dargestellt. Auf der logarithmischen Skala ist in der gestreckten Exponentialfunktion der lineare Bereich von 0,4 bis 2,5 deutlich zu erkennen.

Die gestreckte Exponentialfunktion lässt sich in diesem Intervall sehr gut durch einen biexponentiellen Fit anpassen. Die Zeitkonstanten der biexponentiellen Anpassung sind stark vom gewählten Intervall und vom Streckfaktor  $\beta$  abhängig. Ist der Startpunkt etwa ein zehntel der Zerfallszeit der gestreckten Exponentialfunktion  $\tau_{\text{str}}$ , so ergeben sich Zerfallszeiten in Abhängigkeit von  $\beta$  wie sie Tabelle 6.2 zu entnehmen sind.

Für die Auswertung der spektralen Komponenten mit einer biexponentiellen Anpassung werden die Zeitkonstanten nach Tabelle 6.2 festgesetzt und nur die Amplituden gefittet. Der Streckfaktor  $\beta$  wird aus einer Anpassung der Vektoren  $u_i$  aus der SVD-Analyse gewonnen.

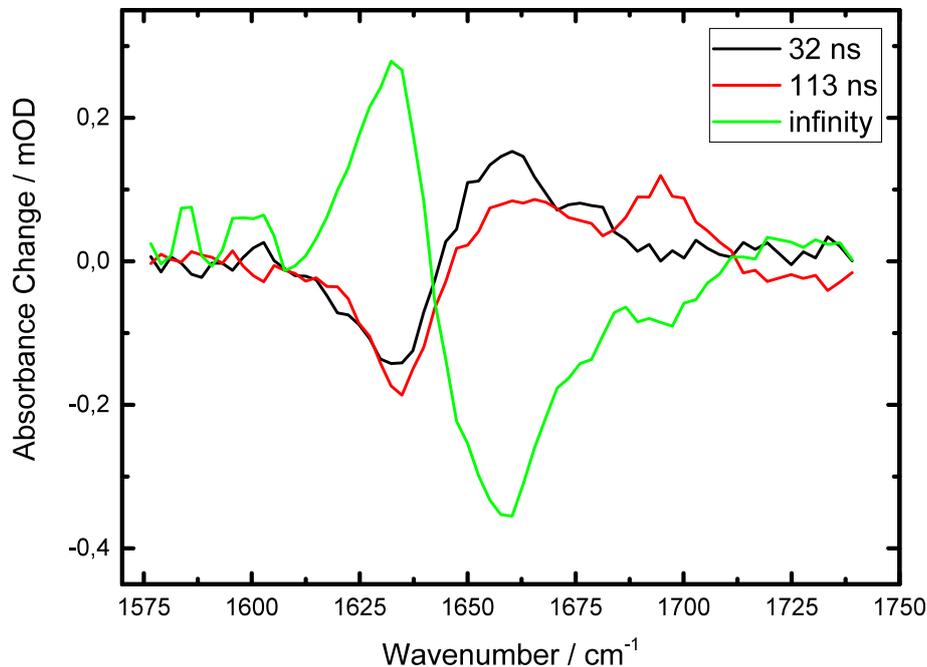


**Abbildung 6.5: Gestreckte Exponentialfunktion, biexponentielle Anpassung und monoexponentielle Funktion** Die gestreckte Exponentialfunktion verläuft deutlich flacher als die Exponentialfunktion mit gleicher Zerfallszeit. Die Anpassung einer gestreckten Exponentialfunktion mit einem biexponentiellen Zerfall ist sehr stark vom analysierten Intervall abhängig. Ist der Startwert 10 % der Zerfallszeit  $\tau$ , so ergeben sich in der biexponentiellen Anpassung Zeitkonstanten von etwa  $\tau_1 = 0,8$  und  $\tau_2 = 5$ .

Die globale Anpassung der Messdaten bei 25 °C mit einer gestreckten Exponentialfunktion und einem Offset liefert mit  $\beta = 0,68$  eine Zeitkonstante von  $\tau_{\text{str}} = 54$  ns. Mit dieser Zeitkonstante findet die Faltung des Peptids statt.

Um die spektralen Komponenten (DADS) zu frühen und späten Zeiten zu erhalten, werden die Daten biexponentiell mit den unveränderlichen Zeitkonstanten  $\tau_1 = 0,6 \cdot \tau_{\text{str}} = 32$  ns und  $\tau_2 = 2,1 \cdot \tau_{\text{str}} = 113$  ns angepasst. Die Amplitudenspektren sind in Abbildung 6.6 dargestellt.

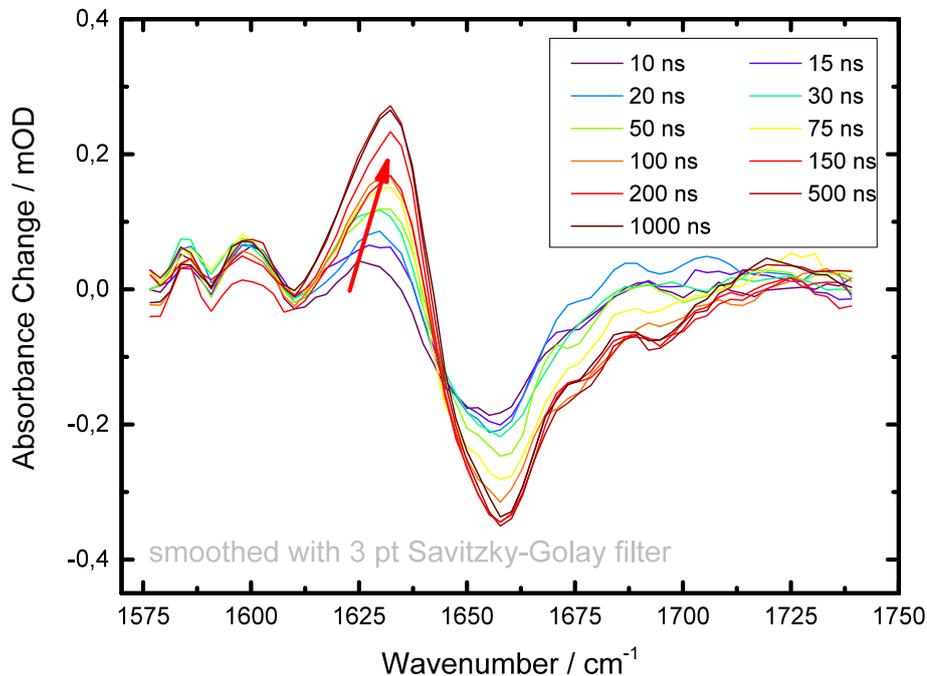
In der biexponentiellen Näherung zeigt das DADS zur Zeitkonstante von 32 ns (schwarz in Abb. 6.6) eine Rotverschiebung der Amid-I' Bande. Auf dieser Zeitskala lösen sich schwache Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel und es bilden sich die ersten starken Interstrang-Wasserstoffbrücken in Schalternähe.



**Abbildung 6.6: DADS aus der globalen Anpassung der ns-Faltungsmessung von Azo-Chignolin bei 25 °C** Die Zeitkonstanten wurden auf 32 ns und 113 ns festgesetzt und nur die Amplituden angepasst. Zu frühen Zeiten (DADS zu 32 ns) bilden sich starke Interstrang-Wasserstoffbrücken und schwache Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel brechen auf. Mit 113 ns findet noch eine Zunahme der Amplituden auf der Amid-I' Bande statt sowie die Dynamik im Bereich 1700  $\text{cm}^{-1}$  die der Seitenkette der Asparaginsäure zugeschrieben wird.

Mit 113 ns (rot in Abb. 6.6) findet die Blauverschiebung von  $1696 \text{ cm}^{-1}$  nach  $1720 \text{ cm}^{-1}$  statt, zusammen mit einer blauverschobenen Zunahme der Amplituden auf der Amid-I' Bande. Mit dieser Zeit bildet sich in der biexponentiellen Näherung die endgültige  $\beta$ -hairpin-Struktur, indem sich das native Wasserstoffbrückennetzwerk formt.

Bei Betrachtung der transienten Spektren zu bestimmten Verzögerungszeiten (Abbildung 6.7) fällt auf, dass zu frühen Zeiten die niederfrequente Bande bei etwa  $1625 \text{ cm}^{-1}$  liegt und erst später nach  $1633 \text{ cm}^{-1}$  schiebt und dabei die Amplitude zunimmt. Dies ist auch in den DADS der biexponentiellen Anpassung enthalten. Das DADS zu 32 ns liegt bei niedrigeren Frequenzen als das zu 113 ns. Das bedeutet, dass nach der Isomerisierung von AMPP als erstes sehr starke Wasserstoffbrücken entstehen, die sich bei natürlichen Systemen in der Nähe der turn-Region befinden



**Abbildung 6.7: Spektren zu verschiedenen Verzögerungszeiten der ns-Faltungsmessung von AzoChignolin bei 25 °C** Es ist deutlich zu erkennen, dass die Bande der starken Interstrang-Wasserstoffbrücken mit zunehmender Verzögerungszeit von  $1625\text{ cm}^{-1}$  nach  $1633\text{ cm}^{-1}$  schiebt und ihre Amplitude dabei anwächst (mit rotem Pfeil markiert). Dies deutet darauf hin, dass zuerst die starken Wasserstoffbrücken in der Nähe des Azobenzolschalters und erst danach die etwas schwächeren an den Termini des Peptids entstehen. Damit folgen die Wasserstoffbrücken einem Zipper-Mechanismus. Die Spektren wurden mit einem 3 Punkte breiten Savitzky-Golay-Filter erster Ordnung geglättet [SG64].

[Hau08]. Erst später bilden sich die etwas schwächeren Wasserstoffbrücken in der Nähe der Termini. Dies ist ein starker Hinweis, dass sich die Interstrang-Wasserstoffbrücken nach dem Zipper-Modell vom Schalter zu den Termini hin mit einer Zeitkonstante von 54 ns ausbilden.

Die Messung der Faltung von AzoChignolin wurde zusätzlich noch bei Temperaturen von 5 °C und 45 °C durchgeführt (Daten und DADS der biexponentiellen Näherung siehe Anhang A.3). Bei den globalen Anpassungen mit einer gestreckten Exponentialfunktion ergaben sich bei 5 °C mit  $\beta = 0,54$  eine Zeitkonstante von  $\tau_{\text{str}} = 83\text{ ns}$  und bei 45 °C mit  $\beta = 0,7$  eine Zeitkonstante von  $\tau_{\text{str}} = 36\text{ ns}$  (siehe Tabelle 6.3).

**Tabelle 6.3: Zeitkonstanten für die Faltung von AzoChignolin gegen die Temperatur**

	$\tau_{\text{str}}$	$\beta$
5 °C	83 ns	0,54
25 °C	54 ns	0,68
45 °C	36 ns	0,7

Die Zeitkonstanten aus den Anpassungen mit gestreckten Exponentialfunktionen zeigen eine deutliche Temperaturabhängigkeit.

Die DADS der biexponentiellen Anpassung mit festen Zerfallszeiten sind sehr ähnlich zu denen bei 25 °C. Bei einer Temperatur von 45 °C sind die gemessenen Amplituden schon sehr klein, da vermutlich die Schmelztemperatur schon deutlich überschritten ist ( $T_m(\text{Chignolin in H}_2\text{O}) = 38\text{ °C}$  [Hon04]). Das heißt, dass auch im cis-Isomer deutlich weniger als 50 % der Peptide gefaltete  $\beta$ -hairpin-Strukturen bilden. Deshalb sind die gefitteten Spektren nicht sehr zuverlässig und haben ebenfalls eine sehr kleine Amplitude.

Die Faltung von AzoChignolin findet auf der 100 ns Zeitskala statt, was wesentlich schneller ist, als die bisher untersuchten  $\beta$ -hairpin Peptide in der Literatur, die mit einigen Mikrosekunden falten. Auf der Pikosekunden Zeitskala findet man bei AzoChignolin hauptsächlich den Schaltvorgang von AMPP sowie die Solvatisierungen der neuen Geometrie nach der Isomerisierung des Peptids.

### 6.1.2 Entfaltung

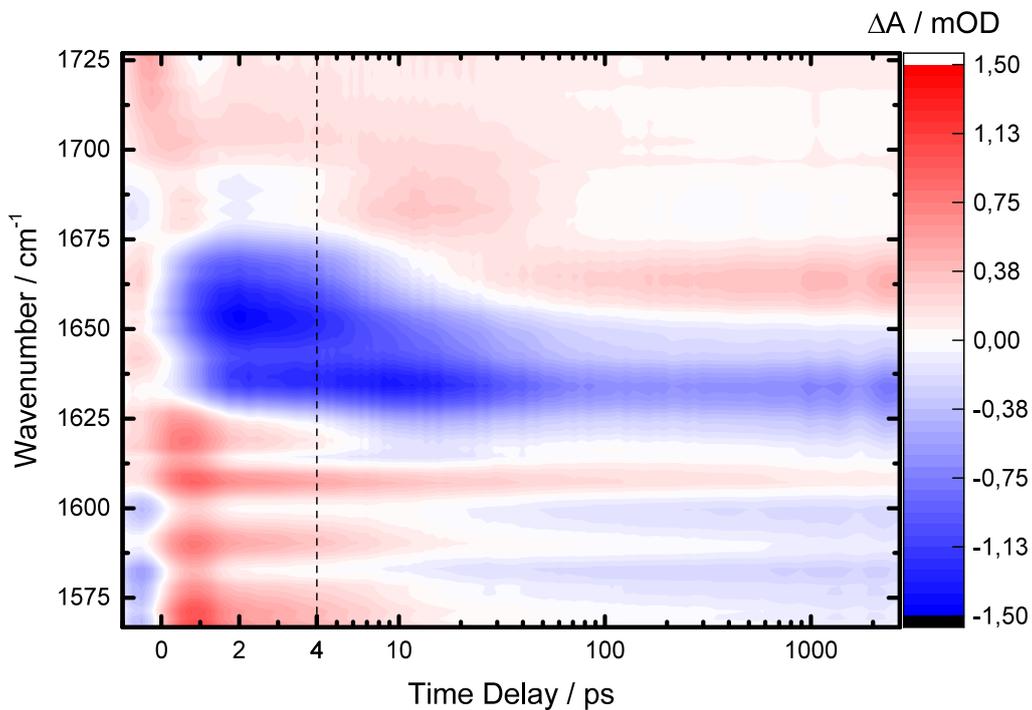
Im Folgenden werden die Ergebnisse der Entfaltungsreaktion (cis  $\rightarrow$  trans) vorgestellt. Die Entfaltungsreaktion auf der Pikosekunden Zeitskala wurde mit 400 nm ps-Lichtimpulsen induziert, die Entfaltung auf der Nanosekunden Skala mit 430 nm ns-Impulsen.

#### ps-Zeitbereich

Betrachtet man die Signalbeiträge analog zur Faltungsmessung mit Gleichung 6.1, so ergibt sich ein Signalverhältnis  $\frac{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} = 0,06$ . Somit ist der Beitrag der trans nach cis Reaktion bei der Entfaltungsmessung vernachlässigbar.

Das Ergebnis der zeitaufgelösten Absorptionsmessung der Entfaltungsreaktion bis 2,7 ns ist in Abbildung 6.8 dargestellt.

Zu frühen Zeiten gibt es sehr ähnliche Prozesse wie bei der trans nach cis Reaktion. In den ersten Pikosekunden ist wieder eine Rotverschiebung der Amid-I' Bande zu



**Abbildung 6.8: Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von AzoChignolin bis 2,7 ns**  
 Es sind die Absorptionsänderungen von AzoChignolin gegen die Zeit aufgetragen. Von  $-1$  ps bis 4 ps ist die Zeitachse linear, danach ist sie logarithmisch (mit gestrichelter Linie markiert). Absorptionszunahmen sind in rot und -abnahmen in blau dargestellt.

erkennen. Es findet ein starkes, breites Ausbleichen bei  $1660 \text{ cm}^{-1}$  statt. Rotverschoben dazu setzt eine induzierte Absorption ein, welche von den Ausbleichbanden des AMPP-Chromophors, bei  $1585 \text{ cm}^{-1}$  und  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , überlagert ist. Zusätzlich gibt es eine starke Ausbleichbande bei  $1630 \text{ cm}^{-1}$ , welche auf ein Aufbrechen von starken Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidsträngen in der Nähe des Schalters hinweist.

Bei  $1609 \text{ cm}^{-1}$  befindet sich eine induzierte Absorption, welche langsam zerfällt und noch am Ende des Messbereichs zu sehen ist. Da diese Absorption direkt am Zeitnullpunkt beginnt, muss davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Gruppe in direkter Nähe zum Schalter oder um den Schalter selbst handelt. Da diese Bande auch im lichtschtbaren Peptid ATZ und im lichtschtbaren Dipeptid Ac-Glu-AMPP-Lys-NH<sub>2</sub> vorhanden ist [Sch08], die beide ebenfalls AMPP als Schalter besitzen, handelt es sich vermutlich um einen Linker, der das Azobenzol mit dem Peptid verbindet. Kurz nach dem Schaltvorgang ( $\text{cis} \rightarrow \text{trans}$ ) befindet sich das Peptid noch in einer  $\beta$ -hairpin-Struktur. Dadurch wirkt eine große Kraft auf die

Linkergruppen zwischen Azobenzol und dem Peptidteil, wodurch diese Absorption induziert wird. Diese Bande sollte mit wenigen Nanosekunden komplett zerfallen, die benötigt werden bis die Verbindung von Azobenzol und Peptid ins Gleichgewicht relaxiert ist.

Bei  $1680\text{ cm}^{-1}$  befindet sich, zwischen 10 ps und 30 ps, die Absorptionsbande der desolvatisierten Carbonyle, welche schnell wieder Wasserstoffbrückenbindungen eingehen.

Nach etwa 40 ps beginnt eine induzierte Absorption bei  $1660\text{ cm}^{-1}$ , welche mit einem Ausbleichen bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  einhergeht. Die Amplituden wachsen bis zum Ende des Messbereichs an, die Dynamik ist nach 3 ns noch nicht abgeschlossen. Dabei handelt es sich um das Aufreißen von starken Interstrang-Wasserstoffbrücken, sowie die Neubildung von Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel. Das heißt, dass schon auf der ps-Zeitskala die Entfaltung der  $\beta$ -hairpin-Struktur beginnt!

Die Amplituden der globalen Datenanpassung sind in Abbildung 6.9 dargestellt. Es wurde mit drei veränderlichen Zeitkonstanten und einem Offset gefittet. Als Zeitkonstanten ergaben sich 5,6 ps, 26 ps und 586 ps. Die gefitteten Spektren und die Zeitkonstanten 5,6 ps und 26 ps sind denen der Faltungsreaktion (5,1 ps und 27 ps) sehr ähnlich. Es handelt sich somit um die gleichen Prozesse.

Mit der kurzen Zeitkonstante ist wieder die Erholung des Grundzustandes zu beobachten (Schwingungskühlen) und mit 26 ps die Resolvatisierung der desolvatisierten Carbonyle.

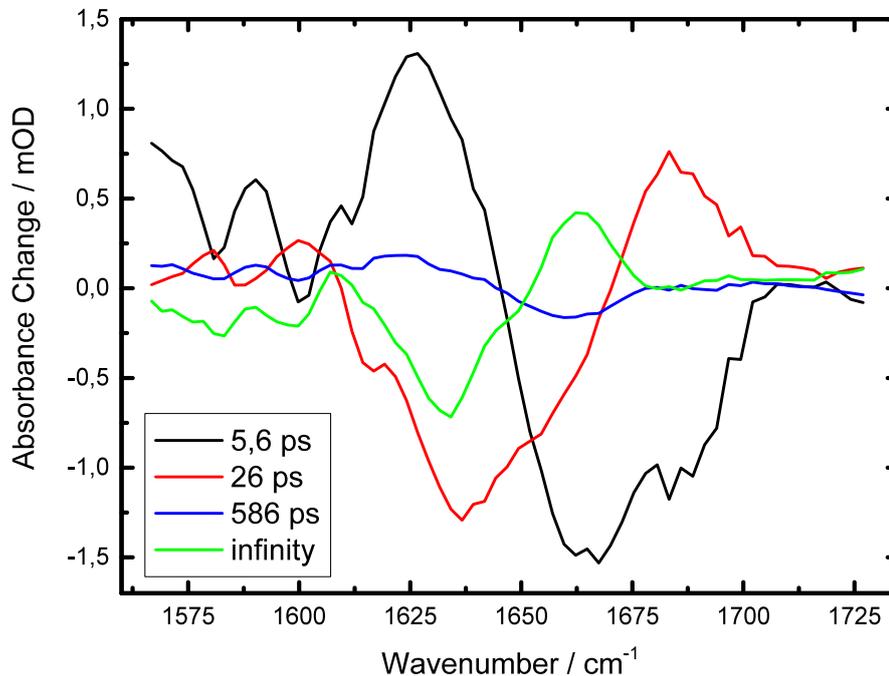
Als zusätzliche Zeitkonstante zeigt sich bei der Entfaltungsreaktion 586 ps. Diese Zeitkonstante stellt allerdings nur eine untere Grenze dar. Da die maximale Verzögerungszeit bei dieser Messung 2,7 ns betrug, sind Fehler in der Zeitkonstante durch die Anpassung nicht auszuschließen. Im DADS befindet sich eine positive Amplitude bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  und eine negative Amplitude bei  $1660\text{ cm}^{-1}$ . Im Absorptionsspektrum macht sich dies durch ein Ausbleichen bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  und eine induzierte Absorption bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  bemerkbar. Die Entfaltung der  $\beta$ -hairpin-Struktur beginnt also schon mit 586 ps.

Der Offset zeigt große Ähnlichkeiten mit dem stationären trans–cis Differenzspektrum. Dennoch ist davon auszugehen, dass die Reaktion noch nicht abgeschlossen ist, da das Bandenschieben von  $1720\text{ cm}^{-1}$  nach  $1696\text{ cm}^{-1}$  auf dieser Zeitskala noch nicht stattgefunden hat.

### ns-Zeitbereich

Die zeitaufgelösten Absorptionsänderungen bei der Entfaltungsreaktion bis  $95\text{ }\mu\text{s}$  sind in Abbildung 6.10 dargestellt.

Innerhalb der Zeitauflösung des Experiments ( $\approx 3\text{ ns}$ ) sind sowohl die Azobenzolbanden bei  $1585\text{ cm}^{-1}$  und  $1600\text{ cm}^{-1}$  als auch die Verschiebung auf der Amid-I' Bande (von  $1630\text{ cm}^{-1}$  nach  $1660\text{ cm}^{-1}$ ) vollständig aufgebaut.



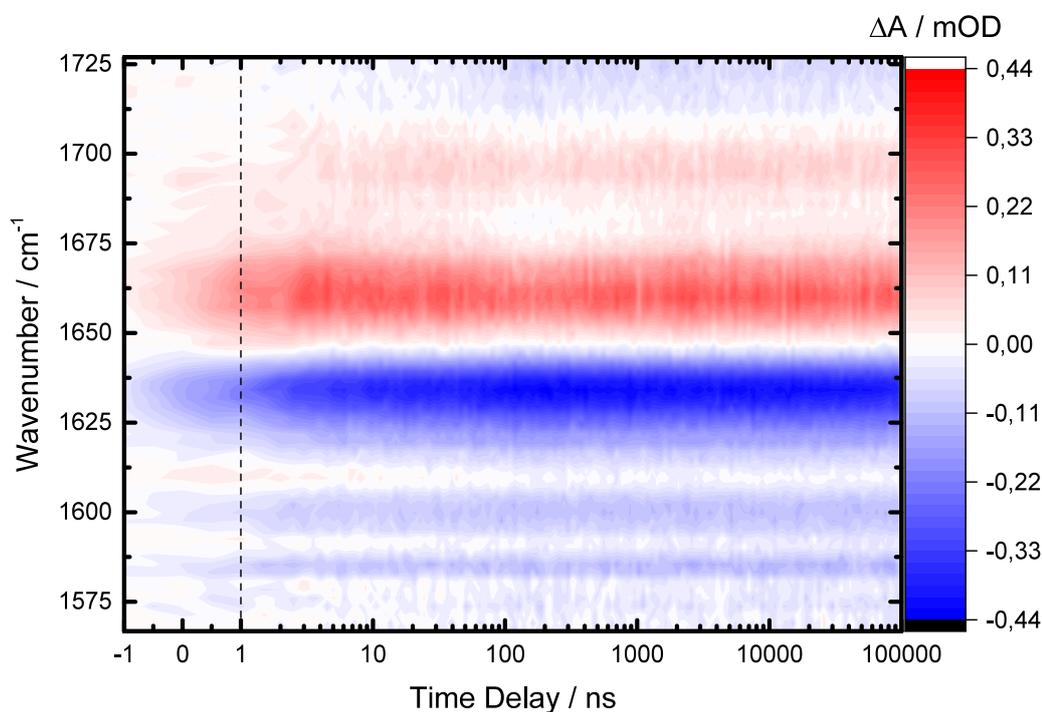
**Abbildung 6.9: DADS aus der globalen Anpassung der ps-Entfaltungsmessung von Azo-Chignolin** Mit 5,6 ps findet das Kühlen heißer vibronischer Zustände statt und damit die Erholung des Grundzustandes. Mit 26 ps resolvatisiert die neue Geometrie des Moleküls und es werden neue Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel gebildet. Mit 586 ps beginnt bereits die Entfaltung der  $\beta$ -hairpin-Struktur, indem Interstrang-Wasserstoffbrücken aufreißen und neue Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel gebildet werden. Das Offset-Spektrum zeigt bereits die ersten Signaturen des trans–cis cw-Spektrums.

Wie erwartet, zerfällt die induzierte Absorption der Linker zwischen Azobenzol und Peptidteil bei  $1609\text{ cm}^{-1}$  innerhalb weniger ns. Die Relaxation ist innerhalb von 100 ns abgeschlossen.

Nach etwa 10 ns findet man ein Bandenschieben von  $1720\text{ cm}^{-1}$  nach  $1696\text{ cm}^{-1}$ , das durch die Bildung einer Wasserstoffbrücke an der Seitenkette der Asparaginsäure erklärt werden kann. Anschließend sind keine Änderungen im Spektrum mehr zu sehen. Die Entfaltungsreaktion ist schon nach 100 ns vollständig abgeschlossen.

Das Amplitudenspektrum sowie der Offset der globalen Datenanpassung sind in Abb. 6.11 dargestellt.

Das DADS zur Zeitkonstante von 34 ns zeigt nahezu keine Amplitude im Bereich der Amid-I' Bande. Es ist lediglich das Bandenschieben von  $1720\text{ cm}^{-1}$  nach  $1696\text{ cm}^{-1}$



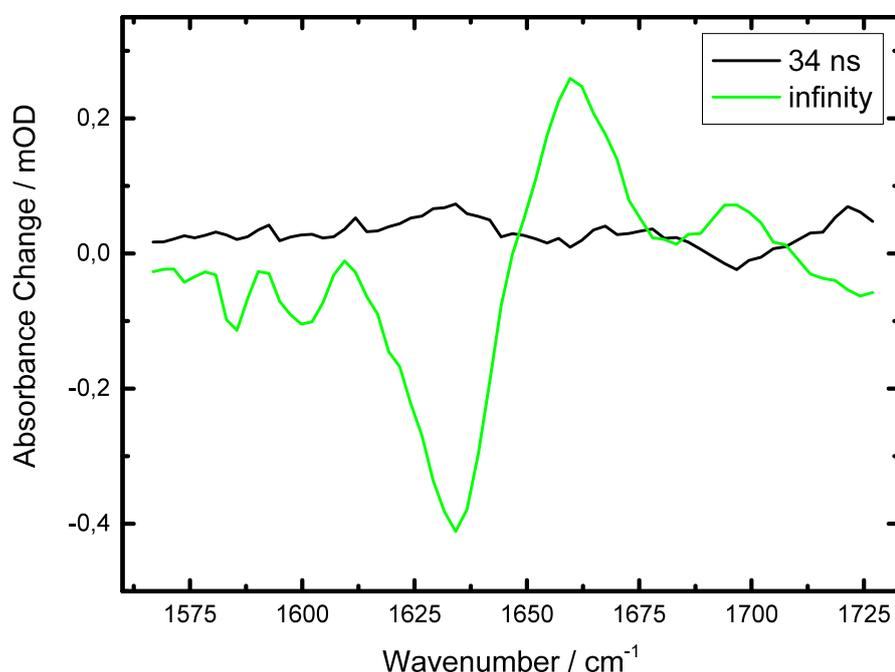
**Abbildung 6.10: Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von AzoChignolin bei 25 °C bis 95  $\mu$ s** Es sind die Absorptionsänderungen von AzoChignolin gegen die Zeit aufgetragen. Von  $-1$  ns bis  $1$  ns ist die Zeitachse linear, danach ist sie logarithmisch (mit gestrichelter Linie markiert). Absorptionszunahmen sind in rot und -abnahmen in blau dargestellt.

zu erkennen. Es war nicht möglich eine weitere Zeitkonstante mit sinnvollem DADS zu erhalten, die den Zerfall der induzierten Absorption bei  $1609\text{ cm}^{-1}$  zeigt.

Die Entfaltungsreaktion wurde, analog zur Faltung, ebenfalls noch bei  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  und bei  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  gemessen (Daten und DADS im Anhang A.4). Es ergab sich jeweils eine Zeitkonstante mit qualitativ gleichem Amplitudenspektrum wie bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die erhaltenen Zeitkonstanten sind  $\tau_{5\text{ }^{\circ}\text{C}} = 40\text{ ns}$  und  $\tau_{45\text{ }^{\circ}\text{C}} = 30\text{ ns}$ .

## 6.2 Faltung von Y2V- und Y2W-AzoChignolin

Im Folgenden werden die zeitaufgelösten Absorptionsmessungen der Faltung im Bereich der Amid-I' Bande an der Y2V- und der Y2W-Mutante vorgestellt. Bei Y2V-AzoChignolin wurden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Peptidsträngen ausgeschaltet, bei Y2W-AzoChignolin dagegen wurden diese im Vergleich



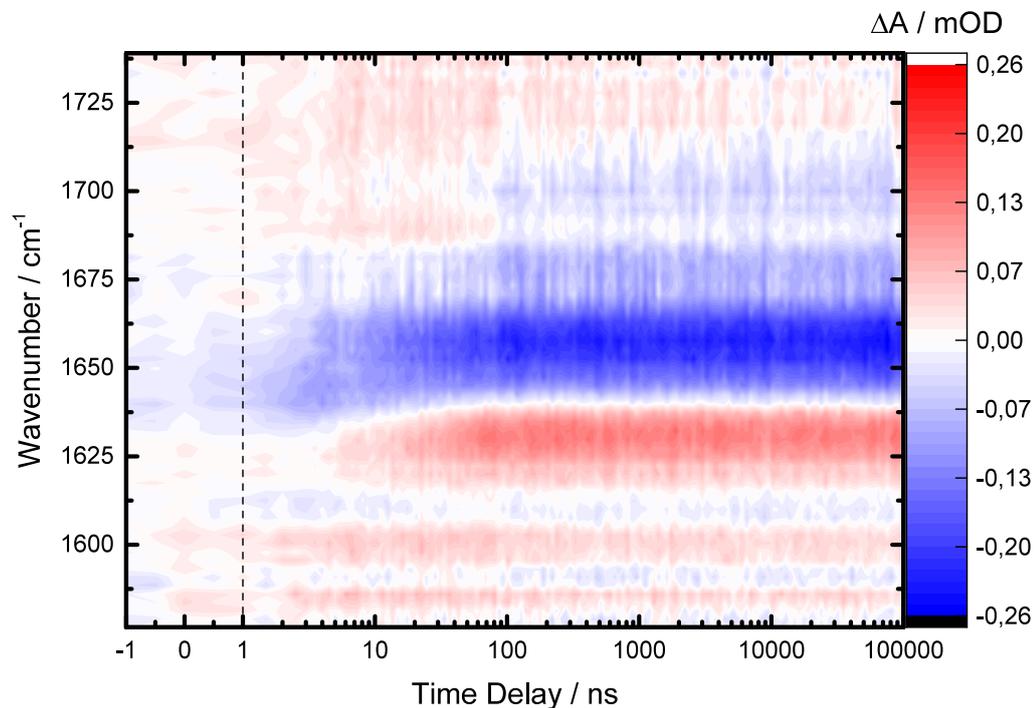
**Abbildung 6.11: DADS aus der globalen Anpassung der ns-Entfaltungsmessung von AzoChignolin** Auf der ns-Zeitskala findet nur das Bandenschieben von  $1696\text{ cm}^{-1}$  nach  $1720\text{ cm}^{-1}$ , sowie eine leichte Zunahme der Amplituden auf der Amid-I' Bande statt.

zu AzoChignolin noch verstärkt. Es wird jeweils die trans nach cis Reaktion, d. h. die Faltung, nach Anregung des photostationären trans-Ensembles mit Licht der Wellenlänge  $355\text{ nm}$  bei  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , im Zeitbereich bis  $100\text{ }\mu\text{s}$  betrachtet.

### 6.2.1 Y2V-AzoChignolin

Die zeitaufgelöste Faltungsmessung von Y2V-AzoChignolin bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ist in Abbildung 6.12 dargestellt. Die Absorptionsänderungen nach der Isomerisierung von AMPP von trans nach cis haben eine große Ähnlichkeit zu denen von AzoChignolin.

Am Zeitnullpunkt ist nur das initiale Ausbleichen bei  $1640\text{ cm}^{-1}$  sowie die Azobenzolbanden bei  $1585\text{ cm}^{-1}$  und  $1600\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Die Azobenzolbanden zeigen im gesamten Zeitbereich keine Dynamik. Innerhalb von  $100\text{ ns}$  bildet sich das Ausbleichen bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  und gleichzeitig eine induzierte Absorption bei  $1630\text{ cm}^{-1}$ . Diese Rotverschiebung der Amid-I' Bande wird, wie schon bei AzoChignolin, mit dem Aufbrechen von schwachen Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel



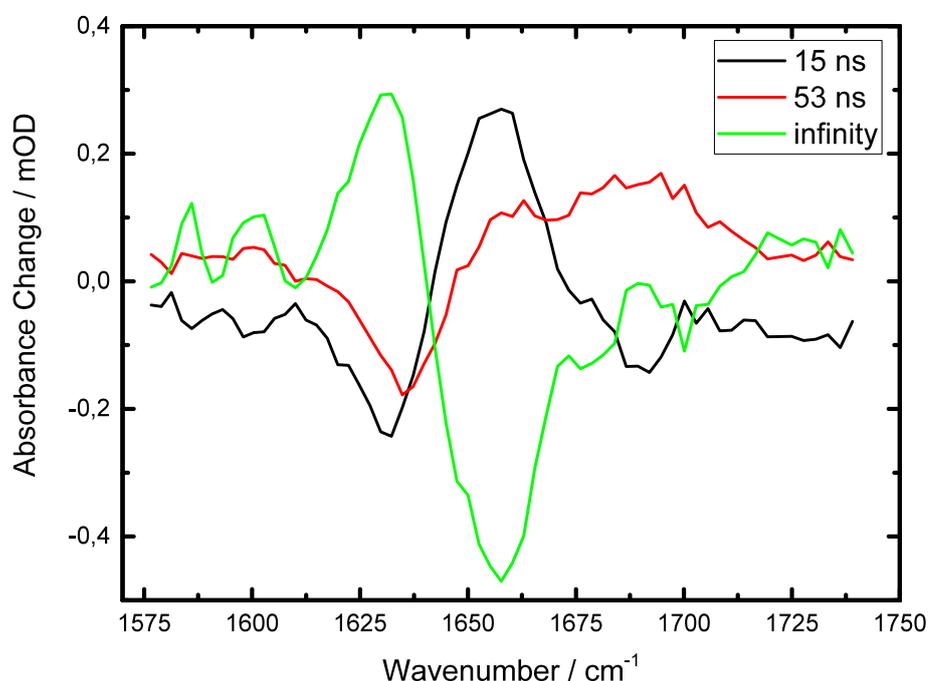
**Abbildung 6.12: Absorptionsänderungen bei der Faltung von Y2V-AzoChignolin bei 25 °C**  
 Es sind die Absorptionsänderungen von Y2V-AzoChignolin gegen die Zeit aufgetragen. Von  $-1$  ns bis  $1$  ns ist die Zeitachse linear, danach ist sie logarithmisch (mit gestrichelter Linie markiert). Absorptionszunahmen sind in rot und -abnahmen in blau dargestellt.

und der gleichzeitigen Bildung starker Interstrang-Wasserstoffbrücken zwischen den  $\beta$ -Strängen interpretiert.

Die induzierte Absorption ist, wie bei AzoChignolin zuerst bei  $1625 \text{ cm}^{-1}$  zu finden und schiebt dann nach  $1633 \text{ cm}^{-1}$ . Es bilden sich offensichtlich (wie bei AzoChignolin) zuerst sehr starke Wasserstoffbrücken, vermutlich in der Nähe des AMPP-Schalters, und anschließend etwas schwächere Interstrang-Wasserstoffbrücken in der Nähe der Termini.

Parallel dazu findet ein schwaches Bandenschieben von etwa  $1696 \text{ cm}^{-1}$  nach  $1720 \text{ cm}^{-1}$  statt. Dieses Bandenschieben ist wieder auf den Verlust oder die Schwächung einer Wasserstoffbrücke an der Carboxygruppe der Asparaginsäure zurückzuführen.

Wie bei AzoChignolin findet die Anpassung mit einer gestreckten Exponentialfunktion statt. Mit einem Streckfaktor  $\beta = 0,7$  ergibt sich eine Zeitkonstante von  $\tau = 25$  ns. Y2V-AzoChignolin faltet also noch schneller als AzoChignolin.



**Abbildung 6.13: DADS aus der globalen Anpassung der Faltungsmessung von Y2V-AzoChignolin** Die Zeitkonstanten wurden auf 15 ns und 53 ns festgesetzt und nur die Amplituden angepasst. Zu frühen Zeiten (DADS zu 15 ns) bilden sich starke Interstrang- Wasserstoffbrücken und schwache Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel brechen auf. Mit 53 ns findet noch eine leichte Zunahme der Amplituden auf der Amid-I' Bande statt sowie die Dynamik um  $1700\text{ cm}^{-1}$ .

Um die spektralen Komponenten zu frühen und späten Zeiten trennen zu können, wurden die Daten wieder näherungsweise mit einem biexponentiellen Zerfall mit festgesetzten Zeitkonstanten  $\tau_1 = 15\text{ ns}$  und  $\tau_2 = 53\text{ ns}$  angepasst. Die Zeitkonstanten ergeben sich aus Tabelle 6.2.

Die erhaltenen DADS sowie der Offset sind in Abbildung 6.13 dargestellt. Sie zeigen qualitativ ein ähnliches Verhalten wie AzoChignolin. Zu frühen Zeiten findet eine Rotverschiebung der Amid-I' Bande statt. Diese ist im DADS zu längeren Zeiten bei höheren Frequenzen zu finden. Im Spektrum von 53 ns ist auch eine Dynamik im Bereich von  $1700\text{ cm}^{-1}$  enthalten.

Die gesamten Dynamiken bei der Faltungsreaktion sind bereits nach etwa 100 ns vollständig abgeschlossen. Damit findet Y2V-AzoChignolin seine native Struktur sogar noch schneller als AzoChignolin.

Die Faltungsmessung an Y2V-AzoChignolin wurde auch bei einer Proben­temperatur von 5 °C durchgeführt. Die Messung ist mit den DADS der biexponentiellen Näherung im Anhang A.5 abgebildet. Die Anpassung mit einer gestreckten Exponentialfunktion mit  $\beta = 0,65$  liefert eine Zeitkonstante  $\tau = 33$  ns. Auch Y2V-AzoChignolin zeigt mit zunehmender Temperatur eine schnellere Faltungszeit.

Die Spektren zeigen das bekannte Verhalten. Mit der kurzen Zeitkonstante findet eine Rotverschiebung auf der Amid-I' Bande statt, die sich mit der langen Zeitkonstante bei höheren Frequenzen fortsetzt. Es ist auch die Blauverschiebung im Bereich von  $1700\text{ cm}^{-1}$  im Spektrum der langen Zeitkonstante enthalten.

Die ermittelten Zeitkonstanten sind in Tabelle 6.4 zusammengefasst.

**Tabelle 6.4: Zeitkonstanten für die Faltung von Y2V-AzoChignolin gegen die Temperatur**  
Die Zeitkonstante  $\tau_{\text{str}}$  und der Streckparameter  $\beta$  stammen aus einer globalen Anpassung einer gestreckten Exponentialfunktion.

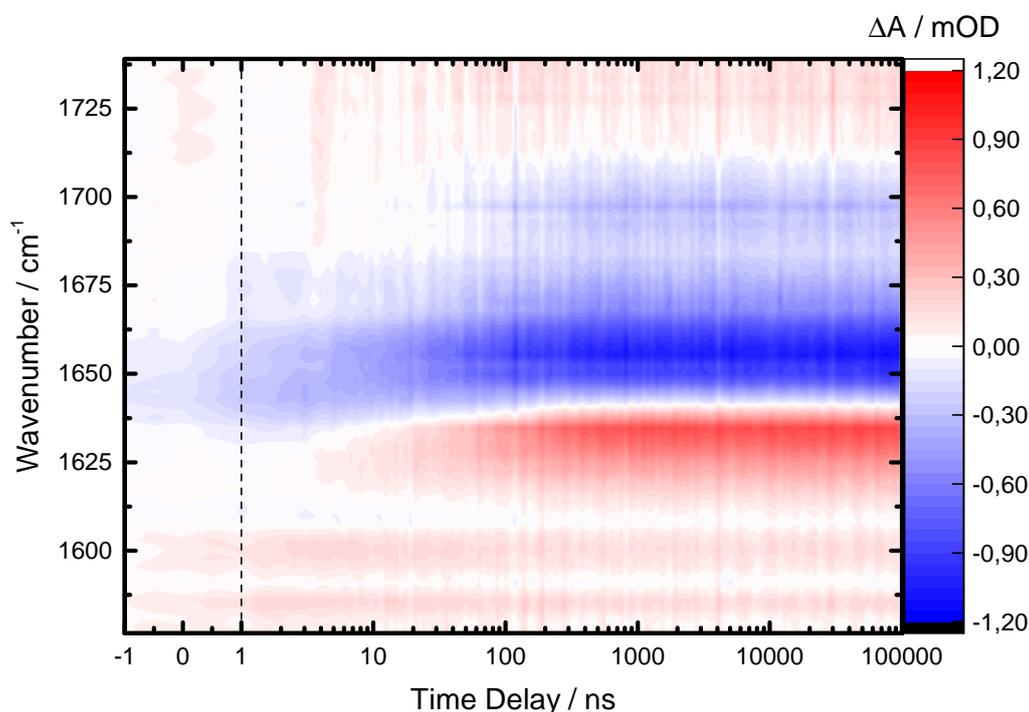
	$\tau_{\text{str}}$	$\beta$
5 °C	33 ns	0,65
25 °C	25 ns	0,70

### 6.2.2 Y2W-AzoChignolin

Die zeitaufgelöste Faltungsmessung von Y2W-AzoChignolin bei 25 °C ist in Abbildung 6.14 dargestellt. Die Absorptionsänderungen zeigen eine große Ähnlichkeit zu denen von AzoChignolin.

Bei sehr kleinen Verzögerungszeiten ist, wie schon bei AzoChignolin und Y2V-AzoChignolin, ein leichtes initiales Ausbleichen bei  $1640\text{ cm}^{-1}$  zu sehen, welches innerhalb weniger Nanosekunden nach  $1660\text{ cm}^{-1}$  schiebt und an Amplitude zunimmt. Diese Bande stammt vom Aufbrechen schwacher Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel. Gleichzeitig bildet sich eine Absorptionszunahme bei  $1625\text{ cm}^{-1}$  welche ihren Ursprung in der Bildung sehr starker Interstrang-Wasserstoffbrücken in Schalternähe zwischen den Peptidsträngen hat. Diese induzierte Absorption schiebt auf der Zeitskala von 100 ns nach  $1633\text{ cm}^{-1}$ .

Zum Zeitnullpunkt ist direkt nach der Anregung bei  $1585\text{ cm}^{-1}$  und  $1600\text{ cm}^{-1}$  die induzierte Absorption von cis-AMPP zu sehen, welche keine Dynamiken mehr zeigt. Nach ungefähr 100 ns findet man, wie bei AzoChignolin, ein Bandenschieben von  $1696\text{ cm}^{-1}$  nach etwa  $1720\text{ cm}^{-1}$ , welches wieder mit einer Änderung der Wasserstoffbrückenumgebung der Asparaginsäure in Verbindung gebracht wird.

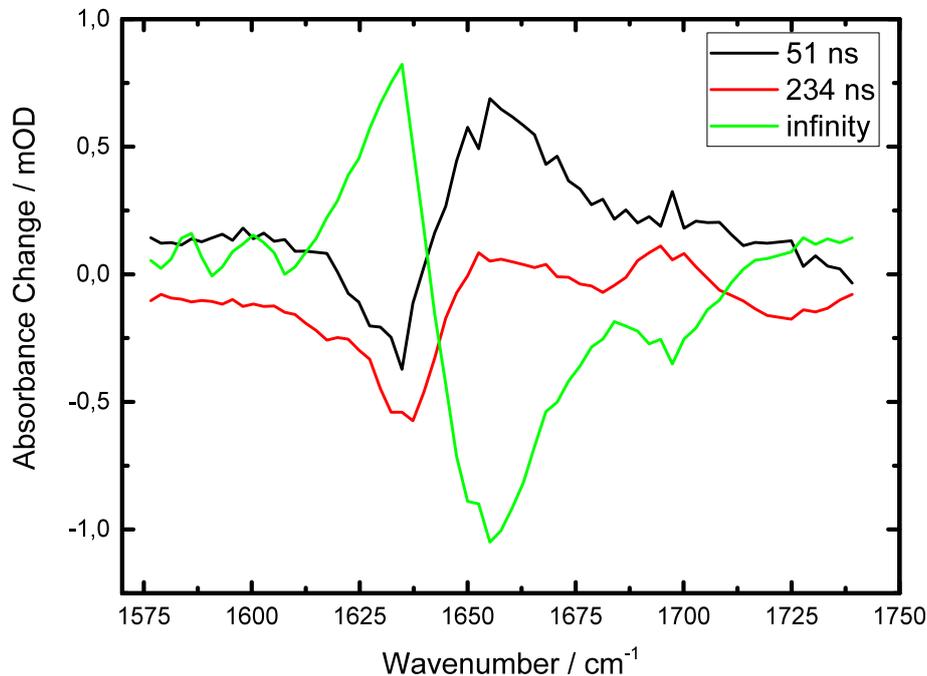


**Abbildung 6.14: Absorptionsänderungen bei der Faltung von Y2W-AzoChignolin bei 25 °C**  
 Es sind die Absorptionsänderungen von Y2W-AzoChignolin gegen die Zeit aufgetragen. Von -1 ns bis 1 ns ist die Zeitachse linear, danach ist sie logarithmisch (mit gestrichelter Linie markiert). Absorptionszunahmen sind in rot und -abnahmen in blau dargestellt.

Die globale Anpassung mit einer gestreckten Exponentialfunktion liefert mit  $\beta = 0,63$  eine Zeitkonstante  $\tau = 73 \text{ ns}$ . Die Faltung dauert also länger als bei AzoChignolin und Y2V-AzoChignolin.

Um die spektralen Komponenten zeitlich trennen zu können, wurden wieder DADS mit einer globalen biexponentiellen Anpassung mit den festen Zeitkonstanten  $\tau_1 = 51 \text{ ns}$  und  $\tau_2 = 234 \text{ ns}$  (aus Tabelle 6.2) durchgeführt. Die Spektren sind in Abbildung 6.15 dargestellt. Das DADS zu 51 ns zeigt eine Zunahme der Absorption bei etwa  $1627 \text{ cm}^{-1}$ , was im Vergleich zum cw-Spektrum rotverschoben ist. Dies wird wieder mit der Bildung der sehr starken Interstrang-Wasserstoffbrücken in der Nähe des Schalters interpretiert.

Das Amplitudenspektrum zu 234 ns zeigt ein Bandenschieben auf der Amid-I' Bande, welches im Vergleich zu dem von 51 ns blauverschoben ist. Bei diesem DADS ist die Absorptionzunahme (Minimum des DADS) bei  $1633 \text{ cm}^{-1}$  zu finden, was auf die Bildung von etwas schwächeren Interstrang-Wasserstoffbrücken in der Nähe der



**Abbildung 6.15: DADS aus der globalen Anpassung der Faltungsmessung von Y2W-Azo-Chignolin** Die Zeitkonstanten wurden auf 51 ns und 234 ns festgesetzt und nur die Amplituden angepasst. Zu frühen Zeiten (DADS zu 51 ns) bilden sich starke Interstrang- Wasserstoffbrücken und schwache Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel brechen auf. Mit 234 ns findet noch eine leichte Zunahme der Amplituden auf der Amid-I' Bande statt sowie die Dynamik um 1700  $\text{cm}^{-1}$ .

Termini schließen lässt. Zusätzlich findet ein Bandenschieben von  $1696 \text{ cm}^{-1}$  nach  $1720 \text{ cm}^{-1}$  statt. Diese Blauverschiebung wird mit dem Verlust einer Wasserstoffbrücke an der Asparaginsäure in Verbindung gebracht.

Die Faltungsmessung von Y2W-AzoChignolin wurde auch bei einer Temperatur von  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Sie ist im Anhang A.6 dargestellt. Bei der globalen Anpassung mit einer gestreckten Exponentialfunktion hat sich mit  $\beta = 0,48$  eine Zeitkonstante  $\tau = 145 \text{ ns}$  ergeben. Die Amplituden aus der biexponentiellen Anpassung mit den festen Zeitkonstanten  $\tau_1 = 115 \text{ ns}$  und  $\tau_2 = 725 \text{ ns}$  sind ebenfalls im Anhang A.6 dargestellt.

Die DADS bei  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  zeigen ein ähnliches Verhalten wie bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Mit der kurzen Zeitkonstante findet eine Rotverschiebung auf der Amid-I' Bande statt, die bei niedrigeren Frequenzen liegt als die der langen Zeitkonstante. Mit  $\tau_2$  findet die

Blauverschiebung von  $1696\text{ cm}^{-1}$  nach  $1720\text{ cm}^{-1}$  sowie eine weitere Zunahme der Amplituden der Amid-I' Bande statt, die bei höheren Frequenzen liegt.

Die Zeitkonstanten sind in Tabelle 6.5 zusammengefasst. Auch Y2W-AzoChignolin zeigt eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Faltungsgeschwindigkeit.

**Tabelle 6.5: Zeitkonstanten für die Faltung von Y2W-AzoChignolin gegen die Temperatur**  
Die Zeitkonstante  $\tau_{\text{str}}$  und der Streckparameter  $\beta$  stammen aus der Anpassung einer gestreckten Exponentialfunktion.

	$\tau_{\text{str}}$	$\beta$
5 °C	145 ns	0,48
25 °C	73 ns	0,63

### 6.2.3 Vergleich der Mutanten

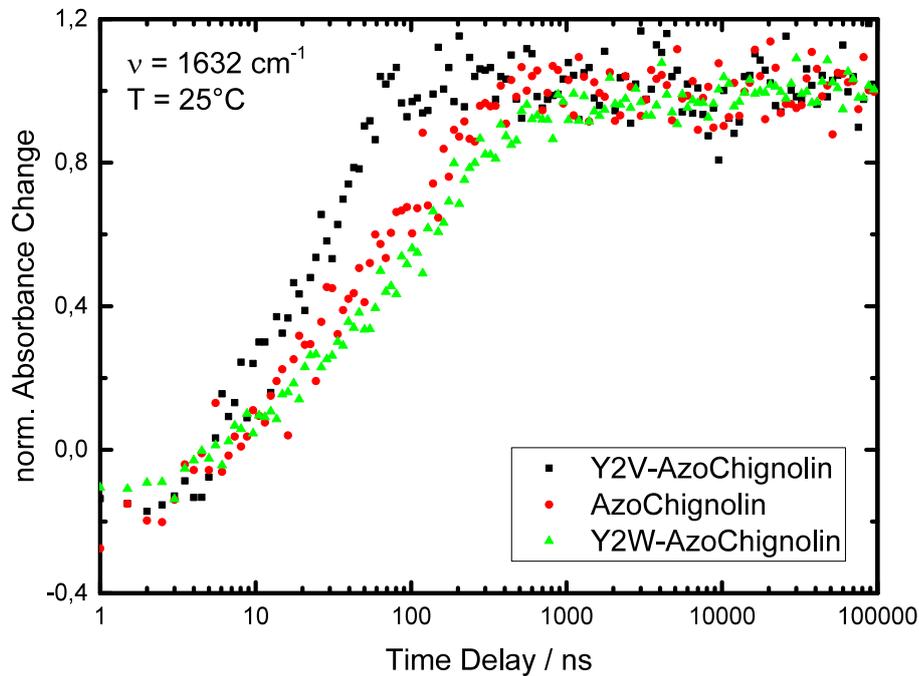
Alle untersuchten Moleküle zeigen sehr große Ähnlichkeiten bei der Faltung. Sie findet aber unterschiedlich schnell statt.

Die Unterschiede der Faltungszeiten (zusammengefasst in Tabelle 6.6), welche aus der Anpassung mit gestreckten Exponentialfunktionen ermittelt wurden, lassen sich auch direkt in den Transienten der Mutanten erkennen. In Abbildung 6.16 sind die Transienten bei  $1632\text{ cm}^{-1}$  von Y2V-AzoChignolin, AzoChignolin und Y2W-AzoChignolin bei  $25\text{ °C}$  auf die gleiche Amplitude skaliert und übereinandergelegt worden.

Diese Transiente bei  $1632\text{ cm}^{-1}$  hat ihren Ursprung in der Bildung starker Interstrang-Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidsträngen und steht deshalb repräsentativ für den Aufbau der  $\beta$ -hairpin-Struktur.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Transiente von Y2V-AzoChignolin (schwarz) links von der von AzoChignolin (rot) und der von Y2W-AzoChignolin (grün) liegt, und damit am schnellsten die native  $\beta$ -hairpin-Struktur einnimmt. Bei Y2V-AzoChignolin gibt es keine stabilisierenden  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den Peptidsträngen.

Die beiden anderen Mutanten, AzoChignolin und Y2W-AzoChignolin, falten dagegen deutlich langsamer. Der Unterschied dieser Moleküle liegt in den hydrophoben Wechselwirkungen, die sie zwischen den Strängen eingehen können. AzoChignolin hat ein Tyrosin in der Primärstruktur, das im gefalteten Zustand gegenüber von Tryptophan liegt. Dieses zwei Aminosäuren wechselwirken und stabilisieren die Struktur. Y2W-AzoChignolin hat zwei Tryptophane, die sich gegenüberliegen und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingehen. Diese Wechselwirkung ist stärker als die zwischen Tyrosin und Tryptophan in AzoChignolin. Y2W-AzoChignolin findet seine  $\beta$ -hairpin-Struktur am langsamsten von den drei untersuchten Peptiden.



**Abbildung 6.16: Transienten bei  $1632\text{ cm}^{-1}$  der AzoChignolin Mutanten** Werden die normierten Transienten bei  $1632\text{ cm}^{-1}$  aus den zeitaufgelösten Absorptionsmessungen, die den Aufbau der  $\beta$ -hairpin Struktur repräsentieren, übereinander gezeichnet, so sieht man deutlich dass Y2V-AzoChignolin am schnellsten die  $\beta$ -hairpin Struktur einnimmt. Es folgen AzoChignolin und Y2W-AzoChignolin. Dies lässt den Schluss zu, dass starke hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Strängen zwar die Struktur stabilisieren, aber dafür auch die Faltungszeit erhöhen.

So faltete Y2V-AzoChignolin, das keine hydrophoben Interstrang-Wechselwirkungen hat mit 25 ns. Y2W-AzoChignolin, indem sich zwei Tryptophane gegenüberliegen, die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingehen, faltet mit 73 ns. Die Faltungszeit ist damit dreimal so lang. AzoChignolin hat schwächere hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Strängen als Y2W-AzoChignolin aber deutlich stärkere als Y2V-AzoChignolin. Seine Faltungszeit liegt mit 54 ns zwischen den beiden Mutanten.

Es liegt deshalb nahe die Vermutung aufzustellen, dass die hydrophoben Aminosäuren nicht nur einen großen Einfluss auf die Stabilität von  $\beta$ -hairpin-Strukturen haben, sondern auch auf die Zeit in der sie ihre native Struktur finden.

Man findet in den Anpassungen bei Y2V-AzoChignolin den größten Streckfaktor und bei Y2W-AzoChignolin den kleinsten. Die Streckfaktoren nehmen mit steigender Temperatur ebenfalls zu ( $\beta \rightarrow 1$ ), was bedeutet, dass die Verteilung an Zerfallszei-

ten mit steigender Temperatur schmaler wird. Man findet bei allen Peptiden mit steigender Temperatur schnellere Faltungszeiten.

**Tabelle 6.6: Zusammenfassung der Faltungszeiten** Die Faltungszeit nimmt für alle Moleküle mit steigender Temperatur ab. Der Streckparameter wird für steigende Temperaturen größer.

	T	$\tau_{\text{str}}$	$\beta$
Y2V-AzoChignolin	5 °C	33 ns	0,65
	25 °C	25 ns	0,70
AzoChignolin	5 °C	83 ns	0,54
	25 °C	54 ns	0,68
	45 °C	36 ns	0,68
Y2W-AzoChignolin	5 °C	145 ns	0,48
	25 °C	73 ns	0,63



## 7 Zeitaufgelöste Trp-Fluoreszenz von AzoChignolin

Die Rolle der aromatischen Seitenketten bei der Faltung und Entfaltung von AzoChignolin wird mithilfe der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie aufgeklärt. Da die Emission von Tryptophan große Unterschiede zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand zeigt, eignet sie sich gut zur Untersuchung der hydrophoben  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Tyrosin und Tryptophan mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie.

### 7.1 Faltung

Die Fluoreszenzänderungen zwischen 300 nm und 340 nm, die bei der Faltung von AzoChignolin bei Raumtemperatur ( $\approx 23^\circ\text{C}$ ) auftreten, sind in Abbildung 7.1 dargestellt. Die Isomerisierungsreaktion von trans-AMPP wurde mit einem ns-Laserimpuls der Wellenlänge 355 nm ausgelöst, die Fluoreszenz mit einem fs-Laserimpuls der Wellenlänge 266 nm angeregt.

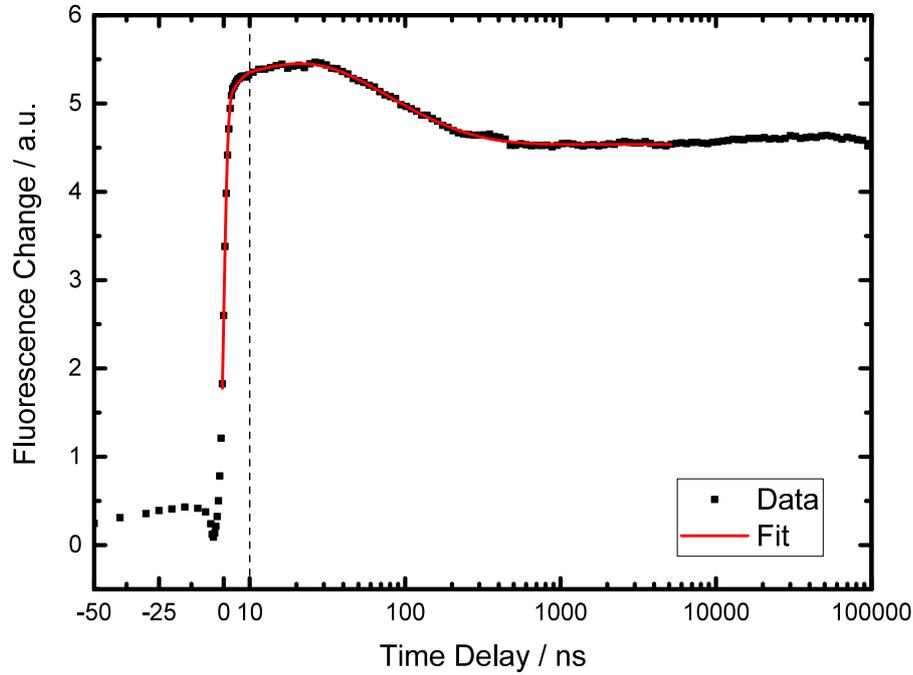
Aus den stationären Spektren ist bereits bekannt, dass bei der Faltung von AzoChignolin eine Fluoreszenzzunahme auftritt. Dieses Verhalten ist auch bei den zeitaufgelösten Messungen zu beobachten. Es stellt sich heraus, dass diese Zunahme mit mehreren Dynamiken auftritt.

Das Minimum der Fluoreszenz vor dem Zeitnullpunkt stammt vermutlich von der Absorption des angeregten Zustands (ESA<sup>1</sup>). Zu negativen Verzögerungszeiten trifft der 266 nm Abtastimpuls als erstes auf die Probe und wird von Tryptophan absorbiert, welches sich dann in einem elektronisch angeregten Zustand befindet. Dieser Zustand zerfällt mit wenigen Nanosekunden [GLW81]. Trifft nun der 355 nm Anregeimpuls auf das elektronisch angeregte Tryptophan erfolgt der Übergang in höhere angeregte Zustände und so werden nicht-strahlende Pfade wie Ionisation eröffnet. In den Daten findet sich deshalb ein Rückgang der Fluoreszenz kurz vor dem Zeitnullpunkt über wenige Nanosekunden.

Am Zeitnullpunkt, an dem die Isomerisierung von AMPP stattfindet, wird eine starke und sehr schnelle Zunahme der Fluoreszenz innerhalb der Zeitauflösung des Experiments beobachtet. Sie ist auf die geringere Reabsorption von cis-Azobenzol und auf den deutlich schwächeren FRET von Tryptophan auf cis-Azobenzol zurückzuführen.

---

<sup>1</sup>excited state absorption



**Abbildung 7.1: Zeitaufgelöste Änderungen der Trp-Fluoreszenz bei der Faltung** Gezeigt ist die Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz während der Faltung von AzoChignolin. Von  $-50$  ns bis  $10$  ns ist die Zeitachse linear, dannach ist sie logarithmisch. Die große Zunahme der Fluoreszenz am Zeitnullpunkt ist auf die geringere Reabsorption der Emission von cis-AzoChignolin und einen deutlich ineffizienteren FRET auf cis-AMPP zurückzuführen. Die anschließende Dynamik auf der  $100$  ns Zeitskala findet auf der gleichen Zeitskala wie im infraroten Spektralbereich statt und ist auf die sich ändernde Umgebung von Tryptophan bei der Faltung zurückzuführen.

Anschließend zeigt sich eine leichte Zunahme der Fluoreszenz auf der zehn Nanosekunden Zeitskala, welche von einer starken Fluoreszenzabnahme auf der hundert Nanosekunden Zeitskala gefolgt wird.

Mit einer Datenanpassung mit einer Exponentialfunktion, für die Zunahme der Fluoreszenz bis  $30$  ns und einer gestrecketen Exponentialfunktion für die Abnahme der Fluoreszenz auf der  $100$  ns Zeitskala und einem Offset wurden die Zeitkonstanten der Dynamiken bestimmt.

$$\Delta F(t) = a_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + a_2 \cdot \exp\left[\left(-\frac{t}{\tau_{\text{str}}}\right)^\beta\right] + a_0 \quad (7.1)$$

Die Datenanpassung von 0 ns bis 5000 ns mit Gleichung 7.1 mit  $\beta = 0,68$  (vgl. IR) ergab folgende Werte:  $\tau = 11$  ns mit einer negativen Amplitude  $a_1 = -1,3$ ,  $\tau_{\text{str}} = 60$  ns mit einer positiven Amplitude  $a_2 = 1,8$ . Der Offset beträgt  $a_0 = 4,5$ . Die Anpassung ist in Abbildung 7.1 als rote Linie dargestellt. Die Zeitkonstante der gestreckten Exponentialfunktion ist nahezu gleich zu der aus den infraroten Absorptionmessungen ( $\tau_{\text{str IR}} = 54$  ns).

Die Fluoreszenzänderungen stammen von unterschiedlichem Quenching der Tryptophan-Fluoreszenz durch FRET auf AMPP. Die FRET-Effizienz ändert sich während der Faltung, da sich der Abstand zwischen den zwei Chromophoren ändert.

Am Zeitnullpunkt findet die Isomerisierung von trans-AMPP nach cis statt. Dies geschieht innerhalb von 10 ps. Es ist davon auszugehen, dass sich innerhalb dieser kurzen Zeit nichts an den Abständen zwischen Tryptophan und AMPP ändert. Das Absorptionsspektrum von AMPP ändert sich aber drastisch und der Förster-Radius beträgt im cis nur noch  $R_{0,cis} = 17,1$  Å. Man kann nun die Fluoreszenzzunahme am Zeitnullpunkt berechnen, indem man die Fluoreszenz vor dem Zeitnullpunkt mit der direkt nach der Isomerisierung von AMPP vergleicht. Die Fluoreszenz vor dem Zeitnullpunkt berechnet sich analog zu Abschnitt 5.3 mit Gleichung 5.3, mit dem Förster-Radius von trans-AMPP und der stationären trans-Abstandsverteilung.

Die Fluoreszenz direkt nach der Isomerisierung von AMPP berechnet sich mit dem Förster-Radius von cis-AMPP mit der stationären trans-Abstandsverteilung, da davon auszugehen ist, dass sich während der schnellen Isomerisierungszeit nichts an der Abstandsverteilung ändert.

Unter Berücksichtigung der Anzahl geschalteter Moleküle im Experiment (14 %) erhält man eine Fluoreszenzzunahme von 62 %, welche im Experiment als starker Anstieg direkt am Zeitnullpunkt zu beobachten ist.

Nach der starken Zunahme der Fluoreszenz am Zeitnullpunkt findet sich in den Daten eine weitere Fluoreszenzzunahme bis etwa 30 ns (Zeitkonstante  $\tau = 11$  ns). Aus MD-Simulationen ist bekannt, dass 38 % der Tryptophane mit einem Phenylring von trans-AMPP  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingehen. Aufgrund des extrem kleinen Abstands zwischen diesen Tryptophanen und AMPP ( $\sim 6$  Å) berechnet sich deren FRET-Effizienz auf 99,8 %. Diese Wechselwirkungen brechen mit der Isomerisierung von AMPP auf und die Tryptophane vergrößern daraufhin diffusiv ihren Abstand zu AMPP, was durch die Zunahme der Fluoreszenz beobachtet wird. Dies entspricht in Abbildung 7.1 der leichten Zunahme der Fluoreszenz bis 30 ns (Zeitkonstante  $\tau = 11$  ns).

In der trans-Abstandsverteilung in Abbildung 5.10 repräsentiert die Bande bei 6 Å die Tryptophane, die auf AMPP stacken. Um die Fluoreszenz nach dem Aufbrechen dieser Wechselwirkungen abzuschätzen, wurde aus der trans-Abstandsverteilung diese Bande entfernt und neu normiert (siehe Anhang A.7). Mithilfe des Förster-Radius für cis-AMPP und dieser neuen Abstandsverteilung lässt sich nun grob die neue Fluoreszenz und damit die Änderung bezogen auf den Zeitpunkt direkt nach der Isomerisierung berechnen. Man erhält eine weitere Zunahme der Fluoreszenz um 15 %.

Nach dieser Zunahme der Fluoreszenz beobachtet man eine Fluoreszenzabnahme auf der 100 ns Zeitskala in der das Peptid seine native Struktur einnimmt. Diese Fluoreszenz lässt sich mit dem Förster-Radius für cis-AMPP und der cis Abstandsverteilung berechnen. Man erhält jedoch anstelle der experimentell beobachteten Abnahme eine Zunahme um 18,6%. Dieser deutliche Unterschied zwischen Theorie und Experiment lässt sich wie schon in Abschnitt 5.3 beschrieben damit erklären, dass sowohl die Abstandsverteilungen als auch die Förster-Radien fehlerbehaftet sind. Beide Größen gehen mit der sechsten Potenz in die Berechnung der Fluoreszenz ein. Geringe Fehler bei beiden Werten verursachen also große Fehler bei der Fluoreszenzberechnung. Eine geringe Änderung der Abstandsverteilung bei großen Abständen könnte zu einer Fluoreszenzabnahme auf der 100 ns Zeitskala führen.

Aus den Absorptionmessungen im infraroten Spektralbereich ist bekannt, dass sich mit 54 ns die native Struktur bildet. Da in den Fluoreszenzmessungen eine sehr ähnliche Zeitkonstante gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass die Fluoreszenzänderung durch die Faltung des Peptids zustande kommen. Damit finden die aromatischen Aminosäuren, welche maßgeblich für die Stabilität der  $\beta$ -hairpin-Struktur verantwortlich sind gleichzeitig mit den Interstrang-Wasserstoffbrücken ihre endgültige Position.

## 7.2 Entfaltung

Die Änderung der Fluoreszenz bei der Entfaltung von photostationärem cis-Azo-Chignolin nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 430 nm ist in Abbildung 7.2 dargestellt.

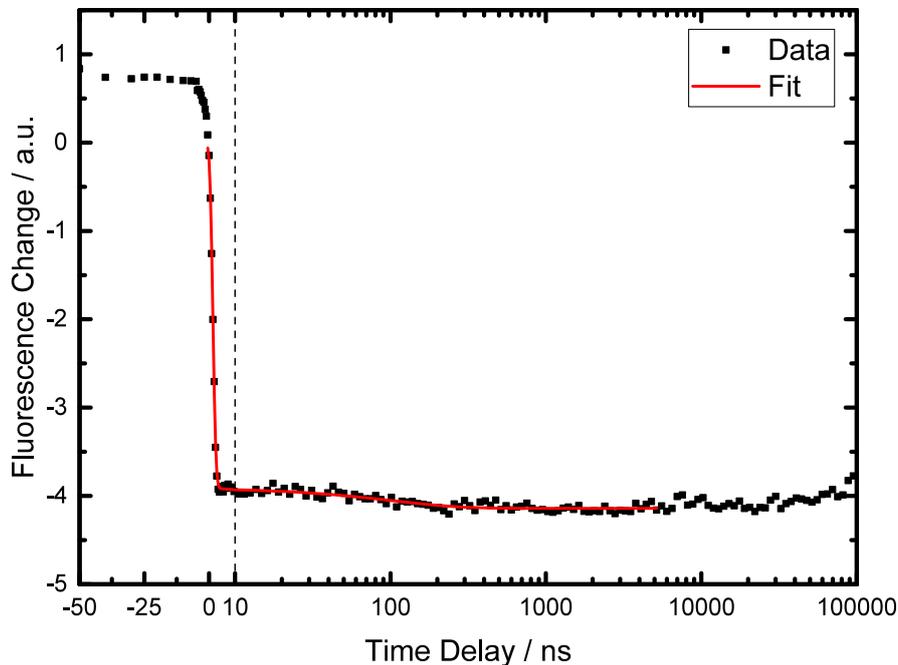
Am Zeitnullpunkt ist der erwartete sehr starke Rückgang der Fluoreszenz zu beobachten. Dieser stammt von der geänderten Reabsorption von AMPP, sowie dem deutlich effizienteren FRET von Tryptophan auf trans-AMPP.

Im weiteren Zeitverlauf ist nur noch eine sehr schwache Abnahme der Fluoreszenz auf der 100 ns Zeitskala zu beobachten.

Die Anpassung von Gleichung 4.6 an Die Datenpunkte von 0 ns bis 5000 ns liefert eine Zeitkonstante, sowie einen Offset. Als Zeitkonstante liefert der Fit  $\tau = 105$  ns mit einer kleinen Amplitude von  $a = 0,23$  und einen Offset von  $a_O = 4,1$ . Die Anpassung ist in Abbildung 7.2 als rote Linie dargestellt.

Mit der Zeitkonstante von 105 ns findet das Ensemble seine stationäre trans-Konfiguration und zusätzlich stacken die Tryptophane auf einen Ring von AMPP, wodurch die Fluoreszenz nochmals abnimmt.

Aus den Absorptionmessungen im infraroten Spektralbereich ist bekannt, dass die Interstrang-Wasserstoffbrücken und damit die  $\beta$ -hairpin Struktur nur wenige Nanosekunden nach der Anregung nicht mehr vorhanden sind. Die zwei Stränge des Peptids unterliegen nun der Diffusion im Lösungsmittel. Aus MD-Simulationen ist bekannt, dass der mittlere Abstand zwischen AMPP und Tryptophan im trans-Ensemble etwas



**Abbildung 7.2: Zeitaufgelöste Änderungen der Trp-Fluoreszenz bei der Entfaltung** Gezeigt ist die Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz während der Entfaltung von AzoChignolin. Von  $-50$  ns bis  $10$  ns ist die Zeitachse linear, danach ist sie logarithmisch. Die große Abnahme der Fluoreszenz am Zeitnullpunkt ist auf die größere Reabsorption der Emission von trans-AzoChignolin und einen deutlich effizienteren FRET im trans zurückzuführen.

kleiner ist als im cis (siehe Abbildung 5.10). Es liegt nun die Vermutung nahe, dass mit der Zeitkonstante von  $105$  ns, welche mit der Fluoreszenzspektroskopie gemessen wurde, diese Änderung des mittleren Abstandes vom cis- ins trans-Ensemble stattfindet.

Um die Fluoreszenzänderung durch die Änderung der Abstandsverteilung von cis nach trans zu berechnen, wird das Fluoreszenzsignal zu kleinen Verzögerungszeiten nach der Isomerisierung ( $0 < t_D \ll 105$  ns, wo die Abstandsverteilung noch dem cis-Ensemble ähnelt) mit dem von großen Verzögerungszeiten ( $t_D \gg 105$  ns, wo die Abstandsverteilung des trans-Ensembles erreicht ist) verglichen.

Für das Signal zu kleinen Verzögerungszeiten wird die Fluoreszenz mit der Abstandsverteilung des stationären cis-Ensembles und dem Förster-Radius von trans-AMPP, mit Gleichung 5.3 berechnet. Dies geschieht unter der Annahme, dass direkt nach der Isomerisierung nach trans die Abstandsverteilung von AMPP und

Tryptophan noch sehr große Ähnlichkeiten mit dem des stationären cis-Ensembles hat. Für das Signal bei großen Verzögerungszeiten wird die Fluoreszenz mit der Abstandsverteilung des stationären trans-Ensembles und mit dem Förster-Radius von trans-AMPP, nach Gleichung 5.3 berechnet.

Unter Berücksichtigung der tatsächlichen Anzahl geschalteter Moleküle im Experiment (7,1 %) erhält man eine erwartete Signaländerung von  $\Delta F_{\text{theo}} = 1,7\%$ . Im Experiment wurde eine Änderung von  $\Delta F_{\text{exp}} = 5,5\%$  gemessen.

Diese Werte zeigen eine gute Übereinstimmung. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass in diesem Experiment nicht die Entfaltung der  $\beta$ -hairpin Struktur beobachtet wurde (die innerhalb weniger Nanosekunden in der Zeitauflösung des Experiments abläuft), sondern nur die anschließende Änderung der Abstandsverteilung von Tryptophan und AMPP aufgrund von Diffusionsprozessen nach Auflösung der  $\beta$ -hairpin Struktur.

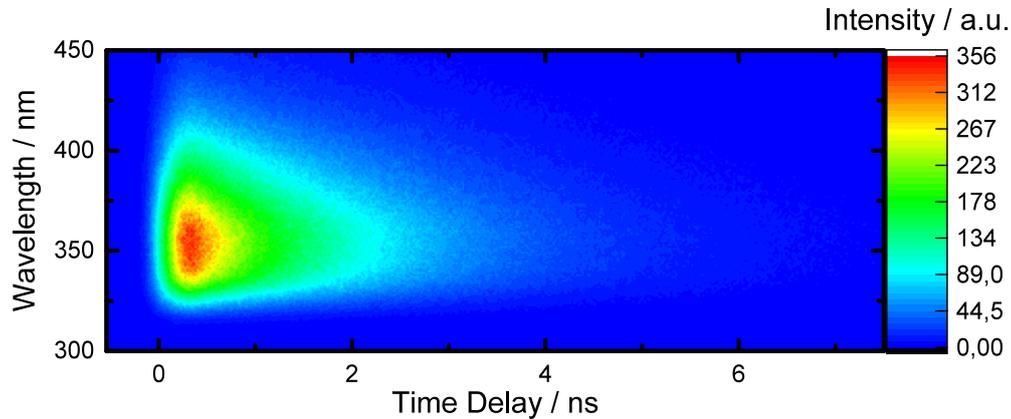
Bei den IR Absorptionsmessungen im Nanosekunden-Zeitbereich in der Amid-I' Bande wurde nur eine Zeitkonstante von 34 ns festgestellt. Diese ist in den Fluoreszenzdaten nicht vorhanden. Wie schon oben erwähnt beobachten die Fluoreszenz und die IR Absorption unterschiedliche Observablen. Die Fluoreszenz ist sensitiv auf den Abstand zwischen Tryptophan und AMPP und die IR Absorption auf Änderungen der Wasserstoffbrückenumgebung.

### 7.3 Streak-Kamera Messungen

Um die Ergebnisse der Messungen in Kapitel 7.1 und 7.2 besser zu verstehen, wurden zusätzlich Messungen mit einer Streak-Kamera an einem Tryptophan-Azobenzol-Gemisch sowie an trans- und cis-AzoChignolin durchgeführt.

Die Fluoreszenz des Tryptophan-Azobenzol-Gemisch ist spektral und zeitlich aufgelöst in Abb. 7.3 dargestellt. Es wurden Tryptophan und Azobenzol mit gleicher Konzentration von je 80  $\mu\text{M}$  in Methanol gelöst, um möglichst identische Absorptionseigenschaften wie im Peptid zu erreichen. Dies entspricht einer optischen Dichte im Maximum von  $\text{OD} = 0,1$  bei der benutzten Schichtdicke von 0,5 mm. Damit ist die Reabsorption des Fluoreszenzlichtes zu vernachlässigen. Bei diesen Konzentrationen beträgt der mittlere Teilchenabstand  $d = \sqrt[3]{1/(160 \mu\text{M} \cdot N_A)} = 21,8 \text{ nm} \gg R_0$ . Die FRET-Effizienz ist bei diesem Abstand  $E(21,8 \text{ nm}) = 1,4 \cdot 10^{-6}$ . Somit ist FRET ebenfalls vernachlässigbar und die Messung zeigt die Fluoreszenz von reinem Tryptophan.

Nach der Anregung mit einem Laserimpuls der Wellenlänge 260 nm ist Fluoreszenz zwischen 325 nm und 400 nm zu beobachten, die nach etwa 6 ns vollständig zerfallen ist. Ihr Maximum liegt bei etwa 350 nm. Eine globale Anpassung liefert zwei Zerfalls-



**Abbildung 7.3: Zeitaufgelöste Fluoreszenz von Tryptophan in Methanol** Es ist die zeitaufgelöste Emission von Tryptophan in Methanol nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 260 nm dargestellt.

zeiten mit den zugehörigen DAS<sup>2</sup>. Die Zeitkonstanten und relativen Amplituden sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst. Die relative Amplitude berechnet sich:  $\alpha_i = \frac{A_i}{\sum_j A_j}$ .

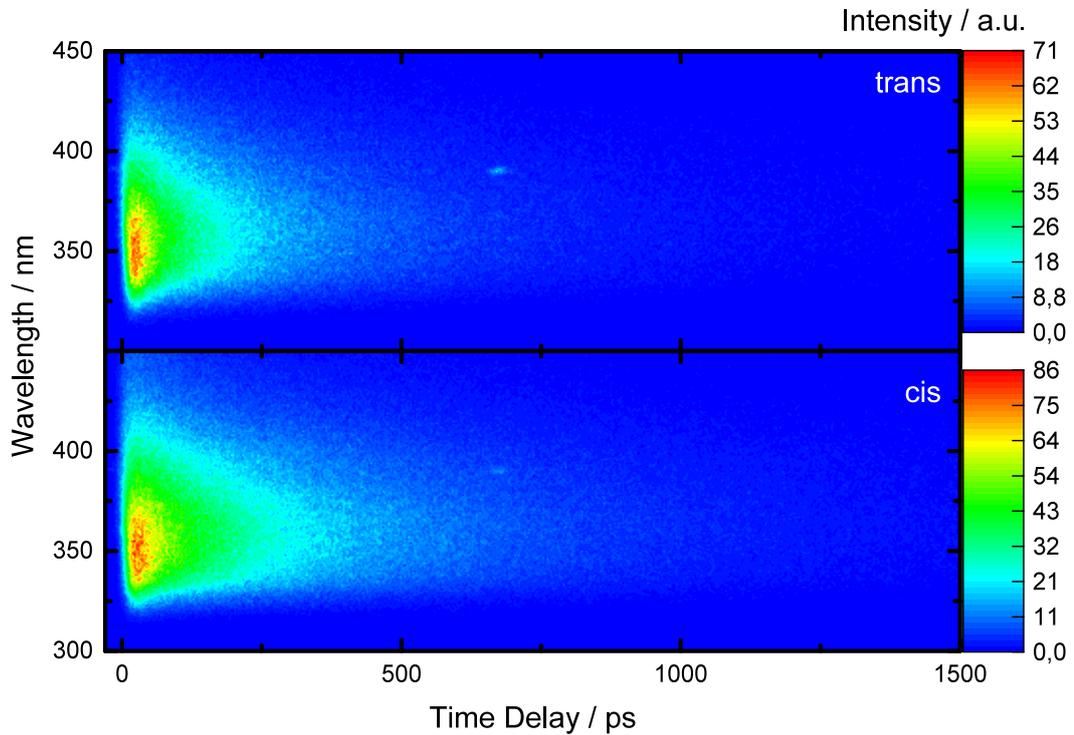
Die kurze Zeitkonstante  $\tau_1 = 350$  ps hat das Maximum im DAS bei etwa 345 nm mit einer relativen Amplitude von  $\alpha_1 = 0,28$ . Die lange Zeitkonstante  $\tau_2 = 1,71$  ns hat das Maximum im DAS bei etwa 355 nm mit einer relativen Amplitude von  $\alpha_2 = 0,72$ . Das DAS der langen Zeit ist im Vergleich zur Kurzen sehr ähnlich, aber um etwa 10 nm rotverschoben. Die kurze Zeitkonstante liegt im Bereich der Zeitauflösung des Experiments von etwa 300 ps. Sie konnte aber in einem kürzeren Zeitfenster der Streak-Kamera mit einer Zeitauflösung von 20 ps bestätigt werden. Die DAS sind im Anhang A.8 zu finden.

Die zeitlich und spektral aufgelöste Emission von trans- und cis-AzoChignolin ist in Abb. 7.4 dargestellt. Diese Messungen wurden in einem kleineren Zeitfenster

<sup>2</sup>Decay Associated Spectrum

**Tabelle 7.1: Zeitkonstanten und Amplituden der Fluoreszenz von AzoChignolin und Tryptophan**

	$\tau_1$	$\alpha_1$	$A_1$	$\tau_2$	$\alpha_2$	$A_2$
Tryptophan-AB-Gemisch	350 ps	0,28	125	1,71 ns	0,72	329
trans-AzoChignolin	100 ps	0,77	52,8	530 ps	0,23	15,5
cis-AzoChignolin	130 ps	0,67	56,0	560 ps	0,33	28,1



**Abbildung 7.4: Zeitaufgelöste Tryptophan-Fluoreszenz von trans- und cis-AzoChignolin**  
 Es ist die zeitaufgelöste Emission von trans- und cis-AzoChignolin nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 260 nm dargestellt.

aufgenommen als die Tryptophan-Azobenzol Probe, deshalb liegt die Zeitauflösung bei diesen Messungen bei etwa 20 ps. Die Fluoreszenz ist wie für das Tryptophan-Azobenzol-Gemisch zwischen 325 nm und 400 nm zu finden. Sie fällt in beiden Fällen aber deutlich schneller ab und ist nach etwa einer Nanosekunde nicht mehr vorhanden. Bei trans-AzoChignolin ist weniger Fluoreszenz als bei cis-AzoChignolin beobachtbar.

Werden das trans- und cis-Spektrum jeweils aufintegriert so erhält man wie erwartet die cw-Spektren. Für das trans-Spektrum erhält man für das Integral über das gesamte Spektrum einen Wert von etwa 269 000 au für das cis-Spektrum einen Wert von ca. 486 000 au. Dies entspricht einem Verhältnis von 1,8. Die stationären Spektren lieferten ein Verhältnis von 1,6, was gut übereinstimmt.

Die globale Datenanpassung liefert jeweils zwei Zeitkonstanten mit den dazugehörigen DAS. Für trans-AzoChignolin liefert der Fit eine kurze Zeitkonstante  $\tau_1 = 100$  ps mit einer relativen Amplitude  $\alpha_1 = 0,77$  und eine lange Zeitkonstante  $\tau_2 = 530$  ps mit einer relativen Amplitude  $\alpha_2 = 0,23$ . Für cis-AzoChignolin ergeben sich sehr

ähnliche Zeitkonstanten:  $\tau_1 = 130$  ps mit einer relativen Amplitude  $\alpha_1 = 0,67$  und  $\tau_2 = 560$  ps mit einer relativen Amplitude  $\alpha_2 = 0,33$ .

Es ist auffällig, dass beide Zeitkonstanten im Peptid in trans und cis jeweils fast gleich groß sind, sich allerdings die Amplitudenverhältnisse ändern. Werden die Emissionsdaten mit dem freien Tryptophan verglichen, so stellt man fest, dass die Zeiten im Peptid um den Faktor 3 kürzer sind als bei Tryptophan und sich die Amplitudenverhältnisse komplett umkehren.

Die vorherigen Überlegungen, dass FRET dafür die Ursache als weiterer Zerfallskanal des angeregten Zustandes ist, werden jetzt weiter quantifiziert. Aus der gemessenen Rate wird dabei für beide Isomerisationszustände der mittlere Abstand bestimmt und die gemessenen Amplituden mit rechnerisch bestimmten Werten verglichen.

Zuerst wird die lange Zeitkonstante  $\tau_2$  betrachtet. Die FRET-Rate lässt sich unter Vernachlässigung der Fluoreszenzrate nähern als  $k_T(r) = 1/\tau_2$  und berechnet sich folgendermaßen [Lak06]:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (7.2)$$

mit der Lebenszeit des angeregten Zustandes des Donors in Abwesenheit des Akzeptors  $\tau_D$ , dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor  $r$  und dem Förster-Radius  $R_0$ . Es werden hier die Werte für den Förster-Radius aus Abschnitt 5.3 verwendet.

Die Vernachlässigung der Fluoreszenzrate lässt sich mit den großen FRET-Effizienzen rechtfertigen. Da diese größer 90 % sind wird die Entvölkerung des angeregten Zustandes durch FRET dominiert und die Entvölkerung durch Fluoreszenz spielt eine geringe Rolle.

Nachdem  $\tau_2$ ,  $\tau_D$  und  $R_0$  bekannt sind lässt sich mit Gleichung 7.2 der Abstand zwischen Tryptophan und Azobenzol im Peptid berechnen und mit den Abständen aus den Strukturen der MD-Simulation vergleichen.

Durch Umformen von Gl. 7.2 erhält man einen Ausdruck für den Abstand  $r$ :

$$r = \frac{R_0}{\sqrt[6]{k_T(r) \cdot \tau_D}} \quad (7.3)$$

Damit lassen sich die Abstände in cis und trans im Peptid berechnen. Im trans erhält man  $r_{\text{trans}} = 19,7$  Å. Dieser Abstand entspricht dem Abstand von Tryptophan zu AMPP in sehr gestreckten Strukturen. Dies ist damit zu erklären, dass bei den kompakteren Strukturen durch den großen Förster Radius von 23,9 Å ein deutlich effizienterer FRET stattfindet und diese in den Fluoreszenzdaten dadurch nicht vorhanden sind.

Der Abstand im cis berechnet sich zu  $r_{\text{cis}} = 14,2$  Å. Dieser Wert passt zu entfalteten cis-Strukturen. Da der Abstand von Tryptophan zu AMPP in entfalteten Struktu-

ren größer sein kann als bei den gefalteten, dominieren vermutlich die gestreckten entfalteten Strukturen die Fluoreszenz, da der FRET auf AMPP bei ihnen die Fluoreszenz am wenigsten quencht.

Aus MD-Simulationen ist bekannt, dass im trans in 38 % der Fälle das Tryptophan mit einem Ring von AMPP  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingeht. Aus dem resultierenden sehr kleinen Abstand zwischen Tryptophan und AMPP kann man auf eine hundert prozentige FRET-Effizienz schließen. Das bedeutet, dass solch gestackte Tryptophane nicht fluoreszieren, da sie alle ihre Energie auf das AMPP übertragen.

Im Umkehrschluss sieht man also im trans nur 62 % der Tryptophane in der Fluoreszenz, wodurch im trans die kleine Amplitude des DAS von  $\tau_2$  im Vergleich zu cis erklärt werden kann. Vergleicht man die Amplituden  $A_{\tau_2}$  der DAS von trans- und cis-AzoChignolin des Experiments so ergibt sich, dass ca. 45 % der Tryptophane, im trans nicht sichtbar sind. Auch dieser Wert passt gut zum theoretisch berechneten Wert aus MD-Simulationen von 38 %.

Diese Überlegungen werden nun ebenfalls für die kurze Zerfallszeit  $\tau_1$  gemacht. Der Försterradius für die kurze Zerfallszeit  $\tau_1$  des angeregten Zustandes lässt sich über das Verhältnis der Fluoreszenz von kurzer zu langer Zeitkonstante abschätzen. Die gesamte Fluoreszenzquantenausbeute von Tryptophan setzt sich aus der der kurzen und der der langen Zeit zusammen  $\Phi_{ges} = \Phi_{\tau_1} + \Phi_{\tau_2}$ , wobei die Quantenausbeute proportional zur jeweiligen Fluoreszenzintensität ist  $\Phi_i \propto \tau_i \cdot A_i$ . Daraus ergeben sich Quantenausbeuten von  $\Phi_{\tau_1} = 1$  % und  $\Phi_{\tau_2} = 12$  %.

Mit diesen Quantenausbeuten lassen sich die Förster-Radien für  $\tau_1$  und  $\tau_2$  nach Gleichung 5.1 berechnen.

$$\begin{aligned} R_{0,trans}^{\tau_1} &= 15,8 \text{ \AA} & R_{0,trans}^{\tau_2} &= 23,9 \text{ \AA} \\ R_{0,cis}^{\tau_1} &= 11,3 \text{ \AA} & R_{0,cis}^{\tau_2} &= 17,1 \text{ \AA} \end{aligned}$$

Wie erwarten sind die Förster-Radien für  $\tau_2$  gleich den Radien, die in Abschnitt 5.3 aus den stationären Fluoreszenzspektren berechnet wurden. Dies liegt daran, dass die stationären Spektren von der langen Zeitkonstante  $\tau_2$  dominiert sind.

Mit diesen Förster-Radien kann man die Änderung der Amplituden der zwei Zerfälle von Tryptophan im Peptid in cis und trans im Vergleich zu Tryptophan in Lösung berechnen. Dies geschieht analog zur Auswertung der stationären Charakterisierung in Abschnitt 5.3, wo die stationären Amplituden von cis und trans berechnet wurden.

Jetzt wird die Abstandsverteilung aus der MD-Simulation benutzt um in cis und trans jeweils das Verhältnis der Amplituden von  $\tau_1$  zu  $\tau_2$  auszurechnen.

Für die Amplituden im trans ergeben sich folgende Werte:

$$A_{\tau_1}^{trans} = 0,157 \qquad A_{\tau_2}^{trans} = 0,021$$

Dies entspricht einem Verhältnis von 7,5. Im Experiment wurde ein Verhältnis  $(A_{\tau_2}/A_{\tau_1})_{trans} = 3,4$  gemessen.

Für cis erhält man folgende Werte:

$$A_{\tau_1}^{cis} = 0,556 \qquad A_{\tau_2}^{cis} = 0,156$$

Dies entspricht einem Verhältnis von 3,6. Im Experiment wurde ein Verhältnis von  $(A_{\tau_2}/A_{\tau_1})_{cis} = 1,6$  gemessen. Das errechnete Verhältnis der Amplituden liegt etwa um den Faktor 2 über den gemessenen.

Somit kann das stark geänderte Amplitudenverhältnis zwischen Tryptophan in Lösung zu Tryptophan im Peptid im wesentlichen durch FRET erklärt werden. Die kurze Zeitkonstante hat nach diesen Berechnungen und im Experiment eine deutlich stärkere Amplitude als die lange Zeitkonstante, da für die kurze Komponente der Förster-Radius kleiner und damit das Quenching viel schwächer ist.

Die Änderungen der Fluoreszenz von Tryptophan bei der Faltung und Entfaltung von AzoChignolin können ganz wesentlich auf FRET zurückgeführt werden. Sie stammen also nicht von der Ausbildung der  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Tyrosin und Tryptophan. Vielmehr zeigen die Experimente dass die Fluoreszenzänderungen vermutlich alleine von der Änderung des Abstandes zwischen Tryptophan und AMPP kommen und durch FRET auf AMPP bestimmt sind.

Dennoch lässt sich aus den Emissionsmessungen schließen, dass sich bei der Faltung die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Strängen gleichzeitig mit der Ausbildung der Interstrang-Wasserstoffbrücken geschieht. Da sich die Fluoreszenzänderung mit der gleichen Zeitkonstante wie die Absorptionsänderung im infraroten einstellt. Das heißt, dass das Tryptophan mit dieser Zeitkonstante seine endgültige Position einnimmt.



## 8 Modell der Faltung und Entfaltung

Basierend auf den Daten aus der zeitaufgelösten Infrarotspektroskopie aus Kapitel 6 und den zeitaufgelösten Emissionsmessungen aus Kapitel 7 wird im Folgenden ein Modell für die Faltung und Entfaltung von AzoChignolin entwickelt sowie die Rolle der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Tyrosin und Tryptophan in AzoChignolin bei der Faltung anhand der Daten der Y2V- und Y2W-Mutanten mit Blick auf das Modell analysiert.

### 8.1 AzoChignolin

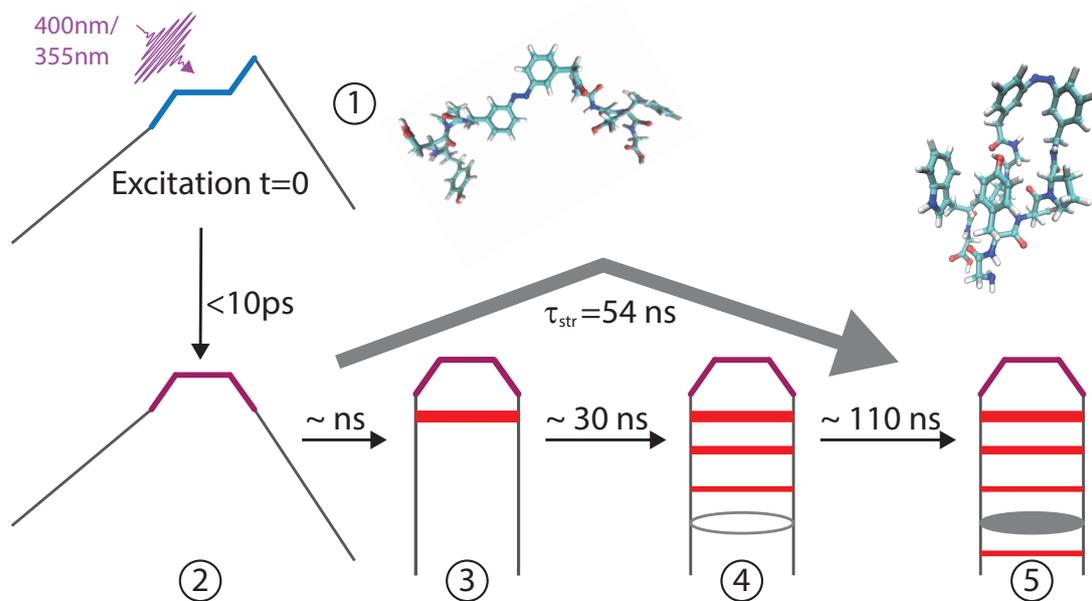
Wie schon in Kapitel 6 und 7 beschrieben, findet die Faltung von AzoChignolin und seiner Mutanten auf deutlich schnelleren Zeitskalen statt, als die von bisher untersuchte  $\beta$ -hairpin Peptiden [Pop12]. Diese Peptide zeigen Faltungszeiten im Bereich von vielen Mikrosekunden. Die Faltung von AzoChignolin ist dagegen schon nach weniger als 1000 ns vollständig abgeschlossen.

#### 8.1.1 Faltung

Die Absorptionsänderungen im infraroten Spektralbereich stammen hauptsächlich von Änderungen der Wasserstoffbrückenbindungen am Peptidrückgrat. Die Fluoreszenzspektroskopie liefert dagegen Informationen zum Abstand von AMPP und Tryptophan. Im gefalteten cis-Zustand ist dieser Abstand im Mittel größer als im ungefalteten trans-Zustand und der spektrale Überlapp ist kleiner. Deshalb ist die Tryptophan-Fluoreszenz im cis-Zustand relativ hoch. Aufgrund von Quenching der Tryptophan-Fluoreszenz durch FRET von Tryptophan auf AMPP nimmt die Fluoreszenz im trans ab. Im entfalteten trans-Zustand liegt außerdem das Tryptophan in 38% der Fälle auf einem der Phenylringe von AMPP und es findet ein sehr effektiver Energietransfer von Tryptophan auf AMPP statt. Die Emission von Tryptophan ist im trans-Zustand geringer als im cis.

Aus den Ergebnissen der beiden Messmethoden soll nun ein Modell der Faltung von AzoChignolin erstellt werden, welches schematisch in Abbildung 8.1 dargestellt ist. Die Nummerierung im folgenden Text bezieht sich auf Abbildung 8.1.

Nach Anregung des ungefalteten Moleküls ① findet auf der ps-Zeitskala die Isomerisierung von AMPP innerhalb weniger Pikosekunden statt ②. Anschließend gibt es Änderungen in der direkten Lösungsumgebung, die sich innerhalb von etwa 30 ps auf die neue Konformation des Schalters einstellt.



**Abbildung 8.1: Schematische Darstellung der Struktur von AzoChignolin während der Faltung.** Innerhalb weniger Pikosekunden nach der Anregung ist die Isomerisierung von trans-AMPP (blau) ① nach cis (violett), sowie die Resolvatisierung der geänderten Struktur im Lösungsmittel abgeschlossen ②. Einige Nanosekunden später entstehen die ersten sehr starken Wasserstoffbrücken (rot) in der Nähe des Schalters ③. Mit einigen zehn Nanosekunden (es gibt eine breite Verteilung an Zerfallszeiten) bilden sich weitere Wasserstoffbrücken zu den Termini hin aus und Tyrosin und Tryptophan nähern sich an (durch graue Ellipse angedeutet) ④. Mit diesem Prozess bildet sich die hairpin-Struktur. Mit 110 ns finden die Interstrang-Wasserstoffbrücken ihren nativen Zustand und Tyrosin und Tryptophan bilden das hydrophobe Cluster (ausgefüllte graue Ellipse). Das  $\beta$ -hairpin Peptid hat damit innerhalb weniger 100 ns seine native Form erreicht ⑤. Oben links ist eine offene trans-Struktur ① welche vor der Isomerisierung des AMPP vorliegt und rechts ist eine gefaltete cis-Struktur ⑤ nach der Isomerisierung aus MD-Simulationen von Christina Frost, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Zacharias, Lehrstuhl für Theoretische Biophysik (T38) - Molekulardynamik, TU München.

Die Tryptophane, die auf einem der Ringe von AMPP stacken, lösen sich mit einer Zeitkonstante von 11 ns von AMPP. Die nun beweglichen Stränge kommen sich nach wenigen Nanosekunden näher wobei in der Nähe des Schalters die ersten sehr starken Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen entstehen ③.

Die Bildung der Interstrang-Wasserstoffbrücken setzt sich nun zu den Termini hin fort wodurch Tyrosin und Tryptophan in Kontakt kommen ④. Die native  $\beta$ -hairpin Struktur bildet sich bei Raumtemperatur mit einer Zeitkonstante  $\tau_{\text{str}} = 54$  ns und einem Streckfaktor  $\beta = 0,68$ . Nach wenigen 100 ns ist die Faltungsreaktion vollständig abgeschlossen und das Peptid liegt in seiner nativen Struktur vor ⑤.

Der Zeitverlauf der Bildung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidsträngen lässt sich mit einer gestreckten Exponentialfunktion anpassen. Dieses Verhalten deutet auf ‘Downhill Folding’ hin [SEG99, Gar02]. Dabei findet das Peptid seine native Struktur indem es auf einer rauen Energielandschaft ohne nennenswerte Energiebarrieren ( $>3RT$ ), entlang des größten Gradienten diffusiv zum globalen Minimum der nativen Struktur gelangt (in Abbildung 8.5 wird eine solche Energielandschaft skizziert). In der Literatur herrscht die Meinung vor, dass nur sehr kleine Peptide downhill folder sein können. Diese finden ihre native Struktur wesentlich schneller als solche, die Energiebarrieren überwinden müssen [GG14]. Diese zwei Merkmale sind bei AzoChignolin erfüllt: es besteht aus nur acht Aminosäuren und AMPP und es faltet sehr schnell mit einer Zeitkonstante von nur 54 ns.

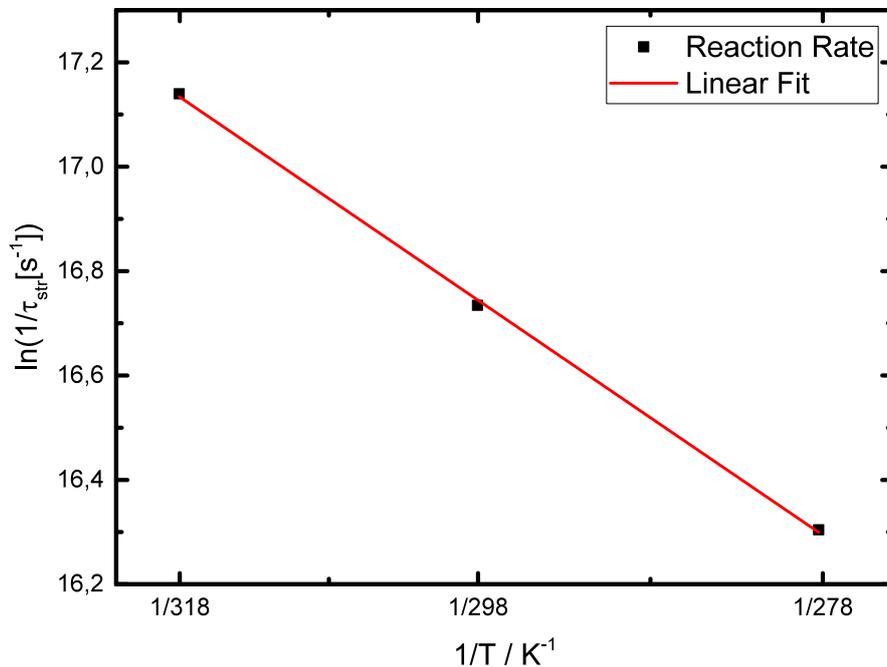
Die Zeitkonstanten aus den Anpassungen mit einer gestreckten Exponentialfunktion zeigen eine Temperaturabhängigkeit. Das Peptid faltet mit steigender Temperatur schneller. Diese Temperaturabhängigkeit stammt von der Rauheit der Energielandschaft [SEG99].

Nimmt man anstatt des Modells eines downhill folders ein Zwei-Zustands-Modell an, so lässt sich mithilfe der Arrhenius-Theorie [Arr89] eine Enthalpiebarriere  $\Delta H^+$  aus der Temperaturabhängigkeit der Reaktionsrate  $k(T) = \frac{1}{\tau_{\text{str}}(T)}$ , mit Gleichung 8.1, berechnen.

$$\begin{aligned} k(T) &= \tilde{k}_0 \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G^+}{RT}\right) = \tilde{k}_0 \cdot \exp\left(\frac{\Delta S^+}{R}\right) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta H^+}{RT}\right) = \\ &= k_0 \cdot \exp\left(-\frac{\Delta H^+}{RT}\right) \end{aligned} \quad (8.1)$$

mit der allgemeinen Gaskonstante  $R$ , der absoluten Temperatur in Kelvin  $T$  und dem präexponentiellen Faktor  $k_0$ , in dem der entropische Anteil  $\Delta S^+$  der freien Enthalpie enthalten ist [Dee14].

Wird der Logarithmus der Reaktionsraten gegen die reziproke Temperatur aufgetragen, so ergibt sich nach der Arrhenius-Theorie eine Gerade, aus deren Steigung  $m$  sich durch Umformen von Gleichung 8.1 die Enthalpiebarriere berechnen lässt. Für Messungen bei zwei Temperaturen ergibt sich:



**Abbildung 8.2: Arrhenius-Plot der Faltungsreaktion von AzoChignolin** Die Arrhenius-Auswertung der Faltungsreaktion von AzoChignolin nach Gleichung 8.2 ergibt eine Enthalpiebarriere von  $\Delta H_F^\ddagger = 15,3 \text{ kJ/mol}$ . Da die Reaktionsrate aus der Zeitkonstante aus der Anpassung der zeitaufgelösten IR Absorptionsänderungen berechnet wird (siehe Tabelle 6.3), hat sie einen großen Fehler von etwa 30 %. Dennoch ist die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit relativ genau.

$$\Delta H^+ = -\frac{\ln\left(\frac{\tau(T_1)}{\tau(T_2)}\right)}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \cdot R = -m \cdot R \quad (8.2)$$

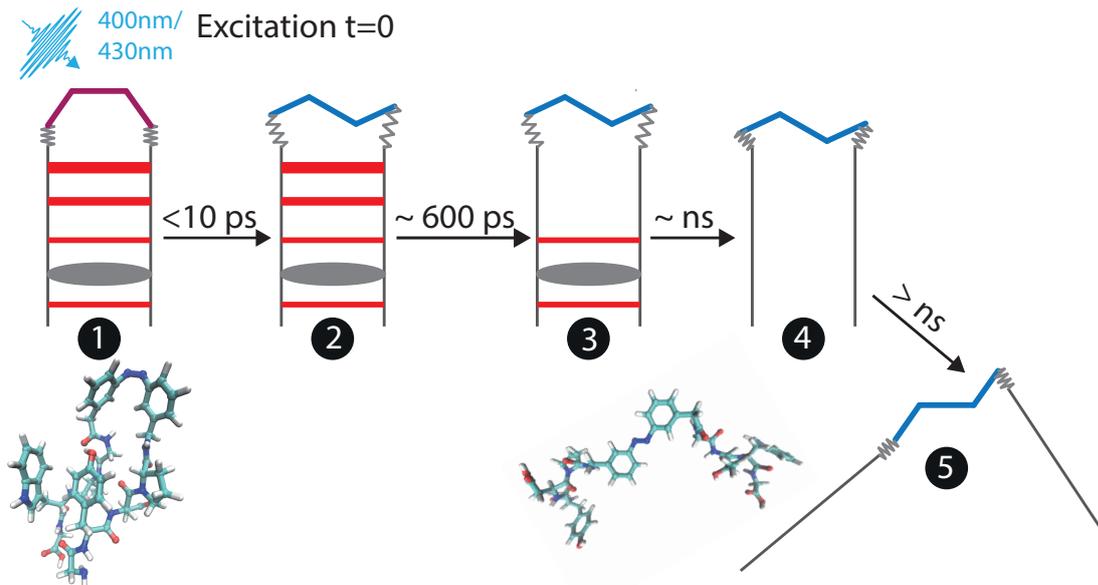
Abbildung 8.2 zeigt den Arrhenius-Plot, aus dem sich eine Barriere von  $\Delta H^+ = 15,3 \text{ kJ/mol}$  für das Zwei-Zustands-Modell von AzoChignolin ergibt.

Diese Energiebarriere entspricht keiner echten Barriere während des Downhill Foldings. Sie ist als Summe der Unebenheiten in der Potentialfläche auf dem Faltungspfad zu verstehen.

### 8.1.2 Entfaltung

Aus den Absorptions- und Emissionsmessungen der cis nach trans Reaktion lässt sich auch ein Modell für die Entfaltung der  $\beta$ -hairpin-Struktur entwickeln.

Die schematischen Strukturänderungen während der Entfaltung von AzoChignolin sind in Abbildung 8.3 dargestellt. Die verwendete Nummerierung findet sich im Text wieder.



**Abbildung 8.3: Schematische Darstellung der Struktur von AzoChignolin während der Entfaltung** Nach der Anregung ist innerhalb weniger Pikosekunden die Isomerisierung von cis-AMPP (violett) ❶ nach trans (blau) ❷ abgeschlossen. Die Linkergruppen (gestreckte Federn) zwischen AMPP und den Peptidsträngen sind noch nicht im Grundzustand, da die Ausdehnung von trans-AMPP zu groß ist für die noch gefaltete Struktur ❷. Mit ca. 600 ps brechen die ersten Wasserstoffbrücken (rot) in der Nähe des Schalters auf ❸. Nach wenigen Nanosekunden sind genügend viele Interstrang-Wasserstoffbrücken aufgebrochen, dass sich die Linker wieder in den Grundzustand zurückkehren können (entspannte Federn), da die Struktur jetzt flexibel genug ist, um sich dem trans-AMPP anzupassen ❹. Kurze Zeit später sind keine nativen Wechselwirkungen zwischen den Strängen mehr vorhanden. Die jetzt freien Stränge unterliegen der Diffusion im Lösungsmittel und nehmen langsam auf der hundert Nanosekunden Zeitskala ungeordnete Strukturen ein. Das Peptid hat nun eine vollständig entfaltete Struktur erreicht ❺. Unten sind die errechnete gefaltete Ausgangsstruktur, sowie eine ungefaltete, gestreckte Struktur abgebildet.

Nach der Anregung von gefaltetem cis-AzoChignolin ❶ findet die Isomerisierung nach trans-AMPP innerhalb weniger Pikosekunden statt ❷. Die Peptidstränge können der schnellen und starken Konformationsänderung von AMPP nicht folgen, deshalb

wirken große Kräfte auf die Linkergruppen, die das Azobenzol und die Peptidstränge verknüpfen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Interstrang-Wasserstoffbrücken und die hydrophoben  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen noch intakt ❷. Mit ca. 600 ps brechen die ersten Interstrang-Wasserstoffbrücken in der Nähe des Schalters auf, da dort die Kräfte am größten sind, die die Stränge des Hairpins auseinanderziehen ❸. Innerhalb der nächsten Nanosekunden brechen die Wasserstoffbrücken der Reihe nach vom Schalter zu den Termini hin mit den  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Tyrosin und Tryptophan auf ❹. Durch die fehlenden nativen Wasserstoffbrücken sind die Peptidstränge jetzt flexibel genug, dass sie der großen Konformationsänderung von trans-AMPP folgen können. Die Linkergruppen sind jetzt entspannt und im Grundzustand angelangt. Ohne die stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen den Peptidsträngen bewegen sich diese unter dem Einfluss der Diffusion im Lösungsmittel. Die Peptide nehmen jetzt die vielen ungeordneten Strukturen des trans-Ensembles ein. Sie sind nun vollständig entfaltet und es gibt keine nativen Wechselwirkungen mehr ❺.

Die Arrhenius-Auswertung der Entfaltung aus den Absorptionsmessungen ergibt eine Enthalpiebarriere  $\Delta H_E^{\ddagger} = 5,3 \text{ kJ/mol}$  (siehe Abbildung 8.4). Dieser Wert ist nur ca. doppelt so groß wie die Energie, die alleine durch die Raumtemperatur zur Verfügung steht ( $R \cdot 300 \text{ K} = 2,5 \text{ kJ/mol}$ ). Damit ist die Enthalpiebarriere bei der Entfaltung als klein einzustufen.

### 8.1.3 Energielandschaften

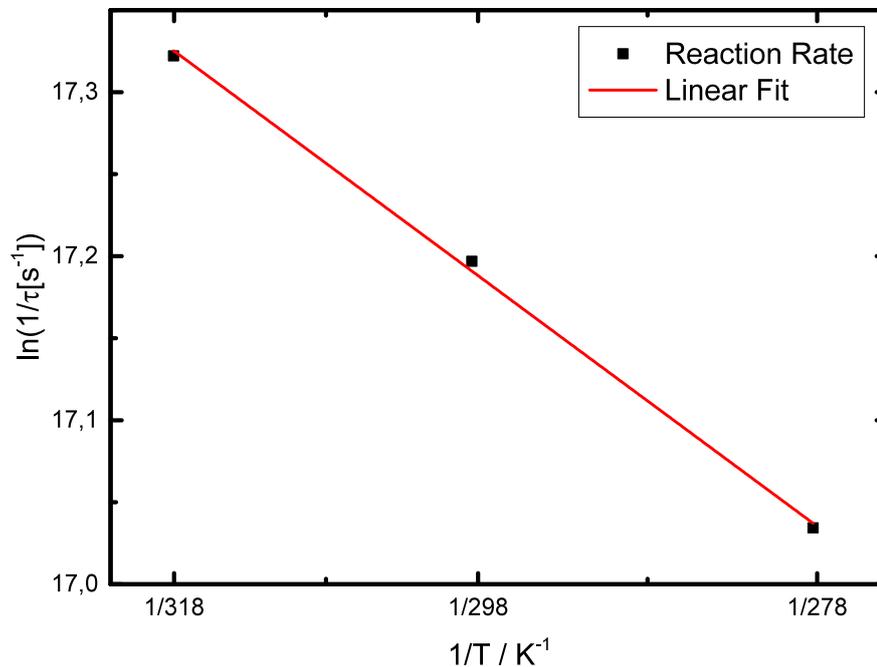
Aus den Messung soll nun auf die Form der Energielandschaft in der Nähe der Faltungs- und Entfaltungspfade geschlossen werden.

#### Faltung

Eine prototypische Energieandschaft für die Faltung ist in Abbildung 8.5 dargestellt. Die Zahlen in Abbildungen 8.5 stimmen mit den Intermediaten der Faltung in Abbildung 8.1 überein.

Zu Beginn der Faltung liegt das Molekül in einer ungefalteten trans-Konformation  $U_t$  vor ❶. Dieses Minimum ist sehr breit, und enthält alle möglichen trans-Strukturen. Nach der Isomerisierung von AMPP nach cis mit Licht der Wellenlänge 355 nm befindet sich das Molekül in einer ungefalteten cis-Konformation  $U_c$  ❷. Nun nimmt das Molekül auf der Energielandschaft den Pfad mit dem größten Gradienten. Dieser Pfad ist abhängig von seinem Startpunkt. Das kann entweder bedeuten, dass das Molekül am Ende in der nativen  $\beta$ -hairpin Struktur vorliegt  $F_c$  ❸ oder einen Pfad nimmt, der nicht in das Minimum der gefalteten Moleküle führt und demnach auch am Ende ungefaltete vorliegt  $U_c$  ❹.

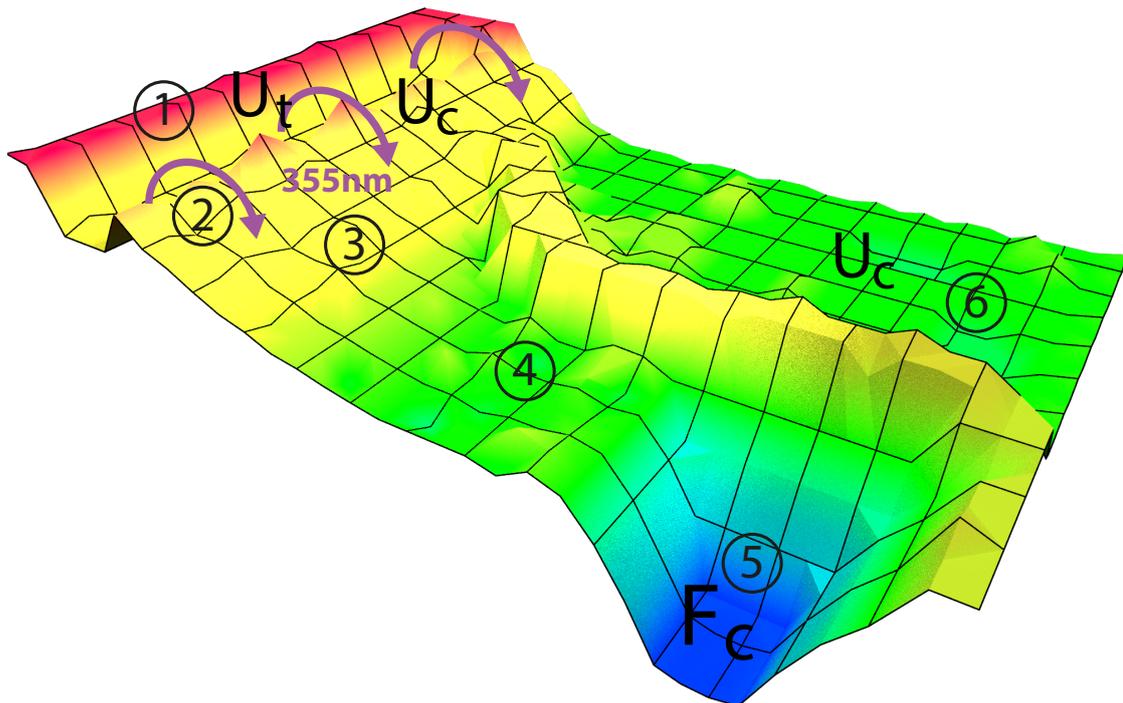
Findet eine Faltung statt, so läuft es auf einem Pfad diffusiv zu kleinerer Energie ❸. Dabei entstehen nach und nach die nativen Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen, ausgehend vom Schalter hin zu den Termini ❹.



**Abbildung 8.4: Arrhenius-Plot der Entfaltung von AzoChignolin** Die Arrhenius Auswertung der Entfaltung von AzoChignolin ergibt eine kleine Enthalpiebarriere von  $\Delta H_E^\ddagger = 5,3 \text{ kJ/mol}$ . Da die Reaktionsrate aus der Zeitkonstante aus der Anpassung der zeitaufgelösten IR Absorptionsänderungen berechnet wird (siehe Abschnitt 6.1.2), hat sie einen großen Fehler. Dennoch ist die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit relativ genau.

Schließlich gelangt das Peptid in das globale Minimum der nativen Struktur  $F_c$  ⑤. Nun ist die Faltungsreaktion vollständig abgeschlossen. Das Peptid hat nun die gefaltete cis-Konformation erreicht. Es gibt sehr viele Pfade, die in das globale Minimum führen. Welcher dieser Pfade gewählt wird, hängt vom Ausgangszustand ab. Durch die große Anzahl an Pfaden, gibt es die breite Verteilung an Zerfallszeiten, die durch die gestreckte Exponentialfunktion ausgedrückt werden.

Findet die Faltung nicht statt, dann läuft das Molekül ebenfalls eine Energielandschaft ohne Barrieren zu kleinerer Energie hinab, aber dieser Pfad führt sehr schnell von der ungefalteten cis-Struktur nach der Anregung in ein großes lokales Minimum, in dem sich alle möglichen ungefalteten cis-Strukturen befinden ⑥. Moleküle, die diesen Pfad nehmen, sind in den vorgestellten Experimenten nur auf der Zeitskala von 10 ps sichtbar, da sich auf dieser Zeitskala die Isomerisierung und anschließend die Solvatationseffekte des Lösungsmittels abspielen.

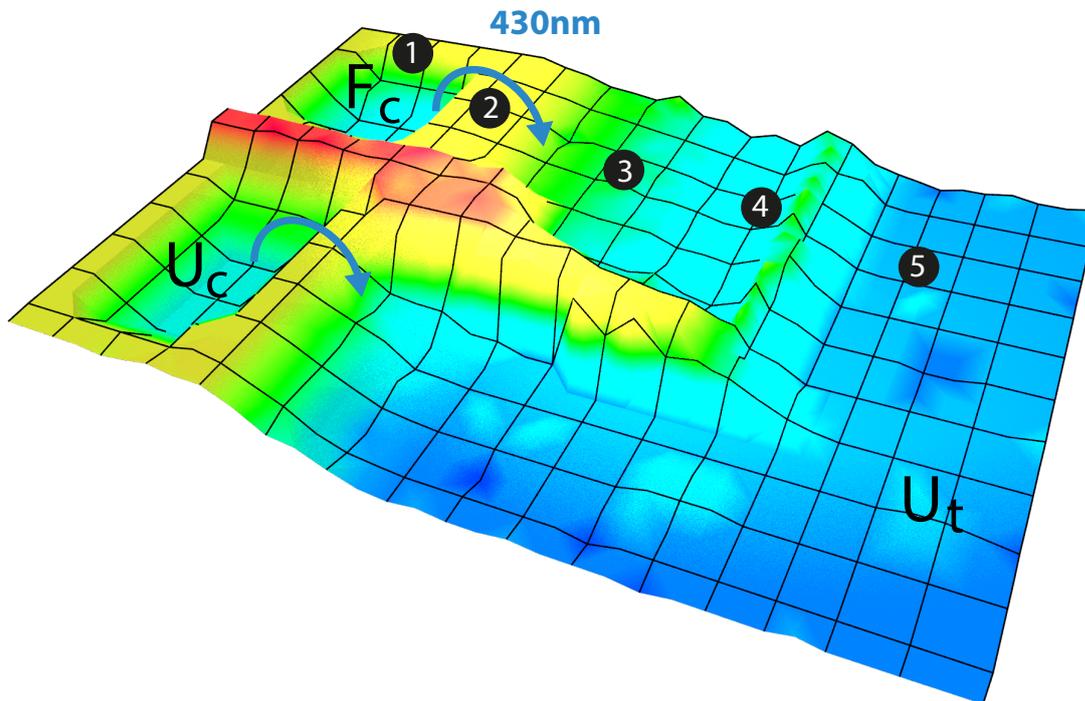


**Abbildung 8.5: Energielandschaft bei der Faltung von AzoChignolin** Ausgehend von ungefalteten trans-Strukturen  $U_t$ , gibt es nach der Isomerisierung zwei mögliche Pfadklassen. Die erste Pfadklasse enthält Pfade, bei denen das Molekül die Faltungsreaktion vollzieht indem es eine raue Energielandschaft hinabläuft während sich die Interstrang-Wasserstoffbrücken bilden (② bis ④) und schließlich im Minimum des nativen gefalteten Zustand  $F_c$  ankommen ⑤. Die andere Pfadklasse führt sehr schnell in ein breites Minimum ungefalteter cis-Strukturen  $U_c$  ⑥. Die ungefalteten cis-Strukturen sind von den gefalteten durch eine Energiebarriere getrennt.

Eine weiterer möglicher Faltungspfad würde über die Energiebarriere führen, die sich zwischen den gefaltete und ungefalteten cis-Peptiden befindet. Würden die Peptide bei der Faltung diese Barriere überwinden, so müsste dies in den Messungen mit einem exponentiellen Zerfall ( $\beta = 1$ ) enthalten sein. Eine solche Dynamik wird in den Daten jedoch nicht gefunden. Damit wird die Faltung vom Downhill Szenario dominiert.

### Entfaltung

Die Energielandschaft der Entfaltung ist in Abbildung 8.6 dargestellt. Die Nummerierung in Abbildung 8.6 stimmen mit den Intermediaten der Entfaltung in Abbildung 8.3 überein.



**Abbildung 8.6: Energielandschaft bei der Entfaltung von AzoChignolin** Im cis-Ausgangszustand liegen gefaltete  $F_c$  und ungefaltete Strukturen  $U_c$  simultan vor. Nach der Isomerisierung nach trans laufen die Reaktionen für beide Strukturen auf unterschiedlichen Pfaden ab. Die Reaktion der ungefalteten Pfade ist in den durchgeführten Experimenten nicht sichtbar. Sie geht vermutlich direkt in das große Minimum der ungefalteten trans-Strukturen  $U_t$ . Die Entfaltungsreaktion der gefalteten Strukturen folgt einer rauen Energielandschaft (2 bis 4) während die Interstrang-Wasserstoffbrücken aufbrechen, wo sie am Ende auf eine sehr kleine Barriere treffen 4, die überwunden werden muss um ins breite Minimum der entfalteten trans Strukturen  $U_t$  zu gelangen 5.

Bei der Betrachtung der Entfaltung muss man von zwei Ausgangszuständen ausgehen: die gefaltete cis-Struktur  $F_c$  und ungefaltete cis-Strukturen  $U_c$ , die zusammen das cis-Ensemble bilden. Nur die gefalteten Moleküle  $F_c$  können eine Entfaltungsreaktion vollziehen.

Die ungefalteten Moleküle  $U_c$  gehen nach der Isomerisierung nach trans sehr schnell in das sehr breite globale Minimum der ungefalteten trans-Strukturen  $U_t$  über. Es finden nur Solvatationseffekte statt, bei der sich das Lösungsmittel auf die neue trans-Konformation des Peptids einstellt. Diese Reaktion ist in den Experimenten nur zu sehr frühen Zeiten mit etwa 30 ps sichtbar, da es später keine Änderung der Wasserstoffbrückenumgebung oder des Quenchings der Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren auftritt.

Findet dagegen die Entfaltungsreaktion der hairpin-Strukturen statt, laufen die gefalteten cis-Strukturen  $F_c$  ❶, nach der Isomerisierung nach trans ❷, innerhalb weniger Nanosekunden eine raue Energielandschaft hinab ❸, auf der sich am unteren Ende eine sehr kleine Energiebarriere befindet ❹ ( $\approx 5$  kJ/mol). Diese stammt von den  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen Tyrosin und Tryptophan. Ist diese Barriere überwunden und die Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäuren sind aufgebrochen, befinden sie sich wieder in Lösungsumgebung. Nun findet durch Diffusion im Lösungsmittel eine Neuordnung der Strukturen statt. Diese vielen ungeordneten trans-Strukturen  $U_t$  liegen in einem sehr breiten Minimum auf der Energielandschaft ❺.

## 8.2 Die Rolle der hydrophoben Wechselwirkungen bei der Faltung

Aus den Abschnitten 5.4 und 6.2 ist bekannt, dass hydrophoben Seitenketten einen großen Einfluss auf die Stabilität und die Faltungsgeschwindigkeit der  $\beta$ -hairpin Strukturen haben. Es wurde in Abschnitt 6.2 gezeigt, dass die Faltung der Mutanten sehr ähnlich wie die von AzoChignolin abläuft, dass aber die Zeitkonstanten der Faltung mit der Hydrophobizität zunehmen. Der Einfluss der hydrophoben Aminosäuren auf die Faltungsreaktion wird nun mit Blick auf das Modell von AzoChignolin diskutiert.

Tabelle 6.6 zeigt, dass mit zunehmender Hydrophobizität der Aminosäuren der Streckfaktor  $\beta$  der Anpassung kleiner wird. Das heißt, dass die Funktion immer stärker von einer Exponentialfunktion abweicht. Mit zunehmender Temperatur wird der Streckfaktor aber größer. Diese zwei Beobachtungen weisen darauf hin, dass der Streckfaktor ein Maß für die Rauheit der Energielandschaft darstellt.

Im Downhill-Szenario ohne große Energiebarrieren deutet ein kleines  $\beta$  auf eine sehr raue Energielandschaft mit vielen Unebenheiten hin. In einer solchen Landschaft gibt es sehr viele unterschiedliche Pfade die das Peptid zum Minimum nehmen kann.

Ein großes  $\beta \rightarrow 1$  deutet dagegen auf eine eher glatte Energielandschaft mit sehr niedrigen oder wenigen Unebenheiten hin. In einer solchen Landschaft sind die möglichen Pfade, die das Peptid nehmen kann, alle sehr ähnlich.

Aus der Betrachtung der ermittelten Streckparameter folgt, dass die Energielandschaft bei der Faltung von Y2V-AzoChignolin weniger rau als die von AzoChignolin ist und diese wiederum weniger rau ist als die von Y2W-AzoChignolin.

Nimmt man für die Mutanten von AzoChignolin auch ein Zwei-Zustand-Modell an, so lässt sich aus den temperaturabhängigen Messungen mit Gleichung 8.2 wieder eine Enthalpiebarriere berechnen. Diese Energiebarrieren sind wie bei AzoChignolin als Maß für die Rauheit der Potentialfläche zu verstehen und nicht als Barrieren während

der Faltung. Die errechnete Barriere von Y2V-AzoChignolin beträgt  $\Delta H_{Y2V}^+ = 4$  kJ/mol und die von Y2W-AzoChignolin  $\Delta H_{Y2W}^+ = 31,6$  kJ/mol.

Aus den errechneten Barrieren findet man wie schon bei den Streckfaktoren, dass Y2V-AzoChignolin die glatteste Energielandschaft der betrachteten Mutanten hat. Y2W-AzoChignolin hat dagegen die raueste. Das erhärtet den Verdacht, dass mit zunehmender Hydrophobizität die Energielandschaft rauer wird.

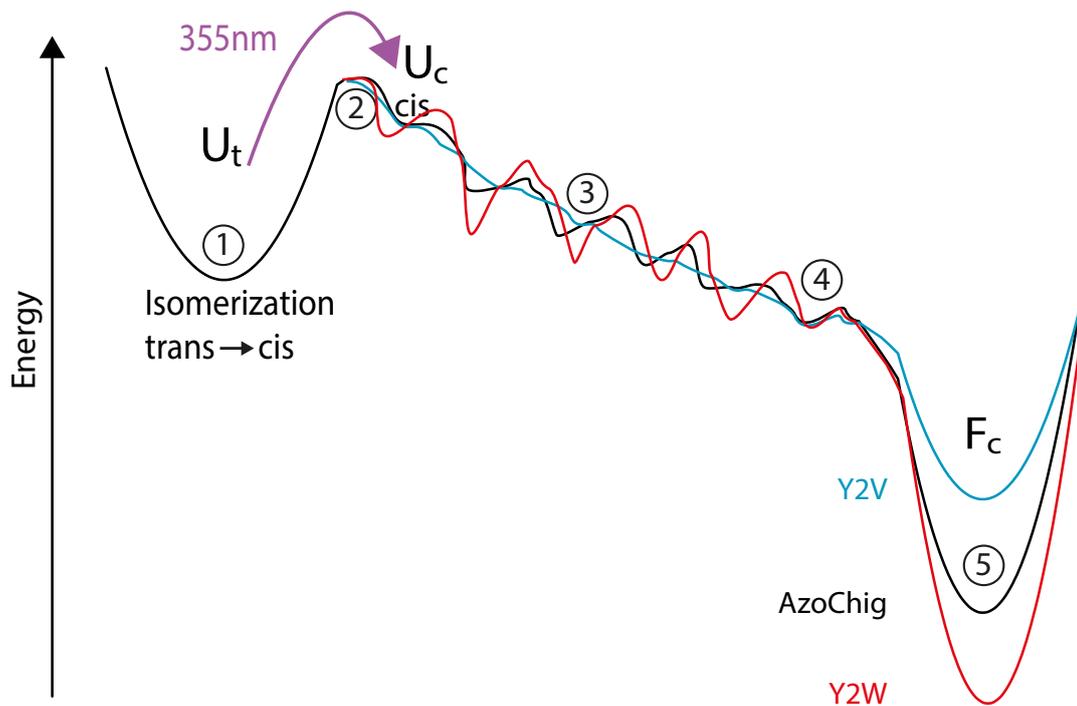
Die Energielandschaft entlang eines Faltungspfads für die Mutanten ist in Abbildung 8.7 dargestellt. Der ungefaltete trans-Zustand  $U_t$  ist der Ausgangspunkt für alle Moleküle. Der anschließende Faltungspfad ist dem zu AzoChignolin sehr ähnlich. Alle Moleküle folgen einem Pfad hin zu kleinerer Energie. Auf diesem Pfad liegen sehr viele kleine Unebenheiten, die überwunden oder umgangen werden müssen.

Der Faltungspfad von Y2V-AzoChignolin (blau in Abbildung 8.7) zeigt die geringsten Unebenheiten der untersuchten Peptide. Demnach findet Y2V-AzoChignolin seine Struktur am schnellsten und die Anpassung zeigt den größten Streckfaktor, da alle Faltungspfade sehr ähnlich sind und die Verteilung an exponentiellen Zerfallszeiten am kleinsten ist. Das globale Minimum der gefalteten Strukturen  $F_c$  ist bei Y2V-AzoChignolin weniger tief als das der anderen Mutanten, da seine  $\beta$ -hairpin-Struktur, aufgrund der fehlenden hydrophoben Wechselwirkungen, weniger stabil ist, als die der anderen Mutanten.

Y2W-AzoChignolin (rot in Abbildung 8.7) zeigt in den Experimenten die größten Faltungszeiten und die kleinsten Streckparameter in der Anpassung. Es bildet auch die stabilste  $\beta$ -hairpin Struktur. Durch den kleinen Streckfaktor und die große Faltungszeit muss davon ausgegangen werden, dass der Faltungspfad von Y2W-AzoChignolin die größten Unebenheiten aufweist. Deshalb sind viele verschiedene Pfade auf dem Weg zum Minimum möglich, was sich in einer sehr breiten Verteilung an exponentiellen Zerfallszeiten und demnach in einem kleinem Streckfaktor in der Anpassung manifestiert. Da es die stabilste Struktur bildet muss das Minimum der nativen Struktur von Y2W-AzoChignolin das Tiefste der drei Mutanten sein.

AzoChignolin (schwarz in Abbildung 8.7) liegt sowohl bei der Stabilität der Struktur, dem Wert des Streckfaktors als auch der Faltungszeit zwischen Y2V- und Y2W-AzoChignolin. Seine Energielandschaft zeigt Unebenheiten die zwischen denen der anderen Peptide liegen. Das gleiche gilt für das Minimum der nativen Struktur.

Damit sind die Dynamiken der Faltungs- und Entfaltungsreaktion von AzoChignolin aufgeklärt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Stabilität von AzoChignolin durch eine Verstärkung der hydrophoben Interstrang-Wechselwirkungen erhöhen lässt. Dies geht allerdings auf Kosten der Faltungsgeschwindigkeit.



**Abbildung 8.7: Energielandschaft bei der Faltung der Mutanten** Der ungefaltete trans-Ausgangszustand ist bei allen Molekülen sehr ähnlich. Nach der Isomerisierung laufen alle Peptide auf einer rauen Potentialfläche abwärts zu niedrigerer Energie. Die Rauheit der Potentialfläche, also die Höhe der Unebenheiten unterscheidet sich bei den Mutanten. Bei Y2V-AzoChignolin (blau) ist die Fläche am glattesten, demnach findet es seinen nativen Zustand am schnellsten mit dem größten Streckfaktor in der Anpassung. Mit der Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen (schwarz für AzoChignolin und rot für Y2W-AzoChignolin) nehmen die Unebenheiten zu und die Faltungszeit erhöht sich mit einer Verkleinerung des Streckfaktors. Die Potentialtiefe des nativen Zustandes, die die Stabilität bestimmt zeigt ein ähnliches Verhalten. Sie ist für Y2W-AzoChignolin am tiefsten, gefolgt von AzoChignolin und Y2V-AzoChignolin.

## 9 Zusammenfassung

Proteine können ihre biologische Funktion nur ausführen, wenn sie in ihre korrekte dreidimensionale Struktur falten. Dies ist der native Zustand. Es ist bis heute immer noch nicht geklärt, wie dieser native Zustand gefunden wird. Anfinsen konnte zeigen, dass der native Zustand alleine in der Primärstruktur von Proteinen codiert ist [Anf61]. Durch das Levinthal-Paradox wird schnell klar, dass Proteinfaltung kein zufälliger Prozess auf einer glatten Energielandschaft sein kann, sondern ein getriebener Prozess hin zur nativen Struktur sein muss [Lev68].

Es herrscht die Meinung vor, dass bei der Proteinfaltung sich zuerst die Sekundärstrukturelemente bilden und sich diese dann zu Domänen und der Tertiärstruktur umlagern [Ros06]. Die in der Natur am häufigsten auftretenden Sekundärstrukturelemente sind  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter. Die Bildung von  $\alpha$ -Helices wird schon seit längerem erforscht [Wil96], da es relativ einfach ist rein  $\alpha$ -helikale Peptide zu finden.  $\beta$ -Hairpin Strukturen neigen dagegen in Lösung stark zur Aggregation und sind erst seit den 2000er Jahren Gegenstand der Forschung. Es wurde vor allem die Faltung der Tryptophan-Zipper (TrpZip) ausgiebig analysiert [CSS01, Hau08, Dee14].

In dieser Arbeit wurden die Faltungs- und Entfaltungsreaktion von AzoChignolin untersucht. AzoChignolin ist ein lichtschtbares  $\beta$ -hairpin Peptid, dessen Struktur auf dem Dekapeptid Chignolin basiert [Hon04]. Es wurden die zwei zentralen Aminosäuren des Turns von Chignolin entfernt (Glu5 und Thr6) und durch den Photoschalter AMPP ersetzt [Pod15]. Das so erhaltene lichtschtbare Peptid AzoChignolin kann gezielt vom entfalteten in den gefalteten Zustand und umgekehrt geschaltet werden. Seine Sequenz ist Gly1-Tyr2-Asp3-Pro4-AMPP-Gly7-Thr8-Trp9-Gly10. Im trans-Zustand zeigt das Peptid ungeordnete Strukturen, im cis bildet sich dagegen ein geordnetes  $\beta$ -hairpin.

Die Entstehung sowie die Entfaltung dieser  $\beta$ -hairpin Struktur wurden mit zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie und zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie verfolgt. Mit der Infrarotspektroskopie können direkt Änderungen in der Wasserstoffbrückenumgebung beobachtet werden und mit der Fluoreszenzspektroskopie Änderungen des Abstands zwischen der aromatischen Aminosäure Tryptophan und AMPP. Dies ist möglich, da ein Quenching der Tryptophan-Fluoreszenz durch FRET auf AMPP stattfindet, welches stark abstandsabhängig ist.

Mit stationärer Infrarotspektroskopie wurde zunächst gezeigt, dass sich in AzoChignolin im cis-Zustand tatsächlich starke Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidsträngen bilden und Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel aufbrechen. Dies wird mit der Bildung der  $\beta$ -hairpin Struktur interpretiert.

In Faltungssimulationen am Wildtyp Chignolin konnten zwei Forschungsgruppen unterschiedliche Wechselwirkungen identifizieren, die für die Stabilität von Chignolin verantwortlich sind. Enemark et al. identifizierten den Intrastrang-Kontakt zwischen Prolin und Tyrosin als wichtigste stabilisierende Wechselwirkung [EKR12]. Xu et al. fanden, dass der Interstrang-Kontakt zwischen Tyrosin und Tryptophan das hairpin stabilisieren [Xu08].

Diese zwei Wechselwirkungen wurden in AzoChignolin durch gezielte Punktmutationen analysiert. Es stellte sich heraus, dass P4T-AzoChignolin, bei dem Prolin durch Threonin ersetzt wurde, nur sehr schwache Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen bildet. Zudem liegt seine Löslichkeitsgrenze erstaunlicherweise bei nur 1,9 mM.

Bei Y2V-AzoChignolin wurde Tyrosin durch Valin ersetzt und folglich können sich weder hydrophobe Interstrang- noch Intrastrang-Wechselwirkungen ausbilden. Dennoch sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen genauso stark wie bei AzoChignolin. Es hat sich aber gezeigt, dass die  $\beta$ -hairpin Struktur dieser Mutante weniger stabil ist als AzoChignolin. Da Y2V-AzoChignolin keine hydrophoben Wechselwirkungen ausbilden kann, es aber dennoch starke Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen bildet, können die schwachen Wasserstoffbrücken bei P4T-AzoChignolin nicht durch die fehlenden Wechselwirkungen erklärt werden. Die Ursache liegt vermutlich in der einzigartigen Struktur von Prolin, die in AzoChignolin sehr wichtig für die Bildung des hairpins ist.

W9V-AzoChignolin, bei dem Tryptophan durch Valin ersetzt wurde, aggregiert schon bei sehr geringen Konzentrationen und konnte ebenfalls nicht in den für die zeitaufgelöste Spektroskopie benötigten Konzentrationen monomer gelöst werden.

In Y2W-AzoChignolin liegen sich zwei Tryptophane im Peptid gegenüber, die starke  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen ausbilden. Diese Mutante hat die stabilste  $\beta$ -hairpin Struktur von allen untersuchten Peptiden. Y2V- und Y2W-AzoChignolin wurden zusammen mit AzoChignolin zeitaufgelöst untersucht.

Da Y2V-AzoChignolin weniger stabil ist als AzoChignolin und das wiederum weniger stabil ist als Y2W-AzoChignolin, beeinflussen die hydrophoben Interstrang-Wechselwirkungen stark die Stabilität der  $\beta$ -hairpin Strukturen.

Mit zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie konnte gezeigt werden, dass nach der Isomerisierung von trans-AzoChignolin nach cis zuerst schalternahe Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidsträngen entstehen. Diese Wasserstoffverbrückung setzt sich zu den Termini hin fort und es entsteht so die  $\beta$ -hairpin Struktur nach dem Zipper-Modell. Die Absorptionsänderungen konnten mit einer gestreckten Exponentialfunktion mit einer Zeitkonstante von 54 ns und einem Streckfaktor  $\beta = 0,68$  angepasst werden. Aus der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie konnte mit fast der gleichen Zeitkonstante (60 ns) ein Rückgang der Fluoreszenz beobachtet werden. Es gibt bei den Fluoreszenzmessungen keine anschließende Dynamik mehr. Das Tryptophan findet also gleichzeitig mit der Bildung der Interstrang-Wasserstoffbrücken und der hairpin-Struktur seine endgültige Position.

---

Die Entfaltung von AzoChignolin, also die Isomerisierung von cis nach trans, findet auf noch schnelleren Zeitskalen statt. Das Aufbrechen der starken Interstrang-Wasserstoffbrücken beginnt schon mit etwa 600 ps und ist nach wenigen Nanosekunden vollständig abgeschlossen. Anschließend finden nur noch Diffusionsprozesse im Lösungsmittel auf der 100 ns Zeitskala statt.

Des Weiteren wurde der Einfluss der hydrophoben Interstrang-Wechselwirkungen auf die Faltung von AzoChignolin untersucht. Dazu wurden durch Punktmutationen gezielt Wechselwirkungen ausgeschaltet (Y2V) oder verstärkt (Y2W). Wie sich herausstellte, sind die Faltungsmechanismen denen von AzoChignolin sehr ähnlich. Auch bei Y2V- und Y2W-AzoChignolin bilden sich zuerst Wasserstoffbrücken in Schalternähe und später die bei den Termini. Die Bildung der  $\beta$ -hairpin Struktur findet allerdings mit anderen Zeitkonstanten statt. Die Dynamiken der Mutanten lassen sich, wie AzoChignolin, mit gestreckten Exponentialfunktionen anpassen. Y2V-AzoChignolin findet seinen nativen Zustand bereits mit 25 ns und  $\beta = 0,70$ . Das stabilere Y2W-AzoChignolin dagegen mit 73 ns und  $\beta = 0,63$ .

Da sich die Daten mit einer gestreckten Exponentialfunktion anpassen lassen, scheint es bei der Faltungsreaktion eine breite Verteilung an Zerfallszeiten zu geben. Dies weist auf downhill folding hin, bei der die Faltung auf einer rauen Energielandschaft ohne Energiebarriere diffusiv zum globalen Minimum hin abläuft.

Nach der Isomerisierung von trans nach cis bewegen sich alle Mutanten eine unterschiedlich raue Potentialfläche hinab. Dabei bilden sich die Wechselwirkungen zwischen den Peptidsträngen. Als Maß für die Rauheit der Energielandschaft dient der Streckfaktor  $\beta$  aus den Anpassungen sowie eine Enthalpiebarriere, die nach dem Zwei-Zustands Modell mit der Arrhenius-Theorie aus temperaturabhängigen Messungen gewonnen wurde. Die Energielandschaft von Y2V-AzoChignolin ist die glatteste. Der Streckfaktor der Anpassung beträgt  $\beta = 0,70$  und die errechnete Barriere  $\Delta H_{Y2V}^+ = 4 \text{ kJ/mol}$ . Y2W-AzoChignolin hat die raueste Potentialfläche. Der Streckfaktor der Anpassung beträgt  $\beta = 0,63$  und die errechnete Barriere  $\Delta H_{Y2W}^+ = 31,6 \text{ kJ/mol}$ . AzoChignolin liegt zwischen diesen Werten mit  $\beta = 0,68$  und  $\Delta H_{AC}^+ = 15,3 \text{ kJ/mol}$ .

Es hat sich herausgestellt, dass AzoChignolin seine hairpin-Struktur wesentlich schneller findet als vergleichbare lichtsichtbare  $\beta$ -hairpin Peptide wie ATZ, das ca. 100fache Faltungszeiten von etwa 16  $\mu\text{s}$  aufweist [Dee14].

Die Faltungszeit von AzoChignolin kann durch das Ausschalten der hydrophoben Interstrang-Wechselwirkungen noch weiter reduziert werden, was allerdings auf Kosten der Stabilität der  $\beta$ -hairpin Struktur geht. Im Umkehrschluss kann durch starke hydrophobe Wechselwirkungen ein sehr stabiles  $\beta$ -hairpin Peptid gebildet werden, was allerdings deutlich mehr Zeit für die Faltung benötigt.

Damit ist die vollständige Dynamik der Faltung und Entfaltung von AzoChignolin aufgeklärt.



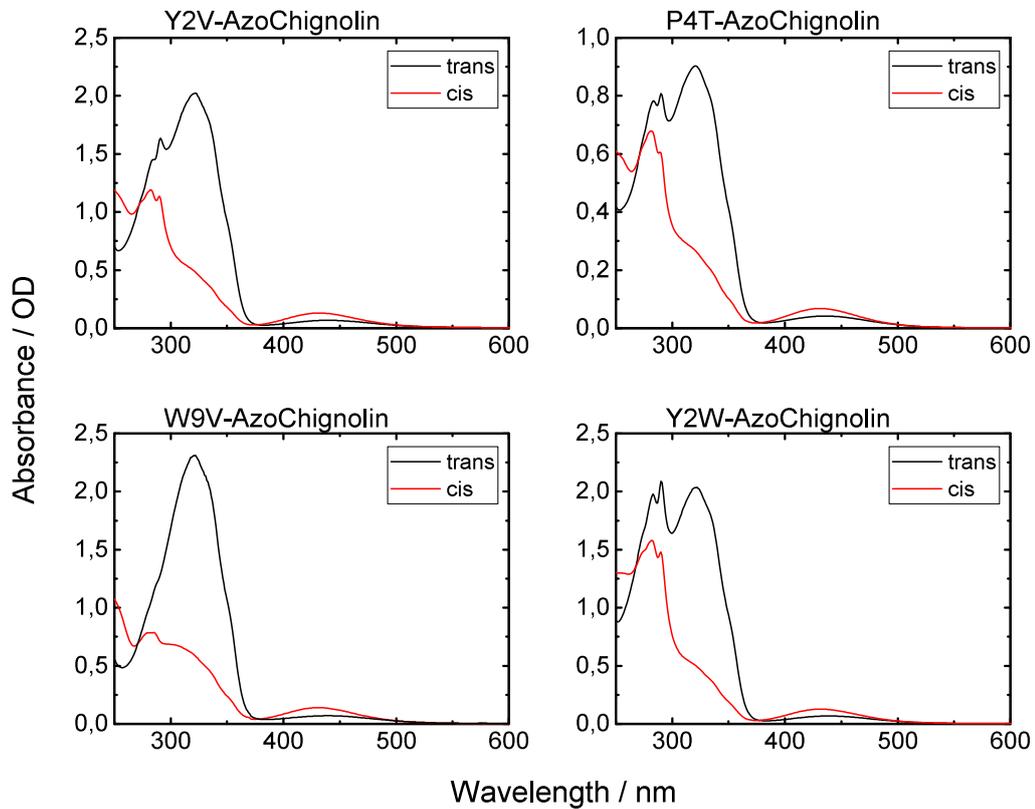
# A Anhang

## A.1 Die proteinogenen Aminosäuren

**Tabelle A.1: Abkürzungen der Aminosäuren**

Name	Drei-Buchstaben Code	Ein-Buchstaben Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## A.2 UVvis-Spektren der Mutanten von AzoChignolin



**Abbildung A.1: UVvis-Absorptionsspektren der Mutanten von AzoChignolin** Es gibt nur Unterschiede im Bereich der Absorption von Tyrosin und Tryptophan bei  $\lambda < 300$  nm.

### A.3 Zeitaufgelöste Absorptionsänderungen der Faltung von AzoChignolin bei 5 °C und 45 °C

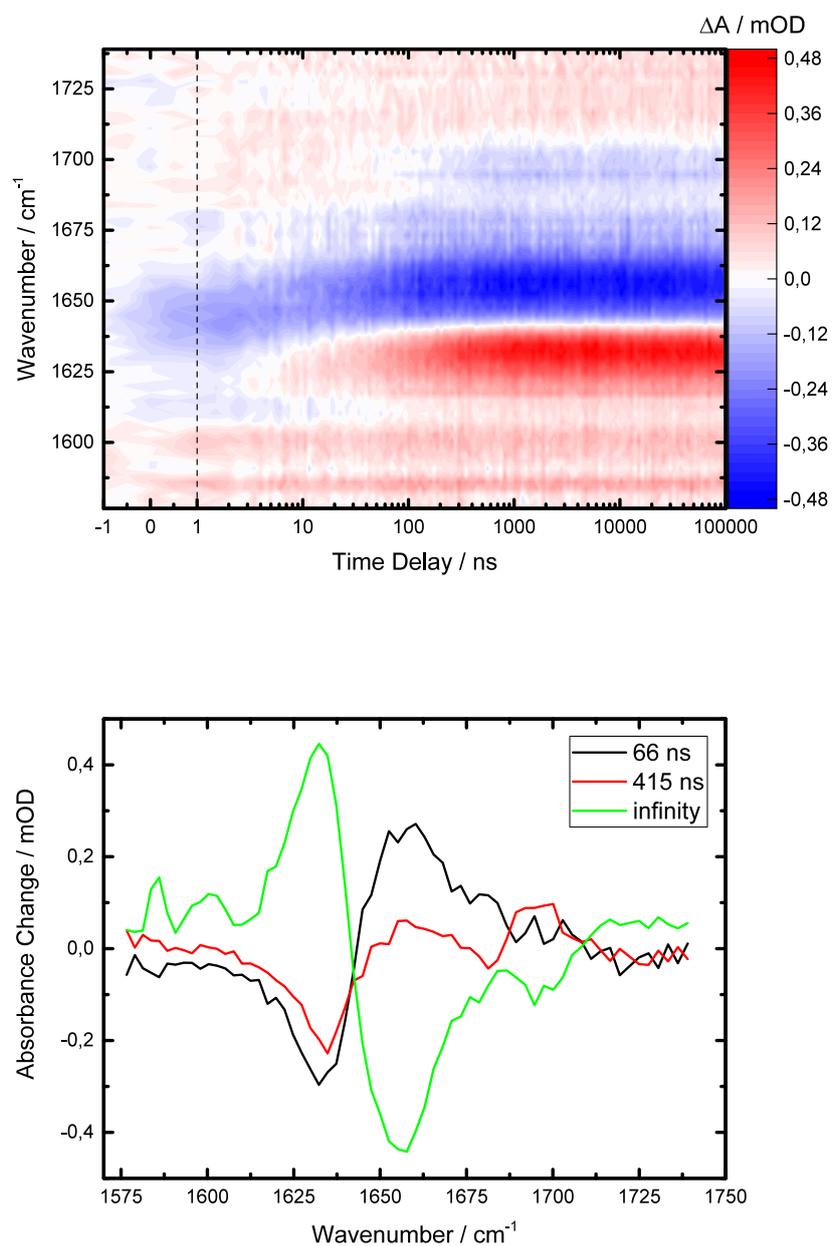
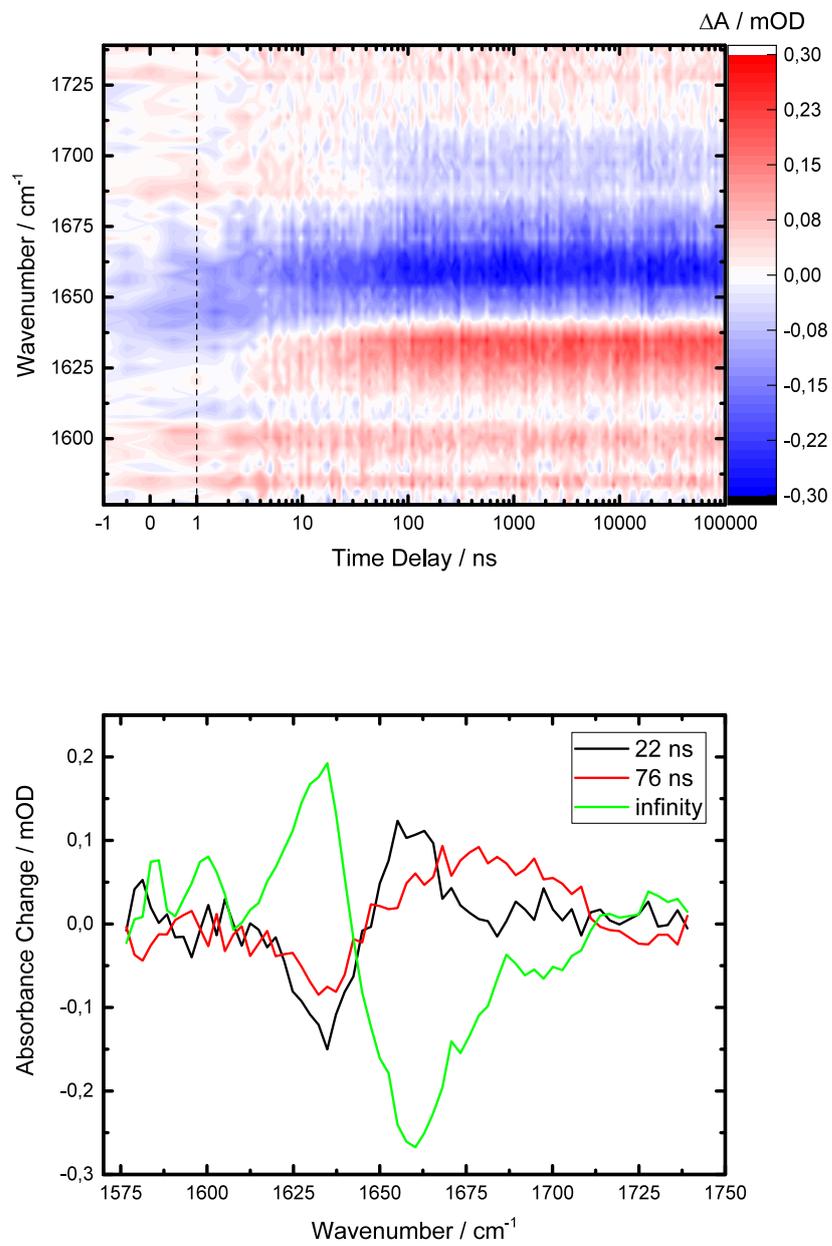


Abbildung A.2: Absorptionsänderungen und DADS der Faltungsmessung von AzoChignolin bei 5 °C



**Abbildung A.3: Absorptionsänderungen und DADS der Faltungsmessung von AzoChignolin bei 45 °C**

## A.4 Zeitaufgelöste Absorptionsänderungen der Entfaltung von AzoChignolin bei 5 °C und 45 °C

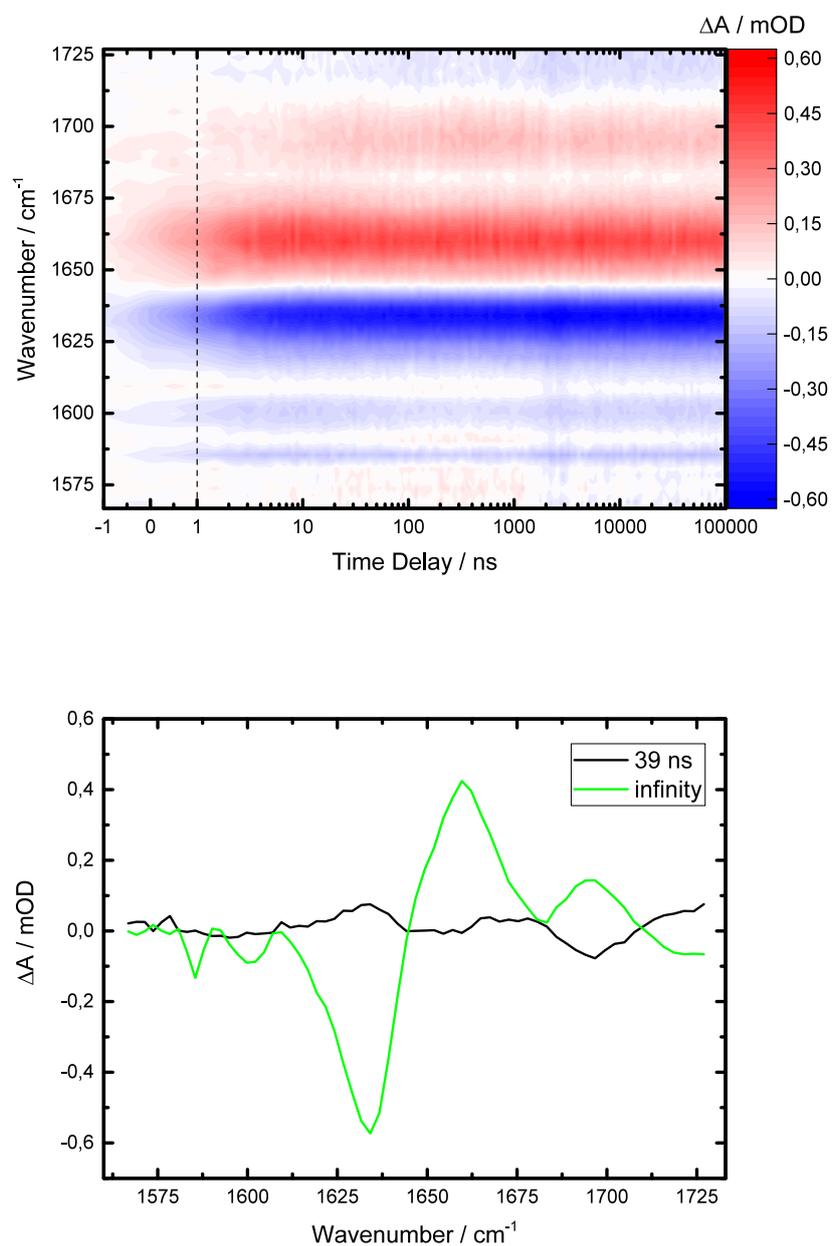


Abbildung A.4: Absorptionsänderungen und DADS der Entfaltungsmessung von Azo-Chignolin bei 5 °C

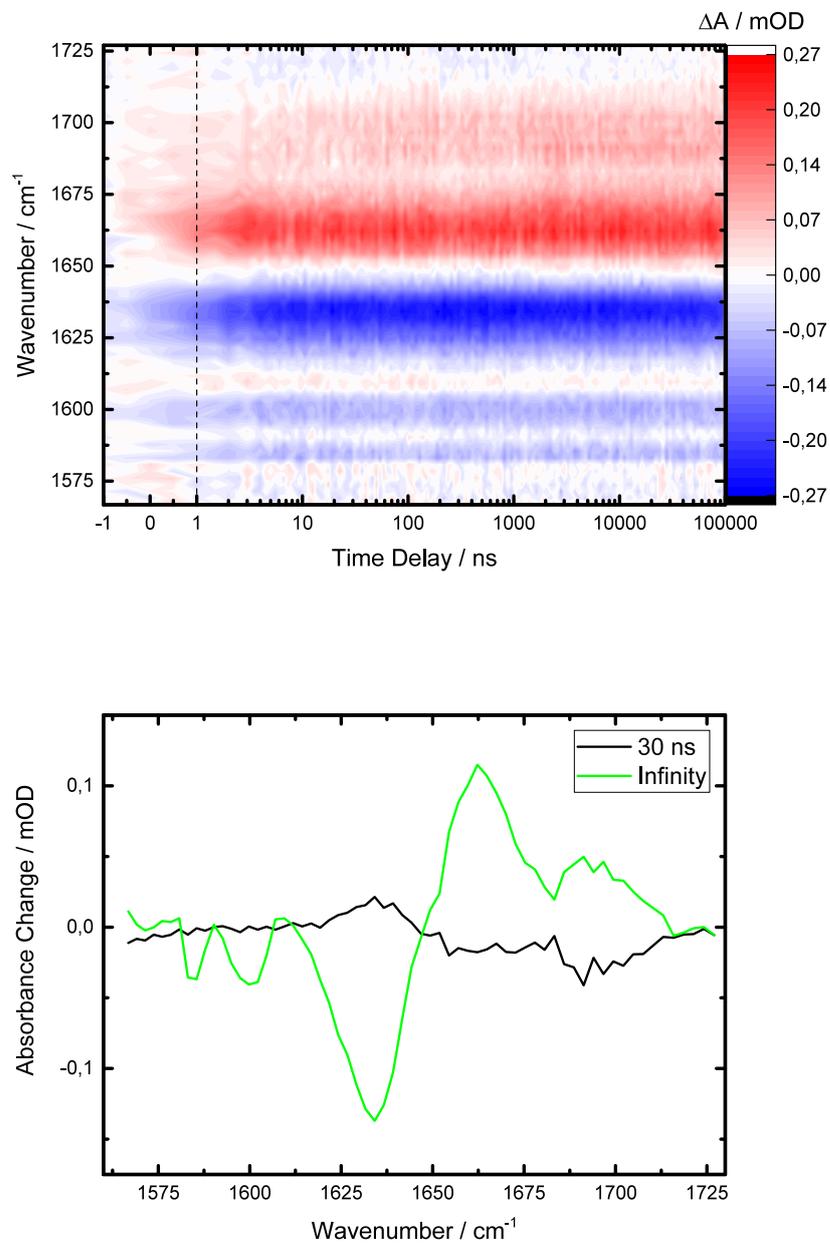


Abbildung A.5: Absorptionsänderungen und DADS der Entfaltungsmessung von Azochignolin bei 45 °C

## A.5 Zeitaufgelöste Absorptionsänderungen der Faltung von Y2V-AzoChignolin bei 5 °C

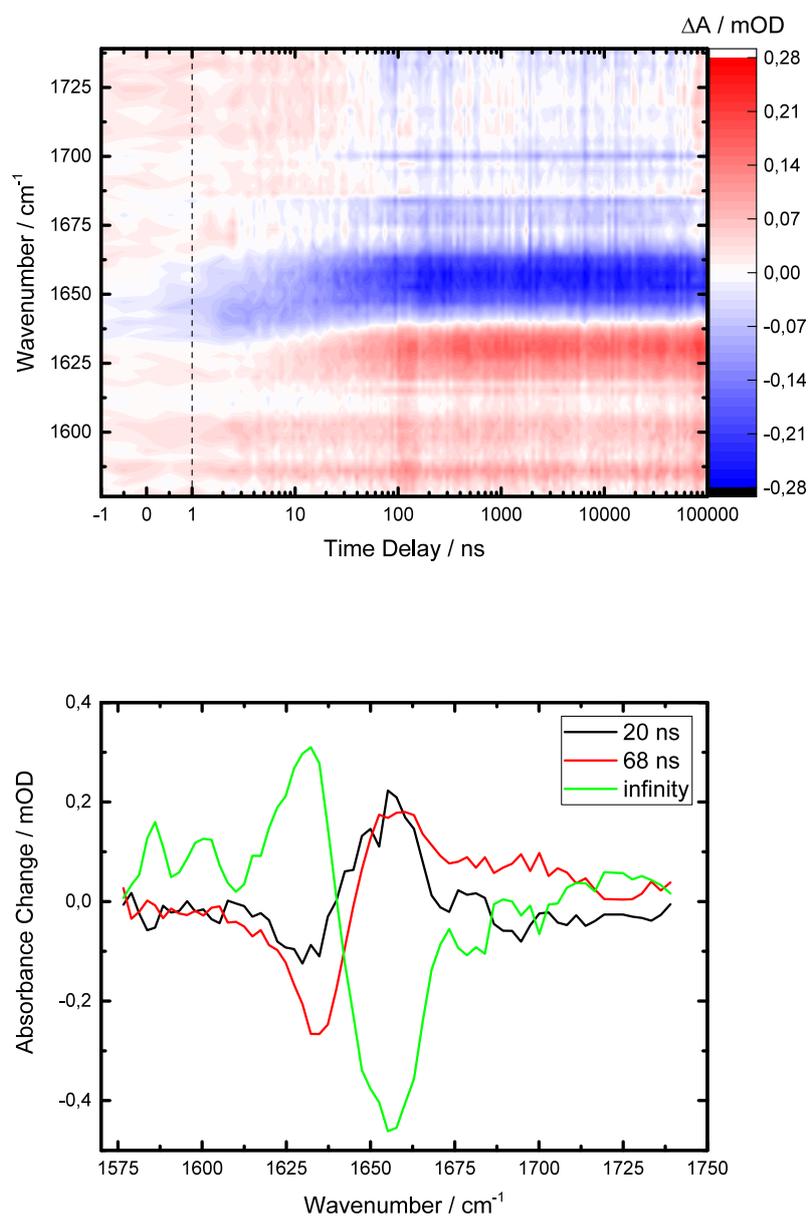


Abbildung A.6: Absorptionsänderungen und DADS der Faltungsmessung von Y2V-Azo-Chignolin bei 5 °C

## A.6 Zeitaufgelöste Absorptionsänderungen der Faltung von Y2W-AzoChignolin bei 5 °C

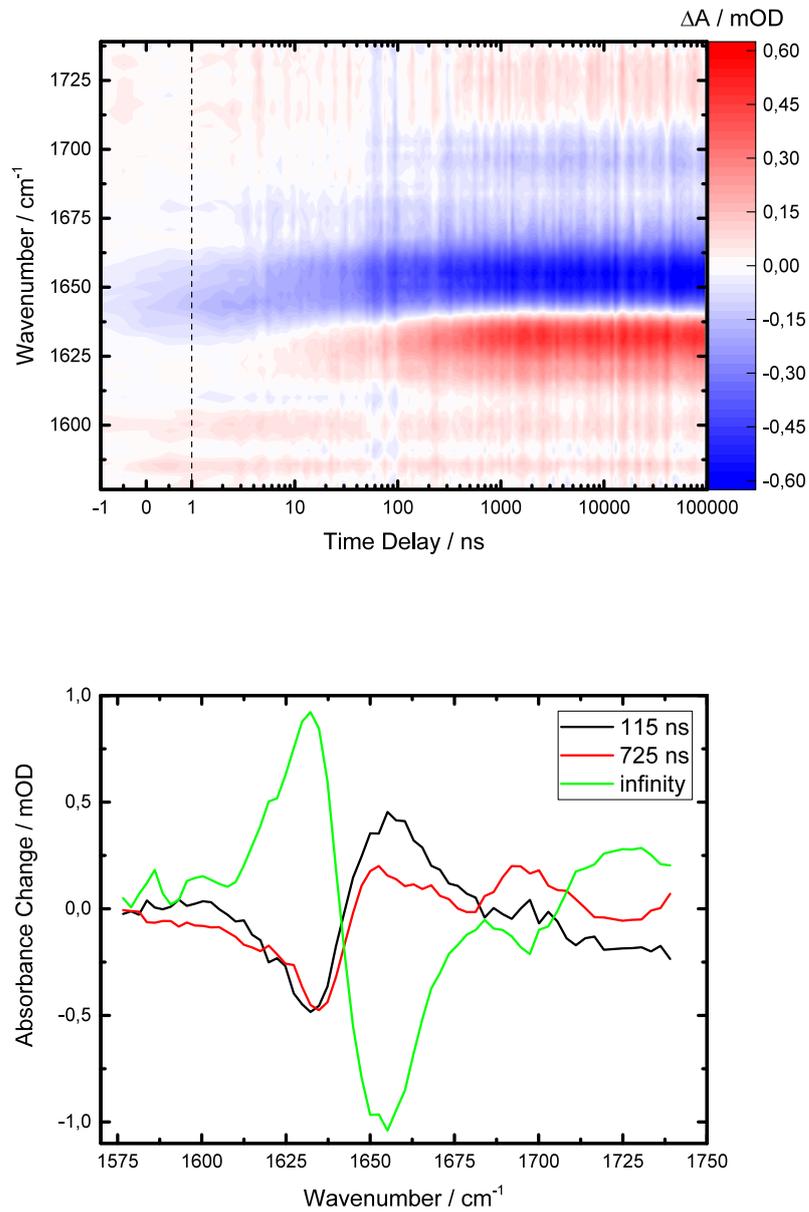
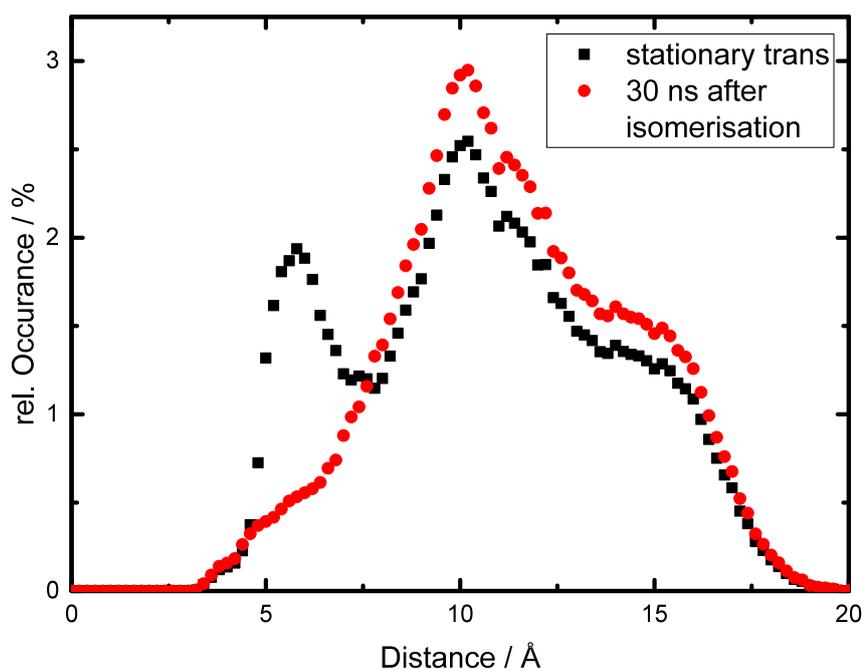


Abbildung A.7: Absorptionsänderungen und DADS der Faltungsmessung von Y2W-Azo-Chignolin bei 5 °C

## A.7 Abstandsverteilungen zur Berechnung der Fluoreszenz



**Abbildung A.8: Abstandsverteilungen zur Berechnung der Fluoreszenz** In der roten Verteilung wurde die Bande bei 6 Å entfernt und neu normiert. (Datenpunkte der stationären Abstandsverteilung aus MD-Simulationen von Christina Frost, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Zacharias, Lehrstuhl für Theoretische Biophysik (T38) - Molekulardynamik, TU München)

## A.8 DAS der Streak-Kamera Messungen

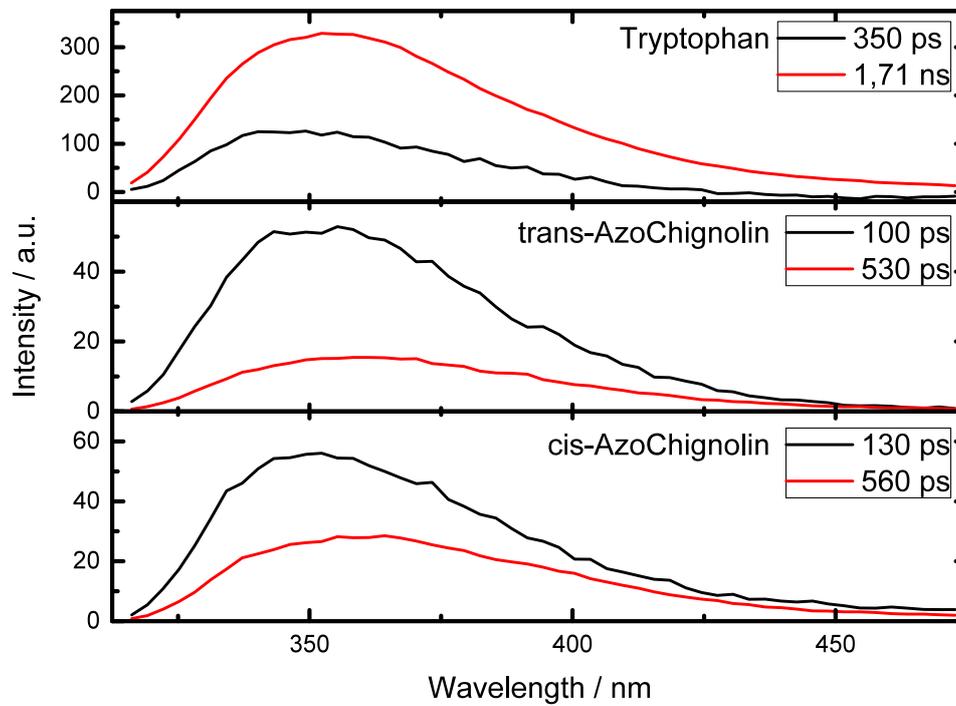


Abbildung A.9: DAS aus den Datenanpassungen der Streak-Kamera Messungen

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Aufbau von $\alpha$ -Aminosäuren . . . . .	3
2.2	Peptidbindung und Hydrolyse . . . . .	4
2.3	Primärstruktur von Chignolin . . . . .	4
2.4	Beispiel einer $\alpha$ -Helix . . . . .	5
2.5	Beispiel einer $\beta$ -Faltblattstruktur . . . . .	6
2.6	Dihedralwinkel im Proteinrückgrat . . . . .	7
2.7	Ramachandran-Diagramm . . . . .	8
2.8	Beispiel einer Tertiärstruktur . . . . .	9
2.9	Protein mit Quartärstruktur . . . . .	10
3.1	Struktur und Spektren von Azobenzol . . . . .	15
3.2	3D-Strukturen von AzoChignolin . . . . .	16
3.3	Strukturen von AzoChignolin, Y2V-, Y2W- und W9V-AzoChignolin .	18
3.4	Keilstrichformel von P4T-AzoChignolin . . . . .	19
4.1	CD-Spektren der Sekundärstrukturen . . . . .	25
4.2	Schematische Darstellung des transienten Infrarot-Absorptions-Aufbaus	28
4.3	Triggerschema für Messungen bis 100 $\mu$ s . . . . .	30
4.4	Schematische Darstellung des Aufbaus der Streak-Kamera . . . . .	32
4.5	Schematische Darstellung des zeitaufgelösten Tryptophan-Fluoreszenz-Aufbaus . . . . .	34
5.1	Stationäre UV- und IR-Spektren von Chignolin . . . . .	38
5.2	CD-Spektren von Chignolin in H <sub>2</sub> O von Honda et al. und in MeOH .	40
5.3	UV/vis-Spektren von trans- und cis-AzoChignolin . . . . .	41
5.4	Thermische Rückreaktion von cis nach trans . . . . .	42
5.5	CD-Spektren von AzoChignolin in Methanol in trans und cis . . . . .	43
5.6	IR-Spektren von AzoChignolin in trans und cis und Differenzspektren	44
5.7	IR-Spektren von AzoChignolin, AzoChignolin-NH <sub>2</sub> und <sup>13</sup> C <sub>Gly</sub> - und <sup>13</sup> C <sub>Asp</sub> -AzoChignolin . . . . .	46
5.8	Temperaturabhängige IR-Spektren von AzoChignolin . . . . .	48
5.9	Fluoreszenzspektren von AzoChignolin . . . . .	49
5.10	Abstandsverteilung von Tryptophan und AMPP aus MD-Simulationen in cis und trans sowie die Fluoreszenzsignale . . . . .	51
5.11	Differenzspektren von Y2V-, Y2W- und W9V-AzoChignolin . . . . .	53
5.12	Fluoreszenzspektren von Y2V- und Y2W-AzoChignolin . . . . .	54
5.13	Differenzspektren von P4T-AzoChignolin . . . . .	56

6.1	Absorptionsänderungen bei der Faltung von AzoChignolin bis 2,7 ns . . . . .	59
6.2	DADS aus der globalen Anpassung der ps-Faltungsmessung . . . . .	60
6.3	Absorptionsänderungen bei der Faltung von AzoChignolin bei 25 °C bis 95 µs . . . . .	62
6.4	Ersten zwei Links-Singulärvektoren der Faltungsmessung von Azo- Chignolin . . . . .	63
6.5	Gestreckte Exponentialfunktion, biexponentielle Anpassung und mo- noexponentielle Funktion . . . . .	65
6.6	DADS aus der globalen Anpassung der ns-Faltungsmessung von Azo- Chignolin bei 25 °C . . . . .	66
6.7	Spektren zu verschiedenen Verzögerungszeiten der ns-Faltungsmessung von AzoChignolin bei 25 °C . . . . .	67
6.8	Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von AzoChignolin . . . . .	69
6.9	DADS aus der globalen Anpassung der ps-Entfaltungsmessung von AzoChignolin . . . . .	71
6.10	Absorptionsänderungen bei der Entfaltung von AzoChignolin bei 25 °C bis 95 µs . . . . .	72
6.11	DADS aus der globalen Anpassung der ns-Entfaltungsmessung von AzoChignolin . . . . .	73
6.12	Absorptionsänderungen bei der Faltung von Y2V-AzoChignolin bei 25 °C . . . . .	74
6.13	DADS aus der globalen Anpassung der Faltungsmessung von Y2V- AzoChignolin . . . . .	75
6.14	Absorptionsänderungen bei der Faltung von Y2W-AzoChignolin bei 25 °C . . . . .	77
6.15	DADS aus der globalen Anpassung der Faltungsmessung von Y2W- AzoChignolin . . . . .	78
6.16	Transienten bei 1632 cm <sup>-1</sup> der AzoChignolin Mutanten . . . . .	80
7.1	Zeitaufgelöste Änderungen der Trp-Fluoreszenz bei der Faltung . . . . .	84
7.2	Zeitaufgelöste Änderungen der Trp-Fluoreszenz bei der Entfaltung . . . . .	87
7.3	Zeitaufgelöste Fluoreszenz von Tryptophan in Methanol . . . . .	89
7.4	Zeitaufgelöste Tryptophan-Fluoreszenz von trans- und cis-AzoChignolin . . . . .	90
8.1	Schematische Darstellung der Struktur von AzoChignolin während der Faltung . . . . .	96
8.2	Arrhenius-Plot der Faltungsreaktion von AzoChignolin . . . . .	98
8.3	Schematische Darstellung der Struktur von AzoChignolin während der Entfaltung . . . . .	99
8.4	Arrhenius-Plot der Entfaltung von AzoChignolin . . . . .	101
8.5	Energielandschaft bei der Faltung von AzoChignolin . . . . .	102
8.6	Energielandschaft bei der Entfaltung von AzoChignolin . . . . .	103

8.7 Energielandschaft bei der Faltung der Mutanten . . . . . 106



## Tabellenverzeichnis

4.1	Amid Banden im infraroten Spektralbereich . . . . .	22
6.1	Schaltquantenausbeuten für Azobenzol in Methanol . . . . .	58
6.2	Zusammenhang zwischen Streckfaktor und biexponentiellen Zeitkonstanten . . . . .	64
6.3	Zeitkonstanten für die Faltung von AzoChignolin gegen die Temperatur	68
6.4	Zeitkonstanten für die Faltung von Y2V-AzoChignolin gegen die Temperatur . . . . .	76
6.5	Zeitkonstanten für die Faltung von Y2W-AzoChignolin gegen die Temperatur . . . . .	79
6.6	Zusammenfassung der Faltungszeiten . . . . .	81
7.1	Zeitkonstanten und Amplituden der Fluoreszenz von AzoChignolin und Tryptophan . . . . .	89



## Literatur

- [Aem05] A. Aemissegger, V. Kräutler, W. F. van Gunsteren und D. Hilvert. *A Photoinducible  $\beta$ -Hairpin*. *Journal of the American Chemical Society* 127(9) (März 2005), S. 2929–2936.
- [And03] A. H. Andreotti. *Native State Proline Isomerization: An Intrinsic Molecular Switch*. *Biochemistry* 42(32) (Aug. 2003), S. 9515–9524.
- [Anf61] C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela und F. H. White. *The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease During Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 47(9) (Jan. 1961), S. 1309–1314.
- [Anf73] C. B. Anfinsen. *Principles That Govern the Folding of Protein Chains*. *Science* 181(4096) (Juli 1973), S. 223–230.
- [Arr89] S. Arrhenius. *Über Die Reaktionsgeschwindigkeit Bei Der Inversion von Rohrzucker Durch Säuren*. *Zeitschrift für physikalische Chemie* 4 (1889), S. 226–248.
- [Ban92] J. Bandekar. *Amide Modes and Protein Conformation*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1120(2) (Apr. 1992), S. 123–143.
- [Bar00] A. Barth. *The Infrared Absorption of Amino Acid Side Chains*. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 74(3–5) (2000), S. 141–173.
- [Bar07] A. Barth. *Infrared Spectroscopy of Proteins*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767(9) (Sep. 2007), S. 1073–1101.
- [BB12] H. D. Bandara und S. C. Burdette. *Photoisomerization in Different Classes of Azobenzene*. *Chemical Society Reviews* 41(5) (2012), S. 1809–1825.
- [BB80] S. Brahm und J. Brahm. *Determination of Protein Secondary Structure in Solution by Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism*. *Journal of Molecular Biology* 138(2) (Apr. 1980), S. 149–178.
- [BBH08] S. Bräse, J. Bülle und A. Hüttermann. *Organische und bioorganische Chemie: Das Basiswissen für Master- und Diplomprüfungen*. 1. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Apr. 2008.
- [Bee52] Beer. *Bestimmung Der Absorption Des Rothen Lichts in Farbigen Flüssigkeiten*. *Annalen der Physik* 162 (1852), S. 78–88.
- [BK05] J. Buchner und T. Kiefhaber. *Protein Folding Handbook*. 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Jan. 2005.

- [Bla91] F. J. Blanco, M. A. Jiménez, M. Rico, J. Santoro, J. Herranz und J. L. Nieto. *Tendamistat (12-26) Fragment. NMR Characterization of Isolated Beta-Turn Folding Intermediates*. European Journal of Biochemistry 200(2) (Sep. 1991), S. 345–351.
- [Bri12] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer und A. Heckel. *Light-Controlled Tools*. Angewandte Chemie International Edition 51(34) (Aug. 2012), S. 8446–8476.
- [BST12] J. M. Berg, L. Stryer und J. L. Tymoczko. *Stryer Biochemie*. Übers. von A. Held et al. 7. Aufl. Berlin u.a.: Springer Spektrum, Okt. 2012.
- [BTW63] D. F. Bradley, I. Tinoco und R. W. Woody. *Absorption and Rotation of Light by Helical Oligomers: The Nearest Neighbor Approximation*. Biopolymers 1(3) (Juni 1963), S. 239–267.
- [BW11] A. A. Beharry und G. A. Woolley. *Azobenzene Photoswitches for Biomolecules*. Chemical Society Reviews 40(8) (2011), S. 4422–4437.
- [Cal97] P. R. Callis.  $^1L_a$  and  $^1L_b$  Transitions of Tryptophan: Applications of Theory and Experimental Observations to Fluorescence of Proteins. Methods in Enzymology. Fluorescence Spectroscopy 278 (Jan. 1997), S. 113–150.
- [CB98] Y. Chen und M. D. Barkley. *Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins†*. Biochemistry 37(28) (Juli 1998), S. 9976–9982.
- [CD03] G. Cerullo und S. De Silvestri. *Ultrafast Optical Parametric Amplifiers*. Review of Scientific Instruments 74(1) (Jan. 2003), S. 1–18.
- [CDW90] N. B. Colthup, L. H. Daly und S. E. Wiberley. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, Third Edition*. 3 edition. Boston: Academic Press, Sep. 1990.
- [Che67] R. F. Chen. *Fluorescence Quantum Yields of Tryptophan and Tyrosine*. Analytical Letters 1(1) (Jan. 1967), S. 35–42.
- [Che96] G. Cheriaux, P. Rousseau, F. Salin, J. P. Chambaret, B. Walker und L. F. Dimauro. *Aberration-Free Stretcher Design for Ultrashort-Pulse Amplification*. Optics Letters 21(6) (März 1996), S. 414–416.
- [CR92] T. P. Creamer und G. D. Rose. *Side-Chain Entropy Opposes Alpha-Helix Formation but Rationalizes Experimentally Determined Helix-Forming Propensities*. Proceedings of the National Academy of Sciences 89(13) (Jan. 1992), S. 5937–5941.
- [CSS01] A. G. Cochran, N. J. Skelton und M. A. Starovasnik. *Tryptophan Zippers: Stable, Monomeric  $\beta$ -Hairpins*. Proceedings of the National Academy of Sciences 98(10) (Aug. 2001), S. 5578–5583.

- [CSS02] A. G. Cochran, N. J. Skelton und M. A. Starovasnik. *Tryptophan Zippers: Stable, Monomeric  $\beta$ -Hairpins*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98 (Apr. 2002), S. 5578–5583.
- [CT30] M. Czerny und A. F. Turner. *Über den Astigmatismus bei Spiegelspektrometern*. Zeitschrift für Physik 61(11-12) (Nov. 1930), S. 792–797.
- [Dav12] C. M. Davis, S. Xiao, D. P. Raleigh und R. B. Dyer. *Raising the Speed Limit for  $\beta$ -Hairpin Formation*. Journal of the American Chemical Society 134(35) (Sep. 2012), S. 14476–14482.
- [Dav64] A. S. Davydov. *The Theory Of Molecular Excitons*. Soviet Physics Uspekhi 7(2) (1964), S. 145.
- [DC97] K. A. Dill und H. S. Chan. *From Levinthal to Pathways to Funnels*. Nature Structural Biology 4(1) (Jan. 1997), S. 10–19.
- [Dee11] A. A. Deeg, T. E. Schrader, S. Kempter, J. Pfizer, L. Moroder und W. Zinth. *Light-Triggered Aggregation and Disassembly of Amyloid-Like Structures*. ChemPhysChem 12(3) (Feb. 2011), S. 559–562.
- [Dee14] A. A. Deeg et al. *Isomerization- and Temperature-Jump-Induced Dynamics of a Photoswitchable  $\beta$ -Hairpin*. Chemistry – A European Journal 20(3) (Jan. 2014), S. 694–703.
- [Dee15] A. A. Deeg et al. *Anle138b and Related Compounds Are Aggregation Specific Fluorescence Markers and Reveal High Affinity Binding to  $\alpha$ -Synuclein Aggregates*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1850(9) (Sep. 2015), S. 1884–1890.
- [Dem86] A. P. Demchenko. *Ultraviolet Spectroscopy of Proteins*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1986.
- [Dex53] D. L. Dexter. *A Theory of Sensitized Luminescence in Solids*. The Journal of Chemical Physics 21(5) (Mai 1953), S. 836–850.
- [Dia15] D. Diana et al. *Long Range Trp-Trp Interaction Initiates the Folding Pathway of a pro-Angiogenic  $\beta$ -Hairpin Peptide*. Scientific Reports 5 (Nov. 2015), S. 16651.
- [Dil08] K. A. Dill, S. B. Ozkan, M. S. Shell und T. R. Weikl. *The Protein Folding Problem*. Annual Review of Biophysics 37(1) (2008), S. 289–316.
- [DLK99] A. R. Dinner, T. Lazaridis und M. Karplus. *Understanding  $\beta$ -Hairpin Formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences 96(16) (März 1999), S. 9068–9073.
- [DM12] K. A. Dill und J. L. MacCallum. *The Protein-Folding Problem, 50 Years On*. Science 338(6110) (Nov. 2012), S. 1042–1046.

- [Dob03] C. M. Dobson. *Protein Folding and Misfolding*. Nature 426(6968) (Dez. 2003), nature02261.
- [Don06] S.-L. Dong, M. Löweneck, T. E. Schrader, W. J. Schreier, W. Zinth, L. Moroder und C. Renner. *A Photocontrolled  $\beta$ -Hairpin Peptide*. Chemistry – A European Journal 12(4) (Jan. 2006), S. 1114–1120.
- [EA50] A. Elliott und E. J. Ambrose. *Structure of Synthetic Polypeptides*. Nature 165(4206) (Juni 1950), S. 921–922.
- [Eat02] W. A. Eaton, V. Muñoz, S. J. Hagen, G. S. Jas, L. J. Lapidus, E. R. Henry und J. Hofrichter. *Fast Kinetics and Mechanisms in Protein Folding*. National Center for Biotechnology Information (US), Nov. 2002.
- [Ede67] H. Edelhoch. *Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins\**. Biochemistry 6(7) (Juli 1967), S. 1948–1954.
- [EG00] J. F. Espinosa und S. H. Gellman. *A Designed  $\beta$ -Hairpin Containing a Natural Hydrophobic Cluster*. Angewandte Chemie International Edition 39(13) (Juli 2000), S. 2330–2333.
- [EKR12] S. Enemark, N. A. Kurniawan und R. Rajagopalan.  *$\beta$ -Hairpin Forms by Rolling up from C-Terminal: Topological Guidance of Early Folding Dynamics*. Scientific Reports 2 (Sep. 2012).
- [ER12] S. Enemark und R. Rajagopalan. *Turn-Directed Folding Dynamics of  $\beta$ -Hairpin-Forming de Novo Decapeptide Chignolin*. Physical Chemistry Chemical Physics 14(36) (Aug. 2012), S. 12442–12450.
- [Fas76] G. D. Fasman. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. 3. ed. Cleveland, Ohio: CRC Press, 1976.
- [För48] T. Förster. *Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz*. Annalen der Physik 437(1-2) (Jan. 1948), S. 55–75.
- [For98] D. Forst, W. Welte, T. Wacker und K. Diederichs. *Structure of the Sucrose-Specific Porin ScrY from Salmonella Typhimurium and Its Complex with Sucrose*. Nature Structural & Molecular Biology 5(1) (Jan. 1998), S. 37–46.
- [Fri13] H. Friebolin. *Ein- Und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. 5., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 2013.
- [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.
- [Gar02] M. M. Garcia-Mira, M. Sadqi, N. Fischer, J. M. Sanchez-Ruiz und V. Muñoz. *Experimental Identification of Downhill Protein Folding*. Science 298(5601) (Dez. 2002), S. 2191–2195.

- [GC14] A. B. T. Ghisaidoobe und S. J. Chung. *Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques*. International Journal of Molecular Sciences 15(12) (Dez. 2014), S. 22518–22538.
- [Gel98] S. H. Gellman. *Minimal Model Systems for  $\beta$ -Sheet Secondary Structure in Proteins*. Current Opinion in Chemical Biology 2(6) (1998), S. 717–725.
- [GF69] N. J. Greenfield und G. D. Fasman. *Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation*. Biochemistry 8(10) (Okt. 1969), S. 4108–4116.
- [GG14] H. Gelman und M. Gruebele. *Fast Protein Folding Kinetics*. Quarterly Reviews of Biophysics 47(02) (Mai 2014), S. 95–142.
- [GH96] H. Günzler und M. H. Heise. *IR-Spektroskopie*. Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo: Wiley-VCH, 1996.
- [GLW81] E. Gudgin, R. Lopez-Delgado und W. R. Ware. *The Tryptophan Fluorescence Lifetime Puzzle. A Study of Decay Times in Aqueous Solution as a Function of pH and Buffer Composition*. Canadian Journal of Chemistry 59(7) (Apr. 1981), S. 1037–1044.
- [Gre06] N. J. Greenfield. *Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure*. Nature protocols 1(6) (2006), S. 2876–2890.
- [GW94] I. B. Grishina und R. W. 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.
- [Har37] G. S. Hartley. *The Cis-Form of Azobenzene*. Nature 140(3537) (Aug. 1937), S. 281–281.
- [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.
- [Hay14] W. M. Haynes, Hrsg. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 95th Edition*. 95 edition. CRC Press, Juni 2014.
- [HF39] G. S. Hartley und R. J. W. L. Fèvre. 119. *The Dipole Moments of Cis- and Trans-Azobenzenes and of Some Related Compounds*. Journal of the Chemical Society (Resumed) (Jan. 1939), S. 531–535.
- [HKM00] S. Honda, N. Kobayashi und E. Munekata. *Thermodynamics of a  $\beta$ -Hairpin Structure: Evidence for Cooperative Formation of Folding nucleus1*. Journal of Molecular Biology 295(2) (Jan. 2000), S. 269–278.

- [Hon04] S. Honda, K. Yamasaki, Y. Sawada und H. Morii. *10 Residue Folded Peptide Designed by Segment Statistics*. *Structure* 12(8) (Aug. 2004), S. 1507–1518.
- [Hon08] S. Honda et al. *Crystal Structure of a Ten-Amino Acid Protein*. *Journal of the American Chemical Society* 130(46) (Nov. 2008), S. 15327–15331.
- [HOZ97] P. Hamm, S. M. Ohline und W. Zinth. *Vibrational Cooling after Ultrafast Photoisomerization of Azobenzene Measured by Femtosecond Infrared Spectroscopy*. *The Journal of Chemical Physics* 106(2) (Jan. 1997), S. 519–529.
- [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.
- [Joh88] W. C. Johnson. *Secondary Structure of Proteins Through Circular Dichroism Spectroscopy*. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 17(1) (1988), S. 145–166.
- [JPT13] K. C. Jones, C. S. Peng und A. Tokmakoff. *Folding of a Heterogeneous  $\beta$ -Hairpin Peptide from Temperature-Jump 2D IR Spectroscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(8) (Feb. 2013), S. 2828–2833.
- [Kar97] M. Karplus. *The Levinthal Paradox: Yesterday and Today*. *Folding and Design* 2, Supplement 1 (Juni 1997), S69–S75.
- [Kat54] J. J. Katz. *Anhydrous Trifluoroacetic Acid as a Solvent for Proteins*. *Nature* 174(4428) (Sep. 1954), S. 509–509.
- [KB86] S. Krimm und J. Bandekar. *Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins*. *Advances in Protein Chemistry*. Hrsg. von C. B. Anfinsen, J. T. Edsall und F. M. Richards. Bd. 38. Academic Press, 1986, S. 181–364.
- [Ken58] J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff und D. C. Phillips. *A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis*. *Nature* 181(4610) (März 1958), S. 662–666.
- [Ken60] J. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, D. R. Davies, D. C. Phillips und V. C. Shore. *Structure of Myoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution*. *Nature* 185(4711) (Feb. 1960), S. 422–427.
- [KLE90] S. K. Katti, D. M. LeMaster und H. Eklund. *Crystal Structure of Thioredoxin from Escherichia Coli at 1.68 Å Resolution*. *Journal of Molecular Biology* 212(1) (März 1990), S. 167–184.

- [Kob00] N. Kobayashi, S. Honda, H. Yoshii und E. Munekata. *Role of Side-Chains in the Cooperative  $\beta$ -Hairpin Folding of the Short C-Terminal Fragment Derived from Streptococcal Protein G*. *Biochemistry* 39(21) (Mai 2000), S. 6564–6571.
- [KP00] S. M. Kelly und N. C. Price. *The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function*. *Current protein and peptide science* 1(4) (2000), S. 349–384.
- [Lak06] J. R. Lakowicz, Hrsg. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. Aufl. Boston, MA: Springer US, 2006.
- [Lee96] C.-H. Lee, K. Saksela, U. A. Mirza, B. T. Chait und J. Kuriyan. *Crystal Structure of the Conserved Core of HIV-1 Nef Complexed with a Src Family SH3 Domain*. *Cell* 85(6) (Juni 1996), S. 931–942.
- [Lev68] C. Levinthal. *Are There Pathways for Protein Folding?* Extrait du *Journal de Chimie Physique* 65(1) (1968), S. 22–24.
- [Lew10a] A. Lewandowska, S. Oldziej, A. Liwo und H. A. Scheraga.  *$\beta$ -Hairpin-Forming Peptides; Models of Early Stages of Protein Folding*. *Biophysical Chemistry* 151(1–2) (Sep. 2010), S. 1–9.
- [Lew10b] A. Lewandowska, S. Oldziej, A. Liwo und H. A. Scheraga. *Mechanism of Formation of the C-Terminal  $\beta$ -Hairpin of the B3 Domain of the Immunoglobulin Binding Protein G from Streptococcus. Part IV. Implication for the Mechanism of Folding of the Parent Protein*. *Biopolymers* 93(5) (Mai 2010), S. 469–480.
- [Lew27] P. S. Lewis. *The Heat-Denaturation of Proteins. Part IV*. *Biochemical Journal* 21(1) (1927), S. 46–53.
- [LK95] S. Labeit und B. Kolmerer. *Titins: Giant Proteins in Charge of Muscle Ultrastructure and Elasticity*. *Science* 270(5234) (Okt. 1995), S. 293–296.
- [Löw05] M. Löweneck. *Synthese Lichtschaltbarer Azobenzol-Enthaltender Peptide Und Deren Biophysikalische Charakterisierung*. Diss. München: Technische Universität München, Apr. 2005.
- [MG82] E. J. Miller und S. Gay. *Collagen: An Overview. Methods in Enzymology*. Bd. 82. *Structural and Contractile Proteins Part A: Extracellular Matrix*. Academic Press, 1982, S. 3–32.
- [Mit34] E. Mitscherlich. *Ueber Das Stickstoffbenzid*. *Annalen der Pharmacie* 12(2-3) (Jan. 1834), S. 311–314.
- [Mor92] A. L. Morris, M. W. MacArthur, E. G. Hutchinson und J. M. Thornton. *Stereochemical Quality of Protein Structure Coordinates*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 12(4) (Apr. 1992), S. 345–364.

- [MSM56] T. Miyazawa, T. Shimanouchi und S.-i. Mizushima. *Characteristic Infra-red Bands of Monosubstituted Amides*. The Journal of Chemical Physics 24(2) (Feb. 1956), S. 408–418.
- [Muñ97] V. Muñoz, P. A. Thompson, J. Hofrichter und W. A. Eaton. *Folding Dynamics and Mechanism of  $\beta$ -Hairpin Formation*. Nature 390(6656) (Nov. 1997), S. 196–199.
- [Muñ98] V. Muñoz, E. R. Henry, J. Hofrichter und W. A. Eaton. *A Statistical Mechanical Model for  $\beta$ -Hairpin Kinetics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(11) (Mai 1998), S. 5872–5879.
- [Nob62] Nobelprize.org. *The Nobel Prize in Chemistry 1962*. [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1962/](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1962/). 1962.
- [Nob72] Nobelprize.org. *The Nobel Prize in Chemistry 1972*. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1972/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1972/). 1972.
- [OW83] M. Ohgushi und A. Wada. ‘*Molten-Globule State*’: *A Compact Form of Globular Proteins with Mobile Side-Chains*. FEBS Letters 164(1) (Nov. 1983), S. 21–24.
- [PBG08] A. Peralvarez-Marin, A. Barth und A. Gräslund. *Time-Resolved Infrared Spectroscopy of pH-Induced Aggregation of the Alzheimer A $\beta$ 1–28 Peptide*. Journal of Molecular Biology 379(3) (Juni 2008), S. 589–596.
- [PC51a] L. Pauling und R. B. Corey. *Atomic Coordinates and Structure Factors for Two Helical Configurations of Polypeptide Chains*. Proceedings of the National Academy of Sciences 37(5) (Jan. 1951), S. 235–240.
- [PC51b] L. Pauling und R. B. Corey. *The Pleated Sheet, A New Layer Configuration of Polypeptide Chains*. Proceedings of the National Academy of Sciences 37(5) (Jan. 1951), S. 251–256.
- [PC51c] L. Pauling und R. B. Corey. *The Polypeptide-Chain Configuration in Hemoglobin and Other Globular Proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences 37(5) (Jan. 1951), S. 282–285.
- [PC51d] L. Pauling und R. B. Corey. *The Structure of Feather Rachis Keratin*. Proceedings of the National Academy of Sciences 37(5) (Jan. 1951), S. 256–261.
- [PC51e] L. Pauling und R. B. Corey. *The Structure of Fibrous Proteins of the Collagen-Gelatin Group*. Proceedings of the National Academy of Sciences 37(5) (Jan. 1951), S. 272–281.
- [PC51f] L. Pauling und R. B. Corey. *The Structure of Hair, Muscle, and Related Proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences 37(5) (Jan. 1951), S. 261–271.

- [PC51g] L. Pauling und R. B. Corey. *The Structure of Synthetic Polypeptides*. Proceedings of the National Academy of Sciences 37(5) (Jan. 1951), S. 241–250.
- [Pet83] J. W. Petrich, M. C. Chang, D. B. McDonald und G. R. Fleming. *On the Origin of Nonexponential Fluorescence Decay in Tryptophan and Its Derivatives*. Journal of the American Chemical Society 105(12) (Juni 1983), S. 3824–3832.
- [Pod15] T. Podewin, M. S. Rampp, I. Turkanovic, K. L. Karaghiosoff, W. Zinth und A. Hoffmann-Röder. *Photocontrolled Chignolin-Derived  $\beta$ -Hairpin Peptidomimetics*. Chemical Communications 51(19) (Feb. 2015), S. 4001–4004.
- [Pop12] A. Popp, L. Wu, T. A. Keiderling und K. Hauser. *Impact of  $\beta$ -Turn Sequence on  $\beta$ -Hairpin Dynamics Studied with Infrared-Detected Temperature Jump*. Journal of Spectroscopy 27(5-6) (Juli 2012), S. 557, 557–564, 564.
- [PVD14] D. Popovic, D. Vucic und I. Dikic. *Ubiquitination in Disease Pathogenesis and Treatment*. Nature Medicine 20(11) (Nov. 2014), S. 1242–1253.
- [Ram16] M. S. Rampp. *Spektroskopische Untersuchungen lichtinduzierter, ultraschneller Konformationsdynamiken von Modellpeptiden*. Diss. München: Ludwig-Maximilians-Universität München, Mai 2016.
- [Ric81] J. S. Richardson. *The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure*. *Advances in Protein Chemistry*. Hrsg. von J. T. E. C.B. Anfinsen und F. M. Richards. Bd. 34. Academic Press, 1981, S. 167–339.
- [Rop16] V. Ropars et al. *The Myosin X Motor Is Optimized for Movement on Actin Bundles*. Nature Communications 7 (Sep. 2016), S. 12456.
- [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.
- [RRS63] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan und V. Sasisekharan. *Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations*. Journal of Molecular Biology 7(1) (Juli 1963), S. 95–99.
- [SB92] J. M. Scholtz und R. L. Baldwin. *The Mechanism of Alpha-Helix Formation by Peptides*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 21(1) (1992), S. 95–118.
- [Sch04] T. Schrader, A. Sieg, F. Koller, W. Schreier, Q. An, W. Zinth und P. Gilch. *Vibrational Relaxation Following Ultrafast Internal Conversion: Comparing IR and Raman Probing*. Chemical Physics Letters 392(4–6) (Juli 2004), S. 358–364.

- [Sch07] T. E. Schrader et al. *Light-Triggered  $\beta$ -Hairpin Folding and Unfolding*. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(40) (Feb. 2007), S. 15729–15734.
- [Sch08] T. E. Schrader. *Strukturdynamik Eines Photoschaltbaren  $\beta$ -Hairpin Modellpeptids*. Diss. München: Ludwig-Maximilians-Universität München, Okt. 2008.
- [Sch54] Schellman. *The Stability of Hydrogen-Bonded Peptide Structures in aqueous solution*. Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg. Serie chimique 29(14-15) (Dez. 1954), S. 230–259.
- [Sea01] M. S. Searle. *Peptide Models of Protein  $\beta$ -Sheets: Design, Folding and Insights into Stabilising Weak Interactions*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 (7) (2001), S. 1011–1020.
- [SEG99] J. Sabelko, J. Ervin und M. Gruebele. *Observation of Strange Kinetics in Protein Folding*. Proceedings of the National Academy of Sciences 96(11) (Mai 1999), S. 6031–6036.
- [Ser00] L. Serrano. *The Relationship between Sequence and Structure in Elementary Folding Units*. *Advances in Protein Chemistry*. Bd. 53. Protein folding mechanisms. Academic Press, 2000, S. 49–85.
- [SG64] A. Savitzky und M. J. E. Golay. *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. Analytical Chemistry 36(8) (Juli 1964), S. 1627–1639.
- [SJ10] C. M. Santiveri und M. A. Jiménez. *Tryptophan Residues: Scarce in Proteins but Strong Stabilizers of  $\beta$ -Hairpin Peptides*. Peptide Science 94(6) (Jan. 2010), S. 779–790.
- [SM85] D. Strickland und G. Mourou. *Compression of Amplified Chirped Optical Pulses*. ResearchGate 55(3) (Dez. 1985), S. 219–221.
- [Sob02] A. L. Sobolewski, W. Domcke, C. Dedonder-Lardeux und C. Jouvet. *Excited-State Hydrogen Detachment and Hydrogen Transfer Driven by Repulsive  $1\pi\sigma^*$  States: A New Paradigm for Nonradiative Decay in Aromatic Biomolecules*. Physical Chemistry Chemical Physics 4(7) (März 2002), S. 1093–1100.
- [Sta13] J. Stark. *Observation of the Separation of Spectral Lines by an Electric Field*. Nature 92 (Jan. 1913), S. 401–401.
- [Sue07] A. Suenaga, T. Narumi, N. Futatsugi, R. Yanai, Y. Ohno, N. Okimoto und M. Taiji. *Folding Dynamics of 10-Residue  $\beta$ -Hairpin Peptide Chignolin*. Chemistry – An Asian Journal 2(5) (Mai 2007), S. 591–598.

- [SWK57] M. Saunders, A. Wishnia und J. G. Kirkwood. *The Nuclear Magnetic Resonance Spectrum Of Ribonuklease*. Journal of the American Chemical Society 79(12) (Juni 1957), S. 3289–3290.
- [Tak90] S. Takahashi. *Conformation of Membrane Fusion-Active 20-Residue Peptides with or without Lipid Bilayers. Implication of .Alpha.-Helix Formation for Membrane Fusion*. Biochemistry 29(26) (Juli 1990), S. 6257–6264.
- [TEH97] P. A. Thompson, W. A. Eaton und J. Hofrichter. *Laser Temperature Jump Study of the Helix  $\rightleftharpoons$  Coil Kinetics of an Alanine Peptide Interpreted with a 'Kinetic Zipper' Model*. Biochemistry 36(30) (Juli 1997), S. 9200–9210.
- [TK75] I. Tatischeff und R. Klein. *Influence of the Environment on the Excitation Wavelength Dependence of the Fluorescence Quantum Yield of Indole*. Photochemistry and Photobiology 22(6) (Dez. 1975), S. 221–229.
- [Tre07] S. R. Trevino, S. Schaefer, J. M. Scholtz und C. N. Pace. *Increasing Protein Conformational Stability by Optimizing  $\beta$ -Turn Sequence*. Journal of Molecular Biology 373(1) (Okt. 2007), S. 211–218.
- [Tre69] E. Treacy. *Optical Pulse Compression with Diffraction Gratings*. IEEE Journal of Quantum Electronics 5(9) (Sep. 1969), S. 454–458.
- [TW57] F. W. J. Teale und G. Weber. *Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids*. Biochemical Journal 65(3) (März 1957), S. 476–482.
- [VK90] S. Y. Venyaminov und N. N. Kalnin. *Quantitative IR Spectrophotometry of Peptide Compounds in Water (H<sub>2</sub>O) Solutions. I. Spectral Parameters of Amino Acid Residue Absorption Bands*. Biopolymers 30(13-14) (Jan. 1990), S. 1243–1257.
- [Vol00] M. Volk et al. *Carbonyl Spectator Bonds as Sensitive Sensors for Charge Transfer Reactions on the Femtosecond Time Scale*. The Journal of Physical Chemistry A 104(21) (Juni 2000), S. 4984–4988.
- [Vol97] M. Volk, Y. Kholodenko, H. S. M. Lu, E. A. Gooding, W. F. DeGrado und R. M. Hochstrasser. *Peptide Conformational Dynamics and Vibrational Stark Effects Following Photoinitiated Disulfide Cleavage*. The Journal of Physical Chemistry B 101(42) (1997), S. 8607–8616.
- [VP97] S. Y. Venyaminov und F. G. Prendergast. *Water (H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O) Molar Absorptivity in the 1000-4000 Cm-1 Range and Quantitative Infrared Spectroscopy of Aqueous Solutions*. Analytical Biochemistry 248(2) (Juni 1997), S. 234–245.
- [Whi61] F. H. White. *Regeneration of Native Secondary and Tertiary Structures by Air Oxidation of Reduced Ribonuclease*. Journal of Biological Chemistry 236(5) (Jan. 1961), S. 1353–1360.

- [Wik16] Wikipedia. *Ramachandran-Plot*. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Ramachandran-Plot&oldid=150090788>. Page Version ID: 150090788. Jan. 2016.
- [Wil96] S. Williams, T. P. Causgrove, R. Gilmanishin, K. S. Fang, R. H. Callender, W. H. Woodruff und R. B. Dyer. *Fast Events in Protein Folding: Helix Melting and Formation in a Small Peptide*. *Biochemistry* 35(3) (Jan. 1996), S. 691–697.
- [WPR97] T. Wilhelm, J. Piel und E. Riedle. *Sub-20-Fs Pulses Tunable across the Visible from a Blue-Pumped Single-Pass Noncollinear Parametric Converter*. *Optics Letters* 22(19) (Okt. 1997), S. 1494–1496.
- [WZ11] J. Wachtveitl und A. Zumbusch. *Azobenzene: An Optical Switch for in Vivo Experiments*. *ChemBioChem* 12(8) (Mai 2011), S. 1169–1170.
- [Xu08] W. Xu, T. Lai, Y. Yang und Y. Mu. *Reversible Folding Simulation by Hybrid Hamiltonian Replica Exchange*. *The Journal of Chemical Physics* 128(17) (Mai 2008), S. 175105.
- [Zew00] A. H. Zewail. *Femtochemistry: Atomic-Scale Dynamics of the Chemical Bond*. *The Journal of Physical Chemistry A* 104(24) (Juni 2000), S. 5660–5694.
- [Zew93] A. H. Zewail. *Femtochemistry*. *The Journal of Physical Chemistry* 97(48) (Dez. 1993), S. 12427–12446.
- [Zhe03] A. Zheltikov. *Editorial: Supercontinuum Generation*. *Applied Physics B* 77(2-3) (Sep. 2003), S. 143–147.
- [ZSB92] R. Zwanzig, A. Szabo und B. Bagchi. *Levinthal's Paradox*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(1) (Jan. 1992), S. 20–22.

# Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ohne eure Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Im Besonderen möchte ich folgenden Personen danken:

**Prof. Dr. Wolfgang Zinth**, für die Möglichkeit dieser Promotion, Ihrer exzellenten Betreuung, den zahlreichen Diskussionen und Ihr stets offenes Ohr bei allen möglichen Problemen und Fragestellungen.

**Prof. Dr. Martin Zacharias**, für die Übernahme des Zweitgutachtens, der freundlichen Kooperation und den hilfreichen MD-Simulationen.

**Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder, Manuel Gailer und Tom Podewin**, für die freundliche Kooperation und der immer unkomplizierten Versorgung mit Peptiden. Manu für deine Wochenenden, die du für die Synthese von  $^{13}\text{C}_{\text{Asp}}$ -AzoChignolin geopfert hast und Tom für die CD- und NMR-Spektren.

**Christina Frost**, für die hilfreichen MD-Simulationen, den daraus übernommenen Strukturen und dass du alle möglichen Werte aus deinen Daten für mich extrahiert hast.

**Den z20-Laborkollegen:** Julia Gontcharov, Michael Rampp, Lizhe Liu und Bert Pilles für eure tatkräftige Unterstützung im Labor und die vielen lustigen Stunden, die wir dort verbracht haben und dem grandiosen USA-Trip zur TRVS mit Michi und Lizhe.

**Den Korrekturlesern:** Anne Reiner, Julia Gontcharov, Florian Trommer, Michael Rampp und Julian Schauseil, die sich unermüdlich durch die Seiten gekämpft haben.

**Den Admins:** Florian Trommer und Karl-Heinz Mantel für eure Unterstützung, wenn die PCs nicht so wollten wie ich das gerne gehabt hätte.

**Der Werkstatt:** Rudi Schwarz, Alfons Stork und Christian Hausmann, für die stets schnelle und präzise Anfertigung der benötigten Teile.

**Dem Sekretariat:** Frau Michaelis und Frau Widmann-Diermeier, für die Hilfe bei Verwaltungsangelegenheiten.

**Dem BMO,** für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die nette Zeit, die ich hier verbringen durfte.

**Meiner ganzen Familie,** für eure liebe Unterstützung.

und

**Elisa,** für deine Geduld und vieles mehr.