

**Zur thermodynamischen Stabilität
von Proteinen:
Fluoreszenzspektroskopische
Untersuchungen am Beispiel
eines modifizierten Cytochrom c**

Harald Lesch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Fischer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Friedrich
2. Univ.-Prof. Dr. F. G. Parak

Die Dissertation wurde am 16.09.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 11.11.2003 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	5
2.1	Der Faltungsprozess von Proteinen	5
2.1.1	Biochemie der Proteinfaltung	5
2.1.2	Betrachtung von Thermodynamik und Kinetik	5
2.1.3	Landschaften und Trichter	7
2.1.4	Der Übergangszustand in der Proteinfaltung	10
2.1.5	Untersuchungsmethoden zur Proteinfaltung	11
2.1.6	Chaperone und Fehlfaltung	12
2.2	Stabilitätsdiagramme von Proteinen	14
2.2.1	Thermodynamische Größen	14
2.2.2	Druck- und Temperaturdenaturierungen	17
2.2.3	Elliptisches Phasendiagramm	18
2.2.4	Die Rolle des Lösungsmittels für die Proteinstabilität	21
3	Experimentelle Methoden	23
3.1	Spektroskopie an Proteinen unter Druck	23
3.1.1	IR-Spektroskopie	23
3.1.2	Spektroskopie im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich	24
3.2	Die Methode des spektralen Lochbrennens	28
3.2.1	Homogene und inhomogene Linien	28
3.2.2	Mechanismus des spektralen Lochbrennens	30
3.2.3	Bestimmung von Kompressibilitäten	32
3.3	Experimentelles	38
3.3.1	Denaturierungsexperimente	38
3.3.2	“Druck-Effekt” mit Lochbrennspektroskopie	40
3.3.3	Eingesetzte Cytochrom c-Proben	42
4	Bestimmung des Phasendiagramms von Cytochrom c	45
4.1	Einleitung	45
4.2	Spektrale Eigenschaften	45
4.3	Grundlegende Muster und ihre Beschreibung	46

4.3.1	Temperaturdenaturierungen bei Atmosphärendruck	46
4.3.2	Druckdenaturierungen bei Raumtemperatur	48
4.4	Diskussion der Fluoreszenzspektren	51
4.4.1	Allgemeines Muster der Fluoreszenz	51
4.4.2	Mikroskopische Aspekte des Transformationsprozesses bei Druckdenaturierungen	51
4.4.3	Mechanismus der Temperaturdenaturierungen	54
4.4.4	Gemeinsamkeiten und Unterschiede	55
4.4.5	Eigenschaften der Linienbreite	55
4.5	Verschiedene Denaturierungsbedingungen	58
4.5.1	Temperaturdenaturierungen unter verschiedenen Drücken	58
4.5.2	Druckdenaturierungen bei verschiedenen Temperaturen	59
4.5.3	Auswertung	60
4.6	Thermodynamik und Phasendiagramm	60
4.6.1	Bestimmung der Gleichgewichtskonstante	60
4.6.2	Phasendiagramm	64
4.6.3	Diskussion zur Thermodynamik der Entfaltung von Zn-Cytochrom c	64
4.6.4	Bemerkung zur Zwei-Zustands-Näherung: Wie vertrauenswürdig ist das Phasendiagramm?	69
4.7	Besonderheiten	70
4.7.1	Kompliziertere Muster	70
4.7.2	Reentrante Übergänge	71
5	Wechselwirkungsradius in Cytochrom c	73
5.1	Motivation	73
5.2	Modellbetrachtung	74
5.3	Ergebnisse und Diskussion	77
5.3.1	Absorptionsspektrum Zn-Cytochrom c	77
5.3.2	“Druck-Effekt” bei ansteigendem Druck	78
5.3.3	“Druck-Effekt” bei abnehmendem Druck	80
5.3.4	Auswertung	81
6	Zusammenfassung	89
A	Abkürzungen	93
	Literaturverzeichnis	97
	Nachwort	111

Abbildungsverzeichnis

2.1	Gyrationsradien von Proteinen bei verschiedenen Temperaturen	7
2.2	Energielandschaften zur Proteinfaltung: Golfplatz und Trichter	8
2.3	Zweidimensionaler Faltungstrichter	9
2.4	Gelöstes Protein: Hohlräume und Umgebung	14
2.5	Freie Enthalpie als Funktion des Drucks und der Temperatur	18
2.6	Ellipsenförmiger Stabilitätsbereich von Proteinen	19
2.7	Stabilitätsdiagramm: Änderungen von Volumen und Entropie	20
3.1	Spektren, Jablonski-Diagramm sowie damit verbundene Prozesse . . .	25
3.2	Homogene Linienbreite	29
3.3	Inhomogene Verbreiterung	30
3.4	Spektrales Lochbrennen	31
3.5	Aufbau für Denaturierungsexperimente	38
3.6	Details der Diamantambosszelle	39
3.7	Aufbau zur Messung des “Druck-Effekts” mittels Lochbrennspektro- skopie	40
3.8	Struktur von Cytochrom c	42
4.1	Absorptions- und Emissionsspektrum von Zn-Cytochrom c	46
4.2	Emissionsspektren von Zn-Cytochrom c während einer Temperatur- denaturierung unter Atmosphärendruck	47
4.3	Verlauf von Zentrum und Breite der Q_x - Q_y -00-Bande für eine Tem- peraturdenaturierung unter Atmosphärendruck	48
4.4	Emissionsspektren von Zn-Cytochrom c während einer Druckdenatu- rierung bei 20°C	49
4.5	Verlauf von Zentrum und Breite der Q_x - Q_y -00-Bande für eine Druck- denaturierung bei 25°C	50
4.6	Erklärung zur Rotverschiebung unter Druck	52
4.7	Erklärung zu Rot- und Blauverschiebung unter hohem Druck	52
4.8	Erklärung zur Rotverschiebung bei der Temperaturdenaturierung . .	54
4.9	Übersicht ausgewählter Temperaturdenaturierungen	58
4.10	Übersicht ausgewählter Druckdenaturierungen	59
4.11	Bestimmung von λ_N und λ_D	61
4.12	Freie Enthalpie in Abhängigkeit von der Temperatur	62

4.13	Freie Enthalpie in Abhängigkeit vom Druck	63
4.14	Vollständiges Phasendiagramm von Zn-Cytochrom c	64
4.15	Kältedenaturierung bei Atmosphärendruck	66
4.16	Verlauf von Zentrum und Breite der Q_x - Q_y -00-Bande für eine Temperaturdenaturierung unter hohem Druck (0,7 GPa)	71
5.1	Absorptionsspektrum von Zn-Cytochrom c bei 2 K	77
5.2	Lochspektren: Effekt ansteigender Drücke	78
5.3	“Druck-Effekt”: Verschiebung der Zentren bei ansteigenden Drücken .	79
5.4	Lochspektren: Effekt abnehmender Drücke	80
5.5	“Druck-Effekt”: Verschiebung der Zentren bei abnehmenden Drücken	81
5.6	Druckbezogene Verschiebung in Abhängigkeit von der Brennfrequenz	82
5.7	Inhomogene Banden im Q_x - Q_y -(00)-Übergang	83
5.8	Verdeutlichung des Wechselwirkungsradius in Cytochrom c anhand der Röntgenstruktur	84

Kapitel 1

Einleitung

Proteine stellen aufgrund ihrer enormen Bedeutung für das Leben eine vielseitig untersuchte Substanzklasse dar. Dies ist nicht erst seit den riesigen Fortschritten auf dem Bereich der Medizin, Gentechnologie und Biotechnologie der Fall. Schon immer waren diese Biomoleküle ein wichtiges Untersuchungsobjekt auf dem Grenzgebiet zwischen Biologie, Chemie und Physik. Die Faltung von Proteinen in ihre stabile Struktur ist Untersuchungsobjekt zahlreicher Wissenschaftler [1]. Dabei sind sowohl kinetische als auch thermodynamische Fragestellungen nach wie vor offen.

Die dreidimensionale Struktur der Proteine spielt hinsichtlich ihrer Funktion eine bedeutende Rolle. Zudem handelt es sich bei dieser Molekülgestaltung keineswegs um starre Moleküle. Vielmehr finden permanent Fluktuationen statt, die katalytische Prozesse oder Redoxreaktionen erst möglich machen. Proteine sind Systeme, die sowohl einen gewissen Grad an Ordnung als auch an Unordnung benötigen. In jüngerer Vergangenheit sind auch Krankheiten entdeckt worden, bei denen die Problematik möglicher Strukturänderungen deutlich wird [2]. Um diese Problematik besser deuten zu können, müssen einige wichtige Fragen genauer geklärt werden:

- Wie kommt es zu dieser fluktuierenden Proteinstruktur?
- Gibt es für eine vorgegebene Aminosäuresequenz wirklich nur eine bestimmte stabile Tertiärstruktur?
- Wie faltet sich das Protein zu seiner natürlichen, nativen Form?
- Unter welchen physikalischen Bedingungen ist die native, d.h. wohlgefaltete, Struktur stabil?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Temperatur und Druck auf die Proteinstabilität näher untersucht. Allgemein ist bekannt, dass "Eiweiß", das Proteingemisch des Hühnereis, bei höheren Temperaturen denaturiert. In Folge dessen verändert es seinen Aggregatzustand von flüssig nach fest. Desweiteren konnte BRIDGMAN vor knapp 100 Jahren feststellen, dass die Ausübung von Druck auf Eiweiß ebenfalls zu einer erstarrten Substanz führt, die der von gekochtem Eiweiß

durchaus ähnelt [3]. Daneben ist es nicht nur mit Hitze, sondern auch durch Kälte möglich, Proteine vom nativen in den denaturierten Zustand überzuführen.

Die Auswirkung von Druck auf Proteine oder auf proteinhaltige Substanzen wurde lange Zeit kaum beachtet. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass Lebensmittel nicht nur durch Erhitzen, sondern auch durch hohen Druck haltbar gemacht werden können [4; 5]. Bei Druckkonservierung ist sogar die Änderung des Geschmacks vernachlässigbar. Allerdings steht der Verbraucher dieser Technologie skeptisch gegenüber. Dies ist aus wissenschaftlicher Sicht durchaus nachvollziehbar, da Druck den Zustand von Proteinen gravierend ändern kann. In Abhängigkeit von der Höhe des Drucks können Proteine eine Vielfalt möglicher Strukturänderungen, wie z.B. Protonierung-Deprotonierung, lokale Konformationsänderungen, Dissoziation oder Denaturierung eingehen. Während bei Drücken im MPa-Bereich Strukturänderung reversibel sind, ergeben sich im GPa-Bereich – abhängig von Größe, Struktur und chemischer Umgebung – irreversible Veränderungen.

Da Proteine unter bestimmtem Druck und bestimmter Temperatur denaturieren, ist es also möglich, Zustandsdiagramme von Proteinen als Funktion von Druck und Temperatur zu erstellen. Unter Annahme von nur einem nativen und einem denaturierten Zustand folgt dieses Phasendiagramm, d.h. die Grenze zwischen den beiden Zuständen, einer Ellipse. Voraussetzung hierfür ist, dass beide Zustände durch konstante thermodynamische Parameter charakterisiert sind. Diese sind die zweite Ableitung der Freien Enthalpie nach dem Druck und der Temperatur, wie isobarer thermischer Ausdehnungskoeffizient, isotherme Kompressibilität und Wärmekapazität. Neben der Klärung der mikroskopischen Transformationsvorgänge gilt es auch herauszufinden, ob die Gleichgewichtsthermodynamik für diese Experimente gilt. Da die Entfaltung mancher kleiner Proteine unter Druck oder Temperatur einen reversiblen Prozess darstellt, können aus dem Entfaltungsprozess auch Rückschlüsse auf den Ablauf der Faltung gezogen werden.

Ziel dieser Arbeit war der Aufbau einer Apparatur zur Untersuchung von Denaturierungsprozessen von Proteinen unter verschiedenen physikalischen Bedingungen (Druck, Temperatur). Als Messparameter wurde die Änderung des Fluoreszenzspektrums ausgewählt. Das Hauptziel dieser Arbeit war die Aufklärung der folgenden Fragen:

- Welche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten lassen sich bei Hitze-, Kälte- und Druckdenaturierung identifizieren?
- Welche Rolle spielt das Hydratwasser bei Transformationsprozessen?
- Verläuft der Transformationsprozess über Zwischenzustände?
- Werden für Druck und Temperatur die gleichen Intermediate erhalten?
- Lassen sich die erhaltenen Daten in einem Phasendiagramm darstellen?

An einem modifizierten Cytochrom *c* wurde eine ausreichende Anzahl an Denaturierungspunkten gemessen, so dass das vollständige Phasendiagramm erstellt werden konnte. Desweiteren ließen sich die mit dem Entfaltungsvorgang verbundenen Änderungen einer Reihe thermodynamischer Parameter bestimmen. Anhand der Muster der Denaturierungsverläufe konnten Unterschiede in den Modellvorstellungen von Druck- und Temperaturdenaturierungen bestätigt werden. Abschließend war es mit der Technik des spektralen Lochbrennens möglich, eine Abschätzung über den Wechselwirkungsradius des Chromophors zu gewinnen. Diese Experimente stellen eine sinnvolle Ergänzung zu den Messungen des Phasendiagramms dar. Hieraus war es möglich, die Aussagekraft der bei den Denaturierungsexperimenten verwendeten Technik zu bewerten sowie die Interpretationen der mikroskopischen Abläufe zu bestätigen.

Kapitel 2

Theoretischer Hintergrund

In diesem Kapitel werden zunächst die Hintergründe der Proteinfaltung beschrieben. Neben den verschiedenen Ansätzen, die Biophysik der Proteinfaltung zu verstehen, werden auch Beispiele zur Untersuchung von Faltungsprozessen angeführt.

Im zweiten Teil dieses Kapitels wird auf das Stabilitätsdiagramm von Proteinen eingegangen. Es bildet den Hintergrund für einen großen Teil der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente.

2.1 Der Faltungsprozess von Proteinen

2.1.1 Biochemie der Proteinfaltung

Proteine sind an nahezu jedem biologischen Prozess beteiligt [6; 7]. Anhand der Information, die in der zellulären DNA codiert ist, werden Proteine in den Ribosomen hergestellt. Die in der DNA gespeicherte Information wird während der *Transkription* zunächst auf die RNA umgeschrieben. Je drei RNA-Bausteine bestimmen dabei den Code für eine der 20 essenziellen Aminosäuren. Dieser Übersetzungsprozess wird als *Translation* bezeichnet. Die in einer definierten Reihenfolge aufgebauten linearen Ketten von Aminosäuren stellen die *Primärstruktur* dar. Sie müssen sich, um ihre Funktion auszuüben, zu einer einzigartigen, dreidimensionalen nativen Struktur falten. Dieser Vorgang läuft zunächst über die Bildung der *Sekundärstruktur* ab, bei der α -Helizes, β -Faltblätter und *Schlaufen* entstehen. Die nächste hierarchische Stufe beim Aufbau der Proteine stellt die *Tertiärstruktur* dar. Sie ist die dreidimensionale Erscheinungsform des Moleküls und wird häufig durch Disulfidbrücken stabilisiert. Die Kombination mehrerer Peptidstränge über Disulfid- und Wasserstoffbrückenbindungen wird schließlich als *Quartärstruktur* bezeichnet.

2.1.2 Betrachtung von Thermodynamik und Kinetik

Die zur Faltung eines Proteins notwendige Information ist somit bereits in der Sequenz enthalten. Die Aminosäuresequenz muss hierfür ein thermodynamisches und

ein kinetisches Kriterium erfüllen [8]:

Das *thermodynamische Kriterium* besteht darin, dass die Moleküle nur eine einzige gefaltete Konformation einnehmen, die unter physiologischen Bedingungen stabil ist. Diese Struktur stellt den nativen Zustand dar. Die Freie Energie des nativen Zustands eines Proteins ist unter physiologischen Bedingungen nur geringfügig niedriger als die des denaturierten Zustands. Als Grund hierfür kann eine annähernd wechselseitige Aufhebung großer enthalpischer und entropischer Beiträge angeführt werden. Während die Konformationsentropie den denaturierten Zustand stark begünstigt, zeigt die Analyse der Beiträge zur “effektiven Energie”, dass unpolare Gruppen den gefalteten Zustand favorisieren. Dies ist auf anziehende Van-der-Waals-Kräfte in der dichtgepackten nativen Struktur sowie auf den hydrophoben Effekt zurückzuführen. Polare Gruppen hingegen zeigen sowohl Wechselwirkungen mit geladenen Aminosäuren im Innern des Proteins als auch mit dem Lösungsmittel. Da sich die dabei auftretenden Wechselwirkungen gegenseitig aufheben können, leisten die polaren Gruppen einen viel kleineren Beitrag zur Stabilität des nativen Zustands. Für globuläre Proteine ergibt sich eine “Freie Entfaltungsentnergie” von ca. 0,1 kcal/mol pro Aminosäure [9].

Da Wechselwirkungen, die die native Struktur stabilisieren, alternative Faltungsmuster derselben Sequenz erheblich destabilisieren, ist der native Zustand einzigartig. Die Evolution hat also Sequenzen mit einem vergleichsweise tiefen Energieminimum für den nativen Zustand hervorgebracht, um bei physiologischen Temperaturen falsch oder partiell gefaltete Strukturen auszuschließen.

Um die Freie Energie eines Proteins mit seinen Konformationen in Bezug zu setzen, kann man diese als Funktion eines Ordnungsparameters beschreiben. Ein häufig verwendeter Ordnungsparameter ist der Gyrationradius R_g , der die Ausdehnung eines Teilchen, abhängig von den Massen m_i und den zugehörigen Ortskoordinaten r_i seiner Bausteine, wie folgt beschreibt (nach [10]):

$$R_g^2 = \frac{\sum_{i=1}^n m_i |r_i - r_c|^2}{\sum_{i=1}^n m_i} \quad \text{mit} \quad r_c = \frac{\sum_{i=1}^n m_i r_i}{\sum_{i=1}^n m_i} \quad (2.1)$$

Er stellt den kugelförmigen Umriss eines nur unscharf erkannten Moleküls dar. Der Verlauf der Freien Energie als Funktion des Gyrationradius ist allgemein stark von den Umgebungsbedingungen (u.a. der Temperatur) abhängig, wie in Abbildung 2.1 gezeigt wird.

Im energetischen Minimum, z.B. nativer Zustand, sind noch Fluktuationen im Ångström-Bereich zulässig, wengleich sich die Strukturen sehr ähnlich sind. Der Bereich höherer Energie zeigt die große Anzahl der Konformationen des denaturierten Zustands. Der als *random coil* bezeichnete Zustand ist großen R_g -Werten zuzuordnen. Bei diesem “Zufallsknäuel” existiert keine erkennbar geordnete Struktur. Der sog. *molten globule*-Zustand besitzt deutlich kleinere Gyrationradien, die jedoch größer als der R_g -Wert des nativen Zustands sind. Diese “geschmolzenen Kügelchen”

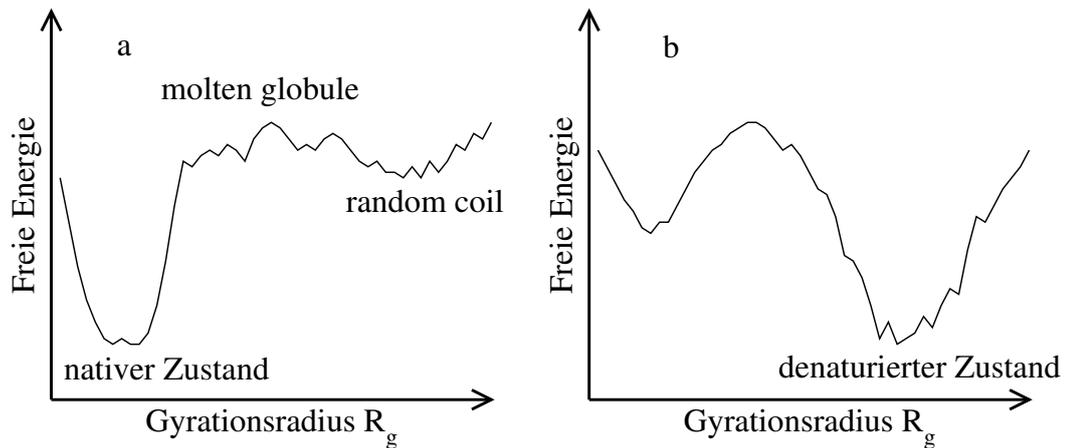


Abbildung 2.1: Freie Energie eines Proteins in Abhängigkeit vom Gyrationradius bei einer Temperatur, bei der (a) der native Zustand stabil ist und (b) bei einer Temperatur, bei der der denaturierte Zustand stabil ist (nach [8]).

weisen eine kompakte Form mit nativähnlicher Sekundärstruktur auf. Es fehlen aber eine deutliche Seitenkettenpackung und eine definierte Tertiärstruktur. Die Strukturänderungen vom *random coil*- zum *nativen* Zustand finden auf einer Längenskala von 10 – 20 Å und einer Zeitskala von Mikro- bis Millisekunden statt. Hinweise, dass der “molten globule”-Zustand nicht nur ein theoretisches Konzept darstellt, sondern ein realer Zustand ist, ergaben zeitaufgelöste Röntgenstreuexperimente [11].

Das *kinetische Kriterium*, das die Proteinsequenz erfüllen muss, besteht darin, dass sich die ungefaltete Polypeptidkette in einer annehmbaren Zeit zum nativen Zustand falten kann. Typischerweise werden hierfür Millisekunden bis Sekunden benötigt [8]. Eine Aminosäurekette kann jedoch eine astronomische Anzahl an Konformationen einnehmen. Daher muss es einen Weg geben, den nativen Zustand in einer um Größenordnungen geringeren Zeit zu erreichen, als für eine statistische Suche erforderlich wäre. Ein anschauliches Beispiel hierzu ist ein Polypeptid aus 100 Aminosäuren, bei dem jeder Aminosäurebaustein zwei mögliche Konformationen einnehmen kann. In diesem Fall gäbe es insgesamt 10^{30} verschiedene Konformationen. Würden 10^{-11} s für eine Konformationsumwandlung benötigt, dann wäre für eine statistische Suche ein Zeitraum von 10^{19} s bzw. 10^{11} Jahren anzusetzen. In Folge dessen hätte seit Entstehung unseres Sonnensystems noch kein Protein seine native Struktur gefunden. Aus diesem *Paradoxon* zog LEVINTHAL daher den Schluss, dass die Proteinfaltung entlang spezieller *Faltungswege* erfolgen muss [12].

2.1.3 Landschaften und Trichter

Neuere Modelle benutzen die Bezeichnungen *Faltungstrichter* und *Energielandschaften*. Bei einer Energielandschaft handelt es sich um die Freie Energie aller Kon-

formationen als Funktion verschiedener Freiheitsgrade. Die vertikale Achse solcher Landschaften, wie in der Abbildung 2.2 gezeigt, repräsentiert die *Freie Energie* der Konformationen des Proteins. Die lateralen Achsen stellen die Koordinaten der Konformationen dar. Der Faltungs- oder Entfaltungsprozess entspricht somit einem Ball, der auf dieser Energiefläche rollt.

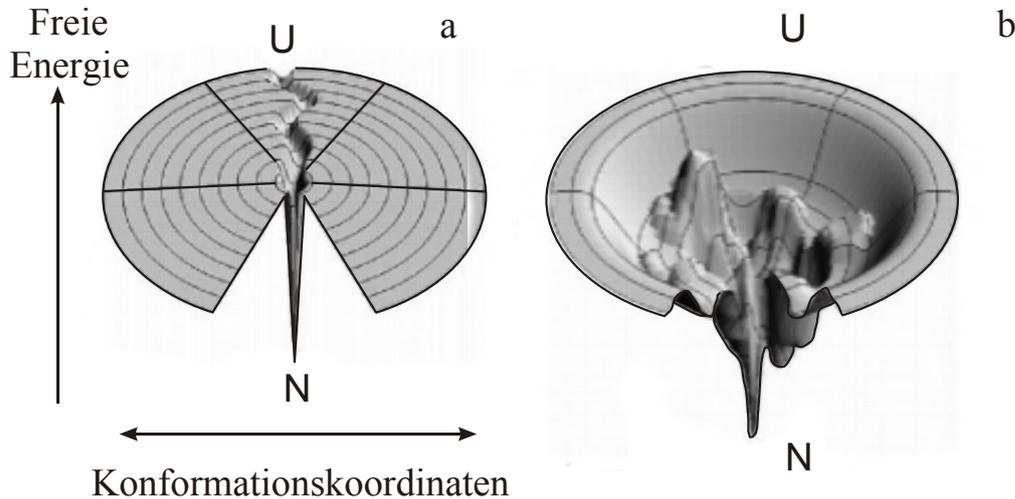


Abbildung 2.2: Der Faltungspfad nach LEVINTHAL (a) sowie der Faltungstrichter nach WOLYNES (b): Auf dem “Golfplatz” (a) findet die Proteinfaltung auf einem definierten Weg mit vorgegebener Abfolge von Ereignissen statt. Mit dem Faltungstrichter (b) lässt sich die Proteinfaltung dagegen als paralleler Prozess in einem Ensemble beschreiben. U = entfalteter Zustand, N = nativer Zustand. Abbildung nach [13].

LEVINTHAL’S Argument, dass durch eine zufällige Suche der native Zustand nicht zu finden ist, entspricht dem *ebenen Spielfeld* oder *Golfplatz-Potenzial* [12]. Wie LEVINTHAL dieses Problem durch einen Faltungsweg zu lösen versuchte, zeigt Abbildung 2.2a: Von einem denaturierten Zustand U ausgehend führt ein Weg, auf dem sich das faltende Molekül wie in einem Tunnel bewegt, zum nativen Zustand N . Der Prozess ist stärker geleitet als beim zufälligen Suchen. Nach dieser Idee bedeutet der Faltungspfad die Existenz einer definierten Abfolge von Ereignissen.

Das “Levinthal-Paradoxon” beschreibt das Missverhältnis zwischen rein statistischen Wahrscheinlichkeiten und thermodynamisch getriebenen Prozessen. Problematisch wird dieser Ansatz einerseits durch die Annahme einer flachen Energielandschaft. Hinzu kommt, dass der denaturierte Zustand eines Proteins nicht durch einen einzigen Punkt auf der Landschaft beschrieben werden kann – es sind vielmehr alle Punkte bis auf den nativen Zustand N . Die Unvollkommenheit dieses *klassischen Modells* wird hiermit deutlich.

Bei der *neuen Sichtweise* wird das “Levinthal-Paradoxon” durch WOLYNES’ Annahme einer *Trichterlandschaft*, wie sie Abbildung 2.2b zeigt, gelöst. Aus dieser

neuen Perspektive wird die Faltung als getriebene Diffusion betrachtet. Veranschaulichen lässt sich diese Theorie anhand von Flüssen, die in einen Talkessel strömen und letztlich in denselben See münden [14]. Diese Trichterlandschaft ist in der Realität nicht glatt, sondern in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz rau und holprig. Die Zahl der metastabilen Minima dieser Energielandschaft mit einer festen Tiefe repräsentiert, gleichbedeutend mit der Konformationsentropie, die Anzahl der Konformationen innerhalb der Kette bei einer definierten Freien Energie. Bewegt sich eine faltende Kette innerhalb des Trichters in Richtung geringerer Freier Energie, so werden die Möglichkeiten für die Konformationen der Kette immer geringer. Am Ende existiert nur noch die Möglichkeit *einer* nativen Struktur. Eine zweidimensionale Betrachtung, die die Idee des Trichters verdeutlicht, ist in Abbildung 2.3 gezeigt. In dieser Abbildung wird zusätzlich ein Ordnungsparameter der Faltung Q eingeführt. Er drückt den Anteil nativer Struktur im Protein aus.

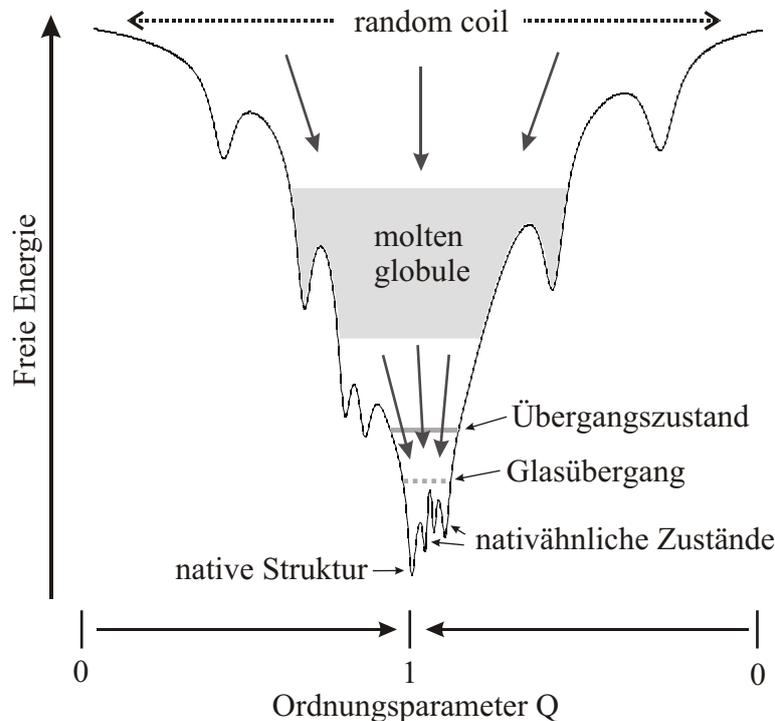


Abbildung 2.3: Der zweidimensionale Faltungstrichter zeigt, über welche Zwischenprodukte ein Protein den nativen Zustand erreicht [15].

Mit jedem Schritt nimmt die Kompaktheit zu und ein hydrophober Rumpf sowie Wasserstoffbrücken und Salzbrücken innerhalb der Kette entstehen. Der Unterschied zwischen den Modellen von LEVINthal und WOLYNES kann präzise folgendermaßen beschrieben werden:

- Der Faltungspfad impliziert die sequenzielle Aneinanderreihung spezifischer

Strukturen. Dabei handelt es sich um eine eindimensionale Route durch den Konformationsphasenraum.

- Ein Trichter erinnert an parallele Prozesse in einem Ensemble. Er beschreibt die fortschreitende Reduzierung der Dimensionalität des zugänglichen Konformationsraums.

In der Theorie häufig angewandte *Gittersimulationen* zeigen ebenfalls, dass die Suche nicht zufällig verläuft, sondern die Zugänglichkeit der Energielandschaft erheblich eingeschränkt ist. Bereiche zu hoher Energie werden von den Faltungstrajektorien gar nicht erreicht [8]. Die Kinetik der Proteinfaltung ist folgendermaßen von der Beschaffenheit dieser Trichter abhängig:

- Glatte Trichter beschreiben schnelle Faltungskinetiken mit zwei Zuständen.
- Eine langsame multiexponentielle Faltung ist durch raue Landschaften gekennzeichnet [13].

2.1.4 Der Übergangszustand in der Proteinfaltung

Auch die Vorstellung vom Übergangszustand hat sich im Laufe der Zeit gewandelt. Angelehnt an Erkenntnisse über Reaktionen kleiner Moleküle, wurde der Übergangszustand in älteren Modellen als “Flaschenhals”-Konformation, dem höchsten Punkt auf einem Reaktionspfad, angesehen. Da in der neuen Sichtweise Pfade durch Hüggellandschaften ersetzt werden, ist der Übergangszustand nicht mehr zwangsweise ein “bottleneck” und folglich auch nicht mehr mit einer speziellen Struktur der Kette verbunden. Vielmehr wird der Übergangszustand dort durch ein grundlegendes Konzept von Raten anstelle spezifischer Strukturen wiedergegeben [13]. Daneben existiert dort auch keine einfache Reaktionskoordinate mehr. Sie wird durch Ordnungsparameter ersetzt, die den Fortschritt der Reaktion vom Anfangs- zum Endzustand beschreiben.

Nach einem verbreiteten Modell der Proteinfaltung kollabiert die Polypeptidkette schnell zu einem kompakten Knäuel. Dieser “frühe” Kollaps ist in erster Linie auf das Vorhandensein hydrophober Gruppen zurückzuführen. Diese gruppieren sich in polaren Lösungsmitteln wie z.B. Wasser durch Reorganisation um, damit Kontakte zwischen polarem und unpolarem Medium reduziert werden. Hier sind zwei Fälle unterscheidbar [8]:

- Im ersten Fall handelt es sich um ein unorganisiertes Knäuel ohne spezifische Kontakte mit großer Konformationsentropie. Hier bringen Fluktuationen innerhalb des kollabierten Zustands verschiedene Gruppen miteinander in Berührung. Die Suche nach den kritischen, zum Erreichen des Übergangszustands erforderlichen Kontakten ist der langsame Schritt.

- Im anderen Fall haben wir es mit einer kompakten Struktur mit günstigen Kontakten und geringer Konformationsentropie zu tun. Rudimentäre Strukturelemente können dort durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Hauptkette stabilisiert werden. Diese bilden sich zwischen benachbarten Strängen eines β -Faltblatts oder α -Helizes aus und führen zur Entstehung größerer Strukturbereiche. Vorübergehende Fluktuationen führen dann zum Kollaps, wenn die erforderlichen stabilisierenden nativ-ähnlichen Kontakte gebildet werden. Dabei entsteht ein Faltungskern, der sog. *Nucleus*, um den herum der Rest der Struktur entsteht.

Größere Proteine zeigen zwar kompliziertere Szenarien, die Wechselwirkungen sind jedoch identisch.

2.1.5 Untersuchungsmethoden zur Proteinfaltung

Proteinfaltungsreaktionen laufen in Bruchteilen von Sekunden ab. Dies ist deutlich schneller als die Zeiten, die für Bestimmungen von Proteinstrukturen mit konventionellen Methoden benötigt werden. Untersuchungsmöglichkeiten bestehen unter anderem darin, ein System durch eine schnelle Störung aus dem Gleichgewicht zu bringen und die nachfolgende Annäherung an den nativen Zustand zu verfolgen. Die Prozesse der Faltung und Entfaltung sind vor allem für kleine Proteine reversibel. In Abhängigkeit von der Methode können unterschiedliche Aspekte der Struktur untersucht werden.

Die Anteile bestimmter Strukturelemente vor und nach einem kollabierten Zustand lassen sich mittels Fluoreszenzexperimenten [16], SAXS¹ [17], CD² [18] und der NMR-Spektroskopie³ [19] beobachten. In diesen Experimenten konnte bestätigt werden, dass bereits im kollabierten Zustand viele Sekundärstrukturelemente vorliegen. Außerdem scheint die Faltung der Polypeptidkette zum *molten globule*-Zustand geringe Kooperativität aufzuweisen, während die für den *nativen* Zustand charakteristische dichte Packung in hochkooperativer Weise entsteht. Für kleine Proteine (< 100 Aminosäuren) tritt keine Anreicherung partiell gefalteter Zwischenprodukte auf.

Daneben ist für die Erforschung des Übergangsbereichs das *Protein-Engineering* von hoher Wichtigkeit [20]. Durch den gezielten Austausch von Aminosäuren ändern sich Faltungs- und Entfaltungsgeschwindigkeiten. Dies kann mit den Auswirkungen auf die Gesamtstabilität des Proteins in Bezug gesetzt werden.

¹Röntgenkleinwinkelstreuung

²Circulardichroismus

³magnetische Kernspinresonanz

2.1.6 Chaperone und Fehlfaltung

ANFINSEN konnte vor etwa 40 Jahren anhand der enzymatischen Aktivität von Ribonuclease A *in vitro* zeigen, dass der Faltungsprozess *autonom* ist, d.h. keine weiteren Faktoren oder Energiezufuhr benötigt [21; 22]. Bis vor ungefähr zehn Jahren wurde davon ausgegangen, dass auch in einer lebenden Zelle die richtige Raumstruktur spontan gebildet wird, sobald die neu synthetisierte Proteinkette das Ribosom verlässt.

Inzwischen ist jedoch bekannt, dass eine Zelle über komplexe und hoch entwickelte Proteinfaltungsmaschinen verfügt [23; 24]. Diese *Chaperone*⁴ unterstützen einerseits die Proteinfaltung. Andererseits sorgen sie für die strukturelle Integrität von Proteinen unter Bedingungen, die eine Aggregation oder Entfaltung von Proteinen zur Folge hätten. In Zellen liegen sowohl hohe Proteinkonzentrationen als auch eine hohe Temperatur vor, die Konkurrenzprozesse zu einer produktiven Faltung verursachen. Fehlgefaltete Proteine können über hydrophobe Oberflächen unspezifisch assoziieren bzw. aggregieren. Molekulare Chaperone liefern zwar keine sterische Information für die Faltung des Zielproteins, unterdrücken jedoch unproduktive Wechselwirkungen und erhöhen somit die Wahrscheinlichkeit, dass ein Protein seine native Struktur ausbilden kann. Viele Schutzproteine, wie z.B. Hitzeschockproteine, gehören zur Klasse der Chaperone. Ihre Aufgabe ist es, unter Stresssituationen Proteine vor Entfaltung oder Aggregation zu bewahren. Auch über Chaperone, die für den Transport von Proteinen innerhalb von Zellen zuständig sind, wurde berichtet [25].

Die Wirkungsweise der molekularen Chaperone findet über ihre Assoziation mit hydrophoben Proteinmolekülen statt. Dadurch wird eine mögliche Aggregation inhibiert. Dabei werden *definierte* Komplexe mit dem Protein eingegangen, die z.B. nach einer Konformationsänderung, durch Umschalten in eine andere Konformation, wieder freigesetzt werden.

Die Abwesenheit von Chaperonen resultiert häufig in schwerwiegenden zellulären Defekten. Darüber hinaus wird aber auch spekuliert, dass die faserigen Prion-Proteinaggregate im Gehirn, die bei BSE⁵ oder dem Creutzfeld-Jakob-Syndrom zu finden sind, durch Chaperone begünstigt werden [26]. Untersuchungen der Prionbildung in Hefezellen geben Hinweise auf diesen Zusammenhang [27].

Im Prinzip scheint eine Vielzahl von Proteinen, die an sich gutartig sind, unter speziellen Bedingungen in Aggregate (“Amyloid-Fibrillen”) überzugehen. Dieser Vorgang läuft über einen falsch oder teilweise gefalteten Zustand ab, der letztlich zum vollständigen Zusammenklumpen führt [28; 29]. Es konnte auch gezeigt werden, dass frühe Aggregate aus Proteinen, die nicht mit der Alzheimer- oder der Creutzfeld-Jakob-Krankheit in Verbindung gebracht werden, eine hohe Cytotoxi-

⁴Bei Chaperonen handelt es sich ebenfalls um Proteine. Sie bilden große Komplexe aus mehreren Untereinheiten.

⁵bovine spongiforme Enzephalopathie

zität aufweisen [30].

Bei den erwähnten Krankheiten geht der Übergang zum aggregierten Zustand mit einer Umwandlung der normalen Sekundärstruktur in eine β -faltblattreiche Struktur einher [31]. In diesem Zusammenhang stellen sich mehrere Fragen:

- Ist der native Zustand der stabilste Zustand eines Proteins? Für ein isoliertes Proteinmolekül, also in einer verdünnten Lösung, scheint dies zuzutreffen. Für konzentrierte Proteinlösungen hingegen ist dies nicht mehr gültig, da nach ausreichend langer Zeit eine Aggregation jedes Proteins stattfindet. Daher wird ein solcher Zustand des Proteins als *metastabil* bezeichnet.
- Stellt die Amyloidform, die von vielen unabhängigen Proteinen gebildet wird, möglicherweise eine grundlegende Proteinkonformation dar? Chaperone könnten auch dabei eine Rolle spielen: Sie bringen die Proteine über eine Energiebarriere und induzieren damit sowohl die korrekte Faltung als auch die Aggregation.

Mit Sicherheit sind auf diesem aktuellen Forschungsgebiet weitere klärende Ergebnisse zu erwarten.

2.2 Stabilitätsdiagramme von Proteinen

2.2.1 Thermodynamische Größen

In dieser Arbeit sollen Faltungs- bzw. Entfaltungsvorgänge an Proteinen näher untersucht werden. Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, spielen bei dieser Thematik kinetische sowie thermodynamische Aspekte eine wichtige Rolle. Dies gilt ebenfalls für die Zustandsdiagramme von Proteinen. Für weitere Betrachtungen müssen zunächst die Definitionen verschiedener thermodynamischer Größen erläutert werden [32; 33; 34]:

- Das **partielle molare Volumen** V_i eines zu lösenden Moleküls oder Ions wird definiert als die Volumenänderung einer Lösung bei Zugabe einer geringen Menge an zu lösendem Stoff n_i , während die anderen Komponenten sowie Druck und Temperatur konstant bleiben:

$$V_i = \left(\frac{\partial V}{\partial n_i} \right)_{n_j, p, T} \quad (2.2)$$

Das Volumen V_i beinhaltet auch die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel und setzt sich für Proteine aus folgenden Beiträgen zusammen:

$$V_i = V_{Atom} + V_{Kavitaeten} + \Delta V_{Hydratation} \quad (2.3)$$

Die einzelnen Beiträge sind in Abbildung 2.4 anschaulich dargestellt.



Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Volumina eines gelösten Proteins nach [32].

- Der **isobare thermische Ausdehnungskoeffizient** $\hat{\alpha}$ bzw. α ist definiert als Änderung des partiellen Volumens V_i mit der Temperatur T bei konstantem Druck p :

$$\hat{\alpha} = \left(\frac{\partial V_i}{\partial T} \right)_p \quad \text{bzw.} \quad \alpha = \frac{1}{V_i} \left(\frac{\partial V_i}{\partial T} \right)_p \quad (2.4)$$

- Die **isotherme Kompressibilität** β oder κ ist die Änderung des Volumens V mit dem Druck p bei konstanter Temperatur T :

$$\beta = \left(\frac{\partial V_i}{\partial p} \right)_T \quad \text{bzw.} \quad \kappa = -\frac{1}{V_i} \left(\frac{\partial V_i}{\partial p} \right)_T \quad (2.5)$$

Die obigen Größen sind Ableitungen der Freien Enthalpie G nach dem Druck p bzw. der Temperatur T :

$$\left(\frac{\partial G}{\partial p} \right)_T = V, \quad \left(\frac{\partial^2 G}{\partial p^2} \right)_T = \beta, \quad \left(\frac{\partial^2 G}{\partial p \partial T} \right) = \hat{\alpha}; \quad (2.6)$$

Desweiteren existieren die Ableitungen

- $\left(\frac{\partial G}{\partial T} \right)_p = -S$ (2.7)

für die **Entropie** S und

- $\left(\frac{\partial^2 G}{\partial T^2} \right)_p = -\frac{C_p}{T_0}$, (2.8)

in der die **spezifische Wärmekapazität** C_p enthalten ist. T_0 ist eine Referenztemperatur.

Zur Veranschaulichung sind in Tabelle 2.1 Werte für ausgewählte Substanzen dargestellt.

Tabelle 2.1: Isobarer thermischer Ausdehnungskoeffizient α , isotherme Kompressibilität κ und Wärmekapazität C_p verschiedener Verbindungen (aus [32]):

Substanz	$\alpha / 10^{-6}/K$	$\kappa / 1/GPa$	$C_p / kJ/kg K$
Wasser	210	0,458	4,17
Benzol	1220	0,96	1,7
Proteine	40 – 110	0,02 – 0,15	0,32 – 0,36

Die Größen für Proteine beziehen sich auf verdünnte wässrige Lösungen.

Sowohl vom statischen als auch vom dynamischen Standpunkt aus betrachtet, handelt es sich bei Kompressibilität κ , Ausdehnungskoeffizient α und Wärmekapazität C_p um interessante thermodynamische Größen. Sie bestimmen die “Schwankungen” eines Systems. Diese “Schwankungen”, d.h. die Abweichungen spezieller Größen von ihrem Mittelwert, sind mit den thermodynamischen Parametern wie folgt verknüpft:

- Für die Beziehung zwischen isothermer Kompressibilität κ und Volumenfluktuationen erhält man:

$$\langle (V - \langle V \rangle)^2 \rangle = \kappa_T k_B T V \quad (2.9)$$

Dies ist eine wichtige Relation für das Verständnis der biologischen Funktion eines Proteins. Die Volumenfluktuationen entstehen durch das Ausdehnen und Zusammenziehen der Kavitäten [35]. Angesichts des kleinen Proteinvolumens können auftretende Volumenfluktuationen verhältnismäßig groß sein, ähnlich den Volumenänderungen bei der Denaturierung. Die Kompressibilität enthält auch Fluktuationen zwischen verschiedenen Konformationszuständen [36]. Im Niederdruckbereich ist die Messung der Kompressibilität über die Methode des spektralen Lochbrennens möglich. Diese wird in Kapitel 3.2 ausführlich beschrieben.

- Auch die thermische Ausdehnung lässt sich auf Fluktuationen des Systems zurückführen. Es besteht eine Proportionalität zwischen Volumen- und Entropiefluktuationen und dem Ausdehnungskoeffizienten α :

$$\langle SV - \langle S \rangle \langle V \rangle \rangle = k_B T V \alpha \quad (2.10)$$

Die thermische Ausdehnung α ist somit eine Verbindung thermischer (T , S) und mechanischer (p , V) Parameter.

- In einem thermodynamischen System mit konstantem Druck p kann die Wärmekapazität C_p als Maß für die Entropiefluktuationen des Systems interpretiert werden:

$$\langle (S - \langle S \rangle)^2 \rangle = k_B C_p \quad (2.11)$$

Ungefähr 85 % der Wärmekapazität eines nativen Proteins in Lösung wird durch die kovalente Struktur vorgegeben. Änderungen in der Wärmekapazität infolge einer Denaturierung sind also in erster Linie auf eine Veränderung der Hydratation zurückzuführen. Die Entropiefluktuationen bedeuten nichts anderes als die Veränderungen der Konformation zwischen geordneten und weniger geordneten Strukturen. Aus Gleichung 2.11 folgt unmittelbar:

$$\langle (H - \langle H \rangle)^2 \rangle = k_B T^2 C_p \quad (2.12)$$

- Eine dem Ausdruck für die Wärmekapazität C_p bei konstantem Druck p entsprechende Gleichung existiert auch für die Wärmekapazität C_V bei konstantem Volumen V , die wie folgt gebildet wird:

$$\langle (E - \langle E \rangle)^2 \rangle = k_B T^2 C_V \quad (2.13)$$

2.2.2 Druck- und Temperaturdenaturierungen

Proteine sind bis auf wenige Ausnahmen empfindliche Systeme, die auf Veränderungen ihrer Umgebung – sei es chemischer oder physikalischer Art – mit Änderungen ihrer Struktur reagieren. Im Extremfall findet eine Entfaltung statt, wodurch das *denaturierte* Protein seine biologische Funktion verliert. Die Zusammensetzung des Lösungsmittels – d.h. Konzentration an Ionen, Anteil organischer Lösungsmittel, pH-Wert – spielt eine wichtige Rolle. Durch Zugabe von Verbindungen, wie z.B. Harnstoff oder Guanidinium-Hydrochlorid, werden viele Proteine *chemisch* denaturiert. Die Wirkung dieser Substanzen beruht auf dem Effekt, dass sie ihrerseits eine große Menge an Wasser zur Solvatation benötigen und dem Protein damit für seine Stabilisierung notwendige Wassermoleküle entziehen.

Desweiteren ist die *physikalische* Denaturierung durch Erhitzen möglich. Viele physiologische Proteine reagieren bereits empfindlich auf eine Erhöhung ihrer Umgebungstemperatur um wenige Kelvin, wie es bei Fieber der Fall ist. Bei deutlich höheren Temperaturen (z.B. ab 60°C) denaturiert ein Großteil der Proteine. Es gibt natürlich auch Ausnahmen, wie z.B. in thermophilen Organismen.

Im Gegensatz zur Stabilität von Proteinen gegenüber Temperatur wird der Effekt hohen Drucks auf die Proteinstruktur erst in jüngerer Vergangenheit ausführlicher untersucht [37]. Die Auswirkungen von Hochdruck sollten dabei leichter zu verstehen sein als die der Temperatur: Während eine Temperaturerhöhung sowohl die Energie als auch das Volumen des Systems verändert, werden durch die Anwendung von Druck infolge der Änderung von Abständen und damit des Volumens ausschließlich interne Wechselwirkungen beeinflusst. Die Gesamtenergie des Systems bleibt jedoch annähernd konstant [38].

Proteine liegen innerhalb eines begrenzten Temperatur- und Druckbereichs in ihrer nativen, d.h. wohlgefalteten Struktur vor. Dabei ist die Freie Energie der nativen Proteinstruktur unter diesen physikalischen Bedingungen niedriger als die der entfalteten. In Abbildung 2.5 ist der Verlauf für die Freie Enthalpie G in Abhängigkeit von Druck p bzw. Temperatur T für den nativen und denaturierten Zustand schematisch skizziert.

- Da mit zunehmendem Druck die Freie Enthalpie des nativen Zustands stärker zunimmt als diejenige des denaturierten Zustands, findet ab einem bestimmten Druck eine Denaturierung statt. Unter Berücksichtigung der Steigung der Kurven für die Freien Enthalpien in Abbildung 2.5 ist damit auch ersichtlich, dass das Volumen eines denaturierten Proteins kleiner ist als das des nativen Proteins.
- Für die Temperaturabhängigkeit gilt hingegen, dass die Freie Energie des denaturierten Proteins mit steigender Temperatur schneller abnimmt als die des nativen Proteins, so dass ab einer bestimmten Temperatur der denaturierte

Zustand begünstigt ist. Die Ursache für diese Verläufe besteht darin, dass die Entropie des entfalteten Zustands größer als die des nativen ist.

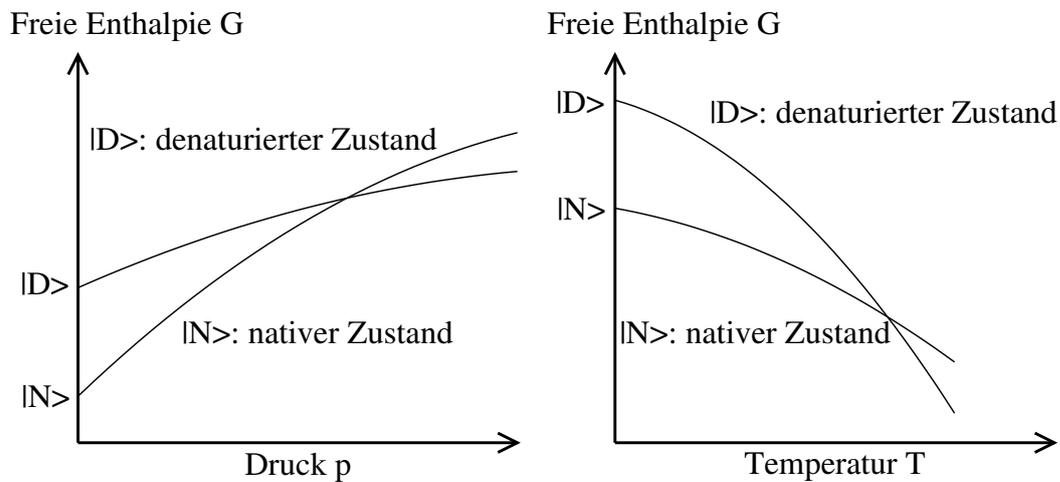


Abbildung 2.5: Der Verlauf der Freien Enthalpie für den nativen und denaturierten Zustand eines Proteins. Der Schnittpunkt der Kurven stellt jeweils den Druck bzw. die Temperatur für den Phasenübergang dar.

Ein Ziel dieser Arbeit besteht darin, die mikroskopischen Vorgänge während solcher Denaturierungsprozesse näher zu beleuchten. Grundsätzlich sind bei der Veränderung von Druck und Temperatur zwei Fälle zu unterscheiden [32]:

- Der Bereich mit Normaldruck und moderater Temperatur, in dem das Protein im nativen Zustand vorliegt und geringe Druck- oder Temperaturänderungen in elastischen und reversiblen Änderungen resultieren. Dort ändern sich nur Bindungslänge oder die Hydratation; die Sekundärstruktur bleibt erhalten.
- Daneben existiert der Bereich von hohem Druck und hoher bzw. niedriger Temperatur, in dem die Veränderungen die Konformation betreffen und zumeist irreversibel sind.

2.2.3 Elliptisches Phasendiagramm

Erstmals wurden von HAWLEY die Strukturtransformationen, die Proteine unter Druck erfahren, als Phasenübergänge eingestuft [33]. Bei diesem Prozess handelt es sich um einen Phasenübergang 1. Ordnung. Nach HAWLEY'S Theorie kann das Protein nur in zwei Zuständen, nämlich einem nativen Zustand $|N\rangle$ und einem denaturierten Zustand $|D\rangle$ existieren. In beiden Zuständen ist das Protein durch wohldefinierte thermodynamische Parameter, wie der isothermen Kompressibilität β , dem isobaren thermischen Ausdehnungskoeffizienten $\hat{\alpha}$ und der spezifischen Wärmekapazität C_p , charakterisiert. Unter der Annahme, dass diese Größen nicht von der Temperatur T oder dem Druck p abhängen, verschwinden die dritten und höheren

Ableitungen der Freien Enthalpie G . Unter dieser Voraussetzung liefert die Auftragung des (Denaturierungs-) Drucks p in Abhängigkeit von der (Denaturierungs-) Temperatur T analog zu Abbildung 2.6 eine elliptische Kurve, die das Gleichgewicht der Strukturtransformation ($\Delta G = 0$) beschreibt [39].

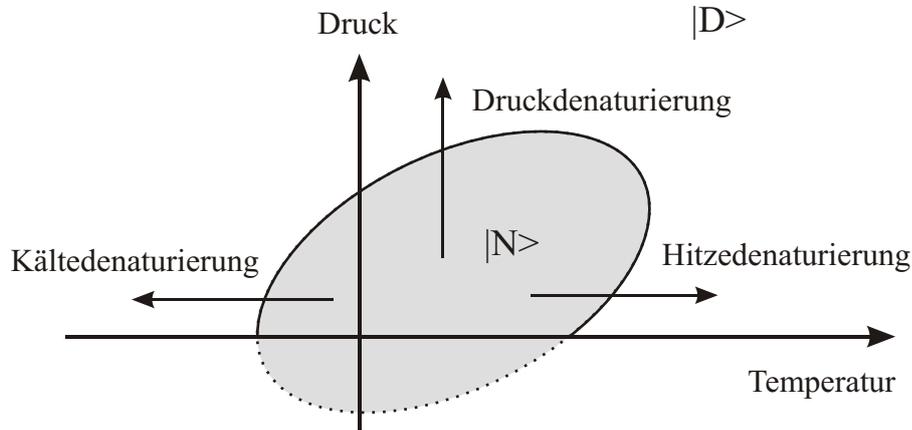


Abbildung 2.6: Phasendiagramm von Proteinen. Innerhalb der Ellipse liegt das Protein im nativen Zustand $|N\rangle$ vor. Außerhalb der Ellipse ist das Protein denaturiert $|D\rangle$. Die Abbildung zeigt zudem die verschiedenen Möglichkeiten einer Denaturierung.

Der mathematische Ursprung der elliptischen Form des Phasendiagramms von Proteinen liegt in der Tatsache begründet, dass die Terme der zweiten Ordnung einen signifikanten Beitrag zur Differenz der Freien Enthalpie ΔG liefern:

$$\Delta G = G_{denaturiert} - G_{nativ} \quad (2.14)$$

Sie lässt sich als Taylor-Entwicklung folgendermaßen schreiben:

$$\begin{aligned} \Delta G = \Delta G_0 - \Delta S_0(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 + \Delta V_0(p - p_0) \\ + \frac{\Delta\beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\hat{\alpha}(p - p_0)(T - T_0) + \dots \end{aligned} \quad (2.15)$$

Stabilitäts- bzw. Phasendiagramme mit ellipsenähnlicher Form konnten für verschiedene Proteine, aber auch für Phasenübergänge in Flüssigkristallen beobachtet werden [34; 40]. Allerdings treten elliptische Kurven nur auf, wenn folgende Bedingung erfüllt ist:

$$\left| \frac{\Delta\hat{\alpha}^2 T_0}{\Delta\beta \Delta C_p} \right| < 1 \quad (2.16)$$

Dieser Ausdruck ist das Inverse des sog. *Prigogine-Defay-Verhältnisses*, das eine wichtige Rolle in der Thermodynamik des Glasübergangs sowie bei Phasenübergängen 2. Ordnung spielt [41]. T_0 ist hierbei eine beliebig wählbare Temperatur. Häufig

wählt man T_0 und p_0 so, dass bei dieser Temperatur bzw. diesem Druck die Differenz der Freien Enthalpie G maximal ist.

Phasentransformationen, die sowohl beim Erwärmen als auch beim Abkühlen durchlaufen werden, werden als *reentrante* Phasenübergänge bezeichnet [34].

In einem Phasendiagramm sind die Differenz der spezifischen Wärmen ΔC_p , die Differenz der thermischen Ausdehnungen $\Delta \hat{\alpha}$, die Differenz der Kompressibilitäten $\Delta \beta$ sowie die Differenz der Freien Enthalpien ΔG von denaturiertem und nativem Zustand enthalten. Außerdem lassen sich auch die Differenzen der Entropie ΔS und des Volumens ΔV für alle Punkte bestimmen. Die Entropiedifferenzen geben Aufschluss darüber, ob Konformationsänderungen mit einer Zu- oder mit einer Abnahme an struktureller Ordnung verknüpft sind. Die Volumendifferenzen sind ein Maß für die Flexibilität eines Proteins in einem bestimmten Zustand. Die Fläche des Phasendiagramms gibt einen Hinweis auf die Stabilität eines Proteins. Aus dem Phasendiagramm können jedoch nur die Verhältnisse der erwähnten Größen erhalten werden. Zur Bestimmung der absoluten Werte muss mindestens eine dieser Größen bekannt sein.

Entlang der Phasengrenze ist $\Delta G = 0$, so dass sich unter Anwendung der *Clausius-Clapeyron-Gleichung* ergibt:

$$d\Delta G = \Delta V dp - \Delta S dT \text{ bzw. } \left(\frac{dp}{dT} \right)_{\Delta G=0} = \left(\frac{\Delta S}{\Delta V} \right)_{\Delta G=0} \quad (2.17)$$

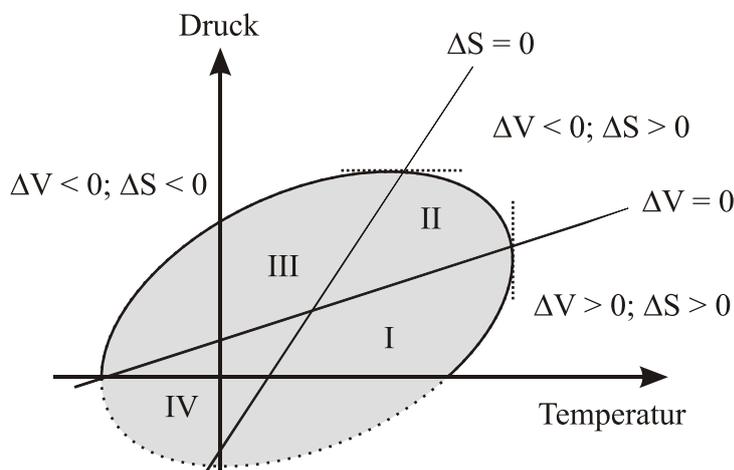


Abbildung 2.7: Änderungen in Entropie ΔS und Volumen ΔV des Proteins beim Phasenübergang.

Bei einer Temperaturdenaturierung unter Atmosphärendruck ist die Änderung der Entropie des Proteins positiv, so dass gemäß der Steigung der Ellipse im Bereich I der Abbildung 2.7 die Volumenänderung in diesem Bereich ebenfalls positiv sein muss. Folgt man dem Verlauf zu höherer Temperatur und zu höheren Drücken, so

geht die Steigung (dp/dT) gegen Unendlich. In Folge dessen verläuft ΔV an diesem Punkt durch Null und nimmt anschließend negative Werte an. Die Änderung der Entropie ist in Bereich II immer noch positiv. Im weiteren Verlauf, nämlich an der Stelle, an der eine waagrechte Tangente an den Kurvenverlauf gelegt werden kann, geht die Entropieänderung durch Null. Im Bereich niedriger und mittlerer Temperatur (Bereich III in Abbildung 2.7) ist die Denaturierung mit einer negativen Volumen- und Entropieänderung verbunden. Die negative Entropieänderung bei einer Kältdenaturierung lässt sich also nur dahingehend erklären, dass bei diesem Prozess die Umgebung des Proteins stärker geordnet wird. Die Entropieänderung für das Protein ist in jedem Fall positiv, so dass die Wassermoleküle eine höher geordnete Struktur anzunehmen scheinen.

Die Gleichgewichtsthermodynamik ist die Voraussetzung für das Phasendiagramm und die Informationen, die es enthält. Gilt die Gleichgewichtsthermodynamik nicht mehr, so ergeben sich möglicherweise Abweichungen in den Größen, die das elliptische Phasendiagramm bestimmen. Diese Abweichungen können von teilweise sehr langen Relaxationszeiten (bei tiefen Temperaturen und hohen Drücken) herrühren.

Eine weitere interessante Frage ist der mikroskopische Charakter der Strukturtransformation, die Proteine unter Druck- oder Temperaturänderung erfahren. Druck- und Temperaturdenaturierung führen nicht unbedingt zu den selben Endzuständen. In diesem Fall wäre die Basis eines Zwei-Zustands-Modells nicht mehr gegeben und die thermodynamische Beschreibung müsste geändert werden.

Die Breite des Transformationsbereichs überstreicht eine Größenordnung von 100 MPa. Dies könnte einerseits auf ein inhomogenes Ensemble hindeuten, das zwar durch eine einstufige Transformation $|N\rangle \leftrightarrow |D\rangle$ charakterisiert ist, bei dem aber die thermodynamischen Parameter einer Verteilung unterliegen. Andererseits könnte dies ein Zeichen dafür sein, dass die Transformation ein Vielstufenprozess ist, bei dem das Protein eine Reihe von Zwischenzuständen durchläuft. Zur einfachen physikalischen Interpretation des Phasendiagramms muss diese Situation wieder auf ein *effektives* Zwei-Zustands-Modell zurückgeführt werden.

2.2.4 Die Rolle des Lösungsmittels für die Proteinstabilität

Wie im vorhergehenden Kapitel angesprochen, lässt sich in vielen Fällen die Gesamtentropieänderung bei Entfaltungsvorgängen nur unter Einbeziehung der Proteinumgebung erklären. Modelle, mit deren Hilfe der Denaturierungsprozess verstanden werden soll, berücksichtigen die Rolle der hydrophoben Wechselwirkung. BALDWIN beispielsweise hat angenommen, dass sich ein Protein ähnlich wie ein Öltröpfchen in Wasser verhält [42; 43]. Allerdings verweisen KAUZMANN und andere Autoren darauf, dass das Modell von BALDWIN mit der Lösung hydrophober Gruppen in Wasser die Druckdenaturierung eines Proteins nicht erklären kann [44]. Neuere In-

terpretationen der Druckdenaturierung von HUMMER beschreiben diese als Prozess, bei dem das Wasser in das Innere des Proteins gepresst wird und dort vorhandene Hohlräume füllt. Es kommt dabei zwar zu Strukturänderungen, die kompakte Form des Proteins bleibt allerdings erhalten [45; 46; 47].

Interessante Beiträge zu diesem Thema liefert auch die Betrachtung von Wasserstrukturen. ROBINSON et al. zeigten, dass flüssiges Wasser aus zwei Strukturtypen zusammengesetzt ist [48]. Zur besseren Übersichtlichkeit sind diese in Tabelle 2.2 mit ihren Eigenschaften erläutert:

Tabelle 2.2: Übersicht zu den Mikrostrukturen in flüssigem Wasser nach ROBINSON [48].

Eis Ih-Struktur	Eis II-Struktur
regulär tetraedrische Wasser - Wasser - Anordnung	nichtregulär tetraedrische Wasser - Wasser - Anordnung
geringe Dichte	höhere Dichte
von polaren Aminosäuren favorisiert	von unpolaren Aminosäuren favorisiert

Das Verhältnis der beiden Wasserstrukturen ist sowohl temperatur- als auch druckabhängig und beeinflusst daher in starkem Maße die Hydratationsthermodynamik des nativen bzw. denaturierten Proteins. So lässt sich zeigen, dass der temperaturabhängige Verlauf der Änderungen der verschiedenen Beiträge zu Enthalpie und Entropie bei der Entfaltung von Ubiquitin mit dem jeweiligen Anteil der entsprechenden Phase im Wasser korreliert ist: Die Beiträge der polaren Gruppen verlaufen ähnlich wie der Anteil an Eis Ih, während die ohnehin dominierenden Beiträge der unpolaren Gruppen sich an den Verlauf vom Eis II-Anteil anlehnen. Die Änderungen der Gibbs'schen Freien Enthalpie mit der Temperatur zeigen auch die Existenz der Kältedenaturierung, so dass mit dieser Interpretation ebenfalls die Rolle der Einflüsse von Entropie und Enthalpie der Umgebung bestätigt wird.

Kapitel 3

Experimentelle Methoden

Im Folgenden werden Methoden vorgestellt, mit denen sich Veränderungen in der Proteinstruktur untersuchen lassen. Zunächst werden Techniken zum Ausmessen von Phasendiagrammen beschrieben. Im zweiten Teil des Kapitels soll die Methode des spektralen Lochbrennens sowie die Hintergründe des “Druck-Effekts” vorgestellt werden. Abschließend folgt die Beschreibung der Versuchsaufbauten und der für die Experimente eingesetzten Proben.

3.1 Spektroskopie an Proteinen unter Druck

Experimente zur Stabilität von Proteinen werden größtenteils mit Methoden durchgeführt, die strukturspezifische Aussagen ermöglichen [49]. Für Druck- und Temperaturdenaturierungsexperimente lassen sich die IR-Spektroskopie [50; 51; 52], CD-Experimente [53; 54] und auch die NMR-Spektroskopie [55; 56] einsetzen. Nachteil dieser Methoden ist, dass sie verhältnismäßig hohe Konzentrationen an Protein benötigen. Diese hohe Konzentration bedingt ihrerseits Störungen, z.B. durch Assoziationsreaktionen. Im Gegensatz dazu benötigen auf Fluoreszenzmessungen basierende Methoden weniger Reagenz und sind daher empfindlicher.

Die Experimente müssen in temperierbaren Druckzellen, wie z.B. Diamantambosszellen für kleine Volumina und hohe Drücke oder konventionelle Druckanlagen für größere Volumina, aber geringere Maximaldrücke, durchgeführt werden.

3.1.1 IR-Spektroskopie

Die Untersuchung von Biomolekülen mittels Schwingungsspektroskopie, wie Fouriertransformierte Infrarot-Absorption und Ramanstreuung, eignet sich gut für die Beobachtung druck- und temperaturinduzierter Veränderungen [57]. Experimente zur Ramanstreuung können direkt in gewöhnlichem Wasser durchgeführt werden, was aus biomimetischen Gründen vorteilhaft ist. Allerdings treten hier häufig Störungen durch fluoreszierende Verunreinigungen auf. Dieser Nachteil kann mit der Infrarot-Spektroskopie umgangen werden, bei der keine störenden Überlagerungen durch

Fluoreszenz auftreten. Zudem trägt die Eigenfluoreszenz, wie z.B. bei Hämproteinen, nicht zu einem Störsignal bei. Allerdings muss als Lösungsmittel deuteriertes Wasser (D_2O) verwendet werden.

Die Infrarot-Spektroskopie informiert vor allem über das *Backbone* eines Proteins. Sie zeigt, dass Sekundärstrukturelemente wie α -Helix oder β -Faltblatt bis zu hohen Drücken erkennbar sind. Im denaturierten Zustand verschwinden diese Strukturen jedoch.

Die Sekundärstruktur eines Proteins lässt sich z.B. durch die Beobachtung der Form der Amid I'-Bande (1650 cm^{-1}) verfolgen [58]. Mit steigendem Druck nimmt das Frequenzmaximum der Amid I'-Bande generell ab, da es zu einer Stärkung der Wasserstoffbrücken kommt. Durch Verschiebungen und Intensitätsänderungen können Rückschlüsse auf mögliche Veränderungen der Sekundärstruktur, wie beispielsweise der Bindungswinkel, getroffen werden. Über die Auswertung der Amid I'-Bande konnten z.B. Phasendiagramme zur Enzymaktivität von Lipoxygenase bestimmt werden [50]. Neben der Amid I'-Bande lassen sich auch Aminosäureseitenketten, v. a. Tyrosine, untersuchen [59].

Die Ergebnisse für Denaturierungen aus Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen stimmen unter Umständen nicht mit denen aus der IR-Spektroskopie überein. Der Grund hierfür ist, dass bei der IR-Spektroskopie deutlich höhere Konzentrationen eingesetzt werden müssen, wodurch sich die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen verstärken.

3.1.2 Spektroskopie im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich

Zur Erläuterung der grundlegenden Begriffe sind in Abbildung 3.1 die spektralen Verhältnisse am Beispiel des Chlorophyllmoleküls, welches ein ausgedehntes π -Elektronensystem besitzt, dargestellt [60]. Im linken Teil der Abbildung 3.1 finden sich die Absorptions-, Fluoreszenz- und Phosphoreszenzspektren. Rechts ist das daraus abgeleitete Jablonski-Diagramm mit den verschiedenen Übergängen und zugehörigen Lebensdauern abgebildet.

Zur Durchführung optischer Denaturierungsexperimente sind spezielle Sondenmoleküle, gewöhnlich Farbstoffe, notwendig. Es gibt viele Proteine, die bereits Farbstoffmoleküle als *prothetische* Gruppe enthalten. Als Beispiel können hier Porphyrinderivate in Hämproteinen, Chlorophyll in den Photorezeptoren grüner Pflanzen oder Retinal im Rhodopsin angeführt werden. Daneben können Proteine mit künstlichen Farbstoffen versehen werden [61; 62; 63]. Auch das Vorhandensein aromatischer Aminosäuren in der Peptidsequenz lässt spektroskopische Untersuchungen in Absorption und Fluoreszenz zu.

Jede Information, die man aus den optischen Experimenten erhält, spiegelt irgendwie die Wechselwirkungen zwischen Farbstoffsonde und Protein wider. Die An-

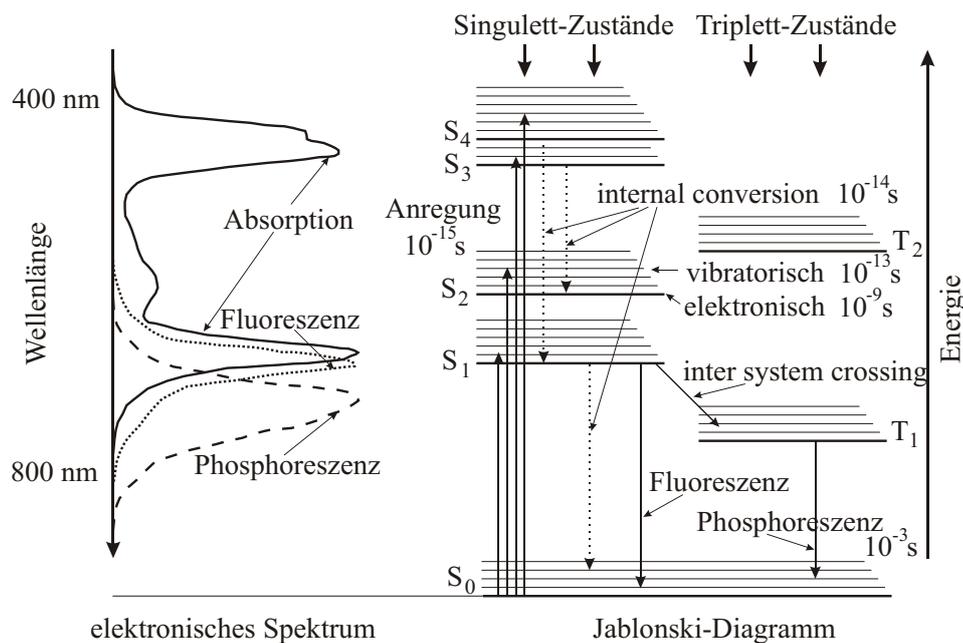


Abbildung 3.1: Beispiel zu Absorption, Fluoreszenz und Phosphoreszenz sowie zugehöriges Jablonski-Diagramm (nach [60]).

wendung von hydrostatischem Druck verstärkt die Wechselwirkung zwischen Probe und Lösungsmittel. Als Folge davon werden die Energien der Eigenzustände der Probenmoleküle verändert. Ob eine positive Druckänderung zu einer Rot- oder Blauverschiebung des betrachteten Übergangs führt, hängt von der relativen Änderung der Energien der beteiligten Zustände, d.h. dem Grundzustand S_0 und dem ersten angeregten Zustand S_1 , ab. Wird der angeregte Zustand stärker abgesenkt als der Grundzustand, so führt dies zu einer Rotverschiebung. Im anderen Fall findet eine Blauverschiebung statt.

Die Art der Verschiebung ist zunächst von der vorherrschenden Art der Wechselwirkung zwischen Sonde und Lösungsmittel abhängig. Dominieren Dispersions-Wechselwirkungen, dann tritt immer eine Rotverschiebung auf. Die Dispersions-Wechselwirkung wird durch die Polarisierbarkeit der Sondenmoleküle bestimmt, die im angeregten Zustand stets größer als im Grundzustand ist. Dominieren hingegen elektrostatische Wechselwirkungen, dann sind sowohl Rot- als auch Blauverschiebungen möglich. Dies ist auf eine unterschiedliche Orientierung des Dipolmoments des Probenmoleküls im angeregten Zustand im Vergleich zur Orientierung im Grundzustand zurückzuführen.

Optische Messungen geben vor allem einen Hinweis darauf, auf welche Art und Weise eine Wechselwirkung verändert wird. Im Gegensatz dazu lässt die IR-Spektroskopie, bei der z.B. eine bestimmte Bindung betrachtet wird, eine Aussage darüber zu, was mit ihr passiert, jedoch nicht auf welchem Weg.

Die inhomogene Verbreiterung spektraler Banden stellt zumeist einen Nachteil dar. Sie ist eine Auswirkung der Dispersion der Lösungsmittelverschiebung ("solvent shift"). Kleine Veränderungen, die lediglich die homogene Linie beeinflussen, können nur mit besonderen Techniken sichtbar gemacht werden. Auf diese Methoden wird in Kapitel 3.2 näher eingegangen.

Absorptionsmessungen

Alle Moleküle zeigen aufgrund ihrer immanenten elektronischen Natur Absorption [60; 64]. Falls es keine apparativen Einschränkungen hinsichtlich des Spektralbereichs gibt, kann damit jedes beliebige Protein mittels Absorptionsmessungen untersucht werden.

Pionierarbeit auf dem Gebiet der Untersuchung der Phasenstabilität von Proteinen mittels Absorptionsspektroskopie haben HAWLEY, ZIPP und KAUFMANN geleistet. HAWLEY erstellte das Phasendiagramm von Chymotrypsinogen, indem er die Differenz zwischen der Absorption des Proteins bei variablen Temperatur- und Druckeinstellungen und der Absorption bei den bekannten Ausgangsbedingungen bestimmte [33]. Das untersuchte Protein Chymotrypsinogen denaturiert bei Temperaturen oberhalb 45°C und Drücken über 3,5 kbar. Unter Annahme eines Zwei-Zustandsmodells gelang es damit auch, die Änderungen der thermodynamischen Parameter während des Phasenübergangs zu bestimmen.

Durch die Untersuchung von Metmyoglobin konnten ZIPP und KAUFMANN zeigen, dass die Absorption im Bereich von 400 bis 700 nm dem Häm-Chromophor zuzuordnen ist und Veränderungen in diesem Bereich während einer Denaturierung nur Änderungen in der Umgebung des Häms, *nicht* aber die Veränderungen im übrigen Molekül widerspiegeln [65]. Änderungen im Bereich von 270 bis 290 nm hingegen geben Auskunft über die Exposition aromatischer Seitenketten in das Lösungsmittel. Da aromatische Aminosäuren über das gesamte Metmyoglobin-Molekül verstreut sind, erhält man somit eine Information über den allgemeinen Faltungszustand. Hiermit wird verdeutlicht, dass jede spektroskopische Technik nur in der Lage ist, Aussagen über lokal beschränkte Umgebungen von Farbstoffsonden zu treffen. Außerdem zeigten die Messungen eine starke Abhängigkeit der Proteinstabilität vom pH-Wert. Oberhalb von 70°C bzw. 6 kbar lag das Metmyoglobin generell im denaturierten Zustand vor. Die Konzentrationen betragen in den beschriebenen Messungen jeweils 0,03 bis 0,05 % bzw. $3 \cdot 10^{-6}$ bis $3 \cdot 10^{-5}$ molar.

Fluoreszenzmessungen

In dieser Arbeit wird die Phasenstabilität von Proteinen mit der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Größter Vorteil dieser Technik ist die hohe Empfindlichkeit der Methode. Im Gegensatz zu Absorptionsmessungen, bei denen häufig geringe Veränderungen gegen einen hohen Hintergrund beobachtet werden, sind bei Fluoreszenz-

reszenzmessungen die relativen Intensitäten besser zu erkennen.

Sind in einem Protein aromatische Aminosäuren vorhanden, so lässt sich vor allem Tryptophan für die Fluoreszenzspektroskopie heranziehen. Tyrosin zeigt eine schwächere Fluoreszenzemission, die auch deutlich weniger rotverschoben als die Tryptophanfluoreszenz auftritt und ebenso wie die schwache Phenylalaninfluoreszenz von – sofern vorhandenen – Tryptophan-Residuen unterdrückt wird.

Ein Großteil der in der Literatur beschriebenen Arbeiten nutzen die Fluoreszenz der Aminosäuren [56; 66; 67; 68]. WEBER und DRICKAMER koppelten Tryptophan und andere kleine Moleküle an Proteine, um über die Veränderung der Fluoreszenzspektren druckinduzierte Entfaltungsprozesse zu verfolgen [69]. Die Fluoreszenzspektren von Proteinen in der “Hochdruck-Konformation” zeigen, dass die Tryptophanreste dort mit einem Medium in Kontakt treten, das die Polarität von Wasser aufweist [70]. Die dabei auftretenden Volumenänderungen liegen im Bereich von 1 % und sind verhältnismäßig gering. Fluoreszenz-Polarisations-Experimente haben ebenfalls gezeigt, dass bei der Entfaltung durch Hochdruck Wasser in das Proteininnere eindringt.

Die Untersuchung der Wirkung von Hochdruck auf β -Lactoglobulin zeigt eine Rotverschiebung und Zunahme der Fluoreszenzintensität, die mit der chemischen Denaturierung durch Guanidinium-Hydrochlorid übereinstimmt [71]. Ab ca. 1 kbar bis 3 kbar kommt es zu einer Dissoziation des Dimers. Außerdem ist die Druckdenaturierung nicht reversibel, da das entfaltete Protein eine nichtnative Disulfidbrücke ausbildet. Die eingesetzten Konzentrationen lagen bei 10^{-5} molar.

Bei der Untersuchung von größeren, aus mehreren Untereinheiten bestehenden Proteinen stellte sich heraus, dass mittlere Drücke (< 3 kbar) zur Dissoziation dieser Untereinheiten führen. Dieser Effekt ist in den meisten Fällen reversibel, auch wenn sich die enzymatische Aktivität erst nach längerer Zeit wieder einstellt [38].

Vollständige Phasendiagramme von Proteinen sind in der Literatur selten beschrieben. Häufig werden nur die Effekte von Temperatur **oder** Druck untersucht. Desweiteren berichten viele Arbeiten über eine Kombination verschiedener Techniken [72; 73]. In diesen Veröffentlichungen finden sich lediglich Ausschnitte von Stabilitätsdiagrammen, da genaugenommen zu wenig Punkte bestimmt wurden. Dies zeigt, dass das Ausmessen von Phasendiagrammen mit Schwierigkeiten verbunden ist.

Fluoreszenzexperimente im Sichtbaren können mit Proteinen, die von Natur aus Farbstoffe mit ausgedehnten π -Elektronensystemen besitzen oder mit entsprechenden Chromophoren “gelabelt” wurden, durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse wurden über die Fluoreszenz von *Zn-Mesoporphyrin-Cytochrom c* gewonnen.

3.2 Die Methode des spektralen Lochbrennens

Diese hochauflösende spektroskopische Methode wurde im zweiten Teil dieser Arbeit benutzt, um den Wechselwirkungsradius des Chromophors im Zn-Cytochrom c abzuschätzen.

3.2.1 Homogene und inhomogene Linien

Idealisiertes System

Zum besseren Verständnis der Lochbrennspektroskopie werden einleitend die Eigenschaften *homogener* und *inhomogener* Linien erläutert. Als Ausgangsbasis hierfür wird ein idealisiertes System angenommen, in dem ein Ensemble von Farbstoffmolekülen in eine perfekte Matrix (Wirtsgitter) eingebaut ist. Wechselwirkungen der Farbstoffmoleküle untereinander sind aufgrund niedriger Konzentration und damit großer Abstände vernachlässigbar. In diesem Fall befinden sich alle Farbstoffmoleküle in der gleichen Umgebung und spüren somit die gleichen Wechselwirkungen. Diese resultieren in einer identischen Lösungsmittelverschiebung gegenüber ihrer Vakuumfrequenz, d.h. sie absorbieren bei einer geänderten, aber einheitlichen Frequenz.

Die Spektrallinie eines Farbstoffs in dem beschriebenen System setzt sich gemäß Abbildung 3.2 aus zwei Anteilen zusammen:

- Die scharfe Null-Phononen-Linie stellt den rein elektronischen Übergang dar. Die Breite der Null-Phononen-Linie wird als *homogene Linienbreite* γ bezeichnet.
- Blauverschoben erscheint ein breiter Phononenflügel. Die Kopplung elektronischer Übergänge an Phononen ist auf unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Wirtsgitter zurückzuführen, da ein Farbstoff im angeregten Zustand eine andere Ladungsverteilung als im Grundzustand hat. In einem Kristall lässt sich eine große Anzahl verschiedener Schwingungsmoden anregen, so dass sich eine Vielzahl von Phononenseitenlinien zu einer Seitenbande überlagern¹.

Die Breite der Null-Phononen-Linie ist ein Maß für die Geschwindigkeit der elektronischen Relaxation. Sie ist deutlich schmaler als die Phononenseitenbande, da bei tiefen Temperaturen die Lebensdauer des niedrigsten angeregten Zustands mehr als drei Größenordnungen länger ist als die eines Phonons. Außerdem besteht sie nur aus einem Übergang. Zunehmende Temperatur verursacht eine Verbreiterung der homogenen Linie und lässt den Phononenseitenflügel dominieren.

¹Das Verhältnis der Intensität der Null-Phononen-Linie zur Gesamtintensität definiert den *Debye-Waller-Faktor* α . Ein α -Wert nahe 1 entspricht einer schwachen Elektron-Phonon-Kopplung. Bei kleinem α hingegen wird das Spektrum von dem Phononenflügel dominiert.

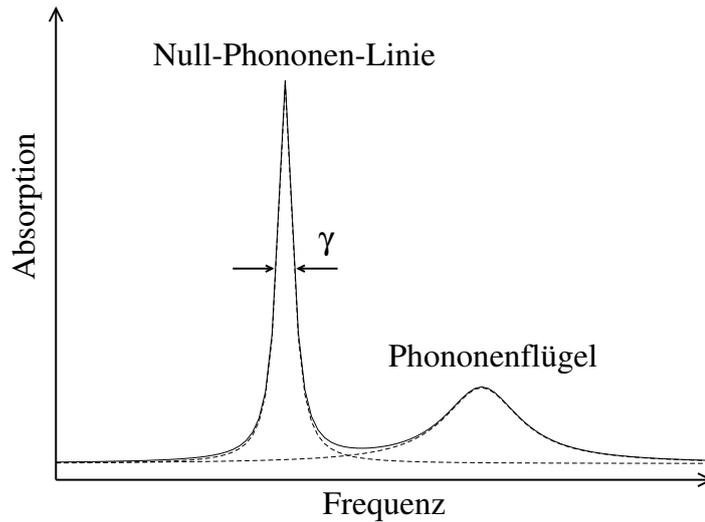


Abbildung 3.2: Absorptionsspektrum eines Farbstoffs in einer perfekt geordneten Matrix. Es besteht aus einer Null-Phononen-Linie mit der homogenen Linienbreite γ und einem breiten Phononenflügel.

Die homogene Linienbreite γ einer Null-Phononen-Linie wird durch die *Heisenbergsche Unschärferelation* bestimmt:

$$\gamma = \frac{1}{2\pi T_2} \quad (3.1)$$

T_2 gibt die *Lebensdauer der Kohärenz* des angeregten Zustands an und ist somit ein Maß dafür, wie lange die Übergangsdipolmomente nach einer Anregung in Phase schwingen. Zwei Prozesse tragen zu T_2 bei:

- Zum einen die *Energierelaxationszeit* T_1 , die Zerfälle in den Grundzustand (z.B. durch Fluoreszenz, Inter System Crossing etc.) repräsentiert. Sie verringert die Anzahl der Moleküle, deren Übergangsdipolmomente im angeregten Zustand in Phase schwingen. T_1 bestimmt die *natürliche Linienbreite* des Übergangs.
- Daneben liefern thermische Bewegungen des Kristallgitters über die *reine Phasenrelaxationszeit* T_2^* einen Beitrag. Nach dieser Phasenrelaxationszeit sind die Phasen der Dipole statistisch verteilt.

Für die *effektive Zerfallszeit* findet man die Beziehung

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{T_1} + \frac{2}{T_2^*}. \quad (3.2)$$

Die Energierelaxationszeit T_1 ist im allgemeinen temperaturunabhängig. Der Kehrwert der Phasenrelaxationszeit T_2^* hingegen nimmt mit fallender Temperatur ab und geht für $T \rightarrow 0$ gegen Null. Die homogene Linienbreite γ strebt für $T \rightarrow 0$ gegen einen endlichen Wert, der nur durch die Energierelaxationszeit T_1 bestimmt wird. Das exponentielle Zeitverhalten der Energie- und Phasenrelaxation resultiert in der Lorentzform der homogenen Linie.

Systeme in der Realität

Im Gegensatz zu dem bisher beschriebenen idealisierten System befinden sich in Wirklichkeit alle Farbstoffmoleküle, in jeder Matrix, in unterschiedlichen Umgebungen. Alle Chromophore gehen daher andere Wechselwirkungen mit der Umgebung ein und zeigen folglich unterschiedliche spektrale Eigenschaften. Bei Farbstoffen, die in eine Matrix eingebaut sind, beobachtet man eine *inhomogen verbreiterte Linie* (siehe Abbildung 3.3).

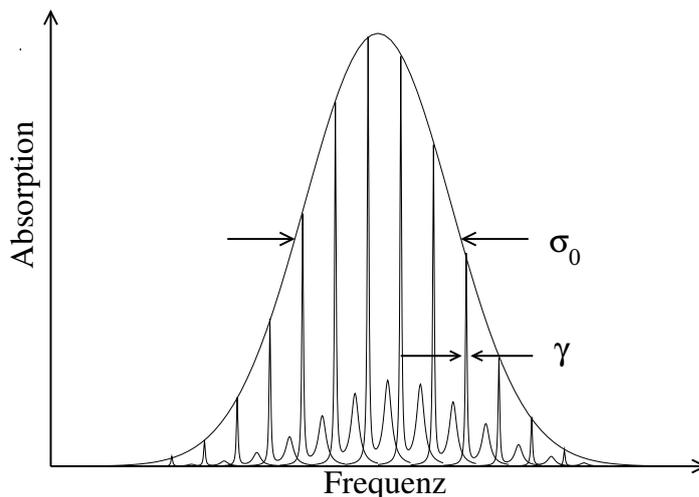


Abbildung 3.3: Absorptionsspektrum von Farbstoffen in realen Matrices. Die Breite der inhomogenen Bande beträgt σ_0 , die Breite der homogenen Null-Phononen-Linie ist γ .

Die Form dieser inhomogenen Linie entsteht durch Faltung der homogenen Linie mit der gaußförmigen Verteilungsfunktion der Absorptionsfrequenzen. Die inhomogenen Linienbreiten σ_0 von Farbstoffen in realen Kristallen liegen in einem Bereich von einigen cm^{-1} . Farbstoffe in Proteinen, die stärker als Kristalle von Unordnung geprägt sind, zeigen Linienbreiten in der Größenordnung² von 100 cm^{-1} . Zwischen inhomogener und homogener Linienbreite in Proteinen liegen bei 2 Kelvin vier Größenordnungen. Mit der Methode des spektralen Lochbrennens ist es möglich, trotz der inhomogenen Verbreiterung Spektroskopie an der durch die homogene Linienbreite vorgegebenen Auflösungsgrenze zu realisieren.

3.2.2 Mechanismus des spektralen Lochbrennens

Die Technik des spektralen Lochbrennens nutzt Sättigungseffekte in inhomogen verbreiterten Systemen aus [74]. Die Möglichkeit, eine unter der *inhomogenen Verbreiterung* verborgene *homogene Linie* eines Übergangs zu messen, führt zu einer hohen Empfindlichkeit der spektroskopischen Experimente. Die Techniken des photochemischen bzw. photophysikalischen Lochbrennens wurden 1974 eingeführt [75; 76]. Das

² 1 cm^{-1} entspricht 30 GHz.

“Brennen eines Lochs” erfolgt mit einem intensiven Laser, der schmalbandig im Bereich der niederenergetischsten Absorptionsbande eines Farbstoffs einstrahlt. Durch die schnelle Relaxation höherer angeregter Zustände entstehen deutlich größere Lochbreiten in höheren elektronischen oder vibronischen Übergängen. Die Voraussetzung für zeitlich stabile Löcher ist – neben einem elektronischen Grundzustand $|E\rangle$ und Anregungszustand $|I\rangle$ – die Existenz eines langlebigen Photoproduktzustands $|P\rangle$ (siehe Abbildung 3.4a).

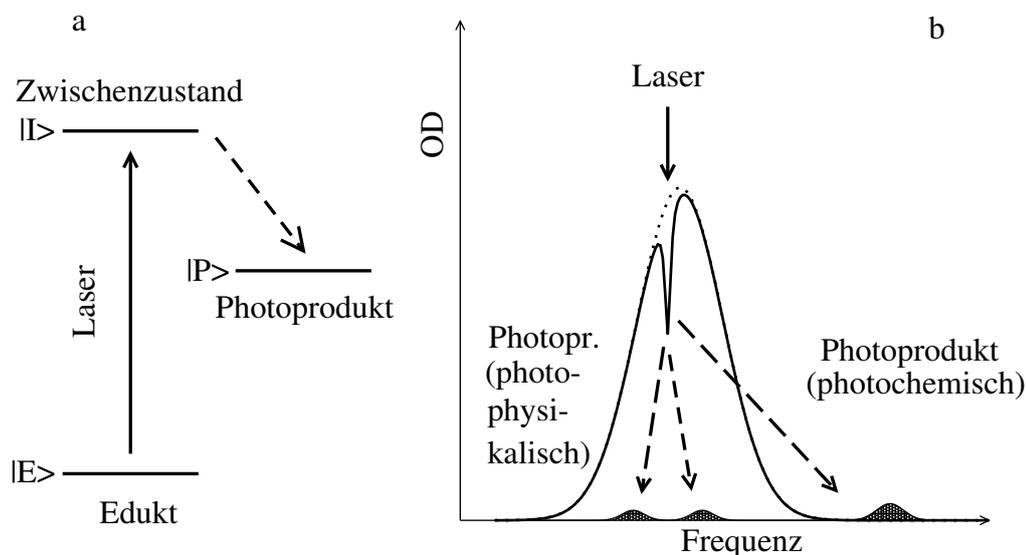


Abbildung 3.4: (a) Für das Lochbrennen notwendige Zustände. (b) Absorptionsbande mit eingebranntem Loch. Es besteht die Möglichkeit des photochemischen und photophysikalischen Lochbrennens.

Statt in den Grundzustand zurückzufallen, kann ein Sondenmolekül in diesem Fall in diesen Photoproduktzustand übergehen. Bei dem Photoproduktzustand handelt es sich um ein strukturell unterschiedliches Molekül mit einer vom ursprünglichen Molekül (deutlich) verschiedenen Absorptionsfrequenz. Die nun fehlenden absorbierenden Moleküle hinterlassen bei der Brennfrequenz ein Loch mit einer Breite, die von der homogenen Linienbreite bestimmt wird (siehe Abbildung 3.4b). Ein spektrales Loch stellt das negative Absorptionsspektrum eines Ensembles von Chromophoren dar, das zum Zeitpunkt des Lochbrennens dieselbe Absorptionsfrequenz hatte. Werden nach dem Lochbrennen die experimentellen Parameter verändert, z.B. durch Ausübung von hydrostatischem Druck oder dem Anlegen eines elektrischen Felds, so reagiert das spektrale Loch analog dem entsprechenden Ensemble.

Es lassen sich zwei Arten von Phototransformationen unterscheiden:

- Beim *photochemischen* Lochbrennen handelt es sich um Transformationen, bei denen der Farbstoff seine chemischen Eigenschaften ändert. Die spektrale Verschiebung zwischen dem Edukt und dem Photoprodukt ist meist so groß,

dass die Absorption des Photoprodukts außerhalb der inhomogenen Linie des Edukts liegt (siehe Abbildung 3.4b).

- Dagegen ändert das photoaktive Molekül beim *photophysikalischen* Lochbrennen seine chemischen Eigenschaften nicht. In diesem Fall ändert sich lediglich die Wechselwirkung des Farbstoffs mit der Matrix, z.B. durch das Zustandekommen einer anderen Lösungsmittelkonfiguration um den Chromophor herum. Die spektrale Verschiebung ist dort kleiner als die inhomogene Linienbreite.

Durch die hohe Frequenzauflösung lässt sich der Einfluss relativ kleiner externer Veränderungen (z.B. Druck) messen. Hierzu ist es notwendig, die Experimente bei tiefen Temperaturen ($T = 2 \text{ K}$) an Null-Phononen-Linien durchzuführen. Die Linienbreiten betragen dabei mehrere GHz. Die Löcher werden in Transmission gemessen. Das “Abscannen” dieses Bereichs erfolgt durch kontinuierliches Durchstimmen der Frequenz des Lasers³. Die dabei gemessene Lochbreite Δ ist mindestens doppelt so groß wie die homogene Linienbreite γ , da sich die homogene Linienbreite sowohl beim Brennen als auch beim Scannen auswirkt.

Besonders hohe Laserintensitäten beim Brennen führen zu einer zusätzlichen “Leistungsverbreiterung”. Es ist daher sinnvoller, mit niedrigerer Leistung länger zu brennen. Einen weiteren Einfluss auf die Form der Löcher hat die “Sättigungsverbreiterung”. Da die Absorptionsbande bei der Laserfrequenz durch das Brennen ausbleicht, ist in den Flanken des Lochs die Zahl der absorbierenden Moleküle größer als im Zentrum, so dass die Photoreaktion vor allem in den Flanken abläuft. Auch bei geringer Brennleistung und Brennenergie wird die messbare Lochbreite zusätzlich noch durch den Prozess der “spektralen Diffusion” vergrößert. Die spektrale Diffusion ist bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten vernachlässigbar, da diese innerhalb von Minuten bzw. Stunden durchgeführt werden können.

3.2.3 Bestimmung von Kompressibilitäten

Über die Messung der Auswirkung hydrostatischer Druckänderungen auf spektrale Löcher ist es möglich, mechanische Eigenschaften von Proteinen mit rein spektroskopischen Methoden zu untersuchen. Die elastischen Eigenschaften von Proteinen hängen von deren Struktur ab. Inhomogene Linien bestehen unter Umständen aus mehreren Konformationen. Somit können mit “Druck-Effekt”-Experimenten, abhängig von der Brennfrequenz, unterschiedliche Kompressibilitäten einzelner Proteinkonformationen gemessen werden [77]. Als Folge dessen ist es möglich, die Anzahl der Proteinkonformationen einzugrenzen und über die Brennfrequenz eine bestimmte Proteinkonformation gezielt zu adressieren. So lässt sich mit dem “Druck-Effekt”

³Um zu vermeiden, dass hierbei zusätzlich Moleküle in den Photoproduktzustand “weggebrannt” werden, wird die Laserintensität um vier Größenordnungen verringert.

spektraler Löcher abschätzen, in welchem Abstand sich die relevanten Aminosäuren eines Proteins zu dem Chromophor befinden, die ein Farbstoff “spürt”.

Farbstoff-Matrix-Wechselwirkungen als Grundlagen des “Druck-Effekts”: “pressure shift solvent shift”

Das Modell von LAIRD und SKINNER erklärt den “Druck-Effekt” spektraler Löcher in Farbstoff-Glas-Systemen [78]. Es erfolgt dabei die Beschränkung auf einen kleinen Druckbereich, in dem alle Deformationen elastisch und reversibel sind. Dieses Modell lässt sich auch auf “Druck-Effekt”-Experimente an Proteinen übertragen, wenngleich die Gültigkeit der darin enthaltenen Näherungen nicht vollständig übertragbar ist. Die Grundlagen der angesprochenen Theorie sollen im Folgenden erläutert werden:

Wie bereits erläutert, erfahren die betrachteten Farbstoffmoleküle aufgrund von Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung eine Verschiebung der Absorptionsfrequenz. Dies resultiert bei einer nicht vollständig geordneten Matrix in einer inhomogenen Verbreiterung der Absorptionslinie. Durch Druckanwendung wird die Dichte des Mediums erhöht, was zu geänderten Abständen zwischen Farbstoff und Matrix führt. Dadurch ändern sich auch die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Umgebung, die sich in veränderten Frequenzverschiebungen widerspiegeln.

In der folgenden Herleitung bezeichnet ν die Verschiebung der Absorptionsfrequenz bezüglich der Vakuumfrequenz⁴. Wichtig ist nun die Bestimmung der Verteilungsfunktion der Frequenzverschiebungen, die die Form der inhomogenen Bande bewirkt.

Die Wechselwirkung zwischen einem Farbstoffmolekül und einem Lösungsmittelmolekül im Abstand \vec{R} erzeugt eine Frequenzverschiebung $\nu(\vec{R})$. $\nu(\vec{R})$ ist ein Differenzpotenzial. In der Umgebung eines Farbstoffs treten Wechselwirkungen mit N Lösungsmittelmolekülen an den Positionen $\vec{R}_1, \dots, \vec{R}_N$ auf. Die resultierende Frequenzverschiebung kann näherungsweise durch die Summe aller N Frequenzverschiebungen beschrieben werden. Folgende Annahmen ermöglichen einen Ansatz für die inhomogene Verteilungsfunktion $I(\nu)$:

1. Es bestehen keine Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Lösungsmittelmolekülen. Damit vereinfacht sich die N -dimensionale Verteilungsfunktion $P(\vec{R}_1, \dots, \vec{R}_N)$ zu einem Produkt aus N Zwei-Teilchen-Verteilungsfunktionen $g(\vec{R}_1) \cdot \dots \cdot g(\vec{R}_N)$.
2. Es besteht eine hohe Anzahldichte ρ der Lösungsmittelmoleküle. Mit Hilfe dieser Annahme lässt sich die inhomogene Verteilungsfunktion $I(\nu)$ gemäß

⁴Bei einer bestimmten Lösungsmittelverschiebung können sich dispersive und elektrostatische Wechselwirkungen gegenseitig aufheben. Die zugehörige Frequenz wird als Vakuumfrequenz bezeichnet, da diese gegenseitige Kompensation den gleichen Effekt wie das Nichtvorhandensein eines Solvens hat.

dem Zentralen Grenzwertsatz als Gaußfunktion annähern.

Bei Gültigkeit beider (eigentlich einander ausschließender) Annahmen erhält man eine gaußförmige Verteilung der Frequenzverschiebungen:

$$I(\nu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_0^2}} \exp\left(-\frac{(\nu - \nu_0)^2}{2\sigma_0^2}\right) \quad (3.3)$$

Die Form der Spektralbande ist eine Faltung der lorentzförmigen homogenen Linie mit der inhomogenen Verteilungsfunktion $I(\nu)$. In der Regel ist die inhomogene Verbreiterung von Chromoproteinen bei tiefen Temperaturen deutlich größer als die homogene Linienbreite, so dass der Lorentzanteil einer inhomogenen Linie vernachlässigbar ist. Die inhomogene Linie folgt daher einer Gaußbande, für deren Zentrum ν_0 (= Maximum der inhomogenen Bande) und Breite σ_0 die folgenden Beziehungen gelten:

$$\nu_0 = N \langle \nu(\vec{R}) \rangle = \frac{N}{V} \int d\vec{R} \cdot g(\vec{R}) \cdot \nu(\vec{R}) \quad (3.4)$$

und

$$\sigma_0^2 = N \langle \nu^2(\vec{R}) \rangle = \frac{N}{V} \int d\vec{R} \cdot g(\vec{R}) \cdot \nu^2(\vec{R}). \quad (3.5)$$

Die mittlere Lösungsmittelverschiebung ν_0 stellt den Frequenzunterschied zwischen dem Zentrum der inhomogenen Bande des gelösten Farbstoffs und der Vakuumfrequenz dar. V ist das Volumen der mit dem Farbstoff wechselwirkenden Matrix.

Wird nun auf die Probe Druck ausgeübt, so ändern sich die Abstände \vec{R} zwischen Farbstoff und Lösungsmittel, wodurch sich die Frequenzverschiebung ohne Druck $\nu(\vec{R})$ wie folgt zur Frequenzverschiebung mit Druck $\nu'(\vec{R}, \Delta p)$ ändert:

$$\nu'(\vec{R}, \Delta p) = \nu(\vec{R}) + \eta(\vec{R})\Delta p. \quad (3.6)$$

η ist ein Maß für die Empfindlichkeit des Systems auf Druckänderungen. Im Fall eines homogenen und isotropen Lösungsmittels lässt sich $\eta(\vec{R})$ durch folgende Gleichung mit der isothermen Kompressibilität κ ausdrücken:

$$\eta(\vec{R}) = \frac{\partial \nu}{\partial \vec{R}} \frac{\partial \vec{R}}{\partial V} \frac{\partial V}{\partial p} = -\frac{\kappa}{3} \vec{R} \frac{\partial \nu}{\partial \vec{R}} \quad (3.7)$$

Da das spektrale Loch der Absorptionslinie der weggebrannten Moleküle entspricht, kann die positive Linie anstatt des gebrannten Lochs für Auswertungen verwendet werden.

Die Druckanwendung verursacht eine Verschiebung der Absorptionsfrequenzen der ausgewählten Moleküle. Obwohl diese Moleküle dieselbe Absorptionsfrequenz besitzen, kann es sich durchaus um Moleküle mit unterschiedlichen Umgebungen handeln. Aus diesem Grund zeigen die durch Druck erzeugten Frequenzverschiebungen eine Dispersion, die in einer Linienverbreiterung resultiert.

Um dieses Verhalten modellieren zu können, muss eine bedingte Wahrscheinlichkeit $f(\nu'|\nu; \Delta p)$ berechnet werden. Diese gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Probemolekül, das zunächst bei der Frequenz ν absorbiert, nach einer Druckänderung Δp nun bei der Frequenz ν' absorbiert. Diesem Modell liegen die gleichen Näherungen zugrunde wie oben erläutert, so dass es sich bei $f(\nu'|\nu; \Delta p)$ ebenfalls um eine Gaußfunktion handelt. Die Form des spektralen Lochs unter Druck setzt sich aus einer Faltung der Funktion $f(\nu'|\nu; \Delta p)$ mit der Funktion der homogenen Linienbreite zusammen. Die experimentell zugänglichen Parameter von $f(\nu'|\nu; \Delta p)$, – die zentrale Frequenz s_p und seine Breite σ_p – hängen linear vom Druck ab. Die Größe s_p wird als Druckverschiebung bezeichnet. Sie lässt sich durch folgende Gleichung ausdrücken:

$$s_p = \left[N \langle \eta \rangle + \frac{\langle \eta \nu \rangle}{\langle \nu^2 \rangle} (\nu_b - \nu_{vac} - \nu_0) \right] \Delta p \quad (3.8)$$

Bei der Frequenz ν_b wird das Loch in die inhomogene Bande gebrannt. Die Größen $\langle \eta \rangle$ und $\langle \eta \nu \rangle$ sind die Mittelwerte von $\eta(\vec{R})$ und $\eta(\vec{R})\nu(\vec{R})$ über die Zwei-Teilchen-Verteilungsfunktionen gemäß Gleichungen 3.4 und 3.5. Nach Gleichung 3.8 hängt die Druckverschiebung nicht nur vom angelegten Druck, sondern auch von der betrachteten Frequenz ab. Dieses Verhalten wird als *Farbefeekt* bezeichnet und wird zur Bestimmung der Kompressibilität κ herangezogen.

Im Gegensatz zur Druckverschiebung zeigt die druckinduzierte Linienverbreiterung σ_p keinen Farbefeekt. Allerdings lassen auch ihre Eigenschaften einen Einblick in das Zusammenspiel zwischen struktureller Ordnung und Unordnung auf der einen Seite und der Linienverbreiterung auf der anderen Seite zu. σ_p setzt sich zusammen aus:

$$\sigma_p = \sqrt{N \langle \eta^2 \rangle (1 - \rho^2)} |\Delta p| \quad (3.9)$$

ρ^2 beschreibt den Grad an Korrelation zwischen $\eta(\vec{R})$ und $\nu(\vec{R})$:

$$\rho^2 = \frac{\langle \eta \nu \rangle^2}{\langle \eta^2 \rangle \langle \nu^2 \rangle}; \quad 0 \leq \rho^2 \leq 1. \quad (3.10)$$

Im Falle einer perfekten Korrelation zwischen $\eta(\vec{R})$ und $\nu(\vec{R})$ ergibt sich für $\rho^2 = 1$ und für $\sigma_p = 0$. Dieses Verhalten wird für hochgeordnete kristalline Materialien gefunden [79; 80]: Trotz einer großen Verschiebung zeigt sich dort lediglich eine kleine Druckverbreiterung. Offensichtlich tritt hohe Korrelation auf, wenn der Druck nur die Dichte, nicht aber die lokale Struktur um ein Molekül verändert. Dagegen ergibt sich ein Maximum für σ_p , wenn $\eta(\vec{R})$ und $\nu(\vec{R})$ unkorreliert sind. Dieser Fall tritt in strukturell ungeordneten Materialien, wie z.B. Gläsern, auf. Interessanterweise zeigen auch Proteine, obwohl sie einen hohen Organisationsgrad besitzen, eine ähnliche Druckverbreiterung wie Gläser. Gleichung 3.9 besagt, dass σ_p proportional zur Größe der Druckänderung ist. Die Richtung der Druckänderung spielt für die Verbreiterung keine Rolle. Im Gegensatz dazu bestimmt das Vorzeichen der Druckänderung auch

das Vorzeichen des “Shifts” s_p . Für den Fall, dass $\nu(\vec{R})$ einer $1/R^n$ -Abhängigkeit folgt, ergibt sich mit Gleichungen 3.7 und 3.8

$$\eta(\vec{R}) = \frac{n}{3}\kappa\nu(\vec{R}) \quad (3.11)$$

sowie für die Druckverschiebung

$$s_p = \frac{n}{3}\kappa(\nu_b - \nu_{vac})\Delta p. \quad (3.12)$$

$\nu_b - \nu_{vac}$ ist die Lösungsmittelverschiebung der frequenzselektierten Farbstoffmoleküle. Ein vernünftiger Wert für n stellt 6 dar, der für Dispersionswechselwirkungen oder elektrostatische Wechselwirkungen höherer Ordnung gilt. Das der Gleichung 3.12 zugrundeliegende Modell wird als *pressure shift solvent shift*-Modell bezeichnet, da beide Größen zueinander proportional sind. In dieser Gleichung sind die Kompressibilität κ , die die Umgebung des Farbstoffs charakterisiert, und die Vakuumabsorptionsfrequenz ν_{vac} , die die Farbstoffsonde charakterisiert, enthalten.

Näherungen im Modell

Für die Gaußsche Näherung ist eine hohe Anzahldichte an Lösungsmittelmolekülen Voraussetzung. Dies deutet auf Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Lösungsmittelmolekülen hin, was durch die Annahme einer geringen Korrelation unter den Lösungsmittelmolekülen eigentlich ausgeschlossen wurde. Dieser offensichtliche Widerspruch ist ein Problem für jedes beliebige Lösungsmittel. Für Proteine wird diese Tatsache noch dadurch verstärkt, dass sie eine definierte Struktur besitzen und somit die Lösungsmittelmoleküle, in diesem Fall die Atome des Apoproteins, hoch korreliert sind.

Aus der Röntgenstrukturanalyse von Proteinen bei Tieftemperatur ist jedoch bekannt, dass trotz der hohen Korrelation eine strukturelle Unbestimmtheit vorhanden ist [81; 82; 83]. Die durchschnittliche Längenskala dieser Unbestimmtheit für ein bestimmtes Atom oder einen bestimmten Proteinbaustein beträgt 0,2 Å. Für eine Druckänderung im Bereich von 1 MPa ist die entsprechende Verschiebung mit ungefähr 10^{-3} Å deutlich kleiner. Auf dieser Längenskala können die Proteinbausteine durchaus als strukturell unkorreliert betrachtet werden, wodurch die Gültigkeit des Modells wiederhergestellt wird.

Eine weitere zu klärende Frage ist, ob die Abhängigkeit $\nu(R) \propto 1/R^6$ die Situation korrekt beschreibt. In diesem Fall muss geklärt werden, warum Wechselwirkungen, die wie z.B. Abstoßungsterme oder dipolare Terme anders von R abhängen, vernachlässigbar sind. Um einen stabilen Lösungsmittelkäfig um die Farbstoffsonde auszubilden, sind sowohl anziehende als auch abstoßende Wechselwirkungen notwendig. Abstoßende Wechselwirkungen lassen sich beim “Druck-Effekt” vernachlässigen, denn es kann davon ausgegangen werden, dass die Atome oder Atomgruppen in nächster Nachbarschaft um das Farbstoffmolekül im Potenzialminimum von $\nu(R)$ lokalisiert sind. Damit verschwindet für sie die entsprechende Ableitung (Gleichung

3.7), so dass hinreichend kleine Verschiebungen der nächsten Nachbarn des Farbstoffs keine Frequenzverschiebung verursachen. Für weiter entfernte Matrixmoleküle sind die abstoßenden Farbstoff-Matrix-Wechselwirkungen wegen ihrer kurzen Reichweite gegenüber anziehenden Wechselwirkungen zu vernachlässigen.

Die Dipol-Dipol- ($\propto R^{-3}$) und Ion-Dipol-Wechselwirkungen ($\propto R^{-2}$) mitteln sich in einer zufallsverteilten Probe zu Null und können somit nicht zur Druckverschiebung, aber zu einer Druckverbreiterung beitragen. Bei Proteinen tritt zumindest teilweise eine Kompensation auf. Daher sind die entsprechenden Kompressibilitäten, die unter Annahme des Vorherrschens von $1/R^6$ -Wechselwirkungen gewonnen werden, etwas zu klein.

In jedem Fall dominieren bei der Verwendung aromatischer Sondenmoleküle mit ausgedehnten π -Elektronensystemen die Dispersionskräfte die Wechselwirkungen. In manchen Systemen ist die Sonde selbst ziemlich polar, so dass sie möglicherweise ein Dipolmoment im Wirtsgitter induziert. Falls die Wirtsmoleküle ein eigenes Dipolmoment besitzen und ausreichend beweglich sind, ist die Polarisierung der Wirtsmoleküle möglich. In all diesen Fällen ist die resultierende Wechselwirkung vom $1/R^6$ -Typ.

Einen größeren Beitrag zur Druckverbreiterung als dipolare Kräfte leisten die Freiheitsgrade der Orientierung. Fehlen diese Freiheitsgrade, z.B. in Edelgasmatrizes, so ist die Druckverbreiterung deutlich kleiner [84].

Auch wenn die im Modell enthaltenen Näherungen nicht absolut gültig erscheinen, stimmen die aus "Druck-Effekt"-Experimenten optisch gewonnen Ergebnisse für die Kompressibilitäten gut mit anderen Experimenten überein [77; 85; 86; 87; 88]

3.3 Experimentelles

3.3.1 Denaturierungsexperimente

Aufbau

Zur Untersuchung der Phasendiagramme von Proteinen sind folgende Komponenten notwendig: Eine Lichtquelle, eine temperierbare Druckzelle und eine Detektionseinheit. Den Aufbau der Messapparatur zeigt Abbildung 3.5.

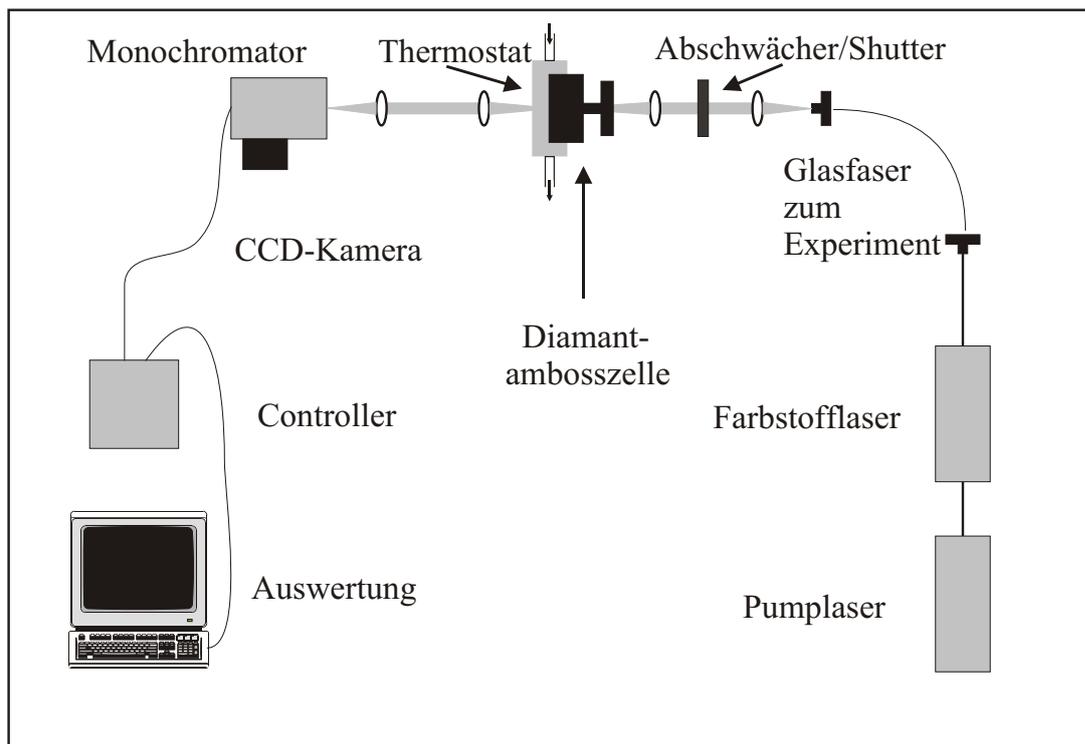


Abbildung 3.5: Aufbau zur Untersuchung der Phasenstabilität von Proteinen mittels laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie.

Lichtquellen

Für die Messungen an Zn-Cytochrom c wurde als Anregungsquelle ein Excimer-Farbstoff-Lasersystem verwendet. Ein XeCl-Excimerlaser (Lambda Physik, LPX 100) pumpt mit einer im Bereich von 1 bis 50 Hz variierbaren Frequenz mit intensiven Laserblitzen der Wellenlänge 308 nm einen Farbstofflaser (LPD 3000). Die Pulsenergie des Pumplasers lag bei etwa 150 mJ. Im Farbstofflaser fand der Farbstoff PBBO (Wellenlängenbereich 386 – 420 nm) Verwendung. Über ein Gitter im Resonator des Lasers lässt sich die Wellenlänge einstellen. Die gepulste Laserstrahlung wird über eine Glasfaser zum eigentlichen Versuchsaufbau geführt.

Druckzelle

Um den Einfluss von Laborlicht auszuschalten, wurde der Strahlengang mit Bälgen vom Laborlicht isoliert. Vor der Druckzelle befindet sich ein Shutter und ein Filterkästchen, um intensive Strahlung durch Graufilter abzuschwächen. Die Diamantambosszelle (DAC) ist von drei Seiten durch eine Halterung aus Aluminium umschlossen. Diese ist von Bohrungen durchzogen und mittels eines Thermostaten (Lauda K 20, mit DLK 30; -20 bis +95°C) temperierbar. Die Wärmeübertragung zwischen der beschriebenen Halterung und der DAC konnte über ein Digitalthermometer überprüft werden. Die Diamantambosszelle (Minicell, Diacell Products, siehe

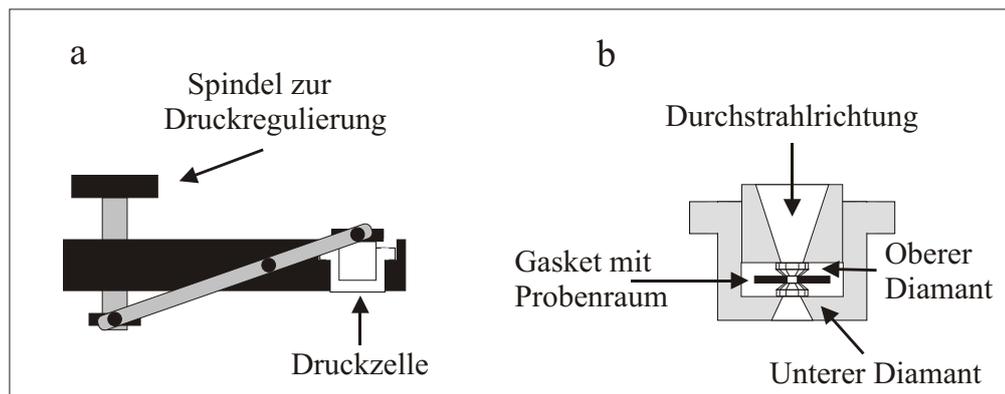


Abbildung 3.6: (a) Seitenansicht der verwendeten Diamantambosszelle. (b) Der Zylinder mit den beiden Diamantambossen. Zwischen den Ambossen wird das "Gasket" eingebaut. Darin befindet sich ein Loch mit der Probe.

Abbildung 3.6) lässt mittels Spindel und Hebelwirkung die Erzeugung von Drücken bis 2 GPa (20 kbar) zu. Zum Befüllen mit Probe muss die DAC ausgebaut werden. Die Probe wird in das Loch eines dünnen Edelstahlplättchens (Gasket), das zwischen die beiden Diamanten positioniert wird, gegeben. Die exakte Positionierung wird mit Hilfe eines Mikroskops verfolgt. Das Volumen der spektroskopierten Probe liegt im Bereich von 25 nl (Lochdurchmesser 0,5 mm; Dicke der Edelstahlfolie 125 μm). Zur spektroskopischen Bestimmung des Drucks ist die Zugabe einer geringen Menge feingemahlene Rubinpulvers notwendig. Die DAC lässt nur einen linearen Versuchsaufbau zu. Das bedeutet, dass auf der Rückseite transmittierte Anregungsstrahlung und Fluoreszenzlicht überlagert austreten.

Detektion

Vor dem Spektrograph wird die noch vorhandene Anregungsstrahlung durch einen Kantenfilter abgeblockt. Das Fluoreszenzlicht trifft auf einen Monochromator (ISA, Triax 180). Die Fokallänge des Monochromators beträgt 19 cm. Es stehen drei Gitter mit den folgenden Strichzahlen zur Auswahl: 1800 l/mm (Blazewellenlänge 400 nm), 1200 l/mm (330 nm) und 600 l/mm (500 nm). Das spektral aufgetrennte Licht wird von

einer CCD-Kamera aufgenommen (ISA, Spectrum One, CCD-3000, 256 x 1024 Pixel). Die Ansteuerung von Monochromator und CCD-Kamera sowie die Ausgabe und Verarbeitung der Spektren auf dem Bildschirm erfolgte über die Software SpectraMax/32, Version 4.11 (ISA).

3.3.2 “Druck-Effekt” mit Lochbrennspektroskopie

Aufbau

Wie in Abbildung 3.7 dargestellt, werden zur Lochbrennspektroskopie an Proteinen eine Lichtquelle, ein Kryostat und eine Detektoreinheit benötigt. Der hydrostatische Druck wird mit einer besonderen Vorrichtung an die Probe angelegt.

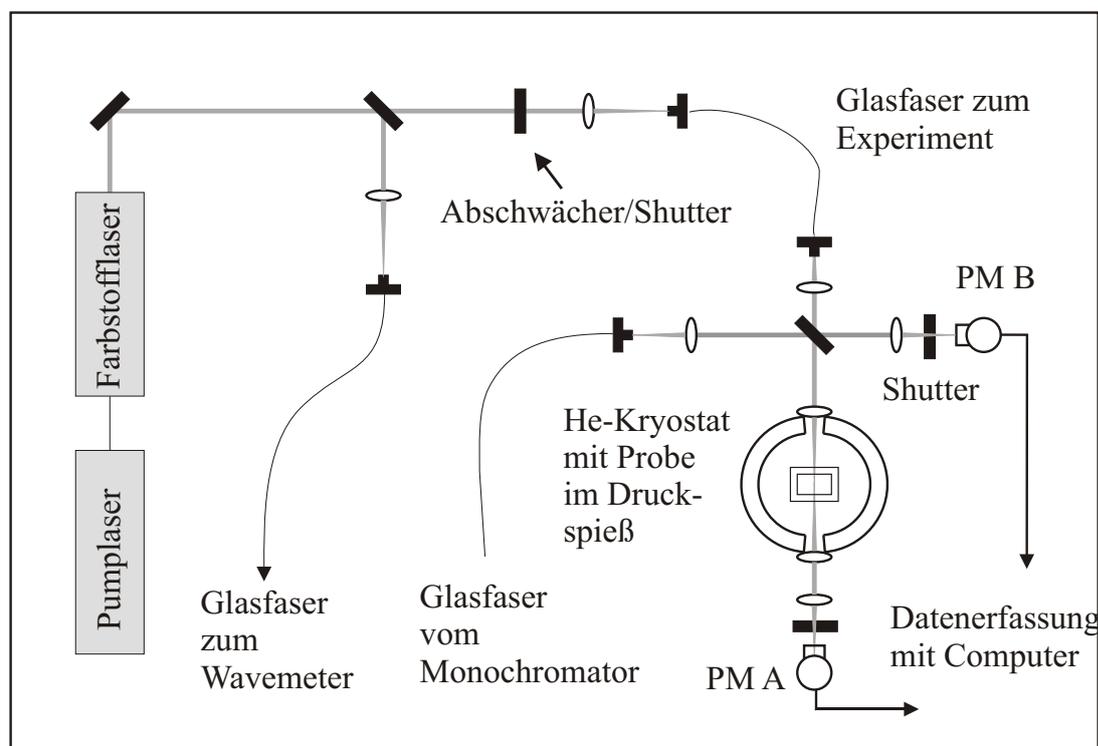


Abbildung 3.7: Aufbau zur Messung des “Druck-Effekts” mit der Methode des spektralen Lochbrennens.

Lichtquellen

Das Licht zur Aufnahme von (Absorptions-) Übersichtsspektren bei Heliumtemperatur lieferte ein Monochromator (Jobin Yvon, 1 m Czerny-Turner-Anordnung, Gitter 600 l/mm) mit einer Xe-Hochdruck-Bogenlampe als Lichtquelle. Die spektrale Auflösung betrug dabei einige cm^{-1} , was angesichts der Breite der inhomogenen Banden ($> 100 \text{ cm}^{-1}$) ausreichend war.

Zum Lochbrennen und zur Aufnahme der Lochspektren wurde ein durchstimmbarer Ring-Farbstofflaser (Coherent 899-21), von einem Argonionenlaser mit 6 W

gepumpt (Coherent Innova Sabre 10), verwendet. Der Ringlaser wurde mit Rhodamin 6 G (Spektralbereich: $16000 - 17850 \text{ cm}^{-1}$, $560 - 625 \text{ nm}$) betrieben. Die Ausgangsleistung des Farbstofflasers lag bei ca. 300 mW. Die Frequenzauflösung des Farbstofflasers lag bei 500 kHz. Der Farbstofflaser ließ sich über 30 GHz modenstabil durchstimmen. Die Scans wurden über einen Computer gesteuert. Die Absolutmessung der Laserwellenlänge erfolgte über ein Wavemeter (Eigenbau, Details siehe [89]). Um Nachbrenneffekte zu vermeiden, wurden die Lochspektren mit einer gegenüber der Brennintensität um 4 Größenordnungen abgeschwächten Intensität aufgenommen. Hierzu wurden Graufilter in den Strahlengang geschoben. Das Licht wurde über eine PMMA-Faser zur Probe geleitet. Der Strahlengang wurde durch Bälge und Tücher lichtdicht gestaltet.

Kryostat

Die “Druck-Effekt”-Experimente wurden in einer Absorptionsanordnung durchgeführt. Die Probe befand sich im Inneren eines Helium-Badkryostaten mit optischen Fenstern. Durch Abpumpen wurde der Druck über dem Helium auf etwa 35 – 40 mbar erniedrigt, was einer Temperatur des flüssigen Heliums von etwa 2,0 K entspricht. Der Helium-Dampfdruck wird über ein Manometer gemessen. Die Kühlung auf 2,0 K bietet mehrere Vorteile: Einerseits ergeben sich günstige Auswirkungen auf die Breite, Fläche und die zeitliche Stabilität der spektralen Löcher. Desweiteren befindet sich das Helium im suprafluiden Zustand und stört somit nicht die Aufnahme der Spektren durch das Sieden flüssigen Heliums.

Aufnahme der Spektren

Das durch die Probe transmittierte Licht wird mit Hilfe eines Photomultipliers (PM A) gemessen. Um Intensitätsschwankungen der Lichtquelle auszugleichen wurde ein Teil des Lichts vor der Probe auf einen weiteren Photomultiplier (PM B) gelenkt. Die Ausgangsströme der Photomultiplier wurden nach Glättung und Verstärkung über eine A/D-Wandlerkarte vom Computer eingelesen und als A/B-Verhältnis zusammen mit den Wellenlängen als Datei gespeichert. Zur Auswertung wurden die A/B-Verhältnisse in Optische Dichte umgerechnet.

Durchführung der “Druck-Effekt”-Experimente

Die Probe wurde in Beutelchen aus Plastik eingeschweißt, die eine Dicke von ungefähr 1 mm hatten. Davon wurden, um eine höhere optische Dichte zu erreichen, zwei Stück in eine gegen den Kryostateninnenraum abgedichtete und mit optischen Fenstern ausgestattete Druckzelle gelegt. Zur Übertragung des Drucks auf die Probe wurde Helium aus einer Druckflasche verwendet. Bei 2 K können wegen der Erstarrung des flüssigen Heliums höchstens Drücke bis zu 2,5 MPa angelegt werden. Der

Helium-Gasdruck in der Zelle wurde mit Hilfe eines Präzisionsdrucksensors (Sensotec TJE/713-25) mit einer Genauigkeit von 10^{-3} MPa gemessen.

Es wurden zwei Typen von “Druck-Effekt”-Experimenten durchgeführt: Entweder wurde das Loch bei Raumdruck gebrannt und anschließend der Druck erhöht oder das Loch wurde bei hohem Druck gebrannt und sein Verhalten mit sinkendem Druck beobachtet. Eine Abweichung des Rückkehrlochs vom Anfangsloch kann Hinweise auf verschiedene irreversible Effekte geben. Die Druckzyklen wurden bei verschiedenen Positionen in der Absorptionsbande durchgeführt.

3.3.3 Eingesetzte Cytochrom c-Proben

Die Experimente wurden an einem modifizierten Cytochrom c-Protein aus dem Arbeitskreis von Prof. J. M. Vanderkooi, University of Pennsylvania, USA, durchgeführt. Das hier untersuchte Cytochrom c wird aus Pferdeherz gewonnen und besteht aus 104 Aminosäuren. Wie aus Abbildung 3.8 ersichtlich, besitzt es einen annähernd kugelförmigen Aufbau mit einem Durchmesser von etwa 34 Å. Als *Re-*

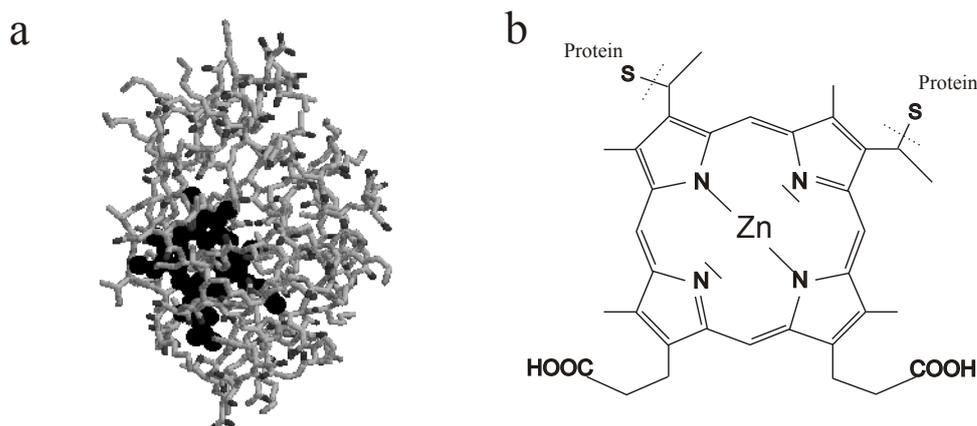


Abbildung 3.8: (a) Röntgenstruktur von Pferdeherz-Cytochrom c (PDB-Eintrag 1HRC [90], bearbeitet mit RasMol 2.7.1). (b) Strukturformel des Zn-Mesoporphyrin-Chromophors.

doxprotein kommt es in der Endoxidationskette der Mitochondrien aller aeroben Organismen vor. Die biologische Funktion ist der Transport von Elektronen über einen Eisencarrier. Das Hämeisen wechselt dabei seinen Oxidationszustand zwischen Fe(II) und Fe(III). Das Cytochrom c-Häm weist zunächst zwei Vinylgruppen auf, die durch eine Additionsreaktion kovalent an zwei Cysteinreste gebunden werden [7]. Die Hämgruppe, der chemisch das System eines Porphyrinrings zugrunde liegt, wird als “Mesoporphyrin” bezeichnet, da die Vinylgruppen nach der Additionsreaktion über gesättigte Kohlenstoffatome verfügen. Die kovalente Bindung zwischen

Porphyrinring und dem Apoprotein verursacht eine relativ geringe Empfindlichkeit von Cytochrom c gegenüber pH-Variationen.

Um die Aufnahme von Fluoreszenzspektren und schmalbandiges Lochbrennen zu ermöglichen, wurde das Häm-Eisen im Cytochrom c durch ein Zink-Ion ersetzt [91]. In einer NMR-Studie wurde gezeigt, dass Zn-Cytochrom c ein gutes Modell für natives Cytochrom c darstellt [92].

Für die Denaturierungsexperimente wurde das Protein in einer Konzentration von 4,2 mg in 250 μl eines 50 millimolaren KH_2PO_4 / K_2HPO_4 -Puffers (pH 7,0) gelöst. Zu dieser Lösung wurde das 2,5 fache Volumen Glycerin hinzugefügt. Das hat den Vorteil, dass die Probe sowohl bei den Denaturierungsexperimenten als auch bei den Lochbrennexperimenten in der gleichen Matrix vorliegt. Die bei Helium-Temperatur durchgeführten Lochbrennexperimente benötigen zur Ausbildung eines Glases einen hohen Glycerinanteil in der Probe. Für die Lochbrennexperimente wurde eine höherkonzentrierte Probe eingesetzt: Es wurden 4 mg Zn-Cytochrom c in 200 μl 10 millimolaren KH_2PO_4 / K_2HPO_4 -Puffer (pH 7,0) gelöst und mit 300 μl Glycerin versetzt.

Kapitel 4

Bestimmung des Phasendiagramms von Cytochrom c

4.1 Einleitung

Im folgenden Kapitel werden die Messungen zur Druck- und Temperaturdenaturierung an *Zn-Mesoporphyrin-Cytochrom c* vorgestellt. Es wird gezeigt, wie sich das erste und zweite Moment¹ der Fluoreszenz unter Veränderung von Druck und Temperatur verhalten und wie das Auftreten des Phasenübergangs interpretiert werden kann. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein elliptisches Stabilitätsdiagramm erzeugen. In Kombination mit der spektroskopischen Bestimmung der Gleichgewichtskonstante K werden anschließend alle mit dem Phasenübergang verbundenen thermodynamischen Parameter berechnet.

4.2 Spektrale Eigenschaften

In Abbildung 4.1 ist das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von *Zn-Mesoporphyrin-Cytochrom c* gezeigt. Neben der intensiven Soret-Bande bei 420 nm zeigt das *modifizierte Cytochrom c* zwei schwächere Absorptionsbanden bei 549 nm und 583 nm.

Zur Erzeugung von Emissionsspektren wurde die Probe über einen gepulsten Excimerlaser (Frequenz: 10 Hz) mit einer Wellenlänge von 420 nm angeregt. Im Fluoreszenzspektrum sind Emissionen bei 585 nm (Q_x - Q_y -00-Bande bzw. "blaue" Bande) und 640 nm (Überlagerung einiger vibronischer Banden) zu erkennen. Das

¹Die Zahl $\alpha_1 = \sum_k x_k p_k$ ist das erste Moment einer Verteilung mit den Werten x_k der Zufallsgröße und p_k der zugehörigen Wahrscheinlichkeit.

Die Zahl $\mu_2 = \sum_k (x_k - \alpha_1)^2 p_k$ stellt das zweite (zentrale) Moment dar.

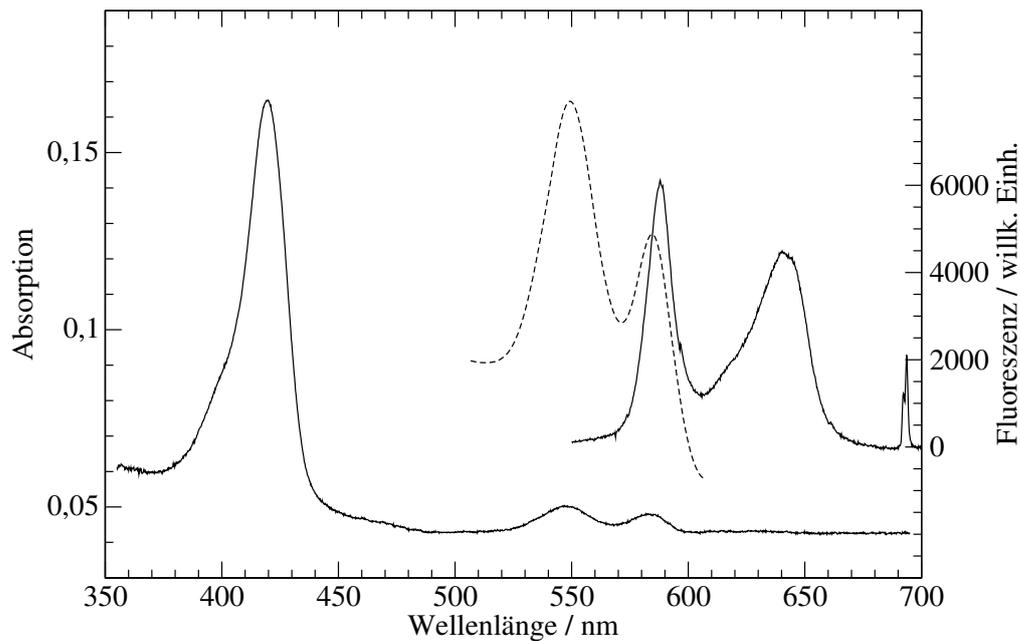


Abbildung 4.1: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Zn-Cytochrom c. Die gestrichelte Linie ist die Absorption in Vergrößerung; rechts daneben findet sich das Emissionsspektrum.

Emissionsspektrum wurde über eine CCD-Kamera aufgenommen. Für die Darstellung eines Spektrums im Bereich von 550 bis 700 nm (siehe hierzu auch [Abbildung 4.2](#)) wurden die Aufnahmen aus drei Abschnitten des Fluoreszenzspektrums zusammengefügt. Die Aufnahmezeit der CCD-Kamera betrug 5 s. Für die weitergehenden Auswertungen, wie z.B. in [Abbildung 4.3](#), wurden die Spektren des gesamten Wellenlängenbereichs aus je drei Aufnahmen gemittelt.

4.3 Grundlegende Muster und ihre Beschreibung

4.3.1 Temperaturdenaturierungen bei Atmosphärendruck

Temperaturdenaturierungen wurden nach folgendem Muster durchgeführt: Nach dem Befüllen der Diamantambosszelle bei Raumtemperatur wurde der Aufbau mittels Thermostat auf 0°C abgekühlt. Dieser Vorgang nahm einen Zeitraum von mindestens einer Stunde in Anspruch. Anschließend wurde die Temperatur der Diamantambosszelle in Schritten von je 5 K erhöht und die Spektren im Bereich von 0°C bis 95°C gemessen. Vor der Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurde das System stets 30 Minuten äquilibriert.

Bei Temperaturdenaturierungen unter Atmosphärendruck wurde die Ambosszelle ohne Druckausübung geschlossen.

[Abbildung 4.2](#) zeigt die Fluoreszenzspektren einer Temperaturdenaturierung

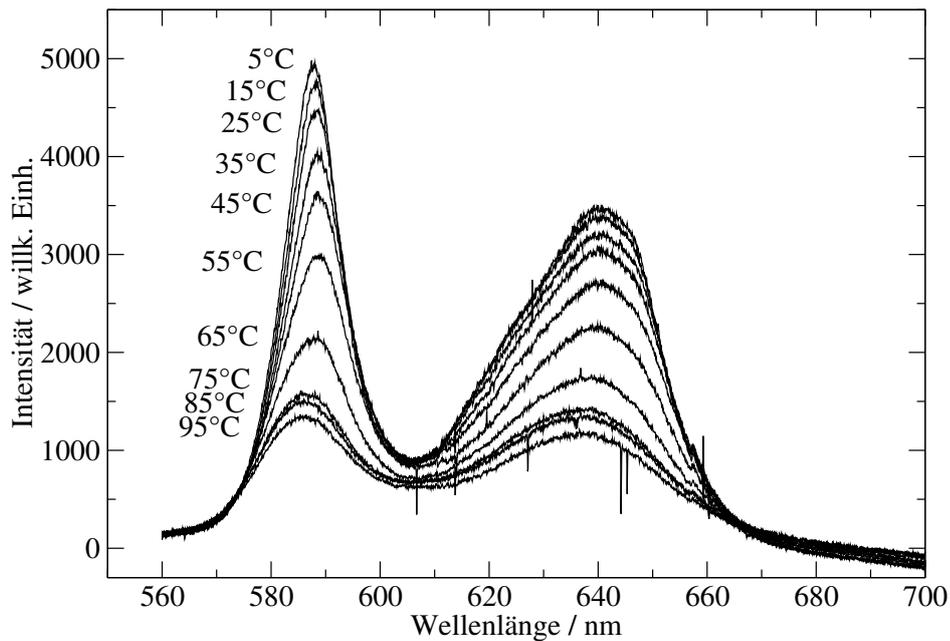


Abbildung 4.2: Emissionsspektren von Zn-Cytochrom *c* während einer Temperaturdenaturierung unter Atmosphärendruck. Es ist deutlich zu erkennen, dass die blaue Bande mit steigender Temperatur eine Rot- und Blauverschiebung erfährt.

unter Atmosphärendruck. In der weiteren Auswertung wird nur die rein elektronische "blaue" Bande betrachtet, da sich bei dieser Wellenlänge nur ein Übergang befindet. Sowohl das Zentrum (bei 587 nm) als auch die Breite (etwa 15 nm) dieser Bande ändern ihre Werte während des Experiments um kleine Beträge.

Zur Bestimmung der Linienverschiebung und der Bandenbreite wurde folgendermaßen vorgegangen: Der Hauptbestandteil des Chromophors besteht aus einem ziemlich starren aromatischen Ring, dessen π -Elektronensystem die jeweilige Oszillatorenstärke bestimmt. Da es unwahrscheinlich ist, dass der Ring während der Denaturierung verändert wird, kann angenommen werden, dass die Oszillatorenstärke des Übergangs sich ebenfalls nicht ändert. Außerdem ist die Skala der jeweiligen Änderungen des Zentrums und der Breite der Bande im Vergleich zu den entsprechenden inhomogenen Breiten ziemlich klein, nämlich wenige Nanometer verglichen mit 15 nm. Daher konnte die gesamte Bande zufriedenstellend durch eine Gaußkurve angefitet werden. Das Maximum, also das Bandenzentrum, und die Breite (2 fwhm) dieser Gaußkurven sind die Größen, die in Abbildung 4.3 gezeigt werden.

Abbildung 4.3 zeigt das Verhalten des Bandenzentrums (λ_{max}) und der Breite der Bande (fwhm) während einer Temperaturänderung zwischen 0°C und 90°C unter Atmosphärendruck. Das Bandenzentrum zeigt eine mäßige Rotverschiebung hinauf bis zu einer Temperatur von etwa 40°C. Dann wird die Rotverschiebung durch ei-

²volle Breite bei halber maximaler Höhe.

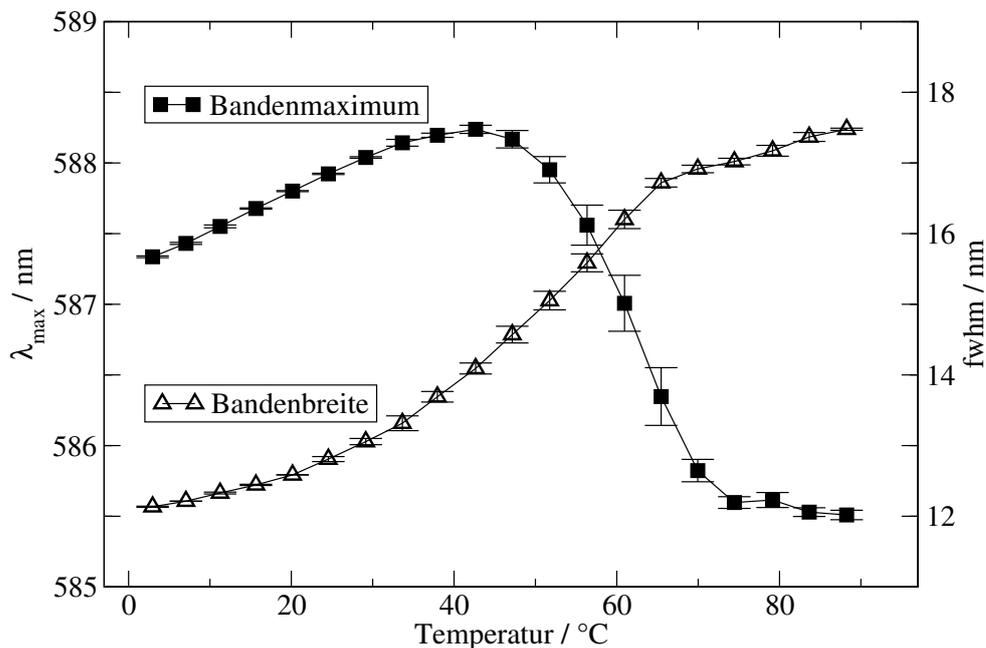


Abbildung 4.3: Verlauf von Zentrum und Breite der Q_x - Q_y -00-Bande für eine Temperaturdenaturierung unter Atmosphärendruck.

ne deutliche Blauverschiebung abgelöst, die bei 70°C wieder schwächer wird. Das Muster zeigt einen sigmoiden Verlauf.

Die Breite der Bande nimmt mit der Temperatur stetig zu. Allerdings wird ab der Temperatur, bei der der Mittelpunkt der Blauverschiebung durchlaufen wird, der Anstieg der Bandenbreite als Funktion der Temperatur flacher. Dies ist als “Knick” im Verlauf zu erkennen.

4.3.2 Druckdenaturierungen bei Raumtemperatur

Die Durchführung eines Druckdenaturierungsexperiments ist durch folgende Schritte charakterisiert: Zunächst wird die Diamantambosszelle mit Probe und Rubinpulver befüllt. Dabei ist es notwendig, dass Protein und Rubinpulver in einem vernünftigen Verhältnis vorliegen. Das heißt, dass die Fluoreszenz des Rubins eine ähnlich hohe Intensität wie die Banden des Proteins aufweisen sollte. Anschließend erfolgt die Einstellung der gewünschten Temperatur mittels Thermostat. Damit sich das thermodynamische Gleichgewicht einstellen kann, wurde nach Erreichen der jeweiligen Experimentiertemperatur 30 Minuten gewartet, bevor die Aufnahme der Spektren für den Ausgangsdruck, d.h. 1 bar, erfolgte. Nach der Aufnahme von drei Fluo-

reszenzspektren wurde der Druck erhöht, nach Möglichkeit stets um einen Wert der gleichen Größenordnung (100 bis 200 MPa). Dies wurde sofort anhand der Rubinlinie abgeschätzt; die Aufnahmen der Spektren für die Auswertung von Bandenmaximum und -breite am nächsten Punkt erfolgten erst nach der üblichen halben Stunde. Dabei wird der Druck über die Differenz der Rubinlinie zur Ausgangsposition gemäß $d\lambda/dp = 3,64 \text{ \AA/GPa}$ bzw. $dp/d\lambda = 0,2747 \text{ GPa/\AA}$ bestimmt [93].

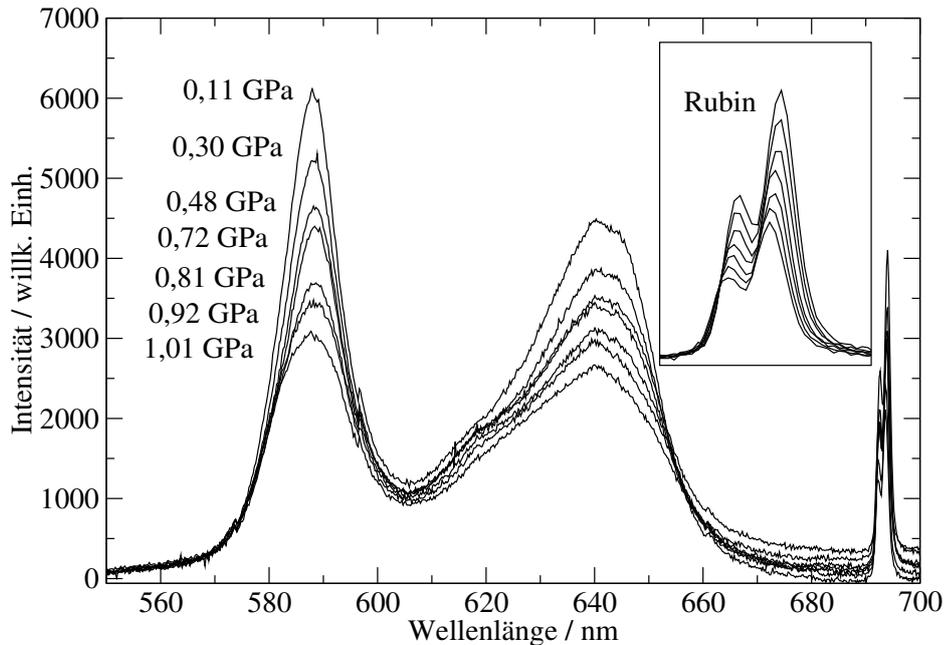


Abbildung 4.4: Emissionsspektren von Zn-Cytochrom c während einer Druckdenaturierung bei 20°C. In der Abbildung ist neben den beiden Q-Banden des Proteins die Fluoreszenz der Rubinpartikel bei ca. 693 nm zu erkennen (siehe auch eingefügter Ausschnitt).

Das Experiment wurde im Regelfall solange durchgeführt, bis bei einem bestimmten Druck (meist über 1 GPa) die Zelle undicht wurde. Das ist darauf zurückzuführen, dass bei einem sehr hohen Druck das “Gasket”, das sich zwischen den Diamantambosflächen befindet, nach einer Seite hinausgedrückt wird. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, dass bei der Präparation der Zelle auf eine exakte Positionierung des Lochs der Metallfolie geachtet wird.

Abbildung 4.4 zeigt die Fluoreszenzspektren von Zn-Cytochrom c im Bereich der Q-Banden während einer Druckdenaturierung bei 20°C. Die angewendeten Drücke lagen bei Werten zwischen 100 MPa und 1 GPa.

Die scharfe Doppellinie bei 695 nm ist die Fluoreszenz einer geringen Menge Rubinpulver, die gleichzeitig mit dem übrigen Spektrum aufgenommen wurde, um den aktuellen Druck zu messen. Anhand der Spektren des Proteins ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die Druckverschiebung als auch die Verbreiterung der Banden im untersuchten Bereich verhältnismäßig moderat ist. Allerdings ist ersichtlich, dass

die Q-Bande bei höheren Drücken eine Blauverschiebung zeigt.

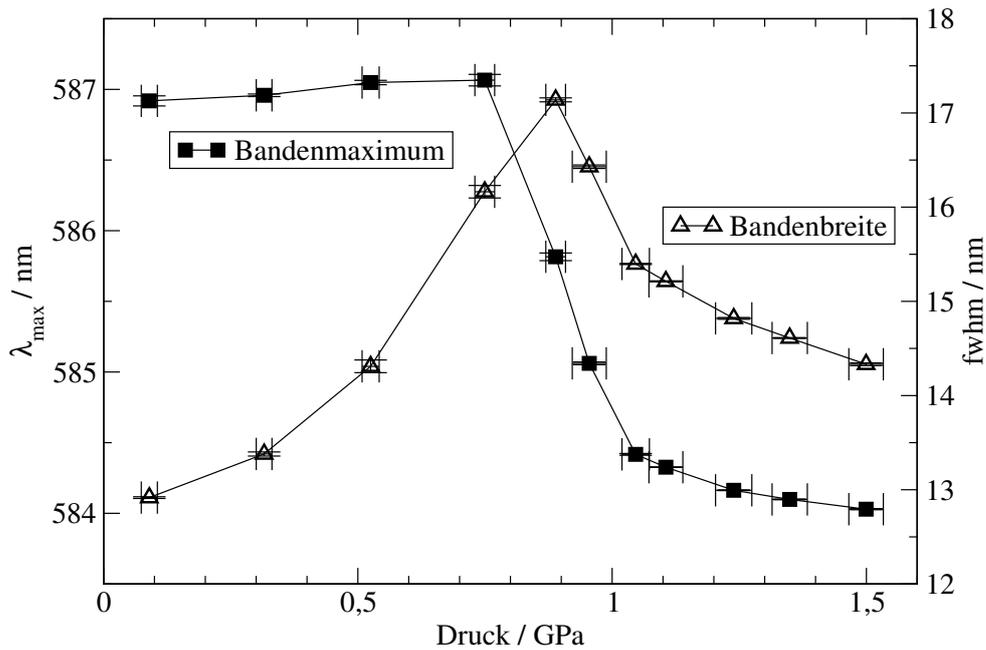


Abbildung 4.5: Verlauf von Zentrum und Breite der Q_x - Q_y -00-Bande für eine Druckdenaturierung bei 25°C .

Zur weiteren Auswertung werden in Analogie zu den Temperaturdenaturierungen an die “blaue” Bande Gaußkurven angefitet und anschließend das Bandenzentrum und seine Breite als Funktion des Drucks betrachtet. Das Verhalten von Bandenzentrum (λ_{max}) und die Bandenbreite (fwhm) des Q-Übergangs unter einer Druckanwendung bis 1,5 GPa bei 25°C ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Für das erste Moment ist, ähnlich wie bei der Temperaturdenaturierung unter Atmosphärendruck, ein sigmoides Muster zu erkennen. Bis zu einem Druck von ca. 0,6 GPa reagiert das Zentrum der Bande nur mit einer schwachen Rotverschiebung. Danach findet jedoch eine Blauverschiebung von ungefähr 3 nm statt. Oberhalb 1 GPa schwächt sich die Blauverschiebung wieder ab.

Die Breite der Bande nimmt mit dem Druck stetig zu und erreicht für die Druckdenaturierung bei 25°C ein Maximum bei etwa 0,9 GPa. Im Anschluss daran kommt es zu einer Abnahme der Bandenbreite. Der Druck für das Maximum der Verbreiterung fällt mit dem Druck für den Mittelpunkt der intensiven Blauverschiebung zusammen.

4.4 Diskussion der Fluoreszenzspektren

4.4.1 Allgemeines Muster der Fluoreszenz

Die Wechselwirkungen einer Farbstoffsonde mit ihrer jeweiligen Umgebung sind ausgiebig untersucht worden und im Detail bekannt [94; 95; 96; 97]. Aus dem Verhalten der Fluoreszenz während der Änderung von Temperatur und Druck ist es also möglich, Informationen über die Vorgänge auf mikroskopischer Ebene während des Entfaltungsprozesses zu gewinnen. Das allgemeine Muster, das z.B. für λ_{max} erhalten wird, ist im Bereich niedrigen Drucks oder gemäßigter Temperatur bis auf moderate Rotverschiebung nahezu konstant. An diesen Bereich schließt sich eine ausgeprägte Blauverschiebung an, die sich bei hohen Werten für Temperatur bzw. Druck wieder abschwächt.

4.4.2 Mikroskopische Aspekte des Transformationsprozesses bei Druckdenaturierungen

Zunächst soll das Verhalten der Druckverschiebung betrachtet werden. Obwohl es sich bei Proteinen um geordnete Strukturen handelt, sind sie durch ein ungewöhnlich großes mittleres Verschiebungsquadrat $\langle x^2 \rangle$ charakterisiert [81; 82; 98]. Verglichen mit organischen Kristallen, die aus kleinen Molekülen aufgebaut sind, gibt es dort einen bemerkenswerten Beitrag struktureller Unordnung. Anders ausgedrückt, es herrscht große strukturelle Freiheit. Wie in Kapitel 3.2 bereits beschrieben, führen verschiedene lokale Strukturen um einen Chromophor zu einer Dispersion der Lösungsmittelverschiebung, die sich als inhomogene Linienverbreiterung bemerkbar macht [78; 99].

Wird auf die Probe Druck ausgeübt, so vergrößert sich die Dichte und als Folge davon auch die Größe der zwischenmolekularen Wechselwirkungen. Dies führt zu einer Vergrößerung des Betrags und der Dispersion der Lösungsmittelverschiebung. Dies zeigt Abbildung 4.6. Allerdings kann die Größe der druckmodifizierten Lösungsmittelverschiebung ziemlich klein sein: Dies trifft besonders für aromatische Moleküle mit polaren Gruppen zu [77; 87; 100]. Der Grund hierfür ist, dass es sich bei der Lösungsmittelverschiebung um eine Überlagerung dispersiver und elektrostatischer Wechselwirkungen handelt. Dispersive Wechselwirkungen führen stets zu einer Rotverschiebung, da die Polarisierbarkeit im angeregten Zustand immer größer als im Grundzustand ist [101]. Im Gegensatz dazu verursachen elektrostatische Wechselwirkungen normalerweise eine Blauverschiebung, wie in Abbildung 4.7b näher beschrieben wird. Eine Ausnahme stellt Tryptophan dar, welches häufig als Fluoreszenzsonde in Entfaltungsexperimenten verwendet wird [72; 102; 103; 104; 105]. Es besitzt ein großes Dipolmoment im angeregten Zustand verglichen mit dem Grund-

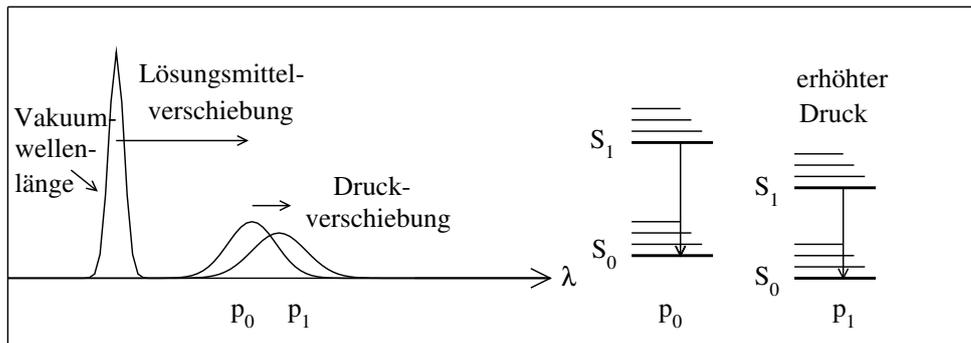


Abbildung 4.6: Dispersive Wechselwirkungen verursachen stets eine Rotverschiebung, da die Polarisierbarkeit im angeregten Zustand größer als im Grundzustand ist. Durch Druckerhöhung von p_0 auf p_1 wird diese Wechselwirkung verstärkt.

zustand, jedoch von gleicher Richtung (siehe Abbildung 4.7a). Dadurch wird eine Rotverschiebung erzeugt.

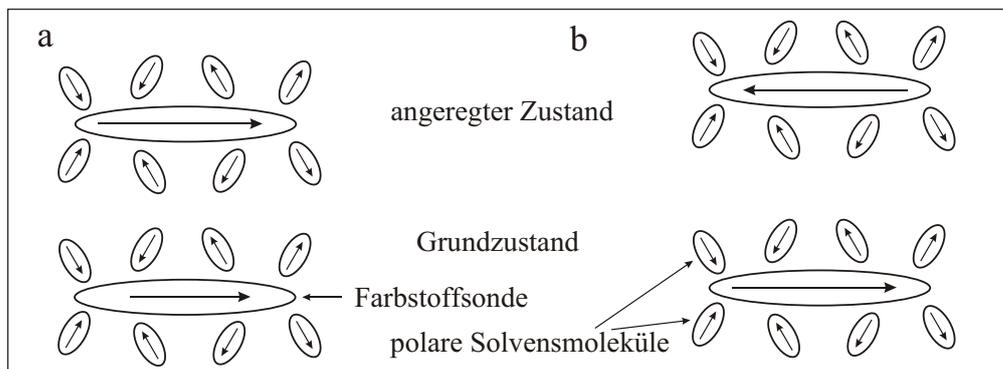


Abbildung 4.7: Hochdruck-Situation, nachdem Wasser ins Proteininnere gedrungen ist. Elektrostatische Wechselwirkungen können sowohl eine Rot- als auch eine Blauverschiebung erzeugen. (a) Ausnahme (z.B. Tryptophan). (b) Regelfall: Der angeregte Zustand ist durch den Wechsel der Richtung des Dipolmoments zusätzlich erhöht.

Es kommt also teilweise zu einer Kompensation in der gesamten Verschiebung, so dass ihr Wert klein wird. Für Protoporphyrin IX-substituiertes Myoglobin wurde beispielsweise eine durchschnittliche Verschiebung pro Druck von ca. 1 nm/GPa gemessen [106]. Die kleinen Druckänderungen, wie in Abbildung 4.5 gezeigt, stimmen mit diesem Ergebnis überein. In der druckinduzierten Dispersion der Lösungsmittelverschiebung gibt es jedoch keine solche Kompensation. Daher ist die zugehörige Änderung in der Bandenbreite im Bereich vor der Transformation stärker ausgeprägt (Abbildung 4.5).

An den flachen Bereich der Verschiebung schließt sich ein durch eine signifikante Blauverschiebung in der Größenordnung einiger Nanometer gekennzeichnete Bereich an. Die Form dieser Kurve zeigt sigmoiden Charakter, wie durch Abbildung

4.5 und 4.10 (Seite 59) deutlich gezeigt wird. Aus diesem sigmoiden Verlauf lässt sich der Schluss ziehen, dass die Veränderung im Verschiebungsmuster nicht allein durch eine vergrößerte Dichte erzeugt wird, sondern ihre Ursache in einer qualitativen Änderung der mikroskopischen Wechselwirkungen zwischen Farbstoffsonde und Umgebung hat. Diese qualitative Veränderung tritt während eines definierten Druckbereichs auf, weshalb dieser Bereich dem Übergang von dem nativen in den denaturierten Zustand zugeschrieben werden kann. Die Tatsache, dass Druckerhöhung eine Blauverschiebung verursacht, macht deutlich, dass im Übergangsbereich das relative Gewicht der elektrostatischen Beiträge zur Lösungsmittelverschiebung zunimmt [87; 100]. Offensichtlich kommen dabei polare Gruppen ausreichend nahe an den Chromophor heran. Dabei sind zwei verschiedene Mechanismen denkbar:

- Die kompakte Proteinstruktur entfaltet auf eine Weise, in der das Innere der Proteintasche, die den Chromophor enthält, mit den Wassermolekülen des Lösungsmittels in Berührung kommt.
- Die andere Möglichkeit ist, dass Wassermoleküle, beispielsweise die der Hydratationsschale, in das Innere des Proteins gedrückt werden.

Falls die Druckdenaturierung nach letzterem Prozess stattfindet, kann das Protein seine kompakte Struktur beibehalten, wenngleich es zu einem “Anschwellen” des Proteins kommt. Diese zweite Möglichkeit wird durch mehrere Fakten begründet:

- Es ist leicht einzusehen, dass zunehmender isotroper Druck keine großen Änderungen in der Proteinstruktur auslösen wird. Im Gegensatz dazu müssten bei der Entfaltung des Proteininneren in das Lösungsmittel Seitenketten und weitere Bestandteile gegen eine dichtere Flüssigkeit bewegt werden.
- Außerdem stimmt die Annahme, dass Wasser in die Hohlräume des Proteins gepresst wird, mit der Beobachtung überein, dass die Volumenänderung ΔV negativ ist. Dies steht zwar im Widerspruch zum “Aufquellen” des Proteins. Das Anschwellen kann allerdings durch eine Reduzierung des Volumens der Hydratationsschale mehr als kompensiert werden.

Die beobachtete Blauverschiebung in der Fluoreszenz stimmt daher mit dem Modell von HUMMER et al., das die Druckentfaltung von Proteinen beschreibt, gut überein [45; 46; 47].

4.4.3 Mechanismus der Temperaturdenaturierungen

Die Ursache für die Verschiebung des Bandenmaximums bei Änderung der Temperatur ist, obwohl das Muster ähnlich aussieht, auf einen vollkommen gegensätzlichen Prozess zurückzuführen.

Es muss beachtet werden, dass in der Regel zunehmende Temperatur immer zu einer Rotverschiebung führt. Wenn die Temperatur ansteigt, werden schrittweise höhere Schwingungsniveaus besetzt. Das hat zur Folge, dass dem 00-Übergang auch 11- und 22-Übergänge überlagert werden. Da die Energie der Schwingungsniveaus im angeregten Zustand in der Regel kleiner als die im Grundzustand ist, führt eine zunehmende Besetzung höherer vibronischer Niveaus zu einer Rotverschiebung. Dies wird anhand Abbildung 4.8 veranschaulicht.

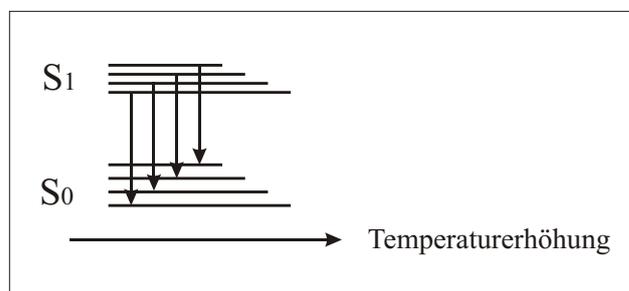


Abbildung 4.8: Erklärung zur Rotverschiebung bei der Temperaturdenaturierung: Mit zunehmender Temperatur werden höhere Schwingungsniveaus besetzt. Die Fluoreszenz aus diesen Schwingungsniveaus ist langwelliger.

Der Verlauf des Bandenmaximums in Abbildung 4.3 zeigt, dass bei geringem Druck die temperaturinduzierte Rotverschiebung deutlich stärker ausgeprägt ist als für Temperaturdenaturierungen bei höheren Drücken (siehe hierzu Abbildung 4.9 auf Seite 58) oder bei Druckdenaturierungen. Der Grund hierfür ist, dass im Gegensatz zur Druckverschiebung die Temperaturverschiebung nicht durch einen Kompensationsmechanismus beeinflusst wird.

Wie bei der Druckdenaturierung auch, ist der Bereich der Blauverschiebung bei einer Temperaturdenaturierung dem Übergangsbereich zum entfalteten Zustand zuzuschreiben. Auch in diesem Fall wird das Auftreten einer Blauverschiebung einer qualitativen Änderung in den Wechselwirkungen zwischen Chromophor und seiner nächsten Umgebung zugeschrieben. Sie wird durch einen verstärkten Beitrag elektrostatischer Terme verursacht, die ihren Ursprung im Kontakt zwischen Chromophor und Wassermolekülen hat. In diesem Fall dringen jedoch keine Wassermoleküle in das Protein ein. Stattdessen entfaltet das Innere des Proteins auf eine Weise, in der es dem Lösungsmittel ausgesetzt wird, wie es von BALDWIN und Mitarbeitern beschrieben wurde [42; 43]. Im Gegensatz zur Druckdenaturierung lässt sich

die Temperaturdenaturierung nach dem “Öltröpfchen-Modell” verstehen, bei der ab einer bestimmten Temperatur die Bedingungen günstig werden, das hydrophobe Proteininnere in das Wasser zu entfalten.

4.4.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Es ist bemerkenswert, dass die Größe der Blauverschiebung für Druck- und Temperaturdenaturierung den gleichen Wert von etwa 3 nm hat. Das bedeutet, dass zum einen die Anzahl der wechselwirkenden Wassermoleküle im Denaturierungsprozess ähnlich hoch ist. Andererseits ist davon auszugehen, dass ihr Abstand vom Chromophor in beiden Fällen die gleiche Größenordnung zeigt.

Abschließend sollte hier hervorgehoben werden, dass Druck- und Temperaturdenaturierungen entlang verschiedener mikroskopischer Wege in der Energielandschaft der Proteine ablaufen. Es sieht also aus, als würden die beiden Prozesse nicht zu ein und demselben Endzustand führen. In der Literatur sind ähnliche Beschreibungen zu finden. So werden aus FTIR-Messungen Ergebnisse erhalten, die Unterschiede in den durch Hitze bzw. Druck induzierten denaturierten Zuständen von Lipoxygenase aufzeigen [57]. An Myoglobin wurde herausgefunden, dass vor allem ein Unterschied in den Endprodukten zwischen Hitzedenaturierungen einerseits und Kälte- und Druckdenaturierungen andererseits besteht. Letztere zeichnen sich durch einen höheren Anteil an noch vorhandener Sekundärstruktur aus [39; 52]. Desweiteren haben NMR-Experimente zur Entfaltung von Lysozym gezeigt, dass der kältedenaturierte Zustand einem frühen Faltungsintermediat entspricht [107]. Wie diese Ergebnisse mit der Zwei-Zustands-Näherung in Einklang zu bringen sind, wird in Kapitel 4.6.4 gezeigt.

4.4.5 Eigenschaften der Linienbreite

Das Verhalten der Linienbreite kann als unabhängiger Parameter zur Bestimmung des Mittelpunkts des Übergangsbereichs, d.h. der Stabilitätsgrenze, herangezogen werden. Im allgemeinen stimmen die Mittelpunkte, die aus der Breite der Bande bestimmt werden, gut mit denjenigen aus der Verschiebung überein.

Trotzdem zeigt die Bandenbreite einige besondere Eigenschaften, die eine eigene Diskussion verlangen: Abbildung 4.5 zeigt wie die anderen Messungen dieser Reihe, dass die Linienbreite mit steigendem Druck zunimmt. Möglicherweise läuft sie auf einen Sättigungswert zu. Im gezeigten Beispiel durchläuft sie ein “Maximum”, was auf die Phasengrenze hindeutet. Hinter diesem “Maximum” existiert ein Druckbereich, in dem die Breite der Bande wieder deutlich abnimmt.

Im Gegensatz dazu verhält sich die Bandenbreite bei Temperaturdenaturierungen anders: Hier gibt es kein Maximum und logischerweise auch keine Abnahme der

Breite. Allerdings lässt sich im Mittelpunkt des Phasenübergangs eine Änderung in der Steigung der Temperaturverbreiterung feststellen (siehe Abbildung 4.3).

Linienverbreiterung unter zunehmendem Druck ist eine spezifische Eigenschaft ungeordneter Materialien, z.B. von Flüssigkeiten oder Gläsern. Der Grund hierfür ist, dass die strukturelle Korrelation unter den jeweiligen Molekülen gering ist. Bei Ausübung von Druck ändert sich somit die lokale Konformation und als Folge davon vergrößert sich die inhomogene Breite. Bei Kristallen, die eine hohe strukturelle Korrelation zeigen, führt Druck hauptsächlich zu einer Verschiebung der Bande und nur zu einer geringen Verbreiterung [79; 80]. Gemäß dieser Argumentation wird klar, dass die Druckverbreiterung nach Erreichen eines bestimmten Drucks p_s abnimmt, bei dem die Dichte ausreichend hoch geworden ist, so dass strukturelle Korrelation vorherrscht. Dieses Niveau lässt sich für Proteine abschätzen:

- Falls die Verschiebung eines Atoms durch die Anwendung von Druck kleiner als die zur konformellen Unordnung gehörende Wurzel des mittleren Verschiebungsquadrats $\langle x^2 \rangle^{1/2}$ ist, dann spricht man von einer niedrigen strukturellen Korrelation.
- Falls sie größer ist, ist die strukturelle Korrelation hoch und es kommt nur zu einer schwachen Druckverbreiterung.

Ein Wert für $\langle x^2 \rangle^{1/2}$ lässt sich durch Röntgenstrukturanalysedaten bei Tieftemperaturen ermitteln. Einen vernünftigen Wert stellt $0,2 \text{ \AA}$ dar [81; 82; 98]. Ist zusätzlich die druckunabhängige Kompressibilität κ des Proteins bekannt, so lässt sich das Druckniveau p_s , welches im Durchschnitt zu einer Verschiebung von der Größenordnung $0,2 \text{ \AA}$ führt, aus Gleichung 4.1 abschätzen:

$$\Delta a = \frac{a\kappa}{3} p_s \quad (4.1)$$

a ist hierbei der mittlere Abstand zwischen den Aminosäuren. Mit $\Delta a \approx 0,2 \text{ \AA}$, $\kappa \approx 0,1 \text{ GPa}^{-1}$ [62; 86; 88; 108; 109] und $a \approx 4 \text{ \AA}$ errechnet sich ein Druck p_s von ca. $1,5 \text{ GPa}$. Der Druckbereich, in dem die Entfaltung des Proteins stattfindet, befindet sich somit bereits nahe an diesem kritischen Wert. Als Folge davon sollte die Druckverbreiterung durch eine hohe strukturelle Korrelation nicht mehr stark zunehmen, da an dieser Stelle ein Sättigungswert erreicht ist.

Die Existenz eines Maximums widerspricht dieser These allerdings. Nach Überqueren des Transformationsbereichs wird der denaturierte Zustand zunehmend besetzt. Daher liegt genau an der Phasengrenze ein Gleichgewicht bezüglich der Besetzung des nativen und denaturierten Zustands vor. Diese beiden Zustände unterscheiden sich jedoch geringfügig in ihrer Anregungsenergie. Allerdings ist dieser

Unterschied klein im Vergleich zur inhomogenen Breite. Daher führt die gleichzeitige Anregung der beiden Zustände zu einer Verbreiterung der Linie. Wird der Druck über die Stabilitätsgrenze erhöht, so nimmt die Besetzung des nativen Zustands ab. Da der Druck selbst keine signifikante Verbreiterung mehr erzeugt, wird die gesamte Linie wieder schmaler.

Auch bei einer Temperaturdenaturierung wird mit steigender Temperatur eine äquivalente Besetzung der beiden Zustände erzeugt, die zur Verbreiterung der Fluoreszenzbande beiträgt. Allerdings kann im Anschluss an die Phasengrenze keine Verschmälerung der Bande auftreten, da die Linienverbreiterung mit steigender Temperatur im Gegensatz zur Verbreiterung mit steigendem Druck nie zu einer Sättigung führt. Als Folge davon ist in Abbildung 4.3 lediglich ein Abflachen der Steigung zu erkennen.

4.5 Verschiedene Denaturierungsbedingungen

4.5.1 Temperaturdenaturierungen unter verschiedenen Drücken

Für die Durchführung von Temperaturdenaturierungen unter Druck war die ständige Überprüfung des Drucks notwendig. Dies wurde durch die Zugabe von Rubinpulver zur Probe realisiert. Die Druckeinstellung fand bei Raumtemperatur statt. Der Druck lässt sich somit während des gesamten Experiments überprüfen. Dabei muss die Verschiebung der Rubinfluoreszenz mit der Temperatur berücksichtigt werden. Für die Verschiebung der Rubinlumineszenz mit dem Druck gilt $d\lambda/dp = 3,64 \text{ \AA/GPa}$. Die Verschiebung mit der Temperatur beträgt $d\lambda/dT = 0,068 \text{ \AA/K}$ [93].

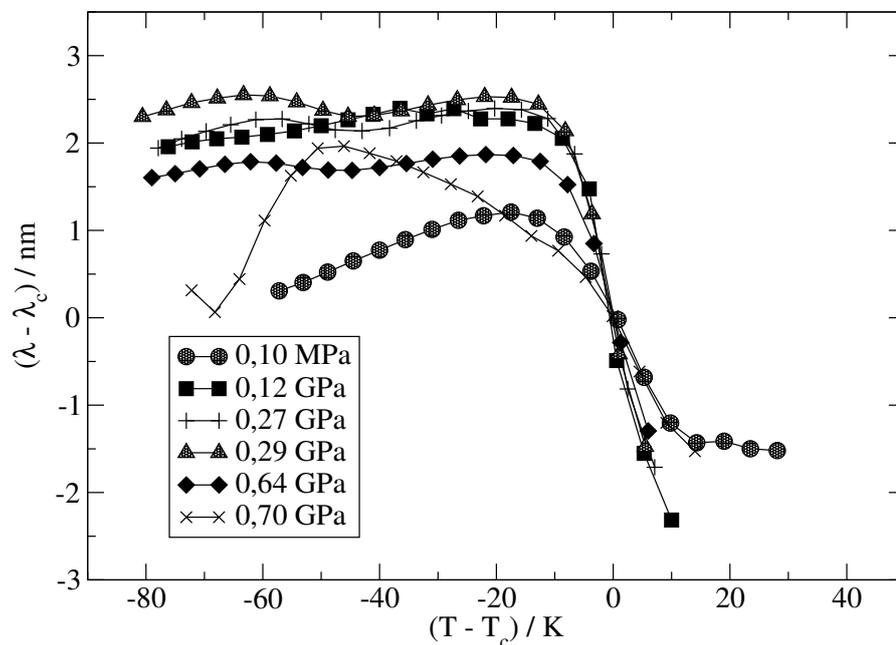


Abbildung 4.9: Übersicht ausgewählter Temperaturdenaturierungen. λ_c und T_c sind Wellenlänge und Temperatur an der Phasengrenze, respektive.

Abbildung 4.9 zeigt eine Auswahl von Temperaturdenaturierungen bei verschiedenen Drücken. Anhand dieser Beispiele wird gezeigt, dass die Muster für λ_{max} unter Druck- und Temperaturänderungen etwas komplizierter sein können. Die Verläufe der Bandenmaxima sind hinsichtlich Temperatur und Wellenlänge normiert.

Häufig lassen sich die Verschiebung des Bandenzentrums sowie, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt, die Veränderungen in der Bandenbreite in mehrere Bereiche unterteilen. Die komplizierteren Muster deuten auf mehrere aufeinanderfolgende Schritte im Denaturierungsprozess hin. Außerdem fällt auf, dass das Protein unter erhöhtem Druck erst bei einer höheren Temperatur entfaltet (bei dieser Form der Abbildung muss berücksichtigt werden, dass für alle Experimente die gleiche Anfangs-

und Endtemperatur eingestellt wurde). Dies deutet auf einen stabilisierenden Effekt des Drucks gegen thermische Denaturierung hin.

4.5.2 Druckdenaturierungen bei verschiedenen Temperaturen

Eine Übersicht verschiedener Druckdenaturierungen, die bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt wurden, zeigt Abbildung 4.10. Analog zum Beispiel für die Temperaturdenaturierungen (Abbildung 4.9) sind die Verläufe des Bandenmaximums auf den Übergangsdruck und die zugehörige Wellenlänge normiert.

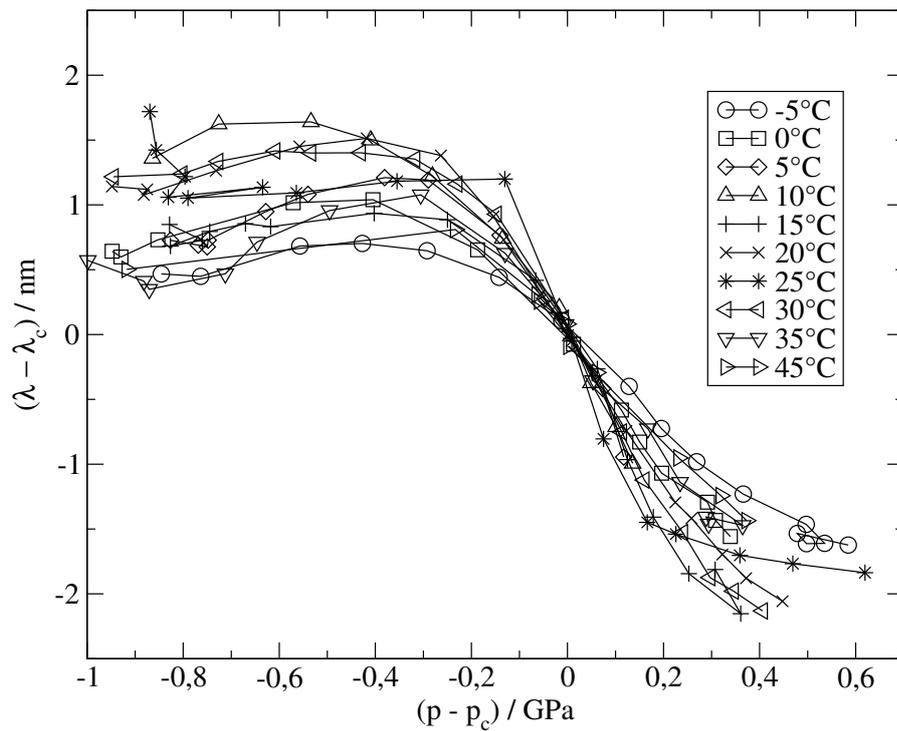


Abbildung 4.10: Übersicht ausgewählter Druckdenaturierungen. λ_c und p_c sind Wellenlänge und Druck an der Phasengrenze, respektive.

Der Einfluss veränderter Temperaturen auf den Verlauf des Bandenmaximums ist weitaus geringer als für die im vorhergehenden Kapitel dargestellten Temperaturdenaturierungen unter Druck.

4.5.3 Auswertung

Die Abbildungen 4.9 und 4.10 deuten darauf hin, dass es in einigen Fällen schwierig sein kann, den Mittelpunkt der Phasentransformation allein aus dem Verhalten der Verschiebung zu ermitteln. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Temperatur- oder Druckbereich oberhalb der Phasengrenze häufig nur begrenzt zugänglich ist. Daher ist eine zweite Größe, mit der eine Bestimmung dieses Punkts möglich ist, hilfreich. Wie in Kapitel 4.4.5 erläutert, wird hierfür die Bandenbreite verwendet.

In Tabelle 4.1 sind die für Temperatur- und Druckdenaturierungen erhaltenen Werte T_c und p_c zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Werte für Temperatur- und Druckdenaturierungen von Zn-Cytochrom c:

Temperaturdenaturierungen		Druckdenaturierungen	
p / GPa	T_c / °C	T / °C	p_c / GPa
0,0001	60	5	0,84
0,12	79	10	0,88
0,36	81	15	0,92
0,38	83	20	0,94
0,71	82	25	0,89
0,72	79	30	0,95
0,74	77	35	1,02
		40	0,89
	Kältdenaturierung	45	0,93
0,0001	-3	50	0,95

4.6 Thermodynamik und Phasendiagramm

4.6.1 Bestimmung der Gleichgewichtskonstante

In Kapitel 2.2.3 wurde bereits angesprochen, dass aus dem Phasendiagramm lediglich die Verhältnisse zwischen thermodynamischen Parametern bestimmt werden können. Mit der im Folgenden beschriebenen Vorgehensweise ist die absolute Bestimmung aller thermodynamischer Parameter möglich (d.h. alle Ableitungen der Freien Enthalpie bis zur zweiten Ordnung).

Um die folgende Prozedur durchführen zu können, ist die Annahme des thermischen Gleichgewichts für den gesamten Transformationsbereich unabdingbar. Wie aus den Abbildungen 4.3 und 4.5 ersichtlich ist, resultiert der Anstieg in Temperatur und Druck in einem charakteristischen Muster der Verschiebung des Ban-

denzentrums. Im niedrigen Bereich dieser Parameter zeigt sich beinahe keine Verschiebung oder nur eine schwache Rotverschiebung. Im Gegensatz dazu ist der Übergangsbereich durch eine starke Blauverschiebung charakterisiert. Nachdem die Transformation, d.h. Entfaltung, abgeschlossen ist, schwächt sich die Blauverschiebung wieder ab. Im Regelfall ist dieser Übergangsbereich verhältnismäßig breit.

Der Grund für diesen breiten Übergangsbereich liegt möglicherweise in der geringen Kooperativität des Denaturierungsprozesses oder in einer Dispersion der beteiligten Parameter. Das Muster der Verschiebung des Bandenzentrums lässt sich daher folgendermaßen deuten:

- Im Bereich niedriger Drücke bzw. Temperaturen wird nur die Druck- bzw. Temperaturverschiebung des nativen Zustands $|N\rangle$ gemessen. Die Wellenlänge unmittelbar vor Beginn des Transformationsbereichs zum denaturierten Zustand wird mit λ_N bezeichnet.
- Nachdem die Transformation abgeschlossen ist, wird die jeweilige Verschiebung des denaturierten Zustands $|D\rangle$ gemessen. Die Wellenlänge, die zum denaturierten Zustand unmittelbar nach Abschluss des Übergangsbereichs gehört, ist λ_D .

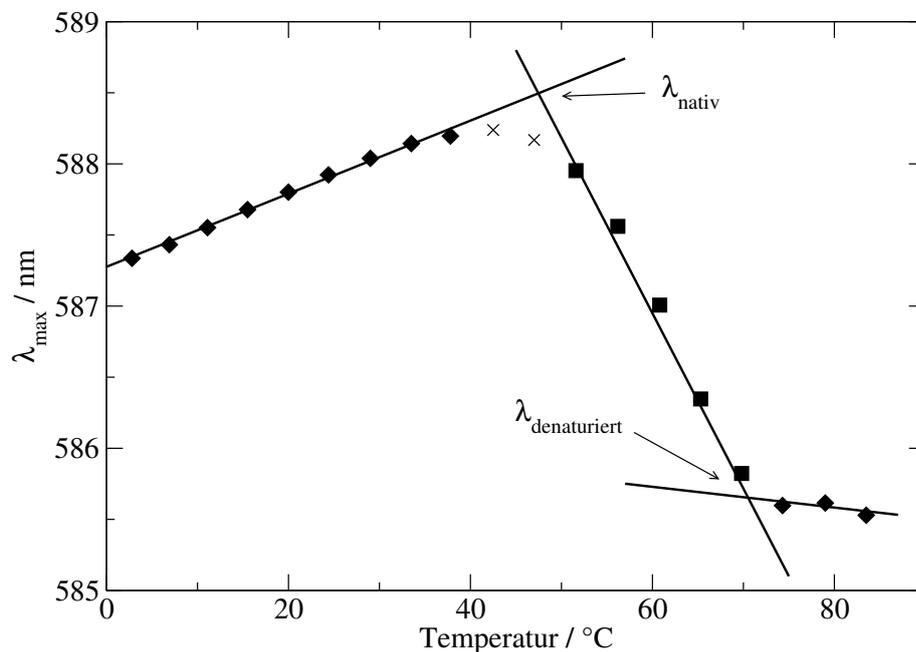


Abbildung 4.11: Bestimmung von λ_N und λ_D über die Schnittpunkte von Geraden, die an die drei Teilbereiche des Verlaufs des Bandenmaximums angefügt wurden. Den Werten liegt die Temperaturdenaturierung bei Atmosphärendruck zugrunde.

λ_N und λ_D lassen sich über die Schnittpunkte linear extrapolierter Datenbereiche bestimmen (siehe Abbildung 4.11). Im Übergangsbereich kann die Wellenlänge λ_{max}

des Fluoreszenzmaximums als Überlagerung von λ_N und λ_D , gewichtet mit der jeweiligen Besetzungswahrscheinlichkeit p_N und p_D der entsprechenden Zustände, angesehen werden. Die gesamte Bande $F(\lambda)$ ist somit näherungsweise durch eine Überlagerung zweier Gaußbanden beschreibbar:

$$F(\lambda) = p_N f_N \exp\left(\frac{-(\lambda - \lambda_N)^2}{2\sigma_N^2}\right) + p_D f_D \exp\left(\frac{-(\lambda - \lambda_D)^2}{2\sigma_D^2}\right) \quad (4.2)$$

Es ist davon auszugehen, dass die Oszillatorstärken f_N und f_D der beiden Zustände ungefähr gleich groß sind und die relativen Änderungen hinsichtlich Wellenlänge des Peaks und seiner Breite klein sind. Damit sind die Exponenten ausreichend ähnlich, so dass die Wellenlänge des Bandenmaximums aus der ersten Ableitung gewonnen werden kann:

$$\lambda_{max} = p_N \lambda_N + p_D \lambda_D \quad (4.3)$$

Im Rahmen des Zwei-Zustands-Modells können die Besetzungswahrscheinlichkeiten p_N und p_D durch die Gleichgewichtskonstante K ausgedrückt werden [33; 72; 103]:

$$p_N = \frac{1}{1 + K}, \quad p_D = \frac{K}{1 + K} \quad (4.4)$$

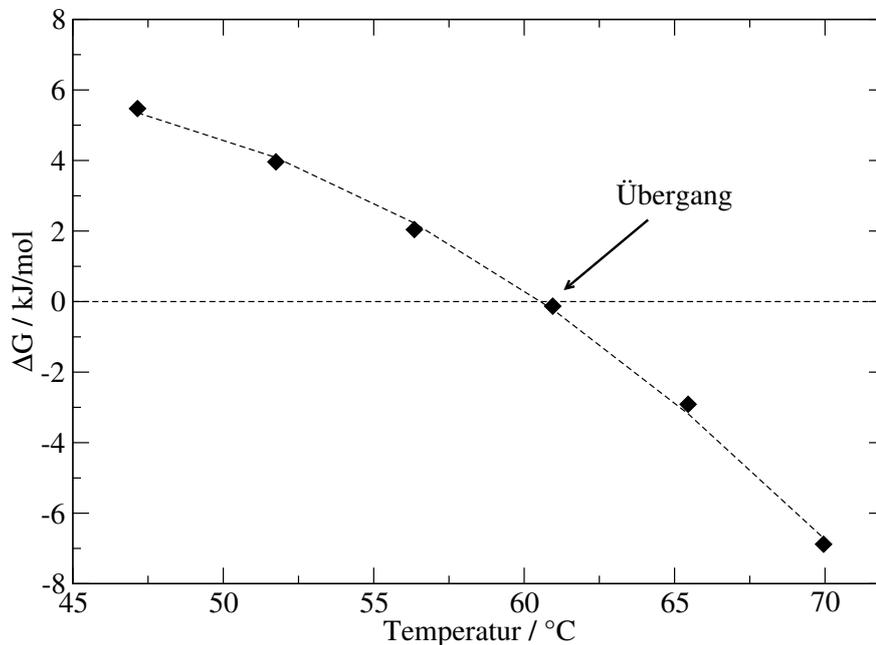


Abbildung 4.12: Freie Enthalpie in Abhängigkeit von der Temperatur bei einer Temperaturdenaturierung unter Atmosphärendruck.

$K(p)$ und $K(T)$ können also aus λ_N , λ_D und den gemessenen Werten für λ_{max} im Übergangsbereich bestimmt werden. Sobald K als Funktion der Temperatur T

oder des Drucks p bekannt ist, lässt sich $\Delta G = G_D - G_N$ nach folgender Gleichung bestimmen:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4.5)$$

In Abbildung 4.12 ist die Differenz $\Delta G = G_D - G_N$ als Funktion der Temperatur unter Atmosphärendruck dargestellt. Die Werte wurden anhand Gleichung 4.5 über die gemessenen Wellenlängen des Bandenzentrums (Gleichung 4.3) bestimmt. An die Punkte wurde eine Parabel angefitet (vgl. Gleichung 2.15). Die erste Ableitung ergibt die Änderung der Entropie ΔS ; über die zweite Ableitung lässt sich die Differenz der spezifischen Wärmekapazität ΔC_p bestimmen.

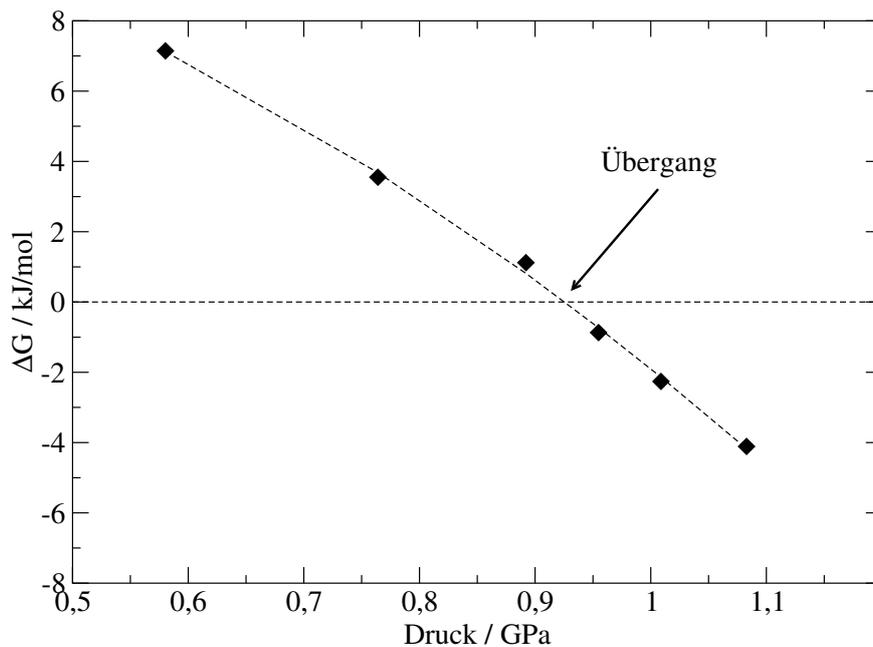


Abbildung 4.13: Freie Enthalpie in Abhängigkeit vom Druck für eine Druckdenaturierung bei 25°C.

Ähnlich wie in Abbildung 4.12 zeigt Abbildung 4.13 die Differenz der Freien Enthalpie als Funktion des Drucks im Bereich von 600 MPa bis 1,1 GPa. Es handelt sich hierbei um die Druckdenaturierung bei 25°C. Die erste und zweite Ableitung der an die Punkte gefitteten Parabelfunktion ergeben die Änderung des Volumens ΔV und der isothermen Kompressibilität $\Delta\beta$.

4.6.2 Phasendiagramm

Mit einer ausreichenden Anzahl an Druck- und Temperaturdenaturierungen ist nach Bestimmung der Mittelpunkte des jeweiligen Transformationsbereichs der Aufbau eines Phasendiagramms möglich.

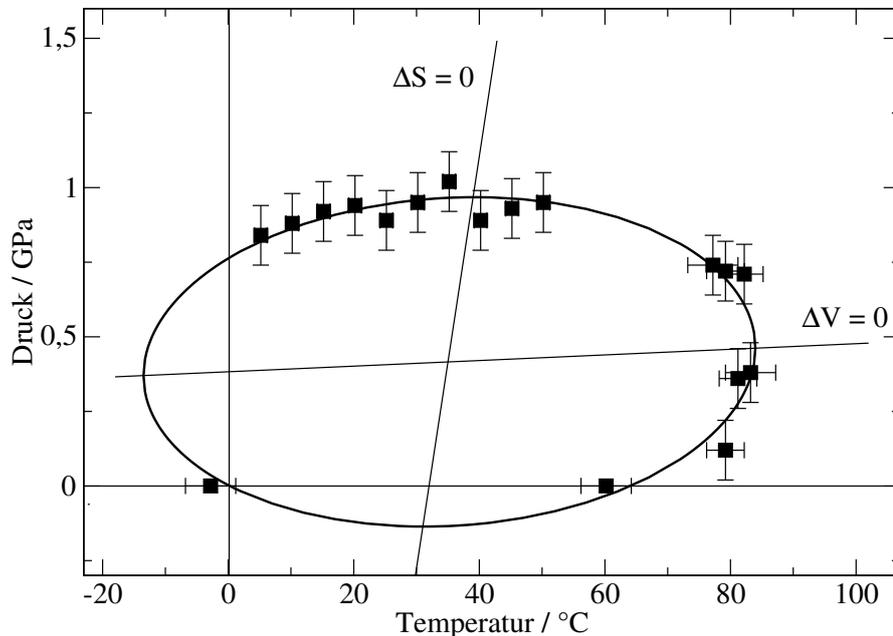


Abbildung 4.14: Komplettes Phasendiagramm von Zn-Cytochrom c. Im linken Teil ist die Kältedenaturierung eingezeichnet, im rechten Teil finden sich die Hitzedenaturierungen bei verschiedenen Drücken. Die Druckdenaturierungen bei verschiedenen Temperaturen sind im mittleren Teil oben dargestellt.

Abbildung 4.14 zeigt das Stabilitätsdiagramm von Zn-Mesoporphyrin-Cytochrom c. Es zeigt sich, dass die Form des Diagramms sehr gut einer Ellipse folgt.

Zu beachten ist, dass bei Temperaturdenaturierungen unter hohem Druck (0,7 GPa, Abbildung 4.16) in diesem Phasendiagramm nur der Denaturierungspunkt bei hoher Temperatur in das Diagramm passt. Möglicherweise stattfindende Prätransformationen werden hierbei nicht einbezogen. Diese Thematik wird ausführlicher in Kapitel 4.7.1 behandelt.

4.6.3 Diskussion zur Thermodynamik der Entfaltung von Zn-Cytochrom c

Wie in Kapitel 4.6.1 gezeigt, lässt sich die Gleichgewichtskonstante K aus den spektroskopischen Daten ermitteln (Gleichung 4.4). Voraussetzung hierfür ist, dass der Übergang zwischen entfaltetem und gefaltetem Protein der Näherung des Zwei-Zustands-Modells genügt und der Prozess in der Nähe des Gleichgewichts abläuft.

Aus bekanntem K lässt sich die Differenz ΔG der Freien Enthalpie zwischen denaturiertem und nativen Zustand bestimmen. Falls ΔG entlang bestimmter Pfade in der (p,T) -Ebene bekannt ist, z.B. entlang der p -Achse für bestimmte Temperaturen T_i oder entlang der T -Achse für bestimmte Druckwerte p_i , dann ist die vollständige Bestimmung sämtlicher thermodynamischer Parameter wie $\Delta V(p, T_i)$, $\Delta S(T, p_i)$ sowie $\Delta\hat{\alpha}$, $\Delta\beta$ und ΔC_p möglich [32; 33; 110].

$$\left. \frac{\partial \Delta G}{\partial p} \right|_{T_i} = \Delta V(p, T_i), \quad \left. \frac{\partial \Delta G}{\partial T} \right|_{p_i} = -\Delta S(T, p_i) \quad (4.6)$$

$$\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial p^2} = \Delta\beta, \quad T \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial T^2} = -\Delta C_p, \quad \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial p \partial T} = \Delta\hat{\alpha} \quad (4.7)$$

Für die an Zn-Cytochrom c durchgeführten Experimente war eine Bestimmung der oben genannten Parameter nicht immer möglich. So konnte nur in einigen Fällen der denaturierte Zustand über einen ausreichend großen Bereich beobachtet werden, der zur Bestimmung von λ_D mit hoher Genauigkeit notwendig war. Oftmals werden die Grenzen des Experiments zu früh erreicht. Sowohl die Drucksteigerung als auch die Temperaturerhöhung unterliegen technischen Limitierungen.

Sehr verlässliche Daten wurden für die Temperaturdenaturierung unter Atmosphärendruck erhalten (Abbildung 4.3). Die hieraus gewonnenen Werte für λ_D und λ_N lassen eine vertrauenswürdige Bestimmung von ΔC_p zu. Der Wert von ΔC_p konnte dabei über die zweite Ableitung der mittels "least square fit" in die entsprechenden ΔG -Werte gefitteten Parabel errechnet werden (siehe hierzu Abbildung 4.12). Der Verlauf der Parabel musste dabei folgender Bedingung genügen: Die beiden Punkte, für die die Ebene $\Delta G = 0$ gekreuzt wird, müssen mit den zugehörigen Punkten im Phasendiagramm übereinstimmen (Abbildung 4.14). Dies trifft auf die Temperatur -3°C und 60°C zu. Die geringfügige Rotation der Ellipse in der (p,T) -Ebene, die durch den Wert für $\Delta\hat{\alpha}$ verursacht wird, wurde im Rahmen dieser Berechnung nicht berücksichtigt.

Da der Wert für ΔC_p als besonders verlässlich eingeschätzt werden konnte, wurde er zur Bestimmung der übrigen thermodynamischen Parameter über das Stabilitätsdiagramm herangezogen. Die Datenpunkte, aus denen das elliptische Phasendiagramm aufgebaut ist, sind sehr vertrauenswürdig, da sie über zwei unabhängige Größen bestimmt wurden, nämlich dem ersten und zweiten Moment der Fluoreszenz. In jenen Fällen, in denen der Übergang zum denaturierten Zustand in beiden Größen erkennbar war, stimmte die Stabilitätsgrenze innerhalb eines sehr engen Druck- oder Temperaturbereichs überein. In anderen Fällen, in denen die Messung der Abschwächung der Bandenverschiebung im Anschluss an den Übergang nicht gemessen werden konnte, ließ sich die Stabilitätsgrenze über das Verhalten der Linienbreite bestimmen.

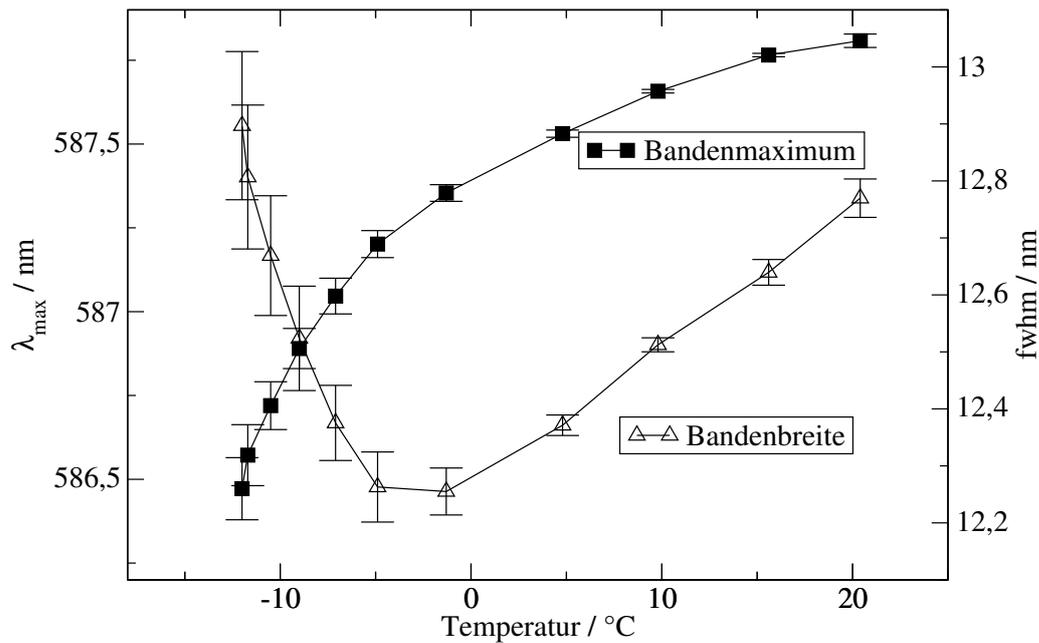


Abbildung 4.15: Kältedenaturierung bei Atmosphärendruck.

Wie in Abbildung 4.15 gezeigt, wurde auf diese Weise der Übergang bei der Kältedenaturierung über ein deutliches Minimum in der Bandenbreite bei -3°C identifiziert: Gewöhnlich wird eine Abnahme der Temperatur mit einer Abnahme der Bandenbreite über ihren homogenen Beitrag erwidert. Falls diese Abnahme ein Minimum passiert und die Bandenbreite anschließend wieder größer wird, so ist dies ein Hinweis auf das Auftreten eines Ereignisses, das die heterogenen Beiträge zur Bandenbreite verstärkt. In dem beschriebenen Fall ist dieses Ereignis die Besetzung des denaturierten Zustands, dessen Absorptionsfrequenz von derjenigen des nativen Zustands abweicht. Das Verhalten der Bandenverschiebung ist in Kältedenaturierungsexperimenten weniger aussagekräftig, da sowohl die thermische Verschiebung als auch das Auftreten des denaturierten Zustands eine Blauverschiebung verursachen.

Sobald ΔC_p bekannt ist, lassen sich aus dem Stabilitätsdiagramm die übrigen thermodynamischen Parameter bestimmen. Zusätzlich können ΔS und ΔV an jedem Punkt auf der Phasengrenze über ΔC_p , $\Delta\beta$ und $\Delta\hat{\alpha}$ bestimmt werden. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Zum Vergleich ist auch der Wert für die Kompressibilität $\Delta\beta_K$ in der Tabelle aufgeführt. Dieser Wert wird aus der Druckabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante K und folglich aus der Differenz der Freien Enthalpie ΔG gewonnen. Die entsprechenden Werte für $\Delta G(p)$ sind in Abbildung 4.13 gezeigt. Die beiden Werte unterscheiden sich in einem Faktor von 1,5. Auch in diesem Fall wurde die Parabel so an die Punkte angefitet, dass sie für $\Delta G = 0$ die entsprechenden Punkte für einen Druck p von 0,9 und $-0,15$ GPa schnei-

det³. Im Stabilitätsdiagramm sind die Linien, entlang derer $\Delta S = 0$ und $\Delta V = 0$

Tabelle 4.2: Thermodynamische Parameter zur Denaturierung von Zn-Cytochrom c:

Parameter	aus dem Phasendiagramm	aus K
$\Delta C_p / (\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	–	5,87
$\Delta\beta / (\text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{GPa}^{-1})$	-148,1	-93,4
$\Delta\hat{\alpha} / (\text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	0,139	–
$\Delta V(0,91 \text{ GPa}, 25^\circ\text{C}) / (\text{cm}^3 \text{mol}^{-1})$	-74,6	-49,4
$\Delta S(0,91 \text{ GPa}, 25^\circ\text{C}) / (\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	-0,263	–
$\Delta V(0,1 \text{ MPa}, 60^\circ\text{C}) / (\text{cm}^3 \text{mol}^{-1})$	65,0	–
$\Delta S(0,1 \text{ MPa}, 60^\circ\text{C}) / (\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	0,530	0,556

Zum Vergleich wurden die Daten aus dem Stabilitätsdiagramm den Daten aus der Gleichgewichtskonstante K gegenübergestellt.

gilt, eingezeichnet. ΔV ist oberhalb eines Drucks von ungefähr 0,4 GPa negativ. Dies stimmt mit den Daten aus anderen Arbeiten zur druckinduzierten Entfaltung von Proteinen überein [44]. Dieses Verhalten spiegelt das Prinzip von LE CHATELIER wider:

ΔS wird sinnvollerweise positiv angenommen, da der Grad an Unordnung für eine entfaltete Struktur mit Sicherheit höher als die der nativen ist. Das Stabilitätsdiagramm zeigt aber, dass dies nur für Temperaturen oberhalb 40°C gilt. Im restlichen Bereich des Phasendiagramms weist ΔS einen negativen Wert auf. Es muss jedoch nach wie vor so sein, dass der denaturierte Zustand größere Entropie als der native Zustand besitzt. Offensichtlich ist die negative Entropieänderung auf die Bildung einer geordneten Struktur in der Hydratationsschale des Proteins zurückzuführen.

Für $\Delta\beta$ ergibt sich ein negativer Wert, was den Erwartungen entspricht. Es muss beachtet werden, dass $\Delta\beta = -V\Delta\kappa$ gilt (κ ist die Kompressibilität in der üblichen Definition). Allgemein ist zu erwarten, dass der Wert der Kompressibilität einer zufälligen Struktur größer ist als derjenige einer geordneten Struktur, da dort mehr freies Volumen vorhanden ist.

Unter Annahme eines kugelförmigen Proteins mit einem Durchmesser von 34 Å lässt sich für das native Cytochrom c ein Molvolumen von 12,4 dm³mol⁻¹ abschätzen. Mit einem Wert von 0,05 GPa⁻¹ (Kapitel 5) für die Kompressibilität κ findet man für β für den nativen Zustand -620 cm³mol⁻¹GPa⁻¹. Die Änderung zur Kompressibilität des denaturierten Zustands liegt demnach in einem relativen Bereich von 15 bis 25 %. Im Gegensatz dazu sind die Änderungen im molaren Volumen mit weniger als 1 % marginal.

³Der letzte Punkt hat selbstverständlich keine physikalische Bedeutung.

Die Größenordnung der Kompressibilität $\Delta\beta$ deckt sich mit den Literaturdaten anderer Proteine [33]. Zum Vergleich auch der anderen Größen sind in Tabelle 4.3 Daten zur Denaturierung von Chymotrypsinogen und Ribonuclease aufgeführt.

Tabelle 4.3: Vergleichswerte für thermodynamische Parameter bei Proteindenaturierungen nach HAWLEY [33].

Parameter	Chymotrypsinogen	Ribonuclease
$\Delta C_p / (\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	15,9	7,11
$\Delta\beta / (\text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{GPa}^{-1})$	-297	-195
$\Delta\hat{\alpha} / (\text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	1,32	0,252
$\Delta V(0,1 \text{ MPa}, 0^\circ\text{C}) / (\text{cm}^3 \text{mol}^{-1})$	-14,3	-48,6
$\Delta S(0,1 \text{ MPa}, 0^\circ\text{C}) / (\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	-0,949	0,0523

Die Übergangsparameter gelten für Chymotrypsinogen bei einem pH-Wert von 2,07 und für Ribonuclease bei pH 2,0.

Wie in Kapitel 2.2.1 angesprochen, sind die Größen C_p , β und $\hat{\alpha}$ mit “Schwankungen” in Volumen und Entropie verknüpft. Der in Kapitel 2.2.3 bereits erwähnte Kehrwert des Prigogine-Defay-Verhältnisses (Gleichung 2.16) ist ein Maß für die Korrelation zwischen Entropie- und Volumenänderung bei einem Phasenübergang. Es gilt:

$$\rho^* = \left| \frac{\Delta\hat{\alpha}^2 T}{\Delta\beta \Delta C_p} \right| = \frac{\langle \Delta S \Delta V \rangle^2}{\langle \Delta S^2 \rangle \langle \Delta V^2 \rangle} \leq 1 \quad (4.8)$$

Ergibt sich für ein System hieraus der Wert 0, so sind die Größen Entropieänderung und Volumenänderung vollkommen unkorreliert. In diesem Fall ist das Phasendiagramm eine achsenparallele Ellipse oder kreisförmig. Im Fall hoher Korrelation liefert das Prigogine-Defay-Verhältnis einen Wert nahe 1. Als “Phasendiagramm” kann man in diesem Fall eine Parabel oder eine Gerade erhalten. In Tabelle 4.4 sind die Werte für ρ^* für Cytochrom c, Chymotrypsinogen und Ribonuclease aufgeführt.

Tabelle 4.4: Vergleichswerte für das inverse Prigogine-Defay-Verhältnis von Cytochrom c, Chymotrypsinogen und Ribonuclease.

Protein	Zn-Cytochrom c	Chymotrypsinogen	Ribonuclease
Verhältnis	0,0067 oder 0,011	0,11	0,014

Der erste Wert für Zn-Cytochrom c wurde aus den Werten des Fits, der zweite aus den Werten der Gleichgewichtskonstante K gewonnen.

Wie aus Abbildung 4.14 ersichtlich und mit den Zahlenwerten des inversen Prigogine-Defay-Verhältnisses bestätigt, folgt das Phasendiagramm von Zn-Cytochrom c aufgrund der geringen Korrelation zwischen den Änderungen in Entropie

und Volumen der Form einer fast achsenparallelen Ellipse. Das gleiche gilt für Ribonuclease; Chymotrypsinogen hingegen zeigt ein ellipsenförmiges Stabilitätsdiagramm mit unterschiedlicheren Halbachsen.

Eine geringe Korrelation bedeutet nichts anderes, als dass die Volumenänderung während einer Denaturierung verschiedenste Werte annehmen kann, unabhängig von den damit verbundenen Werten der Entropieänderung. Volumen- und Entropieänderungen können also nicht mit einem einzigen Ordnungsparameter beschrieben werden. Die Charakterisierung von Proteinen anhand von Energielandschaften zeigt ebenfalls, dass Proteine einen hohen Grad an Entartung besitzen. Viele (Sub-) Konformationen können dieselbe Energie, aber unterschiedliche Volumina haben. Auch damit kann die geringe Korrelation zwischen Volumen und Energie (bzw. Enthalpie oder Entropie) bestätigt werden.

Oben wurde die Sicherheit des Werts von ΔC_p betont. Das Ergebnis stimmt in etwa mit dem Wert überein, der von PRIVALOV mittels kalorimetrischer Techniken gemessen werden konnte [9; 111; 112]. In diesen Arbeiten werden für die Entfaltung von Cytochrom c bei 50°C eine Änderung in der Wärmekapazität von $\Delta C_p = 6,1$ kJ/molK, bei 75°C eine entsprechende Änderung von 4,4 kJ/molK beschrieben. Für 60°C ergibt die Interpolation einen Wert von 5,4 kJ/molK, der nahe an dem Wert für Zn-Mesoporphyrin-Cytochrom c mit $\Delta C_p = 5,87$ kJ/molK liegt. Die kalorimetrischen Daten von PRIVALOV sind völlig frei von etwaigen Modellannahmen (z.B. das Zwei-Zustands-Modell). Die Übereinstimmung kalorimetrischer und spektroskopischer Ergebnisse ist eine Bestätigung der spektroskopischen Technik, die wie zuvor erläutert, auf diverse Modellannahmen angewiesen ist. Es muss beachtet werden, dass das hier verwendete Cytochrom c eine modifizierte prosthetische Gruppe enthält. Außerdem wurden die Versuche in einer Lösung aus Glycerin und Wasser durchgeführt. Das bedeutet, dass die Proben in den beiden Experimenten nicht vollkommen identisch sind. Auf diese Tatsachen sind daher die geringen Abweichungen in den Werten zurückzuführen.

4.6.4 Bemerkung zur Zwei-Zustands-Näherung:

Wie vertrauenswürdig ist das Phasendiagramm?

In diesem Kapitel soll die Bedeutung der Annahme eines Zwei-Zustands-Modells, auf der die Auswertung basiert, genauer betrachtet werden. Die Arbeiten von KAUFMANN [44], BALDWIN [42] und HUMMER [45; 46; 47] haben gezeigt, dass Druck- und Temperaturdenaturierungen zu unterschiedlichen Endzuständen führen. Mit den im Rahmen dieser Arbeit an Zn-Cytochrom c durchgeführten Experimenten kann diese Beobachtung bestätigt werden. Bei dem druckdenaturierten Zustand handelt es sich um einen ziemlich kompakten kugelförmigen Zustand (globule), während durch

Temperaturdenaturierung eine Art “random coil”-Struktur entsteht.

An dieser Stelle ist es hilfreich, den Entfaltungsprozess im Bild der Energielandschaften [98; 113] und weniger nach dem Modell zweier getrennter Zustände zu betrachten: Hier repräsentieren der druck- und temperaturdenaturierte Zustand zwei unterschiedliche Regionen in einer großen Fläche einer komplizierten Energielandschaft. Der denaturierte Zustand gibt dort alle Koordinaten im Phasenraum wieder, die Strukturen repräsentieren, in der das Protein seine Funktion **nicht** erfüllt. Daran angelehnt ist der native Zustand ebenfalls als große Fläche im Konformationsraum anzusehen, welche diejenigen Strukturen repräsentiert, in denen das Protein biologisch aktiv ist.

Diese beiden Flächen im Phasenraum können zu zwei *effektiven Zuständen* mit einer einigermaßen definierten mittleren Energie zusammengelegt werden (state lumping). Dieses “neue” effektive Zwei-Zustands-Modell stellt somit zumindest eine plausible Erklärung dar. Natürlich funktioniert das “über einen Kamm scheren” der Zustände nur dann, wenn die jeweiligen Flächen im Phasenraum nicht durch allzu hohe Barrieren getrennt sind, die einen angemessenen Austausch zwischen ihnen unterbinden würden. Es sollte betont werden, dass eine ähnliche Sichtweise der Energielandschaften auch in der Beschreibung der Faltungsdynamik benutzt werden [13].

4.7 Besonderheiten

4.7.1 Kompliziertere Muster

Die Temperaturdenaturierungen, die unter höheren Drücken durchgeführt wurden, zeigen in den Verschiebungen ihrer Banden sowie den zugehörigen Breiten kompliziertere Muster. Dies ist in den Abbildung 4.9 zu erkennen. Die Wellenlänge des Bandenzentrums λ_{max} zeigt dort zwei Phasen mit Blauverschiebung, wobei diejenige bei der höheren Temperatur stärker ausgeprägt ist. Die Phasen der Blauverschiebung finden sich auch im Verhalten der Linienbreite wieder.

Anhand Abbildung 4.16 soll im Folgenden erklärt werden, warum die Muster für das Bandenmaximum (λ_{max}) und die Bandenbreite (fwhm) unter Druck- und Temperaturänderungen komplizierter werden. In dieser Abbildung ist eine Temperaturdenaturierung unter hohem Druck (700 MPa) dargestellt. Die Verschiebung des Bandenzentrums sowie, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt, die Veränderungen in der Bandenbreite lassen sich in drei Bereiche unterteilen. Der Bereich bis etwa 25°C kann durch eine deutliche Rotverschiebung beschrieben werden. Ungewöhnlicherweise tritt aber gleichzeitig eine merkliche Verschmälerung der Bandenbreite auf. Der Bereich zwischen 25°C und 65°C zeigt eine Blauverschiebung für das Ban-

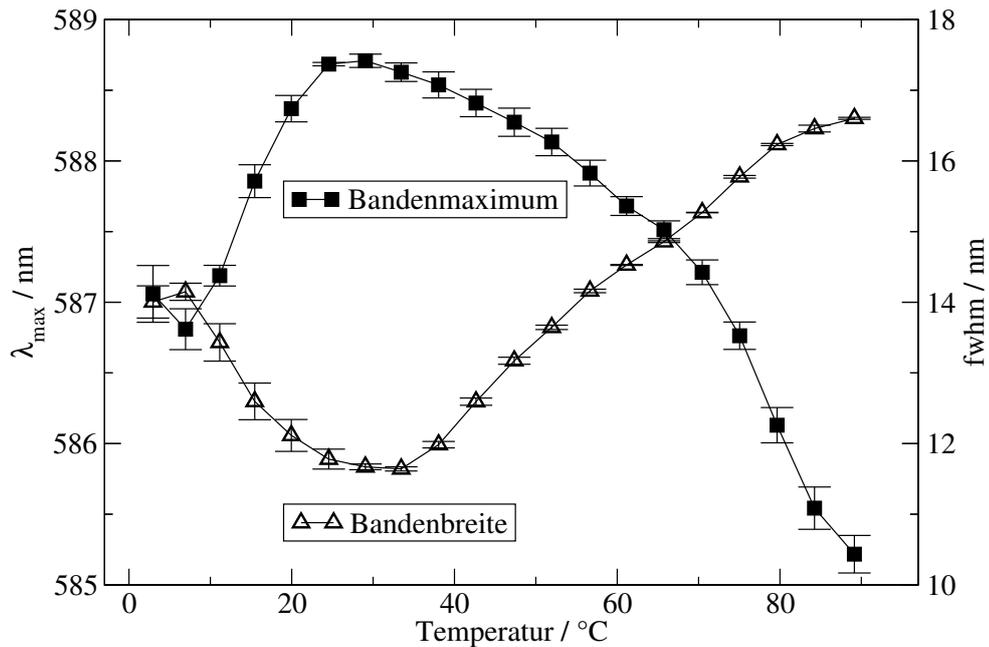


Abbildung 4.16: Verlauf von Zentrum und Breite der Q_x - Q_y -00-Bande für eine Temperaturdenaturierung unter hohem Druck (0,7 GPa).

denzentrum und eine Verbreiterung der Bande. Für Temperaturen höher als 65°C folgt ein weiterer Bereich mit starker Blauverschiebung, der ebenfalls von einer Verbreiterung der Bande begleitet wird. Der Mittelpunkt dieses Bereichs ist bei etwa 77°C zu finden.

Dieses Muster deutet auf mehrere, in diesem Fall zwei aufeinanderfolgende Schritte im Denaturierungsprozess hin.

Der Bereich der Blauverschiebung bei moderater Temperatur lässt sich als eine Art Prätransformation interpretieren. Hier ist allerdings anzumerken, dass diese Art der Prätransformation nur bei verhältnismäßig hohen Drücken zu beobachten ist. Es ist denkbar, dass vor dem Eintritt der Wassermoleküle in die Proteintasche zunächst verschiedene Bindungen gebrochen werden müssen. Dabei muss beachtet werden, dass sich bei einem Druck von ca. 1 GPa die relative Volumenänderung bereits in einem Bereich von 5 % abspielt. Diese Veränderung hat vor allem Auswirkungen auf die Hohlräume in oder um die Proteintasche herum. Als Folge davon kann Wasser erst wieder ab einem Zeitpunkt in diese Hohlräume gepresst werden, wenn durch den Bruch von Bindungen Raum geschaffen worden ist.

4.7.2 Reentrante Übergänge

Zusätzlich zu den oben beschriebenen aufeinanderfolgenden Schritten im Phasentransformationsprozess zeigt Abbildung 4.16 eine eigenartige Anfangsphase während der Temperaturdenaturierung. Das erste Moment λ_{\max} weist eine starke Rotverschie-

bung von ungefähr 2 nm/15 K auf. Interessanterweise liegt bei dem zweiten Moment in demselben Temperaturbereich eine deutliche Verschmälerung der Linienbreite vor.

Dieses Verhalten lässt sich anhand Abbildung 4.14 erklären: Aus dem ellipsoförmigen Phasendiagramm geht hervor, dass sich das Protein für eine Temperatur von etwa 0°C und einem Druck von ca. 700 MPa nahe an der Stabilitätsgrenze befindet. Aus diesem Grund liegt an dieser Stelle eine etwa gleiche Besetzung von nativem und denaturiertem Zustand vor. Eine Erhöhung der Temperatur hat dort zur Folge, dass sich das System in den nativen Stabilitätsbereich bewegt. Ein großer Teil der zuvor denaturierten Moleküle faltet sich dabei in native Proteinstrukturen zurück. Wie in Kapitel 4.4.5 beschrieben, reduziert die bevorzugte Besetzung vor allem eines Zustands die entsprechende Druckverbreiterung. Zusätzlich wird hierdurch zu einem gewissen Grad die thermische Verbreiterung kompensiert, so dass insgesamt eine Abnahme der Bandenbreite zustande kommt. Da der denaturierte Zustand im Vergleich zum nativen Zustand blauverschoben ist, wird die Relaxation zurück in den gefalteten Zustand durch eine deutliche Rotverschiebung des Bandenmaximums begleitet. Anders ausgedrückt ist das besondere Verhalten von Bandenmaximum und -breite bei Temperaturänderungen unter hohem Druck eine Folge der *reentranten* Natur des Phasenübergangs bei Proteinen: Darunter versteht man die Tatsache, dass die Phasengrenze bei einer Erhöhung der Temperatur zweimal überquert wird.

Anhand dieser Daten wird auch deutlich, dass es sich bei der Faltung und Entfaltung von *Zn-Mesoporphyrin-Cytochrom c* um einen reversiblen Prozess handelt, und dies sogar bei relativ tiefen Temperaturen und hohen Drücken.

Kapitel 5

Wechselwirkungsradius in Cytochrom c

5.1 Motivation

Die Wechselwirkungen zwischen molekularen Sonden und ihrer Umgebung führten in der Physik molekularer Kristalle [114] wie auch in der Biophysik zur Entdeckung verschiedenster Phänomene. Die optische Spektroskopie von Reportermolekülen, wie beispielsweise intrinsischen Aminosäuren oder Farbstofflabeln, ist an biologischen Proben weit verbreitet. Sondenmoleküle werden häufig dazu genutzt, Faltungs- und Entfaltungsprozesse, Bindungs- oder Aggregationsvorgänge sowie Konformationsdynamik zu verfolgen [115; 116]. Die wichtigste Frage im Zusammenhang der Spektroskopie von Reportermolekülen ist, was der Reporter “sieht” und wie tief der Bereich ist, den er “spürt”.

Genau diese Frage stellt sich ebenfalls nach den Ergebnissen aus dem vorangegangenen Kapitel zur Untersuchung des Stabilitätsdiagramms von *Zn-Mesoporphyrin-Cytochrom c* [117]. Es wurde dabei das erste und zweite Moment des schwingungsfreien Fluoreszenzübergangs zur Messung der Entfaltung unter Temperatur- und Druckänderung verwendet. Die interessante Beobachtung war, dass zu Beginn der Änderung in den experimentellen Parametern, Druck und Temperatur, eine Rotverschiebung in der Fluoreszenz auftrat. In einem bestimmten Parameterbereich veränderte sich das Verhalten der Lösungsmittelverschiebung: Die Rotverschiebung wechselt zu einer Blauverschiebung. Dieser Wechsel kennzeichnet eine Veränderung in den Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel. Seit den Pionierarbeiten auf dem Gebiet der Wechselwirkungen zwischen molekularen Sonden und dem Lösungsmittel von BAYLISS, MACRAE und LIPTAY ist allgemein bekannt, dass dispersive Wechselwirkungen stets bathochrom verschieben, während die elektrostatischen Wechselwirkungen (hauptsächlich Dipol-induzierte Dipole) auch eine hypsochrome Verschiebung verursachen können [94; 95; 96]. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse ließen sich die

Blauverschiebungen ganz logisch erklären: Durch die Entfaltung des Proteins, sei sie thermisch oder druckinduziert, treten Wassermoleküle aus der Hydratationsschale in die Nähe des Chromophors und induzieren die beobachtete Blauverschiebung durch signifikant vergrößerte elektrostatische Wechselwirkungen aufgrund ihres großen Dipolmoments. Folglich ist es legitim, die Blauverschiebungsphase als Indikator für die Denaturierung zu benutzen.

Auch wenn diese Deutung korrekt ist, bleibt die folgende Frage unbeantwortet:

Wie nahe müssen die Wassermoleküle an den Chromophor herantreten, um eine bedeutende Änderung in den spektralen Eigenschaften sichtbar zu machen? Diese Frage ist gleichbedeutend damit, wie groß der Bereich der Wechselwirkungen des Chromophors mit seiner Umgebung ist. Um zu verstehen, was während des Entfaltungsprozesses vor sich geht, ist es wichtig, zu wissen, wie weit das Reportermolekül "sehen" kann. Im Folgenden wird gezeigt, wie sich mit "Druck-Effekt"-Experimenten über Lochbrennspektroskopie an Zn-Cytochrom c das Wechselwirkungsvolumen abschätzen lässt.

5.2 Modellbetrachtung

Ausgangspunkt für die folgenden Überlegungen ist ein Chromophor im Zentrum eines Volumens mit einem Radius R . Der Chromophor wird näherungsweise als Punktdipol beschrieben. Der Radius R des Volumens stellt den mittleren Wechselwirkungsradius des Chromophors mit seiner Umgebung dar. Die Näherung besagt, dass der Chromophor mit den Molekülen innerhalb des Volumens wechselwirkt (*light space*), allerdings nicht viel von der Umgebung dahinter sieht (*dark space*). Das Ziel dieses Kapitels ist die Bestimmung von R .

Eine wichtige Größe in dieser Betrachtung ist die Kompressibilität. Für das oben beschriebene Volumen gilt folgender Zusammenhang:

$$|\kappa| = \left| \frac{1}{V} \frac{\Delta V}{\Delta p} \right| = \frac{3}{R} \left| \frac{x}{\Delta p} \right| \quad (5.1)$$

Die Größe x beschreibt die Änderung dieses Radius aufgrund einer Druckänderung Δp .

Die Kompressibilität κ lässt sich über ein optisches "Druck-Effekt"-Lochbrennexperiment bestimmen. Dabei wird davon ausgegangen, dass die durch den Druck verursachte spektrale Verschiebung s_p proportional zur Lösungsmittelverschiebung ist und die dominierenden Wechselwirkungen mit dem Abstand R nach R^{-n} abfallen. Für die Dispersion und die elektrostatischen Wechselwirkungen höherer Ordnung hat n den Wert 6. Im Rahmen dieser Näherung ist s_p durch folgenden Ausdruck gegeben (vgl. Gleichung 3.12):

$$s_p = 2\kappa(\nu_b - \nu_{vac})\Delta p \quad (5.2)$$

ν_b ist dabei die Wellenzahl, bei der das Loch gebrannt wurde und ν_{vac} die Vakuumwellenzahl. Entsprechend ist $\nu_b - \nu_{vac}$ die Lösungsmittelverschiebung des frequenzselektierten Ensembles der Sondenmoleküle [99]. Durch die Auftragung von $s_p/\Delta p$ als Funktion der Brennfrequenz ν_b wird eine Gerade erhalten, aus deren Steigung sich die Kompressibilität κ bestimmen lässt.

Es sollte beachtet werden, dass s_p bei ν_{vac} verschwindet. Für Sondenmoleküle in einer polaren Umgebung kann ν_{vac} sogar innerhalb der inhomogenen Bande liegen. In diesem Fall lässt sich diese Wellenzahl direkt bestimmen.

Im nächsten Abschnitt wird die inhomogene Linienbreite näher betrachtet. Sie wird durch die strukturelle Unordnung verursacht. Ein passender Parameter, um die strukturelle Unordnung zu beschreiben, ist das mittlere Verschiebungsquadrat $\langle x_0^2 \rangle$, das die durchschnittliche Abweichung eines individuellen Proteinbausteins (z.B. einer Aminosäure) von der gemittelten Position angibt. Die Lochbrennexperimente wurden bei 2 Kelvin durchgeführt, so dass $\langle x_0^2 \rangle$ allein die Konformationsunordnung widerspiegelt. Der Beitrag der Konformationsunordnung übersteigt die jeweiligen Beiträge der Nullpunkt-Schwingungen bei weitem. Damit lässt sich einfach zeigen, dass die inhomogene Breite σ_0 direkt proportional zu $\langle x_0^2 \rangle$ ist [118]:

$$\sigma_0 = |f_0| \langle x_0^2 \rangle^{1/2} \quad (5.3)$$

Gleichung 5.3 ist identisch mit Gleichung 3.5 unter der Voraussetzung, dass über die Zwei-Teilchen-Korrelationsfunktion gemittelt wird. Der Proportionalitätsfaktor $|f_0|$ hängt von den folgenden Faktoren ab:

- Wechselwirkungen zwischen Sonde und Umgebung,
- von der Struktur und
- der Anzahl wechselwirkender Spezies.

Die inhomogene Linienbreite σ_0 kann bei 2 Kelvin auf einfache Art und Weise gemessen werden, sofern sich nicht verborgene Übergänge in der Absorptionsbande befinden. Im Fall nicht aufgelöster Banden mit nahe beieinander liegenden Zentren sowie unterschiedlicher Intensitäten wird das Problem komplizierter. Das mittlere Verschiebungsquadrat $\langle x_0^2 \rangle$ lässt sich aus Röntgenstreu-Experimenten bestimmen. Für bestimmte Hämproteine, z.B. Myoglobin, sind dazu in der Literatur Daten für Tieftemperaturmessungen zu finden. Auf diesem Weg ist also die Bestimmung von $|f_0|$ möglich. Die Größe $|f_0|$ kann als Transformationsfaktor aufgefasst werden, die eine Längenskala in eine Frequenzskala umwandelt.

Ein spektrales Loch verschiebt sich nicht nur unter Druck, sondern geht auch eine Verbreiterung ein. Diese Druckverbreiterung ist ebenfalls inhomogener Natur. Sie ist darauf zurückzuführen, dass die Anwendung von Druck auf ein strukturell ungeordnetes System die lokalen Konfigurationen der Lösungsmittelmoleküle um einen Chromophor herum ändert. Dadurch wird die Entartung des molekularen Ensembles, die unter den Anfangsbedingungen gegeben war, aufgehoben, was zu der beobachteten Druckverbreiterung führt. An dieser Stelle sollte betont werden, dass der Effekt der Druckverbreiterung bei einem Druck im MPa-Bereich nur in ungeordneten Materialien auftritt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind in dieser Hinsicht zu interpretieren. In molekularen Kristallen zum Beispiel gibt es dagegen keine Druckverbreiterung, obwohl die Verschiebung s_p in der selben Größenordnung wie in ungeordneten Systemen liegt. Diese Beobachtung ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass bei ungeordneten Systemen nicht nur die Dichte, sondern auch die lokalen Strukturen verändert werden. Interessanterweise ist der Wert für σ_p in Proteinen fast genauso groß wie in Gläsern. Diese Beobachtung impliziert, dass die strukturelle Korrelation zwischen den Bausteinen eines Proteins so gering wie in einem amorphen Festkörper ist. Die typischerweise bei "Druck-Effekt"-Experimenten auftretende Verschiebung beträgt weniger als 0,001 Å.

Aus diesen Gründen lässt sich σ_p auf die gleiche Weise wie Gleichung 5.3 interpretieren und es ergibt sich der Ausdruck:

$$\sigma_p = |f_p| \langle x_p^2 \rangle^{1/2} \quad (5.4)$$

Die Größe $\langle x_p^2 \rangle$ ist das mittlere Verschiebungsquadrat einer Aminosäure aufgrund des Drucks. Sie spiegelt die Abweichung einer Aminosäure von der normalerweise eingenommenen Position wider. Dies gilt unter der Annahme, dass der Druck nur die Dichte verändert. Da die inhomogene Verbreiterung und die Druckverbreiterung die gleichen Ursachen besitzen, müssen die Kopplungsfaktoren $|f_0|$ und $|f_p|$ den gleichen Wert haben.

Der nächste Schritt betrifft die Beziehung zwischen druckinduzierter Verschiebung x und der damit verbundenen spektralen Verschiebung $\langle s_p \rangle$. Die Größe $\langle s_p \rangle$ ist die über die inhomogene Bande gemittelten Druckverschiebung. Wie zuvor beschrieben, transformiert der Faktor $|f_0|$ Längenskalen in Frequenzskalen, so dass sich folgender Zusammenhang ergibt:

$$|f_0| x = \langle s_p \rangle \quad (5.5)$$

Dabei wird angenommen, dass der Transformationsfaktor konstant ist, unabhängig ob die Verschiebung zufällig oder nicht zufällig ist. Diese Annahme scheint für den Fall, dass die Linienverbreiterung und die Verschiebung durch die gleiche Art der Wechselwirkung herrühren, sinnvoll zu sein.

Der Wert x kann durch κ aus Gleichung 5.1 ausgedrückt werden. Für R ergibt sich der folgende Ausdruck:

$$R = \frac{3}{\kappa} \frac{\langle x_0^2 \rangle^{1/2}}{\sigma_0} \left| \frac{\langle s_p \rangle}{\Delta p} \right| \quad (5.6)$$

Alle Größen auf der rechten Seite von Gleichung 5.6 lassen sich experimentell bestimmen, so dass R abgeschätzt werden kann.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Absorptionsspektrum Zn-Cytochrom c

Das inhomogene Absorptionsspektrum von *Zn-Mesoporphyrin-Cytochrom c* ist in Abbildung 5.1 gezeigt. Es zeigt den Q_x - und Q_y -(00)-Übergang bei etwa 17300 cm^{-1} (578 nm) sowie den entsprechenden Bereich der assoziierten Schwingungsbande um 18500 cm^{-1} (540 nm). Die gepunktete Linie dient zur Basislinienkorrektur für den (00)-Übergang, mit der die Überlappung mit der Schwingungsbande subtrahiert wird.

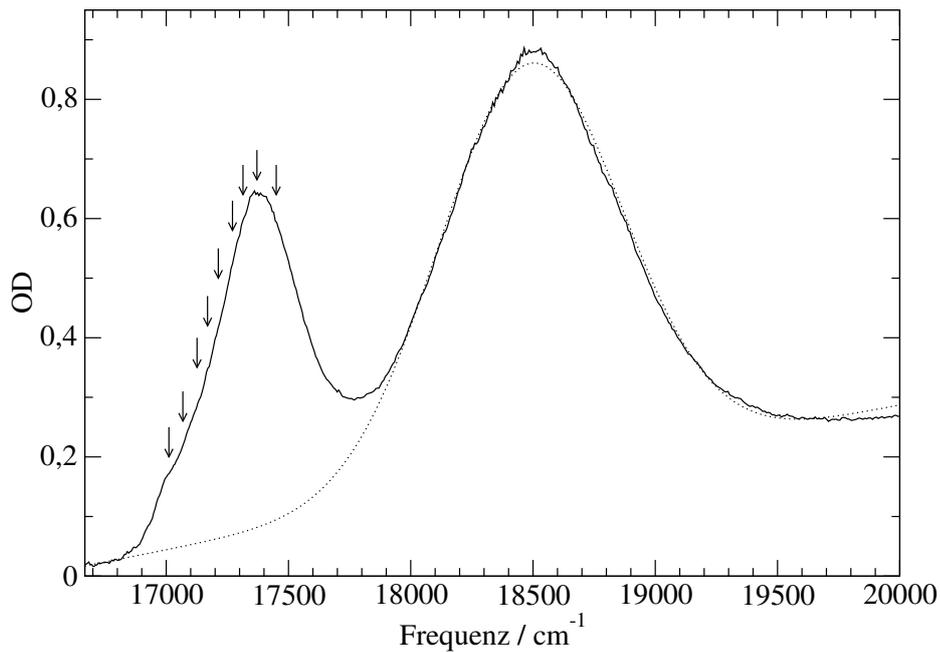


Abbildung 5.1: Absorptionsspektrum von *Zn-Cytochrom c* bei 2 K. Die Pfeile markieren den Frequenzbereich, in dem Löcher gebrannt wurden.

Mit den Pfeilen wird angedeutet, an welchen Stellen “Druck-Effekt”-Lochbrennexperimente durchgeführt wurden. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder wird das Loch bei Normaldruck gebrannt und die Verschiebung sowie die Verbreiterung der Löcher mit ansteigendem Druck verfolgt oder die Löcher werden unter erhöhtem Druck gebrannt und ihre Veränderung mit abnehmendem Druck beobachtet.

5.3.2 “Druck-Effekt” bei ansteigendem Druck

Bei den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurden die Löcher bei Normaldruck mit einer Brenndauer von 5 Minuten im Frequenzbereich von 17000 bis 17450 cm^{-1} (573 bis 588 nm) gebrannt. Die Brennleistung auf der Probe lag bei etwa 0,5 mW. Anschließend wurden die Drücke in sechs Stufen auf 2 MPa erhöht. Bei jedem Druckwert wurden acht Aufnahmen gemacht. Am Ende der Versuchsreihe wurden nochmals die Lochspektren bei Raumdruck aufgenommen.

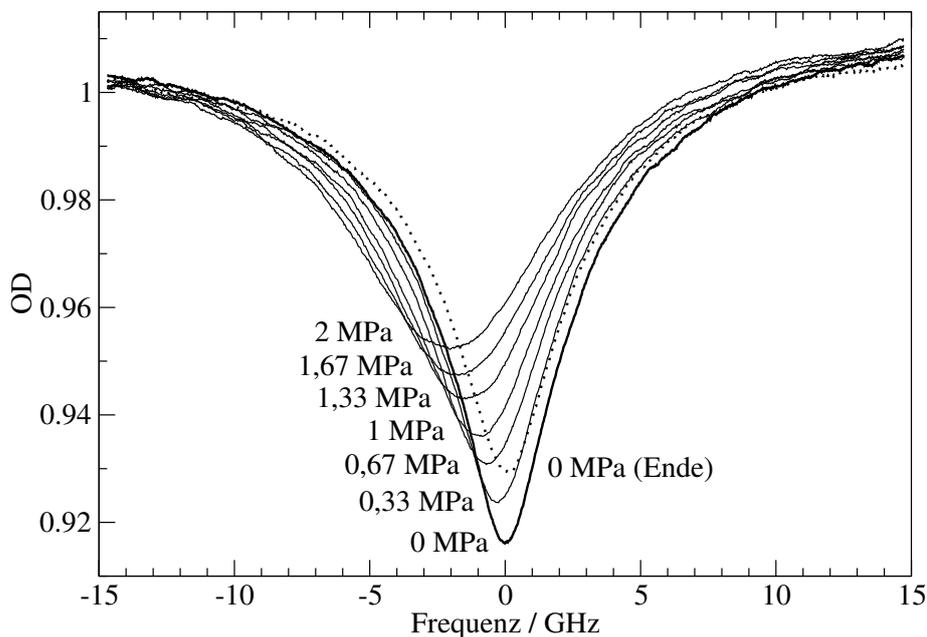


Abbildung 5.2: Lochspektren des ansteigenden “Druck-Effekts” (0 bis 2 MPa) bei 17271 cm^{-1} .

Abbildung 5.2 zeigt als Beispiel den “Druck-Effekt” bei einem Loch, das bei 17271 cm^{-1} (579,0 nm) gebrannt wurde. Die relative Tiefe des Lochs beträgt etwa 20 % der Absorption an dieser Stelle. Die Breite des Lochs liegt bei ca. 5 GHz. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit ansteigendem Druck die Position der Löcher zu niedrigeren Frequenzen verschoben werden. Außerdem nimmt die Breite der Löcher mit steigendem Druck zu. Die gepunktete Linie zeigt das Rückkehrloch bei Normaldruck am Ende der Messung. Sein Zentrum stimmt mit dem des gebrannten Lochs gut überein.

Aufgrund der Faltung von Lorentz- und Gaußfunktion erhält man voigtförmige Löcher. An die Löcher werden deshalb Lorentz- und Voigtkurven angefitet. Für die

Ausgangssituation sind die Löcher eher lorentzförmig, mit zunehmenden Druckänderungen überwiegt der gaußförmige Druckkern das lorentzförmige Ausgangsloch. Die “Fits” ergeben für jedes Loch die Parameter Tiefe, Breite¹ und Zentralfrequenz. Die Lochverschiebung s_p ist die Differenz zwischen der Zentralfrequenz des Lochs nach Druckänderung und der Zentralfrequenz des Ausgangslochs.

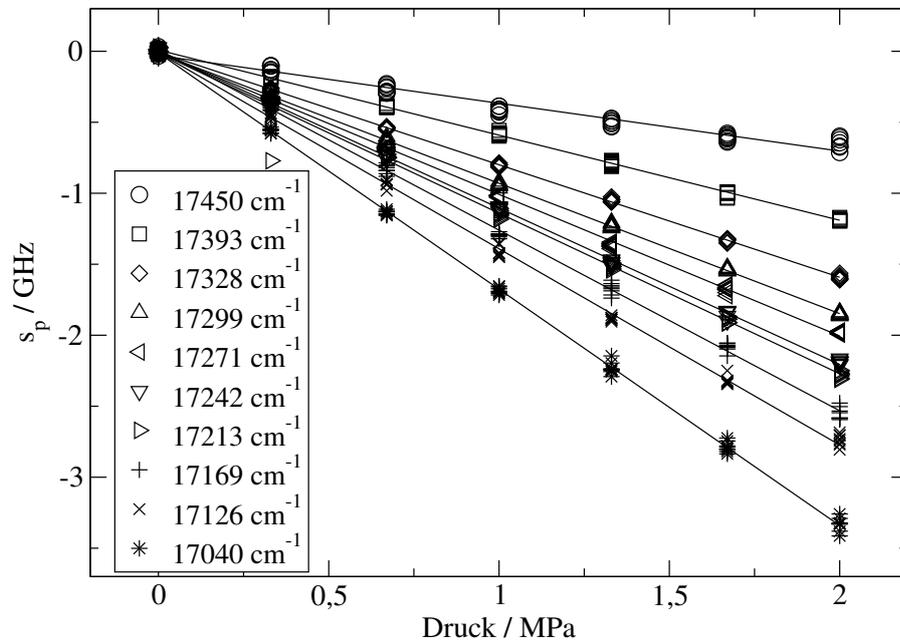


Abbildung 5.3: “Druck-Effekt”: Verschiebung der Zentren bei ansteigenden Drücken.

In Abbildung 5.3 sind für die an verschiedenen Stellen in der inhomogenen Bande gebrannten Löcher die Verschiebungen der Lochzentren s_p dargestellt. Für zunehmende Drücke wird eine Rotverschiebung beobachtet. Außerdem verhält sich die Verschiebung der spektralen Löcher mit dem Druck perfekt linear. Weiterhin ist gut erkennbar, dass die Steigungen der jeweiligen Geraden für kleine Wellenzahlen, d.h. rote Wellenlängen, am größten ist.

¹Zunächst wird für das Ausgangsloch die Lorentzbreite ermittelt. Dieser Wert wird für die durch Druck veränderten voigtförmigen Löcher konstant gehalten. Dabei erfolgt die Bestimmung des Beitrags der Gaußbreite.

5.3.3 “Druck-Effekt” bei abnehmendem Druck

In diesen Experimenten stand die Probe bereits beim Brennen des Lochs unter dem Maximaldruck. Der Brennvorgang sowie die anschließende Beobachtung der Löcher verläuft analog zu den Versuchen in Kapitel 5.3.2. Der einzige Unterschied bestand darin, dass der Druck schrittweise abgesenkt wurde, und zwar mit den gleichen Beträgen wie bei den Versuchen mit zunehmendem Druck. Nach Erreichen des Minimaldrucks wurden die Anfangsbedingungen wiederhergestellt.

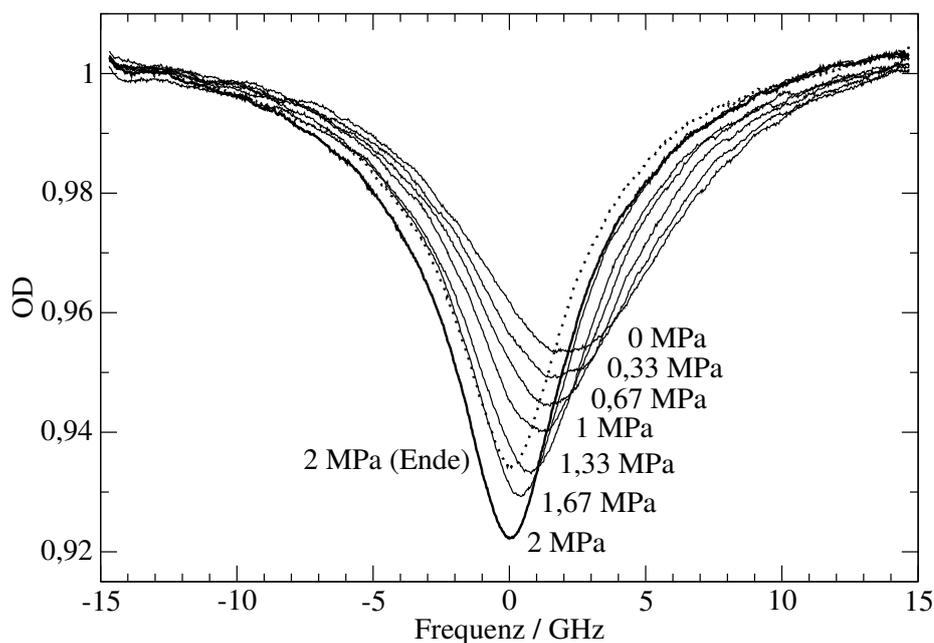


Abbildung 5.4: Lochspektren: Effekt abnehmender Drücke (2 bis 0 MPa) bei 17249 cm^{-1} .

In Abbildung 5.4 ist das Verhalten eines Lochs bei 17249 cm^{-1} ($579,7\text{ nm}$) für abnehmende Drücke exemplarisch gezeigt. Der Vergleich mit Abbildung 5.2 zeigt, dass für abnehmende Drücke eine Blauverschiebung beobachtet wird. Die Breite der Löcher nimmt mit abnehmendem Druck zu. Dies ist ein Beleg dafür, dass die Verbreiterung und damit die Änderung in der strukturellen Ordnung nur durch den Betrag der Differenz zwischen Ausgangs- und Enddruck, nicht aber durch ihr Vorzeichen bestimmt wird.

Abbildung 5.5 zeigt die Verschiebungen der Löcher für abnehmende Drücke bei verschiedenen Brennfrequenzen. Wie in Abbildung 5.3 ist auch hier die Proportionalität zwischen Druckänderung und Verschiebung der spektralen Löcher zu erkennen. Desweiteren wird der Farbeffekt, d.h. immer kleinere Steigungen mit zunehmender Wellenzahl und damit der Annäherung an die Vakuumwellenzahl, deutlich.

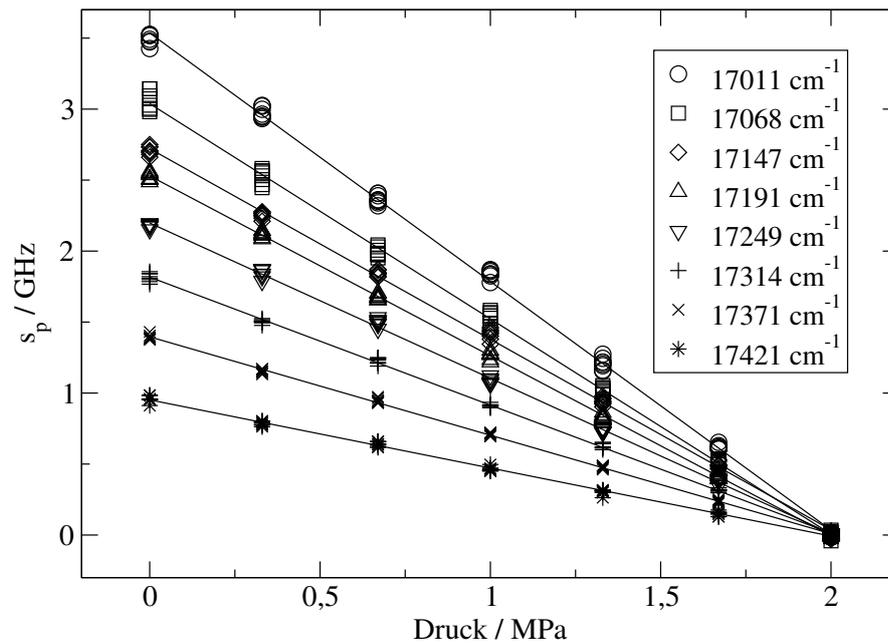


Abbildung 5.5: “Druck-Effekt”: Verschiebung der Zentren bei abnehmenden Drücken.

5.3.4 Auswertung

Bestimmung von Vakuumfrequenz und Kompressibilität

Die Kompressibilität κ wird folgendermaßen bestimmt: die Lochverschiebung s_p für ein bei einer bestimmten Frequenz ν innerhalb der Bande gebranntes Loch wird über der Druckdifferenz Δp aufgetragen. Die Steigungen $s_p/\Delta p$ der sich ergebenden Geraden hängen gemäß des Farbeffekts von der Brennfrequenz ν ab.

Die Auftragung von $s_p/\Delta p$ gegen die zugehörigen Brennfrequenzen liefert die in Abbildung 5.6 gezeigten linearen Zusammenhänge. Nach Gleichung 5.2 wurde aus der Gerade für die “Druck-Effekt”-Experimente mit ansteigendem Druck für die Vakuumfrequenz ein Wert von 17589 cm^{-1} ($568,5 \text{ nm}$) und für die Kompressibilität ein Wert von $0,0501 \text{ GPa}^{-1}$ ermittelt. Für die abnehmenden Drücke erhält man entsprechende Werte von 17607 cm^{-1} ($568,0 \text{ nm}$) und $0,0489 \text{ Pa}^{-1}$. In der weiteren Rechnung wird für die Kompressibilität von Zn-Cytochrom c der Mittelwert aus beiden Experimenten von $0,05 \text{ GPa}^{-1}$ verwendet. Zum Vergleich beträgt die Kompressibilität für Myoglobin $0,07$ bzw. $0,12 \text{ GPa}^{-1}$ (in Abhängigkeit von der Methode) [85; 119] und Meerrettichperoxidase $0,12 \text{ GPa}^{-1}$ [120]. Für BPTI² wird ein Wert von $0,06 \text{ GPa}^{-1}$ gemessen [121; 122].

Der Verlauf dieser Kurve kann Hinweise auf verschiedene Konformationen geben. In dem hier beschriebenen Fall scheinen verschiedene Konformationen aber keine unterschiedlichen Kompressibilitäten zu besitzen.

²bovine pancreatic trypsin inhibitor

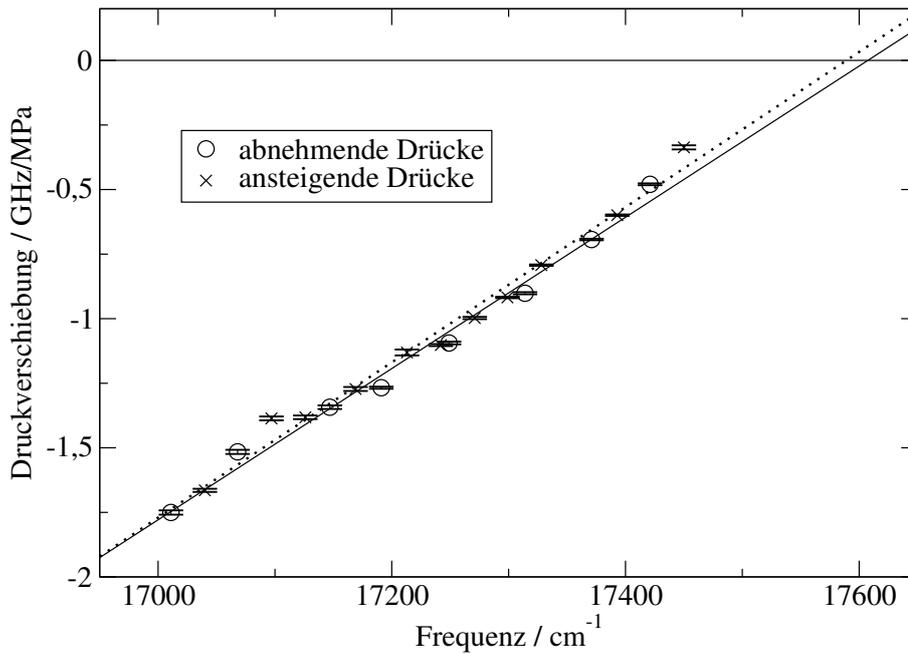


Abbildung 5.6: Darstellung der druckbezogenen Verschiebung der Löcher in Abhängigkeit von der Brennfrequenz.

Wechselwirkungsradius des Chromophor

Anhand von Gleichung 5.6 lässt sich der Wechselwirkungsradius des Zn-Porphyrin-Chromophors mit seiner Proteinumgebung abschätzen: Für die Kompressibilität wird der entsprechende Wert aus den Experimenten verwendet, nämlich $0,05 \text{ GPa}^{-1}$. Das mittlere statische Verschiebungsquadrat $\langle x_0^2 \rangle$ wird mit einem Wert von $0,05 \text{ \AA}^2$ aus Röntgenstreuungsexperimenten angenommen [81]. Etwas komplizierter ist die Abschätzung der Breite der inhomogenen Linie.

Wie in Abbildung 5.7 gezeigt, lassen sich in die Absorptionsbande des Q_x - und Q_y -(00)-Übergangs eine Reihe von Gaußbanden mit einer Breite von 100 cm^{-1} (3000 GHz) einpassen. Dieser Wert wird für die weitere Rechnung verwendet. Die mittlere Druckverschiebung $|\langle s_p \rangle / \Delta p|$ wird nach Abbildung 5.6 mit einem Wert von 1 GHz/MPa angenommen.

Aus Gleichung 5.6 ergibt sich für den Wechselwirkungsradius R ein Wert von **4,5 Å** [123].

Obwohl dieser Wert in einer “vernünftigen” Größenordnung zu liegen scheint, ist dennoch davon auszugehen, dass es sich dabei um eine untere Grenze handelt. Jedenfalls verdeutlicht dieser Wert für den Wechselwirkungsradius des Farbstoffs in Zn-Cytochrom c, dass das Wechselwirkungsvolumen deutlich kleiner als die gesamte Ausdehnung des Proteins ist (34 \AA Durchmesser). Der Zn-Mesoporphyrin-

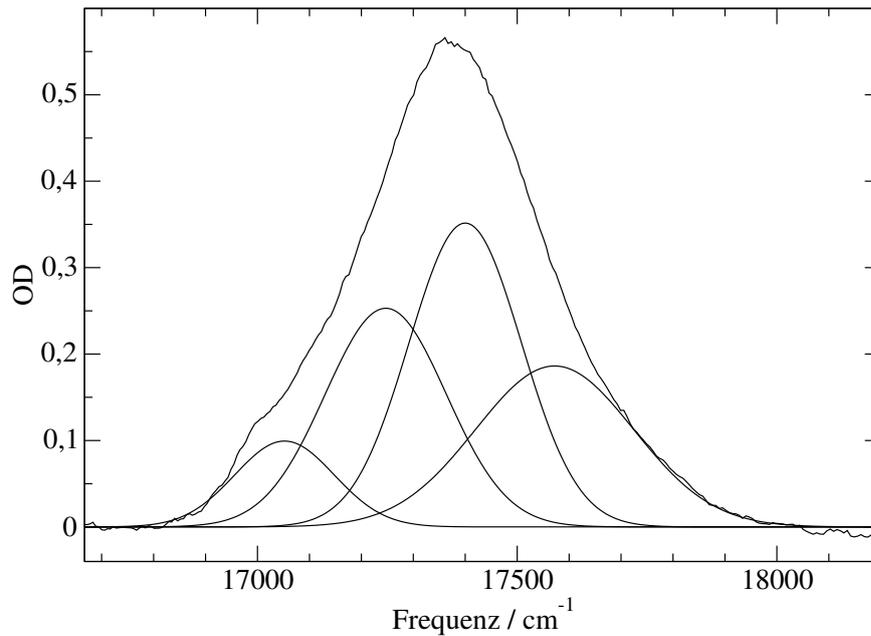


Abbildung 5.7: Bestimmung von σ_0 : In den Q_x - Q_y -(00)-Übergang eingepasste inhomogene Banden.

Chromophor hat eine diagonale Abmessung von etwa 11 Å. In Abbildung 5.8 ist der Raum, mit dem die Farbstoffsonde wechselwirkt, in der Röntgenstruktur von Cytochrom c [90] markiert.

Der Wechselwirkungsradius stimmt in etwa mit der Größe der Proteintasche überein, in dem sich der Chromophor befindet. Für den Fall, dass die Blauverschiebung in der Fluoreszenz, der in den Druck- und Temperaturdenaturierungsexperimenten beobachtet wurde, wirklich durch eine Zunahme in den elektrostatischen Wechselwirkungen mit Wassermolekülen verursacht wird, dann müssen diese Wassermoleküle während des Denaturierungsprozesses sehr nahe an den Chromophor herangebracht werden.

Das ist für den Fall der thermischen Entfaltung nicht überraschend. Viel wichtiger ist diese Erkenntnis für den Fall der druckinduzierten Denaturierung. Die Interpretation, die bereits in Kapitel 4.4 gegeben wurde, wird damit bestätigt: Ganz offensichtlich werden die Wassermoleküle in das Innere der Proteintasche gedrückt und kommen somit in Kontakt mit dem Chromophor [45; 46; 47]. Die Rolle der Wassermoleküle bei der Entfaltung von Proteinen ist noch nicht vollständig geklärt. Eine naheliegende Annahme ist jedoch, dass dabei interne Wasserstoffbrückenbindungen gebrochen und neue gebildet werden, wodurch die Struktur des Proteins so stark verändert wird, dass es zu einer Denaturierung kommt.

In diesem Zusammenhang sollte nochmals erwähnt werden, dass aus Entfal-

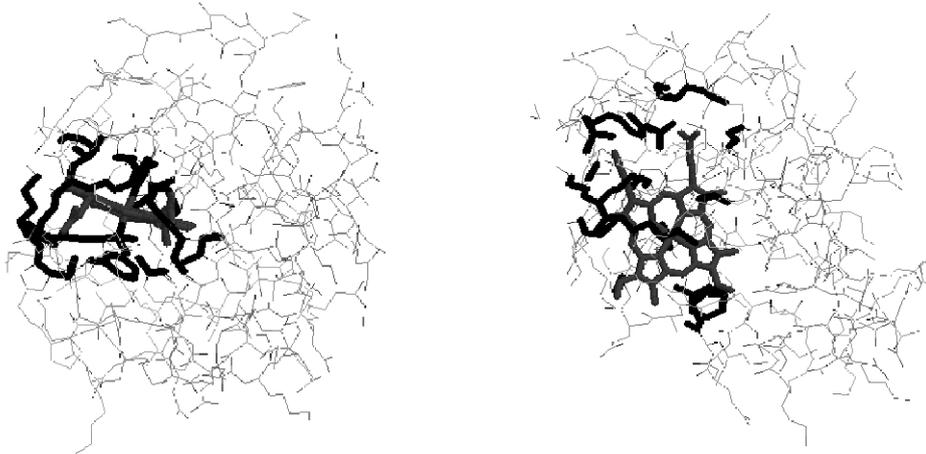


Abbildung 5.8: Verdeutlichung des Wechselwirkungsradius in Cytochrom c anhand der Röntgenstruktur (PDB-Eintrag 1HRC [90], bearbeitet mit RasMol 2.7.1). Der Zn-Porphyrin-Chromophor ist grau eingefärbt. Die Aminosäuren, die innerhalb des Wechselwirkungsradius der Farbstoffsonde liegen, sind schwarz markiert.

tungsexperimenten mit Fluoreszenzspektroskopie nicht Details zu den Strukturänderungen in einem Protein erhalten werden. Vielmehr erhält man eine Information darüber, auf welchem Weg diese strukturellen Änderungen induziert werden³. Im Beispiel einer Druckdenaturierung passiert dies, indem Wasser in das Proteininnere gepresst wird. Im Fall des Cytochrom c ist davon auszugehen, dass das Hineinpressen von Wasser um den Hämchromophor herum einen Effekt auf die globale Struktur des gesamten Proteins hat. Für die Faltung von Cytochrom c ist nämlich die Verbindung aus Polypeptidkette und Porphyrin-Makrocyclus notwendig.

Kommentar zu den Grenzen des Modells

Die Grundidee der vorangegangenen Experimente war, die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein über den “Druck-Effekt” zu messen. Falls diese Wechselwirkung ausreichend schnell abfällt, dann lässt sich mit jedem Chromophor ein bestimmtes Volumen verbinden, dessen Größe bestimmt werden sollte. Dabei waren es vor allem zwei Annahmen, die für diese Problemlösung verwendet wurden:

- Die Linienverbreiterung und die Linienverschiebung lassen sich auf dieselben Wechselwirkungen zurückführen.
- Die Längenskala der Wechselwirkung wird durch das statische mittlere Ver-

³Im Gegensatz dazu wird aus IR-Experimenten eine genaue Information über eine spezielle Änderung erhalten, z.B. dem Bruch von Wasserstoffbrücken zu Amidbindungen. Wie dieser Bruch jedoch abläuft, bleibt bei dieser Technik unklar.

schiebungsquadrat der Konformationen widergespiegelt.

Falls dies richtig ist, benötigt man lediglich die absolute Größe der Wechselwirkung, um einen Wert zu erhalten. Diese absolute Größe wird durch die absolute Lösungsmittelverschiebung wiedergegeben, welche nach Gleichungen 5.2 und 5.6 direkt aus den “Druck-Effekt”-Experimenten erhalten werden. Der Umweg über die Kompressibilität ist allerdings nicht unbedingt notwendig.

Dennoch sollen die oben gemachten Annahmen sowie besondere Situationen bewertet werden:

- Gleichung 5.3, die das Herzstück der Auswertung darstellt, ist nicht auf eine bestimmte Art von Wechselwirkung beschränkt. Es wurde dabei angenommen, dass die durch die statische konformelle Unordnung verursachten Verschiebungen klein gegenüber den mittleren Atomabständen sind. Diese Annahme gilt sicherlich in jedem Fall.
- Auch wenn Linienverschiebung und Linienbreite von verschiedenen Wechselwirkungen stammen können, so kann dies nur eintreten, falls bestimmte Symmetrieeinschränkungen gelten. So leistet die Dipol-Dipol-Wechselwirkung in einem isotropen Lösungsmittel keinen Beitrag zum ersten Moment einer Bande, wohl aber zum zweiten Moment. Diese besondere Situation scheint in Proteinen jedoch keine allgemeine Rolle zu spielen.
- Es existieren entgegengesetzte Wechselwirkungen und diese haben unter Umständen einen gravierenden Einfluss auf das Wechselwirkungsvolumen. Beispielsweise können polare Sonden vergleichbare rotschiebende Dispersionskräfte und blauschiebende elektrostatische Kräfte erfahren. In diesem Fall ist es möglich, dass die Vakuumwellenzahl innerhalb der inhomogenen Absorptionsbande liegt. Sie kann über das Verschwinden von s_p direkt gemessen werden. Somit verschwindet, falls sich ν_{vac} nahe am Bandenmaximum ν_0 befindet, die mittlere Druckverschiebung und folglich auch das Wechselwirkungsvolumen. Letzteres kann jedoch nicht passieren, so dass im beschriebenen Fall die mittlere Druckverschiebung nach folgender Gleichung bestimmt werden kann:

$$\langle s_p \rangle / \Delta p = \left[4\kappa^2 \langle (\nu - \nu_{vac})^2 \rangle \right]^{1/2} \quad (5.7)$$

Die Mittelung findet über die gesamte inhomogene Linienform statt. In Übereinstimmung mit Gleichung 5.2 reduziert sich Gleichung 5.7 im Fall einer Gaußfunktion zu $2\kappa(\nu_0 - \nu_{vac})$, falls die inhomogene Breite klein im Vergleich zur mittleren Lösungsmittelverschiebung ist. ν_0 ist die Wellenzahl des Maximums der inhomogenen Bande. Je näher ν_{vac} an ν_0 herankommt, umso kleiner

werden logischerweise die Druckverschiebung und somit auch das Wechselwirkungsvolumen. Die Kompensation von Wechselwirkungstermen reduziert die Tiefe der Umgebung, die von Wechselwirkungen mit dem Chromophor erfasst wird. Dies könnte im beschriebenen Experiment die Erklärung dafür sein, dass ein relativ kleiner Bereich von $4,5 \text{ \AA}$ abgeschätzt wurde. ν_{vac} fällt in die blaue Flanke der inhomogenen Bande und ist damit bereits in der Nähe des Bandenmaximums.

Die Druckverbreiterung σ_p scheint nicht von der Position von ν_{vac} beeinflusst zu werden. Allerdings übt die strukturelle Ordnung, die beispielsweise in einem Kristall vorliegt, einen großen Einfluss auf die Druckverbreiterung aus. Durch Druck verursachte korrelierte Verschiebungen führen nicht zu einer Linienverbreiterung. Die konformelle Verschiebung, die aus der Linienverbreiterung erhalten wird, ist normalerweise kleiner als die entsprechende aus der Linienverschiebung. Sie kann keinesfalls größer werden. In dem hier beschriebenen Fall liegt sie ungefähr in der gleichen Größenordnung, da ν_{vac} und ν_0 nahe zusammenliegen. Für den Fall, dass beide Frequenzen zusammentreffen, liefern Druckverschiebung und -verbreiterung das gleiche Längenmaß.

Unsicherheit im bestimmten Wechselwirkungsradius

Die Unsicherheit im Wechselwirkungsradius wird durch die Unsicherheit in den Parametern, die in Gleichung 5.6 stehen, bestimmt. Die Bestimmung der Kompressibilität κ basiert auf dem "pressure shift-solvent shift"-Modell. Aus diesem Grund kann der absolute Wert von κ von denen, die mit Hilfe anderer Techniken gemessen werden, abweichen. Im Allgemeinen stimmen die Ergebnisse gut überein. Im vorliegenden Experiment geht es um die Kompressibilität des lokalen Volumens um den Chromophor herum, und genau diese Größe wird durch das Lochbrennexperiment gemessen.

Problematischer in diesem Zusammenhang sind die unter der inhomogenen Absorptionsbanden versteckten Konformationen. Diese besitzen nicht nur unterschiedliche Werte für die Kompressibilität κ , sondern auch verschiedene Vakuumfrequenzen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass in dem hier beschriebenen Fall die entsprechenden Unsicherheiten tragbar sind.

Ein größeres Problem wird durch einen an sich trivialen Parameter ausgelöst, nämlich σ_0 . Verschiedene Konformationen sowie verschiedene nahe beieinanderliegende Übergänge überschneiden sich und maskieren die korrekte Breite. Im Fall von Zn-Cytochrom c besteht die gesamte rote Bande aus einer Überlagerung von zwei quasi-entarteten Zuständen, Q_x und Q_y , die durch das Kristallfeld des Proteins auf etwa 100 cm^{-1} aufgespalten werden [124]. Zusätzlich zu diesen beiden Zuständen gibt

es mindestens noch zwei Konformationen, möglicherweise noch weitere, nicht definierte Zustände unbekannter Anzahl. Zu berücksichtigen sind an dieser Stelle auch noch die Phononenflügel. Die hier benutzte Zerlegungsprozedur ergibt einen Wert im Bereich von 100 cm^{-1} , der einen “vernünftigen” Eindruck macht. Zusätzliche Banden würden diesen Wert reduzieren. Aus diesen Gründen werden die $4,5 \text{ \AA}$ als untere Grenze angesehen. Ein kleinerer Wert für σ_0 würde den Wechselwirkungsradius vergrößern.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Proteine können ihre biologische Funktion nur in ihrem nativen Zustand, in dem die Aminosäurekette zu einer einzigartigen, definierten dreidimensionalen Struktur gefaltet ist, ausüben. Das biophysikalische Verständnis der Proteinfaltung ist Objekt zahlreicher Forschungsarbeiten. Der Prozess von der entfalteten Aminosäurekette hin zur funktionellen Struktur lässt sich mit Hilfe eines "Faltungstrichters" beschreiben, in dem das Protein ausgehend von einem denaturierten Zustand mit hoher Enthalpie und Entropie den nativen Zustand mit geringer Enthalpie und Entropie findet. Durch die wechselseitige Kompensation enthalpischer und entropischer Beiträge ergibt sich somit lediglich ein kleiner Wert für die "Freie Faltungsenergie".

Der native Zustand eines Proteins ist daher nur unter eingeschränkten Bedingungen stabil. Einerseits können Änderungen des chemischen Milieus den Übergang von nativem zu denaturiertem Protein verursachen. Andererseits ist auch eine Denaturierung über Veränderung physikalischer Parameter möglich. Die Hitzedenaturierung von Proteinen ist ein schon lange bekannter Prozess. Daneben ist durch Anwendung hohen Drucks ebenfalls eine Denaturierung von Proteinen möglich, die beispielsweise wie auch die Pasteurisierung zu einer längeren Haltbarkeit von Lebensmitteln genutzt werden kann. Desweiteren verursacht nicht nur Hitze, sondern auch Kälte einen Übergang von nativem zu denaturiertem Protein.

Ausgehend von einem Zwei-Zustands-Modell, bei dem ein Protein nur in *einem* nativen sowie *einem* denaturierten Zustand existiert, beschreibt das Stabilitätsdiagramm von Proteinen in Abhängigkeit von Temperatur und Druck eine Ellipse. Aus diesem elliptischen Phasendiagramm lassen sich eine Reihe thermodynamischer Parameter ermitteln. Dazu zählen die Differenzen von isothermer Kompressibilität, isobarem thermischen Ausdehnungskoeffizient und Wärmekapazität zwischen denaturiertem und nativen Zustand, die als konstant betrachtet werden. Daneben ist die Bestimmung der Differenzen von Entropie und Volumen, die mit der Entfaltung verbunden sind, an beliebigen Punkten des Phasendiagramms möglich.

Zum Ausmessen von Phasendiagrammen wird in dieser Arbeit die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie herangezogen. Es ist davon auszugehen, dass sich die Fluoreszenzeigenschaften eines Chromophors beim Phasenübergang charakteristisch ändern. Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Techniken ist die hohe Empfindlichkeit der Fluoreszenzspektroskopie. Für die Bestimmung eines Phasendiagramms ist die Durchführung von Temperaturdenaturierungen unter verschiedenen Drücken sowie von Druckdenaturierungen bei verschiedenen Temperaturen in einem ausreichend großen Bereich notwendig.

Für die Experimente wurde ein Cytochrom *c*-Protein mit einem modifizierten Zn-Mesoporphyrin-Chromophor verwendet. Die Anregung erfolgte über die Soret-Bande. Zur Auswertung wurde die Abhängigkeit von Zentrum und Breite der Q_x - Q_y -(00)-Fluoreszenzbande von Druck bzw. Temperatur betrachtet. Sowohl die Methode der Druckdenaturierung als auch die der Temperaturdenaturierung scheint dabei ein generelles Muster zu erzeugen.

- Solange Druck oder Temperatur lediglich mäßig erhöht werden, zeigen sich nur geringe Veränderungen in den spektralen Eigenschaften. So ist für beide Methoden eine geringe Rotverschiebung des Zentrums sowie eine geringe Zunahme in der Breite der Bande zu verzeichnen.
- Dies ändert sich allerdings ab bestimmten Werten für die Parameter Druck und Temperatur. Ab diesen Werten wird die Rotverschiebung der Bande in eine deutlich stärkere Blauverschiebung umgewandelt. Diese Blauverschiebung erstreckt sich in beiden Fällen über mehrere Nanometer. Gleichzeitig kommt es im Verlauf der Bandenbreite zu einem typischen Verhalten. Bei Druckdenaturierungen steigt diese stark an, durchläuft ein Maximum und nimmt anschließend wieder ab. Bei Temperaturdenaturierungen ist ebenfalls eine größere Zunahme in der Bandenbreite zu erkennen, die sich jedoch ab einem bestimmten Wert wieder abschwächt.
- Für noch höhere Drücke bzw. Temperaturen wird die Blauverschiebung wieder deutlich schwächer oder geht wiederum in eine Rotverschiebung über. Gleichzeitig nimmt die Breite der Bande wieder ab oder steigt für den Fall der Temperaturdenaturierungen nur noch gering an.

Die Denaturierungen lassen sich also in drei Abschnitte einteilen. Die Veränderungen in den spektralen Eigenschaften können Änderungen in den Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff im Protein und seiner Umgebung zugeordnet werden.

- Die Rotverschiebung im ersten Abschnitt ist für Druckdenaturierungen auf eine Verstärkung der Lösungsmittelverschiebung zurückzuführen, da mit dem

Druck auch die Dichte erhöht wird. Hierbei handelt es sich um dispersive Wechselwirkungen. Im Fall der Temperaturdenaturierungen ist die Rotverschiebung darauf zurückzuführen, dass eine erhöhte Temperatur gemäß der Boltzmannverteilung die Besetzung höherer Schwingungsniveaus zulässt und sich die Energiedifferenzen zwischen elektronischen Zuständen gleicher Schwingungsniveaus verringern.

- Die Blauverschiebung im zweiten Abschnitt kann nur durch das Auftreten starker elektrostatischer Wechselwirkungen erklärt werden. Offensichtlich wird in beiden Denaturierungsarten die ursprünglich unpolare Umgebung des Chromophors durch einen Prozess deutlich polarer.
- Im dritten Abschnitt ist die Veränderung in den Wechselwirkungen abgeschlossen, da nur noch geringe Änderungen in den spektralen Eigenschaften zu erkennen sind.

Eine plausible Erklärung für die Zunahme elektrostatischer Beiträge zu den Wechselwirkungen ist das Herantreten von polaren Wassermolekülen an den Chromophor. Offensichtlich ist der Blauverschiebungsbereich gleichbedeutend mit der Phasentransformation von nativem zu denaturiertem Protein. Dieser Prozess läuft bei der Temperaturdenaturierung jedoch anders ab als bei der Druckdenaturierung. Während bei hoher Temperatur thermische Bewegungen des Proteins zu einer Auf-faltung der Aminosäurekette führen, so dass das Wasser an den nun offenliegenden Chromophor treten kann, wird bei hohem Druck Wasser in das Proteininnere, z.B. in die sich um den Farbstoff herum befindlichen Hohlräume, gepresst. In letzterem Fall bleibt die kompakte Struktur des Proteins vorhanden. Die Annahme von nur einem denaturierten Zustand leuchtet anhand dieser Interpretationen nicht unbedingt ein. Es scheint allerdings möglich zu sein, über das sogenannte “state-lumping” beide denaturierte Zustände zu *einem* Bereich in der Energielandschaft von Proteinen zusammenzufügen, so dass ein “effektives Zwei-Zustands-Modell” mit nur zwei relevanten Zuständen entsteht.

Das vollständige Phasendiagramm von Zn-Mesoporphyrin-Cytochrom c ließ sich mit den Werten für Denaturierungsdruck und -temperatur ermitteln, die aus den jeweiligen Mittelpunkten der Blauverschiebungsbereiche oder anhand der charakteristischen Änderungen in der Bandenbreite bestimmt wurden. Um ein geschlossenes Phasendiagramm zu erhalten, war hierzu auch der Wert aus einer Kältedenaturierung notwendig.

Die mit dem Denaturierungsvorgang verknüpften Änderungen in den thermodynamischen Parametern konnten durch eine Kombination aus Berechnungen der Gleichgewichtskonstanten und den Zusammenhängen des elliptischen Stabilitätsdia-

gramms ermittelt werden.

Jede spektroskopische Technik ist lediglich in der Lage, lokale Änderungen in der Struktur zu betrachten. Bei der Bewertung der Aussagekraft der Änderungen in der Fluoreszenz für die Veränderungen in der Proteinstruktur stellt sich die Frage, wie weit das Wechselwirkungsvolumen des Chromophors reicht.

Die Abschätzung des Wechselwirkungsradius des zuvor in Denaturierungsexperimenten verwendeten Farbstoffs ist über die Messung des "Druck-Effekts" spektraler Löcher möglich. Im Gegensatz zu den Denaturierungsexperimenten, die bei Temperaturen zwischen -10 und 90°C sowie Drücken bis 1,5 GPa durchgeführt wurden, fanden die "Druck-Effekt"-Messungen bei Heliumtemperatur sowie Drücken bis maximal 2 MPa statt.

Aus den Werten der Kompressibilität, dem mittleren Verschiebungsquadrat, der inhomogenen Linienbreite sowie dem Mittelwert der spektralen Verschiebung lässt sich eine Beziehung aufstellen, mit der sich der Wechselwirkungsradius abschätzen lässt. Für den Chromophor im Zn-Mesoporphyrin-Cytochrom c wird ein Wert von 4,5 Å erhalten.

Dieser Wechselwirkungsradius ist deutlich kleiner als die Abmessungen des Proteins. Er ist allerdings auch als untere Grenze anzusehen, da sich die Bestimmung der inhomogenen Linienbreite durch eine Überlagerung verschiedener Banden schwierig gestaltete. In jedem Fall bestätigt der Wert jedoch, dass die Wassermoleküle während des Denaturierungsprozesses sehr nahe an den Chromophor herantreten müssen, um eine Änderung im Fluoreszenzspektrum zu bewirken.

Anhang A

Abkürzungen

A/D	analog/digital
BPTI	bovine pancreatic trypsin inhibitor
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
C_p	Wärmekapazität bei konstantem Druck
CCD	charge coupled device
CD	Circulardichroismus
$ D\rangle$	denaturierter Zustand eines Proteins
DAC	diamond anvil cell; Diamantambosszelle
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E	innere Energie
$f(\nu' \nu, \Delta p)$	Wahrscheinlichkeit, daß ein bei ν absorbierendes Molekül durch Druckänderung Δp nach ν' verschoben wird
fwhm	full width at half maximum; Halbwertsbreite
FT IR	Fourier-transformierte Infrarot...
$g(\vec{R})$	Verteilungsfunktion der Position eines Lösungsmittelmoleküls bzgl. eines Farbstoffmoleküls
G	Gibbs'sche Freie Enthalpie
h	Plancksche Konstante
H	Enthalpie
$I(\nu)$	Verteilung der Frequenzverschiebungen ν
k_B	Boltzmannfaktor
K	Gleichgewichtskonstante
m_i	Massen der Proteinbausteine
n	Exponent der Abstandsabhängigkeit der Chromophor-Matrix-Wechselwirkung
N	Anzahl der mit einem Farbstoffmolekül wechselwirkenden Lösungsmittelmoleküle
$ N\rangle$	nativer Zustand eines Proteins
NMR	nuclear magnetic resonance; magnetische Kernspinresonanz
p_c	Druck am Mittelpunkt der Druckdenaturierung

p_D	Anteil denaturierter Proteinmoleküle
p_N	Anteil nativer Proteinmoleküle
$P(\vec{R}_1, \dots, \vec{R}_N)$	Verteilungsfunktion der Positionen von N Lösungsmittelmolekülen bzgl. eines Farbstoffmoleküls
PBBO	2-(4-Biphenyl)-6-phenyl-benzoxazol-1,3
PDB	Protein Data Bank
PM	Photomultiplier
PMMA	Polymethylmethacrylat
Q	Ordnungsparameter der Faltung
r_c	Koordinaten des Schwerpunkts
r_i	Koordinaten eines Proteinbausteins
\vec{R}	Position eines Lösungsmittelmoleküls bzgl. eines Farbstoffmoleküls
R_g	Gyrationsradius
RNA	Ribonucleinsäure
s_p	Druckverschiebung
S	Entropie
S_1, S_2, \dots	Singulett-Zustände
SAXS	small angle X-ray scattering; Röntgenkleinwinkelstreuung
T	Temperatur
T_c	Temperatur am Mittelpunkt der Temperaturdenaturierung
T_1, T_2, \dots	Triplett-Zustände
T_1	Energierelaxationszeit
T_2	Lebensdauer der Kohärenz des angeregten Zustands
T_2^*	Phasenrelaxationszeit
U	entfalteter Zustand eines Proteins
V	Volumen (z.B. der mit einem Farbstoffmolekül wechselwirkenden Matrix)
$\langle x^2 \rangle$	mittleres Verschiebungsquadrat
XeCl	Xenonchlorid (Excimerlaser)
α	Debye-Waller-Faktor
α	isobarer thermischer Ausdehnungskoeffizient
$\hat{\alpha}$	isobarer thermischer Ausdehnungskoeffizient (nicht volumenbezogen)
β	isotherme Kompressibilität (nicht volumenbezogen)
γ	homogene Linienbreite
Δp	Druckänderung im "Druck-Effekt"-Experiment
$\eta(\vec{R})$	linearer Entwicklungskoeffizient der Frequenzverschiebung $\nu' - \nu$ aufgrund der Druckänderung Δp
κ	isotherme Kompressibilität
λ_c	Mittelwert der Wellenlänge im Übergangsbereich
λ_D	Wellenlänge des denaturierten Zustands
λ_{max}	Zentrum einer Fluoreszenzbande (1. Moment)

λ_N	Wellenlänge des nativen Zustands
ν_B	Brennfrequenz
ν_{vac}	Vakuumfrequenz (Druckeffekt)
ν_0	Absorptionsmaximum
ρ^2	Korrelationsgrad zwischen $\eta(\vec{R})$ und $\nu(\vec{R})$
ρ^*	inverses Prigogine-Defay-Verhältnis
σ_p	Druckverbreiterung
σ_0	inhomogene Bandenbreite

Literaturverzeichnis

- [1] C. L. Brooks III.
„Protein folding: With a little help...“
Nature, **420**, 33–34 (2002).
- [2] C. M. Dobson.
„Getting out of shape.“
Nature, **418**, 729–730 (2002).
- [3] P. W. Bridgman.
„The coagulation of albumen by pressure.“
J. Biol. Chem., **19**, 511–512 (1914).
- [4] D. Knorr, A. Böttcher, H. Dörnenburg *et al.*.
„High pressure effects on microorganisms, enzyme activity and food functionality.“
In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans und P. Masson (Hg.), „High Pressure and Biotechnology,“ 211–218. INSERM, John Libbey Eurotext, London (1992).
- [5] J.-C. Cheftel.
„Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview.“
In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans und P. Masson (Hg.), „High Pressure and Biotechnology,“ 195–209. INSERM, John Libbey Eurotext, London (1992).
- [6] A. L. Lehninger.
Biochemie.
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1985).
- [7] C. K. Mathews, K. E. van Holde und K. G. Ahern.
Biochemistry.
Addison Wesley Longman, San Francisco (2000).
- [8] C. M. Dobson, A. Šali und M. Karplus.

- „Proteinfaltung aus theoretischer und experimenteller Sicht.“
Angew. Chem., **110**, 908–935 (1998).
- [9] G. I. Makhatadze und P. L. Privalov.
„Energetics of protein structure.“
Adv. Prot. Chem., **47**, 307–425 (1995).
- [10] G. Strobl.
The physics of polymers: concepts for understanding their structures and behavior.
Springer, Berlin, zweite Auflage (1997).
- [11] L. Pollack, M. W. Tate, A. C. Finnerock *et al.*.
„Time resolved collapse of a folding protein observed with small angle X-ray scattering.“
Phys. Rev. Lett., **86**, 4962–4965 (2001).
- [12] C. Levinthal.
„Are there pathways for protein folding?“
J. Chim. Phys., **65**, 44–45 (1968).
- [13] K. A. Dill und H. S. Chan.
„From Levinthal to pathways to funnels.“
Nat. Struct. Biol., **4**, 10–19 (1997).
- [14] J. D. Bryngelson, J. N. Onuchic, N. D. Socci und P. G. Wolynes.
„Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis.“
Proteins: Structure, Function, and Genetics, **21**, 167–195 (1995).
- [15] P. G. Wolynes, J. N. Onuchic und D. Thirumalai.
„Navigating the folding routes.“
Science, **267**, 1619–1620 (1995).
- [16] O. B. Ptitsyn, R. H. Pain, G. V. Semisomov, E. Zerovnik und O. I. Razgulysev.
„Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding.“
FEBS Lett., **262**, 20–24 (1990).
- [17] D. Eliezer, P. A. Jennings, P. E. Wright *et al.*.
„The radius of gyration of an apomyoglobin folding intermediate.“
Science, **270**, 487–488 (1995).
- [18] M. Ikeguchi, M. Kuwajima, M. Mitani und S. Sugai.

- „Evidence for identity between the equilibrium unfolding intermediate and a transient folding intermediate: a comparative study of the folding reactions of alpha-lactalbumin and lysozyme.“
Biochemistry, **25**, 6965–6972 (1986).
- [19] A. D. Miranker und C. M. Dobson.
„Collapse and cooperativity in protein folding.“
Curr. Opin. Struct. Biol., **6**, 31–42 (1996).
- [20] A. R. Fersht.
„Protein folding and stability: the pathway of folding of barnase.“
FEBS Lett., **325**, 5–16 (1993).
- [21] C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela und F. H. White.
„The kinetics of formation of a native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **58**, 1309–1314 (1961).
- [22] C. B. Anfinsen.
„Principles that govern the folding of protein chains.“
Science, **181**, 223–230 (1973).
- [23] S. Walter und J. Buchner.
„Molekulare Chaperone: zelluläre Maschinen für die Proteinfaltung.“
Angew. Chem., **114**, 1142–1158 (2002).
- [24] F. U. Hartl und M. Hayer-Hartl.
„Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein.“
Science, **295**, 1852–1858 (2002).
- [25] R. J. Ellis.
„Molecular chaperones: Plugging the transport gap.“
Nature, **421**, 801–802 (2003).
- [26] S. B. Prusiner.
„Prions.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 13363–13383 (1998).
- [27] Y. O. Chernoff, S. L. Lindquist, B. Ono, S. G. Inge-Vechtomov und S. W. Liebman.
„Role of the chaperone protein Hsp 104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+].“
Science, **268**, 880–884 (1995).

- [28] J. Couzin.
„Harmless proteins twist into troublemakers.“
Science, **296**, 28–29 (2002).
- [29] R. J. Ellis und T. J. T. Pinheiro.
„Danger– misfolding proteins.“
Nature, **416**, 483–484 (2002).
- [30] M. Bucciantini, E. Giannoni, F. Chiti *et al.*.
„Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein mis-
folding diseases.“
Nature, **416**, 507–511 (2002).
- [31] E. Gazit.
„Korrekt gefaltete Proteine - ein metastabiler Zustand?“
Angew. Chem., **114**, 267–269 (2002).
- [32] K. Heremans und L. Smeller.
„Protein structure and dynamics at high pressure.“
Biochim. Biophys. Acta, **1386**, 353–370 (1998).
- [33] S. A. Hawley.
„Reversible pressure–temperature denaturation of chymotrypsinogen.“
Biochemistry, **10**, 2436–2442 (1971).
- [34] N. A. Clark.
„Thermodynamics of the re–entrant nematic–bilayer smectic A transition.“
Journal de Physique, **40**, 345–349 (1979).
- [35] F. M. Richards.
„Packing defects, cavities, volume fluctuations and access to the interior of
proteins.“
Carlsberg Res. Commun., **44**, 47–63 (1979).
- [36] H. Frauenfelder, N. A. Alberding, A. Ansari *et al.*.
„Proteins and pressure.“
J. Phys. Chem., **94**, 1024–1037 (1990).
- [37] J. L. Silva, D. Foguel und C. A. Royer.
„Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure.“
TRENDS in Biochemical Sciences, **26**, 612–618 (2001).
- [38] J. L. Silva und G. Weber.
„Pressure stability of proteins.“

- Annu. Rev. Phys. Chem.*, **44**, 89–113 (1993).
- [39] L. Smeller.
„Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules.“
Biochim. Biophys. Acta, **1595**, 11–29 (2002).
- [40] D. D. Klug und E. Whalley.
„Elliptic phase boundaries between smectic and nematic phases.“
J. Chem. Phys., **71**, 1874–1877 (1979).
- [41] E.-J. Donth.
Relaxation and thermodynamics in polymers. Glass transition.
Akademie Verlag, Berlin (1992).
- [42] R. L. Baldwin.
„Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 8069–8072 (1986).
- [43] R. L. Baldwin und N. Muller.
„Relation between the convergence temperatures T_h and T_s in protein unfolding.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 7110–7113 (1992).
- [44] W. Kauzmann.
„Thermodynamics of unfolding.“
Nature, **325**, 763–764 (1987).
- [45] G. Hummer, S. Garde, A. E. García, M. E. Paulaitis und L. R. Pratt.
„The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 1552–1555 (1998).
- [46] G. Hummer, S. Garde, A. E. García, M. E. Paulaitis und L. R. Pratt.
„Hydrophobic effects on a molecular scale.“
J. Phys. Chem. B, **102**, 10469–10482 (1998).
- [47] G. Hummer, L. R. Pratt und A. E. García.
„Molecular theories and simulation of ions and polar molecules in water.“
J. Phys. Chem., **102**, 7885–7895 (1998).
- [48] G. W. Robinson und C. H. Cho.
„Role of hydration water in protein unfolding.“
Biophys. J., **77**, 3311–3318 (1999).

- [49] V. V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson und C. Balny.
„High Pressure Effects on Protein Structure and Function.“
Proteins: Structure, Function, and Genetics, **24**, 81–91 (1996).
- [50] O. Heinisch, E. Kowalski, K. Goossens *et al.*.
„Pressure effects on the stability of lipoxygenase: Fourier transform-infrared spectroscopy (FTIR) and enzyme activity studies.“
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **201**, 562–565 (1995).
- [51] G. Panick, R. Malessa, R. Winter *et al.*.
„Structural characterization of the pressure-denatured state and unfolding/refolding kinetics of staphylococcal nuclease by synchrotron small-angle x-ray scattering and fourier-transform infrared spectroscopy.“
J. Mol. Biol., **275**, 389–402 (1998).
- [52] F. Meersman, L. Smeller und K. Heremans.
„Comparative Fourier transform infrared spectroscopy study of cold-, pressure-, and heat-induced unfolding and aggregation of myoglobin.“
Biophys. J., **82**, 2635–2644 (2002).
- [53] A. W. P. Vermeer und W. Norde.
„The thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein.“
Biophys. J., **78**, 394–404 (2000).
- [54] S. I. Blaber, J. F. Culajay, A. Khurana und M. Blaber.
„Reversible thermal denaturation of human FGF-1 induced by low concentrations of guanidine hydrochloride.“
Biophys. J., **77**, 470–477 (1999).
- [55] H. Li, H. Yamada und K. Akasaka.
„Effect of pressure on the tertiary structure and dynamics of folded basic pancreatic trypsin inhibitor.“
Biophys. J., **77**, 2801–2812 (1999).
- [56] C. A. Royer, A. P. Hinck, S. N. Loh *et al.*.
„Effect of amino acid substitutions on the pressure denaturation of staphylococcal nuclease as monitored by fluorescence and nuclear magnetic resonance spectroscopy.“
Biochemistry, **32**, 5222–5232 (1993).
- [57] K. Heremans, K. Goossens und L. Smeller.

- „Pressure-tuning spectroscopy of proteins: Fourier transform infrared studies in the diamond anvil cell.“
In J. L. Markley, D. B. Northrop und C. A. Royer (Hg.), „High-Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology,“ Kapitel 4, 44–61. Oxford University Press, New York (1996).
- [58] R. Malessa, G. Panick, R. Winter und K. Heremans.
„Pressure-induced denaturation and gel formation of β -Lactoglobulin A/B.“
In K. Heremans (Hg.), „High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology,“ 419–422. Leuven University Press, Leuven (1997).
- [59] K. Goossens, L. Smeller, J. Frank und K. Heremans.
„Pressure-tuning the conformation of bovine pancreatic trypsin inhibitor studied by Fourier-transform infrared spectroscopy.“
Eur. J. Biochem., **236**, 254–262 (1996).
- [60] W. Schmidt.
Optische Spektroskopie.
Wiley-VCH, Weinheim (2000).
- [61] H. Frauenfelder.
„From atoms to biomolecules.“
Helv. Phys. Acta, **57**, 165–187 (1984).
- [62] J. Friedrich.
„Hole burning spectroscopy and the physics of proteins.“
Methods Enzymol., **246**, 226–259 (1995).
- [63] R. Jankoviak, J. M. Hayes und G. J. Small.
„Spectral hole burning spectroscopy in amorphous molecular solids and proteins.“
Chem. Rev., **93**, 1471–1502 (1993).
- [64] H. Neubacher und W. Lohmann.
„Anwendung der Spektralphotometrie im UV- und sichtbaren Bereich.“
In W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl und H. Ziegler (Hg.), „Biophysik,“ 106–116. Springer, Berlin, zweite Auflage (1982).
- [65] A. Zipp und W. Kauzmann.
„Pressure denaturation of metmyoglobin.“
Biochemistry, **12**, 4217–4228 (1973).
- [66] K. Ruan, R. Lange, Y. Zhou und C. Balny.

- „Unusual effect of high hydrostatic pressure on basic phospholipase A₂ from venom of *Agkistrodon halys pallas*.“
Biochemical and Biophysical Research Communications, **249**, 844–848 (1998).
- [67] K. Ruan, S. Tian, R. Lange und C. Balny.
„Pressure effects on tryptophan and its derivatives.“
Biochemical and Biophysical Research Communications, **269**, 681–686 (2000).
- [68] G. J. A. Vidugiris, D. M. Truckses, J. L. Markley und C. A. Royer.
„High-pressure denaturation of staphylococcal nuclease proline-to-glycine substitution mutants.“
Biochemistry, **35**, 3857–3864 (1996).
- [69] G. Weber und H. G. Drickamer.
„The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules.“
Q. Rev. Biophys., **16**, 89–112 (1983).
- [70] T. M. Li, J. W. Hook, H. G. Drickamer und G. Weber.
„Plurality of pressure-denatured forms in lysozyme and chymotrypsinogen.“
Biochemistry, **15**, 5571–5580 (1976).
- [71] V. L. Valente-Mesquita, M. M. Botelho und S. T. Ferreira.
„Pressure-induced subunit dissociation and unfolding of dimeric β -lactoglobulin.“
Biophys. J., **75**, 471–476 (1998).
- [72] G. Panick, G. J. A. Vidugiris, R. Malessa *et al.*.
„Exploring the temperature-pressure phase diagram of staphylococcal nuclease.“
Biochemistry, **38**, 4157–4164 (1999).
- [73] H. Herberhold, S. Marchal, R. Lange *et al.*.
„Characterization of the pressure-induced intermediate and unfolded state of red-shifted green fluorescent protein – a static and kinetic FTIR, UV/VIS and fluorescence spectroscopy study.“
J. Mol. Biol., **330**, 1153–1164 (2003).
- [74] J. Friedrich und D. Haarer.
„Photochemisches Lochbrennen und optische Relaxationsspektroskopie in Polymeren und Gläsern.“
Angew. Chem., **96**, 96–123 (1984).
- [75] A. A. Gorokhovskii, R. K. Kaarli und L. A. Rebane.

- „Hole burning in the contour of a pure electronic line in a shpol'skiĭ system.“
JETP Lett., **20**, 216–218 (1974).
- [76] B. M. Kharlamov, R. I. Personov und L. A. Bykovskaya.
„Stable “gap” in absorption spectra of solid solutions of organic molecules by laser irradiation.“
Opt. Commun., **12**, 191–193 (1974).
- [77] J. Gafert, J. Friedrich und F. Parak.
„A comparative pressure tuning hole burning study of protoporphyrin IX in myoglobin and in a glassy host.“
J. Chem. Phys., **99**, 2478–2486 (1993).
- [78] B. B. Laird und J. L. Skinner.
„Microscopic theory of reversible pressure broadening in hole-burning spectra of impurities in glasses.“
J. Phys. Chem., **90**, 3274–3281 (1989).
- [79] G. Gradl, A. Feis und J. Friedrich.
„Pressure tuning of spectral holes in organic crystalline materials: irreversible effects.“
J. Chem. Phys., **97**, 5403–5409 (1992).
- [80] P. Schellenberg, J. Friedrich und J. Kikas.
„Spectral hole burning in polymorphic systems: single site pressure phenomena and glassy behavior.“
J. Chem. Phys., **100**, 5501–5507 (1994).
- [81] F. Parak, H. Hartmann, K. D. Aumann *et al.*.
„Low temperature X-ray investigation of structural distributions in myoglobin.“
Eur. Biophys. J., **15**, 237–249 (1987).
- [82] H. Frauenfelder, G. A. Petsko und D. Tsernoglou.
„Temperature-dependent x-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics.“
Nature, **280**, 558–563 (1979).
- [83] H. Hartmann, W. Steigemann, H. Reuscher und F. Parak.
„Structural disorder in proteins. a comparison of myoglobin and erythrocyruin.“
Eur. Biophys. J., **19**, 337–348 (1987).

- [84] P. Geissinger.
Lochbrennspektroskopie in dotierten, festen Edelgasmatrizen: Druck-, Temperatur- und Korrelationseffekte.
Dissertation, Universität Bayreuth (1994).
- [85] T. Yamato, J. Higo, Y. Seno und N. Go.
„Conformational deformation in deoxymyoglobin by hydrostatic pressure.“
Proteins: Structure, Function, and Genetics, **16**, 327–340 (1993).
- [86] B. Gavish, E. Gratton und C. J. Hardy.
„Adiabatic compressibility of globular proteins.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 750–754 (1983).
- [87] J. Zollfrank und J. Friedrich.
„Pressure shift and solvent shift: A hole-burning study of resorufin-doped glasses.“
J. Phys. Chem., **96**, 7889–7895 (1992).
- [88] K. Gekko und H. Noguchi.
„Compressibility of globular proteins in water at 25°C.“
J. Phys. Chem., **83**, 2706–2714 (1979).
- [89] J. Schlichter.
Strukturdynamik von Proteinen bei tiefen Temperaturen - anomale Diffusion im Konformationsraum.
Dissertation, Technische Universität München (2001).
- [90] G. W. Bushnell, G. V. Louie und G. D. Brayer.
„High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c.“
J. Mol. Biol., **214**, 585–595 (1990).
- [91] J. M. Vanderkooi, F. Adar und M. Erecinska.
„Metallocytochrome c: characterization of electronic and emission spectra of Sn and Zn cytochromes c.“
Eur. J. Biochem., **64**, 381–387 (1976).
- [92] H. Anni, J. M. Vanderkooi und L. Mayne.
„Structure of zinc-substituted cytochrome c: Nuclear magnetic resonance and optical spectroscopic studies.“
Biochemistry, **34**, 5744–5753 (1995).
- [93] M. I. Eremets.
High pressure experimental methods.
Oxford University Press, Oxford (1996).

- [94] N. S. Bayliss.
„The effect of the electrostatic polarization of the solvent on electronic absorption spectra in solution.“
J. Chem. Phys., **18**, 292–296 (1950).
- [95] N. S. Bayliss und E. G. McRae.
„Solvent effects in organic spectra: Dipole forces and the Franck-Condon principle.“
J. Phys. Chem., **58**, 1002–1006 (1954).
- [96] W. Liptay.
„Dipole moments and polarizabilities of molecules in excited states.“
In E. C. Lim (Hg.), „Excited States,“ Band 1, 129–229. Academic Press, New York (1974).
- [97] J. N. Israelachvili.
Intermolecular and surface forces.
Academic Press, London (1994).
- [98] H. Frauenfelder, F. Parak und R. D. Young.
„Conformational substates in proteins.“
Ann. Rev. Biophys. Chem., **17**, 451–479 (1988).
- [99] M. Köhler, J. Friedrich und J. Fidy.
„Proteins in electric fields and pressure fields: basic aspects.“
Biochim. Biophys. Acta, **1386**, 255–288 (1998).
- [100] J. Zollfrank und J. Friedrich.
„Spectral holes under pressure: proteins and glasses.“
J. Opt. Soc. Am. B, **9**, 956–961 (1992).
- [101] W. Liptay.
„Die Beeinflussung der optischen Absorption von Molekülen durch ein äußeres elektrisches Feld. III. Berücksichtigung der direkten Feldstärkeabhängigkeit des Übergangsmoments und des inneren Feldes in einer Lösung.“
Z. Naturforsch., **20a**, 272–289 (1965).
- [102] G. J. A. Vidugiris, J. L. Markley und C. A. Royer.
„Evidence for a molten globule-like transition state in protein folding from determination of activation volumes.“
Biochemistry, **34**, 4909–4912 (1995).
- [103] G. J. A. Vidugiris und C. A. Royer.

- „Determination of the volume changes for pressure-induced transitions of apomyoglobin between the native, molten globule, and unfolded states.“
Biophys. J., **75**, 463–470 (1998).
- [104] M. Jacob, M. Geeves, G. Holtermann und F. X. Schmid.
„Diffusional barrier crossing in a two-state protein folding reaction.“
Nat. Struct. Biol., **6**, 923–926 (1999).
- [105] M. Jacob, G. Holtermann, D. Perl *et al.*.
„Microsecond folding of the cold shock protein measured by a pressure jump technique.“
Biochemistry, **38**, 2882–2891 (1999).
- [106] J. Zollfrank, J. Friedrich und F. Parak.
„Spectral hole burning study of protoporphyrin IX substituted myoglobin.“
Biophys. J., **61**, 716–724 (1992).
- [107] D. P. Nash und J. Jonas.
„Structure of pressure-assisted cold denatured lysozyme and comparison with lysozyme folding intermediates.“
Biochemistry, **36**, 14375–14383 (1997).
- [108] J. Zollfrank, J. Friedrich, J. Fidy und J. M. Vanderkooi.
„Photochemical holes under pressure: Compressibility and volume fluctuations.“
J. Chem. Phys., **94**, 8600–8603 (1991).
- [109] J. Friedrich, J. Gafert, J. Zollfrank, J. M. Vanderkooi und J. Fidy.
„Spectral hole burning and selection of conformational substates in chromoproteins.“
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 1029–1033 (1994).
- [110] L. Smeller und K. Heremans.
„Some thermodynamic and kinetic consequences of the phase diagram of protein denaturation.“
In K. Heremans (Hg.), „High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology,“ 55–58. Leuven University Press, Leuven, Belgium (1997).
- [111] P. L. Privalov.
„Stability of proteins.“
Adv. Prot. Chem., **33**, 167–241 (1979).
- [112] P. L. Privalov und S. J. Gill.

- „Stability of protein structure and hydrophobic interaction.“
Adv. Prot. Chem., **39**, 191–234 (1988).
- [113] H. Frauenfelder, S. G. Sligar und P. G. Wolynes.
„The energy landscape and motions in proteins.“
Science, **254**, 1598–1603 (1991).
- [114] V. M. Agranovich und R. M. Hochstrasser.
Spectroscopy and excitation dynamics of condensed molecular systems.
North Holland, Amsterdam (1983).
- [115] A. P. Demchenko.
„Red-edge-excitation fluorescence spectroscopy of single-tryptophan proteins.“
Eur. Biophys. J., **16**, 121–129 (1988).
- [116] J. R. Lakowicz.
Principles of fluorescence spectroscopy.
Kluwer Academic Plenum Publishers, New York (1999).
- [117] H. Lesch, H. Stadlbauer, J. Friedrich und J. M. Vanderkooi.
„Stability diagram and unfolding of a modified cytochrome c: What happens
in the transformation regime?“
Biophys. J., **82**, 1644–1653 (2002).
- [118] J. Schlichter, K.-D. Fritsch, J. Friedrich und J. M. Vanderkooi.
„Confomational dynamics of a low temperature protein: Free base cytochrome
c.“
J. Chem. Phys., **6**, 3229–3234 (1999).
- [119] J. W. Gafert.
*Festkörpereigenschaften von Chromoproteinen: Eine Untersuchung mit ver-
schiedenen Varianten der Lochbrenn-Spektroskopie*.
Dissertation, Universität Bayreuth (1994).
- [120] M. J. Köhler.
*Chromophor-Protein-Wechselwirkungen: Lochbrennspektroskopie an Hämpro-
teinen*.
Dissertation, Technische Universität München (1998).
- [121] V. M. Dadarlat und C. B. Post.
„Insights into protein compressibility from molecular dynamics simulations.“
J. Phys. Chem. B, **105**, 715–724 (2001).

- [122] M. Stübner, C. Hecht und J. Friedrich.
„Labeling proteins via hole burning of their aromatic amino acids: Pressure tuning spectroscopy of BPTI.“
Biophys. J., **83**, 3553–3557 (2002).
- [123] H. Lesch, J. Schlichter, J. Friedrich und J. M. Vanderkooi.
„Molecular probes: What is the range of their interaction with the environment?“
Biophys. J. (2004).
Akzeptiert.
- [124] E. S. Manas, W. W. Wright, K. A. Sharp, J. Friedrich und J. M. Vanderkooi.
„The influence of protein environment on the low temperature electronic spectroscopy of Zn-substituted cytochrome c.“
J. Phys. Chem. B, **104**, 6932–6941 (2000).

Nachwort

Abschließend möchte ich natürlich allen danken, die zum Gelingen meiner Arbeit und zu einem sehr angenehmen Arbeitsklima hier am Lehrstuhl für Physik Weihenstephan beigetragen haben.

Großen Dank schulde ich Prof. Friedrich für das interessante Thema und seine angenehme Art, Doktoranden in ihrer Arbeit zu unterstützen. Er hat den Fortgang des Projekts stets mit umfangreichem Rat begleitet und in den Zeiten, als “zu wenig vorwärts ging”, immer motivierend auf mich eingewirkt.

Sehr dankbar bin ich auch den Mit-Doktoranden, die mich die längste Zeit hier am Lehrstuhl begleitet haben: Martin Pinsker, Jörg Schlichter und Markus Stübner. Sie alle haben mich im Laborbetrieb tatkräftig und geduldig unterstützt. Martin danke ich für seine Hilfe bei allem, was mit Computern zu tun hat. Insbesondere beim zweiten Teil meiner Experimente haben mir Jörg und Markus gezeigt, wo es beim Lochbrennen und dem zugehörigen Druckeffekt langgeht.

Zusätzlich zu den zuvor genannten Kollegen danke ich Alfred Sigl und Christoph Schnell für die zahlreichen Diskussionen über Physik, Chemie, Biologie und das Leben an sich.

Gerade beim Zusammenschreiben der Arbeit greife ich nun häufig auf die Textkenntnisse von Christoph Hecht zurück. Auch eine Wissenschaft für sich. Ein Dankeschön dafür, dass mit seiner Hilfe ein Dokument entstehen konnte, das meinen manchmal etwas eigenwilligen Vorstellungen entspricht.

Auch den anderen Wissenschaftlern, Armin Forster, Christina Scharnagl, Johannes Wiedersich, Mark Somoza, Tarekegn Chimdi Yarimo und Vladimir Ponkratov danke ich für die vielfältige Unterstützung in Wissenschaft und die interessanten Gespräche, auch außerhalb der Universität. Dazu kommen auch noch Axel Parbel, Hans Stadlbauer und Jürgen Friebel, die in der Anfangszeit noch am Lehrstuhl waren. Und natürlich möchte ich an Andy Fräbel und Bianca Klein erinnern, die durch jenen tragischen Verkehrsunfall aus dem Leben gerissen wurden.

Ein Dankeschön auch an Ludwig Hütt, Konrad Loher, Sepp Skrebsky und Thomas Zeitler, für ihren ausgezeichneten Service in der Werkstatt und bei Elektronikproblemen.

Unserer Sekretärin Erika Bischofs danke ich für die jederzeitige Hilfe und die

angenehme Atmosphäre, die sie in den Arbeitskreis zu bringen versteht.

Vielen Dank auch an Ellen Schneider und Helene Budjarek für ihre Mithilfe in der Chemie, sprich Probenpräparation. Daneben danke ich Ellen, Helene, Erika und Ludwig auch für die interessanten Diskussionen und ihre Großzügigkeiten (Kuchen etc.) bei den verschiedensten Gelegenheiten.

Für die Synthese und Bereitstellung von Proben danke ich dem Arbeitskreis von Prof. Vanderkooi, USA. Daneben bin ich auch der DFG zwecks ihrer finanziellen Förderung der Hochdruck-Forschergruppe und damit letztlich meines Themas zu Dank verpflichtet.

Zum Schluss noch ein Dankeschön an meine Eltern, die mir diese nicht gerade kurze Ausbildung ermöglicht haben.

Außerdem danke ich natürlich Babsi, dass sie mich diese lange Zeit begleitet hat und für ihre Geduld und Unterstützung beim Zusammenschreiben meiner Arbeit.