

Lehrstuhl für Physik Weihenstephan

Lochbrennspektroskopie von Proteinen im UV

Tyrosin als native optische Sonde

Christoph Schnell

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 02.11.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 14.12.2005 angenommen.



Inhaltsverzeichnis

Einleitende Bemerkungen	7
1 Optische Spektroskopie amorpher Festkörper	11
1.1 Linienformen im Festkörper	11
1.2 spektrales Lochbrennen	14
2 Proteine	17
2.1 Die Struktur von Proteinen	17
2.2 Proteinfaltung	19
2.3 Proteine und Lochbrennen	21
2.4 Circulardichroismus von Proteinen	23
3 Technisches	25
3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau und Erfassung der Daten	25
3.2 Lichtquellen	26
3.3 Kryostat	27
3.4 Durchführung der Experimente und Auswertung der Daten . . .	28
4 Hydrostatische Druckexperimente und Kompressibilitäten	33
4.1 Form und Verhalten spektraler Löcher unter Druck	33
4.2 Anwendbarkeit und Interpretation des Modells	37
4.3 Insulin	41
4.3.1 Druck-Effekt	42
4.3.2 Die molekulare Umgebung einzelner Tyrosine	44
4.3.3 chemische Entfaltung von Insulin	48
4.3.4 Die Struktur von Insulin	50
4.4 Vasopressin	53
4.5 Ribonuclease	55
4.5.1 Druck-Effekt	56
4.5.2 chemische Entfaltung von Ribonuclease	60
4.5.3 Die Struktur von Ribonuclease A	64
4.5.4 Diskussion der Druck-Effekt Daten von Ribonuclease A .	65
4.6 Zusammenfassung der Druckexperimente und Schlußfolgerung .	68

5	Homogene Linienbreiten	71
6	Elektrische Felder und Dipolmomente - Stark-Effekt	73
6.1	Spektrale Löcher im elektrischen Feld	73
6.2	Tyrosin	78
6.3	Insulin	81
6.4	Ribonuclease und Vasopressin	83
6.5	Zusammenfassung der Stark-Effekte und Schlußfolgerung	84
	Zusammenfassung	87
	Abkürzungen	89
	Literaturverzeichnis	91

Abbildungsverzeichnis

1.1	Kristalline Festkörper und elektronische Übergänge.	12
1.2	Amorphe Festkörper und elektronische Übergänge.	13
1.3	Chemisches Lochbrennen	14
2.1	Unterscheidbare Chromophor-Matrix Systeme.	22
3.1	Übersichtsschema des Tieftemperatur-Versuchsaufbaus.	25
4.1	Absorptionsspektrum von Insulin	41
4.2	Spektrale Löcher im Spektrum von Insulin.	42
4.3	Frequenzabhängiger Druck-Effekt beim Insulin.	43
4.4	Lösungsmittelverteilung um das Insulinmolekül.	45
4.5	CD-Spektren von Insulin.	48
4.6	CD-Signal im fernen UV von Insulin.	48
4.7	Druck-Effekt am chemisch entfalteten Insulin.	49
4.8	Struktur des Insulinmoleküls.	51
4.9	Absorptionsspektrum von Vasopressin	53
4.10	Druck-Effekt an Vasopressin.	53
4.11	Absorptionsspektrum von Ribonuclease.	55
4.12	Frequenzabhängiger Druck-Effekt an Ribonuclease.	56
4.13	Spektrale Löcher und Druckverschiebung bei Ribonuclease. . . .	57
4.14	Frequenzabhängige Druckverbreiterung bei Ribonuclease.	58
4.15	Spektrale Löcher und Druckverbreiterung bei Ribonuclease. . . .	59
4.16	Druck-Effekt an chemisch entfalteter Ribonuclease.	60
4.17	CD-Spektren 1 Ribonuclease.	61
4.18	CD-Spektren 2 Ribonuclease.	61
4.19	Struktur von Ribonuclease A.	63
5.1	Spektrale Löcher als Funktion der Brenndauer.	71
5.2	Frequenzabhängige Auftragung homogener Linienbreiten.	71
6.1	Geometrische Situation eines Stark-Effekt Experiments.	75
6.2	Verhalten spektraler Löcher in einem Stark-Feld.	76
6.3	pH-abhängiger Stark-Effekt am Tyrosin.	78

6.4	Stark-Effekt am Insulin.	81
6.5	Frequenzabhängiger Trend des Stark-Effekts am Insulin.	82
6.6	Stark-Effekt an RNase A und an Vasopressin.	83

Einleitende Bemerkungen

Sowohl bezüglich ihrer strukturellen wie funktionellen Vielfalt sind Proteine innerhalb der belebten Materie einzigartig und daher ist es kaum verwunderlich, daß sie seit vielen Jahrzehnten Gegenstand intensiver und interdisziplinärer Forschung sind. Wenn in diesem Zusammenhang häufig von den Katalysatoren des Lebens gesprochen wird, so sind meist die *globulären* Proteine gemeint, die praktisch die gesamte chemische Arbeit der Zellen verrichten. Daneben müssen allerdings auch die strukturbildenden *filamentartigen* Proteine erwähnt werden, die eine molekulare Festigkeit und Bewegung ermöglichen.

Einige Proteine benötigen für ihre physiologische Aktivität sogenannte Cofaktoren oder prosthetische Gruppen. Diese zeigen Absorption im sichtbaren Spektralbereich und sorgen beispielsweise für die rote Farbe des Blutes (Hämoglobin) oder das Blattgrün der Pflanzen (Chlorophyll). Der weitaus größeren Zahl von Proteinen fehlen jedoch solche „echten“ funktionellen Chromophore, allerdings sind sie für die optische Spektroskopie im UV-Bereich zugänglich. Dort knapp unterhalb von 300 nm liegt die Absorption der drei aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan.

Betrachtet man Lehrbuchdarstellungen von Proteinstrukturen, so zeigen diese einen hohen Grad an räumlicher Ordnung, und es lassen sich wiederkehrende Strukturmotife erkennen. Man weiß jedoch, daß diese Struktur-Korrelation unterhalb einer Skala von etwa 10^{-1} Å nicht mehr erkennbar ist, und aus diesem Grund können Proteine zumindest näherungsweise auf einer solchen Ebene als ungeordnete (amorphe) Systeme betrachtet werden, die viele Eigenschaften von Gläsern besitzen.

In solchen Materialien befindliche Farbstoffmoleküle erfahren deshalb eine starke Dispersion lokaler Parameter (Einbaulage, Wechselwirkung mit der Matrix), und ihre Spektren zeigen eine *inhomogene* Verbreiterung.

Gewisse Methoden erlauben es, diese matrixinduzierten Unordnungseffekte zu umgehen und die spektrale Auflösung im optischen Experiment um mehrere Größenordnungen, bis in den Bereich der *homogenen* Linienbreite, zu erhöhen.

Eine solche Technik ist das spektrale Lochbrennen. Hierbei werden innerhalb der inhomogen verbreiterten Absorptionsbande Moleküle mit schmalbandigem Laserlicht angeregt. Daraufhin stattfindende photochemische oder photophy-

sikalische Prozesse führen, unter für das Lochbrennen günstigen Voraussetzungen und bei Temperaturen von wenigen Kelvin, zum Ausbleichen der Absorption bei der Anregungswellenlänge. Die Folge ist ein spektrales Loch, das einer resonant absorbierenden Molekülpopulation bei einer festen Frequenz entspricht, und das als empfindlicher optischer Marker verwendet werden kann. Das Verhalten eines solchen Lochs kann als Funktion äußerer Parameter, wie Druck, Temperatur, elektrischem Feld oder Bestrahlungsdauer studiert werden, und es lassen sich verschiedene Systemparameter wie beispielsweise Kompressibilitäten, Vakuumfrequenzen, Lebensdauern und Polarisierbarkeiten aus solchen Experimenten gewinnen. Die Kenntnis solcher Größen erlaubt zudem Rückschlüsse auf molekulare Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Umgebung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Proteine, Insulin und Ribonuclease (RNase), sowie das funktionelle Peptidhormon Vasopressin untersucht. Dabei diente die Aminosäure Tyrosin in allen Fällen als die optische Sonde im Experiment. Während die Technik des spektralen Lochbrennens bereits seit etwa 25 Jahren erfolgreich insbesondere auf Häm-Proteine ¹ angewendet wird, ist die Ausnutzung der aromatischen Absorption von Tyrosin bei 280 nm in diesem Zusammenhang relativ neu. Man ist hierbei auf eine kontinuierlich durchstimmbare Dauerstrich-UV-Lichtquelle angewiesen, und dann bietet die Methode folgende Merkmale:

- Der Bereich der mit dieser Technik zugänglichen Proteine erweitert sich.
- Die Experimente können am nativen Protein durchgeführt werden.
- Eine unterschiedliche Anzahl und Verteilung von Tyrosinen im Protein lässt eine spektrale Unterscheidung *örtlicher* Positionen zu.
- Die gemessenen Eigenschaften repräsentieren *lokale* Parameter, und diese zeigen eine Heterogenität im Protein und an dessen Oberfläche auf.

Verhalten von Proteinen unter Druck

Eine in der Thermodynamik wichtige Zustandsgröße stellt eine Verbindung zwischen Volumen- und Druckänderung eines Materials her, die Kompressibilität κ . Sie ist damit ein Maß für elastische Eigenschaften und Volumenfluktuationen eines Systems, und gerade aus diesem Grund ist die Messung einer solchen Größe an Proteinen von großem Interesse. Dort sind globale und lokale

¹Aufgrund spektroskopischer Anforderungen beim Lochbrennen, können nur leicht modifizierte Häm-Gruppen verwendet werden.

Veränderungen der Konformation die Voraussetzung für praktisch jede katalytische Funktion dieser Moleküle. Als Beispiel sei hier nur die Bindung von Sauerstoff im Hämoglobin genannt.

Die hier optisch bestimmten Kompressibilitäten im Insulin und RNase zeigten erstmals eine Unterscheidbarkeit *innerhalb* des Moleküls. Offenbar lassen sich Tyrosine mit unterschiedlichen Nahumgebungen in einem Druck-Effekt spektral voneinander trennen.

Erst vor wenigen Jahren wurden auch theoretische Konzepte entwickelt, die eine Berechnung solch lokaler Werte für κ um einzelne atomare Positionen gestatten. Sie bilden auch die Grundlage für parallel am Lehrstuhl durchgeführte Molekulardynamik-Simulationen, welche die experimentell gefundenen Daten ergänzen und unterstützen. So ist es möglich Lösungsmittelverteilungen um einzelne Aminosäuren darzustellen, und damit eine molekulare Interpretation für die lokal gemessenen Kompressibilitäten um verschiedene Tyrosine zu liefern.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Experimente zur chemischen Entfaltung von Insulin und RNase, die generell immer mit einer Abnahme der Kompressibilität verbunden sind. In beiden Fällen verlieren die *nur* im nativen Molekül unterscheidbaren Positionen offenbar ihre differenzierte Wechselwirkungsumgebung, und das Protein exponiert große Teile seiner Struktur nach „außen“. Die Messungen an Tyrosin in Wasser-Glycerin sowie an Vasopressin, einem aus lediglich neun Aminosäuren bestehenden Peptid mit einem einzigen Tyrosin, favorisieren eine solche Interpretation ganz wesentlich. Gleichzeitig wird dort im Vergleich deutlich, wie sehr die Proteinumgebung das im Experiment untersuchte Verhalten der einzelnen Chromophore beeinflusst.

Die Empfindlichkeit mit der ein volumetrischer Parameter wie die Kompressibilität auf seine direkte Matrixumgebung reagiert, zeigte sich bei der RNase auch an zwei Experimenten unter verschiedenen, nicht-nativen Bedingungen. Der Verlauf im Druck-Effekt eines oxidativ entfalteten Proteins ist nicht gleich dem des reduktiv entfalteten Moleküls, das nicht mehr über die insgesamt vier kovalenten Schwefelbrücken verfügt. Ein Befund, der sich nicht ohne weiteres aus einem CD-Spektrum schließen lässt, das unter physiologischen Temperaturbedingungen aufgenommen wurde.

Verhalten von Proteinen in äußeren elektrischen Feldern

Ebenso bedeutsam für die biologische Aktivität eines Proteins wie seine flexiblen Volumeneigenschaften sind lokale elektrische Felder, die von polaren oder geladenen Aminosäuren erzeugt werden. Stark-Effekt Studien erlauben prinzipiell einen empirischen Zugang zu relevanten Größen wie dem Di-

polmoment oder der Polarisierbarkeit eines Moleküls. Da hier insgesamt mehr experimentelle Parameter kontrolliert werden müssen (Anregungspolarisation, externes E-Feld), ist die Durchführung und Auswertung solcher Versuche entsprechend schwieriger. Darüber hinaus ist weit weniger über die Elektrostatik solch biologischer Makromoleküle bekannt wie über deren Struktur. Die Idee, daß sich die im Druck-Effekt beobachtete Unterscheidbarkeit auch in einem solchen Experiment zeigen kann, ist aber durchaus gerechtfertigt. Im Fall von Insulin konnten zumindest Hinweise dafür gefunden werden, das dies tatsächlich zutrifft. Bis zu diesem Zeitpunkt existieren keine, den Experimenten komplementären MD-Rechnungen zur Elektrostatik für die angesprochenen Systeme, und eine klare Aussage mag aus diesem Grund verfrüht erscheinen.

Für Tyrosin, das bei unterschiedlichem pH-Werten im Stark-Feld beobachtet wurde, lässt sich eine kleine, im Trend jedoch eindeutige Tendenz bezüglich der Polarisierbarkeit erkennen. Diese wäre zumindest sinnvoll mit den elektronischen Veränderungen seines aromatischen System erklärbar.

Gliederung der Arbeit

Die Arbeit gliedert sich in insgesamt sechs Kapitel. Kapitel eins und zwei besitzen einen einführenden Charakter in die Methodik (Lochbrennen) und das Untersuchungssystem (Proteine). Es folgt der rein technische Teil des Versuchsaufbaus und der experimentellen Vorgehensweise. Kapitel vier, fünf und sechs enthalten die Messungen zum Druck-Effekt, der Linienbreite und dem Stark-Effekt.

1 Optische Spektroskopie amorpher Festkörper

Der mit unserem Auge wahrnehmbare spektrale Bereich zwischen 400 und 700 nm entspricht grob den Energien, bei denen die niedrigsten elektronischen Anregungen organischer Moleküle liegen. Gewöhnlich bezeichnet man Absorber in diesem Bereich als Farbstoffe oder Chromophore. Die Grenzen der optischen Spektroskopie werden jedoch üblicherweise, der menschlichen Wahrnehmung zum Trotz, etwas weiter ausgedehnt, so daß man zwischen 200 und 1000 nm allgemein von Spektroskopie im optischen Bereich spricht.

Bei der Mehrzahl der während dieser Arbeit durchgeführten Versuche handelt es sich um Tieftemperaturexperimente, aufgenommen bei 2 - 4 K. Die bei Raumtemperatur flüssige Probe in einem Wasser-Glycerin Gemisch, gefriert dann zu einem Glas mit amorphen Festkörpereigenschaften. Gläser unterscheiden sich in ihrem Verhalten grundsätzlich von Kristallen auf der einen, und Flüssigkeiten auf der anderen Seite. Im Folgenden soll nun die Methode des spektralen Lochbrennens erläutert werden, wobei der Bezug zu den molekularen Eigenschaften des Probensystems hergestellt wird.

1.1 Linienformen im Festkörper

Ein wesentliches Merkmal des spektralen Lochbrennens ist die hohe Frequenzauflösung. Diese wird durch das „Ausfrieren“ der thermischen Bewegungen in der Matrix bei einer Temperatur von wenigen Kelvin erreicht. Bevor die technischen Aspekte dieser Methode im Detail besprochen werden, soll zunächst auf einige grundlegende Eigenschaften von Farbstoffen in Festkörpern eingegangen werden.

geordnete Festkörper - Kristalle

Der linke Teil der Abbildung 1.1 zeigt die Situation von sechs Farbstoffmolekülen in einer kristallinen Matrix. Der hohe Grad an Fernordnung solcher Materialien bestimmt weitgehend die spektroskopischen Eigenschaften der Chromophore, die alle eine ähnliche uniforme Nahumgebung besitzen. Der elek-

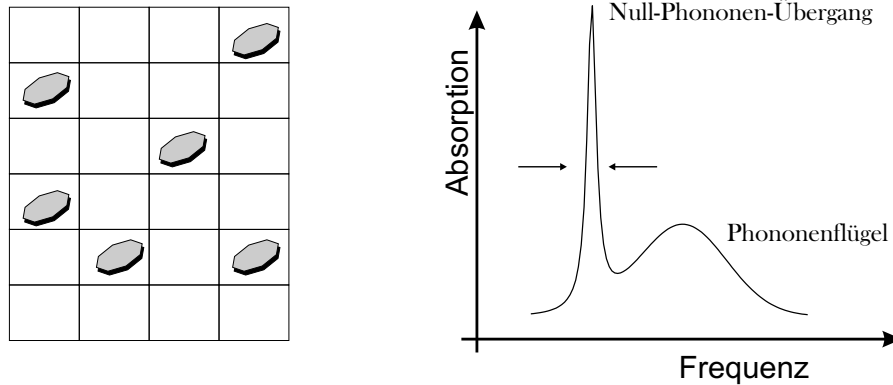


Abbildung 1.1: Kristalline Festkörper zeigen einen hohen Grad an struktureller Ordnung. Links: Kristallgitter mit darin eingebauten „Gastmolekülen“. Rechts: Linienform eines einzelnen elektronischen Übergangs in einem Festkörper.

tronische Grundzustand, meist ein Singulett-Zustand S_0 , führt nach optischer Anregung mit hoher Wahrscheinlichkeit entweder direkt oder indirekt über Relaxationsprozesse aus vibronischen Banden, in den ersten angeregten elektronischen Zustand S_1 . Über den diskreten Frequenzen (elektronische oder Schwingungsfrequenzen) liegen die quasikontinuierlichen Energien der Gitteranregungen der Matrixbausteine, die zu sogenannten Phononenseitenbanden oder Phononenhügeln führen, die den elektronischen Nullphononenübergang begleiten (Abb. 1.1 rechts). Die relative Intensität dieser Nullphononenlinie ist gegeben durch den Debye-Waller Faktor.

Im Gegensatz zu den kurzlebigen Phononen kann die Lebenszeit des rein elektronischen Übergangs um Größenordnungen länger sein. Die sogenannte *homogene* Linienbreite, ergibt sich aus der Heisenbergschen Unbestimmtheit als eine reziproke Lebensdauer

$$\gamma = \frac{1}{T \cdot 2\pi}. \quad (1.1)$$

T beschreibt dabei die Dauer der Kohärenz des angeregten Zustands. Neben den Relaxationsvorgängen tragen auch die direkten Einflüsse der Festkörperumgebung über Gitterschwingungen zum Verlust der makroskopischen Polarisation bei. T setzt sich demnach aus zwei Beiträgen physikalisch verschiedenen Ursprungs zusammen. Elektronische T_1 -Prozesse, und die stark tempera-

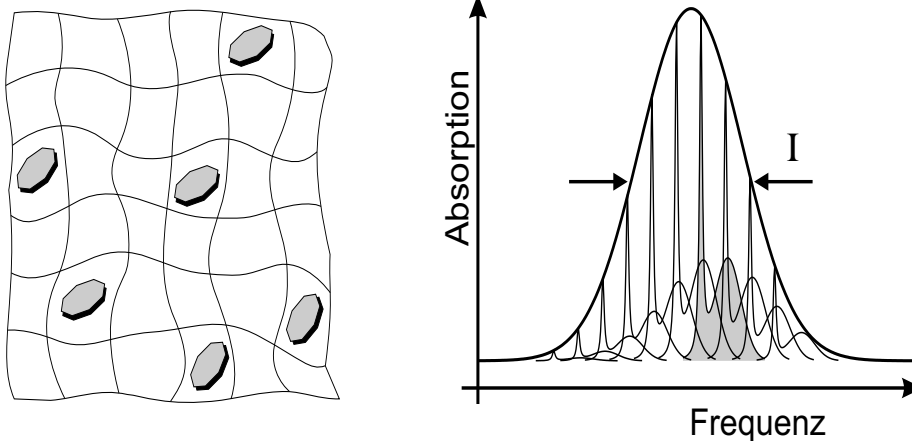


Abbildung 1.2: Links: Gläser besitzen nicht den hohen Ordnungsgrad von Kristallen. Das führt zu einer Dispersion lokaler Parameter, und zu einer Verteilung elektronischer Übergangsfrequenzen innerhalb einer stark verbreiterten Absorptionsbande (rechts).

turabhängigen, phasenerstörenden T_2 -Prozesse.

$$\frac{1}{T} = \frac{1}{T_1} + \frac{2}{T_2}. \quad (1.2)$$

Das exponentielle Zeitverhalten von T_1 und T_2 Prozessen führt zu einem lorentzförmigen Profil der homogenen Linie.

ungeordnete Festkörper - Gläser

Während in einem Kristall die potentielle Energie eines Elektrons beim Fortschreiten längs einer Vorzugsrichtung rein periodisch variiert, tut sie das bei einem Glas in aperiodischer Weise. Der Grund hierfür ist die fehlende Fernordnung der Gitterbausteine. In einem solchen Material eingebaute Farbstoffmoleküle erfahren aufgrund unterschiedlicher Einbaulagen eine Dispersion in der Lösungsmittelverschiebung, die sich in einer zum Teil stark verbreiterten Absorptionsbande bemerkbar macht (Abbildung 1.2). Die Ursache dieser sogenannten *inhomogenen* Verbreiterung, ist also eine *globale* statische Unordnung des Systems.

Interessant ist ein Vergleich der homogenen mit der inhomogenen Linienbreite I . Während für organische Farbstoffe Werte für γ um die 10 MHz realistisch sind, findet man für Proteine typischerweise Werte für I im Bereich von etwa

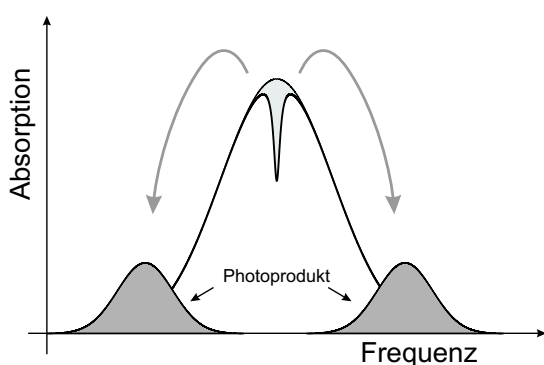


Abbildung 1.3: Photochemisches Lochbrennen: Nach selektiver Anregung entsteht in der inhomogenen Bande ein spektrales Loch, das einer Subpopulation von resonant absorbierenden Molekülen entspricht. Die spektrale Auflösung liegt im Bereich der homogenen Linienbreite.

hundert Wellenzahlen¹, ein Unterschied also von mehreren Größenordnungen. Selbst „gute“ Molekülkristalle zeigen Verbreiterungseffekte, die gewöhnlich als strain-broadening (Verzerrungsverbreiterung) [1] bezeichnet werden und die Folge einer *lokalen* statischen Unordnung sind. Dort hat man Linienbreiten von 1 GHz gefunden. Selbst in diesen Fällen ist die homogene Linienform also komplett inhomogen überlagert.

1.2 spektrales Lochbrennen

Die Lochbrennspektroskopie [2, 3, 4] umgeht diese strukturbedingten Verbreiterungen und bei Temperaturen von einigen Kelvin liegt die spektrale Auflösung dieser Methode im Bereich der homogenen Linienbreite. Voraussetzung für spektrales Lochbrennen ist das Vorhandensein eines langlebigen Reservoirzustands des Farbstoffs. Dies kann beispielsweise ein photochemischer Zustand sein, der andere Eigenschaften als der elektronische Grundzustand besitzt und somit optisch von diesem unterschieden werden kann. Mit einem Laser können innerhalb der inhomogenen Bande selektiv Moleküle angeregt werden, die dann in den Produktzustand überwechseln (Abb. 1.3). Beim nochmaligen Auslesen der Bande erscheint an der Stelle der Anregung ein spektrales Loch aufgrund der dort nun geringeren Anzahl von Absorbern. Dieses Populationsloch wird durch den Detektionsprozess mit sich selbst gefaltet, so daß die quasihomogene Lochbreite gegeben ist durch

$$\gamma_H^* = 2\gamma. \quad (1.3)$$

Ein wesentliches Merkmal der Methode ist die Dauerhaftigkeit der spektralen Löcher. Diese Persistenz ermöglicht es, mittels der nicht transformierten Moleküle Grundzustandseigenschaften auf optischem Wege zu untersuchen. Das Loch dient gewissermaßen als eine lokale Sonde und kann als Indikator

¹Eine Wellenzahl [cm^{-1}] entspricht 30 GHz.

für statische und dynamische Wechselwirkungen mit der Umgebung verwendet werden.

Die hohe spektrale Auflösung gestattet bereits den Einfluß kleinster Störungen anhand von Veränderungen der Lochgestalt (Zentralfrequenz, Lochbreite, Lochtiefe) zu detektieren. So kann beispielsweise der Einfluß von elektrischen Feldern oder von Druckvariationen untersucht werden, wobei die Veränderungen so gering gehalten werden können, daß die gemessenen Effekte einerseits linear, und andererseits vollständig reversibel bleiben.

Darüber hinaus zeigen spektrale Löcher frequenzabhängige Effekte. Damit ist es möglich Molekülpopulationen mit unterschiedlichen Lösungsmittelverschiebungen innerhalb der inhomogenen Bande selektiv zu adressieren und auf ihre Eigenschaften hin zu untersuchen.

Mechanismus des Lochbrennens

Die Entdeckung dieses optischen Phänomens im Jahr 1974, wird in der Regel zwei Forschergruppen zugeschrieben [5, 6]. Dabei nutzt man photochemische oder photophysikalische Eigenschaften des Probensystems und unterscheidet anhand der Art des Photoprodukts zwischen zwei unterschiedlichen Mechanismen.

Beim photochemischen Lochbrennen verändert sich die atomare Struktur der Farbstoffmoleküle. Ein Beispiel hierfür ist die Verschiebungen von inneren Ringprotonen bei Tetrapyrrolen² [7], die die molekulare Grundlage für eine große Zahl von Lochbrennexperimenten an Proteinen darstellt. Die Absorption des Photoprodukts liegt in solchen Fällen oft weit entfernt von der Anregungsenergie, zum Teil ausserhalb der inhomogenen Bande.

Beim physikalischen Lochbrennen kann es zu einer veränderten Kopplung zwischen Farbstoff und einem bistabilen Matrixsystem (Two-Lewel-System: TLS-Modell) kommen [8, 9]. Allerdings sind auch quantenmechanische Prozesse der Probe selbst (Methylgruppenrotationen) beschrieben worden, die zu messbaren Photoprodukten in der direkten Lochumgebung, sogenannten Antilöchern führen [10, 11].

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Experimenten an biologischen Proben: Kleine Peptide (Vasopressin), Proteine (Insulin, Ribonuclease) und Tyrosin. Dabei konnten die photochemischen Eigenschaften der aromatischen Aminosäure für das Lochbrennen ausgenutzt werden. Die molekulare Basis ist möglicherweise die Photoionisation des angeregten Zustands in die geladene Tyrosinat-

²Die Häm-Gruppe, oder auch Chlorophylle, sind Beispiele für Tetrapyrrole.

Form. Die Tatsache, daß Tyrosin als natürlicher Bestandteil in Proteinen vorhanden ist, macht die Methode prinzipiell für eine ganze Reihe unterschiedlicher Systeme anwendbar ohne molekulatechnische Modifikationen vornehmen zu müssen. Gleichzeitig stellt eine einzelne Aminosäure als elementarer Baustein biologischer Moleküle eine empfindliche lokale Sonde der Proteinumgebung dar.

Die enorme Komplexität von Proteinen macht eine klare Zuordnung in klassische Festkörper-Kategorien wie kristallin, amorph oder glasartig schwierig, und in vielen Punkten zeigen sie ein intermediäres Verhalten. Diese Tatsache, sowie die enorme funktionelle Bedeutung von Proteinen, machen eine separate thematische Einführung notwendig. Dabei soll auch auf die besondere Situation für das Lochbrennen in solchen Systemen eingegangen werden.

2 Proteine

Jegliches Leben existiert auf zellulärer Basis, und Hauptbestandteil der Zellen ist Wasser. Tatsächlich macht Wasser in einer typischen Säugetierzelle 70% des gesamten Gewichts aus. An zweiter Stelle folgen Proteine mit 18%, und die restlichen 12% teilen sich anorganische Ionen, kleine Metabolite, Nukleinsäuren, Lipide und Polysaccharide [12]. Allein diese Auflistung mag die funktionelle Bedeutung dieser vielfältigen und bei weitem komplexesten Klasse biologischer Makromoleküle verdeutlichen. Sie sind praktisch an allen physiologischen Prozessen beteiligt: Enzymatische Katalyse, Transport und Speicherung, koordinierte Bewegung, mechanische Festigkeit, Immunreaktionen, Nervenleitung, Kontrolle und Steuerung von Differenzierung [13].

Diese Vielseitigkeit spiegelt sich auch in ihrer molekularen Architektur wider. Aminosäuren polymerisieren in einer hydrolytischen Reaktion zu langen Kettenmolekülen. Zwischen der Carboxyl- und der Amidgruppe entsteht eine kovalente Verknüpfung, die Peptidbindung. Diese aus vier Atomen bestehende starre und planare Einheit, bildet gewissermaßen das kovalente Rückgrat dieser biologischen Katalysatoren. Die dreidimensionale Raumstruktur wird hingegen von überwiegend schwachen, nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Seitengruppen der Aminosäuren bestimmt. Diese sorgen so neben einer funktionellen Variabilität, auch für die notwendige strukturelle Flexibilität eines gefalteten Proteins.

Der unmittelbare Zusammenhang zwischen Sequenz und Struktur, sowie zwischen Form und Funktion, ist spätestens seit den klassischen Experimenten von Christian Anfinsen allgemein etabliert [14]. Doch auch 50 Jahre danach bleibt der detaillierte Prozeß der Faltung in den nativen Zustand, dessen Aufrechterhaltung und funktionelle Dynamik, ein faszinierendes, bei weitem nicht vollständig verstandenes Phänomen.

2.1 Die Struktur von Proteinen

Proteine lassen sich prinzipiell kristallisieren. Dieser Tatsache verdanken wir die größte Anzahl dreidimensionaler Raumstrukturen, die mittels Röntgenstrukturanalysen ermittelt wurden [15].

1963 gelang John Kendrew mit dieser Methode die erste erfolgreiche Strukturaufklärung eines Proteins und damit der Einblick in dessen Aufbau auf einer atomaren Ebene [16]. Kendrews Molekül, das Myoglobin, ist bis heute eines der am intensivsten untersuchten Systeme und wurde aus diesem Grund schon als Wasserstoffatom der Biologie bezeichnet [17].

Kristallstrukturen zeigen ein faszinierend genaues Bild der molekularen Organisation, wobei Bereiche hoher struktureller Ordnung zu erkennen sind.

Anders als bei echten Kristallen jedoch, ist diese Ordnung nicht global, sondern wird immer wieder von Abschnitten scheinbar geringerer räumlicher Korrelation unterbrochen. Man unterscheidet im wesentlichen zwei Struktur motive von Polypeptidketten: α -Helices und β -Faltblätter. Diese bilden „oberhalb“ der linearen Sequenz, der Primärstruktur, eine zweite Organisationstufe, die Sekundärstruktur. Solche Sekundärstrukturelemente können als räumliche Bausteine, als Module betrachtet werden, aus denen das Protein in seiner funktionellen Form, der Tertiärstruktur, zusammengesetzt ist.

Die Elektronendichte in einem Proteinkristall ist eine periodisch veränderliche Größe, deren Intensitätsprofil zu den sogenannten Struktur faktoren einzelner Atome führt. Dabei liefert der Debye-Waller Faktor ein quantitatives Maß für die atomare Verschiebung um eine mittlere Gleichgewichtsposition. Aus vergleichenden Untersuchungen solcher Größen weiß man, daß Proteine keine starren Konstruktionen sind, sondern eine interne Dynamik besitzen [18, 19, 20]. Die Röntgenstruktur ist demnach ein zeitlich und räumlicher Mittelwert¹, um den das Protein mit einer gewissen Amplitude fluktuiert.

Es existieren eine Vielzahl sogenannter Subkonformationen [18, 21, 22], die unter physiologischen Bedingungen in einem dynamischen Gleichgewicht stehen. Bei entsprechend tiefen Temperaturen frieren diese Subzustände aus, da Teile des Konformationsraumes nun kinetisch gehemmt oder blockiert sind. Empirische Beobachtungen wie die spektrale Diffusionsverbreiterung [23, 24] bei der Lochbrennspektroskopie sind ein direkter Beleg für solche Bewegungen im Konformationsraum, und bei geeigneter Wahl der experimentellen Randbedingungen, lassen sich auch quantitative Aussagen zur Verteilung und Höhe von Potentialbarrieren innerhalb einer solchen Energielandschaft von Proteinen treffen [25].

Es gibt mittlerweile zahlreiche Belege für diese temperaturabhängige, dynamische Unbestimmtheit der räumlichen Positionen auf atomarer Ebene.

Die Kristallstruktur von Proteinen bleibt trotz ihres überwiegend statischen Charakters eine kaum zu überschätzende, heuristische Ausgangsbasis für ein

¹In einem typischen Proteinkristall befinden sich 10^{15} bis 10^{16} Moleküle.

weitergehendes Verständnis solcher Systeme. Um letztlich die Zusammenhänge zwischen struktureller und dynamischer Unordnung auf der einen Seite sowie den funktionellen Eigenschaften von Proteinen auf der anderen Seite besser zu verstehen, ist immer der Vergleich von Daten, die mit verschiedenen Methoden gewonnen werden, notwendig.

2.2 Proteinfaltung

„The capability of adopting a dense globular configuration stabilized by self-interactions and of transforming reversibly to the random coil are characteristics peculiar to the chain molecules of globular proteins alone.[26]“

Dieses Zitat von Paul Flory beschreibt in einem Satz eine der bemerkenswertesten Eigenschaften von Proteinen: Die spontane Faltung in den physiologischen Zustand. Der von Anfinsen experimentell gefundene Zusammenhang zwischen Primärsequenz und Tertiärstruktur, lässt sich in dem zuerst von Francis Crick formulierten, oft als zentralem Dogma der Molekularbiologie bezeichneten Schema zusammenfassen, das den Informationsfluß in biologischen Systemen veranschaulicht.



Von der Ribonukleinsäure zum Protein erfolgt der Informationsfluß uneingeschränkt unidirektional. Lediglich zwischen DNA und RNA ist die Ausnahmslosigkeit eingeschränkt und sorgt für den zurückgerichteten Pfeil im obigen Schema. Sogenannte Retroviren sind die einzigen bekannten Fälle, wo die genetische Information primär in Form von RNA gespeichert ist und erst anschließend, durch eine Reverse-Transkriptase in DNA umgeschrieben wird.

Thermodynamische Stabilität

Quantitativ lässt sich die Stabilität eines Proteins als Differenz seiner freien Enthalpie ΔG im gefalteten und entfalteten Zustand erfassen. Unter physiologischen Bedingungen liegt der Wert von G im gefalteten Zustand nur geringfügig niedriger als der des ungefalteten Polypeptids. Der Nettobetrag, der die konformelle Stabilität des nativen Proteins sicherstellt, ist auf die Aufhebung entropischer und enthalpischer Beiträge zurückzuführen.

Im Allgemeinen wird die hohe Konformationsentropie der Peptidkette als der

Wesentliche destabilisierende Faktor betrachtet, wobei Werte von $17 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \text{M}^{-1}$ bis $50 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \text{M}^{-1}$ pro Aminosäure in der Literatur zu finden sind [27].

Im Gegensatz dazu leisten hydrophobe Kräfte einen großen entropischen Beitrag zur Stabilität. Zusammen mit internen, enthalpischen Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten (van der Waals Kontakte, Wasserstoffbrücken, elektrostatische WW, Disulfidbrücken), ergibt sich für globuläre Proteine ein effektiver Wert für G von etwa 50 kJ/mol [28].

Faltungsmodelle

Für vergleichsweise einfache, sogenannte Single-Domain Proteine, hat man Faltungsraten gefunden, die sich um sechs Größenordnungen (Mikrosekunden bis Sekunden) unterscheiden [29]. Im Falle solch kleiner Proteine geht man gewöhnlich von einem zweistufigen Faltungsprozess ohne nachweisbar besetzte Übergangszustände ² aus [30, 31].

Es stellt sich dann die Frage nach den allgemeinen Prinzipien dieses Vorgangs. Die bereits angesprochene thermodynamische Stabilität der gefalteten Konformation ist eine der notwendigen Voraussetzungen für den spontanen Ablauf der Reaktion. Das zweite Kriterium ist ein Kinetisches: Die Überwindung einer schier unendlich großen entropischen Barriere (Levinthal Paradoxon). Mit anderen Worten, der Faltungsvorgang muß schnell ablaufen, verglichen mit der rein statistischen Suche eines Polymers im Konformationsraum.

Die Vorstellungen zur Proteinfaltungskinetik werden heutzutage von einigen, mehr oder weniger verschiedenen, Konzepten geprägt: Diffusion-Collision- [32], Nucleation-Condensation- [33] und Topomer-Search-Modell [34].

In diesem Zusammenhang entscheidend sind dabei nicht die Details, die den einzelnen Modellen zugrundeliegen, sondern die gemeinsame Vorstellung einer progressiven Stabilisierung von Intermediaten während des Faltungsvorgangs. Der Evolutionsbiologe Richard Dawkins verwendete, allerdings in einem etwas anderen Zusammenhang, den Begriff einer „kumulativen Selektion“.

Geht man davon aus, daß partiell korrekt gefaltete Einheiten stabilisiert werden, so verringert sich die Anzahl der möglichen Faltungstrajektorien um Größenordnungen. Das von Levinthal beschriebene Szenario findet in der Realität nicht statt.

Das Konzept einer Energielandschaft, in der Literatur häufig durch Trichter oder Potentialflächen veranschaulicht, hat sich weitgehend etabliert [35, 36, 37, 38]. Es existiert kein singulärer Zustand minimaler Energie, sondern vielmehr

²Jeder Konformationsübergang ist notwendigerweise eine Folge differentieller Veränderungen. Der Begriff des Übergangszustands ist daher ein Konzept, das auch von der räumlichen und zeitlichen Auflösung der Untersuchungsmethode bestimmt ist.

ein Ensemble von Subkonformationen, die unter dem Begriff *nativ* zusammengefasst werden und eher dem „Prinzip der minimalen Frustration“ genügen [35].

2.3 Proteine und Lochbrennen

Voraussetzung für optische Experimente ist das Vorhandensein eines molekularen Farbstoffs, eines Chromophors. Die Absorption sichtbarer Strahlung und damit die Färbung einer organischen Verbindung, beruht in vielen Fällen auf der regelmäßig alternierenden Folge von Einfach- und Doppelbindungen zwischen Kohlenstoffatomen. Eine biologisch besonders wichtige Klasse von Pigmenten sind sogenannte Tetrapyrrol-Verbindungen, die als funktionelle Bestandteile von Proteinen an den beiden elementarsten energetischen Prozessen der Biosphäre beteiligt sind, der Photosynthese und der Atmung.

Seit den ersten Lochbrenn-Experimenten an isolierten biologischen Chromophoren im Jahr 1981 [39], konnten bis heute viele weitere erfolgreiche Untersuchungen, auch an Proteinen durchgeführt werden. Die hohe spektrale Auflösung der Methode erlaubt die Messung lokaler Eigenschaften der Proteinumgebung und eine weitgehende Trennung von Einflüssen des Lösungsmittels.

Etwa 20 Jahre nach den ersten Experimenten an diesen „klassischen“ spektroskopischen Farbstoffproteinen, entdeckte man die Möglichkeit die photochemischen Eigenschaften der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin für Lochbrennstudien auszunutzen [40, 41, 42], wobei man in diesem Fall auf eine kontinuierlich durchstimmbare UV-Lichtquelle angewiesen ist.

Solche Experimente unterscheiden sich nicht grundlegend, jedoch im Speziellen von solchen an Hämproteinen oder Photosynthesepigmenten. Dies soll in den folgenden zwei Abschnitten erläutert werden.

Heterogene Lochbrennsysteme und das Konzept korrelierter Phasenräume

In einem „gewöhnlichen“ farbstoffdotierten Glas, befindet sich der Chromophor direkt in der amorphen Matrix (Abb. 2.1 links). In einer gefrorenen Proteinlösung ist eine äußere Lösungsumgebung, von der direkten Nahumgebung der einzelnen Absorber, dem Protein selbst, zu unterscheiden. Das Vorhandensein von mindestens zwei unterscheidbaren Phasen macht die Probe zu einem heterogenen System. Befindet sich nun ein einzelner Farbstoff (z.B. ein Hämfarbstoff) innerhalb seiner Bindungstasche in einem globulären Protein (Abb. 2.1 Mitte), ist es vorstellbar, daß bestimmte sterische Formen des Chromophors mit

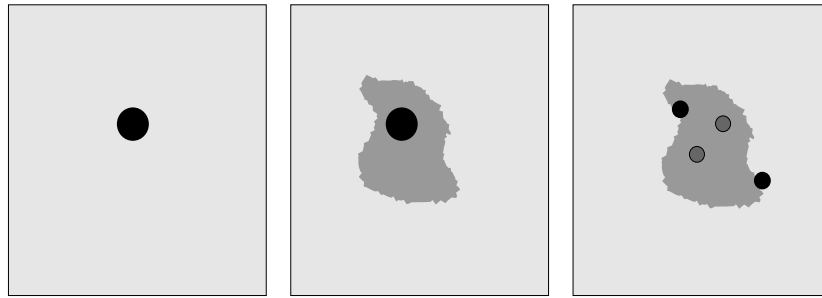


Abbildung 2.1: Schematisch dargestellt sind hier drei Probensysteme. Von links nach rechts: freier Chromophor in einer Glasmatrix; Protein mit einem einzelnen zentralen Chromophor; Protein mit mehreren „Farbzentren“, diese können sich direkt in der Proteinmatrix befinden, oder auch an der Phasengrenze zum Lösungsmittel.

globalen Konformationszuständen des Proteins, das heißt mit seinem strukturellen Phasenraum, korreliert sind. Demnach stabilisieren sogenannte tautomere Spezies des Farbstoffs unterschiedliche Substrukturen des Proteins oder umgekehrt.

Tatsächlich konnten solche Substrukturen mit der Lochbrenntechnik immer wieder erfolgreich unterschieden werden [43, 44, 45, 46]. Sie sind eine weitere experimentelle Bestätigung des Konzepts sogenannter allosterischer Proteinbewegungen, die intensiv an dem Sauerstoff-Carrier Hämoglobin dokumentiert sind und seit langer Zeit bereits allgemeines Lehrbuchwissen darstellen. Bleibt man im Bild der Energielandschaft eines Proteins, so repräsentieren tautomere Konfigurationen relativ hohe Hierarchieebenen. Man findet auch den Begriff taxonomische Zustände [18]. Geht man davon aus, daß der strukturelle Phasenraum letztendlich selbstähnliche Eigenschaften besitzt, so lassen sich Subzustände hoher Hierarchie immer weiter unterteilt denken. Solche, sehr „nahe“ beieinander liegenden Konformationen, sind auch die Ursache für inhomogene Verbreitungseffekte.

Lochbrennen im ultravioletten Spektralbereich

Nutzt man aromatische Aminosäuren wie Tyrosin als optische Marker in einem Lochbrennexperiment, so erweitert sich der potentielle Bereich der spektroskopisch zugänglichen Proteine um eine völlig neue Klasse, die sich strukturell und funktionell von den bisher untersuchten „klassischen“ Chromoproteinen unterscheidet. Solchen Proteinen fehlt häufig eine prosthetische Gruppe oder ein Cofaktor. Unter Umständen hat man es auch mit mehreren Sondenmolekülen zu tun, die im Einzelfall mit beiden Phasen des Zweiphasensystems (Lösungsmittel-

tel und Protein) koppeln können (Abb. 2.1 rechts).

Ein einzelnes Tyrosinmolekül sollte, nicht zuletzt aufgrund des vergleichsweise geringen Molekulargewichts, als eine empfindliche lokale Sonde einsetzbar sein. Die Experimente an Insulin und an Ribonuclease haben gezeigt, daß genau dies prinzipiell möglich ist, und daß verschiedene lokale Positionen auf einem Protein optisch unterschieden werden können.

Diese örtliche Unterscheidbarkeit verschiedener Tyrosine bietet die Möglichkeit, lokale Variationen von Parametern wie der Kompressibilität und elektrostatischen Eigenschaften zu untersuchen.

2.4 Circular dichroismus von Proteinen

An dieser Stelle soll in aller Kürze, und rein qualitativ auf das Prinzip des Circular dichroismus (CD) eingegangen werden. Die Raumtemperatur CD-Spektren waren Teil der angewendeten Methode und trugen nicht unerheblich zur Auswertung und Beurteilung der Druckeffektmessungen von entfaltetem Insulin und Ribonuclease bei (Kap.4). Auf ausführlichere Beschreibungen sei an dieser Stelle verwiesen [47].

Elliptisch polarisiertes Licht resultiert aus einer vektoriellen Überlagerung zweier Wellenzüge gleicher Frequenz, unterschiedlicher Feldstärke und Phase. Dabei erscheinen kreisförmig- und linear polarisiertes Licht als Grenzfälle, und die Gestalt der Ellipse hängt vom Amplituden und Phasenverhältnis der Wellenzüge ab. Substanzen, die Circular dichroismus zeigen, weisen unterschiedliche Extinktionskoeffizienten (ϵ_L, ϵ_R) bezüglich der links und rechts circular polarisierten Komponente des linear polarisierten Anregungslichts auf. Die Folge: Das Licht, das die Probe nach Wechselwirkung mit dieser verläßt, ist elliptisch polarisiert. Die sogenannte Elliptizität θ ist definiert als der Tangens des Verhältnisses zwischen großer und kleiner Halbachse.

optisch aktive Substanzen

Das klassische Beispiel für solche Substanzen sind Moleküle, die sich zueinander wie Bild und Spiegelbild verhalten, sogenannte Enantiomere.

Biologische Aminosäuren gehören, aufgrund ihres asymmetrischen Kohlenstoffatoms C_α mit vier unterschiedlichen Substituenten, zu diesen „optisch drehenden“ Substanzen. In vielen Fällen wird eine optische Aktivität allerdings erst durch eine bestimmte Mikroumgebung hervorgerufen, wie im Fall der Carbonylgruppe einer Peptidbindung. Eine auf Rosenfeld (1928) zurückgehende Kernaussage zur optischen Aktivität besteht darin, daß ein bestimmter elektronischer Übergang sowohl elektrisch als auch magnetisch erlaubt ist, und daß

die beiden Übergangsmomente nicht senkrecht zueinander stehen.

Die CD-Signale proteininterner Strukturen wie α -Helices oder β -Faltblätter weisen charakteristische Muster auf und erlauben deshalb eine Interpretation molekularer Strukturen.

Da sich heutzutage, hauptsächlich aufgrund kristallographischer Studien, ein so detailliertes Bild atomarer Proteinstrukturen abzeichnet, findet die CD-Spektroskopie überwiegend in der Untersuchung konformeller Übergänge und deren Kinetik ihre Anwendung.

3 Technisches

3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau und Erfassung der Daten

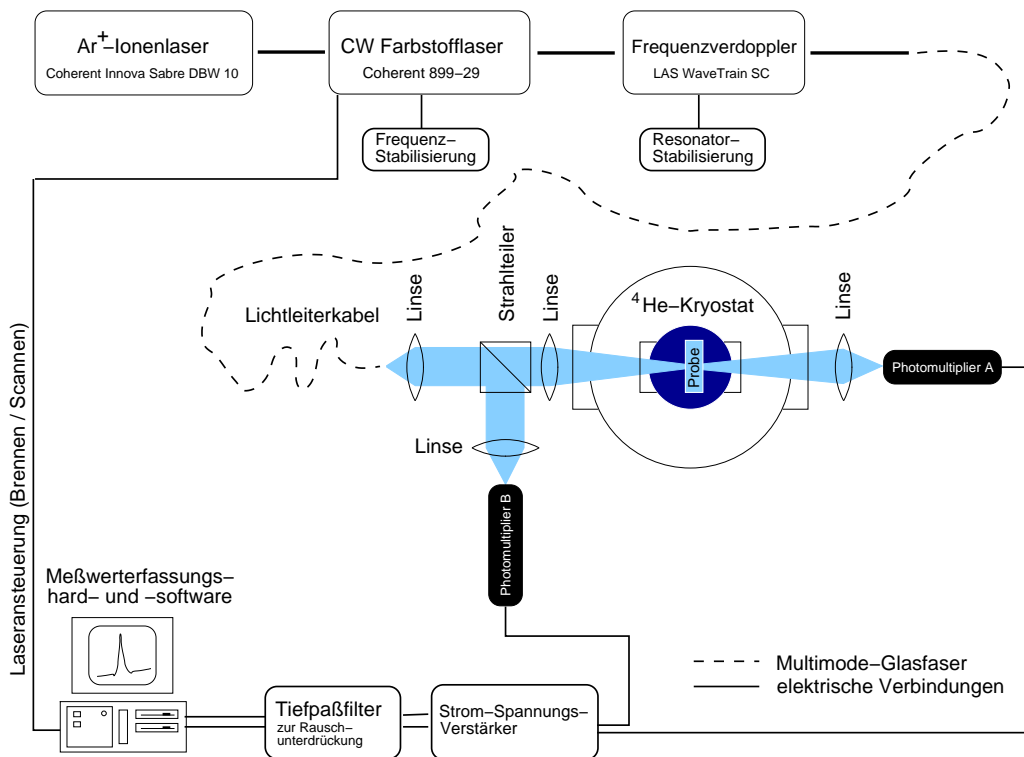


Abbildung 3.1: Übersichtsschema des Tieftemperatur-Versuchsaufbaus.

Abbildung 3.1 gibt einen Überblick aller wesentlichen Komponenten des Aufbaus der Tieftemperaturexperimente, an dem die hochaufgelösten Lochspektren gemessen wurden.

Die Verwendung von Glasfasern, über die das Licht an benötigter Stelle ein- oder ausgekoppelt wurde, gestattete ein hohes Maß an Flexibilität. Bei den gemessenen Spektren handelt es sich um Transmissionsspektren (detektiert am A-Kanal), die zur Eliminierung von Leistungsschwankungen der Lichtquelle

auf einen zweiten Kanal (B-Kanal) normiert wurden (A/B-Messung). Die Detektion erfolgte mit Photomultipliern (Hamamatsu R928), die über einen breiten Spektralbereich (189 bis 900 nm, Angaben des Herstellers) hohe Quanteneffizienz und gutes Signal-Rauschverhältnis gewährleisteten.

Anschließend konnte das Signal, nach Passage von Strom-Spannungsverstärkern (HMS-Elektronik) und variabel einstellbaren RC-Gliedern, über eine AC-Wandlerkarte digital eingelesen und bearbeitet werden.

3.2 Lichtquellen

Monochromator

Zur Aufnahme breitbandiger Absorptions-Übersichtsspektren stand ein Monochromator (Jobin Yvon, 1 m Czerny-Turner Anordnung, Gitter 600/mm) mit einer Xenon-Hochdruck-Bogenlampe zur Verfügung. Die spektrale Auflösung liegt im Bereich von einigen Wellenzahlen, also verglichen mit den inhomogen verbreiterten Absorptionsbanden von einigen hundert Wellenzahlen, ausreichend hoch.

LASER-System

Die lichterzeugende Einheit bestand aus drei funktionellen Komponenten, die im Folgenden kurz beschrieben werden sollen.

- Pump-Laser

Hierbei handelte es sich um einen Argonionen-Laser (Innova Sabre, Coherent), der im Single-Line Modus mit einer Leistung von 6 W betrieben wurde. Der relevante Übergang ist die Hauptlinie bei 514.5 nm (grüne Argonlinie).

- Farbstoff-Ringlaser

In linearer Anordnung direkt dahintergeschaltet befand sich ein Ringlaser (R 899-29, Coherent), der mit Rhodamin 6G als Farbstoff einen Wellenlängenbereich von etwa 560 bis 620 nm abdeckt.

Das System wird mittels eines externen, temperaturstabilisierten Referenz-Etalons (Reference Cavity) aktiv moden- und frequenzstabilisiert und kann über einen Bereich von 30 GHz durchgestimmt werden, was dem nativen Scanbereich entspricht. Zur Kontrolle und Kalibrierung des Scanbereichs konnte bedarfsweise ein portables Fabry-Perot-Interferometer verwendet werden.

Die Linienbreite des Lasers liegt nach Herstellerangaben bei 500 MHz. Typische Ausgangsleistungen lagen hier im Bereich von 400 bis 700 mW. Zur Messung der Wellenlänge diente ein kommerzielles Meßgerät (Burleigh WA-2000).

- Frequenzverdopplung

Der ultraviolette Spektralbereich wird erst durch die Verdopplung des vom Farbstoff-Ringlaser produzierten Lichts zugänglich. Hierbei wurde mittels eines Piezo-gelagerten BBO-Kristalls (Bariumbetaborat) ein nicht-linearer optischer Effekt ausgenutzt, der die zweite Harmonische der einfallenden Fundamentalwellenlänge erzeugt.

Der Kristall selbst befand sich in einer vom Lasersystem unabhängigen externen Einheit, innerhalb der in einer dreieckigen Anordnungsgeometrie Resonanz hergestellt wurde. Dieses „Mode-Matching“ innerhalb der Resonatoreinheit wurde durch manuelle Justage des Kristallwinkels erreicht und führte zu einer über den nativen Scanbereich von 30 GHz stabilen UV-Ausgangsleistung im Bereich von 5-20 mW. Bereits geringe Veränderungen der Wellenlänge machten ein ständiges Nachführen des Kristalls zur Aufrechterhaltung der Resonanzbedingung notwendig.

CD-Spektrometer

Diese Messungen fanden an einem J-180 (Jasco) Spektralpolarimeter statt. Der Durchmesser der Quarzküvette betrug 2 mm. Die Temperatur wurde während des Experiments konstant bei 20°C gehalten.

3.3 Kryostat

Die Tieftemperaturexperimente wurden in einen Helium-Bad Kryostaten durchgeführt. Die Probe selbst befand sich direkt in flüssigem Helium bei einer Temperatur von 4.2 K unter Raumdruckbedingungen. Dampfdruckerniedrigung über den λ -Punkt hinaus machte Messungen zwischen 1.6 und 2 K möglich, was einem Druck im Probenraum zwischen 7 und 30 mbar entspricht.

Bei den hier durchgeführten Messungen wurde jeweils darauf geachtet möglichst gleiche Temperaturen von 1.7 K (10 mbar) im Experiment zu etablieren. Die Heliumstandzeit unter solchen Bedingungen betrug ca. 8 Stunden. Der Kryostat war in einen UV-tauglichen optischen Aufbau eingebettet, der bestmöglich abgedunkelt wurde um störendes Fremdlicht zu minimieren.

3.4 Durchführung der Experimente und Auswertung der Daten

Aufnahme von Lochspektren

Die Leistungen der Anregungsintensität unterschieden sich um bis zu vier Größenordnungen von denen beim Auslesen der Spektren. Letztere lagen im Bereich von μW . Es wurde mit handelsüblichen optischen Graufiltern gearbeitet.

Druck-Effekt

Für die Versuche zur hydrostatischen Druckvariation stand eine Probenzelle zur Verfügung, auf die mittels einer He-Gasflasche über eine heliumdichte Leitung Druck ausgeübt werden konnte.

Die Präparation der Proben erforderte einige Zeit der Vorbereitung sowie etwas manuelles Geschick. Mit einem handelsüblichen Haushaltsschweißgerät wurden kleine Kunststoff-Taschen aus Polyethylen hergestellt, in die die flüssigen Proben schließlich eingeschweißt wurden. Die Probenzelle wurde mit den versiegelten Probenaschen bestückt und beidseitig mit indiumgedichteten Quarzfenstern verschlossen. Dies ermöglichte das Anlegen eines isotropen Drucks an die eingefrorene Probe über das in der Kammer auskondensierte He-Gas.

Ein experimenteller Druck von 2.5 MPa stellt, angesichts der Erstarrung von flüssigem Helium unter diesen Bedingungen, die Obergrenze dar. Tatsächlich wurde während dieser Druckexperimente ein maximaler Wert von 2 MPa nicht überschritten, wobei die Messgenauigkeit des elektronischen Sensors (Sensotec TJE) 10^{-3} betrug.

Nachdem sich das gesamte System (Probenhalter im Kryostaten) bei einer konstanten, über ein Feinventil regelbaren Temperatur von etwa 1.7 K stabilisiert hatte, wurde bei einer bestimmten Frequenz und einem definierten Startdruck ein Loch gebrannt. Von diesem Startdruck ausgehend erfolgte eine schrittweise Erhöhung der Druckwerte auf einen Maximalwert, wobei die zu einem definierten Druck zugehörigen Spektren mehrfach ausgelesen wurden.

Nach Erreichen des Maximaldrucks wurde dieser wieder auf den Ausgangswert reduziert, und die Spektren wurden nochmalig ausgelesen. Dadurch zeigten sich zum einen die vollständig reversiblen Eigenschaften des Effekts, außerdem konnten während der Messung eventuell auftretende Frequenz-Drifts des Lasers abgeschätzt werden. Diese Prozedur wurde für möglichst viele Frequenzen innerhalb der inhomogenen Absorptionsbanden der verwendeten Proben durchgeführt, um farbabhängige Effekte auflösen zu können.

Das zunächst lorentzförmige Ausgangsloch entwickelt sich unter Einfluß von isotropem äußerem Druck mit einem Gaußkernel weiter und lässt sich dann mit einem voigtförmigen Profil beschreiben (siehe dazu auch Kapitel 4).

Die verwendete Fitroutine gestattete die Bestimmung von Tiefe, Breite und Zentralfrequenz der spektralen Löcher. Zu einer festen Wellenlänge erhält man so Serien von Lochspektren unter Einfluß verschiedener Drücke. Durch Auftragung der Verschiebung pro Druck als Funktion der Frequenz, konnten die Parameter Kompressibilität und Vakuumfrequenz ermittelt werden.

Stark-Effekt

Die Messungen in äußeren elektrischen Feldern machten ebenfalls die Konstruktion einer speziellen Probenküvettenhalterung notwendig. In diesem Fall befand sich die Probe zwischen zwei Aluminium-Elektroden in einem Abstand von 1 cm. Jede Elektrode wurde mit einem Hochspannungsnetzgerät (fug Elektronik, HCN 14-6500 bzw, HCN 14-12500) versorgt, mit denen während dieser Experimente Spannungsreihen von bis zu 27 kV/cm durchlaufen wurden. Aufgrund der Linearität des Stark-Effekts spielen nur relative Änderungen der Spannung eine Rolle. Generell konnte eine stabile Spannung erst nach Unterschreiten des λ -Punkts, also mit Erreichen der suprafluiden Phase etabliert werden.

Die Richtung des Stark-Felds \vec{E}_S war somit eine fixierte experimentelle Größe und lag parallel zur Tischebene. Die Polarisationssebene des Anregungsfelds \vec{E}_L konnte mithilfe eines UV-Glan-Tayler-Prismas prinzipiell stufenlos variiert werden, wobei in der Praxis lediglich zwei Anregungsgeometrien verwirklicht wurden. Zu unterscheiden ist demnach eine parallele und eine senkrechte Anordnung, für die jeweils gilt

$$\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S \quad \text{beziehungsweise} \quad \vec{E}_L \perp \vec{E}_S.$$

Analog dazu wird in der weiteren Diskussion auch von senkrechten oder parallelen Spektren gesprochen werden.

Die Auswertung der Meßdaten erfolgte mit einem FORTRAN-Programm von J. Gafert [7], das auf die Fitroutine einer IMSL-Bibliothek zurückgreift [48]. Die theoretische Basis bildet die analytische Beschreibung der Lochformen im elektrischen Feld von P. Schätz und M. Maier [49]. Die Fehlerquadratminimierung erfolgt für beide Polarisationsgeometrien simultan und liefert als Ergebnis folgende Parameter als Funktion der Feldstärke (siehe auch Kapitel 6):

Die Aufspaltung

$$\Delta = (f/h) \cdot E_S \cdot \Delta\mu_0 \cdot \langle \cos\theta \rangle,$$

die Verbreiterung

$$\sigma = (f/h) \cdot E_S \cdot \langle \Delta\mu_{ind}^2 \rangle^{\frac{1}{2}} \cdot \langle \cos^2\theta^* \rangle^{\frac{1}{2}},$$

sowie den Winkel β zwischen $\Delta\vec{\mu}_0$ und $\vec{\mu}_{ii}$.

Der Wert des Korrekturfaktors f muß anhand einiger Annahmen (isotropes Feld, Punktdipolnäherung) abgeschätzt werden. Insofern ist eine Angabe von absoluten Werten der experimentellen Parameter Δ und σ nicht möglich.

Die Komplexität der Fitprozedur macht eine Abschätzung der Zuverlässigkeit der Resultate notwendig. Eine gute Unterscheidbarkeit von parallelen und senkrechten Spektren, eine hinreichend gerade Basislinie sowie ein hohes Signal-Rausch Verhältnis, waren eine notwendige Voraussetzung für befriedigende Fitergebnisse, also die gute Übereinstimmung der experimentellen und gerechneten Spektren.

In der Praxis wurde eine erste Anpassung der Spektren immer bei variabler Wahl des Winkels β durchgeführt. Dabei zeigte sich in der Regel eine hohe Konstanz der Werte, die allerdings manchmal bei den höchsten angelegten Feldstärken, beziehungsweise bei den zugehörigen Spektren, verlorenging. In solchen Fällen konnte β in einer zweiten Anpassung fixiert werden, was die Prozedur auf ein zweidimensionales Problem reduzierte. Eine Auftragung von Δ und σ als Funktion von \vec{E}_S , sollte außerdem der zu erwartenden linearen Abhängigkeit folgen (Kapitel 6).

Linienbreiten

Zur Bestimmung der homogenen Linienbreite wurden bei einer festen Frequenz sukzessiv immer tiefere Löcher gebrannt. Dabei wurde lediglich die Brenndauer verlängert, die Ausgangsleistung des UV-Lasers war konstant. Die so erhaltenen Spektren wurden in Abhängigkeit der Brenndauer nach ihrer Breite und Tiefe ausgewertet, wobei ein lorentzförmiges Profil zugrundegelegt wurde. Schließlich wurde die Lochbreite gegen die Lochfläche aufgetragen. Die nach 0 extrapolierten Werte der Lochflächen ergeben direkt die Werte der quasihomogenen Lochbreiten γ_H^* . Aufgrund der in Kapitel 1.2 gemachten Aussagen, erhält man die homogene Linienbreite γ einfach nach Division mit dem Faktor 2.

Probensysteme und Probenpräparation

Alle während dieser Arbeit verwendeten Proben konnten von Sigma-Aldrich bezogen werden: Insulin, Ribonuclease A, L-Tyrosin und Lysin-8-Vasopressin (Produktnummer: 57590, R4642 beziehungsweise R6513, 93830 und V6879).

Während der Tieftemperaturexperimente befanden sich die Proben gelöst in 0,01 bis 0.1 M Tris/HCl-Puffer, die im Volumenverhältnis 2/3 mit Glycerin gemischt wurden. Ausgehend von einer optischen Dichte von 1, bezogen auf die Extinktion von Tyrosin, wurden folgende Konzentrationen erreicht:

$1 \cdot 10^{-3} M$ beim Insulin, $6 \cdot 10^{-4} M$ bei der Ribonuclease, $3 \cdot 10^{-3} M$ beim Tyrosin und $4 \cdot 10^{-3} M$ für Lysin-8-Vasopressin.

Für die Messungen der CD-Spektren an Insulin und Ribonuclease bei Raumtemperatur wurde auf die Beigabe von Glycerin verzichtet. Dies hatte in erster Linie technische Gründe. So verhinderte, wie sich gezeigt hat, die schmale Küvette eine homogene Verteilung der Probe mit Glycerin, und die Qualität der Spektren war unbefriedigend. Die Proteinkonzentration in diesen Fällen betrug $20 \cdot 10^{-6} M$.

Tyrosin mußte aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in Wasser in konzentrierter Salzsäure angelöst werden bevor der gewünschte pH durch Titration mit NaOH eingestellt werden konnte. Dies war insbesondere bei den pH-abhängigen Versuchen zum Stark-Effekt von Bedeutung.

Die Probenaufbereitung folgte weitgehend den Angaben von Sigma.

Insulin und Vasopressin wurden bei einem pH von etwa 2.5 angesetzt. Insbesondere Insulin neigt bei höherem pH stark zur Aggregation. Unter den gegebenen Bedingungen existiert das Protein als Dimer [50].

Die Experimente an Ribonuclease fanden bei pH 8.0 statt.

Für die chemischen Faltungsstudien am Insulin und an RNase wurde eine hochmolare Stammlösung von Denaturierungspuffer hergestellt. Beim Insulin wurde Harnstoff zur chemischen Entfaltung verwendet, im Fall der RNase Guanidiniumhydrochlorid. Als Reduktionsmittel für Schwefelbrücken diente Mercaptoethanol. Glycerin wurde jeweils erst direkt vor Beginn der Messungen zugefügt.

4 Hydrostatische Druckexperimente und Kompressibilitäten

Mit Druckeffektexperimenten an spektralen Löchern lassen sich mechanische und volumetrische Eigenschaften von Probe und Lösungsmittel auf rein optischem Wege bestimmen. Dazu werden spektrale Veränderungen optischer Löcher detektiert, um Rückschlüsse auf Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Matrix ziehen zu können. Unter moderaten Bedingungen, das heißt bei Drücken bis etwa 10 MPa, sind solche Effekte vollständig reversibel und eignen sich daher gut zur Untersuchung elastischer Eigenschaften von Molekülen. Erst bei Werten im Bereich ab etwa 100 MPa kommt es zu druckinduzierten Phasenübergängen, die sich beispielsweise zu Faltungsstudien von Proteinen einsetzen lassen.

Die ersten Druck-Messungen an farbstoffdotierten Polymeren [51] zeigten, daß sich ein spektrales Loch bei Druckänderung sowohl verschiebt als auch verbreitert. Diese ursprüngliche Beobachtung konnte seither in einer Vielzahl von Experimenten, auch an Proteinen, immer wieder bestätigt und in einem mikroskopischen Modell von Laird und Skinner auch weitgehend erklärt werden [52]. Letzteres bildet auch die theoretische Grundlage der hier durchgeführten Experimente und soll nun in seinen Grundzügen dargestellt werden.

4.1 Form und Verhalten spektraler Löcher unter Druck

Das beobachtete Verhalten spektraler Löcher unter moderatem Druck lässt sich qualitativ anschaulich erklären, wenn man die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Matrix betrachtet. Da in einem optischen Experiment letztlich immer elektronische Veränderungen einer Probe gemessen werden, gelten die nun zu Beginn gemachten allgemeinen Bemerkungen sowohl für den Druck- wie für den Stark-Effekt.

Eine äußere Störung kann nur dann in einer Veränderung des Spektrums sichtbar werden, wenn sie unterschiedlich stark auf den Grund- und den angeregten Zustand des Farbstoffs wirkt. Anders formuliert; eine optische Anregung muß

zu einer Veränderung der Elektronenverteilung des Farbstoffs und damit auch zu einer Veränderung der Wechselwirkung mit seiner Umgebung führen. Daran beteiligt sind im wesentlichen all diejenigen Interaktionen molekularer Systeme, die man unter dem Begriff nichtkovalente Wechselwirkungen zusammenfaßt und die alle einem R^{-n} -Potential folgen. Beispiele sind Wechselwirkungen zwischen molekularen Dipolen, oder auch solche zwischen zeitlich fluktuierenden, sich gegenseitig induzierenden Dipolen (Dispersion, London-Kräfte).

Generell resultiert ein höherer Energiegewinn im angeregten Zustand in einer Rotverschiebung, während bei einer Stabilisierung des Grund- gegenüber dem angeregten Zustand eine Blauverschiebung zu beobachten ist [53]. Bevor die beteiligten molekularen Wechselwirkungen in Abschnitt 4.2 genauer diskutiert werden, soll zunächst auf die Annahmen des Modells eingegangen werden

Um zu einer korrekten Beschreibung der Lochformen unter moderater Druckanwendung zu gelangen, führten Laird und Skinner ein verändertes Lennard-Jones Potential ein, das die kurzreichweitigen repulsiven Wechselwirkungen in einem Polymer-Glas/Farbstoff System akkurat beschreibt. Eine physikalische Interpretation dieses Modells ist dann die Folgende: Eine druckinduzierte Veränderung der verschiedenen langreichweitigen elektrostatischen Wechselwirkungen, äußert sich in einer Verschiebung der Übergangsfrequenz als Folge der veränderten molekularen Abstände. Die beobachtete Verbreiterung hat ihre Ursache hauptsächlich im repulsiven Anteil des Lennard-Jones Potentials. Die ursprünglich bestehende Entartung einer zu Beginn des Experiments zufällig selektierten Menge von Farbstoffmolekülen ist dann, nach einer Änderung des Drucks, nicht mehr vorhanden.

Die mathematische Behandlung der Form spektraler Löcher unter diesen Bedingungen geht von folgenden Annahmen aus:

- Alle Druckänderungen sind elastisch und reversibel.
- Die Probe ist homogen und isotrop.
- Es besteht keine Matrixkorrelation, das bedeutet die Matrixbausteine der Lösung wechselwirken alle unabhängig mit den Farbstoffmolekülen. Die Verteilungsfunktion $P(R)$ aus N Matrixbausteinen und einem Farbstoffmolekül im Abstand R , kann dann in ein Produkt aus N 2-Teilchenkorrelationen faktorisiert werden:
$$P(R_1, R_2, \dots, R_N) = g(R_1)g(R_2) \dots g(R_N).$$
- Verdünnte Lösung: Die inhomogene Verteilungsfunktion wird unter Annahme einer hohen Anzahldichte ρ_N der wechselwirkenden Lösungsmit-

telmoleküle gaußförmig angenähert (zentraler Grenzwertsatz).

Gelten diese Annahmen, so lässt sich das Verhalten eines spektralen Lochs vollständig durch folgende Größen beschreiben:

- die Störung $\nu(R)$, mit der ein Lösungsmittelmolekül im Abstand R auf die Absorptionsfrequenz ν des Farbstoffs einwirkt
- die Farbstoff-Matrix Paarkorrelation $g(R)$
- die Anzahldichte $\rho_N = N/V$
- die isotherme Kompressibilität κ

Eine genaue Analyse von Druckexperimenten muß zusätzlich zur eigentlichen Linienform des ursprünglich ausgewählten Molekülensembles, die druckinduzierte Frequenzverschiebung und Lochverbreiterung berücksichtigen. Farbstoffmoleküle besitzen bei einem konstanten Druck eine definierte Übergangswahrscheinlichkeitsverteilung $i(\nu)$. Zu diesem Term tritt nun die bedingte Wahrscheinlichkeitsfunktion $f(\nu'|\nu, \Delta p)$, welche die neue Verteilung der Übergangsfrequenzen nach einer Druckänderung Δp beschreibt:

$$i(\nu', \Delta p) = \int_{-\infty}^{\infty} d\nu \cdot f(\nu'|\nu, \Delta p) \cdot i(\nu) \quad (4.1)$$

lineare Näherung

Wenn man genügend kleine, elastische Druckänderungen zugrundelegt, so daß für die äußere Störung $\Delta\nu(\vec{R}) \ll \nu(\vec{R})$ gilt, dann kann die verschobene Absorptionsfrequenz $\nu'(\vec{R}, \Delta p)$ linear um $\Delta p = 0$ entwickelt werden.

$$\nu'(\vec{R}, \Delta p) = \nu(\vec{R}, \Delta p = 0) + \alpha(\vec{R}, \Delta p) \quad (4.2)$$

wobei

$$\alpha(\vec{R}) \cdot \Delta p \equiv \Delta\nu(\vec{R}, \Delta p) = \frac{\delta\nu}{\delta R} \cdot \frac{\delta R}{\delta V} \cdot \frac{\delta V}{\delta p} \cdot \Delta p \quad (4.3)$$

Geht man von der zu Beginn gemachten Annahme einer homogenen und isotropen Matrix aus, so verliert \vec{R} seinen vektoriellen Charakter und kann als Betrag geschrieben werden.

Der lineare Koeffizient aus (4.2) ergibt sich dann mit (4.3) als

$$\alpha(R) = -\frac{R}{3} \cdot \frac{\delta v \cdot (R)}{\delta R} \cdot \kappa \quad (4.4)$$

mit der isothermen Kompressibilität $\kappa = -\frac{1}{V} \cdot \frac{\delta V}{\delta p}$.

Gaußsche Näherung

Die bei Druckexperimenten beobachtete Lochform ergibt sich aus der Faltung in Gleichung (4.1). Der sogenannte Druckkern $f(v'|v, \Delta p)$, ist in den meisten Fällen sehr viel größer als das ursprüngliche, lorentzförmige Ausgangsloch. Er liefert die eigentlichen Parameter des Experiments. Für hohe Lösungsmitteldichten zeigt sich, daß die Veränderung eines spektralen Lochs gut mit einer Gaußschen Näherung beschrieben werden kann.

Die Theorie liefert:

$$f(v'|v, \Delta p) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}[\Delta\sigma(\Delta p)]^2} \cdot \exp \left[-\frac{[v' - v - \Delta v(v, \Delta p)]^2}{2[\Delta\sigma(\Delta p)]^2} \right] \quad (4.5)$$

v ergibt sich als Differenz der Brennfrequenz ν_B und der sogenannten Vakuumfrequenz ν_{vac} , deren Definition an späterer Stelle gegeben wird.

Die Druckverteilungsfunktion (4.5) enthält außerdem die Terme der Druckverschiebung $\Delta v(v, \Delta p) = s_p$, sowie der Druckverbreiterung $\Delta\sigma(\Delta p) = \sigma_p$.

$$s_p = \left[N \langle \alpha(R) \rangle + \frac{\langle \alpha(R) \nu(R) \rangle}{\langle \nu^2(R) \rangle} (\nu_B - \nu_{vac} - s_0) \right] \Delta p \quad (4.6)$$

$$\sigma_p = \sqrt{N \langle \alpha^2(R) \rangle (1 - \rho^2)} \cdot |\Delta p| \quad (4.7)$$

s_0 ist die mittlere Lösungsmittelverschiebung ausgehend vom Bandenmaximum. ρ ist ein unabhängiger Systemparameter, der eine Korrelation zwischen α und ν herstellt und dessen Bedeutung im folgenden Abschnitt diskutiert werden soll. Die spitzen Klammern stehen für Ensemble Mittelwerte der Größen $\alpha(R)$ und $\nu(R)$ über das Wechselwirkungsvolumen V . So gilt beispielsweise:

$$\langle \alpha(R) \rangle = \frac{1}{V} \int d^3 R g(R) \alpha(R) \quad (4.8)$$

4.2 Anwendbarkeit und Interpretation des Modells

Das mikroskopische Modell von Laird und Skinner, das unter den oben gemachten Annahmen eine lineare Verschiebung und Verbreiterung spektraler Löcher voraussagt, wurde in allen Fällen experimentell bestätigt.

Diese Methode gestattet es sowohl chromophorspezifische sowie umgebungsbedingte Eigenschaften einer Probe zu untersuchen. Beide Einflüsse bestimmen letztlich die Struktur und Dynamik eines Systems, und obwohl das ursprüngliche Modell für ein „einfaches“ Polymer-Glas entwickelt wurde, kann es meist erfolgreich auf komplexere Objekte wie Proteine angewendet werden. Das scheint zunächst verwunderlich, da auf den ersten Blick bestimmte im mikroskopischen Modell gemachte Näherungen hier nicht zu gelten scheinen. Proteine sind selbstverständlich keine homogenen und isotropen Systeme, da einzelne Domänen durchaus abweichende mechanische Eigenschaften besitzen. Aus diesem Grund ist die skalare isotherme Kompressibilität κ immer eine lokal gemittelte Größe.

Zwei weitere wichtige Punkte betreffen Annahmen, die sich scheinbar zu widersprechen scheinen: Eine hohe Anzahldichte an Lösungsmittelmolekülen und gleichzeitig das Fehlen einer Matrixkorrelation. Aus Kristallstrukturen weiß man, daß einzelne Atome oder Aminosäuren im Protein nur innerhalb eines Bereichs von 0.2 bis 0.3 Å exakt lokalisiert werden können. Diese mittleren quadratischen Abweichungen liegen damit um etwa zwei Größenordnungen über den beim Druck-Effekt erreichten Lageänderungen, und damit können Proteine im Rahmen solcher elastischer Druckexperimente als strukturell unkorreliert angesehen werden.

Farbefeckt der Lochverschiebung und Bestimmung der Kompressibilität: Pressure-shift solvent-shift Modell

Gleichung (4.6) stellt einen linearen Zusammenhang zwischen Frequenzverschiebung und Druck her, macht aber keinerlei Aussagen über bestimmte Wechselwirkungen. Legt man ein R^{-n} Potential zugrunde, so folgt aus (4.4) die Proportionalität zwischen $\alpha(R)$ und $\nu(R)$. Gleichung (4.6) lässt sich dann vereinfachen zu

$$s_p = \frac{n}{3} \cdot \kappa \cdot (\nu_B - \nu_{vac}) \cdot \Delta p \quad (4.9)$$

Dispersionswechselwirkungen und elektrostatische Kräfte höherer Ordnung (beispielsweise zwischen Dipol und induziertem Dipol) lassen sich sinnvoll mit einer $n = 6$ Abstandsabhängigkeit beschreiben. Die Geradensteigung $s_p/\Delta p$ als Funktion der Brennfrequenz ν_B , entspricht nach (4.9) dann gerade dem doppelten Wert der Kompressibilität κ . Der zweite Parameter der Funktion ist die

Vakuumfrequenz ν_{vac} . Im Gegensatz zur Kompressibilität κ , die Eigenschaften des Lösungsmittels charakterisiert, ist die Vakuumfrequenz in erster Linie eine Eigenschaft des Chromophors. Gilt $\nu_B = \nu_{vac}$, so verschwindet nach (4.9) die Druckverschiebung. Liegt ν_{vac} außerdem innerhalb der inhomogenen Absorptionsbande, so wechselt s_p das Vorzeichen.

Die Vakuumfrequenz ist dabei nicht gleichbedeutend mit der Absorption eines Moleküls im Vakuum oder in der Gasphase, sondern sie markiert vielmehr die spektrale Position, an der die Eigenschaften eines fiktiven Probenmoleküls inklusive all seiner Wechselwirkungen, nicht mehr durch die experimentellen Veränderungen des hydrostatischen Drucks beeinflusst werden.

Da für die Lösungsmittelverschiebung $s_0 = \nu_B - \nu_{vac}$ gilt, und ν_B innerhalb der inhomogenen Bande beliebig variiert werden kann, wird auch s_0 ein Parameter des Experiments der proportional ist zu s_p . Aus diesem Grund wird (4.9) auch als pressure shift - solvent shift -Modell bezeichnet.

Die Mehrzahl der bis dato durchgeführten Messungen zur Kompressibilität von Proteinen stammen aus der Bestimmung der Schallgeschwindigkeit in Lösungen unterschiedlicher Probenkonzentrationen. Die Kompressibilität des Proteins wird in diesen Fällen indirekt, aus seiner nach 0 extrapolierten Konzentration abgeleitet.

Einen gänzlich anderen Ansatz stellt die optische Bestimmung von κ dar. Durch die Ausnutzung des Farbeffekts, also des linearen Zusammenhangs zwischen differentieller Druckverschiebung ($s_p/\Delta p$) und Frequenz ν , und der Zugrundelegung einer R^{-6} -Abstandsabhängigkeit, liefert das Experiment nach (4.9) direkt den Wert für κ .

Die mittels Lochbrennspektroskopie bestimmten Kompressibilitäten liegen immer in einem vernünftigen Bereich, vergleicht man sie mit Daten aus den Schallgeschwindigkeitsmessungen.

Korrelationsgrad und Druckverbreiterung

Der Korrelationsgrad ρ zwischen $\alpha(R)$ und $\nu(R)$ ist definiert als

$$\rho^2 = \frac{\langle \alpha(R)\nu(R) \rangle^2}{\langle \alpha^2(R) \rangle \langle \nu^2(R) \rangle} \quad (4.10)$$

und stellt damit ein Maß für die Ähnlichkeit der beiden Größen dar, welche die Matrixkonfigurationen *vor* ($\nu(R)$), und *nach* ($\alpha(R)$) einer Druckänderung charakterisieren. Bei einer Korrelation von $\rho^2 = 1$ verschwindet nach Gleichung 4.7 der Druckverbreiterungsterm vollständig, während sie im anderen Extremfall für $\rho^2 = 0$ maximal wird. Hochgeordnete Systeme wie bestimmte

Kristalle, reagieren auf Druckanwendung hauptsächlich mit einer Veränderung der Materialdichte, während die lokalen Strukturen um das Chromophormolekül weitgehend konstant bleiben. Sie besitzen einen dementsprechend hohen Korrelationsgrad. Weitaus geringere Werte für ρ sind typisch für Gläser, deren struktureller Aufbau durch eine statistische Unordnung geprägt ist. Tatsächlich zeigen Proteine im Druck-Effekt ein ganz ähnliches Verhalten der Verbreiterung wie sie bei Gläsern beobachtet wird.

Molekulare Wechselwirkungen

Die spektrale Verschiebung der Frequenz unter Druckanwendung hat ihre Ursache in einer Veränderung der molekularen Abstände und damit in einer Veränderung der Stärke der beteiligten Wechselwirkungen. Zu unterscheiden sind:

Repulsive WW: Die auf sehr kurzen Distanzen wirkenden abstoßenden Kräfte (R^{-12}) leisten keinen Beitrag zur druckinduzierten Frequenzverschiebung. Warum das so ist wird durch folgende Überlegung deutlich: Wenn man davon ausgeht, daß die direkt zur spektralen Sonde benachbarten Moleküle als in einem Potentialminimum von $\nu(R)$ behandelt werden können, so verschwindet in Gleichung 4.3 die entsprechende Ableitung und diese Moleküle könnten erst in zweiter Ordnung in Δp zur Verschiebung beitragen. Im Bereich moderater Drücke sind sie daher vernachlässigbar.

Dispersions WW, induzierte Polarisation: Insbesondere wenn aromatische Proben mit ausgeprägtem π -Elektronensystem beteiligt sind, scheinen Wechselwirkungen zwischen zeitlich fluktuierenden Dipolen zu dominieren. Sie führen immer zu einer Rotverschiebung und falls andere Wechselwirkungen vernachlässigbar sind, wie im Fall unpolarer Systeme, kann die Lösungsmittelverschiebung s_0 Werte von mehreren hundert oder tausend Wellenzahlen erreichen und damit weit über die inhomogene Bande hinausreichen [54]. Für polare Probensysteme müssen zusätzlich noch Wechselwirkungen zwischen permanenten und induzierten Dipolen berücksichtigt werden. In allen Fällen lassen sich diese mit dem angenommenem R^{-6} Potential beschreiben.

Elektrostatische WW: Elektrostatische Wechselwirkungen, wie die zwischen einer Ladung und einem Dipol sowie zwischen Dipol und Dipol, besitzen eine R^{-2} beziehungsweise R^{-3} -Abstandsabhängigkeit. Die elektrostatischen Terme können sowohl zu einer Rot- wie zu einer Blauverschiebung führen, und daher kompensieren sie im Einzelfall die dispersiven Wechselwirkungen und führen

zu verringerten differentiellen Druckverschiebungen $s_p/\Delta p$.

Bei einer Beschreibung inter- und intramolekularer Wechselwirkungen in wässrigen Lösungsmitteln spielen Wasserstoffbrückenbindungen eine bedeutende Rolle. Sie können als ein besonderer Fall von kombinierter Ladungs- und Dipolwechselwirkung betrachtet werden. Man unterscheidet unterschiedlich starke Wasserstoffbrücken mit einer effektiven Reichweite von etwa 1 bis 3 Å.

Zu erwähnen ist, daß alle genannten Wechselwirkungen bis auf die repulsiven und rein dispersiven, stark directional wirken. Das heißt, sie sind in besonderem Maße von der räumlichen Geometrie der beteiligten Gruppen abhängig. Aus dem gleichen Grund tragen insbesondere H-Brücken zur Stabilität räumlicher makromolekularer Strukturen bei (Proteine, DNA). Es existiert der Begriff *hydrogen-bond-polymerization*.

Volumenfluktuationen

Die Kompressibilität ist eine thermodynamische Zustandsgröße, die experimentell und theoretisch zugänglich ist. Über elementare Beziehungen der statistischen Mechanik, ist der Materialparameter κ mit den Volumenfluktuationen des Systems verknüpft.

$$\frac{\Delta V}{V} = \sqrt{\frac{k_B \cdot T \cdot \kappa}{V}} \quad (4.11)$$

Mit der Temperatur T und dem Boltzmannfaktor k_B .

4.3 Insulin

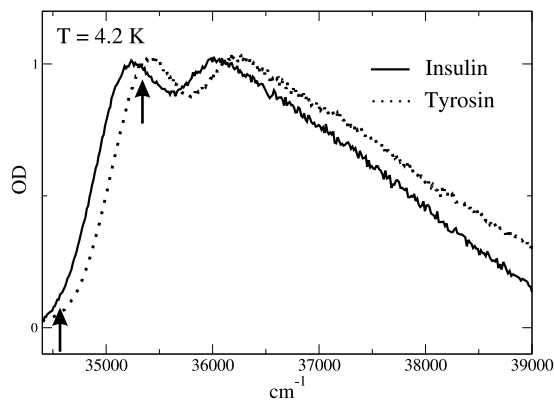


Abbildung 4.1: Tieftemperatur-Absorptionsspektrum von Insulin. Zum Vergleich ist das Spektrum von freiem Tyrosin ebenfalls gezeigt. Das UV-Absorptionsspektrum von Tryptophan-freien Proteinen wird gewöhnlich von den spektralen Eigenschaften des Tyrosins dominiert. Die Pfeile markieren den beim Druck-Effekt gemessenen Frequenzbereich. Spektren auf 1 normiert.

Insulin ist nach BPTI [55, 42] das zweite Protein an dem Lochbrennen im ultravioletten Spektralbereich erfolgreich durchgeführt wurde. Gleichzeitig ist es das erste, an dem mit dieser Methode örtliche Positionen auf einem Molekül spektral aufgelöst werden konnten [56]. Als Hormonprotein ist es am Glucosestoffwechsel beteiligt. Ähnlich wie die Ribonuclease, ist auch Insulin ein Molekül, dessen Erforschung wesentlich zum heutigen Verständnis von Bau und Funktion von Proteinen beigetragen hat. Die erste Entschlüsselung einer nativen Aminosäuresequenz durch F. Sanger [57, 58] markiert einen Meilenstein der biochemischen Forschung, waren dies doch die ersten Schritte in ein biotechnisches Zeitalter.

Bei den enormen Fortschritten die seither auf diesem Gebiet gemacht wurden, mag manch einem der Zeitraum von 60 Jahren fast als gering erscheinen.

Insulin ist ein aus drei α -Helices bestehendes Protein mit einer molekularen Masse von 5.1 kDa. Es entsteht während seiner Synthese aus einem größeren Vorläuferpeptid, dem Proinsulin. Nach Reduktion der Cysteine und Ausbildung der Schwefelbrücken, kommt es zur proteolytischen Abspaltung eines Teils des Proinsulinpeptids. Übrig bleibt das native Insulinmolekül bestehend aus 51 Aminosäuren, die in zwei durch Disulfidbrücken kovalent verbundenen Peptidketten, A und B, organisiert sind. Innerhalb der A-Kette befindet sich eine weitere Disulfidbrücke. Die Sequenz enthält insgesamt vier Tyrosine, die nach ihrer Position als Tyr 14A, Tyr 19A, Tyr 16B und Tyr 26B bezeichnet werden. Abbildung 4.8 zeigt ein „space-filling“-Modell des Insulinmoleküls mit den markierten Positionen der vier aromatischen Aminosäuren.

Absorptionsspektren von freiem Tyrosin und von Insulin sind in Abbildung 4.1 einander gegenübergestellt. Im qualitativen Verlauf unterscheiden sich beide nicht voneinander, man stellt jedoch eine Rotverschiebung der Insulinabsorp-

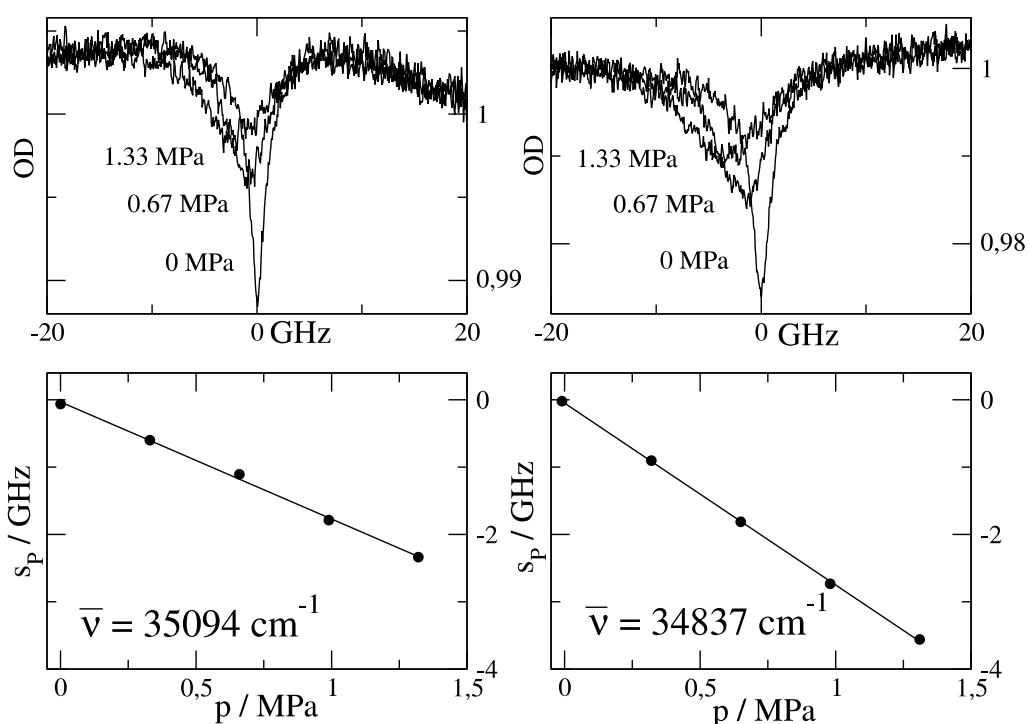


Abbildung 4.2: Spektrale Löcher im Insulin. Deutlich erkennbar ist die unterschiedlich starke Frequenzverschiebung für „blaue“ und „rote“ Löcher. Die unteren Bilder zeigen den jeweiligen Verlauf der Druckverschiebung. Die lineare Abhängigkeit demonstriert gleichzeitig die Anwendbarkeit der in der Theorie gemachten Näherungen.

tion von ca. 250 cm^{-1} verglichen mit der von freiem Tyrosin fest. Als Tryptophanfreies Protein, dominieren hier erwartungsgemäß die spektralen Eigenschaften von Tyrosin. Die insgesamt drei Phenylalanine im Insulin haben mit ihrer vergleichsweise geringen Extinktion oberhalb von 37000 cm^{-1} praktisch keinen Einfluß. Disulfidbrücken hingegen absorbieren über einen recht breiten Bereich, weisen aber aus eben diesem Grund gleichzeitig eine recht geringe Extinktion auf. In den meisten Fällen, speziell wenn die Anzahl an Schwefelbrücken in etwa denen der Tyrosine entspricht, können sie vernachlässigt werden.

4.3.1 Druck-Effekt

Abbildung 4.2 zeigt das Verhalten spektraler Löcher im Insulin nach Druckvariation für zwei verschiedene spektrale Positionen. Die Verschiebung der Zentralfrequenz erfolgt in allen Fällen zu höheren Wellenlängen hin, zeigt also eine Rotverschiebung. Darüber hinaus ist ein Farbeffekt erkennbar, der sich

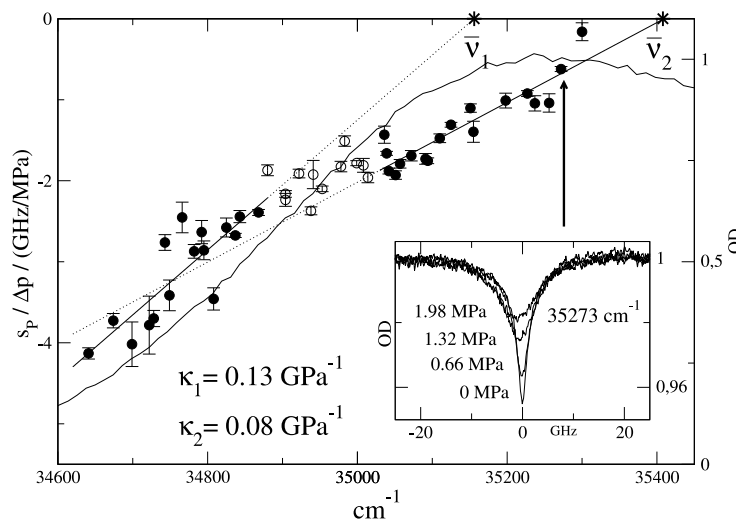


Abbildung 4.3: Farbabhängigkeit des Druck-Effekts von Insulin über die inhomogene Bande. Zwei Bereiche unterschiedlicher Steigung lassen sich unterscheiden. Nahe der Vakuumfrequenz $\bar{\nu}_2$, zeigt sich nur noch eine verschwindende Druckverschiebung.

in einer größeren absoluten Druckverschiebung im Bereich niedrigerer Wellenzahlen bemerkbar macht und zu unterschiedlichen Steigungen von s_p gegen den Druck p führt (Abbildung 4.2, 4.3).

Das Ergebnis der Druck-Effektmessungen über einen Bereich von ca. 700 Wellenzahlen ($34600 - 35300 \text{ cm}^{-1}$) fasst Abbildung 4.3 zusammen. Aufgetragen ist die Verschiebung des Lochzentrums pro Druck $s_p / \Delta p / (\text{GHz}/\text{MPa})$ als Funktion der Anregungswellenzahl. Die Daten zeigen über dem gemessenen Frequenzbereich keinen einheitlichen Verlauf und lassen sich nicht befriedigend mit nur einer einzigen Geraden anpassen (Gl. 4.9). Vielmehr lässt sich ein steilerer Abschnitt von 34600 cm^{-1} bis etwa 34850 cm^{-1} , von einem flacheren Teil im Bereich von 35000 cm^{-1} bis 35300 cm^{-1} unterscheiden.

Obgleich die Datenpunkte gerade zu kleineren Frequenzen hin eine sichtbare Streuung aufweisen, lassen sich beide Abschnitte mit einer vernünftigen Korrelation (0.84 und 0.92) linear anpassen. Die Ausgleichsgeraden sind eingezeichnet, wobei der mittlere Teil als Übergangsregion nicht in die Regression eingeht. Extrapoliert man beide Linien zum Wert 0 für $s_p / \Delta p / (\text{GHz}/\text{MPa})$, erhält man die Schnittpunkte der Abszisse bei 35156 cm^{-1} und 35408 cm^{-1} . Nach Gleichung (4.9) entsprechen diese Werte zwei unterschiedlichen Vakuumabsorptionsfrequenzen $\bar{\nu}_1$ und $\bar{\nu}_2$. Die der Abbildung 4.3 integrierten Lochspektren zeigen eine spektrale Position nahe $\bar{\nu}_2$. Erwartungsgemäß beobachtet man hier nur eine sehr geringe Druckverschiebung zusätzlich zur Verbrei-

terung. Aufgrund der in Abschnitt 4.1 und 4.2 gemachten Aussagen, und zusammen mit Gleichung(4.9), lässt sich aus der Steigung der frequenzabhängigen Druckverschiebung, direkt die Kompressibilität bestimmen. Die ermittelten Werte von $\kappa_1 = 0.13 \text{ GPa}^{-1}$ und $\kappa_2 = 0.08 \text{ GPa}^{-1}$ unterscheiden sich um einen Faktor größer 1.6. Es ist davon auszugehen, daß es sich hier um das Signal von unterscheidbaren Tyrosin-Spezies im Insulinmolekül handelt. Die eigentliche Messgröße ist eine wirklich lokale Kompressibilität, die wie die Messungen zeigen, innerhalb eines makromolekularen Systems wie einen Protein nicht konstant ist.

Tyrosin ist chemisch betrachtet ein substituierter Phenolkörper. Phenol, der einfachste aromatische Alkohol, zeigt eine äußerst vielfältige Lösungsmittelchemie und ist aufgrund seines Modellcharakters im Bezug auf die Aminosäure von Bedeutung [59, 60, 61, 62].

Die Reaktivität wird entscheidend durch die alkoholische Hydroxylgruppe bestimmt, die sowohl als Wasserstoffbrücken-Donor und als Akzeptor fungieren kann. Beide Bindungen entsprechen zwei stabilen Minima des Phenol-Wasser Systems. Zusätzlich dazu kommt es, wenn immer sterisch möglich, zur Ausbildung resonanzstabilisierter π - Wasserstoffbrücken, die die Bindungsenergie weiter absenken.

Entscheidend auch im Hinblick auf die Diskussion dieser Experimente, ist dabei der indirekte strukturelle Einfluß den Tyrosin auf seine Umgebung ausübt. Es bilden sich Cluster-Strukturen, die sich in ihrer Topologie und ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften ganz wesentlich von freiem Lösungsmittel unterscheiden.

4.3.2 Die molekulare Umgebung einzelner Tyrosine

Insulin befand sich während der Experimente in einem Gemisch aus Wasser und Glycerin. Der hohe Anteil von 60 Volumenprozent an Glycerin diene in erster Linie als eine Art Frostschutz und gewährleistet das Einfrieren der Probe als ein Glas. Als Osmolyt wirkt Glycerin außerdem stabilisierend auf Proteine in Lösung. Der dafür verantwortliche Mechanismus ist der einer spezifischen, oder preferentiellen Solvation. Timasheff et al. argumentiert mit einer preferentiellen Hydratation von Proteinen. Der damit verbundene sterische Ausschluß des Cosolvents Glycerin führt zu einer Erhöhung des chemischen Potentials des Proteins. Dies entspricht einer Reduktion der Konzentration bei konstanter chemischer Aktivität, oder einer Reduktion der Löslichkeit des Proteins. Letzteres führt zur Oberflächenminimierung und damit zu einer Stabilisierung des gefalteten Zustands [64]. Allerdings kommt es neben diesen rein sterischen Effek-

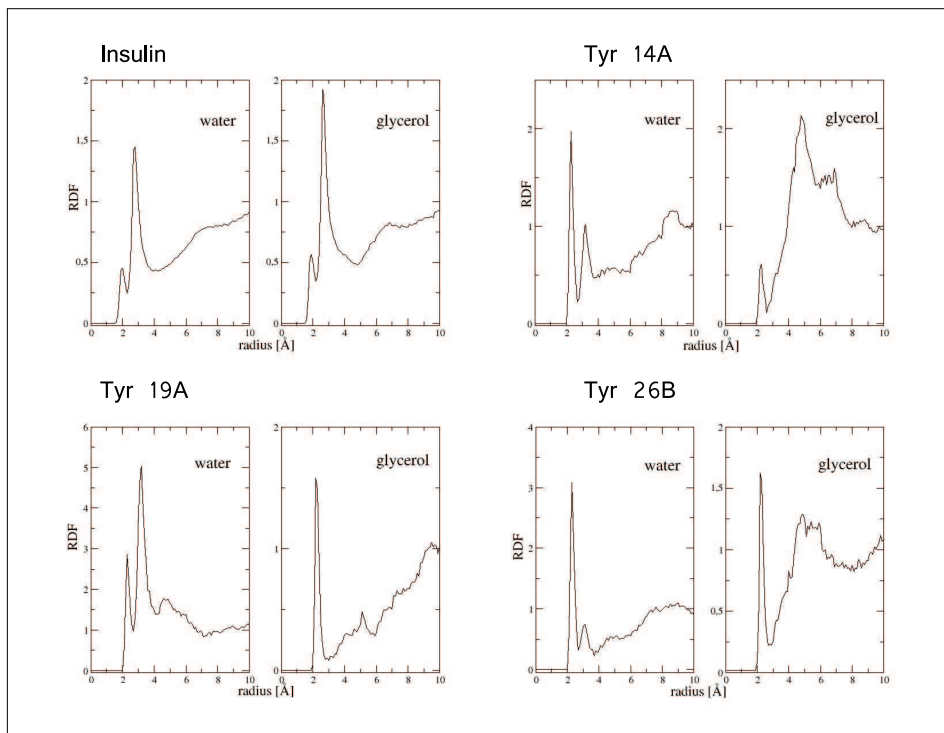


Abbildung 4.4: Aus Ref. [63] entnommene Radiale Verteilungsfunktionen der Lösungsmittelkomponenten um das Insulinmolekül, sowie für drei Tyrosine.

ten, abhängig von der chemischen Beschaffenheit der Proteinoberfläche, auch zu sehr viel spezifischeren Wechselwirkungen. Hier sorgen geladene, polare und hydrophobe Gruppen für einen stark heterogenen Charakter der Solvationshülle mit deutlich variierenden lokalen Eigenschaften [65, 66, 67]. Die gefundene Reduktion von Volumen und Kompressibilität bei Proteinen nach Zugabe von Glycerin deutet darauf hin, daß im Innern gebundenes Wasser aufgrund eines osmotischen Effekts freigesetzt wird [68, 69], was zu einem Kollaps interner Hohlräume und einer insgesamt höheren Packungsdichte globulärer Proteine führt.

Um einen Eindruck der molekularen Umgebung von Insulin zu bekommen, wurden an diesem Lehrstuhl Molekulardynamik Simulationen am monomeren Protein in Wasser- Glycerin bei Raumtemperatur durchgeführt. Abbildung 4.4 zeigt sogenannte Radiale Verteilungsfunktionen (RDF's) entnommen aus Referenz [63]. Dies sind Aufenthaltswahrscheinlichkeiten für Lösungsmittelmoleküle in einem bestimmten Abstand zum Protein, beziehungsweise zu den

Hydroxylgruppen einzelner Tyrosine. Eine erhöhte molekulare Ordnung des Lösungsmittels, immer bezogen auf den Wert in freier Lösung (bulk), manifestiert sich in gut definierten Peaks. Der erste Peak, der gewöhnlich im Bereich von 1.5 bis 2 Å auftritt, ist die Folge von Wasserstoffbrücken zwischen Lösungsmittelmolekülen und der Proteinoberfläche. Andere, nichtkovalente Wechselwirkungen sorgen für ein zweites deutliches Maximum im Bereich von 3.5 Å, das gleichzeitig die äußere Grenze der ersten Solvationshülle bildet.

Lösungsmittelmoleküle, die sich keine direkte Oberfläche mehr mit dem Protein teilen und dennoch in ihrer Struktur deutlich vom reinen Lösungsmittel zu unterscheiden sind, definieren im Bereich von 3.5 bis 6 Å die zweite Solvationshülle. Im Abstand von 8-10 Å ist kein Einfluß des Proteins auf die Lösungsmittelstruktur mehr festzustellen, dieser Bereich ist auf 1 normiert.

Die RDF's für das gesamte Insulinmolekül sind ihrem qualitativen Verlauf nach sehr ähnlich, was eine Folge von Mittelungseffekten ist. Ein interessantes, und keinesfalls zu erwartendes Ergebnis, ist eine bevorzugte Wechselwirkung von Glycerin mit dem Protein. In der ersten Lösungsmittelhülle ist die Anzahl der Glycerinmoleküle doppelt so hoch wie der entsprechende Wert des Bulk-Systems. Die RDF für Wasser zeigt dagegen nur eine Erhöhung um den Faktor 1.5. Das Konzept einer preferentiellen Exklusion von Glycerin als Cosolvent scheint keine uneingeschränkte Allgemeingültigkeit zu besitzen und wird womöglich in weit größerem Maße als bisher angenommen, von den individuellen Oberflächeneigenschaften globulärer Proteine bestimmt.

Abbildung 4.4 zeigt außerdem die lokalen Lösungsmittelverteilungen für drei unterschiedliche Tyrosine.

Polare Gruppen wechselwirken hauptsächlich über Wasserstoffbrücken mit den Lösungsmolekülen. Dabei hängt der strukturelle Einfluß einer polaren Gruppe auf seine Umgebung auch entscheidend vom Abstand zur nächsten polaren Gruppe ab, da innerhalb solcher Regionen ein dichteres Netzwerk von Bindungen aufgebaut werden kann [70]. Betrachtet man die Lösungsmittelverteilungen für drei unterschiedliche Tyrosine im Insulinmolekül so wird, anders als in der über das ganze Protein gemittelten Funktion, die Unterscheidbarkeit lokaler Positionen sichtbar. In allen Fällen beobachtet man *Tyr* – H_2O und ebenso *Tyr* – *Gly*-Bindungen, mit Ausnahme von Tyr 14A, der als einziger keine Wasserstoffbrücken mit Glycerin eingeht. Tyr 14A ist der im Monomer am weitesten exponierte Rest. Die großen Werte für Wassermoleküle bei Tyr 19A stehen im Einklang mit seiner weniger offenen Position im Protein (siehe Abb. 4.8). In diesem Fall, wie auch bei Tyr 26B scheint der direkte Kontakt zu den kleineren Wassermolekülen aus sterischen Gründen zu dominieren.

Die Tabelle 4.1 enthält die Werte zu den lokalen Kompressibilitäten aus den MD-Rechnungen.

Position	κ [GPa ⁻¹]		mean error [GPa ⁻¹]	
Wasser/Glycerin	0.321 ^a	0.411 ^b	0.012 ^a	0.017 ^b
Tyr 14A	0.278 ^a	0.364 ^b	0.026 ^a	0.013 ^b
Tyr 19A	0.183 ^a	0.296 ^b	0.047 ^a	0.015 ^b
Tyr 26B	0.187 ^a	0.193 ^b	0.006 ^a	0.007 ^b
Protein	0.181		0.005	
bulk	0.381		0.002	

Tabelle 4.1: Lokale Kompressibilitäten aus den MD-Rechnungen [63].^(a) berücksichtigt nur die erste Solvationsschale. ^(b) berücksichtigt die erste und die zweite Solvationsschale.

An dieser Stelle noch einige Anmerkung zur Vergleichbarkeit der experimentellen und theoretischen Ergebnisse. Die Simulationen gehen von Raumtemperaturbedingungen aus während die Experimente bei 2 K stattfanden, und es stellt sich notwendigerweise die Frage nach der Temperaturabhängigkeit der Kompressibilität κ .

Die Stabilität eines Proteins unter Druckanwendung wird im wesentlichen durch zwei thermodynamische Parameter charakterisiert: Die Kompressibilität, also die erste Ableitung des Volumens nach dem Druck, und die Expansibilität, die erste Ableitung der Volumens nach der Temperatur. Frauenfelder et al. bestimmten den linearen Expansionskoeffizienten für Myoglobin auf $100 \cdot 10^{-6} \text{K}^{-1}$ [71]. Daraus resultiert eine mittlere relative Abstandsänderung atomarer Positionen von 3%, über einen Temperaturbereich von 300 K. In absoluten Werten entspricht dies einer Änderung von etwa $5 \cdot 10^{-2} \text{Å}$.

Solche Änderungen scheinen zu gering um interatomare Kräfte ausreichend zu beeinflussen, und ein Vergleich von Raumtemperatur-Simulationen und gemessenen Tieftemperatur-Kompressibilitäten ist daher gerechtfertigt.

Im übrigen ist bei Proteinen, in allen Fällen wo ein Vergleich zwischen Theorie und Experiment möglich ist, die Übereinstimmung gut.

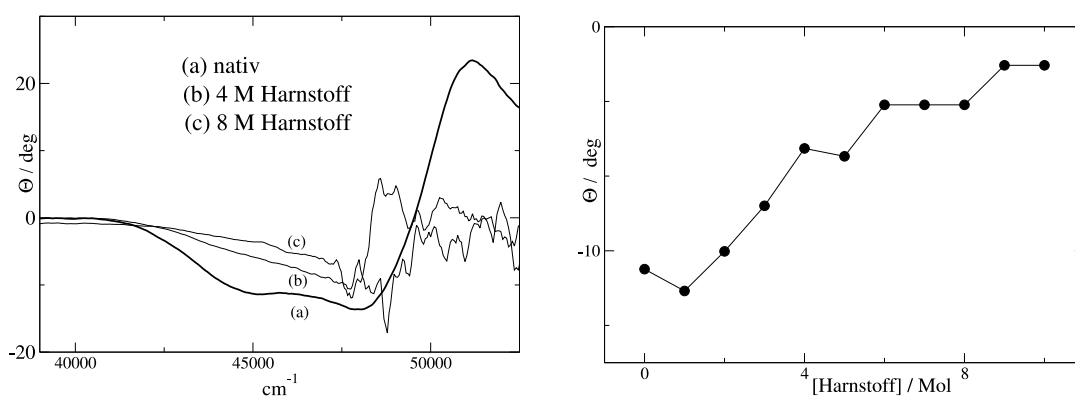


Abbildung 4.5: CD-Spektren von Insulin, **Abbildung 4.6:** CD-Daten gemessen an der Position bei 45000cm^{-1} (224 nm), als Funktion der Harnstoffmenge.

4.3.3 chemische Entfaltung von Insulin

Seit langer Zeit weiß man, daß bestimmte Cosolventien wie Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid ab gewissen Konzentrationen zur Denaturierung von Proteinen führen. Dabei scheint der Effekt solcher Agenzien eine direkte, wie eine indirekte Komponente zu besitzen. Die preferentielle Bindung von Harnstoff oder GuHCl an hydrophobe Aminosäuren sowie an Peptidgruppen, begünstigt einen entfalteten gegenüber einem kompakten nativen Zustand. Gleichzeitig haben sie auch Einfluß auf die Lösungsmittelstruktur und reduzieren hydrophobe Wechselwirkungen über eine Schwächung der Wasserstoffbrücken [72]. Dieser zweite indirekte Mechanismus, sorgt so für die Überwindung einer hohen entropischen Barriere. Das Resultat ist im allgemeinen eine offenerere Struktur, die teilweise Eigenschaften eines „random coils“ besitzt [73]. Mechanistisch betrachtet können stabilisierende (z.B. Glycerin, Sucrose) und destabilisierende Cosolventien (z.B. Harnstoff, GuHCl), als zwei Aspekte desselben Phänomens betrachtet werden. Sie unterscheiden sich lediglich im Vorzeichen der freien Enthalpie bezüglich ihrer Wechselwirkung [74].

Die Abbildungen 4.5 und 4.6 fassen die CD-Daten von Insulin zusammen. Das Spektrum von gefaltetem Insulin ist denen in 4 und 8 molarem Harnstoff gegenübergestellt. Entfaltetes Insulin bedeutet in diesem Fall auch immer reduziertes, das heißt disulfidbrückenfreies Insulin ¹. Natives Insulin zeigt die typische Signatur α -helikaler Strukturen, mit einer deutliche sichtbaren „Welle“ im Bereich zwischen etwa 45000 cm^{-1} und 47000 cm^{-1} . Die Zugabe von

¹Die Anmerkung ist deshalb wichtig, da bei der späteren Diskussion der RNase hier eine Unterscheidung getroffen wird.

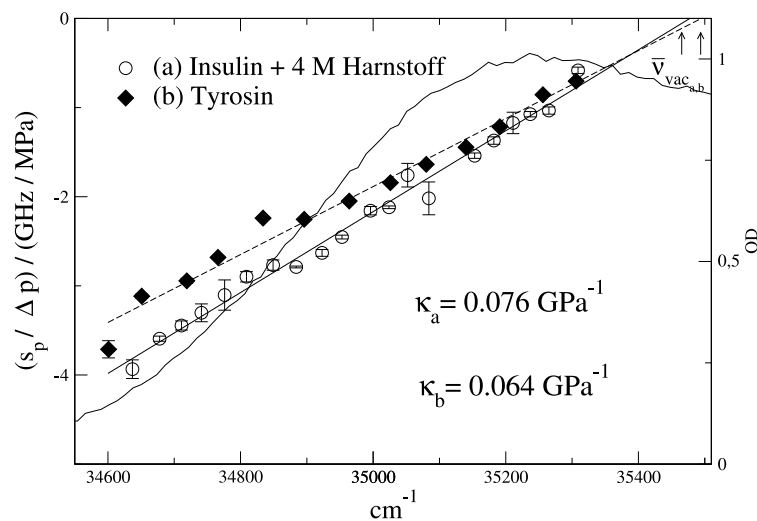


Abbildung 4.7: Druck-Effekt an chemisch denaturiertem Insulin. Zum direkten Vergleich sind die an freiem Tyrosin in Wasser-Glycerin gemessenen Daten gezeigt. Das hinterlegte Spektrum stammt vom Insulin.

Harnstoff verändert das Spektrum über den gesamten Verlauf, wobei dessen eigene Absorption erst oberhalb von 47000 cm^{-1} zum Signal beiträgt [75].

Gewöhnlich dient das an Position von 45000 cm^{-1} (220nm) gemessene CD-Signal zur Charakterisierung des Sekundärstrukturgehalts von Proteinen und damit auch als Indikator für Konformationsübergänge [76, 77]. Abbildung 4.6 zeigt konzentrationsabhängige Werte für $\Theta_{220\text{nm}}$ und verdeutlicht den zunehmenden Verlust der α -Helix Strukturen im Insulin bei steigender Zugabe von Harnstoff. Ziel dieser CD-Messungen war nicht eine systematische oder mechanistische Studie zum Faltungsvorgang beim Insulin, dafür sei auf die oben zitierte Literatur und Referenzen darin verwiesen, sondern vielmehr eine solide experimentelle Ausgangsbasis für die Tieftemperaturversuche mit chemisch denaturiertem Protein.

Das Ergebnis der Druckeffektmessungen am Insulin in 4 M Harnstoff fasst Abbildung 4.7 zusammen und stellt gleichzeitig diese Messungen denen an freiem Tyrosin gegenüber, die bereits im Rahmen einer anderen Arbeit am Lehrstuhl durchgeführt wurden [55]. Die einzelnen Datenpunkte zeigen ein sehr einheitliches Verhalten und lassen sich durch einen einzelnen linearen Fit mit hoher Korrelation von 0.99 anpassen. Der so ermittelte Wert für κ von 0.076 GPa^{-1} für entfaltetes Insulin, liegt damit etwa 16% über dem für Tyrosin in Wasser-Glycerin.

Insgesamt fügt sich das Ergebnis gut in ein qualitatives Bild, das man von der Entfaltung eines Proteins besitzt. Danach verschwindet die differenzierte Tertiär- und Sekundärstrukturumgebung weitgehend, und die Peptidkette ist mehr oder weniger vollständig von Lösungsmittelmolekülen umgeben. Die einzelnen Tyrosine sind im Experiment mit Harnstoff anhand des Druck-Effekts nicht mehr unterscheidbar und zeigen ein Verhalten, das qualitativ praktisch identisch ist mit dem des freien Chromophors (Abb. 4.7). Verglichen mit dem steileren „roten Bereich“ des gefalteten Proteins (Abb. 4.3), fast eine Reduktion um den Faktor 2. Außerdem findet man für beide Proben fast identische Vakuumfrequenzen bei 35480 cm^{-1} . Diese liegen deutlich innerhalb der inhomogenen Absorptionsbande von Insulin² und Tyrosin. Hier werden die bathochromen Beiträge der dispersiven Wechselwirkungen zur Lösungsmittelverschiebung ganz offensichtlich durch elektrostatische Terme stark kompensiert.

4.3.4 Die Struktur von Insulin

Wie können die gefundenen experimentellen Daten nun in Bezug gesetzt werden zur Molekularstruktur von Insulin, beziehungsweise ist es möglich diejenigen Tyrosine, die die unterschiedlichen lokalen „sites“ des Proteins in unserem optischen Experiment definieren, zu identifizieren?

Insulin zeigt ein äußerst komplexes Lösungsverhalten und eine hohe strukturelle Flexibilität [78, 79, 80]. Mir ist nur eine einzige Arbeit bekannt, die für sich in Anspruch nimmt ein *natives Monomer*, und damit die erste Struktur der physiologisch aktiven Forms des Hormons, kristallisiert zu haben [81]. Ansonsten kristallisiert Insulin in einer Vielzahl verschiedener Aggregate von Dimeren bis Hexameren, deren vergleichende Analysen jedoch zu einem recht genauen Bild des monomeren Moleküls geführt haben.

Die hohe Affinität zur hydrophoben Assoziation scheint beim Insulin als ein Schutz vor physiologischer Dysfunktion. Zink-assoziierte Hexamere spielen als kristalline biologische Speicherform des Hormons eine wichtige Rolle, da sie eine pathogene Verklumpung, beispielsweise die Ausbildung amyloider Faserstrukturen³ oder partiell missgefalteter Formen verhindert [82, 83, 50]. Unter sauren Lösungsbedingungen wie im Fall dieser Experimente kristallisiert Insulin als Dimer, da in diesem Fall der Histidin-10 Rest protoniert ist und nicht mehr als Komplexpartner für Zink Ionen zur Verfügung steht [50].

²Das Absorptionsspektrum von Harnstoff-entfaltetem Insulin zeigte keinen Unterschied zu dem des nativen Proteins.

³Solche Strukturen anderer Proteine kennt man an als Ursache degenerativer Erkrankungen wie Alzheimer oder Creutzfeld-Jacob.

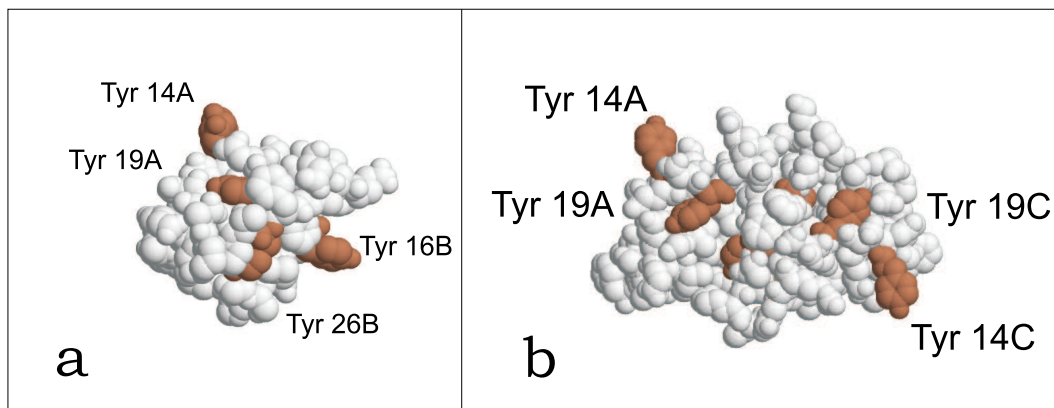


Abbildung 4.8: Raumstrukturen des Insulinmoleküls. a) zeigt das Monomer: Die vier Tyrosine sind markiert. b) zeigt das Dimer, wobei hier nicht alle Tyrosine zu sehen sind. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind außerdem nur die vier der A-Spezies markiert (beim Molekül 2 als C-Tyrosine bezeichnet). Allerdings sind die beiden Tyrosine 26B zu erkennen. Die Darstellung vermittelt einen anschaulichen Eindruck der unterschiedlichen Nahumgebungen der einzelnen Aminosäuren, insbesondere auch zwischen A und B-Spezies.

Ein solches Dimer ist in Abbildung 4.8 neben der monomeren Form gezeigt. Die Insulin-Insulin Assoziation geht einher mit der Ausbildung einer β -Faltblatt Struktur zwischen Regionen der B-Ketten zweier Monomere. Tatsächlich führt diese Verbindung zu einer heterogeneren spektralen Situation der vier Tyrosine, die im Monomer alle eine im Mittel hohe Lösungsmittelzugänglichkeit besitzen. Dies wird allein beim Betrachten der Strukturen deutlich. Die Veränderungen betreffen insbesondere die in der B-Kette befindlichen Reste 16 und 26, da hier nun die Kontaktfläche des Dimers besteht, und die Lösungsmittelzugänglichkeit stark reduziert ist. Diese sollen im weiteren Verlauf als B-Spezies bezeichnet werden. Der Effekt auf die beiden Tyrosine der A-Kette ist dagegen weniger dramatisch. Tyr 19A scheint im Dimer eine etwas freiere Position zu besitzen und bildet mit Tyr 14A eine weitestgehend exponierte A-Spezies.

Man kann davon ausgehen, daß die unterschiedlichen Signale beim Druck-Effekt von den A beziehungsweise B-Chromophoren im Dimer stammen. Auf Grundlage der Messungen an freiem Tyrosin, sowie an denaturiertem Insulin, scheint die Zuordnung der Region geringerer Kompressibilität (flacher Abschnitt) zu den Tyrosinen der A-Spezies zunächst naheliegend. Auch das insgesamt homogenere Signal im blauen Spektralbereich spricht für diese Interpretation. Die größerer Streuung der Daten unterhalb 34850cm^{-1} wäre dann die Folge einer, verglichen mit der A-Spezies, weniger homogenen Gruppe von Chro-

mophoren in der B-Kette (Abbildung 4.8b). Die Lochbrennexperimente am Insulin zeigen, daß diese Methode prinzipiell geeignet ist, unterschiedliche *räumliche* Positionen auf einem Protein zu unterscheiden. Diese existieren sowohl am Dimer, wie auch am Monomer. In Zusammenhang mit den Versuchen zur chemischen Entfaltung vermitteln sie außerdem ein qualitatives Verständnis globaler Konformationsübergänge kompakter Proteine.

4.4 Vasopressin

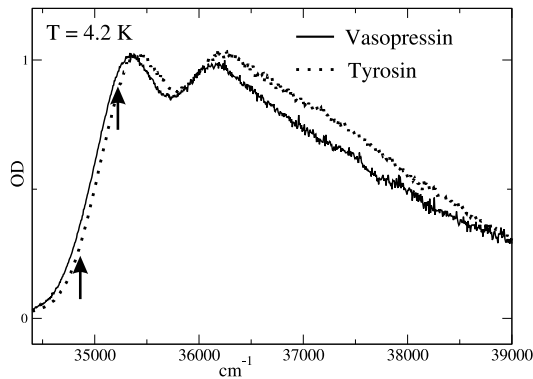


Abbildung 4.9: Tieftemperaturabsorptions- von Vasopressin und Tyrosin. Die Pfeile markieren den experimentellen Frequenzbereich. Spektren auf 1 normiert.

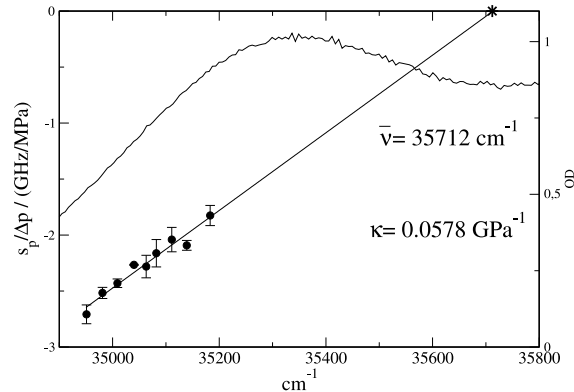


Abbildung 4.10: Druck-Effekt gemessen am Vasopressin

Vasopressin ist ein Peptidhormon, das im Hypothalamus gebildet wird, und das den osmotischen Druck und das Flüssigkeitsvolumen des Körpers reguliert. Es besteht lediglich aus neun Aminosäuren mit folgender Sequenz: **Cys₁-Tyr₂-Phe₃-Gln₄-Asn₅-Cys₆-Pro₇-Lys₈-Gly₉**. Zwischen Cystein₁ und Cystein₆ besteht eine Disulfidbindung.

Es existieren NMR-Datensätze zu verschiedenen Vasopressin-Derivaten [84]. Die Beweglichkeit dieser molekularen Kette wird durch die Schwefelbrücke eingeschränkt und führt zur Ausbildung einer Loop-Struktur. Wirklich definierte Regionen wie Helices oder Faltblätter fehlen, und es existieren keine wirklich „geschlossenen“ Strukturen. Tyrosin befindet sich an Position zwei.

Abbildung 4.9 zeigt zunächst das Absorptionsspektrum von Vasopressin und Tyrosin. Man stellt eine Rotverschiebung von Vasopressin um ca. 100 cm^{-1} fest, und damit liegt die Absorption ziemlich genau zwischen der von Insulin und freiem Tyrosin (Abb. 4.1). Diese deutlich sichtbare Lösungsmittelverschiebung ist durchaus erwähnenswert, das insbesondere vor dem Hintergrund, daß zwischen der Absorption von gefaltetem und denaturiertem Insulin (Spektrum nicht gezeigt), praktisch kein Unterschied festzustellen war.

Die Auswertung der druckabhängigen Frequenzverschiebung (Abb. 4.10) führt zu einem Wert für κ von 0.058 GPa^{-1} . Dieser liegt damit innerhalb von 10% bei dem Wert für freies Tyrosin und knapp 25% unter dem für harnstoffbehandeltes Insulin (Abb. 4.7). Dieser doch recht deutliche Unterschied zum entfalteten Insulin veranschaulicht ein Tatsache: Auch die dort (beim Insulin) zu erwarten-

de offene Konformation der Peptidkette, unterscheidet sich in ihren volumetrischen Eigenschaften um die aromatischen Aminosäuren offenbar erheblich von denen eines Nonapeptids wie Vasopressin. Dies ist in der Tat ein Beleg für den sensitiven Einfluß der lokalen Umgebung (Peptid + äußeres Lösungsmittel) auf Tyrosin in den optischen Experimenten, was in besonderem Maße auch bei der weiter unten stattfindenden Diskussion zum Druck-Effekt an chemisch entfalteter Ribonuclease deutlich werden wird (4.5.2, 4.5.4).

Die Vakuumfrequenz von Vasopressin liegt mit 35712 cm^{-1} im Bereich zwischen beiden Absorptionspeaks der inhomogenen Bande von Vasopressin.

4.5 Ribonuclease

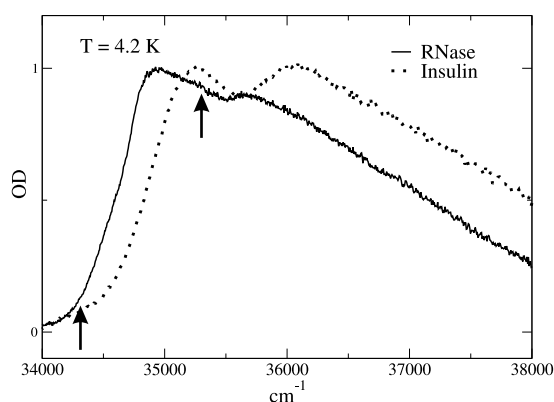


Abbildung 4.11: Absorptionsspektrum von Ribonuclease im Vergleich zum Insulin bei $T = 4\text{K}$. Neben einer deutlichen Rotverschiebung zeigt die RNase einen weniger stark ausgeprägten zweiten Peak im Vergleich zum Insulin. Der Bereich von über 900 cm^{-1} , über den der Verlauf des Druck-Effekts gemessen wurde, ist markiert. Spektren auf 1 normiert.

Die Ribonuclease ist das am meisten untersuchte Protein des 20. Jahrhunderts. Seine Erforschung trug maßgeblich zum Verständnis von Faltung, Stabilität, Chemie, Enzymologie und Evolution biologischer Makromoleküle bei.

Bis heute wurden insgesamt vier Nobelpreise vergeben, die unmittelbar Arbeiten mit diesem Protein zum Thema hatten [85].

Ribonukleinsäuren dienen, wie aus dem Schema in Kapitel 2.2 zu entnehmen, als Mittler biologischer Information zwischen DNA und Protein. Zwei Enzyme spielen hierbei innerhalb des RNA-Stoffwechsels eine kontrollierende Rolle: RNA-Polymerasen und RNA-Depolymerasen. Letztere werden meistens einfach als Ribonucleasen, oder auch kurz RNasen bezeichnet. Das native nicht modifizierte Enzym, die RNase A⁴ besteht aus 124 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 13.680 kDa entspricht. Man findet 19 der 20 natürlichen Aminosäuren in der Sequenz von RNase, lediglich Tryptophan fehlt.

Die dominanten Sekundärstrukturelemente sind ein langes antiparalleles β -Faltblatt und drei kürzere α -Helices (Abb. 4.19). Vier Disulfidbrücken bilden ein symmetrisches Netzwerk, das verschiedene Punkte der Sekundärstrukturen miteinander verbindet, und das sowohl zur enormen Stabilität der RNase, wie auch zu deren katalytischer Aktivität beiträgt [86]. Die gesamte Form des Proteins ähnelt dem einer Niere, mit dem katalytisch aktiven Zentrum an seiner schmalsten Stelle (Abb. 4.19).

In Abbildung 4.11 sieht man das Tieftemperaturabsorptionsspektrum im Vergleich zu dem von Insulin. Neben einer generellen Verschiebung um etwa 300 Wellenzahlen hin zu niedrigeren Frequenzen, zeigt sich auch ein Unter-

⁴Der Zusatz A bezeichnet das unveränderte Protein und unterscheidet damit bestimmte posttranslational modifizierte Glycoformen C und D, die wenn auch in geringeren Konzentrationen, natürlich auftreten.

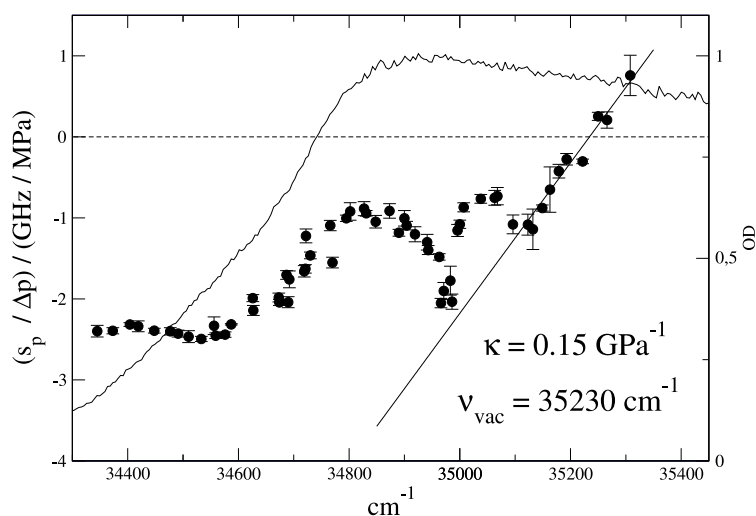


Abbildung 4.12: Druck-Effekt an nativer RNase. Potentiell tragen sechs Tyrosine zum Signal über den gezeigten Frequenzbereich bei. Die waagrechte Linie bei $s_p/\Delta p = 0$ markiert die Vakuumfrequenz, die bei der RNase für drei spektrale Positionen überschritten werden konnte.

schied im qualitativen Verlauf. Die deutliche zwei-Peak-Struktur, die bei bisher allen Proben zu erkennen war, ist für das zweite blaue Maximum weniger stark ausgeprägt. Insgesamt tragen hier sechs Tyrosine zur Extinktion bei.

4.5.1 Druck-Effekt

Die Druckeffektmessungen an nativer RNase über einen spektralen Bereich von mehr als 900 Wellenzahlen sind in Abbildung 4.12 aufgetragen. Der auf den ersten Blick recht differenzierte Verlauf konnte in mehreren unabhängig durchgeführten Messreihen mit hoher Genauigkeit reproduziert werden, was insbesondere auch für den Bereich um 35000 cm^{-1} zutrifft.

Dort kommt es innerhalb weniger Wellenzahlen zu einem Sprung von $s_p/\Delta p$ von mehr als 1 GHz/MPa . In Richtung niedriger Frequenzen ergeben die Einzelmessungen ein insgesamt konsistentes Bild mit zunächst abnehmenden und schließlich wieder zunehmenden Werten für die Druckverschiebung. Die rote Flanke ab ca. 34600 cm^{-1} zeigt schließlich keine Veränderung mehr und bleibt bei einem annähernd konstanten maximalen Wert für $s_p/\Delta p$ von -2.5 GHz/MPa , der betragsmäßig in etwa dem „spektralen dip“ bei fast 35000 cm^{-1} entspricht. Innerhalb der blauen Flanke lässt sich ein kleiner Bereich zwischen 35000 und 35100 cm^{-1} von dem steilen Abschnitt oberhalb von 35100 cm^{-1} unterscheiden. Durch diesen letzteren ziemlich gut linear verlaufenden Bereich wurde eine

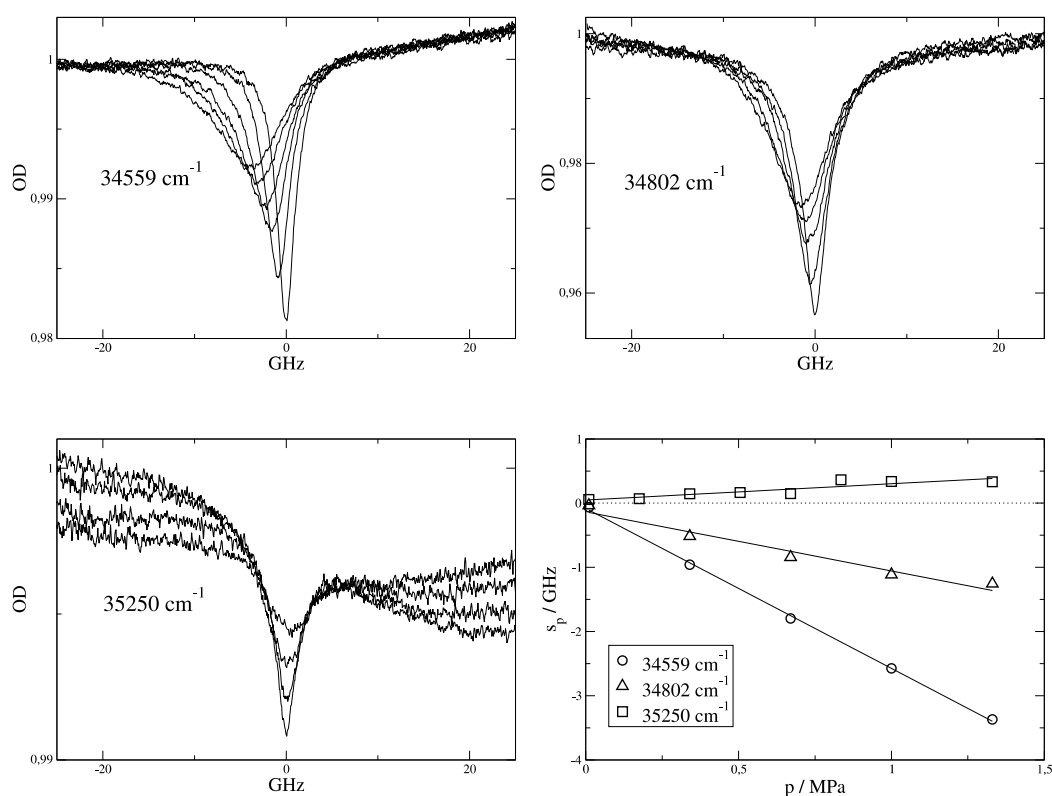


Abbildung 4.13: Für drei verschiedene Frequenzen gezeigte Spektren zur Druckverschiebung bei RNase. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht immer alle Einzelspektren dargestellt. Rechts unten sieht man die ausgewerteten Veränderungen der Zentralfrequenz in GHz mit zunehmendem Druck in MPa. Die für das äußerst blaue Spektrum gefundene positive Steigung für s_p/p , zeigt daß hier über die Vakuumfrequenz hinaus gemessen werden konnte.

Ausgleichsgerade eingezeichnet, die zu einem Wert für κ von 0.15 GPa^{-1} und einer Vakuumfrequenz bei 35230 cm^{-1} führt. Offensichtlich ist der komplizierte Verlauf die Folge einer Überlagerung des spektralen Signals verschiedener Tyrosine, die unterschiedliche Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung eingehen. Tyrosin besitzt als polares Molekül ein permanentes Dipolmoment und folglich kommt es neben den reinen Dispersionskräften zusätzlich zu elektrostatischen Wechselwirkungen (Dipol-Dipol, Dipol-induzierter Dipol, Wasserstoffbrücken).

Im Bereich um 35000 cm^{-1} deutet die sprunghafte Änderung des Signals auf ein starke Überlappung der Absorption von mindestens zwei Tyrosinen hin, und obwohl die Spektren hier besonders gründlich auf eine mögliche Aufspaltung hin untersucht wurden, konnte eine solche nicht eindeutig festgestellt werden.

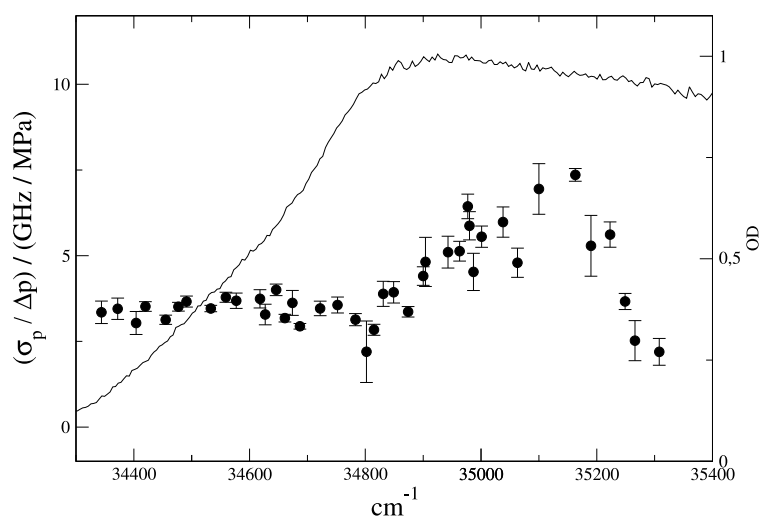


Abbildung 4.14: Relative Druckverbreiterung $\sigma_p/\Delta p$ für RNase. Nach Gleichung (4.7) erwartet man keine direkte Frequenzabhängigkeit für einen einzelnen Chromophor. Unterschiedliche Verbreiterungen können demnach Hinweis auf die Existenz verschiedener Chromophorspezies geben.

Man hat solche Aufspaltungen spektraler Löcher bei Meerrettichperoxidase-Systemen beobachtet [7, 43]. Dort tragen tautomere Formen eines Porphyrinderivats zur Druckverschiebung bei, diese können allerdings bereits in der Absorption klar unterschieden werden. Im vorliegenden Fall der RNase scheinen die unterschiedlichen Lösungsmittelverschiebungen nicht ausreichend um signifikante Lochaufspaltungen sichtbar zu machen. Abbildung 4.15 zeigt unter anderem speziell zwei Serien von Spektren zwischen 35000 und 35100 cm^{-1} .

Abbildung 4.14 zeigt die relativen Druckverbreiterungen $\sigma_p/\Delta p$ über dem gemessenen Bereich der inhomogenen Bande. Zwei Dinge fallen hier auf:

- Die gefundenen Werte sind mit 3,5 beziehungsweise 7 GHz/MPa, fast 1,5 und 3 mal so hoch wie die maximal beobachtete Druckverschiebung.
- Darüber hinaus zeigt die Verbreiterung oberhalb von 34800 cm^{-1} eine Frequenzabhängigkeit, die es nach Gleichung 4.7 (S. 36) nicht geben sollte.

Wie kann nun dieses Ergebnis zu dem Verlauf in Abbildung 4.12 in Beziehung gesetzt werden? Zunächst einmal deuten die verglichen mit $s_p/\Delta p$ recht hohen Verbreiterungen $\sigma_p/\Delta p$, ganz allgemein auf stark inhomogene Umgebungseinflüsse hin. Alle in Abschnitt 4.2 genannten Wechselwirkungen tragen zu Ver-

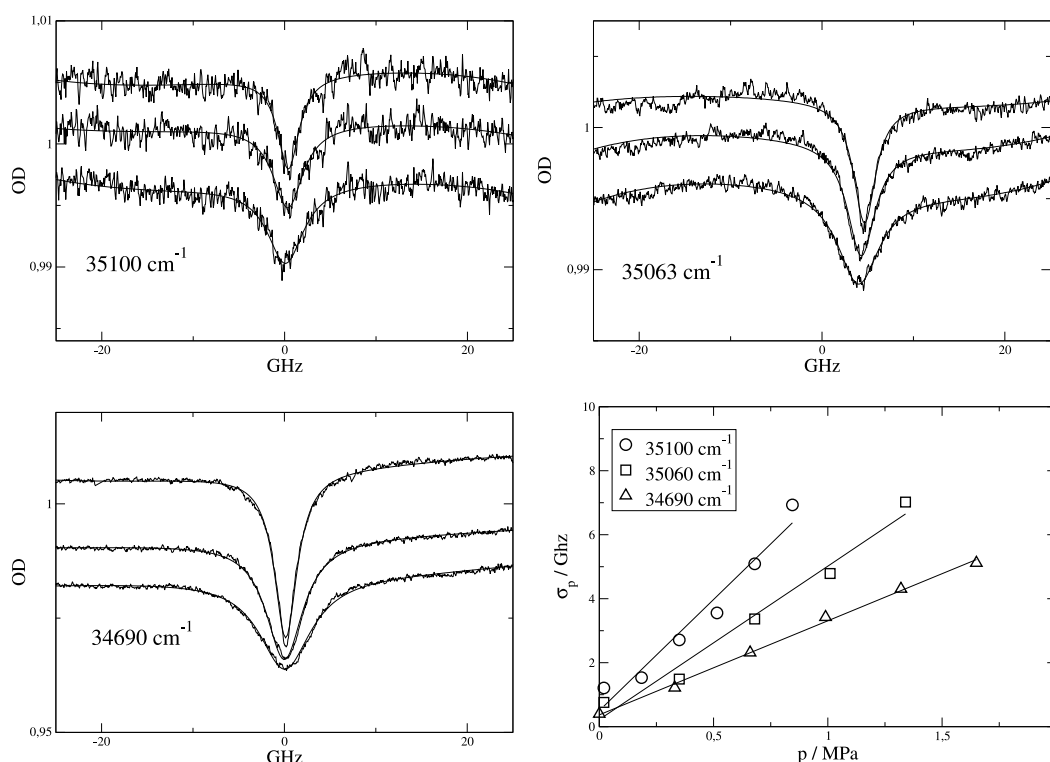


Abbildung 4.15: Verbreiterung spektrale Löcher bei der RNase unter Druck. Zu den gezeigten Spektren sind auch die gefitteten Funktionen gezeigt. Die einzelnen Spektren sind manuell unterinandergeschoben, so daß die Druckverschiebung nicht erkennbar ist. Rechts unten: σ_p / p .

breiterungseffekten bei, das gilt umso mehr, wenn die im Modell gemachte Näherung einer isotrop-homogenen Matrixumgebung nicht mehr realisiert ist. Unterschiedliche Lochverbreiterungen können im Fall der RNase am sinnvollsten mit dem Verhalten unterschiedlicher Sondenmoleküle erklärt werden. Auch die Situation bei der Druckverschiebung oberhalb von 35000 cm^{-1} gibt Hinweise darauf, daß in dieser Region potentiell mehr Tyrosine zum Signal beitragen. Gewisse Unterstützung bekommt diese Deutung auch durch Arbeiten von Horwitz et al. sowie Brandts und Kaplan, die mindestens drei der sechs Tyrosine in RNase A anhand ihres 0-0-Übergangs im Bereich oberhalb von 35000 cm^{-1} ansiedeln [87, 88, 89].

Im Unterschied zur Situation beim Insulin, existieren zum jetzigen Zeitpunkt keine Rechnungen zu lokalen Kompressibilitäten oder Lösungsmittelverteilungen bei der RNase. Die dort (beim Insulin) gemachten grundsätzlichen Aussagen zur räumlichen Unterscheidbarkeit verschiedener Positionen in einem Pro-

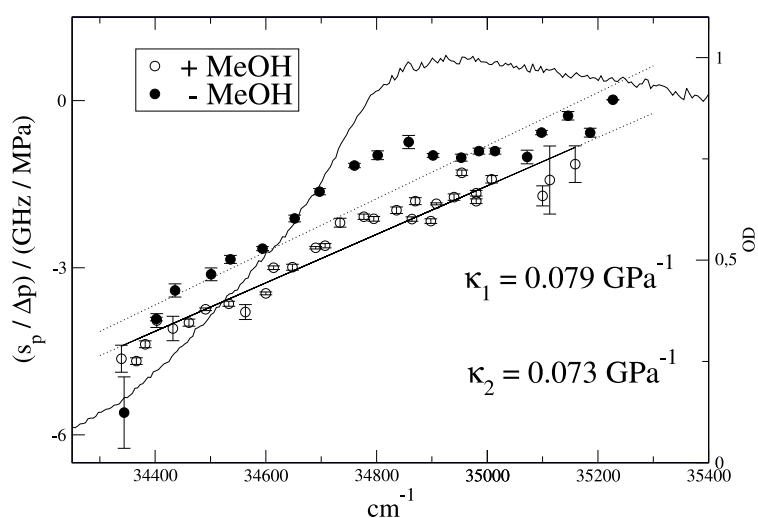


Abbildung 4.16: Druck-Effekt an Guanidinhydrochlorid entfalteter RNase A. Die obere Datenreihe zeigt die Situation unter oxidativen Bedingungen (- MeOH), die untere die unter reduktiven Bedingungen (+ MeOH). Die eingezeichneten Regressionsgeraden verdeutlichen zusätzlich den weniger einheitlichen Verlauf für disulfid-intaktes Protein (oben). Näheres auch im Text.

tein, gelten selbstverständlich auch in diesem Fall. Zusätzlich jedoch, zeigt der insgesamt deutlich andere Verlauf der spektralen Druckverschiebung, daß die Situation für jedes individuelle Protein verschieden ist. Eine detaillierte Betrachtung der Raumstruktur, sowie der genauen Positionen bestimmter Aminosäuren, muß daher in jedem Fall zur Grundlage einer Diskussion herangezogen werden. Darüber hinaus liefern auch hier Entfaltungsexperimente zusätzliche Informationen über Veränderungen der Konformation des Proteins und geben Hinweise auf prinzipielle Eigenschaften des chemisch denaturierten Zustands.

4.5.2 chemische Entfaltung von Ribonuclease

Guanidinhydrochlorid (GuHCl) wird im allgemeinen als ein etwa doppelt so potentes Entfaltungsreagenz wie Harnstoff angesehen [90]. Abbildung 4.16 zeigt die gemessenen Daten zum Druck-Effekt bei RNase unter zwei unterschiedlichen Lösungsbedingungen. Der differenzierte Verlauf der spektralen Verschiebung ist weitgehend verlorengegangen, und man erkennt ein insgesamt einheitlicheres Muster das, analog der Situation beim Insulin, Hinweis auf globale Strukturveränderungen gibt. Gleichzeitig bestehen augenscheinlich auch gewisse Unterschiede zur Messung beim Insulin, wo nach der Behandlung mit

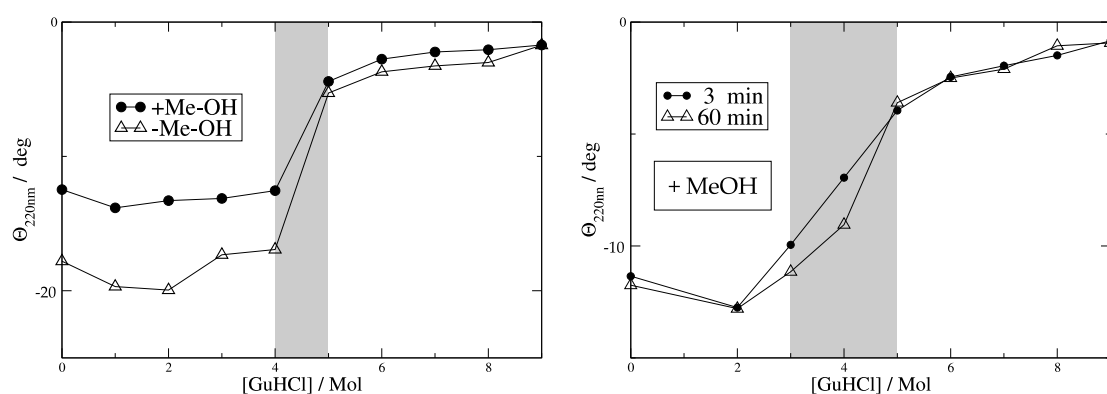


Abbildung 4.17: Vergleich der GuHCl **Abbildung 4.18:** CD-Spektren von RNase abhängigen CD-Spektren von RNase unter nach Rückverdünnung aus höher konzentrierenden oxidierenden und reduzierenden Bedingungen. ter Stammlösung. Reduzierende Bedingungen.

Harnstoff eine fast perfekte Linearität im Druck-Effekt beobachtet wurde (Abb. 4.7).

In diesem Experiment kommt der Verlauf der unteren Datenreihe dem dort gefundenen Ergebnis am nächsten und lediglich am blauen Rand des Spektrums beobachtet man geringfügige Abweichungen eines insgesamt sehr homogenen Verhaltens der Druckverschiebung. Die obere Messung unterscheidet sich deutlich sichtbar von dieser und erinnert in ihrem Verlauf tatsächlich etwas an eine stark entzerrte, „auseinandergezogene“ Form des nativen Proteins (Abb. 4.12). Dies gilt in weitaus geringerem Maße für die untere Versuchsreihe. Beiden Messungen fehlt der kurz vor 35000 cm^{-1} beobachtete „spektrale dip“ des gefalteten Proteins.

Wo liegen nun die Unterschiede zwischen beiden Experimenten?

Ribonuclease A wurde vor Versuchbeginn jeweils mehrere Stunden in hochmolarer GuHCl denaturiert. Nach Zugabe von Glycerin betrug die Konzentration von GuHCl bei der Messung schließlich 5.5 M (obere Datenpunkte) und 3.5 M (untere Datenpunkte). Nur die 3.5 molare Lösung enthielt zudem Mercaptoethanol zur Reduktion von bestehenden Disulfidbrücken. Die Situation ist in einem Fall also die einer oxidativen (- Mercaptoethanol), im anderen Fall die einer reduktiven Entfaltung (+ Mercaptoethanol). Letztere ergibt bei linearer Regression einen Wert für die Kompressibilität κ von 0.073 GPa^{-1} , welcher ziemlich genau dem Wert für Harnstoff-denaturiertes Insulin entspricht (Abb. 4.7).

CD-Spektren chemisch entfalteter RNase sind in Abbildung 4.17 und 4.18 gezeigt. Abbildung 4.17 vergleicht das Signal von disulfid-intaktem (-MeOH) mit disulfid-freiem (+ MeOH) Protein. Obwohl die Konzentrationsabhängigkeit in beiden Fällen quasi identisch ist, muß die absolute Differenz des Signals zwi-

schen 0 und 4 M GuHCl von etwa 25%, als Hinweis für eine deutlich Konformationsänderung gelten. Dies ist primär eine Veränderung der Tertiärstruktur der RNase, da das eigentliche Aufbrechen von Sekundärstrukturen mit dem steilen Übergang ab etwa 4 M GuHCl verbunden ist. Man weiß, daß abhängig von der Anzahl der gebrochenen Schwefelbrücken, ein zunehmend deutlicher Verlust des CD-Signals bei 45000 cm^{-1} zu beobachten ist. Die hier gemessenen Spektren zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Gekko et al. aus dem Jahr 2003 [91].

Abbildung 4.18 zeigt das Ergebnis einer Messreihe, bei der in umgekehrter Richtung vorgegangen wurde. Die Proteinprobe wurde zunächst für mehrere Stunden in hochmolarer ($> 6\text{ M}$) GuHCl-Lösung entfaltet. Von dieser hohen Konzentration und einem entfalteten Zustand ausgehend, wurde unmittelbar vor Beginn der CD-Messungen die gewünschte Konzentration durch Rückverdünnung der Lösung eingestellt. Die ersten Spektren wurden dann in direktem Anschluß in einem Zeitfenster von etwa drei Minuten aufgenommen und nach 60 Minuten wiederholt. Da bei einem Tieftemperaturexperiment nach Einstellen der Protein- und GuHCl-Konzentration eine gewisse Vorlaufzeit vor Messbeginn notwendig war (etwa 25 bis max. 60 Minuten), liegt die reale Situation dort irgendwo zwischen beiden CD-Messreihen in Abbildung 4.18.

Beim Vergleich von 4.17 und 4.18 fällt auf, daß die Übergangsregion in Abbildung 4.18 (grau unterlegt) etwas weniger steil ist. Die Zunahme des CD-Signals von etwa -10 auf -5 deg findet hier über einem doppelt so breiten Bereich statt wie in Abbildung 4.17.

Dieses qualitativ unterschiedliche Verhalten deutet darauf hin, daß unter gegebenen experimentellen Bedingungen und im Zeitrahmen dieser Messungen, nicht von einer vollständigen Reversibilität der Faltung ausgegangen werden kann. Tatsächlich lässt die Abnahme des Signals im Bereich zwischen 3 und 4 M GuHCl nach 60 Minuten in Abbildung 4.18 vermuten, daß hier langsame kinetische Faltungs-Prozesse beteiligt sein könnten. Das ist durchaus vorstellbar, da das zunächst in über 6 M denaturierte Protein, in einer 3 molaren GuHCl-Lösung keineswegs physiologische Bedingungen vorfindet.

An dieser Stelle soll auch erwähnt werden, daß in der Literatur unterschiedliche Angaben zur GuHCl-abhängigen Entfaltung von RNase A existieren. So erwartet Tamura et al. anhand von CD-Daten bereits ab einer Konzentration von 3 molar eine vollständige Entfaltung [92], während Scheraga et al. hier auch schon von 50% entfaltetem Protein ausgehen [93].

Allein auf Grundlage dieser CD-Spektren, muß man bei einer Konzentration von 3-4 M GuHCl davon ausgehen, daß Sekundärstrukturen zu einem beträchtlichen Teil noch existieren. Der im Druck-Effekt gefundene Verlauf zeigt für das

reduktiv entfaltetes Protein bei einer GuHCl-Konzentration von 3.5 M (Abb. 4.16 unten) einen weitgehend einheitlichen Verlauf. Ganz offensichtlich sind die Tyrosine, die hier zu dem Signal beitragen in einer ähnlichen, im Experiment nicht mehr unterscheidbaren Matrixumgebung. In diesem Fall scheint der Bruch von insgesamt vier kovalenten Schwefelbrücken durch Mercaptoethanol für die beobachtete Situation verantwortlich zu sein.

Sind diese Disulfidbrücken hingegen intakt (Abb. 4.16 oben), so deuten die beim Druck-Effekt beobachteten „Reststrukturen“ auf ein gewisses Maß an struktureller Integrität hin, obwohl man hier aufgrund der CD-Messungen eindeutig von einem weitgehenden Verlust der Sekundärstrukturen ausgehen muß.

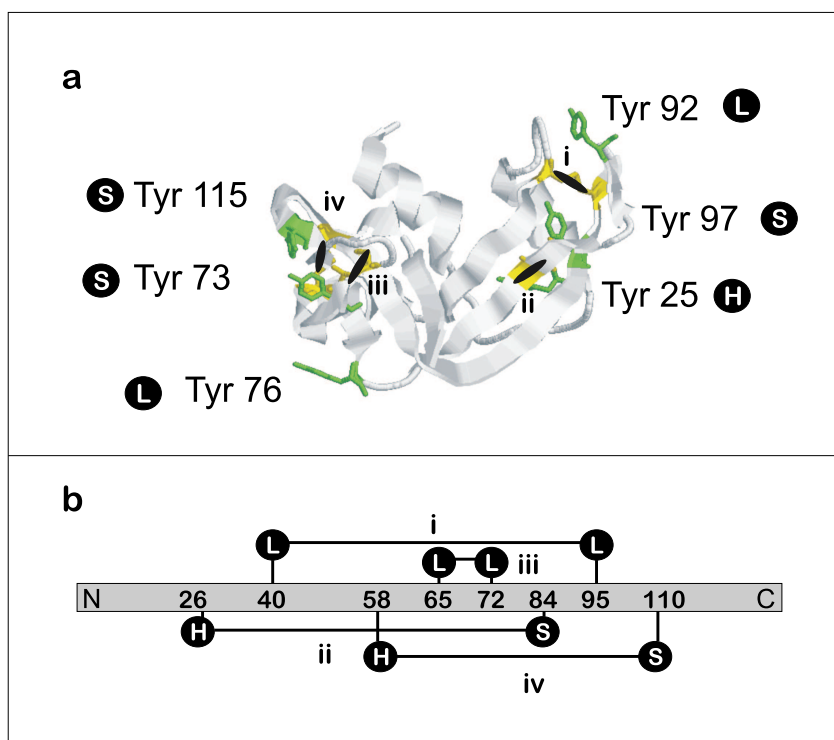


Abbildung 4.19: a): Ribbon Modell von RNase A mit Angabe der Position seiner sechs Tyrosine, sowie den vier Disulfidbrücken i-iv. Die lokale Sekundärstrukturumgebung ist entweder die einer Helix (H), eines Faltblatts (S) oder die einer Loop Region (L).

b): Schema zur Konnektivität der SS-Bindungen im Protein, auch hier mit Angabe der Sekundärstrukturumgebungen.

4.5.3 Die Struktur von Ribonuclease A

Die Röntgenstruktur von RNase A ist in Abbildung 4.19 gezeigt. Die Darstellung zeigt ein Ribbon-Diagramm, das die unterschiedlichen strukturellen Regionen sichtbar macht. Die sechs Tyrosine sind als Stick-Modelle hervorgehoben mit Angabe ihrer jeweiligen Position sowie der individuellen Sekundärstrukturumgebung. Die Positionen der insgesamt vier Disulfidbrücken sind ebenfalls markiert, wobei das Schema im unteren Teil des Bildes zusätzlich die Konnektivität der kovalenten Verknüpfungen zeigt.

Innerhalb der Familie der 40 bekannten Säugetier-Ribonucleasen sind die Disulfidbrücken hochkonserviert. Sie besitzen neben einer strukturellen auch eine katalytische Funktion. Die zwei terminalen Schwefelbrücken Cys 26-Cys 84 und Cys 58-Cys 110, die oberflächenexponierte Bereiche miteinander verbinden, tragen dabei mehr zur konformellen Stabilität des Proteins bei als die beiden übrigen, weniger exponierten Bindungen zwischen Cys 40-Cys 95 und Cys 65-Cys 72. Letztere verbinden im Proteininnern Regionen einer α -Helix mit denen eines β -Faltblatts und spielen eine größere Rolle bei der katalytischen Aktivität des Proteins [86].

Der unterschiedliche Beitrag der Disulfidbrücken zur konformellen Stabilität lässt sich anhand einer Überlegung zur Veränderung der energetischen Verhältnisse anschaulich machen. Cys 26-Cys 84, Cys 40-Cys 95 und Cys 58-Cys 110, umschließen mit 59, 56 und 53 Aminosäuren alle einen Loop vergleichbarer Größe, während der verbleibende Loop zwischen Cys 65 und Cys 72 mit 8 Aminosäuren deutlich kleiner ist. Der Zuwachs an Konformationsentropie nach einer Reduktion ist für solche Cysteine, die weit entfernte Positionen der Primärstruktur verbinden, entsprechend größer. Umgekehrt schränken kovalente Verknüpfungen, die große Bereiche von Aminosäuren einschließen, die molekulare Beweglichkeit ein und führen zu der so typischen kompakten und globulären Struktur vieler Proteine kleiner und mittlerer Größe. Disulfidbrücken sorgen jedoch nicht notwendigerweise für eine erhöhte Stabilität der Proteinstruktur, sondern ihre native Verteilung ist immer auch das Produkt einer positiven Selektion für bestimmte katalytische Funktionen.

Von den insgesamt sechs Tyrosinen der RNase befinden sich drei an der Oberfläche (Tyr 73, Tyr 76, Tyr 115), während die anderen (Tyr 25, Tyr 92, Tyr 97) im nativen Zustand eine hydrophobe Umgebung im Proteininnern besitzen. Tyr 92 allerdings, scheint nicht komplett verborgen zu sein [93].

Höchstwahrscheinlich sind alle sechs Tyrosine über ihre Hydroxylgruppen an intramolekularen Wasserstoffbrücken beteiligt [94], wobei speziell diejenige zwischen Tyr 97 und der Carboxylgruppe der Lys41-Pro42 Peptidbindung eine

wichtige funktionelle Rolle erfüllt [95]. Erwähnenswert ist, daß keiner der potentiellen Bindungspartner im selben strukturellen Element lokalisiert ist, so daß diese Bindungen nur dann ausgebildet werden können wenn Tertiärstruktur entwickelt ist. Zwei Tyrosine befinden sich in direkter Nachbarschaft zu einem Cystein, das unter nativen Lösungsbedingungen an einer der vier Disulfidbrücken beteiligt ist [96].

Die RNase besitzt vier Proline. Im gefalteten, disulfid-intakten Protein, befinden sich zwei Proline in einer cis-Konformation (Tyr92-Pro93, Asn113-Pro114), die anderen beiden in der trans-Konformation (Lys41-Pro42, Val116-Pro117). Die trans Konformation ist unter normalen Umständen gegenüber der cis-Struktur energetisch stark begünstigt (der Faktor beträgt ca. 1000:1). Bei Prolylpeptidbindungen besitzt das trans-Isomer dagegen nur eine geringfügig kleinere Enthalpie als das cis-Isomer (ca. 4:1). Während der Entfaltung finden Isomerisierungen statt, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen ungefähr 70% trans und 30% cis Konformationen einstellt. Aus diesem Grund besteht der entfaltete Zustand von RNase aus zumindest zwei unterschiedlichen Spezies [85, 93]. Die hohe Aktivierungsenergie von Prolyl-Isomerisierungen (ca. 20 kcal/mol) macht diese zum geschwindigkeitsbestimmenden, kinetisch langsameren Schritt bei der Faltung des Proteins [97, 98]

4.5.4 Diskussion der Druck-Effekt Daten von Ribonuclease A

Der native Zustand

Vergleicht man den Verlauf der Druckmessungen von Insulin (Abb.4.3) mit dem von RNase (Abb.4.12), so zeigen sich deutliche Unterschiede. Die Situation bei der RNase deutet darauf hin, daß die insgesamt sechs spektralen Sonden eine weitaus weniger einheitliche Gruppe bilden wie im Fall von Insulin. Dort besitzen alle Chromophore eine im Mittel sehr viel größere Lösungsmittelzugänglichkeit, wobei die Dimerbildung augenscheinlich zu einer höheren Heterogenität der Tyrosinumgebungen führt (Abb. 4.8). Tatsächlich erscheint es nicht unplausibel, daß die spektrale Unterscheidbarkeit im Experiment nur aus diesem Grund erkennbar war.

Während beim Insulin eine Zuordnung von zwei unterschiedlichen Kompressibilitäten zu zwei Gruppen von Tyrosinen anhand der Messungen und der Struktur durchaus vernünftig erscheint, kann für die RNase dieser direkte Schluß nicht gezogen werden. Hier wurde lediglich der äußerst blaue steile Abschnitt mit einer Ausgleichsgeraden angepasst und führt zu einem realistischen Wert für κ von 0.15 GPa^{-1} . Für den Bereich unterhalb von 35100 cm^{-1} scheint es nicht ohne weiteres sinnvoll lokale Kompressibilitäten abzuleiten, da es hier ganz of-

fensichtlich zu stark überlagerten Druckverschiebungen unterschiedlicher Tyrosine kommt. Dies scheint in besonderem Maße für die Position bei 35000 cm^{-1} zuzutreffen. Der ab 34600 cm^{-1} gefundene flache Bereich lässt prinzipiell zwei Schlußfolgerungen zu. Hier könnte es sich um eine Übergangsregion zu einer weiter rotverschobenen Tyrosinspezies handeln. Die zweite Möglichkeit ist die einer kontinuierlich variierenden Vakuumfrequenz einzelner Chromophore aufgrund lokaler Unterschiede in der Farbstoff-Matrix-Wechselwirkung. Tatsächlich spricht einiges für diese zweite mögliche Deutung. Zum einen konnten keine weiter rotverschobenen Löcher mehr gebrannt werden, zum anderen befindet sich nach [87, 88] der 0-0-Übergang des langwelligsten Tyrosinchromophors von RNase A bei 34620 cm^{-1} .

Der entfaltete Zustand

Die an den entfalteten Formen von RNase gemessenen Druck-Effekte zeigen deutlich, daß Strukturveränderungen im Protein stattgefunden haben, die in beiden Fällen für eine veränderte Matrixumgebung der Tyrosine sorgen.

Entfaltete disulfid-intakte RNase weist insbesondere im mittleren Teil einen Signalverlauf auf, der auf das Vorhandensein gewisser Reststrukturen hindeutet, obwohl man in diesem Fall aufgrund der hohen Konzentration an GuHCl (5.5 M) von einer weitgehenden Auflösung der Sekundärstrukturen ausgehen muß (Abb. 4.17, 4.18). Die Schwefelbrücken sorgen hier offensichtlich für ein gewisses Mass an Kompaktheit des Moleküls. Hier sei daran erinnert, daß zwei Tyrosine, Tyr 25 und Tyr 73, direkt zu Cystinen benachbart liegen und deshalb womöglich in Loop-artigen Strukturen teilweise vom Lösungsmittel abgeschirmt sind (Abb. 4.19).

Dem Druck-Effekt am reduzierten Protein in 3.5 M GuHCl-Lösung fehlt diese Unregelmäßigkeit im Bereich von etwa $34650 - 34950\text{ cm}^{-1}$, was auf eine insgesamt noch homogenere Umgebung der zum Signal beitragenden Tyrosine hindeutet. Auch wenn unter den gegebenen Bedingungen die Sekundärstrukturen noch fast vollständig ausgebildet zu sein scheinen, führt die Zugabe von MeOH bereits zu einer deutlich sichtbaren Signalveränderung im CD-Spektrum von 25% (Abb. 4.17), und diese muß als wesentlich auch für das Verhalten im Druck-Effekt betrachtet werden.

Disulfidbrücken sind im nativen Protein normalerweise in hydrophoben Regionen lokalisiert, das heißt, daß deren Reduktion ein zumindest lokaler Entfaltungsschritt vorausgehen muß. Solche lokalen Ereignisse führen meist in einer Art Kettenreaktion zur globalen Entfaltung und vollständigen Reduktion des Moleküls [99], da eine solch offene Konformation notwendigerweise auch für destabilisierende Colsoventien über direkte Wechselwirkungen leichter zugäng-

lich sein muß.

Generell steht eine Abnahme der Kompressibilität im Einklang mit den Ergebnissen aus der Literatur [91] und deutet auf den weitgehenden Verlust interner Cavitäten und einer erhöhten Solvation hin. Ein mikroskopisches Bild dieser Experimente ist das Folgende: Tyrosine in Wasser-Glycerin, und Tyrosine in einer nichtgefalteten Peptidkette, sind von Lösungsmittelmolekülen umgeben. Entsprechend können sich dann um große Teile der Tyrosinoberfläche Käfig-artige Matrixstrukturen ausbilden, die eine geringere Entropie als das freie Lösungsmittel besitzen. Innerhalb solcher Lösungsmittelcluster ist die Wechselwirkung der Moleküle enthalpisch begünstigt, und die Bindungen sind aus diesem Grund stabiler, was zu einer insgesamt geringeren Kompressibilität solcher Bereiche führt.

Aminosäuren an der Oberfläche besitzen mit dem Protein auf der einen, dem äußeren Lösungsmittel auf der anderen Seite, eine sehr viel differenziertere Umgebung. Der strukturelle Einfluß auf das Lösungsmittel ist aus diesem Grund im Einzelfall sehr viel geringer, wenn der Tyrosinrest beispielsweise eine ausgeprägte parallele Komponente zum Protein besitzt und damit seine nach außen exponierte Oberfläche verringert. Deshalb können solche Positionen entsprechend stark variierende Werte für κ besitzen und die komplizierten Beiträge der Lösungsmittelverschiebung für einzelne Chromophore im Insulin und in RNase erklären.

Der unterschiedliche Verlauf des Druck-Effekts unter zwei variierenden, nicht-nativen Bedingungen, läßt einige abschließende Bemerkungen bezüglich der Natur des entfalteten Zustands von Proteinen zu. Tanford bestimmte 1966 die intrinsischen Viskositäten verschiedener Proteine, darunter auch die von Insulin und RNase, in 6 M GuHCl unter reduzierenden Bedingungen und kam zu dem Schluß, daß es sich um random coil Strukturen handelt, die keine Elemente ihrer nativen Konformation mehr besitzen [73]. Am Ende dieser Arbeit machte er jedoch folgenden Zusatz:

„It is of course dangerous to base an important generalization such as made here on a single property of the system, and the conclusion of this paper should not be regarded as established until they can be shown to be compatible with the results of other kinds of measurements.“

Es bestehen heute keine Zweifel, daß entfaltete komplett reduzierte Zustände, kompakte Bereiche, hydrophobe Cluster und Reste von Sekundärstruktur besitzen können [100, 101]. Erst vor einiger Zeit konnten mit NMR-Experimenten Hinweise gefunden werden, daß selbst in 8 molarer Harnstofflösung nativähnliche Strukturelemente vorhanden sind [102, 103].

Weiterhin herrscht Uneinigkeit darüber, inwieweit sich thermisch und chemisch entfaltete Zustände voneinander unterscheiden. Während kinetische Parameter aus Rückfaltungsexperimenten auf eine hohe Ähnlichkeit beider hinweisen sollen [94], kommen die meiner Meinung nach überzeugenderen Befunde aus Messungen, die strukturelle Information beinhalten [92, 101]. So zeigen beispielsweise thermisch entfaltete Proteine, im Gegensatz zu GuHCl-behandelten Proteinen, einen Anstieg ihrer adiabatischen Kompressibilität, während die Volumenänderung in beiden Fällen negativ ist. Außerdem scheint eine thermische Entfaltung nicht in allen Fällen komplett reversibel [104].

Selbst unter denaturierenden Bedingungen finden nach Änderung äußerer Parameter kooperative Konformationsübergänge statt [105]. Da letztlich verschiedene Faktoren wie Temperatur, pH, Druck, Ionenstärke etc., das Lösungsverhalten eines Proteins beeinflussen, ist es oft anschaulich bestimmte Regionen der Stabilität eines Moleküls in einem Phasendiagramm darzustellen.

4.6 Zusammenfassung der Druckexperimente und Schlußfolgerung

Frühere systematische Messungen der Kompressibilität globulärer Proteine stammen hauptsächlich aus den Arbeiten von Gekko et al. [106, 107], später auch von Chalikian und Breslauer [108]. Die dort bestimmte Messgröße ist häufig die partielle molare adiabatische Kompressibilität κ_a . Diese setzt sich zusammen aus dem Protein-intrinsischen Beitrag κ_i sowie der Kompressibilität der Solvationshülle κ_s und der freien Lösung (bulk) κ_B . Letztere tragen negativ zu κ_a bei, da der Gesamtbeitrag des Lösungsmittelsystems als Differenz mit $\kappa_s - \kappa_B$ eingeht. Im Fall globulärer Proteine wird der negative Term in den allermeisten Fällen durch höhere Werte der intrinsischen Kompressibilität kompensiert. Für einzelne Aminosäuren gilt das nicht, sie zeigen in der Tat ausnahmslos negative Werte für κ_a . [109].

Messungen der Schallgeschwindigkeit in verdünnten Proteinlösungen erlauben die Bestimmung der Kompressibilität. Es gilt die Newton-Laplace Gleichung $\kappa = \rho^{-1} \cdot U^{-2}$, mit der Dichte ρ und der Schallgeschwindigkeit U . Allerdings kann in diesen Fällen der Beitrag der direkten Lösungsumgebung nicht vom Beitrag des Proteins getrennt werden, sondern dieser muß anhand von Vergleichsdaten niedermolekularer Substanzen abgeschätzt werden [65]. Die dort gefundenen Werte für κ_a bewegen sich im Bereich zwischen 0.05 und 0.25 GPa^{-1} [106, 107, 110, 111, 112]. All dieses sind mittlere Werte einer globalen adiabatischen Kompressibilität und deshalb nicht direkt mit den hier spektro-

skopisch gemessenen lokalen Größen vergleichbar.

Erst kürzlich gelang die unabhängige Berechnung intrinsischer Kompressibilitäten und der Hydrathülle [113, 114], deren Wert etwa 20% unter dem für freies Wasser liegt. Auf Grundlage des Konzepts sogenannter Voronoi-Volumina [115, 116] ist es möglich, auch lokale Kompressibilitäten um einzelne atomare Positionen zu berechnen [114], und diese mit Lochbrennexperimenten zu vergleichen. Dabei spiegeln unterschiedliche Werte der intrinsischen isothermen Kompressibilitäten globulärer Proteine, Unterschiede im individuellen Aufbau (Sekundärstruktur, Hydrophobizität, Polarität), der Packungsdichte und des Volumens wieder. Das wird insbesondere auch beim Vergleich der Daten für Insulin und RNase sichtbar.

Als volumetrischer Parameter ist κ in besonderem Maße empfindlich für Lösungsmittelbeiträge und Solvationseigenschaften von Proteinen. Diese Einflüsse sind komplex, da sie von verschiedenen äußeren Faktoren und von der chemischen Zusammensetzung des Moleküls bestimmt werden. Gleichzeitig sind genau diese Grenzflächeneigenschaften sowie lösungsmittelzugängliche Hohlräume im Proteininnern, essentiell für ausnahmslos alle biologischen Funktionen. Besondere Belege für solch biologische „Hydrationskräfte“ [117] sind Experimente, bei denen katalytische Enzyymbewegungen allein durch Veränderung der äußeren Bedingungen induziert wurden, in Abwesenheit des eigentlichen Substrats [118, 119].

Die Messung von Kompressibilitäten über ein begrenztes Volumen ist eine experimentelle Methode, die lokale Unterschiede heterogener Makromoleküle sowie deren Grenzflächeneigenschaften sichtbar macht. Jede Veränderung der Lösungsmittelbedingungen ist von einer Veränderung des Volumens und damit auch der Kompressibilität begleitet.

Aufgrund der so komplexen Beiträge mag eine quantitative Diskussion im Einzelfall schwierig sein. Dennoch liefert κ neue Einblicke in Eigenschaften globulärer Proteine, die wie im Fall entfalteter RNase, mit anderen Methoden (z.B. CD-Messungen) nicht möglich sind.

Zusammen mit strukturellen Informationen (Röntgenbeugung, NMR) und kalorimetrischen Parametern wie der Wärmekapazität und Enthalpie [120, 121], kann sie zu einer vollständigeren thermodynamischen Charakterisierung von Proteinen und deren Konformationsübergängen dienen.

5 Homogene Linienbreiten

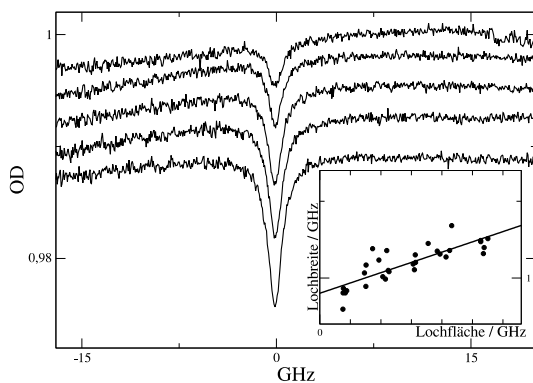


Abbildung 5.1: Die Entwicklung eines spektralen Lochs mit zunehmender Brenndauer für Tyrosin in Wasser-Glycerin. Das kleine Bild zeigt die Auftragung von Lochbreite gegen Lochfläche, ausgewertet für 30 Einzelspektren. Der nach Null extrapolierte Wert ergibt die quasihomogene Lochbreite γ_H^*/GHz . Aus Gründen, wie bereits in Kapitel 1.2 ausgeführt, gilt $\gamma_H^* = 2\gamma$

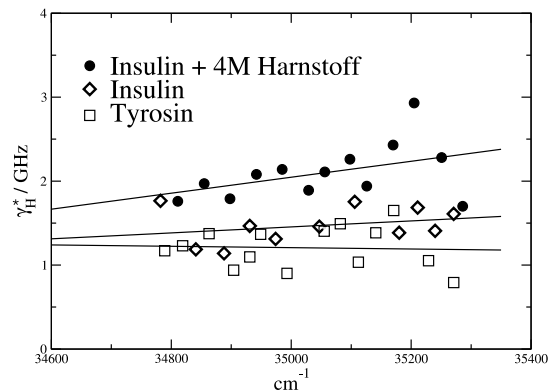


Abbildung 5.2: Frequenzabhängige Auftragung der quasihomogenen Lochbreiten für Insulin, denaturiertes Insulin und Tyrosin. Ein deutlicher Farbeffekt lässt sich in keinem Fall erkennen.

Die sukzessive Steigerung der Lochbrennzeit bei einer festen Frequenz führt zu einer Vertiefung und Verbreiterung spektraler Löcher. Für den Grenzfall kleiner Bestrahlungsintensitäten nimmt die Breite linear mit der Lochfläche zu, und Letztere ist proportional zur Anzahl der gebrannten Moleküle (Abb. 5.1).

Die wellenlängenabhängige Auftragung der gemessenen Lochbreiten für Tyrosin, Insulin und Insulin in 4 molarer Harnstofflösung zeigt Abbildung 5.2. Obgleich die einzelnen Datenpunkte eine gewisse Streuung aufweisen, mitteln sie mit einer hinreichenden Genauigkeit um einen festen Wert für γ_H^* . Ein wirklicher, unidirektionaler Farbeffekt ist nicht erkennbar.

Aus den gemessenen Linienbreiten ergeben sich Lebensdauern im Bereich zwischen 190 und 260 Picosekunden. Nach Gleichung (1.2) wird die Lebensdauer angeregter Zustände bei tiefen Temperaturen neben phasenauslöschenden T_2 -Prozessen, hauptsächlich von elektronischen Relaxationsraten wie der Fluoreszenz bestimmt. Die Fluoreszenzeigenschaften wiederum, werden wesentlich

durch Wechselwirkungen von Tyrosin mit Lösungsmittelmolekülen beeinflusst. Aus diesem Grund ist das Fehlen eines Farbeffekts der Linienbreite zumindest beim Insulin auf den ersten Blick überraschend, da ein solcher direkt auf eine unterschiedliche Kopplung zwischen Chromophor und Umgebung hinweisen könnte.

Man muß sich nun fragen wie groß solche Effekte sein müßten, um sie dann frequenzabhängig in der Linienbreite zu beobachten.

Die Fluoreszenzlebenszeit τ von Tyrosin in Wasser bei Raumtemperatur wurden von Bent und Hayon sowie Guzew et al., im Bereich von einigen wenigen Nanosekunden angegeben [122, 123]. Willis und Szabo untersuchten die Abhängigkeit der Lebenszeiten von Tyrosin- und Tyrosinat- wasserstoffgebundener Komplexe von der Protonenstärke des Lösungsmittels und fanden Werte für τ ebenfalls im Picosekundenregime [124]. In Anwesenheit potentieller Protonenakzeptoren mit pK-Werten im Bereich zwischen 4 und 9 änderte sich τ von etwa 250 ps auf 100 ps, was einer Änderung der Linienbreite um 1GHz entspricht. Selbst unter Annahme solch signifikanter pK-Schwankungen, beispielsweise hervorgerufen durch funktionelle Gruppen im Protein, läge die zu erwartende Änderung der Linienbreite angesichts der experimentellen Unsicherheit der Daten nur knapp innerhalb der Auflösung.

Prinzipiell ist es denkbar, daß geringere Schwankungen der Lebensdauer zu der beobachteten Streuung der Datenpunkte beitragen. In der Realität konkurrieren immer verschiedene Zerfallskanäle mit der Fluoreszenz. Die mit dem Auge sichtbare Phosphoreszenz von Tyrosin ist ein Beleg für Intersystem-Crossing in den Triplett-Zustand. Andere Prozesse sind interne strahlungslose Konversion oder Energietransfer.

6 Elektrische Felder und Dipolmomente - Stark-Effekt

Der nach seinem Entdecker benannte Stark-Effekt, also die Aufspaltung von Spektrallinien im elektrischen Feld, war seinerzeit eine der glänzendsten Bestätigungen der Quantentheorie des Atoms.

Heute, fast 100 Jahre nach dem ursprünglichen Experiment am Wasserstoffatom, spielen Stark-Effekt Messungen gerade an biologischen Systemen eine wichtige Rolle. Elektrostatische Eigenschaften sind von funktioneller Bedeutung für Proteine, und obgleich man lokale elektrische Felder heute mit großer Genauigkeit modellieren kann, bleiben solche Experimente der einzige empirische Zugang. Die Kombination mit der Lochbrennspektroskopie gestattet die Extraktion gewisser Systemparameter, wie beispielsweise Dipolmomentdifferenzen und lokale elektrischer Felder.

Die Grundzüge der Theorie des molekularen Starkeffekts soll nun im Folgenden anhand des Verhaltens spektraler Löcher erläutert werden.

6.1 Spektrale Löcher im elektrischen Feld

Die Voraussetzung um überhaupt eine Frequenzverschiebung ν im elektrischen Feld E zu beobachten, ist das Vorhandensein einer Dipolmomentdifferenz $\Delta\mu$ des Chromophors. Es gilt

$$\Delta\nu = -\frac{1}{h}(\vec{E}\Delta\vec{\mu}), \quad (6.1)$$

mit h als Planck Konstante. Nicht inversionssymmetrische Moleküle besitzen aufgrund ihrer asymmetrischen Ladungsverteilung ein intrinsisches oder molekulares Dipolmoment $\vec{\mu}_0$.

Gleichzeitig induziert das externe elektrische Feld (Starkfeld), abhängig von der Polarisierbarkeit α ein zusätzliches Dipolmoment $\vec{\mu}_{ind} = \alpha\vec{E}$, so daß die spektrale Verschiebung vollständig definiert ist als

$$\Delta\nu = -\frac{1}{h}(\vec{E}\Delta\vec{\mu}_0 + \frac{1}{2}\vec{E}\Delta\alpha\vec{E}). \quad (6.2)$$

Die Unterscheidung zwischen $\Delta\vec{\mu}_0$ und $\Delta\vec{\mu}_{ind}$ macht zwangsläufig eine Unterscheidung zwischen zwei Komponenten des elektrischen Feldes E notwendig. Es gilt:

$$\vec{E} = \vec{E}_p + f\vec{E}_s \quad (6.3)$$

Mit dem lokalen, die Chromophore direkt umgebenden Feld \vec{E}_p („pocket field“ oder „matrix field“), und dem künstlich erzeugten externen Feld oder Stark Feld \vec{E}_s . Das lokale Feld am Ort des Sondenmoleküls unterscheidet sich im allgemeinen deutlich vom äußeren Feld \vec{E}_s . Dieser Tatsache wird mit dem Lorentz-Korrekturfaktor $f = (\epsilon + 2)/3$ Rechnung getragen, wobei davon ausgegangen wird, daß sich das Probenmolekül in einem kugelförmigen Raum mit der Dielektrizitätskonstante ϵ befindet und gleichzeitig eine Punktdipolnäherung gilt¹. Inwieweit diese Annahmen für komplexe molekulare Systeme wie Proteine ihre Gültigkeit besitzen ist nicht genau bekannt. Gewisse Schwierigkeiten in diesem Zusammenhang wurden zum Beispiel von Hanson [125] diskutiert.

Lochbrenn-Starkeffekt-Experimente sind polarisationsabhängige Experimente. Die Richtung des elektrischen Feldvektors ist ein experimenteller Parameter und ist jeweils gleich für Anregung und Ausleseprozess. Neben einer immer zu beobachtenden Verbreiterung spektraler Löcher sieht man oft auch eine Aufspaltung, die von der Anregungsgeometrie, der elektrischen Feldstärke und den Eigenschaften des Chromophors abhängig ist.

Das von Schätz und Maier [49] entwickelte analytische Modell bildet die Grundlage der folgenden Diskussion von Lochformen in einem Stark-Feld. Es sollen nun die verschiedenen Beiträge der Dipolmomentdifferenzen eines Chromophors dargelegt werden, wobei eine statistische Unabhängigkeit der einzelnen Parameter vorausgesetzt wird. Gleichzeitig muß in jedem Fall der Bezug zur äußeren experimentellen Situation hergestellt werden, um das Verhalten der Löcher zu interpretieren.

Die Gesamt-Dipolmomentdifferenz $\Delta\mu$ eines polaren Moleküls in einem elektrischen Feld setzt sich zusammen aus einem molekülfesten Anteil $\Delta\vec{\mu}_0$, sowie aus einem induzierten Anteil $\Delta\vec{\mu}_{ind}$. $\Delta\vec{\mu}_0$ definiert gewissermaßen ein probeninternes Koordinatensystem (\vec{z}). $\Delta\vec{\mu}_{ind}$ zerfällt in zwei Subbeiträge: Einen im molekularen Koordinatensystem fixierten Anteil, sowie einen, aufgrund der amorphen Systemeigenschaften im molekularen Koordinatensystem statistischen Anteil. Letzterer sorgt für einem zusätzlichen Freiheitsgrad von $\Delta\mu$.

Abbildung 6.1 zeigt nun die geometrische Situation eines Experiments worin der optische Aufbau mit der Polarisationsrichtung des Anregungslichts und der Richtung des elektrischen Feldes ein weiteres, externes Koordinatensystem (z) definiert.

¹Im vorliegenden Fall ergaben sich die für $\Delta\vec{\mu}_0$ und $\Delta\vec{\mu}_{ind}$ ermittelten Werte unter der Annahme von $f = 2$.

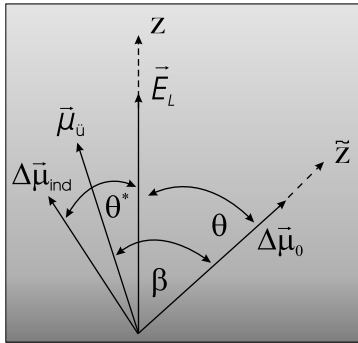


Abbildung 6.1: In einem Stark-Effekt Experiment gibt das externe Feld die Richtung des Laborkoordinatensystems in z -Richtung vor. Das Chromophor interne Bezugssystem \tilde{z} ist durch $\Delta\vec{\mu}_0$ definiert. β ist der Winkel zwischen $\Delta\vec{\mu}_0$ und $\vec{\mu}_{ii}$, θ der Winkel zwischen $\Delta\vec{\mu}_0$ und dem Anregungsfeld \vec{E}_L , und θ^* der Winkel zwischen $\Delta\vec{\mu}_{ind}$ und \vec{E}_L .

Linear polarisiertes Licht selektiert eine Molekülpopulation, dessen Übergangsdipolmomente $\vec{\mu}_{ii}$ ausreichend stark an das Anregungsfeld \vec{E}_L koppeln. Diese Bedingung ist maximal erfüllt für

$$\vec{\mu}_{ii} \uparrow\uparrow \vec{E}_L \quad \text{und} \quad \vec{\mu}_{ii} \uparrow\downarrow \vec{E}_L .$$

Da beide Orientierungen gleich wahrscheinlich auftreten, findet man zwei dem Betrag nach gleich große Frequenzverschiebungen mit unterschiedlichem Vorzeichen. Die Folge ist eine Aufspaltung des spektralen Lochs. Die PhotoSelektion erfolgt proportional einer $\cos^2\theta$ -Verteilung, mit dem Winkel θ zwischen Polarisationsrichtung und Übergangsdipolmoment (Abb. 6.1). Es sei daran erinnert, daß $\Delta\vec{\mu}$ und $\vec{\mu}_{ii}$ voneinander unabhängige Größen sind.

Abbildung 6.2 veranschaulicht das Verhalten spektraler Löcher in einem Stark-Feld in vier verschiedenen Grenzfällen. Es sollen nur Situationen betrachtet werden mit Winkeln für β von 0° oder 90° Grad zwischen Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}_{ii}$ und der Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$. Außerdem nur parallele $\vec{E}_L \parallel \vec{E}_S$, beziehungsweise senkrechte $\vec{E}_L \perp \vec{E}_S$ Anregungsgeometrien. Die Richtung des Stark-Feldes soll als Bezugsachse des äußeren Laborkoordinatensystems dienen.

Abb. 6.2a: Die Verteilung der photoselektierten Molekülpopulation folgt der \cos^2 -Funktion um das Anregungsfeld \vec{E}_L mit einem Öffnungswinkel θ von 30° . Nach Gleichung (6.2) ergibt sich die Starkverschiebung als Projektion der Übergangsdipolmomente auf \vec{E}_S . Die Projektionsvektoren werden hier als $\Delta\mu^*$ bezeichnet. Offensichtlich nehmen sie in diesem Fall maximale positive und negative Werte an, und es kommt zur deutlichen Aufspaltung des Lochs.

Abb. 6.2b: In diesem Fall steht die Polarisationsrichtung des Lasers senkrecht zum E-Feld. Die Projektionen konzentrieren sich um den Bereich bei 0. Es wird lediglich eine Verbreiterung und keine Aufspaltung beobachtet.

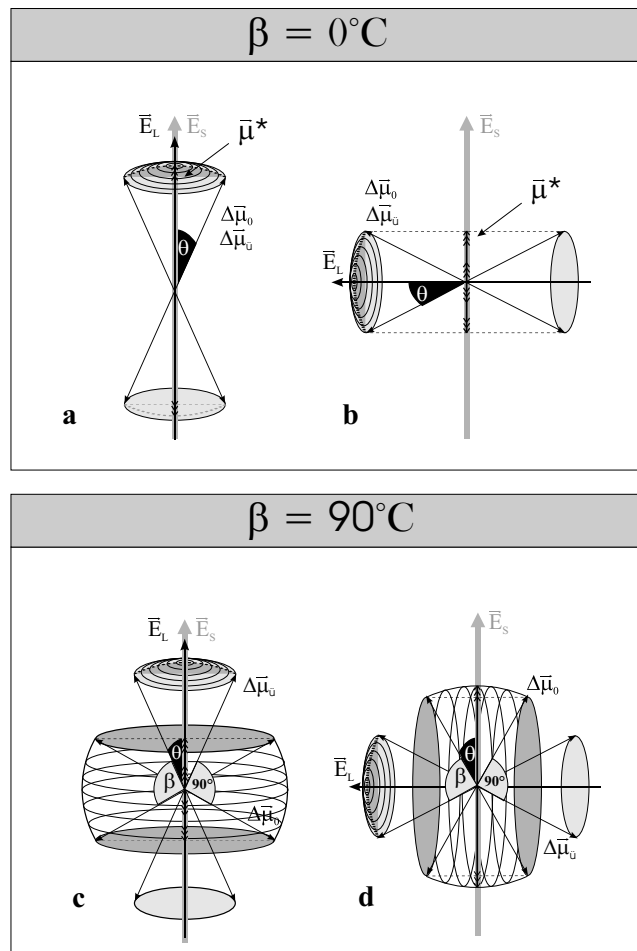


Abbildung 6.2: Vier Grenzfälle, die das Verhalten spektraler Löcher im elektrischen Feld verdeutlichen. Näheres im Text.

Abb. 6.2c: Auch hier dominiert der Verbreiterungseffekt, eine Aufspaltung findet nicht statt.

Abb. 6.2d: Die Verteilungsfunktion von $\Delta\vec{\mu}$ beschreibt wie zuvor einen Torus, allerdings mit seiner Rotationsachse nun parallel zum Anregungsfeld. Die Projektionen $\Delta\mu^*$ erreichen wieder größere positive und negative Werte und man kann eine Aufspaltung feststellen, wenn auch weniger stark ausgeprägt wie im Fall 6.2a.

Die bisher untersuchten molekularen Systeme zeigten meist eine ausgezeichnete Linearität der Frequenzverschiebung mit zunehmender Feldstärke, während der atomare Stark-Effekt in seiner Natur quadratisch ist. Das ist zunächst um

so bemerkenswerter, da beim molekularen Stark-Effekt zwei Felder \vec{E}_S und \vec{E}_P unterschieden werden, also Effekte verschiedener Ordnung beteiligt sind. Faßt man die verschiedenen Beiträge zusammen und schreibt mit (6.2) und (6.3)

$$\Delta\nu = -\frac{1}{h}(\vec{E}_P\Delta\vec{\mu}_0 + f\vec{E}_S\Delta\vec{\mu}_0 + \frac{1}{2}\vec{E}_P\Delta\alpha\vec{E}_P + \frac{1}{2}f^2\vec{E}_S\Delta\alpha\vec{E}_S + f\vec{E}_S\Delta\alpha\vec{E}_P). \quad (6.4)$$

Der Ausdruck enthält insgesamt fünf Terme. Zwei davon sind unabhängig vom externen Feld \vec{E}_S und hängen nur von Chromophor-spezifischen Eigenschaften ab. Das sind die Terme der elektrostatischen Lösungsmittelverschiebung $\vec{E}_P\Delta\vec{\mu}_0$ und $\frac{1}{2}\vec{E}_P\Delta\alpha\vec{E}_P$. Bei allen Molekülen, die ein permanentes Dipolmoment besitzen beobachtet man den linearen Stark-Effekt $f\vec{E}_S\Delta\vec{\mu}_0$, der unter bestimmten experimentellen Bedingungen (Abb. 6.2) zu einer Stark-Aufspaltung Δ führt. Er hängt ausschließlich vom extern angelegten Feld ab, und ist erster Ordnung. Der quadratische Term $\frac{1}{2}f^2\vec{E}_S\Delta\alpha\vec{E}_S$ hängt ebenfalls nur von \vec{E}_S ab. Er kann unter den gegebenen experimentellen Umständen vernachlässigt werden, da er gewöhnlich zu klein ist um beobachtet zu werden und vom linearen und pseudolinearen Effekt dominiert wird. Der pseudolineare Term $f\vec{E}_S\Delta\alpha\vec{E}_P$, der die Frequenzverschiebung des induzierten Dipolmoments durch das Feld berücksichtigt, hängt sowohl von \vec{E}_S wie auch von \vec{E}_P ab.

Fassen wir die Beiträge zur Form spektraler Löcher in einem Stark-Feld zusammen.

- Elektrostatische Lösungsmittelverschiebung: Ganz allgemein ist das die Frequenzverschiebung im Vergleich zur Absorption im Vakuum.
- Linearer Stark-Effekt: Dieser kann prinzipiell nur bei Chromophormolekülen mit einer permanenten Dipolmomentdifferenz beobachtet werden.
- Pseudolinerer Stark-Effekt: Die durch die Matrix induzierten Dipolmomentdifferenzen besitzen in ungeordneten Systemen neben dem molekülfesten Anteil auch immer eine statistische Komponente, das heißt, sie sind sowohl der Richtung wie dem Betrag nach verteilt.
- Die Anregungswahrscheinlichkeit durch polarisiertes Licht folgt einer $\cos^2\beta$ -Abhängigkeit.

In der Praxis ist die Unterscheidbarkeit der einzelnen Parameter β , μ_0 und μ_{indr} oft nicht so eindeutig wie in Abbildung 6.2, da natürlich alle intermediären Fälle denkbar sind. Bei der Auswertung müssen deshalb immer beide Polarisationsrichtungen gleichzeitig in einer globalen Anpassung berücksichtigt werden. Die

Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist dann um so höher, je mehr sich parallele von senkrechten Spektren unterscheiden. Auf Einzelheiten der Fitroutine wurde bereits im technischen Abschnitt (Kapitel 3) eingegangen.

6.2 Tyrosin

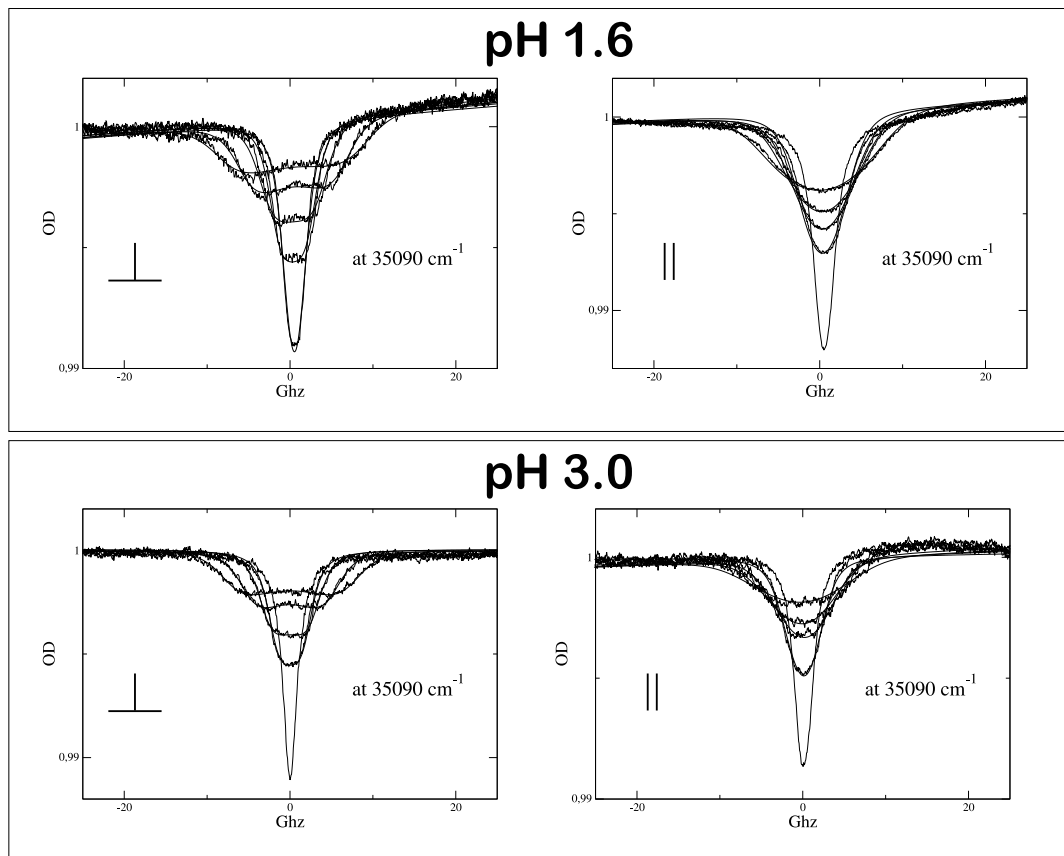


Abbildung 6.3: Spektrale Löcher im Tyrosin in Wasser-Glycerin unter Einfluß eines Starkfeldes von bis zu 27 kV/cm. Die global angepaßten Fitfunktionen sind ebenfalls eingezeichnet.

Die einfachste aromatische Aminosäure Phenylalanin, zählt neben den aliphatischen Gruppen Valin, Leucin und Isoleucin zu den hydrophobsten Aminosäuren überhaupt. Auch Tyrosin hat sich einen gewissen hydrophoben Charakter bewahrt, wobei der polare Substituent am Phenolring dem entgegenwirkt. Bei höherem pH und auch als Folge photoinduzierter Prozesse ionisiert Tyrosin zum Tyrosinat.

Die Voraussetzung um eine Aufspaltung spektraler Löcher in einem Stark-Experiment zu beobachten, ist immer eine nichtsymmetrische Ladungsverteilung des Farbstoffmoleküls bezogen auf ein molekulares Inversionszentrum. Eine solche kann entweder extern, durch eine stark heterogene elektrostatische Umgebung (z. B. Proteinumgebung) induziert sein, oder sie ist bereits eine intrinsische Eigenschaft des Chromophors, wenn dieser ein permanentes Dipolmoment besitzt.

Abbildung 6.3 verdeutlicht, das Letzteres im Fall von Tyrosin zutrifft. Die Tatsache, daß eine Aufspaltung immer in der senkrechten Anregungsgeometrie beobachtet wurde, lässt zudem Rückschlüsse auf den Winkel β zwischen $\Delta\vec{\mu}_0$ und $\vec{\mu}_{ii}$ zu. In diesem Fall erwartet man für β einen Wert größer als 55° , wobei die Deutlichkeit der Aufspaltung einen Winkel näher bei 90° vermuten lässt. Die simultane numerische Anpassung der parallelen und senkrechten Spektren liefert für jeden Wert von $\Delta\vec{E}_S$ die Größen $\Delta\vec{\mu}_{ind}$ und $\Delta\vec{\mu}_0$, sowie den Winkel β (Kapitel 3.4).

Die Ergebnisse der Auswertung für pH-abhängige Starkspektren beim Tyrosin sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Danach mißt man bei einer Temperatur von 2 Kelvin eine molekulare Dipolmomentdifferenz $\Delta\vec{\mu}_0$ von 1.17 D, betrachtet man den Mittelwert aus den insgesamt 8 eigenen Messungen. Das induzierte Moment $\Delta\vec{\mu}_{ind}$ zeigt bei steigendem pH einen Trend zu niedrigeren Werten, wobei im Bereich des ersten pk-Werts von Tyrosin zwischen 2.2 und 2.4 die deutlichsten Schwankungen auftreten. Dieser generelle Trend zeigte sich, wie aus der Tabelle ebenfalls zu entnehmen, auch bei einer bereits zu einem früheren Zeitpunkt unabhängig am Lehrstuhl durchgeführten Messreihe [55].

Die elektronischen Eigenschaften von Tyrosin werden wesentlich durch die polare OH-Gruppe am aromatischen Ring beeinflusst, da sie als potentieller Partner für molekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken zur Verfügung steht. Die chemischen Eigenschaften der meisten Wasserstoffbrücken werden von elektrostatischen Termen dominiert, sind also überwiegend ionischer Natur [126, 127]. Diesem Bild komplementär ist auch die Betrachtung einer solchen Bindung als beginnende Protonentransferreaktion, wobei die Dipolstärke als Funktion der O-H-Streckung aufgetragen werden kann [61].

pH-Werte und Dipolmomente			
pH	$(f \cdot \Delta\mu_0)/\text{Debye}$	$(f \cdot \Delta\mu_{\text{ind}})/\text{Debye}$	$\beta/^\circ$
1.6	1.23 ± 0.02	0.79 ± 0.06	75
1.6*	1.00 ± 0.00	0.88 ± 0.01	75
1.8	1.15 ± 0.02	0.87 ± 0.05	75
2.0	1.13 ± 0.03	0.73 ± 0.03	75
2.1	1.25 ± 0.02	0.91 ± 0.04	75
2.2	1.25 ± 0.02	0.46 ± 0.04	75
2.4	1.03 ± 0.02	1.15 ± 0.03	75
2.7	1.11 ± 0.00	0.59 ± 0.02	75
3.0	1.21 ± 0.02	0.57 ± 0.02	75
3.5*	1.02 ± 0.01	0.26 ± 0.04	70
3.7*	0.97 ± 0.05	0.27 ± 0.05	65
5.5*	0.97 ± 0.05	0.27 ± 0.11	65

Tabelle 6.1: Induzierte und molekulare Dipolmomente für Tyrosin, gemessen bei unterschiedlichen pH-Werten und einer festen Wellenlänge von 35090cm^{-1} . Die mit (*) gekennzeichneten Positionen stammen aus Ref. [55]. Alle pH-Werte wurden bei Raumtemperatur bestimmt. Der pK -Wert der Carboxylgruppe von Tyrosin liegt bei etwa 2.2.

Üblicherweise wird hierbei die „wasserstoffnahe“ Gruppe als Donor bezeichnet. Sie trägt im Gegensatz zum „negativen“ Protonenakzeptor eine positive Partialladung.

Folgende Überlegung kann nun zur Erörterung des pH-Effekts beim Tyrosin herangezogen werden: Ein zunehmend basisches Lösungsmittel macht eine Funktion des hydroxylichen Phenols als Donorgruppe zunehmend wahrscheinlicher. Mit anderen Worten verschiebt sich die Wasserstoffreaktionskoordinate in Richtung des Lösungsmittelmoleküls. Daraus resultiert ein elektronisches Ladungsdefizit am Sauerstoffatom des Phenolrings und damit ein Abfließen von negativer Ladung aus dem Ring, hin zum Sauerstoffatom. Die verringerte aromatische Ladungsdichte verursacht die beobachtete Abnahme der Polarisierbarkeit.

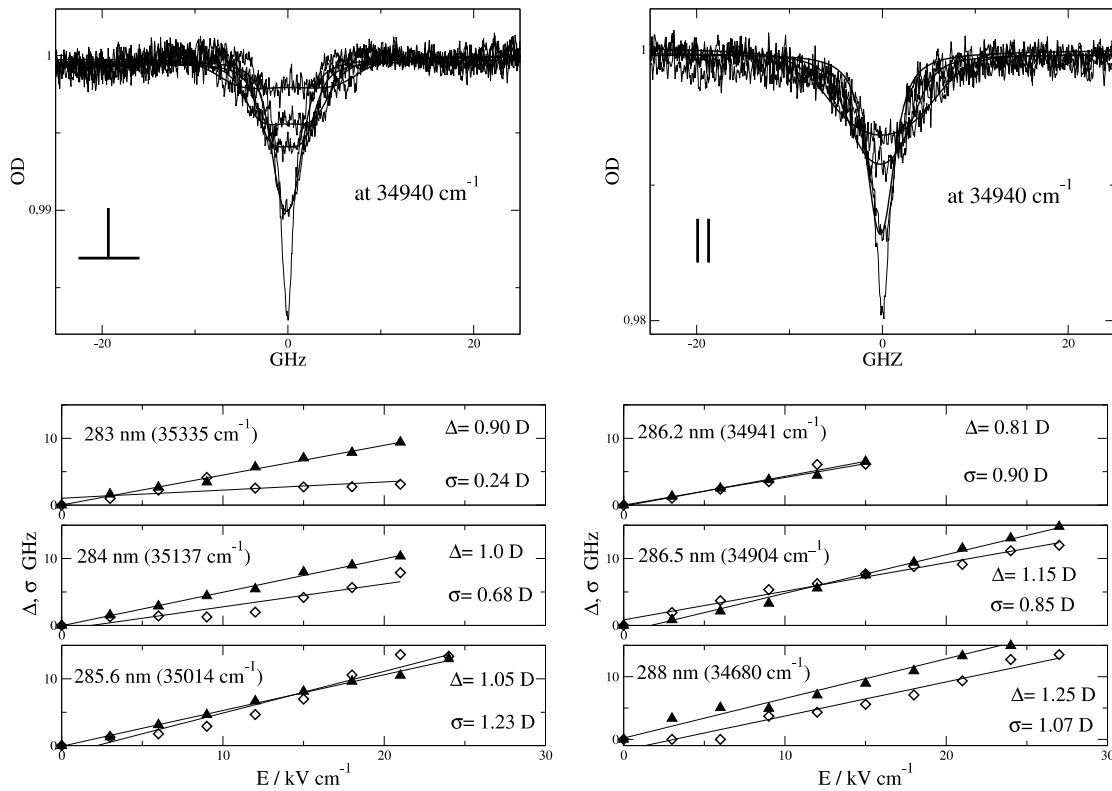


Abbildung 6.4: Spektrale Löcher im Insulin unter Einfluß eines Stark-Feldes von bis zu 27 kV/cm. Im oberen Teil ist die Aufspaltung Δ und Verbreiterung σ der Spektren gezeigt. Die lineare Abhängigkeit beider Parameter von der Feldstärke ist für sechs unterschiedliche Wellenlängen im unteren Teil der Abbildung aufgetragen.

6.3 Insulin

Die Ergebnisse der wellenlängenabhängigen Starkeffekt-Messungen beim Insulin sind in Abbildung 6.4 und 6.5 zusammengefaßt. Genau wie bei freiem Tyrosin beobachtet man auch hier eine deutliche Aufspaltung der spektralen Löcher bei senkrechter Anregung, mit einem Winkel β von etwa 75°. Die Linearität der Aufspaltung und Verbreiterung bezüglich der elektrischen Feldstärke ist für die gemessenen Frequenzen gut erfüllt und zeigt außerdem einen Farbeffekt für das induzierte Dipolmoment, mit einem generellen Trend zu höherer Polarisierbarkeit im roten Frequenzbereich (Abb. 6.5).

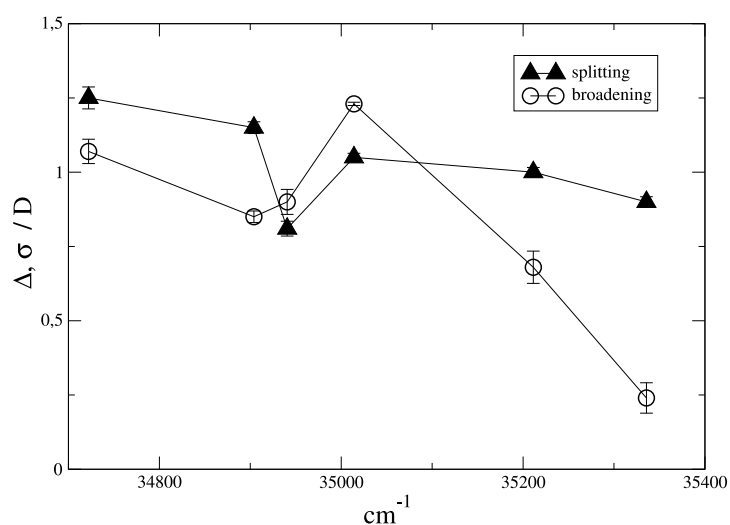


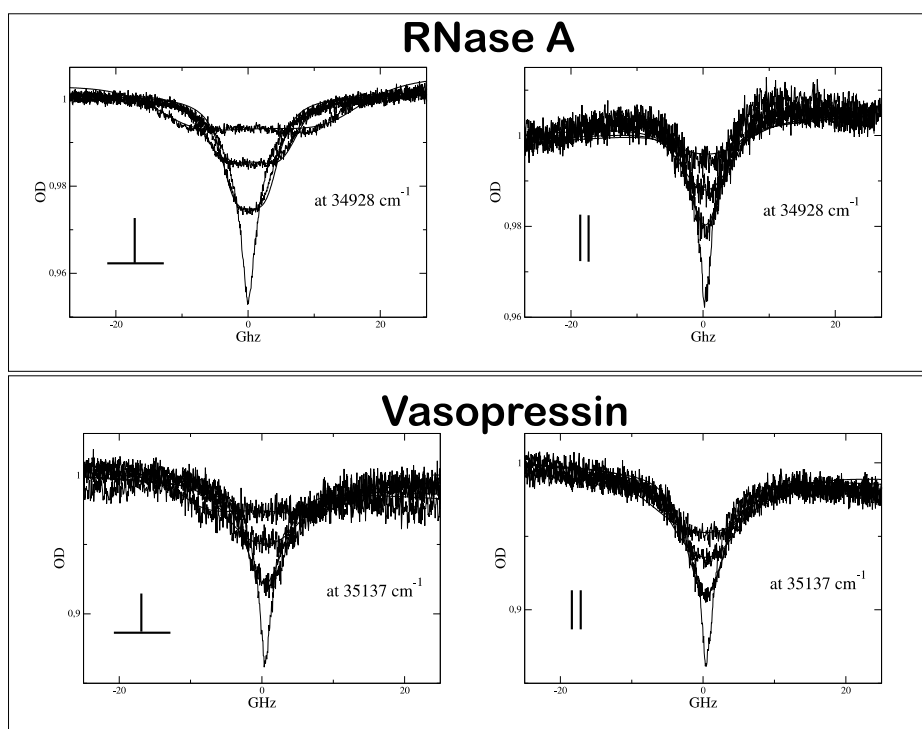
Abbildung 6.5: Frequenzabhängiger Trend des molekularen Stark-Effekts beim Insulin. Insbesondere das induzierte Dipolmoment zeigt eine frequenzabhängige Veränderung mit einer Stufe bei etwa 35000cm^{-1}

Allerdings ist dieser Trend nicht durchgehend linear, sondern verändert sich bei etwa 35000cm^{-1} auf einen niedrigeren Wert und steigt dann wieder leicht an. Das für die Aufspaltung verantwortliche elektronische Dipolmoment $\Delta\mu_0$ zeigt einen wesentlich konstanteren Verlauf und lediglich der Wert knapp unter 35000cm^{-1} weicht etwas ab. Insgesamt zeigt aber auch die Aufspaltung einen leichten Trend zu größeren Werten für rote Wellenlängen.

Eine Farbabhängigkeit von $\Delta\mu_0$ wurde bereits früher beobachtet und kann mit einer unterschiedlich starken Kopplung zwischen Probe und Lösungsmittel erklärt werden [128]. So ist wahrscheinlich, daß die Stärke der molekularen Wasserstoffbrücken nicht konstant über die inhomogene Bande verteilt ist. Der hier gemessene Effekt auf $\Delta\mu_0$ mit einer maximalen Differenz von knapp 0.3 D, ist allerdings gering im Vergleich zu dem auf $\Delta\mu_{ind}$, der immerhin eine Differenz von 1 D besitzt.

Interessant ist ein direkter Vergleich dieser Daten mit dem Druck-Effekt am Insulin (Abb. 4.3). Die in Abbildung 6.4 beobachtete Stufe fällt recht genau mit dem Bereich in Abbildung 4.3 zusammen, der als Übergangsregion interpretiert wurde. Dies deutet darauf hin, daß die unterschiedlichen Tyrosinspezies im blauen und roten Bereich der inhomogenen Bande, auch anhand ihrer elektrostatischen Eigenschaften unterschieden werden können.

6.4 Ribonuclease und Vasopressin

**RNase:**

λ/cm^{-1}	$f \Delta\mu_0/D$	$f \Delta\mu_{\text{ind}}/D$
34928	1.10 +/- 0.01	0.83 +/- 0.03
34916	1.41 +/- 0.06	1.03 +/- 0.09
34835	1.08 +/- 0.01	0.56 +/- 0.01
34819	0.83 +/- 0.05	---
34722	1.27 +/- 0.02	0.75 +/- 0.04

Vasopressin

λ/cm^{-1}	$f \Delta\mu_0/D$	$f \Delta\mu_{\text{ind}}/D$
35242	1.13 +/- 0.02	0.65 +/- 0.04
35137	0.87 +/- 0.07	1.10 +/- 0.09
35051	1.00 +/- 0.50	0.59 +/- 0.27

Abbildung 6.6: Stark-Effekt an RNase A und Vasopressin. Die Werte für $\Delta\mu_0$ und $\Delta\mu_{\text{ind}}$ für die gemessenen Wellenlängen sind aufgelistet.

Auch die Spektren von RNase und Vasopressin zeigen die deutlich Aufspaltung unter senkrechter Anregung. Der ermittelte Winkel β des Übergangsdipolmoments liegt auch hier zwischen 70 und 80°. Die für einige Wellenlängen gemessenen Parameter sind in Abbildung 6.6 für beide Proben ebenfalls aufgelistet. Diese sollen nun in einer abschließenden Diskussion im Zusammenhang mit den übrigen Messungen diskutiert werden.

6.5 Zusammenfassung der Stark-Effekte und Schlußfolgerung

Die qualitativ besten, das heißt rauschärmsten Spektren für senkrechte und parallele Löcher, stammen aus den Messungen an freiem Tyrosin (Abb. 6.3). Allerdings konnten auch alle anderen Daten zuverlässig ausgewertet werden, das zeigen die für alle Beispiele eingefügten Fitfunktionen, sowie die Auswertung der linearen Veränderung der beiden Parameter $\Delta\vec{\mu}_0$ und $\Delta\vec{\mu}_{ind}$ als Funktion von ΔE_S .

Die in allen Fällen beobachtete recht deutliche Aufspaltung, weist auf eine stark orthogonale Komponente von $\Delta\vec{\mu}_0$ bezüglich $\vec{\mu}_{ii}$ hin. Die für β gefundenen Werte bestätigen dies.

In Kapitel 3 wurde bereits auf einige Schwierigkeiten der globalen Auswertung und Anpassung verschiedener Größen beim Starkeffekt hingewiesen. In den meisten Fällen zeigte die verwendete Fitroutine eine hohe Toleranz bei Fixierung des Werts für β in einem Bereich von etwa 65 bis 85°. Ein möglicher orientierender Effekt der Peptidumgebung auf diesen Parameter in der Größenordnung von 20°, bleibt aus diesem Grund schwer auflösbar, schließt aber weit größere Einflüsse aus. Ein solcher Einfluß der Proteinmatrix zeigt sich insbesondere bei Stark-Experimenten mit Chromophoren, die nicht über ein permanentes Dipolmoment verfügen.

Nahezu inversionssymmetrische Farbstoffe wie Porphyrine zeigten im Protein Myoglobin eine deutliche Aufspaltung, während in reinen Glasmatrizen lediglich eine Verbreiterung beobachtet wurde [129]. Eine solche proteininduzierte elektrostatische Symmetriebrechung konnte auch für die Hämgruppe der Meerrettichperoxidase [130] und substratgebundenes Human Serum Albumin (HSA) [46] gefunden werden². Die Deutlichkeit der Aufspaltung war jedoch insbesondere beim HSA-Substrat-Komplex weit weniger ausgeprägt, was auf eine recht „offene“ Position der Bindungsstelle hindeutete. Dies wird auch durch Röntgenstrukturen weitgehend bestätigt.

Tyrosin mag aufgrund der fehlenden Inversionssymmetrie weniger geeignet auf interne Matrixfelder mit einer signifikanten Änderung der spektralen Aufspaltung zu reagieren, da solche Effekte zwangsläufig mit dem molekularen Dipolmoment zur Überlagerung kommen und deshalb schwer trennbar sind.

Betrachtet man die Spektren genau, so lassen sich allerdings doch gewisse Unterschiede im Grad der Aufspaltung ausmachen (z.B. Abb. 6.3, 6.6), was generell zu einer Variation der Werte für $\Delta\mu_0$ führt.

²In diesem Fall war das Substrat der Farbstoff Hypericin.

Insgesamt ergeben die Auswertungen für Tyrosin einen Wert für $f \cdot \Delta\mu_0$ von etwa 1 - 1.2 D. Die induzierten Dipole zeigen bei den pH-abhängigen Messungen einen sichtbaren Trend zu kleineren Werten und bestätigen damit gleichzeitig ältere Messdaten an diesem System.

Der polare Substituent der Phenolgruppe sorgt für eine etwa fünfmal so starke Polarisierbarkeit von Tyrosin verglichen mit der von Phenylalanin, wo nur ein geringer, wenn auch messbarer pH-Einfluß festgestellt wurde [55].

Erwähnenswert ist, daß die beobachtete Änderung von $\Delta\mu_{ind}$ um 0.2 - 0.3 Debyeinheiten im pH Bereich zwischen 2.2 und 2.4 stattfindet. Dies entspricht dem pK-Wert der Carboxylgruppe von Tyrosin, also dem Übergang zur ionisierten $-\text{COO}^-$ -Form. Obwohl die absoluten Änderungen gering sind, geben die gute Qualität der gemessenen und gefitteten Spektren Vertrauen in die gefundenen Werte. Ein optisches Lochbrenn-Experiment erlaubt demnach die direkte Messung einer relativen Veränderung der Polarisierbarkeit α in Abhängigkeit von der Protonenstärke des Lösungsmittels.

Im Prinzip kann bei Kenntnis der Stärke des lokalen Matrix-oder Pocketfelds \vec{E}_p , der absolute Wert von α bestimmt werden. Aus bereits genannten Gründen mögen dazu Proben mit einem verschwindenden festen Dipolmoment geeigneter sein. Allerdings ist damit auch die Anwendung im UV eingeschränkt. So sind beispielsweise Proteine, die nur Phenylalanin als aromatische Aminosäure besitzen, äußerst rar.

Während beim Vasopressin und der Ribonuclease die bislang gemessenen Stark-Effekte noch keine spezifische Aussage zur Situation in der Probe zulassen, zeigt Insulin eine frequenzabhängige Veränderung des induzierten Dipolmoments (Abb. 6.4, 6.5). Der gemessene Effekt läßt Rückschlüsse auf eine differenzierte lokale elektrostatische Umgebung der Tyrosine zu und unterstützt in gewissem Maße die Druck-Effekte beim Insulin. Der als Übergangsbereich interpretierte Abschnitt liegt in beiden Fällen in der Region von etwa 35000 cm^{-1} (Abb. 6.5, 4.3) und trennt eine „rote“ von einer „blauen“ Tyrosinspezies.

Wie lassen sich die Daten nun bezüglich existierender Literatur einordnen? Interessant mag zunächst eine Abschätzung der beteiligten Größenordnungen sein. Ein möglicher Betrachtungsstandpunkt eines Proteins, ist der einer Gruppe polarisierbarer Dipole, die sich vektoriell zu einem Gesamtdipolmoment addieren lassen. Takashima berechnete auf Grundlage von Röntgen- und NMR-Strukturen die Dipolmomente für insgesamt sieben globuläre Proteine [131]. Die ermittelten Werte reichen von 121 bis 785 D, wobei sich im Einzelfall nicht unerhebliche Abweichungen der Ergebnisse ergaben, jenachdem ob die Kristall- oder die Lösungsstruktur als Grundlage verwendet wurde. Für Myoglobin und

RNase A ergaben sich anhand der Röntgenstrukturen Werte von 199 und 361 Debye respektive. In allen untersuchten Proteinen war der Anteil des sogenannten „core-Dipols“, definiert als Summenanteil aller Peptidgruppen-Momente, sehr gering verglichen mit dem Anteil der geladenen Oberflächendipole.

Der Grund für diesen geringen Beitrag ist die statistische Verteilung der Peptid-dipole im Innern globulärer Proteine, sowie das Fehlen von Strukturen ausreichender Persistenzlänge. Zum Vergleich: In langen eindimensionalen Helices aus Polyaminosäuren addieren sich die Beiträge der einzelnen Peptidbindungen (3.4 D) häufig zu Werten von einigen tausend Debye.

Für Tyrosin wurde ein Wert von etwa 5 D für das permanente Dipolmoment sowie eine elektronische Polarisierbarkeit α von 16\AA^3 ermittelt [132, 133].

Sherman und Rubinstein [134] haben auf die dielektrische Heterogenität elektrochemischer Grenzflächensysteme insbesondere von Protein-Lösungsmittel-Oberflächen hingewiesen, sowie auf die Tatsache, daß Proteine nicht pauschal als Medien geringer Dielektrizitätskonstante ϵ behandelt werden können. Für die etwa 5\AA breite Hydrationshülle geben sie einen Wert für ϵ von 6 an. Damit unterscheidet sich dieser erheblich vom Wert von fast 80 für „freies“ Wasser und zeigt erneut die besonderen Eigenschaften dieser biologischen Oberfläche.

Insgesamt zeigen die gemessenen Stark-Effekte, daß Veränderungen des Lösungsmittels und die individuelle Proteinumgebung, die elektronischen Eigenschaften von Tyrosin empfindlich beeinflussen. Es sind dies lokale Effekte begrenzter Reichweite und die absoluten Änderungen sind gering, was gleichzeitig das Potential der Methode aufzeigt. Bis zu diesem Zeitpunkt stehen die Experimente noch für sich. Allerdings ist ein Vergleich mit theoretischen Daten in naher Zukunft sicher wünschenswert.

Zusammenfassung

Nachdem bekannt war, daß sich zwei der insgesamt drei aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin und Tyrosin) für Lochbrennexperimente einsetzen lassen [40, 41], lag auch die Idee nahe sie als spektrales „Label“ an Proteinen zu verwenden. Das dies tatsächlich möglich ist zeigten schließlich erstmals Messungen an BPTI ³ [42]. Überraschenderweise zeigte sich dort jedoch nicht das, was man aufgrund der vier Tyrosine im Protein vielleicht erwartet hätte:

Eine spektrale Trennung unterschiedlicher Chromophore aufgrund unterschiedlicher Lösungsmittelverschiebungen im Molekül.

Eine solche konnte erstmals im Insulin beobachtet werden, dem zweiten Protein an dem die UV-Lochbrennspektroskopie eingesetzt wurde [56]. Dort lassen sich speziell beim Druck-Effekt zwei Bereiche unterscheiden, die nur sinnvoll mit dem Signal verschiedener Tyrosine im Protein erklärt werden können. Die daraus abgeleiteten Werte für die Kompressibilitäten κ dieser Positionen unterscheiden sich etwa um den Faktor 1.6. Die aus den MD-Rechnungen hervorgegangenen Lösungsmittelverteilungen, sowie die auch dort gefundenen verschiedenen lokalen Werte für κ um die Tyrosine im Insulinmolekül, geben den Experimenten eine theoretische Untermauerung.

Die Ribonuclease A ist etwa zweieinhalbfach so groß wie Insulin und besitzt insgesamt sechs Tyrosine. Noch weitaus deutlicher als bei dem Hormonprotein mit vier Chromophoren, zeigt sich hier im Druck-Effekt eine Überlagerung der aromatischen Absorptionen. Gleichzeitig scheinen die Beiträge der einzelnen Tyrosine klarer voneinander unterscheidbar zu sein, was auf eine differenziertere Matrixumgebung der lokalen Positionen in diesem Fall hindeutet. Der über einem Bereich von mehr als 900 cm^{-1} bestimmte Verlauf beim Druck-Effekt zeigt für die äußerst blauen Spektren eine Frequenzverschiebung zu höheren Wellenzahlen. Hier hat bei 35230 cm^{-1} ein Vorzeichenwechsel stattgefunden. Diese spektrale Position markiert die Vakuumabsorption eines Chromophors oder einer Gruppe von Chromophoren, bei der die verschiedenartigen Wechselwirkungen sich gegenseitig kompensieren und keine Lösungsmittelverschiebung mehr zu erkennen ist.

³Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor

Die Entfaltungen der Proteine Insulin und RNase mit Harnstoff und Guanidinhydrochlorid, führten immer zu einer verringerten Kompressibilität, die mit der zu erwartenden offeneren Struktur der Polypeptidkette sinnvoll erklärt werden kann. Die Unterscheidbarkeit einzelner Aminosäuren im Experiment ist dann nicht mehr gegeben.

Tyrosin besitzt als polares Molekül ein nichtverschwindendes permanentes Dipolmoment und zeigt im Stark-Effekt auch eine deutliche Aufspaltung der spektralen Löcher im Insulin, RNase, Vasopressin und als freier Chromophor in Wasser-Glycerin. Der frequenzabhängig Verlauf im Insulin lässt zumindest einen Trend erkennen, der die beim Druck-Effekt gemachten Aussagen ergänzt. Für den freien Chromophor, das Tyrosin, deutet der Stark-Effekt auf eine schwache pH-Abhängigkeit hin.

Insgesamt lassen die Versuche zu den elektrostatischen Eigenschaften keine einheitliche Schlußfolgerung zu, bis auf vielleicht folgende: Tyrosin reagiert selbstverständlich auf lokale elektrische Felder mit einer Veränderung seiner Polarisierbarkeit, jedoch überlagern diese Effekte immer stark mit dem moleküleigenen Dipolmoment. Für solche Experimente, die einen direkten Matrixeinfluß auf die elektronische Struktur des Moleküls untersuchen, wäre Phenylalanin als nahezu inversionssymmetrische Sonde wohl weitaus besser geeignet.

Abschließend mag noch ein Ausblick stehen. Insbesondere für Druck-Effekt Experimente könnten verschiedene Proteine in Frage kommen. Calmodulin beispielsweise, ein Calcium-bindendes Protein mit zwei Tyrosinen, reagiert auf Substratbindung mit großräumigen Veränderungen seiner Form. Es könnte damit ein möglicher Kandidat für Versuche sein, in denen man physiologische Konformationsveränderungen für einzelne Positionen im Protein betrachtet.

Wichtige Abkürzungen

\vec{E}_L	Laserfeld
\vec{E}_P	Pocket- oder Matrixfeld
\vec{E}_S	Starkfeld
f	Lorentz Korrekturfaktor
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
MeOH	Mercaptoethanol
s_0	Lösungsmittelverschiebung
s_p	Druckverschiebung
β	Winkel zwischen $\vec{\mu}_{ii}$ und $\vec{\mu}_0$
γ	Homogene Linienbreite
γ_H^*	Quasihomogene Lochbreite
Δ	Starkaufspaltung
$\vec{\mu}$	Dipolmoment
$\vec{\mu}_0$	Molekulares Dipolmoment
$\vec{\mu}_{ind}$	Induziertes Dipolmoment
$\vec{\mu}_{ii}$	Übergangsdipolmoment
ν	Frequenz
θ, θ^*	Winkel zwischen $\vec{\mu}_0$ bzw. $\vec{\mu}_{ind}$ und \vec{E}_L
κ	Kompressibilität
σ	Starkverbreiterung
σ_p	Druckverbreiterung

Literaturverzeichnis

- [1] D. Harrer and H. Spiess. Spektroskopie amorpher und kristalliner Festkörper. *Steinkopf Verlag Darmstadt*, 1995.
- [2] J. Friedrich and D. Haarer. Photochemical hole burning: A spectroscopic study of relaxation processes in polymers and glasses. *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.*, 23:113–140, 1984.
- [3] J. Friedrich. Hole burning spectroscopy. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*, ed. by J. C. Lindon, G. E. Tranter, J. L. Holmes, *Academic Press*, pages 826–836, 1999.
- [4] S. Völker. Hole-burning spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1989:499–530, 1989.
- [5] B. Kharlamov, R. Personov, and L. Bykovskaya. Stable gap in absorption spectra of solid solutions of organic molecules by laser irradiation. *Opt. Commun.*, 12:191, 1974.
- [6] A. Gorokhovskii, R. Kaarli, and L. Bykowskaya. *JETP Lett.*, 20:216, 1974.
- [7] J. Gafert. Festkörpereigenschaften von Chromoproteinen: Eine untersuchung mit verschiedenen Varianten der Lochbrennspektroskopie. *Dissertation Universität Bayreuth*, 1994.
- [8] T. Reinot and G. Small. Non-lorentzian zero-phonon holes and new insights on nonphotochemical hole burning: Al-phtalocyanine in hyperquenched glassy water. *J. Chem. Phys.*, 114:9105–9114, 2001.
- [9] F. Kokai, H. Tanaka, J. Brauman, and M Fayer. An investigation of the mechanism of nono-photochemical hole burning of resorufin in ethanol glass. *Chem. Phys. Lett.*, 143:1–5, 1988.
- [10] K. Orth, P. Schellenberg, J. Friedrich, and W. Häusler. Symmetrie species conversion in rotational tunneling systems observed by hole burning: high resolution spectroscopy of dimethyl-S-etrazine in n-octan. *J. Luminescence*, 56:99–108, 1993.

- [11] M. Pinsker. Quantenrotation von methylgruppen: UV-Lochbrennexperimente an p-Chlortoluol in Cyclohexan. *Dissertation, Lehrstuhl für Physik Weihenstephan, Technische Universität München*, 2003.
- [12] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. Watson. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc., New York London, 1994.
- [13] L. Stryer. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, New York, 1995.
- [14] C. Anfinsen. Studies on the principles that govern the folding of protein chains. *Nobel lecture*, 1972.
- [15] Y. Muller and U. Heinemann. Röntgenstrukturanalyse großer Biomoleküle. *Chemie unserer Zeit*, 32:22–33, 1998.
- [16] J. Kendrew. Myoglobin and the structure of proteins. *Science*, 139:1259–66, 1963.
- [17] H. Frauenfelder, B. McMahon, and P. Fenimore. Myoglobin: The hydrogen atom of biology and a paradigm of complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:8615–8617, 2003.
- [18] H. Frauenfelder, F. Parak, and R. Young. Conformational substates in proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 17:451–479, 1988.
- [19] C. Scherk, A. Ostermann, K. Achterhold, O. Iakovleva, C. Nazikkol, B. Krebs, E. Knapp, W. Mayer-Klaucke, and F. Parak. The x-ray absorption spectroscopy Debye-Waller factors of an iron compound and of met-myoglobin as a function of temperature. *Eur. Biophys. J.*, 30:393–403, 2001.
- [20] F. Parak, H. Hartmann, K. Aumann, H. Reuscher, G. Rennekamp, and H. Bartunik. Low temperature x-ray investigation of structural distributions in myoglobin. *Eur. Biophys. J.*, 15:237–249, 1987.
- [21] D. Thorn Leeson, D. Wiersma, K. Fritsch, and J. Friedrich. The energy landscape of myoglobin: An optical study. *J. Phys. Chem. B*, 101:6331–6340, 1997.
- [22] H. Frauenfelder, B. McMahon, R. Austin, K. Chu, and J. Groves. The role of structure, energy landscape, dynamics, and allostery in the enzymatic function of myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98:2370–2374, 2001.
- [23] J. Schlichter, J. Friedrich, L. Erenyi, and J. Fidy. Protein dynamics at low temperature. *J. Chem. Phys.*, 112:3045–3050, 2000.

-
- [24] J. Skinner, J. Friedrich, and J. Schlichter. Spectral diffusion in proteins: A simple phenomenological model. *J. Phys. Chem. A*, 103:2310–2311, 1999.
- [25] K. Fritsch, J. Friedrich, F. Parak, and J. Skinner. Spectral diffusion and the energy landscape of a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:15141–15145, 1996.
- [26] J. Flory. Statistical mechanics of chain molecules. *Wiley*, 1969.
- [27] A. Robertson and K. Murphy. Protein structure and the energetics of protein stability. *Chem. Rev.*, 97:1251–1267, 1997.
- [28] Mathews, van Holde, and Ahern. Biochemistry. *Addison Wesley Longman, third Ed.*, 1999.
- [29] B. Gillespie and K. Plaxco. Using protein folding rates to test protein folding theories. *Annu. Rev. Biochem.*, 73:837–859, 2004.
- [30] V. Uversky and O. Ptitsyn. All-or none solvent induced transitions between native, molten globule and unfolded states in globular proteins. *Fold. Des.*, 1996:117–122, 1996.
- [31] S. Jackson. How do small single domain proteins fold? *Fold. Des.*, 3:81–91, 1998.
- [32] M. Karplus and D. Weaver. The diffusion collision model and the experimental data. *Protein Sci.*, 3:650–668, 1994.
- [33] V. Dagget and A. Fersht. Is there a unifying mechanism for protein folding? *TIBS*, 28:18–25, 2003.
- [34] D. Markarov and K. Plaxco. The topomer search model: a quantitative, first-principle description of two-state protein folding kinetics. *Protein Sci.*, 12:17–26, 2003.
- [35] P. Wolynes. Symmetry and the energy landscape of biomolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:14249–14255, 1996.
- [36] Y. Levy, S. Cho, T. Shen, J. Onuchic, and P. Wolynes. Symmetry and frustration in protein energy landscapes: A near degeneracy resolves the rop dimer-folding mystery. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102:2373–2378, 2005.
- [37] O. Miyashita, P. Wolynes, and J. Onuchic. Simple energy landscape model for the kinetics of functional transitions in proteins. *J. Phys. Chem. B*, 109:1959–1969, 2005.

- [38] C. Dobson, A. Sali, and M. Karplus. Proteinfaltung aus theoretischer und experimenteller Sicht. *Angew. Chemie*, 110:908–935, 1998.
- [39] J. Friedrich, H. Scheer, B. Zickendraht-Wendelstadt, and D. Haarer. Photochemical hole-burning: A means to observe high resolution optical structures in phycoerythrin. *J. Chem. Phys.*, 74:2260–2266, 1980.
- [40] M. Stübner, E. Schneider, and J. Friedrich. Hole burning stark-effect studies on aromatic aminoacids: I. phenylalanin in a glycerol-water glass. *PCCP*, 3:5369–5372, 2001.
- [41] M. Stübner, C. Hecht, and J. Friedrich. Hole burning stark-effect studies on aromatic aminoacids: Ii. a comparative investigation of tyrosine and the BPTI protein. *PCCP*, 4:6080–6085, 2002.
- [42] M. Stübner, C. Hecht, and J. Friedrich. Labeling proteins via hole burning of their aromatic amino acids: Pressure tuning spectroscopy of BPTI. *Biophys. J.*, 83:3553–3557, 2002.
- [43] J. Friedrich, J. Gafert, J. Zollfrank, J. Vanderkooi, and J. Fidy. Spectral hole burning and selection of conformational substates in chromoproteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:1029–1033, 1994.
- [44] J. Gafert, J. Friedrich, F. Parak, and J. Fidy. Hole burning and pressure phenomena in chromoproteins. *J. Luminesc.*, 56:157–164, 1993.
- [45] J. Gafert, J. Friedrich, and 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.
- [46] M. Köhler, J. Gafert, J. Friedrich, H. Falk, and J. Meyer. Hole-burning spectroscopy of proteins in external fields: Human serum albumin complexed with the hypercinat ion. *J. Phys. Chem.*, 100:8567–8572, 1996.
- [47] W. Hoppe, W. Lohman, H. Markl, and H. Ziegler. *Biophysik*. 1982.
- [48] IMSL. Fortran subroutines for statistical analysis. 1987.
- [49] P. Schätz and M. Maier. Calculations of electric field effects on persistent spectral holes in amorphous host-guest systems. *J. Chem. Phys.*, 87:809–820, 1987.
- [50] J. Whittigham, D. Scott, K. Chance, A. Wilson, J. Finch, J. Brange, and G. Dodson. Insulin at pH 2: Structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. *J. Mol. Biol.*, 318:479–490, 2002.

-
- [51] T. Sesselmann, W. Richter, D. Haarer, and H. Morawitz. Spectroscopic studies of guest-host interactions in dye doped polymers: Hydrostatic pressure effects versus temperature effects. *Phys. Rev. B*, 36:7601–7611, 1987.
- [52] B.B. Laird and J.L. Skinner. Microscopic theory of reversible pressure broadening in hole burning spectra of impurities in glasses. *J. Chem. Phys.*, 90:3274–3281, 1988.
- [53] G. Köhler and K. Rechthaler. Solvent effects on excited state relaxation phenomena. *Pure Appl. Chem.*, 8:1647–1652, 1993.
- [54] I. Renge. Mechanisms of solvent shifts, pressure shifts, and inhomogeneous broadening of the optical spectra of dyes in liquids and low-temperature glasses. *J. Phys. Chem. A*, 104:7452–7463, 2000.
- [55] M. Stübner. Lochbrennspektroskopie von Biomolekülen in äußeren Feldern. *Dissertation, Lehrstuhl für Physik Weihenstephan, Technische Universität München*, 2002.
- [56] C. Schnell, M. Reif, C. Scharnagl, and J. Friedrich. Local compressibilities in insulin as determined from pressure tuning hole burning experiments and MD simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 7:1–8, 2005.
- [57] A. Stretton. The first sequence: Fred sanger and insulin. *Genetics*, 162:527–532, 2002.
- [58] F. Sanger. The free amino groups of insulin. *Biochem. J.*, 39:507–515, 1945.
- [59] A. Lüchow, D. Spangenberg, C. Janzen, M. Gerhards, and K. Kleidermanns. Structure and energetics of phenol(H_2O) $_n$, $n \leq 7$: Quantum monte carlo calculations and double resonance experiments. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3:2771–2780, 2001.
- [60] R. Parthasarathi, V. Subramanian, and N. Sathyamurthy. Hydrogen bonding in phenol, water and phenol-water clusters. *J. Phys. Chem. A*, 109:843–850, 2005.
- [61] A. Sobolewski and W. Dohmke. Photoinduced electron and proton transfer in phenol and its clusters with water and ammonia. *J. Phys. Chem. A*, 105:9275–9283, 2001.
- [62] H. Tsui and T. van Mourik. Ab initio calculations on phenol-water. *Chem. Phys. Lett.*, 350:565–572, 2001.

- [63] M. Reif. Conformational and thermodynamic characterization of insulin in glycerol water by computer simulations. *Bachelor Thesis, Chair of Physics Freising-Weihenstephan, Technische Universität München*, pages 1–122, 2004.
- [64] K. Ghekko and N. Timasheff. Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, 20:4667–4676, 1981.
- [65] T. Chalikian, A. Sarvazyan, and K. Breslauer. Hydration and partial compressibility of biological compounds. *Biophys. Chem.*, 51:89–107, 1994.
- [66] A. Bizzarri and S. Cannistraro. Molecular dynamics of water at the protein-solvent interface. *J. Phys. Chem. B*, 106:6617–6633, 2002.
- [67] N. Smolin, A. Oleinikova, I. Brovchenko, A. Geiger, and R. Winter. Properties of spanning water networks at protein surfaces. *J. Phys. Chem. B*, 109:10995–11005, 2005.
- [68] A. Priev, A. Almagor, S. Yedgar, and B. Gavish. Glycerol decreases the volume and compressibility of protein interior. *Biochemistry*, 35:2061–2066, 1996.
- [69] V.A. Parsegian, R.P. Rand, and D.C. Rau. Osmotic stress, crowding, preferential hydration, and binding: A comparison of perspectives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:3987–3992, 2000.
- [70] D. Kharakoz. Volumetric properties of proteins and their analogues in diluted water solutions. 2. partiell adiabatic compressibilities of amino acids at 15-70°C. *J. Phys. Chem.*, 95:5634–5642, 1991.
- [71] H. Frauenfelder, H. Hartmann, Martin Karplus, I. Kuntz, J. Kuriyan, F. Parak, G. Petsko, D. Ringe, R. Tilton, M. Conolly, and N. Max. Thermal expansion of a protein. *Biochemistry*, 26:254–261, 1987.
- [72] B. Bennion and V. Daggett. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:5142–5147, 2003.
- [73] C. Tanford, K. Kawahara, and S. Lapanje. Proteins in 6 m guanidine hydrochloride. demonstration of random coil behavior. *J. Biol. Chem.*, 241:1921–1923, 1966.
- [74] J. Schellman. Protein stability in mixed solvents: A balance of contact interaction and excluded volume. *Biophys. J.*, 85:108–125, 2003.

-
- [75] Y. Griko, N. Sreerama, P. Osumi-Davis, R. Woody, and A. Moon Woody. Thermal and urea-induced unfolding in t7 rna-polymerase: Calorimetry, circular dichroism and fluorescence study. *Protein Sci.*, 10:845–853, 2001.
- [76] D.N. Brems, P. Brown, L. Heckenlaible, and B.H. Frank. Equilibrium denaturation of insulin and proinsulin. *Biochemistry*, 29:9289–9293, 1990.
- [77] R.L. Millican and D.N. Brems. Equilibrium intermediates in the denaturation of human insulin and two monomeric insulin analogs. *Biochemistry*, 33:1116–1124, 1994.
- [78] I. Pittman and H.S Tager. A spectroscopic investigation of the conformational dynamics of insulin in solution. *Biochemistry*, 34:10578–10590, 1995.
- [79] A.E. Mark, J. Berendsen, and W.F. van Gunsteren. Conformational flexibility of aqueous monomeric and dimeric insulin: A molecular dynamic study. *Biochemistry*, 30:10866–10872, 1991.
- [80] E. Nettleton, M. Sunde, M. Bouchard, C. Dobson, and C. Robinson. Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by mass spectroscopy. *Biophys. J.*, 79:1053–1065, 2000.
- [81] Y. Zhang, J. Whittingham, J. Turkenburg, E. Dodson J. Brange, and G. Dodson. Crystallization and preliminary crystallographic investigation of a low-ph native insulin monomer with flexible behaviour. *Acta Cryst. D*, D58:186–187, 2002.
- [82] J. Dong, Z. Wan, , M Popov, P. Carey, and M Weiss. Insulin assembly damps conformational fluctuations: raman analysis of amide i linewidth in native states and fibrils. *J. Mol. Biol.*, 330:431–442, 2003.
- [83] G. Dodson and D. Steiner. The role of assembly in insulin’s biosynthesis. *Curr. Op. Stuct. Biol.*, 8:189–194, 1998.
- [84] M. Iwadate, E. Nagao, M. Williamson, M. Ueki, and T. Asakura. Structure determination of [arg8]vasopressin methylendithioester in dimethylsulfoxide using NMR. *Eur. J. Biochem.*, 267:4504–4510, 2000.
- [85] R. Raines. Ribonuclease A. *Chem. Rev.*, 98:1045–1065, 1998.
- [86] T. Klink, K. Woycechowsky, K. Taylor, and R. Raines. Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A. *Eur. J. Biochem.*, 267:566–572, 2000.

- [87] J. Horwitz, E. Strickland, and C. Billups. Analysis of the vibrational structure in the near-ultraviolet circular dichroism and absorption spectra of tyrosine derivatives and ribonuclease A at 77 k. *J. Am. Chem. Soc.*, 92:2119–2129, 1969.
- [88] J. Horwitz and E. Strickland. Absorption and circular dichroism spectra of ribonuclease-S at 77 k. *J. Biol. Chem.*, 246:3749–3752, 1971.
- [89] J. Brandts and L. Kaplan. Derivative spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochem.*, 12:2011–2024, 1973.
- [90] J. Smith and M. Scholtz. Guanidine hydrochlorid unfolding of peptides helices: Separation of denaturant and salt effects. *Biochem.*, 35:7292–7297, 1996.
- [91] K. Gekko, A. Kimoto, and T. Kamiyama. Effects of disulfide bonds on compactness of protein molecules revealed by volume, compressibility, and expansibility changes during reduction. *Biochemistry*, 42:13746–13753, 2003.
- [92] Y. Tamura and K. Gekko. Compactness of thermally and chemically denatured ribonuclease A as revealed by volume and compressibility. *Biochem.*, 34:1878–1884, 1995.
- [93] D. Juminaga, J. Wedemeyer, R. Garduno-Juarez, M. McDonald, and H. Scheraga. Tyrosyl interactions in the folding and unfolding of bovine pancreatic ribonuclease A: A study of tyrosine-to-phenylalanine mutants. *Biochem.*, 36:10131–10145, 1997.
- [94] D. Reinstädler, H. Fabian, J. Backmann, and D. Naumann. Refolding of thermally and urea-denatured ribonuclease A monitored by time-resolved ftir spectroscopy. *Biochem.*, 35:15822–15830, 1996.
- [95] E. Eberhardt, P. Wittmayer, B. Templer, and R. Raines. Contribution of a tyrosine side chain to the ribonuclease A catalysis and stability. *Prot. Sci.*, 5:1697–1703, 1996.
- [96] J. Santoro, C. Gonzalez, M. Bruix, J. Neira, J. Herranz, and M. Rico. High-resolution three-dimensional structure of ribonuclease A in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 229:722–734, 1993.
- [97] J. Brandts, H. Halvorson, and M. Brennan. Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reaction is due to the cis-trans isomerism of proline residue. *Biochem.*, 14:4953–4963, 1975.

-
- [98] W. Houry and H. Scheraga. Nature of the unfolded state of ribonuclease A: Effect of cis-trans x-pro peptide bond isomerization. *Biochem.*, 35:11719–11733, 1996.
- [99] W. Wedemeyer, E. Welker, M. Narayan, and H. Scheraga. Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*, 39:4207–4216, 2000.
- [100] S. Shimizu and H. chan. Origins of protein denatured state compactness and hydrophobic clustering in aqueous urea: Inferences from nonpolar potentials of mean force. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 49:560–566, 2002.
- [101] T. Sosnick and J. Trewhella. Denatured states of ribonuclease A have compact dimensions and residual secondary structure. *Biochem.*, 31:8329–8335, 1992.
- [102] D. Shortle and M. Ackermann. Persistence of native-like topology in 8 M urea. *Science*, 293:487–489, 2001.
- [103] K. Plaxco and M. Gross. Unfolded, yes, but random? Never. *Nature Struct. Biol.*, 8:659, 2001.
- [104] S. Stelea, P. Pancoska, A. Benight, and T. Keiderling. Thermal unfolding of ribonuclease A in phosphate at neutral ph: Deviations from the two state model. *Prot. Sci.*, 10:970–978, 2001.
- [105] J. Denton, Y. Konishi, and H. Scheraga. Folding of ribonuclease A from a partially disordered conformation. Kinetic study under folding conditions. *Biochem.*, 21:5155–5163, 1982.
- [106] K. Gekko and H. Noguchi. Compressibility of globular proteins in water at 25°C. *J. Phys. Chem.*, 83:2706–2714, 1979.
- [107] K. Gekko and Y. Hasegawa. Compressibility-structure relationships of globular proteins. *Biochemistry*, 25:6563–6571, 1986.
- [108] T.V. Chalikian and K.J. Breslauer. Compressibility as a means to detect and characterize globular protein states. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93:1012–1014, 1996.
- [109] F. Milero, A. Lo Surdo, and C. Shin. The apparent molal volumes and adiabatic compressibilities of aqueous amino acids at 25°. *J. Phys. Chem.*, 82:784–791, 1978.
- [110] B. Gavish, E. Gratton, and C.J. Hardy. Adiabatic compressibility of globular proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 80:750–754, 1983.

- [111] M.V. Dadarlat and C.B Post. Insights into protein compressibility from molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B*, 105:715–724, 2001.
- [112] N. Taulier and T. Chalikian. Compressibility of protein transitions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1595:48–70, 2002.
- [113] E. Paci and M. Marchi. Intrinsic compressibility and volume compression in solvated proteins by molecular dynamics simulation at high pressure. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 93:11609–11614, 1996.
- [114] M. Marchi. Compressibility of cavities and biological water from voronoi volumes in hydrated proteins. *J. Phys. Chem. B*, 107:6598–6602, 2003.
- [115] F. Richards. Areas, volumes, packing and protein structure. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 6:151–176, 1977.
- [116] M. Gerstein, J. Tsai, and M. Levitt. The volume of atoms on the protein surface calculated from simulation, using voronoi polyhedra. *J. Mol. Biol.*, 249:955–966, 1995.
- [117] S. Leikin, A. Parsegian, D. Rau, and R. Rand. Hydration forces. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 44:369–395, 1993.
- [118] C. Reid and R. Rand. Probing protein hydration and conformational sub-states in solution. *Biophys. J.*, 72:1022–1030, 1997.
- [119] W. Royer, A. Pardanani, Q. Gibson, and E. Peterson. Ordered water molecules as key allosteric mediators in cooperative dimeric hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:14526–14531, 1996.
- [120] M.V. Dadarlat and C.B Post. Adhesive-cohesive model for protein compressibility: an alternative perspective on stability. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 100:14778–14783, 2003.
- [121] X. Yu, J. Park, and D.M. Leitner. Thermodynamics of protein hydration computed by molecular dynamics and normal modes. *J. Phys. Chem. B*, 107:12820–12828, 2003.
- [122] D. Bent and E. Hayon. Excited state chemistry of aromatic aminoacids and related peptides: Tyrosine. *J. Am. Chem. Soc.*, 14:2599–2606, 1974.
- [123] K. Guzow, R. Ganzynkowicz, A. Rzeska, J. Mrozek, M. Szabelski, J. Karolczak, A. Liwo, and W. Wiczak. Photophysical properties of tyrosine and its simple derivatives studied by time-resolved fluorescence spectroscopy, global analysis and theoretical calculations. *J. Phys. Chem. B*, 108:3879–3889, 2004.

-
- [124] K. Willies and A. Szabo. Fluorescence decay kinetics of tyrosinate and tyrosine hydrogen-bonded complexes. *J. Phys. Chem.*, 95:1585–1589, 1991.
- [125] D. Hanson, J. Patel, I. Winkler, and A. Morrobel-Sosa. Spectroscopy and excitation dynamics of condensed molecular systems. *ed. V. Agranovich and R. Hochstrasser, North Holland Amsterdam*, 1983.
- [126] J. Israelachvili. Intermolecular and surface forces. *Acadaic Press, Harcourt Brace, Publishers*, 1991.
- [127] T. Steiner. Die ganze vielfalt der wasserstoffbrückenbindungen. *Ang. Chem.*, 114:50–80, 2002.
- [128] C. Hecht, M. Stübner, J. Friedrich, and T. Chang. Investigation of probe-solvent interactions: Color effects in optical line width. *Chem. Phys. Lett.*, 395:21–26, 2004.
- [129] J. Gafert, J. Friedrich, and F. Parak. Stark-effect on photochemical holes in chromoproteins: Protoporphyrin IX-substituted myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:2116–2120, 1995.
- [130] M. Köhler, J. Friedrich, E. Balog, and J. Fidy. Symmetry breaking by the heme pocket in horseradish peroxidase as revealed by stark spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 277:417–422, 1997.
- [131] S. Takashima. The structure and dipole moment of globular proteins in solution and crystalline states: Use of nmr and x-ray databases for the numerical calculation of dipole moment. *Biopolymers*, 58:398–409, 2001.
- [132] X. Song. An inhomogenous model of protein dielectric properties: Intrinsic polarizabilities of aminoacids. *J. Chem. Phys.*, 116:9359–9363, 2002.
- [133] D. Voges and A. Karshikoff. A model of dielectric constants in proteins. *J. Chem. Phys.*, 108:2219–2227, 1998.
- [134] A. Rubinstein and S. Sherman. Influence of the solvent structure on the electrostatic interactions in proteins. *Biophys. J.*, 87:1544–1557, 2004.

Schlußgedanke

Viele Menschen haben direkt und indirekt zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen. Zunächst gilt mein Dank Prof. Friedrich, der mich freundlich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen hat, und der nicht zuletzt für das insgesamt mehr als angenehme Arbeitsklima am Lehrstuhl verantwortlich ist. Daneben war er allzeit ein Ansprechpartner für Fragen fachlicher Art, und oft konnte ein klärendes Gespräch die vielleicht manchmal fehlende Motivation und Orientierung zurückbringen.

Das angesprochenen „äußere“ Klima wäre mit Sicherheit auch ein Anderes wären da nicht Erika Bischofs, Helene Budjarek und Ellen Schneider, die mir häufig in allgemeinen Organisationsfragen sowie in der Probenpräparation hilfreich zur Seite standen.

Ein Dank geht auch an Ludwig Hütt, der selbst die ausgefallensten Wünsche bezüglich irgendwelcher Komponenten eines experimentellen Aufbaus, schnell und zuverlässig erfüllt hat. Eine Voraussetzung für erfolgreiches Arbeiten in einem technischen Labor.

Peter Hermann, Vladimir Ponkratov, Maria Reif, Christina Scharnagl, Marc Somoza, Christiane Ullrich, Johannes Wiedersich und Thomas Zeitler, die ich als kompetente Mitarbeiter und Kollegen sehr schätze. Speziell erwähnen möchte ich das Theorie-Team Christina und Maria, die wertvolle Daten zu meinen experimentellen Ergebnissen beigesteuert haben.

Die ehemaligen Doktoranden Harald Lesch, Martin Pinsker, Jörg Schlichter und Markus Stübner. Von ihnen habe ich als Neuling vieles gelernt. Darüber hinaus werden mir auch die diversen Feste und abendlichen Aktivitäten in freudiger Erinnerung bleiben.

Ich möchte natürlich Andy Fräbel und Bianca Klein gedenken, deren tödlicher Unfall uns allen einen Schock versetzte.

Einen Dank an Christoph Hecht, der mir als angenehm ruhiger, stets kompetenter Mitarbeiter in Erinnerung bleiben wird.

Einen Dank an Alfred Sigl für die vielen erhellenden Diskussionen sowie den häufigen „technischen support“ bei der experimentellen Arbeit.

Meinen Eltern danke ich besonders für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht, ohne die vieles schwerer oder unmöglich gewesen wäre.