

Auswirkung hoher hydrostatischer Drücke auf Modelllipidmembranen, Proteine und proteinmimetische Polymere

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
(Doctor rerum naturalium, Dr. rer. nat.)

Eingereicht beim
Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Dortmund

von
Dipl.-Biochem. Matthias Pühse
aus Herford

Dortmund, 2009

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Winter
Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Rehage

Publikationen

Pühse, M., Jeworrek, C., Winter, R., 2008. The temperature-pressure phase diagram of a DPPC-ergosterol fungal model membrane - a SAXS and FT-IR spectroscopy study. *Chem. Phys. Lipids* 152, 57-63.

Jeworrek, C., Pühse, M., Winter, R., 2008. X-ray kinematography of phase transformations of three-component lipid mixtures: A time-resolved synchrotron X-ray scattering study using the pressure-jump relaxation technique. *Langmuir* 24, 11851-18859.

Pühse, M., Szweda, R.T., Ma, Y., Jeworrek, C., Winter, R., Zorn, H., 2009. *Marasmius scorodoni* extracellular dimeric peroxidase - Exploring its temperature and pressure stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 1091-1098.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Roland Winter danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Forschungsgruppe, sein stetes Engagement für den Fortschritt der Dissertation und für die Gelegenheit, an interessanten Projekten forschen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. H. Rehage danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn PD Dr. C. Czeslik möchte ich für seine stete Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen im Labor und auch bei fachlichen Fragestellungen danken.

Frau Andrea Kreusel und Frau Kirsten Skodzik danke ich für viele amüsante Unterhaltungen beim Mittagskaffee sowie für die zahlreichen Hilfestellungen bei allen organisatorischen Fragen.

Meinem Vorgänger, Dr. Vytautas Smirnovas, danke ich für die geduldige, kompetente und stets freundliche Einführung in die FTIR-Spektroskopie, insbesondere die Handhabung der Diamantstempelzellen.

Meinen Bürokollegen Dr. Suman Jha und Dipl.-Chem. Daniel Sellin danke ich für die ruhige und stets konstruktive Arbeitsatmosphäre während der gesamten Zeit sowie für den steten Gedankenaustausch zu theoretischen und praktischen Fragestellungen.

Besonders danken möchte ich M.Sc. Christoph Jeworrek für die hervorragende Zusammenarbeit bei allen Projekten und den daraus resultierenden Publikationen.

Abschließend danke ich allen meinen Kollegen, welche in den vergangenen drei Jahren für ein immer freundliches und harmonisches Arbeitsklima gesorgt haben. Ohne dies hätte es nur halb soviel Spaß gemacht!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Hoher hydrostatischer Druck in der Biosphäre	1
1.2 Zellen und Biomoleküle unter hohen Drücken	2
1.2.1 Zellen	3
1.2.2 Membranlipide	4
1.2.3 Proteine	7
1.2.4 Nukleinsäuren	11
1.3 Untersuchte Systeme	11
1.3.1 p, T -Diagramme von Modellmembranen aus Phospholipiden und Sterinen am Beispiel der Systeme DPPC-Ergosterin (78:22) und DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1)	11
1.3.2 Das p, T -Verhalten der Peroxidase MsP1 aus dem Basidiomyceten <i>Marasmius scorodonius</i>	14
1.3.3 Untersuchung der druckinduzierten Entfaltung der repetitiven Ankyrinsequenz des Notch-Rezeptors aus <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.3.4 Polymere und Hydrogele aus Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid) und Poly(<i>N,N</i> -diethylacrylamid) als Modellsysteme für die Kälte- und Druckdenaturierung von Proteinen	16
2. Methoden	21
2.1 Fourier-Transformations Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie)	21
2.1.1 Grundlagen	21
2.1.2 FTIR-Spektrometer	23
2.1.3 IR-Spektren von Phospholipiden und Proteinen	25
2.1.4 Spektrendekonvolution und Spektralanalyse	27
2.2 Fluoreszenzspektroskopie	28
2.2.1 Grundlagen	28
2.2.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von Proteinen	30
2.3 Differentialkalorimetrie	30
2.4 Hochdruckuntersuchungen mit Hilfe der Diamantstempelzelle	31
3. Experimentelles	33
3.1 Untersuchung des p, T -Phasenverhaltens der Systeme DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%) und DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1)	33
3.1.1 Probenpräparation	33
3.1.2 FTIR-Spektroskopie	33
3.2 p, T -Messungen an der Peroxidase MsP1 aus <i>Marasmius scorodonius</i>	35
3.2.1 FTIR-Spektroskopie	35
3.2.2 Fluoreszenzspektroskopie	35
3.2.3 Differentialkalorimetrie	36
3.3 Hochdruckmessungen an der Ankyrindomäne des Notch-Rezeptors aus <i>D. melanogaster</i>	36
3.3.1 Hochdruck-FTIR-Spektroskopie	36
3.4 p, T -Messungen an linearem PNIPAM und diversen Hydrogelen	37
3.4.1 FTIR-Spektroskopie	37
4. Ergebnisse und Diskussion	39
4.1 Untersuchungen des p, T -Verhaltens von Modelllipidmembranen	39

4.1.1	Das System DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%)	39
4.1.2	Das System DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1)	44
4.2	Untersuchung des p,T -Verhaltens der Peroxidase MsP1 aus <i>Marasmius scorodonius</i>	48
4.2.1	Temperatur- und druckabhängige FTIR-Messungen	48
4.2.2	Differentialkalorimetrie	53
4.2.3	Temperatur- und druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie	54
4.2.4	Zusammenfassung	57
4.3	Untersuchung der druckinduzierten Entfaltung der Ankyrindomäne des Notch-Proteins aus <i>D. melanogaster</i>	59
4.3.1	Hochdruck-FTIR-Spektroskopie	59
4.4	Untersuchung des p,T -Verhaltens von Polymeren und Hydrogelen aus Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid) und Poly(<i>N,N</i> -diethylacrylamid)	64
4.4.1	Temperaturabhängige FTIR-Messungen	64
4.4.2	Druckabhängige FTIR-Messungen	70
4.4.3	Zusammenfassung	83
5.	Zusammenfassung	85
6.	Literatur	89
7.	Anhang	101
7.1	Hochdruck-FTIR-Messungen am System DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%)	101
7.2	Hochdruck-FTIR-Messungen am System DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1)	102
7.3	Hochdruck-FTIR-Messungen an Polymeren und Hydrogelen aus Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid) und Poly(<i>N,N</i> -diethylacrylamid)	103
7.3.1	Hochdruck-FTIR-Messungen an linearem PNIPAM	103
7.3.2	Hochdruck-FTIR-Messungen an PNIPAM Mikrogelen	106
7.3.3	Hochdruck-FTIR-Messungen am Mikrogelgemisch PNIPAM-PDEAAM (40-60)	109
7.3.4	Hochdruck-FTIR-Messungen an der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55)	112

1. Einleitung

1.1 Hoher hydrostatischer Druck in der Biosphäre

Der größte Teil des Lebensraumes auf der Erde befindet sich in hyperbarer Umgebung. Diese auf den ersten Blick überraschende Aussage wird klarer, wenn man sich verdeutlicht, daß ca. 70 % des Globus mit Ozeanen bedeckt sind, welche wiederum eine mittlere Tiefe von 3800 m aufweisen (die sogenannte Abyssalebene, Byatt et al., 2002). Unter Berücksichtigung eines Druckanstieges von 1 bar pro 10 m Wassersäule ergibt sich somit ein mittlerer Druck von 380 bar. Die tiefsten Stellen des Weltmeeres, die Tiefseegräben, können bis zu annähernd 11000 m hinabreichen, was einen Druck von 1100 bar impliziert. Die durchschnittliche Temperatur in der Abyssalebene liegt bei nur -1 bis 4 °C. Gleichzeitig gibt es auch Hochtemperaturregionen an den Grenzen kontinentaler Platten, an denen sich submarine Gebirgszüge wie der mittelatlantische Rücken entfalten. Hier steigt Magma aus dem Erdmantel an den Ozeangrund, aus welchem Tiefseevulkane und heiße, mineral- und schwefelhaltige Quellen ("Schwarze Raucher") aufragen, wobei das heiße Wasser der Letzteren eine Temperatur von bis zu 400 °C erreichen kann. Der hohe Druck und die starke Beladung mit Mineralien sorgen auch unter diesen Bedingungen für einen flüssigen Aggregatzustand. Trotz dieser auf den ersten Blick extrem lebensfeindlichen Bedingungen sind weder die Abyssalebene noch die submarinen Thermalquellen steril, vielmehr beherbergen sie eine reichhaltige (bakterielle) Flora und Fauna (Corliss et al., 1979; Byatt et al., 2002; Daniel et al., 2006; Fry et al., 2008). Während die kalten, submarinen Sedimente vermutlich durch kryo- und barophile (bisweilen wird auch der Ausdruck "piezophil" verwendet), aerobe oder anaerobe, heterotrophe Bakterien dominiert werden, sind die submarinen heißen Quellen durch thermo- und barophile, aerobe oder anaerobe (Archae-) bakterien besiedelt, aber auch höhere Organismen wie Röhrenwürmer sind präsent. Die dortigen Bakterien sind zudem meist chemolithotroph, d.h. sie gewinnen chemische Energie aus der Verstoffwechslung gelöster Mineralien und decken ihren Kohlenstoffbedarf durch Assimilierung gelöster Carbonate. Aus diesem Habitat stammt auch das Archaeobakterium mit der größten kombinierten Druck-/Temperaturtoleranz, *Pyrococcus* CH1, welches im Temperaturbereich von 80-108 °C und im Druckbereich zwischen 200 und 1200 bar wachstumsfähig ist (Zeng et al., 2009). Es ist somit obligat baro- und hyperthermophil, d.h. es findet kein Wachstum bei Atmosphärendruck und niedrigen bis mittleren Temperaturen statt.

Ein weiterer, wenn auch bislang deutlich weniger erforschter, hyperbarer Lebensraum ist die tiefe Geosphäre (Gold, 1992; Guerrero, 1998; Amend & Shock 2001; Daniel et al., 2006). In den letzten 15 Jahren fanden sich starke Hinweise auf die Existenz von lebenden, überwiegend chemolithotrophen Bakterien in Wasseradern, welche sich in bis zu mehreren Kilometer tiefem

Granitgestein befinden. Zusätzlich zu dem hohen lithostatischen Druck von bis zu 1000 bar kommen Temperaturen bis zu 110 °C. Die meisten gefundenen Bakterien gewinnen chemische Energie aus der Oxidation von Wasserstoff mit Sulfat oder Carbonat, woraus als Endprodukte Schwefelwasserstoff, Wasser oder Essigsäure entstehen. Der Wasserstoff scheint überwiegend aus der Verwitterung von eisenreichen Silikaten durch Grundwassereinwirkung zu entstehen. In diesem Fall würden die dortigen Bakterien eine strikt geochemische Existenz, unabhängig vom Sonnenlicht und der Photosynthese führen, da sowohl der Elektronendonator und der -akzeptor als auch der assimilierte Kohlenstoff aus anorganischen Quellen stammen. Dies hätte weitreichende Konsequenzen für die mögliche Verbreitung von Leben im Sonnensystem und im gesamten Universum (Vance et al., 2007).

Diese genannten hyperbaren Lebensräume bieten gleichzeitig Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen wie Ultraviolettstrahlung oder Asteroideneinschlägen. Insbesondere in der Frühgeschichte des Lebens auf der Erde vor ca. 4,0-3,2 Mrd. Jahren waren Einschläge großer Asteroiden als Spätereignisse der Planetenbildung sehr viel häufiger als in späteren Epochen der Erdgeschichte und besaßen durchaus das Potential, die junge Biosphäre zu vernichten. Möglicherweise wurden so Lebensformen in solchen geschützten Habitaten begünstigt. Auch die Entstehung des Lebens in diesen Regionen ist im Bereich des Möglichen, da neben der relativ ungestörten Umgebung der hohe Druck und die hohe Temperatur begünstigend auf präbiotische chemische Reaktionen gewirkt haben könnten (Nisbet & Sleep, 2001; Daniel et al., 2006).

Aus dem oben gesagten ergibt sich somit ein großes wissenschaftliches Interesse hinsichtlich der Erforschung von Zellen (Mikroorganismen) und Biomolekülen unter hohen hydrostatischen Drücken (HHD) bei verschiedenen Temperaturen.

1.2 Zellen und Biomoleküle unter hohen Drücken

Sämtliche biochemische und biophysikalische Prozesse unter hohen Drücken werden durch das Prinzip von Le Chatelier-Braun beeinflusst, welches besagt, daß jedes System im Gleichgewicht einem äußeren Zwang durch eine Anpassungsreaktion ausweicht. Im Fall der Einwirkung hoher Drücke reagieren physikalische Systeme entsprechend mit einer Volumenverkleinerung oder Reaktionen, die mit einem negativen/positiven Aktivierungsvolumen verbunden sind, mit einer Geschwindigkeitserhöhung/-erniedrigung. Die thermodynamische Formulierung für konstante Temperaturen sieht wie folgt aus:

$$(\mathrm{d}\ln K/\mathrm{d}p)_T = -\Delta V/RT \quad (1.1)$$

$$(\mathrm{d}\ln k/\mathrm{d}p)_T = -\Delta V^*/RT \quad (1.2)$$

Hierbei bezeichnet K die Gleichgewichtskonstante, k die Geschwindigkeitskonstante, p den Druck, ΔV das Reaktionsvolumen, ΔV^* das Aktivierungsvolumen einer chemischen Reaktion oder physikalischen Umwandlung, R die allgemeine Gaskonstante und T die thermodynamische Temperatur.

In biologischen Systemen begünstigt Druck daher volumenreduzierende Prozesse wie die Umwandlung von flüssigkristallinen Lipidphasen in Gelphasen oder, in den meisten Fällen, die Entfaltung von Proteinen (s.u.). Hochdruck wirkt somit primär auf die Konformation von Makromolekülen und die supramolekulare Struktur von Aggregaten (Winter et al., 2007). Kovalente Bindungen werden hingegen bis zu Drücken von 20-30 kbar nicht beeinflusst.

1.2.1 Zellen

Neben der Untersuchung von Mikroorganismen aus hyperbaren Habitaten ist auch das Druckverhalten mesophiler Bakterien und Pilze von Interesse, da sich gezeigt hat, daß HDD zur schonenden Sterilisierung von thermosensitiven Biopharmazeutika (Rigaldie et al., 2002a, 2003) und von Lebensmitteln (Matser et al., 2004) eingesetzt werden kann. Letztere weisen nach Hochdrucksterilisierung im Vergleich zur konventionellen Hitzebehandlung einen höheren Gehalt an Nährstoffen und eine generell vorteilhaftere Textur auf. Bakterielle Endosporen sind allgemein deutlich druckresistenter als vegetative Zellen (Rigaldie et al., 2002b), und wachsende Bakterienzellen sind weniger druckresistent als solche in der stationären Phase (Mañas & Mackey, 2004). HDD beeinflusst (inhibiert) sämtliche zellulären Funktionen wie Replikation, Transkription, Proteinbiosynthese und Metabolismus (Abe, 2007). Sowohl hohe als auch niedrige Temperaturen begünstigen eine Druckinaktivierung. Dies führt zu einem annähernd elliptischen p, T -Inaktivierungsdiagramm (Abb. 1.1, Ludwig et al., 1996; Smeller, 2002), das starke Ähnlichkeit mit einem p, T -Stabilitätsdiagramm von Proteinen aufweist (siehe Abb. 1.4). Es ist zu beachten, daß jede Druckinaktivierung oder -denaturierung als kinetischer Prozeß (siehe Gl. 1.2) auch eine Funktion der Druckhaltezeit neben Temperatur und Druckhöhe ist.

1. Einleitung

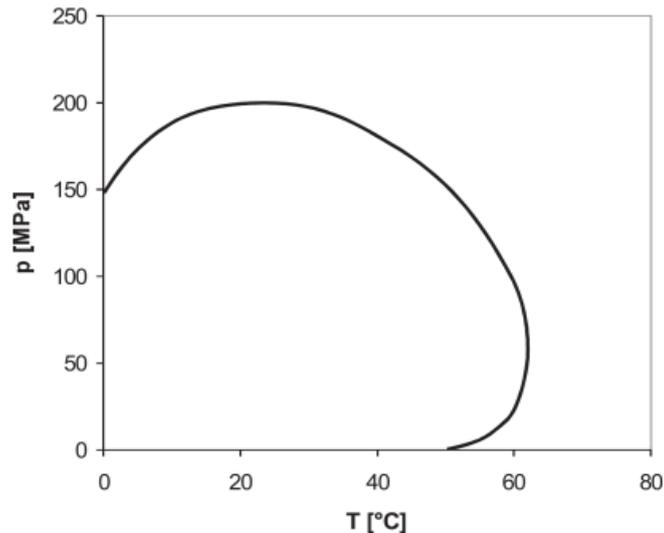


Abb. 1.1: p,T -Inaktivierungsdiagramm von *E. coli*. Gezeigt ist der notwendige Druck zur Verringerung der lebenden Bakterienzellen um zwei Zehnerpotenzen nach 5 Minuten bei der jeweiligen Temperatur. Abbildung nach Ludwig et al., 1996.

Ein weiteres interessantes Gebiet ist die Hochdruckbehandlung von Säugetiertumorzellen zwecks Etablierung eines Tumorzellvakuins. Bei Tests mit verschiedenen Zelllinien zeigte sich eine recht hohe Druckstabilität bis zu 1000 bar bei 1 Minute Haltezeit (Blümelhuber et al., 2002).

1.2.2 Membranlipide

Die Hauptkomponente der Plasmamembranen von Eukaryoten und Eubakterien sind Phospholipide, welche beim Dispergieren in Wasser zahlreiche (nicht-) lamellare lyotrope Mesophasen ausbilden (Abb. 1.2), die sich wiederum thermotrop und barotrop ineinander umwandeln können (Winter, 2002; Winter & Dzwolak, 2005; Winter et al., 2007; Winter & Jeworrek, 2009). Von allen zellulären Komponenten weist die Plasmamembran die größte Drucksensitivität auf. In membranbiophysikalischer Hinsicht sind somit besonders die lamellaren Phasen als Modellmembranen von Interesse. Einfache Phospholipide mit gesättigten Fettsäureresten wie Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) weisen, als Dispersion in Wasser, bei Temperaturerhöhung zwei lamellare Phasenübergänge auf. Zuerst erfolgt ein Gel \rightarrow Gel Übergang von einer L_{β} -Phase mit um 30° gegen die Membrannormale geneigten Lipiden und relativ geordneten Acylketten zu einer P_{β} -Phase, die zusätzlich zum Neigungswinkel noch Wellen mit einer Periodizität von 15-30 nm und einzelne stärker ungeordnete Acylketten aufweist. Bei noch höherer Temperatur erfolgt der Hauptphasenübergang von der Gelphase zur flüssigkristallinen L_{α} -Phase, in der die Acylketten durch zahlreiche *gauche*-Konformere weitgehend ungeordnet vorliegen. Bei Anwendung von HHD werden die Gelphasen gegenüber der flüssigkristallinen Phase bevorzugt, da sie ein geringeres Volumen aufweisen. Die P_{β} -Phase besitzt beispielsweise bei 1 bar ein um 3,5 % geringeres spezifisches Volumen als die L_{α} -Phase. Ein Teil des p,T -Phasendiagramms von DPPC ist in Abb. 1.3 dargestellt.

1. Einleitung

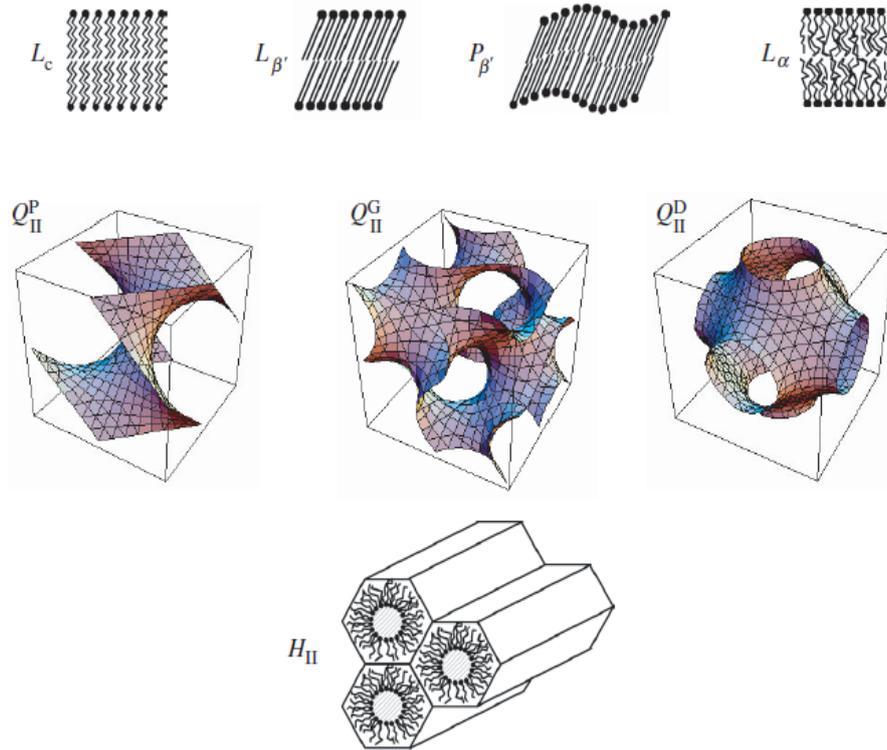


Abb. 1.2: Schematische Darstellung verschiedener lyotroper Lipidmesophasen. L_c = Lamellar kristallin; $L_{\beta'}$ u. $P_{\beta'}$ = Lamellar gelartig; L_{α} = Lamellar flüssigkristallin; Q_{II}^P , Q_{II}^G , Q_{II}^D = Invers bikontinuierliche kubische Phasen; H_{II} = Invers hexagonale Phase. Abbildung nach Winter & Dzwolak, 2005.

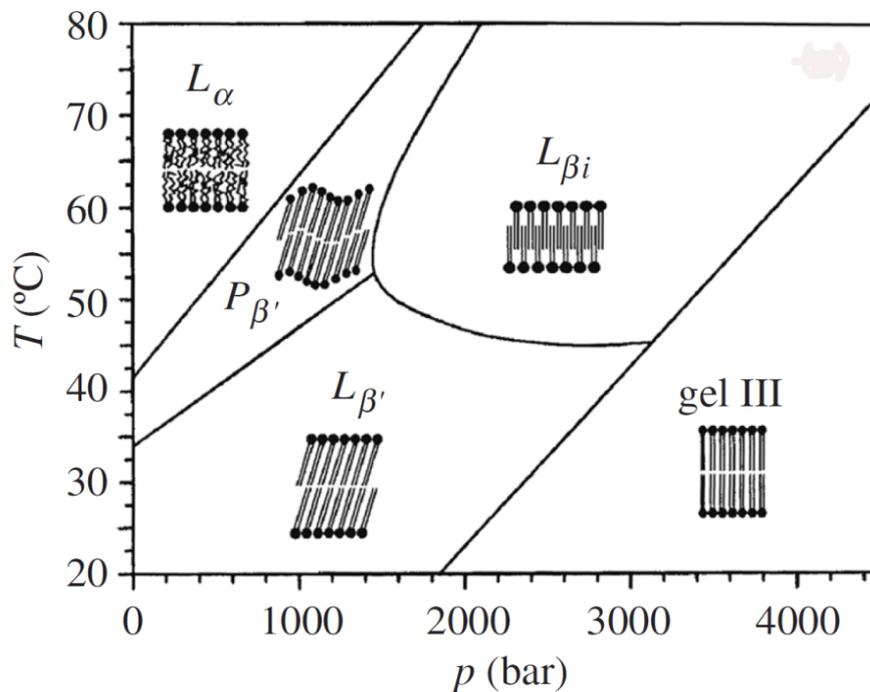


Abb. 1.3: p, T -Phasendiagramm von in Wasser dispergiertem DPPC. Neben den bereits erwähnten $L_{\beta'}$ -, $P_{\beta'}$ -, und L_{α} -Phasen erscheinen bei höheren Drücken auch Gelphasen mit nicht geeigneten Lipiden (Gel III) und interdigitierenden Acylketten (L_{β_i}). Die lamellar-kristalline L_c -Phase kann bei niedrigen Temperaturen nach längerer Inkubationszeit induziert werden. Abbildung nach Winter & Dzwolak, 2005.

Die Phasengrenzlinie für den Übergang $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ weist für Phosphatidylcholine mit saturierten Acylketten eine Steigung von ~ 22 °C/kbar auf (Czeslik et al., 1998). Der Verlauf der Linie kann mittels der Clausius-Clapeyron-Gleichung erklärt werden:

$$dT/dp = T\Delta V/\Delta H \quad (1.3)$$

Für eine positive Steigung müssen sowohl die Volumenänderung ΔV und die Enthalpieänderung ΔH positiv sein, was durch Messungen bestätigt wird (Okoro & Winter, 2008). Beide Parameter sind zudem druckabhängig, wobei beide Größen mit zunehmendem Druck betragsmäßig kleiner werden ($d\Delta H/dp = -3,4$ kJ·mol⁻¹·kbar⁻¹; $d\Delta V/dp = -4,93$ ml·mol⁻¹·kbar⁻¹; Potekhin et al., 2008).

Einige Phospholipide können zudem nichtlamellare lyotrope Phasen annehmen. Ein Beispiel hierfür ist Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) in Überschußwasser. Bei ~ 10 °C wandelt sich die L_{α} -Phase in die invers hexagonale H_{II} -Phase um. Die Ursache hierfür liegt in der durch die zunehmende thermische Energie verursachten Spreitung der Doppelschicht, die zusätzlich durch die beiden *cis*-Doppelbindungen der Ölsäurereste begünstigt wird, was zu ungünstigen Kontakten zwischen den hydrophoben Acylketten und Wasser führt. Das System versucht, durch Krümmung der Phasengrenze zum Wasser hin auszuweichen, was wiederum zu Defektvolumina und schlechter Packung innerhalb der Doppelschicht führt. Letztlich ist die H_{II} -Phase thermodynamisch günstiger als die L_{α} -Phase. Ein weiterer wichtiger Faktor ist hierbei die Natur der Kopfgruppe. Um einen Übergang $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$ zu induzieren, sollten kleine, schwach hydratisierte Kopfgruppen wie Ethanolamin vorhanden sein, die zudem noch attraktive Wechselwirkungen untereinander aufweisen. Bei dem zu DOPE sehr ähnlichen Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) konnte dagegen bislang kein $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$ - Übergang festgestellt werden. Die H_{II} -Phase weist von allen bekannten lyotropen Mesophasen die stärkste Drucksensitivität auf ($dT/dp \approx 40$ °C/kbar), was auf die im Vergleich zu lamellaren Phasen ineffizientere Packung der Acylketten und daraus resultierendem Defektvolumen zurückzuführen ist. Einige Lipide oder Lipidmischungen bilden auch invers bikontinuierliche kubische Phasen, wie in Abb. 1.2 dargestellt. Beispiele für solche Systeme sind Mischungen von Phospholipiden mit Fettsäuren oder reine Fettsäuren in Überschußwasser oder auch bei limitierter Hydratisierung. Kubische Phasen und ebenfalls die H_{II} -Phase spielen vermutlich eine biologische Rolle während Membranfusionsprozessen oder der Fettverdauung (Luzzati, 1997).

Die wichtige Rolle von Sterinen in Biomembranen bei der Ausbildung von Lipidflößen ("Rafts") wird in Kap. 1.3.1 diskutiert.

1.2.3 Proteine

Schon vor 95 Jahren stellte Bridgman fest, daß HHD in der Lage ist, Albumin aus Hühnereiern zu denaturieren (Bridgman, 1914). Durch zahlreiche weitere Untersuchungen ist mittlerweile belegt, daß die meisten Proteine bei Anwendung von hohen Drücken in einem bestimmten p, T -Bereich (reversibel) entfalten. Die für einen druckinduzierten Prozeß gemäß Gl. 1.1 notwendige Volumenreduktion wird durch Füllung von Defektvolumina im Proteininneren durch Wasser, Elektrostriktion von Wasser an geladenen Seitenketten und hydrophile Hydratisierung polarer Gruppen erreicht, was die Volumenzunahme durch Expansion der Proteinkette bei der Entfaltung sowie durch hydrophobe Hydratisierung unpolarer Seitenketten überkompensiert (Harpaz et al., 1994; Boonyaratanakornkit et al., 2002; Winter & Dzwolak, 2005; Winter et al., 2007; Mishra & Winter, 2008). Es zeigt sich, daß das p, T -Stabilitätsdiagramm für Proteine elliptische Form besitzt (Abb. 1.4, Hawley, 1971; Gross & Jaenicke, 1994; Boonyaratanakornkit et al., 2002; Smeller, 2002; Winter & Dzwolak, 2005; Winter et al., 2007; Mishra & Winter, 2008).

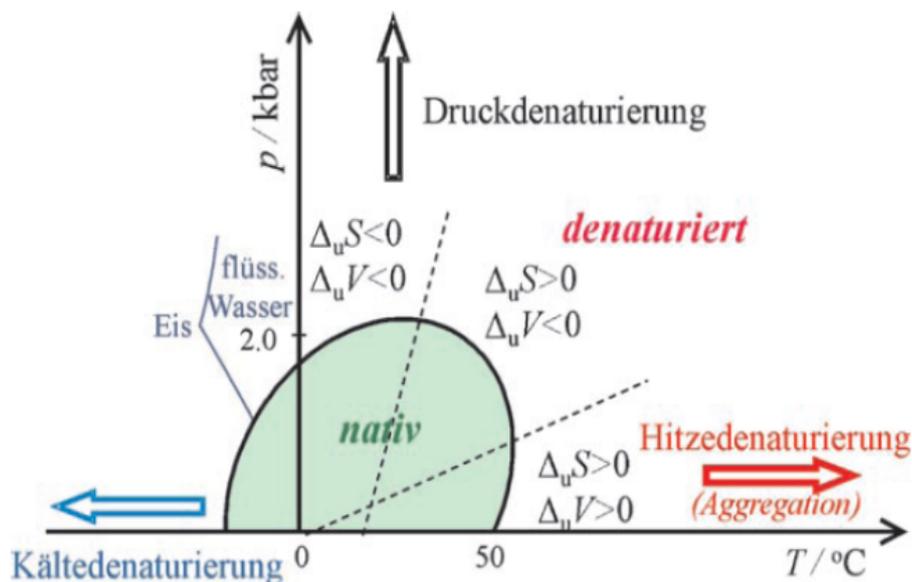


Abb. 1.4: Elliptisches p, T -Stabilitätsdiagramm eines typischen monomeren Proteins in Wasser. Man beachte die gestrichelten Linien, welche jeweils die Übergänge von $\Delta_u V$ und $\Delta_u S$ vom positiven zum negativen Bereich anzeigen (siehe Text). Zudem ist die Phasengrenze flüssiges Wasser/Eis bei Minustemperaturen und HHD eingezeichnet. Abbildung nach Mishra & Winter, 2008.

Bei Atmosphärendruck zeigen Proteine neben der bekannten Hitzenaturierung auch eine Entfaltung bei niedrigen Temperaturen, gewöhnlich unter 0 $^\circ\text{C}$, welche als Kältedenaturierung bezeichnet wird (Privalov, 1990). Im Gegensatz zu Ersterer ist die treibende Kraft hier nicht der Gewinn an Entropie $\Delta_u S$ bei der Denaturierung, welche eine positive Entfaltungsenthalpie $\Delta_u H$ überkompensiert, sondern, in inverser Beziehung, eine negative $\Delta_u H$, die eine ebenfalls negative $\Delta_u S$ überkompensiert. Ein negativer Wert für $\Delta_u H$ kommt durch die zahlreichen Wasserstoffbrü-

cken des Proteinrückgrats zum Solvens bei niedrigen Temperaturen zu Stande (Abb. 1.5, Cooper, 2000).

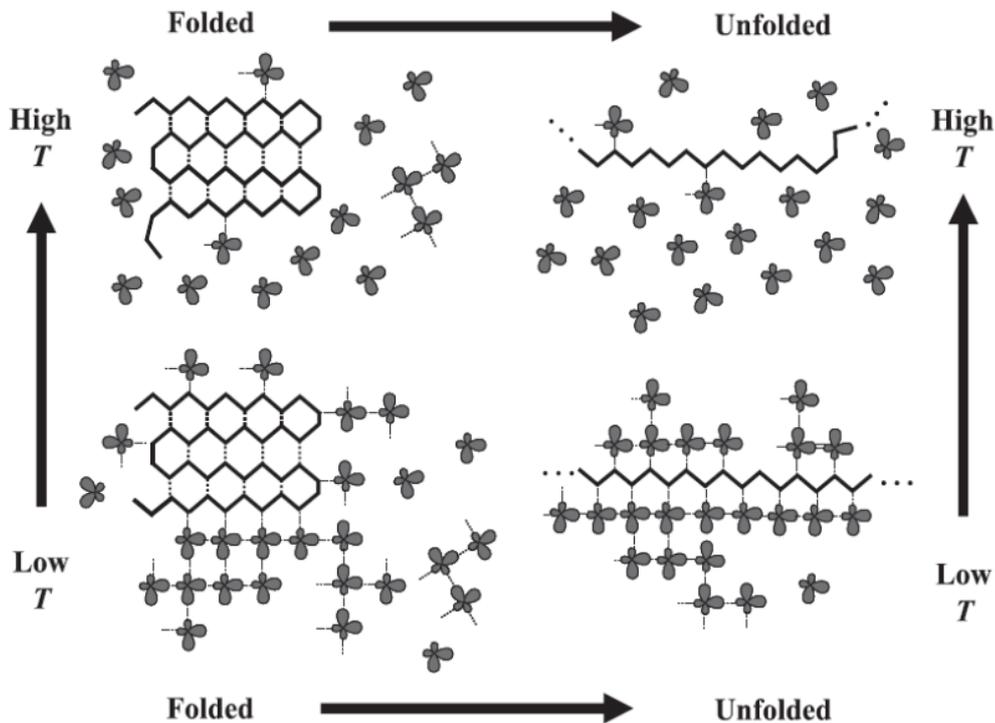


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Verhältnisses der Wasserstoffbrücken (H-Brücken, gepunktete Linien) des Solvens (Wasser) zum Protein (durchgezogene Linien) im Vergleich zu den internen H-Brücken des Polypeptids im gefalteten und entfalteten Zustand bei hohen und niedrigen Temperaturen. Bei hoher Temperatur kann das Solvens aufgrund der thermischen Energie nur wenige H-Brücken zum Peptidrückgrat und hydrophilen Resten ausbilden, was zu einer endothermen Entfaltung führt, da die notwendige Energie zum Aufbrechen der internen H-Brücken so nicht kompensiert werden kann. Hingegen werden bei niedrigen Temperaturen zahlreiche H-Brücken zwischen Solvens und Polypeptid ausgebildet, was eine exotherme Entfaltung bedingt. Abbildung nach Cooper, 2000.

Mit den Kälte- und Hitzedenaturierungstemperaturen sind die ersten Punkte des Stabilitätsdiagramms bei Atmosphärendruck festgelegt. Unter Annahme eines vereinfachten Zweizustandsgleichgewichtes Nativ \leftrightarrow Denaturiert entspricht die Phasengrenze für den Entfaltungsprozeß der allgemeinen thermodynamischen Bedingung $\Delta_u G = 0$. Innerhalb des in Abb. 1.4 gezeigten elliptischen Stabilitätsbereiches ist $\Delta_u G > 0$, d.h. das Protein liegt in nativer, gefalteter Konformation vor, während außerhalb $\Delta_u G < 0$ ist, d.h. das Protein entfaltet spontan zum denaturierten Zustand. $\Delta_u G$ ist wie üblich definiert als:

$$\Delta_u G = \Delta_u H - T\Delta_u S \quad (1.4)$$

Zusätzlich gilt für die druckinduzierte Entfaltung in Anlehnung an Gl. 1.1 $(d\Delta_u G/dp)_T = \Delta_u V$. Alle diese thermodynamischen Größen sind stark temperaturabhängig, wie bereits für $\Delta_u H$ ausgeführt. Bei Temperaturerhöhung wird die negative Volumenänderung vom Betrag immer kleiner. So sinkt zum Beispiel $\Delta_u V$ für die (druckinduzierte) Entfaltung von

1. Einleitung

Staphylokokkennuklease (SNase) von $-80 \text{ ml}\cdot\text{mol}^{-1}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $-19 \text{ ml}\cdot\text{mol}^{-1}$ bei der Hitzedenaturierungstemperatur (1 bar) von $51,5 \text{ }^\circ\text{C}$, jeweils bei pH 5,5 (Panick et al., 1998; Ravindra et al., 2004). Die Ursache hierfür liegt in der schwächeren Solvataion geladener und hydrophiler Reste bei erhöhter Temperatur, welche, wie bereits erwähnt, zu einer Volumenverringerng bei der Entfaltung beiträgt, während die hydrophobe Solvataion unpolarer Aminosäureseitengruppen weniger temperaturabhängig ist. Ein weiterer positiver Volumenbeitrag mit steigender Temperatur liegt im sogenannten "thermischen Volumen", welches eine Art ausgeschlossenes Volumen entlang der Proteinoberfläche darstellt und durch elastisch-repulsive Wechselwirkungen zwischen Proteinrückgrat und Solvens zu Stande kommt (Chalikian, 1996; Ravindra et al., 2004). Diese positiven Volumenbeiträge bei der Entfaltung übersteigen ab einer gewissen Temperatur die Volumenreduktion durch hydrophile Solvataion und Eliminierung interner Defektvolumina, so daß $\Delta_u V \geq 0$ wird (siehe Abb. 1.4). Es ist daher möglich, wie auch in Abb. 1.4 angedeutet, daß moderater HHD bestimmte Proteine sogar stabilisieren kann. Dies wurde tatsächlich für einige Enzyme aus hyperthermophilen Archaeobakterien bestätigt, die teilweise auch in Tiefseehabitaten vorkommen (Hei & Clark, 1994; Boonyaratanakornkit et al., 2002). Die Autoren machen eine recht hohe Hydrophobizität der Enzyme für die Druckstabilisierung verantwortlich, da, wie bereits erwähnt, die Exposition hydrophober Gruppen zu einer Volumenvergrößerung des denaturierten Zustands führt. Aber auch Enzyme aus mesophilen Organismen können eine Stabilisierung durch HHD erfahren, wie z.B. die sehr druckstabile rekombinante Pektin-Methylesterase aus dem Schimmelpilz *Aspergillus aculeatus* (Dirix et al., 2005). Hier wird die vermutliche, β -Helix-reiche Struktur des Enzyms als Erklärung für die Druckstabilisierung herangezogen, da diese aufgrund effizienter Packung nur wenig Defektvolumen aufweist, ähnlich zu Amyloidfibrillen (s.u.). Ein weiteres Beispiel für Strukturstabilisierung eines Polypeptids durch HHD ist α -Chymotrypsinogen (Hawley, 1971; Boonyaratanakornkit et al., 2002). Direkt verknüpft mit der Temperaturabhängigkeit von $\Delta_u V$ ist auch jene der Entfaltungsentropie $\Delta_u S$. Dies wird sofort deutlich, wenn bedacht wird, daß die Hydratationsentropie bei Exposition unpolarer Gruppen mit sinkender Temperatur ebenfalls negativer wird und den positiven Beitrag der Konfigurationsentropie durch die entfaltete Polypeptidkette ab einem bestimmten Punkt überkompensiert, so daß $\Delta_u S \leq 0$ wird (siehe Abb. 1.4). Zudem muß erwähnt werden, daß sowohl die Druck- als auch die Kältedenaturierung eine mildere Form der Entfaltung darstellen als diejenige, die durch Hitze induziert wird (Winter & Dzwolak, 2005; Winter et al., 2007; Mishra & Winter, 2008). Der entfaltete Zustand weist in beiden Fällen signifikant mehr Sekundärstrukturanteile auf, so daß der Gewinn an Konfigurationsentropie entsprechend geringer ausfällt.

Multimere Proteine weisen oft zwei unabhängige p,T -Stabilitätskurven auf, wobei die Erste die Dissoziation des Oligo-/Multimers in Monomere und die Zweite die Druckentfaltung der

Monomere beschreibt. Aufgrund recht großer Kavitäten an den Kontaktgrenzen der Monomere sind die damit verbundenen $\Delta_{\text{u}}V$ - Werte beträchtlich (z.B. $-200 \text{ ml} \cdot \text{mol}^{-1}$ für die Dissoziation der 70S-Ribosomeneinheit von *E. coli*, Van Eldik et al., 1989). Dies führt zu einer häufig reversiblen Dissoziation in moderaten Druckbereichen sogar unterhalb von 1000 bar, welches die druckinduzierte Inhibition der Transkription und Translation erklärt (siehe Kap. 1.2.1, Gross & Jaenicke, 1994; Boonyaratanakornkit et al., 2002; Winter & Dzwolak, 2005; Winter et al., 2007). Bei weiterer Druckerhöhung dringt Wasser in die Monomere ein und bewirkt letztlich durch Ausfüllung der darin enthaltenen Defektvolumina die weitgehende Auflösung der Tertiär- und Sekundärstruktur. Der gesamte Prozeß ist in Abb. 1.6 dargestellt. Die Penetration von Wasser in das Proteininnere wird durch Verringerung hydrophober Wechselwirkungen unter HHD begünstigt (Hummer et al., 1998). Auch Viren als große, multimere Ribonukleoproteinpartikel können bei Anwendung von HHD dissoziieren, was diese Technik zur schonenden Dekontamination viraler Verunreinigungen geeignet erscheinen läßt (Silva & Weber, 1988; Buckow et al., 2008; Shimasaki et al., 2009).

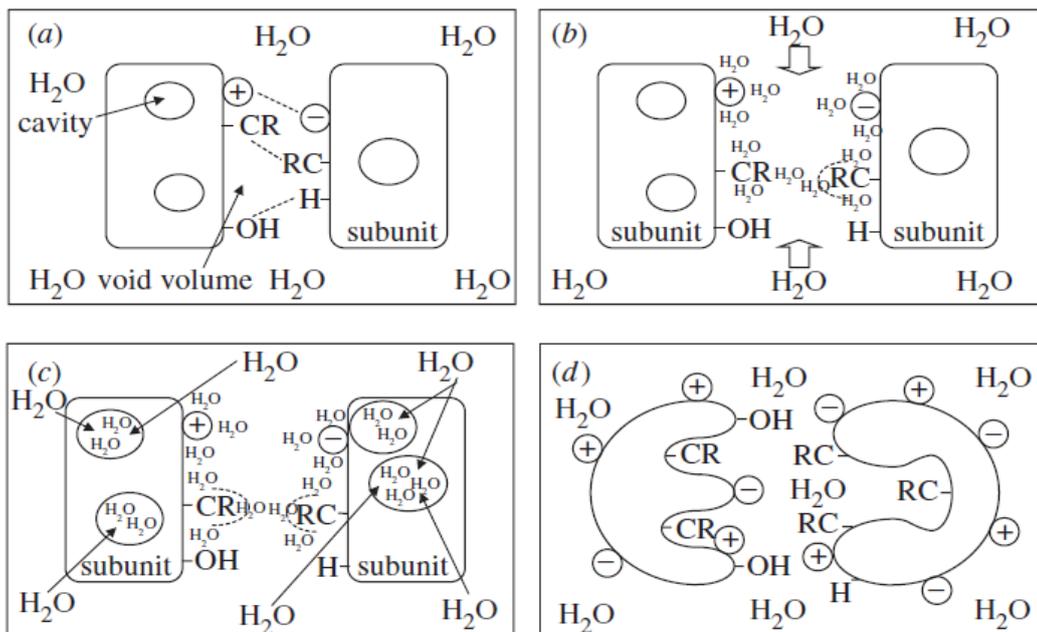


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der druckinduzierten Dissoziation/Entfaltung oligomerer Proteine. (a) zeigt das Dimer bei Atmosphärendruck mit Defektvolumina (cavity/void), elektrostatischen (+/-) und hydrophoben Interaktionen (-CR). (b) Bei mehreren hundert bis ca. 2 kbar kommt es zur Trennung der Untereinheiten mit Solvation der geladenen und hydrophoben Reste sowie Freisetzung des Defektvolumens an der Dimerkontaktgrenze. (c) Bei mehreren kbar dringt Wasser in das Protein ein und füllt die internen Kavitäten, was (d) zur weitgehenden Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur (Druckentfaltung) führt. Abbildung nach Boonyaratanakornkit et al., 2002.

Ein ähnlicher Effekt wie die Dissoziation oligomerer Proteine kann unter moderaten Drücken auch bei amorphen Proteinaggregaten wie Inklusionskörperchen (IC) rekombinanter Proteine in Bakterien beobachtet werden. Die Aggregate bzw. IC dissoziieren, und die daraus gebildeten Monomere können unter Druck in ihre native Struktur zurückfalten (St. John et al., 1999). Im

Gegensatz dazu sind amyloidoforme Aggregate nur sehr wenig drucksensitiv, was auf die effiziente interne Packung und damit verbundenem geringen Defektvolumen in den reifen Fibrillen zurückzuführen ist (Winter et al., 2007; Mishra & Winter, 2008).

Eine weitere Anwendung von HHD bei Proteinen ist das Studium von Proteinfaltungsprozessen. HHD verlangsamt die Faltung von Proteinen in ihre native Struktur, da dies mit einem positiven Aktivierungsvolumen $\Delta_f V^*$ verbunden ist ($\sim 57 \text{ ml}\cdot\text{mol}^{-1}$ für SNase, dagegen ist $\Delta_u V^*$ für die Entfaltung $\sim -23 \text{ ml}\cdot\text{mol}^{-1}$, Panick et al., 1999). Somit erlaubt die Anwendung der Drucksprungtechnik bei Kenntnis des p,T -Stabilitätsdiagramms und reversibler Ent- bzw. Rückfaltung das Studium dieses bei Atmosphärendruck häufig für viele spektroskopische Techniken zu schnell ablaufenden Vorgangs (Panick et al., 1998; Panick et al., 1999; Panick & Winter, 2000).

1.2.4 Nukleinsäuren

Im Vergleich zu Membranlipiden und Proteinen sind Nukleinsäuren wie Desoxyribonukleinsäure (DNS) oder Ribonukleinsäure (RNS) nur sehr wenig drucksensitiv. Da die sie stabilisierenden H-Brücken und Stapelwechselwirkungen zwischen den Basen durch HHD verstärkt werden, steigt die Schmelztemperatur T_m für den Übergang Doppelhelix (DH) \rightarrow Einzelstrang (ES) von DNS unter hohen Drücken zumeist an. Die DH \rightarrow ES Transition ist zudem von einem leicht positiven ΔV von $1\text{-}3 \text{ ml}\cdot\text{mol}^{-1}$ begleitet. (Macgregor, 2002). Einige DNS-RNS-Hybride mit T_m -Werten unterhalb von $50 \text{ }^\circ\text{C}$ scheinen dagegen durch HHD destabilisiert zu werden, wobei der Wert von T_m neben der Nukleotidsequenz auch von der Kationenkonzentration des Solvens abhängig ist (Dubins et al., 2001; Macgregor, 2002).

1.3 Untersuchte Systeme

1.3.1 p,T -Diagramme von Modellmembranen aus Phospholipiden und Sterinen am Beispiel der Systeme DPPC-Ergosterin (78:22) und DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Lipidmischungen aus Phospholipiden und Sterinen (auch der Ausdruck "Sterole" wird verwendet; die Wichtigsten sind in Abb. 1.7 dargestellt) in Hinblick auf ihr p,T -Verhalten untersucht. Diese Gemische bilden neben den in Kap. 1.2.1 diskutierten lamellaren Mesophasen noch eine weitere lamellare Phase in Abhängigkeit von der Sterinkonzentration aus, nämlich die sogenannte flüssig geordnete Phase (L_o - od. l_o -) Phase, welche durch stark geordnete (gestreckte) Acylkettenkonformation bei gleichzeitig beträchtlichen Diffusions- und Translationsraten gekennzeichnet ist (Edidin, 2003; Mouritsen &

1. Einleitung

Zuckermann, 2004). Die l_o -Phase ist in ternären Gemischen, z.B. aus gesättigten und ungesättigten Phospholipiden mit Cholesterin, oberhalb der Kettenschmelztemperatur moderat angereichert mit dem Sterin und sehr stark angereichert mit dem gesättigten Phospholipid, während sich das ungesättigte Phospholipid fast ausschließlich in der zur L_α -Phase analogen flüssig ungeordneten (l_d -) Phase befindet (Abb. 1.8, Veatch et al., 2004; Risselada & Marrink, 2008). Die l_o -Phase ist aus physiologischer Sicht besonders interessant, da sie als Modell für bestimmte, distinkte Regionen in den Zellmembranen von Eukaryoten dienen kann, die "Flöße" oder "Rafts" genannt werden und ebenfalls mit Sterinen, Sphingolipiden und Phospholipiden mit gesättigten Acylketten angereichert sind (Simons & Ikonen, 1997; Edidin, 2003; Mouritsen & Zuckermann, 2004). In solche Domänen inserieren bestimmte Proteine mit Lipidankern aus gesättigten Fettsäuren, was mit einer möglichen Bedeutung für Signaltransduktions-, Proteinverteilungs- und Transportprozesse assoziiert wird. Eine weitere Eigenschaft der l_o -Phase liegt darin, daß sie einen fast ebenso großen Durchmesser wie die Gelphasen besitzt und so zur Membranstabilität und (Im-) Permeabilität beiträgt (Urbina et al., 1995; Xu et al., 2001; Mouritsen & Zuckermann, 2004; Winter et al., 2007; Winter & Jeworrek, 2009). Jedoch werden auch die Gelphasen durch Sterininkorporation beeinflusst. So reduzieren Sterine den Neigungswinkel der L_β -Phase, woraus eine L_β -ähnliche Gelphase (Gel III in Abb. 1.2) mit geraden Acylketten resultiert (fest-geordnete Phase, s_o -Phase, McIntosh, 1978). Aus diesem Grund unterdrücken höhere Sterinkonzentrationen ebenfalls den $L_\beta \rightarrow P_\beta$ -Übergang (Mannock et al., 2006; Okoro & Winter, 2008).

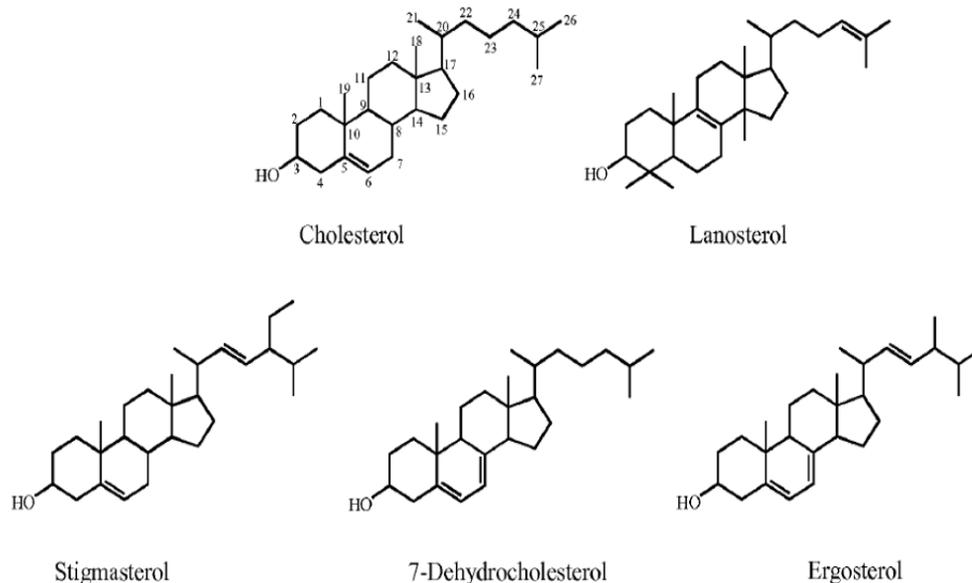


Abb. 1.7: Chemischer Aufbau verschiedener Sterine (Sterole). Cholesterin ist in den Plasmamembranen höherer Eukaryoten (Tiere) vorhanden, während Ergosterin dieselbe Funktion in Fungi übernimmt. Stigmasterol ist ein Phytosterin, ist also in den Plasmamembranen vieler Pflanzenzellen vorhanden. Lanosterin und 7-Dehydrocholesterin sind biosynthetische Vorstufen des Cholesterins. Abbildung nach Okoro & Winter, 2008.

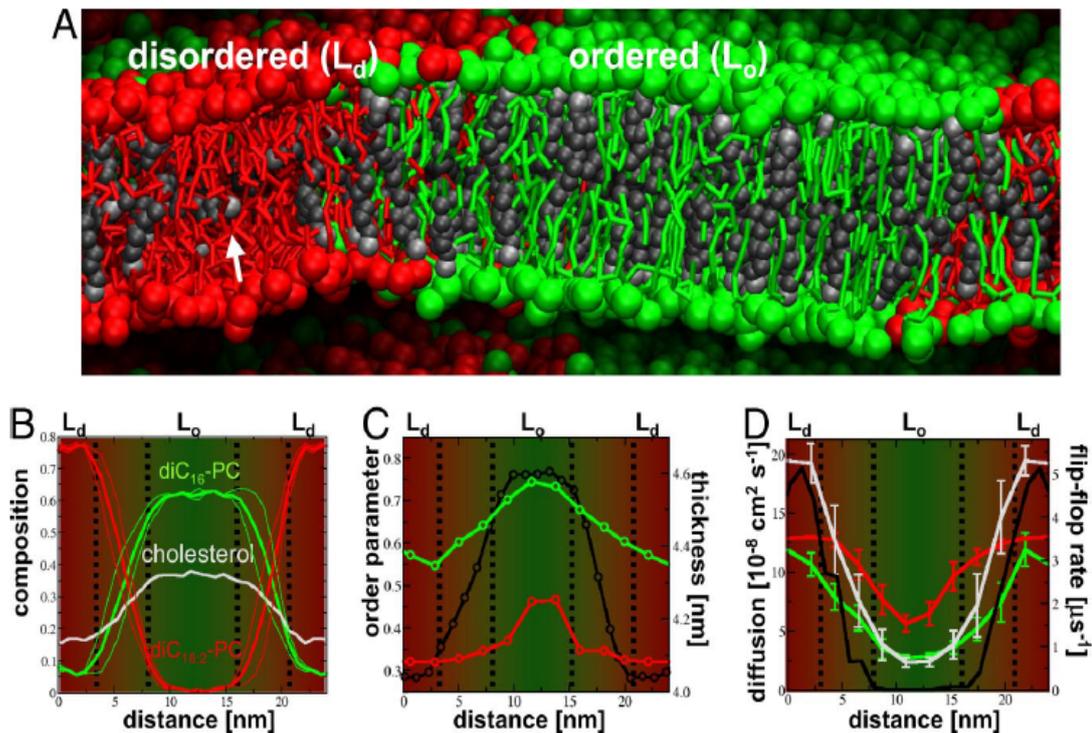


Abb. 1.8: Struktur und Dynamik von l_o - und l_d -Phasen als Ergebnis einer Molekulardynamiksimulation des ternären Gemisches Dipalmitoylphosphatidylcholin ($diC_{16:0}$ -PC)/Dilinoleylphosphatidylcholin ($diC_{18:2}$ -PC)/Cholesterin in der Zusammensetzung 0,42:0,28:0,3. (A) Seitenansicht der phasenseparierten Domänen. Der weiße Pfeil deutet auf ein ungewöhnlich orientiertes Cholesterinmolekül hin, welches sich waagrecht zwischen den Monoschichten befindet. (B) Zusammensetzung der zwei Phasen, ausgedrückt als Molenbruch der jeweiligen Komponenten. Dünne Linien repräsentieren die zwei Monoschichten getrennt, die dicken Linien das Mittel beider Monoschichten. (C) Relative Kettenordnungsparameter für beide Phospholipide (linke y-Achse; Farben siehe A) und Dicke der Doppelschicht für beide Phasen (schwarze Kurve, rechte y-Achse). (D) Laterale Diffusionsrate der Phospholipide und Cholesterin (linke y-Achse; Farben siehe A) und Flip-Flop-Rate (transversale Diffusion) des Cholesterins (schwarze Kurve, rechte y-Achse). Abbildung nach Risselada & Marrink, 2008.

Ergosterin ist ein ubiquitärer Bestandteil der Plasmamembran von Pilzen (Longley et al., 1968; Tuller et al., 1999) und essentiell für die korrekte Funktion von Membranenzymen (Bracher, 2003; Mysiakina & Funtikova, 2007) sowie für die physikalischen Eigenschaften dieser Membranen (s.o.). Aufgrund dieser membranstabilisierenden Wirkung ist es wenig überraschend, daß die Expression mindestens eines Gens für die Ergosterinbiosynthese (*ERG25*) in *Saccharomyces cerevisiae* unter der Streßwirkung hydrostatischen Drucks hochreguliert wird (Fernandes et al., 2004). Ergosterin ist ebenfalls für die Initiierung des Zellwachstums notwendig, wobei die hierfür erforderlichen Konzentrationen deutlich geringer sind (Rodriguez et al., 1985; Mysiakina & Funtikova, 2007). Wie Cholesterin kann auch Ergosterin die oben erwähnte l_o -Phase induzieren (Hsueh et al., 2005). Aus physiologischer Sicht ist insbesondere der l_d+l_o -Koexistenzbereich von Interesse, da dieser der Phasenzusammensetzung natürlicher Plasmamembranen (Lipidflöße/Rafts in flüssigkristalliner Umgebung) am ehesten entspricht. Die untersuchte Modellmembranzusammensetzung DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%) wurde ausgewählt, da sie eine physiologisch sinnvolle Sterinkonzentration, die auch *in natura* bei Hefen gefunden

werden kann, mit der größten Temperaturspanne des l_d+l_o -Koexistenzbereichs verknüpft, was experimentell durch NMR-Spektroskopie bestätigt wurde (Hsueh et al., 2005).

Ähnlich dieser Modellmischung für Pilzmembranen weist auch die andere untersuchte Modellmembran in der Komposition DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1) eine für die Plasmamembran von Säugetierzellen physiologische Zusammensetzung aus einem Phospholipid mit je zwei einfach ungesättigten Acylketten (DOPC, diC_{18:1}), einem Phospholipid mit zwei gesättigten Acylketten (DPPC, diC_{16:0}) und Cholesterin auf. Die Präsenz des DOPC in dieser Konzentration simuliert das Vorhandensein von Phospholipiden mit ein- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Zellmembranen von höheren Eukaryoten, die z.T. auch als Biosynthesevorstufen für Lipidhormone dienen (Berg et al., 2003).

Wie bereits in Kap. 1.2.1 und 1.2.2 erwähnt, ist hoher hydrostatischer Druck ubiquitär in der Biosphäre vertreten und kann auch zur Sterilisation sensitiver Produkte eingesetzt werden, wobei Lipidmembranen die drucksensitivsten zellulären Komponenten darstellen. Neben den bereits dargestellten Auswirkungen auf Proteine führen HHD-induzierte Änderungen der Membranstruktur, -dynamik und -permeabilität zum Verlust der zellulären Homöostase und so zum Zelltod (Molina-Gutierrez et al., 2002; Vogel et al., 2002). Diese Effekte werden auf den durch Druck ausgelösten Übergang der Membran zu festen, gelartigen Phasen zurückgeführt, was mit einem Funktionsverlust von Membranproteinen assoziiert ist (Beney & Gervais, 2001; Ulmer et al., 2002). Aus diesen Gründen ist das Verständnis des Verhaltens von natürlichen Membranen oder geeigneten Modellmembranen unter verschiedenen p,T -Bedingungen von großem biophysikalischen Interesse. Bislang wurden hauptsächlich Untersuchungen des p,T -Phasenverhaltens von reinen Phospholipiden, Mischungen von Phospholipiden mit Fettsäuren oder reinen Fettsäuren in Überschußwasser durchgeführt (Czeslik et al., 1998; Reis & Winter, 1998; Winter, 2002), wohingegen nur wenige Untersuchungen sich mit sterinhaltigen Modellmembranen befassen (Reis et al., 1996; Nicolini et al., 2006a,b). Die in dieser Arbeit verwendeten Modellmischungen sind einerseits nah genug am physiologischen Zustand, um die Reaktion von Zellmembranen auf wechselnde p,T -Bedingungen adäquat zu modellieren, andererseits sind sie einfach genug, um durch thermodynamische Grundprinzipien hinreichend erklärt werden zu können. Hierdurch lassen sich wertvolle Erkenntnisse für die Membranbiophysik unter hyperbaren Bedingungen gewinnen.

1.3.2 Das p,T -Verhalten der Peroxidase MsP1 aus dem Basidiomyceten *Marasmius scorodonius*

Im Falle der Kultivierung auf lignozellulosehaltigen Substraten sekretiert der Basidiomycet *Marasmius scorodonius* die ungewöhnliche Peroxidase MsP1 (UniProt-Nr. BOBK71). *M. scorodo-*

nius (Stammnummer CBS 137.83) ist ein kleiner, eßbarer Pilz mit starkem Knoblaucharoma, der auf Gras, Baumrinde, Zweigen und Nadelmüll wächst (Ainsworth et al., 1973). MsP1 wurde aus Zellkulturüberständen isoliert und das kodierende Gen durch cDNS-Analyse identifiziert; gleichzeitig wurde für das Enzym durch Daten von Größenexklusionschromatographie und SDS-Gelelektrophorese eine homodimere Struktur bestimmt (Scheibner et al., 2008). Durch Sequenzvergleiche konnte das Enzym der DyP-Familie von Peroxidasen zugeordnet werden (Faraco et al., 2007). Bei Zumischung von Lignin zu Standardkulturmedien wird die Expression von MsP1 signifikant erhöht (Hülsdau, 2007), welches daraufhin einen erheblichen Anteil des Gesamtsekretoms bildet, was eine Beteiligung des Enzyms an der Degradation von Lignozellulose impliziert (Bouws et al., 2008). Daher besitzt es das Potential, zu einem wertvollen Werkzeug für die Herstellung von Bioethanol oder ligninbasierenden Polymeren im Bereich der Bioverfahrenstechnik zu werden. Zusätzlich ist MsP1 in der Lage, Carotenoide und Xanthophylle zu degradieren (Scheibner et al., 2008), was weitere industrielle Einsatzmöglichkeiten im Bereich der Lebensmitteltechnologie und Aromastoffherstellung erschließt (Zorn et al., 2003).

Eine möglichst hohe Stabilität hinsichtlich wechselnder physikalischer Bedingungen ist für einen Biokatalysator im Rahmen technischer Prozesse äußerst wünschenswert. Daher soll in dieser Arbeit die Temperatur- und Druckstabilität von MsP1 untersucht werden, wobei eine Kombination mehrerer biophysikalischer Techniken und enzymatischer Aktivitätstests unter Normal- und Hochdruck eingesetzt wurde. Die Untersuchung biotechnologischer Prozesse unter HHD hat in den letzten Jahren deutlich an Interesse gewonnen, da die Aktivität und das katalytische Gleichgewicht von Enzymen durch HHD modifiziert werden können (Baroenzymologie, Northrop, 2002).

1.3.3 Untersuchung der druckinduzierten Entfaltung der repetitiven Ankyrinsequenz des Notch-Rezeptors aus *Drosophila melanogaster*

Im Gegensatz zu Studien des *p,T*-Verhaltens von globulären Proteinen existieren bislang noch keine Untersuchungen zur Druckentfaltung von Proteinen mit sich wiederholenden Domänen. Daher soll das Verhalten der rekombinant hergestellten Ankyrindomäne des Notch-Rezeptors (Nank₁₋₇) aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* hinsichtlich Einwirkung von HHD experimentell bestimmt werden. Die Ankyrinwiederholungssequenz ist ein sehr weit verbreitetes Proteinstrukturmotiv sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryoten und besteht aus 33 Aminosäuren, die sich zu repetitiven α -Helix-Schleife- α -Helix Einheiten zusammenlagern, wobei die Schleifen auch β -Haarnadelstrukturen ausbilden können (Abb. 1.9, Mosavi et al., 2004). Der Notch-Rezeptor ist ein bei Eukaryoten hochkonserviertes Transmembranprotein und an der Signaltransduktion während der Ontogenese beteiligt (Zweifel et al., 2003). Bei diesem Protein bilden 7 Ankyrinwiederholungssequenzen die Ankyrindomäne aus, die einen Teil des zytoplasmatischen Re-

zeptorteils bildet. Angesichts des zwischen den Helices verteilten hydrophoben Proteinkerns ist es von Interesse zu erfahren, ob sich das Entfaltungsverhalten dieser Domäne bei Einwirkung von HHD von jenem globulärer Proteine mit konzentriertem hydrophoben Kern unterscheidet.

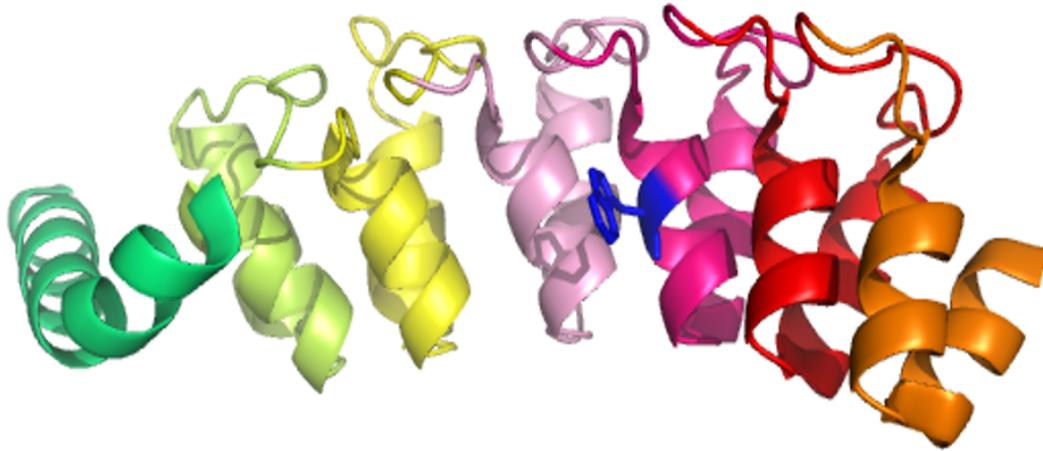


Abb. 1.9: Struktur von Nank₁₋₇. Jede Ankyrinwiederholungssequenz ist in unterschiedlicher Farbe dargestellt. Ein für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen wichtiger Tryptophanrest (der Einzige im gesamten Protein) in der Wiederholungseinheit 5 ist in Blau dargestellt. Abbildung nach Rouget et al., 2009.

1.3.4 Polymere und Hydrogele aus Poly(*N*-isopropylacrylamid) und Poly(*N,N*-diethylacrylamid) als Modellsysteme für die Kälte- und Druckdenaturierung von Proteinen

Polymere aus bestimmten Acrylamidderivaten wie Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM) oder Poly(*N,N*-diethylacrylamid) (PDEAAM) zeigen beim Erhitzen einen Phasenübergang von einer relativ hydrophilen, geschwollenen und ausgestreckten Konformation zu einem recht kompakten, hydrophoben und globulären Zustand (Thermoresponsivität, Abb. 1.10, Lyon & Nayak, 2005). Oberhalb dieser sogenannten unteren kritischen Lösungstemperatur (LCST, 32 °C im Falle von PNIPAM) präzipitiert das Polymer, was sich durch erhöhte Turbidität oder Flockenbildung bemerkbar macht (Trübungspunkt oder "Cloud point"). Der Übergang ist endotherm und entropiegesteuert, da die Freisetzung gebundenen Wassers um die hydrophoben Isopropyl- und Diethylreste zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtentropie des Systems führt. Diese Eigenschaften machen solche Polymere zu wertvollen Modellsystemen für die Kältedenaturierung von Proteinen (Kunugi & Tanaka, 2002). Wie bereits in Kap. 1.2.3 beschrieben, denaturieren Proteine aus mesophilen Organismen unter Abgabe von Wärme, wenn die Temperatur auf Werte deutlich unter 0 °C gesenkt wird (Die einzigen Ausnahmen sind Elastin und daraus abgeleitete Peptide, die einen Kältedenaturierungspunkt bei 35-40 °C aufweisen (Nicolini et al., 2004)). Der notwendige flüssige Zustand des Wassers kann unter diesen Bedingungen nur durch Anwendung hohen hydrostatischen Drucks oder starke

Unterkühlung kleiner Volumina erreicht werden. Daher sind Polymere wie PNIPAM einfacher zu handhaben und bieten darüber hinaus den Vorteil, daß bei ihnen Hydratationseigenschaften mittels IR-Spektroskopie untersucht werden können, die bei Proteinen durch Änderungen der Sekundärstruktur verborgen bleiben (Meersman et al., 2005).

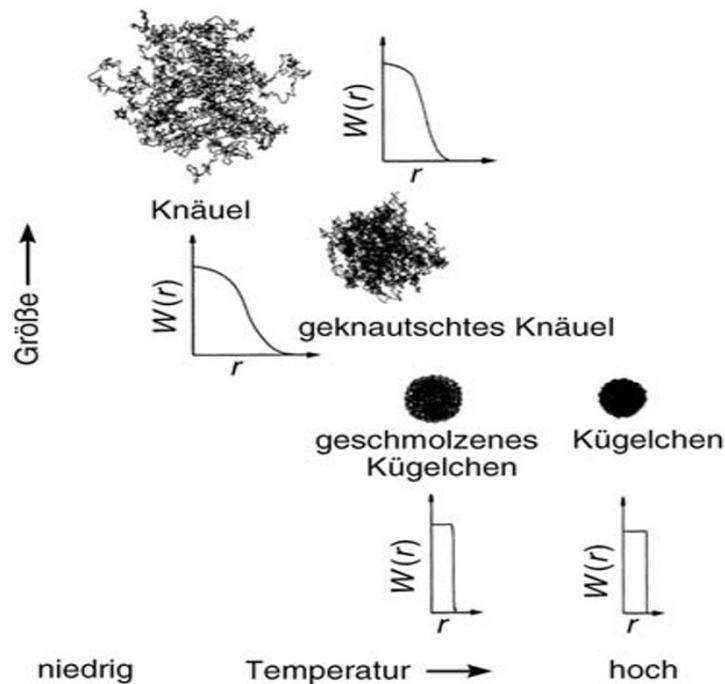


Abb. 1.10: Schematische Darstellung des Phasenübergangs von PNIPAM vom geschwollenen zum kollabierten Zustand mit den zugehörigen radialen Kettendichteverteilungen. Abbildung nach Lyon & Nayak, 2005.

Diese linearen Polymere können durch Einbringung eines Quervernetzers bei der Polymerisation (Abb. 1.11) sogenannte Hydrogele ausbilden, die wiederum in Makro- und Mikrogele unterteilt werden können (Lyon & Nayak, 2005). Mikrogele besitzen Radien von etwa 10-1000 nm und können sowohl physikalisch als auch chemisch quervernetzt sein (Abb. 1.12). Die Mikrogele übernehmen die stimulussensitiven Eigenschaften ihrer Ausgangspolymere und können somit, in Abhängigkeit der Monomerkomposition, z.B. auf Temperatur-, pH-, Lichtintensitäts- oder auch elektrische Spannungsänderungen reagieren, was zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten in Biomedizin und Mikrotechnologie eröffnet (Chaterji et al., 2007). Besonders interessante potentielle Applikationen sind z.B. die stimulusinduzierte Freisetzung von Wirkstoffen (Kavanagh et al., 2004) oder auch die Verwendung als künstliche extrazelluläre Matrices in der Zellkultur oder bei zelltherapeutischen Ansätzen mit gegebenenfalls biodegradierbaren Quervernetzern (Kim & Healy, 2003).

1. Einleitung

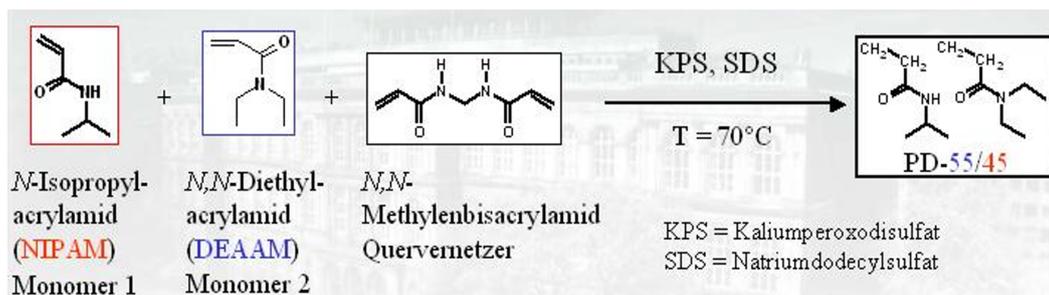


Abb. 1.11: Radikalischer Polymerisationsprozeß eines vernetzten Copolymer-Hydrogels aus PNIPAM und PDEAAM mit *N,N*-Methylenbisacrylamid (BIS) als Quervernetzer

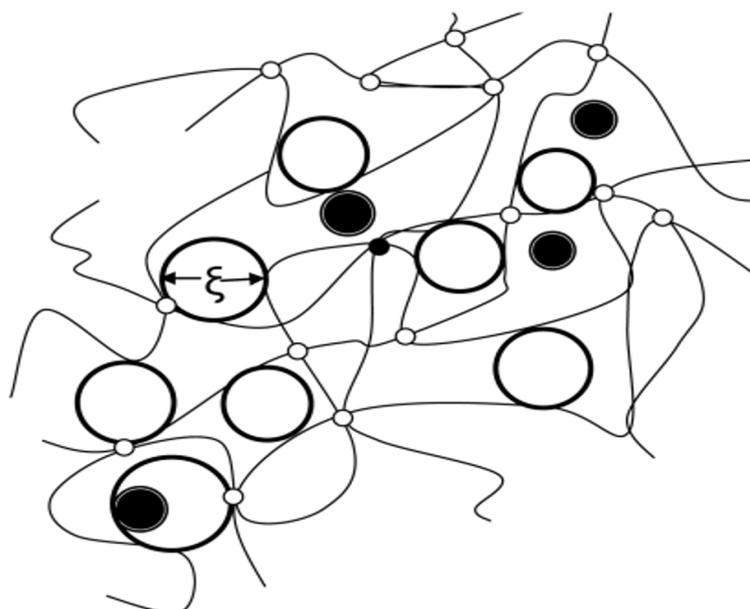


Abb. 1.12: Schematische Darstellung der Struktur eines quervernetzten Hydrogels. Die Vernetzungspunkte sind als kleine, weiße Kreise auf den Polymerketten dargestellt. Die durchschnittliche Porengröße (ξ) des Gels ist durch die großen weißen Kreise verdeutlicht. Moleküle mit kleinerem Radius als die durchschnittliche Porengröße können frei durch das Netzwerk diffundieren (schwarze Kreise). Abbildung nach Chaterji et al., 2007.

Durch die Quervernetzung ändern sich einige physikalische Eigenschaften der Gele im Vergleich zu den linearen Polymeren. Die Phasenübergangstemperatur (bei Gelen Volumenphasenübergangstemperatur (VPTT) genannt), ändert sich nur geringfügig, allerdings wird die Transition aufgrund der größeren Kettenlängeninhomogenität mit steigender Quervernetzerdichte zunehmend breiter und kontinuierlicher, während lineare Polymere einen abrupten, diskontinuierlichen Phasenübergang aufweisen (Wu & Zhou, 1997; Kratz et al., 2001). Der hydrodynamische Radius R_h ändert sich, abgesehen für sehr große Quervernetzerkonzentrationen, nicht signifikant, während die Schwellkapazität für stark quervernetzte Gele aufgrund sterischer Restriktion deutlich abnimmt (Tab. 1.1, Kratz et al., 2001). Es muß beachtet werden, daß die Dichte der Vernetzungen im Mikrogel nicht homogen ist, sondern von innen nach außen stark abnimmt, wie Messungen mittels Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS) zeigen (Stieger et al., 2004).

1. Einleitung

Tab. 1.1: Charakteristische physikalische Größen von PNIPAM-Mikrogelen in Abhängigkeit der Quervernetzerkonzentration (BIS als Vernetzer). R_{SEM} = Radius der Gelpartikel, bestimmt durch Elektronenmikroskopie; R_H = Hydrodynamischer Radius der Mikrogele, bestimmt mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) bei 15 °C; T_C = VPTT; α = Schwellkapazität ($V_{45\text{ °C}}/V_{1,5\text{ °C}}$). Werte nach Kratz et al., 2001.

Quervernetzer (mol-%)	R_{SEM} (nm)	R_H (nm)	T_C (°C)	α
0,73	221 ± 15	298	31,3	0,032
1,47	212 ± 18	286	31,8	0,110
3,67	222 ± 14	304	31,6	0,084
7,33	202 ± 10	277	31,4	0,144
11	314 ± 12	350	32,7	0,273

Bisher wurden die Phasenübergänge von Mikrogelen hauptsächlich durch Lichtstremethoden wie dynamischer Lichtstreuung (DLS) oder SANS untersucht. Erst vor Kurzem kamen infrarot-spektroskopische Untersuchungen hinzu, die zeigten, daß diese Methode sehr gut zur Bestimmung der verschiedenen H-Brückenmuster (intramolekulare H-Brücken gegen intermolekulare H-Brücken zum Solvens) innerhalb des Polymers geeignet ist (Meersman et al., 2005; Keerl et al., 2008). Obwohl bekannt ist, daß PNIPAM-Mikrogele unter Druck einen Phasenübergang zeigen (Yamazaki et al., 2000; Kunugi & Tanaka, 2002; Kunugi et al., 2005), ist über dessen Natur bislang nur wenig bekannt, da fast nur turbidimetrische und DLS-Messungen zum Einsatz kamen. Die bislang einzige IR-spektroskopische Untersuchung von linearem PNIPAM unter HDD wurde nur bei einer Temperatur (25 °C) durchgeführt (Meersman et al., 2005). In dieser Arbeit soll daher das Verhalten verschiedener Hydrogele und von linearem PNIPAM sowohl temperaturabhängig bei Atmosphärendruck als auch druckabhängig von 10-50 °C IR-spektroskopisch untersucht werden, um ihr Verhalten sowohl unterhalb als auch oberhalb ihrer LCST/VPTT genau zu charakterisieren.

1. Einleitung

2. Methoden

2.1 Fourier-Transformations Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie)

Die Fourier-Transformations Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) stellt eine leistungsfähige, nichtperturbative optische Methode zur Analyse und Identifikation chemischer Verbindungen dar (Hesse et al., 2002). Auch im Bereich der Biophysik kann sie sehr gut zur Charakterisierung sämtlicher Klassen von Biomolekülen und Biopolymeren unter den verschiedensten Bedingungen eingesetzt werden (Lottspeich & Zorbas, 1998; Fabian & Mäntele, 2002; Barth, 2007). Im Folgenden soll eine kurze Einführung in die theoretischen und technischen Grundlagen der IR-Spektroskopie gegeben sowie ihre Anwendung in der Analyse von Lipid- und Proteinsystemen erläutert werden.

2.1.1 Grundlagen

Trifft infrarotes Licht auf Moleküle, so werden in Abhängigkeit von dessen Frequenz die kovalenten Bindungen zwischen den Atomen durch die elektrische Feldkomponente der Photonen zum Schwingen angeregt, sofern eine Änderung des molekularen Dipolmomentes auftritt. Die Eigenfrequenz f der Molekülschwingung läßt sich für ein zweiatomiges Molekül mittels Gl. 2.1 berechnen:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (2.1)$$

k ist hierbei die Federkonstante und m die reduzierte Masse ($m = (m_1+m_2)/(m_1 \cdot m_2)$; m_1 und m_2 sind die Massen der schwingenden Atome). Bei Einsetzen typischer Atommassen ergibt sich eine Schwingungsfrequenz, die derjenigen von Licht im mittleren Infrarot (MIR) mit Wellenlängen von 2,5 bis 16 μm , äquivalent zu Wellenzahlen von 4000 bis 600 cm^{-1} , entspricht. Die potentielle Energie V der Schwingungsbewegung ergibt sich aus Gl. 2.2:

$$V = \frac{1}{2} kx^2 \quad (2.2)$$

x symbolisiert hier die Auslenkung aus der Ruhelage. Auf molekularer Dimension bedarf diese Beschreibung durch die klassische Mechanik der Modifikation durch die Quantentheorie, welche besagt, daß kein kontinuierliches Spektrum von Anregungsniveaus existiert, sondern nur diskrete Energiemoden. Bei Anwendung der Schrödingergleichung auf harmonische Oszillatoren ergibt sich Gl. 2.3:

$$E_{vib} = \left(n + \frac{1}{2} \right) hf \quad (2.3)$$

Hierbei ist E_{vib} der Energieeigenwert der Schwingung, n die Schwingungsquantenzahl (0, 1, 2, 3... ∞) und h das Plancksche Wirkungsquantum. Bei der Näherung des harmonischen Oszillators sind immer nur Übergänge ist das direkt benachbarte Energieniveau möglich ($\Delta n \pm 1$). Zudem ergibt sich die aus der klassischen Mechanik nicht herleitbare Konsequenz, daß der Oszillator selbst im Schwingungsgrundzustand nicht in Ruhe ist, sondern immer noch eine Auslenkung mit der Energie $E_{vib} = 1/2 hf$ aufweist (Nullpunktsenergie). Bei Raumtemperatur sind alle Schwingungen nahezu ausschließlich im Grundzustand. Neben den Schwingungen werden gleichzeitig auch Rotationsniveaus angeregt, da die einzelnen Schwingungsmoden in diverse Rotationsniveaus aufgespalten sind, ähnlich wie elektronische Anregungsmoden diverse Schwingungsniveaus enthalten. In flüssiger und fester Umgebung wird die Rotationsfeinstruktur aufgrund starker zwischenmolekularer Wechselwirkungen nicht aufgelöst und kann somit nicht beobachtet werden.

Die Näherung des harmonischen Oszillators ist nur für niedrige Anregungsenergien gültig, da Moleküle bei hohen Bindungsauslenkungen zerfallen, was durch das vereinfachte Modell der harmonischen Schwingung nicht beschrieben werden kann. Zudem wirken analog Abstoßungskräfte zwischen den Kernen bei starker Stauchung. Daher wird das Modell des anharmonischen Oszillators, der durch das sogenannte Morse-Potential beschrieben wird, verwendet (Abb. 2.1).

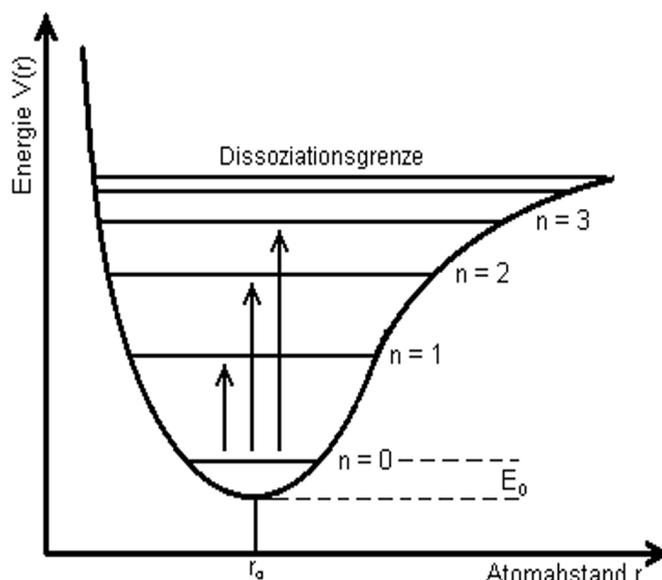


Abb. 2.1: Potentialkurve eines anharmonischen Oszillators. n = Schwingungsniveau, r_0 = Gleichgewichtsabstand, E_0 = Nullpunktsenergie. Abbildung verändert nach Hesse et al., 2002.

Das Verhalten des anharmonischen Oszillators entspricht bei Anregung der niedrigen Schwingungsniveaus der harmonischen Näherung. Schwingungsmoden höherer Energie nehmen einen

immer geringeren diskreten Abstand zueinander ein, bis die Dissoziationsgrenze erreicht ist. Ein wichtiger Unterschied in der quantenmechanischen Beschreibung im Vergleich zum harmonischen Oszillator besteht darin, daß, wie auch in Abb. 2.1 durch die Pfeile angedeutet, Übergänge direkt in höherangeregte Moden möglich sind, also zum Beispiel vom Grundzustand in den zweiten angeregten Zustand ($n_0 \rightarrow n_2$). Diese sogenannten Oberschwingungen besitzen deutlich geringere Intensitäten als die $n \rightarrow n+1$ Übergänge und können bei den für die Biophysik wichtigen Absorptionen von Biopolymeren häufig im nahen Infrarot (NIR) bei Wellenlängen zwischen 780 nm und 2,5 μm beobachtet werden.

2.1.2 FTIR-Spektrometer

Um spektroskopische Untersuchungen durchführen zu können, muß Licht einer oder mehrerer definierter Wellenlängen (monochromatisches Licht) verwendet werden. Früher wurden zur spektralen Aufspaltung und/oder Separierung Filtersysteme oder Brechungsgitter bzw. Prismen in Kombination mit einem Spalt verwendet. Seit dem Aufkommen leistungsfähiger Mikrocomputer Mitte der 1980er Jahre wurden diese Instrumente durch Spektrometer verdrängt, welche das FTIR-Prinzip nutzen. Hierbei wird kein klassischer Monochromator benötigt, da alle Wellenlängen der IR-Quelle simultan in einem Michelsoninterferometer in ein Interferogramm umgewandelt werden (Abb. 2.2). Hierbei wird das Spektrum primär in Abhängigkeit der Position des beweglichen Spiegels in der sogenannten Zeitdomäne aufgezeichnet und anschließend durch eine mathematische Operation, die Fouriertransformation, in die klassische Frequenzdomäne umgewandelt.

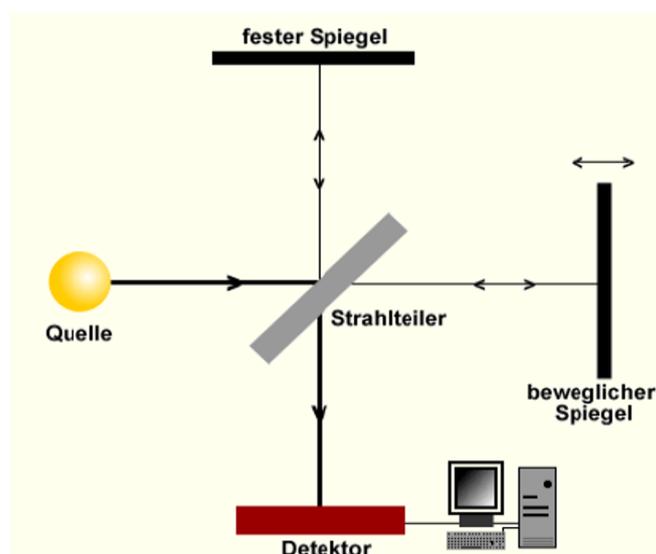


Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines Michelsoninterferometers mit angeschlossener EDV-Einheit. Der von der Quelle kommende Primärstrahl wird an einem Strahlteiler in Richtung auf zwei sich im 90°-Winkel zueinander befindenden Spiegeln aufgeteilt. Ein Spiegel wird daraufhin vor- und zurückbewegt, was in Abhängigkeit der Wellenlänge durch Phasenverschiebung zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz der wiedervereinigten Teilstrahlen am Strahlteiler führt. Der wiedervereinigte Gesamtstrahl wird durch die Probe geleitet (nicht gezeigt) und das resultierende Interferogramm am Detektor aufgezeichnet. Abbildung nach Chemgapedia (FIZ Chemie Berlin GmbH).

Die Formulierung der Fourierreihe für polychromatisches Licht zur Umwandlung der gemessenen Intensität $I(x)$ in Abhängigkeit von der Spiegelposition (Zeitdomäne) in die Intensität $I(\tilde{\nu})$ in Abhängigkeit von der Frequenz/Wellenzahl (Frequenzdomäne) lautet:

$$I(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(x) D(\tilde{\nu}) \cos(2\pi \tilde{\nu} x) dx \quad (2.4)$$

$D(\tilde{\nu})$ ist hierbei eine sogenannte Fensterfunktion, die innerhalb des Meßbereiches des Spektrometers den Wert 1 und außerhalb den Wert 0 annimmt. Die Umwandlung ist graphisch in Abb. 2.3 dargestellt.

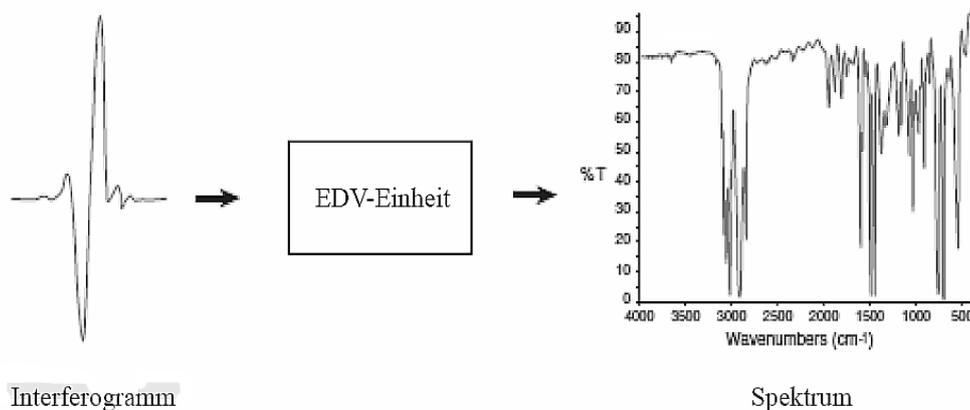


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Umwandlung eines Interferogramms in ein Spektrum. Die Fouriertransformation geschieht durch EDV-Einheiten.

Da die Weglängendifferenz im Michelsoninterferometer nicht unendlich ist, entstehen unerwünschte Seitenbanden bzw. Bandenspitzen, die durch eine sogenannte Apodisierungsfunktion unterdrückt werden können. Die am häufigsten Verwendete ist die Happ-Genzel-Funktion:

$$W(x) = 0,54 + 0,46 \cos\left(\frac{\pi x}{x_m}\right) \quad (2.5)$$

x ist hierbei die aktuelle Weglängendifferenz des vom beweglichen Spiegel reflektierten Lichts und x_m die maximale Weglängendifferenz.

Gegenüber IR-Spektrometern mit Monochromatoren (Filter oder Beugungsgitter) weisen FTIR-Geräte mehrere Vorteile auf. Erstens arbeiten sie erheblich schneller, da durch die Interferometrie keine zeitaufwendige Wellenlängentrennung mehr notwendig ist (Multiplex-Vorteil oder Fellgett-Vorteil), zweitens bieten sie ein stark verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis, da immer die gesamte Strahlungsintensität der Quelle genutzt werden kann (Jacquinot-Vorteil), und drittens

steht als interne Eichung ein Laser mit genau bekannter Wellenlänge zur Verfügung, was die Präzision der Wellenlängen-/Wellenzahlbestimmung erhöht (Connes-Vorteil).

2.1.3 IR-Spektren von Phospholipiden und Proteinen

Obwohl die Schwingungen zwischen Atomen streng genommen das Molekül als Ganzes betreffen, kann dies in guter Näherung aufgrund der Trägheit von größeren Molekülen oder gar Biopolymeren in den meisten Fällen vernachlässigt und die schwingende Gruppe als unabhängig vom Rest des Moleküls betrachtet werden. Hierdurch können sogenannte Gruppenfrequenzen eingeführt werden, welche jeder funktionalen Gruppe einen charakteristischen Wellenlängen- oder Wellenzahlenbereich zuordnen. Bei der IR-spektroskopischen Analytik von Membranlipidsystemen sind insbesondere die symmetrischen und asymmetrischen CH_2 -Streckschwingungen als Indikatoren hinsichtlich der Ordnung der Acylkette und die Carbonylstreckschwingung als Indikator für den Hydratationsgrad der Kopfgruppe von Interesse (Tab. 2.1, Gunstone et al., 1994; Mendelsohn & Moore, 1998).

Tab. 2.1: Übersicht über die wichtigsten diagnostischen IR-Banden von Membranlipiden.

Bande	Wellenzahl / cm^{-1}	Spezifität
$\nu_{\text{Sym}} \text{CH}_2$	2848-2854	Qualitative Beschreibung der Acylkettenordnung
$\nu_{\text{Asym}} \text{CH}_2$	2915-2924	S.o.
$\nu \text{C=O}$	1700-1750	Bande besteht aus mehreren Komponenten, deren relative Flächen Auskunft über den Hydratationsstatus geben ($\sim 1744 \text{ cm}^{-1}$ = nichthydratisierte Carbonylgruppen; $\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$ = einfach hydratisierte Carbonylgruppen (eine H-Brücke); $\sim 1712 \text{ cm}^{-1}$ = mehrfach hydratisierte Carbonylgruppen (mehrere H-Brücken))

Ebenso wie Lipide lassen sich auch Proteine oder Peptide IR-spektroskopisch analysieren. Insbesondere die Amid-I-Region (Amid-I' in D_2O) zwischen 1600 und 1700 cm^{-1} gibt Auskunft über die relativen Sekundärstrukturanteile (Fabian & Mäntele, 2002; Barth, 2007). Die Amid-I-Bande entsteht hauptsächlich aus der Carbonylstreckschwingung der Peptidgruppe mit geringen Bei-

2. Methoden

trägen der außer-Phase C-N-Streckschwingung, der C-C-N-Deformationsschwingung und der N-H-Beugeschwingung. Sie besteht je nach Protein aus mehreren Subbanden, deren Position für eine bestimmte Sekundärstruktur charakteristisch ist (Tab. 2.2). Durch Spektrendekonvolution und nachfolgende Kurvenanpassung (s.u.) lassen sich die relativen Flächenanteile der Subbanden ermitteln. Diese stimmen in der Regel gut mit den Anteilen, die durch Kristallstrukturanalyse ermittelt wurden, überein (Byler & Susi, 1986; Panick et al., 1998; Herberhold et al., 2003; Herberhold et al., 2004). Dies bedeutet, daß sich die Übergangsdipolmomente und damit die Absorptionskoeffizienten der Subbanden oft nur geringfügig unterscheiden.

Tab. 2.2: Zuordnung der Amid-I'-Banden (D₂O) zu Sekundärstrukturelementen von Proteinen. β -Faltblätter weisen oft zwei Banden auf, eine Niedrigfrequenzkomponente bei $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ und eine Hochfrequenzkomponente bei $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$. Antiparallele β -Faltblätter weisen oft eine intensivere Hochfrequenzkomponente und einen größeren Abstand der zwei Banden auf als Parallele. β -Faltblattbanden unterhalb von $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ sind in der Regel auf Aggregate mit intermolekularen β -Faltblättern zurückzuführen. Insbesondere bei Schleifenstrukturen können durch unterschiedliche H-Brückenmuster auch multiple Banden beobachtet werden. Tabelle nach Barth, 2007.

Sekundärstruktur	Mittlere Bandenposition/ cm^{-1}	Gesamter möglicher Bereich / cm^{-1}
α -Helix	1652	1642-1660
β -Faltblatt	1630	1615-1638
	1679	1672-1694
Schleifen	1671	1653-1691
Ungeordnet	1645	1639-1654

Die in Tab. 2.2 angegebenen Werte gelten streng nur für Proteine, während bei den kleineren Peptiden größere Abweichungen auftreten können. So können zum Beispiel stark solvensexponierte α -Helices in Peptiden eine Bande unterhalb von 1640 cm^{-1} aufweisen (Fabian & Mäntele, 2002). Einige IR-Absorptionen von Aminosäureseitenketten liegen ebenfalls in der Amid-I-Region, doch diese stören nur in seltenen Fällen, zum Beispiel wenn eine dieser Aminosäuren extrem häufig vorkommt. Eine Zusammenstellung dieser Aminosäurebanden findet sich bei Barth, 2007.

IR-spektroskopische Experimente und Analysen mit Lipiden und Proteinen werden in der Regel in D₂O oder D₂O-Puffer durchgeführt. Der Grund hierfür liegt in den intensiven Absorptionen der H-O-H-Streckschwingung bei $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$, welche zudem noch eine extreme spektrale Breite aufweist, und der H-O-H-Beugeschwingung bei $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$, welche mit der Amid-I-Region überlappt. Bei Anwendung von D₂O als Solvens verschiebt sich die Bande bei $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ hinab auf $\sim 2500\text{ cm}^{-1}$ und jene bei $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ auf $\sim 1210\text{ cm}^{-1}$ (Venyaminov & Prendergast, 1997). Hierdurch ergeben sich freie spektrale Fenster zur Beobachtung der diagnostischen Banden von Lipiden und Proteinen. Zudem ist es so auch möglich, die Amid-II-Region bei \sim

1545 cm^{-1} , welche hauptsächlich aus der N-H Beugeschwingung der Peptidgruppen resultiert, als zusätzlichen Indikator für Sekundärstrukturänderungen zu nutzen, da sich diese bei Deuterierung zu $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ verschiebt (Amid-II'-Bande). Die Aminosäurereste im Inneren eines Proteins oder in stabilen Sekundärstrukturen wie α -Helices und β -Faltblättern sind oft gegen H-D-Austausch geschützt, was dazu führt, daß oft beide Amid-II-Banden beobachtet werden können. Bei größeren Sekundärstrukturänderungen oder Denaturierungsprozessen verschwindet die Amid-II-Bande zunehmend oder komplett, während die Amid-II'-Bande intensiver wird (Fabian & Mäntele, 2002; Barth, 2007). Die Position der Amid-I-Bande ist hingegen bei Deuterierung nahezu konstant.

2.1.4 Spektrendekonvolution und Spektralanalyse

Wie bereits erwähnt, besteht die Amid-I-/Amid-I'-Bande aus mehreren überlappenden Teilbanden, die spezifisch für bestimmte Sekundärstrukturelemente sind. Um die Zahl und Positionen der vorhandenen Subbanden bestimmen zu können, müssen Techniken zur spektralen Dekonvolution eingesetzt werden. Die hierfür am häufigsten verwendete Methode ist die Bildung der zweiten Ableitung des Originalspektrums (Derivativspektroskopie, Fabian & Mäntele, 2002). Oft wird hierbei noch eine Glättungsfunktion wie der Savitzky-Golay-Algorithmus verwendet, um unerwünschtes Rauschen zu reduzieren (Savitzky & Golay, 1964). Die Berechnung der zweiten Ableitung ergibt eine negative Bande für jede Subbande im untersuchten Spektralbereich. Hierbei werden die relativen Intensitäten der spektralen Teilkomponenten nur teilweise konserviert, da scharfe Banden mit geringer Halbwertsbreite (FWHH) verstärkt und breite Banden abgeschwächt erscheinen. Daher lassen sich die relativen Sekundärstrukturanteile aus der zweiten Ableitung nicht direkt bestimmen. Stattdessen wird eine iterative Kurvenanpassung mit der Anzahl und Position der festgestellten Subbanden durchgeführt. Die Iteration erfolgt so lange, bis die so berechnete Form der umschließenden Gesamtbande mit derjenigen des Originalspektrums (weitestgehend) übereinstimmt. Hinsichtlich der Bandenform für die spektralen Teilkomponenten hat sich für Proteine und Peptide in Lösung eine Mischung aus Gauß- und Lorentzfunktion als am Zutreffendsten erwiesen, da die natürliche Lorentzform der Banden durch Wechselwirkungen mit dem Solvens verbreitert wird. Eine gute Annäherung an die reale Bandenform wird durch das Voigtprofil, ebenfalls eine Mischung aus Gauß- und Lorentzfunktion (Gl. 2.6), erzielt.

$$f(x) = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{H \exp(-y^2) dy}{w_l^2 + \left[\left(\frac{x-x_0}{w_g} \right) - y \right]^2}}{\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\exp(-y^2) dy}{w_l^2 + y^2}} \quad (2.6)$$

H entspricht der Signalhöhe, x_0 der zentralen Bandenposition, x einer beliebigen Position abseits des Bandenzentrums, y der Bandenhöhe an der Position x , w_g dem Gaußanteil und w_l dem Lorentzanteil.

2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Ebenso wie die Infrarotspektroskopie besitzt auch die Fluoreszenzspektroskopie einen festen Platz in der Analytik von Biopolymeren. Sie ist ebenfalls nichtperturbativ und liefert Informationen über die chemische Umgebung der strahlenden Fluorophore. Im Folgenden werden ihre theoretischen Grundlagen und ihre praktische Anwendung bei der Analyse von Proteinen (intrinsische Tryptophanfluoreszenz) erläutert (Lottspeich & Zorbas, 1998).

2.2.1 Grundlagen

Bei Absorption von Licht im UV-VIS-Bereich werden Orbitalelektronen von Molekülen in ein höheres Energieniveau angehoben. Voraussetzung für den Absorptionsprozeß ist wie bei der Anregung von Molekülschwingungen (s.o.) ein von Null verschiedenes Übergangsdipolmoment. Der angeregte Zustand kann strahlungslos durch Energieübertragung auf andere Moleküle in den Grundzustand relaxieren (interne Konversion), oder es findet eine Emission eines Photons statt (Fluoreszenz oder Phosphoreszenz). Somit handelt es sich bei der Untersuchung von Fluoreszenzphänomenen um eine emissionspektroskopische Analyse. Das Emissionsmaximum ist bei Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz gegenüber der anregenden Strahlung rotverschoben, es wird entsprechend bei größeren Wellenlängen beobachtet. Die Ursache hierfür liegt im sogenannten Franck-Condon-Prinzip, welches besagt, daß bei einem elektronischen Übergang die Atomkerne aufgrund ihrer größeren Masse und dadurch verursachten Trägheit dem sehr schnellen, etwa 10^{-15} Sekunden dauernden Übergang nicht folgen können und als Konsequenz aufgrund der quasi instantan veränderten elektronischen Umgebung zu schwingen beginnen. Somit findet in der Regel der Übergang nicht nur in den angeregten elektronischen Zustand, sondern auch in einen angeregten Schwingungszustand statt, da die Gleichgewichtsabstände der Kerne in den elektronischen Niveaus normalerweise nicht identisch sind (Vibronischer Übergang). Welcher Übergang am Wahrscheinlichsten ist, wird durch die Franck-Condon-Faktoren bestimmt; es wird jedoch der Übergang bevorzugt, bei dem sich die Schwingungswellenfunktionen am Besten überlappen. Innerhalb kurzer Zeit relaxiert das Molekül strahlungslos in den Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Niveaus, wobei die Schwingungsenergie durch thermische Äquilibration/Dissipation auf Solvensmoleküle übertragen wird. Vom Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Niveaus erfolgt dann innerhalb von 10^{-10} bis 10^{-7} Sekunden nach der Photoanregung die strahlende Relaxation in den elektronischen Grundzustand, wobei wiederum in Analogie zur Anregung, mehrere Schwingungsmoden des Grundzustandes

gemäß ihrer Franck-Condon-Faktoren erreicht werden können. Neben dieser photophysikalischen Ursache für die Rotverschiebung der Fluoreszenz gegenüber der Anregung ist ein weiterer Faktor bei Messungen in Lösung die sogenannte Lösungsmittelrelaxation zu beachten. Hierbei führt eine schnelle Umorientierung der Lösungsmittelmoleküle nach der Anregung zu einer energetischen Absenkung des angeregten Niveaus, was die Energie des emittierten Photons weiter reduziert.

Während bei der Photoanregung der Spin des promovierten Elektrons erhalten bleibt (Singulettzustand mit antiparallelen Spins zwischen angeregtem und nicht angeregtem Elektron), kann es im höheren elektronischen Niveau bei einigen Molekülen zu einer Spinumkehrung unter Bildung eines Triplettzustandes mit parallelen Spins kommen (Intersystemübergang oder "Intersystem Crossing", ISC). Da der Übergang in den elektronischen Grundzustand nun aufgrund der parallelen Spins spinverboten ist, ist die Transitionswahrscheinlichkeit deutlich kleiner, was zu einer sehr viel schwächeren aber deutlich länger anhaltenden Photoemission, der Phosphoreszenz führt. Auch diese ist gegenüber der Anregung rotverschoben, sogar stärker noch als die Fluoreszenz, da der Triplettzustand aufgrund paralleler Spins eine geringere Energie besitzt als der Singulettzustand (Hundsche Regel der maximalen Multiplizität).

Alle diese photophysikalischen Vorgänge können in dem sogenannten Jablonskidiagramm oder Jablonski-Termschema sehr einfach dargestellt werden, was in Abb. 2.4 gezeigt ist.

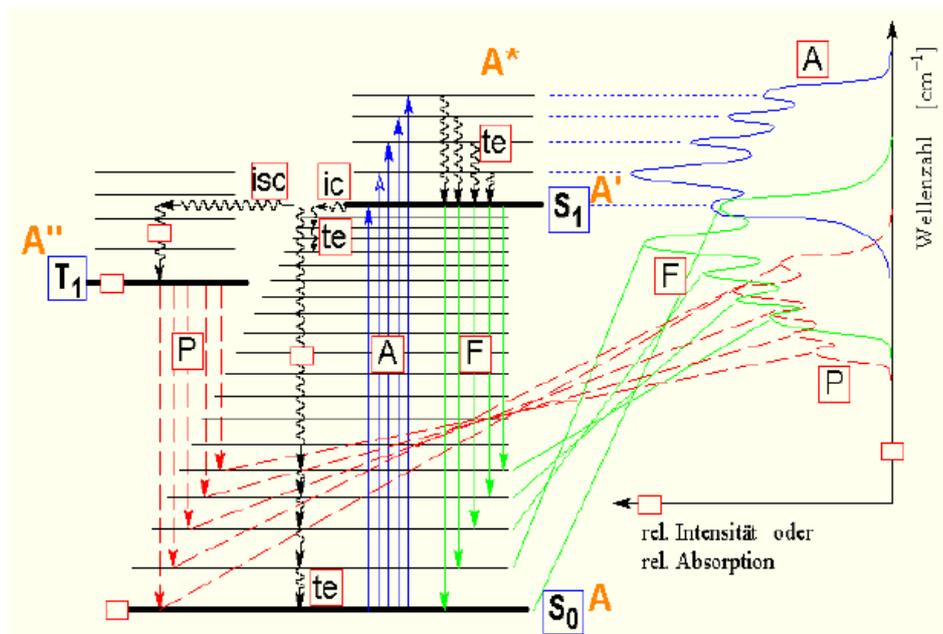


Abb. 2.4: Jablonskidiagramm für Fluoreszenz- und Phosphoreszenzprozesse. **A** = Absorption, **F** = Fluoreszenz, **P** = Phosphoreszenz, **S₀** = Singulettgrundzustand, **S₁** = erster angeregter Singulettzustand, **T₁** = erster angeregter Triplettzustand, **te** = thermische Äquilibration, **isc** = Intersystemübergang (Intersystem crossing) **ic** = interne Konversion (strahlungslose Inaktivierung des angeregten Zustands). Rechts sind die Absorptions-, Fluoreszenz- und Phosphoreszenzspektren dargestellt, wobei die Bandenstruktur nur bei Gasen mit niedrigem Partialdruck beobachtet werden kann; in Lösung sind die Emissionsbanden durch Wechselwirkung mit dem Solvens verbreitert und kontinuierlich. Abbildung nach Chemgapedia (FIZ Chemie Berlin GmbH).

2.2.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von Proteinen

Proteine können sowohl mittels extrinsischer oder intrinsischer Fluorophore untersucht werden. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind solche intrinsischen Fluorophore, die eine fluoreszenzspektroskopische Analyse von Proteinen und Peptiden ohne Verwendung zusätzlicher Markierungsstoffe erlauben. Am Häufigsten wird die Tryptophan (Trp)-Fluoreszenz verwendet, wobei das Tryptophan mit Licht der Wellenlänge 295 nm angeregt und die anschließende Fluoreszenz zwischen ~ 305 und 400-450 nm aufgezeichnet wird. Das sogenannte spektrale Massezentrum ($\langle \lambda \rangle$, CMS) ist ein sehr sensitiver Indikator für die Umgebung des Tryptophans (Silva et al., 1986). Diese wird gemäß Gl. 2.7 berechnet:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum \nu_i F_i}{\sum F_i} \quad (2.7)$$

F_i steht hierbei für die Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge ν_i , wobei über den gesamten Emissionsbereich aufsummiert wird. Hierbei zeigt eine Rotverschiebung einen Übergang zu einer polareren Umgebung an, was zur Überwachung von druck- oder temperaturinduzierten Konformationsübergängen genutzt werden kann. Native Proteine zeigen einen CSM-Wert von ~ 345 nm und denaturierte einen CSM-Wert von ~ 360 nm, wobei die genauen Werte vom Protein, der Anzahl und der Position der Tryptophanreste abhängig sind (Kato et al., 2002). Insbesondere in Kombination mit der FTIR-Spektroskopie können so Konformationsänderungen und Entfaltungen sehr genau studiert werden, wobei die Fluoreszenzspektroskopie den Vorteil besitzt, mit 100-1000-fach geringeren Konzentrationen auszukommen, was insbesondere bei aggregationsanfälligen Proteinen von Vorteil ist.

2.3 Differentialkalorimetrie

Die Differentialkalorimetrie (auch Differential-Scanning-Kalorimetrie, DSC) ist eine leistungsfähige, thermoanalytische Methode zur Überwachung von Phasenübergängen, die mit dem Umsatz latenter Wärme verbunden sind (Schwedt, 2008). Hierbei wird die differentielle Heizleistung ΔP zwischen einer Probe, z.B. Protein oder Lipid in Wasser/Puffer und einer Referenz, also pures Wasser oder Puffer gemessen, während die Temperatur gemäß eines vorgegebenen Heiz- oder Kühlprogrammes verändert wird. Die differentielle Wärmekapazität $\Delta C_p(T)$ kann durch Division von $\Delta P(T)$ mit der Heizrate β erhalten werden. Im Thermogramm ergibt sich somit ein positives Signal gegenüber der Basislinie für einen endothermen Phasenübergang und ein entsprechend negatives Signal für einen exothermen Übergang. Zur Berechnung der Transitionsenthalpie ΔH wird Gl. 2.8 verwendet:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p dT \quad (2.8)$$

2.4 Hochdruckuntersuchungen mit Hilfe der Diamantstempelzelle

Das effektivste und am einfachsten zu bedienende Gerät zur Erzeugung hoher hydrostatischer Drücke in der FTIR-Spektroskopie ist die Diamantstempelzelle (DAC, Weir et al., 1959; Jayaraman, 1983), welche schematisch in Abb. 2.5 dargestellt ist. Ihre Funktionsweise ist sehr einfach. Die Kraft wird durch Kompression einer Feder generiert, welche dann mittels eines metallenen Übertragungsarmes auf die Diamantstempel übertragen wird. Nun drückt der obere Diamantstempel auf die Probe, welche durch einen Abstandhalter und dem unteren Diamantstempel gehalten wird (Van Valkenburg, 1962). Dieser Abstandhalter besteht normalerweise aus einer runden Scheibe aus rostfreiem Stahl und besitzt eine zentrale Bohrung, auf welcher die Probe appliziert wird. Die Dicke des Abstandhalters hängt von der optischen Dichte der Probe als auch von dem intendierten Druck ab, aber typische Werte für biophysikalische Anwendungen sind 30-50 μm bei Verwendung von D_2O als Solvens und Drücken von 10-15 kbar. Einer der Hauptvorteile dieser Vorrichtung ist der äußerst geringe Probenbedarf, da wenige μl für die einmalige Befüllung der Zelle ausreichend sind. Tatsächlich beträgt das effektive Volumen nur ca. 10 nl bei einer Schichtdicke von 50 μm und einer Bohrung mit 0,45 mm Durchmesser, da der Rest der Probe beim Schließen der Zelle herausgedrückt wird.

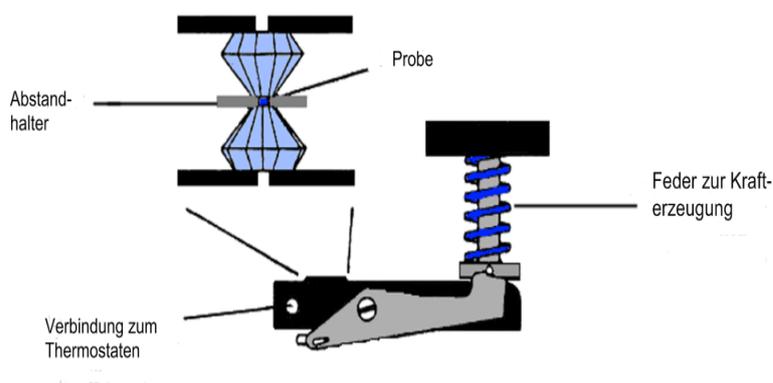


Abb. 2.5: Schematische Darstellung einer Diamantstempelzelle zur Anwendung in der Hochdruck-FTIR-Spektroskopie.

Hinsichtlich der verwendeten Diamanten haben sich Typ IIa Diamanten besonders bewährt, da diese aus reinem Kohlenstoff und frei von spektroskopisch störenden Verunreinigungen sind (Wong & Klug, 1983).

2. Methoden

Zur Bestimmung des Drucks innerhalb der DAC muß auf indirekte Methoden zurückgegriffen werden, da der Anschluß eines Manometers nicht möglich ist. Mögliche Methoden sind die Verwendung der R_1 -Fluoreszenz von Rubinsplintern (Piermarini et al., 1975), die Nutzung der Phononbanden von α -Quarz (Wong et al., 1985) oder der symmetrischen Sulfatstreckschwingung von $BaSO_4$ (Wong & Moffat, 1989). Die Rubinfluoreszenz ist zum einen wenig praktikabel, da für jede Druckbestimmung das Instrument gewechselt werden muß, da sich die Fluoreszenzbande im UV-VIS-Bereich befindet; zudem ist die druckinduzierte Linienverschiebung nicht sensitiv genug für die im biophysikalischen Bereich verwendeten Drücke. Daher verbleiben α -Quarz und $BaSO_4$ als mögliche Kalibriersubstanzen. Im Rahmen dieser Arbeit hat sich $BaSO_4$ als überlegen herausgestellt, da es eine deutlich schärfere Bande bei $\sim 983 \text{ cm}^{-1}$ produziert, welche eine lineare Blauverschiebung von $0,41 \text{ cm}^{-1}/\text{kbar}$ zeigt. Die Druckgenauigkeit liegt bei $\pm 300 \text{ bar}$, welches für die meisten Anwendungen hinreichend ist. Bei Temperaturerhöhung zeigt sich hingegen eine Rotverschiebung, deren genaues Ausmaß von der chemischen Umgebung abhängig ist.

3. Experimentelles

3.1 Untersuchung des *p,T*-Phasenverhaltens der Systeme DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%) und DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1)

3.1.1 Probenpräparation

Für die Herstellung der DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%)-Modellmembran wurden Dipalmitoylphosphatidylcholin und Ergosterin von Avanti Polar Lipids (Birmingham, USA) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%) Mischung wurde durch Lösen der entsprechenden Lipidmengen in Chloroform hergestellt. Anschließend wurde das Chloroform unter trockenem Stickstoffstrom verdampft. Restmengen des Lösungsmittels wurden durch 48-stündige Lyophilisation entfernt. Das so erhaltene Lyophilisat wurde in Puffer (s.u.) gelöst und durch 8 konsekutive Gefrier-Tau-Zyklen homogenisiert, wodurch vollständig hydratisierte, multilamellare Vesikel entstanden.

Für die Herstellung der DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1)-Modellmembran wurden DPPC und DOPC von Avanti Polar Lipids und Cholesterin von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) verwendet. Wie bereits beschrieben, wurden die Lipide in den entsprechenden Mengen in Chloroform gelöst, und dieses durch Stickstoffstrom und 24-stündige Lyophilisation evaporiert. Nach Lösen in Puffer (s.u.) wurde die Probe durch 6 konsekutive Gefrier-Tau-Zyklen homogenisiert.

3.1.2 FTIR-Spektroskopie

Für die Bestimmung des Phasenverhaltens der DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%)-Modellmembran wurde eine 10% (w/v) Dispersion in 50 mM Tris- oder Phosphatpuffer (pH 7,2 in D₂O (99,8 % isopenrein, Sigma-Aldrich) hergestellt. Tris-Puffer wurde für die Hochdruckmessungen und Phosphatpuffer für die temperaturabhängigen Messungen eingesetzt, da sich die jeweiligen Druck- bzw. Temperaturabhängigkeiten der pK_a -Werte stark unterscheiden (Neumann et al., 1973). Die temperaturabhängigen Messungen wurden mit einem Nicolet 5700 FTIR-Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Der verwendete MCT-Detektor (HgCdTe) wurde durch flüssigen Stickstoff gekühlt. Die Probe (Volumen: ~ 20 µl) wurde zwischen CaF₂-Fenster gefüllt, welche durch eine 50 µm starke Mylarfolie separiert wurden. Zwecks Temperaturregulierung wurde die Zelle in einen thermostatisierten Stahlmantel mit interner Temperaturkontrolle überführt, wobei ein externes Wasserbad zur Temperaturregulierung eingesetzt wurde ($\Delta T = \pm 0,2$ °C). Zur Verminderung spektralen Rauschens wurde die Proben-

3. Experimentelles

kammer kontinuierlich mit trockener Luft gespült. Die Spektren wurden im Wellenzahlbereich von 4000 bis 1100 cm^{-1} aufgenommen. Um präzise Bandenpositionen und ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wurden pro Meßtemperatur 256 Spektren mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} aufsummiert. Zur Apodisierung wurde eine Happ-Genzel-Funktion verwendet. Im Temperaturbereich zwischen 7 und 45 °C und von 70 bis 80 °C wurden in 1 °C-Schritten Spektren aufgenommen, während zwischen 45 und 70 °C das Meßintervall auf 0,5 °C reduziert wurde, da mindestens einer der Phasenübergänge bei Atmosphärendruck in diesem Bereich stattfinden sollte (Hsueh et al., 2005). Vor jeder Messung fand eine Temperaturäquilibrierung von 6 Minuten Dauer statt. Die Bandenpositionen wurden mit zwei signifikanten Dezimalstellen mit Hilfe der Spektrenauswertesoftware OMNIC 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ermittelt.

Die druckabhängigen Messungen für das DPPC-Ergosterin-System wurden mit einem Nicolet MAGNA 550 FTIR-Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Als Druckzelle kam eine High Pressure Diamond Optics P-Serie Diamantstempelzelle mit Typ IIa-Diamanten zum Einsatz (High Pressure Diamond Optics Inc., Tucson, USA). Ein 50 μm dicker Abstandhalter aus rostfreiem Stahl mit einer 0,45 mm durchmessenden Bohrung wurde zwischen beiden Diamanten platziert, auf welchem mehrere μl der Probe pipettiert wurden. Das Endvolumen in der geschlossenen Zelle betrug ~ 10 nl. Der Druck innerhalb der Zelle wurde auf ± 300 bar genau mittels coappliziertem BaSO_4 bestimmt (siehe Kap. 2.4). Spektren wurden im Bereich von 4000 bis 650 cm^{-1} aufgenommen. Thermostatisierung wurde mittels eines externen Wasserbades erzielt, und die Temperatur wurde mittels eines internen Digitalthermometers bestimmt ($\Delta T = \pm 0,5$ °C). Alle anderen technischen Parameter waren identisch zu denen der temperaturabhängigen Messungen. Hochdruckmessungen wurden bei 20, 35, 45, 60 und 70 °C durchgeführt.

Die temperatur- und druckabhängigen Messungen für das DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1)-System wurden in identischer Weise durchgeführt. Als Puffersysteme für die druck- und temperaturabhängigen Messungen kamen entsprechend 10 mM Bis-Tris- bzw. Phosphatpuffer (pH 7,0 in D_2O) zum Einsatz. Die temperaturabhängigen Messungen wurden von 7 bis 15, von 26 bis 35 und von 45 bis 80 °C in 1 °C-Schritten durchgeführt, während zwischen 15 und 25 sowie von 35 bis 45 °C das Meßintervall zur präziseren Bestimmung der Phasenübergänge auf 0,5 °C reduziert wurde. Druckabhängige Messungen wurden bei 20, 30, 40, 50 und 60 °C durchgeführt. Die Lipidkonzentration betrug in allen Fällen 10 % (w/v).

3.2 *p,T*-Messungen an der Peroxidase MsP1 aus *Marasmius scorodoni*us

3.2.1 FTIR-Spektroskopie

1 ml einer aufgereinigten Enzymlösung in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) oder 30 mM Bis-Tris-Puffer (pH 5,8; $c = 9,6$ mg/ml) von wurden vom Arbeitskreis Technische Biochemie (Prof. Dr. H. Zorn) der TU Dortmund erhalten. Die Lösungen wurden separat über Nacht lyophilisiert und das Lyophilisat in 200 μ l D₂O resuspendiert. Die endgültige Proteinkonzentrationen wurden zu 2,1 % bzw. 4,4 % (w/v) mittels UV-Spektroskopie bei $\lambda = 280$ nm bestimmt. Für die temperaturabhängigen Messungen (mit Phosphatpuffer) wurde ein Intervall zwischen 10 und 80 °C mit 5 °C-Inkrementen gewählt, wobei die Äquilibrierungszeit vor jeder Messung 15 min betrug. Die druckabhängigen Messungen wurden mit Bis-Tris-Puffer bei 30 und 60 °C durchgeführt. Hinsichtlich aller anderen technischen Parameter siehe Kap. 3.1.2.

Spektralprozessierung und Dekonvolution der Amid-I'-Bande wurden mit dem Programmpaket GRAMS/AI 8.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Nach Subtraktion von spektralem Rauschen und dem temperaturkorrespondierenden Pufferhintergrund (D₂O) wurden sämtliche Spektren auf dieselbe Fläche normalisiert, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Hiernach wurden die jeweiligen Amid-I'-Banden mit der Zahl von Subbanden iterativ angepaßt, welche in der zweiten Ableitung detektiert wurden. Als Bandenform wurde eine Voigtfunktion gewählt. Die Zuordnung der Banden zu den jeweiligen Sekundärstrukturelementen geschah gemäß Tab. 2.2.

3.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die temperaturabhängigen fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden an einem Perkin Elmer LS 55 Fluoreszenzspektrometer (PerkinElmer Inc., Waltham, USA), und die druckabhängigen Messungen an einem ISS K2 Multifrequenzphasen- und Modulationsfluorimeter (ISS Inc., Champaign, USA) durchgeführt. Für die temperaturabhängigen Messungen wurde die Probe, bestehend aus ~ 300 μ l einer 0,5 mg/ml Enzymlösung in 50 mM Phosphatpuffer (H₂O, pH 6,0), in Küvetten mit einem Durchmesser von 3 mm und Quarzglasfenstern überführt. Temperaturkontrolle wurde mittels eines externen Wasserbades erzielt. Fluoreszenzspektren wurden in 5 °C-Schritten aufgenommen und die Temperatur anschließend um die unabhängig gemessene Temperaturdifferenz zwischen Wasserbad und Küvette korrigiert. Vor jeder Messung wurde eine Äquilibrierungszeit von 5 Minuten eingehalten. Die Tryptophanreste des Proteins wurden mit Licht der Wellenlänge von 295 nm angeregt und die resultierende Fluoreszenz im Intervall zwischen 307 und 400 nm aufgezeichnet. Die druckabhängigen Messungen wurden bei 30 °C in einer speziell angefertigten,

thermostatisierbaren Hochdruckzelle aus einer Beryllium-Kupfer-Legierung mit Ethanol als Druckmedium durchgeführt. 1 ml einer Enzymlösung mit einer Konzentration von 1,3 mg/ml in 30 mM Bis-Tris-Puffer (pH 5,8) wurden in eine druckresistente Quarzküvette gefüllt und mit hitze- und lösemittelbeständigem Film fest verschlossen. Die Druckerzeugung geschah mittels eines externen Manometers ($\Delta p = \pm 10$ bar). Spektren wurden in 100 bar Inkrementen bis hinauf zu 2200 bar aufgenommen, wobei die Druckäquilibrierungszeit 5 Minuten betrug. Nach Subtraktion des Pufferhintergrundes wurden sowohl bei den temperatur- als auch bei den druckabhängigen Messungen die Änderungen des Emissionsverhaltens durch Berechnung des CSM gemäß Gl. 2.7 beobachtet.

3.2.3 Differentialkalorimetrie

Für die DSC-Analytik wurde eine Enzymlösung mit einer Konzentration von 0,19 % (w/v) in 50 mM Phosphatpuffer (H₂O, pH 6,0) verwendet. Messungen wurden in zweifacher Ausführung mit einem VP DSC Kalorimeter (MicroCal, Northampton, USA) durchgeführt. Die Probenzelle des Kalorimeters wurde mit 0,5 ml Enzymlösung befüllt, während in die Referenzzelle das entsprechende Volumen Puffer eingefüllt wurde. Der differentielle Wärmestrom (entsprechend der differentiellen Heizleistung) wurde zwischen 10 und 100 °C bei einer Heizrate von 40 °C/h registriert. Die Datenaufnahme und -auswertung geschah mittels einer speziellen Version von ORIGIN 7.0 (MicroCal, Northampton, USA).

3.3 Hochdruckmessungen an der Ankyrindomäne des Notch-Rezeptors aus *D. melanogaster*

3.3.1 Hochdruck-FTIR-Spektroskopie

Rekombinant hergestelltes Nank₁₋₇ (zwei interne Cysteine wurden gegen Serinreste ausgetauscht) wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. C.A. Royer, Zentrum für Strukturbiochemie der Universität Montpellier, erhalten. Eine Proteinlösung mit einer Konzentration von 2 % (w/v) in 50 mM Tris-Puffer mit 150 mM NaCl (D₂O, pH 8,0) ohne oder mit 2,0 bzw. 2,35 M ¹³C-Harnstoff (Sigma-Aldrich) als denaturierendes Agens wurden für die Hochdruckmessungen verwendet. Alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt. Die weiteren technischen Details sind identisch zu jenen in Kap. 3.1.2. Spektrenanalyse und -dekonvolution wurde mit GRAMS/AI 8.0 wie in Kap. 3.2.1 beschrieben durchgeführt.

3.4 *p, T*-Messungen an linearem PNIPAM und diversen Hydrogelen

3.4.1 FTIR-Spektroskopie

Lösungen von linearem PNIPAM, vernetztem PNIPAM (1,5 % w/w BIS als Quervernetzer), vernetztem Copolymer aus 45 mol-% NIPAM und 55 mol-% DEAAM (6 % w/w BIS als Quervernetzer) und von einem Homopolymergemisch aus vernetztem PNIPAM und PDEAAM (60 zu 40 mol-%, 1,5 % BIS als Quervernetzer), alle mit einer Polymer-/Hydrogelkonzentration von 2 % (w/v) in D₂O, wurden vom Lehrstuhl Physikalische Chemie II der RWTH Aachen (Prof. Dr. W. Richtering) erhalten. Die jeweiligen temperaturabhängigen Messungen wurden im Intervall zwischen 10 und 80 °C durchgeführt, wobei die Temperaturäquilibrierungszeit vor jeder Messung 15 min betrug. Die druckabhängigen Messungen wurden für jedes System bei 10, 20, 30, 40 und 50 °C vorgenommen. Alle weiteren technischen Parameter waren identisch zu den in Kap. 3.1.2 beschriebenen. Spektrenauswertung und -dekonvolution wurde mit GRAMS/AI 8.0 gemäß dem in Kap. 3.2.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt, wobei folgende Bandenzuordnung erfolgte (Tab. 3.1, Keerl et al., 2008)

Tab. 3.1: Zuordnung der Amid-I'-Banden von PNIPAM und PNIPAM-PDEAAM-Hydrogelen zu verschiedenen H-Brückenmustern.

Bandenzuordnung	Wellenzahl / cm⁻¹
Intramolekulare H-Brücken (Carbonylgruppen zu Amiddeuteronen)	1642-1652
Carbonylgruppen in gemischt hydrophiler/hydrophober Umgebung	1617-1628
Intermolekulare H-Brücken (Carbonylgruppen zum Solvens D ₂ O, mehrere Banden möglich)	1580-1612

3. Experimentelles

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungen des p,T -Verhaltens von Modellipidmembranen

4.1.1 Das System DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%)

Um strukturelle Änderungen des Lipiddoppelschichtsystems, insbesondere Änderungen in der konformationellen Ordnung der Acylketten, zu beobachten, wurde die Position des Absorptionsmaximums der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung bei ca. 2850 cm^{-1} bestimmt (siehe auch Tab. 2.1). Änderungen in der Steigung des Wellenzahl-Temperatur- bzw. Wellenzahl-Druck-Graphen geben Auskunft über Phasenübergänge, da sie Informationen über Änderungen in dem *trans/gauche*-Verhältnis und über Knicke in der Acylkette geben. Dieser Ansatz wurde bereits erfolgreich bei der Untersuchung von temperatur- und druckinduzierten Phasenübergängen von Phospholipiddoppelschichten eingesetzt (Mantsch & McElhaney, 1991; Reis et al., 1996; Czeslik et al., 1998; Reis & Winter, 1998; Nicolini et al., 2006a,b). In Abwesenheit eines Phasenübergangs führt der elastische Druckeffekt mit zunehmendem Druck lediglich zu einer linearen Blauverschiebung der Frequenz bzw. Wellenzahl der IR-Banden. Mit zunehmender Temperatur wird ein ähnlicher Effekt beobachtet, welcher auf zunehmende elastisch-repulsive Wechselwirkungen zwischen den Acylketten zurückzuführen ist. Diese entstehen durch die thermisch induzierte, entropiegesteuerte Abstoßung der Lipidmoleküle untereinander. Änderungen im Wellenzahl-Temperatur- oder Wellenzahl-Druck-Graphen können auch nichtlinear sein, z.B. sigmoidal in solchen Regionen, in denen eine hochgeordnete Phase sich in eine größtenteils Ungeordnete umwandelt, wobei ein mehr oder weniger breites Zweiphasenkoexistenzgebiet passiert wird.

Abb. 4.1.1 zeigt den entsprechenden Wellenzahl-Temperatur-Graphen der isobaren FTIR-Messung bei Atmosphärendruck (1 bar) von 7-80 °C. Bis 41 °C zeigt die Wellenzahl der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung einen linearen Anstieg bei zunehmender Temperatur ohne erkennbare Änderungen in der Steigung. Bei ~ 41 °C ändert sich der Verlauf des Graphen drastisch und wird sigmoidal, was, in Übereinstimmung mit den Literaturdaten (Hsueh et al., 2005), charakteristisch für den Übergang von der l_o+s_o -Zweiphasenregion zu einem neuen Zweiphasenkoexistenzgebiet, der l_d+l_o -Region, ist, welche nun auch flüssig-ungeordnete Domänen beinhaltet. Diese Region reicht bis ca. 57,5 °C, wo der sigmoidale Verlauf wieder in einen linearen übergeht, und die l_d+l_o -Region sich in eine reine l_d -Phase umwandelt, welche bis zur höchsten gemessenen Temperatur von 80 °C bestehen bleibt. Die Änderung des Kurvenverlaufs ist deutlich weniger prominent als bei ~ 41 °C, da die korrespondierenden Änderungen in der Ordnung der Acylketten weniger ausgeprägt sind. Insgesamt sind die

4. Ergebnisse und Diskussion

erhaltenen Daten in sehr guter Übereinstimmung mit dem bereits publizierten Phasendiagramm für das DPPC-Ergosterin-Gemisch (Hsueh et al., 2005), und werden zudem durch Ergebnisse von Röntgenkleinwinkelstreuungsmessungen (SAXS) bestätigt (Abb. 4.1.2, Pühse et al., 2008).

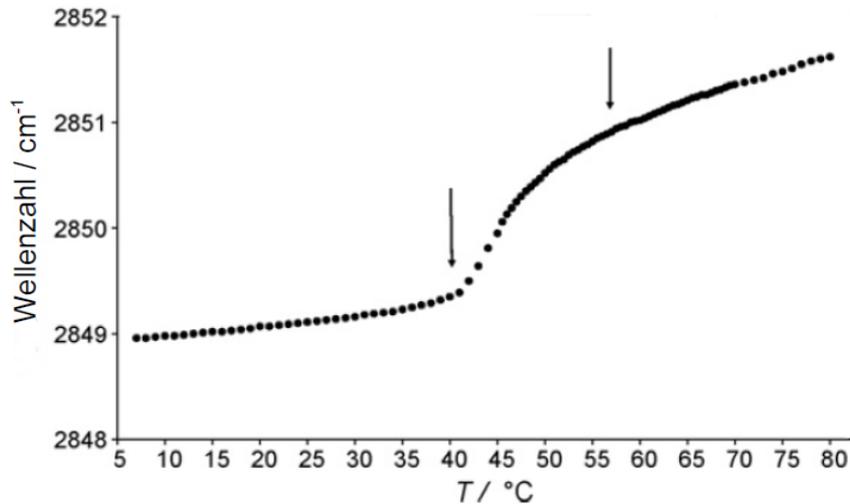


Abb. 4.1.1: Temperaturabhängigkeit der Position des Absorptionsmaximums der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung des Systems DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%) bei Atmosphärendruck (1 bar). Die schwarzen Pfeile kennzeichnen Steigungsänderungen, die auf Phasenübergänge zurückgeführt werden können.

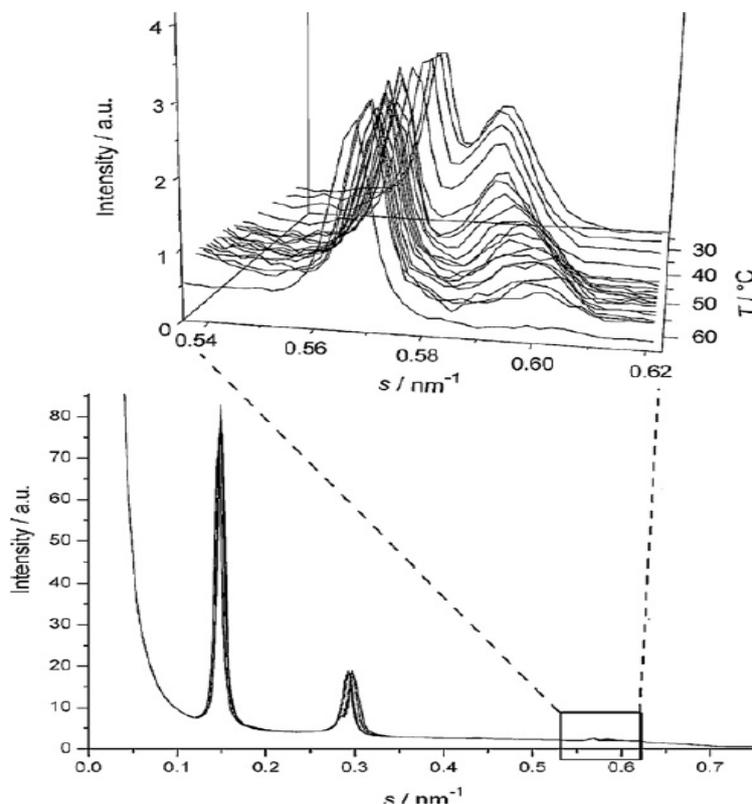


Abb. 4.1.2: SAXS-Streumuster der temperaturabhängigen Messung bei Atmosphärendruck (1 bar) der Mischung DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%). Die Braggreflexe 4. Ordnung sind vergrößert gezeigt, da sie die beste Signalseparation der beiden Phasen zeigen. Man sieht deutlich die Präsenz von zwei Phasen bis ~ 60 °C, wobei die bei hoher Temperatur Verschwindende der l_o -Phase, und die andere der s_o - bzw. l_d -Phase zugeordnet werden kann. Abbildung nach Pühse et al., 2008 (Messung durchgeführt von C. Jeworrek).

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse dreier repräsentativer druckabhängiger FTIR-Messungen (20, 45 und 60 °C) sind in Abb. 4.1.3 dargestellt (alle übrigen Messungen finden sich im Anhang). Bei 20 °C ist lediglich eine Steigungsänderung bei ~ 3200 bar erkennbar, welche vermutlich auf die $l_o+s_o \rightarrow s_o$ -Transition zurückgeführt werden kann (Eine Koexistenz zweier s_o -Phasen kann praktisch ausgeschlossen werden, da SAXS-Messungen bei 10 °C und dem entsprechenden Phasenübergang lediglich die Existenz einer Phase anzeigen, Pühse et al., 2008). Im Gegensatz hierzu zeigen die Wellenzahl-Druck-Graphen bei 45 und 60 °C zwei bzw. drei Phasenübergänge. Bei 45 °C kann der erste Übergang bereits bei ~ 300 bar detektiert werden, wobei es sich mit aller Wahrscheinlichkeit um die $l_d+l_o \rightarrow l_o+s_o$ -Transformation handelt. Eine zweite Transition ist bei ~ 2900 bar detektierbar, wo sich entsprechend die l_o+s_o -Region in eine reine s_o -Phase umwandelt. Die 60 °C-Messung zeigt den ersten Phasenübergang bei ~ 200 bar, welcher die Transformation der flüssigkristallinen l_d -Phase zu einem Zweiphasenkoexistenzgebiet, l_d+l_o , markiert. Weitere Übergänge erscheinen bei ~ 1400 und ~ 4600 bar, welche auf die $l_d+l_o \rightarrow l_o+s_o$ - bzw. $l_o+s_o \rightarrow s_o$ -Konversionen zurückgeführt werden können.

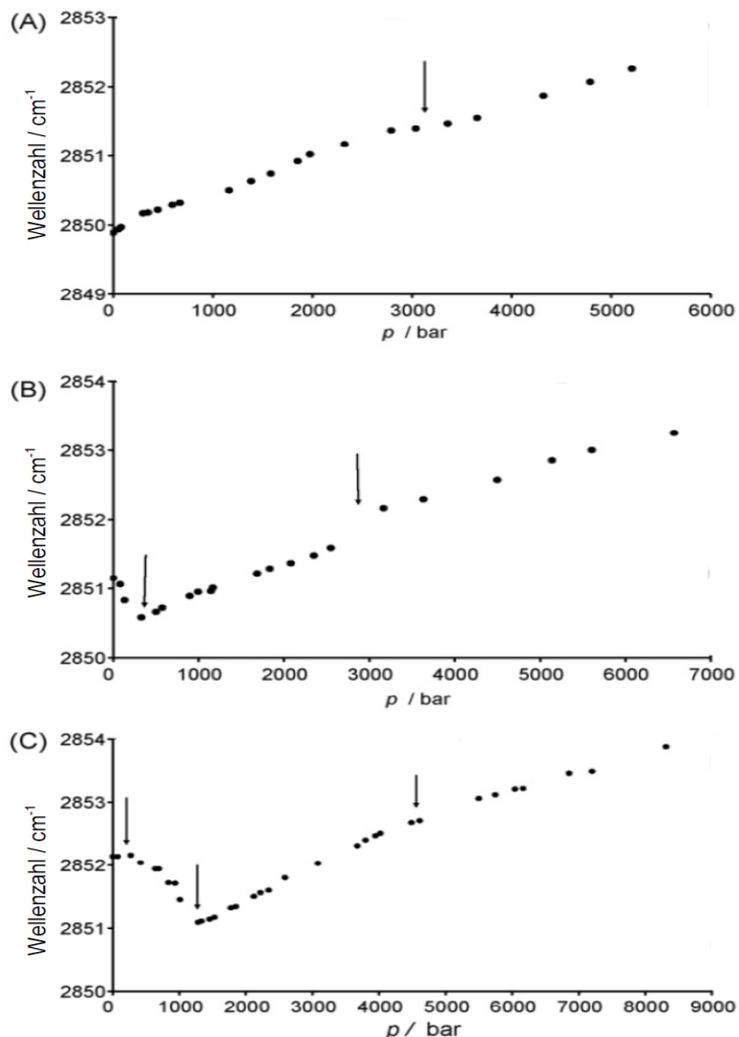


Abb. 4.1.3: Druckabhängigkeit der Position des Absorptionsmaximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingung des Systems DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%) bei drei verschiedenen Temperaturen: 20°C (A), 45 °C (B) und 60 °C (C). Schwarze Pfeile kennzeichnen Phasenübergänge.

4. Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abb. 4.1.3 gesehen werden kann, ist insbesondere die Phasenumwandlung $l_o+s_o \rightarrow s_o$ relativ schwierig zu erkennen, da aufgrund der recht ähnlichen Acylkettenordnungszustände der beteiligten Phasen nur geringe Änderungen in der Steigung des $\tilde{v}(p)$ -Graphen resultieren. Somit sind die erhaltenen Transitionsdrücke weniger genau. Aus diesem Grund und auch zur Bestätigung der aus den FTIR-Daten gewonnenen Phasengrenzlinien wurden zusätzliche SAXS-Messungen durchgeführt, um ein zuverlässiges p,T -Phasendiagramm erstellen zu können. (Pühse et al., 2008). Erleichtert wird diese Aufgabe zudem durch die Gültigkeit der Gibbsschen Phasenregel:

$$F = K - P + 2 \quad (4.1)$$

F bezeichnet hier die Zahl der thermodynamischen Freiheitsgrade, K die Anzahl der das untersuchte System konstituierenden Komponenten und P die Zahl der maximal koexistierenden Phasen. Im System DPPC-Ergosterin sind somit zwei Komponenten vorhanden (das Solvens wird vernachlässigt, da es aus der hydrophoben Phospholipiddoppelschicht weitgehend ausgeschlossen ist), und die Anzahl der thermodynamischen Freiheitsgrade im p,T -Raum ist ebenfalls zwei. Damit ergeben sich maximal zwei gleichzeitig existierende Phasen in einem weiten Druck-/Temperaturbereich. Als Ergebnis aller Messungen in Kombination mit diesen Überlegungen ergibt sich das p,T -Phasendiagramm, welches in Abb. 4.1.4 dargestellt ist.

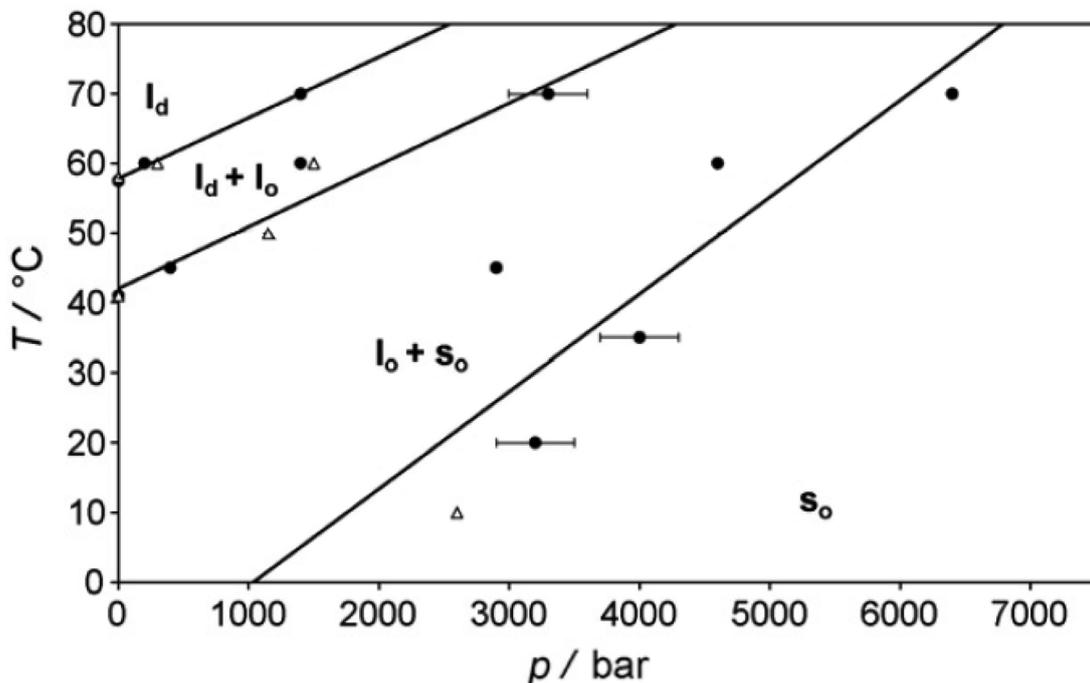


Abb. 4.1.4: p,T -Phasendiagramm für das System DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%) in Überschusswasser, erhalten aus den FTIR-Daten (●) und SAXS-Messungen (Δ). Ausgewählte Fehlerbalken zeigen die Unsicherheit der Druckbestimmung.

4. Ergebnisse und Diskussion

Das Phasendiagramm zeigt mehrere barotrope Phasenübergänge im gesamten abgedeckten p, T -Bereich, welcher von 7-80 °C und Drücken bis hinauf zu 8000 bar reicht. Die $l_d \rightarrow l_d+l_o$ - und $l_d+l_o \rightarrow l_o+s_o$ -Phasengrenzlinien weisen eine Steigung von 9 ± 1 °C/kbar auf, während die $l_o+s_o \rightarrow s_o$ -Grenzlinie deutlich steiler mit einer Steigung von 14-20 °C/kbar verläuft und sich somit in derselben Größenordnung befindet wie Phasenübergänge von gesättigten Phospholipiden. Der lamellar-flüssigkristallin \rightarrow Gel-Übergang ($L_\alpha \rightarrow P_\beta$) in reinem DPPC weist jedoch, wie bereits in Kap. 1.2.2 erwähnt, eine noch etwas steilere Phasengrenzlinie mit einer Steigung von 22 °C/kbar auf. Im Einklang mit der Clausius-Clapeyron-Gleichung (Gl. 1.3) können die hier beobachteten, kleineren Steigungen durch eine positivere Transitionsenthalpie ΔH und/oder einen kleineren Volumengewinn ΔV erklärt werden. In dem vorliegenden Fall ist der letztere Faktor wahrscheinlich entscheidend, da die Volumenänderungen an denjenigen Übergängen als deutlich kleiner angenommen werden dürfen, bei denen sich jeweils ein Teil der flüssigen Phase in eine flüssig-geordnete- (l_o -) Phase umwandelt, welche nach wie vor einige fluide Eigenschaften besitzt. Ein stark reduziertes ΔV wurde in der Tat für das hier betrachtete System bei der $l_o+s_o \rightarrow l_d+l_o$ -Transformation gegenüber der $P_\beta \rightarrow L_\alpha$ -Umwandlung von reinem DPPC, jeweils bei 1 bar, gemessen (~ 16 ml/mol vs. ~ 29 ml/mol, Okoro & Winter, 2008). Analoge Überlegungen gelten auch für die Übergänge zwischen l_o - und s_o -Phasen.

Die aus physiologischer Sicht interessanteste Phase, nämlich die l_d+l_o -Koexistenzregion als Modell für eine lipidfloßähnliche, laterale Membranstruktur (siehe Kap. 1.3.1), erstreckt sich über einen breiten Temperaturbereich von ~ 17 °C im gesamten Druckbereich. Daher hat eine Temperatursenkung von 20 °C in dem l_d+l_o -Koexistenzbereich einen ähnlichen Effekt auf die Membranordnung und laterale Struktur wie eine Druckerhöhung um ~ 2 kbar. Interessanterweise kann in diesem Druckbereich ein zunehmender Funktionsverlust von Membranproteinen in einer Vielzahl von Systemen beobachtet werden (Chong et al., 1985; Janosch et al., 2002; Ulmer et al., 2002; Scarlata, 2005; Nicolini et al., 2006a,b; Powalska et al., 2007), was mit der Erreichung eines physiologisch nicht mehr kompatiblen, komplett geordneten Membranzustandes bei diesen Drücken korreliert werden kann.

Von einem mehr biotechnologischen Standpunkt aus gesehen kann eine solche Studie auch dazu beitragen, den minimalen Druck zur sicheren Inaktivierung von Mikroorganismen zu bestimmen. Zusätzlich zu der in Kap. 1.2.1 beschriebenen bakteriziden Wirkung von HHD wirkt dieser auch entsprechend fungizid (Perrier-Cornet et al., 2002, 2005). Es wird davon ausgegangen, daß, zusätzlich zu den bereits beschriebenen Effekten auf Proteine, der Übergang der Zellmembran in eine geordnete, gelartige Phase verantwortlich für die Abtötung von Mikroorganismen ist.

4.1.2 Das System DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1)

In Abb. 4.1.5 ist die Temperaturabhängigkeit der Position des Absorptionsmaximums der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung von 7-80 °C dargestellt. Bis 25 °C kann lediglich eine konstante, lineare Steigung beobachtet werden. Bei ~ 25 °C ändert sich der Kurvenverlauf drastisch, was auf die Transformation von einem $l_d+l_o+s_o$ -Dreiphasengebiet in ein Zweiphasenkoexistenzgebiet, der l_d+l_o -Phase, zurückgeführt werden kann. Die Existenz eines Dreiphasengebietes ist nach Gibbsschen Phasenregel (Gl. 4.1) bei einem ternären Gemisch thermodynamisch möglich und wird auch durch SAXS-Messungen bestätigt (s.u.). Diese Region reicht bis ca. 45 °C, wo der sigmoidale Verlauf wieder linear wird, und eine reine l_d -Phase erreicht ist, welche bis 80 °C persistiert. Wie bereits beim beschriebenen DPPC-Ergosterin-System ist diese zweite Steigungsänderung des $\tilde{\nu}(T)$ -Graphen weniger ausgeprägt, da auch hier die Änderungen der Acylkettenordnung weniger prononciert sind. Diese Zuordnungen werden durch SAXS-Messungen bestätigt, welche in Abb. 4.1.6 dargestellt sind (Jeworrek et al., 2008). Im Gegensatz zu den Messungen am DDPC-Ergosterin-Gemisch läßt sich die Zahl der das System konstituierenden Phasen aufgrund starker Signalüberlappung nicht direkt aus dem Diffraktogramm ablesen. Daher wird der temperaturabhängige Verlauf der lamellaren Gitterkonstanten gezeigt, welche aus den dekonvolvierten Signalen gewonnen wurden.

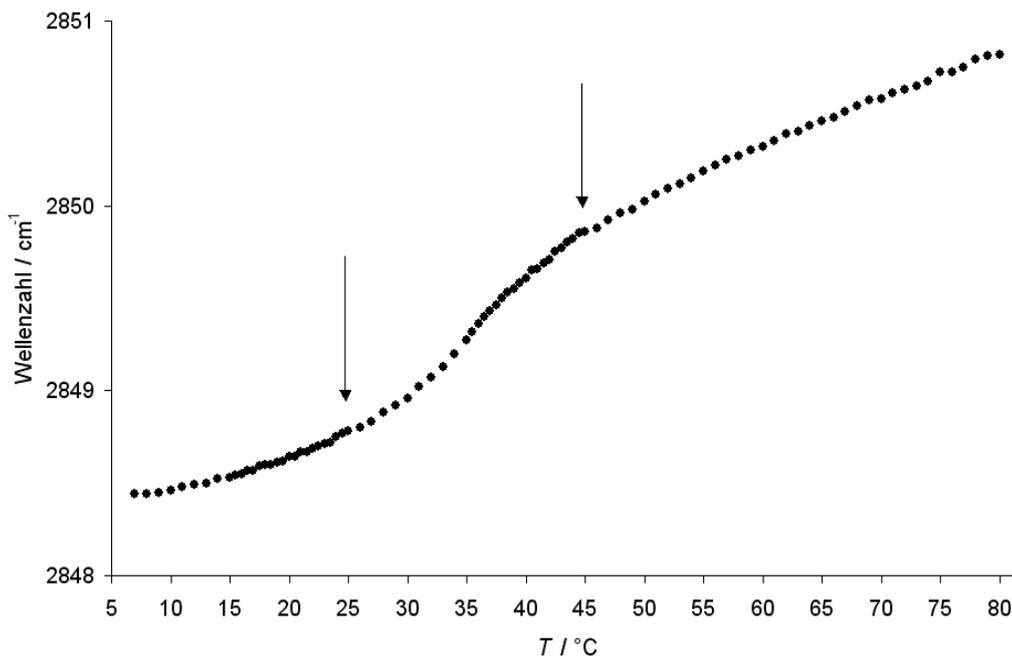


Abb. 4.1.5: Temperaturabhängigkeit der Position des Absorptionsmaximums der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung des Systems DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1) bei Atmosphärendruck (1 bar). Die schwarzen Pfeile kennzeichnen Phasentransformationen.

4. Ergebnisse und Diskussion

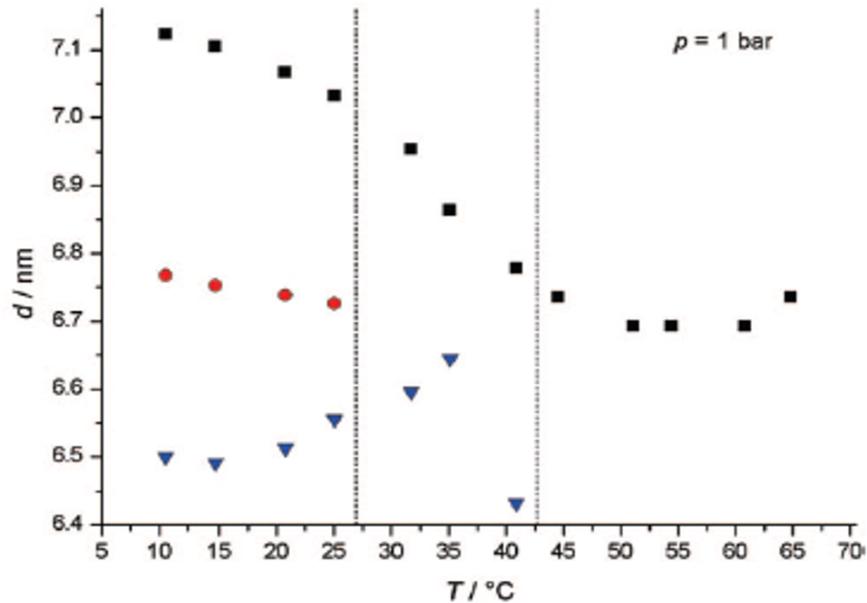


Abb. 4.1.6: Temperaturabhängigkeit der lamellaren Gitterkonstanten des Systems DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1) für die s_o -Phase (rote Kreise), die l_o -Phase (blaue Dreiecke) und die l_d -Phase (schwarze Quadrate). Die gestrichelten Linien zeigen die ungefähren Phasengrenzen. Abbildung nach Jeworrek et al., 2008 (Messung durchgeführt von C. Jeworrek).

Die Resultate repräsentativer, druckabhängiger FTIR-Messungen zeigt Abb. 4.1.7 (die Ergebnisse aller übrigen Messungen befinden sich im Anhang). Bei 20 °C zeigen sich zwei Änderungen in der Steigung des $\tilde{\nu}(p)$ -Graphen, die Erste bei ~ 3900 bar, während sich die Zweite bei ~ 5000 bar befindet. Die entsprechenden Phasentransformationen sind jeweils die $l_d+l_o+s_o \rightarrow l_o+s_o$ - und $l_o+s_o \rightarrow s_o$ -Umwandlungen. Hingegen zeigen sich bei 40 °C bereits drei Phasenübergänge, bei ~ 1300 bar ($l_d+l_o \rightarrow l_d+l_o+s_o$), ~ 5800 bar ($l_d+l_o+s_o \rightarrow l_o+s_o$) und ~ 6800 bar ($l_o+s_o \rightarrow s_o$). Die FTIR-spektroskopischen Daten bei 60 °C zeigen eine erste Steigungsänderung im Bereich von ~ 1000 bar, welche auf die $l_d \rightarrow l_d+l_o$ -Transition zurückgeführt werden kann. Weitere Transformationen erscheinen bei ~ 2300 bar, ~ 8000 bar und ~ 9200 bar, welche entsprechend von den $l_d+l_o \rightarrow l_d+l_o+s_o$ -, $l_d+l_o+s_o \rightarrow l_o+s_o$ - und $l_o+s_o \rightarrow s_o$ -Umwandlungen herrühren.

4. Ergebnisse und Diskussion

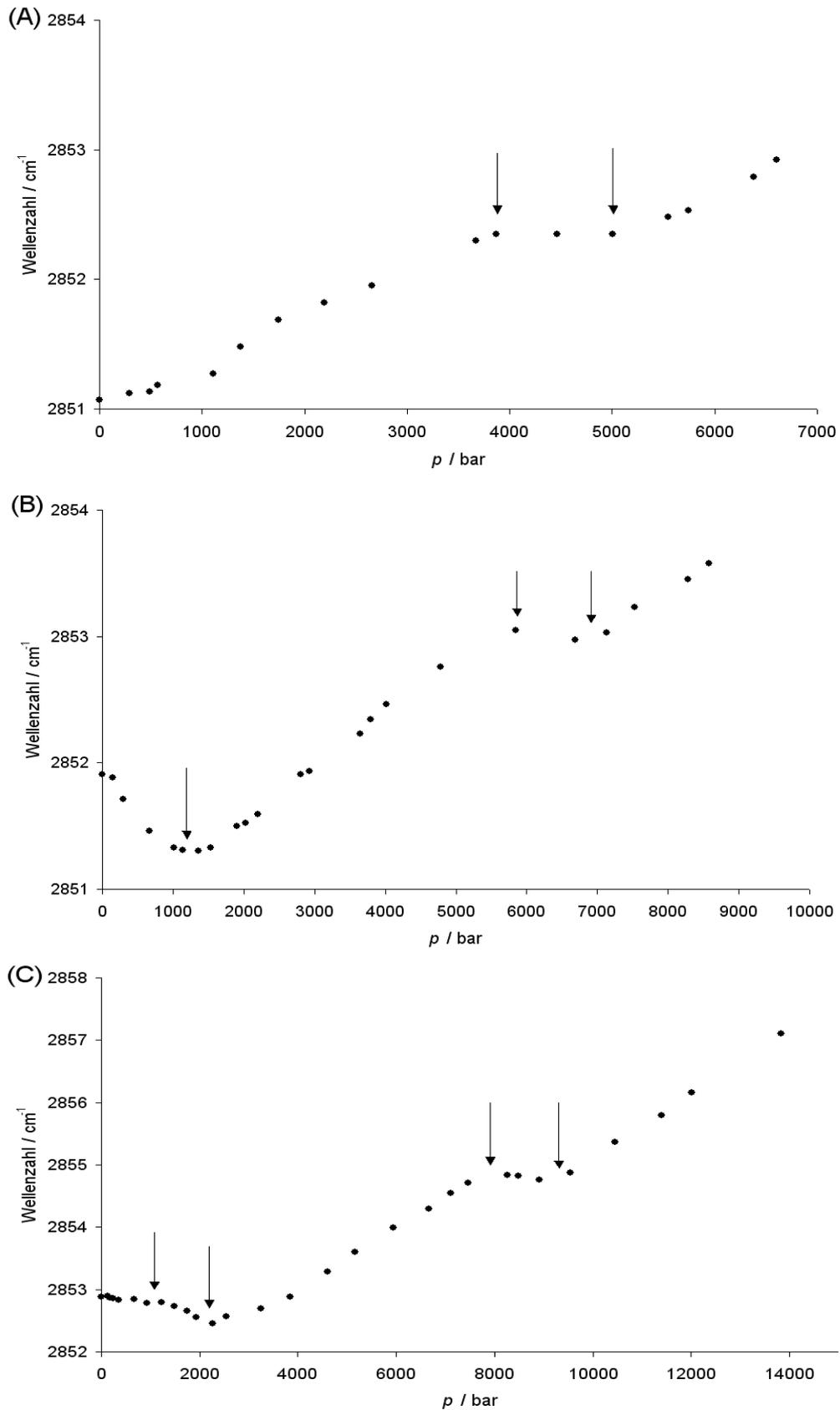


Abb. 4.1.7: Druckabhängigkeit der Position des Absorptionsmaximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingung des Systems DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1) bei drei verschiedenen Temperaturen: 20 °C (A), 40 °C (B) und 60 °C (C). Schwarze Pfeile kennzeichnen Phasenübergänge.

4. Ergebnisse und Diskussion

Wie bereits bei der Modellmembran DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%), so läßt sich auch hier aus der Kombination von FTIR- und SAXS-Messungen ein p,T -Phasendiagramm erstellen (Abb. 4.1.8). Die $l_d \rightarrow l_d+l_o$ - und $l_d+l_o \rightarrow l_d+l_o+s_o$ -Phasengrenzlinien weisen eine Steigung von 15 bzw. 17 °C/kbar auf, während die $l_d+l_o+s_o \rightarrow l_o+s_o$ - und $l_o+s_o \rightarrow s_o$ -Transitionen eine deutlich kleinere Drucksensitivität (~ 9 °C/kbar) besitzen. Im Gegensatz hierzu besitzt, wie bereits mehrfach erwähnt, die lamellar-flüssigkristallin \rightarrow Gel-Umwandlung von reinem DPPC eine Steigung von 22 °C/kbar, und auch die $l_o+s_o \rightarrow s_o$ -Transformation im Modellsystem DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%) verläuft deutlich steiler. Diese sehr geringen Steigungen können, wie bereits in Kap. 4.1.1 unter Rückgriff auf die Clausius-Clapeyron-Gleichung (Gl. 1.3) erwähnt, auf eine geringere Volumenänderung ΔV beim Phasenübergang zurückgeführt werden. Es ist anzunehmen, daß der Volumengewinn bei Phasenumwandlungen in diesem ternären Gemisch deutlich kleiner ist, da im Hinblick auf die $l_d+l_o+s_o \rightarrow l_o+s_o$ - und $l_o+s_o \rightarrow s_o$ -Umwandlungen zwei der drei beteiligten Phasen flüssig-geordnete oder fest-geordnete Charakteristika und damit ähnliche physikalische Eigenschaften aufweisen. Als zusätzliche Faktoren kommen noch die Ölsäurereste mit ihren beiden *cis*-monounsaturierten Acylketten hinzu, welche durch den hierdurch induzierten Knick in der molekularen Struktur weiteres Defektvolumen auch in den geordneten Phasen induzieren, was als Folge ΔV reduziert. Bei Betrachtung der $l_d \rightarrow l_d+l_o$ -Phasengrenzlinie fällt jedoch die größere Steigung im Vergleich zum DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%)-System auf (15 °C/kbar vs. 9 ± 1 °C/kbar). Auch hier spielen wahrscheinlich die ungesättigten Fettsäurereste des DOPC eine entscheidende Rolle, da, wie in Kap. 1.3.1 erwähnt, die l_o -Phase extrem mit gesättigten Phospholipiden angereichert ist, während die ungesättigten Phospholipide in der l_d -Phase verbleiben. Hierdurch wird die Volumendifferenz ΔV erhöht, da die DOPC-Moleküle in der homogenen l_d -Phase oberhalb der l_d+l_o -Phasengrenzlinie durch ihren Raumbedarf zusätzliches Defektvolumen erzeugen, welches bei binären DPPC-Steringemischen im Hochtemperatur-Einphasenbereich nicht vorhanden ist. Die Phasenseparation führt somit zu einer ausgeprägteren Volumenreduktion.

Die biologisch relevante l_d+l_o -Koexistenzregion weist hier einen nahezu konstanten Existenzbereich von ~ 20 °C bei allen betrachteten Drücken auf. Mitsamt den berechneten Steigungen der Phasengrenzlinien ergibt sich somit, daß eine Druckerhöhung von $\sim 1,2$ kbar einen ähnlichen membranphysikalischen Effekt wie eine Temperatursenkung um 20 °C induziert. In diesem Druckbereich beginnt auch eine deutliche Aktivitätsreduktion der Na^+ , K^+ -ATPase, was wahrscheinlich auf eine zu rigide, geordnete Membranstruktur zurückgeführt werden kann (Janosch et al., 2002). Hieraus können weitere Schlüsse auf die Druck- und Temperaturgrenzen für die Existenz eukaryotischen Lebens gezogen werden.

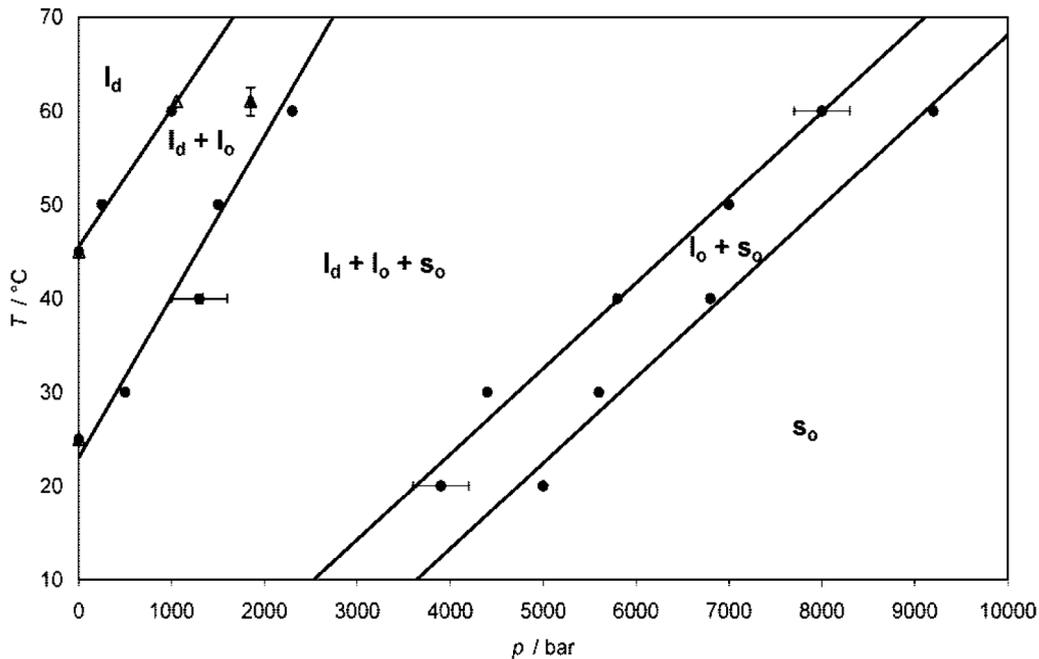


Abb. 4.1.8: p,T -Phasendiagramm für das System DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1) in Überschußwasser, erhalten aus den FTIR-Daten (●) und SAXS-Messungen (Δ). Ausgewählte Fehlerbalken zeigen die Unsicherheit der Druckbestimmung.

4.2 Untersuchung des p,T -Verhaltens der Peroxidase MsP1 aus *Marasmius scorodonium*

4.2.1 Temperatur- und druckabhängige FTIR-Messungen

Um Veränderungen in der Sekundärstruktur des Proteins zu untersuchen, wurde die Amid-I'-Region im Bereich zwischen 1700 und 1600 cm^{-1} spektralanalytisch ausgewertet. Wie bereits in Kap. 2.1.3 erwähnt, entsprechen die relativen Flächen der die Amid-I'-Region konstituierenden Subbanden in guter Näherung den jeweiligen Sekundärstrukturanteilen. Ein repräsentatives Beispiel der dekonvoluierten Amid-I'-Bande nach iterativer Kurvenanpassung zeigt Abb. 4.2.1. Aus der zweiten Ableitung lassen sich 4 Teilbanden im relevanten Bereich ableiten, und zwar bei ~ 1672 , ~ 1657 , ~ 1642 und $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$, welche gemäß Tab. 2.2 jeweils Schleifenstrukturen, α -Helices, ungeordneten Bereichen (Zufallsknäuel) und β -Faltblättern zugeordnet werden können. Bei Erhöhung der Temperatur unter Atmosphärendruck ändern sich die Positionen der Teilbanden nur unwesentlich, und auch die Position der Amid-I'-Bande bleibt nahezu konstant (Abb. 4.2.2). Wie aus der daraus folgenden Sekundärstrukturanalyse in Abb. 4.2.3 ersehen werden kann, ist MsP1 hochgradig α -helikal mit einem ungefähr gleichen Anteil an ungeordneten Strukturbereichen. Kleinere Anteile von Schleifen und intramolekularen β -Faltblättern sind ebenfalls präsent. Mit zunehmender Temperatur bei Atmosphärendruck kann bis $\sim 65\text{ °C}$ keine signifikante Veränderung hinsichtlich der Bandenflächen beobachtet werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Oberhalb dieser Temperatur fällt der α -helikale Anteil zunehmend ab, während der Anteil der ungeordneten Strukturen proportional ansteigt. Zusätzlich erscheint ab ~ 70 °C bei ~ 1617 cm^{-1} eine zusätzliche Bande, welche intermolekularen β -Faltblättern, charakteristisch für aggregierte Proteine, zugeordnet werden kann. Dieses Verhalten ist in guter Übereinstimmung mit der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität, welche ein Maximum zwischen 50 und 60 °C aufweist und oberhalb von 60 °C abrupt abnimmt (Pühse et al., 2009). Insgesamt jedoch sind die Sekundärstrukturänderungen bis zu 80 °C recht gering.

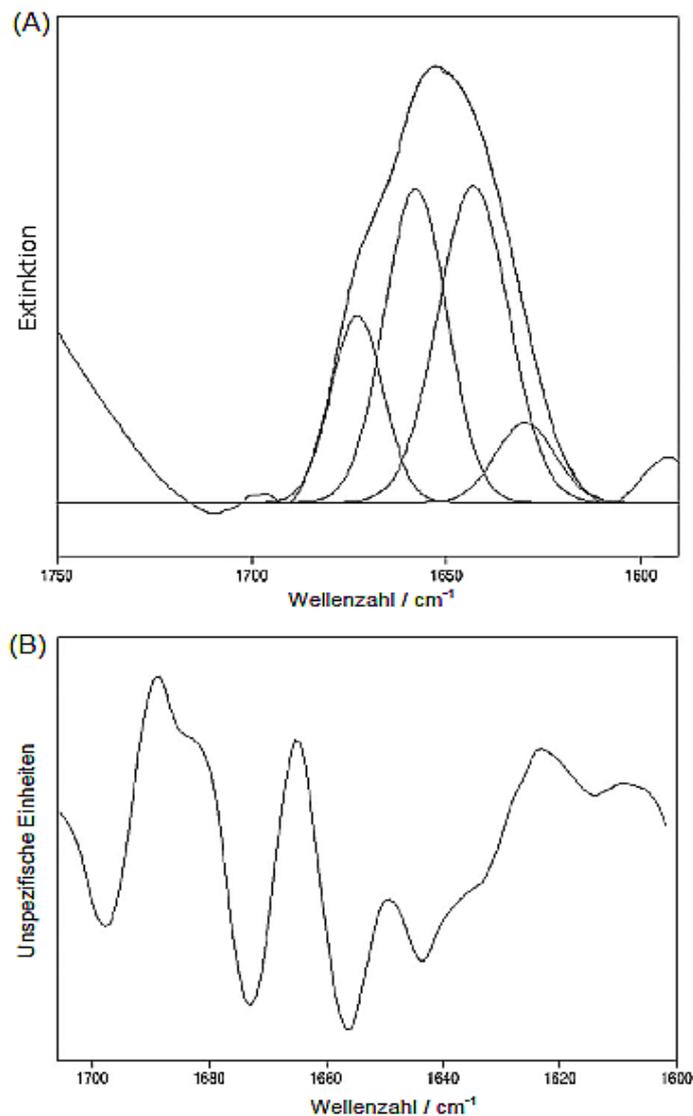


Abb. 4.2.1: (A) Dekonvolviertes und iterativ angepaßtes Amid-I'-FTIR-Spektrum von MsP1 bei 10 °C und Atmosphärendruck. (B) Korrespondierende zweite Ableitung. Negative Banden entsprechen den Positionen der Subbanden im FTIR-Spektrum.

4. Ergebnisse und Diskussion

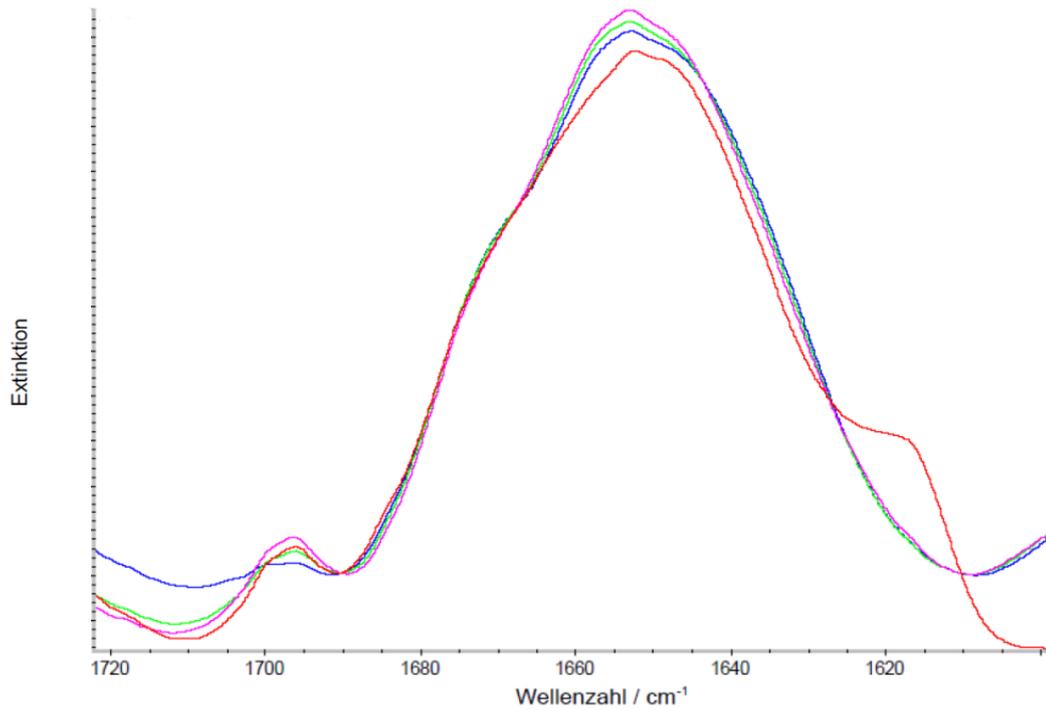


Abb. 4.2.2: Normierte Amid-I'-FTIR-Spektren von MsP1 bei 10 °C (Blau), 30 °C (Grün), 60 °C (Magenta) und 80 °C (Rot), jeweils bei Atmosphärendruck. Man beachte die Schulter im 80 °C-Spektrum bei ~ 1617 cm⁻¹, welche die Präsenz von Aggregaten anzeigt (siehe Text).

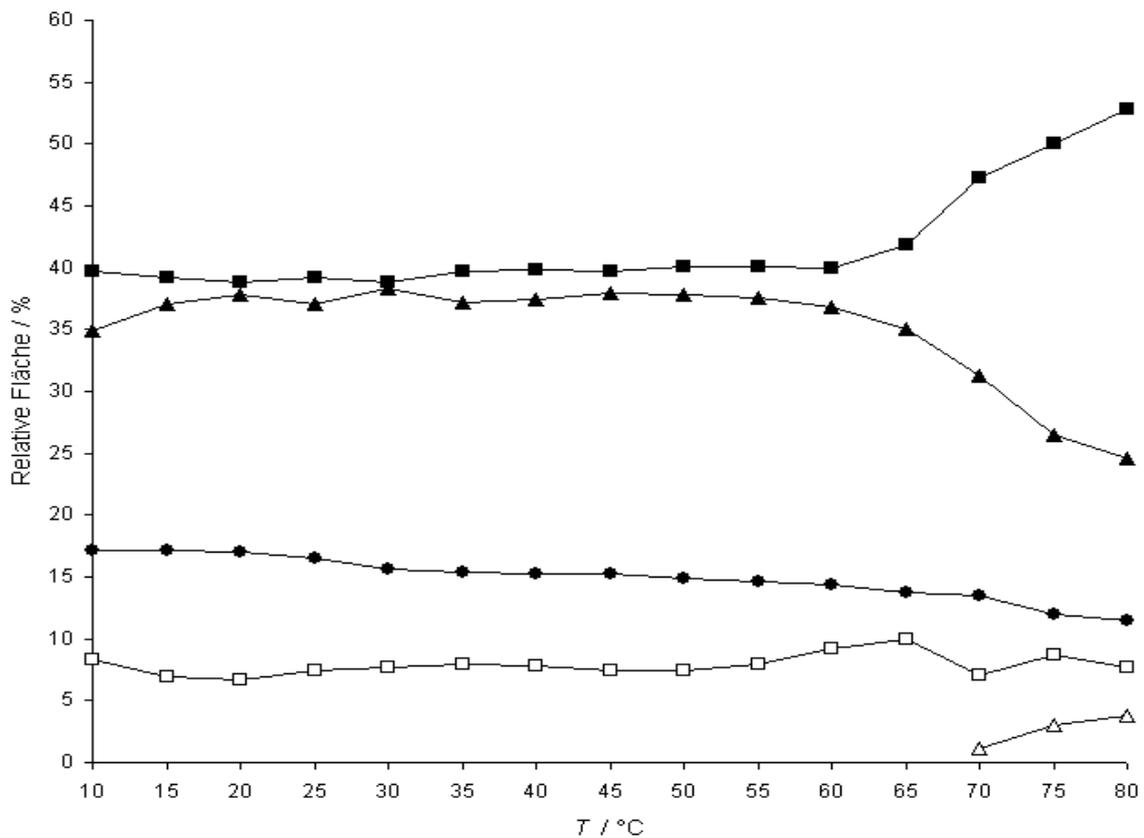


Abb. 4.2.3: Temperaturabhängigkeit der relativen Flächenanteile der Amid-I'-Subbanden von MsP1. Symbolzuordnung: ■ Ungeordnete Struktur (Zufallsknäuel), ▲ α-Helices, ● Schleifen, □ intramolekulare β-Faltblätter und Δ intermolekulare β-Faltblätter (Aggregate).

4. Ergebnisse und Diskussion

Mit zunehmendem hydrostatischen Druck bei 30 und 60 °C können nur geringfügige Änderungen in der Form und Position der Amid-I'-Region beobachtet werden. Dasselbe gilt für die diagnostischen Subbanden, ebenso sind keinerlei signifikante Änderungen in der Sekundärstruktur detektierbar (Abb. 4.2.4-4.2.7). Lediglich oberhalb von ~ 5000 bzw. ~ 8000 bar erfolgt ein leichter Anstieg des Anteils der ungeordneten Strukturen auf Kosten der α -Helices und der Schleifen. Im Gegensatz zur temperaturabhängigen Messung liegt von Beginn an ein geringer Anteil an Aggregaten vor, was wahrscheinlich auf die höhere notwendige Proteinkonzentration für FTIR-Messungen in der Diamantstempelzelle zurückgeführt werden kann.

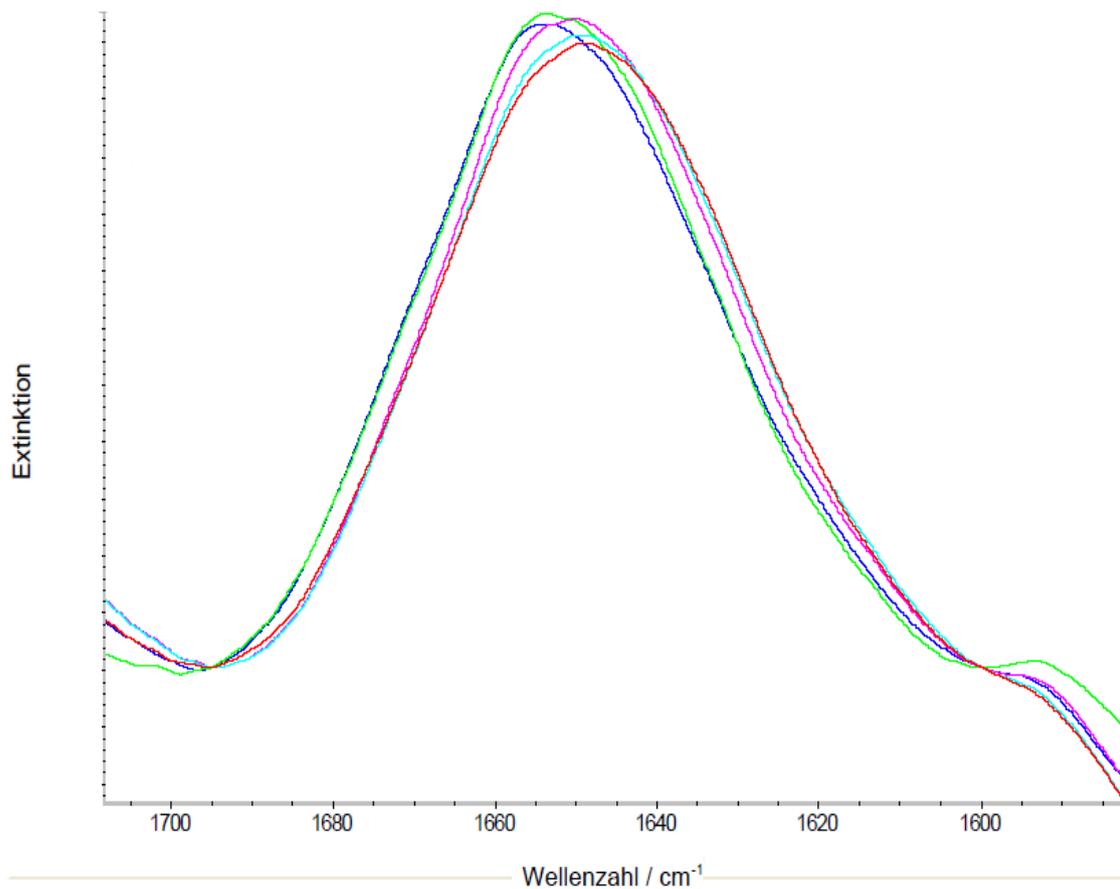


Abb. 4.2.4: Normierte Amid-I'-FTIR-Spektren von MsP1 bei 30 °C und ausgewählten, repräsentativen Drücken: 1 bar (Blau), 1245 bar (Grün), 4525 bar (Magenta), 7016 bar (Türkis) und 9926 bar (Rot).

4. Ergebnisse und Diskussion

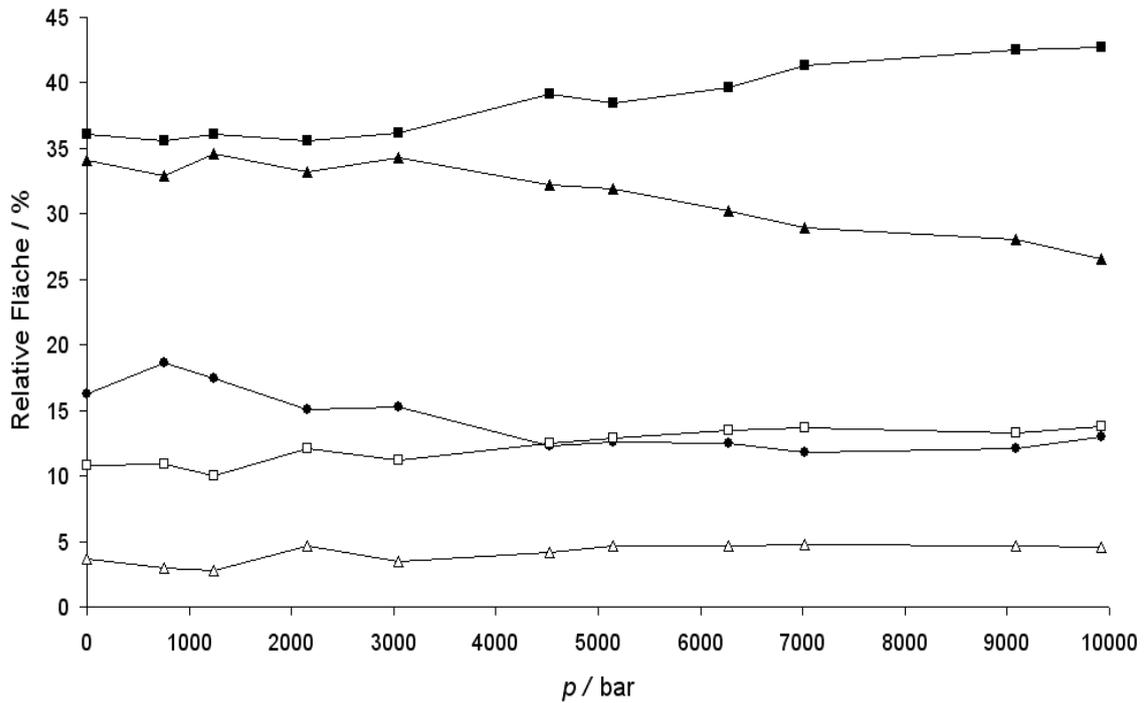


Abb. 4.2.5: Druckabhängigkeit der Sekundärstrukturelemente von MsP1 bei 30 °C. Symbolzuordnung siehe Abb. 4.2.3.

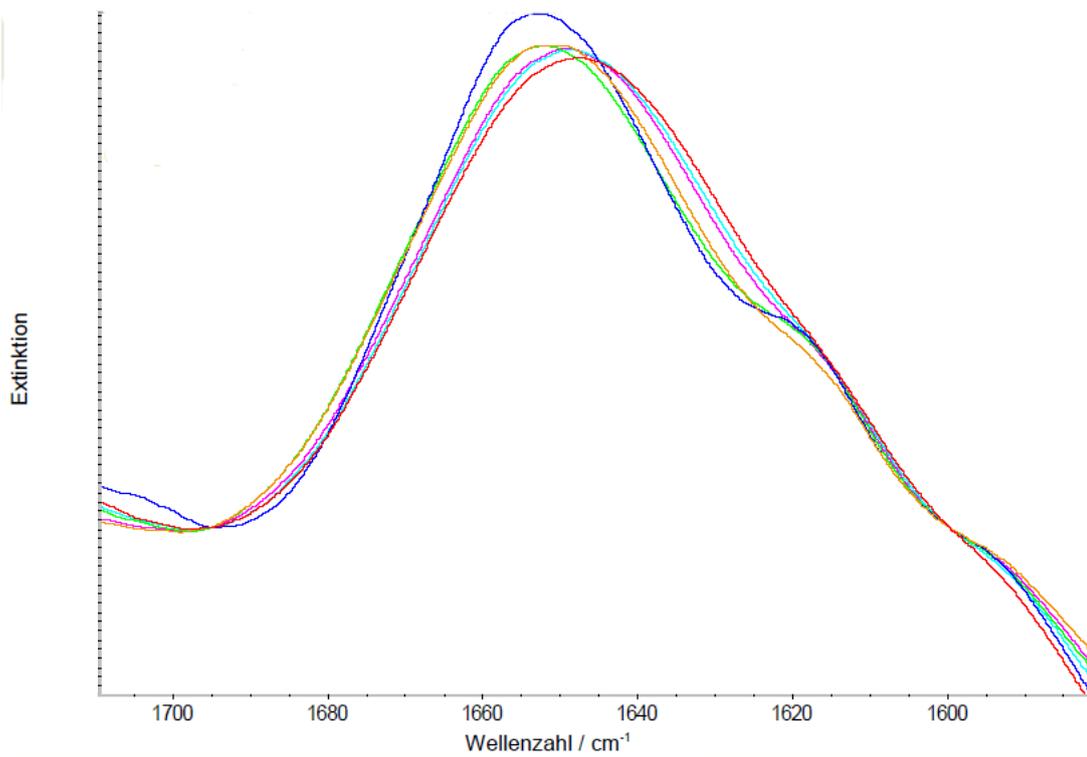


Abb. 4.2.6: Normierte Amid-I'-FTIR-Spektren von MsP1 bei 60 °C und ausgewählten, repräsentativen Drücken: 1 bar (Blau), 1299 bar (Grün), 3321 bar (Ocker), 5442 bar (Magenta), 7020 bar (Türkis) und 10448 bar (Rot)

4. Ergebnisse und Diskussion

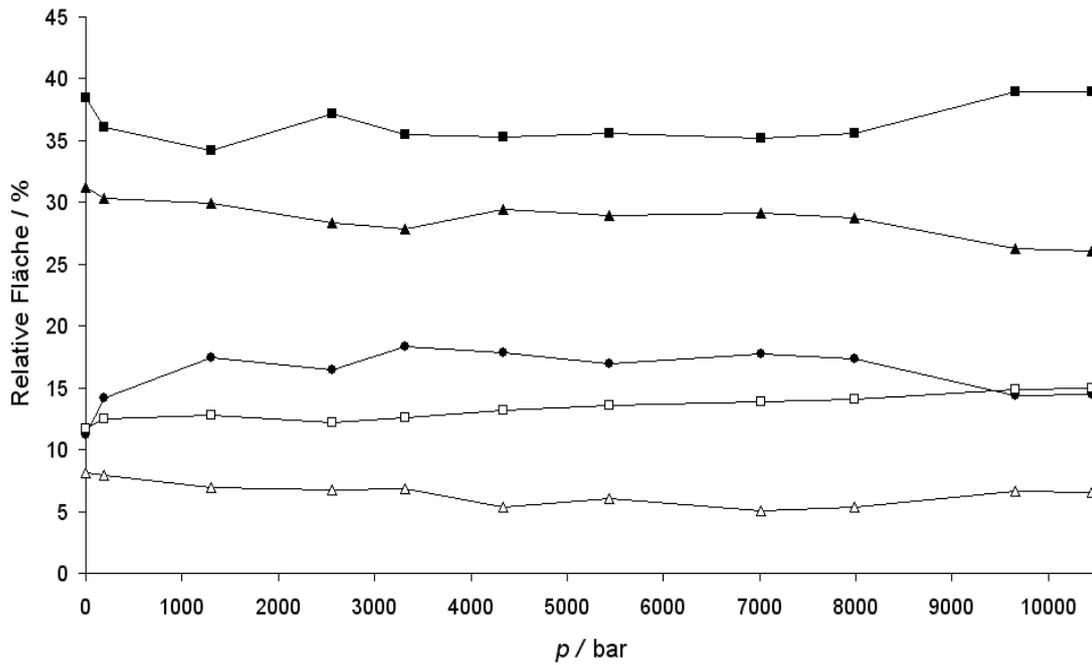


Abb. 4.2.7: Druckabhängigkeit der Sekundärstrukturelemente von MsP1 bei 60 °C. Symbolzuordnung siehe Abb. 4.2.3.

4.2.2 Differentialkalorimetrie

Das Differentialthermogramm von MsP1 ist in Abb. 4.2.8 dargestellt. Bis ~ 60 °C zeigt die differentielle Wärmekapazität ΔC_p einen nahezu linearen Anstieg mit der Temperatur. Danach beobachtet man ein endothermes Signal mit einem Maximum bei ~ 67 °C. Anschließend fällt ΔC_p oberhalb von 78 °C steil ab, wo gemäß den FTIR-Daten die thermische Aggregation des Proteins stattfindet. Aggregationsprozesse sind im Allgemeinen stark exotherm (Dzwolak et al., 2003).

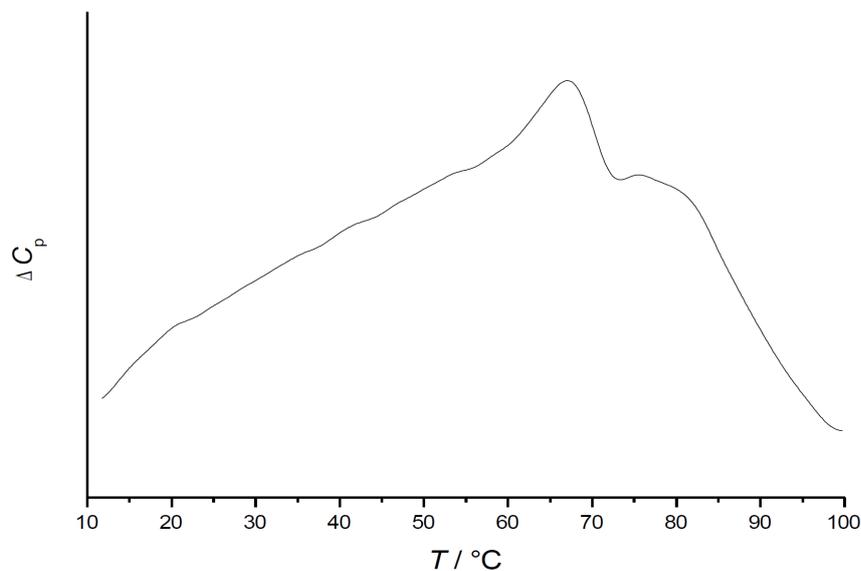


Abb. 4.2.8: DSC-Thermogramm von MsP1.

4.2.3 Temperatur- und druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie

Das MsP1-Dimer enthält 8 Tryptophanreste, entsprechend 4 pro Monomer, welche sich an unterschiedlichen Stellen der Tertiärstruktur befinden. Jedes Fluoreszenzspektrum ergibt daher ein spektrales Mittel aller beitragenden intrinsischen Fluorophore. Wie bereits in Kap. 2.2.2 dargestellt, zeigt eine Rotverschiebung eine polarere Umgebung des fluoreszierenden Trp-Restes an, was mit Denaturierung und Entfaltung des Proteins assoziiert werden kann. Die temperaturabhängigen Fluoreszenzspektren mitsamt den daraus errechneten CSM-Werten zeigen Abb. 4.2.9 und 4.2.10. Zwischen 15 und 50 °C weist das spektrale Massezentrum von MsP1 eine leichte Blauverschiebung auf, welche einem insgesamt hydrophoben Umfeld der emittierenden Fluorophore entspricht, was zeigt, daß sich das Enzym in kompaktem, nativen Zustand befindet. Oberhalb von 50 °C erfolgt bis hinauf zu 70 °C eine ausgeprägte Rotverschiebung, wo sich die Steigung des $\langle\lambda\rangle(T)$ -Graphen erneut ändert und eine weitere, jedoch schwächer ausgeprägte Rotverschiebung folgt. Die Rotverschiebung oberhalb von 50 °C kann durch eine temperaturinduzierte Konformationsänderung mit zunehmender Exposition der Trp-Reste zum Solvens erklärt werden. Der Mittelpunkt der Transition liegt bei ~ 63 °C. Bei Vergleich des finalen CSM-Wertes von ~ 357 nm gegenüber dem eines vollständig hydratisierten Tryptophans (~ 362 nm, Kato et al., 2002) kann geschlossen werden, daß die meisten Trp-Reste größtenteils, aber nicht vollständig solvensexponiert vorliegen. SAXS-Messungen bei Atmosphärendruck zeigen zwischen 60 und 70 °C eine Halbierung des Gyrationradius an (Pühse et al., 2009), welcher nach längerer Inkubation bei 70 °C wieder stark ansteigt, Letzteres eine wahrscheinliche Folge der in den FTIR-Messungen beobachteten Aggregation. Dies bedeutet, daß das native Dimer im Bereich zwischen 60 und 70 °C dissoziiert, was die wahrscheinliche Erklärung für die gemessene starke Rotverschiebung der CMS-Werte in diesem Temperaturbereich darstellt. Die Steigungsänderung des $\langle\lambda\rangle(T)$ -Graphen ab ~ 68 °C kann mit dem Ende des thermisch induzierten Dissoziationsprozesses und darauf folgender weiterer Entfaltung erklärt werden. Aufgrund der deutlich geringeren Proteinkonzentration bei den Fluoreszenzmessungen kann hier im Gegensatz zu den FTIR-, SAXS- und DSC-Messungen keine temperaturinduzierte Aggregation beobachtet werden, da dieser Prozeß hochgradig konzentrationsabhängig ist (Winter & Dzwolak, 2005). Insgesamt ist diese Interpretation in guter Übereinstimmung mit den FTIR- und DSC-Daten, wobei die Diskrepanz von 4 °C zwischen dem aus den Fluoreszenzspektren berechneten Transitions-mittelpunkt der Dimerdissoziation von ~ 63 °C und dem endothermen Maximum im DSC-Thermogramm bei 67 °C (s.o.) auf die längeren Temperierungszeiten im Rahmen der Fluoreszenzmessungen zurückgeführt werden kann, da eine längere Inkubationszeit bei niedrigerer Temperatur aufgrund der Arrhenius-Aktivierungsenergie denselben Effekt besitzt wie eine kürzere Inkubationszeit bei höherer Temperatur. Wie bereits erwähnt, fällt die Aktivität von MsP1 oberhalb von 60 °C drastisch ab. Aus den hier erhaltenen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die katalytische Aktivität des Enzyms an die Integrität des Dimers gekoppelt ist.

4. Ergebnisse und Diskussion

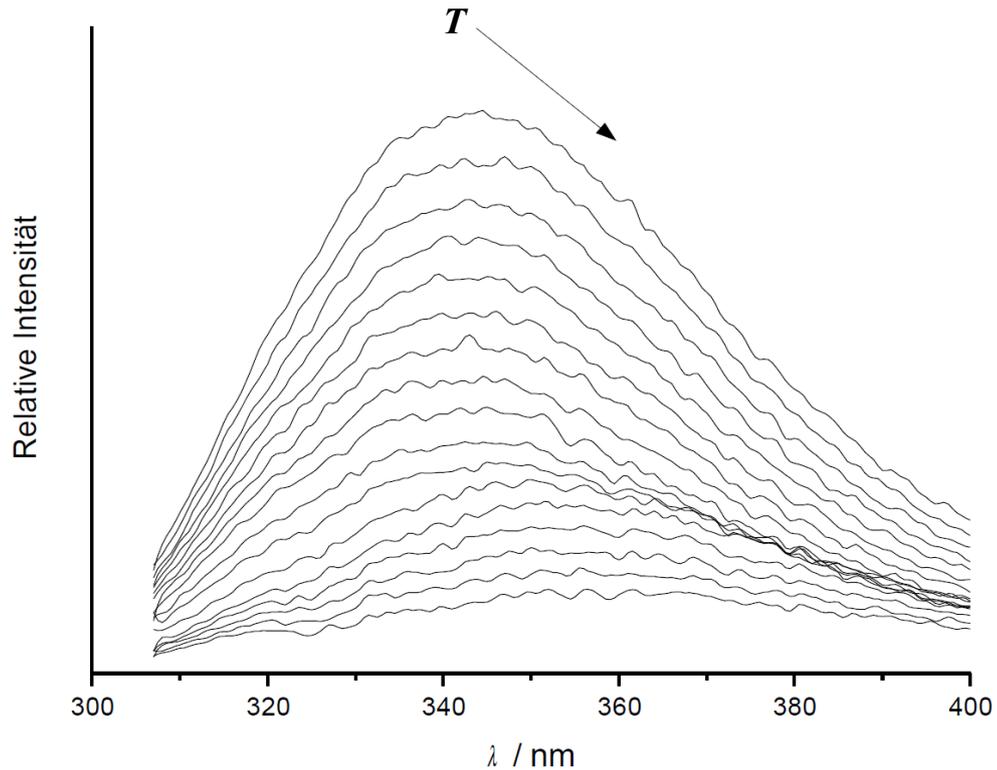


Abb. 4.2.9: Trp-Fluoreszenzspektren von MsP1 im Bereich zwischen 15 und 86 °C bei Atmosphärendruck. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung der Spektren mit steigender Temperatur an (geringere Intensität und Rotverschiebung).

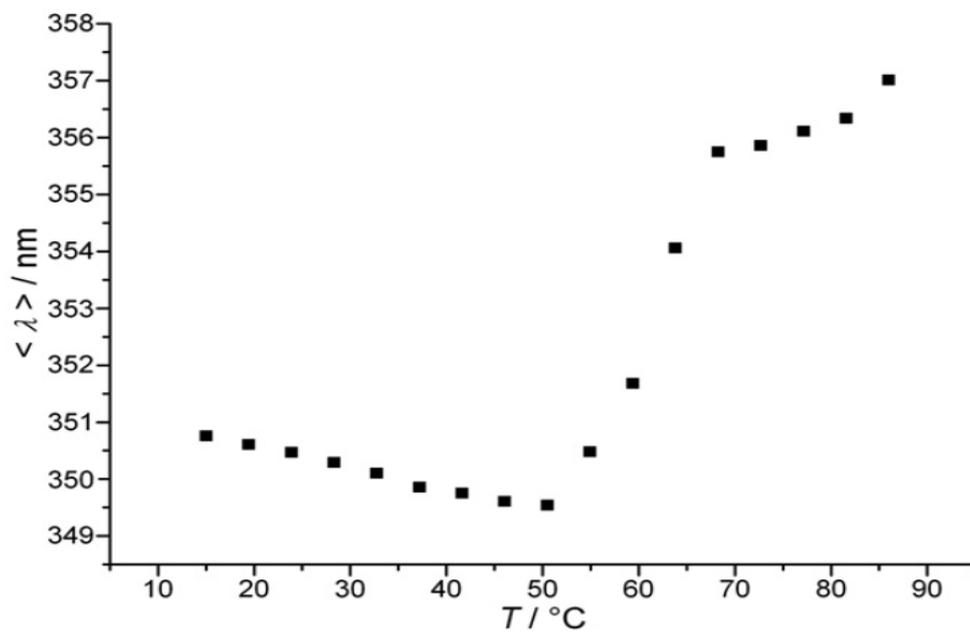


Abb. 4.2.10: Temperaturabhängigkeit des spektralen Massezentrums ($\langle \lambda \rangle$) der Trp-Fluoreszenz von MsP1 bei Atmosphärendruck zwischen 15 und 86 °C.

Die bei 30 °C aufgenommenen, druckabhängigen Fluoreszenzspektren (Abb. 4.2.11) weisen hinsichtlich ihrer CSM-Werte lediglich eine geringe, nahezu lineare Rotverschiebung auf (Abb.

4.2.12). Zwischen 500 und 600 bar kann eine Diskontinuität mit einer nachfolgenden Änderung der Steigung beobachtet werden, welche mit einer kleineren strukturellen Änderung korreliert werden kann, die auch in druckabhängigen SAXS-Messungen von MsP1 bei 30 °C sichtbar ist (Pühse et al., 2009). Aus denselben Messungen ergibt sich zusätzlich, daß die strukturelle Integrität des Dimers bis zu dem maximalen Meßdruck von 3000 bar erhalten bleibt (konstanter Gyrationradius), was eine bemerkenswert hohe Stabilität für ein dimeres Protein darstellt (siehe Kap. 1.2.3). Interessanterweise weist MsP1 ein Aktivitätsmaximum bei ca. 500 bar unter HHD und derselben Temperatur auf, wonach die Aktivität bis zu einem Druck von 2000 bar wieder in etwa auf das Niveau von 1 bar abfällt und bis zum höchsten gemessenen Druck von 2500 bar konstant bleibt (Pühse et al., 2009). Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß diese kleine, in den FTIR-Spektren nicht nachweisbare (Tertiär-) Strukturänderung für die beobachtete Absenkung der Enzymaktivität oberhalb von ~ 500 bar verantwortlich ist. Die zunehmende Rotverschiebung der Fluoreszenzemission oberhalb von 700 bar kann teilweise auf die Wirkung des intrinsischen Druckeffektes auf die Trp-Reste zurückgeführt werden (Louzada et al., 1996), aber auch möglicherweise auf zunehmende Fluktuationen in der Proteinstruktur, welche durch die in Kap. 1.2.3 beschriebene Reduktion der Stärke hydrophober Wechselwirkungen zurückzuführen sind (Silva et al., 2001; Daniel et al., 2006; Meersman et al., 2006).

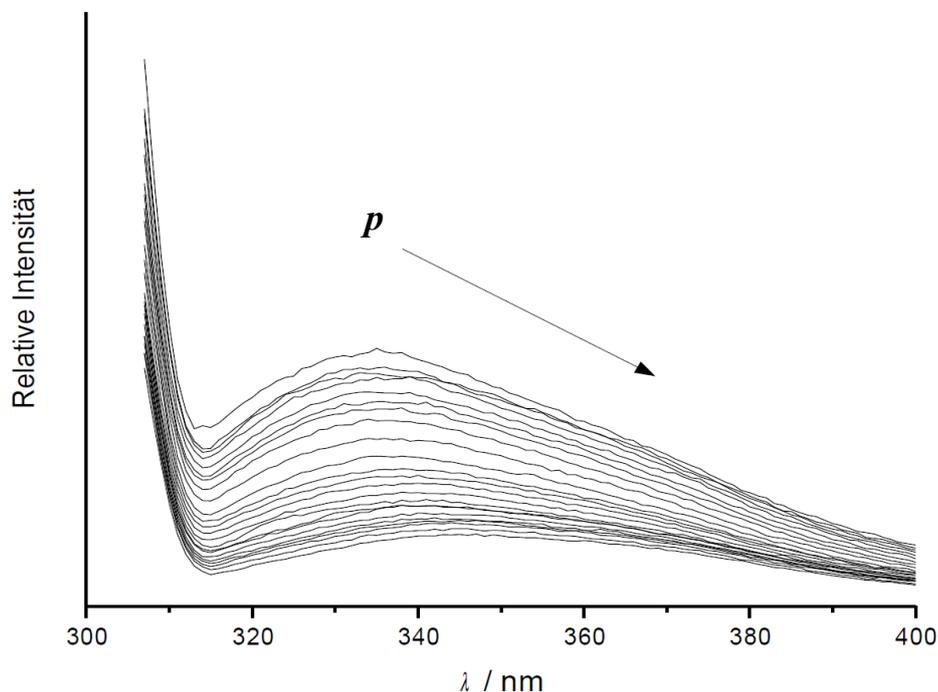


Abb. 4.2.11: Trp-Fluoreszenzspektren von MsP1 von 1-2200 bar bei 30 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung der Spektren mit steigendem Druck an (geringere Intensität und Rotverschiebung).

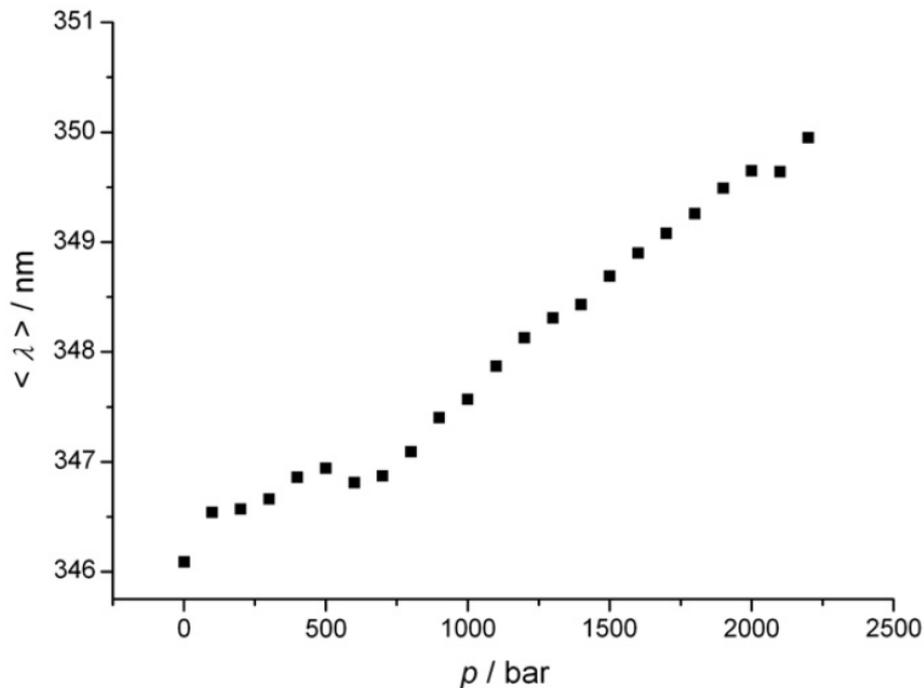


Abb. 4.2.12: Temperaturabhängigkeit des spektralen Massezentrums ($\langle \lambda \rangle$) der Trp-Fluoreszenz von MsP1 im Druckbereich 1-2200 bar bei 30 °C.

4.2.4 Zusammenfassung

Verglichen mit anderen Mitgliedern der DyP-Typ Enzymfamilie, weist MsP1 ein bemerkenswert hohes Temperaturoptimum und eine hohe Thermostabilität auf. Für die DyP-Peroxidase aus *Thaumatococcus danianus* (vormals *Geotrichum candidum*), welche in der Lage ist, diverse synthetische Farbstoffe zu degradieren, wurde ein Temperaturoptimum von 30 °C gemessen (Kim & Shoda, 1999). Lignolytische Enzyme wie manganabhängige Peroxidasen, Laccasen oder die Mitglieder der DyP-Familie stellen interessante enzymatische Werkzeuge mit geringem Energie- und Kapitalbedarf für solche industriellen Prozesse dar, in denen Ligninmodifikation und -abbau von großer Bedeutung ist, wie Papier- und Zellstoffverarbeitung oder die Verwertung landwirtschaftlicher Abfallprodukte, z.B. Stroh. Die polymeren Kohlenhydrate in diesen Abfallprodukten, die Cellulose und die Hemicellulose, werden typischerweise durch Carbohydrasen bei Temperaturen bis zu 50 °C hydrolysiert. Seit Kürzerem sind auch Cellulasen mit enzymatischer Aktivität jenseits von 50 °C verfügbar, was aus mehreren Gründen von Interesse ist. Erstens sind die Hydrolysereaktionen bei erhöhter Temperatur energetisch bevorzugt, und zweitens ergeben sich prozess-technische Vorteile aus der erniedrigten Viskosität (Viikari et al., 2007; Kumar et al., 2008). Daher erfordern simultane Delignifizierung und Saccharifizierung bei erhöhten Temperaturen entsprechend thermostabile delignifizierende Enzyme.

4. Ergebnisse und Diskussion

Wie bereits erwähnt, steigt die Aktivität von MsP1 bis ~ 500 bar an und fällt danach wieder langsam auf das Niveau bei Atmosphärendruck ab. Im Gegensatz hierzu werden viele Enzyme unter HHD bis 2 kbar signifikant inaktiviert. Aktivitätsverluste von 20 und 50 % wurden jeweils für Lipoxygenase aus Sojabohnen und Meerrettichperoxidase nach 15-minütiger Inkubation bei 2 kbar und 55 °C berichtet, wobei eine totale Inaktivierung der Lipoxygenase bei 5,7 kbar erfolgte (Tedjo et al., 2000). Wie bereits in Kap. 1.2.3 erwähnt, kann HHD aber auch stabilisierend auf Enzyme wirken. Zusätzlich zu den dort genannten Beispielen können noch eine Carboxypeptidase aus dem Archaeobakterium *Sulfolobus solfataricus*, welche durch Drücke bis zu 4 kbar in ihrem aktiven Zustand bei erhöhter Temperatur gehalten wird (Bec et al., 1996), und L-Galaktosidasen aus *E. coli* und *Aspergillus oryzae*, die jeweils bei 50 bzw. 65 °C durch Drücke zwischen 2-3 kbar eine Stabilisation erfahren (Degraeve et al., 2002), angeführt werden. Der notwendige Druck zur Dissoziation des MsP1-Dimers konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden, dieses bleibt bis mindestens 3 kbar stabil, was, wie bereits ausgeführt, ungewöhnlich für oligomere Proteine ist.

Die erhöhte Aktivität von MsP1 bei Drücken um 500 bar kann von kleinen strukturellen Änderungen herrühren, welche den Übergangszustand der enzymatischen Reaktion stabilisieren. Im Allgemeinen kann HHD enzymkatalysierte Reaktionen durch Konformationsänderungen der Enzymstruktur oder Modifikationen des Reaktionsmechanismus beeinflussen, neben der allgemeinen druckinduzierten Beschleunigung von Reaktionen mit negativem Aktivierungsvolumen (Northrop, 2002). HHD wurde bereits mehrfach zur Erhöhung der Aktivität oder Modifikation der Selektivität von Enzymen eingesetzt, was neue biotechnische Anwendungen erschließt. Die meisten dieser Applikationen stammen aus der Lebensmitteltechnologie, insbesondere aus der Getränke- und Saftproduktion (Kouassi et al., 2007). Ein Beispiel ist das Enzym Naringinase, welche den bitteren Geschmacksstoff Naringin in Zitrusfrüchten zum geschmackslosen Naringenin hydrolysiert. Unter HHD von 1,6 kbar zeigt sich eine Verdreifachung der Enzymaktivität gegenüber Atmosphärendruck (Ferreira et al., 2008). Die mikrobielle Transglutaminase zeigt unter HHD bis zu 6 kbar die Fähigkeit, Proteine quervernetzen, welche durch dasselbe Enzym bei Atmosphärendruck nicht umgesetzt werden können (Lauber et al., 2003). Bei noch höheren Drücken erfolgt jedoch eine Druckinaktivierung mit Entfaltung der Sekundär- und Tertiärstruktur (Mendez et al., 2006).

Bis zu 10 kbar konnten keine signifikanten Änderungen in der Sekundärstruktur von MsP1 festgestellt werden, lediglich ab 5000 bar (30 °C) bzw. 8000 bar (60 °C) sind kleinere Änderungen, welche möglicherweise ein druckinduziertes Anschwellen des Proteins durch penetrierendes Wasser anzeigen, detektierbar. Unter Berücksichtigung dieser bemerkenswerten Druckstabilität kann MsP1 ein wertvolles Werkzeug für industrielle Hochdruckanwendungen werden. Ein potentielles Anwendungsgebiet ist die Delignifizierung landwirtschaftlicher Abfälle im Rahmen

der Bioethanolproduktion, da die herkömmlichen Verfahren zur Vorbehandlung lignozellulosehaltiger Substrate wie Dampfexplosion (Chandra et al., 2007; Galbe & Zacchi, 2007), Inkubation mit verdünnter Säure (Yee et al., 1999; Lu et al., 2007) oder der Organosolvprozeß (Sun & Chen, 2008) mit der Bildung toxischer Nebenprodukte verbunden sind, welche die anschließende enzymatische Saccharifizierung und fermentative Umwandlung zu Bioethanol beeinträchtigen (Ando et al., 1989; Delgenes et al., 1996; Cantarella et al., 2004; Lu et al., 2007; Ruiz et al., 2007; Mussatto et al., 2008). Ein rein enzymatischer Delignifizierungsprozeß besitzt das Potential, diese Einschränkungen zu überwinden.

4.3 Untersuchung der druckinduzierten Entfaltung der Ankyrindomäne des Notch-Proteins aus *D. melanogaster*

4.3.1 Hochdruck-FTIR-Spektroskopie

Die Abb. 4.3.1 und 4.3.2 zeigen die normalisierten druckabhängigen FTIR-Spektren und die daraus erhaltenen Sekundärstrukturanteile bei 20 °C von 1 bis ~ 8000 bar in Abwesenheit von ¹³C-Harnstoff. Im Einklang mit der Röntgenstruktur von Nank₁₋₇ (Abb. 1.9) erweist sich die Sekundärstruktur bei Atmosphärendruck als vorwiegend α -helikal (Bande bei ~ 1649 cm⁻¹), mit kleineren Beiträgen von Schleifenstrukturen und intramolekularen β -Faltblättern (~ 1670 bzw. 1628 cm⁻¹), wobei es sich bei Letzteren um β -faltblattähnliche Schleifen, sogenannte β -Schleifen, zwischen den repetitiven α -Helices handeln dürfte. Bei Druckerhöhung ergeben sich keinerlei signifikante Änderungen bis ~ 2800 bar. Oberhalb dieses Druckes erscheint eine zusätzliche IR-Bande (~ 1645 cm⁻¹), welche ungeordneten Strukturen zugeordnet werden kann, gleichzeitig fällt der relative Anteil der Bande für α -Helices simultan ab. Der Anstieg dieser Bande setzt sich bis ~ 3600 bar fort (50 % Denaturierungsdruck p_u bei ~ 3200 bar) und erreicht bis ~ 4900 bar ein Plateau. Danach erfolgt eine weitere, ausgeprägtere Entfaltung mit Zunahme des Anteils an Zufallsknäueln bei gleichzeitiger Abnahme des α -helikalen Anteils bis hinauf zu ~ 6500 bar, wo ein weiteres Plateau erreicht wird (p_u ~ 5800 bar), welches bis zum höchsten gemessenen Druck von ~ 8000 bar erhalten bleibt. Die Bandenpositionen bleiben mit steigendem Druck nahezu konstant, lediglich die Banden für Schleifen und α -Helices verschieben sich zu ~ 1674 bzw. ~ 1655 cm⁻¹ bei 8 kbar. Der relative Anteil von Schleifenstrukturen sinkt kontinuierlich auf etwa 50 % des initialen Anteils ab, während der Anteil von β -Faltblättern bzw. β -Schleifen ungefähr auf dem Niveau von 1 bar verbleibt. Dennoch sind auch bei ~ 8000 bar noch ca. 40 % relativer Anteil an α -Helices vorhanden, gegenüber ~ 66 % bei Atmosphärendruck, so daß insgesamt nur eine Teilentfaltung unter HHD beobachtet werden kann. Diese vollzieht sich, wie an den beiden Plateaus gesehen werden kann, in zwei distinkten Schritten zwischen ~ 2800 und 3600 sowie zwischen ~ 4900 und 6500 bar. Bei noch höheren Drücken jenseits von ~ 10 kbar sollten ein oder mehrere zusätzliche Entfaltungsschritte beobachtbar sein. Nach

4. Ergebnisse und Diskussion

Druckentspannung findet nur eine teilweise Rückfaltung statt, eine vollständige liegt jedoch über einen längeren Zeitraum durchaus im Bereich des Möglichen, da keinerlei Aggregatbildung beobachtet wurde.

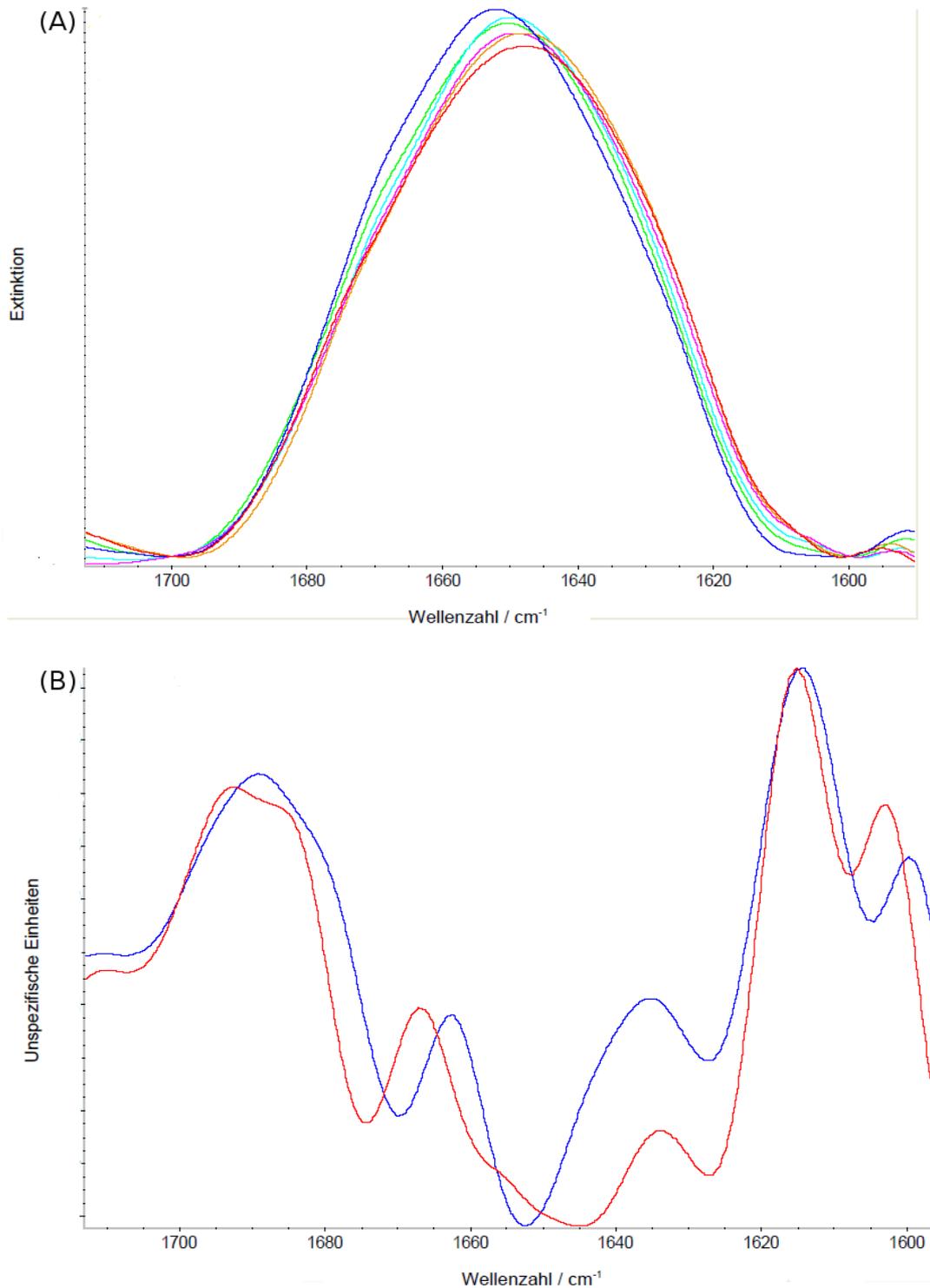


Abb. 4.3.1: (A) Normierte FTIR-Spektren von Nank₁₋₇ bei 20 °C ohne ¹³C-Harnstoff bei ausgewählten, repräsentativen Drücken: 1 bar (Blau), 851 bar (Türkis), 2774 bar (Magenta), 5463 bar (Ocker), 7879 bar (Rot) und Druckentspannung auf ~1 bar (Grün). (B) Korrespondierende zweite Ableitungen der Spektren bei 1 bar (Blau) und 7879 bar (Rot).

4. Ergebnisse und Diskussion

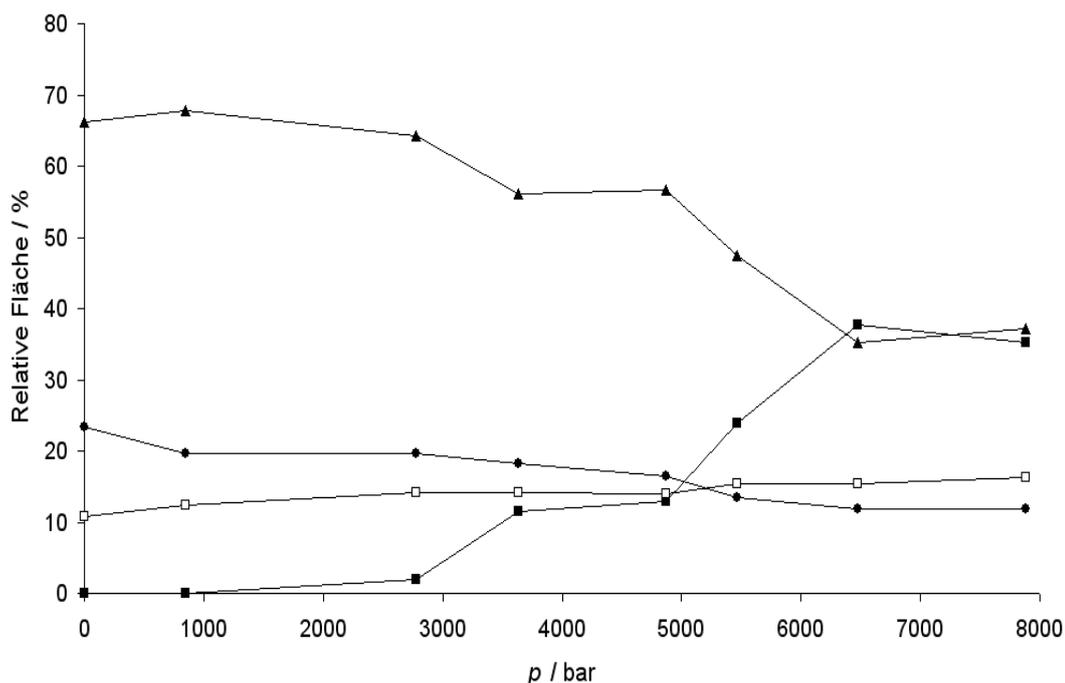


Abb. 4.3.2: Druckabhängigkeit der Sekundärstrukturanteile von Nank₁₋₇ bei 20 °C ohne Zusatz von ¹³C-Harnstoff. Symbolzuordnung: ■ Ungeordnete Struktur (Zufallsknäuel), ▲ α -Helices, ● Schleifen, □ intramolekulare β -Faltblätter.

In Gegenwart von 2 M ¹³C-Harnstoff bei 20 °C sind bei Atmosphärendruck praktisch keine Änderungen in den Spektren als auch in den relativen Sekundärstrukturanteilen gegenüber der Messung ohne Harnstoff beobachtbar (Abb. 4.3.3 und 4.3.4), lediglich die diagnostische Bande für Schleifenstrukturen spaltet sich in zwei Banden auf (bei ~ 1675 und ~ 1663 cm⁻¹). Bei Druckerhöhung zeigen sich erneut die zwei distinkten Entfaltungsschritte, allerdings sind die jeweiligen 50 %-Denaturierungsdrücke p_u mit ~ 1800 bar und ~ 3800 bar, wie auch die Startdrücke der Entfaltungsschritte zu deutlich kleineren Werten verschoben, wie dies bei der Behandlung mit chaotropen Agenzien wie Harnstoff zu erwarten ist (Herberhold et al., 2004). Ebenfalls ist das erste Plateau weniger stark ausgeprägt als bei der Messung ohne Harnstoffzusatz und reicht nur noch über ~ 800 bar. Interessanterweise zeigt sich nach Erreichen des zweiten Plateaus bis zum höchsten Druck von ~ 6100 bar ein größerer Residualanteil von α -Helices bei gleichzeitig verringertem Anteil an ungeordneten Strukturen im Vergleich zur Messung ohne Harnstoff. Bei einer geringfügig höheren ¹³C-Harnstoffkonzentration von 2,35 M ist bereits zu Beginn ein erheblicher Anteil an ungeordneter Konformation vorhanden (Abb. 4.3.5 und 4.3.6), welcher nach Erreichen eines ersten Plateaus bei ~ 1000 bar bis ~ 2300 bar konstant bleibt und dann kontinuierlich bis zum Maximaldruck von ~ 4300 bar ansteigt, ohne ein weiteres Plateau zu erreichen. Obwohl im Vergleich aller drei Messungen der finale relative α -Helixanteil unter HHD am Geringsten ist, kann auch hier keine vollständige Entfaltung beobachtet werden. Die Empfindlichkeit von Nank₁₋₇ hinsichtlich der geringfügigen Erhöhung der Harnstoffkonzentration von 2 auf 2,35 M bei 1 bar steht in Einklang mit Zirkulardichroismusmessungen, welche ein identi-

4. Ergebnisse und Diskussion

sches Verhalten bei 20 °C und identischem Puffersystem anzeigen (Zweifel & Barrick, 2001) sowie mit Hochdruckfluoreszenzmessungen bei 20 °C (Rouget et al., 2009).

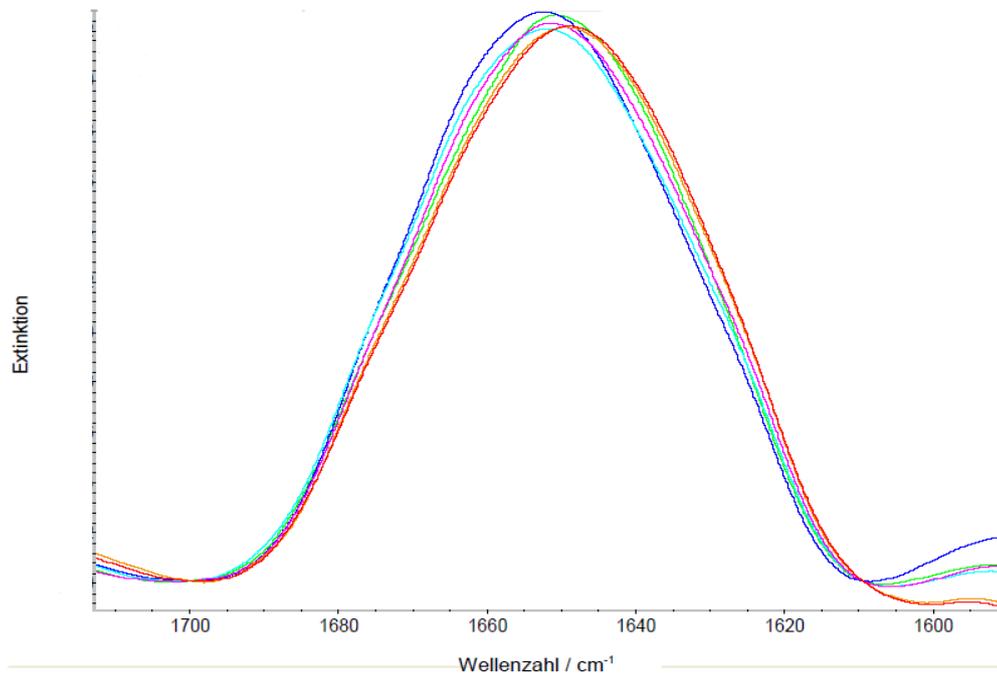


Abb. 4.3.3: Normierte FTIR-Spektren von Nank₁₋₇ bei 20 °C in Gegenwart von 2 M ¹³C-Harnstoff bei ausgewählten, repräsentativen Drücken: 1 bar (Blau), 962 bar (Türkis), 2959 bar (Magenta), 4538 bar (Ocker), 6116 bar (Rot) und nach Dekompression auf ~ 1 bar (Grün).

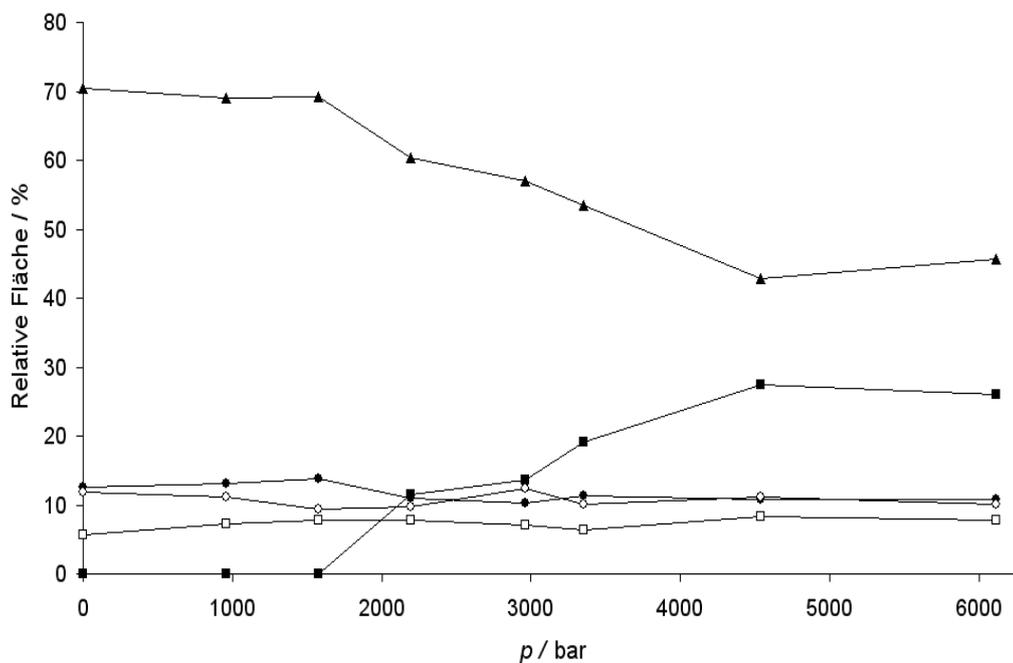


Abb. 4.3.4: Druckabhängigkeit der Sekundärstrukturanteile von Nank₁₋₇ bei 20 °C in Gegenwart von 2 M ¹³C-Harnstoff. Symbolzuordnung siehe Abb. 4.3.2, die im Text erwähnte zusätzliche Bande für Schleifen ist mit ◊ gekennzeichnet.

4. Ergebnisse und Diskussion

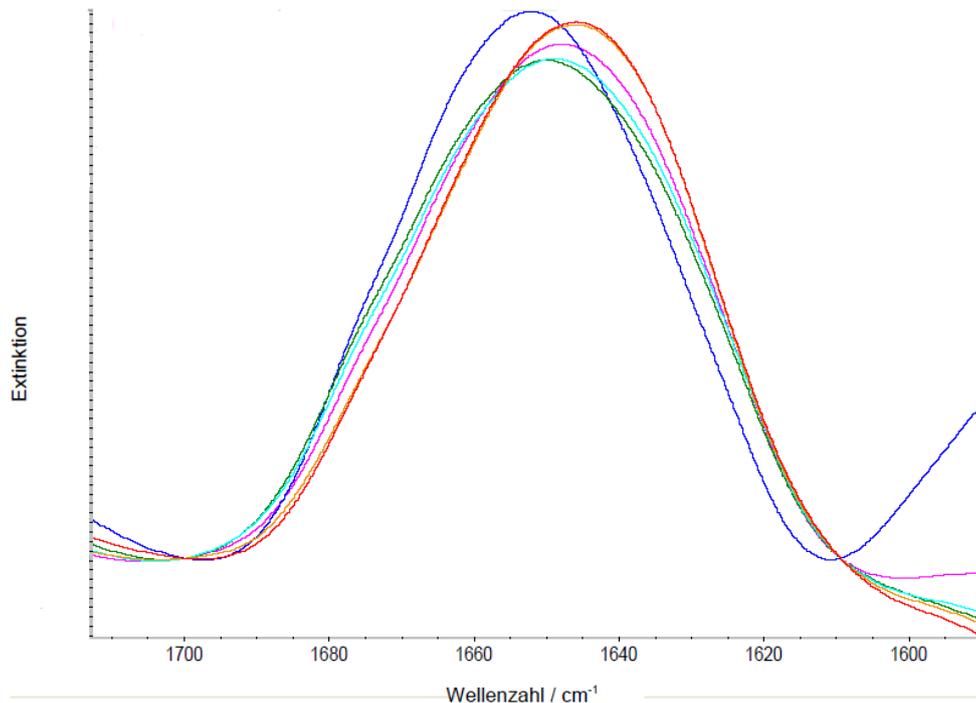


Abb. 4.3.5: Normierte FTIR-Spektren von Nank₁₋₇ bei 20 °C in Gegenwart von 2,35 M ¹³C-Harnstoff bei ausgewählten, repräsentativen Drücken: 1 bar (Blau), 956 bar (Dunkelgrün), 1424 bar (Türkis), 2287 bar (Magenta), 3077 bar (Ocker) und 4285 bar (Rot).

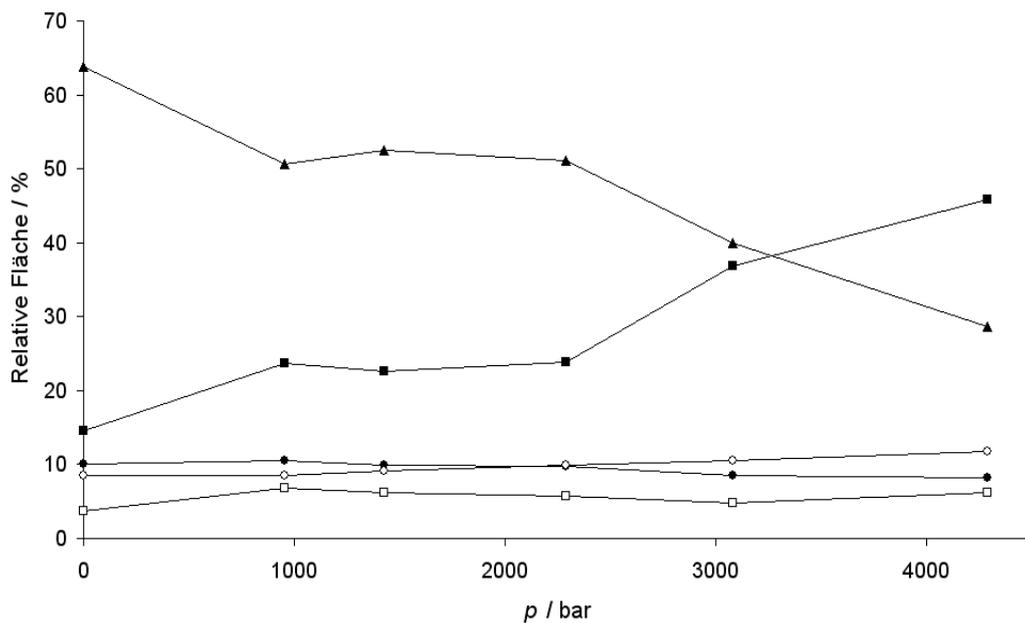


Abb. 4.3.6: Druckabhängigkeit der Sekundärstrukturanteile von Nank₁₋₇ bei 20 °C in Gegenwart von 2,35 M ¹³C-Harnstoff. Symbolzuordnung siehe Abb. 4.3.2 und 4.3.4.

Die hier bei Nank₁₋₇ beobachtete nichtlineare Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration hinsichtlich des Denaturierungsdruckes ist ungewöhnlich, da bisher untersuchte, globuläre Proteine wie SNase eine lineare Korrelation zwischen beiden Parametern aufweisen, wobei der Harnstoff einen nur geringfügigen Einfluß auf $\Delta_u V$ ausübt und stattdessen $\Delta_u G$ bei 1 bar herabsetzt. (Herberhold et al., 2004). Zudem erfolgt die Entfaltung globulärer Proteine mit kompaktem, nichtdis-

tributiertem hydrophoben Kern wie SNase oder RNase A häufig nach einem einfachen Zweizustandsmodell ohne distinkte Zwischenschritte (Panick et al., 1998; Panick & Winter, 2000). Daher kann das hier für Nank₁₋₇ beobachtete Entfaltungsverhalten wahrscheinlich auf den zwischen den einzelnen Wiederholungseinheiten verteilten hydrophoben Kern zurückgeführt werden, wobei die einzelnen "Teilkern" unterschiedliche Drucksensitivitäten und damit verschiedene $\Delta_u G$ - und $\Delta_u V$ -Werte aufweisen. Aus Hochdruckfluoreszenzmessungen in Gegenwart von 2 M Harnstoff ergibt sich für die erste Teilentfaltung ein Wert für $\Delta_u V$ von 44,2 ml·mol⁻¹ für $\Delta_u G$ von 7,11 kJ·mol⁻¹ (Rouget et al., 2009). Ein interessantes Ziel zukünftiger Studien kann es sein, herauszufinden, ob das hier beschriebene Verhalten von Nank₁₋₇ gegenüber HHD und chaotropen Agenzien auch bei anderen Wiederholungssequenzproteinen (Andrade et al., 2001) auftritt.

4.4 Untersuchung des *p,T*-Verhaltens von Polymeren und Hydrogelen aus Poly(*N*-isopropylacrylamid) und Poly(*N,N*-diethylacrylamid)

4.4.1 Temperaturabhängige FTIR-Messungen

In Abb. 4.4.1 ist das dekonvoluierte Amid-I'-Spektrum von linearem PNIPAM bei 20 °C und Atmosphärendruck dargestellt. Die diagnostischen Subbanden befinden sich bei ~ 1652 cm⁻¹, ~ 1626 cm⁻¹, ~ 1606 cm⁻¹ und ~ 1583 cm⁻¹, was jeweils, gemäß Tab. 3.1, intramolekularen H-Brücken zwischen Carbonylgruppen und Amiddeuteronen, Carbonylgruppen in gemischt hydrophiler/hydrophober Umgebung und intermolekularen H-Brücken von Carbonylgruppen zum Solvens D₂O (letzte beide Banden) entspricht. Da PNIPAM, wie bereits in Kap. 1.3.4 erwähnt, unterhalb von 32 °C als stark hydratisiertes Knäuel vorliegt, dominieren die Banden für Carbonylgruppen in mittelhydrophober Umgebung und für intermolekulare H-Brücken zum Lösungsmittel. Bei Temperaturerhöhung verschiebt sich der Schwerpunkt des Amid-I'-Spektrums deutlich zu höheren Wellenzahlen (Abb. 4.4.2), was den Übergang vom relativ hydrophilen, geschwollenen Knäuel zum kompakten, recht hydrophoben Globuluszustand anzeigt. Nach Spektrendekonvolution und -analyse können die relativen spektralen Anteile der Subbanden, analog zur IR-basierten Sekundärstrukturanalyse von Proteinen, in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht werden. Wie aus Abb. 4.4.3 ersehen werden kann, ergibt sich für das lineare PNIPAM in Übereinstimmung mit den Literaturdaten ein scharfer Übergang bei 32-33 °C, welcher durch eine starke Abnahme des relativen Anteils der Bande bei ~ 1606 cm⁻¹ bei simultaner Intensitätszunahme der Bande bei ~ 1652 cm⁻¹ zwischen 30 und 35 °C gekennzeichnet ist, wobei letztere Bande bei ~ 40 °C komplett verschwindet. Im selben Temperaturbereich verringert sich auch der relative Anteil der Bande bei ~ 1626 cm⁻¹. Oberhalb der LCST zeigt sich bis zur Maximaltemperatur von 80 °C eine weitere, wenn auch deutlich schwächere, Dehydratisierung, die durch den weiteren Anstieg des Anteils des Signals bei ~ 1652 cm⁻¹ bei gleichzeitiger Abnahme der Bande bei ~ 1626 cm⁻¹ gekennzeichnet ist. Bisherige

4. Ergebnisse und Diskussion

Untersuchungen mittels DLS zeigten dagegen einen konstanten hydrodynamischen Radius jenseits der Transitionstemperatur (Wu & Zhou, 1997; Kratz et al., 2001). Offenbar erfolgt die hier beobachtete Nachtransitionsdehydratisierung im Inneren der kollabierten Polymerketten, ohne deren räumliche Ausdehnung zu beeinflussen. Die Positionen der Subbanden ändern sich mit steigender Temperatur nicht signifikant, und alle temperaturinduzierten Änderungen sind vollständig reversibel, dies gilt auch für die untersuchten Mikrogele (s.u.)

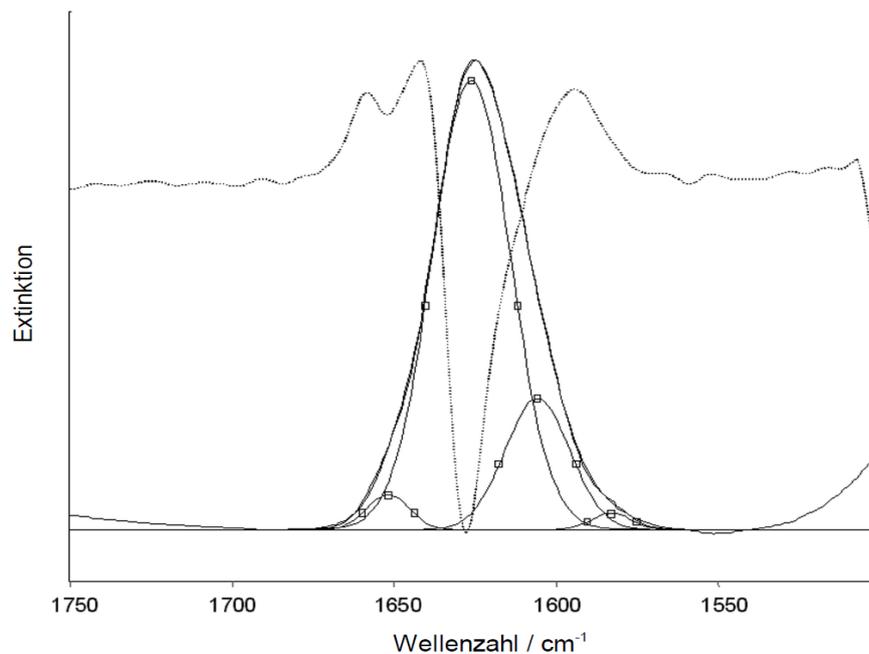


Abb. 4.4.1: Dekonvolvierte Amid-I'-Region von linearem PNIPAM bei 20 °C und 1 bar. Die zweite Ableitung des Spektrums ist gepunktet dargestellt.

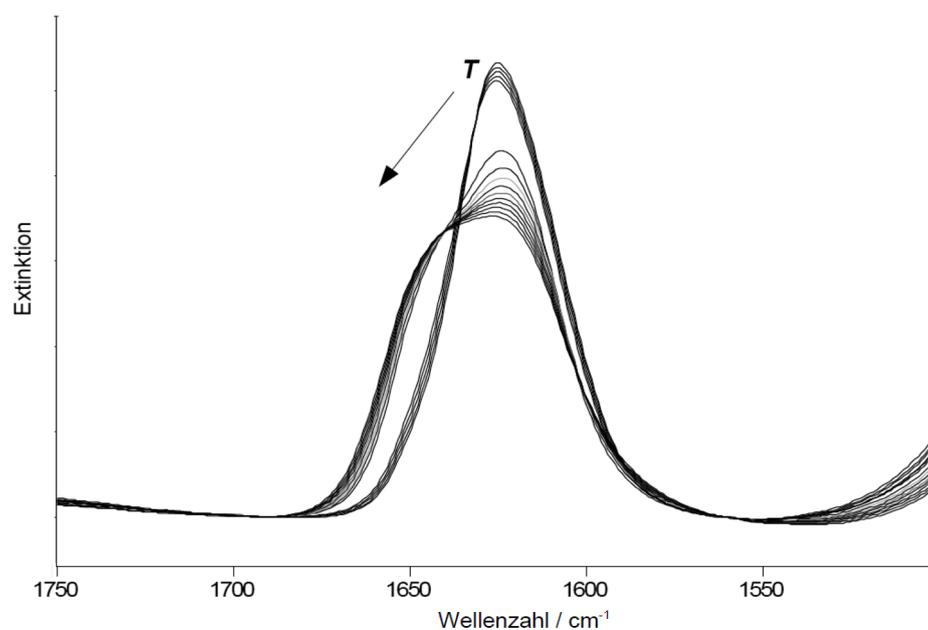


Abb. 4.4.2: Normierte FTIR-Spektren von linearem PNIPAM zwischen 10 und 80 °C bei 1 bar. Der Pfeil zeigt, wie angedeutet, die Entwicklung der Spektren mit steigender Temperatur an.

4. Ergebnisse und Diskussion

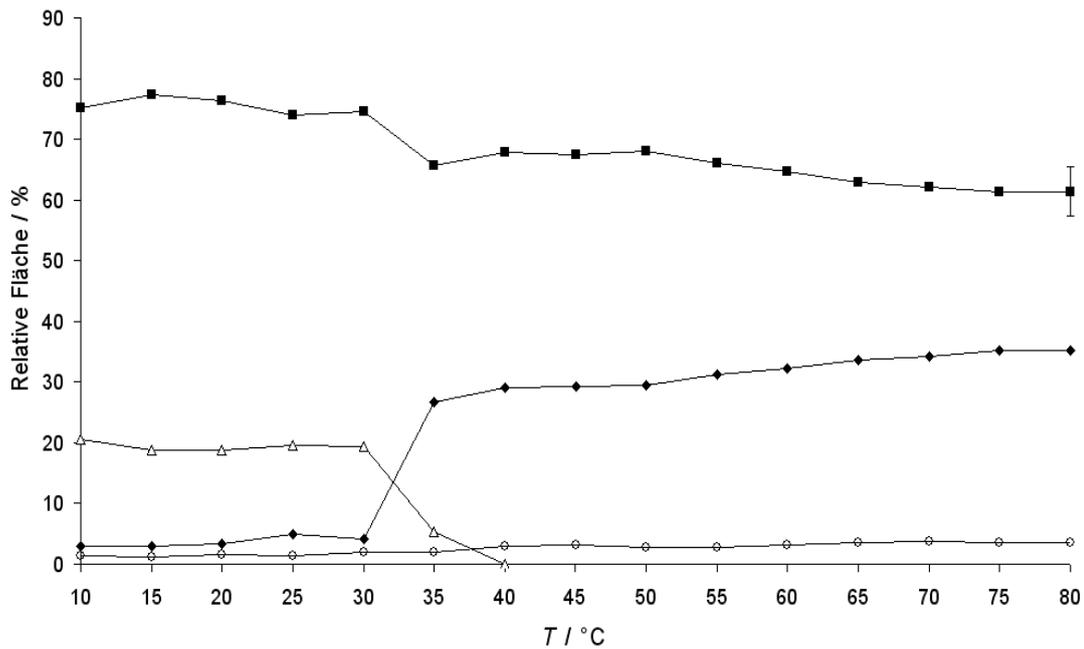


Abb. 4.4.3: Temperaturabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden von linearem PNIPAM im Bereich von 10-80 °C. Symbolzuordnung: ◆ intramolekulare H-Brücken ($\sim 1652 \text{ cm}^{-1}$); ■ Carbonylgruppen in mittelhydrophober Umgebung ($\sim 1626 \text{ cm}^{-1}$); Δ Wasserstoffbrücken zu D₂O I ($\sim 1606 \text{ cm}^{-1}$); □ Wasserstoffbrücken zu D₂O II ($\sim 1583 \text{ cm}^{-1}$). Der Fehlerbalken zeigt die durch Mehrfachbestimmungen ermittelte Ungenauigkeit bei der Sekundärstrukturbestimmung an.

Die folgenden Abb. 4.4.4 und 4.4.5 zeigen die temperaturabhängigen IR-Spektren bzw. H-Brückenanteile für ein Mikrogel aus PNIPAM, welches 1,5 % (w/w) BIS (siehe Abb. 1.11) als Quervernetzer enthält. Im Gegensatz zum linearen PNIPAM, welches einen sehr scharfen, diskontinuierlichen Übergang bei der LCST zeigt, erweist sich die Transition gequollener Zustand → kollabierter Zustand beim Mikrogel als deutlich unschärfer und kontinuierlicher, was bereits aus DLS-Messungen bekannt ist und auf die größere Subkettenlängeninhomogenität bei Mikrogelen zurückgeführt werden kann (siehe Kap. 1.3.4). Dies manifestiert sich durch den deutlich flacheren Anstieg des Anteils der Bande für intramolekulare H-Brücken, während die Bande für H-Brücken zum Solvens beim Erreichen der VPTT ebenso drastisch an Intensität verliert wie beim linearen PNIPAM. Die VPTT ist mit 32-33 °C praktisch identisch zur LCST von linearem PNIPAM, ebenfalls in sehr guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten (Tab. 1.1). Beim nächsten untersuchten System (Abb. 4.4.6 und 4.4.7), einem Copolymermikrogel mit der Zusammensetzung 45 mol-% NIPAM/55 mol-% DEAAM mit 6 % (w/w) BIS als Quervernetzer, ist ein kontinuierlicher Phasenübergang zwischen 10 und 50 °C feststellbar, obwohl DLS-Messungen eine VPTT von 21 °C anzeigen (Keerl & Richtering, 2007). Hier zeigt sich deutlich der Einfluß der hohen Quervernetzerkonzentration, die im Vergleich zum untersuchten PNIPAM-Mikrogel mit nur 1,5 % (w/w) Vernetzer zu einer noch ausgeprägteren Subkettenlängeninhomogenität führt. Ein ähnliches Bild zeigt sich beim Mikrogelgemisch PNIPAM-PDEAAM im Verhältnis 40 zu 60 mol-% mit je 1,5 % (w/w) BIS (Abb. 4.4.8 und 4.4.9), wobei hier eine kontinuierliche Dehydratisierung von ca. 30 °C bis zur maximalen Temperatur von 80 °C beobachtet werden kann.

4. Ergebnisse und Diskussion

De facto würde jedoch ein zweiphasiges Verhalten erwartet werden, da PNIPAM- bzw. PDEAAM-Gele eine VPTT von 32 °C bzw. 26 °C aufweisen. Die Ursache hierfür dürfte in interfacialen Wechselwirkungen der beiden Polymernetzwerke zu suchen sein, die ein teilweise interdependentes, kontinuierliches Kontraktionsverhalten der Mikrogele begünstigen. Die Tatsache, daß ein signifikanter Anstieg des Integrals der Bande für intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen Carbonylgruppen und Amiddeuteronen erst ab 30 °C beobachtet werden kann, deutet jedoch auch darauf hin, daß das temperaturabhängige Verhalten dieses speziellen Gelgemisches durch die PNIPAM-Mikrogele dominiert wird.

Abschließend fällt die generell größere Hydrophilie der Mikrogele (mit Ausnahme des Homopolymergemisches) unterhalb (vernetztes PNIPAM) und auch oberhalb (vernetztes Copolymer) der VPTT im Vergleich zum linearen PNIPAM auf. Eine potentielle Ursache hierfür ist das hydrophile BIS, welches möglicherweise zusätzliche H-Brücken zum Solvens vermittelt sowie das deutlich geringere Kontraktionsvermögen vernetzter Gele (Tab. 1.1).

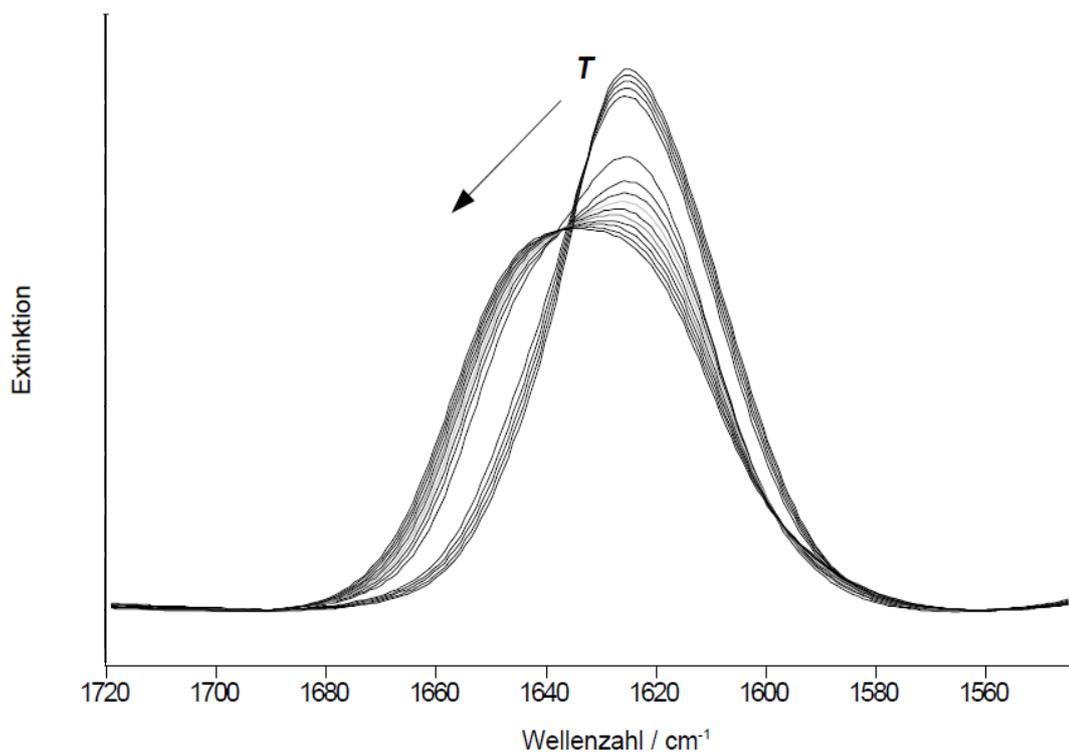


Abb. 4.4.4: Normierte FTIR-Spektren der PNIPAM-Mikrogele zwischen 10 und 80 °C bei 1 bar. Der Pfeil zeigt, wie angedeutet, die Entwicklung der Spektren mit steigender Temperatur an.

4. Ergebnisse und Diskussion

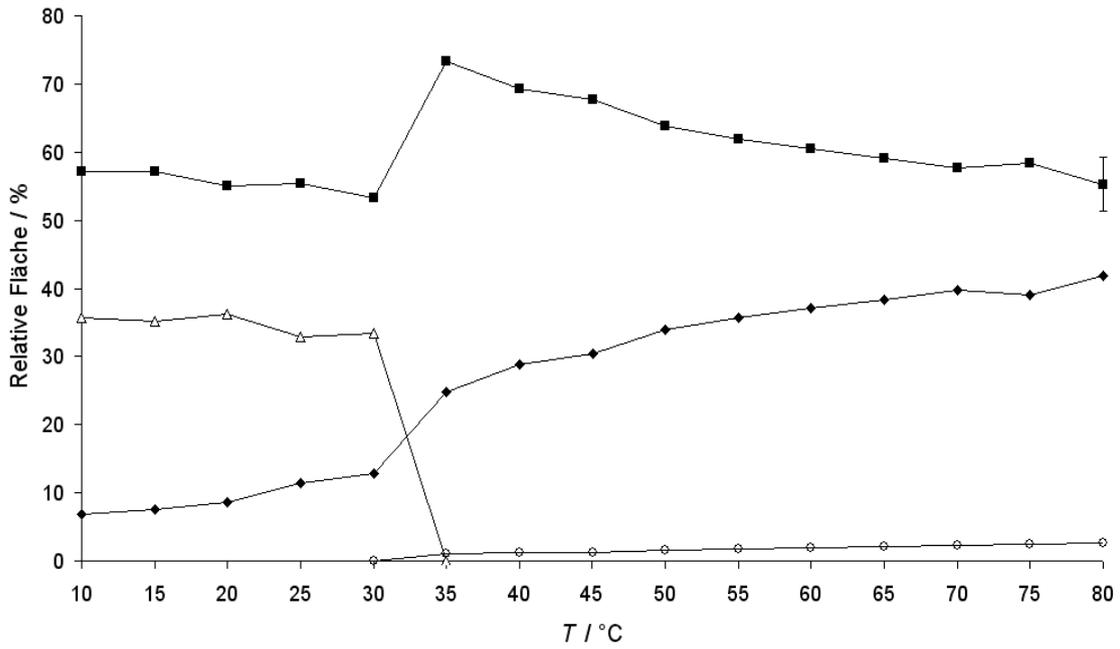


Abb. 4.4.5: Temperaturabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der PNIPAM-Mikrogele im Bereich von 10-80 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

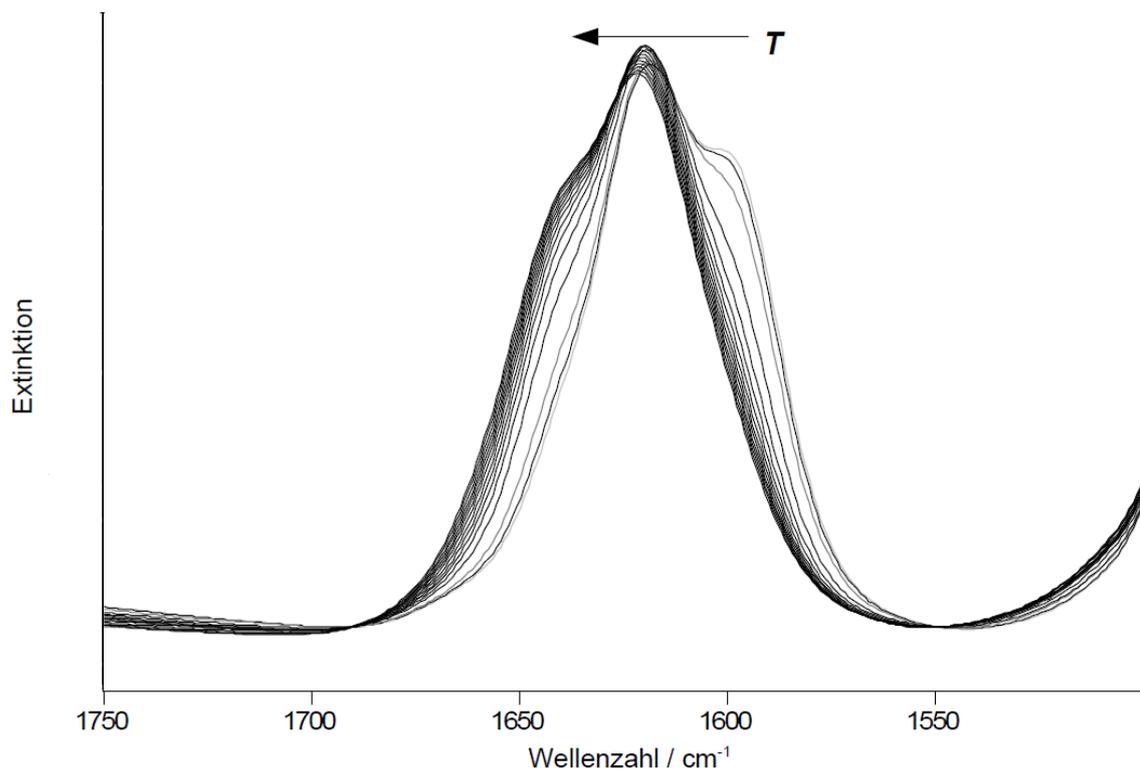


Abb. 4.4.6: Normierte FTIR-Spektren der Mikrogelepräparation aus NIPAM/DEAAM (45-55 mol-%) zwischen 10 und 80 °C bei 1 bar. Der Pfeil zeigt, wie angedeutet, die Entwicklung der Spektren mit steigender Temperatur an.

4. Ergebnisse und Diskussion

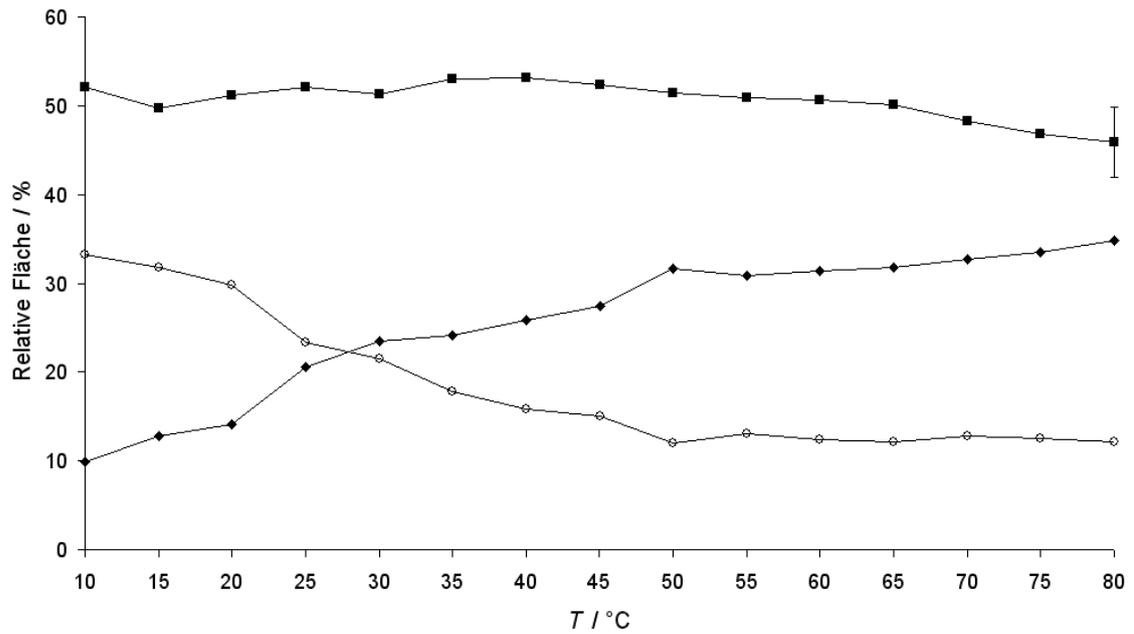


Abb. 4.4.7: Temperaturabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der Mikrogelpräparation aus NIPAM/DEAAM (45-55 mol-%) im Bereich von 10-80 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

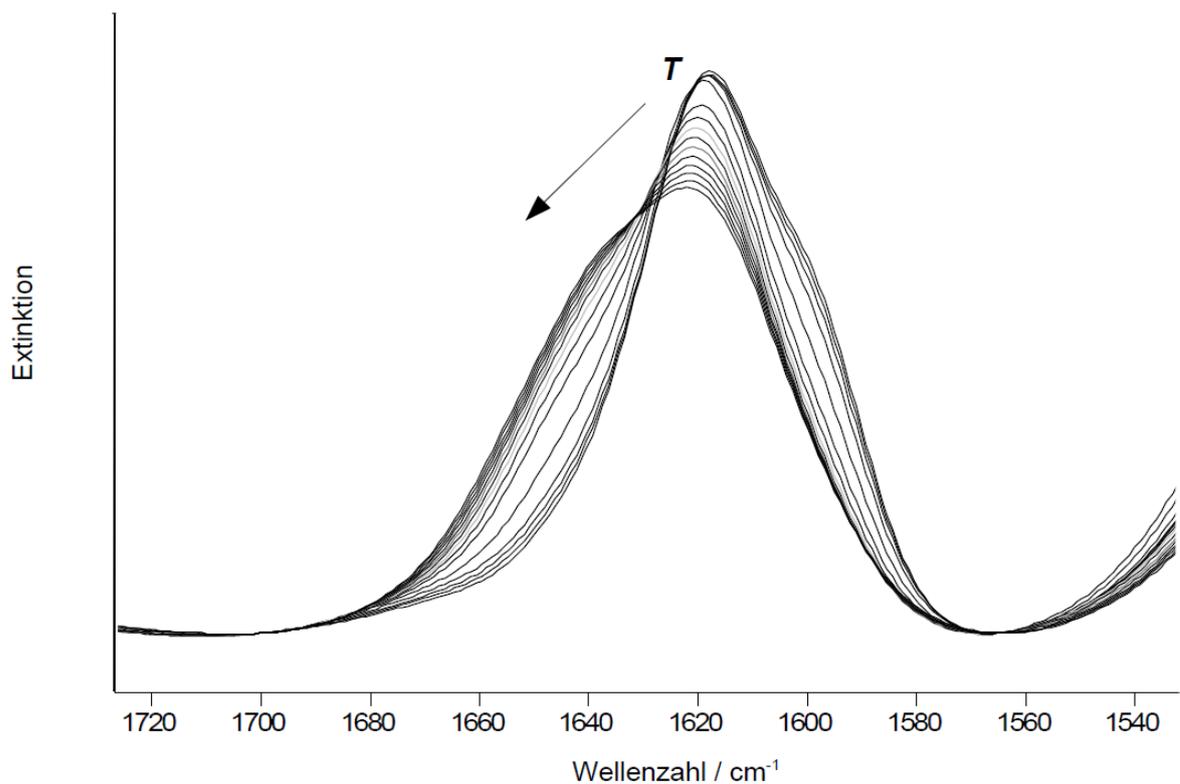


Abb. 4.4.8: Normierte FTIR-Spektren des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60 mol-%) zwischen 10 und 80 °C bei 1 bar. Der Pfeil zeigt, wie angedeutet, die Entwicklung der Spektren mit steigender Temperatur an.

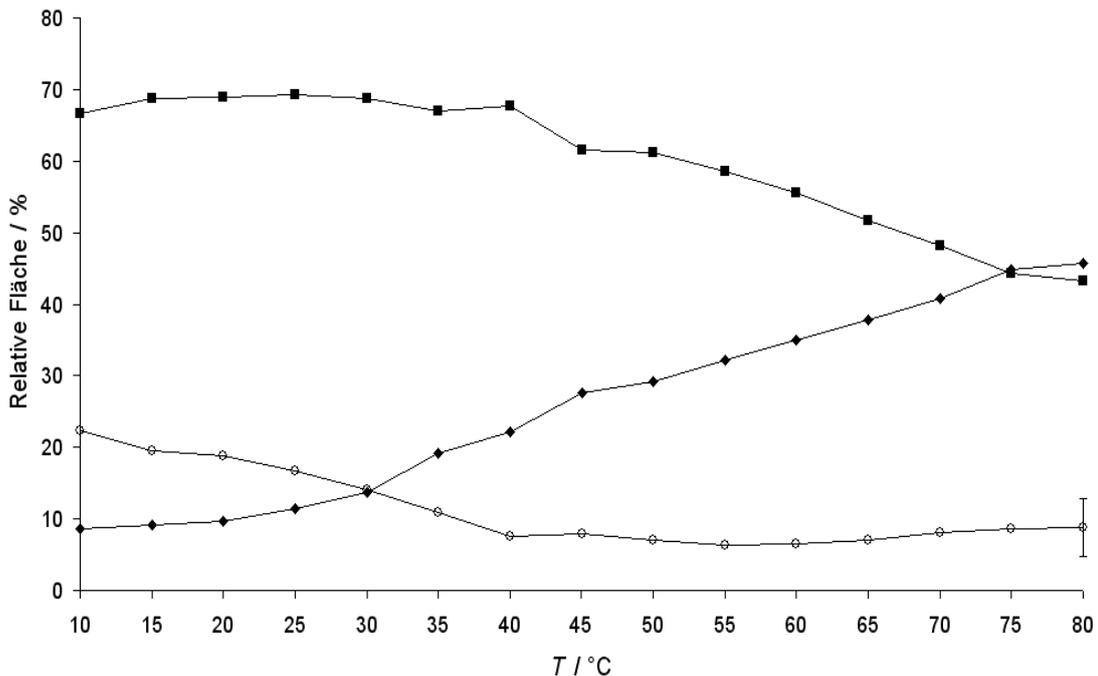


Abb. 4.4.9: Temperaturabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60 mol-%) zwischen 10 und 80 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

4.4.2 Druckabhängige FTIR-Messungen

Bei Anwendung von HHD zeigen alle untersuchten Polymer-/Hydrogelsysteme ein genau entgegengesetztes Verhalten im Vergleich zur Temperaturerhöhung bei Atmosphärendruck. Die Abb. 4.4.10 und 4.4.11 zeigen die repräsentativen Hochdruck-FTIR-Daten von linearem PNIPAM bei 20 °C (unterhalb der LCST) und Abb. 4.4.12 sowie Abb. 4.4.13 diejenigen bei 50 °C (oberhalb der LCST). Alle weiteren Daten der Meßreihen bei 10, 30 und 40 °C befinden sich im Anhang. Bei 20 °C sind bis ~ 1500 bar keinerlei Veränderungen zu beobachten, oberhalb dieses Druckes zeigt sich bis ~ 6000 bar ein leichter Anstieg der relativen Anteile der Banden, welche Wasserstoffbrücken zum Solvens D₂O anzeigen, wohingegen der Anteil der Subbande bei ~ 1626 cm⁻¹ (Carbonylgruppen in mittelhydrophober Umgebung, s.o.) spiegelbildlich abnimmt. Von ~ 6000 bis zum Maximaldruck von ~ 9000 bar treten keine weiteren Veränderungen auf (Bei ~ 8500 bar und 20 °C gefriert D₂O unter Bildung von Eis-VI, Bridgman, 1935). Ähnliche Ergebnisse zeigen auch die Messungen bei 10 und 30 °C. Die Messung bei 50 °C zeigt deutlich stärkere Veränderungen des Wasserstoffbrückenbindungsmusters bereits zwischen 1 und ~ 500 bar, welche sich durch eine starke Abnahme des relativen Anteils der Subbande für intramolekulare H-Brücken bei gleichzeitigem Anstieg des Anteils der Bande für Carbonylgruppen in mittelhydrophober Umgebung äußern. Bei ~ 5400 bar erscheint zudem eine zweite Bande für H-Brücken zum D₂O bei ~ 1612 cm⁻¹, deren Flächenanteil bis zum Maximaldruck von ~ 11400 bar, gemeinsam mit der zweiten, bisher

4. Ergebnisse und Diskussion

nahezu konstanten Bande für H-Brücken zum Solvens bei $\sim 1595 \text{ cm}^{-1}$, ansteigt. Insgesamt zeigt sich somit eine Begünstigung des hydratisierten, gequollenen Zustandes unter hohen hydrostatischen Drücken. Im Vergleich zur temperaturabhängigen Messung bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (Abb. 4.4.3) liegt das Polymer bereits zu Beginn in einer hydrophoberen Konfiguration vor, was ebenfalls für die Mikrogele zutrifft (s.u.). Offenbar begünstigt die Oberfläche der Hochdruckzelle (Diamant und BaSO_4) die Ausbildung intramolekularer H-Brücken im Vergleich zur Oberfläche der Temperaturmeßzelle (CaF_2 und Mylar), wobei das genaue Ausmaß von der Temperatur und dem jeweiligen Polymer abhängig ist. Auch die druckinduzierten, geschwollenen Zustände sind in der Regel hydrophober als diejenigen, die durch Absenkung der Temperatur unter die LCST/VPTT bei Atmosphärendruck induziert werden. Wie auch im Rahmen der temperaturabhängigen Messungen (s.o.) ändern sich die Subbandenpositionen mit steigendem Druck nicht signifikant, und auch die druckinduzierten Veränderungen sind nach Dekompression bei allen untersuchten Systemen vollständig reversibel.

Aus der Messung bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ unter HHD läßt sich unter der Annahme eines Zweizustandsgleichgewichtes Globulus \leftrightarrow Knäuel für den Hauptübergang zwischen 1 und $\sim 5400 \text{ bar}$ die Änderung der Freien Standardenthalpie (Gibbsenergie) mittels folgender Gleichung berechnen:

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K_{\text{eq}} = -RT \cdot \ln [(I_g - I_p) / (I_p - I_k)] \quad (4.2)$$

Hierbei sind I_g , I_p und I_k jeweils die entsprechenden Bandenanteile im globulären Zustand (1 bar), bei einem bestimmten Druck p und im Knäuelzustand (hier bei $\sim 5400 \text{ bar}$), wobei der druckabhängige Verlauf der Bandenanteile bei einem Zweizustandsgleichgewicht sigmoidal sein sollte. Die assoziierten Volumenänderungen ergeben sich mittels der Beziehung $(d\Delta G^0/dp)_T = \Delta V^0$. Somit wird aus einer Auftragung ΔG^0 vs. p aus dem Schnittpunkt mit der Ordinate der Wert für $\Delta G^0_{1 \text{ bar}}$ bezüglich des Gleichgewichtes Globulus \leftrightarrow Knäuel und aus der Steigung die mit der Transition verbundene Volumenänderung erhalten (Abb. 4.4.14). Aus der Berechnung ergeben sich $\Delta G^0_{1 \text{ bar}} = 4,2 \pm 0,24 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und $\Delta V^0 = -29 \pm 1,09 \text{ ml} \cdot \text{mol}^{-1}$. Diese Werte entsprechen in etwa denjenigen für die Druckdenaturierung von Proteinen wie SNase oder RNase (Panick et al., 1998; Panick & Winter, 2000), lediglich $\Delta G^0_{1 \text{ bar}}$ ist deutlich kleiner, was auch nicht überrascht, da sich das Polymer bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ im Gegensatz zu den bei Raumtemperatur untersuchten Proteinen nahe seiner "Kältedenaturierungstemperatur" befindet. Der negative Wert von ΔV^0 weist auf die Anwesenheit von Defektvolumina im kollabierten Globuluszustand hin, da geladene oder polare Gruppen, deren Hydratisierung ebenfalls das Gesamtvolumen des Systems erniedrigt (siehe Kap. 1.2.3), hier nicht vorhanden sind.

4. Ergebnisse und Diskussion

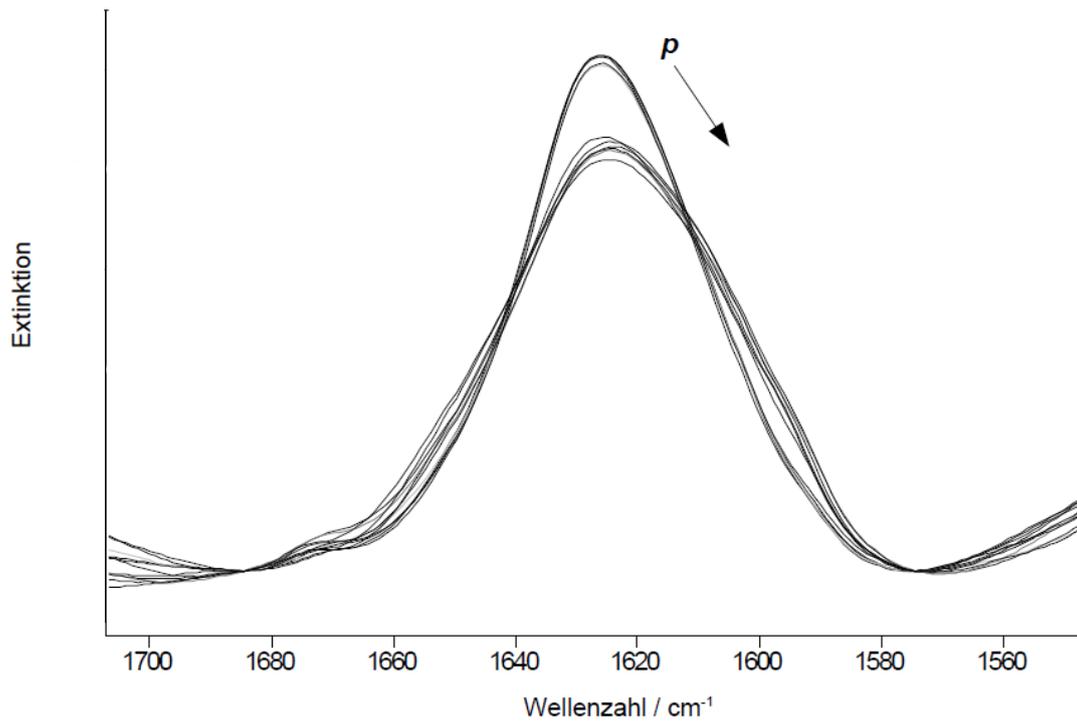


Abb. 4.4.10: Normierte FTIR-Spektren von linearem PNIPAM zwischen 1 und ~ 9000 bar bei 20 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

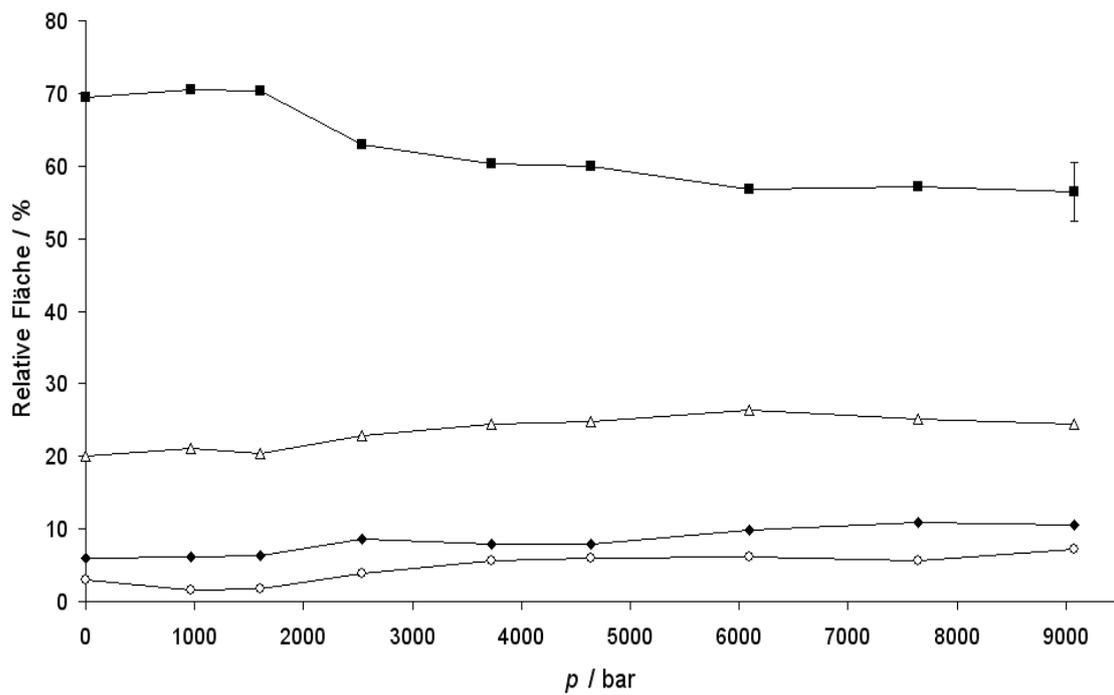


Abb. 4.4.11: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden von linearem PNIPAM bei 20 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

4. Ergebnisse und Diskussion

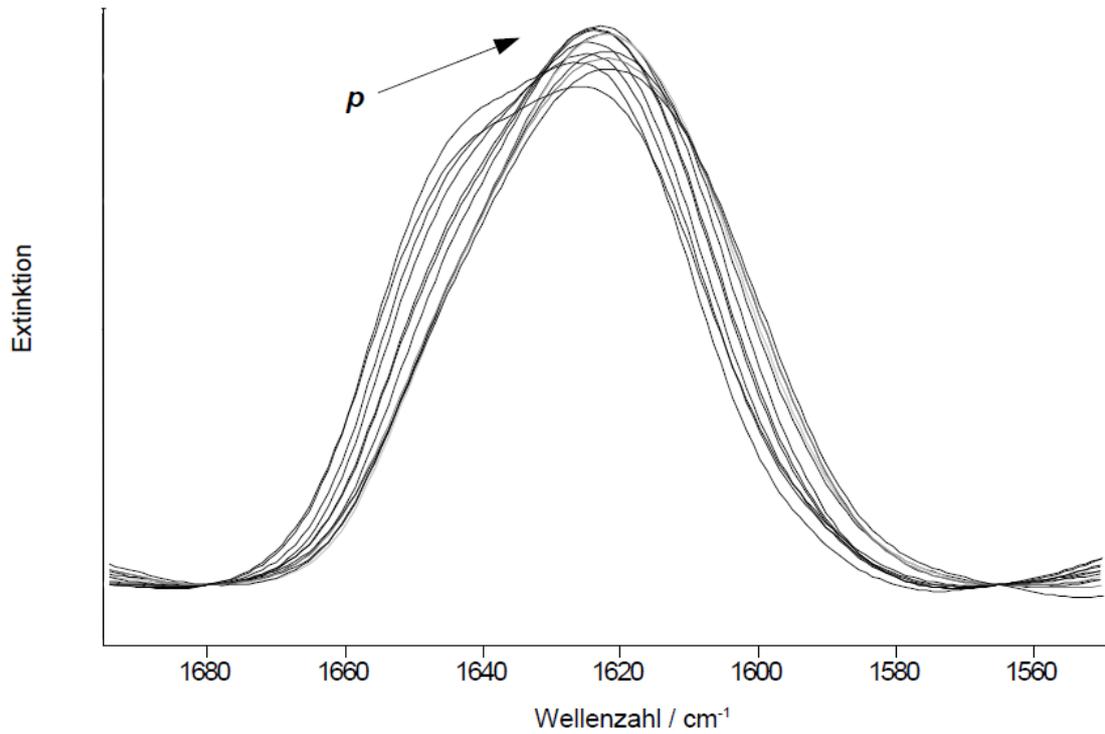


Abb. 4.4.12: Normierte FTIR-Spektren von linearem PNIPAM zwischen 1 und ~ 11500 bar bei 50 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

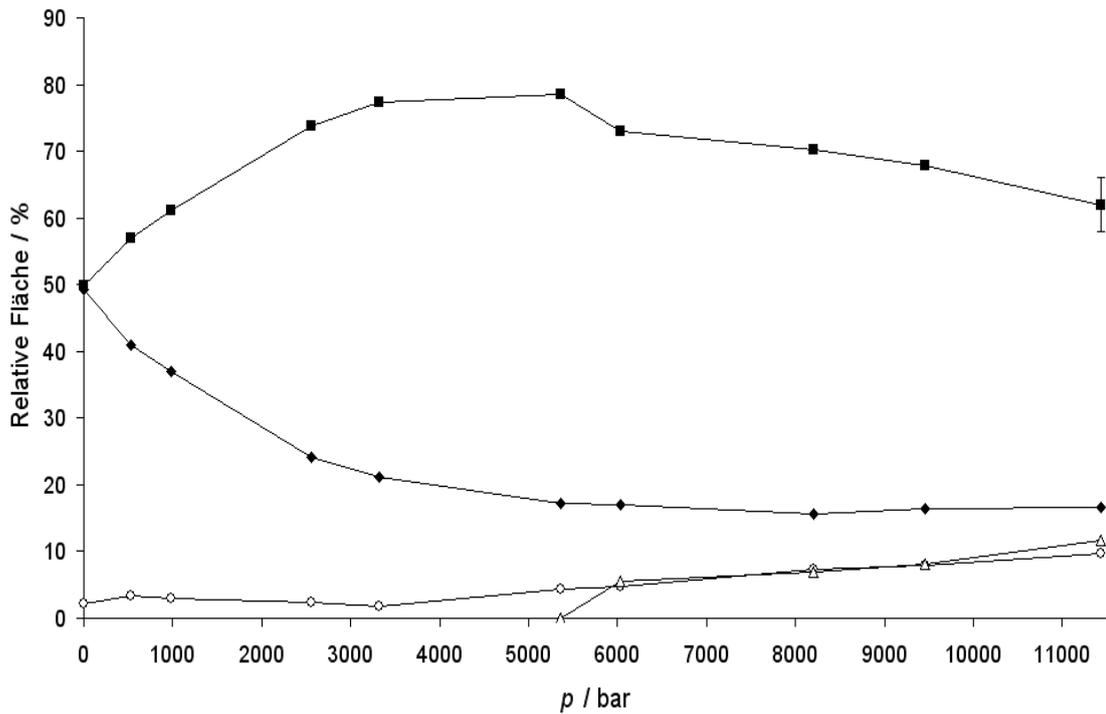


Abb. 4.4.13: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden von linearem PNIPAM bei 50 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

4. Ergebnisse und Diskussion

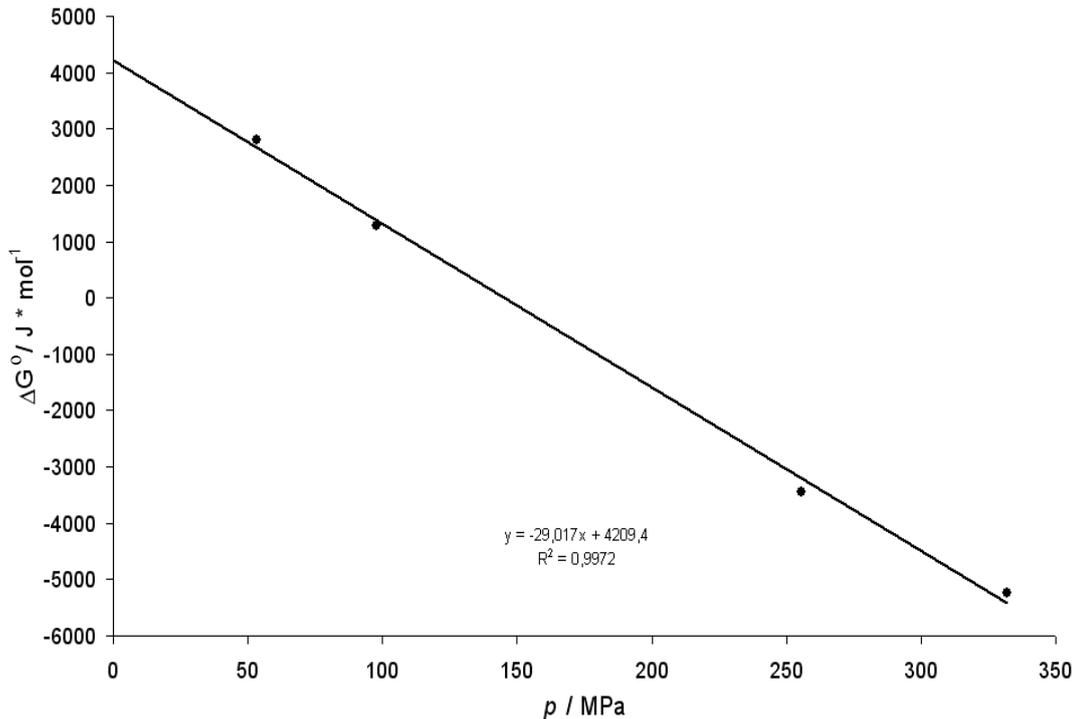


Abb. 4.4.14: Auftragung ΔG° vs. p für den druckinduzierten Übergang Globulus \leftrightarrow Knäuel von linearem PNIPAM bei 50 °C. Als Druckeinheit wurde MPa statt bar gewählt, da sich so aus der angegebenen Geradengleichung die assoziierte Volumenänderung direkt in $\text{ml} \cdot \text{mol}^{-1}$ ablesen läßt (0,1 MPa = 1 bar).

Die Abbildungen 4.4.15 bis 4.4.18 zeigen die entsprechenden Hochdruckmeßreihen für die quervernetzten PNIPAM-Mikrogele (ebenfalls repräsentativ bei 20 und 50 °C, alle übrigen Meßreihen im Anhang). Im Ganzen entsprechen die Ergebnisse denjenigen für das lineare Polymer, i.e. hoher hydrostatischer Druck begünstigt die Hydratisierung des Gels und somit die Ausbildung eines gequolleneren Zustandes. Im Vergleich zum linearen Polymer fällt die größere Druckempfindlichkeit bei 20 °C (unterhalb der VPTT) auf, da der relative Anteil der Bande für H-Brücken zum Solvens einen deutlich stärkeren Anstieg aufweist und bereits bei ~ 2500 bar einen Plateauwert erreicht. Der deutlich hydrophilere Endzustand oberhalb von ~ 2500 bar kann außerdem auf den Einfluß des hydrophilen BIS und die dadurch verstärkte Vermittlung von H-Brücken zum Solvens zurückzuführen sein (s.o.). Bei 50 °C (oberhalb der VPTT) zeigt das PNIPAM-Mikrogel eine deutlich geringere Schwellfähigkeit unter HDD im Vergleich zum linearen Polymer, wie aus den relativen Amid-I'-Bandenanteilen abgelesen werden kann, wobei ähnlich zum linearen PNIPAM ein zweiphasiges Verhalten auftritt mit einem ersten, teilweisen Schwellen zwischen 1 und ~ 1800 bar, gefolgt von einem Plateau, und einer zweiten Schwellphase zwischen ~ 5000 und ~ 9500 bar. Diese geringere Schwellfähigkeit im kollabierten Zustand ist ebenfalls bei den übrigen Mikrogele zu beobachten und kann auf die sterischen Restriktionen durch die Inkorporation des Quervernetzers zurückgeführt werden (s.o.).

4. Ergebnisse und Diskussion

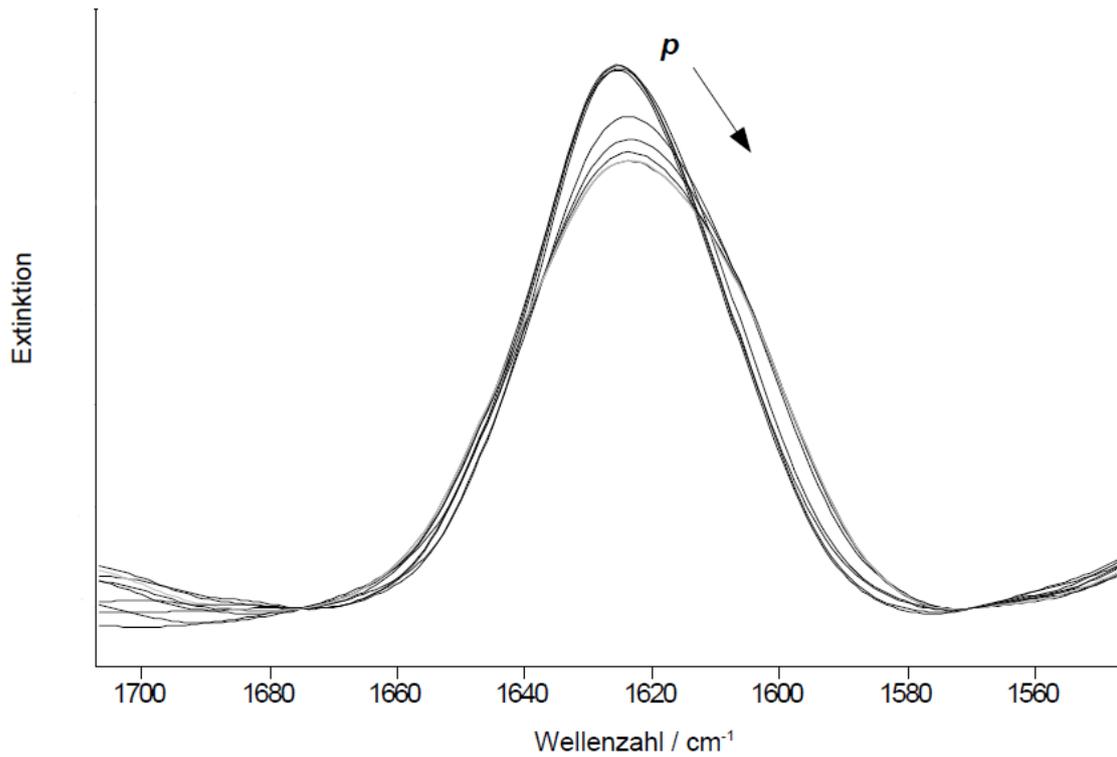


Abb. 4.4.15: Normierte FTIR-Spektren der PNIPAM-Mikrogelpräparation zwischen 1 und ~ 6000 bar bei 20 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

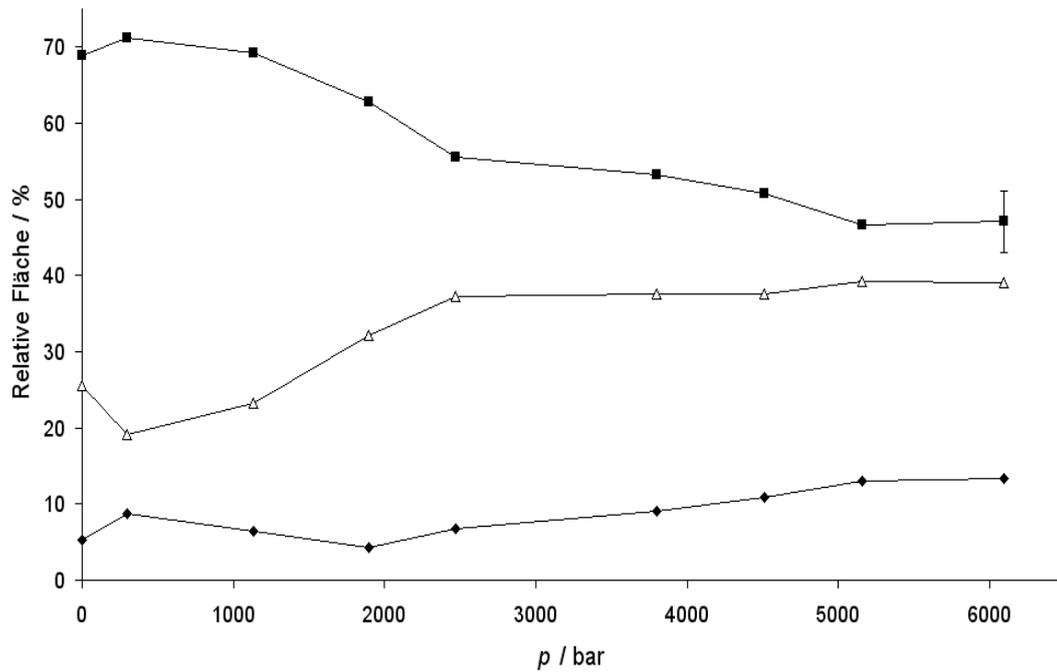


Abb. 4.4.16: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der PNIPAM-Mikrogele bei 20 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

4. Ergebnisse und Diskussion

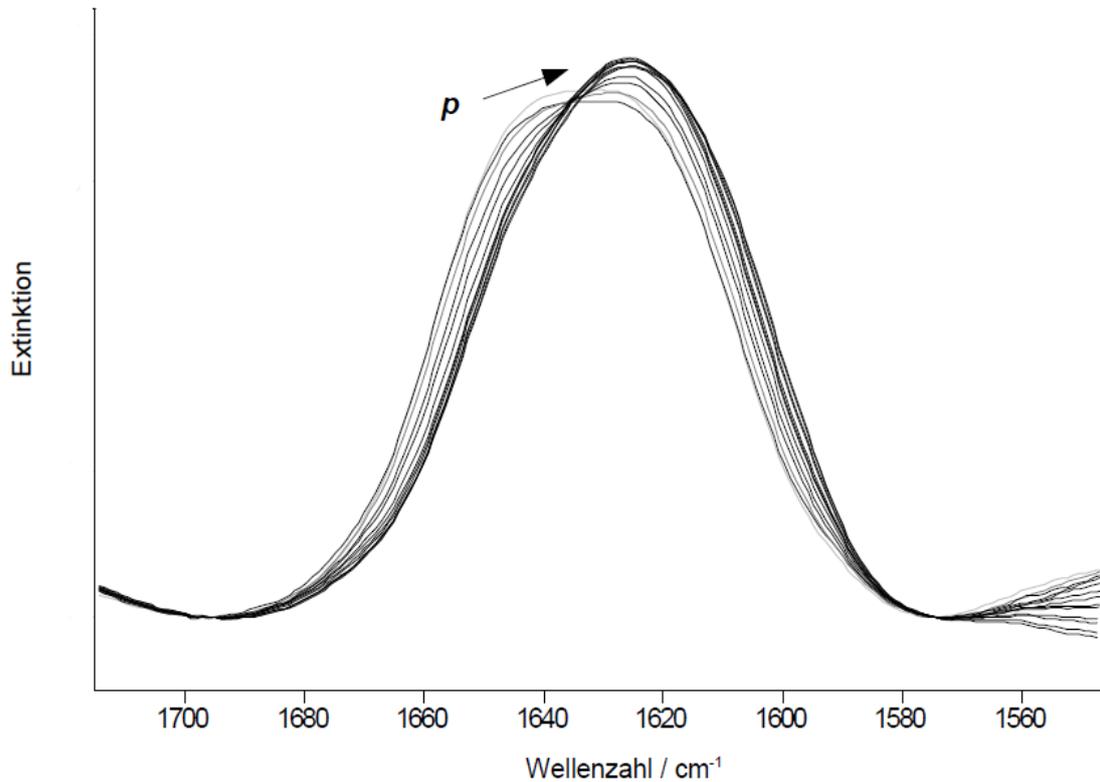


Abb. 4.4.17: Normierte FTIR-Spektren der PNIPAM-Mikrogelpräparation zwischen 1 und ~ 10600 bar bei 50 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

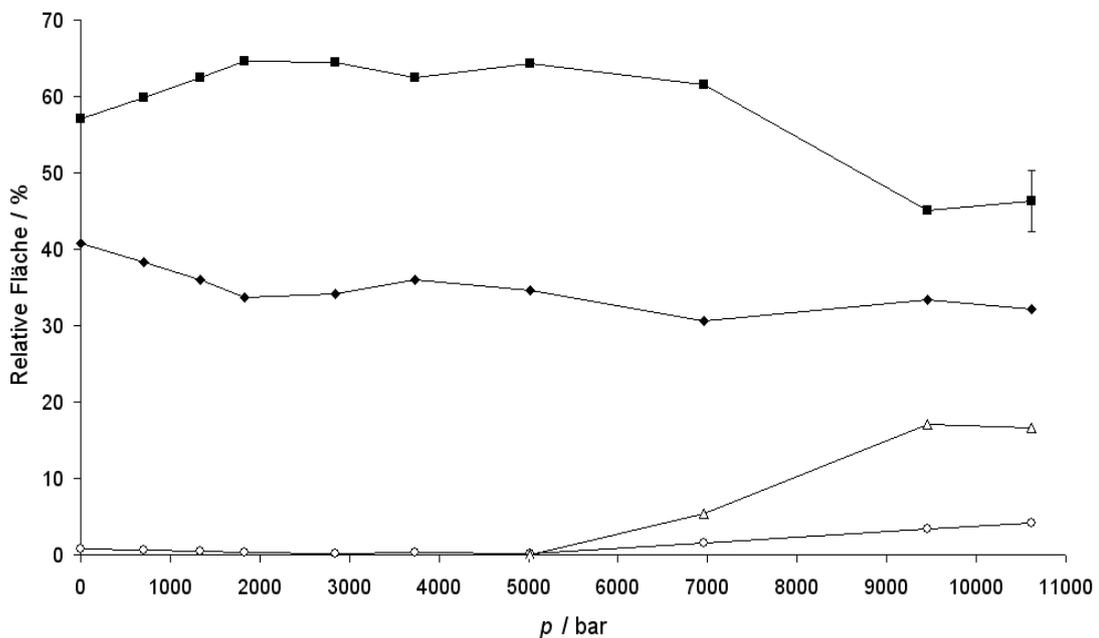


Abb. 4.4.18: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der PNIPAM-Mikrogele bei 50 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

Für das Mikrogelgemisch PNIPAM-PDEAAM (40-60), sind die repräsentativen HHD-Meßreihen bei 10 und 40 °C (übrige Meßreihen im Anhang) in den Abbildungen 4.4.19-4.4.22 dargestellt. Während bei 10 °C (unterhalb der VPTT) praktisch keine Veränderung

4. Ergebnisse und Diskussion

im gesamten Druckverlauf bis über 7000 bar auftritt, zeigen die kollabierten Gele bei 40 °C (oberhalb der VPTT) wieder das bereits bekannte Verhalten der stärkeren Hydratisierung unter Druck. Im Gegensatz zum PNIPAM-Mikrogel kann hier eine zweite Schwellphase bei höheren Drücken nicht beobachtet werden. Aufgrund einer größeren Anzahl von Meßpunkten im Vergleich zum reinen PNIPAM-Mikrogel ist es hier möglich, durch Auftragung von ΔG^0 vs. p die thermodynamischen Parameter $\Delta G^0_{1 \text{ bar}}$ sowie ΔV^0 für den druckinduzierten Schwellprozeß zu ermitteln (Abb. 4.4.23). Es ergeben sich für $\Delta G^0_{1 \text{ bar}} = 8,5 \pm 1,57 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und für $\Delta V^0 = -60 \pm 10,06 \text{ ml}\cdot\text{mol}^{-1}$, womit beide Werte vom Betrag beträchtlich größer sind als beim linearen, nichtvernetzten PNIPAM. Der größere Wert für $\Delta G^0_{1 \text{ bar}}$ kann mit der Tatsache erklärt werden, daß Mikrogele beim Anschwellen aufgrund der Vernetzung einen elastischen Widerstand zu überwinden haben, der bei linearen Polymeren nicht vorhanden ist, wohingegen die deutlich ausgeprägtere Volumenänderung auf größere Defektvolumina im Inneren der Gelpartikel zurückgeführt werden kann. Diese sind wahrscheinlich ebenfalls ein Effekt des Vernetzers BIS, welcher im Gelnetzwerk sterische Restriktionen einführt, die letztlich zu größeren Packungsdefekten führen. Die berechneten $\Delta G^0_{1 \text{ bar}}$ - und ΔV^0 -Werte dürften in guter Näherung auch auf das reine PNIPAM-Mikrogel übertragbar sein. Eine weitere mögliche Erklärung für den hohen Wert von $\Delta G^0_{1 \text{ bar}}$ kann auch darin liegen, daß sich PNIPAM- und PDEAAM-Mikrogele möglicherweise in direkter Nachbarschaft befinden und teilweise über die PNIPAM-Donor- und PDEAAM-Akzeptorfunctionalitäten wasserstoffbrückenvernetzt sind. Beim Anschwellen üben beide Netzwerke einen additiven elastischen Widerstand aufeinander aus, was ebenfalls $\Delta G^0_{1 \text{ bar}}$ erhöht. Diese Interdependenz könnte auch die Abwesenheit eines Zweiphasenprofils bei Temperaturerhöhung unter Atmosphärendruck erklären (s.o.).

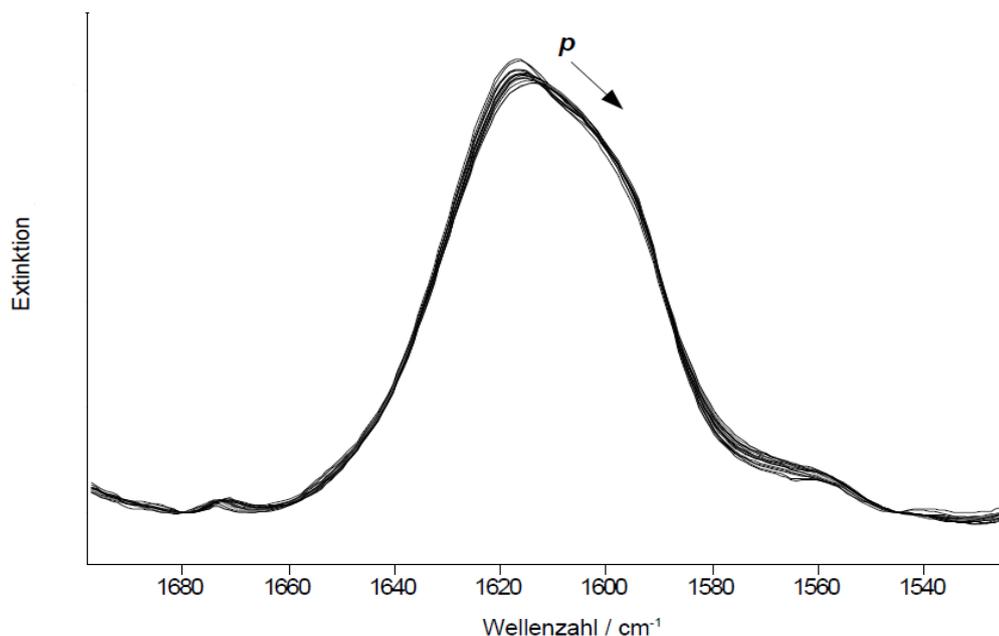


Abb. 4.4.19: Normierte FTIR-Spektren des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60 mol-%) zwischen 1 und ~ 7400 bar bei 10 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

4. Ergebnisse und Diskussion

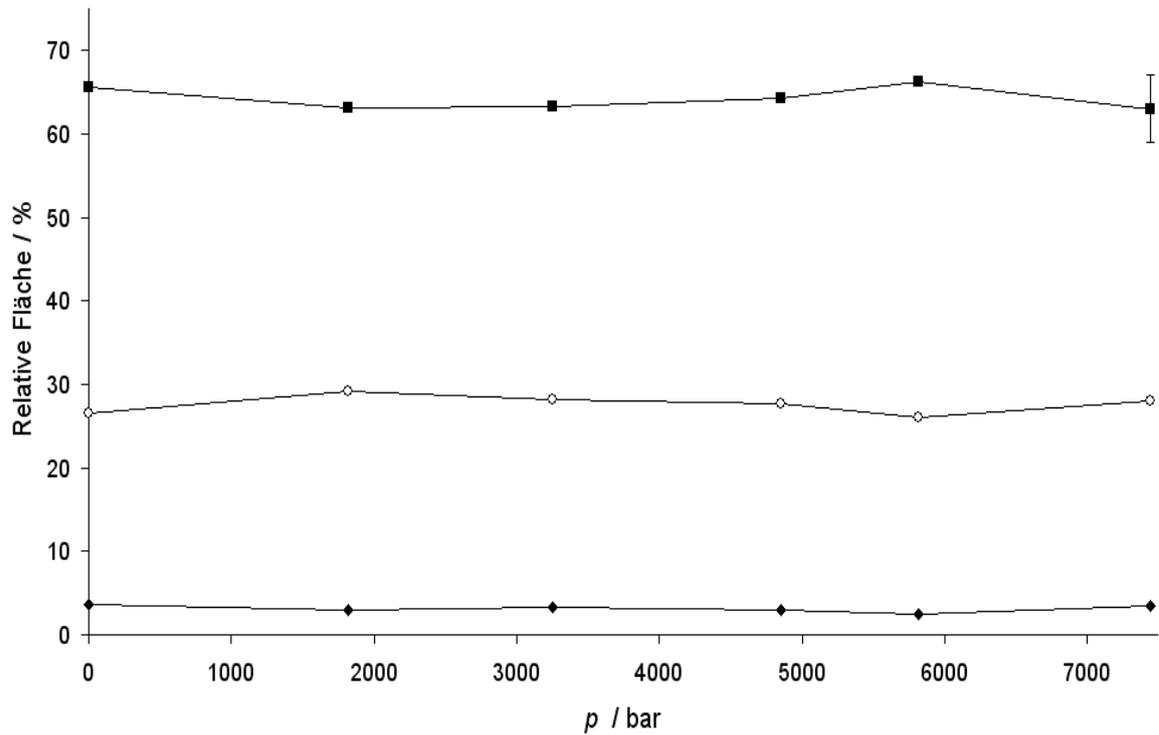


Abb. 4.4.20: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60 mol-%) bei 10 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

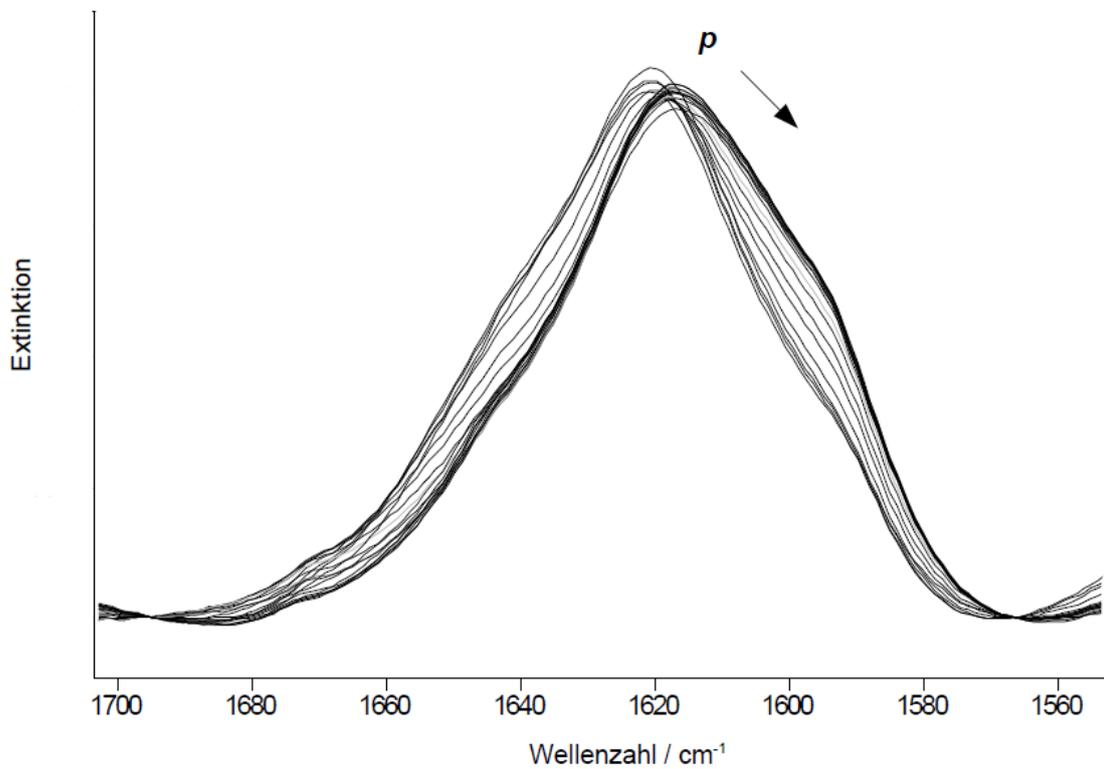


Abb. 4.4.21: Normierte FTIR-Spektren des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60 mol-%) zwischen 1 und ~ 9200 bar bei 40 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

4. Ergebnisse und Diskussion

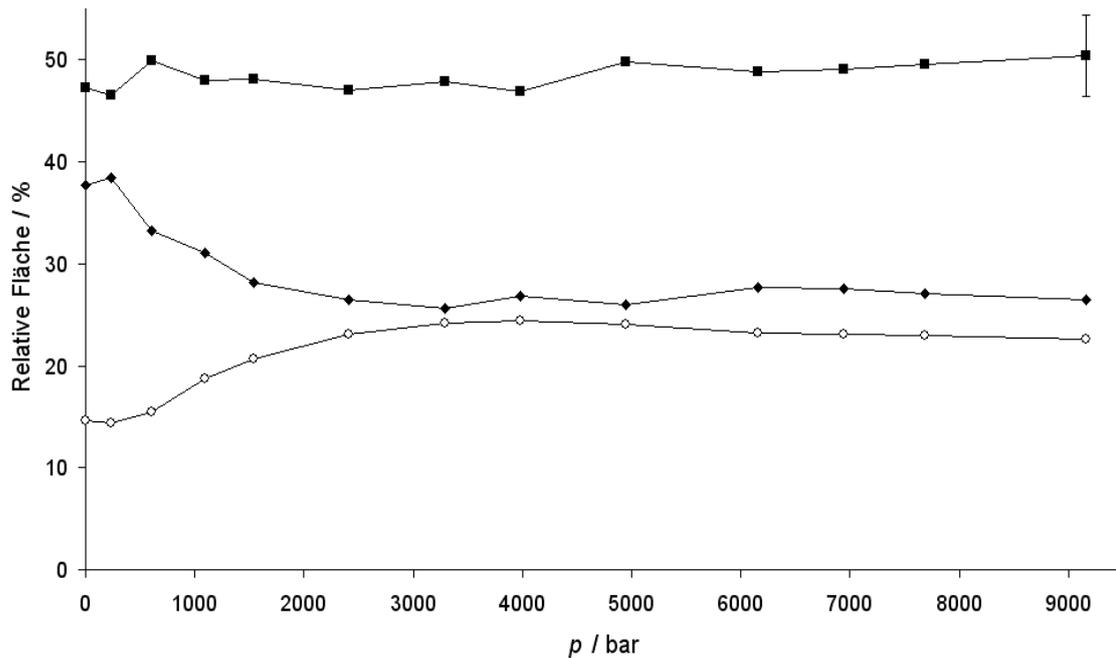


Abb. 4.4.22: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60 mol-%) bei 40 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

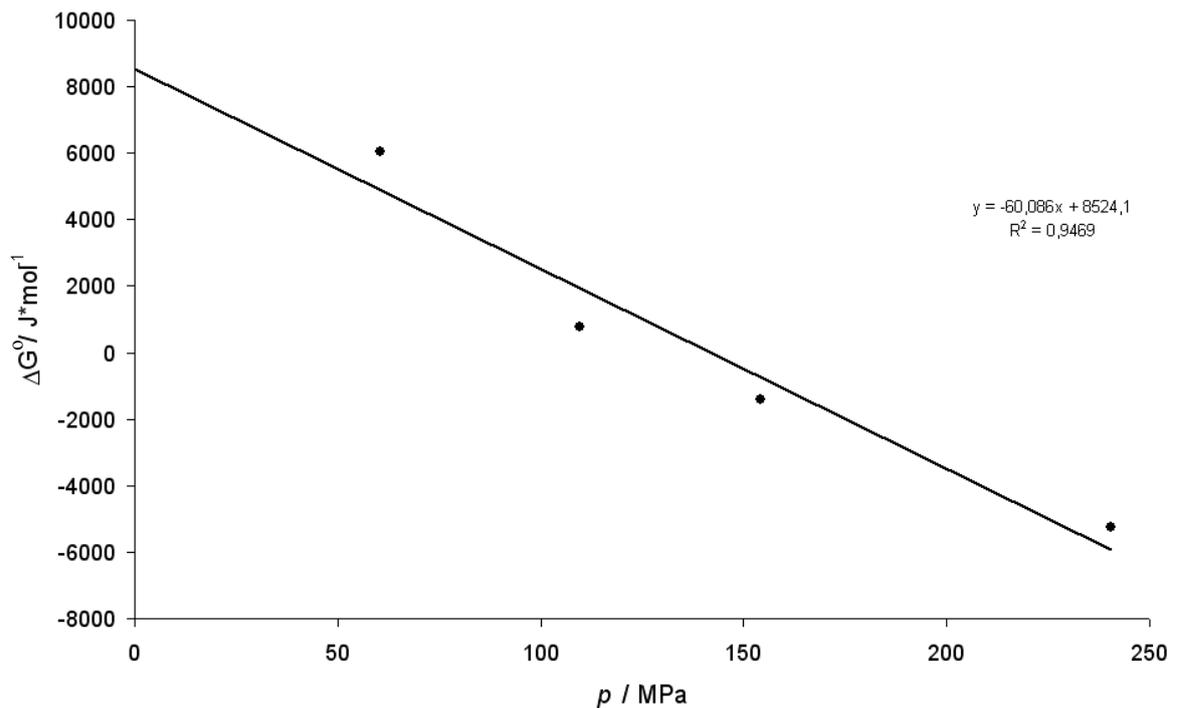


Abb. 4.4.23: Auftragung ΔG^0 vs. p für den druckinduzierten Übergang kollabierter Zustand \leftrightarrow geschwollener Zustand des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60 mol-%) bei 40 °C.

Die repräsentativen Ergebnisse des letzten untersuchten Systems, des Copolymermikrogels NIPAM/DEAAM (45 zu 55 mol-%), bei 10 und 40 °C zeigen die Abbildungen 4.4.24-4.4.27 (die übrigen Meßreihen befinden sich im Anhang). Das Mikrogel erweist sich bei 10 °C (unterhalb der VPTT) als sehr wenig drucksensitiv, erst ab ~ 7000 bar ist eine stärkere

4. Ergebnisse und Diskussion

Hydratisierung durch Erscheinen einer Bande bei $\sim 1610 \text{ cm}^{-1}$ feststellbar (Eis-VI-Bildung ebenfalls ab $\sim 7000 \text{ bar}$, Bridgman 1935). Hingegen zeigt das Copolymermikrogel bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (oberhalb der VPTT) bei Anwendung von HHD schon unterhalb von 1000 bar eine deutliche Hydratisierung, i.e. die Ausbildung eines gequollenen Zustands, wobei ein Plateau bei $\sim 4000 \text{ bar}$ erreicht wird. Aus dem druckabhängigen Verlauf der relativen Bandenanteile lassen sich bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ wieder $\Delta G_{1 \text{ bar}}^0$ und ΔV^0 für den Übergang kollabiert \rightarrow Geschwollen unter Annahme eines Zweizustandsgleichgewichtes berechnen (Abb. 4.4.28). Die erhaltenen Werte sind $\Delta G_{1 \text{ bar}}^0 = 4,8 \pm 1,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und $\Delta V^0 = -23,6 \pm 7,5 \text{ ml}\cdot\text{mol}^{-1}$. Überraschenderweise sind sowohl $\Delta G_{1 \text{ bar}}^0$ als auch ΔV^0 vergleichbar mit den Werten für lineares, nichtvernetztes PNIPAM. Die deutlich kleinere Volumenänderung im Vergleich zum Mikrogelgemisch PNIPAM-PDEAAM (40-60) kann möglicherweise auf die sterisch anspruchsvollen DEAAM-Reste zurückgeführt werden, die mit ihren zwei zusätzlichen Methylengruppen ansonsten leere Packungsdefekte ausfüllen können. Der deutlich geringere Wert für $\Delta G_{1 \text{ bar}}^0$ im Vergleich zum PNIPAM-PDEAAM (40-60) Mikrogelgemisch erscheint zunächst paradox, da aufgrund des erhöhten Gehaltes von BIS (6 % (w/w) vs. 1,5 % (w/w)) ein noch größerer elastischer Widerstand beim Schwellprozeß zu erwarten wäre. Möglicherweise sind H-Brückenbindungen von den zahlreichen BIS-Molekülen zum Solvens hierfür verantwortlich, welche den kollabierten Zustand gegenüber dem Geschwollenen unter HHD destabilisieren und somit die zu erwartende Stabilisierung des kollabierten Zustands durch den elastischen Widerstand des Gelgitters überkompensieren. Man beachte aber auch die oben genannte Möglichkeit, daß sich vicinale, H-brückenvernetzte PNIPAM- und PDEAAM-Mikrogele beim Mikrogelgemisch während des Schwellvorgangs behindern und dadurch einen elastischen Streß aufeinander ausüben. Da dies beim hier diskutierten Copolymermikrogel vermutlich nicht auftritt, kann dies auch eine Deutung für den hier gefundenen kleineren Wert von $\Delta G_{1 \text{ bar}}^0$ sein.

4. Ergebnisse und Diskussion

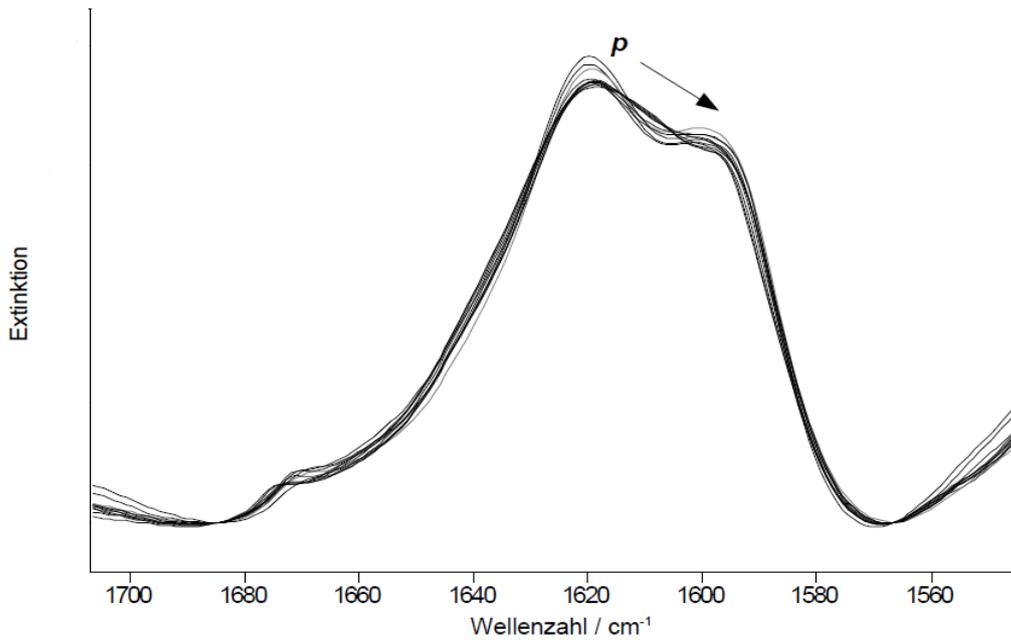


Abb. 4.4.24: Normierte FTIR-Spektren der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55 mol-%) zwischen 1 und ~9200 bar bei 10 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

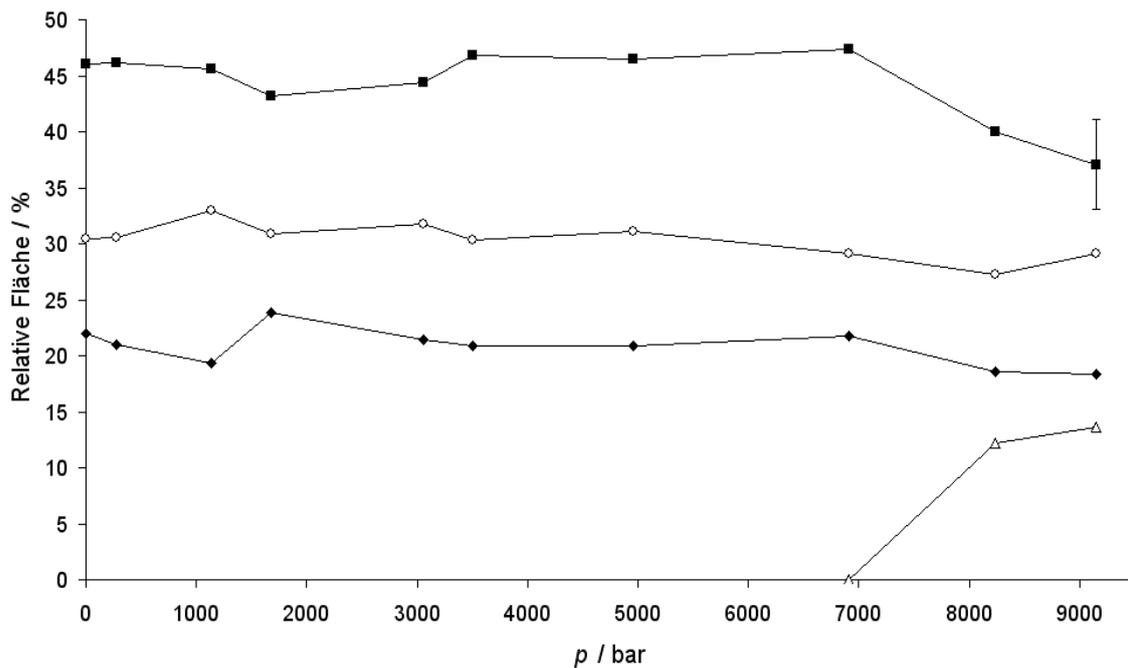


Abb. 4.4.25: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55 mol-%) bei 10 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

4. Ergebnisse und Diskussion

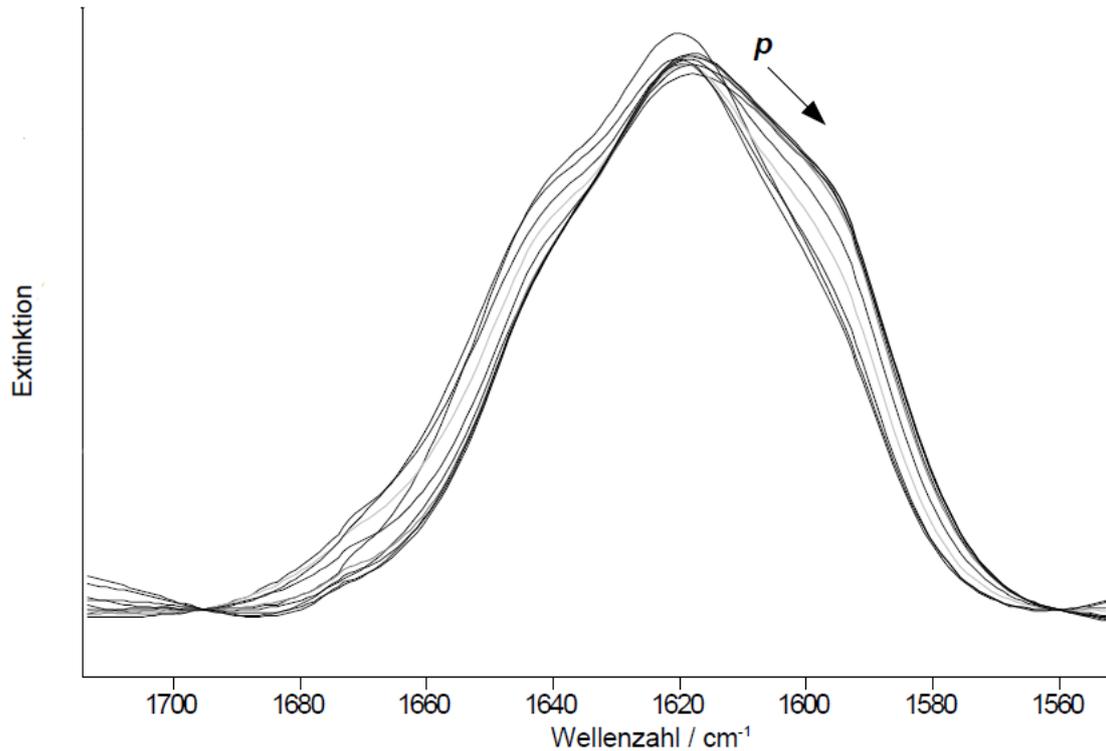


Abb. 4.4.26: Normierte FTIR-Spektren der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55 mol-%) zwischen 1 und ~9800 bar bei 40 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

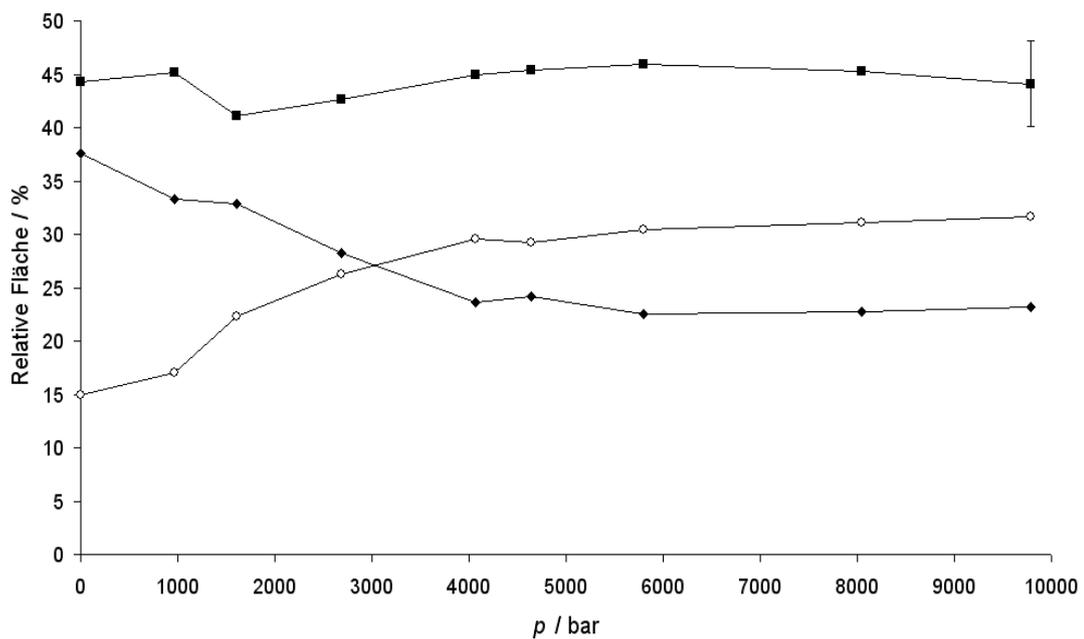


Abb. 4.4.27: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55 mol-%) bei 40 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

4. Ergebnisse und Diskussion

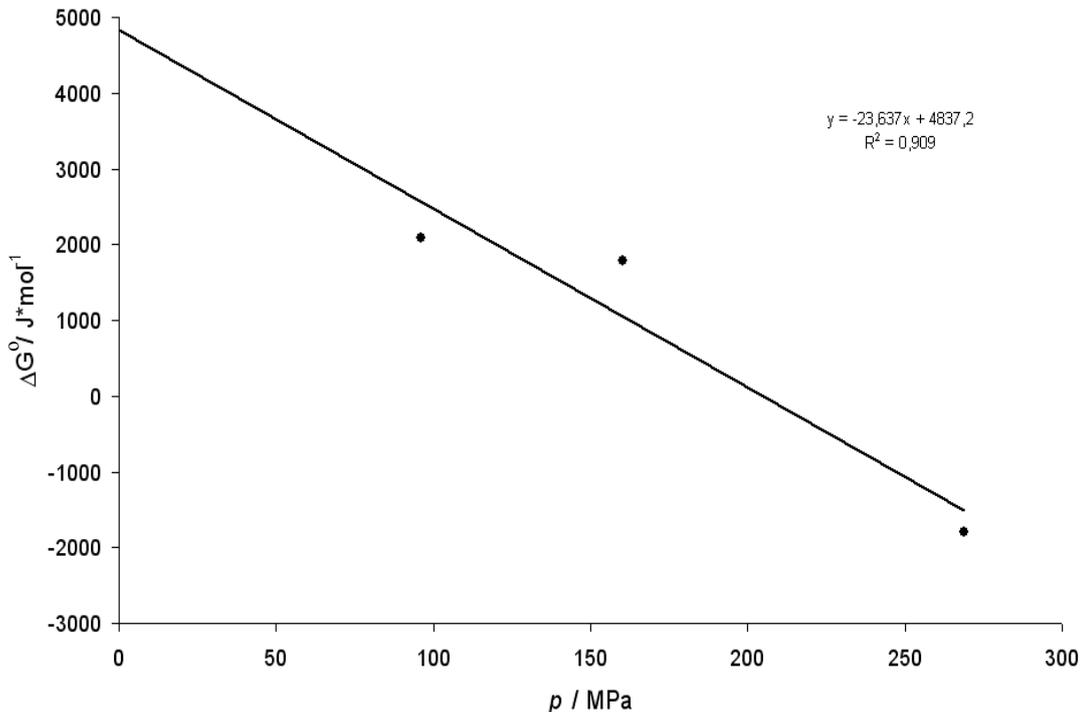


Abb. 4.4.28: Auftragung ΔG^0 vs. p für den druckinduzierten Übergang kollabierter Zustand \leftrightarrow geschwollener Zustand der Copolymermikrogele aus NIPAM/DEAAM (45-55 mol-%) bei 40 °C.

4.4.3 Zusammenfassung

Insgesamt zeigen die obigen Ergebnisse, daß sowohl lineares PNIPAM als auch die untersuchten Mikrogelsysteme unter hohem hydrostatischen Druck stärker hydratisiert werden, i.e. die Wechselwirkung mit dem Solvens nimmt zu. Dies bedeutet, daß der Zufallsknäuel- bzw. gequollene Zustand unter Druck gegenüber dem globulären bzw. kollabierten Zustand begünstigt wird. Sogar unterhalb der jeweiligen LCST oder VPTT, wenn die Polymere sich bereits im gequollenen Zustand befinden, führt die Anwendung von Druck in den meisten Fällen zu einer weiteren Hydratisierung. Diese Resultate stehen in sehr guter Übereinstimmung mit früheren FTIR-Untersuchungen von linearem PNIPAM, welche ebenfalls die Bildung einer stärker hydratisierten Konfiguration unter hohem Druck anzeigen (Meersman et al., 2005). Ein weiterer Hinweis für die Validität der obigen Daten kann aus einer Studie mit Hydrogelen aus dem PNIPAM-Isomer Poly(*N*-vinylisobutyramid) (PNVIBA) abgeleitet werden, in der kollabierte, optisch intransparente Hydrogele unter Druckbehandlung ihre Transparenz wiedergewinnen, i.e. die kollabierten, unlöslichen Polymerketten wieder in Lösung gehen (Kunugi et al., 2005). Hierdurch eignen sich lineare Polymere und Mikrogele aus PNIPAM und/oder PDEAAM nicht nur als vereinfachte Modellsysteme zur Untersuchung der Kälte-denaturierung von Proteinen (Kunugi & Tanaka, 2002), sondern auch als Modelle für die druckinduzierte Proteindenaturierung, welche analog zum Übergang Globulus \rightarrow Knäuel ist. Im Detail zeigen sich jedoch auch signifikante Unterschiede in der Drucksensitivität und den damit assoziierten

4. Ergebnisse und Diskussion

thermodynamischen Parametern wie zwischen dem linearen PNIPAM und den Mikrogelen als auch zwischen den Mikrogelen selbst. Hierbei spielen als mögliche Faktoren die Quervernetzerdichte und die Monomerkomposition eine Rolle, die eventuell Einfluß auf das Defektvolumen innerhalb der Partikel, als auch auf die Neigung H-Brücken zum Solvens auszubilden, nehmen können. Zur Klärung dieser Frage können zukünftige Studien beitragen, die Methoden wie Molekulardynamiksimulationen, Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) oder Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS) einsetzen, die genauere Informationen über die räumliche Anordnung und die interdependenten Wechselwirkungen der Reste innerhalb der Polymere/Gele liefern können.

Auch die temperaturabhängigen IR-Messungen zeigen interessante Resultate, da in allen untersuchten Systemen auch jenseits der LCST bzw. VPTT zum Teil deutliche Veränderungen hinsichtlich einer weiteren Dehydratisierung beobachtet werden können, welche mit DLS allein nicht detektierbar sind. Somit kann die IR-Spektroskopie, wie in der vorliegenden Studie, einen wichtigen Beitrag zum zusätzlichen Verständnis dieser überaus interessanten Polymersysteme leisten.

Durch die reversible Schwellfähigkeit der untersuchten Mikrogele unter Druck ergeben sich auch mögliche technische Anwendungen, wie die druckinduzierte Aktivierung/Desaktivierung von im Gel immobilisierten Enzymen, deren Substratzufuhr durch Erweiterung des Gelnetzwerkes unter Druck angeschaltet und bei Dekompression wieder abgeschaltet werden könnte.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Phospholipid-Sterin-Gemische (DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%) und DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1)) als Modelle für die Plasmamembranen von Pilzen bzw. Säugetieren mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie unter verschiedenen p, T -Bedingungen in Überschußwasser untersucht. Die FTIR-Spektroskopie liefert Informationen über die Ordnung der Acylketten und kann daher zur Identifikation von Phasenübergängen herangezogen werden. Aufgrund der so erhaltenen Daten konnten, mit zusätzlichen, komplementären SAXS-Messungen, p, T -Phasendiagramme für beide Lipidmischungen im Bereich von 7-80 °C erstellt werden. Da beide Gemische als Modelle für sogenannte Lipidflöße oder "Rafts" dienen, besitzen die erhaltenen Ergebnisse eine große biophysikalische Bedeutung, da die Applikation hohen hydrostatischen Drucks Phasentransformationen in den Membranen induziert, die mit dem Funktionsverlust von Membranproteinen, dem Verlust der zellulären Homöostase und somit letalen Wirkungen auf Zellen und Mikroorganismen assoziiert sind. Die Kenntnis der entsprechenden Phasenübergangslinien kann daher dazu beitragen, die potentiellen Grenzen für die Existenz von Leben unter diversen Temperatur-Druck-Bedingungen abzuschätzen, wie auch die notwendigen Minimaldrücke zur sicheren, HHD-vermittelten Sterilisation von Lebensmitteln oder Pharmazeutika zu bestimmen.

Da hoher hydrostatischer Druck (HHD) als fundamental wichtiger Parameter für die Stabilität von Proteinen bekannt ist, wurden zwei Proteine in dieser Arbeit auf ihre Eigenschaften unter Hochdruckbedingungen untersucht. Mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie und nachfolgender Analyse der Amid-I'-Bande (in D₂O) ist es möglich, die Sekundärstrukturanteile des untersuchten Proteins zu bestimmen und ihre Entwicklung unter Temperatur- oder Druckeinwirkung zu verfolgen. Das erste untersuchte Protein, die Peroxidase MsP1 aus dem Basidiomyceten *Marasmius scorodoni*, erweist sich für ein Protein aus dem Sekretom eines mesophilen Organismus als überaus temperatur- und druckstabil. Bei Atmosphärendruck können Sekundärstrukturänderungen erst jenseits von ~ 65 °C festgestellt werden. In diesem Temperaturbereich findet auch die Dissoziation des homodimeren Enzyms statt, wie zusätzliche Fluoreszenz- und SAXS-Messungen belegen. Dies korreliert sehr gut mit Messungen der Enzymaktivität, die ein Aktivitätsmaximum zwischen 55 und 60 °C anzeigen. Unter HHD erweist sich MsP1 als extrem stabil, sowohl bei 30 wie auch bei 60 °C können lediglich minimale Änderungen der Sekundärstruktur erst ab ~ 5000-6000 bzw. ~ 8000 bar beobachtet werden, ohne daß eine ausgeprägte, meßbare Druckdenaturierung eintritt. Zudem zeigen SAXS-Messungen bei 30 °C, daß die Dimerstruktur bis mindestens 3000 bar stabil bleibt, was ebenfalls ein ungewöhnlich hoher Wert ist. Interessanterweise zeigen Messungen der Enzymaktivität unter HHD bei 30 °C eine Zunahme bis 500 bar,

mit langsamem Abfall bei höheren Drücken, wobei selbst bei 2500 bar die Aktivität nur unwesentlich unter dem Niveau bei 1 bar liegt. Da MsP1 die Fähigkeit besitzt, Lignin sowie Carotenoide und Xanthophylle abzubauen, ergeben sich interessante Anwendungsmöglichkeiten in der Biotechnologie wie der Produktion von Bioethanol aus ligninhaltigen Substraten, der Bleichung von Lebensmitteln oder der Herstellung von Geschmacks- und Geruchsstoffen. Diese Prozesse sind oftmals bei erhöhter Temperatur wie auch erhöhtem Druck bevorzugt, wodurch der Einsatz von MsP1 als sehr attraktiv erscheint.

Das zweite in dieser Arbeit untersuchte Protein ist die Ankyrindomäne aus dem Notch-Rezeptor aus *Drosophila melanogaster*, Nank₁₋₇. Diese Ankyrindomäne besteht aus 7 Ankyrinwiederholungssequenzen mit je zwei α -Helices. Das Verhalten solcher Proteine aus repetitiven Sequenzen unter HHD ist bislang, im Gegensatz zu globulären Proteinen, praktisch nicht erforscht. Daher wurden FTIR-spektroskopische Messungen bei 20 °C mit und ohne Zumischung von ¹³C-Harnstoff durchgeführt, um zusätzlich die Auswirkung von denaturierenden Agenzien zu testen. Ohne Harnstoff und in Gegenwart von 2 M Harnstoff zeigt sich ein zweiphasiges Druckdenaturierungsverhalten, das vermutlich auf die distributierte Natur des hydrophoben Kerns mit unterschiedlichen Stabilitäten der Teilkerns zurückgeführt werden kann. In Gegenwart von 2 M Harnstoff sind die entsprechenden Denaturierungsdrücke wie erwartet zu geringeren Werten verschoben, jedoch führt eine geringfügige Erhöhung der Harnstoffkonzentration auf 2,35 M bereits zu einer ausgeprägten Teildenaturierung bei Atmosphärendruck. Die Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration ist somit nichtlinear, im Gegensatz zu bisher untersuchten globulären Proteinen. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob das mehrphasige Druckdenaturierungsverhalten und die nichtlineare Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration einzigartige Eigenschaften von Ankyrindomänen sind oder auch bei anderen Wiederholungssequenzproteinen auftreten.

Polymere wie Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM) und Poly(*N,N*-diethylacrylamid) (PDEAAM) zeigen bei Temperaturerhöhung im Bereich von 20-35 °C (der genaue Wert ist abhängig von der Monomerkomposition) einen reversiblen Übergang von einer geschwollenen, hydrophilen, zufallsknäuelähnlichen Konformation zu einem kollabierten, relativ hydrophoben, globulusartigen Zustand. Dieser ähnelt der Kältedenaturierung von Proteinen, welche bei fast allen Proteinen im Temperaturbereich unterhalb von 0 °C auftritt und daher nur mittels spezieller Techniken wie Anwendung von Druck oder Unterkühlung kleiner Volumina zu beobachten ist. Somit stellen die genannten synthetischen Polymere ein einfaches Modellsystem zum Studium der Kältedenaturierung von Proteinen dar, darüber hinaus kann mit Hilfe dieser Polymere das Wasserstoffbrückenbindungsmuster beim Übergang zwischen der geschwollenen ("denaturierten") und kollabierten ("gefalteten") Konformation in der Amid-I'-Region FTIR-spektroskopisch verfolgt werden, welches bei Peptiden oder Proteinen durch die

Änderungen der Sekundärstrukturelemente überlagert ist. Vernetzte Mikrogele aus PNIPAM, PDEAAM oder einer Mischung aus beiden Monomeren haben zudem zahlreiche potentielle Anwendungen in der Biomedizin, wie die stimulusinduzierte Freisetzung von Wirkstoffen. Daher wurden sowohl lineares PNIPAM, PNIPAM-Mikrogele, Copolymermikrogele aus NIPAM und DEAAM und eine Mikrogelmischung aus PNIPAM und PDEAAM sowohl druck- als auch temperaturabhängig mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Bei Temperaturerhöhung läßt sich in allen Fällen der Übergang vom gequollenen zum kollabierten Zustand sehr gut nachweisen, wobei der Übergang beim linearen PNIPAM nahezu diskontinuierlich verläuft, während die Transitionen bei den Gelen deutlich unschärfer und kontinuierlich ausfallen, was, im Einklang mit der Literatur, auf die größere Inhomogenität der Subketten in den Gelen zurückzuführen ist. Unter Druck zeigen alle Polymersysteme eine verstärkte Hydratisierung, i.e. einen Übergang von der kollabierten zur gequollenen Konformation, analog der Druckdenaturierung von Proteinen, mit ähnlichen assoziierten Werten für ΔG^0 und ΔV^0 . Im Detail ergeben sich jedoch recht deutliche Unterschiede zwischen den Systemen, welche wahrscheinlich in erster Linie auf Unterschiede in der Quervernetzerkonzentration sowie der Monomerkomposition und damit verbundenen unterschiedlichen sterischen Anforderungen zurückgeführt werden können.

5. Zusammenfassung

6. Literatur

Abe, F., 2007. Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: Perspectives from piezophysiology. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2347-2357.

Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, A.S., 1973. A taxonomic review with keys: basidiomycetes and lower fungi. In: G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow, A.S. Sussman (Eds.), *The Fungi, an Advanced Treatise*, vol. 4B, Academic Press, Orlando.

Amend, J.P., Shock, E.L., 2001. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 175-243.

Ando, S., Arai, I., Kiyoto, K., Hanai, S., 1989. Identification of aromatic monomers in steamexploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.* 64, 567-570.

Andrade, M.A., Perez-Iratxeta, C., Ponting, C.P., 2001. Protein repeats: Structures, functions and evolution. *J. Struct. Biol.* 134, 117-131.

Barth, A., 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1073-1101.

Bec, N., Villa, A., Tortora, P., Mozhaev, V.V., Balny, C., Lange, R., 1996. Enhanced stability of carboxypeptidase from *Sulfolobus solfataricus* at high pressure. *Biotechnol. Lett.* 18, 483-488.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2003. *Biochemie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 350 ff. u. 687 f.

Beney, L., Gervais, P., 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 34-42.

Blümelhuber, G., Fischer, S., Gaipf U.S., Herrmann, M., Kalden, J.R., Voll, R.E., Meyer-Pitroff, R., 2002. Apoptosis and necrosis of mammalian cells after high pressure treatment-Prospects for a tumor vaccine. In: Winter, R. (Ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 311-314.

Boonyaratanakornkit, B.B., Park, C.B., Clark, D.S., 2002. Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 235-249.

Bouws, H., Wattenberg, A., Zorn, H., 2008. Fungal secretomes-nature's toolbox for white biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 381-388.

Bracher, F., 2003. Angriffspunkt Ergosterolbiosynthese. *Wirkstoffe und Wirkprinzipien. Pharm. unserer Zeit* 32, 118-123.

Bridgman, P.W., 1914. The coagulation of albumen by pressure. *J. Biol. Chem.* 19, 511-512.

6. Literatur

Bridgman, P.W., 1935. The pressure-volume-temperature relations of the liquid, and the phase diagram of heavy water. *J. Chem. Phys.* 3, 597-605.

Buckow, R., Isbarn, S., Knorr, D., Heinz, V., Lehmacher, A., 2008. Predictive model for inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate, by heat and high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1030-1038.

Byatt, A., Fothergill, A., Holmes, M., 2002. *Unser blauer Planet. Eine Naturgeschichte der Ozeane.* Egmont vgs Verlagsgesellschaft, Köln.

Byler, D.M., Susi, H., 1986. Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra. *Biopolymers* 25, 469-487.

Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., Alfani, F., 2004. Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. *Biotechnol. Prog.* 20, 200-206.

Chalikian, T.V., Totrov, M., Abagyan, R., Breslauer, K.J., 1996. The hydration of globular proteins as derived from volume and compressibility measurements: Cross correlating thermodynamic and structural data. *J. Mol. Biol.* 260, 588-603.

Chandra, R.P., Bura, R., Mabee, W.E., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J.N., 2007. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108, 67-93.

Chaterji, S., Kwon, I.K., Park, K., 2007. Smart polymeric gels: Redefining the limits of biomedical devices. *Prog. Polym. Sci.* 32, 1083-1122.

Chong, P.L., Fortes, P.A., Jameson, D.M., 1985. Mechanisms of inhibition of (Na,K)-ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. *J. Biol. Chem.* 260, 14484-14490.

Cooper, A., 2000. Heat capacity of hydrogen-bonded networks: An alternative view of protein folding thermodynamics. *Biophys. Chem.* 85, 25-39.

Corliss, J.B., Dymond, J., Gordon, L.I., Edmond, J.M., von Herzen, R.P., Ballard, R.D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K., van Andel, T.H., 1979. Submarine thermal springs on the Galapagos rift. *Science* 203, 1073-1083.

Czeslik, C., Reis, O., Winter, R., Rapp, G., 1998. Effect of high pressure on the structure of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes: a synchrotron-X-ray diffraction and FT-IR spectroscopy study using the diamond anvil technique. *Chem. Phys. Lipids* 91, 135-144.

Daniel, I., Oger, P., Winter, R., 2006. Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. *Chem. Soc. Rev.* 35, 858-875.

Degraeve, P., Rubens, P., Lemay, P., Heremans, K., 2002. In situ observation of pressure-induced increased thermostability of two β -galactosidases with FT-IR spectroscopy in the diamond anvil cell. *Enz. Microb. Technol.* 31, 673-684.

6. Literatur

- Delgenes, J.P., Moletta, R., Navarro, J.M., 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 220-225.
- Dirix, C., Duvetter, T., Van Loey, A., Hendrickx, M., Heremans, K., 2005. The in situ observation of the temperature and pressure stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectin methylesterase with Fourier transform IR spectroscopy reveals an unusual pressure stability of β -helices. *Biochem. J.* 392, 565-571.
- Dubins, D.N., Lee, A., Macgregor, R.B. Jr., Chalikian, T.V., 2001. On the stability of double stranded nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 9254-9259.
- Dzwolak, W., Ravindra, R., Lendermann, J., Winter, R., 2003. Aggregation of bovine insulin probed by DSC/PPC calorimetry and FTIR spectroscopy. *Biochemistry* 42, 11347-11355.
- Eddin, M., 2003. The state of lipid rafts: From model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 257-283.
- Fabian, H., Mäntele, W., 2002. Infrared spectroscopy of proteins. In: Chalmers, J.M., Griffiths, P.R. (Eds.), *Handbook of vibrational spectroscopy*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- Faraco, V., Piscitelli, A., Sanna, G., Giardina, P., 2007. Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 889-893.
- Fernandes, P.M.B., Domitrovic, T., Kao, C.M., Kurtenbach, E., 2004. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Lett.* 556, 153-160.
- Ferreira, L., Afonso, C., Vila-Real, H., Alfaia, A., Ribeiro, M.H.L., 2008. Evaluation of the effect of high pressure on naringin hydrolysis in grapefruit juice with naringinase immobilised in calcium alginate beads. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 146-150.
- Fry, J.C., Parkes, R.J., Cragg, B.A., Weightman, A.J., Webster, G., 2008. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafoor biosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 181-196.
- Galbe, M., Zacchi, G., 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108, 41-65.
- Gold, T., 1992. The deep, hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6045-6049.
- Gross, M., Jaenicke, R., 1994. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur. J. Biochem.* 221, 617-630.
- Guerrero, R., 1998. Crucial crises in biology: life in the deep biosphere. *Internatl. Microbiol.* 1, 285-294.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Padley, F.B., 1994. *The lipid handbook*. Chapman & Hall, London, pp.496-503.

6. Literatur

Harpaz, Y., Gerstein, M., Chothia, C., 1994. Volume changes on protein folding. *Structure* 2, 641-649.

Hawley, S. A., 1971. Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry* 10, 2436-2442.

Hei, D.J., Clark, D.S., 1994. Pressure stabilization of proteins from extreme thermophiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 932-939.

Herberhold, H., Marchal, S., Lange, R., Scheyhing, C.H., Vogel, R.F., Winter, R., 2003. Characterization of the pressure-induced intermediate and unfolded state of redshifted green fluorescent protein - a static and kinetic FTIR, UV/VIS and fluorescence spectroscopy study. *J. Mol. Biol.* 330, 1153-1164.

Herberhold, H., Royer, C.A., Winter, R., 2004. Effects of chaotropic and kosmotropic cosolvents on the pressure-induced unfolding and denaturation of proteins: An FT-IR study on staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 43, 3336-3345.

Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., 2002. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, pp. 31-67.

Hsueh, Y.W., Gilbert, K., Trandum, C., Zuckermann, M., Thewalt, J., 2005. The effect of ergosterol on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a deuterium NMR and calorimetric study. *Biophys. J.* 88, 1799-1808.

Hülsdau, B., 2007. *Oxidativer Abbau von Carotinoiden durch Pilzenzyme*. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover.

Hummer, G., Garde, S., Garcia, A.E., Paulaitis, M.E., Pratt, L.R., 1998. The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1552-1555.

Janosch, S., Kinne-Saffran, E., Kinne, R.K.H., Winter, R., 2002. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by hydrostatic pressure. In: Winter, R. (Ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Springer, Heidelberg, New York, pp. 215-219.

Jayaraman, A., 1983. Diamond anvil cell and high-pressure physical investigations. *Rev. Mod. Phys.* 55, 65-108.

Jeworrek, C., Pühse, M., Winter, R., 2008. X-ray kinematography of phase transformations of three-component lipid mixtures: A time-resolved synchrotron X-ray scattering study using the pressure-jump relaxation technique. *Langmuir* 24, 11851-11859.

Kato, M., Maki, T., Hayashi, R., 2002. Fluorescence spectroscopy of *N*-acetyl-L-tryptophanamide and proteins under high pressure: effects of pressure, temperature and organic additives. In: R. Winter (Ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 37-41.

6. Literatur

Kavanagh, C.A., Rochev, Y.A., Gallagher, W.M., Dawson, K.A., Keenan, A.K., 2004. Local drug delivery in restenosis injury: Thermoresponsive copolymers as potential drug delivery systems. *Pharmacology & Therapeutics* 102, 1-15.

Keerl, M., Richtering, W., 2007. Synergistic depression of volume phase transition temperature in copolymer microgels. *Colloid Polym. Sci.* 285, 471-474.

Keerl, M., Smirnovas, V., Winter, R., Richtering, W., 2008. Interplay between hydrogen bonding and macromolecular architecture leading to unusual phase behavior in thermosensitive microgels. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47, 338-341.

Kim, S.J., Shoda, M., 1999. Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1029-1035.

Kim, S., Healy, K.E., 2003. Synthesis and characterization of injectable Poly (*N*-isopropylacrylamide-*co*-acrylic acid) hydrogels with proteolytically degradable crosslinks. *Biomacromolecules* 4, 1214-1223.

Kouassi, G.K., Anantheswaran, R.C., Knabel, S.J., Floros, J.D., 2007. Effect of high pressure processing on activity and structure of alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase in buffer and milk. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9520-9529.

Kratz, K., Hellweg, T., Eimer, W., 2001. Structural changes in PNIPAM microgel particles as seen by SANS, DLS and EM techniques. *Polymer* 42, 6631-6639.

Kumar, R., Singh, S., Singh, O.V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 377-391.

Kunugi, S., Tanaka, N., 2002. Cold denaturation of proteins under high pressure. *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 329-344.

Kunugi, S., Kameyama, K., Tada, T., Tanaka, N., Shibayama, M., Akashi, M., 2005. Differences in pressure and temperature transitions of proteins and polymer gels. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 1233-1238.

Lauber, S., Krause, I., Klostermeyer, H., Henle, T., 2003. Microbial transglutaminase crosslinks b-casein and b-lactoglobulin to heterologous oligomers under high pressure. *Eur. Food Res. Technol.* 216, 15-17.

Lee, Y.Y., Iyer, P., Torget, R.W., 1999. Dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65, 93-115.

Longley, R.P., Rose, A.H., Knights, B.A., 1968. Composition of the protoplast membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 108, 401-412.

Lottspeich, F., Zorbas, H. (Hrsg.), 1998. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 131-162 u. pp. 167-172.

6. Literatur

Louzada, P.R.F., Scaramello, M.E., Maya-Monteiro, C., Rietveld, A.W.M., Ferreira, S.T., 1996. Effect of hydrostatic pressure on the fluorescence of indole derivatives. *J. of Fluorescence* 6, 231-236.

Lu, X.B., Zhang, Y.M., Yang, J., Liang, Y., 2007. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. *Chem. Eng. Technol.* 30, 938-944.

Ludwig, H., Scigalla, W., Sojka, B., 1996. Pressure- and temperature- induced inactivation of microorganisms. In: Markley, J.L., Northrop, D.B., Royer, C.A. (Eds.), *High Pressure Effects in Molecular Biophysics*. Oxford University Press, New York, pp. 346-363.

Luzzati, V., 1997. Biological significance of lipid polymorphism: the cubic phases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 661-668.

Lyon, L.A., Nayak, S., 2005. Weiche Nanotechnologie mit weichen Nanopartikeln. *Angew. Chem.* 117, 7862-7886.

Macgregor Jr., R.B., 2002. The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure. *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 266-276.

Mañas, P., Mackey, B.M., 2004. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: Relationship with cell death. *Appl. Environm. Microbiol.* 70, 1545-1554.

Mannock, D.A., Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N., 2006. Comparative calorimetric and spectroscopic studies of the effects of lanosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biophys. J.* 91, 3327-3340.

Mantsch, H.H., McElhaney, R.N., 1991. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* 57, 213-226.

Matser, A.M., Krebbers, B., van den Berg, R.W., Bartels, P.V., 2004. Advantages of high pressure sterilization on quality of food products. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 79-85.

Meersman, F., Wang, J., Wu, Y., Heremans, K., 2005. Pressure effect on the hydration properties of Poly(*N*-isopropylacrylamide) in aqueous solution studied by FTIR spectroscopy. *Macromolecules* 38, 8923-8928.

Meersman, F., Smeller, L., Heremans, K., 2006. Protein stability and dynamics in the pressure-temperature plane. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 346-354.

Mendelsohn, R., Moore, D.J., 1998. Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem. Phys. Lipids* 96, 141-157.

Mendez, O., Ravel, H., Schwarzenbolz, U., Henle, T., 2006. Structural changes of microbial transglutaminase during thermal and high-pressure treatment. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1716-1721.

6. Literatur

- McIntosh, T.J., 1978. The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 513, 43-58.
- Mishra, R., Winter, R., 2008. Kälte- und druckinduzierte Dissoziation von Amyloidfibrillen. *Angew. Chem.* 120, 6618-6621.
- Molina-Gutierrez, A., Stippel, V., Delgado, A., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2002. In situ determination of the intracellular pH of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum* during pressure treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4399-4406.
- Mosavi, L.K., Cammett, T.J., Desrosiers, D.C., Peng, Z.Y., 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* 13, 1435-1448.
- Mouritsen, O.G., Zuckermann, M.J., 2004. What's so special about cholesterol? *Lipids* 39, 1101-1113.
- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F., Roberto, C., 2008. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 124-129.
- Mysiakina, I.S., Funtikova, N.S., 2007. The role of sterols in morphogenetic processes and dimorphism in fungi. *Mikrobiologiya* 76, 1-13.
- Neumann, R.C., Kauzmann, W., Zipp, A., 1973. Pressure dependence of weak acid ionization in aqueous buffers. *J. Phys. Chem.* 77, 2687-2691.
- Nicolini, C., Ravindra, R., Ludolph, B., Winter, R., 2004. Characterization of the temperature- and pressure-induced inverse and reentrant transition of the minimum Elastin-like polypeptide GVG(VPGVG) by DSC, PPC, CD, and FT-IR spectroscopy. *Biophys. J.* 86, 1385-1392.
- Nicolini, C., Kraineva, J., Khurana, M., Periasamy, N., Funari, S.S., Winter, R., 2006a. Temperature and pressure effects on structural and conformational properties of POPC/SM/cholesterol model raft mixtures - a FT-IR, SAXS, DSC, PPC and Laurdan fluorescence spectroscopy study. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 248-258.
- Nicolini, C., Celli, A., Gratton, E., Winter, R., 2006b. Pressure tuning of the morphology of heterogeneous lipid vesicles: a two-photon-excitation fluorescence microscopy study. *Biophys. J.* 91, 2936-2942.
- Nisbet, E.G., Sleep, N.H., 2001. The habitat and nature of early life. *Nature* 409, 1083-1091.
- Northrop, D.B., 2002. Effects of high pressure on enzymatic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 71-79.
- Okoro, L., Winter, R., 2008. Pressure perturbation calorimetric studies on phospholipid-sterol mixtures. *Z. Naturforsch.* 63b, 769-778.

6. Literatur

- Panick, G., Malessa, R., Winter, R., Rapp, G., Frye, K.J., Royer, C.A., 1998. Structural characterization of the pressure-denatured state and unfolding/refolding kinetics of staphylococcal nuclease by synchrotron small-angle X-ray scattering and Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 275, 389-402.
- Panick, G., Vidugiris, G.J.A., Malessa, R., Rapp, G., Winter, R., Royer, C.A., 1999. Exploring the temperature-pressure phase diagram of staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 38, 4157-4164.
- Panick, G., Winter, R., 2000. Pressure-induced unfolding/refolding of ribonuclease A: Static and kinetic Fourier Transform Infrared Spectroscopy study. *Biochemistry* 39, 1862-1869.
- Perrier-Cornet, J.-M., Tapin, S., Gervais, P., 2002. High pressure inactivation of yeast and spheroplasts at subzero temperatures. In: Winter, R. (Ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 389-393.
- Perrier-Cornet, J.-M., Tapin, S., Gaeta, S., Gervais, P., 2005. High-pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* at subzero temperatures. *J. Biotechnol.* 115, 405-412.
- Piermarini, G. J., Block, S., Barnett, J. D., Forman, R. A., 1975. Calibration of the pressure dependence of the R1 ruby fluorescence line to 195 kbar. *J. Appl. Phys.* 46, 2774-2780.
- Potekhin, S.A., Senin, A.A., Abdurakhmanov, N.N., Khusainova, R.S., 2008. High pressure effect on the main transition from the ripple gel P_{β} phase to the liquid crystal (L_{α}) phase in dipalmitoylphosphatidylcholine. Microcalorimetric study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778, 2588-2593.
- Powalska, E., Janosch, S., Kinne-Saffran, E., Kinne, R.K.H., Fontes, C.F.L., Mignaco, J.A., Winter, R., 2007. Fluorescence spectroscopic studies of pressure effects on Na⁺, K⁺-ATPase reconstituted into phospholipid bilayers and model raft mixtures. *Biochemistry* 46, 1672-1683.
- Privalov, P.L., 1990. Cold denaturation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 281-305.
- Pühse, M., Jeworrek, C., Winter, R., 2008. The temperature-pressure phase diagram of a DPPC-ergosterol fungal model membrane-a SAXS and FT-IR spectroscopy study. *Chem. Phys. Lipids* 152, 57-63.
- Pühse, M., Szweda, R.T., Ma, Y., Jeworrek, C., Winter, R., Zorn, H., 2009. *Marasmius scorodoni* extracellular dimeric peroxidase-Exploring its temperature and pressure stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 1091-1098.
- Ravindra, R., Royer, C., Winter, R., 2004. Pressure perturbation calorimetric studies of the solvation properties and the thermal unfolding of staphylococcal nuclease. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 1952-1961.
- Reis, O., Winter, R., Zerda, T.W., 1996. The effect of high external pressure on DPPC-cholesterol multilamellar vesicles: a pressure-tuning Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochim. Biophys. Acta* 1279, 5-16.

6. Literatur

- Reis, O., Winter, R., 1998. Pressure and temperature effects on conformational and hydrational properties of lamellar and bicontinuous cubic phases of the fully hydrated monoacylglyceride monoelaidin: a Fourier transform infrared spectroscopy study using the diamond anvil technique. *Langmuir* 14, 2903-2909.
- Rigaldie, Y., Largeteau, A., Lemagnen, G., Grislain, L., Demazeau, G., 2002a. Decontamination and sterilization of sensitive drugs using high hydrostatic pressure (HHP). In: Winter, R. (Ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 315-319.
- Rigaldie, Y., Largeteau, A., Lemagnen, G., Grislain, L., Demazeau, G., 2002b. High hydrostatic pressure (HHP) inactivation of five pharmacopoeia strains including spores of *Bacillus subtilis*. In: Winter, R. (Ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 283-286.
- Rigaldie, Y., Largeteau, A., Lemagnen, G., Ibalot, F., Pardon, P., Demazeau, G., Grislain, L., 2003. Effects of high hydrostatic pressure on several sensitive therapeutic molecules and a soft nanodispersed drug delivery system. *Pharm. Res.* 20, 2036-2040.
- Risselada, J.H., Marrink, S.J., 2008. The molecular face of lipid rafts in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 17367-17372.
- Rodriguez, R.J., Low, C., Bottema, C.D., Parks, L.W., 1985. Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 837, 336-343.
- Rouget, J.B., Schroer, M.A., Jeworrek, C., Pühse, M., Saldana, J.L., Bessin, Y., Tolan, M., Barrick, D., Winter, R., Royer, C.A., 2009. Unique features of the folding landscape of a repeat protein revealed by pressure perturbation. *J. Mol. Biol.*, eingereicht.
- Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., Castro, E., 2007. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 160-166.
- Savitzky, A., Golay, M.J.E., 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* 36, 1627-1639.
- Scarlata, S., 2005. Determination of the activation volume of PLC β by G β -subunits through the use of high hydrostatic pressure. *Biophys. J.* 88, 2867-2874.
- Scheibner, M., Hülsdau, B., Zelena, K., Nimtz, M., de Boer, L., Berger, R.G., Zorn, H., 2008. Novel peroxidases of *Marasmius scorodoni* degrade β -carotene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1241-1250.
- Schwedt, G., 2008. *Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis*. 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 215-220.
- Shimasaki, N., Kiyohara, T., Totsuka, A., Nojima, K., Okada, Y., Yamaguchi, K., Kajioka, J., Wakita, T., Yoneyama, T., 2009. Inactivation of hepatitis A virus by heat and high hydrostatic pressure: variation among laboratory strains. *Vox Sanguinis* 96, 14-19.

6. Literatur

- Silva, J.L., Miles, E.W., Weber, G., 1986. Pressure dissociation and conformational drift of the β dimer of tryptophan synthase. *Biochemistry* 25, 5780-5786.
- Silva, J.L., Weber, G., 1988. Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J. Mol. Biol.* 199, 149-159.
- Silva, J.L., Foguel, D., Royer, C.A., 2001. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem. Sci.* 26, 612-618.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Smeller, L., 2002. Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 11-29.
- Stieger, M., Richtering, W., Pedersen, J.S., Lindner, P., 2004. Small-angle neutron scattering study of structural changes in temperature sensitive microgel colloids. *J. Chem. Phys.* 120, 6197-6206.
- St. John, R.J., Carpenter, J.F., Randolph, T.W., 1999. High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13029-13033.
- Sun, F., Chen, H., 2008. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 99, 5474-5479.
- Tedjo, W., Eshtiaghi, M.N., Knorr, D., 2000. Impact of supercritical carbon dioxide and high pressure on lipoxygenase and peroxidase activity. *J. Food Sci.* 65, 1284-1287.
- Tuller, G., Nemeč, T., Hrastnik, C., Daum, G., 1999. Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeast* 15, 1555-1564.
- Ulmer, H.M., Herberhold, H., Fahsel, S., Gänzle, M.G., Winter, R., Vogel, R.F., 2002. Effects of pressure-induced membrane phase transitions on inactivation of HorA, an ATP-dependent multidrug resistance transporter, in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1088-1095.
- Urbina, J.A., Pekarar, S., Le, H.B., Patterson, J., Montez, B., Oldfield, E., 1995. Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using ^2H -, ^{13}C - and ^{31}P -NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1238, 163-176.
- Van Eldik, R., Asano, T., LeNoble, W.J., 1989. Activation and reaction volumes in solution 2. *Chem. Rev.* 89, 549-688.
- Van Valkenburg, A., 1962. Visual observations of high pressure transitions. *Rev. Sci. Instrum.* 33, 1462.
- Vance, S., Harnmeijer, J., Kimura, J., Hussmann, H., Demartin, B., Brown, J.M., 2007. Hydrothermal systems in small ocean planets. *Astrobiology* 7, 987-1005.

6. Literatur

- Veatch, S.L., Polozov, I.V., Gawrisch, K., Keller, S.L., 2004. Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 86, 2910-2922.
- Venyaminov, S.Y., Prendergast, F.G., 1997. Water (H₂O and D₂O) molar absorptivity in the 1000-4000 cm⁻¹ range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions. *Anal. Biochem.* 248, 234-245.
- Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanperä, J., Siika-Aho, M., 2007. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108, 121-145.
- Vogel, R.F., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G., Kato, C., Korakli, M., Scheyhing, C.H., Molina-Gutierrez, A., Ulmer, H.M., Winter, R., 2002. High pressure response of lactic acid bacteria. In: Winter, R. (Ed.), *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 249-254.
- Weir, C. E., Lippincott, E. R., Van Valkenburg, A., Bunting, E. N., 1959. Infrared studies in the 1- to 15-micron region to 30.000 atmospheres. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* 63A, 55-62.
- Winter, R., 2002. Synchrotron X-ray and neutron small-angle scattering of lyotropic lipid mesophases, model biomembranes and proteins in solution at high pressure. *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 160-184.
- Winter, R., Dzwolak, W., 2005. Exploring the temperature-pressure configurational landscape of biomolecules: from lipid membranes to proteins. *Phil. Trans. R. Soc. A* 363, 537-563.
- Winter, R., Lopes, D., Grudzielanek, S., Vogtt, K., 2007. Towards an understanding of the temperature/pressure configurational and free-energy landscape of biomolecules. *J. Non-Equilib. Thermodyn.* 32, 41-97.
- Winter, R., Jeworrek, C., 2009. Effect of pressure on membranes. *Soft Matter* 5, 3157-3173.
- Wong, P.T.T., Klug, D.D., 1983. Reevaluation of type I diamonds for infrared and Raman spectroscopy in high-pressure diamond anvil cells. *Appl. Spectrosc.* 37, 284-286.
- Wong, P.T.T., Mofatt, D.J., Baudais, F.L., 1985. Crystalline quartz as an internal pressure calibrant for high-pressure infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 39, 733-735.
- Wong, P.T.T., Moffat, D.J., 1989. A new internal pressure calibrant for high pressure infrared spectroscopy in aqueous systems. *Appl. Spectrosc.* 43, 1279-1281.
- Wu, C., Zhou, S., 1997. Volume phase transition of swollen gels: Discontinuous or continuous? *Macromolecules* 30, 574-576.
- Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C., London, E., 2001. Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide. *J. Biol. Chem.* 276, 33540-33546.
- Yamazaki, Y., Tada, T., Kunugi, S., 2000. Effects of acrylic acid incorporation on the pressure-temperature behavior and the calorimetric properties of poly(*N*-isopropylacrylamide) in aqueous solutions. *Colloid Polym. Sci.* 278, 80-83.

6. Literatur

Zeng, X., Birrien, J.L., Fouquet, Y., Cherkashov, G., Jebbar, M., Querellou, J., Oger, P., Cambon-Bonavita, A.M., Xiao, X., Prieur, D., 2009. *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. *ISME J.* 3, 873-876.

Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimtz, M., Berger, R.G., 2003. A Peroxidase from *Lepista irina* cleaves β -carotene to flavour compounds. *Biol. Chem.* 384, 1049-1056.

Zweifel, M. E., Barrick, D., 2001. Studies of the ankyrin repeats of the *Drosophila melanogaster* Notch receptor. 2. Solution stability and cooperativity of unfolding. *Biochemistry* 40, 14357-14367.

Zweifel, M. E., Leahy, D. J., Hughson, F. M., Barrick, D., 2003. Structure and stability of the ankyrin domain of the *Drosophila* Notch receptor. *Protein Sci.* 12, 2622-2632.

7. Anhang

7.1 Hochdruck-FTIR-Messungen am System DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%)

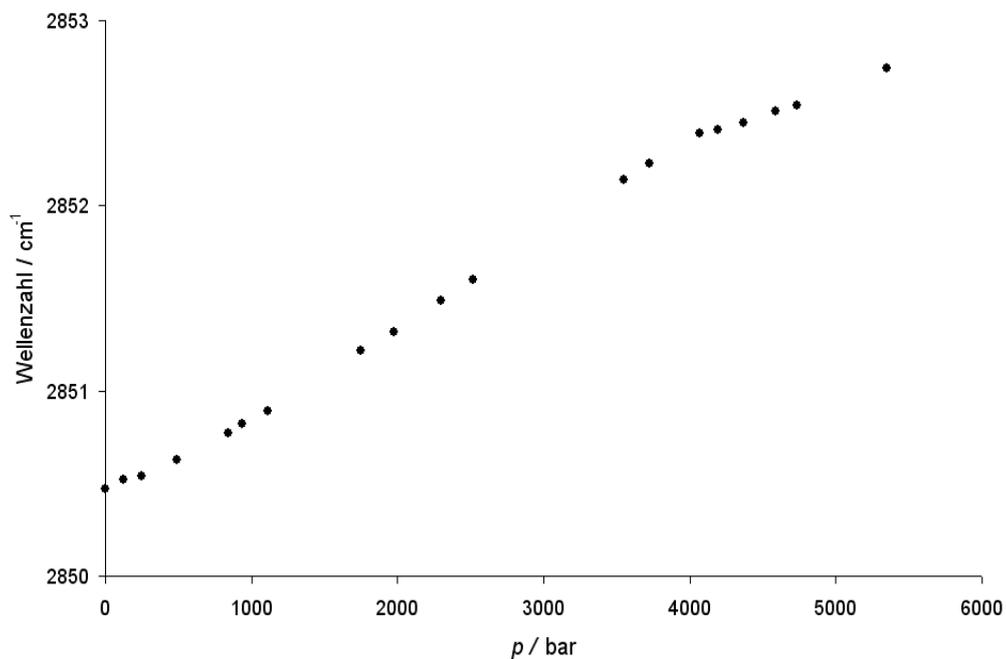


Abb. 7.1.1: Druckabhängigkeit der Position des Absorptionsmaximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingung des Systems DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%) bei 35 °C.

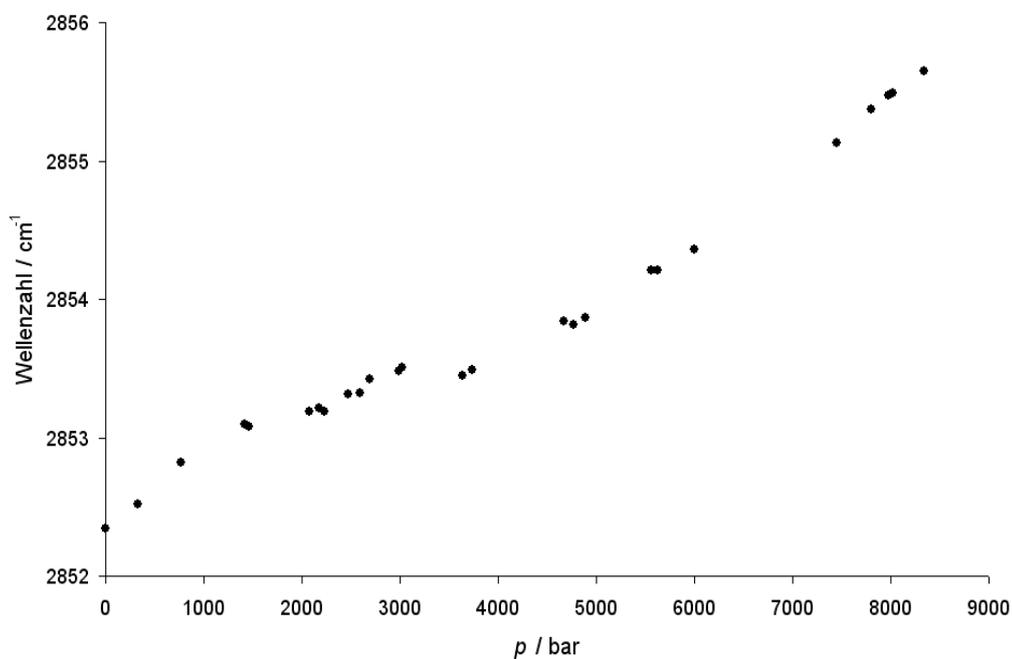


Abb. 7.1.2: Druckabhängigkeit der Position des Absorptionsmaximums der symmetrischen CH₂-Streckschwingung des Systems DPPC-Ergosterin (78:22 mol-%) bei 70 °C.

7.2 Hochdruck-FTIR-Messungen am System DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1)

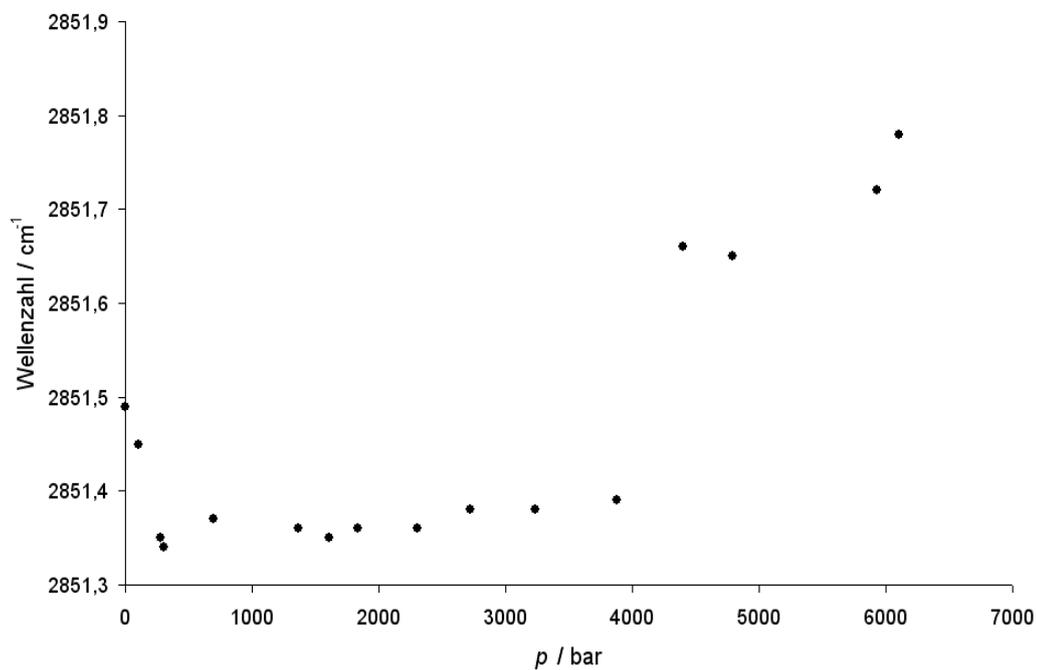


Abb. 7.2.1: Druckabhängigkeit der Position des Absorptionsmaximums der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung des Systems DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1) bei 30 °C.

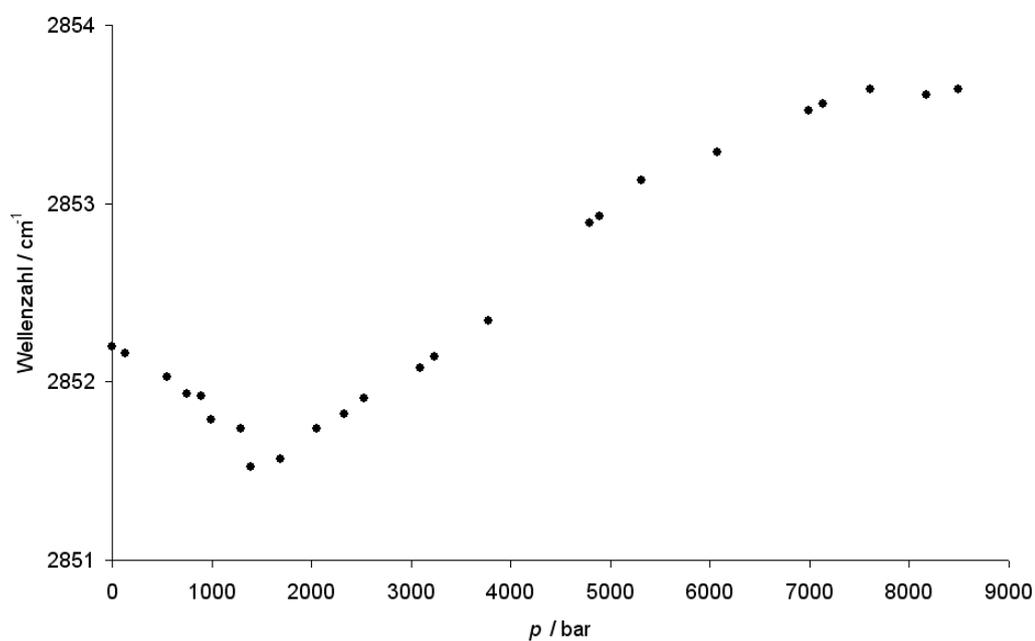


Abb. 7.2.2: Druckabhängigkeit der Position des Absorptionsmaximums der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung des Systems DOPC-DPPC-Cholesterin (1:2:1) bei 50 °C.

7.3 Hochdruck-FTIR-Messungen an Polymeren und Hydrogelen aus Poly(*N*-isopropylacrylamid) und Poly(*N,N*-diethylacrylamid)

7.3.1 Hochdruck-FTIR-Messungen an linearem PNIPAM

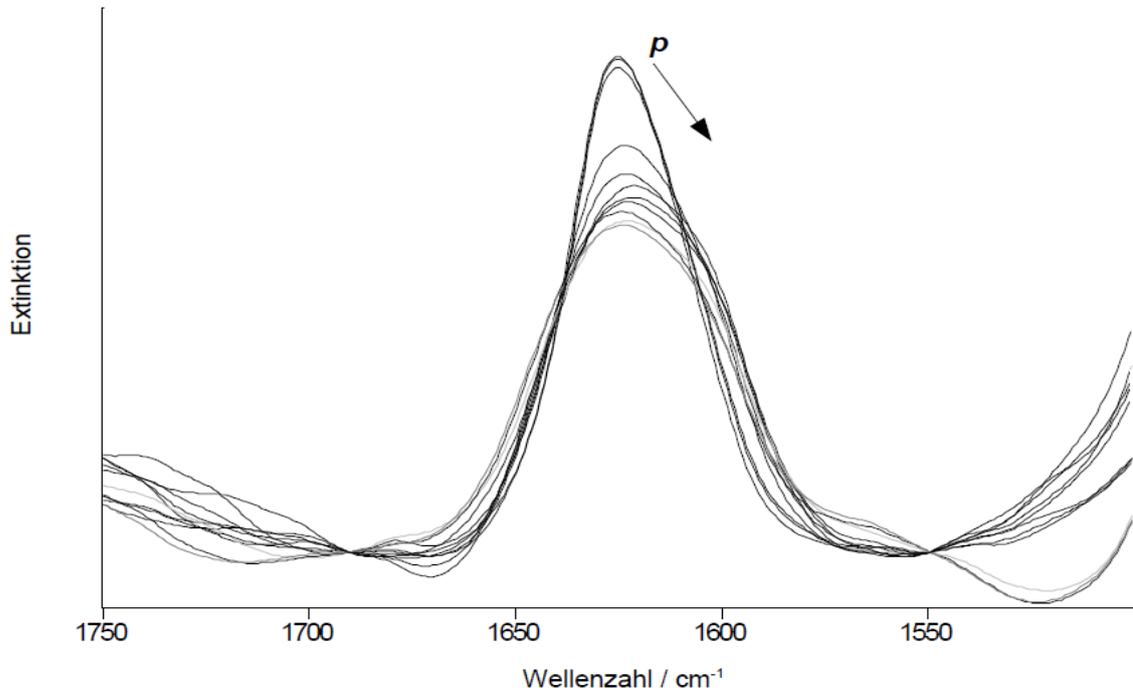


Abb. 7.3.1: Normierte FTIR-Spektren von linearem PNIPAM zwischen 1 und ~ 7600 bar bei 50 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

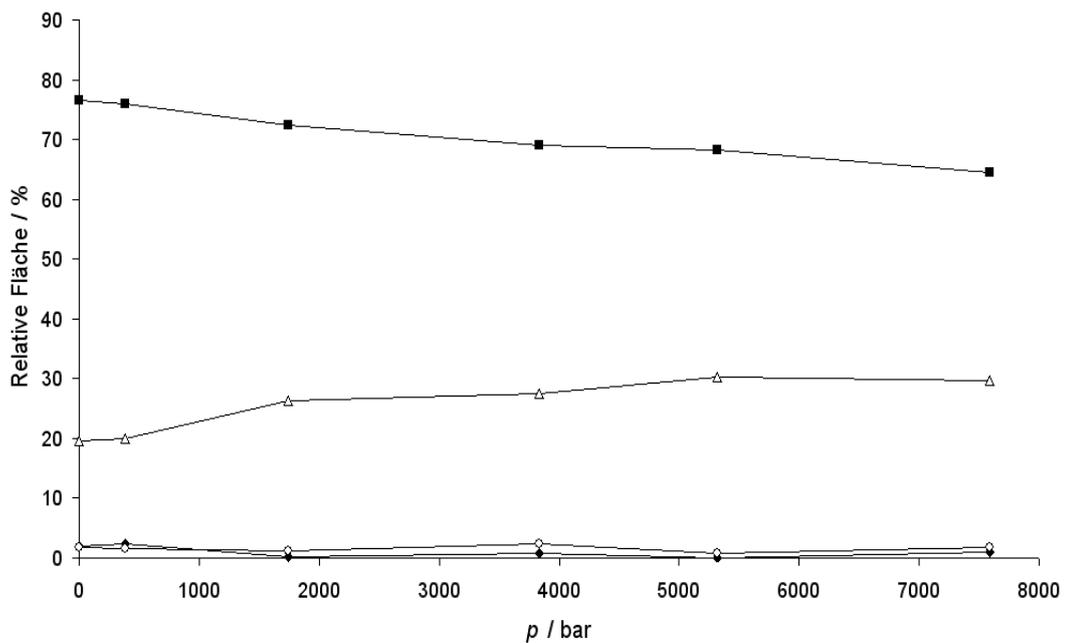


Abb. 7.3.2: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden von linearem PNIPAM bei 10 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

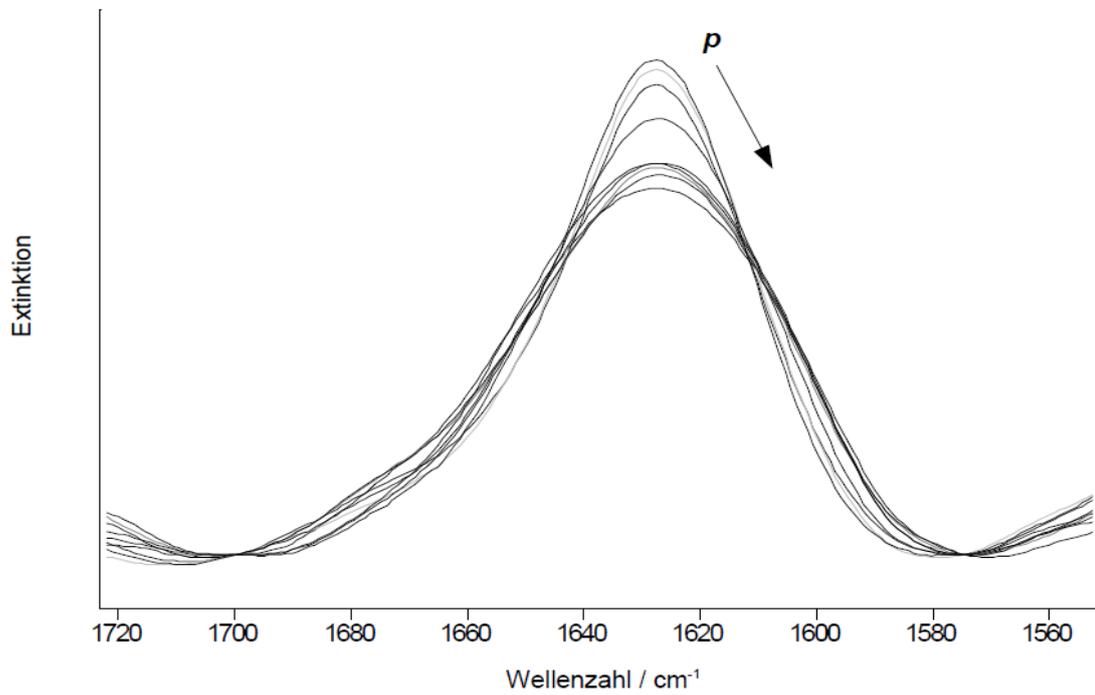


Abb. 7.3.3: Normierte FTIR-Spektren von linearem PNIPAM zwischen 1 und ~ 7800 bar bei 30 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

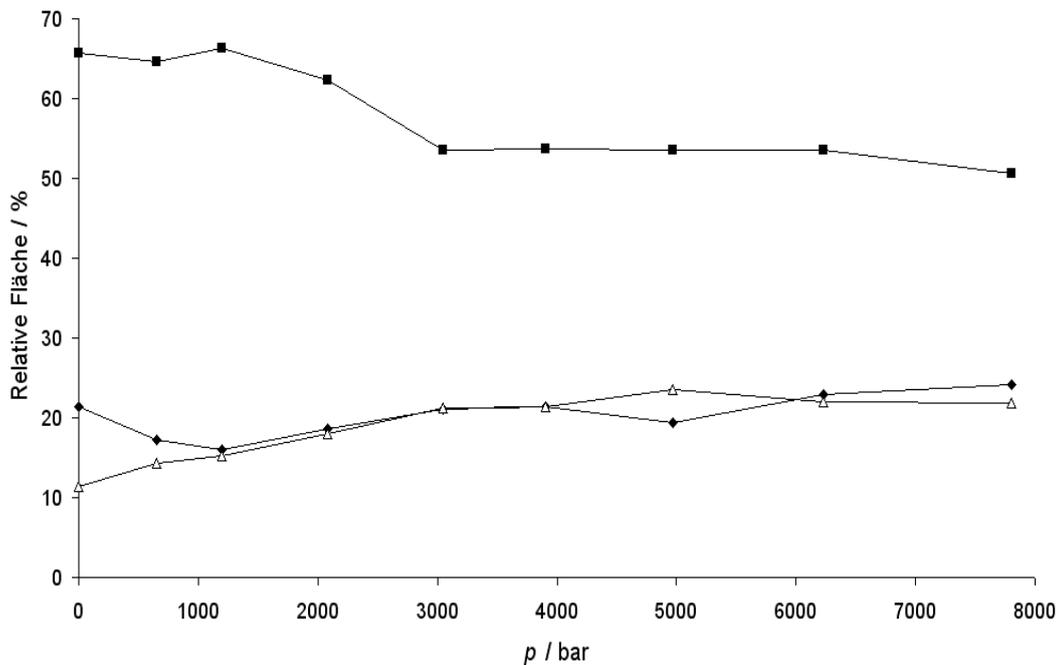


Abb. 7.3.4: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden von linearem PNIPAM bei 30 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

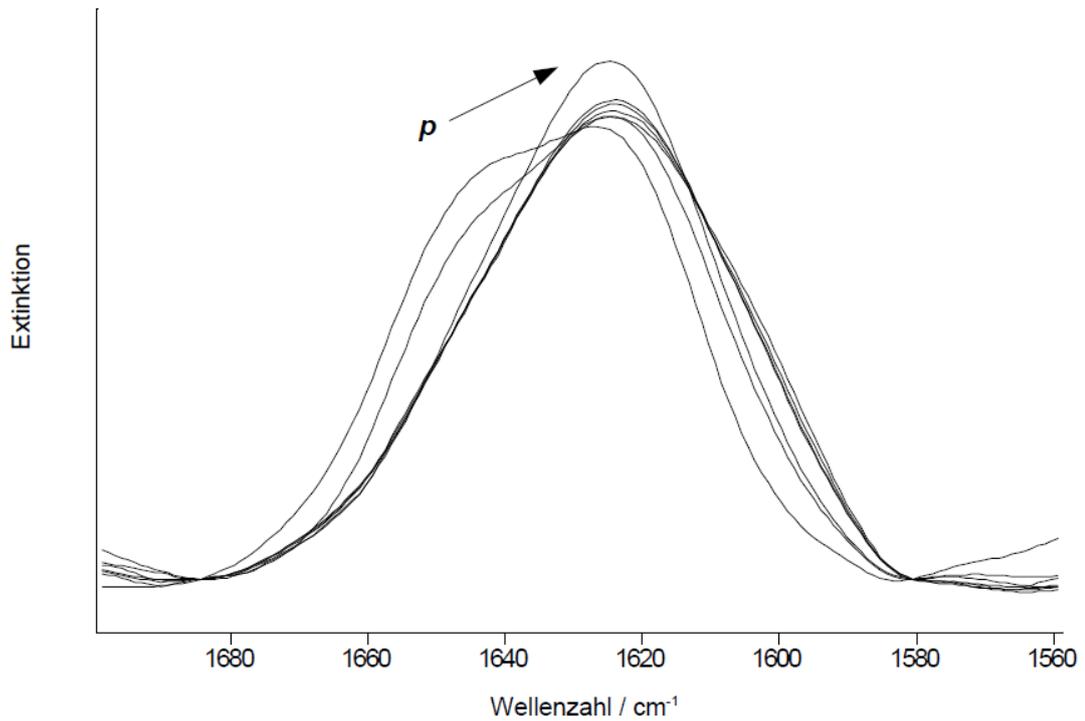


Abb. 7.3.5: Normierte FTIR-Spektren von linearem PNIPAM zwischen 1 und ~ 12400 bar bei 40 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

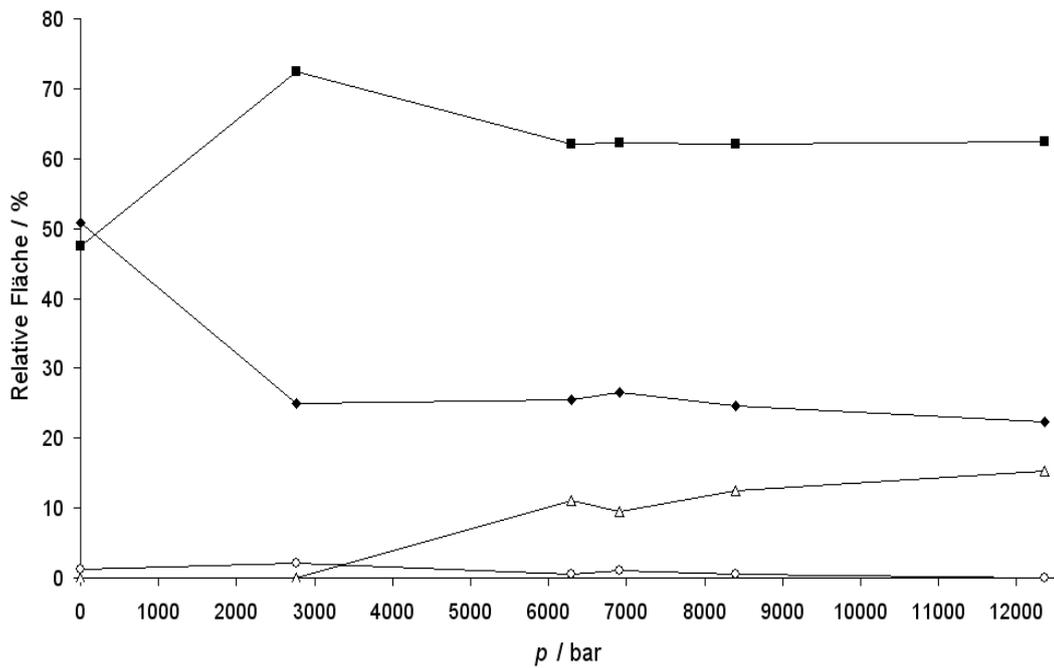


Abb. 7.3.6: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden von linearem PNIPAM bei 40 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

7.3.2 Hochdruck-FTIR-Messungen an PNIPAM Mikrogelen

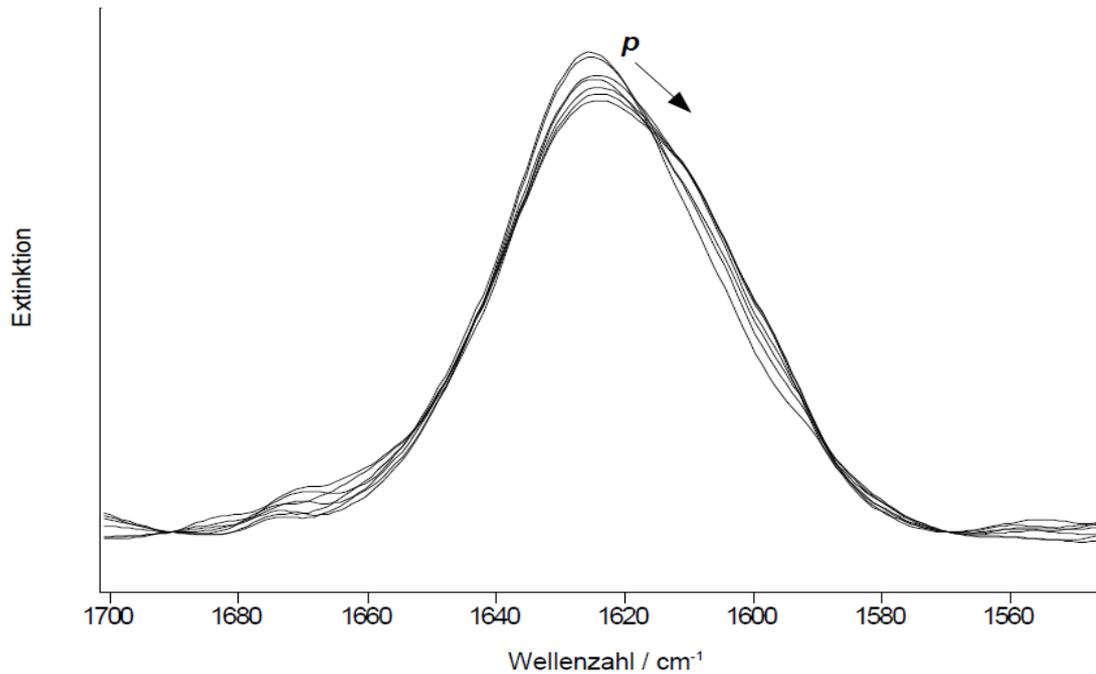


Abb. 7.3.7: Normierte FTIR-Spektren der PNIPAM-Mikrogelpräparation zwischen 1 und ~ 8400 bar bei 10 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

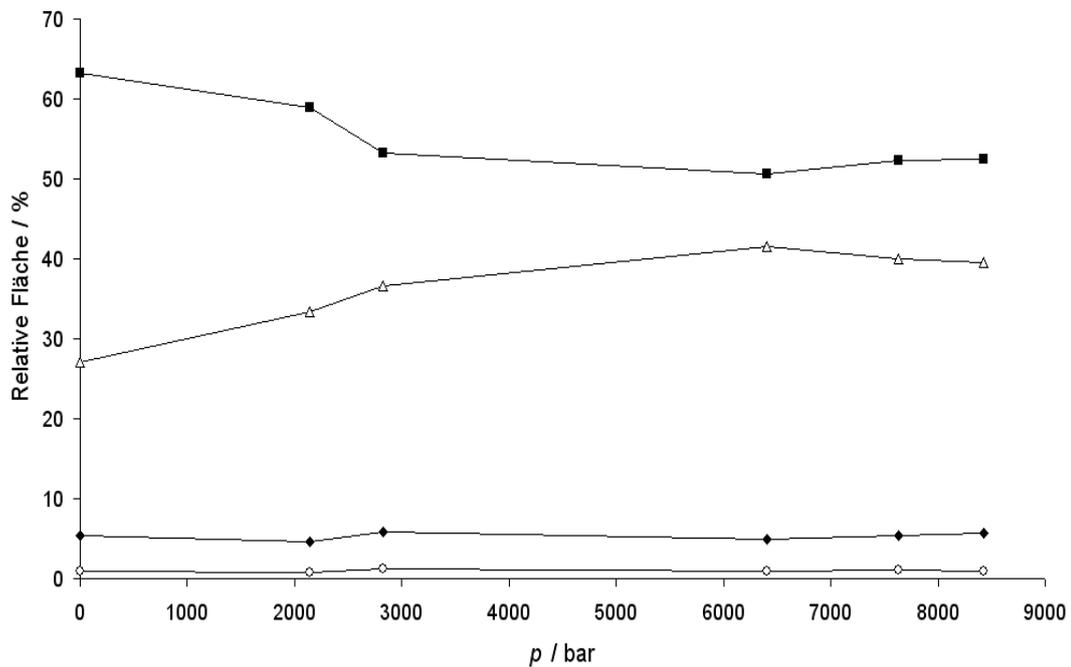


Abb. 7.3.8: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der PNIPAM-Mikrogelpräparation bei 10 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

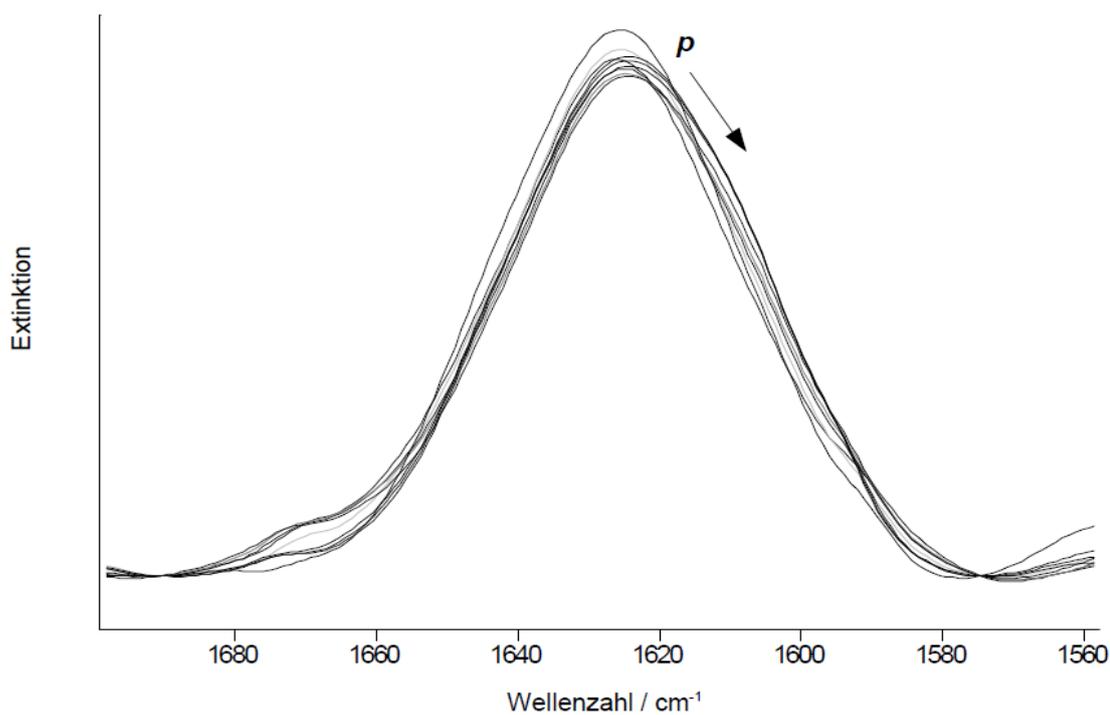


Abb. 7.3.9: Normierte FTIR-Spektren der PNIPAM-Mikrogelpräparation zwischen 1 und ~7900 bar bei 30 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

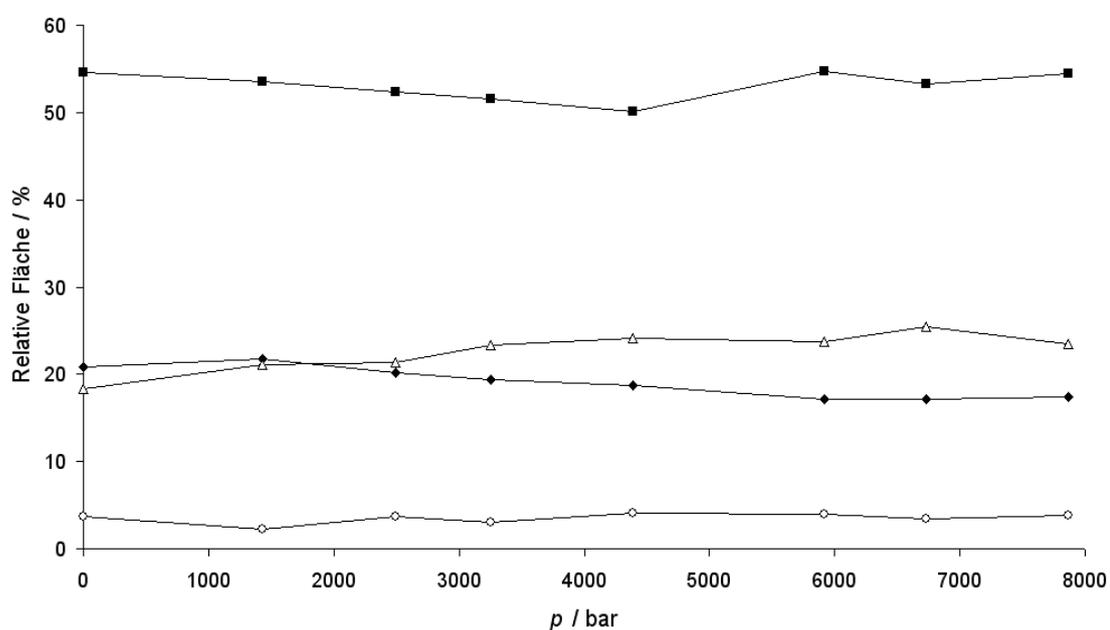


Abb. 7.3.10: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der PNIPAM-Mikrogelpräparation bei 30 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

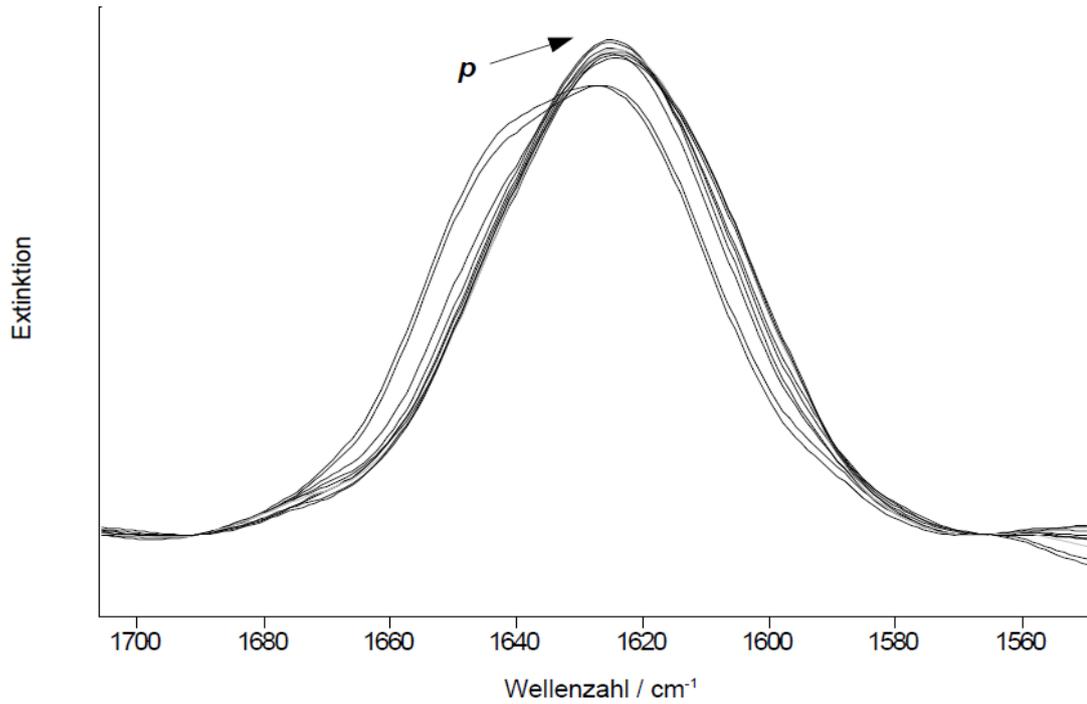


Abb. 7.3.11: Normierte FTIR-Spektren der PNIPAM-Mikrogelpräparation zwischen 1 und ~ 10300 bar bei 40 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

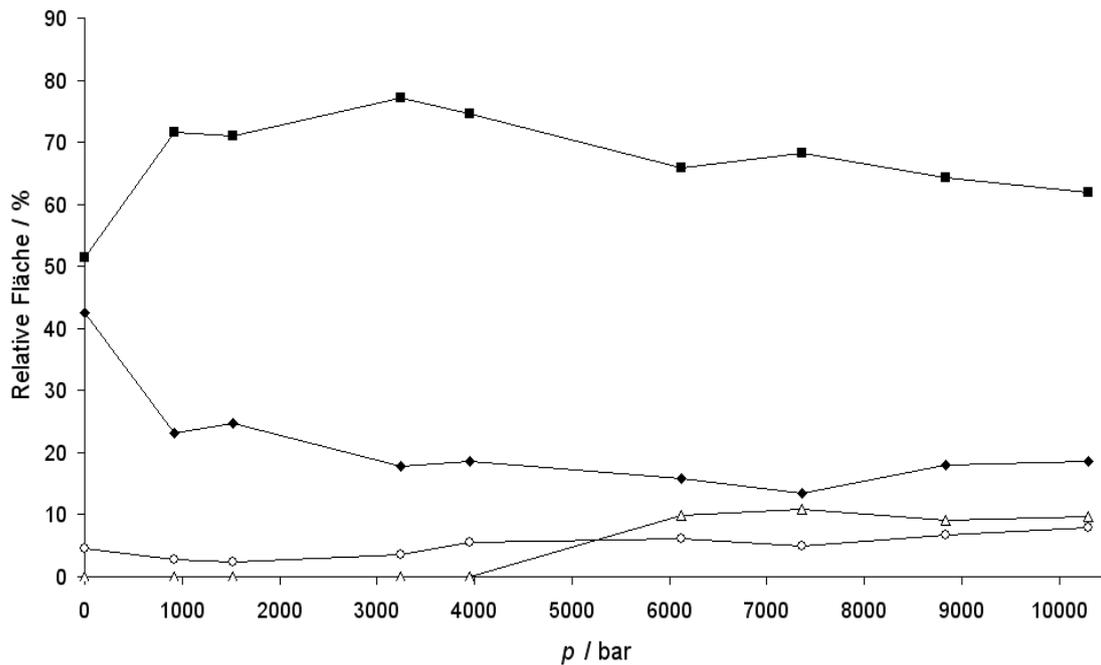


Abb. 7.3.12: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der PNIPAM-Mikrogelpräparation bei 40 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

7.3.3 Hochdruck-FTIR-Messungen am Mikrogelgemisch PNIPAM-PDEAAM (40-60)

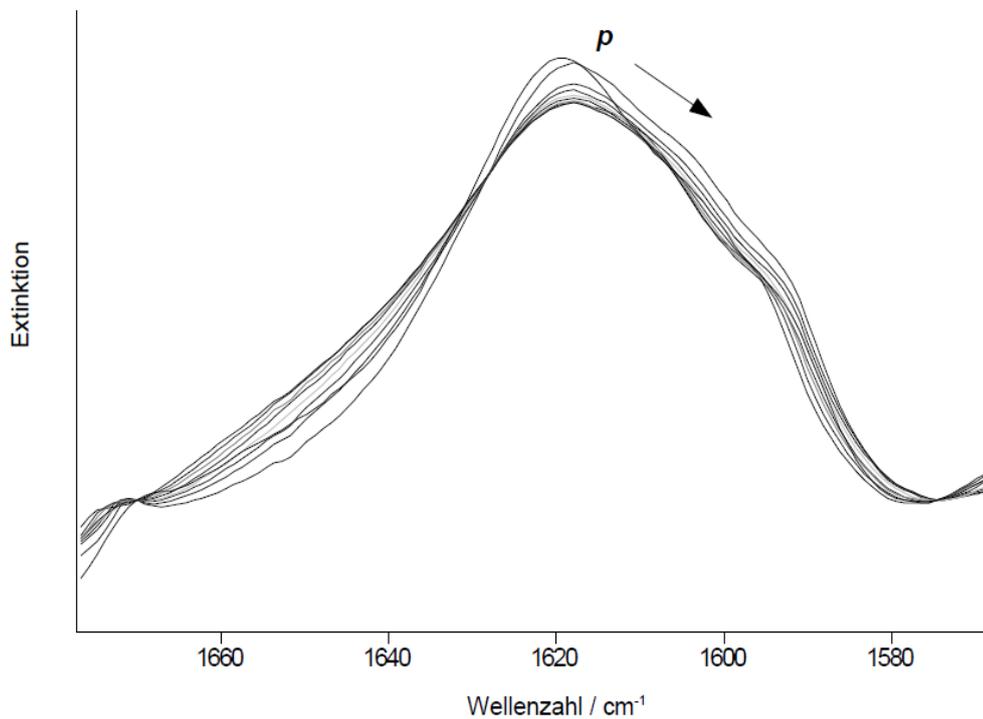


Abb. 7.3.13: Normierte FTIR-Spektren des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60) zwischen 1 und ~9100 bar bei 20 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

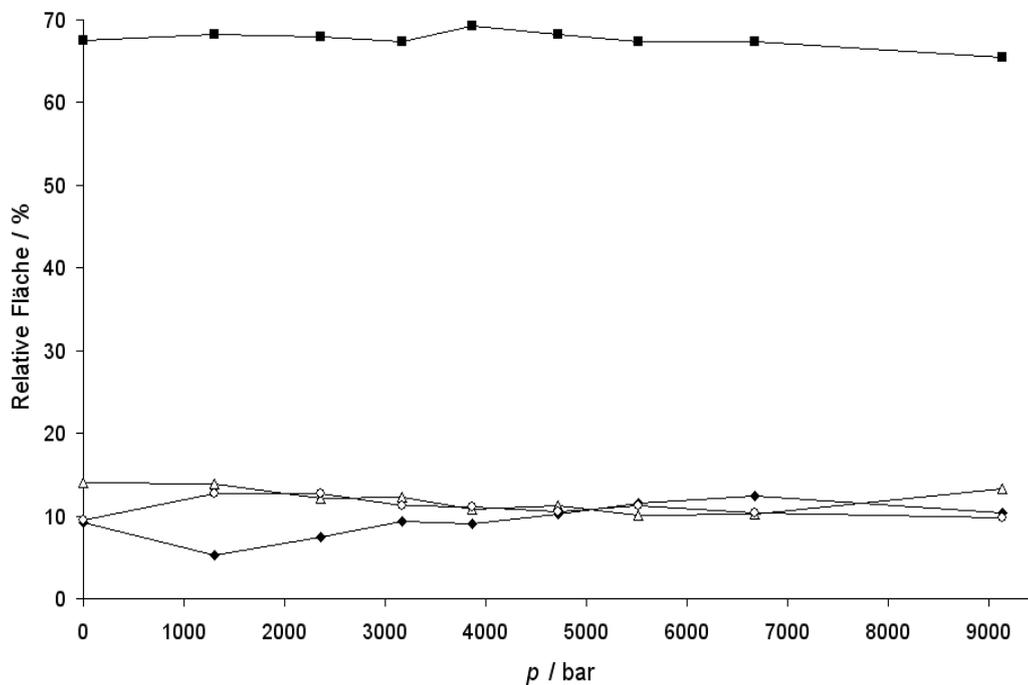


Abb. 7.3.14: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60) bei 20 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

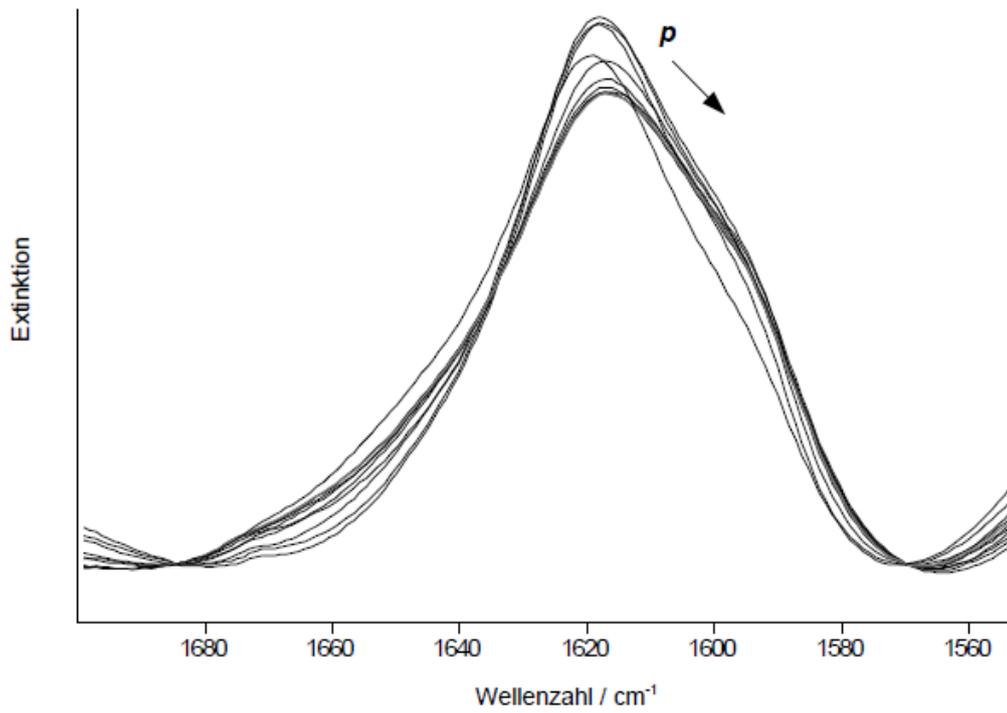


Abb. 7.3.15: Normierte FTIR-Spektren des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60) zwischen 1 und ~9700 bar bei 30 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

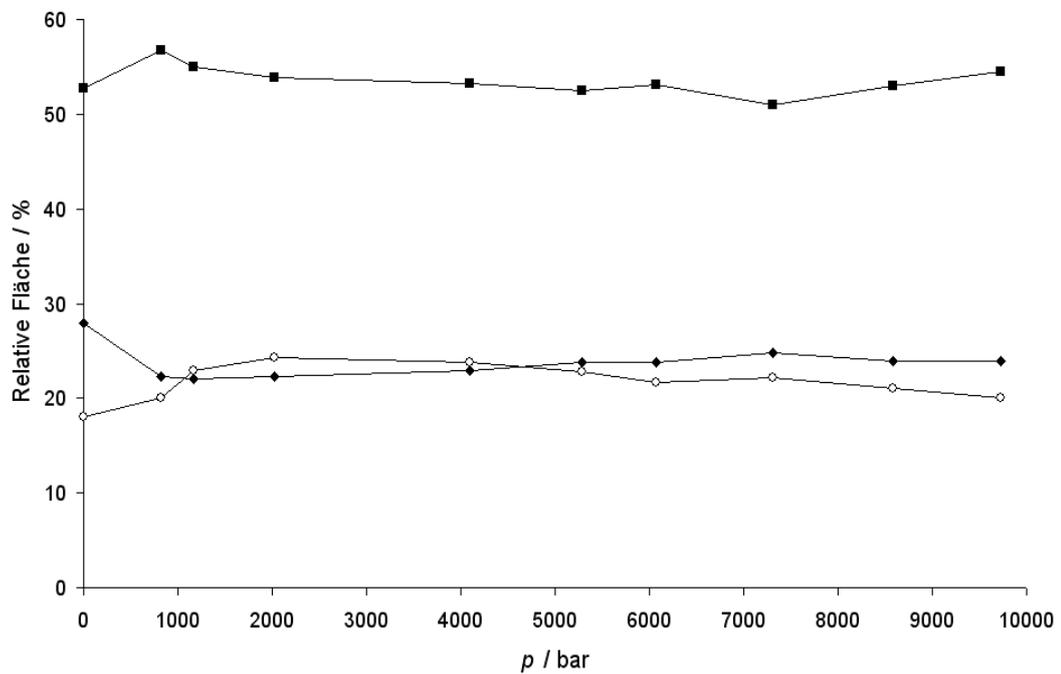


Abb. 7.3.16: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60) bei 30 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

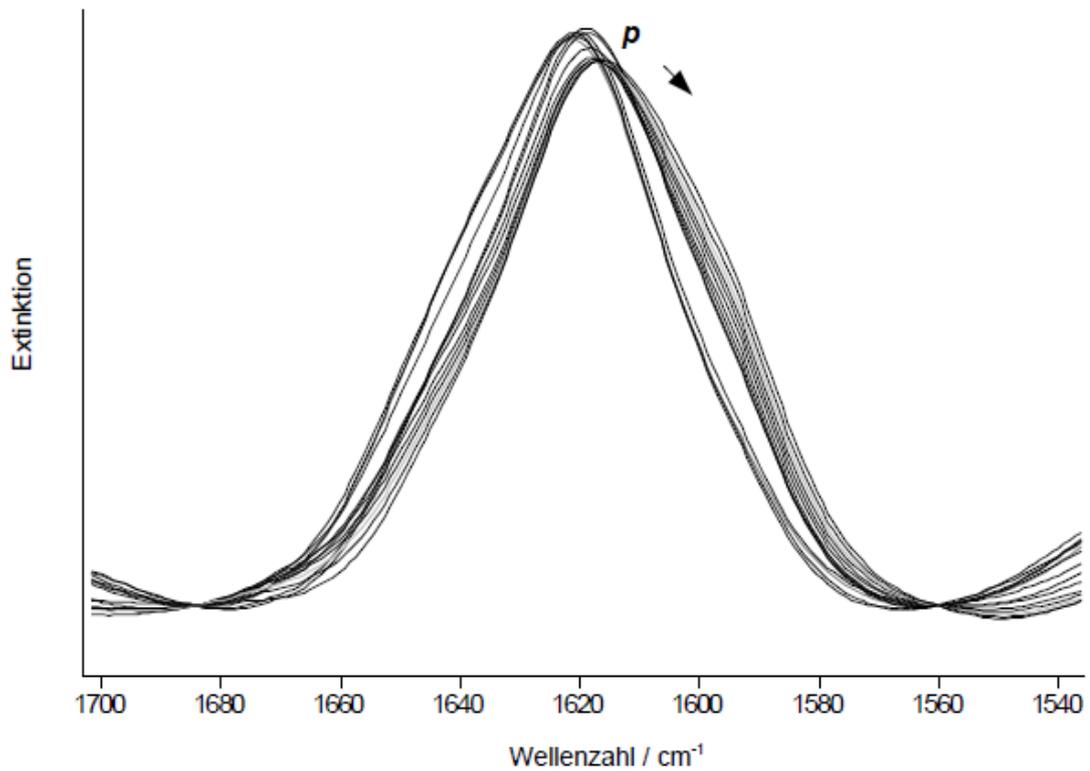


Abb. 7.3.17: Normierte FTIR-Spektren des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60) zwischen 1 und ~9600 bei 50 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

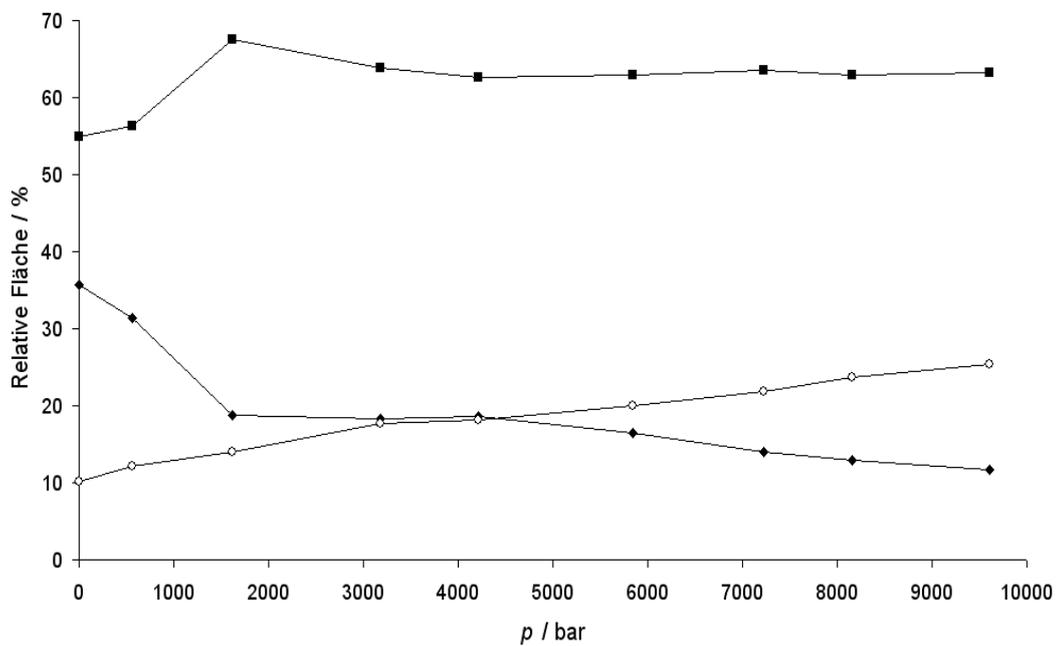


Abb. 7.3.18: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden des Mikrogelgemisches PNIPAM-PDEAAM (40-60) bei 50 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

7.3.4 Hochdruck-FTIR-Messungen an der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55)

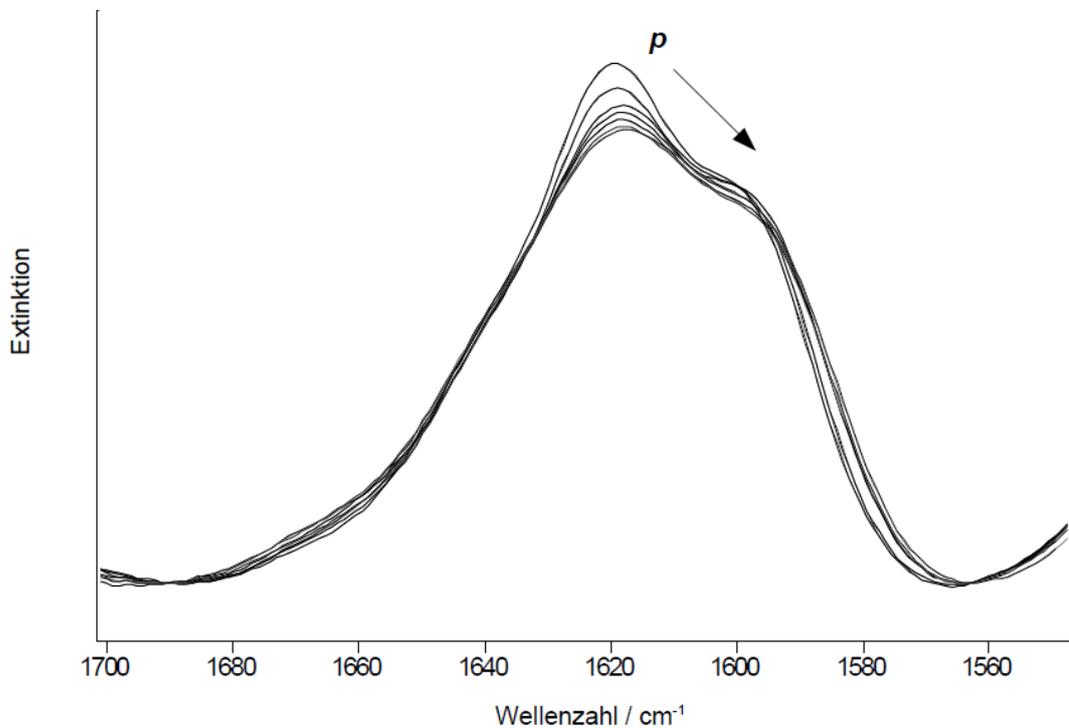


Abb. 7.3.19: Normierte FTIR-Spektren der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55) zwischen 1 und ~ 10400 bar bei 20 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

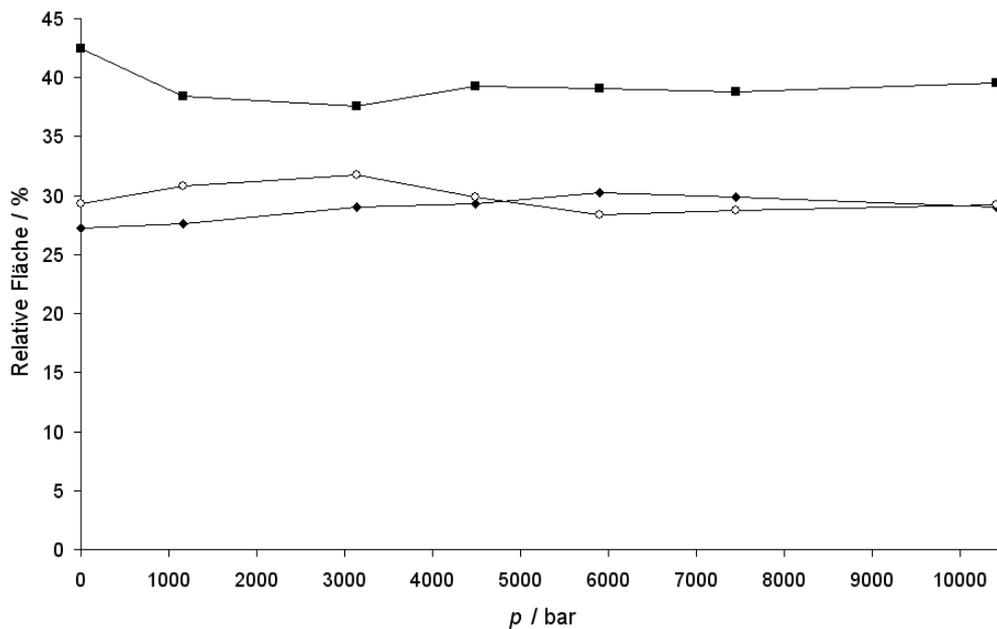


Abb. 7.3.20: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55) bei 20 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

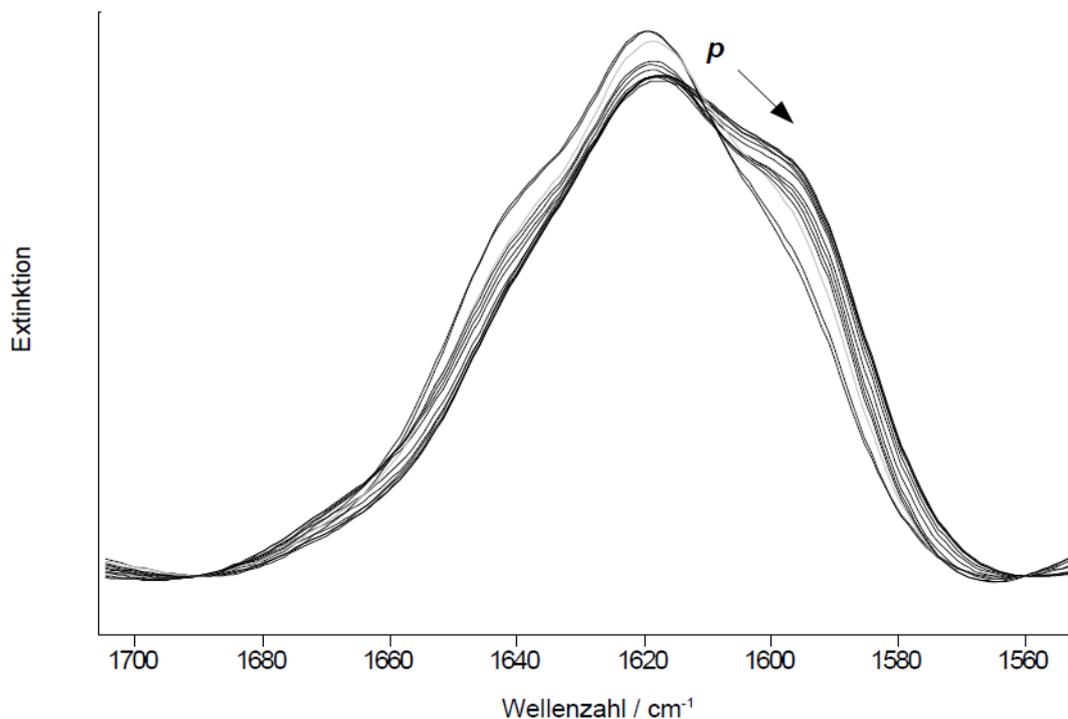


Abb. 7.3.21: Normierte FTIR-Spektren der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55) zwischen 1 und ~ 9900 bar bei 30 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

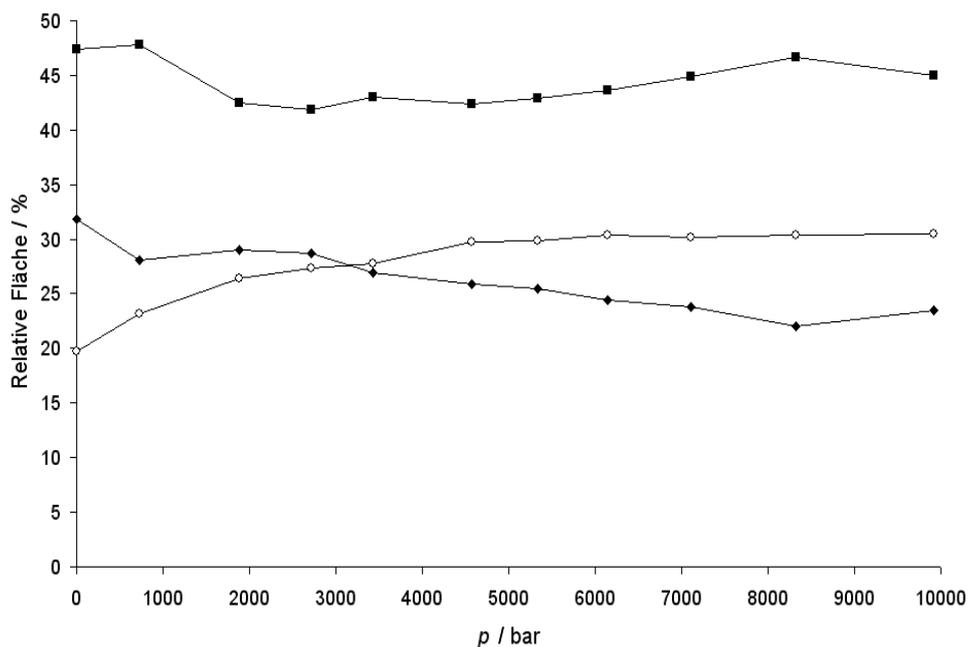


Abb. 7.3.22: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55) bei 30 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.

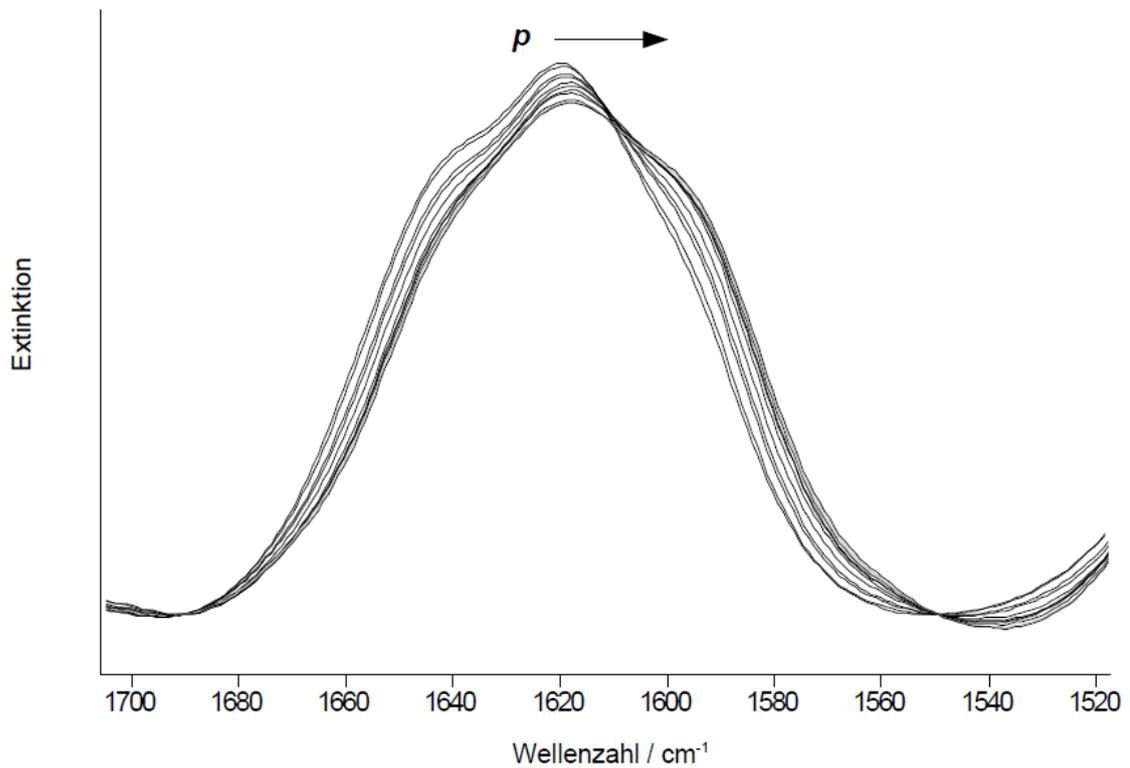


Abb. 7.3.23: Normierte FTIR-Spektren der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55) zwischen 1 und ~ 10100 bar bei 50 °C. Der schwarze Pfeil zeigt die Entwicklung mit steigendem Druck an.

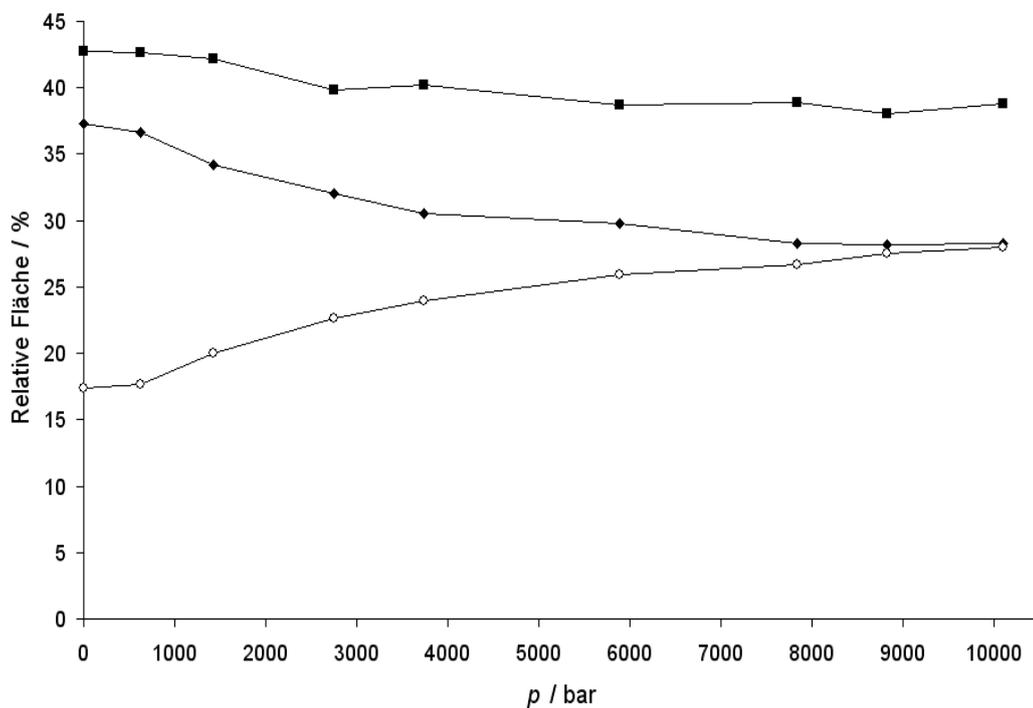


Abb. 7.3.24: Druckabhängigkeit der relativen Flächenanteile der diagnostischen Amid-I'-Banden der Copolymermikrogelpräparation NIPAM/DEAAM (45-55) bei 50 °C. Zur Symbolzuordnung siehe Abb. 4.4.3.