

*Über den strukturellen Aufbau und die Dynamik von
Saccharid/Proteinmischungen
in Lösung und im Festkörper*

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem

Institut für Physik
der Naturwissenschaftlichen Fakultät II
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Christiane Hackel

geboren am 26. Mai 1983 in Merseburg

Halle (Saale), den 7. Mai 2015

Gutachter:

1. Prof. Dr. Detlef Reichert
2. Prof. Dr. Dariush Hinderberger
3. Prof. Dr. Michael Vogel

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 03.06.2015

Öffentliche Verteidigung: 28.10.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Grundlagen der NMR	11
2.1	Vom Kernspin zum NMR-Signal	11
2.2	Wechselwirkungen der NMR	13
3	Experimentelle Details und Datenauswertung	17
3.1	Verwendete Saccharide und Proteine	17
3.2	Messung von Selbstdiffusionskoeffizienten mit Hilfe von Flüssig-NMR-Methoden.....	19
3.2.1	<i>Vom Selbstdiffusionskoeffizient zur Strukturinformation</i>	19
3.2.2	<i>Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D mit Hilfe von PFG-NMR</i>	22
3.2.3	<i>Viskositätsmessung</i>	27
3.2.4	<i>Spektren und Datenverarbeitung</i>	29
3.2.5	<i>Präparation der verwendeten Lösungen</i>	34
3.3	Festkörper-NMR-Experimente zur Untersuchung der molekularen Dynamik	35
3.3.1	<i>Experimente zur Untersuchung von molekularen Bewegungen mit Korrelationszeiten im ns- bis μs-Bereich</i>	35
3.3.2	<i>Experimente zur Untersuchung von molekularen Bewegungen mit Korrelationszeiten im ms- bis s-Bereich</i>	45
3.3.3	<i>Probenpräparation</i>	50
4	Struktureller Aufbau von Lysozym/Saccharidlösungen	53
4.1	Binäres System: Saccharide in wässriger Lösung	53
4.2	Ternäres System: Protein in wässriger Lösung mit Sacchariden	56
4.3	Zusammenfassung: Anlagerungsprozess von Sacchariden und Proteinen	70
5	Struktureller Aufbau und dynamische Eigenschaften von lyophilisierten Csp/Trehalosesystemen	75
5.1	CP-Spektren und spektrale Auflösung	76
5.2	Charakterisierung der dynamischen Eigenschaften von lyophilisierten Csp in Abhängigkeit vom Wassergehalt	80
5.3	Vergleich der Dynamik von lyophilisiertem Csp und einer lyophilisierten Csp/Trehalosemischung.....	89
5.4	Einfluss von Wassermolekülen auf die dynamischen Eigenschaften von Csp in einer Csp/Trehalosemischung	91
5.5	Zusammenfassung: Struktureller Aufbau und dynamische Eigenschaften von Csp/Trehalosesystemen	93
6	Zusammenfassung	97
7	Anhang	99
7.1	Experimentelle Parameter.....	99
7.1.1	<i>NMR-Experimente in Lösung</i>	99
7.1.2	<i>FK-NMR-Experimente</i>	103
7.2	Übersicht über die Diederwinkel der glycosidischen Bindung der Disaccharide in Lösung	104
7.3	Gradientenform.....	104

7.4	Viskositätsmessung in Lösung	106
7.5	Abhängigkeit der spektralen Auflösung von der Ausbildung von Selbstaggregaten in Lysozymlösungen	107
7.6	Simulationsprogramm zur Berechnung der DIPSHIFT-Kurven	107
7.7	Wiedereinkopplung der CSA im CODEX-Experiment	110
7.8	Csp CODEX-Daten	113
7.9	DIPSHIFT-Daten für $T = 25\text{ °C}$	113
	Literaturverzeichnis	115
	Publikationsliste	133
	Danksagung	135
	Lebenslauf	137
	Eidesstattliche Erklärung	139

1 Einleitung

Die Umweltbedingungen, unter denen Organismen auf der Erde überleben können, sind sehr unterschiedlich. Während der Mensch ohne Hilfsmittel einen sehr kleinen Toleranzbereich hinsichtlich seiner Umweltbedingungen (Temperatur, Wasserzufuhr) hat, sind einige Lebewesen in der Lage ein wesentlich größeres Spektrum zu tolerieren [1]. Diese Organismen können ihre Stoffwechselfvorgänge im Fall extremer Umweltbedingungen reduzieren und so einen Zustand einnehmen, der Kryptobiose genannt wird. Erstmals wurde dieses Phänomen 1702 von dem Niederländer Van Leeuwenhoek beobachtet. Dieser untersuchte unter dem Mikroskop das getrocknete Moos seiner Dachrinne. Die darin enthaltenen Rädertierchen waren in der Lage, auch nach mehreren Monaten Trockenheit, ihren Stoffwechsel nach der Zugabe von Wasser komplett zu reaktivieren [2]. Das Wort Kryptobiose setzt sich aus den griechischen Wörtern *kryptos* = verborgen und *bios* = Leben zusammen und beschreibt damit sehr treffend dieses Phänomen. Ausgehend von der Ursache des kryptobiotischen Zustandes werden verschiedene Formen unterschieden. Zwei Beispiele sind die Anhydrobiose, die das Überleben trotz Austrocknung beschreibt, und die Kryobiose, die das Überleben bei niedrigen Temperaturen umfasst. In Organismen, welche diese Eigenschaften aufweisen, wurde auffällig häufig das Disaccharid Trehalose in großen Mengen nachgewiesen. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass Trehalose die biologische Schutzwirkung unterstützt oder sogar verursacht [3, 4]. Die eingekapselten Embryonalstadien (Zysten) der *Artemia* zum Beispiel, einer Gattung der Krebstiere, bestehen zu 15 % ihres Trockengewichtes aus Trehalose [5]. Diese Zysten sind in der Lage 15 Jahre Wassermangel unbeschadet zu überstehen. Das Vorkommen des Disaccharides Trehalose konnte auch bei anderen Organismen, die die Eigenschaft der Anhydrobiose zeigen, nachgewiesen werden. Sowohl in Bärtierchen (*Tardigrada*) [2] als auch in Fadenwürmern (*Aphelenchus avenae*) [6, 7] wurde unter Wassermangel ein Anstieg der Konzentration von Trehalose beobachtet. Nicht nur in tierischen Organismen, sondern auch in Pflanzen wurde das Phänomen der Anhydrobiose beschrieben. Die Unechte Rose von Jericho (*Selaginella lepidophylla*) ist dafür bekannt lange Trockenperioden unbeschadet zu überstehen, wobei in diesen Pflanzen ebenfalls das Disaccharid Trehalose nachgewiesen wurde [8, 9]. Die genannten Organismen sind nur einige Beispiele für kryptobiotische Lebewesen.

Da die Eigenschaften der Kryptobiose vor allem im Bereich der Medizin vielfältige attraktive Einsatzgebiete ermöglichen, wurden bereits zahlreiche Anwendungen der Trehalose in diesem Bereich getestet. Überwiegend widmen sich die Studien dem Problem, organisches Gewebe oder medizinische Wirkstoffe zu lagern, ohne deren Funktionalität einzuschränken. Diese Fragestellung ist für die moderne Medizin von enormer Bedeutung. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Schutzwirkung der Trehalose bei dem Gefriertrocknen von Zellen ausgenutzt werden kann. Beim Prozess des Gefriertrocknens sind die Zellen zwei Stressfaktoren ausgesetzt: Wassermangel und tiefe Temperaturen. Befand sich Trehalose sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zellen während des Gefriertrocknens, konnte eine erhöhte Toleranz von Bakterien gegenüber dem Prozess beobachtet werden [10]. Eine weitere

Anwendung ist die Lagerung von Blutplättchen, welche aktuell in Blutbanken als aufkonzentrierte Plasmapräparate bei 22 °C gelagert werden. Da dies nur für einen begrenzten Zeitraum von einigen Tagen möglich ist, besteht eine chronische Mangelversorgung. Wolkers *et al.* haben gezeigt, dass menschliche Blutplättchen, wenn sie mit Trehalose versetzt werden, im gefriergetrockneten Zustand gelagert werden können [11]. Ohne die Beimengung von Trehalose vor dem Gefriertrocknen verlieren die Blutplättchen nach der Zugabe von Wasser ihre Funktionalität. Die mit Trehalose gefriergetrockneten Blutplättchen zeigen dagegen nach der Zugabe von Wasser ähnliche Eigenschaften wie frische Blutplättchen. Die Möglichkeit, die Blutplättchen ohne Verlust ihrer Funktionalität gefriergetrocknet zu können, würde die Lagerung und auch den Transport erheblich erleichtern. Weiterhin wurden Untersuchungen mit Antikörperkonjugaten durchgeführt, welche unter anderem zur Krebstherapie eingesetzt werden. Für die Lagerung und den Transport werden die Konjugate gefriergetrocknet. Der Vergleich von Proben, die vor dem Einfrieren mit Trehalose versetzt wurden und Proben ohne Trehalose, zeigt, dass die Antikörperkonjugate in der Probe mit Trehalose während der Lagerung über einen längeren Zeitraum stabil waren [12]. Zahlreiche weitere Anwendungen wurden bereits getestet und sind in dem Artikel von Teramoto *et al.* zusammengefasst [3].

Hinsichtlich ihrer biologischen Schutzwirkung wurden verschiedene Saccharide getestet. Der Fokus der überwiegenden Anzahl von Studien liegt jedoch auf der herausragenden Rolle des Disaccharides Trehalose. Im Vergleich zu anderen Sacchariden hat dieses sich als besonders geeignet erwiesen. Bereits 1971 veröffentlichte J. H. Crowe einen Artikel zu diesem Thema, in dem die Funktionsweise der Trehalose als biologischer Schutzstoff auf molekularer Ebene als aufgeklärt betrachtet wurde [13]. Der Schutzmechanismus erweist sich jedoch als so komplex, dass selbst über 40 Jahre später, nach vielfältigen weiteren Untersuchungen durch Crowe und andere Arbeitsgruppen, weiterhin keine umfassende Erklärung zur Verfügung steht [14]. Um das Potential der Anwendungen von Trehalose als Schutzstoff im Bereich der Anhydrobiose und Kryobiose voll ausschöpfen zu können, ist es jedoch notwendig deren Funktionsweise auf molekularer Ebene zu verstehen. Bevor dies in hoch komplizierten Systemen wie Zellen oder gar Organen möglich ist, ist es sinnvoll mit der Charakterisierung der Eigenschaften eines „einfacheren“ Modellsystems zu beginnen. Dafür werden in dieser Arbeit Proteine genutzt, auch wenn diese aufgrund ihrer strukturellen und dynamischen Eigenschaften bereits komplexe Systeme darstellen. Sie bieten sich zur Untersuchung der Schutzwirkung von Trehalose an, da sie ein wichtiger Baustein des Lebens sind und vielfältige Aufgaben innerhalb der Zellen wahrnehmen. Soll die Integrität während des Gefriergetrocknens von Zellen oder organischem Gewebe bewahrt werden, müssen deren Proteine ebenfalls geschützt werden. In dieser Arbeit wird daher die Wechselwirkung von Sacchariden, insbesondere des Disaccharides Trehalose, und Proteinen nach dem Lyophilisieren der Proben untersucht.

Es stellt sich die Frage, wie sich Wassermangel auf die Struktur eines Proteins auswirkt und welche Eigenschaften eines Proteins demnach bei Wassermangel geschützt werden müssen. In einer wässrigen Umgebung wird der gefaltete Zustand eines Proteins durch den Hydrophoben Effekt stabilisiert [15]. Dieser entsteht, da sich im wässrigen Lösungsmittel die

hydrophoben Reste eines gefalteten Proteins im Inneren des Proteinknäuels befinden und dadurch die Gesamtentropie des Systems optimiert wird. Die Entropie der Proteinkette nimmt dadurch zwar ab, gleichzeitig erhöht sich aber die Entropie des umgebenden Wassers. Die Gesamtentropie des Systems ist in wässriger Lösung am höchsten, wenn sich das Protein im gefalteten Zustand befindet. Das heißt, der gefaltete Zustand des Proteins wird in wässriger Lösung begünstigt. Im Fall von Wassermangel dagegen ist der ungefaltete Zustand für das Protein entropisch günstiger. Das heißt, die Proteinstruktur wird destabilisiert. Der Schutz der Struktur des Proteins ist demnach eine Aufgabe, die ein Schutzstoff im Zusammenhang mit Wassermangel erfüllen muss. Die Funktionalität eines Proteins hängt jedoch nicht nur von einer intakten Proteinstruktur ab, sondern auch von dessen dynamischen Eigenschaften. Beide müssen während eines auftretenden Wassermangels geschützt werden und Trehalose scheint diese Aufgabe, wie die oben aufgeführten Anwendungen zeigen, zu übernehmen. Wie die Schutzfunktion auf molekularer Ebene entsteht, konnte bisher nicht geklärt werden. Im Laufe der Zeit haben sich drei Theorien etabliert:

- Die **Hypothese der Wasserersetzung** erklärt die biologische Schutzwirkung von Trehalose bei Wassermangel durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Trehalose und dem Protein. Diese ersetzen Wasserstoffbrückenbindungen, die in wässriger Lösung zwischen dem Protein und dem umgebenden Wasser ausgebildet werden [16, 17, 18, 19, 20].
- Bei der **Glashypothese** wird davon ausgegangen, dass die Viskosität der Trehalose im amorphen Zustand die Dynamik des Proteins einschränkt. Dadurch werden Konformationsänderungen, die für die Änderung der Proteinstruktur notwendig sind, verhindert und das Protein wird geschützt [21, 22, 23, 24].
- Die **Hypothese des Wassereinschlusses** führt die Schutzwirkung darauf zurück, dass eine amorphe Trehalosematrix um das Protein Wassermoleküle einschließt und damit die Oberfläche des Proteins hydratisiert bleibt [19, 25, 26, 27, 28].

Die drei genannten Hypothesen stehen nicht im direkten Widerspruch zueinander und eine Kombination dieser zur Erklärung der Schutzfunktion der Trehalose scheint sinnvoll. Die Ausbildung einer amorphen Trehalosestruktur ist eine wichtige Voraussetzung für den Schutzmechanismus, wie mehrfach demonstriert wurde [14, 21, 22, 23, 24]. Da im Fall eines Wassermangels nicht ausreichend Wassermoleküle zur Verfügung stehen, um die Oberfläche des Proteins zu bedecken, muss es zu Protein/Trehalose-Kontakten kommen. Trehalosemoleküle können in diesem Fall die fehlenden Wassermoleküle an der Oberfläche des Proteins ersetzen. Dieser Effekt wird in der Wasserersetzungshypothese beschrieben. Aufgrund ihrer Größe sind Trehalosemoleküle jedoch nicht in der Lage in enge Räume des Proteins einzudringen [29], um dort gebundene Wassermoleküle zu ersetzen. In diesen Bereichen der Proteinstruktur könnte demnach ein Wassereinschluss stattfinden. Die veröffentlichte Literatur bietet kein einheitliches Bild und es konnte nicht geklärt werden, welche der Hypothesen die biologische Schutzwirkung von Sacchariden erklärt. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag leisten, um die Funktionsweise der biologischen Schutzwirkung von Saccharidmolekülen zu erklären.

Dafür werden im ersten Teil der Arbeit (Kapitel 4) Protein/Saccharidlösungen charakterisiert. Es wird untersucht, unter welchen Bedingungen Anlagerungsprozesse zwischen Saccharidmolekülen und Proteinen auftreten oder ausbleiben. Diese Prozesse werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit als struktureller Aufbau der Lösung beschrieben und wurden bereits in mehreren Studien untersucht. Diese kommen jedoch zu keinem einheitlichen Bild. Einige zeigen, dass sich Saccharidmoleküle an der Oberfläche von Proteinen anlagern [30, 31, 32, 33] andere Studien zeigen das Gegenteil [19, 26, 27, 34, 35, 36, 37, 38, 39]. Dieses kontroverse Bild entsteht, weil die Untersuchungen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden. Der pH-Wert einer Lösung, die Konzentration der gelösten Teilchen sowie die Art der verwendeten Saccharide beeinflussen die Anlagerung von Saccharidmolekülen an der Oberfläche eines Proteins. In dieser Arbeit werden in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen systematische Untersuchungen des Anlagerungsprozesses zwischen Proteinen und Saccharidmolekülen in Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit den veröffentlichten Studien betrachtet. Da die überwiegende Zahl der Studien mit dem Protein Lysozym durchgeführt wurde, werden die Experimente in dieser Arbeit ebenfalls an diesem Protein durchgeführt. So können die Ergebnisse umfassend mit der Literatur verglichen werden. Die Größe des Lysozyms bzw. von Lysozym/Saccharidkomplexen wird mittels der Diffusionseigenschaften des Proteins charakterisiert. Dafür wird die Feldgradienten-NMR (PFG-NMR) [40] genutzt. Sie ist eine aussagekräftige Methode, um die Selbstdiffusionskoeffizienten von gelösten Teilchen zu bestimmen. Ausgehend von den Diffusionskoeffizienten werden über die Stokes-Einstein-Beziehung [41], bei bekannter Viskosität der Lösung, die hydrodynamischen Radien R_h der gelösten Teilchen berechnet. Der hydrodynamische Radius ist eine Modellvorstellung, die eine Abschätzung über die Größe des betrachteten Teilchens ermöglicht. Lagern sich ausreichend Saccharidmoleküle an der Oberfläche des Proteins an, wird dessen R_h vergrößert. Das heißt, durch den Vergleich der hydrodynamischen Radien der Proteine, in Lösung mit und ohne Saccharidmolekülen, können Anlagerungsprozesse detektiert werden.

Der zweite Teil der Arbeit (Kapitel 5) befasst sich mit dem strukturellen Aufbau einer Saccharid/Proteinmischung im Festkörper. Die Verteilung von Wassermolekülen in diesem Probensystem steht im Fokus der Untersuchung. Liegt eine homogene Verteilung innerhalb der Probe vor oder lagern sich die Wassermoleküle bevorzugt an den Saccharidmolekülen oder den Proteinen an? Aus dieser Verteilung lassen sich Rückschlüsse über die Gültigkeit der vorgestellten Hypothesen ziehen. Das Protein Csp wird in eine Trehalosematrix gebettet. Deren Einfluss auf die dynamischen Eigenschaften des Proteins wird für eine amorphe und eine kristalline Matrix untersucht. In Abhängigkeit vom Zustand der Trehalosematrix wird die Wasserverteilung innerhalb des Probensystems charakterisiert. Csp gehört zur Klasse der Kälteschockproteine und ist mit 67 Aminosäuren ein kleines Protein. Unter Kältestress liegt dieses Protein in Bakterien in erhöhter Konzentration vor [42]. Daher wurde es für die Experimente in dieser Arbeit ausgewählt. In Abhängigkeit vom Wassergehalt werden die dynamischen Eigenschaften des Proteins hinsichtlich ihrer Korrelationszeit und Geometrie der Bewegung über einen großen Zeitbereich hinweg untersucht. Durch einen Vergleich dieser

Eigenschaften, in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Proben, werden Informationen über den strukturellen Aufbau von Csp/Trehalosemischungen gewonnen. Dies ermöglicht eine modellhafte Vorstellung über die Verteilung der Wassermoleküle innerhalb des Probensystems und lässt damit Rückschlüsse über den Anwendungsbereich der Hypothesen zu. Zur Charakterisierung der dynamischen Eigenschaften des Csp werden in dieser Arbeit verschiedene Festkörper (FK)-NMR-Experimente angewendet. Nur wenige Studien haben bisher ihren Fokus auf den Einfluss der Trehalose auf die dynamischen Eigenschaften von Proteinen gelegt [43]. Meist steht die Proteinstruktur im Mittelpunkt der Untersuchungen, eine Zusammenfassung der veröffentlichten Ergebnisse ist in [44] nachzulesen. Da die dynamischen Eigenschaften von Proteinen für deren Funktionalität ebenso wichtig sind wie deren strukturelle Eigenschaften [45], werden diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht.

In Abbildung 1.1 ist einen Überblick über die Ziele dieser Arbeit, die verwendeten Probensysteme und Experimente dargestellt. Nach einer kurzen Einführung in die Grundlagen der NMR im Kapitel 2 werden die Details zu den verwendeten Experimenten sowie zur Datenauswertung im Kapitel 3 erläutert. Die Ergebnisse der Experimente werden in den Kapiteln 4 und 5 vorgestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse rundet die Arbeit ab.

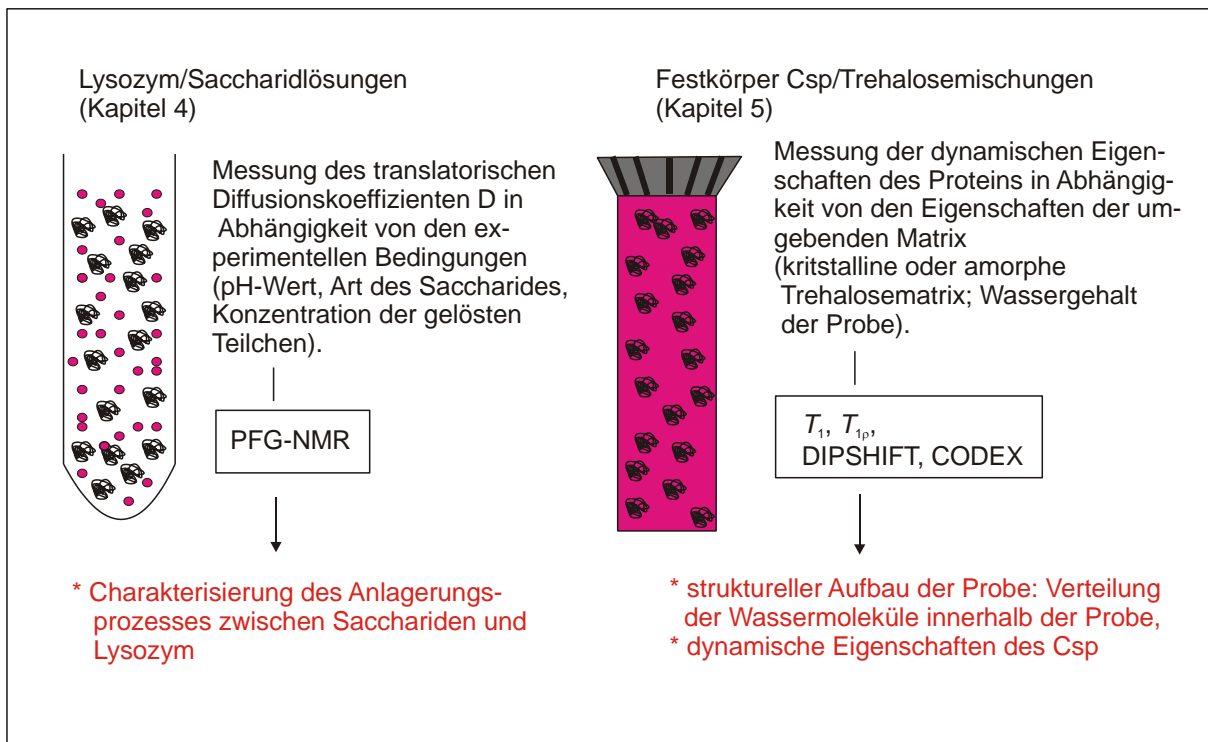


Abbildung 1.1 Übersicht über die in dieser Arbeit charakterisierten Probensysteme. Die verwendeten Methoden und die untersuchten Eigenschaften sind für das jeweilige Probensystem aufgeführt. Das Probenröhrchen und der MAS-NMR-Rotor verdeutlichen modellhaft die untersuchten Proben. Die Knäule stellen die Proteine dar, die pinkfarbenen Punkte sind die Saccharidmoleküle. Im Rotor verdeutlicht der pinkfarbene Hintergrund die Trehalosematrix. Die Wassermoleküle in den Proben sind im Sinne einer übersichtlichen Darstellung nicht abgebildet. Das Verhältnis der dargestellten Proteine zu den Saccharidmolekülen wurde ebenfalls im Sinne einer übersichtlichen Darstellung ausgewählt und entspricht nicht den in den Experimenten verwendeten Teilchenverhältnissen bzw. den tatsächlichen Größenverhältnissen der Teilchen.

2 Grundlagen der NMR

2.1 Vom Kernspin zum NMR-Signal

Dieser Abschnitt bietet einen kurzen Überblick über die Grundlagen der NMR. In der einschlägigen Literatur können diese nachgelesen werden [46, 47, 48]. Die Grundlage der NMR-Spektroskopie ist der Eigendrehimpuls I der Atomkerne. Dieser wird Kernspin genannt und ist eine intrinsische Eigenschaft. Besitzt ein Kern einen Spin $I \neq 0$ ist dieser mit einem magnetischen Moment

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \cdot \boldsymbol{I} \quad (2.1)$$

über das gyromagnetische Verhältnis γ verknüpft. Das magnetische Moment μ eines Kernes setzt sich aus dem intrinsischen Beitrag durch den Kernspin und einem Beitrag durch die geladenen Teilchen im Kern zusammen. Die Summe aller magnetischen Momente pro Volumeneinheit ergibt die makroskopische Magnetisierung \boldsymbol{M} . Ohne ein äußeres Magnetfeld sind die magnetischen Momente in der Probe isotrop verteilt und es entsteht in der Summe keine makroskopische Magnetisierung. Bringt man die Probe in ein äußeres Magnetfeld \boldsymbol{B}_0 wirkt ein Drehmoment

$$\boldsymbol{D} = \boldsymbol{\mu} \times \boldsymbol{B}_0 \quad (2.2)$$

senkrecht zum magnetischen Moment und dem äußeren Magnetfeld. Die Richtung dieses Drehmomentes wird als Achse der Spinpolarisation bezeichnet. Aufgrund des wirkenden Drehmomentes führt der Spin eine Präzessionsbewegung um die Achse des angelegten äußeren Feldes mit der Frequenz

$$\omega_0 = -\gamma \cdot B_0 \quad (2.3)$$

aus. Die Frequenz ω_0 ist die Larmorfrequenz. Bei einer Magnetfeldstärke von $B_0 = 9,4$ T präzedieren ^1H -Spins mit einer Frequenz von $\omega_0 = 2\pi \cdot 400$ MHz um das äußere angelegte Feld. Aufgrund der thermischen Bewegung der Moleküle in einer Probe entstehen zeitlich fluktuierende lokale magnetische Felder am Ort der Spins. Diese sind die Ursache für eine anisotrope Verteilung der Ausrichtungen der Achsen der Spinpolarisationen und damit der magnetischen Momente der einzelnen Spins in einer Probe. Aufgrund dessen entsteht eine makroskopische Magnetisierung \boldsymbol{M} entlang der Achse des \boldsymbol{B}_0 -Feldes. Dieser Effekt wird Kernparamagnetismus genannt [46]. Die makroskopische Magnetisierung baut sich mit der charakteristischen Zeitkonstante T_1 auf und wird longitudinale Magnetisierung genannt. Das äußere Feld wird für alle Betrachtungen in dieser Arbeit in z-Richtung gelegt. Der Einfluss einer Wechselwirkung auf einen Kernspin wird mathematisch mit einem Hamiltonoperator beschrieben. Für die Wirkung des äußeren Magnetfeldes hat der Hamiltonoperator die Form:

$$\hat{H}_0 = -\gamma \mathbf{B}_0 \hat{\mathbf{I}} \quad (2.4)$$

und wird Hamiltonoperator der Zeemanwechselwirkung genannt.

Im NMR-Experiment wird nicht die longitudinale Magnetisierung, sondern die Magnetisierung senkrecht zum äußeren Magnetfeld \mathbf{B}_0 gemessen. Diese Magnetisierung wird transversale Magnetisierung genannt. Durch einen Radio-Frequenz-Puls (RF-Puls) kann die makroskopische Magnetisierung manipuliert werden. Ein RF-Puls ist eine elektromagnetische Welle, die mit einer Stärke \mathbf{B}_1 in Resonanz mit der Präzession der Spins (Larmorfrequenz ω_0) für eine Zeit t eingestrahlt wird. Dadurch wird die Polarisationsachse jedes einzelnen Spins um einen definierten Winkel um die Achse des eingestrahlenen RF-Pulses gekippt. Im gleichen Sinn ändert sich auch die Orientierung der makroskopischen Magnetisierung zum äußeren Magnetfeld. Alle Wechselwirkungen des Kernspins werden als Störung des Spinsystems durch zusätzliche Hamiltonoperatoren betrachtet:

$$\begin{aligned} \hat{H}_{\text{ges}} &= \hat{H}_0 + \hat{H}_{RF} \\ \hat{H}_{RF} &= -\gamma \mathbf{B}_{RF} \hat{\mathbf{I}} . \end{aligned} \quad (2.5)$$

Die wirkenden Hamiltonoperatoren werden in säkularer Näherung betrachtet. Das heißt, dass nur Anteile der Hamiltonoperatoren einer Wechselwirkung berücksichtigt werden, die die gleichen Eigenfunktionen besitzen wie der Hamiltonoperator \hat{H}_0 . Die Hamiltonoperatoren vertauschen in diesem Fall miteinander.

Die im NMR-Experiment verwendeten RF-Pulse werden entsprechend des Kippwinkels bezeichnet. Ein $(\pi/2)$ -Puls kippt die Magnetisierung um 90° z. B. von der z-Achse in Richtung der x-Achse, während ein (π) -Puls die Magnetisierung von der z-Achse in Richtung der -z-Achse dreht. Aufgrund der Präzession der einzelnen Spins, präzediert auch die makroskopische Magnetisierung um die Achse des äußeren Magnetfeldes. Die Spins präzedieren zu Beginn mit einer kohärenten Phase. Aufgrund von thermischen Fluktuationen der lokalen Magnetfelder am Ort der Kernspins geht die Phasenkohärenz mit der Zeit verloren. In Folge dessen verringert sich die makroskopische Magnetisierung in der (x-y)-Ebene. Die makroskopische Magnetisierung in der (x-y)-Ebene wird im NMR-Experiment detektiert und als freier Induktionszerfall (*free induction decay* - fid) bezeichnet. Das aufgenommene Signal fällt mit der charakteristischen Zeitkonstante T_2 ab. Diese beinhaltet Informationen zur molekularen Dynamik, wird aber auch durch Inhomogenitäten des Magnetfeldes beeinflusst. Durch eine Fouriertransformation wird das detektierte NMR-Signal aus dem Zeitraum (fid) in den Frequenzraum (Spektrum) überführt.

Die Kernspins in einer Probe unterliegen nicht nur der Wechselwirkung mit dem äußeren Magnetfeld, sondern auch anderen Wechselwirkungen. Die größte Bedeutung für Kerne mit Spin $I = 1/2$ kommt dabei der chemischen Verschiebung zu. Im Festkörper muss zusätzlich die Wirkung der dipolaren Kopplung und in Flüssigkeiten der Einfluss der skalaren Kopplung berücksichtigt werden. Deren Auswirkungen auf das Spinsystem werden in der Form

$$\hat{H}_{\text{ges}} = \hat{H}_0 + \hat{H}_{\text{CS}} + \hat{H}_{\text{DD}} + \hat{H}_J \quad (2.6)$$

Berücksichtigt, wobei \hat{H}_{CS} der Hamiltonoperator der chemischen Verschiebung, \hat{H}_{DD} der Hamiltonoperator der direkten dipolaren Kopplung und \hat{H}_J der Hamiltonoperator der skalaren Kopplung ist. Im folgenden Abschnitt werden die Wechselwirkungen der chemischen Verschiebung und der dipolaren Kopplung näher erläutert, da diese für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente von Bedeutung sind.

2.2 Wechselwirkungen der NMR

Chemische Verschiebung und spektrale Auflösung. Das lokale magnetische Feld $\mathbf{B}_{\text{lokal}}$ am Ort eines Kernspins hängt nicht nur vom äußeren Magnetfeld \mathbf{B}_0 ab, sondern auch von den Elektronen in der Umgebung des Spins. Durch das äußere Magnetfeld werden in den Elektronen um den Kern Ströme induziert. Durch die Bewegung der Elektronen wird wiederum ein magnetisches Feld $\mathbf{B}_{\text{induziert}}$ am Ort des Kernspins induziert. In Summe wirkt damit am Ort eines Kernspins das Magnetfeld

$$\mathbf{B}_{\text{lokal}} = \mathbf{B}_0 + \mathbf{B}_{\text{induziert}} \quad (2.7)$$

Das lokale Magnetfeld hängt daher direkt von der chemischen Umgebung des betrachteten Kernspins ab. Das heißt, das lokale Magnetfeld eines ^{13}C -Kernspins in einer CH_3 -Gruppe ist ein anderes als in einer CH -Gruppe. Da die Larmorfrequenz von der Stärke des Magnetfeldes am Ort des Kernspins bestimmt wird (Gleichung (2.3)), erscheinen die Resonanzen unterschiedlicher chemischer Gruppen an verschiedenen Stellen im NMR-Spektrum. Dieser Effekt wird chemische Verschiebung genannt und ist eine der zentralen Wechselwirkungen, die in der NMR-Spektroskopie genutzt wird. Das induzierte Magnetfeld wird mit der Gleichung

$$\mathbf{B}_{\text{induziert}} = \sigma \mathbf{B}_0 \quad (2.8)$$

beschrieben, wobei σ der Tensor der chemischen Verschiebung ist. Dieser wird durch eine 3×3 Matrix repräsentiert. Der Tensor wird im sogenannten Hauptachsensystem (*principal axis system* - PAS) so definiert, dass er nur aus den drei Hauptachsenwerten σ_{11} , σ_{22} und σ_{33} besteht. Alle Elemente außerhalb der Hauptdiagonalen sind Null. Dieses Koordinatensystem ist spezifisch für jeden Kernspin einer chemischen Gruppe und damit fest mit dessen Orientierung verknüpft.

Der Tensor der chemischen Verschiebung wird durch eine Rotation in das Laborkoordinatensystem (*laboratory frame* - LF) überführt, so dass der Hamiltonoperator der chemischen Verschiebung in säkularer Näherung mit

$$\hat{H}_{\text{CS}} = \gamma \sigma_{zz} B_0 \hat{I}_z = \gamma \omega_{\text{CS}} \hat{I}_z \quad (2.9)$$

beschrieben wird. σ_{zz} ist die zz -Komponente des Tensors der chemischen Verschiebung im Laborkoordinatensystem. Es werden die isotrope chemische Verschiebung σ_{iso} , der Asymmetrieparameter η sowie der Anisotropieparameter δ definiert:

$$\begin{aligned} \sigma_{\text{iso}} &= (\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33}) / 3 \\ \eta &= (\sigma_{22} - \sigma_{11}) / (\sigma_{33} - \sigma_{\text{iso}}) \\ \delta &= (\sigma_{33} - \sigma_{\text{iso}}). \end{aligned} \quad (2.10)$$

Die Frequenz der chemischen Verschiebung

$$\omega_{\text{CS}} = \omega_0 \sigma_{zz} = \omega_0 \left(\underbrace{\sigma_{\text{iso}} + \frac{\delta}{2} (3 \cos^2 \beta - 1 - \eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha)}_{\sigma_{\text{aniso}}} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \vartheta - 1) \right) \quad (2.11)$$

setzt sich aus einem isotropen und einem anisotropen Anteil zusammen. Die Winkel α und β sind die Polarwinkel der Transformation des Tensors vom Hauptachsensystem in das Laborkoordinatensystem. Die Orientierung des Tensors im Laborkoordinatensystem wird durch den Winkel ϑ beschrieben. Der anisotrope Anteil der chemischen Verschiebung (*chemical shift anisotropy* - CSA) ist damit direkt von der Lage des Moleküls im Magnetfeld abhängig.

Aufgrund der schnellen isotropen molekularen Bewegung in Flüssigkeiten wird in diesen der anisotrope Anteil der chemischen Verschiebung ausgemittelt. Die Lage der Resonanz im Spektrum wird durch die isotrope chemische Verschiebung bestimmt. Im Festkörper kommen solche schnellen Bewegungen nicht vor. In einer Pulverprobe sind alle möglichen Orientierungen vorhanden und jede verursacht eine Resonanz bei einer der Orientierung entsprechenden Frequenz. Die Summe aller dieser Resonanzen ergibt ein sogenanntes Pulverspektrum. Um trotzdem schmale Resonanzen und damit eine hohe Auflösung im NMR-Spektrum zu erhalten, wird die Probe im magischen Winkel ($\vartheta_m = 54,74^\circ$ zwischen dem äußeren Magnetfeld und der Rotationsachse der Probe) rotiert (*magic angle spinning* - MAS). In diesem Fall wird der anisotrope Anteil der chemischen Verschiebung in Gleichung (2.11) Null. Im Spektrum erscheint eine schmale Resonanz an der Stelle $\omega_0 \sigma_{\text{iso}}$.

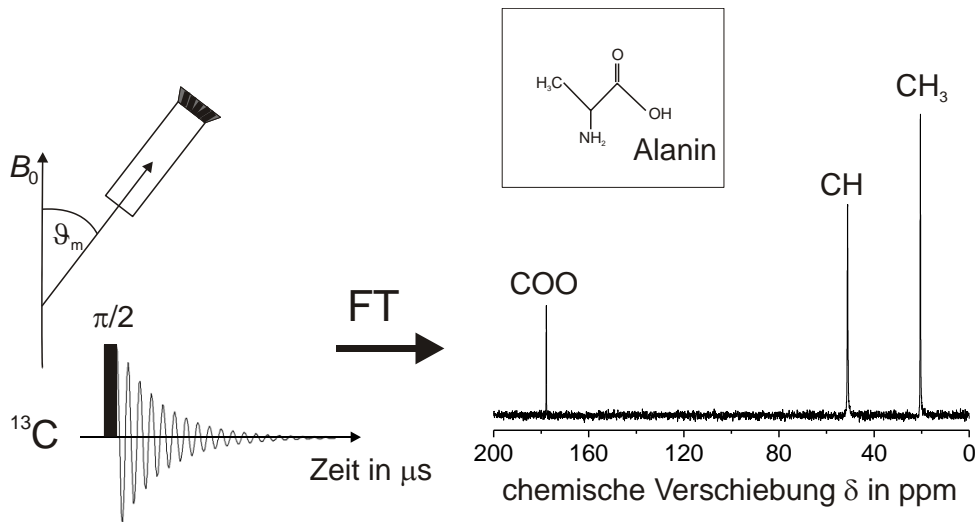


Abbildung 2.1 Messung des Zeitsignales (fid) im NMR-Experiment unter schneller Probenrotation (MAS) im magischen Winkel ϑ_m (der fid ist schematisch dargestellt). Die Fouriertransformation (FT) überführt das Signal in den Frequenzraum. In der Abbildung ist das ^{13}C -Spektrum des Alanin dargestellt. Die COO, CH und CH_3 -Gruppen sind deutlich zu erkennen. Durch die Probenrotation entstehen Rotationsseitenbänder, diese sind hier aufgrund einer zu geringen Intensität nicht zu erkennen.

Direkte dipolare Kopplung. Jeder Kernspin generiert ein magnetisches Feld in seiner Umgebung. Jeder weitere Kernspin, der sich in diesem magnetischen Feld befindet, wechselwirkt mit diesem. Dies wird als direkte dipolare Kopplung bezeichnet. Abhängig davon, ob Kernspins der gleichen Spezies miteinander wechselwirken oder Kernspins unterschiedlicher Spezies, wird im ersten Fall von homonuklearer Kopplung und im zweiten Fall von heteronuklearer Kopplung gesprochen. Die dipolare Kopplung wirkt durch den Raum und kann daher sowohl inter- als auch intramolekularer Natur sein. Betrachtet man die homonukleare Kopplung zwischen zwei Kernspins \mathbf{I}_j und \mathbf{I}_k der gleichen Spezies, so wird diese in säkularer Näherung durch den Hamiltonoperator

$$\hat{H}_{\text{DD}}^{\text{II}} = \omega_{\text{II}} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) (3 \hat{\mathbf{I}}_{jz} \hat{\mathbf{I}}_{kz} - \hat{\mathbf{I}}_j \cdot \hat{\mathbf{I}}_k) \quad (2.12)$$

beschrieben. Für eine dipolare Kopplung zwischen zwei Kernspins \mathbf{I} und \mathbf{S} unterschiedlicher Spezies wirkt dagegen der Hamiltonoperator

$$\hat{H}_{\text{DD}}^{\text{SI}} = \omega_{\text{SI}} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) 2 \hat{\mathbf{I}}_z \hat{\mathbf{S}}_z. \quad (2.13)$$

Die dipolare Kopplungskonstante wird durch

$$\omega_{SI} = -\frac{\mu_0}{4\pi} \hbar \frac{\gamma_S \gamma_I}{r_{SI}^3} \quad (2.14)$$

$$D_{SI} = \frac{\omega_{SI}}{2\pi}$$

beschrieben, wobei ω_{SI} die dipolare Kopplung in rad/s angibt und D_{SI} in Hz. Die dipolare Kopplung hängt damit vom Abstand r der wechselwirkenden Spins I und S sowie von der Orientierung θ des Verbindungsvektors der Kernspins zum äußeren Magnetfeld ab. Im Fall der homonuklearen dipolaren Kopplung wird in der Gleichung (2.14) $\gamma_I = \gamma_S$ gesetzt. μ_0 ist die magnetische Feldkonstante und \hbar das reduzierte Plancksche Wirkungsquantum. Während die dipolare Kopplung in isotropen Flüssigkeiten durch die schnelle Molekülbewegung nahezu ausgemittelt wird, kann sie im Festkörper zur Charakterisierung der Geometrie der molekularen Bewegung genutzt werden.

3 Experimentelle Details und Datenauswertung

3.1 Verwendete Saccharide und Proteine

In der vorliegenden Arbeit wurden das Protein Lysozym und das Kälteschockprotein Csp verwendet. Beide werden im Folgenden näher vorgestellt.

Lysozym. Viele veröffentlichte Studien, die sich mit dem Aggregationsverhalten von Sacchariden und Proteinen beschäftigen, wurden mit dem Protein Lysozym durchgeführt [19, 26, 31, 32, 34, 35, 36]. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, das Aggregationsverhalten von Sacchariden und Proteinen systematisch in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen zu untersuchen. Daher wurden die Experimente in Lösung mit dem Protein Lysozym durchgeführt und die Ergebnisse können umfangreich mit der vorhandenen Literatur verglichen werden. Lysozym ist ein kleines gut untersuchtes Protein, das im Hühnereiweiß vorkommt. Es besteht aus 129 Aminosäuren und wirkt als Enzym. Es spaltet Peptidoglykane, die in Zellwänden von Bakterien vorkommen und schützt damit das Hühnereiweiß. Lysozym besitzt einen pK von ungefähr 11 [49]. Die Struktur des Proteins ist in Abbildung 3.1(a) dargestellt. Für die Experimente wurde nicht isotope-markiertes Lysozym verwendet.

Kälteschockprotein Csp. Die FK-NMR-Experimente wurden mit dem Protein Bs-Csp durchgeführt. Dieses Protein besteht aus 67 Aminosäuren und gehört zur großen Klasse der Kälteschockproteine. Die Struktur des Csp ist in Abbildung 3.1 (b) dargestellt. Das Bakterium *Bacillus subtilis* lebt in den oberen Regionen der Erdschicht und ist damit Kältestress ausgesetzt. Bei tiefen Temperaturen bildet das Bakterium vermehrt Kälte induzierte Gene. Nach der Anpassung an die neuen Umweltbedingungen wird die Bildung dieser Gene wieder zurückgefahren, gleichzeitig steigt die Bildung von Kälte induzierten Proteinen an. Zur Klasse dieser Kälte induzierten Proteine gehören die Kälteschockproteine. Diese unterstützen viele Zellfunktionen bei ihrer Reaktion auf Kältestress [42]. Aufgrund dessen wurde das Csp für die FK-NMR-Experimente im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt.

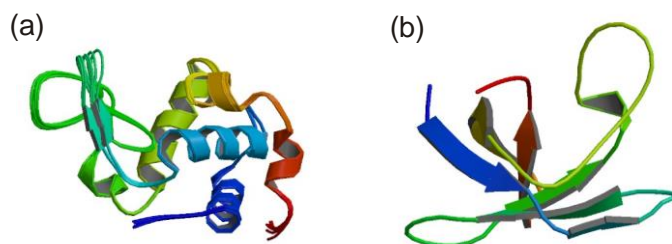


Abbildung 3.1 (a) Struktur des Lysozyms durch NMR-Experimente in Lösung charakterisiert [50]. (b) Kristallstruktur des Csp, aufgeklärt durch Röntgenstreuung [51].

Alle NMR-Messungen wurden mit vollständigem ^{15}N -markiertem Bs-Csp durchgeführt, um eine gute Signalqualität zu erhalten. Das Protein wurde von Dr. R. Sachs aus der Arbeitsgruppe Biophysik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg hergestellt. Bs-Csp wurde dabei wie in [52, 53] beschrieben mit kleinen Modifikationen gereinigt.

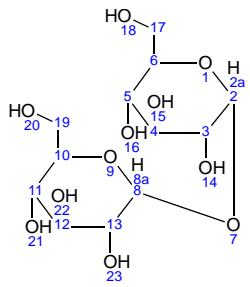
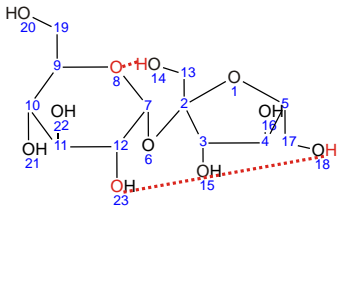
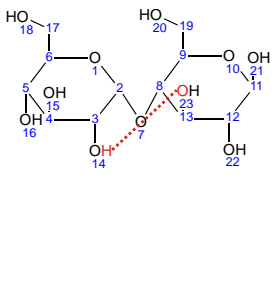
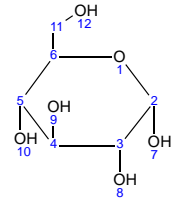
Saccharide. Für die Experimente in Lösung wurden die Disaccharide Trehalose [54], Saccharose [55] und Maltose [56] sowie das Monosaccharid Glucose [57, 58] verwendet. Die angegebenen Literaturstellen beinhalten die kristalline Struktur der einzelnen Saccharide. In der Tabelle 1 sind einige Eigenschaften der einzelnen Saccharide aufgeführt.

Das Monosaccharid Glucose ist ebenfalls unter dem Begriff Traubenzucker oder Dextrose bekannt. Es existieren zwei Enantiomere, *D*-Glucose und *L*-Glucose, wobei in der Natur ausschließlich die *D*-Glucose vorkommt. Sie gehört zu den reduzierenden Sacchariden. Das heißt, die beiden Isomere α -*D*-Glucose und β -*D*-Glucose liegen in Lösung in einer Gleichgewichtsverteilung vor und können über eine offenkettige Form ineinander übergehen. Die offenkettige Form liegt in der Lösung praktisch nicht vor und stellt nur eine Übergangsform dar. Die Isomere der Glucose nehmen in Lösung die gleichen Konformationen ein und beeinflussen daher nicht den hydrodynamischen Radius [59]. Glucose dient als Baustein für Di- und Oligosaccharide.

Trehalose ist ein Disaccharid, das aus zwei Glucosemolekülen besteht, die mittels einer α, α' -1, 1'-glycosidischen Bindung verknüpft sind. In vielfältigen Untersuchungen der Diederwinkel der glycosidischen Bindung der Trehalose zeigen Ergebnisse im Bereich von $\Phi(\text{H}_1\text{-C}_1\text{-O}_1\text{-C}'_x) = \Psi(\text{C}_1\text{-O}_1\text{-C}'_x\text{-H}'_x) = -38^\circ$ bis -60° . Eine Übersicht der einzelnen Veröffentlichungen ist im Abschnitt 7.2 aufgeführt. Im Mittel liegen die Winkel nach diesen Literaturstellen damit bei $\Phi = \Psi = -45^\circ$. Alle Studien zeigen, dass Trehalose bevorzugt in dieser einen Konformation in Lösung vorkommt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kommt dieses Disaccharid in verschiedenen Organismen vor. Trehalose ist genau wie Saccharose ein nicht-reduzierendes Saccharid. Das heißt, beide liegen in einer geschlossenen Ringform vor. Saccharose ist besser bekannt als Rohrzucker oder Sucrose und wird als Haushaltszucker verwendet. Es kommt vor allem in Zuckerrüben, Zuckerrohr und Zuckerpalmen vor. Saccharose ist aus je einem α -*D*-Glucose und einem β -*D*-Fructose Molekül aufgebaut. Diese sind über eine α, β -1, 2-glycosidische Bindung miteinander verbunden. In Lösung liegt das Molekül in einer Konformation mit den Diederwinkeln $\Phi = 105^\circ$ und $\Psi = -48^\circ$ vor [60]. Weiterhin wird in dieser Arbeit Maltose verwendet. Dieses, auch als Malzzucker bekannte Disaccharid, entsteht beim Keimen von Getreide und kommt zum Beispiel in Bier und Kartoffeln vor. Maltose ist, genau wie Trehalose, aus zwei Glucose Molekülen zusammengesetzt. Diese sind im Malzzucker jedoch über eine α, α' -1, 4'-glycosidischen Bindung verknüpft. Daher ist Maltose auch ein reduzierendes Saccharid, einer der beiden Ringe kann in eine offenkettige Form übergehen. In [61] ist eine Übersicht über die Diederwinkel der glycosidischen Winkel der Maltose in Lösung aufgeführt. Im Mittel liegen diese bei $\Phi = \Psi = (-20 \pm 10)^\circ$. Alle beschriebenen Saccharide

zeigen eine unterschiedliche Anzahl an intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Kristallstruktur. Während Trehalose und Glucose keine solche Bindung besitzen, bildet Maltose eine und Saccharose zwei intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aus. Für die FK-NMR-Experimente wurde das Protein Csp mit dem Disaccharid Trehalose gemischt. Die Präparation der einzelnen Proben wird in den jeweiligen Abschnitten dieses Kapitels zu den Flüssig- und Festkörperexperimenten erläutert.

Tabelle 1 Übersicht über einige Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Saccharide. Die Nummerierung der Strukturen wird für die Zuordnung der NMR-Resonanzen im Abschnitt 3.2.4 verwendet. Die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen sind rot gekennzeichnet.

Disaccharide			Monosaccharid
Trehalose	Saccharose (Sucrose)	Maltose (Malzzucker)	Glucose (Traubenzucker)
$C_{12}H_{22}O_{11}$	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$C_6H_{12}O_6$
			
nicht-reduzierend	nicht-reduzierend	reduzierend	reduzierend
intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen			
keine [54]	2 [55]	1 [56]	keine [57, 58]

3.2 Messung von Selbstdiffusionskoeffizienten mit Hilfe von Flüssig-NMR-Methoden

3.2.1 Vom Selbstdiffusionskoeffizient zur Strukturinformation

Befinden sich Moleküle in einer Lösung mit einem Konzentrationsgradienten, sind sie bestrebt diesen Gradienten auszugleichen. Dies geschieht durch einen gerichteten Diffusionsprozess vom Ort der niedrigeren Konzentration zum Ort der höheren Konzentration. Die Triebkraft dieses Prozesses ist der Gradient des chemischen Potentials innerhalb der Probe. Mathematisch wird der Vorgang der Diffusion mit dem 1. und 2. Fickschen Gesetz beschrieben [62]. Doch auch in einer Lösung mit einer konstanten Konzentration führen die Moleküle eine translatorische Diffusionsbewegung aus. Diese ist ungerichtet und wird als Selbstdiffusion bezeichnet. Sie ist nicht zu verwechseln mit der Rotationsdiffusion eines Moleküls, welche eine taumelartige Bewegung des Moleküls ohne

translatorische Verschiebung ist. Die Rotationsdiffusion wird in dieser Arbeit nicht betrachtet. Die treibende Kraft der Selbstdiffusion ist die Brownsche Molekularbewegung, deren Ursache die ungeordnete Wärmebewegung der Moleküle ist [62]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Selbstdiffusion von Molekülen experimentell beobachtet und ausgewertet. Die mathematische Beschreibung der Selbstdiffusion erfolgt mit Hilfe einer Verteilung der Wahrscheinlichkeitsdichte $p(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_1, t)$ [63]. Diese kann wie folgt interpretiert werden: Befindet sich ein Molekül zum Zeitpunkt $t = 0$ am Ort \mathbf{r}_0 , so beschreibt $p(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_1, t)$ die Wahrscheinlichkeit, mit der sich das Molekül zum Zeitpunkt t um $(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_0)$ von seinem Ausgangsort entfernt hat. Die zeitliche Entwicklung der Verteilungsdichte wird mit dem 2. Fickschen Gesetz beschrieben

$$\frac{\partial p}{\partial t} = D \nabla^2 p, \quad (3.1)$$

wobei $\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$ ist.

Die, im Fall von isotroper Diffusion, skalare Konstante D ist der Diffusionskoeffizient. Er trägt die Einheit m^2/s und beschreibt im Wesentlichen die Fähigkeit der betrachteten Moleküle durch eine Lösung zu diffundieren. Mit der Anfangsbedingung $p(\mathbf{r}_0, t) = \delta(\mathbf{r}_0)$ und der Randbedingung $p(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_1, t) \rightarrow 0$ für $\mathbf{r}_1 \rightarrow \infty$ ergibt sich als Lösung von Gleichung (3.1) die normalisierte Gauss-Funktion

$$p(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_1, t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{\xi/2}} \exp\left\{-\frac{(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_0)^2}{4Dt}\right\}, \quad (3.2)$$

wobei $\xi = 1, 2, 3$ die Dimension der Diffusionsbewegung beschreibt. In dieser Arbeit wird die Diffusionsbewegung in nur einer Raumrichtung untersucht, die dazugehörige Verteilung der Wahrscheinlichkeitsdichte wird für $\xi = 1$ erhalten. Gleichung (3.2) zeigt, dass die Verteilung der Wahrscheinlichkeitsdichte unabhängig vom Ausgangsort der Moleküle \mathbf{r}_0 ist und nur von der Ortsänderung $(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_0)$ abhängt. Die Breite der Verteilung kann durch das zweite Moment

$$\langle (\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_0)^2 \rangle = nDt \quad (3.3)$$

beschrieben werden, wobei gilt: $n = 2, 4, 6$ jeweils für ein-, zwei- oder dreidimensionale Diffusionsprozesse. Diese Beschreibung des Diffusionsvorganges ist nur im Fall der isotropen Diffusion gültig. Tritt eine anormale Diffusion, z. B. durch eine geometrische Einschränkung des Diffusionsweges auf, kann das System nicht mit einer Gaussverteilung beschrieben werden und der Diffusionskoeffizient muss als Tensor zweiter Stufe betrachtet werden. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit hohe Teilchenkonzentrationen betrachtet werden, können alle Experimente mit der Theorie der isotropen Diffusion beschrieben werden. Dies wird im Rahmen der Auswertung im Abschnitt 4.2 diskutiert.

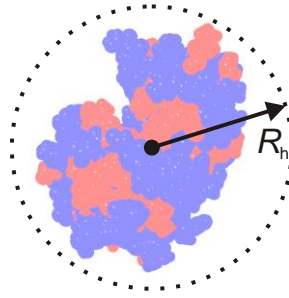


Abbildung 3.2 Hypothetische Kugel mit dem Radius R_h (hydrodynamischer Radius), die die gleichen Diffusionseigenschaften besitzt wie das dargestellte Protein.

Die Diffusionseigenschaften eines Moleküls stehen im Zusammenhang mit dessen Größe. Die Stokes-Einstein Beziehung

$$D = \frac{kT}{f} \quad (3.4)$$

beschreibt den Zusammenhang von Diffusionskoeffizient D , Temperatur T und Reibungskoeffizient f [41]. k ist die Boltzmann Konstante. Im Fall eines diffundierenden kugelförmigen Moleküls mit dem Radius R_h kann der Reibungskoeffizient mit

$$f = 6\pi\eta R_h \quad (3.5)$$

beschrieben werden. Durch Einsetzen in Gleichung (3.4) erhält man

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} . \quad (3.6)$$

Der Radius der Kugel R_h ist der hydrodynamischer Radius. Mit Hilfe der Gleichung (3.6) kann dem Diffusionskoeffizient D eines beliebigen Moleküls modellhaft eine Kugel mit dem Radius R_h zugeordnet werden. Diese Kugel hat unter den gleichen experimentellen Bedingungen denselben Diffusionskoeffizienten D wie das untersuchte Molekül. Das bedeutet, das untersuchte Molekül wird unabhängig von seiner möglicherweise sehr komplexen, geometrischen Form durch eine Kugel mit einem spezifischen hydrodynamischen Radius beschrieben (siehe Abbildung 3.2). Durch diese Modellannahme wird eine Abschätzung der Größenordnung von komplexen Molekülen sowie ein Vergleich der Größenordnung zwischen verschiedenen Molekülen ermöglicht. Dadurch können Aggregationsprozessen in Protein/Saccharidlösungen charakterisiert werden. Das heißt, der Diffusionskoeffizient und der hydrodynamische Radius bieten einen Zugang, um die Fragestellungen in dieser Arbeit zu beantworten. Im folgenden Abschnitt wird die NMR-Methode erläutert, mit der die Diffusionskoeffizienten der untersuchten Moleküle gemessen wurden.

3.2.2 Bestimmung des Diffusionskoeffizienten D mit Hilfe von PFG-NMR

Die NMR bietet prinzipiell zwei Methoden zur Messung des Diffusionskoeffizienten D der Selbstdiffusion. Einerseits kann dieser mit Hilfe von Relaxationsexperimenten indirekt bestimmt werden. Für die Auswertung der Daten sind Modellannahmen z. B. über den Mechanismus der Relaxation, die Anteile von inter- und intramolekularen Relaxationsbeiträgen oder die Geometrie der untersuchten Moleküle notwendig [64]. Die zweite Methode ist die PFG („*pulsed field gradient*“)-NMR, die im Gegensatz zu den Relaxationsexperimenten eine direkte experimentelle Bestimmung des Diffusionskoeffizienten ermöglicht. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet und soll in diesem Abschnitt vorgestellt werden. Da eine allumfassende Betrachtung der theoretischen Hintergründe des Experimentes im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich ist, soll zur Beantwortung offener Fragen auf aussagekräftige Literaturstellen verwiesen werden. In [64] ist die zugrunde liegende Theorie ausführlich erläutert, in [65] findet sich eine Zusammenfassung der experimentellen Aspekte und [66] gibt nützliche Hinweise zur Optimierung des Experimentes bei der Durchführung im Labor.

Die PFG-NMR basiert darauf, dass zusätzlich zum homogenen B_0 -Feld ein inhomogenes Magnetfeld auf die Probe wirkt. Das B_0 -Feld liegt in der folgenden Betrachtung in z -Richtung an. Wird zusätzlich ein ortsabhängiges Magnetfeld G_z in Richtung des B_0 -Feldes angelegt, ist

$$B_z = B_0 + G_z z \quad (3.7)$$

das in Summe wirkende Magnetfeld in Richtung der z -Achse. Die Larmorfrequenz ω_z der Kernspins, die sich im Magnetfeld befinden, ist damit abhängig von deren Lage entlang der z -Richtung im Magnetfeld:

$$\begin{aligned} \gamma B_z &= \gamma(B_0 + G_z z) \\ \omega_z &= \omega_0 + \gamma G_z z . \end{aligned} \quad (3.8)$$

Das Gleiche gilt auch für die Phase Φ jedes einzelnen Kernspins

$$\Phi(t) = \omega_0 t + \gamma \int_0^t G_z(t') z(t') dt' , \quad (3.9)$$

die sowohl von der Position des Kernspins entlang der z -Achse abhängt, als auch von der Dauer t des Gradienten. Bei bekannter Stärke und Dauer des Magnetfeldes steht ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem eine Ortskodierung der Kernspins vorgenommen werden kann. Um den Diffusionskoeffizienten zu messen, wird ein Feldgradient während eines Echo-Experimentes verwendet. Stejskal und Tanner haben zu diesem Zweck 1965 das Spin-Echo-Experiment genutzt [40]. In dieser Arbeit wird das stimulierte Echoexperiment [67] in Kombination mit sinusförmigen bipolaren Gradienten [68, 69] eingesetzt. In Abbildung 3.3 (a) ist die verwendete Pulssequenz mit den Gradientenblöcken dargestellt. Die Sequenz kann

in drei Abschnitte eingeteilt werden: Einen Präparationsblock, eine Mischzeit und einen Rephasierungsblock mit anschließender Datenaufnahme. Nach der Anregung der Magnetisierung durch einen $(\pi/2)$ -Puls erfolgt während des Präparationsblockes die Ortskodierung der Kernspins durch einen Gradienten. Der Gradient setzt sich aus zwei sinusförmigen bipolaren Gradienten, die durch einen (π) -Puls voneinander getrennt sind, zusammen. Die Form der verwendeten Gradienten wird im Abschnitt 7.3 näher erläutert. Zur Veranschaulichung der Funktionsweise der Sequenz wird die Länge des Gradientenpulses in der folgenden Beschreibung als sehr kurz ($\delta \rightarrow 0$) angenommen, auch wenn der Gradientenpuls tatsächlich eine endliche, nicht zu vernachlässigende Dauer hat. Nach dem Präparationsblock wird die Magnetisierung durch einen $(\pi/2)$ -Puls in z-Richtung gespeichert, um Relaxationsprozesse zu minimieren. In der Mischzeit können translatorische Diffusionsprozesse stattfinden. Im Anschluss wird die Magnetisierung durch einen $(\pi/2)$ -Puls wieder in die (x-y)-Ebene geklappt. Die Phase des Pulses wird dabei so gewählt, dass das Vorzeichen der Phase der Kernspins invertiert wird. Es folgt der Rephasierungsblock. Dieser besteht aus einem Gradienten, der in Amplitude, Form und Dauer genau dem Gradienten im Präparationsblock entspricht. Hat sich die Position der Kernspins im Magnetfeld im Vergleich zum Beginn der Präparationszeit nicht verändert, wird die Ortskodierung der Kernspins wieder vollständig aufgehoben und es wird ein Echosignal mit maximaler Intensität gemessen. Hat sich die Lage der Kernspins jedoch entlang der z-Achse verändert, ist eine vollständige Rephasierung nicht mehr möglich, da die Phase vor und nach der Diffusionszeit nicht gleich ist. Dadurch wird das gemessene Signal in seiner Intensität moduliert.

Die Diffusionszeit Δ erstreckt sich von der Mitte des Gradientenblocks im Präparationsblock bis zur Mitte des Gradientenblocks im Rephasierungsblock. In Abbildung 3.3 (b) und (c) ist schematisch die Entwicklung der Phase der Magnetisierung mit und ohne einen Diffusionsprozess der Kernspins während der Pulssequenz gezeigt. Das magnetische Feld ist in z-Richtung ausgerichtet und der Einfluss des Feldgradienten auf 4 exemplarisch ausgewählte Kernspins ist dargestellt. Der Feldgradient ist zu Beginn jedes Schemas eingezeichnet. Er wird so angelegt, dass in der Mitte der Probe der Gradient Null ist. Die ausgewählten Kernspins verdeutlichen zu Beginn der Präparationszeit die Ortskodierung durch die Zuordnung verschiedener Phasen. Ohne einen translatorischen Diffusionsprozess (Abbildung 3.3 (b)) befinden sich die Kernspins nach der Diffusionszeit Δ am gleichen Ort im Magnetfeld wie zum Beginn des Präparationsblockes. In diesem Fall können die Phasen der Kernspins rephasiert werden und ein Signal mit maximaler Intensität wird während der Datenaufnahme detektiert. Durch translatorische Diffusion der Kernspins (Abbildung 3.3 (c)) ändert sich deren Lage im Magnetfeld und es ist nicht möglich, die Phasen der verschiedenen Kernspins zu rephasieren. Dies wirkt sich als Verringerung der Signalintensität aus. Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wird das in Abbildung 3.3 (a) gezeigte Experiment für unterschiedliche Gradientenstärken durchgeführt, was zur Intensitätsmodulierung führt. Die Diffusionszeit Δ und die Länge der Gradienten bleiben dabei unverändert. In der Abbildung 3.4 ist eine Resonanz von Trehalose in Abhängigkeit von der Stärke des Gradienten dargestellt. J. E. Tanner hat 1970 [70] gezeigt, dass die Intensität S des NMR-

Signals im stimulierten Echoexperiment unter Berücksichtigung der endlichen Länge der Gradientenpulse wie folgt beschrieben werden kann:

$$S(G_z) = \underbrace{\exp\left(-\frac{\tau_2}{T_1}\right) \exp\left(-\frac{2\tau_1}{T_2}\right)}_{\text{Relaxation}} \underbrace{\exp\left(-\gamma^2 G_z^2 \delta^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right)}_{\text{Diffusion}}. \quad (3.10)$$

Da das Experiment hier mit konstanten Zeiten τ_1 und τ_2 durchgeführt wurde, ist der Beitrag durch Relaxationsprozesse für alle in Abbildung 3.4 gezeigten Spektren gleich. Der Beitrag durch Relaxation ist damit ein konstanter Faktor und die Modulation der Signalintensität kann mittels des Diffusionsterms in Gleichung (3.10) beschrieben werden. Da alle Parameter dieser Gleichung bekannt sind, kann der Diffusionskoeffizient D direkt aus der Anpassung der modulierten Signalintensität bestimmt werden (siehe Abbildung 3.4 (b)).

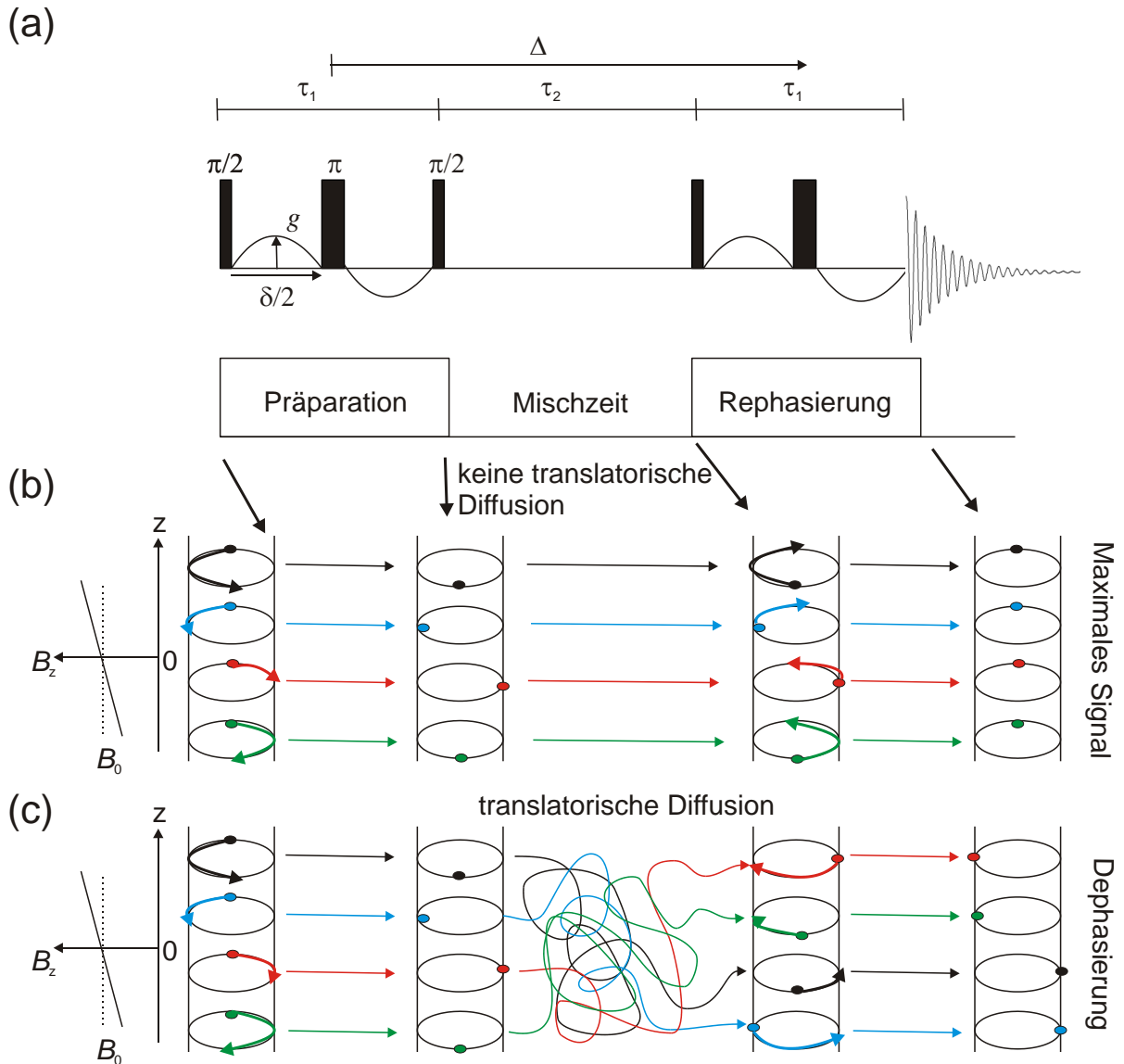


Abbildung 3.3 (a) Darstellung der Pulssequenz für das stimulierte Echo. Die grauen Kästchen kennzeichnen die Gradientenblöcke. Diese setzen sich aus zwei sinusförmigen bipolaren Gradienten zusammen, welche durch einen (π)-Puls voneinander getrennt sind. δ ist die Dauer der bipolaren Gradienten in einem Block und Δ die Diffusionszeit. Abbildungen (b) und (c) stellen am Beispiel von 4 ausgewählten Kernspins deren Verhalten ohne translatorische Diffusion (b) und mit translatorischer Diffusion (c) dar. In dieser Darstellung wird, um eine einfache Erklärung zu ermöglichen, die Länge der Gradientenpulse als sehr kurz ($\delta \rightarrow 0$) angenommen. Während dieser Zeit finden damit keine Diffusionsprozesse statt. Die Achse zu Beginn der Schemata verdeutlicht das Gradientenfeld während des Präparations- und Rephasierungsblockes. Abbildung (b) und (c) nach [64, 71].

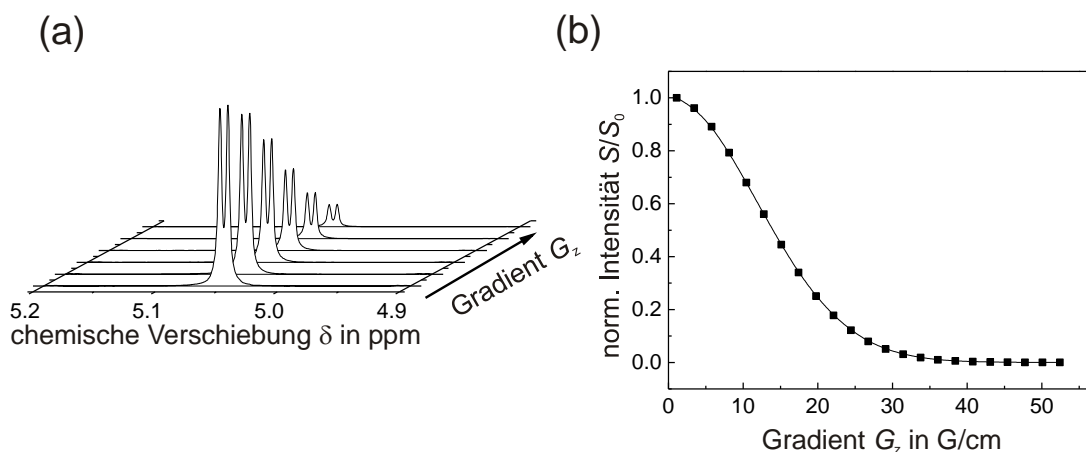


Abbildung 3.4 (a) Intensität einer ausgewählten ^1H -Resonanz von Trehalose in Abhängigkeit von der Stärke des Gradienten G_z . Die Auftragung der normierten Intensität gegen die Gradientenstärke ist in (b) zu sehen. Die Daten wurden mit Gleichung (3.10) angepasst. Ein Korrekturfaktor von $G_z = 2/\pi \cdot g$ berücksichtigt die Verwendung der sinusförmigen Gradienten (siehe Abschnitt 7.3) [65].

Sind sowohl die Viskosität als auch die Temperatur der Lösung bekannt, kann die Stokes-Einstein Beziehung (Gleichung (3.6)) angewendet werden. Mit deren Hilfe werden den gemessenen Diffusionskoeffizienten hydrodynamische Radien zugeordnet. Das heißt, das untersuchte Molekül wird durch eine Kugel mit dem Radius R_h angenähert.

In mehreren Studien wurde der Diffusionskoeffizient und damit der hydrodynamische Radius genutzt, um Aggregationszustände von Proteinen [72, 73, 74, 75] oder auch deren nativen oder denaturierten Zustand zu untersuchen [76]. Um die Eignung der PFG-NMR zur Charakterisierung von strukturellen Eigenschaften von Proteinlösungen zu zeigen, wurden PFG-NMR-Experimente mit Lysozymlösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Konzentration der Lösungen durchgeführt. Für hohe Konzentrationen und pH-Werte der Lösung wird eine Selbstaggregation des Lysozyms erwartet. Es ist bekannt, dass bei einer Konzentration von 1,3 mM unabhängig vom pH-Wert der Lösung keine Selbstaggregation des Lysozyms auftritt. Dagegen wurde in Lysozymlösungen mit einer Konzentration von $c_{\text{Lysozym}} = 10 \text{ mM}$ eine Selbstaggregation der Moleküle bei pH-Werten nahe des $\text{pI}^{\text{Lysozym}} \sim 11$ nachgewiesen [72, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 80, 81]. Dies sollte sich im Diffusionskoeffizient bzw. dem hydrodynamischen Radius des Lysozym widerspiegeln. In Abbildung 3.5 ist der Diffusionskoeffizient von Lysozym in D_2O -Lösung bei einer Konzentration von 1,3 mM und 10 mM in Abhängigkeit vom pH-Wert gezeigt. Da die pH-Werte in einer D_2O -Lösung bestimmt wurden, sind diese mit pH^{D} gekennzeichnet. Für die 1,3 mM Lösung ist der Diffusionskoeffizient und damit der hydrodynamische Radius von Lysozym, wie erwartet, über den gesamten pH-Bereich konstant. Die Daten der 10 mM Lösung zeigen dagegen einen deutlichen Abfall des Diffusionskoeffizienten ab $\text{pH}^{\text{D}} > 5$. Dies ist gleichbedeutend mit einem Anstieg des hydrodynamischen Radius des Lysozyms in der Lösung bei konstanter Viskosität

und Temperatur. Ein solcher Anstieg ist im Fall einer Selbstaggregation der Lysozymmoleküle zu erwarten. Die gezeigten Daten bestätigen damit die in der Literatur beschriebenen Aggregationsbedingungen und verdeutlichen die Möglichkeiten der PFG-NMR zur Charakterisierung des strukturellen Aufbaus von Lösungen. Die Diffusionskoeffizienten des Lysozyms für die Lösung mit $c_{\text{Lysozym}} = 10 \text{ mM}$ sind deutlich kleiner im Vergleich zu den Diffusionskoeffizienten der Lösung mit $c_{\text{Lysozym}} = 1,3 \text{ mM}$. Dies ist auf die unterschiedliche Viskosität der beiden Lösungen zurückzuführen. Innerhalb der Messreihe für eine Konzentration in Abhängigkeit vom pH^{D} -Wert wird die Viskosität als konstant angenommen und ein direkter Vergleich der Diffusionskoeffizienten ist möglich.

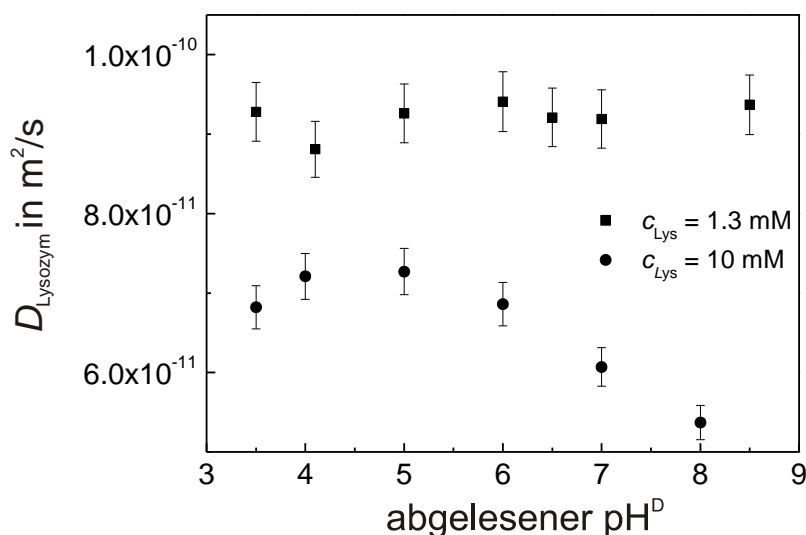


Abbildung 3.5 Diffusionskoeffizienten einer 1,3 mM (■) und 10 mM (●) Lösung von Lysozym in D_2O in Abhängigkeit vom pH -Wert.

Möchte man die strukturellen Eigenschaften von Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung miteinander vergleichen, ist es notwendig, deren jeweilige Viskosität zu kennen. Im folgenden Abschnitt wird daher das Vorgehen zur Bestimmung der Viskosität der in dieser Arbeit untersuchten Proben näher erläutert. Einzelheiten zur Temperatur- und Gradientenkalibrierung sowie der Verwendung eines sogenannten Spoilergradienten können im Abschnitt 7.1.1 nachgelesen werden.

3.2.3 Viskositätsmessung

Wie bereits beschrieben, wird der hydrodynamische Radius R_{h} aus dem Diffusionskoeffizienten D eines Moleküls bestimmt. Um die Beziehung in Gleichung (3.6) anwenden zu können, muss die Viskosität der Lösung bekannt sein. Diese kann mit einem Viskosimeter oder über die Messung des Diffusionskoeffizienten eines Sondenmoleküls bestimmt werden [82]. Für die Bestimmung der Viskosität über den Diffusionskoeffizienten wird ein Molekül

mit bekanntem hydrodynamischem Radius als Sondenmolekül eingesetzt. Während des Diffusionsexperimentes wird neben den Diffusionskoeffizienten der zu untersuchenden Moleküle auch der Diffusionskoeffizient des Sondenmoleküls bestimmt. Ist der hydrodynamische Radius R_h dieses Moleküls bekannt, kann die Viskosität der untersuchten Lösung nach Gleichung (3.6) berechnet werden. Mehrere Substanzen wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur Viskositätsmessung im Diffusionsexperiment untersucht. Dioxan ($C_4H_8O_2$), ein kleines Molekül mit $R_h = 2,12 \text{ \AA}$ [76], hat sich dabei als geeignet erwiesen [82]. Voraussetzungen für eine Viskositätssonde sind, dass das Molekül keine Wechselwirkungen mit einem anderen Molekül in der Lösung eingeht und sein hydrodynamischer Radius R_h unabhängig von den äußeren Einflüssen (pH-Wert der Lösung, Konzentration der gelösten Teilchen) ist [82]. Außerdem muss eine isolierte Resonanz des Sondenmoleküls im Spektrum zu erkennen sein, um eine verlässliche Auswertung zu gewährleisten. Diese Voraussetzungen sind für Dioxan in Lösung mit dem Protein Lysozym und Saccharidmolekülen innerhalb des in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationsbereiches erfüllt. In Abbildung 3.6 ist ein 1H -Spektrum von Trehalose/Lysozymlösung mit Dioxan dargestellt. Die Resonanz des Dioxans wird zwar von Proteinresonanzen überlagert, diese haben jedoch eine so geringe Intensität, dass sie die Auswertung der Daten nicht beeinflussen.

Um sicherzugehen, dass keine Wechselwirkungen von Dioxan mit Lysozym oder Saccharidmolekülen die Viskositätsmessung beeinflussen, wurden Vergleichsmessungen mit einem Kapillarviskosimeter durchgeführt. Für diese Messungen wurde ein m-VROC der Firma RheoSense, Inc. verwendet. Eine gleichmäßige Temperierung der Probe wurde über ein Wärmebad erreicht. Die mittels Kapillarviskosimeter und Diffusionskoeffizienten gemessenen Viskositäten sind in Abbildung 3.7 (a) für eine Trehaloselösung dargestellt und stimmen innerhalb des Messfehlers sehr gut überein. Die Viskosität wurde im Kapillarviskosimeter für eine Konzentration in sechs aufeinanderfolgenden Messungen mit jeweils unterschiedlicher Scherrate gemessen. Die in der Graphik dargestellten Punkte sind die Mittelwerte der Einzelmessungen. Es wurden ebenfalls Messungen für Saccharose- und Glucoselösungen durchgeführt. Diese zeigen ebenfalls eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse der zwei Messmethoden. Die Daten der Saccharose- und Glucoselösungen sind im Anhang im Abschnitt 7.4 dargestellt. Ein Vergleich der Messmethoden wurde ebenfalls für eine Saccharose/Lysozymlösung mit $pH^D = 3,2$ durchgeführt. Die Daten sind in Abbildung 3.7 (b) dargestellt. Es ist auch hier eine gute Übereinstimmung der Messdaten zu erkennen. Der experimentelle Vergleich der beiden Messmethoden zeigt, dass Dioxan für die in dieser Arbeit untersuchten Lösungen eine geeignete Viskositätssonde darstellt. Die Messung der Viskosität über ein Sondenmolekül während des Diffusionsexperimentes hat den Vorteil, dass die Viskosität unter den gleichen experimentellen Bedingungen bestimmt wird wie die Diffusionskoeffizienten der untersuchten Teilchen. Daher wurden alle Viskositäten, die in dieser Arbeit bestimmt wurden, mit Hilfe des Sondenmoleküls Dioxan gemessen.

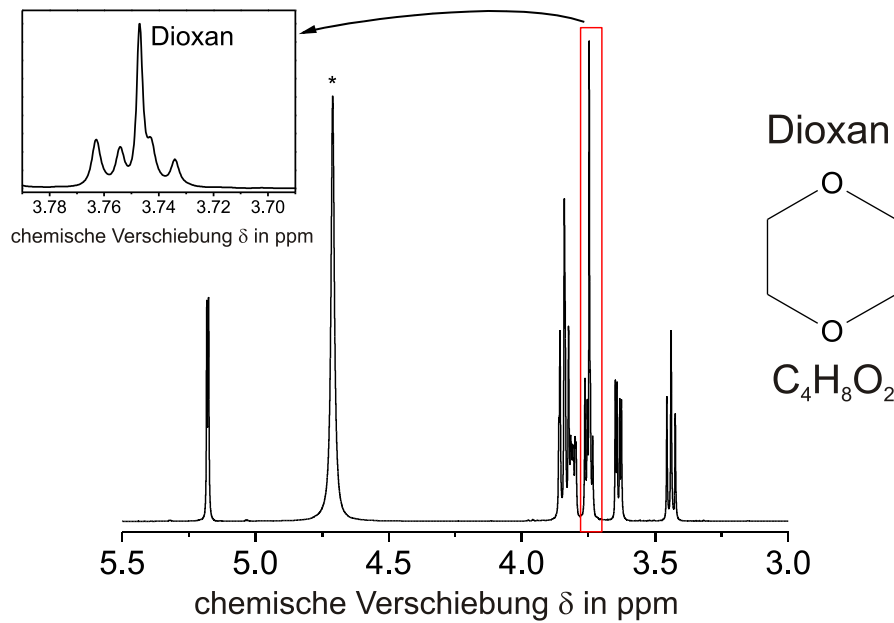


Abbildung 3.6 ^1H -Spektrum einer Lysozym/Trehaloselösung mit Dioxan. Die Resonanz des Dioxan ist vergrößert dargestellt. Rechts ist die Strukturformel des Moleküls abgebildet.

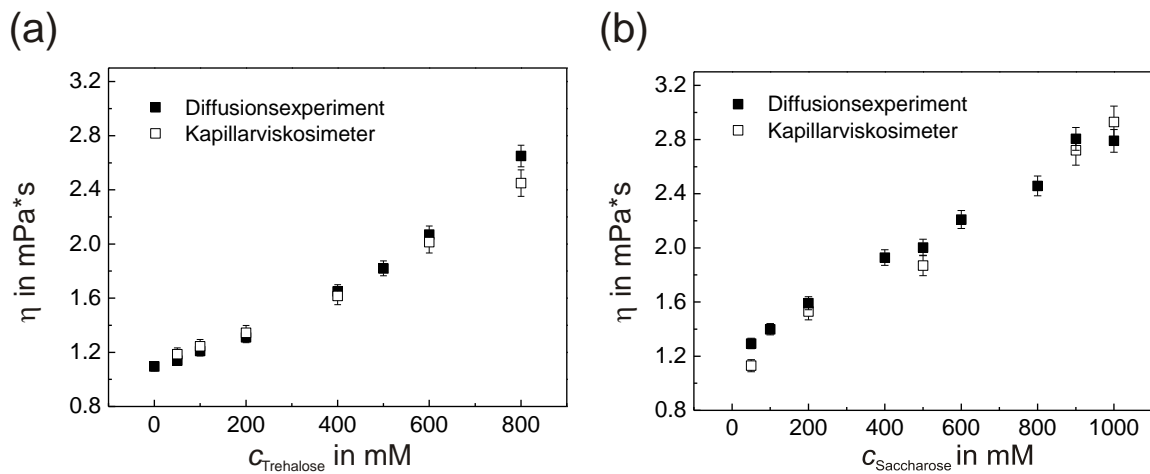


Abbildung 3.7 Vergleich der Viskosität von (a) Trehaloselösung ($\text{pH}^{\text{D}} = 6$) und Saccharose/Lysozymlösung ($\text{pH}^{\text{D}} = 3,2$) gemessen mit einem Kapillarviskosimeter und mittels des Diffusionskoeffizienten von Dioxan. Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von $T = 298 \text{ K}$ durchgeführt.

3.2.4 Spektren und Datenverarbeitung

In Abbildung 3.8 sind die ^1H -Spektren von Glucose-, Trehalose-, Saccharose- und Maltose-lösungen dargestellt. Eine Zuordnung der Resonanzen wurde, soweit möglich, auf der Grundlage von berechneten Spektren vorgenommen.

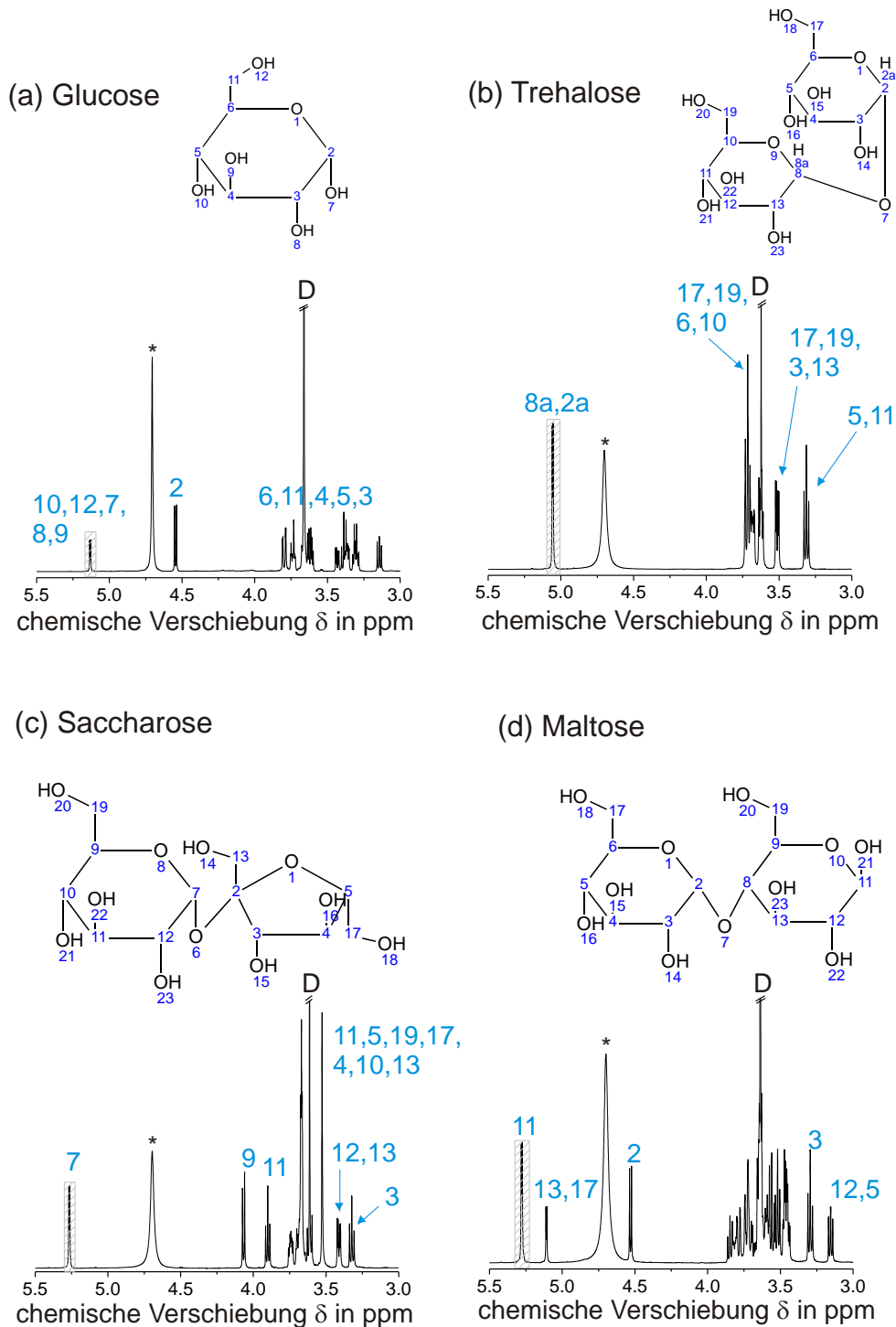


Abbildung 3.8 Abbildung der ^1H -Spektren der Saccharide in verschiedenen Lysozym/Saccharidlösungen. In allen Proben liegt eine Konzentration von 1,3 mM Lysozym und 600 mM Saccharid vor. Die Spektren wurden bei einer Temperatur von $T = 298\text{ K}$ und einem abgelesenen $\text{pH}^{\text{D}} = 3,5$ gemessen. Die Zuordnung der Saccharidsignale wurde mit Hilfe von berechneten Spektren, soweit möglich, vorgenommen. Die Signale des restlichen Wassers bzw. HDO (*) und des Dioxan (D) sind entsprechend markiert. Die schraffierte Fläche kennzeichnet den spektralen Bereich, der für die Auswertung der Saccharidsignale genutzt wurde.

Diese wurden mit dem ACD/Labs-Programm erstellt [83]. Neben den Resonanzen der Saccharide sind im Spektrum Resonanzen des Dioxan sowie des restlichen in der Probe vorhandenen H₂O bzw. HDO zu erkennen. Alle in dieser Arbeit mittels PFG-NMR untersuchten Substanzen wurden in D₂O anstatt in H₂O gelöst, da H₂O als Lösungsmittel ein starkes ¹H-Signal im NMR-Experiment verursacht. Dieses Signal würde die Resonanzen der Saccharide teilweise überlagern und damit eine eindeutige Auswertung der Daten erschweren bzw. unmöglich machen. Eine Sequenz zur Wasserunterdrückung kann hier Abhilfe schaffen, verursacht aber zusätzliche Artefakte im Spektrum. Um dies zu vermeiden, wurde D₂O als Lösungsmittel verwendet. Für die Auswertung der Saccharidresonanzen wurden die in den Spektren gekennzeichneten Integrationsregionen verwendet. Das ¹H-Spektrum von Lysozym ist in Abbildung 3.9 in einer Vergrößerung gezeigt. Während die Resonanzen im Bereich um 7 ppm vorwiegend durch die Protonen der Aminogruppen und der Amidgruppen hervorgerufen werden, repräsentieren die Resonanzen im Bereich um 1 ppm hauptsächlich die Protonen der Methylgruppen. Eine vollständige Zuordnung der Struktur des Lysozyms wurde in [84] vorgenommen.

Es ist bekannt, dass Protonen und Deuteronen im Protein miteinander austauschen können [85]. Ein solcher H/D-Austauschprozess beeinflusst die Intensität der Resonanzen im Spektrum, da die ausgetauschten Protonen nicht zum Signal beitragen. Die Zeitskala, auf der H und D gegeneinander ausgetauscht werden, ist für die einzelnen chemischen Gruppen des Lysozyms verschieden. Die meisten Protonen, die in den Seitenketten der Proteine vorkommen, tauschen auf einer sehr kurzen Zeitskala H und D gegeneinander aus. In diesem Fall wird der Austauschprozess nur durch die Diffusionskoeffizienten der beteiligten Substanzen limitiert (wie schnell treffen die beiden Austauschpartner aufeinander). Das heißt, der H/D-Austausch ist wesentlich schneller als die Dauer des NMR-Experimentes. Die Amidgruppen hingegen zeigen einen deutlich langsameren Austauschprozess, während andere Gruppen des Proteins (NH-Gruppen des Rückgrates) auf der Zeitskala von Wochen gar keinen Austauschprozess zeigen [86]. Die Austauschrate hängt nicht nur von den chemischen Gruppen, sondern auch vom pH-Wert der Lösung ab [87]. Dieser Effekt ist in den NMR-Spektren in Abbildung 3.10 zu sehen. Mit steigendem pH^D der Lösung nimmt die Austauschrate im Bereich der Amidprotonen zu und es sind weniger Signale im Spektrum zu sehen. Im Bereich der Methylprotonen zeigt sich ebenfalls eine Änderung der Signalförmigkeit mit dem pH^D, es bleiben aber alle Signale erhalten. Für die Auswertung der Daten wurden verschiedene Integrationsbereiche und damit unterschiedliche chemische Gruppen innerhalb des Proteins verglichen. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen den gewählten Bereichen. Das Verhalten der Intensitäten der Resonanzen ist unabhängig davon, wie stark die Signale vom H/D-Austausch betroffen sind. Für die Auswertung der Experimente in dieser Arbeit wurde eine Integrationsregion im Bereich der Methylgruppen gewählt, da diese den langsamsten H/D-Austausch zeigen. In diesem spektralen Bereich ist der H/D-Austauscheffekt deutlich weniger vom pH-Wert der Lösung beeinflusst als im Bereich der Amidprotonen. Die für die Auswertung genutzte Integrationsregion ist in Abbildung 3.9 gekennzeichnet. Die spektrale Auflösung wurde vor und nach jedem Diffusionsexperiment verglichen, um spektrale Veränderungen auf der Zeitskala des Experimentes auszuschließen.

Das Phänomen des H/D-Austausches betrifft nicht nur die Proteine, sondern ebenso die Hydroxylgruppen der Saccharide. Hier findet der H/D-Austauschprozess im Vergleich zur Dauer des NMR-Experimentes auf einer schnellen Zeitskala statt. Das heißt, die Spektren zeigen keine Veränderung während der Experimente. Ein Vergleich zwischen einem Trehalose ^1H -Spektrum in H_2O und D_2O ist in [88] gezeigt.

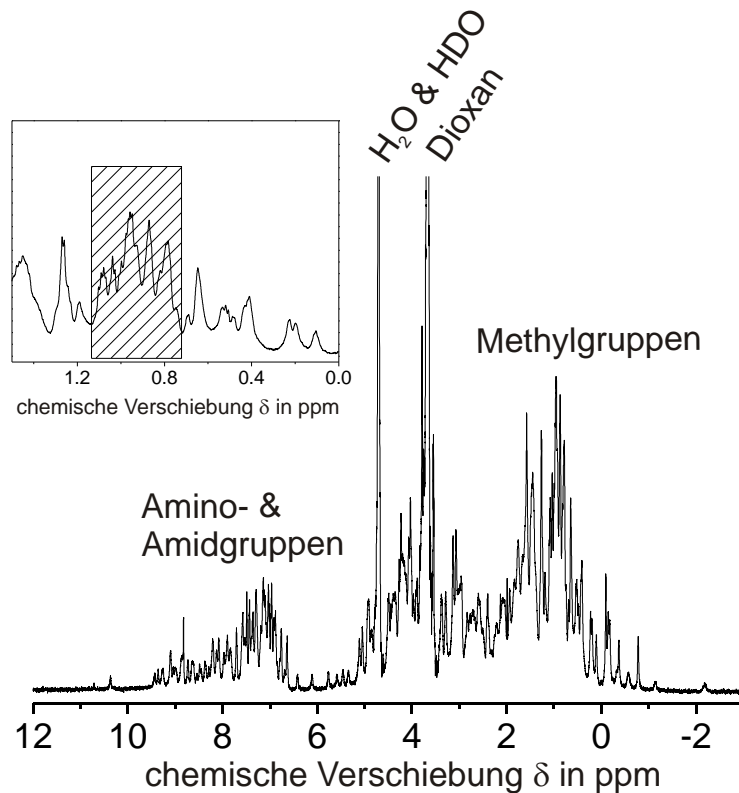


Abbildung 3.9 ^1H -Spektrum von Lysozym in D_2O bei $T = 298\text{ K}$ und abgelesenem $\text{pH}^{\text{D}} = 3,5$. In der Vergrößerung ist der für die Auswertung genutzte Integrationsbereich gekennzeichnet.

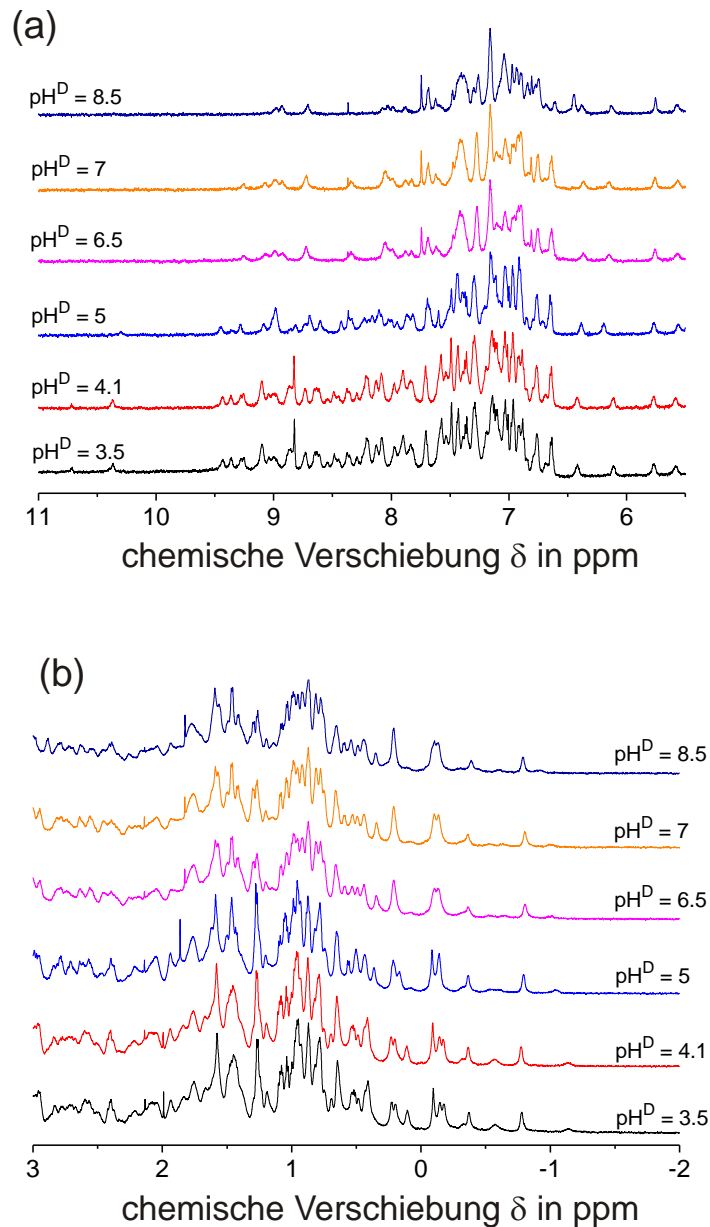


Abbildung 3.10 Lysozymspektren in Abhängigkeit vom abgelesenen pH^{D} -Wert. Dargestellt ist der Bereich der Amidgruppen um 7 ppm (a) und der spektrale Bereich der Methylgruppen um 1 ppm (b).

Für die Auswertung der PFG-NMR-Experimente wurde die Intensität der Resonanzen S in Abhängigkeit vom Feldgradienten G_z gemessen. Anschließend wurde $\ln(S/S_0)$ gegen $(G_z \gamma \delta)^2 (\Delta - \delta/3)$ aufgetragen, wie in Abbildung 3.11 für Lysozym und Trehalose dargestellt. Nach Gleichung (3.10) beschreibt der Anstieg dieser Kurve den Diffusionskoeffizienten D des jeweils untersuchten Moleküls. Alle Daten in dieser Arbeit wurden mit einer Geraden angepasst. Das Dioxansignal wird teilweise von Saccharidsignal überlagert. Da die Intensität des Dioxansignals im Vergleich zum Saccharid jedoch wesentlich größer ist, ist es möglich, auch in diesen Fällen den Kurvenverlauf mit nur einer Komponente anzupassen. Im Kapitel 4 werden die Ergebnisse der Diffusionsexperimente besprochen. Dabei werden die untersuchten Saccharide und das Protein Lysozym anhand ihrer hydrodynamischen Radien in Abhängigkeit

von den experimentellen Bedingungen analysiert. Gemessen wurden dabei Diffusionskoeffizienten für eine 1,3 mM Lysozymlösung von $D_{\text{Lysozym}} = 9 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ und für 50 mM Disaccharidlösungen (Trehalose, Saccharose, Maltose) im Bereich von $D_{\text{Disaccharid}} \sim 3,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

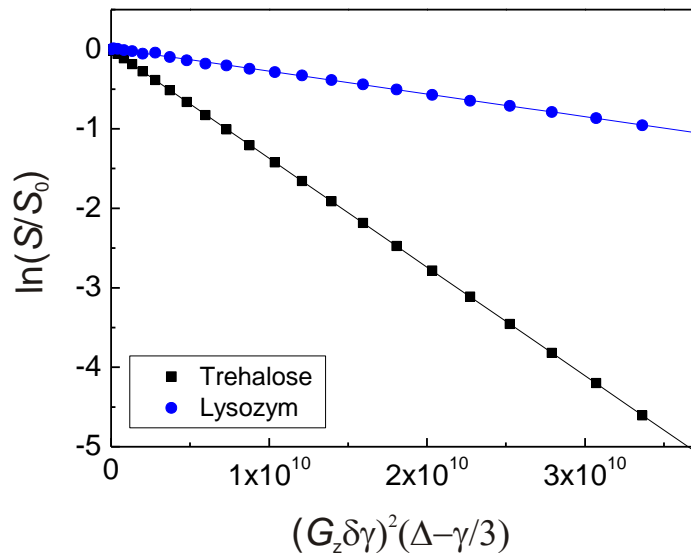


Abbildung 3.11 Auftragung der Intensität des Lysozimsignals und des Trehalosesignals für eine Lösung mit $c_{\text{Lysozym}} = 1,3 \text{ mM}$ und $c_{\text{Trehalose}} = 1 \text{ M}$. Gemessen wurde bei einer Temperatur von $T = 298 \text{ K}$ und $\text{pH}^{\text{D}} = 3,5$.

3.2.5 Präparation der verwendeten Lösungen

Alle verwendeten Substanzen (Lysozym, Trehalose, Sucrose, Maltose, Glucose und Dioxan) wurden von Sigma Aldrich bezogen. Es wurde eine 2,5 mM Stammlösung mit Lysozym und eine 1 M Stammlösung der Saccharide mit D_2O hergestellt. Die Konzentration der Stammlösung von Lysozym wurde so gewählt, dass keine Selbstaggregation von Lysozym auftritt und somit in den weiteren Verdünnungsschritten korrekt gearbeitet werden kann. Unter welchen Bedingungen eine Selbstaggregation von Lysozym stattfindet, wurde im Abschnitt 3.2.2 ausgeführt. Die Konzentration der Stammlösung von Lysozym wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers überprüft [Spektralphotometer-Typ: JASCO-V650]. Für Lysozym wurde ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 37970 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ [www.expasy.org] bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ zur Berechnung der Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz benutzt [89]. Für die niedrigen Saccharidkonzentrationen wurden die beiden Stammlösungen im jeweils berechneten Verhältnis gemischt und mit D_2O verdünnt. Für Saccharidkonzentrationen ab 500 mM wurde eine Einwaage von Saccharid vorgenommen und diese in einer 1,3 mM Lysozymlösung gelöst. Dioxan wurde als Viskositätssonde, wie im Abschnitt 3.2.3 ausgeführt, verwendet und zu diesem Zweck in geringer Konzentration den

Proben beigemischt. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde in D₂O gelöstes NaOH bzw. DCl-Lösung verwendet. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit pH-Indikatorstäbchen gemessen, wobei berücksichtigt werden muss, dass der pH-Wert nicht in H₂O-, sondern in D₂O-Lösung bestimmt wurde. Die direkt mit den Indikatorstäbchen in der D₂O-Lösung abgelesenen Werte werden in dieser Arbeit mit pH^D bezeichnet.

3.3 Festkörper-NMR-Experimente zur Untersuchung der molekularen Dynamik

Die dynamischen Eigenschaften eines Proteins werden durch die Korrelationszeit der Bewegung und die Geometrie der Bewegung beschrieben, wobei beide Informationen mit Hilfe von FK-NMR-Experimenten zugänglich sind. Die Anwendung einer breiten Palette zur Verfügung stehender Experimente ermöglicht es, Bewegungen über einen großen Bereich von Korrelationszeiten (im Bereich von ns bis s) hinweg zu untersuchen. Die Abbildung 3.12 bietet einen Überblick über die Sensitivität der in dieser Arbeit genutzten Experimente hinsichtlich der Korrelationszeit der Bewegungen, wobei das DIPSHIFT-Experiment keine Information über die Korrelationszeit der Bewegung liefert, sondern über die Geometrie von Bewegungen, für deren Korrelationszeiten $(\tau_c)^{-1} \gg D_{\text{stat}}$ gilt. D_{stat} ist die statische dipolare Kopplungskonstante. Wie zu sehen ist, ergänzen sich die ausgewählten Sequenzen in ihrem Informationsgehalt. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit genutzten NMR-Experimente kurz vorgestellt und die Auswertung der Messdaten erläutert.

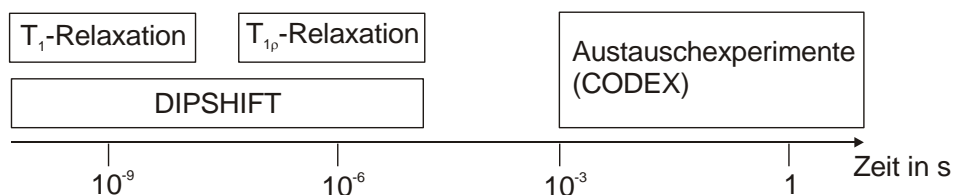


Abbildung 3.12 Übersicht der verwendeten FK-NMR-Experimente hinsichtlich ihrer Sensitivität auf die Korrelationszeit der Bewegung.

3.3.1 Experimente zur Untersuchung von molekularen Bewegungen mit Korrelationszeiten im ns- bis μ s-Bereich

Schnelle Bewegungen mit Korrelationszeiten im ns- bis μ s-Bereich können in der Festkörper-NMR mit Hilfe der Relaxation der longitudinalen Magnetisierung untersucht werden. Relaxation bedeutet hierbei die Wiederherstellung des thermischen Gleichgewichtes nach einer Störung des Systems. Das thermische Gleichgewicht entspricht in diesem Fall der Boltzmann-Verteilung der Spinpolarisationen im anliegenden Magnetfeld. Die Zeit, die vom System benötigt wird, um das thermische Gleichgewicht nach einer Störung wieder herzustellen, wird von den dynamischen Eigenschaften (Korrelationszeit sowie Geometrie der Bewegung) des Systems bestimmt. Die experimentelle Beobachtung dieses Vorganges ist daher ein direkter Zugang zur Charakterisierung der dynamischen Eigenschaften von

Molekülen. Eine umfangreiche Abhandlung der zugrundeliegenden Theorie findet sich in [46, 90]. Hier soll festgehalten werden, dass die experimentell zugänglichen Relaxationszeiten als Funktionen der Korrelationszeit der Bewegung beschrieben werden können (Bloembergen-Purcell-Pound(BPP)-Theorie) [91].

Je nach ihrer Korrelationszeit tragen molekulare Bewegungen unterschiedlich stark zum Relaxationsprozess bei. Dynamische Prozesse mit Korrelationszeiten τ_c , für die $\omega^* \tau_c \sim 1$ gilt, tragen dabei am effektivsten zum Relaxationsprozess bei. Die Größe $\hbar\omega^*$ beschreibt die Übergangsenergie zwischen den Eigenzuständen des betrachteten Spinsystems. Diese Übergangsenergie ist mit der Stärke des wirkenden Magnetfeldes B über die Gleichung

$$\omega^* = -\gamma \cdot B \quad (3.11)$$

verknüpft. Die Relaxationsexperimente sind daher, je nach der Stärke des wirkenden Magnetfeldes, sensitiv für molekulare Bewegungen mit unterschiedlichen Korrelationszeiten. In dieser Arbeit wurden T_1 - und $T_{1\rho}$ -Experimente genutzt, um Bewegungen auf verschiedenen Zeitskalen zu untersuchen. Während das T_1 -Experiment die Relaxation im äußeren Magnetfeld B_0 untersucht, charakterisiert das $T_{1\rho}$ -Experiment die Relaxation in einem zusätzlich angelegten Magnetfeld der Stärke B_1 . Da $B_1 \ll B_0$ gilt, unterscheiden sich die Korrelationszeiten der Molekulardynamiken, auf die die Experimente sensitiv sind. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Stärke der wirkenden Magnetfelder und den Bereich von Korrelationszeiten, für die der Relaxationsprozess jeweils am effektivsten ist. Das heißt, T_1 wird vor allem durch Bewegungen mit Korrelationszeiten im Bereich von einigen ns bestimmt. Im Protein sind das z. B. molekulare Fluktuationen. Das $T_{1\rho}$ -Experiment dagegen ist sensitiv gegenüber Bewegungen mit Korrelationszeiten im Bereich von einigen μ s. Auf dieser Zeitskala finden in Proteinen z. B. lokale Faltungsprozesse statt [92, 93]. Der Relaxationsprozess der longitudinalen Magnetisierung wird sowohl von der Korrelationszeit der molekularen Bewegungen als auch von deren Geometrie beeinflusst. In dieser Arbeit wird die Abhängigkeit der dynamischen Eigenschaften des Proteins Csp in Abhängigkeit von seiner Umgebung untersucht. Um ein möglichst umfangreiches Bild zu erhalten, ist es notwendig, die Korrelationszeiten der molekularen Bewegungen und deren Geometrie separat zu betrachten. Die Messung der heteronuklearen dipolaren Kopplungskonstante der NH-Gruppen des Csp bietet eine Möglichkeit die Geometrie der Bewegungen mit Korrelationszeiten im Bereich von ns bis μ s zu untersuchen. Das DIPSHIFT-Experiment wird in dieser Arbeit für diesen Zweck benutzt. Die NMR-Sequenzen, die zur Messung der Relaxationszeiten sowie der heteronuklearen dipolaren Kopplung genutzt wurden, werden im Folgenden vorgestellt.

Tabelle 2 Übersicht über die in dieser Arbeit genutzten Relaxationsexperimente. Zum jeweiligen Experiment sind die Korrelationszeiten der Bewegungen angegeben, die den Relaxationsprozess der ^{15}N -Kernspins innerhalb des anliegenden Magnetfeldes am stärksten vorantreibt.

Experiment	B-Feld	$\tau_c \sim \omega^{-1}$
T_1	$\omega_0 = 40,531 \text{ MHz}$ ($B_0 = 9,39 \text{ T}$)	$\sim 20 \text{ ns}$
$T_{1\rho}$	$\omega_1 \sim 60 \text{ Hz}$ ($B_1 \sim 14 \text{ mT}$)	$\sim 20 \mu\text{s}$

T_1 -Relaxation. In dieser Arbeit wurde die T_1 -Relaxation im äußeren Magnetfeld B_0 mit Hilfe des TORCHIA-Experimentes [94] untersucht. Diese Pulssequenz nutzt zur Anregung der Magnetisierung eine CP-Sequenz [95]. Diese besteht aus einem $(\pi/2)$ -Anregungspuls auf dem ^1H -Kanal und einem anschließendem Spinlock-Feld (SL) auf beiden Kanälen. Durch diese Sequenz wird Magnetisierung von den wesentlich häufigeren ^1H -Kernen auf die selteneren ^{15}N -Kerne übertragen. Dadurch wird eine höhere Signalintensität der ^{15}N -Kerne erreicht und darüber hinaus die Wartezeit d_1 zwischen den einzelnen Experimenten verkürzt. Diese Wartezeit wird durch die Zeit T_1 bestimmt und beträgt im Fall eines CP-Experimentes $T_1^{1\text{H}}$ anstatt $T_1^{15\text{N}}$, wobei $T_1^{15\text{N}} > T_1^{1\text{H}}$ [47].

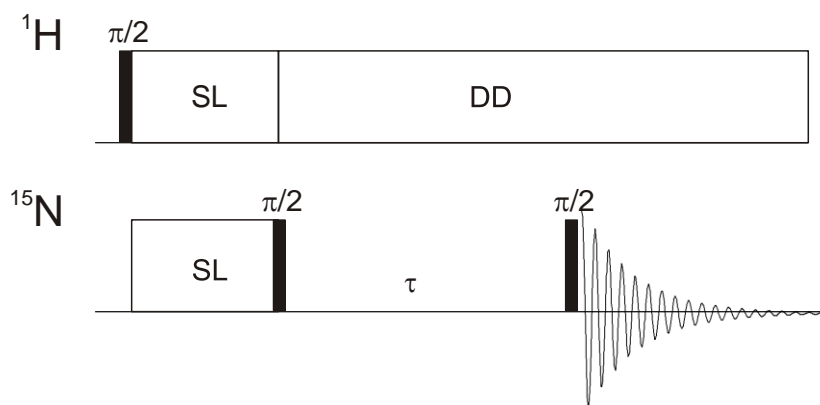


Abbildung 3.13 TORCHIA-Sequenz [94] zur Messung der T_1 -Relaxation der ^{15}N -Kernspins. Mit DD ist die heteronukleare Entkopplungssequenz gekennzeichnet.

Die TORCHIA-Sequenz ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Nach der Anregung der Magnetisierung wird diese durch einen $(\pi/2)$ -Puls auf die -z-Achse geklappt. Die Anregung der Magnetisierung stellt eine Störung des thermischen Gleichgewichts des Systems dar. Während der nun folgenden Wartezeit τ relaxiert die Magnetisierung mit der Zeitkonstante T_1

in das thermische Gleichgewicht zurück. Nach einem $(\pi/2)$ -Auslesepuls wird das Signal in Abhängigkeit von der Wartezeit τ ausgelesen. Während der Datenaufnahme erfolgt eine heteronukleare Entkopplungssequenz. Das Experiment wird in Abhängigkeit der Zeit τ durchgeführt und die Modulation der Intensität aufgetragen. Die Signalintensität wird durch

$$M_z^1(\tau) = [M_{CP}(\tau = 0) - M_0] e^{-\frac{\tau}{T_1}} + M_0 + M_z^{Zeeman}(\tau) \quad (3.12)$$

beschrieben und setzt sich aus drei Termen zusammen. Der erste Term beschreibt den Anteil der Magnetisierung, der mit der Konstante T_1 in das thermische Gleichgewicht relaxiert $M_{CP}(\tau = 0) - M_0$. Dieser Anteil der Magnetisierung wird durch die CP-Sequenz angeregt. Weiterhin muss der Anteil der Magnetisierung M_0 , der sich bereits im thermischen Gleichgewicht befindet, berücksichtigt werden, ebenso wie ein Beitrag zur Magnetisierung M_z^{Zeeman} , der nicht durch das CP verursacht wird. Für die Bestimmung der Relaxationszeit T_1 ist der erste Term ausreichend. Deswegen wird die Phase des $(\pi/2)$ -Pulses auf dem ^1H -Kanal, der die Magnetisierung für den Übertrag auf die ^{15}N -Kerne anregt, um 180° gedreht. Dadurch wird nicht der Anteil der Magnetisierung $M_{CP}(\tau = 0) - M_0$ angeregt, sondern $-M_{CP}(\tau = 0) - M_0$. Daraus folgt für die Signalintensität:

$$M_z^2(\tau) = [-M_{CP}(\tau = 0) - M_0] e^{-\frac{\tau}{T_1}} + M_0 + M_z^{Zeeman}(\tau) . \quad (3.13)$$

Wird das Signal des ersten Experimentes M_z^1 vom Signal des zweiten Experimentes M_z^2 für ein Konstantes τ abgezogen

$$M_z^2(\tau) - M_z^1(\tau) = -2M_{CP}(\tau = 0) e^{-\frac{\tau}{T_1}}, \quad (3.14)$$

wird die Signalintensität nur noch durch die Relaxationskonstante T_1 bestimmt. In der Abbildung 3.14(a) ist die Modulation der Signalintensität in Abhängigkeit von τ für das Protein Csp abgebildet.

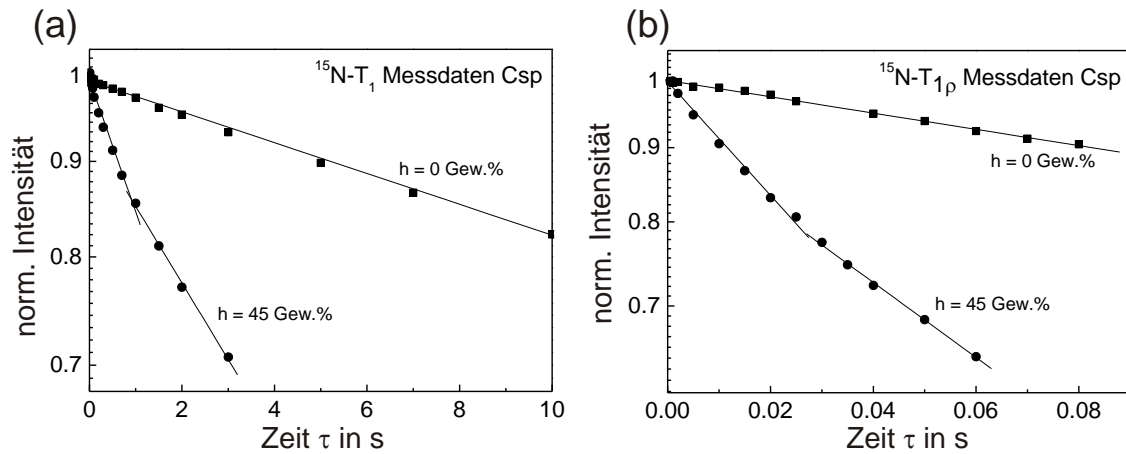


Abbildung 3.14 Rohdaten der (a) $^{15}\text{N-T}_1$ - und (b) $^{15}\text{N-T}_{1\rho}$ -Messung von Csp für 0 Gew.% und 45 Gew.% Wassergehalt. Die Fehler der Datenpunkte liegen im Bereich der Größe der Punkte. Die Daten wurden bei einer Temperatur von $T = 25^\circ\text{C}$ aufgenommen. Die Messunsicherheiten der Daten sind in der Größenordnung der dargestellten Punkte und wurden aus dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis berechnet.

$T_{1\rho}$ -Relaxation. Die Zeit $T_{1\rho}$ beschreibt die Relaxation in einem Magnetfeld $B_1 \neq B_0$. Das Magnetfeld B_1 wird im Experiment durch ein angelegtes Spin-Lock-Feld (SL-Feld) realisiert, das in Richtung der makroskopischen Magnetisierung angelegt wird. Eine Sequenz zur Messung der $T_{1\rho}$ -Relaxation ist in Abbildung 3.15 (a) dargestellt. Zunächst wird die Magnetisierung der ^{15}N -Kernspins durch eine CP-Sequenz angeregt. Anschließend wird auf dem ^{15}N -Kanal ein SL-Feld ($B_1 = \omega_1 / \gamma_{15\text{N}}$) für eine Zeit τ in Richtung der makroskopischen Magnetisierung angelegt. Während des SL-Feldes und der Datenaufnahme wirkt auf dem ^1H -Kanal eine heteronukleare Entkopplungssequenz. Nach der Anregung des Spinsystems durch die CP-Sequenz strebt das System in das thermische Gleichgewicht zurück. Das thermische Gleichgewicht wird während des SL-Feldes nicht durch das äußere Magnetfeld bestimmt, sondern durch die Stärke des SL-Feldes B_1 . Die Sequenz wird in Abhängigkeit von der Länge τ des SL-Feldes durchgeführt und die Signalintensität ausgewertet. Die Modulation der Signalintensität in Abhängigkeit von τ ist in Abbildung 3.14 (b) dargestellt.

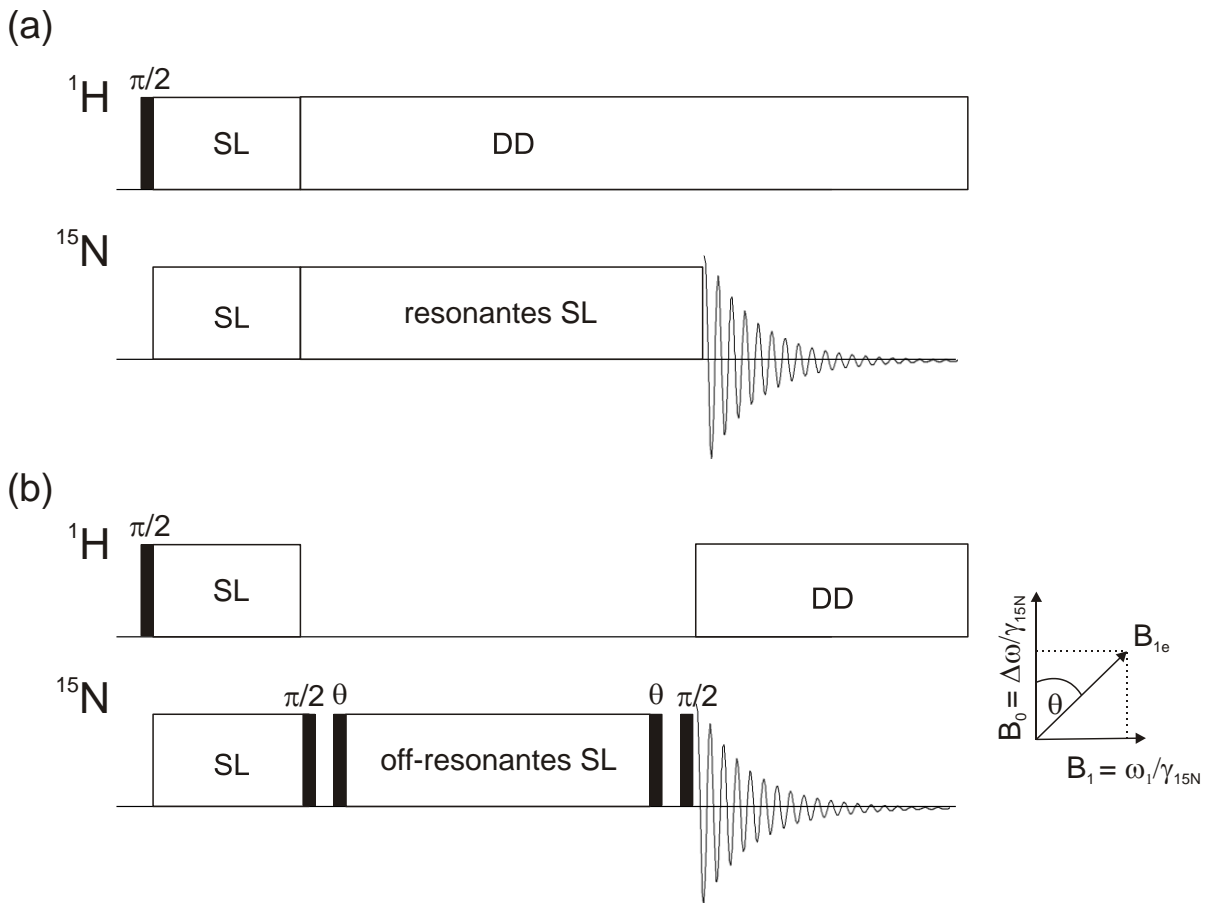


Abbildung 3.15 (a) Sequenz zur Messung von ^{15}N - $T_{1\rho}$ mit Hilfe eines resonanten SL-Feldes und heteronuklearer Entkopplung (DD). (b) Pulssequenz zur Messung der off-Resonanz ^{15}N - $T_{1\rho}$ -Relaxation. Die Skizze verdeutlicht die Definition des effektiven Spin-Lock-Feldes B_{1e} sowie des Winkels θ .

Der Relaxationsprozess im SL-Feld wird über zwei Mechanismen vorangetrieben. Einmal durch die Spin-Gitter Relaxation $T_{1\rho}$, die von der Moleküldynamik abhängt, und zweitens durch die Spin-Spin Relaxation T_{XH} . Experimentell wird daher ein scheinbares $T_{1\rho}^*$ gemessen

$$\frac{1}{T_{1\rho}^*} = \frac{1}{T_{1\rho}} + \frac{1}{T_{\text{XH}}} \quad (3.15)$$

das sich additiv aus beiden Termen zusammensetzt, wobei der Anteil von T_{XH} im Allgemeinen nicht zu vernachlässigen ist [96]. Spin-Spin Relaxation findet zwischen den häufig in der Probe vorkommenden ^1H -Kernen und den ^{15}N -Kernen, auf die das SL-Feld wirkt, statt. Die Zeitkonstante T_{XH} ist dabei unabhängig von molekularen Bewegungen. Deswegen ist deren Beitrag zur Messung von $T_{1\rho}^*$ unerwünscht und sollte möglichst gering gehalten werden.

Es gibt mehrere Ansätze, um $T_{1\rho}$ ohne den störenden Beitrag von T_{XH} experimentell zu ermitteln. Akasaka *et al.* haben $T_{1\rho}^*$ bestimmt und T_{XH} anschließend analytisch in der

Datenanpassung berücksichtigt. Eine andere Strategie ist die Vergrößerung von T_{XH} , so dass $(T_{1\rho})^{-1} \gg (T_{XH})^{-1}$ und damit $(T_{1\rho^*})^{-1} = (T_{1\rho})^{-1}$. Zu diesem Zweck wurden in $T_{1\rho}$ -Experimenten sowohl homonukleare Entkopplung [97] als auch heteronukleare Entkopplung [98] eingesetzt. Beide Methoden liefern nur zum Teil befriedigende Ergebnisse. Eine weitere erfolgreiche Methode ist die Erhöhung der Amplitude des Spin-Lock-Feldes. Diese ist zwar durch die baulichen Gegebenheiten des Spektrometers begrenzt, kann aber durch die Verwendung eines Resonanz-Offsets erhöht werden [99]. Die entsprechende Sequenz, die auch für die Experimente in dieser Arbeit verwendet wurde, ist in Abbildung 3.15 (b) dargestellt. In diesem Fall wird das SL-Feld nicht genau in Resonanz mit der Magnetisierung eingestrahlt, sondern um einen Betrag $\Delta\omega/2\pi$ verschoben. Das effektive SL-Feld berechnet sich wie folgt:

$$B_{1e} = \sqrt{B_1^2 + (\Delta\omega / \gamma_{15N})^2} , \quad (3.16)$$

mit B_1 dem eingestrahlten Magnetfeld und γ_{15N} dem gyromagnetischen Verhältnis der ^{15}N -Kernspins. Diese Strategie wurde bereits zur Untersuchung von chemischen Austauschprozessen in Flüssigkeiten verwendet [100, 101] sowie zur Charakterisierung von Biopolymeren im Festkörper [98, 102, 103, 104]. Eine analytische Beschreibung findet sich in Kurbanov *et al.*, hierin werden sowohl die Hauptbeiträge zur Relaxation (Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, anisotrope chemische Verschiebung) berücksichtigt als auch die Wechselwirkung des SL-Feldes mit der Rotationsfrequenz des Rotors (Stärke des SL-Feldes Vergleichbar der Rotationsfrequenz des Rotors) [105]. Um die makroskopische Magnetisierung in Richtung des off-resonanten SL-Feldes zu richten, werden zu Beginn und Ende des SL-Feldes kurze Orientierungspulse verwendet [98]. Die Berechnung des Winkels θ , nach der Gleichung $\theta = \arctan(B_1 / (\Delta\omega / \gamma_{15N}))$, ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Sowohl die Stärke des effektiven Feldes B_{1e} als auch der Winkel θ wurden vor jedem Experiment kalibriert und nach der Durchführung des Experimentes überprüft. Der Winkel θ zwischen B_0 - und B_{1e} -Feld wurde so gewählt, dass das effektive Feld so groß wie möglich wird, die Stärke des SL-Pulses die Hardware des Spektrometers aber nicht beschädigt.

Auswertung der Rohdaten der Relaxationsexperimente. In Abbildung 3.14 sind die Rohdaten des ^{15}N - T_1 - und ^{15}N - $T_{1\rho}$ -Experimentes für das Protein Csp mit $h = 0$ Gew.% und 45 Gew.% Wasser dargestellt. Um den Verlauf der Daten besser beurteilen zu können, wurden diese in der Abbildung einfach logarithmische aufgetragen. Der Kurvenverlauf der Csp-Probe mit $h = 0$ Gew.% kann mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden. Die Anpassung der Daten der Csp-Probe mit einem höheren Wassergehalt (z. B. $h = 45$ Gew.%) wird mit einer doppel-exponentiellen Funktion der Form

$$I(\tau) = P^a \exp\left(-\frac{\tau}{T_{1,\rho}^a}\right) + P^b \exp\left(-\frac{\tau}{T_{1,\rho}^b}\right) \quad (3.17)$$

vorgenommen. Um die Relaxationsraten untereinander vergleichen zu können, wird aus den angepassten Werten eine mittlere Relaxationsrate

$$\langle R_{1,1p} \rangle = \frac{1}{P^a + P^b} \left(\frac{P^a}{T_{1,1p}^a} + \frac{P^b}{T_{1,1p}^b} \right) \quad (3.18)$$

errechnet [102, 106]. Im Zuge der Auswertung der Daten wurde ebenfalls eine Anpassung der Daten mit einem Verteilungsparameter getestet, dafür wurde die KWW-Funktion genutzt [107]. Beide Kurvenanpassungen sind für die T_1 -Messung der CSP-Probe mit $h = 45$ Gew.% im Vergleich in Abbildung 3.16 dargestellt. Um die Qualität der Anpassungen besser beurteilen zu können, ist die Differenz von Anpassungskurve und Datenpunkten ebenfalls aufgetragen. Die Anpassung der Daten mit Hilfe der doppel-exponentiellen Funktion erweist sich als stabiler im Vergleich zur KWW-Funktion. Dieses Ergebnis ist exemplarisch für die Daten der übrigen Messungen, daher wurden alle Daten in dieser Arbeit mit der doppel-exponentiellen Funktion angepasst.

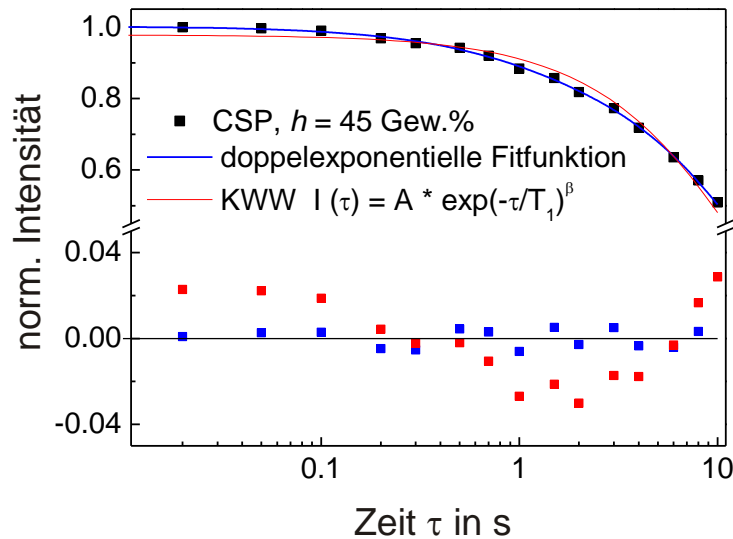


Abbildung 3.16 Vergleich der Kurvenanpassung der T_1 -Daten der CSP-Probe für $h = 45$ Gew.%, gemessen bei $T = 10$ °C, für eine doppel-exponentielle Funktion (blau) und eine KWW-Funktion (rot). Die Differenz zwischen Kurvenanpassung und Messdaten ist ebenfalls aufgetragen.

DIPSHIFT-Experiment zur Charakterisierung der Geometrie von Bewegungen mit Korrelationszeiten im Bereich von $(\tau_c)^{-1} \gg D_{\text{stat}}$. Die Wechselwirkung der dipolaren Kopplung kann zur Charakterisierung von molekularen Bewegungen genutzt werden, da Bewegungen mit Korrelationszeiten $(\tau_c)^{-1} \gg D_{\text{stat}}$ den Tensor der dipolaren Kopplung mitteln. In der Folge wird, im Gegensatz zur statischen Kopplungskonstante D_{stat} , eine reduzierte dipolaren Restkopplungskonstante D_{res} gemessen. Die statische heteronukleare Kopplungskonstante einer NH-Gruppe $D_{15\text{N}-1\text{H}}$ errechnet sich nach Gleichung (2.14). Für einen ^{15}N - ^1H -Abstand von $1,015 \text{ \AA}$ [108] ist $D_{\text{stat}} = 11,63 \text{ kHz}$. Das heißt, Bewegungen mit Korrelationszeit

kleiner als $\tau_c \sim 100 \mu\text{s}$ mitteln den Tensor der dipolaren Kopplung und führen zu einer reduzierten dipolaren Kopplung.

Im DIPSHIFT-Experiment wird die heteronukleare dipolare Kopplungskonstante D_{SI} zwischen einem häufigen Kernspin I (im allgemeinen ^1H -Kernspin) und einem seltenen Kernspin S betrachtet. In den Experimenten in dieser Arbeit sind das konkret die dipolare Kopplung zwischen ^1H - und ^{15}N -Kernspins, $D_{15\text{N}-1\text{H}}$, und zwischen ^1H - und ^{13}C -Kernspins, $D_{13\text{C}-1\text{H}}$. Aus dem Verhältnis der gemessenen dipolaren Restkopplungskonstante D_{res} einer chemischen Gruppe zur dipolaren Kopplungskonstante im starren Fall D_{stat}

$$S = \langle P_2(\cos \theta) \rangle = \frac{D_{\text{res}}}{D_{\text{stat}}} \quad (3.19)$$

ergibt sich der dynamische Ordnungsparameter S . $P_2(\cos \theta)$ ist das 2. Legendre Polynom und θ der Winkel zwischen dem dipolaren Tensor im Hauptachsensystem und dem äußeren Magnetfeld. Die Klammern kennzeichnen den zeitlichen Mittelwert. Der dynamische Ordnungsparameter ist ein Maß für die Anisotropie der molekularen Bewegung, er nimmt Werte zwischen Eins für ein starres System, Null für eine isotrope Bewegung bis $-1/2$ für eine transversale isotrope Bewegung an. Wie in [109] beschrieben können für modellhaft angenommene Bewegungen, wie zum Beispiel einen Zweiplatzsprung, Dreiplatzsprung oder die Diffusion innerhalb eines Kegels quantitative Zusammenhänge zwischen Ordnungsparameter und Öffnungswinkel dieser Bewegungen berechnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird die mittlere dipolare Kopplungskonstante aller NH-Gruppen des Csp bestimmt. Da man in diesem Fall kein begründetes Modell für die Geometrie der Bewegung zugrundelegen kann, ist eine Auswertung hinsichtlich der Art der Bewegung (z. B. Sprungwinkel) der NH-Gruppen im Protein nicht möglich. Die Messung der dipolaren Kopplungskonstante in Abhängigkeit vom Wassergehalt, sowie der umgebenden Matrix bietet jedoch die Möglichkeit, Änderungen der Geometrie der NH-Bewegungen zu detektieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die heteronuklearen dipolaren Kopplungskonstanten $D_{15\text{N}-1\text{H}}$ und $D_{13\text{C}-1\text{H}}$ mit Hilfe des DIPSHIFT-Experimentes gemessen [110, 111]. Das Experiment wurde bereits mehrfach auf biologische Systeme angewendet [112, 113, 114, 115] und wird in dieser Arbeit genutzt, um die Geometrie der Bewegung der untersuchten Proteine in Abhängigkeit ihrer Umgebung zu charakterisieren. Im Allgemeinen wirken auf die Kernspins in einer Probe im äußeren Magnetfeld B_0 verschiedene Wechselwirkungen. Im Fall von Kernspins mit $I = 1/2$ sind dies im Besonderen die Wechselwirkungen der chemischen Verschiebung und die dipolare Kopplung. Das DIPSHIFT-Experiment ist eine sogenannte „*separated local field*“-Methode [116, 117]. Das heißt, im Experiment werden die Einflüsse der beiden Wechselwirkungen, heteronukleare dipolare Kopplung (DIP-) und chemische Verschiebung (-SHIFT) voneinander separiert. Dadurch ist es möglich, zugeordnet zu jeder Resonanz im NMR-Spektrum, die zugehörige heteronukleare Kopplungskonstante zu messen. Das Experiment wurde wie in der Abbildung 3.17 dargestellt verwendet.

Nach der Anregung der S-Kernspins (^{15}N bzw. ^{13}C) durch eine CP-Sequenz entwickelt sich die Magnetisierung über zwei Rotorperioden hinweg unter dem Einfluss der chemischen Verschiebung. Genau nach einer Rotorperiode erfolgt ein (π)-Puls, der als Hahn-Echo [67] wirkt. Am Ende der Sequenz wird ein hoch aufgelöstes Spektrum aufgenommen.

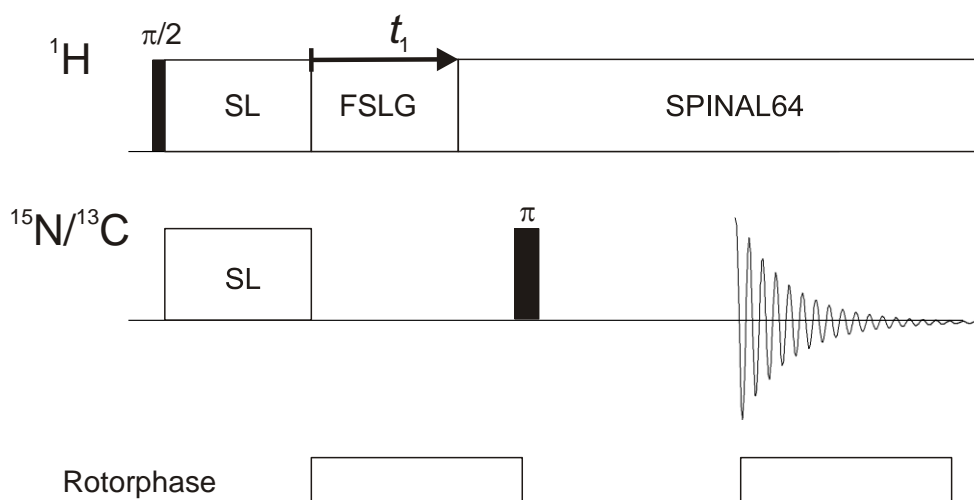


Abbildung 3.17 *DIPSHIFT*-Sequenz zur Messung der heteronuklearen Dipolkopplungskonstante $D_{1\text{H}-15\text{N}/13\text{C}}$.

Die Kernspins der Probe unterliegen zusätzlich zur chemischen Verschiebung, sowohl der heteronuklearen Kopplung zwischen den S-Kernspins und den I-Kernspins (^1H) als auch der homonuklearen Kopplung der I-Kernspins (^1H - ^1H). Der Einfluss der homonuklearen Kopplung zwischen S-Kernspins (^{15}N - ^{15}N bzw. ^{13}C - ^{13}C) kann aufgrund des im Allgemeinen großen räumlichen Abstands dieser Kerne zueinander vernachlässigt werden. Das Ziel des Experimentes ist es, die heteronukleare dipolare Kopplungskonstante zwischen den S- und I-Kernspins D_{IS} ($D_{15\text{N}-1\text{H}}$ und $D_{13\text{C}-1\text{H}}$) zu messen. Dafür wird die Wirkung der homonuklearen ^1H - ^1H -Kopplung für einen definierten Zeitraum eliminiert. Dies geschieht nach der CP-Anregung für einen Zeitraum t_1 durch die homonukleare Entkopplungssequenz FSLG [118], die auf dem ^1H -Kanal eingestrahlt wird. Während t_1 entwickelt sich die Magnetisierung ausschließlich unter dem Einfluss der heteronuklearen dipolaren Kopplung. Im Anschluss wird für den Rest der Sequenz auf dem ^1H -Kanal die heteronukleare dipolare Entkopplungssequenz SPINAL 64 [119] eingestrahlt. Dadurch ist während dieses Zeitraumes die heteronukleare Kopplung zwischen den ^{15}N - bzw. ^{13}C -Kernspins und den ^1H -Kernspins unterbrochen. Die heteronukleare dipolare Kopplung wirkt sich im Spektrum als Intensitätsverlust der Resonanzen aus. Das Experiment wird als Funktion der Zeit t_1 durchgeführt, wobei t_1 von 0 bis zu einer Rotorperiode variiert wird. Um die heteronukleare Kopplungskonstante einer chemischen Gruppe der Probe zu bestimmen, wird die Intensität der zugehörigen Resonanz als Funktion von t_1/T_{R} aufgetragen wobei T_{R} die Rotorperiode während des Experimentes ist. In der Abbildung 3.18 ist die Modulation der Intensität der NH-Gruppen des Proteins Csp aufgetragen. Die Form der Kurve hängt von der Stärke der wirkenden heteronuklearen dipolaren Kopplung ab. Mit Hilfe eines Simulationsprogramms

kann der theoretische Verlauf der DIPSHIFT-Kurven für vorgegebene dipolare Kopplungskonstanten berechnet werden. Das in dieser Arbeit verwendete Simulationsprogramm wird im Anhang 7.6 näher erläutert. Die für eine dipolare Kopplungskonstante von $D_{\text{res}}^{15\text{N}-1\text{H}} = 10,8 \text{ kHz}$ simulierte Kurve beschreibt die gemessenen Daten in Abbildung 3.18 am besten. Die simulierte Kurve wurde mit einer exponentiellen Funktion multipliziert, um den Signalabfall, der durch T_2 -Relaxation entsteht, zu berücksichtigen. Dies führt zum asymmetrischen Verlauf der Kurvenanpassung.

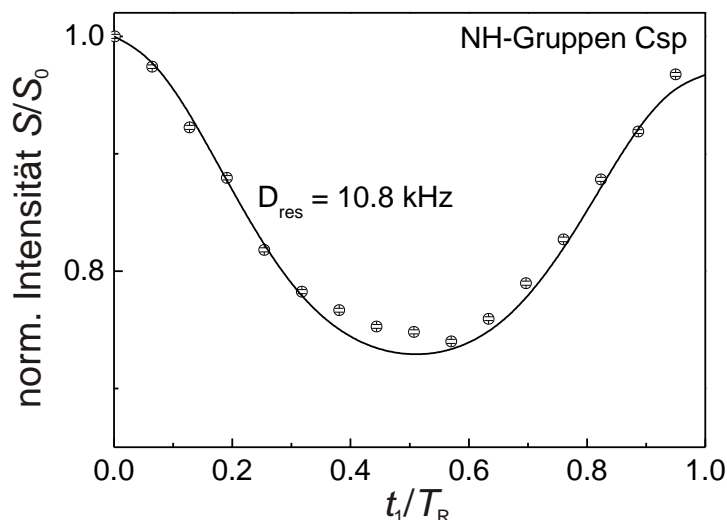


Abbildung 3.18 Modulation der Intensität der NH-Gruppen im Protein Csp, gemessen mit dem DIPSHIFT-Experiment. Die Linie zeigt den simulierten Intensitätsverlauf für eine dipolare Restkopplung von $D_{\text{res}} = 10,8 \text{ kHz}$.

3.3.2 Experimente zur Untersuchung von molekularen Bewegungen mit Korrelationszeiten im ms- bis s-Bereich

Mit Hilfe von Austauschexperimenten können molekulare Bewegungen mit Korrelationszeiten im ms- bis s-Bereich charakterisiert werden. 1D- und 2D-Austauschexperimente liefern sowohl Informationen über die Korrelationszeit der Bewegung als auch über deren Geometrie [48]. Die Grundlage dieser Experimente ist die Anisotropie der chemischen Verschiebung σ_{aniso} (siehe Abschnitt 2.2). Diese ist mit der Orientierung der chemischen Gruppe, in der sich der betrachtete Kernspin befindet, zum äußeren Magnetfeld fest verknüpft. Das heißt, die Frequenz der chemischen Verschiebung ω_{CS} des Kernspins ist eine Sonde für die Orientierung der chemischen Gruppe zum äußeren Magnetfeld, wenn der anisotrope Teil der chemischen Verschiebung im Experiment berücksichtigt wird. Mit Hilfe von ω_{CS} kann daher die molekulare Bewegung untersucht werden. In dieser Arbeit wurde das CODEX-Experiment benutzt [120, 121]. Es ist ein 1D-Experiment, das unter schneller Probenrotation (MAS, siehe Abschnitt 2.2) durchgeführt wird. Dadurch können hochaufgelöste Spektren genutzt werden.

Durch die Probenrotation wird allerdings der anisotrope Anteil der chemischen Verschiebung ausgemittelt ($\sigma_{\text{aniso}} = 0$) und muss durch eine spezielle Abfolge von Pulsen wieder eingeführt werden. Dieser Vorgang wird Wiedereinkopplung der Anisotropie der chemischen Verschiebung genannt.

In der Abbildung 3.19 ist die CODEX-Sequenz abgebildet. Nach der Anregung des Spinsystems durch eine CP-Sequenz entwickelt sich die Magnetisierung während des Dephasierungsblockes unter der Wirkung der anisotropen chemischen Verschiebung (CSA). Während der Mischzeit wird die Magnetisierung in z-Richtung gespeichert, um Signalverluste durch Relaxationsprozesse zu minimieren. In der Mischzeit können molekulare Bewegungen stattfinden. Im anschließenden Rephasierungsblock entwickelt sich die Magnetisierung erneut unter der Wirkung der CSA. Ist die CSA vor und nach der Mischzeit die gleiche, wird die maximale Signalintensität gemessen. Hat sich die CSA jedoch aufgrund molekularer Bewegungen verändert, ist die Signalintensität verringert. Die Änderung der Frequenz der chemischen Verschiebung ω_{CS} ist in der Abbildung am Beispiel des Zweiplatzsprunges des Moleküls Dimethylsulfon (DMS) illustriert [122]. Dafür wird das Signal des ^{13}C -Kernspins in der CH_3 -Gruppe betrachtet. Innerhalb des Dephasierungsblockes hat die chemische Gruppe eine Orientierung zum äußeren Magnetfeld, der die Frequenz ω_{CS}^i entspricht. Während der Mischzeit findet ein Sprung statt und die CH_3 -Gruppe nimmt während des Rephasierungsblockes eine andere Orientierung zum äußeren Magnetfeld ein. Dieser Orientierung entspricht die Frequenz ω_{CS}^j . Die Änderung der Frequenz führt zu einem Intensitätsverlust des aufgenommenen Signals. Da die Frequenz der chemischen Verschiebung unter MAS zusätzlich von der Probenrotation abhängt, muss die gesamte Sequenz rotationssynchronisiert durchgeführt werden [48].

Das CODEX-Experiment kann in Abhängigkeit von der Länge der Mischzeit oder der Länge der Wiedereinkopplung der CSA durchgeführt werden. Die Modulation der Signalintensität gibt entsprechend Aufschluss über die Korrelationszeit oder die Geometrie der Bewegung. Die Wiedereinkopplung der CSA erfolgt über eine rotorsynchronisierte Abfolge von (π) -Pulsen. Die Länge der Wiedereinkopplung wird mit der Größe NT_{R} angegeben, wobei N die Anzahl an (π) -Pulsen vor und nach der Mischzeit angibt und T_{R} die Rotationsperiode. NT_{R} ist damit eine Größe der Zeit. Die Wiedereinkopplung der CSA über (π) -Pulse wird im Abschnitt 7.7 näher erläutert.

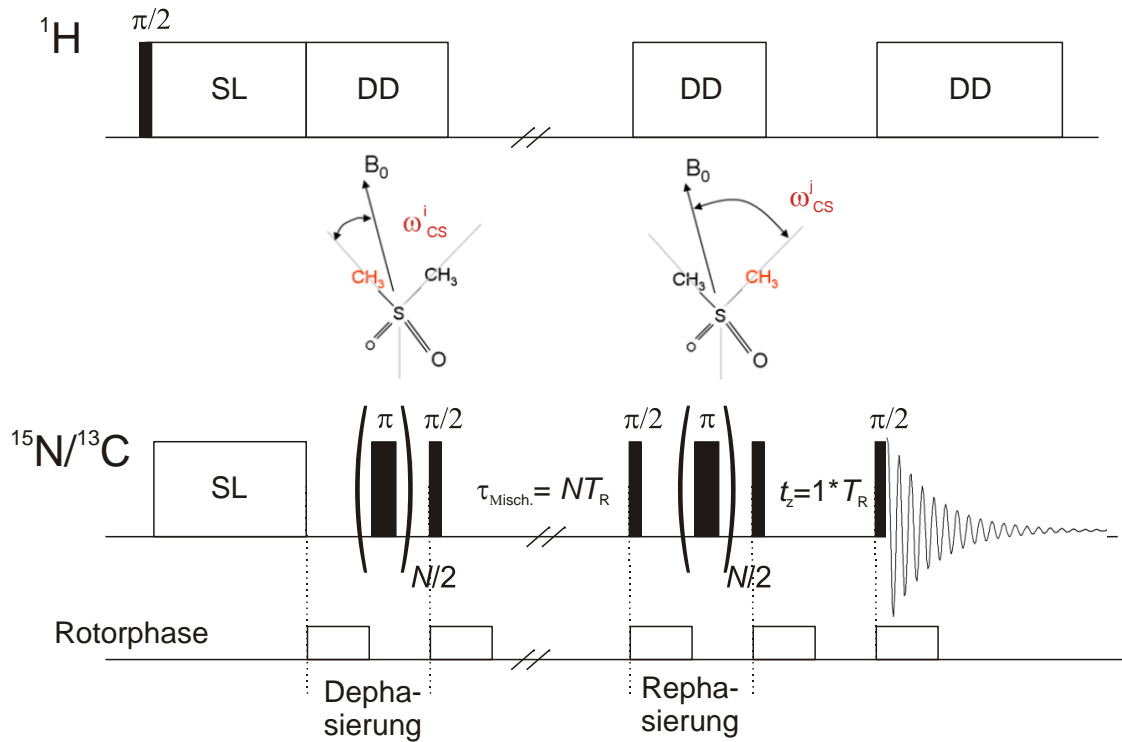


Abbildung 3.19 Schematische Darstellung des CODEX-Experimentes. Zusätzlich ist das DMS (Dimethylsulfon)-Molekül, als Beispiel für ein Molekül mit einem Zweiplatzsprung, eingezeichnet. Es verdeutlicht die Änderung der Frequenz der chemischen Verschiebung ω_{CS} , in Abhängigkeit von der Orientierung der CH_3 -Gruppe zum äußeren Magnetfeld. Unten ist die Rotorsynchronisation der Sequenz zu erkennen.

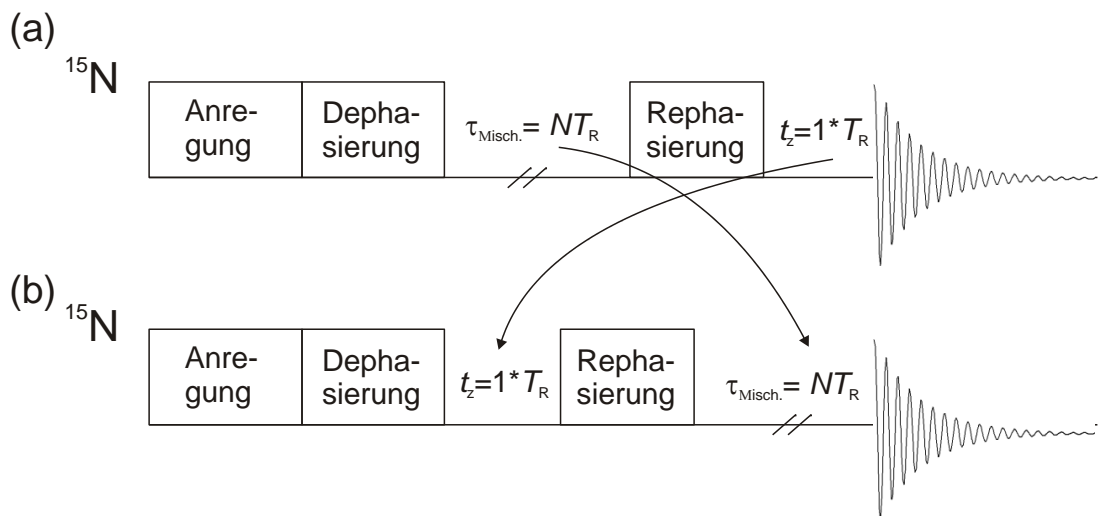


Abbildung 3.20 Im Normalisierungsexperiment (b) werden die Zeiten der Mischzeit $\tau_{\text{Misch.}}$ und des z-Filters t_z des Austauschexperimentes (a) miteinander vertauscht.

Das Signal des CODEX-Experimentes

$$S(\tau_{\text{Misch.}}, NT_R) \sim \sum_{ij} \underbrace{P_{ij}(\tau_{\text{Misch.}})}_{\text{Mischzeit-abhängigkeit}} \underbrace{\langle D^{ij}(NT_R) \rangle}_{\text{Wiedereinkopplung CSA}}_{\alpha, \beta, \gamma} \quad (3.20)$$

ist proportional zu einem Term, der die Mischzeitabhangigkeit des Signals beschreibt und einem Term, der die Abhängigkeit der Signalintensität von der Länge der Wiedereinkopplung der CSA (NT_R -Abhängigkeit) beschreibt [121]. P_{ij} ist der Anteil an Kernspins, die sich vor der Mischzeit $\tau_{\text{Misch.}}$ in einem Zustand i befinden. Das heißt, die chemische Gruppe, in der sich der Kernspin befindet, nimmt eine Orientierung zum äußeren Magnetfeld ein, der die Frequenz der chemischen Verschiebung ω_{CS}^i entspricht. Nach der Mischzeit befinden sich diese Kernspins im Zustand j . Entsprechend wird dieser durch die Frequenz ω_{CS}^j repräsentiert. Es wird über alle möglichen Zustände i und j , die von den chemischen Gruppen eingenommen werden können, summiert. Da beide Terme in Gleichung (3.20) multiplikativ miteinander verbunden sind, kann die Mischzeitabhangigkeit getrennt von der NT_R -Abhängigkeit gemessen werden. Eine vollständige Erläuterung der Theorie des CODEX-Experimentes ist in [121] zu finden.

Da in dieser Arbeit ausschließlich Mischzeitabhangigkeiten gemessen wurden, wird im Folgenden auf die Messung und Analyse dieser Daten eingegangen. Für einen konstanten Wert von NT_R wird das CODEX-Experiment in Abhängigkeit von der Mischzeit durchgeführt. Die Länge der Wiedereinkopplung der CSA wird dafür so gewählt, dass eine hinreichend große Wiedereinkopplung der CSA möglich ist. Das Signal im Austauschexperiment lässt sich mit der Gleichung

$$S(\tau_{\text{Misch.}}, t_z) = \underbrace{\left\{ (1-a) + ae^{\left(\frac{-\tau_{\text{Misch.}}}{\tau_c} \right)^\beta} \right\}}_{\text{molekulare Bewegung}} \underbrace{e^{\left(\frac{-\tau_{\text{Misch.}}}{t_{\text{SD}}} \right)^{\beta_1}}}_{\text{Spindiffusion}} \underbrace{e^{\left(\frac{-\tau_{\text{Misch.}} + t_z}{T_1} \right)}}_{T_1\text{-Relaxation}} \underbrace{e^{\left(\frac{-NT_R}{T_2} \right)}}_{T_2\text{-Relaxation}} \quad (3.21)$$

beschreiben. Die Intensität des Signals wird durch vier Komponenten bestimmt: Einen Anteil durch molekulare Bewegung, einen Anteil durch Spindiffusion, einen Anteil durch T_1 -Relaxation und einen Anteil durch T_2 -Relaxation. Die Modulation der Signalintensität, die durch molekulare Bewegungen verursacht wird, kann analytisch durch eine KWW-Funktion [107] beschrieben werden. Diese Funktion berücksichtigt, dass im Allgemeinen eine Verteilung von Korrelationszeiten zu erwarten ist. Dieser Teil des Signals enthält die gewünschten Informationen über die Korrelationszeit der molekularen Bewegung. Gleichung (3.21) zeigt, dass die Modulation der Signalintensität ebenfalls durch Spindiffusion und Relaxation beeinflusst wird. Um den Beitrag der T_1 -Relaxation zu eliminieren, wird der z-Filter vor der Datenaufnahme genutzt. In der Pulssequenz werden $\tau_{\text{Misch.}}$ und t_z vertauscht und das Experiment unter ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt. Dieses Experiment wird Normalisierungsexperiment genannt. Austausch- und Normalisierungsexperiment sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Die Mischzeit des Normalisierungsexperimentes ist zu kurz für

molekulare Bewegungen, somit werden diese nicht detektiert. Aufgrund des z-Filters wirkt im Austausch- und Normalisierungsexperiment die T_1 -Relaxation jedoch über den gleichen Zeitraum. Teilt man das Signal des Austauschexperimentes $S(\tau_{\text{Misch.}}, t_z)$ durch das Signal des Normalisierungsexperimentes $S_0(\tau_{\text{Misch.}}, t_z)$

$$S_0(\tau_{\text{Misch.}}, t_z) = e^{\left(-\frac{\tau_{\text{Misch.}} + t_z}{T_1}\right)} e^{\left(-\frac{NT_R}{T_2}\right)}$$

$$\frac{S(\tau_{\text{Misch.}}, t_z)}{S_0(\tau_{\text{Misch.}}, t_z)} = \left\{ (1-a) + ae^{\left(-\frac{\tau_{\text{Misch.}}}{\tau_c}\right)^\beta} \right\} e^{\left(-\frac{\tau_{\text{Misch.}}}{t_{SD}}\right)^\beta}, \quad (3.22)$$

wird der Signalabfall nur noch durch die molekulare Bewegung und den Beitrag der Spindiffusion verursacht. Der Anteil der T_2 -Relaxation im Normalisierungsexperiment ist gleich der T_2 -Relaxation im Austauschexperiment und wird daher durch das beschriebene Vorgehen ebenfalls eliminiert.

Die Spindiffusion wird durch dipolare Wechselwirkungen der Kernspins verursacht und enthält keine Informationen über die dynamischen Eigenschaften der untersuchten Substanzen. Sie wird mit der Spindiffusionszeit t_{SD} beschrieben, die im Allgemeinen eine Verteilung aufweist, die nicht der Verteilung der Korrelationszeiten der molekularen Bewegung τ_c entspricht. Die Spindiffusion ist im Gegensatz zur molekularen Bewegung weitgehend unabhängig von der Temperatur der Probe [123, 124]. Die einzelnen Komponenten können demnach durch temperaturabhängige Experimente separiert werden. In Abbildung 3.21 ist der Verlauf der Mischzeitabhängigkeit der CH_3 -Gruppen des DMS-Moleküls dargestellt. Die Daten wurden mit der Gleichung (3.22) ohne Spindiffusionsterm angepasst.

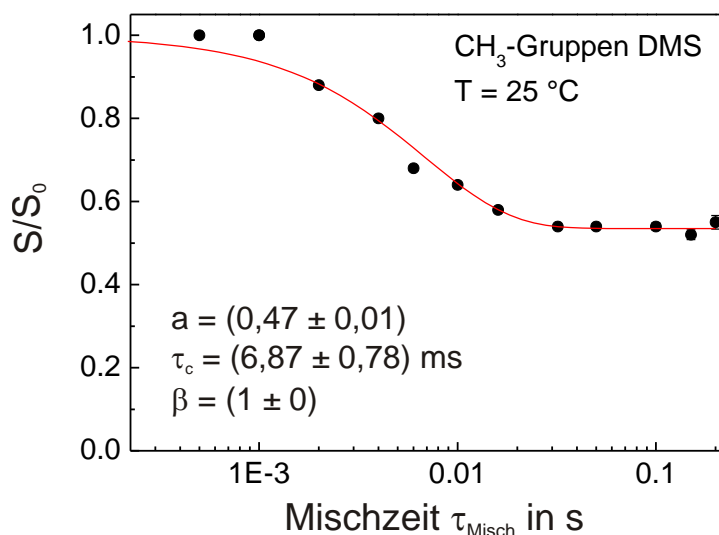


Abbildung 3.21 Mischzeitabhängigkeit des CODEX-Experimentes der CH_3 -Gruppen des DMS-Moleküls. Gemessen mit $\nu_r = 3 \text{ kHz}$ und $NT_R = 2 \text{ ms}$. Die Daten wurden mit der Gleichung (3.22) ohne einen Spindiffusionsbeitrag angepasst.

3.3.3 Probenpräparation

Csp wurde in einer NH_4HCO_3 Pufferlösung mit einer Konzentration von 20-30 g/l aufgelöst und anschließend 24 h lyophilisiert, um die reine Csp-Pulverprobe herzustellen. Für die Herstellung der Pulverprobe des Lysozyms wurde das Protein in destilliertem Wasser aufgelöst und anschließend ebenfalls lyophilisiert. Für die Csp/Trehalosemischung wurden 20 Gew.% Csp und 80 Gew.% Trehalose aufgelöst und lyophilisiert. Die Proben wurden anschließend in 4 mm MAS Rotoren gefüllt und bei Raumtemperatur über Nacht im Vakuum gelagert, um das restliche in den Proben verbliebene Wasser zu minimieren. Auf diese Weise können jedoch Wassermoleküle, die durch die Proteinstruktur gefangen sind, nicht entfernt werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass ein geringer Anteil von ~1 Gew.% oder weniger von Wassermolekülen in der Probe verbleibt [125]. Die Rotoren wurden unmittelbar nach diesem Prozess verschlossen.

Um den Wassergehalt der Proben zu verändern, wurden die Proben bei geöffnetem Rotor mit einem Fläschchen Wasser in einen Exsikkator gestellt und dieser wurde evakuiert. Der gewünschte Wassergehalt wurde durch die Zeit im Vakuum gesteuert. Durch das Wiegen der Probe vor und nach dieser Prozedur wurde der Wassergehalt bestimmt. Über Nacht wurden die geschlossenen Rotoren bei Raumtemperatur aufbewahrt, damit sich die Proben für die Experimente im Gleichgewicht befinden. Zuerst wurde versucht, den Wassergehalt der Csp/Trehalosemischung ebenfalls auf die beschriebene Weise zu erhöhen. Aufgrund der kleinen Kontaktfläche der Csp/Trehalose Mischung im Rotor mit dem Wasserdampf kam es jedoch an der Oberfläche der Probe lokal zu einem hohen Wassergehalt. Infolgedessen konnte

eine teilweise Kristallisation der Trehalose beobachtet werden. Dies kann, wie im Abschnitt 5.1 gezeigt, in den ^{13}C -Spektren der Proben direkt nachgewiesen werden. Die in der Arbeit untersuchte Probe mit ~4 Gew.% Wasser wurde daher in einem Eppendorfgesäß anstatt im Rotor hydratisiert. Im Eppendorfgesäß ist die Oberfläche der Probe, die dem Wasserdampf ausgesetzt ist, deutlich größer im Vergleich zur Probe im Rotor. Dadurch wird eine lokale hohe Wasserkonzentration, die zur Kristallisation der Trehalose führt, vermieden.

4 Struktureller Aufbau von Lysozym/Saccharidlösungen

In diesem Kapitel wird untersucht, unter welchen experimentellen Bedingungen eine Anlagerung von Saccharidmolekülen an das Protein Lysozym beobachtet werden kann. Die Anlagerung wird in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung, der Konzentration der gelösten Teilchen und der Art des verwendeten Saccharides untersucht. Die Experimente werden sowohl mit dem Monosaccharid Glucose als auch mit den Disacchariden Trehalose, Saccharose und Maltose durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Kontext der veröffentlichten Studien betrachtet. Da für den Großteil der Arbeiten das Protein Lysozym genutzt wurde, wird dieses auch in dieser Arbeit benutzt. Somit ist ein umfangreicher Vergleich der Ergebnisse möglich. In wässriger Lösung sind Proteine von Wassermolekülen umgeben, die eine Hydrathülle um das Protein bilden. Die Wassermoleküle innerhalb dieser Hülle werden mehr oder weniger stark thermodynamisch vom Protein beeinflusst [126, 127]. Die Größe des Proteins wird mit Hilfe des hydrodynamischen Radius R_h angegeben. Lagern sich Saccharidmoleküle am Protein an, wird sich dessen hydrodynamischer Radius vergrößern. Der hydrodynamische Radius ist über den Selbstdiffusionskoeffizienten des betrachteten Teilchens zugänglich (siehe Abschnitt 3.2), welcher in dieser Arbeit mit Hilfe der PFG-NMR (Abschnitt 3.2.2) gemessen wird.

Es werden das binäre System Saccharid/Wasser (Abschnitt 4.1) und das ternäre System Lysozym/Saccharid/Wasser (Abschnitt 4.2) untersucht, um die folgenden Fragen zu beleuchten:

- Lagern sich Saccharidmoleküle am Lysozym an? Von welchen Bedingungen hängt dieser Prozess ab?
- Ist der Anlagerungsprozess abhängig von der Art des Saccharides?
- Wie passen die hier vorgestellten Ergebnisse zu den veröffentlichten Studien?

In der Zusammenfassung zu diesem Kapitel werden die oben gestellten Fragen auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit beantwortet.

4.1 Binäres System: Saccharide in wässriger Lösung

Wässrige Saccharidlösungen sind schon lange Gegenstand vielfältiger Untersuchungen. Lichtstreuexperimente [128, 129, 130, 131], Molekulardynamik (MD)-Simulationen [132, 133, 134, 135], PFG-NMR-Experimente [128, 136, 137, 138] und NMR-Relaxationsexperimente [88] zeigen, dass bei verdünnten Lösungen mit niedriger Saccharidkonzentration die Saccharidmoleküle als Monomere vorliegen. Mit zunehmender Konzentration werden dagegen Aggregationsprozesse der Saccharide beobachtet [88, 134], dies konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten bestätigt werden. In Abbildung 4.1 ist der hydrodynamische Radius von Trehalose, Maltose und Saccharose in D_2O -Lösung in

Abhängigkeit von der Konzentration der Saccharide dargestellt. Der hydrodynamische Radius beträgt für alle untersuchten Disaccharide in D₂O-Lösung bei einer Konzentration von $c_{\text{Saccharid}} = 50 \text{ mM}$ $R_h^{\text{Saccharid}} \sim (4,7 \pm 0,2) \text{ \AA}$. Dieser Wert stimmt mit bereits veröffentlichten Daten, zum Beispiel für Saccharose $R_h^{\text{Saccharose}} \sim (4,6 \pm 0,1) \text{ \AA}$ in D₂O überein [138]. Der hydrodynamische Radius der untersuchten Saccharide zeigt für alle Substanzen das gleiche Verhalten. Das heißt, er bleibt zunächst konstant bis zu einer Saccharidkonzentration von $\sim 600 \text{ mM}$ und steigt anschließend für höhere Konzentrationen um $\sim 13 \%$ an.

Saccharide sind in wässriger Lösung von einer Hydrathülle umgeben und die intrinsischen Wechselwirkungen der Saccharide mit den Wassermolekülen bestimmen deren Konformation. Die Größe dieser Hülle wird in der Literatur, je nach verwendeter experimenteller Methode, zum Beispiel für Trehalose verschieden beschrieben. Viele Untersuchungen zeigen, dass ein Trehalosemolekül mit 16 - 18 Wassermolekülen des umgebenden Wassers wechselwirkt. Diese Wassermoleküle bilden die Hydrathülle um das Trehalosemolekül [88, 135, 136, 139]. Einige Untersuchungen beschreiben eine langreichweitigere Wechselwirkung der Trehalosemoleküle, wobei sich die Hydrathülle auf bis zu 123 Wassermoleküle in der Umgebung des Saccharides erstreckt [140, 141]. Heugen *et al.* haben gezeigt, dass die Wassermoleküle in der Hydrathülle innerhalb von 10 – 100 ps Moleküle mit dem umgebenden freien Wasser austauschen [140]. Die Wechselwirkung zwischen den Wassermolekülen der Hydrathülle und den Trehalosemolekülen ist demnach transients Natur.

Steigt die Konzentration der Saccharide in der wässrigen Lösung an, beginnen sich die Hydrathüllen der Saccharidmoleküle aufgrund der räumlichen Nähe zu überschneiden [130, 135]. Die Wassermoleküle der Hydrathülle eines Saccharidmoleküls wechselwirken in diesem Fall auch mit anderen Saccharidmolekülen in der Umgebung. Erhöht sich die Konzentration weiter, bilden sich intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Saccharidmolekülen aus. Die Anzahl dieser transienten Saccharid-Saccharid Wasserstoffbrückenbindungen nimmt mit steigender Konzentration der Saccharide zu [88, 132, 134, 135]. Ein Überlappen der Hydrathüllen bzw. die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Saccharidmolekülen erklärt die Vergrößerung des hydrodynamischen Radius der Saccharidmoleküle, die in Abbildung 4.1 beobachtet wird. Eine schematische Darstellung der Überlappung der Hydrathüllen einzelner Saccharidmoleküle sowie die Ausbildung von Saccharid-Saccharid Wasserstoffbrückenbindungen mit steigender Konzentration von Saccharid in Lösung ist in Abbildung 4.1 gezeigt.

Winther *et al.* und Sapir *et al.* beobachteten mit Hilfe von MD-Simulationen Aggregationsprozesse bzw. die Ausbildung von Clusterstrukturen von Trehalosemolekülen bereits ab einer Konzentration von 250 mM [88, 134]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Diffusionsexperimente zeigen einen Anstieg des hydrodynamischen Radius und damit einen Aggregationsprozess ab einer Konzentration von 600 mM für Saccharose und Maltose und ab 800 mM für Trehalose (siehe Abbildung 4.1). Dass der Anstieg des hydrodynamischen Radius im Vergleich zu den Literaturwerten erst bei größeren Konzentrationen beobachtet

wird, kann damit erklärt werden, dass im NMR-Experiment ein mittlerer Diffusionskoeffizient aller Saccharidmoleküle in der Probe gemessen wird. Es tragen sowohl Monomere als auch Di- und Oligomere der Saccharide zum gemessenen Signal bei. Sapir *et al.* haben mit MD-Simulationen gezeigt, dass bei einer Konzentration von 200 mM Trehalose 25 % der Trehalosemoleküle in der Probe in Aggregaten vorliegen, während bei einer Konzentration von 600 mM bereits 50 % aller Moleküle Aggregate bilden [134]. Das heißt, der Anteil an Aggregaten zum Diffusionssignal nimmt mit steigender Konzentration erheblich zu.

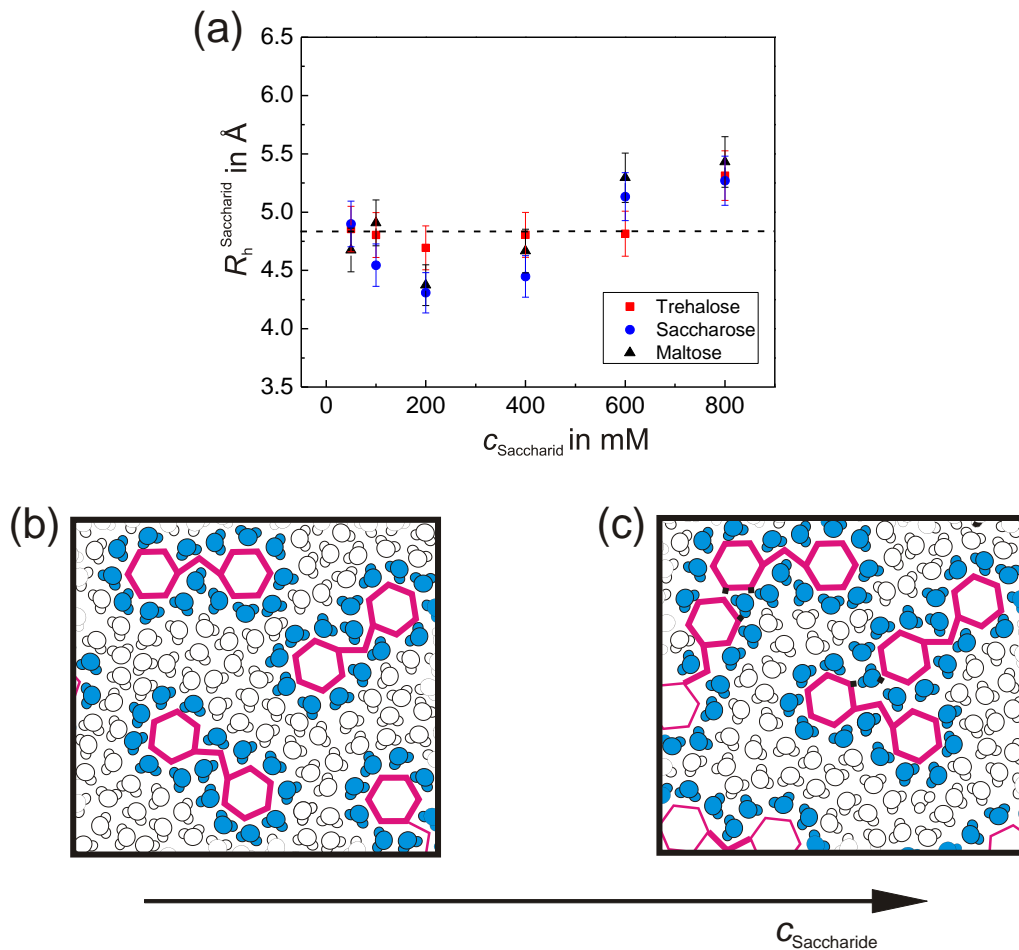


Abbildung 4.1 (a) Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius von Trehalose, Maltose und Saccharose von der Konzentration in wässriger Lösung ($\text{pH}^{\text{D}} = 6$, $T = 298 \text{ K}$). Die Schemazeichnungen (b) und (c) verdeutlichen, wie es mit steigender Konzentration von Saccharidmolekülen (pink) aufgrund der räumlichen Nähe zur Überlappung der Hydrathüllen (dunkelblau) kommt. Bei hohen Konzentrationen (c) werden auch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Saccharidmolekülen ausgebildet. Die D_2O -Moleküle, die nicht an der Hydrathülle beteiligt sind und sich frei bewegen können, sind weiß dargestellt.

4.2 Ternäres System: Protein in wässriger Lösung mit Sacchariden

Die Struktur von Protein/Saccharidlösungen wurde bereits mit vielfältigen experimentellen Methoden untersucht. Untersuchungen zur Hydrathülle liefern dabei unterschiedliche Ergebnisse über den Aufbau und die Wechselwirkungen mit den Proteinen. In einem Teil der Arbeiten wird die Schlussfolgerung gezogen, dass die Hydrathülle ausschließlich aus Wassermolekülen besteht und die Saccharidmoleküle von dieser ausgeschlossen sind [19, 26, 27, 34, 35, 36, 37, 38, 39]. Andererseits beschreiben aber auch zahlreiche Studien ein gegensätzliches Bild. Sie zeigen, dass die Saccharidmoleküle in die Hydrathülle des Proteins eindringen [30, 31, 32, 33]. Eine Ursache für das widersprüchliche Bild kann die Tatsache sein, dass alle genannten Studien unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Temperatur, Art des Proteins/Saccharides, pH-Wert der Lösung, Konzentration der Makromoleküle in der Lösung) durchgeführt wurden. In dieser Arbeit wird daher eine systematische Untersuchung des hydrodynamischen Radius von Lysozym R_h^{Lysozym} in Abhängigkeit von verschiedenen experimentellen Parametern, wie

- dem Typ des gelösten Saccharides
- dem pH-Wert der Lösung
- der Konzentration von Protein und Saccharid in der Lösung

durchgeführt. Die Ergebnisse können das vorhandene kontroverse Bild komplettieren und Aufschluss über die Zusammensetzung der Hydrathülle des Lysozyms unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen geben. Im Folgenden werden die Resultate gegliedert nach den experimentellen Parametern dargelegt.

Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung. Keine der eingangs erwähnten Studien untersucht das Aggregationsverhalten von Lysozym und Saccharid in Abhängigkeit vom pH-Wert. Ein Einfluss des pH-Wertes wird erwartet, da der pH-Wert der Lösung die Oberflächenladung des Proteins ändert. Dadurch werden die Wechselwirkungen mit anderen Teilchen in der Lösung, zum Beispiel mit Sacchariden ebenfalls beeinflusst. Am Beispiel einer Lysozymlösung heißt das, dass die Proteinoberfläche bei niedrigen pH-Werten positiv geladen ist. Dadurch ist die elektrostatische Abstoßung sehr groß und die Proteine liegen gut separiert in der Lösung vor. Mit steigendem pH-Wert der Lösung wird die Oberflächenladung des Lysozyms zunehmend neutralisiert. Am sogenannten isoelektrischen Punkt (pI) ist die Oberflächenladung eines Proteins per Definition neutral. Lysozym hat einen isoelektrischen Punkt von $\text{pH} \approx 11$ [49]. Im Bereich dieses pH-Wertes kommt es zu attraktiven Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und ein Selbstaggregationsprozess wird begünstigt [75, 80, 81].

Der Einfluss des pH-Wertes und damit der Oberflächenladung des Lysozym auf die Zusammensetzung der Hydrathülle des Proteins wurde in dieser Arbeit untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben. Der hydrodynamische Radius von Lysozym R_h^{Lysozym} wurde in einer Lösung mit 1,3 mM Lysozym in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt. Dazu wurde ein konstantes Verhältnis von $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}} = 600$ gewählt. In

Abbildung 4.2 sind die Graphen für Lysozym in Lösung mit Trehalose und Saccharose dargestellt. Es ist zu erkennen, dass für pH^{D} -Werte größer 7 (Trehalose (■)) beziehungsweise 6 (Saccharose (●)) $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ in der Lösung mit Saccharid dem $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ in wässriger Lösung (▲) entspricht. Das heißt, unter diesen Bedingungen findet keine Aggregation von Saccharid und Lysozym statt und an der Proteinoberfläche befinden sich bevorzugt Wassermoleküle. Für kleinere pH^{D} -Werte steigt $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ in beiden Saccharidlösungen an. Das bedeutet, dass sich Saccharidmoleküle an der Oberfläche des Proteins anlagern und damit den hydrodynamischen Radius von Lysozym vergrößern. Die Ergebnisse zeigen, dass es zu weniger Wechselwirkungen zwischen Lysozym und Saccharidmolekülen kommt, je neutraler die Oberfläche des Lysozyms geladen ist. Die unterschiedlichen beschriebenen Szenarien sind mit Schemazeichnungen in Abbildung 4.2 illustriert. Die Zeichnungen stellen die Proteinoberfläche sowie die Hydrathülle des Proteins und die umgebende Lösung dar. Bei hohen pH-Werten besteht die Hydrathülle des Proteins aus Wassermolekülen (dunkelblau) und die Saccharidmoleküle (pink) befinden sich in der umgebenden Lösung mit freiem Wasser (weiß). Sinkt der pH-Wert, dringen Saccharidmoleküle in die Hydrathülle ein. Die beiden untersuchten Saccharide Trehalose und Saccharose zeigen ein unterschiedliches Verhalten in Abhängigkeit vom pH-Wert. Trehalosemoleküle dringen bei höheren pH-Werten in die Hydrathülle des Lysozym ein als Saccharosemoleküle. Dies führt für die Lysozym/Trehaloselösung bei gleichem pH-Wert zu einem größeren $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ im Vergleich zur Lysozym/Saccharoselösung.

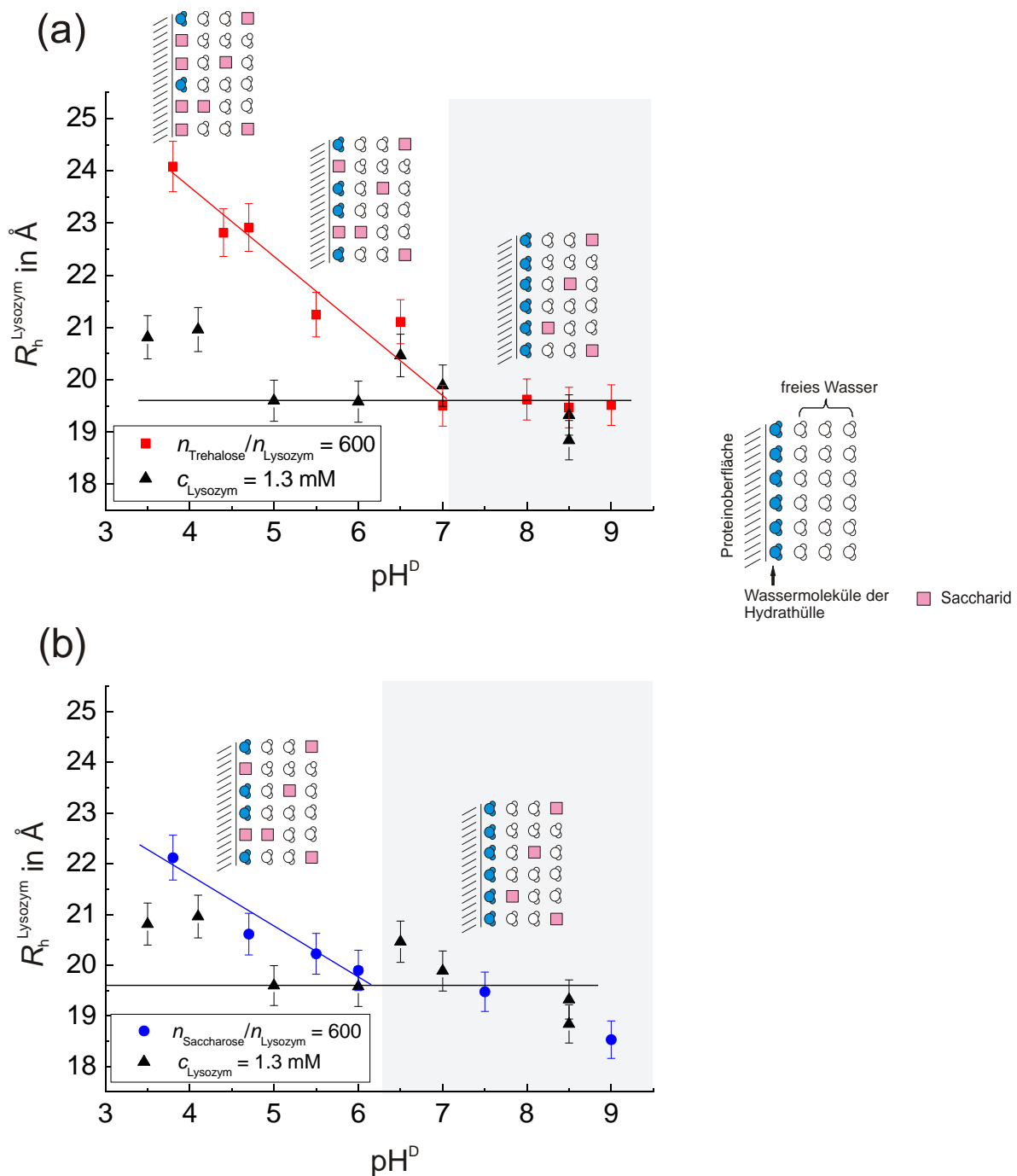


Abbildung 4.2 Der hydrodynamische Radius von Lysozym in wässriger Lösung, (a) Trehalose- und (b) Saccharoselösung mit $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}} = 600$ in Abhängigkeit vom pH^D -Wert, gemessen bei $T = 298 \text{ K}$. Die Zeichnungen zeigen die Moleküle, die sich an der Oberfläche des Proteins befinden. Während sich bei $\text{pH}^D > 7$ (Trehalose) bzw. $\text{pH}^D > 6$ (Saccharose) bevorzugt Wassermoleküle an der Proteinoberfläche befinden, lagern sich bei niedrigeren pH^D -Werten vermehrt Saccharidmoleküle an der Oberfläche des Proteins an (Darstellung nach [126]).

Zusammenfassend wird festgestellt, dass die Zusammensetzung der Hydrathülle des Lysozyms vom pH-Wert der Lösung abhängt. Saccharidmoleküle dringen bei niedrigen pH^{D} -Werten ($\text{pH}^{\text{D}} < 6$) in die Hydrathülle des Lysozyms ein, während sie für größere pH^{D} -Werte von der Hydrathülle ausgeschlossen sind.

Abhängigkeit vom Saccharidtyp. Bereits die Untersuchung des hydrodynamischen Radius des Lysozyms in Abhängigkeit vom pH-Wert der Saccharid/Lysozymbilösung hat gezeigt, dass der $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ vom Typ des gelösten Saccharides abhängt. In Abbildung 4.3 ist der hydrodynamische Radius des Lysozyms in Abhängigkeit vom Teilchenverhältnis der Saccharide zum Lysozym dargestellt. Alle untersuchten Lösungen haben eine Lysozymkonzentration von 1,3 mM und die Konzentration der Saccharidmoleküle wird schrittweise erhöht, um das Teilchenverhältnis $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}}$ zu erhöhen. Es wurde das Verhalten des hydrodynamischen Radius von Lysozym in Lösung mit den Disacchariden Trehalose, Saccharose und Maltose, sowie dem Monosaccharid Glucose analysiert. Der pH-Wert aller Lösungen betrug $\text{pH}^{\text{D}} = 3,8$. Zuerst wird der Einfluss der Disaccharide auf $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ beschrieben. Der hydrodynamische Radius des Lysozyms zeigt in Abhängigkeit von der Disaccharidkonzentration für alle untersuchten Disaccharide prinzipiell das gleiche Verhalten. Bei einer niedrigen Konzentration der Disaccharide entspricht $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ in der Disaccharidlösung dem hydrodynamischen Radius von Lysozym in wässriger Lösung. Mit zunehmender Konzentration der Disaccharide in der Lösung wird auch $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ größer. Bei der größten untersuchten Disaccharidkonzentration ist für alle untersuchten Disaccharide ein Anstieg des $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ um 30 % im Vergleich zur wässrigen Lösung zu erkennen. Die Konzentration, ab der eine Änderung von $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ einsetzt, hängt vom Disaccharid in der Lösung ab. Während für Trehalose und Maltose ein Anstieg bei $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}} \sim 100$ beginnt, setzt dieser für die Lysozymbilösung mit Saccharose erst bei $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}} \sim 180$ ein.

Tabelle 3 Konzentrationen von Lysozym und Saccharid für die Messung des $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ in Abhängigkeit vom Teilchenverhältnis $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}}$.

c_{Lysozym} in mM	$c_{\text{Saccharid}}$ in mM	$n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}}$
1,3	0	0
1,3	50	39
1,3	100	77
1,3	200	154
1,3	400	308
1,3	500	385
1,3	600	462
1,3	800	615
1,3	900	692
1,3	1000	769

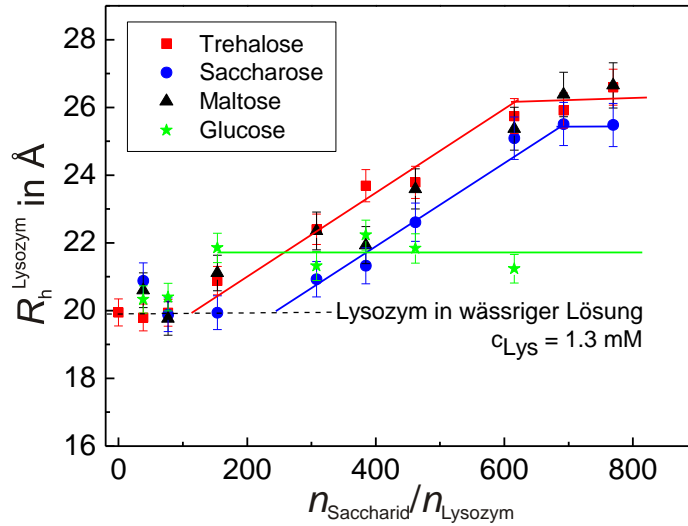


Abbildung 4.3 Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius des Lysozyms von der Anzahl an Saccharidmolekülen pro Lysozym für Trehalose, Saccharose, Maltose und Glucose. Alle Messungen wurden bei $T = 298 \text{ K}$ und $\text{pH}^{\text{D}} = 3,8$ durchgeführt.

Ab einem Teilchenverhältnis von $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}} \sim 600$ steigt der R_h^{Lysozym} nicht weiter an, sondern bleibt konstant. Nun wird der Einfluss des Monosaccharides Glucose im Vergleich zum Einfluss der Disaccharide auf den hydrodynamischen Radius von Lysozym betrachtet. R_h^{Lysozym} verhält sich in der Lösung mit Glucose qualitativ ähnlich, jedoch steigt der hydrodynamische Radius lediglich um 10 % im Vergleich zur wässrigen Lösung an. Das heißt, mit weiter ansteigender Konzentration von Saccharidmolekülen bleibt der hydrodynamische Radius von Lysozym in der Lösung mit Glucose unverändert. Die durchgeführten Diffusionsexperimente zeigen, dass mit zunehmender Konzentration von Saccharidmolekülen in der Lösung eine Anlagerung dieser an das Protein Lysozym stattfindet. Dadurch wird dessen hydrodynamischer Radius vergrößert. Dieser Anlagerungsprozess wird für alle untersuchten Typen von Saccharid beobachtet.

Das Teilchenverhältnis, bei dem der Anlagerungsprozess von Saccharidmolekülen an Lysozym gesättigt ist, ist für die Mono- und Disaccharide sehr unterschiedlich. Es könnte vermutet werden, dass der Anlagerungsprozess der Saccharide stagniert, sobald die Oberfläche des Proteins mit Saccharidmolekülen bedeckt ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, ist eine Überschlagsrechnung mit Hilfe der hydrodynamischen Radien der Saccharide und des Lysozyms hilfreich. Hierfür wird das Protein als Kugel mit einem Radius, der dem hydrodynamischen Radius in wässriger Lösung entspricht, betrachtet. Damit kann dessen Oberfläche abgeschätzt werden:

Oberfläche des Lysozyms:

$$R_h^{\text{Lysozym}} \sim 20 \text{ \AA} \quad (4.1)$$

$$\text{Kugelfläche } A_{\text{Lysozym}} = 4\pi(R_h^{\text{Lysozym}})^2 \sim 5026 \text{ \AA}^2 .$$

Um die Oberfläche des Lysozims zu bedecken, muss die maximale Fläche, die ein Saccharidmolekül auf dieser bedecken kann, abgeschätzt werden. Dafür wird die Ausdehnung der Saccharidmoleküle durch eine Kugel mit dem Radius $R_h^{\text{Saccharid}}$ beschrieben. Die maximale Fläche, die diese auf der Oberfläche des Lysozims einnehmen kann, wird mit der Querschnittsfläche durch den Kugelmittelpunkt genähert.

einfache Bedeckung mit Disaccharidmolekülen:

$$R_h^{\text{Disaccharid}} \sim 4,7 \text{ \AA}$$

$$\text{Kreisfläche } A_{\text{Disaccharid}} = \pi(R_h^{\text{Disaccharid}})^2 \sim 70 \text{ \AA}^2$$

$$\frac{5026 \text{ \AA}^2}{70 \text{ \AA}^2} \sim 72$$

(4.2)

einfache Bedeckung mit Monosaccharidmolekülen:

$$R_h^{\text{Glucose}} \sim 3,5 \text{ \AA}$$

$$\text{Kreisfläche } A_{\text{Glucose}} = \pi(R_h^{\text{Glucose}})^2 \sim 38 \text{ \AA}^2$$

$$\frac{5026 \text{ \AA}^2}{38 \text{ \AA}^2} \sim 132$$

Wie in der Abbildung 4.3 zu sehen ist, tritt für das Monosaccharid Glucose eine Sättigung des Anstiegs des R_h^{Lysozym} im Bereich von $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}} = 100 - 200$ ein. Dieses Teilchenverhältnis stimmt mit dem berechneten Verhältnis von Glucose zu Lysozym überein, bei der die Oberfläche des Lysozims einmal komplett mit Glucosemolekülen bedeckt ist. Das heißt, die Anlagerung von Glucose an Lysozym kommt nach der Ausbildung einer Schicht Glucosemoleküle um das Protein zum Stillstand. Da die Disaccharide einen größeren hydrodynamischen Radius besitzen, ist im Vergleich zum kleineren Monosaccharid Glucose ein geringeres Teilchenverhältnis notwendig ($n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}} \sim 72$), um die Oberfläche des Lysozims zu bedecken. Die Sättigung von R_h^{Lysozym} in der Lösung mit den Disacchariden muss bei einem geringeren $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}}$ im Vergleich zu Glucose eintreten, wenn nur die einfache Bedeckung der Oberfläche ausschlaggebend für den Anlagerungsprozess ist. Der hydrodynamische Radius von Lysozym steigt jedoch bis zu einem Teilchenverhältnis von $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}} \sim 600$ an. Das bedeutet, dass in Lösung mit den Disacchariden eine Anlagerung über die Bedeckung der Oberfläche des Lysozims hinaus stattfindet. In der Lösung mit Glucose hat das Saccharid nach der Bedeckung der Oberfläche des Lysozims dagegen keinen weiteren Einfluss auf das Protein.

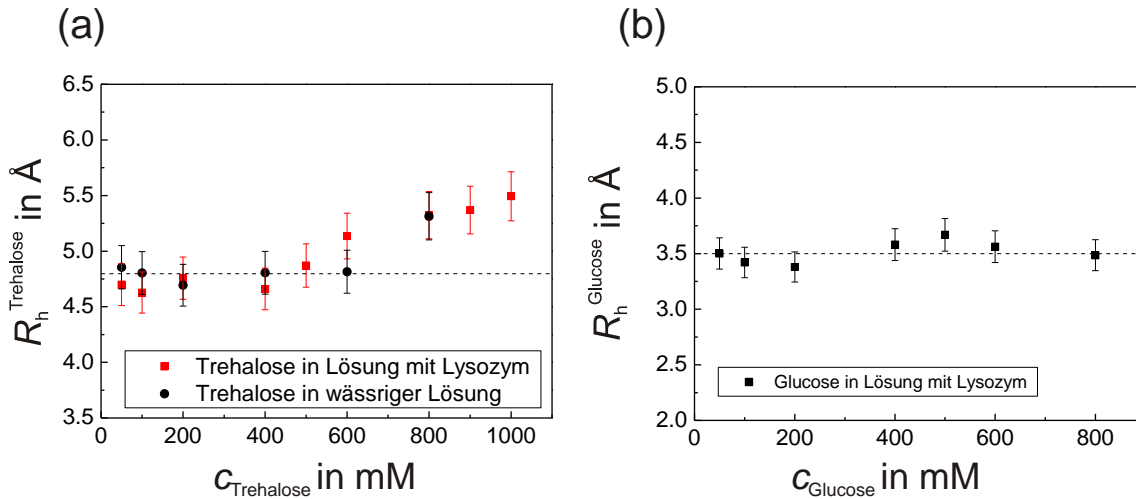


Abbildung 4.4 (a) Hydrodynamischer Radius von Trehalose in wässriger Lösung und in Lösung mit 1,3 mM Lysozym. (b) Hydrodynamischer Radius von Glucose in Lösung mit 1,3 mM Lysozym. Alle Messungen wurden bei $T = 298\text{ K}$ und $\text{pH}^{\text{D}} = 3,8$ durchgeführt.

Warum beeinflussen die Disaccharide das Protein über einen größeren Konzentrationsbereich als für eine einfache Bedeckung notwendig wäre, während das Monosaccharid Glucose diesen Effekt nicht zeigt? Dieses Ergebnis kann mit der Eigenschaft der Disaccharide, Aggregate zu bilden, erklärt werden. Mit steigender Konzentration der Disaccharide kommt es zu einem Überlappen der Hydrathüllen der einzelnen Saccharidmoleküle. Dies wurde in Abschnitt 4.1 anhand von Diffusionsexperimenten an Saccharid/Wassersystemen gezeigt. Bei weiter ansteigenden Konzentrationen kann es auch zur Ausbildung von Saccharid-Saccharid Wasserstoffbrückenbindungen kommen. Das heißt, es bilden sich Saccharidaggregate in der Lösung aus. In Abbildung 4.4 (a) ist der hydrodynamische Radius von Trehalose in wässriger Lösung mit Lysozym im Vergleich zu einer wässrigen Lösung aufgetragen. Der $R_h^{\text{Trehalose}}$ zeigt in beiden Lösungen den gleichen Verlauf. Das bedeutet, eine Aggregation der Disaccharidmoleküle findet nicht nur in wässriger Lösung statt, sondern auch in der Lösung mit Lysozym. Der hydrodynamische Radius von Trehalose wird hier als Beispiel gezeigt, die hydrodynamischen Radien von Saccharose und Maltose zeigen das gleiche Verhalten.

Dass sich der hydrodynamische Radius von Lysozym über die Konzentration, bei der eine einfache Bedeckung der Oberfläche gegeben ist, hinaus vergrößert, kann mit der Eigenschaft der Disaccharide, Aggregate zu bilden, erklärt werden. Ab einer bestimmten Konzentration von Disacchariden in der Lösung mit Lysozym dringen diese in die Hydrathülle des Proteins ein. Die Disaccharidmoleküle, die sich in der Hydrathülle befinden, bilden Aggregate mit den umgebenden Disacchariden aus. Diese Aggregate wirken sich auf die Diffusionsgeschwindigkeit des Proteins aus und verlangsamen diese. Aufgrund dessen wird die Diffusionskonstante des Lysozyms geringer und der hydrodynamische Radius steigt dadurch an. Eine Sättigung des Effektes, wie in den Daten beobachtet, tritt ein, wenn die Wechselwirkungen der Saccharide untereinander zu weit entfernt vom Protein stattfinden. Eine solche Bildung von Aggregaten ist für das Monosaccharid Glucose nicht bekannt [130,

131, 142, 143] und kann auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht Abbildung 4.4 (b), in welcher der hydrodynamische Radius von Glucose in Lösung mit Lysozym dargestellt ist. Der R_h^{Glucose} bleibt mit zunehmender Konzentration von Glucose konstant. Das heißt, es ist keine Aggregation der Glucosemoleküle zu beobachten. Die schematischen Darstellungen in Abbildung 4.5 geben eine modellhafte Vorstellung vom strukturellen Aufbau der Lösung, wenn keine Anlagerung von Saccharidmolekülen an der Oberfläche des Lysozym stattfindet (Abbildung 4.5 (a)), beziehungsweise wenn eine solche Anlagerung zu beobachten ist (Abbildung 4.5 (b)).

Wie bereits beschrieben, beginnt der Anstieg des hydrodynamischen Radius von Lysozym in Lösung mit Trehalose und Maltose bei einem kleineren Teilchenverhältnis von $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}}$ im Vergleich zur Lösung mit Saccharose. Dies kann an der unterschiedlichen Fähigkeit der einzelnen Saccharide liegen intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. In verdünnter Lösung bilden alle Hydroxylgruppen Wasserstoffbrückenbindungen zum umgebenden Wasser aus [144]. Die Anlagerung von Sacchariden an die Oberfläche des Lysozims wird im Experiment mit zunehmender Saccharidkonzentration beobachtet. Durch die ansteigende Saccharidkonzentration verringert sich die Anzahl an Wassermolekülen, die pro gelöstem Teilchen zur Verfügung steht. Die Saccharidmoleküle können nun Wasserstoffbrücken mit der Oberfläche des Lysozims oder intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Beide Prozesse stehen in Konkurrenz zueinander. Aufgrund von Untersuchungen der Kristallstruktur ist bekannt, dass die Saccharide unterschiedlich viele intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Während Saccharose zwei intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen besitzt [55], weist Maltose eine auf [56] und im Trehalosemolekül kommt gar keine vor [54]. Die Hydroxylgruppen, die an intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, stehen nicht für intermolekulare Bindungen zur Verfügung. Da Saccharose die meisten intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen im Vergleich zu Maltose und Trehalose aufweist, steht es in geringerem Maße als Partner für intermolekulare Bindungen zu Verfügung. Das heißt, bei einer vergleichbaren Konzentration von Saccharose und Trehalose stellt die Saccharose weniger Bindungsstellen für Wasserstoffbrückenbindungen zu anderen Molekülen (Protein oder Wasser) zur Verfügung. Daher werden auch die Diffusionseigenschaften des Lysozims erst bei einer höheren Konzentration von Saccharose beeinflusst. Dies spiegelt sich entsprechend auch im hydrodynamischen Radius wieder.

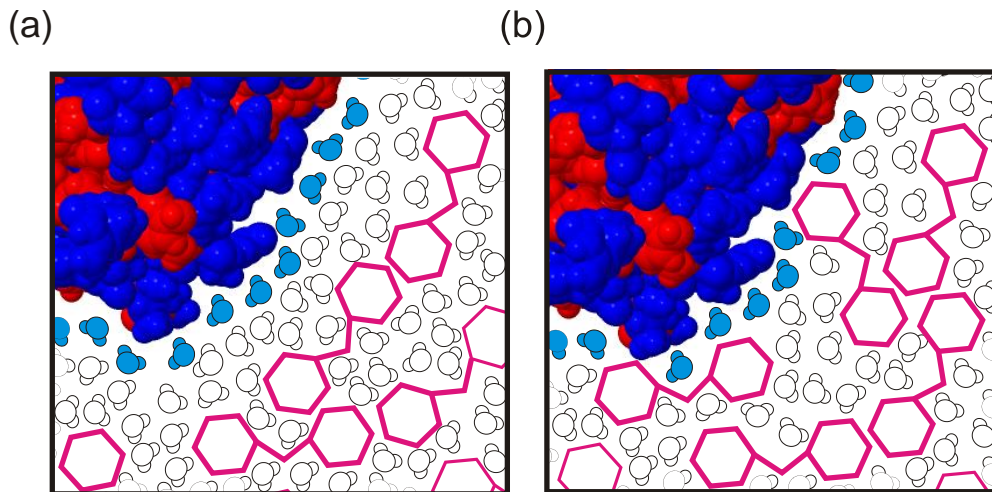


Abbildung 4.5 Schematische Darstellung der Hydrathülle des Lysozyms. In Bild (a) ist die Oberfläche des Proteins bei pH^{D} -Werten der Lösung, bei denen keine Saccharidmoleküle in die Hydrathülle des Proteins eindringen gezeigt. An der Oberfläche des Proteins befinden sich ausschließlich Wassermoleküle (dunkelblau). In Abbildung (b) ist die Zusammensetzung der Hydrathülle, bei pH^{D} -Werten der Lösung, bei denen Saccharidmoleküle in die Hydrathülle des Proteins eindringen können dargestellt. Die Saccharidmoleküle verdeutlichen darüber hinaus die Ausbildung von Saccharidaggregaten in beiden Lösungen durch die Überlagerung der Hydrathüllen der Saccharide bzw. der Ausbildung von Saccharid-Saccharid-Wasserstoffbrückenbindungen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass alle untersuchten Saccharide in die Hydrathülle des Lysozyms eindringen. In den Lysozymlösungen mit Disacchariden werden die Diffusionseigenschaften des Lysozyms über einen größeren Konzentrationsbereich von Saccharid hinaus beeinflusst als in einer Lysozymlösungen mit dem Monosaccharid Glucose. Dieser Unterschied kann auf die Eigenschaft der Disaccharide, bei hohen Konzentrationen Aggregate zu bilden, zurückgeführt werden. Dieses Verhalten zeigt das Monosaccharid Glucose nicht.

Abhängigkeit von der Konzentration der gelösten Teilchen ($n_{\text{gelöste Teilchen}} = n_{\text{Saccharid}} + n_{\text{Lysozym}}$). Bisher wurde die Änderung des hydrodynamischen Radius von Lysozym in Abhängigkeit vom Teilchenverhältnis $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}}$ und dem pH -Wert der Lösung betrachtet. In diesem Abschnitt wird der Einfluss der Konzentration aller gelösten Teilchen ($n_{\text{gelöste Teilchen}} = n_{\text{Saccharid}} + n_{\text{Lysozym}}$) auf $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ untersucht. Dafür wurden Lysozym/Saccharidlösungen mit einem konstanten Teilchenverhältnis von $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}} = 600$ hergestellt, wobei die Konzentration von Saccharid und Lysozym in der Lösung variiert wurde. In Tabelle 4 sind die verwendeten Konzentrationen sowie die Teilchenverhältnisse aufgelistet. In der Abbildung 4.6 (a) ist der $R_{\text{h}}^{\text{Lysozym}}$ in Abhängigkeit von $c_{\text{gelöste Teilchen}}$ einer Lysozym/Trehalose- und einer Lysozym/Saccharoselösung dargestellt. Der hydrodynamische Radius des Lysozyms ist von der Konzentration der gelösten Teilchen abhängig. Bei einer geringen Konzentration von gelösten Teilchen entspricht der hydrodynamische Radius von Lysozym in den Lösungen mit Saccharid dem

hydrodynamischen Radius von Lysozym in wässriger Lösung. In der Lysozym/Trehaloselösung steigt R_h^{Lysozym} ab einer Konzentration von ungefähr $c_{\text{gelöste Teilchen}} = 100 \text{ g/l}$ an und erreicht bei $c_{\text{gelöste Teilchen}} = 170 \text{ g/l}$ eine Sättigung. Dieser Anstieg des hydrodynamischen Radius zeigt sich auch in der Lysozym/Saccharoselösung. Jedoch ist hier ein Anstieg des R_h^{Lysozym} erst ab einer Konzentration von ungefähr 170 g/l zu erkennen. Dieser Unterschied kann auf die im vorigen Abschnitt bereits ausgeführte Eigenschaft bezüglich der Ausbildung von Aggregaten von Trehalose und Saccharose zurückgeführt werden. Um den Einfluss des Teilchenverhältnisses von Saccharid zu Lysozym zu untersuchen, werden die hydrodynamischen Radien des Lysozyms für zwei Lysozym/Trehaloselösungen mit $n_{\text{Trehalose}}/n_{\text{Lysozym}} = 400$ und 600 in Abbildung 4.6 (b) verglichen.

Tabelle 4 Konzentration der gelösten Teilchen $c_{\text{gelöste Teilchen}}$ sowie das Verhältnis der Wassermoleküle zur Anzahl an gelösten Teilchen ($n_{\text{gelöste Teilchen}} = n_{\text{Saccharid}} + n_{\text{Lysozym}}$) für die untersuchten Lysozym/Trehalose- und Lysozym/Saccharidlösungen. Angegeben ist ebenfalls die Lysozymkonzentration für die Lösungen c_{Lysozym} und das Verhältnis von Saccharidmolekülen zu Lysozymmolekülen $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}}$.

Trehalose/Lysozym		Saccharose/Lysozym		c_{Lysozym} in mM	$n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}}$
$c_{\text{gelöste Teilchen}}$ in g/l	$n_{\text{D}_2\text{O}}/n_{\text{gelöste Teilchen}}$	$c_{\text{gelöste Teilchen}}$ in g/l	$n_{\text{D}_2\text{O}}/n_{\text{gelöste Teilchen}}$		
103	184	97	217	0,5	600
123	153	117	181	0,6	600
144	131	136	155	0,7	600
164	115	-	-	0,8	600
185	102	175	121	0,9	600
205	92	194	109	1	600
267	71	295	73	1,3	600

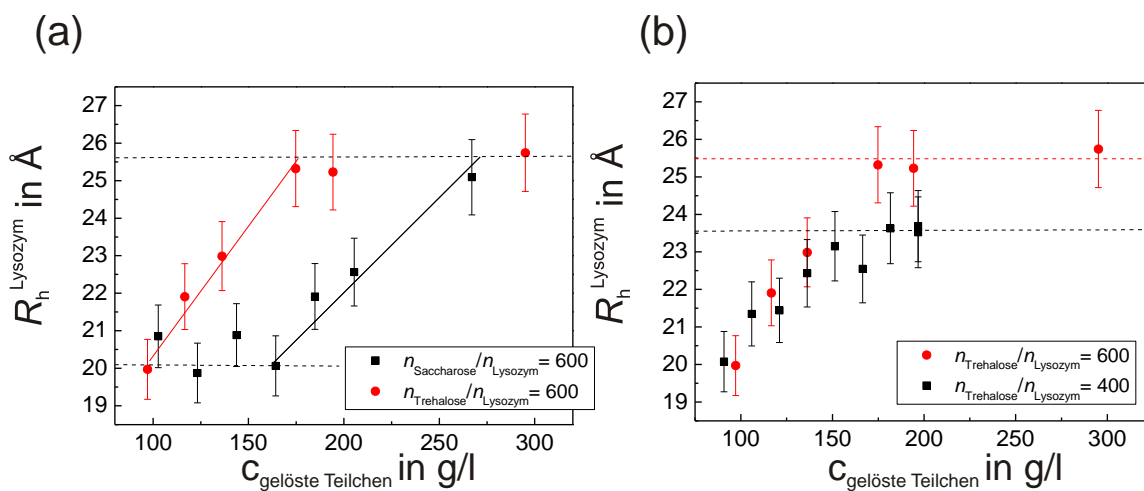


Abbildung 4.6 Hydrodynamischer Radius des Lysozyms in Abhängigkeit von der Konzentration von gelösten Teilchen. (a) R_h^{Lysozym} in Lysozym/Saccharose- und Lysozym/Trehaloselösung bei einem konstanten mol-Verhältnis von $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}} = 600$. Die untere Linie kennzeichnet den hydrodynamischen Radius des Lysozyms in wässriger Lösung ($c_{\text{Lysozym}} = 1,3 \text{ mM}$). (b) R_h^{Lysozym} in Lysozym/Trehaloselösung bei zwei verschiedenen mol-Verhältnissen von Trehalose zu Lysozym. Die Linien dienen jeweils der Verdeutlichung des Sättigungswertes.

Der Anstieg des R_h^{Lysozym} ist bei beiden Teilchenverhältnissen der gleiche, jedoch ist der Sättigungswert für das Verhältnis von $n_{\text{Trehalose}}/n_{\text{Lysozym}} = 400$ signifikant kleiner im Vergleich zu $n_{\text{Trehalose}}/n_{\text{Lysozym}} = 600$. Das heißt, das Teilchenverhältnis von Trehalose zu Lysozym beeinflusst lediglich die Größe des hydrodynamischen Radius, bei dem die Sättigung eintritt, aber nicht den Anlagerungsprozess an sich. Aus den Daten kann geschlussfolgert werden, dass die Änderung des hydrodynamischen Radius von Lysozym nicht nur vom Verhältnis der Saccharidmoleküle zu Lysozym abhängt, sondern auch von der Konzentration von gelösten Teilchen.

Warum ist das der Fall? Eine Änderung der Konzentration der gelösten Teilchen ist gleichbedeutend mit einer Änderung des Verhältnisses von D_2O -Molekülen zur Anzahl an gelösten Teilchen ($n_{\text{D}_2\text{O}}/n_{\text{gelöste Teilchen}}$). Je größer die Konzentration an gelösten Teilchen ist, desto kleiner ist das Verhältnis von Wassermolekülen zu gelösten Teilchen $n_{\text{D}_2\text{O}}/n_{\text{gelöste Teilchen}}$. Eine Anlagerung wird in den Diffusionsexperimenten erst mit einem sinkenden Verhältnis von $n_{\text{D}_2\text{O}}/n_{\text{gelöste Teilchen}}$ beobachtet. Das heißt, solange genug D_2O -Moleküle pro gelöstem Teilchen vorhanden sind, findet kein Anlagerungsprozess zwischen Lysozym und Saccharid statt. In diesem Fall bilden die Saccharid- und Lysozymmoleküle in der Lösung hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen zu umgebenden D_2O -Molekülen aus. Erst unterhalb eines kritischen Verhältnisses von $n_{\text{D}_2\text{O}}/n_{\text{gelöste Teilchen}}$ werden im Diffusionsexperiment Anlagerungsprozesse beobachtet. Zwischen Lysozym und Saccharid sowie zwischen den Saccharidmolekülen kommt es zu Wechselwirkungen. Dies führt zu einem Anstieg des hydrodynamischen Radius des Lysozyms, wie in Abbildung 4.6 zu erkennen ist. Es besteht die Möglichkeit, dass der beobachtete Anstieg des R_h^{Lysozym} nicht durch einen

Anlagerungsprozess, sondern durch sogenannte „*crowding*“-Effekte [145, 146] oder durch eine Selbstaggregation des Lysozyms verursacht wird. Im Folgenden wird zuerst der Effekt des „*crowding*“ und anschließend der Einfluss von Selbstaggregationsprozessen des Lysozyms auf die Experimente dieser Arbeit besprochen.

Durch eine Zunahme der Konzentration an gelösten Teilchen steigt auch das von den Teilchen eingenommene Volumen in der Lösung an. Während bei der niedrigsten Konzentration an Saccharid ($c_{\text{Saccharid}} = 50 \text{ mM}$) lediglich 4 % des Probenvolumens von Lysozym- und Saccharidmolekülen eingenommen werden, sind dies bei der höchsten Konzentration ($c_{\text{Saccharid}} = 800 \text{ mM}$) rund 27 % des Probenvolumens. In diesem Fall ist die Konzentration von gelösten Teilchen in der Größenordnung von biologischen Zellen [147]. Aufgrund der hohen Konzentration an gelösten Teilchen könnte der Diffusionsweg eines Teilchens durch die anderen Teilchen in der Lösung behindert werden. Das Probenvolumen, das von den gelösten Teilchen eingenommen wird, kann dann von dem beobachteten diffundierenden Teilchen nicht eingenommen werden. Das heißt, es entsteht ein ausgeschlossenes Volumen innerhalb der Probe, das für das diffundierende Teilchen nicht zugänglich ist. In diesem Fall kann die Diffusionsbewegung des Teilchens nicht länger mit dem Modell einer isotropen Diffusion, wie im Abschnitt 3.2.1 erläutert, beschrieben werden. Es ist bekannt, dass dieser Effekt zur Messung einer reduzierten Diffusionskonstante führt [75, 148], was wiederum als Anstieg des hydrodynamischen Radius interpretiert werden kann. Wie die theoretische Beschreibung in verschiedenen Studien zeigt [148, 149, 150], hängt der „*crowding*“-Effekt nur von der Größe des diffundierenden Teilchens und dem Volumenanteil der gelösten Teilchen ab. Ein Einfluss des pH-Wertes wird jedoch in keiner Arbeit beschrieben. Würden die in dieser Arbeit beobachteten Änderungen des hydrodynamischen Radius durch den Effekt des „*crowding*“ verursacht werden, so müssten Änderungen des R_h^{Lysozym} unabhängig vom pH-Wert der Lösung beobachtet werden. Dies ist nicht der Fall, wie in Abbildung 4.2 dargestellt und im dazugehörigen Abschnitt besprochen wurden. Im Gegenteil, bei pH-Werten > 7 ist gar keine Änderung des R_h^{Lysozym} zu beobachten. Daraus wird der Schluss gezogen, dass der hydrodynamische Radius des Lysozyms für die in dieser Arbeit untersuchten Probensysteme nicht durch den „*crowding*“-Effekt beeinflusst wird.

Wie bereits erwähnt, führt eine Selbstaggregation der Lysozymmoleküle ebenfalls zu einer Vergrößerung des hydrodynamischen Radius des Lysozyms. Im Abschnitt 3.2.2 wird dieser Effekt für eine Lysozymlösung unter experimentellen Bedingungen gezeigt, bei denen bekannt ist, dass es zur Selbstaggregation des Lysozyms kommt. Aufgrund der spektralen Auflösung der NMR-Spektren und der Abhängigkeit des Anlagerungsprozesses vom pH-Wert kann jedoch eine Selbstaggregation des Lysozyms während der Experimente dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Beide Faktoren werden im Folgenden näher betrachtet. Moleküle, die sich in einer Lösung befinden, führen in dieser neben der translatorischen Diffusion auch eine willkürliche taumelartige Molekülbewegung aus („*molecular tumbling*“). Die Korrelationszeiten dieser Molekülbewegungen liegen für globuläre Proteine im Bereich von ns. Dadurch haben sie einen Einfluss auf die spektrale Auflösung, d. h. die Linienbreite im NMR-Spektrum. Je langsamer sich das gelöste Teilchen in der Lösung bewegt, desto breiter werden

die Linien im Spektrum. Die Geschwindigkeit der Molekülbewegung hängt wiederum von der Größe des gelösten Teilchens ab: je größer das Molekül ist, desto langsamer ist dessen Molekülbewegung in der Lösung. Das bedeutet, die spektrale Auflösung des NMR-Spektrums ist sensitiv auf die Größe des gelösten Teilchens. Im Abschnitt 3.2.2 (Abbildung 3.5) wurde die Selbstaggregation einer Lysozymbilösung untersucht. Die spektrale Auflösung wurde mit einsetzender Selbstaggregation der Lysozymbilöser geringer. Die Ursache dafür ist der Größenunterschied der aggregierten Lysozymbilöser im Vergleich zu den separiert vorliegenden Lysozymbilöser. Letztere sind kleiner als die Aggregate der Lysozymbilöser. Die Resonanzen im NMR-Spektrum werden deshalb mit zunehmender Selbstaggregation breiter. Ein Vergleich der spektralen Auflösung ist in Abbildung 7.6 im Abschnitt 7.5 dargestellt. Alle in diesem Kapitel vorgestellten Experimente zeigen keine signifikanten Änderungen der spektralen Auflösung in Abhängigkeit von einem der untersuchten experimentellen Parameter. Das heißt, ein Selbstaggregationsprozess des Lysozymbilöser ist anhand der spektralen Auflösung nicht zu erkennen.

Zusätzlich spricht die pH-Wert-Abhängigkeit des Anlagerungsprozesses gegen einen Selbstaggregationsprozess von Lysozym. Wie im Abschnitt 3.2.2 besprochen, findet eine Selbstaggregation von Lysozym bei pH-Werten um den isoelektrischen Punkt von Lysozym statt, das heißt, im Bereich um $\text{pH} \approx 11$. Bei wesentlich niedrigeren pH-Werten dominiert die elektrostatische Coulomb-Abstoßung zwischen den Lysozymbilöser. Dadurch wird die gesamte Lösung stabilisiert und eine Aggregation der Proteine verhindert [35, 151]. Die in den Experimenten beobachtete Vergrößerung des hydrodynamischen Radius des Lysozymbilöser tritt im Bereich von $\text{pH}^{\text{D}} = 3$ bis $\text{pH}^{\text{D}} = 6$ auf, das heißt, genau in dem Bereich von pH-Werten, in welchem eine Selbstaggregation des Lysozymbilöser ausgeschlossen werden kann.

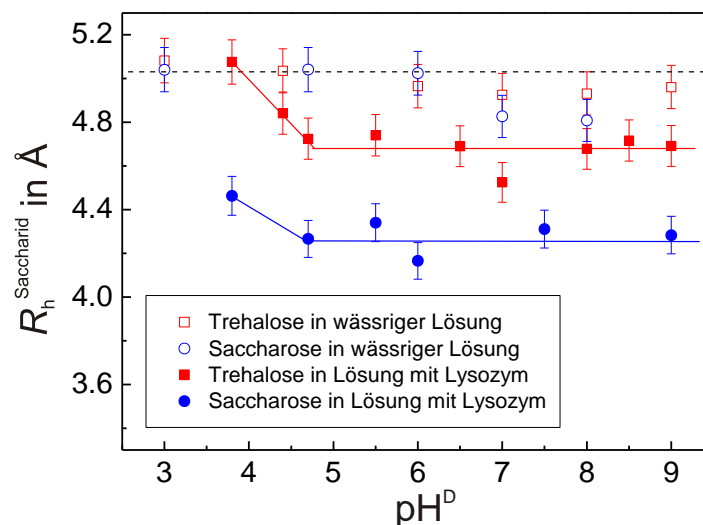


Abbildung 4.7 Darstellung der hydrodynamischen Radien von Trehalose und Saccharose in wässriger Lösung und in Lösung mit Lysozym in Abhängigkeit vom pH^{D} -Wert der Lösung.

Der hydrodynamische Radius der Disaccharide in Abhängigkeit vom pH-Wert. Das Verhalten des hydrodynamischen Radius des Lysozyms hängt, wie bereits gezeigt, vom pH-Wert der Lösung ab. Es stellt sich die Frage, ob der hydrodynamische Radius der Saccharide in Lösung mit Lysozym und in wässriger Lösung ebenfalls vom pH-Wert der Lösung abhängt. Dieser Frage wird im Folgenden nachgegangen. Die Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius von Trehalose und Saccharose vom pH^{D} -Wert in wässriger Lösung ($c_{\text{Saccharide}} \sim 600\text{mM}$) und in einer Lösung mit Lysozym mit $n_{\text{Saccharid}}/n_{\text{Lysozym}} \sim 600$ ($n_{\text{D}_2\text{O}}/n_{\text{gelöste Teilchen}} \sim 70$) ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Die Konzentration von gelösten Teilchen ist in allen Lösungen vergleichbar. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse ist eine Anlagerung von Saccharidmolekülen an Lysozym bei den verwendeten Konzentrationen der gelösten Stoffe zu erwarten. Die offenen Symbole in der Abbildung 4.7 stellen $R_{\text{h}}^{\text{Saccharid}}$ in wässriger Trehalose- und Saccharoselösung dar. Es ist zu erkennen, dass der hydrodynamische Radius für beide Saccharide vom pH^{D} -Wert unabhängig ist. In der Lösung mit Lysozym zeigt sich für beide Saccharide dagegen eine deutliche Abhängigkeit vom pH^{D} -Wert der Lösung. Für Trehalose nimmt der hydrodynamische Radius mit steigendem pH^{D} -Wert der Lösung ab und bleibt ab $\text{pH}^{\text{D}} = 4,5$ konstant. Der hydrodynamische Radius von Trehalose entspricht im Bereich niedriger pH^{D} -Werte ($\text{pH}^{\text{D}} < 4,5$) dem von Trehalose in wässriger Lösung bei gleicher Saccharidkonzentration. In diesem pH-Bereich wird der Anlagerungsprozess von Trehalose und Lysozym beobachtet. Für Saccharose gelöst mit Lysozym zeigt sich ein ähnliches Verhalten (gefüllte Kreise). Für $\text{pH}^{\text{D}} > 5,5$ bleibt der hydrodynamische Radius von Saccharose konstant, während er für kleinere pH^{D} -Werte ansteigt. Bei $\text{pH}^{\text{D}} = 3,8$ haben die Saccharosemoleküle im Vergleich zur wässrigen Lösung jedoch einen kleineren hydrodynamischen Radius.

Das Verhalten der hydrodynamischen Radien der Saccharide in Abhängigkeit vom pH-Wert kann aufgrund des pH-Wert-abhängigen Anlagerungsprozesses mit Lysozym verstanden werden. Zusätzlich muss die Eigenschaft der Saccharide, intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, berücksichtigt werden. Zuerst wird der Bereich des pH^{D} -Wertes betrachtet, bei dem sich keine Anlagerungsprozesse von Lysozym und Saccharid zeigen ($\text{pH}^{\text{D}} > 6$, Abbildung 4.2). In diesem Fall befinden sich keine Saccharidmoleküle in der Hydrathülle des Lysozyms und die hydrodynamischen Radien beider Saccharide sind kleiner als in wässriger Saccharidlösung. An der Oberfläche des Proteins lagern sich bevorzugt Wassermoleküle an. Diese stehen nicht mehr zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Saccharidmolekülen zu Verfügung. Die Saccharidmoleküle bilden daher mehr intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aus. Dies wirkt sich auf die Hydrathülle der Saccharide aus und verkleinert diese. Im Vergleich zu Trehalose bildet Saccharose mehr intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aus [54, 55]. Dadurch ist der hydrodynamische Radius von Saccharose im Vergleich zu Trehalose in der Lösung mit Lysozym kleiner. Mit sinkendem pH^{D} -Wert dringen Saccharidmoleküle in die Hydrathülle des Proteins ein und es werden intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Saccharid und Lysozym oder Saccharid und D_2O ausgebildet. Da Saccharose mehr intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet, ist dessen hydrodynamischer Radius über den gesamten pH^{D} -Wert Bereich kleiner im Vergleich zu Trehalose.

4.3 Zusammenfassung: Anlagerungsprozess von Sacchariden und Proteinen

Auf der Grundlage der in diesem Kapitel besprochenen experimentellen Ergebnisse lassen sich die eingangs gestellten Fragen beantworten.

- Lagern sich Saccharidmoleküle am Lysozym an? Von welchen Bedingungen hängt dieser Prozess ab?

Die vorgestellten experimentellen Ergebnisse zeigen, dass ein Anlagerungsprozess von Lysozym und Saccharid stattfindet. Dieser Prozess hängt von

- der Art des Saccharides,
- dem pH-Wert der Lösung,
- und der Konzentration der gelösten Teilchen

ab. In der Abbildung 4.8 ist am Beispiel von Trehalose und Lysozym schematisch dargestellt, unter welchen Bedingungen ein Anlagerungsprozess zu beobachten ist und unter welchen Bedingungen nicht. Im Folgenden wird dieses Verhalten am Beispiel von Trehalose erörtert und in den Kontext der veröffentlichten Fachliteratur gesetzt. Dabei wird zuerst die Situation beschrieben, bei der sich keine Saccharidmoleküle in der Hydrathülle des Lysozym befinden. Im Anschluss folgt eine Beschreibung des strukturellen Aufbaus der Hydrathülle, wenn Trehalosemoleküle in diese eindringen. Dafür werden zuerst die experimentellen Bedingungen besprochen, unter denen sich bevorzugt Wassermoleküle an der Oberfläche des Lysozyms anlagern und Saccharidmoleküle von dieser ausgeschlossen sind.

Bevorzugte Anlagerung von Wassermolekülen an der Oberfläche des Lysozyms. Unabhängig vom pH^{D} -Wert der Lösung wird bei einer geringen Trehalosekonzentration ($n_{\text{Trehalose}}/n_{\text{Lysozym}} < 100$) und einer Konzentration von gelösten Teilchen $c_{\text{gelöste Teilchen}} < 100 \text{ g/l}$ kein Anlagerungsprozess von Trehalosemolekülen an der Oberfläche des Lysozyms beobachtet. Unter den genannten Bedingungen entspricht der hydrodynamische Radius des Lysozyms in Lysozym/Trehaloselösung dem von Lysozym in wässriger Lösung. Das heißt, Lysozym bevorzugt die Nähe von Wassermolekülen an seiner Oberfläche. Ein Ausschluss der Saccharidmoleküle von der Oberfläche der Proteine wurde bereits in der Literatur beschrieben [19, 26, 27, 34, 35, 36, 37, 38, 39]. Simulationsrechnungen kombiniert mit Raman-Spektroskopie zeigen in Anwesenheit von Saccharidmolekülen um das Protein eine Verlangsamung der Dynamik der Wassermoleküle sowie einen destrukturierenden Effekt auf das tetrahedrale Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen des Wassers [39]. Die Saccharidmoleküle bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit den Wassermolekülen aus und verlangsamen dadurch dessen Dynamik. Infolgedessen haben die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen und Protein eine lange „Verweilzeit“ am Protein [34, 152]. Die biologische Schutzwirkung von Saccharidmolekülen wird in diesem Fall auf ihre

Wirkung auf das umgebende Wasser zurückgeführt. Die Proteine werden vor äußeren Stressfaktoren geschützt, indem ihre Hydrathülle stabilisiert wird.

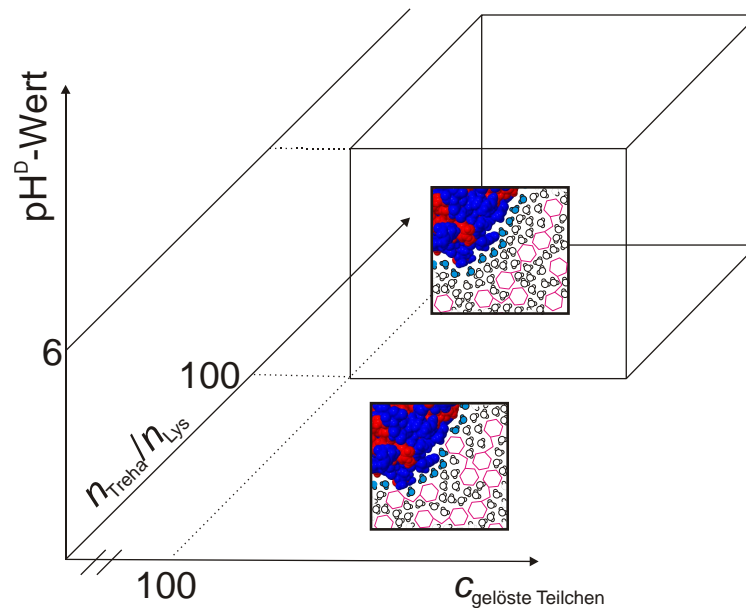


Abbildung 4.8 Anlagerungsprozess am Beispiel von Lysozym und Trehalose in Abhängigkeit vom pH^{D} -Wert, der Konzentration von gelösten Teilchen und dem Teilchenverhältnis von Trehalose zu Lysozym. Die Modellzeichnungen verdeutlichen die Verteilung von Trehalosemolekülen (pink) und Wassermolekülen in der Umgebung des Proteins in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen. Findet keine Anlagerung statt, sind die Trehalosemoleküle (pink) von der Oberfläche des Proteins ausgeschlossen, während sich Wassermoleküle (blau) ansammeln. Können Trehalosemoleküle an die Oberfläche des Lysozym vordringen, findet ein Anlagerungsprozess statt.

Saccharidmoleküle in der Hydrathülle des Lysozym. Sind die Bedingungen für einen Anlagerungsprozess von Saccharidmolekülen an der Oberfläche des Lysozyms erfüllt, werden die Trehalosemoleküle nicht länger von der Oberfläche des Proteins ausgeschlossen. Das heißt, Trehalosemoleküle dringen in die Hydrathülle des Proteins ein. Mit zunehmender Oberflächenladung (d.h. bei sinkendem pH^{D} -Wert der Lösung) wird dieser Prozess immer effektiver. Ein Anlagerungsprozess von Saccharidmolekülen an der Proteinoberfläche wurde in der Literatur bereits beschrieben. Simulationsrechnung von Ubiquitin in Glucoselösung zeigen, dass sich eine Glucoseschicht um das Protein ausbildet, die eine geringe Anzahl verbleibender Wassermoleküle an der Proteinoberfläche einschließt [38]. Glucose ersetzt die Wassermoleküle an der Proteinoberfläche dabei weitgehend und die verbliebenen Wassermoleküle, die von der Zuckerschicht eingeschlossen werden, erhalten die Struktur des Proteins. Die längere Verweilzeit der Glucose und Wassermoleküle an der Proteinoberfläche erhöht die effektive Masse des Proteins. Dies wirkt sich auf die Diffusionseigenschaften des Proteins aus. Die Diffusionskonstante wird mit steigender Masse kleiner und der

hydrodynamische Radius damit größer. Ein ähnliches Verhalten wurde für nicht-kovalent gebundene Metaboliten im Cytosol gefunden [153].

Der Einfluss der Trehalose auf die Diffusionseigenschaften des Proteins geht über die Konzentration, die für eine einfache Bedeckung des Lysozyms mit Trehalose notwendig wäre hinaus, da sich bei hohen Konzentrationen Trehaloseaggregate ausbilden. Unter Kältestress setzt eine Verglasung der umgebenden Saccharidmatrix ein. Dadurch werden die Wassermoleküle in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt und eine Kristallisation wird erschwert [22, 131].

- Ist der Anlagerungsprozess abhängig von der Art des Saccharides?

Ja, dieser Prozess hängt von der Art des Saccharides ab. Das oben beschriebene Verhalten von Lysozym und Trehalose wird in den Experimenten für alle untersuchten Disaccharide (Trehalose, Maltose und Saccharose) gefunden und in eingeschränkter Form auch für das Monosaccharid Glucose. Im Vergleich zu Trehalose und Maltose wird ein Anlagerungsprozess an der Oberfläche des Lysozyms für Saccharose erst bei größeren Konzentrationen beobachtet. Trehalosemoleküle finden sich im Vergleich zu Saccharose über einen größeren pH-Bereich der Lösung in der Hydrathülle des Lysozyms. Das heißt, Trehalose befindet sich über einen größeren Bereich von experimentellen Bedingungen in der Hydrathülle des Lysozyms als die anderen untersuchten Saccharide.

- Wie passen die hier vorgestellten Ergebnisse zu den veröffentlichten Studien?

Das Eindringen der Saccharidmoleküle in die Hydrathülle des Lysozyms hängt von den experimentellen Bedingungen ab. Es gibt sowohl Veröffentlichungen, die zeigen, dass eine Anlagerung zwischen Protein und Saccharid stattfindet, als auch solche, die zu einem gegenteiligen Schluss kommen. Wie passen diese Ergebnisse mit den hier beschriebenen Daten zusammen? Die publizierten Arbeiten wurden alle unter verschiedenen experimentellen Bedingungen durchgeführt. Viele der Studien, die keinen Anlagerungsprozess feststellen, sind MD-Simulationen, die den Einfluss des pH-Wertes der Lösung nicht berücksichtigen [19, 26, 34, 36]. Einige Ergebnisse von veröffentlichten Studien können nicht mit den hier vorgestellten Daten verglichen werden, da die Experimente mit anderen Proteinen durchgeführt wurden [27, 37, 38]. James *et al.* haben eine Lösung von Lysozym und Trehalose mit quasi-elastischer Lichtstreuung (QELS) in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht, treffen aber über das Anlagerungsverhalten von Lysozym und Trehalose nur bei pH = 7 eine Aussage [35]. Bei diesem pH-Wert beschreiben sie Lysozym als bevorzugt hydratisiert und Trehalose als von der Oberfläche ausgeschlossen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Schlussfolgerungen, die in der vorliegenden Arbeit gezogen werden, überein. MD-Simulationen von Fedorov *et al.* und Ghaty *et al.* weisen einen Anlagerungsprozess von Trehalose und Lysozym nach [31, 32]. Mit Hilfe von UV-Spektroskopie ist auch eine Anlagerung von Trehalose an Ribonuklease A bei pH-Werten von pH = 2,8 und pH = 5 beobachtet worden [30].

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten stellen eine systematische Untersuchung des strukturellen Aufbaus von Lysozym/Saccharidlösungen in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen der Lösung (pH-Wert, Konzentration der gelösten Teilchen, Art des Saccharides) dar und ergänzen damit die in der Literatur vorhandene Datenlage. Ein Eindringen von Saccharidmolekülen in die Hydrathülle des Lysozyms ist möglich und hängt von den experimentellen Bedingungen ab. Dies erklärt die unterschiedlichen Ergebnisse, die in der Literatur gefunden werden.

5 Struktureller Aufbau und dynamische Eigenschaften von lyophilisierten Csp/Trehalosesystemen

Dieses Kapitel der Arbeit widmet sich der Charakterisierung des strukturellen Aufbaus von Csp/Trehalosemischungen im Festkörper. Das Protein Csp wurde für diese Experimente ausgewählt, da es unter Kältestress von einigen Organismen vermehrt produziert wird. Es scheint demnach im Zusammenhang mit der Kältetoleranz dieser Organismen zu stehen [42]. Im Fokus stehen dabei die Verteilung von Wassermolekülen in diesem Probensystem und die dynamischen Eigenschaften des Proteins in Abhängigkeit von dessen Umgebung. Insbesondere die folgenden Punkte werden mit Hilfe von FK-NMR-Experimenten untersucht:

- Wie wirkt sich eine amorphe Trehalosematrix auf die Sekundärstruktur des Proteins Csp aus?
- Wie werden die dynamischen Eigenschaften des Rückgrates des Csp von einer amorphen Trehalosematrix beeinflusst? Welche Informationen über den strukturellen Aufbau der Mischung lassen sich daraus ableiten?
- Wie wirkt sich die Zugabe von Wassermolekülen auf die dynamischen Eigenschaften des Csp und den strukturellen Aufbau der Csp/Trehalosemischung aus?

Dafür werden die dynamischen Eigenschaften des Csp in den in Tabelle 5 aufgeführten Probensystemen miteinander verglichen. Die Herstellung der einzelnen Proben wird in Abschnitt 3.3.3 beschrieben. Optimal ist es, für die Csp/Trehalosemischungen eine möglichst hohe Verdünnung von Csp in der Trehalosematrix zu erreichen, um Kontakte zwischen den einzelnen Proteinen zu vermeiden. Die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen ist nicht Gegenstand dieser Arbeit. Protein-Protein Wechselwirkungen würden die Auswertung der gemessenen Daten erschweren und sollen daher weitgehend vermieden werden. Für die Experimente wird eine Mischung von 20 Gew.% Csp und 80 Gew.% Trehalose verwendet. Dies stellt einen Kompromiss zwischen einer möglichst großen Verdünnung von Csp in der Matrix und einem Probensystem, das ein praktikables Signal-zu-Rausch-Verhältnis im NMR-Experiment bietet, dar.

Der Effekt von Trehalose auf die Proteinstruktur wurde bereits vielfach untersucht, ein Überblick über die Ergebnisse bietet [44]. Der Einfluss der Trehalose auf die dynamischen Eigenschaften von Proteinen stand hingegen nur selten im Fokus wissenschaftlicher Arbeiten. Zum Beispiel wurde der Bindungsmechanismus von CO an das Protein Myoglobin, das in eine amorphe Trehalosematrix eingebettet war, untersucht. Hierbei wurde der Bindungsmechanismus als Zugang genutzt, um indirekt mittels IR- und Mößbauer-Spektroskopie sowie Blitzlichtphotolyse und MD-Simulationen Informationen über die Proteindynamik zu gewinnen [43, 154, 155, 156, 157, 158]. Eine direkte Beobachtung der Proteindynamik konnte mit diesen Studien nicht realisiert werden. FK-NMR-Experimente dagegen bieten den Vorteil, dass Messungen der Zeitskala und der Amplitude der Bewegungen direkt am Protein vorgenommen werden können. Bisher sind lediglich zwei FK-

NMR-Studien an Protein/Saccharidmischungen veröffentlicht worden. In diesen Studien wurden ^1H - T_1 - und ^1H - $T_{1\rho}$ -Messungen durchgeführt [159, 160]. Der Nachteil dieser Methode ist, dass sich die Signale von Protein und Saccharid in einem ^1H -Spektrum schwer voneinander separieren lassen. ^{13}C und ^{15}N detektierte Experimente bieten eine elegante Lösung dieses Problems. Durch die Verwendung von markierten Proben wird das Problem eines zu geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses umgangen.

Tabelle 5 Untersuchte Probensysteme

i)	lyophilisiertes Csp mit verschiedenen Wassergehalten
ii)	20 Gew.% Csp in einer amorphen Trehalosematrix (80 Gew.%) bei zwei Wassergehalten (0 Gew.% und ~ 4 Gew.%)
iii)	Csp in kristalliner Trehalosematrix

In den folgenden Abschnitten dieses Kapitels sind die experimentellen Ergebnisse der FK-NMR-Experimente dargestellt. Dabei werden im ersten Abschnitt die spektralen Auflösungen verschiedener Proteinsysteme untersucht, um Informationen über den strukturellen Aufbau der Proben zu gewinnen. Anschließend werden im Abschnitt 5.2 die dynamischen Eigenschaften der lyophilisierten Csp-Probe in Abhängigkeit vom Wassergehalt auf verschiedenen Zeitskalen der Korrelationszeit beschrieben. Diese Ergebnisse charakterisieren einerseits die dynamischen Eigenschaften des Proteins und dienen andererseits zum Vergleich der dynamischen Eigenschaften des Csp/Trehalosesystems, welche im Abschnitt 5.3 näher erläutert werden. Im Abschnitt 5.4 wird der Einfluss von Wassermolekülen auf die Eigenschaften des Csp in der amorphen Trehalosematrix beschrieben. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse schließt dieses Kapitel ab. Einzelheiten zu den experimentellen Einstellungen am Spektrometer finden sich im Anhang im Abschnitt 7.1.2.

5.1 CP-Spektren und spektrale Auflösung

Bereits anhand der CPMAS-Spektren [47] können Erkenntnisse über die Struktur der untersuchten Systeme gewonnen werden. Während ein ^{15}N -CPMAS-Spektrum Informationen über den strukturellen Aufbau des Proteins liefert, kann mit Hilfe des ^{13}C -CPMAS-Spektrums die Struktur der Trehalose überprüft werden. In Abbildung 5.1 wird im Vergleich das ^{15}N -CPMAS-Spektrum des Proteins Csp

- (a) im lyophilisierten Zustand
- (b) in einer lyophilisierten Csp/Trehalosemischung und
- (c) in einer gefrorenen 2% Csp-Lösung

gezeigt. Alle Spektren zeigen die gleichen Signale jedoch mit unterschiedlicher spektraler Auflösung. Das Hauptsignal bei 125 ppm wird durch die NH-Gruppen hervorgerufen, welche sich hauptsächlich im Rückgrat des Proteins befinden. Das Doppelsignal zwischen 70 und 90 ppm repräsentiert die Stickstoffkerne der NH₂-Gruppen, das Signal bei 37 ppm wird den NH₃-Gruppen der Lysin Seitenketten zugeordnet.

Die spektrale Auflösung ist im lyophilisierten Csp (Abbildung 5.1 (a)) geringer als in der gefrorenen Lösung (Abbildung 5.1 (c)). Dieser Effekt ist auf die unterschiedliche Umgebung der Proteinmoleküle in den beiden Proben zurückzuführen und wurde in der Literatur bereits beschrieben [161, 162, 163, 164]. In einer verdünnten Lösung bilden Wassermoleküle um das Protein eine Hydrathülle, welche während des Lyophilisierens zerstört wird. In diesem Fall bilden sich nicht-native Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Proteins (intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen) und zwischen den Proteinen (intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen) aus [165]. Aufgrund dessen liegen die Proteinmoleküle in der Probe in unterschiedlichen Konformationen vor. Dies führt zu einer inhomogenen Verteilung der chemischen Verschiebung und damit zu einem breiten Spektrum (geringe spektrale Auflösung) [163]. In der gefrorenen Lösung dagegen werden die Proteine im gelösten Zustand mit intakten Hydrathüllen eingefroren. Diese eingefrorene Festkörperstruktur kommt dem natürlichen Zustand der Proteine in Lösung am nächsten und weist im Vergleich zur lyophilisierten Probe eine geringere Verteilung von Proteinkonformationen auf. Es kann festgehalten werden, dass die spektrale Auflösung von Csp in gefrorener Lösung größer ist als die im lyophilisierten trockenen Zustand. Das bedeutet, je weniger nicht-native Wasserstoffbrückenbindungen vorhanden sind, desto größer ist die spektrale Auflösung. Vergleicht man die spektrale Auflösung des lyophilisierten Csp (Abbildung 5.1 (a)) mit der lyophilisierten Csp/Trehalosemischung in Abbildung 5.1 (b) ist ersichtlich, dass diese in der Mischung größer ist als in der reinen Proteinprobe. Das heißt, die Verteilung von Konformationen des Csp wird kleiner, da weniger nicht-native Wasserstoffbrückenbindungen im Vergleich zur lyophilisierten Csp-Probe vorhanden sind. Die Csp-Trehalose-Wechselwirkungen ersetzen vermutlich teilweise nicht-native Wasserstoffbrückenbindungen, was ein Indiz für die Wasserersetzungshypothese ist. Die spektrale Auflösung der lyophilisierten Csp/Trehalosemischung ist geringer als die Auflösung des Csp in gefrorener Lösung. Dieser Vergleich der spektralen Auflösung zeigt, dass die Trehalosematrix um das Csp nicht den gleichen Einfluss auf das Csp hat wie eine intakte Hydrathülle. Dennoch kann festgehalten werden, dass die Einbettung von Csp in eine amorphe Trehalosematrix der nativen Umgebung ähnlicher ist, als die Umgebung im lyophilisierten Proteinpulver.

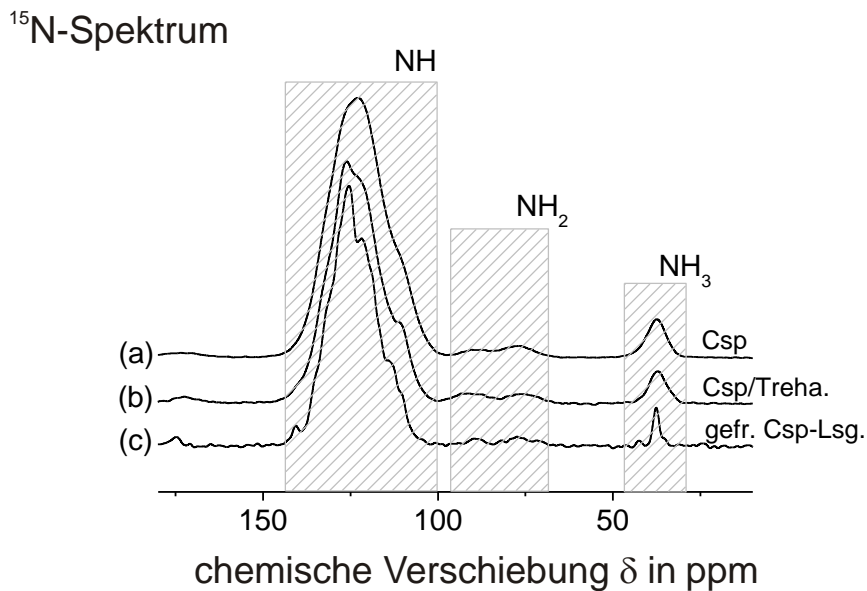


Abbildung 5.1 ¹⁵N-CPMAS-Spektrum von (a) lyophilisiertem Csp, (b) einer lyophilisierten 20 Gew.% Csp – 80 Gew.% Trehalose-Mischung und (c) einer gefrorenen 2 % Csp-Lösung. Die spektralen Regionen der verschiedenen chemischen Gruppen sind gekennzeichnet. Das Spektrum der gefrorenen Csp-Lösung wurde von A. Krushelnitsky gemessen ($\nu_r = 6$ kHz, Probe (a) und (b) wurden bei RT gemessen, Probe (c) bei $T = 10$ °C).

Es könnte vermutet werden, dass die höhere spektrale Auflösung der Proben in Abbildung 5.1 durch die Verwendung der CPMAS-Sequenz verursacht wird. CP ist eine Sequenz, bei der die selten in der Probe vorkommenden ¹⁵N- bzw. ¹³C-Kerne ihre Magnetisierung von den häufig in der Probe vorkommenden ¹H-Kernen erhalten, anstatt direkt angeregt zu werden (DP-Sequenz). Dieser Übertrag der Magnetisierung wird durch die dipolare Wechselwirkung der beteiligten Kerne vermittelt und dessen Effizienz hängt von der dipolaren Kopplungsstärke der Kerne ab. Dabei gilt: je stärker die dipolare Kopplung ist, desto größer ist die Rate des Magnetisierungsübertrages. Die Kopplungsstärke wird von den dynamischen Eigenschaften der Kerne beeinflusst, wobei chemische Gruppen mit einer hohen Mobilität eine kleinere Kopplungskonstante aufweisen im Vergleich zu chemischen Gruppen, die sich durch eine geringe Mobilität auszeichnen. Das bedeutet, dass bei einer breiten Verteilung der dynamischen Eigenschaften der Probe die CP-Sequenz einen Bewegungsfiler darstellt. In diesem Fall können je nach gewählter Sequenzlänge stärker (geringe Mobilität) oder schwächer (hohe Mobilität) gekoppelte chemische Gruppen bevorzugt angeregt werden. Krushelnitsky *et al.* haben CP- und direkt angeregte (DP)-¹⁵N- und ¹³C-Spektren mehrerer Proteine mit verschiedenen Wassergehalten miteinander verglichen und konnten keine Unterschiede in der spektralen Auflösung feststellen [104]. Auch Kennedy *et al.* haben bei Untersuchungen des Proteins Lysozym in Abhängigkeit vom Wassergehalt festgestellt, dass keine signifikanten Änderungen der ¹H-¹³C dipolaren Kopplungen auftreten, so dass die Effizienz des Magnetisierungsübertrages während der CP-Sequenz von Filtereffekten unbeeinflusst ist [163]. Das heißt, dass für die in dieser Arbeit verwendeten Probensysteme

eine Anregung mit der CPMAS-Sequenz möglich ist und die Daten der unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss einer amorphen Trehalosematrix auf die Struktur und Dynamik von Csp untersucht werden, wofür es notwendig ist, den Zustand der Trehalosematrix zu kennen. Nach dem Lyophilisieren der Probe befindet sich die Matrix im amorphen Zustand. Durch die Zugabe von Wassermolekülen wird ab einem bestimmten Wassergehalt eine Kristallisation der Matrix einsetzten. Um sicherzustellen, dass sich die Trehalosematrix im amorphen Zustand befindet und nicht kristallin ist, bieten sich ^{13}C -CPMAS-Spektren als einfaches Werkzeug an. Das ^{13}C -CPMAS-Spektrum der Trehalose ist in Abbildung 5.2 für amorphe, kristalline und teilkristalline Trehalose abgebildet. Die spektrale Auflösung ist für die Proben deutlich unterschiedlich. Während die kristalline Trehalose aufgrund ihres hohen Ordnungsgrades eine hohe spektrale Auflösung liefert, zeichnet sich die amorphe Trehalose durch eine breite Verteilung der chemischen Verschiebung der Signale aus. Bereits eine teilweise Kristallisierung der Trehalose ist deutlich anhand des Spektrums zu erkennen. Ein CPMAS-Spektrum wurde vor und nach jedem Dynamikexperiment für die Csp/Trehalosemischung aufgenommen, um sicherzustellen, dass sich das Csp in einer amorphen Trehalosematrix befindet.

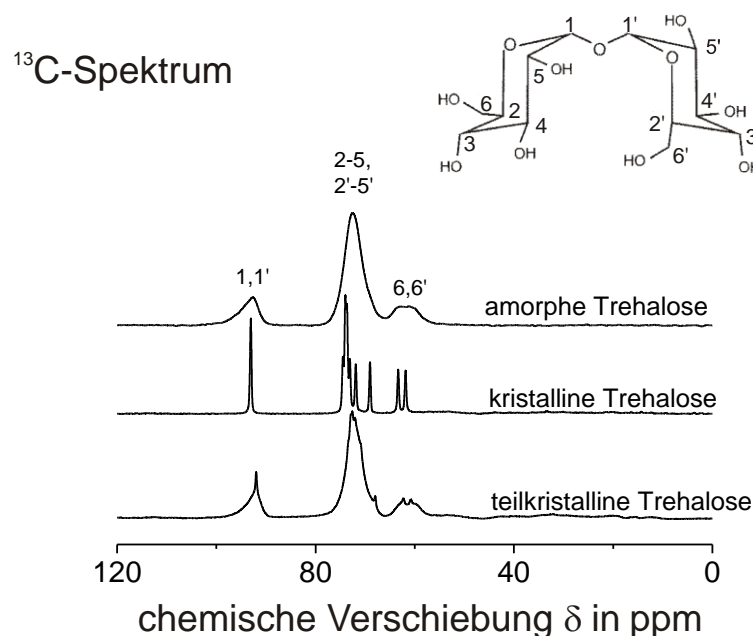


Abbildung 5.2 ^{13}C -CPMAS-Spektrum (natürliche Häufigkeit) von amorpher Trehalose, kristalliner Trehalose und teilkristalliner Trehalose. Die Zuordnung der Signale erfolgte über ein berechnetes Spektrum mit dem Programm ACD [83]. Das Spektrum der amorphen Trehalose wurde nach dem Lyophilisieren in trockenem Zustand gemessen. Das Spektrum der teilkristallinen Trehalose wurde an der Csp/Trehalosemischung mit einem Wassergehalt von $h = 4$ Gew.% gemessen ($\nu_r = 6$ kHz, RT).

5.2 Charakterisierung der dynamischen Eigenschaften von lyophilisierten Csp in Abhängigkeit vom Wassergehalt

Um die dynamischen und strukturellen Eigenschaften von Csp in einer amorphen Trehalosematrix verstehen und charakterisieren zu können, müssen zuerst die Eigenschaften des Proteins außerhalb einer solchen Matrix verstanden werden. Daher wurde zunächst das Protein Csp im lyophilisierten Zustand mit verschiedenen Wassergehalten untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in diesem Abschnitt dargestellt. Die Herstellung der Probe und die Einstellung der verschiedenen Wassergehalte werden im Abschnitt 3.3.3 beschrieben. Nach der Präparation wurde ein vollständiges Set von FK-NMR-Experimenten zur Charakterisierung der dynamischen Eigenschaften des Proteins durchgeführt. Ein vollständiges Set von Experimenten bei einem bestimmten Wassergehalt einer Probe besteht aus einer $^{15}\text{N-T}_1$ -, $^{15}\text{N-T}_{1\rho}$ -, $^{15}\text{N-DIPSHIFT}$ - und $^{15}\text{N-CODEX}$ -Messung jeweils bei $T = 10\text{ }^\circ\text{C}$ und $25\text{ }^\circ\text{C}$. Die Kombination der einzelnen FK-NMR-Experimente bietet die Möglichkeit, die dynamischen Eigenschaften der chemischen Gruppen des Proteins über einen großen Bereich von Korrelationszeiten zu untersuchen. In welcher Hinsicht sich die verschiedenen Experimente ergänzen, wurde bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel erläutert, die Funktionsweise der einzelnen Experimente wird im Abschnitt 3.3 beschrieben. Im $^{15}\text{N-CPMAS}$ -Spektrum in Abbildung 5.1 ist ersichtlich, dass die NH-Gruppen des Csp ein starkes Signal verursachen. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist groß genug, um eine verlässliche Auswertung der experimentellen Daten zu ermöglichen. Die NH-Gruppen befinden sich überwiegend im Rückgrat des Proteins und ermöglichen damit die Beschreibung von dessen dynamischen Eigenschaften. Die Signale der NH_2 - und der NH_3 -Gruppen werden aufgrund eines zu geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht ausgewertet. Zu Beginn soll die langsame Dynamik, mit Korrelationszeiten im ms- bis s-Bereich des Proteins untersucht werden. Im Anschluss folgt eine Beschreibung der Dynamik mit Korrelationszeiten im Bereich von μs bis ns.

Charakterisierung der langsamen Dynamik des Csp-Rückgrates mit Korrelationszeiten im ms- bis s-Bereich. Auf der Zeitskala im ms- bis s-Bereich finden viele biologisch relevante Prozesse, wie zum Beispiel Faltungsprozesse, katalytische Prozesse oder die Bindung von Substraten statt. Die dynamischen Eigenschaften von Proteinen mit Korrelationszeiten, die vergleichbar mit den genannten Prozessen sind, rücken immer mehr in den Blickpunkt der Forschung. Mehrere Proteine wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften im Bereich der langsamen Dynamik bereits untersucht. Während das Protein T4-Lysozym unabhängig vom Wassergehalt keine langsamen Bewegungen aufweist [162], konnten diese in den Proteinen Barstar [166], Kollagen [115] oder auch der SH3-Domäne des α -Spektrin nachgewiesen werden [104]. Es ist bislang ungeklärt, ob das Protein Csp eine langsame Bewegung aufweist. Dies wird im Folgenden mit Hilfe von $^{15}\text{N-CODEX}$ -Experimenten untersucht und charakterisiert. In Abbildung 5.3 (a) ist der Abfall der $^{15}\text{N-CODEX}$ -Kurven für die NH-Gruppen des Csp bei verschiedenen Wassergehalten und bei einer Temperatur von $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ dargestellt. Die durchgezogenen Linien dienen der Verdeutlichung des Kurvenverlaufes und stellen keine Kurvenanpassung der Messdaten dar. Es ist zu erkennen, dass der Signalabfall

vom Wassergehalt der Probe abhängt. Mit zunehmendem Wassergehalt wird eine zweite Komponente im Kurvenverlauf deutlich sichtbar. Der Signalabfall im CODEX-Experiment wird zum einen durch langsame Bewegungen im Protein und zum anderen durch Spindiffusion bestimmt. Während die dynamischen Eigenschaften von der Temperatur der Probe abhängen, ist die Spindiffusion weitgehend von der Temperatur unabhängig [123]. Indem das CODEX-Experiment bei zwei verschiedenen Temperaturen durchgeführt wird, lassen sich durch einen Vergleich der Kurvenverläufe beide Effekte voneinander separieren. Ist die Kurvenform von der Temperatur unabhängig, wird der Intensitätsabfall durch Spindiffusion verursacht und nicht durch die dynamischen Prozesse des untersuchten Systems. In Abbildung 5.3 (b) ist exemplarisch der Kurvenverlauf für einen Wassergehalt von 0 und 35 Gew.% dargestellt. Es ist kein Unterschied im Kurvenverlauf in Abhängigkeit von der Temperatur zu erkennen. Die Daten für alle anderen Wassergehalte zeigen ebenfalls keine Abhängigkeit von der Temperatur und sind im Anhang 7.8 dargestellt. Der im ^{15}N -CODEX-Experiment gemessene Signalabfall wird demnach ausschließlich durch Spindiffusion verursacht. Das heißt, Csp besitzt bei allen untersuchten Wassergehalten der Probe keine dynamischen Eigenschaften mit Korrelationszeiten im ms- bis s-Bereich.

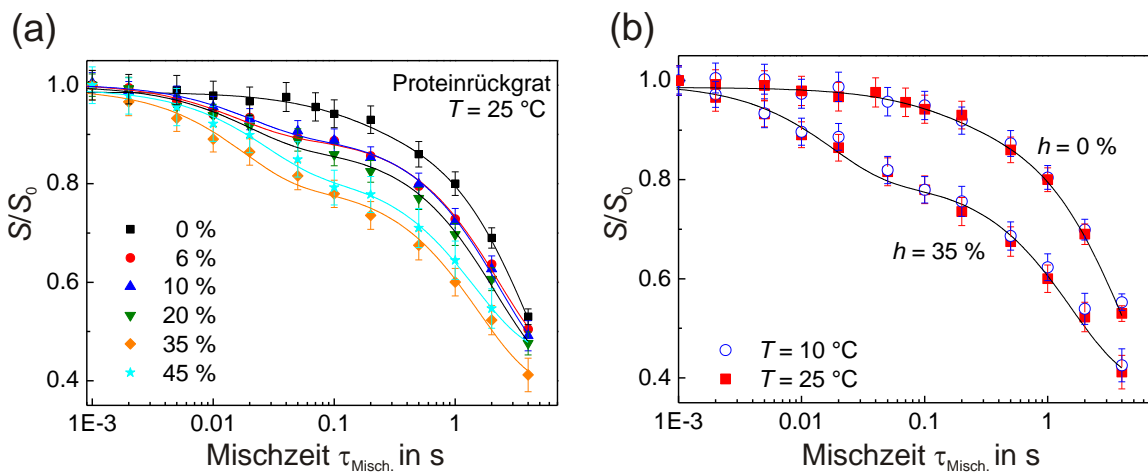


Abbildung 5.3 (a) Ergebnisse des ^{15}N -CODEX-Experimentes für die NH-Gruppen des Csp-Rückgrates in Abhängigkeit vom Wassergehalt der Probe. (b) Kurvenverlauf für zwei ausgewählte Wassergehalte von 0 und 35 Gew.% bei zwei verschiedenen Temperaturen von $T = 10\text{ °C}$ und 25 °C . Die durchgezogenen Linien sollen den Verlauf der Daten verdeutlichen. Die eingezeichneten Fehlerbalken wurden aus dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis bestimmt ($\nu_r = 6\text{ kHz}$, $NT_R = 2,3\text{ ms}$).

Ein Vergleich der Kurvenformen bei einer bestimmten Temperatur für die untersuchten Wassergehalte von Csp (Abbildung 5.3 (a)) zeigt, dass eine deutliche Abhängigkeit vom Wassergehalt der Probe besteht. Mit zunehmendem Wassergehalt entwickelt sich eine schnell abfallende Komponente. Dieser Effekt wurde bereits von Krushelnitsky *et al.* an T4-Lysozym beobachtet [106] und durch eine Änderung der Sekundärstruktur des Proteins erklärt. Es ist

bekannt, dass durch das Lyophilisieren (Wasserverlust und Kältestress) der Proteine deren Sekundärstruktur verändert wird. Im trockenen Zustand ist der Anteil an β -Faltblättern größer und der Anteil an α -Helices geringer als im nativen Zustand [165]. Der Abstand aufeinander folgender Aminosäuren in den beiden Sekundärstrukturen ist verschieden (3,66 Å im β -Faltblatt und 2,82 Å in der α -Helix). Da die Spindiffusion von den dipolaren Wechselwirkungen der Kernspins abhängt, ist die Rate der Spindiffusion umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands der Kerne und damit sensitiv hinsichtlich der Sekundärstrukturelemente des Proteins. Ein veränderter Anteil an β -Faltblättern und α -Helices im Protein und damit der molekularen Abstände verursacht eine veränderte Form der Spindiffusionskurve. Dieser Effekt wird auch zur Strukturbestimmung von Proteinen genutzt [167, 168, 169, 170].

Charakterisierung der Dynamik des Csp-Rückgrates mit Korrelationszeiten im ns- bis μ s-Bereich. In mehreren Studien wurde eine kombinierte Anwendung von ^{15}N - T_1 - und ^{15}N - $T_{1\rho}$ -Experimenten angewendet, um die internen dynamischen Eigenschaften von lyophilisierten Proteinen zu beschreiben [102, 103, 106, 171]. Die Signalintensität wird in den Relaxationsexperimenten, wie im Abschnitt 3.3 erläutert, sowohl von der Geometrie als auch der Korrelationszeit der Dynamik der chemischen Gruppe beeinflusst. Einen direkten Zugang zur Beschreibung der Geometrie der Bewegung bietet das DIPSHIFT-Experiment. Mit Hilfe dieses Experimentes kann der dynamische Ordnungsparameter einer chemischen Gruppe bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden ^{15}N - T_1 -, ^{15}N - $T_{1\rho}$ - und ^{15}N -DIPSHIFT-Experimente an Csp-Proben in Abhängigkeit vom Wassergehalt durchgeführt. Dieses Vorgehen ermöglicht eine eindeutige Charakterisierung der dynamischen Eigenschaften hinsichtlich der Korrelationszeit und der Geometrie der Bewegung in Abhängigkeit vom Wassergehalt der Csp-Probe.

Das hier betrachtete Signal der NH-Gruppen wird durch alle ^{15}N -Kerne in den NH-Gruppen des Proteins verursacht, welche sich über das Protein verteilt durch verschiedene dynamische Parameter auszeichnen und daher einen multiexponentiellen Kurvenverlauf verursachen. Die Verteilung der dynamischen Parameter kann vom Wassergehalt abhängig sein und somit auch die jeweilige Kurvenform. Die Kurvenform wird im Weiteren nicht näher betrachtet, da hierfür die Messung einer vollständigen Relaxationskurve notwendig ist. Dies erfordert lange Messzeiten (T_1 -Experimente) bzw. Lock-Pulse ($T_{1\rho}$ -Experimente), was im ersten Fall nicht praktikabel ist und im zweiten Fall durch die Hardwareeigenschaften des Spektrometers begrenzt ist. Die Rohdaten für die Proben mit einem Wassergehalt von 0 Gew.% wurden mit einer einfachen Exponentialfunktion angepasst. Für alle anderen Proben mit einem höheren Wassergehalt wurde eine doppel-exponentielle Funktion (Gleichung (3.17)) genutzt.

Die Relaxationsraten $\langle R_1 \rangle$ und $\langle R_{1\rho} \rangle$ der NH-Gruppen des Csp-Rückgrates zeigen eine deutliche Abhängigkeit vom Wassergehalt des Proteins, wie in Abbildung 5.4 dargestellt. Die Experimente wurden bei zwei Temperaturen durchgeführt und sowohl $\langle R_1 \rangle$ - als auch $\langle R_{1\rho} \rangle$ -Relaxationsraten weisen für $T = 10\text{ °C}$ und 25 °C einen ähnlichen Verlauf auf. Die Relaxationsraten steigen mit zunehmendem Wassergehalt an und zeigen eine Sättigung im

Bereich von ~ 30 Gew.% Wasser. Eine solche charakteristische Abhängigkeit wurde bereits in anderen Untersuchungen an T4-Lysozym und α B-Kristallin gefunden [106] und es wird angenommen, dass dies eine allgemeine Eigenschaft von Proteinen ist. Die Sättigung tritt ein, wenn die gemessenen dynamischen Parameter im Festkörper denen in der Lösung ähnlich sind [162]. Bei Wassergehalten der Proteinproben von ~ 30 Gew.% können vollständige Hydrathüllen um ein Protein ausgebildet werden [172]. Der genaue Wassergehalt, der für ein spezifisches Protein nötig ist, um den Sättigungspunkt zu erreichen, hängt, wie für die Proteine T4-Lysozym und α B-Kristallin gezeigt wurde, von den hydrophoben Eigenschaften des jeweiligen Proteins ab [104].

Wie bereits beschrieben, werden die Relaxationsraten sowohl von der Korrelationszeit der Bewegung als auch von deren Geometrie beeinflusst. Anhand der Relaxationsdaten kann demnach nicht festgestellt werden, ob die Änderung der Relaxationsraten in Abhängigkeit vom Wassergehalt durch eine Änderung der Korrelationszeit der Bewegung verursacht wird, ob sich die Geometrie der Bewegung ändert oder ob beide Faktoren eine Rolle spielen.

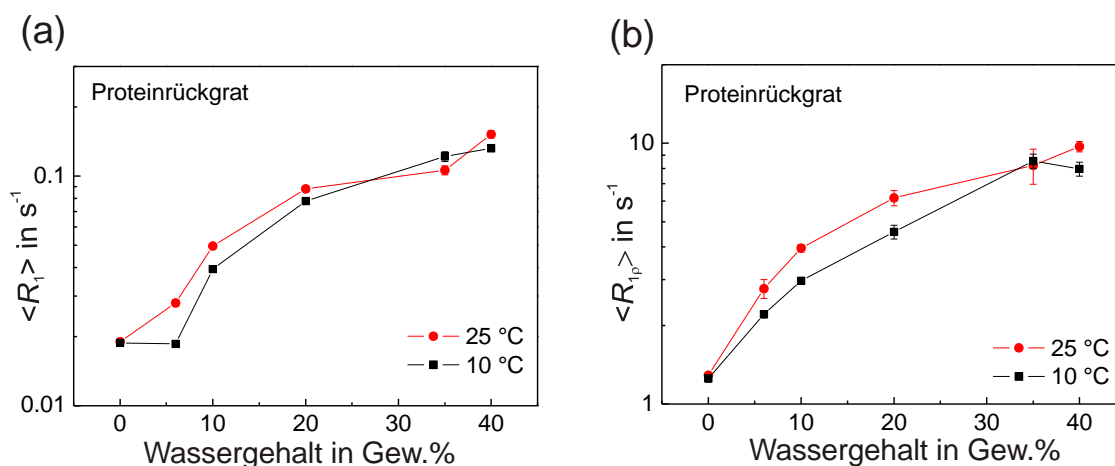


Abbildung 5.4 (a) $\langle R_1 \rangle$ - und (b) $\langle R_{1\rho} \rangle$ - Daten für Csp in Abhängigkeit vom Wassergehalt der Proben, gemessen bei zwei Temperaturen. Die Fehlerbalken der Relaxationsraten welche teilweise im Größenbereich der Datenpunkte liegen, wurden auf Grundlage des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der Spektren bestimmt.

Um die Effekte voneinander zu trennen wurden die ^1H - ^{15}N dipolaren Kopplungskonstanten D mit Hilfe des ^{15}N -DIPSHIFT-Experimentes gemessen. Die dipolaren Kopplungskonstanten werden von Bewegungen im μs -Bereich und schneller gemittelt und hängen nur von der Geometrie dieser Bewegungen ab. In Abbildung 5.5 (a) sind die ^{15}N -DIPSHIFT-Kurven für Csp für alle Wassergehalte der Probe gezeigt. Der Verlauf der jeweiligen ^{15}N -DIPSHIFT-Kurve wird durch die Stärke der zugrundeliegenden Kopplungskonstante bestimmt. Je tiefer der Kurvenverlauf, desto größer ist die Kopplungskonstante. Sie ist am größten, wenn man eine statische chemische Gruppe betrachtet. Zum Vergleich ist die statische Kopplungskonstante einer NH-Gruppe ebenfalls aufgetragen ($D_{\text{stat}} = 11,63 \text{ kHz}$). Die

Berechnung der Kopplungskonstante ist im Abschnitt 3.3.1. Alle Messungen wurden sowohl bei $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ als auch bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Da sich keine Unterschiede im Kurvenverlauf zeigen, werden hier nur die Ergebnisse für $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ dargestellt. Die Daten, die bei einer Temperatur von $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen wurden, sind im Anhang 7.9 dargestellt. Der theoretische Verlauf der ^{15}N -DIPSHIFT-Kurven kann mit Hilfe eines Simulationsprogramms für eine gegebene dipolare Kopplungskonstante berechnet werden. Das verwendete Programm wird im Abschnitt 7.6 näher erläutert. Durch den Vergleich der simulierten Kurvenverläufe für bekannte Kopplungskonstanten mit den experimentellen Daten wurden die dipolaren Kopplungskonstanten D_{res} extrahiert.

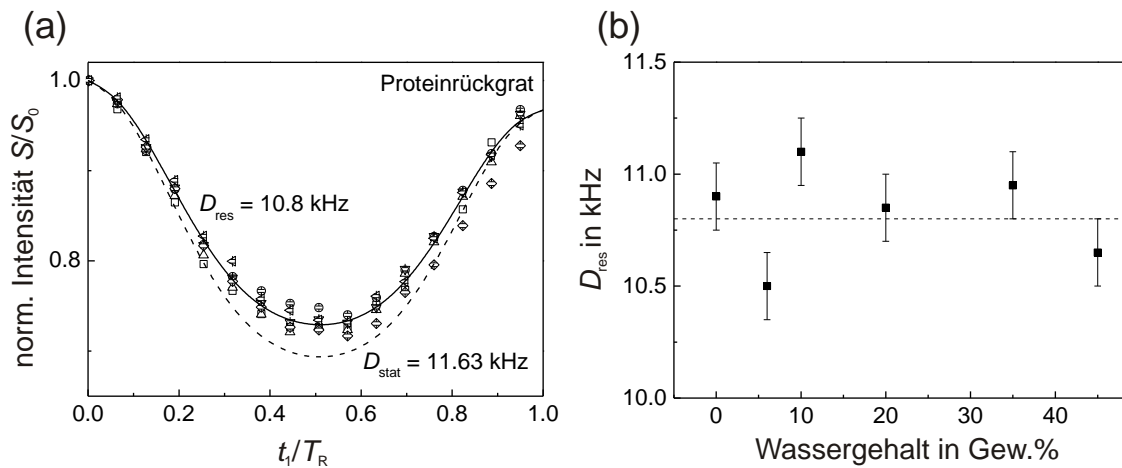


Abbildung 5.5 (a) ^{15}N -DIPSHIFT-Daten für Csp in Abhängigkeit vom Wassergehalt der Proben bei 0 (∇), 6 ($-$), 10 (8), 20 (X), 35 (M) und 45 Gew.% (Ξ), gemessen bei $T=10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die durchgezogene Linie entspricht dem simulierten Kurvenverlauf für eine ^{15}N - ^1H -Dipolkopplung von $D_{\text{res}} = 10,8\text{ kHz}$. Der simulierte Kurvenverlauf für eine statische Kopplung von $D_{\text{stat}} = 11,63\text{ kHz}$ ist gestrichelt eingezeichnet. Die Messunsicherheit der Daten liegt im Bereich der Datenpunkte. (b) Die aus den Kurvenverläufen von Abbildung (a) erhaltenen ^{15}N - ^1H -Dipolkopplungen D_{res} aufgetragen gegen den Wassergehalt der Csp-Probe. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die mittlere Dipolkopplungsstärke von $D_{\text{res}} = 10,8\text{ kHz}$ für alle Proben.

In Abbildung 5.5 (b) sind die dipolaren Kopplungskonstanten der NH-Gruppen über dem Wassergehalt der Proben aufgetragen. Es zeigt sich innerhalb des experimentellen Fehlers keine Abhängigkeit der dipolaren Kopplungskonstanten vom Wassergehalt. Der Fehler von D_{res} ergibt sich aus dem Bereich von Kopplungskonstanten, in denen eine Anpassung der jeweiligen ^{15}N -DIPSHIFT-Kurve möglich ist. Der mittlere Wert der Kopplungskonstante beträgt $D_{\text{res}} = (10,8 \pm 0,2)\text{ kHz}$. Mit diesem Wert kann der Ordnungsparameter S des Csp-Rückgrates wie folgt berechnet werden:

$$S = \frac{D_{\text{res}}}{D_{\text{stat}}} = 0,93 \pm 0,02 . \quad (5.1)$$

Wie bereits mehrfach erwähnt, beeinflussen sowohl die Geometrie als auch die Korrelationszeit der Bewegung die Relaxationsraten. Die Änderung der Relaxationsraten $\langle R_1 \rangle$ und $\langle R_{1\rho} \rangle$ in Abhängigkeit vom Wassergehalt kann daher auch durch die Unsicherheit in der Bestimmung der dipolaren Kopplungskonstante erklärt werden. Geht man davon aus, dass die Änderung der Relaxationsraten ausschließlich durch eine Änderung der Kopplungskonstanten verursacht wird und die Korrelationszeit der Bewegung unabhängig vom Wassergehalt ist, kann eine Näherung, wie von Krushelnitsky *et al.* [106] beschrieben, verwendet werden. Für Relaxationsrate R und Ordnungsparameter S gilt folgender Zusammenhang:

$$R \sim (1 - S^2). \quad (5.2)$$

Substituiert man $S = 0,93 \pm 0,02$ erhält man $R \sim 0,135 \pm 0,035$, das heißt die Unsicherheit in der Bestimmung der dipolaren Kopplungskonstante kann ungefähr eine Änderung der Relaxationsraten um 26 % erklären. Wie in Abbildung 5.4 (a) und (b) gezeigt, ist die Änderung der Relaxationsraten in Abhängigkeit vom Wassergehalt um ein Vielfaches größer. Die Daten zeigen daher eindeutig, dass die Änderung der Relaxationsraten mit dem Wassergehalt durch eine Änderung der Korrelationszeit der Bewegung verursacht wird, während die Geometrie dieser Bewegung unverändert bleibt.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den von Krushelnitsky *et al.* veröffentlichten Daten [102]. In dieser Arbeit wurden $\langle R_1 \rangle$ - und $\langle R_{1\rho} \rangle$ - Relaxationsraten von Lysozym in Abhängigkeit vom Wassergehalt für ^{13}C -Kerne bestimmt. Dabei wurden die dynamischen Eigenschaften der CH-Gruppen untersucht, um Aussagen über die dynamischen Eigenschaften des Proteinrückgrates zu treffen. Die Daten wurden dahingehend interpretiert, dass mit steigendem Wassergehalt die Amplitude der Bewegung zunimmt, während die Korrelationszeit unverändert bleibt. In dieser Studie wurden keine dipolaren Kopplungskonstanten gemessen, sondern die Amplitude der Bewegung wurde aus den Parametern der Anpassung der Relaxationsdaten gewonnen. Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse mit der veröffentlichten Relaxationsstudie zusammenpassen, wurden ^{13}C -DIPSHIFT-Experimente an Lysozym durchgeführt. Die Abbildung 5.6 stellt die ^{13}C -DIPSHIFT-Messdaten für eine trockene Lysozymprobe im Vergleich zu einer Lysozymprobe mit einem Wassergehalt von 47 Gew.% dar. Über den ^{13}C -DIPSHIFT-Daten sind die zur Auswertung genutzten spektralen Regionen gekennzeichnet. Region A repräsentiert die CH-Gruppen des Lysozym, Band B die CH_2 -Gruppen, Region C ist eine Mischung aus CH_2 - und CH_3 -Gruppen. Die spektrale Region D spiegelt hauptsächlich Signale der CH_3 -Gruppen wieder. Die in den DIPSHIFT-Daten eingezeichneten Linien entsprechen simulierten Kurven für die jeweils angegebenen dipolaren Kopplungen. Es wurde dasselbe Simulationsprogramm wie für die Auswertung der ^{15}N -DIPSHIFT-Daten in Abbildung 5.5 verwendet. Die untersuchten Lysozymproben wurden auf die gleiche Weise hergestellt wie im Abschnitt 3.3.3 für Csp erläutert. Die ^{13}C -DIPSHIFT-Kurven für Lysozym zeigen eine deutliche Abhängigkeit vom Wassergehalt der Probe für die CH- und CH_2 -Gruppen. Beide chemischen

Gruppen zeichnen sich für einen Wassergehalt von $h = 0$ Gew.% durch einen tiefen Kurvenverlauf aus, der durch eine große dipolare Restkopplung verursacht wird. Im Vergleich dazu ist der Kurvenverlauf für einen Wassergehalt von $h = 45$ Gew.% deutlich flacher und die zugrundeliegende dipolare Restkopplung damit geringer. Das bedeutet, dass sich die Geometrie der Bewegung der CH und CH₂-Gruppen des Lysozyms in Abhängigkeit vom Wassergehalt der Probe ändert. Dieses Ergebnis bestätigt die Daten von Krushelnitsky *et al.* und verdeutlicht, dass sich CH- und NH-Gruppen in Abhängigkeit vom Wassergehalt unterschiedlich verhalten. Eine mögliche Erklärung für das hier vorgestellte Resultat ist natürlich, dass die Experimente an zwei verschiedenen Proteinen (Csp und Lysozym) durchgeführt wurden und diese jeweils spezifische dynamische Eigenschaften besitzen. Naheliegender ist allerdings, dass die beiden betrachteten chemischen Gruppen aufgrund ihrer Position in der Proteinstruktur unterschiedliche dynamische Eigenschaften aufweisen. Die NH-Gruppen sind Bestandteil der Peptidbindung im Proteinerückgrat und damit Teil einer starren Struktur. Die NH-CO Gruppen spannen eine Ebene auf und sind an der Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt, die die Sekundärstruktur des Proteins stabilisieren. Diese Wasserstoffbrückenbindungen verringern den Bewegungsfreiraum der beteiligten chemischen Gruppen stark und werden nicht durch den Wassergehalt der Proben beeinflusst. Dies erklärt, warum keine Änderung der Amplitude der Bewegung der NH-Gruppen beobachtet wird. Die CH-Gruppen befinden sich zwar im Proteinerückgrat sind aber kein Bestandteil der Peptidbindung. An den CH-Gruppen sind die Seitenketten des Proteins lokalisiert, in denen sich die CH₂-Gruppen befinden. Sowohl die CH- als auch die CH₂-Gruppen unterliegen damit einer geringeren Einschränkung der Bewegung im Vergleich zu den NH-Gruppen. Damit kann das unterschiedliche Verhalten der chemischen Gruppen erklärt werden. In Abbildung 5.7 (a) ist zur Veranschaulichung ein Dipeptid dargestellt, wobei die an der Peptidbindung beteiligten chemischen Gruppen rot gekennzeichnet sind.

¹³C-Spektrum Lysozym

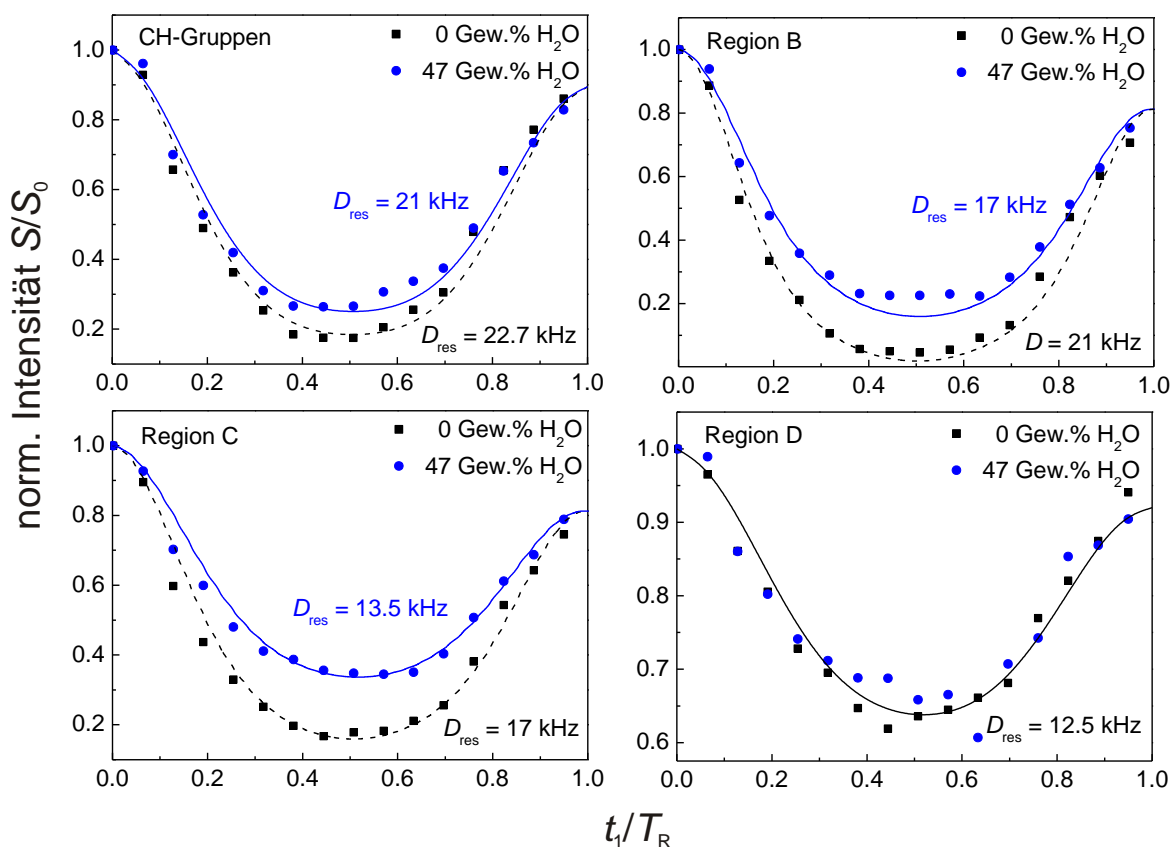
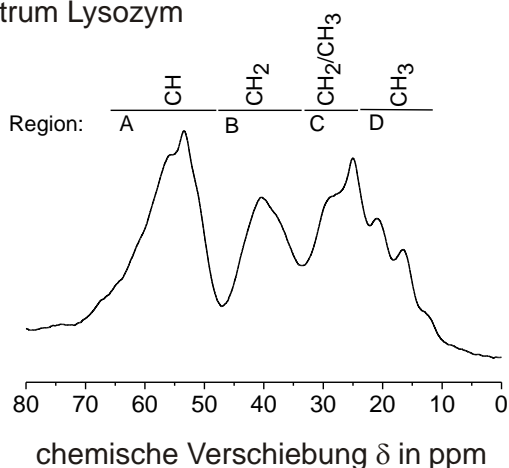
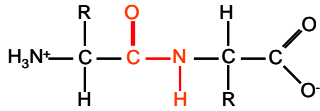


Abbildung 5.6 ¹³C-DIPSHIFT-Experiment an lyophilisiertem Lysozym bei zwei Wassergehalten. Die zur Auswertung genutzten spektralen Bereiche sind im Spektrum gekennzeichnet. Die eingezeichneten Linien entsprechen simulierten Kurven für die angegebenen dipolaren Kopplungen. Die Messunsicherheit der Daten liegt im Bereich der Datenpunkte. Die experimentellen Daten wurden von T. Zinkevich gemessen.

(a)



(b)

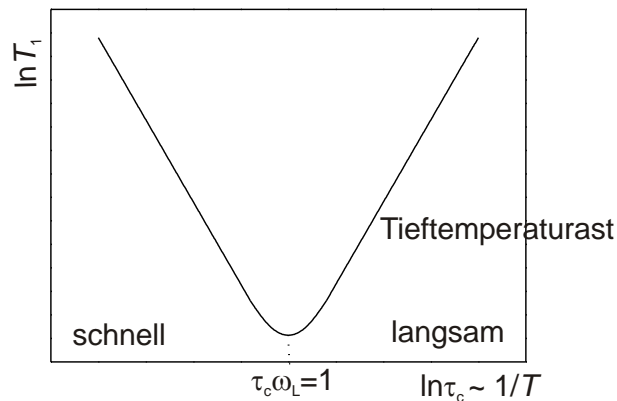


Abbildung 5.7 (a) Darstellung eines Dipeptides. Die an der Peptidbindung beteiligten chemischen Gruppen sind rot gekennzeichnet. (b) Schematische Darstellung des BPP-Grafen nach [48] für T_1 . Rechts vom Minimum befindet sich der Tieftemperaturast.

Bisher wurden die dynamischen Eigenschaften der NH-Gruppen mit Hilfe von Änderungen in der Geometrie der Bewegung und der Relaxationsraten charakterisiert. Mit den Relaxationsraten bzw. Relaxationszeiten $\langle T_1 \rangle$ und $\langle T_{1\rho} \rangle$ können mit Hilfe der Bloembergen-Purcell-Pound (BPP)-Theorie Aussagen über die Korrelationszeit der molekularen Bewegung getroffen werden. In Abbildung 5.7 (b) ist der Zusammenhang dargestellt. Für verschiedene Proteine wurde bereits gezeigt, dass die Relaxationszeiten $\langle T_1 \rangle$ und $\langle T_{1\rho} \rangle$ mit sinkender Temperatur zunehmen [103, 171]. Das heißt, für Messungen bei Raumtemperatur liegen die Korrelationszeiten τ_c auf dem so genannten Tieftemperaturast (links vom Minimum) der in Abbildung 5.7 (b) gezeigten BPP-Darstellung. Für die in dieser Arbeit gezeigten Relaxationsdaten kann man demnach den folgenden Schluss ziehen: Die Relaxationsraten steigen mit zunehmendem Wassergehalt der Csp-Proben, das heißt, die Relaxationszeiten werden kleiner und die Korrelationszeit der Bewegung τ_c nimmt folglich ab. Die Bewegung des Proteinrückgrates wird demzufolge mit zunehmendem Wassergehalt der Csp-Proben schneller.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Dynamik des Csp-Rückgrates vom Wassergehalt der Probe abhängt. Mit steigendem Wassergehalt nimmt die Korrelationszeit der Bewegung ab, das heißt, die Bewegung wird schneller. Gleichzeitig bleibt die Geometrie der Bewegung jedoch unverändert. Die Ergebnisse konnten mit bereits veröffentlichten Daten in Einklang gebracht werden.

5.3 Vergleich der Dynamik von lyophilisiertem Csp und einer lyophilisierten Csp/Trehalosemischung

Das ^{15}N -CPMAS-Spektrum liefert bereits Hinweise, dass die amorphe Trehalosematrix Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Csp ausbildet und damit teilweise die nicht-nativen Wasserstoffbrückenbindungen, welche in einer lyophilisierten Csp-Probe vorliegen, ersetzt. Inwiefern sich die Trehalosematrix auf die dynamischen Eigenschaften des Proteins auswirkt, ist jedoch nicht geklärt. Diese Frage soll in diesem Abschnitt untersucht und die dynamischen Eigenschaften des Csp innerhalb der Trehalosematrix charakterisiert werden.

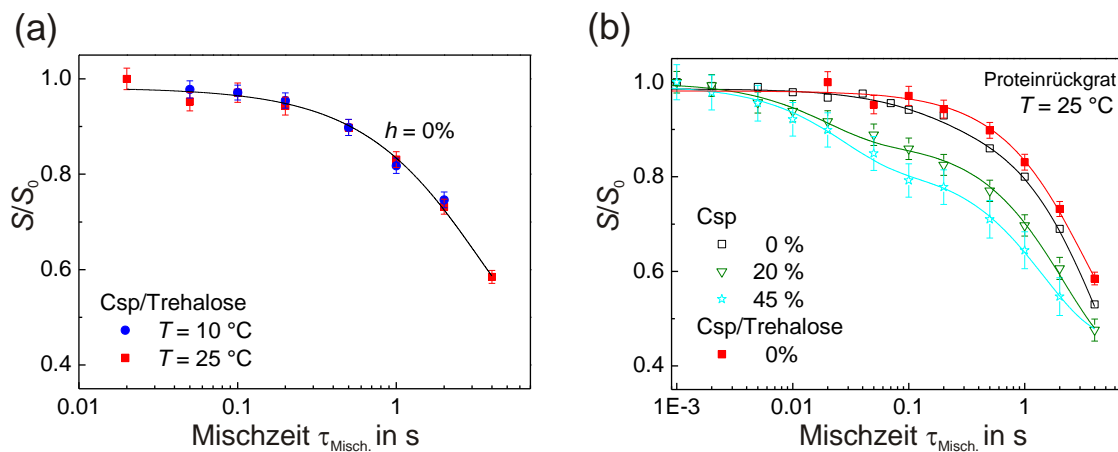


Abbildung 5.8 (a) Kurvenverlauf der Csp/Trehalosemischung für zwei verschiedene Temperaturen. (b) ^{15}N -CODEX-Experiment für die NH-Gruppen des Csp-Rückgrates für Csp eingebettet in eine amorphe Trehalosematrix im Vergleich zu lyophilisiertem Csp. Die durchgezogenen Linien sollen den Verlauf der Daten verdeutlichen. Die Messunsicherheit wurde aus dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis der experimentellen Daten berechnet. Alle Messungen wurden mit $\nu_r = 6\text{ kHz}$ und $NT_R = 2,3\text{ ms}$ durchgeführt.

Charakterisierung der langsamen Dynamik des Csp-Rückgrates mit Korrelationszeiten im ms- bis s-Bereich. In Abbildung 5.8 (a) sind die ^{15}N -CODEX-Daten für die NH-Gruppen der Csp/Trehalosemischung für $T = 10\text{ °C}$ und 25 °C dargestellt. Es ist keine Abhängigkeit der Messdaten von der Temperatur zu erkennen, das heißt, die NH-Gruppen besitzen keine dynamischen Eigenschaften mit Korrelationszeiten im ms- bis s-Bereich. Die Form der Kurven wird allein durch Spindiffusion bestimmt. Ein Vergleich der ^{15}N -CODEX-Kurven der Csp/Trehalosemischung mit verschiedenen Kurven des reinen Csp mit verschiedenen Wassergehalten ist in Abbildung 5.8 (b) abgebildet. Der Kurvenverlauf der Csp/Trehalosemischung ähnelt mehr dem Kurvenverlauf von trockenem lyophilisiertem Csp als dem von lyophilisiertem Csp mit einem Wassergehalt von 20 bzw. 45 Gew.%. Wie bereits erwähnt, hängt die Spindiffusion vom Abstand der Atome zueinander ab und damit von der Sekundärstruktur der Proteine. Daher wird die Sekundärstruktur des Csp in der trockenen Csp/Trehalosemischung ähnlich wie in der trockenen lyophilisierten Csp-Probe angenommen.

Charakterisierung der Dynamik des Csp-Rückgrates mit Korrelationszeiten im ns- bis μ s-Bereich. Wie wirkt sich die amorphe Trehalosematrix auf die Dynamik des Proteinerückgrates des Csp für schnelle Bewegungen aus? In Abbildung 5.9 sind die Relaxationsdaten für Csp in einer trockenen Trehalosematrix im Vergleich zu den im Abschnitt 5.2 vorgestellten Ergebnissen des lyophilisierten Csp gezeigt. Die Relaxationsraten der NH-Gruppen der Csp/Trehalosemischung sind kleiner als die Relaxationsraten des lyophilisierten Csp. Die Trehalosematrix beeinflusst demnach die Beweglichkeit der NH-Gruppen des Proteins. Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits erläutert, dass die Relaxationsraten sowohl durch eine Änderung der Korrelationszeit der Bewegung als auch durch Änderungen in der Geometrie der Bewegung beeinflusst werden. Um zu klären, welche Effekte hier eine Rolle spielen, wurde auch für diese Probe die dipolare Kopplungskonstante D_{res} gemessen. In Abbildung 5.10 sind die ^{15}N -DIPSHIFT-Kurven von lyophilisiertem Csp und der trockenen Csp/Trehalosemischung dargestellt. Es kann kein Unterschied im Kurvenverlauf der beiden Proben festgestellt werden, das heißt, die dipolare Kopplung ist unverändert. Die amorphe Trehalosematrix um das Csp verändert demnach zwar die Korrelationszeit der Bewegung der NH-Gruppen des Proteins, beeinflusst aber die Geometrie der Bewegung nicht. Aufgrund des bereits in Abschnitt 5.2 erläuterten Zusammenhangs zwischen Relaxationsrate und Korrelationszeit kann hier festgehalten werden, dass die Dynamik der NH-Gruppen durch die umgebende Trehalosematrix langsamer wird. Es soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die hier festgestellten Ergebnisse für die NH-Gruppen des Proteins gelten. Für andere chemische Gruppen des Proteins, vor allem in den Seitenketten, könnte die Trehalosematrix durchaus eine Änderung der Geometrie der Bewegung bewirken.

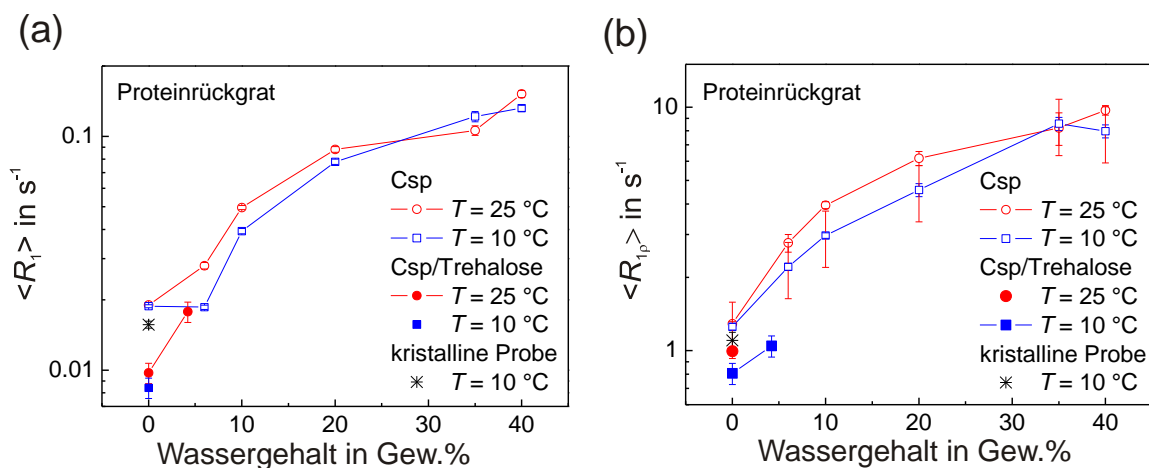


Abbildung 5.9 (a) $\langle R_1 \rangle$ - und (b) $\langle R_{1\rho} \rangle$ - Daten für lyophilisiertes Csp in Abhängigkeit vom Wassergehalt der Proben, gemessen bei zwei verschiedenen Temperaturen (ungefüllte Symbole). Im Vergleich sind die Daten für die Csp/Trehalosemischungen für 0 und 4,2 Gew.% Wassergehalt (gefüllte Symbole), sowie für eine Csp/Trehalosemischung mit kristallisierter Trehalose dargestellt.

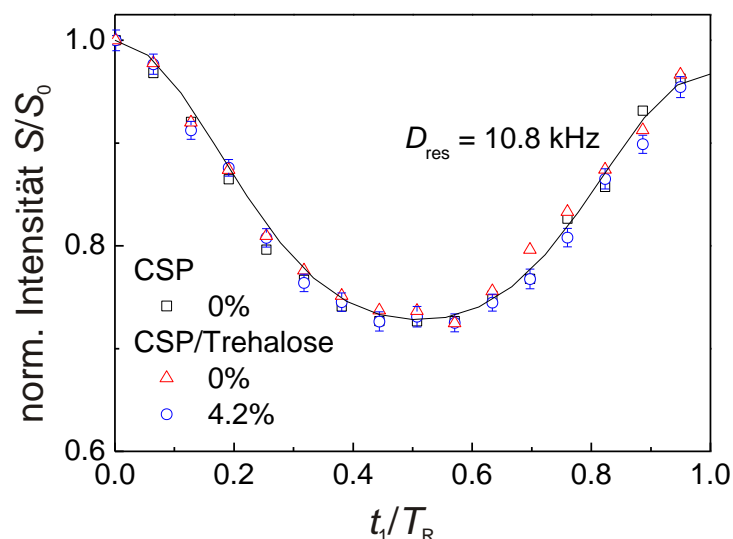


Abbildung 5.10 ^{15}N -DIPSHIFT-Kurven für Csp/Trehalosemischung bei zwei Wassergehalten von 0 und 4,2 Gew.% im Vergleich zu lyophilisiertem Csp mit einem Wassergehalt von 0 Gew.% gemessen bei $T = 10 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.4 Einfluss von Wassermolekülen auf die dynamischen Eigenschaften von Csp in einer Csp/Trehalosemischung

In Abbildung 5.9 sind ebenfalls die Relaxationsraten für eine Csp/Trehalosemischung mit einem Wassergehalt von 4,2 Gew.% dargestellt. Es ist zu erkennen, dass diese Relaxationsraten im Vergleich zur trocknen Csp/Trehalosemischung größer sind. Die dipolare Kopplungskonstante D_{res} bleibt dagegen unverändert, wie in Abbildung 5.10 zu erkennen ist. Das heißt, die Bewegung der NH-Gruppen des Proteins werden im Vergleich zur trockenen Mischung schneller, während die Geometrie der Bewegung unverändert ist. Die Relaxationsraten der Csp/Trehalosemischung mit einem Wassergehalt von 4,2 Gew.% befinden sich im Bereich der trockenen Csp-Proben. Aus diesen experimentellen Daten können Rückschlüsse auf den strukturellen Aufbau der Mischung gezogen werden. Es liegen zwei Möglichkeiten für die Verteilung der Wassermoleküle in der Probe nahe. Sie können sich einerseits bevorzugt an der Oberfläche des Proteins anlagern (Hypothese des Wassereinschlusses) oder sich andererseits gleichmäßig in der Probe verteilen. Bei einer homogenen Verteilung der Wassermoleküle in der Probe sind die Wechselwirkungen zwischen Protein und Wassermolekülen gering, da der Anteil an Protein in der Probe lediglich 20 Gew.% beträgt. Deswegen ist bei einer Zugabe von 4,2 Gew.% Wasser kein Einfluss auf die Relaxationsraten zu erwarten. Lagern sich die Wassermoleküle dagegen bevorzugt am Protein an, entsteht dort eine lokal erhöhte Wasserkonzentration. Befinden sich die Wassermoleküle bevorzugt in der Nähe des Proteins bedeutet ein Wassergehalt von 4,2 Gew.% in der Csp/Trehalosemischung einen Wassergehalt von ~ 20 Gew.% für das Csp. In diesem Fall ist

eine Änderung der Relaxationsraten $\langle R_1 \rangle$ und $\langle R_{1\rho} \rangle$ im Vergleich zur trockenen Csp/Trehalosemischung zu erwarten. Da eine solche Änderung auftritt, kann der Schluss gezogen werden, dass sich die Wassermoleküle in der Csp/Trehalosemischung bevorzugt am Csp anlagern. In der Abbildung 5.11 ist der strukturelle Aufbau der trockenen Csp/Trehalosemischung (b) im Vergleich zur Csp/Trehalosemischung mit $h = 4,2$ Gew.% als Modell dargestellt. Die gemessenen Relaxationsraten $\langle R_1 \rangle$ und $\langle R_{1\rho} \rangle$ in der Csp/Trehalosemischung mit $h = 4,2$ Gew.% sind kleiner als $\langle R_1 \rangle$ und $\langle R_{1\rho} \rangle$ für Csp mit $h = 20$ Gew.%. Aufgrund der Ausführungen im Abschnitt 5.2 (Abbildung 5.7) bedeutet dies, dass die Bewegung des Csp-Rückgrates in der Trehalosematrix mit $h = 4,2$ Gew.% langsamer ist im Vergleich Csp mit $h = 20$ Gew.%. Daraus kann geschlossen werden, dass nicht alle Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Csp und Trehalose durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Csp und Wasser ersetzt werden. Die verbleibenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Csp und der Trehalosematrix schränken die Beweglichkeit des Csp-Rückgrates ein. Die Untersuchung einer Csp/Trehalose-Probe mit einem höheren Wassergehalt ist nicht möglich, da mit steigendem Wassergehalt eine Kristallisation der Trehalosematrix einsetzt, welche sofort im ^{13}C -Spektrum zu erkennen ist (Abbildung 5.2). Tatsächlich beginnt der Prozess der Kristallisation bereits bei einem Wassergehalt von ~ 4 Gew.% jedoch auf einer sehr langsamen Zeitskala. Eine im ^{13}C -CPMAS-Spektrum sichtbare Kristallisation der Probe trat ungefähr 4 Wochen nach der Wasserzugabe auf. Aufgrund dessen konnten die Relaxationsraten nicht für beide Temperaturen bestimmt werden.

Bei einem Wassergehalt von 4,2 Gew.% ist eine komplette Kristallisation der Probe nicht möglich, da das molare Verhältnis von Wasser zu Trehalose nicht ausreicht, um Trehalose Dihydrat zu bilden. Zur Untersuchung des Einflusses von kristalliner Trehalose auf Csp wurde der Mischung 10 Gew.% Wasser zugegeben. Nachdem die Trehalose vollständig kristallisiert war, wurde die Probe eine Stunde in Vakuumatmosphäre gelagert, um nicht gebundene Wassermoleküle so weit wie möglich zu entfernen. Die Relaxationsraten für diese Probe sind ebenfalls in Abbildung 5.9 dargestellt. Es ergeben sich für diese Probe annähernd die gleichen Relaxationsraten wie für lyophilisiertes trockenes Csp. Das heißt, die Dynamik des Csp wird von der kristallinen Trehalosematrix nicht beeinflusst.

Die Kristallisation von Trehalose/Wassermischungen wurde in der Literatur ab einem molaren Verhältnis von 1:2 (Trehalose:Wasser) beobachtet [173]. In der Csp/Trehalosemischung beginnt die Kristallisation bereits ab einem molaren Verhältnis von 1:1. Dies deutet darauf hin, dass es in der Probe lokal erhöhte Konzentrationen von Wasser gibt, bei denen der Kristallisationsprozess stattfinden kann. Dies stützt die bereits beschriebene Beobachtung, dass sich die Wassermoleküle inhomogen in der Csp/Trehalosemischung verteilen. Die Wassermoleküle bevorzugen die Nähe zum Protein, wodurch lokal eine genügend große Wasserkonzentration vorhanden ist, um eine Kristallisation der Trehalosemoleküle zu ermöglichen. Aufgrund der beginnenden Kristallisation der Trehalose in der Probe konnten die ^{15}N -CODEX-Experimente zur Charakterisierung der langsamen Dynamik mit Korrelationszeiten im Bereich von ms bis s nicht durchgeführt werden.

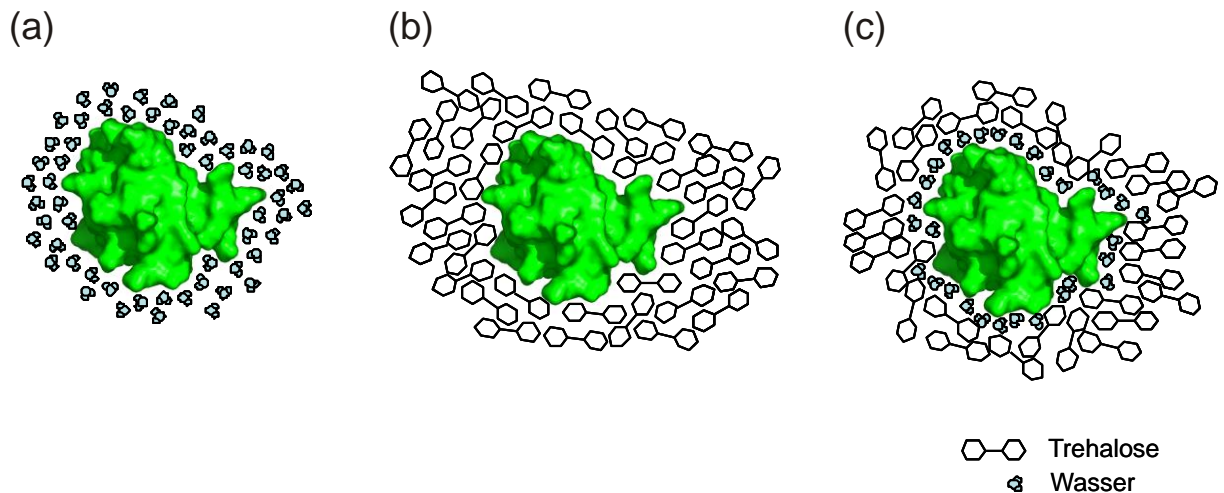


Abbildung 5.11 Modellhafte Darstellung der Struktur der untersuchten Probensysteme. (a) Csp mit Wassermolekülen in der Umgebung, (b) trockene Csp/Trehalosemischung und (c) Csp/Trehalosemischung mit einem geringen Wassergehalt.

5.5 Zusammenfassung: Struktureller Aufbau und dynamische Eigenschaften von Csp/Trehalosesystemen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse dieses Kapitels zusammengefasst. Die Abhängigkeit der dynamischen Eigenschaften des Csp, die sich aus den gemessenen experimentellen Daten ergeben, werden im Zusammenhang mit der biologischen Schutzwirkung der Trehalose betrachtet. Die Schlussfolgerungen, die gezogen werden können, werden unter den bereits in der Einleitung genannten Fragen zusammengefasst.

- Wie wirkt sich eine amorphe Trehalosematrix auf die Sekundärstruktur des Proteins Csp aus?

Durch das Einbetten des Csp in eine amorphe Trehalosematrix werden nicht-native intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen des Csp durch Bindungen zu der Trehalosematrix ersetzt. Dies wurde an der größeren spektralen Auflösung des Csp im ^{15}N -CPMAS-Spektrum in der Mischung gezeigt. Die ^{15}N -CODEX-Kurven verdeutlichen jedoch, dass die Sekundärstruktur des Csp nicht gravierend von der amorphen Trehalosematrix beeinflusst wird. Die Sekundärstruktur des Csp in der Csp/Trehalosemischung weist mehr Ähnlichkeit mit der Sekundärstruktur der trockenen Csp-Probe als mit der Sekundärstruktur des Csp mit einem Wassergehalt von 20 bzw. 45 Gew.% auf.

- Wie werden die dynamischen Eigenschaften des Rückgrates des Csp von einer amorphen Trehalosematrix beeinflusst? Welche Informationen über den strukturellen Aufbau der Mischung lassen sich daraus ableiten?

Bereits durch den Vergleich der ^{15}N -CPMAS-Spektren von lyophilisiertem trockenem Csp, der trockenen Csp/Trehalosemischung sowie einer gefrorenen Csp-Probe ist zu erkennen, dass sich das Csp innerhalb der Trehalosematrix in einer nativeren Umgebung befindet im Vergleich zum trockenen lyophilisierten Csp. Dies wird auf die Ausbildung weniger nicht-nativer inter- und intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der amorphen Trehalosematrix zurückgeführt. Bereits der Vergleich der spektralen Auflösung des CPMAS-Spektrums der Csp/Trehalosemischung und einer gefrorenen Csp-Probe zeigt jedoch, dass die amorphe Trehalosematrix nicht die gleichen Umgebungsbedingungen bietet wie eine vollständige gefrorene Hydrathülle um das Csp.

Es konnte für keine untersuchte Csp-Probe eine langsame Dynamik mit Korrelationszeiten im ms- bis s-Bereich detektiert werden. Die Relaxationsraten der Bewegung des Proteinrückgrates in der lyophilisierten Csp-Probe werden mit zunehmendem Wassergehalt größer. Daraus kann geschlossen werden, dass die Korrelationszeiten der Bewegung des Proteinrückgrates mit zunehmendem Wassergehalt der Probe kleiner werden, das heißt, die Bewegungen werden schneller. Dieser Effekt kann darauf zurückgeführt werden, dass mit zunehmendem Wassergehalt die nicht-native intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen weniger werden und dadurch die Bewegung des Rückgrates schneller wird. Die Geometrie der Bewegung bleibt in Abhängigkeit des Wassergehaltes unverändert. Diese Eigenschaft ist auf die Lage der NH-Gruppen im Protein zurückzuführen. Sie sind Teil der Peptidbindung, welche in ihrer Bewegungsfreiheit stark eingeschränkt ist. Die dynamischen Eigenschaften der NH-Gruppe lassen sich nicht für andere chemische Gruppen im Protein verallgemeinern. Je nach der Lage der chemischen Gruppen in der Proteinstruktur (z. B. bewegliche Seitenketten), kann sich die Geometrie der Bewegung in Abhängigkeit vom Wassergehalt der Proteinprobe verändern. Dies wurde in anderen Studien bereits beschrieben [43, 102] und mit ^{13}C -Experimenten auch in dieser Arbeit untermauert.

Durch das Einbetten des Csp in eine amorphe Trehalosematrix sind die Relaxationsraten der NH-Gruppen des Rückgrates im Vergleich zum trockenen lyophilisierten Csp verringert. Da im Vergleich zum lyophilisierten Csp die Geometrie der NH-Bewegung unverändert ist, muß sich die Korrelationszeit der NH-Gruppen ändern. Im Vergleich zum lyophilisierten Csp führen die NH-Gruppen damit eine langsamere Bewegung aus. Dieses Ergebnis kann man sich auf molekularer Ebene wie folgt vorstellen: Die Trehalosematrix bildet ein stabilisierendes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen mit der Proteinoberfläche aus, wie in der Wasserersetzungshypothese beschrieben. Gleichzeitig ist die glasige Trehalosematrix eine viskosere Umgebung für das Protein im Vergleich zum Wasser der Hydrathüllen (Glashypothese), wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen wesentlich langlebiger und steifer sind. Die Stabilisierung des Proteins kann daher durch ein Zusammenspiel der zwei Theorien, der Hypothesen der Wasserersetzung und der Glashypothese, erklärt werden.

- Wie wirkt sich die Zugabe von Wassermolekülen auf die dynamischen Eigenschaften des Csp und den strukturellen Aufbau der Csp/Trehalosemischung aus?

Der Vergleich der Relaxationsraten der NH-Gruppen in der Csp/Trehalosemischung mit $h = 4,2$ Gew.% und der trockenen Csp/Trehalosemischung zeigt, dass $\langle R_1 \rangle$ und $\langle R_{1\rho} \rangle$ mit zunehmendem Wassergehalt der Probe größer werden, während gleichzeitig die dipolare Kopplungskonstante gleichbleibt. Das bedeutet, dass die Bewegungen der NH-Gruppen des Csp in der amorphen Trehalosematrix durch die Zugabe von Wasser schneller werden, während die Geometrie der Bewegung unverändert ist.

Es lässt sich also, trotz der geringen Menge von Csp in der Csp/Trehalosemischung, ein signifikanter Einfluss der Wassermoleküle auf die dynamischen Eigenschaften des Csp feststellen. Aufgrund dieser Beobachtungen kann geschlossen werden, dass sich die Wassermoleküle bevorzugt an der Oberfläche der Proteine ansammeln, anstatt sich homogen über die gesamte Probe zu verteilen. Dadurch entsteht eine lokal erhöhte Wasserkonzentration, die ausreicht, um die Beweglichkeit des Csp zu beeinflussen. Um dieses Ergebnis zu verdeutlichen, ist in Abbildung 5.11 ein Modell des strukturellen Aufbaus von Csp/Trehalosemischungen mit und ohne Wasser und des Csp mit Wasser dargestellt. Eine weitere Erhöhung der Wasserkonzentration in der Csp/Trehalosemischung führt zu einer beginnenden Kristallisation der Trehalosematrix. Ein Vergleich der dynamischen Eigenschaften des Csp in einer vollständig kristallinen Trehalosematrix mit lyophilisierten Csp mit $h = 0$ Gew.% zeigt, dass die kristalline Trehalosematrix keinen Einfluss auf das Csp hat. Das heißt, dass die dynamischen Eigenschaften des Proteins vom Zustand der umgebenden Trehalosematrix abhängen. Während eine amorphe Trehalosematrix die dynamischen Eigenschaften des Csp beeinflusst, wirkt sich eine kristalline Trehalosematrix nicht auf das Csp aus.

Die inhomogene Verteilung des Wassers in der Csp/Trehalosemischung stützt die in der Einleitung vorgestellte Hypothese, dass Wasser von der Trehalosematrix eingeschlossen wird und dadurch das Protein stabilisiert wird. Dies geschieht durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Csp und Trehalose. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Trehalosematrix nur einen Einfluss auf das Csp hat, wenn sie sich im amorphen Zustand befindet. Vermutlich können Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Csp und Trehalose nur innerhalb einer amorphen Trehalosematrix ausgebildet werden. Dies ist ein Beweis dafür, dass der amorphe Zustand der Trehalosematrix für die biologische Schutzwirkung eine wichtige Rolle spielt (Glashypothese). Offensichtlich kann nur eine Kombination der in der Einleitung beschriebenen Hypothesen die biologische Schutzwirkung von Trehalose erklären.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag um die Funktionsweise der biologischen Schutzwirkung von Saccharidmolekülen zu verstehen. Dafür wurden zwei Probensysteme mit Hilfe von NMR-Experimenten untersucht:

- Lysozym/Saccharidlösungen und
- lyophilisierte Csp/Trehalosemischungen.

Die Lysozym/Saccharidlösungen wurden hinsichtlich der Anlagerung von Saccharidmolekülen an der Oberfläche des Lysozyms untersucht. Die Literaturdaten bezüglich dieser Fragestellung bieten kein einheitliches Bild, da eine systematische Untersuchung des Anlagerungsprozesses in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen bisher nicht durchgeführt wurde. Dies war das Ziel der im Kapitel 4 vorgestellten Experimente. Es wurden die Diffusionskonstanten der gelösten Teilchen mit PFG-NMR-Experimenten gemessen. Auf Grundlage dieser Messdaten konnten die hydrodynamischen Radien der Teilchen berechnet werden, welche eine Größenabschätzung der Moleküle ermöglichen. In den Experimenten wurde die Wechselwirkung der drei Disaccharide Trehalose, Saccharose und Maltose sowie des Monosaccharides Glucose mit dem Protein Lysozym untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Anlagerung von Saccharidmolekülen an der Oberfläche von Lysozym für alle Substanzen zu beobachten ist. Dieser Prozess hängt jedoch von den experimentellen Bedingungen ab, das heißt, nur für niedrige pH-Werte der Lösung und eine hohe Konzentration von gelösten Teilchen findet eine Anlagerung statt. Der Anlagerungsprozess ist darüber hinaus bei gleichen experimentellen Bedingungen nicht für alle Saccharide im gleichen Masse effektiv. Während Trehalose und Maltose ein ähnliches Verhalten zeigen, lagert sich Saccharose erst bei niedrigeren pH-Werten der Lösung und höheren Konzentrationen der gelösten Teilchen an. Während das Monosaccharid Glucose sich am Lysozym anlagert bis eine einfache Bedeckung der Oberfläche erreicht ist, zeigen alle Disaccharide eine Anlagerung über die einfache Bedeckung der Oberfläche hinaus. Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse bringen die veröffentlichten Studien über das Aggregationsverhalten von Lysozym und Saccharide, hinsichtlich der Abhängigkeit des Aggregationsprozesses von den experimentellen Bedingungen, in Einklang.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem strukturellen Aufbau und den dynamischen Eigenschaften von Csp/Trehalosemischungen im Festkörper. Hierfür wurde das Protein Csp in eine Trehalosematrix eingebettet. Der Einfluss der Matrix auf die dynamischen Eigenschaften des Proteins wurde in Abhängigkeit vom Zustand der Matrix (amorphe oder kristalline Matrix) und dem Wassergehalt der Probe untersucht. Im Rahmen dieser Experimente konnten folgende Punkte festgestellt werden:

In einer lyophilisierten Csp-Probe konnte keine molekulare Dynamik mit Korrelationszeiten im ms bis s Bereich des Csp-Rückgrates festgestellt werden. Die molekulare Dynamik des

Csp mit Korrelationszeiten im ns bis μ s Bereich ist vom Wassergehalt der Probe abhängig. Mit steigendem Wassergehalt nimmt die Korrelationszeit ab, das heißt, die Bewegung wird schneller. Die Geometrie der Bewegung bleibt dabei unbeeinflusst. Werden die Csp-Moleküle in eine amorphe Trehalosematrix gebettet, werden die Bewegungen des Rückgrates mit Korrelationszeiten im ns bis μ s Bereich langsamer, während deren Geometrie unverändert bleibt. Es konnte gezeigt werden, dass eine kristalline Trehalosematrix, im Gegensatz zur amorphen Matrix, keinen Einfluss auf die dynamischen Eigenschaften des Csp hat. Wird der amorphen Csp/Trehalosemischung Wasser zugegeben, verteilt sich dieses inhomogen innerhalb der Probe, die Wassermoleküle lagern sich bevorzugt an der Oberfläche des Csp an.

Betrachtet man diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den bestehenden Theorien zur Erklärung der biologischen Schutzwirkung der Trehalose, zeigt sich, dass nur eine Kombination der Hypothesen (Wasserersetzung, Wassereinschluss und Glashypothese) die Interaktion des Saccharides mit Csp erklären kann.

Die amorphe Trehalosematrix bildet Wasserstoffbrücken zum Protein aus und verhindert damit zu einem Teil das Entstehen von nicht-nativen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen im Protein. Das heißt, die Trehalosemoleküle ersetzen teilweise die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und umgebenden Wassermolekülen, wenn ein starker Wassermangel eintritt. Im Rahmen der Experimente dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass kristalline Trehalose im Gegensatz zur amorphen Trehalose keinen Einfluss auf die dynamischen Eigenschaften des Csp hat. Die Eigenschaft der Trehalose, Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein zu bilden, ist eng mit dessen amorpher Struktur verknüpft. Die Ausbildung einer amorphen Trehalosematrix ist eine notwendige Voraussetzung zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Trehalose. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Fall eines starken Wassermangels nur eine Kombination der Wasserersatzungs- und Glashypothese die Funktionsweise der Trehalose erklären kann.

Wird der Csp/Trehalosemischung Wasser zugegeben, ändern sich die dynamischen Eigenschaften des Csp. Mit zunehmendem Wassergehalt der Probe ähneln die dynamischen Eigenschaften des Csp in der Trehalosematrix denen in einer reinen Csp-Probe. Dieser Effekt ist, trotz der geringen Menge von Csp in der Mischung, sehr stark. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass sich die Wassermoleküle nicht homogen in der Probe verteilen, sondern sich bevorzugt am Csp anlagern. Um das Csp bildet sich eine Hydrathülle aus, die von der amorphen Trehalosematrix umgeben ist. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese vom Wassereinschluss durch die Trehalosematrix.

7 Anhang

7.1 Experimentelle Parameter

7.1.1 NMR-Experimente in Lösung

Alle PFG-NMR-Experimente in dieser Arbeit wurden mit einem BRUKER AVANCE II-Spektrometer an einem 600 MHz Magneten durchgeführt. Es wurde ein QXI-Probenkopf mit z-Gradient verwendet. Die Wartezeit dI , zwischen zwei Experimenten die hintereinander aufgenommen wurden, betrug für alle Diffusionsmessungen $dI = 2$ s, wobei für jedes Experiment das Signal von 16 einzelnen Experimenten aufsummiert wurde. Die Pulslänge des $(\pi/2)$ -Pulses auf dem Protonenkanal betrug $8,8 \mu\text{s}$. Die Aufnahme der Daten erfolgte für $1,5$ s. Für jede Probe wurde ein 3D-Shim bis zur 3. Ordnung mit Hilfe der Spektrometer Software durchgeführt [174]. Die Diffusionszeiten waren zwischen $\Delta = 70$ und $\Delta = 250$ ms lang, wobei die Länge des Gradienten für alle Diffusionsexperimente $\delta = 3$ ms betrug.

Um den Diffusionskoeffizienten mit Hilfe der PFG-NMR möglichst genau messen zu können, muss die Viskosität der Lösung, deren Temperatur und die Stärke des Feldgradienten bekannt sein. Auch der Einfluss von Konvektionsströmen innerhalb der Lösung muss berücksichtigt werden. Während der experimentelle Zugang zur Viskosität bereits im Abschnitt 3.2.3 erläutert wurde, werden im Folgenden die Auswirkungen von Konvektionsströmen sowie die Durchführung der Temperatur- und Gradientenkalibrierung erläutert. Am Ende dieses Abschnittes wird auf die Auswirkungen eines sogenannten Spoilergradienten eingegangen.

Temperaturkalibrierung. Da der Diffusionskoeffizient D eines Moleküls direkt von der Temperatur der Lösung abhängt, ist es notwendig diese zu kennen. Die Temperierung innerhalb des verwendeten QXI-Probenkopfes wird über einen geheizten Gasstrom vorgenommen. Damit dieser eine möglichst gleichmäßige Temperierung der Probe gewährleistet, wurde ein hoher Gasfluss von 535 l/h verwendet. Da die am Spektrometer eingestellte Temperatur $T_{\text{eing.}}$ nicht der tatsächlichen Temperatur in der Lösung $T_{\text{tat.}}$ entspricht, muss eine Temperaturkalibrierung vorgenommen werden. Um den Fehler der Kalibrierung abschätzen zu können, wurde diese mit drei verschiedenen Substanzen vorgenommen. Die verwendeten Lösungen sowie die Ergebnisse der Kurvenanpassungen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Einzelheiten zur Durchführung der Temperaturkalibrierung können in den zugehörigen Literaturstellen, die in der Tabelle angegeben sind, nachgelesen werden. Die Rohdaten sind in Abbildung 7.1 zusammen mit den Kurvenanpassungen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Temperaturkalibrierung von der verwendeten Substanz abhängt. Ein Vergleich der Datenverläufe zeigt, dass die absolute Temperatur in der Probe mit den verwendeten Methoden mit einer Genauigkeit von $\pm 0,7$ % bestimmt werden kann. Das bedeutet für $T_{\text{tat.}} = 298$ K eine Genauigkeit von ± 2 K. Für die im Kapitel 4 vorgestellten Daten wurde die Kalibrierung mit Hilfe der 80 % Ethylenglykol – DMSO d_6 Probe angewendet. Da die Temperatur für die Messung des Diffusionskoeffizienten eine

entscheidende Größe darstellt, wurde die Temperaturkalibrierung im Laufe der Experimente stichpunktartig überprüft. Es zeigte sich keine Abweichung von der Ursprungskalibrierung.

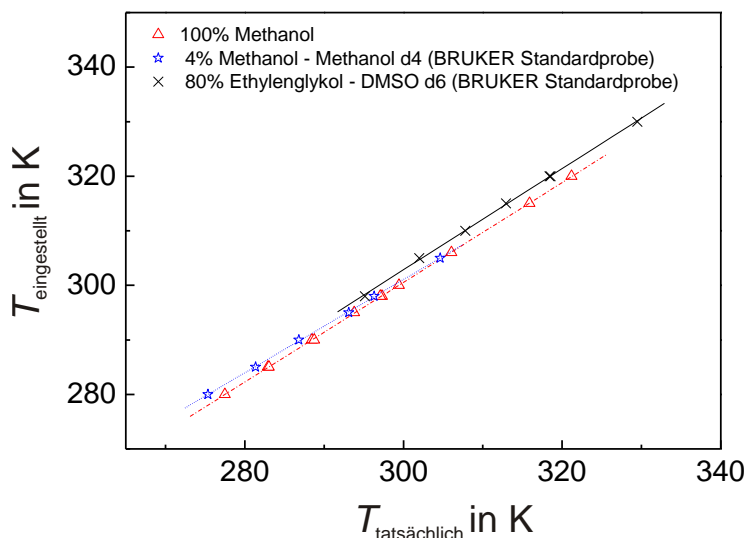


Abbildung 7.1 Rohdaten der Temperaturkalibrierung mit 100% Methanol, 4% Methanol - Methanol d4 und 80% Ethylenglykol - DMSO d6. Die eingezeichneten Kurvenanpassungen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6 Kurvenanpassungen der Temperaturkalibrierung der am Spektrometer eingestellten Temperatur $T_{\text{eing.}}$ und der tatsächlichen Temperatur der Lösung $T_{\text{tat.}}$ für die verschiedenen Substanzen. In Klammern sind die dazugehörigen Literaturstellen angegeben.

Probe	Kurvenanpassung
100 % Methanol [175]	$T_{\text{eing.}} [\text{K}] = 0,91 \cdot T_{\text{tat.}} [\text{K}] + 26,23$
80 % Ethylenglykol - DMSO d6 (BRUKER: $T [\text{K}] = (4,218 - \delta [\text{ppm}]) / 0,009132$)	$T_{\text{eing.}} [\text{K}] = 0,93 \cdot T_{\text{tat.}} [\text{K}] + 24,65$
4 % Methanol - Methanol d4 [176]	$T_{\text{eing.}} [\text{K}] = 0,86 \cdot T_{\text{tat.}} [\text{K}] + 44,50$

Gradientenkalibrierung. Das PFG-NMR-Experiment wird in Abhängigkeit von der Stärke des Feldgradienten durchgeführt. Der Feldgradient wird dafür am Spektrometer in % des maximal verfügbaren Feldgradienten eingestellt. Um die Rohdaten des Diffusionsexperimentes auszuwerten, muss jedoch die Gradientenstärke in T/m bekannt sein. Daher wurde eine Kalibrierung des Feldgradienten vorgenommen, die eine Zuordnung der Angabe des Gradienten in % am Spektrometer mit der Gradientenstärke in T/m ermöglicht. Diese Gradientenkalibrierung wurde mit Hilfe eines Phantoms durchgeführt. Eine Beschreibung der

experimentellen Umsetzung findet sich in [177]. Das verwendete Phantom besteht aus einem mit Wasser gefüllten 5 mm NMR-Röhrchen, in dem sich ein Teflonplättchen mit einer Ausdehnung $\Delta z = (2,00 \pm 0,03)$ mm in Richtung des Feldgradienten befindet. Von diesem Phantom wird mit Hilfe einer bildgebenden NMR-Sequenz eine Abbildung erzeugt, bei der die Signalintensität S die ^1H -Verteilung in der Probe widerspiegelt. In Abbildung 7.2 (a) ist die Intensität des ^1H -Signals im Längsschnitt durch das NMR-Röhrchen dargestellt. An der Stelle des Teflonplättchens sinkt die Signalintensität der Protonen ab, da Teflon $(\text{C}_2\text{F}_4)_n$ keine ^1H -Kerne enthält. Die Breite dieser Senke $\Delta\omega$ hängt von der Stärke des Feldgradienten ab und kann daher zur Kalibrierung des Gradienten

$$G_z = \frac{\Delta\omega}{\gamma \cdot \Delta z} \quad (7.1)$$

genutzt werden [178], wobei γ das gyromagnetische Verhältnis der Protonen ist. Da die Kanten der Senke nicht perfekt senkrecht abfallen, hängt die berechnete Kalibrierungskonstante von der Stelle ab, an der die Breite der Senke $\Delta\omega$ abgelesen wird. Für die in dieser Arbeit genutzte Kalibrierung wurde die Breite auf der halben Höhe abgelesen und ausgewertet. Dies ergibt eine maximal verfügbare Gradientenstärke von $G_z^{\text{max}} = (0,55 \pm 0,05)$ T/m. Zur Abschätzung des Fehlers wurde die Breite der Senke an der oberen und an der unteren Kante der Senke ausgewertet. Aus den Abweichungen der daraus berechneten Gradientenstärken vom oben angegebenen Wert G_z^{max} ergibt sich der Fehler.

In dieser Arbeit wird für die Auswertung aller Rohdaten die gleiche Gradienten- und Temperaturkalibrierung angewendet, dadurch sind die Daten untereinander vergleichbar. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass bei einem Vergleich der absoluten Diffusionskoeffizienten mit Literaturwerten die ausgeführten Unsicherheiten in der Temperatur- und Gradientenkalibrierung berücksichtigt werden müssen.

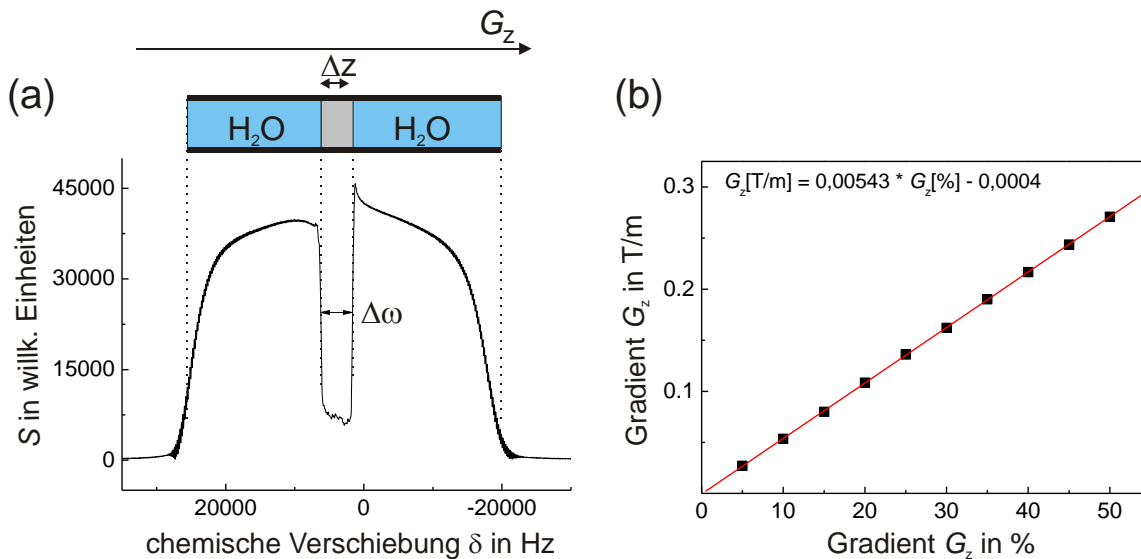


Abbildung 7.2 Kalibrierung des Feldgradienten G_z mit Hilfe eines Teflonphantoms. In (a) sind sowohl das Phantom als auch die dazugehörige spektrale Abbildung dargestellt. Die Gradientenstärke G_z in T/m ist in Abhängigkeit von der Gradientenstärke in % (Breite der Senke auf halber Höhe abgelesen) in (b) gezeigt. Die lineare Kurvenanpassung ist ebenfalls aufgetragen. Der fid wurde mit 1988 Punkten aufgenommen und ohne eine Wichtungsfunktion verarbeitet.

Konvektion. Aufgrund der Ausdehnung des verwendeten Probenröhrchens kann ein Temperaturgradient über der Lösung auftreten. Dieser verursacht zusätzlich zur ungerichteten Selbstdiffusion der Moleküle einen gerichteten Konvektionsstrom. Dieser beeinflusst die gemessenen Daten und verhindert eine eindeutige Bestimmung des Diffusionskoeffizienten der Selbstdiffusion. Der gemessene Diffusionskoeffizient D ist in diesem Fall eine Funktion der verwendeten Diffusionszeit Δ , die im PFG-NMR-Experiment verwendet wird. Auf Grund dessen kann überprüft werden, ob Konvektionsströme die gemessenen Daten beeinflussen. Dafür wird der Diffusionskoeffizient in Abhängigkeit von der Diffusionszeit gemessen. Treten Konvektionsströme auf, kann deren Einfluss zum Beispiel mit Hilfe spezieller NMR-Pulssequenzen [65, 66, 179] oder durch eine Rotation des Probenröhrchens [180] minimiert werden. Eine einfache Methode Konvektionsströme zu verhindern ist die Verwendung eines speziellen Röhrchendesigns [181]. Es wurde gezeigt, dass die Verkleinerung des Probendurchmessers eine effektive Möglichkeit darstellt, Konvektionseffekte zu verhindern [65, 66, 182]. Für die Diffusionsmessungen in dieser Arbeit wurden daher NMR-Röhrchen mit einem Durchmesser von 3 mm verwendet, die bis zu einer Höhe von 4 cm mit Probe gefüllt wurden. Alle Diffusionsexperimente wurden für mindestens zwei Diffusionszeiten Δ durchgeführt, wobei sich keine Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von Δ gezeigt hat. Ein Einfluss von Konvektionsströmen auf die Messung der Diffusionskoeffizienten kann demnach ausgeschlossen werden.

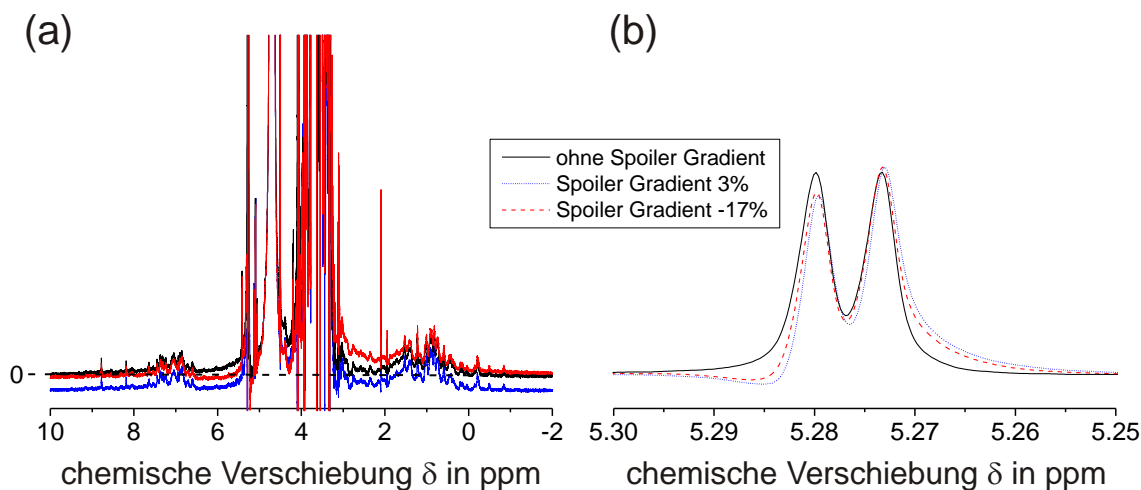


Abbildung 7.3 Einfluss des Spoilergradienten auf die Basislinie und die Linienform der Signale einer Lysozym/Trehaloselösung. Abbildung (b) zeigt eine vergrößerte Darstellung eines Signalbereichs aus Spektrum (a).

Spoilergradient. Häufig wird bei der Verwendung der Stimulierten-Echo-Sequenz zur Messung von Diffusionskonstanten ein Spoilergradient verwendet. Dieser erfolgt nach dem zweiten ($\pi/2$)-Puls zu Beginn der Mischzeit (siehe Abbildung 3.3), um die in der (x - y)-Ebene verbliebene Magnetisierung zu dephasieren. Bei der Anwendung von Spoilergradienten in den Diffusionsexperimenten in dieser Arbeit traten Phasenfehler an den Dioxan- und Saccharidsignalen auf und es kam zu einer Verschiebung der Basislinie. Beide Störungen sind in Abbildung 7.3 dargestellt. Diese Effekte müssen für eine eindeutige Datenauswertung minimiert oder besser noch vermieden werden. Dafür wurden Diffusionsexperimente in Abhängigkeit von der Stärke des Spoilergradienten durchgeführt. Die Qualität der Spektren erweist sich in den Experimenten ohne einen Spoilergradienten und mit einer ausreichend langen Diffusionszeit als deutlich besser als in den Spektren, die mit einem Spoilergradienten aufgenommen wurden. Es ist weder ein Phasenfehler zu erkennen, noch ist eine Basislinienkorrektur der Daten notwendig. Alle in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden daher ohne Spoilergradient aufgenommen.

7.1.2 FK-NMR-Experimente

Alle FK-NMR Messungen wurden an einem 400 MHz OXFORD-Magneten mit Hilfe eines BRUKER AVANCE II-Spektrometers durchgeführt. Für die Messungen wurde ein 4mm-MAS Tripel-Resonanzkopf verwendet, der über einen zusätzlichen Luftstrom temperiert wird. Eine Temperaturkalibrierung wurde mit Methanol und Bleinitrat durchgeführt [183, 184].

Die Wartezeit dI zwischen zwei Experimenten betrug 2 - 3 s für alle Experimente außer das $T_{1\rho}$ -Experiment. Für dieses wurde eine Wartezeit von 5 - 6 s verwendet. Die Kontaktzeit für den Magnetisierungsübertrag während des CP ($^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ und $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) betrug 0,5 - 1 ms. Die Pulslängen für den ($\pi/2$)-Puls betrug 3, 4,5 und 7 μs jeweils für den ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Kanal.

Während der Aufnahme des fid wurde die SPINAL64-Sequenz mit einer effektiven Feldstärke von 80 kHz zur Entkopplung genutzt [119]. Für die reine Csp-Probe wurden 1800 für das $T_{1\rho}$ -Experiment, bzw. 500 Scans für alle anderen Experimente. Für die Csp/Trehalose-mischung wurden alle Experimente mit 4800 Scans durchgeführt. Der fid wurde für alle Experimenten 20ms mit 1600 Datenpunkten aufgenommen. Im DIPSHIFT-Experiment wurde die FSLG-Sequenz für die homonukleare Entkopplung verwendet [118]. Das effektive Feld im $T_{1\rho}$ -Experiment hatte eine Stärke von $59,7 \pm 0,1$ kHz und wurde in einem Winkel von $\theta = 22,8 \pm 0,5^\circ$ eingestrahlt. Diese Parameter wurden vor und nach jedem $T_{1\rho}$ -Experiment überprüft.

7.2 Übersicht über die Diederwinkel der glycosidischen Bindung der Disaccharide in Lösung

Die Diederwinkel $\Phi(H_1-C_1-O_1-C'_x)$ und $\Psi(C_1-O_1-C'_x-H'_x)$ der glycosidischen Bindungen des Saccharides Trehalose:

Diederwinkel Φ, Ψ	exp. Methode	Referenz
$-60^\circ, -60^\circ$	Polarimeter	[185]
$(-41 \pm 5)^\circ, (-41 \pm 5)^\circ$	NMR (NOE mit markierter Probe)	[186]
$-50^\circ, -50^\circ$	Simulation	[186]
$(-45 \pm 5)^\circ, (-45 \pm 5)^\circ$	NMR (selektiver NOE)	[187]
$-44^\circ, -44^\circ$	Simulation	[188]
$-42,2^\circ, -42,2^\circ$	NMR (NOE)	[61]
$-38^\circ, -38^\circ$	Simulation	[61]
$-50^\circ, -50^\circ$	Simulation	[189]
$-45^\circ, -45^\circ$	Simulation	[189]

7.3 Gradientenform

Durch den Gradienten entstehen Wirbelströme, die zusätzliche magnetische Felder verursachen und so das Signal stören. Die Stärke der Wirbelströme hängt von der Stärke und dem Anstieg des Gradienten (dI/dt) ab. Um den Einfluss der Wirbelströme zu minimieren werden im Experiment sinusförmige, bipolare Gradienten verwendet. Die Sinusform bietet gegenüber der Rechteckform den Vorteil, dass der Anstieg bzw. der Abfall (dI/dt) des Gradienten reduziert ist. Die Gleichung (3.10) gilt für rechteckige Gradienten, daher muß für die Gradientenstärke G_z ein Korrekturfaktor eingeführt werden. Dieser wird berechnet indem die Fläche des rechteckigen Gradienten und die Fläche des sinusförmigen Gradienten zueinander ins Verhältnis gesetzt werden (Abbildung 7.4).

$$A_R = 1 \cdot \pi$$

$$A_S = \int_0^\pi \sin x dx = -\cos x \Big|_0^\pi = 2 \quad (7.2)$$

$$\frac{A_S}{A_R} = \frac{2}{\pi}$$

Ein bipolarer Gradient bedeutet, dass ein Gradient δ durch zwei Gradienten mit unterschiedlichen Vorzeichen der Länge $\delta/2$ ersetzt wird, die durch einen (π)-Puls voneinander getrennt sind. Die Wirbelströme, die vom ersten Gradienten hervorgerufen werden, werden zu einem großen Teil durch die Wirbelströme des zweiten Gradienten kompensiert.

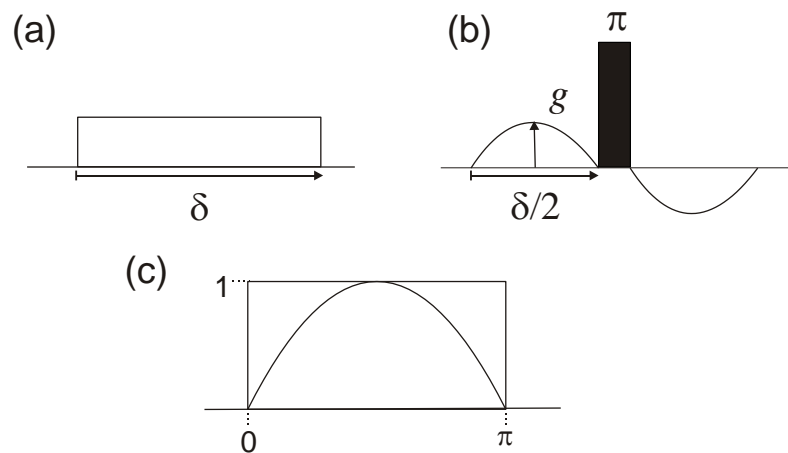


Abbildung 7.4 Darstellung eines rechteckigen Gradienten (a) und dessen Umsetzung als bipolarer sinusförmiger Gradient (b). Die Berechnung des Korrekturfaktors verdeutlicht die Abbildung (c).

7.4 Viskositätsmessung in Lösung

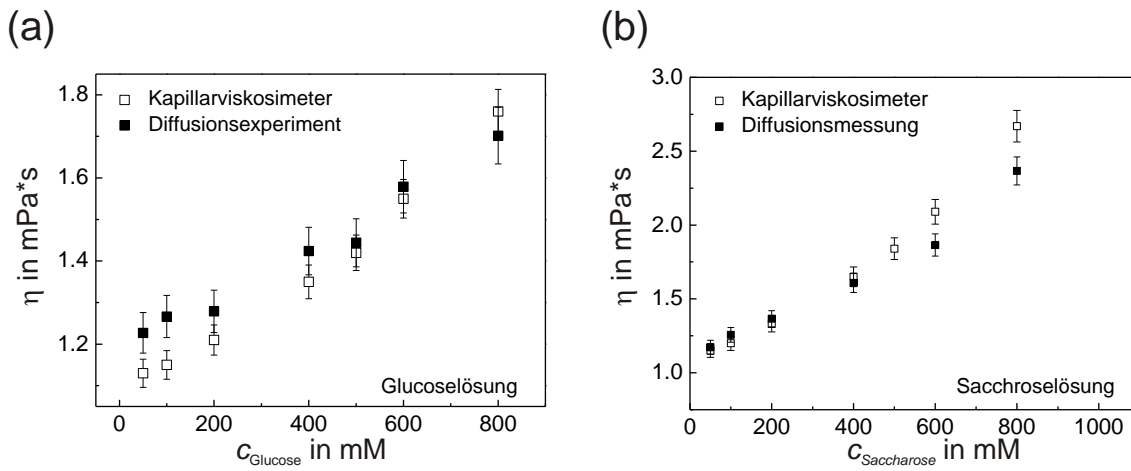


Abbildung 7.5 Viskositätsmessung mittels Kapillarviskosimeter und des Diffusionskoeffizienten von Dioxan einer Glucose- und einer Saccharoselösung in Abhängigkeit von deren Konzentration.

7.5 Abhängigkeit der spektralen Auflösung von der Ausbildung von Selbstaggregaten in Lysozymlösungen

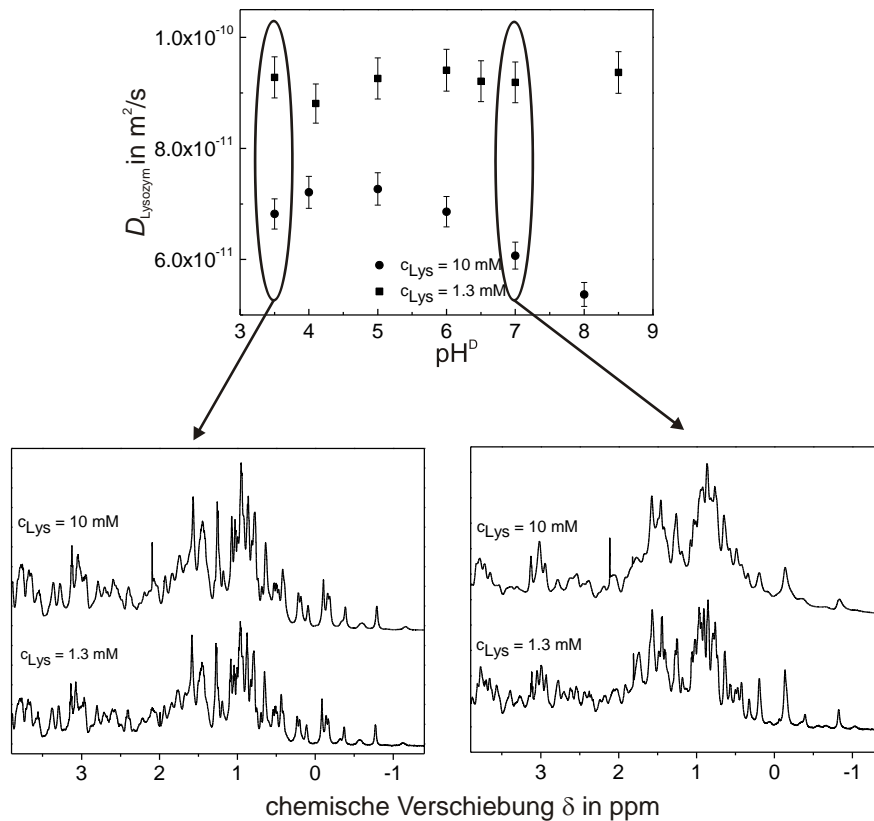


Abbildung 7.6 Vergleich der spektralen Auflösung von Lysozymlösungen mit $c_{\text{Lys}} = 1,3 \text{ mM}$ und $c_{\text{Lys}} = 10 \text{ mM}$ bei $\text{pH}^D = 3,5$ und 7. Bei $\text{pH}^D = 7$ findet in der 10 mM Lösung eine Selbstaggregation der Lysozymmoleküle statt. Dies ist auch in der spektralen Auflösung deutlich zu erkennen.

7.6 Simulationsprogramm zur Berechnung der DIPSHIFT-Kurven

Das Simulationsprogramm berechnet den theoretischen Kurvenverlauf der DIPSHIFT-Kurve für eine gegebene heteronukleare Kopplungskonstante $D_{1\text{H}-15\text{N}/13\text{C}}$. Das Programm basiert auf den Berechnungen der FIDs unter der Wechselwirkung der chemischen Verschiebung [113, 190] und der dipolaren Kopplung [48, 191]. Das vorliegende Programm wurde von A. Achilles verfasst (FG FK-NMR, MLU Halle-Wittenberg). Die DIPSHIFT-Kurven, das heißt die Modulation der Signalintensität in Abhängigkeit von t_1 , werden für NH- und NH_2 -Gruppen wie folgt berechnet:

$$\text{NH: } \frac{I(t_1)}{I(0)} = \langle \cos \Phi \rangle_{\alpha, \beta, \gamma} \quad (7.3)$$

NH₂:

$$\frac{I(t_1)}{I(0)} = \langle \cos \Phi_1 \rangle_{\alpha, \beta, \gamma} \cdot \langle \cos \Phi_2 \rangle_{\alpha, \beta, \gamma} = \frac{1}{2} \langle \cos(\Phi_1 - \Phi_2) \rangle_{\alpha, \beta, \gamma} + \frac{1}{2} \langle \cos(\Phi_1 + \Phi_2) \rangle_{\alpha, \beta, \gamma} \quad (7.4)$$

Die eckigen Klammern beschreiben das Pulvermittel über die Euler Winkel α , β und γ . Φ ist die Phase der Magnetisierung nach der Zeit t_1 . Diese berechnet sich nach der Gleichung

$$\Phi = \int_0^{t_1} D_{zz}^{\text{LF}}(t) dt \quad , \quad (7.5)$$

mit $D_{zz}^{\text{LKS}}(t)$ der zz -Komponente des dipolaren Tensors im Laborkoordinatensystem (LKS). Während für die NH-Gruppen die dipolare Kopplung zwischen einem ¹⁵N-Kern und dem benachbarten ¹H-Kern betrachtet wird, muss für die NH₂-Gruppen die Kopplung des ¹⁵N-Kernes zu den zwei benachbarten ¹H-Kernen berücksichtigt werden. Die Gleichungen, die hier für ¹⁵N-¹H Kopplungen vorgestellt werden, können genauso für ¹³C-¹H Kopplungen verwendet werden. Für die Berechnung wird zuerst der Tensor der dipolaren Kopplung im Hauptachsensystem (PAS)

$$D^{\text{PAS}} = d_{\text{NH}} \begin{pmatrix} -\frac{1}{2} & 0 & 0 \\ 0 & -\frac{1}{2} & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad , \quad (7.6)$$

wobei d_{NH} die dipolare Kopplungskonstante ist. Das Hauptachsensystem ist ein Koordinatensystem mit dem der Tensor der dipolaren Kopplung im Bezug auf den Kern beschrieben wird. Um $D_{zz}^{\text{LKS}}(t)$ im Laborkoordinatensystem zu bestimmen, muss der Tensor aus dem Hauptachsensystem in das Laborkoordinatensystem überführt werden. Hierfür sind mehrere Transformationen notwendig, vom Hauptachsensystem (PAS) → statisches Rotorsystem (SRS) → rotierendes Koordinatensystem (RKS) → Laborkoordinatensystem (LKS), die im Folgenden näher erläutert werden. In Abbildung 7.7 ist die Definition des Hauptachsensystems sowie des rotierenden Koordinatensystem verdeutlicht.

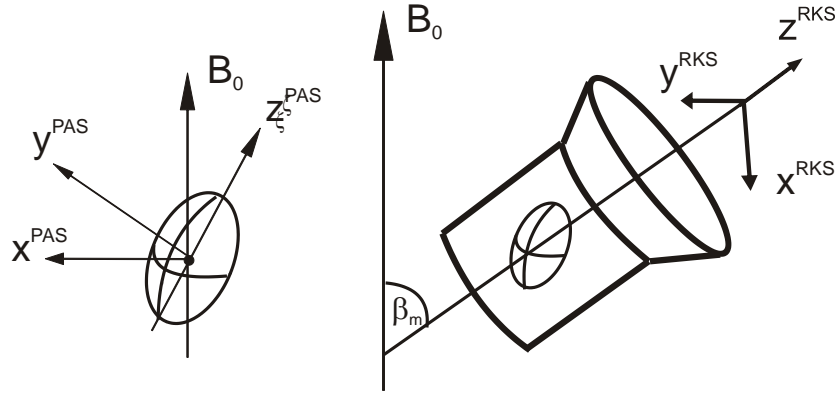


Abbildung 7.7 Abbildung des Hauptachsensystems (PAS) mit Tensor. Definition des rotierenden Koordinatensystems (RKS) zum äußeren statischen Magnetfeld B_0 und dem Rotor.

Zuerst wird der Tensor der dipolaren Kopplung vom PAS Koordinatensystem in eine Koordinatensystem, das fest mit dem Rotor (statisches Rotorsystem SRS) verbunden ist, überführt. Das heißt, am Beispiel der NH-Gruppe, dass die N-H Achse in Richtung des magischen Winkels gerichtet wird, wobei für den Fall der NH-Gruppe, die Rotation um den Winkel α nicht ausgeführt werden braucht, da der Tensor achsialsymmetrisch ist.

$$D^{\text{SKS}} = R_z^{-1}(\gamma)R_y^{-1}(\beta)R_z^{-1}(\alpha)D^{\text{PAS}}R_z(\alpha)R_y(\beta)R_z(\gamma) \quad (7.7)$$

Anschließend erfolgt eine Transformation in das rotierende Koordinatensystem (RKS), wodurch die Rotation der Probe im Experiment im Magischen Winkel mit ω_{MAS} berücksichtigt wird.

$$D^{\text{RKS}} = R_z^{-1}(\omega_{\text{MAS}}t)D^{\text{SKS}}R_z(\omega_{\text{MAS}}t) \quad (7.8)$$

Zum Schluss wird D^{LF} durch eine Rotation um den magischen Winkel β_m

$$D^{\text{LKS}} = R_y^{-1}(\beta_m)D^{\text{RKS}}R_y(\beta_m) \quad (7.9)$$

berechnet. Für die Berechnung der NH_2 -Gruppe wird das PAS so gewählt, dass die z-Achse des Koordinatensystems entlang der Halbierenden des H-N-H Winkels zeigt. In diesem Fall muss in einer ersten Transformation die z-Achse des Koordinatensystems entlang eines der beiden N-H Vektoren gerichtet werden $\text{PAS} \rightarrow \text{PAS}^\pm$

$$D^{\text{PAS}^\pm} = R_y^{-1}(\pm\beta_{\text{NH}})D^{\text{PAS}}R_y(\pm\beta_{\text{NH}}). \quad (7.10)$$

Der halbe Öffnungswinkel \angle N-H-N wird mit β_{NH} bezeichnet wobei \pm jeweils für den Ersten und den Zweiten N-H Vektor steht. Der dipolare Tensor im D^{PAS^\pm} ist nicht länger achsial symmetrisch, daher muss bei der Transformation von $D^{\text{PAS}^\pm} \rightarrow D^{\text{SKS}}$ die Rotation um den Euler Winkel α berücksichtigt werden. Nach den genannten Umformungen ergibt sich die zz-

Komponente des dipolaren Tensors im Laborkoordinatensystem $D_{zz}^{\text{LKS}}(t)$ für die NH- und NH₂-Gruppe wie folgt:

NH-Gruppe:

$$D_{zz}^{\text{LKS}}(t) = d_{\text{NH}} \left[-\frac{1}{2}(\cos^2 \beta - 1) \cos(2\omega_{\text{MAS}}t + 2\gamma) - \sqrt{2} \sin \beta \cos \beta \cos(\omega_{\text{MAS}}t + \gamma) \right] \quad (7.11)$$

NH₂-Gruppe:

$$\begin{aligned} D_{zz}^{\text{LKS}}(t) = d_{\text{NH}} & \left(\frac{1}{6} \cos 2\alpha \cdot (\cos^2 \beta + 1) \pm \frac{\sqrt{2}}{3} \cos \alpha \sin \beta \cos \beta \right) \cos(2\omega_{\text{MAS}}t + 2\gamma) + \\ & \left(-\frac{2}{3} \cos \alpha \sin \beta \cos \beta \mp \frac{\sqrt{2}}{3} \sin \alpha \sin \beta \right) \sin(2\omega_{\text{MAS}}t + 2\gamma) + \\ & \left(\frac{\sqrt{2}}{3} \cos 2\alpha \cos \beta \sin \beta \mp \frac{2}{3} \cos \alpha \cos 2\beta \right) \cos(\omega_{\text{MAS}}t + \gamma) + \\ & \left(-\frac{2\sqrt{2}}{3} \cos \alpha \sin \alpha \sin \beta \pm \frac{2}{3} \sin \alpha \cos \beta \right) \sin(\omega_{\text{MAS}}t + \gamma) \end{aligned} \quad (7.12)$$

Um die Signalintensität des Experimentes als Funktion der Zeit t_1 für eine gegebene dipolare Kopplungskonstante d_{NH} zu erhalten, werden die Gleichungen (7.11) und (7.12) in Gleichung (7.5) eingesetzt und das Pulvermittel berechnet.

7.7 Wiedereinkopplung der CSA im CODEX-Experiment

Die Wiedereinkopplung der CSA geschieht während des De- und Rephasierungsblockes durch eine rotorsynchronisierte Abfolge von (π)-Pulsen. Dies wird im Folgenden näher erläutert. Die Phase der Magnetisierung der Kerne unter MAS ändert sich periodisch mit der Rotationsfrequenz und ist sowohl von den diagonal als auch den nicht-diagonal Elementen des Tensors der chemischen Verschiebung abhängig [47]. Dabei ändert sich die Phase $\psi(t)$ im zweiten Teil der Rotationsperiode genau entgegengesetzt zur ersten Hälfte

$$\begin{aligned} \psi(t) &= \int_0^{T_R} \omega(t') dt' = 0 \\ \psi(t) &= \int_0^{T_R/2} \omega(t') dt' + \int_{T_R/2}^{T_R} \omega(t') dt' = 0 \\ \int_0^{T_R/2} \omega(t') dt' &= - \int_{T_R/2}^{T_R} \omega(t') dt'. \end{aligned} \quad (7.13)$$

In der Abbildung 7.8 (a) ist schematisch das Verhalten der Phase der Magnetisierung dargestellt. Der rote Pfeil beschreibt die Phase, die die Magnetisierung im ersten Teil der Rotorperiode überstreicht, der blaue Pfeil verdeutlicht den Verlauf der Phase der Magnetisierung im zweiten Teil der Rotorperiode. Der Verlauf der Phase der Magnetisierung während der halben Rotorperiode ist keineswegs linear wie hier dargestellt, dies dient lediglich der anschaulichen Verdeutlichung des Effektes. Am Ende einer Rotorperiode befindet sich die Phase der Magnetisierung wieder auf der x-Achse mit einem kleinen Intensitätsverlust durch T_2 -Relaxation. Dieses Verhalten ist auch der Grund für Rotationsechos im Spektrum. φ beschreibt die Phase, die die Magnetisierung innerhalb einer halben Rotorperiode überstreicht

$$\varphi(t) = \int_0^{T_R/2} \omega(t') dt' . \quad (7.14)$$

Durch einen (π) -Puls nach einer halben Rotorperiode, wird die Phase der Magnetisierung um 180° geklappt und entwickelt sich im Anschluss genauso weiter wie ohne Störung. In diesem Fall hat die Phase der Magnetisierung nach einer Rotorperiode den Winkel 2φ überstrichen anstatt sich wieder auf der x-Achse zu befinden. Der Einfluss des (π) -Pulses ist in Abbildung 7.8 (b) dargestellt. Durch eine Abfolge von (π) -Pulsen, die jede halbe Rotorperiode erfolgen, kann der Winkel der Magnetisierung $\phi(NT_R)$

$$\phi(NT_R) = -2\varphi N , \quad (7.15)$$

innerhalb einer Anzahl N von Rotorperioden T_R beliebig vergrößert werden. Lässt man einen (π) -Puls in der Mitte dieser Abfolge weg, so verkleinert sich die aufakkumulierte Phase durch die darauffolgenden (π) -Puls wieder. Ist die Anzahl an Pulsen vor und nach dem ausgelassenen Puls gleich, so ist am Ende der Pulsabfolge der Winkel der Magnetisierung $\phi(NT_R)$ wieder Null

$$\phi(NT_R) = -\frac{N}{2} 2\varphi - \left(-\frac{N}{2} 2\varphi \right) = 0 . \quad (7.16)$$

Dieses Prinzip wird beim CODEX-Experiment ausgenutzt. In der Lücke zwischen dem aufakkumulieren der Phase (Dephasierung) und dem verringern der Phase (Rephasierung), wird eine Komponente der Magnetisierung in z-Richtung gespeichert. Es folgt die Mischzeit während der molekulare Bewegungen stattfinden können. Hat sich die chemische Umgebung der Kerne in dieser Zeit nicht geändert, so ist der Winkel der Magnetisierung am Ende der Rephasierungsphase wieder Null. Hat jedoch eine molekulare Bewegung stattgefunden, die die chemische Umgebung des Kerns ändert, ändert sich auch der Tensor der anisotropen chemischen Verschiebung des Kerns. Die Phase der Magnetisierung verhält sich daher nach der Mischzeit anders als davor und die Phase der Magnetisierung am Ende des Rephasierungsblocks ist nicht Null. Dies zeigt sich im Spektrum durch eine verringerte Intensität.

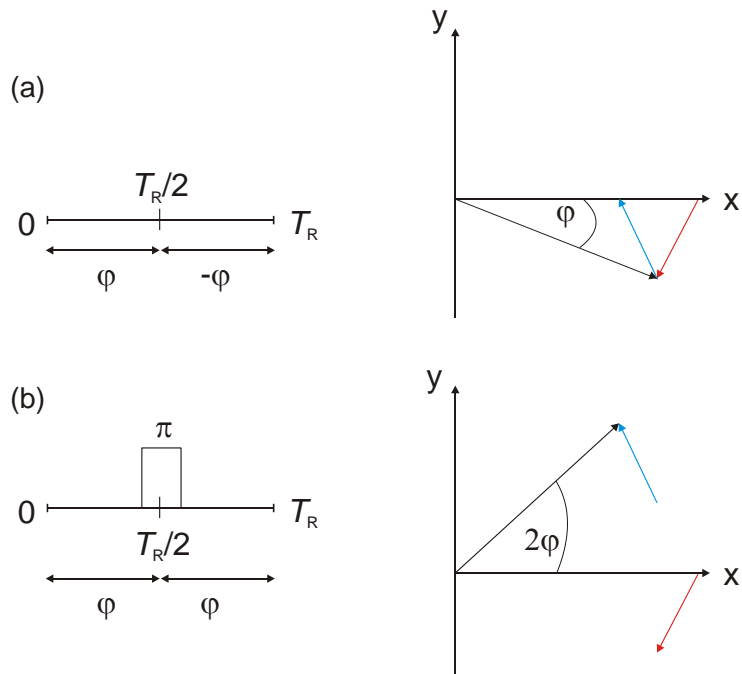


Abbildung 7.8 (a) Entwicklung der Phase φ der Magnetisierung während einer Rotorperiode ohne (π)-Puls und (b) mit einem (π)-Puls in der Hälfte der Rotorperiode T_R . Dargestellt sind jeweils die Pulssequenz und die Phase φ der Magnetisierung.

7.8 Csp CODEX-Daten

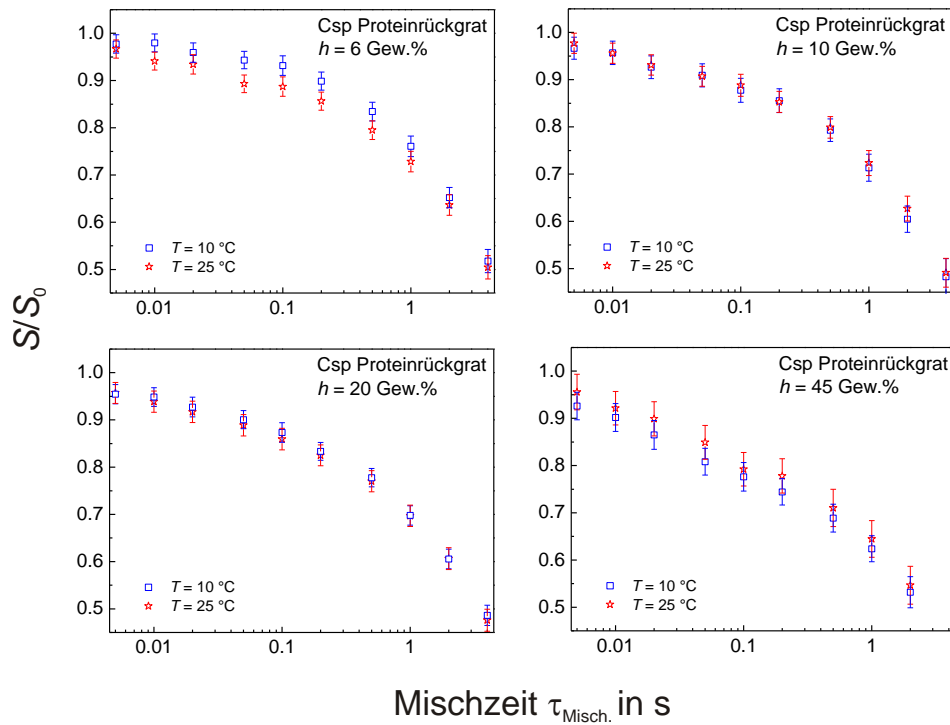


Abbildung 7.9 CODEX-Daten für lyophilisiertes Csp in Abhängigkeit vom Wassergehalt der Probe für $T = 10 \text{ }^\circ\text{C}$ und $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Vergleich des Kurvenverlaufs bei einem Wassergehalt in Abhängigkeit von der Temperaturen zeigt, dass der Abfall der Daten durch Spindiffusion verursacht wird und nicht durch molekulare Bewegungen.

7.9 DIPSHIFT-Daten für $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

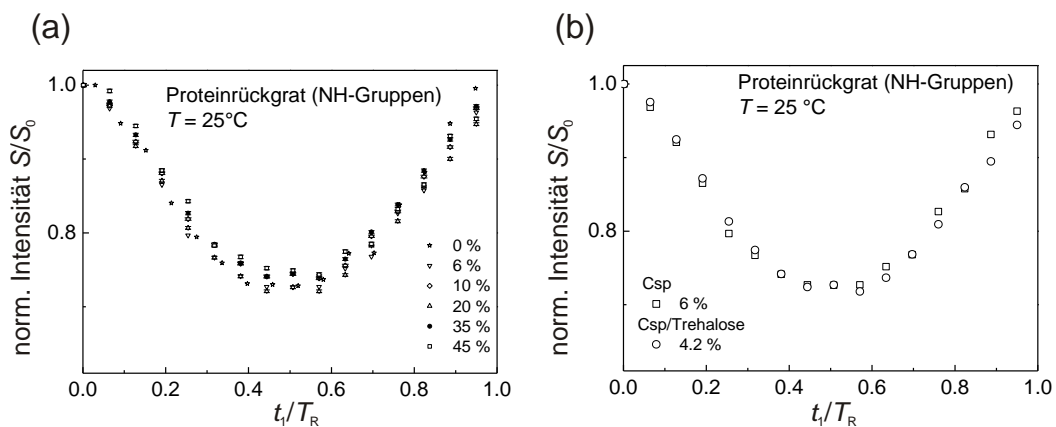


Abbildung 7.10 (a) DIPSHIFT-Daten der NH-Gruppen für Csp in Abhängigkeit vom Wassergehalt. (b) Vergleich der NH-Gruppen der Csp-Probe mit 6 Gew.% Wasser und der Csp/Trehalosemischung mit 4,2 Gew.% Wasser. Alle Daten wurden bei $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen.

Literaturverzeichnis

- [1] Wharton, D. A., *Life at the Limits - Organisms in extreme environments*, Cambridge University Press, 2002.
- [2] Wright, J. C., *Cryptobiosis 300 Years on from van Leuwenhoek: What Have We Learned about Tardigrades?*, *Zoologischer Anzeiger* **240**, 563 (2001).
- [3] Teramoto, N., N. D. Sachinvala und M. Shibata, *Trehalose and Trehalose-based Polymers for Environmentally Benign, Biocompatible and Bioactive Materials*, *Molecules* **13**, 1773 (2008).
- [4] Crowe, J. H., L. M. Crowe, A. E. Oliver, N. Tsvetkova, W. Wolkers und F. Tablin, *The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State*, *Cryobiology* **43**, 89 (2001).
- [5] Clegg, J. S., *Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization*, *Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry & Molecular Biology* **128**, 613 (2001).
- [6] Higa, L. M. und C. Z. Womersley, *New Insights Into the Anhydrobiotic Phenomenon - The Effects of Trehalose Content and Differential Rates of Evaporative Water Loss on the Survival of Aphelenchus Avenae*, *The Journal of Experimental Zoology* **267**, 120 (1993).
- [7] Behm, C. A., *The Role of Trehalose in the Physiology of Nematodes*, *International Journal for Parasitology* **27**, 215 (1997).
- [8] Adams, R. P., E. Kendall und K. K. Kartha, *Comparison of Free Sugars in Growing and Desiccated Plants of Selaginella Lepidophylla*, *Biochemical Systematics and Ecology* **18**, 107 (1990).
- [9] Müller, J., T. Boller und A. Wiemken, *Trehalose and trehalase in plants: recent developments*, *Plant Science* **112**, 1 (1995).
- [10] Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe und L. M. Crowe, *Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying*, *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3592 (1995).
- [11] Wolkers, W. F., N. J. Walker, F. Tablin und J. H. Crowe, *Human Platelets Loaded with Trehalose Survive Freeze-Drying*, *Cryobiology* **42**, 79 (2001).

- [12] Esteves, M. I., W. Quintilio, R. A. Sato, I. Raw, P. S. de Araujo und M. H. B. da Costa, *Stabilisation of immunoconjugates by trehalose*, *Biotechnology Letters* **22**, 417 (2000).
- [13] Crowe, J. H., *Anhydrobiosis: An Unsolved Problem*, *The American Naturalist* **105**, 563 (1971).
- [14] Crowe, J. H., *Anhydrobiosis: an unsolved problem*, *Plant, Cell and Environment* **37**, 1491 (2014).
- [15] Kauzmann, W., *Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation*, *Advances in Protein Chemistry* **14**, 1 (1959).
- [16] Crowe, J. H., L. M. Crowe und D. Chapman, *Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose*, *Science* **223**, 701 (1984).
- [17] Carpenter, J. F. und J. H. Crowe, *An Infrared Spectroscopic Study of the Interactions of Carbohydrates with Dried Proteins*, *Biochemistry* **28**, 3916 (1989).
- [18] Prestrelski, S. J., N. Tedeschi, T. Arakawa und J. F. Carpenter, *Dehydration-Induced Conformational Transitions in Proteins and Their Inhibition by Stabilizers*, *Biophysical Journal* **65**, 661 (1993).
- [19] Lerbret, A., P. Bordat, F. Affouard, A. Hedoux, Y. Guinet und M. Descamps, *How Do Trehalose, Maltose, and Sucrose Influence Some Structural and Dynamical Properties of Lysozyme? Insight from Molecular Dynamics Simulations*, *Journal of Physical Chemistry B* **111**, 9410 (2007).
- [20] Dirama, T. E., J. E. Curtis, G. A. Carri und A. P. Sokolov, *Coupling between lysozyme and trehalose dynamics: Microscopic insights from molecular-dynamics simulations*, *Journal of Chemical Physics* **124(3)** (2006).
- [21] Sampedro, J. G. und S. Uribe, *Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity*, *Molecular and Cellular Biochemistry* **256/257**, 319 (2004).
- [22] Green, J. L. und C. A. Angell, *Phase Relations and Vitrification in Saccharide-Water Solutions and the Trehalose Anomaly*, *Journal of Physical Chemistry* **93**, 2880 (1989).
- [23] Ansari, A., C. M. Jones, E. R. Henry, J. Hofrichter und W. A. Eaton, *The Role of Solvent Viscosity in the Dynamics of Protein Conformational Changes*, *Science* **256**, 1796 (1992).

- [24] Hagen, S. J., J. Hofrichter und W. A. Eaton, *Protein Reaction Kinetics in a Room-Temperature Glass*, *Science* **269**, 959 (1995).
- [25] Belton, P. S. und A. M. Gil, *IR and Raman Spectroscopic Studies of the Interaction of Trehalose with Hen Egg White Lysozyme*, *Biopolymers* **34**, 957 (1994).
- [26] Lins, R. D., C. S. Pereira und P. H. Hünenberger, *Trehalose-Protein Interaction in Aqueous Solution*, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **55**, 177 (2004).
- [27] Cottone, G., G. Ciccotti und L. Cordone, *Protein-trehalose-water structures in trehalose coated carboxy-myoglobin*, *Journal of Chemical Physics* **117**, 9862 (2002).
- [28] Massari, A. M., I. J. Finkelstein, B. L. McClain, A. Goj, X. Wen, K. L. Bren, R. F. Loring und M. D. Fayer, *The Influence of Aqueous Versus Glassy Solvents on Protein Dynamics: Vibrational Echo Experiments and Molecular Dynamics Simulations*, *Journal of the American Chemical Society* **127**, 14279 (2005).
- [29] Sastry, G. M. und N. Agmon, *Trehalose Prevents Myoglobin Collapse and Preserves Its Internal Mobility*, *Biochemistry* **36**, 7097 (1997).
- [30] Xie, G. und S. N. Timasheff, *The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose*, *Biophysical Chemistry* **64**, 25 (1997).
- [31] Fedorov, M. V., J. M. Goodman, D. Nerukh und S. Schumm, *Self-assembly of trehalose molecules on a lysozyme surface: the broken glass hypothesis*, *Physical Chemistry Chemical Physics* **13**, 2294 (2011).
- [32] GhatyVenkataKrishna, P. K. und G. A. Carri, *The effect of complex solvents on the structure and dynamics of protein solutions: The case of lysozyme in trehalose/water mixtures*, *European Physical Journal E* **36** (2013).
- [33] Banerjee, S. K. und J. A. Rupley, *Temperature and pH-Dependence of the Binding of Oligosaccharides to Lysozyme*, *The Journal of Biological Chemistry* **248**, 2117 (1973).
- [34] Lerbret, A., F. Affouard, P. Bordat, A. Hedoux, Y. Guinet und M. Descamps, *Molecular dynamics simulations of lysozyme in water/sugar solutions*, *Chemical Physics* **345**, 267 (2008).
- [35] James, S. und J. J. McManus, *Thermal and Solution Stability of Lysozyme in the Presence of Sucrose, Glucose, and Trehalose*, *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 10182 (2012).

- [36] Corradini, D., E. G. Strekalova, H. E. Stanley und P. Gallo, *Microscopic mechanism of protein cryopreservation in an aqueous solution with trehalose*, Scientific Reports **3** (2013).
- [37] Sola-Penna, M. und J. R. Meyer-Fernandes, *Stabilization against Thermal Inactivation Promoted by Sugars on Enzyme Structure and Function: Why Is Trehalose More Effective Than Other Sugars?*, Archives of Biochemistry and Biophysics **360**, 10 (1998).
- [38] Spiga, E., L. A. Abriata, F. Piazza und M. Dal Peraro, *Dissecting the Effects of Concentrated Carbohydrate Solutions on Protein Diffusion, Hydration, and Internal Dynamics*, The Journal of Physical Chemistry B **118**, 5310 (2014).
- [39] Lerbret, A., F. Affouard, P. Bordat, A. Hedoux, Y. Guinet und M. Descamps, *Low-frequency vibrational properties of lysozyme in sugar aqueous solutions: A Raman scattering and molecular dynamics simulation study*, The Journal of Chemical Physics **131** (2009).
- [40] Stejskal, E. O. und J. E. Tanner, *Spin Diffusion Measurements: Spin Echos in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient*, The Journal of Chemical Physics **42**, 288 (1965).
- [41] Einstein, A., *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierenden Teilchen*, Annalen der Physik **17**, 549 (1905).
- [42] Sachs, R., K. E. A. Max, U. Heinemann und J. Balbach, *RNA single strands bind to a conserved surface of the major cold shock protein in crystals and solution*, RNA - A Publication in the RNA Society **18**, 65 (2012).
- [43] Cordone, L., G. Cottone, S. Giuffrida, G. Palazzo, G. Venturoli und C. Viappiani, *Internal dynamics and protein-matrix coupling in trehalose-coated proteins*, Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics **1749**, 252 (2005).
- [44] Jain, N. K. und I. Roy, *Effect of trehalose on protein structure*, Protein Science **18**, 24 (2009).
- [45] Henzler-Wildman, K. und D. Kern, *Dynamic personalities of proteins*, Nature **450**, 964 (2007).
- [46] Levitt, M. H., *spin dynamics - Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, Wiley, 2008.
- [47] Duer, M. J., *Solid-State NMR Spectroscopy*, Wiley, 2008.

- [48] Schmidt-Rohr, K. und H. W. Spiess, *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*, Academic Press, 1994.
- [49] Stevens, L., *Egg-White Proteins*, Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry & Molecular Biology **100**, 1 (1991).
- [50] Schwalbe, H., S. B. Grimshaw, A. Spencer, M. Buck, J. Boyd, C. M. Dobson, C. Redfield und L. J. Smith, *A refined solution structure of hen lysozyme determined using residual dipolar coupling data*, Protein Science **10**, 677 (2001).
- [51] Schindelin, H., M. A. Marahiel und U. Heinemann, *Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the B. subtilis major cold-shock protein*, Nature **364**, 164 (1993).
- [52] Schindelin, H., M. Herrler, G. Willmsky, M. A. Marahiel und U. Heinemann, *Overproduction, Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Studies of the Major Cold Shock Protein from Bacillus-Subtilis, CspB*, Proteins-Structure Function and Genetics **14**, 120 (1992).
- [53] Schindler, T., M. Herrler, M. A. Marahiel und F. X. Schmid, *Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates*, Nature Structural Biology **2**, 663 (1995).
- [54] Taga, T., M. Senma und K. Osaki, *The Crystal and Molecular Structure of Trehalose Dihydrate*, Acta Crystallographica Section B - Structural Science **B 28**, 3258 (1972).
- [55] Brown, G. M. und H. A. Levy, *Further Refinement of The Structure of Sucrose Based on Neutron-Diffraction Data*, Acta Crystallographica Section B - Structural Science **B 29**, 790 (1973).
- [56] Gress, M. E. und G. A. Jeffrey, *A Neutron Diffraction Refinement of the Crystal Structure of Beta-Maltose Monohydrate*, Acta Crystallographica Section B - Structural Science **33**, 2490 (1977).
- [57] McDonald, T. R. R. und C. A. Beevers, *The Crystal and Molecular Structure of Alpha-Glucose*, Acta Crystallographica **5**, 654 (1952).
- [58] Ferrier, W. G., *The Crystal and Molecular Structure of Beta-D-Glucose*, Acta Crystallographica **16**, 1023 (1963).
- [59] Stick, R. V., *Carbohydrates - The Sweet Molecules of Life*, Academic Press, 2001.

- [60] Immel, S. und F. W. Lichtenthaler, *Molecular Modeling of Saccharides. 7. The Conformation of Sucrose in Water: A Molecular-Dynamics Approach*, Liebigs Annalen 1925–1937 (1995).
- [61] Cheetham, N. W. H., P. Dasgupta und G. E. Ball, *NMR and modelling studies of disaccharide conformation*, Carbohydrate Research **338**, 955 (2003).
- [62] Glaser, R., *Biophysics*, Springer-Verlag, 2001.
- [63] Kimmich, R., *NMR Tomography Diffusometry Relaxometry*, Springer-Verlag, 1997.
- [64] Price, W. S., *Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance as a Tool for Studying Translational Diffusion: Part I. Basic Theory*, Concepts in Magnetic Resonance **9**, 299 (1997).
- [65] Price, W. S., *Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance as a Tool for Studying Translational Diffusion: Part II. Experimental Aspects*, Concepts in Magnetic Resonance **10**, 197 (1998).
- [66] Antalek, B., *Using Pulsed Gradient Spin Echo NMR for Chemical Mixture Analysis: How to Obtain Optimum Results*, Concepts in Magnetic Resonance **14**, 225 (2002).
- [67] Hahn, E. L., *Spin Echoes*, Physical Review **80**, 580 (1950).
- [68] Wider, G., V. Dötsch und K. Wüthrich, *Self-Compensating Pulsed Magnetic-Field Gradients for Short Recovery Times*, Journal of Magnetic Resonance, Series A **108**, 255 (1994).
- [69] Wu, D., A. Chen und C. S. Johnson, *An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses*, Journal of Magnetic Resonance, Series A **115**, 260 (1995).
- [70] Tanner, J. E., *Use of Stimulated Echo in NMR Diffusion Studies*, The Journal of Chemical Physics **52**, 2523 (1970).
- [71] Keeler, J., *Understanding NMR Spectroscopy*, Wiley, 2005.
- [72] Nesmelova, I. und V. D. Fedotov, *Self-Diffusion and Self-Associations of Lysozyme Molecules in Solution*, Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology **1383**, 311 (1998).

- [73] Nesmelova, I. V., V. D. Skirda und V. D. Fedotov, *Generalized Concentration Dependence of Globular Protein Self-Diffusion Coefficients in Aqueous Solutions*, *Biopolymers* **63**, 132 (2002).
- [74] Barhoum, S. und A. Yethiraj, *NMR Detection of an Equilibrium Phase Consisting of Monomers and Clusters in Concentrated Lysozyme Solutions*, *Journal of Physical Chemistry B* **114**, 17062 (2010).
- [75] Price, W. S., F. Tsuchiya und Y. Arata, *Lysozyme Aggregation and Solution Properties Studied Using PGSE NMR Diffusion Measurements*, *Journal of the American Chemical Society* **121**, 11503 (1999).
- [76] Wilkins, D. K., S. B. Grimshaw, V. Receveur, C. M. Dobson, J. A. Jones und L. J. Smith, *Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques*, *Biochemistry* **38**, 16424 (1999).
- [77] Sophianopoulos, A. J. und K. E. VanHolde, *Physical Studies of Muramidase (Lysozyme). II. pH-Dependent Dimerization*, *The Journal of Biological Chemistry* **239**, 2516 (1964).
- [78] Raeymaekers, H. H., H. Eisendrath, A. Verbeken, Y. VanHaverbeke und R. N. Muller, *Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion in Protein Solutions as a Probe for Protein Transformation. Example, the Dimerization of Lysozyme*, *Journal of Magnetic Resonance* **85**, 421 (1989).
- [79] Poznanski, J., J. Szymanski, T. Basinska, S. Slomkowski und W. Zielenkiewicz, *Aggregation of aqueous lysozyme solutions followed by dynamic light scattering and H-1 NMR spectroscopy*, *Journal of Molecular Liquids* **121**, 21 (2005).
- [80] Price, W. S., *Protein association studied by NMR diffusometry*, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11**, 19 (2006).
- [81] Price, W. S., F. Tsuchiya und Y. Arata, *Time Dependence of Aggregation in Crystallizing Lysozyme Solutions Probed Using NMR Self-Diffusion Measurements*, *Biophysical Journal* **80**, 1585 (2001).
- [82] Jones, J. A., D. K. Wilkins, L. J. Smith und C. M. Dobson, *Characterisation of protein unfolding by NMR diffusion measurements*, *Journal of Biomolecular NMR* **10**, 199 (1997).
- [83] ACD/ChemSketch, Version 4.0, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, (1999) .

- [84] Redfield, C. und C. M. Dobson, *Sequential H-1 NMR Assignments and Secondary Structure of Hen Egg White Lysozyme in Solution*, *Biochemistry* **27**, 122 (1988).
- [85] Englander, S. W., N. W. Downer und H. Teitelbaum, *Hydrogen Exchange*, *Annual Review of Biochemistry* **41**, 903 (1972).
- [86] Hvidt, A. und K. Linderstrom-Lang, *Exchange of Hydrogen Atoms in Insulin with Deuterium Atoms in Aqueous Solutions*, *Biochimica et Biophysica Acta* **14**, 574 (1954).
- [87] Hilton, B. D. und C. K. Woodward, *On the Mechanism of Isotope Exchange Kinetics of Single Protons in Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*, *Biochemistry* **18**, 5834 (1979).
- [88] Revsbech Winther, L., J. Qvist und B. Halle, *Hydration and Mobility of Trehalose in Aqueous Solution*, *The Journal of Physical Chemistry B* **116**, 9196 (2012).
- [89] Davies, R. C., A. Neuberger und B. M. Wilson, *The Dependence of Lysozyme Activity on pH and Ionic Strength*, *Biochimica et Biophysica Acta* **178**, 294 (1969).
- [90] Abragam, A., *Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford Science Publications, 1989.
- [91] Bloembergen, N., E. M. Purcell und R. V. Pound, *Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption*, *Physical Review* **73**, 679 (1948).
- [92] Lewandowski, J. R., *Advances in Solid-State Relaxation Methodology for Probing Site-Specific Protein Dynamics*, *Accounts of Chemical Research* **46**, 2018 (2013).
- [93] Krushelnitsky, A., D. Reichert und K. Saalwächter, *Solid-State NMR Approaches to Internal Dynamics of Proteins: From Picoseconds to Microseconds and Seconds*, *Accounts of Chemical Research* **46**, 2028 (2013).
- [94] Torchia, D. A., *Measurements of Proton-Enhanced C-13 T1 Values by a Method Which Suppresses Artifacts*, *Journal of Magnetic Resonance* **30**, 613 (1978).
- [95] Pines, A., M. G. Gibby und J. S. Waugh, *Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids*, *The Journal of Chemical Physics* **59**, 569 (1973).
- [96] VanderHart, D. L. und A. N. Garroway, *C-13 NMR rotating frame relaxation in a solid with strongly coupled protons: Polyethylene*, *The Journal of Chemical Physics* **71**, 2773 (1979).

- [97] Tekely, P., D. Canet, J. J. Delpuech und J. Virlet, *Attenuation of Spin-Spin Effects in C-13 T1Roh NMR Experiments by Multipulse Proton Homonuclear Decoupling*, *Magnetic Resonance in Chemistry* **28**, 10 (1990).
- [98] Krushelnitsky, A., R. Kurbanov, D. Reichert, G. Hempel, H. Schneider und V. Fedotov, *Expanding the Frequency Range of the Solid-State T1roh Experiment for Heteronuclear Dipolar Relaxation*, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **22**, 423 (2002).
- [99] Jones, G. P., *Spin-Lattice Relaxation in the Rotating Frame: Weak-Collision Case*, *Physical Review* **148**, 332 (1966).
- [100] Nesmelova, I., A. Krushelnitsky, D. Idiyatullin, F. Blanco, M. Ramirez-Alvarado, V. A. Daragan, L. Serrano und K. H. Mayo, *Conformational Exchange on the Microsecond Time Scale in Alpha-Helix and Beta-Hairpin Peptides Measured by C-13 NMR Transverse Relaxation*, *Biochemistry* **40**, 2844 (2001).
- [101] Mulder, F. A. A., P. J. A. van Tilborg, R. Kaptein und R. Boelens, *Microsecond time scale dynamics in the RXR DNA-binding domain from a combination of spin-echo and off-resonance rotating frame relaxation measurements*, *Journal of Biomolecular NMR* **13**, 275 (1999).
- [102] Krushelnitsky, A. und D. Reichert, *Response of Lysozyme Internal Dynamics to Hydration Probed by C-13 and H-1 Solid-State NMR Relaxation*, *Applied Magnetic Resonance* **27**, 501 (2004).
- [103] Krushelnitsky, A., Y. Gogolev, R. Golbik, F. Dahlquist und D. Reichert, *Comparison of the internal dynamics of globular proteins in the microcrystalline and rehydrated lyophilized states*, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1764**, 1639 (2006).
- [104] Krushelnitsky, A., E. deAzevedo, R. Linser, B. Reif, K. Saalwächter und D. Reichert, *Direct Observation of Millisecond to Second Motions in Proteins by Dipolar CODEX NMR Spectroscopy*, *Journal of the American Chemical Society* **131**, 12097 (2009).
- [105] Kurbanov, R., T. Zinkevich und A. Krushelnitsky, *The nuclear magnetic resonance relaxation data analysis in solids: General R1/R1rho equations and the model-free approach*, *The Journal of Chemical Physics* **135** (2011).
- [106] Krushelnitsky, A., T. Zinkevich, N. Mukhametshina, N. Tarasova, Y. Gogolev, O. Gnezdilov, V. Fedotov, P. Belton und D. Reichert, *C-13 and N-15 NMR Study of the Hydration Response of T4 Lysozyme and Alpha B-Crystallin Internal Dynamics*, *Journal of Physical Chemistry B* **113**, 10022 (2009).

- [107] Williams, G. und D. C. Watts, *Non-Symmetrical Dielectric Relaxation Behaviour Arising from a Simple Empirical Decay Function*, Transactions of the Faraday Society **66**, 80 (1970).
- [108] Yao, L., B. Vögeli, J. Ying und A. Bax, *NMR Determination of Amide N-H Equilibrium Bond Length from Concerted Dipolar Coupling Measurements*, Journal of the American Chemical Society **130**, 16518 (2008).
- [109] Reichert, D. und K. Saalwächter, *NMR Crystallography*, Kap. 13. Dipolar Coupling: Molecular-level Mobility, 177–193, Wiley, 2009.
- [110] Munowitz, M. G., R. G. Griffin, G. Bodenhausen und T. H. Huang, *Two-Dimensional Rotational Spin-Echo Nuclear Magnetic Resonance in Solids: Correlation of Chemical Shift and Dipolar Interactions*, Journal of the American Chemical Society **103**, 2529 (1981).
- [111] Munowitz, M., W. P. Aue und R. G. Griffin, *Two-dimensional separation of dipolar and scaled isotropic chemical shift interactions in magic angle NMR-spectra*, The Journal of Chemical Physics **77**, 1686 (1982).
- [112] Hong, M., J. D. Gross und R. G. Griffin, *Site-Resolved Determination of Peptide Torsion Angle ϕ from the Relative Orientations of Backbone N-H and C-H Bonds by Solid-State NMR*, Journal of Physical Chemistry B **101**, 5869 (1997).
- [113] Hong, M., X. Yao, K. Jakes und D. Huster, *Investigation of Molecular Motions by Lee-Goldburg Cross-Polarization NMR Spectroscopy*, Journal of Physical Chemistry B **106**, 7355 (2002).
- [114] Huster, D., L. Xiao und M. Hong, *Solid-state NMR investigation of the dynamics of the soluble and membrane-bound colicin Ia channel-forming domain*, Biochemistry **40**, 7662 (2001).
- [115] Reichert, D., O. Pascui, E. R. deAzevedo, T. J. Bonagamba, K. Arnold und D. Huster, *A solid-state NMR study of the fast and slow dynamics of collagen fibrils at varying hydration levels*, Magnetic Resonance in Chemistry **42**, 276 (2004).
- [116] Waugh, J. S., *Uncoupling of local field spectra in nuclear magnetic resonance: Determination of atomic positions in solids*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **73**, 1394 (1976).

- [117] Hester, R. K., J. L. Ackerman, B. L. Neff und J. S. Waugh, *Seperated Local Field Spectra in NMR: Determination of Structure of Solids*, Physical Review Letters **36**, 1081 (1976).
- [118] Dvinskikh, S. V., H. Zimmermann, A. Maliniak und D. Sandström, *Heteronuclear dipolar recoupling in solid-state nuclear magnetic resonance by amplitude-, phase-, and frequency-modulated Lee-Goldburg cross-polarization*, The Journal of Chemical Physics **122** (2005).
- [119] Fung, B. M., A. K. Khitrin und K. Ermolaev, *An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids*, Journal of Magnetic Resonance **142**, 97 (2000).
- [120] deAzevedo, E. R., W. G. Hu, T. J. Bonagamba und K. Schmidt-Rohr, *Centerband-Only Detection of Exchange: Efficient Analysis of Dynamics in Solids by NMR*, Journal of the American Chemical Society **121**, 8411 (1999).
- [121] deAzevedo, E. R., W. G. Hu, T. J. Bonagamba und K. Schmidt-Rohr, *Principles of centerband-only detection of exchange in solid-state nuclear magnetic resonance, and extension to four-time centerband-only detection of exchange*, Journal of Chemical Physics **112**, 8988 (2000).
- [122] de Lacaillerie, J. B. D., B. Jarry, O. Pascui und D. Reichert, *"Cooking the sample": Radiofrequency induced heating during solid-state NMR experiments*, Solid State Nuclear Magnetic Resonance **28**, 225 (2005).
- [123] Schaefer, D. J., D. E. Favre, M. Wilhelm, S. J. Weigel und B. F. Chmelka, *Site-Hopping Dynamics of Benzene Adsorbed on Ca-LSX Zeolite Studied by Solid-State Exchange C-13 NMR*, Journal of the American Chemical Society **119**, 9252 (1997).
- [124] Pascui, O., M. Beiner und D. Reichert, *Identification of Slow Dynamic Processes in Poly(n-Hexyl Methacrylate) by Solid-State 1D-MAS Exchange NMR*, Macromolecules **36**, 3992 (2003).
- [125] Wang, W., *Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals*, International Journal of Pharmaceutics **203**, 1 (2000).
- [126] Timasheff, S. N., *Protein Hydration, Thermodynamic Binding, and Preferential Hydration*, Biochemistry **41**, 13473 (2002).
- [127] Ball, P., *Water as an Active Constituent in Cell Biology*, Chemical Reviews **108**, 74 (2008).

- [128] Iannilli, E., E. Tettamanti, L. Galantini und S. Magazu, *An Integrated Quasi-Elastic Light-Scattering, Pulse-Gradient-Spin-Echo Study on the Transport Properties of Alpha,Alpha-Trehalose, Sucrose, and Maltose Deuterium Oxide Solutions*, Journal of Physical Chemistry B **105**, 12143 (2001).
- [129] Gallina, M. E., L. Comez, A. Morresi, M. Paolantoni, S. Perticaroli, P. Sassi und D. Fioretto, *Rotational dynamics of trehalose in aqueous solutions studied by depolarized light scattering*, The Journal of Chemical Physics **132** (2010).
- [130] Fioretto, D., L. Comez, S. Corezzi, M. Paolantoni, P. Sassi und A. Morresi, *Solvent Sharing Models for Non-Interacting Solute Molecules: The Case of Glucose and Trehalose Water Solutions*, Food Biophysics **8**, 177 (2013).
- [131] Sidebottom, D. L. und T. D. Tran, *Universal patterns of equilibrium cluster growth in aqueous sugars observed by dynamic light scattering*, Physical Review E **82** (2010).
- [132] Lerbret, A., P. Bordat, F. Affouard, M. Descamps und F. Migliardo, *How Homogeneous Are the Trehalose, Maltose, and Sucrose Water Solutions? An Insight From Molecular Dynamics Simulations*, Journal of Physical Chemistry B **109**, 11046 (2005).
- [133] Sonoda, M. T. und M. S. Skaf, *Carbohydrate Clustering in Aqueous Solutions and the Dynamics of Confined Water*, Journal of Physical Chemistry B **111**, 11948 (2007).
- [134] Sapir, L. und D. Harries, *Linking Trehalose Self-Association with Binary Aqueous Solution Equation of State*, Journal of Physical Chemistry B **115**, 624 (2011).
- [135] Lupi, L., L. Comez, M. Paolantoni, S. Perticaroli, P. Sassi, A. Morresi, B. M. Ladanyi und D. Fioretto, *Hydration and Aggregation in Mono- and Disaccharide Aqueous Solutions by Gigahertz-to-Terahertz Light Scattering and Molecular Dynamics Simulations*, Journal of Physical Chemistry B **116**, 14760 (2012).
- [136] Rampp, M., C. Buttersack und H. D. Lüdemann, *c,T-Dependence of the viscosity and the self-diffusion coefficients in some aqueous carbohydrate solutions*, Carbohydrate Research **328**, 561 (2000).
- [137] Ekdawi-Sever, N., J. J. de Pablo, E. Feick und E. von Meerwall, *Diffusion of Sucrose and Alpha,Alpha-Trehalose in Aqueous Solutions*, Journal of Physical Chemistry A **107**, 936 (2003).
- [138] Monteiro, C. und C. H. du Penhoat, *Translational Diffusion of Dilute Aqueous Solutions of Sugars as Probed by NMR and Hydrodynamic Theory*, Journal of Physical Chemistry A **105**, 9827 (2001).

- [139] Paolantoni, M., L. Comez, M. E. Gallina, P. Sassi, F. Scarponi, D. Fioretto und A. Morresi, *Light Scattering Spectra of Water in Trehalose Aqueous Solutions: Evidence for Two Different Solvent Relaxation Processes*, Journal of Physical Chemistry B **113**, 7874 (2009).
- [140] Heugen, U., G. Schwaab, E. Bründermann, M. Heyden, X. Yu, D. M. Leitner und M. Havenith, *Solute-induced retardation of water dynamics probed directly by terahertz spectroscopy*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**, 12301 (2006).
- [141] Heyden, M., E. Bründermann, U. Heugen, G. Niehues, D. M. Leitner und M. Havenith, *Long-Range Influence of Carbohydrates on the Solvation Dynamics of Water-Answers from Terahertz Absorption Measurements and Molecular Modeling Simulations*, Journal of the American Chemical Society **130**, 5773 (2008).
- [142] Smith, L. J., D. L. Price, Z. Chowdhuri, J. W. Brady und M. L. Saboungi, *Molecular dynamics of glucose in solution: A quasielastic neutron scattering study*, Journal of Chemical Physics **120**, 3527 (2004).
- [143] Mason, P. E., G. W. Neilson, J. E. Enderby, M. L. Saboungi und J. W. Brady, *Structure of Aqueous Glucose Solutions as Determined by Neutron Diffraction with Isotopic Substitution Experiments and Molecular Dynamics Calculations*, Journal of Physical Chemistry B **109**, 13104 (2005).
- [144] Engelsen, S. B. und S. Perez, *Unique Similarity of the Asymmetric Trehalose Solid-State Hydration and the Diluted Aqueous-Solution Hydration*, Journal of Physical Chemistry B **104**, 9301 (2000).
- [145] Ellis, R. J., *Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment*, Current Opinion in Structural Biology **11**, 114 (2001).
- [146] Ellis, R. J., *Macromolecular crowding: obvious but underappreciated*, Trends in Biochemical Sciences **26**, 597 (2001).
- [147] Zimmerman, S. B. und S. O. Trach, *Estimation of Macromolecule Concentrations and Excluded Volume Effects for the Cytoplasm of Escherichia-Coli*, Journal of Molecular Biology **222**, 599 (1991).
- [148] Muramatsu, N. und A. P. Minton, *Tracer diffusion of globular-proteins in concentrated protein solutions*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**, 2984 (1988).

- [149] Han, J. und J. Herzfeld, *Macromolecular Diffusion in Crowded Solutions*, Biophysical Journal **65**, 1155 (1993).
- [150] Tokuyama, M. und I. Oppenheim, *Dynamic of hard-sphere suspensions*, Physical Review E **50**, R16 (1994).
- [151] Tanford, C. und M. L. Wagner, *Hydrogen Ion Equilibria of Lysozyme*, Journal of the American Chemical Society **76**, 3331 (1954).
- [152] Ionov, R., A. Hedoux, Y. Guinet, P. Bordat, A. Lerbret, F. Affouard, D. Prevost und M. Descamps, *Sugar bioprotective effects on thermal denaturation of lysozyme: Insights from Raman scattering experiments and molecular dynamics simulation*, Journal of Non-Crystalline Solids **352**, 4430 (2006).
- [153] Cossins, B. P., M. P. Jacobson und V. Guallar, *A New View of the Bacterial Cytosol Environment*, Plos Computational Biology **7** (2011).
- [154] Cottone, G., S. Giuffrida, G. Ciccotti und L. Cordone, *Molecular Dynamics Simulation of Sucrose- and Trehalose-Coated Carboxy-Myoglobin*, Protein: Structure, Function, and Bioinformatics **59**, 291 (2005).
- [155] Cordone, L., G. Cottone und S. Giuffrida, *Role of residual water hydrogen bonding in sugar/Water/biomolecule systems: a possible explanation for trehalose peculiarity*, Journal of Physics: Condensed Matter **19** (2007).
- [156] Cordone, L., P. Galajda, E. Vitrano, A. Gassmann, A. and Ostermann und F. Parak, *A reduction of protein specific motions in co-ligated myoglobin embedded in a trehalose glass*, European Journal with Biophysics Letters **27**, 173 (1998).
- [157] Cottone, G., L. Cordone und G. Ciccotti, *Molecular Dynamics Simulation of Carboxy-Myoglobin Embedded in a Trehalose-Water Matrix*, Biophysical Journal **80**, 931 (2001).
- [158] Giuffrida, S., G. Cottone und L. Cordone, *Role of Solvent on Protein-Matrix Coupling in MbCO Embedded in Water-Saccharide Systems: A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study*, Biophysical Journal **91**, 968 (2006).
- [159] Lam, Y. H., R. Bustami, T. Phan, H. K. Chan und F. Separovic, *A Solid-State NMR Study of Protein Mobility in Lyophilized Protein-Sugar Powders*, Journal of Pharmaceutical Sciences **91**, 943 (2002).

- [160] Suihko, E. J., R. T. Forbes und D. C. Apperley, *A solid-state NMR study of molecular mobility and phase separation in co-spray-dried protein-sugar particles*, European Journal of Pharmaceutical Sciences **25**, 105 (2005).
- [161] Gregory, R. B., M. Gangoda, R. K. Gilpin und W. Su, *The Influence of Hydration on the Conformation of Bovine Serum-Albumin Studied by Solid-State C-13-NMR Spectroscopy*, Biopolymers **33**, 1871 (1993).
- [162] Krushelnitsky, A., T. Bräuniger und D. Reichert, *N-15 spin diffusion rate in solid-state NMR of totally enriched proteins: The magic angle spinning frequency effect*, Journal of Magnetic Resonance **182**, 339 (2006).
- [163] Kennedy, S. D. und R. G. Bryant, *Structural Effects of Hydration: Studies of Lysozyme by C-13 Solids NMR*, Biopolymers **29**, 1801 (1990).
- [164] Perry, A., M. P. Stypa, B. K. Tenn und K. K. Kumashiro, *Solid-State C-13 NMR Reveals Effects of Temperature and Hydration on Elastin*, Biophysics Journal **82**, 1086 (2002).
- [165] Griebenow, K. und A. M. Klibanov, *Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**, 10969 (1995).
- [166] Krushelnitsky, A., D. Reichert, G. Hempel, V. Fedotov, H. Schneider, L. Yagodina und A. Schulga, *Superslow Backbone Protein Dynamics as Studied by 1D Solid-State MAS Exchange NMR Spectroscopy*, Journal of Magnetic Resonance **138**, 244 (1999).
- [167] Cross, T. A., M. H. Frey und S. J. Opella, *N-15 Spin Exchange in a Protein*, Journal of the American Chemical Society **105**, 7471 (1983).
- [168] Castellani, F., B. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein und H. Oschkinat, *Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy*, Nature **420**, 98 (2002).
- [169] van Rossum, B. J., F. Castellani, J. Pauli, K. Rehbein, J. Hollander, H. J. M. de Groot und H. Oschkinat, *Assignment of amide proton signals by combined evaluation of HN, NN and HNCA MAS-NMR correlation spectra*, Journal of Biomolecular NMR **25**, 217 (2003).
- [170] McDermott, A. E., *Structural and dynamic studies of proteins by solid-state NMR spectroscopy: rapid movement forward*, Current Opinion in Structural Biology **14**, 554 (2004).

- [171] Krushelnitsky, A. G., G. Hempel und D. Reichert, *Simultaneous processing of solid-state NMR relaxation and 1D-MAS exchange data: the backbone dynamics of free vs. binase-bound barstar*, *Biochimica et Biophysica Acta: Proteins and Proteomics* **1650**, 117 (2003).
- [172] Rupley, J. A., E. Gratton und G. Careri, *Water and globular proteins*, *Trends in Biochemical Sciences* **8**, 18 (1983).
- [173] Hunter, N. E., C. S. Frampton, D. Q. M. Craig und P. S. Belton, *The use of dynamic vapour sorption methods for the characterisation of water uptake in amorphous trehalose*, *Carbohydrate Research* **345**, 1938 (2010).
- [174] Pearson, G. A., *Shimming An NMR Magnet*, Chemistry Department, University of Iowa, 1991.
- [175] Ammann, C., P. Meier und A. E. Merbach, *A Simple Multi Nuclear NMR Thermometer*, *Journal of Magnetic Resonance* **46**, 319 (1982).
- [176] Findeisen, M., T. Brand und S. Berger, *A H-1-NMR thermometer suitable for cryoprobes*, *Magnetic Resonance in Chemistry* **45**, 175 (2007).
- [177] Berger, S. und S. Braun, *200 and more NMR Experiments*, Wiley-VCH, 2004.
- [178] Hrovat, M. I. und C. G. Wade, *NMR Pulsed-Gradient Diffusion Measurements. I. Spin-Echo Stability and Gradient Calibration*, *Journal of Magnetic Resonance* **44**, 62 (1981).
- [179] Zheng, G. und W. S. Price, *Simultaneous convection compensation and solvent suppression in biomolecular NMR diffusion experiments*, *Journal of Biomolecular NMR* **45**, 295 (2009).
- [180] Esturau, N., F. Sanchez-Ferrando, J. A. Gavin, C. Roumestand, M. A. Delsuc und T. Parella, *The Use of Sample Rotation for Minimizing Convection Effects in Self-Diffusion NMR Measurements*, *Journal of Magnetic Resonance* **153**, 48 (2001).
- [181] Holz, M. und H. Weingärtner, *Calibration in Accurate Spin-Echo Self-Diffusion Measurements Using H-1 and Less-Common Nuclei*, *Journal of Magnetic Resonance* **92**, 115 (1991).
- [182] Price, W. S., *NMR gradient methods in the study of proteins*, *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. C: Phys. Chem.* **96**, 3 (2000).

- [183] Aliev, A. E. und K. D. M. Harris, *Simple Technique for Temperature Calibration of a MAS Probe for Solid-State NMR Spectroscopy*, *Magnetic Resonance in Chemistry* **32**, 366 (1994).
- [184] Bielecki, A. und D. P. Burum, *Temperature Dependence of P-207 MAS Spectra of Solid Lead Nitrate. An Accurate, Sensitive Thermometer for Variable-Temperature MAS*, *Journal of Magnetic Resonance Series A* **116**, 215 (1995).
- [185] Duda, C. A. und E. S. Stevens, *Trehalose Conformation in Aqueous Solution from Optical-Rotation*, *Journal of the American Chemical Society* **112**, 7406 (1990).
- [186] Batta, G., K. E. Köver, J. Gervay, M. Hornyak und G. M. Roberts, *Temperature Dependence of Molecular Conformation, Dynamics, and Chemical Shift Anisotropy of Alpha,Alpha-Trehalose in D2O by NMR Relaxation*, *Journal of the American Chemical Society* **119**, 1336 (1997).
- [187] Poveda, A., C. Vicent, S. Penades und J. JimenezBarbero, *NMR experiments for the detection of NOEs and scalar coupling constants between equivalent protons in trehalose-containing molecules*, *Carbohydrate Research* **301**, 5 (1997).
- [188] Dowd, M. K., P. J. Reilly und A. D. French, *Conformational Analysis of Trehalose Disaccharides and Analogues using MM3*, *Journal of Computational Chemistry* **13**, 102 (1992).
- [189] Bock, K., J. Defaye, H. Driguez und E. Bargailloux, *Conformations in Solution of Alpha, Alpha-Trehalose, Alpha-D-Glucopyranosyl Alpha-D-Mannopyranoside, and their 1-Thioglycosyl Analogs, and a Tentative Correlation of their Behaviour with Respect to the Enzyme Trehalase*, *European Journal of Biochemistry* **131**, 595 (1983).
- [190] Herzfeld, J. und A. E. Berger, *Sideband intensities in NMR-spectra of sample spinning at the magic angle*, *Journal of Chemical Physics* **73**, 6021 (1980).
- [191] Olejniczak, E. T., S. Vega und R. G. Griffin, *Multiple pulse NMR in rotating solids*, *Journal of Chemical Physics* **81**, 4804 (1984).

Publikationsliste

- [1] Hackel, C., C. Franz, A. Achilles, K. Saalwächter und D. Reichert, *Signal loss in 1D magic-angle spinning exchange NMR (CODEX): radio-frequency limitations and intermediate motions*, Physical Chemistry Chemical Physics **11**, 7022 (2009).

- [2] Hackel, C., T. Zinkevich, P. Belton, A. Achilles, D. Reichert und A. Krushelnitsky, *The trehalose coating effect on the internal protein dynamics*, Physical Chemistry Chemical Physics **14**, 2727 (2012).

- [3] Schäler, K., A. Achilles, R. Bärenwald, C. Hackel und K. Saalwächter, *Dynamics in Crystallites of Poly (epsilon-caprolactone) As Investigated by Solid-State NMR*, Macromolecules **46**, 7818 (2013).

Danksagung

Für die Möglichkeit das Thema dieser Dissertation zu bearbeiten, möchte ich Prof. Dr. Detlef Reichert danken. Viele „Kaffeerunden“ und immer ein offenes Ohr haben zum Gelingen der Arbeit entschieden beigetragen. Darüber hinaus möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit bedanken, dass ich an zahlreichen internationalen und nationalen Konferenzen teilnehmen konnte.

Viele aufschlussreiche Diskussionen und Hinweise zur experimentellen Umsetzung der FK-Messungen an den Csp/Trehalosesystemen mit Alexey Krushelnisky haben zum Gelingen dieses Teilprojektes beigetragen. Tanja Zinkevich möchte ich in diesem Zusammenhang für die Vortführung einiger Experimente während meiner Elternzeit danken.

Ein Dank geht an Prof. Dr. Kay Saalwächter für die Bereitschaft über die Daten zu diskutieren wann immer dies nötig war.

Rolf Sachs von der FG-Biophysik möchte ich recht herzlich für seine Versuche danken mir die Herstellung von ^{15}N -markiertem Csp näher zu bringen, sowie für die Überlassung des ^{15}N -markierten Csp für die FK-Messungen.

Für die praktische Unterstützung und viele nützliche Hinweise zu aussagekräftigen Literaturstellen bezüglich der Diffusionsexperimente möchte ich Stefan Gröger von der FG-Biophysik danken. Die Einarbeitung in diese Methode hätte andernfalls sicher mehr Zeit in Anspruch genommen.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an Pierre Seiboth richten, der mit seiner Hilfe bezüglich technischer Probleme vieles leichter gemacht hat und immer ein offenes Ohr für seine „Mädchen“ hat.

Ein herzliches Dankeschön geht an Anja und Christl für die Korrektur der vorliegenden Arbeit.

Allen Mitarbeitern der FG-NMR und FG-Biophysik möchte ich für die entspannte Arbeitsatmosphäre und viele schöne „Sozialevents“ danken: Weihnachtsfeiern, Landeserkundungstage, BBQ's, Filmabende...

Für die vielen geteilten Momente die meist zum Lachen, manchmal aber auch zum Weinen waren, gilt mein Dank Anja Achilles und Kerstin Steiner. Unsere Diskussionen über fachliche aber auch private Themen haben vieles leichter gemacht! Unsere Aktivitäten zur außeruniversitären „Weiterbildung“ zusammen mit Anke haben unvergessliche Erinnerungen geschaffen.

Zu guter Letzt geht das allergrößte Dankeschön an meine Familie, die immer dafür sorgt, dass alles im Leben den richtigen Bezugspunkt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christiane Hackel, geb. Forst

Geburtsdatum: 26.05.1983

Geburtsort: Merseburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schulbildung

1989 – 1993 Grundschule „Borlachscheule“ in Bad Dürrenberg

1993 – 1995 Realschule „Borlachscheule“ in Bad Dürrenberg

1995 – 2002 „Novalisgymnasium“ in Bad Dürrenberg

Studium

10/2002 – 01/2008 Studium der Medizinischen Physik an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluß: Diplom-Physikerin (Medizinphysik)
Thema der Diplomarbeit: „*Untersuchungen zur molekularen
Dynamik in Trehalose im glasartigen Zustand mittels
dynamischer Festkörper-NMR und
Positronenlebenszeitmessungen*“

02/2008-07/2011 wissenschaftliche Mitarbeiterin
im Institut für Physik bei Prof. Dr. D. Reichert, FG-NMR,
MLU Halle-Wittenberg

08/2011-08/2012 Mutterschutz und Elternzeit
Seit 09/2012 wissenschaftliche Mitarbeiterin
im Institut für Physik bei Prof. Dr. D. Reichert, FG-NMR,
MLU Halle-Wittenberg, Anfertigung der Dissertation

Halle (Saale), den 7. Mai 2015

Christiane Hackel

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in einer anderen Fassung im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt oder veröffentlicht.

Halle (Saale), den 7. Mai 2015

Christiane Hackel