

Untersuchung der Druckantwort der random coil
Modellpeptide Ac-GGXA-NH₂ und der
amyloidbildenden Polypeptide A β und IAPP mit Hilfe
der Hochdruck-NMR-Spektroskopie



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Markus Beck Erlach

aus
Mexiko-Stadt, Mexiko

im Jahr
2016

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

21.10.2016

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Christoph Oberprieler
Erstgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Hans Robert Kalbitzer
Zweitgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Christine Ziegler
Drittprüfer:	Prof. Dr. rer. nat. Wolfram Gronwald

Unterschrift:

Dipl.-Chem. Markus Beck Erlach

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	12
1 Allgemeine Einleitung	13
2 Allgemeine Methoden	16
2.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie	16
2.2 Beschreibung der Hochdruckanlagen	18
2.3 Nomenklatur der Atome in den Aminosäuren	21
3 Entwicklung eines Druckautoklaven mit Keramikmesszelle	22
3.1 Einleitung	23
3.2 Ergebnisse und Diskussion	27
4 Untersuchung der Druckantwort von amyloidbildenden Peptiden	33
4.1 Einleitung	34
4.2 Materialien und Methoden	36
4.2.1 Probenpräparation	36
4.2.2 NMR-Spektroskopie	39
4.2.3 Datenauswertung	42
4.3 Ergebnisse	44
4.3.1 Druckabhängigkeit des A β (1–40)-Peptids	44
4.3.2 Herleitung der Beschreibung der druckabhängigen Monomer- konzentration	48
4.3.3 Druckinduzierte Depolymerisierung des A β (1–40)-Peptids . . .	52
4.3.4 Druckabhängigkeit des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP)	60
4.3.5 Temperaturabhängigkeit des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP)	69

4.3.6	Korrelationsanalyse der Druck- und Temperaturabhängigkeit des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP)	71
4.4	Diskussion	75
4.4.1	Untersuchung der Druckabhängigkeit des A β (1–40)-Peptids . .	75
4.4.2	Druck- und Temperaturabhängigkeit des IAPP	77
5	Untersuchung der Druckeffekte am Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂	83
5.1	Einleitung	84
5.2	Materialien und Methoden	87
5.2.1	Synthese der Peptide	87
5.2.2	Probenpräparation	88
5.2.3	NMR-Spektroskopie	89
5.2.4	Prozessierung der NMR-Daten	89
5.2.5	Verwendete Software	93
5.3	Ergebnisse	93
5.3.1	Chemische Verschiebung der Kohlenstoffkerne bei Normaldruck	93
5.3.2	Druckabhängigkeit der Kohlenstoffkerne des Peptidrückgrats .	98
5.3.3	Druckabhängigkeit der Kohlenstoffkerne der Peptidseitenketten	103
5.3.4	Druck- und Temperaturabhängigkeit der Kohlestoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH ₂	110
5.3.5	Einfluss des Drucks auf die terminalen Schutzgruppen des Modellpeptids Ac-GGXA-NH ₂	118
5.4	Diskussion	124
6	Verknüpfung des Verhältnisses der Druckkoeffizienten mit thermodynamischen Parametern	128
6.1	Einleitung	129
6.2	Ergebnisse	132
6.2.1	Herleitung des Zusammenhangs zwischen Druckkoeffizienten und thermodynamischen Größen	132
6.2.2	Theoretische Überprüfung an simulierten Kurven	137
6.2.3	Überprüfung der Nachweisbarkeit des Taylorpolynoms durch lineare Regression	139
6.2.4	Verknüpfung des Koeffizientenverhältnisses mit thermodynamischen Parametern anhand von Extremwerten	142

6.2.5	Untersuchung des Verhältnisses der Druckkoeffizienten an unterschiedlichen Systemen	145
6.3	Diskussion	152
7	Zusammenfassung	154
8	Literaturverzeichnis	158
	Danksagung	172
9	Anhang	174
9.1	Eigene Publikationen	174
9.2	Technische Zeichnung des Hochdruckautoklaven	176
9.3	Chemische Verschiebungen des A β (1–40)-Peptids	177
9.4	Druckkoeffizienten des A β (1–40)-Peptids	180
9.5	Konzentrationen an monomerem A β (1–40)	181
9.6	Chemische Verschiebungen des IAPP	182
9.7	Druckkoeffizienten des IAPP	188
9.8	Korrelationen für das Modellpeptid Ac-GGXA-NH ₂	192
9.9	Einteilung der Kohlenstoffkerne der Peptidseitenketten in vergleichbare Gruppen	194
9.10	Druck- und Temperaturkoeffizienten des Tetrapeptids Ac-GGFA-NH ₂ . .	195
	Erklärung	197

Abbildungsverzeichnis

2.1	Phasendiagramm von Wasser	19
2.2	Schema des automatisierbaren Druckregelsystems	20
2.3	Nomenklatur der Atome in den proteinogenen Aminosäuren	21
3.1	Aufbau der Hochdruckzelle und deren Halterung	28
3.2	Einfluss der Membran, des Sicherheitsstempels und des Verdrängers auf die Druckübertragung	29
3.3	Homogenität des Magnetfelds in der Keramikzelle	30
4.1	Spaltungsprodukte des APP durch unterschiedliche Sekretasen	34
4.2	Aufbau des Pankreasgewebes und der Langerhans-Inseln	36
4.3	Nachgewiesene Verunreinigungen in den A β (1–40)-Proben	39
4.4	1D-Protonenspektren von A β (1–40)	40
4.5	Zweidimensionale [$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-HSQC Spektren von A β (1–40) und IAPP bei unterschiedlichen Drücken	41
4.6	Mögliche Zustände der Polymerisierung des A β (1–40)-Peptids	45
4.7	Druckkoeffizienten der kombinierten chemischen Verschiebung von A β (1–40)	46
4.8	Relative Populationen der konformationellen Zustände des A β (1–40)-Peptids	48
4.9	Simulierte Kurven der Monomerkonzentration für unterschiedliche thermodynamische Parameter in Abhängigkeit vom Druck	52
4.10	Druckinduzierte Depolymerisierung von A β (1–40) in Abhängigkeit der Temperatur	53
4.11	Vergleich der Modelle zur Beschreibung der druckinduzierten Depolymerisierung von A β (1–40) mit und ohne Berücksichtigung des Kompressibilitätsfaktors	55
4.12	Vergleich der Modelle zur Beschreibung der druckinduzierten Depolymerisierung von A β mit $\Delta\beta^0$ und ohne $\Delta\beta^0$ mit c_T als Fitparameter	57

4.13 Druckabhängigkeit der Signalintensitäten für IAPP bei unterschiedlichen Temperaturen	61
4.14 Druckkoeffizienten für die Amidprotonen H^N des IAPP	63
4.15 Druckkoeffizienten für die Amidstickstoffe N des IAPP	64
4.16 Korrelation zwischen den Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für IAPP	65
4.17 Differenz zwischen den Druckkoeffizienten des Amidstickstoffs und der Amidprotonen im IAPP	66
4.18 Druckkoeffizienten der kombinierten chemischen Verschiebung der Amidgruppe des Peptidrückgrats für IAPP	67
4.19 Differenz der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 zu der in der Sequenz vorhergehenden Amidgruppe des IAPP	68
4.20 Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 aus der kombinierten chemischen Verschiebung für IAPP	69
4.21 Temperaturkoeffizienten C_1 für die Kerne H^N und N des IAPP	70
4.22 Korrigierte Temperaturkoeffizienten C_1^{corr} für die Kerne H^N und N des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP)	71
4.23 Korrelationen zwischen den Druck- und Temperaturkoeffizienten des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP)	72
4.24 Druckabhängigkeit der Temperaturkoeffizienten C_1^{corr} für die Kerne H^N und N des IAPP	73
4.25 Korrelation zwischen der Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten und der Druckabhängigkeit der Temperaturkoeffizienten	74
4.26 Differenz der Druckkoeffizienten zwischen IAPP und $A\beta(1-40)$	79
5.1 Chemische Struktur des Modellpeptids	88
5.2 Korrelation der Druckkoeffizienten bei Auswertung mit exponentiellem Filter beziehungsweise Gauss Filter für die Kohlenstoffkerne	91
5.3 Vergleich des korrigierten Bestimmtheitsmaßes bei Verwendung unterschiedlicher Fensterfunktionen	92
5.4 Vergleich der chemischen Verschiebungen bei Normaldruck mit bereits publizierten Datensätzen	97
5.5 Druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung für die Kerne H^α , C^α und C' des Peptidrückgrats im Modellpeptid Ac-GGXA-NH ₂	99
5.6 Übersicht der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kerne des Peptidrückgrats in dem Modellpeptid Ac-GGXA-NH ₂	101

5.7	Druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung für die Kohlenstoffkerne der Seitenketten in dem Modellpeptid Ac-GGXA-NH ₂ . . .	104
5.8	Übersicht der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kohlenstoffkerne der Seitenketten in dem Modellpeptid Ac-GGXA-NH ₂	107
5.9	Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung bei Normaldruck für die Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH ₂	111
5.10	Temperaturinduzierte Änderung der Druckkoeffizienten für die Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH ₂	113
5.11	Druckinduzierte Änderung der Temperaturkoeffizienten für die Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH ₂	114
5.12	Temperaturinduzierte Änderung des Druckkoeffizientenverhältnisses und druckinduzierte Änderung des Temperaturkoeffizientenverhältnisses für die Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH ₂	115
5.13	Protonenspektrum des Tetrapeptids Ac-GGAA-NH ₂	119
5.14	Druckkoeffizienten B_1 und B_2 der terminalen Schutzgruppen des Modellpeptids Ac-GGXA-NH ₂	123
6.1	Verlauf der Funktion des Tangens Hyperbolicus	135
6.2	Vergleich von simulierten thermodynamischen Kurven mit einer durch deren Taylorpolynom ausgedrückten Funktion	137
6.3	Verhältnis der Druckkoeffizienten $B_2^{\#}/B_1$ für unterschiedliche symmetrische Fitbereiche um $P = P_0$	140
6.4	Verhältnis der Druckkoeffizienten $B_2^{\#}/B_1$ für unterschiedliche Fitbereiche mit $P > P_0$	141
6.5	Variation des Startpunkts eines festgelegten Fitbereichs zur Beschreibung einer simulierten Kurve mit einem Polynom zweiter Ordnung	144
6.6	Korrelation des Verhältnisses der Druckkoeffizienten mit dem Verhältnis thermodynamischer Parameter für das A β -Peptid	146
6.7	Korrelation (Ac-GGXA-NH ₂) und Temperaturabhängigkeit (Ac-GGIA-NH ₂) des Verhältnisses der Druckkoeffizienten	151
9.1	Technische Zeichnung des Hochdruckautoklaven	176
9.2	Korrelationen zwischen den Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kerne des Peptidrückgrats in dem Modellpeptid Ac-GGXA-NH ₂	192
9.3	Korrelationen zwischen den Koeffizientenverhältnissen B_2/B_1 des Kerns H ^N und der übrigen Kerne des Peptidrückgrats	193

Tabellenverzeichnis

3.1	Modifikationen des Zirconium(IV)-oxids	24
3.2	Physikalische und mechanische Eigenschaften von Hochdruckzellen . .	26
4.1	Pufferzusammensetzungen für die Probenpräparation von A β (1–40) .	37
4.2	Konformationelle Übergänge des monomeren A β (1–40)-Peptids	47
4.3	Thermodynamische Parameter der druckinduzierten Depolymerisierung von A β (1–40)	58
4.4	Aus den thermodynamischen Parametern abgeleitete Größen der druck- induzierten Depolymerisierung von A β (1–40)	59
5.1	Übersicht von ^{13}C random coil Datensätzen	86
5.2	Schutzgruppen der Seitenketten der Aminosäure X3 im Modellpeptid Ac-GGXA-NH $_2$	87
5.3	Chemische Verschiebung der Kohlenstoffkerne bei Normaldruck für die Aminosäure X im Modellpeptid Ac-GGXA-NH $_2$	95
5.4	Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kohlenstoffkerne des Peptidrück- grats im Modellpeptid Ac-GGXA-NH $_2$	100
5.5	Pearson Korrelationskoeffizienten der Druckkoeffizienten und deren Verhältnis für unterschiedliche Kerne des Peptidrückgrats	102
5.6	Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kohlenstoffkerne der Seitenketten des Modellpeptids Ac-GGXA-NH $_2$	105
5.7	Gemittelte Druckkoeffizienten für die in unterschiedliche Gruppen ein- geteilten Kohlenstoffkerne	108
5.8	Lineare und polynomiale Temperaturabhängigkeit der Kohlenstoff- kerne im Tetrapeptid Ac-GGFA-NH $_2$	112
5.9	Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 sowie Druck- abhängigkeit der Temperaturkoeffizienten C_1 und C_2 der Kohlenstoff- kerne im Tetrapeptid Ac-GGFA-NH $_2$	116

5.10	Temperaturabhängigkeit des Druckkoeffizientenverhältnisses und Druckabhängigkeit des Temperaturkoeffizientenverhältnisses für die Kohlenstoffkerne des Tetrapeptids Ac-GGFA-NH ₂	117
5.11	Druckkoeffizienten der terminalen -CH ₃ Schutzgruppe des Modellpeptids Ac-GGXA-NH ₂	121
5.12	Druckkoeffizienten der terminalen -NH ₂ Schutzgruppe des Modellpeptids Ac-GGXA-NH ₂	122
6.1	Parameter der thermodynamischen und polynominalen Kurven sowie daraus abgeleitete Verhältnisse	138
6.2	Verhältnis der Druckkoeffizienten für die Kerne des Peptidrückgrats in den Modellpeptiden Ac-GGXA-NH ₂ und GGXA	149
9.1	Chemische Verschiebungen des Aβ(1–40)-Peptids bei 278 K	177
9.2	Chemische Verschiebungen des Aβ(1–40)-Peptids bei 288 K	178
9.3	Druckkoeffizienten des Aβ(1–40)-Peptids	180
9.4	Konzentrationen an monomerem Aβ(1–40) in Abhängigkeit der Temperatur und der Peptidkonzentration	181
9.5	Chemische Verschiebungen des IAPP bei 278 K	182
9.6	Chemische Verschiebungen des IAPP bei 288 K	183
9.7	Chemische Verschiebungen des IAPP bei 298 K	184
9.8	Chemische Verschiebungen des IAPP bei 308 K	186
9.9	Druckkoeffizienten des IAPP bei 278 K	188
9.10	Druckkoeffizienten des IAPP bei 288 K	189
9.11	Druckkoeffizienten des IAPP bei 298 K	190
9.12	Druckkoeffizienten des IAPP bei 308 K	191
9.13	Einteilung der Kohlenstoffkerne der Peptidseitenketten in vergleichbare Gruppen	194
9.14	Druckkoeffizienten der Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH ₂ für unterschiedliche Temperaturen	195
9.15	Temperaturkoeffizienten der Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH ₂ für unterschiedliche Drücke	196

Abkürzungsverzeichnis

Aβ	Amyloid- β
AICD	<i>APP intracellular domain</i>
APP	<i>Amyloid-Precursor-Protein</i>
ATZ	<i>Alumina toughened zirconia</i>
BACE1	<i>β-site of APP cleaving enzyme</i>
CMC	<i>Critical micelle concentration</i>
CSI	<i>Chemical shift index</i>
CW	<i>Continous wave</i>
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
FID	<i>Free induction decay</i>
FT	Fourier-Transformation
IAPP	Insel-Amyloid-Polypeptid
IDP	<i>Intrinsically disordered proteins</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MD	<i>Molecular dynamics</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
PII	<i>Polyproline-II</i>
PSSI	<i>Probability based Secondary Structure Identification</i>
PSZ	<i>Partially stabilized zirconia</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RP-HPLC	<i>Reversed-phase high-performance chromatography</i>

1 Allgemeine Einleitung

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) ist eine in der Chemie und Biologie vielseitig einsetzbare Methode, um Systeme auf atomarer Ebene zu untersuchen. Die Möglichkeiten reichen dabei von Strukturaufklärungen mit Hilfe dreidimensionaler NMR-Spektren über die Charakterisierung des Systems bei Änderung von Temperatur oder Druck bis hin zur Qualitätssicherung von hergestellten Substanzen. Insbesondere die Biologie profitiert von der Vielseitigkeit der NMR-Spektroskopie. Hier können gezielt Proteine, die zum Beispiel bei der Entstehung von Krankheiten eine wichtige Rolle spielen, untersucht werden. Ebenso können zeitliche Abläufe, wie zum Beispiel Polymerisierungen oder Depolymerisierungen verfolgt werden.

Ein Teilgebiet der NMR-Spektroskopie ist die Hochdruck-Kernspinresonanzspektroskopie (HP-NMR-Spektroskopie, *High-Pressure Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*), die den Einfluss des Drucks auf das jeweilige System untersucht. Bezüglich der Hochdruck-NMR-Spektroskopie gibt es eine Vielzahl von empfehlenswerten Übersichtsartikeln (Kremer, 2006; Lassalle und Akasaka, 2006; Akasaka, 2006, 2013; Kalbitzer, 2015). Die Anwendung von Druck erweitert auch die Möglichkeiten anderer Analysemethoden, wie zum Beispiel der Röntgenstrukturanalyse oder der Fluoreszenzspektroskopie (Fourme et al., 2012; Luong et al., 2015; Akasaka und Matsuki, 2015).

Die instrumentellen Anforderungen an die Hochdruck-NMR-Spektroskopie übersteigen die der normalen NMR-Spektroskopie (Yamada, 1974; Jonas, 1972), erweitern jedoch beträchtlich ihre Untersuchungsmöglichkeiten. So hängt zum Beispiel die Stabilität und Dynamik von Proteinen vom Druck als thermodynamische Größe ab (Gross und Jaenicke, 1994; Heremans und Smeller, 1998). Zudem können Gleichgewichte zwischen Populationen mit Hilfe des Drucks manipuliert werden, um niedrig populierte Zustände der spektroskopischen Analyse zugänglich zu machen (Inoue et al., 2000; Kachel et al., 2006; Munte et al., 2013; Beck Erlach et al., 2016b).

Die hohen hydrostatischen Drücke stellen eine besondere Herausforderung der Hochdruck-NMR-Spektroskopie dar. Dies gilt im Besonderen für die Messzelle im Probenkopf des NMR-Spektrometers, die den hohen Drücken widerstehen muss, ohne Einfluss auf die sensitiven Messungen zu nehmen (Urbauer et al., 1996; Peterson und Wand, 2005; Beck Erlach et al., 2010). Allgemein muss bei der Anwendung der Hochdruck-NMR-Spektroskopie bei allen Komponenten in der Nähe des NMR-Spektrometers auf magnetische Komponenten verzichtet werden. In Kapitel 3 dieser Arbeit wird auf die unterschiedlichen technischen Aspekte der Hochdruck-NMR-Spektroskopie eingegangen und die Entwicklung eines Hochdruckautoklaven zur Verwendung mit einer Keramikmesszelle beschrieben. Dabei wird auch auf die Sicherheit des Hochdrucksystems eingegangen, da im Falle eines Bruchs der Messzelle im Spektrometer großer Schaden entstehen kann. Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits in Beck Erlach et al. (2010) veröffentlicht.

Eine Anwendung der Hochdruck-NMR-Spektroskopie erfolgte an den amyloidogenen Peptiden Amyloid- β ($A\beta$) und dem Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP), die an der Entstehung der Alzheimer-Krankheit ($A\beta$) beziehungsweise Diabetes mellitus (IAPP) beteiligt sein sollen. Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung sowie der Signalvolumen erlaubte dabei die Identifizierung der von uns in Munte et al. (2013) beschriebenen Zustände, die bei der Bildung von Fibrillen aus monomerem $A\beta$ beteiligt sein könnten. Diese Ergebnisse sowie die Untersuchung der druckinduzierten Depolymerisierung kleiner Aggregate von $A\beta$ in Abhängigkeit der Temperatur und der eingesetzten Peptidkonzentration behandelt Kapitel 4. Des Weiteren wird in diesem Kapitel die Untersuchung des Druckeinflusses auf die chemische Verschiebung des IAPP gezeigt, welche bereits in Beck Erlach et al. (2016a) veröffentlicht wurde. Zusätzlich wird auf die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen beziehungsweise den Einfluss der Temperatur auf das Druckverhalten eingegangen.

Die Hochdruck-NMR-Spektroskopie eignet sich sehr gut für die Untersuchung von Druckeffekten an Proteinen, da die Änderung des Drucks als thermodynamischer Parameter zu konformationellen Änderungen des Systems führen kann. Um diese strukturellen Effekte des Proteins von den intrinsischen Druckeffekten der Aminosäuren zu unterscheiden, wurden Korrekturfaktoren aus den Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebung von Modellpeptiden ermittelt. Diese wurden für die Amidprotonen des Peptidrückgrats H^N , die Protonen H^α und H^β des Modellpeptids Gly-Gly-Xxx-Ala von Arnold et al. (2002) bestimmt (Xxx entspricht dabei einer der 20 kanonischen Aminosäuren). In einer weiterführenden Studie von Koehler et al. (2012) wurden die

Korrekturfaktoren der Stickstoffkerne und aller Protonen für das Modellpeptid Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ bestimmt, wobei die Kerne der Aminosäure Xxx ¹⁵N- und ¹³C-markiert wurden (Koehler et al., 2012; Koehler, 2014). Hierbei wurden die terminalen Gruppen geschützt (N-terminale Acetylierung und C-terminale Aminierung), um Effekte der Ladungen (COO⁻ beziehungsweise NH₃⁺) auf die Druckabhängigkeit der Aminosäure Xxx auszuschließen.

In Kapitel 5 dieser Arbeit wird die druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung für die Kohlenstoffkerne des Modellpeptids Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂ mit ¹⁵N- und ¹³C-markierter Aminosäure Xxx untersucht und quantifiziert. Zudem wird für das Peptid Ac-Gly-Gly-Phe-Ala-NH₂ auf die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von der Temperatur und vom Druck sowie die gegenseitige Beeinflussung dieser Größen eingegangen. Um den Einfluss der Aminosäure Xxx auf die Druckabhängigkeit des Modellpeptids zu untersuchen, wurden die chemischen Verschiebungen der Protonen der terminalen Schutzgruppen in Abhängigkeit des Drucks bestimmt.

Es wurde bereits gezeigt, dass sich die chemische Verschiebung in Abhängigkeit vom Druck für Peptide und Proteine in den meisten Fällen nicht linear verhält (Inoue et al., 2000; Kalbitzer et al., 2000). Die Stärke der Nichtlinearität kann dabei auf konformationelle Änderungen in der Struktur des untersuchten Systems hindeuten (Akasaka und Li, 2001). Aufgrund dieser Nichtlinearität erfolgt die Quantifizierung der Druckeffekte mit Hilfe eines Polynoms zweiter Ordnung, welches die Bestimmung eines linearen sowie eines nicht linearen Druckkoeffizienten ermöglicht. Diese Druckkoeffizienten lassen jedoch keinen Rückschluss auf thermodynamische Parameter des Systems, wie der Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG^0 , der Volumenänderung ΔV^0 oder der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta^0$, zu. Daher wird in Kapitel 6 dieser Arbeit versucht, die Druckkoeffizienten mit thermodynamischen Parametern des Systems zu verknüpfen. Die Beschreibung dieses Zusammenhangs wurde bereits in Beck Erlach et al. (2014) veröffentlicht. Ergänzend erfolgt in diesem Kapitel die Anwendung der Verknüpfung auf unterschiedliche Systeme sowie eine detaillierte Auseinandersetzung mit den Limitierungen des Zusammenhangs.

2 Allgemeine Methoden

2.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Die Kernspinresonanz wurde 1946 unabhängig voneinander in den Arbeitsgruppen von Felix Bloch und Edward Purcell entdeckt. Beide wurden 1952 mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet. Mit Hilfe der Kernspinresonanz war es möglich, strukturabhängige Signale der Atomkerne zu erhalten. Zu Beginn erfolgten die Messungen unter Verwendung der Continuous-Wave-(CW)-Methode, bei der die Einstrahlungsfrequenz über das gesamte Spektrum nacheinander variiert wird. Diese Methode wurde durch die von R. R. Ernst entwickelte Puls-Fourier-Transformations-NMR-Spektroskopie (FT-NMR) abgelöst, die zu einer deutlichen Reduktion der Messzeit sowie zu einer höheren Empfindlichkeit führte. Für die Entwicklung dieser Methode erhielt R. R. Ernst 1991 den Nobelpreis für Chemie. Bei der FT-NMR wird das gesamte Spektrum mit einem breitbandigen Puls angeregt und die Zeitabhängigkeit des detektierten Signals aufgenommen (FID, *free induction decay*, freier Induktionszerfall). Dieses zeitabhängige Signal kann mit Hilfe der Fourier-Transformation in ein Frequenzspektrum umgewandelt werden.

Eine weitere, insbesondere für die Biologie, wichtige Entwicklung war die Einführung der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie von Jean Jeener, der diese 1971 in einem Seminar vorstellte (Porneuf und Goldman, 1994). Die ersten zweidimensionalen NMR-Experimente wurden 1976 von Walter P. Aue, Enrico Bartholdi und Richard R. Ernst durchgeführt (Aue et al., 1976). Mit Hilfe mehrdimensionaler Experimente wurde es möglich, die Struktur von biologischen Molekülen bis hin zu komplexeren Systemen, wie zum Beispiel Proteinen, zu bestimmen. Im Gegensatz zu der Röntgenstrukturanalyse, bei der die Probe in kristalliner Form vorliegen muss, ermöglicht die NMR-Spektroskopie eine Strukturaufklärung der Probe in flüssigen Lösungsmitteln.

An dieser Stelle erfolgt eine kurze Einführung in die Grundlagen der NMR-Spektroskopie. Für eine detaillierte Beschreibung sei an dieser Stelle auf die hervorragenden Lehrbücher von Claridge (2016) und Friebolin (2013) verwiesen. Grundlage der NMR-Spektroskopie ist die Aufspaltung der Orientierungen des Kernspins in Gegenwart eines

starken homogenen Magnetfeldes. Diese führt zu $(2I + 1)$ möglichen Orientierungen und ist abhängig von der Kernspinquantenzahl I . Für Kerne mit einer Kernspinquantenzahl I von $1/2$ ergeben sich somit zwei mögliche Orientierungen des Kernspins. Die energetisch niedrigere und somit stärker populierte Orientierung ist die parallel zum äußeren Magnetfeld, während die Orientierung antiparallel zum äußeren Magnetfeld energetisch höher und somit weniger populierte ist. Diese energetischen Niveaus werden als Zeeman-Niveaus bezeichnet. Bei Einstrahlung einer Energie, die dem Energieunterschied zwischen den Niveaus entspricht, ist die Resonanzbedingung erfüllt und es erfolgt eine Spinumkehr (Gleichung 2.1).

$$h\nu = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (2.1)$$

Dabei entspricht $h\nu$ der eingestrahnten Energie, die mit Hilfe des Planckschen Wirkungsquantums h und der Frequenz ν beschrieben werden kann. Der Energieunterschied zwischen den durch das Magnetfeld erzeugten Zeeman-Niveaus wird durch das kernabhängige magnetogyrische Verhältnis γ , dem reduzierten Planckschen Wirkungsquantum $\hbar = h/2\pi$ und der magnetischen Flussdichte B_0 bestimmt.

Da das energetisch niedrigere Niveau höher populierte ist, überwiegt in Summe die Absorption der Energie gegenüber der Emission. Dabei wird der eingestrahlte Puls so gewählt, dass die im Ausgangszustand parallel zum äußeren Magnetfeld liegende makroskopische Magnetisierung um 90° umgelenkt wird. Diese Quermagnetisierung wird von Detektionsspulen in dieser Ebene aufgenommen. Nach Einstrahlung des Pulses beziehungsweise Absorption der Energie kehrt das System über unterschiedliche Relaxationsprozesse in den Ausgangszustand zurück. Man unterscheidet hierbei die longitudinale Relaxationszeit T_1 (Spin-Gitter-Relaxationszeit), bei der Energie an die Umgebung abgegeben wird und die transversale Relaxationszeit T_2 (Spin-Spin-Relaxationszeit), bei der die Energie auf einen anderen Spin übertragen wird. Das Besetzungsverhältnis zwischen den Spinzuständen bleibt im Falle der transversalen Relaxationszeit T_2 konstant. Die zeitabhängige Abnahme der Quermagnetisierung stellt den freien Induktionszerfall (FID) dar, der über eine Fourier-Transformation in ein Frequenzspektrum umgewandelt werden kann.

Die Resonanzfrequenzen der Kerne in einem Molekül hängen dabei charakteristisch von der Kernumgebung und damit von der effektiven Flussdichte B_{eff} des Magnetfeldes am Ort des Kerns ab (Gleichung 2.2). Die effektive magnetische Flussdichte ist abhän-

gig von der Abschirmungskonstante σ , die wiederum abhängig von der chemischen Umgebung des Kerns ist.

$$B_{\text{eff}} = B_0 - \sigma B_0 = B_0(1 - \sigma) \quad (2.2)$$

Diese unterschiedlichen lokalen magnetischen Flussdichten B_{eff} führen gemäß Gleichung 2.1 zu unterschiedlichen Resonanzfrequenzen und somit zu einer Unterscheidung der Kerne in Abhängigkeit ihrer chemischen Umgebung. Dabei ist die Resonanzfrequenz abhängig von der Stärke des magnetischen Feldes und somit sind Spektren, die an NMR-Spektrometern unterschiedlicher Feldstärke aufgenommen wurden, schwer zu vergleichen. Aus diesem Grund verwendet man anstatt der Resonanzfrequenz die von der Magnetfeldstärke des Spektrometers unabhängige Größe der chemischen Verschiebung δ (Gleichung 2.3).

$$\delta = \frac{\nu_{\text{Probe}} - \nu_{\text{Referenz}}}{\nu_{\text{Referenz}}} \quad (2.3)$$

Die chemische Verschiebung δ ergibt sich aus dem Abstand der Resonanzfrequenz der Probe ν_{Probe} und der Resonanzfrequenz einer Referenzsubstanz ν_{Referenz} . Dieser Abstand, der in der Größenordnung von einigen Hertz liegt, wird durch die Resonanzfrequenz der Referenzsubstanz ν_{Referenz} geteilt, welche in der Größenordnung von einigen Megahertz liegt. Aus diesem Grund wird die chemische Verschiebung üblicherweise in parts per million (ppm) angegeben.

2.2 Beschreibung der Hochdruckanlagen

Die in dieser Arbeit verwendeten Hochdruckanlagen für die Hochdruck-NMR-Spektroskopie werden aus verschiedenen Elementen zusammengesetzt. Grundlegend erfolgt die Druckerzeugung mit Hilfe der Yamada-Methode, bei der die Messzelle im NMR-Spektrometer über eine Zuleitung mit dem druckerzeugenden System verbunden ist (on-line) und die in kommerziell erhältlichen Probenköpfen angewandt werden kann (siehe Kapitel 3.1). Diese Elemente der Yamada-Methode bestehen aus einer druckerzeugenden Einheit, welche über eine nicht magnetische Zuleitung mit einem Autoklaven im Probenkopf des NMR-Spektrometers verbunden ist und einer in diesen

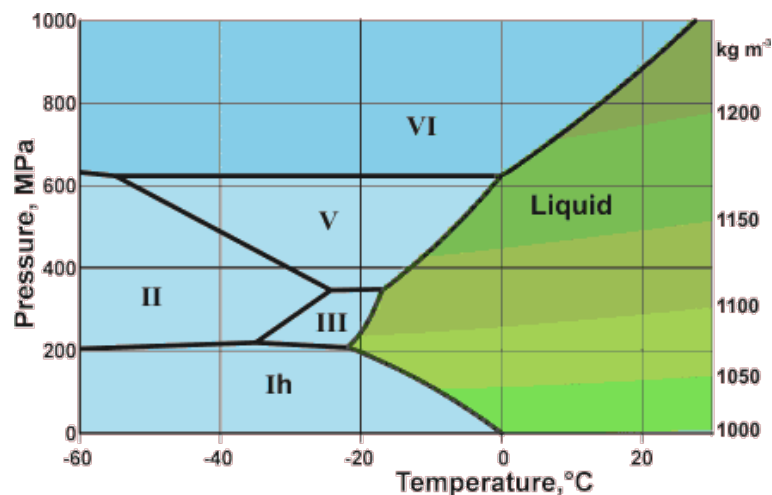


Abbildung 2.1: Phasendiagramm von Wasser Die Abbildung zeigt einen für die Hochdruck-NMR-Spektroskopie relevanten Ausschnitt des Phasendiagramms von Wasser. Dieser reicht von 0 MPa bis 1000 MPa und von $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis ca. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dabei sind die Phasen, in denen Wasser als Festkörper vorliegt blau gefärbt und die flüssige Phase von Wasser ist grün gefärbt. (Quelle: http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_phase_diagram.html)

Autoklaven integrierten Messzelle, die entweder aus Glas, Saphir oder Keramik gefertigt sein kann (siehe Kapitel 3.1). Ein zusätzliches Element ist das Druckfluid, welches für die Übertragung des Drucks in dem System zuständig ist.

Zu Beginn wurde als Druckfluid Methylcyclohexan verwendet, da es mit einem Schmelzpunkt von $-126,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ auch bei Messungen unter dem Gefrierpunkt von Wasser verwendet werden kann. Aufgrund der negativen Eigenschaften, wie zum Beispiel der Entzündlichkeit (niedriger Flammpunkt) und der gesundheitsschädlichen Wirkung auf Menschen und Wasserlebewesen, wurde es durch destilliertes Wasser ersetzt, welches über deutlich weniger negative Eigenschaften verfügt. Auch mit Wasser als Druckfluid ist es möglich Messungen unter $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchzuführen, da sich der Gefrierpunkt mit dem Druck erniedrigt ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 200 MPa). Es ist jedoch darauf zu achten, dass sich der Gefrierpunkt von Wasser bei Drücken über 200 MPa wieder erhöht (Abbildung 2.1).

Die für die Messungen wichtigste Komponente eines Hochdrucksystems ist die Messzelle, die in eine Halterung (Autoklav) integriert ist, um eine korrekte Platzierung der Messzelle im Probenkopf des NMR-Spektrometers zu gewährleisten. Die Messzelle muss hohen Drücken widerstehen können und darf die NMR-spektroskopischen Messungen nicht beeinflussen. Im Laufe der Zeit wurden unterschiedliche Materialien, wie zum Beispiel Glas, Saphir und Keramik, zur Fertigung der Messzelle herangezogen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Messzellen aus Keramik verwendet. Einen detaillierten

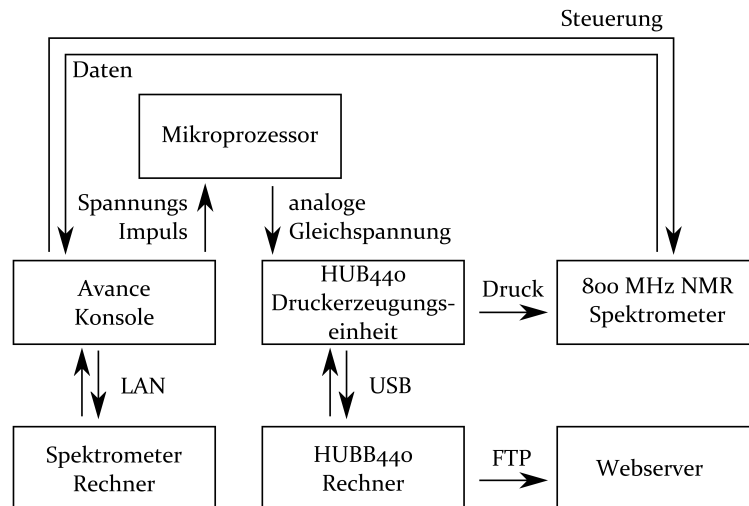


Abbildung 2.2: Schema des automatisierbaren Druckregelsystems Die Abbildung zeigt die Konnektivitäten der Druckerzeugungseinheit (Barocycler[®] HUB440) der Firma Pressure BioSciences Inc. (South Easton, Massachusetts, USA) und des Mikroprozessors sowie die peripheren Anschlussmöglichkeiten. Dieses integrierte System wurde in Koehler (2014) entwickelt und ist dort ausführlich beschrieben. (Quelle: Koehler (2014))

Vergleich der unterschiedlichen Materialien sowie Informationen über die Halterung und in diese integrierte Sicherheitssysteme finden sich in Kapitel 3 dieser Arbeit. Zu Beginn der Arbeit wurde eine Keramikzelle der Firma *HiPer Ceramics GmbH* (Oberkrämer, Deutschland) verwendet (Kapitel 3). Die Druckmessungen der restlichen Arbeit wurden mit Keramikzellen der Firma *Daedalus Innovations LLC* (Aston, Pennsylvania, USA) durchgeführt. Für die Messungen standen eine Keramikzelle für Drücke bis 200 MPa und eine für Drücke bis 250 MPa zur Verfügung.

Für die Druckerzeugung standen zwei Spindelpressen, zwei Gas-zu-Flüssigkeits-Druck-Verstärker (Druckpumpen) sowie ein automatisierbares Druckregelsystem (Barocycler[®] HUB440) der Firma *Pressure BioSciences Inc.* (South Easton, Massachusetts, USA) zur Verfügung. Die Spindelpressen eignen sich sehr gut für statische Messungen, während die über den Gasdruck geregelten Druckpumpen optimal in Drucksprungexperimenten eingesetzt werden können (Koehler, 2014).

Ein Großteil der Experimente wurde mit dem Druckregelsystem Barocycler[®] HUB440 durchgeführt, da hier eine Automatisierung der Druckregelung möglich ist. Die in Koehler (2014) beschriebenen Erweiterungen des Barocycler[®] HUB440 ermöglichte eine Automatisierung vollständiger Druckreihen. Das Kernelement stellt dabei das Druckregelsystem Barocycler[®] HUB440 dar, welches über eine eigene Software zur Einstellung

beziehungsweise Überprüfung des Drucks verfügt. Die Verknüpfung mit dem Spektrometer erfolgt über einen Mikroprozessor, der eine im Spektrometer eingestellte Pulsdauer in ein elektrisches Signal umwandelt, welches wiederum als Eingangssignal von der Hardware des Barocycler® HUB440 verarbeitet wird und in einer Anpassung des Drucks resultiert. Spektrometerseitig wird ein Bruker AU Programm verwendet, um vollständig automatisierte Druckreihen zu realisieren. Eine ausführliche Beschreibung dieses Systems findet sich in Koehler (2014). Ein Übersichtsdiagramm der zusammenhängenden Komponenten zeigt Abbildung 2.2.

2.3 Nomenklatur der Atome in den Aminosäuren

Die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung für die Atome der 20 proteinogenen Aminosäuren entspricht der von der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) empfohlenen Nomenklatur, die aus Markley et al. (1998) übernommen wurde (Abbildung 2.3).

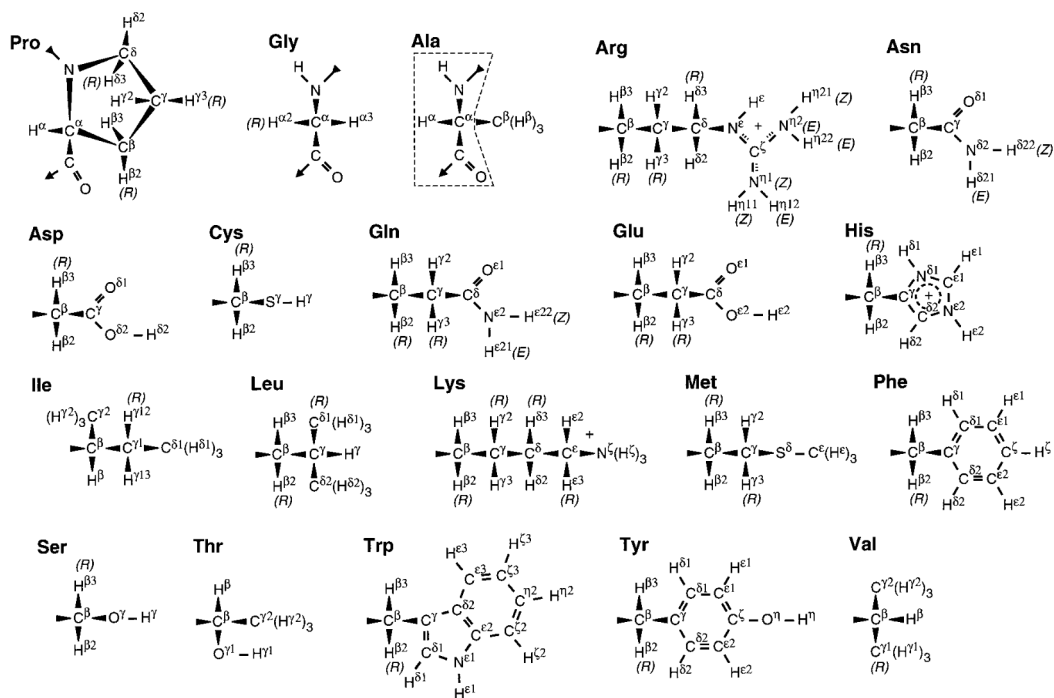


Abbildung 2.3: Nomenklatur der Atome in den proteinogenen Aminosäuren Die Abbildung zeigt die von der IUPAC empfohlene Nomenklatur der Atome für die 20 proteinogenen Aminosäuren. (Quelle: Markley et al. (1998))

3 Entwicklung eines Druckautoklaven mit Keramikmesszelle

In diesem Kapitel wird auf die technischen Aspekte der Hochdruck-NMR-Spektroskopie, insbesondere auf die aus Keramik gefertigte Messzelle und deren Haltevorrichtung (Druckautoklav), eingegangen. Der Druckautoklav gewährleistet die optimale Positionierung der Messzelle im Spektrometer und stellt über Druckleitungen die Verbindung zu einem druckerzeugenden Element (Spindelpresse, Druckpumpe) her. Die in diesem Kapitel wiedergegebenen Ergebnisse wurden bereits in Beck Erlach et al. (2010) veröffentlicht.

Hochdruckzellen können aus verschiedenen Materialien, wie zum Beispiel Glas, Saphir oder Keramik, gefertigt werden. Je nach Material unterscheiden sich die Messzellen in ihrer Druckbeständigkeit und der Komplexität ihrer Handhabung. In diesem Kapitel werden diese Unterschiede diskutiert und die Vorzüge von Keramik als Material für die Messzelle herausgearbeitet.

Die Anwendung von hohen Drücken ist mit dem Sicherheitsbestreben verbunden, im Falle des Berstens der Keramikzelle die Schäden am NMR-Spektrometer so gering wie möglich zu halten. Aus diesem Grund wurden in den Druckautoklaven Sicherheitsmerkmale integriert, die zum einen die Messzelle bei Druckverlust vom druckerzeugenden Teil des Systems abtrennen können und zum anderen den Probenkopf vor Absplittungen schützen können.

3.1 Einleitung

Es existieren zwei grundsätzliche Methoden, eine Probe in einem NMR-Spektrometer unter Druck zu setzen. Zum einen gibt es die von Jonas (1972) entwickelte Methode, bei welcher der gesamte Probenkopf unter Druck gesetzt wird (Ballard et al., 1998; Jonas, 2002). Yamada entwickelte andererseits eine Methode, bei welcher lediglich das Probengefäß mit Druck beaufschlagt ist (Yamada, 1974). Dieses ist dann über eine druckdichte Leitung mit der Druckerzeugungseinheit außerhalb des Spektrometers verbunden (Price und Lüdemann, 1997; Yamada et al., 2001).

Dabei besitzen beide Methoden Vor- und Nachteile (Kremer, 2006). Der Vorteil der Yamada-Methode ist die Anwendbarkeit auf kommerziell erhältlichen NMR-Spektrometern und die Möglichkeit, Druckänderungen über die Druckleitung an die Messzelle zu übertragen. Die Änderung des Drucks kann dabei im Minutenbereich erfolgen, wie zum Beispiel für Relaxations- oder Gleichgewichtsstudien (Kitahara et al., 2002), oder in Form schneller Drucksprünge im Millisekundenbereich, um zeitabhängige Faltungsmechanismen zu untersuchen (Kremer et al., 2011). Nachteile der Yamada-Methode sind die technischen Anforderungen an die Messzelle, die erforderliche Erfahrung in der Handhabung und die im Vergleich zur Jonas-Methode geringeren erzielbaren Drücke (bis zu 300 MPa (Daedalus Innovations LLC, 2016)).

Ein wesentlicher Nachteil der Jonas-Methode ist die Verwendung eines nicht kommerziell erhältlichen druckstabilen Probenkopfs. Zudem erfordert auch hier die Handhabung Erfahrung und Druckänderungen können nicht von außerhalb des Spektrometers ausgeführt werden. Zusätzlich entfallen Messanordnungen, bei denen die Druckänderung im System einen integralen Bestandteil darstellt, wie zum Beispiel bei Drucksprüngen die gezielt innerhalb der Pulssequenz eingesetzt werden können (Kremer et al., 2011). Der Vorteil der Jonas-Methode sind die deutlich höheren Drücke, die bei Messungen erzielt werden können (bis zu 500 MPa).

Ein wichtiges Kriterium bei der Beschreibung von Hochdruckzellen ist das Material, aus welchem diese gefertigt werden. Seit den Anfängen der Hochdruck-NMR-Spektroskopie gibt es Glaszellen aus Borosilikat beziehungsweise Quarzglas, die jedoch sehr fragil sind, da sie einen sehr dünnen kapillaren Bereich besitzen. Daher erfordert die Handhabung dieser Zellen aus Glas äußerste Vorsicht. Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von Saphir als Material für Hochdruckzellen (Roe, 1985; Urbauer et al., 1996; Arnold et al., 2003). Diese zeichnen sich durch eine einfache Handhabung aus,

Temperatur [°C]	Kristallsystem	Koordinations- zahl	Raumgruppe	Dichte [g/cm ³]
< 950 - 1170	monoklin	7	$P2_1/c$	5,56
1170 - 2370	tetragonal	8	$P4_2/nmc$	6,10
2370 - 2706	kubisch	8	$Fm\bar{3}m$	5,68 - 5,91
> 2706		Schmelze		

Tabelle 3.1: Modifikationen des Zirconium(IV)-oxids Die Tabelle zeigt die Modifikationen des Zirconium(IV)-oxids in Abhängigkeit der Kristallisationstemperatur mit den zugehörigen Koordinationszahlen, Raumgruppen und Dichten (Salmang und Scholze, 2007). Bei Raumtemperatur kristallisiert ZrO_2 in der monoklinen Modifikation (Baddeleyit).

jedoch stellt die geringe Verfügbarkeit von qualitativ hochwertigen Saphirzellen einen gravierenden Nachteil dar.

In den letzten Jahren hat sich aufgrund der überlegenen Materialeigenschaften die Verwendung von Hochdruckzellen aus Keramik durchgesetzt. Von der Firma *Daedalus Innovations LLC* (Aston, Pennsylvania, USA) sind im Spritzgussverfahren hergestellte Keramikzellen aus aluminiumverstärktem Zirconium(IV)-oxid (ATZ, *Alumina toughened zirconia*) erhältlich, die für Untersuchungen an Proteinen in niedrigviskosen Flüssigkeiten entwickelt wurden (Peterson und Wand, 2005; Peterson et al., 2005).

Die in Beck Erlach et al. (2010) und diesem Kapitel vorgestellten Keramikzellen wurden von der Firma *HiPer Ceramics GmbH* (Oberkrämer, Deutschland) gefertigt und bestehen aus Zirconium(IV)-oxid, welches durch Yttriumoxid Y_2O_3 teilstabilisiert wurde (*Y-PSZ, Partially stabilized zirconia*).

Zirconium(IV)-oxid kommt in der Natur als natürliches Mineral Baddeleyit vor, welches 1892 von Joseph Baddeley zum ersten Mal beschrieben wurde. Baddeleyit kristallisiert im monoklinen Kristallsystem und kann in verschiedenen Farben angetroffen werden. Je nach Kristallisationstemperatur des ZrO_2 erhält man in Tabelle 3.1 aufgelistete Modifikationen. Die Übergänge zwischen den Kristallsystemen sind dabei mit einer großen Änderung des Gittervolumens verbunden, was bei Abkühlung zu einer großen Volumenausdehnung führt. Aus diesem Grund wird reines monoklines ZrO_2 nicht als Keramik verwendet. Mit Hilfe der Stabilisierung durch CaO, MgO oder Y_2O_3 kann man das System beim Abkühlen teilweise oder vollständig in der kubischen Phase halten.

Die Zugabe von Y_2O_3 zu ZrO_2 stabilisiert die Mikrostruktur, welche aus einer kubischen Phase mit Anteilen an monoklinen und tetragonalen Ausschlüssen besteht.

Diese Stabilisierung führt dazu, dass die Keramik eine sehr hohe Zugfestigkeit von bis zu 1000 N/mm^2 aufweist (Salmang und Scholze, 2007). Um die unterschiedlichen Materialien in Bezug auf ihre Druckresistenz zu vergleichen, bedient man sich des maximalen Drucks dem eine Kapillare widerstehen kann. Nach Sherman und Stadtmüller (1987) ergibt sich dieser Druck P_{\max} gemäß Gleichung 3.1.

$$P_{\max} = \tau \ln \frac{d_o^2}{d_i^2} \quad (3.1)$$

Dabei ist τ die Scherfestigkeit, d_o der Außendurchmesser und d_i der Innendurchmesser der Kapillare. Die Scherfestigkeit τ kann dabei mit Hilfe von Gleichung 3.2 über die Zugfestigkeit σ angenähert werden.

$$\tau = \frac{\sigma}{2} \quad (3.2)$$

Der durchschnittliche maximale Druck P_{\max}^* , dem die Kapillare bei sich wiederholenden Anwendungen von Druck (Drucksprüngen) widersteht, ist geringer als der maximale Druck P_{\max} bei einmaliger Anwendung. Nach Sherman und Stadtmüller (1987) ergibt sich die auf repetitive Druckanwendungen ausgelegte scheinbare Scherfestigkeit τ^* nach Gleichung 3.3.

$$\tau^* = \frac{1}{\sqrt{3}} \tau \quad (3.3)$$

Damit ergibt sich für repetitive Druckanwendungen in Langzeitexperimenten ein maximaler Druck P_{\max}^* , dem eine Kapillare widerstehen kann, gemäß Gleichung 3.4.

$$P_{\max}^* = \frac{1}{\sqrt{3}} P_{\max} = \frac{\sigma}{\sqrt{3}} \ln \frac{d_o}{d_i} \quad (3.4)$$

Umgekehrt bedeutet dies, dass eine Keramikzelle, die einen maximalen Druck von P_{\max} in repetitiven Druckanwendungen aushalten soll, bei dem ca. 1,7fachen ($\sqrt{3}$) dieses Drucks getestet werden sollte.

Die unterschiedlichen Materialien, aus denen Hochdruckzellen gefertigt werden, deren physikalische Eigenschaften sowie die theoretischen und realen Drücke die wi-

Material Hersteller	Keramik			Borosilikat	Quarz	Saphir ^a	
	HiPer	Daedalus		Schott	Qsil	Saphikon	
Zugfestigkeit σ [N/mm ²]	1000			7	50	140	
Ausdehnungskoeffizient [10^{-6} K]	11,4			3	0,5	8,8	7,9
χ_{magn} [10^{-9} m ³ kg ⁻¹]	-1,4 (ZrO ₂)			-0,86	-0,49	-0,21	-0,25
d_o [mm]	4	4	5	4	4	3,18	
d_i [mm]	1,1	2	3	0,8-1	0,8 - 1	1,73	
d_o/d_i	3,64	2	1,67	4-5	4-5	1,84	
$P_{\text{max, theor}}$ [MPa]	1290	693	513	10 - 11	70 - 81	85	
$P_{\text{max, theor}}^*$ [MPa]	745	400	296	6 - 7	40 - 47	49	
$P_{\text{max, exp}}^*$ [MPa]	200	200	250	200	200	200	

Tabelle 3.2: Physikalische und mechanische Eigenschaften von Hochdruckzellen

Die Tabelle fasst die physikalischen und mechanischen Eigenschaften der unterschiedlichen Materialien, aus denen Hochdruckzellen gefertigt werden, zusammen. Dabei ist χ_{magn} die magnetische Suszeptibilität, d_o der Außendurchmesser, d_i der Innendurchmesser, $P_{\text{max, theor}}$ der nach Gleichung 3.1 maximal ausgehaltene Druck der Hochdruckzelle, $P_{\text{max, theor}}^*$ der nach Gleichung 3.4 maximal ausgehaltene Druck bei repetitiven Druckanwendungen und $P_{\text{max, exp}}^*$ der in der vorliegenden Arbeit maximal angelegte Druck in Experimenten. Die Daten entstammen den Datenblättern der Hersteller (Schott AG, 2016; QSIL GmbH, 2016; Saint-Gobain Crystals, 2016), bis auf die magnetischen Suszeptibilitäten für Borosilikatglas und Quarzglas (Wilmad-LabGlass, 2016; Lide, 2000).

^a Aufgrund der einkristallinen Struktur von Saphir sind der Ausdehnungskoeffizient und die magnetische Suszeptibilität χ_{magn} Tensoren, die je nach Ausrichtung zur Hauptachse unterschiedliche Werte aufweisen (linker Wert: parallel, rechter Wert: senkrecht).

derstanden werden können, sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Dabei zeigt sich, dass Keramik als Material zur Herstellung von Hochdruckzellen den anderen Materialien zumindest den theoretischen Werten nach überlegen ist. Es zeigt sich jedoch auch für andere Materialien, dass entgegen der theoretischen Werte, Drücke bis 200 MPa erreicht werden können. Dies liegt zum Teil an unterschiedlichen Behandlungsmöglichkeiten (zum Beispiel Tempern), welche die Materialeigenschaften verbessern können. Einzelne Exemplare der Hochdruckzellen erreichen ein Vielfaches des theoretisch möglichen Drucks. So widerstand zum Beispiel eine Saphirzelle beim Testen des maximalen Drucks 320 MPa und es existieren Hochdruckzellen aus Quarz (Außendurchmesser 3,5 mm, Innendurchmesser 1 mm), die Drücken bis zu 400 MPa widerstehen (Maeno et al., 2009). Dies zeigt, dass die Druckresistenz der Messzelle nicht nur von den theoretischen Materialeigenschaften, sondern auch von den Fertigungsbedingungen und der Vorgeschichte der jeweiligen Messzelle abhängt.

3.2 Ergebnisse und Diskussion

Ein in der Hochfeld-NMR eingesetztes Hochdrucksystem sollte im Idealfall folgende Bedingungen erfüllen:

1. Die Hochdruckzelle muss einem gegebenen Druck standhalten
2. Das System soll einfach zu handhaben sein
3. Es sollen homogene hochaufgelöste Spektren möglich sein
4. Bersten der Hochdruckzelle soll minimalen Schaden anrichten

Diese Punkte ermöglichen ein sicheres und einfaches Arbeiten und minimieren im Falle des Berstens der Hochdruckzelle entstehende Schäden am NMR-Spektrometer. Bei der Entwicklung der Hochdruckzelle konnte bereits auf eine langjährige Erfahrung des Lehrstuhls mit unterschiedlichen Hochdrucksystemen zurückgegriffen werden (Borosilikatglas, Quarzglas und Saphir). Jedoch besitzt Keramik, wie bereits in Kapitel 3.1 erläutert, die besten Materialeigenschaften in Bezug auf die Druckresistenz.

Das hier vorgestellte Hochdrucksystem besteht aus einer Hochdruckzelle aus Keramik und einer Halterung aus TiAl_6V_4 (*Hempel Special Metals GmbH*, Oberhausen, Deutschland). Die verwendete Keramik besteht aus Zirconium(IV)-oxid, welches durch Y_2O_3 teilstabilisiert wurde (Y-PSZ) und von der Firma *HiPer Ceramics GmbH* (Oberkrämer, Deutschland) gefertigt wurde.

Das gesamte Hochdrucksystem ist in Abbildung 3.1 dargestellt und ähnelt in seiner grundsätzlichen Form der von Urbauer et al. (1996) gezeigten Saphirzelle. Die technische Zeichnung des Autoklaven befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Abbildung 9.1). Die Halterung aus TiAl_6V_4 wurde auf Basis des von Arnold et al. (2003) beschriebenen Systems konstruiert. Die Halterung besteht aus gegeneinander verschraubbaren Teilen, wobei der untere Abschluss gleichzeitig den Teflon Berstschutz beinhaltet (Abbildung 3.1, Teil 7). Auf diesem liegen Scheiben aus Polyethylen und Teflon, welche die Auflagefläche für die Keramik (Abbildung 3.1, Teil 5) bilden. Im Falle von wertvollen Proben kann ein Volumenverdränger (3.1, Teil 6) in die Keramikzelle eingeführt werden, um das Probenvolumen von 350 μL auf ca. 150 μL zu reduzieren.

Die Druckübertragung auf die Keramikzelle erfolgt über eine flexible Polyethylen-Membran, die eine Trennung des Druckübertragungsmittels von der Probe gewährleistet. Die Beständigkeit der Polyethylen-Membran gegenüber einigen anzutreffenden Druckübertragungsmitteln, wie zum Beispiel Methylcyclohexan, wurde durch

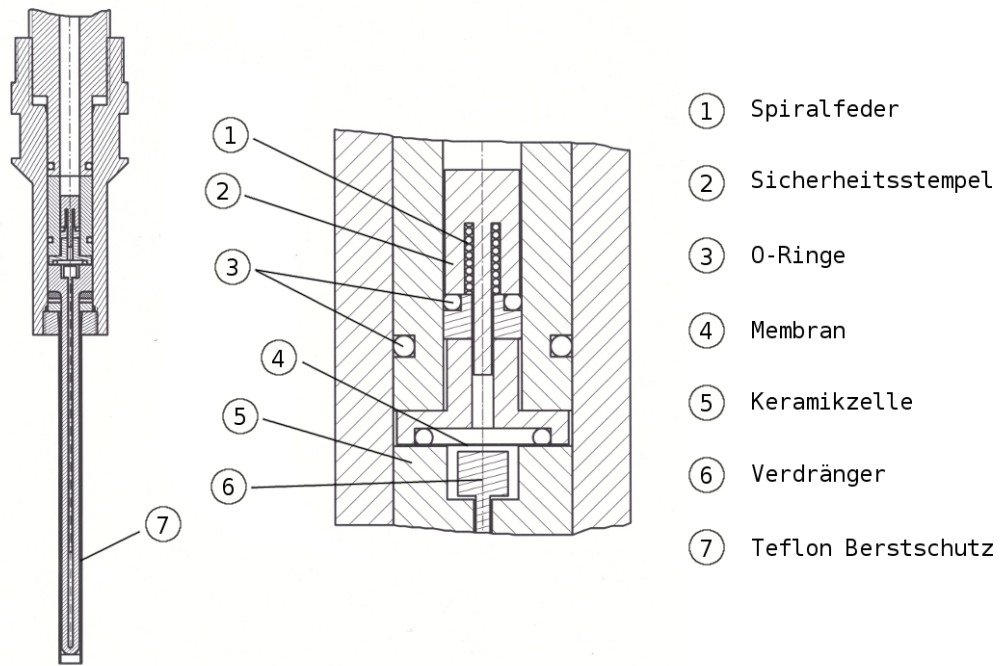


Abbildung 3.1: Aufbau der Hochdruckzelle und deren Halterung Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Keramikzelle (durch Y_2O_3 teilstabilisiertes Zirconium(IV)-oxid) und deren Halterung (aus $TiAl_6V_4$, *Hempel Special Metals GmbH*, Oberhausen, Deutschland). Die Keramikzelle wurde von der Firma *HiPer Ceramics GmbH* (Oberkrämer, Deutschland) gefertigt. Die rechte Seite zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Druckübertragungssystems mit dem integrierten Sicherheitsstempel (Teil 2), welcher mittels einer Spiralfeder (Teil 1) auf einem T-förmigen Aufbaustück platziert wird. Dieses liegt auf der Polyethylen-Membran (Teil 4), die das Druckübertragungsmittel von der Probe trennt. An unterschiedlichen Stellen dichten O-Ringe (Teil 3) das System ab. Der gesamte Aufbau sitzt über der eigentlichen Keramikzelle (Teil 5), in welchem ein Volumenverdränger (Teil 6) eingebracht werden kann, um das Probenvolumen zu verkleinern. In der Gesamtansicht auf der linken Seite ist der die Keramikzelle umgebende Teflonschutz (Teil 7) gekennzeichnet, der den Probenkopf im Falle des Berstens der Keramikzelle vor Keramiksplittern und eindringender Flüssigkeit schützen soll. Eine technische Zeichnung des Druckautoklaven befindet sich im Anhang (Abbildung 9.1).

24-stündiges Einlegen der Membran in die jeweilige Flüssigkeit überprüft und bestätigt. Zudem hält die Polyethylen-Membran mechanischen Ansprüchen unter statischen sowie auch dynamischen Druckverhältnissen (Drucksprung) stand, ohne die für die Druckübertragung relevante Flexibilität zu verlieren.

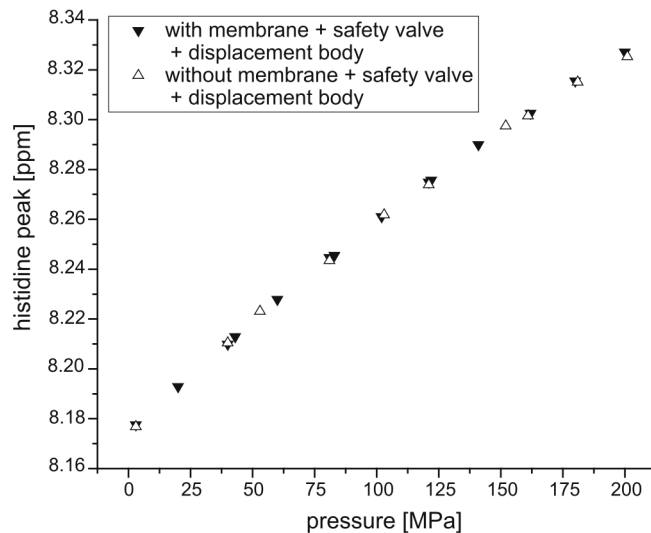


Abbildung 3.2: Einfluss der Membran, des Sicherheitsstempels und des Verdrängers auf die Druckübertragung Die Abbildung zeigt den Vergleich der druckabhängigen chemischen Verschiebung der $H^{\epsilon 1}$ -Resonanzlinie des Histidins mit (\blacktriangledown) beziehungsweise ohne (\triangle) Membran, Sicherheitsstempel und Volumenverdränger. Die Probe enthielt 100 mM L-Histidin, 100 mM Phosphatpuffer, 1 mM DSS, 1 mM EDTA, 1 mM NaN_3 , 100 % D_2O , pH 6,5. Die Messungen wurden an einem 500 MHz Bruker Spektrometer bei 298 K aufgenommen. (Quelle: Beck Erlach et al. (2010))

Um den Einfluss der Membran, des Sicherheitsstempels und des Volumenverdrängers auf die Druckübertragung zu untersuchen, wurde eine Vergleichsmessung mit und ohne diese Komponenten durchgeführt (Abbildung 3.2). Es zeigte sich, dass die Komponenten keinen Einfluss auf die Druckübertragung haben, da die Änderung der chemischen Verschiebung der $H^{\epsilon 1}$ -Resonanzlinie des Histidins (interner Drucksensor) im Rahmen der Messgenauigkeit mit und ohne diese Komponenten identisch ist. Der Druck wurde dabei mit Hilfe einer Spindelpresse erzeugt und über eine druckstabile Leitung in das Spektrometer geführt. Der tatsächlich angelegte Druck wurde über das Druckübertragungsmittel mit Hilfe eines Burdon Manometers ermittelt.

Insbesondere die Anwendung der Hochdruckzelle in der Protein-NMR-Spektroskopie erfordert ein qualitativ hochwertiges Signal. Die Qualität eines Signals wird durch Feldinhomogenitäten vermindert. Diese entstehen, wenn das Material der Messzelle eine zum Lösungsmittel unterschiedliche magnetische Suszeptibilität aufweist. Das in biologischen Proben am häufigsten eingesetzte Lösungsmittel ist Wasser mit einer magnetischen Suszeptibilität von $\chi_{\text{magn}}(H_2O) = -9,05 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3/\text{kg}$. Je kleiner die Differenz $\Delta\chi_{\text{magn}}$ des Materials der Messzelle zu der des Lösungsmittels ist, desto geringer sind die Feldinhomogenitäten. Wie aus Tabelle 3.2 ersichtlich, besitzt Keramik die

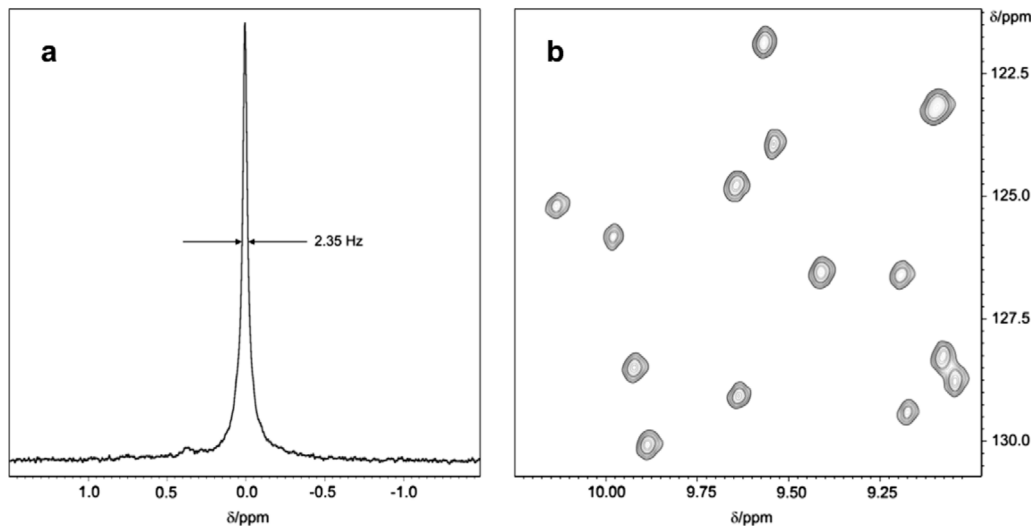


Abbildung 3.3: Homogenität des Magnetfelds in der Keramikzelle Die Abbildung zeigt ein Protonenspektrum von DSS (3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonsäure, Abbildung 3.3a) prozessiert mit einer Linienverbreiterung (*LB*) von 0,3 Hz. Die Linienbreite des DSS-Signals liegt damit bei ca. 2,05 Hz. Abbildung 3.3b zeigt den Ausschnitt eines $[^{15}\text{N}-^1\text{H}]$ -HSQC von *Plasmodium falciparum thioredoxin* (Munte et al., 2009). Die Spektren wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer aufgenommen. Die Innenseite der Keramikzelle wurde vor den Messungen poliert, um eine höhere Homogenität zu gewährleisten. (Quelle: Beck Erlach et al. (2010))

geringste Abweichung $\Delta\chi_{\text{magn}}$ zu Wasser als Lösungsmittel, ist aber dennoch deutlich größer als Null.

Da die Inhomogenitäten an der Grenzfläche zwischen Keramikzelle und Lösungsmittel entstehen, wurde die Keramikzelle vor den Messungen an der Innenseite poliert. Der Einfluss der Keramikzelle auf die Feldhomogenität wurde anhand der Linienbreite des DSS-Signals (3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonsäure) untersucht. Das DSS-Signal sowie der Ausschnitt eines hochaufgelösten $[^{15}\text{N}-^1\text{H}]$ -HSQC von *Plasmodium falciparum thioredoxin* (*PfTrx*) (Munte et al., 2009) zeigt Abbildung 3.3. Die in Abbildung 3.3a gezeigte Linienbreite des DSS-Signals beträgt abzüglich der durch die Prozessierung des NMR-Spektrums hinzugefügten Linienverbreiterung (*LB*) 2,05 Hz. Dies ist in etwa 1 Hz mehr, als unter Verwendung von handelsüblichen NMR-Röhrchen aus Glas zu erwarten ist. Abbildung 3.3b zeigt jedoch, dass Proteinproben im hohen Feld (800 MHz) hochaufgelöste, gut separierte Signale liefern. Trotz zusätzlicher Feldinhomogenitäten kann mit dem vorgestellten Drucksystem Protein-NMR-Spektroskopie mit hohen Magnetfeldern durchgeführt werden.

Die Halterung der Keramikzelle wurde mit Sicherheitsmerkmalen ausgestattet, um Schäden im Falle des Bruchs einer Keramikzelle zu minimieren. Dabei handelt es sich einerseits um einen die Keramikzelle umschließenden Teflonschutz, der den Probenkopf vor eventuellen Splittern bei Bersten der Keramik schützen soll. Dieser ähnelt Teflonschutzsystemen, die bereits zuvor mit Hochdruckzellen aus Quarzglas verwendet wurden (Yamada et al., 2001; Akasaka, 2003; Kamatari et al., 2004; Akasaka, 2006). Zudem soll verhindert werden, dass bei Bruch der Keramik Druckflüssigkeit in den Probenkopf eindringt. Dies ist vor allem bei entzündlichen Druckübertragungsmitteln, wie zum Beispiel Methylcyclohexan, von Bedeutung.

Zum anderen beinhaltet das Sicherheitskonzept einen Stempel in der Halterung der Hochdruckzelle. Dieser soll die Hochdruckzelle im Spektrometer von dem druckerzeugenden System außerhalb des Spektrometers abtrennen, falls es zu einem Bruch der Keramikzelle kommt. Dies geschieht durch den plötzlich auftretenden Druckgradienten, der den Stempel in die Halterung zieht. Das Sicherheitssystem besteht aus dem Stempel, welcher durch eine Auflagefläche mit aufgelegtem O-Ring gesteckt wird. Der Stempel besitzt am Kopf Einsparungen, die eine Spiralfeder aufnehmen können. Diese verhindert das Schließen des Stempels beim Füllen der Messzelle und unter normalen Messbedingungen, bei denen nur geringe Druckgradienten erzeugt werden. Für große Druckgradienten wird der Stempel in den O-Ring der Stempelhalterung gepresst und somit das Öffnen des Systems über die Spiralfeder verhindert.

Um das Verhalten des Sicherheitsstempels im Falle eines Bruchs der Keramikzelle zu testen, wurde eine eigens angefertigte Dummy-Zelle aus Edelstahl verwendet. Das obere Ende entspricht dem Kopf der Keramik mit Auflagefläche und Vertiefung, in die analog zur Keramik der Aufsatz (Abbildung 3.1, Teile 1 bis 3) mit Stempel eingesetzt werden kann. Der Innendurchmesser in diesem oberen Bereich, der in der Gesamtheit ca. 1,9 cm umfasst, beträgt analog zu der Keramik 1 mm. Dieser Teil geht in eine angeschweißte Leitung mit einem Durchmesser von 0,1 mm über, an dessen Ende ein Handventil angebracht wurde. Dieser Aufbau erlaubt das Simulieren eines spontanen Druckabfalls durch Öffnen des Handventils. Da alle für das Sicherheitssystem relevanten Komponenten eingesetzt wurden und lediglich die Keramikzelle durch eine Dummy-Zelle ausgetauscht wurde, lassen sich die Ergebnisse auf den Fall eines Bruchs der Keramikzelle in einem NMR-Spektrometer übertragen.

Die Simulation des Bruchs der Keramik wurde für unterschiedliche Drücke durchgeführt. Dabei zeigt sich für Drücke $P < 50$ MPa, dass der Stempel nur in ca. 50 % der Fälle das System abschliesst. Dies liegt an dem zu geringen Druckgradienten, der benö-

tigt wird um den Stempel in die Halterung zu ziehen. Jedoch ist dies in der Realität ein unwahrscheinliches Szenario, da die Keramikzelle in den seltensten Fällen bei Drücken unter 50 MPa zerstört wird (siehe Tabelle 3.2).

Für Drücke $P > 50$ MPa funktionierte das System in allen Versuchen. Dabei erfolgte vor dem Schließen des Sicherheitsstempels lediglich ein Druckabfall von ca. 3-5 MPa, was auf ein schnelles Verschließen des Systems hindeutet. Zudem verlassen durch das schnelle Verschließen nur geringe Flüssigkeitsmengen das Hochdrucksystem, die in den meisten Fällen von dem die Keramikzelle umschließenden Teflonschutz aufgenommen werden können.

Ein unfreiwilliger Test des gesamten Schutzsystems stellte das reale Bersten einer Keramikzelle in einem 800 MHz NMR-Spektrometer dar, welches hierdurch keinerlei Schäden davontrug.

4 Untersuchung der Druckantwort von amyloidbildenden Peptiden

Im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit und Diabetes mellitus stehen die in diesen Krankheitsbildern anzutreffenden Ablagerungen (Amyloid Plaques) im Gehirn (Alzheimer-Krankheit) beziehungsweise in der Bauchspeicheldrüse (Diabetes mellitus). Der Hauptbestandteil dieser Ablagerungen bei der Alzheimer-Krankheit ist das β -Amyloid ($A\beta$), bei Diabetes mellitus das Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP). Diese Peptide erfüllen im menschlichen Körper unterschiedliche Aufgaben, stehen jedoch im Verdacht durch Polymerisierung direkt an der Krankheitsentstehung beteiligt zu sein. Daher ist der Übergang von monomeren nicht pathogenen Peptiden hin zu den durch Polymerisierung entstehenden Amyloid Plaques für das Verständnis der Entstehung dieser Krankheiten unentbehrlich.

Die Hochdruck-NMR-Spektroskopie ist in diesem Zusammenhang ein mächtiges Werkzeug, da zum einen über den Druck direkt Einfluss auf die Thermodynamik der Polymerisierung genommen werden kann und zum anderen niedrig populierte Zustände durch Verschiebung des Gleichgewichts spektroskopisch zugänglich gemacht werden können.

In diesem Kapitel werden die druckinduzierten Änderungen des β -Amyloids und des Insel-Amyloid-Polypeptids untersucht. Die von uns bereits in Munte et al. (2013) und Beck Erlach et al. (2016b) publizierten Ergebnisse werden zusammenfassend dargestellt und an einigen Stellen erweitert.

Für die druckinduzierte Depolymerisierung des β -Amyloids wird eine quantitative Beschreibung hergeleitet und auf die Depolymerisierung bei unterschiedlichen Temperaturen und Peptidkonzentrationen angewandt. Desweiteren wird auf die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung des Insel-Amyloid-Polypeptids und die gegenseitige Beeinflussung von Temperatur und Druck eingegangen.

4.1 Einleitung

β -Amyloid Das β -Amyloid entsteht aus dem Amyloid-Precursor-Protein (APP), welches sich in den Synapsen der Nervenzellen befindet. Die Spaltung des APP durch die β -Sekretase führt zur Bildung des sAPP β -Peptids (*soluble APP β*) und einem membrangebundenen Fragment C-99, welches anschließend durch die γ -Sekretase in das A β -Peptid und das intrazelluläre AICD (*APP intracellular domain*) gespalten wird. Dabei entstehen A β -Peptide unterschiedlicher Sequenzlänge (A β (1–40) und A β (1–42)).

Zu einem nicht amyloidogenen Pfad führt die Spaltung des APP durch eine α -Sekretase unter Bildung des sAPP α -Peptids und eines membrangebundenen Fragments C-83, welches anschließend durch die γ -Sekretase in das p3-Peptid und das intrazelluläre AICD gespalten wird. Die unterschiedlichen Möglichkeiten der Spaltung von APP sind in Abbildung 4.1 zusammengefasst.

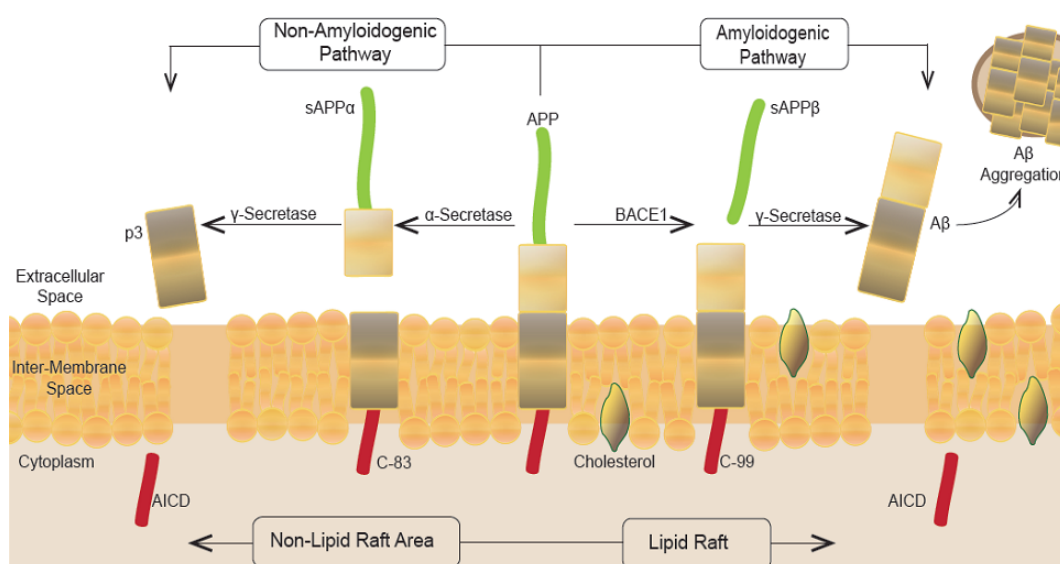


Abbildung 4.1: Spaltungsprodukte des APP durch unterschiedliche Sekretasen

Die Abbildung zeigt die Spaltungsprodukte des in der Membran verankerten Amyloid-Precursor-Proteins (APP) für unterschiedliche Sekretasen. Die Bildung des β -Amyloids erfolgt über die Spaltung des APP durch die β -Sekretase (BACE1) und anschließender Spaltung durch die γ -Sekretase. Der nicht amyloidogene Weg besteht aus der Spaltung des APP durch die α -Sekretase und Bildung des sAPP α -Peptids und anschließender Spaltung durch die γ -Sekretase unter Bildung des p3-Peptids. (Quelle: Read und Suphioglu (2013))

Die physiologische Bedeutung des β -Amyloids ist noch nicht vollständig geklärt, steht jedoch neben dem neurotoxischen Effekt ebenfalls im Fokus der Wissenschaft (Pearson

und Peers, 2006). Es gibt Hinweise darauf, dass das A β -Peptid eine Rolle bei der synaptischen Aktivität spielt und diese mitreguliert, um vor exzessiver Freisetzung von Glutamat zu schützen (Steinbach et al., 1998; Kamenetz et al., 2003; Lesné et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein durch Inhibition der Sekretasen ausgelöster Zelltod durch Zugabe physiologischer Mengen von A β rückgängig gemacht werden konnte (Plant et al., 2003).

Bereits Pythagoras (ca. 570–510 v. Chr.) beschreibt das Phänomen der Abnahme der geistigen Fähigkeiten mit dem Alter und bezeichnet diesen Lebensabschnitt als *senium*. Der berühmte Arzt Galen (ca. 150–200 v. Chr.) nimmt diesen als *morosis* betitelten Zustand in seinem Buch *Methodus medendi* als Erkrankung des Geistes auf, jedoch schwankt über die folgenden Jahrhunderte die Einschätzung, ob es sich bei dem durch *dementia* ausgelösten Verhalten um eine Krankheit oder ein Verbrechen handelt. Einen bedeutenden Durchbruch erzielten Blocq und Marinesco (1892) durch das Auffinden einer unbekanntes Substanz im Gehirn von Epilepsie-Patienten mit Hilfe der Karminfärbung. Namensgebend für diese häufig anzutreffende Form der Demenz war die Beschreibung des Krankheitsverlaufes einer Patientin durch Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907) und die Aufnahme als „Alzheimer Krankheit“ in das Lehrbuch der Psychiatrie von Kraepelin (1910).

Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) Das neuroendokrine Hormon Amylin oder Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) wird zusammen mit Insulin in den β -Zellen der in der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) verorteten Langerhans-Inseln gebildet. Es reguliert den Blutdruck über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), welches auch für den Wasser- und Salzhaushalt des Blutes zuständig ist (Wookey et al., 1998). Zudem reduziert es die nährstoffstimulierte Sekretion des blutzuckersteigernden Glucagons (Gedulin et al., 1997) und verzögert die Magenentleerung durch Verminderung des Nährstofftransports vom Magen in den Dünndarm (Edelman und Weyer, 2002; Wickbom et al., 2008).

Aus pathologischer Sicht steht IAPP in Zusammenhang mit Diabetes mellitus und Bauchspeicheldrüsenkrebs, wobei die kausalen Zusammenhänge und Interaktionen nicht vollständig geklärt sind. Bereits um 1900 wurde der pathologische Zusammenhang zwischen den von Langerhans (1869) entdeckten Langerhans-Inseln und Diabetes mellitus diskutiert (Opie, 1901a,b). In den folgenden Jahren gerieten die in den Langerhans-Inseln von Patienten mit Diabetes mellitus gefundenen Amyloid-Ablagerungen in den Fokus der medizinischen Forschung (Gellerstedt, 1938; Lacy, 1964; Ramløv

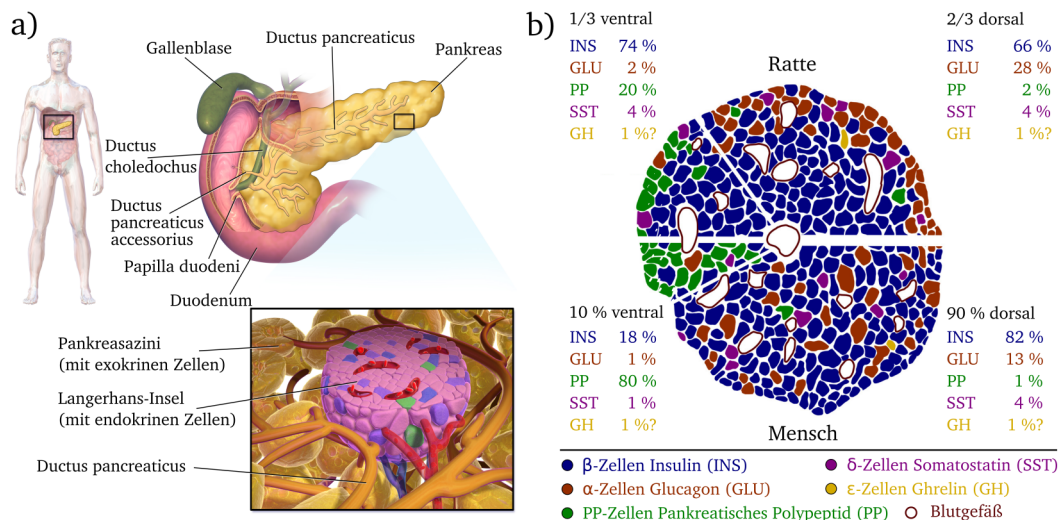


Abbildung 4.2: Aufbau des Pankreasgewebes und der Langerhans-Inseln Abbildung 4.2a zeigt die unterschiedlichen Bestandteile des Pankreasgewebes mit den Langerhans-Inseln im vergrößerten Ausschnitt. Abbildung 4.2b zeigt den Aufbau der Langerhans-Inseln mit den unterschiedlichen Zellen beziehungsweise Anteilen der in diesen Zellen produzierten Hormone des ventralen sowie dorsalen Teils von Mensch und Ratte. Neben den β -Zellen befinden sich in den Langerhans-Inseln α -Zellen (Glucagonbildung), δ -Zellen (Somatostatinbildung) und ϵ - beziehungsweise PP-Zellen (Bildung von pankreatischem Polypeptid (PP)) sowie ϵ -Zellen (Bildung von Ghrelin). (Quelle: Abbildung 4.2a nach Blausen.com Staff (2014) (Beschriftung ins Deutsche übersetzt), Abbildung 4.2b nach Suckale und Solimena (2008) (Beschriftung ins Deutsche übersetzt und Änderung des Layouts))

und Wanstrup, 1967, 1968). Jedoch konnten erst Westermarck et al. (1987) und Cooper et al. (1987) unabhängig voneinander IAPP als Hauptbestandteil dieser Ablagerungen ausmachen.

4.2 Materialien und Methoden

4.2.1 Probenpräparation

A β -Peptid(1–40) Das nicht isotoopenmarkierte sowie ^{15}N -markierte menschliche A β (1–40) wurde von der Firma *rPeptide* (Bogard, Georgia, USA) erworben. Die für die Probenherstellung benötigten Chemikalien 2,2',2'' ^{15}N -[$^{2}\text{H}_4$]-1,2-Ethandiyldinitrilo]tetra- $^{2}\text{H}_3$)essigsäure (EDTA-d $_{16}$) und 2- $^{2}\text{H}_2$)Amino-2-[^{2}H]hydroxy($^{2}\text{H}_2$)methyl]-1,3-($^{2}\text{H}_4$)-propan($^{2}\text{H}_2$)diol (TRIS-d $_{11}$) wurden von der Firma *Cambridge Isotope Laboratories* (Andover, Massachusetts, USA) bezogen.

Lösung	Zusammensetzung	Lösung	Zusammensetzung
P ₁ D	100 mM NaOD in D ₂ O	P ₃ D	500 mM DCl in D ₂ O
P ₂ D	500 mM TRIS-d ₁₁ 5 mM EDTA-d ₁₆ 10 mM NaN ₃ 90 mM NaCl in D ₂ O	P ₄ D	10 % Puffer P ₂ D 81 mM NaCl in D ₂ O pH 7,0

Tabelle 4.1: Pufferzusammensetzungen für die Probenpräparation von A β (1–40)
Diese Tabelle zeigt die für die Probenpräparation von A β (1–40) verwendeten Pufferzusammensetzungen.

Zu Beginn wurden 2 mg des menschlichen A β (1–40)-Peptids in 2 mL 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (HFIP) gelöst, um mögliche Aggregate aufzulösen. Bei der Handhabung mit HFIP ist darauf zu achten, inerte Materialien zu benutzen, da HFIP als organisches Lösungsmittel Stoffe aus zum Beispiel Plastikspritzen herauslösen kann. Die gelöste Probe wurde in einen Rundkolben überführt und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandelt und ruhte im Anschluss 30 Minuten im Dunstabzug. Die Probe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das HFIP im Rotationsverdampfer abgezogen (Lyophilisierung). Vor der Vakuumpumpe ist eine Kühlfalle zu installieren, da HFIP als organisches Lösungsmittel die Dichtungen in den Pumpen angreifen kann. Um Siedeverzüge zu vermeiden, sollte das Vakuum langsam und vorsichtig aufgebaut werden. Nachdem der größte Teil des HFIP abgezogen wurde, erfolgte erneut ein Schockgefrieren der Probe in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde die Probe in einen Exsikkator überführt, welcher sich in einer mit Eis gefüllten Styroporbox befand, um mit Hilfe einer Vakuumpumpe mit vorgeschalteter Kühlfalle das restliche HFIP zu entfernen.

Die nachfolgenden Schritte sind bei 0 °C durchzuführen, um die Polymerisierung des Peptids weitestgehend zu unterbinden. Die Probe und benötigten Lösungen wurden daher vor und während der Verwendung auf Eis gelagert. Die pH-Elektrode wurde mit D₂O gewaschen und der pH-Wert des P₄D-Puffers (siehe Tabelle 4.1) als Referenz gemessen. Die Probe wurde mit 360 μ L der P₁D-Lösung und 40 μ L P₂D-Puffer versetzt. Mit Hilfe der P₃D-Lösung wurde der pH-Wert vorsichtig auf den des P₄D-Puffers eingestellt. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass der pH-Wert nicht unter 7,0 fällt, da in diesem Bereich die Polymerisierung begünstigt wird. Anschließend wurden 10 % des zur pH-Einstellung benötigten Volumens an P₂D-Puffer zugegeben und mit P₄D-Puffer

auf das gewünschte Endvolumen von 615,9 μL aufgefüllt. Dies führte zu folgender Probenzusammensetzung: 750 μM menschliches A β (1–40), 50 mM TRIS- d_{11} , 90 mM NaCl, 0,5 mM EDTA- d_{16} , 1 mM NaN_3 , pH 7,0, 100 % D_2O .

Für die Messungen ohne Deuterierung der Amidgruppe des Peptidrückgrats ($[\text{}^{15}\text{N}, \text{}^1\text{H}]$ -HSQC) wurde D_2O in der Beschreibung durch H_2O ersetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten A β (1–40)-Proben enthielten zusätzlich 50 μM 3-(Trimethylsilyl)-1-propan-sulfonsäure (DSS) zur Referenzierung, wobei beachtet werden muss, dass A β und DSS bei niedrigem pH-Wert interagieren können (Laurents et al., 2005). Die Untersuchung der druckinduzierten Depolymerisierung in Abhängigkeit der Temperatur und der eingesetzten Peptidkonzentration wurden jeweils mit einer eigenen Probe durchgeführt. Dabei wurde zuerst die Temperaturabhängigkeit (283 K \rightarrow 293 K \rightarrow 303 K) untersucht. Die Abhängigkeit der Polymerisierung von der Peptidkonzentration wurde durch Verdünnen einer Probe mit P_4D -Puffer (750 μM \rightarrow 375 μM \rightarrow 75 μM) überprüft.

Die qualitative Überprüfung der Proben ergab eine Verunreinigung mit Glycerin (ca. 30 μM , siehe Abbildung 4.3b), welches über eine verunreinigte pH-Elektrode in die Proben gelangen konnte. Zudem konnte restliches HFIP nachgewiesen werden (Abbildung 4.3a), welches bei höheren Temperaturen jedoch unter dem Restsignal des Wassers liegt.

Wiederum mit einer eigenen Probe wurde die Untersuchung der Druckeffekte auf die chemischen Verschiebung der Amidgruppe des Peptidrückgrats mit Hilfe von $[\text{}^{15}\text{N}, \text{}^1\text{H}]$ -HSQC Spektren (Munte et al., 2013) durchgeführt. Diese Probe enthielt eine effektive Peptidkonzentration (monomeres A β) von 474 μM . Die restliche Probenzusammensetzung stimmte mit der oben genannten überein (siehe Beschreibung Abbildung 4.5).

Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) Das synthetische menschliche IAPP, bezogen von der Firma *Calbiochem* (San Diego, CA, USA), wurde freundlicherweise von Prof. Roland Winter (Universität Dortmund) zur Verfügung gestellt. Das für die Probenpräparation benötigte 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (HFIP) wurde von der Firma *Honeywell Specialty Chemicals Seelze* (Seelze, Deutschland) erworben.

Das menschliche Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) wurde in HFIP gelöst, um potentielle Aggregate aufzulösen, anschließend mit vorgeschalteter Kühlfalle lyophilisiert und in 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) gelöst. Zusätzlich wurde zur Referenzierung DSS und für das Lock-Signal des NMR-Spektrometers D_2O zugesetzt. Dies führte zu folgender Zusammensetzung der Probe: 110 μM menschliches IAPP, 10 mM Natriumacetat-Puffer, 0,1 mM DSS, pH 5,5, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 92 %/8 %.

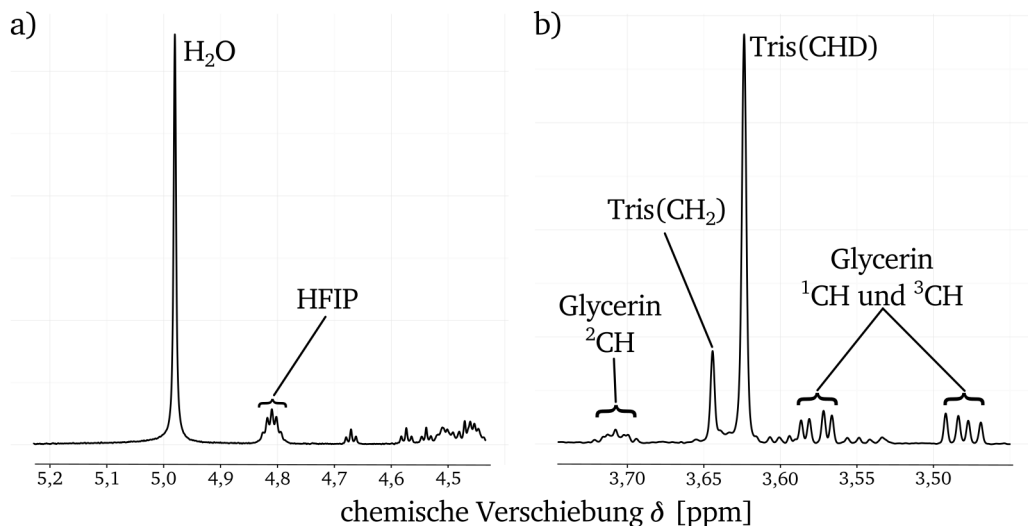


Abbildung 4.3: Nachgewiesene Verunreinigungen in den A β (1–40)-Proben Die Abbildung zeigt Verunreinigungen der A β (1–40)-Proben mit HFIP (Abbildung 4.3a) und Glycerin (Abbildung 4.3b). Die Spektren wurden bei einer Temperatur von 277 K und einem Druck von 3 MPa aufgenommen. Die Probe enthielt 750 μ M menschliches A β (1–40), 50 mM TRIS-d₁₁, 90 mM NaCl, 0,5 mM EDTA-d₁₆, 1 mM NaN₃, 50 μ M DSS, pH 7,0, 100 % D₂O.

4.2.2 NMR-Spektroskopie

A β -Peptid(1–40) Die Bestimmung der druckinduzierten Änderung der chemischen Verschiebung des Peptidrückgrats erfolgte über die Auswertung zweidimensionaler [¹⁵N,¹H]-HSQC Spektren (Bruker Pulsprogramm: *hsqc3gpqh19*, Abbildung 4.5a). Die druckinduzierte Depolymerisierung in Abhängigkeit der Temperatur und der eingesetzten Peptidkonzentration wurde durch Aufnahme eindimensionaler Protonenspektren untersucht (Bruker Pulsprogramm: *noesygpqh1D*, Abbildung 4.4b). Die Experimente wurden an einem 800 MHz Bruker Avance NMR-Spektrometer der Firma *Bruker Biospin GmbH* (Rheinstetten, Deutschland) mit einem Raumtemperaturprobenkopf (*QXI*) durchgeführt.

Da die direkte Quantifizierung des freien A β -Peptids und Referenzierung der Spektren über den Standard DSS aufgrund von Interaktion (Laurents et al., 2005) nicht möglich ist, erfolgte die Referenzierung und Quantifizierung des freien A β -Peptids über den nicht deuterierten Anteil des TRIS-d₁₁-Signals. Dazu wurde der verwendete Puffer P₄D (siehe Tabelle 4.1) in separaten Messreihen bei unterschiedlichen Drücken und Temperaturen vermessen und die Konzentration von TRIS über das Flächenverhältnis mit dem DSS-Signal bekannter Konzentration ermittelt. Die Experimente wurden

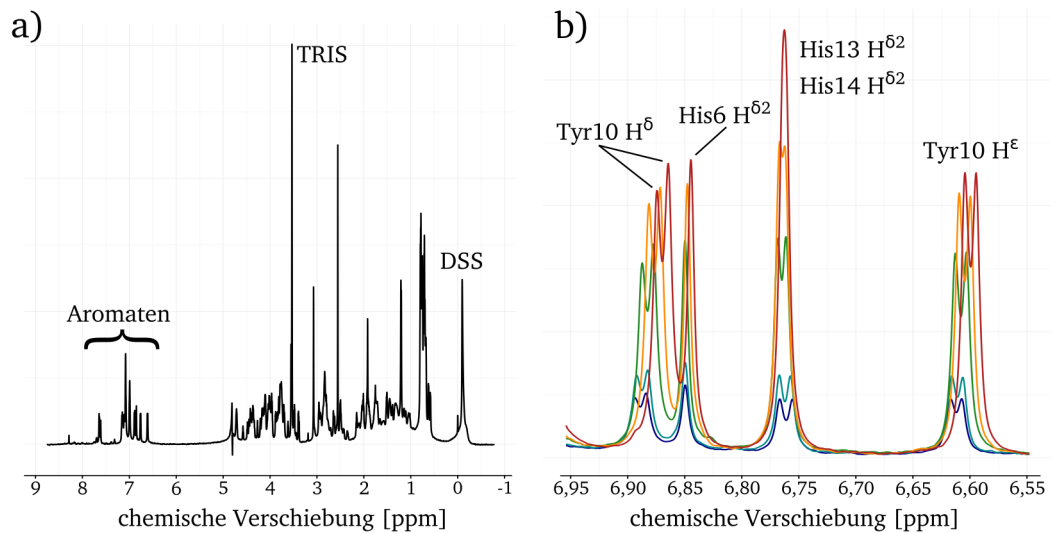


Abbildung 4.4: 1D-Protonenspektren von A β (1–40) Die Abbildung zeigt Protonenspektren für A β (1–40) bei Normaldruck ($P_0 = 0,1$ MPa) und einer Temperatur von 283 K (Abbildung 4.4a) sowie eine Druckreihe bei 283 K mit den Drücken 0,1 MPa (dunkelblau), 20 MPa (hellblau), 60 MPa (grün), 100 MPa (orange) und 150 MPa (rot) (Abbildung 4.4b). In Abbildung 4.4a sind die Signale von DSS und TRIS sowie der Aromatenbereich gekennzeichnet. Dieser ist in Abbildung 4.4b für die unterschiedlichen Drücke vergrößert dargestellt. Dabei sind Signale, die zur Quantifizierung von freiem A β herangezogen wurden, gekennzeichnet.

unter Verwendung des Bruker Pulsprogramms *noesygpplr1D* mit einer Wiederholzeit (Repetitionszeit $d1$ + Aquisitionszeit AQ) von 14 s durchgeführt. Die Relaxationszeit T_1 der Methylgruppen des DSS und der Methylengruppen des TRIS wurde zu 1,4 s (DSS) beziehungsweise 1,1 s (TRIS) ermittelt. Für das A β (1–40)-Peptid beträgt die T_1 -Zeit der H ϵ Protonen des Tyrosins und Histidins $< 0,8$ s (Munte et al. (2013), *Supporting Information*).

Da es sich bei einer polymerisierenden Probe um ein dynamisches System handelt, dessen Zusammensetzung über die thermodynamischen Größen Druck und Temperatur sowie die Konzentration bestimmt wird, wurde nach jeder Änderung einer dieser Variablen eine Reihe kurzer 1D-Protonenspektren (Bruker Pulsprogramm: *zggpw5*) aufgenommen, um zu überprüfen, ob sich das System im Gleichgewicht befindet. Dies war der Fall, wenn keine größeren Änderungen der Signalflächen beziehungsweise Signalvolumen mehr auftraten.

Ein Protonenübersichtspektrum des A β (1–40)-Peptids bei Normaldruck und 283 K zeigt Abbildung 4.4a. Die Druckabhängigkeit der untersuchten Signale im Aromaten-

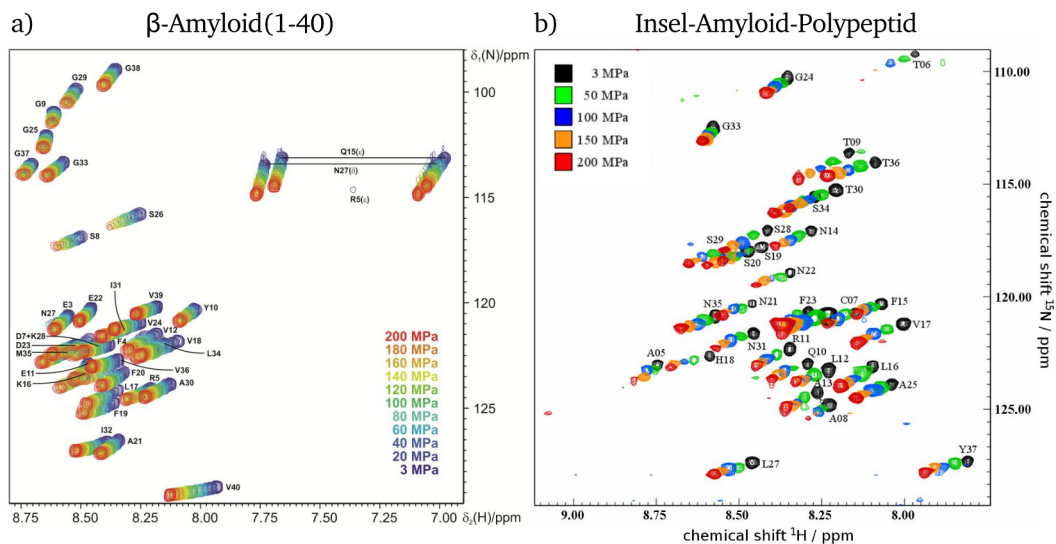


Abbildung 4.5: Zweidimensionale $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -HSQC Spektren von $\text{A}\beta(1-40)$ und IAPP bei unterschiedlichen Drücken Die Abbildung 4.5a zeigt $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -HSQC Spektren (Bruker Pulsprogramm: *hsqcf3gpph19*) von $\text{A}\beta(1-40)$ bei einer Temperatur von 277 K und für unterschiedliche Drücke von 3 MPa (dunkelblau) bis 200 MPa (rot). Die Probe enthielt $474 \mu\text{M}$ ^{15}N -markiertes $\text{A}\beta(1-40)$, 50 mM TRIS- d_{11} , 90 mM NaCl, 50 μM DSS, 0,1 mM Dioxan, 1 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA- d_{16} , 8 % D_2O , pH 7,0. Abbildung 4.5b zeigt $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -HSQC Spektren (Bruker Pulsprogramm: *hsqctf3gpsi2*) von IAPP bei einer Temperatur von 278 K und für unterschiedliche Drücke von 3 MPa (schwarz) bis 200 MPa (rot) in Schritten von 50 MPa. Die Probe enthielt 110 μM menschliches IAPP, 10 mM Natriumacetat-Puffer, 0,1 mM DSS, pH 5,5, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 92 %/8 %. (Quelle: Abbildung 4.5a (Munte et al. (2013), *Supporting Information*), Abbildung 4.5b (Beck Erlach et al. (2016a), *Supporting Information*))

bereich zeigt Abbildung 4.4b für eine Temperatur von 283 K und Drücke von 3 MPa bis 150 MPa.

Nach Erreichen des Gleichgewichts wurde im Falle der isotopenmarkierten Probe ein $[^{15}\text{N}-^1\text{H}]$ -HSQC Spektrum (Bruker Pulsprogramm: *hsqcf3gpph19*) und im Falle der nicht markierten Probe ein 1D-Protonenspektrum (Bruker Pulsprogramm: *noesygpphr1D*) aufgenommen. Die $[^{15}\text{N}-^1\text{H}]$ -HSQC Spektren wurden bei Temperaturen von 277 K und 288 K aufgenommen, die druckinduzierte Depolymerisierung (Bruker Pulsprogramm: *noesygpphr1D*) in Abhängigkeit der Temperatur bei 283 K, 293 K und 303 K und die Abhängigkeit der Verdünnung bei 293 K. Nach jeder Temperaturänderung erfolgte eine Temperaturkalibrierung durch die Messung der Differenz der ^1H -Resonanzlinien der Hydroxyl- und Methylgruppe in 100 % Methanol nach Raiford et al. (1979).

Die [^{15}N , ^1H]-HSQC Spektren zur Druckuntersuchung der chemischen Verschiebung wurden mit einer effektiven Peptidkonzentration (monomeres A β) von 474 μM durchgeführt, die druckinduzierte Depolymerisierung in Abhängigkeit der Temperatur mit einer eingesetzten Peptidkonzentration von 750 μM . Die Untersuchung der Abhängigkeit von der eingesetzten Peptidkonzentration erfolgte für die Konzentrationen 750 μM , 375 μM und 75 μM .

Die [^{15}N , ^1H]-HSQC Spektren wurden bei Drücken von 3 MPa bis 200 MPa in Schritten von 20 MPa gemessen, ebenso wie die Temperaturabhängigkeit der Depolymerisierung. Die Abhängigkeit der Depolymerisierung von der Peptidkonzentration wurde bei Drücken von 3 MPa bis 240 MPa in Schritten von 40 MPa gemessen. Die Druckerzeugung erfolgte über eine Spindelpresse beziehungsweise einen mit dem Spektrometer synchronisierten Kompressor (Barocycler[®] HUB440 der Firma *Pressure BioSciences Inc.* (South Easton, Massachusetts, USA)).

Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) Die NMR-spektroskopische Untersuchung des IAPP erfolgte an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer der Firma *Bruker Biospin GmbH* (Rheinstetten, Deutschland), ausgerüstet mit einem Kryoprobenkopf (*TCI*). Bei jedem Druckwert wurden zwei 1D-Protonenspektren (Bruker Pulsprogramme: *zgpg30*, *noesygppr1D*) und ein zweidimensionales [^{15}N , ^1H]-HSQC (Bruker Pulsprogramm: *hsqcetf3gpsi2*, Abbildung 4.5b) aufgenommen.

Die Untersuchung erfolgte bei Temperaturen von 278 K, 288 K, 298 K und 308 K. Nach jeder Temperaturänderung erfolgte eine Temperaturkalibrierung durch die Messung der Differenz der ^1H -Resonanzlinien der Hydroxyl- und Methylgruppe in 100 % Methanol nach Raiford et al. (1979).

Die Druckabhängigkeit des Peptidrückgrats wurde bei Drücken von 3 MPa bis 200 MPa in Schritten von 20 MPa bestimmt. Die Druckerzeugung erfolgte über eine Spindelpresse beziehungsweise einen mit dem Spektrometer synchronisierten Kompressor (Barocycler[®] HUB440 der Firma *Pressure BioSciences Inc.* (South Easton, Massachusetts, USA)).

4.2.3 Datenauswertung

A β -Peptid(1–40) Die Datenauswertung der druckinduzierten Depolymerisierung des A β -Peptids beruht im Wesentlichen auf der Auswertung der Signalfächen für die aromatischen Protonen der Seitenketten (Abbildung 4.4b), um die Konzentration an monomerem A β (1–40) zu bestimmen.

Dabei wurden für die druckinduzierte Depolymerisierung in Abhängigkeit der Temperatur die Signalflächen des Tyrosin 10 H^ε, der Summe der H^{δ2} von Histidin 13 und Histidin 14 (bei hohen Drücken meist überlagert) sowie des Histidin 6 H^{δ2} bestimmt. Diese wurden zur Bestimmung der monomeren Peptidkonzentration mit der Signalfläche des TRIS-Signals bekannter Konzentration ins Verhältnis gesetzt. Für die druckinduzierte Depolymerisierung in Abhängigkeit der Peptidkonzentration erfolgte die Bestimmung der Peptidkonzentration anhand der Signalfläche des Tyrosin 10 H^ε und über das Verhältnis zur Signalfläche des TRIS-Signals bekannter Konzentration. Die Zunahme der Konzentrationen aufgrund der Kompressibilität des Wassers wurde mit Hilfe der Daten in Chen et al. (1977) kompensiert. Die Bestimmung der Signalflächen erfolgte durch Anfitten der Signale mit der Software *Dmfit* (Massiot et al., 2002).

Zusätzlich zu den chemischen Verschiebungen der einzelnen Dimensionen für ¹H und ¹⁵N aus den [¹⁵N,¹H]-HSQC Spektren wurde die kombinierte chemische Verschiebung über die Summe der nach Schumann et al. (2007) gewichteten chemischen Verschiebungen bestimmt.

Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) Die Signalvolumen, Intensitäten am Signalmaximum und chemischen Verschiebungen aus den zweidimensionalen [¹⁵N,¹H]-HSQC Spektren wurden unter Verwendung der Software *Auremol* (Gronwald und Kalbitzer, 2004) analysiert. Die Integration der Signalvolumen erfolgte dabei mit einem Segmentierungslevel von 0,1 und 10 Iterationen. Die Integrationsmethode wurde auf *exakt* gestellt und negative Signalvolumen erlaubt. Zudem wurden die Spektren vor der Integration geglättet (smoothing). Sowohl Signalvolumen als auch die Intensitäten am Signalmaximum wurden nach Chen et al. (1977) über die Änderung der Kompressibilität des Wassers mit dem Druck korrigiert.

Zusätzlich zu den chemischen Verschiebungen der einzelnen Dimensionen für ¹H und ¹⁵N aus den [¹⁵N,¹H]-HSQC Spektren wurde die kombinierte chemische Verschiebung über die Summe der nach Schumann et al. (2007) gewichteten chemischen Verschiebungen bestimmt.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Druckabhängigkeit des A β (1–40)-Peptids

Die Ergebnisse der Untersuchung der Druckabhängigkeit des A β (1–40)-Peptids wurden von uns bereits in Munte et al. (2013) veröffentlicht und werden an dieser Stelle zusammengefasst.

Ein großer Vorteil der Hochdruck-NMR-Spektroskopie ist die Möglichkeit Populationsgleichgewichte zu verschieben, um so mögliche niedrig populierte Zustände nachzuweisen. Diese Zustände wurden über die Untersuchung der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung und der Signalvolumen am A β (1–40)-Peptid nachgewiesen. Dabei wurden die Signale des Peptidrückgrats aus zweidimensionalen [^{15}N , ^1H]-HSQC Spektren bei unterschiedlichen Drücken analysiert.

Die grundsätzlichen Schritte der Polymerisierung des A β bestehen aus der initialen Keimbildung and anschließender Verlängerung der Fibrillen. Die möglichen Zustände zeigt Abbildung 4.6, bestehend aus einem nahezu korrekt gefaltetem Peptid (Zustand 1) und einem wenig bis gar nicht gefaltetem Peptid (Zustand 2), die sich jeweils an vorhandene Fibrillen anlagern können (Zustand 3 und 4) oder eigene kleine oligomere Einheiten ausbilden können (Zustand 5).

Die chemischen Verschiebung wurde aus zweidimensionalen [^{15}N , ^1H]-HSQC Spektren für die Protonen und Stickstoffe des Peptidrückgrats ermittelt und nach Schumann et al. (2007) kombiniert. Des Weiteren wurde die chemische Verschiebung um den intrinsische Druckeffekt der Aminosäuren nach Koehler et al. (2012) korrigiert. Die Druckabhängigkeit der kombinierten chemischen Verschiebung wurde durch Anfitzen mit Gleichung 4.1 bestimmt. In Munte et al. (2013) wurde anstatt B_2 der Druckkoeffizient $B_2^\# = 2B_2$ bestimmt. Zur Vereinfachung der Vergleichbarkeit mit anderen nicht linearen Druckkoeffizienten in dieser Arbeit wurde dieser gemäß $B_2 = B_2^\#/2$ umgerechnet.

$$\delta(P, T_0) = \delta_0(P_0, T_0) + B_1(P - P_0) + \frac{B_2^\#}{2}(P - P_0)^2 \quad (4.1)$$

Dabei erhält man den linearen Druckkoeffizienten B_1 sowie den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 , welche für A β (1–40) in Abbildung 4.7 dargestellt sind. Die linearen Druckkoeffizienten B_1 sind größtenteils positiv, während die nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 überwiegend negativ sind. Ausnahmen dieses Verhaltens finden sich in

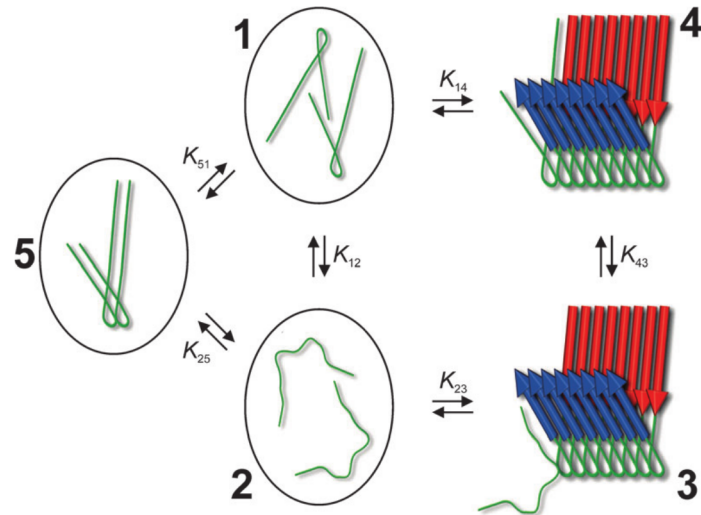


Abbildung 4.6: Mögliche Zustände der Polymerisation des Aβ(1–40)-Peptids Die Abbildung zeigt die Polymerisation von Aβ(1–40) mit den möglichen Zuständen und Interaktionswegen. Dabei stellt Zustand 1 ein nahezu korrekt gefaltetes Peptid und Zustand 2 ein wenig bis gar nicht gefaltetes Peptid dar. Beide können sich an vorhandene Fibrillen anlagern (Zustand 3 und 4) oder eigene oligomere Keime bilden (Zustand 5). Die Analyse der Daten ergab für Zustand 2 die Subzustände 2' (partiell gefaltet) und 2'' (random coil). Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung der komplexen Polymerisation des Aβ-Peptids und vernachlässigt das Vorhandensein von β-balls und unterschiedliche Arten von Fibrillen. (Quelle: Munte et al. (2013))

den Schleifenregionen und gegen Ende der Sequenz. Die größten Änderungen findet man in den Regionen mit struktureller Neigung zum gestreckten β-Strang.

Die thermodynamische Untersuchung der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit des Drucks für mehrere Zustände erfolgte über Gleichung 4.2. Diese gilt für n Zustände i mit $i = 1, n$ im Gleichgewicht und unter schnellen Austauschbedingungen $|\Delta\omega_{ij}\tau_c \ll 1|$. Dabei ist τ_c die Korrelationszeit und $\Delta\omega_{ij}$ der Unterschied der Frequenzen der Zustände i und j .

$$\delta = \frac{\delta_1 + \sum_{i=2}^n \delta_i \exp\left(-\frac{\Delta G_{1i}}{RT}\right)}{1 + \sum_{i=2}^n \exp\left(-\frac{\Delta G_{1i}}{RT}\right)} \quad (4.2)$$

Hier ist δ_1 die chemische Verschiebung des Zustands 1, δ_i die chemische Verschiebung des Zustands i , ΔG_{1i} die Änderung der freien Gibbs-Energie bei dem Übergang von Zustand 1 in Zustand i , R die allgemeine Gaskonstante und T die Temperatur.

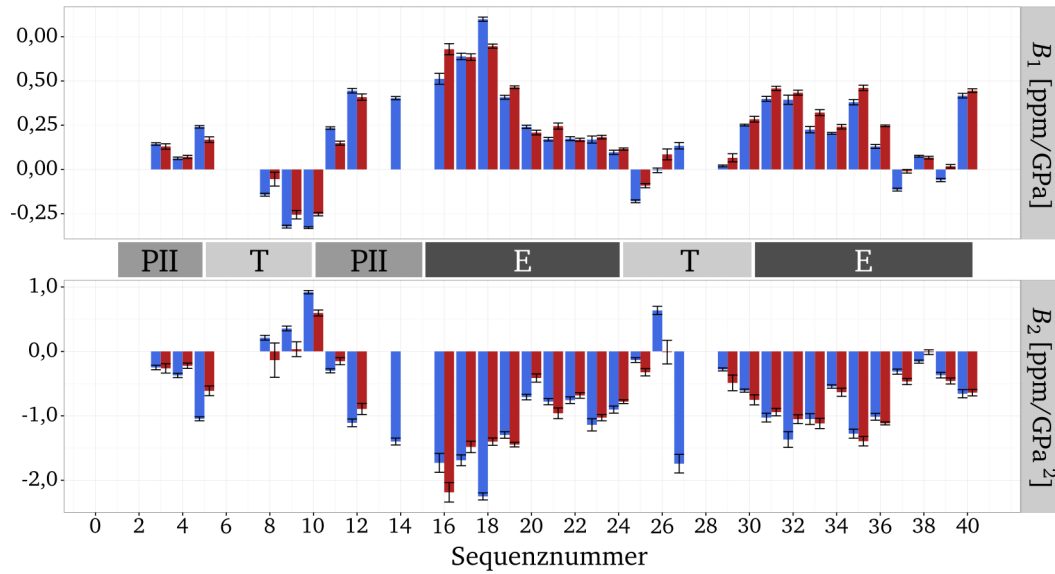


Abbildung 4.7: Druckkoeffizienten der kombinierten chemischen Verschiebung von A β (1–40) Die Abbildung zeigt die linearen Druckkoeffizienten B_1 und die nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 für die Temperaturen 277 K (blau) und 288 K (rot). Der nicht lineare Druckkoeffizient wurde dabei gemäß $B_2 = B_2^\# / 2$ umgerechnet. Die Koeffizienten wurden aus den nach Schumann et al. (2007) kombinierten chemischen Verschiebungen der Protonen und Stickstoffkerne des A β -Peptidrückgrats aus zwei-dimensionalen [^{15}N , ^1H]-HSQC Spektren ermittelt. Die Daten wurden nach Koehler et al. (2012) um den intrinsischen Druckeffekt korrigiert. Die Probe enthielt 474 μM ^{15}N -markiertes A β (1–40), 50 mM TRIS- d_{11} , 90 mM NaCl, 50 μM DSS, 0,1 mM Dioxan, 1 mM NaN_3 , 0,5 mM EDTA- d_{16} , 8 % D_2O , pH 7,0. In der Mitte sind von Danielsson et al. (2006) vorgeschlagene Strukturelemente abgebildet. PII: Polyprolin-II Helix, T: Schleife, E: gestreckter β -Strang. (Quelle: Abbildung nach Munte et al. (2013) (neues Layout und Umrechnung von $B_2^\#$ nach B_2))

Die thermodynamische Analyse der Druckabhängigkeit der Kreuzsignalvolumen erfolgte durch Anfitzen der Signalvolumen mit Hilfe von Gleichung 4.3.

$$\frac{V_i(P, T_0)}{V_i(P_0, T_0)} = \frac{c_1(P, T_0)}{c_1(P_0, T_0)} \left(p_i(P_0, T_0) \left(1 + \exp\left(-\frac{\Delta G_i}{RT_0}\right) \right) \right)^{-1} \quad (4.3)$$

In Gleichung 4.3 ist V_i das Volumen des Kreuzsignals, c_1 die Konzentration des monomeren A β , $p_i(P_0, T_0)$ die Wahrscheinlichkeit des Residuums i in Zustand 1 bei P_0 und T_0 , R die allgemeine Gaskonstante und T die Temperatur.

Für die thermodynamische Analyse der chemischen Verschiebung (Gleichung 4.2) und der Kreuzsignalvolumen (Gleichung 4.3) hängt die Änderung der freien Gibbs-

T [K]	Übergang $i - j$	K_{ij} (0,1 MPa)	ΔG_{ij}^0 [kJ/mol]	ΔV_{ij}^0 [mL/mol]	$\Delta \beta_{ij}'^0$ [mL/(MPa · mol)]
277	1-2'	0,48	$1,7 \pm 0,9$	$-43,6 \pm 1,7$	$-0,30 \pm 0,04$
277	(1,2')-2''	0,24	$3,3 \pm 0,1$	$-11,8 \pm 5,0$	$0,05 \pm 0,03$
288	1-2'	0,42	$2,1 \pm 0,8$	$-43,7 \pm 1,7$	$-0,28 \pm 0,05$
288	(1,2')-2''	0,11	$5,2 \pm 0,3$	$-29,0 \pm 13$	$0,03 \pm 0,13$

Tabelle 4.2: Konformationelle Übergänge des monomeren A β (1-40)-Peptids Die Tabelle wurde aus Munte et al. (2013) übernommen. Dabei ist $K_{ij} = [i]/[j]$ die Gleichgewichtskonstante für den Übergang $i - j$, T die Temperatur, ΔG^0 die Änderung der freien Gibbs-Energie, ΔV^0 die Änderung des partiellen molaren Volumens und $\Delta \beta'^0$ die Änderung des Kompressibilitätsfaktors. Die Probe enthielt 474 μM ^{15}N -markiertes A β (1-40), 50 mM TRIS-d $_{11}$, 90 mM NaCl, 50 μM DSS, 0,1 mM Dioxan, 1 mM NaN $_3$, 0,5 mM EDTA-d $_{16}$, 8 % D $_2\text{O}$, pH 7,0.

Energie ΔG_{1i} mit dem Druck über Gleichung 4.4 zusammen.

$$\Delta G_{1i}(P, T_0) = \Delta G_{1i}^0(P_0, T_0) + \Delta V_{1i}^0(P - P_0) - \frac{\Delta \beta_{1i}'^0}{2}(P - P_0)^2 \quad (4.4)$$

Die Untersuchung der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung und der Signallvolumen führt zu zwei Subzuständen des wenig bis gar nicht gefalteten Zustands 2. Dabei handelt es sich um den Subzustand 2', der partiell gefaltet ist und Subzustand 2'', der eine random coil Struktur aufweist. Die thermodynamische Untersuchung führt zu den in Tabelle 4.2 angegebenen Parametern. Dabei kann der Übergang zu Zustand 2'' von Zustand 1 oder Zustand 2' erfolgen. Diese Übergänge können nicht separiert werden und führen zu relativ großen Fehlern für ΔV^0 , wobei der Übergang 2'-2'' deutlich kleiner sein sollte als die errechneten Volumenänderungen und somit der Übergang 1-2'' maßgeblich für ΔV^0 verantwortlich ist.

Anhand der thermodynamischen Parameter aus Tabelle 4.2 lassen sich die relativen Populationen der Zustände in Abhängigkeit vom Druck berechnen. Diese Abhängigkeit ist in Abbildung 4.8 für eine Temperatur von 277 K dargestellt. Die relativen Populationen p_i wurden unter Verwendung von Gleichung 4.5 berechnet, wobei $K_{ij} = [i]/[j]$ die Gleichgewichtskonstante der Zustände i und j darstellt. Die angegebene Gleichung bezieht sich auf einen beliebig gewählten Zustand 1.

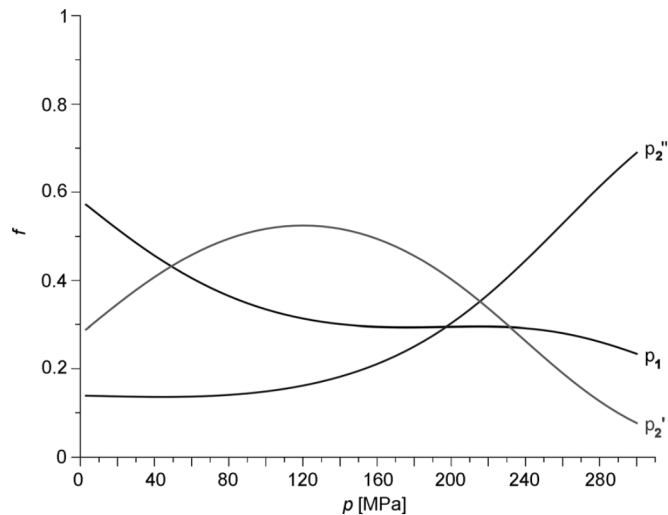


Abbildung 4.8: Relative Populationen der konformationellen Zustände des A β (1–40)-Peptids Gezeigt ist die Druckabhängigkeit der relativen Populationen f der konformationellen Zustände 1, 2' und 2'' (siehe Abbildung 4.6). Die Populationen wurden anhand der thermodynamischen Parameter aus Tabelle 4.2 für die Temperatur 277 K berechnet. (Quelle: Munte et al. (2013))

$$p_i(P, T_0) = \frac{K_{1i}(P, T_0)}{\sum_{j=1}^N K_{1j}(P, T_0)} \quad (4.5)$$

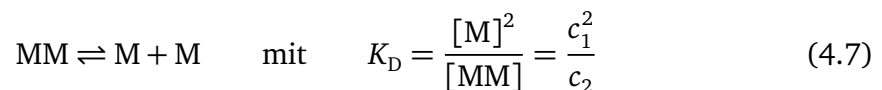
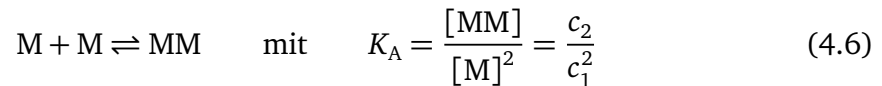
Die Abbildung 4.8 zeigt bei Normaldruck, dass ca. 58 % der Moleküle in dem gefalteten Zustand 1 vorliegen, während die Zustände 2' und 2'' mit 29 % beziehungsweise 13 % niedrig populiert sind. Bei mittleren Drücken um 100 MPa überwiegt der Zustand 2' mit ca. 50 %, während bei hohen Drücken ab ca. 250 MPa der random coil ähnliche Zustand 2'' mit über 60 % dominiert und der partiell gefaltete Zustand 2' auf unter 10 % fällt.

4.3.2 Herleitung der Beschreibung der druckabhängigen Monomerkonzentration

Für die Auswertung der druckinduzierten Depolymerisierung des A β (1–40)-Peptids benötigt man eine Beschreibung der Monomerkonzentration c_1 in Abhängigkeit des Drucks. Die Polymerisierung des A β -Peptids stellt einen komplizierten Prozess dar, in dem potentiell eine große Anzahl an Polymertypen als auch Polymergrößen be-

teilt sein können. Es wurden für die Polymerisierung von biologischen Systemen mehrere quantitative Beschreibungsmodelle vorgeschlagen (Morris et al., 2009). Eines der einfachsten Modelle wurde von Oosawa und Kasai (1962) vorgeschlagen und beschreibt die Polymerisierung mit einer Bindungskonstante von Monomer zu Polymer, die unabhängig von der Länge des Polymers ist (Oosawa und Kasai, 1962; Oosawa, 1970).

Grundsätzlich gelten folgende thermodynamische Zusammenhänge für die Assoziation von Monomeren (M) zu einem Dimer (MM) (Gleichung 4.6) beziehungsweise die Dissoziation eines Dimers (MM) zu Monomeren (M) (Gleichung 4.7). Dabei stellt K_A die Assoziationskonstante und K_D die Dissoziationskonstante, $[M]$ beziehungsweise c_1 die Konzentration der Monomere und $[MM]$ beziehungsweise c_2 die Konzentration der Dimere dar.



Im Folgenden wird die Monomerkonzentration $[M]$ als c_1 und die Polymerkonzentrationen mit c_i bezeichnet, wobei i den Grad der Polymerisierung darstellt (z.B. Dimerkonzentration c_2 , Trimerkonzentration c_3). Thermodynamisch hängt die Gleichgewichtskonstante (Gleichung 4.8)

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (4.8)$$

über Gleichung 4.9

$$\Delta G = \Delta G^0 + \Delta V^0(P - P_0) - \frac{\Delta\beta'^0}{2}(P - P_0)^2 \quad (4.9)$$

mit dem Druck zusammen. Dabei ist ΔG die Änderung der freien Gibbs-Energie, ΔG^0 die Änderung der freien Gibbs-Energie unter Standardbedingungen, ΔV^0 die molare Volumenänderung unter Standardbedingungen und $\Delta\beta'^0$ die Änderung des

Kompressibilitätsfaktors unter Standardbedingungen, wobei gilt $\beta' = \beta V$, P ist der Druck, R die allgemeine Gaskonstante und T die Temperatur.

Ist $K_{A,1}$ nun die Assoziation der Dimerisierung und allgemein $K_{A,i}$ die Assoziationskonstante für die Polymerisierung aus einem i -mer zu einem $(i + 1)$ -mer so gilt

$$c_{i+1} = K_{A,i} c_i c_1 \quad (4.10)$$

Ist die freie Bindungsenergie der Assoziation eines Monomers zu einem $(i + 1)$ -mer beziehungsweise die Assoziationskonstante $K_{A,i}$ unabhängig von i , so ergibt sich die Konzentration eines i -mers mit

$$c_i = \frac{1}{K_A} (K_A c_1)^i \quad (4.11)$$

Die gesamte Konzentration an eingesetzten Monomeren kann durch die Summe der Konzentrationen an i -meren ausgedrückt werden (Gleichung 4.12).

$$c_T = \sum_{i=1}^{\infty} i c_i \quad (4.12)$$

Kombiniert man nun die i -mer Konzentration (Gleichung 4.11) und die gesamte Konzentration an Monomeren c_T (Gleichung 4.12) so ergibt sich

$$c_T = \sum_{i=1}^{\infty} i \frac{1}{K_A} (K_A c_1)^i \quad (4.13)$$

Über eine Reihenentwicklung erhält man die angenäherte Funktion

$$c_T = \frac{\frac{1}{K_A} (K_A c_1)}{(1 - K_A c_1)^2} \quad (4.14)$$

beziehungsweise als Ausdruck der Monomerkonzentration c_1

$$c_1 = c_T(1 - K_A c_1)^2 \quad (4.15)$$

Löst man Gleichung 4.15 eindeutig nach der Monomerkonzentration auf erhält man

$$c_1 = \frac{1}{K_A} \left(\frac{\pm \sqrt{1 + 4c_T K_A} + 1}{2c_T K_A} + 1 \right) \quad (4.16)$$

Es gibt zwei Lösungen für die Beschreibung der Monomerkonzentration. Es trifft hier jedoch nur eine Lösung zu, wie man bei Betrachtung der Grenzwerte für $\lim_{K_A \rightarrow 0}$ sieht. Bei einer Assoziationskonstanten von 0 findet keine Polymerisierung statt und die Monomerkonzentration c_1 ist gleich der gesamten Konzentration an Monomereinheiten c_T . Im Folgenden sind die beiden Grenzwerte $\lim_{K_A \rightarrow 0}$ für Gleichung 4.16 angegeben.

$$\lim_{K_A \rightarrow 0} \frac{1}{K_A} \left(\frac{-\sqrt{1 + 4c_T K_A} + 1}{2c_T K_A} + 1 \right) = c_T \quad (4.17)$$

$$\lim_{K_A \rightarrow 0} \frac{1}{K_A} \left(\frac{+\sqrt{1 + 4c_T K_A} + 1}{2c_T K_A} + 1 \right) = \frac{1}{\pm c_T} \infty \quad (4.18)$$

Nur Gleichung 4.17 zeigt den erwarteten Grenzwert von c_T . Somit lässt sich die Monomerkonzentration in Abhängigkeit der Assoziationskonstante K_A und der maximalen Peptidkonzentration c_T gemäß Gleichung 4.19 ausdrücken.

$$c_1 = \frac{1}{K_A} \left(\frac{-\sqrt{1 + 4c_T K_A} + 1}{2c_T K_A} + 1 \right) \quad (4.19)$$

Mit dieser Funktion sollte es möglich sein, bei gegebener Gesamtkonzentration an Monomeren c_T und gegebener Temperatur T , über die durch die Signalflächen ermittelten Monomerkonzentrationen c_1 die thermodynamischen Größen ΔG^0 , ΔV^0 und $\Delta \beta^0$ mit Hilfe von Gleichung 4.8 und Gleichung 4.9 zu bestimmen.

In Abbildung 4.9 sind exemplarisch simulierte Kurven über den Druck in Abhängigkeit der molaren Volumenänderung ΔV^0 bei festgesetztem ΔG^0 (Abbildung 4.9a) sowie in Abhängigkeit der Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG^0 bei festgesetztem ΔV^0 (Abbildung 4.9b) dargestellt.

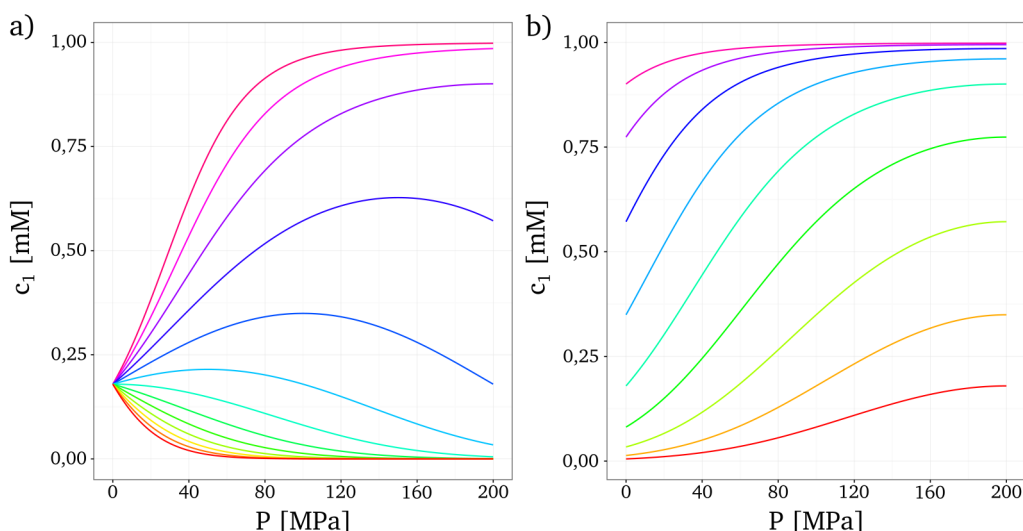


Abbildung 4.9: Simulierte Kurven der Monomerkonzentration für unterschiedliche thermodynamische Parameter in Abhängigkeit vom Druck Diese Abbildung zeigt die Druckabhängigkeit der Monomerkonzentration c_1 gemäß Gleichung 4.19, jedoch bezogen auf die Dissoziation ($K_D = 1/K_A$). In beiden Fällen wurde die gesamte Monomerkonzentration c_T auf 1 mM, die Änderung des Kompressibilitätsfaktors auf $\Delta\beta^0 = -0,5 \text{ mL}/(\text{MPa} \cdot \text{mol})$ und die Temperatur auf $T = 298 \text{ K}$ gesetzt. In Abbildung 4.9a ist die freie Gibbs-Energie ΔG^0 auf 20 kJ/mol festgesetzt und simulierte Kurven für unterschiedliche ΔV^0 von $-150 \text{ mL}/\text{mol}$ (violett) bis $150 \text{ mL}/\text{mol}$ (rot) in Schritten von $25 \text{ mL}/\text{mol}$ dargestellt. Abbildung 4.9b zeigt bei festgesetztem ΔV^0 von $-100 \text{ mL}/\text{mol}$ die Kurven für unterschiedliche freie Gibbs-Energien von 10 kJ/mol (violett) bis 30 kJ/mol (rot) in Schritten von $2,5 \text{ kJ}/\text{mol}$.

4.3.3 Druckinduzierte Depolymerisierung des A β (1–40)-Peptids

In diesem Abschnitt wird der hergeleitete Zusammenhang zwischen der Monomerkonzentration c_1 , gesamter eingesetzter Monomerkonzentration c_T und Assoziationskonstante K_A beziehungsweise Dissoziationskonstante K_D (Kapitel 4.3.2) auf Daten der druckinduzierten Depolymerisierung des A β (1–40)-Peptids angewendet. Dabei wurde die Monomerkonzentration c_1 über die Signalfächen der aromatischen Seitenkettenprotonen (Tyrosin 10 H^ϵ , Histidin 6 $\text{H}^{\delta 2}$ und Summe Histidin 13/14 $\text{H}^{\delta 2}$, siehe Abbildung 4.4b) aus 1D-Protonenspektren in D_2O bestimmt.

Zunächst wurde der Einfluss des zur Bestimmung der Monomerkonzentration c_1 verwendeten Signals untersucht, da die verschiedenen Seitenkettenprotonen im A β ein unterschiedliches Verhalten zeigen können. Dies kann an unterschiedlichen Relaxationszeiten der Kerne, unterschiedlichen Austauschraten mit D_2O oder an der Umgebung des Signals (Überlagerung mit anderen Signalen) liegen. Abbildung 4.10 zeigt die

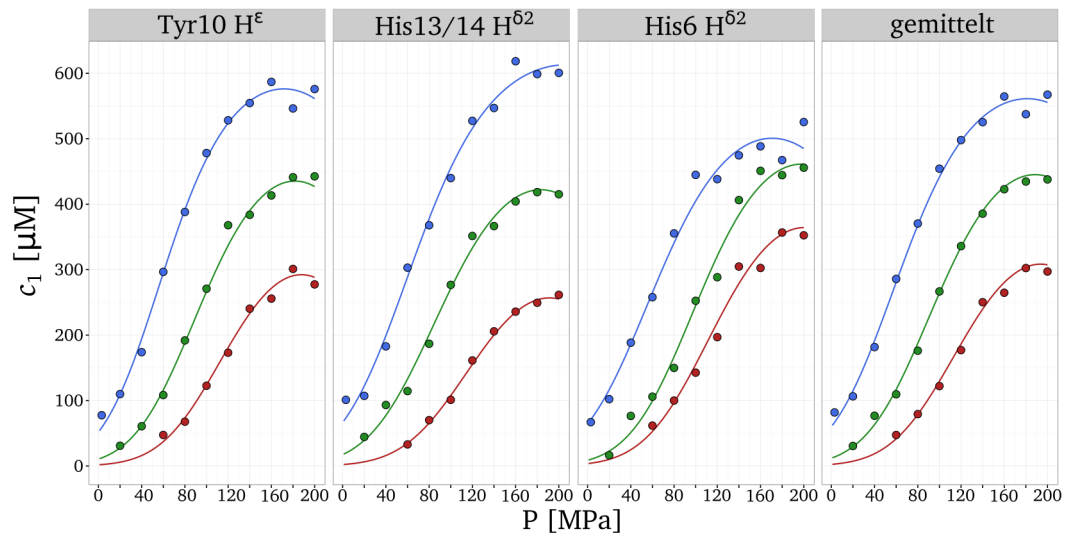


Abbildung 4.10: Druckinduzierte Depolymerisierung von A β (1–40) in Abhängigkeit der Temperatur Die Abbildung zeigt die druckinduzierte Änderung der Signalflächen (Monomerkonzentration c_1) für unterschiedliche Seitenkettenprotonen von A β (1–40) (siehe Abbildung 4.4b) in Abhängigkeit der Temperatur. Angegeben sind die Temperaturen 283 K (blau), 293 K (grün) und 303 K (rot). Zusätzlich angegeben ist der gemittelte Wert der untersuchten Seitenkettenprotonen. Durch die Datenpunkte wurde die mit Hilfe von Gleichung 4.19 erhaltene Fitkurve eingezeichnet.

unterschiedlichen Verläufe der druckinduzierten Depolymerisierung in Abhängigkeit der Temperatur für die unterschiedlichen, zur Bestimmung der Monomerkonzentration c_1 herangezogenen Signale.

Die verschiedenen Signale der Seitenkettenprotonen zeigen ein unterschiedliches Verhalten. Die größten Abweichungen zeigt der Verlauf der Depolymerisierung, der mit Hilfe des Signals des Histidin 6 H δ^2 ermittelt wurde.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede sind die unterschiedlichen Relaxationszeiten der unterschiedlichen Seitenkettenprotonen. Bei einer Temperatur von 277 K liegen die T_1 -Relaxationszeiten der Kerne der untersuchten Signale bei $< 0,8$ s, die der Methylgruppen des TRIS-Signals bei 1,1 s und die der Methylgruppe des DSS bei 1,4 s (Munte et al. (2013), *Supporting Information*). Die Wiederholzeit der Experimente (Repetitionszeit $d1$ + Aquisitionszeit AQ) lag bei ca. 4 s und ist damit 3-5 mal so lang wie die T_1 -Relaxationszeiten. Dies sollte für ein ausrelaxiertes System ausreichend sein.

Eine andere Möglichkeit zur Erklärung des unterschiedlichen Verhaltens der Signale liegt in den unterschiedlichen Austauschraten der Seitenkettenprotonen begründet. Dies gilt insbesondere für die H δ^2 -Protonen der Histidin Seitenkette (Hansen und Kay, 2014) und könnte erklären, warum die Auswertung über das Signal des Histidin 6

$H^{\delta 2}$ deutliche Abweichungen zeigt. Die Summe der $H^{\delta 2}$ Signalflächen der Histidine 13 und 14 zeigen auch Abweichungen, die jedoch im Vergleich zu Histidin 6 geringer ausfallen.

Ein weiterer Erklärungsansatz ist die Genauigkeit mit der die Fläche des jeweiligen Signals bestimmt werden kann. Bei Betrachtung der verschiedenen Signale in Abbildung 4.4b zeigen sich unterschiedliche Umgebungen, die Einfluss auf die Genauigkeit der Signalflächenbestimmung haben können. Für hohe Drücke überlagern die $H^{\delta 2}$ -Signale der Histidine 13 und 14. Die Signale werden daher aufsummiert, um die Genauigkeit der Signalflächenbestimmung zu erhöhen. Auch die Signale des Histidin 6 $H^{\delta 2}$ und des Tyrosin 10 H^{δ} überlagern sich für hohe Drücke und verringern somit die Genauigkeit mit der die Monomerkonzentration c_1 bestimmt werden kann. Einzig das Signal des Tyrosin 10 H^{ϵ} zeigt keine Überlagerungen und sollte daher zu der genauesten Signalflächenbestimmung führen.

Im weiteren Verlauf der Analyse wurden für die Depolymerisierung in Abhängigkeit der Temperatur die gemittelten Signalflächen verwendet. Diese entsprechen nahezu dem Verlauf des Tyrosin 10 H^{ϵ} (Abbildung 4.10). Die Abhängigkeit der Depolymerisierung von der eingesetzten Peptidkonzentration wurde mit Hilfe der Signalflächen des Tyrosin 10 H^{ϵ} ausgewertet.

Es wurde nun überprüft, inwiefern sich eine Vereinfachung des Modells (Gleichung 4.19 mit Gleichung 4.9) durch Vernachlässigung der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta^{/0}$ auswirkt. Daher wurden beide Abhängigkeiten der Depolymerisierung (Temperatur und Peptidkonzentration) einmal unter Berücksichtigung des Kompressibilitätsfaktors als Fitparameter und einmal mit $\Delta\beta^{/0} = 0 \text{ mL}/(\text{MPa} \cdot \text{mol})$ angefitet (Abbildung 4.11).

Es zeigt sich für beide Abhängigkeiten, dass das vereinfachte Modell mit $\Delta\beta^{/0} = 0 \text{ mL}/(\text{MPa} \cdot \text{mol})$ die Daten nur unzureichend beschreibt, da der Sättigungsbereich ohne Berücksichtigung der Änderung des Kompressibilitätsfaktors der maximalen Peptidkonzentration c_T entspricht. Da dies für den gemessenen Verlauf der Depolymerisierung nicht der Fall ist und die Daten nur unzureichend beschrieben werden, kann in diesem Fall die Änderung des Kompressibilitätsfaktors nicht vernachlässigt werden.

Bei Betrachtung von Abbildung 4.11 fällt auf, dass die eingesetzte Peptidkonzentration (gepunktete Linie) mit dem Druck zunimmt. Dies liegt an der Kompressibilität von Wasser und der damit einhergehenden Volumenverringern bei Erhöhung des Drucks und führt zu einer Erhöhung der Konzentration. Die Effekte der Kompressibilität von

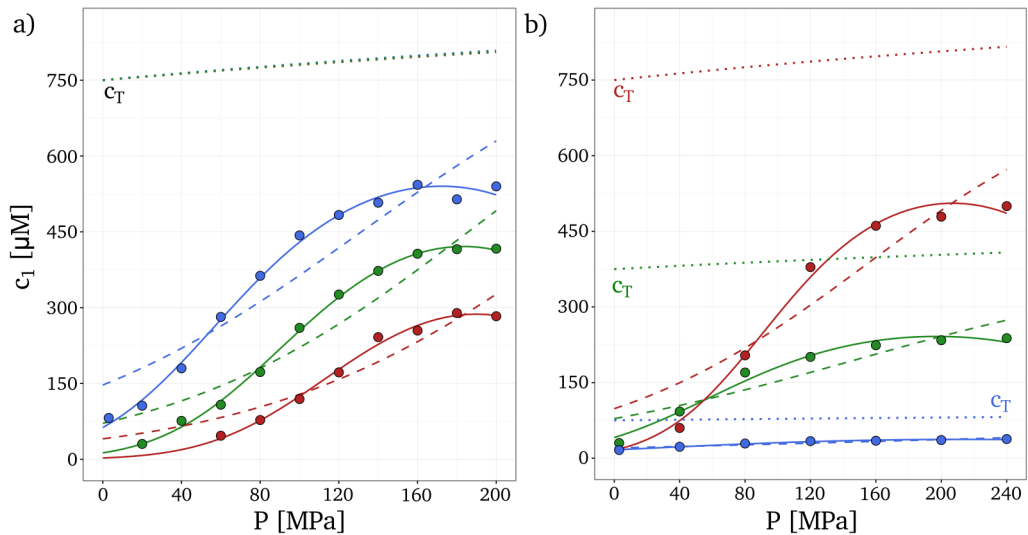


Abbildung 4.11: Vergleich der Modelle zur Beschreibung der druckinduzierten Depolymerisierung von A β (1–40) mit und ohne Berücksichtigung des Kompressibilitätsfaktors Die Abbildung zeigt die Druckabhängigkeit der Monomerkonzentration c_1 für unterschiedliche Temperaturen und einer Peptidkonzentration von 750 μM (Abbildung 4.11a) und unterschiedliche eingesetzte Peptidkonzentrationen c_T bei einer Temperatur von 293 K (Abbildung 4.11b). Farblich kodiert sind in Abbildung 4.11a die Temperaturen 283 K (blau), 293 K (grün) und 303 K (rot) und in Abbildung 4.11b die eingesetzten Peptidkonzentrationen 750 μM (rot), 375 μM (grün) und 75 μM (blau). Die eingezeichneten Linien zeigen die Fits gemäß Gleichung 4.19 mit $\Delta\beta^{/0}$ als freiem Fitparameter (durchgezogene Linie) und $\Delta\beta^{/0} = 0$ $\text{mL}/(\text{MPa} \cdot \text{mol})$ (gestrichelte Linie). In beiden Modellen wurde c_T gemäß der eingesetzten Peptidkonzentration fest gesetzt. Die gepunkteten Horizontallinien zeigen die jeweilige eingesetzte Totalkonzentration c_T des Peptids an. Die Bestimmung der beiden Abhängigkeiten erfolgte jeweils mit einer eigenen Probe mit folgender Ausgangszusammensetzung: 750 μM menschliches A β (1–40), 50 mM TRIS-d₁₁, 90 mM NaCl, 50 μM DSS, 0,5 mM EDTA-d₁₆, 1 mM NaN₃, pH 7,0, 100 % D₂O.

Wasser (Chen et al., 1977) wurden bei der Fitroutine (Druck- und Temperaturabhängigkeit von c_T) und der Angabe von c_T in den Abbildungen berücksichtigt.

Für viele Probenpräparationen gilt, dass die genaue Konzentration an eingesetztem Peptid oder Protein nicht exakt bekannt ist. Dies gilt vor allem bei Proben, die polymerisieren und größere Aggregate ausbilden. Diese können ausfallen oder die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung beeinträchtigen. In unserem Fall wurden die Abhängigkeiten der druckinduzierten Depolymerisierung jeweils mit einer eigenen Probe vermessen, wobei die Messreihe jeweils ca. 1 Woche in Anspruch nahm. Dabei wurde zuerst die Abhängigkeit von der Temperatur untersucht, beginnend bei 283 K über 293 K bis hin zu 303 K. Für die Abhängigkeit der Peptidkonzentration wurde

die Probe mit 750 μM vermessen und anschließend mit P₄D-Puffer (Tabelle 4.1) auf 375 μM und letztlich auf 75 μM verdünnt.

Da die Konstanz von c_T über einen längeren Zeitraum aufgrund von nicht mehr deaggregierbaren Polymeren oder ausfallendem Peptid/Protein nicht immer gewährleistet ist, kann c_T als freier Fitparameter gesetzt werden. Daher wird im Folgenden untersucht, ob ein Modell mit der eingesetzten Peptidkonzentration c_T als freiem Fitparameter (Modell c_T) die Daten ausreichend gut beschreiben kann. Setzt man c_T als Fitparameter und behält zudem $\Delta\beta'^0$ als Fitparameter, führt dies zu einer Überparametrisierung und unzureichend genauen Fitkoeffizienten. Daher wurde für die Untersuchung des Modells c_T die Änderung des Kompressibilitätsfaktors gleich Null gesetzt ($\Delta\beta'^0 = 0 \text{ mL}/(\text{MPa} \cdot \text{mol})$) und überprüft, ob das Modell c_T die Daten ähnlich gut beschreibt wie das Modell mit Berücksichtigung von $\Delta\beta'^0$ und festgesetztem c_T (Modell $\Delta\beta'^0$).

Der Vergleich beider Modelle wird in Abbildung 4.12a für die druckinduzierte Depolymerisierung in Abhängigkeit der Temperatur und in Abbildung 4.12b für die Abhängigkeit der Peptidkonzentration dargestellt. Mit Hilfe des in ANOVA implementierten F-Tests zeigt sich, dass beide Modelle unter Berücksichtigung eines Signifikanzkriteriums von $p = 0,01$ die Daten gleich gut beschreiben.

Die aus den Fits der beiden Modelle erhaltenen Parameter sind für beide Abhängigkeiten in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Für die Abhängigkeit von der eingesetzten Peptidkonzentration muss für 75 μM beachtet werden, dass das Modell gemäß Gleichung 4.19 keine Gültigkeit besitzt, da die Konzentration unter der angenommenen kritischen Micellbildungskonzentration (CMC) von 100 μM für A β liegt (Kusumoto et al., 1998).

Die beiden Abhängigkeiten der druckinduzierten Depolymerisierung überschneiden sich für eine Observablenkombination bei einer Temperatur von 293 K und einer eingesetzten Peptidkonzentration von 750 μM . Ein Vergleich dieser Messungen gibt Aufschluss über die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse, da es sich für beide Abhängigkeiten jeweils um eine eigene Probe handelt. Vergleicht man die thermodynamischen Parameter für 293 K und 750 μM für die beiden Abhängigkeiten, so zeigen sich innerhalb der Fehlertoleranz vergleichbare Werte und es kann von reproduzierbaren Messreihen ausgegangen werden.

Für die Abhängigkeit der druckinduzierten Depolymerisierung von der Temperatur (Tabelle 4.3, obere Hälfte) ergibt sich eine Zunahme von ΔG^0 mit der Temperatur. Dabei nimmt die Änderung der freien Gibbs-Energie von ca. 22 kJ/mol bei 283 K

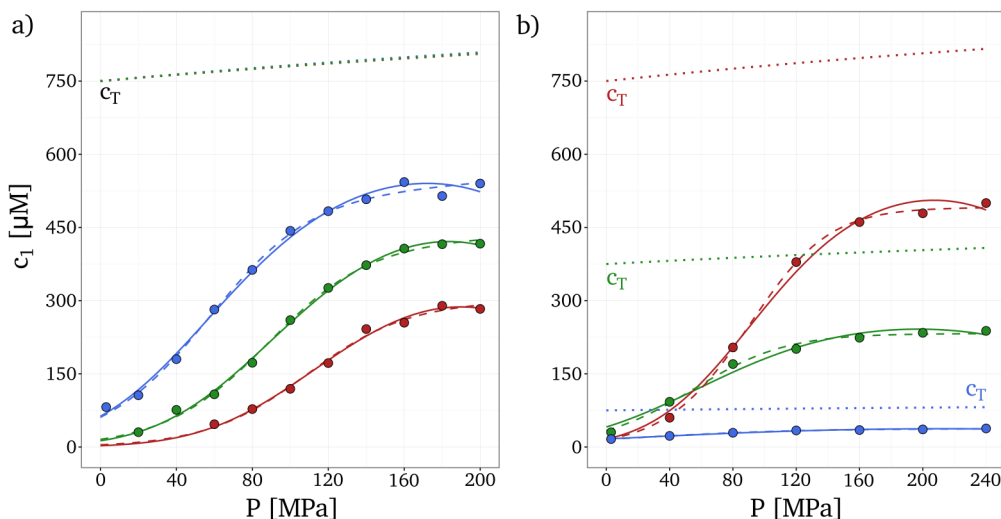


Abbildung 4.12: Vergleich der Modelle zur Beschreibung der druckinduzierten Depolymerisation von $A\beta(1-40)$ mit $\Delta\beta^0$ und ohne $\Delta\beta^0$ mit c_T als Fitparameter
 Die Abbildung zeigt die Druckabhängigkeit der Monomerkonzentration c_1 für unterschiedliche Temperaturen und einer Peptidkonzentration $750 \mu\text{M}$ (Abbildung 4.12a) und unterschiedliche Totalkonzentrationen des eingesetzten Peptids c_T bei 293 K (Abbildung 4.12b). In allen Fällen wurde die Kompressibilität von Wasser und die damit einhergehende Konzentrationszunahme berücksichtigt (Druck- und Temperaturabhängigkeit von c_T , c_1). Farblich kodiert sind in Abbildung 4.12a die Temperaturen 283 K (blau), 293 K (grün) und 303 K (rot) und in Abbildung 4.12b die eingesetzten Peptidkonzentrationen $750 \mu\text{M}$ (rot), $375 \mu\text{M}$ (grün) und $75 \mu\text{M}$ (blau). Die eingezeichneten Linien zeigen die Fits gemäß Gleichung 4.19 mit $\Delta\beta^0$ als freiem Fitparameter (durchgezogene Linie, Modell $\Delta\beta$) und $\Delta\beta^0 = 0 \text{ mL}/(\text{MPa} \cdot \text{mol})$ mit c_T als Fitparameter (gestrichelte Linie, Modell c_T). Die gepunkteten Linien zeigen die jeweils eingesetzte Peptidkonzentration c_T an. Die Bestimmung der beiden Abhängigkeiten erfolgte jeweils mit einer eigenen Probe mit folgender Ausgangszusammensetzung: $750 \mu\text{M}$ menschliches $A\beta(1-40)$, 50 mM TRIS- d_{11} , $50 \mu\text{M}$ DSS, 90 mM NaCl, $0,5 \text{ mM}$ EDTA- d_{16} , 1 mM NaN_3 , pH 7,0, 100 % D_2O .

über ca. 27 kJ/mol bei 293 K auf ca. 32 kJ/mol bei 303 K zu. Für die Abhängigkeit der druckinduzierten Depolymerisierung von der eingesetzten Peptidkonzentration ergibt sich eine unregelmäßige Abnahme von ΔG^0 . Sie nimmt von ca. $26,5 \text{ kJ/mol}$ bei $750 \mu\text{M}$ über ca. 24 kJ/mol bei $375 \mu\text{M}$ ab und bleibt bei ca. 25 kJ/mol für $75 \mu\text{M}$. Im Rahmen der Fehlertoleranz zeigen beide Modelle vergleichbare Werte.

Der Vergleich der Änderung des partiellen molaren Volumens zeigt für beide Abhängigkeiten und Modelle leichte Unterschiede. Für das Modell $\Delta\beta$ nimmt ΔV^0 mit Erhöhung der Temperatur von 98 mL/mol (283 K) über 125 mL/mol (293 K) auf 148 mL/mol (303 K) zu, während ΔV^0 für das Modell c_T von 96 mL/mol (283 K) über

T [K]	c_T [μM]	Modell	ΔG^0 [kJ/mol]	ΔV^0 [mL/mol]	$\Delta\beta'^0$ [mL/(MPa · mol)]	c_T^{fit} [μM]
283	750	$\Delta\beta$	$22,0 \pm 0,3$	$98,1 \pm 5,6$	$0,59 \pm 0,05$	-
293	750	$\Delta\beta$	$27,1 \pm 0,4$	$124,5 \pm 5,5$	$0,69 \pm 0,04$	-
303	750	$\Delta\beta$	$32,2 \pm 1,0$	$147,8 \pm 14,4$	$0,78 \pm 0,10$	-
283	750	c_T	$21,8 \pm 0,3$	$95,8 \pm 5,3$	-	491 ± 6
293	750	c_T	$26,4 \pm 0,4$	$101,5 \pm 4,7$	-	390 ± 5
303	750	c_T	$30,7 \pm 1,1$	$108,1 \pm 11,2$	-	271 ± 9
293	750	$\Delta\beta$	$26,2 \pm 1,2$	$113,1 \pm 16,0$	$0,56 \pm 0,10$	-
293	375	$\Delta\beta$	$23,5 \pm 0,7$	$71,1 \pm 10,3$	$0,37 \pm 0,07$	-
293	75	$\Delta\beta$	$25,3 \pm 0,2$	$31,0 \pm 3,9$	$0,15 \pm 0,03$	-
293	750	c_T	$27,0 \pm 0,3$	$112,3 \pm 2,9$	-	442 ± 2
293	375	c_T	$24,1 \pm 0,4$	$100,1 \pm 7,0$	-	210 ± 3
293	75	c_T	$24,2 \pm 0,2$	$60,2 \pm 5,2$	-	34 ± 1

Tabelle 4.3: Thermodynamische Parameter der druckinduzierten Depolymerisierung von A β (1–40) Die Tabelle fasst die thermodynamischen Parameter der druckinduzierten Depolymerisierung für die unterschiedlichen Modelle zusammen. Die Parameter für die Abhängigkeit von der Temperatur sind dabei über dem Doppelstrich zu finden, die Parameter für die Abhängigkeit der eingesetzten Peptidkonzentration unter dem Doppelstrich. Die Parameter wurden durch Anfitzen gemäß Gleichung 4.19 erhalten. Die Parameter der Temperaturabhängigkeit beziehen sich dabei auf die gemittelten Signalfächen (Abbildung 4.10), die der Abhängigkeit der eingesetzten Peptidkonzentration auf die Signalfächen des Tyrosin 10 H $^{\epsilon}$.

102 mL/mol (293 K) auf 108 mL/mol (303 K) eine kleinere Zunahme zeigte. Bei Änderung der eingesetzten Peptidkonzentration zeigte sich für das Modell $\Delta\beta$ eine Abnahme von ΔV^0 von 113 mL/mol (750 μM) über 71 mL/mol (375 μM) auf 31 mL/mol (75 μM), während für das Modell c_T eine Abnahme von ΔV^0 von 112 mL/mol (750 μM) über 100 mL/mol (375 μM) auf 60 mL/mol (75 μM) gefunden wurde.

Die weiteren Parameter sind jeweils spezifisch für die unterschiedlichen Modelle. Dabei nimmt für das Modell $\Delta\beta$ die Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta'^0$ mit der Temperatur zu und zwar von 0,59 mL/(MPa · mol) (283 K) über 0,69 mL/(MPa · mol) (293 K) auf 0,78 mL/(MPa · mol). Für die Abhängigkeit von der eingesetzten Peptidkonzentration erniedrigt sich $\Delta\beta'^0$ von 0,57 mL/(MPa · mol) (750 μM) über 0,37 mL/(MPa · mol) (375 μM) auf 0,15 mL/(MPa · mol) (75 μM).

T [K]	c_T [μM]	Modell	K_D	K_D	c_1/c_T	c_1/c_T	c_1/c_T^{fit}	c_1/c_T^{fit}
			(0,1 MPa) [μM]	(200 MPa) [mM]	(0,1 MPa)	(200 MPa)	(0,1 MPa)	(200 MPa)
283	750	$\Delta\beta$	88,3	2,7	0,08	0,70	-	-
293	750	$\Delta\beta$	14,6	1,5	0,02	0,55	-	-
303	750	$\Delta\beta$	2,8	0,7	0,003	0,38	-	-
283	750	c_T	93,8	322,4	0,08	0,72	0,12	1,10
293	750	c_T	19,5	80,7	0,02	0,57	0,04	1,09
303	750	c_T	5,0	26,8	0,01	0,39	0,02	1,07
293	750	$\Delta\beta$	21,4	2,5	0,02	0,68	-	-
293	375	$\Delta\beta$	63,8	1,1	0,11	0,65	-	-
293	75	$\Delta\beta$	31,3	0,1	0,22	0,50	-	-
293	750	c_T	15,2	152,6	0,02	0,65	0,03	1,09
293	375	c_T	50,2	184,7	0,08	0,62	0,15	1,10
293	75	c_T	47,9	6,7	0,21	0,49	0,46	1,09

Tabelle 4.4: Aus den thermodynamischen Parametern abgeleitete Größen der druckinduzierten Depolymerisierung von A β (1–40) Die Abbildung zeigt die aus den thermodynamischen Parametern (Tabelle 4.3) abgeleiteten Größen der Dissoziationskonstanten bei 0,1 MPa und 200 MPa sowie die Verhältnisse der Monomerkonzentration c_1 zu der eingesetzten Peptidkonzentration c_T beziehungsweise zu der als Fitparameter erhaltenen Peptidkonzentration c_T^{fit} .

Die Änderung von c_T^{fit} als freiem Fitparameter im Modell c_T beträgt für die Abhängigkeit von der Temperatur 491 μM (283 K), 390 μM (293 K) und 271 μM (303 K). Für die Abhängigkeit von der eingesetzten Peptidkonzentration nimmt sie von 442 μM (750 μM) über 210 μM (375 μM) auf 34 μM (75 μM) ab.

Anhand der thermodynamischen Parameter (Tabelle 4.3) lassen sich die Dissoziationskonstanten K_D für die Drücke 0,1 MPa und 200 MPa nach Gleichung 4.8 und Gleichung 4.9 berechnen. Dabei zeigt sich für die Dissoziationskonstante bei 0,1 MPa eine gute Übereinstimmung zwischen den unterschiedlichen Modellen. Bei Betrachtung der Temperaturabhängigkeit zeigt sich eine über die Modelle gemittelte Abnahme von ca. 90 μM (283 K) über ca. 17 μM (293 K) auf ca. 4 μM (303 K). Für die Abhängigkeit der druckinduzierten Depolymerisierung von der eingesetzten Peptidkonzentration zeigt sich eine über die Modelle gemittelte Zunahme von ca. 18 μM (750 μM) über ca. 57 μM (375 μM) auf ca. 39 μM (75 μM).

Teils deutliche Unterschiede zeigen sich für die Dissoziationskonstanten bei 200 MPa. Hier wirkt sich der Einfluss der unterschiedlichen Werte der partiellen molaren Volumenänderung mit dessen größeren Fehlergrenzen aus. Es zeigt sich für die Zunahme der Temperatur und Abnahme der eingesetzten Peptidkonzentration eine Verringerung

der Dissoziationskonstanten. Die größte Dissoziationskonstante ergibt sich für eine Temperatur von 283 K und einer eingesetzten Peptidkonzentration von 750 μM mit $K_D = 322 \text{ mM}$ unter Verwendung des Modells c_T .

Bezogen auf das Verhältnis der Monomerkonzentration c_1 zur eingesetzten Peptidkonzentration c_T wurden für die Abhängigkeit der Temperatur und 200 MPa gemittelt über beide Modelle 71 % (283 K), 56 % (293 K) und 38,5 % (303 K) der eingesetzten Peptidkonzentration $c_T = 750 \mu\text{M}$ erreicht. Für die Abhängigkeit der eingesetzten Peptidkonzentration wurden bei 200 MPa 66,5 % (750 μM), 63,5 % (375 μM) und 49,5 % (75 μM) der eingesetzten Peptidkonzentration c_T bei Mittelung über beide Modelle erreicht.

4.3.4 Druckabhängigkeit des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP)

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Druckabhängigkeit des Peptidrückgrats des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP) vorgestellt. Da es, wie auch das A β -Peptid, zu den fibrillenbildenden Peptiden gehört, wird zunächst auf die Auswirkung des Drucks auf die maximalen Signalintensitäten der Amidgruppensignale des Peptidrückgrats eingegangen. Wenn im Folgenden von Intensitäten gesprochen wird, handelt es sich um den Maximalwert der Signalintensität. Die Intensitäten wurden anhand der [^{15}N , ^1H]-HSQC Spektren bei Temperaturen von 278 K, 288 K, 298 K und 308 K ermittelt. Die Intensitäten der Signale bei den unterschiedlichen Temperaturen sind in Abbildung 4.13 gezeigt. Dabei sind die einzelnen Signalintensitäten als halbtransparente Linien und der Mittelwert als fette Linie dargestellt.

Bei 278 K zeigt sich bei 20 MPa ein moderater Abfall der durchschnittlichen Signalintensität auf 95 % der Ausgangsintensität, die jedoch bis zum Enddruck von 200 MPa weitestgehend stabil bleibt. Für 288 K bleiben die Intensitäten bis ca. 140 MPa konstant und zeigen für höhere Drücke einen minimalen Abfall auf ca. 95 % der Anfangsintensität. Für beide Temperaturen zeigt sich nahezu kein Einfluss des Druckes auf die Signalintensität, wobei im Vergleich die Abweichungen vom Mittelwert für 288 K größer sind, während sich für 278 K ein nahezu konstantes Bild über den gesamten Druckbereich ergibt. Um den Einfluss der Änderung der Austauschraten der Amidprotonen einzuschätzen, wurden auch die Linienbreiten in Abhängigkeit vom Druck analysiert. Diese zeigen eine Zunahme um ca. 1 Hz bei 200 MPa, zeigen jedoch große Schwankungen über den Druckbereich, insbesondere für die Linienbreiten der Amidprotonen. Daher ist ein großer Einfluss der Austauschraten auf den Intensitätsverlauf unwahrscheinlich.

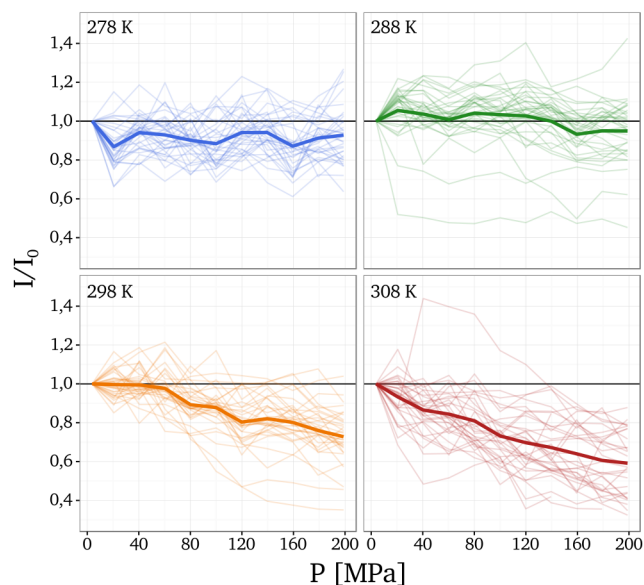


Abbildung 4.13: Druckabhängigkeit der Signalintensitäten für IAPP bei unterschiedlichen Temperaturen Die Abbildung zeigt die auf den Normaldruck ($P_0 = 0,1$ MPa) normierten Signalintensitäten der Amidgruppe des IAPP. Die Intensitäten wurden aus den zweidimensionalen $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -HSQC Spektren ermittelt und sind für die Temperaturen 278 K (blau), 288 K (grün), 298 K (orange) und 308 K (rot) gezeigt. Die dünnen halbtransparenten Linien stellen die einzelnen Intensitäten der Amidgruppen des IAPP dar, während die dicke Linie die Mittelung über diese darstellt.

Bei höheren Temperaturen zeigt sich ein deutlicher Einfluss des Drucks auf die Signalintensitäten. Bei 298 K bleiben die Intensitäten bis ca. 60 MPa nahezu konstant, während sich für die höheren Drücke eine lineare Abnahme der Signalintensitäten auf ca. 75 % der Anfangsintensität zeigt. Dieses Verhalten spiegeln sowohl die Einzelintensitäten sowie der Mittelwert der Signalintensitäten wider. Für 308 K zeigt sich von Beginn an eine lineare Abnahme der Signalintensitäten mit dem Druck auf einen Wert von ca. 60 % bei 200 MPa. Wiederum spiegelt sich das Verhalten des Mittelwertes in den Einzelmessungen wider.

Nach jeder Druckreihe (3 MPa – 200 MPa) wurde die Reversibilität überprüft und ein weiterer Messpunkt bei 3 MPa aufgenommen. Für die Temperaturen 278 K und 288 K zeigte sich kein Einfluss, da hier eine Druckerhöhung zu nahezu keiner Abnahme der Signalintensität führte. Für die Temperaturen 298 K und 308 K, bei denen eine starke Abnahme der Intensität auftrat, zeigt sich keine Reversibilität. Die Erniedrigung des Drucks auf 3 MPa führte zu keiner Erholung der Signalintensitäten. Zwischen den Messungen bei 200 MPa und der Reversibilitätsmessung bei 3 MPa lagen jeweils

ca. 30 min. Innerhalb von 30 min waren die Signalintensitäten bei den Temperaturen 298 K und 308 K nicht reversibel. Eine langsame Depolymerisierung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Auswertung der chemischen Verschiebung der Signale des Peptidrückgrats erfolgte über Anpassen der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung mit einem Polynom zweiter Ordnung gemäß $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$. Dabei wurden der lineare Druckkoeffizient B_1 und der nicht lineare Druckkoeffizient B_2 für das Amidproton sowie den Amidstickstoff des Peptidrückgrats ermittelt. Die untersuchten chemischen Verschiebungen wurden über den intrinsischen Druckeffekt nach Koehler et al. (2012) korrigiert.

Die Druckkoeffizienten für das Amidproton sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Dabei ergibt sich für den linearen Druckkoeffizienten B_1 über die Sequenz ein mittlerer Wert von 0,08 ppm/GPa (278 K), 0,07 ppm/GPa (288 K), 0,10 ppm/GPa (293 K) und 0,09 ppm/GPa bei 308 K. Dabei liegt die Standardabweichung für alle Temperaturen bei ca. 0,18 ppm/GPa. Über alle Temperaturen gemittelt zeigt His18 den größten positiven Wert mit 0,43 ppm/GPa und Thr4 den größten negativen Wert mit $-0,53$ ppm/GPa.

Für den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 erhält man einen gemittelten Wert von $-0,34$ ppm/GPa² (278 K), $-0,28$ ppm/GPa² (288 K), $-0,32$ ppm/GPa² (298 K) und $-0,23$ ppm/GPa² bei 308 K. Dabei liegt die Standardabweichung für alle Temperaturen bei ca. 0,50 ppm/GPa². Den größten positiven Wert zeigt Ala5 mit 0,56 ppm/GPa², den größten negativen Wert zeigt His18 mit $-1,32$ ppm/GPa².

Die Druckabhängigkeit des Amidstickstoffs für das Peptidrückgrat ist in Abbildung 4.15 gezeigt. Dabei ergibt sich für den linearen Druckkoeffizienten B_1 ein über die Sequenz gemittelter Wert von 1,12 ppm/GPa (278 K), 0,88 ppm/GPa (288 K), 0,97 ppm/GPa (298 K) und 1,09 ppm/GPa bei 308 K. Dabei beträgt die Standardabweichung für die unterschiedlichen Temperaturen ca. 1,00 ppm/GPa. Den größten positiven Wert bei Mittelung über alle Temperaturen findet man für Val17 mit 3,55 ppm/GPa, den größten negativen Wert für Tyr37 mit $-0,84$ ppm/GPa.

Über die Sequenz gemittelt erhält man für den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 einen Wert von $-4,14$ ppm/GPa² (278 K), $-2,97$ ppm/GPa² (288 K), $-2,81$ ppm/GPa² (298 K) und $-2,67$ ppm/GPa² für 308 K. Für die Temperaturen 288 K bis 308 K liegt die Standardabweichung bei ca. 2,70 ppm/GPa² für 278 K mit 4,39 ppm/GPa² deutlich höher. Gemittelt über die Temperaturen zeigt sich der größte positive Wert für Thr6 mit 4,05 ppm/GPa², den größten negativen Wert findet man für Val17 mit $-8,34$ ppm/GPa².

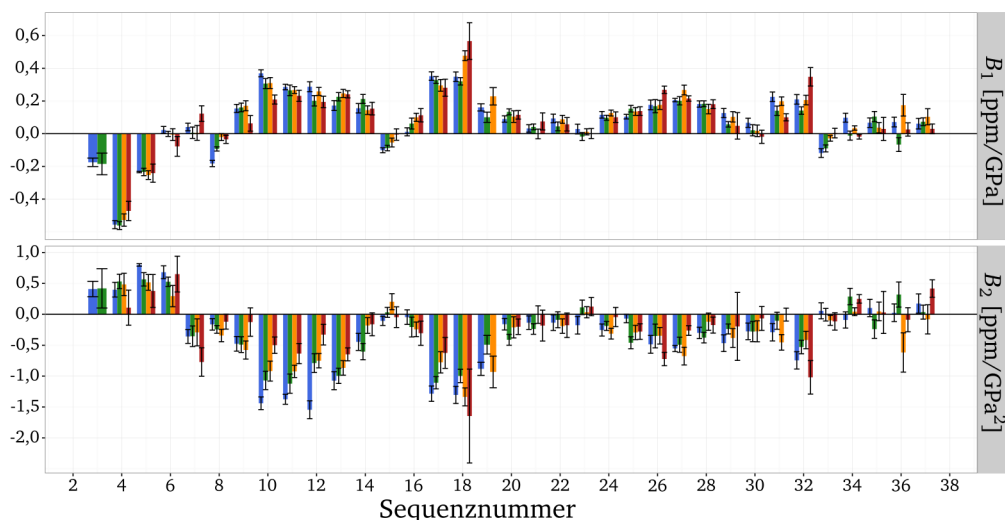


Abbildung 4.14: Druckkoeffizienten für die Amidprotonen H^N des IAPP Die Abbildung zeigt den linearen (B_1) und nicht linearen (B_2) Druckkoeffizienten für das Amidproton des IAPP Peptidrückgrats für die Temperaturen 278 K (blau), 288 K (grün), 298 K (orange) und 308 K (rot). Die Druckkoeffizienten wurden mit einem Polynom zweiter Ordnung gemäß $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$ ermittelt. Die druckinduzierten chemischen Verschiebungsänderungen wurden aus zweidimensionalen [$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-HSQC ermittelt und sind nach Koehler et al. (2012) um den intrinsischen Druckeffekt korrigiert worden.

Wie auch schon für das Druckverhalten der Tetrapeptide gezeigt wurde, verhält sich der lineare Druckkoeffizient B_1 nahezu spiegelbildlich zu dem nicht linearen Koeffizienten B_2 (Koehler et al., 2012; Beck Erlach et al., 2016b). Ersichtlich wird dies bei Betrachtung von Abbildung 4.16, in der die Korrelation zwischen den Druckkoeffizienten für die beiden Kerne N und H^N dargestellt wird. Dabei zeigt sich für beide Kerne eine starke negative Korrelation von $r(H^N) = -0,84$ und $r(N) = -0,70$.

Die Analyse der [$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-HSQC gibt Informationen über das Druckverhalten der Stickstoffkerne und Protonen. Diese befinden sich in räumlicher Nähe, besitzen jedoch ein unterschiedliches chemisches Verhalten (chemischer Austausch, Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel). Interessant erscheint daher ein Vergleich der Druckkoeffizienten für den Stickstoffkern und die Protonen (Abbildung 4.17). Dabei wurden die Druckkoeffizienten aus nach Schumann et al. (2007) gewichteten chemischen Verschiebungen errechnet und anschließend die Werte der Protonen von denen des Stickstoffs abgezogen.

Für den linearen Druckkoeffizienten B_1 findet man die größten Abweichungen zwischen den Kernen am Anfang der Sequenz, vor allem für Thr4. Der größte Anteil der

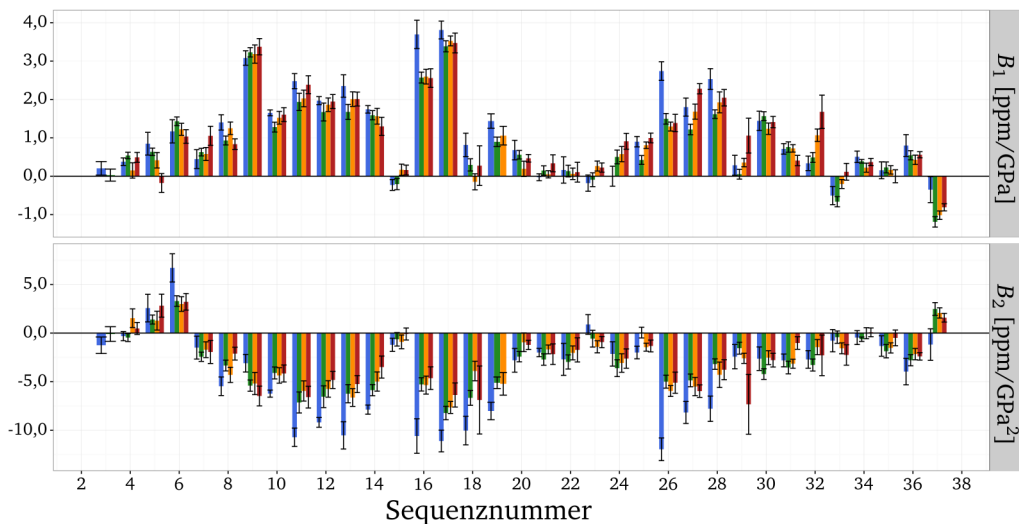


Abbildung 4.15: Druckkoeffizienten für die Amidstickstoffe N des IAPP Die Abbildung zeigt den linearen (B_1) und nicht linearen (B_2) Druckkoeffizienten für den Amidstickstoff des IAPP Peptidrückgrats für die Temperaturen 278 K (blau), 288 K (grün), 298 K (orange) und 308 K (rot). Die Druckkoeffizienten wurden mit einem Polynom zweiter Ordnung gemäß $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$ ermittelt. Die druckinduzierten chemischen Verschiebungsänderungen wurden aus zweidimensionalen [$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$]-HSQC ermittelt und sind nach Koehler et al. (2012) um den intrinsischen Druckeffekt korrigiert worden.

Differenzen ist positiv. Im Vergleich zur Umgebung zeigt auch Leu16 einen großen Unterschied gefolgt von einem Vorzeichenwechsel bei His18. Ab His18 zeigen sich nur kleine Differenzen zwischen den Kernen. Bezogen auf die absoluten Werte ergibt sich für B_1 eine gemittelte Differenz von 0,20 ppm/GPa.

Die Mehrheit der Differenzen für den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 sind negativ und spiegeln das Verhalten von B_1 . Dies wird besonders an den Positionen Val32, His18 und Gln10 ersichtlich, da hier das Vorzeichen in beiden Fällen gegenläufig zum Rest der Sequenz ist. Große Unterschiede finden sich wieder zu Beginn der Sequenz für Asn3 sowie für Ala8, His18 und den Cluster von Ile26 bis Ser28. Bezogen auf die absoluten Werte ergibt sich eine gemittelte Abweichung von 0,44 ppm/GPa² für den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 .

Korreliert man die gewichteten Kerne für die beiden Druckkoeffizienten B_1 und B_2 , so erhält man Pearson Korrelationskoeffizienten von $r(B_1) = 0,47$ und $r(B_2) = 0,86$. Der geringe Korrelationskoeffizient für den linearen Druckkoeffizienten B_1 lässt sich auf die starken Unterschiede am Anfang der Sequenz zwischen Asn3 und Thr9

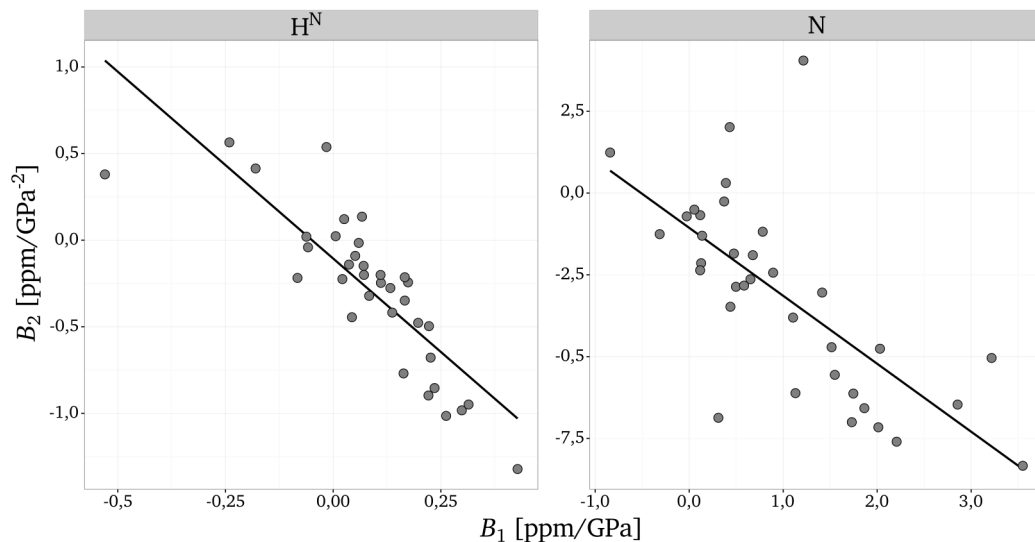


Abbildung 4.16: Korrelation zwischen den Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für IAPP
 Die Abbildung zeigt die Korrelation zwischen dem linearen Druckkoeffizienten B_1 und dem nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 für die beiden Kerne H^N und N der Amidgruppe des IAPP Peptidrückgrats. Die Druckkoeffizienten wurden nach Koehler et al. (2012) um den intrinsischen Druckeffekt korrigiert und über die unterschiedlichen Temperaturen gemittelt. Es ergeben sich Pearson Korrelationskoeffizienten von $r(H^N) = -0,84$ und $r(N) = -0,70$. Das über die gesamte Sequenz gemittelte Verhältnis B_2/B_1 beträgt $-3,1 \text{ GPa}^{-1}$ (H^N) und $-3,5 \text{ GPa}^{-1}$ (N).

zurückführen (vergleiche Abbildung 4.14 und 4.15), während für den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 die Differenz größer jedoch die Korrelation höher ist (Offset).

Eine weitere Möglichkeit ist die Simplifizierung der Daten über die Kombination der gewichteten chemischen Verschiebungen der einzelnen Kerne. Dabei betrachtet man die Summe der gewichteten chemischen Verschiebungen nach Schumann et al. (2007) und analysiert ihr Druckverhalten. Dies ermöglicht eine einheitliche Beschreibung der Amidgruppe des Peptidrückgrats. Die Druckkoeffizienten dieser kombinierten chemischen Verschiebung zeigt Abbildung 4.18.

Der Tendenz nach verhalten sich die Druckkoeffizienten der kombinierten chemischen Verschiebung ähnlich zu den bereits gezeigten Druckkoeffizienten der einzelnen Kerne (H^N : Abbildung 4.14, N : 4.15). In den meisten Fällen zeigt sich das typische Verhalten eines positiven linearen Koeffizienten B_1 und eines negativen nicht linearen Koeffizienten B_2 . Ausnahmen hiervon sind die Aminosäuren Asn3 bis Ala5, Phe15, Gly33 und Tyr37. Hier verhalten sich die Druckkoeffizienten entgegengesetzt zum restlichen Muster. Auffällig sind Phe15, welches nahezu keine Druckabhängigkeit zeigt,

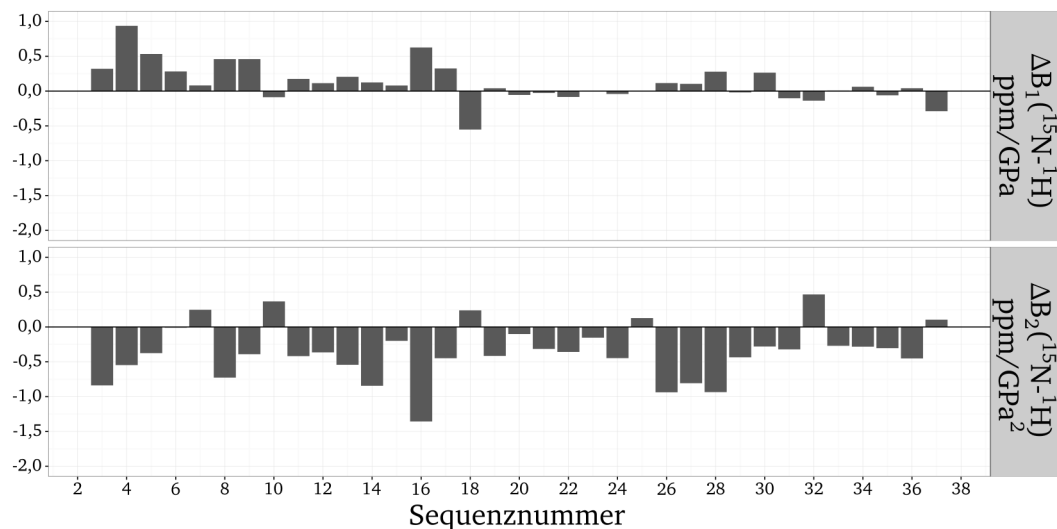


Abbildung 4.17: Differenz zwischen den Druckkoeffizienten des Amidstickstoffs und der Amidprotonen im IAPP Die Abbildung zeigt die Differenz der Druckkoeffizienten des Amidstickstoff zu den Druckkoeffizienten der Amidprotonen im IAPP. Um eine bessere Vergleichbarkeit der chemischen Verschiebungen zu erreichen, diente als Berechnungsgrundlage die nach Schumann et al. (2007) gewichtete chemische Verschiebung der Kerne. Für den linearen Druckkoeffizienten B_1 ergibt sich für die Korrelation zwischen den Kernen ein Pearson Korrelationskoeffizient von $r(B_1) = 0,47$, für den nicht linearen Druckkoeffizienten $r(B_2) = 0,86$. Die mittlere Abweichung zwischen den Kernen beträgt $0,20 \text{ ppm/GPa}$ für B_1 und $0,44 \text{ ppm/GPa}^2$ für B_2 .

und der Bereich um Phe23, der sich ebenfalls durch eine geringe Druckabhängigkeit auszeichnet.

Insgesamt kann man die Druckabhängigkeit in Abhängigkeit der Sequenz in folgende Breiche einteilen. Der Beginn der Sequenz von Asn3 bis Ala5 ist gekennzeichnet durch entgegengesetzte Vorzeichen, während Thr6 positive Koeffizienten B_1 und B_2 aufweist. Es folgt ein Bereich von mittleren bis starken Druckkoeffizienten von Cys7 bis Asn14, gefolgt von einem starken Einschnitt bei Phe15. Von Leu16 bis Ser19 folgt wieder ein Bereich mit starker Druckabhängigkeit, der von Ser20 bis Ala25 in einen Breich geringerer Druckabhängigkeit übergeht. Es folgt ein leichter Anstieg bis Ser28 gefolgt von einem moderaten Bereich zwischen Ser29 und Val32. Das Ende der Sequenz zeigt wieder eine geringere Abhängigkeit vom Druck.

Interessant ist auch die Änderung der Druckkoeffizienten in Bezug auf den Vorgänger in der Sequenz. Damit lassen sich die Breiche im Peptid darstellen, bei denen die stärksten Änderungen auftreten. In Abbildung 4.19 sind die Differenzen zu den Druckkoeffizienten des Vorgängers in der Sequenz dargestellt. Dabei liegt die mittlere

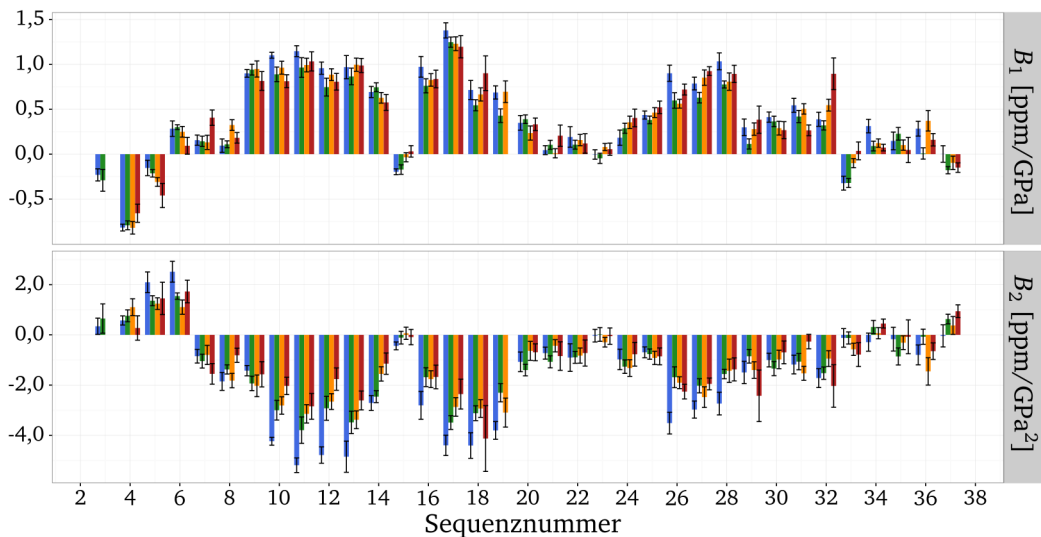


Abbildung 4.18: Druckkoeffizienten der kombinierten chemischen Verschiebung der Amidgruppe des Peptidrückgrats für IAPP Die Abbildung zeigt den linearen Druckkoeffizienten B_1 und den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 der kombinierten chemischen Verschiebung der Amidgruppe des IAPP Peptidrückgrats für die Temperaturen 278 K (blau), 288 K (grün), 298 K (orange) und 308 K (rot). Die kombinierte chemische Verschiebung entspricht der Summe der nach Schumann et al. (2007) gewichteten chemischen Verschiebung der Kerne H^N und N. Die chemischen Verschiebungen wurde aus zweidimensionalen $[^{15}N, ^1H]$ -HSQC Spektren ermittelt. Die Probe enthielt: 110 μ M menschliches IAPP, 10 mM Natriumacetat-Puffer, 0,1 mM DSS, pH 5,5, H_2O/D_2O 92 %/8 %.

Differenz über die Sequenz für B_1 bei 0,005 ppm/GPa und für B_2 bei 0,0006 ppm/GPa². Dies weist darauf hin, daß sich die Änderungen der Druckkoeffizienten über die Sequenz nahezu komplett herausmitteln.

In Abbildung 4.19 ist zusätzlich die Standardabweichung als gestrichelte Linie eingezeichnet. Sie liegt für B_1 bei $-0,38$ ppm/GPa und für B_2 bei $1,05$ ppm/GPa². Außerhalb der Standardabweichung liegen für den linearen Druckkoeffizienten B_1 die Aminosäuren Asn3, Thr4, Ala5, Thr9, Phe15, Leu16, Val17, His18, Ser29 und Gly33. Für den nicht linearen Druckkoeffizienten liegen Cys7, Gln10, Asn14, Phe15, Leu16, Val17, Ser20, Ile26, Gly33 und Tyr37 außerhalb der Standardabweichung.

Die Druckreihen für das Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) wurden bei den Temperaturen 278 K, 288 K, 298 K und 308 K aufgenommen. Die unterschiedlichen Druckkoeffizienten für diese Temperaturen sind in den Abbildungen 4.14, 4.15 und 4.18 dargestellt. Schon in diesen Abbildungen fällt auf, daß die Druckkoeffizienten teils eine

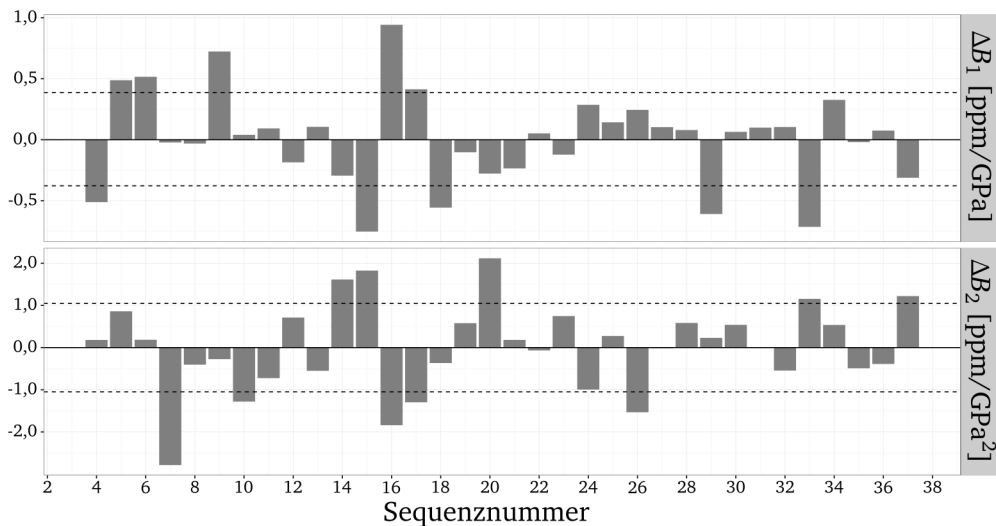


Abbildung 4.19: Differenz der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 zu der in der Sequenz vorhergehenden Amidgruppe des IAPP Die Abbildung zeigt die Differenz für die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 aus der kombinierten chemischen Verschiebung (Summe der nach Schumann et al. (2007) gewichteten chemischen Verschiebungen der Kerne) zu der in der Sequenz vorhergehenden Amidgruppe. Dabei wurden die Druckkoeffizienten über die Temperaturen gemittelt. Eingezeichnet ist zudem die einfache Standardabweichung (gestrichelte Linie) bezogen auf den Mittelwert.

starke Abhängigkeit von der Temperatur zeigen, teils jedoch nahezu keinen Einfluss der Temperatur erkennen lassen.

Aus diesem Grund wurde anhand der Druckkoeffizienten der kombinierten chemischen Verschiebungen der ^1H und ^{15}N Kerne (siehe Abbildung 4.18) die Temperaturabhängigkeit über eine lineares Modell überprüft. Die Temperaturabhängigkeiten der beiden Druckkoeffizienten B_1 und B_2 sind in Abbildung 4.20 dargestellt.

Betrachtet man die Temperaturabhängigkeit des linearen Druckkoeffizienten B_1 so liegt der Mittelwert bei $3 \cdot 10^{-5} \text{ ppm}/(\text{GPa} \cdot \text{K})$ mit einer Standardabweichung von $0,006 \text{ ppm}/(\text{GPa} \cdot \text{K})$. Eine größere Abweichung vom Mittelwert bezogen auf die Standardabweichung zeigen dabei Ala5, Cys7, Gln10, Phe15, His18, Gly24, Leu27 und die Sequenz von Asn31 bis Ser34.

Der Mittelwert für die Temperaturabhängigkeit des nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 beträgt $0,02 \text{ ppm}/(\text{GPa}^2 \cdot \text{K})$ mit einer Standardabweichung von $0,03 \text{ ppm}/(\text{GPa}^2 \cdot \text{K})$. Die stärksten Effekte bezogen auf die Standardabweichung vom Mittelwert zeigen Ala5 bis Cys7, Gln10 bis Asn14, Val17, Ile26 bis Ser29 und Gly33.

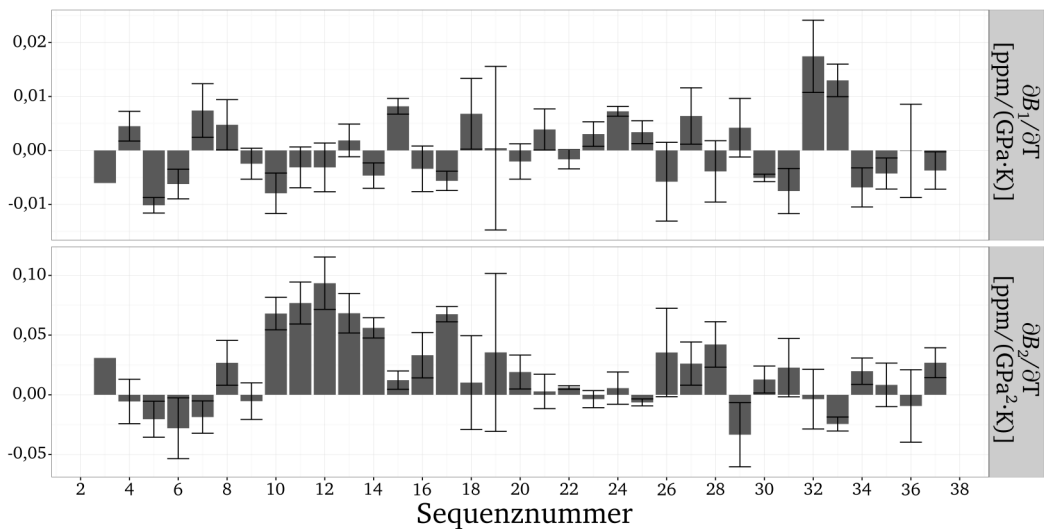


Abbildung 4.20: Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 aus der kombinierten chemischen Verschiebung für IAPP Die Abbildung zeigt die Koeffizienten für die lineare Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 über die Sequenz des IAPP. Als Berechnungsgrundlage dienten hierbei die Druckkoeffizienten der kombinierten chemischen Verschiebung (Summe der nach Schumann et al. (2007) gewichteten chemischen Verschiebungen der Kerne).

4.3.5 Temperaturabhängigkeit des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP)

Im vorherigen Kapitel wurde die Druckabhängigkeit der Amidgruppe des IAPP Peptidrückgrats untersucht. Analog kann auch der Einfluss der Temperatur auf die chemischen Verschiebungen der Amidgruppe des Peptidrückgrats für IAPP untersucht werden. Im Gegensatz zu den 11 Messpunkten für die Untersuchung der Druckeffekte stehen für die Untersuchung der Temperatur nur 4 Messpunkte zur Verfügung. Daher wurden die Daten, im Gegensatz zu der Auswertung der Druckeffekte (Polynom zweiter Ordnung), mit einem Polynom erster Ordnung untersucht (Gleichung 4.20).

$$\delta(T) = \delta_0 + C_1 T \quad (4.20)$$

Die linearen Koeffizienten C_1 über die Sequenz des IAPP für die Kerne H^N und N sind in Abbildung 4.21 gezeigt. Dabei zeigen sich deutlich negative Temperaturkoeffizienten C_1 . Für H^N ergibt sich ein Mittelwert von $-6,0$ ppb/K mit einer Standardabweichung

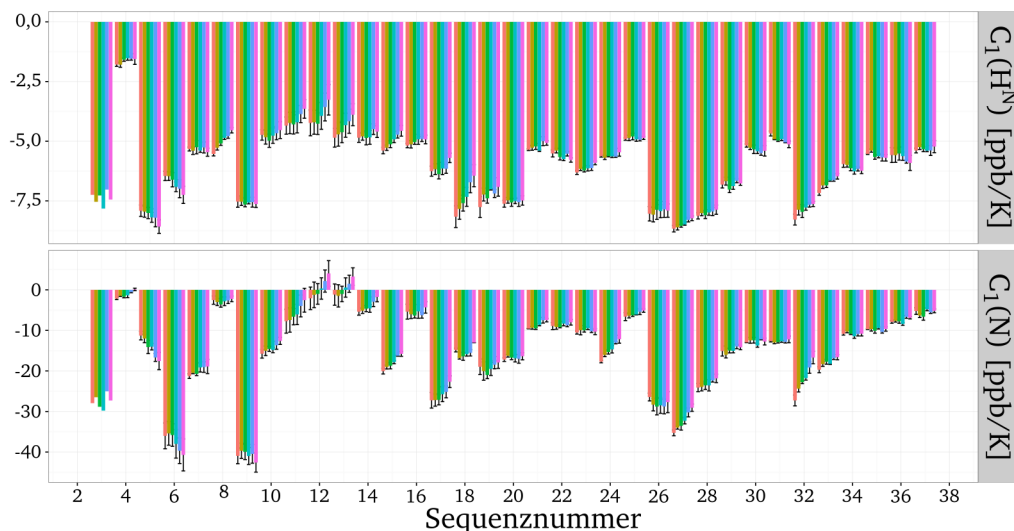


Abbildung 4.21: Temperaturkoeffizienten C_1 für die Kerne H^N und N des IAPP Die Abbildung zeigt den linearen Temperaturkoeffizienten C_1 für die Kerne H^N (oben) und N (unten) für die unterschiedlichen Drücke von 3 MPa (rot) bis 200 MPa (pink) in Schritten von 40 MPa. Für die Korrelation zwischen den beiden Kernen ergibt sich ein Pearson Korrelationskoeffizient von $r = 0,74$. Die Probe enthielt: 110 μM menschliches IAPP, 10 mM Natriumacetat-Puffer, 0,1 mM DSS, pH 5,5, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 92 %/8 %.

von 1,5 ppb/K. Bezogen auf den Mittelwert zeigen Thr4, Ala5, Thr9, Arg11 bis Ala13, Ser20, Ile26 bis Ser28 und Val32 größere Abweichung als die Standardabweichung.

Für den Amidstickstoff ergibt sich ein Mittelwert von $-14,7$ ppb/K mit einer Standardabweichung von 10,23 ppb/K. Große Abweichungen findet man für Asn3, Thr4, Thr6, Ala8, Thr9, Leu12 bis Asn14, Val14 und Ile26 bis Leu27.

Für beide Kerne auffällig sind Thr4, mit im Vergleich sehr geringer Temperaturabhängigkeit, Thr9 mit starker Temperaturabhängigkeit sowie die Bereiche Arg11 bis Val14 und Ile26 bis Ser28. Die Korrelation der Kerne H^N und N ergibt einen Pearson Korrelationskoeffizienten von $r = 0,74$.

Analog zu den Druckkoeffizienten kann davon ausgegangen werden, dass die Aminosäuren unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten aufweisen. Diese intrinsische Temperaturabhängigkeit wurde von Kjaergaard et al. (2011) für die unterschiedlichen Aminosäuren im Peptid Ac-Gly-Gly-Xxx-Gly-Gly-NH₂ bestimmt. Die in Abbildung 4.21 gezeigten Temperaturkoeffizienten wurden um diesen intrinsischen Temperatureffekt der jeweiligen Aminosäure nach Kjaergaard et al. (2011) korrigiert und sind in Abbildung 4.22 gezeigt.

Während sich für die Temperaturabhängigkeit der Stickstoffkerne keine großen Änderungen ergeben, zeigen sich für die Protonen deutliche Veränderungen. Mit einem

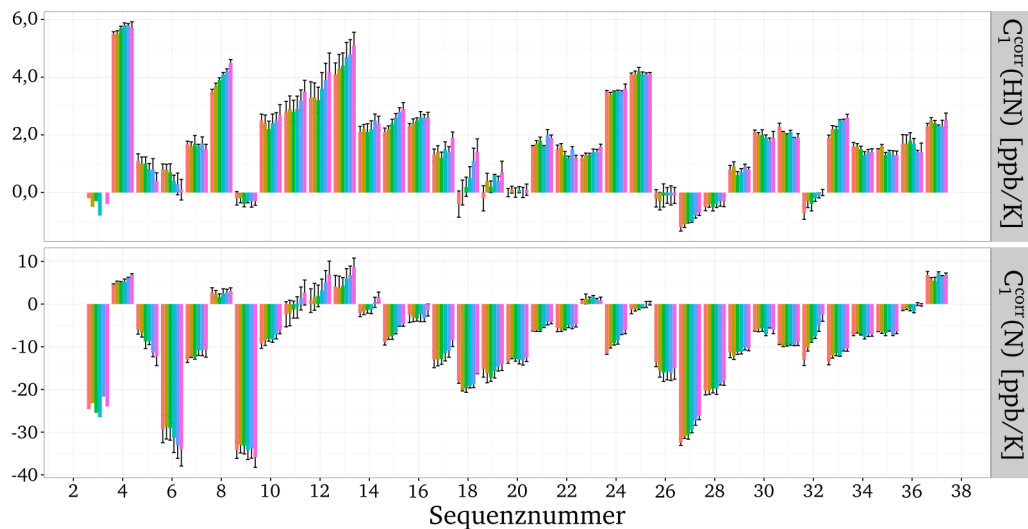


Abbildung 4.22: Korrigierte Temperaturkoeffizienten C_1^{corr} für die Kerne H^N und N des IAPP Die Abbildung zeigt die nach Kjaergaard et al. (2011) korrigierten linearen Temperaturkoeffizienten C_1^{corr} über die Sequenz des IAPP für die Drücke 3 MPa (rot) bis 200 MPa (violett) in Schritten von 40 MPa. Die Korrelation für C_1^{corr} zwischen den Kernen H^N und N ergibt einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,78$. Die Probe enthielt: 110 μM menschliches IAPP, 10 mM Natriumacetat-Puffer, 0,1 mM DSS, pH 5,5, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 92 %/8 %.

Mittelwert von 1,7 ppb/K und einer Standardabweichung von 1,6 ppb/K für H^N hat ein Großteil der Koeffizienten durch die Korrektur das Vorzeichen gewechselt. Bezogen auf den Mittelwert zeigen Asn3, Thr4, Ala8, Thr9, Leu12, Ala13, Ser20, Gly24 bis Ser28 und Val32 größere Abweichung als die Standardabweichung.

Für den Amidstickstoff ergibt sich ein Mittelwert von $-8,8$ ppb/K mit einer Standardabweichung von 10,1 ppb/K. Dabei zeigen Asn3, Thr4, Thr6, Ala8, Thr9, Leu12, Ala13, Leu27, Ser28 und Tyr37 größere Abweichungen als die Standardabweichung. Die Korrelation der Kerne H^N und N führt für die korrigierten Temperaturkoeffizienten im Vergleich zu den unkorrigierten zu einem leicht größerem Pearson Korrelationskoeffizienten von $r = 0,78$.

4.3.6 Korrelationsanalyse der Druck- und Temperaturabhängigkeit des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP)

Da für das IAPP nun die Druck- und Temperaturabhängigkeit der Amidgruppe des Peptidrückgrats bekannt ist, erfolgt an dieser Stelle eine Korrelationsanalyse zwischen den Koeffizienten. Dabei wurden jeweils die um den intrinsischen Effekt korrigierten

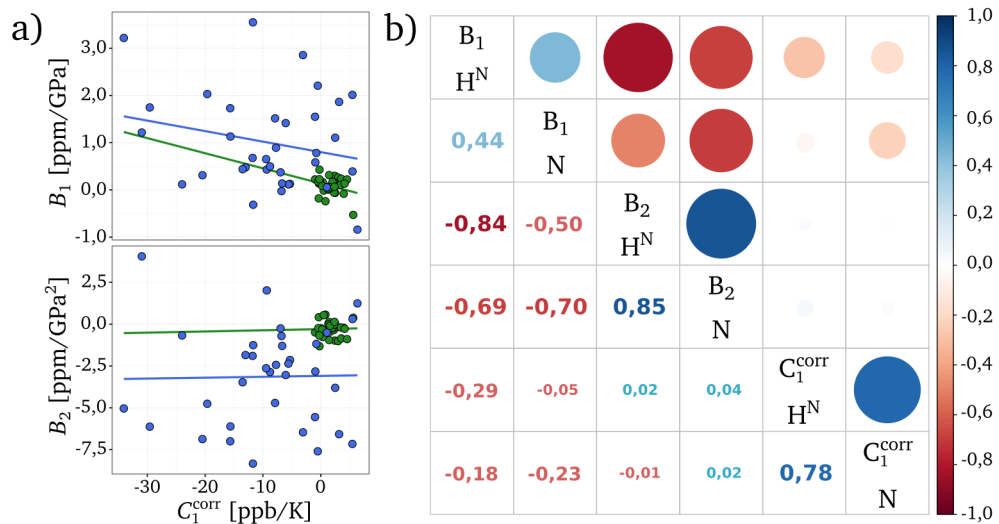


Abbildung 4.23: Korrelationen zwischen den Druck- und Temperaturkoeffizienten des IAPP Die Abbildung zeigt die Korrelationen zwischen den nach Kjaergaard et al. (2011) korrigierten Temperaturkoeffizienten C_1^{corr} und den nach Koehler et al. (2012) korrigierten Druckkoeffizienten B_1 und B_2 . Dabei zeigt Abbildung 4.23a die Korrelationen für die Kerne H^N (grün) und N (blau) zwischen den Temperaturkoeffizienten und den Druckkoeffizienten. Abbildung 4.23b zeigt die Korrelationstabelle für die unterschiedlichen Koeffizienten und Kerne.

Koeffizienten verwendet. Der Temperaturkoeffizient C_1 wurde nach Kjaergaard et al. (2011) und die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 nach Koehler et al. (2012) korrigiert.

Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 4.23 zusammengefasst. In Abbildung 4.23a) sind die Korrelationen zwischen C_1 und B_1 beziehungsweise B_2 für die Kerne H^N und N gezeigt. Dabei zeigt sich für die Stickstoffkerne in beiden Fällen eine größere Streuung der Daten. Die Korrelationen zwischen den Koeffizienten sind in Abbildung 4.23b) dargestellt. Es zeigen sich die typischen starken Korrelationen zwischen B_1 und B_2 mit $r(H^N) = -0,84$ und $r(N) = -0,70$ sowie eine starke Korrelation zwischen den nicht linearen Druckkoeffizienten der Kerne H^N und N mit $r(N) = 0,85$. Zusätzlich korreliert der lineare Druckkoeffizient B_1 des Protons mit dem nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 des Stickstoffs mit $r = -0,69$.

Die Korrelation zwischen den Kernen für die Temperaturkoeffizienten C_1 ist mit $r = 0,78$ ebenfalls stark ausgeprägt. Die Korrelation zwischen den Temperaturkoeffizienten und den linearen Druckkoeffizienten ist mit $r(H^N) = -0,29$ und $r(N) = -0,23$ eher als schwach zu bezeichnen.

Bei Betrachtung der korrigierten Temperaturkoeffizienten für die unterschiedlichen Drücke ist für viele Aminosäuren eine deutliche Abhängigkeit des Koeffizienten C_1^{corr}

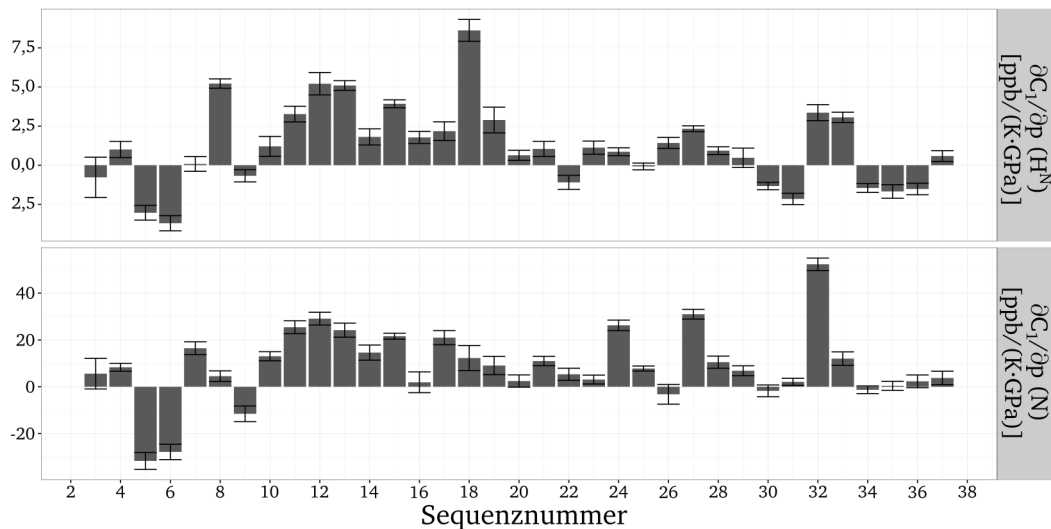


Abbildung 4.24: Druckabhängigkeit der Temperaturkoeffizienten C_1^{corr} für die Kerne H^N und N des IAPP Die Abbildung zeigt die lineare Abhängigkeit der Temperaturkoeffizienten C_1^{corr} vom Druck. Als Berechnungsgrundlage dienten die nach Kjaergaard et al. (2011) korrigierten Temperaturkoeffizienten (Abbildung 4.22).

vom Druck erkennbar (Abbildung 4.21 und 4.22). Aus diesem Grund wurde die Druckabhängigkeit des Temperaturkoeffizienten C_1^{corr} anhand eines linearen Modells untersucht.

Der Großteil der Koeffizienten ist positiv und deutet daher auf eine Erhöhung der Temperaturabhängigkeit mit dem Druck hin. Deutliche Abweichungen zeigen Ala5 und Thr6 mit einer deutlichen Abnahme der Temperaturabhängigkeit für beide Kerne mit dem Druck. Die größte Abhängigkeit vom Druck zeigt His18 für die Protonen zeigt und Val32 für den Stickstoff.

Es ergeben sich Mittelwerte von 1,16 ppb/(GPa · K) für die Amidprotonen und 8,77 ppb/(GPa · K) für den Amidstickstoff. Die Standardabweichung beträgt für die Protonen 2,59 ppb/(GPa · K) und 15,49 ppb/(GPa · K) für den Stickstoff.

Außerhalb der einfachen Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert befinden sich für die Protonen Ala5, Thr6, Ala8, Leu12, Ala13, Phe15, His18, Asn31 und Ser34 bis Thr36. Für die Stickstoffe zeigen Ala5, Thr6, Thr9, Arg11, Leu12, Gly24, Leu27 und Val32 die größten Abweichungen zum Mittelwert.

Vergleicht man nun die Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 mit der Druckabhängigkeit des Temperaturkoeffizienten C_1^{corr} über die Sequenz des IAPP, so zeigt sich jeweils eine starke negative Korrelation von $r = -0,61$ zwischen den Temperaturabhängigkeiten von B_1 zu B_2 für die Kerne H^N und N (Abbildung

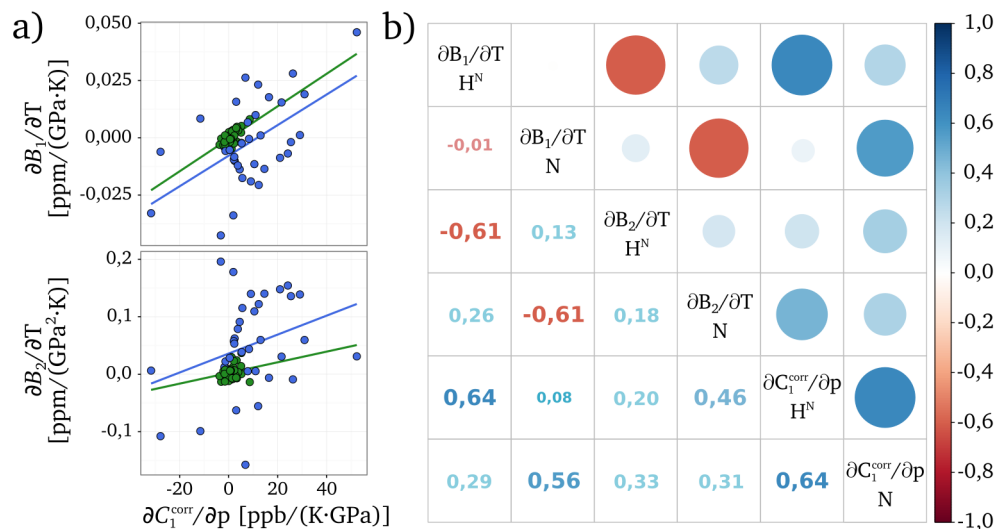


Abbildung 4.25: Korrelation zwischen der Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten und der Druckabhängigkeit der Temperaturkoeffizienten Die Abbildung zeigt die Korrelation zwischen der Druckabhängigkeit der nach Kjaergaard et al. (2011) korrigierten Temperaturkoeffizienten C_1^{corr} und der Temperaturabhängigkeit der nach Koehler et al. (2012) korrigierten Druckkoeffizienten B_1 und B_2 . Dabei zeigt Abbildung 4.23a die Korrelationen für die Kerne H^N (grün) und N (blau). Abbildung 4.23b zeigt die Korrelationstabelle für die Druck- und Temperaturabhängigkeiten der unterschiedlichen Koeffizienten und Kerne.

4.25b). Zudem zeigt sich für $\partial C_1^{corr}/\partial P$ zwischen den Kernen eine starke Korrelation von $r = 0,64$. Zwischen $\partial C_1^{corr}/\partial P$ und der Temperaturabhängigkeit des linearen Druckkoeffizienten B_1 beträgt der Korrelationskoeffizient $r = 0,64$, zwischen $\partial C_1^{corr}/\partial P$ und $\partial B_2/\partial T$ beträgt er $r = 0,56$.

Wie auch schon für die Korrelation zwischen den Koeffizienten (Abbildung 4.23), weist der Amidstickstoff für die Korrelationen zwischen der Druckabhängigkeit der Temperaturkoeffizienten $\partial C_1^{corr}/\partial P$ und den Temperaturabhängigkeiten der Druckkoeffizienten $\partial B_1/\partial T$ und $\partial B_2/\partial T$, verglichen mit den Amidprotonen, eine größere Streuung auf (Abbildung 4.25a). Ersichtlich ist zudem die nahezu identische Korrelationsgerade zwischen $\partial C_1^{corr}/\partial P$ und $\partial B_1/\partial T$ für die beiden Kerne der Amidgruppe.

4.4 Diskussion

4.4.1 Untersuchung der Druckabhängigkeit des A β (1–40)-Peptids

Die von uns in Munte et al. (2013) veröffentlichte und in Kapitel 4.3.1 behandelte Untersuchung der chemischen Verschiebungen und der Signallinien führte zu einem Nachweis verschiedener Subzustände. Diese beziehen sich auf den wichtigen Schritt der Anlagerung des monomeren Peptids an bereits vorhandene Fibrillen. Dabei konnte zwischen einem nahezu korrekt gefalteten A β -Monomer (Zustand 1), einem partiell gefalteten Monomer (Zustand 2') und einem nicht gefalteten Monomer (Zustand 2'') unterschieden werden. Die Analyse erlaubte die Bestimmung der thermodynamischen Parameter für einige der möglichen Übergänge bei unterschiedlichen Temperaturen (Tabelle 4.2). Aus den thermodynamischen Parametern konnte der druckabhängige Verlauf der unterschiedlichen Populationen der Zustände abgeleitet werden (Abbildung 4.8). Dabei befindet sich für niedrige Drücke ein Hauptteil der Monomere in Zustand 1, bei mittleren Drücken dominiert Zustand 2' und für große Drücke liegt ein Großteil der Monomere in Zustand 2'' vor.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 , welche über einen polynominalen Fit zweiter Ordnung der chemischen Verschiebung über den Druck erhalten wurden, für unterschiedliche Bereiche in der Sequenz ein deutliches Muster zeigen. Diese Bereiche schwacher beziehungsweise starker Druckabhängigkeit zeigen eine gute Übereinstimmung mit den von Danielsson et al. (2006) vorgeschlagenen Strukturelementen über die Sequenz von A β (1–40) (Abbildung 4.7). Dabei zeigen Schleifenregionen kleiner Druckeffekte und Regionen mit gestrecktem β -Strang größere Druckeffekte.

Die Untersuchung der druckinduzierten Depolymerisierung (Kapitel 4.3.3) ist ein weiteres Anwendungsgebiet der Hochdruck-NMR-Spektroskopie, da der Polymerisierungsgrad des A β (1–40) mit dem Druck beeinflusst werden kann. Dabei zeigt sich, dass bei 200 MPa bis zu 70 % der eingesetzten Peptidkonzentration als monomeres A β vorliegen, während bei Normaldruck ($P = 0,1$ MPa), je nach Temperatur, nur ca. 1 % bis 8 % in monomerer Form vorliegen (Tabelle 4.4).

Um die Peptidkonzentration als Monomereinheit in Abhängigkeit vom Druck zu beschreiben, wurde ein einfaches Modell nach Oosawa und Kasai (1962) und Oosawa (1970) abgeleitet (Gleichung 4.19). Dabei wurde die Bindungskonstante zwischen Monomer und Polymer als Konstante und unabhängig von der Länge des Polymers angesehen. Dieses Modell kann auf unterschiedliche Arten angewendet werden, einmal

unter Berücksichtigung der Kompressibilitätsänderung $\Delta\beta'^0 \neq 0$, mit festgesetzter Peptidkonzentration c_T (Modell $\Delta\beta$) und ohne Berücksichtigung von $\Delta\beta'^0$ mit der eingesetzten Peptidkonzentration c_T als freiem Fitparameter (Modell c_T). Der freie Fitparameter c_T ermöglicht dabei Untersuchungen an Proben, bei denen die Peptidkonzentration nicht exakt bekannt ist oder sich durch nicht mehr deaggregierbare Fibrillen oder ausgefallenes Peptid verändert hat. Dies kann vor allem bei zeitintensiven Messreihen oder älteren Proben von Bedeutung sein. Die Daten lassen sich mit beiden Modellen gut beschreiben und geben Aufschluss über die thermodynamischen Größen der Polymerisierung beziehungsweise Depolymerisierung. Dabei erfolgten Untersuchungen der druckinduzierten Depolymerisierung in Abhängigkeit der Temperatur und der eingesetzten Peptidkonzentration.

Die erhaltenen thermodynamischen Größen für die Differenz der freien Gibbs-Energie ΔG^0 , Volumenänderung ΔV^0 und Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta'^0$ für die unterschiedlichen Modelle sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Die Größenordnung der erhaltenen Änderung der freien Gibbs-Energie ist vergleichbar mit dem in Kusumoto et al. (1998) über dynamische Lichtstreuung (DLS) erhaltenen Wert von $\Delta G^0 \approx 21$ kJ/mol für A β bei einer Temperatur von 300 K und einer Peptidkonzentration von 250 μ M.

Die druckinduzierte Depolymerisierung in Abhängigkeit der Temperatur zeigt größere Mengen an freiem A β , je geringer die Temperatur ist. Der Anteil an freiem Peptid bei 200 MPa nimmt von 70 % bei 283 K auf ca. 40 % bei 303 K ab. Für die Annahme einer Bindungskonstante für die Anlagerung des Peptids an vorhandene Fibrillen, sollte eine Temperaturerhöhung zu einem größerem Anteil an freiem A β führen. Dies deutet darauf hin, dass bei höheren Temperaturen mehr beziehungsweise schneller größere Aggregate gebildet werden können, die keine Reversibilität durch Erhöhung des Drucks zeigen und damit die effektive maximale Monomerkonzentration herabsetzen.

Für die Temperaturabhängigkeit ergeben sich für die Änderung der freien Gibbs-Energie für beide Modelle vergleichbare Werte, die von ca. 22 kJ/mol bei 283 K auf ca. 31 kJ/mol bei 303 K ansteigen. Für die Abhängigkeit der eingesetzten Peptidkonzentration bei 293 K ergeben sich ca. 26,5 kJ/mol für 750 μ M und ca. 24 kJ/mol für 375 μ M und 75 μ M, wobei das Modell für eine Konzentration unter der angenommenen kritischen Micellbildungskonzentration (CMC) für A β von 100 μ M (Kusumoto et al., 1998) keine Gültigkeit besitzt.

Die Volumenänderung ΔV^0 nimmt mit der Temperatur von ca. -97 mL/mol (283 K) auf -148 mL/mol (Modell $\Delta\beta$) beziehungsweise -110 mL/mol (Modell Δc_T) bei 303 K

zu. Hier zeigen sich Unterschiede zwischen den Modellen, was zu unterschiedlichen Dissoziationskonstanten K_D bei höheren Drücken führt (Tabelle 4.4), wobei hier auch die Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta^0$ für das Modell $\Delta\beta$ eine Rolle spielt.

Ein qualitativer Unterschied für die Beschreibung der Daten kann zwischen den Modellen nicht festgestellt werden. Das Modell $\Delta\beta$ berücksichtigt die Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta^0$, setzt jedoch die möglichst genaue Kenntnis der eingesetzten Peptidkonzentration voraus. Mit der Zeit bilden sich jedoch Aggregate, welche keine Reversibilität aufweisen und die maximal zugängliche Monomerkonzentration herabsetzen können. Das Modell $\Delta\beta$ sollte angewendet werden, wenn es sich um frisch hergestellte Proben beziehungsweise um Proben mit bekannter Peptidkonzentration handelt.

Für ältere Proben, bei denen die Peptidkonzentration nicht bekannt ist, eignet sich die Anwendung von Modell c_T , da hier das Anpassen der Daten ohne Kenntnis der exakt eingesetzten Peptidkonzentration erfolgen kann. Zudem kann bei älteren Proben die Peptidkonzentration durch nicht mehr deaggregierbare Polymere herabgesetzt werden. Jedoch wird in diesem Modell die Änderung des Kompressibilitätsfaktors vernachlässigt, da die Verwendung von $\Delta\beta^0$ als zusätzlichem Fitparameter zu einer Überparametrisierung führen würde.

Beide Modelle liefern im Rahmen der Fehlertoleranz vergleichbare Werte für die Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG^0 , die somit mit beiden Modellen gut bestimmt werden kann. Sensitiver reagiert die partielle molare Volumenänderung ΔV^0 auf die unterschiedlichen Modelle, da hier der angefittete Kurvenverlauf für hohe Drücke in der Nähe des Sättigungsbereiches der Kurve einen stärkeren Einfluss ausübt.

4.4.2 Druck- und Temperaturabhängigkeit des IAPP

Betrachtet man die Intensitäten am Signalmaximums des hIAPP für die verschiedenen Temperaturen und Drücke (Abbildung 4.13), so zeigt sich für die Temperaturen 278 K und 288 K ein konstantes Verhalten der Intensitäten über den Druck, während man für die Temperaturen 298 K und 308 K eine Abnahme der Intensitäten feststellt. Die Aggregation wird durch höhere Temperaturen begünstigt und kann womöglich bei 298 K und 308 K vom Druck nicht mehr kompensiert werden. Darauf deuten auch die Reversibilitätsmessungen hin, bei denen die Verminderung des Drucks nach der Druckreihe auf 3 MPa nicht zu einer Erholung der Signalintensitäten führte.

Vergleicht man das Verhalten der Signalintensitäten des IAPP mit der druckinduzierten Depolymerisierung des Amyloid- β (Kapitel 4.3.3), so scheint das IAPP im

Temperaturbereich von 278 K bis 288 K im Gegensatz zum Amyloid- β vollständig in der monomeren Form vorzuliegen, da weder mit Druck noch mit der Zeit größere Änderungen der Signalintensitäten auftraten.

Bei Betrachtung der Druckabhängigkeit des IAPP fallen vor allem die Aminosäuren Phe15 und Phe23 auf, die nahezu unabhängig von der Temperatur, keine Druckeffekte aufweisen. Da die Druckantwort um intrinsische random coil Effekte korrigiert wurde, verhalten sich die beiden Phenylalanine wie in dem random coil Peptid Ac-Gly-Gly-Phe-Gly-NH₂. Eine bessere Einordnung der Effekte lässt sich bei Betrachtung von Punktmutationen am IAPP erreichen (Cao et al., 2012, 2013). Es wurde gezeigt, dass einzelne Mutationen die Aggregation von IAPP abschwächen, verstärken oder komplett verhindern können. Die Mutationen, welche eine Aggregation verhindern liegen nach Cao et al. (2013) in den Sequenzbereichen 12-17, 21 und 24-28. Bis auf die Aminosäuren Phe15 und Asn21 zeigt sich in diesen Bereichen eine erhöhte Drucksensitivität. Eine Verstärkung der Aggregation findet man für Punktmutationen an den Stellen Phe15, Val17 und Ser20 (Cao et al., 2013). Dabei zeigt Phe15 nahezu keinerlei Druckabhängigkeit, Ser20 einen mittleren und Val17 einen starken Druckeffekt. Eine Verringerung der Amyloidbildung findet man für die Aminosäuren Ala13, Phe15, Ser20, Phe23, Ala25, Asn31, Asn35 und Tyr37 (Cao et al., 2013). Diese liegen hauptsächlich am Ende der Peptidsequenz. Betrachtet man die Druckabhängigkeit dieser Residuen, so zeigt sich für die Phenylalanine nahezu kein Druckeffekt, mittlere Druckeffekte für Ser20, Ala25 und Asn31, während der überwiegende Teil gegen Ende der Sequenz nur kleine Druckeffekte aufweist.

Interessanterweise führten Punktmutationen an den Aminosäuren Phe15 und Ser20 je nach Mutation zu einer Verstärkung beziehungsweise Abschwächung der Aggregation (Tu und Raleigh, 2013; Wiltzius et al., 2009). Einen besonders starken Einfluss auf die Aggregation zeigen nach Tu und Raleigh (2013) die aromatischen Aminosäuren Phe15, Phe23 und Tyr37. Dabei zeigt die Mutation F15L im Vergleich zum Wildtyp eine doppelt so starke Aggregation, während die Mutation F23L die Aggregation um die Hälfte und Y37L um zwei Drittel reduziert. Für die Position Phe15 wurde außerdem gezeigt, dass ein Austausch zu Leucin, Norleucin, Isoleucin und tert-Leucin eine Korrelation der Aggregation zur α -helikalen Propensität aufweist. Dieses Verhalten stimmt mit den Beobachtungen anderer Gruppen überein, wonach der Beginn der Aggregation durch Ausbildung einer helikalen Struktur im Sequenzbereich der Aminosäuren 8-22 gekennzeichnet ist (Wiltzius et al., 2009; Abedini und Raleigh, 2009; Williamson et al., 2009). Ähnliche Studien für das Amyloid- β zeigen an den Positionen 19 und 20 ein vom

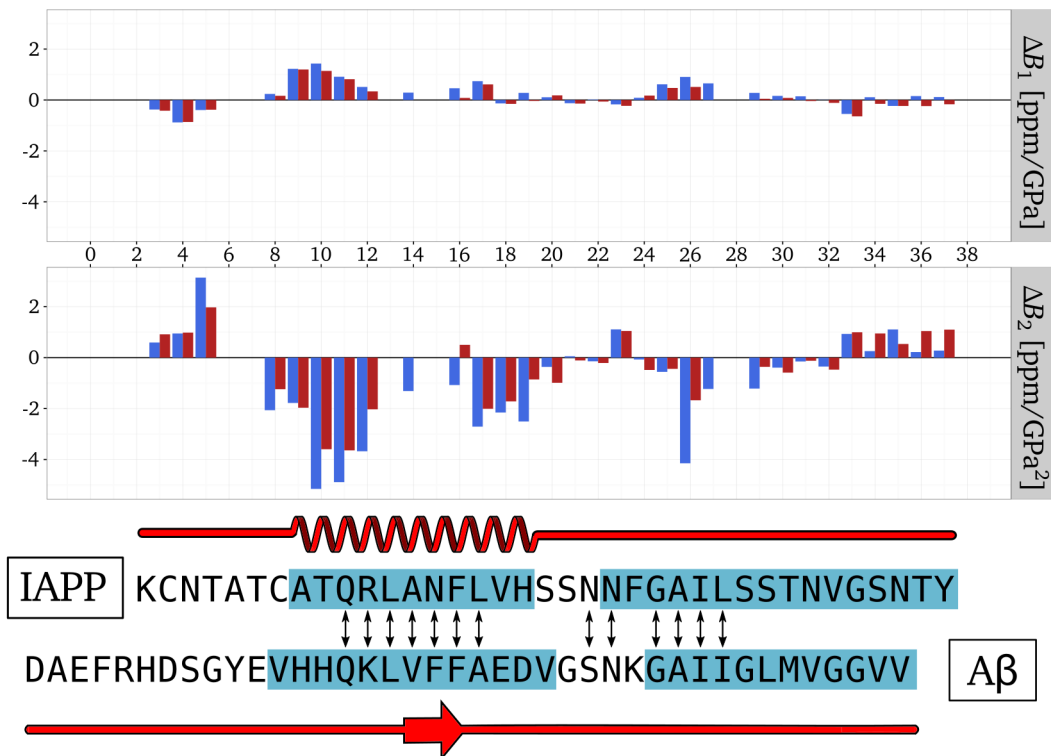


Abbildung 4.26: Differenz der Druckkoeffizienten zwischen dem IAPP und dem A β (1–40)-Peptid Die Abbildung zeigt die Differenz der aus den nach Schumann et al. (2007) kombinierten chemischen Verschiebung der Amidgruppe erhaltenen Druckkoeffizienten für das IAPP und A β (1–40) bei den Temperaturen 278 K (blau) und 288 K (rot). Der untere Teil der Abbildung zeigt den Vergleich der Sequenzen für IAPP und A β . Die obere rote Linie zeigt den von Williamson und Miranker (2007) vorgeschlagenen Bereich der α -Helix. Die untere rote Linie kennzeichnet den von Munte et al. (2013) vorgeschlagenen Bereich für eine β -Faltblattstruktur. Die blau hinterlegten Bereiche der Sequenz kennzeichnen Regionen, die nach Andreetto et al. (2010) für die Selbstassoziation des jeweiligen Peptids verantwortlich sind.

IAPP unterschiedliches Verhalten. Hier führen Substitutionen, welche die Propensität für β -Faltblätter erhöhen zu einer erhöhten Aggregation und eine Erniedrigung der Propensität führt zu einer verminderten Aggregation (Armstrong et al., 2011).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Amyloid- β mit IAPP zeigt zwei homologe Bereiche für Gln10-Leu16 und Asn21-Leu27 im IAPP und Gln15-Ala21 und Ser26-Ile32 im Amyloid- β (Abbildung 4.26). Dabei zeigen die blau hinterlegten Bereiche für die Selbstassoziation relevante Regionen in der Peptidsequenz (Andreetto et al., 2010). Insbesondere die homologen Regionen weisen für die von uns in Munte et al. (2013) gezeigten Druckeffekte deutliche Abweichungen zu den Druckeffekten des IAPP auf. Dies kann mit den strukturellen Gegebenheiten der beiden Peptide erklärt

werden. Für das Amyloid- β weisen die chemischen Verschiebungen, bei Betrachtung des Chemischen Verschiebungs- Index (CSI), für den Sequenzbereich Val18-Phe19-Phe20 auf die Ausbildung einer β -Faltblattstruktur hin (Munte et al., 2013), während der homologe Bereich im IAPP nach Williamson und Miranker (2007) eine α -helikale Struktur aufweist.

Die großen Unterschiede der Druckkoeffizienten zwischen dem Amyloid- β und IAPP sind vor allem zu Beginn der Sequenz ausgeprägt und deuten auf ein unterschiedliches strukturelles Ensemble hin. Unterstützt wird dies durch die von Williamson und Miranker (2007) gefundenen, für eine α -helikale Struktur typischen chemischen Verschiebungen der H^α , C^α , C' , H^N und C^β -Kerne für den Sequenzbereich von Ala8 bis Ser19. Ähnliche Beobachtungen zeigen Untersuchungen der Ionen-Mobilitäts-Spektrometrie mit gekoppeltem Massenspektrometer sowie Molekulardynamik-Simulationen (MD), die unterschiedliche Möglichkeiten der Dimerisierung über β -Schleifen beziehungsweise α -helikale Motive zeigen (Dupuis et al., 2009, 2011).

Da die Druckeffekte der chemischen Verschiebung bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen wurden, konnte der Einfluss der Temperatur auf die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 untersucht werden (Abbildung 4.20). Die Druckkoeffizienten wurden aus der Druckabhängigkeit der kombinierten chemischen Verschiebung (Summe der nach Schumann et al. (2007) gewichteten chemischen Verschiebungen der Kerne) ermittelt. Es zeigte sich, dass der nicht lineare Druckkoeffizient B_2 , mit einer gemittelten Temperaturabhängigkeit von $0,02 \text{ ppm}/(\text{GPa}^2 \cdot \text{K})$ eine deutlich stärkere Temperaturabhängigkeit zeigt als der lineare Druckkoeffizient B_1 mit einer gemittelten Temperaturabhängigkeit von $3 \cdot 10^{-5} \text{ ppm}/(\text{GPa} \cdot \text{K})$.

Dabei zeigt sich für B_1 eine starke Temperaturabhängigkeit für die Aminosäuren Val32 und Gly33. Bei der Temperaturabhängigkeit von B_2 fällt vor allem die Sequenz von Gln10 bis Asn14 auf. Diese Bereiche zeigen auch bei der Druckabhängigkeit Auffälligkeiten. So findet sich für B_1 nach Val32 ein starker Abfall der Druckabhängigkeit (Abbildung 4.19) und der Bereich Gln10 bis Asn14 zeigt für B_2 starke Druckeffekte (Abbildung 4.18). Im Rahmen der Messgenauigkeit zeigten sich Bereiche, in denen die Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten Ähnlichkeiten mit der Stärke des Druckeffekts aufweisen.

Des Weiteren wurde die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Amidgruppenkerne des Peptidrückgrats von IAPP untersucht. Dabei wurden die intrinsischen Temperatureffekte der jeweiligen Aminosäure nach Kjaergaard et al. (2011) korrigiert. Dabei änderte sich der gemittelte Temperaturkoeffizient für die Amidproto-

nen von -6 ppb/K (ohne Korrektur) auf $1,7$ ppb/K (mit Korrektur). Für die Stickstoffkerne ergab sich eine Änderung von $-14,7$ ppb/K (ohne Korrektur) auf $-8,8$ ppb/K. In beiden Fällen zeigte sich für die Stickstoffkerne eine deutlich höhere Temperaturabhängigkeit. Nach der Korrektur findet man für einige Aminosäuren verschwindende Temperaturkoeffizienten. So zeigen zum Beispiel Asn3, Thr9, Ser20, Ile26 und Val32 nahezu keine Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von der Temperatur. Es wurde von Baxter und Williamson (1997) gezeigt, dass langsam austauschende Amidprotonen mit einem Temperaturkoeffizienten $> -4,5$ ppb/K an einer Wasserstoffbrücke beteiligt sind, während Temperaturkoeffizienten $< -4,5$ ppb/K für keine Beteiligung an einer Wasserstoffbrücke sprechen. Dies bezieht sich jedoch auf Temperaturkoeffizienten, welche nicht um den intrinsische Temperatureffekt der jeweiligen Aminosäuren korrigiert wurden. Betrachtet man die nicht korrigierten Temperaturkoeffizienten (Abbildung 4.21), so zeigt einzig Thr4 einen Temperaturkoeffizienten, der auf eine Beteiligung an einer Wasserstoffbrücke hinweist.

Analog zu der Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten wurde die Druckabhängigkeit der Temperaturkoeffizienten untersucht. Hier fallen wie schon zuvor für die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung und der Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten beschriebene Bereiche auf. Diese scheinen für die Druckabhängigkeit des Temperaturkoeffizienten auch zwischen den Kernen übereinzustimmen. Dabei fallen vor allem die Aminosäuren Ala5 und Thr6 mit deutlich negativem $\partial C_1/\partial P$, der Bereich von Gln10 bis Phe15 und die Aminosäuren Val32 und Gly33 mit deutlich positivem $\partial C_1/\partial P$ auf (Abbildung 4.24).

Da die bereits beschriebenen Koeffizienten und deren Druck- und Temperaturabhängigkeit in Abhängigkeit der Sequenz ähnliche Muster aufweisen, wurden Korrelationen zwischen diesen ermittelt. Starke Pearson Korrelationskoeffizienten zeigten sich zwischen den Druckkoeffizienten B_1 und B_2 mit $-0,84$ (H^N) und $-0,7$ (N) aber auch zwischen den Kernen H^N und N mit $0,85$ (B_2) und $0,78$ (C_1^{corr}) sowie zwischen unterschiedlichen Kernen und Druckkoeffizienten mit $r(B_2(N)-B_1(H^N)) = -0,69$.

Betrachtet man die Korrelationen der Druck- und Temperaturabhängigkeiten der Koeffizienten, so zeigten sich starke Korrelationen zwischen den Temperaturabhängigkeiten der Druckkoeffizienten $\partial B_1/\partial T$ und $\partial B_2/\partial T$ von $-0,61$ (H^N) und $-0,61$ (N). Zwischen den Kernen H^N und N ergaben sich starke Korrelation für die Druckabhängigkeit des Temperaturkoeffizienten $\partial C_1/\partial P$ mit $r = 0,64$. Zwischen den Abhängigkeiten der linearen Koeffizienten $r(\partial B_1/\partial T - \partial C_1/\partial P)$ ergaben sich Korrelationen von $0,64$ (H^N) und $0,56$ (N).

Ein Ziel weiterer Arbeiten stellt die Verknüpfung der unterschiedlichen Abhängigkeiten von Druck und Temperatur mit strukturellen und dynamischen Eigenschaften des untersuchten Peptids/Proteins dar.

5 Untersuchung der Druckeffekte am Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂

Die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse sind Teil eines mit Joerg Koehler (Universität Regensburg) gemeinschaftlich durchgeführten Projekts zur Analyse der Druckantwort der Modellpeptide Ac-GGXA-NH₂, wobei X für eine der 20 kanonischen Aminosäuren steht. Diese stellen ein Modellsystem zur Bestimmung der Druckabhängigkeit von weitgehend unstrukturierten Peptidsequenzen dar. Die erhaltenen Druckkorrekturen können auf komplexere Systeme übertragen werden und dienen der Korrektur des intrinsischen Druckeffekts der jeweiligen Aminosäure.

Der Hauptteil dieses Kapitels beschäftigt sich mit Druckeffekten der chemischen Verschiebung der isotoopenmarkierten Kohlenstoffkerne an der Position X im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂. Hierbei werden die Druckeffekte des Peptidrückgrats (Kapitel 5.3.2) und der Seitenketten (Kapitel 5.3.3) getrennt behandelt. Die Ergebnisse der Druckabhängigkeit der Kohlenstoffkerne des Peptidrückgrats wurden bereits in Beck Erlach et al. (2016b) veröffentlicht.

Im Zuge der Analyse der Druckantwort der Modellpeptide erhält man zudem einen kompletten Datensatz der chemischen Verschiebungen bei Normaldruck ($P_0 = 0,1$ MPa), der in Kapitel 5.3.1 beschrieben wird und mit bereits veröffentlichten Datensätzen verglichen wird.

Für das Modellpeptid Ac-GGFA-NH₂ wurde die Messung der Druckantwort um zusätzliche Temperaturen erweitert, um den Einfluss der Temperatur auf die Druckantwort und auch die Temperatureffekte auf die chemische Verschiebung zu untersuchen (Kapitel 5.3.4).

Abschließend wurde der Einfluss des Drucks auf die chemische Verschiebung der terminalen Schutzgruppen -CH₃ und -NH₂ des Modellpeptidsystems Ac-GGXA-NH₂ untersucht (Kapitel 5.3.5).

5.1 Einleitung

Die Bestimmung der chemischen Verschiebung ist in der NMR eine der elementarsten Möglichkeiten Informationen über ein System zu erhalten. Dies trifft vor allem für biologische Systeme zu, die überwiegend aus sich wiederholenden Einheiten aufgebaut sind. Ein fundamentales Paradigma der Biologie ist der Zusammenhang der Sequenz über die Struktur zur Funktion. Daher ist es nicht verwunderlich, dass bereits sehr früh damit begonnen wurde Aminosäuren NMR-spektroskopisch in Bezug auf ihre Sekundärstruktur beziehungsweise auf das Fehlen jener zu untersuchen (Bovey et al., 1959). Daraufhin wurden die Untersuchungen systematisch erweitert und an unterschiedlichen Peptiden durchgeführt (Markley et al., 1967; Nakamura und Jardetzky, 1968). Diese Untersuchungen zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der chemischen Verschiebung und der Sekundärstruktur, sowie die Notwendigkeit bei komplexen NMR-Analysen von Proteinen die Effekte der Sequenz und der Sekundärstruktur unterscheiden zu können.

Mit der Einführung der Fourier-Transformation (Ernst und Anderson, 1966) war es möglich die Protonenspektroskopie durch die Analyse seltener vorkommender Kerne, wie zum Beispiel ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P zu ergänzen. Dies führte zu einer Reihe an Untersuchungen an freien Aminosäuren mit Hilfe der ^{13}C -Spektroskopie (Horsley und Sternlicht, 1968; Horsley et al., 1969, 1970). Zudem konnte an cyclischen Pentapeptiden gezeigt werden, dass auch die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffkerne mit der Konformation korreliert (Wüthrich et al., 1972).

Ladungseffekte der Endgruppen der freien Aminosäuren haben einen Einfluss auf die chemische Verschiebung und führten daher zu Polypeptiden als neuem Modellsystem, welches typischerweise aus 4 bis 5 Aminosäuren besteht. Einen ersten vollständigen Datensatz von ^{13}C -chemischen Verschiebungen an einem geschützten Tetrapeptid (TFA-GGXA-OCH₃) zeigten Grathwohl und Wüthrich (1974). Als Lösungsmittel wurde hierbei DMSO-d₆ und für einige Aminosäuren D₂O verwendet.

Ein vergleichbarer Datensatz in D₂O und ohne endständige Schutzgruppen (H-GGXA-OH) wurde von Richarz und Wuethrich (1978) gezeigt. Ein Vergleich der Datensätze mit und ohne endständige Schutzgruppen zeigte für die meisten Aminosäuren eine Abweichung kleiner als 0,3 ppm, wobei Glutamat und Histidin größere Abweichungen zeigten. Des Weiteren zeigten Richarz und Wuethrich (1978) einen Vergleich mit chemischen Verschiebungen, die mittels Korrekturtermen (Christl und Roberts, 1972) aus freien Aminosäuren beziehungsweise Peptiden unterschiedlicher Sequenznachbarn

erhalten wurden. Diese zeigen eine grobe Übereinstimmung von ± 1 ppm für den Carbonylkohlenstoff sowie C^α , jedoch geringere Übereinstimmung für die Kohlenstoffe der Seitenketten.

Ein weiterer Datensatz, dessen Fokus auf Beeinflussung der chemischen Verschiebung durch unterschiedlich große Beimischungen an Acetonitril beziehungsweise TFE in D_2O liegt, zeigte Thanabal et al. (1994). Dies geschah nachdem durch Wishart et al. (1991) und Spera und Bax (1991) die Wichtigkeit der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffkerne für die strukturelle Proteinanalyse systematisch herausgestellt wurde. Dies zeigte sich auch an der Entwicklung des Chemischen Verschiebungs-Index (CSI), der anhand des Vergleichs der chemischen Verschiebungen der H^α -Kerne aus Proteindaten mit den random coil Werten eine Aussage zur Sekundärstruktur erlaubt (Wishart et al., 1992). Dieser wurde dann auf die chemischen Verschiebungen der Kerne C' , C^α und C^β erweitert (Wishart und Sykes, 1994).

Im Zuge dieser Entwicklung wurde der zu diesem Zeitpunkt vollständigste Datensatz für chemische Verschiebungen des Strukturtyps random coil veröffentlicht, der alle Kerne der Aminosäure X im Hexapeptid Ac-GGXAGG-NH₂, sowie Nachbarschaftseffekte durch zusätzliche Messungen des Hexapeptids Ac-GGXPPG-NH₂ beinhaltet (Wishart et al., 1995).

Der Datensatz von Schwarzinger et al. (2000) zeigte die chemischen Verschiebungen des Peptidrückgrats (N, H^N , C' , C^α , H^α) und zusätzlich C^β und H^β für niedrige pH-Werte und hohen Konzentrationen von Urea. Dies sollte die Bedingungen der Proteindenaturierung widerspiegeln.

Einen wichtigen Einfluss auf die chemische Verschiebung hat die Temperatur und der pH-Wert. Um die Temperatur und pH-Effekte herausrechnen zu können, wurden durch Kjaergaard et al. (2011) random coil Werte für die Kerne des Peptidrückgrats, sowie der β -Position mit Korrekturtermen für die Temperatur, pH und Nachbarschaftseffekte vorgestellt. Dies wurde zuerst am Pentapeptid Ac-GGXGG-NH₂ (Kjaergaard et al., 2011) gezeigt, später jedoch zusätzlich am Pentapeptid Ac-QQXQQ-NH₂ (Kjaergaard und Poulsen, 011a), da Glycin sich im Ramachandran Plot bezogen auf seine konformationelle Freiheit ungewöhnlich verhält und daher nicht als repräsentative Aminosäure als Nachbar zur untersuchenden Aminosäure X angesehen werden sollte (Ting et al., 2010). Eine weitere detaillierte Untersuchung der pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebungen von random coil Peptiden (Ac-GXG-NH₂) zeigte Platzter et al. (2014).

Parallel zur Bestimmung der random coil chemischen Verschiebungen auf Grundlage von experimentellen Daten, entwickelte sich mit zunehmend vorhandenen NMR-

Publikation	Typ	T [K]	pH	Probe
Richarz, 1978	a	308	-	0,1 M H-GGXA-OH in D ₂ O
Thanabal, 1994	a	298	2,0-3,5	15 mg/400 µL TFA-GGXGG-OCH ₃ D ₂ O
Wishart, 1995	a	298	5,0	20 mM Ac-GGXAGG-NH ₂ ¹ H: D ₂ O, 1 M Urea ¹⁵ N: H ₂ O, 5 % D ₂ O (v/v), 1 M Urea
Schwarzinger, 2000	a	293	2,4	20 mM Ac-GGXGG-NH ₂ H ₂ O, 10 % D ₂ O (v/v), 8 M Urea
Wang, 2002	b	-	-	PSSI
Zhang, 2003	b	-	-	RefDB
DeSimone, 2009	b	-	-	loop Regionen
Tamiola, 2010	b	-	-	IDP
Kjaergaard, 2011	a	278-318	6,5	2-3 mg/500 µL Ac-GGXGG-NH ₂ H ₂ O, 5 % D ₂ O (v/v), 1 M Urea
Kjaergaard und Poulsen 2011	a	278	6,5	2-3 mg/500 µL Ac-QQXQQ-NH ₂ H ₂ O, 5 % D ₂ O (v/v), 1 M Urea
Beck Erlach, 2016	a	283	6,7	20 mM Ac-GGXA-NH ₂ H ₂ O, 10 % D ₂ O (v/v)

Tabelle 5.1: Übersicht von ¹³C random coil Datensätzen Dargestellt sind experimentell bestimmte Datensätze (Typ a) und Datensätze, die auf der Berechnung aus Datenbanken beruhen (Typ b). Bei den experimentellen Datensätzen sind die verwendeten Temperaturen sowie der pH Wert und die Probenzusammensetzung (Lösungsmittel, verwendetes Peptid und eventuelle Zusätze) angegeben. Die aus Datenbanken errechneten Datensätze führen unter der Spalte Probe das Charakteristikum dieser Auswertung: PSSI *Probability based Secondary Structure Identification*, RefDB *Re-referenced Protein Chemical shift Database*, IDP *Intrinsically Disordered Proteins*

Proteindaten die Bestimmung über computergestützte Analysen anhand unterschiedlicher Verteilungsfunktionen.

Eine erste Überprüfung erfolgte durch Groß und Kalbitzer (1988) für die ¹H-Kerne der bis dahin veröffentlichten Proteindaten, wobei Proteine mit paramagnetischen Zentren und in Wasser unlösliche Protein ausgeschlossen wurden.

Eine Weiterentwicklung stellt der durch *Probability based Secondary Structure Identification* (PSSI) erhaltene Datensatz für die Kerne des Peptidrückgrats sowie der β -Position dar (Wang und Jardetzky, 2002). Dabei wird die Sekundärstruktur den einzelnen Aminosäuren auf Basis einer multivariaten Verteilung aus den chemischen Verschiebungen der H^N, N, H ^{α} , C ^{α} , C ^{β} und C' Kerne zugewiesen. Einen Datensatz basierend auf der Referenz-korrigierten RefDB Datenbank zeigte Zhang et al. (2003). Einen nur auf den loop-Regionen der Proteine basierenden Datensatz zeigte De Simone et al.

(2009), wohingegen Tamiola et al. (2010) einen auf *intrinsically disordered proteins* (IDP) basierenden Datensatz vorstellte.

Einen Überblick der Datensätze der chemischen Verschiebung der random coil Werte der Kohlenstoffkerne mit relevanten Parametern zeigt Tabelle 5.1.

5.2 Materialien und Methoden

5.2.1 Synthese der Peptide

Die für die Synthese benötigten ^{13}C und ^{15}N -isotopenmarkierten Aminosäuren, sowie die N-terminale Schutzgruppe Fmoc (9H-Fluoren-9-ylmethylcarbonochloridat) wurden von *Sigma Aldrich* (St. Louis, MO, USA) bezogen. Alle übrigen benötigten Chemikalien wurden bei der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) erworben.

Die Synthese wurde von Dr. Edson Crusca Jr. (Physikalisches Institut von Sao Carlos, Universität Sao Paulo, Brasilien) durchgeführt. Das Tetrapeptid wurde mit Hilfe der Merrifield-Synthese (Festphasensynthese) hergestellt, wobei an dritter Position eine der 20 kanonischen Aminosäuren in isotopenmarkierter Form (^{13}C , ^{15}N) eingesetzt wurde.

Die Kopplung wurde durch Einsatz von drei Äquivalenten HBTU ((1H-Benzotriazol-1-yloxy)(dimethylamino)-N,N-dimethylmethaniminiumhexafluorophosphat) und zwei Äquivalenten DIEA (N-Ethyl-N-isopropyl-2-propanamin) für jedes Äquivalent Fmoc geschützter Aminosäure durchgeführt. Nach jedem Kopplungsschritt wurden ungekoppelte Aminosäuren mit 10 % Essigsäureanhydrid in DMF (N,N-Dimethylformamid)

X3	Schutzgruppe		X3	Schutzgruppe	
N			S		
Q	Trt	Triphenylmethyl	T	tBu	tert-Butyl
H			Y		
K	Boc	tert-Butyloxycarbonyl	D	OtBu	tert-Butylester
W			E		
R	Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonylchlorid			

Tabelle 5.2: Schutzgruppen der Seitenketten der Aminosäure X3 im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ Aufgeführt sind die bei der Synthese der Modellpeptide Ac-GGXA-NH₂ verwendeten Schutzgruppen, die zur Blockierung der Seitengruppen verwendet wurden, um die unerwünschte Kopplung an die reaktiven Gruppen der Seitenkette zu verhindern.

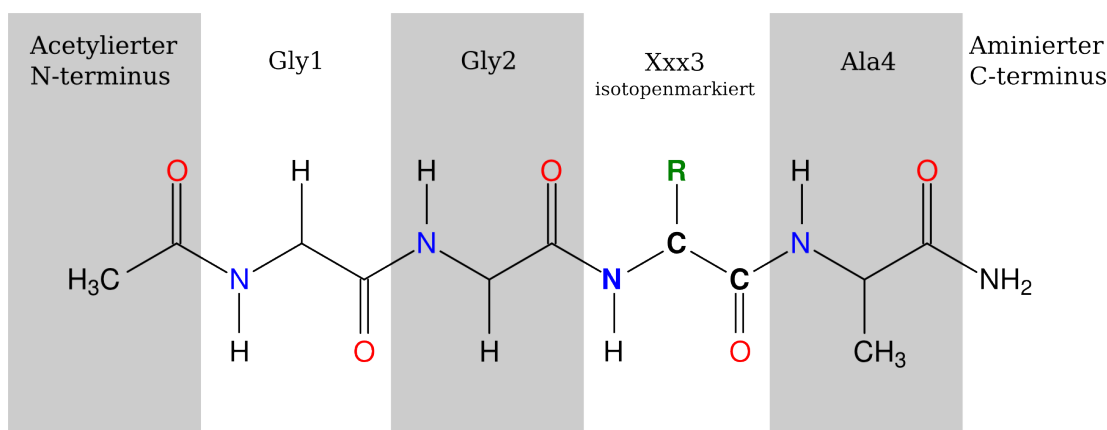


Abbildung 5.1: Chemische Struktur des Modellpeptids Die Grundstruktur des Peptids besteht aus einem acetylierten N-Terminus sowie einem aminierten C-Terminus. Die Schutzgruppen verhindern einen Einfluss der ansonsten geladenen Endgruppen und minimieren zusätzlich den Einfluss des pH-Wertes. Glycine besetzen die Positionen 1 und 2, die dritte Position nimmt eine der 20 kanonischen Aminosäuren ein. Diese dritte Position ist isotopenmarkiert (Kerne fett dargestellt). An Position 4 befindet sich ein Alanin.

acetyliert, damit diese in späteren Zyklen nicht koppeln. Die für die jeweiligen Seitenketten verwendeten Schutzgruppen sind in Tabelle 5.2 aufgeführt.

Nach erfolgter Synthese wurden die Schutzgruppen des Peptidrückgrats sowie der Seitenketten gleichzeitig entfernt. Der N-Terminus wurde mit Hilfe von 10 %igem Essigsäureanhydrid in DMF acetyliert. Die Aminierung des C-Terminus erfolgte durch Einsatz eines Rink-Amid-Harztes. Eine grafische Darstellung des Peptidrückgrats zeigt Abbildung 5.1. Die Reinheit der synthetisierten Tetrapeptide wurde mit Hilfe der Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) überprüft.

5.2.2 Probenpräparation

Der verwendete Puffer enthielt 20 mM perdeutertes TRIS- d_{11} (2- $(^2\text{H}_2)$ Amino-2- (^2H) hydroxy($^2\text{H}_2$)methyl]-1,3- $(^2\text{H}_4)$ propan($^2\text{H}_2$)diol) und als internen Standard zur Referenzierung 0,5 mM DSS (3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonsäure). Das jeweilige Tetrapeptid wurde nun entsprechend einer Konzentration von 5 mM im Puffer gelöst und der pH-Wert mit Hilfe von HCl und NaOH auf 6,7 eingestellt. Hierzu wurde eine Hamilton Spintrode an einem Beckman Coulter pH-Meter verwendet. Der pH-Wert

wurde nicht um den Deuterium-Isotopen-Effekt korrigiert. Das Verhältnis von H₂O zu D₂O betrug 90%/10%.

5.2.3 NMR-Spektroskopie

Der größte Teil der Experimente in diesem Kapitel wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer der Firma *Bruker Biospin GmbH* (Rheinstetten, Deutschland) mit einem Raumtemperaturprobenkopf (*QXI*) durchgeführt. Die Messungen der Temperaturabhängigkeit der Druckeffekte am Modellpeptid Ac-GGFA-NH₂, sowie Nachmessungen der Tetrapeptide Ac-GG[E, I, Y]A-NH₂ wurden mit einem Kryoprobenkopf (*TCI*) aufgenommen.

Die Experimente wurden bei 283 K durchgeführt, wobei die Druckantwort des Modellpeptids Ac-GGFA-NH₂ zusätzlich bei 278 K, 288 K, 293 K, 298 K, 303 K und 308 K vermessen wurde. Die Kalibrierung der Temperatur erfolgte nach jedem Probenwechsel durch Messung der Differenz der ¹H-Resonanzlinien der Hydroxyl- und Methylgruppe in 100 % Methanol nach Raiford et al. (1979).

Die Experimente zur Bestimmung der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffkerne wurden mit Hilfe der Bruker Pulsprogramme *zgnoe* und *zgdc* mit 512k Datenpunkten, einer spektralen Weite von 40,76 kHz und 128 Scans durchgeführt. Die Messung der Protonendaten für die Bestimmung der Druckantwort der terminalen Schutzgruppen erfolgte mit dem Bruker Pulsprogramm *purge1Dwig* mit 512k Datenpunkten, einer spektralen Weite von 11,16 kHz und 16 Scans.

5.2.4 Prozessierung der NMR-Daten

Im Gegensatz zu der Untersuchung der chemischen Verschiebungen der Protonen und Stickstoffkerne erstreckt sich die Analyse der ¹³C-Kerne über einen großen spektralen Bereich von 13 ppm (Isoleucin C^δ) bis 184 ppm (Glutamat C^δ). Dies hat zur Folge, dass trotz aufgenommener 512k Datenpunkte die Auflösung des FID mit 0,16 Hz im Gegensatz zu den Protonenspektren mit 0,04 Hz geringer ist. Zudem erschweren komplexere Kopplungsmuster die Analyse. Es muss daher darauf geachtet werden einen Parametersatz zu finden, der die unterschiedlichen ¹³C-Kerne mit ihren jeweiligen Kopplungsmustern möglichst gut aufzulösen vermag. Ziel hierbei sind symmetrische Signale, die jedoch sauber voneinander getrennt sind (Kopplungen). Der Parameter der den größten Einfluss auf die Signalform und Signaltrennung hat, ist die auf den FID an-

gewendete Fensterfunktion. Auf die Wahl der Fensterfunktion und deren Auswirkungen wird gesondert im Verlauf dieses Kapitels eingegangen.

Die ^{13}C -Spektren zeigen Artefakte in Form starker Verzerrungen der Baseline, die auf Störung der ersten Datenpunkte des FID zurückzuführen sind. Grund hierfür ist die unzureichende Entkopplung der Sende- und Empfangsspule nach dem 90° Puls und tritt hauptsächlich bei Probenköpfen auf, die mehrere Frequenzen beziehungsweise Kerne aufnehmen können (Dabirzadeh, 2008; Roig et al., 2015).

Dieser Effekt kann durch Erhöhung des Pre-Scan-Delays (Bruker Prozessierungsparameter *DE*) reduziert werden, was jedoch zu einer Verzerrung der Phase führt. Besser geeignet ist die Korrektur der fehlerhaften Signale im FID mittels linearer Rückprädiktion. Dabei werden die gestörten Daten zu Beginn des FID mit aus dem weiteren Verlauf extrapolierten Daten überschrieben. Anhand des Bruker Prozessierungsparameters *TDoff* bestimmt man die Anzahl der zu ersetzenden Datenpunkte und mittels *LPBIN* die zur Extrapolation herangezogenen Datenpunkte. Die Größe des linearen Prädiktionskoeffizienten *NCOEF* wird typischerweise auf die 2 bis 3-fache Anzahl der Signale gesetzt. Die Anzahl der für die Rückprädiktion verwendeten Datenpunkte liegt in unserem Fall je nach Spektrum zwischen 128 Datenpunkten und 512 Datenpunkten. Der sensitivste Parameter der Rückprädiktion ist die Anzahl der überschriebenen Datenpunkte *TDoff*. Dieser wurde sorgfältig über Begutachtung des verzerrten Bereiches des FID gewählt, um die Artefakte zu eliminieren ohne zuviele Datenpunkte zu überschreiben. Dabei wurden je nach Spektrum zwischen 10 und 24 Datenpunkte (bei 512k aufgenommenen) überschrieben. Die Durchführung der linearen Rückprädiktion für mit Bruker Spektrometern aufgenommene Spektren setzt eine Konvertierung in das AMX Format voraus. Dies erreicht man in der Bruker Software *TopSpin* mit Hilfe des Befehles *convdta*. Dies muss vor dem Setzen der Prozessierungsparameter erfolgen, da die Konvertierung einen neuen Datensatz generiert. Mit Hilfe der Rückprädiktion war es für alle Spektren möglich eine verzerrungsfreie Baseline ohne Artefakte zu erhalten.

Im Folgenden wird auf die Wahl der Fensterfunktion und die Auswirkungen dieser eingegangen. Für ein nicht überlagertes Signal hat die Wahl der Fensterfunktion keinen Einfluss auf die chemische Verschiebung, es können jedoch Unterschiede für sich überlagernde Signale oder Multiplett-Strukturen auftreten. Die zwei in der NMR-Spektroskopie am häufigsten anzutreffenden Fensterfunktionen sind der exponentielle Filter (*EM*) und der Gauss Filter (*GM*). Der exponentielle Filter wird nur über den Bruker Prozessierungsparameter der Linienverbreiterung *LB* definiert, während der Gauss Filter über die Linienverbreiterung *LB*, sowie die Position des Gauss-Maximums

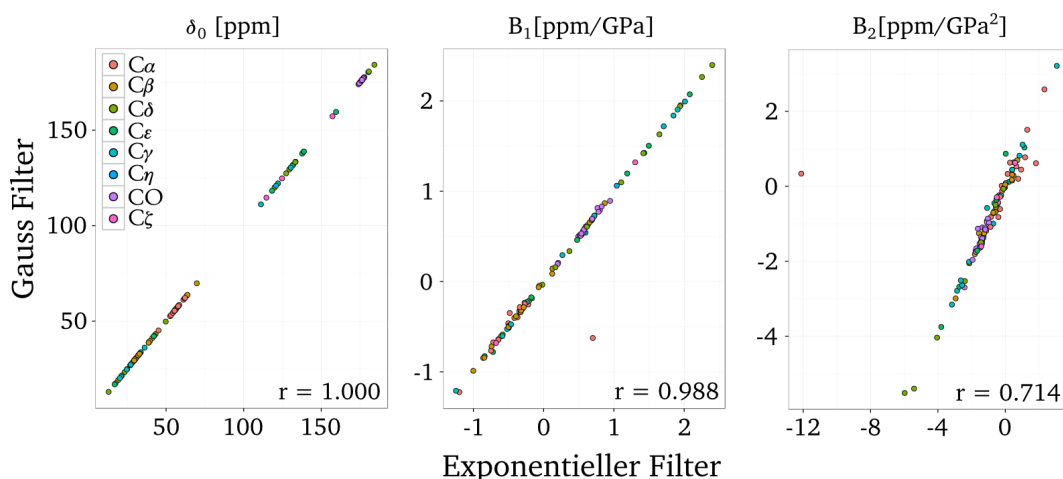


Abbildung 5.2: Korrelation der Druckkoeffizienten bei Auswertung mit exponentiellem Filter beziehungsweise Gauss Filter für die Kohlenstoffkerne Die Abbildung zeigt die Korrelation der Druckkoeffizienten für die Auswertung mit einem exponentiellen Filter (gewählte Linienverbreiterung LB je nach Aminosäure 3-15) und einem Gauss Filter (gewählte Linienverbreiterung je nach Aminosäure LB zwischen -3 und -6 und angepasster Position des Gauss Maximums GB). Die Werte wurden so gewählt, dass eine homogene Linienform, sowie eine optimale Trennung der Signale für die unterschiedlichen Kohlenstoffkerne erhalten wurde.

GB definiert wird. Die einfachere Variante stellt der exponentielle Filter dar, da der Gauss Filter mit der Verschiebung des Gauss Maximums einen zusätzlichen, sehr sensitiven Parameter besitzt, mit dessen Hilfe eine bessere Trennung zusammenliegender Signale ermöglicht wird.

Zur Bestimmung der optimalen Fensterfunktion wurden nahezu alle Modellpeptide (Ausnahmen waren die cis-Konformation des Prolins P_{cis} und die oxidierte Form des Cysteins C_{ox} (Cystin)) mit beiden Fensterfunktionen ausgewertet und die erhaltenen Druckkoeffizienten δ_0 , B_1 und B_2 für beide Fensterfunktionen verglichen und korreliert (Abbildung 5.2).

Der Einfluss der verwendeten Fensterfunktion fällt für die verschiedenen Koeffizienten unterschiedlich aus. Für den Koeffizienten δ_0 , der der chemischen Verschiebung bei Normaldruck ($P_0 = 0,1$ MPa) entspricht, zeigt sich kein Einfluss (Pearson Korrelationskoeffizient $r = 1,000$), während sich für den Druckkoeffizienten erster Ordnung B_1 eine schwächere, aber immer noch starke Korrelation mit einem Pearson Korrelationskoeffizienten von $r = 0,988$ ergibt. Deutlich schwächer fällt die Korrelation für den Druckkoeffizienten zweiter Ordnung mit einem Pearson Korrelationskoeffizienten von $0,714$ aus. Der in den Korrelationen am stärksten abweichende Wert ist das C^α

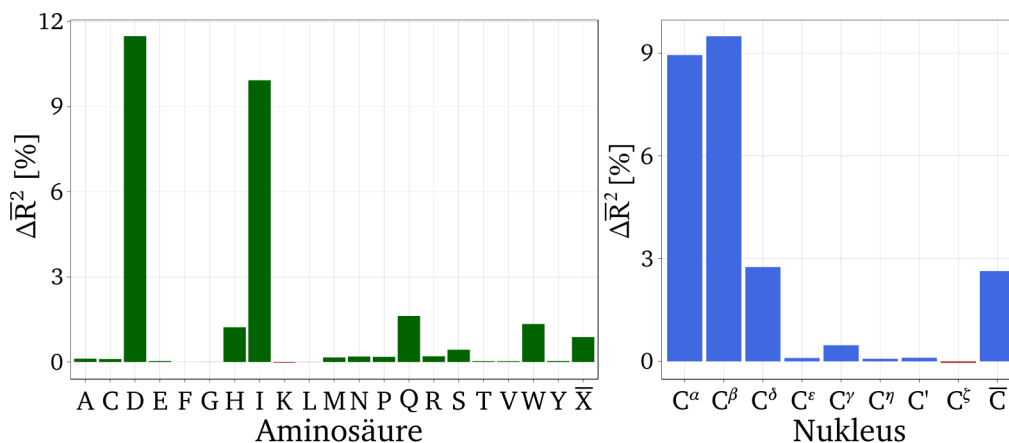


Abbildung 5.3: Vergleich des korrigierten Bestimmtheitsmaßes bei Verwendung unterschiedlicher Fensterfunktionen Die Abbildung zeigt die prozentuale Verbesserung des korrigierten Bestimmtheitsmaßes \bar{R}^2 bei Verwendung des Gauss Filters anstatt des exponentiellen Filters. Dabei zeigt Abbildung 5.3a die über alle Kohlenstoffkerne gemittelte Verbesserung für die unterschiedlichen Aminosäuren, wobei \bar{X} die Mittelung über die Aminosäuren darstellt. Abbildung 5.3b zeigt die über alle Aminosäuren gemittelte Verbesserung für die unterschiedlichen Kohlenstoffkerne, wobei \bar{C} die Mittelung über alle Kohlenstoffkerne angibt.

des Isoleucins. Dies ist auf eine unzureichende Trennung der Signale bei Verwendung des exponentiellen Filters zurückzuführen. Die Korrelationen zeigen, dass die Wahl der Fensterfunktion für überlagerte Signale oder Multipllettstrukturen, aufgrund unterschiedlich guter Trennung der Signale, einen Einfluss auf die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 hat, jedoch nicht welche zu genaueren Ergebnissen führt.

Ein Vergleich der Qualität der Fensterfunktionen erfolgte über das korrigierte Bestimmtheitsmaß \bar{R}^2 des Fits der chemischen Verschiebung über den Druck. Abbildung 5.3 zeigt die mittlere prozentuale Änderung des korrigierten Bestimmtheitsmaßes bei Verwendung des Gauss Filters im Vergleich zum exponentiellen Filter. Dabei zeigt Abbildung 5.3a die über die jeweilige Aminosäure X3 gemittelte Änderung von \bar{R}^2 und Abbildung 5.3b die Änderung von \bar{R}^2 für die unterschiedlichen Kohlenstoffkerne.

Bei der Verbesserung des korrigierten Bestimmtheitsmaßes für die unterschiedlichen Aminosäuren (Abbildung 5.3a) zeigen Aspartat und Isoleucin deutliche Verbesserungen ($\Delta\bar{R}^2 > 10\%$). Für Histidin, Glutamin und Tryptophan findet man mittlere Verbesserungen bei Verwendung des Gauss Filters um die 1,5%. Bei Betrachtung der Verbesserung des korrigierten Bestimmtheitsmaßes bei der Mittelung über die ^{13}C -

Kerne (Abbildung 5.3b) zeigt sich für die Kerne C^α und C^β eine deutliche Verbesserung ($\Delta\bar{R}^2 \approx 9\%$).

In beiden Fällen ist die Verbesserung des korrigierten Bestimmtheitsmaßes auf die bessere Trennung der Linien zurückzuführen, da bei Verwendung des Gauss Filters eine schmalere Linienform erreicht wird. Dies führt insbesondere bei Multiplettstrukturen zu erkennbaren Verbesserungen. Die Verwendung des Gauss Filters bei der Auswertung der Druckkoeffizienten führt zu einer Verringerung der absoluten Fehler und wird daher bei den Auswertungen der Druckreihen angewendet. Die optimalen Parameter für die Linienverbreiterung LB und die Lage des Gauss Maximums GB wurden für jedes Modellpeptid sorgfältig ausgewählt. Dabei wurde die natürliche Linienbreite (Filter EM und $LB = 0$) ermittelt und als negative Linienverbreiterung LB für den Gauss Filter gesetzt. Daraufhin wurde der Parameter des Gauss Maximums GB variiert, um eine möglichst homogene und rauschfreie Linienform zu erhalten.

5.2.5 Verwendete Software

Die Aufnahme sowie Prozessierung der Daten erfolgte mit dem Programmpaket *TopSpin* der Firma *Bruker* in den Versionen 2.1 für die Aufnahme und 3.1/3.2 für die Datenprozessierung. Die Analyse der prozessierten Spektren erfolgte mit dem Softwarepaket *Auremol* (Gronwald und Kalbitzer, 2004). Anschließend erfolgte die Datenverarbeitung mit dem Statistikprogramm *R* (R Core Team, 2016).

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Chemische Verschiebung der Kohlenstoffkerne bei Normaldruck

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Bestimmung der chemischen Verschiebung bei Normaldruck ($P_0 = 0,1$ MPa) der Kohlenstoffkerne an der Position X im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ dargelegt. Die Bestimmung erfolgte dabei über das Anfitzen der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung mit Hilfe der Funktion $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$. In dieser Funktion ist δ_0 die chemische Verschiebung bei Normaldruck, B_1 der lineare Druckkoeffizient und B_2 der nicht lineare Druckkoeffizient. Die Bestimmung über das Anfitzen der chemischen Verschiebung über alle Druckpunkte führt zu einer sehr hohen Genauigkeit der erhaltenen Werte für δ_0 . Da es

sich bei der ermittelten chemischen Verschiebung um einen Fitparameter handelt, kann für diesen ein Fehler in Bezug auf die Druckreihe angegeben werden.

Die hier angegebenen chemischen Verschiebungen wurden bei einer Temperatur von 283 K und einem pH-Wert von 6,7 ermittelt. Die Zuordnung erfolgte dabei über die in Wishart et al. (1995) veröffentlichten chemischen Verschiebungen, wobei diese anhand der Kopplungsmuster (keine Protonenentkopplung) überprüft wurden. Die Zuordnung der prochiralen Kohlenstoffkerne des Leucins und Valins erfolgte mit Hilfe von Experimenten an den jeweiligen freien Aminosäuren, wobei die pro-(R) Kohlenstoffkerne (Leu C^{δ1} und Val C^{γ1}) einen höheren Anteil an ¹³C-markiertem Kohlenstoff besaßen (≈ 80 %). Diese Gruppe zeigte daher in [¹³C-¹H]-HSQC Spektren eine charakteristische Aufspaltung.

Für Histidin wurde zusätzlich ein Messpunkt bei einem pH-Wert von 4,0 vermessen. Eine weitere zusätzliche Messung bei einem pH-Wert von 8,5 führte aufgrund schlechter Signalquantität und Signalqualität zu keinem verwertbaren Ergebnis. Das Peptid AcGGFA-NH₂ wurde zusätzlich bei den Temperaturen 278 K, 288 K, 293 K, 298 K, 303 K und 308 K vermessen. Die Auswertung dieser Temperatur- und Druckabhängigkeit erfolgt gesondert in Kapitel 5.3.4. Die ermittelten chemischen Verschiebungen bei Normaldruck werden in Tabelle 5.3 zusammenfassend dargestellt.

Die durchschnittliche chemische Verschiebung lag für die Carbonylkohlenstoffe des Peptidrückgrats bei 175,84 ppm mit einer Standardabweichung von 1,05 ppm. Für die C^α-Kohlenstoffe ergab sich eine durchschnittliche chemische Verschiebung von 56,87 ppm mit einer Standardabweichung von 3,92 ppm. Für die Kohlenstoffe der Seitenketten ergaben sich folgende Mittelwerte mit in Klammern angegebener Standardabweichung: C^β 36,60 ppm (11,25 ppm), C^γ 67,10 ppm (59,28 ppm), C^δ 90,72 ppm (59,30 ppm), C^ε 105,49 ppm (47,95 ppm), C^η 120,95 ppm (-), C^ζ 137,26 ppm (20,12 ppm).

Die größten Fehler der chemischen Verschiebung bei Normaldruck findet man für die Kerne der Aminosäuren C_{ox}, H, H^{4,0} und P_{cis}. Dies lässt sich mit den geringen Populationen der oxidierten Form des Cysteins (C_{ox}, Cystin) beziehungsweise der cis-Konformation des Prolins (P_{cis}) erklären, die zu einer schlechten Signalquantität und Signalqualität führen. Histidin zeigt im Vergleich zu anderen Aminosäuren im Allgemeinen nicht optimale Spektren. Bei einem pH-Wert von 6,7 zeigt Histidin schlechtere Spektren verglichen mit Histidin bei einem pH-Wert von 4,0. Die Untersuchung von Histidin bei einem pH-Wert von 8,5 ergab keine auswertbaren Spektren. Anhand der Fehler in Bezug auf die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung lässt sich

X3	Kern	δ_0 [ppm]	Kern	δ_0 [ppm]	Kern	δ_0 [ppm]
A	C'	177,8045 ± 0,0006	C ^α	52,6134 ± 0,0009	C ^β	19,0728 ± 0,0006
C _{red}	C'	174,5524 ± 0,0011	C ^α	58,3406 ± 0,0005	C ^β	28,1170 ± 0,0008
C _{ox}	C'	174,6752 ± 0,0031	C ^α	55,3892 ± 0,0200	C ^β	40,9277 ± 0,0021
D	C'	176,2271 ± 0,0016	C ^α	54,3849 ± 0,0032	C ^β	41,1403 ± 0,0008
	C ^γ	180,3683 ± 0,0020				
E	C'	176,6114 ± 0,0003	C ^α	56,7344 ± 0,0006	C ^β	29,9893 ± 0,0004
	C ^γ	36,1295 ± 0,0003	C ^δ	184,2697 ± 0,0006		
F	C'	175,7594 ± 0,0005	C ^α	57,8677 ± 0,0002	C ^β	39,5493 ± 0,0004
	C ^γ	138,7373 ± 0,0002	C ^δ	131,9444 ± 0,0003	C ^ε	131,4888 ± 0,0002
	C ^ζ	129,9728 ± 0,0001				
G	C'	174,0468 ± 0,0007	C ^α	45,1154 ± 0,0006		
H	C'	175,0275 ± 0,0021	C ^α	55,9606 ± 0,0023	C ^β	30,3025 ± 0,0028
	C ^γ	133,4758 ± 0,0261	C ^{δ2}	119,9216 ± 0,0084	C ^{ε1}	137,7571 ± 0,0047
H ^{4,0}	C'	174,1979 ± 0,0010	C ^α	55,0876 ± 0,0021	C ^β	29,0330 ± 0,0031
	C ^γ	131,0726 ± 0,0049	C ^{δ2}	120,1636 ± 0,0032	C ^{ε1}	136,3608 ± 0,0019
I	C'	176,3639 ± 0,0012	C ^α	61,2012 ± 0,0011	C ^β	38,7677 ± 0,0009
	C ^{γ1}	27,1072 ± 0,0007	C ^{γ2}	17,3955 ± 0,0008	C ^{δ1}	12,9522 ± 0,0006
K	C'	176,5584 ± 0,0005	C ^α	56,2401 ± 0,0011	C ^β	33,0324 ± 0,0005
	C ^γ	24,6459 ± 0,0005	C ^δ	29,0630 ± 0,0005	C ^ε	42,0965 ± 0,0003

Tabelle 5.3: Chemische Verschiebung der Kohlenstoffkerne bei Normdruck für die Aminosäure X im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ (Teil 1) Die Tabelle zeigt die chemischen Verschiebungen δ_0 der Kohlenstoffkerne für die Aminosäure X im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ bei einer Temperatur von 283 K und einem pH-Wert von 6,7. Ermittelt wurden diese durch Anfitzen der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung mit Hilfe der Funktion $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$. Die Daten wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer mit einem Raumtemperaturprobenkopf (QXI) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte über eindimensionale ¹³C-Spektren, die mit dem Bruker Pulsprogramm *zgnoe* ohne Entkopplung der Protonen aufgenommen wurden. Die Proben enthielten 5 mM Ac-GGXA-NH₂, 20 mM Tris-d₁₁, 0,5 mM DSS, H₂O/D₂O 90%/10%. Für Histidin wurde eine zusätzliche Messreihe bei einem pH-Wert von 4,0 durchgeführt (His^{4,0}). In Teil 2 der Tabelle sind die Mittelwerte der Kerne mit der einfachen Standardabweichung angegeben.

erkennen, für welche Aminosäuren und Kerne die exakte Bestimmung der chemischen Verschiebung mit Problemen behaftet ist.

Die Größe der Standardabweichung nimmt in etwa mit dem Abstand vom Peptidrückgrat zu, da die Kohlenstoffe für C^γ und C^δ je nach Aminosäure teils deutlich unterschiedliche chemische Umgebungen aufweisen (zum Beispiel Carboxygruppe für Glutamat und Aspartat) und die Kohlenstoffe an den Positionen C^ε, C^η und C^ζ nur in wenigen Aminosäuren vorkommen.

X3	Kern	δ_0 [ppm]	Kern	δ_0 [ppm]	Kern	δ_0 [ppm]
L	C'	177,5242 ± 0,0006	C ^α	55,2242 ± 0,0010	C ^β	42,2738 ± 0,0021
	C ^γ	26,9084 ± 0,0014	C ^{δ1}	24,9110 ± 0,0026	C ^{δ2}	23,2441 ± 0,0031
M	C'	176,2618 ± 0,0014	C ^α	55,4599 ± 0,0007	C ^β	32,7616 ± 0,0010
	C ^γ	31,9217 ± 0,0008	C ^ε	16,8756 ± 0,0011		
N	C'	175,1486 ± 0,0007	C ^α	53,1977 ± 0,0009	C ^β	38,8721 ± 0,0008
	C ^γ	177,3319 ± 0,0030				
P _{trans}	C'	177,1159 ± 0,0011	C ^α	63,3272 ± 0,0012	C ^β	32,0439 ± 0,0004
	C ^γ	27,1766 ± 0,0004	C ^δ	49,7770 ± 0,0003		
P _{cis}	C'	176,4775 ± 0,0011	C ^α	62,0816 ± 0,0059	C ^β	34,6410 ± 0,0008
	C ^γ	24,7529 ± 0,0017	C ^δ	50,3326 ± 0,0027		
Q	C'	175,9643 ± 0,0011	C ^α	55,8119 ± 0,0023	C ^β	29,3716 ± 0,0007
	C ^γ	33,7259 ± 0,0011	C ^δ	180,7461 ± 0,0016		
R	C'	176,3271 ± 0,0012	C ^α	56,1178 ± 0,0009	C ^β	30,7321 ± 0,0009
	C ^γ	26,9839 ± 0,0008	C ^δ	43,2709 ± 0,0008	C ^ζ	159,5703 ± 0,0005
S	C'	174,5455 ± 0,0006	C ^α	58,4572 ± 0,0004	C ^β	63,7704 ± 0,0007
T	C'	174,6118 ± 0,0008	C ^α	61,9213 ± 0,0019	C ^β	69,8071 ± 0,0011
	C ^{γ2}	21,4867 ± 0,0005				
V	C'	176,3210 ± 0,0005	C ^α	62,1650 ± 0,0021	C ^β	32,8528 ± 0,0005
	C ^{γ1}	21,0457 ± 0,0004	C ^{γ2}	20,1276 ± 0,0005		
W	C'	176,2366 ± 0,0015	C ^α	57,5070 ± 0,0019	C ^β	29,3923 ± 0,0008
	C ^γ	111,1756 ± 0,0021	C ^{δ1}	127,4224 ± 0,0015	C ^{δ2}	129,4414 ± 0,0023
	C ^{ε2}	138,8729 ± 0,0040	C ^{ε3}	122,1638 ± 0,0014	C ^{η2}	120,9519 ± 0,0016
	C ^{ζ2}	114,6685 ± 0,0011	C ^{ζ3}	124,7682 ± 0,0014		
Y	C'	175,8858 ± 0,0010	C ^α	57,8732 ± 0,0002	C ^β	38,7351 ± 0,0004
	C ^γ	130,3985 ± 0,0008	C ^δ	133,3036 ± 0,0007	C ^ε	118,2734 ± 0,0007
	C ^ζ	157,2986 ± 0,0004				
\bar{X}	C'	175,48 (1,05)	C ^α	56,87 (3,92)	C ^β	36,60 (11,25)
	C ^γ	67,10 (59,28)	C ^δ	90,72 (59,30)	C ^ε	105,49 (47,95)
	C ^η	120,95 (-)	C ^ζ	137,26 (20,12)		

Chemische Verschiebung der Kohlenstoffkerne bei Normaldruck für die Aminosäure X im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ (Teil 2) Beschriftung siehe Tabelle 5.3

Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, existieren für die chemische Verschiebung der Kohlenstoffkerne bereits experimentelle Datensätze sowie Datensätze, die auf der Berechnung von Datenbanken beruhen (Tabelle 5.1). Einen Vergleich der von uns ermittelten Werte für die chemische Verschiebung bei Normaldruck mit den bereits publizierten Datensätzen zeigt Abbildung 5.4. Für die Carbonylkohlenstoffe des Peptidrückgrats ergab sich die beste Übereinstimmung mit dem Datensatz aus Wishart et al. (1995) mit einer mittleren Abweichung von 0,02 ppm und einer Standardabweichung von 0,29 ppm. Die größte Abweichung findet man für den Datensatz aus Richarz und Wuethrich (1978) mit einer mittleren Abweichung von -0,91 ppm und einer Standardabweichung von 0,55 ppm.

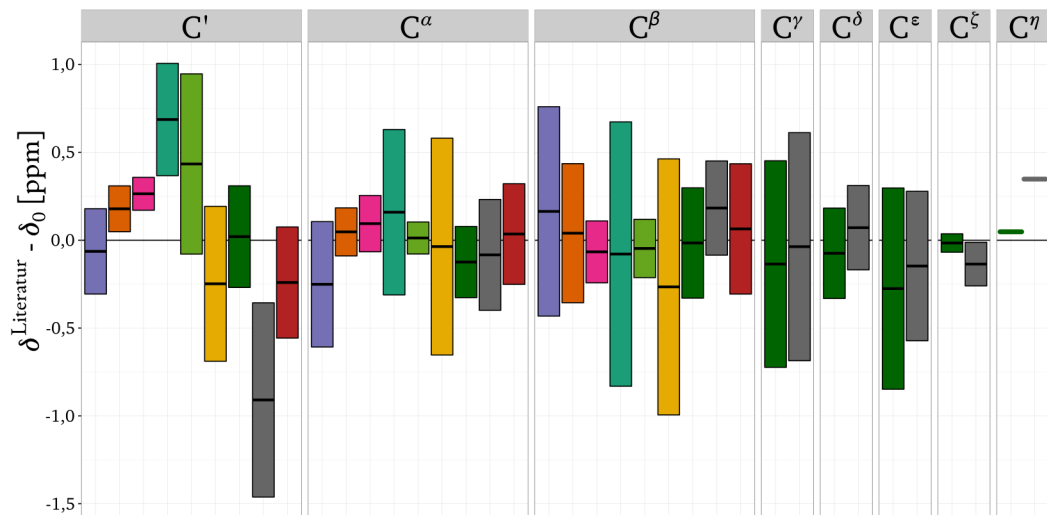


Abbildung 5.4: Vergleich der chemischen Verschiebungen bei Normaldruck mit bereits publizierten Datensätzen Die Abbildung zeigt den Vergleich der ermittelten chemischen Verschiebung δ_0 bei Normaldruck mit bereits publizierten Datensätzen (siehe Tabelle 5.1). Der schwarze Balken gibt dabei die mittlere Abweichung unserer Daten zu den publizierten Datensätzen an. Die Länge der Säulen repräsentiert die einfache Standardabweichung. Die verschiedenen Datensätze sind dabei folgendermaßen farblich dargestellt: De Simone et al. (2009) (violett), Kjaergaard und Poulsen (011a) (orange), Kjaergaard et al. (2011) (pink), Schwarzingler et al. (2000) (türkis), Tamiola et al. (2010) (hellgrün), Wang und Jardetzky (2002) (gelb), Wishart et al. (1995) (dunkelgrün), Richarz und Wuethrich (1978) (grau), Zhang et al. (2003) (rot). Dabei wurden für Wang und Jardetzky (2002) und Zhang et al. (2003) die random coil Datensätze verwendet. Experimentelle Datensätze mit unterschiedlichen Standards zur Referenzierung wurden gemäß Wishart und Sykes (1994) und Wishart et al. (1995a) auf DSS als Standard nachreferenziert.

Für die C^α -Kerne ergab sich die beste Übereinstimmung mit dem Datensatz aus Tamiola et al. (2010) mit einer mittleren Abweichung von 0,01 ppm und einer Standardabweichung von 0,09 ppm. Die größte Abweichung findet man für den Datensatz aus De Simone et al. (2009) mit einer mittleren Abweichung von $-0,25$ ppm und einer Standardabweichung von 0,36 ppm.

Für die C^β -Kerne zeigte der Datensatz von Kjaergaard und Poulsen (011a) mit einer mittleren Abweichung von 0,04 ppm und einer Standardabweichung von 0,40 ppm die geringste Abweichung, wobei die Datensätze von Tamiola et al. (2010) und Kjaergaard et al. (2011) nur minimal größere Abweichungen, jedoch mit 0,17 ppm beziehungsweise 0,18 ppm deutlich kleinere Standardabweichungen aufzeigen. Die

größte Abweichung findet man für Richarz und Wuethrich (1978) mit 0,18 ppm und einer Standardabweichung von 0,27 ppm.

Für die Kerne C^γ , C^δ , C^ϵ , C^ζ und C^η existieren nur die experimentellen Datensätze von Richarz und Wuethrich (1978) und Wishart et al. (1995). Große Standardabweichungen findet man bei beiden Datensätzen für die Kerne C^γ und C^ϵ und mittlere Standardabweichungen für den Kern C^δ . C^η besitzt keine Standardabweichung da dieser Kern nur in der Aminosäure Tryptophan vorzufinden ist.

Gemittelt über alle Kerne ergab sich die beste Übereinstimmung mit den Datensätzen von Wishart et al. (1995) und Kjaergaard und Poulsen (2011a) mit jeweils mittleren Abweichungen von 0,09 ppm. Die beste Übereinstimmung für aus Datenbanken errechnete chemische Verschiebungen ergab sich für Zhang et al. (2003) mit einer mittleren Abweichung von 0,11 ppm.

5.3.2 Druckabhängigkeit der Kohlenstoffkerne des Peptidrückgrats

Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Kerne C' und C^α des Peptidrückgrats im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ wurde bei Drücken von 3 MPa bis 200 MPa in Schritten von 20 MPa ermittelt. Bereits in Koehler et al. (2012) wurde gezeigt, dass sich die chemische Verschiebung in Abhängigkeit des Drucks in den meisten Fällen nicht linear verhält. Daher wurde die chemische Verschiebung über den Druck mit einem Polynom zweiter Ordnung $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$ gefittet, wobei δ_0 die chemische Verschiebung bei Normaldruck (Kapitel 5.3.1), B_1 den linearen Druckkoeffizienten und B_2 den nicht linearen Druckkoeffizienten darstellt. Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Amidgruppe wurde bereits in Koehler et al. (2012) dargestellt. Die Ergebnisse der Kohlenstoffkerne und H^α des Peptidrückgrats wurden bereits in Beck Erlach et al. (2016b) veröffentlicht. Abbildung 5.5 zeigt exemplarisch die druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung für einige ausgewählte Aminosäuren.

Die über das Polynom zweiter Ordnung erhaltenen Druckkoeffizienten B_1 und B_2 sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst. Der Mittelwert über alle Aminosäuren des linearen Druckkoeffizienten für den Kern C' beträgt 0,60 ppm/GPa mit einer Standardabweichung von 0,19 ppm/GPa. Der Druckkoeffizient B_1 für C' zeigt für alle Aminosäuren positive Werte. Große Abweichungen vom Mittelwert zeigen Aspartat und Glutamat. Diese sind deutlich größer als die Standardabweichung und weisen auf einen starken

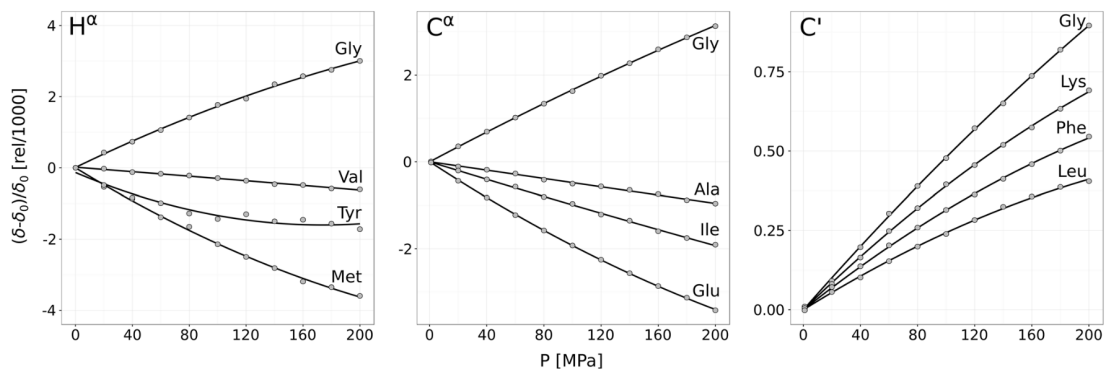


Abbildung 5.5: Druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung für die Kerne H^α , C^α und C' des Peptidrückgrats im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ Die Abbildung zeigt die Änderung der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit vom Druck für einige ausgewählte Aminosäuren. Gezeigt werden die Kerne H^α , C^α und C' des Peptidrückgrats vom Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂. Die Proben enthielten 5 mM Ac-GGXA-NH₂, 20 mM Tris-d₁₁, 0,5 mM DSS, H₂O/D₂O 90%/10%, pH 6,7 und wurden bei einer Temperatur von 283 K vermessen. (Quelle: Beck Erlach et al. (2016b))

Einfluss der negativ geladenen Carboxygruppe der Seitenkette hin. Da beide Aminosäuren vergleichbare Werte für den Druckkoeffizienten B_1 besitzen, scheint die Entfernung der Carboxygruppe der Seitenkette zu der des Peptidrückgrats keinen großen Einfluss zu besitzen.

Der nicht lineare Druckkoeffizient B_2 für C' ist für alle Aminosäuren negativ, was auf ein Sättigungsverhalten der chemischen Verschiebung für hohe Drücke hindeutet. Wie auch schon in Koehler et al. (2012) für die Amidprotonen und Amidstickstoffe beobachtet, besitzen B_1 und B_2 in den meisten Fällen ein gegensätzliches Vorzeichen. Der Mittelwert für den nicht linearen Druckkoeffizienten für C' beträgt $-0,67 \text{ ppm/GPa}^2$ mit einer Standardabweichung von $0,27 \text{ ppm/GPa}^2$. Wie auch für B_1 zeigt Glutamat eine große Abweichung vom Mittelwert.

Für die C^α -Kerne beträgt der Mittelwert des linearen Druckkoeffizienten B_1 $-0,37 \text{ ppm/GPa}$ mit einer Standardabweichung von $0,38 \text{ ppm/GPa}$. Bis auf Glycin und das oxidierte Cystein besitzen alle Aminosäuren ein negatives Vorzeichen für den Druckkoeffizienten B_1 . Die größten linearen Druckkoeffizienten findet man für Cystein und Glutamat.

Der Mittelwert des nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 für die C^α -Kerne beträgt $0,03 \text{ ppm/GPa}^2$ mit einer Standardabweichung von $0,82 \text{ ppm/GPa}^2$. Ein Großteil der Aminosäuren zeigt, wie auch schon für C' beobachtet, ein unterschiedliches Vorzeichen für B_2 im Vergleich zu B_1 . Eine Ausnahme von diesem Verhalten zeigen Asparagin,

X3	C'		C ^α	
	B ₁ [ppm/GPa]	B ₂ [ppm/GPa ²]	B ₁ [ppm/GPa]	B ₂ [ppm/GPa ²]
A	0,52 ± 0,01	-0,55 ± 0,07	-0,25 ± 0,02	0,01 ± 0,10
C _{red}	0,55 ± 0,03	-0,55 ± 0,13	-0,85 ± 0,01	0,75 ± 0,06
C _{ox}	0,43 ± 0,07	-0,1 ± 0,4	0,2 ± 0,5	-3,0 ± 2,2
D	0,21 ± 0,04	-0,5 ± 0,2	-0,32 ± 0,07	-0,4 ± 0,4
E	0,19 ± 0,01	-0,22 ± 0,03	-1,22 ± 0,02	1,29 ± 0,07
F	0,63 ± 0,01	-0,76 ± 0,05	-0,49 ± 0,01	-0,14 ± 0,02
G	0,89 ± 0,02	-0,56 ± 0,08	0,79 ± 0,01	-0,41 ± 0,07
H	0,81 ± 0,05	-1,4 ± 0,2	-0,30 ± 0,05	0,1 ± 0,3
H ^{4,0}	0,89 ± 0,03	-1,05 ± 0,12	-0,06 ± 0,05	-0,1 ± 0,2
I	0,61 ± 0,03	-0,68 ± 0,14	-0,63 ± 0,03	0,17 ± 0,13
K	0,77 ± 0,01	-0,83 ± 0,06	-0,34 ± 0,03	-0,06 ± 0,13
L	0,50 ± 0,01	-0,67 ± 0,06	-0,34 ± 0,02	0,27 ± 0,12
M	0,52 ± 0,03	-0,5 ± 0,2	-0,24 ± 0,02	-0,30 ± 0,08
N	0,56 ± 0,02	-0,69 ± 0,08	-0,31 ± 0,02	-0,02 ± 0,10
P _{trans}	0,52 ± 0,03	-0,7 ± 0,2	-0,35 ± 0,03	0,3 ± 0,2
P _{cis}	0,81 ± 0,03	-1,0 ± 0,2	-0,28 ± 0,15	1,5 ± 0,8
Q	0,59 ± 0,03	-0,8 ± 0,1	-0,46 ± 0,05	0,4 ± 0,3
R	0,73 ± 0,03	-0,7 ± 0,1	-0,40 ± 0,02	0,17 ± 0,11
S	0,52 ± 0,02	-0,43 ± 0,07	-0,64 ± 0,01	0,22 ± 0,05
T	0,58 ± 0,02	-0,49 ± 0,09	-0,67 ± 0,04	0,2 ± 0,2
V	0,53 ± 0,01	-0,58 ± 0,05	-0,77 ± 0,05	0,3 ± 0,2
W	0,83 ± 0,03	-0,9 ± 0,2	-0,28 ± 0,04	0,1 ± 0,2
Y	0,69 ± 0,02	-1,0 ± 0,1	-0,25 ± 0,01	-0,54 ± 0,02
\bar{X}	0,60 (0,19)	-0,67 (0,27)	-0,37 (0,38)	0,03 (0,82)

Tabelle 5.4: Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kohlenstoffkerne des Peptid-drückgrats im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ Die Tabelle zeigt die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kerne C' und C^α, die über ein Anfitzen der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit vom Druck mit Hilfe der Funktion $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$ ermittelt wurden. Die Daten wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer mit einem Raumtemperaturprobenkopf (QXI) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte über eindimensionale ¹³C-Spektren, die mit dem Bruker Pulsprogramm *zgnoe* ohne Entkopplung der Protonen aufgenommen wurden. Die Proben enthielten 5 mM Ac-GGXA-NH₂, 20 mM Tris-d₁₁, 0,5 mM DSS, H₂O/D₂O 90%/10%, pH 6,7 und wurden bei einer Temperatur von 283 K vermessen. Für Histidin wurde eine zusätzliche Messreihe bei einem pH-Wert von 4,0 durchgeführt (H^{4,0}). Zusätzlich angegeben sind die Mittelwerte der Druckkoeffizienten für die unterschiedlichen Kerne und die einfache Standardabweichung.

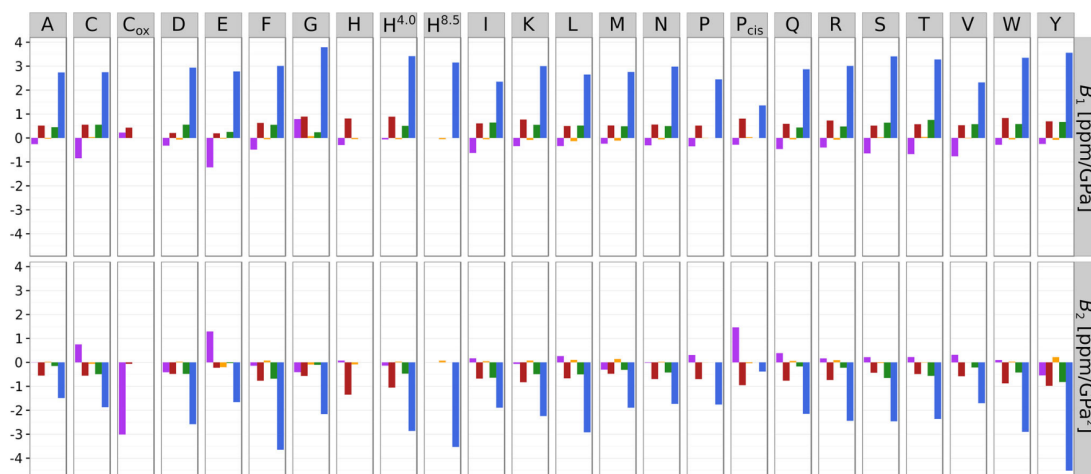


Abbildung 5.6: Übersicht der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kerne des Peptidrückgrats in dem Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ Die Abbildung zeigt die Druckkoeffizienten der Kerne C^α (violett), C' (rot), H^α (orange), H^N (grün) und N (blau). Die Druckkoeffizienten für H^N und N wurden aus Koehler et al. (2012) übernommen, die für H^α aus Beck Erlach et al. (2016b). Die Daten wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer mit einem Raumtemperaturprobenkopf (QXI) aufgenommen. Die Proben enthielten 5 mM Ac-GGXA-NH₂, 20 mM Tris-d₁₁, 0,5 mM DSS, H₂O/D₂O 90%/10 %, pH 6,7 und wurden bei einer Temperatur von 283 K vermessen. Für Histidin wurden zusätzliche Messreihen bei pH-Werten von 4,0 (H^{4,0}) und 8,5 (H^{8,5}) durchgeführt. (Quelle: Beck Erlach et al. (2016b))

Histidin, Lysin, Aspartat, Methionin, Phenylalanin und Tyrosin. Dabei weisen Asparagin, Histidin und Lysin einen Fehler von über 100 % auf, was eine Festlegung auf ein Vorzeichen erschwert. Interessant hierbei ist das Tyrosin, welches für beide Druckkoeffizienten negative Werte mit kleinen Fehlern aufweist. Den größten signifikanten Effekt findet man für Glutamat mit 1,29 ppm/GPa².

Die durchschnittliche Änderung der chemischen Verschiebung bei einer Druckerhöhung von 3 MPa auf 200 MPa beträgt für die C^α-Kerne −0,08 ppm. Eine etwas größere durchschnittliche Änderung zeigen die C' mit 0,09 ppm. Die größte Änderung der chemischen Verschiebung der Kerne für das Peptidrückgrat zeigt der Amidstickstoff mit 0,50 ppm für eine Erhöhung des Drucks von 3 MPa auf 200 MPa (Koehler et al., 2012).

Zusammen mit den in Koehler et al. (2012) gezeigten Druckkoeffizienten für die Amidgruppe des Peptidrückgrats und den in Beck Erlach et al. (2016b) gezeigten Druckkoeffizienten für das H^α, sind nun alle Kerne des Peptidrückgrats für das Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ in Bezug auf ihre Druckabhängigkeit charakterisiert worden. Eine grafische Gesamtübersicht der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 des Peptidrückgrats

	$B_1(\text{H}^{\text{N}})$	$B_2(\text{H}^{\text{N}})$	$B_1(\text{N})$	$B_2(\text{N})$	$B_1(\text{H}^{\alpha})$	$B_2(\text{H}^{\alpha})$	$B_1(\text{C}^{\alpha})$	$B_2(\text{C}^{\alpha})$	$B_1(\text{C}')$	$B_2(\text{C}')$	
$B_2/B_1(\text{H}^{\text{N}})$	1	-0,80	-0,05	-0,38	-0,10	0,50	-0,28	-0,24	0,07	-0,29	$B_1(\text{H}^{\text{N}})$
	1	1	-0,19	0,67	0,16	-0,51	0,08	0,37	-0,14	0,41	$B_2(\text{H}^{\text{N}})$
$B_2/B_1(\text{N})$	0,69		1	-0,54	0,35	0,04	0,54	-0,45	0,52	-0,28	$B_1(\text{N})$
			1	1	0,28	-0,58	-0,20	0,48	-0,32	0,58	$B_2(\text{N})$
$B_2/B_1(\text{H}^{\alpha})$	0,57		0,38		1	-0,69	0,05	0,22	0,08	0,30	$B_1(\text{H}^{\alpha})$
					1	1	0,27	-0,65	0,33	-0,57	$B_2(\text{H}^{\alpha})$
$B_2/B_1(\text{C}^{\alpha})$	-0,46		-0,41		-0,33		1	-0,75	0,61	-0,35	$B_1(\text{C}^{\alpha})$
							1	1	-0,42	0,38	$B_2(\text{C}^{\alpha})$
$B_2/B_1(\text{C}')$	0,24		0,39		0,04		-0,30		1	-0,72	$B_1(\text{C}')$
									1	1	$B_2(\text{C}')$
	$B_2/B_1(\text{H}^{\text{N}})$		$B_2/B_1(\text{N})$		$B_2/B_1(\text{H}^{\alpha})$		$B_2/B_1(\text{C}^{\alpha})$		$B_2/B_1(\text{C}')$		

Tabelle 5.5: Pearson Korrelationskoeffizienten der Druckkoeffizienten und deren Verhältnis für unterschiedliche Kerne des Peptidrückgrats Die Abbildung zeigt die Korrelationen für die Kerne des Peptidrückgrats im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ zwischen den Druckkoeffizienten B_1 und B_2 (obere Hälfte) und deren Koeffizientenverhältnis B_2/B_1 (untere Hälfte). Die Druckkoeffizienten für H^N und N wurden aus Koehler et al. (2012) übernommen, die für H^α aus Beck Erlach et al. (2016b). Aufgrund der großen Fehler der Druckkoeffizienten für die Aminosäuren C_{ox} und P_{cis} wurden diese bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten vernachlässigt. Die in Fett dargestellten Werte weisen einen Korrelationskoeffizienten größer als 0,5 auf.

zeigt Abbildung 5.6. Für die meisten Aminosäuren an der Position X im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ weisen die Kerne H^α und C^α eine Hochfeldverschiebung, die Kerne H^N, N und C' eine Tieffeldverschiebung auf.

Die Vollständigkeit der Daten für die Kerne des Peptidrückgrats erlaubte es nun, Korrelationen der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 untereinander sowie auch zwischen den Kernen zu untersuchen. Die Korrelationen zwischen den Druckkoeffizienten B_1 und B_2 sowie deren Verhältnis B_2/B_1 sind für die unterschiedlichen Kerne des Peptidrückgrats in Tabelle 5.5 zusammengefasst. Dabei wurden für die Berechnung des Pearson Korrelationskoeffizienten die Werte der Aminosäuren C_{ox} und P_{cis} aufgrund ihrer großen Fehler vernachlässigt. Die grafische Auftragung einiger Korrelationen sind im Anhang dieser Arbeit (siehe Anhang, Abbildung 9.2 und 9.3) abgebildet.

Die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 zeigten für alle Kerne des Peptidrückgrats eine Korrelation untereinander. Die schwächste Korrelation zwischen den Druckkoeffizienten zeigte der Amidstickstoff mit einem Korrelationskoeffizienten von $r(N) = -0,54$, die stärkste Korrelation findet man für H^N mit $r(H^N) = -0,80$. Die Korrelationen zwischen B_1 und B_2 sind für alle Kerne negativ, was auf ein Maximum des Kurvenverlaufs der chemischen Verschiebung für höhere Drücke beziehungsweise auf ein asymptotisches Verhalten hinweist.

Auch die Korrelation zwischen den Kernen der unterschiedlichen Aminosäuren weisen eine Korrelation auf. Diese ist stärker für den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 und stärker für direkt benachbarte Kerne. Die Korrelationen für B_2 reichen von $r(C^\alpha - C') = 0,38$ bis hin zu $r(H^N - N) = 0,67$. Diese Korrelationen weisen darauf hin, dass zumindest zum Teil ähnliche physikalische Prozesse die Änderung der chemischen Verschiebung beeinflussen. Für die Kerne des Peptidrückgrats sind dies aller Wahrscheinlichkeit nach konformationelle Änderungen.

Zusätzlich wurden die Korrelationen des Koeffizientenverhältnisses B_2/B_1 zwischen den Kernen des Peptidrückgrats untersucht (Tabelle 5.5, untere Hälfte). Die größten Korrelationen findet man dabei zwischen dem Koeffizientenverhältnis B_2/B_1 des Amidprotons und den Kernen N ($r(H^N - N) = 0,69$ sowie H^α ($r(H^N - H^\alpha) = 0,57$). Die Korrelationen zwischen B_2/B_1 für C^α und den Kernen N, C' , H^N und H^α besitzen ein negatives Vorzeichen, während die übrigen Korrelationen ein positives Vorzeichen aufweisen.

5.3.3 Druckabhängigkeit der Kohlenstoffkerne der Peptidseitenketten

In diesem Abschnitt wurde die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Kohlenstoffkerne für die Seitenketten der ^{13}C -markierten Aminosäure X3 in dem Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ untersucht. Die Druckabhängigkeit der Kohlenstoffkerne des Peptidrückgrats wurden bereits in Kapitel 5.3.2 behandelt. Die Messreihen wurden bei Drücken von 3 MPa bis 200 MPa bei einer Temperatur von 283 K durchgeführt. Die Spektren wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer mit Raumtemperaturprobenkopf (QXI) unter Verwendung des Bruker Pulsprogramms *zgnoe* ohne Entkopplung der Protonen aufgenommen. Zusätzliche Druckreihen wurden für Histidin bei einem pH-Wert von 4,0 und 8,5 durchgeführt, wobei die Auswertung bei pH 8,5 aufgrund der schlechten Signalqualität nicht möglich war. Die chemische Verschiebung über den

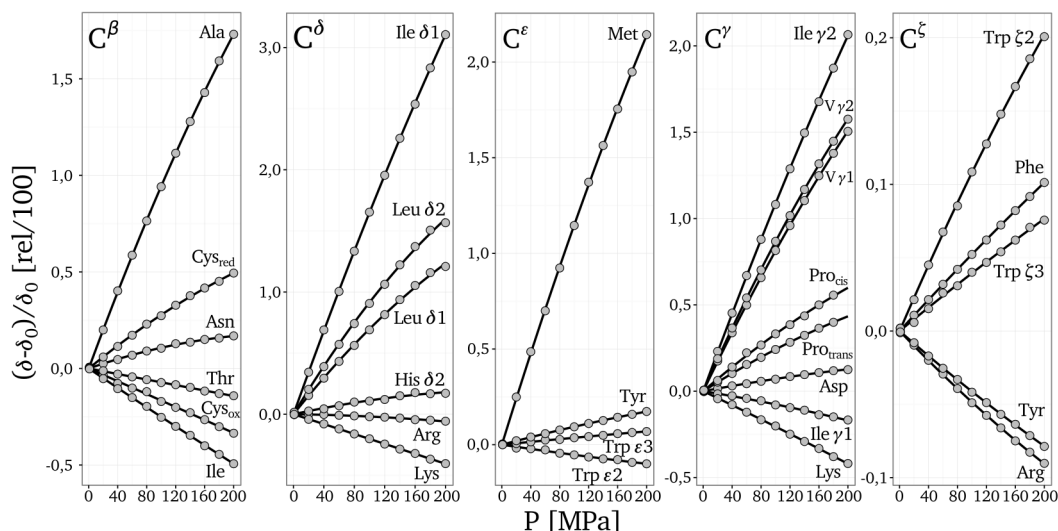


Abbildung 5.7: Druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung für die Kohlenstoffkerne der Seitenketten in dem Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂. Die Abbildung zeigt die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung einiger ausgewählter Aminosäuren für die Kerne C^β, C^δ, C^ε, C^γ und C^ζ in dem Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂. Die Proben enthielten 5 mM Ac-GGXA-NH₂, 20 mM Tris-d₁₁, 0,5 mM DSS, H₂O/D₂O 90%/10%, pH 6,7 und wurden bei einer Temperatur von 283 K vermessen.

Druck wurde mit einem Polynom zweiter Ordnung $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$ gefittet, wobei δ_0 die chemische Verschiebung bei Normaldruck (siehe Kapitel 5.3.1), B_1 den linearen Druckkoeffizienten und B_2 den nicht linearen Druckkoeffizienten darstellt. Abbildung 5.7 zeigt exemplarisch die druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung für einige ausgewählte Aminosäuren.

Die über das Polynom zweiter Ordnung erhaltenen Druckkoeffizienten B_1 und B_2 sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst.

Der Mittelwert des linearen Druckkoeffizienten B_1 beträgt für die C^β-Kerne $-0,08$ ppm/GPa mit einer Standardabweichung von $0,67$ ppm/GPa. Dabei verhalten sich die Aminosäuren bezüglich des Vorzeichens sehr unterschiedlich. Eine Sonderstellung nimmt hierbei Alanin mit dem größten Wert für B_1 von $1,95$ ppm/GPa ein. Dies liegt aller Wahrscheinlichkeit nach an der endständigen -C^βH₃ Gruppe, die bis auf die Bindung zum C^α keine weitere Kohlenstoffbindung aufweist. Bei den längeren Kohlenstoffketten, wie zum Beispiel für Isoleucin ($-0,99$ ppm/GPa), Leucin ($-0,84$ ppm/GPa) oder Valin ($-0,72$ ppm/GPa) zeigt das C^β ein zu Alanin gegensätzliches Vorzeichen. Sehr kleine Druckkoeffizienten findet man für Aspartat ($0,09$ ppm/GPa) und Histidin (pH 4,0: $-0,09$ ppm/GPa, pH 6,7: $-0,05$ ppm/GPa).

X3	Kern	B_1 [ppm/GPa]	B_2 [ppm/GPa ²]	Kern	B_1 [ppm/GPa]	B_2 [ppm/GPa ²]
A	C ^β	1,95 ± 0,02	-1,50 ± 0,07			
C _{red}	C ^β	0,87 ± 0,02	-0,86 ± 0,09			
C _{ox}	C ^β	-0,68 ± 0,05	-0,04 ± 0,24			
D	C ^β	0,09 ± 0,02	-0,63 ± 0,09	C ^γ	1,42 ± 0,05	-1,4 ± 0,2
E	C ^β	-0,21 ± 0,01	-0,73 ± 0,05	C ^γ	-0,23 ± 0,01	0,06 ± 0,04
	C ^δ	1,10 ± 0,01	-1,03 ± 0,07			
F	C ^β	-0,32 ± 0,01	-0,36 ± 0,05	C ^γ	-0,51 ± 0,01	0,56 ± 0,02
	C ^δ	0,68 ± 0,01	-0,25 ± 0,03	C ^ε	0,69 ± 0,01	-0,23 ± 0,03
	C ^ζ	0,70 ± 0,01	-0,22 ± 0,02			
H	C ^β	-0,05 ± 0,06	0,1 ± 0,3	C ^γ	-1,2 ± 0,6	1,6 ± 2,9
	C ^{δ2}	1,6 ± 0,2	-2,8 ± 0,9	C ^{ε1}	1,5 ± 0,1	-1,9 ± 0,5
H ^{4,0}	C ^β	-0,09 ± 0,07	-0,1 ± 0,3	C ^γ	-0,9 ± 0,1	-0,8 ± 0,6
	C ^{δ2}	0,82 ± 0,08	-0,4 ± 0,4	C ^{ε1}	1,33 ± 0,04	-1,4 ± 0,2
I	C ^β	-0,99 ± 0,02	0,16 ± 0,10	C ^{γ1}	-0,19 ± 0,02	-0,22 ± 0,08
	C ^{δ1}	2,26 ± 0,01	-1,26 ± 0,06	C ^{γ2}	1,99 ± 0,02	-1,01 ± 0,09
K	C ^β	-0,61 ± 0,01	-0,25 ± 0,06	C ^γ	-0,49 ± 0,01	-0,12 ± 0,06
	C ^δ	-0,59 ± 0,01	-0,02 ± 0,05	C ^ε	-0,18 ± 0,01	-0,33 ± 0,04
L	C ^β	-0,84 ± 0,05	0,4 ± 0,2	C ^γ	-0,64 ± 0,03	0,4 ± 0,2
	C ^{δ1}	1,94 ± 0,06	-2,0 ± 0,3	C ^{δ2}	2,40 ± 0,07	-2,70 ± 0,35
M	C ^β	-0,38 ± 0,02	-0,6 ± 0,1	C ^γ	-0,53 ± 0,02	0,04 ± 0,09
	C ^ε	2,07 ± 0,03	-1,3 ± 0,1			

Tabelle 5.6: Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kohlenstoffkerne der Seitenketten des Modellpeptids Ac-GGXA-NH₂ (Teil 1) Die Tabelle zeigt die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 der Kohlenstoffkerne für die Seitenkette der Aminosäure X3 im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂. Diese wurden über Anfitten der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit vom Druck mit Hilfe der Funktion $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$ ermittelt. Die Daten wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer mit einem Raumtemperaturprobenkopf (QXI) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte über eindimensionale ¹³C-Spektren, die mit dem Bruker Pulsprogramm *zgnoe* ohne Entkopplung der Protonen aufgenommen wurden. Die Proben enthielten 5 mM Ac-GGXA-NH₂, 20 mM Tris-d₁₁, 0,5 mM DSS, H₂O/D₂O 90%/10%, pH 6,7 und wurden bei einer Temperatur von 283 K vermessen. Für Histidin wurde eine zusätzliche Messreihe bei einem pH-Wert von 4,0 durchgeführt (H^{4,0}). In Teil 2 der Tabelle sind die Mittelwerte der Kerne mit der einfachen Standardabweichung angegeben.

Der Mittelwert des linearen Druckkoeffizienten B_1 für die C^γ-Kerne beträgt 0,25 ppm/GPa mit einer Standardabweichung von 1,05 ppm/GPa. Wie auch schon für die -CH₃ Gruppe des Alanins beobachtet, zeigen die endständigen -C^γH₃ Gruppen für Isoleucin C^{γ2} (1,99 ppm/GPa), Threonin C^{γ2} (1,72 ppm/GPa), Valin C^{γ1} (1,84 ppm/GPa)

X3	Kern	B_1 [ppm/GPa]	B_2 [ppm/GPa ²]	Kern	B_1 [ppm/GPa]	B_2 [ppm/GPa ²]
N	C^β	$0,51 \pm 0,02$	$-0,90 \pm 0,08$	C^γ	$0,54 \pm 0,07$	$-0,3 \pm 0,3$
P_{trans}	C^β	$0,66 \pm 0,01$	$-0,63 \pm 0,05$	C^γ	$0,73 \pm 0,01$	$-0,69 \pm 0,06$
	C^δ	$0,68 \pm 0,01$	$-0,28 \pm 0,05$			
P_{cis}	C^β	$0,52 \pm 0,02$	$-0,6 \pm 0,1$	C^γ	$0,90 \pm 0,04$	$-0,8 \pm 0,2$
	C^δ	$0,84 \pm 0,07$	$-1,0 \pm 0,4$			
Q	C^β	$-0,40 \pm 0,02$	$-0,33 \pm 0,07$	C^γ	$0,29 \pm 0,03$	$-0,5 \pm 0,1$
	C^δ	$0,34 \pm 0,04$	$-0,2 \pm 0,2$			
R	C^β	$-0,34 \pm 0,02$	$-0,58 \pm 0,10$	C^γ	$-0,51 \pm 0,02$	$-0,12 \pm 0,09$
	C^δ	$-0,04 \pm 0,02$	$-0,46 \pm 0,09$	C^ζ	$-0,83 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,06$
S	C^β	$-0,06 \pm 0,02$	$-0,34 \pm 0,08$			
T	C^β	$-0,50 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,12$	$C^{\gamma 2}$	$1,72 \pm 0,01$	$-1,32 \pm 0,06$
V	C^β	$-0,72 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,05$	$C^{\gamma 1}$	$1,84 \pm 0,01$	$-1,26 \pm 0,05$
	$C^{\gamma 2}$	$1,90 \pm 0,01$	$-1,58 \pm 0,06$			
W	C^β	$0,14 \pm 0,02$	$-0,81 \pm 0,09$	C^γ	$-0,47 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,2$
	$C^{\delta 1}$	$1,42 \pm 0,04$	$-0,7 \pm 0,2$	$C^{\epsilon 2}$	$-0,78 \pm 0,09$	$0,4 \pm 0,5$
	$C^{\delta 2}$	$0,16 \pm 0,05$	$-0,03 \pm 0,26$	$C^{\epsilon 3}$	$0,46 \pm 0,03$	$-0,18 \pm 0,15$
	$C^{\zeta 2}$	$1,32 \pm 0,03$	$-0,8 \pm 0,1$	$C^{\eta 2}$	$1,06 \pm 0,04$	$-0,8 \pm 0,2$
	$C^{\zeta 3}$	$0,51 \pm 0,03$	$-0,1 \pm 0,2$			
Y	C^β	$-0,28 \pm 0,01$	$-0,35 \pm 0,05$	C^γ	$-0,60 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,09$
	C^δ	$0,61 \pm 0,02$	$-0,25 \pm 0,08$	C^ϵ	$1,20 \pm 0,02$	$-0,86 \pm 0,08$
	C^ζ	$-0,68 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,05$			
\bar{X}	C^β	$-0,08$ (0,67)	$-0,40$ (0,44)	C^γ	$0,25$ (1,05)	$-0,34$ (0,79)
	C^δ	$0,95$ (0,85)	$-0,90$ (0,92)	C^ϵ	$0,79$ (0,94)	$-0,73$ (0,78)
	C^ζ	$0,20$ (0,93)	$-0,07$ (0,51)	C^η	$1,06$ (-)	$-0,82$ (-)

Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kohlenstoffkerne der Seitenketten des Peptids Ac-GGXA-NH₂ (Teil 2) Beschriftung siehe Tabelle 5.6

sowie Valin $C^{\gamma 2}$ (1,90 ppm/GPa) große positive Werte für den linearen Druckkoeffizienten B_1 , die deutlich außerhalb der Standardabweichung liegen.

Für die C^δ -Kerne liegt der Mittelwert des linearen Druckkoeffizienten B_1 bei 0,95 ppm/GPa mit einer Standardabweichung von 0,85 ppm/GPa. Eine starke pH-Abhängigkeit zeigt sich für das Histidin $H^{\delta 2}$ mit einem Druckkoeffizienten B_1 von 0,82 ppm/GPa bei einem pH-Wert von 4,0 und 1,63 ppm bei einem pH-Wert von 6,7. Wiederum zeigen die -CH₃ Gruppen für Isoleucin $C^{\delta 1}$ (2,26 ppm/GPa), Leucin $C^{\delta 1}$ (1,94 ppm/GPa) und Leucin $C^{\delta 2}$ (2,40 ppm/GPa) die größten Werte für den linearen Druckkoeffizienten B_1 .

Der Mittelwert für den linearen Druckkoeffizienten B_1 für die C^ϵ -Kerne liegt bei 0,79 ppm/GPa mit einer Standardabweichung von 0,94 ppm/GPa. Die -CH₃ Gruppe

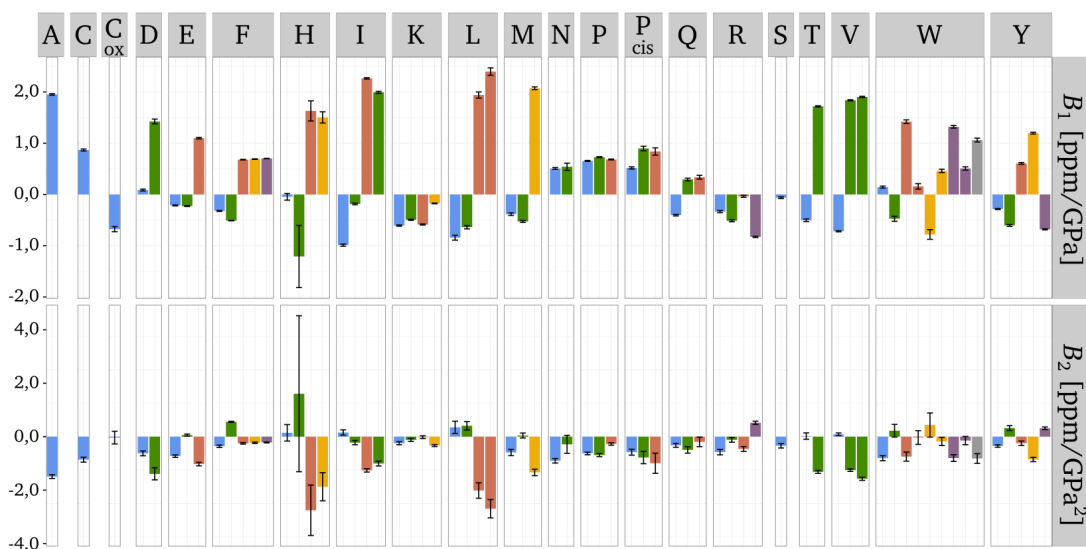


Abbildung 5.8: Übersicht der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kohlenstoffkerne der Seitenketten in dem Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂. Die Abbildung zeigt die Druckkoeffizienten der Kerne C^β (blau), C^γ (grün), C^δ (rot), C^ε (gelb), C^ζ (violett) und C^η (grau). Die gezeigten Druckkoeffizienten sind in Tabelle 5.6 angegeben. Die Daten wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer mit einem Raumtemperaturprobenkopf (QXI) mit Hilfe des Bruker Pulsprogramms *zgnoe* ohne Entkopplung der Protonen aufgenommen. Die Proben enthielten 5 mM Ac-GGXA-NH₂, 20 mM Tris-d₁₁, 0,5 mM DSS, H₂O/D₂O 90%/10%, pH 6,7 und wurden bei einer Temperatur von 283 K vermessen.

des Methionins zeigte mit 2,07 ppm/GPa den größten Wert für B_1 . Auch für Histidin konnte ein großer Wert für den Druckkoeffizienten B_1 gefunden werden, der jedoch im Gegensatz zu Histidin C^{δ2} eine geringere pH-Abhängigkeit aufweist (pH 4,0: 1,33 ppm/GPa, pH 6,7: 1,50 ppm/GPa).

Für die C^ζ-Kerne liegt der Mittelwert des linearen Druckkoeffizienten bei 0,20 ppm/GPa mit einer Standardabweichung von 0,93 ppm/GPa. Der Mittelwert des linearen Druckkoeffizienten für C^η entspricht dem des Tryptophan C^{η2} mit 1,06 ppm/GPa, da dies das einzige Vorkommen dieses Kerns darstellt.

Die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 der Kerne der Seitenketten in dem Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ für die ¹³C-markierte Aminosäure X3 sind in Abbildung 5.8 zusammenfassend dargestellt. Dabei zeigt sich für die meisten Aminosäuren und Kerne die Tendenz eines sich gegensätzlich zu B_1 verhaltenden nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 .

Im Gegensatz zu den Kernen des Peptidrückgrats, lassen sich die Kerne der Nomenklatur nach untereinander nur schwer vergleichen, da sie unterschiedliche funktionel-

Kern bzw. Gruppe	$\overline{B_1}$ [ppm/GPa]	$\overline{B_2}$ [ppm/GPa ²]	$\overline{B_2/B_1}$ [GPa ⁻¹]	$ \overline{B_1} $ [ppm/GPa]	$ \overline{B_2} $ [ppm/GPa ²]	$ \overline{B_2/B_1} $ [GPa ⁻¹]
H ^N	0,52 ± 0,13	-0,41 ± 0,22	-0,73 ± 0,32	0,52 ± 0,13	0,41 ± 0,22	0,73 ± 0,32
N	2,95 ± 0,40	-2,34 ± 0,75	-0,79 ± 0,20	2,95 ± 0,40	2,34 ± 0,75	0,79 ± 0,20
H ^α	-0,04 ± 0,05	0,02 ± 0,09	-0,41 ± 2,15	0,06 ± 0,03	0,07 ± 0,06	1,40 ± 1,66
C ^α	-0,41 ± 0,38	0,12 ± 0,42	-0,11 ± 0,83	0,50 ± 0,26	0,31 ± 0,30	0,63 ± 0,53
C'	0,59 ± 0,18	-0,67 ± 0,24	-1,18 ± 0,35	0,59 ± 0,18	0,67 ± 0,24	1,18 ± 0,35
C=O _{Amid}	0,44 ± 0,14	-0,24 ± 0,07	-0,56 ± 0,03	0,44 ± 0,14	0,24 ± 0,07	0,55 ± 0,03
C=O _{Carboxy}	1,26 ± 0,23	-1,21 ± 0,26	-0,96 ± 0,03	1,26 ± 0,23	1,21 ± 0,26	0,96 ± 0,03
C _{quartär}	-0,43 ± 0,34	0,23 ± 0,23	-0,48 ± 0,38	0,49 ± 0,21	0,24 ± 0,21	0,48 ± 0,38
C _{aromatisch}	0,40 ± 0,88	-0,30 ± 0,93	-0,65 ± 0,41	0,85 ± 0,42	0,66 ± 0,71	0,65 ± 0,41
C ^β -CH ₂	-0,14 ± 0,51	-0,42 ± 0,37	-0,29 ± 3,14	0,42 ± 0,30	0,50 ± 0,25	2,25 ± 2,13
C-H	-0,71 ± 0,20	0,17 ± 0,17	-0,24 ± 0,27	0,71 ± 0,20	0,17 ± 0,17	0,24 ± 0,27
C-H ₂	-0,02 ± 0,52	-0,25 ± 0,23	1,06 ± 3,87	0,44 ± 0,25	0,27 ± 0,21	1,71 ± 3,61
C-H ₃	2,01 ± 0,21	-1,55 ± 0,51	-0,77 ± 0,21	2,01 ± 0,21	1,55 ± 0,51	0,77 ± 0,21

Tabelle 5.7: Gemittelte Druckkoeffizienten für die in unterschiedliche Gruppen eingeteilten Kohlenstoffkerne Die Tabelle zeigt die gemittelten Druckkoeffizienten B_1 und B_2 sowie deren Koeffizientenverhältnis B_2/B_1 für die unterschiedlichen Kerne beziehungsweise Gruppen der Aminosäure X3 im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂. Dabei stellen H^N, N, H^α, C^α und C' die Kerne des Peptidrückgrats dar. Die Kohlenstoffkerne der Seitenketten sind in verschiedene Gruppen gemäß ihrer chemischen Struktur eingeteilt (siehe Anhang Tabelle 9.13). Die Daten für die Amidgruppe wurden aus Koehler et al. (2012), die der H^α aus Beck Erlach et al. (2016b) entnommen. Zusätzlich angegeben sind die Mittelungen und Standardabweichungen der absoluten Beträge $|B_1|$, $|B_2|$ und $|B_2/B_1|$.

le Gruppen darstellen (Glutamin, Glutamat) beziehungsweise eine unterschiedliche Konnektivität zu den anderen Kernen aufweisen. Zudem besitzen einige Kerne unterschiedliche benachbarte Heterokerne wie zum Beispiel Schwefel (Cystein, Methionin), Sauerstoff in einer Alkoholgruppe (Serin, Threonine) oder Sauerstoff als Teil einer Carbonylgruppe (Aspartat, Asparagin, Glutamin, Glutamat). Die sp²-hybridisierten Kohlenstoffkerne der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin stellen zusätzlich eine eigene Gruppe dar. Aus diesem Grund wurden die Kohlenstoffkerne in unterschiedliche Gruppen eingeteilt (siehe Anhang Tabelle 9.13) und der Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt. Diese sind sowohl unter Berücksichtigung des Vorzeichens, wie auch aus absoluten Beträgen ermittelt in Tabelle 5.7 angegeben.

Dabei zeigt sich für die meisten Kerne des Peptidrückgrats ein homogenes Verhalten. Mittlere Druckeffekte findet man für das Amidproton sowohl für den linearen Druckkoeffizienten B_1 als auch für den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 . Die stärksten Druckkoeffizienten zeigt der Amidstickstoff des Peptidrückgrats für B_1 als auch für B_2 . Interessanterweise findet man für das Koeffizientenverhältnis B_2/B_1 für das Amidproton und den Amidstickstoff vergleichbare Werte.

Für die H^α -Kerne findet man sehr geringe Druckeffekte und die Kurven weisen im Mittel nahezu keine Krümmung auf. Eine geringe Krümmung jedoch mit größerer Standardabweichung weisen die C^α -Kerne auf, die für den linearen Druckkoeffizienten mittlere Effekte in der Größenordnung des H^N zeigen. Insgesamt zeigen die Kerne H^α und C^α mit großen Standardabweichungen eine starke Abhängigkeit von den unterschiedlichen Seitenketten.

Der Carbonylkohlenstoff C' des Peptidrückgrats weist etwas stärkere Druckeffekte als das Amidproton auf und verhält sich mit niedrigen Standardabweichungen sehr homogen für die unterschiedlichen Aminosäuren. Die Krümmung ist im Mittel stärker als bei allen anderen Kernen, was durch das betragsmäßig große Koeffizientenverhältnis B_2/B_1 zum Ausdruck gebracht wird.

Die in unterschiedliche Gruppen eingeteilten Kohlenstoffkerne der Seitenketten zeigen ebenfalls ein unterschiedliches Verhalten, jedoch weisen sie im Vergleich zu den Kernen des Peptidrückgrats größere Standardabweichungen und damit für die unterschiedlichen Aminosäuren ein inhomogeneres Verhalten auf.

Deutliche Unterschiede zeigen sich für die Carbonylkohlenstoffe in den Amidgruppen beziehungsweise Carboxygruppen der Peptidseitenkette. Der Carbonylkohlenstoff der Carboxygruppe zeigt für den linearen Druckkoeffizienten einen ca. um das dreifache stärkeren Effekt verglichen mit dem Carbonylkohlenstoff der Amidgruppe. Der nicht lineare Druckkoeffizient B_2 zeigt im Mittel einen fünfmal stärkeren Effekt. Dies schlägt sich in einem betragsmäßig ca. doppelt so großen Koeffizientenverhältnis B_2/B_1 nieder.

Die sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffkerne der Aromaten weisen sehr große Standardabweichungen und somit unterschiedliche Druckeffekte auf. Bei Betrachtung der Mittelwerte aus den absoluten Werten fällt zudem auf, dass sich die Standardabweichung in diesem Fall vermindert, was auf unterschiedliche Vorzeichen der Druckeffekte schließen lässt (Abbildung 5.8). Die quartären Kohlenstoffe zeigen mittlere Druckeffekte, wobei ähnlich dem C^α und den Kohlenstoffen der C-H Gruppe der Mittelwert der linearen Druckkoeffizienten negativ und der des nicht linearen Druckkoeffizienten positiv ist.

Die Kohlenstoffkerne der C^β -CH₂ und der C-H₂ Gruppe zeigen vergleichbar starke Druckeffekte mit großen Standardabweichungen, wobei die Mittelwerte der C^β -CH₂ für B_2 eine stärkere Krümmung aufweisen.

Die Kohlenstoffkerne der C-H Gruppe zeigen für den linearen Druckkoeffizienten einen negativen Wert und für den nicht linearen Druckkoeffizienten einen positiven Wert. Dieser Effekt deckt sich mit dem des C^α , welches bis auf Glycin ebenfalls als C-H Gruppe angesehen werden kann. Die Druckeffekte der Kohlenstoffkerne der C-H Gruppe weisen dabei deutlich stärkere Druckeffekte für B_1 auf.

Nach dem Amidstickstoff des Peptidrückgrats weisen die Kohlenstoffkerne der C-H₃ Gruppe die größten Druckeffekte auf. Diese besitzen große Werte für den linearen und nicht linearen Druckkoeffizienten und zeigen auch in Bezug auf das Vorzeichen ein homogenes Verhalten. Zudem besitzen sie im Vergleich zu den anderen Gruppen der Peptidseitenkette sehr kleine Standardabweichungen.

5.3.4 Druck- und Temperaturabhängigkeit der Kohlestoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂

Zusätzlich zu den Druckreihen der Modellpeptide Ac-GGXA-NH₂ bei einer Temperatur von 283 K, wurden für das Peptid Ac-GGFA-NH₂ Druckreihen von 3 MPa bis 200 MPa bei den Temperaturen 278 K, 283 K, 288 K, 293 K, 298 K, 303 K und 308 K untersucht. Das Modellpeptid mit Phenylalanin an der Position 3 wurde gewählt, da eine große Anzahl an unterschiedlichen ¹³C-markierten Kernen vorhanden ist (Kerne C', C^α, C^β, C^γ, C^δ, C^ε und C^ζ) und die Druckkoeffizienten mit einer hohen Genauigkeit bestimmt werden konnten ($\bar{R}^2(B_1) > 0,999$ und $\bar{R}^2(B_2) > 0,999$). Dies spiegelt sich auch in den kleinen Fehlern der Druckkoeffizienten wider (siehe Tabelle 5.3).

Die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von der Temperatur wurde bereits von Kjaergaard et al. (2011) für das Modellpeptid Ac-GGXGG-NH₂ untersucht. Diese wurde für die Kerne des Peptidrückgrats und C^β über einen Temperaturbereich von 278 K bis 318 K in Schritten von 10 K mit Hilfe eines linearen Modells untersucht. Da die Abhängigkeit vom Druck in den meisten Fällen eine nicht lineare Abhängigkeit aufweist, wurde für das Peptid Ac-GGFA-NH₂ untersucht, ob ein Polynom zweiter Ordnung die Daten eventuell besser beschreibt als das lineare Modell. Die Untersuchung erfolgte für Temperaturen von 278 K bis 308 K in Schritten von 5 K. Die chemischen Verschiebungen bei Normaldruck wurden aus den Druckreihen der jeweiligen Temperatur ermittelt (siehe Anhang Tabelle 9.12). Die Temperaturabhängigkeit der chemischen

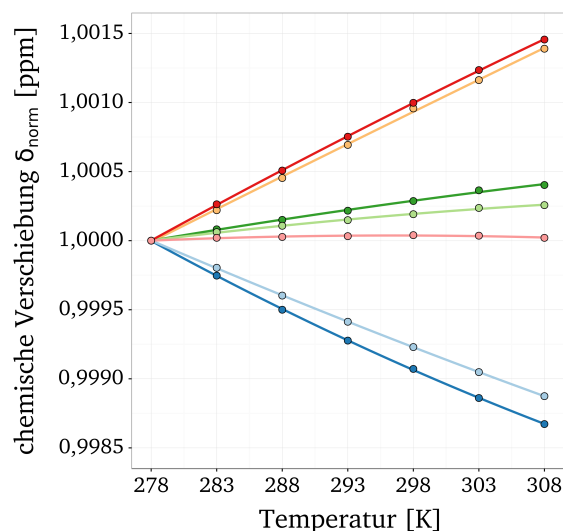


Abbildung 5.9: Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung bei Normaldruck für die Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂ Gezeigt sind die auf eine Temperatur von 278 K normierten Daten aus Tabelle 9.12 für C' (hellblau), C^α (dunkelblau), C^β (orange), C^γ (rot), C^δ (dunkelgrün), C^ε (hellgrün) und C^ζ (rosa). Die durchgezogene Linie entspricht einem polynominalen Fit zweiter Ordnung.

Verschiebung für die Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂ sind in Abbildung 5.9 wiedergegeben. Die Untersuchung der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit der Temperatur bei Normaldruck erfolgte mit dem in Gleichung 5.1 angegebenen Polynom zweiter Ordnung, wobei δ_0^T die chemische Verschiebung bei $T = 0$ K, C_1 den linearen Temperaturkoeffizienten und C_2 den nicht linearen Temperaturkoeffizienten darstellt.

$$\delta = \delta_0^T + C_1 T + C_2 T^2 \quad (5.1)$$

Die Anwendung des linearen Modells erfolgte durch Anfitten mit der in Gleichung 5.1 angegebenen Funktion, wobei der nicht lineare Temperaturkoeffizient C_2 Null gesetzt wurde. In Abbildung 5.9 sind die auf 278 K normierten unterschiedlichen Verläufe der chemische Verschiebung der Kohlenstoffkerne abgebildet. Dabei zeigen C^β und C^γ eine starke Tieffeldverschiebung, C' und C^α eine starke Hochfeldverschiebung und die Kerne C^δ, C^ε und C^ζ eine leichte Tieffeldverschiebung.

Die chemische Verschiebung in Abhängigkeit der Temperatur wurden mit Hilfe eines linearen Modells und eines Polynoms zweiter Ordnung (Gleichung 5.1) untersucht. Die erhaltenen Koeffizienten sind in Tabelle 5.8 zusammengefasst. Die Entscheidung, welches Modell die Daten besser beschreibt, wurde anhand des in ANOVA implemen-

Kern	linear	polynomial	
	C_1 [ppb/K]	C_1 [ppb/K]	C_2 [ppb/K ²]
C'	$-6,61 \pm 0,07$	$-17,5 \pm 1,0$	$0,019 \pm 0,002$
C^α	$-2,56 \pm 0,06$	$-11,3 \pm 0,7$	$0,015 \pm 0,001$
C^β	$1,85 \pm 0,02$	$2,5 \pm 1,6$	$-0,001 \pm 0,003$
C^γ	$6,74 \pm 0,07$	$16,3 \pm 1,6$	$-0,016 \pm 0,003$
C^δ	$1,80 \pm 0,05$	$7,9 \pm 2,8$	$-0,010 \pm 0,005$
C^ϵ	$1,13 \pm 0,06$	$8,7 \pm 1,8$	$-0,013 \pm 0,003$
C^ζ	$0,10 \pm 0,06$	$8,4 \pm 1,2$	$-0,014 \pm 0,002$

Tabelle 5.8: Lineare und polynomiale Temperaturabhängigkeit der Kohlenstoffkerne im Tetrapeptid Ac-GGFA-NH₂ Diese Tabelle zeigt die Fitkoeffizienten der Daten aus Tabelle 9.12, die linear ($\delta_0 = \delta_0^T + C_1 T$) und mit einem Polynom zweiter Ordnung ($\delta_0 = \delta_0^T + C_1 T + C_2 T^2$) gefittet wurden. Die Modelle wurden mit dem in ANOVA implementierten F-Test und einem angenommenen Signifikanzkriterium von $p = 0,05$ verglichen. Dabei sind die Koeffizienten desjenigen Modells fett hervorgehoben, welches die Daten besser beschreibt.

tierten F-Tests mit einem Signifikanzkriterium von $p = 0,05$ getroffen. In Tabelle 5.8 sind die Koeffizienten des Modells, welches die Daten besser beschreibt fett dargestellt.

Zunächst werden die Koeffizienten des linearen Modells der Kerne C' , C^α und C^β mit denen in Kjaergaard et al. (2011) verglichen. Für den Carbonylkohlenstoff des Peptidrückgrats ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit einer Differenz von 0,3 ppb/K. Für C^α ergibt sich eine relativ große Differenz von 2,1 ppb/K und für C^β eine mittlere Übereinstimmung von 0,5 ppb/K. Dabei muss beachtet werden, dass es sich um unterschiedliche Modellpeptide handelt und in Kjaergaard et al. (2011) 1 M Urea zugesetzt wurde.

Bis auf C^β und C^δ beschreibt die polynomiale Funktion zweiter Ordnung die Daten besser als das lineare Modell. Somit weisen die Kerne C' , C^α , C^γ , C^ϵ und C^ζ einen signifikanten nicht linearen Anteil auf. Die stärksten Effekte findet man für C' und C^γ mit nahezu gleich großen Werten, jedoch unterschiedlichen Vorzeichen. Einen großen Effekt zeigt auch C^α , während C^ϵ und C^ζ nur mittelstarke Effekte aufweisen. C^β und C^δ zeigen für das lineare Modell eine mittelstarke Abhängigkeit von der Temperatur. Wie auch schon für die Druckkoeffizienten beobachtet, besitzen bei Anwendung der polynominalen Funktion zweiter Ordnung die linearen Temperaturkoeffizienten und die nicht linearen Temperaturkoeffizienten gegensätzliche Vorzeichen.

Im Folgenden wird der Einfluss der Temperatur auf die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 sowie der Einfluss des Drucks auf die Temperaturkoeffizienten C_1 und C_2 für die

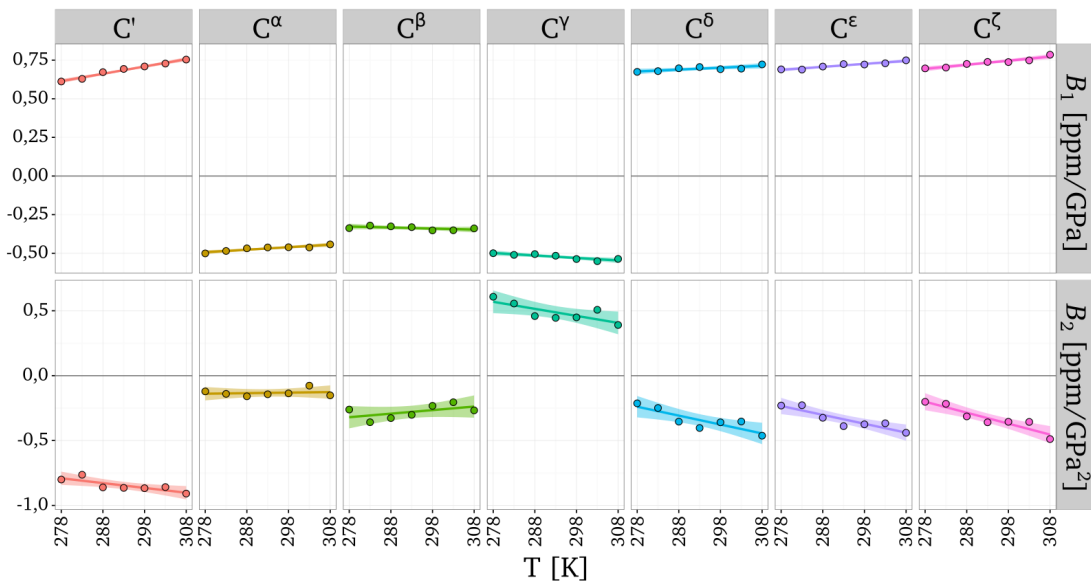


Abbildung 5.10: Temperaturinduzierte Änderung der Druckkoeffizienten für die Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂ Die Abbildung zeigt den linearen Druckkoeffizienten B_1 und den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 der Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂ für die Temperaturen 278 K bis 308 K in Schritten von 5 K. Die Ermittlung der Druckkoeffizienten erfolgte mit Hilfe der Funktion $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$ über einen Druckbereich von 3 MPa bis 200 MPa. Die der Abbildung zugrundeliegenden Daten sind im Anhang in Tabelle 9.14 wiedergegeben. Die lineare Regression der wiedergegebenen Daten führte zu den in Tabelle 5.9 angegebenen Koeffizienten.

Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂ untersucht. Dabei wurde das Verhalten der chemischen Verschiebung bei Drücken von 3 MPa bis 200 MPa und Temperaturen von 278 K bis 308 K untersucht. Diese wurde je nach Abhängigkeit mit einem Polynom zweiter Ordnung gefittet und die erhaltenen Koeffizienten anschließend mit Hilfe eines linearen Modells untersucht.

Die Temperaturabhängigkeit des linearen Druckkoeffizienten B_1 und des nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 ist in Abbildung 5.10 dargestellt. Die ermittelten linearen Koeffizienten für die Abhängigkeit der Druckkoeffizienten vom Druck sind in Tabelle 5.9 zusammengefasst.

Für den Druckkoeffizienten erster Ordnung B_1 zeigt der Carbonylkohlenstoff die stärkste Temperaturabhängigkeit, während C^β nahezu keinen Einfluss der Temperatur zeigt. Mittlere Effekte zeigen C^α , C^δ , C^γ und C^ζ . Interessant ist hierbei jedoch das Vorzeichen dieser Effekte. Während die Kerne, die ein positives B_1 besitzen (C' , C^δ , C^ϵ , C^ζ) mit Erhöhung der Temperatur eine stärkere Druckantwort zeigen, so verhalten sich die

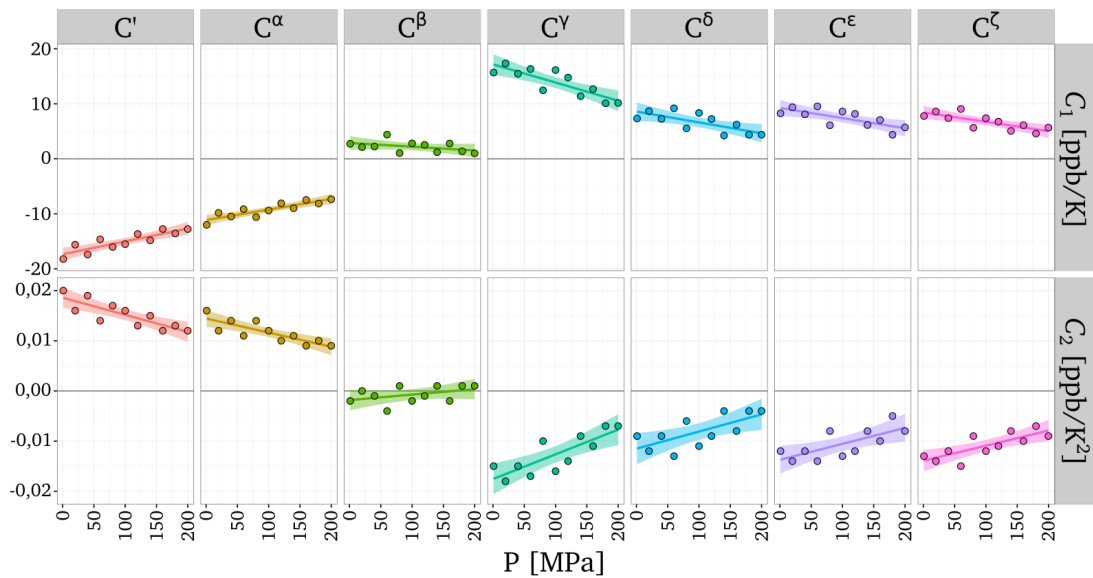


Abbildung 5.11: Druckinduzierte Änderung der Temperaturkoeffizienten für die Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂ Die Abbildung zeigt den linearen Temperaturkoeffizienten C_1 und den nicht linearen Temperaturkoeffizienten C_2 der Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂ für die Drücke 3 MPa bis 200 MPa in Schritten von 20 MPa. Die Ermittlung der Temperaturkoeffizienten erfolgte mit Hilfe der Funktion $\delta = \delta_0^T + C_1 T + C_2 T^2$ über einen Temperaturbereich von 278 K bis 308 K. Die der Abbildung zugrundeliegenden Daten sind im Anhang in Tabelle 9.15 wiedergegeben. Die lineare Regression der wiedergegebenen Daten führte zu den in Tabelle 5.9 angegebenen Koeffizienten.

Kerne mit negativem B_1 (C^α , C^β , C^γ) im Rahmen der Meßgenauigkeit unterschiedlich. Der Druckkoeffizient B_1 wird für C^α betragsmäßig kleiner, für C^β erfolgt nahezu keine Änderung und C^γ weist eine betragsmäßige Erhöhung auf.

Für die Temperaturabhängigkeit des nicht linearen Druckkoeffizienten zeigt sich ebenfalls ein unterschiedliches Verhalten. Grundsätzlich konnte beobachtet werden, dass das Temperaturverhalten von B_2 dem des linearen Koeffizienten mit entgegengesetztem Vorzeichen entspricht. Aufgrund des größeren Fehlers bei der Bestimmung des nicht linearen Druckkoeffizienten zeigen die Datenpunkte, verglichen mit denen des Druckkoeffizienten B_1 , eine größere Streuung. Die stärksten Änderungen mit der Temperatur findet man für C^ζ . Ebenfalls starke Effekte zeigen C^γ , C^δ und C^ϵ . Einen mittelstarken Effekt zeigt der Carbonylkohlenstoff C' , während C^α nahezu keinen Einfluss der Temperatur auf den Druckkoeffizienten B_2 erkennen lässt. Ein nahezu spiegelbildliches Verhalten zeigt sich bei der Betrachtung der Richtung der Änderung. Klammert man C^α und C^β mit kleiner Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten

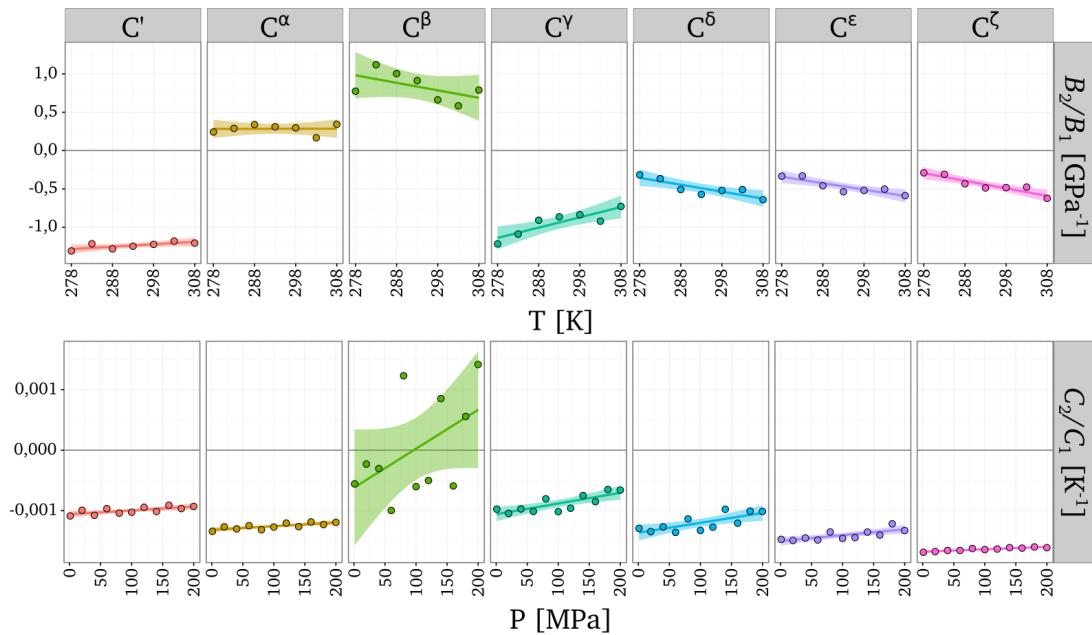


Abbildung 5.12: Temperaturinduzierte Änderung des Druckkoeffizientenverhältnisses und druckinduzierte Änderung des Temperaturkoeffizientenverhältnisses für die Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂ Die Abbildung zeigt die Änderung des Druckkoeffizientenverhältnisses B_2/B_1 in Abhängigkeit der Temperatur (oberer Teil) und die Änderung des Temperaturkoeffizientenverhältnisses C_2/C_1 in Abhängigkeit des Drucks (unterer Teil). Die Untersuchungen erfolgten über einen Druckbereich von 3 MPa bis 200 MPa und einem Temperaturbereich von 278 K bis 308 K. Die Koeffizientenverhältnisse wurde aus den im Anhang gezeigten Koeffizienten berechnet (Tabelle 9.14 und 9.15). Die lineare Regression der wiedergegebenen Daten führte zu den in Tabelle 5.10 angegebenen Koeffizienten.

und C^γ mit einer negativen Steigung für die Temperaturabhängigkeit von B_1 und B_2 aus, so zeigen die anderen Kerne ein spiegelbildliches Verhalten bezüglich der Temperaturabhängigkeit des linearen Druckkoeffizienten B_1 . Die Kerne C' , C^δ , C^ϵ und C^ζ zeigen eine betragsmäßige Erhöhung des Druckeffekts.

Analog zu der Bestimmung der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 in Abhängigkeit der Temperatur, lassen sich die Temperaturkoeffizienten C_1 und C_2 in Abhängigkeit des Drucks bestimmen. Die Druckabhängigkeit des linearen Temperaturkoeffizienten C_1 und des nicht linearen Temperaturkoeffizienten C_2 für die Kohlenstoffe im Peptid Ac-GGFA-NH₂ ist in Abbildung 5.11 dargestellt.

Grundsätzlich zeigen die ermittelten Temperaturkoeffizienten über den Druck eine größere Streuung verglichen mit den Druckkoeffizienten über die Temperatur. Dies liegt zum einen an der Anzahl der Datenpunkte, die mit 7 Messpunkten für die Temperatur

Kern	$\partial B_1/\partial T$ [ppm/(K · GPa)]	$\partial B_2/\partial T$ [ppm/(K · GPa ²)]	$\partial C_1/\partial P$ [ppm/(GPa · K)]	$\partial C_2/\partial P$ [ppb/(GPa · K ²)]
C'	0,0047 ± 0,0003	−0,004 ± 0,001	0,023 ± 0,004	−0,033 ± 0,008
C ^α	0,0016 ± 0,0003	0,0004 ± 0,001	0,019 ± 0,003	−0,030 ± 0,006
C ^β	−0,0007 ± 0,0004	0,003 ± 0,002	−0,007 ± 0,005	0,011 ± 0,008
C ^δ	0,0012 ± 0,0004	−0,007 ± 0,002	−0,020 ± 0,006	0,033 ± 0,010
C ^ε	0,0019 ± 0,0002	−0,007 ± 0,001	−0,019 ± 0,006	0,033 ± 0,009
C ^γ	−0,0016 ± 0,0004	−0,005 ± 0,002	−0,033 ± 0,007	0,052 ± 0,012
C ^ζ	0,0026 ± 0,0004	−0,008 ± 0,001	−0,017 ± 0,005	0,031 ± 0,008

Tabelle 5.9: Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten B_1 und B_2 sowie Druckabhängigkeit der Temperaturkoeffizienten C_1 und C_2 der Kohlenstoffkerne im Modellpeptid Ac-GGFA-NH₂. Die Tabelle zeigt die Temperaturabhängigkeit des linearen Druckkoeffizienten $\partial B_1/\partial T$ und des nicht linearen Druckkoeffizienten $\partial B_2/\partial T$ sowie die Druckabhängigkeit des linearen Temperaturkoeffizienten $\partial C_1/\partial P$ und des nicht linearen Temperaturkoeffizienten $\partial C_2/\partial P$. Die Untersuchungen fanden in einem Druckbereich von 3 MPa bis 200 MPa und einem Temperaturbereich von 278 K bis 308 K statt.

geringer ist, als die der Druckreihe mit 11 Messpunkten. Zum anderen wurde bereits gezeigt, dass die Untersuchung mit Hilfe eines Polynoms zweiter Ordnung nicht für alle Kohlenstoffkerne in dem Peptid Ac-GGFA-NH₂ die besten Ergebnisse liefert (siehe Tabelle 5.8).

Für den Koeffizienten C_1 zeigt C^γ den stärksten Effekt in Bezug auf die Änderung des Drucks. Mittlere Effekte zeigen C', C^α, C^δ, C^ε und C^ζ. Nahezu keinen Effekt des Drucks auf C_1 zeigt C^β. Eine Erhöhung des Drucks führt bei allen Kernen (ausgenommen C^β) zu einer betragsmäßigen Erniedrigung des Koeffizienten C_1 . Eine Erhöhung des Drucks führt somit zu einer niedrigeren linearen Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung.

Für den nicht linearen Temperaturkoeffizienten C_2 ergibt sich wie auch schon für den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 in Abhängigkeit der Temperatur ein spiegelbildliches Verhalten in Bezug auf den linearen Temperaturkoeffizienten C_1 . Auch die Stärke des Effekts ist vergleichbar mit der des linearen Temperaturkoeffizienten. Der Kern C^γ zeigt den größten Effekt, die Kerne C', C^α, C^δ, C^ε und C^ζ zeigen einen Effekt mittlerer Stärke und C^β zeigt nahezu keinen Effekt des Drucks auf den Temperaturkoeffizienten C_2 . Wie auch schon für C_1 beobachtet wurde, führt eine Erhöhung des Drucks bei den Kernen (ausgenommen C_β) zu einer betragsmäßigen Erniedrigung des Koeffizienten

Kern	$\frac{\partial B_2/B_1}{\partial T} \left[\frac{1}{\text{K} \cdot \text{GPa}} \right]$	$\frac{\partial C_2/C_1}{\partial P} \left[\frac{1}{\text{GPa} \cdot \text{K}} \right]$
C'	0,003 ± 0,001	0,0006 ± 0,0002
C ^α	0,0001 ± 0,003	0,0006 ± 0,0002
C ^β	-0,010 ± 0,007	0,006 ± 0,004
C ^γ	0,013 ± 0,003	0,0018 ± 0,0004
C ^δ	-0,009 ± 0,002	0,0016 ± 0,0005
C ^ε	-0,008 ± 0,002	0,0010 ± 0,0003
C ^ζ	-0,010 ± 0,002	0,0004 ± 0,0001

Tabelle 5.10: Temperaturabhängigkeit des Druckkoeffizientenverhältnisses und Druckabhängigkeit des Temperaturkoeffizientenverhältnisses für die Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂ Die Tabelle zeigt die Temperaturabhängigkeit des Verhältnisses der Druckkoeffizienten $\partial(B_2/B_1)/\partial T$ sowie die Druckabhängigkeit des Verhältnisses der Temperaturkoeffizienten $\partial(C_2/C_1)/\partial P$. Die Untersuchungen fanden in einem Druckbereich von 3 MPa bis 200 MPa und einem Temperaturbereich von 278 K bis 308 K statt. Die Koeffizientenverhältnisse wurden aus den im Anhang gezeigten Koeffizienten berechnet (Tabelle 9.14 und 9.15).

C₂. Das bedeutet eine Erhöhung des Drucks führt zu einer weniger stark gekrümmten Kurve der Temperaturabhängigkeit.

Zusätzlich zu der Temperaturabhängigkeit der Druckkoeffizienten B₁ und B₂ beziehungsweise der Druckabhängigkeit der Temperaturkoeffizienten C₁ und C₂, kann man das Verhältnis des nicht linearen Koeffizienten zu dem linearen Koeffizienten B₂/B₁ und C₂/C₁ untersuchen. Besonders interessant hierbei ist das Verhältnis B₂/B₁, da in Beck Erlach et al. (2014) gezeigt werden konnte, dass das Verhältnis in Zusammenhang mit den thermodynamischen Parametern der Volumenänderung ΔV^0 und der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta'^0$ zusammenhängen. Der Verlauf des Verhältnisses der Druckkoeffizienten in Abhängigkeit der Temperatur sowie des Verhältnisses der Temperaturkoeffizienten in Abhängigkeit des Drucks sind Abbildung 5.12 dargestellt. Die über eine lineare Regression erhaltenen Koeffizienten sind in Tabelle 5.10 zusammengefasst.

Für die Temperaturabhängigkeit des Druckkoeffizientenverhältnisses B₂/B₁ zeigen der Carbonylkohlenstoff C' sowie C^α geringe Effekte. Die stärksten Effekte wurden für C^γ, mittelstarke Effekte für C^δ, C^ε und C^ζ beobachtet. Für C^β konnte ebenfalls ein mittelstarker Effekt nachgewiesen werden, jedoch zeigt C^β die größte Streuung der Datenpunkte, was zu einem relativ großen Fehler führt. Die Kerne die deutliche Effekte in Bezug auf die Temperaturabhängigkeit zeigen, verhalten sich auch in Bezug auf die

Richtung des Effektes unterschiedlich. So zeigt zum Beispiel C^γ bei 278 K ein negatives Koeffizientenverhältnis, welches bei Temperaturerhöhung betragsmäßig kleiner wird, während die Kerne C^δ , C^ϵ und C^ζ bei Erhöhung der Temperatur betragsmäßig größer werden.

Tendenziell ähnlich verhält sich das Temperaturkoeffizientenverhältnis C_2/C_1 in Abhängigkeit zum Druck. Geringe Effekte findet man wiederum für die Kohlenstoffkerne C^γ und C^α , wobei auch C^ζ einen sehr kleinen Effekt aufweist. Vergleichbare mittelstarke Effekte zeigen die Kerne C^γ , C^δ und C^ϵ mit relativ kleinen Fehlern. Den stärksten Effekt, der jedoch auch den größten Fehler beziehungsweise die größte Streuung der Datenpunkte aufweist findet man für C^β . Wie bereits erwähnt, zeigt C^β eine nahezu lineare Temperaturabhängigkeit (Abbildung 5.11, Tabelle 5.9), was zu einem sehr kleinen fehlerbehafteten Temperaturkoeffizienten C_2 führt. Dies beeinflusst auch das Verhalten des Koeffizientenverhältnisses C_2/C_1 . Das Temperaturkoeffizientenverhältnis C_2/C_1 ist für alle Kerne (ausgenommen C^β) im untersuchten Druckbereich negativ und zeigt bei Erhöhung des Drucks eine betragsmäßige Erniedrigung des Koeffizientenverhältnisses.

5.3.5 Einfluss des Drucks auf die terminalen Schutzgruppen des Modellpeptids Ac-GGXA-NH₂

In diesem Kapitel wird der Einfluss des Drucks auf die terminalen Schutzgruppen des Modellpeptids Ac-GGXA-NH₂ untersucht. Diese bestehen aus dem acetylierten N-Terminus und dem aminierten C-Terminus. Die Schutzgruppen verhindern, dass Ladungseffekte, der zwischen pH 2 und pH 9 vorhandenen -NH₃⁺ Gruppe sowie der -COO⁻ Gruppe am C-Terminus, Einfluss auf die Druckeffekte der Peptidsequenz nehmen. Es wurde bereits für das Peptid GGQA gezeigt, dass Ladungseffekte der terminalen Gruppen die Druckantwort beeinflussen können (Kremer, 2006). Zudem soll das gewählte Tetrapeptid als Modellsystem für das Proteinrückgrat verwendet werden, welches größtenteils ebenfalls keine Ladungseffekte an benachbarten Positionen aufweist. Es erfolgte bereits ein Vergleich der Druckantwort des ungeschützten Peptids GGXA Arnold et al. (2002) mit dem geschützten Peptid Ac-GGXA-NH₂ für die Protonen des Peptidrückgrats sowie der Seitenketten in Koehler et al. (2012) und Koehler (2014). Ebenso wurde in Koehler (2014) der Einfluss der Aminosäure X im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ auf die Amidprotonen beziehungsweise H^α der Aminosäuren Gly1, Gly2 und Ala4 untersucht.

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss der Aminosäure X im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ auf das gesamte Peptid zu bestimmen, ist die Untersuchung der Druckantwort der

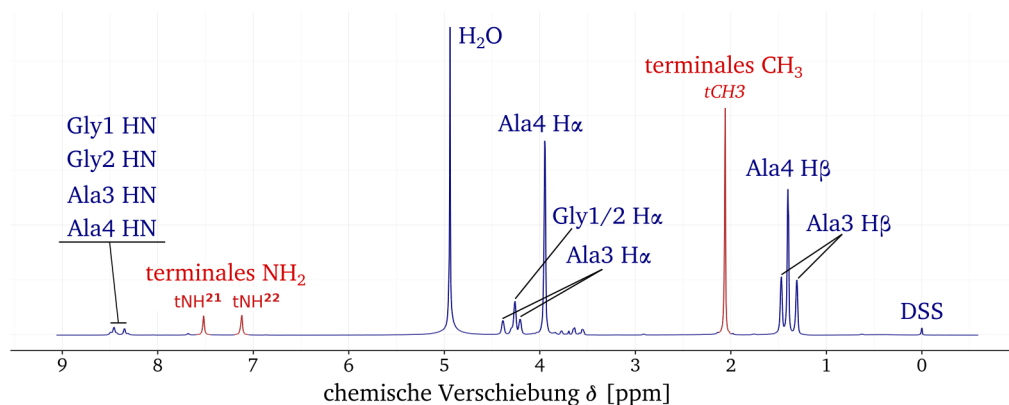


Abbildung 5.13: Protonenspektrum des Tetrapeptids Ac-GGAA-NH₂ Die Abbildung zeigt das Protonenspektrum des Tetrapeptids Ac-GGAA-NH₂ bei Normaldruck und einer Temperatur von 283 K, aufgenommen an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer unter Verwendung des Bruker Pulsprogramms *purge1Dwig*. Die Prozessierung erfolgte mit einem exponentiellen Filter. Gekennzeichnet sind die relevanten Signale des Tetrapeptids, der Referenzsubstanz DSS und das Restsignal des Wassers. Die rot gefärbten Signale zeigen die terminalen Gruppen sowie in kursiv geschriebenen deren in diesem Kapitel verwendete Bezeichnung. Diese bezieht sich im Falle der -NH₂ Gruppe auf die stereochemische Zuordnung in Harsch et al. (2013) für die C-terminale Schutzgruppe -NH₂ der Peptide Ac-GGQA-NH₂ und Ac-GGNA-NH₂, bei der das H²¹ der (E)-Konfiguration und H²² der (Z)-Konfiguration entspricht.

terminalen Schutzgruppen. Diese zeigen in den 1D-Protonenspektren im Gegensatz zu den Amidprotonen und H^α deutliche Signale, die wenige Überlagerungen aufweisen. Zudem ergibt sich die Möglichkeit einer distanzabhängigen Analyse des Druckeinflusses der Aminosäure X auf die weiter entfernte -CH₃ Gruppe des N-Terminus und die näher gelegene -NH₂ Gruppe des C-Terminus.

Die Auswertung der Druckeffekte auf die Schutzgruppen wurde anhand ihrer im 1D-Protonenspektrum (Bruker-Pulsprogramm *purge1Dwig*) beobachtbaren -CH₃ Gruppe am N-Terminus des Tetrapeptids und der -NH₂ Gruppe am C-Terminus (2 Signale) durchgeführt. Diese Signale lassen sich sehr gut zuordnen, da in ihren jeweiligen Regionen nahezu keine anderen Signale vorzufinden sind und daher keine Überlagerungen vorhanden sind. Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit einem exponentiellen Filter. Das Beispielspektrum in Abbildung 5.13 zeigt die Signale der Schutzgruppen (rot) sowie andere relevante Signale (blau) für das Peptid Ac-GGAA-NH₂.

Die -CH₃ Gruppe des acetylierten N-Terminus zeigt ein starkes Protonensignal, während die Protonen der -NH₂ Gruppe aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters zwischen dem Stickstoff und der Carbonylgruppe des Alanins an Position 4 zwei deut-

lich getrennte Signale aufweisen. Die stereospezifische Zuordnung erfolgte gemäß der Zuordnung in Harsch et al. (2013) für die C-terminale Schutzgruppe -NH_2 in den Peptiden Ac-GGQA-NH_2 und Ac-GGNA-NH_2 , bei der das H^{21} der (E)-Konfiguration und H^{22} der (Z)-Konfiguration entspricht. Dabei ist die (E)-Konfiguration relativ zur (Z)-Konfiguration tieffeldverschoben. Daher wird das tieffeldverschobene Signal in der (E)-Konfiguration als tNH^{21} bezeichnet und das relativ zu diesem hochfeldverschobene Signal in der (Z)-Konfiguration als tNH^{22} bezeichnet (siehe Abbildung 5.13). Das Signal der N-terminalen -CH_3 Gruppe wird als tCH_3 bezeichnet.

Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der terminalen Schutzgruppensignale

Analog zu den bereits durchgeführten Untersuchungen der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung für die Kohlenstoffkerne im Modellpeptid Ac-GGXA-NH_2 wurde die chemische Verschiebung der Protonen der terminalen Schutzgruppen über den Druck mit Hilfe eines Polynoms zweiter Ordnung gemäß $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$ angefitet. Dabei ist δ_0 die chemische Verschiebung bei Normaldruck, B_1 der lineare Druckkoeffizient und B_2 der nicht lineare Druckkoeffizient. Die erhaltenen Koeffizienten der terminalen -CH_3 Gruppe sind in Tabelle 5.11, die der terminalen -NH_2 Gruppe in Tabelle 5.12 zusammengefasst.

Die Schutzgruppe -CH_3 zeigt eine geringe Abhängigkeit der chemischen Verschiebung bei Normaldruck bezogen auf die jeweilige Aminosäure X an Position 3 des Tetrapeptids Ac-GGXA-NH_2 . Der Mittelwert beträgt 2,06 ppm mit einer Standardabweichung von 0,01 ppm. Die größten Abweichungen vom Mittelwert findet man für Tyrosin ($-0,04$ ppm), Valin ($-0,01$ ppm) und Tryptophan ($-0,01$ ppm), die bezogen auf den Mittelwert alle hochfeldverschoben sind.

Einen deutlich größeren Einfluss der Aminosäure X an der Position 3 des Tetrapeptids zeigen die chemischen Verschiebungen bei Normaldruck der Protonensignale der -NH_2 Schutzgruppe. Für das Signal tNH^{21} ergibt sich ein Mittelwert von 7,5 ppm mit einer Standardabweichung von 0,2 ppm, während man für das Signal tNH^{22} einen Mittelwert von 7,09 ppm mit einer Standardabweichung von 0,08 ppm erhält. Die größten Abweichungen vom Mittelwert für das Signal tNH^{21} findet man für Tryptophan ($-0,57$ ppm), Phenylalanin ($-0,45$ ppm) und Tyrosin ($-0,43$ ppm). Für das Signal tNH^{22} zeigen Tryptophan ($-0,30$ ppm) sowie Phenylalanin ($-0,11$ ppm) die größten Abweichungen vom Mittelwert.

X3	δ_0 [ppm]	B_1 [ppm/GPa]	B_2 [ppm/GPa ²]
A	2,0599 ± 0,00007	0,059 ± 0,002	-0,056 ± 0,008
C	2,0615 ± 0,00004	0,053 ± 0,001	-0,046 ± 0,005
D	2,0578 ± 0,00005	0,053 ± 0,001	-0,053 ± 0,005
E	2,0600 ± 0,00012	0,054 ± 0,003	-0,062 ± 0,014
F	2,0613 ± 0,00004	0,053 ± 0,001	-0,054 ± 0,005
G	2,0613 ± 0,00005	0,053 ± 0,001	-0,042 ± 0,005
H	2,0602 ± 0,00005	0,050 ± 0,001	-0,036 ± 0,007
I	2,0602 ± 0,00007	0,052 ± 0,002	-0,053 ± 0,008
K	2,0614 ± 0,00003	0,052 ± 0,001	-0,050 ± 0,003
L	2,0602 ± 0,00006	0,055 ± 0,001	-0,064 ± 0,007
M	2,0600 ± 0,00005	0,053 ± 0,001	-0,045 ± 0,005
N	2,0591 ± 0,00007	0,053 ± 0,002	-0,052 ± 0,008
P	2,0588 ± 0,00009	0,055 ± 0,002	-0,051 ± 0,012
Q	2,0595 ± 0,00004	0,055 ± 0,001	-0,054 ± 0,004
R	2,0632 ± 0,00003	0,049 ± 0,001	-0,037 ± 0,003
S	2,0591 ± 0,00006	0,054 ± 0,001	-0,047 ± 0,007
T	2,0590 ± 0,00005	0,054 ± 0,001	-0,053 ± 0,006
V	2,0461 ± 0,00004	0,052 ± 0,001	-0,036 ± 0,005
W	2,0474 ± 0,00006	0,054 ± 0,001	-0,048 ± 0,006
Y	2,0127 ± 0,00007	0,073 ± 0,002	-0,073 ± 0,008
\bar{X}	2,0564 (0,0114)	0,054 (0,005)	-0,051 (0,009)

Tabelle 5.11: Druckkoeffizienten der terminalen -CH₃ Schutzgruppe des Modellpeptids Ac-GGXA-NH₂ Die Tabelle zeigt die mit Hilfe der Gleichung $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$ erhaltenen Koeffizienten, die über Anfitzen der chemischen Verschiebung der Protonen der N-terminalen Schutzgruppe -CH₃ über den Druck ermittelt wurden. Dabei ist δ_0 die chemische Verschiebung bei Normaldruck, B_1 der lineare Druckkoeffizient und B_2 der nicht lineare Druckkoeffizient. Die Spektren wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer mit Kryoprobekopf (TCL) unter Verwendung des Bruker Pulsprogramms *purge1Dwig* bei einer Temperatur von 283 K aufgenommen. Zusätzlich angegeben ist der Mittelwert über alle Aminosäuren mit in Klammern angegebener Standardabweichung.

Betrachtet man die Druckabhängigkeit der Protonensignale der Schutzgruppen, so erhält man für den linearen Druckkoeffizienten B_1 der terminalen -CH₃ Gruppe einen Mittelwert von 0,054 ppm/GPa mit einer Standardabweichung von 0,005 ppm/GPa.

X3	δ_0 [ppm]		B_1 [ppm/GPa]		B_2 [ppm/GPa ²]	
	tNH ²¹	tNH ²²	tNH ²¹	tNH ²²	tNH ²¹	tNH ²²
A	7,5196 ± 0,0003	7,1200 ± 0,0003	0,314 ± 0,006	0,545 ± 0,007	-0,20 ± 0,03	-0,37 ± 0,03
C	7,6131 ± 0,0002	7,1393 ± 0,0003	0,335 ± 0,006	0,528 ± 0,006	-0,21 ± 0,03	-0,40 ± 0,03
D	7,6046 ± 0,0001	7,1091 ± 0,0002	0,128 ± 0,003	0,554 ± 0,004	-0,02 ± 0,01	-0,45 ± 0,02
E	7,5595 ± 0,0002	7,1115 ± 0,0002	0,296 ± 0,005	0,535 ± 0,004	-0,23 ± 0,03	-0,41 ± 0,02
F	7,0453 ± 0,0001	6,9808 ± 0,0003	0,504 ± 0,002	0,456 ± 0,006	-0,32 ± 0,01	0,03 ± 0,03
G	7,6737 ± 0,0002	7,1323 ± 0,0003	0,313 ± 0,004	0,503 ± 0,008	-0,14 ± 0,02	-0,36 ± 0,04
H	7,5737 ± 0,0001	7,1280 ± 0,0003	0,222 ± 0,003	0,481 ± 0,007	-0,07 ± 0,02	-0,33 ± 0,04
I	7,5661 ± 0,0003	7,0864 ± 0,0003	0,297 ± 0,006	0,554 ± 0,007	-0,12 ± 0,03	-0,32 ± 0,03
K	7,6137 ± 0,0001	7,1080 ± 0,0003	0,255 ± 0,003	0,546 ± 0,007	-0,14 ± 0,02	-0,35 ± 0,03
L	7,5094 ± 0,0004	7,0973 ± 0,0006	0,302 ± 0,008	0,56 ± 0,02	-0,23 ± 0,04	-0,49 ± 0,07
M	7,5890 ± 0,0001	7,1069 ± 0,0002	0,283 ± 0,003	0,543 ± 0,004	-0,15 ± 0,02	-0,34 ± 0,02
N	7,6130 ± 0,0001	7,1317 ± 0,0002	0,238 ± 0,002	0,480 ± 0,004	-0,09 ± 0,01	-0,28 ± 0,02
P	7,5612 ± 0,0002	7,1041 ± 0,0002	0,311 ± 0,004	0,572 ± 0,006	-0,21 ± 0,02	-0,40 ± 0,03
Q	7,6165 ± 0,0001	7,1205 ± 0,0001	0,258 ± 0,003	0,532 ± 0,002	-0,13 ± 0,01	-0,37 ± 0,01
R	7,6150 ± 0,0002	7,1104 ± 0,0003	0,262 ± 0,005	0,533 ± 0,007	-0,13 ± 0,03	-0,34 ± 0,04
S	7,5469 ± 0,0005	7,1446 ± 0,0007	0,26 ± 0,01	0,45 ± 0,02	-0,06 ± 0,06	-0,21 ± 0,08
T	7,5782 ± 0,0002	7,1267 ± 0,0002	0,295 ± 0,003	0,496 ± 0,005	-0,13 ± 0,02	-0,31 ± 0,02
V	7,5907 ± 0,0002	7,0951 ± 0,0001	0,279 ± 0,004	0,549 ± 0,002	-0,06 ± 0,02	-0,27 ± 0,01
W	6,9250 ± 0,0002	6,7840 ± 0,0001	0,477 ± 0,004	0,168 ± 0,003	-0,18 ± 0,02	0,39 ± 0,02
Y	7,0714 ± 0,0002	7,0382 ± 0,0005	0,514 ± 0,005	0,338 ± 0,010	-0,33 ± 0,02	0,24 ± 0,05
\bar{X}	7,4993 (0,2139)	7,0887 (0,0808)	0,307 (0,094)	0,496 (0,094)	-0,16 (0,08)	-0,27 (0,23)

Tabelle 5.12: Druckkoeffizienten der terminalen -NH₂ Schutzgruppe des Modellpeptids Ac-GGXA-NH₂. Die Tabelle zeigt die mit Hilfe der Gleichung $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$ erhaltenen Koeffizienten, die über Anfitzen der chemischen Verschiebung der Protonen der C-terminalen Schutzgruppe -NH₂ über den Druck ermittelt wurden. Dabei ist δ_0 die chemische Verschiebung bei Normaldruck, B_1 der lineare Druckkoeffizient und B_2 der nicht lineare Druckkoeffizient. Die Spektren wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer mit Kryoprobenkopf (TCI) unter Verwendung des Bruker Pulsprogramms *purge1Dwig* bei einer Temperatur von 283 K aufgenommen. Zusätzlich angegeben ist der Mittelwert über alle Aminosäuren mit in Klammern angegebener Standardabweichung.

Die größten Abweichungen vom Mittelwert findet man für Tyrosin (0,019 ppm/GPa), Arginin (-0,005 ppm/GPa) und Alanin (0,005 ppm/GPa).

Für das Signal tNH²¹ ergibt sich für B_1 ein Mittelwert von 0,31 ppm/GPa mit einer Standardabweichung von 0,09 ppm/GPa und für das Signal tNH²² erhält man einen Mittelwert von 0,50 ppm/GPa mit einer Standardabweichung von 0,09 ppm/GPa. Dabei findet man die größten Abweichungen vom Mittelwert für tNH²¹ für Tyrosin (0,21 ppm/GPa), Phenylalanin (0,20 ppm/GPa), Aspartat (-0,18 ppm/GPa) und Tryp-

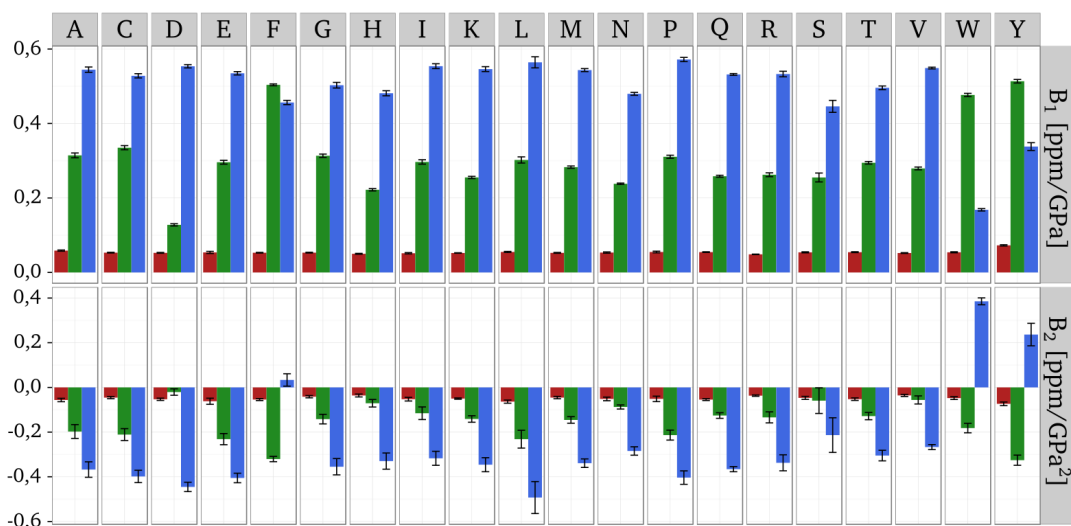


Abbildung 5.14: Druckkoeffizienten B_1 und B_2 der terminalen Schutzgruppen des Modellpeptids Ac-GGXA-NH₂ Die Abbildung zeigt den linearen Druckkoeffizienten B_1 und den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 für die Protonensignale der N-terminalen -CH₃ Gruppe und der C-terminalen -NH₂ Gruppe. Farblich unterschieden werden die Signale tCH₃ (rot) für die -CH₃ Gruppe, sowie die Signale tNH²¹ (grün) und tNH²² (blau) für die -NH₂ Gruppe. Die Druckkoeffizienten wurden aus den Tabellen 5.11 (tCH₃) und 5.12 (tNH²¹ und tNH²²) übernommen.

tophan (0,17 ppm/GPa). Für das Signal tNH²² liegen außerhalb der Standardabweichung Tryptophan (−0,33 ppm/GPa) und Tyrosin (−0,16 ppm/GPa).

Für den nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 ergibt sich für das terminale Signal tCH₃ ein Mittelwert von −0,05 ppm/GPa² mit einer Standardabweichung von 0,01 ppm/GPa². Dabei findet man die größten Abweichungen vom Mittelwert für Tyrosin (−0,022 ppm/GPa²), Valin (0,015 ppm/GPa²), Histidin (0,015 ppm/GPa²), Arginin (0,014 ppm/GPa², Leucin (−0,013 ppm/GPa²) und Glutamat (−0,011 ppm/GPa²).

Für die terminale -NH₂ Gruppe erhält man für das Signal tNH²¹ einen Mittelwert von −0,16 ppm/GPa² mit einer Standardabweichung von 0,08 ppm/GPa² und für tNH²² einen Mittelwert von −0,27 ppm/GPa² mit einer Standardabweichung von 0,23 ppm/GPa². Für das Signal tNH²¹ liegen dabei außerhalb der Standardabweichung Tyrosin (−0,17 ppm/GPa²), Phenylalanin (−0,16 ppm/GPa²), Aspartat (0,14 ppm/GPa²), Valin (0,10 ppm/GPa²), Serin (0,10 ppm/GPa²) und Histidin (0,09 ppm/GPa²). Für das Signal tNH²² liegen Tryptophan (0,65 ppm/GPa²), Tyrosin (0,50 ppm/GPa²), Phenylalanin (0,30 ppm/GPa²) und Leucin (0,23 ppm/GPa²) außerhalb der Standardabweichung.

Der lineare Druckkoeffizient B_1 und der nicht lineare Druckkoeffizient B_2 für die Protonensignale der N-terminalen $-CH_3$ Gruppe sowie der C-terminalen $-NH_2$ Gruppe sind zusammenfassend in Abbildung 5.14 gezeigt.

5.4 Diskussion

In diesem Kapitel wurde Einfluss des Drucks auf das Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ untersucht, wobei X eine der 20 kanonischen Aminosäuren darstellt. Dieses Modellpeptid wurde gewählt, um eine möglichst unstrukturierte Peptidkette zu erhalten. Mit Hilfe dieses Modellpeptids konnten die intrinsischen Druckeffekte der Aminosäure X3 bestimmt werden. Druckeffekte in Proteinen können mit Hilfe der ermittelten Korrekturterme um den intrinsischen Effekt der jeweiligen Aminosäuren korrigiert werden, um Effekte von konformationellen Strukturänderungen besser herausarbeiten zu können. Die N-terminale und C-terminale Endgruppe wurde durch Acetylierung (N-Terminus) und Aminierung (C-Terminus) geschützt, da die ansonsten auftretenden Ladungseffekte Einfluss auf die chemische Verschiebung und deren Druckabhängigkeit ausüben können (Kremer (2006)).

Die Charakterisierung der Druckeffekte der Protonen und Stickstoffkerne der Aminosäure X3 im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ erfolgte bereits in Koehler (2014). In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Druckeffekte auf die Kohlenstoffkerne der ¹³C-markierten Aminosäuren X3. Dazu wurden die chemischen Verschiebungen über den Druck mit einem Polynom zweiter Ordnung gemäß $\delta = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2$ gefittet. Dabei entspricht δ_0 der chemischen Verschiebung bei Normaldruck, B_1 dem linearen Druckkoeffizienten und B_2 dem nicht linearen Druckkoeffizienten.

Damit konnten für die 20 kanonischen Aminosäuren aus den Druckreihen die chemische Verschiebung bei Normaldruck für die Kohlenstoffkerne ermittelt werden. Die Bestimmung des Koeffizienten δ_0 mit Hilfe der linearen Regression erlaubte zudem die Angabe eines Fehlers. Dieser war für den Großteil der Aminosäuren in der Nähe der spektrometerseitigen Auflösung (0,0008 ppm), so dass eine sehr genaue Angabe der chemischen Verschiebung möglich war (Tabelle 5.3). Zudem war es möglich die oxidierte Form des Cysteins (C_{ox}, Cystin) sowie die cis-Konfiguration des Prolins (P_{cis}) zu vermessen. Dieser komplette Datensatz für die Kohlenstoffkerne wurde mit bereits veröffentlichten Datensätzen verglichen (Abbildung 5.4). Diese Datensätze sind entweder experimenteller Natur oder wurden aus Proteindatenbanken ermittelt. Die deutlichsten Abweichungen konnten für den Carbonylkohlenstoff des Peptidrückgrats

festgestellt werden. Diese Abweichungen lassen sich für die experimentellen Datensätze mit stark unterschiedlichen Messbedingungen (Temperatur, pH, Urea) beziehungsweise unterschiedlichen Modellpeptiden erklären (Tabelle 5.1). Die Unterschiede zu den aus Proteindatenbanken ermittelten Datensätzen liegen zum Teil an großen Fehlern für selten vorkommende Aminosäuren wie Cystein oder Tryptophan. Insgesamt konnte anhand der Bestimmung des Koeffizienten δ_0 aus den Druckreihen ein kompletter Datensatz der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffkerne für eine Temperatur von 283 K gewonnen werden.

Der Fokus der Untersuchung des Druckeinflusses auf die chemische Verschiebung lag bei der Quantifizierung des Effekts mit Hilfe des linearen Druckkoeffizienten B_1 und des nicht linearen Druckkoeffizienten B_2 . Es wurde bereits für die Amidprotonen beziehungsweise Stickstoffkerne gezeigt, dass sich die chemischen Verschiebungen unter Druck in den meisten Fällen nicht linear verhält (Arnold et al., 2002; Koehler et al., 2012). Dies konnte nun auch für die Kohlenstoffkerne bestätigt werden, wobei der Amidstickstoff des Peptidrückgrats eine größere Nichtlinearität aufweist (Koehler et al., 2012). Für den Carbonylkohlenstoff des Peptidrückgrats sowie für die Kohlenstoffkerne in $-\text{CH}_3$ Gruppen konnte ebenfalls eine starke Nichtlinearität festgestellt werden (Tabelle 5.7).

Es konnte gezeigt werden, dass die Seitenkette der unterschiedlichen Aminosäuren einen deutlichen Einfluss auf die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 der Kohlenstoffkerne des Peptidrückgrats (C' , C^α) hat (Tabelle 5.4). Dennoch verhalten sich diese relativ homogen, das heisst, sie besitzen bis auf das C^α des Glycins dieselben Vorzeichen. Die Homogenität ist für den Carbonylkohlenstoff C' wesentlich stärker ausgeprägt als für C^α , da der Einfluss der unterschiedlichen Seitenketten mit der Distanz abnimmt. Dieses wird durch die wesentlich kleinere Standardabweichung des C' im Vergleich zu C^α bestätigt. Wie auch schon für die Kerne der Amidgruppe beobachtet wurde (Koehler et al., 2012), besitzen der lineare Druckkoeffizient B_1 und der nicht lineare Druckkoeffizient B_2 ein unterschiedliches Vorzeichen für einen Großteil der untersuchten Kerne. Eine Zusammenfassung der Kerne des Peptidrückgrats zeigt Abbildung 5.6.

Wie in Beck Erlach et al. (2014) gezeigt werden konnte, ist es möglich für ein Zweizustandsmodell das Koeffizientenverhältnis B_2/B_1 mit der Änderung der Volumenänderung ΔV^0 und der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta'^0$ in Verbindung zu bringen. Daher wurden die Korrelationen der Kerne des Peptidrückgrats für die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 sowie das Koeffizientenverhältnis B_2/B_1 untersucht. Dabei ergaben sich große Korrelationen zwischen B_1 und B_2 der unterschiedlichen Kerne

(siehe Anhang Abbildung 9.2) sowie auch Korrelationen zwischen den Kernen (Tabelle 5.5). Zudem konnte ausgehend vom Amidproton H^N eine mit der Distanz zu diesem abnehmende Korrelation des Koeffizientenverhältnisses gefunden werden.

Die druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebungen für die Kohlenstoffkerne der Peptidseitenketten weisen im Gegensatz zum Peptidrückgrat eine wesentlich größere Variation auf (Abbildung 5.8). Dies liegt an den unterschiedlichen funktionellen Gruppen (Amidgruppe, Carboxygruppe, Alkoholgruppe), unterschiedlichen Konnektivitäten der Kerne oder an den in den Aminosäuren vorkommenden Heterokernen wie Schwefel oder Sauerstoff. Eine Einteilung der Kohlenstoffkerne in vergleichbare Gruppen mit deren Druckverhalten fasst Tabelle 5.7 zusammen.

Zusätzlich wurden für das Peptid Ac-GGFA-NH₂ Druckreihen bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt um den Einfluss der Temperatur auf die Druckkoeffizienten zu untersuchen. Über die ermittelten chemischen Verschiebungen bei Normaldruck konnte zudem die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von der Temperatur untersucht werden (Tabelle 5.8). Diese wurde mit von Kjaergaard et al. (2011) ermittelten Temperaturabhängigkeiten verglichen, wobei sich hierbei deutliche Unterschiede für C^α zeigten. Eine gute Übereinstimmung wiesen die Kerne C' und C^β auf. Die Unterschiede für C^α lassen sich wahrscheinlich mit einem unterschiedlichen Modellpeptid und der Zugabe von 1 M Urea in Kjaergaard et al. (2011) erklären. Es konnte auch gezeigt werden, dass sich die Änderung der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit der Temperatur nicht für alle Kerne linear verhält. So konnte gezeigt werden, dass sich die Kerne C' , C^α , C^γ , C^ϵ und C^ζ besser mit einem Polynom zweiter Ordnung beschreiben lassen (Tabelle 5.8).

Die Bestimmung der chemischen Verschiebung bei unterschiedlichen Drücken und Temperaturen erlaubte die Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Druckkoeffizienten sowie des Einflusses des Drucks auf die Temperaturkoeffizienten. Diese wurden in beiden Fällen über ein Polynom zweiter Ordnung bestimmt. Dabei zeigte sich in beiden Fällen ein je nach Kern unterschiedlich starker Einfluss (Tabelle 5.9). Schwache Effekte wurden in beiden Fällen für C^β gefunden. Starke Effekte wurden für den Carbonylkohlenstoff des Peptidrückgrats C' und für C^γ gefunden. Zudem konnte über die ermittelten Druck und Temperaturkoeffizienten die Temperaturabhängigkeit des Druckkoeffizientenverhältnisses beziehungsweise die Druckabhängigkeit des Temperaturkoeffizientenverhältnisses ermittelt werden (Tabelle 5.10). Hier zeigten sich ebenfalls für C^γ starke Effekte.

Um den Einfluss der unterschiedlichen Seitenketten auf die Druckantwort weiter entfernter Gruppen zu untersuchen, wurde der Einfluss des Drucks auf die chemische Verschiebung der Protonensignale der N-terminalen $-CH_3$ Schutzgruppe sowie der C-terminalen $-NH_2$ Schutzgruppe untersucht. Dabei zeigte sich auf die weiter entfernt liegende $-CH_3$ Gruppe nur noch ein schwacher Einfluss der Seitenkette der Aminosäure X3 im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂. Nur Tyrosin zeigte hier einen außerhalb der Standardabweichung liegenden Effekt. Wesentlich deutlicher fiel der Einfluss der unterschiedlichen Seitenketten auf die näher liegende $-NH_2$ Gruppe aus. Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die beiden Protonen der $-NH_2$ Gruppe in den meisten Fällen unterschiedlich verhalten (Tabelle 5.12). Dies liegt an dem partiellen Doppelbindungscharakter der Amidgruppe am C-terminalen Ende der Peptidsequenz. Durch diesen lassen sich die Protonen gemäß der (E/Z)-Nomenklatur zuordnen. Mit Hilfe der Zuordnung der Protonen der C-terminalen $-NH_2$ Gruppe in Harsch et al. (2013) für die Peptide Ac-GGQA-NH₂ und Ac-GGNA-NH₂ konnte gezeigt werden, dass die (Z)-Konfiguration (tNH^{22}), verglichen mit der (E)-Konfiguration (tNH^{21}), größere Druckeffekte aufweist (Abbildung 5.14).

6 Verknüpfung des Verhältnisses der Druckkoeffizienten mit thermodynamischen Parametern

Die Untersuchung der chemischen Verschiebung δ in Abhängigkeit vom Druck ist eine grundlegende Methode den Einfluss des Drucks auf das untersuchte System quantitativ zu beschreiben. Dabei ist die druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung überwiegend nicht linear und kann mittels einer polynominalen Funktion zweiter Ordnung beschrieben werden (Gleichung 6.1). Hierbei erhält man den linearen Parameter B_1 und den nicht linearen quadratischen Parameter B_2 .

Jedoch erfordern viele Fragestellungen in der NMR (Proteinstabilität, Bindungseffekte) die Bestimmung von thermodynamischen Parametern, wie der Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG^0 , der partiellen molaren Volumenänderung ΔV^0 des Systems oder der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta'^0$ (Heremans und Smeller, 1998; Meersman et al., 2006, 006a). Diese Größen lassen sich über Anfitzen der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung über ein thermodynamisches Zweizustandsmodell (Gleichung 6.16) ermitteln. Dieses Modell führt jedoch nur in den wenigsten Fällen zu einem stabilen Fit und kann daher nur selten angewendet werden. Routinemäßig werden die Daten daher mit einem Polynom zweiten Grades gefittet, da hier eine quantitative Beschreibung des Druckeffekts möglich ist.

Ziel dieses Kapitels ist die Verknüpfung der aus dem polynominalen Modell zweiter Ordnung erhaltenen Druckkoeffizienten B_1 und B_2 mit den oben genannten thermodynamischen Größen des Systems. Zudem wird untersucht wann diese Verknüpfung anwendbar ist und welche Grenzen der Ermittlung dieses Zusammenhangs gesetzt sind. Ein wesentlicher Teil dieses Kapitels wurde bereits in Beck Erlach et al. (2014) veröffentlicht.

6.1 Einleitung

Aufgrund der hohen Genauigkeit und Sensitivität der Bestimmung der chemischen Verschiebung und deren Druckabhängigkeit eignet sich die NMR hervorragend zur quantitativen Beschreibung von Druckeffekten. Es wurde schon früher gezeigt, dass sich die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung innerhalb eines Peptids oder eines Proteins von Atom zu Atom unterscheidet und häufig durch einen nicht linearen Verlauf gekennzeichnet ist (Inoue et al., 2000; Kalbitzer et al., 2000). Dieser lässt sich zur quantitativen Bestimmung der Größe des Druckeffekts mit Hilfe eines Polynoms zweiter Ordnung beschreiben. Starke nicht lineare Effekte deuten dabei auf konformationelle Änderungen im untersuchten System hin (Akasaka und Li, 2001).

Die Untersuchung der druckinduzierten chemischen Verschiebung mit einem Polynom zweiter Ordnung lässt jedoch keine Aussagen über thermodynamische Größen des Systems, wie der Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG^0 , der partiellen molaren Volumenänderung ΔV^0 oder der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta^0$, zu. Die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von diesen thermodynamischen Größen in einem Zweizustandsmodell lässt sich durch Gleichung 6.16 beschreiben, führt jedoch in den meisten Fällen zu instabilen Fits und stark fehlerbehafteten Fitparametern.

Die polynomiale Funktion zweiter Ordnung zur Beschreibung der druckinduzierten Änderung der chemischen Verschiebung kann in unterschiedlichen Schreibweisen dargestellt werden. Am häufigsten angetroffen wird hierbei die in Gleichung 6.1 angegebene Form.

$$\delta(P) = \delta_0 + B_1(P - P_0) + B_2(P - P_0)^2 \quad (6.1)$$

Dabei stellt δ_0 die chemische Verschiebung bei Normaldruck $P_0 = 0,1 \text{ MPa}$ dar, B_1 den linearen Druckkoeffizienten und B_2 den nicht linearen Druckkoeffizienten.

Eine andere Möglichkeit der Darstellung von Gleichung 6.1, die auch in Beck Erlach et al. (2014) verwendet wurde, verdeutlicht die zugrundeliegende Herleitung aus einer Taylorreihe (Gleichung 6.2). Um eine Verwechslung der nicht linearen Druckkoeffizienten auszuschließen, wurde der nicht lineare Druckkoeffizient mit einem hochgestellten Doppelkreuz gekennzeichnet.

$$\delta(P) = \delta_0 + B_1(P - P_0) + \frac{B_2^\#}{2}(P - P_0)^2 \quad (6.2)$$

Diese Darstellungsform vereinfacht einige der in diesem Kapitel hergeleiteten Ausdrücke und führt zu dem in Gleichung 6.3 angegebenen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen nicht linearen Druckkoeffizienten.

$$B_2^\# = 2B_2 \quad (6.3)$$

Auch für andere Größen findet man in der Literatur unterschiedliche Darstellungsformen. So findet man unterschiedliche Bezeichnungen für die Kompressibilität und den aus ihr abgeleiteten Kompressibilitätsfaktor. In dieser Arbeit wird die isotherme Kompressibilität gemäß Gleichung 6.4 verwendet.

$$\beta = \kappa = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \quad (6.4)$$

Die isotherme Kompressibilität beschreibt die Änderung des Volumens bei konstanter Temperatur in Bezug auf das Ausgangsvolumen des Systems. Die Kompressibilität wird dabei in der Literatur durch unterschiedliche griechischen Buchstaben ausgedrückt (β und κ). Die Verwendung des Buchstaben β findet man vor allem in Veröffentlichungen mit biophysikalischem Kontext (Bridgman, 1915; Heremans und Smeller, 1998) und wird daher in dieser Arbeit übernommen.

Auch die Bezeichnung des isothermen Kompressibilitätsfaktors variiert je nach Veröffentlichung. In dieser Arbeit wird das einfach gestrichene β zur Kennzeichnung des Kompressibilitätsfaktors verwendet (Gleichung 6.5).

$$\pm\beta' = \pm\hat{\beta} = \beta V = -\left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \quad (6.5)$$

Der isotherme Kompressibilitätsfaktor beschreibt die Änderung des Volumens mit dem Druck bei konstanter Temperatur. Es muss hierbei darauf geachtet werden, dass in der Literatur keine einheitliche Definition bezüglich des Vorzeichens des Kompressibilitäts-

faktors anzutreffen ist. In dieser Arbeit wird der Kompressibilitätsfaktor gemäß der in Gleichung 6.6 angegebenen Definition verwendet.

$$\beta' := \beta V = -\left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T \quad (6.6)$$

Die Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG ergibt sich aus dem Volumen V und der Entropie S des Systems sowie der Änderungen des Drucks dP und der Temperatur dT (Gleichung 6.7).

$$d\Delta G = VdP - SdT \quad (6.7)$$

Dabei führt die Integration der Referenzpunkte von P_0 und T_0 zu P und T zu dem in Gleichung 6.8 angegebenen Ausdruck für die Änderung der freien Gibbs-Energie (Hawley, 1971; Smeller, 2002; Ravindra und Winter, 2003).

$$\begin{aligned} \Delta G = \Delta G^0 + \Delta V^0(P - P_0) - \Delta S^0(T - T_0) - \frac{\Delta\beta'}{2}(P - P_0)^2 + \\ \Delta\alpha'(P - P_0)(T - T_0) - \Delta C_p \left[T \left(\ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] \end{aligned} \quad (6.8)$$

Nahe der Referenzpunkte gilt die in Gleichung 6.9 gegebene Näherung.

$$T \left(\ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 = \frac{(T - T_0)^2}{2T_0} \quad (6.9)$$

Mit Hilfe dieser kann Gleichung 6.8 vereinfacht werden, was zu dem in Gleichung 6.10 angegebenen Ausdruck führt.

$$\begin{aligned} \Delta G = \Delta G^0 + \Delta V^0(P - P_0) - \Delta S^0(T - T_0) - \frac{\Delta\beta'}{2}(P - P_0)^2 + \\ \Delta\alpha'(P - P_0)(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 \end{aligned} \quad (6.10)$$

Hierbei ist $\beta' = -(\partial V/\partial P)_T$ der Kompressibilitätsfaktor, $\alpha' = (\partial V/\partial T)_P = -(\partial S/\partial P)_T$ der thermische Ausdehnungsfaktor und $C_p = T(\partial S/\partial T)_P$ die Wärmekapazität.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Herleitung des Zusammenhangs zwischen Druckkoeffizienten und thermodynamischen Größen

In Abwesenheit eines passenden Modells, kann die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung $\delta(P)$ bei konstanter Temperatur durch ein Polynom zweiten Grades beschrieben werden (Gleichung 6.11).

$$\delta(P) = B_0 + B_1(P - P_0) + \frac{B_2^\#}{2}(P - P_0)^2 \quad (6.11)$$

Die in Gleichung 6.11 angegebene Funktion entstammt einer Taylorentwicklung um den Druck $P = P_0$ und führt somit zu folgenden Ausdrücken für die Druckkoeffizienten (Gleichung 6.14).

$$B_0 = \delta(P_0) \quad (6.12)$$

$$B_1 = \frac{\partial \delta}{\partial P}(P_0) \quad (6.13)$$

$$B_2^\# = \frac{\partial^2 \delta}{\partial P^2}(P_0) \quad (6.14)$$

Allgemein entspricht die gemittelte chemische Verschiebung $\langle \delta_i \rangle$ eines Spins i in einem Ensemble mit N Elementen im schnellen Austausch auf der NMR-Zeitskala dem frequenzgewichteten Mittel der individuellen chemischen Verschiebung (δ_i). Im thermischen Gleichgewicht von M Zuständen s_j und $M^* \leq M$ Zuständen mit gemittelter Verschiebung $[\delta_i(s_j)]$ im schnellen Austausch kann die beobachtete chemische Verschiebung δ_i des Spins i folgendermaßen geschrieben werden (Gleichung 6.15, Baskaran et al. (2010)).

$$\langle \delta_i \rangle = \sum_{j=1}^{M^*} p^*(s_j) \delta_i(s_j) = \frac{1}{Z^*} \sum_{j=1}^{M^*} \delta_i(s_j) e^{-G(s_j)/RT} \quad (6.15)$$

Hierbei stellt $p(s_j)$ die Wahrscheinlichkeit des Zustandes s_j , $G(s_j)$ die zugehörige freie Gibbs-Energie, Z^* die Zustandssumme aller M^* Zustände und R die allgemeine Gas-konstante dar.

Das einfachste physikalische Modell um die druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung zu beschreiben ist das Zweizustandsmodell mit den Zuständen 1 und 2, welche durch die zwei chemischen Verschiebungen δ_1 und δ_2 des Spins i und die korrespondierenden freien Gibbs-Energien G_1 und G_2 charakterisiert werden. Im Falle eines schnellen Austausches der zwei Zustände bezogen auf die NMR-Zeitskala ($|\Delta\omega\tau_e| \ll 1$, $\Delta\omega$ Differenz der Resonanzfrequenzen ω_1 und ω_2 , τ_e Austausch-Korrelationszeit) kann Gleichung 6.15 folgendermaßen ausgedrückt werden (Gleichung 6.16).

$$\begin{aligned}
 \delta &= \frac{\delta_1 e^{-G_1/RT} + \delta_2 e^{-G_2/RT}}{e^{-G_1/RT} + \delta_2 e^{-G_2/RT}} \\
 &= \frac{\delta_1 e^{\Delta G/RT} + \delta_2}{1 + e^{\Delta G/RT}} \\
 &= \frac{1}{2}(\delta_1 + \delta_2) + \frac{\delta_1 e^{\Delta G/RT} + \delta_2}{1 + e^{\Delta G/RT}} - \frac{1}{2}(\delta_1 + \delta_2) \quad (6.16) \\
 &= \frac{1}{2}(\delta_1 + \delta_2) - \frac{1}{2}(\delta_2 - \delta_1) \frac{e^{\Delta G/RT} - 1}{1 + e^{\Delta G/RT}} \\
 &= \frac{1}{2}(\delta_1 + \delta_2) - \frac{1}{2}(\delta_2 - \delta_1) \tanh\left(\frac{\Delta G}{2RT}\right)
 \end{aligned}$$

Mit $\Delta G^0 = G_2(P_0, T_0) - G_1(P_0, T_0) = \Delta G(P_0, T_0)$, ergeben sich damit aus der Taylorentwicklung von Gleichung 6.16 die in Gleichung 6.17 bis 6.19 angegebenen Taylorkoeffizienten.

$$B_0 = \frac{1}{2}(\delta_1 + \delta_2) - \frac{1}{2}(\delta_2 - \delta_1) \tanh\left(\frac{\Delta G^0}{2RT_0}\right) \quad (6.17)$$

$$B_1 = \frac{(\delta_2 - \delta_1)}{4RT_0} \frac{\partial \Delta G(P_0)}{\partial P} \left[1 - \tanh^2\left(\frac{\Delta G^0}{2RT_0}\right) \right] \quad (6.18)$$

$$\begin{aligned}
 B_2^{\#} &= -\frac{(\delta_2 - \delta_1)}{4RT_0} \left[1 - \tanh^2\left(\frac{\Delta G^0}{2RT_0}\right) \right] \\
 &\quad \left[\frac{\partial^2 \Delta G(P_0)}{\partial P^2} - \frac{1}{RT_0} \left(\frac{\partial \Delta G(P_0)}{\partial P} \right)^2 \tanh\left(\frac{\Delta G^0}{2RT_0}\right) \right] \quad (6.19)
 \end{aligned}$$

Einen von der chemischen Verschiebung unabhängigen Ausdruck erhält man dabei für das folgende Verhältnis (Gleichung 6.20).

$$\frac{B_2^\#}{B_1} = \frac{\frac{\partial^2 \Delta G(P_0)}{\partial P^2}}{\frac{\partial \Delta G(P_0)}{\partial P}} - \frac{1}{RT_0} \left(\frac{\partial \Delta G(P_0)}{\partial P} \right) \tanh \left(\frac{\Delta G^0}{2RT_0} \right) \quad (6.20)$$

Dieser Ausdruck ist nur von der Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG^0 , deren partielle Ableitung gegen den Druck P erster und zweiter Ordnung und der Temperatur T_0 abhängig. Die erste Ableitung von der Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG gegen den Druck bei konstanter Temperatur zeigt Gleichung 6.21.

$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial P} \right)_T = \Delta V \quad (6.21)$$

Diese stellt die Differenz des partiellen molaren Volumens zwischen den Zuständen dar. Die zweite Ableitung der Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG gegen den Druck bei konstanter Temperatur stellt Gleichung 6.22 dar.

$$\left(\frac{\partial^2 \Delta G}{\partial P^2} \right)_T = \frac{\partial \Delta V}{\partial P} \quad (6.22)$$

Diese stellt die partielle Ableitung der Volumenänderung nach dem Druck dar. Gemäß der Definition der Kompressibilität β (Gleichung 6.4) und des Kompressibilitätsfaktors β' (Gleichung 6.6) ergibt sich in Gleichung 6.23 dargestellter Zusammenhang.

$$\frac{\partial \Delta V}{\partial P} = \frac{\partial (V_2 - V_1)}{\partial P} = -\beta_2 V_2 + \beta_1 V_1 = -\beta_2' + \beta_1' = -\Delta \beta' \quad (6.23)$$

Dieser stellt die Differenz des Kompressibilitätsfaktors β' zwischen den zwei Zuständen 1 und 2 dar. In Gleichung 6.20 eingesetzt ergibt sich somit eine Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ gemäß Gleichung .

$$\frac{B_2^\#}{B_1} = -\frac{\Delta \beta'(P_0)}{\Delta V^0} - \frac{\Delta V^0}{RT_0} \tanh \left(\frac{\Delta G^0}{2RT_0} \right) \quad (6.24)$$

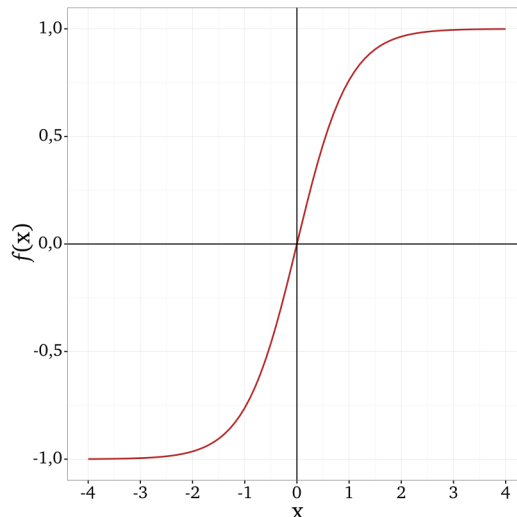


Abbildung 6.1: Verlauf der Funktion des Tangens Hyperbolicus Die Abbildung zeigt den Verlauf der Funktion $f(x) = \tanh(x)$ für das Intervall $x = [-4,4]$. Die Funktion ist für alle $x \in \mathbb{R}$ stetig.

Der Tangens Hyperbolicus $\tanh(x)$ (Abbildung 6.1) besitzt eine Nullstelle für $x = 0$ und folgende Grenzwerte für $\lim_{x \rightarrow -\infty}$ und $\lim_{x \rightarrow \infty}$ (Gleichung 6.25 und 6.26).

$$\lim_{x \rightarrow -\infty} \tanh(x) = -1 \quad (6.25)$$

$$\lim_{x \rightarrow \infty} \tanh(x) = 1 \quad (6.26)$$

Damit ergibt sich für Gleichung 6.24 mit $\Delta G^0 = 0$ der in Gleichung 6.27 gezeigte Zusammenhang zwischen dem Druckkoeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ und den thermodynamischen Parametern ΔV^0 und $\Delta \beta'^0$.

$$\frac{B_2^\#}{B_1} = -\frac{\Delta \beta'^0}{\Delta V^0} \quad \text{für} \quad \Delta G^0 = 0 \quad (6.27)$$

Wendet man die Grenzwerte für $\lim_{x \rightarrow -\infty}$ (Gleichung 6.25) und $\lim_{x \rightarrow \infty}$ (Gleichung 6.26) auf Gleichung 6.24 an, so führt dies zu den folgenden Grenzwerten mit $\Delta G^0 \rightarrow -\infty$ (Gleichung 6.28) und $\Delta G^0 \rightarrow \infty$ (Gleichung 6.29).

$$\frac{B_2^\#}{B_1} = -\frac{\Delta\beta'^0}{\Delta V^0} + \frac{\Delta V^0}{RT_0} \quad \text{für} \quad \Delta G^0 \rightarrow -\infty \quad (6.28)$$

$$\frac{B_2^\#}{B_1} = -\frac{\Delta\beta'^0}{\Delta V^0} - \frac{\Delta V^0}{RT_0} \quad \text{für} \quad \Delta G^0 \rightarrow \infty \quad (6.29)$$

Bei konstanter Temperatur und $\Delta G^0 = 0$ entspricht das Verhältnis von nicht linearem Druckkoeffizienten $B_2^\#$ zu linearem Druckkoeffizienten B_1 dem Verhältnis der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta'^0$ zu der Änderung des partiellen molaren Volumens ΔV^0 zwischen den Zuständen 1 und 2 (Gleichung 6.27). Für sehr große Unterschiede der freien Gibbs-Energie erweitert sich dieses Verhältnis je nach Vorzeichen um das Verhältnis der partiellen molaren Volumenänderung zu dem Produkt aus allgemeiner Gaskonstante R und der Temperatur T_0 (Gleichung 6.28 und Gleichung 6.29). Hierbei ergibt sich explizit eine Temperaturabhängigkeit des Verhältnisses $B_2^\#/B_1$. Diese $1/T$ Abhängigkeit kann genutzt werden, um die Gültigkeit von Gleichung 6.28 und Gleichung 6.29 zu bestätigen. Umgekehrt beinhaltet die Abhängigkeit des Verhältnisses $B_2^\#/B_1$ zur reziproken Temperatur die Möglichkeit der Berechnung der partiellen molaren Volumenänderung ΔV^0 über die Steigung der Temperaturabhängigkeit.

Die Änderung des Kompressibilitätsfaktors kann dabei umgeformt werden, um eine Vergleichbarkeit zu anderen Methoden, wie zum Beispiel Ultraschallmessungen, zu erlangen. Dies ist über den in Gleichung 6.30 dargestellten Zusammenhang möglich.

$$\Delta\beta' = V_2\beta_2 - V_1\beta_1 = \langle\beta\rangle\Delta V + \Delta\beta\langle V\rangle \quad (6.30)$$

Dabei ist $\langle\beta\rangle$ das Mittel und $\Delta\beta$ die Differenz der partiellen molaren Kompressibilitäten der zwei Zustände. Dies gilt ebenso für das Volumen bei dem $\langle V\rangle$ das Mittel und ΔV die Differenz der partiellen molaren Volumen zwischen den Zuständen darstellt. Dabei wird häufig der erste Term von Gleichung (6.30) ($\langle\beta\rangle\Delta V$) vernachlässigt (Kitahara et al., 2013).

In vorhergehender Herleitung wird davon ausgegangen, daß die chemischen Verschiebungen der zwei Zustände δ_1 und δ_2 unabhängig vom Druck sind. Dies muss nicht unbedingt der Fall sein, da die das Molekül umgebende Wasserschicht eine Abhängigkeit vom Druck zeigen kann. Dies kann jedoch in den meisten Fällen vernachlässigt werden, da diese Druckabhängigkeit im Vergleich zu $\Delta\delta$ sehr klein ist.

6.2.2 Theoretische Überprüfung an simulierten Kurven

In diesem Kapitel erfolgt eine Überprüfung des in Kapitel 6.2.1 hergeleiteten Zusammenhangs zwischen dem Verhältnis der Druckkoeffizienten $B_2^\# / B_1$ und dem Verhältnis der thermodynamischen Größen $\Delta\beta'^0$ und ΔV^0 . Die Überprüfung erfolgt anhand simulierter Kurvenverläufe der chemischen Verschiebung δ in Abhängigkeit des Drucks gemäß Gleichung 6.16.

Die simulierten Kurvenverläufe sowie das aus der Ausgangsfunktion abgeleitete Taylorpolynom zweiten Grades sind in Abbildung 6.2 dargestellt. Dabei wurde einmal der Fall für $\Delta G^0 = 0$ kJ/mol (Abbildung 6.2b, grüne Kurve) simuliert als auch der Fall für sehr große Änderungen der freien Gibbs-Energie mit $\Delta G^0 = -15$ MJ/mol (Abbildung 6.2a, grüne Kurve). Bei einer Änderung der freien Gibbs-Energie von -15 MJ/mol werden für die eingesetzten Parameter ca. 99 % des Sättigungswertes des Tangens Hyperbolicus erreicht. Somit kann dieser Kurvenverlauf als Grenzfall für

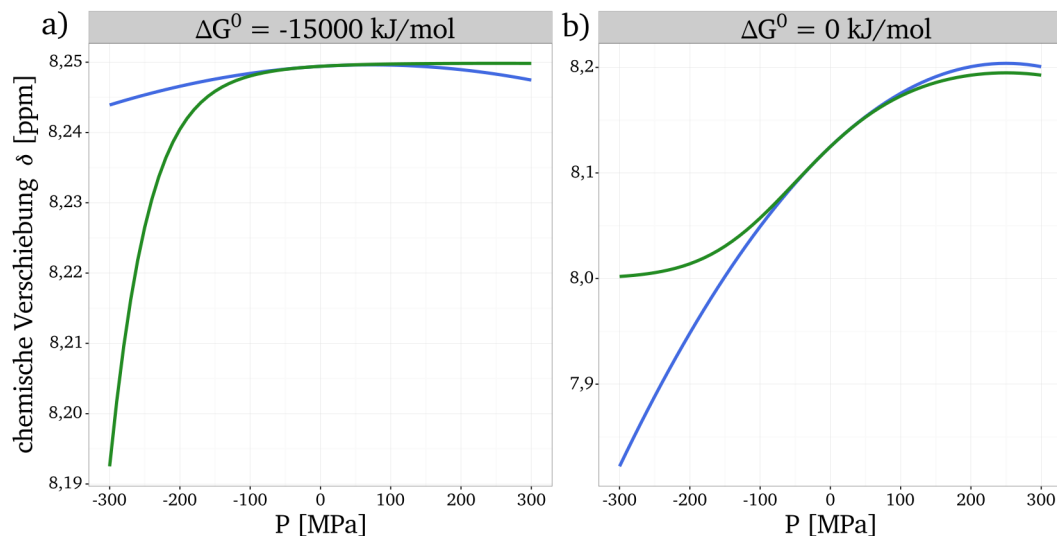


Abbildung 6.2: Vergleich von simulierten thermodynamischen Kurven mit einer durch deren Taylorpolynom ausgedrückten Funktion Die Abbildung zeigt den mit Gleichung 6.16 erzeugten Funktionsverlauf (grün) sowie den Verlauf des aus dieser Funktion abgeleiteten Taylorpolynoms zweiter Ordnung (blau). Die verwendeten Parameter der mit Gleichung 6.16 simulierten Kurvenverläufe (grün) lauten: $\delta_1 = 8,00$ ppm, $\delta_2 = 8,25$ ppm, $\Delta V^0 = -25$ mL/mol, $\Delta\beta'^0 = -0,1$ mL/(MPa · mol), $\Delta G^0 = -15$ MJ/mol (Abbildung 6.2a) und $\Delta G^0 = 0$ kJ/mol (Abbildung 6.2b). Das aus diesen Funktionen abgeleitete Taylorpolynom zweiter Ordnung (blau) lautet: $\delta(p) = 8,249 + 5,896 \cdot 10^{-6}p - 8,280/2 \cdot 10^{-8}p^2$ ($\Delta G^0 = -15$ MJ/mol, Abbildung 6.2a) und $\delta(p) = 8,125 + 6,306 \cdot 10^{-4}p - 2,523/2 \cdot 10^{-6}p^2$ ($\Delta G^0 = -0$ kJ/mol, Abbildung 6.2b). Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Abb. 6.2			a)	b)
Parameter	Formel		$\Delta G^0 \rightarrow -\infty$	$\Delta G^0 = 0$
δ_1 [ppm]			8,00	8,00
δ_2 [ppm]			8,25	8,25
ΔG^0 [kJ/mol]			-15000	0
ΔV^0 [mL/mol]		6.16	-25	-25
$\Delta\beta'$ [mL/(mol MPa)]			-0,1	-0,1
T [K]			298	298
$-\Delta\beta'/\Delta V^0$	6.27		-0,004	-0,004
$-\Delta\beta'/\Delta V^0 + \Delta V^0/RT$	6.28		-0,0141	-0,0141
δ_0 [ppm]			8,249	8,125
B_1 [1/MPa]		6.11	$5,896 \cdot 10^{-6}$	$6,306 \cdot 10^{-4}$
$B_2^\#$ [1/MPa ²]			$-8,280 \cdot 10^{-8}$	$-2,523 \cdot 10^{-6}$
$B_2^\#/B_1$ [1/MPa]	6.28, 6.27		-0,0140	-0,004

Tabelle 6.1: Parameter der thermodynamischen und polynominalen Kurven sowie daraus abgeleitete Verhältnisse Die Tabelle fasst die Parameter der Kurvenverläufe aus Abbildung 6.2 zusammen. Über dem Doppelstrich sind die Parameter für die mit Gleichung 6.16 erzeugten thermodynamischen Kurven (Abbildung 6.2, grüne Kurven) sowie die aus diesen Parametern abgeleiteten Verhältnisse angegeben. Unter dem Doppelstrich sind die aus der thermodynamischen Funktion (Gleichung 6.16) abgeleiteten Taylorpolynome zweiter Ordnung (Abbildung 6.2, blaue Kurve) mit ihren Koeffizienten d_0 , B_1 und $B_2^\#$ und dem Koeffizientenverhältnis $B_2^\#/B_1$ angegeben. Die Werte werden angegeben für den Grenzfalle $\Delta G^0 \rightarrow -\infty$ (Abbildung 6.2a) und $\Delta G^0 = 0$ kJ/mol (Abbildung 6.2b). Zudem sind die Gleichungen, die mit diesen Funktionen beziehungsweise Verhältnissen zusammenhängen in der Spalte *Formel* angegeben.

$\Delta G^0 \rightarrow -\infty$ angesehen werden. Zudem lässt sich die Betrachtung für $\Delta G^0 \rightarrow -\infty$ aufgrund der Symmetrie des tanh auch auf den Fall für $\Delta G^0 \rightarrow \infty$ übertragen.

Die für die Simulation verwendeten Parameter sind in Tabelle 6.1 angegeben. Dabei wurde auch das aus den abgeleiteten Taylorpolynomen zweiter Ordnung bestimmte Koeffizientenverhältnis $B_2^\#/B_1$ angegeben sowie das Verhältnis $-\Delta\beta'/\Delta V^0$ und $\Delta\beta'/\Delta V^0 + \Delta V^0/RT$ der Ausgangsfunktionen.

Wie aus Tabelle 6.1 ersichtlich, ergibt sich für $\Delta G^0 = 0$ kJ/mol eine Übereinstimmung des simulierten Verhältnisses $-\Delta\beta'/\Delta V^0$ zu dem Koeffizientenverhältnis $B_2^\#/B_1$ des Taylorpolynoms. Nahezu übereinstimmend zeigt sich das Koeffizientenverhältnis $B_2^\#/B_1$

zum Ausdruck $-\Delta\beta'/\Delta V^0 + \Delta V^0/RT$ für den Grenzfall $\Delta G^0 \rightarrow -\infty$. Die kleine Abweichung ergibt sich aus dem nur zu 99,5 % erreichten Grenzwert der Funktion.

Die Funktion für $\Delta G^0 \rightarrow \infty$ verhält sich gemäß Gleichung 6.29 symmetrisch zu $\Delta G^0 \rightarrow -\infty$ und sollte somit eine Übereinstimmung des Koeffizientenverhältnis von $B_2^\#/B_1$ zum Ausdruck $-\Delta\beta'/\Delta V^0 - \Delta V^0/RT$ zeigen.

Der Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Druckkoeffizienten und den thermodynamischen Größen $\Delta\beta'^0$ und ΔV^0 wurde somit an den simulierten Kurvenverläufe der chemischen Verschiebung über den Druck für $\Delta G^0 = 0 \text{ kJ/mol}$ und $\Delta G^0 \rightarrow \pm\infty$ bestätigt.

6.2.3 Überprüfung der Nachweisbarkeit des Taylorpolynoms durch lineare Regression

Es zeigt sich in Abbildung 6.2, dass die aus den thermodynamischen Ausgangsfunktionen (Gleichung 6.16) hergeleiteten Taylorpolynome zweiter Ordnung die simulierte Kurve nicht ausreichend gut beziehungsweise nur in einem eingeschränkten Druckbereich (um $P = P_0$) gut beschreiben. Daher muss zwischen einem hergeleiteten Taylorpolynom aus den Ausgangsfunktionen und einer linearen Regression, die diese Ausgangsfunktion beschreiben soll, unterschieden werden. Um dies zu verdeutlichen zeigt Abbildung 6.3 den Fit der Ausgangsfunktionen (mit $\Delta\beta' \neq 0$) gemäß Formel 6.2 für unterschiedliche Fitbereiche ΔP (10 MPa bis 500 MPa), die symmetrisch um $P = P_0$ liegen.

Es zeigt sich wie erwartet für den Grenzfall $\Delta G^0 \rightarrow -\infty$ (Abbildung 6.3c) und $\Delta G^0 = 0 \text{ kJ/mol}$ (Abbildung 6.3d), dass für ausreichend kleine Fitbereiche das Koeffizientenverhältnis $B_2^\#/B_1$ dem theoretischen Verhältnis aus $\Delta\beta'^0/\Delta V^0 + \Delta V^0/RT$ (Abbildung 6.3, graue Linie) beziehungsweise $\Delta\beta'^0/\Delta V^0$ (Abbildung 6.3, schwarze Linie) entspricht. Für größere Fitbereiche weicht das durch lineare Regression erhaltene Koeffizientenverhältnis vom theoretischen zunehmend ab.

Betrachtet man die in den Abbildungen 6.3a und 6.3b abgebildeten Kurvenverläufe der thermodynamischen Funktion (Gleichung 6.16) mit den durch die lineare Regression abgedeckten Fitbereichen (transparente graue Fläche), so fällt auf, dass in beiden Fällen nahezu der gesamte Kurvenverlauf vom Fitbereich abgedeckt wird. Dies entspricht nicht den Kurvenverläufen aus realen Experimenten, die kleinere Druckbereiche abdecken, die in den meisten Fällen keine Maxima, Wendepunkte oder Sättigungsbereiche aufweisen. Daher wird im Folgenden der Fitbereich verkleinert ($\Delta P = 20 \text{ MPa}$

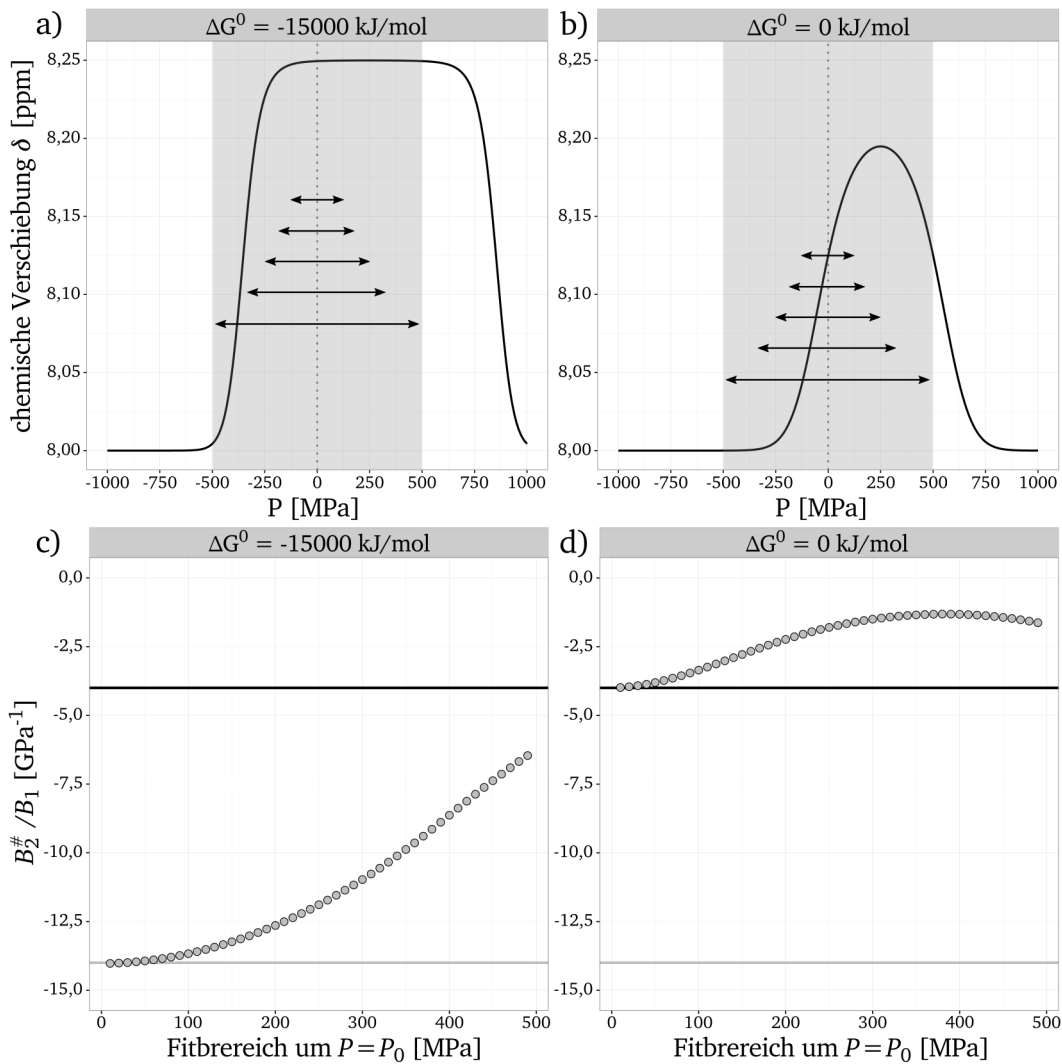


Abbildung 6.3: Verhältnis der Druckkoeffizienten $B_2^\# / B_1$ für unterschiedliche symmetrische Fitbereiche um $P = P_0$ Die Abbildung zeigt die symmetrischen Fitbereiche um $P = P_0$ für $\Delta G^0 \rightarrow -\infty$ (Abbildung 6.3a) und $\Delta G^0 = 0 \text{ kJ/mol}$ (Abbildung 6.3b). Zudem wird das Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ gemäß Gleichung 6.2 in Abhängigkeit des Fitbereichs ΔP um $P = P_0$ für $\Delta G^0 \rightarrow -\infty$ (Abbildung 6.3c) und $\Delta G^0 = 0 \text{ kJ/mol}$ (Abbildung 6.3d) gezeigt. Die thermodynamischen Kurvenverläufe wurden mit Hilfe von Gleichung 6.16 und den in Tabelle 6.1 angegebenen Parametern erzeugt. In den Abbildungen 6.3c und 6.3d sind die theoretischen Werte für $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0 + \Delta V^0 / RT = -14,1 \text{ GPa}^{-1}$ (graue Linie) und $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0 = -4 \text{ GPa}^{-1}$ (schwarze Linie) gekennzeichnet.

bis $\Delta P = 500 \text{ MPa}$) und nur Bereiche gefittet, die keine Wendepunkte enthalten (Abbildung 6.4). Betrachtet man das Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ für die unterschiedlichen Fitbereiche mit $P > P_0$ (Abbildungen 6.4), so zeigt sich wie für den symmetri-

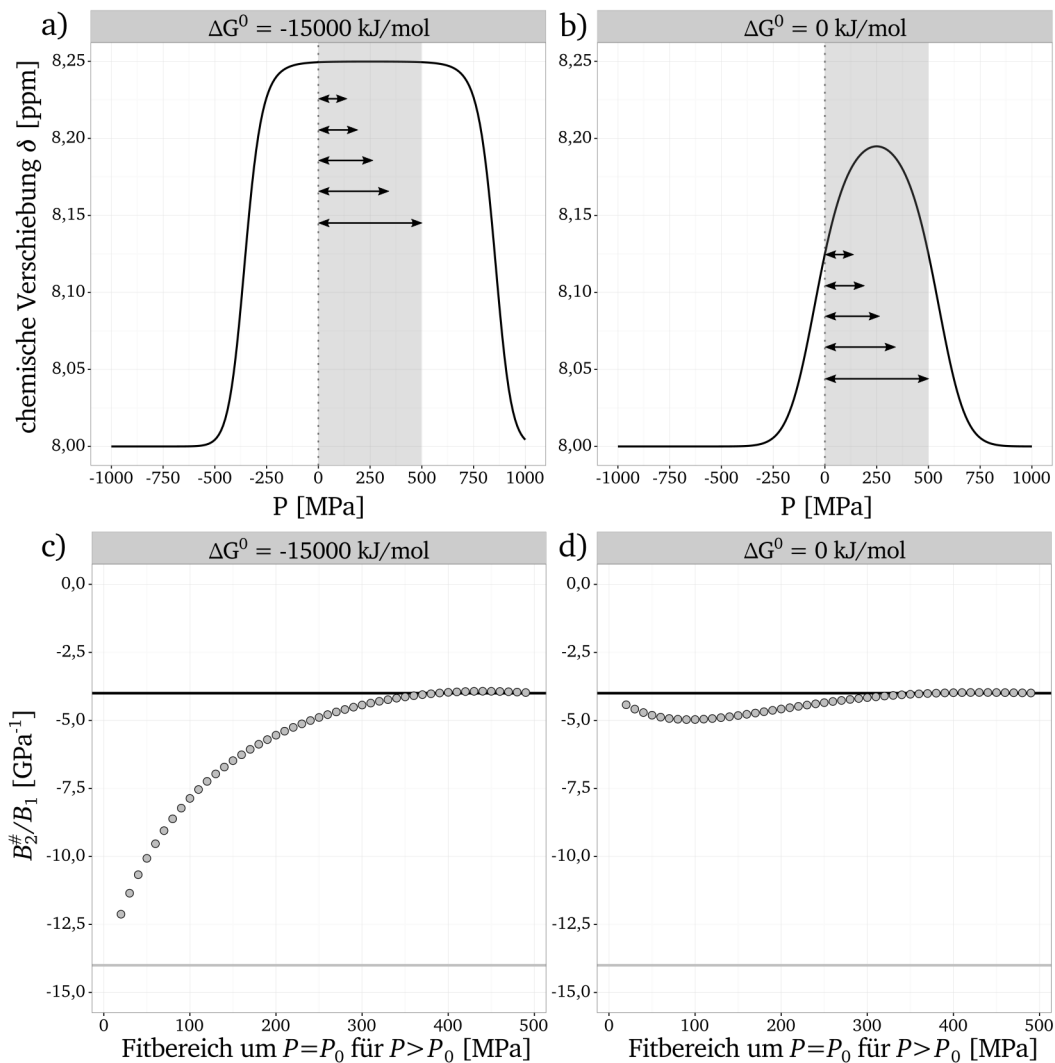


Abbildung 6.4: Verhältnis der Druckkoeffizienten $B_2^\# / B_1$ für unterschiedliche Fitbereiche mit $P > P_0$ Die Abbildung zeigt die Fitbereiche mit $P > P_0$ für $\Delta G^0 \rightarrow -\infty$ (Abbildung 6.4a) und $\Delta G^0 = 0 \text{ kJ/mol}$ (Abbildung 6.4b). Zudem wird das Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ gemäß Gleichung 6.2 in Abhängigkeit des Fitbereichs ΔP mit $P > P_0$ für $\Delta G^0 \rightarrow -\infty$ (Abbildung 6.4c) und $\Delta G^0 = 0 \text{ kJ/mol}$ (Abbildung 6.4d) gezeigt. Die thermodynamische Kurvenverläufe wurden mit Hilfe von Gleichung 6.16 und den in Tabelle 6.1 angegebenen Parametern erzeugt. In den Abbildungen 6.4c und 6.4d sind die theoretischen Werte für $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0 + \Delta V^0 / RT = -14,1 \text{ GPa}^{-1}$ (graue Linie) und $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0 = -4 \text{ GPa}^{-1}$ (schwarze Linie) gekennzeichnet.

schen Fall für kleine Fitbereiche eine Annäherung an das theoretische Verhältnis für $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0 + \Delta V^0 / RT$ (Abbildung 6.4c) beziehungsweise $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0$ (Abbildung 6.4d). Für Fitbereiche $\Delta P > 300 \text{ MPa}$ nähert sich das Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ für $\Delta G^0 \rightarrow -\infty$ und $\Delta G^0 = 0 \text{ kJ/mol}$ dem theoretischen Verhältnis $\Delta\beta'^0 / \Delta V^0$ an (Abbil-

dung 6.4c und 6.4d). Somit zeigt sich für sehr kleine Fitbereiche ein Zusammenhang zwischen dem Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ und $-\Delta\beta^{00} / \Delta V^0 + \Delta V^0 / RT$ ($\Delta G^0 \rightarrow -\infty$) sowie $-\Delta\beta^{00} / \Delta V^0$ ($\Delta G^0 = 0 \text{ kJ/mol}$). Für große Fitbereiche ($\Delta P > 300 \text{ MPa}$) nähert sich das Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ in beiden Fällen dem theoretischen Wert $\Delta\beta^{00} / \Delta V^0$ an.

Bei Betrachtung der in den Abbildungen 6.4a und 6.4b gezeigten Kurvenverläufe der thermodynamischen Funktion (Gleichung 6.16) und der durch die lineare Regression abgedeckten Fitbereiche fällt auf, dass in beiden Fällen für große Fitbereiche $\Delta P > 300 \text{ MPa}$ der Extremwert der Funktion bei $P = 250 \text{ MPa}$ innerhalb dieses Bereiches liegt. Daher wird im Folgenden untersucht, inwiefern das Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ mit $-\Delta\beta^{00} / \Delta V^0$ über den Extremwert der thermodynamischen Funktion zusammenhängt.

6.2.4 Verknüpfung des Koeffizientenverhältnisses mit thermodynamischen Parametern anhand von Extremwerten

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass für große Fitbereiche, in denen der Extremwert der thermodynamischen Funktion liegt, das durch lineare Regression erhaltene Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ dem theoretischen Verhältnis $-\Delta\beta^{00} / \Delta V^0$ der thermodynamischen Ausgangsfunktion entspricht. Somit scheint es eine Verbindung zwischen dem Extremwert der thermodynamischen Funktion und dem Extremwert des Polynoms zweiter Ordnung zu geben. Ausgehend von einem Polynom zweiten Grades mit den Koeffizienten B_0 , B_1 und B_2 (Gleichung 6.31)

$$f(x) = B_0 + B_1 x + \frac{B_2^\#}{2} x^2 \quad (6.31)$$

ergibt sich die erste Ableitung gemäß Gleichung 6.32.

$$f'(x) = B_1 + B_2^\# x \quad (6.32)$$

Diese Funktion besitzt mit dem notwendigen Kriterium $f'(x) = 0$ eine Extremstelle (Gleichung 6.33).

$$x_1 = -\frac{B_1}{B_2^\#} \quad (6.33)$$

Somit beschreibt das negative Verhältnis des nicht linearen Koeffizienten $B_2^\#$ zu dem linearen Koeffizienten B_1 die Extremstelle dieses Polynoms zweiter Ordnung. Die Ausgangsfunktion gemäß Formel 6.16 mit eingesetzter Gibbs-Energie (Gleichung 6.34)

$$\Delta G = \Delta G^0 + \Delta V^0(P - P_0) - \frac{\Delta\beta'^0}{2}(P - P_0)^2 \quad (6.34)$$

ergibt mit $x = (P - P_0)$

$$f(x) = \frac{1}{2}(\delta_1 + \delta_2) - \frac{1}{2}(\delta_2 - \delta_1) \tanh\left(\frac{\Delta G^0 + \Delta V^0 x - \frac{\Delta\beta'^0}{2}x^2}{2RT}\right) \quad (6.35)$$

mit der ersten Ableitung

$$f'(x) = \frac{0,25(d_1 - d_2)(\Delta V^0 - \Delta\beta'^0 x) \operatorname{sech}^2\left(\frac{\Delta G^0 + \Delta V^0 x - \frac{\Delta\beta'^0}{2}x^2}{2RT}\right)}{RT} \quad (6.36)$$

Mit dem notwendigen Kriterium $f'(x) = 0$ ergibt sich eine Extremstelle der Ausgangsfunktion für $\Delta\beta'^0 \neq 0$ (Gleichung 6.37).

$$x_1 = \frac{\Delta V^0}{\Delta\beta'^0} \quad (6.37)$$

Die thermodynamische Funktion besitzt somit für $\Delta\beta'^0 \neq 0$ einen Extremwert, der durch das Verhältnis der partiellen molaren Volumenänderung ΔV^0 zu der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta'^0$ beschrieben werden kann. Stimmen die Extremstellen für das Polynom zweiter Ordnung und der thermodynamischen Funktion überein, so ergibt sich der in Gleichung 6.38 gezeigte Zusammenhang.

$$\frac{B_2^\#}{B_1} = -\frac{\Delta\beta'^0}{\Delta V^0} \quad (6.38)$$

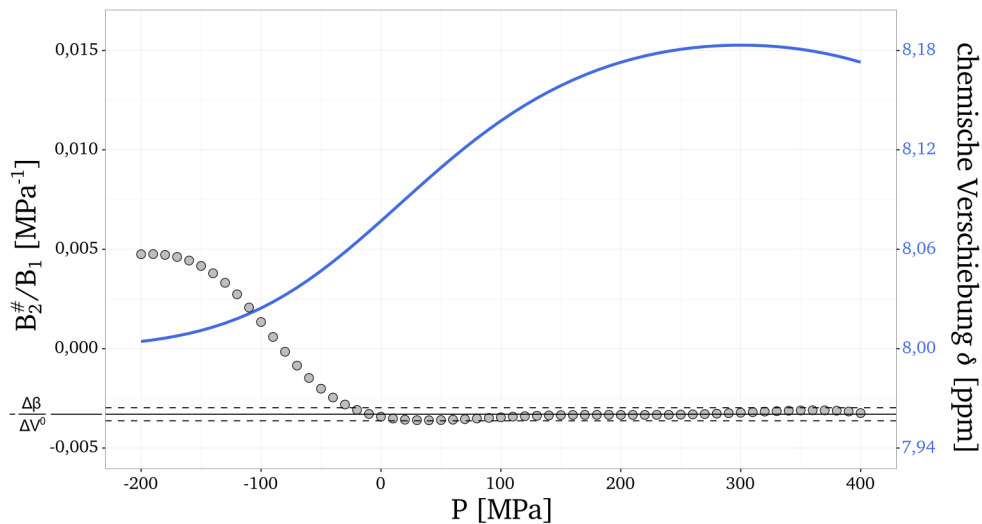


Abbildung 6.5: Variation des Startpunktes eines festgelegten Fitbereiches zur Beschreibung einer simulierten Kurve mit einem Polynom zweiter Ordnung Die Abbildung zeigt eine mit Hilfe von Gleichung 6.16 simulierte Kurve (blaue Linie) mit folgenden Parametern: $\delta_1 = 8,00$ ppm, $\delta_2 = 8,25$ ppm, $\Delta G^0 = 2000$ kJ/mol, $\Delta V^0 = -30$ mL/mol, $\Delta\beta^0 = -0,1$ mL/(mol · MPa), $T = 298$ K. Das Verhältnis $\Delta\beta^0/\Delta V^0$ beträgt $-0,0033$ MPa $^{-1}$ und ist als horizontale schwarze durchgehende Linie eingezeichnet. Die über und unter dieser angeordnete gestrichelten Linien zeigen eine Abweichung von 10% an. Für die simulierte Kurve (blaue Linie) gilt die rechts angegebene Achsenbeschriftung (blau). Die grauen Punkte zeigen jeweils das Koeffizientenverhältnis $B_2^\#/B_1$ für den Startpunkt einer linearen Regression mit Hilfe eines Polynoms zweiter Ordnung (Gleichung 6.11) mit einem festgelegten Fitbereich von $\Delta P = 200$ MPa.

Somit lässt sich das Koeffizientenverhältnis des nicht linearen Druckkoeffizienten $B_2^\#$ und dem linearen Druckkoeffizienten B_1 mit dem negativen Verhältnis der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta'$ und der Volumenänderung ΔV^0 verknüpfen, wenn der Extremwert des durch lineare Regression erhaltenen Polynoms zweiter Ordnung mit dem Extremwert der thermodynamischen Ausgangsfunktion übereinstimmt. Je genauer das Anfiten mit Hilfe eines Polynoms zweiter Ordnung den Extremwert der thermodynamischen Ausgangsfunktion bestimmen kann, desto exakter kann das Verhältnis $-\Delta\beta^0/\Delta V^0$ bestimmt werden.

Es wurde bereits die Auswirkung der Variation des Fitbereiches um $P = P_0$ für den symmetrischen Fall und für $P > P_0$ auf die Nachweisbarkeit des Taylorpolynoms untersucht. Der Druckbereich ist experimentell bedingt auf $P_0 \leq P \leq P_{\max}$ beschränkt, wobei P_{\max} durch die verwendete Keramik und einem eventuellen Sicherheitspuffer vorgegeben ist. Da der Druckbereich bei unseren Messungen in den meisten Fällen bei

200 MPa liegt, wurde ähnlich der Untersuchung des Fitbereiches (Abbildung 6.4 und 6.3) eine gemäß Gleichung 6.16 simulierte Kurve mit Hilfe eines Polynoms zweiter Ordnung für einen festgelegten Fitbereich von $\Delta P = 200$ MPa gefittet (Abbildung 6.5). Dabei wurde der Startpunkt der linearen Regression von -200 MPa bis 400 MPa variiert. Die Parameter orientieren sich der Größenordnung nach an experimentellen Werten der Depolymerisierung des A β (1–40)-Peptids (siehe Kapitel 4.3.1, Tabelle 4.2).

Das Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ entspricht ca. ab einem Startpunkt von -20 MPa, dem Verhältnis $\Delta\beta'^0 / \Delta V^0$ unter Berücksichtigung eines 10 %igen Fehlerbereiches. Ab diesem Startpunkt der linearen Regression mit einem festgelegten Druckbereich von $\Delta P = 200$ MPa ist es möglich, das Verhältnis der thermodynamischen Parameter $\Delta\beta'^0 / \Delta V^0$ mit einer maximalen Abweichung von 10 % zu bestimmen. Noch besser ist die Übereinstimmung für Startpunkte in dem Bereich von ca. 150 MPa bis ca. 280 MPa, in dem nahezu keine Abweichung vorhanden ist. Dies liegt an der Lage des Maximums der thermodynamischen Funktion bei 300 MPa, welches ab ca. 100 MPa mitgefittet werden kann. Für die Startpunkte mit $P > 280$ MPa ergibt sich wieder eine etwas größere Abweichung, die jedoch immer noch innerhalb des 10 %igen Fehlerbereichs liegt. Somit zeigt sich für den Fall realistisch gewählter thermodynamischer Parameter, dass sich Gleichung 6.38 für einen großen Bereich der Kurve anwenden lässt, der sich in diesem Fall in etwa vom Wendepunkt der Funktion bei 15 MPa bis hinter das Maximum (300 MPa) bei ca. 400 MPa erstreckt.

6.2.5 Untersuchung des Verhältnisses der Druckkoeffizienten an unterschiedlichen Systemen

Es wurde im Laufe dieses Kapitels gezeigt, dass das Verhältnis der Druckkoeffizienten $B_2^\# / B_1$ in vielen Fällen mit dem Verhältnis der thermodynamischen Parameter $\Delta\beta'^0 / \Delta V^0$ in Verbindung gebracht werden kann. Das führt zu der Frage, wie sich das Koeffizientenverhältnis für unterschiedliche Proben verhält. Daher wird in diesem Kapitel das Verhältnis $B_2^\# / B_1$ für unterschiedliche Systeme untersucht.

A β (1–40)-Peptid Zu Beginn erfolgt eine Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ und dem Verhältnis $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0$ unter Zuhilfenahme der thermodynamischen Daten und Druckkoeffizienten A β (1–40)-Peptids (siehe Kapitel 4.3.1 und Munte et al. (2013)). Das β -Amyloid eignet sich sehr gut für diesen Vergleich, da ein Großteil der chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit vom

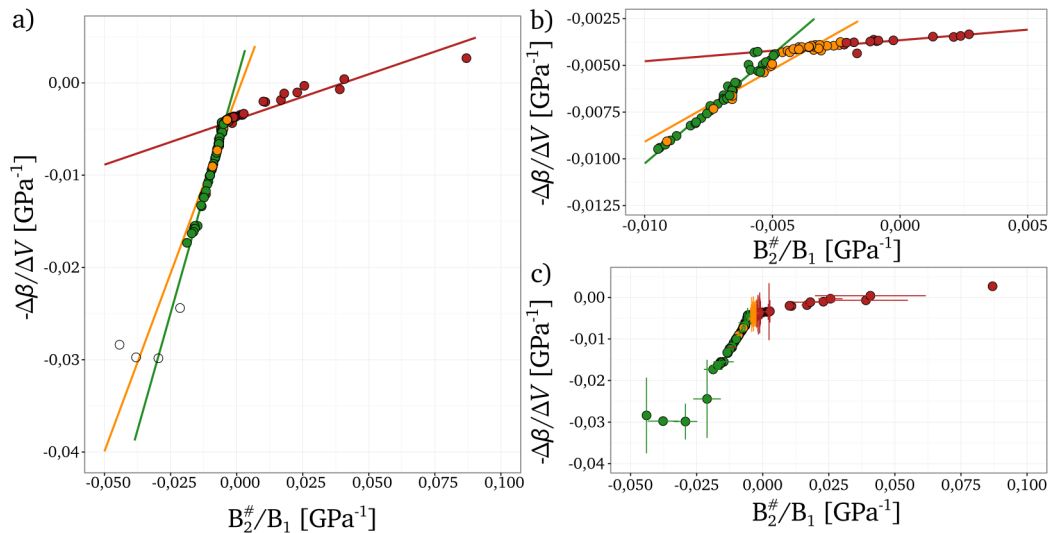


Abbildung 6.6: Korrelation des Verhältnisses der Druckkoeffizienten mit dem Verhältnis thermodynamischer Parameter für das A β -Peptid Die Abbildung zeigt die Auftragung des Verhältnisses $-\Delta\beta/\Delta V$ über das Verhältnis der Druckkoeffizienten $B_2^\#/B_1$. Diese wurden durch Anfitzen der chemischen Verschiebungen des Amyloid- β über den Druck mit Gleichung 6.16 ($-\Delta\beta/\Delta V$) beziehungsweise Gleichung 6.11 ($B_2^\#/B_1$) ermittelt. Farblich kodiert sind dabei für die gesamte Abbildung unterschiedliche Bereiche für die Änderung der freien Gibbs-Energie: $\Delta G^0 < RT$ (grün), $RT < \Delta G^0 < 2RT$ (orange) und $\Delta G^0 > 2RT$ (rot). Abbildung 6.6a zeigt den gesamten Datenbereich mit den Korrelationsgeraden für die jeweiligen Bereiche für ΔG^0 . Dabei sind Ausreißer als transparente Datenpunkte gekennzeichnet. Abbildung 6.6b zeigt einen vergrößerten Ausschnitt für den Schnittpunkt der Korrelationsgeraden. Abbildung 6.6c zeigt den gesamten Datenbereich mit eingezeichneten Fehlern. Die Korrelationskoeffizienten der unterschiedlichen Bereiche betragen $r = 0,99$ (grün), $r = 0,95$ (orange) und $r = 0,79$ (rot).

Druck thermodynamisch (Gleichung 6.16) sowie mit einem Polynom zweiter Ordnung (Gleichung 6.11) gefittet werden können.

Den Vergleich des Koeffizientenverhältnisses $B_2^\#/B_1$ mit dem thermodynamischen Verhältnis $-\Delta\beta^0/\Delta V^0$ zeigt Abbildung 6.6. Dabei sind die beiden Verhältnisse gegeneinander aufgetragen und die entsprechenden Korrelationsgeraden eingezeichnet (Abbildung 6.6a). Für die gesamte Abbildung gilt die farbliche Einteilung der Größe der Änderung der freien Gibbs-Energie bei Standardbedingungen ΔG^0 . Dabei stellen grüne Punkte eine Änderung von $\Delta G^0 < RT$, orange Punkte eine Änderung von $RT < \Delta G^0 < 2RT$ und rote Punkte eine Änderung von $\Delta G^0 > 2RT$ dar. Zur genaueren Betrachtung des Bereichs, in dem sich die Korrelationsgeraden schneiden, zeigt Abbildung 6.6b einen vergrößerten Ausschnitt. Für die grünen Punkte zeigt sich mit

einem Pearson Korrelationskoeffizienten von $r = 0,99$ eine sehr gute Übereinstimmung der Verhältnisse. Die orangen Punkte zeigen ein unterschiedliches Verhalten mit einem Pearson Korrelationskoeffizienten von $r = 0,95$. So liegen einige Punkte auf der grünen Korrelationsgeraden, ein Großteil jedoch auf der roten Korrelationsgeraden, die mit einem Pearson Korrelationskoeffizienten von $r = 0,79$ deutlich von der grünen und der orangen Gerade abweicht.

Somit zeigt sich bei der Untersuchung des Zusammenhangs der Verhältnisse eine Abhängigkeit von der Größe der Änderung der freien Gibbs-Energie bei Standardbedingungen ΔG^0 . Für Werte, für die $\Delta G^0 < RT$ gilt, ergibt sich eine gute Übereinstimmung des in Gleichung 6.38 beschriebenen Zusammenhangs. Für Werte, für die $RT < \Delta G^0 < 2RT$ gilt, zeigen einige Datenpunkte diesen Zusammenhang auf, der Großteil der Datenpunkte verhält sich jedoch anders und liegt auf der Korrelationsgeraden für die Werte $\Delta G^0 > 2RT$.

Eine mögliche Erklärung für diese Abweichung ist, dass für große Werte von ΔG^0 Gleichung 6.38 nicht gilt und eher dem Zusammenhang gemäß der Gleichungen 6.28 und 6.29 für $\Delta G^0 \rightarrow \pm\infty$ gehorcht. Eine diesbezügliche Überprüfung führte jedoch auch in diesen Fällen zu keinem eindeutigen Zusammenhang zwischen $B_2^\# / B_1$ und $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0 \pm \Delta V^0 / RT$. Eine weitere Möglichkeit die Abweichungen für große Werte von ΔG^0 zu erklären, ist die Tatsache, dass die Verhältnisse aus Fitparametern abgeleitet werden, die fehlerbehaftet sind. Daher wurden in Abbildung 6.6c bei der Auftragung von $B_2^\# / B_1$ über $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0$ zusätzlich die Fehler der Größen als Striche angegeben. Dabei fällt auf, dass bis auf die Punkte, die in Abbildung 6.6a als Ausreisser gekennzeichnet sind (transparenter Kreis), die Fehler für $\Delta G^0 < RT$ (grüne Punkte) für beide aufgetragenen Werte sehr klein sind. Im Gegensatz dazu zeigen die Werte für $RT < \Delta G^0 < 2RT$ (orange Punkte) und $\Delta G^0 > 2RT$ (rote Punkte) sehr viel größere Fehler vor allem für das Verhältnis $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0$.

Modellpeptide Ac-GGXA-NH₂ Das Druckkoeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ stellt einen zusätzlichen Wert bei der Betrachtung der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung dar. Es wurde daher das Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ für die Kerne des Peptidrückgrats des Modellpeptids Ac-GGXA-NH₂ bestimmt. Für die Amidgruppe wurden diese aus den von Koehler et al. (2012) gezeigten Daten rückgerechnet. Zudem sind die Koeffizientenverhältnisse für die Kerne H^α, C^α und C' aus den in Beck Erlach et al. (2016b) angegebenen Druckkoeffizienten für das Peptid Ac-GGXA-NH₂ angegeben. Zusätzlich aufgeführt sind die rückgerechneten Werte anhand der Druckkoeffizienten aus

Arnold et al. (2002) für das ungeschützte Modellpeptid GGXA. Eine Zusammenfassung der Koeffizientenverhältnisse $B_2^\# / B_1$ findet man in Tabelle 6.2.

Vergleicht man die Verhältnisse für das Amidproton H^N zwischen dem geschützten und ungeschützten Peptid, so zeigen sich zum Teil große Unterschiede. So ist das Verhältnis $B_2^\# / B_1$ für das geschützte Peptid für alle Aminosäuren negativ, während für das ungeschützte Peptid einige Werte teils stark positive Werte aufweisen (Asparagin und Aspartat). Auch der Mittelwert über alle Aminosäuren unterscheidet sich mit $-1,5 \text{ GPa}^{-1}$ für das geschützte Peptid und $-0,7 \text{ GPa}^{-1}$ für das ungeschützte Peptid. Dies liegt hauptsächlich an den Messbedingungen mit unterschiedlicher Temperatur und pH-Wert, jedoch auch an der partiell geladenen N-terminalen Aminogruppe und C-terminalen Carboxygruppe, deren Ladungen einen Effekt auf Druckabhängigkeit ausüben können. Verändert sich der Protonierungsgrad einer geladenen Gruppe durch eine Verschiebung des pH-Wertes, so hat dies Einfluss auf die chemische Verschiebung benachbarter Aminosäuren. Nach Gross und Jaenicke (1994) führt eine Erhöhung des Drucks zu einer Protonierung der Aminogruppe und einer Deprotonierung der Carboxygruppe. Der Einfluss von Ladungseffekten fällt vor allem bei der Betrachtung des Glutamats auf, für das bereits gezeigt wurde, dass die druckinduzierte Änderung der chemischen Verschiebung im ungeschützten Peptid, abhängig von der Ladung der Carboxygruppe ist (Arnold et al., 2002; Kremer, 2006). Die Verwendung von GGEA-OME als Peptid führte zu deutlich geringeren Druckeffekten für Glutamat (Kremer, 2006). Dies deutet darauf hin, dass die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung zum Teil von der Interaktion der Carboxygruppe der Seitenkette mit der des Peptidrückgrats abhängig ist.

Betrachtet man die Mittelwerte für $B_2^\# / B_1$ für die unterschiedlichen Kerne im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂, so zeigen H^N ($-1,5 \text{ GPa}^{-1}$) und N ($-1,6 \text{ GPa}^{-1}$) vergleichbare Werte. Eine mögliche Interpretation ist, dass sich im Mittel auch das Verhältnis $\Delta\beta^0 / \Delta V^0$ ähnlich verhält, da beide Kerne denselben physikalischen Vorgang wahrnehmen. Darauf deutet auch die Korrelation zwischen den Koeffizientenverhältnissen der beiden Kerne hin, die mit einem Pearson Korrelationskoeffizienten von $r = 0,69$ sehr deutlich ausfällt (Abbildung 6.7a). Die Abweichung beruht zum größten Teil auf den relativ großen Fehlern des Verhältnisses $B_2^\# / B_1$ (Tabelle 6.2). Die durch einen zweiseitigen t-Test ermittelten Fehler zeigen, dass viele Werte nahe am Mittelwert liegen. Deutliche Abweichungen vom Mittelwert zeigen Tyrosin und Phenylalanin, mit größeren negativen Werten und Glycin und Alanin mit kleineren negativen Werten. Dies deutet auf einen Zusammenhang des Verhältnisses der Druckkoeffizienten mit der

Kern Peptid	H ^N a	H ^N b	N a	C' a	H ^α a	C ^α a
X3	$B_2^{\#}/B_1$ [GPa ⁻¹]					
A	-0,7 ± 0,4	-1,4	-1,1 ± 0,1	-2,1 ± 0,3	-1,8 ± 1,3	-0,1 ± 1,4
R	-0,9 ± 0,4	-0,3	-1,6 ± 0,1	-2,0 ± 0,4	-2,7 ± 1,2	-1,7 ± 1,1
N	-1,7 ± 0,6	2,6	-1,2 ± 0,6	-2,5 ± 0,3	-0,9 ± 2,1	0,2 ± 1,1
D	-1,7 ± 0,3	1,2	-1,8 ± 0,2	-4,7 ± 2,0	-0,9 ± 0,9	5,1 ± 4,6
C	-1,8 ± 0,2	0,0	-1,4 ± 0,3	-2,0 ± 0,5	-3,1 ± 0,9	-3,6 ± 0,3
C _{ox}				-0,3 ± 1,8	-	-
Q	-0,8 ± 0,6	0,3	-1,5 ± 0,2	-2,6 ± 0,4	-2,3 ± 1,0	-3,4 ± 2,3
E	-0,2 ± 0,6	-1,8 ^c	-1,2 ± 0,6	-2,3 ± 0,4	15,8 ± 4,5	-4,2 ± 0,2
G	-0,8 ± 0,5	0,8	-1,1 ± 0,2	-1,3 ± 0,2	-2,3 ± 0,4	-2,1 ± 0,3
H	-	-	-	-3,3 ± 0,6	-	-1,0 ± 3,4
H ^{4,0}	-1,8 ± 0,2	-	-1,7 ± 0,2	-	-1,4 ± 1,2	-
H ^{5,4}	-	-1,7	-	-	-	-
H ^{8,5}	-	-	-2,2 ± 0,3	-	-3,1 ± 3,0	-
I	-2,0 ± 0,4	-2,1	-1,6 ± 0,1	-2,2 ± 0,5	-2,0 ± 1,9	-1,1 ± 0,8
L	-1,9 ± 0,5	-1,8	-2,2 ± 0,4	-2,7 ± 0,3	-1,6 ± 1,2	-3,2 ± 1,4
K	-1,8 ± 0,4	-1,4	-1,5 ± 0,1	-2,1 ± 0,1	-1,9 ± 0,6	0,7 ± 1,5
M	-1,3 ± 0,4	-1,5	-1,4 ± 0,2	-1,8 ± 0,6	-2,6 ± 0,4	5,1 ± 1,4
F	-2,5 ± 0,4	0,4	-2,4 ± 0,1	-2,4 ± 0,2	-3,2 ± 1,0	1,2 ± 0,2
P _{trans}	-	-	-1,4 ± 0,1	-2,7 ± 0,6	-1,3 ± 0,7	-3,5 ± 1,9
P _{cis}	-	-	-0,6 ± 0,1	-2,4 ± 0,4	-2,0 ± 1,1	-
S	-2,0 ± 0,8	-1,4	-1,4 ± 0,4	-1,7 ± 0,3	-2,2 ± 3,3	-1,4 ± 0,3
T	-1,5 ± 0,3	-1,2	-1,4 ± 0,1	-1,7 ± 0,3	-0,4 ± 0,9	-1,3 ± 1,2
W	-1,4 ± 0,4	-2,0	-1,7 ± 0,1	-2,1 ± 0,4	-1,2 ± 1,6	-1,4 ± 2,9
Y	-2,4 ± 0,8	-1,1	-2,5 ± 0,2	-2,8 ± 0,3	-5,7 ± 1,4	8,7 ± 0,4
V	-0,7 ± 0,3	-1,5	-1,5 ± 0,1	-2,2 ± 0,2	0,3 ± 1,1	-1,6 ± 1,2
X3	-1,5 (0,3)	-0,7 (0,6)	-1,6 (0,2)	-2,3 (0,4)	-1,2 (1,8)	-3,2 (5,4)

Tabelle 6.2: Verhältnis der Druckkoeffizienten für die Kerne des Peptidrückgrats in den Modellpeptiden Ac-GGXA-NH₂ und GGXA Die Tabelle zeigt das Verhältnis $B_2^{\#}/B_1$ für die unterschiedlichen Kerne des Peptidrückgrats in dem geschützten Peptid Ac-GGXA-NH₂ (Peptid a) und dem ungeschützten Peptid GGXA (Peptid b). Die Daten der Amidprotonen des Peptids GGXA (Peptid b) wurden aus Arnold et al. (2002) rückgerechnet, die der Amidgruppe des Peptids Ac-GGXA-NH₂ aus Koehler et al. (2012) und die der Kerne C', C^α und H^α aus Beck Erlach et al. (2016b). Die Proben des Peptids Ac-GGXA-NH₂ enthielten 5 mM Ac-GGXA-NH₂, 20 mM Tris-d₁₁, 0,5 mM DSS, H₂O/D₂O 90%/10%, pH 6,7 und wurden bei einer Temperatur von 283 K vermessen. Die Proben des ungeschützten Peptids enthielten 5 mM GGXA, 50 mM Phosphatpuffer, 1 μM NaN₃, 0,1 mM DSS, H₂O/D₂O 80%/20%, pH 5,4 und wurden bei einer Temperatur von 305 K vermessen. Der in Klammern angegebene Fehler des Mittelwerts wurde über einen zweiseitigen t-Test mit einem Konfidenzintervall von 0,95 ermittelt. ^c gemessen für GGEA-OMe (Kremer, 2006).

molaren Masse hin. Dieser ist mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,54$ für den Amidstickstoff stark, jedoch weniger ausgeprägt für das Amidproton ($r = 0,32$).

Der Mittelwert des Verhältnisses für den Kern C' ist mit $-2,3 \text{ GPa}^{-1}$ deutlich größer als die Verhältnisse der Amidgruppe. Wie auch für die Kerne der Amidgruppen zeigen alle Aminosäuren ein negatives Verhältnis und weisen relativ kleine Fehler auf. Auch der Fehler des Mittelwertes fällt mit $0,4 \text{ GPa}^{-1}$ sehr gering aus. Zur Vervollständigung des Peptidrückgrats sind in Tabelle 6.2 zudem die Werte für das Proton H^α und den Kohlenstoff C^α aufgeführt. Diese besitzen jedoch einen sehr großen Fehler, der auf die schlechte Signalqualität dieser Kerne zurückzuführen ist. Es finden sich für beide Kerne sowohl positive als auch negative Koeffizientenverhältnisse.

Eine weitere Möglichkeit das Verhalten des Koeffizientenverhältnisses $B_2^\# / B_1$ zu analysieren, ist die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit. Dazu wurden für das Modellpeptid Ac-GGIA-NH₂ zusätzliche Druckreihen von 3 MPa bis 200 MPa bei den Temperaturen 278 K, 283 K, 288 K, 293 K, 298 K, 303 K und 308 K durchgeführt. Für kleine Änderungen der freien Gibbs-Energie sollte das Verhältnis $B_2^\# / B_1$ nach Gleichung 6.27 keine Temperaturabhängigkeit zeigen. Für große Änderungen der freien Gibbs-Energie sollte das Koeffizientenverhältnis gemäß Gleichung 6.28 beziehungsweise Gleichung 6.29 eine lineare Abhängigkeit mit der Steigung $\Delta V / R$ aufweisen. Die für das Peptid Ac-GGIA-NH₂ ermittelten Koeffizientenverhältnisse der Amidprotonen für die Aminosäuren Gly1, Gly2, Ile3 und Ala4 sind in Abbildung 6.7b dargestellt.

Dabei zeigen sich drei unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Aminosäuren. Für das Isoleucin 3 und das Alanin 4 zeigt sich nahezu keine Abhängigkeit von der Temperatur, während man für das Glycin 2 eine starke lineare $1/T$ -Abhängigkeit findet. Die fehlenden Werte für Glycin 2 und Alanin 4 für die Temperaturen 303 K und 308 K sind auf die Überlagerung der beiden Amidprotonen-Signale zurückzuführen. Das Glycin 1 zeigt von 308 K bis 293 K keine Abhängigkeit von der Temperatur, unterhalb einer Temperatur von 293 K jedoch eine immer größer werdende nicht lineare $1/T$ -Abhängigkeit.

Berechnet man über die Steigung der $1/T$ -Abhängigkeit des Glycin 2 die Änderung des partiellen molaren Volumens so ergibt sich mit -63 mL/mol ein relativ großer Wert für dieses kleine Peptid. Im Allgemeinen findet man für die Änderungen des partiellen molaren Volumens über die Druckabhängigkeit eher große Werte. Man muss hierbei jedoch beachten, dass nicht nur Volumenänderungen des Moleküls an sich, sondern auch Änderungen der Wasserhülle um das Peptid in die Volumenänderung mit einfließen können.

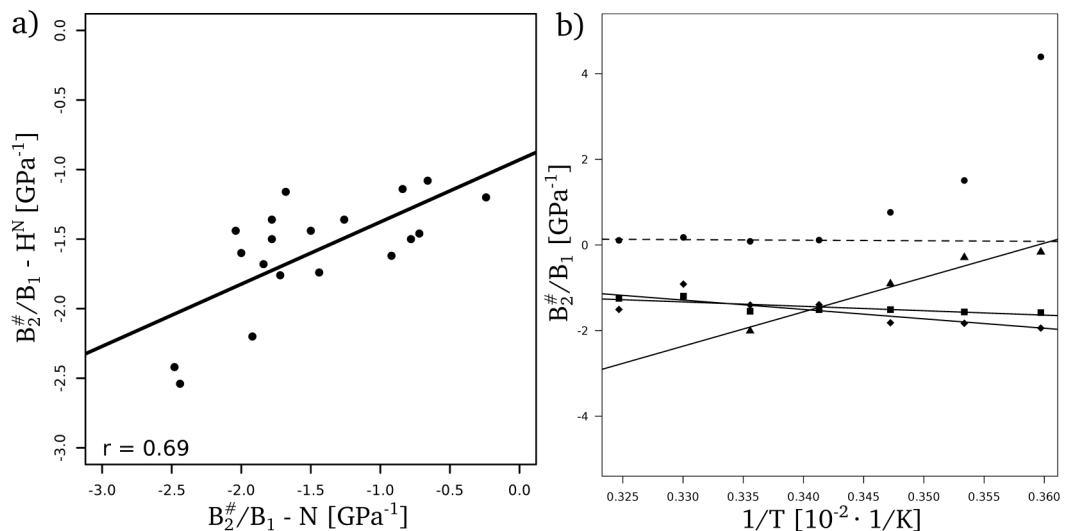


Abbildung 6.7: Korrelation (Ac-GGXA-NH₂) und Temperaturabhängigkeit (Ac-GGIA-NH₂) des Verhältnisses der Druckkoeffizienten Die Abbildung zeigt die Korrelation zwischen den Koeffizientenverhältnissen $B_2^{\#}/B_1$ für die Kerne H^N und N für das Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ (Abbildung 6.7a) und die Abhängigkeit des Verhältnisses $B_2^{\#}/B_1$ für Ac-GGIA-NH₂ von der Temperatur (Abbildung 6.7b). Die Koeffizientenverhältnisse in Abbildung 6.7a wurden aus den in Koehler et al. (2012) publizierten Druckkoeffizienten ermittelt. Die Überprüfung der Temperaturabhängigkeit für das Peptid Ac-GGIA-NH₂ erfolgte mit Hilfe von Druckreihen bei 278 K, 283 K, 288 K, 293 K, 298 K, 303 K und 308 K für die Amidprotonen des Gly1 (●), Gly2 (▲), Ile3 (■) und Ala4 (◆). Die Koeffizientenverhältnisse der Temperaturabhängigkeit zeigten einen sehr kleinen Fehler (ungefähr Symbolgröße). In beiden Fällen enthielten die Proben 5 mM Ac-GGXA-NH₂, 20 mM Tris-d₁₁, 0,5 mM DSS, H₂O/D₂O 90%/10%, pH 6,7. Die Druckkoeffizienten für das Verhältnis $B_2^{\#}/B_1$ der Korrelation (Abbildung 6.7a) wurden bei 283 K ermittelt. (Quelle: Beck Erlach et al. (2014) (Achsenbeschriftung gemäß der Nomenklatur dieser Arbeit angepasst und Schrift vergrößert))

Auffällig ist, dass beide Glycine eine Abhängigkeit von der Temperatur zeigen und somit gemäß der Gleichungen 6.28 und 6.29 eine relativ große Änderung der freien Gibbs-Energie von >4,6 kJ/mol aufweisen. Was die Glycine von den anderen beiden Aminosäuren unterscheidet, ist das Fehlen einer Seitenkette. Damit besitzt das Peptid am N-Terminus eine wesentlich höhere Flexibilität und kann somit mehrere unterschiedliche Konformationen einnehmen. Dies spiegelt sich auch in dem Ramachandran-Plot von Glycin wieder, das verglichen mit anderen Aminosäuren eine Vielzahl von unterschiedlichen Winkeln im Peptidrückgrat darstellen kann.

6.3 Diskussion

Eine Vielzahl der druckinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebung verhält sich nicht linear und lässt sich damit nur unzureichend mit einem linearen Modell beschreiben (Arnold et al., 2002). Aus diesem Grund beschreibt man die Daten häufig mit einem Polynom zweiter Ordnung (Akasaka und Li, 2001). Dies ermöglicht die quantitative Beschreibung des Druckeffekts, lässt jedoch keinen Rückschluss auf thermodynamische Parameter zu. Daher erfolgte in diesem Kapitel eine Verknüpfung der aus der linearen Regression ermittelten Druckkoeffizienten B_1 und $B_2^\#$ ($B_2^\# = 2B_2$) mit thermodynamischen Parametern (Kapitel 6.2.1). Die vollständige thermodynamische Beschreibung der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit vom Druck für ein Zweizustandsmodell (Gleichung 6.16) lässt sich in den meisten Fällen nicht anwenden, da ein Anpassen zu sehr großen Fehlern der Fitkoeffizienten führt.

Der Zusammenhang ist dabei abhängig von der Größe der Änderung der freien Gibbs-Energie zwischen den Zuständen. Für $\Delta G^0 = 0$ kJ/mol ergibt sich der Zusammenhang $B_2^\#/B_1 = -\Delta\beta'^0/\Delta V^0$ (Gleichung 6.27), für betragsmäßig große Änderungen ergibt sich zusätzlich eine Abhängigkeit von der Temperatur $B_2^\#/B_1 = -\Delta\beta'^0/\Delta V^0 \pm \Delta V^0/RT$ (Gleichung 6.28 und 6.29). Diese Zusammenhänge ergeben sich aus der Taylorentwicklung der thermodynamischen Ausgangsfunktion (Gleichung 6.16). Somit hängt das Verhältnis der Druckkoeffizienten mit dem Verhältnis der Volumenänderung und der Änderung des Kompressibilitätsfaktors zusammen. Dies wurde an simulierten Verläufen der druckabhängigen chemischen Verschiebung überprüft und bestätigt (Kapitel 6.2.2).

Die gezeigten Zusammenhänge gelten für das aus der thermodynamischen Ausgangsfunktion (Gleichung 6.16) abgeleitete Taylorpolynom beziehungsweise für dessen Koeffizientenverhältnis $B_2^\#/B_1$. Das durch lineare Regression ermittelte Polynom zweiter Ordnung entspricht dem abgeleiteten Taylorpolynom für sehr kleine Fitbereiche um $P = P_0$. Daher wurde in Kapitel 6.2.3 der Einfluss des Fitbereichs auf die Nachweisbarkeit des Taylorpolynoms untersucht. Dabei zeigte sich wie erwartet für sehr kleine Fitbereiche um $P = P_0$ eine Übereinstimmung mit dem abgeleiteten Taylorpolynom, größere Fitbereiche führten jedoch zu einer Abweichung. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl für $\Delta G^0 = 0$ kJ/mol als auch $\Delta G^0 \rightarrow \pm\infty$ für ausreichend große Fitbereiche das durch lineare Regression ermittelte Koeffizientenverhältnis $B_2^\#/B_1$ dem des Taylorpolynoms entspricht (Abbildung 6.4).

Dies führte zu der in Kapitel 6.2.4 untersuchten Möglichkeit, die Verknüpfung des Koeffizientenverhältnisses mit thermodynamischen Parametern über die Extremwerte

der Funktionen zu erklären. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei ausreichend guter Beschreibung des Extremwerts der thermodynamischen Ausgangsfunktion durch das Polynom zweiter Ordnung, der Zusammenhang $B_2^\# / B_1 = -\Delta\beta'^0 / \Delta V^0$ (Gleichung 6.38) gilt. Des Weiteren wurde an einer simulierten Kurve der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit vom Druck der Einfluss des Fitbereichs untersucht (Abbildung 6.5). Dabei wurde gezeigt, dass der ermittelte Zusammenhang zwischen $B_2^\# / B_1$ und $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0$ in einem relativ großen Bereich der Kurve Gültigkeit besitzt.

Abschließend wurde das Verhältnis der Druckkoeffizienten für unterschiedliche Systeme untersucht (Kapitel 6.2.5). Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen $B_2^\# / B_1$ und den thermodynamischen Parametern wurde am Amyloid- β -Peptid durchgeführt, da hier sowohl die thermodynamischen Parameter ΔV^0 und $\Delta\beta'^0$, als auch die Druckkoeffizienten B_1 und $B_2^\#$ aus der Änderung der chemischen Verschiebung über den Druck ermittelt werden konnten (Kapitel 4.3.1). Dabei zeigte sich überwiegend für Aminosäuren mit kleiner Änderung der freien Gibbs-Energie von $\Delta G^0 < RT$ eine Korrelation mit dem Verhältnis $B_2^\# / B_1$ (Abbildung 6.6). Für größere Änderungen von $\Delta G^0 > RT$ zeigte sich eine Abweichung dieses Zusammenhangs, der sich wahrscheinlich durch den relativ großen Fehler für das Verhältnis $B_2^\# / B_1$ beziehungsweise $-\Delta\beta'^0 / \Delta V^0$ erklären lässt (Abbildung 6.6c).

Des Weiteren wurde das Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ für die Kerne des Peptidrückgrats für das Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ untersucht. Dabei zeigten sich über die Aminosäuren gemittelt vergleichbare Werte für die Amidgruppe. Der Carbonylkohlenstoff zeigte einen größeren Mittelwert, während die Mittelwerte für das H ^{α} und das C ^{α} sehr große Fehler aufwiesen (schlechte Signalqualität). Das Koeffizientenverhältnis $B_2^\# / B_1$ für die Kerne H^N, N und C' war für alle Aminosäuren negativ, für die Kerne H ^{α} und C ^{α} wurden Werte unterschiedlichen Vorzeichens gefunden. Eine Überprüfung der Temperaturabhängigkeit des Koeffizientenverhältnisses für das Peptid Ac-GGIA-NH₂ zeigte, dass die Aminosäuren Ile3 und Ala4 keine Temperaturabhängigkeit aufweisen, während für die Aminosäuren Gly1 und Gly2 zumindest unter 293 K eine 1/T-Abhängigkeit nachgewiesen wurde. Dies lässt sich möglicherweise anhand der Flexibilität des N-Terminus mit den Glycinen erklären, da diese gemäß ihres Ramachandran-Plots eine Vielzahl an unterschiedlichen Orientierungen annehmen können.

7 Zusammenfassung

Ein wichtiger Aspekt der Hochdruck-NMR-Spektroskopie ist die technische Anforderung an das Messsystem. Der Druck muss den gesamten Messvorgang über konstant bleiben und die Messzelle sollte einen möglichst geringen Einfluss auf die Signalqualität der Messungen ausüben. Im Falle des Bruchs einer Messzelle sollte zudem der Schaden am Probenkopf des NMR-Spektrometers minimal gehalten werden. Einen besonderen Stellenwert nimmt dabei die Messzelle ein, die in den Probenkopf des NMR-Spektrometers eingeführt wird. Diese kann aus unterschiedlichen Materialien gefertigt werden, wobei sich in letzter Zeit, aufgrund der hohen Druckresistenz und einfachen Handhabung, Keramik als Material bewährt hat.

In dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der Firma *HiPer Ceramics GmbH* (Oberkrämer, Deutschland) eine Keramikzelle aus Zirconium(IV)-oxid ZrO_2 , welches unter Beimischung von Yttriumoxid Y_2O_3 teilstabilisiert wurde (*Y-PSZ, Partially Stabilized Zirconia*), entwickelt. Diese kann Drücken bis 200 MPa widerstehen und erlaubt, verglichen mit zuvor verwendeten Glaskapillaren, eine einfachere Handhabung. Zudem besitzt sie, im Gegensatz zu Messzellen aus Glas oder Saphir, eine dem Lösungsmittel Wasser ähnlichere magnetische Suszeptibilität, was zu einer geringeren Beeinflussung der Signalqualität führt. So war es möglich, hochaufgelöste zweidimensionale Spektren mit deutlich voneinander getrennten Signalen aufzunehmen.

Für die Keramikzelle wurde eine Halterung aus $TiAl_6V_4$ (Hochdruckautoklav) entwickelt, die eine optimale Lage der Messzelle im Probenkopf des NMR-Spektrometers gewährleistet. Dieser Hochdruckautoklav wurde mit zusätzlichen Sicherheitsmerkmalen ausgestattet, um den Schaden am Probenkopf beziehungsweise dem NMR-Spektrometer im Falle eines Bruchs der Messzelle zu minimieren. Die Sicherheitsmerkmale bestehen aus einem die Messzelle umhüllenden Teflonschutz, der den Probenkopf im Falle des Berstens der Messzelle vor Bruchstücken schützt und zudem ein geringes Volumen an Flüssigkeiten aufnehmen kann. Des Weiteren wurde ein Stempel integriert, der die Messzelle im Falle eines Bruchs durch den entstehenden Druckgradienten von dem druckerzeugenden System außerhalb des Spektrometers abtrennt. So wird zum Beispiel

bei der Verwendung von Druckpumpen verhindert, dass eine immer größer werdende Menge an Druckfluid in den Probenkopf gelangt. Dies ist vor allem bei automatisierten Messungen von Bedeutung, bei denen in Notfällen nicht sofort eingegriffen werden kann (zum Beispiel bei Messungen über Nacht).

Angewandt wurde die Hochdruck-NMR-Spektroskopie auf das Peptid Amyloid- β sowie das Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP). Diese stehen im Verdacht, bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit (Amyloid- β) beziehungsweise Diabetes mellitus (IAPP), durch Bildung von amyloiden Plaques beteiligt zu sein.

Für das A β (1–40)-Peptid wurden die druckinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebung sowie der Signalvolumen untersucht. Mit Hilfe dieser konnten Subzustände bei der Aggregation der A β -Peptide nachgewiesen werden. Dabei wurden die Übergänge eines nahezu korrekt gefalteten Peptids (Zustand 1) zu einem wenig bis gar nicht gefalteten Zustand 2 thermodynamisch charakterisiert. Für den Zustand 2 wurden zwei Subzustände (Zustand 2' und 2'') nachgewiesen, wobei Zustand 2' partiell gefaltet ist und Zustand 2'' eine ungeordnete Struktur (random coil) aufweist. Der Übergang zwischen Zustand 1 und Zustand 2' zeigte über die Temperaturen gemittelt deutlich unterschiedliche thermodynamische Werte mit $\Delta G^0 \approx 2 \text{ kJ/mol}$, $\Delta V^0 \approx -44 \text{ mL/mol}$ und $\Delta\beta'^0 \approx -0,3 \text{ mL}/(\text{mol} \cdot \text{MPa})$, verglichen mit dem Übergang zwischen Zustand 1 und Zustand 2'' mit $\Delta G^0 \approx 4 \text{ kJ/mol}$, $\Delta V^0 \approx -20 \text{ mL/mol}$ und $\Delta\beta''^0 \approx -0,04 \text{ mL}/(\text{mol} \cdot \text{MPa})$.

Des Weiteren wurde die druckinduzierte Depolymerisierung des A β (1–40)-Peptids in Abhängigkeit der Temperatur und der eingesetzten Peptidkonzentration untersucht. Um die Depolymerisierung in Abhängigkeit des Drucks zu beschreiben, wurde ein in Oosawa und Kasai (1962) und Oosawa (1970) gezeigtes Modell weiterentwickelt und auf die Depolymerisierung des Amyloid- β angewandt. Es wurden zwei unterschiedliche Variationen des Modells untersucht, wobei einmal die eingesetzte Peptidkonzentration als bekannt vorausgesetzt wurde und der Kompressibilitätsfaktor als Fitparameter übernommen wurde und zudem die Variante unter Vernachlässigung des Kompressibilitätsfaktors und unter Einbeziehung der Peptidkonzentration als Fitparameter. Mit beiden Modellen konnte die druckinduzierte Depolymerisierung in Abhängigkeit der Temperatur und der Peptidkonzentration beschrieben und thermodynamische Daten ermittelt werden. Dabei ergaben sich unter Berücksichtigung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta'^0$ mit Zunahme der Temperatur (283 K \rightarrow 293 K \rightarrow 303 K) zunehmende Werte für die Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG^0 (22 \rightarrow 27 \rightarrow 32 kJ/mol), der partiellen molaren Volumenänderung ΔV^0 (98 \rightarrow 125 \rightarrow 148 mL/mol) und der Änderung

des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta^0$ (0,6 → 0,7 → 0,8 mL/(mol · MPa)). Ebenfalls unter Berücksichtigung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta^0$ ergaben sich mit Abnahme der eingesetzten Peptidkonzentration (750 μ M → 375 μ M → 75 μ M) abnehmende Werte für die Änderung der freien Gibbs-Energie ΔG^0 (26 → 24 → 25 kJ/mol), der partiellen molaren Volumenänderung ΔV^0 (113 → 71 → 31 mL/mol) und der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta^0$ (0,6 → 0,4 → 0,2 mL/(mol · MPa)).

Für das Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) wurden die chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit des Drucks und der Temperatur untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die ermittelten Druckkoeffizienten ein sequenzabhängiges Muster ergeben. So zeigten die Aminosäuren in dem Bereich von Glutamin 10 bis Histidin 18 starke Druckeffekte. Dieser Bereich stimmt mit dem von Williamson und Miranker (2007) vorgeschlagenen Bereich einer α -Helix überein. Zudem zeigten die Phenylalanine an den Positionen 15 und 23 der Sequenz nahezu keine Druckeffekte. Für die Temperaturabhängigkeit ergaben sich ebenfalls sequenzabhängige Muster, die jedoch nur eine geringe Korrelation mit den Druckeffekten aufwiesen.

Für die Untersuchung von Proteinen mit Hilfe der Hochdruck-NMR-Spektroskopie stellt sich die Frage, inwiefern die beobachteten Druckeffekte von konformationellen Änderungen des Proteins oder von intrinsischen Druckeffekten der Aminosäuren abhängen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffkerne für das Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ bestimmt, wobei X eine der 20 proteinogenen Aminosäuren darstellt. Die terminalen Enden des Peptids wurden mit Schutzgruppen versehen, um den Einfluss der ansonsten vorhandenen Ladungen auf die Druckeffekte auszuschließen. Dabei wurden die Druckkoeffizienten der Kohlenstoffkerne des Peptidrückgrats und der Seitenketten mit Hilfe eines Polynoms zweiter Ordnung bestimmt. Diese können zur Korrektur des intrinsischen Druckeffekts der Aminosäuren bei Hochdruck-Messungen an Proteinen herangezogen werden. Zusätzlich wurde für das Modellpeptid Ac-GGFA-NH₂ der Einfluss der Temperatur auf die chemische Verschiebung sowie auf die Druckkoeffizienten bestimmt. Dieser unterscheidet sich deutlich für die verschiedenen Kohlenstoffkerne des Phenylalanins. Dabei ist die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung für die Kerne C' und C ^{γ} am stärksten, während C ^{β} und C ^{δ} kleine lineare Temperaturkoeffizienten aufweisen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich bis auf C ^{β} und C ^{δ} die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung nicht linear verhält und somit genauer mit Hilfe eines Polynoms zweiter Ordnung beschrieben werden kann.

Der Einfluss der Aminosäure X des Modellpeptids Ac-GGXA-NH₂ auf dessen Druckverhalten wurde anhand der druckinduzierten Änderung der chemischen Verschiebung für die Protonen der terminalen Schutzgruppen untersucht. Dabei zeigte die weiter entfernt liegende N-terminale Acetylgruppe nahezu keine Abhängigkeit von der Aminosäure X, während für die direkt benachbarte C-terminale Amidgruppe eine deutliche Abhängigkeit festgestellt wurde. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Protonen der C-terminalen -NH₂ Gruppe eine unterschiedlich starke Druckabhängigkeit aufweisen. Dabei zeigte das Proton in (Z)-Konfiguration eine stärkere Druckabhängigkeit, verglichen mit dem Proton in (E)-Konfiguration.

Aufgrund der Nichtlinearität der chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit vom Druck erfolgt die quantitative Beschreibung der Druckeffekte mit einem Polynom zweiter Ordnung. Mit Hilfe des linearen Druckkoeffizienten und des nicht linearen Druckkoeffizienten ist es möglich, die Stärke des Druckeffekts zu quantifizieren. Es ist jedoch nicht möglich, relevante thermodynamische Größen des Systems, wie der freien Gibbs-Energie ΔG^0 , der Volumenänderung ΔV^0 oder der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta^0$, zu bestimmen. Daher erfolgte in dieser Arbeit, für die Annahme eines Zweizustandsmodells, eine Verknüpfung der Druckkoeffizienten mit thermodynamischen Größen. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis des nicht linearen Druckkoeffizienten zu dem linearen Druckkoeffizienten, für kleine Änderungen der freien Gibbs-Energie, dem negativen Verhältnis des Kompressibilitätsfaktors zu der Volumenänderung entspricht ($B_2^\# / B_1 = \Delta\beta^0 / \Delta V^0$). Beschreibt das Polynom zweiter Ordnung das Maximum der thermodynamischen Ausgangsfunktion, so gilt der ermittelte Zusammenhang unabhängig von der Größe der freien Gibbs-Energie. Für große Änderungen der freien Gibbs-Energie wird dieses Verhältnis je nach Vorzeichen von ΔG^0 noch um einen temperaturabhängigen Term erweitert ($\pm \Delta V^0 / RT$). Diese Zusammenhänge wurden an simulierten Kurven und experimentellen Daten des A β (1–40)-Peptids überprüft und bestätigt.

8 Literaturverzeichnis

- Abedini, A. und Raleigh, D. P. (2009). A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides. *Protein Engineering Design and Selection*, 22(8):453–459.
- Akasaka, K. (2003). Highly fluctuating protein structures revealed by variable-pressure nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 42(37):10875–10885.
- Akasaka, K. (2006). Probing conformational fluctuation of proteins by pressure perturbation. *Chem. Rev.*, 106(5):1814–1835.
- Akasaka, K. (2013). High-Pressure NMR. In Roberts, G. C. K., editor, *Encyclopedia of Biophysics*, pages 983–984. Springer-Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg.
- Akasaka, K. und Li, H. (2001). Low-lying excited states of proteins revealed from nonlinear pressure shifts in ^1H and ^{15}N NMR. *Biochemistry*, 40(30):8665–8671.
- Akasaka, K. und Matsuki, H., editors (2015). *High Pressure Bioscience*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie*, 64:146–148.
- Andretto, E., Yan, L.-M., Tatarek-Nossol, M., Velkova, A., Frank, R., und Kapurniotu, A. (2010). Identification of hot regions of the $\text{A}\beta$ -IAPP interaction interface as high-affinity binding sites in both cross- and self-association. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(17):3081–3085.
- Armstrong, A. H., Chen, J., McKoy, A. F., und Hecht, M. H. (2011). Mutations that replace aromatic side chains promote aggregation of the Alzheimer's $\text{A}\beta$ peptide. *Biochemistry*, 50(19):4058–4067.
- Arnold, M. R., Kalbitzer, H. R., und Kremer, W. (2003). High-sensitivity sapphire cells for high pressure NMR spectroscopy on proteins. *J. Magn. Reson.*, 161(2):127–131.

- Arnold, M. R., Kremer, W., Lüdemann, H.-D., und Kalbitzer, H. R. (2002). ^1H -NMR parameters of common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides Gly-Gly-X-Ala at pressures between 0.1 and 200 MPa. *Biophys. Chem.*, 96(2–3):129–140.
- Aue, W. P., Bartholdi, E., und Ernst, R. R. (1976). Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *The Journal of Chemical Physics*, 64(5):2229–2246.
- Ballard, L., Yu, A., Reiner, C., und Jonas, J. (1998). A high-pressure, high-resolution NMR probe for experiments at 500 MHz. *Journal of Magnetic Resonance*, 133(1):190–193.
- Baskaran, K., Brunner, K., Munte, C. E., und Kalbitzer, H. R. (2010). Mapping of protein structural ensembles by chemical shifts. *Journal of Biomolecular NMR*, 48(2):71–83.
- Baxter, N. J. und Williamson, M. P. (1997). Temperature dependence of ^1H chemical shifts in proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 9(4):359–369.
- Beck Erlach, M., Kalbitzer, H. R., Winter, R., und Kremer, W. (2016a). Conformational substates of amyloidogenic hIAPP revealed by high pressure NMR spectroscopy. *ChemistrySelect*, 1(12):3239–3243.
- Beck Erlach, M., Koehler, J., Crusca Jr., E., Kremer, W., Munte, C. E., und Kalbitzer, H. R. (2016b). Pressure dependence of backbone chemical shifts in the model peptides Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂. *Journal of Biomolecular NMR*, 65(2):65–77.
- Beck Erlach, M., Koehler, J., Moeser, B., Horinek, D., Kremer, W., und Kalbitzer, H. R. (2014). Relationship between nonlinear pressure-induced chemical shift changes and thermodynamic parameters. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(21):5681–5690.
- Beck Erlach, M., Munte, C. E., Kremer, W., Hartl, R., Rochelt, D., Niesner, D., und Kalbitzer, H. R. (2010). Ceramic cells for high pressure NMR spectroscopy of proteins. *J. Magn. Reson.*, 204(2):196–199.
- Blausen.com Staff (2014). Blausen Gallery 2014. *Wikiversity Journal of Medicine*, 1(2).
- Blocq, P. und Marinesco, G. (1892). Sur les lésions et la pathogénie de l'épilepsie dite essentielle. *Sem. Med*, 12:445–456.

- Bovey, F. A., Tiers, G. V. D., und Filipovich, G. (1959). Polymer NMR spectroscopy. I. The motion and configuration of polymer chains in solution. *Journal of Polymer Science*, 38(133):73–90.
- Bridgman, P. W. (1915). Change of phase under pressure. II. New melting curves with a general thermodynamic discussion of melting. *Phys. Rev.*, 6:94–112.
- Cao, P., Marek, P., Noor, H., Patsalo, V., Tu, L.-H., Wang, H., Abedini, A., und Raleigh, D. P. (2013). Islet amyloid: From fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. *FEBS Letters*, 587(8):1106–1118.
- Cao, P., Tu, L.-H., Abedini, A., Levsh, O., Akter, R., Patsalo, V., Schmidt, A. M., und Raleigh, D. P. (2012). Sensitivity of amyloid formation by human islet amyloid polypeptide to mutations at residue 20. *Journal of Molecular Biology*, 421(2-3):282–295.
- Chen, C.-T., Fine, R. A., und Millero, F. J. (1977). The equation of state of pure water determined from sound speeds. *J. Chem. Phys.*, 66(5):2142–2144.
- Christl, M. und Roberts, J. D. (1972). Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 chemical shifts of small peptides as a function of pH. *Journal of the American Chemical Society*, 94(13):4565–4573.
- Claridge, T. D. W. (2016). *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Tetrahedron Organic Chemistry. Elsevier Science.
- Cooper, G. J., Willis, A. C., Clark, A., Turner, R. C., Sim, R. B., und Reid, K. B. (1987). Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23):8628–8632.
- Dabirzadeh, A. (2008). RF coil design for multi-frequency magnetic resonance imaging & spectroscopy. Master's thesis, Texas A&M University.
- Daedalus Innovations LLC (2016). Daedalus Innovations LLC. <http://www.daedalusinnovations.com>. Zugriff am 02.09.2016.
- Danielsson, J., Andersson, A., Jarvet, J., und Gräslund, A. (2006). ¹⁵N relaxation study of the amyloid β -peptide: structural propensities and persistence length. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 44(S1):S114–S121.

- De Simone, A., Cavalli, A., Hsu, S.-T. D., Vranken, W., und Vendruscolo, M. (2009). Accurate random coil chemical shifts from an analysis of loop regions in native states of proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 131(45):16332–16333.
- Dupuis, N. F., Wu, C., Shea, J.-E., und Bowers, M. T. (2009). Human islet amyloid polypeptide monomers form ordered β -hairpins: A possible direct amyloidogenic precursor. *Journal of the American Chemical Society*, 131(51):18283–18292.
- Dupuis, N. F., Wu, C., Shea, J.-E., und Bowers, M. T. (2011). The amyloid formation mechanism in human IAPP: Dimers have β -strand monomer-monomer interfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 133(19):7240–7243.
- Edelman, S. V. und Weyer, C. (2002). Unresolved challenges with insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes: potential benefit of replacing amylin, a second beta-cell hormone. *Diabetes technology & therapeutics*, 4(2):175–189.
- Ernst, R. R. und Anderson, W. A. (1966). Application of fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. *Review of Scientific Instruments*, 37(1):93–102.
- Fourme, R., Girard, E., und Akasaka, K. (2012). High-pressure macromolecular crystallography and NMR: status, achievements and prospects. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(5):636–642.
- Friebolin, H. (2013). *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*. Wiley.
- Gedulin, B. R., Rink, T. J., und Young, A. A. (1997). Dose-response for glucagonostatic effect of amylin in rats. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 46(1):67–70.
- Gellerstedt, N. (1938). Die Elektive, Insuläre (para-) Amyloidose Der Bauchspeicheldrüse. Zugleich Ein Beitrag Zur Kenntnis Der “senilen Amyloidose”. *Beitr. Path. Anat.*, 101:1–13.
- Grathwohl, C. und Wüthrich, K. (1974). Carbon-13 NMR of the protected tetrapeptides TFA-Gly-Gly-L-X-L-Ala-OCH₃, where X stands for the 20 common amino acids. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 13(2):217–225.
- Gronwald, W. und Kalbitzer, H. (2004). Automated structure determination of proteins by NMR spectroscopy. *Progr. NMR Spectr.*, 44:33–96.

- Gross, M. und Jaenicke, R. (1994). Proteins under pressure. *Eur. J. Biochem.*, 221(2):617–630.
- Groß, K.-H. und Kalbitzer, H. R. (1988). Distribution of chemical shifts in ^1H nuclear magnetic resonance spectra of proteins. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 76(1):87–99.
- Hansen, A. L. und Kay, L. E. (2014). Measurement of histidine pKa values and tautomer populations in invisible protein states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17):E1705–E1712.
- Harsch, T., Dasch, C., Donaubaue, H., Baskaran, K., Kremer, W., und Kalbitzer, H. (2013). Stereospecific assignment of the asparagine and glutamine side chain amide protons in random-coil peptides by combination of molecular dynamic simulations with relaxation matrix calculations. *Applied Magnetic Resonance*, 44(1-2):319–331.
- Hawley, S. A. (1971). Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry*, 10(13):2436–2442.
- Heremans, K. und Smeller, L. (1998). Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1386(2):353–370.
- Horsley, W., Sternlicht, H., und Cohen, J. S. (1969). Carbon-13 magnetic resonance studies of carbon-13 enriched amino acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 37(1):47–51.
- Horsley, W. J. und Sternlicht, H. (1968). Carbon-13 magnetic resonance studies of amino acids and peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 90(14):3738–3748.
- Horsley, W. J., Sternlicht, H., und Cohen, J. S. (1970). Carbon-13 magnetic resonance studies of amino acids and peptides. II. *Journal of the American Chemical Society*, 92(3):680–686.
- Inoue, K., Yamada, H., Akasaka, K., Herrmann, C., Kremer, W., Maurer, T., Döker, R., und Kalbitzer, H. R. (2000). Pressure-induced local unfolding of the Ras binding domain of RalGDS. *Nat. Struct. Biol.*, 7(7):547–550.
- Jonas, J. (1972). Nuclear magnetic resonance measurements at high pressure. *Review of Scientific Instruments*, 43(4):643–649.

- Jonas, J. (2002). High-resolution nuclear magnetic resonance studies of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1–2):145–159.
- Kachel, N., Kremer, W., Zahn, R., und Kalbitzer, H. R. (2006). Observation of intermediate states of the human prion protein by high pressure NMR spectroscopy. *BMC Struct. Biol.*, 6(1):16.
- Kalbitzer, H. R. (2015). High pressure NMR methods for characterizing functional substates of proteins. In Akasaka, K. und Matsuki, H., editors, *High Pressure Bioscience: Basic Concepts, Applications and Frontiers*, pages 179–197. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Kalbitzer, H. R., Görler, A., Li, H., Dubovskii, P. V., Hengstenberg, W., Kowolik, C., Yamada, H., und Akasaka, K. (2000). ¹⁵N and ¹H NMR study of histidine containing protein (HPr) from *Staphylococcus carnosus* at high pressure. *Protein Sci.*, 9(4):693–703.
- Kamatari, Y. O., Kitahara, R., Yamada, H., Yokoyama, S., und Akasaka, K. (2004). High-pressure NMR spectroscopy for characterizing folding intermediates and denatured states of proteins. *Methods*, 34(1):133–143.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., und Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron*, 37(6):925–937.
- Kitahara, R., Hata, K., Li, H., Williamson, M. P., und Akasaka, K. (2013). Pressure-induced chemical shifts as probes for conformational fluctuations in proteins. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 71:35–58.
- Kitahara, R., Royer, C., Yamada, H., Boyer, M., Saldana, J.-L., Akasaka, K., und Roume-stand, C. (2002). Equilibrium and pressure-jump relaxation studies of the conformational transitions of P13MTCP1. *Journal of Molecular Biology*, 320(3):609–628.
- Kjaergaard, M., Brander, S., und Poulsen, F. (2011). Random coil chemical shift for intrinsically disordered proteins: effects of temperature and pH. *J. Biomol. NMR*, 49:139–149.
- Kjaergaard, M. und Poulsen, F. M. (2011a). Sequence correction of random coil chemical shifts: correlation between neighbor correction factors and changes in the Ramachandran distribution. *J. Biomol. NMR*, 50:157–165.

- Koehler, J. (2014). *Methodische Entwicklung zur Hochdruck-Kernspinresonanzspektroskopie sowie druckabhängige Untersuchungen an Oozyten von Xenopus laevis und Modellpeptiden*. PhD thesis, University of Regensburg.
- Koehler, J., Beck Erlach, M., Crusca, E., Kremer, W., Munte, C. E., und Kalbitzer, H. R. (2012). Pressure dependence of ^{15}N chemical shifts in model peptides Ac-Gly-Gly-X-Ala-NH₂. *Materials*, 5(10):1774–1786.
- Kraepelin, E. (1910). *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. Johann Ambrosius Barth, Leipzig.
- Kremer, W. (2006). High-pressure NMR studies in proteins. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 57:177–203.
- Kremer, W., Arnold, M., Munte, C. E., Hartl, R., Beck Erlach, M., Koehler, J., Meier, A., und Kalbitzer, H. R. (2011). Pulsed pressure perturbations, an extra dimension in NMR spectroscopy of proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 133(34):13646–13651.
- Kusumoto, Y., Lomakin, A., Teplow, D., und Benedek, G. (1998). Temperature dependence of amyloid β -protein fibrillization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21):12277–12282.
- Lacy, P. E. (1964). Pancreatic beta cell. In *Ciba Foundation Symposium-Aetiology of Diabetes Mellitus and its Complications (Colloquia on Endocrinology), Volume 15*, pages 75–88. Wiley Online Library.
- Langerhans, P. (1869). *Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse*. PhD thesis, Friedrich-Wilhelms-Universität Berlin.
- Lassalle, M. W. und Akasaka, K. (2006). The use of high-pressure nuclear magnetic resonance to study protein folding. In Bai, Y. und Nussinov, R., editors, *Protein Folding Protocols*, pages 21–38. Humana Press, Totowa, NJ.
- Laurents, D. V., Gorman, P. M., Guo, M., Rico, M., Chakrabartty, A., und Bruix, M. (2005). Alzheimer's A β 40 studied by NMR at low pH reveals that sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (DSS) binds and promotes β -ball oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5):3675–3685.

- Lesné, S., Ali, C., Gabriel, C., Croci, N., MacKenzie, E. T., Glabe, C. G., Plotkine, M., Marchand-Verrecchia, C., Vivien, D., und Buisson, A. (2005). NMDA receptor activation inhibits α -secretase and promotes neuronal amyloid- β production. *The Journal of Neuroscience*, 25(41):9367–9377.
- Lide, D. R. (2000). *CRC handbook of chemistry and physics*. CRC press, 81th edition.
- Luong, T. Q., Kapoor, S., und Winter, R. (2015). Pressure—a gateway to fundamental insights into protein solvation, dynamics, and function. *ChemPhysChem*, 16(17):3555–3571.
- Maeno, A., Matsuo, H., und Akasaka, K. (2009). The pressure-temperature phase diagram of hen lysozyme at low pH. *Biophysics*, 5:1–9.
- Markley, J. L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C. W., Kaptein, R., Sykes, B. D., Wright, P. E., und Wüthrich, K. (1998). Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *J. Mol. Biol.*, 280(5):933–952.
- Markley, J. L., Meadows, D. H., und Jardetzky, O. (1967). Nuclear magnetic resonance studies of helix-coil transitions in polyamino acids. *Journal of Molecular Biology*, 27(1):25–40.
- Massiot, D., Fayon, F., Capron, M., King, I., Le Calvé, S., Alonso, B., Durand, J.-O., Bujoli, B., Gan, Z., und Hoatson, G. (2002). Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40(1):70–76.
- Meersman, F., Dobson, C. M., und Heremans, K. (2006). Protein unfolding, amyloid fibril formation and configurational energy landscapes under high pressure conditions. *Chemical Society Reviews*, 35(10):908–917.
- Meersman, F., Smeller, L., und Heremans, K. (2006a). Protein stability and dynamics in the pressure-temperature plane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1764(3):346–354.
- Morris, A. M., Watzky, M. A., und Finke, R. G. (2009). Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: A review of the literature. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 1794(3):375–397.

- Munte, C. E., Beck Erlach, M., Kremer, W., Koehler, J., und Kalbitzer, H. R. (2013). Distinct conformational states of the Alzheimer β -amyloid peptide can be detected by high-pressure NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(34):8943–8947.
- Munte, C. E., Becker, K., Schirmer, R. H., und Kalbitzer, H. R. (2009). NMR assignments of oxidised thioredoxin from *Plasmodium falciparum*. *Biomolecular NMR Assignments*, 3(2):159–161.
- Nakamura, A. und Jardetzky, O. (1968). Systematic analysis of chemical shifts in the nuclear magnetic resonance spectra of peptide chains. II. Oligoglycines. *Biochemistry*, 7(3):1226–1230.
- Oosawa, F. (1970). Size distribution of protein polymers. *Journal of Theoretical Biology*, 27(1):69–86.
- Oosawa, F. und Kasai, M. (1962). A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *J. Mol. Biol.*, 4(1):10–21.
- Opie, E. L. (1901a). On the relation of chronic interstitial pancreatitis to the islands of Langerhans and to Diabetes mellitus. *The Journal of Experimental Medicine*, 5(4):397–428.
- Opie, E. L. (1901b). The relation of Diabetes mellitus to lesions of the pancreas. Hyaline degeneration of the islands of Langerhans. *The Journal of Experimental Medicine*, 5(5):527–540.
- Pearson, H. A. und Peers, C. (2006). Physiological roles for amyloid β peptides. *The Journal of Physiology*, 575(1):5–10.
- Peterson, R. W., Lefebvre, B. G., und Wand, J. A. (2005). High-resolution NMR studies of encapsulated proteins in liquid ethane. *Journal of the American Chemical Society*, 127(29):10176–10177.
- Peterson, R. W. und Wand, A. J. (2005). Self-contained high-pressure cell, apparatus, and procedure for the preparation of encapsulated proteins dissolved in low viscosity fluids for nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 76(9):094101.
- Plant, L. D., Boyle, J. P., Smith, I. F., Peers, C., und Pearson, H. A. (2003). The production of amyloid β peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(13):5531–5535.

- Platzer, G., Okon, M., und McIntosh, L. P. (2014). pH-dependent random coil ^1H , ^{13}C , and ^{15}N chemical shifts of the ionizable amino acids: a guide for protein pK_a measurements. *Journal of Biomolecular NMR*, 60(2-3):109–129.
- Porneuf, M. und Goldman, M. (1994). *NMR and More: In Honour of Anatole Abragam*. Editions de Physique.
- Price, W. E. und Lüdemann, H.-D. (1997). NMR and diaphragm cell techniques for the study of molecular dynamics in fluids. In Holzapfel, W. B. und Isaacs, N. S., editors, *High Pressure Techniques in Chemistry and Physics: A Practical Approach*, chapter 5, page 225. Oxford University Press, Oxford.
- QSIL GmbH (2016). Eigenschaften von Quarzglas. <http://www.qsil.com/material/quarzglas>. Zugriff am 13.10.2016.
- R Core Team (2016). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raiford, D. S., Fisk, C. L., und Becker, E. D. (1979). Calibration of methanol and ethylene glycol nuclear magnetic resonance thermometers. *Anal. Chem.*, 51(12):2050–2051.
- Ranløv, P. und Wanstrup, J. (1967). Ultrastructural investigations on the cellular morphogenesis of experimental mouse amyloidosis. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 71(4):575–591.
- Ranløv, P. und Wanstrup, J. (1968). Electron-microscopic demonstration of intracellular amyloid in experimental mouse amyloidosis. *Excerpta Medica Foundation, Amsterdam*, pages 74–81.
- Ravindra, R. und Winter, R. (2003). On the temperature-pressure free-energy landscape of proteins. *ChemPhysChem*, 4(4):359–365.
- Read, J. und Suphioglu, C. (2013). Dropping the BACE: beta secretase (BACE1) as an Alzheimer's disease intervention target. In Kishore, D. U., editor, *Neurodegenerative Diseases*, pages 227–256. InTech.
- Richarz, R. und Wuethrich, K. (1978). Carbon-13 NMR chemical shifts of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly- X-L- Ala-OH. *Biopolymers*, 17(9):2133–2141.

- Roe, C. D. (1985). Sapphire NMR tube for high-resolution studies at elevated pressure. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 63(2):388–391.
- Roig, E. S., Magill, A. W., Donati, G., Meyerspeer, M., Xin, L., Ipek, O., und Gruetter, R. (2015). A double-quadrature radiofrequency coil design for proton-decoupled carbon-13 magnetic resonance spectroscopy in humans at 7T. *Magnetic Resonance in Medicine*, 73(2):894–900.
- Saint-Gobain Crystals (2016). Sapphire Products - Properties and Benefits. <http://www.crystals.saint-gobain.com/uploadedFiles/SG-Crystals/Documents/sapphire-material-products-properties.pdf>. Zugriff am 14.09.2016.
- Salmang, H. und Scholze, H. (2007). *Keramik*. Springer.
- Schott AG (2016). Duran Tubing, Capillary and Rod of Borosilicate Glass 3.3. http://www.schott.com/tubing/english/download/schott-tubing_brochure_duran_english.pdf. Zugriff am 14.09.2016.
- Schumann, F. H., Riepl, H., Maurer, T., Gronwald, W., Neidig, K.-P., und Kalbitzer, H. R. (2007). Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions. *J. Biomol. NMR*, 39(4):275–289.
- Schwarzinger, S., Kroon, G. J., Foss, T. R., Wright, P. E., und Dyson, H. J. (2000). Random coil chemical shifts in acidic 8 M urea: Implementation of random coil shift data in NMRView. *J. Biomol. NMR*, 18:43–48.
- Sherman, W. F. und Stadtmüller, A. A. (1987). *Experimental techniques in high-pressure research*. John Wiley & Sons Incorporated.
- Smeller, L. (2002). Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595:11–29.
- Spera, S. und Bax, A. (1991). Empirical correlation between protein backbone conformation and C α and C β ¹³C nuclear magnetic resonance chemical shifts. *Journal of the American Chemical Society*, 113(14):5490–5492.
- Steinbach, J. P., Müller, U., Leist, M., Li, Z.-W., Nicotera, P., und Aguzzi, A. (1998). Hypersensitivity to seizures in β -amyloid precursor protein deficient mice. *Journal of Cell Death and Differentiation*, 5(10):858–866.

- Suckale, J. und Solimena, M. (2008). Pancreas islets in metabolic signaling-focus on the beta-cell. *Frontiers in Bioscience*, 13:7156–7171.
- Tamiola, K., Acar, B., und Mulder, F. A. A. (2010). Sequence-specific random coil chemical shifts of intrinsically disordered proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 132(51):18000–18003.
- Thanabal, V., Omecinsky, D., Reily, M., und Cody, W. (1994). The ^{13}C chemical shifts of amino acids in aqueous solution containing organic solvents: Application to the secondary structure characterization of peptides in aqueous trifluoroethanol solution. *Journal of Biomolecular NMR*, 4(1):47–59.
- Ting, D., Wang, G., Shapovalov, M., Mitra, R., Jordan, M. I., und Dunbrack, Jr, R. L. (2010). Neighbor-dependent Ramachandran probability distributions of amino acids developed from a hierarchical dirichlet process model. *PLoS Comput. Biol.*, 6(4):e1000763.
- Tu, L.-H. und Raleigh, D. P. (2013). Role of aromatic interactions in amyloid formation by islet amyloid polypeptide. *Biochemistry*, 52(2):333–342.
- Urbauer, J. L., Ehrhardt, M. R., Bieber, R. J., Flynn, P. F., und Wand, A. J. (1996). High-resolution triple-resonance NMR spectroscopy of a novel calmodulin peptide complex at kilobar pressures. *Journal of the American Chemical Society*, 118(45):11329–11330.
- Wang, Y. und Jardetzky, O. (2002). Probability-based protein secondary structure identification using combined NMR chemical-shift data. *Protein Science*, 11(4):852–861.
- Westermarck, P., Wernstedt, C., Wilander, E., Hayden, D. W., O'Brien, T. D., und Johnson, K. H. (1987). Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(11):3881–3885.
- Wickbom, J., Herrington, M. K., Permert, J., Jansson, A., und Arnelo, U. (2008). Gastric emptying in response to IAPP and CCK in rats with subdiaphragmatic afferent vagotomy. *Regulatory Peptides*, 148(1–3):21–25.

- Williamson, J. A., Loria, J. P., und Miranker, A. D. (2009). Helix stabilization precedes aqueous and bilayer-catalyzed fiber formation in islet amyloid polypeptide. *Journal of Molecular Biology*, 393(2):383–396.
- Williamson, J. A. und Miranker, A. D. (2007). Direct detection of transient α -helical states in islet amyloid polypeptide. *Protein Science*, 16(1):110–117.
- Wilmad-LabGlass (2016). NMR-002: Sample Devices and Magnetic Susceptibility. <http://www.wilmad-labglass.com/Support/NMR-and-EPR-Technical-Reports/Sample-Devices-and-Magnetic-Susceptibility/>. Zugriff am 14.09.2016.
- Wiltzius, J. J. W., Sievers, S. A., Sawaya, M. R., und Eisenberg, D. (2009). Atomic structures of IAPP (amylin) fusions suggest a mechanism for fibrillation and the role of insulin in the process. *Protein Science*, 18(7):1521–1530.
- Wishart, D., Bigam, C., Holm, A., Hodges, R., und Sykes, B. (1995). ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR*, 5:67–81.
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., Markley, J. L., und Sykes, B. D. (1995a). ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, 6(2):135–140.
- Wishart, D. S. und Sykes, B. D. (1994). The ^{13}C chemical-shift index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J. Biomol. NMR*, 4(2):171–180.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D., und Richards, F. M. (1991). Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *Journal of Molecular Biology*, 222(2):311–333.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D., und Richards, F. M. (1992). The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 31(6):1647–1651.
- Wookey, P., Cao, Z., und Cooper, M. (1998). Interaction of the renal amylin and renin-angiotensin systems in animal models of diabetes and hypertension. *Mineral and electrolyte metabolism*, 24(6):389–399.

- Wüthrich, K., Tun-Kyi, A., und Schwyzer, R. (1972). Manifestation in the ^{13}C -NMR spectra of two different molecular conformations of a cyclic pentapeptide. *FEBS Letters*, 25(1):104–108.
- Yamada, H. (1974). Pressure-resisting glass cell for high pressure, high resolution NMR measurement. *Rev. Sci. Instrum.*, 45(5):640–642.
- Yamada, H., Nishikawa, K., Honda, M., Shimura, T., Akasaka, K., und Tabayashi, K. (2001). Pressure-resisting cell for high-pressure, high-resolution nuclear magnetic resonance measurements at very high magnetic fields. *Rev. Sci. Instrum.*, 72(2):1463–1471.
- Zhang, H., Neal, S., und Wishart, D. S. (2003). RefDB: A database of uniformly referenced protein chemical shifts. *Journal of Biomolecular NMR*, 25(3):173–195.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meiner Familie, allen Kollegen und Freunden sehr herzlich bedanken, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Im Besonderen möchte ich mich bedanken bei

Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die Möglichkeit, diese Dissertation an seinem Lehrstuhl durchzuführen sowie für die zahlreichen Gespräche und Diskussionen, die mich im Laufe dieser Arbeit immer vorangebracht haben. Des Weiteren möchte ich ihm für die Unterstützung beim Anfertigen meiner Veröffentlichungen und für die Möglichkeit der Teilnahme an zahlreichen internationalen Konferenzen danken.

Prof. Dr. Werner Kremer für die Hilfestellungen bei fachspezifischen Problemen, vor allem die NMR-Spektroskopie betreffend sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit

PD Dr. Michael Spörner für die vielen interessanten Diskussionen und das Korrekturlesen dieser Arbeit

Prof. Dr. Claudia E. Munte für die exzellente Einführung in die NMR-Spektroskopie und die Bereitschaft für die unterschiedlichsten Probleme Lösungen zu finden

Prof. Dr. Roland Winter für das Bereitstellen der ^{15}N -markierten Proben des Insel-Amyloid-Polypeptids

Prof. Dr. Dominik Horinek für MD-Simulationen an den Modellpeptiden

Dr. Alexander Lazarev von Pressure Biosciences Inc. für die Zusammenarbeit und Hilfe in Bezug auf das automatisierbare Druckregelsystem

Dr. Jörg Köhler für die Unterstützung beim Hardcore-Spindelpressing während der Messung der Modellpeptid-Daten, für die vielen Diskussionen und Gespräche auch außerhalb der Universität sowie die Unterstützung bei mathematischen und physikalischen Fragen

Dr. Edson Crusca Jr. für die Synthese der Modellpeptide sowie deren Überprüfung auf Reinheit mit Hilfe der Massenspektrometrie

Harald Donaubauer für die Hilfe bei der Verwendung der Software Auremol, und die vielen Zeilen Code, die mir bei den Auswertungen dieser Arbeit sehr geholfen haben

Dr. Tobias Harsch für die Hilfe bei Problemen mit der Software Auremol

Dr. Malte Andrasch und Dr. Johannes Hiltl für die Hilfe in biochemischen Fragestellungen

Dörte Repenning-Rochelt, Robert Bobardt und Simon Grunert für die Hilfe bei organisatorischen und technischen Problemen

und allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Biophysik für die angenehme Atmosphäre am Lehrstuhl.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer und in jeglicher Hinsicht unterstützt haben sowie bei meiner Freundin Stephanie Rübenach, die immer für mich da war und die Launen bei der Anfertigungen dieser Arbeit ertragen musste. — DANKE! — Ohne euch hätte ich es nicht geschafft.

9 Anhang

9.1 Eigene Publikationen

Veröffentlichungen

Beck Erlach, M., Munte, C. E., Kremer, W., Hartl, R., Rochelt, D., Niesner, D., Kalbitzer, H. R. (2010). Ceramic cells for high pressure NMR spectroscopy of proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, 204(2):196–199.

Kremer, W., Beck Erlach, M., Munte, C. E., Ernst, T., Hartl, R., Arnold, M., Rochelt, D., Niesner, D., Kalbitzer, H. R. (2010). Development of an integrated system for high-pressure NMR spectroscopy on proteins. *Verhandlungen der Deutschen Physikalischen Gesellschaft*, (Regensburg 2010 issue):1.

Kremer, W., Arnold, M., Munte, C. E., Hartl, R., Beck Erlach, M., Koehler, J., Meier, A., Kalbitzer, H. R. (2011). Pulsed Pressure Perturbations, an Extra Dimension in NMR Spectroscopy of Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 133(34):13646–13651.

Koehler, J., Beck Erlach, M., Crusca Jr., E., Kremer, W., Munte, C. E., Kalbitzer, H. R. (2012). Pressure Dependence of ^{15}N Chemical Shifts in Model Peptides Ac-Gly-Gly-X-Ala-NH₂. *Materials*, 5:1774–1786.

Munte, C. E., Beck Erlach, M., Kremer, W., Koehler, J., Kalbitzer, H. R. (2013). Distinct Conformational States of the Alzheimer β -Amyloid Peptide Can Be Detected by High-Pressure NMR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(34):8943–8947.

Beck Erlach, M., Koehler, J., Moeser, B., Horinek, D., Kremer, W., Kalbitzer, H. R. (2014). Relationship between nonlinear pressure-induced chemical shift changes and thermodynamic parameters. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(21):5681–5690.

Koehler, J., Beck Erlach, M., Crusca Jr., E., Kremer, W., Munte, C. E., Meier, A., Kalbitzer, H. R. (2014). Pressure response of amide one-bond J -couplings in model peptides and proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 60(1):45–50.

Beck Erlach, M., Koehler, J., Crusca Jr., E., Kremer, W., Munte, C. E., Kalbitzer, H. R. (2016). Pressure dependence of backbone chemical shifts in the model peptides Ac-Gly-Gly-Xxx-Ala-NH₂. *Journal of Biomolecular NMR*, 65(2):65–77.

Beck Erlach, M., Kalbitzer, H. R., Winter, R., Kremer, W. (2016). Conformational Substates of Amyloidogenic hIAPP Revealed by High Pressure NMR Spectroscopy. *ChemistrySelect*, 1(12):3239–3243.

Internationale Vorträge

Beck Erlach, M. (2011). High pressure NMR spectroscopic study of structural changes of the mutant I14A of the histidine-containing phosphocarrier protein (HPr). *6th International Meeting on Biomolecules under Pressure (IMBP), Otsu, Japan.*

Beck Erlach, M. (2011). High pressure NMR on proteins. *22. Faltertage, Regensburg, Deutschland.*

9.2 Technische Zeichnung des Hochdruckautoklaven

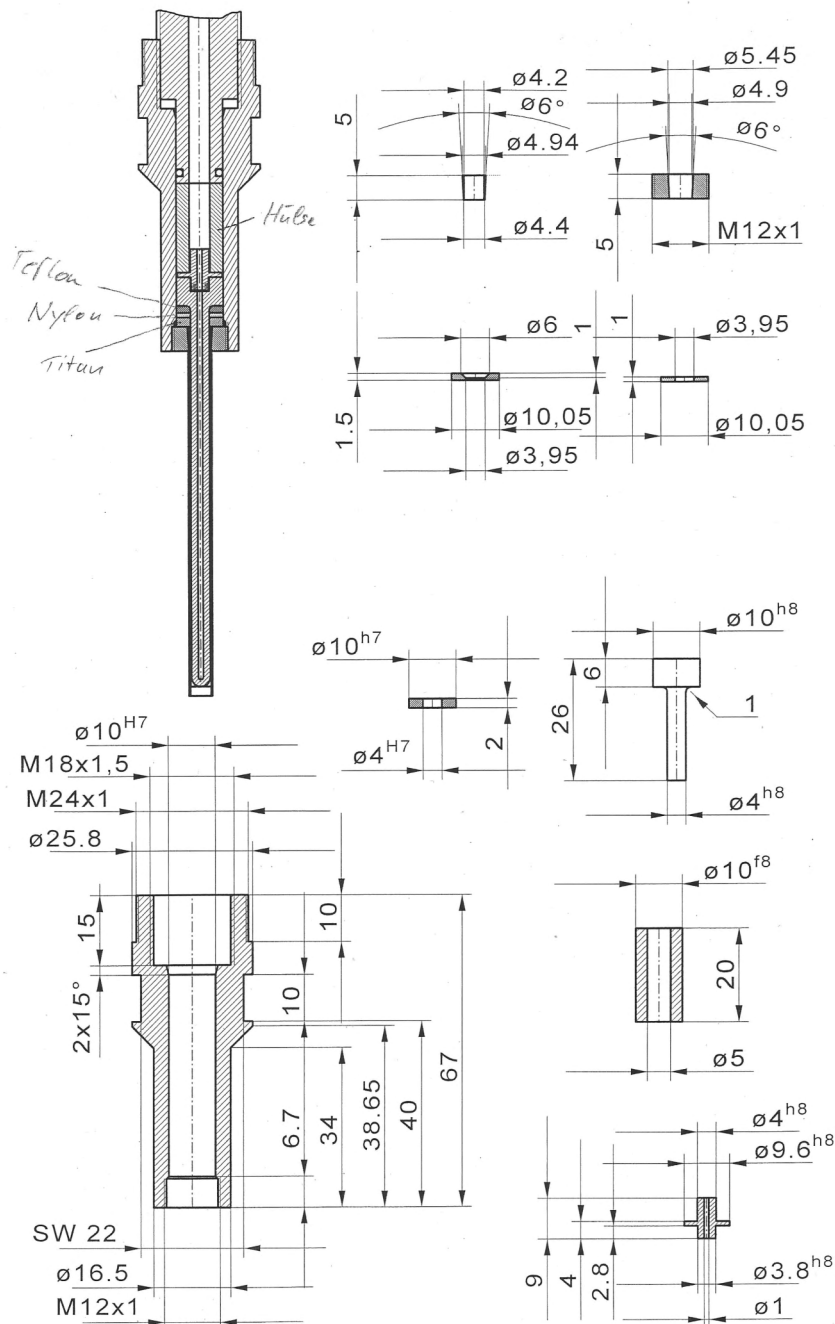


Abbildung 9.1: Technische Zeichnung des Hochdruckautoklaven Die Abbildung zeigt die technische Zeichnung des Hochdruckautoklaven sowie der einzelnen Komponenten mit einer Skalierung auf 60% der Originalgröße des Originaldokuments.

9.3 Chemische Verschiebungen des A β (1–40)-Peptids

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
E3	120,613	120,678	120,746	120,813	120,878	120,940	121,001	121,058	121,115	121,171	121,221
	8,568	8,573	8,579	8,584	8,589	8,594	8,599	8,605	8,610	8,615	8,620
F4	121,959	122,008	122,058	122,104	122,141	122,175	122,204	122,230	122,251	122,268	122,281
	8,397	8,408	8,421	8,433	8,444	8,454	8,464	8,473	8,482	8,490	8,497
R5	124,047	124,117	124,185	124,253	124,311	124,364	124,409	124,447	124,480	124,507	124,528
	8,223	8,233	8,245	8,256	8,266	8,276	8,285	8,294	8,303	8,311	8,319
S8	116,878	116,928	116,984	117,036	117,085	117,132	117,178	117,223	117,262	117,294	117,323
	8,516	8,525	8,536	8,546	8,556	8,565	8,575	8,585	8,595	8,605	8,615
G9	110,971	111,022	111,081	111,136	111,188	111,239	111,285	111,334	111,382	111,427	111,473
	8,628	8,627	8,627	8,626	8,626	8,626	8,626	8,627	8,628	8,629	8,631
Y10	120,317	120,365	120,419	120,472	120,524	120,576	120,627	120,679	120,728	120,780	120,837
	8,038	8,043	8,050	8,056	8,062	8,068	8,074	8,080	8,085	8,091	8,096
E11	122,874	122,967	123,059	123,147	123,223	123,295	123,365	123,430	123,486	123,534	123,577
	8,481	8,483	8,487	8,491	8,496	8,501	8,507	8,513	8,520	8,528	8,536
V12	121,466	121,559	121,673	121,765	121,852	121,931	122,001	122,070	122,129	122,184	122,230
	8,197	8,209	8,223	8,236	8,248	8,259	8,270	8,281	8,291	8,301	8,310
H14	121,513	121,615	121,708	121,794	121,871	121,940	121,997	122,042	122,070	122,083	-
	8,245	8,256	8,269	8,281	8,293	8,304	8,315	8,325	8,335	-	-
K16	123,290	123,404	123,511	123,604	123,683	123,747	123,804	123,860	123,903	123,946	123,982
	8,494	8,507	8,521	8,533	8,544	8,555	8,564	8,574	8,582	8,590	8,596
L17	124,118	124,209	124,314	124,398	124,477	124,539	124,599	124,647	124,693	124,729	124,757
	8,364	8,379	8,396	8,411	8,424	8,437	8,448	8,459	8,469	8,478	8,485
V18	121,799	121,908	122,019	122,112	122,202	122,277	122,354	122,406	122,460	122,499	122,527
	8,109	8,128	8,150	8,169	8,190	8,208	8,223	8,237	8,250	8,263	8,273
F19	124,699	124,783	124,868	124,936	124,996	125,049	125,093	125,126	125,153	125,168	125,178
	8,380	8,394	8,410	8,424	8,438	8,450	8,461	8,472	8,482	8,491	8,499
F20	123,284	123,378	123,469	123,545	123,620	123,682	123,737	123,785	123,826	123,857	123,881
	8,337	8,346	8,356	8,366	8,375	8,384	8,392	8,400	8,408	8,415	8,422
A21	126,487	126,567	126,652	126,725	126,795	126,855	126,908	126,958	127,004	127,045	127,081
	8,357	8,363	8,371	8,378	8,385	8,392	8,399	8,406	8,413	8,420	8,426
E22	120,248	120,326	120,407	120,472	120,536	120,592	120,645	120,693	120,736	120,775	120,808
	8,472	8,475	8,480	8,484	8,488	8,493	8,497	8,502	8,506	8,511	8,515
D23	121,998	122,061	122,125	122,181	122,228	122,267	122,292	122,324	122,348	122,367	122,381
	8,536	8,547	8,560	8,571	8,582	8,591	8,599	8,608	8,615	8,622	8,628
V24	120,926	120,971	121,015	121,054	121,088	121,118	121,142	121,161	121,180	121,196	121,207
	8,268	8,280	8,293	8,305	8,316	8,326	8,335	8,344	8,352	8,360	8,367
G25	112,098	112,159	112,227	112,290	112,350	112,408	112,460	112,515	112,563	112,607	112,650
	8,659	8,660	8,661	8,661	8,662	8,662	8,662	8,663	8,664	8,664	8,665
S26	115,795	115,845	115,907	115,968	116,030	116,092	116,155	116,219	116,272	116,350	116,411
	8,269	8,280	8,294	8,307	8,320	8,333	8,345	8,357	8,369	8,382	8,393
N27	120,889	120,925	120,968	121,004	121,025	121,036	121,039	-	-	-	-
	8,600	8,611	8,624	8,636	8,647	8,657	8,666	8,674	-	-	-
G29	109,891	109,963	110,044	110,118	110,189	110,257	110,320	110,382	110,440	110,492	110,540
	8,535	8,538	8,542	8,546	8,549	8,553	8,556	8,560	8,563	8,567	8,570
A30	123,832	123,895	123,965	124,029	124,093	124,153	124,210	124,267	124,319	124,369	124,415
	8,142	8,152	8,164	8,175	8,185	8,195	8,205	8,214	8,223	8,231	8,239
I31	121,052	121,122	121,194	121,260	121,318	121,367	121,413	121,454	121,492	121,524	121,550
	8,302	8,317	8,334	8,348	8,361	8,374	8,385	8,396	8,406	8,415	8,423
I32	126,571	126,642	126,718	126,777	126,822	126,859	126,887	126,909	126,924	126,939	126,947
	8,406	8,421	8,438	8,452	8,465	8,478	8,489	8,500	8,510	8,520	8,528

Tabelle 9.1: Chemische Verschiebungen des A β (1–40)-Peptids bei 278 K (Teil 1)

Die Tabelle zeigt die chemischen Verschiebungen der Amidgruppe des Peptidrückgrats des A β (1–40)-Peptids bei 278 K. Dabei stellt die erste Reihe des jeweiligen Residuums die chemische Verschiebung der Stickstoffkerne und die zweite Reihe die chemische Verschiebung der Protonen dar. Es handelt sich hierbei um die Rohdaten, die in keiner Weise korrigiert wurden.

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
G33	113,365 8,588	113,444 8,595	113,528 8,604	113,602 8,611	113,671 8,618	113,730 8,624	113,781 8,629	113,830 8,635	113,875 8,639	113,916 8,644	113,959 8,648
L34	121,923 8,169	121,981 8,179	122,048 8,191	122,109 8,201	122,169 8,211	122,226 8,220	122,281 8,228	122,330 8,236	122,373 8,243	122,414 8,249	122,450 8,254
M35	122,242 8,566	122,313 8,578	122,391 8,592	122,461 8,604	122,519 8,616	122,575 8,626	122,625 8,636	122,670 8,645	122,710 8,654	122,745 8,662	122,774 8,670
V36	122,710 8,358	122,757 8,371	122,801 8,385	122,837 8,397	122,870 8,408	122,897 8,419	122,921 8,429	122,941 8,439	122,952 8,448	122,960 8,456	122,965 8,463
G37	113,461 8,720	113,511 8,724	113,567 8,728	113,621 8,732	113,671 8,735	113,720 8,738	113,759 8,741	113,801 8,743	113,843 8,746	113,885 8,748	113,920 8,749
G38	108,971 8,369	109,042 8,374	109,122 8,379	109,200 8,384	109,277 8,389	109,351 8,393	109,423 8,398	109,494 8,402	109,561 8,406	109,626 8,411	109,687 8,414
V39	120,175 8,197	120,215 8,206	120,256 8,216	120,295 8,225	120,329 8,234	120,360 8,242	120,390 8,249	120,417 8,257	120,444 8,264	120,470 8,271	120,493 8,277
V40	128,690 7,947	128,735 7,965	128,782 7,989	128,827 8,008	128,867 8,029	128,903 8,047	128,938 8,065	128,968 8,084	128,998 8,102	129,023 8,119	129,045 8,135

Chemische Verschiebungen des A β (1–40)-Peptids bei 278 K (Teil 2) Beschriftung siehe Tabelle 9.1

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
E3	120,467 8,501	120,528 8,506	120,594 8,512	120,659 8,517	120,722 8,522	120,781 8,528	120,837 8,533	120,892 8,538	120,943 8,543	120,994 8,548	121,042 8,553
F4	121,722 8,317	121,770 8,329	121,822 8,342	121,870 8,354	121,915 8,365	121,957 8,376	121,994 8,386	122,024 8,395	122,054 8,404	122,079 8,412	122,101 8,419
R5	123,746 8,174	123,810 8,184	123,881 8,196	123,950 8,207	124,009 8,217	124,063 8,227	124,112 8,236	124,157 8,245	124,196 8,253	124,232 8,261	124,264 8,268
S8	116,655 8,438	116,707 8,446	116,764 8,456	116,818 8,467	116,865 8,478	116,912 8,490	116,931 8,503	- 8,516	-	-	-
G9	110,849 8,567	110,889 8,567	110,947 8,567	111,001 8,567	111,055 8,567	111,108 8,567	111,161 8,567	111,212 8,567	111,254 8,567	111,303 8,567	111,346 8,567
Y10	120,195 7,991	120,241 7,997	120,300 8,004	120,356 8,011	120,410 8,017	120,463 8,024	120,515 8,030	120,568 8,036	120,617 8,041	120,666 8,047	120,720 8,052
E11	122,706 8,432	122,787 8,434	122,872 8,438	122,942 8,442	123,012 8,447	123,078 8,452	123,141 8,457	123,201 8,463	123,259 8,469	123,313 8,475	123,368 8,482
V12	121,138 8,112	121,234 8,124	121,333 8,137	121,440 8,150	121,513 8,162	121,595 8,174	121,664 8,185	121,729 8,196	121,797 8,206	121,861 8,216	121,927 8,225
K16	122,932 8,414	123,028 8,427	123,136 8,442	123,244 8,455	123,330 8,467	123,415 8,477	123,487 8,486	123,548 8,495	123,591 8,503	123,620 8,510	- -
L17	123,849 8,274	123,937 8,288	124,041 8,304	124,127 8,320	124,209 8,334	124,282 8,347	124,357 8,359	124,410 8,369	124,462 8,378	124,502 8,386	124,534 8,393
V18	121,365 8,020	121,461 8,037	121,570 8,056	121,667 8,076	121,755 8,093	121,829 8,110	121,914 8,127	121,983 8,141	122,047 8,155	122,110 8,168	122,153 8,181
F19	124,262 8,282	124,344 8,295	124,434 8,311	124,516 8,326	124,577 8,340	124,629 8,354	124,673 8,366	124,705 8,377	124,729 8,387	124,747 8,396	124,751 8,404
F20	122,893 8,263	122,975 8,271	123,064 8,281	123,150 8,290	123,227 8,299	123,294 8,308	123,353 8,316	123,406 8,324	123,454 8,332	123,493 8,340	123,522 8,348
A21	126,216 8,284	126,310 8,291	126,397 8,299	126,472 8,307	126,545 8,315	126,604 8,322	126,661 8,330	126,717 8,337	126,765 8,343	126,811 8,350	126,846 8,357
E22	120,025 8,401	120,099 8,405	120,178 8,409	120,246 8,413	120,311 8,417	120,372 8,422	120,427 8,426	120,477 8,430	120,523 8,434	120,565 8,439	120,605 8,443

Tabelle 9.2: Chemische Verschiebungen des A β (1–40)-Peptids bei 288 K (Teil 1)

Die Tabelle zeigt die chemischen Verschiebungen der Amidgruppe des Peptidrückgrats des A β (1–40)-Peptids bei 288 K. Dabei stellt die erste Reihe des jeweiligen Residuums die chemische Verschiebung der Stickstoffkerne und die zweite Reihe die chemische Verschiebung der Protonen dar. Es handelt sich hierbei um die Rohdaten, die in keiner Weise korrigiert wurden.

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
D23	121,705	121,764	121,830	121,889	121,941	121,988	122,027	122,060	122,087	122,109	122,112
	8,454	8,465	8,477	8,488	8,499	8,508	8,517	8,525	8,533	8,541	8,548
V24	120,574	120,620	120,668	120,712	120,753	120,788	120,821	120,850	120,872	120,890	120,905
	8,175	8,186	8,199	8,211	8,222	8,233	8,243	8,252	8,261	8,269	8,277
G25	111,863	111,926	111,997	112,063	112,127	112,188	112,246	112,303	112,356	112,403	112,441
	8,583	8,585	8,587	8,589	8,591	8,592	8,593	8,594	8,595	8,596	8,596
S26	115,667	115,719	115,784	115,848	115,914	115,980	116,050	-	-	-	-
	8,204	8,216	8,229	8,242	8,254	8,266	8,277	8,288	8,299	-	-
G29	109,697	109,773	109,854	109,934	110,010	110,081	110,148	110,211	110,269	110,316	-
	8,463	8,467	8,471	8,475	8,479	8,483	8,486	8,489	8,492	8,495	-
A30	123,724	123,783	123,854	123,918	123,984	124,044	124,103	124,161	124,214	124,266	124,315
	8,078	8,088	8,100	8,111	8,122	8,132	8,142	8,151	8,160	8,168	8,176
I31	120,669	120,739	120,819	120,891	120,957	121,017	121,072	121,121	121,166	121,206	121,237
	8,200	8,216	8,232	8,247	8,261	8,274	8,287	8,299	8,309	8,320	8,329
I32	125,987	126,056	126,133	126,200	126,260	126,310	126,356	126,395	126,426	126,451	126,467
	8,297	8,311	8,327	8,343	8,357	8,371	8,383	8,395	8,406	8,416	8,426
G33	112,972	113,061	113,155	113,237	113,314	113,384	113,448	113,508	113,562	113,611	113,649
	8,494	8,502	8,511	8,519	8,527	8,534	8,540	8,546	8,552	8,557	8,561
L34	121,789	121,855	121,922	121,984	122,042	122,094	122,143	122,186	122,222	122,252	122,272
	8,081	8,092	8,104	8,115	8,126	8,136	8,146	8,155	8,164	8,172	8,179
M35	121,927	121,997	122,083	122,158	122,224	122,284	122,338	122,390	122,435	122,473	122,505
	8,479	8,492	8,506	8,519	8,531	8,543	8,554	8,564	8,573	8,581	8,588
V36	122,164	122,221	122,280	122,335	122,382	122,424	122,462	122,493	122,517	122,537	122,549
	8,251	8,264	8,278	8,291	8,303	8,315	8,326	8,336	8,346	8,355	8,363
G37	113,102	113,162	113,228	113,287	113,341	113,393	113,441	113,490	113,534	113,574	113,612
	8,617	8,623	8,628	8,633	8,638	8,642	8,646	8,649	8,652	8,655	8,657
G38	108,875	108,947	109,032	109,114	109,193	109,272	109,345	109,416	109,486	109,551	109,614
	8,301	8,306	8,311	8,316	8,321	8,326	8,331	8,335	8,340	8,344	8,349
V39	119,995	120,037	120,084	120,128	120,169	120,206	120,241	120,274	120,305	120,334	120,361
	8,116	8,126	8,137	8,147	8,157	8,166	8,174	8,182	8,190	8,198	8,205
V40	128,331	128,379	128,434	128,485	128,536	128,582	128,623	128,661	128,696	128,727	128,754
	7,852	7,870	7,890	7,911	7,931	7,950	7,970	7,987	8,004	8,021	8,037

Chemische Verschiebungen des A β (1–40)-Peptids bei 288 K (Teil 2) Beschriftung siehe Tabelle 9.2

9.4 Druckkoeffizienten des A β (1–40)-Peptids

	277 K		288 K	
	B_1 [ppm/GPa]	B_2 [ppm/GPa ²]	B_1 [ppm/GPa]	B_2 [ppm/GPa ²]
E3	0,144 ± 0,007	−0,25 ± 0,04	0,130 ± 0,015	−0,26 ± 0,07
F4	0,063 ± 0,007	−0,37 ± 0,03	0,071 ± 0,009	−0,22 ± 0,04
R5	0,241 ± 0,007	−1,05 ± 0,03	0,169 ± 0,016	−0,61 ± 0,08
S8	−0,143 ± 0,008	0,21 ± 0,04	−0,055 ± 0,039	−0,14 ± 0,27
G9	−0,323 ± 0,008	0,36 ± 0,04	−0,256 ± 0,024	0,03 ± 0,12
Y10	−0,329 ± 0,005	0,92 ± 0,02	−0,253 ± 0,010	0,60 ± 0,05
E11	0,234 ± 0,007	−0,30 ± 0,03	0,149 ± 0,011	−0,15 ± 0,05
V12	0,445 ± 0,013	−1,11 ± 0,06	0,409 ± 0,018	−0,89 ± 0,09
H14	0,403 ± 0,009	−1,40 ± 0,05	-	-
K16	0,512 ± 0,031	−1,73 ± 0,15	0,680 ± 0,031	−2,19 ± 0,15
L17	0,639 ± 0,018	−1,69 ± 0,08	0,635 ± 0,019	−1,48 ± 0,09
V18	0,849 ± 0,012	−2,25 ± 0,06	0,697 ± 0,012	−1,40 ± 0,06
F19	0,408 ± 0,011	−1,30 ± 0,05	0,465 ± 0,007	−1,45 ± 0,04
F20	0,241 ± 0,009	−0,71 ± 0,04	0,209 ± 0,013	−0,41 ± 0,06
A21	0,171 ± 0,010	−0,78 ± 0,05	0,245 ± 0,017	−0,96 ± 0,08
E22	0,174 ± 0,011	−0,76 ± 0,05	0,167 ± 0,009	−0,68 ± 0,04
D23	0,169 ± 0,020	−1,14 ± 0,10	0,183 ± 0,010	−1,03 ± 0,05
V24	0,097 ± 0,012	−0,90 ± 0,06	0,116 ± 0,006	−0,78 ± 0,03
G25	−0,180 ± 0,008	−0,14 ± 0,04	−0,092 ± 0,012	−0,32 ± 0,06
S26	−0,005 ± 0,013	0,64 ± 0,06	0,085 ± 0,031	−0,01 ± 0,18
N27	0,134 ± 0,018	−1,74 ± 0,14	-	-
G29	0,020 ± 0,005	−0,28 ± 0,02	0,066 ± 0,023	−0,49 ± 0,12
A30	0,251 ± 0,005	−0,61 ± 0,02	0,284 ± 0,016	−0,75 ± 0,08
I31	0,399 ± 0,014	−1,03 ± 0,07	0,458 ± 0,012	−0,94 ± 0,06
I32	0,394 ± 0,026	−1,37 ± 0,12	0,434 ± 0,014	−1,05 ± 0,07
G33	0,225 ± 0,018	−1,05 ± 0,08	0,322 ± 0,017	−1,12 ± 0,08
L34	0,204 ± 0,005	−0,55 ± 0,03	0,242 ± 0,013	−0,63 ± 0,06
M35	0,380 ± 0,015	−1,28 ± 0,07	0,461 ± 0,015	−1,39 ± 0,07
V36	0,130 ± 0,011	−1,01 ± 0,05	0,247 ± 0,005	−1,12 ± 0,02
G37	−0,114 ± 0,008	−0,31 ± 0,04	−0,010 ± 0,010	−0,47 ± 0,05
G38	0,075 ± 0,005	−0,16 ± 0,02	0,067 ± 0,008	−0,01 ± 0,04
V39	−0,060 ± 0,009	−0,37 ± 0,04	0,018 ± 0,010	−0,46 ± 0,05
V40	0,417 ± 0,013	−0,66 ± 0,06	0,445 ± 0,011	−0,64 ± 0,05
Mittelwert	0,190 ± 0,258	−0,73 ± 0,71	0,219 ± 0,243	−0,69 ± 0,57

Tabelle 9.3: Druckkoeffizienten des A β (1–40)-Peptids Die Tabelle fasst die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für das A β (1–40)-Peptid bei den Temperaturen 277 K und 288 K zusammen. Die Koeffizienten wurden aus der kombinierten chemischen Verschiebung (Summe der nach Schumann et al. (2007) gewichteten Kerne) der Kerne H^N und N des Peptidrückgrats ermittelt.

9.5 Konzentrationen an monomerem A β (1–40) in Abhängigkeit der Temperatur und der Peptidkonzentration

Abhängigkeit von der Temperatur				Abhängigkeit von der Peptidkonzentration			
c_T	P [MPa]	T [K]	c_1	c_T	P [MPa]	T [K]	c_1
750	3	283	82	750	40	293	60
750	20	283	106	750	80	293	204
750	40	283	180	750	120	293	379
750	60	283	282	750	160	293	461
750	80	283	363	750	200	293	479
750	100	283	443	750	240	293	500
750	120	283	483	375	3	293	30
750	140	283	508	375	40	293	93
750	160	283	543	375	80	293	170
750	180	283	514	375	120	293	201
750	200	283	540	375	160	293	224
750	20	293	30	375	200	293	234
750	40	293	76	375	240	293	238
750	60	293	108	75	3	293	16
750	80	293	173	75	40	293	23
750	100	293	260	75	80	293	29
750	120	293	326	75	120	293	34
750	140	293	373	75	160	293	35
750	160	293	407	75	200	293	36
750	180	293	416	75	240	293	38
750	200	293	417				
750	60	303	47				
750	80	303	78				
750	100	303	119				
750	120	303	172				
750	140	303	242				
750	160	303	255				
750	180	303	289				
750	200	303	283				

Tabelle 9.4: Konzentrationen an monomeren A β (1–40) in Abhängigkeit der Temperatur und der Peptidkonzentration Die Tabelle fasst die Konzentrationen an monomerem A β (1–40) für die druckinduzierte Depolymerisierung in Abhängigkeit der Temperatur und der eingesetzten Peptidkonzentration zusammen.

9.6 Chemische Verschiebungen des IAPP

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
N3	124,580	124,630	124,680	124,740	124,810	124,850	124,910	124,960	124,980	125,040	125,090
	9,055	9,063	9,068	9,073	9,080	9,086	9,093	9,101	9,105	9,110	9,119
T4	111,160	111,200	111,280	111,350	111,410	111,470	111,540	111,600	111,650	111,710	111,760
	7,662	7,667	7,671	7,673	7,675	7,682	7,685	7,685	7,689	7,694	7,695
A5	123,020	123,090	123,150	123,260	123,320	123,380	123,430	123,540	123,620	123,690	123,770
	8,801	8,805	8,809	8,815	8,821	8,828	8,835	8,843	8,851	8,859	8,869
T6	109,690	109,760	109,840	109,930	110,020	110,180	110,270	110,360	110,490	110,600	110,710
	8,014	8,031	8,043	8,060	8,074	8,093	8,108	8,123	8,139	8,155	8,172
C7	120,750	120,810	120,860	120,950	120,980	121,040	121,070	121,120	121,180	121,190	121,260
	8,183	8,195	8,203	8,213	8,223	8,234	8,241	8,248	8,252	8,261	8,266
A8	124,630	124,700	124,780	124,840	124,920	124,960	125,010	125,070	125,100	125,120	125,180
	8,265	8,269	8,274	8,279	8,282	8,288	8,291	8,295	8,299	8,300	8,305
T9	114,060	114,160	114,280	114,400	114,510	114,630	114,720	114,800	114,900	115,010	115,090
	8,222	8,238	8,254	8,271	8,286	8,300	8,311	8,327	8,339	8,347	8,360
Q10	122,990	123,060	123,140	123,210	123,270	123,340	123,400	123,440	123,480	123,510	123,540
	8,320	8,332	8,348	8,361	8,372	8,382	8,389	8,397	8,405	8,409	8,415
R11	122,250	122,340	122,450	122,540	122,600	122,650	122,710	122,740	122,770	122,800	122,820
	8,370	8,383	8,395	8,408	8,419	8,429	8,436	8,444	8,448	8,452	8,458
L12	123,130	123,200	123,280	123,350	123,410	123,440	123,490	123,520	123,540	123,550	123,560
	8,245	8,261	8,274	8,287	8,297	8,304	8,311	8,315	8,319	8,323	8,325
A13	124,130	124,230	124,310	124,400	124,460	124,520	124,540	124,600	124,630	124,630	124,680
	8,288	8,300	8,309	8,322	8,329	8,339	8,342	8,350	8,354	8,359	8,364
N14	117,140	117,220	117,310	117,380	117,450	117,510	117,550	117,600	117,630	117,660	117,700
	8,312	8,324	8,336	8,346	8,356	8,367	8,378	8,385	8,389	8,398	8,407
F15	120,390	120,440	120,500	120,540	120,590	120,620	120,650	120,680	120,690	120,730	120,760
	8,104	8,113	8,121	8,127	8,133	8,140	8,147	8,151	8,155	8,159	8,161
L16	123,050	123,140	123,280	123,390	123,460	123,540	123,550	123,650	123,710	123,740	123,760
	8,128	8,140	8,148	8,158	8,168	8,175	8,182	8,190	8,198	8,206	8,212
V17	121,250	121,360	121,480	121,570	121,660	121,730	121,770	121,830	121,900	121,930	121,960
	8,042	8,058	8,074	8,092	8,106	8,116	8,127	8,139	8,151	8,159	8,165
H18	122,600	122,670	122,760	122,820	122,870	122,880	122,900	122,930	122,940	122,930	122,950
	8,644	8,660	8,673	8,690	8,700	8,711	8,718	8,726	8,734	8,738	8,744
S19	117,860	117,950	118,030	118,120	118,180	118,240	118,270	118,320	118,350	118,380	118,410
	8,484	8,496	8,508	8,522	8,536	8,547	8,554	8,561	8,569	8,574	8,579
S20	118,110	118,160	118,230	118,320	118,370	118,460	118,490	118,550	118,620	118,630	118,700
	8,527	8,539	8,551	8,565	8,579	8,590	8,601	8,608	8,620	8,628	8,638
N21	120,350	120,390	120,450	120,490	120,560	120,590	120,630	120,680	120,710	120,740	120,770
	8,503	8,512	8,520	8,530	8,540	8,547	8,557	8,565	8,569	8,578	8,583
N22	118,970	119,060	119,110	119,180	119,210	119,260	119,270	119,320	119,380	119,400	119,450
	8,386	8,398	8,407	8,420	8,430	8,437	8,448	8,456	8,464	8,472	8,481
F23	120,720	120,780	120,810	120,880	120,930	120,980	121,010	121,050	121,100	121,120	121,180
	8,335	8,344	8,352	8,361	8,372	8,382	8,389	8,397	8,401	8,409	8,411
G24	110,580	110,640	110,700	110,770	110,840	110,910	110,970	110,990	111,040	111,120	111,150
	8,394	8,402	8,407	8,412	8,419	8,425	8,432	8,436	8,440	8,445	8,450
A25	123,800	123,880	123,930	124,010	124,070	124,120	124,180	124,230	124,290	124,340	124,380
	8,073	8,081	8,094	8,103	8,114	8,124	8,135	8,143	8,155	8,163	8,172
I26	120,920	121,020	121,110	121,200	121,240	121,290	121,320	121,350	121,370	121,380	121,400
	8,292	8,308	8,324	8,338	8,348	8,363	8,374	8,381	8,393	8,402	8,411
L27	127,380	127,450	127,530	127,620	127,670	127,700	127,740	127,760	127,790	127,820	127,820
	8,519	8,531	8,543	8,557	8,567	8,578	8,589	8,597	8,605	8,613	8,618

Tabelle 9.5: Chemische Verschiebungen des IAPP bei 278 K (Teil 1) Die Tabelle zeigt die chemischen Verschiebungen der Amidgruppe des Peptidrückgrats des IAPP bei 278 K. Dabei stellt die erste Reihe des jeweiligen Residuums die chemische Verschiebung der Stickstoffkerne und die zweite Reihe die chemische Verschiebung der Protonen dar. Es handelt sich hierbei um die Rohdaten, die in keiner Weise korrigiert wurden

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
S28	117,250 8,468	117,340 8,480	117,480 8,497	117,570 8,510	117,630 8,524	117,740 8,539	117,800 8,550	117,850 8,561	117,910 8,569	117,980 8,581	118,020 8,591
S29	118,030 8,582	118,120 8,594	118,200 8,606	118,260 8,623	118,300 8,634	118,350 8,644	118,410 8,655	118,440 8,663	118,510 8,671	118,550 8,679	118,590 8,689
T30	115,360 8,245	115,420 8,261	115,510 8,278	115,600 8,291	115,680 8,305	115,770 8,316	115,850 8,331	115,880 8,342	115,940 8,354	116,020 8,362	116,090 8,376
N31	121,640 8,488	121,700 8,500	121,780 8,516	121,850 8,530	121,900 8,540	121,960 8,550	122,010 8,561	122,050 8,573	122,100 8,581	122,150 8,593	122,200 8,603
V32	120,860 8,280	120,910 8,293	120,970 8,309	121,010 8,322	121,040 8,336	121,090 8,347	121,120 8,358	121,130 8,370	121,160 8,378	121,180 8,386	121,230 8,399
G33	112,770 8,625	112,810 8,625	112,890 8,626	112,930 8,631	112,990 8,634	113,070 8,636	113,110 8,636	113,130 8,640	113,190 8,640	113,260 8,644	113,290 8,646
S34	115,720 8,312	115,780 8,324	115,860 8,336	115,930 8,350	115,990 8,364	116,050 8,374	116,150 8,389	116,190 8,397	116,260 8,405	116,300 8,417	116,370 8,427
N35	120,880 8,609	120,940 8,621	121,000 8,630	121,070 8,643	121,120 8,653	121,150 8,660	121,190 8,671	121,240 8,679	121,300 8,691	121,340 8,699	121,380 8,708
T36	114,170 8,128	114,220 8,144	114,310 8,160	114,370 8,174	114,430 8,188	114,510 8,206	114,570 8,217	114,580 8,229	114,620 8,245	114,690 8,257	114,710 8,270
Y37	127,110 7,846	127,170 7,858	127,250 7,871	127,310 7,888	127,350 7,898	127,380 7,909	127,380 7,924	127,440 7,932	127,480 7,943	127,510 7,952	127,540 7,965

Chemische Verschiebungen des IAPP 278 K (Teil 2) Beschriftung siehe Tabelle 9.5

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
N3	124,300 8,982	124,360 8,992	124,420 8,992	124,470 8,999	124,520 9,007	124,570 9,015	124,620 9,015	124,690 9,030	124,730 9,035	124,780 9,033	124,810 9,045
T4	111,130 7,648	111,180 7,651	111,260 7,657	111,330 7,661	111,400 7,662	111,460 7,666	111,530 7,670	111,600 7,675	111,640 7,676	111,710 7,681	111,760 7,686
A5	122,880 8,713	122,940 8,720	123,010 8,723	123,080 8,727	123,130 8,735	123,210 8,739	123,270 8,746	123,340 8,751	123,410 8,759	123,470 8,767	123,540 8,772
T6	109,230 7,944	109,310 7,957	109,400 7,974	109,500 7,988	109,580 8,002	109,690 8,017	109,790 8,031	109,900 8,046	109,990 8,061	110,080 8,076	110,180 8,091
C7	120,530 8,128	120,590 8,141	120,650 8,151	120,700 8,158	120,760 8,169	120,820 8,174	120,870 8,184	120,910 8,189	120,940 8,194	120,990 8,202	121,020 8,207
A8	124,650 8,210	124,720 8,216	124,780 8,223	124,850 8,229	124,900 8,234	124,950 8,242	125,010 8,246	125,060 8,250	125,100 8,255	125,150 8,260	125,180 8,265
T9	113,600 8,141	113,720 8,161	113,840 8,175	113,940 8,192	114,050 8,207	114,160 8,221	114,250 8,235	114,350 8,247	114,410 8,259	114,500 8,270	114,580 8,282
Q10	122,870 8,281	122,960 8,298	123,030 8,311	123,100 8,321	123,150 8,333	123,220 8,344	123,270 8,351	123,330 8,359	123,370 8,368	123,410 8,376	123,450 8,381
R11	122,280 8,339	122,390 8,356	122,490 8,369	122,550 8,379	122,600 8,391	122,670 8,398	122,740 8,409	122,790 8,417	122,820 8,422	122,860 8,430	122,890 8,435
L12	123,210 8,223	123,300 8,240	123,390 8,250	123,440 8,264	123,500 8,271	123,540 8,282	123,580 8,290	123,630 8,298	123,650 8,303	123,670 8,311	123,710 8,316
A13	124,220 8,254	124,310 8,267	124,400 8,281	124,460 8,291	124,520 8,299	124,570 8,310	124,630 8,317	124,680 8,325	124,730 8,330	124,760 8,338	124,790 8,343
N14	117,120 8,271	117,210 8,284	117,290 8,294	117,370 8,308	117,430 8,319	117,490 8,330	117,550 8,341	117,610 8,346	117,650 8,354	117,690 8,362	117,720 8,370
F15	120,210 8,056	120,260 8,066	120,290 8,073	120,350 8,080	120,380 8,088	120,440 8,095	120,480 8,103	120,510 8,107	120,540 8,112	120,560 8,117	120,580 8,122
L16	123,070 8,080	123,170 8,093	123,260 8,104	123,350 8,114	123,420 8,122	123,500 8,133	123,560 8,140	123,630 8,145	123,670 8,153	123,740 8,161	123,770 8,169
V17	121,060 7,988	121,160 8,005	121,270 8,022	121,360 8,035	121,440 8,050	121,510 8,065	121,590 8,075	121,650 8,087	121,700 8,095	121,750 8,107	121,800 8,115

Tabelle 9.6: Chemische Verschiebungen des IAPP bei 288 K (Teil 1) Die Tabelle zeigt die chemischen Verschiebungen der Amidgruppe des Peptidrückgrats des IAPP bei 288 K. Dabei stellt die erste Reihe des jeweiligen Residuums die chemische Verschiebung der Stickstoffkerne und die zweite Reihe die chemische Verschiebung der Protonen dar. Es handelt sich hierbei um die Rohdaten, die in keiner Weise korrigiert wurden

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
H18	122,450	122,530	122,600	122,640	122,690	122,720	122,760	122,780	122,800	122,810	122,820
	8,581	8,597	8,611	8,624	8,636	8,647	8,658	8,666	8,674	8,679	8,687
S19	117,700	117,780	117,870	117,930	117,990	118,050	118,100	118,150	118,180	118,220	118,260
	8,414	8,430	8,441	8,454	8,466	8,477	8,484	8,495	8,500	8,508	8,517
S20	117,930	118,010	118,070	118,150	118,200	118,270	118,330	118,390	118,420	118,470	118,520
	8,448	8,461	8,475	8,488	8,500	8,514	8,521	8,533	8,541	8,549	8,558
N21	120,250	120,320	120,370	120,420	120,470	120,520	120,550	120,600	120,620	120,670	120,700
	8,451	8,461	8,471	8,478	8,489	8,497	8,504	8,513	8,517	8,525	8,530
N22	118,920	118,960	119,040	119,090	119,120	119,180	119,210	119,240	119,280	119,320	119,350
	8,336	8,345	8,352	8,366	8,374	8,381	8,392	8,400	8,405	8,413	8,421
F23	120,630	120,700	120,760	120,800	120,840	120,880	120,920	120,950	120,990	121,020	121,050
	8,271	8,281	8,287	8,301	8,309	8,317	8,324	8,332	8,340	8,345	8,353
G24	110,400	110,490	110,550	110,640	110,700	110,770	110,820	110,880	110,910	110,990	111,020
	8,339	8,345	8,352	8,359	8,363	8,368	8,375	8,380	8,385	8,389	8,394
A25	123,770	123,830	123,890	123,960	124,000	124,070	124,120	124,180	124,230	124,300	124,330
	8,026	8,039	8,049	8,059	8,071	8,078	8,089	8,097	8,105	8,113	8,122
I26	120,660	120,750	120,800	120,860	120,920	120,970	121,020	121,060	121,080	121,130	121,150
	8,206	8,226	8,240	8,253	8,265	8,276	8,290	8,301	8,310	8,321	8,330
L27	127,050	127,140	127,190	127,260	127,300	127,350	127,400	127,440	127,470	127,490	127,510
	8,434	8,447	8,461	8,471	8,483	8,497	8,504	8,513	8,521	8,529	8,537
S28	117,040	117,140	117,210	117,310	117,380	117,470	117,550	117,620	117,680	117,740	117,800
	8,387	8,400	8,417	8,430	8,442	8,456	8,467	8,478	8,490	8,498	8,507
S29	117,930	118,000	118,070	118,110	118,180	118,230	118,280	118,320	118,380	118,420	118,450
	8,519	8,533	8,546	8,556	8,568	8,579	8,589	8,598	8,606	8,614	8,622
T30	115,230	115,320	115,420	115,490	115,570	115,640	115,710	115,760	115,820	115,880	115,930
	8,196	8,209	8,223	8,236	8,254	8,262	8,273	8,284	8,296	8,304	8,316
N31	121,520	121,600	121,660	121,720	121,780	121,840	121,890	121,930	121,980	122,020	122,050
	8,444	8,458	8,468	8,481	8,489	8,500	8,511	8,523	8,531	8,542	8,547
V32	120,640	120,690	120,760	120,790	120,820	120,870	120,900	120,930	120,950	120,980	121,000
	8,206	8,219	8,233	8,243	8,258	8,269	8,280	8,291	8,299	8,307	8,319
G33	112,600	112,670	112,710	112,760	112,830	112,880	112,940	112,980	113,020	113,070	113,110
	8,553	8,556	8,560	8,560	8,564	8,568	8,569	8,570	8,575	8,576	8,578
S34	115,620	115,690	115,750	115,820	115,890	115,960	116,020	116,080	116,130	116,190	116,240
	8,254	8,267	8,277	8,287	8,299	8,313	8,324	8,332	8,344	8,352	8,364
N35	120,780	120,840	120,910	120,960	120,990	121,060	121,100	121,160	121,190	121,240	121,270
	8,553	8,567	8,577	8,587	8,598	8,606	8,613	8,625	8,630	8,641	8,646
T36	114,110	114,170	114,220	114,300	114,360	114,420	114,470	114,530	114,560	114,620	114,640
	8,077	8,093	8,107	8,117	8,128	8,143	8,154	8,169	8,184	8,192	8,204
Y37	127,090	127,140	127,190	127,230	127,260	127,300	127,340	127,390	127,410	127,460	127,480
	7,794	7,807	7,821	7,831	7,846	7,857	7,871	7,879	7,891	7,899	7,907

Chemische Verschiebungen des IAPP bei 288 K (Teil 2) Beschriftung siehe Tabelle 9.6

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
T4	111,110	111,190	111,250	111,300	111,370	111,430	111,490	111,580	111,640	111,690	111,750
	7,627	7,633	7,638	7,640	7,646	7,648	7,657	7,656	7,659	7,665	7,671
A5	122,760	122,820	122,880	122,930	122,990	123,070	123,120	123,170	123,250	123,320	123,350
	8,635	8,637	8,643	8,648	8,654	8,656	8,665	8,668	8,674	8,680	8,690
T6	108,870	108,960	109,040	109,130	109,220	109,310	109,400	109,500	109,600	109,690	109,770
	7,879	7,892	7,907	7,919	7,932	7,951	7,964	7,977	7,986	8,002	8,015
C7	120,310	120,380	120,440	120,490	120,550	120,600	120,650	120,690	120,760	120,780	120,820
	8,073	8,082	8,091	8,100	8,109	8,122	8,131	8,130	8,139	8,145	8,152

Tabelle 9.7: Chemische Verschiebungen des IAPP bei 298 K (Teil 1) Die Tabelle zeigt die chemischen Verschiebungen der Amidgruppe des Peptidrückgrats des IAPP bei 298 K. Dabei stellt die erste Reihe des jeweiligen Residuums die chemische Verschiebung der Stickstoffkerne und die zweite Reihe die chemische Verschiebung der Protonen dar. Es handelt sich hierbei um die Rohdaten, die in keiner Weise korrigiert wurden

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
A8	124,600 8,152	124,670 8,157	124,730 8,166	124,800 8,174	124,860 8,180	124,930 8,186	124,980 8,195	125,020 8,201	125,070 8,204	125,100 8,210	125,160 8,216
T9	113,180 8,063	113,320 8,082	113,420 8,098	113,550 8,113	113,650 8,129	113,740 8,142	113,840 8,158	113,910 8,167	114,020 8,180	114,090 8,189	114,170 8,203
Q10	122,700 8,230	122,780 8,246	122,870 8,258	122,930 8,270	123,000 8,279	123,070 8,292	123,120 8,304	123,160 8,314	123,230 8,320	123,270 8,326	123,310 8,335
R11	122,180 8,295	122,290 8,307	122,390 8,323	122,460 8,334	122,530 8,344	122,590 8,357	122,660 8,366	122,710 8,375	122,770 8,381	122,800 8,390	122,860 8,397
L12	123,170 8,175	123,260 8,188	123,330 8,204	123,410 8,215	123,470 8,225	123,530 8,237	123,580 8,250	123,620 8,256	123,670 8,265	123,680 8,271	123,730 8,278
A13	124,170 8,203	124,280 8,215	124,350 8,227	124,440 8,239	124,500 8,248	124,570 8,261	124,620 8,270	124,670 8,276	124,720 8,286	124,760 8,295	124,810 8,298
N14	117,050 8,220	117,140 8,232	117,220 8,244	117,300 8,256	117,370 8,265	117,430 8,275	117,480 8,287	117,530 8,297	117,610 8,303	117,630 8,315	117,690 8,322
F15	119,980 7,998	120,040 8,007	120,100 8,016	120,160 8,025	120,190 8,034	120,250 8,040	120,280 8,052	120,320 8,055	120,370 8,065	120,400 8,070	120,420 8,077
L16	122,990 8,026	123,100 8,038	123,180 8,047	123,270 8,059	123,350 8,068	123,430 8,077	123,500 8,090	123,530 8,096	123,610 8,102	123,660 8,111	123,710 8,117
V17	120,750 7,920	120,870 7,939	120,970 7,955	121,060 7,970	121,150 7,983	121,230 7,996	121,300 8,011	121,380 8,021	121,440 8,034	121,490 8,043	121,540 8,056
H18	122,290 8,492	122,360 8,511	122,430 8,527	122,470 8,542	122,510 8,558	122,560 8,568	122,580 8,584	122,610 8,593	122,630 8,599	122,660 8,608	122,690 8,615
S19	117,480 8,329	117,540 8,348	117,630 8,364	117,730 8,379	117,760 8,388	117,830 8,397	117,880 8,413	117,940 8,416	117,980 8,425	118,010 8,435	118,060 8,441
S20	117,750 8,370	117,850 8,382	117,900 8,398	117,960 8,406	118,020 8,422	118,080 8,431	118,130 8,447	118,200 8,453	118,240 8,463	118,290 8,472	118,340 8,482
N21	120,150 8,397	120,200 8,406	120,260 8,415	120,320 8,423	120,360 8,432	120,410 8,442	120,460 8,451	120,500 8,453	120,540 8,463	120,580 8,469	120,610 8,478
N22	118,810 8,274	118,870 8,283	118,930 8,295	118,960 8,304	119,030 8,313	119,060 8,322	119,110 8,335	119,150 8,341	119,200 8,351	119,210 8,356	119,260 8,363
F23	120,510 8,206	120,550 8,215	120,620 8,227	120,660 8,236	120,720 8,245	120,770 8,254	120,810 8,263	120,850 8,269	120,890 8,276	120,900 8,285	120,950 8,291
G24	110,220 8,281	110,310 8,287	110,370 8,292	110,460 8,300	110,530 8,306	110,600 8,312	110,650 8,318	110,700 8,320	110,780 8,327	110,820 8,332	110,870 8,335
A25	123,680 7,975	123,740 7,987	123,810 7,996	123,880 8,008	123,940 8,017	124,000 8,026	124,060 8,039	124,110 8,048	124,160 8,054	124,210 8,063	124,270 8,073
I26	120,360 8,121	120,430 8,137	120,490 8,152	120,550 8,164	120,600 8,177	120,650 8,190	120,680 8,206	120,700 8,215	120,740 8,225	120,750 8,234	120,780 8,243
L27	126,670 8,342	126,770 8,358	126,840 8,370	126,910 8,382	126,960 8,395	127,020 8,408	127,070 8,420	127,100 8,426	127,150 8,436	127,170 8,441	127,210 8,451
S28	116,760 8,301	116,870 8,317	116,970 8,333	117,050 8,345	117,130 8,357	117,220 8,370	117,280 8,386	117,360 8,395	117,450 8,405	117,480 8,418	117,550 8,427
S29	117,760 8,448	117,840 8,460	117,900 8,476	117,960 8,484	118,020 8,497	118,090 8,510	118,130 8,522	118,180 8,528	118,230 8,538	118,260 8,544	118,300 8,553
T30	115,100 8,141	115,190 8,154	115,270 8,169	115,350 8,181	115,420 8,194	115,500 8,207	115,560 8,223	115,620 8,229	115,700 8,242	115,730 8,247	115,810 8,260
N31	121,380 8,393	121,450 8,406	121,520 8,418	121,580 8,430	121,640 8,439	121,700 8,452	121,750 8,464	121,790 8,470	121,840 8,480	121,870 8,486	121,920 8,495
V32	120,350 8,114	120,430 8,130	120,490 8,146	120,530 8,157	120,600 8,170	120,660 8,183	120,690 8,199	120,770 8,211	120,820 8,221	120,850 8,234	120,890 8,243
G33	112,380 8,479	112,440 8,484	112,500 8,486	112,580 8,491	112,630 8,494	112,690 8,496	112,750 8,502	112,800 8,504	112,860 8,507	112,880 8,509	112,930 8,512
S34	115,510 8,189	115,590 8,202	115,660 8,214	115,720 8,225	115,780 8,238	115,840 8,248	115,900 8,260	115,970 8,269	116,020 8,279	116,070 8,288	116,130 8,298
N35	120,680 8,499	120,730 8,511	120,790 8,520	120,850 8,529	120,900 8,538	120,960 8,547	121,000 8,560	121,040 8,566	121,090 8,572	121,120 8,581	121,170 8,591
T36	114,010 8,009	114,090 8,024	114,150 8,040	114,210 8,062	114,270 8,068	114,330 8,081	114,390 8,103	114,430 8,113	114,490 8,126	114,510 8,135	114,560 8,141
Y37	127,020 7,736	127,070 7,752	127,110 7,764	127,160 7,776	127,190 7,789	127,260 7,801	127,280 7,817	127,320 7,827	127,360 7,830	127,390 7,846	127,420 7,852

Chemische Verschiebungen des IAPP bei 298 K (Teil 2) Beschriftung siehe Tabelle 9.7

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
T4	111,090 7,610	111,160 7,611	111,230 7,618	111,300 7,627	111,370 7,628	111,450 7,629	111,500 7,639	111,570 7,634	111,630 7,643	111,690 7,641	111,760 7,648
A5	122,680 8,563	122,720 8,564	122,800 8,571	122,810 8,572	122,900 8,581	122,950 8,586	123,010 8,589	123,050 8,590	123,110 8,606	123,160 8,606	123,250 8,610
T6	108,610 7,821	108,680 7,837	108,780 7,850	108,850 7,859	108,950 7,877	109,040 7,884	109,140 7,900	109,200 7,921	109,300 7,931	109,400 7,946	109,490 7,956
C7	120,120 8,023	120,170 8,030	120,240 8,043	120,310 8,059	120,360 8,068	120,430 8,072	120,500 8,079	120,580 8,091	120,610 8,095	120,640 8,102	120,700 8,103
A8	124,560 8,100	124,620 8,107	124,700 8,117	124,740 8,123	124,810 8,130	124,870 8,137	124,920 8,146	124,980 8,150	125,020 8,157	125,070 8,166	125,110 8,170
T9	112,840 7,997	112,970 8,016	113,090 8,029	113,200 8,041	113,310 8,056	113,400 8,069	113,500 8,085	113,570 8,097	113,680 8,113	113,740 8,117	113,800 8,132
Q10	122,520 8,179	122,620 8,192	122,690 8,205	122,780 8,214	122,840 8,224	122,900 8,233	122,950 8,246	123,020 8,256	123,070 8,265	123,120 8,272	123,170 8,279
R11	122,030 8,240	122,140 8,256	122,240 8,269	122,330 8,282	122,410 8,291	122,470 8,304	122,530 8,310	122,580 8,323	122,660 8,333	122,710 8,339	122,750 8,349
L12	123,070 8,120	123,170 8,136	123,250 8,149	123,330 8,161	123,390 8,171	123,440 8,184	123,500 8,193	123,550 8,200	123,610 8,213	123,640 8,222	123,680 8,229
A13	124,100 8,144	124,200 8,156	124,270 8,169	124,370 8,182	124,430 8,191	124,510 8,204	124,560 8,214	124,620 8,223	124,680 8,230	124,720 8,240	124,790 8,250
N14	116,990 8,167	117,090 8,180	117,160 8,193	117,230 8,205	117,310 8,212	117,360 8,225	117,420 8,234	117,470 8,244	117,550 8,257	117,570 8,266	117,650 8,270
F15	119,800 7,944	119,860 7,957	119,930 7,964	119,970 7,974	120,030 7,980	120,080 7,993	120,120 7,999	120,170 8,003	120,210 8,013	120,230 8,017	120,280 8,024
L16	122,900 7,973	122,990 7,980	123,100 7,996	123,160 8,009	123,270 8,018	123,340 8,022	123,400 8,035	123,450 8,041	123,520 8,051	123,570 8,058	123,640 8,065
V17	120,450 7,856	120,560 7,869	120,680 7,891	120,760 7,906	120,860 7,916	120,950 7,934	121,010 7,944	121,080 7,956	121,140 7,966	121,210 7,982	121,290 7,994
H18	122,160 8,402	122,200 8,429	122,260 8,439	122,300 8,458	122,380 8,473	122,420 8,489	122,430 8,498	122,450 8,511	-	-	-
S20	117,600 8,299	117,660 8,312	117,750 8,328	117,800 8,337	117,870 8,353	117,930 8,363	118,000 8,375	118,060 8,388	118,110 8,394	118,160 8,404	118,210 8,414
N21	120,060 8,343	120,110 8,353	120,170 8,363	120,230 8,375	120,270 8,385	120,360 8,392	120,380 8,396	120,430 8,411	120,490 8,421	120,500 8,422	120,550 8,431
N22	118,710 8,223	118,790 8,233	118,840 8,246	118,900 8,255	118,940 8,262	118,980 8,272	119,030 8,275	119,090 8,288	119,120 8,298	119,130 8,301	119,210 8,308
F23	120,410 8,146	120,460 8,156	120,520 8,166	120,590 8,179	120,640 8,185	120,680 8,195	120,730 8,205	120,750 8,209	120,790 8,218	120,830 8,225	120,870 8,235
G24	110,050 8,226	110,120 8,230	110,220 8,237	110,310 8,243	110,380 8,250	110,440 8,257	110,540 8,263	110,600 8,270	110,640 8,271	110,720 8,278	110,790 8,288
A25	123,610 7,926	123,670 7,936	123,750 7,949	123,820 7,959	123,880 7,971	123,950 7,981	124,000 7,988	124,060 7,997	124,130 8,007	124,170 8,017	124,230 8,027
I26	120,140 8,053	120,190 8,066	120,270 8,084	120,320 8,100	120,390 8,115	120,440 8,125	120,480 8,137	120,500 8,150	120,520 8,160	120,570 8,169	120,600 8,176
L27	126,330 8,261	126,430 8,274	126,510 8,287	126,590 8,299	126,660 8,312	126,720 8,324	126,770 8,334	126,840 8,347	126,890 8,356	126,910 8,366	126,950 8,373
S28	116,540 8,226	116,640 8,239	116,760 8,257	116,850 8,270	116,930 8,282	117,010 8,298	117,110 8,310	117,160 8,320	117,240 8,333	117,320 8,342	117,380 8,355
S29	117,590 8,378	117,660 8,388	117,720 8,407	117,830 8,414	117,860 8,423	117,910 8,436	117,960 8,448	118,010 8,455	-	-	-
T30	114,970 8,091	115,060 8,104	115,140 8,120	115,230 8,132	115,320 8,147	115,380 8,157	115,440 8,167	115,510 8,179	115,580 8,189	115,630 8,199	115,700 8,214
N31	121,270 8,349	121,340 8,359	121,390 8,369	121,450 8,381	121,520 8,391	121,580 8,404	121,630 8,413	121,680 8,420	121,720 8,430	121,780 8,439	121,830 8,449

Tabelle 9.8: Chemische Verschiebungen des IAPP bei 308 K (Teil 1) Die Tabelle zeigt die chemischen Verschiebungen der Amidgruppe des Peptidrückgrats des IAPP bei 308 K. Dabei stellt die erste Reihe des jeweiligen Residuums die chemische Verschiebung der Stickstoffkerne und die zweite Reihe die chemische Verschiebung der Protonen dar. Es handelt sich hierbei um die Rohdaten, die in keiner Weise korrigiert wurden

	3 MPa	20 MPa	40 MPa	60 MPa	80 MPa	100 MPa	120 MPa	140 MPa	160 MPa	180 MPa	200 MPa
V32	120,050	120,120	120,240	120,310	120,360	120,420	120,460	120,510	120,570	120,660	120,710
	8,035	8,051	8,076	8,088	8,100	8,113	8,126	8,138	8,148	8,163	8,170
G33	112,180	112,260	112,340	112,390	112,470	112,530	112,570	112,640	112,680	112,720	112,800
	8,411	8,415	8,422	8,422	8,429	8,433	8,437	8,440	8,441	8,445	8,452
S34	115,390	115,470	115,540	115,610	115,670	115,740	115,800	115,870	115,930	115,990	116,040
	8,135	8,145	8,158	8,170	8,180	8,190	8,202	8,212	8,221	8,231	8,241
N35	120,590	120,640	120,710	120,750	120,810	120,850	120,910	120,940	120,990	121,040	121,090
	8,443	8,456	8,469	8,481	8,485	8,492	8,501	8,505	8,521	8,524	8,537
T36	113,940	114,000	114,080	114,140	114,200	114,270	114,320	114,380	114,420	114,460	114,510
	7,965	7,980	7,996	8,006	8,024	8,037	8,046	8,059	8,069	8,084	8,094
Y37	126,960	127,010	127,060	127,110	127,150	127,200	127,240	127,280	127,310	127,360	127,390
	7,686	7,699	7,715	7,727	7,739	7,749	7,762	7,774	7,784	7,797	7,809

Chemische Verschiebungen des IAPP bei 308 K (Teil 2) Beschriftung siehe Tabelle 9.8

9.7 Druckkoeffizienten des IAPP

	B_1 [ppm/GPa]		B_2 [ppm/GPa ⁻²]	
	N	H ^N	N	H ^N
N3	0,21 ± 0,18	-0,18 ± 0,03	-1,25 ± 0,85	0,41 ± 0,12
T4	0,38 ± 0,10	-0,56 ± 0,02	-0,32 ± 0,47	0,40 ± 0,12
A5	0,85 ± 0,30	-0,23 ± 0,00	2,57 ± 1,42	0,80 ± 0,02
T6	1,17 ± 0,30	0,02 ± 0,02	6,71 ± 1,45	0,68 ± 0,10
C7	0,45 ± 0,25	0,04 ± 0,02	-1,50 ± 1,18	-0,36 ± 0,11
A8	1,40 ± 0,20	-0,18 ± 0,02	-5,47 ± 0,96	-0,16 ± 0,09
T9	3,08 ± 0,19	0,15 ± 0,02	-3,10 ± 0,90	-0,48 ± 0,12
Q10	1,65 ± 0,08	0,37 ± 0,02	-6,23 ± 0,36	-1,44 ± 0,10
R11	2,48 ± 0,20	0,29 ± 0,02	-10,72 ± 0,95	-1,38 ± 0,08
L12	1,97 ± 0,10	0,29 ± 0,03	-9,18 ± 0,50	-1,54 ± 0,14
A13	2,35 ± 0,29	0,17 ± 0,03	-10,52 ± 1,40	-1,07 ± 0,15
N14	1,74 ± 0,10	0,16 ± 0,03	-7,87 ± 0,47	-0,45 ± 0,14
F15	-0,23 ± 0,14	-0,10 ± 0,02	-1,20 ± 0,68	-0,11 ± 0,07
L16	3,70 ± 0,37	0,01 ± 0,02	-10,59 ± 1,77	-0,05 ± 0,12
V17	3,81 ± 0,23	0,35 ± 0,03	-11,10 ± 1,12	-1,28 ± 0,12
H18	0,82 ± 0,31	0,35 ± 0,03	-10,03 ± 1,47	-1,30 ± 0,14
S19	1,44 ± 0,19	0,16 ± 0,02	-8,01 ± 0,90	-0,88 ± 0,11
S20	0,68 ± 0,25	0,09 ± 0,02	-2,80 ± 1,22	-0,16 ± 0,09
N21	-0,03 ± 0,09	0,03 ± 0,02	-2,00 ± 0,43	-0,14 ± 0,11
N22	0,16 ± 0,34	0,09 ± 0,03	-2,70 ± 1,65	-0,14 ± 0,13
F23	-0,18 ± 0,21	0,03 ± 0,03	0,89 ± 1,02	-0,18 ± 0,14
G24	0,00 ± 0,26	0,12 ± 0,02	-2,15 ± 1,25	-0,25 ± 0,10
A25	0,90 ± 0,14	0,10 ± 0,01	-2,00 ± 0,65	-0,07 ± 0,07
I26	2,74 ± 0,24	0,18 ± 0,03	-11,95 ± 1,16	-0,49 ± 0,14
L27	1,80 ± 0,24	0,21 ± 0,01	-8,17 ± 1,13	-0,55 ± 0,05
S28	2,53 ± 0,27	0,18 ± 0,02	-7,78 ± 1,30	-0,30 ± 0,09
S29	0,29 ± 0,26	0,13 ± 0,03	-2,42 ± 1,25	-0,47 ± 0,13
T30	1,44 ± 0,25	0,07 ± 0,03	-2,64 ± 1,21	-0,28 ± 0,13
N31	0,71 ± 0,14	0,23 ± 0,03	-2,81 ± 0,66	-0,29 ± 0,14
V32	0,34 ± 0,19	0,21 ± 0,03	-2,71 ± 0,90	-0,75 ± 0,14
G33	-0,50 ± 0,24	-0,12 ± 0,03	-0,78 ± 1,14	0,06 ± 0,13
S34	0,51 ± 0,15	0,10 ± 0,03	-0,46 ± 0,72	-0,09 ± 0,13
N35	0,15 ± 0,22	0,07 ± 0,03	-1,33 ± 1,05	0,10 ± 0,14
T36	0,80 ± 0,28	0,07 ± 0,03	-3,96 ± 1,36	0,02 ± 0,14
Y37	-0,35 ± 0,34	0,06 ± 0,03	-1,18 ± 1,62	0,17 ± 0,16
Mittelwert	1,12 (1,15)	0,08 (0,18)	-4,14 (4,39)	-0,34 (0,03)

Tabelle 9.9: Druckkoeffizienten des IAPP bei 278 K Die Tabelle fasst die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 der Kerne H^N und N des Peptidrückgrats des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP) bei einer Temperatur von 278 K zusammen.

	B_1 [ppm/GPa]		B_2 [ppm/GPa ⁻²]	
	N	H ^N	N	H ^N
N3	0,03 ± 0,16	-0,19 ± 0,07	-0,10 ± 0,76	0,42 ± 0,32
T4	0,54 ± 0,08	-0,56 ± 0,02	-0,46 ± 0,41	0,53 ± 0,12
A5	0,64 ± 0,10	-0,23 ± 0,02	1,39 ± 0,46	0,57 ± 0,11
T6	1,43 ± 0,11	0,00 ± 0,02	3,29 ± 0,54	0,53 ± 0,08
C7	0,63 ± 0,10	0,01 ± 0,03	-2,44 ± 0,48	-0,36 ± 0,17
A8	0,93 ± 0,12	-0,09 ± 0,01	-3,34 ± 0,56	-0,24 ± 0,06
T9	3,23 ± 0,12	0,16 ± 0,03	-5,41 ± 0,58	-0,49 ± 0,13
Q10	1,28 ± 0,13	0,31 ± 0,03	-4,10 ± 0,62	-1,07 ± 0,15
R11	1,94 ± 0,22	0,27 ± 0,03	-7,14 ± 1,08	-1,12 ± 0,16
L12	1,67 ± 0,23	0,20 ± 0,03	-6,54 ± 1,12	-0,79 ± 0,15
A13	1,68 ± 0,20	0,23 ± 0,03	-6,24 ± 0,94	-1,00 ± 0,12
N14	1,59 ± 0,12	0,21 ± 0,03	-5,87 ± 0,58	-0,60 ± 0,13
F15	-0,21 ± 0,14	-0,09 ± 0,02	-0,64 ± 0,69	0,03 ± 0,08
L16	2,57 ± 0,14	0,06 ± 0,03	-5,28 ± 0,68	-0,21 ± 0,16
V17	3,39 ± 0,14	0,33 ± 0,02	-8,22 ± 0,69	-1,11 ± 0,10
H18	0,30 ± 0,16	0,32 ± 0,02	-6,66 ± 0,76	-1,00 ± 0,11
S19	0,90 ± 0,12	0,10 ± 0,03	-5,11 ± 0,60	-0,49 ± 0,15
S20	0,56 ± 0,11	0,13 ± 0,02	-2,42 ± 0,53	-0,41 ± 0,09
N21	0,15 ± 0,12	0,04 ± 0,02	-2,72 ± 0,59	-0,24 ± 0,09
N22	0,13 ± 0,15	0,04 ± 0,03	-2,97 ± 0,73	-0,09 ± 0,13
F23	-0,09 ± 0,18	-0,02 ± 0,02	-0,57 ± 0,86	0,11 ± 0,12
G24	0,50 ± 0,18	0,10 ± 0,02	-3,61 ± 0,86	-0,19 ± 0,07
A25	0,42 ± 0,12	0,15 ± 0,02	0,05 ± 0,55	-0,46 ± 0,10
I26	1,50 ± 0,14	0,17 ± 0,04	-5,00 ± 0,66	-0,35 ± 0,19
L27	1,22 ± 0,14	0,20 ± 0,03	-4,87 ± 0,66	-0,49 ± 0,12
S28	1,62 ± 0,11	0,18 ± 0,02	-3,19 ± 0,54	-0,38 ± 0,09
S29	0,05 ± 0,13	0,06 ± 0,02	-1,55 ± 0,61	-0,24 ± 0,08
T30	1,57 ± 0,11	0,02 ± 0,03	-4,22 ± 0,55	-0,28 ± 0,16
N31	0,76 ± 0,14	0,14 ± 0,03	-3,54 ± 0,65	-0,10 ± 0,14
V32	0,49 ± 0,13	0,14 ± 0,02	-3,29 ± 0,62	-0,53 ± 0,11
G33	-0,66 ± 0,13	-0,09 ± 0,02	-0,42 ± 0,64	-0,01 ± 0,10
S34	0,39 ± 0,05	-0,01 ± 0,03	-0,63 ± 0,23	0,29 ± 0,13
N35	0,23 ± 0,14	0,10 ± 0,03	-1,86 ± 0,68	-0,24 ± 0,15
T36	0,55 ± 0,12	-0,07 ± 0,04	-2,79 ± 0,57	0,32 ± 0,20
Y37	-1,19 ± 0,14	0,07 ± 0,02	2,48 ± 0,66	0,04 ± 0,11
Mittelwert	0,88 (0,98)	0,07 (0,17)	-2,97 (2,75)	-0,28 (0,47)

Tabelle 9.10: Druckkoeffizienten des IAPP bei 288 K Die Tabelle fasst die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 der Kerne H^N und N des Peptidrückgrats des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP) bei einer Temperatur von 288 K zusammen.

	B_1 [ppm/GPa]		B_2 [ppm/GPa ⁻²]	
	N	H ^N	N	H ^N
T4	0,15 ± 0,20	-0,53 ± 0,04	1,53 ± 0,96	0,48 ± 0,18
A5	0,42 ± 0,20	-0,25 ± 0,03	1,28 ± 0,97	0,52 ± 0,13
T6	1,22 ± 0,16	-0,01 ± 0,04	2,99 ± 0,75	0,29 ± 0,17
C7	0,58 ± 0,17	0,00 ± 0,05	-1,71 ± 0,81	-0,29 ± 0,22
A8	1,25 ± 0,16	-0,02 ± 0,02	-4,30 ± 0,78	-0,34 ± 0,10
T9	3,18 ± 0,24	0,17 ± 0,03	-5,19 ± 1,14	-0,58 ± 0,15
Q10	1,52 ± 0,17	0,31 ± 0,03	-4,36 ± 0,80	-0,92 ± 0,16
R11	2,03 ± 0,22	0,27 ± 0,02	-5,95 ± 1,04	-0,92 ± 0,10
L12	1,86 ± 0,18	0,26 ± 0,02	-5,75 ± 0,85	-0,75 ± 0,12
A13	2,01 ± 0,19	0,25 ± 0,02	-6,63 ± 0,91	-0,87 ± 0,12
N14	1,56 ± 0,21	0,14 ± 0,03	-4,99 ± 0,99	-0,18 ± 0,13
F15	0,17 ± 0,15	-0,05 ± 0,03	-0,91 ± 0,70	0,20 ± 0,13
L16	2,60 ± 0,19	0,10 ± 0,02	-5,35 ± 0,92	-0,24 ± 0,12
V17	3,53 ± 0,13	0,30 ± 0,04	-7,65 ± 0,62	-0,78 ± 0,17
H18	-0,15 ± 0,21	0,48 ± 0,03	-3,90 ± 1,00	-1,34 ± 0,15
S19	1,06 ± 0,24	0,23 ± 0,05	-5,22 ± 1,16	-0,93 ± 0,26
S20	0,19 ± 0,20	0,10 ± 0,04	-0,95 ± 0,95	-0,21 ± 0,17
N21	0,05 ± 0,09	0,00 ± 0,03	-1,68 ± 0,45	-0,01 ± 0,14
N22	0,06 ± 0,15	0,09 ± 0,02	-2,04 ± 0,72	-0,19 ± 0,12
F23	0,27 ± 0,13	0,01 ± 0,02	-1,41 ± 0,62	0,03 ± 0,09
G24	0,58 ± 0,20	0,13 ± 0,02	-3,08 ± 0,95	-0,31 ± 0,09
A25	0,81 ± 0,09	0,14 ± 0,02	-1,45 ± 0,41	-0,29 ± 0,12
I26	1,29 ± 0,12	0,18 ± 0,03	-5,95 ± 0,56	-0,35 ± 0,13
L27	1,68 ± 0,20	0,27 ± 0,03	-5,50 ± 0,94	-0,68 ± 0,14
S28	1,92 ± 0,27	0,15 ± 0,03	-4,29 ± 1,31	-0,12 ± 0,14
S29	0,36 ± 0,11	0,10 ± 0,03	-2,60 ± 0,53	-0,38 ± 0,15
T30	1,24 ± 0,15	0,02 ± 0,04	-2,53 ± 0,71	-0,28 ± 0,17
N31	0,73 ± 0,10	0,20 ± 0,03	-3,15 ± 0,46	-0,45 ± 0,13
V32	1,07 ± 0,16	0,21 ± 0,03	-1,45 ± 0,78	-0,42 ± 0,14
G33	-0,20 ± 0,12	-0,03 ± 0,02	-1,57 ± 0,56	-0,10 ± 0,08
S34	0,22 ± 0,12	0,03 ± 0,01	-0,02 ± 0,57	0,04 ± 0,06
N35	0,17 ± 0,11	0,04 ± 0,03	-1,53 ± 0,52	0,05 ± 0,15
T36	0,43 ± 0,12	0,17 ± 0,07	-2,16 ± 0,58	-0,62 ± 0,32
Y37	-1,02 ± 0,11	0,10 ± 0,05	2,07 ± 0,53	-0,08 ± 0,24
Mittelwert	0,97 (1,00)	0,10 (0,18)	-2,81 (2,61)	-0,32 (0,42)

Tabelle 9.11: Druckkoeffizienten des IAPP bei 298 K Die Tabelle fasst die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 der Kerne H^N und N des Peptidrückgrats des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP) bei einer Temperatur von 298 K zusammen.

	B_1 [ppm/GPa]		B_2 [ppm/GPa ⁻²]	
	N	H ^N	N	H ^N
T4	0,49 ± 0,13	-0,47 ± 0,06	0,48 ± 0,62	0,11 ± 0,28
A5	-0,18 ± 0,25	-0,24 ± 0,06	2,82 ± 1,18	0,38 ± 0,27
T6	1,04 ± 0,18	-0,08 ± 0,06	3,22 ± 0,85	0,65 ± 0,29
C7	1,05 ± 0,25	0,12 ± 0,05	-1,94 ± 1,19	-0,77 ± 0,23
A8	0,84 ± 0,14	-0,03 ± 0,02	-2,11 ± 0,66	-0,12 ± 0,12
T9	3,38 ± 0,21	0,06 ± 0,05	-6,47 ± 1,02	-0,13 ± 0,23
Q10	1,60 ± 0,18	0,21 ± 0,03	-4,16 ± 0,87	-0,50 ± 0,13
R11	2,39 ± 0,23	0,23 ± 0,03	-6,59 ± 1,12	-0,64 ± 0,16
L12	1,95 ± 0,18	0,19 ± 0,03	-4,83 ± 0,88	-0,33 ± 0,17
A13	2,01 ± 0,18	0,24 ± 0,02	-5,25 ± 0,87	-0,65 ± 0,10
N14	1,30 ± 0,24	0,15 ± 0,04	-3,50 ± 1,13	-0,16 ± 0,19
F15	0,16 ± 0,13	-0,01 ± 0,03	-0,10 ± 0,62	-0,05 ± 0,17
L16	2,56 ± 0,24	0,11 ± 0,04	-4,64 ± 1,16	-0,31 ± 0,20
V17	3,47 ± 0,26	0,28 ± 0,05	-6,37 ± 1,24	-0,63 ± 0,25
H18	0,28 ± 0,52	0,57 ± 0,11	-6,88 ± 3,50	-1,65 ± 0,76
S20	0,47 ± 0,10	0,12 ± 0,03	-1,22 ± 0,47	-0,20 ± 0,13
N21	0,34 ± 0,22	0,07 ± 0,05	-2,17 ± 1,06	-0,18 ± 0,25
N22	0,11 ± 0,26	0,06 ± 0,04	-1,73 ± 1,24	-0,18 ± 0,20
F23	0,23 ± 0,12	0,00 ± 0,03	-0,93 ± 0,58	0,12 ± 0,15
G24	0,91 ± 0,21	0,10 ± 0,03	-2,62 ± 0,99	-0,04 ± 0,16
A25	1,00 ± 0,13	0,14 ± 0,03	-1,33 ± 0,61	-0,28 ± 0,13
I26	1,39 ± 0,23	0,27 ± 0,02	-5,10 ± 1,09	-0,72 ± 0,11
L27	2,28 ± 0,13	0,22 ± 0,02	-5,97 ± 0,64	-0,26 ± 0,08
S28	2,05 ± 0,21	0,18 ± 0,03	-3,77 ± 1,03	-0,17 ± 0,13
S29	1,06 ± 0,45	0,05 ± 0,08	-7,33 ± 3,08	-0,20 ± 0,55
T30	1,41 ± 0,15	-0,02 ± 0,04	-2,78 ± 0,71	-0,07 ± 0,19
N31	0,41 ± 0,14	0,10 ± 0,02	-1,02 ± 0,65	-0,01 ± 0,10
V32	1,68 ± 0,43	0,35 ± 0,06	-2,29 ± 2,09	-1,02 ± 0,27
G33	0,12 ± 0,22	0,00 ± 0,03	-2,25 ± 1,05	-0,12 ± 0,14
S34	0,37 ± 0,09	-0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,45	0,25 ± 0,07
N35	0,00 ± 0,17	0,03 ± 0,07	-0,50 ± 0,81	0,03 ± 0,34
T36	0,56 ± 0,08	0,03 ± 0,04	-2,40 ± 0,38	-0,09 ± 0,19
Y37	-0,81 ± 0,09	0,03 ± 0,03	1,58 ± 0,45	0,42 ± 0,14
Mittelwert	1,09 (1,01)	0,09 (0,18)	-2,67 (2,75)	-0,23 (0,44)

Tabelle 9.12: Druckkoeffizienten des IAPP bei 308 K Die Tabelle fasst die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 der Kerne H^N und N des Peptidrückgrats des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP) bei einer Temperatur von 308 K zusammen.

9.8 Korrelationen für das Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂

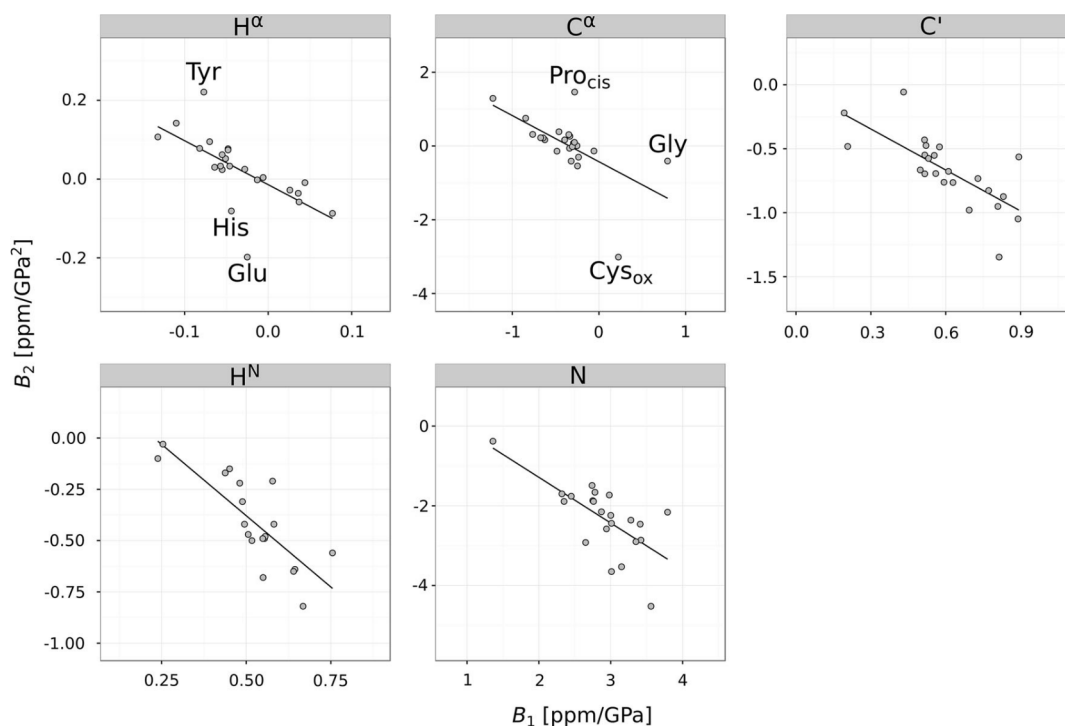


Abbildung 9.2: Korrelationen zwischen den Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kerne des Peptidrückgrats in dem Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂. Die Abbildung zeigt die Korrelationen zwischen den Druckkoeffizienten B_1 und B_2 für die Kerne H^α, C^α, C', H^N und N des Peptidrückgrats im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂. Die Korrelation ergab folgende Korrelationskoeffizienten: $r(\text{H}^\alpha) = -0,69$, $r(\text{C}^\alpha) = -0,75$, $r(\text{C}') = -0,72$, $r(\text{H}^\text{N}) = -0,80$ und $r(\text{N}) = -0,54$. Die gesamten Korrelationen sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst. Die Daten wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer mit einem Raumtemperaturprobenkopf (QXI) aufgenommen. Die Proben enthielten 5 mM Ac-GGXA-NH₂, 20 mM Tris-d₁₁, 0,5 mM DSS, H₂O/D₂O 90 %/10 %, pH 6,7 und wurden bei einer Temperatur von 283 K vermessen. Für Histidin wurden zusätzliche Messreihen bei pH-Werten von 4,0 (H^{4,0}) und 8,5 (H^{8,5}) durchgeführt. Die Druckkoeffizienten für H^N und N wurden aus Koehler et al. (2012) übernommen, die für H^α aus Beck Erlach et al. (2016b). Aufgrund der großen Fehler der Druckkoeffizienten für die Aminosäuren C_{ox} und P_{cis} wurden diese bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten vernachlässigt. (Quelle: Beck Erlach et al. (2016b))

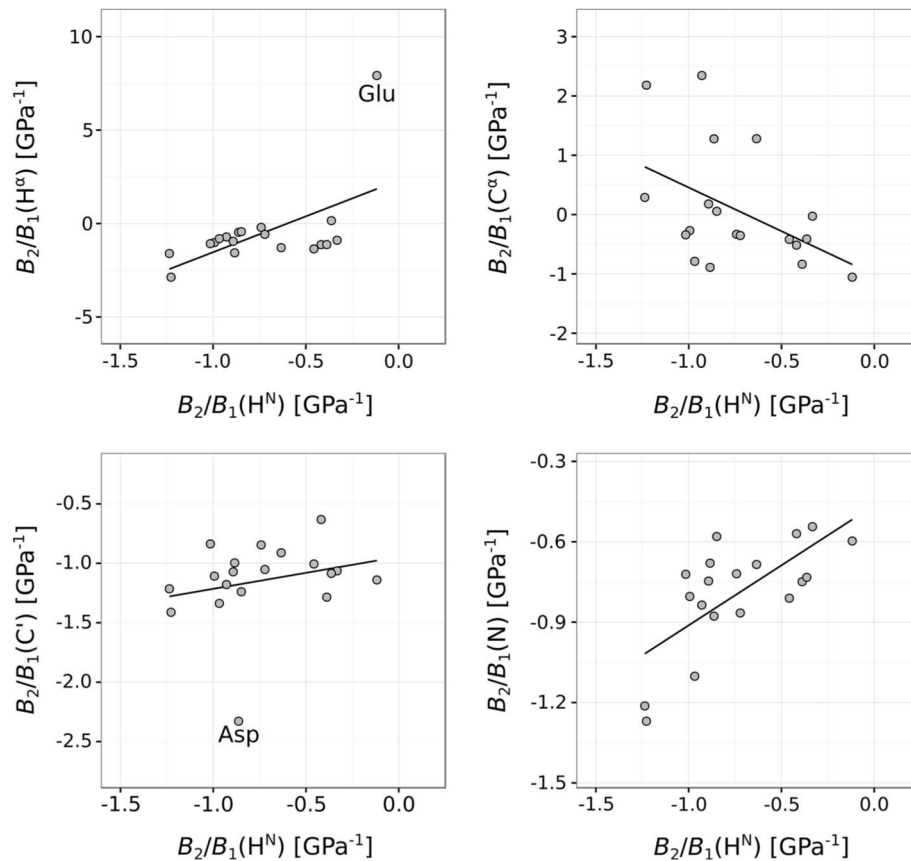


Abbildung 9.3: Korrelationen zwischen den Koeffizientenverhältnissen B_2/B_1 des Kerns H^N und der übrigen Kerne des Peptidrückgrats Die Abbildung zeigt die Korrelationen zwischen dem Koeffizientenverhältnis B_2/B_1 für den Kern H^N des Peptidrückgrats im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ und den Koeffizientenverhältnisse B_2/B_1 der Kerne H^α , C^α , C' und N . Die Korrelation ergab folgende Werte: $r(H^N - H^\alpha) = 0,57$, $r(H^N - C^\alpha) = -0,46$, $r(H^N - C') = 0,24$ und $r(H^N - N) = 0,69$. Die gesamten Korrelationen sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst. Die Daten wurden an einem 800 MHz Bruker Avance Spektrometer mit einem Raumtemperaturprobenkopf (QXI) aufgenommen. Die Proben enthielten 5 mM Ac-GGXA-NH₂, 20 mM Tris-d₁₁, 0,5 mM DSS, H₂O/D₂O 90%/10%, pH 6,7 und wurden bei einer Temperatur von 283 K vermessen. Für Histidin wurden zusätzliche Messreihen bei pH-Werten von 4,0 ($H^{4,0}$) und 8,5 ($H^{8,5}$) durchgeführt. Die Druckkoeffizienten für H^N und N wurden aus Koehler et al. (2012) übernommen, die für H^α aus Beck Erlach et al. (2016b). Aufgrund der großen Fehler der Druckkoeffizienten für die Aminosäuren C_{ox} und P_{cis} wurden diese bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten vernachlässigt. (Quelle: Beck Erlach et al. (2016b))

9.9 Einteilung der Kohlenstoffkerne der Peptidseitenketten in vergleichbare Gruppen

Gruppe	zugehörige Aminosäuren und Kerne
$C=O_{\text{Amid}}$	Asparagin C^γ , Glutamin C^δ
$C=O_{\text{Carboxy}}$	Aspartat C^γ , Glutamat C^δ
$C_{\text{quartär}}$	Valin C^β , Tyrosin C^γ , Tryptophan ($C^{\delta 2}$, C^γ), Phenylalanin C^γ
$C_{\text{aromatisch}}$	Phenylalanin (C^γ , C^δ , C^ϵ , C^ζ), Histidin ($C^{\epsilon 1}$, $C^{\delta 2}$, C^γ), Tryptophan (C^γ , $C^{\delta 1}$, $C^{\delta 2}$, $C^{\epsilon 2}$, $C^{\epsilon 3}$, $C^{\zeta 2}$, $C^{\zeta 3}$, $C^{\eta 2}$), Tyrosin (C^γ , C^δ , C^ϵ , C^ζ)
$C^\beta\text{-H}_2$	Cystein C^β , Aspartat C^β , Glutamat C^β , Phenylalanin C^β Histidin C^β , Isoleucin C^β , Lysin C^β , Leucin C^β , Methionin C^β Asparagin C^β , Prolin C^β , Glutamin C^β , Arginin C^β Serin C^β , Tryptophan C^β , Tyrosin C^β
$C\text{-H}$	Valin C^β , Threonin C^β , Leucin C^γ , Isoleucin C^β
$C\text{-H}_2$	Proline (C^δ , C^γ), Glycin C^α , Arginin (C^γ , C^δ), Glutamin C^γ Glutamat C^γ , Isoleucin $C^{\gamma 1}$, Lysin (C^γ , C^δ , C^ϵ), Methionin C^γ
$C\text{-H}_3$	Alanin C^β , Isoleucin ($C^{\gamma 2}$, $C^{\delta 1}$), Leucin ($C^{\delta 1}$, $C^{\delta 2}$) Methionin C^ϵ , Threonin $C^{\gamma 2}$, Valin ($C^{\gamma 1}$, $C^{\gamma 2}$)

Tabelle 9.13: Einteilung der Kohlenstoffkerne der Peptidseitenkette in vergleichbare Gruppen Die Tabelle zeigt die Einordnung der Kohlenstoffkerne der Peptidseitenketten der Aminosäure X3 im Modellpeptid Ac-GGXA-NH₂ in vergleichbare Gruppen, die aus ihrer chemischen Struktur und Umgebung abgeleitet wurden.

9.10 Druck- und Temperaturkoeffizienten des Tetrapeptids Ac-GGFA-NH₂

T [K]	Kern	B_1 [ppm/GPa]	B_2 [ppm/GPa ²]	Kern	B_1 [ppm/GPa]	B_2 [ppm/GPa ²]
278	C ^α	-0,501 ± 0,008	-0,121 ± 0,038	C ^β	-0,337 ± 0,009	-0,261 ± 0,042
283		-0,485 ± 0,005	-0,140 ± 0,023		-0,321 ± 0,009	-0,359 ± 0,045
288		-0,468 ± 0,006	-0,159 ± 0,029		-0,326 ± 0,008	-0,327 ± 0,037
293		-0,462 ± 0,004	-0,144 ± 0,018		-0,331 ± 0,004	-0,302 ± 0,020
298		-0,461 ± 0,005	-0,137 ± 0,024		-0,352 ± 0,010	-0,233 ± 0,049
303		-0,462 ± 0,010	-0,077 ± 0,048		-0,351 ± 0,009	-0,205 ± 0,045
308		-0,443 ± 0,004	-0,152 ± 0,020		-0,339 ± 0,007	-0,268 ± 0,031
278	C ^δ	0,674 ± 0,010	-0,213 ± 0,047	C ^ε	0,690 ± 0,006	-0,230 ± 0,028
283		0,679 ± 0,006	-0,249 ± 0,029		0,689 ± 0,006	-0,228 ± 0,027
288		0,697 ± 0,008	-0,354 ± 0,037		0,708 ± 0,007	-0,325 ± 0,034
293		0,705 ± 0,004	-0,403 ± 0,022		0,724 ± 0,007	-0,389 ± 0,033
298		0,691 ± 0,009	-0,360 ± 0,045		0,722 ± 0,009	-0,375 ± 0,045
303		0,695 ± 0,011	-0,353 ± 0,053		0,729 ± 0,009	-0,367 ± 0,042
308		0,722 ± 0,009	-0,463 ± 0,044		0,749 ± 0,010	-0,440 ± 0,047
278	C ^γ	-0,499 ± 0,014	0,608 ± 0,069	C ^ζ	0,611 ± 0,009	-0,801 ± 0,045
283		-0,510 ± 0,004	0,556 ± 0,021		0,629 ± 0,011	-0,764 ± 0,053
288		-0,505 ± 0,007	0,459 ± 0,032		0,672 ± 0,012	-0,861 ± 0,059
293		-0,516 ± 0,008	0,445 ± 0,038		0,693 ± 0,009	-0,865 ± 0,045
298		-0,537 ± 0,010	0,449 ± 0,047		0,709 ± 0,014	-0,867 ± 0,069
303		-0,551 ± 0,010	0,508 ± 0,046		0,728 ± 0,012	-0,859 ± 0,056
308		-0,536 ± 0,006	0,391 ± 0,029		0,753 ± 0,012	-0,909 ± 0,058
278	C ^ζ	0,696 ± 0,009	-0,202 ± 0,043			
283		0,702 ± 0,003	-0,217 ± 0,016			
288		0,725 ± 0,008	-0,314 ± 0,039			
293		0,738 ± 0,005	-0,360 ± 0,026			
298		0,737 ± 0,011	-0,356 ± 0,051			
303		0,748 ± 0,008	-0,356 ± 0,040			
308		0,785 ± 0,009	-0,489 ± 0,043			

Tabelle 9.14: Druckkoeffizienten der Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂ für unterschiedliche Temperaturen Die Tabelle fasst die Druckkoeffizienten B_1 und B_2 der Kohlenstoffkerne der Aminosäure Phenylalanin im Tetrapeptid Ac-GGFA-NH₂ in Abhängigkeit der Temperatur zusammen.

P [MPa]	Kern	C ₁ [ppb/K]	C ₂ [ppb/K ²]	Kern	C ₁ [ppb/K]	C ₂ [ppm/K ²]
1	C ^α	-12,00 ± 1,11	0,016 ± 0,002	C ^β	2,74 ± 1,60	-0,002 ± 0,003
20		-9,82 ± 1,05	0,012 ± 0,002		2,13 ± 1,78	0,000 ± 0,003
40		-10,49 ± 1,15	0,014 ± 0,002		2,24 ± 1,23	-0,001 ± 0,002
60		-9,14 ± 0,79	0,011 ± 0,001		4,40 ± 1,39	-0,004 ± 0,002
80		-10,60 ± 0,46	0,014 ± 0,001		1,05 ± 0,99	0,001 ± 0,002
100		-9,39 ± 1,85	0,012 ± 0,003		2,81 ± 1,12	-0,002 ± 0,002
120		-8,08 ± 1,62	0,010 ± 0,003		2,54 ± 1,05	-0,001 ± 0,002
140		-8,97 ± 1,04	0,011 ± 0,002		1,21 ± 1,52	0,001 ± 0,003
160		-7,47 ± 0,92	0,009 ± 0,002		2,79 ± 0,89	-0,002 ± 0,002
180		-8,12 ± 0,56	0,010 ± 0,001		1,37 ± 0,76	0,001 ± 0,001
200	-7,34 ± 0,36	0,009 ± 0,001	1,00 ± 0,75	0,001 ± 0,001		
1	C ^δ	7,33 ± 2,61	-0,009 ± 0,004	C ^ε	8,27 ± 1,92	-0,012 ± 0,003
20		8,68 ± 2,71	-0,012 ± 0,005		9,37 ± 1,75	-0,014 ± 0,004
40		7,26 ± 1,84	-0,009 ± 0,003		8,09 ± 1,41	-0,012 ± 0,002
60		9,19 ± 2,43	-0,013 ± 0,004		9,55 ± 1,33	-0,014 ± 0,002
80		5,54 ± 3,09	-0,006 ± 0,005		6,11 ± 2,11	-0,008 ± 0,004
100		8,35 ± 1,84	-0,011 ± 0,003		8,61 ± 1,15	-0,013 ± 0,002
120		7,24 ± 0,92	-0,009 ± 0,002		8,17 ± 0,89	-0,012 ± 0,002
140		4,24 ± 2,49	-0,004 ± 0,004		6,14 ± 1,75	-0,008 ± 0,003
160		6,23 ± 2,54	-0,008 ± 0,004		7,07 ± 2,39	-0,010 ± 0,004
180		4,39 ± 2,49	-0,004 ± 0,004		4,37 ± 1,89	-0,005 ± 0,003
200	4,39 ± 2,97	-0,004 ± 0,005	5,71 ± 2,29	-0,008 ± 0,004		
1	C ^γ	15,68 ± 1,21	-0,015 ± 0,002	C ^{γ'}	-18,21 ± 1,01	0,020 ± 0,002
20		17,34 ± 1,68	-0,018 ± 0,003		-15,61 ± 1,28	0,016 ± 0,002
40		15,47 ± 1,02	-0,015 ± 0,002		-17,40 ± 0,90	0,019 ± 0,002
60		16,34 ± 1,20	-0,017 ± 0,002		-14,63 ± 1,24	0,014 ± 0,002
80		12,46 ± 2,29	-0,010 ± 0,004		-16,03 ± 0,60	0,017 ± 0,001
100		16,14 ± 0,84	-0,016 ± 0,001		-15,51 ± 1,42	0,016 ± 0,002
120		14,78 ± 1,00	-0,014 ± 0,002		-13,65 ± 1,00	0,013 ± 0,002
140		11,39 ± 1,51	-0,009 ± 0,003		-14,82 ± 0,98	0,015 ± 0,002
160		12,68 ± 1,56	-0,011 ± 0,003		-12,76 ± 1,21	0,012 ± 0,002
180		10,10 ± 1,00	-0,007 ± 0,002		-13,56 ± 0,55	0,013 ± 0,001
200	10,16 ± 2,36	-0,007 ± 0,004	-12,76 ± 1,15	0,012 ± 0,002		
1	C ^ζ	7,79 ± 1,36	-0,013 ± 0,002			
20		8,61 ± 1,11	-0,014 ± 0,002			
40		7,39 ± 0,66	-0,012 ± 0,001			
60		9,07 ± 0,79	-0,015 ± 0,001			
80		5,64 ± 0,98	-0,009 ± 0,002			
100		7,40 ± 0,88	-0,012 ± 0,001			
120		6,76 ± 0,56	-0,011 ± 0,001			
140		5,08 ± 0,99	-0,008 ± 0,002			
160		6,12 ± 1,63	-0,010 ± 0,003			
180		4,59 ± 0,75	-0,007 ± 0,001			
200	5,67 ± 0,81	-0,009 ± 0,001				

Tabelle 9.15: Temperaturkoeffizienten der Kohlenstoffkerne des Peptids Ac-GGFA-NH₂ für unterschiedliche Drücke Die Tabelle fasst die Temperaturkoeffizienten C₁ und C₂ der Kohlenstoffkerne der Aminosäure Phenylalanin im Tetrapeptid Ac-GGFA-NH₂ in Abhängigkeit des Drucks zusammen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, Oktober 2016

Markus Beck Erlach