

Fourier-Transform Infrarotspektroskopie an Proteinen

**Versuch im Rahmen des Praktikums für
Fortgeschrittene**

am
Lehrstuhl für BioMolekulare Optik
des
Departments für Physik
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

erstellt von
Dr. K.-H. Mantel, März 2005
überarbeitet: März 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Vorwort	1
2	Vorbemerkungen	2
2.1	Laserschutz	2
2.2	Lehr- und Lernziele	2
2.3	Vorkenntnisse	2
2.4	Leitfaden	2
2.5	Literatur	3
3	Infrarotspektroskopie an Proteinen	4
3.1	Schwingungen von Molekülen	4
3.2	Absorption im infraroten Spektralbereich	4
3.3	Aufbau von Proteinen	5
3.4	Infrarotspektroskopie an Proteinen	7
3.5	Absorptionsbanden der Peptidgruppe	8
3.6	Die Beiträge der Aminosäureseitenketten	9
4	Das Fourier-Transform Spektrometer	11
4.1	Das Interferogramm	11
4.2	Die Fourier-Transformation	13
4.3	Apodisation	13
4.4	Zerofilling	14
4.5	Auflösungsverbesserung	14
4.5.1	Höhere Ableitungen	14
4.5.2	Fourier-Selbstdekonvolution	15
4.5.3	Feinstrukturverstärkung	15
4.6	Durchführung einer Sekundärstrukturanalyse	15
4.7	Sekundärstrukturanteile einiger Proteine	16
5	Versuchsdurchführung	18
5.1	Präparation der Proben	19
5.2	Bedienung FTIR	19
5.3	Vorversuche	20
5.4	Die Amid-I-Bande von Proteinen	20
5.5	CO ₂ Absorption	21

Inhaltsverzeichnis

6 Auswertung	22
6.1 Vorversuche	23
6.2 Die Amid-I-Bande von Proteinen	23
6.3 CO ₂ Absorption	24
Anhang	26
A.1 Optische Dichte	26
A.2 Proben	27
A.2.1 Präparation des Puffers	27
A.2.2 Präparation der Proben	28
A.3 Gnuplot	29
A.4 Abgabe der Auswertung	33
Abbildungsverzeichnis	34
Tabellenverzeichnis	35
Index	36

1 Vorwort

Dieser Versuch wurde im Frühjahr 2005 für ein F1-Praktikum zur Infrarot-Spektroskopie an Proteinen konzipiert. Das Kapitel "Infrarotspektroskopie an Proteinen" lehnt sich eng an das Skript der Biophysik-Vorlesung von Prof. Wolfgang Zinth an (gehalten im Sommersemester 2004 an der Ludwig-Maximilians-Universität München).

Besonderer Dank gilt Dipl. Phys. Tobias Schrader und Dipl.Phys. Florian Koller, die die ersten Testmessungen durchführten und wesentliche Beiträge zur Verbesserung des Auswerteprogramms lieferten.

Auf Grund der Erfahrungen aus zwei Semestern wurde das Kapitel zur Auswertung im Frühjahr 2006 überarbeitet.

München, den 10.03.2006

Karl-Heinz Mantel

2 Vorbemerkungen

2.1 Laserschutz

Warnung!

Sie arbeiten bei diesem Versuch mit einem Gerät, in dessen Inneren ein Laser mit der Leistung von 1 *mW* arbeitet. Gelangt der Laserstrahl ungeschwächt in Ihr Auge, so kann dieses geschädigt werden. Aus Gründen des Laserschutzes ist jede in der Versuchsanleitung nicht genannte Veränderung der Apparatur zu unterlassen.

2.2 Lehr- und Lernziele

Ziel des Versuchs ist es, Sie mit einem modernen Verfahren der Infrarotspektroskopie vertraut zu machen. Sie sollen mit Hilfe der Fourier-Transform Infrarotspektroskopie die Sekundärstruktur von Proteinen untersuchen. Dabei lernen Sie auch wesentliche Schritte zur Präparation von biologischen Proben kennen.

2.3 Vorkenntnisse

Dieser Abschnitt soll Ihnen als Leitfaden für die Vorbereitung auf den Versuch dienen. Die weiter unten angeführten Punkte erheben durchaus nicht den Anspruch auf Vollständigkeit, sondern sollen Sie zum eigenständigen Durcharbeiten der einschlägigen Literatur animieren. Unter diesem Aspekt sind auch die Literaturangaben am Ende dieses Abschnittes zu verstehen.

2.4 Leitfaden

1. Schwingungsmoden von Molekülen
2. Absorptionsbanden von Peptiden
3. Fouriertransformation
4. Michelsoninterferometer
5. Fourier-Transform Infrarotspektroskopie

2.5 Literatur

- Erwerb der Grundkenntnisse
 1. *Hecht, Eugene*: Optik, Oldenburg, 2001.
 2. *Demtröder, Wolfgang*: Molekülphysik, Oldenburg, 2003.
- Zur Vertiefung und Ergänzung
 1. *Günzler, Helmut, Gremlich, Hans-Ulrich*: IR-Spektroskopie, Wiley-VCH, 2003.

3 Infrarotspektroskopie an Proteinen

3.1 Schwingungen von Molekülen

Die Wechselwirkung eines Moleküls mit einem Strahlungsfeld ist direkt proportional zum Dipolmoment des Moleküls (siehe auch Lehrbücher der Atom- und Molekülphysik). Absorption oder Emission von Strahlung wird deshalb nur beobachtet, wenn sich dabei das Dipolmoment des Moleküls verändert; Multipolübergänge höherer Ordnung werden hier nicht berücksichtigt. Entscheidend für die Beobachtung von Strahlung ist deshalb der Aufbau eines Moleküls. So zeigen z.B. zweiatomige Moleküle mit gleichen Atomen (z.B. N_2 , O_2) bei Schwingungsanregung oder Rotation keine Änderung des Dipolmoments und damit keine Absorption oder Emission von Strahlung.

Die Anzahl der möglichen Schwingungsformen von mehratomigen Molekülen lässt sich auf einfache Art ableiten: Jedes einzelne Atom kann Bewegungen in den 3 Richtungen des Raumes ausführen, ein System von N Atomen verfügt deshalb über $3N$ Bewegungsfreiheitsgrade. Da jedoch 3 Bewegungskombinationen zu Rotationen um den Massenschwerpunkt und weitere 3 Bewegungskombinationen zu Translationen des Massenschwerpunkts führen, beträgt die Zahl der Schwingungsfreiheitsgrade Z nur noch $3N - 6$. Bei linearen Molekülen kommen nur 2 Rotationsfreiheitsgrade vor, da die Rotation um die Molekülachse mit keiner Bewegung der Atome oder des Massenschwerpunktes verbunden ist. In diesem Fall gibt es deshalb $Z = 3N - 5$ Schwingungsfreiheitsgrade. Für jeden dieser Schwingungsfreiheitsgrade findet man eine sog. Normalmode. Hierbei schwingen die an der Normalmode beteiligten Atome mit gleicher Frequenz und fester Phase zueinander. Jeder Normalmode ist eine bestimmte Schwingungsfrequenz zugeordnet.

3.2 Absorption im infraroten Spektralbereich

Absorbiert ein Molekül Licht im infraroten Spektralbereich, geht es in einen höher angeregten Schwingungszustand über. Absorption kann nur stattfinden, wenn sich während einer Schwingung das Dipolmoment der betreffenden Atomgruppierung ändert. Die Intensität einer Absorptionsbande ist proportional zum Quadrat der Dipolmomentsänderung relativ zum Gleichgewichtszustand. Dies wird verursacht bei Streckschwingungen durch Änderung der Bindungslängen, bei Deformations- und Biegeschwingungen durch Änderungen von Bindungswinkeln. Die Frequenz, bei der eine Schwingung absorbiert, hängt von den reduzierten Massen der beteiligten Atome, der Kraftkonstante der Bindung, der Bindung zu den Nachbaratomen und

der Koppelung mit anderen Molekülschwingungen ab. Sie berechnet sich für ein zweiatomiges Molekül (mit verschiedenen Atomen) nach:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.1)$$

wobei ν die Schwingungsfrequenz, k die Kraftkonstante und μ die reduzierte Masse ist.

Es ist üblich, nicht die Frequenzen selbst anzugeben, sondern die energieproportionalen Wellenzahlen, die sich aus dem Kehrwert der Wellenlänge ergeben. Für die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ ist die Einheit cm^{-1} gebräuchlich.

Tabelle 3.1: Wellenzahl und Wellenlänge.

Wellenzahl [cm^{-1}]	1000	2000	3000	4000	5000	6000	8000	10000
Wellenlänge [μm]	10	5	3.33	2.5	2	1.67	1.25	1

3.3 Aufbau von Proteinen

Stellt man sich eine lange Proteinkette vor, so gibt es im Prinzip sehr viele Möglichkeiten wie diese Proteinkette gefaltet werden kann. Eine erste wesentliche Randbedingung besteht in der speziellen Eigenschaft der Peptidbindung (siehe Abb. 3.1), die eine planare Anordnung der CO- und NH-Gruppen im Peptid fordert. Eine Peptidkette besteht folglich aus starren Plättchen, die über zwei Bindungswinkel, ϕ und ψ , mit je einem C-Atom verknüpft sind (siehe Abb. 3.2). Auf Grund der Randbedingungen können nur bestimmte Werte der Bindungswinkel auftreten. Zusätzlich spielen Wasserstoffbrückenbindungen für die Ausbildung der Struktur eine sehr große Rolle. Hier sind es im wesentlichen Wasserstoffbrückenbindungen die zwischen der NH- und der CO-Gruppe des Rückgrats aufgebaut werden. Bei der Struktur unterscheidet man im wesentlichen die Primärstruktur und die Sekundärstruktur. Erstere beschreibt die Sequenz der Aminosäuren, während letztere die spezielle räumliche Anordnung nah benachbarter Aminosäuren beschreibt.

Sekundärstrukturen

α -Helix

Die α -Helix ist eine stabförmige Struktur, bei der eine eng aufgewickelte Polypeptidhauptkette den inneren Teil des Stabes bildet. Die Seitenketten sind in dieser schraubenartigen Anordnung nach außen gerichtet (siehe Abb. 3.3).

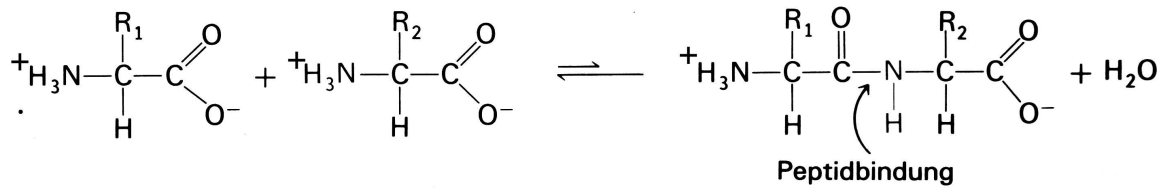


Abbildung 3.1: Struktur und Entstehung einer Peptidbindung durch Abspaltung von H₂O.

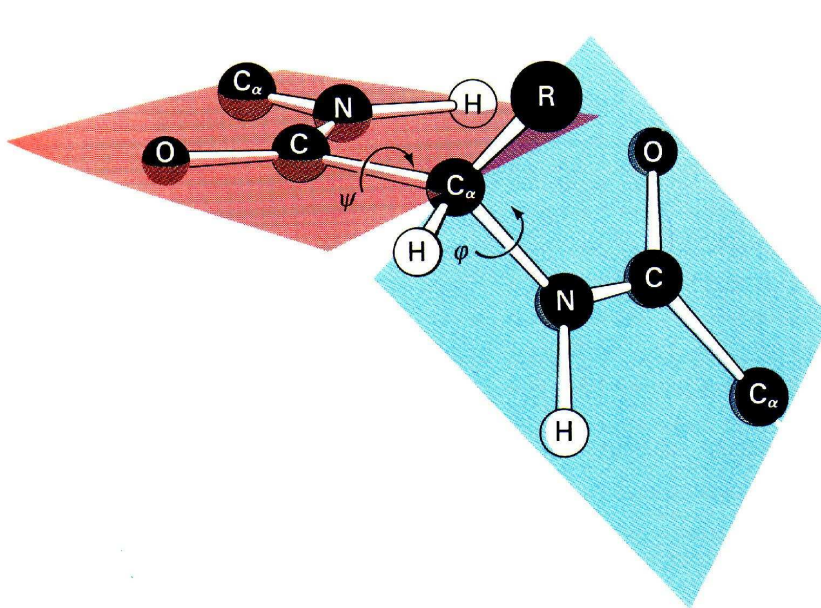


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Peptidbindung.

Die α -Helix wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den NH- und den CO-Gruppen des Rückgrates stabilisiert. Dabei bildet die CO-Gruppe einer Aminosäure eine Wasserstoffbrücke zu der NH-Gruppe der Aminosäure, die in der Sequenz vier Reste vor ihr liegt. Alle CO- und NH-Gruppen der Hauptkette sind an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligt. Der Abstand zwischen benachbarten Resten entlang der Helixachse ist 1,5 Å, die Verdrehung in der Helixachse ist 100°. Die Ganghöhe der α -Helix beträgt 5,4 Å. In den Proteinen findet man nur rechtsgängige α -Helices. Der Anteil des Proteins, der in einer α -Helix gefaltet ist, kann zwischen unterschiedlichen Proteinen stark variieren.

β -Faltblatt

Während bei der α -Helix die Wasserstoffbrückenbindung zwischen nahe benachbarten Aminosäuren gebildet werden, werden die Wasserstoffbrücken in der β -Faltblatt-

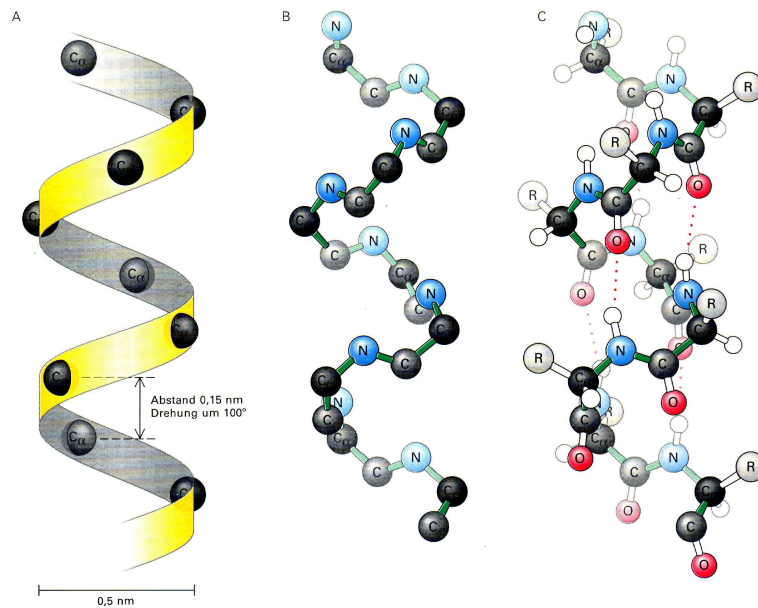


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der α -Helix.

struktur zwischen verschiedenen Strängen gebildet (siehe Abb. 3.4). Die β -Faltblattstruktur gibt platten- oder stabförmige Strukturen. In einem β -Faltblatt ist die Polypeptidkette praktisch völlig gestreckt. Benachbarte Stränge in einem β -Faltblatt können dieselbe Richtung aufweisen (paralleles β -Faltblatt) oder entgegengesetzt verlaufen (antiparallele β -Faltblattstruktur).

3.4 Infrarotspektroskopie an Proteinen

Für das Verständnis biologischer Reaktionen gewinnt die Infrarot-Spektroskopie zunehmend an Bedeutung, insbesondere weil sie Informationen liefert, die mit Methoden der Strukturaufklärung wie NMR, Elektronenmikroskopie und Röntgenstrukturanalyse nicht erhalten werden. Sie erlaubt Aussagen über Struktur und Umgebung des Proteinrückgrats und vieler Aminosäureseitenketten. Sie macht dynamische Vorgänge zugänglich, wie z.B. die Änderung von Bindungslängen und -geometrien im Verlauf einer Proteinreaktion, die Modifizierung chemischer Gruppen (z.B. Protonierung) oder die veränderte Ladungsdichte einer chemischen Bindung.

Die Empfindlichkeit moderner Infrarotspektrometer ist heute prinzipiell groß genug, um mit speziellen Techniken die Beiträge einzelner Aminosäuren zu detektieren. Ein Protein liefert jedoch im Absorptionsspektrum eine Vielzahl überlappender Banden des Peptid-Rückgrates (Amid-Banden; Tab. 3.2, Abb. 3.2) und der Aminosäure-Seitenketten.

Darüberhinaus werden die Peptid-C=O-Moden von einer starken Wasserbande bei ca. 1650 cm^{-1} überlagert, die zwar, im Vergleich zu den Moden der Amino-

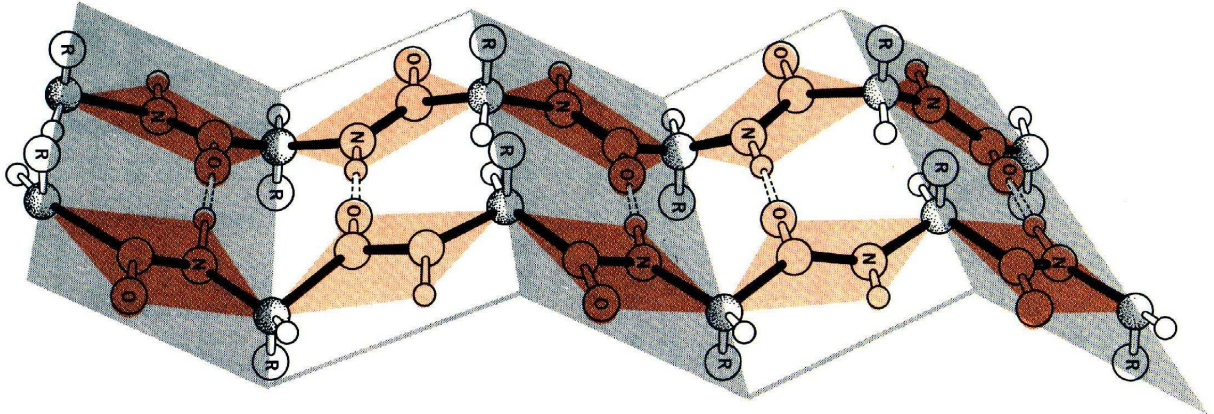


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der β -Faltblattstruktur.

säureseitenketten, einen schwachen Extinktionskoeffizienten ($20 \frac{l}{mol \text{ cm}}$) besitzt, aber bereits bei einer Schichtdicke von $10 \mu\text{m}$ aufgrund des hohen Wassergehaltes der Proben zu einer optischen Dichte von 1 führt (d.h. nur 10% des eingestrahnten Lichtes wird transmittiert). Zur Definition der optischen Dichte siehe Anhang A.1.

3.5 Absorptionsbanden der Peptidgruppe

Einer (hypothetischen) freien, planaren Peptidgruppe können 9 Schwingungsmoden zugeordnet werden, die mit abnehmender Wellenzahl der Absorptionsbande als Amid-A, -B und Amid-I bis -VII bezeichnet werden. Für Strukturuntersuchungen ist besonders die Amid-I-Schwingung von Bedeutung.

Für die Amid-I-Schwingung, zu der ca. 80% die C=O-Valenzschwingung der Carbonylpeptidgruppe beiträgt, kann die Lage der Absorptionsbande mit der Sekundärstruktur des betreffenden Polypeptids korreliert werden. Dies wird dadurch verursacht, dass die exakte Geometrie und damit Lage und Intensität der ψ - und ϕ -Winkel die Amid-I-Bande verändern (starke Wechselwirkung und Veränderung der Dipol-Wechselwirkung zwischen den C=O Schwingungen). Die genaue Analyse der Amid-I-Bande kann daher in Verbindung mit mathematischen Verfahren zur Trennung überlappender Absorptionsbanden (Fourier-Selbstdekonvolution) Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen liefern.

Ein Wasserstoff-Deuterium-Austausch (H/D-Austausch) verändert die Massen der schwingenden Atome und damit die Schwingungsfrequenz und die Lage der Absorptionsbanden im Spektrum. Dabei ist die Bandenverschiebung abhängig von der Sekundärstruktur: die schwache hochfrequente Amid-I-Bande von β -Faltblatt und von Schleifen ($\approx 1670 \text{ cm}^{-1}$) wird oft mit ca. 10 cm^{-1} am stärksten zu niedrigen

Tabelle 3.2: Amid-I-Moden verschiedener Sekundärstrukturelemente.

Sekundärstruktur	Bandenposition in H ₂ O/cm ⁻¹		Bandenposition in D ₂ O/cm ⁻¹	
	Mittelwert	Bereich	Mittelwert	Bereich
α-Helix	1654	1648-1657	1652	1642-1660
β-Faltblatt	1633	1623-1641	1630	1615-1638
	1684	1674-1695	1679	1672-1694
Schleifen	1672	1662-1686	1671	1653-1691
Ungeordnet	1654	1642-1657	1645	1639-1654

Quelle: nach E. Goormaghtigh et al. (1994), Subcellular Biochemistry 23, 405. Anmerkung: Oft tauchen in ähnlichen Tabellen unterschiedliche Bandenpositionen für die hochfrequente Bande von parallelem und antiparallelem β-Faltblatt auf. Dies beruht auf der berechneten Bandenposition (für β-parallel). Experimentell kann jedoch nicht zwischen parallelen und anti-parallelen β-Faltblatt unterschieden werden.

Wellenzahlen verschoben, während bei allen anderen Sekundärstrukturelementen die Verschiebung nur wenige cm⁻¹ beträgt. Tab. 3.2 zeigt eine Zusammenstellung der Amid-I-Moden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente. Die Amid-II-Bande (40-60% N-H Biegeschwingung, 18-40% C-N Streckschwingung, ca. 10% C-C Streck-schwingung) zeigt gegenüber der Amid-I-Bande eine weitaus größere Empfindlichkeit gegenüber H/D-Austausch: sie wird um etwa 100 cm⁻¹ zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Dabei verändert sich der Charakter der Schwingung: sie ist hauptsächlich eine C-N Streckschwingung und enthält keine Anteile mehr der N-H Biegeschwingung. Diese Eigenschaft ermöglicht die Kontrolle des Deuterierungsgrades des Proteins über das Verschwinden des Amid-II- und das Entstehen des sog. Amid-II'-Signals bei 1450 cm⁻¹ in D₂O. Ein ähnlicher Effekt tritt bei der Amid-A-Bande auf.

Abhängig von der Stabilität der Proteinstruktur zeigen die verschiedenen Bereiche eines Proteins unterschiedliche H/D-Austauschgeschwindigkeiten, was zur Zuordnung der Absorptionsbanden zu einzelnen Sekundärstrukturelementen genutzt werden kann.

3.6 Die Beiträge der Aminosäureseitenketten

Im Bereich der Amid-I-Bande tragen auch Aminosäureseitenketten zur Absorption bei, insbesondere wenn sie C=O-Gruppen enthalten. Es sind dies Tyr, Lys, Phe, Glu, Asp. Diese tragen etwa 10-15% zur Gesamtabsorption in diesem Spektralbereich bei. Der Einfluss der jeweiligen Proteinumgebung (Solvation, pH-Wert, Dielektrizitätskonstante) auf die Absorptionseigenschaften der Seitenketten macht es unmöglich, die jeweils genaue Lage der Absorptionsbanden aufgrund von Modellspektren der

3 Infrarotspektroskopie an Proteinen

Aminosäuren in wässriger Lösung vorherzusagen. Abbildung 3.5 gibt einen Überblick über verschiedene Aminosäureseitenketten.

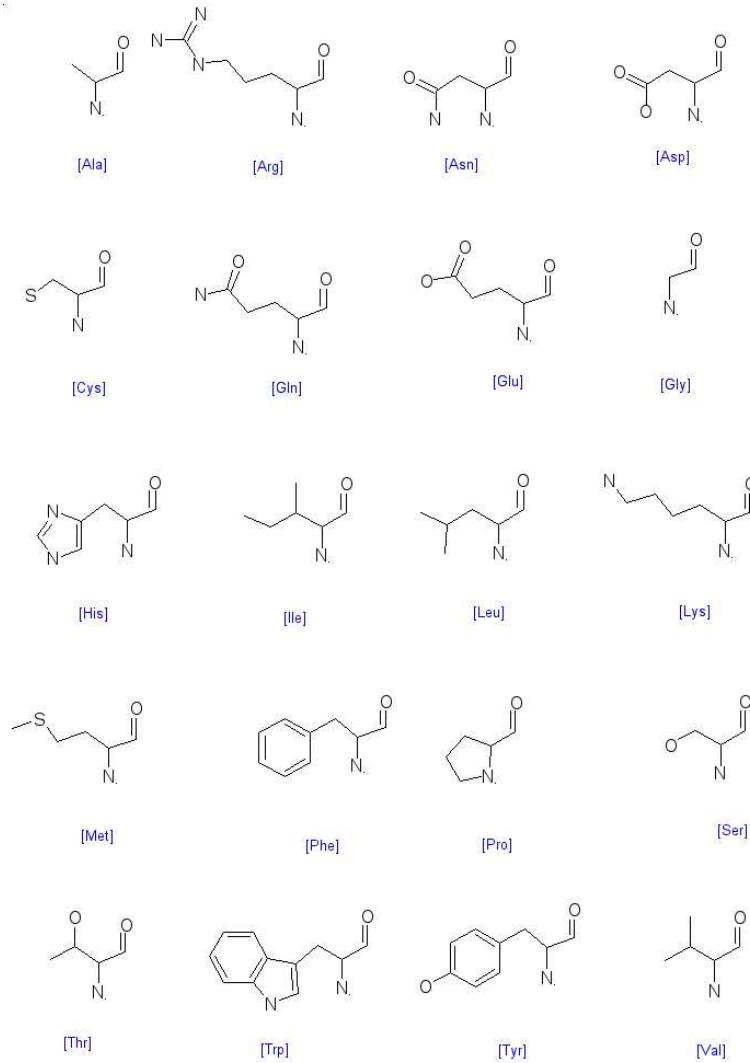


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung von Aminosäureseitenketten.

4 Das Fourier-Transform Spektrometer

In modernen Messgeräten zur Bestimmung der Infrarottransmission und in der Raman-spektroskopie werden meist Fouriertransformations-Spektrometer (FT-Spektrometer) eingesetzt. Ein solches Spektrometer besitzt als Herzstück statt eines Monochromators (dispersives Spektrometer, wie z.B. Spektrometer für den sichtbaren Spektralbereich) ein Michelson Interferometer (s. Abb. 4.1). Dabei wird durch teilreflektierende Spiegel die zu messende Strahlungsquelle in zwei Strahlbündel zerlegt, welche anschließend zur Interferenz gebracht werden.

Im Vergleich zur herkömmlichen dispersiven Infrarotspektroskopie hat die FT-Spektroskopie folgende Vorteile zu bieten:

- Eine erhebliche Zeitersparnis entsteht dadurch, dass ein komplettes Spektrum sehr viel schneller aufgenommen werden kann.
- Parallele Messung aller Frequenzen
- Weil bei der FT-Spektroskopie der Strahl nicht durch Spalte eingengt werden muss, steht eine höhere Lichtintensität zur Verfügung, was sich in einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis niederschlägt.
- Wegen der Kontrolle der Spiegelposition durch einen HeNe-Laser ist die Genauigkeit der Wellenlängenbestimmung sehr hoch.

4.1 Das Interferogramm

Im FT-Spektrometer wird das Spektrum der Probe nicht direkt gemessen. Stattdessen erhält man zunächst ein sog. Interferogramm, das mittels Fourier-Transformation in ein Spektrum umgerechnet wird. Das Interferogramm wird durch ein Michelson-Interferometer erzeugt (siehe Abb. 4.1). Das Interferogramm ist die gemessene Intensität in Abhängigkeit der Position des Spiegels S_2 .

Das von einer Quelle ausgehende Licht wird durch eine halb-durchlässige Platte P_1 (die reflektierende Schicht S befindet sich im Bild auf der Rückseite) in zwei Komponenten, Lichtbündel I und II, aufgespalten. Das transmittierte Licht (I) durchläuft eine zweite Platte P_2 identischer Dicke und wird von einem genau senkrecht stehenden Spiegel S_1 in sich zurückreflektiert. Von der Spiegelschicht S des halb-durchlässigen Spiegels wird ein Teil des rücklaufenden Lichtes dann auf den Schirm

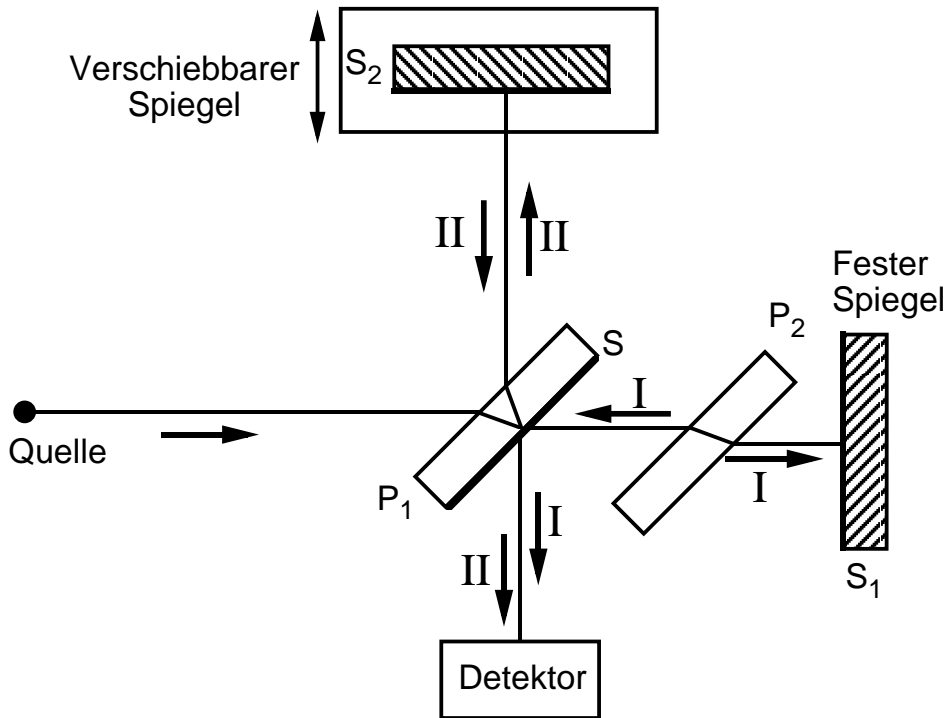


Abbildung 4.1: Interferometer

(Detektor) gelenkt. Das zweite Lichtbündel (Bündel II) werde von S nach oben reflektiert; es durchläuft ein zweites Mal die Glasplatte P_1 , wird am Spiegel S_2 in sich zurückgeworfen. Sein durch S transmittierter Anteil fällt ebenfalls auf den Schirm (Detektor) und interferiert dort mit Bündel I. Durch Verschieben des Spiegels S_2 längs der Strahlachse lässt sich der Gangunterschied zwischen den beiden Lichtbündeln variieren. Die Nullstellung, d.h. die Einstellung, bei der beide Strahlengänge genau gleich lang sind, lässt sich am besten mit weißem Licht überprüfen: Die Verwendung von weißem Licht ist vorteilhaft, da dort die Kohärenzlänge extrem kurz ist und so die Nullstellung exakt bestimmt werden kann. Der dabei vorliegende Phasenunterschied von π rührt daher, dass Bündel I an der Außenfläche des Spiegels, Bündel II an der Innenfläche reflektiert wurde. Die Kompensationsplatte P_2 wird im Michelson Interferometer verwendet, um auch für spektral breitbandiges Licht beide Strahlengänge exakt identisch zu führen. Da beide Lichtbündel die Glasplatten gleich oft (dreimal) durchqueren, erfahren sie auch die gleiche Dispersion.

Im Falle von monochromatischem Licht erhält man als Interferogramm eine Kosinusfunktion. Dies wird zur Kontrolle der Spiegelposition ausgenutzt, indem das Licht eines HeNe-Lasers (632 nm) ebenfalls in das Interferometer eingekoppelt wird. An den Nulldurchgängen des Laser-Interferogramms wird das Infrarot-Interferogramm digitalisiert. Aus der Wellenlänge des Lasers ergibt sich, dass die Nulldurchgänge einen Abstand von $\frac{1}{31600} \text{ cm} = \lambda_{\text{HeNe}}/2$ besitzen, was zu einer Wellenzahlkalibrierung des Gerätes mit einer Genauigkeit in der Größenordnung von 0.01 cm^{-1} führt.

4.2 Die Fourier-Transformation

Die Intensität am Detektor $I(x)$ als Funktion der Spiegelposition x (das Interferogramm) und die Intensität $S(\nu)$ als Funktion der Wellenzahl $\nu = \lambda^{-1}$ des Lichtes (das sog. Einkanalspektrum) stellen ein Fouriertransformiertes Paar dar:

$$S(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(x) \exp[i2\pi\nu x] dx \quad (4.1)$$

$$I(x) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} S(\nu) \exp[-i2\pi\nu x] d\nu \quad (4.2)$$

Natürlich kann in der Praxis kein kontinuierliches Interferogramm unendlicher Ausdehnung gemessen werden. Stattdessen wird eine endliche Anzahl N von Interferogrammpunkten im Abstand Δx digitalisiert. Ersetzt man x durch $n\Delta x$, ν durch $k\Delta\nu$ und das Integral durch eine Summe, so erhält man die diskrete Fourier-Transformation

$$S(k\Delta\nu) = \sum_{n=0}^{N-1} I(n\Delta x) \exp \frac{i2\pi k\Delta\nu n\Delta x}{N} \Delta x \quad (4.3)$$

Die berechneten Punkte im Frequenzraum besitzen den Abstand

$$\Delta\nu = \frac{1}{N\Delta x} \quad (4.4)$$

Der Punkteabstand $\Delta\nu$, der die spektrale Auflösung bestimmt, ist also umgekehrt proportional zum Spiegelweg und der Anzahl der Meßpunkte. Probleme, die bei der diskreten Fourier-Transformation entstehen, und deren Korrektur werden in den nächsten Abschnitten besprochen.

4.3 Apodisation

Wegen der endlichen Länge der gemessenen Interferogramme kann es bei der Fourier-Transformation zu Artefakten kommen. Das bei $x = x_{max}$ abgeschnittene Interferogramm kann als Produkt eines Interferogramms unendlicher Ausdehnung mit einer Rechteckfunktion aufgefasst werden. Die Rechteckfunktion hat die Werte Eins für $0 \leq x \leq x_{max}$ und Null sonst. Als Folge dessen entstehen neben der eigentlichen Bande Nebenminima und -maxima. Die Amplitude des größten Nebenminimums macht 22% der Amplitude des Hauptmaximums aus.

Dieser störende Effekt kann umgangen werden, indem man das Interferogramm statt mit der Rechteckfunktion mit einer anderen Funktion multipliziert, die sich sanfter an Null annähert. Solche Funktionen werden *Apodisationsfunktionen* genannt. Weil durch die Apodisation Informationen an den Rändern des Interferogramms verloren gehen, ist eine Verschlechterung der Auflösung bzw. eine Linienverbreiterung die Folge. Die Apodisationsfunktionen sind darauf optimiert, dass trotz

starker Unterdrückung der Nebenmaxima eine geringe Verbreiterung des Hauptmaximums resultiert.

Bei der Messung mit dem FT-Spektrometer wird eine optimierte Apodisationsfunktion verwendet und somit diese Korrektur automatisch angewandt.

4.4 Zerofilling

Wegen der endlichen Abstände der Stützpunkte des Interferogramms und des daraus berechneten Spektrums kann es vorkommen, dass schmale Banden, die zwischen den Stützstellen liegen, mit verringerter Amplitude wiedergegeben werden. Dieser Fehler kann durch folgenden Trick ausgeglichen werden: Vor der Durchführung der Fourier-Transformation werden an das Interferogramm Nullen angehängt (Zerofilling). Dies entspricht einer Näherung eines Interferogramms, das bei höherer spektraler Auflösung (d.h. längerem Spiegelweg) aufgenommen wurde. Dadurch wird der Abstand zwischen den Punkten des Spektrums kleiner, allerdings ohne dass sich die spektrale Auflösung verbessert. Auf diese Weise wird zwischen den Stützstellen des Spektrums interpoliert.

Zerofilling wird bei der Messung mit dem FT-Spektrometer automatisch angewandt.

4.5 Auflösungsverbesserung

Die Amid-I-Bande von Proteinen besteht meist aus mehreren Banden, die für die verschiedenen Sekundärstrukturen charakteristisch sind. Diese Einzelkomponenten überlappen sich zu einer breiten konturlosen Bande. Daher werden Verfahren angewandt, um das Spektrum in die Einzelkomponenten aufzulösen, also um das Spektrum zu entwirren (Dekonvolution). Hierbei handelt es sich nicht um eine tatsächliche nachträgliche Verbesserung der spektralen Auflösung, sondern um Methoden, die die Feinstruktur des Spektrums hervorheben. Drei Methoden werden hier vorgestellt und ihre Effekte auf eine Absorptionsbande beschrieben.

4.5.1 Höhere Ableitungen

Es ergibt sich jeweils eine schmalere Bande, die bei der 2. Ableitung ein negatives Vorzeichen hat, bei der 4. Ableitung ein positives.

- **Vorteil:** lässt sich fast mit jedem Programm durchführen (z.B. auch mit *Excel*).
- **Nachteil:** prominente Seitenbanden mit anderem Vorzeichen, die die Interpretation bei komplizierteren Spektren erschweren.

4.5.2 Fourier-Selbstdekonvolution

Man nutzt die Eigenschaft der Fouriertransformation, bzw. des Interferogramms aus, dass die Information über die Feinstruktur des Spektrums bei großen Spiegelauslenkungen registriert wird. Wenn man diesen Teil des Interferogramms stärker gewichtet, ist daher die Feinstruktur im Spektrum stärker hervorgehoben, die Banden erscheinen schärfer. Man macht dies, indem man das Interferogramm $I_0(x)$ mit einer Gewichtsfunktion $G(x)$ (Exponentialfunktion) multipliziert: $I = I_0(x) \cdot G(x)$ (dabei bedeutet x die Spiegelposition).

- **Vorteil:** Die Banden im bearbeiteten Spektrum haben das gleiche Vorzeichen, wie im unbearbeiteten.
- **Nachteil:** Man braucht spezielle Programme, 2 Parameter sind frei wählbar, was zu einer gewissen Subjektivität des Ergebnisses führt. Überdekonvolution mit dem Auftreten von Artefakten ist möglich.

4.5.3 Feinstrukturverstärkung

Wenn man vom Originalspektrum eine geglättete Version des gleichen Spektrums abzieht, wird die Grobstruktur eliminiert und die Feinstruktur bleibt übrig. Die Banden werden schärfer. Zur Vermeidung von negativen Nebenbanden wird das geglättete Spektrum mit einem Faktor (≤ 1 , etwa 0.9) multipliziert.

- **Vorteil:** die Banden im bearbeiteten Spektrum haben das gleiche Vorzeichen wie im unbearbeiteten. Lässt sich fast mit jedem Programm durchführen (z.B. auch mit *Excel*). "Auflösevermögen" vergleichbar wie bei der Fourier-Selbstdekonvolution.
- **Nachteil:** Das Auftreten von Artefakten ist ebenfalls möglich.

4.6 Durchführung einer Sekundärstrukturanalyse

Bei einer Messung mit dem FT-Spektrometer werden die Daten automatisch fouriertransformiert, dabei werden die Korrekturverfahren *Apodisation* und *Zerofilling* automatisch angewandt. Trotz der weiter unten aufgeführten Probleme ist die Übereinstimmung der Infrarotergebnisse mit den aus der Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Sekundärstrukturanteilen recht gut. Die maximalen Abweichungen sind etwa 15%. Zu bedenken ist auch, dass es auch bei der Analyse der Kristallstruktur bis zu 20% Abweichungen in den Sekundärstrukturanteilen gibt, je nach Definition der Kriterien für die Sekundärstrukturen. Die Infrarotspektroskopie eignet sich insbesondere dazu, β -Faltblattstrukturen zu detektieren.

Probleme:

- Der Schluss von Bandenpositionen auf die Sekundärstruktur ist nicht eindeutig. Dies führt insbesondere bei hochhelikalen Proteinen zu Fehlern. Die α -Helix erzeugt offensichtlich (und theoretisch nachvollziehbar) nicht nur eine Bande bei 1654 cm^{-1} sondern auch Nebenbanden bei niedrigeren Wellenzahlen. Diese werden aber in der Sekundärstrukturanalyse einem β -Faltblatt zugeordnet.
- Die Extinktionskoeffizienten der Sekundärstrukturelemente werden oft als gleich angenommen. Dies ist insbesondere falsch für die beiden Banden des β -Faltblatts. Die hochfrequente Bande bei 1684 cm^{-1} ist wesentlich schwächer als die bei 1633 cm^{-1} .
- Der Abzug der Wasserbande (H_2O) im Amid-I-Bereich ist nicht ganz einfach und beeinflusst die relativen Flächenanteile der angefitteten Kurven. Daher werden die Experimente oft in D_2O durchgeführt, welches im Bereich der Amid-I-Bande nicht so stark absorbiert.
- Im Bereich der Amid-I-Bande absorbieren auch Seitengruppen, die etwa 15-20% der Absorption ausmachen können. Ein Abzug dieses Beitrags ist problematisch, weil die Absorption der Seitenketten von ihrer Umgebung im Protein abhängt.
- Wenn man das aus dem Fit rekonstruierte Spektrum so bearbeitet wie das Originalspektrum, sollte natürlich das Gleiche herauskommen. Dies wird oft nicht kontrolliert.

4.7 Sekundärstrukturanteile einiger Proteine

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Sekundärstrukturanteile einiger Proteine, die aus einer Röntgenstrukturanalyse gewonnen wurden.

Tabelle 4.1: Sekundärstrukturanteile einiger Proteine.

Proteine	α-Helix	β-Faltblatt	Schleifen	Sonstiges
Myoglobin	77-88	0	7-12	7-11
Phosphorylasekinase	30	23	20	27
Papain	26-29	22-29	18-23	25-30
Alkoholdehydrogenase	25-29	36-40	19	12-20
Trypsin Inhibitor	21-26	26-45	16-24	13-29
Elastase	10	40-47	26-28	16-24
Chymotrypsinogen	12	49	23	16
9-Chymotrypsin	8-11	35-50	25-27	14-30
Trypsinogen	9	56		
Concanavalin	2-3	44-65	22-25	10-28

Anmerkung: Man beachte die z.T. erheblichen Unsicherheiten bei den Sekundärstrukturanteilen durch unterschiedliche Definitionen der Sekundärstrukturen.

5 Versuchsdurchführung

Für die Versuchsdurchführung werden Proben von Poly-L-Lysin, Papain und Myoglobin verwendet.

Poly-L-Lysin (M(Poly-L-Lysin) ca. $6kDa$)

Wird zur Trennung/Aufreinigung von Proteinen aus Zellen verwendet sowie in der Genetik beim Arbeiten mit DNA/RNA (z.B. als Beschichtung für Objektträger).

Papain (M(Papain) ca. $23kDa$, mehr als 230 Aminosäuren)

Das Enzym Papain (siehe Abb.5.1) wird vorwiegend aus dem Milchsaft des Melonenbaums (*Carica papaya*) gewonnen. Es wird verwendet als Zusatz zu Reinigungsmitteln, als Weichmacher für Fleisch, zur Entfernung von Trübstoffen in Bier, zur Wundheilung, zur Senkung der Viskosität in Tiernahrung. Es hat eine allgemein milde, beruhigende Wirkung auf den Magen und hilft bei der Verdauung von Proteinen.

Myoglobin (M(Myoglobin) ca. $18 kDa$, 153 Aminosäuren)

Myoglobin (siehe Abb.5.1) wird z.B. aus Pferdeherz gewonnen, es ist ein Hämhaltiges Protein, das eine hohe Affinität zu Sauerstoff hat. Es dient der Speicherung von Sauerstoff in den Muskeln und gibt den Muskeln die rote Farbe.

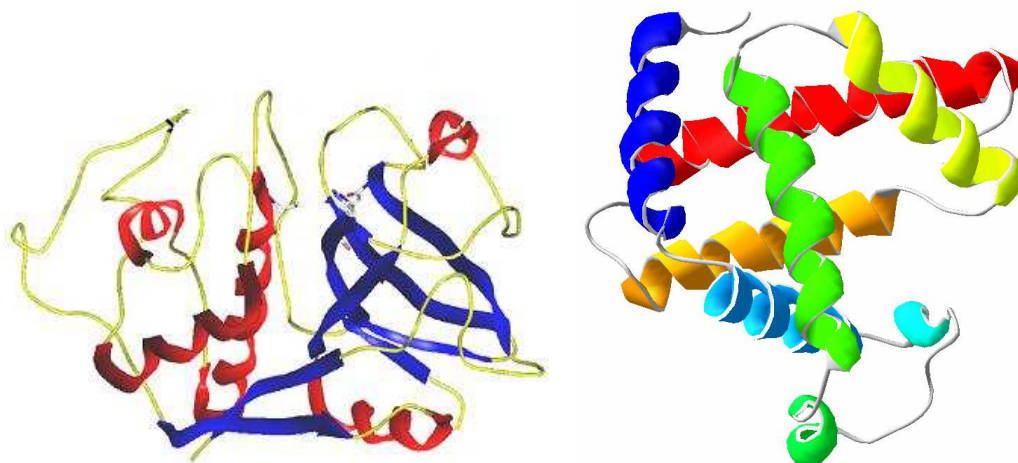


Abbildung 5.1: Struktur von Papain (links) und Myoglobin (rechts).

5.1 Präparation der Proben

Folgende Proben werden benötigt:

- **Poly-L-Lys**, 2 mg gelöst in 100 μl D₂O Phosphatpuffer pD 7.4 für Standard-Küvette
- **Poly-L-Lys**, 4 mg gelöst in 200 μl D₂O Phosphatpuffer pD 7.4 (für Durchfluss-Küvette)
- **Papain**, 1 mg gelöst in 100 μl D₂O Phosphatpuffer pD 7.4 für Standard-Küvette
- **Myoglobin**, 1.5 mg gelöst in 100 μl D₂O Phosphatpuffer pD 7.4 für Standard-Küvette

Berechnen Sie die einzelnen Konzentrationen der Proben!

Zur Messung werden für eine 20 mm Standardküvette (siehe Abb.5.2) mit einer Schichtdicke von ca. 45 μm etwa 50 μl Probenflüssigkeit benötigt, bei Verwendung der Durchflussküvette etwa 100 μl Probenflüssigkeit.

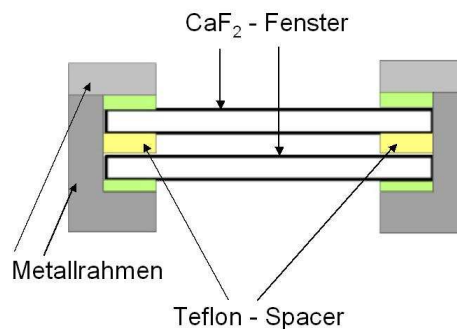


Abbildung 5.2: Aufbau einer Standard-Küvette.

5.2 Bedienung FTIR

Zur Ansteuerung des FTIR-Spektrometers wird das Programm OPUS verwendet. Nach dem Starten des Programms werden im Menü *Measure/Advanced Measurement* die Mess-Parameter eingestellt. Als Messbereich wird 4000 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1} gewählt, für die Wellenlängenauflösung 2 cm^{-1} . Es empfiehlt sich zunächst als Pfad für die Dateien den lokalen Pfad *D:f1prakt* anzugeben. Die Daten liegen zunächst in Binärform vor, können aber unter dem Menüpunkt *File/Save as* auch im ASCII-Format in Form einer Tabelle abgespeichert werden. Zur weiteren Verarbeitung der Daten können diese später auf das Home-Verzeichnis */home/diverse/f1prakt* kopiert

werden und von dort aus auf eine von uns gestellte CD gebrannt oder auf einen von Ihnen mitgebrachten USB-Stick kopiert werden.

Es wird immer zunächst eine Hintergrundmessung sowie anschließend eine Probenmessung durchgeführt. Falls Sie am Step-Scan-FT-Spektrometer arbeiten, dann achten Sie bitte darauf, dass Sie die richtigen Werte für Probenposition und Hintergrundposition eingeben. Dies ist abhängig von der Position des Probentisches im Spektrometer.

5.3 Vorversuche

- Nehmen Sie ein Spektrum auf mit einer leeren Küvette ohne Probe bei geöffnetem Probenraum. Dabei sollte sich die Küvette nicht im Strahlengang befinden (sog. Leerspektrum). Diskutieren Sie die beobachteten Absorptionsbanden mit dem Betreuer.
- Schließen Sie den Probenraum, fahren Sie die Küvette in den Strahlengang und öffnen Sie die Trockluftzufuhr. Wiederholen Sie die vorgehende Messung mehrmals im Abstand von ca. 5 Minuten. Diskutieren Sie die Ergebnisse. Bestimmen Sie die erforderliche Wartezeit für möglichst rauscharme Absorptionsspektren.
- Nehmen Sie ein Absorptionsspektrum von H_2O und D_2O , sowie einer D_2O -Probe mit einer kleinen, definierten Verunreinigung von H_2O auf. Verwenden Sie dazu eine feine Spritze um eine Verunreinigung mit H_2O von ca. 1% zu erreichen.

5.4 Die Amid-I-Bande von Proteinen

Nehmen Sie die Absorptionsspektren in D_2O mit einer Wellenlängenauflösung von 2 cm^{-1} von folgenden Proteinen auf:

- Papain und Poly-L-Lysin als Vertreter für Proteine mit gemischten Sekundärstrukturanteilen.
- Myoglobin als Vertreter für Proteine mit hohem Helixanteil.

Verwenden Sie zunächst bei allen Messungen die Standard-Küvetten.

Für Poly-L-Lysin sollen zusätzlich (unter Anleitung durch den Betreuer) zwei Serien von Messungen, bei einer Auflösung von 1 cm^{-1} , bzw. 2 cm^{-1} mit der Durchfluss-Küvette durchgeführt werden. Dazu sind jeweils folgende Einzelmessungen notwendig:

- Hintergrundmessung: Küvette mit Lösungsmittel aus Strahlengang entfernen, Absorptionsspektrum mit Küvette aufnehmen
- Küvette mit Lösungsmittel als Hintergrundspektrum aufnehmen

- Lösungsmittel abpumpen, Poly-L-Lysin-Lösung einfüllen, Absorptionsspektrum aufnehmen (automatische Lösungsmittel-Korrektur) Von erhaltenem Spektrum mit 1 cm^{-1} Auflösung Interferogramm zusätzlich abspeichern
- Küvette aus Strahlengang entfernen, Hintergrundspektrum ohne Küvette im Strahlengang und Absorptionsspektrum aufnehmen

5.5 CO₂ Absorption

Verwenden sie die Gasküvette und erstellen Sie zunächst eine Hintergrundmessung. Blasen Sie dann über einen Schlauch kräftig hinein und nehmen Sie damit eine Messung auf.

Vorsicht: dabei kann sich leicht Kondenswasser bilden. Um dies zu vermeiden kann man eine Kühlspirale in den Schlauch einbauen um so den H₂O-Dampfdruck abzusenken.

Wiederholen Sie das Vorgehen nachdem Sie 20 Kniebeugen gemacht haben. Wiederholen Sie die Messung nachdem Sie in die Küvette einen Tropfen Ethanol gegeben und die Küvette mit Trockenluft nachgespült haben.

6 Auswertung

Im folgenden sind die Auswertungen der Messungen beschrieben. Optionale Auswertungen sind mit einem “*” markiert und werden nur bei herausragenden Leistungen erwartet. Zur Auswertung benötigen Sie ein Programm, mit dem Sie Spektren darstellen und bearbeiten können. Dies kann z.B. mit *Gnuplot* (siehe Anhang A.3) durchgeführt werden, das für jede gängige Computerplattform kostenlos verfügbar ist. Sie können aber auch jedes andere Plot-Programm verwenden, das eine ASCII-Tabelle als Quelldaten akzeptiert. Sie können die Auswertung entweder in Schriftform abgeben, oder aber auch als ps-, oder pdf-Dokument per Email einsenden (Adresse siehe Anhang A.4).

Abbildung 6.1 zeigt einige beispielhafte Messungen von Papain, Poly-L-Lysin, Myoglobin sowie der Lösungsmittel H₂O und D₂O.

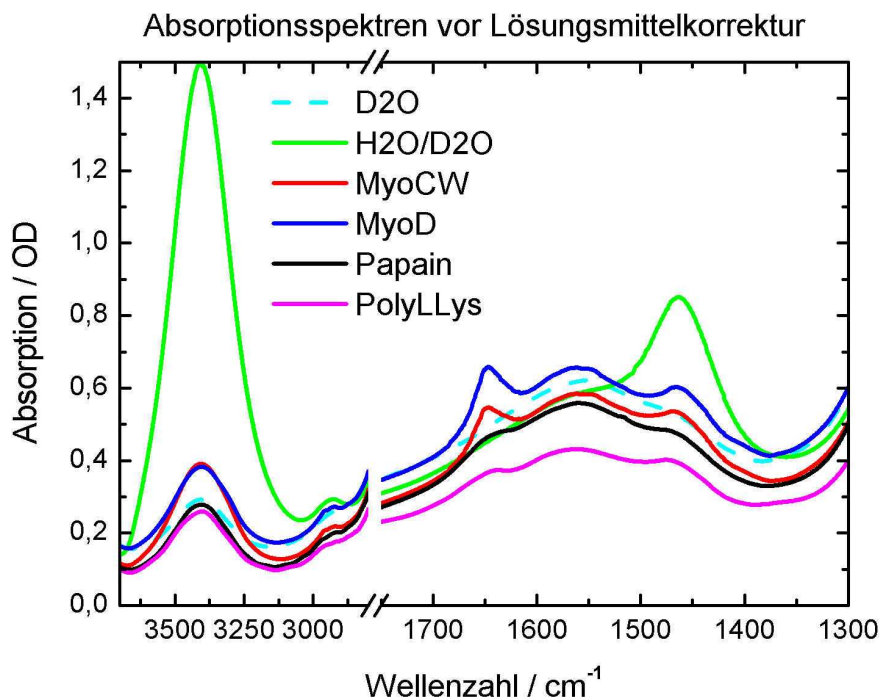


Abbildung 6.1: Beispiele für Spektren.

6.1 Vorversuche

- Diskutieren Sie die Spektren (FTIR offen, geschlossen mit Trockenluftspülung).
- Bestimmen Sie die erforderliche Wartezeit für möglichst rauscharme Absorptionsspektren.
- Bestimmen Sie aus den Strukturen des Leerspektrums die Dicke des Probenraums der Küvette.
- Bestimmen Sie ein reines Absorptionsspektrum von D₂O.
- Bestimmen Sie ein reines Absorptionsspektrum von HDO in D₂O.
- Schätzen Sie die HDO-Konzentration der D₂O-Probe ab.

6.2 Die Amid-I-Bande von Proteinen

- Diskutieren Sie einen möglichen H₂O-Gehalt der Papain-, Poly-L-Lysin und Myoglobin-Proben an Hand der Spektren.
- Subtrahieren Sie von den Proben das Hintergrundspektrum des Puffers und führen Sie gegebenenfalls eine HDO-Korrektur durch. Lokalisieren Sie die typischen Banden der Proben im Bereich von etwa 1400 cm^{-1} bis ca. 1700 cm^{-1} , sowie die Amid-A-Bande.
- Weshalb eignen sich andere Wellenlängenbereiche nicht zur Auswertung?
- Wenden Sie die Methoden zur Auflösungsverbesserung nach 3.5.1 und 3.5.3 für die Messung mit Poly-L-Lysin in der Durchfluss-Küvette an. Führt dies zu einer Verbesserung? Warum bzw. warum nicht?
- * Wenden Sie die Korrektur nach 3.5.2 für die Messung mit Poly-L-Lysin in der Durchfluss-Küvette an. Verwenden Sie dabei für die Gewichtsfunktion $G(x)$ folgende Form:

$$G(x) = \left(1 - \frac{|x|}{L}\right) \cdot e^{2\pi k|x|^r}$$

Dabei bedeutet x die Spiegelposition, L ist ein Abschneideparameter, k gibt die Breite der zu dekonvolutierenden Banden an. Mit dem Parameter r ($1 < r < 2$) kann eine stufenlose Variation zwischen einem Lorentz- und einem Gaußprofil realisiert werden. Diskutieren Sie die Ergebnisse.

- Treffen Sie nach Möglichkeit eine Zuordnung für die Einzelbanden (siehe Tab. 6.1) der auflösungsveresserten Spektren für Poly-L-Lysin in der Durchfluss-Küvette.
- Analysieren Sie nun das wie oben auf Puffer und HDO korrigierte Absorptionsspektrum im Amid-I-Bereich von Papain, Poly-L-Lysin (Standard-Küvette und Durchfluss-Küvette) und Myoglobin. Machen Sie zunächst eine Basislinienkorrektur, indem Sie eine gerade Linie zwischen den Absorptionswerten bei 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} einzeichnen und die Fläche darunter abziehen. Dies kann als ein näherungsweise grobes Subtrahieren der Seitenkettenabsorption angesehen werden.
- Fitten Sie das so korrigierte Absorptionsspektrum mit einem Multi-Gauss-Fit. Benutzen Sie dazu als Startwerte für den Fit die Angaben in Tabelle 6.1. Starten Sie den Fit zunächst mit den vorgegebenen Zentralwellenlängen und der FWHM. Optimieren Sie in einem zweiten Schritt den Fit durch freigeben dieser Parameter. Integrieren Sie nun die Fitkomponenten und bestimmen Sie daraus die Sekundärstrukturanteile. Dabei wird näherungsweise angenommen, dass die Extinktionskoeffizienten für die Hauptbande der verschiedenen Sekundärstrukturen gleich sind. Die hochfrequenten Nebenbande der β -Faltblattstruktur sollen bei diesem Verfahren ignoriert werden, weil man sonst den β -Flächenanteil doppelt zählen würde.
- * Vergleichen Sie dieses Ergebnis mit dem, das Sie erhalten, wenn Sie einfach das Absorptionsspektrum in den oben genannten Grenzen integrieren und aus den so erhaltenen Flächen die Sekundärstrukturanteile ermitteln (z.B. Integral von 1645 cm^{-1} bis 1662 cm^{-1} ist der Flächenanteil, der α -helikalen Strukturen zugeordnet wird). Ignorieren Sie den Bereich zwischen 1682 cm^{-1} und 1689 cm^{-1} .
- Diskutieren Sie Ihre Werte im Vergleich zu denen aus der Röntgenstrukturanalyse (Tab. 4.1), sowie Probleme und Fehlerquellen der Sekundärstrukturanalyse mittels Infrarotspektroskopie.
- Vergleichen Sie für Poly-L-Lysin die Messung in der Standard-Küvette mit der Messung in der Durchfluss-Küvette. Welche Methode liefert zuverlässigere Ergebnisse? Warum?
- Beschreiben Sie Vor- und Nachteile der Meßmethoden mit der Standard-Küvette und der Durchfluss-Küvette.

6.3 CO₂ Absorption

Vergleichen Sie die verschiedenen Spektren, diskutieren Sie die Unterschiede.

Tabelle 6.1: Typische Wellenlängenbereiche von Sekundärstrukturen.

Wellenlängenbereich	Wellenlänge	FWHM	Struktur
1613 – 1637 cm^{-1}	1632	20	β -Faltblatt
1637 – 1648 cm^{-1}	1640	20	Ungeordnet
1648 – 1662 cm^{-1}	1655	20	α -Helix
1662 – 1682 cm^{-1}	1675	20	Schleifen
1682 – 1689 cm^{-1}	1685	20	β -Faltblatt

Anhang

A.1 Optische Dichte

Die optische Dichte ergibt sich aus dem Lambert-Beerschen Gesetz, das die Absorption von Strahlung beim Durchgang durch ein homogenes Medium beschreibt:

$$I = I_0 10^{-\epsilon c d} \quad (\text{A.1})$$

wobei I_0 die Intensität der einfallenden Strahlung, I die Intensität der Strahlung nach dem Durchgang durch das homogene Medium mit dem Extinktionskoeffizienten ϵ , der Konzentration c und der Dicke d beschreibt.

Den Exponenten fasst man zur dimensionslosen Größe der optischen Dichte "OD" zusammen.

A.2 Proben

A.2.1 Präparation des Puffers

Für die Proben ist ein Phosphat-Puffer mit dem pH-Wert 7.4 erforderlich. Für diesen Puffer wird KH_2PO_4 und K_2HPO_4 benötigt. Der pH-Wert des Puffers ergibt sich aus den Konzentrationen zu (Henderson-Hasselbach-Gl.):

$$pH = pK_s + \lg \frac{[Base]}{[Säure]} \quad (\text{A.2})$$

Für pK_s ergibt sich aus der Literatur:

$$pK_s(\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-}) = 7.2 \quad (\text{A.3})$$

Setzt man dies in Gl. zusammen mit dem pH-Wert ein, so ergibt sich:

$$\lg \frac{[Base]}{[Säure]} = 0.28 \quad (\text{A.4})$$

Damit ergibt sich:

$$\frac{[Base]}{[Säure]} = 1.6 \quad (\text{A.5})$$

oder

$$[Säure] = 1 \text{ mM} \quad (\text{A.6})$$

$$[Base] = 1.6 \text{ mM} \quad (\text{A.7})$$

Für die Molgewichte ergibt sich:

Puffer	Molgewicht
KH_2PO_4	136.1
K_2HPO_4	174.2

Die Konzentration c errechnet sich aus dem Molgewicht M , der molaren Masse m dem Volumen V und der Anzahl der gelösten Teilchen n :

$$c = \frac{n}{V} \quad (\text{A.8})$$

$$n = \frac{m}{M} \quad (\text{A.9})$$

$$c = \frac{m}{M V} \quad (\text{A.10})$$

Es wurden bereits 100 ml des Puffers hergestellt, dieser befindet sich im Exikator im Labor Z20 in einer kleine Glasflasche. Bitte Puffer nur mit einer Spritze entnehmen, Verschluß nicht öffnen, um eine Kontaminierung mit H_2O möglichst gering zu halten.

A.2.2 Präparation der Proben

Zur Probenpräparation stehen verschiedene Proteine im Tiefkühlschrank (-20°C) zur Verfügung. Tabelle A.2 gibt einen Überblick über die Proteine und die empfohlenen Konzentrationen. Um eine Verunreinigung der Proben möglichst gering zu halten wurde jeweils eine kleinere Menge aus dem Originalgebinde in einen kleinen Glasbehälter abgefüllt (Sekundärproben). Bitte zur Probenpräparation nur die Sekundärproben benutzen, Originalgebinde stets im Kühlschrank lagern.

Tabelle A.2: Verwendete Proteine.

Protein	Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
Myoglobin	1.5
Papain	1.0
Poly-L-Lysin	2.0

Für einen Versuch wird jeweils ein Probenvolumen von ca. $100\mu\text{l}$ benötigt. Zum Abwiegen die Probenwaage im Chemielabor benutzen. Dabei jeweils ein Wägebepapier auf die Waage auflegen. Da die Genauigkeitsgrenze der Waage bei ca. 0.5 mg liegt, müssen Sie sehr vorsichtig und genau arbeiten. Zunächst Wägebepapier auflegen, Waage neu austarieren. Dann erforderliche Menge aus dem Gefäß auf das Wägebepapier aufbringen (vorsichtig rausschütteln, evtl. kleinen Spatel verwenden). Diese Menge dann in ein Gefäß geben, anschließend zur Kontrolle Wägebepapier nochmals wiegen und über diese Differenzmessung die eingebrachte Probenmenge bestimmen. Falls das genaue Abwiegen nicht gelingt kann das Probenvolumen auch verdoppelt werden. Zum Schluß Probe mit der erforderlichen Menge Pufferlösung mit einer Spritze auffüllen. Probe verschließen und beschriften.

A.3 Gnuplot

Gnuplot ist ein interaktives Plotprogramm, das für alle gängigen Betriebssysteme (Unix, Linux, MacOS, Windows, VMS) zur freien Verfügung steht. Mit *Gnuplot* können Daten aus ASCII-Dateien in 2D oder 3D-Darstellung geplottet werden. Die Ausgabe der Plots kann auf eine Vielzahl von Geräten/Formaten erfolgen (z.B. X11-Terminal, ASCII-Terminal, Drucker, PS-Datei, PDF-Datei, Latex-Quellcode, PNG-Format). Neben der interaktiven Steuerung ist es auch möglich, *Gnuplot* über ein Shell-Skript zu steuern. Tab. A.3 gibt eine Liste der Dokumentation zu *Gnuplot*.

Tabelle A.3: Download und Dokumentation zu *Gnuplot*.

Download	http://www.gnuplot.info/download.html
Homepage	http://www.gnuplot.info
Dokumentation allgemein	http://www.gnuplot.info/documentation.html
ausführliches Handbuch (PDF)	http://www.gnuplot.info/docs/gnuplot.pdf
Online Handbuch (HTML)	http://www.gnuplot.info/docs/gnuplot.html
sehr gute Kurzanleitung (PDF)	http://www.duke.edu/hpgavin/gnuplot.html

Im folgenden werden an einem Beispiel-Spektrum (FTIR-Spektrum von KBr) einige Plotmöglichkeiten mit *Gnuplot* gezeigt.

Hier ein kurzer Ausschnitt aus der Datei kbr.dat:

```
#
# KBr-Testmessung FTIR
# 10.03.2005
#
7500.54795 1.63501
7498.61930 1.57173
7496.69064 1.57159
7494.76198 1.56722
7492.83333 1.58188
7490.90467 1.60738
7488.97601 1.60447
7487.04735 1.60584
7485.11870 1.62005
7483.19004 1.62905
7481.26138 1.62015
7479.33272 1.61253
7477.40407 1.61675
7475.47541 1.61231
7473.54675 1.59585
7471.61810 1.58244
7469.68944 1.57952
7467.76078 1.58853
7465.83212 1.59771
```

```
7463.90347 1.61704
7461.97481 1.65929
```

Diese Daten können nach dem Aufruf von Gnuplot mit dem Kommando **plot** geplottet werden:

```
gnuplot> plot "kbr.dat" using 1:2 title 'KBr'
```

Dies erzeugt einen Plot der Daten in einem Standardfenster. Zur Gestaltung des Plots können die folgenden Kommandos verwendet werden:

Titel:	> set title "KBr Daten"
Bezeichnung der X-Achse:	> set xlabel "Wellenlaenge"
Bezeichnung der Y-Achse:	> set ylabel "Absorption"
Daten-Bereich der X-Achse:	> set xrange [0.001:0.005]
Daten-Bereich der Y-Achse:	> set yrange [20:500]
automatische Skalierung:	> set autoscale
Eine Markierung setzen:	> set label "Marke" at 0.003, 260
Alle Markierungen löschen:	> unset label
Logarithmische Skalierung:	> set logscale
Logarithmische Skalierung Y-Achse:	> unset logscale; set logscale y
Setzen der Skalierung X-Achse:	> set xtics (0.002,0.004,0.006,0.008)
Automatische Ticks X-Achse:	> unset xtics; set xtics auto

Die Daten könne über folgendes Skript geplottet werden:

```
# Gnuplot script file for plotting data in file "kbr.dat"
# This file is called  'kbr.gpl'
set autoscale                # scale axes automatically
unset log                    # remove any log-scaling
unset label                  # remove any previous labels
set xtic auto                # set xtics automatically
set ytic auto                # set ytics automatically
set title "KBr-Testmessung 10.03.2005 FTIR"
set xlabel "Wellenlänge [cm-1]"
set ylabel "Absorption"
set key 0.01,100
set label "Yield Point" at 0.003,260
set arrow from 0.0028,250 to 0.003,280
set xr [0.0:0.022]
set yr [0:325]
plot "kbr.dat" using 1:2 title 'Column' with linespoints , \
```

Das Ergebnis zeigt Abb. A.2.

Die Umlenkung des Plots in eine Postscript-Datei wird mit folgenden Kommandos erreicht:

```
gnuplot> set out 'plotfile.ps'
gnuplot> set size 1.0, 0.4
gnuplot> set terminal postscript portrait enhanced linewidth 2.0 "Helvetica" 14
gnuplot> replot
```

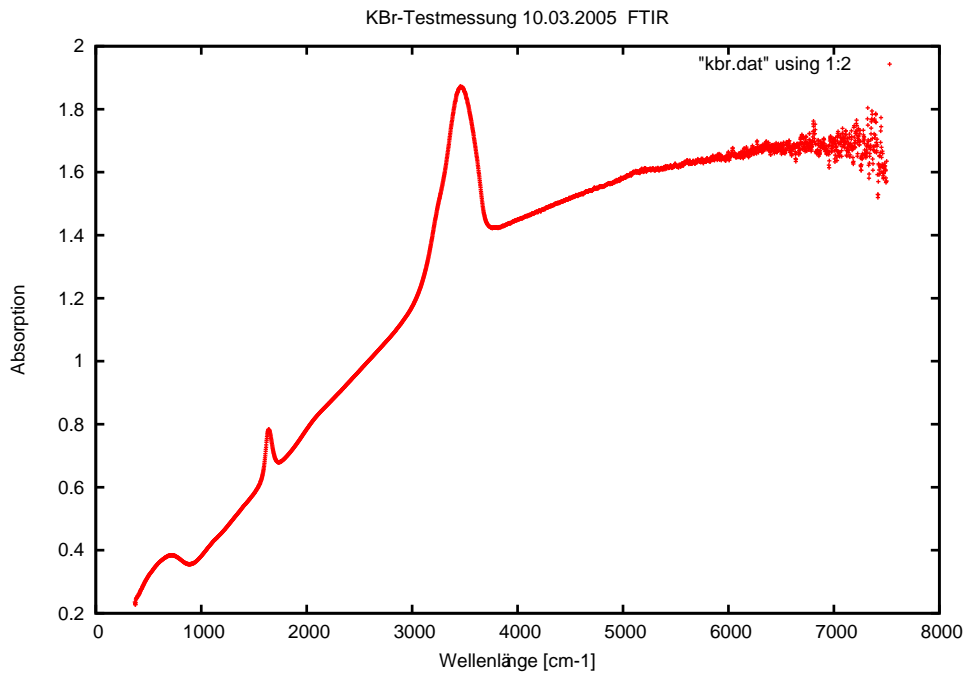


Abbildung A.2: KBr-Testmessung

An das Spektrum läßt sich eine beliebige Funktion mit folgenden Kommandos fitten:

```
f1(x) = a*tanh(x/b)           # define the function to be fit
a = 300; b = 0.005;          # initial guess for a and b
fit f1(x) 'force.dat' using 1:2 via a, b
```

Dies ergibt für a und b die folgenden Fit-Parameter: $a = 1.25567$, $b = 0.005$

Ein Plot der Daten zusammen mit der gefitteten Kurve erfolgt durch:

```
plot "kbr.dat" using 1:2 title 'KBr-Testmessung' with points 3, \
    a * tanh( x / b ) title 'fit: A=1.25567, B=0.005', \
```

Daten lassen sich auch mit Bezierkurven oder Splines glätten. Um den Datensatz geglättet zu plotten wird einfach nach dem plot-Kommando die Glättungsfunktion angegeben:

```
plot 'kbr.dat' using 1:2:(0.00001) smooth acsplines
```

Dabei gibt der Wert in Klammern das Gewicht der einzelnen Punkte an: Je kleiner der Wert, desto mehr Punkte werden bei der Berechnung der Splines mit einbezogen. Bei kleinen Werten wird also die Kurve glatt, bei großen Werten folgt sie immer genauer den einzelnen Datenpunkten. Abb. A.3 zeigt den gleichen Datensatz geglättet mit Splines.

Die geglätteten Daten können auch wieder in eine ASCII-Datei ausgegeben werden zur weiteren Verarbeitung. Dazu muss lediglich vor dem Glätten der Output in eine Tabelle umgelenkt werden:

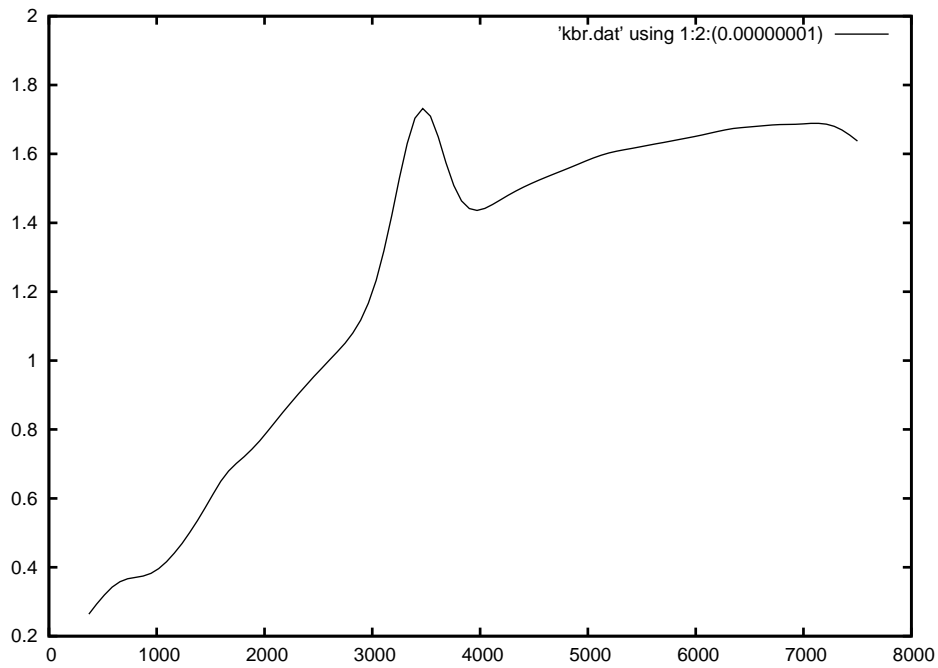


Abbildung A.3: KBr-Testmessung geglättet

```
set terminal table
set out 'kbrSmooth.dat'
plot 'kbr.dat' using 1:2:(0.00001) smooth acsplines
```

A.4 Abgabe der Auswertung

Bitte senden Sie die Auswertung an folgende Adresse (schriftlich oder per Email):

=====
Dr. Karl-Heinz Mantel
Lehrstuhl fuer BioMolekulare Optik
Sektion Physik der Ludwig-Maximilians-Universitaet
Oettingenstrasse 67, Raum C0.11 (Sekretariat Raum Z0.15)
D-80538 Muenchen

Phone: +49-89-2180-9234 (Buero) Fax: +49-89-2180-999234
 +49-89-2180-9201 (Sekretariat)
Email: Karl-Heinz.Mantel@physik.uni-muenchen.de
=====

Abbildungsverzeichnis

3.1	Struktur und Entstehung einer Peptidbindung durch Abspaltung von H_2O	6
3.2	Schematische Darstellung der Peptidbindung.	6
3.3	Schematische Darstellung der α -Helix.	7
3.4	Schematische Darstellung der β -Faltblattstruktur.	8
3.5	Schematische Darstellung von Aminosäureseitenketten.	10
4.1	Interferometer	12
5.1	Struktur von Papain (links) und Myoglobin (rechts).	18
5.2	Aufbau einer Standard-Küvette.	19
6.1	Beispiele für Spektren.	22
A.2	KBr-Testmessung	31
A.3	KBr-Testmessung geglättet	32

Tabellenverzeichnis

3.1	Wellenzahl und Wellenlänge.	5
3.2	Amid-I-Moden verschiedener Sekundärstrukturelemente.	9
4.1	Sekundärstrukturanteile einiger Proteine.	17
6.1	Typische Wellenlängenbereiche von Sekundärstrukturen.	25
A.2	Verwendete Proteine.	28
A.3	Download und Dokumentation zu <i>Gnuplot</i>	29

Index

- α -Helix, 4, 15
- β -Faltblatt, 5, 15
- β -Faltblattstruktur, 15
- Amid-I-Bande, 7, 8, 13, 15
- Amid-I-Schwingung, 7
- Amid-II-Bande, 8
- Aminosäure, 5, 8
 - Seitenketten, 6
- Aminosäureseitenketten, 8
- Apodisation, 12, 14
- Bandenverschiebung, 7
- C-C Streckschwingung, 8
- C-N Streckschwingung, 8
- C=O-Moden, 6
- Feinstrukturverstärkung, 14
- Fourier-Selbstdekonvolution, 14
- Fourier-Transform Spektrometer, 10
- Fourier-Transformation, 12
- Gnuplot, 27
- Interferogramm, 10, 12
- Küvette
 - Durchfluß , 19
 - Gas , 19
 - Standard , 19
- Laserschutz, 1
- Michelson-Interferometer, 10, 11
- Myoglobin, 16, 17, 26
- N-H Biegeschwingung, 8
- Papain, 16, 17, 26
- Peptid, 4
- Peptidgruppe, 7
- Phosphat-Puffer, 25
- Poly-L-Lysin, 17, 26
- Polypeptidkette, 5
- Primärstruktur, 4
- Probenpräparation, 26
- Protein, 4
- Protonierung, 6
- Röntgenstrukturanalyse, 6
- Ramanspektroskopie, 10
- Sekundärstruktur, 4
- Sekundärstrukturanalyse, 14
- Sekundärstrukturanteile, 15, 16
- Sekundärstrukturelemente, 8
- Solvation, 8
- Strukturaufklärung, 6
- Wasserbande, 6
- Wasserstoffbrückenbindung, 4
- Wellenzahl, 4
- Zerofilling, 13, 14