

**SPEKTROSKOPISCHE STRUKTURANALYTIK
SYNTHETISCHER POLYPEPTIDE**

Dissertation

zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius–Maximilians–Universität Würzburg

vorgelegt von
Renate Petry
aus Würzburg

Würzburg 2002

Eingereicht am **22.04.2002**

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

1. Gutachter: **Prof. Dr. W. Kiefer**

2. Gutachter: **Prof. Dr. D. Palm**

der Dissertation.

1. Prüfer: **Prof. Dr. W. Kiefer**

2. Prüfer: **Prof. Dr. D. Palm**

der mündlichen Prüfung.

Tag der mündlichen Prüfung: **19.06.2002**

Dedicated to the memory of

JAPIE VERMEULEN

(10.04.1957 – 11.02.2001)

He would never have believed he would be so missed by so many people.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Aufbau und Struktur der Proteine	5
2.1	Die Bausteine der Proteine	5
2.2	Sekundärstrukturelemente	7
2.2.1	Helix- und Faltblattstrukturen	10
2.2.2	β -Schleife	12
2.2.3	<i>Random coil</i> -Konformation	12
2.2.4	<i>Cis-trans</i> -Isomerasen	12
2.3	Vorhersagen von Sekundärstrukturen	14
3	Grundlagen der spektroskopischen Experimente	21
3.1	Circular-Dichroismus	21
3.2	Raman-Spektroskopie	25
3.2.1	Mikro-Raman-Spektroskopie	27
3.2.2	FT-Raman-Spektroskopie	29
3.3	Grundlagen der NMR-Spektroskopie	30
3.3.1	Kernspin, Energiequantelung und Resonanzbedingung	31
3.3.2	Gleichgewichtsmagnetisierung	33
3.3.3	Bloch-Gleichungen und Relaxationsprozesse	36
3.3.4	Chemische Verschiebung und Spin-Spin-Kopplung	38
3.3.5	Aufbau des NMR-Spektrometers	40
3.4	Strukturuntersuchungen an Proteinen und Polypeptiden	41
3.4.1	Extrazelluläre Schleife des GnRH-Rezeptors	41
3.4.2	Alanin-Prolin-Polypeptide	46
3.4.3	Helikale Modellpeptide	48
4	Materialien und Methoden	51
4.1	Eingesetzte Chemikalien und Pufferlösungen	51
4.2	Festphasenpeptidsynthese	53
4.3	Aufreinigen der Proben	55
4.4	Probenverifizierung mit Massenspektrometrie	55

4.5	Absorptionsmessungen	57
5	Resultate und Diskussion	59
5.1	Extrazelluläre Schleife des GnRH-Rezeptors	59
5.1.1	Vorbemerkungen und Motivation	59
5.1.2	ECL3-Peptid des GnRH-Rezeptors	61
5.1.3	CD-Spektroskopie am ECL3-Peptid	63
5.1.4	Mikro- und FT-Raman-Spektroskopie am ECL3-Peptid	67
5.1.5	2D-NMR-Spektroskopie	74
5.1.6	Struktur-Funktions-Relationen am GnRH-Rezeptor	76
5.1.7	<i>Molecular Modeling</i> Experiment	79
5.1.8	Zusammenfassung und Diskussion	80
5.2	Alanin-Prolin-Polypeptide	82
5.2.1	Probenaufbereitung mit HPLC	84
5.2.2	Strukturanalyse mit CD-Spektroskopie	85
5.2.3	Vorbemerkungen zur Raman-Spektroskopie an gelösten und an festen Proben	86
5.2.4	Raman-Spektroskopie an Polypeptidlösungen	89
5.2.5	Raman-Spektroskopie am Feststoff	96
5.2.6	Bedingungen der quantitativen Konformationsanalyse	98
5.2.7	Spektrenauswertung	102
5.2.8	Ergebnisse der Konformationsanalyse	106
5.2.9	Strukturaufklärung mit ^1H -NMR-Spektroskopie	110
5.2.10	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse	124
5.3	Helikale Modellpeptide	126
5.3.1	Vorbereitende Analysen mit MS und HPLC	128
5.3.2	CD-Spektroskopie an Modellpeptiden	129
5.3.3	Auswertungen der Mikro-Raman-Spektroskopie	130
5.3.4	Ergebnisse der 2D-NMR-Spektroskopie	132
5.3.5	Quantitative Konformationsanalyse	134
5.3.6	<i>Molecular Modeling</i> Experiment	139
5.3.7	Sekundärstrukturvorhersagen	141
5.3.8	Sekundärstrukturuntersuchungen an Alanin-Prolin- und helikalen Modellpeptiden im Vergleich	144
6	Zusammenfassung	147
	Summary	151
	Literaturverzeichnis	155
	Abkürzungen und Symbole	169

Anhang

175

Publikationsverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

Kapitel 1

Einleitung

Proteine sind die funktionalen Bausteine des Lebens, die in den Zellen von Organismen an vielen biologischen Prozessen beteiligt sind. Sie sind durch eine große Zahl von Genen in der DNA codiert. Mit der Transkription wird die genetische Information, die Basensequenz der DNA, auf eine Boten-RNA umgeschrieben. Im nachfolgenden Translationsschritt wird die Information übernommen und in der Synthese von Proteinen exprimiert. Der Aufbau von Proteinen geschieht an Ribosomen, einem Komplex aus Ribonukleinsäuren und Proteinen, in dem die 20 „natürlichen“ Aminosäuren durch die Bildung kovalenter Peptidbindungen zu einer linearen Kette verknüpft werden.

Seit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms, in der die Abfolge der Bausteine in den Erbmolekülen nahezu vollständig abgelesen wurde, interpretiert man die struktur-determinierenden Faktoren und Interaktionen in Proteinen als den zweiten Teil des genetischen Codes, dessen Entzifferung noch nicht abgeschlossen ist. Während und unmittelbar nach der Proteinbiosynthese am Ribosom faltet sich die Polypeptidkette in eine charakteristische, dreidimensionale Struktur. Bei einigen Proteinen wird der Faltungsprozess katalytisch durch Hilfsproteine (Enzyme, Chaperone) unterstützt, aber prinzipiell ist die eigentliche Triebkraft für den dreidimensionalen Aufbau einzig in der Aminosäuresequenz und in den daraus resultierenden intramolekularen Wechselwirkungen enthalten.

Die Struktur von Proteinen wird neben der linearen Aminosäuresequenz, oder der Primärstruktur, durch höhere Strukturmerkmale bestimmt. Mit den verschiedenen Sekundärstrukturtypen, wie beispielsweise der α -Helix, dem β -Faltblatt oder dem β -turn, werden sich wiederholende Muster zu operationalen Einheiten zusammengefasst, die in Proteinen zum Aufbau von Tertiärstrukturen beitragen. Änderungen in der Primärstruktur beeinflussen den schnellen, spontan ablaufenden Prozess der Faltung und die korrekte räumliche Anordnung der Strukturelemente, von denen die funktionellen Eigenschaften von Proteinen in eindeutiger Weise determiniert werden.

Der experimentelle Aufwand, der bei den Untersuchungen zum Proteinfaltungsproblem betrieben wird, liegt nicht allein in rein akademischem Forschungsinteresse begründet. Aus dem vertieften Verständnis über die komplexen Beziehungen zwischen Struktur und Funktion von Biomolekülen verspricht sich die Forschung Entwicklungspotenziale auf dem Gebiet der Biotechnologie und in der modernen Wirkstoffentwicklung.

In der vorliegenden Arbeit werden drei komplementäre spektroskopische Methoden zur Untersuchung der Sekundärstruktur von synthetischen Polypeptiden eingesetzt. Dabei kommen in erster Linie die Messung des Circular-Dichroismus und die Raman-Spektroskopie zum Einsatz, die detaillierte Informationen über die Konformation und über Konformationsänderungen liefern können. Die Analysen werden durch die zweidimensionale Kernspinresonanzspektroskopie ergänzt, die zu den etablierten Methoden in der Strukturaufklärung mit atomarer Auflösung zählt.

Die Auswahl der synthetischen Polypeptide lässt unterschiedliche Motivationen und Zielsetzungen erkennen. Die durchgeführten Experimente sollen einerseits einen Beitrag für die Grundlagenforschung zum Proteinfaltungsproblem und andererseits für die biomedizinische Forschung liefern. Der erste Arbeitsabschnitt konzentriert sich auf das Fragment eines Membran-gebundenen Rezeptors, der für die Freisetzung des Hormons Gonadotropin verantwortlich ist. Im Vordergrund dieser Studien steht die Analyse der Struktur-Funktions-Beziehungen zwischen dem Hormon und der dritten extrazellulären Schleife des Hormonrezeptors (GnRH-R). Das Gonadotropin-freisetzende Hormon und der korrespondierende Rezeptor GnRH-R nehmen in Säugetieren und beim Mensch eine zentrale Rolle in der Reproduktionssteuerung ein. Der GnRH-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), deren morphologische Verwandtschaft sich im Wesentlichen an den sieben transmembranen Helices manifestiert. Von einem Vertreter der GPC-Rezeptoren, dem Rhodopsin, sind die transmembranen Bereiche mit Hilfe der Röntgenkristallographie und der NMR-Spektroskopie aufgeklärt, so dass prinzipiell Analogieschlüsse über die Struktur anderer Rezeptoren gezogen werden können. Allerdings zeigen die intra- und extrazellulären Bereiche des Rhodopsin-Rezeptors ein hohes Maß an Flexibilität und infolgedessen ist die Übertragbarkeit ihrer Strukturelemente weniger gesichert.

Aus theoretischen Simulationsexperimenten wurde vorhergesagt, dass in der dritten extrazellulären Schleife des GnRH-Rezeptors eine α -helikale Konformation vorliegen würde, wodurch die Wechselwirkungen bei der Ligand-Rezeptor-Bindung beeinflusst werden würde. Diese Aussage sollte in den spektroskopischen Untersuchungen verifiziert werden und zu einer Verfeinerung des molekularen Modells des Hormon-Rezeptors beitragen. Der behandelte Fragenkomplex ist im Bereich der endokrinologischen Forschung angesiedelt und verfolgt als langfristiges Ziel die synthetische Herstellung von Peptidanaloga mit therapeutischen und kontrazeptiven Eigenschaften.

Das zweite Gebiet beschäftigt sich mit synthetischen Polypeptiden, bei denen im einen Fall die Kettenlänge und im anderen Fall die Sequenz systematisch verändert wurde. In einer kleinen Serien aus Penta-, Hexa- und Heptapeptiden konzentrierten sich die Strukturuntersuchungen auf die Peptidyl-Prolyl-Bindung und auf die Detektion von Konformationsänderungen, die durch die Verlängerung der Kettenlänge ausgelöst werden.

Für eine weitere Serie von Polypeptiden wurden ausgewählte Sequenzen entworfen und synthetisiert, deren Primärstruktur auf einen hohen Anteil von α -helikaler Konformation schließen lässt. In den Sequenzen wurden einzelne Aminosäuren ausgetauscht, um den Gehalt an helikaler Struktur systematisch zu variieren. Für den quantitativen Nachweis von Konformationsänderungen wurde eine Methode aus der Raman-Spektroskopie angewendet, bei der die Intensitätsänderungen charakteristischer, struktur-sensitiver Raman-Linien ausgewertet und analysiert wurden.

Die Gliederung der Arbeit sieht im *Kapitel 2* eine Einführung in die Systematik und Terminologie aller Sekundärstrukturtypen vor, die an den synthetischen Polypeptiden untersucht wurden. Darüber hinaus werden die Besonderheiten der Peptidyl-Prolyl-Bindung im Zusammenhang mit den Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen und ein Algorithmus zur Vorhersage von Sekundärstrukturen kurz vorgestellt. Das *Kapitel 3* beschreibt die physikalischen Grundlagen der CD-, Raman- und NMR-spektroskopischen Methoden. Ein separater Abschnitt stellt die synthetischen Polypeptide vor und erörtert die damit verknüpften Strategien und Zielsetzungen der durchgeführten Strukturuntersuchungen. Das *Kapitel 4* umfasst die Probenherstellung mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese sowie einige technische Aspekte der eingesetzten Chemikalien und Pufferlösungen. Bei den Vorbereitungen der experimentellen Arbeiten wurden die Hochdruckflüssigkeitschromatographie und die Massenspektrometrie eingesetzt, deren Prinzipien in einem Überblick vorgestellt werden. Die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen werden im *Kapitel 5* im Kontext diskutiert, dessen Inhalt das *Kapitel 6* abschließend zusammenfasst.

Kapitel 2

Aufbau und Struktur der Proteine

Proteine sind Makromoleküle, die aus den 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren über kovalente Bindungen zu Polymeren aufgebaut sind. Sie nehmen eine zentrale Position in fast allen biologischen Prozessen ein. Ihre Funktionen sind vielfältig und an ein breites Aufgabenspektrum angepasst. Aus der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms ergeben sich 30000 bis 50000 Gene, die für eine nahezu gleichgroße Zahl von Proteinen codiert. Diese Zahl erhöht sich um ein Vielfaches, wenn systematische Rekombinationen und Mutationen hinzugerechnet werden.

Das folgende Kapitel gibt eine Einführung in den Proteinaufbau und stellt die wichtigsten Begriffe und Definitionen der Sekundärstrukturen vor, die für die durchgeführten spektroskopischen Analysen in dieser Arbeit Relevanz haben.

2.1 Die Bausteine der Proteine

Die dreidimensionale Gestalt von Proteinen wird als Tertiärstruktur bezeichnet, die sich wiederum in wiederholende Muster, die Sekundärstrukturen, unterteilen lässt. In der Primärstruktur, der Aminosäuresequenz der Polypeptidkette, wird bereits die dreidimensionale Struktur festgelegt. In ihr bilden die kovalenten Amidbindungen der Peptidgruppen mit ihrem partiellen Doppelbindungscharakter die starren Elemente der Kette. Freie Beweglichkeit und Zusammenfaltung der Polypeptidkette ist nur über Drehungen um die Einfachbindungen des Peptidrückgrates der C–C_α– und der C_α–N–Bindungen möglich.

Die Struktur und die Funktion von Proteinen stehen in einer kausalen Beziehung zueinander, wie sich beispielhaft anhand des Prion-Proteins demonstrieren lässt. Nach der umstrittenen Hypothese wandelt sich das natürliche, zelluläre Prion-Protein entweder spontan oder möglicherweise durch einen Kaskadenprozess ausgelöst um und wird dadurch zum Erreger von lethalen, spongiformen Enzephalopathien (z. B. Creutzfeldt–Jakob–Erkrankung, Scrapie, Rinderwahnsinn) [1, 2].

Die 20 natürlichen Aminosäuren sind als molekulare Bausteine mit unterschiedlicher relativer Häufigkeit am Aufbau der Proteine beteiligt. Das Molekulargewicht M_r der Aminosäuren erstreckt sich über eine Bandbreite von 57 bis 186 Da; das gewichtete Mittel liegt bei etwa 110 Da. Somit besteht ein mittelgroßes Protein mit $M_r = 33$ kDa aus ca. 300 Aminosäuren. Alanin ist nach dem Glycin mit 71 g/mol die zweitkleinste der Aminosäuren und tritt in Proteinen mit der größten Häufigkeit auf. Die Alanin-Reste mit der kleinen CH_3 -Seitenkette sind meist am Aufbau von Helixstrukturen beteiligt (s. Tab. 2.4).

Tabelle 2.1: Notation und Eigenschaften der 20 natürlichen Aminosäuren mit Drei-Buchstaben-Abkürzungen, Einbuchstabensymbol, relativer Häufigkeit in Proteinen (in %), Molekulargewicht pro Rest bei pH 7,0 (in Da), pK-Werten der Seitenketten, sowie der α -COOH-Gruppe und der α - NH_3^+ -Gruppe bei 25 °C. Nach [3], S. 2 und [4], S. 43.

Aminosäure	Abkürzung		Relative Häufigkeit [%]	M_r [Da]	pK-Wert (25 °C)		
					Seitenkette	α -COOH-Gruppe	α - NH_3^+ -Gruppe
Alanin	Ala	A	13,0	71		2,3	9,9
Glutaminsäure	Glu	E	10,8	128	4,3	2,2	9,7
Glutamin	Gln	Q	10,8	128			
Asparaginsäure	Asp	D	9,9	114	3,9	2,0	10,0
Asparagin	Asn	N	9,9	114			
Leucin	Leu	L	7,8	113			
Glycin	Gly	G	7,8	57		2,4	9,8
Lysin	Lys	K	7,0	129	10,8	2,2	9,2
Serin	Ser	S	6,0	87		2,1	9,2
Valin	Val	V	6,0	99		2,3	9,6
Arginin	Arg	R	5,3	157	12,5	1,8	9,0
Threonin	Thr	T	4,6	101			
Prolin	Pro	P	4,6	97			
Isoleucin	Ile	I	4,4	113			
Methionin	Met	M	3,8	131			
Phenylalanin	Phe	F	3,3	147		1,8	9,1
Tyrosin	Tyr	Y	2,2	163	10,9	2,2	9,1
Cystein	Cys	C	1,8	103	8,3	1,8	10,8
Tryptophan	Trp	W	1,0	186			
Histidin	His	H	0,7	137	6,0	1,8	9,2

Alle Aminosäuren haben identischen Aufbau: am α -Kohlenstoff (C_α) sind je eine Aminogruppe, eine Carboxylgruppe, ein H-Atom und eine Seitenkette (Rest) gebunden. Aus der tetraedrischen Anordnung der vier unterschiedlichen Gruppen um das C_α -Atom, dem Chiralitätszentrum, resultiert die optische Aktivität der Aminosäuren. Die beiden Enantio-

mere werden als D- und L-Isomere bezeichnet. Eine Ausnahme bildet die Aminosäure Glycin, bei der die Asymmetrie der tetraedrisch angeordneten Substituenten von der Seitenkette (H-Atom) aufgehoben wird. Proteine sind ausschließlich aus den L-Stereoisomeren aufgebaut. Lediglich in kleinen Peptiden von Bakterienzellwänden, sowie in Peptidantibiotika und -analoga kommen die D-Isomere vor. Sofern nicht ausdrücklich darauf hingewiesen wird, sind in den folgenden Betrachtungen immer die L-stereoisomeren Aminosäuren angesprochen.

Die Seitenketten sind das Unterscheidungskriterium der Aminosäuren hinsichtlich ihrer Größe, Gestalt, Ladungsverteilung, chemischen Reaktivität und ihrer intrinsischen Präferenzen zur Ausbildung von H-Brückenbindungen. Unter den verschiedenen Kategorien, nach denen man die Aminosäuren gruppieren kann, bietet sich im folgenden Zusammenhang diejenige an, welche die Bedeutung der Seitenketten für die dreidimensionale Proteinstruktur berücksichtigt. Demnach unterscheidet man die polaren von den apolaren Resten der Aminosäuren. Betrachtet man die Polarität nach aufsteigender Größe ihrer Seitenketten angeordnet, so gehören Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin zu den apolaren Aminosäuren. Weitere apolare Vertreter sind die beiden Aromaten Phenylalanin und Tryptophan, sowie die schwefelhaltige Aminosäure Methionin. Alle diese Reste sind hydrophob und neigen dazu, sich zusammenzulagern, indem sie Wassermoleküle verdrängen. Hydrophobe Seitenketten meiden den Kontakt mit Wasser und wirken dabei stabilisierend auf die dreidimensionale Raumstruktur von Proteinen [4].

Prolin hat eine sekundäre Aminogruppe und nimmt eine besondere Rolle ein. Die Iminosäure Prolin besitzt eine Seitenkette, die sowohl mit dem Stickstoffatom als auch mit dem C_α -Atom verbunden ist. Prolin ist hydrophil und findet sich in Proteinen häufig in Knickpunkten oder am Ende helikaler Sekundärstrukturen.

Die polaren Reste lassen sich weiter unterteilen in Gruppen mit ungeladener, positiv oder negativ geladener Seitenkette. Vertreter der Gruppe mit polaren, ungeladenen Seitenketten sind Glycin, Serin, Threonin, Cystein und Tyrosin. Durch die Ladungen auf den Seitenketten werden die Aminosäuren stark hydrophil. Bei pH 6–7 weisen die Asparaginsäure und die Glutaminsäure negative Ladung auf. Positiv geladen sind die polaren Reste des Lysins, des Arginins und des Histidins. In wässriger Lösung liegen die Aminosäuren als dipolare Ionen (Zwitterionen) vor.

2.2 Sekundärstrukturelemente

Aus Polypeptidketten aufgebaute Proteine haben eine definierte, dreidimensionale Struktur, deren Konformation durch die Aminosäuresequenz bestimmt wird. Die Konformation der Proteine wiederum legt die Funktion und die biologische Aktivität fest. Die Aminosäuren sind über Peptidbindungen (Amidbindungen) zwischen den α -Aminogruppen und den α -Carboxylgruppen miteinander verknüpft. Die Peptideinheit ist starr und planar (Abb. 2.1), da die Bindung partiellen Doppelbindungscharakter besitzt [5]. Der Ab-

stand zwischen den C'- und den N-Atomen ist um 10 % geringer als gewöhnlich und liegt zwischen dem der C-N-Einfachbindung (0,149 nm) und der C-N-Doppelbindung (0,127 nm). Dies lässt sich mit Isomerieeffekten zwischen den beiden Grenzstrukturen I und II (Abb. 2.1) begründen.

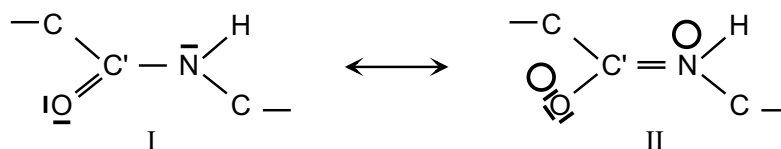


Abbildung 2.1: Elektronische Struktur der planaren Peptidbindung mit partiellem Doppelbindungscharakter. Die C'-N-Bindung der Struktur I (**links**) enthält nur axialsymmetrische π -Elektronen und kann frei rotieren. In der Struktur II (**rechts**) wird die Rotation um die C'-N-Doppelbindung von den σ - und π -Elektronen und deren starkem Dipolmoment verhindert. Nach [3], S. 18.

Innerhalb der Peptideinheit wird dadurch eine freie Rotation um die Bindung zwischen dem C'-Atom der Carboxylgruppe und dem N-Atom der Aminogruppe verhindert. Die Hybridstruktur enthält 60 % der Struktur I und 40 % der Struktur II und bestimmt somit die planaren Eigenschaften der Peptidbindung. Die Flexibilität der Peptidkette in Proteinen kommt erst durch die Rotationsfreiheit der Bindungen beiderseits der starren Amidbindung zustande (Abb. 2.2). Die Konformation einer Polypeptidkette wird über die dihedralen Winkel ψ und ϕ der beiden Bindungen am C_α -Atom beschrieben (s. Tab. 2.2 und Abb. 2.2). Der Torsionswinkel ω ist wegen der Resonanzstruktur fixiert und wird bei der Beschreibung der *cis*-Konfigurationen in Polypeptidbindungen (s. Kap. 2.2.4) herangezogen. Der vierte Winkel, χ , definiert die Orientierung zwischen dem α - und dem β -Kohlenstoff der Seitenkette (vgl. Abb. 2.2). Die Null-Positionen der Konformationswinkel wurden 1969 durch die IUPAC-Kommission wie folgt definiert:

Tabelle 2.2: Definition der Konformationswinkel ω , ψ , ϕ und χ in Polypeptidketten aus der Festlegung durch die IUPAC-Kommission, 1969 [6].

$$\begin{aligned} \omega_i = 0 & \quad \text{für } C_i^\alpha - C'_i \quad \textit{cis} \quad \text{zu } N_{i+1} - C_{i+1}^\alpha, \\ \psi_i = 0 & \quad \text{für } C'_i - N_i \quad \textit{trans} \quad \text{zu } C'_i - O_i, \\ \phi_i = 0 & \quad \text{für } C_i^\alpha - C'_i \quad \textit{trans} \quad \text{zu } N_i - H_i, \\ \chi_i^1 = 0 & \quad \text{für } C_i^\alpha - N_i \quad \textit{cis} \quad \text{zu } C_i^\beta - O_i^\gamma. \end{aligned}$$

Die Torsionswinkel ψ und ϕ legen die relative Orientierung zweier benachbarter Peptidgruppen zueinander fest. Für beide Winkel sind prinzipiell beliebige Werte zwischen 0° und 360° möglich. Die räumliche Struktur einer Polypeptidkette erzeugt sterische Einschränkungen, so dass nur begrenzte Winkelbereiche tatsächlich realisiert sind. Die graphische Auftragung der erlaubten dihedralen Winkelpaare ϕ - und ψ wird im Ramachandran-Diagramm (Abb. 2.3) erfasst [7].

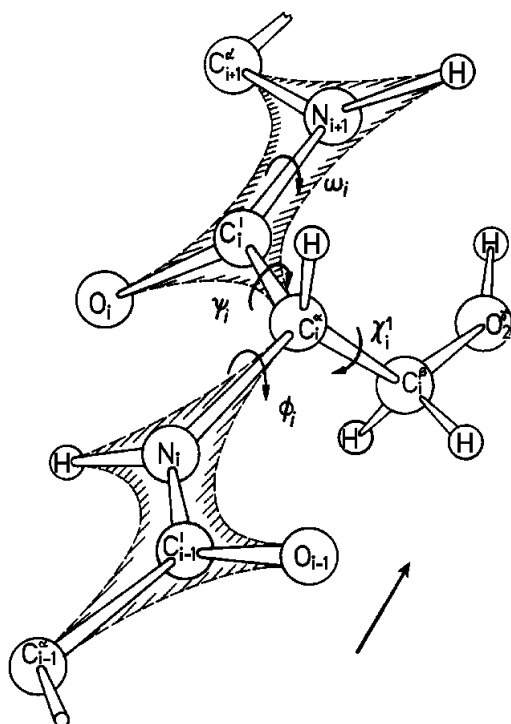


Abbildung 2.2: Perspektivische Darstellung der Konformationswinkel ω , ψ , ϕ und χ aus einer Polypeptidkette mit zwei Peptidbindungen. Der Pfeil zeigt entlang des Peptidrückgrats in die Richtung vom N- zum C-Terminus. In den schraffierten Flächen sind die 6 Atome angedeutet, die in der *trans*-Konfiguration mit $\omega = 180^\circ$ in einer Ebene liegen. In dieser Darstellung sind die angegebenen Drehrichtungen von ω , ψ und ψ jeweils positiv (= im Uhrzeigersinn) definiert, wenn der Betrachter von einem Atom am N-Terminus ausgehend in Richtung des C-Terminus blickt. Nach [3], S. 19.

Aus der graphischen Auftragung der **Abbildung 2.3** lassen sich erlaubte und nicht-erlaubte Winkelbereiche für die dihedralen Winkel ablesen und für die Zuordnung von Sekundärstrukturen entnehmen. Die empirisch ermittelte Verteilung zeigt die größte Dichte für das Winkelpaar ($\phi \simeq -60^\circ$, $\psi \simeq -60^\circ$) in rechtshändigen Helices und ein weiteres Dichtemaximum bei ($\phi \simeq -90^\circ$, $\psi \simeq +120^\circ$), das mit β -Faltblattstrukturen korrespondiert.

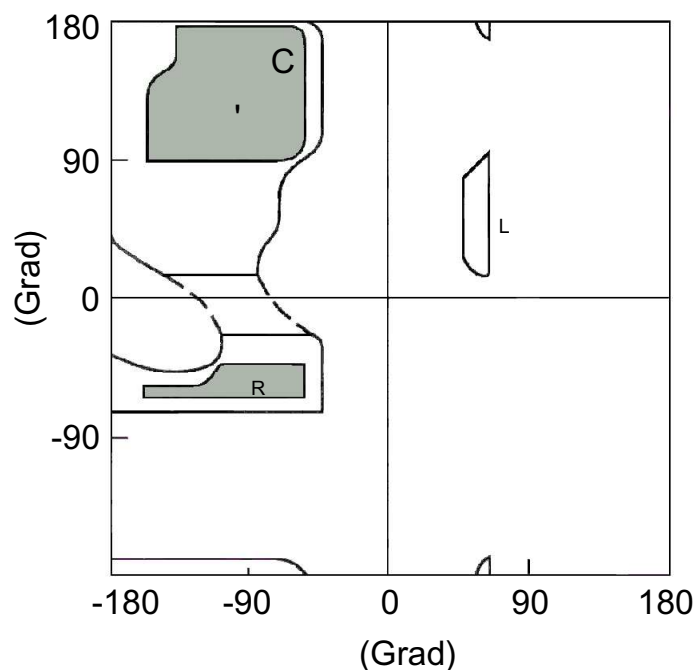


Abbildung 2.3: Konfigurationsraum von Proteinen und Polypeptiden (Ramachandran-Diagramm) mit den sterisch erlaubten (grau schattiert) und teilweise erlaubten Regionen (unterbrochene Linien) für die dihedralen Winkel ϕ und ψ . Die linkshändige α -Helix (α_L) ist zwar aus sterischen Gründen erlaubt, tritt jedoch in Proteinen nicht auf. Sie ist energetisch weniger begünstigt als die rechtshändige Helix (α_R). Nach [8], S. 175.

2.2.1 Helix- und Faltblattstrukturen

Die „klassische“, rechtshändige α -Helix wurde von L. Pauling und R. Corey im Jahr 1951 theoretisch abgeleitet [5]. Helices treten sehr häufig in Proteinen auf und ihre Strukturen sind am intensivsten untersucht. Die α -Helix wird wesentlich durch H-Brücken zwischen der CO-Gruppe der i -ten Peptideinheit und der NH-Gruppe der $(i + 4)$ -ten Einheit stabilisiert (Abb. 2.4). Jedoch muss aus thermodynamischen Studien an Peptiden gefolgert werden, dass dies nicht der einzige stabilisierende Faktor der α -Helixformation ist, sondern dass hydrophobe und weitere Wechselwirkungen einen Beitrag zur Stabilisierung liefern.

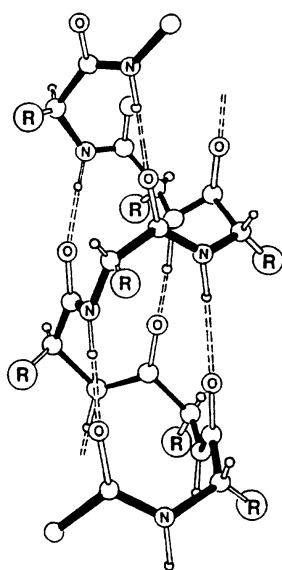


Abbildung 2.4: Modell der klassischen rechtshändigen α -Helix mit 3,6 Aminosäureresten je Drehung. Die stabilisierenden H-Brückenbindungen zwischen den CO- und den NH-Gruppen des Peptidrückgrates verlaufen annähernd parallel zur Helixachse. Die Seitenketten der Aminosäuren (R) zeigen radial nach außen. Nach [8], S. 182.

Die wichtigsten Unterscheidungskriterien in der Abgrenzung gegenüber der 3_{10} -Helix und der π -Helix sind die Anzahl der Reste je Drehung und die Versetzung (*translation*) bzw. die Drehung (*pitch*) je Rest. In Tabelle 2.3 sind die Parameter der regulären Peptidkonformationen nach den Richtlinien der IUPAC-Kommission aufgelistet.

Die Grundstruktur des β -Faltblatts wurde als zweite Struktur im selben Jahr wie die α -Helix von Pauling und Corey aufgeklärt [9]. In Faltblattstrukturen liegen zwei oder mehr Polypeptidketten zickzackförmig nebeneinander, deren Orientierungen (vom N- zum C-Terminus) entweder parallel oder antiparallel zueinander verlaufen können. Im Unterschied zur α -Helix ist die β -Faltblattstruktur weniger intensiv untersucht, wengleich die Häufigkeit von β -Strukturen in Proteinen mit ca. 15 % an zweiter Stelle liegt. In der β -Konformation sind die Polypeptidketten nahezu vollständig ausgestreckt und die Seitenketten der Aminosäuren stehen wechselweise zu der gebildeten Ebene nach außen. Die Bindungen zwischen den C_{α} - und den C_{β} -Atomen sind fast senkrecht zur Faltblattebene (Abb. 2.5). Die flächige Verknüpfung kommt durch H-Brückenbindungen zwischen den CO- und NH-Gruppen verschiedener Polypeptidstränge zustande.

Tabelle 2.3: Parameter der regulären Peptidkonformationen mit den Konformationswinkeln ψ , ϕ und ω für die β -Faltblatt- und Helixstrukturen, sowie für die beiden Konformationen in Prolin-Homopolymeren. Nach [6].

	Torsionswinkel (°)			Reste je Drehung	Versetzung je Rest (Å)
	ϕ	ψ	ω		
antiparalleles β -Faltblatt	-139	+135	-178	2,0	3,40
paralleles β -Faltblatt	-119	+113	180	2,0	3,20
rechtshändige α -Helix	-57	-47	180	3,6	1,50
3_{10} -Helix	-49	-26	180	3,0	2,00
π -Helix	-57	-70	180	4,4	1,15
Polyprolin I	-83	+158	0	3,3	1,90
Polyprolin II	-78	+149	180	3,0	3,12

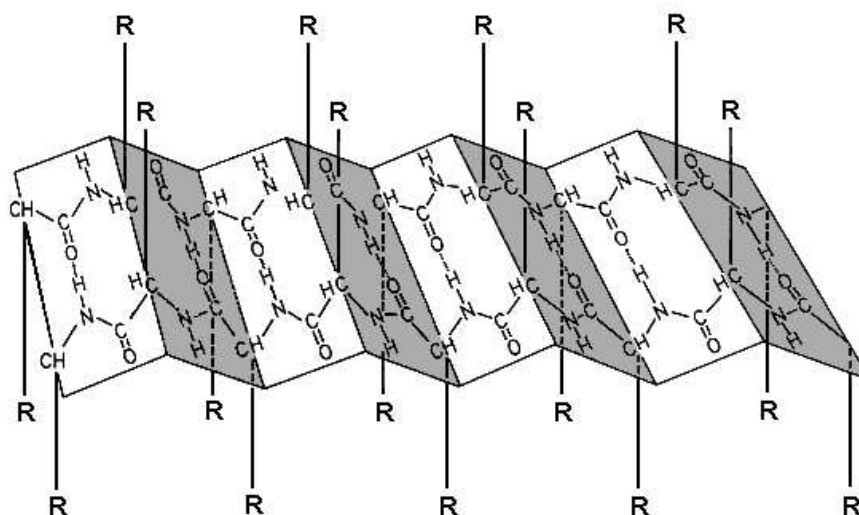


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung einer antiparallelen β -Faltblattstruktur. Die Seitenketten ragen alternierend oberhalb und unterhalb der Faltblattfläche nahezu senkrecht heraus. Die beiden gegensinnig verlaufenden Polypeptidketten sind durch H-Brückenbindungen zwischen den Carboxyl- und den Aminogruppen benachbarter Peptidstränge verbunden.

Nach [10], S. 60.

2.2.2 β -Schleife

An der kompakten, globulären Gestalt von Proteinen sind Richtungsänderungen der Polypeptidkette beteiligt, die durch ein drittes Strukturprinzip, die β -Schleife (β -turn), gebildet werden. Anders als in helikalen Strukturen mit H-Brücken zwischen den Resten n und $n + 4$ ist hier die CO-Gruppe des Restes n durch eine H-Brücke mit der NH-Gruppe des Restes $n + 3$ verknüpft (Abb. 2.6). Dies bewirkt eine Richtungsumkehr der Polypeptidkette um 180° (Haarnadelschleife). β -Schleifen (gelegentlich auch als *reverse turn* bezeichnet) verbinden häufig die benachbarten Stränge antiparalleler Faltblattstrukturen.

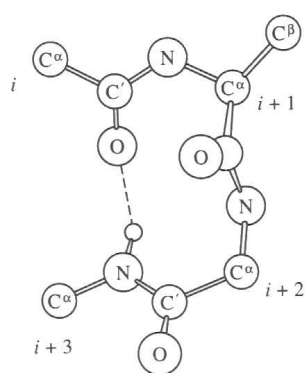


Abbildung 2.6: Struktur einer β -Schleife. Die Wasserstoffbrücke (unterbrochene Linie) zwischen der C–O-Gruppe des ersten Restes (i) und der NH-Gruppe am vierten Rest ($i+3$) verursacht eine abrupte Richtungsumkehr der Polypeptidkette.

Nach [8].

2.2.3 *Random coil*-Konformation

Mit hochkonzentrierten, denaturierenden Reagenzien (z. B. 8 M Harnstoff, 6 M Guanidiniumhydrochlorid) und durch Temperaturerhöhung können die nichtkovalenten Bindungen der Sekundärstrukturen in Proteinen und Polypeptiden zerstört werden. Dabei entstehen zufällige, ungeordnete Knäuelstrukturen, die keine regelmäßigen Struktur motive aufweisen. Eine *random coil*-Struktur entsteht z. B. unmittelbar während und kurz nach der Proteinbiosynthese, bevor der autonome Faltungsprozess von der Primärstruktur zum nativen Protein einsetzt. Neu synthetisierte Proteine können theoretisch alle möglichen Konformationen austesten, bis die einzige, energetisch stabilste gefunden ist. Unter Berücksichtigung der sehr kurzen Zeit von einigen wenigen Sekunden, die für den Faltungsprozess beansprucht wird, ist es unwahrscheinlich, dass das gesamte Faltungsrepertoire durchgespielt wird (s. Kap. 2.3). In vielen Fällen setzt sich die Tertiärstruktur in Proteinen aus mehreren Sekundärstrukturen (Helix, Faltblatt, β -Schleife) und aus Anteilen von *random coil*-Strukturen zusammen.

2.2.4 *Cis-trans*-Isomerasen

Die Peptidbindungen zwischen den 20 proteinogenen Aminosäuren liegen überwiegend in der *trans*-Konfiguration vor. Mit dem Torsionswinkel $\omega = 180^\circ$ ist diese Konfiguration gegenüber *cis* ($\omega = 0^\circ$) im Verhältnis 1000:1 begünstigt (Tab. 2.2), da in der *cis*-Konfiguration die C_α -Atome und die Seitenketten zu nahe beieinanderliegen würden

(sterische Einschränkung). Die Wahrscheinlichkeit spontaner Isomerisierung während der Faltung zur Polypeptidkette ist gering, da die Energiebarriere zwischen *trans* und *cis* mit 84 kJ/mol sehr hoch liegt. Die Ursache dafür liegt im partiellen Doppelbindungscharakter zwischen dem Carboxylkohlenstoffatom und dem Amidstickstoffatom (Abb. 2.1). Beim Prolin allerdings ist die Energiebarriere auf 54 kJ/mol herabgesetzt. Prolin besitzt eine aliphatische Seitenkette mit einer geschlossenen Ringstruktur (Abb. 2.7) und unterscheidet sich darin wesentlich von den übrigen 19 Aminosäuren.

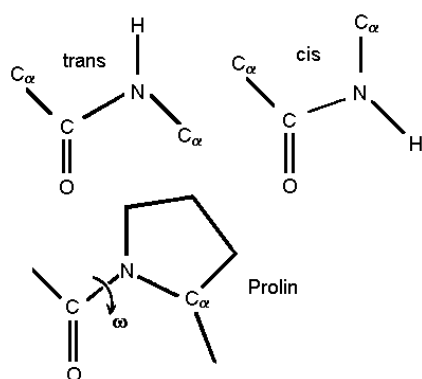


Abbildung 2.7: Mesomeriestrukturen der X-X-Peptidbindung in der *trans*- und in der *cis*-Konfiguration (oben). Der fünfgliedrige Ring des Prolin bewirkt eine sterische Einschränkung des Konformationsraumes der Aminosäure auf der aminoterminalen Seite (unten). Der Konformationswinkel $\omega = 0^\circ$ der *cis*-Konfiguration tritt in X-Pro-Bindungen mit 6,5 % Häufigkeit auf.

Die Seitenkette ist sowohl an das C α -Kohlenstoffatom als auch an das Stickstoffatom gebunden, wodurch aus sterischen Gründen die freie Drehbarkeit um die N-C α -Bindung (s. Torsionswinkel ω der Abb. 2.7, unten) aufgehoben wird. Dadurch besitzt Prolin eine sekundäre Aminogruppe und wird als Iminosäure bezeichnet. Ihr Pyrrolidinring beeinflusst das reguläre Muster in α -helikalen Strukturen und in den Knickpunkten von β -Faltblättern. Anstelle des Amid-Protons befindet sich eine CH₂-Gruppe, wodurch Prolin nicht als Donor für H-Brücken zur Bildung und Stabilisierung von Sekundärstrukturen agieren kann. In α -Helices führt dies zu Musterunterbrechungen (*helix breaker*). Jedoch findet sich ein auffallend hoher Pro-Anteil in transmembranen Regionen von Rezeptorproteinen (vgl. Kap. 3.4.1 und Kap. 5.1), wo es möglicherweise eine Rolle in der Signalübertragung spielt.

Eine Peptidyl-Prolyl-Bindung X-Pro (allgemein auch: -Xaa-Pro-Peptidbindung)¹ zwischen der Iminosäure Prolin und der vorangehenden Aminosäure hat eine deutlich niedrigere Konfigurationspräferenz von 4:1 für *trans* gegenüber *cis*. Von Protein-Kristallstrukturanalysen ist bekannt, dass die X-Pro-Bindung als *cis*-Isomer mit 6,5 % weitaus häufiger auftritt, als in den „normalen“ Peptidbindungen [-C(=O)-NH-] [11]. Ohne die Beteiligung von Prolin findet man in Proteinen nur 0,05 % der Peptidbindungen in der *trans*-Isoform vor.

Die spontane Konformationsumwandlung ist bei der Renaturierung von Proteinen ein langsamer, zeitlich nachgelagerter Schritt [12]. Jedoch kann die Aktivierungsenergie für die *cis-trans*-Isomerisierung durch Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen (PPIasen) um den Faktor 300 herabgesetzt werden. Isomerasen sind Enzyme, die die Umwandlung iso-

¹X steht stellvertretend für eine beliebige Aminosäure verschieden von Prolin.

merer Formen bei der *in-vitro*-Proteinfaltung katalysieren. Aufgrund der herabgesetzten Energiebarriere kontrolliert die Prolin-*cis-trans*-Isomerisierung häufig die geschwindigkeitsbestimmenden Konformationsumwandlungen bei der Proteinfaltung.

2.3 Vorhersagen von Sekundärstrukturen

Das Verständnis der Mechanismen und der Ursachen, die für die Faltung von Proteinen in ihre native Form verantwortlich sind, stehen im Mittelpunkt der Proteinanalytik. Dabei bestimmen zwei Fragen die Ausrichtung der Forschung: Wie bestimmt die Aminosäuresequenz die dreidimensionale Struktur von Proteinen? Durch welche chemischen und physikalischen Prinzipien wird eine neu synthetisierte Polypeptidkette veranlasst, zur biologisch aktiven Raumstruktur zusammenzufalten?

Cyrus Levinthal hat demonstriert, dass kein Molekül auch nur annähernd das gesamte Faltungsrepertoire durchspielen könne, das ihm theoretisch zur Verfügung steht. Wenn man ein vergleichsweise kleines Protein aus 100 Resten betrachtet, bei dem jeder Rest nur drei verschiedene Konformationen einnehmen kann, ergäben sich daraus 3^{100} mögliche Strukturen. Unter der Annahme, dass für das Austesten jeder dieser Konformationen eine Zeit von 10^{-13} s verstreichen würde, wäre eine Suchzeit von $1,6 \times 10^{27}$ Jahren nötig, bis das Protein in seine energetisch günstigste, native Form gefaltet ist. Die Diskrepanz zwischen der theoretischen und der tatsächlichen Zeit, die für das Durchlaufen des großen Konformationsraums bei der Proteinfaltung erforderlich ist, bezeichnet man als das Levinthalsche Paradoxon [13]. Die zugrundeliegenden Prinzipien der Faltungsprozesse in Proteinen sind bis heute nur teilweise verstanden und deren Erforschung wird unter dem Begriff „Proteinfaltungsproblem“ zusammengefasst. Die große Zahl der Ansätze und Erklärungsversuche reflektiert die Komplexität des Problems.

Ein Schlüsselexperiment zur Proteinfaltung haben C. Anfinsen und Mitarbeiter in den späten 1950er Jahren durchgeführt. Sie demonstrierten anhand der Ribonuklease den kausalen Zusammenhang zwischen der Übersetzung von Information, die in der Aminosäuresequenz enthalten ist, und der Faltung des Proteins zur nativen Struktur [14]. Die Ribonuklease ist ein Enzym aus 124 Resten, deren 4 Disulfidbrücken durch Reduktion mit hochkonzentrierten Denaturierungsmitteln (Harnstoff, β -Mercaptoethanol) reversibel gespalten werden können. Auf diese Weise erhält man eine reduzierte, zufällig geknäuelte Polypeptidkette, die jegliche enzymatische Aktivität verloren hat.

Wenn die denaturierenden Reagenzien anschließend wieder langsam durch Dialyse entzogen wurden, konnten die Disulfidbrücken über den Luftsauerstoff allmählich oxidieren, so dass sich nach einiger Zeit das aktive Enzym wieder in seine native Form zurückbildete [15]. Dagegen war nur noch etwa 1% der enzymatischen Aktivität festzustellen, wenn die Ribonuklease unter Anwesenheit von Harnstoff reoxidierte. Dabei bilden sich zahlreiche falsche Disulfidpaare, die Anfinsen mit dem Ausdruck *scrambled protein* bezeichnete. Die acht Cysteine des Enzyms können in 105 verschiedenen Anordnungen mit Disulfidbrücken

verknüpft werden, wobei nur eine einzige davon die enzymatisch aktive Konformation darstellt. Unter Zugabe niedrigkonzentrierter thiolhaltiger Lösung oder geringer Mengen an β -Mercaptoethanol reorganisierten sich die Schwefelbrücken über mehrere Stunden hinweg, so dass das Protein wieder seine native Struktur eingenommen hatte.

Daraus war abzuleiten, dass die native Form zugleich auch die thermodynamisch stabilste Struktur ausbildet. Die Energie für diesen Reorganisationsprozess stammt aus der Reduzierung der Freien Energie, die beim Übergang vom *scrambled protein* zum nativen Protein gewonnen wird. In diesem klassischen Beispiel, wie auch später wiederholt in anderen Experimenten, konnte somit der Nachweis erbracht werden, dass die Aminosäuresequenz die dreidimensionale Proteinstruktur festlegt.

Das amino-terminale Fragment der Rinderpankreas-Ribonuklease A (RNase A), das aus den Resten 1 bis 13 besteht, war das erste Beispiel – und mehrere Jahre lang auch das einzige – bei dem α -Helixbildung bei niedrigen Temperaturen nachgewiesen werden konnte [16]. Das sog. C-Peptid der RNase A bildet eine helikale Region des Enzyms und lässt sich nach Cyanobromid-Abtrennung als isoliertes Peptid und somit als autonome Faltungseinheit studieren. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Helixbildung im C-Peptid durch Änderung der Temperatur, der Ionenstärke und durch organische Lösungsmittel, wie z. B. Trifluorethanol oder Methanol, maßgeblich beeinflussen lässt.

Um die Konformationsänderungen des Peptids unter extremen thermischen und chemischen Bedingungen zu untersuchen, wurde die CD-Spektroskopie eingesetzt. Überraschend war dabei die Beobachtung, dass im untersuchten Temperaturbereich zwischen 1 °C bis 26 °C der Helixgehalt jeweils bei den niedrigsten Temperaturen Maximalwerte erreichte. Zwar ließ sich die Temperaturabhängigkeit der helikalen Peptidkonformation nur in einem begrenzten Intervall studieren, doch selbst bei der tiefsten erreichbaren Temperatur von –13 °C war immer noch eine stetige Zunahme in der Helizität des C-Peptids zu beobachten. Brown und Klee berichteten, dass der temperaturabhängige Effekt noch nicht den Extremwert erreicht zu haben schien [16].

Das zuvor beschriebene temperaturabhängige Verhalten, das in zahlreichen CD-Untersuchungen an anderen helikalen Peptiden wiederholt bestätigt wurde, schränkt das Interpretationspotenzial von CD-Spektren bei thermodynamischen Untersuchungen stark ein. Die Proteinlösungen können mit dieser optischen Methode nur in einem limitierten Temperaturbereich analysiert werden. Bei Denaturierungsexperimenten, in denen der Übergang von der α -Helix zur ungeordneten Struktur beobachtet werden kann (*thermal melting*), ist es nicht möglich, die gesamte Breite des Phasentübergangs vollständig zu erfassen. Dies erschwert die Auswertung von Denaturierungsexperimenten mit Hilfe der CD-Spektroskopie (ebenso wie in der Kalorimetrie durch den Einsatz der *Differential Scanning Calorimetry*). Wichtige thermodynamische Parameter, wie z. B. die Enthalpie ΔH , oder die Änderung der Freien Energie ΔG , können nur näherungsweise mit Hilfe von Extrapolationstechniken ermittelt werden.

In den 1950er Jahren entdeckten Doty und Yang, dass in einigen Homopolymeren helikale Konformation durch Temperaturänderung, Variation des pH-Wertes und durch die Zusammensetzung des Lösungsmittels induziert werden kann [17]. Beispielsweise kann poly-L-Glutaminsäure (PGA) in wässriger Lösung in zwei Formen existieren — entweder als α -Helix unterhalb von pH 4,7 oder als ungeordnete Struktur oberhalb von pH 5,5. Der Übergang zwischen den beiden Zuständen ist stark ausgeprägt, reversibel und zeigt kooperativen Charakter. Die Kooperativität wird von den H-Brückenbindungen zwischen den Resten n und $n+4$ in einer helikalen Polypeptidkette verursacht, wodurch drei weitere Reste $n+1$, $n+2$ und $n+3$ in ihrem Konformationsraum eingeschränkt werden. Beim Denaturieren müssen nach dem Aufbrechen der ersten H-Brücke in einer gegebenen Peptideinheit drei zusätzliche nichtkovalente Bindungen in einem kooperativen Prozess gelöst werden. Diese Überlegungen bilden die Grundlage für ein statistisch-mechanisches Vorhersagemodell (*helix coil transition theory*), deren Grundlagen in der thermodynamischen Theorie der Phasenübergänge verankert sind.

Bei einem Polypeptid, das sich in Lösung befindet, können die Einfachbindungen zwischen den N-C $_{\alpha}$ - und den C $_{\alpha}$ -C'-Atomen aufgrund der vorhandenen thermischen Energie freie Drehungen ausführen. Wenn man für die weiteren Betrachtungen die Rotationsfreiheitsgrade der Seitenketten zunächst außer Acht lässt, besitzt jeder Aminosäurerest zwei Rotationsfreiheitsgrade (ϕ , ψ). Es besteht eine beliebig gering anzunehmende Wahrscheinlichkeit, dass sich drei benachbarte Reste $n+1$, $n+2$ und $n+3$ mit ihren dihedralen Winkeln ϕ und ψ gerade so ausrichten, wie sie im Ramachandran-Diagramm für die α -helikale Region erfasst sind (Abb. 2.3). Unter dieser Voraussetzung kann sich eine H-Brücke zwischen den Resten n und $n+4$ ausbilden und einen Nukleationsprozess zur Entstehung von helikaler Sekundärstruktur auslösen. Für den ersten Nukleationsschritt beim Zusammenfallen einer Polypeptidkette müssen insgesamt 6 dihedrale Winkel immobilisiert werden. Sobald sich der Faltungskern (Nukleus) geformt hat, ist die Wahrscheinlichkeit für den Aufbau jeder weiteren H-Brücke deutlich erhöht, da im nachfolgenden Propagationsprozess nur jeweils ein zusätzliches dihedrales Winkelpaar fixiert werden muß, um eine weitere H-Brücke zu bilden und zur Strukturstabilisierung beizutragen.

Das spontane Entstehen von α -Helices in Polypeptidketten ist ein Ereignis mit einer äußerst geringen Wahrscheinlichkeit. Er wird begleitet von einem großen Absenken der Entropie und einer Tendenz zur Ausbildung langer helikaler Kettenabschnitte. Die intrinsisch niedrige Faltungstendenz (Nukleation und Propagation) erfährt externe Verstärkung durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen benachbarten Seitenketten, ebenso wie durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen.

Nahezu zeitgleich mit Anfinsens Nachweis der Reversibilität und Unität der Proteinfaltung stellten Zimm und Bragg eine Theorie des Phasenübergangs zwischen helikaler und ungeordneter Struktur in Polypeptiden vor [18, 19, 20]. Die *helix-coil transition theory* ist ein Algorithmus zur Strukturvorhersage, die sich formal weitgehend an das zweidimensionale Ising-Modell anlehnt, mit dem die statistische Beschreibung von Phasenübergängen in Ferromagnetika erfolgt [21, 22].

Die Zimm–Bragg–Theorie definiert die Anzahl n der Aminosäurereste in einem Polymer anhand der Zahl der C_α -Atome, die beiderseits von Peptideinheiten umgeben sind (Abb. 2.8). Ein C_α -Atom kann demnach nur in zwei Zuständen existieren, entweder mit (1) oder ohne (0) einer H-Verknüpfung der zugehörigen NH-Gruppe.² Die terminalen C_α -Atome sind in diesem elementaren Modellansatz zunächst außer Acht gelassen und ihr Einfluss auf die Helixstruktur wurde erst später als sog. N-caps bzw. C-caps integriert [23, 24].

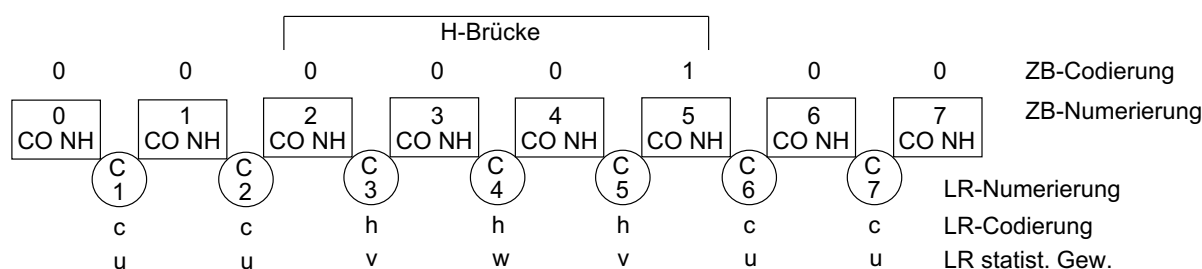


Abbildung 2.8: Schema der Numerierung, der Codierung und der Zuordnung der statistischen Gewichte im Zimm–Bragg– und im Lifson–Roig–Vorhersagemodell (ZB, LR). Der verfügbare Konformationsraum einer partiell helikalen Polypeptidkette ist unterteilt in helikale (h) und random coil (c) Regionen. Insgesamt sind 5 Aminosäuren an der H-Brücke beteiligt, die sich zwischen dem 2. und dem 6. C_α -Atom erstreckt. Die drei dazwischen liegenden C_α -Atome sind in helikaler Konformation (h). Nach [25].

Der Beginn der Helixfaltung wird durch den Nukleationsparameter σ und der nachfolgende Helixaufbau durch den Propagationsparameter s beschrieben. Ausgehend vom N-Terminus wird die erste H-gebundene Einheit der Peptidkette gezählt und ihr ein statistisches Gewicht σs zugeordnet. Alle weiteren Einheiten erhalten s , und die nicht H-gebundenen Einheiten erhalten den Wert 1 zugewiesen.

Aminosäuren werden klassifiziert und mit Zahlenwerten P_α nahe Eins quantifiziert, je nachdem, ob sie helixbrechende ($P_\alpha < 1$), helixneutrale ($P_\alpha \simeq 1$) oder helixbildende ($P_\alpha > 1$) Eigenschaften (*helix propensity*) besitzen (Tab. 2.4). Nach der Vorhersage aus der Zimm–Bragg–Theorie zeigen kleine Peptide, die aus weniger als 20 Aminosäuren bestehen, in wässriger Lösung keine nachweisbare Helixbildung. Einige Jahre später wurde diese Aussage jedoch widerlegt, nachdem in kürzeren Modellpeptiden Sekundärstrukturen beobachtet wurden und deren Konformation durch thermische oder chemische Einflussnahme verändert werden konnte.

Das Zimm–Bragg–Modell (ZB) wurde Anfang der 1960er Jahre durch die Arbeiten von Lifson und Roig (LR) modifiziert [26]. Der wesentliche Unterschied beider Modelle liegt in der Art, in der die Einheit einer Polypeptidkette definiert wird. Als sich wiederholende Einheit in der Polypeptidkette ist in der LR–Theorie die Aminosäure zugrundegelegt, die

²Die Besetzung der erlaubten (ϕ , ψ)-Winkel war zur Zeit der Entstehung dieses Vorhersagemodells noch nicht bekannt und wurde nicht in Betracht gezogen.

Amino- säure	α - Helix P_α	β - Faltblatt P_β	β - turn P_t
Glu	1,59	0,52	1,01
Ala	1,41	0,72	0,82
Leu	1,34	1,22	0,57
Met	1,30	1,14	0,52
Gln	1,27	0,98	0,84
Lys	1,23	0,69	1,07
Arg	1,21	0,84	0,90
His	1,05	0,80	0,81
Val	0,90	1,87	0,41
Ile	1,09	1,67	0,47
Tyr	0,74	1,45	0,76
Cys	0,66	1,40	0,54
Trp	1,02	1,35	0,65
Phe	1,16	1,33	0,59
Thr	0,76	1,17	0,90
Gly	0,43	0,58	1,77
Asn	0,76	0,48	1,34
Pro	0,34	0,31	1,32
Ser	0,57	0,96	1,22
Asp	0,99	0,39	1,24

Tabelle 2.4: Relative Häufigkeiten des Auftretens von Aminosäureresten in den Sekundärstrukturen von Proteinen (helix propensity). Die Präferenzen P für die jeweilige Konformation sind normiert: P_α – α -Helix, P_β – β -Faltblatt und P_t – β -Schleife (β -turn). Nach [8], S. 256.

nur entweder in der helikalen (h) oder in der ungeordneten (c, *coil*) Konformation vorliegen kann (Abb. 2.8). Der Helix-Zustand wird hierin eng verknüpft mit der α -helikalen Geometrie und den empirisch festgelegten Konformationswinkeln [7].

Die Lifson-Roig-Theorie ordnet jedem Aminosäurerest in einer Peptidsequenz ein statistisches Gewicht zu, das sich aus dem Zustand des betreffenden Restes und der zwei beiderseitig angeordneten Reste ergibt. Nach der LR-Theorie definiert u die ungeordnete Struktur, v eine Peptideinheit im helikalen Zustand, bei dem sich nur auf einer Seite eine ungeordnete Peptideinheit befindet, und w beschreibt eine Peptideinheit, die jeweils auf beiden Seiten von helikalen Einheiten umgeben ist. So wird beispielsweise eine Polypeptidkette mit insgesamt 17 Resten und mit der Konformation

c c c c c h h h h h c c c h h c c,

in der insgesamt 7 Reste helikale Konformationswinkel einnehmen, beschrieben über ihre statistischen Gewichte

u u u u u v w w w v u u u v v u u.

Die LR–Theorie erlaubt die Umsetzung dieser Definitionen in eine kompakte Matrixdarstellung (\mathbf{m}) von der Gestalt

$$\mathbf{m} = \begin{pmatrix} w & v & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 \\ v & v & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 \end{pmatrix}. \quad (2.1)$$

Das statistisch–mechanische Modell zur Beschreibung eines Polymers in helikaler Konformation ist somit reduziert auf eine Matrix der Form $(\mathbf{m})^N$ und auf das Ermitteln ihrer Eigenwerte. Für ein Polypeptid mit N Resten erhält man die Verteilungsfunktion Z aus der Berechnung der folgenden Matrix:

$$Z = (0 \ 0 \ 1 \ 1) \mathbf{m}^N \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \end{pmatrix}. \quad (2.2)$$

Aus der Verteilungsfunktion Z berechnet man die mittlere Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen $\langle n_h \rangle$ pro Molekül durch Differentiation der Verteilungsfunktion

$$\langle n_h \rangle = \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln w}. \quad (2.3)$$

In vielen Aspekten ist die LR–Theorie vom statistisch–mechanischen Modell der ZB–Theorie abgeleitet und hat sich als eine Vorhersagemethode unter zahlreichen anderen Proteinfaltungsmodellen etabliert [27, 28, 29]. Wiederholt zeigte sich ihre Leistungsfähigkeit darin, dass zusätzliche Modifikationen im Algorithmus sukzessive implementiert werden konnten [25, 30, 31, 32].

In ihrer ursprünglichen Fassung war die *helix coil transition theory* zunächst nur für Homopolymere konzipiert. Viele nachträgliche Ergänzungen und Änderungen des Algorithmus erlaubten seine erweiterte Anwendung auf heteropolymere Moleküle. Helix–stabilisierende Effekte, die von Wechselwirkungen der hydrophoben Seitenketten resultieren, wurden in die Theorie integriert. Aus experimentellen Ergebnissen von kurzen Polypeptiden wurden schrittweise weitere Faktoren in den Formalismus einbezogen [33, 34], wie z. B. Effekte durch Salzbrücken und langreichweitige elektrostatische Wechselwirkungen [35], Abhängigkeiten von der ionischen Stärke des Lösungsmittels [36], Makrodipol–Wechselwirkungen [37], Sequenz– und Temperaturabhängigkeit [38, 39, 40, 41], Einfluss der Polypeptidkettenlänge [30, 31], N– und C–*capping*–Effekte [23, 24] sowie Seitenkettenkonformationen (Rotamere) [32, 42], wodurch die Vorhersagegenauigkeit verbessert werden konnte. Der LR–Algorithmus ist als FORTRAN–Quellcode über anonymen FTP–Transfer frei zugänglich und kann als interaktives Programm im Internet aufgerufen werden [25].

Kapitel 3

Grundlagen der spektroskopischen Experimente

Der folgende Teil der Arbeit beschreibt die physikalischen Grundlagen der spektroskopischen Messmethoden, die zur Strukturanalyse an den synthetischen Polypeptiden verwendet wurden. Neben den Grundbegriffen des Circular-Dichroismus werden die Theorie und die Messaufbauten für die Mikro- und die FT-Raman-Spektroskopie vorgestellt. Daran schließt sich ein Überblick an über die physikalischen Aspekte einiger Experimente aus der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polypeptide zielen auf unterschiedliche Fragestellungen zum Proteinfaltungsproblem. Die chemisch-physikalischen Merkmale der Proben werden am Ende dieses Kapitels vorgestellt und detailliert beschrieben.

3.1 Circular-Dichroismus

Linear polarisiertes Licht läßt sich als Überlagerung zweier entgegengesetzt zirkular polarisierter Lichtwellen beschreiben. Ihre elektrischen Feldvektoren (\mathbf{E}_L und \mathbf{E}_R) rotieren gegensinnig um die Achse der Ausbreitungsrichtung. In der Lösung einer optisch aktiven Substanz sind die Brechungsindizes für rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht verschieden groß.

Aufgrund der unterschiedlichen Winkelgeschwindigkeiten der beiden Vektoren \mathbf{E}_L und \mathbf{E}_R weisen sie nach dem Durchdringen der Lösung eine Phasendifferenz auf. Diese ruft eine Drehung der Polarisationssebene um den Winkel α hervor (in Analogie zur optischen Rotationsdispersion, ORD). Die CD-Spektroskopie untersucht zusätzlich die unterschiedliche Absorption des links- und rechtszirkular polarisierten Lichts. Somit unterscheiden sich die Feldvektoren \mathbf{E}_L und \mathbf{E}_R sowohl in ihren Winkelgeschwindigkeiten als auch in ihrer Länge. Die Vektoraddition (Abb. 3.1, links) liefert einen resultierenden Vektor \mathbf{E} , dessen Spitze die Form einer Ellipse beschreibt.

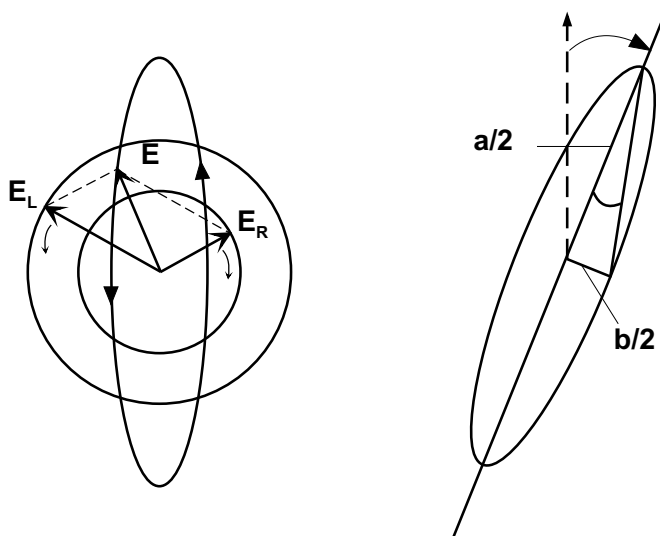


Abbildung 3.1: *Elliptisch polarisiertes Licht (Vektor \mathbf{E}) entsteht durch die Überlagerung eines links- und eines rechtszirkular polarisierten Lichtstrahls (Vektoren \mathbf{E}_L und \mathbf{E}_R) ungleicher Intensität. Das Maß für den Circular-Dichroismus ist die Elliptizität Θ , die als Tangens vom Verhältnis der kleinen ($b/2$) zur großen ($a/2$) Ellipsenachse definiert ist. Die optische Rotation α beschreibt den Winkel zwischen der großen Ellipsenachse $a/2$ und der Polarisationssebene des ursprünglich planar polarisierten Lichts vor dem Durchstrahlen der Probe. Nach [43].*

In Analogie zur Absorptionsspektroskopie (mit dem molaren Absorptionskoeffizienten ϵ) benutzt die CD-Spektroskopie die Differenz $\Delta\epsilon$ zur Beschreibung der Absorption des links- und rechtszirkular polarisierten Lichts:

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R. \quad (3.1)$$

Linear polarisiertes Licht erzeugt man mit Hilfe von Polarisationsfiltern, die für das eintreffende unpolarisierte Licht nur in einer bestimmten Richtung durchlässig sind. Die Wirkung von Polarisatoren beruht entweder auf Doppelbrechung, Streuung oder Reflexion. Für die Erzeugung von zirkular polarisiertem Licht verschiebt man zwei linear polarisierte Lichtwellen um eine viertel Wellenlänge gegeneinander. Dann beschreibt der resultierende Summenvektor \mathbf{E} in [Abbildung 3.1](#) eine Spiralbahn um die Achse der Ausbreitungsrichtung des Lichtes. Den Gangunterschied von einer viertel Wellenlänge zwischen den rechts- und linkszirkular polarisierten Lichtvektoren erzeugt man mit Hilfe von $\lambda/4$ -Plättchen (Pockels-Zelle), die aus doppelbrechenden Kristallen in geeigneter Schichtdicke bestehen. Um die rechts- und linkszirkularen Komponenten gleichzeitig messen zu können, muss die Pockels-Zelle um 90° gedreht werden. Dies wird mit einem hochfrequenten, elektrischen Wechselfeld, unter Ausnutzung des piezoelektrischen Effekts im Kristall, erreicht (CD-Modulator). Nach dem Durchstrahlen der Probe werden die Lichtintensitäten I_L und I_R im Takt des CD-Modulators über einen Photomultiplier detektiert.

Die gemessene Differenz $\Delta\epsilon$ der links– und rechtszirkularen Komponenten ist analog zum Lambert–Beer’schen Absorptionsgesetz mit der molaren Elliptizität $[\Theta]$ verknüpft:

$$[\Theta] = \frac{\Delta\epsilon \cdot M_r}{c \cdot d} \quad [\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}] \quad (3.2)$$

mit $\Delta\epsilon$ gemessene Elliptizität [mdeg],
 M_r Molekulargewicht [g/mol],
 c Proteinkonzentration [mg/ml],
 d Schichtdicke der Küvette [cm].

Die Differenz der Absorptionskoeffizienten (Gl. 3.1) ist nur ein sehr kleiner Teil des Absorptionskoeffizienten selbst. Mit empfindlichen CD–Spektrometern können Differenzen von 1 bis 1000 mdeg gemessen werden. Häufig wird in der CD–Spektroskopie als Messgröße die mittlere molare Elliptizität pro Rest $[\Theta]_{\text{MRW}}$ angegeben, die den durchschnittlichen Betrag der einzelnen Aminosäure am Gesamtsignal ausdrückt. Man erhält sie durch Division der gemessenen molaren Elliptizität $[\Theta]$ durch die Anzahl n der Aminosäuren des Proteins oder des Polypeptids:

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = [\Theta]/n \quad [\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}]. \quad (3.3)$$

Optische Aktivität kann sowohl durch chirale C–Atome als auch durch die optisch aktiven Chromophore in asymmetrischen Molekülstrukturen (z.B. α –Helix, β –Faltblatt) verursacht werden. Mit Hilfe der CD–Spektroskopie werden Sekundärstrukturen von Proteinen im Spektralbereich von etwa 170 bis 250 nm untersucht (UV–CD). Die absorbierenden Gruppen im fernen UV sind die Peptidbindungen. Sie zeigen einen breiten $n \rightarrow \pi^*$ Übergang zentriert um 210 nm und eine sehr starke CD–Bande des $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergangs bei 190 nm.

In [Abbildung 3.2](#) sind typische CD–Spektren im fernen UV–Bereich zwischen 190 und 250 nm für drei Sekundärstrukturtypen gezeigt. In „reinen“ helikalen Polypeptiden (z. B. in Poly–L–Lysin bei pH <10) beobachtet man zwei starke negative CD–Banden mit Minima bei 208 und 222 nm und Werten bis ca. $-40000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$. In reinen β –Faltblättern dagegen liegt ein schwächeres negatives Signal nahe bei 215 nm vor. Die beiden Sekundärstrukturen heben sich somit in den charakteristischen Extrema deutlich ab vom CD–Spektrum von ungeordneten Strukturen (*random coil*). Im Allgemeinen erhält man von Proteinen und Polypeptiden Überlagerungen aus den CD–Spektren, wie sie in [Abbildung 3.2](#) als Einzelspektren aus den „reinen“ Sekundärstrukturen dargestellt sind.

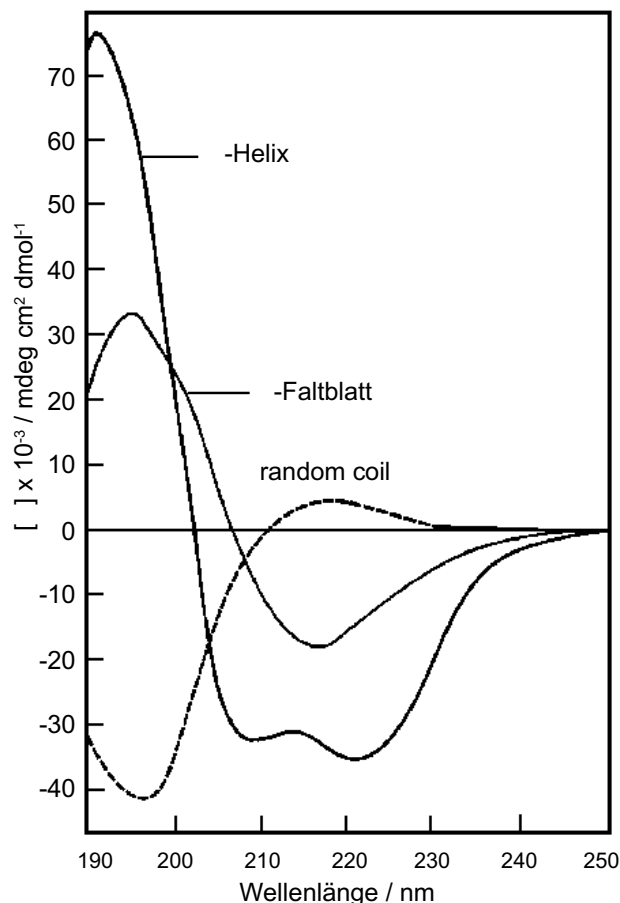


Abbildung 3.2: Charakteristische Banden im fernen UV CD-Spektrum von „reinen“ α -Helix-, β -Faltblatt- und ungeordneten Strukturen (random coil). Nach [43].

Bei der quantitativen Analyse des CD-Spektrums eines Proteins oder Polypeptids geht man davon aus, dass sich das experimentell ermittelte Gesamtspektrum aus verschiedenen Komponenten der einzelnen Sekundärstrukturen additiv zusammensetzt, entsprechend der Gleichung

$$X = f_{\alpha}X_{\alpha} + f_{\beta}X_{\beta} + f_rX_r, \quad (3.4)$$

worin die Faktoren f jeweils den Anteil an Helix (α), Faltblatt (β) und ungeordneter Struktur (r) bezeichnen, für die gilt: $f_{\alpha} + f_{\beta} + f_r = 1$ und $f \geq 0$ [44]. In Gleichung (3.4) ist X als mittlere molare Elliptizität pro Rest $[\Theta]_{\text{MRW}}$ zu interpretieren und die Parameter X_H , X_{β} und X_r repräsentieren die Referenzwerte für Helix-, β - und ungeordnete (r) Strukturen.

Im CD-Spektrum eines Proteins, dessen Sekundärstruktur quantitativ analysiert werden soll, ermittelt man nach diesem Schema durch mathematische Anpassung Linear-kombinationen aus den reinen Anteilen von Helix, Faltblatt und ungeordneten Strukturen [44]. Dadurch lassen sich aus der gemessenen Elliptizität $\Delta\epsilon$ die prozentualen Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturen rekonstruieren. Jedoch wurden bei dieser Methode zunächst nur die drei häufigsten Vertreter von Sekundärstrukturen (α , β , *random coil*) berücksichtigt. Die Algorithmen für die Strukturanalysen in der CD-Spektroskopie wurden in den 1980er Jahren verfeinert, mit Daten aus der Kristallographie und NMR-

Spektroskopie abgeglichen und durch weitere Sekundärstrukturen (z.B. β -turn, parallele und antiparallele Faltblätter) erweitert [45]. Eine gewisse technische Einschränkung der CD–Spektroskopie besteht darin, dass sie Strukturinformation mit vergleichsweise niedriger Auflösung liefert. Wie bereits weiter oben erwähnt, können Sekundärstrukturen wie α -Helix oder β -Faltblatt, gegebenenfalls auch β -turns, detektiert und analytisch separiert werden. Jedoch liefern die Spektren keinen Hinweis darauf, in welchem Bereich des Proteins welcher der Strukturtypen jeweils anzutreffen ist. Der Informationsinhalt aus der CD–Spektroskopie kann zusätzlich durch Vorhersagealgorithmen, die auf der Strukturvorhersage aus den Proteinsequenzen (vgl. Kap. 2.3) basiert, ergänzt werden [46].

Die Aussagekraft der CD–Spektroskopie für die Strukturanalytik wurde wiederholt kritisch kommentiert und die Anwendung dieser Untersuchungsmethode hat in den zurückliegenden 30 Jahren unterschiedliche Akzeptanz erfahren [43, 45, 46]. Dennoch liegt ein wesentlicher Vorteil in der schnellen Zugänglichkeit von Übersichtsspektren, die unter moderatem technischen Aufwand innerhalb kurzer Zeit erhalten werden können. Auf diese Weise hat sich die CD–Spektroskopie als komplementäre Methode etabliert, mit der Strukturinformationen aus Röntgenstreuexperimenten und aus der NMR–Spektroskopie verifiziert werden können.

3.2 Raman–Spektroskopie

Lichtstreuung beruht auf der Wechselwirkung von Photonen des einfallenden Lichts mit den Molekülen einer Probe. Die „klassische“ Rayleigh–Streuung wird immer von einer gestreuten Sekundärstrahlung begleitet, deren Frequenz von der Primärstrahlung abweicht. Man beobachtet im Frequenzspektrum das Auftreten charakteristischer Linien, die sowohl nach niedrigeren als auch nach höheren Frequenzen verschoben sind. Dieses Phänomen der inelastischen Lichtstreuung wurde 1928 von Raman und Krishnan entdeckt und wird als Raman–Streuung bezeichnet.¹

Inelastische Lichtstreuung an Molekülen lässt sich in Lösungen ebenso beobachten wie in Festkörpern und in Gasen. In der Raman–Spektroskopie wird monochromatisches Licht hoher Intensität eingesetzt, um Schwingungen in Molekülen anzuregen. Die Frequenzänderung und die Intensität des inelastisch gestreuten Lichtes werden gemessen und in einem Raman–Spektrum aufgezeichnet. Die im Spektrum beobachteten Wellenzahlen entsprechen den angeregten Normalschwingungen des Moleküls, die durch den elektronischen Molekül–Grundzustand festgelegt sind. Die gemessenen Intensitäten der Raman–Banden resultieren sowohl aus den Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen dem elektronischen Grundzustand und den angeregten Zuständen des Moleküls, als auch aus den Wahrscheinlichkeiten für die Anregung von Schwingungsübergängen.

¹Frequenzverschiebung durch Lichtstreuung war bereits 1923 von A. Smekal vorausgesagt worden und man spricht deshalb manchmal vom *Raman–Smekal–Effekt*.

Die Anregung von Übergängen in höhere elektronische Zustände erfolgt, wenn die Frequenz des eingestrahnten Laserlichts im Bereich einer elektronischen Absorptionsbande des Moleküls liegt (Resonanz-Raman-Effekt). Dagegen ruft die Anregung mit Licht aus dem niederenergetischen (IR, NIR) und dem sichtbaren Spektralbereich (VIS) im Molekül Übergänge in höhere Vibrations- und Rotationsniveaus hervor.

Bei der klassischen Beschreibung des Raman-Effektes betrachtet man das zeitlich oszillierende Dipolmoment $\boldsymbol{\mu}(t)$, das vom elektrischen Feld $\boldsymbol{E} = \boldsymbol{E}_0 \sin 2\pi\nu t$ der einfallenden Lichtwelle im Molekül induziert wird. Es ist proportional zum zeitlich veränderlichen Feld $\boldsymbol{E}(t)$ und zum Polarisierbarkeitstensor α_{kl}

$$\boldsymbol{\mu}(t) = \alpha_{kl}\boldsymbol{E}(t) = \alpha_{kl}\boldsymbol{E}_0 \sin 2\pi\nu t. \quad (3.5)$$

Ein oszillierendes Dipolmoment ist eine Quelle neuer elektromagnetischer Wellen; es emittiert Strahlung, die dieselbe Frequenz besitzt, wie jene der anregenden Strahlung (Rayleigh-Streuung). Durch Anregung von Rotationen und Schwingungen im Molekül ändert sich die Polarisierbarkeit und somit gilt für das Dipolmoment

$$\boldsymbol{\mu}(t) = \alpha_{kl}\boldsymbol{E}(t) = (\alpha_0 + \beta \sin 2\pi\nu t)\boldsymbol{E}_0 \sin 2\pi\nu t. \quad (3.6)$$

In Gleichung (3.6) bezeichnen α_0 die Polarisierbarkeit des Moleküls bei Gleichgewichtslage der Kerne und β die von den Molekül-Rotationen und -Vibrationen hervorgerufene Änderung der Polarisierbarkeit. Nach Umformen durch Reihenentwicklung und unter Anwendung elementarer trigonometrischer Relationen erhält man daraus mit dem Ausdruck

$$\boldsymbol{\mu}(t) = \alpha_0\boldsymbol{E}_0 \sin 2\pi\nu t + \frac{1}{2}\beta\boldsymbol{E}_0\{\cos 2\pi(\nu - \nu')t + \cos 2\pi(\nu + \nu')t\} \quad (3.7)$$

eine Beschreibung für das oszillierende Dipolmoment mit zwei separierten Summanden. Darin ist zum einen der Term $\alpha_0\boldsymbol{E}_0 \sin 2\pi\nu t$ enthalten, der mit der gleichen Frequenz ν wie die anregende Lichtwelle oszilliert und zum anderen zwei Komponenten, die frequenzverschoben mit $\nu \pm \nu'$ oszillieren.² Die Schwingungsfrequenzen des Raman-gestreuten Lichts sind um gleiche Beträge sowohl nach niedrigeren Frequenzen $\nu - \nu'$ (Stokes-Linien), als auch nach höheren Frequenzen $\nu + \nu'$ (Anti-Stokes-Linien) gegen die Frequenz der Anregungslinie ν verschoben [47, 48].

Die Stokes-Linien resultieren aus Übergängen von niedrigeren (E_i) zu höheren (E_f) Energieniveaus (Abb. 3.3). Bei der Anti-Stokes-Streuung wird Energie von einem höheren Energieniveau des Moleküls auf die anregende Lichtwelle (Laserphoton) übertragen. Die Intensitäten der Anti-Stokes-Linien sind wesentlich geringer als die der Stokes-Linien, da nach der Boltzmann-Statistik bei Raumtemperatur die höheren Energieniveaus geringer besetzt sind, als die niedrigeren Niveaus.

²In Gleichung 3.7 ist $\beta \neq 0$ eine notwendige Voraussetzung für die Raman-Aktivität von Molekülschwingungen.

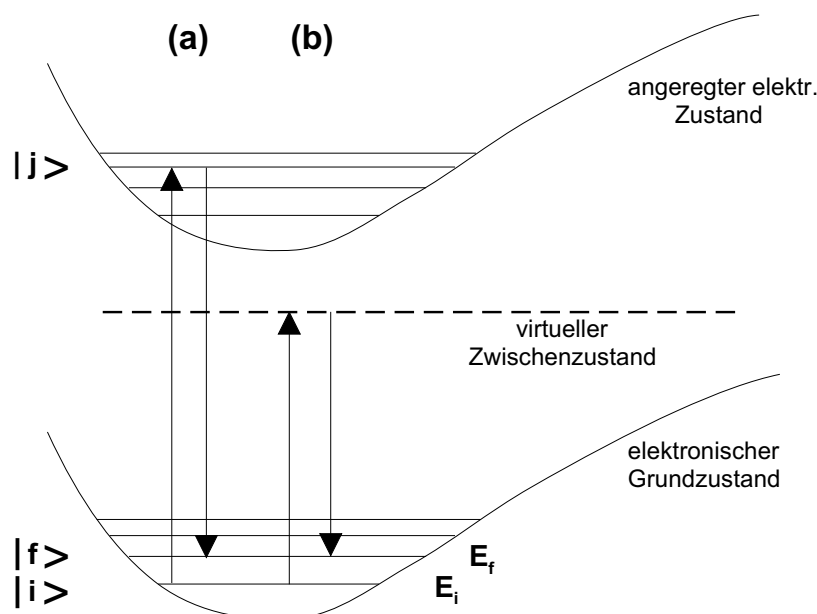


Abbildung 3.3: Illustration des Raman-Effektes (Stokes-Streuung) im quantenmechanischen Formalismus. $|i\rangle$ bezeichnet den Molekül-Grundzustand vor dem Wechselwirkungsprozess zwischen Photon und Molekül und $|f\rangle$ den vibronisch angeregten Zustand. $|j\rangle$ ist ein stationärer Zwischenzustand bei der resonanten Raman-Streuung (a). Bei präresonanter (nicht-resonanter) Raman-Streuung (b) erfolgt die Streuung über einen virtuellen Zustand.

In der quantenmechanischen Beschreibung des Raman-Effektes betrachtet man die Wechselwirkung zwischen einem Photon der Energie $\hbar\omega_0$ und einem Molekül im elektronischen Grundzustand $|i\rangle$. Das Photon wird am Molekül gestreut und überträgt dabei entweder einen Teil seiner Energie auf das Molekül (Stokes-Streuung) oder bekommt einen Teil der Energie des Moleküls übertragen (Anti-Stokes-Streuung). Dieser Prozess besitzt eine endlich große Wahrscheinlichkeit $P_{\langle j|i\rangle}$, dass im Molekül ein Übergang vom Grundzustand $|i\rangle$ in einen elektronisch angeregten Zustand $|j\rangle$ erzeugt wird. Aus diesem Zwischenzustand relaxiert das Molekül in einen vibronisch angeregten Grundzustand $|f\rangle$. Das inelastisch gestreute Photon besitzt im Falle der Stokes-Streuung eine niedrigere Energie $\hbar\omega_S < \hbar\omega_0$ und im Falle der Anti-Stokes-Streuung eine höhere Energie $\hbar\omega_S > \hbar\omega_0$ als das eintreffende Photon.

3.2.1 Mikro-Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie eignet sich für Untersuchungen über den strukturellen Aufbau von organischen und anorganischen Molekülen. Im Bereich der Proteinstrukturanalytik wird sie in jüngerer Zeit verstärkt eingesetzt, um Informationen über die Sekundärstruktur und über inter- und intramolekulare Wechselwirkungen zu erhalten. Aus den Lagen und aus den Intensitäten der Raman-Banden lassen sich Aussagen über die Schwingungen

des Peptidrückgrates und der Aminosäureseitenketten gewinnen. Die beobachteten Verschiebungen mehrerer struktur-sensitiver Raman-Banden (Amidbanden) erlauben Rückschlüsse auf die Konformation und auf Konformationsänderungen in Proteinen und Polypeptiden. Die charakteristischen Banden treten typischerweise in einem Wellenzahlenbereich³ von $\tilde{\nu} = 4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ auf.

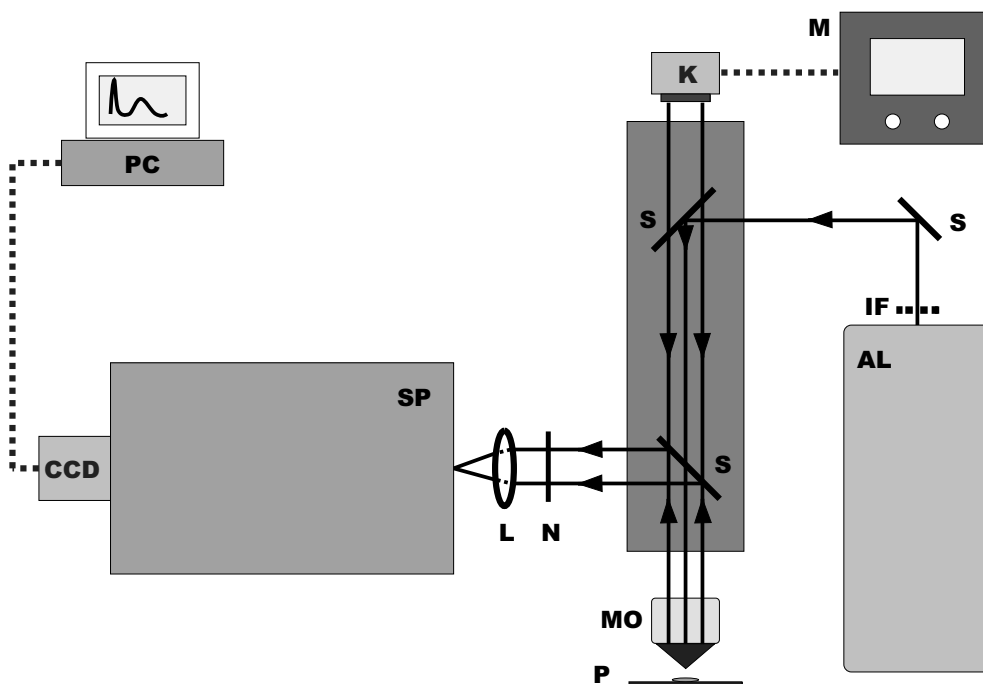


Abbildung 3.4: Experimenteller Aufbau zur Mikro-Raman-Spektroskopie (LabRam, Yvon Jobin) mit Anregung im sichtbaren Bereich ($\lambda_0 = 514,5 \text{ nm}$). Legende: **AL** Argon-Ionen-Laser, **IF** Interferenzfilter, **S** Spiegel, **K** Kamera, **M** Monitor, **MO** Mikroskop-Objektiv, **P** Probe auf Objektträger, **N** Notch-Filter, **L** Sammellinse, **SP** Spektrometer, **CCD** charge coupled device Kamera.

Bei der verwendeten Mikro-Raman-Apparatur wird ein Lichtmikroskop in Kombination mit einem dispersiv arbeitenden Spektrometer verwendet (Abb. 3.4). Für die Anregung im sichtbaren Spektralbereich wird die 514,5 nm Linie eines *cw* Ar⁺-Lasers (Modell 1016, Spectra Physics) in das Mikroskop eingekoppelt und auf die Probe geleitet. Mit Hilfe einer Kamera, die auf der Vertikalachse des Mikroskops montiert ist, ebenso wie mit dem Mikroskopobjektiv, kann der Lichtstrahl auf die Probe fokussiert werden. Das an der Probe Raman-gestreuete Licht wird in 180°-Streugeometrie auf den Eintrittsspalt des Monochromators gelenkt, der mit einem Gitter mit 1800 Strichen/mm ausgerüstet ist. Da das Rayleigh-gestreuete Licht um den Faktor 10⁵ bis 10⁸ intensiver ist als das inelastisch gestreute Licht, muss es für die Detektion der schwachen Raman-Banden durch einen lei-

³In Anlehnung an die Infrarotspektroskopie verwendet man in der Raman-Spektroskopie die Einheit *Wellenzahl* $\tilde{\nu} = \nu/c = 1/\lambda \text{ [cm}^{-1}\text{]}$. Sie ist somit zur Frequenz und damit auch zur Energie direkt proportional.

stungsfähigen Notch-Filter abgetrennt werden. Er filtert das gewünschte spektrale Band heraus, so dass das Rayleigh-Streulicht unterdrückt wird. Am Spektrometerausgang ist eine auf Halbleitertechnologie basierende CCD-Kamera als Vielkanalanalysator eingesetzt, mit der die Spektren in Simultanmessungen bestehend aus max. 1024×512 Spektralelementen aufgezeichnet werden (Multiplexverfahren). Das Ansteuern der CCD-Kamera und des Spektrometers erfolgen über einen Computer, der auch für das Einlesen der digitalisierten Signale und zur weiteren Analyse der Daten genutzt wird. Typische Integrationszeiten beim Aufzeichnen der Raman-Daten für die vorliegende Arbeit lagen zwischen 15 und 30 min je Spektrum.

Die spektrale Auflösung ist über die Anregungswellenlänge, die Dimension der Dioden auf der CCD-Kamera und durch die Dispersionscharakteristik des Spektrometers festgelegt. Bei den durchgeführten Raman-Messungen mit Anregung im sichtbaren Spektralbereich lag die Auflösung bei $3 - 4 \text{ cm}^{-1}$. Um die Belastung der Proben durch das Laserlicht und mögliche Photoreaktionen zu vermeiden, wurde die Laserausgangsleistung bei der Spektrenaufzeichnung entsprechend limitiert (etwa 8 bis 20 mW auf der Probe).

3.2.2 FT-Raman-Spektroskopie

Für die Aufzeichnung der FT-Raman-Spektren stand ein IFS 120 HR Spektrometer der Firma Bruker zur Verfügung, das mit einem Raman-Modul (Bruker, FRA 106) ausgestattet ist. Das physikalische Prinzip der FT-Messtechnik benutzt eine modifizierte Form eines Michelson-Interferometers (Abb. 3.5). Darin wird der Laserstrahl von einem teildurchlässigen Strahlteiler (z. B. CaF_2 , Quarz, Mylar) in einen durchgehenden und in einen reflektierten Teilstrahl zerlegt. Nach der Reflexion am fest montierten Spiegel tritt ein Teilstrahl wieder durch den Strahlteiler und wird dort mit dem zweiten Teilstrahl, nachdem dieser am beweglichen Spiegel reflektiert wurde, zusammengeführt und zur Interferenz gebracht. Die Nullposition des beweglichen Spiegels wird über einen Feintrieb um die Wegstrecke $+d$ und $-d$ moduliert, so dass in Abhängigkeit von der Phasenlage beider Teilstrahlen konstruktive und destruktive Interferenz auftritt. Am Detektor wird die Signalintensität als Funktion des Ortes des beweglichen Spiegels in einem Interferogramm aufgezeichnet.

Zur Anregung wurde die 1064 nm Linie eines Dioden-gepumpten *cw* Nd:YAG-Lasers benutzt. Das Raman-gestreute Licht wurde in 180° -Rückstreugeometrie mit einer Quarzlinse gesammelt und einer kryotechnisch gekühlten Germanium-Diode zur Detektion zugeführt. Das integrierte Software-Paket (OPUS-2, Bruker) berechnet über Fourier-Transformation die Raman-Spektren aus dem erhaltenen Interferogramm. Die Messzeiten beim FT-Raman-Spektrometer nahmen zwischen 1 und 2 h Zeit in Anspruch, wobei jedes Spektrum aus 1000 Einzelscans als Mittelwert aus 10 Spektren aufgezeichnet wurde. Mit den langen Messzeiten und der Mittelung aus vielen Einzelspektren wird das S/N-Verhältnis verbessert.

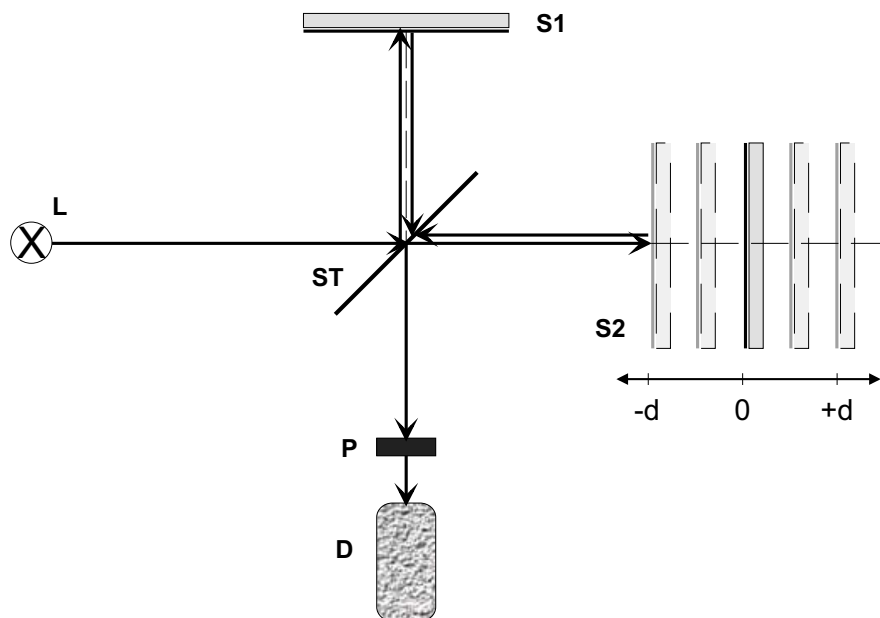


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung eines Michelson-Interferometers, wie es in der FT-Raman-Spektroskopie eingesetzt wird. Legende: **L** Lichtquelle, **ST** Strahlteiler (teildurchlässiger Spiegel), **S1** fester Spiegel, **S2** beweglicher Spiegel, **P** Probe, **D** Detektor. Die optische Weglängendifferenz Δx beträgt das Zweifache der Spiegelauslenkung d aus der Nullposition. Nach [48].

3.3 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Kernmagnetische Resonanz, Röntgenstreuung und Atomkraftmikroskopie (AFM) sind experimentell anspruchsvolle und derzeit die einzig verfügbaren Untersuchungsmethoden, mit denen bei atomarer Auflösung die Strukturen von biologischen Makromolekülen bestimmt werden können. Darüber hinaus erlaubt die NMR-Spektroskopie die Untersuchung zeitabhängiger Phänomene, wie etwa intramolekulare Dynamik, Reaktionskinetik, molekulare Erkennungsmechanismen und Proteinfaltung.

NMR-spektroskopische Methoden sind gegenüber der Röntgenstrukturanalyse insofern im Vorteil, als Proteinuntersuchungen in wässriger Lösung, und somit unter physiologischen Bedingungen, durchgeführt werden können. Dagegen setzt die hochauflösende dreidimensionale Strukturaufklärung mit Röntgenstreuung die Herstellung von Proteinkristallen hoher Qualität voraus. Die experimentellen Bedingungen können in NMR-Studien über einen weiten Bereich variiert werden (pH-Wert, Ionenstärke, Puffer, wässrige und nichtwässrige Lösungsmittel, Temperatur, native und denaturierende Lösungen). Die Anwendung der NMR ist nach dem gegenwärtigen Stand der Technik limitiert auf Makromoleküle, die kleiner sind als 35–40 kDa. Ein Nachteil der NMR-Spektroskopie liegt in der Komplexität der NMR-Spektren, die eine zeitintensive Datenauswertung nach sich zieht. Die NMR-Spektroskopie unterscheidet sich in zwei wesentlichen Punkten von den übrigen spektroskopischen Methoden: die Aufspaltung der energetischen Niveaus wird erst durch

das äußere Magnetfeld erzeugt und die Wechselwirkung erfolgt zwischen den Kernspins und der magnetischen Komponente, nicht der elektrischen Komponente elektromagnetischer Strahlung.

3.3.1 Kernspin, Energiequantelung und Resonanzbedingung

Die physikalische Grundlage des NMR–Experiments ist der Eigendrehimpuls \mathbf{J} (Spin) von Protonen und Neutronen. Der Kernspin \mathbf{J} erzeugt ein magnetisches Moment $\boldsymbol{\mu}$, das mit einem äußeren magnetischen Feld wechselwirkt. Der Eigendrehimpuls \mathbf{J} ist gemäß

$$|\mathbf{J}| = \sqrt{I(I+1)} \hbar \quad (3.8)$$

gequantelt ($\hbar = h/2\pi$; $h =$ Plancksches Wirkungsquantum), wobei die Spinquantenzahl I halb- und ganzzahlige Werte annehmen kann ($I = 0, 1/2, 1, 3/2, 2, \dots$).

Die beiden vektoriellen Größen $\boldsymbol{\mu}$ und \mathbf{J} sind durch das gyromagnetische Verhältnis γ miteinander verknüpft. Die Proportionalitätskonstante γ ist ausschlaggebend für die Nachweisempfindlichkeit in NMR–Experimenten:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{J}. \quad (3.9)$$

Für die Strukturaufklärung von Biomolekülen ist der wichtigste Atomkern das Proton (^1H). Weitere magnetisch aktive Kerne, deren NMR–Sensitivität deutlich unterhalb der des Protons liegt, sind ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P . Kerne mit dem Kernspin $\mathbf{J} = 0$, wie beispielsweise das Kohlenstoff–Isotop ^{12}C und das Sauerstoff–Isotop ^{16}O , haben kein kernmagnetisches Moment und sind in der NMR–Spektroskopie nicht nachweisbar.

In einem von außen angelegten, homogenen Magnetfeld B_0 , welches konventionsgemäß in z –Richtung weist, werden die Kernspins so ausgerichtet, dass deren Komponente in Richtung des Feldes ein ganz- oder halbzahliges Vielfaches des Planckschen Wirkungsquantums beträgt:

$$J_z = m\hbar, \quad (3.10)$$

Die magnetische Quantenzahl m kann dabei $2I + 1$ Werte, nämlich $I, I - 1, \dots, -I$, annehmen. Für das Beispiel des Wasserstoffkerns mit Spin $1/2$ ergeben sich daraus zwei mögliche Spineinstellungen im Magnetfeld, und somit zwei verschiedene Energieniveaus. Die Berechnung der beiden Energien für die Kernspins parallel (\uparrow , $m = +1/2$) und antiparallel (\downarrow , $m = -1/2$) zum äußeren Feld B_0 erhält man klassisch aus der Beziehung

$$E = -\boldsymbol{\mu} \mathbf{B} = -\mu_z B_0 = -m \gamma \hbar B_0. \quad (3.11)$$

Die Larmorfrequenz ω_0 ist durch das gyromagnetische Verhältnis γ und durch die Stärke des äußeren Feldes bestimmt ($\omega_0 = \gamma B_0$). Wählt man speziell eine Magnetfeldstärke von $B_0 = 2,3487$ T, so resultiert daraus für das Proton mit dem gyromagnetischen Verhältnis

$\gamma = 26,7519 \cdot 10^{-7} \frac{\text{rad}}{\text{T} \cdot \text{s}}$ eine Larmorfrequenz von 100 MHz. Diese liegt im Bereich der Radiowellen.

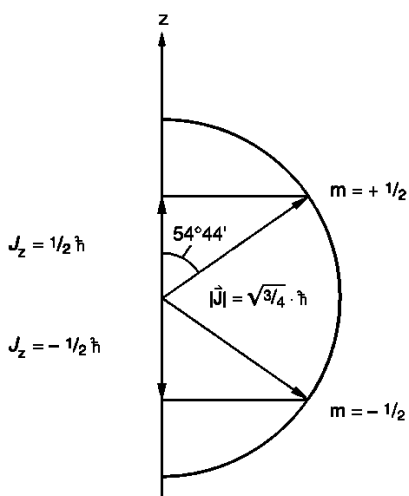


Abbildung 3.6: Richtungsquantelung des Kern Drehimpulses \mathbf{J} für einen Kern mit Spin $I = 1/2$. Nach [48], S. 373.

Ein äußeres, in z -Richtung orientiertes Magnetfeld B_0 führt bei Kernen mit den Spins $\pm 1/2$ zur Aufspaltung in zwei mögliche Energieniveaus, bei denen die z -Komponente der Kernspins parallel oder antiparallel zu B_0 ausgerichtet ist. Die Larmorfrequenz (Präzessionsfrequenz) entspricht der Frequenzdifferenz der beiden aufgespaltenen Energieniveaus. Der klassischen Beschreibung zufolge verhalten sich die magnetischen Momente des Kerns wie Kreisel: sie präzedieren mit der Larmorfrequenz um die Richtung des Magnetfeldes B_0 auf einem Doppelpräzessionskegel. Aufgrund der Quantisierungsbedingung sind jedoch nur bestimmte Winkel erlaubt. In Abbildung 3.6 ist $J_z = 1/2 \hbar$ und $|\mathbf{J}| = \frac{\sqrt{3}}{2} \hbar$. Die Lage von $|\mathbf{J}|$ ist auf dem Doppelkegel mit dem Öffnungswinkel $\arccos(J_z/|\mathbf{J}|) = 54^\circ 44'$ unbestimmt, da J_x und J_y nicht gleichzeitig scharf gemessen werden können.

Die Wahrscheinlichkeit für Übergänge vom niederenergetischen Spinzustand (N_\uparrow) in ein höheres Energieniveau mit Spin N_\downarrow ist direkt proportional zur Besetzungszahldifferenz der Niveaus ($N_\uparrow - N_\downarrow$). Bei jedem Übergang vom tieferen in ein höheres Niveau (oder entgegengesetzt) wird die Richtung der Kernspins umgekehrt. Das niedrigere Energieniveau besitzt einen kleinen Teilchenüberschuss (s. Tab. 3.1) gegenüber dem höheren Niveau, so dass bei Einstrahlung der Resonanzfrequenz ν_L aus dem Zusatzfeld Übergänge in das höhere Niveau geringfügig dominieren. In Analogie zu den Übergangswahrscheinlichkeiten hängt auch die Intensität der detektierten Signale von der Besetzungszahldifferenz $N_\uparrow - N_\downarrow$ ab. Sie wird wesentlich von der Gesamtzahl der Spins in der Probe (Konzentration), aber auch durch die angelegte Magnetfeldstärke B_0 bestimmt. Nur unter der Bedingung, dass die Frequenz ν der eingestrahnten elektromagnetischen Welle ($\nu = \Delta E / h$) und die Frequenz der präzedierenden Kernspins ν_L übereinstimmen, können die Kerne mit dem eingestrahnten Feld wechselwirken und Energie absorbieren oder emittieren (Resonanzbedingung).

3.3.2 Gleichgewichtsmagnetisierung

Betrachtet man Kerne mit dem Spin $1/2$ (und somit zwei gegebene Energieniveaus), so werden sich die Spins in einem äußeren Magnetfeld B_0 unabhängig voneinander parallel oder antiparallel zu B_0 ausrichten. Die Energieniveaus sind bei einer gegebenen Temperatur ungleich besetzt, wobei das niedrigere Niveau nur einen sehr geringen Überschuss gegenüber dem höheren Niveau besitzt. Dies ist eine Folge der thermischen Bewegung, die mit dem Besetzungszahlverhältnis $N_{\downarrow}/N_{\uparrow}$ in der Boltzmann-Verteilung in Gleichung (3.12) zum Ausdruck kommt. Mit der klassischen Theorie läßt sich das Verhältnis der Kerne N_{\downarrow} mit antiparalleler Orientierung im Feld B_0 zu den parallel ausgerichteten Kernen N_{\uparrow} berechnen:

$$\frac{N_{\downarrow}}{N_{\uparrow}} = e^{-\Delta E/k_B T} = e^{-\gamma \hbar B_0/k_B T}. \quad (3.12)$$

In der Gleichung (3.12) steht k_B für die Boltzmann-Konstante, T für die absolute Temperatur und ΔE ist die Energiedifferenz zwischen den beiden Niveaus mit antiparalleler (N_{\downarrow}) und paralleler (N_{\uparrow}) Ausrichtung der Kernspins in einem äußeren Magnetfeld B_0 . Die Gleichung (3.11) kann herangezogen werden, um in einem Zahlenbeispiel für Protonen den Energieunterschied ΔE zu berechnen.

$$\Delta E = \Delta m \gamma \hbar B_0 = \gamma \hbar B_0, \quad (3.13)$$

mit $m = \pm 1/2 \Rightarrow \Delta m = 1$. ΔE ist sehr klein gegen die mittlere thermische Energie ($k_B T$), so dass der Teilchenüberschuß im energieärmeren Niveau mit antiparallelen Spins (N_{\downarrow}) im Bereich einiger tausendstel Promille (ppm) liegt.

B_0 [T]	ν_L [MHz]	$N_{\downarrow}/N_{\uparrow}$	Teilchenüberschuß (ppm)
1,41	60	0,999990	10
2,3487	100	0,999984	16
7,05	300	0,999950	50
18,70	800	0,999873	130

Tabelle 3.1: Bei Raumtemperatur liegt bei gegebenem Magnetfeld B_0 ein sehr niedriger Teilchenüberschuß $N_{\downarrow}/N_{\uparrow}$ vor.

Die geringe Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie ist eine Folge des geringen Unterschiedes der Besetzungszahlen N_{\downarrow} und N_{\uparrow} , die in [Tabelle 3.1](#) für einige ausgewählte Magnetfelder B_0 aufgeführt sind. Aus der Summe der z -Komponenten der magnetischen Kernmomente ($N = N_{\uparrow} + N_{\downarrow}$, $N_{\uparrow} > N_{\downarrow}$) resultiert die makroskopische Magnetisierung \mathbf{M}_0 (s. [Abb. 3.7](#)), die bei der Beschreibung von Impuls-Experimenten eine wichtige Rolle spielt. Gleichung (3.12) und [Tabelle 3.1](#) demonstrieren, welche Faktoren eine Verstärkung des NMR-Signals beeinflussen. Durch Herabsetzen der Temperatur (möglichst nahe an den Gefrierpunkt des eingesetzten Lösungsmittels), durch Erhöhung der Anzahl der Spins (hohe Probenkonzentration) und durch den Einsatz starker Magnetfelder kann die makroskopische Magnetisierung heraufgesetzt werden.

Die magnetischen Momente auf dem Doppelkegel, die mit der Larmorfrequenz um die z -Achse präzedieren, sind ungleich verteilt, da N_{\uparrow} gegenüber N_{\downarrow} geringfügig überwiegt. Die Vektorsumme aller magnetischen Momente ergibt die makroskopische Magnetisierung \mathbf{M}_0 ([Abb. 3.7](#)), die im Gleichgewicht parallel zum Feld B_0 ausgerichtet ist.

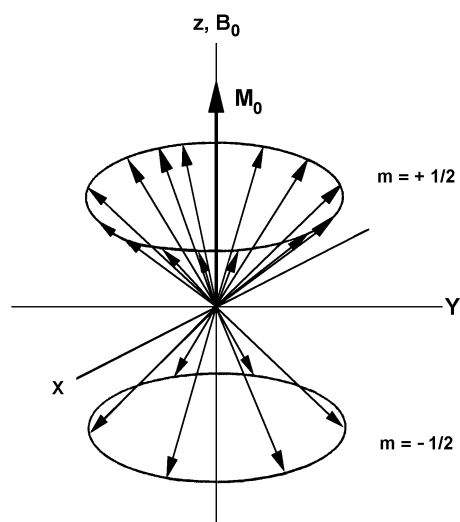


Abbildung 3.7: Wegen ungleicher Besetzungszahlen $N_{\uparrow} > N_{\downarrow}$ addieren sich im thermodynamischen Gleichgewicht die z -Komponenten aller Kernspins zur makroskopischen Magnetisierung \mathbf{M}_0 parallel zur Achse des äußeren Magnetfeldes B_0 .
Nach [48], S. 375.

Die makroskopische Magnetisierung \mathbf{M}_0 dient der detaillierten Beschreibung der Präparations-, Evolutions- und Detektionsphasen in NMR-Experimenten. Um NMR-Übergänge anzuregen, wird ein Magnetfeld B_x , das senkrecht zum Hauptfeld B_0 angeordnet ist, über eine Senderspule eingestrahlt. Dabei wird \mathbf{M}_0 aus der z -Richtung gedreht und zirkuliert danach in der x - y -Ebene ([Abb. 3.8](#)) mit der Larmorfrequenz.

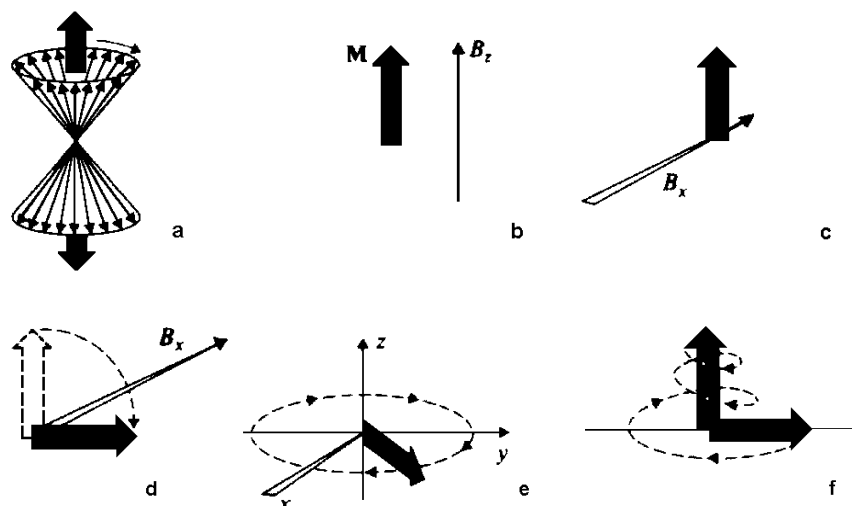


Abbildung 3.8: Bewegung einzelner Kernspins auf dem Präzessionskonus und resultierende makroskopische Magnetisierung \mathbf{M}_0 im äußeren Feld B_z (a, b) und kurz vor der Einstrahlung eines Magnetfeldes in x' -Richtung (c). Der Magnetisierungsvektor \mathbf{M}_0 wird durch das B_x -Feld gedreht (d) und zirkuliert in der x' - y' -Ebene (e). Nach dem x -Impuls relaxiert \mathbf{M}_0 auf einer Spiralbahn zurück in die Gleichgewichtslage (f). Nach [47], S. 210.

Sobald der Senderimpuls abgeschaltet wird, kehrt die makroskopische Magnetisierung durch Relaxation auf einer Spiralbahn in die zuvor beschriebene Gleichgewichtslage zurück (Abb. 3.8). Die xy -Komponente dieser Magnetisierung wird detektiert, anschließend Fourier-transformiert und als Frequenz-Spektrum ausgegeben. Über die Dauer und die Stärke des eingestrahlteten B_x -Feldes läßt sich die Präzessionsbewegung von \mathbf{M}_0 um die x -Achse experimentell beeinflussen. Für die anschaulichere Darstellung der quantenmechanischen Vorgänge, wird anstatt des ortsfesten ein rotierendes Koordinatensystem x' , y' , z gewählt, das mit derselben Frequenz rotiert wie \mathbf{M}_0 .

Die magnetische Flussdichte B_x und die Dauer des eingestrahlteten Impulses τ_p entlang der x' -Achse (des rotierenden Koordinatensystems) haben Einfluss auf die Drehung des Vektors \mathbf{M}_0 um den Impulswinkel ϕ (vgl. Abb. 3.9).

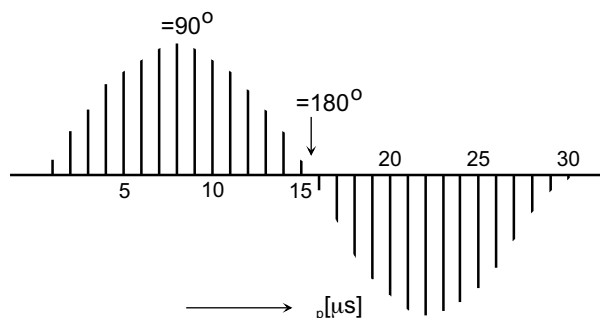


Abbildung 3.9: Intensität eines NMR-Signals in Abhängigkeit von der Impulslänge (τ_p). Im Maximum der Signalamplitude erhält man einen 90° -Impuls. Bei Verdoppelung der Impulslänge τ_p wird beim Nulldurchgang der Impulswinkel $\phi = 180^\circ$ erreicht. Nach [49], S. 13.

Hält man beispielsweise die Stärke der Impulskomponente B_x konstant und verlängert die Impulslänge τ_p , so beschreibt der Impulswinkel einen sinusförmigen Verlauf. Im Maximum bei ca. 7 bis 9 μs beträgt der Impulswinkel 90° ; nach einer Verdopplung der Im-

pulsdauer τ_p tritt ein 180° -Impuls auf. Mit größeren Impulslängen ($\tau_p > 15 \mu\text{s}$) hat das NMR-Signal eine negative Amplitude. Dies lässt sich anhand von [Abbildung 3.10](#) verdeutlichen, in dem die Richtungen des Magnetisierungsvektors \mathbf{M}_0 nach einem $90^\circ_{x'}$ - und nach einem $180^\circ_{x'}$ -Impuls skizziert sind. Das Signal, das in der Empfängerspule induziert wird, resultiert aus der negativen Querkomponente $\mathbf{M}_0 = -\mathbf{M}_{y'}$ in Richtung der negativen y' -Achse. Für den Impulswinkel gilt in diesem Fall $180^\circ < \phi < 360^\circ$. Da nur eine sich zeitlich ändernde Magnetisierung in der Empfängerspule eine Spannung induziert, trägt nur die xy -Komponente zum Signal bei. Maximale Kernresonanzsignale werden somit beim 90° - und beim 270° -Impuls beobachtet. Dagegen erzeugt der 180° -Impuls keine transversale Komponente und es wird kein Signal beobachtet.

Da die Richtung des eingestrahlten Feldes in [Abbildung 3.10](#) mit der x' -Achse zusammenfällt, spricht man bei dieser Anordnung von $90^\circ_{x'}$ - und $180^\circ_{x'}$ -Impulsen, die häufig in der 1D-NMR-Spektroskopie eingesetzt werden. Strahlt man dagegen über die Senderspule ein, die in y' -Richtung angeordnet ist, erhält man $90^\circ_{y'}$ - und $180^\circ_{y'}$ -Impulse. Solche Impulsfolgen werden bei zweidimensionalen und bei dynamischen NMR-Experimenten verwendet.

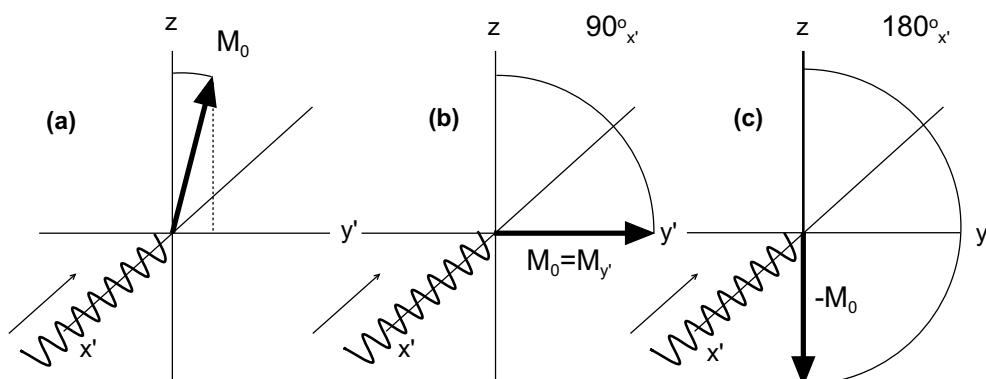


Abbildung 3.10: Makroskopischer Magnetisierungsvektor \mathbf{M}_0 im rotierenden Koordinatensystem x' , y' , z nach einem beliebigen Impuls (a), nach einem $90^\circ_{x'}$ -Impuls mit $\mathbf{M}_0 = \mathbf{M}_{y'}$ (b) und nach einem $180^\circ_{x'}$ -Impuls mit $\mathbf{M}_0 = -\mathbf{M}_0$ (c). Die Senderspule strahlt das Feld B_x (als Wellenlinie eingezeichnet) in Richtung der x' -Achse ein. Nach [49], S. 12.

3.3.3 Bloch-Gleichungen und Relaxationsprozesse

Mit dem eingeführten rotierenden Koordinatensystem x' , y' , z vereinfacht sich die mathematische Beschreibung der Bewegungsabläufe des Magnetisierungsvektors \mathbf{M}_0 . Die zeitliche Änderung des Magnetisierungsvektors wird in den Blochschen Gleichungen (3.14) und (3.15) analysiert. Man nimmt dabei an, dass die Relaxationsprozesse nach einem Zeitgesetz erster Ordnung verlaufen und beschreibt sie mit Hilfe der longitudinalen oder Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 und mit der transversalen oder Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 .

Nach Abschalten des Feldes B_x gilt für den zeitlichen Verlauf der drei Komponenten des Magnetisierungsvektors:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1}, \quad (3.14)$$

$$\frac{dM_{x'}}{dt} = -\frac{M_{x'}}{T_2} \quad \text{und} \quad \frac{dM_{y'}}{dt} = -\frac{M_{y'}}{T_2}. \quad (3.15)$$

Die reziproken Relaxationszeiten T_1^{-1} und T_2^{-1} sind die in der Reaktionskinetik gebräuchlichen Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Relaxationsprozesse. In Kernsystemen erfolgen Relaxationsprozesse deutlich langsamer als in angeregten Elektronen-, Schwingungs- oder Rotationszuständen. Die Relaxationszeiten T_1 und T_2 liegen in der Größenordnung von Sekunden oder Minuten, in Einzelfällen auch Stunden. In der NMR-Spektroskopie mit ^{13}C -Kernen schwanken die Spin-Gitter-Relaxationszeiten je nach Molekülgröße über einen vergleichsweise großen Bereich von einigen Millisekunden bis hin zu mehreren hundert Sekunden. Die longitudinale Relaxationszeit spielt deshalb in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie eine größere Rolle als die transversale Relaxationszeit T_2 .

Nach dem 90° -Impuls ist der Magnetisierungsvektor in die y' -Achse gedreht. Betrachtet man nun diese Situation im ortsfesten Koordinatensystem x, y, z , so hat der Magnetisierungsvektor \mathbf{M}_0 zum Zeitpunkt $t = 0$ nach dem erhaltenen 90° -Impuls die Koordinaten $M_0 = M_y = M_{y'}$. Er präzediert mit der Larmorfrequenz μ_L und die Quermagnetisierung bliebe (ohne Relaxationsprozesse) in y' -Richtung konstant. Man beobachtet jedoch einen exponentiell abklingenden Verlauf der Quermagnetisierung, wobei die transversale Relaxationszeit T_2 die bestimmende Größe ist. Die Empfängerspule registriert die Abnahme der Quermagnetisierung, den freien Induktionsabfall (FID, *free induction decay*).

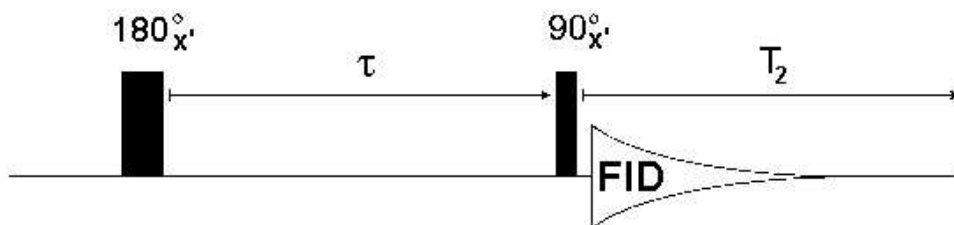


Abbildung 3.11: Bestimmung der Spin-Gitterrelaxationszeit T_1 von ^{13}C -Kernen über die Impulsfolge $180^\circ_{x'} - \tau - 90^\circ_{x'} - \text{FID}$. Nach [48], S. 383.

Die Ermittlung der Spin-Gitter-Relaxationszeit kann am Beispiel eines *Inversion-Recovery*-Experiments mit der Impulsfolge $180^\circ_{x'} - \tau - 90^\circ_{x'} - \text{FID}$ demonstriert werden. Der erste Impuls wird den Magnetisierungsvektor \mathbf{M}_0 in die negative z -Achse drehen (Abb. 3.11). Die Impulsdauer τ_p liegt üblicherweise bei einigen μs . Nach dem Verstreichen einer Wartezeit τ wird nun ein 90° -Impuls von wenigen μs gesetzt und im Anschluß daran der Induktionsabfall über die Empfängerspule aufgezeichnet. Dieser Vorgang wird

mehrfach wiederholt, wobei die Wartezeit τ sukzessive erhöht wird. Die Empfängersignale für verschiedene Wartezeiten τ werden häufig als pseudo-dreidimensionale Graphik wie in [Abbildung 3.12](#) dargestellt.

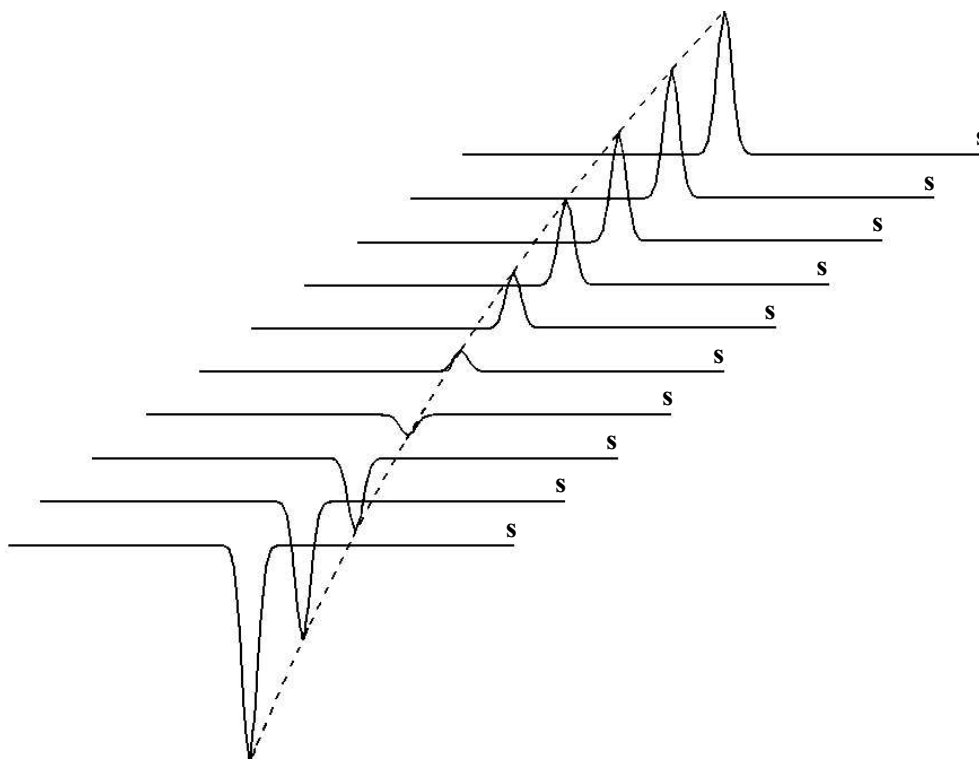


Abbildung 3.12: ^{13}C -NMR-Spektren für verschiedene Wartezeiten τ aufgenommen nach der Inversion-Recovery-Methode mit der Impulsfolge $180_x^\circ - \tau - 90_x^\circ - \text{FID}$. Nach [47], S. 214.

3.3.4 Chemische Verschiebung und Spin-Spin-Kopplung

Die bisherigen Betrachtungen aus den [Kapiteln 3.3.2](#) und [3.3.3](#) galten nur für isolierte Kerne in einem äußeren Feld. Demnach existierte dann zu jeder Kernsorte nur ein einziges Kernresonanz-Signal und der Informationsinhalt der NMR-Spektroskopie wäre gering. Diese Situation entspricht allerdings nicht der Realität, denn in einem Molekül sind die untersuchten Kerne immer von Elektronen und Atomen umgeben. Dadurch wird ein schwaches, aber messbares Magnetfeld erzeugt, das den Kern gegen das Hauptfeld abschirmt. Dieses induzierte Feld ist proportional zum äußeren Feld \mathbf{B}_0 und es folgt für das effektive Feld \mathbf{B}_{eff}

$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \mathbf{B}_0 - \sigma \mathbf{B}_0 = (1 - \sigma) \mathbf{B}_0 \quad (3.16)$$

mit einer dimensionslosen Größe, der Abschirmkonstanten σ , die durch die elektronische und magnetische Umgebung der beobachteten Kerne bestimmt wird. Für Protonen

gilt $\sigma \approx 10^{-5}$, für schwerere Kerne vergrößert sich mit zunehmender Elektronenzahl die Abschirmkonstante.

Setzt man \mathbf{B}_{eff} aus Gleichung (3.16) in die Resonanzbedingung ein, so zeigt sich, dass die Resonanzfrequenz ν_L proportional ist einerseits zum stationären, äußeren Feld \mathbf{B}_0 , und andererseits zum Abschirmungsterm $(1 - \sigma)$, denn es ist

$$\nu_L = \frac{\gamma}{2\pi}(1 - \sigma)B_0. \quad (3.17)$$

Gleichung (3.17) bildet die Basis für qualitative und quantitative Analysen in der NMR-Spektroskopie. Die unterschiedliche Abschirmung von nicht-äquivalenten Kernen ist die Ursache der getrennten Resonanzsignale in den NMR-Spektren. Da die Resonanzfrequenz und die magnetische Flußdichte \mathbf{B}_0 über die Resonanzbedingung miteinander verknüpft sind, benutzt man in der ^{13}C - und ^1H -NMR-Analytik Referenzsubstanzen als relativen Maßstab. Man verwendet häufig Tetramethylsilan (TMS) als Standard, da es zwölf äquivalente, stark abgeschirmte Protonen enthält und chemisch inert ist. NMR-Spektren werden nach der Konvention so dargestellt, daß die Frequenz auf der Abszisse von rechts nach links ansteigt. Mit Hilfe des TMS-Standards definiert man die chemische Verschiebung δ

$$\delta = \frac{\nu_{\text{Probe}} - \nu_{\text{TMS}}}{\nu_{\text{TMS}}} \cdot 10^6 \quad (3.18)$$

und gibt die δ -Werte in *parts per million* (ppm) anstatt in Hz an. Die chemische Verschiebung von TMS wird zu 0 ppm definiert und der Faktor 10^6 ist zur Vereinfachung der Zahlenwerte eingeführt.

1D-NMR-Spektren enthalten Information über die Konformation von Proteinen, die anhand der drei folgenden spektralen Parameter analysiert werden kann:

- Die chemische Verschiebung δ . Sie ist eine Folge der magnetischen Abschirmung der Kerne durch ihre Umgebung. δ ist als dimensionslose, geräteunabhängige Größe definiert, die die Lage des NMR-Signals bezogen auf eine Referenzsubstanz und auf die eingesetzte Messfrequenz angibt. Dies ermöglicht den direkten Vergleich von δ -Werten, die aus verschiedenen NMR-Experimenten gewonnen wurden. In dieser heute verwendeten δ -Skala ist das externe Feld auf der Abszisse aufsteigend von links nach rechts ('downfield') dargestellt. Sowohl für die ^1H -, als auch für die ^{13}C -NMR-Spektroskopie ist die Resonanzfrequenz des TMS-Standards zu 0 ppm festgesetzt. Verringerte Abschirmung der Kerne sind auf dieser Skala in der Richtung von rechts nach links zu entnehmen.

- Die Spin-Spin-Kopplungskonstante J . Die Feinstruktur in Molekülen resultiert aus der Wechselwirkung benachbarter Kerndipole über Bindungselektronen. Zu ihrer Beschreibung bedient man sich der Kopplungskonstanten J , die feldunabhängig ist und stets in Hz angegeben wird. Kopplungen können zwischen gleichen und verschiedenen Kernen auftreten (z. B. H,H- und C,H-Kopplungen).

- Die spektrale Intensität I . Sie stellt im allgemeinen nur in ^1H -Spektren, nicht dagegen in ^{13}C -Spektren, einen sinnvollen Parameter dar.

3.3.5 Aufbau des NMR-Spektrometers

In der NMR-Spektroskopie wurden bis ca. 1970 ausschließlich Spektrometer verwendet, bei denen die *continuous-wave*-Technik (*cw*) eingesetzt wurde. Der schematische Aufbau eines *cw*-Spektrometers (Abb. 3.13) ähnelt jenem Gerät, das Bloch ursprünglich verwendet hat. In modernen NMR-Spektrometern ist die *cw*-Technik durch die gepulste Fourier-Transformationspektroskopie abgelöst worden.

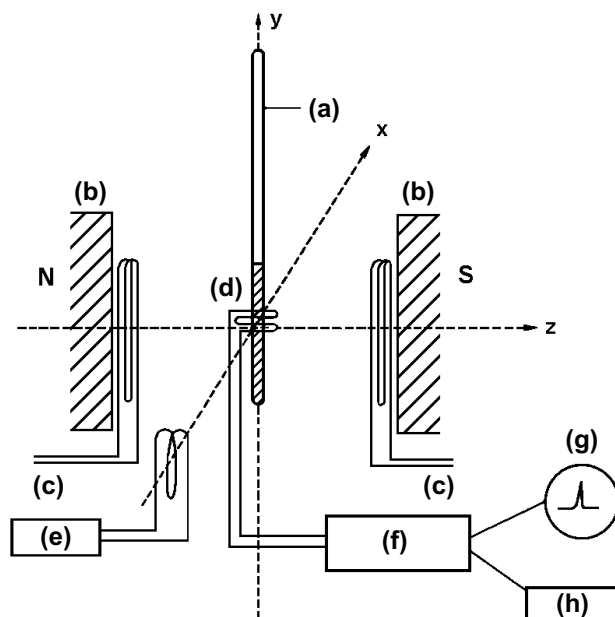


Abbildung 3.13: Schematischer Aufbau eines *cw*-NMR-Spektrometers. (a) NMR-Röhrchen mit gelöster Probensubstanz; (b) Magnet; (c) Sweep-Spulen; (d) Empfänger; (e) Sender; (f) Verstärker; (g) Oszilloskop; (h) Schreiber. Nach [49], S. 9.

Die wichtigsten Bauteile im NMR-Spektrometer sind der Magnet (Magnetfeld in z -Richtung), der Sender zur Erzeugung der Resonanzfrequenz und der Empfänger für die Aufzeichnung des Induktionsspektrums. Prinzipiell sind zwei Möglichkeiten des technischen Aufbaus gegeben, die beide in der Praxis verwirklicht sind:

- entweder wird im *Feld-Sweep-Verfahren* die Senderfrequenz ($\nu = \nu_L$) konstant gehalten, wobei über die Sweep-Spulen das Magnetfeld B_0 verändert wird,
- oder man hält das Magnetfeld konstant und variiert die Senderfrequenz (*Frequenz-Sweep-Verfahren*).

Im *cw*-Spektrometer sind Sender- und Empfängerspule senkrecht zueinander angeordnet, die wiederum senkrecht zum Magnetfeld (in z -Richtung) stehen.

3.4 Strukturuntersuchungen an Proteinen und Polypeptiden

3.4.1 Extrazelluläre Schleife des GnRH-Rezeptors

Einleitung und Motivation

Die Strukturuntersuchungen an der dritten extrazellulären Schleife (ECL3, *extracellular loop 3*) des Hormon-Rezeptors wurden von Prof. Robert Millar vom Institut für Reproduktive Endokrinologie der Universität Kapstadt angeregt. Seine Arbeitsgruppe befasst sich seit Jahren mit dem Gonadotropin-freisetzenden Hormon (GnRH, *gonadotropin-releasing hormone*) und dem zugehörigen Hormonrezeptor (GnRH-R, *gonadotropin-releasing hormone receptor*). Im Mittelpunkt dieser Studien stehen die Hormon-Rezeptor-Wechselwirkungen, die umfassend mit molekularbiologischen und evolutionstheoretischen Methoden untersucht und analysiert wurden [50, 51].

Reproduktive Hormonregulation wird systematisch in sechs Stufen beschrieben: Synthese, Freisetzung, Transport, Erkennung, Signalwandlung und Antwortreaktion. Bei den Untersuchungen der Hormon-Rezeptor-Mechanismen liegt der Schwerpunkt meist auf den beiden Stufen der Erkennung und der Signalwandlung, weil medizinisch-therapeutische Eingriffe auf diesem Sektor vielversprechende Wirkung zeigen.

Die zentrale Funktion von GnRH in der Steuerung der biologischen Reproduktion in Säugetieren und beim Menschen ist lange bekannt [51, 52]. Es wirkt über seine hohe Affinität zum Hormonrezeptor auf die gonadotropen Zellen der Hirnanhangdrüse und stimuliert die Biosynthese und gepulste Freisetzung der beiden Gonadotropine Follitropin und Lutropin [53]. Die Gonadotropinausschüttungen steuern über das FSH (follikelstimulierendes Hormon) die Reifung der Follikel bzw. der Samenzellen und über das LH (luteinisierendes Hormon) die Ausschüttung weiblicher Sexualhormone und des Testosterons.

Synthetisches GnRH findet breite Anwendung in der klinischen Endokrinologie, beispielsweise bei verfrüht auftretenden Pubertätssymptomen oder bei Störungen des weiblichen Zyklus [54]. Die Vision der endokrinologischen Forschung an GnRH und am GnRH-Rezeptor zielt auf den Einsatz von Peptidanaloga als Kontrazeptivum im männlichen wie im weiblichen Organismus, wobei als Adressaten Menschen und Tiere in gleicher Weise in Betracht gezogen werden.

Beim GnRH-Rezeptor zeigt sich in vielen Aspekten morphologische Verwandtschaft zum Rhodopsin, einem membranständigen Sehpigment der Retina. Rhodopsin ist eingehend mit kristallographischen und Kernspinresonanz-Experimenten untersucht worden und seine Modellstruktur wird exemplarisch für viele andere Rezeptoren herangezogen [55, 56]. Der GnRH-R gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und ist mit 328 Aminosäuren einer ihrer kleinsten Vertreter [51].

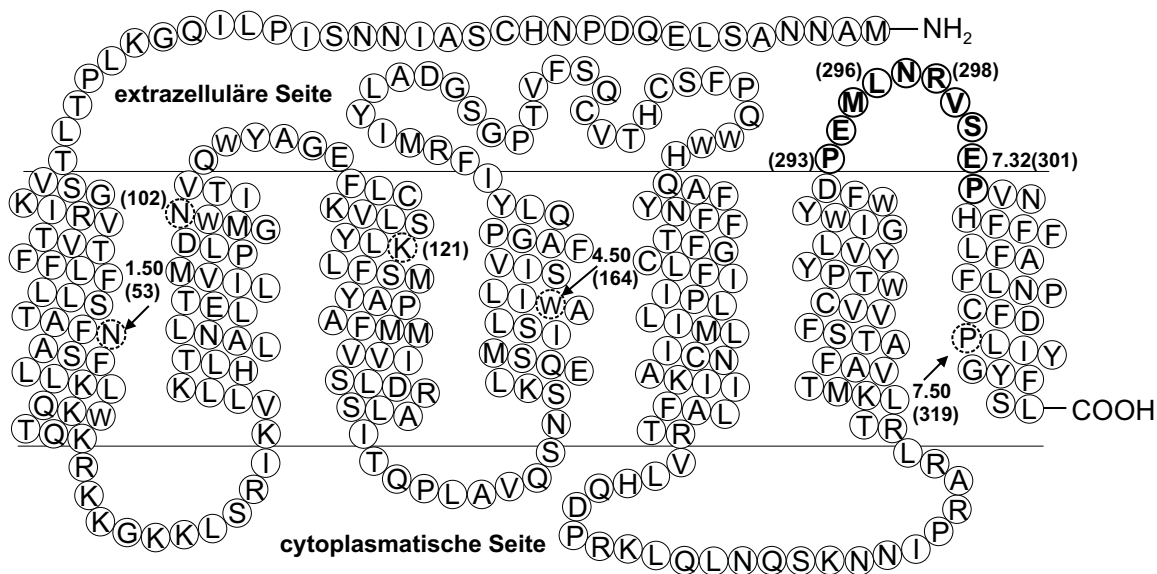


Abbildung 3.14: Aminosäuresequenz und Topologie des GnRH-Rezeptors im Organismus der Maus. Die zehn Reste der dritten extrazellulären Schleife sind fett hervorgehoben. (Erläuterungen zum Nummerierungsschema: siehe Seite 43.)

Wie in der [Abbildung 3.14](#) für den GnRH-R der Maus skizziert, besteht der Rezeptor aus 7 helikalen, transmembranen Domänen (TMD), die durch je drei extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen (*loops*) fortlaufend miteinander verbunden sind. Insbesondere bei den transmembranen Domänen weist der GnRH-R einen hohen Grad von Homologie zu anderen Rezeptoren auf [55], etwa zum Bacteriorhodopsin [57], zum Rhodopsin [56] oder zum β -adrenergen Rezeptor [58, 59]. Dagegen besteht hinsichtlich der internen und externen Schleifen nur geringe Übereinstimmung zwischen dem GnRH-R und den zuvor genannten Rezeptoren aus der GPCR-Familie. Auch die Gegenüberstellung ihrer Aminosäuresequenzen zeigt eine Reihe von Unterschieden. Darüberhinaus fehlt beim GnRH-R komplett die cytoplasmatische Schleife des C-Terminus. Über die Anordnung der Helices innerhalb der Membran der GPCR-Rezeptoren liegt eine Fülle von Informationen und verfeinerter Strukturdaten vor [55, 60, 61, 62, 63]. Die internen und externen *loops*, ebenso wie die C- und die N-Termini, sind jedoch weit weniger exakt definiert. Somit fehlt es an einer hinreichenden Grundlage, die es erlaubt, in Analogie zum Rhodopsin-Rezeptor Aussagen über die Struktur der Schleifen im GnRH-R zu treffen.

Man geht davon aus, daß die G-Protein gekoppelten Rezeptoren ein untereinander ähnliches Schema bezüglich der Rezeptor-Aktivierungsmechanismen aufzeigen [64]. Auf der extrazellulären Seite wird der Rezeptor durch die Anwesenheit des Agonisten aktiviert und nach Ausbildung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes erfolgt eine Konformationsänderung, die transversal über die membranständigen Helices an die intrazellulären Schleifen weitergeleitet wird [62]. Die helikalen Domänen übernehmen hierbei die Aufgabe der Signalpropagation. Der Rezeptor geht unter Bildung eines ternären Komplexes in die aktive Konformation über.

Diesem Schema folgend beruht auch die Rezeptoraktivierung des GnRH-R auf der Bindung des Liganden an den Rezeptor. Seitens des Rezeptors sind am dafür verantwortlichen *binding pocket* sowohl ein Lysinrest (Lys¹²¹) aus der dritten TMD, als auch zwei weitere Reste (Asp⁹⁸ und Asn¹⁰²) am N-Terminus der zweiten TMD beteiligt [65, 66, 67]. Alle Komponenten bilden zusammen die Bindungstasche [51, 68, 69, 70].

Der weiter oben dargestellte Kenntnisstand warf die Frage auf, ob invariante Konformation oder induzierte Konformationsänderungen der dritten Rezeptorschleife eine Rolle beim Zustandekommen eines aktiven (bzw. aktivierten) Komplexes spielen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Struktur-Funktions-Beziehungen mit spektroskopischen Methoden, insbesondere mit Hilfe der Raman-Spektroskopie, erfasst werden können. Aus vergleichbaren Untersuchungen an extra- und intrazellulären *loops* des Rhodopsin [71, 72], am A₂ Thromboxan-Rezeptor [60] und dem β -adrenergen Rezeptor [58, 59] wurde gefolgert, dass synthetische Peptide, die den Sequenzen der *loops* und deren angrenzenden Bereichen der TMD entsprechen, hinreichend in der Lage sind, die natürlichen *loops* funktional und strukturell zu repräsentieren.

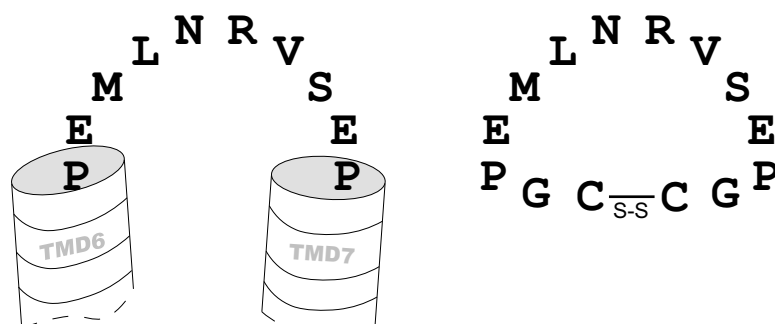


Abbildung 3.15: Skizzenhafte Darstellung eines Ausschnitts des GnRH-Rezeptors mit der dritten extrazellulären Schleife, von der die beiden transmembranen Domänen TMD6 und TMD7 des Hormon-Rezeptors miteinander verbunden werden (**links**). Das synthetische ECL3-Peptid (**rechts**) hat eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Cystein-Resten und wird durch zwei Glycin-Reste von der übrigen Peptidsequenz separiert. Die Schwefelbrücke erzeugt eine lokale Restriktion in der linearen Kette und simuliert die reale Situation, vergleichbar mit jener im nativen Rezeptor.

Die Bezifferung einzelner Aminosäuren in [Abbildung 3.14](#) folgt der von Ballesteros *et al.* eingeführten Nomenklatur der „Consensus-Numerierung“ [73, 74]. Sie basiert auf der Analyse von Sequenzhomologien und Strukturelementen, womit der Vergleich von sequenziellen und strukturellen Merkmalen unterschiedlicher Vertreter aus der GPCR-Familie erleichtert wird. Jener Rest einer transmembranen Helix, der am stärksten konserviert ist, erhält in der Ballesteros-Definition die Zahl 50 zugeordnet. Alle hierzu benachbarten Aminosäuren werden dann auf diesen festgelegten Zahlenwert bezogen und entweder aufsteigend oder absteigend numeriert, je nachdem, ob die Betrachtung sich in Richtung des C-Terminus oder in Richtung des N-Terminus erstreckt. Zusätzlich geht der Zahl ein einstelliger Wert

voraus, mit dem die jeweilige TMD bezeichnet wird. So erhält die meist konservierte Aminosäure Pro³¹⁹ in der siebten transmembranen Helix den Wert Pro^{7.50(319)} zugeordnet. Ihr indizierter Wert (7.50(319)) besagt, dass sich der Prolin-Rest auf der Position 319 der Proteinsequenz befindet, und dass es sich um jenen Rest in der siebten transmembranen Helix (TM7) handelt, der am meisten konserviert ist. Nach diesem Schema erhalten die Reste des ECL3-Peptids eine Zuordnung, die sich auf das konservierte Prolin der TM7 bezieht: zählt man in Richtung des N-Terminus, befindet sich die Glutaminsäure Glu^{7.32(301)} in der TM7 und ist 18 Aminosäuren von Pro^{7.50(319)} entfernt.

Der Rezeptor (Abb. 3.14) bindet mit hoher Affinität und Selektivität an das Peptidhormon GnRH, ein Dekapeptid mit der Sequenz pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly.NH₂, das vom Hypothalamus synthetisiert und durch Neurosekretion freigesetzt wird [69, 70]. Es wurde diskutiert, ob ein Beitrag zur hohen Affinität von der Wechselwirkung zwischen dem konservierten Glutaminsäurerest (Glu^{7.32(301)}) im Rezeptor und dem Arginin in Position 8 des GnRH-Hormons herrührt [69, 70]. Möglicherweise wird die hohe Bindungsaffinität durch die Anwesenheit des Prolinrestes in unmittelbarer Nachbarschaft zur Glutaminsäure Glu^{7.32(301)} hervorgerufen. Die besondere Rolle von Prolin und die daraus resultierenden sterischen Einschränkungen in der Polypeptidkette wurden bereits in den Kapiteln 2.1 und 2.2.4 angesprochen. Wendet man die dort aufgeführten Kriterien auf den Rezeptor-Hormon-Komplex an, so erscheint es plausibel, dass die unmittelbare sequenzielle Nachbarschaft der beiden Reste Glu³⁰¹ und Pro³⁰² im ECL3-Peptid eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen Glutaminsäure Glu³⁰¹ aus der dritten extrazelluläre Schleife und dem positiv geladenen Argininrest Arg⁸ des Hormon-Dekapeptids unterstützt.

Zielsetzung und Strategien

Zur Beantwortung der in der Einleitung diskutierten Fragen wurde ein Peptid entworfen, das der dritten extrazellulären Schleife des GnRH-Rezeptors entsprach. Das ECL3-Peptid wurde nach der t-BOC-Strategie am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Universität Queensland in Brisbane synthetisiert. Wie in Abbildung 3.15 angedeutet, besteht das Peptid mit der Sequenz CGPEMLNRVSEPGC aus den zehn Aminosäuren, mit denen die TMD6 und die TMD7 verbunden werden, sowie aus den zusätzlichen Glycin- und Cystein-Resten an den beiden Termini. Mit den Cysteininsertionen lässt sich eine Modifikation des linearen Peptids durch den Einbau einer Schwefelbrücke erreichen. Die beiden Glycine trennen einerseits die Cys-Reste von der eigentlichen ECL3-Sequenz und erzeugen andererseits einen Abstand von ca. 15 Å zwischen Pro3 und Pro12, der den realen Abstand im nativen Rezeptor simulieren soll.⁴

⁴Zur übersichtlichen Beschreibung der Ergebnisse aus der NMR-Spektroskopie werden die Positionen der Reste im synthetischen ECL3-Peptid vom N- zum C-Terminus fortlaufend mit den Ziffern 1 bis 14 neben dem Einbuchstaben- bzw. dem Dreibuchstabensymbol gekennzeichnet (vgl. Abb. 5.15, Seite 76).

Nach der Synthese des linearen ECL3-Peptids wurde die Kette vom Harz mit wasserfreier HF abgetrennt und auf einer Reversed Phase C18-Säule chromatographisch aufgereinigt. Das Einbringen der Disulfidbrücke geschah in einem nachfolgenden Schritt in einer 12-stündigen Sauerstoffoxidationsreaktion (1:1 DMF-H₂O). Daraufhin wurde wiederholt mit HPLC aufgereinigt und über MALDI-TOF-Massenspektrometrie die Sequenz überprüft und bestätigt.

Spektroskopische Messparameter

Bei den CD-Messungen an der dritten extrazellulären Schleife des GnRH-Rezeptors war die Frage aufgekommen, ob die spektroskopischen Ergebnisse signifikante Abweichungen zeigen würden, wenn entweder der NaF-haltige Puffer, oder eine Standard-Nährlösung ('Medium 199', s. [Anhang C](#)) verwendet wird. Diese war in vorangegangenen Untersuchungen als Nährlösung in zellbiologischen Kulturen und zur pharmakologischen Charakterisierung in einer Reihe von Mutationsexperimenten eingesetzt worden [69, 70]. Die Nährlösung 'Medium 199' enthält eine Reihe von anorganischen Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und organischen Komponenten und kann daher die Funktionen eines Puffers übernehmen. Idealerweise sollten bei den CD-Messungen die gleichen Pufferlösungen benutzt werden wie bei den vorausgegangenen biochemischen Tests am synthetischen ECL3-Peptid.

Zusätzliche CD-Messungen unter Variation der Temperatur zwischen 4 und 80 °C wurden am zyklischen ECL3-Peptid mit einem JASCO (Modell J715) Spektropolarimeter am EMBL Heidelberg (*European Molecular Biology Laboratories*) vorgenommen. Das Gerät ist mit einem Peltier-Element ausgestattet, mit dem die Temperatur der Probe mit großer Genauigkeit in Intervallen von 0,1 °C reguliert werden kann.

Die NMR-Untersuchungen zur ECL3-Struktur wurden von Dr. David Craik (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Universität Queensland, Brisbane) durchgeführt. Es wurden zwei Bruker-NMR-Spektrometer (500 MHz und 750 MHz DRX) verwendet, mit denen COSY-, TOCSY- und NOESY-Studien vorgenommen wurden [75, 76]. Die Messungen erfolgten in der Nähe von bzw. unterhalb der Raumtemperatur (280 – 310 K) unter Aufzeichnung im TPPI-Modus, bei dem das zeitliche Inkrement proportional zum Phaseninkrement ausgelegt ist [77]. Für die TOCSY-Experimente wurde eine isotrope Mischzeit von 80 ms gewählt [78]; die NOESY-Signale wurden mit unterschiedlichen Mischzeiten (200 ms, 250 ms, 300 ms) aufgezeichnet [79]. Zur Unterdrückung des Wassersignals wurde im DQF-COSY-Experiment während der Spinrelaxation (1,8 s) eine herabgesetzte Leistung eingestrahlt. Bei den TOCSY- und NOESY-Messungen erfolgte die Unterdrückung des Lösungsmittels über eine modifizierte Watergate-Sequenz [80], bei der zwei Gradientenpulse von 1 ms Dauer und 6 G cm⁻¹ Stärke beiderseits des binomialen Pulses eingesetzt wurden. Die 2D Spektren wurden über 4096 Datenpunkte in der F₂-Dimension und über 512 Punkte in der F₁-Dimension aufgezeichnet. Alle Spektren wurden auf einer Silicon Graphics Workstation mit dem Programm „XwinNMR“ von Bruker prozessiert. Vor der Fourier-Transformation des FID wurde die F₁-Dimension jeweils mit einer Zero-Filling-

Prozedur (Verlängerung des FID durch Auffüllen mit Nulldaten) auf 2048 reale Datenpunkte erhöht. Zusätzlich wurden die F_1 - und die F_2 -Dimension mit einer quadratischen Sinus-Funktion um 90° verschoben.

3.4.2 Alanin–Prolin–Polypeptide

Eine andere Thematik, die dem Bereich der Grundlagenforschung zugeordnet werden kann, wird in dieser Arbeit mit drei Polypeptiden angesprochen, die ausschließlich aus Alanin- und Prolin-Resten bestehen. Die Proben wurden vom Department of Medical Biochemistry der Universität Kapstadt für die Untersuchungen mit CD-, Raman- und NMR-Spektroskopie zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen der drei Peptide AlaPro(Ala) $_n$ (mit $n = 3, 4, 5$) werden in dieser Arbeit mit den allgemein üblichen Abkürzungen geschrieben:

Peptidsequenz	Kurzbezeichnung	Sequenzen der drei Alanin–Prolin–Polypeptide. Für die Kurzbezeichnungen ist die Anzahl der Alanin–Seitenketten des C–Terminus als Index neben das Einbuchstabensymbol gesetzt.
APAAA	APA ₃	
APAAAA	APA ₄	
APAAAAA	APA ₅	

Das Interesse an diesen einfachen Sequenzen konzentriert sich auf die Peptidbindung zwischen der Iminosäure Prolin und der ihr vorangehenden Aminosäure Alanin auf der N-terminalen Seite. Wie im [Abschnitt 2.2.4](#) bereits angesprochen, nimmt Prolin unter den 20 proteinogenen Aminosäuren eine Ausnahmeposition ein. Seine Seitenkette ist nicht nur an das α -Kohlenstoffatom gebunden, wie alle übrigen Reste auch, sondern zusätzlich an das Stickstoffatom, wodurch sich eine annähernd planare, ringförmige Molekülgestalt ergibt. Die von dem fünfgliedrigen Ring ausgehenden sterischen Einschränkungen erstrecken sich auch auf den Rest auf der aminoterminalen Seite des Prolins. Für eine X-Pro-Sequenz ist es unwahrscheinlich, dass sie Teil einer α -Helix ist. Darüber hinaus beeinträchtigt Pro die Entstehung einer α -Helix, da ihm ein Amid-H-Proton zum Aufbau von Wasserstoffbrücken mit den benachbarten Aminosäuren fehlt. Die besondere Form der Seitenkette begünstigt das Ausbilden von β -Faltblattstrukturen und Pro ist daher bevorzugt in Haarnadelschleifen zu finden. In β -Schleifen ist die relative Häufigkeit für das Auftreten von Pro 4-mal größer als in helikalen Strukturen (vgl. [Tab. 2.4](#)).

Aus diesen Vorüberlegungen folgern bereits vor den spektroskopischen Untersuchungen einige Annahmen über die Strukturen der Alanin–Prolin–Polypeptide. Eine helikale Konformation ist beispielsweise für das Polypeptid APA₃ äußerst unwahrscheinlich. Sie käme theoretisch nur dann zustande, wenn sich zwischen dem ersten und dem letzten Ala-Rest eine H-Brücke ausbilden würde. Die sperrige Seitenkette des Prolins zwingt jedoch dem zugänglichen Konformationsraum eine starke Restriktion auf. Ähnliche Überlegungen gelten analog für die beiden Polypeptide APA₄ und APA₅, bei denen die Kette am C-Terminus sukzessive um 1 bzw. 2 Ala-Reste verlängert wurde. Das häufige Auftreten

von Pro in β -turns wurde bereits im [Kapitel 2.2.2](#) angesprochen. Somit erscheint es diskutabel, dass sich einige der insgesamt vier, fünf bzw. sechs dihedralen Winkel ϕ und ψ an den Amidbindungen zu einer partiellen β -Faltblattstruktur orientieren. Eine H-Brücke zwischen der C=O-Gruppe des ersten Ala-Restes (i) und der Aminogruppe des vierten Restes ($i + 3$), über die ein β -turn aufgebaut werden könnte, wäre prinzipiell in jedem der Polypeptide AlaPro(Ala) $_n$ möglich. Darüber hinaus liegt die Vermutung nahe, dass ein großer Anteil der Polypeptide in ungeordneter Struktur vorliegt, da alle drei Peptidketten sehr kurz und flexibel sind und einen großen Konformationsraum einnehmen.

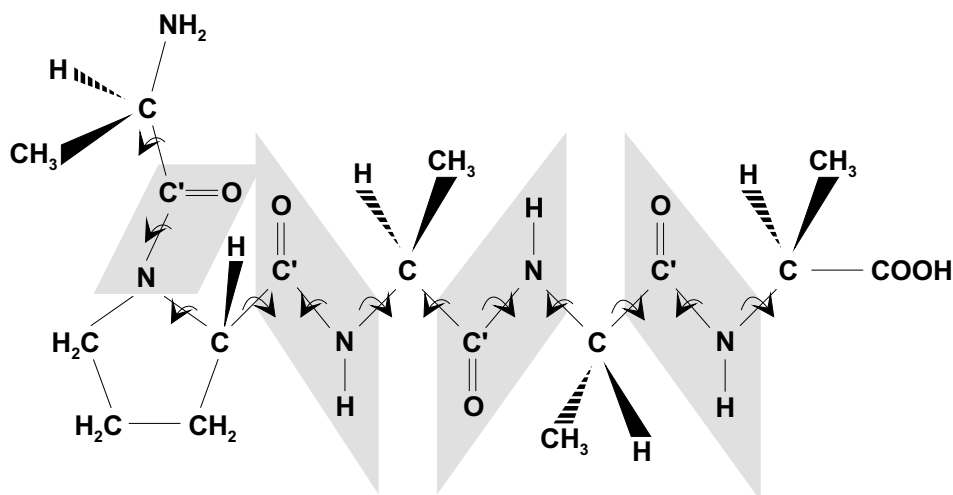


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der Molekülstruktur des Pentapeptids APA₃ mit den dihedralen Torsionswinkeln ϕ_i , ψ_j des Peptidrückgrats und den Konfigurationswinkeln ω_k der Peptidbindung (mit $i, j, k = 1 \dots 4$ und $\phi_i = \psi_j = \omega_k = 180^\circ$). Die 4 planaren Peptidbindungen sind schattiert eingezeichnet. Die Alanyl-Prolyl-Peptidbindung liegt hier in der *cis*-Konfiguration ($\omega_1 = 0^\circ$) vor (s. [Tab. 2.2](#), Seite 8).

Eine schematische Darstellung der ausgestreckten Kette ist für das Polypeptid APA₃ in der [Abbildung 3.16](#) gezeigt. Die drei Alaninreste am C-Terminus sind in linearer Anordnung wechselständig (in *trans*-Konfiguration) entlang des Rückgrates angeordnet. Beim Hexapeptid APA₄ und beim Heptapeptid APA₅ ergäbe sich ein ähnliches Bild, lediglich der C-Terminus ist um eine bzw. zwei weitere Alaninreste in analoger Weise fortgesetzt zu denken. Die Polypeptidkette wird nahe dem N-Terminus stark umgelenkt und ist in der Zeichnung mit einer 90°-Richtungsänderung übertrieben dargestellt.

3.4.3 Helikale Modellpeptide

Zur Untersuchung helikaler Sekundärstrukturen wurde für diese Arbeit eine Serie von 13 Peptiden zusammengesetzt. Die Peptidproben mit Alanin-reichen Sequenzen wurden am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften (Biozentrum), Physiologische Chemie I synthetisiert. Hierfür wurde die Fmoc-Variante der Festphasenpeptidsynthese auf einem automatisierten Synthesegerät (SMPS350 Zinsser Analytic, Syro II, MultiSynTech GmbH) verwendet (s. [Kap. 4.2](#)). Bei der Synthese wurde ein neuer Kupplungsaktivator (HOAt) eingesetzt [81, 82], mit dem hohe Ausbeuten unter extrem niedriger Racematbildung erzielt wurden. Alle Peptide wurden nach der Abtrennung vom Harz gewaschen, lyophilisiert und routinemäßig chromatographisch analysiert. Die Modellpeptide sind an den Enden jeweils acetyliert bzw. amidiert, um Dipolwechselwirkungen der Peptidtermini zu vermeiden. Dadurch können die Kettenenden an der Bildung von H-Brückenbindungen teilnehmen und zur Stabilisierung der Sekundärstruktur beitragen. Allen Peptiden ist das N-Terminus mit dem einzelnen Tyr-Rest gemeinsam, das durch zwei Gly-Reste vom übrigen Teil der Kette getrennt ist. Wie im [Kapitel 4.1](#) bereits angesprochen, wird Tyr als Chromophor für die Konzentrationsbestimmung mittels UV-Absorptionsmessungen benötigt. Im CD-Spektrum liefert Tyrosin jedoch einen zusätzlichen Beitrag zu den negativen Banden im nahen UV-Bereich. Dies verfälscht die CD-Messergebnisse und die exakte Bestimmung des Helixgehaltes. Der Einfluss der Tyr-Reste kann eliminiert werden, wenn mindestens ein Glycin, oder besser zwei Glycine, in die Sequenz unmittelbar neben Tyr eingesetzt sind [25, 83].

Zur Beschreibung der physikalisch-chemischen Merkmale und im Hinblick auf die Diskussion der Ergebnisse wurden Kurzbezeichnungen für die Peptide gewählt, welche die Hauptmerkmale der jeweiligen Sequenzen erfassen sollen. Die Kurzbezeichnungen in der äußerst rechten Spalte der [Tabelle 3.2](#) setzen sich aus Buchstaben und Ziffern zusammen, deren erste Zahl jeweils der Anzahl von Leucin- bzw. Isoleucin-Insertionen entspricht. Daran schließt sich das Einbuchstabensymbol der eingesetzten Aminosäure an (L oder I) und darauf folgend steht in Klammern die Position der eingesetzten Aminosäure, wobei folgende Schematik zu Grunde gelegt wurde: In jeder Sequenz befinden sich drei Blöcke, bestehend aus 4 Ala-Resten, die zu beiden Seiten zwischen den positiv geladenen Seitenkette des Lysin (K) eingebunden sind. Je einer der Ala-Blöcke befindet sich näher am C-Terminus angeordnet (C), einer in der Mitte der Peptidsequenz (M) und einer am N-Terminus (N). In einigen Fällen, z. B. für die Peptide 3L oder 0L, waren diese zusätzlichen Angaben redundant, so dass sie zur Vereinfachung weggelassen wurden. Die sukzessiven Leu- oder Ile-Insertionen (1, 2, und 3) in den Ala-Blöcken erfolgten immer auf der gleichen Position. Als interne Referenz diente das Peptid „ref“, das weder Leu- noch Ile-Insertionen enthielt.

Aus den oben beschriebenen Peptidsequenzen lassen sich bei den spektroskopischen Untersuchungen eine Reihe von Fragestellungen zum Proteinfaltungsproblem angehen. Beispielsweise können die spektroskopischen Daten in der Weise zusammengestellt werden, dass der Einfluss auf die Struktur aufgrund der zunehmenden Zahl von Leu-Resten betrachtet wird, die jeweils auf der gleichen Position innerhalb der Ala-Blöcke inseriert wurden (0L \rightarrow 1L(C) \rightarrow 2L(C) \rightarrow 3L). In analoger Weise kann eine Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der Ile-Reihe mit der Folge 0I \rightarrow 1I(C) \rightarrow 2I(C) \rightarrow 3I vorgenommen werden. In einer anderen Auswahl lässt sich die Positionsabhängigkeit von je einer einzelnen Insertion in den drei verschiedenen Ala-Blöcken studieren (1L(C) \rightarrow 1L(M) \rightarrow 1L(N) bzw. 1I(C) \rightarrow 1I(M) \rightarrow 1I(N)).

Tabelle 3.2: Peptidsequenzen der Alanin-reichen Modellpeptide mit 1 bis 3 Leu- bzw. Ile-Insertionen in den Ala-Blöcken der Polypeptidkette. (Erläuterung der Probennamen und Kurzbezeichnungen: siehe Seite 48.)

Peptidsequenz	Insertion	Kurzbezeichnung
YGGKAA L AKAA L AKAA L AK	3 Leu	3L
YGGKAAA AKAA L AKAA L AK	2 Leu	2L(C)
YGGKAAA AKAAA AKAA L AK	1 Leu	1L(C)
YGGKAAA AKAA L AKAAA AK	1 Leu	1L(M)
YGGKAA L AKAA L AKAAA AK	2 Leu	2L(N)
YGGKAA L AKAAA AKAAA AK	1 Leu	1L(N)
YGGKAA I AKAA I AKAA I AK	3 Ile	3I
YGGKAAA AKAA I AKAA I AK	2 Ile	2I(C)
YGGKAAA AKAA AAKAA I AK	1 Ile	1I(C)
YGGKAAA AKAA I AKAA A AK	1 Ile	1I(M)
YGGKAA I AKAA I AKAA AAK	2 Ile	2I(N)
YGGKAA I AKAA AAKAA AAK	1 Ile	1I(N)
YGGKAA AAKAA AAKAA AAK	0 Leu/0 Ile	ref

Die Nonadekapeptide haben einen hohen Anteil an Ala-Resten, wodurch die Ausprägung helikaler Sekundärstruktur begünstigt wird, da Ala mit seiner kleinen CH₃-Seitenkette ein hohes Potenzial zum Aufbau von Helices aufweist (vgl. Tab. 2.4). Mit den Insertionen von 1, 2 und 3 Leu bzw. Ile kann das Gleichgewicht zwischen Helix- und *random coil*-Struktur in Abhängigkeit der Insertionen studiert werden. Insbesondere für quantitative Untersuchungen des Strukturgehaltes kamen hierfür in dieser Arbeit die

CD- und die Raman-Spektroskopie in Betracht. Mit Hilfe von 2D NMR-Experimenten (COSY, TOCSY, NOESY) konnten komplementäre Informationen über intermolekulare, lokale Wechselwirkungen innerhalb der Polypeptidkette erhalten werden.

Mit der Wahl der Aminosäuren Leu und Ile für die Substitutionen sollte ein zusätzlicher Aspekt in die Untersuchungen an den Modellpeptiden eingebracht werden. Beide Reste haben identisches Molekulargewicht, jedoch unterscheiden sie sich hinsichtlich ihres molekularen Aufbaus. Anhand der [Abbildung 3.17](#) lässt sich die unterschiedliche Verzweigung der Seitenketten erläutern. Die Aminosäuren Leu und Ile sind in Bezug auf die Anzahl der Methyl-, der Methylen- und der CH-Gruppen identisch aufgebaut. Sie unterscheiden sich lediglich in der Anordnung der drei chemischen Gruppen. Beim Leu tritt am letzten Kohlenstoffatom der Seitenkette (C_γ) eine Verzweigung auf (γ -branched), wogegen das Ile weiter vorne in der Kette, am C_β -Atom, verzweigt ist (β -branched). Daraus ergeben sich für den Leu-Rest andere sterische Einschränkungen als für den Ile-Rest, die bei den sukzessiven Insertionen in der Polypeptidkette (0L \rightarrow 1L(C) \rightarrow 2L(C) \rightarrow 3L und 0I \rightarrow 1I(C) \rightarrow 2I(C) \rightarrow 3I) Auswirkungen auf die helikale Struktur erwarten lassen.

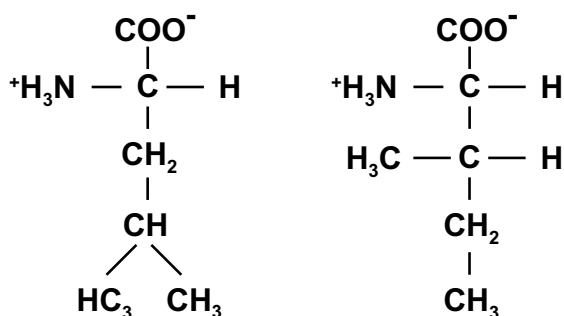


Abbildung 3.17: Strukturformeln der Aminosäuren Leucin (**links**) und Isoleucin (**rechts**). Beide Reste zählen zur Gruppe der aliphatischen Aminosäuren und unterscheiden sich in den Anordnungen der Methyl- und Methylengruppen. Die Seitenkette ist im Leu-Rest auf dem γ -Kohlenstoffatom (γ -branched) und beim Ile-Rest auf dem β -Kohlenstoffatom verzweigt (β -branched).) Nach [4].

Kapitel 4

Materialien und Methoden

Dieses Kapitel erfasst die Chemikalien und Lösungen, die zur Probenherstellung, in der HPLC-Analyse und für die CD-spektroskopischen Untersuchungen verwendet wurden. Darüber hinaus werden die technischen Prinzipien der automatisierten Festphasenpeptidsynthese und die Probenaufreinigung unter Einsatz der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie umrissen.

4.1 Eingesetzte Chemikalien und Pufferlösungen

An die Puffer, die in der CD-Spektroskopie zum Einsatz kamen, waren spezielle Anforderungen hinsichtlich der Transparenz im UV-Bereich gestellt. Die Versuchsbedingungen und die Durchführung der CD-Experimente in dieser Arbeit wurden in Anlehnung an Arbeiten von Forschungsgruppen¹, die ähnliche Fragestellungen bearbeitet hatten, ausgeführt. Dadurch sollte die Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit mit jenen aus anderen Untersuchungen gewährleistet werden.

In mehreren CD-Untersuchungen wurde der Einsatz von NaCl-haltigen Puffern systematisch im Bereich von 10 mM bis 1 M variiert, um deren Einfluss auf die Sekundärstruktur zu studieren [85, 91, 92]. In eigenen Vorversuchen am CD-Spektrometer hatte sich allerdings gezeigt, dass der chlorid-haltige Puffer das S/N-Verhältnis negativ beeinflusst. Dies zeichnete sich bereits bei den Vorversuchen ab, so dass die CD-Scans bei etwa 200 nm unterbrochen werden mussten. Die Chlorid-Ionen absorbieren stark im kurzwelligen Bereich, wodurch das CD-Spektrometer automatisch die Verstärkungsspannung am Photomultiplier in den kritischen, nichtlinearen Hochspannungsbereich nachregelt. Für eine gesicherte Interpretation der CD-Spektren und für die quantitative Auswertung der Sekundärstruktur sind besonders die Banden im fernen UV maßgeblich. Auf die Qualität der CD-Spektren speziell in diesem Spektralbereich lässt sich über zwei Faktoren (Schichtdicke der Küvette, Wahl des Puffers) entscheidend einwirken. Prinzipiell ist auch die Proben-

¹Beispielhaft seien hier genannt: R. Baldwin [84, 85], E. Stellwagen [86], L. Serrano [40, 87], F. X. Schmid [88] und N. Kallenbach [89, 90].

konzentration eine Variationsgrösse, mit der die erhaltenen CD-Signale optimiert werden können (vgl. Gl. 3.2). Hier ist jedoch nur ein limitierter Spielraum vorhanden, da die Peptid-Lösungen für die Messungen so eingestellt bzw. verdünnt werden sollten, dass sowohl das Auftreten von Dimerisierung ausgeschlossen ist, als auch die Gesamtabsorption der Probe den Wert 1 nicht übersteigt. Andererseits würde das CD-Spektrometer mit zu stark verdünnten Lösungen in der Nähe des Detektionslimits arbeiten.

Die in dieser Arbeit vorgestellten CD-Daten wurden daher mit einem Phosphat-, Citrat-, Borat-haltigen Puffer durchgeführt, dem NaF anstelle von NaCl zugesetzt worden war. Der CD-Puffer wurde unter Verwendung von NaOH- und HCl-Lösungen bei Raumtemperatur mit einem pH-Meter auf pH 7,0 eingestellt. Die Peptidkonzentrationen lagen zwischen 20 und 100 μM . Unmittelbar vor dem Einsatz für die spektroskopischen Untersuchungen wurden die gelösten Proben mit einem Feinfilter filtriert. Die eingesetzten Quarzküvetten hatten Schichtdicken von 0,2 cm, 0,02 cm sowie 0,01 cm, für deren Füllung eine Probenmenge von etwa 50 bis 100 μl benötigt wurde. Mit dem Chlorid-freien Puffer ließen sich CD-Spektren mit akzeptablem S/N-Verhältnis bis in den fernen UV-Bereich aufzeichnen. Weitere Details der verwendeten Puffer sind dem [Anhang C](#) zu entnehmen. In einigen CD-Messungen wurde den Puffern, in denen definierte Mengen von Peptiden gelöst waren, 40 Vol.% Trifluorethanol (TFE) zugesetzt. Die helixstabilisierende Wirkung von TFE ist lange bekannt, wenngleich die Ursachen für den signalverstärkenden Effekt des Alkohols in den CD-Banden bisher noch nicht völlig verstanden sind [24].

Den Richtlinien des Geräteherstellers folgend wurde die standardisierte Zweipunkt-Kalibrierung des Spektrometers regelmäßig mit Campher-Sulfonsäure durchgeführt [93]. Das Scannen der CD-Spektren erfolgte in einem Wellenlängenbereich zwischen 300 und ~ 190 nm, mit einer Zeitkonstanten (*response time*) von 0,25 s und einer Scangeschwindigkeit von 200 nm/min. Es wurden 20 Spektren von jeder Probe akkumuliert, deren Mittelwerte vom Messprogramm als Rohdaten ausgelesen werden. Nach jedem Probenwechsel wurden die Quarzküvetten mit Ethanol (p. a.) gespült und mit der reinen Pufferlösung in einem Kontrollscan dahingehend überprüft, dass keine Peptidrückstände in den Küvetten zurückgeblieben waren. Die Basislinie des Puffers wurde an jedem Versuchstag separat aufgezeichnet und für die nachfolgende Datenauswertung abgespeichert.

Die qualitative Auswertung der CD-Daten ist hochsensitiv hinsichtlich der gemessenen Protein- oder Peptidkonzentrationen und erfordert die Konzentrationsbestimmung mit einer Genauigkeit von $\pm 5\%$ oder besser [46]. In Sequenzen, in denen die Aminosäuren Tyrosin oder Tryptophan enthalten sind, bietet sich die Absorptionsspektroskopie bei 280 nm an [94]. Sie ist leicht und schnell in der experimentellen Handhabung und wird weit weniger durch parallele Absorption von nichtproteinogenen Substanzen gestört, als dies bei Bestimmungsmethoden der Fall ist, die auf Färbetests beruhen [48]. Die aromatischen Aminosäuren (Tyr, Trp) zeigen im UV-Bereich Absorptionsmaxima, die mit Hilfe der bekannten molaren spektralen Absorptionskoeffizienten ϵ zur Ermittlung der Konzentration eingesetzt werden. Eine andere Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung, die insbesondere bei Chromophor-freien Sequenzen in Frage kommt, ist mit einem kolorimetrischen

Nachweis, dem Lowry-Test, gegeben [48]. Der Farbstofftest beruht auf der Komplexbildung von Kupferionen aus gelöstem Biuret (Carbamoylharnstoff) mit den Tyrosinresten des zu untersuchenden Proteins (Biuret-Reaktion). Die spektralen Absorptionskoeffizienten individueller Proteine (Peptide) können sich im Lowry-Test bis zu einem Faktor 2 unterscheiden und müssen gegenüber einem Referenzwert geeicht werden. Seine Anwendung für die qualitative CD-Spektroskopie wurde wiederholt kritisch diskutiert [43].

4.2 Festphasenpeptidsynthese

Bei der Peptidsynthese werden je zwei Aminosäuren in einer Kondensationsreaktion zusammengesetzt und schrittweise zu einer Polymerkette aufgebaut. Nach der Merrifield-Methode [95] wächst das an einem polymeren Trägermaterial immobilisierte Peptid vom C-Terminus zum N-Terminus an.² Der Ablauf der Kupplungsreaktion muss eindeutig erfolgen, damit unerwünschte Nebenreaktionen unter den Reaktionspartnern ausgeschlossen werden. Dazu müssen die Aminosäuren mit gezielt abspaltbaren Schutzgruppen ausgestattet sein, welche die Carboxyl- und die Aminogruppen während bestimmter Teilschritte im Syntheseverlauf blockieren und unkontrollierte Polymerisierung vermeiden sollen. Zusätzlich müssen die reaktiven Seitenketten einiger Aminosäuren bis zum Ende der gesamten Synthese durch geeignete Schutzgruppen maskiert sein. Jedem Kupplungsschritt (Kondensation) geht ein Aktivierungsprozess voraus, bei dem die vergleichsweise träge Carboxylgruppe der (N-terminal geschützten) Aminosäure durch Kupplungsreagenzien hoher Reaktivität (Diisopropylcarbodiimid und Hydroxybenzotriazol, HOBt) zu einem Aktivester umgesetzt wird. Nach dem Abschluss der Peptidsynthese erfolgt die Abspaltung von der Trägersubstanz und das Entfernen der Seitenkettenschutzgruppen durch die Behandlung mit konzentrierter Trifluoressigsäure (TFA) in Gegenwart geeigneter Radikalfänger (*scavenger*).

Die schematische Darstellung der [Abbildung 4.1](#) demonstriert das Syntheseprinzip mit der Bildung einer kovalenten Peptidbindung zwischen dem Carboxylterminus der zu kupplenden Aminosäure und dem freien Aminoterminus der Polypeptidkette, die unter Abspaltung eines Wassermoleküls zustande kommt.

Das Problem der Ausbeute spielt bei der Festphasenpeptidsynthese eine große Rolle. Unterstellt man für jeden Reaktionsschritt (bestehend aus Deprotektionierung, Aktivierung und Kupplung) eine 90 %-ige Effizienz, so würde die Herstellung eines Peptids, das aus 100 Aminosäuren besteht, nach 100 durchlaufenen Reaktionszyklen eine Ausbeute von $100^{0,90} \simeq 0,003\%$ ergeben. Mit der Merrifield-Methode können jedoch Ausbeuten einzelner Reaktionen um 99 % und 99,5 % erzielt werden, wodurch sich das Syntheseergebnis des vorangegangenen Beispiels auf etwa 66 % erhöht. Die Reinheit kann durch *Capping* der nicht verlängerten Aminogruppen gewährleistet werden.

²Sequenzen von Proteinen und Polypeptiden werden immer in umgekehrter Reihenfolge, vom N-Terminus beginnend in Richtung zum C-Terminus, notiert.

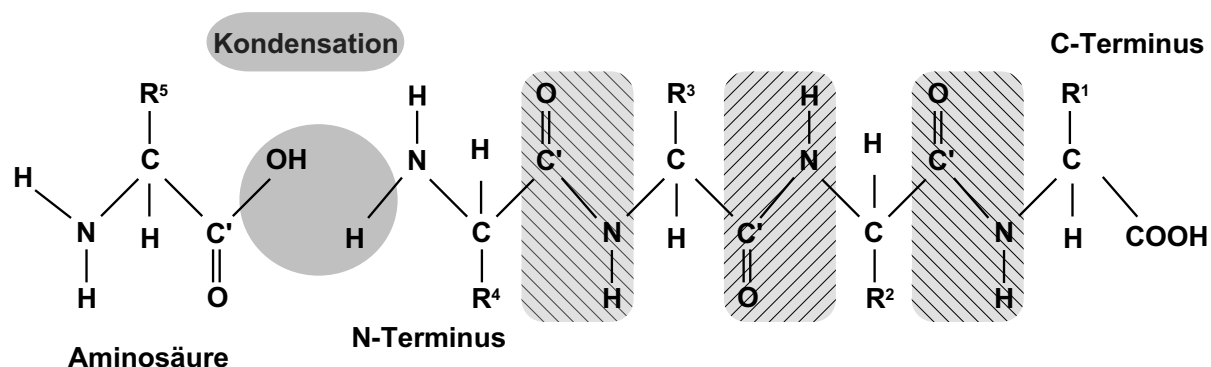


Abbildung 4.1: Prinzip der Festphasenpeptidsynthese. An die vorhandenen vier Reste $R^1 \dots R^4$, die über drei Peptidbindungen (schraffiert) bereits miteinander verbunden sind, wird in einer Kondensationsreaktion auf der N-terminalen Seite des Restes R^4 eine weitere Aminosäure gekuppelt. Dabei wird ein Molekül Wasser frei. Der zu kuppelnde Rest R^5 ist zur Vereinfachung ohne α -Aminoschutzgruppe gezeichnet. Nach [4], S. 468.

Die Synthese der 13 Nonadekapeptide (s. Tab. 3.2) erfolgte im μM -Maßstab nach der Fmoc-Methode (Fluorenylmethoxycarbonyl). Als polymeres Trägermaterial wurden Rinkamidharze eingesetzt, so dass nach der Abspaltung am Ende der Synthese die Peptidtermini als Amide vorlagen. Die Abspaltung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppen erfolgte mit 20 %-igem Piperidin in Dimethylformamid (DMF). Zur Aktivierung der zu kuppelnden Aminosäuren wurde der neu eingeführte Aktivator HOAt (1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol) [81, 82] in N-Methylpyrrolidon eingesetzt, mit dem hohe Syntheseausbeuten und racematfreie Probenqualität erzielt werden konnten (s. Kap. 5.3).

Folgende geschützte Aminosäurederivate kamen bei der Synthese der Modellpeptide zum Einsatz:

Tyr	Fmoc-Tyr(tBu)-OH,
Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH,
Ala	Fmoc-Ala-OH,
Gly	Fmoc-Gly-OH,
Leu	Fmoc-Leu-OH,
Ile	Fmoc-Ile-OH.

Unmittelbar nach dem letzten Kupplungsschritt erfolgte die Acetylierung der ungeschützten Carboxylgruppen durch Essigsäureanhydrid. Abschließend wurden die Harze 5mal in DMF gewaschen, 4mal in Methanol und 5mal in Dichlormethan, bevor sie im Wasserstrahlvakuum getrocknet wurden. Das Abtrennen der Peptide vom festen Trägermaterial folgte einer standardisierten Arbeitsvorschrift unter Verwendung eines Abspaltungsreagenz, bestehend aus 90 % TFA, 2,5 % Wasser, 5 % Ethandithiol und 2,5 % Anisol (die letzteren beiden sind als Scavenger eingesetzt).

Nach dem Abfiltrieren der Harze und wiederholtem Auswaschen der Abspatlösung wurden die Filtrate etwa 3 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach dem Einengen

der Filtrate im Membranpumpenvakuum wurden die Überstände in TFA aufgenommen, in eisgekühlten Ether getropft und 30 min im Eisbad stengelassen. Daraufhin wurden die Niederschläge bei 7000 Upm abzentrifugiert und nach Dekantieren des Überstandes 4mal mit eisgekühltem Ether gewaschen. Abschließend wurden die Rückstände in Wasser mit 5 % Essigsäure aufgenommen und lyophilisiert.

Alternativ zur Fmoc-Synthese-Strategie lassen sich Peptide unter Verwendung von BOC-Schutzgruppen (t-Butyloxycarbonyl) für die α -Aminogruppen synthetisieren, wobei die säure-katalysierte Abspaltung dieser Schutzgruppen mit TFA durchgeführt wird. Die verwendeten Substanzen und Lösungsmittel wurden kommerziell bei verschiedenen Herstellern erworben (s. [Anhang C](#)). Die Reinheit der Chemikalien entsprach HPLC-Qualität oder der zur Analyse (p. a.) und alle Substanzen wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

4.3 Aufreinigen der Proben

Nach der Abspaltung der synthetischen Peptide vom Harz folgte routinemäßig die Untersuchung der Probenreinheit mit analytischer HPLC (Merck Hitachi) auf einer Reversed Phase C18-Säule (CC 125/4 Nucleosil 120-5 C₁₈, Macherey-Nagel). Als mobile Phase wurde Acetonitril/Wasser (HPLC-Qualität)/Trifluoressigsäure (0,06 %) bei einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt. Die Proben wurden mit einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ in Wasser/1 % Essigsäure auf die Säule gegeben, über einen stufenlosen Gradienten von 5 – 60 % Acetonitril eluiert und mit einem Zweikanal-UV-Detektor bei 216 nm und bei 274 nm analysiert.

Die für die NMR-Spektroskopie vorgesehenen Proben wurden mit Hilfe der präparativen HPLC entsalzt. Das Aufreinigen dieser Proben erfolgte bei 5ml/min Flussrate auf einer präparativen HPLC der Firma Bio-Rad unter Verwendung einer RP-C₁₈-Säule (SP 250/21 Nucleosil 300-7, Macherey-Nagel). Als Elutionsmittel wurden Acetonitril/Wasser/TFA-Mischungen eingesetzt und deren Gradient an die nachzureinigenden Peptide entsprechend angepasst (s. [Anhang A](#)). Die fraktionierten Elutionen wurden abschließend über eine Dauer von ca. 20 h lyophilisiert und kühl gelagert.

4.4 Probenverifizierung mit Massenspektrometrie

Die Molekülmasse von Proteinen und Polypeptiden kann mit Hilfe der Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI) bestimmt werden. Die drei wichtigsten Elemente eines Massenspektrometers (MS) bestehen aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor für die Aufzeichnung der Spektren. Je nach Bauart der Ionenquelle unterscheidet man bei der Ionisierung der zu analysierenden Moleküle zwischen Elektronenstoß-Ionisation (EI), *Fast-Atom-Bombardment* (FAB)-Ionisation und Laserdesorption/Ionisation (LDI). Trennung und Nachweis der unterschied-

lich aufgebrachten Ionisierung auf die Analytmoleküle erfolgen entweder in einer Kombination eines Magnetfeldes und einem elektrischen Feld oder im Hochfrequenzfeld eines Quadrupolinstruments. In Flugzeitmassenspektrometern (MALDI-TOF) basiert die Massenbestimmung im Ultrahochvakuum auf einer sehr genauen Messung der Zeit, die zwischen dem Austritt der Ionen aus der Ionenquelle und dem Eintreffen im Analysator verstrichen ist.

An allen Peptidproben der vorliegenden Arbeit wurden nach der Peptidsynthese die Molekulargewichte bestimmt und die Probenreinheit analysiert. Die MALDI-TOF-Experimente führte Werner Bouschen an einem MALDI-Spektrometer durch, das der Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Spengler (Institut für Physikalische Chemie, Universität Würzburg) als Prototyp für Proteinuntersuchungen konstruiert hatte. Durch die zusätzliche Kopplung des Flugzeitanalysators (TOF) an ein Reflektron wird mit diesem Gerät eine sehr hohe Massenauflösung (Isotopenauflösung) erreicht.

Die Probenpräparation erforderte das Aufbringen einer 5–10 mg/ml konzentrierten Matrixlösung auf einen goldbeschichteten Probeneller. Als Matrixsubstanz diente Dihydroxybenzoesäure (DHB), eine in der MS häufig verwendete Lösung, die für massenspektrometrische Analysen an Proteinen bis 20 kDa geeignet ist. Sie dient als Absorbens für die Energie des Laserlichts, zur Separation und Isolation der Biomoleküle und unterstützt den Ionisationsprozess. Die Matrix wird zunächst in hohem molarem Überschuss (ca. 1000– bis 10000-fach) in organischen Lösungsmitteln gelöst und anschließend mit der 10^{-5} – 10^{-7} M Analytlösung gemischt. Während das Lösungsmittel verdunstet, werden die Probenmoleküle in einem Kokristallisationsprozeß in die Matrix eingebaut. Gute MS-Spektren lassen sich auf fein dispergierten Tröpfchen des Matrix-Proteingemisches erzielen, welche idealerweise nach dem Entfernen des Lösungsmittels zu feinen Kristalliten ausgebildet sind. Der Probeneller ist auf einem xy-Manipulator montiert und kann über eine Videokamera beobachtet werden, um die Kristallite vor der Laserionisation zu lokalisieren.

Als Laser-Desorptions-Ionenquelle werden gepulste Laser mit einer variablen Pulsdauer zwischen 1 und 200 ns verwendet. Die emittierte Linie eines Nd:YAG-Lasers ($\lambda_0 = 1064$ nm) wird durch Frequenzverdreifung auf 355 nm oder durch -vervierfachung auf 266 nm gebracht, so dass sie auf den Bereich der Absorptionsbande des Matrixmaterials optimiert ist. Um eine möglichst hohe Ionisierungseffizienz zu gewährleisten, werden die Matrix-Protein-Kristallite auf dem Probeneller meist unter Neigungswinkeln von 15° bis 70° mit dem Laserlicht beschossen.

In TOF-Analysatoren wird das Verhältnis aus Analytmasse und Ionenladung (m/z) über die Messung der Flugzeit bestimmt. Dazu werden die erzeugten Ionen in der Ionenquelle beschleunigt und erhalten eine definierte kinetische Energie. Die Geschwindigkeit der Ionen beim Passieren des feldfreien, hochevakuierten Flugkanals ist proportional zu $(m/z)^{-1/2}$. In Abhängigkeit von der unterschiedlichen Analytmasse variieren die Geschwindigkeiten, wodurch die Ionen während des ca. 2 m langen Weges durch den Flugkanal separiert werden. Typische Flugzeiten, die in der TOF-Massenspektrometrie gemessen werden, liegen im Bereich von wenigen μs bis zu einigen 100 μs .

4.5 Absorptionsmessungen

Für die Auswertung der Daten aus der CD-Spektroskopie war eine exakte Konzentrationsbestimmung der Peptidlösungen erforderlich. Alle Absorptionsspektren wurden mit einem UV/VIS-Spektrometer, Modell Lambda 9 (Perkin-Elmer), in einem Bereich von 250 bis 350 nm aufgezeichnet. In dem Zweistrahlphotometer werden die Spektren durch Differenzbildung der Absorptionen von Probe und Referenz (Lösungsmittel) gebildet. Ein dispersiv arbeitendes Reflexionsgitter im Monochromator wird schrittweise gedreht, so dass alle ausgewählten Spektralbereiche durchlaufen werden.

Kapitel 5

Resultate und Diskussion

Im Kapitel 5 werden die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen an mehreren synthetischen Peptiden vorgestellt und diskutiert. Für die Strukturbestimmungen wurden die CD- und die Raman-Spektroskopie eingesetzt, die durch hochauflösende, zweidimensionale Kernspinresonanzexperimente ergänzt wurden.

Der erste Teil befasst sich mit der dritten extrazellulären Schleife des Hormonrezeptors, der für die Freisetzung des Hormons Gonadotropin verantwortlich ist. Die daraus gewonnenen Informationen sind für das Design neuer Peptidanaloga zur hormonellen Steuerung der Reproduktionsmechanismen von Bedeutung. Eine weitere Untersuchung beschäftigt sich mit einem Thema aus der Grundlagenforschung zum Proteinfaltungsproblem. Darin wurde die Peptidyl-Prolyl-Bindung in Polypeptiden studiert, die ausschließlich aus den beiden Aminosäuren Alanin und Prolin aufgebaut sind. Der letzte Abschnitt dieses Kapitels diskutiert die Ergebnisse aus den spektroskopischen Untersuchungen an helikalen Modellpeptiden, bei denen die Änderung des helikalen Sekundärstrukturanteils unter dem Einfluss von Substitutionen nicht-polarer Seitenketten (Leucin, Isoleucin) studiert wurde.

5.1 Extrazelluläre Schleife des GnRH-Rezeptors

5.1.1 Vorbemerkungen und Motivation

Die Wechselwirkungen zwischen dem Hormon GnRH, einem Decapeptid, und seinem Rezeptor (GnRH-R) bestimmen die zentralen Prozesse der biologischen Reproduktion in Säugetieren und beim Mensch [53]. Diese Thematik ist am Institut für Reproduktive Endokrinologie der Universität Kapstadt in zahlreichen molekularbiologischen Untersuchungen behandelt worden und hatte einen Schwerpunkt auf die dritte extrazelluläre Schleife (ECL3) gelegt, nachdem weiter zurückliegende Forschungen an der ersten und zweiten extrazellulären Schleife abgeschlossen worden waren [66, 68, 96].

Die dritte extrazelluläre Schleife des Hormonrezeptors (vgl. Abb. 3.14 und Abb. 3.15) bildet eine Mikrodomäne und ihr Beitrag zum Entstehen der Bindungstasche war dem

sauren Aminosäurerest Glu^{7.32(301)} des ECL3¹ zugeschrieben worden [69, 70]. Die Untersuchungen hatten bis dahin zu einem groben Bild über den Rezeptor–Ligand–Komplex beigetragen, das in der **Abbildung 5.1** für den GnRH–R der Maus skizzenhaft dargestellt ist. Darin sind die Wechselwirkungen der drei Reste des Hormons, die an der Ligand–Bindung beteiligt sind, den korrespondierenden Resten des Hormon–Rezeptors zugeordnet. Dies betrifft den Rest Asp⁹⁸ der TMD 2, den basischen Rest Lys¹²¹ der TMD 3 sowie den Aminosäurerest Glu³⁰¹ der dritten extrazellulären Schleife. Beim menschlichen GnRH–R entspricht Asp³⁰² der sauren Aminosäure aus ECL3. Die Verschiebung der Sequenz kommt dadurch zustande, dass im Maus–GnRH–R eine Aminosäure auf der Position 191 fehlt [51].

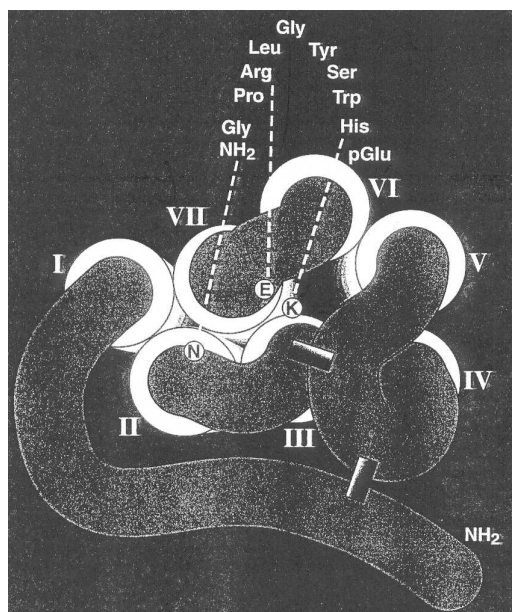


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Rezeptor–Ligand–Bindungstasche, die vom Dekapeptid GnRH und dem GnRH–Rezeptor (Maus) gebildet wird. Der Betrachter blickt von der extrazellulären Seite aus auf die Membran, so dass die 7 helikalen Domänen in die Zeichenebene hineinragen scheinen. Die dritte Schleife verbindet die Helices VI und VII des Rezeptors.

Darüber hinaus hatten Fromme *et al.* vorgeschlagen, dass die Glutaminsäure vom benachbarten Prolin–Rest maßgeblich beeinflusst wird. Dadurch werde die Spezifität und die hohe Bindungsaktivität zwischen dem *loop* und dem Hormonrezeptor hervorgerufen [70]. Es wurde diskutiert, dass Pro möglicherweise dazu beiträgt, die Seitenkette der Glutaminsäure in eine bevorzugte Position zu bringen, so dass die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Glu^{7.32(301)} und Arg⁸ des Hormons begünstigt wird.

Zur Bestätigung dieser Aussagen wurde eine Reihe von Mutationsexperimenten an ECL3 durchgeführt, in denen ein bis vier Alanin–Reste eingesetzt wurden, um die Position der Glutaminsäure systematisch zu variieren. Die Überlegungen zu diesen Versuchen basierten auf einem theoretischen Modell, wonach die extrazelluläre Schleife eine helikale Konformation besitzt [97].

Wenn man berücksichtigt, dass in der α –Helix eine vollständige Drehung um die Helixachse durch 3,4 Reste zustande kommt (vgl. **Tab. 2.3**), so ließen die Mutationsexperimente beim Einsetzen von ein bis vier zusätzlichen Alanin–Resten erwarten, dass die Ausrichtung

¹Das Prinzip der Rezeptor–Numerierung ist im **Kap. 3.4.1** (S. 43) beschrieben.

der Seitenkette der an der Bindung beteiligten Säure Glu^{7.32(301)} dabei maßgeblich beeinflusst wird. Weitere Mutationsversuche konzentrierten sich auf den Austausch von Glu²⁹⁵ und Arg²⁹⁹, jedoch lieferten die Ergebnisse keine schlüssigen Antworten auf die Frage, ob der *loop* in Helix-Konformation vorliegt, oder nicht.

Die vorhandenen zellbiologischen Ergebnisse waren komplex und erschwerten eine gesicherte Interpretation der Struktur-Funktions-Beziehungen zwischen Rezeptor und Ligand. Im [Kap. 3.4.1](#) wurde bereits angesprochen, dass die Ähnlichkeit des GnRH-Rezeptors mit verschiedenen Vertretern der GPCR-Familie nur in einem begrenzten Rahmen für Analogieschlüsse herangezogen werden kann. Über die sieben hydrophoben Domänen liegen aus kristallographischen und NMR-Experimenten hinreichend exakte Strukturdaten vor, aber die externen und internen Schleifen der GPCR-Rezeptoren sind sehr flexibel und zeigen vergleichsweise wenig Sekundärstruktur [[71](#), [72](#), [98](#)].

Daraufhin wurden ergänzende strukturanalytische Untersuchungen mit Hilfe der CD- und der Raman-Spektroskopie angeregt. Parallel dazu erfolgte eine Strukturuntersuchung des synthetischen ECL3-Peptids mit 2D-NMR-Spektroskopie am Molekularbiologischen Institut der Universität Queensland, Brisbane, Australien. Von der Probe war jedoch nur noch eine sehr geringe Menge (< 0,5 mg) verblieben, so dass eine sorgfältige Planung der durchzuführenden Versuche mit der CD- und der Raman-Spektroskopie bei extrem geringem Materialeinsatz erforderlich war.

5.1.2 ECL3-Peptid des GnRH-Rezeptors

Die Probenreinheit und -identität des linearen und des zyklischen Peptids wurden in einer MALDI-Analyse überprüft. Dazu wurde eine wässrige Peptidlösung in pM Konzentration auf eine DHB-Matrix aufgebracht und nach dem Auskristallisieren auf dem Proben-teller mit 3 ns Pulsen der 337 nm-Laserlinie ionisiert. Das Massenspektrum der [Abbildung 5.2](#) zeigt bei sehr hoher Isotopenauflösung ausgezeichnete Übereinstimmung mit der erwarteten Masse von 1489 Da für das zyklische ECL3-Peptid. Die Probe zeigte keine Fehlsequenzen, jedoch einen Anteil an Salzüberständen (Na⁺ und K⁺) aus der Peptidsynthese, die offensichtlich auch noch nach der HPLC-Nachreinigung nachweislich vorhanden waren. Der auffallende Peak bei $[M + 16u]^+ = 1505,77$ Da ist möglicherweise auf einen Anteil an oxidiertem Met (Methioninsulfoxid) zurückzuführen.

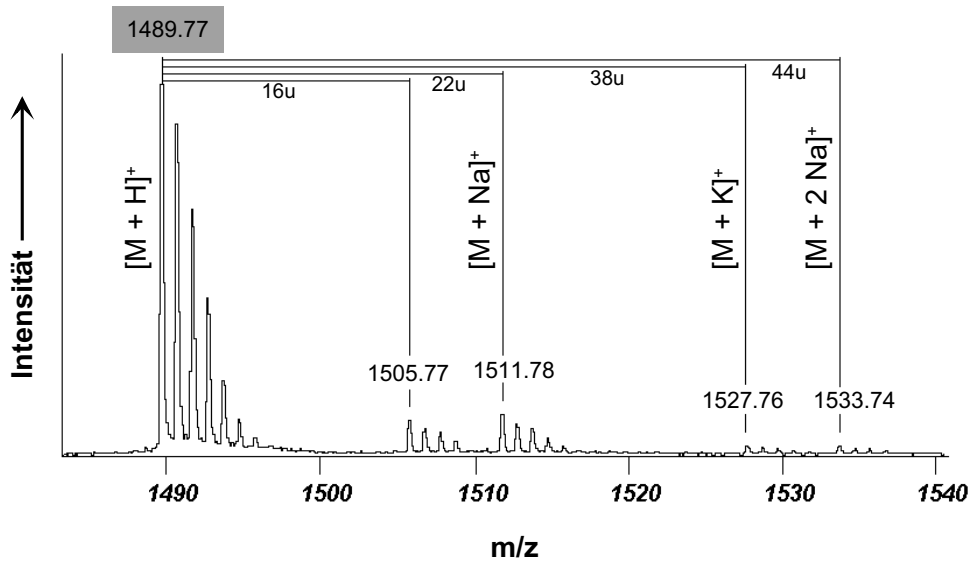


Abbildung 5.2: Massenspektrometrische Analyse des zyklischen ECL3-Peptids mit der erwarteten Masse von 1489 Da. Spuren von Na- und K-Salzen aus der Peptidsynthese sind bei höheren Massewerten (1511 Da und 1527 Da) zu erkennen.

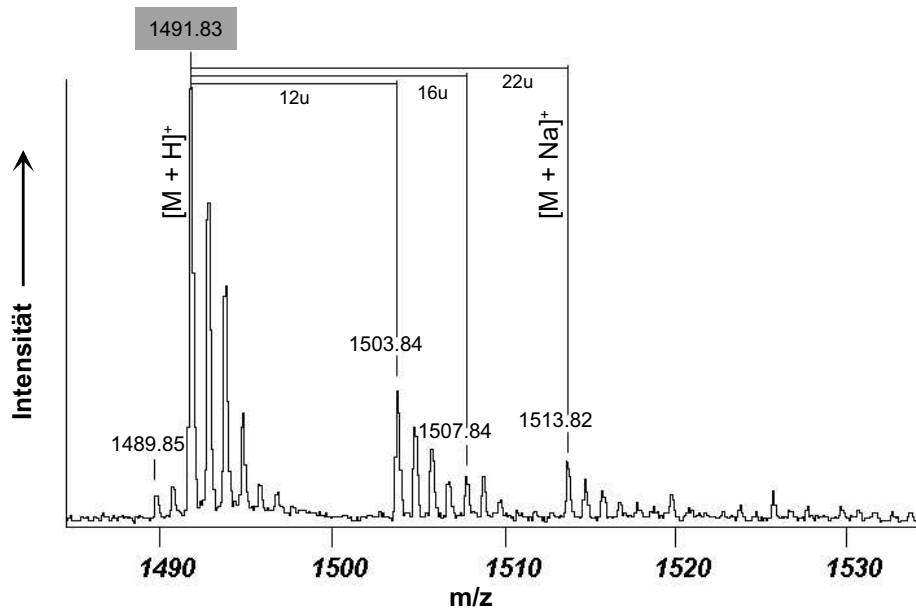


Abbildung 5.3: Hochauflösende MALDI-Analyse des linearen ECL3-Peptids mit einer erwarteten Masse von 1491 Da. Neben einigen Salzurückständen treten im Massenspektrum Beiträge des zyklischen Peptids (mit $m/z \sim 1489$ Da) auf, das aus der Oxidation (Dehydrierung) der endständigen Cysteine entsteht.

Ein ähnliches Resultat ergab sich beim linearen ECL3-Peptid (Abb. 5.3), in dem ebenfalls Salzspuren detektiert wurden. Darüberhinaus trat ein weiterer Massenpeak mit deutlich geringerer Intensität bei 1489,85 Da auf. Es handelt sich dabei nicht um Fehlsequenzen, sondern um rezyklierte Peptide. Diese entstehen bei den selbständig ablaufenden Oxidationsreaktionen zwischen den freien SH-Gruppen der beiden Cystein-Seitenketten. Wenn in der wässrigen Peptidlösung keine Alkylierung durch stabilisierende Reagenzien, wie beispielsweise mit Iodessigsäure oder mit Iodacetamid, vorgenommen wird, reorganisieren die Schwefelbrücken und das lineare Peptid geht teilweise in die zyklische Form über. Dieser Sachverhalt wurde in einer Wiederholung des MALDI-Experiments überprüft und bestätigt. Die Probenlösung des linearen ECL3-Peptids aus der ersten massenspektrometrischen Analyse war etwa 3 Wochen lang gelagert worden. Sie zeigte bei einer Wiederholung der Massenanalyse einen signifikant höheren Anteil an zyklisierten Peptidkomponenten, da die Anzahl der Schwefelbrücken zwischenzeitlich angewachsen war.

5.1.3 CD-Spektroskopie am ECL3-Peptid

Für die Strukturanalyse mit Circular-Dichroismus wurde nur die zyklische Form des ECL3-Peptids herangezogen und daran zunächst eine Messung im Puffer 'Medium 199' durchgeführt (s. Anhang C). Das CD-Spektrum konnte in diesem Fall nur bis in den nahen UV-Bereich (~ 207 nm) aufgezeichnet werden (Abb. 5.4), da der Puffer im fernen UV sehr starke Absorption zeigte. Bei der Untersuchung helikaler Sekundärstrukturen sind zwei CD-Signale besonders relevant, und zwar zum einen eine starke $\pi \rightarrow \pi^*$ -Bande nahe 190 nm und zum anderen ein etwas schwächerer $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 206 nm [99]. Durch das vorzeitige Abbrechen des CD-Scans geht jedoch wertvolle Information für die präzise Strukturanalyse verloren [43].

Die Reduktion der Disulfidbrücken im zyklischen ECL3-Peptid erfolgte durch Zugabe von 1 μ l eines 10-fach molaren Überschusses von DTT in H₂O zu 100 μ l Probenlösung. Nach einer Reaktionszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurde diese Probenlösung erneut unter sonst gleichen Bedingungen gescannt. Im CD-Spektrum war lediglich zu erkennen, dass die Absorption durch das DTT geringfügig erhöht war. Der Vergleich beider CD-Spektren in Abbildung 5.4, aufgezeichnet vom zyklischen sowie vom linearen ECL3-Peptid, zeigt in beiden Fällen breite negative Signale um 230 nm mit einem Verlauf, der für ungeordnete Polypeptidstruktur charakteristisch ist. Die gleiche Vorgehensweise bei der Reduktion der Disulfidbrücken mit DTT-Lösung wurde daraufhin am zyklischen Peptid wiederholt, jedoch unter Verwendung des NaF-haltigen Puffers (vgl. Kap. 3.4.1). Mit diesem Puffer war das S/N-Verhältnis um Einiges verbessert (Abb. 5.5). Es zeichnete sich dabei eine Charakteristik der CD-Spektren ab, die den vorgegangenen Versuchen mit dem Puffer 'Medium 199' ähnlich war und die wiederum auf ungeordnete Struktur schließen ließ. Ein helix-unterstützender Effekt, der mit zunehmendem Trifluorethanol im Lösungsmittel zu erwarten gewesen wäre, war nicht zu beobachten.

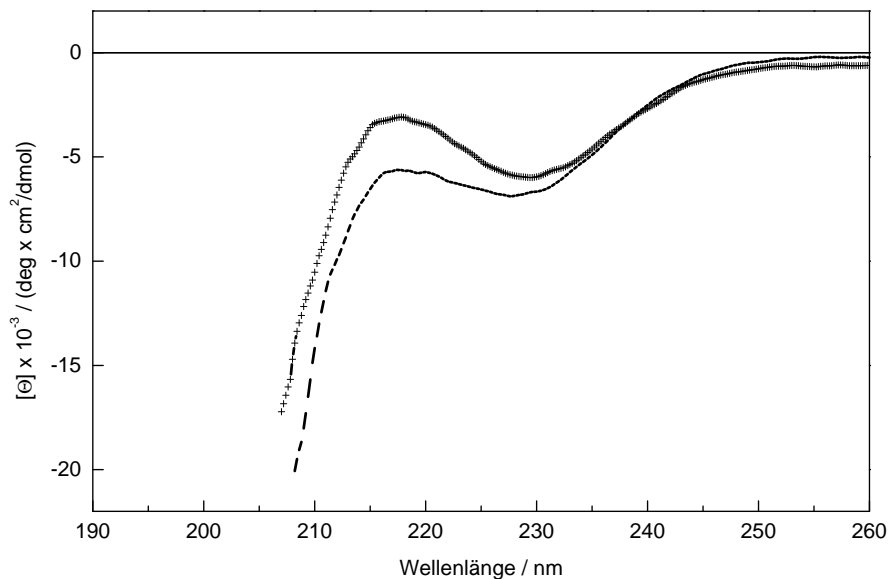


Abbildung 5.4: CD-Spektren des ECL3-Peptids im nahen UV-Bereich, aufgezeichnet im Puffer 'Medium 199'. Die Untersuchung des zyklischen Peptids (+ + + +) erfolgte in $\sim 500 \mu\text{M}$ Konzentration in einer Quarzküvette mit 0,1 cm Schichtdicke. Dieselbe Probe wurde durch die Zugabe von konzentrierter Dithiothreitol-Lösung in die lineare Form (- - - -) übergeführt und anschließend unter identischen Versuchsbedingungen gemessen.

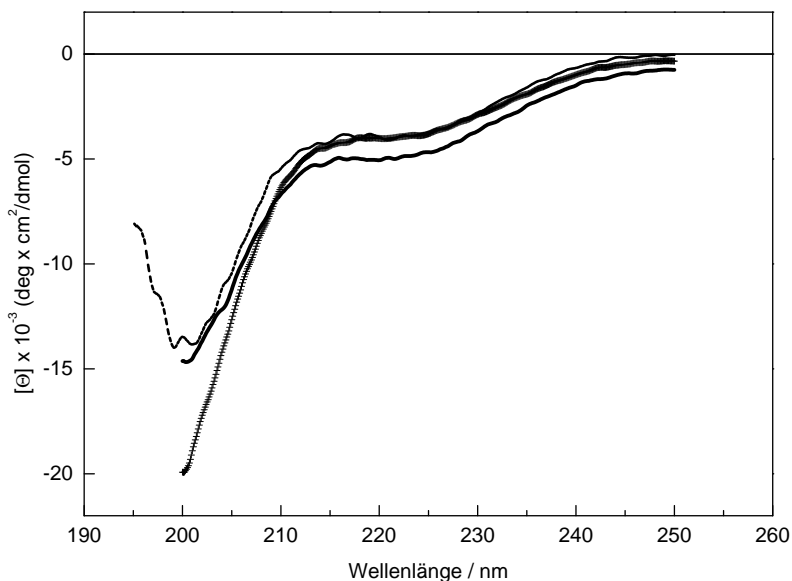


Abbildung 5.5: CD-Spektren des zyklischen ECL3-Peptids, aufgezeichnet im NaF-haltigen Puffer (+ + + +), in 40 Vol.% Trifluorethanol (-) und nach Zugabe von konzentrierter DTT-Lösung (- - - -) zur Reduktion der Disulfidbrücken (Peptidkonzentration $\sim 100 \mu\text{M}$, Quarzküvette mit 0,2 cm Schichtdicke).

Beide CD-Messungen in verschiedenen Puffern führten somit auf dieselbe Schlussfolgerung, wonach sowohl im zyklischen, als auch im linearen Peptid ein sehr hoher Anteil an *random coil*-Konformation vorliegt, der von geringen Beiträgen aus β -Faltblattstruktur überlagert wird. Auf eine detaillierte quantitative Analyse der partiellen Sekundärstrukturen mit Hilfe von Dekonvolutionsalgorithmen wurde verzichtet.

Eine Bestätigung der Aussagen aus den vorangegangenen CD-Messungen in verschiedenen Puffern konnte mit einem temperaturabhängigen Scan am zyklischen ECL3-Peptid erhalten werden. Wie bereits im Kapitel 2.3 kurz angesprochen, werden in Peptiden mit hohem helikalem Anteil CD-Signale beobachtet, die sich bei niedrigen Temperaturen (um 0 °C) Maximalwerten annähern. Mit steigender Temperatur werden die stabilisierenden H-Brücken in helikalen Sekundärstrukturen aufgebrochen. Das charakteristische CD-Signal $[\Theta]_{222}$ verringert sich bei ansteigender Temperatur und strebt nahe bei 100 °C einen Wert an, der typisch ist für *random coil*-Konformation. Das Kennzeichen solcher Temperatur-scans ist das Auftreten eines isospeptischen Punktes (*isodichroic point*) etwa bei 203 nm, der gewöhnlich als ein Anzeichen dafür interpretiert wird, dass ein Zwei-Phasenübergang zwischen Helix- und *random coil*-Struktur stattfindet [35]. Man unterstellt dabei, dass jeder Aminosäurerest entweder nur die helikale oder nur die ungeordnete Konformation besetzt.

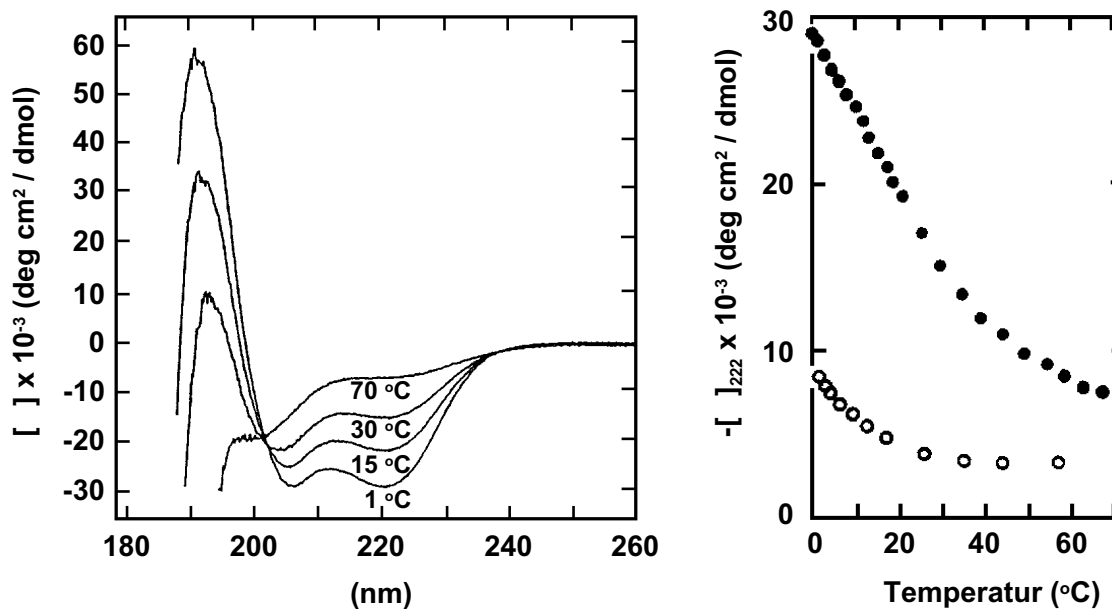


Abbildung 5.6:

Links: CD-Spektrum eines 17mer-Peptids (AEAAAKEAAAKEAAKA) bei vier verschiedenen Temperaturen in 0,01 M Kaliumfluoridpuffer (17 μ M, pH 7,0).

Rechts: Thermisches Auffaltungsprofil eines 17mer-Peptids (•) mit der Sequenz AEAAAKEAAAKEAAKA und (◦) mit der Sequenz AKAAAEKAAAEKAAAEA, gemessen bei $[\Theta]_{222}$, der mittleren molaren Elliptizität bei 222 nm. (Nach [35], Abb. 2 und 3.)

Die [Abbildung 5.6](#) zeigt den Verlauf der Temperaturabhängigkeit in Peptiden mit hohem Helixgehalt und verdeutlicht, dass die Helixbildung ein Enthalpie-getriebener Prozess ist. Maximale Helizität wird bei niedrigen Temperaturen beobachtet — mit ansteigender Temperatur findet Entfaltung statt. Dieses Verhalten wurde bereits in früheren Studien wiederholt an ähnlichen Peptidsequenzen (z. B. beim C-Peptid der Ribonuklease) beobachtet [35]. Sowohl bei guten Helixbildnern, als auch bei schlechten Helixbildnern verläuft der Denaturierungsvorgang auf ähnliche Weise.

Der thermische Übergang ist sehr breit. Selbst bei 70 °C zeigt der charakteristische Verlauf des CD-Spektrums, dass immer noch ein kleiner Helixanteil vorhanden ist. Bei niedrigen Temperaturen (um 0 °C) wird kein Plateau erreicht und deutet somit darauf hin, dass die Helixbildung noch nicht vollständig abgeschlossen ist (vgl. [Abb. 5.6](#), rechts). Thermische Denaturierungsexperimente an helikalen Peptiden weisen einen isospestischen Punkt auf. Dieser gilt als ein Indikator für einen Zwei-Phasenübergang zwischen ungeordneter Struktur bei hohen Temperaturen und einer einzigen Sekundärstruktur (Helix) im niedrigeren Temperaturbereich.

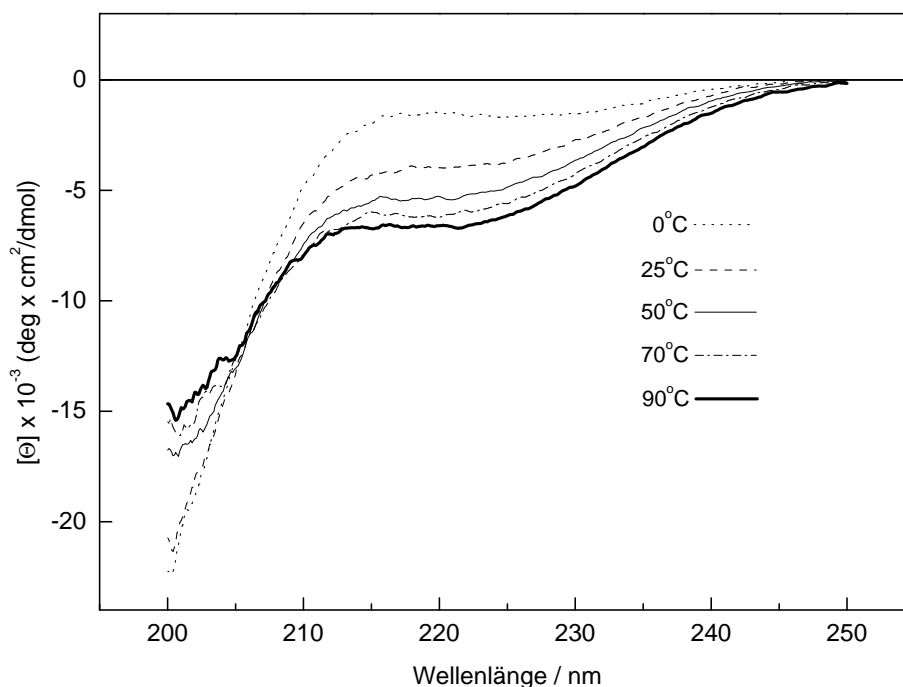


Abbildung 5.7: Temperaturabhängigkeit des CD-Signals beim zyklischen ECL3-Peptid, aufgezeichnet in NaF-haltigem Puffer im Bereich von 0 °C bis 90 °C.

Im Verlauf der CD-Spektren der [Abbildung 5.7](#) ist dieses Helix-typische, temperaturabhängige Verhalten nicht zu beobachten. Es tritt zwar ein isospestischer Punkt nahe 206 nm auf, jedoch sind die CD-Banden bei $[\Theta]_{222}$ mit steigender Temperatur invers angeordnet zu jenen, die zuvor diskutiert wurden (s. [Abb. 5.7](#)). Dies ist als weiterer Hinweis zu interpretieren, dass sich mit Hilfe des Circular-Dichroismus im zyklischen ECL3-Peptid keine Helixanteile nachweisen lassen.

5.1.4 Mikro- und FT-Raman-Spektroskopie am ECL3-Peptid

Bei den Strukturuntersuchungen an der extrazellulären Schleife kamen Raman-Messungen in wässriger Lösung nicht in Betracht. Das verbliebene Probenmaterial war nach den CD-Messungen nicht mehr ausreichend, um die erforderlichen Mindestkonzentrationen in Lösungen zu erreichen (≥ 1 mg/ml). Die im folgenden beschriebenen spektroskopischen Ergebnisse aus den Mikro-Raman- und den FT-Raman-Messungen wurden deshalb alle an getrockneten Peptiden aufgezeichnet. Die Mikro-Raman-Spektroskopie ist für solche Problemstellungen geeignet, da einige wenige μg trockener Substanz für mehrere Untersuchungen ausreichen. Auch in der FT-Raman-Spektroskopie ließ sich diese Problematik bei exakter Fokussierung des anregenden Lasers auf eine sehr kleine Probenmenge zufriedenstellend handhaben, wenngleich der Materialbedarf in diesem Fall um Einiges höher liegt, als bei der Verwendung des Mikro-Raman-Aufbaus.

Beim Mikro-Raman-Experiment wird das gestreute Licht in 180° -Geometrie von einem Mikroskop-Objektiv unmittelbar oberhalb der Probe gesammelt. Die Qualität der aufgezeichneten Raman-Spektren hängt empfindlich von der Fokussierung des Laserstrahls auf die Probe ab. Grob geschätzt trat in 5 % der Raman-Versuche Photozersetzung auf. In Abhängigkeit von der Korngröße der getrockneten, polymorphen Substanz traten lokal sehr hohe Energiedichten auf. Dabei heizte sich die Probe auf und verbrannte innerhalb weniger Sekunden. Die zerstörten Stellen waren im Mikroskop an den braunen/dunkelbraunen Flecken auf der sonst weißen Peptidoberfläche leicht zu erkennen (Abb. 5.8).

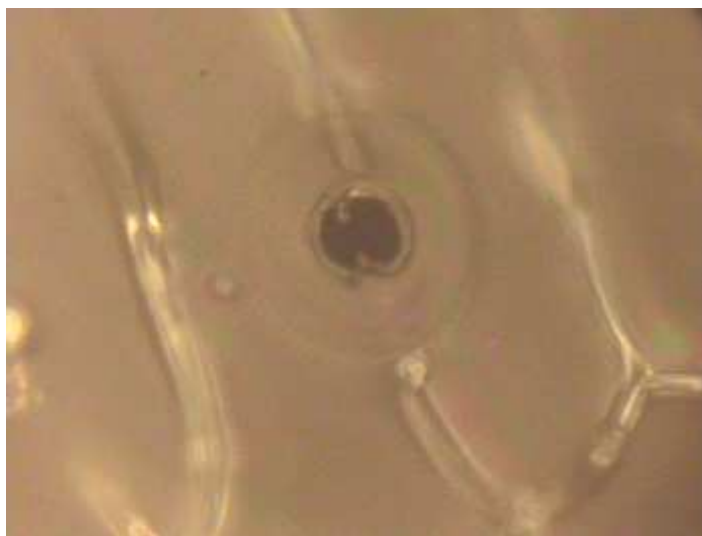


Abbildung 5.8: Lokale Photodekomposition auf der Oberfläche der lyophilisierten ECL3-Probe, die für die Dauer von etwa 5 s mit maximal 20 mW Laserleistung (auf der Probe) angeregt worden war.

Die [Abbildung 5.8](#) zeigt ein ausgewähltes Beispiel von lokal begrenzter Probenbeschädigung durch Photozeretzung. Bei diesem Versuch war der Laser auf eine der langgezogenen, weiß schillernden Bereiche fokussiert worden, in denen erfahrungsgemäß sehr gute Raman-Streuung zu beobachten war.

Proteine sind komplex aufgebaute Makromoleküle, deren dreidimensionale Struktur sich meist aus verschiedenen großen Anteilen unterschiedlicher Sekundärstrukturtypen zusammensetzt. Im Raman-Spektrum von Proteinen und Polypeptiden zeigen sich charakteristische Banden, welche den Normalschwingungen des Peptidrückgrates und den Schwingungen der Seitenketten der Aminosäuren zugeordnet werden können. Aus den struktur-sensitiven Raman-Banden lassen sich Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur ziehen. Wie bereits im [Kapitel 3.1](#) im Zusammenhang mit der Auswertung von CD-Spektren angesprochen, reflektiert auch ein Raman-Spektrum im Allgemeinen eine Überlagerung mehrerer Sekundärstrukturen. Die Wellenzahlen bestimmter struktur-sensitiver Raman-Banden weisen qualitativ auf jene Sekundärstruktur, die in einem Protein oder Peptid dominant vorhanden ist. Detaillierte Aussagen zum prozentualen Anteil des jeweiligen Strukturtyps sind jedoch nicht ohne weiteres möglich.

Die Zuordnungen der Raman-Banden gehen auf zahlreiche Untersuchungen an Proteinen in den vergangenen drei Jahrzehnten zurück. In einer UV-Resonanz-Raman-Studie haben Asher und Mitarbeiter eine Reihe von Proteinen untersucht, deren Röntgenstrukturen aufgeklärt sind [100]. Die Proteine weisen einen unterschiedlich hohen Helixgehalt auf (z. B. Concanavalin A: 2 %, Ribonuklease: 23 %, Rinderserumalbumin: 68 %, Myoglobin: 68 %).

Tabelle 5.1: Wellenzahlen (in cm^{-1}) der drei wichtigsten Amid-Banden, die bei der Sekundärstrukturanalyse in Proteinen herangezogen werden. Die Raman-Intensität der $\text{C}_\alpha\text{-H}$ -Schwingung um 1386 cm^{-1} kann bei einem hohen Anteil von β -Faltblatt- und ungeordneter Struktur als ein zusätzlicher signifikanter Marker zur qualitativen Proteinstrukturanalyse herangezogen werden. Nach [101].

	α -Helix	β -Faltbl.	ungeordnet
Amid I	1647	1654	1665
Amid II	1545	1551	1560
Amid III	1299	1235	1267
$\text{C}_\alpha\text{-H}$	–	1386	1386

Für eine systematische Einteilung der Sekundärstrukturen wurden die Wellenzahlen und die Intensitäten einiger Raman-Banden ermittelt (s. [Tab. 5.1](#)). Bei diesen Untersuchungen zeigte sich eine weitere Raman-Bande, die $\text{C}_\alpha\text{-H}$ -Schwingung um 1386 cm^{-1} , als Strukturmarker in helikalen Proteinen. Sie besteht im wesentlichen aus einer symmetrischen $\text{C}_\alpha\text{-H}$ -Biegeschwingung, die von einem variablen Anteil von C-C_α -Stretschwingung des Peptidrückgrates überlagert ist. Mit zunehmendem α -Helix-Gehalt in Proteinstrukturen nimmt ihre Intensität signifikant ab.

Die Normalschwingungen und elektronischen Zustände der Peptidbindung werden an einem einfachen Modellpeptid, dem N-Methylacetamid (NMA), studiert [102, 103]. NMA hat eine Peptidbindung, bei der jeweils eine Methylgruppe an das Kohlenstoffatom und an das Stickstoffatom gebunden ist. Die Peptidgruppe des NMA liegt in der *trans*-Konfiguration vor und bietet sich an für Untersuchungen der Amidbanden (Amid I..V, Amid S, Amid A), wie sie typischerweise in Protein-Raman-Spektren auftreten. Die struktursensitiven Banden eines Raman-Spektrums setzen sich aus mehreren Komponenten zusammen, von denen einige der wichtigsten in [Tabelle 5.2](#) aufgeführt sind.

Tabelle 5.2: Experimentell beobachtete ($\tilde{\nu}_{\text{obs}}$) und berechnete ($\tilde{\nu}_{\text{calc}}$) Wellenzahlen in N-Methylacetamid. Alle Schwingungsbeiträge $\leq 5\%$ sind nicht berücksichtigt. Nach [102].

Mode	$\tilde{\nu}_{\text{obs}}$ (cm^{-1})	$\tilde{\nu}_{\text{calc}}$ (cm^{-1})	Potenzial-Energieverteilung
Amid I	1653 s	1646	$\nu(\text{CO})$ (83 %), $\nu(\text{CN})$ (15 %), $\delta(\text{CCN})$ (11 %)
Amid II	1567 s	1515	$\delta_{ip}(\text{NH})$ (49 %), $\nu(\text{CN})$ (33 %), $\delta_{ip}(\text{CO})$ (12 %), $\nu(\text{CC})$ (10 %), $\nu(\text{NC})$ (9 %)
Amid III	1299 m	1269	$\delta_{ip}(\text{NH})$ (52 %), $\nu(\text{CC})$ (18 %), $\nu(\text{CN})$ (14 %), $\delta_{ip}(\text{CO})$ (11 %)

Die Übereinstimmung zwischen den experimentellen und den berechneten Werten in [Tabelle 5.2](#) ist nur mäßig gut. Die starken Abweichungen begründeten die Autoren Krimm und Bandekar damit, dass die Normalmoden aus modifizierten Kraftfeldrechnungen ermittelt worden waren, bei denen zuvor eine Anpassung und Optimierung wegen H-Brücken-gebundener Peptidgruppen stattgefunden hatte. Diese rechnerische Korrektur war jedoch für ein anderes Modellsystem durchgeführt worden und die experimentellen Ergebnisse stammten von einem Glycin-Homopolymer. Insofern sind einige der Analogien zwischen den Normalmodenberechnungen des NMA-Modellsystem und experimentellen Bedingungen nur eingeschränkt zulässig. Besonders auffällig wird dies bei der Amid I-Bande (s. [Tab. 5.2](#)), die einen ausgesprochen hoch geschätzten Anteil an C-O-Schwingungsbeiträgen und einen vernachlässigten (in der [Tabelle 5.2](#) nicht aufgelisteten) Anteil ($\leq 5\%$) an N-H-Vibrationsschwingungen zeigt. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Wang *et al.* in Normalmodenanalysen an NMA [103]. Wiederholt findet sich in der Literatur der Hinweis auf die Sensitivität der drei Amid-Banden (AI, AII und AIII), sowie der Amid-S-Bande. Darin wird die Amid I-Bande häufig vereinfacht beschrieben als eine Kombination der Carbonyl-Streckschwingungen (C-O), die von kleineren Beiträgen aus C-N-Streckschwingungen und aus N-H-Biegeschwingungen überlagert sind. Die AII- und AIII-Banden dagegen werden von den C-N-Streckschwingungen dominiert, zu der sich unterschiedlich große Beiträge von den N-H-Biegeschwingungen sowie von den C-C-Streckschwingungen addieren.

Die [Abbildung 5.10](#) zeigt eine Gegenüberstellung der Spektren, die mit dem Mikro-Raman-Aufbau am zyklischen und am linearen ECL3-Peptid aufgezeichnet wurden. Die stark ausgeprägte AI-Bande liegt bei beiden Proben in einem hohen Wellenzahlbereich um

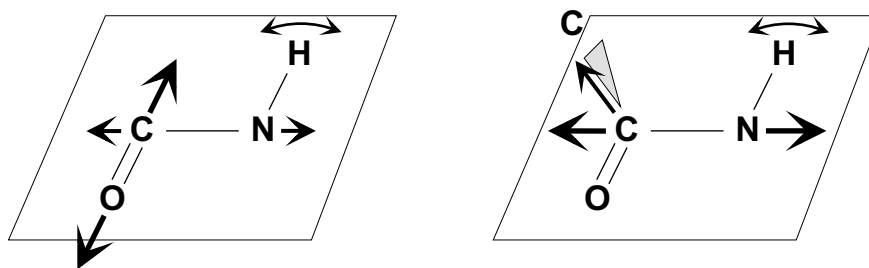


Abbildung 5.9: Planare Peptidbindung mit den Amidbandenzusammensetzungen der Amid I-Bande (**links**) und der Amid III-Bande (**rechts**).

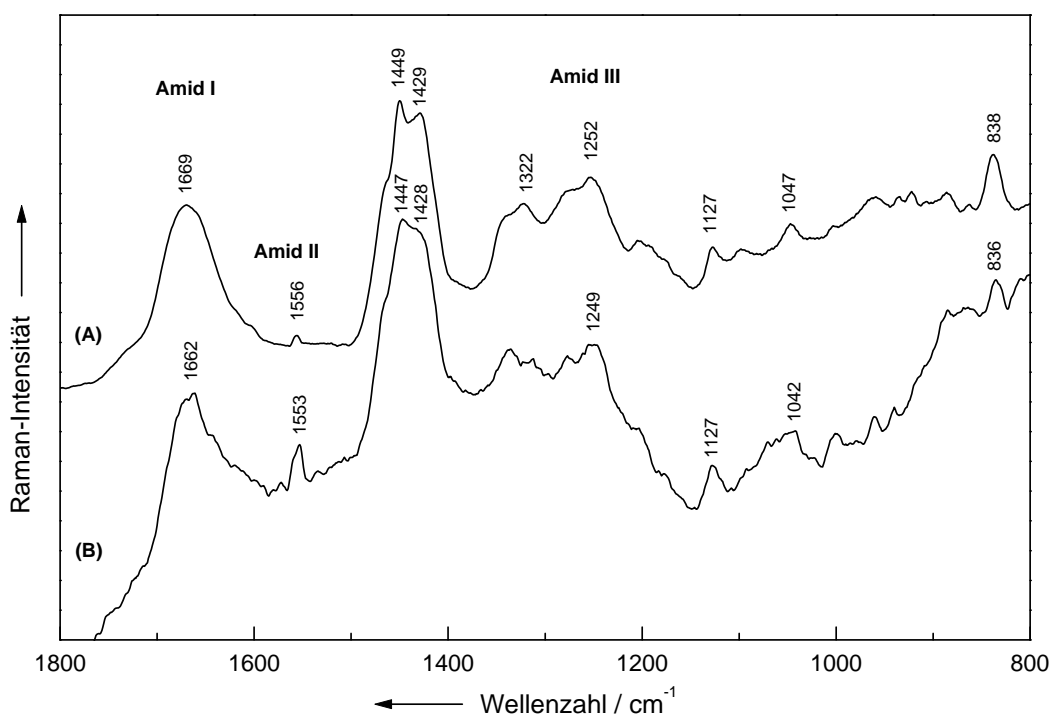


Abbildung 5.10: Mikro-Raman-Spektren der dritten extrazellulären Schleife des Gonadotropin-freisetzenden Hormonrezeptors GnRH-R im Organismus der Maus. **(A)** zyklisches ECL3-Peptid, **(B)** lineares ECL3-Peptid.

1660 bis 1670 cm^{-1} . Dies ist ein Hinweis dafür, dass in beiden Peptiden geringe strukturelle Stabilität mit einem niedrigen Anteil an H-Brücken vorliegt. In Proteinstrukturen mit einem hohen Helix-Gehalt, bei denen viele H-Brücken zur Strukturstabilisierung beitragen, werden typischerweise Wellenzahlen von 1645 bis 1650 cm^{-1} beobachtet [104].

Zusätzliche Strukturinformation ist der AII-Bande bei 1556 cm^{-1} im zyklischen Peptid und bei 1553 cm^{-1} im linearen Peptid zu entnehmen, die in beiden Spektren mit überraschend starker Intensität auftreten. Meist zeigt die AII im Raman-Spektrum nur geringe Intensität. In der Infrarotspektroskopie dagegen ist sie vergleichsweise stark ausgeprägt [105]. Die Positionen der AII unterstützen die Aussage, die bei der AI getroffen wurde, dass beide ECL3-Peptide eine weitgehend ungeordnete Struktur besitzen.

Die Sensitivität der AIII-Bande als Indikator für Sekundärstruktur wird etwa dreifach höher eingeschätzt, als bei der AI oder AII [106, 107, 108]. Aus den Wellenzahlen der AIII in den Spektren der [Abbildung 5.10](#) lässt sich ebenfalls ein überwiegender Anteil an *random coil* in beiden Proben interpretieren. Vergleicht man die beobachteten Wellenzahlen der AI, AII und AIII mit jenen aus [Tabelle 5.1](#), so zeigt sich bei allen drei Banden ein geringer Trend nach niedrigeren Wellenzahlen. Dies kann als ein Anzeichen für partiell vorhandene β -Faltblattstruktur interpretiert werden. Die gewählte Versuchsanordnung erlaubte jedoch keine quantitative Analyse der relativen Anteile von Faltblatt- und *random coil*-Struktur.

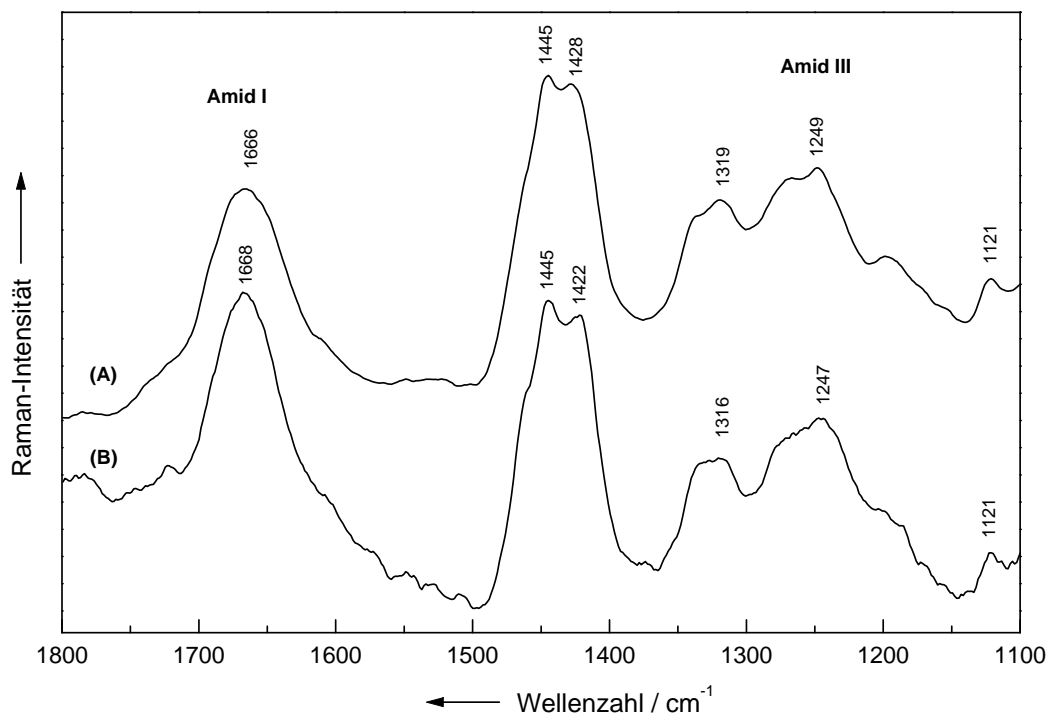


Abbildung 5.11: Mikro-Raman-Spektren des ECL3-Peptids (lyophilisiert), aufgezeichnet am LabRam (Dilor) mit Anregungswellenlänge $\lambda_0 = 514,5\text{ nm}$. (A) zyklisches Peptid, (B) lineares Peptid.

Die stark ausgeprägte Raman-Linie bei 1449 cm^{-1} ist in ihrer Intensität und Lage typisch für Biegeschwingungen der CH_2 -Seitenketten (vgl. Tab. 5.6). Dicht daneben findet sich eine starke, als Schulter ausgeprägte Linie um 1428 cm^{-1} , für die keine zuverlässige Zuordnung getroffen werden kann. Weitere Banden können einzelnen Aminosäuren zugewiesen werden, wie beispielsweise eine mittelstarke Linie bei 838 cm^{-1} , die von der Ringschwingungen der beiden Prolin-Reste herrührt.

Im Mikro-Raman-Spektrum der [Abbildung 5.11](#), das mit dem LabRam-Aufbau aufgezeichnet wurde, waren keine Anzeichen der AII zu beobachten. Die Lagen und Intensitäten der beiden Amid-Banden (AI bei 1666 cm^{-1} und AIII bei 1249 cm^{-1}) ließen keinen Unterschied erkennen zwischen dem zyklischen und dem linearen ECL3-Peptid. Die Positionen beider Linien deuten auf eine Überlagerung von Beiträgen von Faltblattstruktur und ungeordneter Struktur hin.

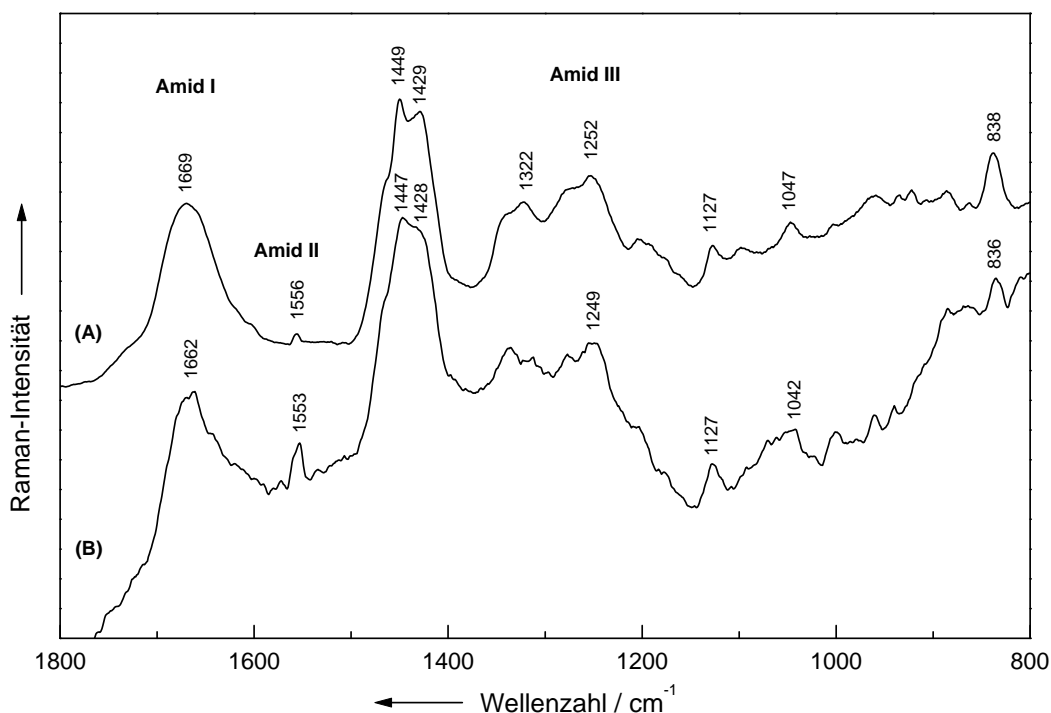


Abbildung 5.12: FT-Raman-Spektren des lyophilisierten ECL3-Peptids ($\lambda_0 = 1064\text{ nm}$). (A) zyklisches Peptid, (B) lineares Peptid.

Mit der Aufzeichnung der FT-Raman-Spektren ([Abb. 5.12](#)) wurden die vorausgegangenen Mikro-Raman-Messungen im niedrigen Wellenzahlenbereich ergänzt. Hier ist die deutlich ausgeprägte Linie bei 509 cm^{-1} als ein Indikator für die Schwefelbrücke des zyklischen Peptids zu erkennen. Die S-S-Streckschwingung fehlt im Spektrum des linearen Peptids und liefert somit eine Bestätigung der Probenidentität. In der FT-Raman-Untersuchung wurde die AIII des zyklischen *loops* bei 1249 cm^{-1} , und die AIII des linearen *loops* bei 1247 cm^{-1} beobachtet.

Beide struktur-sensitiven Linien weisen somit auf *random coil*-Struktur hin, in der (nicht-quantifizierte) Beiträge von β -Faltblattstruktur beteiligt sind (s. Tab. 5.1). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Raman-Streuexperimente eine sehr gute Übereinstimmung bezüglich der struktur-sensitiven Amidbanden ergaben. Keine dieser Linien ließ Hinweise auf helikale Sekundärstruktur erkennen. In beiden Peptiden liegt vorwiegend ungeordnete Konformation vor, die von geringeren Anteilen von β -Faltblattstruktur überlagert ist. Die Zuordnungen der beobachteten Raman-Banden aus den drei Versuchen am ECL3-Peptid sind für die zyklische und für die lineare Form in Tabelle 5.3 in einer Übersicht aufgelistet.

Tabelle 5.3: Wellenzahlen (in cm^{-1}) und Zuordnung der beobachteten Linien aus den Mikro- und FT-Raman-Messungen am zyklischen und am linearen ECL3-Peptid. Abkürzungen: *zykl.* – zyklisches Peptid mit Disulfidbrücke, *lin.* – lineares Peptid.

Mikro-Raman		LabRam		FT-Raman		Zuordnung
zykl.	lin.	zykl.	lin.	zykl.	lin.	
1669 s	1662 s	1666 vs	1668 vs	1666 s	1669 s	AI
1556 vw	1553 mw			1556 vw		AII
1449 vs	1447 vs	1445 vs	1445 vs	1449 vs	1449 ws	$\delta(\text{CH}_2)$
1429 vs	1428 sh	1428 vs	1422 vs		1430	–
1322 m		1319 ms	1316 ms			$\tau(\text{CH}_2)$
1252 ms	1249 ms	1249 s	1247 s	1246 ms	1254 ms	AIII
1127 ms	1127 ms	1121 m	1121 m	1121 vw	1126 vw	$\nu(\text{C-N})$
1047 ms	1042 w			1044 mw	1042 mw	$\tau(\text{CH}_2)$
838 w	836 s			835 ms	836 ms	Pro
				724 mw	723 mw	Met
				509 ms		$\nu(\text{S-S})$

5.1.5 2D-NMR-Spektroskopie

In Ergänzung der CD- und Raman-Untersuchungen wurden am zyklischen und linearen ECL3-Peptid NMR-spektroskopische Messungen vorgenommen. Das NOESY-Spektrum in [Abbildung 5.13](#) wurde vom zyklischen ECL3-Peptid in wässriger Lösung bei 280 K aufgezeichnet. Die Analyse der 2D-NMR-Spektren folgte dem standardisierten sequenziellen Zuordnungsverfahren, bei dem zunächst alle beteiligten Spinsysteme aus dem TOCSY-Spektrum identifiziert und anschließend die benachbarten Kreuzkorrelationen aus dem NOESY-Spektrum entnommen werden [109]. Die Verschiebungen aller 14 Aminosäuren sind in der Amidregion (8,8...8 ppm) sehr gut aufgelöst und deutlich separiert. Die aufgezeichneten 2D-NMR-Spektren erlaubten eine ebenso vollständige wie eindeutige sequenzielle Zuordnung. Die waagrechten Hilfslinien verbinden die Kopplungen benachbarter Kerne. Die Zahlen an den Signalen im Spektrum entsprechen den jeweiligen Positionen in der Peptidsequenz. Folgt man den eingezeichneten Hilfslinien der [Abbildung 5.13](#), so können alle Reste der Peptidsequenz CGPEMLNRVSEPGC der Reihe nach im 2D-Spektrum aufgefunden werden.

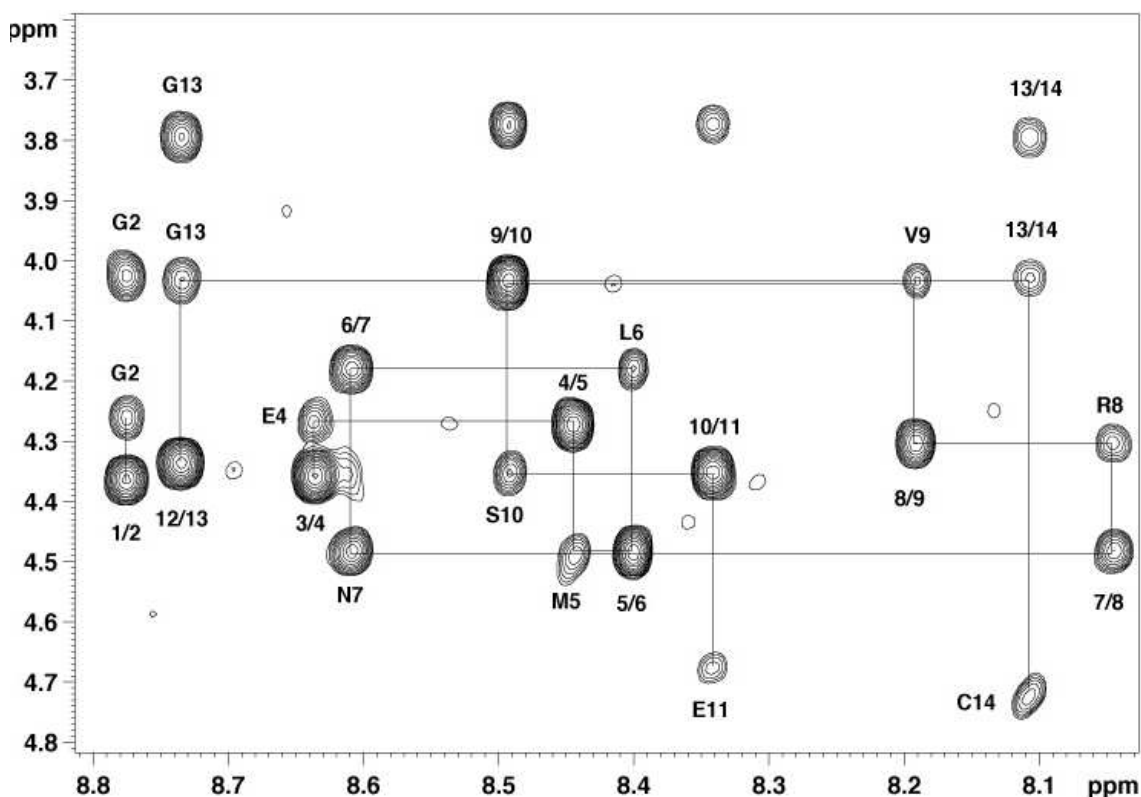


Abbildung 5.13: Ausschnitt aus dem 750 MHz NOESY-Spektrum des zyklischen Peptids ECL3 mit sequenzieller Zuordnung. In der Fingerprintregion sind die Kreuzkorrelationen durch die nummerierten Positionen der Aminosäuren zusammen mit dem Einbuchstabensymbol gekennzeichnet.

Erwartungsgemäß fehlen die beiden Korrelationen zwischen dem zweiten und dritten Rest (Gly-Pro), sowie zwischen dem elften und zwölften Rest (Glu-Pro). Wie bereits im [Kapitel 2.2.4](#) erwähnt, ist die Seitenkette des Pro mit dem N-terminalen Stickstoff-Atom verbunden. Dadurch ist kein Spinaustausch zwischen dem Stickstoffproton des Prolin und dem Kohlenstoffproton seines N-terminal benachbarten Restes möglich. Ausgehend vom NMR-Signal der Glutaminsäure (E4) lassen sich – den waagrechten und senkrechten Hilfslinien im Spektrum abwechselnd folgend – alle beobachteten Resonanzen der Reihe nach vom N-Terminus bis zum C-Terminus eindeutig zuordnen. Beginnt man beispielsweise bei der Kreuzkorrelation zwischen den Resten 3 und 4, so findet man senkrecht oberhalb dazu die Glutaminsäure und rechts davon wiederum deren Kreuzkorrelation zum nächsten Rest M5.

Das Spektrum zeigte ein sich wiederholendes Muster aus schwächeren und stärkeren Korrelationen zwischen direkt benachbarten $C_{\alpha}(i)$ - und $N(i+1)$ -Protonen. Das Muster ist typisch für ausgestreckte Polypeptidketten mit einer ungeordneten Konformation. Diese Aussage wird bestärkt durch die Beobachtung mittelschwacher NH-NH-Kreuzkorrelationen im NOESY-Spektrum ([Abb. 5.14](#)), das ebenfalls am zyklischen ECL3-Peptid in wässriger Lösung bei 280 K aufgezeichnet wurde.

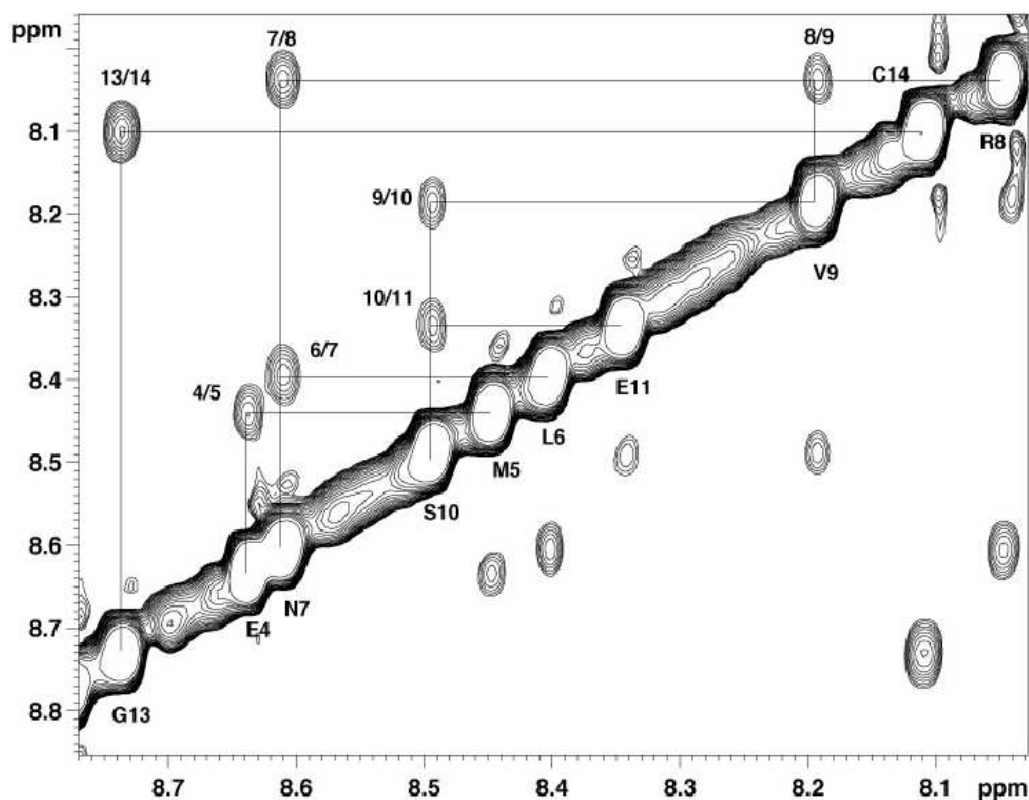


Abbildung 5.14: Ausschnitt aus dem 750 MHz NOESY-Spektrum des zyklischen Peptids ECL3, aufgezeichnet bei 280 K in wässriger Lösung. Das ^1H -Spektrum zeigt die NOESY-Signale zwischen benachbarten Amidprotonen.

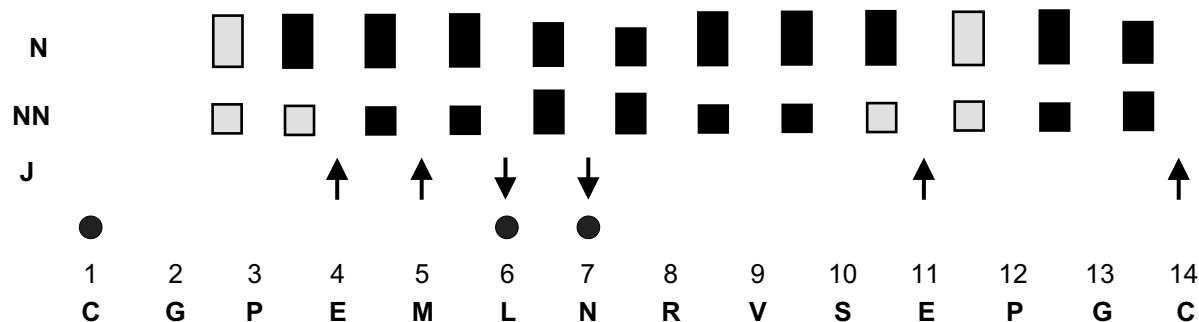


Abbildung 5.15: Schematische Zusammenfassung der erhaltenen Informationen aus den 2D-NMR-Untersuchungen am zyklischen ECL3-Peptid. (Ausführliche Erläuterung im Text.)

Eine Zusammenfassung der NMR-Spektrenauswertung ist in der [Abbildung 5.15](#) mit Balkendiagrammen und Symbolen wiedergegeben. Dort sind in den beiden untersten Spalten die Positionen innerhalb der Peptidsequenz von 1 bis 14 fortlaufend numeriert und die jeweiligen Aminosäuren im Einbuchstabensymbol angefügt. Die schwarz ausgefüllten Balken der beiden obersten Reihen geben die α N- und die NN-Kreuzkorrelationen wieder. In dieser Darstellung korrespondiert die Höhe der Balken jeweils mit der experimentell beobachteten Signalintensität. Die grauen Balken stehen für die Prolin-Reste, bei denen keine NH-Signale auftreten können. In der dritten Reihe der [Abbildung 5.15](#) sind diejenigen Reste mit einem aufwärtsgerichteten Pfeil symbolisiert, deren J-Kopplungskonstante oberhalb von 8 Hz lag. Auf die Reste mit kleineren J-Kopplungskonstanten (< 5 Hz) wird mit einem abwärtsgerichteten Pfeil hingewiesen. Alle auffälligen chemischen Verschiebungen sind in der vierten Spalte (δ) notiert. Die schwarzen Punkte markieren dabei jeweils die Aminosäuren, deren Verschiebungen um mehr als 0,1 ppm von den üblichen Werten, die für *random coil*-Strukturen charakteristisch sind, abweichen. Sie signalisieren eine partielle Strukturierung des zyklischen Peptids nahe der Reste C1 sowie bei den Resten L6 und N7.

Die NMR-Untersuchungen am linearen ECL3-Peptid (Ergebnisse nicht abgebildet) waren von den schwachen Kreuzkorrelationen gekennzeichnet, deren Muster auf ungeordnete Konformation hinwies. Beim zyklischen Peptid dagegen ergab die Analyse der NMR-Signale Hinweise auf *random coil*-Konformation, in der sich Anzeichen einer kleinen Population von strukturierten Aminosäureresten erkennen ließen. Eine lokale β -turn-Struktur konnte in der Nähe der mittleren Reste (L6 und N7) lokalisiert werden.

5.1.6 Struktur-Funktions-Relationen am GnRH-Rezeptor

Die nachfolgende Diskussion der Struktur-Funktions-Beziehungen zwischen dem GnRH-Rezeptor und seinem Liganden (GnRH) zeigt, welche Problematik entsteht, wenn die verfügbare Information aus den experimentell ermittelten Strukturdaten mit der biologischen Aktivität der Biomoleküle zueinander in Beziehung gesetzt werden. Eine wesent-

liche Rolle in der Analyse der Protein–Ligand–Wechselwirkungen spielen die folgenden Bindungsparameter:

- die Lokalisierung des aktiven Zentrums,
- die Konformation des an das Protein gebundenen Liganden,
- die Art der Bindung zwischen Protein und Ligand.

Vor der Durchführung der Strukturuntersuchungen am GnRH–Rezeptor waren zwei der oben genannten Parameter noch weitgehend ungeklärt. Über das aktive Zentrum lagen bereits Informationen vor, mit dem ein schematisches, jedoch immer noch rudimentäres Bild von der Bindetasche aufgebaut werden konnte. Die Konformation des Liganden war nur über eine computerunterstützte Simulationsrechnung (*simulated annealing, molecular dynamics simulation*) gegeben, derzufolge im dritten *loop* des Hormonrezeptors eine helikale Konformation vorliegen solle [97]. Die vorgeschlagene Konformation wurde angezweifelt, insbesondere als die molekularbiologischen Experimente, basierend auf der Annahme helikaler *loop*–Struktur, wiederholt widersprüchliche Ergebnisse erbracht hatten [110].

Zur Art der Bindung zwischen dem Hormonrezeptor und dem Liganden waren mehrfach Vermutungen geäußert worden [110]. Die dritte extrazelluläre Schleife des GnRH–R war als eine Mikrodomäne der Bindetasche identifiziert worden und die Spezifität des sauren Aminosäurerestes in der Maus [69] bzw. im Mensch [70] für den positiv geladenen Arg–Rest des GnRH war nachgewiesen worden. Im Organismus der Maus wird die Spezifität von Glu^{7.32(301)} und im Mensch von Asp^{7.32(302)} verursacht.² In beiden Organismen folgt den Resten Glu³⁰¹ und Asp³⁰² jeweils ein Pro in der Sequenz. Diese sequenzielle Konstellation in Verbindung mit den sterischen Einschränkungen, die der Pro–Rest bewirkt, mögen eventuell dazu beitragen, dass die negativ geladenen Seitenketten des Glu³⁰¹ sowie des Asp³⁰² in eine bevorzugte Position gebracht werden. Dadurch könnte eine elektrostatische Wechselwirkung mit der positiv geladenen Aminosäure Arg⁸ des GnRH begünstigt werden [110].

Ergänzend zu dieser Beobachtung lagen die bereits angesprochenen molekulardynamischen Berechnungen vor, wonach der dritte *loop* des GnRH–R eine α –helikale Konformation annimmt [97]. Theoretisch könne auch dies zur bevorzugten Positionierung der Seitenketten von Glu³⁰¹ bzw. von Asp³⁰² zur effizienten Wechselwirkung mit Arg⁸ beitragen [110].

Auf diesen Vorgaben basierend wurden am endokrinologischen Institut der Universität Kapstadt eine Reihe molekularbiologischer Experimente durchgeführt, bei denen Insertionen von Ala–Resten in ECL3 des Rezeptor–Gens vorgenommen wurden [70]. Die Ala–Reste wurden in unmittelbarer Nachbarschaft zu Pro²⁹⁴ und zum Glu²⁹⁵ (in Mensch) auf der N–terminalen Seite des *loops* eingefügt. Damit war beabsichtigt, das sog. DP–Motiv (in Mensch) auf der C–terminalen Seite des *loops* zu stören und eine eventuell vorhandene helix–abhängige Orientierung der Seitenketten um 360°/(3,4 Aminosäuren pro Windung)

²Details zum Schema der Rezeptornumerierung sind im Kap. 3.4.1 (S. 43) angesprochen.

abzuwandeln. Die zellbiologischen Tests brachten jedoch keine signifikanten Ergebnisse, die sich als Hinweise auf eine Helixstruktur des *loops* interpretieren ließen.

Die biologische Aktivität des synthetischen ECL3-Peptids wurde in einem Bioassay untersucht, bei dem das synthetische Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen (zwischen 10^{-7} und 10^{-4} M) an das GnRH der Maus gebunden wurde (s. Abb. 5.16). Die Experimente wurden je zweimal als Doppelmessungen durchgeführt und zusätzlich mit einem Kontrollpeptid (Somatostatin) hinsichtlich unspezifischer Bindung zum GnRH überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl das zyklische als auch das lineare ECL3-Peptid spezifisch an GnRH binden. Als Indikator für die spezifische Bindung von Ligand und Rezeptor dient die im Bioassay detektierte Produktion an Inositol-Phosphat (IP). Wegen der großen Streuung war jedoch aus dem Bioassay nicht eindeutig abzulesen, ob das zyklische Peptid geringfügig besser bindet als das lineare Peptid.

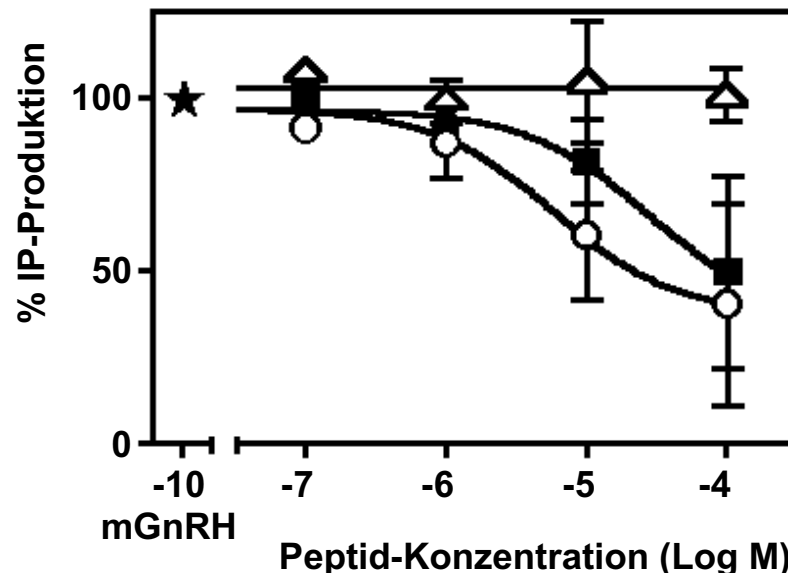


Abbildung 5.16: Inhibition der GnRH-stimulierten Produktion von Phosphatidyl-Inositol. (Δ) Somatostatin, (\blacksquare) lineares ECL3-Peptid und (\circ) zyklisches Peptid. Somatostatin ist ein 14 Aminosäuren langes Kontrollpeptid, das zum Nachweis eingesetzt wird, dass keine unspezifische Bindung zwischen dem Hormonpeptid und dem Rezeptor stattfindet [110].

5.1.7 Molecular Modeling Experiment

Die Strukturinformationen aus den spektroskopischen Untersuchungen wurden in einem zusätzlichen, theoretischen Experiment (*Molecular Modeling*) eingebracht. Das computerunterstützte Modellieren der Ligand-Rezeptor-Funktion führte Phil Taylor in Edinburgh, Schottland (*Human Reproductive Sciences Unit*) durch. Er verwendete bei den Simulationen ein GnRH-Rezeptormodell, das sich weitgehend an die Röntgenstrukturdaten des Rhodopsins anlehnt.

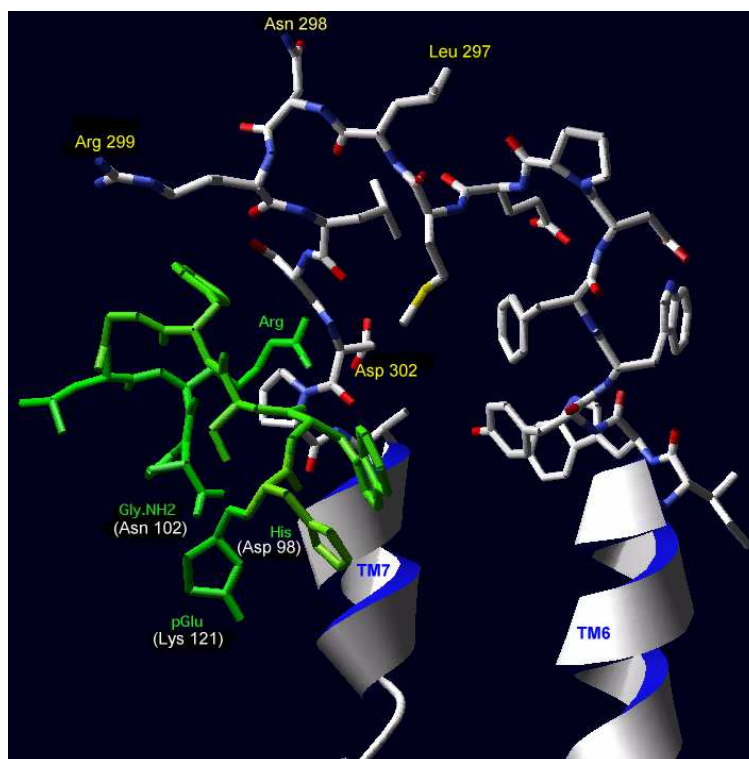


Abbildung 5.17: Wechselwirkung zwischen der Aminosäure Arg⁸ des Hormondekapeptids GnRH und dem geladenen Asparaginrest Asp³⁰² der dritten extrazellulären Schleife im GnRH-Rezeptor (Mensch). Das molekulare Rezeptormodell zeigt nur die beiden Helices TM6 und TM7. Die drei bekannten Rezeptorbindungsstellen Asp⁹⁸, Asn¹⁰² und Lys¹²¹ (in Klammern notiert) sind in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Resten His, Gly.NH2 und pGlu des Hormonpeptids angedeutet. Man beachte, dass in der hier gewählten Darstellung die Sequenz des loops in 'umgekehrter' Reihenfolge, von der rechts angeordneten TM6 zu der links daneben dargestellten TM7 erfolgt.

Ausgehend von den Ergebnissen der 2D-NMR-Untersuchungen (s. Kap. 5.1.5) war dem zyklischen ECL3-Peptid eine β -turn-Konformation zugeordnet worden, die sich um die drei Reste LNR zentriert (s. Kap. 5.1.5). Diese Sekundärstruktur des loops wurde im Docking-Experiment eingesetzt und mit den beiden transmembranen Helices des Rezeptors in Verbindung gebracht. Das Hormon-Dekapeptid GnRH wurde mit seiner aktiven β II turn-Konformation an die bekannten Bindungsstellen des Rezeptors ge-

dockt. Die Rezeptor-Bindungsstellen bestehen aus den drei Resten Asp⁹⁸, Asn¹⁰² und Lys¹²¹ (s. Abb. 5.1). Aus der Simulation der Bindungstasche zeigte sich im *molecular modeling* Experiment, dass nach der vollständigen Orientierung dieser drei Bindungsstellen der Argininsäurerest (Arg⁸) des Hormons mit der sauren Glutaminsäure Asp³⁰² in Kontakt treten und wechselwirken kann.

Aus dem *Modeling*-Experiment lässt sich schlussfolgern, dass das zyklische ECL3-Peptid mit der eingesetzten Disulfidbrücke zwischen den beiden Cys-Resten der Peptidtermini die reale Situation im Rezeptor hinreichend gut simuliert. Der synthetische *loop* ist als Modellpeptid geeignet, da er die gegebenen räumlichen Einschränkungen im Rezeptor nachahmt und die beiden transmembranen Helices 6 und 7 im geeigneten Abstand miteinander verbindet (s. Abb. 3.15).

5.1.8 Zusammenfassung und Diskussion

Die Aussagen aus den Untersuchungen mit Circular-Dichroismus (vgl. Kap. 5.1.3) und mit der Raman-Spektroskopie (vgl. Kap. 5.1.4) erbrachten weitgehende Übereinstimmung bei der Sekundärstrukturanalyse. Beide Methoden lieferten deutliche Hinweise auf die ungeordnete Struktur, die sowohl im zyklischen als auch im linearen ECL3-Peptid dominant vorhanden ist. Im Widerspruch zu den vorgegebenen Aussagen [97] und zu einigen spekulativen Annahmen [110] waren keine Anzeichen von Helixbildung zu beobachten. Darüber hinaus waren die 2D-NMR-Experimente im wesentlichen mit den CD- und den Raman-Ergebnissen konsistent. Mit den Kernspinresonanzmessungen, die sich durch die höhere Sensitivität — insbesondere bezüglich lokaler Strukturbildung — auszeichnen, wurde im zyklischen ECL3-Peptid ein zentral gelegenes β -turn detektiert.

Vom Phosphatidyl-Inositol-Assay (vgl. Abb. 5.16) war kein signifikanter Unterschied zwischen der Inhibitionskapazität des zyklischen und des linearen ECL3-Peptids erkennbar. Wenn man die Ergebnisse aus der 2D-NMR-Spektroskopie in Betracht zieht, erscheinen die Assay-Resultate jedoch in einem anderen Licht. Das zyklische Peptid nimmt überwiegend ungeordnete Konformation an und ist durch einen kleinen Strukturanteil eines β -turns, zentriert um die drei mittleren Aminosäuren L²⁹⁶N²⁹⁷R²⁹⁸ (bzw. L6 N7 R8), gekennzeichnet. Es ist denkbar, dass auch das lineare Peptid eine Neigung zur β -turn Konformation besitzt. Dieser potentielle Strukturanteil ist jedoch sehr gering und liegt möglicherweise unterhalb des Detektionslimits der NMR-Spektroskopie. Darin mögen sich die vergleichsweise geringen Unterschiede im PI-Assay beim zyklischen und beim linearen Peptid erklären lassen.

Anhand der vorangehend dargestellten Ergebnisse ist die Schlussfolgerung naheliegend, dass die biologische Aktivität des *loops* mit der β -turn Struktur korreliert ist. Auch das lineare Peptid zeigte eine ähnlich starke Inhibition der Phosphatidyl-Inositol-Produktion. Es besitzt möglicherweise die Neigung, während des Bindens an den Rezeptor die β -turn Konformation spontan einzunehmen. Mit dieser Argumentation kann ein Rezeptormodell diskutiert werden, das die gewonnenen Strukturinformationen und deren Einfluss auf die

Rezeptor–Ligand–Bindung im sog. *conformational selection model* vereint. Im Konzept des *selection model* wird vorausgesetzt, dass der Rezeptor zwischen Konformeren der aktiven und der inaktiven Form fluktuiert. In dieser Konstellation besitzen nun die Agonisten eine erhöhte Bindeaffinität zum aktiven Rezeptorkonformer, wogegen die Antagonisten eine bevorzugte Bindung zum inaktiven Rezeptorkonformer aufweisen [51, 62]. Sobald der Agonist an den Rezeptor gebunden ist, steigt die Konzentration des aktiven Rezeptors an und begünstigt dadurch weitere, nachgelagerte Bindungsprozesse mit hoher Affinität.

Das Prinzip des *conformational induction model* dagegen beruht auf der Annahme, dass keine Vorgaben hinsichtlich der strukturellen Konformation des Rezeptors gegeben sind. In diesem Modell wird unterstellt, dass erst mit dem Vorgang der Rezeptor–Ligand–Bindung eine definierte Struktur induziert wird. Im Augenblick der Ligand–Bindung an den (zunächst noch) inaktiven Rezeptor nimmt dieser eine spezielle Konformation mit hoher Bindungsaffinität ein. In einem simultan ablaufenden oder möglicherweise zeitlich unmittelbar nachfolgenden Schritt liegt der Rezeptor dann in einer geänderten Konformation, durch den Bindungsprozess aktiviert vor.

5.2 Alanin–Prolin–Polypeptide

In der vorangegangenen Diskussion um den GnRH–Rezeptor wurde bereits die besondere Rolle des Prolins und der Einfluss auf die Konformation in einer Polypeptidkette angesprochen. Das folgende Kapitel stellt die Ergebnisse der strukturanalytischen Untersuchungen an drei synthetischen Polypeptiden vor, die allein aus den beiden Aminosäuren Alanin und Prolin aufgebaut sind. Die Systematik im sequenziellen Aufbau des Pentapeptids APA₃, des Hexapeptids APA₄ und des Heptapeptids APA₅ (vgl. [Kap. 3.4.2](#)) ist konzipiert, um mehrere Fragestellungen zugleich anzugehen. Die komplementären Strukturuntersuchungen in der vorliegenden Arbeit mittels der CD–Spektroskopie, sowie der Raman– und der 2D–NMR–Spektroskopie zielten auf die Aufklärung folgender Zusammenhänge:

- Treten Konformationsänderungen auf und lassen sich diese mit den eingesetzten spektroskopischen Methoden beobachten, wenn die Polypeptidkette sukzessive um eine einzelne Aminosäure verlängert wird?
- Sind Unterschiede im Raman–Spektrum erkennbar, wenn die Proben in wässriger Lösung oder im Feststoff untersucht werden?
- Wie verhalten sich die relativen Intensitäten wichtiger, struktur–sensitiver Raman–Linien in Abhängigkeit von der Peptidlänge und/oder der Konformation?
- Kann mit Hilfe der Raman–Spektroskopie die absolute Konfiguration der Prolyl–Peptidbindung detektiert werden?

Die Alanin–Prolin–Polypeptide wurden von R. deL Milton am Institut für Reproduktive Endokrinologie der Universität Kapstadt synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Vor Beginn der strukturanalytischen Untersuchungen wurden von den drei Polypeptiden die molekularen Massen bestimmt. Die Massenspektren wurden von Werner Bouschen (Institut für Physikalische Chemie, Universität Würzburg) mit einem MALDI–Spektrometer (Eigenkonstruktion) aus dem Arbeitskreis von Prof. Spengler aufgezeichnet.

In der Massenspektrometrie hängt die gemessene Signalintensität nicht nur von der eingesetzten Analytmenge (Peptidmenge), sondern auch vom Matrix–/Analyt–Verhältnis ab. Somit können die Signalintensitäten, je nach eingesetzter Probenmenge stark variieren, und sind streng genommen nicht zur quantitativen Auswertung, sondern bestenfalls für eine semiquantitative Bewertung verwendbar. Aus diesem Grund wurden jeweils mehrere Spektren von unterschiedlichen Matrixpositionen auf dem verfahrenbaren MALDI–Proben­teller aufgenommen, die alle große Ähnlichkeit bei den detektierten Peakintensitäten aufwiesen. Von den Proben APA₃, APA₄ und APA₅ ist jeweils ein typisches Massenspektrum ausgewählt und in der [Abbildung 5.18](#) zusammen mit den Zuordnungen der wichtigsten Haupt– und Nebenpeaks wiedergegeben.

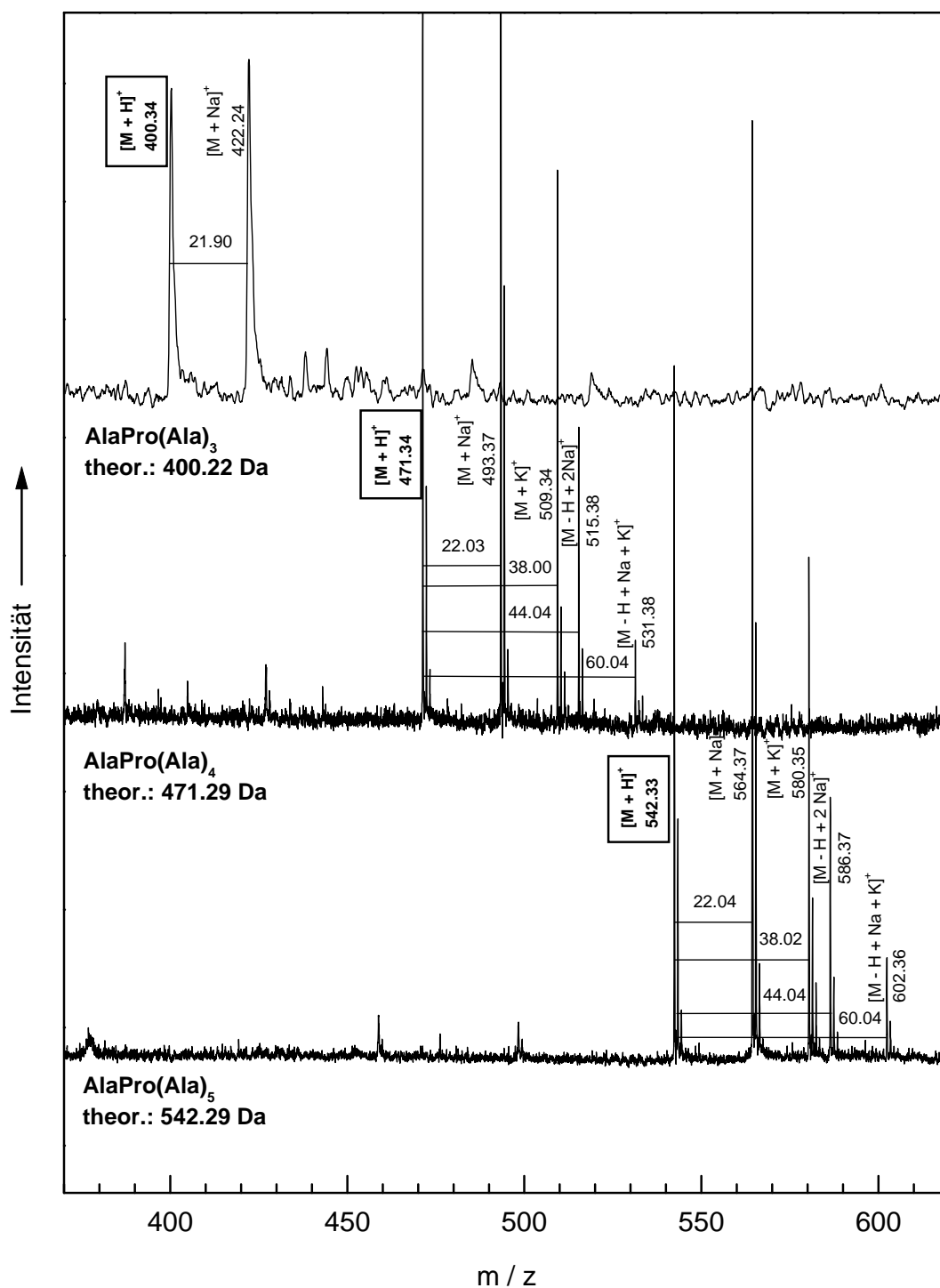


Abbildung 5.18: Massenspektrometrische Analyse der Polypeptide AlaPro(Ala)_n mit MALDI-TOF unter Verwendung einer gesättigten DHB-Lösung als Matrix. (Anmerkung: Die hohe Isotopenauflösung des MALDI-Spektrometers geht in der hier gewählten graphischen Präsentation der Ergebnisse teilweise verloren.)

Die erhaltenen Massenspektren bestätigten die Übereinstimmung zwischen dem theoretischen und dem gemessenen Molekulargewicht. Die Hauptpeaks in der Probe APA₄ bei den Ionen $m/z = 471$ Da und $m/z = 542$ Da (APA₅) waren von weit intensiveren Signalen überragt, die auf offensichtlich sehr hohe (nicht quantifizierbare) Mengen von Salzurückständen (Na^+ , K^+) schließen ließen. Lediglich bei der Probe APA₃ war auch nach wiederholten MS-Messungen ein einziger Nebenpeak ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), etwa gleichgroß wie der Hauptpeak, detektiert worden.

Die Massenspektrometrie lieferte den Nachweis, dass die Proben keine Fehlsequenzen enthielten. Die Polypeptide mussten zur Vorbereitung auf die spektroskopischen Untersuchungen mit präparativer HPLC entsalzt werden, da der hohe Salzgehalt bei den CD- und NMR-Messungen Störungen hätte hervorrufen können.

5.2.1 Probenaufbereitung mit HPLC

Um die Proben zu entsalzen, wurde vorab eine analytische HPLC durchgeführt, aus der anschließend die Parameter für den Lösungsmittel-Gradienten der nachfolgenden präparativen HPLC festgelegt wurden. Hierzu wurden aus den drei Proben jeweils Lösungen in einer Konzentration von 1 mg/ml angesetzt, auf die RP-HPLC-Trennsäule injiziert (Injektionsvolumen 20 μl) und bei einer Flussrate von 1 ml/min mit einem flachen Acetonitril-Gradienten getrennt (weitere Details zur Chromatographie: s. [Anhang A](#)). Die Identität der Proben konnte anhand der Peakflächen hinreichend genau identifiziert werden. Daraus wurden die optimalen Trennungsbedingungen für die präparative HPLC festgelegt.

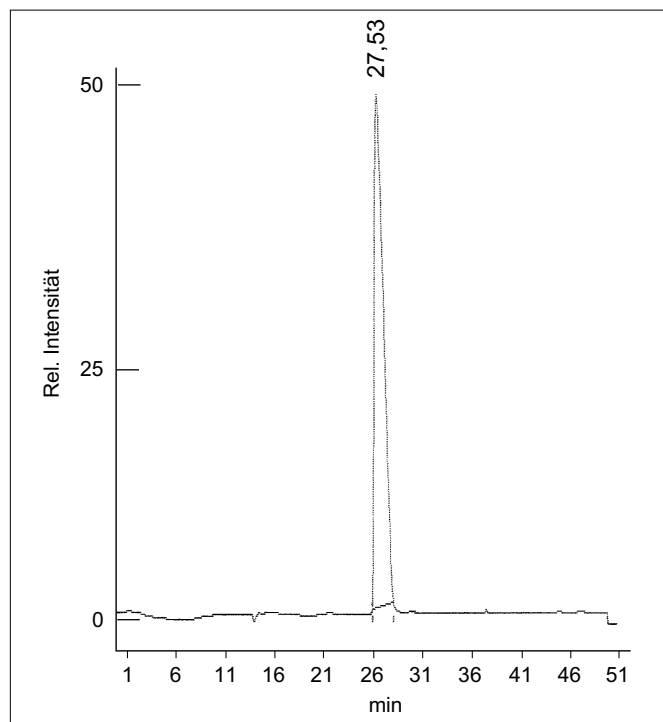


Abbildung 5.19: RP-HPLC-Chromatogramm der Probe APA₄ mit Detektion bei 216 nm. Probenreinheit > 99%; Trennsäule CC125/4 Nucleosil 120-5 C₁₈. Lösungsmittel und Gradient: s. [Anhang](#).

In [Abbildung 5.19](#) ist exemplarisch ein Chromatogramm der analytischen HPLC vom Polypeptid APA_4 dargestellt. Bei der gewählten Wellenlänge von 216 nm am UV/VIS–Detektor wurde eine einzige Komponente nachgewiesen (Probenreinheit > 99%). Die Elutionsprofile (nicht abgebildet) der beiden Proben APA_3 ($R_t = 26,27$ min) und APA_5 ($R_t = 28,52$ min) waren jenem der [Abbildung 5.19](#) ähnlich und zeigten jeweils einen einzigen Hauptpeak.

5.2.2 Strukturanalyse mit CD–Spektroskopie

Wie bereits im [Kap. 4.1](#) angesprochen, hat die quantitative Sekundärstrukturanalyse mit Hilfe der CD–Spektroskopie zur Voraussetzung, dass die Peptidkonzentrationen möglichst genau bekannt sein müssen. Wenn in der zu untersuchenden Protein– oder Polypeptidsequenz aromatische Aminosäuren (Tyr oder Trp) enthalten sind, lässt sich hierfür die UV–Absorptionsspektroskopie einsetzen. Da die drei Polypeptide keine Aromaten enthalten, kam diese Methode der Konzentrationsbestimmung im vorliegenden Fall jedoch nicht in Betracht.

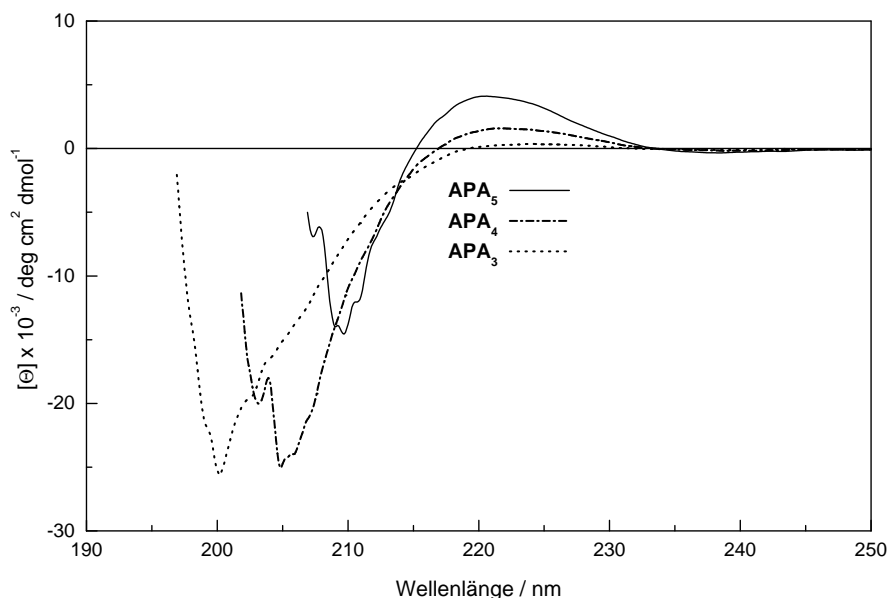


Abbildung 5.20: CD–Spektren der Polypeptide APA_3 ($\sim 110 \mu\text{M}$), APA_4 ($\sim 100 \mu\text{M}$) und APA_5 ($\sim 95 \mu\text{M}$), aufgezeichnet in NaF–haltigem Puffer. Schichtdicke der Quarzküvette: 0,2 cm.

Demzufolge können die aufgezeichneten CD–Spektren ([Abb. 5.20](#)) nur für eine qualitative Analyse herangezogen werden. Mit der Einwaage von 1 mg Peptid, das im NaF–haltigen–Puffer (s. [Kap. 4.1](#)) gelöst und anschließend unter kontrollierter Pufferzugabe weiter verdünnt wurde, kann die Probenkonzentration nur wenig genau und mit einem großen Fehler behaftet abgeschätzt werden. Andererseits ist diese Vorgehensweise hinreichend, um zumindest sicherzustellen, dass die für die CD–Spektroskopie erforderlichen Konzentrationen eingehalten werden. Generell gilt für die Parameterabschätzung, die jeder CD–Messung vorausgehen muß, dass die Absorption der Proteinlösung den Wert 1 nicht

übersteigen soll und dass die Spannung am Photomultiplier bei gegebener Schichtdicke der Küvette idealerweise im linearen Betriebsbereich unterhalb von 600 V liegen soll.

Im vorliegenden Fall ist es für eine grobe Analyse der Sekundärstruktur hinreichend, die CD-Spektren der Polypeptide AlaPro(Ala)_n mit jenen der „reinen“ Sekundärstrukturen (s. [Abb. 3.2](#)) zu vergleichen. Bei der Probe APA₅ liefert das Maximum der breiten, positiven CD-Bande, zentriert um den Wellenlängenbereich von 220 nm, einen sicheren Hinweis auf das Vorhandensein von *random coil*-Konformation. Sowohl das Hexapeptid APA₄, als auch das Pentapeptid APA₃ zeigten eine moderate, stetige Abnahme der positiven Bande nahe bei 220 nm. Dies kann aus Überlagerungen des *random coil*-Signals durch einen geringen Beitrag (schätzungsweise 5 – 10 %) vom negativen CD-Signal aus β -Faltblattstruktur zustandekommen.

Das Minimum im CD-Spektrum der Probe APA₅ befindet sich mit 210 nm bei einer untypisch hohen Wellenlänge. Üblicherweise ist ein starkes, negatives CD-Signal bei 196 nm kennzeichnend für reine *random coil*-Strukturen (vgl. [Abb. 3.2](#)). Offensichtlich rufen geringe Beiträge von β -Struktur, die mit der ungeordneten Konformation überlagern, die Verschiebung hervor. Dieser Effekt ist in der Probe APA₄ mit dem Minimum bei 205 nm und in der Probe APA₃ mit dem Minimum bei 200 nm um Einiges deutlicher ausgeprägt. Die Gestalt der CD-Spektren lässt erkennen, dass in den drei Polypeptiden ein geringer Anteil an β -Faltblattstruktur zu der dominant vorhandenen ungeordneten Konformation beiträgt.

5.2.3 Vorbemerkungen zur Raman-Spektroskopie an gelösten und an festen Proben

Die Raman-Messungen an den Polypeptiden AlaPro(Ala)_n wurden sowohl am Feststoff, als auch in wässriger Lösung durchgeführt. Im Mittelpunkt stand dabei die Frage, ob die Peptide in Lösung oder in Abwesenheit eines Lösungsmittels in ihrer spektroskopischen Information signifikante Unterschiede zeigen, die auf Änderungen der Konformation schließen lassen.

Zur Aufzeichnung der Spektren wurde eine Mikro-Raman-Apparatur unter Anregung mit der 514,5 nm Linie eines Argon-Ionen-Lasers verwendet. Die Lösungsspektren wurden ohne Einsatz des Mikroskops in 90 °-Streugeometrie aufgenommen. Dabei wurde ein geringfügig modifizierter, konventioneller Raman-Aufbau verwendet, dessen Details im [Kapitel 5.2.4](#) näher beschrieben sind. Der Mikro-Raman-Aufbau (für die Aufnahme der Spektren am Feststoff) enthält ein Lichtmikroskop, das in Anlehnung an ein konventionelles Mikroskop (Fa. Olympus) im Institut für Physikalische Chemie nachgebaut worden war. Für komplementäre Messungen mit Anregung im nahen Infrarot-Bereich wurde ein FT-Raman-Spektrometer IFS 120 HR der Firma Bruker, Karlsruhe, eingesetzt. Weitere Details der Apparaturen und Systemparameter sind in den [Kapiteln 3.2.1](#) und [3.2.2](#) sowie im [Anhang A](#) beschrieben.

Bevor die Ergebnisse im Einzelnen vorgestellt und ausführlich diskutiert werden, seien einige Anmerkungen zum Thema Lösungsmittel vorangestellt. Die unterschiedlichen Untersuchungsbedingungen in der Raman–Spektroskopie an Proteinen, sei es in der festen Phase (Pulver, Kristall) oder in der gelösten Phase, sind nach wie vor Gegenstand lebhafter Debatten. Als eines der hartnäckigen Argumente wird in diesen Diskussionen oft eingebracht, dass die Messungen unter physiologischen Bedingungen stattfinden soll(t)en, da Wasser die natürliche Umgebung für die meisten Proteine bildet. Allerdings können diese experimentellen Bedingungen nicht immer erfüllt werden. So mussten beispielsweise bei Untersuchungen am wasserunlöslichen, pathologischen Prion–Protein Alternativen gefunden werden, um das Molekül in Lösung zu bringen und es auf diese Weise in eine für die Spektroskopie zugängliche Form zu überführen. Oft wird eine ausführliche Erörterung unterschlagen, die sich mit den Konsequenzen auf die Proteinkonformation beim Einsatz von nichtwässrigen Lösungsmitteln auseinandersetzt.

Die Notwendigkeit, Lösungsmittelleffekte in Betracht zu ziehen, soll am Beispiel des charakteristischen Dubletts der Tyr–Seitenkette veranschaulicht werden. Hierzu können – stellvertretend für andere – die Raman–Studien in unterschiedlichen wässrigen Lösungen an den Histonproteinen H1, H2A und H2B des Kalbsthymus herausgegriffen werden [111]. Die Histone sind aus mehreren Regionen von α –Helix sowie *random coil*–Strukturen aufgebaut und ihre Proteinsequenzen enthalten drei Tyr–Reste. Yu *et al.* haben aus ihren Untersuchungen abgeleitet, dass das Intensitätsverhältnis der beiden Banden des Tyr–Dubletts bei 855 cm^{-1} und 830 cm^{-1} eine Aussage darüber liefert, ob die Seitenketten in Wasser bzw. in NaCl–haltigen, wässrigen Lösungen nach außen hin orientiert sind und dabei H–Brückenbindungen mit dem Lösungsmittel bilden oder nicht (Ref. 49 in [104]). Es ist evident, dass sich die Verhältnisse von I_{855}/I_{830} in nicht–wässrigen Lösungsmitteln aufgrund der Veränderungen bei den H–Bindungen drastisch verändern können. Im Gegensatz zu dieser Aussage stehen die Beobachtungen an Tyr–haltigem Oxytocin, die aus Raman–Studien in verschiedenen Lösungsmitteln ebenso wie am Feststoff gewonnen wurden [112]. Das Hypophysenhormon Oxytocin³ ist ein zyklisches Peptid mit einer kurzen Sequenz von 9 Aminosäuren, welches zwischen zwei Cysteinyl–Resten in den Positionen 1 und 6 durch eine Disulfidbrücke verknüpft ist ([10], Seite 47f). Tu *et al.* haben die Konformation des Hormonpeptids Raman–spektroskopisch in H_2O , in D_2O und in Dimethylsulfoxid sowie am Feststoff (Pulver, lyophilisiert) untersucht [112]. Beim Vergleich der Raman–Spektren in H_2O und in D_2O zeigten sich keine Änderungen in der Konformation des Peptid–Rückgrates. Allerdings waren die Tyr–Intensitätsverhältnisse I_{855}/I_{830} in beiden Lösungen deutlich verändert und führten zu der Schlussfolgerung, dass die Orientierung der Tyr–Seitenketten von den unterschiedlichen Lösungsmitteln maßgeblich beeinflusst wird. Beim Vergleich der H_2O –Spektren und der Feststoffspektren zeigte das Tyr–Dublett eine bemerkenswerte Übereinstimmung.

³Im englischen Sprachgebrauch findet sich häufig die Bezeichnung Oxytocin, anstelle von Ocytocin. Nach der Empfehlung der IUPAC–Kommission für die Nomenklatur von Peptidhormonen sind beide Namen zulässig.

Bei Raman–Untersuchungen an Protein– und Polypeptidlösungen geht ein wichtiger Teil der Strukturinformationen verloren, da die AI von der intensiven Raman–Streuung der Wassermoleküle weitgehend überdeckt wird. Ein repräsentatives Beispiel dazu ist mit der [Abbildung 5.21](#) herausgegriffen, bei dem die Überlagerung der AI durch das dominante Wassersignal um 1650 cm^{-1} (OH–Biegeschwingungen) demonstriert wird.

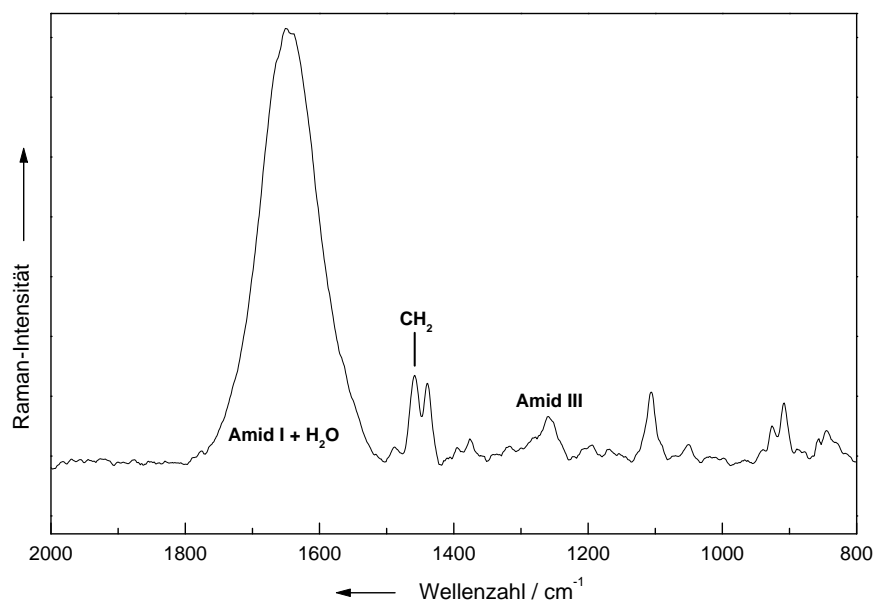


Abbildung 5.21: Beispiel für die Überlagerung der Amid I–Bande durch das Wassersignal in einem Raman–Spektrum aus der Polypeptidserie $\text{AlaPro}(\text{Ala})_n$, aufgezeichnet in wässriger Lösung (ca. 5 mg/ml) im Wellenzahlenbereich von 800 cm^{-1} bis 2000 cm^{-1} .

Für die Sekundärstrukturanalyse aus Raman–Spektren müssen sowohl die Positionen als auch die Intensitäten charakteristischer Banden herangezogen werden. Um Änderungen in den Intensitäten analysieren zu können, ist das reine Lösungsmittelspektrum vom Proteinspektrum abzuziehen. In der Literatur finden sich zur Bearbeitung der Raman–Daten unterschiedlichen Vorgehensweisen beschrieben. Einige Autoren verwenden in willkürlich abgegrenzten Wellenzahlbereichen eine lineare Basislinie, um die Lösungsmittelbeiträge zu subtrahieren [113, 101]. Pézolet *et al.* haben in einer Studie an Muskelfasern die relativen Intensitätsänderungen untersucht und zur Datenauswertung die von Fluoreszenz verursachten Untergrundbeiträge mittels einer quadratischen Polynomfunktion abgezogen [114]. In einer weiteren Arbeit derselben Autoren wurden Differenzspektren berechnet, bei denen zuvor ein Basislinienfit mit einem Polynom höherer Ordnung angesetzt worden war [115]. Gaber und Kollegen hingegen verwenden eine ausführlich beschriebene, mathematische Methode zur Korrektur der Basislinie und zur Glättung der Spektren [116]. Auf Details über die Vorgehensweise bei der Basislinienkorrektur wird bei den im [Kapitel 5.2.6](#) vorgestellten Ergebnissen aus der Raman–Spektroskopie näher eingegangen. Streng genommen ist die korrekte Subtraktion des Wassersignals nur mit einem speziell konfigurierten Aufbau, unter Verwendung einer rotierenden Rundküvette, realisierbar (Raman–Differenz–

Spektroskopie), bei der das Proteinspektrum und das Lösungsmittelspektrum simultan aufgezeichnet werden, so dass identische Bedingungen von Laseranregung und Signal-Detektion gewährleistet sind [117, 118].

5.2.4 Raman–Spektroskopie an Polypeptidlösungen

Im Folgenden wird bei allen vorgestellten und diskutierten Spektren der Wellenzahlenbereich zwischen 800 und 1500 cm^{-1} gezeigt, sofern die Raman–Experimente an Lösungen durchgeführt wurden. Der AI–Bereich (um 1650 cm^{-1}) bleibt in diesem Fall wegen des Wassersignals ausgespart (vgl. Kap. 5.2.3). Bei den Messungen am Feststoff dagegen erstrecken sich die Spektren über den Bereich von 800 bis 1800 cm^{-1} , womit alle Schwingungsmoden erfasst werden, die bei der Interpretation von Proteinstrukturen relevant sind [104]. Dazu gehören an erster Stelle die struktur–sensitiven Amid–Banden (AI und AIII), aber auch die Schwingungen des Polypeptidrückgrates und einiger Aminosäureseitengruppen.⁴

Zur Vorbereitung der spektroskopischen Untersuchungen wurden die Peptidlösungen in schmale, am unteren Rand abgerundete Glasröhrchen gegeben, wie sie üblicherweise in der NMR–Spektroskopie eingesetzt werden (Innendurchmesser ca. 5 mm). Die NMR–Röhrchen waren in einer einfachen Haltevorrichtung aufrecht auf dem Spektrometertisch unmittelbar vor einer großen Sammellinse ($f = 150 \text{ mm}$) und nahe am Eingangsspalt des Doppel–Monochromators angebracht (Abb. 5.22).

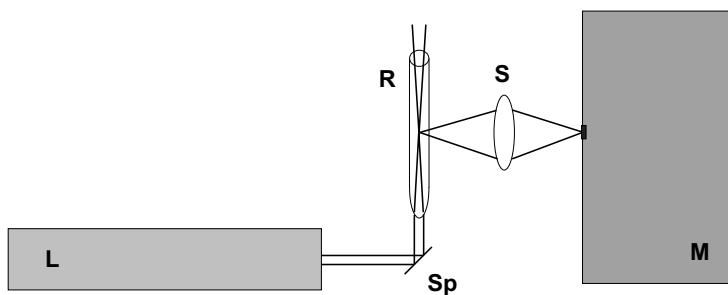


Abbildung 5.22: Schematische Anordnung des NMR–Röhrchens unmittelbar vor dem Eingangsspalt zum Doppelmonochromator in 90° –Streugeometrie (Zeichnung nicht maßstabsge-
recht). Abkürzungen: **L** Laser; **SP** Spiegel; **R** NMR–Röhrchen; **S** Sammellinse ($f = 150 \text{ mm}$); **M** Doppelmonochromator.

Über einen Spiegel wurde der Laser vertikal zum abgerundeten Boden des Röhrchens hochgelenkt, so dass das NMR–Röhrchen der Länge nach vom Laserstrahl durchsetzt wurde (s. Abb. 5.22). Man macht sich bei dieser Anordnung die Abrundung am Boden des Glasröhrchens zunutze, der für den durchgeleiteten Laserstrahl wie eine kleine Linse (ohne scharfe Abbildung) wirkt und in der Probenlösung einen kurzen, wenige mm ausgedehnten

⁴Raman–Streuung von Cys–Seitenketten (C–S, S–H) und von Disulfidbrücken (S–S) ist hierbei außer Acht gelassen. Sie ist überwiegend im niedrigeren Wellenzahlenbereich zwischen 500 und 700 cm^{-1} zu beobachten.

Fokusbereich erzeugt, der sich mit bloßem Auge gut erkennen und justieren lässt. Das Raman-gestreuete Licht wird bei dieser Anordnung in 90°-Geometrie erfasst.

Zunächst werden die Resultate aus der Raman-Spektroskopie (unter Verwendung des Aufbaus der [Abbildung 5.22](#)) und die der FT-Raman-Spektroskopie diskutiert, die in wässriger Lösung aufgezeichnet wurden. Die Raman-Spektren der drei Polypeptide werden im abgebildeten Wellenzahlenbereich zwischen 800 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} von mehreren starken Linien dominiert (s. Hervorhebung durch gestrichelte Rahmen in [Abb. 5.23](#)). Die Schwingungen der Aminosäureseitenketten (CH_2/CH_3) sind meist um 1450 cm^{-1} zentriert und liegen hier mit 1457 cm^{-1} bzw. 1458 cm^{-1} ausgesprochen hoch, wie der Vergleich mit den zusammengestellten Daten der [Tabelle 5.6](#) zeigt.

In enger Nachbarschaft dazu taucht in allen drei Spektren ein klar separierter zweiter Peak bei 1439 cm^{-1} auf, dessen Intensität in der Probe APA_5 signifikant verringert ist. In der Literatur finden sich zu dieser Raman-Bande divergente Aussagen. So berichteten beispielsweise Lord und Yu von einer starken Linie bei 1432 cm^{-1} im Raman-Spektrum von Lysozym und ordneten diese der N-H-Biegeschwingung des Indolringes im Tryptophan zu [[119](#)]. Diese Interpretation kommt im hier vorliegenden Fall mit Sicherheit nicht in Betracht, da in den Sequenzen der Prolin-haltigen Polypeptide diese Aminosäure nicht enthalten ist. Frushour und König hingegen detektierten im Spektrum von Collagen eine starke Schwingungsbande bei 1438 cm^{-1} und schrieben diese der *in-plane*-Biegeschwingung der Carboxyl-OH-Gruppe zu [[120](#)]. Es ist davon auszugehen, dass die Schwingungsmoden im Zusammenhang mit der X-Pro-Bindung zu interpretieren ist, auf die auf Seite 92 erneut eingegangen wird.

Die AIII-Regionen um 1253 bis 1262 cm^{-1} in [Abbildung 5.23](#) sind durch wenig scharfe Konturen gekennzeichnet und deuten in diesem niedrigen Wellenzahlenbereich auf einen dominanten Anteil von ungeordneter Struktur hin. Die Schwankungen betragen zwischen 3 und 14 cm^{-1} und liegen somit klar oberhalb des typischen *random coil*-Bereiches, den Spiro und Gaber mit der Wellenzahl $1245 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$ definierten [[104](#)]. Darüberhinaus ist festzustellen, dass die AIII-Banden der drei Proben von einem geringen Beitrag aus dem höheren Wellenzahlenbereich überlagert sind. Es ist bekannt, dass die Position der AIII nach höheren Wellenzahlen verschoben ist, wenn H-Brückenbindungen vorhanden sind und zur Stabilität in der Polypeptidkette beitragen. Ein hoher Strukturgehalt, der durch starke H-Bindungen gekennzeichnet ist, wurde von denselben Autoren für Wellenzahlen $> 1275 \text{ cm}^{-1}$ festgelegt [[104](#)]. Für eine zuverlässige Interpretation dieser Schwingung hinsichtlich der Sekundärstruktur ist jedoch die Aussagekraft der AIII allein noch nicht ausreichend. Hierzu ist ergänzende spektrale Information aus der AI-Region notwendig. Wie bereits zuvor erwähnt, kann auf diesen Teil des Spektrums jedoch nicht zurückgegriffen werden, da die AI von der starken Raman-Streuung des Lösungsmittels überdeckt wird. Verfolgt man die Positionen der AIII vom Polypeptid APA_3 , über APA_4 bis zum APA_5 , also in der Reihenfolge wachsender Kettenlänge, so ist ein geringer *down shift* zu registrieren. Diese Beobachtung ist aus zwei Gründen mit einiger Vorsicht zu bewerten: zum einen ist zu berücksichtigen, dass unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen die

spektrale Auflösung des Raman–Aufbaus in der Größenordnung von $\sim 6 \text{ cm}^{-1}$ liegt. Zum anderen ist die Form der AIII nicht genügend klar ausgeprägt, sondern erscheint als breite Bande mit Überlagerungen aus dem nahe benachbarten Wellenzahlenbereich.

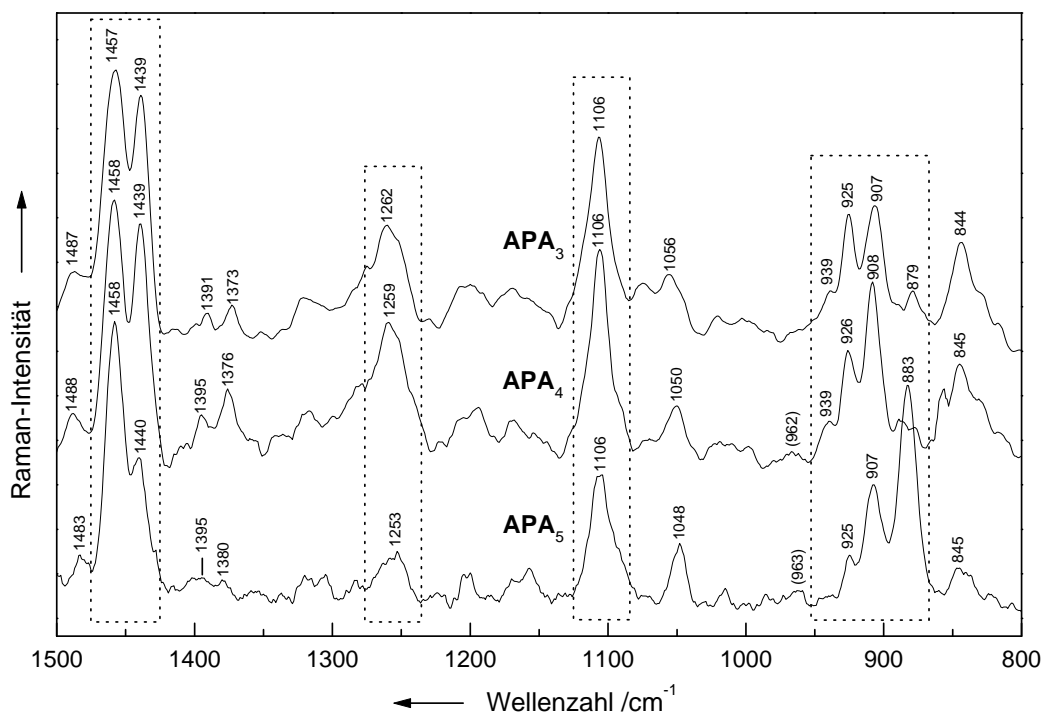


Abbildung 5.23: Gegenüberstellung der Raman–Spektren der drei Polypeptide APA_3 , APA_4 und APA_5 in wässriger Lösung (je 5 mg/ml) bei einer Anregung mit $\lambda_0 = 514,5 \text{ nm}$.

Neben der AIII liefern auch die C–N–Streckschwingungen bei 1106 cm^{-1} einen weiteren Strukturindikator, der von den Schwingungen des Polypeptidrückgrates stammt. In den drei Raman–Spektren (Abb. 5.23) erscheint diese Linie in einer nahezu symmetrischen Form jeweils auf der gleichen Position. Diese Schwingungsmode wurde mehrfach als sensibler Konformationsmarker in Proteinen beschrieben, deren Intensität sich unter Denaturierungsexperimenten merklich reduzierte [121]. Die relative Intensität der $\nu(\text{C–N})$ lässt sich an einer internen Referenzlinie ermitteln und kann als eine Messgröße herangezogen werden, um Änderungen der Konformation zu erfassen (s. a. Abb. 5.32, links).

Weiterhin sind in der Abbildung 5.23 eine Reihe von mittelstarken Banden zu erkennen, die zum Teil von den C–C–Schwingungen des Polypeptidrückgrades herrühren (~ 940 und $\sim 907 \text{ cm}^{-1}$). Die Positionen dieser Banden sind in allen Proben nahezu identisch. Die großen Unterschiede in den relativen Intensitäten, die bei den Raman–Messungen an den Alanin–Prolin–Polypeptiden beobachtet wurden, waren Auslöser für zusätzliche spektroskopische Untersuchungen, die im Kapitel 5.2.6 im Detail erörtert werden. Speziell die 907 cm^{-1} –Linie wurde als ein Konformations–sensibler Marker in poly–(Ala–Gly) detektiert ([122], S. 35–97) und wurde im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit anderen Strukturmarkern für die quantitative Strukturbestimmung herangezogen (vgl. Kap. 5.2.6). Die

schwache und breit geformte Raman-Bande bei 963 cm^{-1} stammt ebenfalls von Schwingungen des Polypeptidrückgrates. Die Linie wurde als ein Anzeichen für Helix-Strukturen in Proteinen beschrieben [121]. Im Spektrum der Proben APA₄ und APA₅ ist sie sich sehr schwach ausgeprägt und signalisiert den tendentiell hohen Grad an ungeordneter Struktur in den Prolin-haltigen Polypeptiden.

In der [Abbildung 5.23](#) ist eine schwache Bande bei 1485 cm^{-1} zu sehen, deren Zuordnung im Folgenden diskutiert werden soll. Dieser Schwingungsmode widmeten Jordan *et al.* besondere Aufmerksamkeit in umfassenden UVR- Studien an einer Auswahl von Dipeptiden und Proteinen [11]. Aus den ergänzenden Analysen an der Modells substanz N-Methylacetamid schlussfolgerten sie, dass die X-Pro-Bindung eine lokalisierte C-N-Streckschwingung um 1460 cm^{-1} verursacht. Diese tritt an einer Position auf, die sich genügend deutlich vom Bereich der AII und der AIII abhebt. Da die Wellenzahl dieser Linie der sog. Amid II'-Bande im N-Methylacetamid sehr ähnelt, schlugen die Autoren vor, diese charakteristische Schwingung anstelle der zuvor üblichen Bezeichnung Imid II ($\sim 1460\text{ cm}^{-1}$) als Amid IIp (AIIp) zu bezeichnen.

Die *cis-trans*-Isomerisierung der X-Pro-Bindung ist eine Struktur determinante in Proteinen, auf deren Schlüsselrolle bei der Proteinfaltung wiederholt hingewiesen wurde [12]. Zahlreiche Raman-Untersuchungen konzentrierten sich speziell auf diese Thematik. Allerdings lagen die Interpretationen diametral auseinander, wenn es um die Frage ging, ob die AIIp bezüglich der X-Pro-Konfiguration sensitiv ist, oder nicht. Die Raman-Studien zur X-Pro-Bindung erfolgten nahezu ausschließlich im UV-Bereich zwischen 240 und 200 nm, nachdem nachgewiesen worden war, dass bei dieser Anregung die Signalintensitäten gegenüber den Schwingungen der übrigen Peptidbindungen um den Faktor 30 verstärkt werden [123]. Mayne und Hudson beobachteten eine starke AIIp-Mode bei 1485 cm^{-1} an Pro-Gly- und Gly-Pro-Dipeptiden [123]. Unter Verwendung der Anregungswellenlänge von 218 nm detektierten allerdings Caswell und Spiro im Protein RNase A eine Linie bei 1465 cm^{-1} als AIIp-Schwingung. Weiterhin konnten sie nachweisen, dass sich der hohe Pro-Gehalt in His-reichem Glycoprotein in einer starken Bande bei 1457 cm^{-1} widerspiegelt. Darüberhinaus riefen sie im Polyprolin durch Änderung des Lösungsmittels einen signifikanten *down shift* von 1465 nach 1435 cm^{-1} hervor, den sie dem Übergang der Imidbindung von *trans* nach *cis* zuschrieben [124]. Anhand von Denaturierungsexperimenten an RNase definierten sie die AIIp bei 1465 cm^{-1} als *trans*- und bei 1455 cm^{-1} als *cis*-Konfiguration. Im Gegensatz dazu ordneten Hudson und Mayne die AIIp-Schwingungen an den isomeren Konformationen von Gly-Pro-Dipeptiden in umgekehrter Reihenfolge, und zwar mit *trans* bei der Wellenzahl 1500 cm^{-1} und mit *cis* bei 1515 cm^{-1} [125].

Aufgrund dieser Inkonsistenzen bei der Raman–Bande der X–Pro–Bindung erfolgten weitere Untersuchungen, wobei in mehreren Arbeiten übereinstimmend bewiesen werden konnte, dass die AIIp–Bande für die *cis–trans*–Isomerisierung nicht sensitiv ist [11, 126, 127]. Vielmehr werden die Verschiebungen der Wellenzahlen unter Veränderungen des Lösungsmittels ausgelöst. Für den großen Bandenshift sind die vorhandenen H–Brücken an der C–O–Bindung des Pro ausschlaggebend. Die Wellenzahl der AIIp variiert über eine breite Spanne zwischen $\sim 1445\text{ cm}^{-1}$ beim nicht–H–gebundenen Zustand und $\sim 1485\text{ cm}^{-1}$, wenn starke H–Bindungen vorliegen. Daher ist die AIIp ein sensitiver Strukturmarker, der als Unterscheidungskriterium dafür dient, ob in X–Pro–Bindungen starke oder schwache H–Brücken zur C–O–Bindung vorliegen [11].

Anlehnend an die vorangegangene Argumentation können anhand der Raman–Spektren der **Abbildung 5.23** folgende Aussagen getroffen werden: im Hepta– und im Hexapeptid zeigen sich bei 1439 cm^{-1} starke, symmetrische AIIp–Banden, die darauf hindeuten, dass wenige H–Bindungen zwischen Pro und dem Lösungsmittel vorliegen, wodurch die Polypeptide einen hydrophoben Charakter erhalten. Diese Interpretation wird durch die sehr geringe Intensität der Linie bei 1487 (APA₃) bzw. 1488 cm^{-1} (APA₄) unterstützt, die als Indikator für starke H–Bindungen zuvor erörtert worden war. Mit der Verlängerung der Polypeptidkette (APA₃ \rightarrow APA₄ \rightarrow APA₅) sind im Heptapeptid die geringen H–Bindungen zwischen Pro und dem Lösungsmittel noch weiter herabgesetzt, wie sich an der reduzierten Bandenintensität bei 1440 cm^{-1} (APA₅) erkennen lässt.

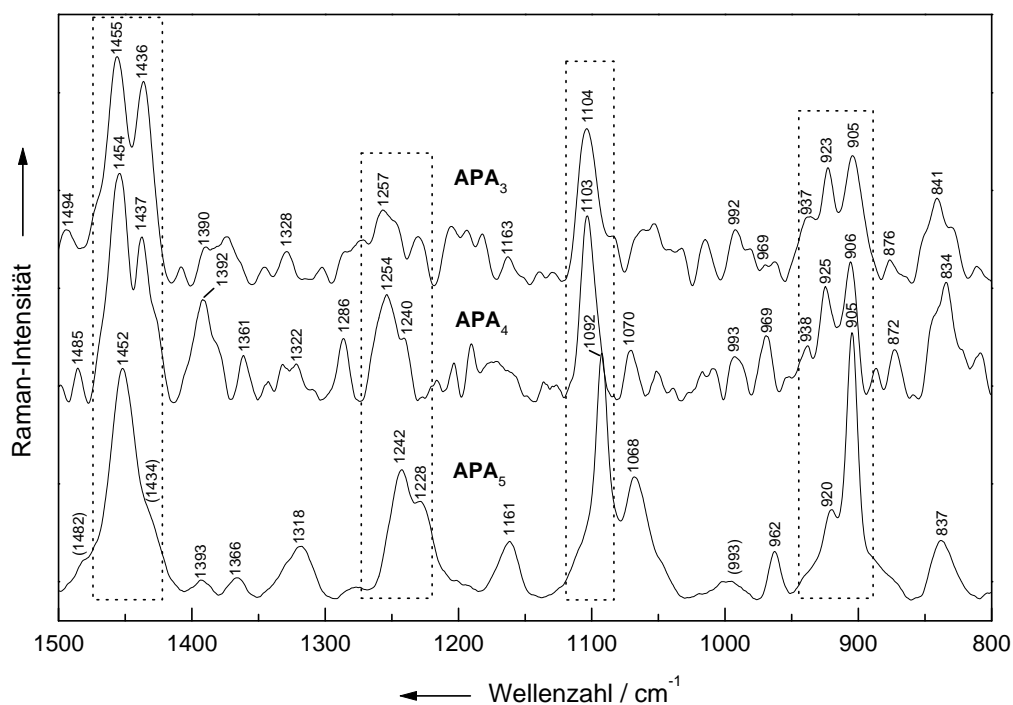


Abbildung 5.24: Vergleich der FT–Raman–Spektren ($\lambda_0 = 1064\text{ nm}$) von Polypeptidlösungen aus APA₃, APA₄ und APA₅ (5 mg/ml).

Abschließend bleibt anzumerken, dass bei den Spektren aus den [Abbildungen 5.23](#) und [5.24](#) nach Anwendung einer Glättungsfunktion lediglich ein Basislinienfit vorgenommen wurde, um den Untergrund zu subtrahieren. Die Spektren wurden jedoch nicht auf die $\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$ -Referenzbande normiert, wie es im [Kapitel 5.2.6](#) durchgeführt wurde. Daher ist die Argumentation anhand der relativen Bandenintensitäten in den hier vorliegenden Spektren mit einem Unsicherheitsfaktor behaftet und kann nur für eine semiquantitative Abschätzung benutzt werden.

In den Spektren der [Abbildung 5.23](#) erscheint die separierte Bande bei 840 cm^{-1} in den drei Proben nahezu auf der gleichen Wellenzahl. Dagegen treten in den FT-Raman-Spektren ([Abb. 5.24](#)) für dieselbe Linie Schwankungen zwischen 834 und 841 cm^{-1} auf, für deren Ursprung keine Erklärung gegeben werden kann. Zumindest kann die gesicherte Zuordnung getroffen werden, dass für die beobachteten Banden die CH_2 -Schwingungen am Pyrrolidinring von Pro ursächlich sind. Dies lässt sich aus mehreren, weiter zurückliegenden Raman-Analysen an Polyprolin ableiten [[120](#), [128](#)]. Bereits gegen Ende der 1960er Jahre war durch Röntgenstrukturaufklärung festgestellt worden, dass das Homopolymer Poly-L-Prolin in zwei Formen existiert, die man mit den Bezeichnungen *cis*-Polyprolin I sowie *trans*-Polyprolin II voneinander unterscheidet [[129](#)]. Welche der beiden Formen vorliegt, hängt vom verwendeten Lösungsmittel ab, aus dem das Polymer präzipitiert wird. Poly-L-Prolin I bildet eine rechtshändige Helix mit *cis*-Peptidbindungen, die Form II dagegen zeigt eine linkshändige Helix in der *trans*-Konformation. Große Wellenzahlendifferenzen (bis zu 10 cm^{-1}) wurden indessen im Poly-L-Prolin aufgezeigt [[128](#)], bei dem das Festkörperspektrum eine schwache Bande bei 836 cm^{-1} enthielt. Diese Bande verschwand vollständig im Lösungsspektrum, wobei gleichzeitig eine neue bei 826 cm^{-1} hervortrat, die den Vibrationen des Pyrrolidinringes zugeschrieben wurden. Die beobachtete Verschiebung der Raman-Bande sei jedoch nicht auf eine Konformationsänderung des Polypeptids zurückzuführen. Vielmehr konzentrierte sich die Interpretation darauf, dass entweder die Schwingungsmoden des Pyrrolidinringes durch die Lösungsmittelleffekte beeinflusst worden waren oder dass möglicherweise der Pyrrolidinring selbst seine Konformation geändert hatte [[128](#)].

Eine Bestätigung für die getroffene Zuordnung zur CH_2 -Prolinschwingung in den drei Proben AlaPro(Ala)_n findet sich in einer späteren Publikation an Polypeptiden, in deren Sequenzen Pro enthalten ist [[113](#)]. Aus Untersuchungen am zyklischen Pentadekapeptid c(VPGVG)₃ sowie am korrespondierenden Polypeptid (VPGVG) hatte sich gezeigt, dass die charakteristische Wellenzahl von 836 bzw. $\sim 832\text{ cm}^{-1}$ in den Festkörperspektren und in den Lösungsspektren invariant ist. Die gute Übereinstimmung der Raman-Spektren wurde dahingehend interpretiert, dass in der kristallinen wie in der gelösten Form sehr große Ähnlichkeit der vorhandenen Sekundärstrukturen vorliegen müsse [[113](#)].

In den durchgeführten Raman-Messungen ([Abb. 5.23](#)) ließen sich keine Verschiebungen der $\nu(\text{CH}_2)$ -Wellenzahlen der Pro-Seitenkette (844 cm^{-1}) erkennen, wogegen bei den FT-Raman-Untersuchungen ([Abb. 5.24](#)) im Bereich von 834 bis 841 cm^{-1} erhebliche Schwankungen auffielen. Ein vergleichbarer Trend ließ sich auch bei den Messungen an den lyophi-

Tabelle 5.4: Zusammenfassung und Zuordnung der beobachteten Banden (in cm^{-1}) aus den Raman– und den FT–Raman–Messungen (vgl. Abb. 5.23 und 5.24) in wässriger Lösung (ca. 5 mg/ml). Die Zuordnung erfolgte nach [121] und nach weiteren Literaturstellen, die jeweils im Text angeführt werden. # Zuordnung nicht gesichert oder nicht möglich; § Konformationsmarker (Polypeptidrückgrat), ^b Hinweis auf β –Faltblatt.

Raman			FT–Raman			Zuordnung
APA ₃	APA ₄	APA ₅	APA ₃	APA ₄	APA ₅	
1487	1488	1483	1494	1485	1482	AIp (Pro)
1457	1458	1458	1455	1454	1452	$\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$
1439	1439	1440	1436	1437	1434	AIp (Pro)
1391	1395	1395	1392	1392	1393	#
1373	1376	1380	1363	1361	1366	$\nu(\text{C}_\alpha\text{–H})$ (Amid S)
—	—	—	1328	1322	1318	#
1262	1259	1253	1257	1254	1242	AIII
—	—	—	1245	1240	1228	
—	—	—	1163	—	1161	#
1106	1106	1106	1104	1103	1092	$\nu(\text{C–N})$ §
1056	1050	1048	—	—	—	#
—	—	—	992	993	993	$\nu(\text{C}_\alpha\text{–C}')$ oder $\nu(\text{C}_\alpha\text{–C}_\beta)$ ^b
—	—	—	969	969	962	$\nu(\text{C–C})$ §
939	939	—	—	—	—	$\nu(\text{C–C})$ #
925	926	925	923	925	920	#
907	908	907	905	906	905	$\nu(\text{C–C})$ §
879	—	883	876	872	—	#
844	845	845	841	834	837	$\nu(\text{CH}_2)_{op}$ (Pro)

lisierten Proben (Abb. 5.25 und Abb. 5.26) verfolgen. Allerdings sind die Verschiebungen wenig aussagekräftig für eine gesicherte Interpretation bezüglich des Lösungsmiteleinflusses auf die Pro–Konformation. An dieser Stelle wird auf die quantitativen Konformationsanalysen im Abschnitt 5.2.6 verwiesen, worin die Diskussion dieser Raman–Linie erneut aufgegriffen wird. Die Ergebnisse der Spektren–Analysen sind in einer Übersicht tabellarisch zusammengefasst (Tab. 5.4).

5.2.5 Raman-Spektroskopie am Feststoff

Bei den Mikro-Raman-Untersuchungen an den lyophilisierten Proben wurde eine extrem kleine Peptidmenge auf einen Objektträger ohne zusätzliche Abdeckung unter das Licht-Mikroskop gelegt. Zur Aufzeichnung der Spektren wurde ein Objektiv mit maximaler Vergrößerung (80-fach) verwendet.

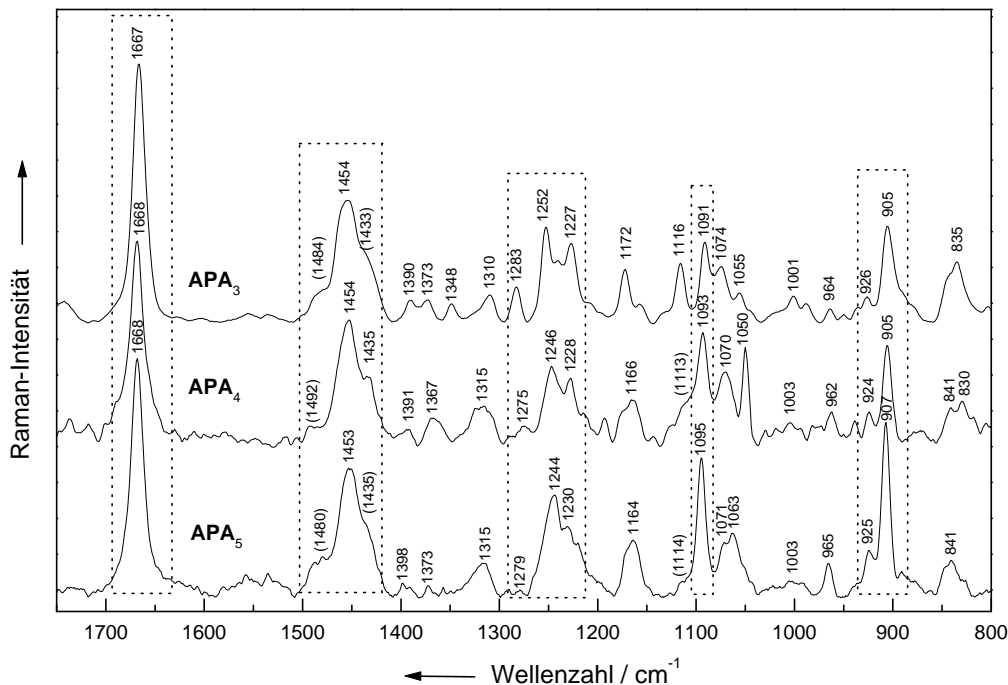


Abbildung 5.25: Gegenüberstellung der Mikro-Raman-Spektren der drei lyophilisierten Polypeptide APA₃, APA₄ und APA₅ (Anregung mit $\lambda_0 = 514,5$ nm).

In den [Abbildungen 5.25](#) und [5.26](#) sind mehrere Bereiche der Raman-Banden durch Markierungen hervorgehoben, die im Zusammenhang mit den vorangegangenen Untersuchungen an den Polypeptidlösungen ([Kap. 5.2.4](#)) analysiert werden sollen. Anders als bei den zuvor diskutierten Lösungsspektren erstreckt sich der hier dargestellte Wellenzahlenbereich von 800 bis etwa 1800 cm^{-1} . Alle Spektren werden von der scharfen, ausgesprochen symmetrischen Form der AI dominiert. Beim Vergleich mit den Lösungsspektren ist eine Fülle von Veränderungen zu entdecken, die den Eindruck erwecken, dass bei den Raman-Messungen am Feststoff einzelne Banden schärfer hervortreten. Die Linien im AIII-Bereich beispielsweise sind deutlicher separiert. Bei einem quantitativen Vergleich der relativen Intensitäten fällt auf, dass die Schwingungen des Polypeptidrückgrates bei 1091, 964 und 905 cm^{-1} annähernd die Intensität der CH_2/CH_3 -Schwingung erreichen. Bei den Spektren dagegen, die in Lösung aufgezeichnet wurden, zeigen sich diese Linien durchweg in den verschiedensten Proportionalitäten zueinander.

Eine andere Auffälligkeit betrifft die Unterschiede der CH_2/CH_3 -Mode um 1458 cm^{-1} aus den Lösungsspektren ([Abb. 5.23](#)) in der Gegenüberstellung mit der gleichen Mode

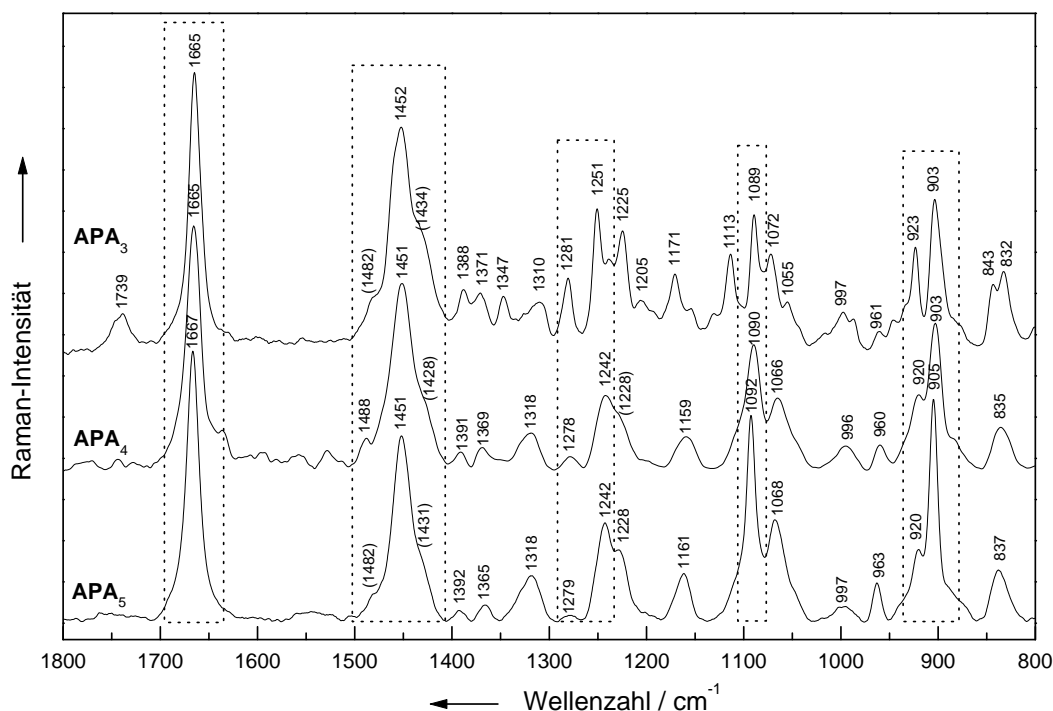


Abbildung 5.26: FT–Raman–Spektren der drei Proben APA_3 , APA_4 und APA_5 (lyophilisiert) bei Anregung mit $\lambda_0 = 1064$ nm.

um 1454 cm^{-1} aus den Festkörperspektren (Abb. 5.25). Dies zeigte sich nicht nur bei den (Mikro–)Raman–Ergebnissen (Abb. 5.23 und 5.25), sondern auch bei den FT–Raman–Messungen (vgl. Abb. 5.24 und 5.26). In den Raman–Spektren am Feststoff (Abb. 5.25 und 5.26) sind die AIIp–Moden der X–Pro–Bindung mit den CH_2/CH_3 –Schwingungen überlagert und können nur als Schultern beobachtet werden. Betrachtet man dagegen die Lösungsspektren (Abb. 5.23 und 5.24), so sind die beiden AIIp–Moden von der CH_2/CH_3 –Schwingungen gut getrennt erkennbar.

Ähnlich auffällige Unterschiede zwischen den Spektren in Lösung und am Feststoff lassen sich auch anhand der Kippschwingung $\omega(\text{CH}_2)$ der Methylengruppen des Pyrrolidinrings festhalten. Sie sind in den Festkörperspektren der Abbildung 5.25 um 1172 bis 1164 cm^{-1} und in der Abbildung 5.26 um 1171 bis 1161 cm^{-1} gut zu erkennen und zeigen einen schwachen *down shift* von rund 10 cm^{-1} in der Reihenfolge $APA_3 \rightarrow APA_4 \rightarrow APA_5$. In den Lösungsspektren (vgl. Abb. 5.23 und 5.24) dagegen sind diese Linien weniger klar zu erkennen. Alle zugeordneten Banden aus den Feststoffuntersuchungen sind zur Übersicht in Tabelle 5.5 zusammengestellt.

Tabelle 5.5: Zusammenfassung und Zuordnung der Raman-Linien (in cm^{-1}) der lyophilisierten Proben APA_3 , APA_4 und APA_5 . # Zuordnung nicht gesichert oder nicht möglich; § Konformationsmarker (Polypeptidrückgrat), ^b Hinweis auf β -Faltblatt.

Mikro-Raman			FT-Raman			Zuordnung
APA_3	APA_4	APA_5	APA_3	APA_4	APA_5	
1667	1668	1668	1665	1665	1667	AI
1484	1492	1480	1482	1488	1482	AIIP (Pro)
1454	1454	1453	1452	1451	1451	$\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$
1433	1435	1435	1434	1428	1431	AIIP (Pro)
1390	1391	1398	1388	1391	1392	#
1373	1367	1373	1371	1369	1365	$\nu(\text{C}_\alpha\text{-H})$ (Amid S)
1348	—	—	1347	—	—	#
1310	1315	1315	1310	1318	1318	#
1283	1275	1279	1281	1278	1279	AIII
1252	1246	1244	1251	1242	1242	
1227	1228	1230	1225	1228	1228	#
1172	1165	1164	1171	1159	1161	$\omega(\text{CH}_2)$ (Pro)
1116	1113	1114	1113	—	—	#
1091	1093	1095	1089	1090	1092	$\nu(\text{C-N})$ §
1074	1070	1071	1072	1066	1068	$\nu(\text{C-N})$ (Pro, Ala)#
1055	1050	—	1055	—	—	#
1001	1003	1003	997	996	997	$\nu(\text{C}_\alpha\text{-C}')$ oder $\nu(\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta)$ ^b
964	962	965	961	960	963	$\nu(\text{C-C})$ §
926	924	925	923	920	920	#
905	905	907	903	903	905	$\nu(\text{C-C})$ §
—	841	841	843	—	—	#
835	830	—	832	835	837	$\nu(\text{CH}_2)_{op}$ (Pro)

5.2.6 Bedingungen der quantitativen Konformationsanalyse

In Arbeiten verschiedener Autoren wurde die Vorgehensweise zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen mit Hilfe der Raman-Spektroskopie beschrieben [104]. Darin wird häufig auf die Pionierarbeiten von Yu, Jo, Liu und Lord aus dem Anfang der 1970er Jahre verwiesen [106, 108, 130]. In einer Reihe von Vergleichsstudien wurden beispielsweise die Proteinstrukturen des Myoglobin, des Lysozym, der RNase A, des Insulin und Proinsulin spektroskopisch analysiert. Daraus wurden Aussagen über die Proteinkonformation aus dem Vergleich mit bekannten Kristallstrukturen empirisch abgeleitet.

Viele der gewonnenen Raman–Informationen wurden zusätzlich mit Ergebnissen aus der IR– und aus der NMR–Spektroskopie bestätigt und erweitert [121]. Dennoch ergeben sich in vielen Einzelaspekten wiederholt widersprüchliche Aussagen, die durch neuere Arbeiten (nach 1990) nur zum Teil aufgehoben werden [11, 101, 127, 131]. Die Vielfalt der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren und die Unterschiede im molekularen Aufbau ihrer Seitenketten spiegeln sich in der Komplexität der Raman–Spektren wider. Die Analyse aller Raman–Banden in Protein–Spektren ist noch um Einiges davon entfernt, das Attribut „vollständig“ für sich in Anspruch nehmen zu können. Die gesicherte Interpretation und insbesondere die quantitative Analyse von Raman–Banden wird dadurch erheblich erschwert. Diese Problematik soll im Vorfeld der Konformationsanalysen vertieft diskutiert werden.

Für die starke Raman–Bande bei 1450 cm^{-1} finden sich in der Literatur ebenso viele konforme wie divergente Aussagen, die in einer Übersicht in Tabelle 5.6 wiedergegeben sind. Die meisten Autoren stimmen überein, dass die Linie den CH_2/CH_3 –Gruppen der Seitenketten zuzuordnen ist. In Protein–Spektren bei Anregungen mit sichtbarem Licht ist diese Raman–Linie stets stark ausgeprägt, wogegen sie in Resonanz–Raman–Spektren nahezu verschwunden ist.

Die Ergebnisse der Messungen an Lysozym [133], an Histon–Proteinen von Kalbs-thymus [111], an Myosin [136], ebenso wie an Wolle und Ocytocin [122] oder an Muskelfasern [115] demonstrieren, dass sich die Position der CH_2/CH_3 –Schwingung von den Aminosäureseitenketten nicht verändert, wenn H_2O oder D_2O als Lösungsmittel eingesetzt werden. Auch bei Raman–Messungen am Feststoff bleibt die Wellenzahl unverändert. Unter denaturierenden Versuchsbedingungen wird keine signifikante Veränderung beobachtet, wie anhand von Untersuchungen am Immunglobulin IgM [135] oder am Insulin [106] nachgewiesen wurde.

Mit den experimentellen Beobachtungen wird die Feststellung untermauert, dass die CH_2/CH_3 –Schwingung sich in unterschiedlichen Lösungsmitteln (H_2O , D_2O , organische Lösungsmittel) als eine invariante Größe verhält. Demzufolge erscheint es gerechtfertigt, sie als internen Standard bei der Bestimmung relativer Linienintensitäten im Raman–Spektrum heranzuziehen. Die CH_2/CH_3 –Raman–Bande unterscheidet sich darin wesentlich von den struktur–sensitiven AIII– und AI–Banden der Peptidbindung.

Einen alternativen Weg der quantitativen Sekundärstrukturbestimmung, der in diesem Zusammenhang der Vollständigkeit wegen erwähnt werden soll, verfolgten Yu und Mitarbeiter in einer Studie an nativem und denaturiertem Insulin [106]. Sie benutzten die Konformations–unabhängigen Ringschwingungen des Phenylalaninringes bei 624 cm^{-1} als interne Referenz. Aus der graphischen Überlagerung beider Raman–Spektren detektierten sie die Verschiebungen und die Intensitätsänderungen der Banden von den C–C–Rückgratschwingungen, den AI– und AIII–Banden, sowie der C–S–Streckschwingungen der Disulfidbrücken. Die Übertragbarkeit dieser Methode zur Strukturanalytik ist jedoch auf jene Proteine beschränkt, in deren Sequenzen die Aminosäure Phe enthalten ist. Nach einem analogen Schema kämen bei der Strukturanalytik prinzipiell auch die planaren Schwin-

Tabelle 5.6: Übersicht über die Wellenzahlen der um 1450 cm^{-1} zentrierten Raman-Linie. Abkürzungen und Schwingungssymbole: siehe [Anhang](#); # keine oder nicht gesicherte Angaben zur Bandenzuordnung.

cm ⁻¹	Protein/ Polypeptid	Lösung/ Feststoff	Zuordnung	Autor/Quelle
1444	poly-Lys	lyophilisiert H ₂ O	#	Painter [132]
1445 1450	Lysozym	H ₂ O D ₂ O	$\delta(\text{CH}_2/\text{CH})$	Lippert [133]
1449 vs 1451 vs 1454 vs	Histon H1 Histon H2A Histon H2B	H ₂ O	$\delta(\text{CH}_2)$	Guillot [111]
1449 vs 1452	Immuno- globulin IgG	H ₂ O, nativ H ₂ O, denat.	$\delta(\text{CH}_2)$	Pézolet, 1976 [134]
1452	Immuno- globulin IgM	H ₂ O	$\delta(\text{CH}_2)$	Thomas Jr. [135]
1451 1451	Myosin	H ₂ O D ₂ O	$\delta(\text{CH}_3)_{as}$, $\delta(\text{CH}_2/\text{CH})$	Carew [136]
1450 vs 1451 vs	Wolle	H ₂ O D ₂ O	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)_{as}$	Frushour [122]
1451 s	Collagen	H ₂ O	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)_{as}$	Frushour [122]
1456 1454 1450	Ocytocin	H ₂ O D ₂ O lyophilisiert	$\delta(\text{CH}_2)$	Tu [112]
1449 1448	Muskelfaser	H ₂ O D ₂ O	#	Pézolet, 1978 [115]
1450 1450	Insulin	H ₂ O, nativ H ₂ O, denat.	$\delta(\text{CH})$	Yu, 1972 [106]
1449 vs 1458 sh	BSA	H ₂ O	$\delta(\text{CH}_2)$	Chen [137]
1455	Neurotoxin	H ₂ O lyophilisiert	#	Yu, 1975 [138]

gungsmoden des Tyr-Ringes als Referenzlinie in Frage. Noch bis in den Anfang der 1970er Jahre hinein wurden die Tyr-Banden von mehreren Autoren als struktur-unabhängig bewertet [105, 106, 119]. Das charakteristische Tyr-Dublett zeigt zwei Linien bei 853 und 828 cm^{-1} , die durch Fermi-Resonanz zwischen der Fundamentalschwingung und der Obertonschwingung zustande kommt. Anhand des Vergleichs der Raman-Spektren von

Ocytocin konnten Tu *et al.* zeigen, dass sich das Intensitätsverhältnis $I_{853}/I_{828} = 10 : 7$ des Tyr–Dubletts in H_2O kaum von jenem unterscheidet, das am Feststoff aufgezeichnet worden war [112]. In der D_2O –Proteinlösung jedoch lagen beide Peaks in gleicher Intensität vor, woraus die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass die Deuterierung eine starke Veränderung in der Orientierung der Tyr–Seitenkette hervorruft. Nachdem gezeigt worden war, dass die Intensitätsrelation des Tyr–Dubletts I_{853}/I_{828} stark Lösungsmittel–abhängig ist, kamen die beiden Raman–Banden für quantitative Analysen nicht weiter in Betracht.

Andere Untersuchungen von Yu *et al.* konzentrierten sich auf die AI– und die AIII–Banden im Neurotoxin der Seeschlange *Lapemis hardwickii*, die vom Feststoff und in Lösung aufgenommen wurden [138]. Die Raman–Ergebnisse bestätigten, dass die Konformation des Peptidrückgrates sich nicht verändert, wenn das Protein in Lösung gegeben wird. Eine ähnlich gelagerte Studie zu diesem Thema bearbeiteten Yu *et al.* anhand des Proteins Ribonuklease A [130]. Sie zeichneten Raman–Spektren der RNase A im festen sowie im gelösten Zustand auf und legten bei den Pulverspektren die Versuchsbedingungen durch geeignete Maßnahmen an einem vakuumdichten Kupferblock so fest, dass die Raman–Messungen am Feststoff unter definierten Feuchtigkeitsbedingungen (0 % rel. F. und 100 % rel. F.) erfolgten. Sie stellten fest, dass die Linien in den Raman–Spektren keine Unterschiede bei den extrem verschiedenen relativen Feuchtigkeiten aufwiesen. Diese Beobachtung ist insofern bemerkenswert, als durch das Gefriertrocknen von Proteinlösungen vergleichbare Situationen vorliegen. Beim Lyophilisieren wird das Lösungsmittel bis zur vollständigen Trockenheit der Probe entzogen. Während dieses Prozesses werden die meisten Proteine nicht denaturiert und können für lange Zeit (auch über Jahre hinweg) gelagert werden. Man unterstellt allerdings, dass einige Wassermoleküle fest am Protein gebunden bleiben und auch unter drastischen Trocknungsmaßnahmen nicht entfernt werden können.

Die vorangegangenen Ausführungen erfassen die Bedingungen, die von einem Strukturmarker erfüllt werden müssen, damit dieser als interne Intensitätsreferenz bei der quantitativen Analyse von Sekundärstrukturen verwendet werden kann: die Raman–Linie muss Lösungsmittel–unabhängig sein und sie muss in unterschiedlichen Phasen (Pulver, Kristall, H_2O – und D_2O –Lösung, organische Lösungsmittel) messbar sein. Weiterhin sollte sie sich als Referenzlinie idealerweise auch in Homopolypeptiden und in kurzen Peptidsequenzen finden lassen. Wie im Vorangegangenen ausführlich dargelegt, werden diese Bedingungen von der CH_2/CH_3 –Raman–Bande erfüllt. Die Seitenketten fast aller 20 natürlichen Aminosäuren sind (mit Ausnahme des Glycin–Restes) größtenteils aus Methylen– und Methylgruppen aufgebaut.

Lippert *et al.* verwendeten die $\delta(CH_2/CH_3)$ –Schwingung als Referenzlinie und führten eine qualitative Analyse anhand von drei charakteristischen Banden durch [133]. Sie wählten im Poly–L–Lys die AI– und die AIII–Bande des Raman–Spektrums in wässriger Lösung, sowie die AI′–Bande in D_2O –Lösung für die quantitative Sekundärstrukturbestimmung. Poly–L–Lys ist eine geeignete Modellsubstanz und wurde in der Raman–Spektroskopie vielfach bei Strukturbestimmungen herangezogen. Es lässt sich bei nied-

rigem pH in die ungeordnete und bei hohem pH in die α -helikale Struktur überführen. Darüber hinaus kann antiparallele β -Faltblattstruktur durch höhere Temperaturen bei hohem pH erzeugt werden. In Anlehnung an die Überlegungen aus der CD-Spektroskopie (vgl. Gl. 3.4, Kap. 3.1) stellten die Autoren eine allgemeine Beziehung über den Konformationsinhalt in Proteinen auf:

$$C^{\text{Protein}} I_{1240}^{\text{Protein}} = f_{\alpha} I_{1240}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1240}^{\beta} + f_R I_{1240}^R \quad (5.1)$$

$$C^{\text{Protein}} I_{1632}^{\text{Protein}} = f_{\alpha} I_{1632}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1632}^{\beta} + f_R I_{1632}^R \quad (5.2)$$

$$C^{\text{Protein}} I_{1660}^{\text{Protein}} = f_{\alpha} I_{1660}^{\alpha} + f_{\beta} I_{1660}^{\beta} + f_R I_{1660}^R \quad (5.3)$$

$$1.0 = f_{\alpha} + f_{\beta} + f_R \quad (5.4)$$

In den Gleichungen 5.1, 5.2 und 5.3 steht $I_{1240}^{\text{Protein}}$ für die spektrale Intensität der AIII im Protein-Raman-Spektrum, die in Relation zur Referenzlinie bei 1450 cm^{-1} gesetzt wird. $I_{1240}^{\alpha, \beta, R}$ bezeichnen die Intensitäten der „reinen“ α -, β - bzw. *random coil*-Strukturen, die aus Vorversuchen am Modellmolekül Poly-L-Lys gewonnen werden können. Die Abkürzungen f_{α} , f_{β} und f_R stehen für die jeweiligen Strukturanteile im Protein und C^{Protein} ist ein experimentell zu bestimmender Skalierungsfaktor für die Intensität der Referenzlinie in Bezug auf die Modellsubstanz Poly-L-Lys.

Die oben beschriebene Methode wurde an bekannten Proteinen (z. B. Lysozym, BSA, RNase A) getestet, deren Strukturdaten aus Röntgenstreuung und CD-Experimenten bekannt sind. Aus den Übereinstimmungen zwischen den qualitativen Analysen aus der Raman-Spektroskopie und den auf anderen Techniken basierenden Strukturdaten schätzten die Autoren die Genauigkeit ihrer Analysemithe mit $\pm 10 - 15\%$ ein [133].

5.2.7 Spektrenauswertung

Für die Konformationsanalyse wurden an den Alanin-Prolin-Polypeptiden je 10 Wiederholungsmessungen durchgeführt. Alle Spektren wurden an lyophilisierten Proben mit dem LabRam unter Anregung im sichtbaren Spektralbereich aufgezeichnet ($\lambda_0 = 514,5 \text{ nm}$). Dazu wurde eine geringe Menge Pulver (etwa 0,1 mg) auf einen Objektträger ohne zusätzliche Abdeckung gelegt. Durch Verfahren des x-y-Tisches ließ sich der Objektträger vor jedem neuen Scan um eine kleine Wegstrecke nach links oder rechts, bzw. vor oder zurück bewegen, so dass immer eine neue Stelle auf der Probe dem Laserlicht ausgesetzt wurde. Die Laserausgangsleistungen wurden in den Vorversuchen möglichst niedrig gewählt und lagen durchgehend im Bereich von 50 bis maximal 100 mW, um Erwärmung und Photozersetzung zu vermeiden.

In [Abbildung 5.27](#) ist eine Auswahl von Original-Spektren der Probe APA₃ beispielhaft herausgegriffen, die im Bereich von 400 bis 2000 cm^{-1} aufgezeichnet wurden. Die Qualität der Spektren hängt empfindlich von der sorgfältigen Fokussierung auf die Probe

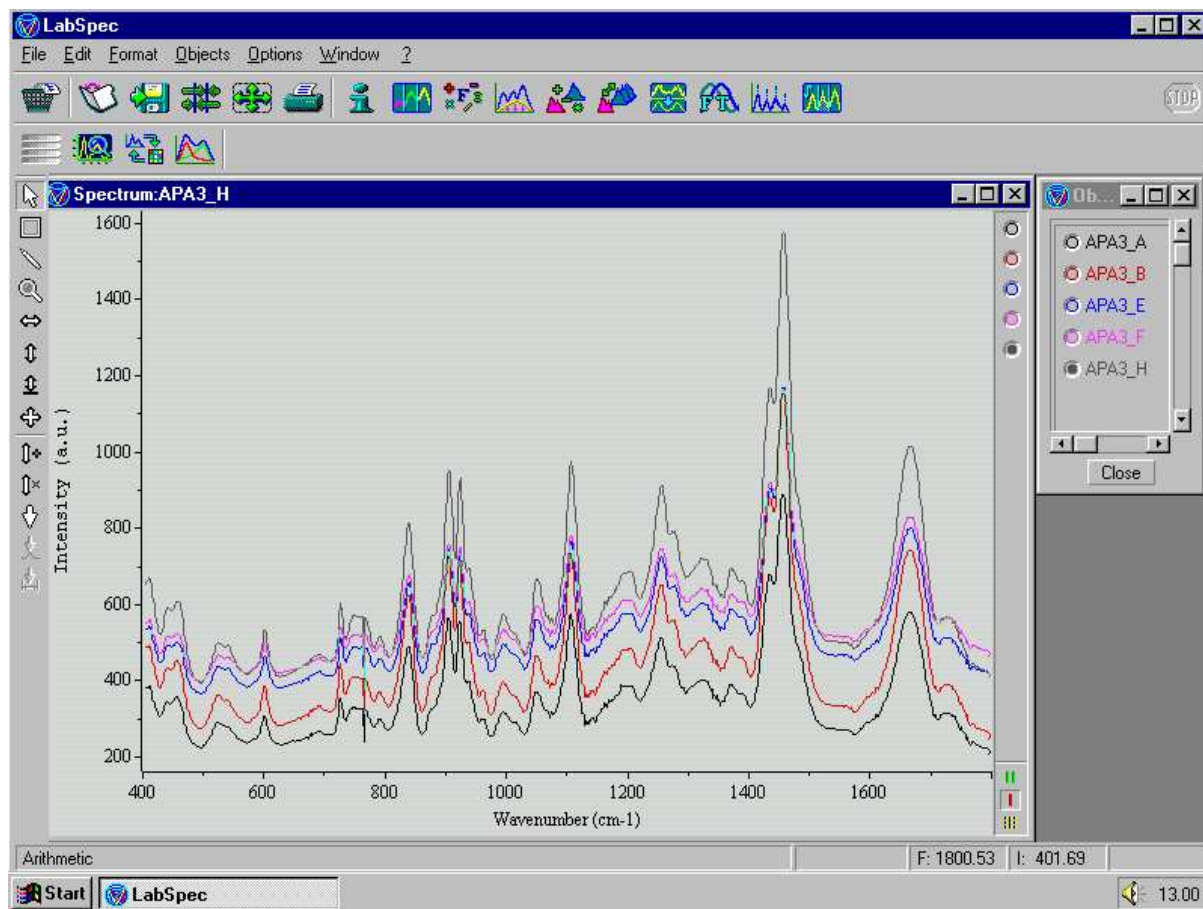


Abbildung 5.27: Ausschnitt aus den Originaldaten, die an 5 verschiedenen Positionen der Probe APA_3 aufgezeichnet wurden. Die Laserausgangsleistung betrug jeweils 50 mW; $\lambda_0 = 514,5$ nm. Anmerkung: Im Gegensatz zu allen anderen abgebildeten Raman–Ergebnissen erscheinen hier die Spektren invertiert. Im Daten–Prozessierungs–Programm LabSpec werden die Spektren, entgegen der weit verbreiteten Konvention, seitenverkehrt abgebildet, d. h. die Wellenzahlen werden auf der Abszisse von links nach rechts ansteigend aufgetragen.

ab. Der negative Peak, der in allen Spektren auf derselben Position bei 764 cm^{-1} zu sehen ist, entstand möglicherweise durch das fehlerhafte Auslesen einzelner Pixelwerte von der CCD–Kamera. Es handelte sich dabei um einen einzelnen Datenmesspunkt, der sich über eine Hilfsfunktion mit dem Programm LabSpec korrigieren ließ und für die weitere Datenauswertung ohne Auswirkung blieb. Die Ordinatenkalierung der [Abbildung 5.27](#) (in willkürlichen Einheiten) demonstriert die Variation des Untergrunds und der absoluten Signalintensitäten bei den einzelnen Spektren. Die hohe Reinheit der Proben, die mit der Massenspektrometrie (s. [Abb. 5.18](#)) und mit der HPLC (s. [Abb. 5.19](#)) bestätigt wurde, trug zu einem guten S/N–Verhältnis bei. Besonders auffällig ist die große Homogenität in der Gestalt der Raman–Spektren. Die internen Abweichungen einzelner Banden betragen allerdings zwischen 2 und 12 % und wurden in einer statistischen Auswertung erfasst, bei der das nachfolgend beschriebene Verfahren angewendet wurde.

Im ersten Schritt der Datenprozessierung wurden alle Rohdaten einheitlich auf den Wellenzahlenbereich von 630 bis 1800 cm^{-1} begrenzt. Dieser Spektralbereich umfasst jene Raman-Banden, die für die Durchführung der Konformationsanalyse relevant sind. Die darauf folgende arithmetische Operation betraf die Korrektur der Spektren hinsichtlich der Anzahl der vorhandenen CH_2 - und CH_3 -Gruppen. Dies war notwendig, da die Intensität der Raman-Banden (und somit auch die der Referenzlinie) sowohl vom Raman-Streuquerschnitt σ , als auch von der Anzahl der zu den Schwingungsmoden beitragenden Molekülgruppen abhängt. Betrachtet man die Anzahl der vorhandenen CH_2/CH_3 -Gruppen in den Polypeptiden in der Reihenfolge $\text{APA}_3 \rightarrow \text{APA}_4 \rightarrow \text{APA}_5$, so ist im Hexapeptid die Kette um einen Alaninrest und im Heptapeptid um zwei Reste gegenüber dem Pentapeptid verlängert. Im Polypeptid APA_3 zählt man 7 CH_2 - und CH_3 -Gruppen, wobei 3 Methylengruppen vom Prolinring und 4 Methylgruppen von den 4 Alaninresten stammen. Im Hexapeptid APA_4 ist diese Zahl um eins erhöht und im Heptapeptid APA_5 ist die Zahl der CH_2 - und CH_3 -Gruppen auf 9 angestiegen. Die Gesamtzahl der CH_2/CH_3 -Gruppen, die zur Intensität der Referenzlinie beitragen, wurde in der Auswertung der Raman-Spektren mit den entsprechenden Korrekturfaktoren (i. e. 1/7; 1/8; 1/9) berücksichtigt.

Nach Abschluss der umfassenden Datenauswertung stellte sich heraus, dass eine notwendige Berichtigung angefügt werden musste. Damit wurden die vorhandenen signifikanten Trends verschiedener Linienintensitäten zwar nur geringfügig verändert, doch muss dieser Schritt der Vollständigkeit wegen an dieser Stelle erörtert werden. Greift man beispielhaft die Situation bei der AI-Bande des APA_3 heraus, so wurde die Intensität dieser Linie (und alle übrigen Linien im Spektrum ebenfalls) mit der vorangehend beschriebenen arithmetischen Operation auf 1/7 reduziert. Nun ist jedoch zu berücksichtigen, dass im Pentapeptid APA_3 Beiträge von 4 Amidbindungen enthalten sind, für deren additiven Einfluss auf die Raman-Linie in entsprechender Weise Rechnung getragen werden muss. Die Intensität der AI im Hexapeptid APA_4 hingegen wurde mit dem Faktor 1/8 multipliziert, wobei das Polypeptid aufgrund der verlängerten Kette 5 Amidbindungen enthält. Analog ist die Intensität der AI im Heptapeptid auf 1/9 verringert, deren Linienintensität sich aus insgesamt 6 Amidbindungen zusammensetzt. Die Umrechnungen und Anpassungen wurden in einem weiteren Rechenschritt entsprechend angefügt und zogen anschließend eine erneute Normierung nach sich, so dass bei allen analysierten Linienintensitäten auf das kürzeste Peptid APA_3 Bezug genommen wurde.

Wie die [Abbildung 5.27](#) bestätigt, enthielten alle Spektren einen homogenen Untergrund, der mit einem festgelegten Basislinienfit (Polynom 3. Grades) einheitlich abgezogen wurde. Im Anschluss daran erfolgte die Normierung auf die Referenzlinie $\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$. Für jede dieser Banden lagen 10 Messwerte für die relativen Intensitäten vor, aus denen der Mittelwert, die Standardabweichung und der prozentuale Fehler berechnet wurden.

In der Konformationsanalyse der Alanin–Prolin–Polypeptide wurden die relativen Intensitäten der folgenden Raman–Banden untersucht:

	1668 cm ⁻¹ , AI,
	1484 cm ⁻¹ , AIIp, X–Pro,
	1256 cm ⁻¹ , AIII,
	1436 cm ⁻¹ , AIIp, X–Pro,
(C _α –H)	1371 cm ⁻¹ , Amid S,
ν(C–N)	1106 cm ⁻¹ , Peptidrückgrat,
ν(C–C)	961 cm ⁻¹ , Peptidrückgrat,
	924 cm ⁻¹ , (keine gesicherte Zuordnung),
ν(C–C)	905 cm ⁻¹ , Peptidrückgrat,
ν(CH ₂)	839 cm ⁻¹ , Pro.

Für die [Abbildungen 5.28](#) und [5.29](#) wurden drei Einzelspektren als Beispiele ausgewählt, anhand derer die Auswirkung des beschriebenen Auswertungsverfahrens demonstriert werden kann. Bei den Spektren der Proben APA₃, APA₄ und APA₅ ist die Anzahl der Methylen– und Methylgruppen mit dem zugehörigen Korrekturfaktor berücksichtigt. Der Untergrund ist nach der Durchführung eines einheitlichen Basislinienfits abgezogen und die Spektren sind auf die Referenzlinie normiert. Die Überlagerung der drei Raman–Spektren zeigt gute Übereinstimmung und unterstreicht die Güte der durchgeführten Basislinienanpassung. Die Kettenlänge des Penta–, des Hexa– und des Heptapeptids ist stark mit der Intensität der AI korreliert. Im spektralen Ausschnitt der [Abbildung 5.29](#) ist der niedrigere Wellenzahlenbereich herausgegriffen, in dem überwiegend Schwingungen des Peptidrückgrates und der ν(CH₂) des Pro auftreten.

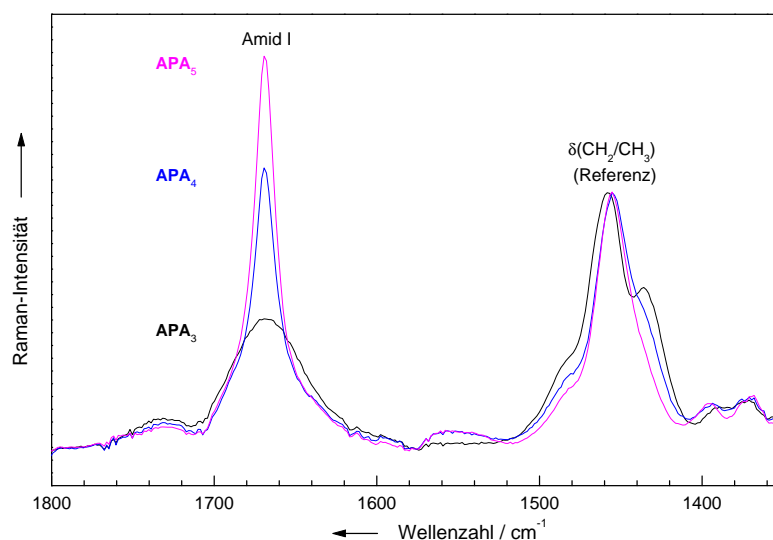


Abbildung 5.28: Ausschnitt des Amid I–Bereiches mit Überlagerung dreier ausgewählter Einzelspektren. Die Raman–Spektren sind auf die Referenzlinie $\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$ normiert.

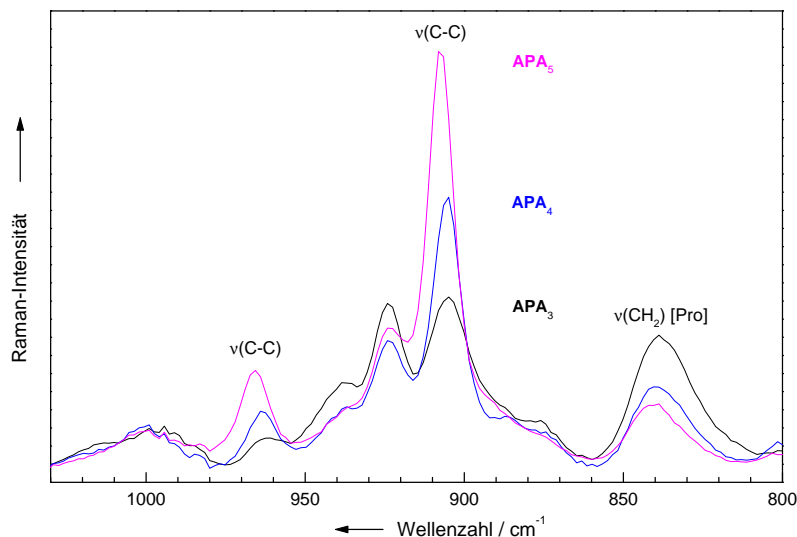


Abbildung 5.29: Vergrößerter Ausschnitt aus dem niedrigeren Wellenzahlenbereich, in dem die struktur-sensitiven Schwingungen des Polypeptidrückgrates ($\nu(C-C)$, 906 und 964 cm^{-1}) und die $\nu(CH_2)$ -Schwingungen des Pro bei 839 cm^{-1} auftreten.

5.2.8 Ergebnisse der Konformationsanalyse

Die statistischen Auswertungen der relativen Raman-Intensitäten sind in den nachfolgenden Abbildungen als Balkendiagramme unter Angabe der Fehlerbalken dargestellt. Darin wird jeweils auf das kürzeste der drei Polypeptide, das Pentapeptid APA_3 , Bezug genommen. Die relativen Intensitätszunahmen der AI- und der AIII-Banden korrelieren unterschiedlich stark mit der Länge der Polypeptidkette $APA_3 \rightarrow APA_4 \rightarrow APA_5$ (Abb. 5.30). Die Intensität der AI im Hexapeptid APA_4 ist etwa verdoppelt und im Heptapeptid APA_5 etwa 2,6mal stärker als im Referenzpeptid APA_3 . Dagegen nimmt der Intensitätszuwachs bei den AIII-Banden mit 36 % (APA_4) bzw. 43 % (APA_5) weniger stark zu als bei den AI-Banden.

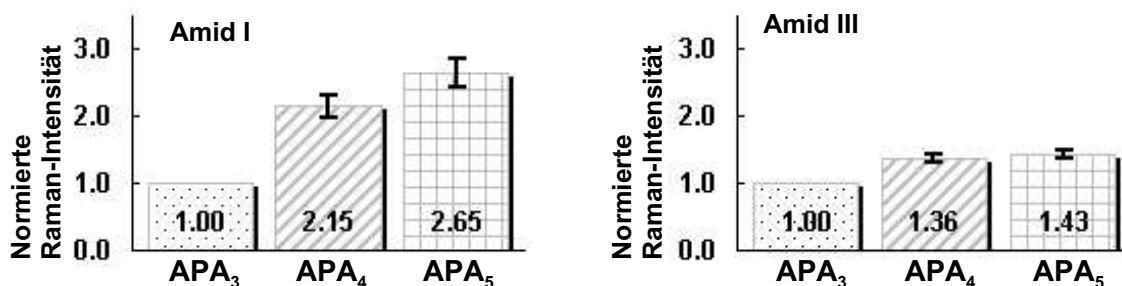


Abbildung 5.30: Relative Intensitätsänderungen der AI-Banden (links) und der AIII-Banden (rechts) in der Serie $AlaPro(Ala)_n$.

Die C-C-Schwingungen des Polypeptidrückgrates erweisen sich als sensitive Konformationsmarker (Abb. 5.31, rechts). Die Intensität der Linie bei 964 cm^{-1} ist etwa um den

Faktor 2 (APA₄) bzw. etwa um den Faktor 3 (APA₅) erhöht und reflektiert eine signifikante Korrelation zur Länge der Polypeptidkette.

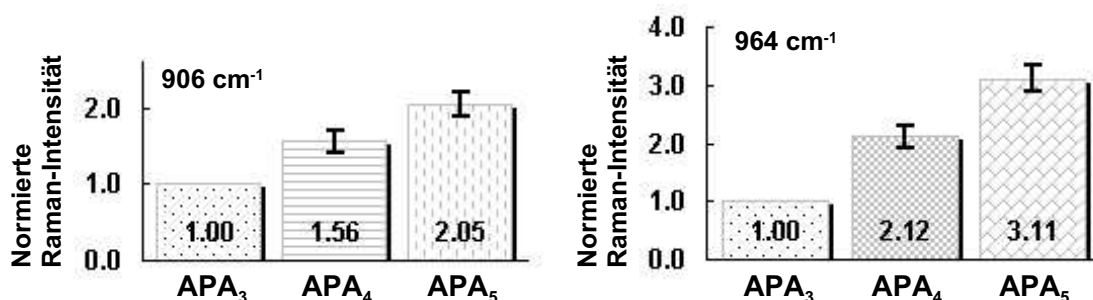


Abbildung 5.31: Relative Intensitätsänderungen der C–C–Schwingungen bei 906 cm⁻¹ (links) und bei 964 cm⁻¹ (rechts) der Polypeptide APA₃, APA₄ und APA₅.

Eine vergleichbare Tendenz ist mit einem flacheren Anstieg auch bei der $\nu(\text{C–C})$ -Bande (906 cm⁻¹) zu beobachten (Abb. 5.31, links). Speziell bei diesen beiden Rückgratschwingungen ist auf die in den Balkendiagrammen eingetragenen Werte für die normierten Raman-Intensitäten hinzuweisen, die eine nahezu lineare Abhängigkeit (1,0 → 1,5 → 2,0 in Abb. 5.31, links und 1,0 → 2,1 → 3,1 in Abb. 5.31, rechts) erkennen lassen.

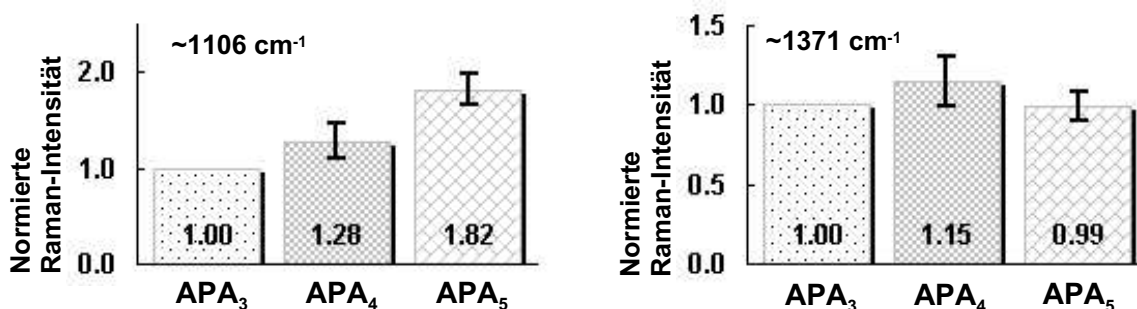


Abbildung 5.32: Relative Intensitätsänderungen der C–N–Streckschwingung bei 1106 cm⁻¹ (links) und der C_α–H–Streckschwingung (Amid S) bei 1371 cm⁻¹ (rechts).

Bei einem weiteren Strukturmarker, der C–N–Streckschwingung bei 1106 cm⁻¹, zeigt sich ebenso eine ansteigende Tendenz wie bei den übrigen Moden des Polypeptidrückgrates (Abb. 5.32, links). Hier ist zwar keine strenge lineare Abhängigkeit erkennbar, allerdings lagen in den Untersuchungen dieser Linien die Streuungen besonders hoch. Die Schwingungsmode ist keine separierte Schwingung, sondern setzt sich aus symmetrischen C_α–H–Biegeschwingungen und anteiligen C–C_α–Streckschwingungen zusammen [101].

Die Amid S–Bande (1371 cm⁻¹) wurde in Proteinen untersucht, die unterschiedlich hohen Helix–Gehalt aufweisen. Dabei zeigte sich, dass die Abnahme der Intensität dieser Raman–Linie als Indikator für zunehmenden Helix–Gehalt herangezogen werden kann. Wie dem rechten Teil der Abbildung 5.32 zu entnehmen ist, verhält sich die Amid S–Bande bei 1371 cm⁻¹ indifferent zur Veränderung der Polypeptidkettenlänge. Im Gegensatz zu den vorangehend diskutierten Ergebnissen der statistischen Auswertung fallen die relativen

Intensitätsänderungen der Amid S mit 15 % (APA₄) bzw. -1 % (APA₅) vergleichsweise gering aus und lassen, wenn die dazugehörigen Fehlerbalken mit berücksichtigt werden, keinen klaren Trend erkennen.

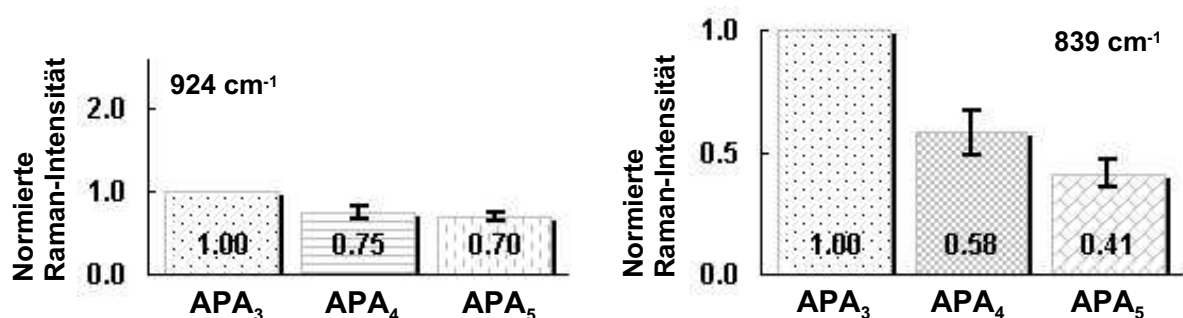


Abbildung 5.33: Relative Intensitätsänderungen der Raman-Linie (ohne gesicherte Zuordnung) bei 924 cm^{-1} (links) und der CH_2 -Schwingungen der Prolinseitenkette bei 839 cm^{-1} (rechts) der Polypeptide APA₃, APA₄ und APA₅.

Ein anderes Bild stellt sich bei der Untersuchung der Schwingungen bei 924 cm^{-1} dar. Wie bereits in den Tabellen 5.4 und 5.5 vermerkt wurde, ist die Zuordnung dieser Bande nicht gesichert. Für diese Raman-Linie ließ sich nach einer ausführlichen Literaturrecherche lediglich ein Hinweis in einer weiter zurückliegenden Raman-spektroskopischen Messung an Collagen finden [121]. Für gesicherte Aussagen sind weitere, gezielte Studien notwendig. Möglicherweise gehört die Linie zu den Schwingungen der drei C-C-Bindungen des Pro-Ringes, die für das Zustandekommen der starren planaren Form des Pyrrolidinrings verantwortlich sind.

Die Schwingungen der Methylengruppen des Prolinrings $\nu(\text{CH}_2)$ bei 839 cm^{-1} zeigen mit der Abnahme der relativen Intensitäten einen signifikanten Trend, der allerdings von großer Streuung begleitet wird (Abb. 5.33, rechts).

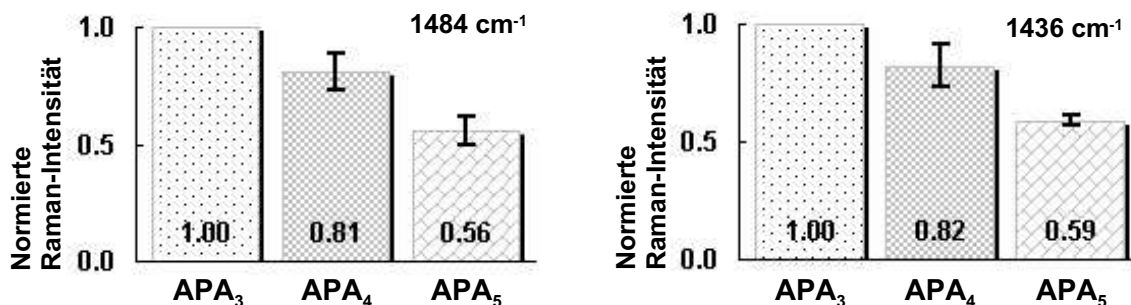


Abbildung 5.34: Relative Intensitätsänderungen der AIIp-Streckschwingung bei 1484 cm^{-1} (links) und bei 1436 cm^{-1} (rechts) der Polypeptide AlaPro(Ala)_n.

Zwei weitere Moden in der Abbildung 5.34, die zur Streckschwingung der AIIp zugeordnet wurden, geben Aufschluss über die Kettenlängen-korrelierten Änderungen der X-Pro-Peptidbindung. Wie bereits im Zusammenhang mit den Mikro-Raman-Untersuchungen

im Kapitel 5.2.5 erwähnt, sind die Linien als Schultern links und rechts der Referenzlinie zusammengelagert zu sehen, wodurch die Intensitätsanalyse erschwert wird. Dieser Umstand spiegelt sich merklich mit den starken Streuungen in der Probe APA₄ wider.

Eine zusammenfassende Betrachtung der drei Raman–Banden des Pro bei 839, 1484 und 1436 cm⁻¹ lässt den Eindruck entstehen, dass die Vibrationsfreiheit des Prolin–Restes in der Reihenfolge APA₃ → APA₄ → APA₅ eingeschränkt wird. Die Auswirkungen der Kettenlänge auf die X–Pro–Peptidbindung und auf die drei Methylgruppen des Pyrrolidinderings verlaufen moderater als bei den Schwingungen des Polypeptidrückgrates (906 und 964 cm⁻¹) und der Amid–Banden (AI und AIII). Diese vier struktur–sensitiven Banden verhalten sich mehr oder minder konform und lassen signifikante und teilweise sehr große Intensitätszunahmen erkennen, die zweifelsfrei mit der Länge der Polypeptidkette korreliert sind. Die Streckerschwingungen zwischen dem α–Kohlenstoffatom und dem H–Atom (C_α–H, Amid S) scheinen von diesem Wechselspiel der Intensitätszunahme und –abnahme nicht betroffen zu sein.

Die Beobachtungen an den AIp–Schwingungen der X–Pro–Bindung unterstreichen die hohe Sensitivität der hier eingesetzten Methode der Konformationsanalyse anhand von Raman–Intensitäten einzelner, struktur–relevanter Schwingungen. Der Literatur zufolge ist die höhere Linie (1484 cm⁻¹) als Indikator für starke H–Brücken und die niedrigere Linie (1445 cm⁻¹) als ein Anzeichen für das Fehlen von H–Brücken zwischen den Carboxylgruppen in Pro und dem Lösungsmittel zu interpretieren [11]. Andererseits stammen alle Daten der Raman–Spektroskopie, die in der Konformationsanalyse einbezogen wurden, von lyophilisierten (also von wasserfreien) Polypeptidproben. Die AIp–Bande ließ sich in den Lösungsspektren (Abb. 5.23 und Abb. 5.24) ebenso wie in den Festkörperspektren (Abb. 5.25 und Abb. 5.26) erkennen und gesichert zuordnen. Die Ähnlichkeit der AIp hinsichtlich der Wellenzahlen und hinsichtlich der Intensitätsverhältnisse im gelösten und im festen Zustand impliziert daher, dass in beiden Phasen die Konformationen der Polypeptide weitgehend übereinstimmen. Es ist davon auszugehen, dass selbst im lyophilisierten Polypeptid eine kleine Zahl von Wassermolekülen am Polypeptid gebunden bleibt. Die Auswirkung des Lyophilisierens auf die Konformation wurde im Kapitel 5.2.6 (s. S. 101) bereits angesprochen. Die vorliegenden Ergebnisse der Raman–Spektroskopie führen zu der Schlussfolgerung, dass die Sekundärstruktur in Polypeptiden gleichermaßen aus Festkörperspektren wie aus Lösungsspektren bestimmt werden kann.

Verschiebungen der beiden struktur–sensitiven Raman–Banden AI und AIII, die von der Polypeptidbindung herrühren, sind durch deutlich abgegrenzte Wellenzahlenbereiche in der Literatur beschrieben [104]:

- Wenn sich die AI von ca. 1665±3 cm⁻¹ nach höheren Wellenzahlen verschiebt, kann daraus die Superposition von ungeordneter Konformation und anteiliger β–Faltblattstruktur abgeleitet werden.
- Die AIII um 1245±4 cm⁻¹ verhält sich in *random coil*–Strukturen entgegengesetzt dazu. Die Linie verschiebt sich nach niedrigeren Wellenzahlen (1235±5 cm⁻¹), wenn Anteile von β–Faltblattstruktur vorhanden sind.

Generell sind die Beobachtungen von *up shifts* bei der AI bzw. von *down shifts* bei der AIII bestenfalls dazu geeignet, um semiquantitative Aussagen über dominant vorhandene Sekundärstrukturen zu treffen. Demzufolge erlaubten die Positionen der AI und der AIII in den Alanin–Prolin–Polypeptiden lediglich die wenig konkrete Aussage über die überwiegend vorhandene, ungeordnete Konformation. Die Verschiebungen der Wellenzahlen in der Reihenfolge $\text{APA}_3 \rightarrow \text{APA}_4 \rightarrow \text{APA}_5$ waren in den hier vorgestellten Raman–Untersuchungen sehr gering ausgefallen und lieferten keinen hinreichenden Hinweis auf das Vorhandensein von anteiliger β –Faltblattstruktur.

Dagegen zeigte sich aus der quantitativen Konformationsanalyse anhand der Intensitätsänderungen bei der AI– und der AIII–Bande weitaus deutlicher, dass mit der Verlängerung der Kette in der Kleinserie $\text{APA}_3 \rightarrow \text{APA}_4 \rightarrow \text{APA}_5$ stabilisierende H–Brücken sukzessive aufgebaut werden. Diese Interpretation wird untermauert durch die struktursensitiven Linien des Polypeptidrückgrates (906, 964 und 1106 cm^{-1}), bei denen jeweils ein systematischer Anstieg erkennbar war. Die drei Linien sind als Konformationsmarker in Proteinen und Polypeptiden untersucht worden und es wurde berichtet, dass die Intensitäten der C–C– und der C–N–Schwingungen des Polypeptidrückgrates mit dem Aufbrechen der H–Brücken bei thermischer oder chemischer Denaturierung signifikant abnehmen [104, 139]. Aus den Untersuchungen kann für die hier vorliegenden Konformationsanalysen abgeleitet werden, dass mit wachsender Kettenlänge eine zunehmende Tendenz von stabilisierenden H–Brücken vom Penta–, über das Hexa– bis zum Heptapeptid auftritt, wodurch die Polypeptide einen zunehmenden Anteil an β –Konformation annehmen.

5.2.9 Strukturaufklärung mit ^1H –NMR–Spektroskopie

Aus den drei Polypeptiden mit den Sequenzen AlaPro(Ala)_n (mit $n = 3, 4, 5$) wurde die Probe APA_4 ausgewählt und mit Hilfe der 2D–NMR–Spektroskopie untersucht. Da der hohe Anteil an Salzen und Synthesefragmenten, der sich bei den MALDI–Untersuchungen gezeigt hatte, bei den NMR–Messungen zu Störungen führen kann, mußte die Probe zuvor durch HPLC entsalzt werden (s. Kap. 5.2.1). Zur Vorbereitung für die NMR–Messungen wurde das Polypeptid dann zunächst in einem Natriumphosphat–Puffer (s. Anhang) bei pH 7,0 gelöst und lyophilisiert. Anschließend wurde die Probe je zweimal in D_2O gelöst und erneut lyophilisiert, um einen möglichst vollständigen Austausch der labil gebundenen Protonen zu erreichen. Für die NMR–Spektroskopie wurde eine Probenkonzentration von 5 mg/ml ($\approx 10 \text{ mM}$) in einem NMR–Glasröhrchen (Innendurchmesser 5 mm) vorbereitet.

Die NMR–Messungen wurden mit einem Bruker 600 MHz–Spektrometer bei Raumtemperatur ausgeführt. Die Aufzeichnung der Spektren verlief im phasensensitiven Modus (TPPI) [77] über eine Gesamtmesszeit von etwa 8 h. Die Anzahl der Scans betrug 256 bei einem t_1 –Inkrement von jeweils $288 \mu\text{s}$. Die 2D–Spektren wurden über 2048 Datenpunkte in der F_2 –Dimension und über 1024 Datenpunkte in der F_1 –Dimension aufgezeichnet. Das Zero–filling (4–fach) auf 2048 reale Datenpunkte erfolgte routinemäßig in der F_1 –

Dimension vor der Fourier–Transformation. Die NMR–Spektren wurden auf einer Silicon Graphics Workstation mit dem Programm „NMR–Xwin“ (Bruker) prozessiert. In allen Messungen kam Tetramethylsilan (TMS) als interner Standard zum Einsatz.

Erwartete chemische Verschiebungen

Vor der ausführlichen Diskussion der NMR–Ergebnisse sind einige Anmerkungen zu den chemischen Verschiebungen und zu deren Nomenklatur erforderlich. Das Polypeptid APA₄ mit der Sequenz APAAAA ist aus fünf Alaninresten und einem einzelnen Prolinrest (nahe am N–Terminus) aufgebaut. In einer derart kurzen Sequenz ist zu erwarten, dass bei geeignet gewählter Pulssequenz in verschiedenen NMR–Experimenten (COSY, TOCSY, ROESY, HMQC, HMBC) nahezu alle Signale vollständig analysiert und zugeordnet werden können.

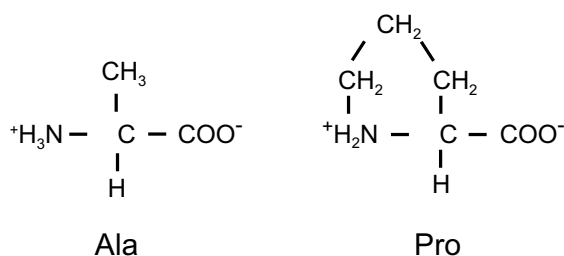


Abbildung 5.35: Indizierungsschema der Methyl– und Methylengruppen in den Seitenketten von Alanin (**links**) und von Prolin (**rechts**).

In Anlehnung an die Proteinchemie verwendet man kleine griechische und große lateinische Buchstaben, um die chemischen Verschiebungen in verschiedenen Spinsystemen zu kennzeichnen. Beim zentralen C_α–Atom beginnend erhalten alle C–Atome der Aminosäureseitenketten einen vorangestellten griechischen Kleinbuchstaben (Abb. 5.35). Zur Kennzeichnung der Spinsysteme der Aminosäuren werden lateinische Großbuchstaben eingesetzt (Abb. 5.36).

Die Aminosäuren Ala und Pro bilden mit ihren chemisch äquivalenten und nicht–äquivalenten Kernen zwei unterschiedliche Spinsysteme. Mit dem Buchstaben A beginnend ordnet man die Signale in 2D–NMR–Spektren von niedrigen zu hohen δ–Werten (vgl. Abb. 5.37). Wenn die chemischen Verschiebungen zweier Kerne große Abstände aufweisen, wählt man entsprechende Buchstaben, die im Alphabet weiter auseinander liegen. Beispielsweise liegt die chemische Verschiebung des Protons vom zentralen C_α–Atom des Alanin in ungeordneten Strukturen bei einem typischen (hohen) Wert von δ = 4,35. Dieser wird durch den Buchstaben X gekennzeichnet. Dagegen liegt die chemische Verschiebung der drei chemisch äquivalenten Protonen aus der Methylgruppe des Alanins erheblich niedriger, bei etwa δ = 1,39 und erhält den Buchstaben A. Die Aminosäure Ala bildet ein Vierspinsystem vom Typ A₃X (s. Abb. 5.35), dessen C_α–Proton mit den drei äquivalenten Nachbarkernen aus der Methylgruppe der Seitenkette magnetisch koppelt. Vom C_α–Proton des Ala wird man daher im 1D–NMR–Spektrum ein Dublett erwarten und

von den drei Protonen aus der Methylgruppe der Alaninseitenkette ein Quartett. Nach der Multiplizitätsregel wird das Quartett vier Linien im Intensitätsverhältnis 1 : 3 : 3 : 1 zeigen.

Beim Prolin liegt mit $A_2(T_2)$ MPX ein komplizierteres Spinsystem vor. Die beiden Protonen der ersten Methylengruppe im Prolinring (β CH und β' CH) sind chemisch nicht äquivalent und liegen mit den chemischen Verschiebungen von $\delta = 2,02$ (β H) und $\delta = 2,28$ (β' H) klar voneinander getrennt (vgl. Tab. 5.37, links). Um diesen Unterschied zu verdeutlichen, werden bei der Beschreibung des Pro-Spinsystems die Buchstaben M und P verwendet (vgl. Abb. 5.36 und Abb. 5.37, rechts).

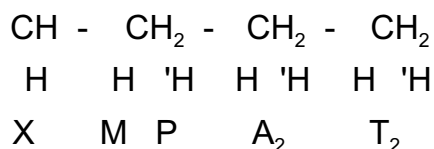


Abbildung 5.36: Details zur Nomenklatur des $A_2(T_2)$ MPX-Spinsystems von Prolin (dargestellt ohne Amino- und Carboxylgruppe).

Die Protonen der zweiten Methylengruppe (γ CH, γ' CH) und der dritten Methylengruppe (δ CH, δ' CH) werden in der Literatur meist wie chemisch äquivalente Kerne betrachtet, da ihre Verschiebungen nur minimal voneinander abweichen (vgl. Tab. 5.8, links). Die Spinsysteme der beiden γ - und δ -Protonen werden daher mit den Buchstaben A_2 und T_2 bezeichnet. Zur Verdeutlichung der Nomenklatur, die in dieser Arbeit verwendet wird, sind in Abbildung 5.36 das C_α -Atom und die drei Methylengruppen der Seitenkette von Pro (β CH₂, γ CH₂, δ CH₂) in einer Skizze dargestellt. Darin ist jedem einzelnen Proton ein griechischer Buchstabe (β , β' , γ , γ' , δ , δ') vorangestellt. Diese exakte Beschreibung ist für die detaillierte Analyse der NMR-Spektren notwendig. Es zeigte sich in den NMR-Untersuchungen am Hexapeptid APA₄, dass sich alle 6 Protonen des Pro-Ringes wie chemisch nicht-äquivalente Kerne verhalten, die in verschiedene Multipletts mit entsprechend unterschiedlichen chemischen Verschiebungen aufspalten.

Die Abbildung 5.36 zeigt, wie die chemischen Verschiebungen der Protonen aus der zweiten Methylengruppe (γ CH₂) mit den Bezeichnungen γ H und γ' H unterschieden werden. In analoger Weise bezeichnen δ H und δ' H die niedrigere bzw. die höhere chemische Verschiebung in der dritten Methylengruppe des Prolinringes.

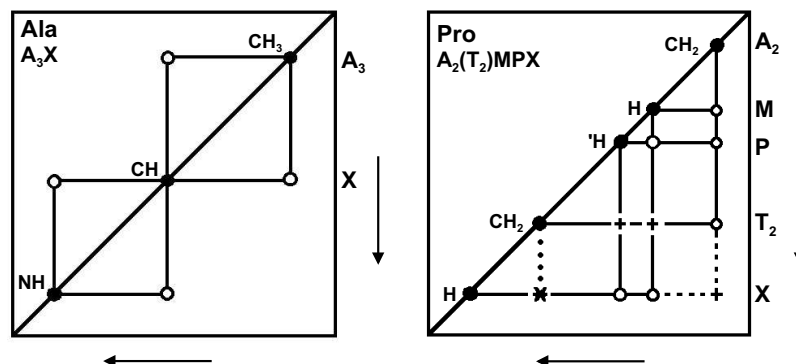


Abbildung 5.37: Erwartete Kreuz- und Diagonalpeaks im 2D-NMR-Spektrum beim Spinsystem A_3X von Alanin (links) und beim Spinsystem $A_2(T_2)MPX$ von Prolin (rechts) mit den Positionen der Diagonalpeaks (●), COSY-Kreuzpeaks (○), RELAYED-COSY-Kreuzpeaks (+) und DOUBLED-RELAYED-COSY-Kreuzpeaks (*). Alle symmetrisch auftretenden Korrelationspeaks oberhalb der Diagonalen im 2D-Spektrum von Pro sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Die Achsenskalierungen wurden in dieser Darstellung willkürlich gewählt. Die erwarteten chemischen Verschiebungen sind in [Tabelle 5.8](#) zusammengestellt. (Nach [\[109\]](#)).

Signalzuordnung erster Ordnung

Der erste Schritt der NMR-Analyse konzentriert sich auf die Signale, die zu den Aminosäuren Alanin gehören, da diese am leichtesten zugeordnet werden können. Für die Beschreibung und Diskussion der beobachteten Signale sind in [Abbildung 5.38](#) die Positionen der Aminosäuren mit fortlaufenden Nummern (vom N- zum C-Terminus) neben dem Einbuchstabensymbol angegeben (A1, P2, A3, usw.). Wie bereits im Kapitel 5.2.9 erläutert, sind vom C_α -Proton Dubletts und von den Methylgruppen der Alaninreste charakteristische Quartetts zu erwarten. Letztere liegen für ungeordnete Polypeptid- und Proteinstrukturen erwartungsgemäß im Bereich von $\delta = 4,35$ und $\delta = 1,39$ ([\[109\]](#), Seite 168). Für die Methylgruppe des Ala liegt die erwartete Verschiebung bei $\delta = 1,39$ (vgl. [Tab. 5.8](#)).

Bei der Analyse der 1D-Spektren in [Abbildung 5.38 \(a\)](#) fällt auf, dass bei allen Quartetts die chemischen Verschiebungen um mehr als 0,1 ppm von den Werten entfernt sind, die für *random coil*-Strukturen charakteristisch sind. Daraus kann eine gewisse Tendenz zur Strukturierung abgeleitet werden, von der die Aminosäure A6 am N-Terminus am stärksten betroffen ist ($\delta = 4,0$). Ebenso deutet bei den Resten A3/A4/A5 die Verschiebung auf eine partielle, jedoch geringe Strukturierung hin. Die drei Quartetts der Reste A3/A4/A5 sind zu einem breiten Multipllett überlagert. Anhand des erwarteten Intensitätsverhältnisses von 1 : 3 : 3 : 1 lassen sich jedoch die einzelnen Positionen der drei Quartetts erahnen. Die vermuteten Positionen sind in [Abbildung 5.38 \(a\)](#) durch eingezeichnete Hilfslinien oberhalb des Multipletts angedeutet.

Die drei Alaninreste A3/A4/A5 befinden sich im mittleren Bereich der Peptidkette und sind daher in einer anderen chemischen Umgebung, als die beiden einzelnen Alaninreste

A1 am C- und A6 am N-Terminus. Deshalb liegt hier die Vermutung nahe, dass die drei überlagerten Quartetts aus dem inneren Teil der Peptidkette von den Positionen 3 bis 5 der Aminosäuresequenz stammen. Eine sequenzielle Zuordnung ist jedoch nicht möglich.

Das Pseudotriplett im ^1H -Spektrum der [Abbildung 5.38 \(b\)](#) ist wiederum eine Überlagerung von drei Dubletts, die von den α -Protonen der drei in der Sequenz zentral gelegenen Alaninreste A3/A4/A5 stammen. Die bis dahin getroffenen ersten Zuordnungen werden durch die experimentell ermittelten Kopplungskonstanten 3J unterstützt, die in [Tabelle 5.7](#) zusammengestellt sind.

Mit der Gegenüberstellung der Kopplungskonstanten für die Reste A1 und A6 in [Tabelle 5.7](#) ergibt sich ein weiterer Hinweis darauf, wie die Signale sequenziell zugeordnet werden können. Bei den drei überlagerten Alaninresten A3/A4/A5 war keine exakte Bestimmung der Kopplungskonstanten möglich. Jedoch kann man anhand der vorliegenden Werte bereits eine Aussage über die Sekundärstruktur des Peptids treffen. Hierzu benutzt man die Korrelation zwischen der Größe der skalaren Kopplungskonstanten und dem Torsionswinkel θ , die von M. Karplus beschrieben wurde [140]. Aus der Karplus-Beziehung lassen sich anhand von Kopplungskonstanten Aussagen über die Konformation ableiten. Man beobachtet Kopplungskonstanten von ca. 5,0 – 7,0 Hz typischerweise in kurzen, unstrukturierten Peptiden [141]. In Proteinen und Polypeptiden mit Helix-Struktur liegt die Kopplungskonstante deutlich tiefer als 5,0 Hz und β -Faltblattstrukturen haben 3J -Werte oberhalb von 7,0 Hz.

Tabelle 5.7: Signal-Zuordnungen für die Alaninreste aus den ^1H -Spektren der [Abbildung 5.38 \(a\) und \(b\)](#) anhand der vicinalen Kopplungskonstanten $^3J_{\text{HN}-\text{H}\alpha}$.

	3J (βCH_3)	3J (αCH)
A1	7,022	7,039
A3/A4/A5	—	7,231
A6	7,235	7,241

Die experimentell ermittelten Werte für 3J der [Tabelle 5.7](#) lassen einen dominanten Anteil von ungeordneter Struktur im Polypeptid APA_4 erkennen. Auf den Positionen A3/A4/A5 und beim C-terminalen Rest A6 entfernen sich die Kopplungskonstanten von den typischen *random coil*-Werten. Daraus ist eine marginale Beteiligung von β -Faltblattstruktur erkennbar, die in Richtung des C-Terminus gering zunimmt.

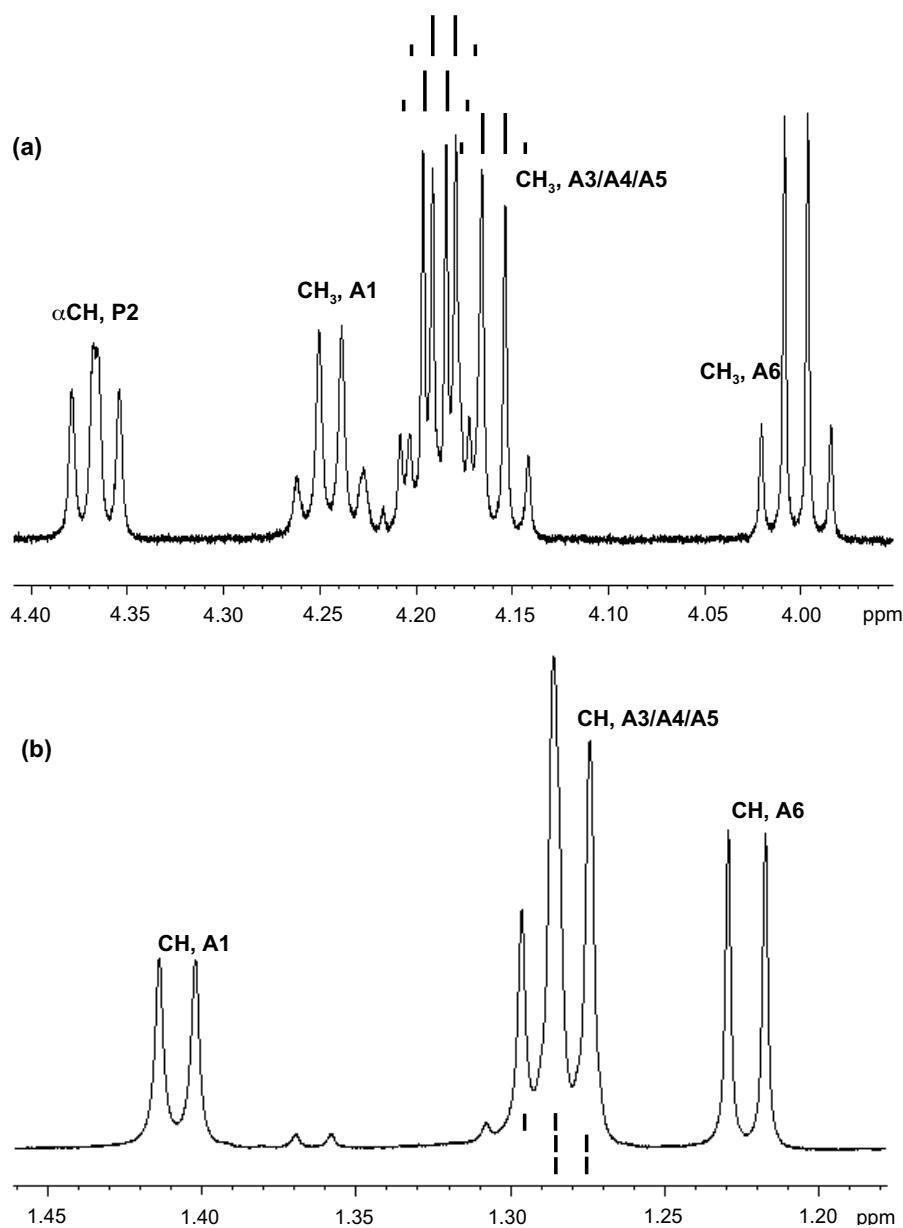


Abbildung 5.38:

(a) Typische Quartetts der βCH_3 -Protonen im ^1H -Spektrum von APA_4 . Drei der insgesamt fünf Quartetts sind im Bereich von $\delta = 4,15$ bis $\delta = 4,20$ überlagert. Anhand des erwarteten Intensitätsverhältnisses von $1 : 3 : 3 : 1$ lassen sich die Quartetts jedoch getrennt erkennen. Am linken Spektrenrand bei $\delta \approx 4,37$ ist das deutlich separierte symmetrische Triplet des α -Protons von Prolin (αCH) zu sehen.

(b) Vergrößerter Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum von APA_4 . Zwischen $\delta = 1,27$ und $\delta = 1,30$ sind die drei Dubletts der Alaninreste A3/A4/A5 zum Pseudotriplet überlagert.

Die vermuteten Positionen der drei Quartetts und der drei Dubletts sind durch senkrechte Balken oberhalb bzw. unterhalb der Überlagerungsbereiche in (a) und (b) angedeutet.

Zuordnung der COSY-Signale

Das COSY-Experiment untermauerte die zuvor getroffenen Aussagen aus der Signalzuordnung erster Ordnung. Anhand der COSY-Korrelationspeaks wurde die gesicherte sequenzspezifische Zuordnung zumindest für zwei der fünf Alaninreste möglich. In einer Übersicht zeigt [Abbildung 5.39](#) das gesamte 600 MHz COSY-Spektrum von APA₄, das mit der im ¹H-Kanal eingestrahlten Impulsfolge $90_{x'}^\circ - t_1 - \Theta_{x'} - \text{FID}$ aufgezeichnet wurde. Anstatt eines $90_{x'}^\circ$ -Pulses („Jeener-Puls“ [\[79\]](#)) wurde im Experiment ein kleinerer Winkel von $\Theta_{x'} = 45^\circ$ gewählt. Dadurch vereinfacht sich das Spektrum, jedoch wirkt sich dies zu Lasten der Empfindlichkeit aus. Alle relevanten Kreuzkorrelationen des COSY-Spektrums sind in der [Abbildung 5.39](#) zusätzlich durch Buchstaben markiert, um die ausführliche Diskussion der Ergebnisse im nachfolgenden [Kapitel 5.2.9](#) zu erleichtern.

Zur Auswertung der Kreuzkorrelationen aus dem COSY-Spektrum wurden die erwarteten chemischen Verschiebungen (δ_{theor}) aus [Tabelle 5.8](#) als Hinweis herangezogen. Dadurch konnten alle Linien gesichert zugeordnet werden. Die Ergebnisse (δ_{exp}) sind ebenso in [Tabelle 5.8](#) aufgelistet. Ein schwaches Korrelationssignal trat im COSY-Spektrum auf der Position $F_2/F_1 = 1,36/3,75$ auf, das mit Sicherheit nicht von der Probe, sondern möglicherweise von einer Verunreinigung des Lösungsmittels stammte.

Einige der relevanten Kreuzkorrelationen sind in einem Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum in der [Abbildung 5.40](#) separat und vergrößert dargestellt. Am oberen Rand des 2D-Spektrums sind die Projektionen der Signale auf die F_2 -Achse aufgetragen. Der linke Rand zeigt die F_1 -Achse des eindimensionalen ¹H-NMR-Spektrums. Die starken Signale der Aminosäuren A6 und A3/A4/A5 ragen über den oberen Rand der Abbildung hinaus und sind aus Gründen der Übersichtlichkeit abgeschnitten ([Abb. 5.40](#)).

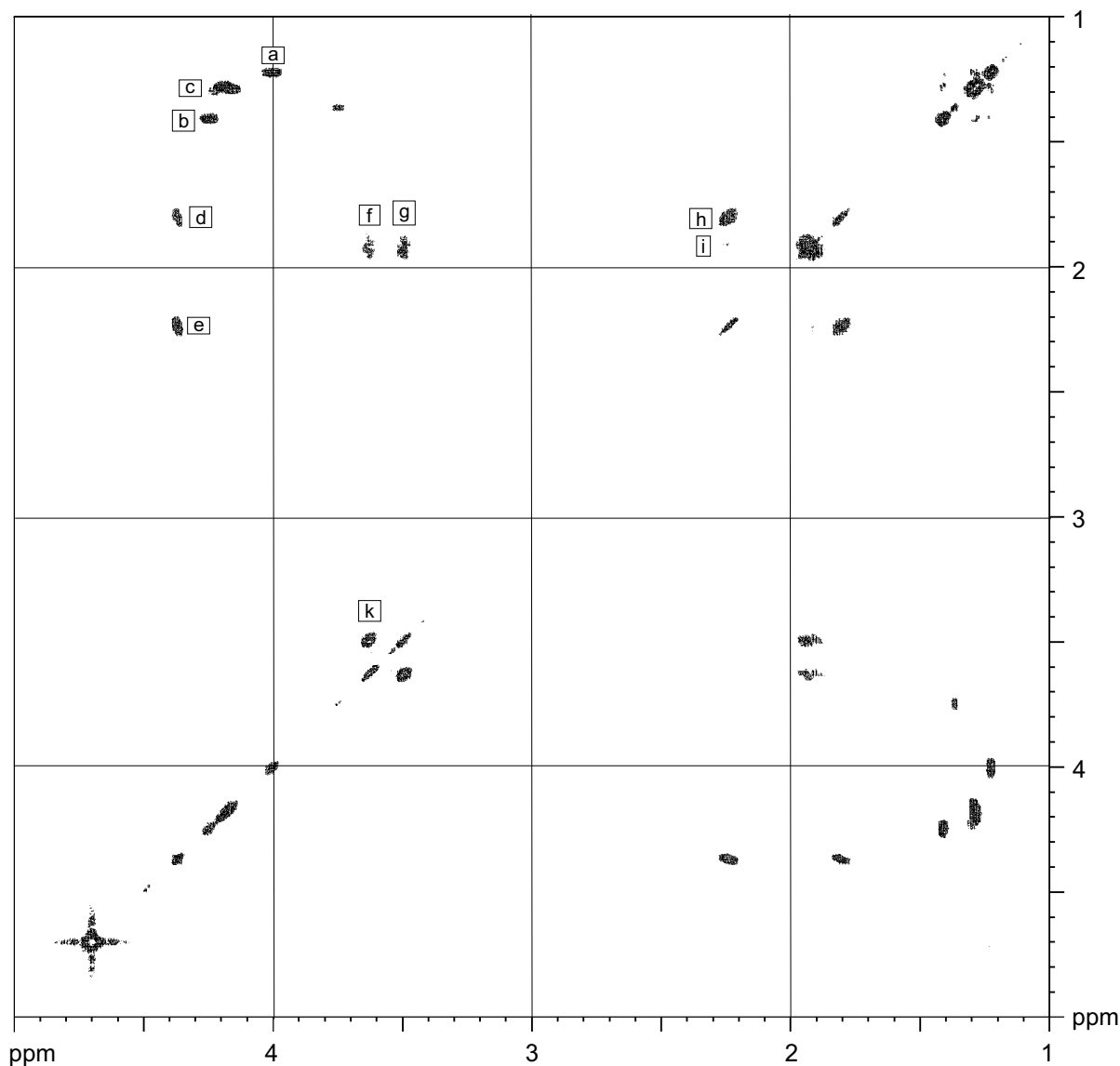


Abbildung 5.39: 600 MHz $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Spektrum des Hexapeptids APA_4 . Das starke Signal auf der Diagonalen bei $\delta = 4,7$ stammt vom unvollständig unterdrückten Wassersignal.

Im horizontal abgebildeten ^1H -Spektrum der [Abbildung 5.40](#) sind die Dubletts der beiden α -Protonen von A1 und A6 deutlich erkennbar. Diese können aus den Korrelationspeaks bei den Koordinaten $F_2/F_1 = 1,4/4,25$ und bei $F_2/F_1 = 1,25/4,0$ den entsprechenden Quartetts der CH_3 -Gruppen im vertikal abgebildeten ^1H -Spektrum (F_1 -Dimension) zugeordnet werden. Die bereits erwähnte Verunreinigung (bei den Koordinaten $F_2/F_1 = 1,36/3,75$) tritt in dieser Abbildung größer hervor. Ein intensiver Korrelationspeak bei $F_2/F_1 = 2,35/4,37$ entsteht aus der magnetischen Wechselwirkung zwischen dem α -Proton und dem β' -Proton der β -Methylengruppe des Prolin. Ebenso deutlich erkennt man die Wechselwirkung der zu Multipletts aufgespaltenen Protonen aus der γ -

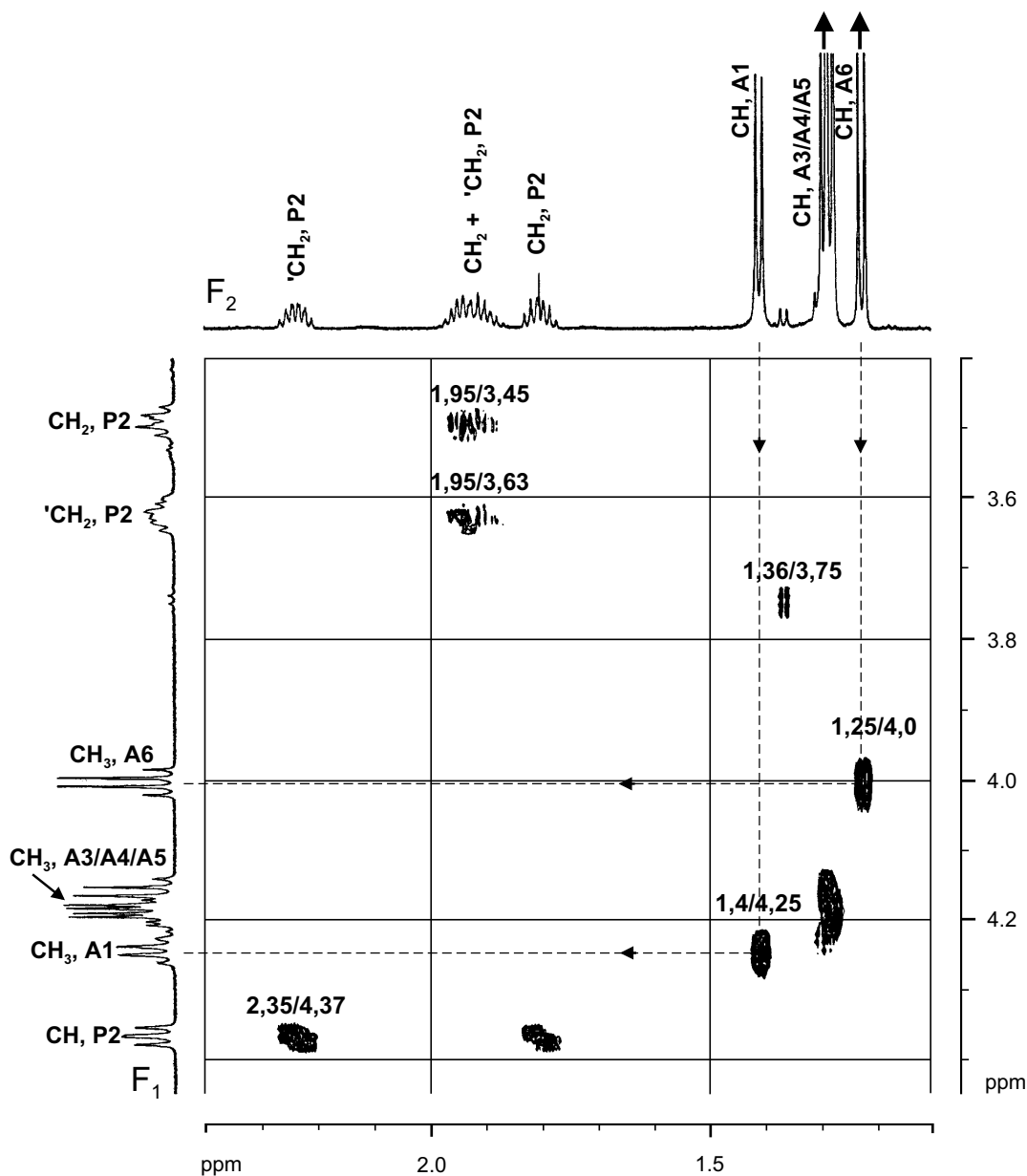


Abbildung 5.40: Vergrößerter Ausschnitt aus dem 600 MHz ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von APA_4 (vgl. Abb. 5.39). Der ausgewählte Bereich liegt unterhalb der Hauptdiagonalen und zeigt die fünf Alanin-Methylgruppen zwischen $\delta = 1,24 \dots 1,41$, von denen jedoch nur zwei den α -Protonen zugeordnet werden können. Der Verlauf der Signalzuordnung der N-terminalen (A1) und der C-terminalen Aminosäuren (A6) ist mit unterbrochenen Linien gekennzeichnet.

Methylengruppe (γCH , $\gamma'\text{CH}$) mit den Protonen der δ -Methylengruppe (1,95/3,45 und 1,95/3,62). Alle Kreuzkorrelationen, die aus dem COSY-Spektrum entnommen werden konnten, sind zur Übersicht in der [Tabelle 5.9](#) zusammengestellt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt in einer Aufstellung die erwarteten (δ_{theor}) und die gemessenen chemischen Verschiebungen (δ_{exp}) für alle Aminosäuren (Tab. 5.8). Bei den Positionen A1, P2 und A6 in der Kette konnte eine gesicherte sequenzspezifische Zuordnung getroffen werden. Bei den δ -Werten der Alaninreste A3/A4/A5 jedoch können in der Tabelle 5.8 jeweils nur die δ -Bereiche angegeben werden, innerhalb derer sich die Signale von den drei Dubletts der α -Protonen und von den drei Quartetts der Methylgruppen überlagern.

Tabelle 5.8: Erwartete chemische Verschiebungen (**links**) in Proteinen mit ungeordneter Konformation (nach [109]) und experimentell beobachtete chemische Verschiebungen (**rechts**) für die Aminosäuren Alanin und Prolin im Polypeptid APA₄.

	δ_{theor}			δ_{exp}			
	Ala	Pro		A1	P2	A3/A4/A5	A6
αCH	4,35	4,44	αCH	4,245	4,37	4,14...4,21	4,001
βCH_3 (A)	1,39	—	βCH_3 (A)	1,245	—	1,27...1,30	1,418
βCH_2 (P)	—	2,02	βCH_2 (P)		1,80		
$\beta'\text{CH}_2$	—	2,28	$\beta'\text{CH}_2$		2,24		
γCH_2	—	2,03	γCH_2		1,925*		
$\gamma'\text{CH}_2$	—	2,03	$\gamma'\text{CH}_2$		1,920*		
δCH_2	—	3,68	δCH_2		3,49		
$\delta'\text{CH}_2$	—	3,65	$\delta'\text{CH}_2$		3,63		

In der Tabelle 5.8 sind die δ -Werte der beiden γ -Protonen mit einem Stern gekennzeichnet, um darauf hinzuweisen, dass die beiden Multipletts nahezu übereinanderliegen. Eine detailliertere Zuordnung einzelner Kreuzkorrelationen der γ - und der γ' -Protonen war hier nicht möglich.

Die chemischen Verschiebungen in Tabelle 5.8 erlaubten eine erste Aussage über die Sekundärstruktur der untersuchten Probe APA₄ zu treffen. Aus den beobachteten δ -Werten kann gefolgert werden, dass das Polypeptid überwiegend ungeordnete Konformation annimmt, während sich in der Nähe des N-Terminus ein geringer Anteil von β -Faltblattstruktur abzeichnet.

Kern–Overhauser–Experiment (ROESY)

Die Ergebnisse des COSY-Experiments, die im Kapitel 5.2.9 vorgestellt wurden, ergaben eine gesicherte Signaluordnung zu den einzelnen Aminosäuren des Hexapeptids APA₄. In einer Variante von COSY, dem RELAYED-COSY und dem DOUBLED-RELAYED-COSY, erreicht man durch einen speziellen Delay in Verbindung mit einem zusätzlich eingestrahlten Radiofrequenzpuls einen verzögerten Kohärenztransfer zwischen zwei Spins, die nicht direkt, sondern nur indirekt über einen gemeinsamen Partner gekoppelt sind. Im Alanin beispielsweise besteht die Seitenkette nur aus der Methylgruppe, die durch eine

Einfachbindung direkt an das zentrale Kohlenstoffatom gebunden ist. Wie aus der Übersicht in [Abbildung 5.37](#) ersichtlich ist, wäre für deren vollständige Detektion die Pulsfolge eines einfachen COSY-Experiments prinzipiell ausreichend. Beim Prolin jedoch sind vielfache Wechselwirkungen unter den insgesamt sieben Kernen innerhalb des Prolinringes möglich, deren Korrelationen nur über komplexere Pulsfolgen, wie etwa im RELAYED-COSY oder im DOUBLED-RELAYED-COSY erfasst werden können. Das RELAYED-COSY ermöglicht es, einen größeren Bereich von J -Kopplungen zu erfassen als das COSY-Experiment. Ähnliche Ergebnisse lassen sich allerdings auch mit NOESY und ROESY erzielen, so dass für jeden Einzelfall abzuklären ist, welches der 2D-Experimente jeweils am besten geeignet ist. In NMR-Untersuchungen an biologischen Makromolekülen ist man stets mit dem Problem konfrontiert, nach optimierten experimentellen Bedingungen zu suchen. Häufig sind die Spektren wegen starker Signalüberlagerungen nur sehr schwer oder gar nicht analysierbar. Man wählt deshalb aus dem Repertoire der 2D-NMR-Spektroskopie mit den zahlreichen Varianten meist mehrere, verschiedene Experimente aus und versucht, schrittweise durch wiederholte Gegenüberstellung aller ausgeführten Messungen und der analysierten Daten, die gegebene Molekülstruktur aufzuklären.

Das NOESY-Experiment am Polypeptid APA₄ ergab ein wenig aufgelöstes Spektrum und konnte zur gesicherten Signalzuordnung der NOEs nicht herangezogen werden. In einem weiteren NMR-Experiment konnte jedoch ein ROESY-Spektrum aufgezeichnet werden, mit dem sich ein Teil der Interpretationen aus dem COSY-Spektrum überprüfen und bestätigen ließ. ROESY leitet seinen Kurznamen in Anlehnung an das NOESY-Experiment ab und dient der Detektion von magnetischen Transfers über den Raum. Beide haben dieselbe Abhängigkeit von $1/r^6$ für die Signalintensitäten und liefern quantitative Informationen über Kernabstände. Die eingesetzten Pulssequenzen sind im TOCSY und im ROESY annähernd identisch, allerdings liegt im ROESY die Leistung der verwendeten Radiofrequenz zum Erzielen des Spin-Lock deutlich niedriger, wodurch die TOCSY-Kreuzkorrelationen im ROESY-Spektrum zusätzlich unterdrückt werden. Dieser Tatbestand muss hier deshalb kurz angesprochen werden, weil die TOCSY-Peaks entgegengesetztes Vorzeichen haben und häufig in der Intensität die ROESY-Peaks übertreffen oder sie teilweise kompensieren [142]. Daher ist ROESY für die Detektion von NOE-Signalen in mittelgroßen und kleinen Molekülen mehr geeignet als NOESY.

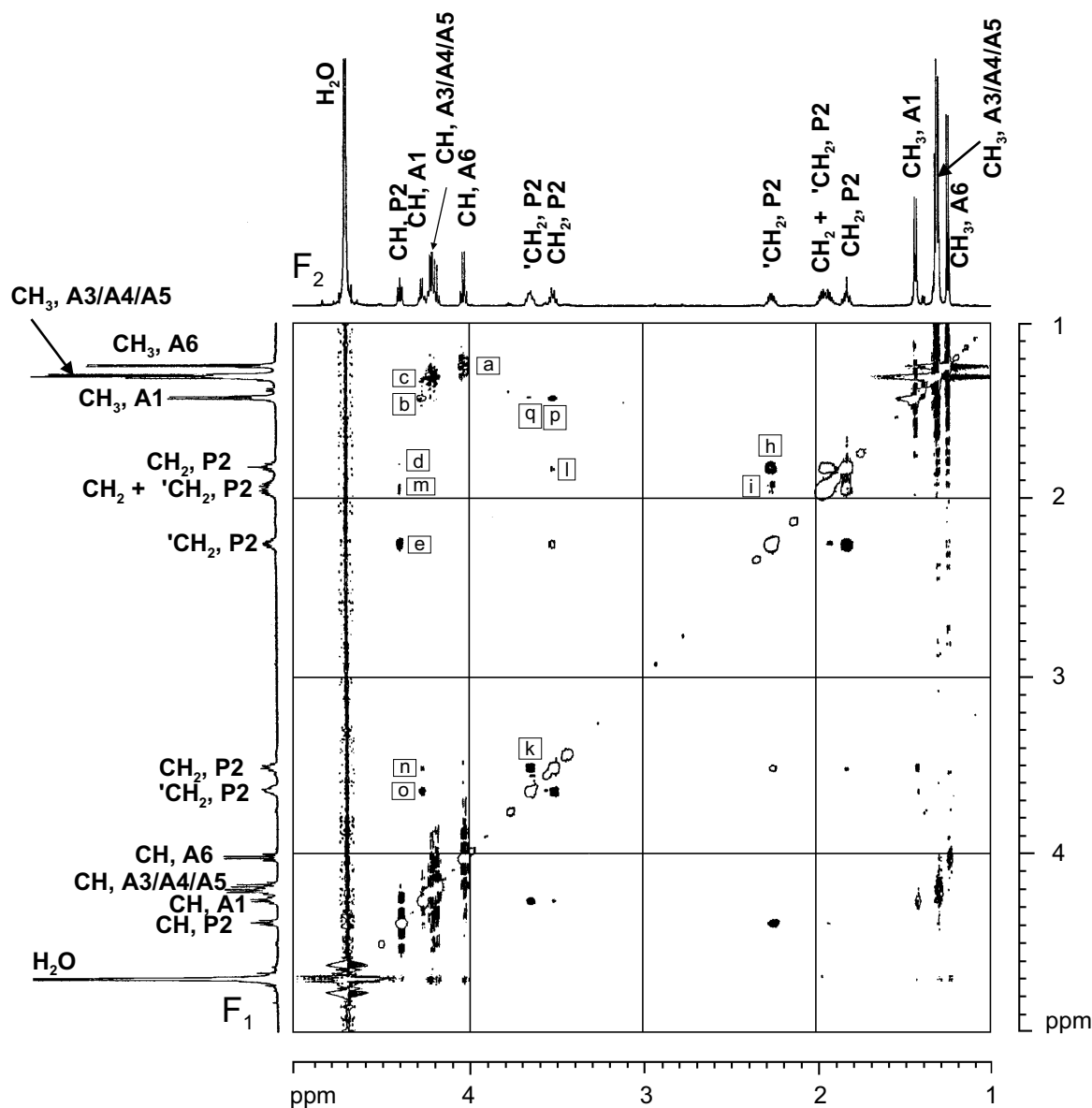


Abbildung 5.41: 600 MHz ROESY–Spektrum von APA₄. Am unteren linken Rand des 2D–Spektrums taucht das Wassersignal auf. Die zugeordneten Kreuzkorrelationen (mit kleinen Buchstaben markiert) korrespondieren mit denen des COSY–Spektrums aus [Abbildung 5.39](#) und werden im Text diskutiert.

Die ROESY–Ergebnisse belegen die vorangestellten Überlegungen zur Wahl des geeigneten NMR–Experiments. In [Abbildung 5.41](#) ist eine Übersicht des Spektrums im Bereich von 1 – 5 ppm wiedergegeben. Erwartungsgemäß wiederholten sich im ROESY–Spektrum einige der bereits zuvor im COSY–Experiment detektierten Signale, während andere Kreuzkorrelationen im ROESY–Diagramm neu auftauchten und somit eine verfeinerte Strukturanalyse ermöglichten. Wie bereits zuvor kurz angesprochen, können im ROESY–Spektrum die unterschiedliche Dominanz und die unterschiedlichen Vorzeichen der TOCSY– und ROESY–Signale zu gegenseitiger Kompensation führen. In den 2D–

Spektren erscheinen positive Peaks (also dominante ROESY-Signale) als schwarze Flächen. Dominante TOCSY-Peaks dagegen werden als weiße Flächen mit schwarzer Umrandung gezeichnet.

Die stärkste Korrelation ist zwischen den beiden β -Protonen des Prolinringes (βCH , $\beta'\text{CH}$) zu beobachten. Diese Position ist im ROESY-Spektrum (Abb. 5.41) oberhalb der Diagonalen durch den Buchstaben h markiert. Eine ähnlich starke Wechselwirkung zeigt sich auch zwischen den beiden δ -Kernen (Buchstabe k in Abb. 5.41). In einer Übersicht sind alle weiteren detektierten COSY- und ROESY-Kreuzsignale in Tabelle 5.9 zum Vergleich gegenübergestellt.

Tabelle 5.9: Gegenüberstellung der NMR-Daten aus dem COSY- und dem ROESY-Experiment. Die Stärke der skalaren Kopplungen (COSY) und der indirekten Spin-Spin-Kopplungen (ROESY) sind neben den Aminosäuren (A1, P2, A3/A4/A5 und A6) durch waagrechte Balken wiedergegeben, deren Längen proportional zu den beobachteten Signalintensitäten sind.

COSY				ROESY			
A1	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \beta\text{CH}_3$	a	■■■■	A1	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \beta\text{CH}_3$	a	■■■■
P2	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \beta\text{CH}_2$	d	■■■■	P2	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \beta\text{CH}_2$	d	■
P2	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \beta'\text{CH}_2$	e	■■■■	P2	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \beta'\text{CH}_2$	e	■■■■
P2	$\beta'\text{CH}_2 \leftrightarrow \beta\text{CH}_2$	h	■■■■	P2	$\beta'\text{CH}_2 \leftrightarrow \beta\text{CH}_2$	h	■■■■
P2	$\beta'\text{CH}_2 \leftrightarrow \gamma\text{CH}_2$	i	■	P2	$\beta'\text{CH}_2 \leftrightarrow \gamma\text{CH}_2$	i	■
P2	$\delta\text{CH}_2 \leftrightarrow \gamma\text{CH}_2$	g	■■■				
P2	$\delta'\text{CH}_2 \leftrightarrow \gamma\text{CH}_2$	f	■■■				
P2	$\delta'\text{CH}_2 \leftrightarrow \delta\text{CH}_2$	k	■■■■	P2	$\delta'\text{CH}_2 \leftrightarrow \delta\text{CH}_2$	k	■■■■
A3/4/5	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \beta\text{CH}_3$	c	■■■■	A3/4/5	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \beta\text{CH}_2$	c	■■■■
A6	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \beta\text{CH}_3$	b	■■■■	A6	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \beta\text{CH}_2$	b	■
				P2	$\delta\text{CH}_2 \leftrightarrow \beta\text{CH}_2$	l	■
				P2	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \gamma\text{CH}_2$	m	■
				P2 \leftrightarrow A1	$\delta\text{CH}_2 \leftrightarrow \beta\text{CH}_3$	p	■■■■
				P2 \leftrightarrow A1	$\delta'\text{CH}_2 \leftrightarrow \beta\text{CH}_3$	q	■
				A1 \leftrightarrow P2	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \delta\text{CH}_2$	o	■■■■
				A1 \leftrightarrow P2	$\alpha\text{CH} \leftrightarrow \delta'\text{CH}_2$	n	■

Jede Wechselwirkung zwischen verschiedenen Methyl- und Methylengruppen steht in der zweiten Spalte beschrieben; die Buchstabenkennzeichnung, die mit den Abbildungen 5.39 und 5.41 korrespondiert, ist in der dritten Spalte erfasst. Erwartungsgemäß erscheinen fast alle Signale zwischen direkt benachbarten Protonen sowohl im COSY- als auch im ROESY-Spektrum (vgl. a bis e und h bis k in Tabelle 5.9). Ebenso zeigt sich eine

große Übereinstimmung in den jeweiligen Signalintensitäten. Überraschenderweise fehlen jedoch im ROESY die Korrelationen zwischen den beiden δ - und den γ -Protonen des Pro (vgl. Buchstaben g und f der [Tabelle 5.9](#)).

Im ROESY-Spektrum wurden zwei weitere Kreuzpeaks erfasst, die auf indirekte Spin–Spin–Wechselwirkungen innerhalb des Prolinrings zurückzuführen sind (l und m). Diese sind in der [Abbildung 5.42](#) mit zwei kleinen Pfeilen angedeutet. Für deren Interpretation ist es aufschlussreich, die zusätzliche Information aus den vier weiteren Kreuzkorrelationen (n bis q aus [Tabelle 5.9](#)) heranzuziehen. Dadurch kann zuverlässig festgelegt werden, welches der beiden β - und welches der beiden δ -Protonen des Prolin aus der Zeichenebene der [Abbildung 5.42](#) herausragt und welches unterhalb der Zeichenebene liegt. Demnach deuten die beiden starken Signale (l und p) vom β - und vom δ -Proton darauf hin, dass sie in die gleiche Richtung (aus der Zeichenebene heraus) zeigen. Diese Beobachtung wird durch die zwei starken Kreuzkorrelation zwischen dem Prolin und der ersten Aminosäure Alanin bestätigt (vgl. o und p).

Die Ergebnisse aus dem COSY- und ROESY-Experiment konnten zu einem detaillierten Bild zusammengesetzt werden, mit dem die Molekularstruktur im Polypeptid APA₄ verfeinert werden konnte. Dadurch ließ sich das rudimentäre Bild aus [Abbildung 3.16](#) (s. Seite 47) korrigieren und konkretisieren. Das C-terminale Alanin A1 befindet sich in enger Nachbarschaft zum Pyrrolidinring des Prolin und seine Methylgruppe (βCH_3) liegt oberhalb des planaren Pro-Ringes (vgl. [Abb. 5.42](#)).

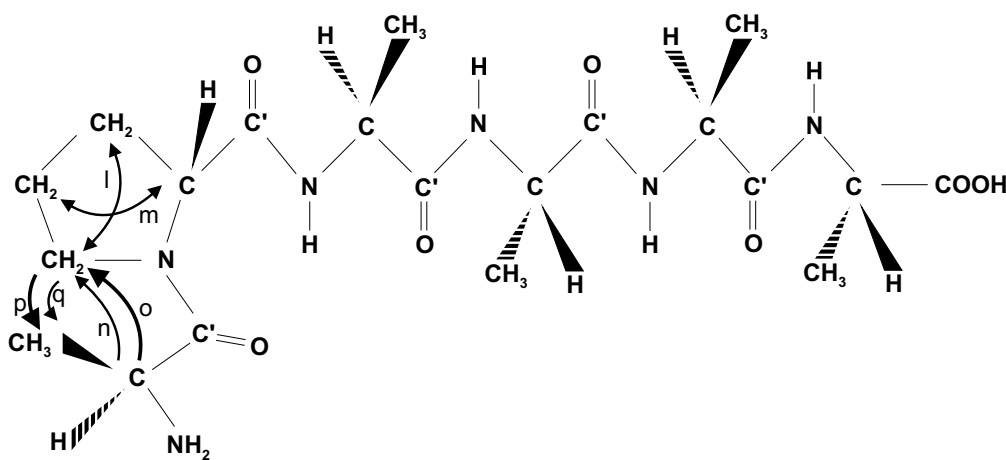


Abbildung 5.42: Verfeinerte Molekularstruktur des Polypeptids APA₄ mit der Peptidyl–Prolyl–Bindung in der *trans*-Konfiguration. Die mit Kleinbuchstaben markierten Pfeile deuten die magnetische Wechselwirkung an, auf die im Text näher eingegangen wird.

Das ROESY-Spektrum lieferte darüber hinaus ausreichende Information über die Konfiguration der Peptidyl–Prolyl–Bindung. Die Intensitäten der ROESY-Signale zwischen der Seitengruppe von Alanin und den δ -Protonen von Prolin lassen keinen Zweifel daran, dass die Alanyl–Prolyl–Bindung am Amino–Terminus des Polypeptids APA₄ in der *trans*-Konfiguration vorliegt.

5.2.10 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse

Das Kapitel 5.2 beschreibt die Ergebnisse der Untersuchungen an einer kleinen Serie von drei Polypeptiden, die aus zwei Bausteinen mit konträren Eigenschaften aufgebaut sind. In der Zusammensetzung der Aminosäuren Ala und Pro in den Sequenzen AlaPro(Ala)_n kann die nahe am N-Terminus positionierte X-Pro-Bindung studiert werden. Mit dem gewählten sequenziellen Aufbau wird ein weiterer Schwerpunkt der Untersuchungen auf die sukzessive Kettenverlängerung durch Alaninreste am Carboxyl-Terminus gelegt. Die Polypeptidkette des Pentapeptids APA₃ ist im Hexapeptid APA₄ um einen Ala-Rest und im Heptapeptid APA₅ um zwei Ala-Reste verlängert.

Die Iminosäure Prolin verursacht durch den planar angeordneten Pyrrolidinring eine starke sterische Einschränkung im Aufbau von Protein- und Polypeptidstrukturen. Pro wird als „Helix-Brecher“ bezeichnet und spielt als Faltungskatalysator im Zusammenhang mit *cis-trans*-Isomerasen eine entscheidende Rolle. Seine Ausnahmeposition unter den 20 proteinogenen Aminosäuren spiegelt sich auch in relativ häufigem Auftreten in Haarnadelschleifen (*β-turns*) wider. Wegen des fehlenden Amid-H-Protons ist Pro nicht am Aufbau von stabilisierenden Wasserstoffbrücken beteiligt. Die kleine, kompakte Seitenkette der aliphatischen Aminosäure Alanin begünstigt das Zustandekommen geordneter Strukturen in Biomolekülen. Alanin ist für seine Eigenschaft zum Ausformen von helikalen Sekundärstrukturen bekannt und wird daher oft als „Helix-Bildner“ bezeichnet.

Für die Strukturanalyse der Polypeptide wurden drei komplementäre optische Messmethoden (CD-, Raman- und 2D-NMR-Spektroskopie) gewählt. Die durchgeführten spektroskopischen Experimente unterscheiden sich wesentlich in der Sensitivität und in der Aussagekraft. Die Informationen, die aus den Ergebnissen der CD-Spektroskopie gezogen werden können, sind mit einem großen Unsicherheitsfaktor behaftet, da die Messungen empfindlich von den Konzentrationen der Polypeptidlösungen abhängen. In einer semi-quantitativen Analyse zeigte sich der hohe Gehalt an ungeordneter Konformation der Prolin-haltigen Polypeptide, deren CD-Signal geringe Beiträge von *β*-Faltblattstruktur erkennen ließ.

Die Raman-Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse aus der CD-Spektroskopie. Die Gegenüberstellung von Lösungsspektren und Festkörperspektren aus Raman-, Mikro-Raman- und FT-Raman-Experimenten lieferte große Übereinstimmung in der spektralen Information. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Konformation in den lyophilisierten Polypeptiden AlaPro(Ala)_n mit jener in der gelösten Form vergleichbar ist. Insbesondere mit der Mikro-Raman-Spektroskopie am Feststoff lassen sich mehrere Probleme technischer Natur umgehen, die im Zusammenhang mit der Diskussion der Ergebnisse ausführlich erörtert wurden. Dabei kamen die Löslichkeit von Proteinen und die Effekte des Lösungsmittels zur Sprache, ebenso wie der Informationsverlust, der in Lösungsspektren in Kauf genommen werden muss, weil die Amid I-Bande von der starken Streuung der Wassermoleküle überdeckt wird.

Die Komplexität von Raman–Spektren erfordert eine sorgfältige Analyse einer breiten Palette von charakteristischen Banden. Neben den Amid–Banden (AI, AIII, Amid S) sind hier auch die Schwingungen des Polypeptidrückgrates und einiger Aminosäureseitenketten zu berücksichtigen. Dabei spielen sowohl die Wellenzahlen, als auch die Banden–Intensitäten eine entscheidende Rolle. Mit der statistischen Untersuchung im letzten Teil des vorliegenden Kapitels wurde gezeigt, dass die Sekundärstrukturanalyse anhand der Positionen und Verschiebungen von Raman–Linien weniger sensitiv ist, als die Analyse anhand der Änderungen der Linien–Intensitäten. Die Verlängerung der Kette um eine bzw. zwei Aminosäuren in der Serie des Penta–, Hexa– und Heptapeptids ist mit den Intensitäten der C–C– und C–N–Schwingungen des Polypeptidrückgrates signifikant korreliert. Mit Hilfe dieser Strukturmarker konnte das sukzessive Anwachsen einer sehr geringen Strukturierung in den Polypeptiden detektiert werden.

Die Raman–spektroskopischen Untersuchungen lieferten keine Aussage zur absoluten Konfiguration der X–Pro–Bindung. Die Information über die *trans*–Konfiguration der Peptidyl–Prolyl–Bindung im Hexapeptid APA₄ konnte aus mehreren Experimenten der NMR–Spektroskopie gewonnen werden. Kleine chemische Verschiebungen und geringe Bewegungen der vicinalen Kopplungskonstanten bestätigten die Interpretationen aus den Untersuchungen mittels der CD– und der Raman–Spektroskopie über die gering vorhandene β –Faltblattstruktur in einem Gefüge aus weitgehend ungeordneter Konformation. Mit den hier vorgestellten Ergebnissen lässt sich der große Informationsinhalt demonstrieren, der aus der Kombination der drei spektroskopischen Methoden CD, Raman und 2D–NMR gezogen werden kann.

5.3 Helikale Modellpeptide

Der Aufbau der untersuchten Nonadekapeptide wurde schematisch an die Polypeptidsequenzen vergleichbarer Studien angelehnt [84, 143, 144]. Viele dieser Experimente konzentrierten sich auf die stabilisierenden Faktoren in der α -Helix, da sie die am häufigsten in Proteinen anzutreffende Sekundärstruktur repräsentiert [84, 85, 91]. Sie zielten darauf, die Ursachen der Proteinfaltung zu analysieren und in Algorithmen die dreidimensionale Struktur von Proteinen mit verbesserter Genauigkeit vorherzusagen [18, 19]. Nach der Aufklärung der klassischen α -Helixstruktur und der β -Faltblattstruktur durch L. Pauling und R. Corey [5, 9] wurden nahezu drei Jahrzehnte lang überwiegend die CD- und ORD-Spektroskopie als Alternative zur aufwändigeren Technik der Röntgenstrukturanalyse eingesetzt.

Die quantitative Bestimmung des Helix-Gehaltes in Modellpeptiden basiert primär auf der Anwendung des Circular-Dichroismus, indem die gemessene Elliptizität bei 222 nm ($[\Theta_{222}]$) als ein lineares Maß für helikale Strukturen herangezogen wird [42, 145]. Der Informationsinhalt wird allerdings durch die Tatsache limitiert, dass die CD-Spektroskopie nur einen gemittelten Wert über den Helix-Gehalt der gesamten Polypeptidkette erfassen kann. Mit Hilfe des Circular-Dichroismus ist es nicht möglich, Aussagen über die lokalen Verteilungen helikal oder nicht-helikal angeordneter Aminosäuren in einer Polypeptidkette zu treffen.

Mit der Einführung der zweidimensionalen Kernspinresonanz begann in den 1970er Jahren eine neue Epoche in der Strukturanalytik, mit deren Hilfe zusätzliche Informationen über den atomaren Aufbau von Biomolekülen gewonnen werden konnten. Dadurch stand eine komplementäre Messmethode zur Verfügung, die quantitativen Ergebnisse (*helix propensities*) aus der CD-Spektroskopie mit den Daten aus der 2D-NMR-Spektroskopie zu vergleichen. Die Quantifizierung der struktur-bildenden Eigenschaften aller 20 proteino-genen Aminosäuren mit Hilfe der Helix-Propagationsparameter P_α bildet die Grundlage für die Entwicklung von Algorithmen zur Proteinstrukturvorhersage [146, 147, 148].

Durch die verfeinerten Methoden der Strukturuntersuchungen konnten in wiederholten Gegenüberstellungen von theoretischen und experimentellen Ergebnissen eine Reihe von Widersprüchen in der Festlegung der Helix-Propagationsparameter aufgedeckt und teilweise beseitigt werden [145, 149, 150]. Eine weitere Verbesserung wurde mit der Einführung geeigneter helikaler Modellsysteme erreicht, in denen sich die helix-bildenden Eigenschaften der Aminosäuren besser und zweifellos realistischer studieren ließen. In der Anfangszeit der Helix-coil-Theorie, der als experimentelles Instrument hauptsächlich die CD- und ORD-Spektroskopie zur Verfügung standen, wurden die *helix propensities* anhand von *host-guest*-Versuchen ermittelt. Die Methode bestand darin, Polymere zu spektroskopieren, in denen jeweils eine einzelne Aminosäure (*guest*) in langen Ketten aus Hydroxypropyl- oder Hydroxybutyl-L-Glutaminsäure (*host*) eingebaut waren [17, 20, 151].

Die *host-guest*-Experimente wurden als Instrument in der Erforschung der Proteinfaltungsmechanismen weitgehend verdrängt, als ein Fragment der RNase A (C-Peptid) als autonome Faltungseinheit entdeckt wurde [14, 152, 153, 154]. Das C-Peptid besitzt einen hohen Anteil an helikaler Konformation und wurde zum Vorbild bei der Synthese von Alanin-reichen Modellpeptiden (*peptides of de novo design*) [155, 156], mit denen die Genauigkeit der Proteinstrukturvorhersagen verbessert werden konnte [157].

Annähernd zeitgleich mit der 2D-NMR-Spektroskopie rückte die Raman-Spektroskopie für die Strukturuntersuchungen an Biomolekülen in das Blickfeld der Experimentatoren. In der Anfangszeit der Bio-Raman-Spektroskopie war bei den Messungen an Protein-Lösungen aus technischen Gründen die Verwendung hoher Konzentrationen notwendig. So wurden beispielsweise in Raman-spektroskopischen Studien an Lysozym Konzentrationen von 300 mg/ml (~ 21 mM) und an RNase A von 200 mg/ml eingesetzt [119, 130]. Auf Grund von instrumentellen Verbesserungen in der Raman-Spektroskopie (Laser, optische Filter, Detektoren) konnten in der Folgezeit gute Spektren mit niedrigeren Konzentrationen ($\sim 1 \dots 5$ mg/ml) aufgezeichnet werden [158].

Die Raman-Spektroskopie kann als Ergänzung zu den etablierten Untersuchungsmethoden mit Hilfe des Circular-Dichroismus und der Kernspinresonanz beim Proteinfaltungsproblem eingesetzt werden. Sie leistet einen Beitrag zur Bestimmung von Helix-Propagationsparametern, welche in die vorhandenen Algorithmen zur Proteinstrukturvorhersage integriert werden können und die Vorhersagegenauigkeit verbessern können. Raman-Messungen lassen sich an gelösten Proben ebenso wie an lyophilisierten und kristallinen Proben durchführen, wobei meist die Versuche in Lösung favorisiert werden, weil Wasser die natürliche Umgebung der meisten Proteine ist. Einige der kritischen Aspekte in Lösungsspektren (Überlagerung der Amid I-Bande durch das Wassersignal, Beeinflussung der Konformation durch Lösungsmittelleffekte, Subtraktion der spektralen Beiträge vom Lösungsmittel) wurden in den [Kapiteln 5.2.3](#) und [5.2.7](#) bereits angesprochen.

In diesem Zusammenhang ist ein weiterer Gesichtspunkt bei den Raman-Lösungsspektren zu diskutieren, der die potenziellen Aggregationen von Polypeptiden in Lösungen betrifft. In der CD- und NMR-Spektroskopie ist es stets erforderlich, durch die Wahl eines möglichst großen Konzentrationsbereiches den Nachweis zu erbringen, dass die Polypeptide in der monomeren Form vorliegen und dass die helikale Konformation nicht durch Dimerisierungseffekte zustande kommt. Man weist dies gewöhnlich anhand der Konstanz der Signale in mehreren Messungen an unterschiedlich konzentrierten Lösungen (bis ca. 10 mM bzw. bis zu 6 mg/ml) nach [91, 159]. Diese notwendige Kontrolle, ob die Polypeptide in den jeweiligen Lösungen als Monomere vorliegen, wurde bisher in der Raman-Spektroskopie stets außer Acht gelassen. Die Problematik der Konzentrationsabhängigkeit entfällt jedoch, wenn die Untersuchungen am Feststoff durchgeführt werden.

5.3.1 Vorbereitende Analysen mit MS und HPLC

Die Synthese der Nonadekapeptide wurde mit der Fmoc-Methode der Festphasenpeptidsynthese durchgeführt, deren Beschreibung im [Kapitel 4.2](#) zu finden ist. Alle Proben sind am Amino-Terminus acetyliert und am Carboxyl-Terminus amidiert, um Dipolwechselwirkungen der Peptidtermini, autokatalytische Zyklisierung und Wechselwirkungen zwischen den Enden und den geladenen Seitenketten (Lys) zu vermeiden. Die Details über die Polypeptidsequenzen und die Begründung für die Wahl der beiden aliphatischen Reste Leu und Ile sind im [Kapitel 3.4.3](#) dargestellt. Die vier Lys-Seitenketten in jeder Sequenz sind durch 4 Ala-Reste voneinander getrennt, so dass mit den Abständen $i, i+4$ die gegenseitige Wechselwirkung durch elektrostatische Abstoßung minimiert wird.

Nach der Synthese erfolgte die Überprüfung der Polypeptidsequenzen in der massenspektrometrischen Analyse mit MALDI-TOF. Aus den umfangreichen Messungen ist mit der [Abbildung 5.43](#) ein einzelnes Spektrum als Beispiel herausgegriffen, in dem die gute Übereinstimmung zwischen der erwarteten und der gemessenen Polypeptidmasse demonstriert werden kann. Bei allen Proben wurden Salzreste (Na, K) aus der Peptidsynthese detektiert.

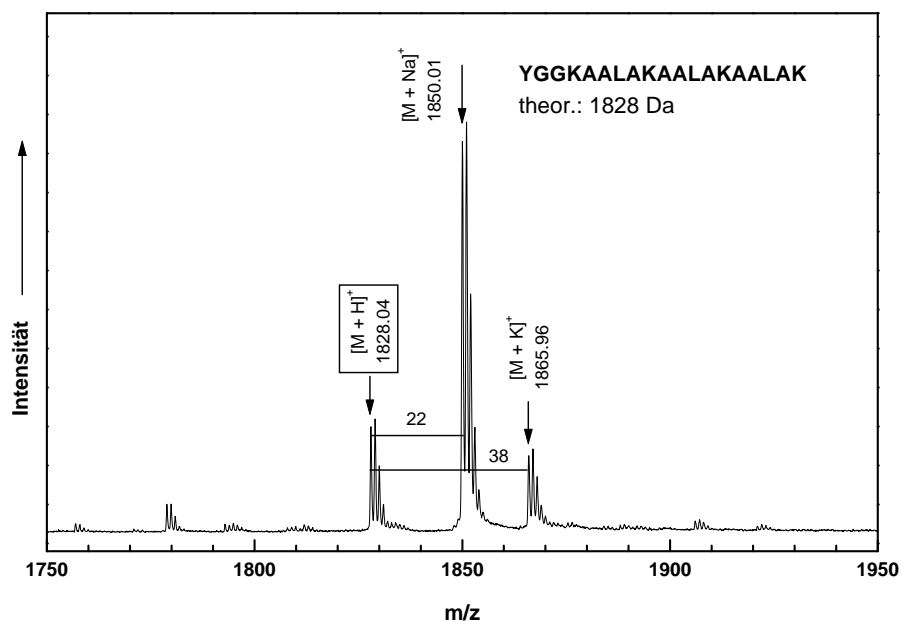


Abbildung 5.43: Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse (MALDI-TOF) am Polypeptid mit 3 Leu-Insertionen unter Verwendung einer gesättigten DHB-Lösung als Matrix.

Ergänzend zur Massenspektrometrie wurde die HPLC-Analyse (s. [Kap. 4.3](#) und [Anhang A](#)) unter Verwendung einer C₁₈-RP-Trennsäule zur Kontrolle der Probenqualität eingesetzt. Die Aufzeichnung der Chromatogramme (nicht abgebildet) bestätigte die Reinheit der Proben (>99 %), in denen keine Fehlsequenzen vorhanden waren, so dass auf die präparative HPLC verzichtet werden konnte.

5.3.2 CD-Spektroskopie an Modellpeptiden

Der Einfluss der Leu- und Ile-Insertionen in den helikalen Polypeptiden wurde mit Hilfe der CD-Spektroskopie quantitativ bestimmt. Dazu wurde die Elliptizität $[\Theta]$ bei 222 nm gemessen, welche als ein lineares Maß für den Helix-Gehalt gilt [145]. Zur Vorbereitung der Messungen wurden zunächst Mutterlösungen (< 5 mM) im NaF-haltigen Puffer (s. Anhang C) angesetzt, anschließend 10-fach verdünnt und die Konzentrationen mit einem UV/VIS-Spektrometer gemessen. Aus der Gleichung

$$c = \frac{A}{\epsilon d} \quad (5.5)$$

kann die Konzentration der Polypeptidlösungen ermittelt werden. Darin beschreibt A die gemessene Absorption⁵ im Maximum der Tyr-Absorptionsbande (275 nm), d steht für die Pfadlänge der Quarzküvette und ϵ für den molaren Absorptionskoeffizienten in H₂O ($\epsilon = 1390$ L/mol cm) [92, 160].

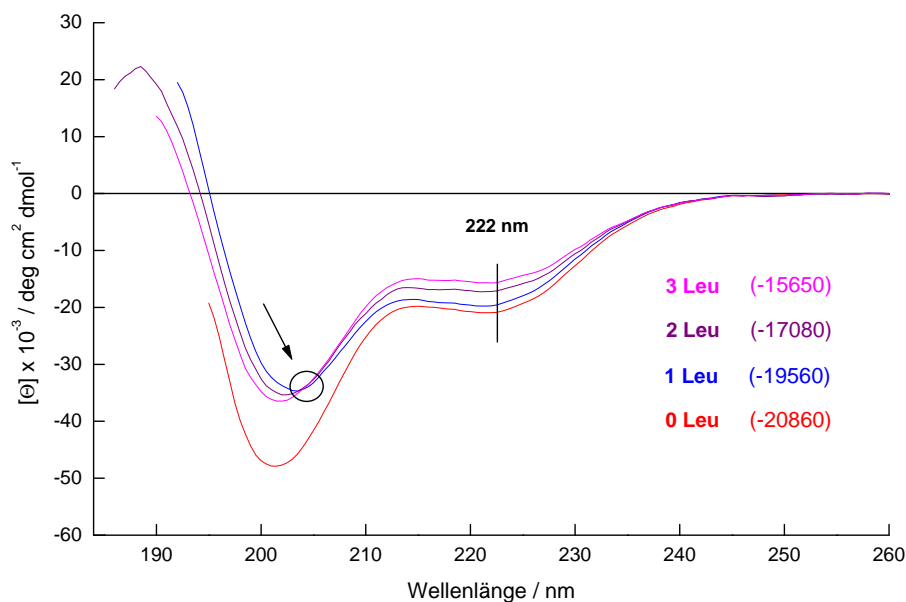


Abbildung 5.44: CD-Spektren der Nonadekapeptide mit 1 bis 3 Leu-Insertionen aufgezeichnet in NaF-haltigem Puffer. Schichtdicke der Quarzküvette: 0,2 cm, Peptidkonzentrationen: 300...600 μ M.

Die CD-Spektren der **Abbildung 5.44** zeigen typische Konturen der Überlagerung von α -Helix und ungeordneter Struktur mit dem ersten Minimum bei 222 nm und dem zweiten Minimum zwischen 201 und 204 nm. Das charakteristische Maximum im fernen UV (~ 190 nm) ist nur bei einer der vier Proben (2L) andeutungsweise zu erkennen. Der isospektische Punkt (*isodichroic point*) tritt bei 204 nm auf und deutet darauf hin, dass jeder

⁵Die englische Bezeichnung *absorbance* wird im deutschen Sprachgebrauch gelegentlich mit dem Begriff der 'Absorption' übersetzt, wenngleich im strengen Sinn der Begriff der 'Extinktion' verwendet werden muss.

Aminosäurerest nur eine der beiden Konformationen (Helix oder *random coil*) einnimmt. In der [Abbildung 5.44](#) sind in der Legende die Werte für die Elliptizität der einzelnen Proben angegeben. Der höchste Helix-Gehalt ist im Referenzpeptid zu erkennen, dessen $[\Theta_{222}]$ -Wert geringfügig niedriger, jedoch in vergleichbarer Größordnung mit Studien an Polypeptiden mit ähnlicher Sequenz liegen [25, 24, 84, 85, 91]. Mit der Zunahme an Leu-Insertionen verringert sich in der Folge 1 Leu \rightarrow 2 Leu \rightarrow 3 Leu die Elliptizität $[\Theta_{222}]$ und weist signifikant auf die Reduzierung der Helixstruktur hin.

5.3.3 Auswertungen der Mikro-Raman-Spektroskopie

Die helikalen Modellpeptide wurden als lyophilisierte Proben mit dem Mikro-Raman-Aufbau (LabRam) untersucht, wobei die 514 nm Linie eines Argon-Ionen-Lasers zur Anregung verwendet wurde. Der Laser-Strahl wurde mit dem Mikroskop-Objektiv (Vergrößerung 100-fach) auf die Probe fokussiert. Das gesamte Raman-spektroskopische Datenmaterial über die helikalen Modellpeptide umfasste mehr als 300 Einzelspektren. Von diesen ist mit der nachfolgenden Darstellung ein Beispiel der Original-Daten im Wellenzahlenbereich von 800 bis ~ 1750 cm^{-1} herausgegriffen.

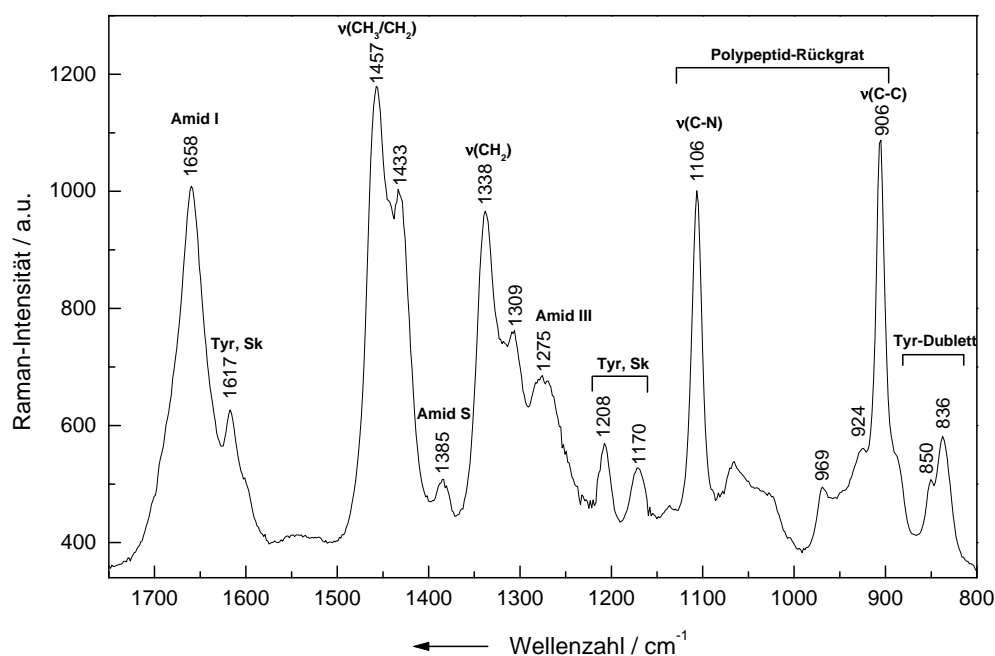


Abbildung 5.45: Beispiel eines Mikro-Raman-Spektrums (Original-Daten), aufgenommen an einer lyophilisierten Probe des Referenzpeptids bei Anregung mit $\lambda_0 = 514,5$ nm. (Sk – Seitenkette).

Das Spektrum der [Abbildung 5.45](#) demonstriert stellvertretend für die übrigen Messungen das hohe S/N-Verhältnis mit einem auffallend geringen Untergrund und zeigt die gute Auflösung der charakteristischen Raman-Schwingungen, die zur Sekundärstrukturanalyse herangezogen wurden. Die beobachteten Wellenzahlen der beiden wichtigsten Amidschwin-

gungen liefern übereinstimmend den Hinweis auf die dominant vorhandene Helix-Struktur. Die deutlich erkennbare AIII-Bande bei 1275 cm^{-1} und die symmetrische Form der AI-Bande bei 1658 cm^{-1} weisen auf den hohen Grad an Strukturierung der Polypeptidkette hin [104].

Die Schwingungen des Polypeptidrückgrates im niedrigen Wellenzahlenbereich sind klar separiert. Von diesen können die beiden stärksten Linien bei 1106 cm^{-1} und bei 905 cm^{-1} den $\nu(\text{C-N})$ - bzw. den $\nu(\text{C-C})$ -Schwingungen zugeordnet werden. Die mäßig intensive Amid S-Bande bei 1385 cm^{-1} signalisiert das Vorhandensein anteiliger *random coil*-Konformation. Drei Schwingungsmoden niedriger Intensität stammen von der Tyr-Seitenkette (1617 , 1208 und 1170 cm^{-1}) und am äußerst rechten Spektrenrand ist das charakteristische Tyr-Dublett zu erkennen. Die intensivste Raman-Linie bilden die $\nu(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$ -Schwingungen bei 1457 cm^{-1} . Sie ist von einer schwächeren Linie überlagert (1433 cm^{-1}), deren Ursprung unklar ist. Alle beobachteten Raman-Banden der Abbildung 5.45 sind mit den Wellenzahlen und den getroffenen Zuordnungen in der Tabelle 5.10 zusammengestellt.

Tabelle 5.10: Zuordnung der Raman-Linien (Wellenzahlen in cm^{-1}) im Referenzpeptid mit der Sequenz YGGKAAAKAAAKAAAK. # Zuordnung nicht gesichert oder nicht möglich.

Wellenzahl	Zuordnung
1658vs	Amid I
1617w	Tyr, Seitenkette
1457vs	$\nu(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$
1433sh	#
1385vw	Amid S
1338vs	$\nu(\text{CH}_2)$ #
1309s	#
1275ms	Amid III
1208mw	Tyr, Seitenkette
1170w	
1106vs	$\nu(\text{C-N})$
969vw	$\nu(\text{C-C})$
924w	#
905vs	$\nu(\text{C-C})$
850vw	Tyr-Dublett
836w	

5.3.4 Ergebnisse der 2D-NMR-Spektroskopie

Aus der Serie der Nonadekapeptide wurden die beiden Proben mit der größten Anzahl von Insertionen (3L und 3I)⁶ für die NMR-Untersuchungen ausgewählt. Die Messungen waren als Vorversuche konzipiert und sollten zunächst zur Klärung einiger technischer Fragen beitragen. Wie bereits im Kapitel 5.2.9 angesprochen, gehört die sorgfältige Auswahl experimenteller Parameter und geeigneter Pulssequenzen zu den notwendigen Vorbedingungen, unter denen NMR-Spektren erfolgreich aufgenommen werden können. Daneben sind weitere Faktoren bei der Aufzeichnung von NMR-Spektren mit guter Auflösung ausschlaggebend, damit die sequenzspezifische Zuordnung der beobachteten Kreuzkorrelationen gewährleistet werden kann. Beispielsweise spielt die Stärke des äußeren Magnetfeldes eine entscheidende Rolle, aber auch die Probenreinheit und die Probenkonzentration, ebenso wie ein möglichst vollständiger Austausch ($^1\text{H} \rightarrow ^2\text{D}$) der labil gebundenen Protonen. Für die ^1H - und ^{13}C -NMR-Untersuchungen wurde ein DMX 600 Spektrometer (Bruker) verwendet, mit dem COSY-, ROESY-, TOCSY-, HMQC- und HMBC-Experimente durchgeführt wurden. Die Probenvorbereitungen verliefen analog wie bei den Alanin-Prolin-Polypeptiden (vgl. Kap. 5.2.9), wonach im Anschluss an das Lösen in einem 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer (s. Anhang C) die Polypeptide zweimal in D_2O gelöst und wiederholt lyophilisiert wurden. Für die NMR-Messungen waren die Konzentrationen der Polypeptidlösungen auf 5 mg/ml (ca. 2,5 mM) eingestellt.

Mit der Abbildung 5.46 ist beispielhaft das $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum der Probe 3L in einem kleinen Bereich mit den chemischen Verschiebungen von 0,5 bis 4,5 ppm herausgegriffen. Das Spektrum demonstriert die zuvor angesprochene Problematik und zeigt eine geringe spektrale Auflösung. Das Polypeptid 3L ist aus 5 verschiedenen Aminosäuren (Ala, Leu, Lys, Gly, Tyr) aufgebaut, von denen zwei ein vergleichsweise einfaches Spinsystem bilden (Ala, Gly), deren chemische Verschiebungen im 2D-NMR-Spektrum größtenteils zugeordnet werden konnten. Dagegen war die detaillierte Spektren-Analyse bei den komplexen Spinsystemen des Leu ($\text{A}_3\text{B}_3\text{MPTX}$) und des Lys ($\text{A}_2(\text{F}_2\text{T}_2)\text{MPX}$) nicht möglich. Im COSY-Spektrum waren die α -Protonen des Ala und die des Lys zu einem breiten Multiplett überlagert. Ebenso bildeten die Methylgruppen der insgesamt 9 Ala-Reste ein Multiplett mit hoher Signalintensität, deren sequenzspezifische Zuordnung wegen der zahlreichen Überlagerungen ausgeschlossen war. Die einzigen Aminosäuren mit gut aufgelösten Kreuzkorrelationen waren Tyr und Gly, deren Signale gesichert zugeordnet werden konnten.

Das breite Multiplett der Ala- α -Protonen zeigte chemische Verschiebungen, die mit 0,16 bis 0,36 ppm signifikant von den typischen *random coil*-Werten entfernt lagen. Daraus lässt sich die helikale Strukturierung im inneren Teil der Polypeptidkette interpretieren. Dagegen war der aminoternale Bereich wenig fixiert. Insbesondere deuteten die hohen 3J -Kopplungskonstanten der beiden Tyr-Reste ($^3J > 10,3$ Hz und $^3J > 12,4$ Hz) auf ein hohes Maß von ungeordneter Konformation hin.

⁶Sequenzen und Probenbezeichnungen sind dem Anhang D zu entnehmen.

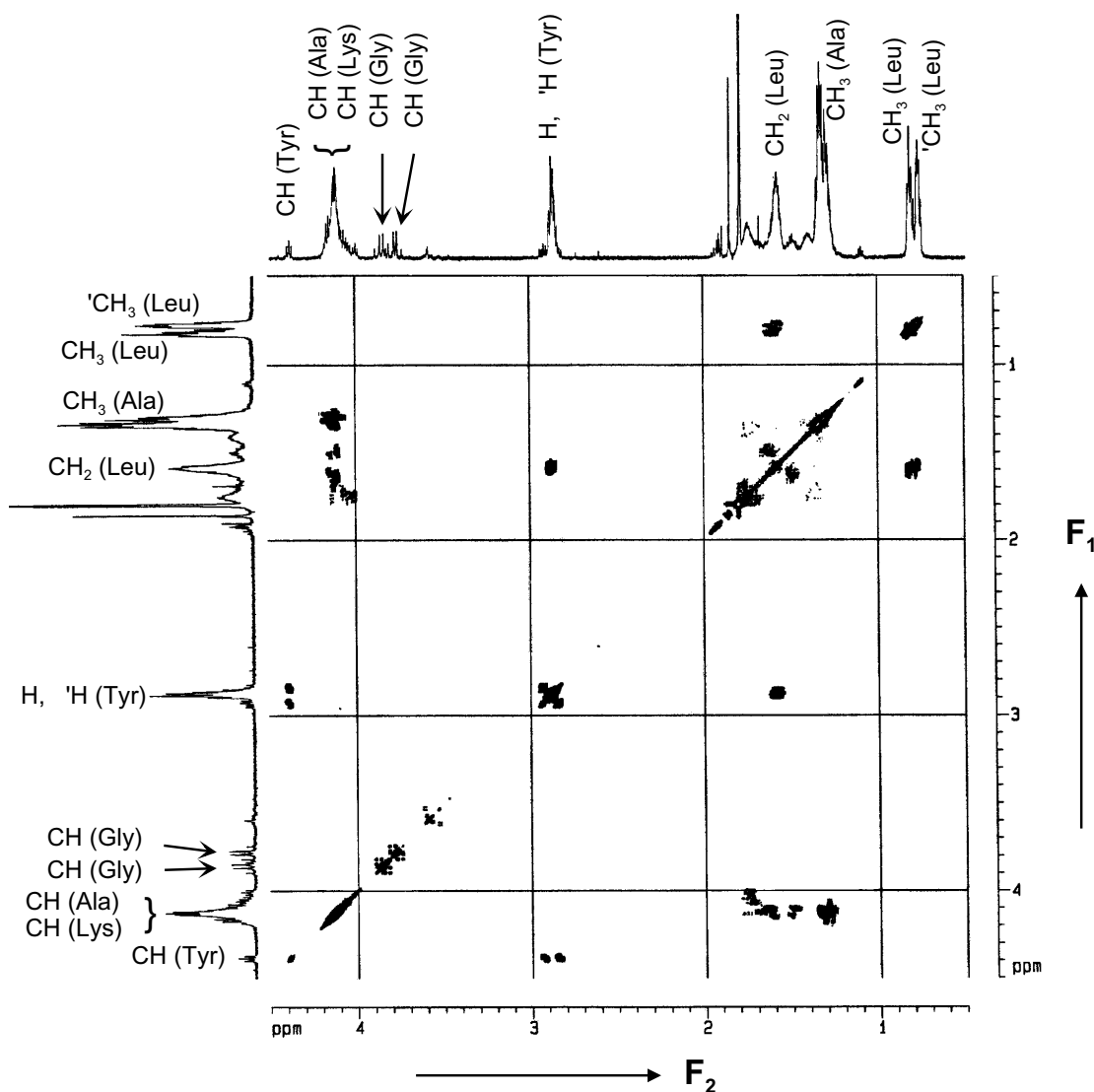


Abbildung 5.46: Zweidimensionales 600 MHz NMR-Spektrum der Probe 3L mit drei Leu-Insertionen. Bei den eindimensionalen Spektren (^1H -Resonanzen am oberen und linken Rand) entspricht die Abszisse der F_2 -Achse und die Ordinate der F_1 -Achse.

Qualitativ ähnliche Ergebnisse konnten aus den NMR-Experimenten der zweiten Probe 3I (nicht abgebildet) gewonnen werden. Die Strukturuntersuchungen hatten gezeigt, dass bei diesen vergleichsweise großen Molekülen mit 19 Aminosäuren andere Pulssequenzen gewählt werden müssen, damit eine verbesserte Auflösung für die sequenzspezifische Zuordnung erreicht werden kann.

5.3.5 Quantitative Konformationsanalyse

Alle Polypeptide aus der Serie der Nonadeka-peptide mit Leu- und Ile-Insertionen wurden als lyophilisierte Proben mit dem Mikro-Raman-Aufbau (LabRam) spektroskopisch untersucht (s. Anhang). Zur Anregung wurde die 514,5 nm-Linie eines Argon-Ionen-Lasers mit niedriger Ausgangsleistung (< 100 mW) eingesetzt, um Photozerstörung oder partielle Denaturierung durch extreme, lokale Probenerwärmung zu vermeiden.

Von jeder Probe wurden zwischen 20 und 30 Raman-Spektren aufgezeichnet, so dass für die statistische Auswertung eine größere Datenmenge zur Verfügung stand. Die Spektrenauswertung erfolgte analog zur Konformationsanalyse der Alanin-Prolin-Polypeptide. Vor der Datenprozessierung mußte wiederum, wie im Kapitel 5.2.7 bereits diskutiert, in jedem Spektrum die unterschiedliche Anzahl von CH_2/CH_3 -Gruppen in den variierenden Probesequenzen mit dem entsprechender Korrekturfaktor rechnerisch berücksichtigt werden. Die Subtraktion des Untergrundes erfolgte im ausgewählten Wellenzahlenbereich zwischen 800 und 1750 cm^{-1} mit Hilfe des Software-Paketes LabSpec (Jobin Yvon) nach der Anpassung einer Polynomfunktion 3. Grades. Nach der Normierung aller Spektren auf die Referenzlinie ($\nu(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$) wurden für die quantitative Konformationsanalyse die relativen Intensitäten, die Mittelwerte und die Standardabweichungen mehrerer struktur-sensitiver Raman-Linien ermittelt.

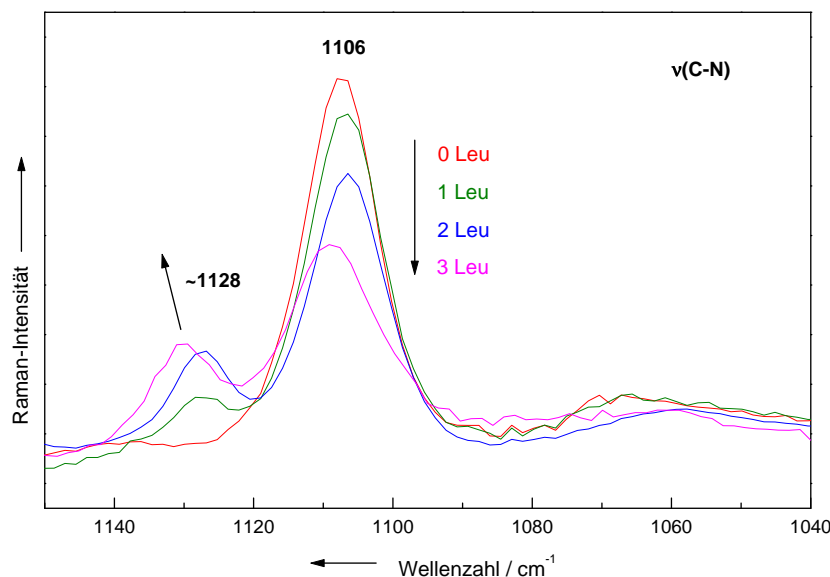


Abbildung 5.47: Spektraler Ausschnitt aus vier Mikro-Raman-Spektren im Bereich der C-N-Streckschwingung bei 1106 cm^{-1} aus der Serie mit Leu-Insertionen in den helikalen Nonadeka-peptiden. Der Untergrund wurde mit einem Basislinienfit abgezogen und alle Spektren sind auf die CH_2/CH_3 -Referenzlinie normiert.

Als Beispiel für die Ergebnisse der beschriebenen Auswertungstechnik sind mit der **Abbildung 5.47** vier Mikro-Raman-Spektren zusammengestellt. Die gute Übereinstimmung der überlagerten Spektren aus der Leu-Serie (0 Leu, ... , 3 Leu) demonstriert die Ho-

mogenität des Untergrundes, der mit Hilfe eines Basislinienfits abgezogen wurde. Die Intensitäten der $\nu(\text{C-N})$ -Schwingung lassen die signifikanten Änderungen erkennen, die von den Insertionen der Leu-Reste hervorgerufen werden. Ihre Positionen zeigen (zentriert um die Wellenzahl $\sim 1106 \text{ cm}^{-1}$) geringe Schwankungen, die jedoch in der statistischen Konformationsanalyse nicht berücksichtigt wurden.

Die Ergebnisse der Konformationsanalyse werden im Folgenden als Diagramme mit den zugehörigen Fehlerbalken wiedergegeben, bei denen jeweils die Serien mit den Leu- und Ile-Insertionen zum direkten Vergleich nebeneinander abgebildet sind. Die Intensitäten der untersuchten Linien des Referenzpeptids dienen dabei als Bezugspunkt (Normierung 1) für die beiden Polypeptidserien, in denen eine anwachsende Zahl von Leu- bzw. Ile-Resten auf der Position von Alanin ausgetauscht wurde.

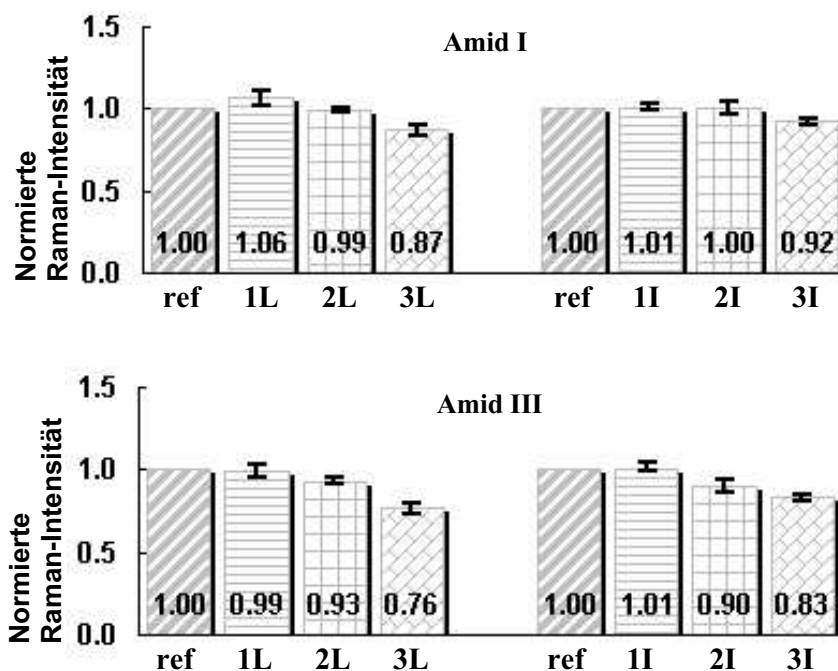


Abbildung 5.48: Relative Intensitätsänderungen der AI- und der AIII-Banden in den Nonadekapeptidserien mit 1 bis 3 Leu-Insertionen (**links**) und mit 1 bis 3 Ile-Insertionen (**rechts**).

Wie den Balkendiagrammen der [Abbildung 5.48](#) zu entnehmen ist, verhalten sich die relativen Intensitäten beider Schwingungen der Polypeptidbindung (AI und AIII) bei den sukzessiven Aminosäure-Insertionen nahezu indifferent. Ein schwacher Trend der Intensitätsreduzierung ist bestenfalls bei der AIII zu beobachten ([Abb. 5.48](#), unten), wogegen in den AI-Banden zufällige Streuung um den Bezugswert 1 auftritt. Die geringe Sensitivität hinsichtlich der Strukturänderungen in der AI-Bande ist ein überraschendes Ergebnis. Es kann jedoch als ein Hinweis dahingehend interpretiert werden, dass die hier betrachteten sieben unterschiedlichen Nonadekapeptide starke Variationen in ihren hygroskopischen Eigenschaften aufweisen. Die Überlagerung der AI-Bande durch die starke Raman-Streuung an Wassermolekülen ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$) wurde bereits im Zusammenhang

mit den Untersuchungen an Polypeptiden in Lösung diskutiert (vgl. Kap. 5.2.3). Die vorliegenden Ergebnissen lassen erkennen, dass auch die Raman-Messungen an lyophilisierten Proben von diesem Handicap nicht völlig befreit sind. Die Hygroskopizität von Polypeptiden und Proteinen ist eine intrinsische Eigenschaft, die sich aus der gegebenen Aminosäuresequenz ergibt. Es ist anzunehmen, dass zusätzliche Experimente, in denen der Feuchtigkeitsgehalt von lyophilisierten Proben durch entsprechende externe Maßnahmen kontrolliert wird, möglicherweise wenig Erfolg verspricht und den notwendigen technischen Aufwand vermutlich nicht rechtfertigen würde.

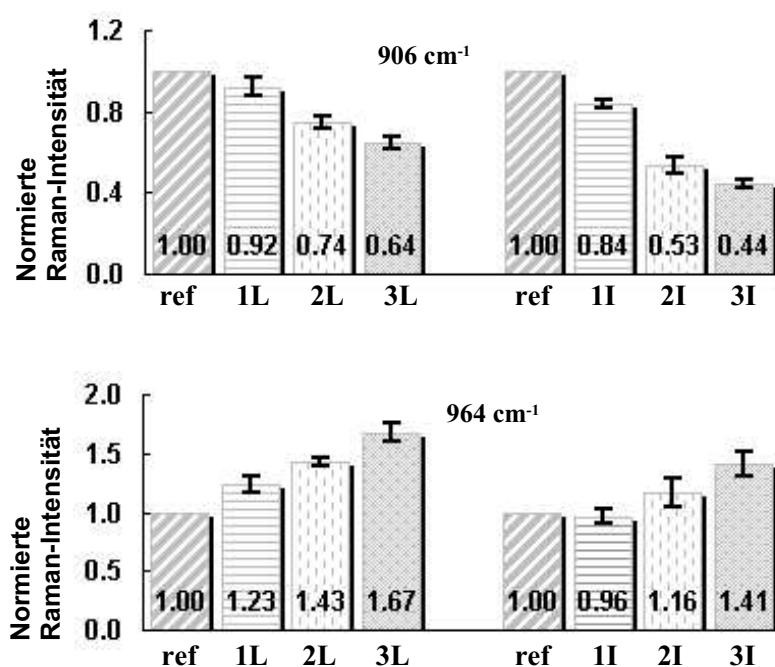


Abbildung 5.49: Relative Intensitätsänderungen der C–C-Schwingungen in den Nonadekapeptiden verursacht durch 1 bis 3 Leu- bzw. Ile-Insertionen.

Die beiden Schwingungen bei 906 und 964 cm⁻¹ zeigen klare, entgegengesetzte Trends im Intensitätsverlauf. Spiro und Gaber interpretierten die C–C-Streckschwingung bei 900 cm⁻¹ als einen Konformationsmarker, dessen Raman-Linie unter denaturierenden Bedingungen in Proteinen eine Abnahme der Intensität zeigte [104]. Die Resultate, die in Abbildung 5.49 (oben) präsentiert werden, untermauern diese Aussage. Die Insertion von Leu- und Ile-Resten ruft eine Abnahme des Helix-Gehaltes hervor, die sich anhand der Linie bei 906 cm⁻¹ quantitativ erfassen lässt. Der entgegengesetzte Trend war bei den Alanin–Prolin–Polypeptiden zu beobachten, bei denen die Intensitätszunahme derselben Raman-Bande (906 cm⁻¹) in der Reihe APA₃ → APA₄ → APA₅ signifikant mit der Strukturzunahme korreliert war (vgl. Abb. 5.31).

Die Linie bei 964 cm⁻¹ zeigt im gesamten bisherigen Kontext ein unerwartetes Ergebnis. Über das Auftreten von schwachen Raman-Linien bei 959, 960, 963 und 964 cm⁻¹ wurde in verschiedenen Untersuchungen an Proteinen und Polypeptiden berichtet [104,

119, 139]. Darin wurde einmal die Linie den Vibrationen des Skelett-Gerüsts zugeschrieben [161], meist war jedoch keinerlei gesicherte Zuordnung angegeben. Die Untersuchungen an den Nonadekapeptiden (Abb. 5.49, unten) und an den Alanin-Prolin-Polypeptiden (vgl. Abb. 5.31) führten bei der 964 cm^{-1} -Linie zu einem eklatanten Widerspruch. Es kann geschlussfolgert werden, dass diese Linie bei quantitativen Konformationsanalysen als Strukturmarker nicht in Betracht zu ziehen ist und dass es sich möglicherweise um selektive C-C-Streckschwingungen der Seitenketten handelt.

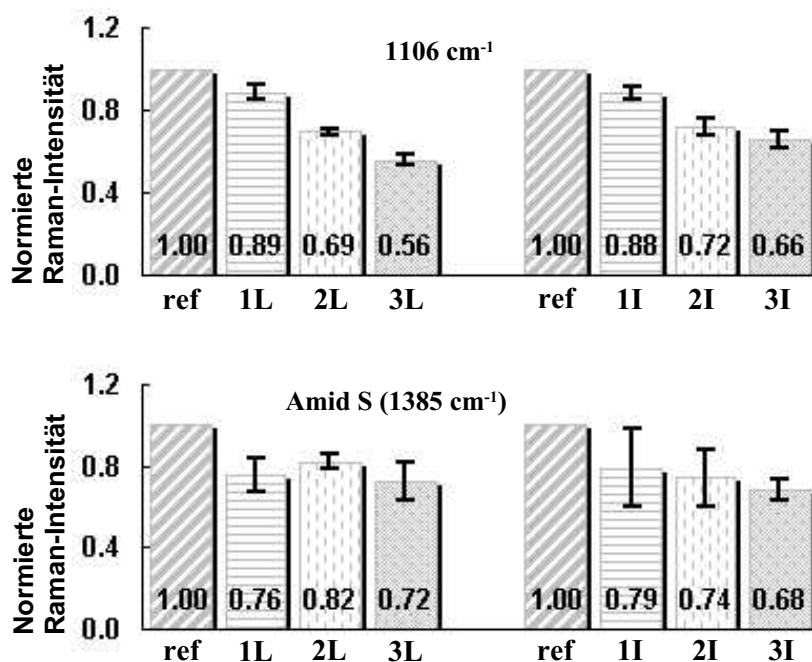


Abbildung 5.50: Relative Intensitätsänderungen der C–N–Streckschwingung bei 1106 cm^{-1} und der C_{α} –H–Streckschwingung (Amid S) bei 1385 cm^{-1} in den Nonadekapeptiden mit Leu-Insertionen (links) und in der Serie mit Ile-Insertionen (rechts).

Die Schwingungsintensitäten des Polypeptidrückgrates bei 1106 cm^{-1} zeigen in der Abbildung 5.50 (oben) signifikante Korrelationen zu den Insertionen der aliphatischen Seitenketten. Der Helix-Gehalt reduziert sich auf 56 % bzw. auf 66 % auf Grund der Leu- oder Ile-Insertionen. Der Trend der C–N–Streckschwingung ist konform mit dem der C–C–Streckschwingung (vgl. Abb. 5.49, oben) und unterstreicht die Sensitivität beider Raman-Linien, die als Strukturmarker bei der quantitativen Sekundärstrukturanalyse herangezogen werden können.

Das Verhalten der Amid S-Bande (Abb. 5.50, unten) bestätigt die Aussage, die bereits zuvor im Zusammenhang mit den Alanin-Prolin-Polypeptiden getroffen worden war (vgl. Kap. 5.2.8, Abb. 5.32, unten). Die Amid S-Bande erscheint wenig sensitiv gegenüber den Insertionen von Leu- oder Ile-Resten. Die Intensitäten der Linie zeigen große Streuungen und lassen keine klare Tendenz in der Änderung des Helix-Gehaltes erkennen.

Die Untersuchung der Raman-Linie bei 924 cm^{-1} lieferte in der Gegenüberstellung der Polypeptide mit Leu- und Ile-Insertionen ein überraschendes Ergebnis (Abb. 5.51). Wie bereits im Kapitel 5.2.8 erwähnt, kann für diese Schwingung keine Zuordnung getroffen werden. Bei den Alanin-Prolin-Polypeptiden wurde die Kettenlänge in der Reihenfolge $\text{APA}_3 \rightarrow \text{APA}_4 \rightarrow \text{APA}_5$ mit Ala-Resten variiert, wogegen in den Nonadeka-peptiden einzelne Ala-Reste gegen Leu oder Ile (ohne Veränderung der Länge der Polypeptidkette) ausgetauscht wurden. Vergleicht man die Analysenergebnisse der Abbildungen 5.51 und 5.32 (links), so liegt die Vermutung nahe, dass die beobachtete Linie nicht den Ala-Seitenketten und ebensowenig den Schwingungen des Polypeptidrückgrates zuzuordnen ist. Offensichtlich ist diese Raman-Bande für Aussagen über Konformationsänderungen ungeeignet.

Die Serie mit den Ile-Insertionen hingegen (Abb. 5.50, rechts) ließ eine signifikante Korrelation der Linien-Intensität erkennen. In der Gegenüberstellung mit dem Referenzpeptid zeigte sich eine Zunahme der Intensitäten um 34 % (1 Ile), um 58 % (2 Ile) und um 78 % (3 Ile). Die Unterschiede im molekularen Aufbau des Leu-Restes (γ -branched) und des Ile-Restes (β -branched) wurden im Kapitel 3.4.3 angesprochen (s. Abb. 3.17). Die vorliegenden Ergebnisse legen daher die Vermutung nahe, dass es sich um eine selektive Schwingungs-mode der Methyl- und Methylengruppen handelt, die dem veränderten Aufbau der Seitenkette zugeordnet werden können.

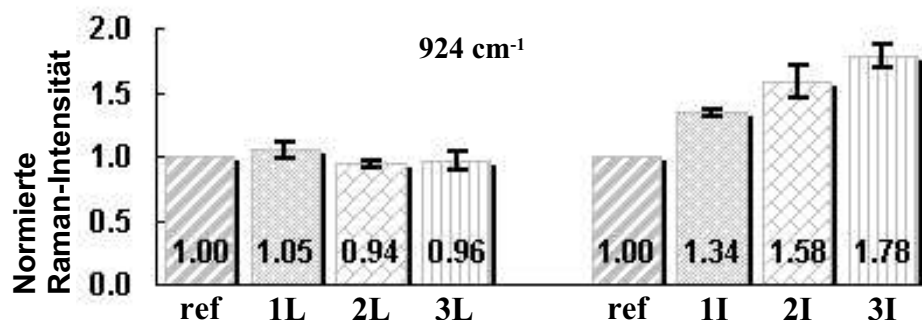


Abbildung 5.51: Relative Intensitätsänderungen der Raman-Linie bei 924 cm^{-1} (Zuordnung nicht gesichert) in den Nonadeka-peptiden mit Leu-Insertionen (links) und in der Serie mit Ile-Insertionen (rechts).

5.3.6 Molecular Modeling Experiment

Zum Vergleich der experimentell und theoretisch ermittelten Daten wurde für das Referenzpeptid in einem *Molecular Modeling* Experiment ein Strukturmodell erstellt. Dabei wurde das Software-Paket „Swiss-PDB-Viewer“ eingesetzt, das auf der Internetseite der Schweizer Proteindatenbank „SwissProt“ zu finden ist (<http://www.expasy.ch/sppdb>). „Swiss-PDB-Viewer“ lässt sich auf einem Computer installieren und mit moderaten Rechnerzeiten bedienen. Es dient der graphischen Darstellung und molekular-dynamischen Analyse von biomolekularen Strukturen. Das Programm erleichtert die Suche nach Strukturhomologien, die Berechnung von H-Bindungen sowie von Abständen und Winkeln zwischen einzelnen Atomen. Darüber hinaus können Mutationen von Aminosäuren in Proteinsequenzen vorgenommen werden, seitdem zusätzlich einige der gängigen Algorithmen zur Energieminimierung (z.B. *force field calculation*, GROMOS, [162]) in den Quellcode integriert wurden. Bei der Dateneingabe im „Swiss-PDB-Viewer“ müssen Kristallstrukturdaten im pdb-Format eingelesen werden, die von der Protein Datenbank, Brookhaven (<http://www.rcsb.org/pdb/>), abgerufen werden können.

Als Grundlage für das Modell (s. Abb. 5.52) diente der Koordinatensatz aus der Protein-Datenbank, Brookhaven (PDB-Code: 1F88) mit den neuesten, hochaufgelösten Kristallstrukturdaten des Rhodopsinrezeptors [56]). Der Rhodopsin-Rezeptor besteht aus mehr als 300 Aminosäuren mit 7 transmembranen Helices und mehreren intra- und extrazellulären Schleifen (vgl. Kap. 5.1). Aus dem Datensatz des Rhodopsin-Rezeptors wurden die Koordinaten der ersten transmembranen Helix entnommen und für das Modelling-Experiment am Referenzpeptid eingesetzt. Anschließend wurde jede Aminosäure aus der Helix-Sequenz des Rezeptorproteins mutiert, bis die Sequenz des Referenzpeptids vorlag. Nach jedem Mutationsschritt erfolgte die Energieminimierung mit Hilfe des im Programm implementierten Algorithmus GROMOS96 [162].

In der Abbildung 5.52 sind die Aminosäuren Ala, Lys, Gly und Tyr durch unterschiedliche farbliche Kennzeichnungen hervorgehoben. Die schraubenförmige Anordnung der vier hydrophilen Lys-Reste, deren Seitenketten in annähernd spitzem Winkel von der Helixachse weggespreizt sind, trägt zur H₂O-Löslichkeit des Polypeptids bei. Mit Ausnahme des C-terminalen Lys-Restes (Lys19) sind alle Aminosäuren am Aufbau der insgesamt 15 H-Brücken zur intramolekularen Strukturstabilisierung beteiligt. Die beiden Gly-Reste am N-Terminus (Gly2 und Gly3) unterstützen die sterisch begünstigte Anordnung von Tyr1 und Lys4, so dass deren Seitenketten den größtmöglichen Abstand zueinander einnehmen. In der N-terminalen und in der mittleren Alanin-Gruppe mit den Resten Ala5...Ala8 und Ala10...Ala13 bildet jeder Rest zwei H-Brücken jeweils zur viertnächsten Aminosäure aus. Dagegen ist bei den Resten der C-terminalen Alanin-Gruppe (Ala15...Ala18) nur eine H-Brücke pro Rest zu erkennen. Der stärkere Beitrag zur Helixstruktur wird somit von den N-terminalen Aminosäuren bestritten, wogegen am C-Terminus die Helixstruktur aufgelockert wird und eine „ausgefranzte“ (im Englischen mit dem Ausdruck *frayed* bezeichnete) Struktur annimmt.

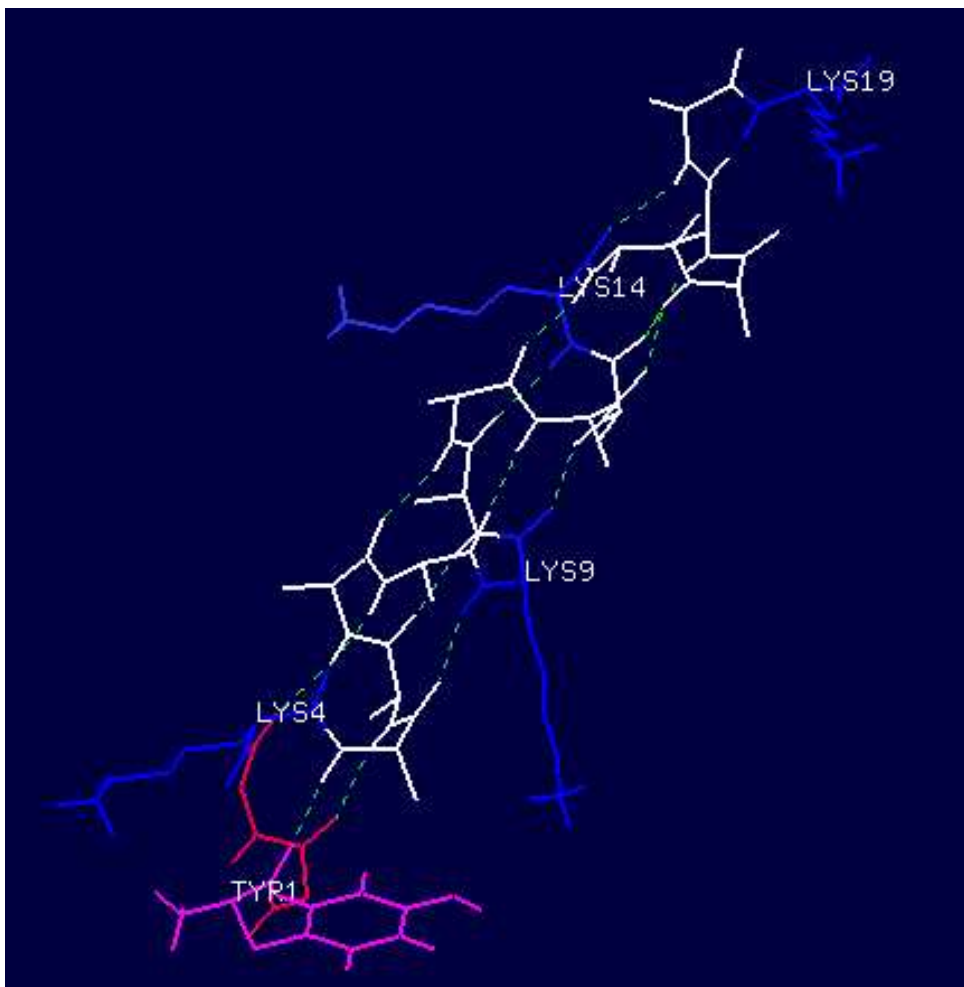


Abbildung 5.52: Molekülstruktur des Referenzpeptids aus der *Molecular Dynamics Simulation* mit „Swiss-PDB-Viewer“. Die vier verschiedenen Aminosäuren und die H-Brücken sind durch Farbabstufung hervorgehoben: Ala – weiß, Lys – blau, Gly – rot, Tyr – magenta, H-Brücken – grüne, unterbrochene Linien.

Die Beobachtung der Strukturaufflockerung am C-Terminal wird mit der Analyse des Ramachandran-Diagramms (Abb. 5.53) bestätigt. Alle N-terminal gelegenen Aminosäuren bis einschließlich zur Position Lys14 nehmen dihedrale Winkel ein, die in α -Helices kennzeichnend sind ($\phi = -59^\circ$, $\psi = -47^\circ$). Die Reste Ala15...Ala18, die nur mit einer H-Brücke zur Strukturstabilisierung beitragen, befinden sich im Ramachandran-Diagramm innerhalb des Bereiches, der für Helices erlaubt ist. Ihre Konformationswinkel ϕ und ψ weichen jedoch stärker von den idealen Werten ab. Die Darstellung im Diagramm (Abb. 5.53) verdeutlicht, dass der überwiegende Beitrag zur Helix-Stabilisierung von den Aminosäuren stammt, die im inneren Bereich der Sequenz liegen. In diesem Punkt zeigt sich Übereinstimmung mit den Vorhersagen aus der *Helix-coil*-Theorie, die im Kapitel 5.3.7 diskutiert werden.

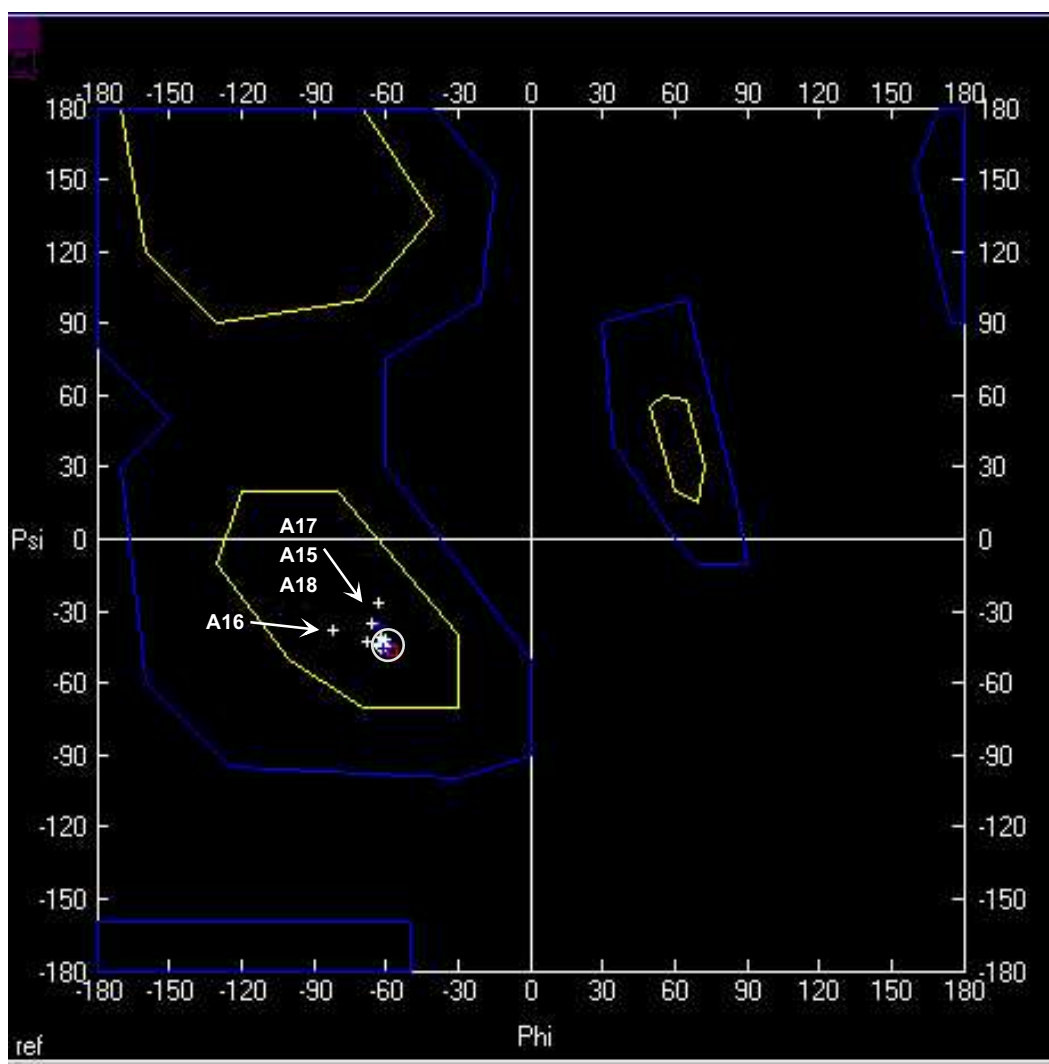


Abbildung 5.53: Ramachandran-Plot des Referenzpeptids. Der gelb umrandete Bereich im linken unteren Quadranten begrenzt den gesamten Konformationsraum der Winkel ϕ und ψ , der in α -helikalen Strukturen besetzt werden kann. Die vier C-terminalen Alanin-Reste (Ala15...Ala18) zeigen eine Abweichung von den ϕ/ψ -Werten der idealen α -Helix ($\phi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$).

5.3.7 Sekundärstrukturvorhersagen

Die Theorie des Helix-coil-Phasenübergangs (Lifson-Roig-Theorie) befasst sich mit der Vorhersage von Helixstrukturen in Polypeptiden und Proteinen (vgl. Kap. 2.3). Darin werden die helixbildenden Eigenschaften der 20 proteinogenen Aminosäuren durch zwei Parameter klassifiziert. Nach der Lifson-Roig-Theorie kann der Beginn der Helixfaltung durch den Nukleationsparameter σ und der weitere Helixaufbau durch den Propagationsparameter s beschrieben werden. Die Präferenzen der Aminosäuren für die helikale, sowie für die β -Faltblatt- und β -turn-Konformation (P_α , P_β , P_t) wurden aus statistischen Untersuchungen an einer Vielzahl von Proteinen abgeleitet und in einem vorangegangenen

nen Kapitel vorgestellt (s. Tab. 2.4, Seite 18). Aus diesen empirisch ermittelten relativen Häufigkeiten für das Auftreten in Sekundärstrukturen wurde eine Rangordnung (Präferenz P) für die Aminosäuren erfasst, die durch eine Zahl nahe des Wertes Eins ($P_{\alpha,\beta,t} > 1$, $P_{\alpha,\beta,t} < 1$) beschrieben wird. Diese Zahlen wurden wiederholt mit den experimentellen Ergebnissen aus der CD- und NMR-Spektroskopie abgeglichen, bestätigt und/oder korrigiert [23, 24, 30, 83, 84, 92].

Greift man aus der Tabelle 2.4 die Werte für die 6 Aminosäuren heraus, die in den Sequenzen der hier untersuchten helikalen Modellpeptide auftreten, so kommen in deren relativen Häufigkeiten die unterschiedlichen helixbildenden ($P_\alpha > 1$) oder helixbrechenden ($P_\alpha < 1$) Eigenschaften zum Ausdruck:

Rest	P
Ala	1,41
Leu	1,34
Lys	1,24
Ile	1,09
Tyr	0,74
Gly	0,43

Die Gegenüberstellung macht deutlich, dass Ala wesentlich am Aufbau von Helixstrukturen beteiligt ist, wogegen Tyr und Gly den helixbrechenden Aminosäuren zuzuordnen sind. Die Reste Leu und Ile tragen mit mäßig starken Tendenzen zum Helix-Aufbau bei, wobei Ile mit seiner relativen Häufigkeit sehr nahe beim Wert 1 ($P_\alpha = 1,09$) gelegentlich auch als „Helix-indifferent“ bezeichnet wird [91].

Die zuvor diskutierten Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit zur Strukturvorhersage verwendet. Dazu wurde der Helix-coil-Algorithmus verwendet, dessen Quellcode über das Internet bezogen werden kann (<http://www.bi.umist.ac.uk>). Das Programm berechnet aus einer 26 x 26 Matrix die Verteilungsfunktion Z (vgl. Kap. 2.3) für jede individuelle Aminosäure in einer beliebigen Sequenz, die für den Programmablauf als Eingabedatei vorgelegt wird.

Die Abbildung 5.54 zeigt in einer graphischen Übersicht den Verlauf des Helix-Gehaltes für die beiden Serien der Nonadekapeptide mit 1 bis 3 Leu- bzw. Ile-Insertionen. Der höchste Helix-Anteil zeigt sich erwartungsgemäss im Referenzpeptid, in dessen Sequenz die größte Anzahl des Helix-Bildners Ala auftritt. Die Helixstruktur wird in Richtung der beiden Peptidtermini verringert („ausgefranzt“) und am Amino-Terminus wirken die Tyr- und Gly-Reste wie Helixbrecher.

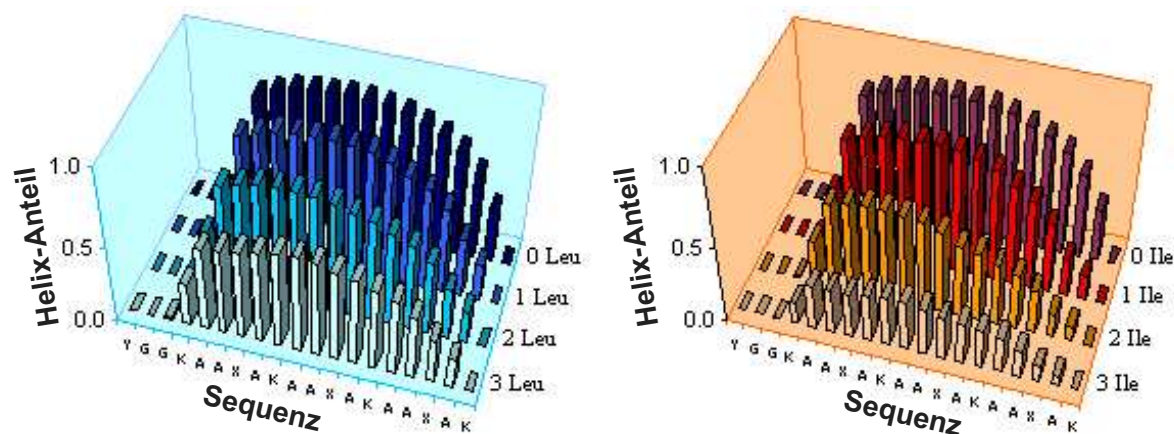


Abbildung 5.54: Vorhersage der Helix-Anteile in den Nonadekapeptiden mit Leu-Insertionen (**links**) und in der Serie mit Ile-Insertionen (**rechts**). Entlang der Abszissen sind die Sequenzen $YGGK(AAXAK)_3$ in einer verallgemeinerten Form angegeben, worin die Bezeichnung 'X' jene Positionen kennzeichnet, an denen 1, 2 und 3 Leu- bzw. Ile-Insertionen vorgenommen wurden.

In einer Gegenüberstellung (Tab. 5.11) können die prozentualen Helix-Anteile verglichen werden und bestätigen, dass der Helix-Gehalt durch die Ile-Insertionen stärker abnimmt als durch die Leu-Insertionen.

Tabelle 5.11: Ergebnisse aus der Vorhersage mit dem Lifson-Roig-Algorithmus für die Nonadekapeptide mit Leu-Insertionen (**links**) und mit Ile-Insertionen (**rechts**).

Insertion	% Helix	Insertion	% Helix
0 Leu	87,1	0 Ile	87,1
1 Leu	83,4	1 Ile	80,3
2 Leu	73,3	2 Ile	56,9
3 Leu	62,1	3 Ile	32,2

Die Vorhersageergebnisse aus der Helix-coil-Theorie unterstützten die Aussagen des *Molecular Modeling Experiments* (Kap. 5.3.6) und zeigten gute Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Werten aus der CD- und Raman-Spektroskopie.

5.3.8 Sekundärstrukturuntersuchungen an Alanin–Prolin– und helikalen Modellpeptiden im Vergleich

Aus den Ergebnissen der Strukturuntersuchungen an den Prolin–haltigen und an den helikalen Modellpeptiden lassen sich Gemeinsamkeiten erkennen und Aussagen ableiten, weshalb in den nachfolgenden Anmerkungen der Blick auf beide Versuchsabschnitte gleichzeitig gerichtet werden soll.

In der kleinen Serie aus Alanin–Prolin–Polypeptiden beobachtet man überwiegend *random coil*–Konformation, bei der sich unter Verlängerung der Kettenlänge in der Reihenfolge $APA_3 \rightarrow APA_4 \rightarrow APA_5$ ein Zuwachs an Strukturierung detektieren lässt. In den Nonadekapeptiden dagegen bleibt die Länge der Polypeptidkette unverändert und alle Proben zeigen einen mehr oder minder hohen Helix–Gehalt, der partiell von *random coil*–Konformation begleitet wird. Durch sukzessive Insertionen, bei denen an ausgewählten Positionen Ala–Reste gegen 1 bis 3 Leu– bzw. Ile–Seitenketten ausgetauscht werden, nimmt die Helix–Struktur signifikant ab. Dabei zeigt die Aminosäure Isoleucin mehr Helix–abschwächenden Effekt als Leucin.

Anhand der Positionen von struktur–sensitiven Raman–Banden (AIII, AI) kann in einer ersten Zuordnung klassifiziert werden, welcher Sekundärstrukturtyp im Polypeptid überwiegend vorhanden ist. Die erhaltene Raman–Information über die Konformation wird durch die Ergebnisse aus komplementären spektroskopischen Methoden weitgehend bestätigt (CD) und ergänzt (2D–NMR). Allerdings sind die Verschiebungen der Raman–Linien gering und erlauben keine detaillierte Bestimmung der Strukturänderungen, die im einen Fall durch die Verlängerung der Polypeptidkette oder im anderen Fall durch den Austausch von Aminosäuren hervorgerufen werden.

Dagegen zeigen die vorliegenden Ergebnisse die Sensitivität der Untersuchungsmethode, mit der die Strukturzunahme bzw. Strukturabnahme quantifiziert werden kann. Die Veränderungen im Gesamtgefüge der Polypeptidkette, die durch einzelne (addierte oder substituierte) Aminosäuren ausgelöst werden, sind anhand der Intensitäten charakteristischer Raman–Linien nachweisbar. Neben den typischen Schwingungen aus den Amidbindungen (AIII und AI) reagieren insbesondere die C–C– und die C–N–Schwingungen des Polypeptidrückgrates sensibel auf den veränderten Strukturgehalt, der mit den Linien–Intensitäten signifikant korreliert ist. Somit können die Raman–Banden bei 906 und bei 1106 cm^{-1} als Strukturmarker zur quantitativen Analyse in Polypeptiden eingesetzt werden.

Vergleicht man die Größe der prozentualen Änderungen bei den vier angesprochenen Raman-Linien (AIII, AI, $\nu(\text{C-C})$ und $\nu(\text{C-N})$), die in den entsprechenden Abbildungen jeweils angegeben sind, so entsteht der Eindruck, dass die Intensitätsänderungen bei den kleinen Polypeptiden AlaPro(Ala)_n stärker zum Ausdruck kommen, als bei den (etwa drei bis vier Mal) größeren Modellpeptiden. Möglicherweise zeichnet sich darin bereits ein limitierender Trend der vorgestellten Analyse­methode ab. Es ist denkbar, dass in erheblich größeren Molekülen (z. B. in Proteinen mit > 300 Aminosäuren) die starke Korrelation zwischen Linien-Intensität und Strukturinhalt weiter verringert und nicht mehr beobachtbar ist.

Kapitel 6

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden der optischen Spektroskopie und die Kernspinresonanz zur Untersuchung der Sekundärstruktur von synthetischen Polypeptiden eingesetzt. Die bearbeiteten Fragestellungen sind zum überwiegenden Teil der Grundlagenforschung der Proteinfaltung zuzuordnen. Ein weiteres Themengebiet befaßt sich mit der Analyse der Struktur-Funktions-Beziehungen an einem Hormon-Rezeptor, auf dessen Ergebnisse zuerst eingegangen werden soll.

Beim Gonadotropin-freisetzenden Rezeptor (GnRH-R) lassen sich durch Analogieschlüsse und Homologievergleiche viele wesentliche Strukturmerkmale aus der Verwandtschaft mit anderen Rezeptoren ableiten, die zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gezählt werden. Das Interesse der Untersuchungen am GnRH-R konzentriert sich auf die dritte extrazelluläre Schleife (ECL3), die als Mikrodomäne bei der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung eine wichtige Rolle spielt. Die Aussage aus Computersimulationen, wonach die ECL3 in helikaler Konformation vorliegt, hatte die Ausführungen von molekularbiologischen Experimenten stark beeinflusst und zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt.

Die Mikro-Raman- und der FT-Raman-Messungen am synthetischen ECL3-Peptid zeigten weitgehende Übereinstimmung mit den Aussagen aus der CD-Spektroskopie. Der *loop* hat überwiegend ungeordnete Konformation und läßt keine Anzeichen von helikaler Strukturierung erkennen. Dieses Resultat wurde mit den 2D NMR-Messungen bestätigt und dahingehend verfeinert, dass im inneren Teil des *loops* ein geringer Grad von Strukturierung (β -*turn*) detektiert wurde. Mit diesen erweiterten Strukturinformationen wurde in einem Docking-Experiment aufgezeigt, wie die Wechselwirkung zwischen dem Hormon und dem Hormon-Rezeptor erfolgt. Die Interpretationen der Strukturuntersuchungen tendierten zum *induced fit* Modell, wonach der *loop* eine weitgehend flexible Struktur besitzt und erst in der Wechselwirkung mit dem Hormondekapeptid (GnRH) zur Adaption einer ausgewählten Konformation induziert wird. Die Ergebnisse belegten, dass die zuvor getroffene Aussage über eine vorhandene helikale Struktur im *loop* revidiert werden musste.

In drei Polypeptiden mit den Sequenzen APA₃, APA₄ und APA₅ waren die Strukturuntersuchungen auf die Peptidbindung zwischen der Iminosäure Prolin und der N-terminalen Aminosäure Alanin gerichtet. Die sterische Konstellation in der X-Pro-Bindung hat maßgeblichen Einfluss auf das Faltungspotenzial in Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen (PPIasen). Die katalytische Wirkung von PPIasen bei der Konformationsumwandlung in Proteinen lässt sich mit der anderer Faltungshelferproteine (Enzyme, Chaperone) vergleichen.

Die Auswertung der CD-spektroskopischen Messungen erlaubte lediglich eine qualitative Bestimmung der vorhandenen Sekundärstrukturtypen, da eine exakte Ermittlung der Konzentrationen in den Peptidlösungen nicht möglich war. Alle Proben zeigten typische Konturen mit Minima im fernen UV-Bereich, die für Polypeptide mit ungeordneter Konformation kennzeichnend sind.

Die Raman-Untersuchungen bestätigten die Aussagen aus der CD-Spektroskopie und lieferten ergänzende Information über die Polypeptidstruktur. Die Positionen der Amid-Banden (AI und AIII) signalisierten die überwiegend vorhandene *random coil*-Konformation. In der Gegenüberstellung von Lösungs- und Festkörperspektren bestätigte die gute Übereinstimmung struktur-sensitiver Raman-Linien, wonach die Polypeptide in der gelösten wie in der lyophilisierten Form die gleiche Konformation einnehmen. Diese Beobachtung rechtfertigt die Vorgehensweise bei der quantitativen Strukturanalyse, für die das spektrale Datenmaterial ausschließlich aus lyophilisierten Proben ermittelt wurde. Mit Raman-Messungen an getrockneten Polypeptiden umgeht man den Informationsverlust, der bei Lösungsspektren wegen der Überdeckung der Amid I-Bande durch das dominante Wassersignal in Kauf genommen werden muss. Der Einsatz der Mikro-Raman-Spektroskopie mit Anregung im sichtbaren Bereich ($\lambda_0 = 514,5 \text{ nm}$) erwies sich bei den Konformationsanalysen in mehrfacher Hinsicht als vorteilhaft. Neben dem ausgesprochen niedrigen Verbrauch an Probenmaterial ist in diesem Zusammenhang auch der Einsatz niedriger Laserausgangsleistungen ($\leq 100 \text{ mW}$) hervorzuheben, mit denen gut aufgelöste, fluoreszenzfreie Raman-Spektren mit geringem Untergrund und akzeptablem S/N-Verhältnis aufgezeichnet werden konnten. Die Methode schont die Proben und reduziert das Auftreten von Photodekomposition. Zudem ist durch die Spektroskopie an lyophilisierten Polypeptidproben die Problematik von Dimerisierungseffekten ausgeklammert, die in Raman-Messungen an Lösungen mit den notwendig hohen Konzentrationen die Ergebnisse der Konformationsbestimmung verfälschen kann.

Aus der Analyse der Raman-Linien bei 1484 und bei 1436 cm^{-1} (AIIp) konnte keine Aussage zur Konfiguration der X-Pro-Bindung, jedoch über die Stärke der H-Bindungen zwischen der Prolin-OH-Gruppe und dem Lösungsmittel getroffen werden. Die Präsenz dieser beiden Linien in den Festkörperspektren deutete darauf hin, dass nach dem Lyophilisieren eine unbekannte Zahl von Wassermolekülen am Polypeptid gebunden und am gesamten Strukturaufbau beteiligt bleibt. Es erscheint diskutabel, dass die Raman-Information aus den AIIp-Banden nach entsprechender Eichung zur quantitativen Bestimmung des Restwassergehaltes in getrockneten Proben herangezogen werden kann. Als ein mögliches

Anwendungsgebiet wäre die Analyse und Ableitung von Kontrollparametern denkbar, die im kryotechnischen Bereich für die Haltbarkeit und Lagerungsbedingungen von Biomolekülen relevant sind.

Die Frage nach der absoluten Konfiguration der X-Pro-Bindung wurde mit einer Reihe von Kernspinresonanzexperimenten mit dem Nachweis beantwortet, dass die Peptidyl-Prolyl-Bindung in der *trans*-Form vorliegt.

Die Raman-Untersuchungen an den Proben AlaPro(Ala)_n (mit $n = 3, 4, 5$) führten mit der statistischen Datenanalyse zu detaillierter Information über subtile Konformationsänderungen, die von einzelnen Aminosäuren ausgelöst werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich Strukturänderungen anhand der Linienintensitäten mit höherer Sensitivität detektieren lassen, als mit den Verschiebungen der Linienpositionen. Die relativen Intensitäten der AI, AIII, der C-C- und C-N-Streckschwingungen korrelierten signifikant mit der Länge der Polypeptidketten. Die quantitativen Ergebnisse aus der Serie APA₃ → APA₄ → APA₅ wurden mit der Zunahme von Strukturierung interpretiert.

Bei den Untersuchungen an Nonadekapeptiden war als Ziel gesetzt, einen Raman-spektroskopischen Nachweis über die Strukturmodifikationen in α -Helices zu erbringen. Die etablierten Methoden der CD-Spektroskopie an helikalen Modellpeptiden, mit denen die helixbildenden und helixbrechenden Eigenschaften der 20 natürlichen Aminosäuren quantisiert und parametrisiert werden, lassen sich durch die Raman-Ergebnisse ergänzen und verfeinern. Die Helix-Parameter werden in einem Zweizustandsmodell (*helix coil transition theory*) eingesetzt und dienen der Verbesserung von Algorithmen zur Sekundärstrukturvorhersage.

Die Polypeptidsequenzen waren speziell ausgewählt, so dass sich mit Hilfe von Absorptionmessungen unter Erfassung des Tyrosin-Gehaltes die Konzentrationen der Lösungen hinreichend exakt bestimmen ließen. Alle Polypeptide wiesen einen hohen Gehalt (55 – 80 %) an helikaler Konformation auf, der durch die Insertionen von 1 bis 3 Aminosäuren (Leu, Ile) systematisch reduziert wurde. Die Aminosäuren Leu und Ile haben identisches Molekulargewicht und unterscheiden sich im molekularen Aufbau der Seitenketten. Isoleucin mit der β -Verzweigung erwies sich als ein stärkerer Helix-Abschwächer als Leucin, bei dem die Seitenkettenverzweigung am γ -Kohlenstoffatom auftritt. Die gemessene mittlere Elliptizität bei 222 nm [Θ_{222}] zeigte gute Übereinstimmung mit CD-Ergebnissen, die an gleichen oder sehr ähnlichen Sequenzen von anderen Forschergruppen berichtet worden waren.

Anhand der Positionen der struktur-sensitiven Amidschwingungen (AI, AIII) war die Zuordnung zur helikalen Sekundärstruktur gesichert und ergab übereinstimmende Resultate aus der Raman- und CD-Spektroskopie. In der quantitativen Konformationsanalyse ließen sich die Raman-Banden der Amidbindung und des Polypeptidrückgrates analog zum vorangegangenen Fall als sensible Strukturmarker heranziehen. Die statistischen Untersuchungen zeigten, wie stark die Strukturabnahme mit der zunehmenden Anzahl von Leu- und Ile-Insertionen korreliert war.

Die Kernspinresonanzexperimente waren weitgehend konsistent mit den theoretischen Strukturvorhersagen aus der Lifson–Roig–Theorie und den *Molecular Modeling* Experimenten. Demnach besteht an den Peptidtermini eine Auflockerung der Sekundärstruktur und der intramolekulare Beitrag zur Stabilität wird von den gebildeten H–Brücken parallel zur Helix–Achse verursacht.

Die Kombination aus den beiden Spektroskopie–Methoden des Circular–Dichroismus und der Raman–Streuung in Verbindung mit 2D Kernspinresonanz–Untersuchungen lässt sich bei der Strukturanalyse von Biomolekülen erfolgversprechend einsetzen. Es ist zu betonen, dass Raman–Messungen an Proteinen und Polypeptiden in verschiedenen physikalischen Phasen durchgeführt werden können (Feststoff, Kristall, Lösungen, Suspensionen). Hierin ist die Raman–Spektroskopie gegenüber der Röntgenkristallographie im Vorteil und bietet sich als eine alternative Analyse­methode an — beispielsweise für Untersuchungen an membrangebundenen Rezeptor–Proteinen oder an der wasserunlöslichen, pathologischen Variante des Prion–Proteins. Die Vision der Forschung zum Proteinfaltungsproblem besteht darin, ein vermutlich nie vollständiges, aber hinreichendes Wissen von den komplexen Zusammenhängen über die autonome Faltung und die Stabilität von Proteinen zu erhalten, mit dem neue medizinische und pharmazeutische Entwicklungen voran getrieben werden können.

Summary

Optical spectroscopic methods in a combination of Circular Dichroism and Raman spectroscopy were applied for studies on the secondary structure of synthetic polypeptides and peptidomimetics of membrane bound receptors. The studies aimed not only at a supplementation of comparable qualitative and quantitative studies of the structural properties by Nuclear Magnetic Resonance investigations, but also to evaluate to what extent special applications of Raman spectroscopy can substitute the more 'consumptious' NMR methods especially with very small samples. The essential part of this research is focused on basic topics related to the protein folding problem. A separate chapter is dealing with the analysis of the structure–function relationship of a hormone receptor, of which the results shall be discussed at first.

The gonadotropin–releasing hormone receptor (GnRH–R) is a member of the G–protein–coupled receptor (GPCR) family. Essential structural information can be deduced from computational molecular models of related GPCRs because of the high degree of homology. The present study concentrates on the third extracellular loop (ECL3), which has been identified to be implicated in the interaction between the ligand and the receptor. From computer simulations it has been proposed that ECL3 could exist as an α –helix. However, the theoretically predicted structure was largely incompatible with the experimental results and did not provide any definite answer as to whether the third extracellular loop is helical or not.

The structural information of ECL3 obtained from the micro–Raman and from the FT Raman experiments were corroborating the CD data. The loop exists predominantly as a random coil and does not exhibit any α –helical structure. The 2D NMR experiments were in good agreement with these results. The large coupling constants of some residues were indicating a small degree of structure (β –hairpin conformation) in the central region of the loop. In addition the specificity of the interaction between the hormone and the hormone receptor was affirmatively demonstrated by a docking experiment. The structural analysis of the spectroscopic and the computational data favours the 'conformational induction' model, which assumes that the flexible loop can adopt an altered active state induced by the interaction with the hormone decapeptide (GnRH). The results have thus demonstrated the necessity to revise the unwarrantedly forwarded concept of a helical loop structure.

An X-Pro bond can provide a pivotal influence on the folding potential of peptidyl prolyl *cis-trans* isomerases, which play a role in the folding process of many regulatory proteins. The structural investigation of a series of polypeptides with the sequences APAAA (APA₃), APAAAA (APA₄) and APAAAAA (APA₅) was concerned with the influence of a stepwise elongation of the peptide chain, which might be exerted on the peptide bond between the amino acid Proline and the single Alanine residue at the N-terminal side.

However, the results from CD spectroscopy were useful only for a qualitative interpretation of the secondary structure due to the lack of an exact determination of the polypeptide concentrations. The spectra of the polypeptides were exhibiting unique contours with negative CD signals in the far UV range that are typical for random coil conformation.

The Raman investigations did not only confirm the results from the CD spectroscopy experiments but also provided further details about the secondary structure. The positions of the Raman lines from the amide bands (AI and AIII) were clearly indicating a predominantly unordered conformation in the polypeptides. The spectra taken from dissolved and from solid sample were in good agreement with respect to the structure-sensitive Raman bands. It can therefore be deduced that the polypeptides under investigation adopt the same conformation in solution and in the lyophilised samples. These observations provide confidence in performing a statistical analysis on the Raman band intensities, which was based on data exclusively from lyophilised polypeptides. Raman spectra taken from dry samples contain more structural information since in absence of the water signals the amide I band of peptides is clearly detectable. The strong scattering potential of the water molecules is usually masking a Raman spectrum completely in the amide I region. The micro-Raman setup with excitation in the visible range of the spectrum ($\lambda_0 = 514.5$ nm) has proven to be most suitable for the conformational analysis. Investigations can be performed on extremely small sample amounts and little laser power (≤ 100 mW) is needed for the excitation of characteristic vibrations. Thus, highly resolved spectra with acceptable signal-to-noise ratios, low background signal and devoid of deteriorating fluorescence can be obtained. The method applied here is non-destructive and allows to overcome the frequently occurring problems of photodecomposition. Furthermore, high concentrations are usually required for the recording of decent solution spectra, whereas the problem of dimerisation effects is excluded in micro-Raman experiments taken from lyophilised sample.

Inspection of the Raman lines at 1484 and at 1436 cm^{-1} (AIIp) did not provide insight into the configuration of the X-Pro bond, but rather on the strength of the hydrogen bonds between the OH group of Pro and the solvent. From both lines it could be concluded that even after lyophilisation an unknown amount of water molecules was still bound to the polypeptide, thereby contributing to the overall structural stability. It appears debatable that these Raman lines may serve as a sensor for the quantitative determination of the residual water content in dried samples. Provided an appropriate calibration procedure

the detected intensities of the AIIp bands can support the determination of crucial cryotechnical parameters, which might be useful in the handling and long-term storage of biomolecules.

The configuration of the X-Pro bond was also investigated by a series of 2D NMR experiments. The results gave proof that the peptidyl prolyl bond exists in the *trans* form.

The statistical analysis of the Raman data allowed to deduce detailed information on subtle conformational changes in the samples AlaPro(Ala)_n ($n = 3, 4, 5$), which were caused solely by the addition of single amino acid residues to the polypeptide chain. The data presented in this study demonstrated that structural changes can be detected more sensitively by the Raman band intensities than by the frequency shift of the bands. Namely the relative band intensities of the AI, AIII, C-C and C-N stretching vibrations were significantly correlated to the length of the polypeptide chains. The quantitative analysis of the band intensities could be interpreted as an increase of structural content in the series APA₃ → APA₄ → APA₅.

The investigation of systematically varied array of nonadecapeptides was aimed at the spectroscopic determination of conformational changes in α -helical model peptides. The results from the Raman experiments were useful to complement and refine established methods of Circular Dichroism spectroscopy, which had been applied earlier to evaluate the helix-building and helix-breaking propensities of the 20 naturally occurring amino acids. The helix propensity parameters can be implemented in a mechanical-statistical model (helix coil transition theory) and thus may serve to improve the quality of algorithms for the prediction of secondary structure in proteins.

The sequences of the polypeptides in this study were designed to allow for the exact measurement of the peptide concentrations by means of the absorbance of a unique Tyrosine as part of the polypeptide. The high helix content in the polypeptides (55 – 80 %) was systematically reduced by the substitutions of 1, 2 and 3 amino acid residues (Leu, Ile). Though the residues Leucin and Isoleucin exhibit the same molecular weight, they differ with respect to the molecular structure of their side chains. The β -branched side chain of Isoleucin appeared to interfere stronger in disrupting the helical structure of the model peptides than Leucin (γ -branched side chain). The recorded CD signal at 222 nm (mean ellipticity per residue [Θ_{222}]) was in good agreement with the results of similar polypeptide sequences, which had been investigated earlier in other research groups.

The positions of the characteristic amide vibrations (AI, AIII) were assigned to the helical structure content and were consistent with the results from Raman and CD spectroscopy. The Raman lines of the amide bonds served as sensitive structure marker and were applied for a quantitative conformational analysis. It could be shown that the number of substitutions of Leu and Ile was significantly correlated to the decrease of structural content.

The results from Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy corroborated the structure prediction when the Lifson–Roig theory and molecular modeling experiments were applied. The N- and C-termini of the peptides exhibited a lower degree of structure, whereas the major part of the structural stability was contributed by the regular hydrogen bond pattern parallel to the helix axis.

The application of the two spectroscopic methods, i. e. Circular Dichroism and Raman spectroscopy, in combination with 2D NMR experiments can be used successfully as a tool in the structural analysis of biomolecules. It is worth mentioning that Raman spectroscopy can be applied to proteins and polypeptides literally in any physical state (solid, crystals, solutions, suspensions). Compared to X-ray crystallography the advantages of Raman spectroscopy give way to an analytical alternative, in particular when investigations of complex systems, such as membrane proteins or the pathologic form of prion protein are challenged. The long-term goal in protein folding research is to increase our knowledge about the complex interactions that govern the self assembling and structural stability in proteins, which finally may support medical and pharmaceutical development.

Literaturverzeichnis

- [1] Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136–144.
- [2] Prusiner, S. B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515–1522.
- [3] Schulz, G. E. & Schirmer, R. (1988) *Principles of Protein Structure* (Hrsg.: C. R. Cantor). Springer-Verlag, New York/Berlin/Heidelberg/Tokyo, 8. Auflage.
- [4] Stryer, L. (1995) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 4. Auflage.
- [5] Pauling, L., Corey, R. B. & Branson, H. R. (1951) The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **37**, 205–211.
- [6] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature 1969 (1970) Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polypeptide chains. *Biochemistry* **9**, 3471–3479.
- [7] Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**, 283–438.
- [8] Creighton, T. E. (1992) *Proteins: Structures and Molecular Properties*. Freeman, New York, 4. Auflage.
- [9] Pauling, L. & Corey, R. B. (1951) Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: Two new pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **37**, 729–740.
- [10] Groß, W., Ring, K. & Lodemann, E. (1989) *Physiologische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1. Auflage.
- [11] Jordan, T., Mukerji, I., Wang, Y. & Spiro, T. G. (1996) UV resonance Raman spectroscopy and hydrogen bonding of the proline peptide bond. *J. Mol. Struct.* **379**, 51–64.

-
- [12] Fischer, G. (1996) Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen: Prolinspezifische Bindeproteine oder Faltungskatalysatoren? *Biospektrum* **4**, 43–46.
- [13] Karplus, M. (1997) The Levinthal paradox: yesterday and today. *Fold. Des.* **2**, 569–576.
- [14] Sela, M., White Jr., F. H. & Anfinsen, C. B. (1957) Reductive cleavage of disulfide bridges in ribonuclease. *Science* **125**, 691–692.
- [15] Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223–230.
- [16] Brown, J. E. & Klee, W. A. (1971) Helix-coil transition of the isolated amino terminus of ribonuclease. *Biochemistry* **10**, 470–476.
- [17] Doty, P. & Yang, J. T. (1956) Polypeptides. VII. Poly- γ -benzyl-L-glutamate: The helix-coil transition in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 498–500.
- [18] Zimm, B. H. & Bragg, J. K. (1958) Theory of the one-dimensional phase transition in polypeptide chains. *J. Chem. Phys.* **28**, 1246–1247.
- [19] Zimm, B. H. & Bragg, J. K. (1959) Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains. *J. Chem. Phys.* **31**, 526–535.
- [20] Zimm, B. H., Doty, P. & Iso, K. (1959) Determination of the parameters for helix formation in poly- γ -benzyl-L-glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **45**, 1601–1607.
- [21] Kramers, H. A. & Wannier, G. H. (1941) Statistics of the two-dimensional ferromagnet. Part I. *Phys. Rev.* **60**, 252–262.
- [22] Kramers, H. A. & Wannier, G. H. (1941) Statistics of the two-dimensional ferromagnet. Part II. *Phys. Rev.* **60**, 263–276.
- [23] Doig, A. J. & Baldwin, R. L. (1995) N- and C-capping preferences for all 20 amino acids in α -helical peptides. *Protein Sci.* **4**, 1325–1336.
- [24] Rohl, C. A., Chakrabartty, A. & Baldwin, R. L. (1996) Helix propagation and N-cap propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides in 40 volume percent trifluoroethanol. *Protein Sci.* **5**, 2623–2637.
- [25] Doig, A. J., Chakrabartty, A., Klingler, T. M. & Baldwin, R. L. (1994) Determination of free energies of N-capping in α -helices by modification of the Lifson-Roig helix-coil theory to include N- and C-capping. *Biochemistry* **33**, 3396–3403.
- [26] Lifson, S. & Roig, A. (1961) On the theory of helix-coil transition in polypeptides. *J. Chem. Phys.* **34**, 1963–1974.

-
- [27] Qian, H. & Schellman, J. A. (1992) Helix–coil theories: A comparative study for finite length polypeptides. *J. Phys. Chem.* **96**, 3987–3994.
- [28] Poland, D. C. & Scheraga, H. A. (1965) Comparison of theories of the helix–coil transition in polypeptides. *J. Chem. Phys.* **43**, 2071–2074.
- [29] Poland, D. & Scheraga, H. A. (1970) *Theory of Helix–Coil Transitions in Biopolymers*. Academic Press, New York, London, 1. Auflage.
- [30] Scholtz, J. M., Qian, H., York, E. J., Stewart, J. M. & Baldwin, R. L. (1991) Parameters of helix–coil transition theory for alanine–based peptides of varying chain lengths in water. *Biopolymers* **31**, 1463–1470.
- [31] Rohl, C. A., Scholtz, J. M., York, E. J., Stewart, J. M. & Baldwin, R. L. (1992) Kinetics of amide exchange in helical peptides of varying chain lengths. Interpretation by the Lifson–Roig equation. *Biochemistry* **31**, 1263–1269.
- [32] Stapley, B. J., Rohl, C. A. & Doig, A. J. (1995) Addition of side chain interactions to modified Lifson–Roig helix–coil theory: Application to energetics of phenylalanine–methionine interactions. *Protein Sci.* **4**, 2383–2391.
- [33] Lacroix, E., Viguera, A. R. & Serrano, L. (1998) Elucidating the folding problem of α –helices: Local motifs, long–range electrostatics, ionic–strength dependence and prediction of NMR parameters. *J. Mol. Biol.* **284**, 173–191.
- [34] Ooi, T. & Oobatake, M. (1991) Prediction of the thermodynamics of protein unfolding: The helix–coil transition of poly(L–alanine). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2859–2863.
- [35] Marqusee, S. & Baldwin, R. L. (1987) Helix stabilization by $\text{Glu}^- \cdots \text{Lys}^+$ salt bridges in short peptides of *de novo* design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8898–8902.
- [36] Ptitsyn, O. B. (1972) Thermodynamic parameters of helix–coil transitions in polypeptide chains. *Pure Appl. Chem.* **31**, 227–244.
- [37] Muñoz, V. & Serrano, L. (1995) Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. II. Helix macrodipole effects and rational modification on the helical content of natural peptides. *J. Mol. Biol.* **245**, 275–296.
- [38] Vásquez, M. & Scheraga, H. A. (1988) Effect of sequence–specific interactions on the stability of helical conformations in polypeptides. *Biopolymers* **27**, 41–58.
- [39] Muñoz, V. & Serrano, L. (1997) Development of the multiple sequence approximation within the AGADIR model of α –helix formation: Comparison with Zimm–Bragg and Lifson–Roig formalisms. *Biopolymers* **41**, 495–509.

- [40] Petukhov, M., Muñoz, V., Yumoto, N., Yoshikawa, S. & Serrano, L. (1998) Position dependence of non-polar amino acid intrinsic helical propensities. *J. Mol. Biol.* **278**, 279–289.
- [41] Scholtz, J. M., Marqusee, S., Baldwin, R. L., York, E. J., Stewart, J. M., Santoro, M. & Bolen, D. W. (1991) Calorimetric determination of the enthalpy change for the α -helix to coil transition of an alanine peptide in water. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2854–2858.
- [42] Chakrabartty, A., Kortemme, T. & Baldwin, R. L. (1994) Helix propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides without helix-stabilizing side-chain interactions. *Protein Sci.* **3**, 843–852.
- [43] Johnson, Jr., W. C. (1990) Proteins secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins* **7**, 205–214.
- [44] Chen, Y.-H., Yang, J. T. & Chau, K. H. (1974) Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **13**, 3350–3359.
- [45] Compton, L. A. & Johnson, Jr., W. C. (1986) Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.* **155**, 155–167.
- [46] Kelly, S. M. & Price, N. C. (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta* **1338**, 161–185.
- [47] Banwell, C. N. & McCash, E. M. (1994) *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*. McGraw-Hill International (UK), London, 4. Auflage.
- [48] Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1. Auflage.
- [49] Friebolin, H. (1992) *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2. Auflage.
- [50] King, J. A. & Millar, R. P. (1995) Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cell. Mol. Neurobiol.* **15**, 5–23.
- [51] Sealfon, S. C., Weinstein, H. & Millar, R. P. (1997) Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr. Rev.* **18**, 180–205.
- [52] Sealfon, S. C. & Millar, R. P. (1995) The gonadotrophin-releasing hormone receptor: structural determinants and regulatory control. *Hum. Reprod. Update* **1**, 216–230.

- [53] Fink, G. (1988) Gonadotropin secretion and its control. In: *The Physiology of Reproduction*. (Hrsg.: E. Knobil und J. Neill), Raven Press, New York, 1. Auflage.
- [54] Millar, R. P., King, J. A., Davidson, J. S. & Milton, R. C. (1987) Gonadotrophin-releasing hormone – diversity of functions and clinical applications. *S. Afr. Med. J.* **72**, 748–755.
- [55] Baldwin, J. M. (1993) The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **12**, 1693–1703.
- [56] Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. & Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739–745.
- [57] Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J. P. & Landau, E. M. (1997) X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* **277**, 1676–1682.
- [58] Jung, H., Windhaber, R., Palm, D. & Schnackerz, K. D. (1995) NMR and circular dichroism studies of synthetic peptides derived from the third intracellular loop of the β -adrenoceptor. *FEBS* **358**, 133–136.
- [59] Jung, H., Windhaber, R., Palm, D. & Schnackerz, K. D. (1996) Conformation of a β -adrenoceptor-derived signal transducing peptide as inferred by circular dichroism and ^1H NMR spectroscopy. *Biochemistry* **35**, 6399–6405.
- [60] Ruan, K.-H., So, S.-P., Wu, J., Li, D., Huang, A. & Kung, J. (2001) Solution structure of the second extracellular loop of human thromboxane A_2 receptor. *Biochemistry* **40**, 275–280.
- [61] Gudermann, T., Schöneberg, T. & Schultz, G. (1997) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 399–427.
- [62] Palm, D., Münch, G. & Malek, D. (1995) Mapping G protein coupling domains by site-specific peptides. *Methods Neurosci.* **25**, 302–321.
- [63] Schwartz, T. W. (1994) Locating ligand-binding sites in 7TM receptors by protein engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 434–444.
- [64] Meng, E. C. & Bourne, H. R. (2001) Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 587–593.

- [65] Davidson, J. S., McArdle, C. A., Davies, P., Elario, R., Flanagan, C. A. & Millar, R. P. (1996) Asn102 of the gonadotropin-releasing hormone receptor is a critical determinant of potency for agonists containing C-terminal glycineamide. *J. Biol. Chem.* **271**, 15510–15514.
- [66] Flanagan, C. A., Rodic, V., Konvicka, K., Yuen, T., Chi, L., Rivier, J. E., Millar, R. P., Weinstein, H. & Sealfon, S. C. (2000) Multiple interactions of the Asp(2.61(98)) side chain of the gonadotropin-releasing hormone receptor contribute differentially to ligand interaction. *Biochemistry* **39**, 8133–8141.
- [67] Zhou, W., Rodic, V., Kitanovic, S., Flanagan, C. A., Chi, L., Weinstein, H., Maayani, S. & Millar, R. P. (1995) A locus of the gonadotropin-releasing hormone receptor that differentiates agonist and antagonist binding sites. *J. Biol. Chem.* **270**, 18853–18857.
- [68] Flanagan, C. A., Millar, R. P. & Illing, N. (1997) Advances in understanding gonadotropin-releasing hormone receptor structure and ligand interactions. *Rev. Reprod.* **2**, 113–120.
- [69] Flanagan, C. A., Becker, I. I., Davidson, J. S., Wakefield, I. K., Zhou, W., Sealfon, S. C. & Millar, R. P. (1994) Glutamate 301 of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor confers specificity for Arginine 8 of mammalian gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* **269**, 22636–22641.
- [70] Fromme, B. J., Katz, A., Roeske, R. W., Millar, R. P. & Flanagan, C. A. (2001) Role of Aspartate^{7.32(302)} of the human gonadotropin-releasing hormone receptor in stabilizing a high affinity ligand conformation. *Mol. Pharm.* **60**, 1280–1287.
- [71] Yeagle, R. L., Salloum, A., Chopra, A., Bhawsar, N., Ali, L., Kuzmanovski, G., Alderfer, J. L. & Albert, A. D. (2000) Structures of the intradiskal loops and amino terminus of the G-protein receptor, rhodopsin. *J. Peptide Res.* **55**, 455–465.
- [72] Yeagle, R. L., Alderfer, J. L. & Albert, A. D. (1995) Structure of the third cytoplasmic loop of bovine rhodopsin. *Biochemistry* **34**, 14621–14625.
- [73] Ballesteros, J. H. & Weinstein, H. (1997) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure–function relations in G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **18**, 180–205.
- [74] van Rhee, A. M. & Jacobson, K. A. (1996) Molecular architecture of G protein-coupled receptors. *Drug Dev. Res.* **37**, 1–38.
- [75] Rance, M., Sørensen, O. W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R. R. & Wüthrich, K. (1983) Improved spectral resolution in COSY ¹H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 479–495.

- [76] Braunschweiler, L. & Ernst, R. R. (1983) Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **53**, 521–528.
- [77] Marion, D. & Wüthrich, K. (1983) Application of phase sensitive two dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin couplings in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **113**, 967–974.
- [78] Bax, A. & Davis, D. G. (1985) MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **65**, 355–360.
- [79] Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. & Ernst, R. R. (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **71**, 4546–4553.
- [80] Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. (1985) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**, 661–665.
- [81] Carpino, L. A. (1993) 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4397–4398.
- [82] Carpino, L. A., El-Faham, A. & Albericio, F. (1994) Racemization studies during solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents. *Tetrahedron Lett.* **35**, 2279–2282.
- [83] Chakrabartty, A., Kortemme, T., Padmanabhan, S. & Baldwin, R. L. (1993) Aromatic side-chain contribution to far-ultraviolet circular dichroism of helical peptides and its effect on measurement of helix propensities. *Biochemistry* **32**, 5560–5565.
- [84] Marqusee, S., Robbins, V. H. & Baldwin, R. L. (1989) Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5286–5290.
- [85] Chakrabartty, A., Schellman, J. A. & Baldwin, R. L. (1991) Large differences in the helix propensities of alanine and glycine. *Nature* **351**, 586–588.
- [86] Merutka, G., Lipton, W., Shalongo, W., Park, S.-H. & Stellwagen, E. (1990) Effect of central-residue replacements on the helical stability of a monomeric peptide. *Biochemistry* **29**, 7511–7515.
- [87] Muñoz, V. & Serrano, L. (1994) Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nature Struct. Biol.* **1**, 399–409.
- [88] Schmid, F. X. (1989) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: *Protein structure – A practical approach*, (Hrsg.: T. E. Creighton), Oxford University Press, Oxford, 1. Auflage.

- [89] Gans, P. J., Lyu, P. C., Manning, M. C., Woody, R. W. & Kallenbach, N. R. (1991) The helix–coil transition in heterogeneous peptides with specific side–chain interactions: Theory and comparison with CD spectral data. *Biopolymers* **31**, 1605–1614.
- [90] Yang, J., Spek, E. J., Gong, Y., Zhou, H. & Kallenbach, N. R. (1997) The role of context on α –helix stabilization: Host–guest analysis in a mixed background peptide model. *Protein Sci.* **6**, 1264–1272.
- [91] Padmanabhan, S., Marqusee, S., Ridgeway, T., Laue, T. M. & Baldwin, R. L. (1990) Relative helix–forming tendencies of nonpolar amino acids. *Nature* **344**, 268–270.
- [92] Huyghues–Despointes, B. M. P., Klingler, T. M. & Baldwin, R. L. (1995) Measuring the strength of side–chain hydrogen bonds in peptide helices: The Gln•Asp ($i, i + 4$) interaction. *Biochemistry* **34**, 13267–13271.
- [93] Chen, G. C. & Yang, J. T. (1977) Two–point calibration of circular dichrometer with d–10–camphorsulfonic acid. *Anal. Letters* **10**, 1195–1207.
- [94] Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**, 1948–1954.
- [95] Atherton, E. & Sheppard, R. C. (1989) *Solid phase peptide synthesis*. Oxford University Press, Oxford, 1. Auflage.
- [96] Flanagan, C. A., Fromme, B. J., Davidson, J. S. & Millar, R. P. (1998) A high affinity gonadotropin–releasing hormone (GnRH) tracer, radioiodinated at position 6, facilitates analysis of mutant GnRH receptors. *Endocrinology* **139**, 4115–4119.
- [97] Sankararamakrishnan, R., Konvicka, K., Mehler, E. L. & Weinstein, H. (2000) Solvation in simulated annealing and high–temperature molecular dynamics of proteins: A restrained water droplet model. *Int. J. Quant. Chem.* **77**, 174–186.
- [98] Yeagle, R. L., Alderfer, J. L. & Albert, A. D. (1997) Three–dimensional structure of the cytoplasmic face of the G protein receptor, rhodopsin. *Biochemistry* **36**, 9649–9654.
- [99] Kallenbach, N. R., Lyu, P. & Zhou, H. (1996) CD spectroscopy and the helix–coil transition in peptides and polypeptides, in: *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (Hrsg.: G. D. Fasman). Plenum Press, New York, 1. Auflage.
- [100] Chi, Z. & Asher, S. A. (1998) UV resonance Raman determination of protein acid denaturation: Selective unfolding of helical segments of horse myoglobin. *Biochemistry* **37**, 2865–2872.

- [101] Chi, Z., Chen, X. G., Holtz, J. S. W. & Asher, S. A. (1998) UV resonance Raman-selective amide vibrational enhancement: Quantitative methodology for determining protein secondary structure. *Biochemistry* **37**, 2854–2864.
- [102] Krimm, S. & Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* **38**, 181–364.
- [103] Wang, Y., Purrello, R., Georgiou, S. & Spiro, T. G. (1991) UVRaman spectroscopy of the peptide bond. 2. Carbonyl H-bond effects on the ground- and excited-state structures of N-methylacetamide. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6368–6377.
- [104] Spiro, T. G. & Gaber, B. P. (1977) Laser Raman scattering as a probe of protein structure. *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 553–572.
- [105] Lord, R. C. & Yu, N.-T. (1970) Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules. II. Native ribonuclease and α -chymotrypsin. *J. Mol. Biol.* **51**, 203–213.
- [106] Yu, N.-T., Liu, C. S. & O’Shea, D. C. (1972) Laser Raman spectroscopy and the conformation of insulin and proinsulin. *J. Mol. Biol.* **70**, 117–132.
- [107] Yu, N.-T. & Jo, B. H. (1973) Comparison of protein structure in crystals and in solution by laser Raman scattering. I. Lysozyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **156**, 469–474.
- [108] Yu, N.-T. & Jo, B. H. (1973) Comparison of protein structure in crystals and in solution by laser Raman scattering. II. Ribonuclease A and carboxypeptidase A. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 5033–5037.
- [109] Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. John Wiley & Sons Inc., New York, 1. Auflage.
- [110] Petry, R., Craik, D., Haaima, G., Fromme, B., Klump, H., Kiefer, W., Palm, D. & Millar, R. (2002) Secondary structure of the third extracellular loop responsible for ligand selectivity of a mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Med. Chem.* **45**, 1026–1034.
- [111] Guillot, J.-G. and Pézolet, M. and Pallotta, D. (1977) Laser Raman spectra of calf thymus histones H1, H2A, and H2B. *Biochim. Biophys. Acta* **491**, 423–433.
- [112] Tu, A. T., Bjarnason, J. B. & Hruby, V. J. (1978) Conformation of oxytocin studied by laser Raman spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **533**, 530–533.
- [113] Thomas, Jr. G. J. & Prescott, B. (1987) Raman amide bands of type-II β -turns in cyclo-(VPGVG)₃ and poly-(VPGVG), and implications for protein secondary-structure analysis. *Biopolymers* **26**, 921–934.

- [114] Pézolet, M., Pigeon-Gosselin, M., Nadeau, J. & Caillé, J.-P. (1980) Laser Raman scattering – A molecular probe of the contractile state of intact single muscle fibers. *Biophys. J.* **31**, 1–8.
- [115] Pézolet, M., Pigeon-Gosselin, M. & Caillé, J.-P. (1978) Laser Raman investigation of intact single muscle fibers protein conformations. *Biochim. Biophys. Acta* **533**, 263–269.
- [116] Gaber, B. P., Yager, P. & Peticolas, W. L. (1978) Interpretation of biomembrane structure by Raman difference spectroscopy. Nature of the endothermic transitions in phosphatidylcholines. *Biophys. J.* **21**, 161–176.
- [117] Kiefer, W. (1973) Raman difference spectroscopy with the rotating cell. *Appl. Spectrosc.* **27**, 253–257.
- [118] Shelnutt, J. A., Rousseau, D. L., Dethmers, J. K. & Margoliash, E. (1981) Protein influence on porphyrin structure in cytochrome c: Evidence from Raman difference spectroscopy. *Biochemistry* **20**, 6485–6497.
- [119] Lord, R. C. & Yu, N.-T. (1970) Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules. I. Native lysozyme and its constituent amino acids. *J. Mol. Biol.* **50**, 509–524.
- [120] Frushour, B. G. & König, J. L. (1975) Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. *Biopolymers* **14**, 379–391.
- [121] Parker, F. S. (1983) *Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry*. Plenum Press, New York, 1. Auflage.
- [122] Frushour, B. G. & König, J. L. (1975) *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy* (Hrsg.: R. J. H. Clark und R. E. Hester). Heyden, London, 1. Auflage.
- [123] Mayne, L. & Hudson, B. (1987) Selective enhancement of proline signals with ultraviolet excitation. *J. Phys. Chem.* **91**, 4438–4440.
- [124] Caswell, D. S. & Spiro, T. G. (1987) Proline signals in ultraviolet resonance Raman spectra of proteins: Cis–Trans isomerism in polyproline and ribonuclease A. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 2796–2800.
- [125] Hudson, B. & Mayne, L. (1986) Ultraviolet resonance Raman spectroscopy of biopolymers. *Methods Enzymol.* **130**, 331–350.
- [126] Harhay, G. P. & Hudson, B. S. (1991) Ultraviolet resonance Raman study of proline isomerization. *J. Phys. Chem.* **95**, 3511–3513.
- [127] Takeuchi, H. & Harada, I. (1990) Ultraviolet resonance Raman spectroscopy of X–Proline bonds: a new marker band of hydrogen bonding at the imide C=O site. *J. Raman Spectrosc.* **21**, 509–515.

- [128] Smith, M., Walton, A. G. & König, J. L. (1969) Raman spectroscopy of poly-L-proline in aqueous solution. *Biopolymers* **8**, 173–179.
- [129] Rippon, W. B., König, J. L. & Walton, A. G. (1970) Raman spectroscopy of proline oligomers and poly-L-proline. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 7455–7459.
- [130] Yu, N.-T., Jo, B. H. & Liu, C. S. (1972) A laser Raman spectroscopic study of the effect of solvation on the conformation of ribonuclease A. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 7572–7575.
- [131] Wang, Y., Purrello, R., Jordan, T. & Spiro, T. G. (1991) UVRR spectroscopy of the peptide bond. 1. Amide S, a nonhelical structure marker, is a C_αH bending mode. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6359–6368.
- [132] Painter, P. C. & König, J. L. (1976) The solution conformation of poly(L-lysine). A Raman and infrared spectroscopic study. *Biopolymers* **15**, 229–240.
- [133] Lippert, J. L., Tyminski, D. & Desmeules, P. J. (1976) Determination of the secondary structure of proteins by laser Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7075–7080.
- [134] Pézolet, M., Pigeon-Gosselin, M. & Coulombe, L. (1976) Laser Raman investigation of the conformation of human immunoglobulin G. *Biochim. Biophys. Acta* **453**, 502–512.
- [135] Thomas, Jr. G. J., Prescott, B., Middaugh, C. R. & Litman, G. W. (1979) Raman spectra and conformational structures of Fab μ and (Fc)₅ μ fragments of cryoglobulin IgM- κ McE. *Biochim. Biophys. Acta* **577**, 285–290.
- [136] Carew, E. B., Asher, I. M. & Stanley, H. E. (1975) Laser Raman spectroscopy — new probe of myosin substructure. *Science* **188**, 933–936.
- [137] Chen, M. C. & Lord, R. C. (1976) Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules. VIII. Conformational study of bovine serum albumin. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 990–992.
- [138] Yu, N.-T., Lin, T.-S. & Tu, A. T. (1975) Laser Raman scattering of neurotoxins isolated from the venoms of sea snakes *Lapemis hardwickii* and *Enhydrina schistosa*. *J. Biol. Chem.* **250**, 1782–1785.
- [139] Chen, M. C., Lord, R. C. & Mendelsohn, R. (1974) Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules. V. Conformational changes associated with the chemical denaturation of lysozyme. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 3038–3042.
- [140] Karplus, M. (1959) Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. Phys. Chem.* **30**, 11–15.

- [141] Cavanagh, J. (1996) *Protein NMR Spectroscopy*. Academic Press, Inc., San Diego, 1. Auflage.
- [142] Evans, J. N. S. (1995) *Biomolecular NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, Inc., New York, 1. Auflage.
- [143] Rohl, C. A. & Baldwin, R. L. (1998) Deciphering rules of helix stability in peptides. *Methods Enzymol.* **295**, 1–26.
- [144] Shalongo, W. & Stellwagen, E. (1995) Incorporation of pairwise interactions into the Lifson–Roig model for helix prediction. *Protein Sci.* **4**, 1161–1166.
- [145] Rohl, C. A. & Baldwin, R. L. (1997) Comparison of NH exchange and circular dichroism as techniques for measuring the parameters of the helix–coil transition in peptides. *Biochemistry* **36**, 8435–8442.
- [146] Go, M., Go, N. & Scheraga, H. A. (1970) Molecular theory of the helix–coil transition in polyamino acids. II. Numerical evaluation of s and σ for polyglycine and poly-L-alanine in the absence (for s and σ) and presence (for σ) of solvent. *J. Chem. Phys.* **52**, 2060–2079.
- [147] Go, M., Go, N. & Scheraga, H. A. (1971) Molecular theory of the helix–coil transition in polyamino acids. III. Evaluation and analysis of s and σ for polyglycine and poly-L-alanine in water. *J. Chem. Phys.* **54**, 4489–4503.
- [148] Bixon, M., Scheraga, H. A. & Lifson, S. (1963) Effect of hydrophobic bonding on the stability of poly-L-alanine helices in water. *Biopolymers* **1**, 419–429.
- [149] Loh, S. N., Rohl, C. A., Kiefhaber, T. & Baldwin, R. L. (1996) A general two-process model describes the hydrogen exchange behavior of RNase A in unfolding conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1982–1987.
- [150] Padmanabhan, S., York, E. J., Gera, L., Stewart, J. M. & Baldwin, R. L. (1994) Helix-forming tendencies of amino acids in short (hydroxybutyl)-L-glutamine peptides: An evaluation of the contradictory results from host–guest studies and short alanine-based peptides. *Biochemistry* **33**, 8604–8609.
- [151] Sueki, M., Lee, S., Powers, S. P., Denton, J. B., Konishi, Y. & Scheraga, H. A. (1984) Helix–coil stability constants for the naturally occurring amino acids in water. 22. Histidine parameters from random poly[(hydroxybutyl)glutamine-co-L-histidine]. *Macromolecules* **17**, 148–155.
- [152] Rico, M., Nieto, J. L., Santoro, J., Bermejo, F. J., Herranz, J. & Gallego, E. (1983) Low-temperature ^1H -NMR evidence of the folding of isolated ribonuclease S-peptide. *FEBS* **162**, 314–319.

- [153] Wlodawer, A. & Sjölin, L. (1983) Structure of ribonuclease A: Results of joint neutron and X-ray refinement at 2.0-Å resolution. *Biochemistry* **22**, 2720–2728.
- [154] Strehlow, K. G. & Baldwin, R. L. (1989) Effect of the substitution Ala → Gly at each of five residue positions in the C-peptide helix. *Biochemistry* **28**, 2130–2133.
- [155] Kim, P. S., Bierzynski, A. & Baldwin, R. L. (1982) A competing salt-bridge suppresses helix formation by the isolated C-peptide carboxylate of ribonuclease A. *J. Mol. Biol.* **162**, 187–199.
- [156] Shoemaker, K. R., Kim, P. S., Brems, D. N., Marqusee, S., York, E. J., Chaiken, I. M., Stewart, J. M. & Baldwin, R. L. (1985) Nature of the charged-group effect on the stability of the C-peptide helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 2349–2353.
- [157] Fairman, R., Shoemaker, K. R., York, E. J., Stewart, J. M. & Baldwin, R. L. (1990) The Glu 2⁻ ... Arg 10⁺ side-chain interaction in the C-peptide helix of ribonuclease A. *Biophys. Chem.* **37**, 107–119.
- [158] Thomas, Jr. G. J. (1999) Raman spectroscopy of protein and nucleic acid assemblies. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 1–27.
- [159] Bolin, K. A., Pitkeathly, M., Miranker, A., Smith, L. J. & Dobson, C. M. (1996) Insight into a random coil conformation and an isolated helix: Structural and dynamical characterisation of the C-helix peptide from hen lysozyme. *J. Mol. Biol.* **261**, 443–453.
- [160] Brandts, J. F. & Kaplan, L. J. (1973) Derivative spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* **12**, 2011–2024.
- [161] Painter, P. C. & König, J. L. (1976) Raman spectroscopy of polypeptides and proteins, in: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Proteins. Vol. III* (Hrsg.: G. D. Fasman). CRC Press, Cleveland, Ohio, 3. Auflage.
- [162] van Gunsteren, W. F. (1993) Molecular dynamics and stochastic dynamics simulation: A primer. In: *Computer Simulation of Biomolecular Systems, Theoretical and Experimental Applications*, (Hrsg.: W. F. van Gunsteren, P. K. Weiner, A. J. Wilkinson), Escom Science Publishers, Leiden, The Netherlands, 1. Auflage.
- [163] Morgan, J. F., Morton, H. J. & Parker, R. C. (1950) Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **73**, 1–10.

Abkürzungen und Symbole

α	Absorptionskoeffizient
AI	Amid-I-Bande (Peptidbindung)
AIII	Amid-III-Bande
Ac	Acetylgruppe
AFM	<i>atomic force microscopy</i> (Atomkraftmikroskopie)
Boc	t-Butyloxycarbonyl (Schutzgruppe)
BOP	Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium- hexafluorophosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
B_0	Magnetfeld in z-Richtung (NMR)
χ	Torsionswinkel (Konformationswinkel)
<i>cw</i>	<i>continuous wave</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CD	Circular-Dichroismus
CSA	<i>(1S)-(+) -10-camphorsulfonic acid</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i> (Korrelationsspektroskopie)
δ	Chemische Verschiebung (NMR)
Da	Dalton
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DMF	N,N-Dimethylformamid
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
DTT	Dithiothreitol (Clelands Reagenz)
DQF	<i>double quantum filtered</i>

ϵ	molarer Absorptionskoeffizient
ECL3	<i>extracellular loop 3</i> (dritte extrazelluläre Schleife)
ESR	Elektronenspinresonanz
ϕ	Torsionswinkel (Konformationswinkel)
FAB	<i>Fast-Atom-Bombardment</i> Ionisation
FID	<i>free induction decay</i> (freier Induktionsabfall)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT	Fourier-Transformation
γ	gyromagnetisches Verhältnis
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>
GnRH-R	<i>gonadotropin-releasing hormone receptor</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
HF	Hydrogenfluorid, Fluss-Säure
HMBC	<i>heteronuclear multiple-bond correlation</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IR	Infrarot
nJ	Kopplungskonstante über n Bindungen
J	Kernspin
J_z	Z-Komponente des Kernspins
k_B	Boltzmann-Konstante
K	Kelvin
λ_0	Lasieranregungswellenlänge
μ	magnetisches Moment
m	magnetische Quantenzahl, Kernspinquantenzahl
M	Molarität (mol/l)
M_r	relative Molekülmasse

MALDI	Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
ν	Frequenz [Hz]
$\tilde{\nu}$	Raman-Verschiebung in relativen Wellenzahlen [cm^{-1}]
ν_L	Larmorfrequenz
Nd	Nd
NIR	Nahes Infrarot
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
ORD	optische Rotationsdispersion
p. a.	pro analysis
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
ppm	<i>parts per million</i>
θ	Impulswinkel (NMR-Spektroskopie)
[Θ]	mittlere Elliptizität (CD-Spektroskopie)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
ROESY	<i>rotating frame Overhauser effect spectroscopy</i>
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase, HPLC)
R_t	Retentionszeit (HPLC)
σ	1.) Abschirmungskonstante (NMR-Spektroskopie) 2.) (Raman-)Streuquerschnitt
S/N	Signal-Rausch(-Verhältnis)
τ	Impulsintervall
τ_P	Impulslänge (NMR-Spektroskopie)
T	Tesla
T	absolute Temperatur
T_1	longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationszeit
T_2	transversale oder Spin-Spin-Relaxationszeit

tBu	tertbutyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TMD	transmembrane Domäne
TMS	Tetramethylsilan
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i> (Korrelationspektroskopie)
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (Flugzeitmassenspektrometrie)
TPPI	<i>time-proportional phase incrementation</i>
tRNA	Transfer-RNA
Upm	Umdrehungen pro min
UV	Ultraviolett
UVR	UV Resonanz-Raman-Spektroskopie
VIS	sichtbarer Bereich des Spektrums
ω	Torsionswinkel (Konformationswinkel)
ω_0	Larmorfrequenz
ψ	Torsionswinkel (Konformationswinkel)
YAG	<i>yttrium aluminium garnet</i>

Kennzeichnung von Schwingungen

δ	<i>deformation</i>	as	antisymmetrisch (als Index)
ν	<i>stretching</i>	ip	<i>in plane</i>
ρ	<i>rocking</i>	m	<i>medium</i>
τ	<i>twist</i>	op	<i>out of plane</i>
ω	<i>wagging</i>	s	<i>strong</i>
		s	symmetrisch (als Index)
		sh	<i>shoulder</i>
		v	<i>very</i>
		w	<i>weak</i>

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	L	Leu	Leucin
R	Arg	Arginin	K	Lys	Lysin
N	Asn	Asparagin	M	Met	Methionin
D	Asp	Asparaginsäure	F	Phe	Phenylalanin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin	S	Ser	Serin
E	Glu	Glutaminsäure	T	Thr	Threonin
G	Gly	Glycin	W	Trp	Tryptophan
H	His	Histidin	Y	Tyr	Tyrosin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin

Anhang

A: Gerätekonfigurationen und Systemparameter

Analytische HPLC

Gerätekonfiguration:

HPLC-System:	L 6200A, AS 2000A Merck/Hitachi, Darmstadt
Detektor:	variabler UV/VIS-Detektor, UVD160 Gynkotheek, Germering
Detektion:	UV 216 nm; 274 nm
Injektionsvolumen:	20 μ l

Systemparameter:

Trennsäule:	CC125/4 Nucleosil 120-5 C ₁₈ , Macherey-Nagel, Düren
Mobile Phase:	Lösungsmittel A: Wasser*/5 % Acetonitril/0,1 % TFA Lösungsmittel B: Acetonitril/0,1 % TFA
Flussrate:	1 ml/min
Gradient:	0 – 20 min 5 % – 60 % B 20 – 22 min 60 % – 70 % B 22 – 27 min 70 % B 27 – 32 min 70 % – 5 % B 32 – 35 min 5 % B

* Wasser (18 M Ω) wurde über LiChroprep Si60 nachgereinigt.

Präparative HPLC

Gerätekonfiguration:

HPLC-System:	BioRad, München, Modell 400
Detektor:	variabler UV/VIS-Detektor, BioRad Modell 1706
Detektion:	UV 230 nm; 274 nm
Injektionsvolumen:	0,1 – 1,0 ml

Systemparameter:

Trennsäule:	SP 250/21 Nucleosil 300–7 C ₁₈ , Macherey–Nagel, Düren	
Mobile Phase:	Lösungsmittel A: Wasser*/5 % Acetonitril/0,1 % TFA	
	Lösungsmittel B: Acetonitril/0,1 % TFA	
Flussrate:	5 ml/min	
Gradient:	0 – 20 min	5 % – 60 % B
	20 – 22 min	60 % – 70 % B
	22 – 27 min	70 % B
	27 – 32 min	70 % – 5 % B
	32 – 35 min	5 % B

* Wasser (18 MΩ) wurde über LiChroprep Si60 nachgereinigt.

CD-Spektroskopie

Gerätekonfiguration:

Hersteller:	Jasco Deutschland, Groß-Umstadt
Modell:	Jasco J-810
Detektor:	Photomultiplier, max. 650 – 700 V
Küvetten:	Quarzküvetten mit Schichtdicke 0,1 mm, 0,2 mm und 0,2 cm

Systemparameter:

Band width:	1 nm
Response time:	0,25 sec
Sensitivity:	200 mdeg
Measurement range:	300–190 nm, 250–185 nm
Datenintervall:	0,1 nm
Scan-Geschw.-keit:	200 nm/min
Akkumulationen:	3. . .20 je Scan
Auflösung:	0,0005 mdeg
Datenprozessierung:	Spectra Manager Version 1.4, Software für Windows 95/NT, Jasco Corp.

Mikro-Raman-Spektroskopie, SPEX-Doppelmonochromator

	Gerätekonfiguration/Systemparameter/Hersteller:
Laser:	Argon-Ionen-Laser ($\lambda_0 = 514,5 \text{ nm}$) Spectra Physics, Modell 166 Ausgangsleistung max. 400 mW
Laserleistung:	max. $\sim 22 \text{ mW}$ auf der Probe
Plasmalinien-Filter:	Pellin-Broca-Prisma und Lochblendensystem
Spektrometer:	Doppelmonochromator 0,85 m, SPEX Modell 1404
Eintrittsspalt:	$200 \mu\text{m}$
Mittelspalte:	beide Spalte offen
Gitter:	holographisch, 1800 Linien/mm
spektr. Auflösung:	$\sim 3 \text{ cm}^{-1}$
Streugeometrie:	90° (ohne Mikroskop, Lösungsspektren) 180° (mit Mikroskop, Festkörperspektren)
Detektion:	mit flüssigem N_2 gekühlte CCD-Kamera (ca. -110°C) Photometrics Modell SDS 9000 (1024 x 256 Pixel)
Mikroskop:	nicht invertierter Aufbau in Anlehnung an kommerzielles Lichtmikroskop von Olympus
Objektiv:	Olympus ULWD MSPLAN80/0,75 (<i>Ultra Long Working Distance</i>)
Sammellinse:	$f = 150 \text{ mm}$, zur Streulichtabbildung auf den Eingangsspalt des Doppelmonochromators
elektr. Ansteuerung:	MAPS zur Ansteuerung von CCD-Kamera und Spektrometer
Datenaufzeichnung:	Scanning-Multichannel-Technik (SMT)
Datenprozessierung:	MAPS Analysis, MicroCal Origin

Mikro-Raman-Spektroskopie, LabRam

	Gerätekonfiguration/Systemparameter/Hersteller:
Spektrometer:	LabRam, Jobin Yvon, Horiba Group
Laser:	Argon-Ionen-Laser ($\lambda_0 = 514,5 \text{ nm}$) Spectra Physics, Modell 2016 Ausgangsleistung max. 250 mW
Laserleistung:	max. $\sim 8 \text{ mW}$ auf der Probe
Spektrometer:	Monochromator
Eintrittsspalt:	$100 \mu\text{m}$
Gitter:	holographisch, 1800 Linien/mm
spektr. Auflösung:	zwischen 4 cm^{-1} und 6 cm^{-1}
Streugeometrie:	180° -Rückstreuung
Detektion:	mit Peltier-Element gekühlte CCD-Kamera
Mikroskop:	Olympus BX40 (nicht invertierter Aufbau)
Objektiv:	MPlan10/0,25 LMPlanF150/0,50 LMPlanF1100/0,80 (alle: Fa. Olympus)
zus. Ausstattung:	Feinpositionierungssystem MCL (x-y Kreutztisch), Fa. Lang, Hüttenberg Farbmonitor und Digital CCD-Farbkamera WAT-202D, Fa. Water
Datenprozessierung:	Labspec Version 3.01C, Jobin Yvon

FT-Raman-Spektroskopie

Gerätekonfiguration und Systemparameter:

Spektrometer:	IFS 120 HR mit Raman-Modul FRA 106, Bruker, Karlsruhe
Laser:	Dioden-gepumpter cw Nd:YAG-Laser ($\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$)
Laserleistung:	max. 400 mW
Strahlteiler:	CaF ₂
spektr. Auflösung	$\sim 2 \text{ cm}^{-1}$
Detektion:	mit flüssigem N ₂ gekühlter Ge-Halbleiterdetektor
Streugeometrie:	180°-Rückstreuung
Konfiguration:	Apodisationsfunktion: Box-Car; Zero-Filling: 2-fach
elektr. Ansteuerung	OPUS (Optical User Software), Bruker, Karlsruhe, Datenaquisitionsprogramm zur Spektrometersteuerung und Spektrenauswertung
Datenprozessierung:	OPUS, Bruker

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Spektrometerspezifikationen:	
Spektrometer:	DMX 600 , Bruker, Karlsruhe 14,1 T mit ^1H Resonanzfrequenz 600,13 MHz ^{13}C Resonanzfrequenz 150,9 MHz
Ausstattung:	4 unabhängige Frequenzkanäle, abgeschirmte 3-Achsen-Feldgradienten, Tripel-/Quadrupel-Probenköpfe (QXI)
Datenaufzeichnung:	2048 (F_2 -Dimension) 256 (F_1 -Dimension)
Kalibrierung:	auf 0 ppm (^1H) mit TMS (295 K, pH 7,0)
Zero-Filling (F_1 -Dimension):	4-fach
Datenprozessierung:	Silicon Graphics Workstation, NMR-Xwin, Bruker
Spektrometer:	DMX 500 , Bruker
Ausstattung:	500,13 MHz, BB-invers Probenkopf
Datenaufzeichnung:	4096 (F_2) 512 (F_1)
Zero-Filling (F_1):	4-fach
Spectral width:	11 ppm
Spektrometer:	DMX 750 , Bruker
Ausstattung:	750,13 MHz, TXI-Probenkopf
Wassersignalunterdrückung:	WATERGATE Pulssequenz
Datenaufzeichnung:	4096 (F_2) 512 (F_1)
Zero-Filling (F_1):	4-fach

Durchgeführte Experimente

Probe:	Experiment:	Spektrometer:
ECL3-Peptid	(DQF) COSY, TOCSY (MLEV17), NOESY	DMX750, DMX500
APA ₄	COSY, NOESY, TOCSY, ROESY, HMQC, HMBC	DMX600
3L	COSY, ROESY, TOCSY, HMQC, HMBC	DMX600
3I	COSY, ROESY, TOCSY, HMQC, HMBC	DMX600

B: Sonstige Geräte

	Spezifikationen/Hersteller:
Lyophilisator:	Christ, Alpha 1-4
Digital pH-Meter:	Wiss. techn. Werkstätten Weinheim mit pH-Elektrode (Messkette) SenTix61
Mikro-Pipetten:	Calibra88, Socorex 1 – 10 μl ($< \pm 2\%$) 10 – 100 μl ($< \pm 1\%$) 100 – 1000 μl ($< \pm 0,7\%$)
Ultraschallbad:	Sonorex RK100H, Bandelin electronic GmbH
Zentrifuge:	Sorvall RC 5B, DuPont
Analysenwaage:	H10Tx, Mettler, Ablesbarkeit 0,1 mg
Mikrowaage:	Toledo PG503, Mettler, Ablesbarkeit 0,001 g

C: Lösungsmittel, Puffer und Chemikalien

Reagenzien zur Peptidsynthese

HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
DIC	Diisopropylcarbodiimid
NMP	N-Methylpyrrolidon
DMF	Dimethylformamid
DCM	Dichlormethan
TFA	Trifluoressigsäure
EDT	Ethandithiol (<i>scavenger</i>)
	Anisol (<i>scavenger</i>)
	Piperidin
	Essigsäureanhydrid

Geschützte Aminosäurederivate

Tyr	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
Lys	Fmoc-Lys(Boc)-OH
Ala	Fmoc-Ala-OH
Gly	Fmoc-Gly-OH
Leu	Fmoc-Leu-OH
Ile	Fmoc-Ile-OH

Alle Reagenzien zur Peptidsynthese wurden, wenn nicht anders angegeben, von NovaBiochem, Läudefingen (CH), von AppliedBiosystems, Weiterstadt, oder von Fluka, Neu-Ulm bezogen.

Puffer für die CD-Spektroskopie

NaF-haltiger Puffer

0,1	M	Natriumfluorid	(NaF)
1	mM	Natriumborat	(Na ₂ B ₄ O ₇)
1	mM	Natriumcitrat	(C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)
1	mM	Natriumphosphat	(Na ₃ PO ₄)

mit NaOH und HCl auf pH 7,0 eingestellt. Bei den CD-Messungen mit TFE wurde diesem Puffer 40 Vol. % TFE zugesetzt.

Medium 199

Medium 199 ist eine Standard-Nährlösung, die in der Zellkultur-Technik vielfach eingesetzt wird [163]. Die Lösung enthält anorganische Salze (CaCl₂, Fe(NO)₃, KCl, MgSO₄, NaCl, NaH₂PO₄), zahlreiche weitere Komponenten (z.B. ATP, AMP, 2-Deoxy-D-Ribose, Guanin-Hydrochlorid, Glutathion), alle 20 L-Aminosäuren und eine Reihe von Vitaminen (z. B. Ascorbinsäure, Riboflavin, Vitamine A, D2, K3).

Weitere Details aller Komponenten sind unter der Katalog-Nr. 11180 vom Hersteller Invitrogen GmbH, Karlsruhe, aufgelistet und über die URL <http://www.lifetech.com> verfügbar.

Puffer für die NMR-Spektroskopie

0,1 M Phosphatpuffer (Natriumdihydrogenphosphat/Dinatriumhydrogenphosphat), mit NaOH und HCl auf pH 7,0 eingestellt.

Chemikalien

Produkt:	Vertrieb, Hersteller:
Acetonitril	RIEDEL-DE HAËN, Seelze
Acetanhydrid	FLUKA, Neu-Ulm
Campher-Sulfonsäure (CSA)	SIGMA, Deisenhofen
Deuteriumoxid (D ₂ O)	SIGMA
Dihydroxybenzoesäure (DHB)	SIGMA
Dimethylformamid (DMF)	RIEDEL-DE HAËN
Dithiothreitol (DTT)	MERCK, Darmstadt
Essigsäure	RIEDEL-DE HAËN
Ethanol	MERCK
Natriumborat (Na ₂ B ₄ O ₇)	SIGMA
Natriumfluorid (NaF)	SIGMA
Piperidin	FLUKA
Trifluoressigsäure (TFA), <i>Peptide Grade</i>	SOLVAY, Hannover
Trifluorethanol (TFE)	SIGMA
Trinatriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	SIGMA
Trinatriumphosphat (Na ₃ PO ₄)	SIGMA

D: Peptidsequenzen

Kurzbe- zeichnung:	Sequenz:
1.) ECL3	CGPEMLNRVSEPGC
2.) APA ₃	APAAA
APA ₄	APAAAA
APA ₅	APAAAAA
3.) 3L	YGGKAALAKAALAKAALAK
2L(C)	YGGKAAAAKAALAKAALAK
1L(C)	YGGKAAAAKAAAAKAALAK
1L(M)	YGGKAAAAKAALAKAAA
2L(N)	YGGKAALAKAALAKAAA
1L(N)	YGGKAALAKAAA
3I	YGGKAAIAKAAIAKAAIAK
2I(C)	YGGKAAAAKAAIAKAAIAK
1I(C)	YGGKAAAAKAAAIAKAAIAK
1I(M)	YGGKAAAAKAAIAKAAA
2I(N)	YGGKAAIAKAAIAKAAA
1I(N)	YGGKAAIAKAAA
ref	YGGKAAAAKAAA

Alle Peptide N-terminal acetyliert und C-terminal amidiert.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden oder werden veröffentlicht:

Cîntă-Pînzaru, S., Cavalu, S., Leopold, N., Petry, R. & Kiefer, W. (2001) Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy of tempyo spin labelled ovalbumin. *J. Mol. Str.* **565–566**, 225–229.

Popp, J. & Petry, R. (2002) Progress in Laser Raman Biospectroscopy. *Angew. Chemie*, eingereicht.

Petry, R., Craik, D., Haaïma, G., Fromme, B., Klump, H., Kiefer, W., Palm, D. & Millar, R. (2002) Secondary structure of the third extracellular loop responsible for ligand selectivity of a mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *J. Med. Chem.* **45**, 1026–1034.

Baia, L., Gigant, K., Posset, U., Petry, R., Schottner, G., Kiefer, W. & Popp, J. (2002) Confocal Raman Investigations on Hybrid Polymer Coatings. *Appl. Spectrosc.*, im Druck.

Tagungsbeiträge:

Petry, R., Kiefer, W., Klump, H., Fromme, B., Katz, A. & Millar, R. *Secondary structure of extracellular loop 3 in mouse GnRH receptor*, BIO-Y2K Combined Millennium Meeting of the South African Society for Biochemistry and Microbiology, Grahamstown, South Africa, 23.–28.01.2000.

Cîntă-Pînzaru, S., Cavalu, S., Leopold, N., Petry, R., Pop, C. C., Iliescu, T., & Kiefer, W. *Raman and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Ovalbumin marked with Tempyo ESR label*.

25th European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS), Coimbra, Portugal, 27.08.–01.09.2000.

Cavalu, S., Cîntă, S., Leopold, N., Petry, R., Pop, C. C., Cozar, O. & Kiefer, W. *Tempyo Labeled Cytochrome C studied by Resonance Raman and Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy*

25th European Congress on Molecular Spectroscopy (EUCMOS), Coimbra, Portugal, 27.08.–01.09.2000.

Petry, R., Bouschen, W., Klump, H., Millar, R. & Kiefer, W. *Conformational Raman analysis on small alanine-proline peptides*.

in: Proc. XVIIth International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2000), Peking, China, 20.–25.08.2000.

Petry, R., Popp, J., Klump, H., Palm, D. & Kiefer, W.

Monitoring selective substitutions of amino acids in helical peptides by Raman spectroscopy.

9th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM2001), Prag, Tschechische Republik, 08.–13.09.2001.

Popp, J., Petry, R. & Kiefer, W.

Raman studies of the helix stabilization tendencies in alanine-based model peptides.

9th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM2001), Prag, Tschechische Republik, 08.–13.09.2001.

Petry, R., Klump, H., Palm, D., Popp, J. & Kiefer, W.

Spectroscopic determination of the secondary structure in proline-containing polypeptides.

in: Proc. XVIIIth International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2002), Budapest, Ungarn, 25.–30.08.2002.

Danksagung

Die Kunst der Forschung beginne damit, sich einen guten Boss zu besorgen, soll André Lwoff einmal gesagt haben. In diesem Sinn ist mein herzlicher Dank an erster Stelle an Prof. Wolfgang Kiefer gerichtet. Seiner Unterstützung und Motivierung habe ich es zuzuschreiben, dass meine Arbeit positive Impulse für den Abschluss erhalten hat. Viele Gespräche und Diskussionen mit ihm haben mir Zuversicht vermittelt und ausschlaggebende Anregungen gegeben.

Während der Laborarbeit, an die ich gerne zurückdenke, genauso wie in der Arbeit an Veröffentlichungen und Tagungsbeiträgen, war Prof. Dieter Palm ein ruhender Pol und zugleich eine vielseitige Informationsquelle. Er hat mich in der Endphase eines langen Weges begleitet, wobei er wiederholt kritische Urteilskraft und stichhaltige Argumentation eingefordert hat. Beispielhaft sei eine seiner Bemerkungen nach einer unserer vielen, langen Diskussionen erwähnt: 'Man beweist immer das, woran man glaubt und man glaubt immer an das, was man bereits bewiesen hat.'

Der lehrreiche und anregende Aufenthalt im biochemischen Institut der Kapstadter Universität zusammen mit dem oft gefährlichen Lebensalltag in der südafrikanischen Großstadt waren für mich eine neue und fremde Herausforderung. Prof. Horst Klump möchte ich danken für seine wissenschaftliche Betreuung, die stets geprägt war von Toleranz und Fürsorge, mit der er mir den spannenden Weg in die interdisziplinäre Forschung in seiner angenehmen Weise eröffnet hat.

Die Namensliste der vielen Mitarbeiter, Berater und Freunde, die mir helfend zur Seite standen und am Zustandekommen dieser Arbeit mitgewirkt haben, würde sich in die Länge ziehen, sollten alle Personen einzeln aufgeführt werden. Stellvertretend für die freundliche Unterstützung in Kapstadt möchte ich mich bedanken bei Prof. Robert Millar, Prof. Guillaume Brümmer, Anna-Maria Bassel, Moira Cooke, Dr. Neo Makube, Dr. Martin Mills, Madhu Chauhan, Anke Fiedler, Jennifer Eidelman, Ethne Liebenberg, Marianne Marold und Bastienne Klein.

Fachliche Unterstützung, angenehme Zusammenarbeit und kompetente Beratung verbinde ich in Würzburg mit den Namen von Prof. Jürgen Popp, Dr. Matthias Grüne, Elfriede Ruckdeschel, Adelgunde Wolpert, Werner Bouschen, Petra Meuer, Petra Rösch, Nicu Tarcea, Nicolae Leopold, Ursula Müller, Belinda Leimeister, Melanie Grom, Peter Popp, Michael Dreyer und Dr. Michael Wohlfahrt. Ihnen allen sei gedankt für die mir entgegengebrachte Aufmerksamkeit, für die prompte Hilfe bei technischen Problemen und für die produktive, gemeinsame Zeit im Institut.

Ein Wort des Dankes will ich auch meinen Brüdern Helmut, Ulrich und Günter aussprechen. Mit ihrer Anteilnahme und den Ratschlägen per Telefon oder Internet haben sie mir die große Entfernung zwischen den beiden Kontinenten manchmal klein erscheinen lassen. Mein herzliches Dankeschön soll abschließend an Karl-Heinz Greubel gerichtet sein, der manche Unruhe und Gemütsschwankung während der Zeit des Zusammenschreibens mit geduldigem Zuhören und kulinarischen Intermezzi abgefangen hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Renate Petry, geb. Baierl, 23.11.1959, Würzburg

Schulbildung

1966–1970 Schillerschule, Würzburg
1970–1979 Mozart–Gymnasium, Würzburg

Ausbildung

1979–1983 Fachhochschule für Technik und Wirtschaft, Reutlingen,
Dipl.–Ing. (FH) für Textilwesen
1986–1989 Studium der Physik, Albert–Ludwigs–Universität, Freiburg,
Diplom–Zwischenprüfung
1990–1993 Studium der Physik, Julius–Maximilians–Universität, Würzburg,
Diplom–Hauptprüfung
1994–1995 Diplom–Arbeit am Max–Planck–Institut für Festkörperforschung,
Stuttgart, *Thermische und magnetische Eigenschaften
von Delafossiten*

Tätigkeiten

09/79–02/80 ICI (Europa) Fibres, Chemiefaserwerke Östringen, Industrie-
Praktikum im Entwicklungslabor für neue Spinnfasern
03/82–08/82 Kammgarnspinnerei Schachenmayr, Salach, Industrie–Praktikum
in der Faserproduktion und Qualitätskontrolle
09/83–09/85 Berufliche Tätigkeit als Textilingenieur im Bereich Maschinen-
bau/Entwicklung neuer Spinntechnologien
10/88–05/89 Nebentätigkeit am Institut für Allgemeine Wirtschaftsforschung,
Universität Freiburg, Betreuung und Auswertung einer statistischen
Erhebung über Freiburger Großindustriebetriebe
09/89–07/90 Nebentätigkeit am Ernst–Mach–Institut der Fraunhofer–Gesellschaft,
Freiburg, Impaktforschung und Bildanalyse
04/90–06/90 Lehrauftrag (Nebentätigkeit) an der Universität Bamberg, Einführung
in die mathematischen Grundlagen der Synergetik
09/90–10/90 Nebentätigkeit am Fraunhofer–Institut für Silicatchemie, Würzburg,
Dielektrische–Thermische Analyse von 'Ormoceren'
03/95–08/95 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max–Planck–Institut für
Festkörperforschung, Stuttgart, Tieftemperaturlabor
10/95–04/99 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Department of Molecular and
Cellular Biology, University of Cape Town, South Africa
seit 05/1999 Wissenschaftliche Hilfskraft/Mitarbeiterin am Institut für
Physikalische Chemie, Universität Würzburg