

Untersuchungen im infraroten Spektralbereich zur Aufklärung der Strukturdynamik von Biopolymeren

Schmelzprozesse in Collagen-Modellsystemen und
photoinduzierte Konformationsänderungen in Azo-Peptiden

Dissertation

der Fakultät für Physik

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Benno Fonrobert

aus Essen

München, den 06. Juni 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Wachtveitl

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Rief

Tag der mündlichen Prüfung: 21. November 2003

Kurzfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Konformationsänderung zweier verschiedener biologischer Modellsysteme: des temperaturinduzierten Entfaltungs- und Schmelzvorgangs in Collagenen und der photoinduzierten Strukturodynamik in Azopeptiden. Die Untersuchungen wurden mittels optischer Spektroskopie im mittleren infraroten Bereich des Spektrums durchgeführt, wobei die Methode die Gewinnung umfangreicher Informationen über die Systeme zuläßt. Aufgrund nur geringer Signalamplituden war es äußerst wichtig, die Experimente mit hoher Einstell- und Abtastgenauigkeit durchzuführen. Dies wurde durch den Einsatz umfangreicher Modifikationen an kommerziellen Abtastsystemen bzw. den Aufbau und die Etablierung eines eigenen Meßplatzes zur zeitaufgelösten Spektroskopie ermöglicht.

Im ersten Teil der Arbeit wird die Temperaturabhängigkeit der Konformation an vier homotrimeren und einem heterotrimeren Collagen-Modellsystem untersucht. Dabei konnte in allen Fällen ein reversibles Schmelzen und Rückfalten bei Abkühlung beobachtet werden, wobei die unterschiedlichen Reaktionskinetiken sich gut auf die molekularen Eigenheiten wie z.B. Größe und Bindungsanzahl der Systeme abbilden ließen. Das postulierte bi-phasische Schmelzen des Heterotrimers konnte erstmals nachgewiesen werden. Die Reaktion folgt einer zwei-Zustands-Kinetik, wie durch die Einführung einer verbesserten und einfachen Modellfunktion gezeigt werden konnte.

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit der durch die photoinduzierte Isomerisierung des Azobenzols ausgelöste Konformationsdynamik in Azo-Peptiden. Durch cw-Experimente konnte die Übertragung der Reversibilität der Azobenzolkinetik auf die zyklische Peptidkette gezeigt werden. Die zeitaufgelöste Untersuchung der Konformationskinetik im bizyklischen Azo-Peptid für die *trans* \Rightarrow *cis* Photoreaktion ergab, daß die Konformationsdynamik im Peptid innerhalb von Pikosekunden weitgehend abgeschlossen ist. Damit konnte die bisher herrschende Meinung widerlegt werden, nach der die Bewegung einer Aminosäure außerhalb von Fluktuationen zur Bildung von sekundären Strukturmotiven beim Faltungsvorgang schnellstens im 10 ns-Bereich ablaufen kann.

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung	7
1.1 Biopolymere und Proteine	7
1.2 Strukturelemente der Proteine	7
1.3 Untersuchung der Strukturodynamik.....	8
2 Molekülschwingungen und ihr Nachweis im infraroten Spektralbereich	9
2.1 Spektren im infraroten Spektralbereich.....	9
2.2 Schwingungsübergänge in Proteinen.....	10
2.3 Struktursensitivität der Infrarotbanden - Wasserstoffbrücken.....	12
2.4 Aufnahme von statischen Infrarot-Spektren.....	13
2.5 Notwendige Erweiterungen des FT-Spektrometers.....	14
2.6 Diskussion und Anmerkungen zur Probenanregung.....	15
2.7 Aufnahme von zeitaufgelösten Infrarot-Meßkurven	17
2.8 Diodenlaser – Abtastlichtquelle.....	18
2.9 Spektrometer.....	20
2.10 Detektion	21
2.11 Laser zur Probenanregung	22
2.12 Zeitauflösung des Meßaufbaus.....	22
3 Konformationsuntersuchung an Collagentrimeren	25
3.1 Einführung	25
3.2 Methoden zur Strukturuntersuchung von Collagen-Modellsystemen	27
3.3 Bindungen und Helixstabilität – Bedeutung von Hyp.....	27
3.4 Helixbildung und Faltungskinetik	28
3.5 Synthetische Collagen-Modellpeptide.....	30
3.6 Die untersuchten Modellpeptide.....	31
3.7 Temperaturexkursionsuntersuchungen an Trimer B	35
3.8 Bandenzuordnung bei Collagen-Trimeren in der Literatur	38

3.9	Schmelzpunkt und Kooperativitätsgrad.....	41
3.10	Temperaturrekursionsuntersuchungen an den Modellsystemen Trimer E bis Trimer H	43
3.11	Zusammenfassung und Diskussion	46
3.12	Ergänzende Ergebnisdiskussion vor dem Hintergrund der Probenreinheit der Trimere E bis H	49
3.13	Strukturstabilität der Collagenase-Schnittstelle und biphasisches Schmelzen des Trimer B	50
3.14	Diskussion der Modellfunktion erf(t).....	54
4	Konformationsuntersuchungen an Azo-Peptiden	57
4.1	Einführung	57
4.2	Synthese und Struktur der Azo-Peptid-Verbindungen	60
4.3	Untersuchungen an Azobenzol	64
4.4	Untersuchungen an Azo-Peptiden	67
4.5	Zeitaufgelöste Messungen an bcAMPB	68
4.6	Signalhöhenabschätzung in zeitaufgelösten Untersuchungen.....	70
4.7	Meßprozedur.....	71
4.8	Ergebnisse.....	72
4.9	Diskussion der Ergebnisse.....	74
5	Zusammenfassung	77
6	Literatur	79
	Danksagung.....	85
	Anhang: Spektren der Modelltrimere E - H.....	88

1 Einführung

1.1 Biopolymere und Proteine

Das Verständnis großer Zusammenhänge der Biophysik fußt vielfach auf der Ermittlung der beteiligten Moleküle und dem Verständnis ihrer Wechselwirkungen. Unter den Biopolymeren stellen die Proteine (von griech. πρωτοζ, Eiweißbaustein) eine wichtige Untergruppe dar. Einfache Proteine sind Verbindungen, die nur aus Aminosäuren zusammengesetzt sind, zusammengesetzte Proteine enthalten zusätzlich prosthetische Gruppen. Diese Gruppen geben Einteilung und Namensgebung vor: z.B. Chromoproteine, Glykoproteine, Metalloproteine oder Hämoproteine. Die meisten natürlichen Systeme sind zusammengesetzte Proteine. Die Gruppe der Enzyme, der biologischen Katalysatoren, stellt den bekanntesten Vertreter dieser Molekülklasse. Doch auch andere Funktionen werden von Proteinen übernommen. Zu nennen sind hier beispielhaft Sauerstofftransport und Sauerstoffspeicherung, Strukturfestigung des Gewebes oder Ionen-transport durch eine Membran.

1.2 Strukturelemente der Proteine

Aufgrund ihrer vielfältigen Aufgaben ist es von großem Interesse, die inneren Mechanismen dieser Molekülklasse zu verstehen. Proteine sind lange Fadenmoleküle, sie werden gebildet durch eine Kette von kleineren Untereinheiten, den Aminosäuren. Die spezifische Aneinanderreihung der zwanzig natürlich vorkommenden Aminosäuren ist charakteristisch für jedes Protein, diese Sequenz wird die primäre Struktur des Proteins genannt.

Die richtige Abfolge der Aminosäuren im Fadenmolekül ist für die biologische Funktion allein nicht ausreichend. Erst in der richtigen geometrischen Anordnung kann das System seinen Aufgaben gerecht werden. Das lässt sich am Beispiel von Hämoglobin, dem Blutfarbstoff und Sauerstoffträger, gut verstehen: Das Eisen der Hämgruppe im Zentrum des Proteins soll das Sauerstoffmolekül binden, es muß also eine räumliche Nähe zwischen Fe und O₂ geschaffen werden. Doch allzu nah dürfen sich die Partner auch nicht kommen, da sonst die Bindung kovalent und damit irreversibel wäre. Die definierte Proteinstruktur um die zentrale Hämgruppe herum sorgt dafür, dass die Sauerstoffbindung reversibel erfolgt und das Protein damit seiner zugeordneten Aufgabe nachkommen kann. „Die Struktur bestimmt die Funktion“, ist also die Beschreibung dieses Sachverhalts.

In der Konformation (Geometrie) nativer Proteine finden sich häufig wiederkehrende Elemente wie etwa eine korkenzieherähnliche α -Helix oder ein S-förmiges β -Faltblatt. Diese Elemente werden Sekundärstrukturelemente genannt. Die Anordnung von Sekundärstrukturelementen zusammen mit weiteren Teilen des Proteins bildet schließlich dessen Tertiärstruktur.

Wie ist nun die Strukturinformation gespeichert? Der genetische Code der Organismen enthält nur die Primärstruktur, und durch Denaturierungsexperimente konnte Anfinsen [Anf61] zeigen, dass diese Information für die Bildung der Tertiärstruktur ausreichend ist.

1.3 Untersuchung der Strukturodynamik

Bis heute konnten die Sequenzen einer großen Zahl von Proteinen bestimmt werden. Auch die Bestimmung der räumlichen Struktur ist so erfolgreich, daß Proteindatenbanken mit vielen tausend Einträgen existieren (PDB u.a.). So gut also die Strukturen bekannt sind, so wenig weiß man doch gleichzeitig über die zugrundeliegenden Mechanismen. Wie falten einzelne Proteinteile? Welche Kräfte wirken? Gibt es eine definierte Abfolge der Faltung? Mit welcher Geschwindigkeit laufen die Prozesse ab? Bekannt ist, daß die Bildung der nativen Konformation nicht zufällig verläuft. Levinthal zeigte [Lev68], dass die beobachteten Faltungszeiten nicht mit einem Testen des gesamten Konformationsraums ohne gezielt treibende Mechanismen erklärbar sind. Dieser Sachverhalt ist als ‚Levinthal-Paradoxon‘ bekannt geworden. Zum Verständnis der Mechanismen reicht es nicht aus, nur Anfangs- und Endzustand der Proteingeometrie zu untersuchen. Es ist notwendig, das Protein während der Faltung zu beobachten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen gewählt, den dynamischen Faltungsprozeß der Beobachtung zugänglich zu machen. Im ersten Fall wurden verschiedene Peptide thermisch denaturiert, was erlaubt, ein teilweise entfaltetes System in einer konformativen „Wärmefalle“ zu halten. Der zweite Zugang ist die Verwendung von Systemen, welche sich durch einen eingebauten Schalter zwischen zwei Konformationen reversibel hin- und herschalten lassen. Wird im ersten Fall der Faltungsprozeß gezielt angehalten, so kann er im zweiten Zugang gleichsam in Echtzeit verfolgt werden.

2 Molekülschwingungen und ihr Nachweis im infraroten Spektralbereich

2.1 Spektren im infraroten Spektralbereich

Das Absorptionsspektrum einer Probe im infraroten Spektralbereich erlaubt es, schon von der Lage von Absorptionsbanden innerhalb gewisser Frequenzbereiche auf das Vorhandensein bestimmter Strukturgruppen zu schließen. Diese direkte stoffspezifische Aussagemöglichkeit ist mit anderen Methoden vielfach deutlich schwieriger oder gar nicht zu leisten und bildet das wesentliche Merkmal der Infrarotspektrenanalyse und begründet ihre Bedeutung in der instrumentellen Analytik [Gün96]. Für Proteine gilt zusätzlich, daß aus der Lage von Absorptionsbanden auf die Existenz bestimmter Strukturelemente geschlossen werden kann.

Die Absorption von elektromagnetischer Strahlungsenergie läßt sich auf verschiedene Prozesse im System zurückführen. In Atomen lassen sich bei Einhaltung der Frequenzbedingung und der Auswahlregeln elektronische Übergänge anregen. Bei Molekülen ist es zusätzlich möglich, gequantelte Schwingungs- und Rotationsübergänge anzuregen. Die notwendige Energie für Schwingungsübergänge liegt im infraroten Bereich des Spektrums zwischen $12800 - 200 \text{ cm}^{-1}$, zur Anregung von Rotationsübergängen wird i.a. weniger Energie benötigt, sie liegt bei weniger als 200 cm^{-1} im fernen Infrarot (FIR) bis hin in den Mikrowellenbereich des Spektrums.

Im Molekül kann die Schwingung oder Rotation mit der Bewegung einer Ladung verbunden sein. Dies ist der Fall, wenn die Ladungen der Atome im Molekül nicht symmetrisch verteilt sind. Polarisierbarkeit und Dipolmoment können durch die Schwingung verändert werden. Zur Schwingungsanregung gibt es unterschiedliche Wege, auch mechanische. Im Rahmen dieser Arbeit werden jedoch nur Prozesse betrachtet, bei denen aus dem Schwingungsgrundzustand ein IR-Photon absorbiert wird. Zerfälle höherer IR-Schwingungsniveaus werden nicht untersucht.

Eine ebenfalls für die Untersuchung von Molekülschwingungen geeignete und der IR-Spektroskopie verwandte Methode ist die Raman-Spektroskopie. Da für die Raman-Prozesse andere Auswahlregeln gelten, ergeben sich aus den beiden Methoden häufig ergänzende oder komplementäre Informationen. Die Raman-Streuung stellt einen inelastischen Streuprozess zwischen Photonen und Molekülschwingungen dar: einige der Lichtquanten geben einen Teil ihrer Energie an die Moleküle ab und treten längerwellig (um den übertragenen Energiebetrag ärmer) gestreut aus der Probe aus (Stokes-

Bereich). Trifft die Anregungsstrahlung auf schwingungsangeregte Moleküle, so können diese ihre Schwingungsenergie auf die einfallende Strahlung übertragen; es tritt also ein energiereicheres Quant aus der Probe aus (Anti-Stokes-Bereich). Die Frequenzverteilung, d.h. das Spektrum des Streulichts, weist Banden mit Frequenzdifferenzen zur Anregung auf, die den Schwingungsfrequenzen der Moleküle entsprechen. Die Differenz der Photonenenergie wird also vom Molekül zur Erhöhung seiner Schwingungsenergie verbraucht. Bei monochromatischer Anregung lassen sich demnach wertvolle Aussagen über das Schwingungsverhalten der Moleküle gewinnen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Raman-Spektroskopie zur Untersuchung von Proteineigenschaften nicht herangezogen.

In Abhängigkeit vom Aggregatzustand einer Probe zeigt das IR-Absorptionsspektrum unterschiedliche Ausprägungen: Absorptionsbanden mit scharf hervortretenden Linien der Rotationsübergänge (Rotationsfeinstruktur) treten nur bei Gasen auf. In Flüssigkeiten, in denen die Rotation stark behindert ist, lassen sich die einzelnen Rotationslinien nicht mehr beobachten. Stattdessen findet sich eine relativ breite, unstrukturierte Bande. Erst beim Übergang in den festen, kristallinen Zustand, bei dem die Rotationsbewegung vollständig eingefroren ist, tritt wieder eine deutliche Verringerung der Linien-Halbwertsbreiten ein. Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählten Bedingungen ergibt sich daher, dass die Absorptionsspektren im wesentlichen von den Schwingungsübergängen der Moleküle herrühren.

2.2 Schwingungsübergänge in Proteinen

Das Proteinrückgrat besteht aus einer wiederholten Abfolge von $(CCN)_n$, wobei das zweite Kohlenstoffatom als C_α -Atom bezeichnet wird, welches an ein Wasserstoffatom und einen aminosäurebestimmenden Rest bindet. Die Gruppe CONH, siehe Fig. 2.1, bildet durch einen partiellen Doppelbindungscharakter eine starre, planare Einheit, Amidgruppe genannt. Die vorhandene Kettenbeweglichkeit ergibt sich durch Drehungen um die Bindungen des C_α -Atoms. Dem Proteinrückgrat stehen aufgrund der freien Drehbarkeit um die C_α -C_O-Bindung (Torsionswinkel Ψ) und um die N- C_α -Bindung (Torsionswinkel Φ) viele Konformationen zur Verfügung (die Summe dieser Konformationen wird unter dem Begriff des Konformationsraums zusammengefaßt). Aufgrund sterischer Behinderung sind bestimmte Kombinationen nicht möglich. Die erlaubten Bereiche von Ψ und Φ kann man mit Raumkonturdiagrammen, den sog. Ramachandran-Plots einfach darstellen.

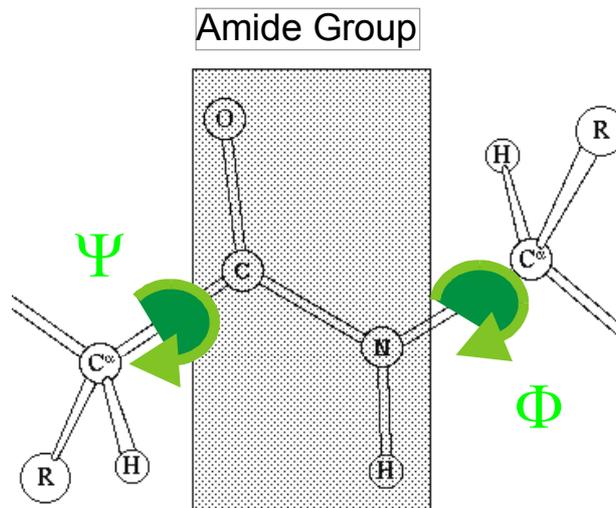


Fig. 2.1: Im Proteinrückgrat bildet die Gruppe CONH durch einen partiellen Doppelbindungscharakter eine starre, planare Einheit, Amidgruppe genannt. Die Kettenbeweglichkeit ergibt sich aus möglichen Drehungen mit den Dihedralwinkeln Ψ und Φ um die Bindungen des C_{α} Atoms.

Im Infrarotspektrum von Proteinen finden sich spezifische Banden, deren prominenteste – die Amid I-Bande – im Bereich von 1660 cm^{-1} zu finden ist. Diese Bande wird dominiert durch die C=O-Streckschwingung [Kri86]; weitere Banden (Amid II und höhere) enthalten Komponenten von CN-Schwingungen und anderen, vgl. Fig.2.2. Die Amidgruppe der Proteine ist anhand der Absorptionsbandenverteilung im Infrarotspektrum eindeutig identifizierbar.

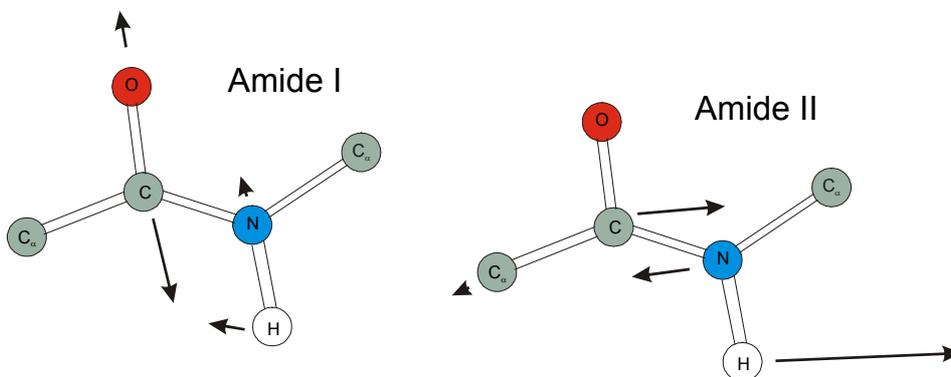


Fig. 2.2: Schwingungen des Proteinrückgrats: Die dargestellten Schwingungen führen zu den Amid I und Amid II genannten Banden im Spektrum, nach [Kri86]. Die Schwingung zu Amid I wird durch die C=O-Streckschwingung dominiert.

2.3 Struktursensitivität der Infrarotbanden - Wasserstoffbrücken

Bei der Bindung an Kohlenstoff behält das O-Atom eine partiell negative Ladung bei. Diese Ladung kann ein Wasserstoffatom einer benachbarten Molekülgruppe anziehen. Zwischen dem Wasserstoffakzeptor Sauerstoff auf der einen Seite und einem Wasserstoffdonor auf der anderen Seite bildet sich eine reversible Wasserstoffbrückenbindung; die Atome teilen sich gewissermaßen das Proton. Die Bindungslängen liegen bei etwa 0.3 nm mit Bindungsenergien von 12 bis 29 kJ/mol.

Als Wasserstoffdonor kann entweder ein Lösungsmittelmolekül dienen (etwa H₂O) oder aber das Stickstoffatom aus einem anderen Teil des Proteinrückgrats, wodurch die Interaktion unterschiedlicher Proteinteile möglich wird. So wird etwa die α -Helix durch Wasserstoffbrücken zwischen Amid- (-NH-) und Carbonylgruppen (-C=O-) stabilisiert [Str90]. Die Wasserstoffbrücke beeinflusst die C=O-Streckschwingung. Die Oszillationsfrequenz und damit die Lage der Absorptionsbanden sollte sich verändern.

Diese Erwartung wird tatsächlich bestätigt. Es besteht ein Zusammenhang zwischen einer dominanten Sekundärstruktur eines Proteins und der Amid I Bandenlage. In einem überwiegend α -helicalen Protein sind die Oszillatoren sehr ähnlich, was zu einer schmalen Bande führt, die sich bei 1660 - 1650 cm⁻¹ befindet. Auch überwiegend β -Faltblattstrukturen sind anhand der Amid I Bande im Bereich von 1640 - 1620 cm⁻¹ zu identifizieren [Tor96]. Damit ist auch sofort zu erklären, dass denaturierte Proteine mit vielen unterschiedlichen Oszillatoren eine breite Amid I Bande von 1700 - 1600 cm⁻¹ aufweisen.

Die Amid I Bande wird in ihrer Form und Lage von der Proteinstruktur beeinflusst. Damit kann sie als struktursensitive Sonde eingesetzt werden. Diese Sondenfunktion wird in der vorliegenden Arbeit zur Aufklärung von Faltungsprozessen in Proteinen intensiv genutzt.

Kleine Peptide lassen sich zusätzlich über die 2D-IR Methode untersuchen. Hierbei wird die Wechselwirkung zwischen zwei C=O-Gruppen bezüglich Abstand und Winkel getestet, was zu einer konvolutionsspektroskopischen Methode führt.

2.4 Aufnahme von statischen Infrarot-Spektren

Zur Aufnahme von statischen Spektren stand im Rahmen dieser Arbeit ein kommerzielles Fourier-Transform-Infrarotspektrometer (IFS66, Bruker) zur Verfügung, an welchem eine Reihe von notwendigen Modifikationen durchgeführt wurden.

In FTIR-Spektrometern, vgl. Fig. 2.3, gelangt das Licht einer spektral breitbandigen Quelle auf den Spektralapparat, der hier durch ein Michelson-Interferometer gebildet wird. Nachfolgend durchtritt das modulierte Licht die zu untersuchende Probe und wird schließlich im Detektor aufgefangen. Eine Auswertelektronik berechnet mit Hilfe des Fast Fourier-Transform (FFT) Algorithmus aus den aufgenommenen Interferogrammen von Probe und Hintergrund das Substanzabsorptionsspektrum.

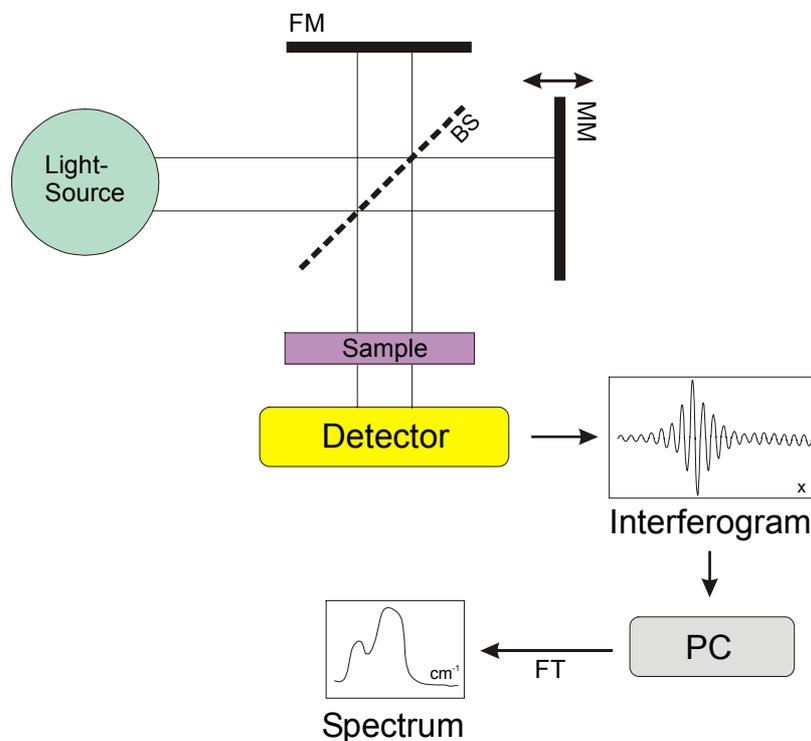


Fig. 2.3: Schematischer Aufbau des FTIR-Spektrometers u.a. mit den Komponenten: FM-fixed mirror, MM-movable mirror, BS-beamsplitter, FT-Fouriertransformation, Light Source-Globar, Detector-Diglycin-Trisulfid (DGTS).

In der Infrarotspektroskopie haben sich seit Ende der 1960er Jahre die Fourier-Transform-Spektrometer aufgrund einer Reihe von Vorteilen gegenüber den dispersiven Geräten durchgesetzt.

Diese sind:

- a) Multiplex- oder Fellgett-Vorteil: Alle Wellenlängen werden im Interferometer gleichzeitig, im Monochromator dagegen sequentiell gemessen. Bei im MIR meist dominierenden Detektorrauschen lässt sich für jedes Spektralelement N mit $N = (\tilde{\nu}_{\max} - \tilde{\nu}_{\min}) / \Delta\tilde{\nu}$, mit $\tilde{\nu}_{\max}$ als oberer und $\tilde{\nu}_{\min}$ als unterer Grenze des spektralen Meßbereichs und $\Delta\tilde{\nu}$ als Breite eines Spektralelements, eine um den Faktor N längere Meßzeit realisieren. Dies bedeutet, dass bei derselben Meßzeit das Rauschen um den Faktor \sqrt{N} verringert wird oder für dasselbe Signal-zu-Rausch-Verhältnis sich die Meßzeit um den Faktor N verkürzt.
- b) Lichtleitwert- oder Jacquinot-Vorteil: Bei gleicher spektraler Auflösung kann generell der Lichtleitwert des FT-Spektrometers mit seinen kreisförmigen Blenden höher sein als der eines dispersiven Geräts, das mit zwei Spalten ausgestattet ist. Der Leitwert kann bei gleichem Auflösungsvermögen bis zu zwei Zehnerpotenzen höher liegen. Damit ist eine um den Faktor 100 höhere Strahlungsleistung detektierbar.
- c) Wellenzahlstabilitäts- oder Connes-Vorteil: Auch über längere Meßperioden ist die Wellenzahlstabilität von FT-Spektrometern deutlich höher als die von dispersiven Geräten. Dies beruht darauf, dass die Frequenzskala des FT-Geräts an den das Michelson-Interferometer kontrollierenden He-Ne-Laser gekoppelt ist, der eine interne Referenz für jedes Interferogramm liefert.

2.5 Notwendige Erweiterungen des FT-Spektrometers

Um eine Verwendung in den hier vorgestellten Messungen zu erlauben, mußten am Spektrometer Maßnahmen zur Erweiterung der Gerätekapazität durchgeführt werden.

- a) Probenwechsler:
Das Absorptionsspektrum einer Probe wird unter Berücksichtigung des Absorptionsverhaltens des Lösungsmittel-Hintergrunds errechnet. Ein Probenwechsler erlaubt die abwechselnde Aufnahme von Spektren der Probe bzw. des reinen Lösungsmittels und reduziert deutlich die Meßzeit. Zusätzlich liegen im MIR Absorptionsbanden des Rotationsschwingungsspektrums des gasförmigen Wasserdampfs. Zur Unterdrückung dieser Banden wird die Probenkammer mit getrockneter Luft gespült. Ein Probenwechsler vermeidet wiederkehrende Wartezeiten durch den Spülprozeß nach Öffnen der Probenkammer.

b) Küvette:

Zur Aufnahme eines dünnen und homogenen Probenfilms wurde eine zweiteilige Küvette gefertigt. Zwei IR-transparente CaF_2 -Fenster werden durch einen PTFE-Abstandsring in definiertem Abstand gehalten und fixiert. Dieser Abstand definiert die Dicke des zu untersuchenden Probenfilms. Dieselbe Küvette lässt sich auch im Messplatz zur Untersuchung zeitaufgelöster Spektren verwenden.

c) Proben temperierung:

Die Küvettenaufnahme im Probenraum des Spektrometers ist an einen externen Kühl- und Heizkreislauf angeschlossen. Über eine Kombination aus temperierten Wasserbädern und einem elektronisch geregelten zweistufigen Peltierelement läßt sich die Temperatur des Probenfilms im Bereich von unter 250 K bis über 360 K frei einstellen und wählen. Die Langzeitstabilität des gewählten Temperaturwerts ist besser als 0.2 K.

d) Probenbeleuchtung:

Am Meßort kann die Probe beleuchtet werden. Dazu stehen zwei Beleuchtungsquellen zur Verfügung (Hg-Xe-Dampfampe und Halogen-Glühbirne), deren Licht über zwei getrennte Lichtleiter-Faserbündel zur Probe geleitet werden kann. Vor Eintritt in die Fasern läßt sich das jeweilige Lampenspektrum durch geeignete Filter an die Anforderungen anpassen.

e) Kombination mit VIS-Absorptionsspektroskopie:

Es ist häufig von Vorteil, das IR- und das VIS-Absorptionsspektrum einer Probe gleichzeitig bestimmen zu können. Die Probe wird dazu breitbandig beleuchtet und das transmittierte Licht von einem weiteren Faserbündel aufgefangen. Dieses Bündel ist mit einem externen VIS-Spektrometer verbunden, über das ein VIS-Absorptionsspektrum der Probe bestimmt werden kann, ohne dass die Küvette aus dem FTIR-Probenraum entnommen werden muß.

2.6 Diskussion und Anmerkungen zur Proben temperierung

Bei der Untersuchung erwärmter Proben ist stets die Eigenstrahlung der Substanz zu beachten. Ein im Strahlengang befindlicher Körper, dessen Temperatur höher als die der Umgebung ist, liefert zusätzlich zur Strahlung der Lichtquelle einen Anteil entsprechend seiner Temperatur. Nach Kirchhoff ist das Verhältnis von Absorption und Emission substanzunabhängig und nur eine Funktion von Wellenlänge und Temperatur. Damit emittiert die Substanz bei Erwärmung selektiv in den Bereichen ihrer Absorptionsbanden.

Bei FT-Spektrometern liegt die Probenkammer hinter dem die Strahlung modulierenden Interferometer, so daß die Probenemission (und die Streustrahlung) unmoduliert auf den Detektor fällt und damit in der Fouriertransformation herausgefiltert wird. Tritt jedoch die thermische Probenstrahlung rückwärtig in das Interferometer ein, so kann diese doppelt moduliert zum Detektorsignal beitragen. Weicht als einzige Komponente im Spektrometer nur die Probe von der Raumtemperatur ab, so kann die Probenstrahlung zu einer geringen Verzerrung des Spektrums im Bereich des Maximums eines RT-Schwarzkörperstrahlers führen [Tan84]. Diese Probenstrahlung im untersuchten Spektralbereich ist von geringer Stärke und wird zusätzlich im Interferometer in ihrer Intensität halbiert, vgl. Fig. 2.4. Für die vorgenommenen Untersuchungen in der Amid I-Region kann die Probenstrahlung daher vernachlässigt werden.

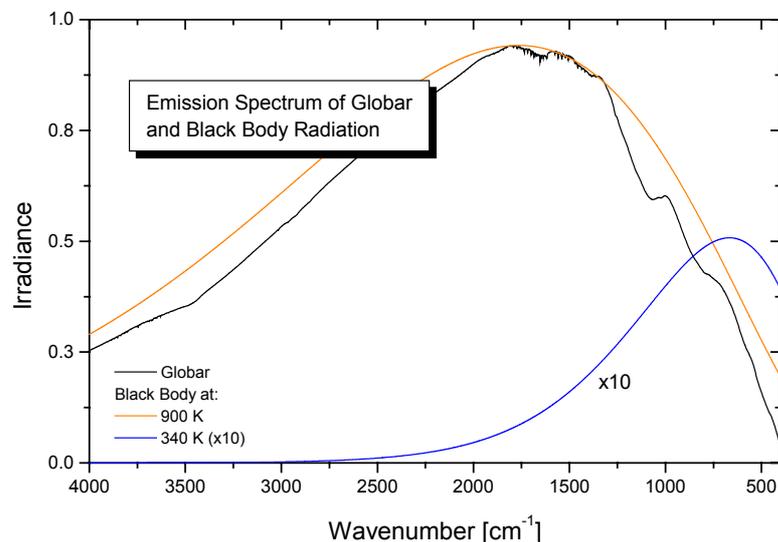


Fig. 2.4: *Das Emissionsspektrum des Globars kann gut durch ein Schwarzkörperspektrum bei 900 K angepaßt werden. Die Emission der 340 K heißen Probe ist im untersuchten Spektralbereich gering (Kurve 10-fach überhöht). Das gemessene Emissionsspektrum des Globars enthält geringe Anteile von gasförmigen Wasserdampf-Absorptionsbanden.*

Bei der Untersuchung von Proben, deren Temperatur deutlich unterhalb der Umgebungstemperatur liegt, kann es zum Beschlagen der Küvettenfenster kommen. Diese Fehlerquelle kann aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da der Taupunkt der Spülluft in der Probenkammer unter -40°C liegt, ein Wert, der in den Messreihen nicht erreicht wurde.

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Der vorliegende, modifizierte Aufbau erlaubt es, Infrarotspektren im Bereich von $4000 - 1100 \text{ cm}^{-1}$ mit einer spektralen Auflösung

von besser als 2 cm^{-1} aufzunehmen. Dabei ist eine Kontrolle der thermischen Umgebungsbedingungen der Probe ebenso möglich wie eine Steuerung der Beleuchtungseinrichtungen. Parallel können Absorptionsspektren im sichtbaren Teil des Spektrums aufgezeichnet werden.

2.7 Aufnahme von zeitaufgelösten Infrarot-Meßkurven

Zur Aufnahme von zeitaufgelösten Signalen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Aufbau realisiert, dessen Grundlagen zum Teil in [Lut97] und [Fon98] beschrieben sind. Fig. 2.5 zeigt den Aufbau schematisch. Quelle für das Abtastlicht im Spektralbereich von ca. $1500 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ ist ein Infrarot-Diodenlaser, der im Dauerbetrieb arbeitet. Das Abtastlicht wird direkt auf die Probenküvette fokussiert und gelangt nach Durchtritt derselben entweder direkt oder nach Passieren des Monochromators auf den Detektor.

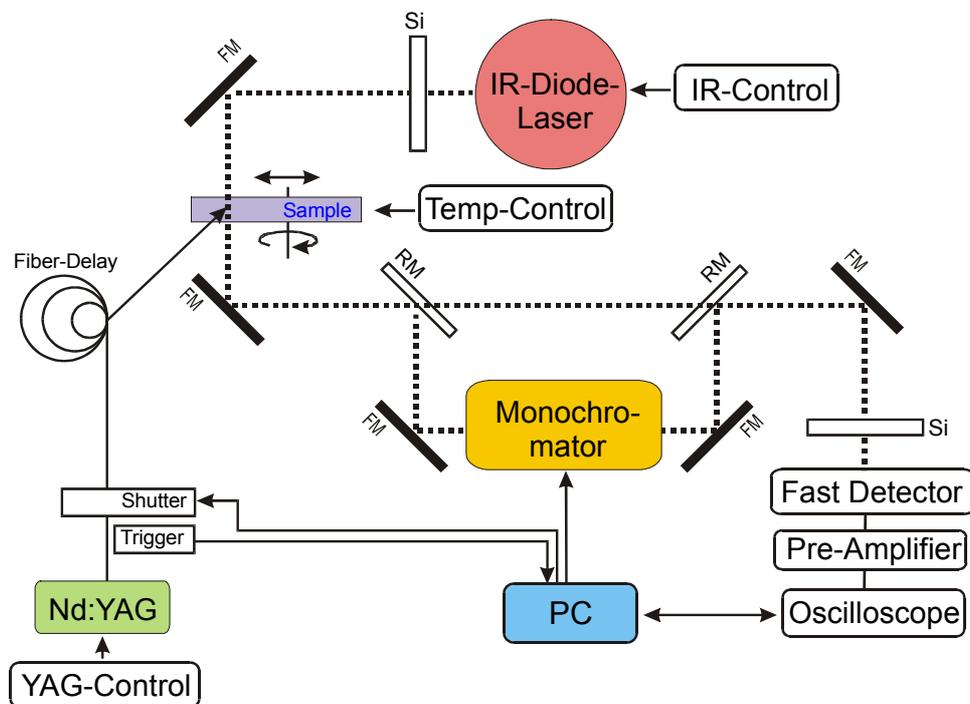


Fig. 2.5: IR-Meßplatz mit Nanosekunden-Zeitauflösung: FM-fixed mirror, RM-removable mirror, Si-Silizium VIS-Filter: Das Abtastlicht des Diodenlasers durchdringt die bewegbare Probenküvette und gelangt durch einen Monochromator (oder direkt) auf den schnellen Detektor. Nach Vorverstärkung des Detektorsignals und Mittelung der Daten im Oszilloskop werden die Meßdaten in den Steuerungsrechner übertragen. Dieser kontrolliert seinerseits den Monochromator und steuert den Verschluss zwischen Anregelaser und Probe. Ein einzelner Meßzyklus wird durch das Triggersignal des Anregelasers über den Meßrechner gestartet. Durch die Silizium-Plättchen gelangt kein Anreglicht direkt auf Detektor oder Abtastlaser.

Die Optik im Infrarotteil des Meßplatzes wurde mit goldbeschichteten Parabol- und Planspiegeln realisiert. Durch die minimale Anzahl optischer Elemente und die hohe Reflexion der Goldoberflächen werden die Energieverluste minimiert. Für die optische Anregung der Probe kommt ein gepulster Nd:YAG-Laser zum Einsatz. Das Anreglicht kann über einen durch das Messprogramm gesteuerten Verschuß abgeblockt werden.

Das Detektorsignal wird nach einer Signalverstärkung von einem Speicheroszilloskop aufgenommen, die Daten werden digitalisiert und stehen für die weitere Auswertung durch das Meßprogramm bereit. Die Zeitauflösung ergibt sich aus dem Zusammenspiel von Anregelaser-Pulsdauer, der Detektorantwortzeit inklusive Verstärkerbandbreite und Abtastrate des Digitaloszilloskops.

2.8 Diodenlaser – Abtastlichtquelle

Im Kontaktbereich eines p-dotierten Halbleiters mit dem eines n-dotierten Halbleiters gleichen sich die Dichten der beiden Ladungsträgerarten rasch aus, so daß schließlich kein Nettostrom mehr zu detektieren ist. Wird eine Spannung ausreichender Größe angelegt, so ändert sich die Ladungsträgerdichte in der Verarmungszone grundlegend: es entsteht eine schmale Schicht (wenige μm dick), in der beide Arten freier Ladungsträger existieren. In dieser aktiven Schicht ist eine strahlende Rekombination der Ladungsträger unter Aussendung von Photonen möglich. Löcher und Elektronen werden laufend durch nachströmende Ladungsträger ersetzt. Dieser Zustand entspricht dem einer für den Laserbetrieb notwendigen Besetzungsinversion, wobei die Emission spontan oder als stimulierte Emission stattfinden kann. Für den Laserbetrieb ist es erforderlich, daß die stimulierte Emission stärker ist als alle optischen Verluste. Schon ein einfacher Resonator, der entsteht, wenn die Endflächen des Halbleitermaterials plangeschliffen werden, reicht für den Laserbetrieb aus [Dem93].

Das Emissionsspektrum des Diodenlasers hängt neben den materialspezifischen und geometrischen Parametern im Betrieb in erster Linie von Diodentemperatur und Diodenstrom ab. Temperaturänderungen beeinflussen zum einen die Größe der Bandlücke und damit die Lage des Verstärkungsprofils und zum zweiten die Resonatorlänge und damit die longitudinalen Resonatormoden. Der Diodenstrom beeinflusst die Breite des Verstärkungsprofils und über die Temperaturentwicklung wieder die Laserfrequenz. Zur Kontrolle von Frequenz, Leistung und Zahl der oszillierenden Moden werden meist Strom und Temperatur getrennt geregelt. So läßt sich eine Durchstimmpbarkeit von einigen Prozent der Grundwellenlänge erreichen, die durch die jeweilige Bandlücke in der aktiven Zone bestimmt ist.

Es ist allerdings keine kontinuierliche Wellenlängenabstimmung durch eine Temperaturabstimmung ΔT nach $\Delta \nu_{gap} = \Delta E_{gap}(T)/h$ möglich. Gleichzeitig ändert sich nämlich auch der Brechungsindex n des Materials und damit die Eigenfrequenz ν_q der longitudinalen Moden um $\Delta \nu_q = \nu_q \Delta n/n$. Die Temperaturänderung verschiebt im wesentlichen das Verstärkungsprofil entlang der Frequenzachse. Es schwingt dabei immer diejenige Resonatormode an, die die höchste Verstärkung erfährt. Eine kontinuierliche Abstimmung wäre möglich, wenn sich die Eigenfrequenzen des Resonators simultan mitverschieben und damit immer dieselbe Mode oszilliert. Doch verschieben sich die Resonatormoden bei gleicher Temperaturänderung nur um etwa 15% der longitudinalen Moden. Beim Abstimmen wird also eine benachbarte Mode eine höhere Verstärkung erfahren und die Laseroszillation wird auf diese Mode springen (engl.: mode jumping). Der kontinuierliche Abstimmbereich für eine einzelne Mode ist mit wenigen cm^{-1} klein bei Abständen von ca. 5 cm^{-1} [Kne91].

In der vorliegenden Meßapparatur kommt ein Diodenlasersystem (TDL 100, Müttek) zum Einsatz. Es erlaubt die getrennte Regelung von Temperatur und Diodenstrom. Die eingebauten Dioden lassen sich damit etwa um 100 Wellenzahlen um ihre jeweilige zentrale Emissionswellenlänge verstimmen. Allerdings ist die erreichbare Leistung stark von den gewählten Parametern abhängig. Die verwendeten Laserdioden (DH4, Laser Components) bestehen aus einer Bleisalz- (PbEuSe-) Doppelheterostruktur. Die Zentralwellenlängen liegen bei 1550 , 1650 und 1750 cm^{-1} . Die aktive Zone ist aus der Abstrahlrichtung gesehen ca. $0.5 \mu\text{m}$ hoch und $20 \mu\text{m}$ breit. Das Strahlenbündel tritt mit einer Divergenz von etwa $25 - 30^\circ$ aus und wird mit Hilfe eines Off-axis Parabolspiegels zu einem parallelen Bündel von ca. 14 mm Durchmesser kollimiert.

Die Abhängigkeit der Laseremission von Diodenstrom und Temperatur ist gut in Modenkarten darstellbar. Für jeweils eine feste Diodentemperatur wird dazu der Diodenstrom in Schritten variiert und jeweils ein Spektrum aufgenommen. In der zweidimensionalen Darstellung der Modenkarte (Abzisse: Wellenlänge, Ordinate: Diodenstrom) werden diejenigen Punkte dargestellt, bei denen die gemessene Laseremission einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Eine Modenkarte ist exemplarisch in Fig. 2.6 dargestellt.

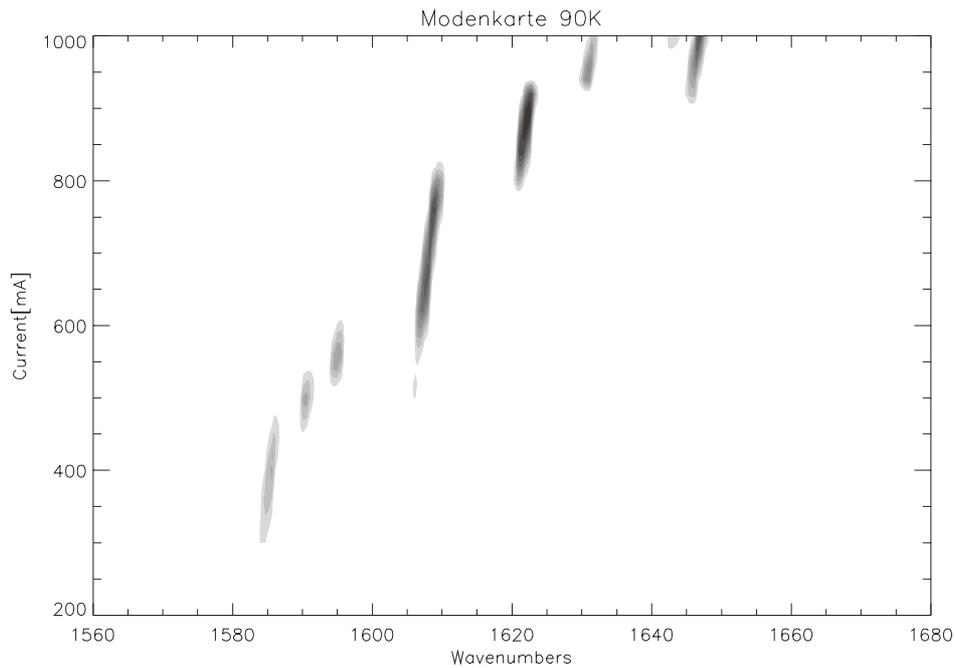


Fig. 2.6: Modenkarte der Laserdiode HL-1-12. Für eine feste Temperatur (hier: 90 K) wird der Diodenstrom variiert (Ordinate: hier zwischen 200 und 1000 mA). Über ein Durchfahren des Monochromators (Abzisse: von 1560 bis 1680 cm^{-1}) kann das Emissionsverhalten der Diode bestimmt werden. Die Laseremission wird im Diagramm festgehalten. Die Abbildung zeigt, daß Einmodenbetrieb z.B. bei 1608 cm^{-1} oder 1622 cm^{-1} möglich ist.

Eine experimentelle Schwierigkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass die verschiedenen Lasermoden eine vollkommen unterschiedliche Leistung aufweisen. Daher verändert sich bei Verstimmung der Abtastwellenlänge das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des Meßsignals. Liegt ein vollständiger Satz Modenkarten vor, so lassen sich die erforderlichen Parameter für die gewünschte Emissionswellenlänge ablesen. Zur Ermittlung der Parameter für nichtkartographierte Zwischenwellenlängen gilt die empirische Regel, dass die Wellenlänge zwischen den Modensprüngen mit dem Diodenstrom um ca. $0.015 \text{ cm}^{-1}/\text{mA}$ und $20 \text{ cm}^{-1}/5 \text{ K}$ steigt. Damit lassen sich für alle gewünschten Emissionswellenlängen Lasermoden finden, die dann für die eigentliche Messung noch hinsichtlich Laserleistung und Stabilität beurteilt werden müssen.

2.9 Spektrometer

Im Messplatz kommen dem Spektrometer zwei Aufgaben zu: zum einen wird es zur Überprüfung des Laseremissionsspektrums verwendet, zum anderen dient es als Monochromator während der Messungen. Die Spektrenaufnahme kann über das Meßprogramm gesteuert vollständig automatisiert durchgeführt werden.

Bei Verwendung des Monochromators ist die Öffnung des Eingangspalts durch die Bündelgröße am Fokusort (ca. 200 μm) festgelegt. Mit der spektralen Dispersion des Geräts von 24.8 nm/mm ergibt sich damit eine Auflösung von ca. 5 nm. Bei einer Wellenlänge von 1666 cm^{-1} (6 μm) entspricht dies einer Auflösung von ca. 1.4 cm^{-1} . Mit dieser Genauigkeit lässt sich die Emissionswellenlänge des Diodenlasers für die Messungen bestimmen. Der Blazewinkel des verwendeten Gitters ist für 6 μm gewählt, so daß in diesem Spektralbereich eine gute Transmission des Monochromators von über 70% erreicht wird.

Der Monochromator filtert auch gestreutes Anreglicht aus dem Detektorsignal. Allerdings ist darauf zu achten, dass bei bestimmten Wellenlängen die höheren Ordnungen des Anreglichts den Gittermonochromator passieren können (z.B. 12. Ordnung 532 nm: entspricht 6384 nm bzw. 1566 cm^{-1}). Zur Lösung des Problems sind direkt vor dem Diodenlaser und dem Detektor jeweils Si-Brewsterfenster montiert. Ein meßbarer Verlust der Beleuchtungsstärke tritt nicht auf, da das Laserabtastricht sehr gut polarisiert ist.

2.10 Detektion

Als Detektor steht eine Photodiode (Kolmar Technologies) aus HgCdTe (MCT) zur Verfügung. Die aktive Fläche ist ein Quadrat mit 250 μm Seitenlänge. Die Kapazität und damit die Ansprechzeit der Diode steigt mit zunehmender Detektorfläche. Detektorfläche und Bündelradius am Detektorort sind derart abzustimmen, daß das gesamte Bündel gerade noch auf der Diode plaziert werden kann. Detektor und angepaßter Vorverstärker sind spezifiziert mit einer Bandbreite von 100 MHz (Transimpedanzfaktor 2000 Ω). Das Ausgangssignal des Verstärkers wird an den Eingang des Digitaloszilloskops angelegt. Die maximale Abtastrate des Gerätes liegt bei 2 Gs/s, was einer Bandbreite von 500 MHz (-3 dB) entspricht.

Zusätzlich konnten noch zwei weitere Detektoren mit größerer Fläche verwendet werden. Für diese wurde jeweils eine zweistufige Vorverstärkerschaltung konzipiert und aufgebaut. Diese Anordnung eignet sich für Justagezwecke und Messungen, bei denen mit größeren Strahlenbündelschwankungen zu rechnen ist. Für den kleineren Detektor (1 mm mal 2 mm Fläche) ergab sich eine 10 – 90% Systemanstiegszeit von 900 ns, bei dem größeren mit 4 mm mal 4 mm ergab sich ein Wert von 1.5 ms.

Zur adäquaten Signalaufnahme wird von Detektoren gefordert, dass sie die auf sie fallende Strahlungsintensität linear detektieren. Die hier vorgestellten MCT-Detektoren verhalten sich bei größeren Strahlungsintensitäten sehr nichtlinear. Eine direkte Auswirkung ist beispielsweise eine Stauchung hoher Signalamplituden. Von Bedeutung ist

dieser Umstand, wenn vom Detektor eine große Dynamik verlangt wird, wie etwa bei der Verwendung in FT-Spektrometern. (Der Fehler ist dann elektronisch zu kompensieren). Die Signale im hier vorgestellten Meßplatz weisen allerdings nur eine sehr geringe Dynamik auf, typischerweise weniger als 1%, so daß die Detektor-Nichtlinearität vernachlässigt werden kann.

2.11 Laser zur Probenanregung

Zur Probenanregung standen zwei verschiedene Nd:YAG-Lasersysteme zur Verfügung (BMI und Continuum NY60). Diese Geräte erzeugen Pulse mit einer Repetitionsrate zwischen 0.5 und 50 Hz. Die Grundfrequenz des Laserüberganges beträgt 1064 nm. Zusätzlich sind die Wellenlängen 532 nm und 355 nm durch den Einbau eines Frequenzverdopplers bzw. Frequenzverdreifachers (KDP-Kristalle) leicht zugänglich. Die Breite der Pulse beträgt 10 ns bzw. 6 ns, liegt also unterhalb der Zeitauflösung der Detektion. Die Pulsenergien liegen bei etwa 60 mJ im Grünen und 15 mJ im UV. Das Anreglicht wird über Quarz-Multimode-Lichtleitfasern vom Laser zum Ort der Probe geführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich umfangreiche Untersuchungen zu Effekten der stimulierten Raman-Streuung in Quarzfasern durchgeführt. Aufgrund der geringen Anregungsenergien in den hier vorgestellten Messungen kommen diese Effekte aber nicht zum Tragen und werden daher nicht im Detail erläutert.

2.12 Zeitauflösung des Meßaufbaus

Für die Analyse der Meßdaten muß die Korrelationsbreite der Instrumenten-Antwortfunktion bestimmt werden. Auch ist es bei komplizierten Signalverläufen von Vorteil, den Zeitnullpunkt getrennt von der Messung festlegen zu können, da dies die Zahl der freien Parameter der Datenanpassung um eins reduziert. Beide Werte können aus einer Messung ermittelt werden. Dazu wird an einem dünnen Siliziumplättchen die lichtinduzierte Absorptionsänderung untersucht. Durch Anregung mit sichtbarem Licht werden Elektronen vom Valenzband in das Leitungsband des Halbleiters gehoben. Diese zusätzlichen freien Ladungsträger können infrarote Photonen absorbieren. Die Infrarotabsorption der Probe steigt stark an [Kah54]. Anschließend erfolgt ein langsamerer Signalabfall [Lin82], [Fau86]. Der schnelle Prozeß erfolgt innerhalb weniger 100 ps und stellt daher für die hier vorgestellte Nanosekundenanlage ein Stufensignal mit verschwindender Anstiegszeit dar. Die Signalantwort des Meßaufbaus weist dann eine endliche Breite - nämlich k_b - auf. Für den hier beschriebenen Aufbau wurde so

eine Zeitauflösung von 10 ns bestimmt. Als Nullpunkt der Messung wird derjenige Zeitpunkt definiert, bei dem die halbe Anstiegshöhe erreicht ist.

Das Triggersignal lässt sich im vorgestellten Meßplatz über zwei Wege detektieren. Wird vom optischen Anrempuls ein Teil abgespalten und auf eine schnelle Diode gelenkt, so kann die ansteigende Flanke des Diodensignals als Trigger dienen. Der Zeitpunkt der halben Maximalhöhe des Signals wird gewöhnlich als Zeitnullpunkt definiert. Nachteilig wirkt sich allerdings eine Puls-zu-Puls Intensitätsschwankung des Lichtimpulses aus, da damit der Zeitnullpunkt der Messung beeinflusst wird. Der zweite Weg ist die Verwendung des Steuersignals der Güteschaltung des YAG-Lasersystems. Dieses Steuersignal besitzt eine ausreichende Flankensteilheit und ist in seiner Höhe nicht von der Laseremission abhängig. Für die vorgestellten Messungen wurde dieses Signal als Trigger verwendet. Über den Vergleich der beiden Signale gelingt der Nachweis, dass der für die Messung verwendete Zeitnullpunkt gegenüber dem realen Lasersignal keinen Langzeitdrift und keine intrinsische Verzögerung aufweist. Der meßbare Jitter für das Einzelsignal liegt unter 1 ns.

3 Konformationsuntersuchung an Collagentrimeren

3.1 Einführung

Collagen stellt die größte Klasse der fasrigen Proteine in der extrazellulären Matrix und im Bindegewebe dar. Das Wort leitet sich vom griechischen Wort für ‚Leimbildner‘ her. In Wirbeltieren konnten bislang 19 verschiedene Collagenarten identifiziert werden. Zur Unterscheidung wurde die Benennung mit römischen Ziffern in der Reihenfolge ihrer Entdeckung eingeführt [Kad94]. Die Collagentypen I – III treten am häufigsten auf. In der Primärstruktur sind etwa ein Drittel der Aminosäure-Reste Glycin (Gly), und es ist ein hoher Anteil Prolin (Pro) und 4-Hydroxyprolin (Hyp) zu finden. Ein Teil der Pro-Reste wird erst nach Synthese der Peptidketten durch die Prolin-Hydroxylase zu Hydroxyprolin umgewandelt. Die Primärstruktur zeigt die wiederholte Trimerabfolge Gly-X-Y. Die Iminosäure Pro findet sich häufig an der Position X und Hyp ist zumeist an der Stelle Y positioniert. In natürlichem Collagen sind auch die Aminosäuren Ala, Lys, Arg, Leu, Val, Ser und Thr vertreten. Der hohe Iminosäureanteil ist wesentlich für die Stabilität der tripelhelikalen Struktur verantwortlich [God98].

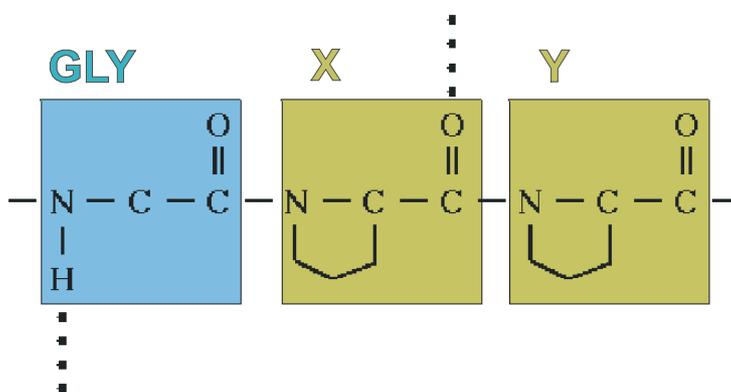


Fig. 3.1: Die Primärstruktur des Collageneinzelstranges weist die regelmäßige Abfolge Gly-X-Y auf, wobei an der Position X häufig Pro und an Y häufig Hyp zu finden ist. Gly als Aminosäure mit kleinster Seitenkette ist essentiell für den kompakten Bereich der Helixmittellachse, während der hohe Iminosäureanteil eine wesentliche Bedingung für die Stabilität der Tripelhelix darstellt.

Die Sekundärstruktur von Collagen wird durch eine einzelne Kette (benannt α_1 , α_2 , ...) gebildet, die durch den Pyrrolinring des Prolins eine Windung erfährt. Diese Helix mit 10 Residuen für 3 Windungen wird als Polyprolin-Helix bezeichnet. Die Pro-Peptidbindungen liegen bei Raumtemperatur in *cis* Konformation vor. Durch Umorientierung nach *trans* erhält man die linksgängige Polyprolin II-Helix. Zur Ausbildung der Tertiärstruktur winden sich drei Polyprolin II-Helices umeinander und formen mit einer Restverschiebung eine rechtsgängige Tripelhelix. Damit Gly jeweils im Zentrum der Tripelhelix Platz finden kann, sind benachbarte Ketten jeweils um einen Rest verschoben.



Fig. 3.2: Die Anordnung von Gly-X-Y in der Collagenhelix. Drei Polyprolin-II Helices winden sich zur Bildung der Tripelhelix umeinander. Die kleinste Aminosäure Gly ist zur Mitte der Helixachse orientiert ist

Diese Tertiärstruktur wurde in den 1960er Jahren durch Ramachandran und [Ric61] vorgeschlagen und von Okuyama [Oku81] anhand kristallographischer Untersuchungen an synthetischen Polytripeptiden bestätigt.

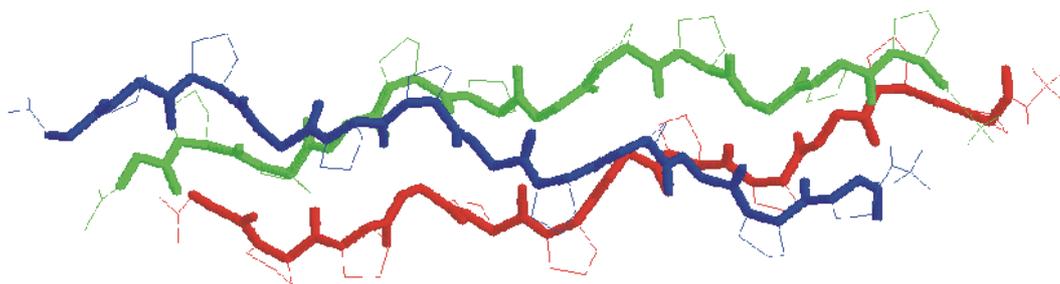


Fig. 3.3: Die Collagentripelhelix in der Bänderdarstellung. Gut zu erkennen sind drei sich umwindende Einzelstränge. Die Pyrrolidinringe von Pro und Hyp weisen jeweils nach außen. Abbildung nach PDB, Code 1BKV.

Die Tripel-Helicität ist das herausragende Unterscheidungskriterium zwischen Collagen und anderen extrazellulären Matrix-Proteinen. Dieses Strukturelement macht Collagene weitgehend resistent gegenüber Proteasen (Ausnahme: Matrix Metalloproteinasen) [Fie95]. In wässriger Lösung neigt Polyprolin-II zu Aggregation [Mak93], so daß für die Untersuchung derartiger Systeme umfangreiche Syntheseanstrengungen vorgenommen wurden. Synthetisch hergestellte Collagen-artige Peptide werden häufig als Modellsysteme herangezogen. Sie helfen beispielsweise, die Faktoren zu bestimmen, welche für die Stabilität und Bildung der Collagenstruktur verantwortlich sind. Es existiert eine Vielzahl von Beispielen für die Synthese von Modellpeptiden der regelmäßigen und wiederholten Abfolge von Gly-Pro-Pro, Gly-Hyp-Pro, Gly-Pro-Hyp, Gly-Pro-Leu etc.

3.2 Methoden zur Strukturuntersuchung von Collagen-Modellsystemen

Zur Untersuchung der Tripelhelix in Collagensystemen wurden eine Reihe von Methoden eingesetzt. Zu nennen sind hier die Röntgendiffraktion an Kristallen und Elektronenmikroskopie. Besonders häufig finden sich in der Literatur Circular-Dichroismus- (CD) und Kernspin-Resonanz- (NMR) Spektroskopie. Auch FT-Infrarot-Spektroskopie wird zur Untersuchung der Strukturodynamik in Collagen eingesetzt; eine ausführliche Behandlung findet sich nachfolgend.

Mittels NMR-Spektroskopie lassen sich tripelhelikale Strukturen nachweisen. Dabei können i) Resonanzen ermittelt werden, die sich nur in tripelhelikalen Systemen finden. Desweiteren kann ii) durch Amidprotonensignale (NH) im Lösungsmittel D₂O ein langsamer Protonenaustausch und damit eine Tripelhelixbildung verfolgt werden und iii) können intramolekulare Kern-Overhauser Effekte (NOEs) beobachtet werden, die der Tripelhelix zuzuordnen sind.

3.3 Bindungen und Helixstabilität – Bedeutung von Hyp

Als Maß für die Stabilität der Collagen-Tripelhelix dient häufig die Schmelztemperatur des Systems. Dieser Wert beschreibt den Übergang der Tripelhelix zur ungeordneten Kette, Random-Coil. Im allgemeinen steigt der Schmelzpunkt mit zunehmender Kettenlänge: So liegen beispielsweise in der Verbindung KTA-[Gly-(Gly-Pro-Hyp)_n-NH₂]₃ für n = 3, 5 bzw. 6 die Schmelzpunkte bei 30, 70 bzw. 81°C [Goo98].

Durch Hyp an Position Y wird der Schmelzpunkt von (poly-(Gly-Pro-Hyp)) im Vergleich zu poly-(Gly-Pro-Pro)) erhöht [Kob70], an Position X verringert die Substitution von Pro durch Hyp die Schmelztemperatur [Ino82]. Während (Gly-Pro-Hyp)₁₀ eine stabile Tripelhelix in Wasser bildet, ist dies bei (Gly-Hyp-Pro)₁₀ nicht zu beobachten [Ols71, Sut74, Li93].

Eine direkte Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe und einer beliebigen anderen Gruppe des Rückgrats derselben Tripelhelix kann von Hyp weder an Position X noch an Y ausgebildet werden. Der stabilisierende Effekt von Hyp an Position Y muß eine andere Ursache haben und wird auf Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel (Wasser) zurückgeführt [Ram73, Tra75]: Hydroxyprolin steuert zum Wasserstoffbrückennetzwerk mit dem Lösungsmittel wichtige Akzeptorgruppen bei [Bel95, May96] bzw. unterstützt die Stabilität über Wasser vermittelte H-Brücken zwischen der Hydroxy-Gruppe von Hyp und der Carbonyl-Gruppe der benachbarten Kette [Vit01]. Auch bei der Vernetzung mehrerer Helices wird die Bedeutung von Hyp ersichtlich: [Nem85] zeigten durch theoretische Berechnungen, daß bei der Bildung von Fibrillen die Hydroxy-Gruppe von Hyp in der Kavität zwischen zwei Tripelhelices ohne sterische Hindernisse Platz findet. In der aktuellen Diskussion bleibt die Rolle des Wassers umstritten; hier wird das Puckering immer mehr diskutiert (dazu z.B. Review von [Jen02]).

3.4 Helixbildung und Faltungskinetik

Drei Einzelketten des natürlichen Collagens zeigen in Lösung nur eine sehr eingeschränkte Tendenz, sich selbsttätig zu einer korrekten Tripelhelix zusammenzufügen. Für eine korrekte und vollständige Ausbildung der Tripelhelix ist eine Assoziation und Erfassung der Einzelketten notwendig [Eng91].

Bei natürlichem Collagen III erfolgt die Erkennung der Einzelstränge durch globuläre Domänen am C-terminalen Kettenende und dient als Nukleationskeim der Kettenfaltung. Die Ausbildung der tripelhelicalen Struktur erfolgt ausgehend vom C-terminalen Ende Reißverschluß-ähnlich entlang der Kette: Die Tripelhelix bildet sich im Regelfall vom C- bis zum N-terminalen Ende des Trimers fort. Mit dieser Faltung unterscheiden sich collagenähnliche Systeme grundsätzlich von globulären Proteinen.

Die Unidirektionalität des ‚Zipper-folding‘ konnte durch eine Reihe von Untersuchungen bestätigt werden. So bleibt sie bei Einbringung einer Disulfidverbrückung auch am N-terminalen Ende erhalten. Bei gleichzeitiger Zerstörung des C-terminalen Globulus

hingegen bilden sich nur noch kurze, zufällig verteilte tripelhelicale Bereiche [Bäc80, Döl90].

In der ungefalteten Einzelkette gehen die Peptidbindungen der Sequenzen Gly-Pro-Y und Gly-X-Hyp spontan teilweise in eine *cis*-Konfiguration über. Untersuchungen anhand des Hydroxyprolin-Analogons aHyp (4-*cis*-Hydroxyprolin) in Collagenmodellsystemen wie (Gly-Pro-aHyp)₁₀ und (Gly-aHyp-Pro)₁₀ [Ino76, Ino82] zeigen, daß diese Systeme keine tripelhelicalen Strukturen formen. Da für die native Tripelhelix alle Peptidbindungen in der *trans*-Konformation vorliegen müssen, ist vor der Helixbildung eine *cis* ⇒ *trans*-Isomerisierung notwendig.

Die Faltungsdynamik von Collagen III zeigt zwei gut trennbare, kinetisch unterschiedliche Phasen. Eine schnelle Komponente von ca. fünf Sekunden und eine langsame von einigen hundert Sekunden, die von der Kettenlänge abhängt [Eng91]. Die erste Phase spiegelt die Faltung eines kurzen Abschnitts von wenigen Triplets zwischen den Disulfidbrücken am C-Terminus und der ersten *cis* Peptidbindung wider. Die zweite, langsame Phase zeigt die Propagation der Tripelhelix nach dem Reißverschlußprinzip, welche durch die *cis* ⇒ *trans*-Isomerisierung der zufällig verteilten *cis*-Peptidbindungen beschränkt wird. Wie es für das ‚Zipper-like folding‘ zu erwarten ist, ist die Dauer der zweiten Phase proportional abhängig von der Länge der generierten Tripelhelix; die Helixbildung schreitet zeitlinear voran. Der ratenlimitierende Schritt in der Faltung der Collagenhelix ist demnach die *cis* ⇒ *trans*-Isomerisierung der Prolinbindungen [Rot80, Sar84]. Es gibt Hinweise darauf, dass für die Isomerisierung eine Peptidyl-Prolyl *cis* ⇒ *trans*-Isomerase zum Einsatz kommt [Bäc87, Fis84]. Ergänzend wurde in jüngerer Zeit durch [Mel00] gezeigt, dass Hydratisierungs-Dehydratisierungs-Effekte nicht als ratenlimitierende Prozesse in Betracht kommen.

3.5 Synthetische Collagen-Modellpeptide

Die Selbst-Assoziation von monomeren Collagenpeptiden zu Homotrimeren stellt ein wesentliches Problem in der Collagen-Synthese dar. Analog zum natürlichen Vorbild Collagen III [Rot80] mit disulfid-verbrücktem C-Terminus konnten durch unterschiedliche Syntheseverfahren C-terminal kovalent verbrückte Collagen-Modellsysteme hergestellt werden [Rot79, Tha86, Goo96, Gre79, Fie91].

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden Collagensysteme verwendet, die in der Arbeitsgruppe Moroder am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried hergestellt wurden [Ott99a, Ott99b]. Mit diesem Verfahren wurden verschiedene heterotrimere Collagen-Peptide z.T. mit eingebauter Collagenase-Schnittstelle (Reste 772-784 aus Collagen I) synthetisiert. Der Knoten erlaubt die richtige Anordnung der Ketten, was durch die erfolgreiche Trennung der Helix an einer einzelnen Stelle durch die Collagenase MMP-8 gezeigt wurde [Ott96]. Der grundlegende Aufbau des Modellsystems ist in Fig. 3.4 dargestellt.

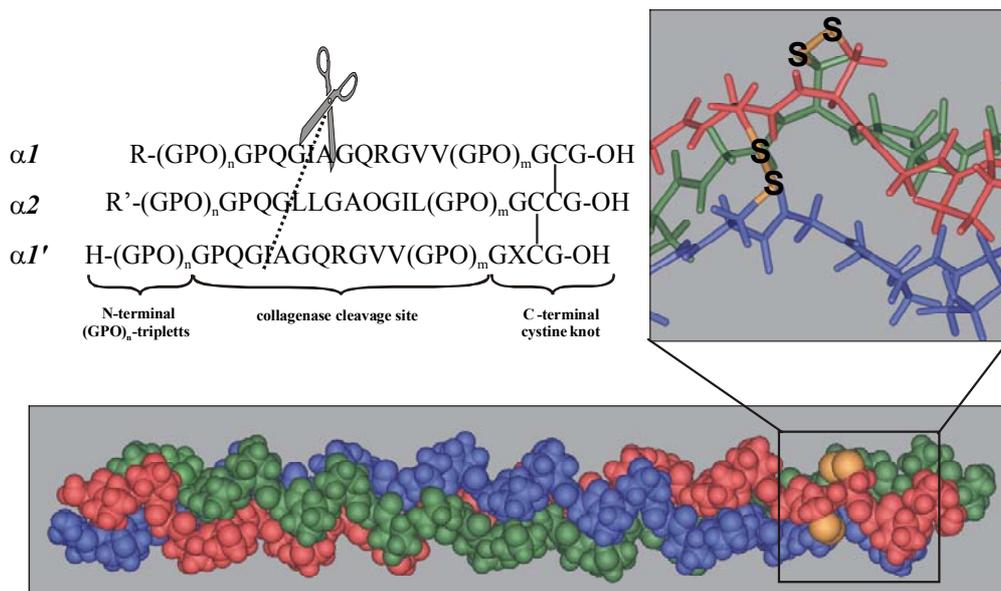


Fig. 3.4: CPK-Modell einer Collagen-Tripelhelix mit einem C-terminalen, künstlichen Cysteinknoten. Eingebettet in das Peptid ist die Collagenase-Schnittstelle des Collagen Typ I. Im Bereich der Schnittstelle ist der Iminosäureanteil gering und damit die Tendenz zur Ausbildung einer tripelhelicalen Konformation eingeschränkt. Die Struktur wird durch optionale (GPO)-Repeats auf beiden Seiten der Schnittstelle stabilisiert. Die temperaturinduzierte Faltungsdynamik entspricht im wesentlichen dem bi-phasischen zeitlichen Ablauf natürlicher Collagene. Abbildung nach [Ott99a].

Über den Cysteinknoten können Triplets aus (Gly-Pro-Hyp)_n zu trimeren Collagen-Peptiden verknüpft werden. Dabei lässt sich die Anzahl der Tripeptid-Repeats systematisch variieren und der Cysteinknoten am C- bzw. N-terminalen Ende platzieren. Im Vergleich der verschiedenen Modellpeptide sollen die faltungsdynamischen Parameter für collagenverwandte Strukturen ermittelt werden.

3.6 Die untersuchten Modellpeptide

Trimer B

Das Modellsystem Trimer B stellt ein C-terminal cysteinverbrücktes Heterotrimer mit einem Molgewicht von 8424 dar. Es ist das einzige in dieser Arbeit untersuchte System, welches die Collagenase-Schnittstelle enthält. Die Ketten des Trimers sind:



In der Nomenklatur von Fig. 3.4 ist im Trimer B $n = 5$ und $m = 0$. Die Reste R und R' werden durch die Gruppe H₂N gebildet, X entspricht hier L.

Trimer E

Trimer E besitzt vier POG-Triplets und ist C-terminal disulfidverbrückt. Am N-Terminus schließen die Peptide nicht bündig ab (für die Collagenhelix sind die Anordnungen (GPO)_n und (POG)_n äquivalent, die Schreibweisen orientieren sich hier für eine bessere Übersichtlichkeit an den Darstellungen 3.5 – 3.8). Die Ketten



sind über den Rest R (C₂OH₃) N-terminal acetyliert, damit die Aminogruppen nicht protoniert werden können, was zu gegenseitiger elektrostatischer Abstoßung führen würde. Der dritte N-Terminus der



Kette ist für mögliche spätere Verbrückungen nicht acetyliert.

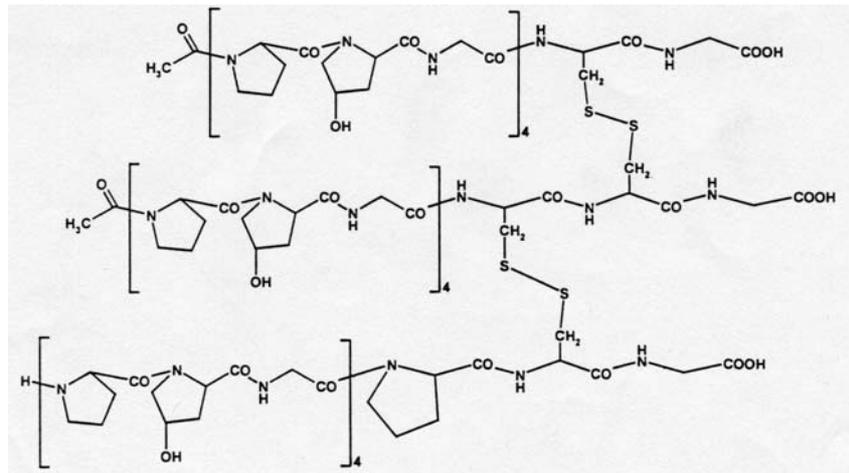


Fig. 3.5: Das Modellpeptid Trimer E: es zeigt vier (POG)-Repeats und ist C-terminal disulfidverbrückt. Zwei Ketten sind N-terminal acetyliert. Die Abbildungen der Modellsysteme sind [Fri99] entnommen.

Trimer F

Der Trimer F besitzt vier POG-Triplets und ist C-terminal verbrückt. Im Unterschied zum Trimer E ist das Raster jedoch aufgefüllt (in $\alpha 1$ mit Hyp und Gly, in $\alpha 2$ mit Gly), um eine maximale Wechselwirkung zwischen den Einzelketten zu ermöglichen. Ein Vergleich mit Trimer E sollte also eine Aussage darüber ermöglichen, ob diese wenigen zusätzlichen Bindungen bereits eine messbare Zunahme der Helixstabilität bewirken. Wie im Trimer E wird der Rest R gebildet durch (C_2OH_3) . Die Einzelketten lauten wie folgt:

- $\alpha 1:$ R – OG (POG)₄ – CG-OH und
- $\alpha 2:$ R – G (POG)₄ – CCG-OH
- $\alpha 3:$ H – (POG)₄ – PCG – OH

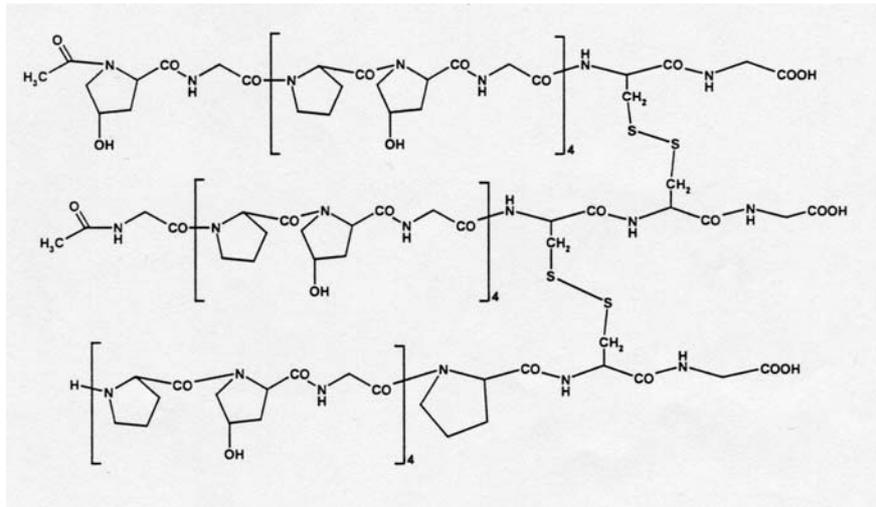


Fig. 3.6: Das Modellpeptid Trimer F

Trimer G

Der Trimer G entspricht dem Trimer E, jedoch mit fünf (POG)-Repeats. Dies sollte sich im Vergleich der Systeme stabilisierend auf die Tripelhelix auswirken. Die Ketten



sind über den Rest R (C_2OH_3) N-terminal acetyliert, der dritte Strang hat die Form

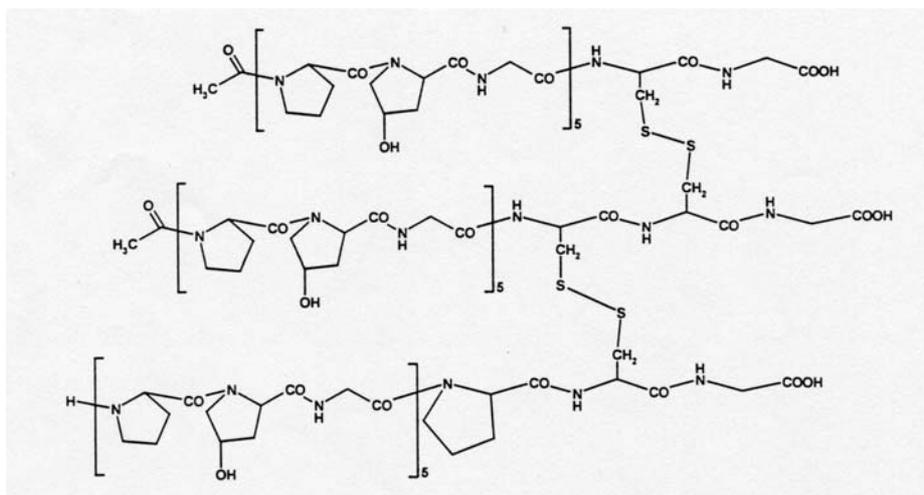


Fig. 3.7: Das Modellpeptid Trimer G

Trimer H

Der Trimer H ist im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Modellpeptiden am N-Terminus durch einen Cysteinknoten verbrückt. Die Anzahl der Wasserstoffbrücken innerhalb der Helix ändert sich dadurch nicht. Er besitzt fünf (POG)-Repeats und erlaubt einen Vergleich mit dem C-terminal verbrückten Trimer G. Im natürlichen Collagen schreitet die Faltung der Collagenhelix vom C- zum N-Terminus voran. Insofern ist die vorliegende N-terminale Verbrückung anders als im natürlichen Vorbild.



mit R: C₂OH₃.

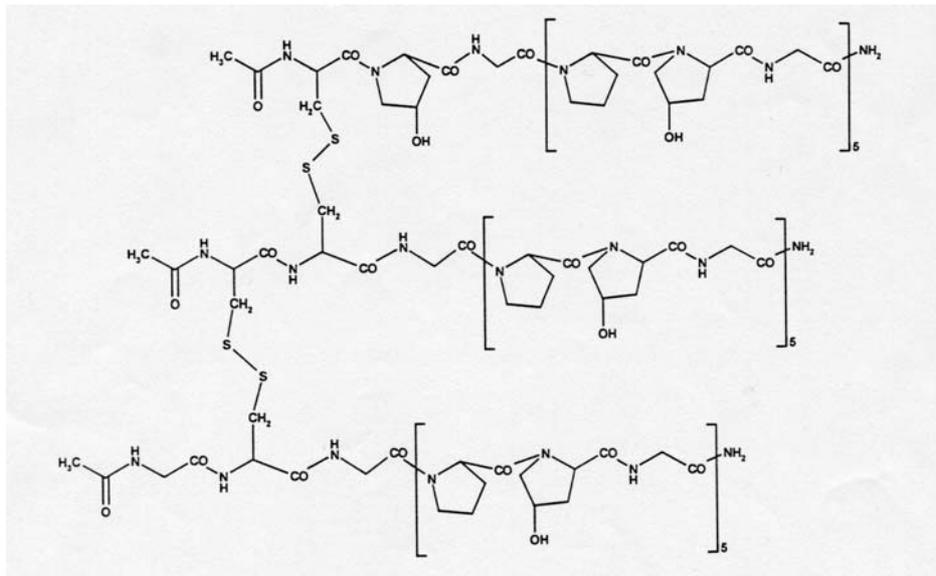


Fig. 3.8: Das Modellpeptid Trimer H: es entspricht dem Trimer G, jedoch mit einer N-terminalen Verbrückung.

3.7 Temperaturexkursionsuntersuchungen an Trimer B

Trimer B wurde in einer Konzentration von 1.8 mM in D₂O gelöst. Ein Absorberfarbstoff, Crystallviolett, wurde für projektierte zeitaufgelöste Temperatursprungexperimente dazugegeben. Das Absorptionsspektrum des Heterotrimers, Fig. 3.9, kann durch drei gaußförmige Banden angepasst werden. Diese repräsentieren drei unterscheidbare Arten von Wasserstoffbrücken zu den Carbonylgruppen des Trimers.

Die Randbereiche der Amid I Bande von Trimer B zeigen um 1695 und 1610 cm⁻¹ leichte Schultern, die auf von Pro/Hyp abweichende Carbonyle der Collagen-Schnittstelle zurückzuführen sind. Die negative Bande um 1593 cm⁻¹ rührt von einer Überkompensation des Crystallviolett-Hintergrunds her.

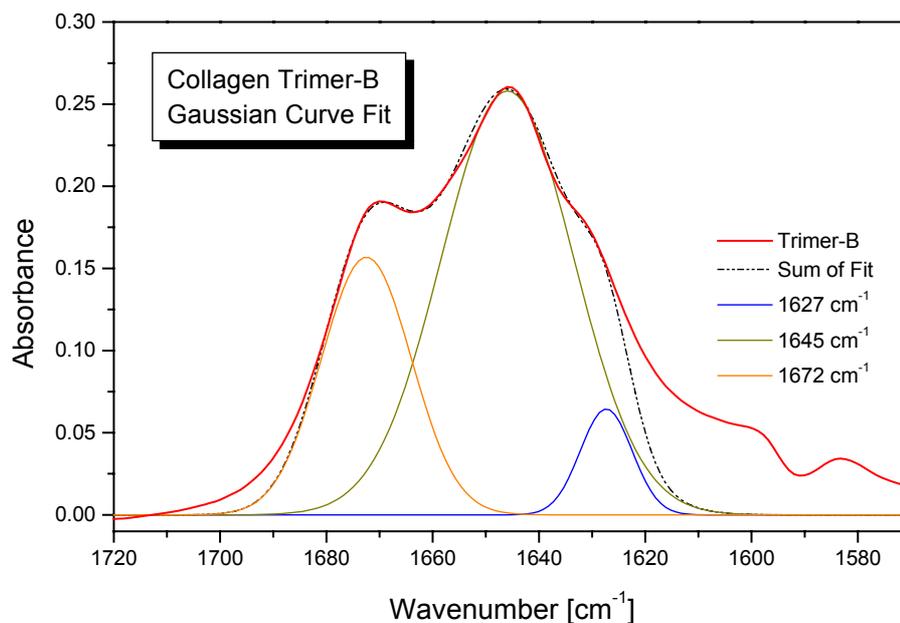


Fig. 3.9: Das Absorptionsspektrum des Trimer B zeigt im infraroten Spektralbereich eine Amid I Bande mit dreifacher Unterstruktur. Diese Ausformung der Bande unterscheidet die collagenartigen Peptide grundsätzlich von globulären Proteinen. Die Absorptionsbande kann gut durch drei gaußförmige Banden mit Maxima bei 1627, 1645, und 1672 cm⁻¹ angepasst werden, welche die drei unterschiedlichen, häufig wiederholten Wasserstoffbrücken-Bindungen zu den Carbonylgruppen des Trimers repräsentieren. Schultern im Bereich von 1695 und 1610 cm⁻¹ rühren her von anderen Carbonylen als Pro/Hyp im Bereich der Collagenase Schnittstelle. Die negative Bande um 1593 cm⁻¹ hat ihre Ursache in einer Überkompensation des Crystallviolett-Hintergrundes.

Mit dem im Abschnitt 2.4ff beschriebenen Meßaufbau wurden Temperatur-Exkursions-Experimente durchgeführt und die Spektralantwort des Heterotrimers in der Amid I Region detektiert. Zwischen 5 und 71°C wurden die Absorptionsspektren der Probe aufgenommen. Die entsprechenden Spektren des Lösungsmittelhintergrundes wurden nachfolgend subtrahiert, ebenso Raumluft-Wasserdampfbanden.

Die Collagen-Helix entfaltet mit steigender Temperatur und faltet nach Abkühlung reversibel zurück in die native Struktur. Die Reversibilität ist durch den künstlichen Cysteinknoten am C-Terminus gegeben und mindestens für den Temperaturbereich zwischen 5 und 71°C nachgewiesen. In Fig. 3.10 ist die Spektralantwort des Trimers in Form von Differenzspektren zwischen den Absorptionsspektren bei 5°C und jeweils einer höheren Temperatur dargestellt. Die Spektrenaufnahme erfolgte in Schritten der Temperaturerhöhung von 2°C; jedes zweite Spektrum davon wird gezeigt.

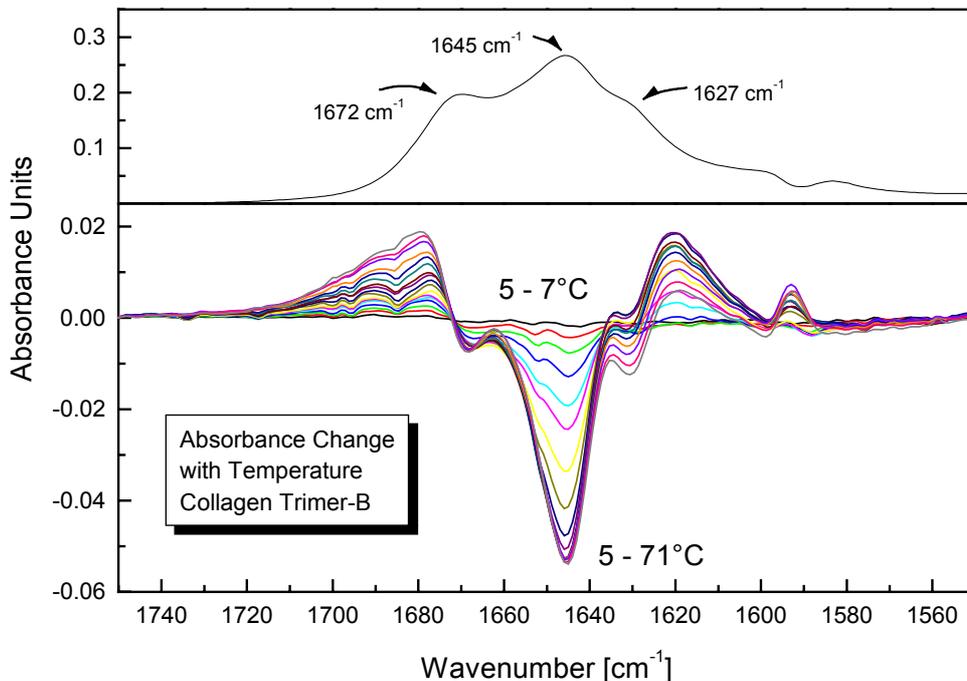


Fig. 3.10: Absolutspektrum von Trimer B bei 5°C (oben) und Differenzspektren zwischen 5°C und jeweils höherer Temperatur im Bereich der Amid I Bande (unten). Dargestellt sind 4°C-Schritte der Temperaturerhöhung. Die Spektralantwort zeigt für verschiedene Bereiche der Bande deutlich unterschiedliches Verhalten. Die größte Signaländerung ist im Bereich der zentralen Unterbande bei 1645 cm⁻¹ zu erkennen. Die unregelmäßigen Strukturen bei 1685 und 1698 cm⁻¹ stehen im Zusammenhang mit der Kompensierung von Wasserdampfbanden in der Spektrometer-Probenkammer.

Die Temperaturabhängigkeit an ausgewählten spektralen Positionen ist in Fig. 3.11 dargestellt. Es finden sich für unterschiedliche spektrale Positionen deutlich von einander abweichende Signalantworten. Bei 1677 cm^{-1} ist die positive Absorptionsänderung nahezu vollkommen linear abhängig von der Temperatur, ein Verhalten, wie es häufig für ungeordnete Lösungsmittelvolumina zu finden ist. Die anderen dargestellten Kurven weichen vom linearen Verlauf ab und zeigen in einigen Fällen auch eine negative Signalantwort. Die Kurvenpaare $1593 / 1630\text{ cm}^{-1}$ und $1662 / 1668\text{ cm}^{-1}$ liegen von der Starttemperatur bis etwa $27\text{-}28^\circ\text{C}$ nah zusammen, um dann für höhere Temperaturen deutlich auseinander zu laufen.

Die Kurve bei 1620 cm^{-1} zeigt die größten Änderungen im Temperaturbereich zwischen 20 und 33°C , darüber nimmt das Signal wieder leicht ab. Die größte Signalamplitude zeigt die Kurve bei 1645 cm^{-1} . Bei geringen Temperaturen ist die Signaländerung moderat, sie nimmt im Bereich zwischen 17 und 35°C stark zu. Oberhalb von 45°C ergeben sich keine Änderungen im Signal als Antwort auf die Temperaturerhöhung. Der Kurvenverlauf bei 1645 cm^{-1} entspricht dem, wie er i.a. von Schmelzkurven bekannt ist.

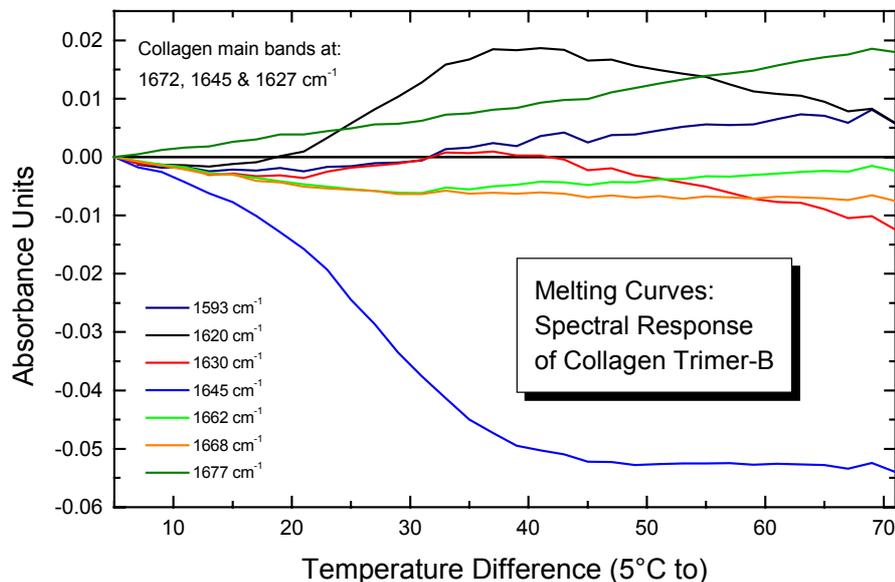


Fig. 3.11 Die temperaturabhängigen Signalantworten von Trimer B an ausgewählten Spektralpositionen. Die Kurven zeigen deutlich unterschiedliches Verhalten. Es finden sich linear temperaturabhängige Antworten ebenso wie stark nichtlineare und auch positive und negative Signalvorzeichen.

In Fig. 3.12 sind alle Temperatur-Differenzspektren in einer 3D-Graphik zusammengefasst dargestellt.

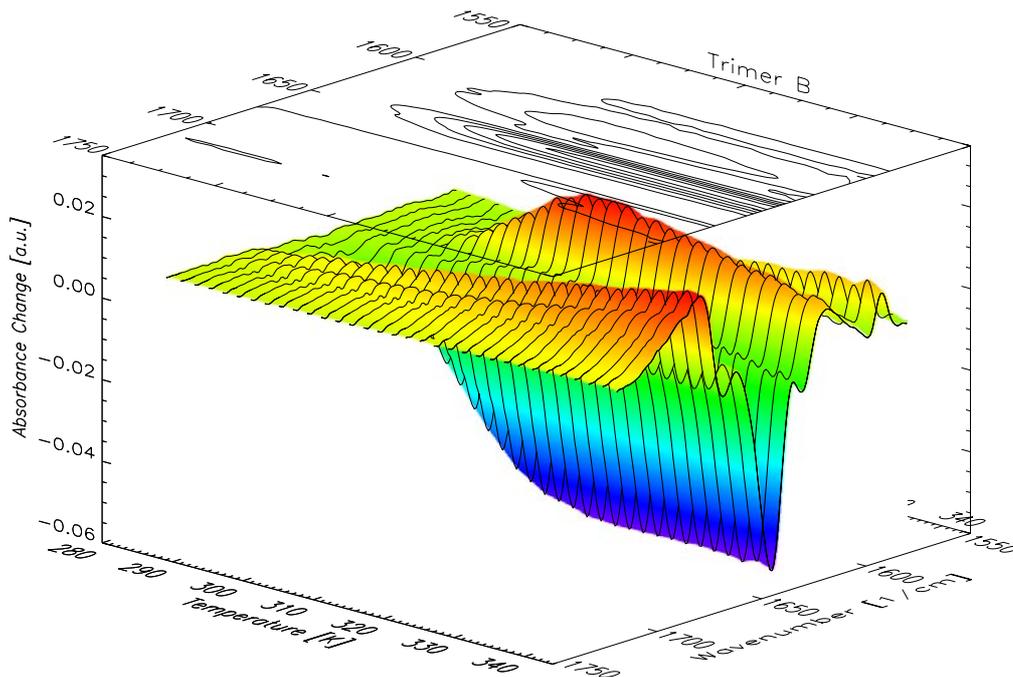


Fig. 3.12: Dreidimensionale Darstellung der Temperatur-Differenzspektren des Trimer B. Gut zu erkennen sind die spektral unterschiedlichen Signalantworten auf Temperaturvariationen. So sind Bereiche, die der helixstabilisierenden Wasserstoffbrücke zugeordnet werden können, gut unterscheidbar von Regionen der Lösungsmittelbanden und unbeeinflusster Carbonyle. Der Plot und weitere 3D-Graphiken wurden mit Hilfe eines Softwarepaketes erstellt, welches im Rahmen von [Spö01, Lut02] entstanden ist.

3.8 Bandenzuordnung bei Collagen-Trimeren in der Literatur

In der Literatur finden sich mehrere Modelle für die IR-Bandenzuordnung des Collagens. Nach [Laz85, Laz92] sind die CO-Gruppen der Triplets Gly-X-Y nicht äquivalent. Bei Gly-Pro-Pro finden sich in einem feuchten Probenfilm (10°C) drei trennbare Unterbanden in der Amid I Region bei 1628, 1644 und 1664 cm^{-1} . Eine Störung in der Struktur, wie sie beispielsweise durch einen thermisch induzierten Phasenübergang hervorgerufen werden kann, bewirkt eine Veränderung in der Amid I Kontur. Die Bande wird breiter und die Feinstruktur verschwindet allmählich.

Nach diesem Modell bildet die Aminogruppe von Gly eine Wasserstoffbrücke zum Carbonyl von Pro, welches an der X-Position einer benachbarten Kette sitzt. Die Brücke wird mit $\text{NH} \cdots \text{C}_2\text{O}_2$ bezeichnet und der Bande bei 1644 cm^{-1} zugeordnet, welche mit der Denaturierung verschwindet. Die Bande des Imino-Carbonyls bei 1628 cm^{-1} wird assoziiert mit der C_1O_1 -Gruppe, die über H-Brücken mit strukturellem Wasser wech-

selwirkt und damit insensitiv bezüglich der Collagen-Denaturierung ist, ebenso wie die der Wechselwirkung mit dem zweiten Iminocarbonyl zugeordnete Bande bei 1664 cm^{-1} .

Im Rahmen einer weiteren Untersuchung über Temperaturabhängigkeiten an natürlichem Collagen [Pay88] zeigen sich drei unterschiedliche Komponenten innerhalb der Amid I Absorptionsbande. Die relativen Intensitäten dieser sub-Banden sind von der Konformation abhängig. Mit der Denaturierung der Tripel-Helix verringert sich der dominante und intensivste Anteil bei 1660 cm^{-1} , während zugleich die Unterbande bei 1633 cm^{-1} wächst. Die Dominanz im nativen Zustand und das Abnehmen der relativen Intensität der 1660 cm^{-1} -Bande mit der Entfaltung legt nahe, dass dieser Peak eine Komponente enthält, die direkt mit der nativen Tripel-Helix verbunden ist. Die dritte Komponente bei 1643 cm^{-1} bleibt in ihrer Intensität weitgehend unberührt von der Denaturierung. In diesem Modell erscheint es sinnvoll, diese Bande der C=O-Streckschwingung des Backbone-Carbonyls einer Lösungsmittelbrücke von Gly zuzuordnen, wobei eine H-Brücke zwischen O und einem Wassermolekül besteht. Payne et al. argumentieren, dass die Wasserstoffbrücke zwischen den Ketten sehr schwach sein muß. Die $\text{C}_{(2)}\text{O}_{(2)}\text{---H}_{(4)}\text{N}_{(4)}$ -Bindung muß länger, d.h. schwächer, sein als gewöhnlich. Die Bande mit der höchsten Wellenzahl bei 1660 cm^{-1} ist also der helixstabilisierenden Bindung zuzuordnen.

In einer weiteren Untersuchung am Modellsystem poly(L-Prolin) [Geo91] wird die zentrale strukturstabilisierende Wasserstoffbrücke der Bande bei 1630 cm^{-1} zugeordnet.

Die Zuordnung der beobachteten Banden im IR-Absorptionsspektrum des Collagens ist in der Literatur bisher nicht einheitlich dargestellt. Auf der Basis unserer eigenen Ergebnisse wird nachfolgend eine Zuordnung der ermittelten Banden zu einzelnen Gruppen von Carbonylen vorgenommen.

Der Kurvenverlauf bei 1645 cm^{-1} korreliert mit der Schmelzkurve, wie sie mittels CD-Spektroskopie für das vorliegende Modellpolymer aufgenommen werden konnte [Ott99a]. Sie ist streng verknüpft mit einer Konformationsänderung des Collagen-Peptides. Diese Kurve und die ihr zugrunde liegende Bande kann der Wasserstoffbrücke von Gly im Innern der Helix zugeordnet werden, welche die Amidgruppe von Gly mit dem Carbonyl von Pro an der X-Position ausbildet. Nach Modell und Nomenklatur von [Laz85] ist dies die Bande $\text{N}_{(1)}\text{H}_{(1)}\text{---C}_{(2)}\text{O}_{(2)}$. (Hierbei kennzeichnen die Zahlen den betreffenden Strang des Trimers; mit dieser Notation wird eine Bindung zwischen der Amidgruppe von Strang 1 mit der Carboxylgruppe von Strang 2 beschrieben.) Die Bande bei 1668 cm^{-1} zeigt nur geringe Veränderungen aufgrund Temperaturvariationen bei geringen Temperaturen und bleibt oberhalb von 34°C konstant. Aufgrund von Betrachtungen der sterischen Gegebenheiten und dem spektralen Antwortverhalten kann diese

Bande einer nach außen gerichteten Carbonyl-Gruppe zugeordnet werden. Die Bindung C_3O_3 ---DOD zum Lösungsmittel sollte weitgehend un sensitiv bezüglich des Faltungszustandes des Peptids sein. Dies entspricht gut den vorgestellten Ergebnissen.

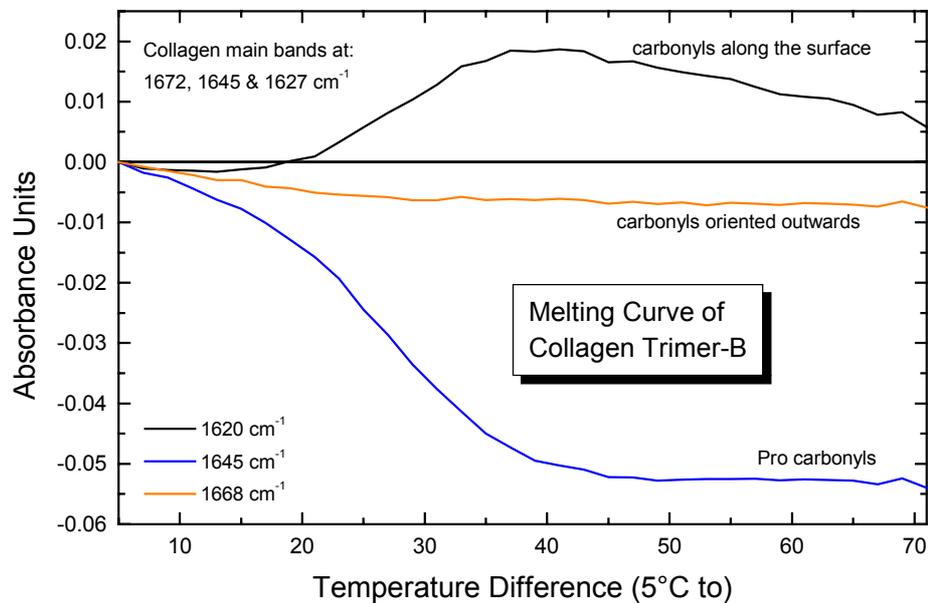


Fig. 3.13: Die Spektralantworten bei 1620, 1645 und 1668 cm^{-1} des Trimer B lassen sich gut den Veränderungen der drei zentralen Wasserstoffbrücken im System auf temperaturinduzierte Umgebungsänderungen zuordnen.

Die Kurve bei 1620 cm^{-1} zeigt einen zwei-Phasen-Prozess: im Bereich bis 20°C ist eine leichte Abnahme der Absorption zu finden, gefolgt von einem größeren Anstieg zwischen 20 und 40°C. Dieser Kurve kann die Wasserstoffbrücke $C_{(1)}O_{(1)}$ ---DOD zugeordnet werden. Dies ist eine Brücke, die aufgrund von Strukturbetrachtungen entlang der Zylinderoberfläche des Collagens orientiert ist. Die Reaktionen der Pro-Carbonyle finden sich als Signalantwort der Absorptionsänderung in der 1645 cm^{-1} -Kurve. Bei geringeren Temperaturen im Bereich um 12°C wird ein Vorschmelzen (Pre-Melting) der Collagenase-Schnittstellen Domäne (welche eine geringere Neigung zur Ausbildung der tripelhelicalen Struktur aufweist als die GPO-Repeats [Fio02]) zusammen mit assoziierten Pro- und Hyp-Isomerisierungen beobachtet. Daran schließt sich das Schmelzen von größeren Teilen der Trimer-Helix mit ihren wiederholt verwendeten Gly-Pro-Hyp Bausteinen an. Die spektrale Antwort oberhalb von 1680 cm^{-1} ist dem linearen Anstieg mit der Temperatur ähnlich, wie er für das Lösungsmittel beobachtet wird. Signale in

diesem Bereich werden Änderungen im Heterotrimer zugeordnet, die von konformellen Umordnungen unberührt bleiben.

Die drei beobachteten Banden in der Amid I Region können also zugeordnet werden:

- a) den Carbonylen der Prolin-Reste (1645 cm^{-1})
- b) den Carbonylen, die entlang der (Zylinder-)Oberfläche orientiert sind (1630 cm^{-1}) und
- c) den nach außen orientierten Carbonylen (1668 cm^{-1}),

siehe Fig. 3.13 [Fio01]. Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse stützen das Modell von [Laz85, Laz92].

3.9 Schmelzpunkt und Kooperativitätsgrad

Als Schmelzpunkt eines Proteins wird der Übergang von einer geordneten Struktur zur ungeordneten verstanden. Dieser Übergang lässt sich durch eine thermisch induzierte Entfaltung erreichen. Die Ermittlung des Schmelzpunkts kann über unterschiedliche Methoden erfolgen:

- a) Man bestimmt anhand struktursensitiver Größen (hier anhand der Absorptionsbande bei 1645 cm^{-1}) diejenige Temperatur, bei der die Signaländerung 50% des Wertes zwischen den Extrema der Versuchsreihe beträgt.
- b) Man bestimmt den Punkt der maximalen Steigung der Schmelzkurve durch zweimaliges Ableiten und Bestimmung des Kurvenulldurchganges. Dies setzt eine ausreichend symmetrische Schmelzkurve voraus.
- c) Man bestimmt die relativen Anteile der jeweiligen Spezies (gefaltet/entfaltet) über die relativen Absorptionsänderungen bei einer Temperatur. Analog der Theorie zur Nernst-Gleichung [Atk96] trägt man das negative logarithmische Verhältnis gegenüber der Inversen der absoluten Temperatur auf. Um den Gleichgewichtspunkt herum, wenn also $-\log(\text{rate}_{\text{folded}} / \text{rate}_{\text{unfolded}}) = 0$ ist, können die Daten linear angepaßt werden und man liest den inversen Temperaturwert des Schmelzpunktes ab. Es bleibt festzuhalten, daß die Voraussetzungen für die Analogie der H-Brücken mit der Redox-Reaktion des Elektronentransfers nur eingeschränkt gegeben sind, da in der Entfaltung kein singuläres System vorliegt. Daraus folgt, daß die lineare Abhängigkeit nicht über den ganzen Temperaturbereich gegeben sein kann. Dennoch läßt sich diese Methode zur Aus-

wertung gut heranziehen, und der Vorteil dieser Methode gegenüber a und b liegt u.a. in ihrer einfachen und sicheren numerischen Handhabung.

In der Literatur wird zur Bestimmung des Schmelzpunktes überwiegend die Methode a verwendet. Die vorliegende Arbeit verwendet Methode c, deren Ergebniskonsistenz mit a und b jeweils geprüft wurde. Fig 3.14 zeigt die Darstellung zur Ermittlung des Schmelzpunktes des Trimer B.

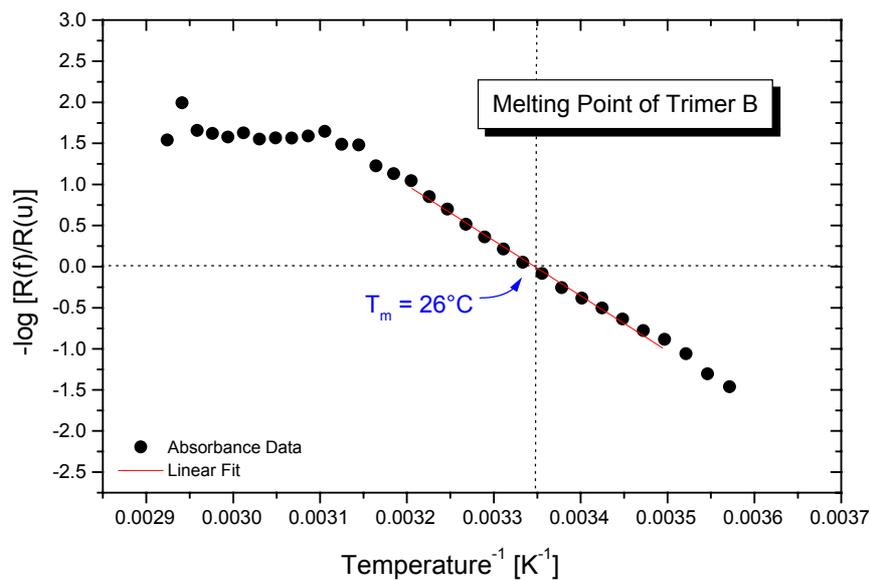


Fig. 3.14: Ermittlung des Schmelzpunktes des Collagen-Modellsystems Trimer B. Der Schmelzpunkt von Trimer B liegt bei 26°C .

Der Schmelzpunkt des Trimer B liegt bei einem Wert von 26°C . Dieses Ergebnis wurde in den CD-spektroskopische Untersuchungen von [Fio00] bestätigt.

3.10 Temperaturexkursionsuntersuchungen an den Modellsystemen Trimer E bis Trimer H

Im vorangegangenen Abschnitt wurde anhand der Untersuchungen am Heterotrimer B gezeigt, dass es mit der vorgestellten IR-spektroskopischen Methodik möglich ist, lokale thermische Entfaltungsprozesse zu erfassen. Einzelne Banden und Bindungen im System können identifiziert werden. Bandenzuordnung und Strukturodynamik passen in den Rahmen der Ergebnisse begleitender Untersuchungsmethoden wie CD- oder NMR-Spektroskopie.

Dieser Abschnitt vergleicht nun das Schmelzverhalten der Trimere E bis H. Diese Modellsysteme wurden in Kap. 3.6 vorgestellt: Sie unterscheiden sich von Trimer B in erster Linie darin, dass sie im wesentlichen aus (POG)_n-Repeats und einem Cysteinknoten aufgebaut sind; die Collagenase-Schnittstelle fehlt.

Zur Darstellung der Ergebnisse werden in diesem Abschnitt die Graphen zur Ermittlung des Schmelzpunkts gezeigt; Absolutspektren inkl. Bandenanpassung, 3D-Plots, Differenzspektren und Schmelzkurven finden sich in Anhang A.

Temperaturexkursionsmessungen an Trimer E

Collagen Trimer E wurde in D₂O gelöst. Küvette und Probenhalterung / -temperierung sowie spektroskopische Einheit entsprechen dem im letzten Abschnitt beschriebenen Aufbau. Temperaturexkursions-Messungen wurden im Bereich der reversiblen Ent-/Rückfaltung zwischen 2°C und 70°C bei einer Schrittweite von 2°C durchgeführt. Das Absorptionsspektrum zeigt im Bereich der Amid I-Bande drei Unterbanden, die über Gauß-Kurven gut angepasst werden können; die spektralen Mittelpositionen liegen bei 1629, 1644 und 1663 cm⁻¹. Sie repräsentieren die drei unterschiedlichen Serien von Carbonylen im Trimer in Verbindung mit ihren jeweiligen Wasserstoffbrücken. Anhand Fig. 3.15 ergibt sich ein Schmelzpunkt von 33°C.

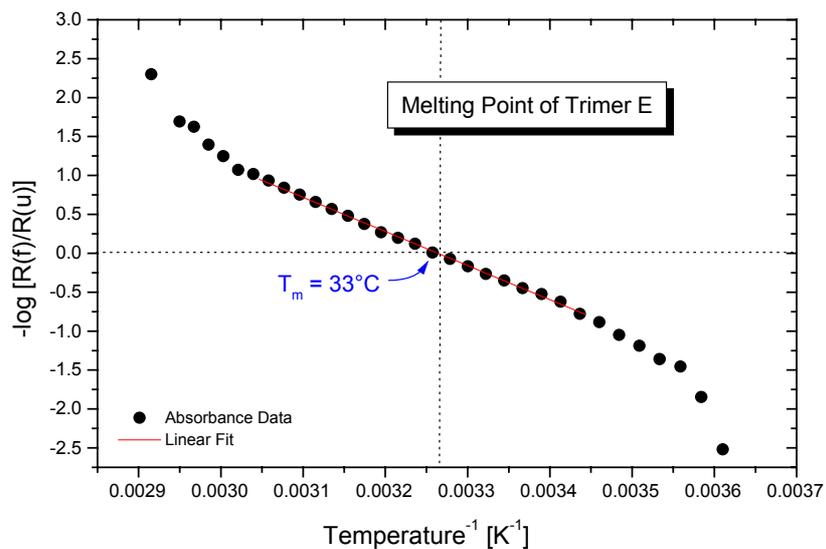


Fig. 3.15: *Ermittlung des Schmelzpunkts von Trimer E*

Temperaturexkursionsmessungen an Trimer F

Collagen Trimer F wurde in D₂O gelöst. Temperaturexkursions-Messungen wurden im Bereich der reversiblen Ent-/ Rückfaltung zwischen 3°C und 71°C bei einer Schrittweite von 2°C durchgeführt. Die spektralen Mittelpositionen der zur Anpassung verwendeten Gauß-Kurven liegen bei 1630, 1645 und 1664 cm⁻¹. Für den Schmelzpunkt ergibt sich ein Wert von 35°C.

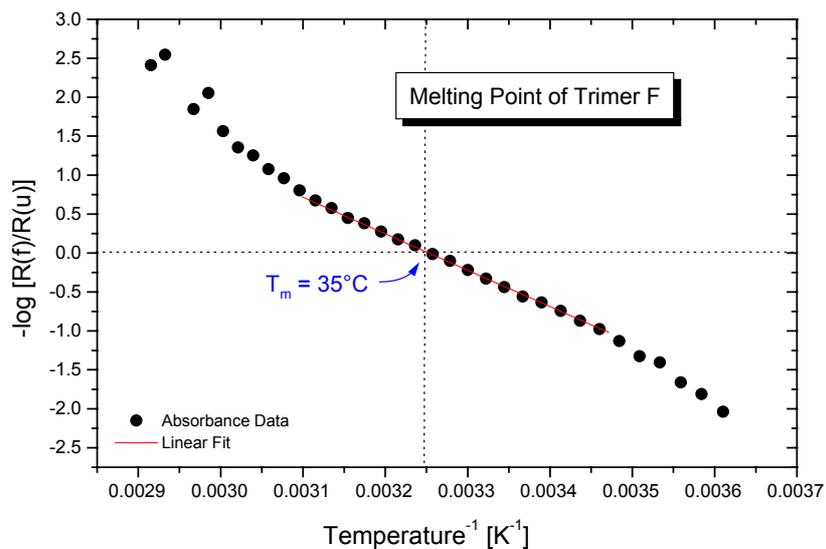


Fig. 3.16: *Der Schmelzpunkt von Trimer F*

Temperaturexkursionsmessungen an Trimer G

Collagen Trimer G wurde in D₂O gelöst. Im Bereich der reversiblen temperaturinduzierten Entfaltung wurden Temperaturexkursions-Messungen durchgeführt. Die Mittelpositionen der Gauß-Kurven zur Anpassung der IR-Absorptionsbande liegen bei 1630, 1645 und 1667 cm⁻¹. Für den Schmelzpunkt ergibt sich ein Wert von 39°C.

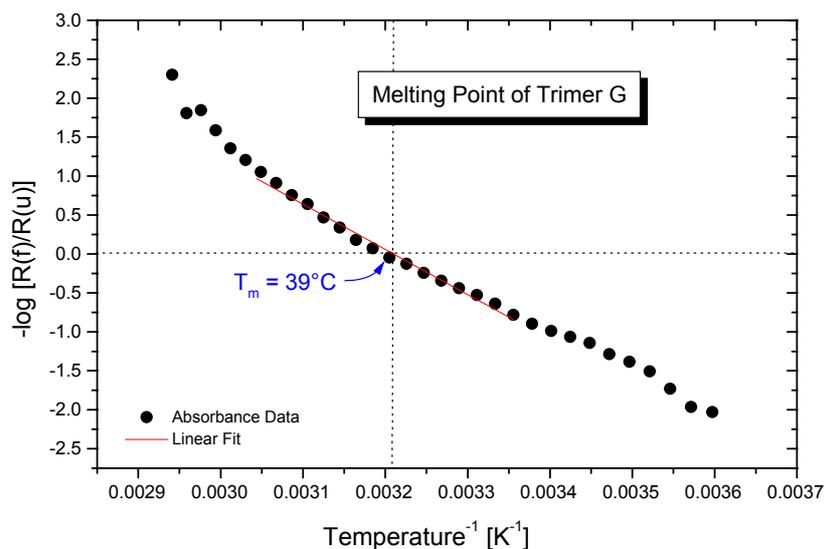


Fig. 3.17: Der Schmelzpunkt von Trimer G

Temperaturexkursionsmessungen an Trimer H

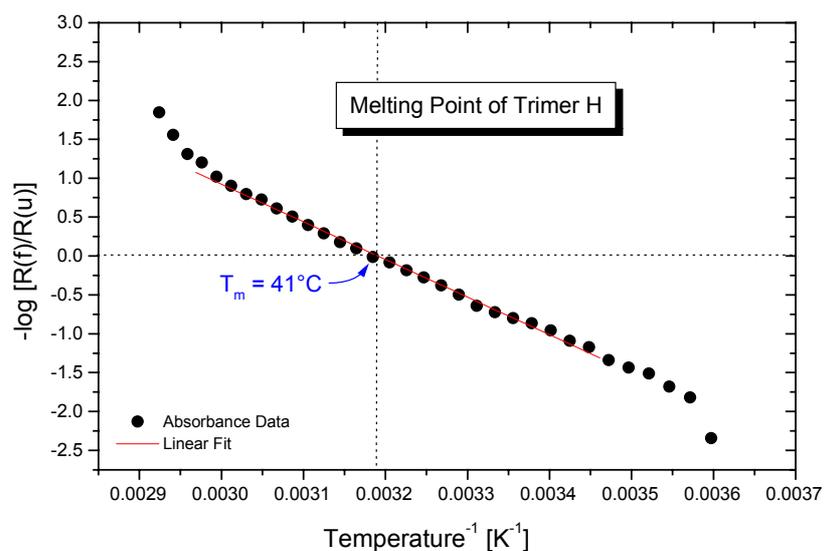


Fig. 3.18: Der Schmelzpunkt von Trimer H

Collagen Trimer H wurde in D₂O gelöst. Im Bereich der reversiblen temperaturinduzierten Entfaltung wurden Temperaturexkursions-Messungen durchgeführt; die Mittelpositionen der Gauß-Kurven zur Anpassung der IR-Absorptionsbande liegen bei 1629, 1644 und 1668 cm⁻¹. Für den Schmelzpunkt ergibt sich ein Wert von 41°C.

3.11 Zusammenfassung und Diskussion

Die Ergebnisse der Fig. 3.15 – 3.18 für die Schmelzpunkte der untersuchten Collagen-Modellsysteme werden in Tab. 3.1 zusammengefasst und mit den zuvor gewonnenen Werten des Trimer B verglichen.

Modellpeptid	Basiseigenschaften	Schmelzpunkt
Trimer B	5 POG-Triplets mit Schnittstelle	26°C
Trimer E	4 POG-Triplets	33°C
Trimer F	4 POG-Triplets, aufgefüllt	35°C
Trimer G	5 POG-Triplets, C-verbrückt	39°C
Trimer H	5 POG-Triplets, N-verbrückt	41°C

Tab. 3.1: *Schmelzpunkte und Übergangsbreiten der untersuchten Collagen-Modellsysteme. Die Collagenase-Schnittstelle in Trimer B scheint die Struktur deutlich zu schwächen, was an einem geringen Schmelzpunkt und einem steilen Schmelzübergang abzulesen ist.*

In Fig 3.19 sind die fünf normierten Schmelzkurven der Modelltrimere abgebildet. Deutlich zu erkennen ist der Zusammenhang zwischen der Anzahl der (GPO)-Repeats und der Schmelztemperatur. Die Collagenase-Schnittstelle, CCS, des Trimer B wirkt sich schwächend auf die Tripelhelixformation aus.

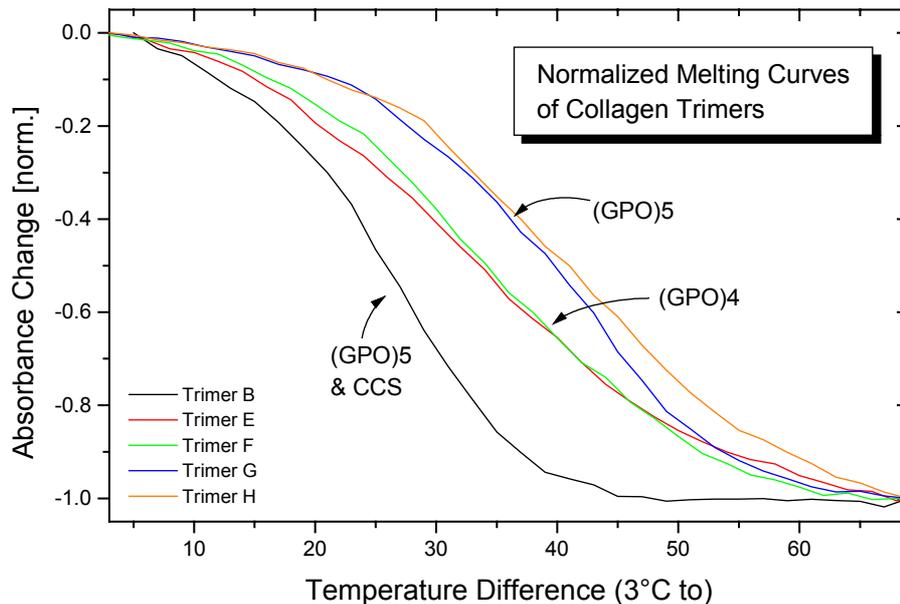


Fig. 3.19: Darstellung der normierten Schmelzkurven der untersuchten Collagen-Modellpeptide. Deutlich zu erkennen ist der Zusammenhang zwischen der Anzahl der (GPO)-Repeats und der Schmelztemperatur. Die Collagenase-Schnittstelle, CCS, schwächt die Struktur im Trimer B merklich.

Aus der Sequenzbeschreibung der Trimere E bis H ergibt sich eine Reihe von Punkten, die sich durch die vorgestellten Messungen beleuchten lassen. Zentral ist hier die Helixstabilität, das Maß für die thermisch induzierte Denaturierung. Bezüglich des Schmelzverhaltens der Modellsysteme ergeben sich die folgenden Fragen:

- a) Verhält sich Trimer F stabiler als Trimer E?

Der Schmelzpunkt des Trimer F liegt ca. 2°C über dem Wert des Trimer E. Die wenigen zusätzlichen Wechselwirkungen durch das in Trimer F aufgefüllte Raster bewirken eine meßbare Zunahme der Helixstabilität.

- b) Zeigt sich Trimer G stabiler als Trimer E?

Der Trimer G-Schmelzpunkt liegt etwa um 6°C über dem des Trimer E. Die Verlängerung der Struktur um jeweils ein GPO-Triplet des Trimer G im Vergleich zu Trimer E zeigt eine deutliche Stabilisierung der Tripelhelixformation.

- c) Ist Trimer G stabiler als Trimer F?

Der Schmelzpunkt von Trimer G liegt ca. 4°C über dem von Trimer F. Daran zeigt sich, daß sich die Verlängerung der Helix um ein GPO-Triplet in Trimer G deutlich stabilisierender auf die Struktur auswirkt, als das Auffüllen des Rasters am N-Terminus des Trimer F.

- d) Schmelzverhalten der Trimere H und G im Vergleich

Für den Schmelzpunkt des Trimers H findet sich ein Wert, der etwa 2°C über dem des Trimers G liegt. Trimer H ist durch die Verbrückung am N-Terminus im Schmelzprozeß gehemmt gegenüber dem C-terminal verknüpften, gleich langen Trimer G, die natürliche Faltungsrichtung ist unterdrückt.

- e) Im Vergleich mit Trimer B: schwächt die Collagenase-Schnittstelle die Struktur merklich?

Trimer B zeigt von allen untersuchten Systemen den geringsten Schmelzpunkt und die größte Steigung der Schmelzkurve am Schmelzpunkt. Obwohl dieses System zusammen mit den Trimeren G und H fünf GPO-Triplets aufweist, also eine ähnliche Stabilität im Schmelzprozeß aufweisen müßte, zeigt sich, dass die Schwächung durch die labile Collagenase Schnittstelle (CCS, collagenase cleavage site) deutlich zum Tragen kommt.

Die Collagen-Modellsysteme wurden für die vorliegenden Untersuchungen direkt in D₂O gelöst. Einzig bei dem Trimer B war zusätzlich der Farbstoff Kristallviolett in einer Konzentration von 2.5 mM zugegeben worden. Dieser Absorberfarbstoff sollte für Laser-induzierte Temperatursprung-Experimente Verwendung finden. Für die Auswertung der vorgestellten Meßreihen muß daher in Betracht gezogen werden, daß der als Kation vorliegende Farbstoff das Schmelzverhalten des Collagens beeinflussen kann.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden parallele Untersuchungen durchgeführt, und es konnte gezeigt werden, daß die Zugabe von Kristallviolett zur Collagenlösung in den entsprechenden Konzentrationen das Schmelzverhalten beeinflusst. In CD-spektroskopischen Experimenten [Mor00] ergab sich eine Schmelzpunktniedrigung um wenige °C (ca. 3-5°C gegenüber einer Farbstoff-freien Lösung). Form und Steigung der ermittelten Schmelzkurve wurden durch die Zugabe des Farbstoffs zur Lösung dagegen nicht beeinflusst.

Der zugrunde liegende Mechanismus läßt sich wie folgt interpretieren: während der thermisch induzierten Entfaltung eines Trimerstrangs werden einzelne, im nativen Zustand einwärts (bzw. nach innen) gerichtete, geschützte Seitenketten einer Lösungsumgebung zugänglich. Das Farbstoff-Ion kann im entfalteten Zustand des Trimers um einzelne, elektrostatische Bindungen mit den Seitenketten erfolgreich konkurrieren. Bei der Rückfaltung verbleibt ein Teil der Farbstoff-Ionen in dieser Bindung, so daß nicht alle ursprünglichen Bindungen innerhalb des Trimerstranges wiederhergestellt werden können. Dieser Zustand ist geeignet, den Collagen-Trimer im Hinblick auf eine weitere, thermische Entfaltung zu schwächen. Dies kann schließlich in einer Absenkung der ermittelten Schmelztemperatur münden. Die Kooperativität wird in diesem Modell nicht dahingehend beeinflusst, daß sich eine Änderung der Schmelzkurvenverlaufsform ergeben würde.

Für die weitere Diskussion der Schmelzkurve von Collagen Trimer B bedeutet das oben angeführte, daß durch die Farbstoffzugabe allein der quantitativ genannte Aspekt der Schmelzpunkterniedrigung auftritt, nicht aber qualitative wie etwa eine Änderung der Kurvensteigung oder der Kurvenverlaufsform.

3.12 Ergänzende Ergebnisdiskussion vor dem Hintergrund der Probenreinheit der Trimere E bis H

Die Absolutspektren der Trimere E bis H, dargestellt in Anhang A, zeigen im Bereich der Amid I Bande eine deutlich ausgeprägte dreifache Bandenunterstruktur. Diese dreifache Struktur läßt sich gut mittels dreier Gaußkurven anpassen. Die Absorption liegt jeweils bei den Maxima der Amid I Banden im Bereich von 0,35 bis 0,40.

Obwohl diese Ergebnisse für eine vergleichbare Probenkonzentration und Probenreinheit der Proben untereinander sprechen, war die Ausbeute bei der Aufreinigung mittels HPLC-Methode gering und die Definition der Konzentration bei diesen Proben nicht eindeutig [Mor00]. Daher ist es prinzipiell möglich, daß auch die Ergebnisse dieser Meßreihen mit einer gewissen Unsicherheit behaftet sein könnten.

Die gute Übereinstimmung der aufgrund der strukturellen Eigenschaften dieser Modellpeptide erwarteten mit den gemessenen Ergebnissen deutet auf eine allenfalls geringe Probenverunreinigung hin. Weiterhin eliminiert die im Rahmen dieser Arbeit verwendete differenzspektroskopische Untersuchungsmethode die Signale einzelner ungebundener Aminosäuren bzw. einzelner Collagenstränge im Gesamtsignal effektiv. Zur Etablierung der hier vorgestellten Meß- und Auswertmethodik sind die Probeneigenschaften in jedem Fall ausreichend.

3.13 Strukturstabilität der Collagenase-Schnittstelle und biphasisches Schmelzen des Trimer B

Die Collagenase-Schnittstelle wird innerhalb des Modell-Heterotrimers auf der einen Seite durch den Cystein-Knoten stabilisiert, auf der anderen Seite durch die Wechselwirkungen der (GPO)₅-Triplets der Einzelketten. Der Trimer verhält sich wie ein perfektes collagenartiges Substrat in seiner Kinetik bezüglich der Abbau durch Collagenasen (MMP1, MMP8 und MMP13), was bestätigt, daß das gewählte Raster $\alpha 1\alpha 2\alpha 1'$ dem für diesen Collagentypus richtigen entspricht. Besonders interessant erscheint, daß dieses synthetische Konstrukt die Konformationseigenschaften des funktionalen Epitops im nativen wie auch im denaturierten Zustand abbildet [Mül00].

Für die hochspezifische Trennung von Collagen Typ I durch die Collagenasen an einer definierten Schnittstelle ist lokal eine weichere tripelhelicale Struktur notwendig. Dieser labilere Abschnitt sollte eine teilweise Entfaltung des natürlichen Substrats durch die enzymatischen Unterdomänen der Collagenase erlauben, bevor der eigentliche Trennungsprozeß durch die Enzyme selbst erfolgt.

Durch den Einsatz von NMR-Spektroskopie wurde die Koexistenz von zwei strukturellen Domänen in dem Collagen-Peptid bestätigt. Ein tripel-helicales Segment enthält den (GPO)-Teil der Helix und ein weniger strukturiertes Segment stellt die Schnittstelle des Heterotrimers dar [Fio01]. Entsprechend wird für die thermisch induzierte Entfaltung erwartet, dass sich zwei trennbare Entfaltungsreaktionen beobachten lassen: für die labilere Schnittstellen-Region bei geringen Temperaturen und für den rigiden Bereich bei höheren Temperaturen.

Wie gelingt nun der Nachweis der zwei Übergänge? CD- und Fluoreszenz- Spektroskopie können die zwei erwarteten Phasen des Schmelzprozesses nicht auflösen. In den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen mittels FTIR-Spektroskopie hingegen finden sich sehr deutliche Hinweise auf ein Pre-Melting der Schnittstelle im Temperaturbereich um 10-12°C, vgl. Fig. 3.13. Die Carbonyle entlang der Helix-Oberfläche spielen hier als Schnittstellen-Sonden eine besondere Rolle.

Mittels einer verfeinerten Auswertmethodik lassen sich aus den FTIR-Daten die zwei Phasen des Schmelzens im Trimer B extrahieren. Bei Betrachtung der Schmelzkurven der Trimere E-H, vgl. Fig. 3.20, ist zu erkennen, dass die Schmelzkurven nahezu punktsymmetrisch zum Schmelzpunkt verlaufen, die Kurve des Trimers B hingegen ist verzerrt und verläuft nicht-symmetrisch.

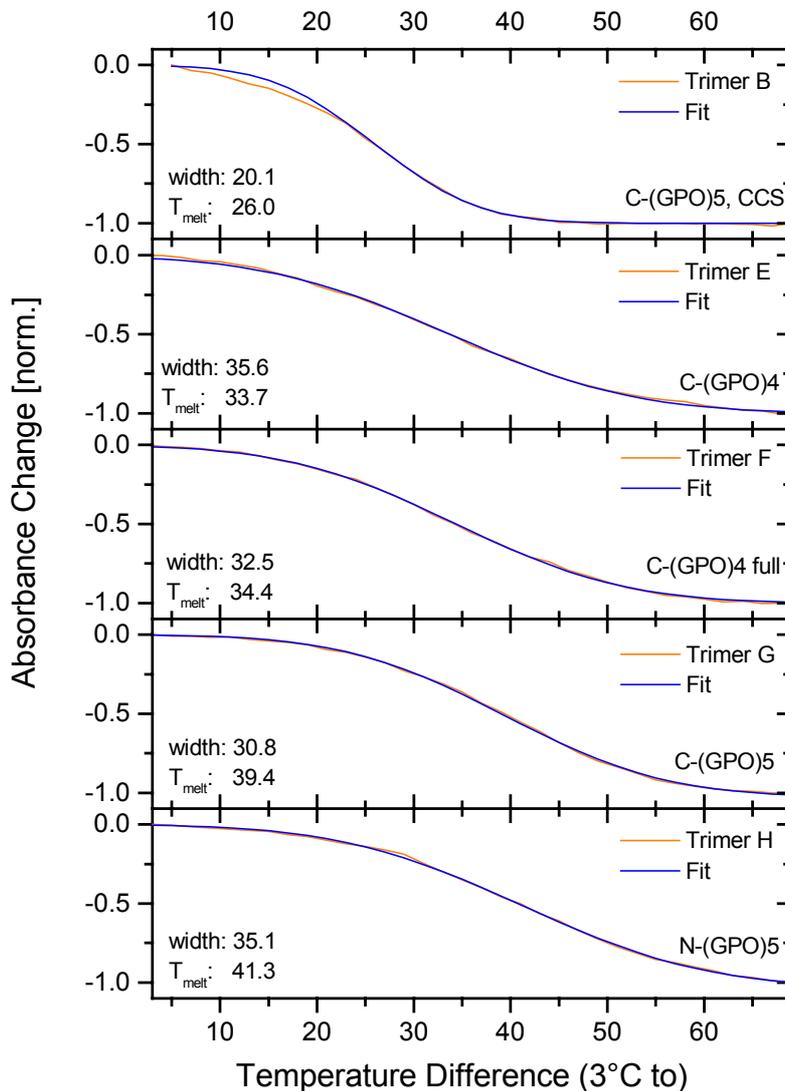


Fig 3.20: Die Anpassung der Collagen-Schmelzkurven durch $erf(x)$ liefert ein Maß für die Breite des Schmelzübergangs und den Schmelzpunkt. Die Werte werden in dieser Methode mit der Dimension $^{\circ}C$ berechnet und stimmen gut überein mit den zuvor ermittelten, vgl. Tab. 3.1. Die Anpassung der Homotrimer-Schmelzkurven (E bis H) an das mono-phasige Modell gelingt gut. Die Schmelzkurve des Heterotrimers B zeigt für tiefe Temperaturen deutliche Abweichungen von der Modellkurve.

Zur Analyse sollen die Kurven durch eine adäquate Funktion angepasst werden. Gut geeignet als Modellfunktion ist die Fehlerfunktion, $erf(x)$. Die Anpassung liefert einen Wert für die Breite und die Mitte des Übergangs, hier interpretiert als Schmelzbreite und Schmelzpunkt.

Die Anpassung der Schmelzkurven ist in Fig. 3.20 dargestellt. Angegeben sind die Schmelzkurven der Trimere, die jeweilige Anpassung mit der Modellfunktion und die ermittelten Werte für Schmelzübergangsbreite und Schmelzpunkt. Diese Werte stimmen gut mit den zuvor ermittelten überein, vgl. Tab. 3.1. Die Qualität der Anpassung aber variiert: während die Homotrimere E bis H durch das mono-phasige Modell gut abgebildet werden, finden sich im Heterotrimer B signifikante Abweichungen im Bereich tiefer Temperaturen. Dieser Bereich entspricht gerade dem Temperaturfenster, in dem das Pre-Melting der Collagenase-Schnittstelle vermutet wird.

Mit der Summe aus zwei mono-phasischen Modellfunktionen läßt sich die Schmelzkurve des Trimer B gut anpassen, vgl. Fig. 3.21. Die einzelnen Funktionsparameter liefern Schmelzpunkt und Übergangsbreite für die Collagenase-Schnittstelle getrennt vom (GPO)₅-Segment.

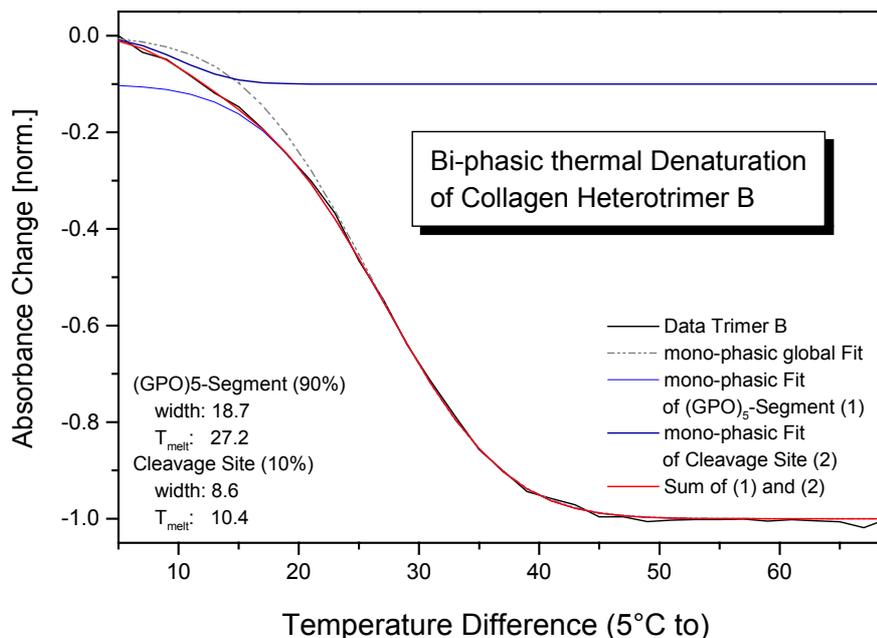


Fig. 3.21: *Anpassen der Schmelzkurve von Trimer B mit einer bi-phasischen Modellfunktion. Die Amplitudenverteilung liegt bei 10% zu 90%. Das Pre-Melting der Schnittstellenregion findet bei 10.4°C statt, der Wert für den Haupt-Schmelzübergang ist 27.2°C.*

Die ermittelten Werte für den bi-phasischen Schmelzübergang in Trimer B sind in Tab. 3.2 zusammengefaßt.

	global	(GPO)₅-Segment	Schnittstelle
Schmelzbreite	20.1°C	18.7°C	8.6°C
Schmelzpunkt	26.0°C	27.2°C	10.4°C
Anteil	100%	90%	10%

Tab. 3.2: Schmelzpunkt und Übergangsbreiten des Trimer B bei Anpassung durch eine monophasische (globale) im Vergleich mit einer biphasischen Modellfunktion für Collagenase-Schnittstelle und (GPO)₅-Segment. Die Amplitude des Schnittstellen-Anteils liegt deutlich unter dem des Peptidrestes. Die Schmelzpunkte im biphasischen Ansatz liegen oberhalb und unterhalb des monophasischen Wertes und werden gut durch ihre Gewichtsanteile abgebildet.

Das Amplitudenverhältnis GPO₅ zu CCS beträgt 90% zu 10%. Der Anteil der Collagenase-Schnittstelle am Gesamtsignal ist demnach relativ gering, obwohl die Schnittstelle eine ähnliche Anzahl von Wechselwirkungen besitzt. Die geringe Signalamplitude zeigt hingegen, dass die Entfaltung in diesem Bereich nur geringe Änderungen der Carbonyle hervorruft. Diese Deutung korrespondiert gut mit der Vorstellung, dass die Schnittstelle im nativen Zustand relativ labil und wenig kompakt geformt ist.

Die Schmelzpunkte der zwei Trimer-Segmente bilden im nach ihren Anteilen gewichteten Mittel gut den globalen Schmelzpunkt ab. Der Schmelzpunkt der labileren Schnittstelle liegt bei ca. 10°C; ein Wert, wie er sich aus früheren Betrachtungen (vgl. Fig. 3.13) angedeutet hat. Der Wert für das (GPO)₅-Segment wurde bei ca. 27°C ermittelt. Als Vergleichsgröße erscheint der Schmelzpunkt des C-terminal verbrückten (GPO)₅-Modellpolymers Trimer G sinnvoll: er liegt bei 39°C und damit signifikant höher. Eine solche Differenz lässt sich dahingehend deuten, dass die labile Schnittstellenregion auf die Entfaltung der kompakten (GPO)₅-Struktur treibend wirkt. Dieser Befund bestätigt die hohe Kooperativität des reißverschlußartigen Faltungsprozesses, des ‚Zipper-like Folding‘ der Collagenhelix.

Die Breite des Schmelzprozesses der Collagenase-Schnittstelle liegt deutlich unter dem Wert des (GPO)₅-Segments. Die labile Struktur entfaltet offensichtlich beschleunigt. Die Summe der Breiten ist größer als die mono-phasische Breite. Dies zeigt, dass die

Entfaltungsprozesse trennbar sind, jedoch nicht rein sequentiell ablaufen, sondern in einem wesentlichen Temperaturbereich überlappen und parallel fortschreiten. Eine derartige Parallelität der Ereignisse ist auch als Ursache dafür anzusehen, dass die Schmelzkurve des Peptids keine Form zeigt, die mit zwei aufeinanderfolgenden Stufen einer Treppe vergleichbar wäre.

3.14 Diskussion der Modellfunktion erf(t)

Das thermische Entfalten von Collagen wird in einem nur sehr schmalen Temperaturbereich beobachtet. Innerhalb weniger °C findet sich der Übergang von einer fast vollständig nativen zu einer überwiegend denaturierten Konformation. In dieser Hinsicht zeigen Collagene ein unter den Proteinen herausragendes Verhalten [Eng00]. Auch bei globulären Proteinen finden sich steile aber dennoch weniger scharfe Übergangskurven. Eine Analyse dieser Kurven konnte zeigen, daß die Übergänge hoch kooperativ ablaufen [Pri79]. Zur Anpassung der Collagen-Schmelzkurven finden sich in der Literatur verschiedene Ansätze, die nachfolgend erläutert werden.

Im kinetischen Modell nach Miles [Mil99] wird die Schärfe des Übergangs bei Collagen allein auf die hohe Aktivierungsenergie der Reaktion zurückgeführt. Als temperaturabhängige Konversionsfunktion wird angegeben: $F = e^{-At \exp(-E_a / RT)}$, wobei der Anteil der Umwandlung F dargestellt wird über: E_a : Aktivierungsenergie, t: Zeit nach Initiierung der Denaturierung, A: Frequenzfaktor (in etwa die maximale Ratenkonstante bei verschwindender Aktivierungsenergie). Die Anpassungsparameter sind E_a sowie das Produkt aus $A \cdot t$. Der Versuch einer Anpassung obiger Daten an das dargestellte kinetische Modell führte nicht zu einer befriedigenden Anpassung der Meßdaten (nicht gezeigt). Das Modell, welches allein eine kinetische Erklärung für die extreme Schärfe des Schmelzüberganges fordert, muß hier daher verworfen werden.

Das Modell von Engel und Bächinger [Eng00] beruht auf der hohen Kooperativität des Collagen-Schmelzüberganges. Der Übergang kleiner Proteine, deren Größe unterhalb der Kooperationslänge liegt, kann angepaßt werden durch ein Zwei-Zustandsmodell, in dem Intermediate zwischen einem vollständig nativen und einem vollständig denaturierten Zustand allenfalls in vernachlässigbaren Konzentrationen vorliegen. Die Kooperationslänge N_0 bezeichnet hierbei die Größe ungestörter Regionen gleichen Zustands (gefaltet oder entfaltet), die zur Erfüllung des reinen Zwei-Zustandssystems zu groß sind. Die Kooperationslänge für Collagen liegt bei 95 Tripeptid-Einheiten [Dav93], so daß für die Untersuchungen von Engel et al. an nativem Collagen III diese Probe mit 1026 Einheiten in diese Klasse kooperativer Systeme fällt. Die Autoren betonen, daß die Kooperationslänge eine gemittelte Größe darstellt. Für homogene Systeme finden

sich an jeder Stelle Regionen gleicher Konformation mit derselben Wahrscheinlichkeit. Für inhomogene Systeme wie das betrachtete Collagen III wird hier eine Vereinfachung vorgenommen. Mit der Einführung mikroskopischer Gleichgewichtskonstanten s und einer Konstanten s^{N_0} für die Faltung einer kooperativen Einheit mit N_0 Tripeptid-Einheiten ergibt sich für den Faltungsgrad:

$$F = \frac{s^{N_0}}{1 + s^{N_0}}$$

Mit dieser Darstellung des Faltungsgrades können die Autoren die experimentellen Daten des Schmelzübergangs bei natürlichem Collagens III hinreichend gut anpassen, obgleich es in den Bereichen größter Krümmung der Schmelzkurve noch zu Abweichungen zwischen experimentellen Daten und Modellkurve kommt.

In einer früheren Arbeit derselben Arbeitsgruppe [Bru78] wird das obige Modell das ‚all or none model‘ genannt, und es stellt dort eine Näherungslösung des Zipper-Modells dar, welches einen einzelnen Propagationsschritt einer Tripeptid-Einheit vom ungeordneten Zustand (coiled state) zur tripelhelicalen Struktur an der Grenze zwischen Helix und coil beschreibt. Obwohl beide Modelle die dortigen CD-spektroskopisch bestimmten Schmelzkurven gut anpassen können, ergeben sich für verschiedene physikalische Parameter stark voneinander abweichende Werte.

Die Anwendung des kinetischen Modells nach Miles führte bei den vorliegenden Daten nicht zu einer befriedigenden Anpassung der Meßdaten. Dieses Modell muß für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Collagen-Modellpeptide verworfen werden. Das Gleichgewichtsmodell nach Engel berücksichtigt die Kooperationslänge des Collagens und führt bei der Anwendung auf das Schmelzverhalten von Collagen III [Eng00] zu ausreichend guten Anpassungen der experimentellen Daten. Die in dieser Arbeit untersuchten Modellsysteme liegen in ihrer Größe jeweils deutlich unter der dargestellten Kooperationslänge von 95 Tripeptid-Einheiten. Mit Ausnahme der Collagenase-Schnittstelle als Teil des Trimers B sind die Systeme mit jeweils homogenen Trimeren aufgebaut, so daß eine Mittelung über die Sequenzvariation der Ketten entfallen kann. Die Trimere B, E-H sollten in ihrem Schmelzverhalten daher durch ein Zwei-Zustands-Modell beschrieben werden können, in welchem vollständig natives und vollständig entfaltetes Protein nebeneinander existieren.

Eine wichtige und mathematisch einfach zu handhabende Modellfunktion für ein derartiges Zustandssystem ist die Fehlerfunktion $erf(x)$. Sie kommt z.B. zum Tragen bei der

Beschreibung einer zeitlichen Antwortfunktion $H(t)$ auf einen instantanen Signalanstieg am realen Detektor eines Meßaufbaus:

$$H(t) = \text{const} \cdot \text{erf}(t/b)$$

wobei b die Halbwertsbreite der durch eine Gaußfunktion approximierte Instrumentenfunktion als Faltung von Anregepuls und Detektorantwort und:

$$\text{erf}(x) = \int_{-\infty}^x \exp(-z^2) dz$$

ist. Die Breite des Signalverlaufs von $H(t)$ ist ein gutes Maß für das zeitliche Auflösungsvermögen des betrachteten Meßaufbaus. Sie ist proportional zum Parameter b der Instrumentenfunktion und entspricht praktisch deren Halbwertsbreite k_b mit $k_b = 2b\sqrt{\ln 2}$. Für einen Anstieg von 10% auf 90% der Signalhöhe erhält man als Breite von $H(t)$ den Wert $1.087k_b$. Über die Fehlerfunktion $\text{erf}(t)$ gelingt nun die Beschreibung einer zeitlichen Signalantwort eines realen Meßsystems auf eine beliebig schnelle Signaländerung. Sie stellt dann den vom Detektionssystem aufgenommenen Übergang zwischen einem Zustand I (z.B. kein Signal) zu einem Zustand II (z.B. Signal liegt an) dar. Auch dieses System ist ein reines zwei-Zustands-System, bei welchem Zwischenzustände allenfalls in vernachlässigbarer Quantität auftreten.

Diese dargestellte Fehlerfunktion ist in der vorliegenden Arbeit zur Anpassung der Schmelzkurven der Modelltrimere herangezogen worden. Die Anpassung der Daten gelingt mit sehr hoher Übereinstimmung zwischen Daten und Modellkurve. Aus dieser sehr guten Übereinstimmung kann geschlossen werden, daß die vorliegenden Modellpeptide im Schmelzverhalten einem reinen Zwei-Zustandssystem folgen. Desweiteren liefert die Fehlerfunktion $\text{erf}(x)$ über ihre Mittenposition einen Hinweis auf den Schmelzpunkt des betrachteten Systems und über ihre Breite ein Maß für die Kooperativität des einzelnen Systems und im Vergleich der Systeme untereinander.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß für den Entfaltungsprozeß des Collagens als ein Zwei-Zustands-Prozeß starke Hinweise in der Literatur existieren. Die Anpassung der experimentellen Daten durch unterschiedliche Modelle konnte bisher nur eingeschränkt erfolgen. In dieser Arbeit wird für die Interpretation und Datenanpassung eine Analogie mit einem zeitlichen Zwei-Zustands-System verwendet. Die Anwendung der Fehlerfunktion $\text{erf}(x)$ als Anpassfunktion der Schmelzkurve für Collagen zeigt eine sehr gute Datenanpassung. Die Güte der Anpassung erscheint hier besser als die dargestellten Ergebnisse aus der Literatur.

4 Konformationsuntersuchungen an Azo-Peptiden

4.1 Einführung

Zur Aufklärung der Proteinfaltungsdynamik wurden in der Vergangenheit eine Reihe von Ansätzen verfolgt. Konformationsübergänge lassen sich z.B. durch durch Elektronentransfer-Prozesse auslösen [Jon93, Pas96] oder indem durch einen eingestrahlt Laserpuls ein Temperatursprung in einer Lösung induziert wird [Tho97]. Auf die temperaturinduzierte Beeinflussung der Polymerkonformation und ihre cw-Beobachtung ist in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich eingegangen worden. Im vorliegenden Abschnitt soll eine Methode dargestellt werden, die es erlaubt, eine optisch ausgelöste Konformationsdynamik zeitaufgelöst nachzuvollziehen.

Als Trigger bzw. Schalter des Prozesses wird ein Molekül verwendet, welches reversibel und schnell photoisomerisiert und dabei seine Geometrie ändert. Der Schalter wird in das Rückgrat eines Peptids eingebaut. Besitzt das Peptidstück eine geeignete Länge und wird es zyklisiert, so kann durch die Längenänderung des optischen Schalters eine Konformationsänderung im Peptid induziert werden [Ren00a], Fig. 4.1.

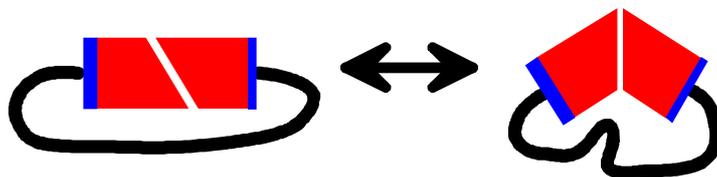


Fig. 4.1: *Das Prinzip der photoinduzierten Konformationsbeeinflussung: Der reversibel photoschaltbare Baustein (rot) ist als Aminosäure getarnt (blau) und wird in das zyklische Peptid (schwarz) einbettet. In der gestreckten Schalterstellung ist der Konformationsraum der Kette stark eingeschränkt, der nach Photoisomerisation gewinkelte Schalter erlaubt dem Peptid, seine bevorzugte native Struktur einzunehmen; Graphik nach [Spö01].*

Als Peptidsequenz wurde ein Stück der Thioredoxin Reduktase aus *E.coli* gewählt. Das Protein reduziert Thioredoxin und erlaubt einen reversiblen Oxidations-Reduktionszyklus des Thioredoxins, welches für Zellwachstum und Apoptose-Inhibitierung von Bedeutung ist [Mus00]. Die acht gewählten Aminosäuren (Reste 134-141; Ala-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly-Phe) enthalten das katalytische Zentrum des Proteins.

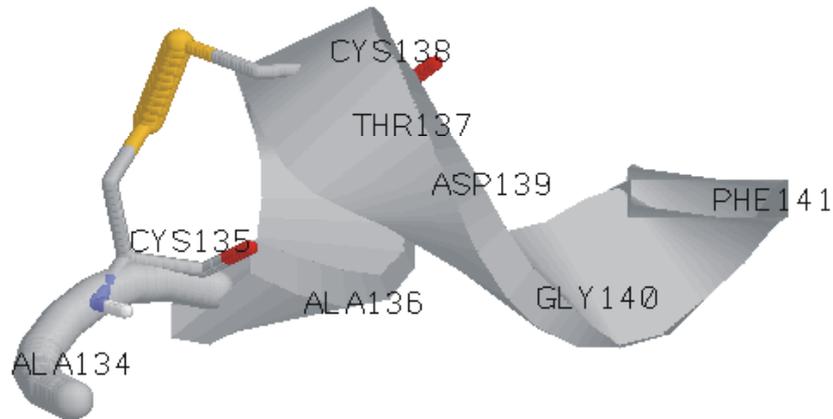


Fig. 4.2: Das Peptidsegment (Reste 134-141) aus Thioredoxin Reduktase: in der nativen Konformation enthält es das katalytische Zentrum des Proteins (-Cys-Ala-Thr-Cys-) und bildet einen einzelnen Loop aus. Die Cysteine 135 und 138 sind durch eine Disulfidbrücke verbunden (gelb), PDB-Code: 1TDE

Die Sequenz wurde ausgewählt, da sie durch Rückgratzyklisierung Spielraum läßt, konformationelle Einschränkungen oder Freiheitsgrade einzuführen. Gleichzeitig ist der Test der Bioaktivität möglich. Der Konformationsraum kann durch Schließen oder Lösen einer Disulfidbrücke zwischen den zwei Cysteinen zusätzlich beeinflusst werden. In der nativen Struktur formt das Peptidstück eine Schleife aus, vgl. Fig 4.2.

Als Photoschalter wird Azobenzol verwendet. Es enthält als zentrale Einheit die Azo-Gruppe (-N=N-) der Diazene: zwei sp^2 -hybridisierte Stickstoffatome, die über eine Doppelbindung verbunden sind. An beiden Enden sind Phenylringe angelagert. Das Molekül wird auch Diphenyldiazen genannt, Summenformel: $(C_6H_5)_2N_2$. Azobenzol liegt in zwei stereoisomeren Formen vor, dem *cis*- und dem *trans*-Azobenzol. Lichtinduziert können die Formen ineinander überführt werden, die Isomerisierung verläuft anregungsabhängig multiphasisch mit Hauptkomponenten im Bereich von 150 fs – 350 fs [Näg97]. Das *trans*-Isomer ist energetisch stabiler: die *cis*-Form isomerisiert bei RT thermisch aktiviert nach *trans* auf der Zeitskala von Stunden. Die Potentialbarriere beträgt dabei etwa 90 kJ/mol [Rau73]. Die geometrische Struktur in der *cis*-Konformation ist aufgrund sterischer Hinderung der Phenylringe verdrillt: ein Ring ist um 53.3° aus der N=N-C-Ebene herausgedreht. Ob die *trans*-Konformation planar ist oder leicht verdrillt, wird derzeit diskutiert. Kristallstrukturen deuten auf eine planare Geometrie hin, während Elektronen-Streuexperimente in der Gasphase eine Nichtplanarität aufzeigen: die Phenylringe erscheinen um 30° aus der N=N-C-Ebene herausgedreht [Rau73, Tra77]. In den Abbildungen 4.3 und 4.4 sind die räumliche Strukturen von Azobenzol

in *trans*- und *cis*-Konfiguration schematisch dargestellt. Die Außenmaße des Moleküls, d.h. die End-zu-End-Abstände zwischen den äußeren H-Atomen, variieren mit der Isomerisierung deutlich, um fast einen Faktor 2: *trans*: 9.0 Å, *cis*: 5.5 Å.

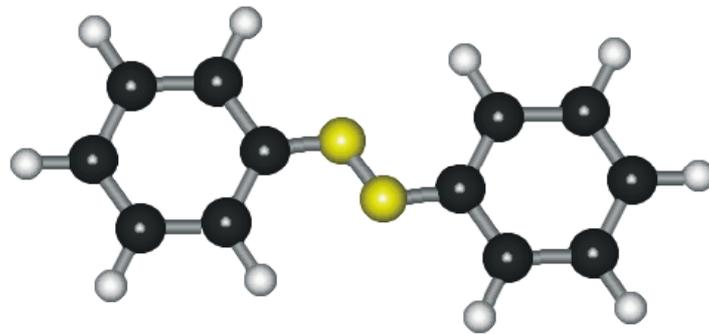


Fig. 4.3: Die räumliche Struktur von *trans*-Azobenzol. An die zentrale Azogruppe (-N=N-, gelb) sind zwei Phenylringe gekoppelt.

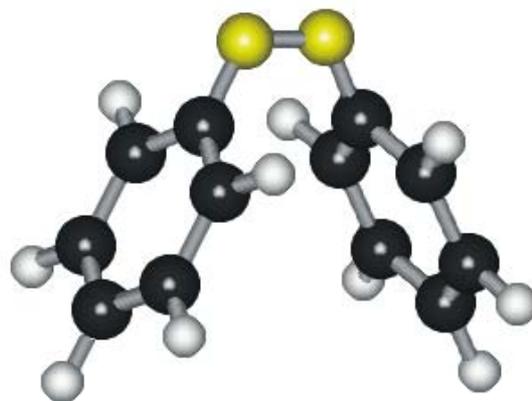


Fig. 4.4: Die räumliche Struktur von *cis*-Azobenzol. Durch Photoisomerisation können die beiden Isomere reversibel ineinander überführt werden. Die Zeitskala dafür liegt in der Größenordnung von wenigen hundert Femtosekunden. Der Abstand der beiden Enden des Azobenzols variiert durch die Isomerisierung um nahezu einen Faktor 2 (*trans*: 9.0 Å, *cis*: 5.5 Å).

Die Photoisomerisierung ist der dominante photochemische Prozeß bei Azobenzol und den modifizierten Azobenzol-Peptid-Verbindungen. Nebenreaktionen wie Photo-reduktion, Photooxidation oder Photozyklisierung treten gar nicht bzw. mit Quantenausbeuten von unter 10^{-3} auf [Rau90].

Absorbiert das Molekül ein Photon, wird es in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt, von dem es schließlich nahezu strahlungslos auf die Grundzustandspotentialfläche zurückkehrt und dort energetisch relaxiert. Da die Grundzustandsfläche zwei Minima besitzt, die dem *trans*- bzw. dem *cis*-Isomer zugeordnet werden, kann die Reaktion in einem anderen Zustand enden als sie begonnen hat: die Isomerisierung findet statt. Das Verhältnis von isomerisierten zu angeregten Molekülen wird Quantenausbeute Ψ genannt.

Der detaillierte Ablauf der Isomerisierung ist noch nicht abschließend geklärt. Es werden mehrere Isomerisierungsmechanismen diskutiert. Diese sind eine Rotation eines Phenylrings um die N-N-Bindungsachse bzw. eine Inversionsbewegung. Es gibt Hinweise darauf, dass Inversion und Rotation kombiniert ablaufen. Daher wird ein ‚Hula-Twist‘ genannter Mechanismus diskutiert, bei dem sich ein Stickstoffatom aus der Phenylringebene herausbewegt und damit die Inversionsbewegung zulässt. Am häufigsten wird in der Literatur diskutiert, dass bei Anregung in der niederenergetischen $n\pi^*$ -Bande die Inversion und der ‚Hula-Twist‘ dominieren, während bei Anregung in der höherenergetischen $\pi\pi^*$ -Bande die Rotation Vorrang hat [Mon82, Rau90, Wac98]. Allerdings wird der Rotationsmechanismus durch neuere Rechnungen wieder infrage gestellt [Ish01].

4.2 Synthese und Struktur der Azo-Peptid-Verbindungen

Durch den Einbau des Azobenzol-Schalters in die Peptidsequenz soll ein System geschaffen werden, lichtinduzierte Konformationsübergänge an Modellpeptiden zu untersuchen. Der erste Schritt ist die Tarnung des Azobenzols als Aminosäure, indem jeweils an die p-Position der beiden Phenylringe eine Amino- bzw. eine Carboxylgruppe angehängt wird. Die Synthese der Pseudoaminosäure APB, vgl. Fig. 4.5, 4.6, ist detailliert in [Beh00] beschrieben.

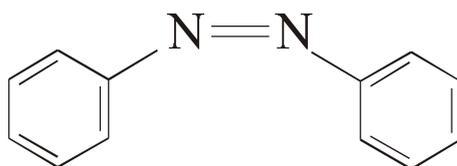


Fig. 4.5: Strukturformel des Azobenzols

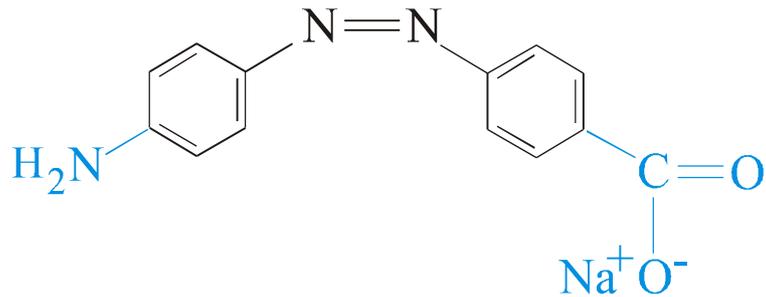


Fig 4.6: Strukturformel von APB (4-aminophenyl)-Azobenzoessäure

Durch eine zusätzliche Methylengruppe zwischen der Aminofunktion und dem Phenylring in der Pseudoaminosäure AMPB wird die Konjugation des π -Elektronensystems unterbrochen. Die Gruppe dient als kleiner und flexibler Spacer.

An die Pseudoaminosäure AMPB wurde das Oktapeptid angehängt und zu einem Ring geschlossen. In der Kette des Oktapeptids stellt der Chromophor als neunte Aminosäure die Verbindung zwischen Ala und Phe her. Im (mono-) zyklischen Peptid cAMPB sind zur Vermeidung von Nebenreaktionen die Cysteine mit StBu- (*S-tert*-Buthylthio-) Schutzgruppen versehen. Nach Entfernung der Schutzgruppen und Schließen der Disulfidbrücke erhält man das bizyklische Peptid bcAMPB.

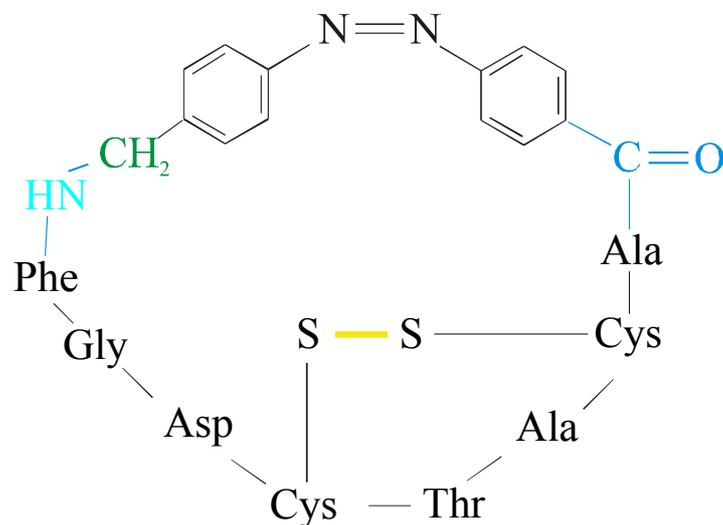


Fig. 4.7: Strukturformel von bcAMPB, dem doppelt zyklisierten Peptid mit (4-aminomethyl-phenyl)-Azobenzoessäure. Der Methylspacer ist grün, die Disulfidbrücke gelb dargestellt.

Für die Interpretation der Meßergebnisse ist die möglichst genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der zyklischen Peptide von elementarer Bedeutung. Dazu wurden NMR-Untersuchungen durchgeführt [Ren00b]. Aus den NMR-Spektren können Abstands- und Torsionswinkeldaten gewonnen werden, eine Umsetzung in eine sichtbare Struktur erfolgt rechnergestützt, z.B. über das simulierte Tempern. Bei diesem iterativen Verfahren wird eine Startstruktur mit empirischen Strukturparametern für eine kurze Zeit auf eine hohe Temperatur gebracht. Die Atome dieser Startstruktur erhalten so eine hohe thermische Beweglichkeit. In mehreren Abkühlschritten kann sich die Struktur unter dem Einfluß eines Kraftfelds auf eine energetisch günstige Zielstruktur zubewegen. Das Ergebnis ist eine Peptidstruktur mit einer lokal minimalen Energie. Konvergieren unter Berücksichtigung der NOE-Nebenbedingungen verschiedene, zufällig gewählte Startstrukturen im Konformationsraum und läßt sich für diese schließlich keine Verringerung der globalen Energie mehr beobachten, so erhält man eine Strukturfamilie, die einen mehr oder weniger begrenzten Konformationsraum absteckt, welcher ein realistisches Abbild der Struktur darstellt [Lot98].

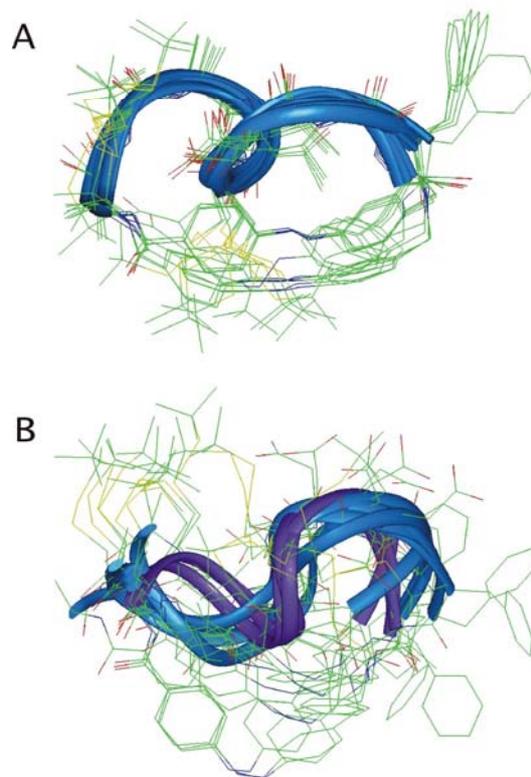


Fig 4.8: *Ensemble der zehn energieärmsten NMR-Strukturen des monozyklischen AMPB-Peptids in der trans- (oben, A) und der cis- (unten, B) Konformation. Chromophor und Aminosäureseitenketten sind als Skelettmodell dargestellt. Färbung: C grün, N blau, O rot und S gelb, H wird nicht dargestellt. Das Peptidrückgrad ist als blaues Band gezeichnet, eine weitere Populationsfamilie desselben Zustandes ist violett dargestellt, nach [Ren00b].*

In Fig. 4.8 sind die mit NOE-Restraints gewonnenen NMR-Strukturen von cAMPB dargestellt. Die Konvergenz als Maß der Abweichung der zehn Strukturen voneinander stellt sich für das *trans*- und das *cis*-Konformer unterschiedlich dar. Während die Konvergenz der *trans*-Peptidkette hoch ist, treten im *cis*-Konformationsraum zwei Konformationsfamilien auf: es findet sich eine stärker populierte Familie mit S-förmiger Struktur des Peptidrückgrats und eine schwächer populierte mit mehr helicaler Struktur.

Zyklisierung und Disulfidverbrückung im bicyklischen Peptid geben sehr restriktive Zwangsbedingungen für die relativen Aminosäurepositionen vor. Insbesondere ist die Konvergenz der *trans*-Zustandsfamilie erhöht. Für das *cis*-Konformer ergeben sich wieder zwei unterschiedlich populierte Familien, vgl. Fig. 4.9.

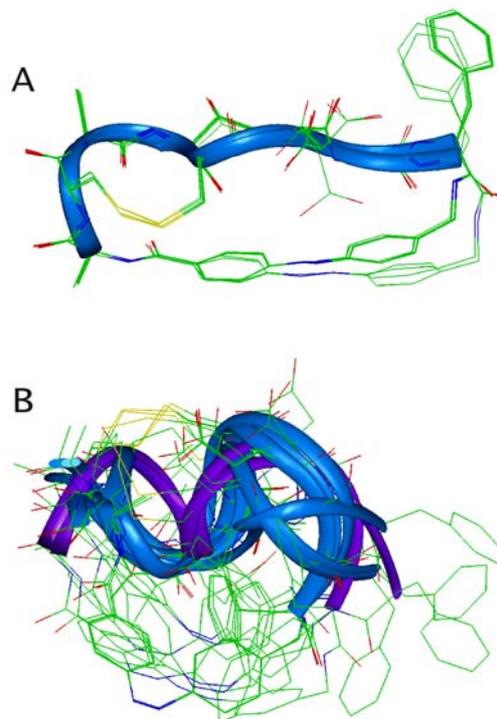


Fig. 4.9: Ensemble der zehn energieärmsten NMR-Strukturen des bicyklischen AMPB-Peptids in der *trans*- (A) und der *cis*- (B) Konformation, Darstellung analog Fig. 4.8. Die Konvergenz der *trans*-Zustandsfamilie ist sehr hoch, für den *cis*-Zustand finden sich wie im cAMPB zwei besetzte Zustandsfamilien.

Rückgrat-zyklisierte Azo-Peptid-Verbindungen besitzen eine Reihe von Eigenschaften, die sie als Modellsysteme der Proteinfaltung geeignet erscheinen lassen:

- a) Azobenzol als Trigger isomerisiert sehr schnell und liefert einen definierten Startpunkt der Konformationsänderung

- b) Die Photoreaktion ist reversibel, das System bistabil
- c) Das System bildet in dieser Größe definierte und interpretierbare Strukturelemente aus
- d) Die Verbindungen sind spektroskopischen Methoden (Dauerstrich und zeitaufgelöst) zugänglich

4.3 Untersuchungen an Azobenzol

Als Lösungsmittel für Azobenzol und alle Azo-Peptid-Verbindungen wurde deuteriertes DMSO (d₆) verwendet (MW: 84.17, Aldrich). Die Substanz ist stark hygroskopisch; vor Verwendung mußte sie in einer Eigenbau-Destillationsanlage aufbereitet werden.

trans-Azobenzol (MW: 182.22, Merck) wurde in Lösung gebracht (10-25 mM) und nachfolgend bei Schichtdicken von 50 µm spektroskopisch untersucht. In Abbildung 4.10 bzw. 4.11 sind die Spektren beider Konformere im UV-VIS bzw. IR dargestellt.

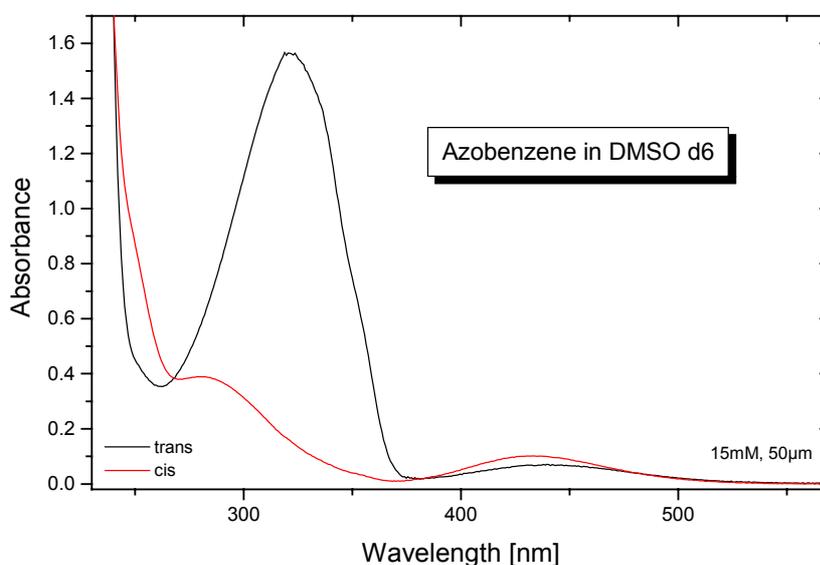


Fig. 4.10: Azobenzol in DMSO d₆. Dargestellt sind die photostationären Gleichgewichte, diese entsprechen nicht einem 100% zu 0% Anteil im Isomerengemisch, vielmehr kann ein Anteil von ca. 80% *trans* bei Belichtung im Wellenlängenbereich zwischen 400 nm und 500 nm erreicht werden.

Im Bereich von 390 nm und 500 nm finden sich die die $n\pi^*$ -Banden des *cis*- und des *trans*-Konformers. Bei gleicher Wellenlänge für das Absorptionsmaximum der Banden

ist die Extinktion ϵ für *cis* höher, so daß die Banden in Fig. 4.10 unterschiedliche Höhe aufweisen. Für die höherenergetischen $\pi\pi^*$ -Übergänge liegen die Banden im Bereich von 270 nm bis 360 nm. Der Extinktionskoeffizient für das *trans*-Konformer ($\lambda_{\max} = 320$ nm) liegt über dem des *cis*-Konformers ($\lambda_{\max} = 280$ nm), dessen Absorptionsmaximum kurzwelliger liegt. Durch selektive Belichtung in den angegebenen Wellenlängenbereichen läßt sich das Konformerengemisch in Richtung einer *trans*- bzw. *cis*-Dominanz verschieben. Durch die Photoisomerisierung wird aufgrund der Bandenüberlappung das photostationäre Gleichgewicht nicht bei 100% zu 0% eingestellt, vielmehr ist etwa ein maximaler *trans*-Anteil von ca. 80% erreichbar. Im *cis*-Gleichgewicht ist ein ca. 10%-iger Anteil von Molekülen in *trans* festzustellen. Die Anteile im Gemisch lassen sich gut anhand der Absorption in den angegebenen Wellenlängenbereichen ablesen.

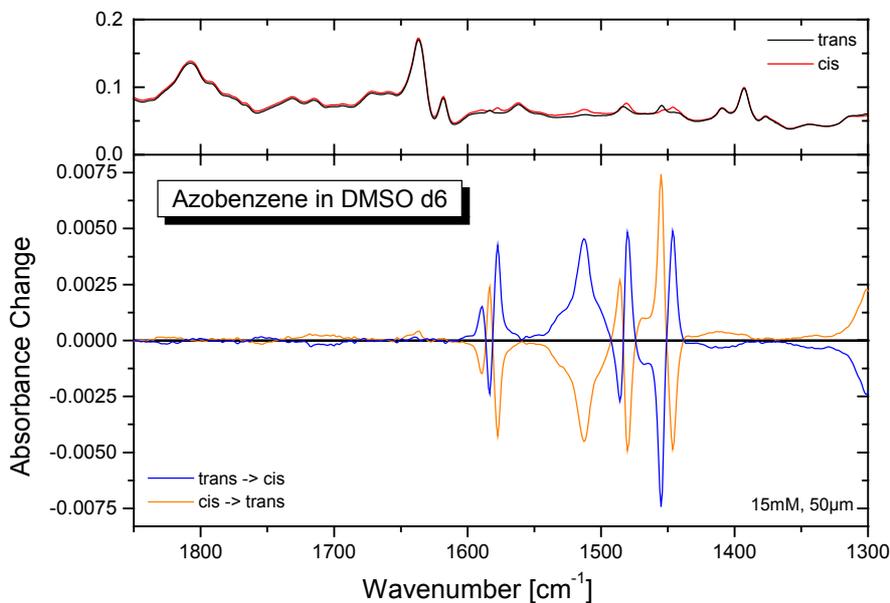


Fig. 4.11: MIR-Absorptions-Spektren von Azobenzol in DMSO d6. Die im oberen Fenster gezeigten Spektren bilden dieselben Isomerengemische wie Fig. 4.10 ab. In diesem Spektralbereich ist vor einer hohen Hintergrundabsorption nur eine kleine Signalveränderung durch die Isomerisierung auszumachen. Deutlichere Aussagen ergeben sich aus den Differenzspektren der beiden Isomere: das $\text{trans} \Rightarrow \text{cis}$ Spektrum wird gebildet aus *cis*-Spektrum abzüglich *trans*-Spektrum, $\text{cis} \Rightarrow \text{trans}$ analog. Diese Art der Darstellung – im unteren Fenster gezeigt – wird nachfolgend für den infraroten Spektralbereich bevorzugt verwendet.

Auch im infraroten Bereich des optischen Spektrums ergeben sich Absorptionsänderungen aufgrund der Isomerisierung. Da vor einem hohen Hintergrund die Signaländerungen klein sind, ist eine deutlichere Aussage dem Differenzspektrum aus zwei Absolut-

spektren zu entnehmen. Diese Art der Darstellung, vgl. Fig 4.11, wird in dieser Arbeit bevorzugt Verwendung finden. Für Azobenzol ergeben sich symmetrische Differenzbanden, was die Reversibilität der Reaktion unter den gewählten Belichtungsparametern zeigt. Im Bereich oberhalb von 1605 cm^{-1} zeigt die Substanz keine nennenswerten Differenzbanden.

Die vorangehenden Abbildungen zeigen, dass die Isomerisierung von Azobenzol unter Belichtung im UV-VIS der zeitaufgelösten Infrarotspektroskopie zugänglich sein sollte. Zur Aufklärung der dynamischen Eigenschaften wurde die Isomerisierung von *trans* nach *cis* in Azobenzol zeitaufgelöst untersucht, Fig. 4.12.

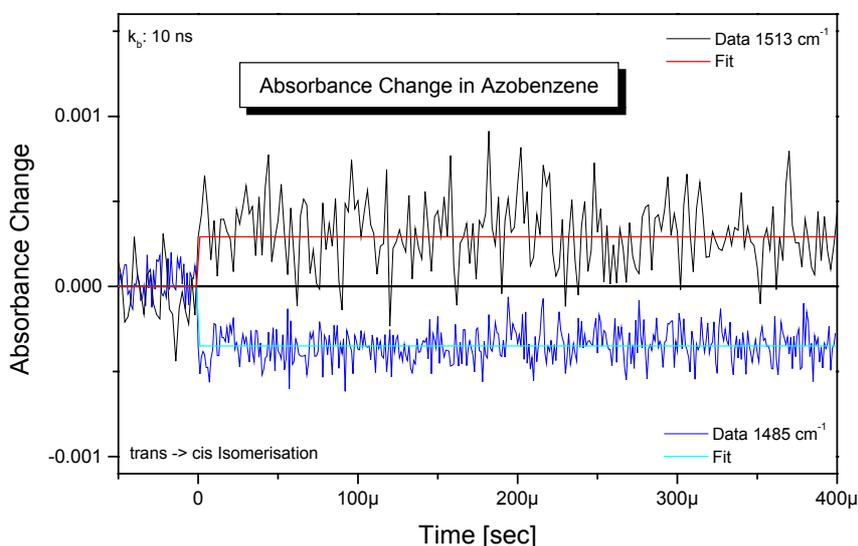


Fig 4.12: *Transiente Spektren des Azobenzols, trans nach cis, an Spektralpositionen großen Differenzsignals. Die Kurvendynamik entspricht der Instrumentenfunktion. Die Isomerisierung des Schalters wird nicht aufgelöst, das Signal verbleibt im Messfenster auf konstantem Wert. Azobenzol stellt für den vorliegenden Messaufbau einen quasi-instantanen Trigger der Faltungsdynamik dar.*

Die transienten Spektren von Azobenzol zeigen in der *trans* nach *cis* Isomerisierung eine schnelle Stufe und verbleiben anschließend auf konstantem Niveau. Der Verlauf der Stufe entspricht der Instrumentenantwortfunktion. Daraus ergibt sich, dass Azobenzol für den vorgestellten Meßaufbau als quasi-instantaner Trigger der Peptid-Faltungsdynamik eingesetzt werden kann.

4.4 Untersuchungen an Azo-Peptiden

Zur Untersuchung der optisch getriggerten Peptid-Konformationsdynamik standen aus der AMPB-Familie unterschiedliche Proben (AMPB, das lineare lAMPB, das einfach zyklisierte cAMPB sowie der Bizeklus bcAMPB) zur Verfügung. Diese wurden in aufbereitetem DMSO d6 gelöst. Differenzspektren *cis* \Rightarrow *trans* bzw. *trans* \Rightarrow *cis* sind in Abbildung 4.13 dargestellt.

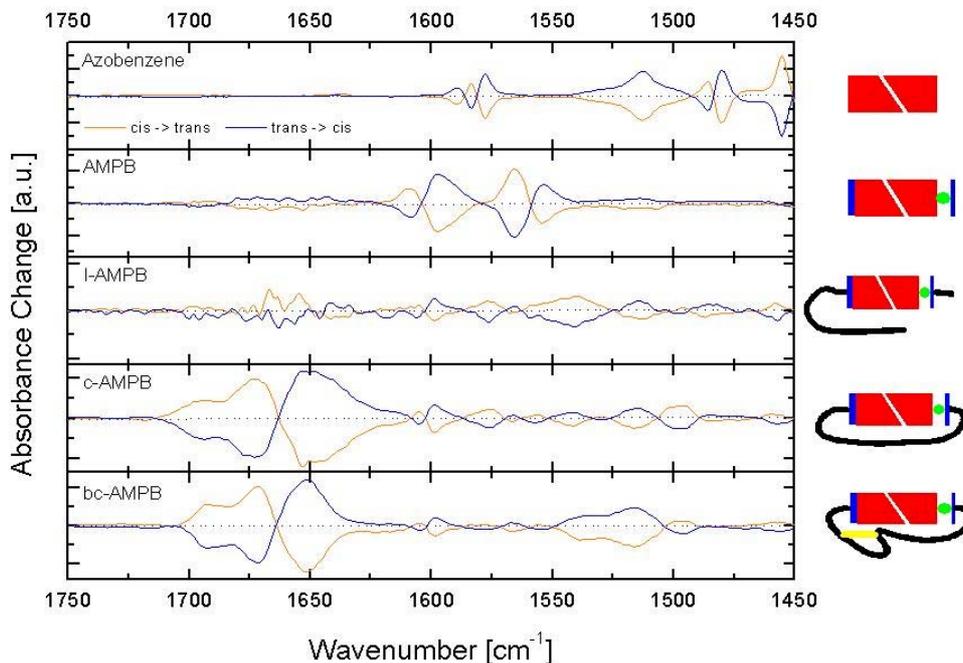


Fig. 4.13: Differenzspektren *cis* \Rightarrow *trans* bzw. *trans* \Rightarrow *cis* der untersuchten Proben aus der AMPB-Familie; im Vergleich: Azobenzol. Die Symbolik auf der rechten Seite entspricht der in Fig. 4.1 eingeführten. Dargestellt sind die Differenzspektren zwischen den photostationären Gleichgewichten, die durch Belichtung mit 355 nm bzw. 436 nm eingestellt wurden. Aufgrund eines höheren Wasseranteils im Lösungsmittel von AMPB und lAMPB und damit höherer Hintergrundabsorption sind diese Spektren im Bereich der Wasserabsorptionsbande zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} stärker verrauscht.

Anhand Abbildung 4.13 lassen sich die wesentlichen Unterschiede der Konformationsänderungen der Proben darstellen. Der Schalter Azobenzol besitzt ein symmetrisches Differenzspektrenpaar mit unterhalb von etwa 1600 cm^{-1} deutlich ausgeprägten Differenzbanden. Oberhalb von 1600 cm^{-1} finden sich keine ausgeprägten Differenzbanden. AMPB zeigt bis 1625 cm^{-1} ausgeprägte Differenzbanden. lAMPB zeigt unterhalb von 1600 cm^{-1} symmetrische Differenzbanden, wohingegen die Kurven aufgrund eines hö-

heren Wasseranteils im Lösungsmittel im Bereich hoher Wasserabsorption um 1650 cm^{-1} stärker verwascht sind. Das zyklisierte Peptid cAMPB zeigt symmetrische Banden des Schalters und in der Amid I Region (zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1}). Im Zyklus ist es also möglich, die Konformation der Peptidkette optisch getrieben reversibel durch eine Schalterisomerisierung zu beeinflussen. Auch im bicyklischen Azopeptid bcAMPB induziert die Schalterisomerisierung eine reversible Konformationsänderung der Peptidkette, sichtbar an symmetrischen Differenzbanden in der Amid I Region. Im Vergleich zum monozyklischen Peptid sind die Signalantworten im Bereich der Amid II Region (um 1530 cm^{-1}) deutlicher ausgeprägt.

Die Meßkurven der Fig. 4.13 zeigen, daß sich die bei der NMR-Analyse gefundenen Strukturänderungen durch optische Spektroskopie eindeutig nachweisen und damit auch zeitaufgelöst verfolgen lassen.

4.5 Zeitaufgelöste Messungen an bcAMPB

Auf der Basis der dargestellten Ergebnisse wurde bcAMPB für Dynamik-Untersuchungen der Peptid-Konformation ausgewählt. Es zeigt deutlich ausgeprägte Differenzbanden von Schalter und Peptidkette und weist den größten rmsd-Unterschied auf [Ren00b]. Die Absorptionseigenschaften des bcAMPB im UV-VIS-Spektralbereich sind gegenüber dem reinen Azobenzol verändert. Aufgrund des elektronischen Kontakts zwischen elektronenschiebenden (C=O)-Gruppen und elektronegativen Gruppen verschiebt sich das π -Elektronensystem des Azobenzols. Gegenüber dem Absorptionsmaximum des Azobenzols ist es für APB von ca. 320 nm nach 450 nm verschoben. Der Methylspacer in AMPB entkoppelt die Gruppen elektronisch wieder, so dass das Absorptionsmaximum nahezu vollständig zurückschiebt auf etwa 345 nm. Durch Anhängen einer linearen, zyklischen oder bicyklischen Peptidkette bleibt die Position unverändert. Würde ein weiterer Methylspacer an der Carboxygruppe in das System eingebracht, so wäre zu erwarten, dass das Absorptionsmaximum wieder bei 320 nm liegen würde.

Das Modellpeptid bcAMPB (MW 1003, rb127/2 #1) wurde in DMSO d_6 gelöst. UV-VIS-Spektren (Schichtdicke $50\text{ }\mu\text{m}$) wurden mit einem Standard-Spektrometer (Lambda 19, Perkin-Elmer) aufgenommen. Die Probenbelichtung erfolgte über zwei Quellen: Hg-Xe-Dampflampe (6140, Oriel) mit Filtern UG1 und WG320, Schott für *trans* \Rightarrow *cis* und mit einer Halogenglühlampe (KL 1500, Schott) mit Filter GG400, Schott für *cis* \Rightarrow *trans*. Unter Einhaltung identischer Belichtungsbedingungen wurden IR-Spektren mit einem FTIR-Spektrometer (IFS66, Bruker) aufgezeichnet. Die Absorptionsspektren von *trans*- und *cis*-bcAMPB sind in Fig. 4.14, 4.15 dargestellt.

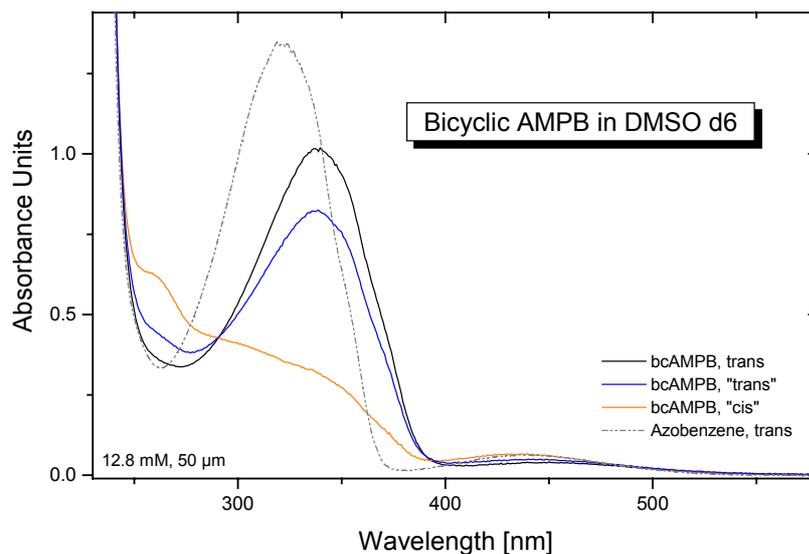


Fig. 4.14: UV-VIS Absorptionsspektren von bcAMPB in DMSO d6 bei einer Schichtdicke von 50 μm und einer Konzentration von 12.8 mM. Das Absorptionsmaximum der $\pi\pi^*$ -Bande (schwarz) ist gegenüber Azobenzol (grau strichpunktiert) um 17 nm rotverschoben. Nach Lösen liegt die Probe vollständig im trans-Konformer vor, die Absorption ist daher höher als die des photostationären Gleichgewichtszustandes „trans“ (blau), bei dem der Anteil der Moleküle im trans-Konformer bei etwa 82% liegt. Das photostationäre Gleichgewicht „cis“ ist orange dargestellt, es enthält etwa 10% trans-Anteile. Nachfolgend werden die Begriffe trans und cis für das photostationäre Gleichgewicht des Molekülensembles verwendet.

Die Abbildung 4.15 zeigt die unter identischen Belichtungsbedingungen ermittelten IR-Spektren von bcAMPB. Die größten Signaländerungen im Differenzspektrum ergeben sich an den Positionen großer Absorption der Amid I und II Region. Auffällig ist, daß obwohl sich zwischen den beiden Konformationen für praktisch alle Carbonyle die Umgebungsbedingungen geändert haben (vgl. NMR-Struktur, Fig. 4.9), das maximale Differenzsignal nur etwa 0.005 (bei einer Amid I Maximalabsorption von 0.15) ausmacht. Ein solch geringes Verhältnis wurde für alle untersuchten Azo-Peptid-Verbindungen ermittelt.

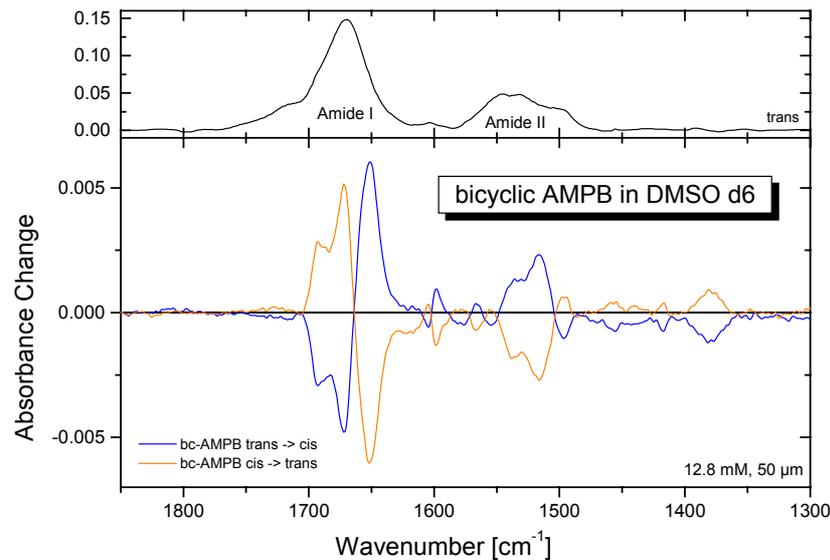


Fig. 4.15: IR- Absorptions- und lichtinduzierte Differenzspektren von bcAMPB in DMSO d6. Proben- und Belichtungsparameter entsprechen denen aus Fig. 4.14. Größte Signaländerungen finden sich in spektralen Bereichen hoher Absorption, Amid I und II.

Die Amplitude des Differenzsignals ist deutlich kleiner als bei einer durch NMR-Untersuchungen bekannten Änderung nahezu aller Carbonylumgebungen im Peptid zu erwarten wäre. Für dieses Verhalten ergeben sich verschiedene mögliche Erklärungsansätze:

- a) Die einzelnen Carbonyle erfahren jeweils nur eine kleine Änderung ihrer Umgebungsbedingungen
- b) Änderungen unterschiedlicher Carbonyle kompensieren einander
- c) Die Amidbande ist nicht die Summe der Einzelszillatoren, sondern wird vielmehr bestimmt durch die Kopplung der Oszillatoren. Ausgehend von 2D-IR Untersuchungen wird dieser Aspekt diskutiert z.B. in [Zan01].

4.6 Signalhöhenabschätzung in zeitaufgelösten Untersuchungen

Eine wichtige Größe ist die bei einem Laserimpuls angeregte Anzahl von Molekülen relativ zur Gesamtzahl der im Anregungsvolumen vorhandenen. Eine Abschätzung liefert folgendes Resultat: Die Anregung der Photoreaktion erfolgte mit Lichtimpulsen, die bei 355 nm eine Energie von 35 μJ hatten. Auf das abgefragte Volumen entfallen darauf 9% (Bündeldurchmesser UV: 700 μm bzw. IR: 210 μm). Dies entspricht einer Photo-

nenzahl im Zielvolumen von $5.6 \cdot 10^{12}$. Davon werden bei einer Absorption des photostationären *trans*-Ensembles von $A = 0.65$ bei dieser Wellenlänge $1 - 10^{-A} = 77\%$ der Photonen absorbiert, also $4.3 \cdot 10^{12}$. Im angeregten Volumen mit $50 \mu\text{m}$ Schichtdicke und $210 \mu\text{m}$ Durchmesser – dies entspricht einem Volumen von 1.7 nl – sind bei einer Konzentration von 12.8 mM etwa $1.3 \cdot 10^{13}$ Farbstoffmoleküle vorhanden. Daraus folgt, dass pro Laserschuss etwa 33% der Moleküle im Anregungsvolumen ein Photon absorbieren.

4.7 Meßprozedur

Die Probenküvette wurde im ns-Meßaufbau (vgl. Fig. 2.5) plaziert. Die Anregung der Photoreaktion in bcAMPB erfolgte mit einer Repetitionsrate von 2 Hz durch einen frequenzverdreifachten Nd:YAG-Laserpuls bei 355 nm . Die Probe wurde relativ zum Anreg- und Abtastbündel in der Fokusebene rotiert und lateral verschoben, so daß die Foki eine Spirale auf der Küvettenoberfläche beschrieben. Die Belichtungsparameter wurden so gewählt, daß die Photoreaktion immer von einem Ensemble im photostationären *trans*-Gleichgewicht aus ablaufen konnte. Bei einer Zeitauflösung von 10 ns stand ein Meßfenster bis ca. $10\text{-}50 \text{ ms}$ offen. An jeder gewählten Spektralposition wurden Messungen an bcAMPB und der Referenzprobe Azobenzol durchgeführt. Durch den Vergleich der Signalkurven lassen sich Störungen, die durch Dichteschwankungen oder zeitabhängige Temperaturgradienten im Probenfilm verursacht werden, effektiv und sicher nachträglich eliminieren.

Das zugängliche Meßfenster wurde in zwei sequentiellen Untersuchungen vollständig abgebildet. Die Darstellung der Kurven erfolgt in einem Lin-Log-Plot, bei dem die Zeitachse zu frühen Zeiten linear, zu späteren Zeiten oberhalb $1 \mu\text{s}$ logarithmisch ist. Die Daten sind ab $1 \mu\text{s}$ nach dem Anregzeitpunkt logarithmisch komprimiert.

4.8 Ergebnisse

Das Ergebnis einer Messung bei 1678 cm^{-1} ist in Fig. 4.16 dargestellt. Die spektrale Position von 1678 cm^{-1} liegt im Bereich der Amid I Bande. Es wird erwartet, dort die Dynamik des Peptidgerüsts im Modellsystem beobachten zu können. Die ermittelten Daten konnten durch eine erf(t)-Funktion gut angepasst werden. Im Bereich des

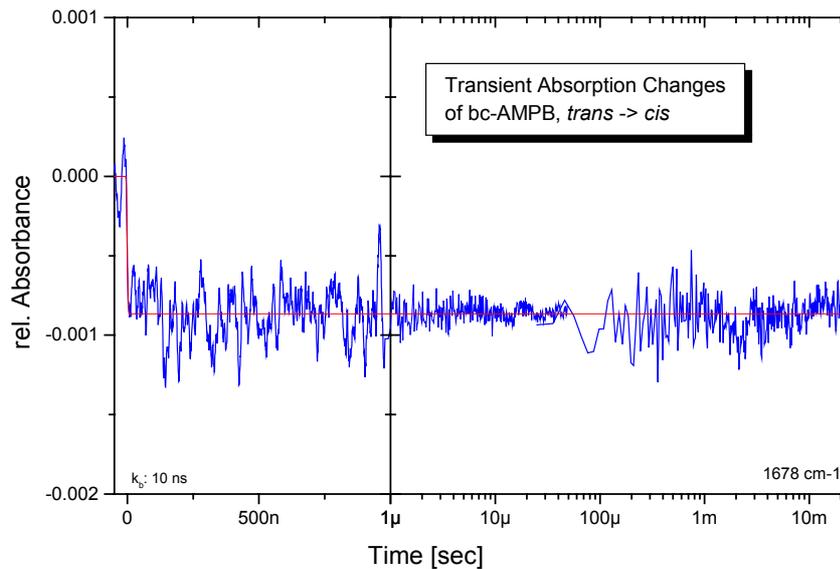


Fig. 4.16: *Transiente Absorptionsänderungen in bcAMPB bei der $trans \Rightarrow cis$ Photoreaktion bei 1678 cm^{-1} . Im ersten Bereich wurden 10.000 Datenpunkte gemittelt, im zweiten 3.000. Bei einer Anregungsrate von 2 Hz betrug die Anregungsenergie $35\text{ }\mu\text{J}$.*

zugänglichen Meßfensters konnten außer der instantanen Antwort keine signifikanten Amplituden, die auf eine Peptiddynamik hindeuten, extrahiert werden. Auch bei Messungen an einer weiteren Position innerhalb der Amid I Region zeigt sich dasselbe Bild, vgl. Fig. 4.17. Auch im positiven Bereich der $trans \Rightarrow cis$ Differenzbande um 1650 cm^{-1} läßt sich im zugänglichen Meßfenster außer der instantanen Antwort keine weitere Dynamik des Peptidrückgrats auflösen. Die Messungen wurden an über einem Dutzend weiteren Spektralpositionen wiederholt. Die Positionen wurden so ausgewählt, dass Banden des Azobenzol-Schalters ebenso betrachtet wurden wie das Peptidrückgrat. An allen betrachteten Positionen ergab sich dasselbe Bild: im zugänglichen Meßfenster konnte keine zusätzliche, langsame, abgesehen von der im Rahmen der Zeitauflösung des Meßaufbaus instantanen Dynamik aufgelöst

werden, wohl aber variierten Amplitude und Vorzeichen der stufenartigen transienten Absorptionskurven.

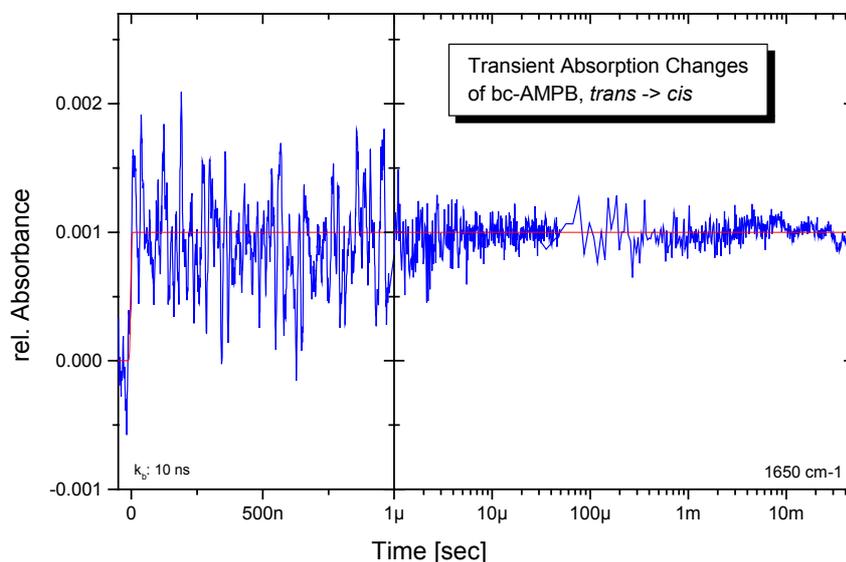


Fig. 4.17: *Transiente Absorptionsänderungen in bcAMPB bei der trans \Rightarrow cis Photoreaktion bei 1650 cm^{-1} , Auftragung analog Fig. 4.16. Die spektrale Position entspricht dem positiven Maximum der Amid I Differenzbande.*

Die ermittelten Amplituden wurden anschließend mit dem cw-Differenzspektrum verglichen. Dazu wurden die Amplituden in denselben Graphen gezeichnet und ihre Amplitude mit einem gemeinsamen Faktor multipliziert. Bei Wahl des Faktors zu 6.6 ergab sich eine gute Übereinstimmung der Amplituden der transienten Spektren mit der jeweiligen Signalthöhe im Differenzspektrum, Fig. 4.18.

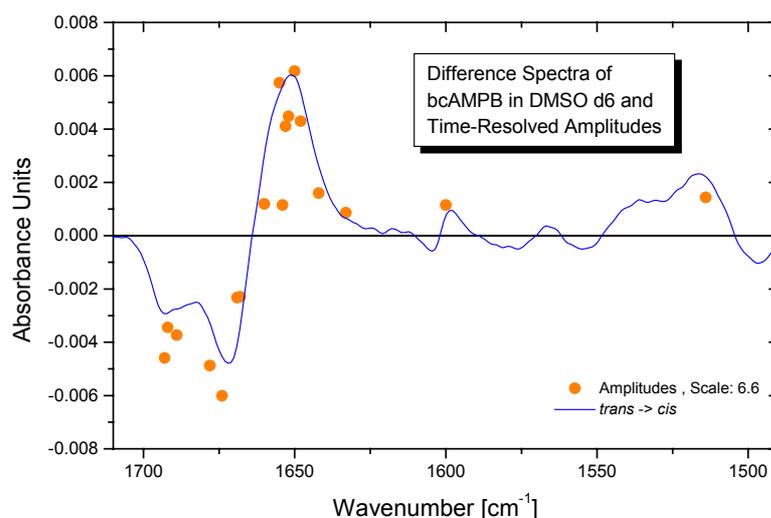


Fig. 4.18: Vergleich des *trans* \Rightarrow *cis* cw-Differenzspektrums des Modellsystems bcAMPB mit skalierten Signalamplituden aus zeitaufgelösten Messungen. In Vorzeichen und Amplitude stimmen die Werte an den jeweiligen Spektralpositionen gut überein. Der Skalierungsfaktor betrug 6.6. Die Auswertung wurde durch Vergleich mit zwei verwandten Methoden überprüft: über die Analyse der Signalamplitude innerhalb [-20 ns; 20 ns] und anhand der theoretischen Differenzfaktoren aus individuellen UV-VIS-Spektren der Proben (nicht gezeigt).

4.9 Diskussion der Ergebnisse

Durch die dargestellten Ergebnisse konnte für das bazyklische Azopeptid im Rahmen der Zeitauflösung des Messaufbaus eine instantane Dynamik nachgewiesen werden. Zu späteren Zeiten findet sich keine zusätzliche Peptiddynamik mit ausreichender Signalamplitude. Die ermittelten Signalamplituden passen gut zu den cw-Differenzspektren, die mit einer vollkommen anderen Methode (FTIR-Spektroskopie) ermittelt wurden. Bei Skalierung der Signalamplituden mit einem gemeinsamen Faktor lassen sich die Werte gut zur Deckung bringen. Der Skalierungsfaktor hat einen Wert von 6.6. Damit kann der Wert für die Quantenausbeute der *trans* \Rightarrow *cis* Photoreaktion nach $\pi\pi^*$ -Anregung von bcAMPB zu 21% bestimmt werden.

Für die Aufklärung der Konformationsdynamik des Modellpeptids sind die hier vorgestellten, zeitaufgelösten Untersuchungen von großer Bedeutung: Sie erlauben es erstmals, eine obere Schranke anzugeben, bis zu der die Umordnungsprozesse in der Peptidkette vervollständigt sind.

Parallel zu den hier vorgestellten Messungen wurden an einem weiteren Meßplatz am Lehrstuhl Untersuchungen im sichtbaren Spektralbereich mittels eines Pump-Probe

Femtosekunden-Aufbaus an bcAMPB durchgeführt [Spö01]. Bei VIS-Abtastung dient der Azobenzol-Schalter als indirekte Sonde für die Konformationsdynamik des Modellpeptids. Zur vollständigen Beschreibung der Transienten sind drei Zeitkonstanten im fs/ps-Bereich notwendig. Desweiteren war ein konstanter Anteil (Zerfallszeit unendlich) erforderlich, die zu langen Verzögerungszeiten verbleibende Absorptionsänderung durch Produktbildung zu modellieren.

In einer weiteren, jüngeren Arbeit [Bre03] wurden die ultraschnellen Prozesse bei der *cis* \Rightarrow *trans* Isomerisierung mit MIR-Abtastung zur direkten Untersuchung des Peptid-Rückgrats durchgeführt. Hierbei läuft der Übergang von einem breiten Ensemble hinein in eines mit nur einer schmalen Verteilung im Konformationsraum. Dabei ist der größte Teil des Konformationsüberganges des Peptid-Rückgrats innerhalb von 20 ps abgeschlossen, während nachfolgende Äquilibrierungen bis über 16 ns andauern. Zusammen mit den Ergebnissen aus den NMR-Strukturuntersuchungen – vgl. Fig. 4.9 – ergibt sich für den *cis*-Zustand des Systems eine Potentialfläche mit vielen nahe benachbarten Energieminima. Die *cis* \Rightarrow *trans* Isomerisierung überführt das System in einen Zustand mit einem deutlicher ausgeprägten Energieminimum, welches schließlich im oben genannten Zeitfenster erreicht wird.

Für die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Isomerisierungsrichtung *trans* \Rightarrow *cis* zeigt dies, daß die Konformationsänderungen von einer schmalen Verteilung im Konformationsraum zu einem breit gestreuten Ensemble ablaufen. Aus dem Verlauf der entsprechenden Potentialfläche werden daher keine späten Umordnungsprozesse nach Abschluß der Schalterkinetik erwartet. Somit stimmen die Ergebnisse der Arbeit mit denen aus der Literatur gut überein.

Für zukünftige Messungen am vorgestellten Meßplatz wäre die Untersuchung der *cis* \Rightarrow *trans* Isomerisierung mit ns-Zeitauflösung bis in den ms-Bereich zur detaillierten Charakterisierung der Zustandsverteilungen wünschenswert.

5 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Dauerstrich-Experimente im mittelinfraroten Spektralbereich bei Variation der Proben temperatur an Collagen-Modellsystemen durchgeführt. Durch die Untersuchung temperaturinduzierter Konformationsdynamik in Collagen-Modellsystemen konnten subtile Variationen in den Molekülwechselwirkungen nachgewiesen werden. Stabilität und Kooperativität unterschiedlicher Trimere konnten mit großer Genauigkeit und in Übereinstimmung mit theoretischen Vorüberlegungen bestimmt werden. Kettenlänge, Sequenzmotiv und Schmelzpunkt korrelieren. Die Meßmethode ist unempfindlich gegenüber einer potentiellen Verunreinigung der Proben durch Mono- und Dimere in Lösung. Über die Bandenanalyse im Bereich von Amid I konnten einzelne Carbonylgruppen in den Modellpeptiden getrennt voneinander aufgelöst und einzeln beobachtet werden. Es gelang die Trennung der Entfaltung differenzierter lokaler Bereiche wie der labilen Collagenase-Schnittstelle und dem rigiden Homotrimer-Segment. Zur Anpassung der Meßdaten wurde eine neue, einfache und mathematisch leicht zu handhabende Modellfunktion vorgeschlagen. Für die vorliegenden Meßdaten gelingt die Datenanpassung sehr gut. Deren Ergebnisse liefern starke Hinweise auf die Existenz des Zwei-Zustände-Modells („folded \leftrightarrow unfolded“) der Collagen-Konformationsdynamik.

Der zweite Teil dieser Arbeit befaßte sich mit Dauerstrich- sowie zeitaufgelösten Untersuchungen im mittelinfraroten Spektralbereich bei konstanter Temperatur an Azo-Peptid-Verbindungen. Die reversible, optisch induzierte Faltungsdynamik in zyklischen Azo-Peptid-Verbindungen konnte direkt mit optischer Spektroskopie nachgewiesen werden. Es gelingt ein direkter Blick auf das Peptidrückgrat. Die Quantenausbeute der *trans* \Rightarrow *cis* Photoreaktion von bcAMPB nach $\pi\pi^*$ -Anregung wurde bestimmt. Die Peptiddynamik kann innerhalb eines großen Zeitfensters von einigen Nanosekunden bis weit in den Millisekundenzeitbereich hinein abgebildet werden. Die Ergebnisse der zeitaufgelösten Untersuchungen konnten gut mit den entsprechenden Teilen von Dauerstrich-Untersuchungen in Einklang gebracht werden. Der Nachweis gelang, daß wichtige Teile der Konformationsdynamik auch im Peptid in weniger als 10 Nanosekunden abgeschlossen sind. Damit sollte die bisher herrschende Meinung [Gal01], nach der die Bewegung einer Aminosäure beim Faltungsvorgang schnellstens im 10 ns-Bereich ablaufen kann, erweitert werden.

6 Literatur

- [Atk96] Atkins: Physikalische Chemie, VCH Weinheim, 1996
- [Bäc80] H P Bächinger, P Bruckner, R Timpl, D J Prockop & J Engel. Eur. J. Biochem., 106, 619-625, 1980
- [Bäc87] H P Bächinger. J. Biol. Chem., 262, 17144-17148, 1987
- [Bai02] E Baigar, Dissertation LMU München, 2002
- [Beh00] R Behrendt: Photoschaltung von Konformation und Bioaktivität cyclischer Modellpeptide. Dissertation TU München, 2000
- [Bel95] J Bella, B Brodsky & H M Berman: Hydration Structure of a Collagen Peptide. Structure, 3, 893-906, 1995
- [Bre03] J Bredenbeck, J Helbing, A Sieg, T Schrader, W Zinth, C Renner, R Behrendt, L Moroder, J Wachtveitl, P Hamm: Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide. PNAS, 2003 in press
- [Bru78] P Bruckner, H P Bächinger, R Timpl & J Engel: Three conformationally distinct Domains in the amino-terminal Segment of Type III Procollagen and its rapid Triple Helix – Coil Transition. Eur. J. Biochem., 90, 595-603, 1978
- [Dav93] J M Davis & H P Bächinger: Hysteresis in the triple helix-coil transition of type III collagen. J. Biol. Chem., 268, 25965-25972, 1993
- [Dem93] W Demtröder: Laserspektroskopie, Springer, 1993
- [Döl90] R Dölz & J Engel. Ann. NY Acad. Sci., 580, 421-427, 1990
- [Dou48] T B Douglas: Vapor Pressure of Methyl Sulfoxide from 20 to 50 deg. Calculation of the Heat of Vaporization. J. Am. Chem. Soc., 70, 2001, 1948
- [Eng91] J Engel & D J Prockop: The Zipper-like Folding of Collagen Triple Helices and the Effects of Mutations that disrupt the Zipper. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 20, 137-152, 1991
- [Eng00] J Engel & H P Bächinger: Cooperative equilibrium transitions coupled with a slow annealing step explain the sharpness and hysteresis of collagen folding. Matrix Biology, 19, 235-244, 2000
- [Fau86] P M Fauchet, D Hulin, G Hamoniaux, A Orszag, J Kolodzey & S Wagner: Femtosecond Spectroscopy of Hot Carriers in Germanium. In: Ultrafast Phenomena V 248-250, Springer Verlag, Heidelberg 1986
- [Fie91] G B Fields. J. Theor. Biol., 153, 585-602, 1991
- [Fie95] G B Fields: The Collagen Triple-Helix: Correlation of Conformation with biological Activities. Connective Tissue Research, 31, 235-243, 1995
- [Fio00] S Fiori, J Ottl, B Fonrobert, J Wachtveitl & L Moroder: Conformational Analysis of Synthetic Heterotrimeric Collagenase Substrates. Peptides 2000, J Martinez & J-A Fehrentz (Eds.) EDK, Paris, France 2001
- [Fio01] S Fiori, J Ottl, B Fonrobert, J Wachtveitl & L Moroder: Biophysical Characterization of Synthetic Heterotrimeric Collagen Peptides as Functional Epitopes of Collagen Type I. Nova Acta Leopoldina Supplementum, 16, 43-45, 2001
- [Fio02] S Fiori, B Sacca & L Moroder: Structural properties of a collagenous heterotrimer that mimics the collagenase cleavage site of collagen type I. J Mol Biol, 319, 1235-42, 2002

- [Fis84] G Fischer, H Bang & C Mech. *Biomed. Biochim. Acta.*, 43, 1101-1107, 1984
- [Fon98] B Fonrobert, Diplomarbeit, LMU München, 1998
- [Gal01] O V Galitzkaya, D N Ivankov & A V Finkelstein: Folding nuclei in proteins. *FEBS letters*, 489, 113-118, 2001
- [Geo91] A George & A Veis: FTIRS in H₂O Demonstrates that Collagen Monomers undergo a conformational Transition prior to thermal self-assembly in vitro. *Biochemistry* 30, 2372-2377, 1991
- [Goo96] M Goodman, Y Feng, G Melacini & J P Taulane: A Template-induced incipient collagen-like triple-helical structure. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 5156-5157, 1996
- [Goo98] M Goodman, M Bhumralkar, E A Jefferson, J Kwak & E Locardi: Collagen Mimetics. *Biopolymers*, 47, 127-142, 1998
- [Gre79] Y Greiche & E Heidemann. *Biopolymers*, 18, 2359-2361, 1979
- [Ino76] K Inouye, S Sakakibara & J D Prockop. *Biochim. Biophys. Acta.*, 420, 133-141, 1976
- [Ino82] K Inouye, Y Kobayashi, Y Kyogoku, Y Kishida, S Sakakibara & J D Prockop. *Arch. Biochim. Biophys.* 219, 198-203, 1982
- [Ish01] T Ishikawa, T Noro & Tshoda: Theoretical Study on the Photoisomerization of Azobenzene. *J Chem. Phys.* 115, 7503-7512, 2001
- [Jen02] C L Jenkins & R T Raines: Insights of the conformationally stability of collagen. *Nat. Prod. Rep.* 19, 49-59, 2002
- [Jon93] C M Jones, E R Henry, Y Hu, C K Chan, S D Luck, A Bhuyan, H Roder, J Hofrichter & W A Eaton: Fast events in protein folding initiated by nanosecond laser photolysis. *PNAS* 90, 11860-11864, 1993
- [Kah54] A H Kahn: Theory of the Infrared Absorption of Carriers in Germanium and Silicon. *The Physical Review* ,97, 1647-1652, 1954
- [Kad94] K Kadler: Extracellular Matrix 1: Fibril-forming collagens. *Protein profile*, 5, 519-582, 1994
- [Kne91] F K Kneubühl & M W Sigrist: *Laser*, Teubner 1991
- [Kob70] Y Kobayashi, R Sakai, K Kakiuchi & T Isemura, *Biopolymers*, 9, 415-425, 1970
- [Kri86] S Krimm & J Bandekar: Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides and Proteins. *Adv. in Protein Chemistry*, 38, 181-363, 1986
- [Laz85] Y A Lazarev, B A Grishkovsky & T B Khromova: Amide I Band of IR Spectrum and Structure of Collagen and Related Polypeptides. *Biopolymers*, 24, 1449-1478, 1985
- [Laz92] Y A Lazarev, B A Grishkovsky, T B Khromova, A V Lazareva & V S Grechishko: Bound Water in the Collagen-Like Triple-Helical Structure. *Biopolymers* 32, 189-195, 1992
- [Lev68] C Levinthal: Are there pathways for protein folding?, *J. Chim Phys.*, 65, 44-45, 1968
- [Li93] M Li, P Fan, B Brodsky & J Baum. *Biochemistry*, 32, 7377-7387, 1993

- [Lin66] JJ Lindberg & V Stenholm: Viscosities, Densities, and Related Properties of Binary Mixtures Containing Dimethyl Sulphoxide and Mono-Subst. Benzenes or Guaiacol. *Suom. Kemistiseuran Tied.*, 75, 22, 1966
- [Lin82] D von der Linde & N Fabricius: Spectroscopy of Picosecond Relaxation Processes in Semiconductors. In: *Picosecond Phenomena III*, 336-340, Springer Verlag Heidelberg 1982
- [Lot98] F Lotspeich & H Sorbas: *Bioanalytik*. Spektrum, Berlin-Heidelberg, 1998
- [Lut97] I Lutz, Diplomarbeit, LMU München, 1997
- [Lut02] I Lutz, Dissertation, LMU München, 2002
- [Mak93] A A Makarov, I A Adzhubei, I I Protasevich, V M Lobachov & N G Esipova: Scanning Microcalometry and Circular Dichroism Study of Melting of the natural Polypeptides in the left-handed helical Conformation. *J Prot Chemistry*, 12, 85-91, 1993
- [May96] K H Mayo: NMR and X-Ray Studies of Collagen Model Peptides. *Biopolymers*, 40, 359-370, 1996
- [Mel00] G Melacini, A M Bonvin, M Goodman, R Boelens & R Kaptein: Hydration Dynamics of the Collagen Triple Helix by NMR. *J. Mol. Biol.*, 300, 1041-1048, 2000
- [Mil99] C A Miles & A J Bailey: Thermal denaturation of collagen revisited. *Proc. Indian Acad. Sci. Chem. Sci.*, 111, 71-80, 1999
- [Mon82] S Monti, G Orlande & P Palmieri: Features of the photochemically active state of azobenzene. *Chem. Phys.*, 71, 87-99, 1982
- [Mor00] L Moroder, persönliche Mitteilung, 2000
- [Mül00] J C D Müller, J Ottl & L Moroder: Heterotrimeric collagen peptides as fluorogenic collagenase substrates: Synthesis, conformational properties, and enzymatic digestion. *Biochemistry* 39, 5111-5116, 2000
- [Mus00] D Mustacich & G Powis: Thiredoxin Reduktase. *Biochem. J.*, 346, 1-8, 2000
- [Näg97] T Nägele, R Hoche, W Zinth & J Wachtveitl: Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene. *Chem. Phys. Lett.*, 252, 489-495, 1997
- [Nem85] G Némethy & H A Scheraga: Stabilization of Collagen Fibrils by Hydroxyproline. *Biochemistry*, 25, 3184-3188, 1985
- [Ols71] B R Olsen, R A Berg, S Sakabibara, Y Kishida & J D Prockop. *J. Mol. Biol.* 57, 589-595, 1971
- [Ott96] J Ottl, R Battistuta, M Pieper, H Tschesche, W Bode, W Kühn & L Moroder: Design and Synthesis of heterotrimeric collagen peptides with a built-in cystine-knot. Models for collagen catabolism by matrix-metalloproteases. *FEBS Letters*, 398, 31-36, 1996
- [Ott99a] J Ottl & L Moroder: Disulfide-Bridged Heterotrimeric Collagen Peptides containing the Collagenase Cleavage Site of Collagen Type I. Synthesis and Conformational Properties. *J. Am. Chem. Soc.*, 121,653-661, 1999
- [Ott99b] J Ottl & L Moroder: A New Strategy for Regioselective Interstrand Disulfide Bridging of Multiple Cystein Peptides. *Tetrahedron Letters*, 40, 1487-1490, 1999
- [Pas96] T Pascher, J P Chesick, J R Winkler & H B Gray: Protein folding triggered by electron transfer. *Science*, 271, 1558-1560, 1996

- [Pay88] K J Payne & A Veis: FTIR Spectroscopy of Collagen and Gelatin Solutions: Deconvolution of the Amide I Band for Conformational Studies. *Biopolymers* 27, 1749-1760, 1988
- [Pri79] P L Privalov: Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Protein Chem.*, 33, 1979, 167-241
- [Ram73] G N Ramachandran, M Bansal & R S Bhatnagar. *Biochim. Biophys. Acta*, 322, 166-171, 1973
- [Rau73] H Rau: Spektroskopische Eigenschaften organischer Azoverbindungen. *Angew. Chem.*, 6, 248-258, 1973
- [Rau90] H Rau: Azo Compounds. In: H Dürr & H Bouas-Laurent, Eds: *Studies in Organic Chemistry: Photochromism, Molecules and Systems.*, 40, 165-192, Elsevier, Amsterdam, 1990
- [Ren00a] C Renner, R Behrendt, S Spörlein, J Wachtveitl & L Moroder: Photomodulation of Conformational States. I. Mono- and Bicyclic Peptides with (4-Amino)-phenylazobenzoic Acid as Backbone Constituent. *Biopolymers*, 54, 489-500, 2000
- [Ren00b] C Renner, J Cramer, R Behrendt & L Moroder: Photomodulation of Conformational States. II. Mono- and Bicyclic Peptides with (4-Aminomethyl)-phenylazobenzoic Acid as Backbone Constituent. *Biopolymers*, 54, 501-514, 2000
- [Ric61] A Rich & F H C Crick. *J. Mol. Biol.*, 3, 483-506, 1961
- [Rot79] W Roth, K Heppenheimer & E Heidemann. *Makromol. Chem.*, 180, 905-917, 1979
- [Rot80] W Roth & E Heidemann. *Biopolymers*, 19, 1909-1917, 1980
- [Sak72] S Sakakibara, Y Kishida, K Okuyama, N Tanaka, T Ashida & M Kakudo. *J. Mol. Biol.*, 65, 371-373, 1972
- [Sar84] S K Sarkar, P E Young C E Sullivan & D A Torchia: Detection of *cis* and *trans* X.-Pro peptide bonds in proteins by ¹³C NMR: Application to collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 4800-4803, 1984
- [Sch90] G E Schulz & R H Schirmer: *Principles of Protein Structure*. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo. 9. überarb. Ausg., 1990
- [Seg69] D M Segal, W Traub & A Yonath, *J. Mol. Biol.* 43, 479-485, 1969
- [Spö01] S Spörlein, Dissertation, LMU München, 2001
- [Str90] L Stryer: *Biochemie*. Spektrum Verlag Heidelberg, völlig neu bearbeitete Ausg., 1990
- [Sut74] K Sutoh & H Noda. *Biopolymers*, 13, 2385-2390, 1974
- [Tan84] D B Tanner & R P McCall: Source of a Problem with Fourier Transform Spectroscopy. *Applied Optics* Vol 23, No 14, 2363-2368, 1984
- [Tha86] S Thakur, D Valodas, H Germann & E Heidemann. *Biopolymers*, 25, 1081-1086, 1986
- [Tho97] P A Thomson, W A Eaton & J Hofrichter: Laser temperature jump study of the helix-coil kinetics of an alanine peptide interpreted with a 'kinetic zipper' model. *Biochemistry*, 36, 9200-9210, 1997
- [Tra66] W Traub & A Yonath, *J. Mol. Biol.*, 16, 404-411, 1966
- [Tra75] W Traub, *Isr. J. Chem.* 12, 435-439, 1975

- [Tra77] M Trattenberg, I Hilmo & K Hagen: A Gas Electron Diffraction Study of the Molecular Structure of Trans-Azobenzene. *J. Mol. Struct.*, 39, 231-236, 1977
- [Vit01] L Vitagliano, R Berisio, L Mazzarella & A Zagari: Structural Bases of Collagen Stabilisation induced by Proline Hydroxylation. *Biopolymers*, 58, 459-464, 2001
- [Wac98] J Wachtveitl, T Nägele, A J Wurzer, M Schenk & L Moroder: Ultrafast Photomodulation of Conformation in Azobenzene Containing Cyclic Peptides. In: T Elsässer, J G Fujimoto, D A Wiersma & W Zinth (Eds.): *Ultrafast Phenomena XI*, 609-611, Springer, 1998
- [Zan01] M Zanni, S Gnanakaran, J Stenger & R Hochstrasser: Heterodyned Two-Dimensional Infrared Spectroscopy of Solvent-Dependent Conformations of Acetylproline-NH₂. *J. Phys. Chem. B*, 105, 6520-6535, 2001

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich herzlich allen danken, ohne die die vorliegende Arbeit nicht hätte entstehen können. Nur im Team gelingen solche Projekte. Der Dank im speziellen geht an:

Prof. W. Zinth für die gebotenen idealen Arbeitsbedingungen sowie die kontinuierliche Unterstützung und viele hilfreiche Ratschläge und Diskussionen während der gesamten Zeit.

Prof. J. Wachtveitl für die stete Förderung der Arbeit in seiner Gruppe. Trotz aller technischen Widrigkeiten hat er für ein stets konstruktives und persönliches Umfeld Sorge getragen.

Prof. L. Moroder und Stella Fiori für die Herstellung verschiedener Proben sowie die anregenden Diskussionen zu den Collagen-Modellsystemen.

Ingo Lutz, Sebastian Spörlein, Erik Baigar, Peter Gilch, Thomas Nägele und Atzo Kalewski für unzählige nützliche Tips, Anregungen und Hilfestellungen sowie Bereicherungen auf der sportlich-humanistischen Ebene.

Allen BiMO-Mitarbeitern für die gute Teamarbeit und das hervorragende Arbeitsklima.

Sowie schließlich: Meiner Familie für die Basis, meinen Freunden für den Halt und meinem Umfeld für die Perspektive. Und Daniela für die Liebe.

Und damit ist die erwähnte Schwierigkeit beseitigt.

Lebenslauf

Name: Benno Fonrobot

Geburtsdatum: 26. März 1971

Geburtsort: Essen

Familienstand: ledig

Ausbildung

1977 – 1981 Grundschule Essen-Werden

1981 – 1990 Gymnasium Essen-Werden

1990 Abitur

1990 – 1991 Wehrdienst

1991 – 1994 Studium der Physik an der Ruhr-Universität Bochum

1993 Vordiplom

1994 – 1995 Studium der Physik an der University of Sussex at Brighton, UK

1995 Master of Science

1995 – 1998 Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München



1997 – 1998 Diplomarbeit am Institut für Medizinische Optik an der Ludwig-Maximilians-Universität München



1998 Diplom

seit 1998 Promotion am Lehrstuhl für BioMolekulare Optik an der Ludwig-Maximilians-Universität München



Anhang: Spektren der Modelltrimere E - H



Absorptions- und differenztemperaturinduzierte Differenzspektren und Schmelzkurven des Trimer E









Absorptions- und differenztemperaturinduzierte Differenzspektren und Schmelzkurven des Trimer F





Absorptions- und differenztemperaturinduzierte Differenzspektren und Schmelzkurven des Trimer G





Absorptions- und differenztemperaturinduzierte Differenzspektren und Schmelzkurven des Trimer H

