

Kapitel 3

Abstands- und Orientierungsbestimmung

3.1 De novo Peptide

Das Ziel der Forschung an *de novo* Peptiden ist den Zusammenhang zwischen Sequenz, Struktur und Funktion von Proteinen zu klären.

Im Jahr 2001 wurde das menschliche Genom [41, 42] sequenziert; es folgte einer Serie von Gensequenzierung, die bei den Eukaryonten im Jahr 1997 mit der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* [43] begann. Aus der Gensequenz die kodierten Proteine, ihre Geometrie und Funktion zu entnehmen, ist Gegenstand aktueller Forschung [44]. Selbst grundlegende Fragestellungen über den Zusammenhang von Aminosäuresequenz und Proteinstruktur sind noch nicht geklärt.

Ein Ansatz dabei ist die *de novo* Peptidsynthese, welche versucht Proteine von Grund auf neu herzustellen. Durch kombinatorische Synthese sowie gezielt ausgehend von Modellrechnungen wird versucht Proteine mit definierter Sekundär- und Tertiärstruktur zu produzieren. Damit kann selbst der Einfluß einzelner Aminosäuren auf die Struktur untersucht werden. Eine weitere bedeutende Anwendung der *de novo* Synthese liegt in der Modellierung von Proteinen. Es wird versucht katalytisch aktive Einheiten zu bilden, deren Eigenschaften durch Änderung der Aminosäuresequenz dem jeweiligen Bedarf angepasst werden können.

Die Bausteine der Peptidsynthese sind primär die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren, die seit Anfang des letzten Jahrhunderts zu Peptiden verknüpft werden können [45]. Durch die Einführung der Festphasen-Peptidsynthese

1962 durch B. Merrifield [46, 47] ist eine effiziente Synthese von Proteinen möglich. Es können beliebige Peptidsequenzen in hoher Ausbeute in einem automatisierten Prozeß erzeugt werden. Die Merrifieldmethode wird ab Kettenlängen von ca. 30 Aminosäuren ineffizient, zur Synthese größerer Proteine müssen einzeln synthetisierte Stränge verknüpft werden. Ein alternativer Ansatz zu Herstellung langkettiger Proteine ist die Exprimierung aus *E. coli*. Hier ist die Synthese in der Praxis auf die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren beschränkt, die Erweiterung auf nicht natürliche Aminosäuren erfordert eine Änderung des genetischen Codes [48], die Einführung manipulierter t-RNA [49, 50] oder den Einbau künstlicher Basen in die DNA [51, 52].

Ob chemisch oder in Zukunft auch vermehrt gentechnisch, der Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren kann chemische Eigenschaften des Enzyms wie Nucleophilie oder Azidität ändern. Es ist möglich neue Bindungsstellen zu schaffen, indem Elektronenakzeptoren oder Metallchelatoren eingebaut werden. Der Einbau von spektroskopisch selektiv detektierbaren Aminosäuren erlaubt physikalische Eigenschaften lokal abzufragen, z. B. durch isotonenmarkierte Aminosäuren, Spinlabel oder Fluoreszenzlabel.

Bedeutend für die Funktion eines Enzyms ist die korrekte Faltung des Proteins in Sekundär- und Tertiärstruktur. In der Natur geschieht dies zum Teil unterstützt durch Chaperone. Doch sind die physikalischen Kriterien, welche Strukturen stabilisiert werden und Mechanismen, nach denen Proteine zu ihrer Struktur finden, noch weitgehend unbekannt.

3.1.1 Spektroskopische Strukturbestimmung

Um die Struktur von Proteinen zu untersuchen, stehen diverse spektroskopische Methoden zur Verfügung. Dabei kann zwischen Methoden, mit denen das Gesamtprotein global untersucht wird, und Methoden, mit denen lokale Geometrien zugänglich sind, unterschieden werden.

Eine grundlegende Methode zur globalen Analyse der Proteinstruktur bildet der zirkulare Dichroismus (CD), mit dem die relativen Anteile von Sekundärstrukturelementen im Gesamtprotein bestimmt werden können. Weiterhin können strukturelle Änderungen über die Zeit sowie im Vergleich verschiedener Zustände detektiert werden. Die Methode ist zu unspezifisch, um Proteinsubstrukturen selektiv messen zu können. Weiterhin können in Proteinen Chromophore auftreten, die in ähnlichen Wellenlängenbereichen absorbieren und so die Effekte überlagern.

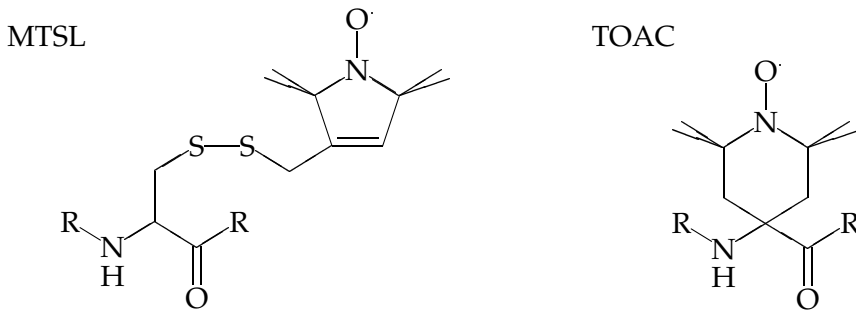


Abbildung 3.1: Spinlabel: MTSL wird über ein Cystein kovalent mit dem Protein verbunden; TOAC wird als Aminosäurederivat direkt in die Primärsequenz eingebaut.

Methoden der Kristallstrukturanalyse, wie Röntgenbeugung, liefern vollständige dreidimensionale Strukturen von Proteinen. Sie erfordern die Kristallisierbarkeit des Proteins, wobei die Proteinstruktur im Kristall nicht notwendigerweise mit der funktionalen Struktur in Lösung übereinstimmt.

Mit kernmagnetischer Resonanz (NMR) können nicht nur Anteile der auftretenden Sekundärstrukturen bestimmt, sondern weiterhin spezifischen Segmenten der Polypeptidkette zugeordnet werden. NMR-Experimente werden in Lösung durchgeführt, so daß die Proteine in natürlicher Konformation vorliegen. Nachteil der NMR-Spektroskopie ist der Bedarf an hohen Substanzmengen. Zwar wurden inzwischen NMR-Strukturen von Proteinen bis 900 kDa vorgestellt [53], doch ist die standardmäßige Anwendung noch auf Proteine bis 30 kDa beschränkt [54]. Im allgemeinen ist auch eine Isotopenmarkierung mit ^2H , ^{15}N und ^{13}C notwendig.

Lokale Geometrien können mit Methoden des resonanten Fluoreszenzenergie-Transfers (FRET) bestimmt werden. Hierbei wird der Energietransfer nach Förster [55] zwischen zwei Fluorophoren zu einer Abstandsbestimmung in der Größenordnung 2–8 nm genutzt. Fluoreszenzlabel werden an der Oberfläche bereits gefalteter Proteine angebracht. FRET wird daher häufig eingesetzt, um die Interaktion zweier Proteine nachzuweisen. Um strukturelle Änderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur zu beobachten, kommen die Fluoreszenzlabel nicht weit genug in das Innere eines Proteins. Mit ihren typischerweise drei annelierten Ringen sind sie häufig zu groß, um sie am ungefalteten Protein anzubringen und trotzdem eine korrekte Faltung des Proteins zu erzielen.

EPR

EPR hat sich in Verbindung mit ortsspezifischer Spinmarkierung zu einem wichtigen Werkzeug in der Bestimmung von Proteinstrukturen entwickelt [56, 57]. Die Art der Information über das Biomolekül wird durch die Wahl des Spinlabels beeinflusst. Bei den Spinlabels der MTSL-Familie (Abb. 3.1) wird der Nitroxidring über einen Linker kovalent mit einem Cystein verbunden. MTSL kann daher leicht an natürlichen Proteinen angebracht werden. Der Linker erzeugt eine flexible Struktur, die den konformellen Restriktionen des Proteins ausweichen kann. Aus dem EPR-Spektrum des einzelnen Spinlabels können die Lösemittelzugänglichkeit, die Mobilität der Seitenkette und die Polarität der direkten Umgebung bestimmt werden [6]. Die g -Tensorwerte und Hyperfeinkopplungen des Spinlabels werden durch die Polarität der Umgebung beeinflusst. So konnte durch sukzessives einfaches Spinmarkieren unterschiedlicher Positionen eines Membranproteins ein Protonenkanal lokalisiert werden [58]. Die Linienform des Spinlabels hängt von der Bewegung des Labels und seiner Umgebung ab, so daß mittels EPR bei verschiedenen Frequenzen auf die Dynamik des Proteins geschlossen werden kann [59]. MTSL wird auch zur Abstandsbestimmung bei zweifach markierten Proteinen benutzt [6]. Die Flexibilität der Struktur sowie der große Abstand des Nitroxids zum Proteinrückrat führen bei Strukturaussagen zur Sekundärstruktur jedoch zu großen Fehlerbereichen [60].

Das Spinlabel TOAC (Bild 3.1) ist eine nicht-natürliche Aminosäure und kann direkt in die Primärstruktur eines synthetischen Proteins eingebaut werden. Die Seitenkette des TOAC ist von ähnlicher Größe wie die natürlicher Aminosäuren und stört die Peptidstruktur nicht durch ihren sterischen Anspruch. Bei TOAC ist das C_{α} -Atom Teil des radikalischen Heterozyklus, es besteht daher eine starre Geometrie zwischen Nitroxid und Proteinrückrat, wobei nur die Konformation des Sechsrings als Freiheitsgrad bestehen bleibt. Durch diese rigide Verknüpfung eignet sich das TOAC Spinlabel gut für Strukturuntersuchungen. Es ist jedoch bekannt, daß C^{α} -tetrasubstituierte Aminosäuren durch ihren eingeschränkten Torsionswinkel die Helizität von Peptiden erhöhen, es wurden erhöhte Anteile von α - [61, 62] sowie 3_{10} -Helices [63] sowie eine Destabilisierung von β -Faltblättern [64] beobachtet.

In doppelt markierten Systemen können aus der Größe der Kopplung zwischen den Labels Rückschlüsse auf die Proteinstruktur gezogen werden. Es wurden unterschiedliche EPR-Methoden zur Abstandsbestimmung entwickelt. Mit cw EPR-Experimenten an flüssiger Lösung kann bei geringem Abstand

zwischen den Labeln die Austauschkopplung bestimmt werden. Langreichweitiger als die Austauschwechselwirkung ist die dipolare Kopplung. Diese mittelt sich bei schneller Molekülbewegung aus und wird daher an gefrorener Lösung aus der Linienaufspaltung bestimmt. Bei Abständen größer ca. 20 Å wird die Aufspaltung der Linien deutlich geringer als die Linienbreite, so daß keine Effekte mehr erkennbar sind. Abstände zwischen ca. 12–20 Å zwischen den Labeln führen zu einer Erhöhung der Linienbreite des Nitroxidspektrums. Diese dipolare Verbreiterung kann durch eine Entfaltung der Spektren gegen das Spektrum eines einzelnen Spinlabels bestimmt werden. Die Methode konnte eine Serie von doppelt spinmarkierten Peptiden mit unterschiedlichen Abständen zwischen den Spinlabeln einer α -helikalen Struktur zuordnen und wurde damit als "EPR-spectroscopic ruler" etabliert [65]. Die numerische Spektren-Entfaltung eignet sich nur zur Bestimmung von Abständen, die nicht zu Aufspaltungen der Linien, sondern nur zu einer isotropen Verbreiterung des Spektrums eines einzelnen Spinlabels führen.

Eine weitere Methode, mit der der Abstand zweier Spinlabel bestimmt werden kann, ist die Messung der Intensität von Halbfeldübergängen [66]. Intensitätsmessungen sind in der EPR, insbesondere bei schlecht quantifizierbaren biologischen Proben im allgemeinen mit großen Fehlern behaftet und führen daher auch zu großen Fehlern in der Abstandsbestimmung.

Mit Elektron-Elektron Doppelresonanz (ELDOR, '2+1') wird direkt die dipolare Kopplung gemessen und primär der Abstand zweier Spinlabel bestimmt. Die Methode kann aber auch für Aussagen zur relativen Orientierung genutzt werden. Mit der ELDOR-Technik lassen sich Abstände größer 15 Å bestimmen. Somit ergänzt diese Methode cw-Experimente. In DQ-EPR Experimenten [67] wird eine Doppelquantenkohärenz zwischen den beiden Spins angeregt und selektiert. Diese Methode hat sich auch in der Abstandsbestimmung in Proteinen als erfolgreich erwiesen [68], kommt aber wegen der erforderlichen hohen Pulsleistungen selten zum Einsatz. Weitere Methoden, die zur Anwendung kommen, sind *saturation recovery* und Relaxationsverstärkung durch dipolare Kopplung.

In einer Reihe von Arbeiten wurden Abstandsmessungen zur Strukturbestimmung von zweifach TOAC markierten Peptiden benutzt. Milov *et al.* zeigen mittels gepulster ELDOR-Messungen, daß die Konformation der untersuchten Peptide von der Lösemittelumgebung abhängt. Sie beobachten in $\text{CHCl}_3/\text{DMSO}$ die Formation von 2_7 -Helices [69]. In $\text{CHCl}_3/\text{Toluol}$ wurden in älteren Studien Aggregate von 3_{10} -Helices beobachtet, welche bei Zugabe von

Ethanol desaggregieren [70]. Später wurde gezeigt, daß der 3_{10} -Helixanteil in CHCl_3 /Toluol ca. 20 % beträgt [71]. In neueren Arbeiten an einem Dimer des Peptids in CHCl_3 /Toluol werden α -Helices beobachtet [72]. Weiterhin wird gezeigt, daß alkoholische Lösemittel nicht nur Peptidaggregate auflösen, sondern auch die Sekundärstruktur, es existiert eine große Abstandsverteilung zwischen den Labeln sowie ein hoher Anteil ungefalteten Peptids [72].

In einer Studie der Gruppe um Millhauser wurde die Struktur von alaninreichen, zweifach TOAC markierten Peptiden mittels cw-EPR in flüssiger Lösung bestimmt. Hanson *et al.* und Anderson *et al.* finden in diversen Arbeiten für dieselben Peptide α - oder 3_{10} -helikale Strukturen [73, 74, 75] bis dann von Bolin *et al.* eine Koexistenz von α -/ 3_{10} -Helices gefolgert wird [76]. Die Helixstabilität gilt in Methanol und Ethanol als am größten, während fluorinierte Alkohole (HFIP und TFE) als destabilisierend befunden werden.

Für ein alanin-reiches Peptid mit MTSL-Labeln wird von Miick *et al.* eine 3_{10} -helikale Struktur gefunden [77], was aber später korrigiert wurde [78]. Smythe *et al.* bestimmen für dasselbe Peptid mit zwei TOACs eine α -helikale Struktur mit 88%-98% Helixanteil, je nach Positionierung der TOACs [79].

Diese Sammlung von teilweise sehr widersprüchlichen Ergebnissen (die keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt) zeigt, daß die Strukturbestimmung von Peptiden mittels EPR noch an verschiedenen Stellen auf Schwierigkeiten stößt. Auf chemischer Seite steht die Fragestellung in welcher Weise die Stabilität von Sekundärstruktur von der Aminosäuresequenz und von Parametern der Umgebung abhängt. Auf spektroskopischer Seite wird mehr Information über die Geometrie der Spinlabel und eine bessere Verknüpfung dieser Daten mit der Proteinstruktur benötigt.

Fragestellung

EPR-Spektren enthalten neben dem Abstand der Spinlabel auch Information über deren relative Orientierung. Es können fünf weitere geometrische Parameter bestimmt werden, welche in Relation zur Proteinstruktur stehen. Jedoch wird die relative Orientierung zweier Spinlabel selten zur Strukturbestimmung genutzt. Insbesondere zur Bestimmung von Proteinsekundärstruktur ist doppeltes Spinmarkieren gut geeignet, da Proteine konformellen Zwängen unterliegen. Helikale Peptidstrukturen werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäuren i und $i + n, n = 2 - 5$ stabilisiert. Daher be-

	1	5	10
mr57	NH ₂	KKKLAE	EAXKXLQEA CONH ₂
mr58	NH ₂	KKKLAE	EAXKLXQEA CONH ₂
mr59	NH ₂	KKKLAE	EAXKLQXEA CONH ₂
mr510	NH ₂	KKKLAE	EAXKLQEXA CONH ₂
mr17	NH ₂	KKKLXEE	AAKXLQEA CONH ₂
mr18	NH ₂	KKKLXEE	AAKLXQEA CONH ₂
mr19	NH ₂	KKKLXEE	AAKQLXEA CONH ₂

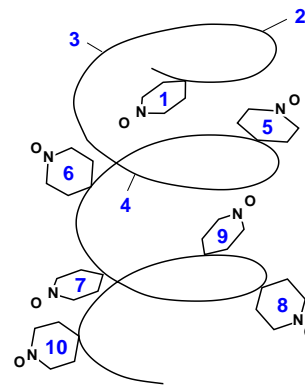


Abbildung 3.2: Primärsequenzen der untersuchten Peptide, wobei X das Spinlabel TOAC bezeichnet, und schematische Skizze der Spinlabelpositionen.

schränken sich die theoretisch möglichen Helices auf 2.2₇-, 3₁₀-, α - und π -Helices (Abb. 3.3). Schon wenig Information führt zu einer ausreichenden Restriktion des Parameterraums, welcher einen Typ von Sekundärstruktur beschreibt.

In der Literatur werden meist die Abstände zwischen den beiden Spinlabeln zur Bestimmung der Sekundärstruktur herangezogen. Die Messung der Abstände von 1 – 3 Spinlabelpaaren wird für ausreichend befunden, um die Sekundärstruktur eines Peptids zu bestimmen [74, 69], doch stehen diese Strukturen genauso oft in der Kontroverse [76, 62]. Ein Problem bei der Strukturbestimmung aus Abständen ist die Konformationsvariabilität der Spinlabel. Selbst bei idealer Proteinrückgratkonformation führen allein die beiden Sesselkonformationen des TOAC-Sechsrings zu vier Abständen pro Spinlabelpaar und Helixtyp (Abb. 3.4). Diese Abstandsbereiche, welche die Helices charakterisieren sollen, überlappen in weiten Teilen für die verschiedenen Helixtypen. Bei anderen Spinlabeln als TOAC wird entsprechend der Länge des Linkers die Abstandsvarianz größer. Daher kann durch eine Abstandsbestimmung die Sekundärstruktur eines Peptids nicht eindeutig bestimmt werden.

Im folgenden Kapitel soll ermittelt werden, wie Strukturuntersuchungen durch eine Bestimmung der relativen Orientierung der Spinlabel verbessert werden können, einerseits dahingehend, daß weniger markierte Proteine benötigt werden und weiterhin die Konformationsaussage konkretisiert wird. Es werden Multifrequenzmessungen an Peptiden mit zwei TOACs in unterschiedlichen Lösemitteln vorgestellt. Es wurden EPR-Messungen an einer Reihe analoger, *de novo* Peptide durchgeführt, bei denen die beiden TOACs durch 1-7 Aminosäuren separiert sind. Eine schematische Skizze der Peptide soll die Sequenzen

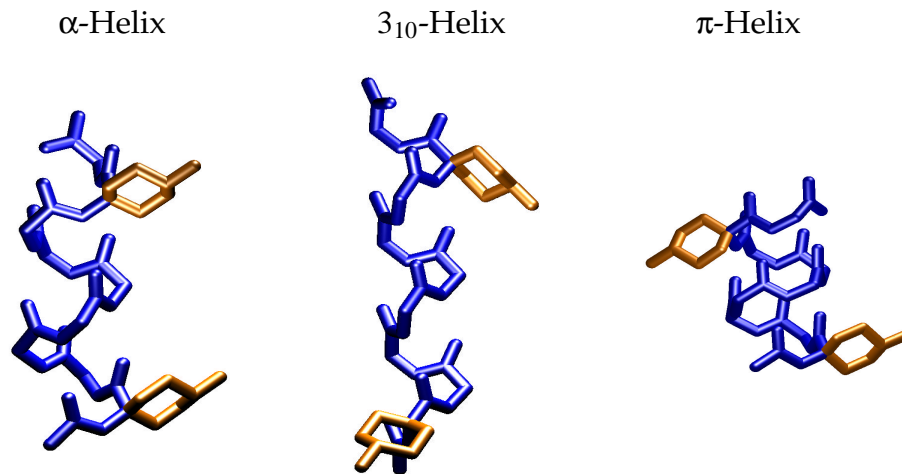


Abbildung 3.3: Räumliche Anordnung zweier Spinlabel, die sich an Aminosäurepositionen $i, i + 8$ in Peptiden unterschiedlicher Sekundärstruktur befinden.

veranschaulichen (Abb. 3.2). Die Benennung der Peptide basiert auf den Positionen der Spinlabel.

3.2 EPR an doppelt spinmarkierten Peptiden

Die Struktur eines EPR-Spektrums von zwei gekoppelten Spinlabeln ist sensibel auf Abstand und Orientierung der beiden Label. Die relative Orientierung zweier Spinlabel wird durch sechs unabhängige Parameter bestimmt. In dieser Arbeit wurde dafür der folgende Parametersatz gewählt:

- drei Eulerwinkel α, β, γ , welche mittels der Drehoperation $R_z(\beta) \cdot R_x(\alpha) \cdot R_z(\gamma)$ die g -Tensorachsen des einen Spinlabeln in das Achsensystem des zweiten überführen [80].
- zwei Winkel ϑ, φ , welche die Lage der dipolaren Achse beschreiben (Abb. 3.5). ϑ ist der Winkel zwischen dem Spin-Spin Verbindungsvektor und der z -Achse der g -Matrix des ersten Spinsystems. φ ist der Winkel zwischen der Projektion des Verbindungsvektors in die x - y Ebene der g -Matrix des ersten Spinsystems und dessen x -Achse.
- der Abstand R zwischen den beiden Schwerpunkten der Spindichte.

EPR-Spektren von gekoppelten Spinlabeln reagieren sehr empfindlich auf klei-

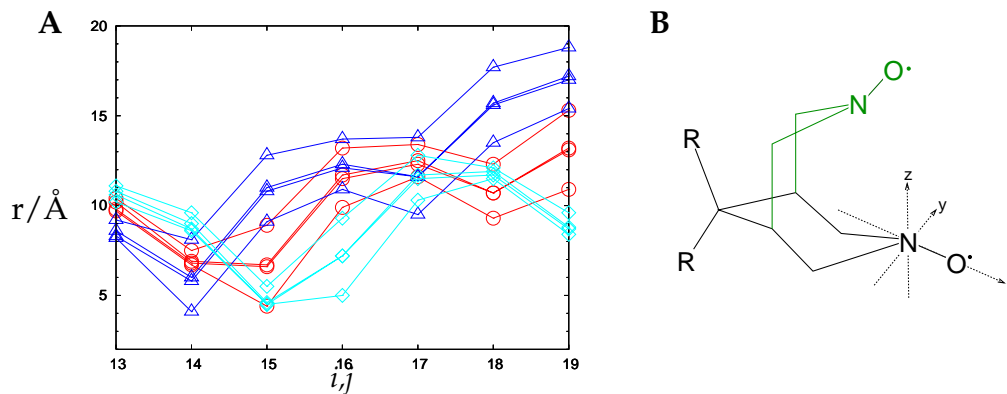


Abbildung 3.4: **A** Abstände der NO-Gruppe bei verschiedenen Sekundärstrukturen (Δ : 3_{10} -Helix, \circ : α -Helix, \diamond : π -Helix) für TOACs an den Positionen i, j unter Berücksichtigung der Konformationsvariabilität im Sechsring (**B**).

ne Änderungen von Winkeln und Abständen. Es ist sinnvoll den Einfluß aller Parameter, welche die EPR-Spektren beeinflussen, auf ein einzelnes Spinlabel zu betrachten. So können die magnetischen Parameter (g_i, A_{ii}) für die Simulation der Zweispinsysteme benutzt werden und müssen nicht als zusätzliche freie Parameter eingehen. Die Spektren von doppelt markierten Peptiden werden dann durch sechs freie Parameter bestimmt ($\alpha, \beta, \gamma, \vartheta, \varphi, R$). Damit ist der Parametersatz oft unterbestimmt (d.h. das Spektrum läßt sich mit unterschiedlichen Parametersätzen simulieren). Um die Zahl der Möglichkeiten zu verringern, wurden Messungen bei unterschiedlichen Frequenzen und unter Ausnutzung verschiedener Temperaturregime durchgeführt.

EPR an einem Spinlabel

Das EPR-Spektrum eines Spinlabels wird durch die g -Hauptwerte und die Hyperfeinkopplung des Stickstoffs bestimmt. Bei 9 GHz wird das Spektrum von der Hyperfeinkopplung dominiert, bei 360 GHz von der Aufspaltung des g -Tensors. Bei 94 GHz sind g -Tensor- und Hyperfeinaufspaltung zwar in der gleichen Größenordnung, trotzdem sind die spektralen Komponenten zur Analyse der Spektren ausreichend separiert.

Um die Effekte der Lösemittelumgebung auf das EPR-Spektrum zu bestimmen, wurde das Spinlabel TEMPO, welches dem TOAC sehr ähnlich ist, in unterschiedlichen Lösemitteln gemessen (Abb. 3.6). Der Einfluß von Polarität und Protizität des Lösemittel, insbesondere auf g_x und A_{zz} [58] ist deutlich erkennbar. In den polaren Lösemitteln MeOH und TFE/H₂O ist A_{zz} kleiner als in dem unpolaren Gemisch aus CHCl₃/DMSO, auch g_x ist in den polaren

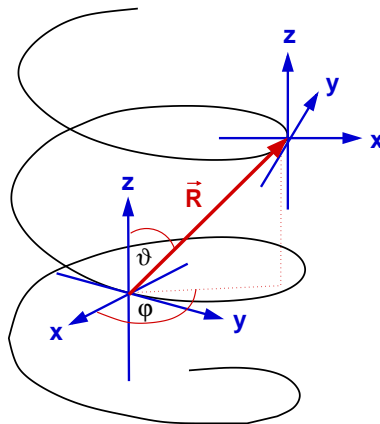


Abbildung 3.5: Die relative Orientierung zweier Spinlabel wird durch ihren Abstand R , die Lage der dipolaren Achse ϑ , φ sowie drei Eulerwinkel bestimmt, welche die g -Tensorsysteme ineinander überführen

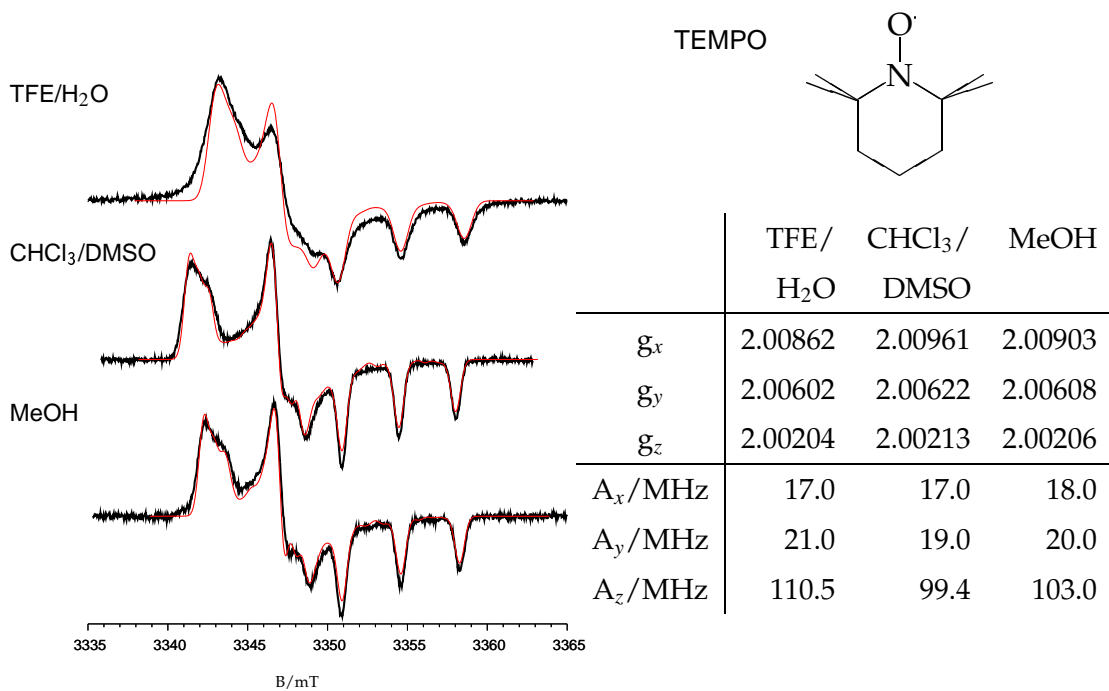


Abbildung 3.6: cw EPR-Spektren und Simulation von TEMPO in verschiedenen Lösungsmitteln bei 94 GHz, 80 K.

Lösemitteln kleiner. In TFE/H₂O ist die Linienbreite stark erhöht, was darauf hindeutet, daß die 1:1 Mischung dieser Lösemittel kein ideales Glas bildet. In Mikrokristallen liegt das Spinlabel in unterschiedlichen Umgebungen vor, so daß eine Verteilung der g -Werte auftritt was wiederum eine Linienverbreiterung zur Folge hat. CHCl₃/DMSO (7:3) sowie Methanol bilden gute Gläser, was zu schmalen Linien führt.

Der Mehrfrequenzansatz

Das EPR-Spektrum von zwei Spinlabeln wird durch die g - und A -Werte der einzelnen Spinlabel sowie die dipolare Kopplung zwischen den beiden Labeln bestimmt. Die Aufspaltung durch dipolare Kopplung ist unabhängig vom äußeren Feld. Eine Interpretation der Spektren ist am einfachsten, wenn die Aufspaltung durch die dipolare Kopplung deutlich größer oder deutlich kleiner als die beiden anderen Effekte ist, sich die Effekte also deutlich unterscheiden lassen. Große dipolare Kopplungen dominieren EPR-Spektren bei 9 GHz, diese Spektren sind zur Abschätzung kleiner Abstände gut geeignet. Jedoch geht durch die geringe g -Aufspaltung im X-Band Information über die Orientierung der Label zum Teil verloren. Bei 360 GHz sind die g -Tensorkomponenten des Spinlabels deutlich separiert, Hyperfein- und dipolare Kopplung spalten die Hauptlinien auf. Damit ist es möglich, die Lage der dipolaren Achse im g -Tensorsystem und die relative Lage der g -Tensoren zueinander zu bestimmen. Linienverbreiterung durch g - und A -strain überlagern kleine Aufspaltungen bei geringen Abständen. g -strain führt z.T. zu Linienverbreiterungen, die sich weder mit Gauß- oder Lorentz-förmigen Linien anpassen lassen, dies erschwert insbesondere die Interpretation kleiner Kopplungen, welche nur zu Linienverbreiterungen und nicht zu Aufspaltungen führen.

Zweispin-Ordnung

Bei Signalen von einzelnen Spinlabeln wird eine Erniedrigung der Temperatur zur Erhöhung der Signalstärke genutzt. Das obere Elektronenspinniveau wird zugunsten des unteren entvölkert und so die Besetzungsdifferenz erhöht. Weiterhin verringern sich dynamische Effekte durch rotierende Seitenketten oder Bewegungen des gesamten Proteins.

Bei gekoppelten Zweispinsystemen führt die Envölkerung der oberen Niveaus zu Verschiebungen der Besetzungsdifferenzen zwischen unterschiedlichen m_s -

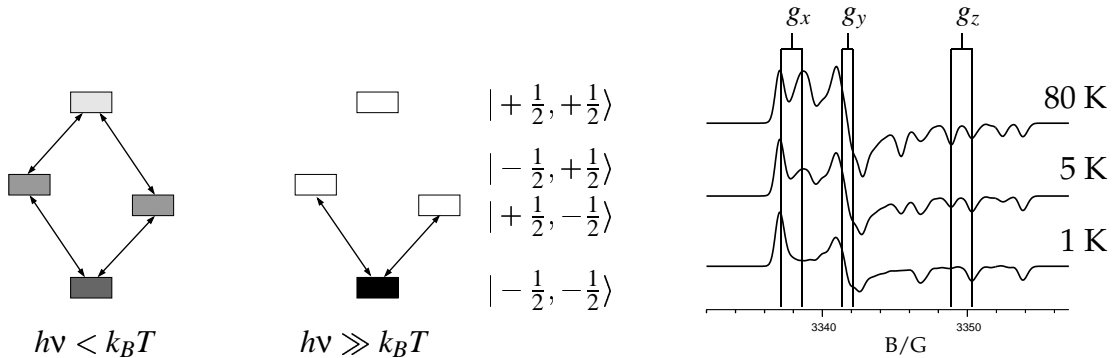


Abbildung 3.7: Zweispinordnung. Links: Besetzung der vier Elektronenspinniveaus im Hochtemperatur- und Tieftemperaturregime. Rechts: Simulation von W-Band EPR-Spektren zweier Nitroxide bei unterschiedlichen Temperaturen.

Niveaus. Dieser Effekt wird als Zweispin-Ordnung bezeichnet. Resultierende Intensitätsverschiebungen sind schon bei Temperaturen $h\nu = kT_Z$, die eine Größenordnung über der Zeemantemperatur (T_Z) liegen, erkennbar [81]. Bei Temperaturen unter der Zeemantemperatur ist hauptsächlich das unterste Niveau besetzt, d.h. die Hälfte der Übergänge fehlt (Abb. 3.2).

Die Zeemantemperatur liegt im X-Band bei $T_Z = 0.4$ K. Temperaturen dieser Größenordnung sind mit den hier verwendeten Aufbauten nicht zu erreichen. Bei einer Mikrowellenfrequenz von 360 GHz liegt die Zeemantemperatur bei $T_Z = 17$ K, beim derzeitigen Aufbau ist jedoch nur eine Stickstoffkühlung implementiert. Im W-Band sind mit $T = 5$ K Temperaturen nahe der Zeemantemperatur ($T_Z = 4.5$ K) gut erreichbar. Simulationen von Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen (Abb. 3.2 rechts) zeigen deutlich Intensitätsverschiebungen. Entlang der g_x -Komponente verliert die Linie bei höherem Feld an Intensität, während entlang g_z die Linien bei tieferem Feld an Intensität verlieren. Dies liegt daran, daß die dipolare Kopplung entlang g_x ein anderes Vorzeichen als an g_z hat. Daher können relative Vorzeichen der dipolaren Kopplung bestimmt werden.

Simulation

Zur Bestimmung von Abstand und Orientierung der beiden g -Tensoren wurden jeweils drei Spektren (X-Band, W-Band bei 80 K und 5 K) von einem Peptid in einem Lösemittel mit demselben Parametersatz simuliert (soweit vorhanden auch das Spektrum bei 360 GHz). Die g -Hauptwerte und Hyperfeinkopplungskonstanten wurden Messungen von TEMPO in demselben Löse-

mittel entnommen. Die verwendeten Simulationsprogramme sind in Kapitel 2.4.1 kurz beschrieben. Bei der Simulation wurde von den Ergebnissen einer Fitroutine bei 9 GHz [36] ausgegangen, wobei versucht wurde möglichst viele lokale Minima zu finden. Die ermittelten Parametersätze wurden dahingehend getestet, ob auch eine Simulation der Spektren bei 94 GHz möglich war. Zur qualitativen Analyse wurden aus modellierten Peptidstrukturen Abstand und Orientierung der beiden Spinlabel für die idealen Sekundärstrukturen bestimmt. Mit den Parametersätzen wurden EPR-Spektren berechnet und diese mit den gemessenen Spektren verglichen.

3.2.1 Induzierung von Sekundärstruktur

Die Struktur eines Peptids hängt von der Sequenz sowie seiner Umgebung ab. Durch unterschiedliche Lösemittel konnte erreicht werden, daß die Peptide verschiedene Sekundärstrukturen annehmen. Der Einfluß der Umgebung auf die Peptidstruktur wurde durch Messungen in unterschiedlichen Lösemitteln untersucht. Diese Messungen wurden exemplarisch an mr57 und mr18 durchgeführt. Als Lösemittel wurden die Gemische H₂O/TFE (1:1), H₂O/Glycerin (4:6), CHCl₃/DMSO (7:3), sowie die reinen Komponenten verwandt.

H₂O, pH=7

Das Design des Peptids ist auf die Bildung einer α -Helix in einer wäßrigen Umgebung ausgelegt. Bei pH = 7 (MOPS-Puffer) liegen die basischen Seitenketten in protonierter, die sauren Seitenketten in deprotonierter Form vor. Die Anordnung der geladenen Seitenketten wurde so gewählt, daß bei α -helikaler Konformation eine große Zahl von Salzbrücken gebildet werden, welche das Peptid stabilisieren [82]. Andererseits wird berichtet, daß positiv geladene Aminosäuren am N-terminalen Ende des Peptids (hier: drei Lysine) aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung mit dem Helixdipol die Struktur stark destabilisieren [83].

CHCl₃/DMSO (7:3)

Der Effekt von organischen Lösemitteln auf Proteinstrukturen gewinnt zur Zeit an Interesse, da Modellumgebungen für Membranproteine benötigt werden. Mit CHCl₃ und DMSO wurden ein polares aber aprotisches Lösemittel-

gemisch verwandt. Aprotische Lösemittel, welche keine oder nur in geringen Maß Wasserstoffbrücken ausbilden, treten nicht in Konkurrenz zu den peptidinternen Wasserstoffbrückenbindungen. Durch den polaren Charakter sind sie aber weiterhin in der Lage Strukturen mit Partialladungen zu stabilisieren. Auch Salzbrücken zwischen Seitenketten erfahren keine Konkurrenz durch das Lösemittel. Die Messungen wurden auch in den reinen Lösemitteln durchgeführt, da dies die Interpretation der Effekte des Lösemittelgemisches erleichtern kann.

TFE/H₂O (1:1)

Das Gemisch H₂O/TFE hat bei 80 K eine Dielektrizitätskonstante $\epsilon=15$, bei Raumtemperatur $\epsilon=52$. Fluorinierte Lösemittel wie TFE (2,2,2-Trifluorethanol) und HFIP (1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol) und ihre Gemische mit Wasser gelten in den meisten Fällen als 'strukturstabilisierend' [84]. Die Strukturstabilisierung durch H₂O/TFE wird einerseits auf die verringerte Dielektrizitätskonstante und die dadurch ausbleibende Solvatation der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zurückgeführt [85]. Als alternative Erklärung gilt die Anhebung des freien Enthalpie des Zufallsknäuels [86].

Glycerin/H₂O (6:4)

Durch die hohe Dichte von Hydroxydgruppen wird Glycerin dem Wasser für recht ähnlich befunden. Ein Zusatz von 60% Glycerin zum Wasser verhindert die Bildung von Mikrokristallen beim Einfrieren und führt zur Glasbildung. Daher wird Glycerin bei biologischen Proben häufig als Glasbildner eingesetzt. Es gibt jedoch Hinweise, daß Proteinstrukturen durch Glycerinzusatz verändert werden [87].

3.2.2 Analyse der EPR-Spektren

Ob ein Peptid in einem Lösemittel eine definierte und analysierbare Struktur annimmt, kann primär über die Linienverbreiterung im EPR-Spektrum beurteilt werden. In den Lösemitteln TFE/H₂O, Glycerin/H₂O und CHCl₃/DMSO erhöht sich die Linienbreiten nicht wesentlich (Abb. 3.8) verglichen mit den Spektren eines einzelnen Spinlabel (Abb. 3.6). Dagegen kommt es in H₂O, DMSO und CHCl₃ zu starken Linienverbreiterungen. Zum Teil werden selbst im

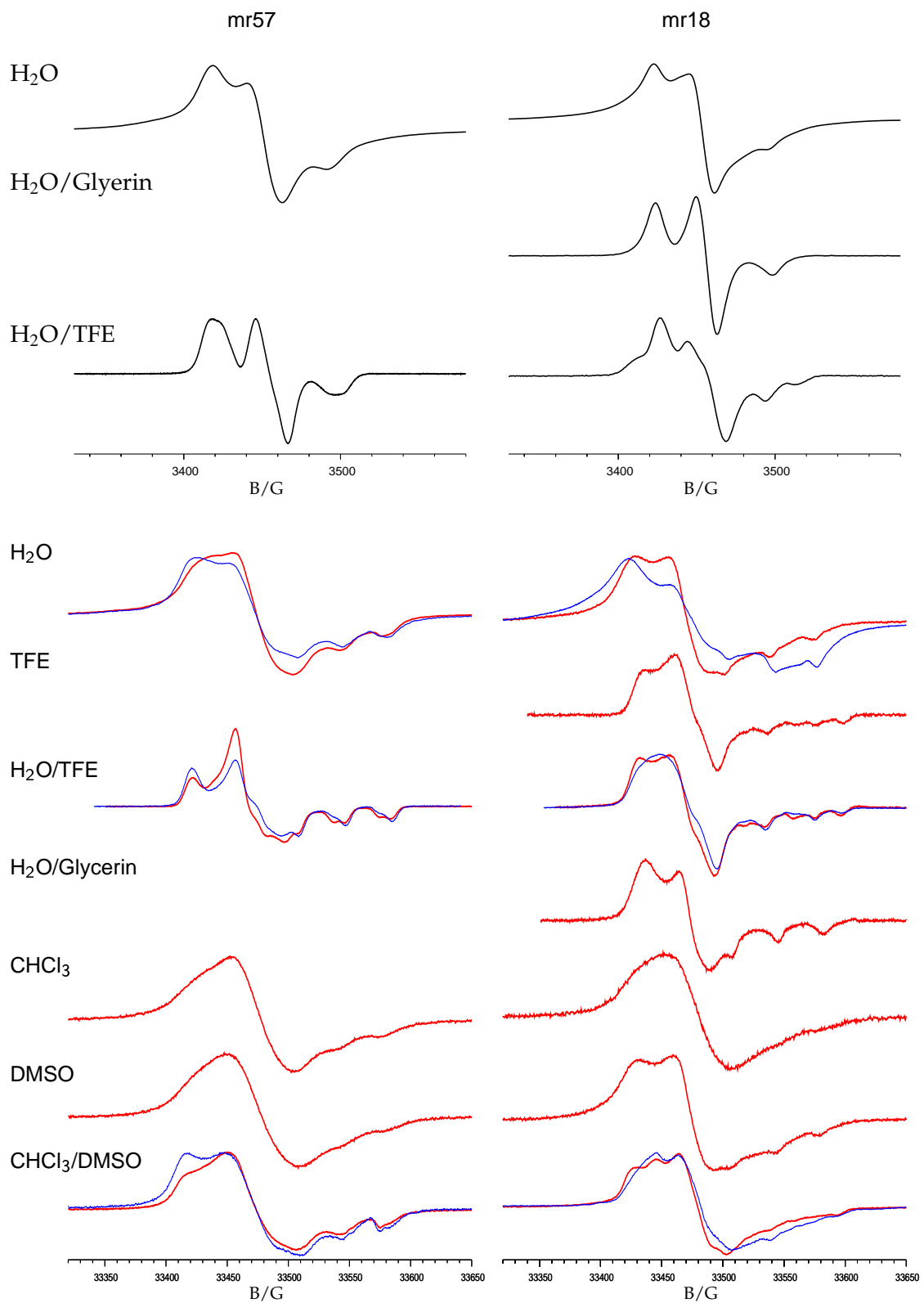


Abbildung 3.8: cw-EPR von mr57 (links) und mr18 (rechts) in verschiedenen Löse-
mitteln (oben: 9 GHz, 80 K; unten: 94 GHz, rot: 80 K, blau: 5K).

Tabelle 3.1: Die Orientierungsparameter der Spinlabel, welche zur Simulation der Spektren von mr57 (Abb. 3.9) benutzt wurden im Vergleich mit den Parametern für unterschiedliche Helixtypen.

	d/nm	α	β	γ	ϑ	φ
Fit	1.3	60°	184°	33°	60°	25°
α -Helix	1.23-1.28	102°	124°	30°	89°	114°
3_{10} -Helix	1.04-1.11	32°	82°	20°	105°	122°
π -Helix	1.28-1.38	100°	145°	4°	90°	128°

W-Band die Linien zu einer fast strukturlosen Linie verbreitert.

Die Spektren in den unterschiedlichen Lösemitteln haben teilweise sehr unterschiedliche Formen, es liegen also sehr wahrscheinlich unterschiedliche Sekundärstrukturen vor. Das Spektrum in reinem TFE unterscheidet sich nur geringfügig von dem TFE/H₂O-Gemisch. Da die Peptide in Gemischen von TFE/H₂O sowie CHCl₃/DMSO gut definierte Strukturen annehmen, wurde die quantitative Analyse daher hauptsächlich an Peptiden in diesen beiden Lösemittelgemischen durchgeführt.

H₂O

X-Band EPR-Spektren der Peptide (Abb. 3.10) in Wasser (MOPS, pH 7) zeigen ein mehrfaches Zu- und Abnehmen der dipolaren Kopplung. Die Abweichung von der spektralen Form eines einzelnen Spinlabels nimmt von mr57 bis mr59 zu. In mr59 dominiert die dipolare Kopplung deutlich das Spektrum. Bei dem folgenden Peptid, mr510, ist die dipolare Kopplung so gering, daß sie nur zu einer Linienverbreiterung führt. Das Spektrum von mr17 setzt sich aus mindestens zwei Konformeren zusammen. An dem Signal zwischen 3400-3500 G ist keine dipolare Verbreiterung zu erkennen, dagegen gehören die Linien bei 3370 G und 3570 G zu einer stark gekoppelten Konformation. Prinzipiell sollte noch eine Linie bei tieferem Feld sichtbar sein, die aber durch starke Verbreiterung vermutlich nur geringe Intensität hat und nicht mehr beobachtbar war. In mr18 sind die Linien stark verbreitert und werden bei mr19 wieder schmaler. Ein ähnliches Verhalten ist in den W-Band Spektren erkennbar. Eine Zuordnung zu einem bestimmten Helixtyp unter Zuhilfenahme der für die einzelnen

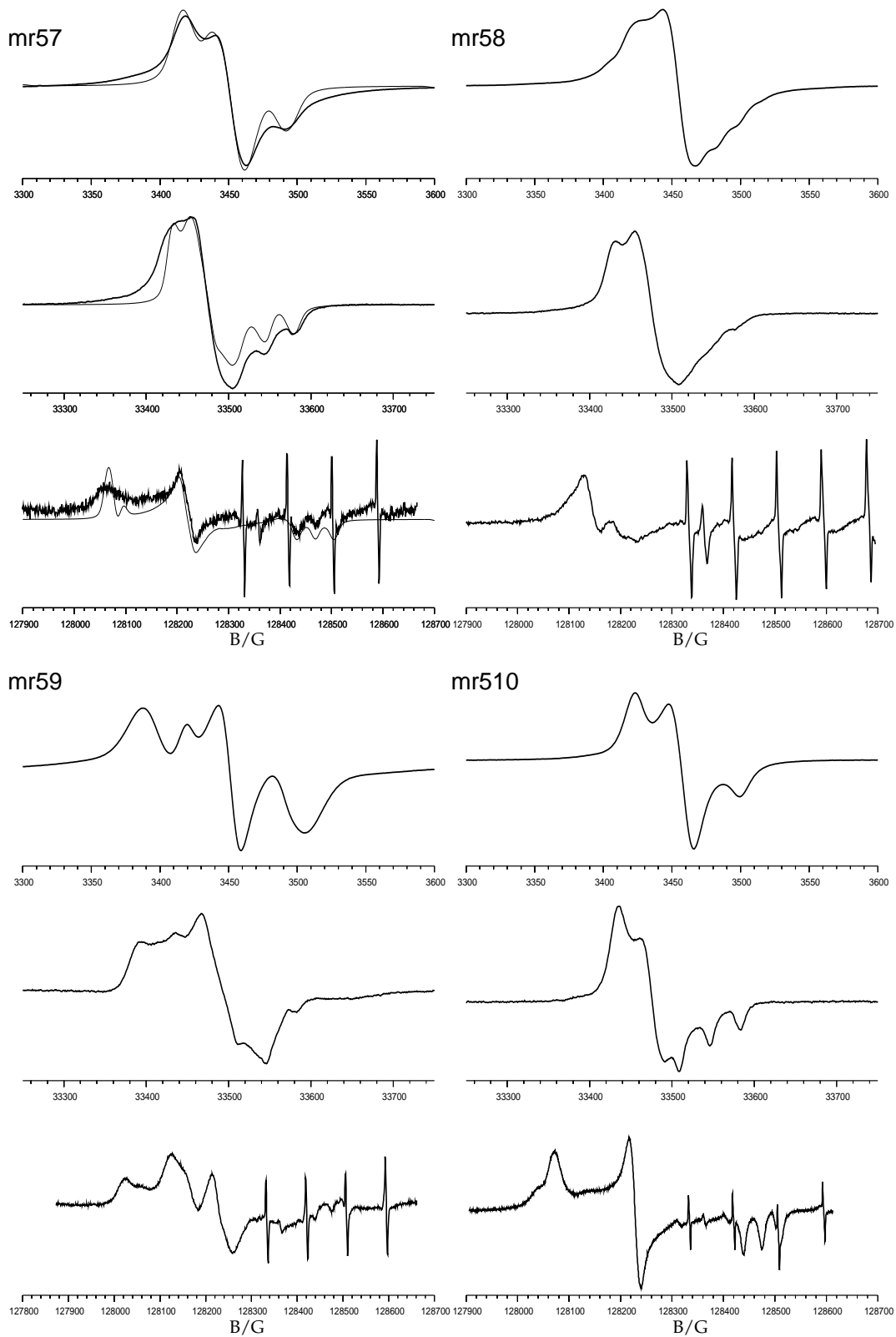


Abbildung 3.9: Die Peptide mr57, mr58, mr59 und mr510 in H₂O (pH 7), gemessen in drei Frequenzbändern. Jeweils oben: 9 GHz, 80 K, mitte: 94 GHz, 80 K, unten: 360 GHz, 120 K.

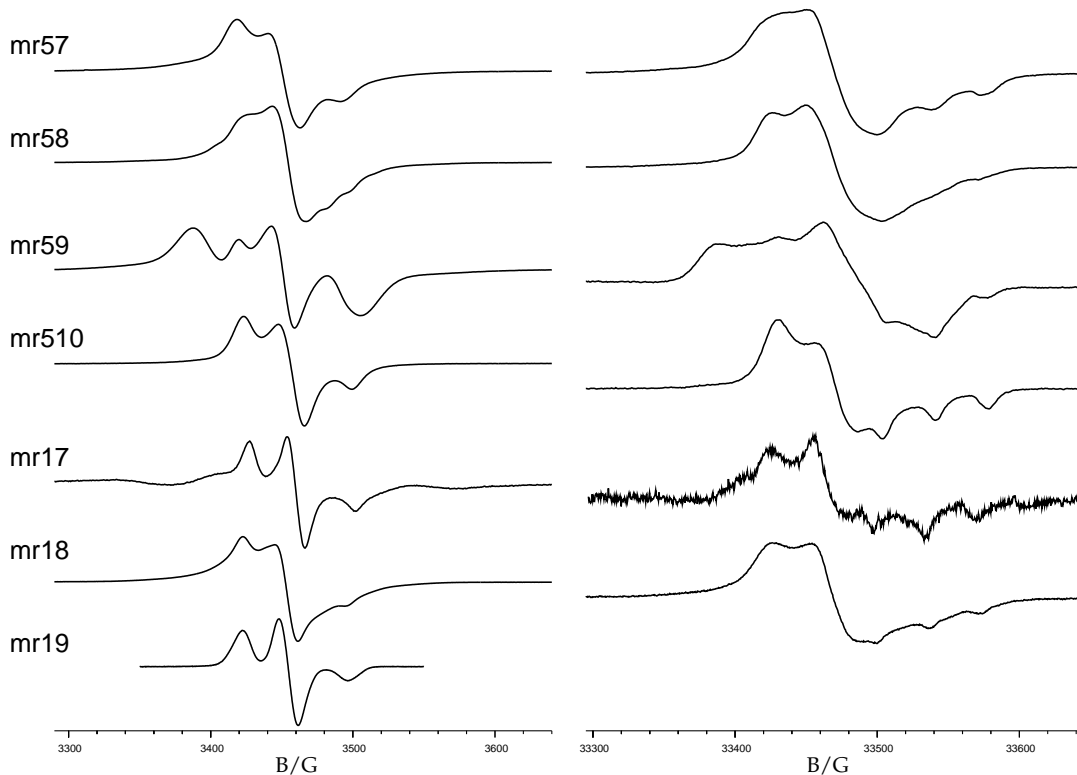


Abbildung 3.10: cw-EPR von doppelt spinmarkierten Peptiden bei 80 K in H_2O . Links: 9 GHz, Rechts: 94 GHz.

Helixtypen berechneten Abstände [65, 79] ist nicht möglich. In einer 3_{10} -Helix wird eine Windung aus exakt drei Aminosäuren gebildet, so daß die dipolare Kopplung mit einem Spinlabel an Position eins, bei der vierten und der siebten Aminosäure maximal ist. Für eine typische α -Helix sollte die dipolare Kopplung zwischen vierten und der fünften und dann bei der achten Aminosäure maximal sein, bei einer π -Helix zwischen der fünften und der sechsten, sowie der neunten Aminosäure. Die Spektrenreihe erfüllt keine der Bedingungen. Es ist möglich, daß die Peptide, trotz ihres nahezu identischen Aufbaus, unterschiedliche Konformationen einnehmen. Die stark verbreiterten Linien in den Spektren deuten weiterhin auf eine strukturelle Variabilität hin, die auf kein gut definierte Gleichgewichtskonformation in wäßriger Lösung schließen läßt.

Die Peptide mr57 - mr510 konnten in drei Frequenzbändern, bei 9 GHz, 94 GHz und 360 GHz gemessen werden (Abb. 3.9). Die cw EPR-Spektren von mr57 zeigen keine konkrete Aufspaltung. Bei 94 GHz und 360 GHz ist eine starke Verbreiterung der g_x -Komponente zu erkennen, welche sich nicht allein durch ei-

ne Gaußlinie erzeugen läßt. Die g_y -Komponente ist auf ca. 30 G verbreitert. Bei einer gut definierten Orientierung der Spinlabel sollte eine dipolare Kopplung dieser Größenordnung zu einer Aufspaltung führen. Die hohe Linienbreite läßt auf weitere Verbreiterungseffekte schließen. Die Spektren von $m\text{r}57/\text{H}_2\text{O}$ wurden in drei Frequenzbändern mit einem Parametersatz simuliert. Dieser Parametersatz wurde mit theoretisch ermittelten Werten für unterschiedliche Helixtypen verglichen. Die Übereinstimmung mit den Orientierungsparametern einer α -Helix ist am größten. Da die Linien im Spektrum sehr breit sind, lassen sie sich aber ebensogut durch eine π -Helix anpassen. Bei nur einer Aminosäure zwischen den Labeln ist der Unterschied zwischen α - und π -Helix sehr gering. Nur eine 3_{10} -Helix läßt sich gut unterscheiden (Abb. 3.11). α - und π -Helices sind erst ab zwei Aminosäuren zwischen den Labeln unterscheidbar. Bei den Messungen bei 360 GHz muß der wäßrigen Lösung aus technischen Gründen ca. 20% Glycerin zugesetzt werden. Jedoch ist das Glycerin/ H_2O -Verhältnis bei der Messung aufgrund von Verdunstung während des Einbaus nicht quantifizierbar. Daher war es nicht möglich, Messungen in X- und W-Band bei gleicher Lösemittelzusammensetzung durchzuführen. Es wird später gezeigt, daß der Zusatz von 60% Glycerin einen Einfluß auf die Peptidstruktur hat.

Die Spektren von $m\text{r}510$ sind wenig aufgespalten (Abb. 3.9). Nur das Spektrum bei 360 GHz zeigt in der g_x -Komponente eine Schulter, was einer 30 G großen Aufspaltung entspricht. Diese ist auch im W-Bandspektrum erkennbar, jedoch mit sehr geringer Intensität. Die Spektren von $m\text{r}58$ und $m\text{r}59$ weichen deutlich von der eines einfachen Spinlabels ab. $m\text{r}58$ zeigt in X-Band und W-Band aufgespaltene, aber auch stark verbreiterte Linien. Im Spektrum bei 360 GHz ist durch die Verbreiterung nur eine aufgespaltene Kante im Tieffeldbereich erkennbar. $m\text{r}59$ zeigt in allen drei Frequenzbändern große Aufspaltungen aller g -Tensorkomponenten. Bei 9 GHz wird das Spektrum von der dipolaren Kopplung dominiert, selbst bei 360 GHz ist die dipolare Aufspaltung noch in derselben Größenordnung wie die Aufspaltung durch g -Anisotropie. Die größte Aufspaltung und damit die Lage der dipolaren Achse ist in Richtung g_z . Diese parallele Anordnung der Spinlabel ist ein Hinweis auf einen Versatz von einer Helixwindung wie er in einer α -helikalen Konformation auftritt. Obwohl eindeutige Aufspaltungen sichtbar sind, war es nicht möglich, die Spektren adäquat zu simulieren.

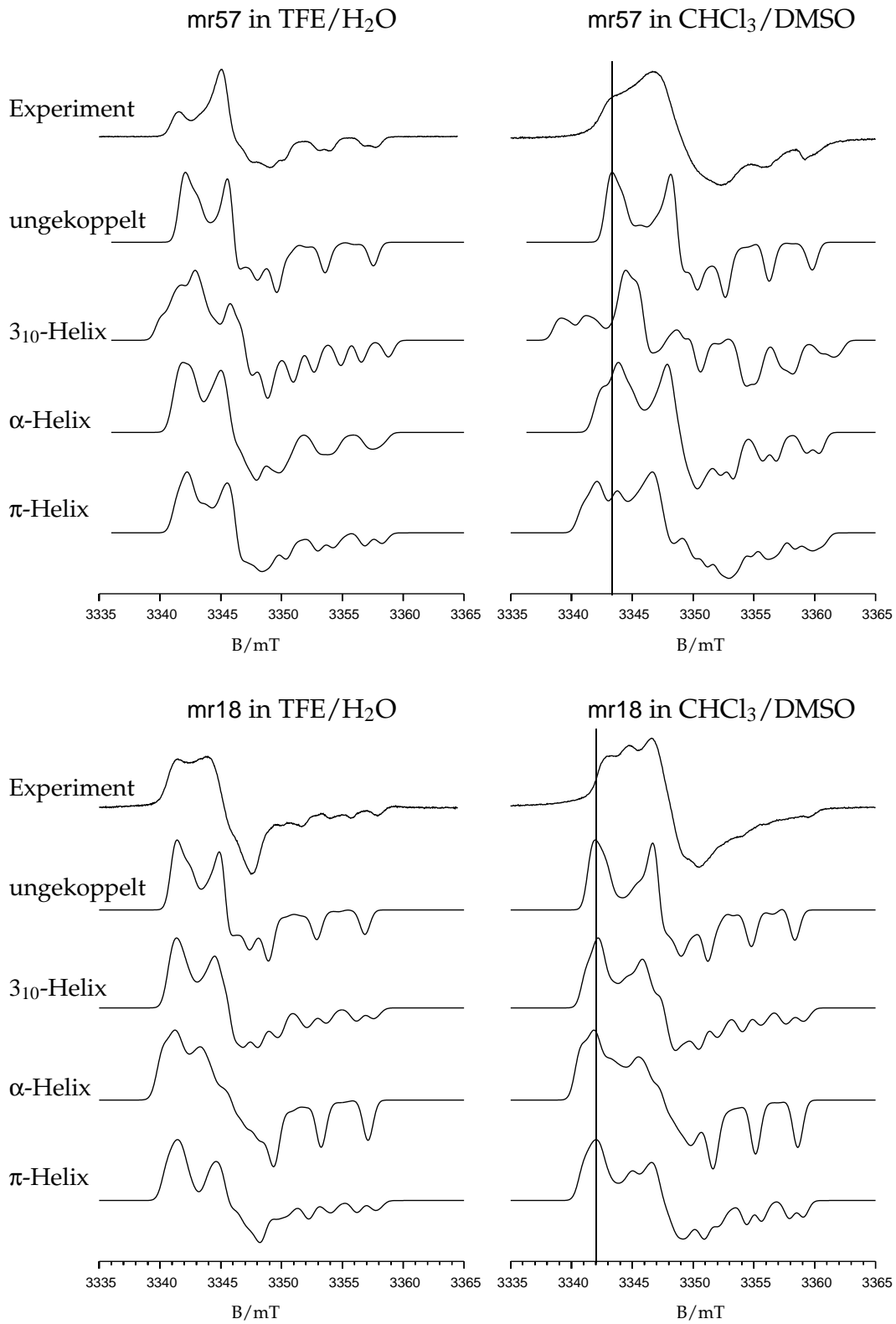


Abbildung 3.11: W-Band Spektren von mr57 und mr18 bei 94 GHz, 80K im Vergleich mit Simulationen für berechnete Orientierungen der Spinlabel in drei Sekundärstrukturen sowie mit dem Spektrum eines einzelnen Spinlabels. In den Messungen in CHCl₃/DMSO ist g_x des einzelnen Labels gekennzeichnet.

TFE/H₂O

Die X-Band Spektren (Abb. 3.12) zeigen ein periodisches Zu- und Abnehmen der dipolaren Kopplung. Die großen dipolaren Kopplungen bei mr58, mr59 und mr18 weisen auf eine α -helikale Struktur hin.

Eine Ausnahme in der Reihe bildet das Spektrum von mr58, welches mit 4 G Linienbreite deutlich schmalere Linien als die anderen Spektren mit mindestens 6 G Linienbreite aufweist. Das Spektrum lässt sich jedoch nicht anpassen, da es für zwei gekoppelte Nitroxide zuviele Linien zeigt. Das Spektrum besteht daher vermutlich aus der Überlagerung von zwei gut definierten Spezies. Das X-Band EPR-Spektrum von mr57 in TFE/H₂O zeigt insbesondere auf der g_z -Komponente Aufspaltungen durch dipolare Kopplung. Auch die zentrale Linie im Spektrum zeigt eine zusätzliche Schulter. Im W-Band (Abb. 3.8) ist die Aufspaltung der g_z -Linien noch deutlich erkennbar, g_x und g_y zeigen sich überlagerne Aufspaltungen in der Größenordnung von 20 G.

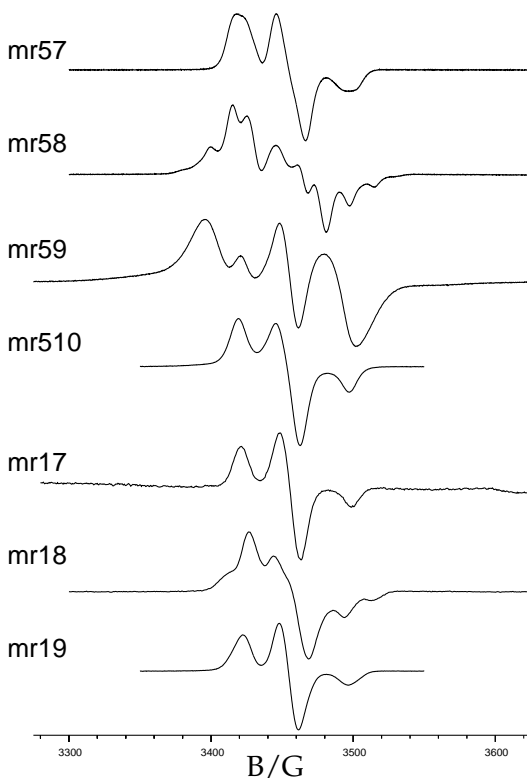


Abbildung 3.12: cw EPR bei 9 GHz von doppelt spinmarkierten Peptiden bei 80 K in TFE/H₂O (1:1)

Das Spektrum in H₂O ist nicht die verbreiterte Form des Spektrums in TFE/H₂O. Das Peptid nimmt also in TFE/H₂O eine andere und definiertere Konformation an als in H₂O. Ein Vergleich des Spektrums mit Simulationen für unterschiedliche Helixtypen (Abb. 3.11) zeigt Ähnlichkeit mit einer α - und einer π -Helix. Die Simulationen zeigen jedoch eine zu große Intensität auf der g_x -Komponente. Dies wäre möglich, wenn durch dipolare Kopplung oder eine andere Modulation des Hamiltonoperators die g_y - und g_z -Komponente schneller relaxieren als die g_x -Komponente. Ein solches Verhalten ist jedoch in 2P EPR-Spektren, die mit unterschiedlichen Pulsabständen aufgenommen wurden, nicht zu erkennen.

Bei einem Vergleich der W-Band

Spektren bei 80 K und bei 5 K sind Intensitätsänderungen der dipolar aufgespaltenen Linie zu erkennen, welche durch die Zweispinordnung bei tiefen Temperaturen entstehen (Kap. 3.2). Entlang der g_z -Komponente verlieren jeweils die Linien bei höherem Feld an Intensität. Daraus kann man schliessen, daß die dipolare Kopplung entlang beider g_z -Achsen dasselbe Vorzeichen hat. Auch bei dem Peptid mr18 ist zu erkennen, daß das fluorinierte Lösemittel eine andere Konformation induziert. Die X-Band Spektren in H_2O und TFE/ H_2O zeigen keine Übereinstimmungen (Abb. 3.8). Beim qualitativen Vergleich der W-Band Spektren bei 80 K und 5 K sind auch hier Intensitätsänderungen beobachtbar. Es verliert entlang g_z jeweils die Linie bei höherem Feld an Intensität. Damit hat die dipolare Kopplung entlang g_z das entgegengesetzte Vorzeichen verglichen mit dem Peptid mr57. Das X-Band Spektrum kann trotz differenzierter Struktur durch unterschiedliche Parametersätze gut reproduziert werden. Die W-Band Spektren konnten nur mit einem dieser Parametersätze simuliert werden. Der Parametersatz und die Simulation der drei Spektren sind in Abb. 3.13 gezeigt. Die relative Orientierung und der Abstand der Spinlabel stimmt mit keiner der Orientierungen für theoretisch ermittelte Helices überein. Da dies aus den Winkeln nicht notwendigerweise direkt zu erkennen ist, wurde ein graphischer Vergleich dargestellt. Es wurde die Lage der beiden g -Achsensysteme im Tensor der dipolaren Kopplung berechnet. Aufgrund der Winkelabhängigkeit der dipolaren Kopplung wird die Größe der Aufspaltung der g -Hauptwerte von ihrer Orientierung im dipolaren Tensor abhängig. Die Schnittpunkte der g -Hauptachsen mit dem dipolaren Tensor geben die Reduktion der Kopplung entlang der ausgezeichneten Richtungen der g -Matrix an. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die g -Achsen eines Spinsystems jeweils auf eine Seite des dipolaren Tensors gespiegelt. Im Fit hat die dipolare Kopplung entlang der g_z -Achsen ein positives Vorzeichen, während sie in allen Simulationen entlang der g_z -Achse unterschiedliche Vorzeichen hat. Die Vorzeichen der dipolaren Kopplung sind durch die gute Übereinstimmung des W-Band Spektrums mit der Simulation bei 5 K sicher korrekt bestimmt.

CHCl₃/DMSO

In CHCl₃/DMSO sieht das Spektrum von mr57 dem Spektrum in Wasser sehr ähnlich (Abb. 3.8). Die schärferen Abrißkanten zeigen eine besser definierte Struktur und lassen die Aufspaltung der g_z -Komponente besser erkennen. Dagegen unterscheiden sich für mr18 die Spektren in Wasser und in

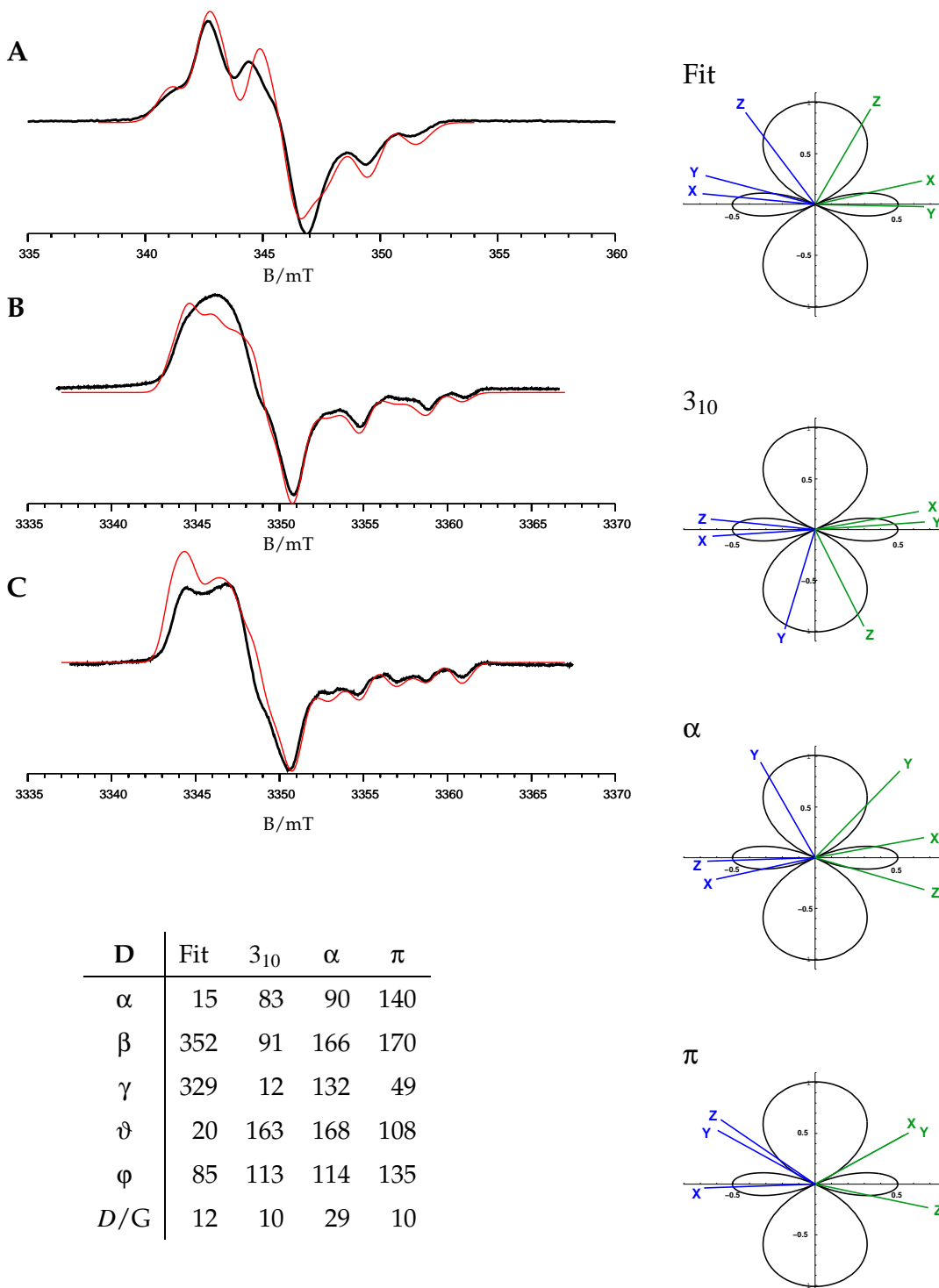


Abbildung 3.13: mr18 in TFE/H₂O. EPR-Spektren und Simulation bei **A** 9.7 GHz, 80 K, **B** 94 GHz, 5 K **C** 94 GHz, 80 K. **D** Tabellierung der Orientierungsparameter für den Fit und verschiedene Helixtypen. Rechts: Lage der g -Tensorachsen im dipolaren Tensor für die simulierten Werte und die Helixtypen. Die Schnittpunkte der Achsen mit dem dipolaren Tensor geben die Aufspaltung der Hauptwerte an (Spinsystem 1: blau, Spinsystem 2: grün).

CHCl₃/DMSO.

Ein Vergleich des W-Band Spektrums mit dem Spektrum eines einzelnen Spinlabels in CHCl₃/DMSO zeigt, daß die g_x -Linie des einzelnen Labels bei tieferem Feld (33370 G) liegt als die niedrigste Resonanz im gekoppelten Spektrum (33382 G) (Abb. 3.11). Eine Verschiebung dieser Art ist durch Spin-Spin-Wechselwirkung nicht möglich, sondern kann nur durch eine Erniedrigung von g_x erklärt werden. Im Spektrum von mr57 liegt die äußerste Linie auf der Tieffeldseite bei gleichem Feld wie g_x des ungekoppelten Nitroxids. Diese Linie kann die unaufgespaltene g_x -Komponente sein, was aber bei dem geringen Abstand der beiden Label unwahrscheinlich ist. Es besteht die Möglichkeit, daß auch in diesem Fall g_x abgesenkt ist und die Linie nur eine Komponente der dipolaren Aufspaltung darstellt.

Glycerin/H₂O

Im Lösemittelgemisch Glycerin/H₂O gleicht das Spektrum von mr18 einem einzelnen Spinlabel. Die Aufspaltung der g_z -Komponente in reinem H₂O ist im Gemisch mit Glycerin nicht mehr erkennbar. Damit nimmt das Peptid auch durch Zusatz von Glycerin eine andere Konformation an als in Wasser.

3.2.3 Diskussion

Die hier untersuchten sieben Peptide zeigen in Wasser stark verbreiterte Spektren. Große Linienbreiten können durch zwei unterschiedliche Effekte entstehen. Eine Möglichkeit ist, daß Wasser kein Glas bildet, sondern in Mikrokristallen gefriert. Damit sind die Moleküle verschiedenen Umgebungen und unterschiedlichen Verzerrungen ausgesetzt, wodurch eine Verteilung der g -Werte entsteht. Eine übliche Methode die Bildung von Mikrokristallen zu verhindern, ist der Zusatz von 60% Glycerin als Glasbildner. Dies hat zwar bei den hier untersuchten Peptiden die Linienbreite deutlich reduziert, weiterhin hat es aber zu einer Änderung in der Struktur der Spektren geführt, die nur mit einer Änderung der Konformation der Peptide erklärbar ist. Auch in Proteinen wurden schon Fälle gezeigt, wo der Zusatz von Glasbildnern Änderungen hervorruft [87]. Die großen Linienbreiten können auch entstehen, wenn unterschiedliche Strukturen sich energetisch kaum unterscheiden. Eine strukturelle Variabilität in flüssiger Lösung führt zu einer Konformationsverteilung im gefrorenen Zustand.

Die cw-EPR Messungen der Peptide in H₂O bei 9 GHz und 94 GHz zeigen mit dem Verlauf der Kopplungen eine schlecht strukturierte Helix. Die Reihe mr57-mr19 ist keiner einheitlichen Sekundärstruktur zuzuordnen. Die große dipolare Kopplung bei mr58, mr59 deutet auf eine α -Helix hin, die starke dipolare Kopplung bei mr17 kann jedoch nur mit einer 3_{10} -Helix erklärt werden. Die Simulation der Spektren von mr57 kann einer Konformation, die in erster Näherung einer α - und einer π -Helix ähnlich ist, zugeordnet werden.

Diese scheinbaren Widersprüche können durch zwei Möglichkeiten zustande kommen. Die Konformation der Peptide könnte so labil sein, daß je nach Einbauposition des Spinlabels die Sekundärstruktur entscheidend beeinflusst wird. Es wurde jedoch gezeigt, daß eine Peptidstruktur hauptsächlich vom Anteil C $_{\alpha}$ -tetrasubstituierter Aminosäuren bestimmt wird und nicht durch die Positionierung dieser Aminosäuren [88]. Eine andere Erklärung ist, daß die sieben Peptide alle in derselben Konformation vorliegen, diese aber nicht durchgehend einem Helixtyp entspricht, sondern einen Übergang zwischen unterschiedlicher Sekundärstrukturen beinhaltet.

In CHCl₃/DMSO kam es zu einer Absenkung der g_x -Komponente der Spinlabel. g_x hängt von der Polarität der Umgebung und der Art der Wasserstoffbrückenbindung an die Nitroxid-Gruppe ab. Die Polarität der Umgebung wurde berücksichtigt, indem die g - und A -Werte für die Simulation der Messung von TEMPO in demselben Lösemittel entnommen wurden. Eine Absenkung von g_x muß durch eine Veränderung der Umgebung zustande kommen. Im Peptid sind interne Wasserstoffbrückenbindungen mit Seitenketten naheliegender Aminosäuren möglich. Eine Wasserstoffbrücke zu einer NH₃⁺-Gruppe führt zu einer Absenkung von g_x um einen Betrag in der beobachteten Größenordnung. In dem Peptid sind NH₃⁺-Gruppen durch benachbarte Lysine vorhanden. Es ist möglich, daß bei bestimmten Peptidgeometrien Wasserstoffbrücken zwischen Lysin und TOAC ausgebildet werden. Eine Verschiebung der g - und Hyperfeinwerte in der Peptidumgebung erhöht die Zahl der zu bestimmenden Parameter von 6 auf 18, da sich die Werte für die beiden Label auch durchaus unterscheiden können. Durch Analyse zweier Peptide, die an denselben Positionen einfach markiert sind, könnten die g - und A -Werte im voraus bestimmt werden und die Zahl der Parameter wieder erniedrigt werden. Derartige Proben lagen im Rahmen dieser Arbeit nicht vor. Weiterhin ist DMSO sehr hygroskopisch. Es ist nicht auszuschließen, daß bei der Probenbereitung Wasser aufgenommen wurde, welches starke Wasserstoffbrückenbindungen mit der Nitroxidgruppe bildet und den g_x -Wert in der beobachteten

Größenordnung absenkt. Dafür spricht die große Ähnlichkeit des Spektrums von mr57 in $\text{CHCl}_3/\text{DMSO}$ mit dem in H_2O . Andererseits wurden die Proben identisch präpariert und die Spektren von mr18 unterscheiden sich in den verschiedenen Lösemitteln deutlich. Auch die magnetischen Parameter von TEMPO in $\text{CHCl}_3/\text{DMSO}$ entsprechen Werten, die für Spinlabel in aprotischen und wenig polaren Lösemitteln gefunden wurden [89]. Damit ist die Absenkung der g_x -Werte durch Wasser unwahrscheinlich und wird auf interne Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäureseitenketten zurückgeführt.

Das Spektrum von mr18 zeigt die größte Ähnlichkeit mit der Simulation der 3_{10} -Helix. Mit ELDOR-Experimenten wurde ein ähnliches Peptid in $\text{CHCl}_3/\text{DMSO}$ einer 2_7 -Konformation zugeordnet [69]. Diese Konformation kann für mr18 ausgeschlossen werden. Aufspaltungen im X-Band Spektrum wären bei einem Abstand, wie sie die Label in einer 2_7 -Helix einnehmen, nicht erkennbar.

Die Strukturstabilisierung durch aprotische und wenig polare Lösemittel wird durch ihre geringe Fähigkeit begründet, polare Strukturen zu solvatisieren. Damit stehen sie nicht in Konkurrenz zu Intra-Peptid Wasserstoffbrückenbindungen. Organische Lösemittel werden meist mit einer Vakuum-Umgebung gleichgesetzt für die theoretisch [90] wie experimentell [91] π -helikale Strukturen gefunden werden. Neben den Carbonyl- und Amidgruppen, welche die Helixstruktur stabilisieren, treten am Ende von Peptiden diese polaren Gruppen ohne Wechselwirkungspartner auf. In kurzen Peptiden ist diese Randbedingung nicht mehr vernachlässigbar. Die Stabilität der Struktur steigt bei Solvatisierung durch die Umgebung. In einer π -Helix aus 15 Aminosäuren stehen zehn Wasserstoffbrückenbindungen acht unsolvatisierten Gruppen gegenüber, in einer α -Helix beträgt dieses Verhältnis 11:7, in einer 3_{10} -Helix 12:4. Dies würde für die Stabilisierung einer 3_{10} -helikalen Struktur in unpolaren Lösemitteln sprechen.

In TFE/ H_2O zeigen die Peptide schmalere Linien und eine andere Struktur als in H_2O . Generell gelten fluorinierte Lösemittel in der Literatur als strukturstabilisierend [84, 85, 86]. Einige Arbeiten an doppelt TOAC markierten Peptiden klassifizieren fluorinierte Alkohole (TFE/HFIP) als struktur-destabilisierend [73]. In der hier vorliegenden Arbeit stehen die beiden TOAC-Label in *de novo* Peptiden in gut definierten Orientierungen zueinander. Die Strukturstabilisierung durch TFE/ H_2O wird z.T. auf die verringerte Dielektrizitätskonstante und die dadurch ausbleibende Solvataion der intermolekularen Wasserstoffbrücken zurückgeführt [85]. Mit denselben Argumenten wird die Struktur-

stabilisierung durch organische Lösemittel begründet. Die hier untersuchten Peptide nehmen in TFE/H₂O und CHCl₃/DMSO jedoch verschiedene Konformationen an. Der Unterschied in den Dielektrizitätskonstanten der beiden Lösemittelgemische ist zu gering, um für den Konformationsunterschied verantwortlich zu sein.

Der Größenverlauf der dipolaren Kopplung der aus den X-Band Spektren der Peptide in TFE/H₂O (Abb. 3.12) entnommen werden kann, weist große Kopplungen bei mr58, mr59 und mr18 auf und stimmt daher qualitativ mit dem einer α -Helix überein. Das W-Band Spektrum von mr57 ist der Simulation einer α - sowie einer π -Helix ähnlich. Die Spektren von mr18 wurden dagegen mit einem Parametersatz simuliert, der keiner theoretischen Helix entspricht.

Dieser scheinbare Widerspruch kann durch das vereinfachte Modell, welches zur Definition von Helixtypen verwandt wurde, erklärt werden: Die Helixtypen sind über die Intervalle der Wasserstoffbrückenbindungen im Proteinerückgrat definiert. In einem Ramachandranplot sind weite Bereiche über die Rückgratwinkel ϑ und ϕ einem Helixtyp zugeordnet. Nur die Werte im energetischen Minimum, berechnet für ein Polyalanin werden als Definition für die Helixtypen angegeben. Durch die polaren und sterisch anspruchsvollen Seitenketten in den mr-Peptiden ist eine Abweichung von den 'Lehrbuchwerten' für ϑ und ϕ nicht verwunderlich. Diese Abweichung, über acht Aminosäuren fortgesetzt, führt zu relativer Orientierung der Spinlabel, die keine Ähnlichkeit mehr mit der Orientierung in einem Polyalanin aufweisen.

Dies zeigt, daß der hier vorgestellte Vorschlag, Sekundärstrukturen aus den geometrischen Parametern eines Spinlabelpaars abzuleiten nicht auf diese einfache Weise durchführbar ist. Zwar können Abstand und Orientierung der beiden Spinlabel eines zweifach markierten Peptids sehr genau ermittelt werden, es existieren jedoch keine Vergleichswerte, welche die Sekundärstrukturen beschreiben. Solche Vergleichswerte wären stark von den Seitenketten des Peptids abhängig und daher nicht allgemein tabellierbar. Moleküldynamiksimulationen des Peptids mit expliziter Lösemittelumgebung könnten für weitere Arbeiten einen besseren Zusammenhang zwischen der durch EPR bestimmten Orientierung der Spinlabel und der Geometrie des Proteins liefern.

3.2.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel sollte gezeigt werden, wie die Bestimmung der relativen Orientierung zweier Spinlabel zu Analyse der Peptidstruktur beitragen kann.

Es wurde ein Peptid an unterschiedlichen Positionen mit dem starren Spinlabel TOAC markiert und durch die Wahl des Lösemittels wurden verschiedene Sekundärstrukturen induziert. Prinzipiell genügt ein Paar von TOAC-Spinlabeln, um eine definierte Sekundärstruktur eines Peptids zu bestimmen. Zwischen den beiden Labeln sollten mindestens zwei Aminosäuren liegen, da sonst die Struktur zu sehr durch den helixstabilisierenden Einfluß des TOAC bestimmt wird. Abstand und Orientierung der beiden Spinlabel können sehr genau bestimmt werden. Der Rückschluß auf die Proteinstruktur durch einen Vergleich mit Peptiden in idealen Sekundärstrukturen hat sich als unzureichend erwiesen. In Zukunft sollten Modellierungen der Helixstruktur die Messungen ergänzen.

Es muß berücksichtigt werden, daß sich g_x und A_{zz} der Spinlabel durch peptidinterne Wasserstoffbrücken gegenüber den Werten im Lösemittel verschieben können. Für eine eindeutige Analyse ist es sinnvoll, g - und A -Werte im Peptid mit jeweils einfacher Markierung an beiden Positionen zu bestimmen.