

1 Einleitung

1.1 Proteine

Leben, wie wir es kennen, ist ohne Proteine nicht möglich. Proteine erfüllen in den verschiedensten Organismen ihre Funktionen und zeigen dabei ein erstaunliches Spektrum von Eigenschaften.

Im einfachsten Fall, können Proteine rein strukturelle Aufgabe übernehmen, wie das Kollagen (Sehnen), das Keratin (Haare) oder viele Proteine des Zellskeletts. Naturgemäß sind solche Proteine unlöslich. Weitaus vielfältiger erfüllt die Gruppe der löslichen Proteine ihre Aufgaben in den verschiedenen Kompartimenten der Zellen oder auch im extrazellulären Raum. Die meisten dieser Proteine haben katalytische Eigenschaften (Enzyme), während andere eine Rolle in der Regulation biologischer Vorgänge, in der Signalübertragung oder in der Kommunikation zwischen Zellen spielen. Eine weitere Gruppe von Proteinen befindet sich in oder an den Membranen, die Zellen umgeben oder Zellkompartimente voneinander abtrennen. Sie wirken hier als Rezeptoren oder bilden Poren und Kanäle.

1.1.1 Proteinstruktur

Das Baugerüst ist für alle Proteine gleich. Sie werden aus bis zu 20 unterschiedlichen Aminosäuren aufgebaut, deren Sequenz, die so genannte Primärstruktur, in der DNA kodiert ist. Nach der Transkription erfolgt die Translation des genetischen Codes – die Synthese der Proteine aus den Aminosäuren durch die Ribosomen. Letztlich sind jedoch sowohl die physikalischen als auch die chemischen Eigenschaften eines Proteinmoleküls davon abhängig, wie sich die Kette von Aminosäuren nach der Synthese räumlich faltet. Man bezeichnet diese Konformation als die native Struktur des Proteins.

Alle natürlichen Aminosäuren weisen das gleiche Grundgerüst auf. Sie tragen an dem einen Ende eine Aminogruppe (NH_2) und an dem anderen Ende eine Carboxylgruppe (COOH). Das Rückgrat der Proteine (Polypeptide) entsteht dann durch Peptidbindungen zwischen diesen beiden funktionellen Gruppen. Aufgrund der stark dipolaren Natur der Peptidgruppe ist die Rotationsbarriere um die relativ kurze Carbonylstickstoffbindung (partieller Doppelbindungscharakter) so groß, dass die Faltungsmöglichkeiten der Peptidkette eingeschränkt sind (vergleiche auch Abschnitt 1.2.3.4 und Abbildung 6.3 auf Seite 106). Jede Peptidbindung liegt in einer Ebene und eine Faltung des Polypeptids ist deshalb nur durch Rotationen der Bindungen an den α -Kohlenstoffatomen, die die Peptidgruppen miteinander verbinden, möglich.

1 Einleitung

An die α -Kohlenstoffatome sind die Aminosäureseitengruppen gebunden. Die Eigenschaften dieser Seitengruppen beeinflussen die endgültige räumliche Struktur der Polypeptidkette entscheidend. Eine besondere Rolle spielt dabei ihr polarer bzw. unpolarer Charakter. So befinden sich Aminosäuren mit unpolaren Seitengruppen nahezu ausschließlich im Proteinkern, in stark hydrophober Umgebung. Die polaren Aminosäuren sind hingegen sowohl an der Oberfläche nativ gefalteter Proteine, in hydrophiler Umgebung, als auch im Proteinkern lokalisiert. Dort sind sie bevorzugt in Wasserstoffbrückenbindungen involviert.

Die schwachen Wechselwirkungen in Proteinen und zwischen Protein und Lösemittel sind elektrostatischer Natur, VAN-DER-WAALS-Kräfte¹ und Wasserstoffbrückenbindungen. Ausgehend von der Aminosäuresequenz oder auch Primärstruktur der Proteine, lassen sich drei weitere Grundstrukturen in Proteinen und Polypeptiden unterscheiden. Die Sekundärstruktur, die Tertiärstruktur und die Quartärstruktur. Hierbei schließt die Sekundärstruktur die lokal unterscheidbaren so genannten Sekundärstrukturelemente, wie das antiparallele und parallele β -Faltblatt, die α -Helix, Turn, etc. ein. Die Tertiärstruktur beschreibt die gesamte räumliche Struktur und die Quartärstruktur die Gesamtstruktur multimerer Proteine.

1.1.2 Proteinfaltung

Damit eine lineare Polypeptidkette der von der Evolution vorgesehenen Funktion gerecht werden kann, muss sie die dafür nötige Struktur einnehmen. Sämtliche Informationen, die sie dazu braucht, sind in der Aminosäuresequenz enthalten [2]. Dieser Sachverhalt konnte mittlerweile schon viele Male bestätigt werden – zumindest für vergleichsweise kleine, globuläre Proteine [3,4].² Die Aminosäuresequenz muss deshalb zwei Grundvoraussetzungen erfüllen: eine thermodynamische und eine kinetische [8]. Die Erste verlangt, dass das Protein eine einzigartige gefaltete Konformation annimmt, die unter physiologischen Bedingungen stabil ist. Die Zweite verlangt, dass diese native Struktur von einem denaturierten Zustand aus in einer „vernünftigen“ Zeit erreicht wird. Hierbei bedeutet „vernünftig“ schneller, als bei einer zufälligen Suche nach der nativen Konformation zu erwarten wäre.

Stellt man sich ein Protein aufgebaut aus 100 Aminosäuren vor, von denen jede drei mögliche Konfigurationen annehmen kann, so wären für die Polypeptidkette 10^{47} verschiedene Konformationen möglich. Würde nun der Wechsel von einer Konformation in die nächste nur 10^{-11} s dauern, so würde eine zufällige Suche nach der nativen Konformation 10^{36} s oder 10^{29} Jahre dauern. Dieses Erkenntnis veranlasste LEVINTHAL in den sechziger Jahren dazu, vordefinierte Faltungswege (*pathways*) für das Phänomen der Proteinfaltung vorzuschlagen [9]. Letztere erscheinen allerdings heute, angesichts der immensen Zahl möglicher Konformationen, die ein ungefaltetes Protein theoretisch annehmen könnte, ebenso unwahrscheinlich wie die zufällige

¹VAN-DER-WAALS-Kräfte werden häufig synonym mit LONDON'schen Dispersionskräften verwendet [1].

²Daneben hält der Organismus aber auch noch eine Vielzahl von Mechanismen bereit, die die Faltung von Proteinen beschleunigen [5,6] bzw. eine Fehlfaltung verhindern [7].

Suche nach der nativen Struktur. Aus diesem Grunde sind eine Vielzahl von theoretischen Modellen zur Lösung des „Faltungsproblems“ entwickelt worden. Ein wichtiges, heute weitgehend akzeptiertes Modell, stellt die unterschiedlichen Konformationen einer Polypeptidkette in Form von Energielandschaften der potenziellen Energie dar, mit dem Energieminimum beim nativ gefalteten Protein [10–12]. Im Gegensatz zu LEVINTHAL, schlägt dieses Modell viele mögliche, eher undefinierte Wege entlang eines trichterförmigen Energieprofils zur nativen Konformation vor.

Die Proteinfaltung konnte bereits erfolgreich von einigen Autoren am Computer simuliert werden. Hierbei werden die Polypeptidketten stark vereinfacht, statistisch als Rahmen- oder Gittermodelle aufgefasst [13, 14]. Generell setzt sich der Ablauf der Faltung nach heutiger Sicht aus einem konzertierten Zusammenziehen der hydrophoben Gruppen in den Proteinkern einerseits und der bereits sehr frühen Bildung von Sekundärstrukturen andererseits zusammen. Hierbei können unterschiedlich stark popularisierte Intermediatzustände durchlaufen werden, in denen das Protein seine native Struktur noch nicht erreicht hat. Diese wird jedoch in der Regel im weiteren Faltungsverlauf, aufgrund ihrer stärkeren Stabilisierung gegenüber den Intermediatzuständen, eingenommen [15, 16].

Partiell gefaltete Intermediate können den Faltungsprozess entscheidend beeinflussen. Leider ist zur Zeit noch nicht geklärt, ob sie für eine effiziente Faltung notwendig sind [17], ob sie nur kinetisch gefangene – *trapped* – Übergangszustände darstellen, die den Faltungsprozess bremsen [18], oder ob es sich bei den Intermediaten einfach nur um lokale Minima in einer „rauen“ Energielandschaft (siehe oben) handelt.

Die Zeitdauer von Proteinfaltungsreaktionen reicht von einigen Millisekunden für sehr kleine eindomänige Proteine bis hin zu Minuten und Stunden für große Proteine. Die molekularen Prozesse, die die Faltung beeinflussen, sind häufig nicht bekannt. In einigen Fällen ist es jedoch die *trans*→*cis*-Isomerisierungsreaktion der Prolinpeptidbindungen im Protein [19, 20]. Die Tertiärstrukturbildung verläuft meistens viel schneller als die Prolinisomerisierung, so dass sich im Faltungsverlauf Intermediatzustände langer Lebensdauer mit nicht-nativer Prolinkonformation untersuchen lassen [15, 21–23].

Durch die Entwicklung immer empfindlicherer experimenteller Methoden zur Untersuchung der Proteinfaltung (siehe Kapitel 1.1.3), ist man heute der experimentellen Bestätigung theoretischer Überlegungen einen großen Schritt nähergekommen [24, 25].

1.1.3 Methoden zur Untersuchung der Proteinstruktur und Proteinfaltung

Zum Verständnis der vielfältigen Eigenschaften und Funktionen von Proteinen, sind Analysen ihrer räumlichen Strukturen von besonderem Interesse. Ist man auch noch an ihrem komplexen dynamischen Verhalten interessiert, so erfordert das hohe Ansprüche an die analytischen Methoden. Bis heute gibt es keine Methode der Wahl, die es erlaubt alle Aspekte der Proteinstruktur und -faltung zu untersuchen. Vielmehr öffnet jede Methode dem Analytiker ein spezifisches Fenster, das mehr oder weniger tiefe Einblicke in bestimmte Teilbereiche der Proteinstrukturanalytik gewährt. Die

1 Einleitung

nun folgenden Abschnitte stellen deshalb kurz die wichtigsten Methoden der biophysikalischen Proteinstrukturanalytik vor (einen umfassenden Überblick liefern [26–28]).

1.1.3.1 Röntgenstrukturuntersuchungen

Die klassische Methode zur präzisen Bestimmung der Koordinaten der meisten Atome eines Proteinmoleküls ist die Röntgenstrukturanalyse. Grundvoraussetzung für die Anwendung dieser Methode sind perfekte Kristalle des zu untersuchenden Proteins. Die Qualität dieser Kristalle bestimmt ganz entscheidend die Auflösung der Kristallstruktur.

Leider lassen sich nicht alle Proteine in ausreichender Qualität kristallisieren. Hinzu kommt, dass die Kristallisation häufig ein recht langwieriges Unterfangen und deshalb für Routineuntersuchungen nicht praktikabel ist.

1.1.3.2 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie

In den letzten 15 Jahren hat sich die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) in der Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Molekülen als wertvolle Alternative neben der Röntgenbeugung etabliert. Gegenüber der Kristallographie hat sie den Vorteil, dass auch Proben in wässriger Lösung untersucht werden können.

Noch bis vor kurzem konnten nur kleine Proteine bis zu einer Größe von ca. 10–15 kDa strukturell aufgelöst werden. Durch die Einführung von stabilen Isotopenmarkierungen, der Entwicklung von multidimensionalen NMR-Pulssequenzen und leistungsfähigen Computerprogrammen gelang es dann auch, Molekülestrukturen bis hin zu 30 kDa mit hoher Auflösung zu routinemäßig zu bestimmen [29,30]. Bei ca. 40 kDa liegt zur Zeit die Grenze der NMR.³ Die Struktur großer Moleküle kann deshalb mit hoher Auflösung nur mit der Röntgenbeugung bestimmt werden.

Mit der NMR-Spektroskopie lassen sich auch schnelle Reaktionen, wie zum Beispiel die Proteinfaltung zeitaufgelöst messen. Hierbei finden vor allem *pulse-labeling*-Experimente Anwendung, mit denen in Zeitinkrementen von 5 ms bis 2 s gemessen werden kann. Die Strukturbildung wird dabei durch Variation des Rückfaltungszeitpunktes verfolgt [32].

Will man die Rückfaltung in höherer Strukturauflösung verfolgen, so sind zeitaufgelöste 1D- und 2D-NMR-Techniken notwendig. Die Totzeiten für solche Echtzeit NMR-Experimente reichen von 100 ms bis 4 s. Die Zeitauflösung für 1D-Experimente liegt bei ca. 1 s pro Spektrum [15,32].

1.1.3.3 Spektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Bereich des Lichtes

Proteine und Polypeptide können auch im ultravioletten und sichtbaren (UV/Vis)-Bereich des elektromagnetischen Spektrums Photonen absorbieren und emittieren.

³Es gibt bereits erste Fortschritte mit neuen NMR-Techniken zur Überwindung dieser Grenze [31].

Die Absorption des Lichtes basiert auf Elektronenübergängen von σ -, π - und n -Elektronen in angeregte Zustände. Die Emission von Fluoreszenzstrahlung basiert auf Übergängen aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Singulettzustandes S_{10} eines Moleküls in unterschiedliche Schwingungsniveaus des Singulettgrundzustandes S_{0n} ($n = 0, 1, 2, 3, \dots$). Die dazu erforderliche Anregung erfolgt in der Regel im UV/Vis-Bereich.

Im fernen UV-Bereich von 190 bis 200 nm absorbieren in erster Linie die Peptidbindungen der Proteine. Da die Delokalisation der Elektronen in der Peptidbindung stark von der Geometrie des Polypeptids abhängig ist, ist dieser Bereich empfindlich für Konformationsänderungen. Die Aminosäureseitenketten absorbieren hauptsächlich im nahen UV-Bereich zwischen 230 und 300 nm. Da in diesem spektralen Bereich die Konformation der Polypeptidkette so gut wie keine Rolle spielt, wird er gerne zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen herangezogen (280 nm).

Enthalten Proteine so genannte prosthetische Gruppen, wie zum Beispiel komplexe Metallionen, so können sie sogar im Vis-Bereich absorbieren. Solche Chromophore sind im Allgemeinen sehr empfindlich gegenüber strukturellen Änderungen im Protein und machen sie daher zu empfindlichen Sonden für die Untersuchung der Proteinfaltung.

Als natürliche Fluorophore in Proteinen dienen die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Diese werden, ebenso wie an das Protein bindende Fluoreszenzmarker, als empfindliche Sonden ihrer Mikroumgebung in der Fluoreszenzspektroskopie verwendet. Im Gegensatz zu Fluoreszenzmarkern verändern natürliche Fluorophore nicht die Eigenschaften der Proteine.

Die UV/Vis-Spektroskopie und insbesondere die Fluoreszenzspektroskopie sind empfindliche Methoden zur Untersuchung der Proteinfaltung. Ein besonderer Vorteil der Fluoreszenzspektroskopie ist, dass diese mit sehr geringen Probenmengen auskommt. Beide Methoden zeichnen sich durch eine hohe Zeitauflösung aus, wenn ein kinetisches Experiment wellenlängenselektiv verfolgt wird. Messungen der zeitaufgelösten Fluoreszenz sind bis in den Nano- und Picosekundenbereich experimentell durchführbar. Der Zeitbedarf für die Aufnahme eines gesamten Spektrums ist weitaus höher. Moderne Geräte mit Diodenarray-Detektoren schaffen dies aber schon in weit weniger als einer Sekunde.

1.1.3.4 Circular dichroismus

Unter Circular dichroismus (CD) versteht man die unterschiedliche Absorption von rechts und links circular polarisiertem Licht durch eine Probe im UV/Vis-Bereich des elektromagnetischen Spektrums.

Circular dichroismus wird bei der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit chiralen Molekülen beobachtet. Proteine besitzen viele chirale Zentren und eignen sich deshalb sehr gut für CD-Untersuchungen in wässriger Lösung. Bei allen Aminosäuren, mit der Ausnahme von Glycin, ist das der Peptidgruppe benachbarte α -Kohlenstoffatom asymmetrisch substituiert und absorbiert deshalb circular polarisiertes Licht. Einen weiteren Beitrag zu Asymmetrien in den Elektronenkonfigurationen der Pep-

1 Einleitung

tidbindungen und den Seitenketten aromatischer Aminosäuren liefert die individuelle Konformation der Proteinkette. CD-Spektren von Proteinen sind deshalb ebenso spezifisch wie ihre Faltung.

Protein-CD-Spektren lassen sich in zwei charakteristische spektrale Bereiche aufteilen: In einen Bereich von 160 bis 230 nm, den so genannten Peptidbereich, und einen Bereich von 230 bis 300 nm, in dem vor allem die aromatischen Aminosäuren absorbieren. Die CD-Spektren von Proteinen im Peptidbereich unterhalb von 250 nm sind besonders empfindlich für die Detektion von Sekundärstruktur. Dies gilt im Speziellen für die Charakterisierung von α -helikalen Anteilen.

Typische CD-Spektren werden mit handelsüblichen dispersiven Geräten im Bereich von 260 bis 178 nm innerhalb von 30 bis 60 Minuten aufgenommen.

1.1.3.5 Fourier Transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie

FTIR-spektroskopische Methoden zur Proteinstrukturuntersuchung werden eingehend in den Abschnitten 1.2 und 4.3 beschrieben.

1.1.3.6 Weitere Methoden

Enzymatische Aktivität Enzyme haben in der Regel im nativ gefalteten Zustand ihre größte Aktivität. Diese Tatsache machen sich eine Reihe von Methoden zu Nutze, die die enzymatische bzw. immunologische Aktivität von Enzymen bestimmen. So lassen sich (allerdings mit schlechter Zeitauflösung) späte Phasen der Proteinfaltung, in denen die native Konformation schon fast erreicht ist, verfolgen. Es ist ebenso möglich milieuingezogene Veränderungen der Proteinstruktur auf diese Weise zu untersuchen [21, 33].

Dynamische Lichtstreuung Zur Bestimmung des Translationsdiffusionskoeffizienten von Proteinen und anderen Makromolekülen, der letztendlich von der Molmasse und dem STOKES'schen Radius der Moleküle abhängt, findet die Dynamische Lichtstreuung Anwendung. Sie eignet sich auch zur Verfolgung von Änderungen dieser Größen, wie sie zum Beispiel bei der Bildung von Aggregaten oder Amyloidstrukturen auftritt [34].

Kalorimetrie Thermodynamische Informationen über Proteine lassen sich mit der Kalorimetrie ermitteln. Insbesondere werden hiermit Phasenübergänge (Scanning-Kalorimetrie) und Protein-Ligand-Wechselwirkungen untersucht (Mischungs- und Titrationskalorimetrie) [35, 36].

1.1.4 Ribonuklease T1

Wie bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben, sind kleine, globuläre Proteine häufig dazu in der Lage, selbständig aus einem denaturierten Zustand in ihren ganz spezifischen, nativen Zustand zu falten. Sie eignen sich deshalb hervorragend als Modellproteine für *in vitro* Experimente zur Proteinfaltung.

Ein Protein, das diesen Anforderungen gerecht wird, ist das Enzym Ribonuklease T1 (RNase T1), das 1957 erstmals aus Takadiastase, einem kommerziell verfügbaren Rohextrakt des Kulturmediums von *Aspergillus oryzae*, einem Reisschimmelpilz, isoliert wurde [37]. Spätestens nach der Entwicklung eines effizienten Expressionssystems in *E. coli* [38], diente RNase T1 vielen Forschern als Modellprotein für die Proteinfaltung.

1.1.4.1 Struktur und Funktion

Das thermodynamisch sehr stabile Eindomänenprotein RNase T1 besteht aus 104 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 11 085 Da. Es katalysiert die Spaltung von Phosphodiesterbindungen in RNA-Molekülen. Dabei zeigt die RNase T1 eine hohe Spezifität für Guanin [39, 40].

Die Tertiärstruktur des Proteins mit dem Inhibitor 2'-GMP im Komplex wurde erstmals 1982 mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt [41]. Anfang der neunziger Jahre wurde es dann sogar möglich die Struktur ohne Inhibitor mit einer höheren Auflösung zu bestimmen [42].

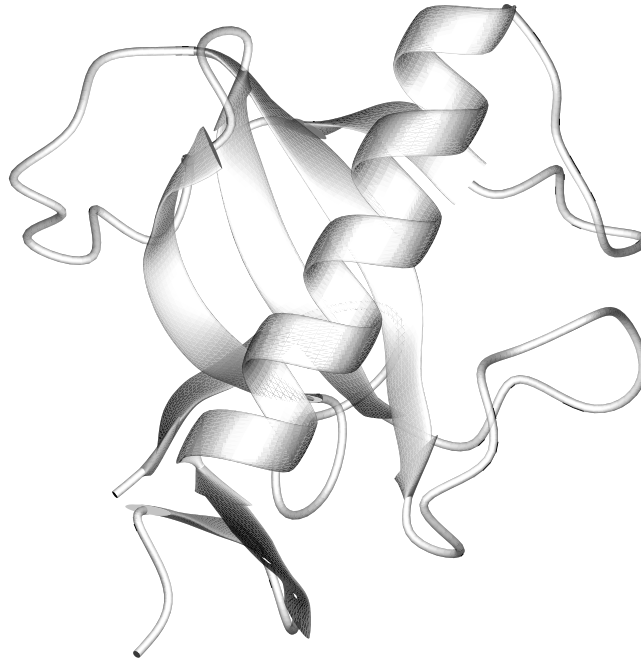


Abbildung 1.1: Kristallstruktur von RNase T1 (Datei 9RNT.pdb) [42]. β -Faltblattstrukturen sind als Pfeile und die α -Helix ist als Spirale dargestellt. Die Abbildung wurde mit der Software MOLMOL 2.5.1 erstellt.

Abbildung 1.1 zeigt die dreidimensionale Struktur der RNase T1. Das Protein enthält ein kurzes doppelsträngiges antiparalleles β -Faltblatt, auf das eine viereinhalb Windungen lange α -Helix und ein zweites antiparalleles β -Faltblatt, das aus fünf Strängen zusammengesetzt ist, folgt. Das fünfsträngige Faltblatt ist stark verdrillt

1 Einleitung

und bildet eine fassähnliche Struktur. Durch Bildung des Enzym-Substrat Komplexes wird diese Struktur vervollständigt, indem der gebundene RNA-Strang den fehlenden sechsten Strang ersetzt [43]. Die Struktur wird zusätzlich durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert, von denen eine den C- und N-Terminus des Proteins verknüpft und die zweite eine Verknüpfung zwischen den beiden Faltblättern herstellt. Schließlich werden die Verbindungen zwischen den Sekundärstrukturelementen mit mehr oder weniger langen Schleifen gebildet, die Turnstrukturen enthalten.

Ein besonderes Augenmerk sei auf die Proline an den Positionen 39, 55, 60 und 73 gerichtet (siehe hierzu auch Abbildung 6.1 auf Seite 97): im nativen Protein gehen Pro 39 und Pro 55 *cis*-Polypeptidbindungen voraus, wohingegen sich Pro 60 und Pro 73 in der *trans*-Konformation befinden.

1.1.4.2 Stand der Forschung

Die RNase T1 dient schon seit einiger Zeit vielen Forschern als Modellprotein für zeitaufgelöste Faltungsstudien. Die Rückfaltung wurde hierbei aus einem chaotrop bzw. Temperatur-denaturierten Zustand untersucht. Als Methoden zur zeitaufgelösten Studie der Rückfaltungskinetiken dienten UV/Vis-, Fluoreszenz-, CD- [21, 22, 33, 44, 45], NMR- [15, 46] und FTIR-spektroskopische Methoden [23, 47].

Die Untersuchungen wurden sowohl am RNase T1-Wildtyp durchgeführt als auch an den Varianten W59Y und S54G/P55N. Unter physiologischen Bedingungen konnten für den Wildtyp drei Faltungsphasen aufgelöst werden: eine sehr schnelle, die innerhalb einer Sekunde abgeschlossen ist, gefolgt von zwei langsamen, die Minuten bis Stunden andauern. Rückfaltungsexperimente mit den beiden Varianten ergaben eine einfachere und schnellere Kinetik als beim Wildtyp. Ähnliches konnte beim Wildtyp bei Rückfaltungsexperimenten vom chaotrop denaturierten Zustand in einen Zustand, mit einer leicht erhöhten Restkonzentration von chaotropem Agens [48] bzw. bei einem Temperatur-induzierten Rückfaltungsexperiment in einen Zustand mit einer Temperatur dicht unter dem Schmelzpunkt des Proteins, beobachtet werden [23].

Wie bereits in Abschnitt 1.1.4.1 beschrieben, verfügt die RNase T1 über vier Proline von denen im nativen Zustand je zwei eine *cis*- und je zwei eine *trans*-Konformation einnehmen. Im denaturierten Zustand befinden sich aus thermodynamischen Gründen alle vier Proline fast ausschließlich in der *trans*-Konformation (Verhältnis 8 zu 1). Für die Rückfaltung der RNase T1 bedeutet dies, dass zwei Proline von *trans* nach *cis* isomerisieren müssen, nämlich Pro 39 und Pro 55. Bei der Variante W59Y ist diese Isomerisierung für Pro 39 aus sterischen Gründen begünstigt, wohingegen sie bei der Variante S54G/P55N ganz entfällt. Weil nun diese beiden Varianten schneller und mit einer einfacheren Kinetik rückfalten als der Wildtyp, kann geschlossen werden, dass die Prolin *trans*→*cis*-Isomerisierung ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt bei der Rückfaltung der RNase T1 ist bzw. die Prolinisomerisierung und die Proteinfaltung kinetisch gekoppelt sind [19, 20]. Diese Tatsache wird unterstützt durch Rückfaltungsexperimente unter destabilisierenden Bedingungen, bei denen die Rückfaltungstemperatur nahe beim Phasenübergangsbereich liegt. Die Prolin *trans*→*cis*-Isomerisierung ist unter solchen Bedingungen beschleunigt und das

Enzym faltet deshalb schneller in seinen nativen Zustand zurück als unter physiologischen bzw. stark stabilisierenden Bedingungen.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Prolinomerisierung durch den Einsatz des Enzyms Prolylisomerase beschleunigt werden kann. Dieses Enzym vermag die Isomerisierungsreaktion zu katalysieren, so dass die RNase T1 schneller in ihren nativen Zustand rückfaltet [21].

1.2 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie

Im Spektrum der elektromagnetischen Strahlung nimmt die Infrarotstrahlung (IR) den Bereich von 12 800 bis 10 cm^{-1} ein. Das Spektrum des infraroten Lichtes gliedert sich wiederum in einen Bereich der nahen, der mittleren und der fernen Infrarotstrahlung. Einen Überblick gibt Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1: Übersicht der verschiedenen spektralen Regionen im infraroten Bereich elektromagnetischer Strahlung [49]

Bereich	Wellenlänge, λ (μm)	Wellenzahl ^a , $\bar{\nu}$ (cm^{-1})	Frequenz, ν (Hz)
nahes Infrarot	0,78 – 2,5	12 800 – 4 000	$3,8 \cdot 10^{14}$ – $1,2 \cdot 10^{14}$
mittleres Infrarot	2,5 – 50	4 000 – 200	$1,2 \cdot 10^{14}$ – $6,0 \cdot 10^{12}$
fernes Infrarot	50 – 1000	200 – 10	$6,0 \cdot 10^{12}$ – $3,0 \cdot 10^{11}$
gewöhnlich verwendet	2,5 – 15	4 000 – 670	$1,2 \cdot 10^{14}$ – $2,0 \cdot 10^{13}$

^aDie Wellenzahl $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$ und damit direkt proportional zur Energie und Frequenz der Strahlung.

Naturgemäß ist die Energie der IR-Strahlung nicht hoch genug, um Elektronenübergänge anzuregen, wie es in der Absorptionsspektroskopie im ultravioletten (UV) und sichtbaren (Vis) Bereich des Lichtes der Fall ist. Vielmehr werden durch die Absorption im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums Molekülschwingungen und -rotationen angeregt. Diesem physikalischen Effekt verdankt die Infrarotspektroskopie ihre weite Verbreitung in der qualitativen und quantitativen Analytik anorganischer und organischer Materie.

Die nun folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die physikalischen Grundlagen der Schwingungsspektroskopie, die Messtechnik der FOURIER-Transform-Infrarot-(FTIR)-Spektrometrie und die Anwendung dieser Methode zur Untersuchung von Proteinstrukturen.

1.2.1 Physikalische Grundlagen der FTIR-Spektroskopie

Die Grundvoraussetzung für die Absorption infraroter Strahlung ist die Wechselwirkung eines sich ändernden Dipolmoments mit dem elektrischen Vektor des Lichts. Dies geschieht im einfachsten Fall bei der Schwingung eines zweiatomigen, polaren Moleküls. Betrachtet man nun die Atome des Moleküls als Punktmassen, so lässt sich die Schwingung zunächst mit den Gesetzen der klassischen Mechanik beschreiben.

1 Einleitung

1.2.1.1 Potenzielle Energie eines harmonischen Oszillators

Wird eine an einer elastischen Feder befestigte Punktmasse um den Betrag y aus ihrer Gleichgewichtslage gebracht, dann ist nach dem HOOK'schen Gesetz die rücktreibende Kraft F in erster Näherung proportional der Auslenkung

$$F = -ky. \quad (1.1)$$

Für die Änderung der potenziellen Energie $dE = -F dy$ ergibt sich deshalb

$$dE = ky dy. \quad (1.2)$$

Eine anschließende Integration

$$\int_0^E dE = k \int_0^y y dy \quad (1.3)$$

liefert die Potenzialkurve des harmonischen Oszillators

$$E = \frac{1}{2}ky^2. \quad (1.4)$$

1.2.1.2 Schwingungsfrequenz

Die Frequenz einer Schwingung ergibt sich aus der schwingenden Masse m als Funktion der Zeit t . Mit $F = ma$ und $a = \frac{d^2y}{dt^2}$ ergibt sich aus Gleichung 1.1

$$m \frac{d^2y}{dt^2} = -ky. \quad (1.5)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung ist die periodische Funktion mit der natürlichen Schwingungsfrequenz ν_m

$$y = A \cos 2\pi\nu_m t. \quad (1.6)$$

Damit lässt sich die Schwingungsfrequenz ν_m eines zweiatomigen Moleküls nach dem mechanischen Modell ausrechnen als

$$\nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (1.7)$$

wobei die Masse m durch die reduzierte Masse $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ ersetzt ist. Die Schwingungsfrequenz ν_m ist danach umso höher, je größer die Kraftkonstante k ist, das heißt je stärker die Bindung ist. Weiter folgt: Je kleiner die schwingenden Atommassen sind, umso höher liegt die Frequenz ν_m der Schwingung (vergleiche Tabelle 1.2 auf Seite 18).

1.2.1.3 Quantenmechanische Betrachtung der Schwingung

Die Gleichungen der Mechanik sind nicht ausreichend, um das Verhalten von Teilchen atomarer Dimensionen zu beschreiben. In den Gleichungen 1.4 und 1.7 findet zum Beispiel die diskrete Natur der molekularen Schwingungsenergien keine Berücksichtigung. Die quantenmechanische Wellenfunktion zur Beschreibung der potenziellen Energie lässt sich im einfachsten Fall aus dem Konzept des harmonischen Oszillators ableiten und nimmt die Form

$$E = \left(v + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1.8)$$

an. Hierbei sind h die PLANCK'sche Konstante und v die Schwingungsquantenzahl, die neben Null nur positive ganze Zahlen annehmen kann. Mit Gleichung 1.7 ergibt sich

$$E = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\nu_m. \quad (1.9)$$

Schwingungsübergänge sind nur zwischen benachbarten Energieniveaus möglich (Auswahlregel $\Delta v = \pm 1$) und können nur dann herbeigeführt werden, wenn die eingestrahlte Energie ΔE exakt der Energiedifferenz der Schwingungsquantenzustände entspricht.⁴ Diese Differenz ist für alle benachbarten Energieniveaus identisch.

1.2.1.4 Anharmonischer Oszillator

Qualitative Überlegungen machen deutlich, dass die Beschreibung molekularer Schwingungen mit dem Modell des symmetrischen harmonischen Oszillators nicht perfekt ist. Die Abstoßung der Kerne mit zunehmender Annäherung und die Dissoziation von Bindungen bei hoher Energie finden keine Berücksichtigung. Der Natur der Schwingungen besser gerecht wird der asymmetrische anharmonische Oszillator. Die Energieniveaus sind nicht mehr äquidistant sondern werden zur Dissoziationsgrenze hin immer kleiner. Hinzu kommt, dass die Auswahlregel $\Delta v = \pm 1$ nicht mehr korrekt eingehalten wird. Übergänge mit $\Delta v = \pm 2$ oder ± 3 sind nun möglich und werden im Spektrum als Obertonschwingungen der zwei- bis dreifachen Frequenz der Grundschwingung beobachtet (siehe auch Tabelle 1.2 auf Seite 18). Die Population dieser Schwingungszustände ist jedoch gering und die Intensitäten im Spektrum deshalb entsprechend niedrig.

Bei Raumtemperatur befinden sich die meisten Schwingungen im Grundzustand $v = 0$. Bei diesen Energien lässt sich die Potenzialkurve des anharmonischen Oszillators sehr gut mit der des harmonischen Oszillators annähern.

1.2.1.5 Schwingungsspektren vielatomiger Moleküle

Es können nur solche Schwingungsformen in Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung treten, bei denen die Moleküle keiner Translationsbewegung unterlie-

⁴Natürlich vorausgesetzt, die Schwingung bewirkt eine Änderung des Dipolmoments.

1 Einleitung

gen.⁵ Zweiatomige Moleküle können demnach nur eine einzige Schwingungsbewegung ausführen. Die Anzahl der so genannten Schwingungsfreiheitsgrade Z mehratomiger Moleküle mit N Atomen, hängt von ihrer jeweiligen Geometrie ab. Allgemein besitzen sie (nach Abzug der Freiheitsgrade, die zu einer Translations- bzw. Rotationsbewegung führen) $Z = 3N - 6$ Schwingungsfreiheitsgrade. Sind sie jedoch linear, so reduziert sich die Anzahl nur auf $Z = 3N - 5$. Die auf diese Weise zu berechnende Gesamtheit der Schwingungen eines Moleküls bezeichnet man auch als seine Normalschwingungen.

Die tatsächlich beobachtete Anzahl von Banden in IR-Spektren weicht häufig von den berechneten Normalschwingungen ab. Einzelne Schwingungen können miteinander auf verschiedene Weise koppeln und dadurch die Frequenzen der Normalschwingungen stark verändern. Ebenso können Obertöne (siehe Abschnitt 1.2.1.4) und Resonanzeffekte (siehe Abschnitt 1.2.3.1) auftreten. Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass nur solche Schwingungen IR-aktiv sind, bei denen sich das Dipolmoment verändert. Verändert sich während der Schwingung auch oder nur die Polarisierbarkeit des Moleküls, dann sind die entsprechenden Schwingungen RAMAN-aktiv. Ein umfassendes schwingungsspektroskopisches Bild von Molekülen liefern deshalb RAMAN- und IR-Spektren nur gemeinsam.

1.2.2 FTIR-Spektrometrie

Die Messgröße in der IR-Spektroskopie ist die Absorption A bzw. Extinktion E (auch Absorbanz).⁶ Sie berechnet sich aus dem dekadischen Logarithmus des Quotienten aus der Intensität der Referenz I_0 und der Probe I . Die Abhängigkeit der Extinktion einer Substanz von der Schichtdicke d und der Konzentration c beschreibt das LAMBERT-BEER'sche Gesetz

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon dc, \quad (1.10)$$

wobei ϵ den substanzspezifischen Extinktionskoeffizienten darstellt. Die Aufgabe eines IR-Spektrometers ist es nun, die von der Probe durchgelassene Strahlungsintensität in jedem Wellenlängenintervall zur Primärstrahlung ins Verhältnis zu setzen. In dispersiv arbeitenden IR-Spektrometern werden die einzelnen Wellenlängenintervalle mit Hilfe eines Monochromators und Spaltes erzeugt und anschließend durch die Probe geleitet. Die Extinktion wird dann aus diesem Messstrahl und einem Referenzstrahl bestimmt. Ganz anders geschieht die Spektrenaufnahme in modernen FOURIER-Transform-IR-Spektrometern.

⁵Eine Ausnahme bilden die so genannten Gitterschwingungen, die im langwelligen Bereich des IR-Spektrums stark absorbieren.

⁶Die generell synonyme Verwendung der Begriffe Absorption und Extinktion ist eigentlich nicht korrekt: Während die Absorption direkt mit dem molekularen Prozess der Wechselwirkung von Licht mit Materie verknüpft ist, bezeichnet die Extinktion einfach nur den aus dem Messstrahl entnommenen Anteil elektromagnetischer Strahlung (z. B. durch Streuung) [28].

1.2.2.1 Das Michelson-Interferometer

Drei große Vorteile gegenüber dispersiven IR-Spektrometern sprechen für die FTIR-Technik:

- Der JAQUINOT-Vorteil:
Ein FTIR-Spektrometer ist aus nur wenigen optischen Elementen aufgebaut (es gibt keinen Spaltmonochromator). Dies bedeutet, dass eine viel höhere Strahlungsintensität auf die Probe trifft und somit ein verbessertes Signal-/Rauschverhältnis erreicht wird.
- Der CONNES-Vorteil:
FTIR-Spektrometer zeichnen sich aufgrund einer Laser gestützten Kalibration durch eine hohe Wellenzahlgenauigkeit aus (besser als $0,01 \text{ cm}^{-1}$).
- Der Multiplex- oder FELGETT-Vorteil:
Die FTIR-Spektren werden über alle Frequenzen simultan aufgenommen. Dies ist ein enormer Geschwindigkeitsvorteil. Die Dauer für die Aufnahme eines Spektrums sinkt auf wenige Millisekunden.

Der physikalische Hintergrund dieser Vorteile ist das Kernstück der für die Experimente in dieser Arbeit verwendeten FTIR-Spektrometer – das MICHELSON-Interferometer. Ein Schema des MICHELSON-Interferometers ist in Abbildung 1.2 auf der nächsten Seite dargestellt. Die parallelisierte IR-Strahlung (in diesem Beispiel die monochromatische Strahlung mit der Wellenzahl $\bar{\nu}_m$) passiert zunächst die Probe und trifft dann auf einen Strahlteiler. Dieser reflektiert annähernd 50 % der Strahlung auf einen fixierten Spiegel, wohingegen die anderen 50 % auf einen sich mit gleichförmiger Geschwindigkeit vor und zurück bewegenden Spiegel durchgelassen werden. Das von den Spiegeln reflektierte Licht interferiert am Strahlteiler und wird anschließend detektiert. Das detektierte Signal ist eine Funktion der Spiegelbewegung und wird als Interferogramm bezeichnet.

Abbildung 1.3 auf Seite 15 zeigt die Interferogramme dieser mono- und einer polychromatischen Lichtquelle. Die Intensität I des monochromatischen Lichtes wird am Detektor in Form einer Kosinus-Kurve detektiert

$$I(x) = S(\bar{\nu}) \cdot \cos(2\pi\bar{\nu}x). \quad (1.11)$$

Hierbei beschreibt $S(\bar{\nu})$ die maximale Intensität des monochromatischen Lichtstrahls der Wellenzahl ($\bar{\nu}$) und x die Spiegelposition. Durch die Modulation am beweglichen Spiegel, weisen die am Strahlteiler interferierenden Strahlen eine Phasendifferenz $\Delta\bar{\nu}$ als Funktion der Spiegelbewegung auf. Dies führt dazu, dass am Detektor bei einer Phasendifferenz, die ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge bzw. Wellenzahl beträgt eine positive Interferenz detektiert wird, wohingegen es bei einer Phasendifferenz, die einem Vielfachen der halben Wellenlänge des monochromatischen Lichtes entspricht zu einer völligen Auslöschung der beiden Wellenzüge kommt.

Weitaus komplexer sind die Interferenzerscheinungen wenn polychromatisches Licht auf den Detektor trifft. Die höchste Intensität wird registriert, wenn der bewegliche

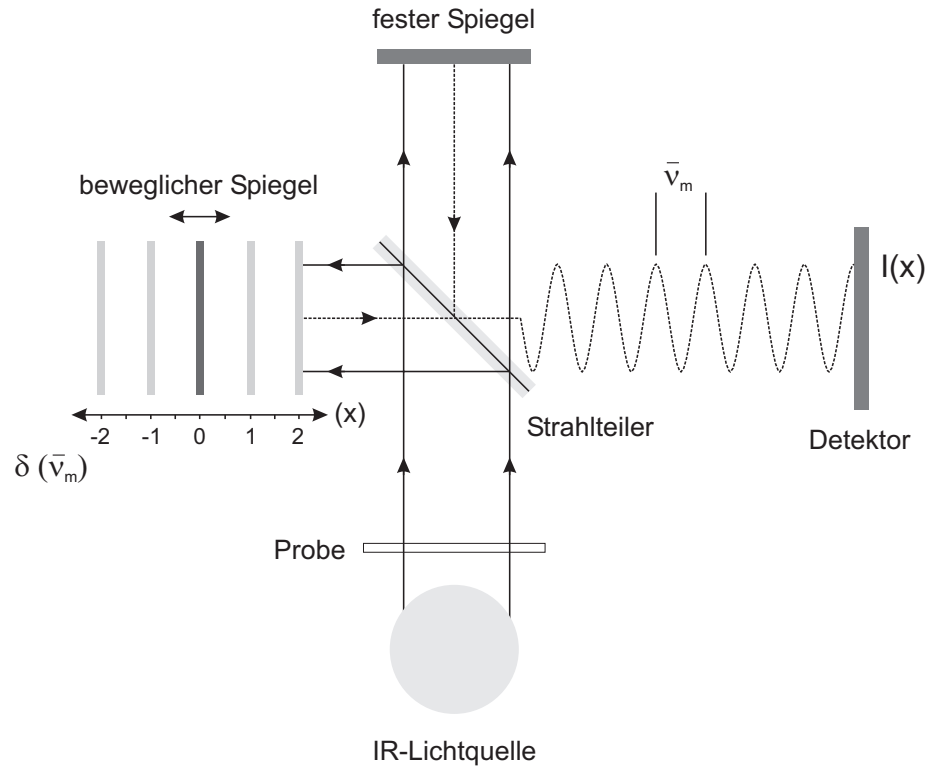


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau eines MICHELSON-Interferometers.

Spiegel den exakt gleichen Abstand zum Strahlteiler einnimmt ($\delta = 0$), wie der fixierte Spiegel. Sämtliche Wellenzüge schwingen dann in Phase und interferieren konstruktiv. Mit zunehmendem Abstand von dieser Position wird die Zahl destruktiv interferierender Wellenzüge immer grösser und die am Detektor registrierte Intensität nimmt ab.

1.2.2.2 Fourier-Transformation

Das Interferogramm $I(x)$ gibt die Intensität als Funktion des Spiegelweges wider, wohingegen das IR-Spektrum $S(\bar{\nu})$ die Intensität als Funktion der Wellenzahl beschreibt. Die mathematische Operation, die aus einem Interferogramm ein Spektrum erzeugt bezeichnet man als FOURIER-Transformation.

Moderne FTIR-Spektrometer zeichnen das Interferogramm nicht als kontinuierliches Spektrum auf, sondern in Form von N diskreten, äquidistanten Punkten des Abstands Δx . Gleichung 1.11 für monochromatische Strahlung wird deshalb zu

$$I(n\Delta x) = S(k\Delta\bar{\nu}) \cdot \cos(2\pi \cdot k\Delta\bar{\nu} \cdot n\Delta x) \quad (1.12)$$

wobei die Variablen x und $\bar{\nu}$ durch $n\Delta x$ und $k\Delta\bar{\nu}$ ersetzt sind. Soll nun das Interferogramm polychromatischer Strahlung als eine Summe von Sinus- und Kosinusfunktionen ausgedrückt, also in ein IR-Spektrum FOURIER-transformiert werden, so

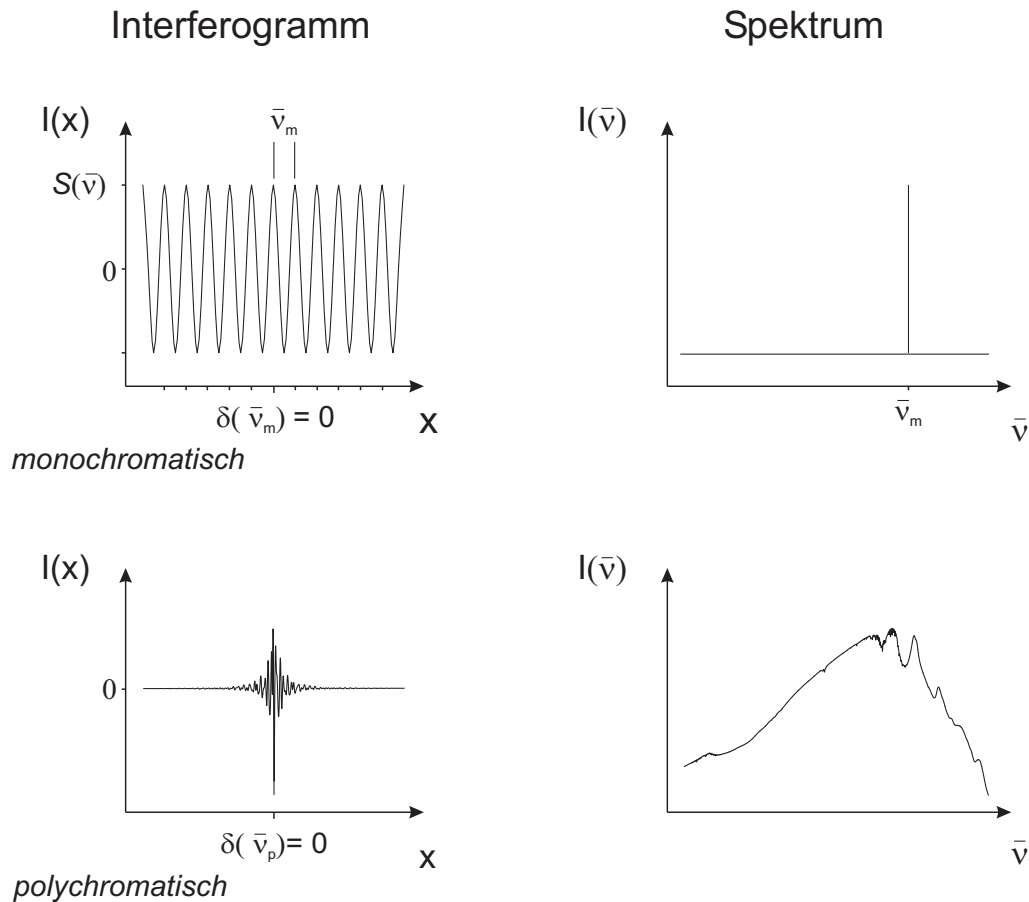


Abbildung 1.3: Interferogramme und die daraus FOURIER-transformierten Spektren einer monochromatischen (oben) und polychromatischen (unten) Lichtquelle.

geschieht das mit Hilfe der diskreten Variante der FOURIER-Transformation (DFT)

$$S(k\Delta\bar{\nu}) = \sum_{n=0}^{N-1} I(n\Delta x) \frac{i2\pi nk}{N}. \quad (1.13)$$

1.2.2.3 Mathematische Verfahren zur Beeinflussung der spektralen Auflösung von FTIR-Spektren

Die spektrale Auflösung von FTIR-Spektren hängt vom Spiegelweg ab. Je geringer der Abstand zwischen zwei Spektrallinien ist, desto größer ist der Abstand der modulierten, sich wiederholenden Muster im Interferogramm. Das RAYLEIGH-Kriterium besagt, dass zur Auflösung zweier Spektrallinien des Abstands d eine Weglänge von mindestens $1/d$ notwendig ist. Durch die Anwendung geeigneter mathematischer Verfahren lässt sich in vielen Fällen, in denen das Auflösungsvermögen eines Spektro-

1 Einleitung

meters aus gerätetechnischen- bzw. physikalischen Gründen beschränkt ist, trotzdem eine Auflösungsverstärkung erreichen:

Zero Filling Die DFT ist eine sehr gute Näherung der kontinuierlichen FT. Trotzdem kann es vorkommen, dass Banden mit einer sehr geringen Halbwertsbreite genau zwischen zwei Datenpunkten liegen und deshalb nur ungenügend aufgelöst werden. Im Allgemeinen erstrecken sich jedoch die Halbwertsbreiten der Banden über mehrere Datenpunkte und können ohne weiteres erfasst werden. Eine mathematische Erhöhung der Datenpunkte ist dennoch möglich mit Hilfe von *zero filling*. Hierbei wird das Interferogramm vor der FOURIER-Transformation mit Nullen verlängert. Mit dieser Prozedur wird die Anzahl der Messpunkte durch zusätzliche Punkte interpoliert, so dass die Banden im Spektrum besser aufgelöst erscheinen.

Apodisierung In jedem Spektrometer ist der optische Weg des beweglichen Spiegels begrenzt. Das Interferogramm wird am Ende des Spiegelweges förmlich abgeschnitten, was im FT-Spektrum zu Banden führt, deren Flanken mit einer gedämpften Oszillation abklingen. Diese Seitenbanden spiegeln keine reale spektrale Information wider, sondern sind vielmehr Artefakte. Hinzu kommt, dass die Gesamtintensität der spektralen Information auf die Hauptbande und diese Seitenbanden (*side lobes*) verteilt ist. Das mathematische Verfahren der Apodisierung sorgt nun dafür das Auftreten solcher Seitenbanden im Spektrum zu vermindern. Vor der FOURIER-Transformation wird das Interferogramm deshalb mit einer geeigneten Apodisierungsfunktion multipliziert, die es mehr oder weniger flach abklingen lässt. Leider geht eine hohe Dämpfung immer auch mit der einer Verminderung der spektralen Auflösung einher, so dass bei der Wahl der Apodisierungsfunktion immer ein Kompromiss zwischen Auflösung und Unterdrückung der Seitenbanden gefunden werden muss.

Fourier-Selbstentfaltung Die FOURIER-Selbstentfaltung (FOURIER *self deconvolution* (FSD)) ist eine auf der FT basierende Methode zur Erhöhung der apparenten Auflösung des Spektrums [50]. Sie basiert auf der Annahme, dass ein Spektrum $S(\bar{\nu})$ eine Konvolution ist, aus einem Spektrum $S(\bar{\nu})$ mit scharfen Linien und einer Funktion $L(\bar{\nu})$, die für die Verbreiterung der Linien verantwortlich ist. Das Prinzip der FSD ist nun, das Spektrum einer Inversen FT zu unterziehen, anschließend das Interferogramm $I(x)$ durch die linienverbreiternde Funktion zu teilen (zum Beispiel eine LORENTZ-Funktion) und schließlich das so veränderte Interferogramm wieder einer FT zu unterziehen. Das Ergebnis ist ein Spektrum mit einer künstlich verringerten Halbwertsbreite.

Angewandt auf experimentelle Daten ist die FSD längst nicht so trivial wie oben dargestellt. So kann man die Funktion für die korrekte Bandenform nur angenähert werden (LORENTZ, GAUSS oder eine Mischung aus beiden). Eine weitere Fehlerquelle resultiert aus dem spektralen Rauschen einerseits und Banden mit sehr geringer Halbwertsbreite im Spektrum (zum Beispiel die Rotationsschwingungsbanden des Wasser-

dampfes) andererseits. Diese werden ebenfalls durch die FSD verstärkt und können zu Fehldeutungen führen. Um der Verstärkung des spektralen Rauschens entgegenzuwirken, wird das Spektrum während jeder Dekonvolution mit einer ansteigenden Dekonvolutionsfunktion und gleichzeitig mit einer abfallenden Apodisierungsfunktion (in der Regel BLACKMANN-HARRIS) multipliziert. Das Produkt dieser Funktionen ist gleich Eins an dem Punkt des Interferogramms, an dem der Gangunterschied Null beträgt, und Null an den Flanken des zu berechnenden Intervalls.

Die Wahl geeigneter FSD Parameter hängt stark von den verwendeten Messparametern (Auflösung, *zero filling*, Apodisierung, etc.) ab und erfordert deshalb ein gewisses Maß an Erfahrung. Als Faustregel könnte gelten, nur solche Banden in FSD Spektren zur Auswertung heranzuziehen, die man auch in abgeleiteten Spektren (siehe unten) auflösen kann [51]. Ein großer Vorteil der FSD ist, dass sie die relativen integralen Intensitäten der Banden nicht verändert. FSD Spektren eignen sich deshalb hervorragend für quantitative Untersuchungen [52].

Ableitungen Insbesondere für die qualitative Untersuchung eignen sich Ableitungen von Spektren. Hierbei sei vor allem auf die zweiten Ableitungen hingewiesen, die Banden des Originalspektrums verstärken und in negativer Richtung abbilden. Da die Intensitäten der Banden im abgeleiteten Spektrum stark von den Halbwertsbreiten der entsprechenden Banden im Originalspektrum abhängen und weniger stark von deren Intensität, sind quantitative Aussagen, basierend auf dieser Methode nur mit Vorsicht zu treffen. Für qualitative Vergleiche von Spektren eignen sich die zweiten Ableitungen der Originalspektren jedoch hervorragend. Vor allem deshalb, weil sehr breite Banden, die häufig aus einer schlechten Kompensation des Untergrundes bzw. aus Instabilitäten in der Basislinie herrühren, sehr gut eliminiert werden. Außerdem lassen sich in Spektren der zweiten Ableitungen Bandenpositionen mit sehr hoher Genauigkeit auslesen.

Ebenso wie bei den FSD-Spektren, werden auch durch die Bildung der zweiten Ableitung Banden des Originalspektrums mit sehr geringer Halbwertsbreite, sowie spektrales Rauschen verstärkt. Auf Kosten der Auflösung kann deshalb auch bei Anwendung dieser Methode „geglättet“ werden.

1.2.3 Infrarotspektroskopische Untersuchungen an Proteinen

1.2.3.1 Amidbanden

RAMAN- und Infrarotspektren bieten die Möglichkeit, Molekülschwingungen in Peptiden und Proteinen zu untersuchen. Von besonderem Interesse ist dabei, aus den Schwingungsspektren dieser Moleküle auf ihre dreidimensionale Struktur zu schließen. Zu dieser Problematik wurden bereits in den fünfziger Jahren erste schwingungsspektroskopische Untersuchungen durchgeführt [53, 54].

Wie bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben wurde, entsteht das Rückgrat von Peptiden und Proteinen durch die Verknüpfung von Aminosäuren über Peptidbindungen. Durch die anschließende Ausbildung von inter- und intramolekularen Wasserstoff-

1 Einleitung

brückenbindungen erhalten diese Biopolymere dann ihre dreidimensionale Struktur. Es liegt deshalb nahe, zur Strukturuntersuchung die Absorptionen der Peptidbindung im Schwingungsspektrum genauer zu betrachten. Tabelle 1.2 fasst die neun infrarot-aktiven Schwingungen einer Peptidbindung, auch Amidbanden genannt, zusammen. Die experimentell ermittelten Amidbanden sind Überlagerungen der in Tabelle 1.2

Tabelle 1.2: Charakteristische Infrarot-Banden der Peptidbindung nach [55, 56].

Amid	Wellenzahl (cm^{-1})	Zuordnung der Schwingungsformen ^a
A	3 300	N–H (ν)
B	3 100	N–H (ν)
I	1 690–1 600	C=O (ν) 80 %; N–H (δ_i) 10 %; C–N (ν) 10 %
II	1 575–1 480	N–H (δ_i) 60 %; C–N (ν) 40 %
III	1 301–1 229	C–N (ν) 30 %; N–H (δ_i) 30 %; C=O (δ_i) 10 %; O=C–N (δ_i) 10 %
IV	767–625	O=C–N (δ_a) 40 %; andere Schwingungen
V	800–640	N–H (δ_a)
VI	606–537	C=O (δ_a)
VII	200	C–H (τ)

^aAbkürzungen: (ν) Streckschwingung, (δ_i) Deformationsschwingung in der Ebene der Amidbindung, (δ_a) Deformationsschwingung aus der Ebene der Amidbindung und (τ) Torsionsschwingung.

zusammengefassten Schwingungsmoden der einzelnen Amidgruppen, die aufgrund ihrer individuellen Mikroumgebung variieren und deshalb zu relativ breiten Banden im Spektrum führen. Die Amid-I- und Amid-II-Banden werden meistens herangezogen, um Strukturinformationen aus Proteinspektren zu erhalten. Erstere setzt sich hauptsächlich aus den C=O-Streckschwingungen der Amidgruppen zusammen, die schwach mit den in der Bindungsebene erfolgenden N–H-Beugeschwingungen und den C–N-Streckschwingung gekoppelt sind. Letztere beruht auf den N–H-Beuge- und C–N-Streckschwingungen der Amidgruppen im Protein. Die Amid-III bis VII-Banden sind für Strukturuntersuchungen eher unbedeutend. Die Amid-A- und Amid-B-Banden lassen sich zur Bestimmung des H/D-Austausches in den Proteinen heranziehen (siehe Abschnitt 1.2.3.2). Es handelt sich hierbei um Wechselwirkungen der Amid-N–H-Streckschwingungen mit dem ersten Oberton der Amid-II-Bande. Die gegenüber den ungestörten Bandenpositionen im Spektrum beobachtbare Resonanzaufspaltung, lässt sich durch FERMI-Resonanz der entsprechenden – zufällig entarteten – Schwingungsbanden erklären.

1.2.3.2 IR-Spektren von Proteinen in wässriger Lösung

Von großer Relevanz ist die Strukturuntersuchung von nativ gefalteten Proteinen in wässriger Lösung. Der Einsatz der IR-Spektroskopie zu diesem Zweck ist jedoch li-

mitiert durch die starken Absorptionsbanden des Wassers. Abbildung 1.4 zeigt, dass die H–O–H-Deformationsschwingungsbande um 1645 cm^{-1} stark im Bereich der besonders wichtigen Protein Amid-I-Bande absorbiert. Dieser Umstand zwingt zur

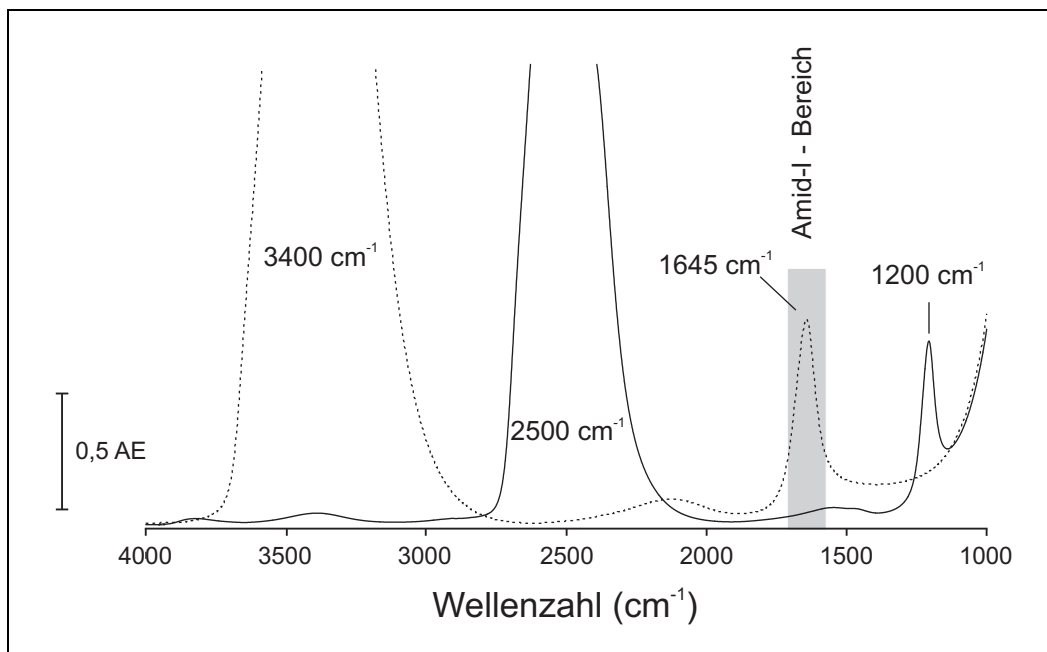


Abbildung 1.4: IR-Spektren von H₂O (gestrichelte Linie) und D₂O (durchgezogene Linie) in einer 8 µm Küvette. Die Banden bei 3400 und 2500 cm⁻¹ sind Überlagerungen der symmetrischen und antisymmetrischen Streckschwingungsbanden, die Banden bei 1645 und 1200 cm⁻¹ sind die Deformationsschwingungsbanden des H₂O bzw. D₂O. Der Amid-I-Bereich ist grau hinterlegt.

Verwendung von Küvetten mit geringer Schichtdicke ($< 12\text{ }\mu\text{m}$) um den Bereich, in dem der Detektor noch linear arbeitet, nicht zu überschreiten. Leider geht, nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz (siehe Formel 1.10), eine geringe Schichtdicke immer auch mit einer geringen Signalintensität einher. Zur Verbesserung des Signal-/Rausch-Verhältnisses, macht man sich deshalb den Isotopeneffekt von ²H₂O (D₂O) zu nutze. D₂O absorbiert im Bereich von 1700 bis 1500 cm⁻¹ relativ wenig und ist darum im Vergleich zum H₂O bedeutend besser als Lösemittel für die IR-Spektroskopie an Proteinen geeignet. In D₂O lassen sich Lösungen in einer Schichtdicke von ca. 50 bis 100 µm untersuchen [51]. Bei der Messung von Proteinen in D₂O-Lösungen ist es sinnvoll, dass alle Amidprotonen durch Deuteronen ausgetauscht werden. In manchen Fällen kann es jedoch von Nutzen sein, mit Hilfe der IR Spektroskopie den Austausch von Protonen durch Deuteronen zu verfolgen, weil hierdurch wichtige Informationen zur Proteinstruktur bzw. -stabilität erhalten werden können [57]. Naturgemäß ist der Einfluss der Deuterierung am deutlichsten bei den Schwingungen festzustellen, die

1 Einleitung

einen hohen Anteil an N–H-Streck- bzw. Biegeschwingungen aufweisen. Im für Proteinuntersuchungen wichtigen Frequenzbereich von 1500 bis 1750 cm^{-1} ist das die Amid-II-Bande, die sich um ca. 100 cm^{-1} von 1550 nach 1450 cm^{-1} niederfrequent verschiebt. Die größte niederfrequente Verschiebung durch die Deuterierung erfahren jedoch die Amid A und Amid B-Banden mit ca. 1000 cm^{-1} . Hingegen ist die Bandenform der hauptsächlich aus Carbonylstreckschwingungen bestehenden Amid-I-Bande nur indirekt durch die veränderten Lösebedingungen betroffen. Frequenzverschiebungen resultieren hier hauptsächlich aus einer modifizierten Wasserstoffbrückenbindungsstärke. Konventionsgemäß werden Amidbanden von Protein- bzw. Peptid-IR-Spektren in D_2O -Lösungen mit einem Strich gekennzeichnet, zum Beispiel Amid-I' und Amid-II'.⁷

1.2.3.3 Absorptionen der Aminosäureseitengruppen

Neben den Schwingungen des Peptidrückgrats, werden im IR-Spektrum auch Absorptionsbanden der Aminosäureseitengruppen beobachtet (siehe Tabelle 1.3). Diese können zwischen 10 und 30 % zur Gesamtintensität des Spektrums beitragen [58]. Aminosäureseitengruppenabsorptionen können wertvolle Informationen über die je-

Tabelle 1.3: Absorptionen der Aminosäureseitengruppen im Amid-I- und -II-Bereich in D_2O [59].

Aminosäure		Wellenzahl (cm^{-1})	Schwingungsform ^a
Arginin	(Arg)	1 586	CN_3H_5^+ (ν_s)
		1 608	CN_3H_5^+ (ν_{as})
Asparagin	(Asn)	1 648	$\text{C}=\text{O}$ (ν)
Aspartat	(Asp)	1 584	COO^- (ν_{as})
Glutamat	(Glu)	1 567	COO^- (ν_{as})
Glutamin	(Gln)	1 634–1 654	$\text{C}=\text{O}$ (ν)
Tyrosin	(Tyr)	1 612–1 618	CC (ν), CH (δ)
		1 513–1 517	CC (ν), CH (δ)

^aAbkürzungen: (ν_s) symmetrische Streckschwingung, (ν_{as}) antisymmetrische Streckschwingung, (δ) Deformationsschwingung.

weilige Mikroumgebung der entsprechenden Aminosäure im Protein liefern. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass Intensitätsänderungen von Asp und Glu bzw. eine Frequenzverschiebung der Tyr-Ringschwingung um 1515 cm^{-1} als empfindliche Sonden zur Detektion der Proteinstrukturbildung dienen können [23, 60]. Absorptionen dieser Seitengruppen lassen sich besonders gut im IR-Spektrum eines vollständig H/D-ausgetauschten Proteins beobachten. Die Verschiebung von Amid-II nach Amid-II' gibt den Bereich von ca. 1500 bis 1600 cm^{-1} frei zur „ungestörten“ Untersuchung der Seitengruppenabsorptionen von Tyr, Asp und Glu.

⁷Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Messungen an D_2O -Proteinlösungen durchgeführt. Aus diesem Grunde wird im folgenden Text Amid-I synonym mit Amid-I' verwendet.

1.2.3.4 Proteinstrukturbestimmung aus IR-Spektren

Wie bereits in Abschnitt 1.2.3.1 gezeigt wurde, setzt sich die Amid-I-Bande fast ausschließlich aus den C=O-Streckschwingungen des Peptidrückgrats zusammen. Je nach ihrer individuellen Mikroumgebung können die Schwingungen der Carbonylgruppen auf unterschiedliche Art und Weise miteinander koppeln [61] und dadurch mehr oder weniger von ihren Normalschwingungsfrequenzen abweichend IR-Strahlung absorbieren. In den meisten Proteinen befinden sich jedoch Gruppen dieser Oszillatoren in bestimmten Strukturen (β -Faltblatt, α -Helix, etc.), so dass ihre Schwingungskraftfelder auf andere Proteine, mit Carbonylgruppen in ähnlichen Strukturen, übertragbar sind [62]. In den Anfängen der Proteinstrukturbestimmung aus Schwingungsspektren wurde deshalb empirisch nach Korrelationen bestimmter Bandenmuster mit den in den jeweiligen Proteinen und Peptiden vorkommenden Strukturen gesucht. Eine detailliertere Untersuchung solcher Schwingungsspektren führte schließlich in den fünfziger Jahren zur Charakterisierung einiger spezifischer Amidschwingungsbanden in bestimmten Sekundärstrukturelementen von Proteinen und Polypeptiden [54, 63]. Erste theoretische Berechnungen von Spektren gelangen wenig später durch Anwendung der Normalkoordinatenanalyse [64, 65].

Tabelle 1.4 gibt einen Überblick über die theoretische Zuordnung von Sekundärstrukturelementen zu Schwingungsbanden im Amid-I- und Amid-II-Bereich. Die Be-

Tabelle 1.4: Theoretische Zuordnung von Peptidschwingungsbanden verschiedener Konformationen im Amid-I- und Amid-II-Bereich [66].

Sekundärstrukturelement	Amid-I-Bande ^a (cm ⁻¹)	Amid-II-Bande ^a (cm ⁻¹)
antiparalleles β -Faltblatt	1 685 (w), 1 668 (vw) 1 632 (s)	1 550 (w), 1 530 (s) 1 510 (w)
paralleles β -Faltblatt	1 648 (w), 1 632 (s)	1 550 (w), 1 530 (s)
α -Helix	1 650 (s), 1 646 (w)	1 546 (s), 1 516 (w)
β - und γ -Turns	1 660 bis 1 700	keine Angaben
ungeordnete Strukturen	1 658	1 520

^a Akürzungen: stark (s), schwach (w), sehr schwach (vw).

rechnung dieser Schwingungen wurde erst durch genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der Moleküle und ihrer Schwingungskraftfelder möglich [66]. Sie macht auch eindrucksvoll deutlich, wie empfindlich insbesondere die Frequenz der Carbonylstreckschwingung, die hauptsächlich für Strukturuntersuchungen herangezogen wird, auf die lokale Konformation im Protein oder Polypeptid reagiert. In den nächsten Abschnitten wird deshalb detailliert auf die intermolekularen Wechselwirkungen eingegangen, die diese Schwingungen beeinflussen und zu einer Abweichung von der „ungestörten“ Absorption (ca. 1645 cm⁻¹) der Carbonylstreckschwingung in Schwingungsspektren führen.

Wasserstoffbrückenbindungen Die dreidimensionale Struktur von Proteinen und Polypeptiden wird unter anderem durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (siehe Kapitel 1.1.1). In besonderer Weise bestimmt dabei die Sequenz der Aminosäuren die Bindungswinkel im Peptidrückgrat und somit auch die Länge und Richtung der Wasserstoffbrücken. Die IR-Spektroskopie ist sehr sensitiv gegenüber Änderungen von Bindungsstärken. Schon eine Bindungsstärkenänderung von nur 0,02 % kann detektiert werden [67]. Da die Carbonylgruppe ein ausgezeichneter Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor ist, verändert die Stärke einer Wasserstoffbrückenbindung die Elektronendichte der C=O-Doppelbindung [68] und beeinflusst dadurch die Kraftkonstante k der Carbonylstreckschwingung (vergleiche Formel 1.7 auf Seite 10). Wasserstoffbrückenbindungen sind zum Beispiel in β -Faltblättern kürzer als in α -Helices. Die Elektronendichte in den Carbonylgruppen der Peptidbindungen innerhalb von β -Faltblättern ist deshalb geringer und deren Absorptionsfrequenzen sind zwangsläufig niedriger als die Carbonylstreckschwingungsfrequenzen der Peptidgruppen in α -Helices (vergleiche Tabelle 1.4 auf der vorherigen Seite). Wasserstoffbrückenbindungen lassen sich jedoch nicht zur Erklärung der hochfrequenten Bande um 1680 cm^{-1} heranziehen, die in IR-Spektren von Proteinen mit antiparallelem β -Faltblatt beobachtet wird (siehe unten, TDC).

Im entfalteten Zustand von Proteinen haben intramolekulare Wasserstoffbrücken naturgemäß keinen Einfluss mehr auf die Frequenzen der Carbonylschwingungen. IR-Spektren von thermisch und chaotrop denaturierten Proteinen belegen dies eindeutig [3,23]. Schließlich sei noch angemerkt, dass selbst Wasserstoffbrücken vom Lösemittel zum Polypeptid die Frequenz der Carbonylstreckschwingungen beeinflussen können [69].

Geometrie der Amidbindung Die Peptidgruppe ist planar und zeichnet sich durch einen partiellen Doppelbindungscharakter aus [70]. Ist nun diese Planarität in sterisch beanspruchten Turn-Strukturen nicht mehr gewährleistet, so bedeutet dies eine höhere Elektronendichte in der Carbonyldoppelbindung und damit verbunden eine höhere Absorptionsfrequenz [51] (vergleiche Tabelle 1.4 auf der vorherigen Seite).

Dielektrizitätskonstante Von einigen Autoren wird auch der Einfluss der Dielektrizitätskonstante des Lösemittels auf die Frequenz der Carbonylstreckschwingung diskutiert [51]. So konnten hochfrequente Carbonylstreckschwingungsfrequenzen mit einer geringen Dielektrizitätskonstante des Lösemittels korreliert werden. Eine Verringerung der Dielektrizitätskonstante wird auch im Innern der Proteine, bei stark hydrophober Umgebung, angenommen.

Kopplung von Carbonylschwingungen Die bisher geschilderten Einflüsse auf die Carbonylstreckschwingungsfrequenz eignen sich eher zur qualitativen Beschreibung der breiten Kontur der Amid-I-Bande. Bestimmte Beobachtungen in den Schwingungsspektren von Proteinen und Peptiden, wie zum Beispiel die charakteristische Aufspaltung der Schwingungsbanden für antiparallele β -Faltblätter in je eine hoch-

und niederfrequente Komponente, lassen sich damit nicht erklären. Erste Versuche zur quantitativen Beschreibung dieses Phänomens gelangen in den sechziger und siebziger Jahren [65, 71, 72]. Hierbei wurde die Aufspaltung durch eine Kopplung der Schwingungen über Valenz- [73] und Wasserstoffbrückenbindungen erklärt. Eine erste befriedigende quantitative Beschreibung der Amid-I-Bande gelang durch die Erweiterung der Berechnungen um einen Term, der die Kopplung zwischen den Carbonyl-oszillatoren *via* Übergangsdipolmomenten (*transition dipole coupling* (TDC)) beschreibt [67, 74–76]. Hierbei versteht man unter TDC die Resonanzwechselwirkung zwischen zwei Oszillatoren A und B, wenn sich einer von ihnen in einem angeregten Zustand befindet [61]. Die Kopplung der Oszillatoren erfolgt über COULOMB-Wechselwirkungen und ist stark abhängig von ihren Frequenzen sowie ihrer relativen Ausrichtung und Entfernung zueinander [61].

Eine quantitative Berechnung von IR-Spektren einiger Polypeptide unterschiedlicher Struktur gelang BRAUNER *et al.* auf der Grundlage der Normalkoordinatenanalyse und Kopplungen *via* Valenzbindungen und Wasserstoffbrücken, sowie TDC [77]. Diese Untersuchungen zeigen eindrucksvoll, dass schwingungsspektroskopische Untersuchungen zur Kopplung von Schwingungen das Potenzial haben, Einblicke in die dreidimensionale Struktur von Molekülen zu liefern.

1 Einleitung