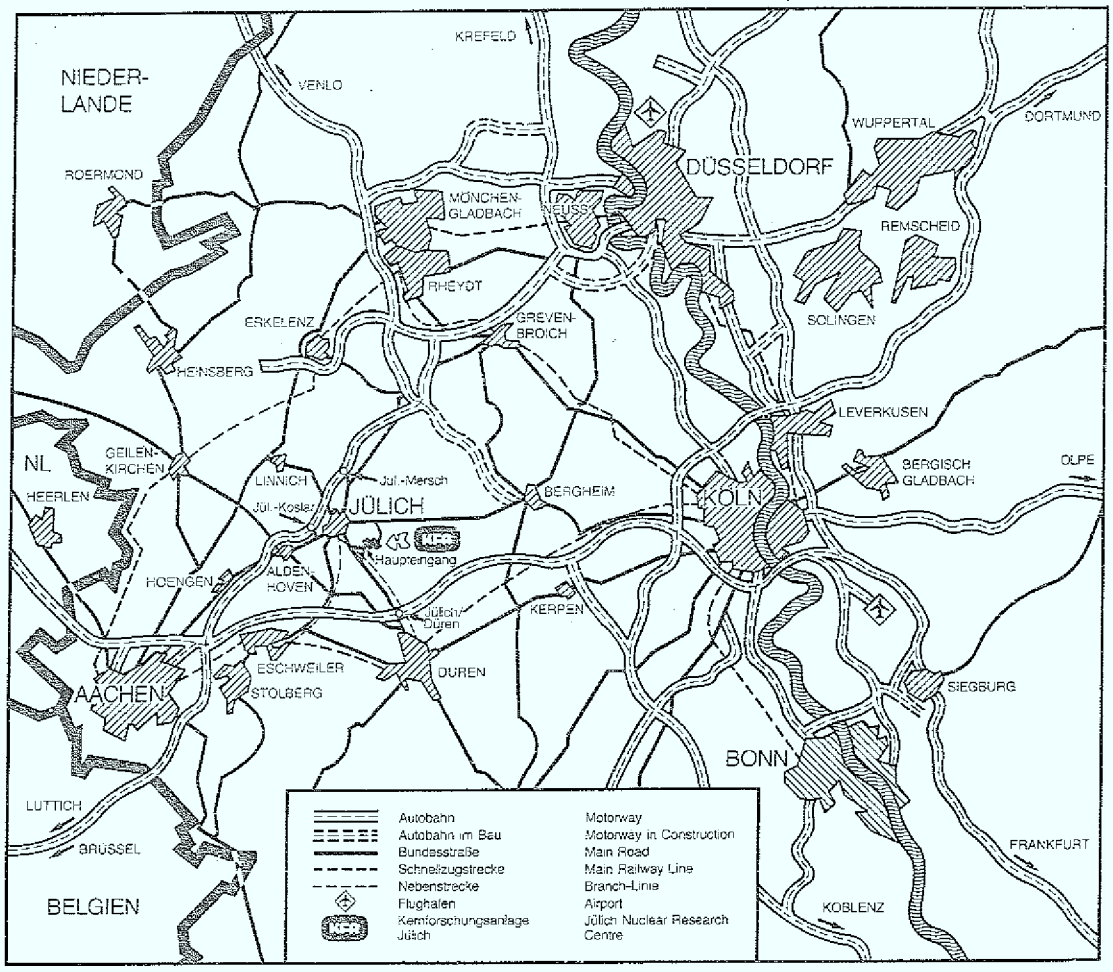
KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH
Institut für Chemie 4: Angewandte Physikalische Chemie

Schwingungsspektroskopische Analysen der Sekundärstruktur von Peptiden

von

Brigitte Kisters

Jül-2179
Januar 1988
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2179
Institut für Chemie 4: Angewandte Physikalische Chemie Jül-2179

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

Schwingungsspektroskopische Analysen der Sekundärstruktur von Peptiden

von

Brigitte Kisters

D 38 (Diss. Uni. Köln)

ABSTRACT

The "ß-peptide" (103), a synthetic tridecapeptide, was designed to form an antiparallel ß-sheet containing a turn to connect both strands. By infrared- and Fourier Transform infrared spectroscopy, the peptide was confirmed to be mainly of the depicted conformation. This structure was shown to exist in both, KBr-pellets and aqueous solution.

Dispersive infrared measurements have shown that a second peptide, "Con A 1/4" (92), is an antiparallel ß-sheet without a turn. In contrast to the ß-peptide, the structure of Con A 1/4 is based on the antiparallel alignment of several molecules. A detailed model for this aggregation has been proposed.

Structure analysis of cystein-containing peptides, being modelled on the active site of the basic pancreatic trypsin inhibitor (41) was confirmed indirectly by combination of several vibration spectroscopic methods:

- Normal Raman spectroscopy was used to determine the conformation of disulfide-bridges in oxidized peptide III, like the lack of disulfide-bridges in reduced peptide II.
- Dispersive infrared-spectroscopy showed a mainly similar secondary structure of the peptides II and III in their oxidized and reduced forms.
- Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) revealed a likewise distribution of amino acids on the surface of peptide II and III.

In summary, it has to be concluded that both peptides in their oxidized as well as in their reduced form are very

rigid antiparallel ß-sheets flanking a tight ß-turn. According to Fourier Transform infrared measurements the secondary structure of reduced peptide II is mainly identical in aqueous solution and pressed KBr.

Both, SERS-experiments and dispersive infrared measurements proved for peptide I a structure being quite different from peptides II and III.

The secondary structures of several peptides, synthesized to examine the structure of the protein fibrillary deposits found in Alzheimer's disease, were determined by dispersive infrared spectroscopy and compared with the secondary structure of "native" deposits (amyloide plaque cores (APC)). In connection with these experiments, the secondary structure of different peptide aggregates have been examined with regard to temperature stability.

Concluding from these spectroscopic results, in agreement with biochemical experiments (68, 74, 88, pers. comm. K.Beyreuther, C. Hilbich, U. Mönning) and data from x-ray analysis (51) models were developed to account for the secondary structures of different synthetic peptides as well as for the structure and aggregation of fibrillary deposits in the brain. Starting from these models, it might be possible to explain the differing morphology of both types of native filaments (APC and paired helical filaments (PHF)) as well as the morphology of fibrils created by co-aggregation of two peptides (1-28 and 4-28).

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

DNA bestimmt den Genotyp, Proteine den Phänotyp von Lebewesen.
Die jeweilige Funktion der Proteine wird durch die dreidimensionale Struktur bestimmt, deren Selektion im Laufe der Evolution stark von dem das Makromolekül umgebende Medium abhängt. Demzufolge werden Proteine in verschiedenen Umgebungen zum überwiegenden Teil durch unterschiedliche Strukturelemente aufgebaut. Als grundlegende Peptidkonformationen zum Aufbau ausgedehnter, regelmäßiger Strukturen sind Helices und Faltblattstrukturen anzusehen.
Die detaillierten atomaren Koordinaten von α-Helix bzw. parallelem und antiparallelem ß-Faltblatt wurden erstmals von Pauling et al. (84, 85, 86) vorgestellt. Diese Arbeiten basierten auf ersten groben Röntgenstrukturanalysen von Proteinen, die an Seide (70) und ß-Keratin (6, 7) durchgeführt worden waren.
Obwohl mittlerweile auch andere helicale Konformationen postuliert und teilweise auch nachgewiesen wurden (Tabelle 1.1), bleibt die α-Helix die vorherrschende helicale Konformation globulärer Proteine (98).

Eine neue Klasse von Helices bilden die ß-Helices (64, 115), in denen D- und L-Aminosäuren alternierend vorliegen. Obwohl α-helicale Struktur möglich ist, werden durch die alternierende Chiralität der Aminosäuren z.B. in Gramicidin A andere Konformationen favorisiert. Dieses integrale Membranpeptid liegt isoliert als antiparallele doppelsträngige $ß^{5.6}$-Helix vor, in Lipidvesikeln jedoch als einzelsträngige $ß^{6.3}$-Helix (76, 77, 79, 115, 117) wobei $ß^{n}$: n die Anzahl der L+D-Reste pro Umdrehung angibt.

Struktur	n	m	h (Å)	H-Brücke	Referenz
α_I	3.60	13	1.495	5 → 1	(3)
α_{II}	3.60	13	1.50	5 → 1	(27)
3_{10}	2.99	10	2.01	4 → 1	(90)
ω	-4.00	13	1.325	5 → 1	(15)
π	4.40	16	1.15	6 → 1	(66)
π	4.25	16	1.17	6 → 1	(102)
2.2_7	2.17	7	2.75	3 → 1	(26)

Tabelle 1.1: Helicale Konformationen, intramolekular durch H-Brücken stabilisiert
n = Anzahl der As pro Umdrehung der Helix (negativ: links-drehende Helix)
m=Anzahl der Atome in dem durch die Wasserstoffbrücke gebildetem Ring
h = Translation pro Rest
H-Brücke: Orientierung NH → OC (48)

Das ß-Faltblatt als gestreckte Konformation der Polypeptidkette, in der eine Blatt-ähnliche Struktur durch seitlich, d.h. in die Ebene des Faltblattes orientierte Wasserstoffbrücken stabilisiert wird, wurde sowohl in antiparalleler als auch paralleler Anordnung in zahlreichen Peptiden und Proteinen durch Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen (1, 4, 5, 18, 19, 20, 24, 30, 32, 61, 67, 93, 94, 98, 110, 125, 126, 127). Für die antiparallele Orientierung benachbarter Ketten wurden zwei Varianten zur Anordnung der Seitengruppen nachgewiesen: sie sind als "rippled" oder "pleated sheet" zu finden (3, 4, 64, 72). Diese beiden Konformationen von "sheets" sind in Bild 1.1 dargestellt.

Im Unterschied zu diesen "unendlich ausgedehnten" Faltblattstrukturen in synthetischen Polypeptiden wie

poly ß-Ala sind die in Proteinen vorliegenden, "begrenzten", nicht völlig planar, sondern leicht gedreht (19, 20, 93, 128).

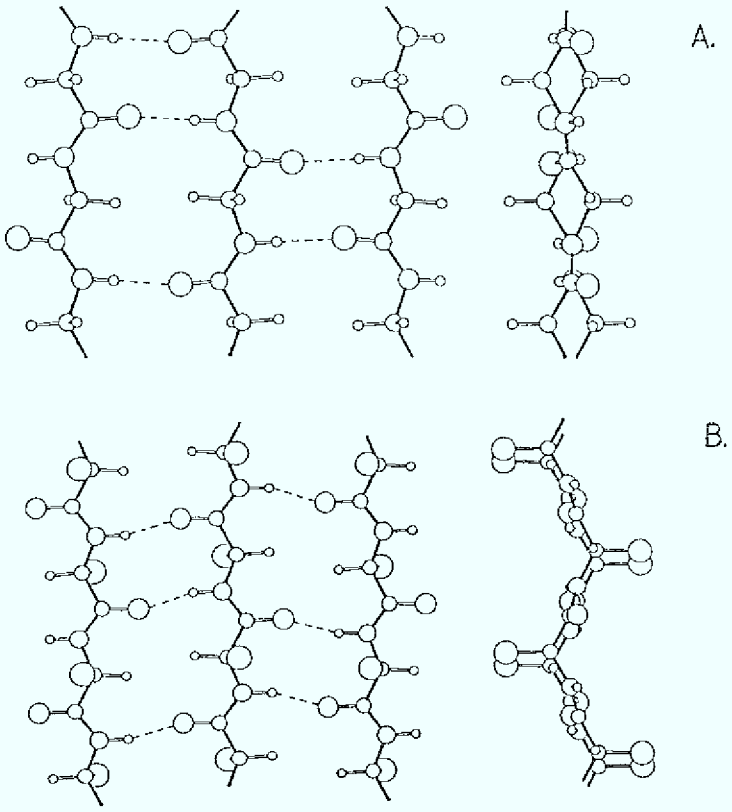


Bild 1.1: A. Antiparalleles "rippled" ß-Faltblatt (APRS)
B. Antiparalleles "pleated" ß-Faltblatt (APPS)
(nach (57))

Ein weiteres Strukturelement von Peptiden sind "Turns", Bereiche des Moleküls, in dem die Polypeptidkette ihre Gesamtrichtung um 180° ändert (57, 99). Je nach Anzahl der beteiligten Aminosäuren wird prinzipiell zwischen ß-Turns (vier Aminosäuren) oder γ-Turns (drei Aminosäuren) unterschieden, die aufgrund der möglichen Bindungswinkel in acht bzw. zwei verschiedenen Konformationen vorliegen können (82, 98, 118). Diese Strukturen können, müssen aber nicht durch "intraturn"-Wasserstoffbrücken stabilisiert werden (Bild 1.2).

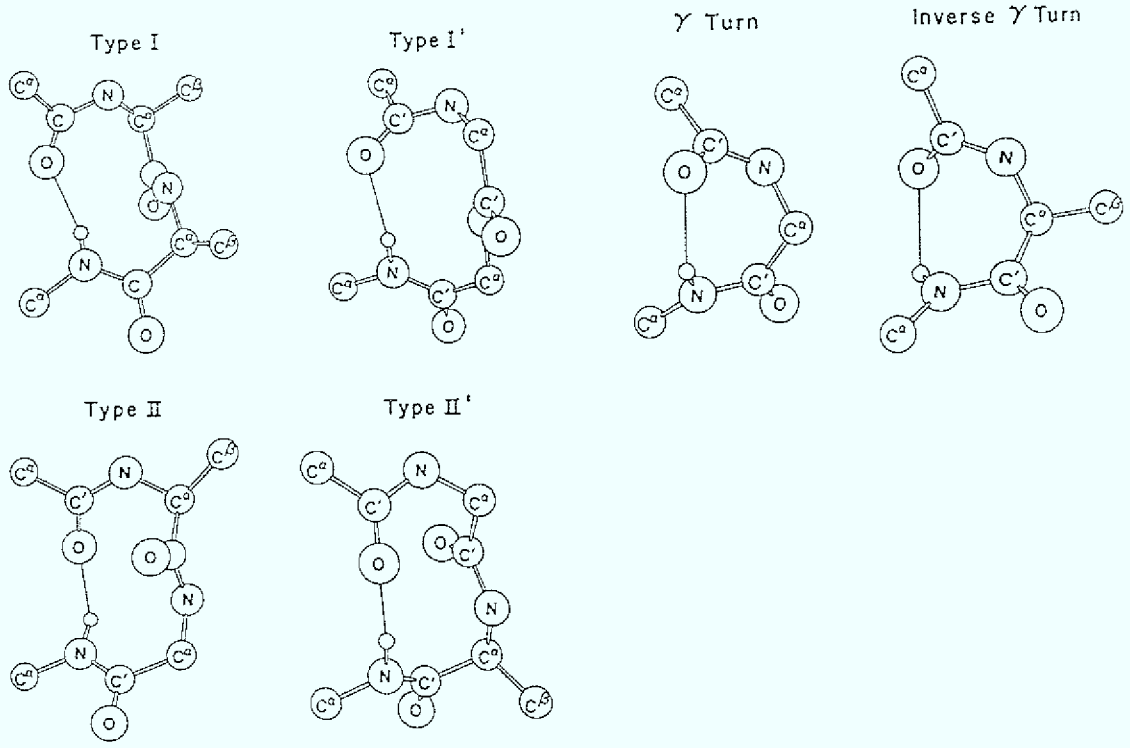


Bild 1.2: Turn-Konformationen (nach Rose et al.(100)) Ein Turn von Typ III ist nicht dargestellt, weil er sich nur unwesentlich vom Typ I unterscheidet

Im Gegensatz zu Helices oder ß-Faltblattstrukturen erscheinen Turns weit weniger deutlich in Röntgenstrukturanalysen, da ihre "Backbone"-Winkel nicht repetitiv sind. Nichtsdestoweniger handelt es sich um häufige Strukturen, die in globulären Proteinen ungefähr ein Drittel aller Reste ausmachen (98). Turns sind generell polare Strukturelemente mit eng zusammengepackten "Backbone"-Gruppen und Seitenketten, die auswärts zeigen. In Peptiden optimieren Turns die Kompaktheit der "Backbone"-Kette (intramolekulare nicht-kovalente Kontakte) und ermöglichen das Gruppieren von Seitenketten, so daß intermolekulare Erkennung erleichtert wird (100).

Bei "Loops" handelt es sich um verwandte Strukturen der Turns. Sie bewirken ebenfalls eine Änderung der Richtung der Peptidkette, sind jedoch nicht durch bestimmte Bindungswinkel oder Wasserstoffbrücken zu definieren.

Durch die Faltung, d.h. die spezifische Kombination der verschiedenen Strukturelemente entsteht die jeweils charakteristische Struktur des Proteins. Levitt und Chothia klassifizierten 1976 die in ihrer 3 D - Struktur bekannten Proteine nach Ausmaß und Verteilung von α-Helix und ß-Faltblatt in fünf Gruppen (62). Diese Einteilung wurde 1981 von Richardson erweitert und verfeinert (98). Eine sich aus diesen Klassifikationen ergebende, wichtige Konsequenz für die Faltung von Proteinen ist, daß die Tertiärstruktur durch Wechselwirkungen zwischen ausgedehnten "Struktureinheiten", den "Supersekundärstrukturen", bestimmt wird. Die Anordnung der Strukturelemente, α-Helix und/oder ß-Faltblatt, zueinander wird - zumindest in wässrigem Medium - durch "Clustering" hydrophober Reste bestimmt (105, 106).
Eine zuverlässige Vorhersage der Tertiärstruktur eines Proteins aufgrund seiner Aminosäuresequenz muß folglich auf der korrekten Erkennung und Anordnung von Sekundärstrukturen beruhen.
Da empirische Methoden zur Strukturvorhersage (Chou und Fasman, 21, 22, 23) auf den aus Röntgenstrukturanalysen globulärer Proteine gewonnenen statistischen Daten beruhen, sinkt ihre Zuverlässigkeit bei Membranproteinen drastisch. Eine andere "Problemgruppe" der Strukturvorhersagen sind Peptide, da bei diesen relativ kleinen Molekülen nahezu alle Atome dem externen Lösungsmittel ausgesetzt sind. Peptidkonformationen werden deshalb notwendigerweise von Wechselwirkungen nahe beieinanderliegender Reste stabilisiert, sind jedoch in der Regel sehr flexibel.

Damit ergibt sich besonders im Rahmen von "Peptid Engineering" die Notwendigkeit, die Sekundärstruktur der synthetisierten Moleküle zu bestimmen. Diese Messungen sollten möglichst schnell erfolgen, in verschiedenen Lösungsmitteln und auch für unlösliche Peptide und Peptidaggregate durchführbar sein.
Physikalische Meßmethoden, die diese Bedingungen prinzipiell erfüllen, sind Messungen des Circular Dichroismus (CD-Spektroskopie), Kernspinresonanz (NMR) sowie Schwingungsspektroskopie (Raman-Spektroskopie, Infrarot-Spektroskopie).
CD-Spektroskopie ist eine sehr schnelle Methode. Sie ist zur Analyse von Turns jedoch nur begrenzt einzusetzen, da die Elliptizität von Turns im Verhältnis zu derjenigen von α-Helix oder ß-Faltblatt nur gering ist. Die Interpretation komplexer Spektren unter Berücksichtigung von Turn-Konformationen ist deshalb nur mit einem relativ hohen Fehler möglich (99). Außerdem können Prolinhaltige Turns mit CD nicht identifiziert werden, da der Beitrag des Turns zum Gesamtspektrum sehr stark von der jeweiligen lokalen Umgebung des Pro-Restes und dem von der Seitenkette der Aminosäure in Position 3 ausgeübten Einfluß abhängt (42).
Kernspinresonanz ist im Gegensatz zu CD-Messungen eine hervorragende Methode zur detaillierten Analyse von Turn-Konformationen. Die Interpretation der Spektren größerer Peptide gestaltet sich jedoch schwierig und verlangt zumindest eine Erweiterung der Technik (COSY, NOESY). Strukturelle Umlagerungen ohne Rotation der Peptidbindung verursachen bei den üblichen Messungen der NMR eine Mittelung der Parameter, so daß die Analyse dieser Spektren bezüglich nur einer Konformation des Peptids von geringem Wert ist (46).
Mit schwingungsspektroskopischen Messungen (Raman- und IR- Spektroskopie) können wie auch durch Bestimmungen des Circular Dichroismus einzelne Konformationen von

kleinen Peptiden sehr genau aufgelöst werden (99). Einschränkungen bezüglich Turns gibt es in der Schwingungsspektroskopie nicht. Die detaillierte Zuordnung der einzelnen Signale ist durch Vergleich der Schwingungsspektren mit der über Normalkoordinaten-Analyse berechnete Stärke der Kraftkonstanten für eine bestimmte Konformation des jeweiligen Peptids möglich (siehe (57)). Solche Analysen werden jedoch mit zunehmender Größe des Peptids überaus aufwendig. Aus diesem Grund besteht das Bestreben, rechnerunterstützte Methoden zu entwickeln, mit denen es möglich ist, aus einem vorgegebenen Spektrum eines komplexen Proteins die prozentualen Anteile der einzelnen Konformationen zu bestimmen. Ein solches Verfahren wurde von Williams und Dunker 1983 für die Ramanspektroskopie vorgestellt und an verschiedenen bakteriellen Transmembranproteinen erfolgreich angewandt (119, 120, 121). Ähnliche Rechnungen liegen auch für IR- (bzw. Fourier-Transform Infrarot-) Spektroskopie vor, wie beispielsweise die Arbeiten von Renugopalakrishnan et al. am Amelogenin zeigen (97).
Schwingungsspektroskopische Sekundärstrukturanalysen wurden bisher vorwiegend entweder an relativ kleinen Peptiden bzw. synthetischen Homopolymeren (Normalkoordinatenanalysen (57)) oder an hochmolekularen Proteinen (rechnerunterstützte Entwicklung oder "Fit" der Spektren) durchgeführt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden erstmals die sich in ihren Aussagen ergänzenden schwingungsspektroskopischen Methoden - Raman Spektroskopie, SERS ("Surface Enhanced Raman Spectroscopy"), IR (Infrarot), FTIR (Fourier Transform Infrarot Spektroskopie), ATR ("Attenuated Total Reflectance") - zur Bestimmung der Sekundärstruktur synthetischer Peptide eingesetzt. Dabei wurde die "Surface Enhanced Raman Spectroscopy" als besonders geeignete Methode zur Analyse von Peptidober-

flächenstrukturen etabliert. Mit den so erzielten Daten konnten über die Sekundärstruktur hinausgehend Modelle zur Tertiär- und im Fall des Morbus Alzheimer auch der Quartärstruktur der Peptide erstellt werden. Diese Modelle werden mit den Ergebnissen biochemischer Experimente und Röntgenstrukturanalysen verglichen (51, 68, 74, 88). Dabei zeigt sich, daß die in dieser Arbeit vorgestellten Modelle für die vorliegenden Daten eine konsistente Erklärungsmöglichkeit darstellen.

2. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Infrarot- und Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie (IR und FTIR) wurde nachgewiesen, daß ein als antiparalleles Faltblatt entworfenes Peptid (ß-Peptid (103)), in dem die gegenläufige Stränge über einen Turn miteinander verbunden sind, sowohl im KBr-Pressling als auch in wässriger Lösung vorwiegend in der geplanten Konformation vorliegt.

Ein weiteres Peptid (Con A 1/4 (92)) zeigt die Struktur eines antiparallelen ß-Faltblattes ohne Turn, wie durch dispersive IR-Messungen gezeigt wurde. In diesem Fall beruht die antiparallele Struktur auf einer entsprechenden Anordnung der Moleküle zueinander. Diese Aggregation des Peptides wird durch ein Modell seiner Struktur erklärt.

Die Strukturanalyse Cystein-haltiger Peptide zur Nachbildung der primären Bindungsstelle des basischen pankreatischen Trypsin-Inhibitors (41) erfolgte indirekt durch Kombination mehrerer schwingungsspektroskopischer Methoden.
Durch Normale Raman-Spektroskopie wurde die Konformation der Disulfidbrücken des oxidierten Peptid III und ihr Fehlen in der reduzierten Form des Peptid II bestimmt. Eine weitgehend übereinstimmende Sekundärstruktur der Peptide II und III in oxidierter und reduzierter Form wurde durch dispersive IR-Spektroskopie nachgewiesen, übereinstimmende Verteilung der Aminosäuren an der Peptidoberfläche durch "Oberflächenverstärkte Raman-Streuung" (SERS). Beide Peptide liegen demnach in der oxidierten wie reduzierten Form als äußerst starres antiparalleles Faltblatt vor, in das jeweils mindestens ein Turn eingebettet ist. Die Sekundärstruktur des reduzierten Peptid II in wässriger Lösung stimmt mit der

im KBr-Pressling überein (FTIR-Messungen). Wie durch dispersive IR-Spektroskopie und SERS-Messungen bewiesen, besitzt Peptid I eine von den beiden anderen Peptiden stark abweichende Sekundärstruktur.

Die Sekundärstrukturen einer Reihe von Peptiden zur Untersuchung der Struktur der fibrillären Proteinablagerungen beim Morbus Alzheimer, sowie eines Isolates solcher Ablagerungen ("amyloide plaque cores" (APC)) wurden mit dispersiver IR-Spektroskopie bestimmt. In diesem Zusammenhang wurden die Sekundärstrukturen mehrerer Peptid-Aggregate auch auf ihre Temperaturstabilität hin untersucht.

Ausgehend von diesen spektroskopischen Ergebnissen wurden in Übereinstimmung mit biochemischen Daten (68, 74, 88, pers. Mitt. K.Beyreuther, C. Hilbich, U. Mönning) und Röntgenstrukturanalysen (51) über die Sekundärstruktur der Peptide hinaus Modelle zur Struktur und Aggregation der fibrillären Proteinablagerungen entwickelt. Diese Modelle bieten eine Erklärung für die unterschiedliche Morphologie verschiedener filamentöser Ablagerungen (APC und "paired helical filaments" (PHF)), sowie der durch Aggregation zweier Peptide (1-28 und 4-28) erzeugten Fibrillen.

3. MATERIAL

3.1 Abkürzungen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ACA	Amyloide cerebrale congophile Angiopathie
AD	Alzheimer'sche Demenz
APC	Amyloid Plaque Core (Proteine)
APPS	Antiparalleles "pleated" Faltblatt
APRS	Antiparalleles "rippled" Faltblatt
As	Aminosäure
ATR	"Attenuated Total Reflectance"
BPTI	Basischer Pankreatischer Trypsin Inhibitor
C-ATR	"Circular-Attenuated Total Reflectance"
CD	Circular Dichroismus
Con A	Concanavalin A
D (kD)	Dalton (Kilodalton)
DS	Down Syndrom
FTIR	Fourier Transform Infrarot Spektroskopie
G	Gauche
GGG	Gauche-Gauche-Gauche
GGT	Gauche-Gauche-Trans
IR	Infrarot (Spektroskopie)
k	Wellenzahl (cm^{-1}) = $1/\lambda$
KLH	"Keyhole Limpet Hemocyanin"
MG	Molekulargewicht
n.d.	nicht gemessen
NFT	Neurofibrilläre Bündel
NRS	Normale Raman Spektroskopie
ORC	Oxidations-Reduktions Zyklus
PHF	Helikal gepaarte Filamente
rms	Mittlere quadratische Fehlerabweichung
RT	Raumtemperatur
SDAT	Senile Demenz vom Alzheimer Typ
SERS	"Surface Enhanced Raman Spectroscopy"

T	Trans
TGT	Trans-Gauche-Trans
ν_A	Frequenz der Amid A - Bande
λ	Wellenlänge

3.2 Beschriftung der Tabellen und Spektren

- Intensitäten der Linien

VS	sehr stark
S	stark
M	mittel
W	schwach
VW	sehr schwach
br	breit
sh	Schulter

- Schwingungsmoden

s	Streckschwingung
b	Biegeschwingung
sb	symmetrische Biegeschwingung
ab	antisymmetrische Biegeschwingung
ss	symmetrische Streckschwingung
as	antisymmetrische Streckschwingung

3.3 Aminosäuren

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

3.4 Peptide

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Peptide wurden, soweit nicht anders erwähnt, freundlicherweise von Frau C. Hilbich, Herrn G. Multhaup, Herrn H. Prinz und Frau U. Schulze-Gahmen zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden in 70% Ameisensäure gelöst, 1:10 bis 1:20 mit H_2O verdünnt und anschließend lyophilisiert.

4. METHODEN

4.1 Einführung in die Schwingungsspektroskopie

Jede Substanz besitzt ein für sie charakteristisches Schwingungsspektrum, das sich aus der Bewegung der Atome um ihre Ruhelage ergibt. Diese wiederum wird durch die Wechselwirkung mit den Nachbaratomen festgelegt.
In einem nicht-linearen Molekül aus n Atomen können 3n-6 Schwingungen auftreten. Darunter fällt sowohl die Änderung der Abstände der miteinander verbundenen Atome (Valenzschwingungen), als auch die Änderung ihrer Bindungswinkel (Deformationsschwingungen).

Die Stärke der i-ten Schwingung ist durch ihre Kraftkonstante λ_i gegeben. Diese ergibt sich nach der Transformation des Moleküls auf die ihm zugehörigen Symmetriekoordinaten (Normalkoordinaten Q_i) aus der potentiellen Energie U

$$U = \frac{1}{2} \sum_i \lambda_i Q_i^2$$

Mißt man die Schwingungsfrequenzen ω_i, so können mit geeigneten mathematischen Modellen und entsprechenden Näherungen die Kraftkonstanten λ_i berechnet und Modelle der Molekülstrukturen entworfen werden. Solche Analysen der Normalkoordinaten wurden u.a. von S. Krimm et al. durchgeführt (Übersicht: (57)), so daß für verschiedene Peptidstrukturen jeweils charakteristische Frequenzen der sogen. "Amidbanden" angegeben werden konnten (Bild 4.1, Tabelle 4.1).
Die in Tabelle 4.1 zusammengefaßten, charakteristischen Wellenzahlen stellen Richtwerte zur Interpretation der Schwingungsspektren dar. Sie werden wie auch die relativen Intensitäten der Linien u.a. durch die interne Ladungsverteilung des Peptids oder Stärke der Wasserstoffbrücken beeinflußt. Der Analyse eines Peptid-

spektrums sollten aus diesem Grund alle Amid-Banden zugrundegelegt werden.

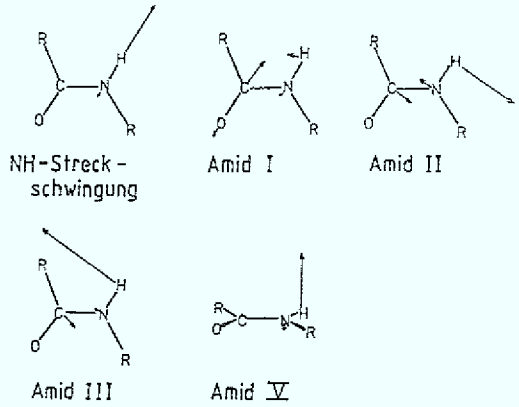


Bild 4.1: Amidschwingungen der Peptidbindung

Mode	Struktur					
	α	$\beta(\uparrow\uparrow)$	$\beta(\uparrow\downarrow)$	β_{I}	β_{II}	β_{III}
Amid I	-	-	1695	1690	-	1686
	-	-	1669	-	1666	-
	1659	1652	-	-	1656	-
	-	1650	1630	1640	-	1646
Amid II	-	n.d.	-	1575	-	-
	-		1555	1558	1558	1552
	1543		-	-	1547	1551
	-		1534	1536	1540	1539
	1520		1523	-	-	-
Amid III	-	n.d.	-	1324	1329	1317
	-		-	1305	1303	1303
	1287		-	1299	1297	1291
	1270		-	-	-	-
	-		1247	-	-	-
	-		1228	-	-	-
	-		1225	-	-	-
Amid V	-	n.d.	-	595	644	671
	628		713	575	607	589
	609		702	574	594	577
	-		-	570	588	573
	-		-	-	572	-
	-		-	-	571	-

Tabelle 4.1: Berechnete Frequenzen der Amidmoden verschiedener Strukturen (nach (57))

Die Messung von Molekülschwingungen ist aufgrund der Wechselwirkung von Licht mit Materie möglich. Dabei wird der Energiezustand des Moleküls um die Größe $\Delta E = \hbar\omega$ geändert.

Dies kann auf zwei Arten geschehen:

- Infrarot-Spektroskopie
  Wird bei einer Absorption des Energiequants $\Delta E = \hbar\omega$ das Dipolmoment $\vec{\mu} = e\vec{r}$ geändert, so geht das Molekül von einem Schwingungszustand $|\psi_n\rangle$ in den angeregten Zustand $|\psi_m\rangle$ über (Bild 4.2).

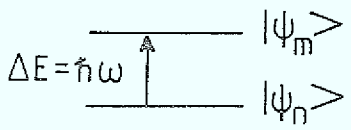


Bild 4.2: Anregung eines Schwingungszustandes $|\psi_n\rangle$ durch Absorption eines Energiequants $\hbar\omega$

Die Übergangswahrscheinlichkeit P_{nm} für diesen IR-Übergang ist gegeben durch das Matrixelement

$$P_{nm} \sim \langle\psi_n|e\vec{r}|\psi_m\rangle = \int \psi_n e\vec{r}\,\psi_m \, dQ$$

Ein IR-Übergang ist erlaubt, wenn $P_{nm} \neq 0$. Der IR-Übergang ist verboten, wenn $P_{nm} = 0$. Die betrachtete Schwingung ist damit infrarotinaktiv. In diesem Fall kann die IR-Spektroskopie zur Messung der Schwingung nicht herangezogen werden. Aus gruppentheoretischen Überlegungen ergibt sich, daß P_{nm} nur dann ungleich Null ist, wenn das direkte Produkt

$$\Gamma_{\psi_n} \times \Gamma_{\vec{r}} \times \Gamma_{\psi_m}$$

die totalsymmetrische irreduzible Darstellung enthält:

$$\Gamma_{\psi_n} \times \Gamma_{\vec{r}} \times \Gamma_{\psi_m} \supset A_1$$

- Raman-Spektroskopie

Eine zweite Möglichkeit der Wechselwirkung von Licht mit Materie besteht in der inelastischen Streuung des einfallenden Lichtes an einer vorgegebenen Elektronenverteilung.

In der klassischen Beschreibung des Vorgangs gibt ein ankommendes Lichtquant der Energie $\hbar\omega_1$ bei der Wechselwirkung eine Energie ΔE ab und besitzt dann die Energie $\hbar\omega_2$. Quantenmechanisch wird diese Wechselwirkung durch ein virtuelles Niveau beschrieben.

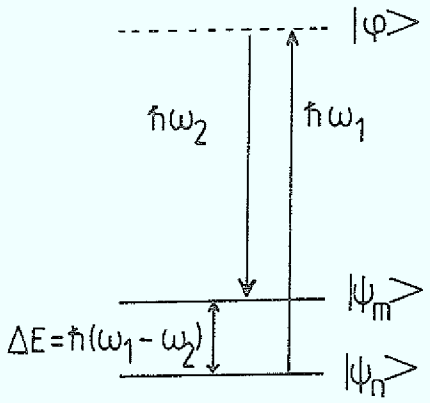


Bild 4.3:Ramanprozeß als 2-Stufen Prozeß

Die Übergangswahrscheinlichkeit P_{nm} ist durch das Matrixelement

$$P_{nm} \sim \langle\psi_n|\hat{H}|\varphi\rangle\langle\varphi|\hat{H}|\psi_m\rangle$$

(H: Hamiltonoperator) gegeben. Dies zeigt deutlich, daß der physikalische Prozess der Energieübertragung im Zwischenniveau $|\varphi\rangle$ stattfindet, die nur erfolgen kann, wenn die Polarisierbarkeit des Moleküls geändert wird. Die Ramanspektroskopie ist also zur Infrarotspektroskopie komplementär.

Auch hier kann mit Hilfe der Gruppentheorie geprüft werden, ob $P_{nm}=0$ oder $P_{nm}\neq 0$ gilt. Kehrt man diese Aussage um, so kann eine vorgegebene, angenommene Struktur (Symmetrie) dadurch überprüft werden, indem sie den Auswahlregeln für Raman- und IR- Spektroskopie gehorcht oder nicht.

Befindet sich ein Molekül in der Nähe einer Metalloberfläche, so werden die relativen Intensitäten verschiedener Schwingungsmoden sowohl im IR- als auch im Raman-Spektrum sehr stark verändert. Einheitliche Auswahlregeln für die im SERS-Experiment gefundenen Schwingungsbanden gestalten sich sehr schwierig und sind nur ansatzweise aufgestellt worden (146).
Aus der kurzen Reichweite der SERS-Verstärkung ergibt sich weiter, daß Molekülgruppen, die in direktem Kontakt mit der Metalloberfläche liegen, die intensivsten SERS-Banden ergeben.

4.1.1 Raman-Spektroskopie

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Raman-Spektren (NRS) wurden ausschließlich an polykristallinen Proben gemessen, da Messungen in wässriger Lösung aufgrund der zur Verfügung stehenden Probenmengen nicht möglich waren (114).
Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem Standard-Ramanspektrometer, das aus den in Bild 4.1.1 dargestellten Komponenten aufgebaut ist.

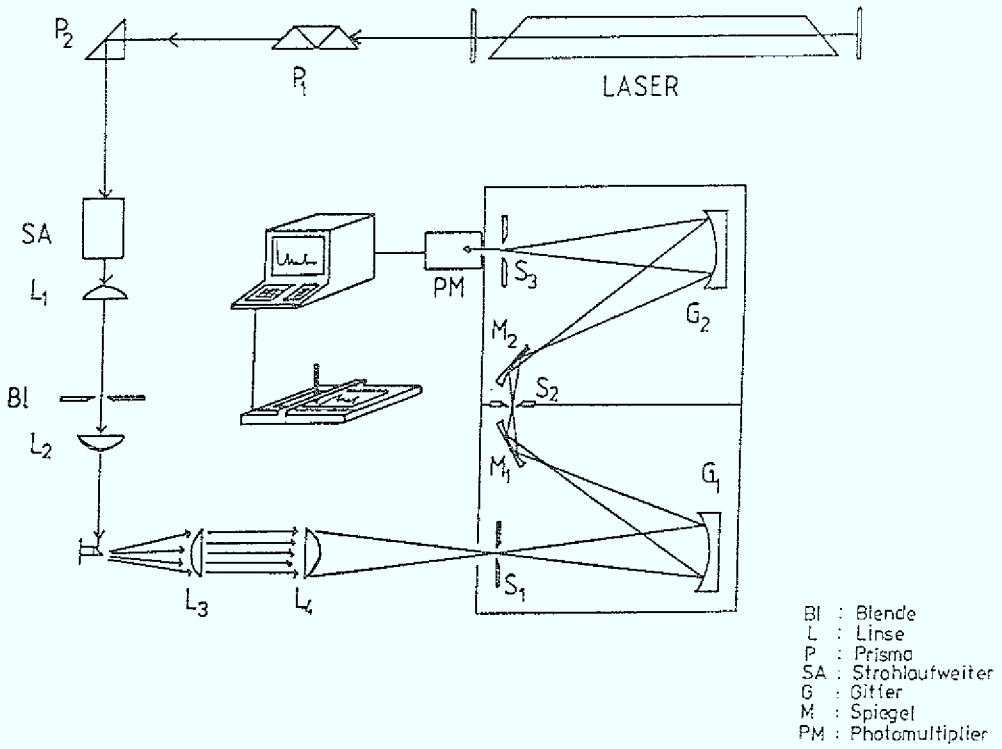


Bild 4.1.1: Schema der Raman-Apparatur

Als intensive, monochromatische Lichtquelle dient ein Ar^+-Laser, dessen Plasmalinien durch eine Kombination aus Prisma P_1 und Lochblende Bl ausgeblendet werden. Nach Passieren der Blende wird der Laserstrahl durch die Sammellinse (L_2, f=80 mm) auf die Oberfläche der frei auf einem Halter befindlichen Probe fokussiert. Entsprechend dieser Anordnung wurden alle Messungen in der

sogenannten "90°- Streuung" vorgenommen.
Das von der Probe ausgehende Streulicht wird durch zwei Plankonvex-Linsen L_3, L_4 (f_3=25 cm, f_4=45 cm) auf den Eintrittsspalt S_1 des Doppelgittermonochromators fokussiert. Die Brennweiten sind an das Öffnungsverhältnis des Monochromators angepaßt.
Nach dispersiver Zerlegung und Unterdrückung der Primärlinie (Rayleighlinie) von etwa $1:10^{11}$ tritt das Licht durch den Spalt S_3 aus. Im angeschlossenen Photomultiplier erfolgt die Detektion und Verstärkung des Signals. Ein Rechner dient als Vielkanalanalysator zur Integration und Aufnahme der Spektren, die ggf. auf einem XY-Schreiber ausgegeben werden können.

4.1.2 "Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie" (SERS)

Die "Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie" hat gegenüber der Normalen Raman Spektroskopie mehrere Vorteile. So sind bei kürzerer Meßdauer weit geringere Laserintensitäten notwendig (10 mW gegenüber 300 mW, (54)), was eine Wärmebelastung der Probe und auch eventuelle photochemische Reaktionen verringert. Weiterhin liegt die für dieses Meßverfahren einzusetzende Probenmenge mit 20 bis 40 µg Protein pro ml um zwei bis drei Größenordnungen unter der für NRS benötigten.
Hinzu kommt, daß die Intensität von SERS-Signalen um fünf bis sechs Größenordnungen über der der NRS-Signale derselben Substanz liegt (116). Da der Verstärkungsfaktor jedoch stark von der Entfernung zwischen der adsorbierten Probenoberfläche und der Metalloberfläche abhängig ist (54), ist diese Methode besonders zur Bestimmung der Oberflächenstruktur biologischer Moleküle geeignet.

Zur Vorbereitung der Messung wird die aus polykristallinem Ag bestehende Arbeitselektrode mit Al_2O_3 poliert, durch H_2-Entwicklung in 10 N NaOH chemisch gereinigt und im Elektrolyten (100 mM KCl, 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.5) aktiviert. Eine solche Aktivierung der Elektrode durch mehrere aufeinanderfolgende elektrochemische Oxidations-Reduktionszyklen (ORC, -0.9 V ⇔ +0.2 V) ist zur Aufrauhung der Elektrodenoberfläche notwendig (vgl. zur Theorie von SERS (129) - (152)). Nach der Aktivierung, die bereits in der Meßzelle (Bild 4.1.2) ohne die zu untersuchende Substanz durchgeführt wird, wird die Elektrolytlösung gegen die Probenlösung (20 - 40 ug Protein in 100 mM KCl, 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.5) ausgetauscht. Die Messung erfolgt bei -0.9 V (Arbeitselektrode/Referenzelektrode) mit dem unter 4.1.1 beschriebenen Meßaufbau, der um einen Strahlaufweiter (SA) sowie eine plankonvexe Linse (L_1) erweitert worden war. Der angegebene Probenpuffer bzw. Aktivierungselektrolyt und die während der Messung angelegte Spannung wurden in Vorversuchen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht beschrieben werden, für SERS-Messungen an Proteinen ermittelt.

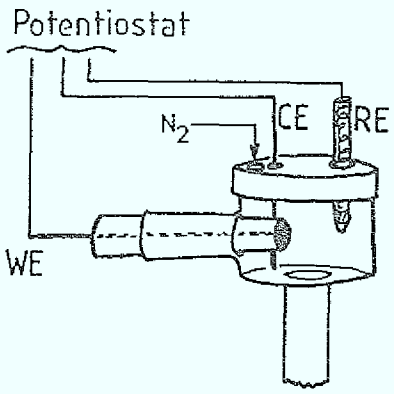


Bild 4.1.2: Aufbau der spektroelektrochemischen Zelle
WE = Arbeitselektrode (Ag, polykristallin)
CE = Zählelektrode RE = Referenzelektrode
(verändert nach (29))

Aufgrund der hohen Feldstärken im Bereich der aufgerauhten Elektrodenoberfläche ist eine partielle Denaturierung der Probe während der Messung nicht vollständig auszuschließen. Die Denaturierung wird jedoch durch das beschriebene Verfahren zur Aktivierung der Elektrode minimiert, da sich die Probe während des ORC nicht in der Meßzelle befindet (54).

4.1.3 Infrarot-Spektroskopie, Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie (FTIR)

Die dispersiven IR-Messungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit einem Perkin-Elmer Model 283B an KBr-Presslingen aufgenommen.
Das getrocknete KBr wird mit der Probe gemischt, sorgfältig zermörsert und 15 Minuten mit einem Druck von 10 Tonnen pro cm^2 gepreßt. Die zur Herstellung der Presslinge (kreisf. Durchmesser: 1 cm, Dicke: 1 (+/- 0.5) mm) benötigte Probenmenge variierte zwischen 0.5 mg Peptid/200mg KBr und 1 mg Peptid/150 mg KBr.
Der im Idealfall glasklare Pressling wird im Strahlengang des Spektrometers befestigt. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur unter Standardbedingungen, so daß die in Bild 4.1.3 dargestellte spektrale Auflösung des Perkin-Elmer Spektrometers erreicht wurde.

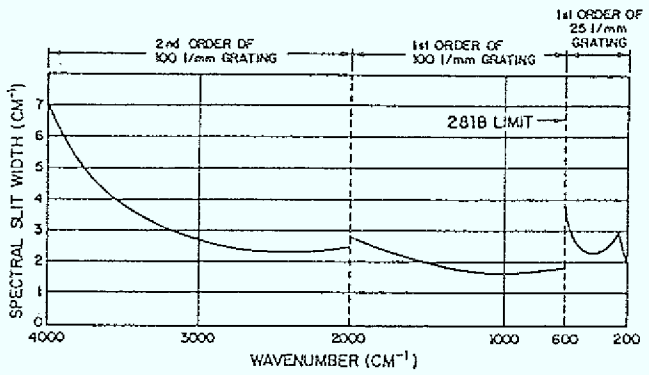


Bild 4.1.3: Auflösung des Perkin-Elmer Model 283B (aus dem Handbuch des Gerätes)

In konventionellen, dispersiven IR-Spektrometern wird das von der IR-Quelle (Globar, Metalldraht, ...) ausgehende Licht vor dem Probenraum spektral zerlegt. Bei verschiedenen Einstellungen des Monochromators wird das Spektrum nach Transmission durch die Probe direkt als Intensität I des IR-Lichtes in Abhängigkeit von seiner Wellenzahl k gemessen.
Im Gegensatz dazu wird bei der Fourier-Transform IR-Technik vor der Passage des IR-Strahls durch den Probenraum in einem Michelson-Interferometer ein Interferogramm aller von der IR-Quelle ausgehenden Wellenlängen erzeugt (Bild 4.1.4).
Zwischen der Intensität des Interferogramms und der Stellung x des beweglichen Spiegels im Michelson-Interferometer besteht eine feste Beziehung. Das vom Detektor nach Durchgang des Lichtes durch den Probenraum registrierte Signal (Interferogramm) stellt somit die Intensität I der IR-Strahlung in Abhängigkeit von der Stellung x des Spiegels dar. Aus dieser Beziehung I(x) wird durch eine Fourier-Transformation das eigentliche Infrarot-Spektrum als Abhängigkeit der Intensität von der Wellenzahl k berechnet I(k).

Die Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie hat gegenüber der konventionellen dispersiven IR Spektroskopie mehrere Vorteile. So ist es nicht nur möglich, FTIR-Spektrometer mit im Vergleich zu Gittergeräten wesentlich höherer Auflösung herzustellen. Bei gegebener Auflösung werden außerdem weit kürzere Meßzeiten benötigt, die Proben dementsprechend geschont.

Ein weiterer Vorteil der FTIR-Spektroskopie wird bei der Messung stark Infrarot-absorbierender Substanzen deutlich, die die Technik der "Attenuated Total Reflectance" (ATR, Kap. 4.1.4) ermöglicht.

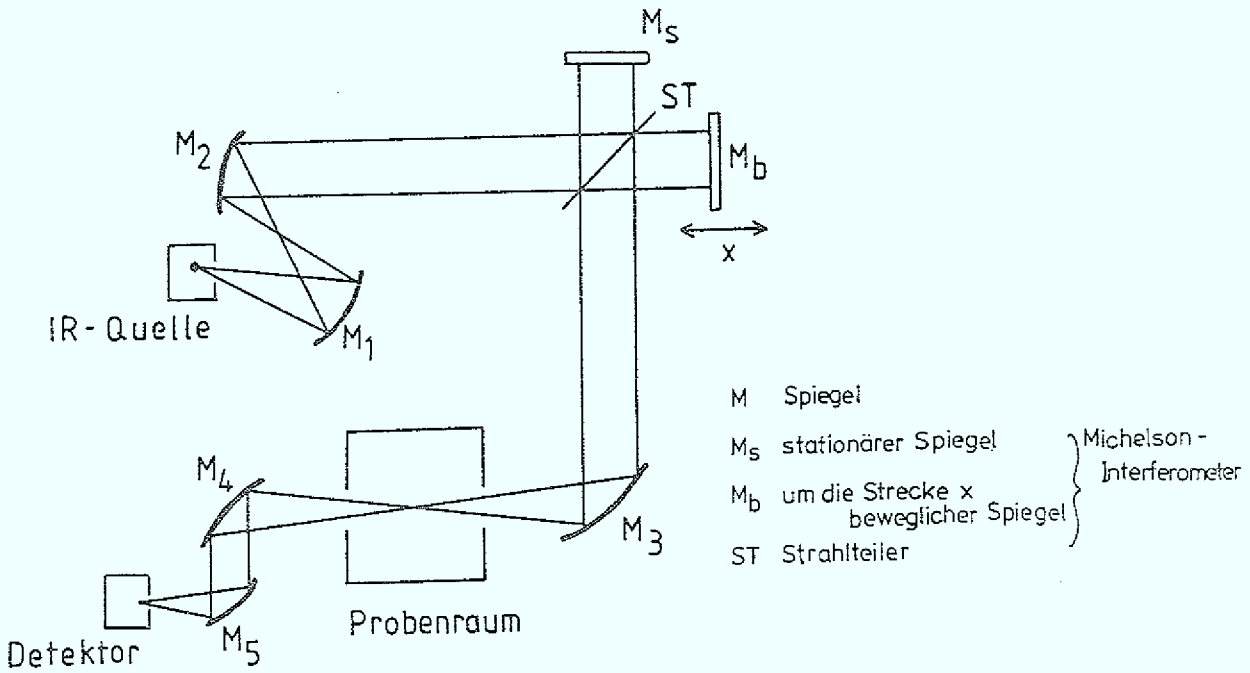


Bild 4.1.4: Schematischer Aufbau eines FTIR-Spektrometers

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Fourier-Transform Infrarot-Messungen am KBr-Pressling und im ATR-Verfahren wurden in Offenbach, Fa. NICOLET an einem SDX20-, sowie in Düsseldorf, Fa. BIORAD an einem FTS40-Spektrometer durchgeführt.

4.1.4 "Attenuated Total Reflection" (ATR)

"Attenuated Total Reflection" ist zwar prinzipiell auch mit dispersiven Geräten durchführbar, FTIR-Spektrometer sind ihnen jedoch aufgrund ihres höheren Strahlendurchsatzes weit überlegen ("Jacquinot-Vorteil", (59)). Die ATR-Technik ist für die Sekundärstrukturanalyse von Peptiden im biologisch relevanten wässrigen Medium von

großer Bedeutung, da H_2O eine äußerst starke IR-Absorptionsbande im Bereich der struktursensitiven Amid I-Bande hat. Aus diesem Grund sind solche Untersuchungen mit normalen dispersiven IR-Spektrometern praktisch nicht durchführbar, wohl aber mit FTIR-Spektrometern, die mit ATR-Probengefäßen zur Messung in Liquid ("Circle-Cell" bzw. "C-ATR Zelle") ausgestattet sind.

Bei einer "Circle-Cell" oder "C-ATR Zelle" handelt es sich um eine Metallschale, in der ein stabförmiger Kristall aus einem Material mit hohen Brechungsindex (ZnSe) allseitig von der zu untersuchenden Lösung umgeben ist. Der IR-Strahl (bei FTIR: Interferogramm) wird in den Kristall gelenkt und dort aufgrund seines Einfallswinkels mehrfach totalreflektiert. An der Grenzfläche zwischen Kristall und der (flüssigen) Probe bildet sich eine stehende Welle aus. Das einfallende Licht kann also mit der Probe wechselwirken, Absorption findet statt. Bei diesem Vorgang hängt die Eindringtiefe der Strahlung in die Probe von den Brechungsindices des Kristalls und der Probe ab, vom effektiven Einfallswinkel des Lichtes und seiner Wellenlänge. Außerdem ist sie vom Kontakt zwischen Probe und Kristall abhängig.

Zur Messung wurde eine 5%ige Lösung des Peptids in H_2O eingesetzt. Die "Macro-ATR Zelle" faßt ein Probenvolumen von 5 ml, für die "µ-ATR Zelle" werden ca. 100ul benötigt.

Alle schwingungsspektroskopischen Messungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, in der Kernforschungsanlage Jülich, ICH4 durchgeführt.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 ß-Peptid

Zur Analyse von Sekundärstrukturen, die an der Oberfläche von Proteinen liegen, können Antikörper eingesetzt werden, die an eine Sequenz nur dann binden, wenn sie in einer bestimmten Konformation vorliegt. Zur Erzeugung solcher topologischer Antikörper sind Peptide notwendig, die stabile Sekundärstrukturen ausbilden.
Als Modell wurde ein antiparalleles ß-Faltblatt entworfen, dessen gegenläufige Stränge über einen Turn miteinander verbunden sind (103)(Bild 5.1.1).

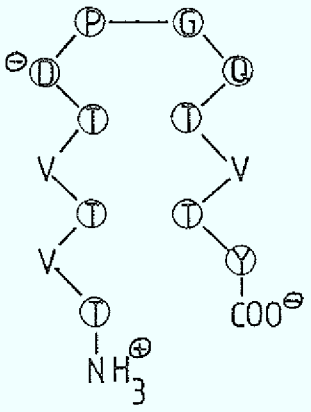


Bild 5.1.1: ß-Peptid (103)
umkreist: polare As

Die Sekundärstrukturanalyse des Peptids durch CD-Spektroskopie in 10mM Phosphatpuffer, pH 7 ergab mit einer Fehlerabweichung unter 10% rms: 2% α-Helix, 33% ß-Faltblatt, 20% ß-Turn und 45% ungeordnete Struktur.

Das IR-Spektrum des ß-Peptids (Bild 5.1.2, Tabelle 5.1.1) zeigt Maxima der Amid - Banden bei 1630, 1535 und 1230 cm^{-1} und bestätigt damit das Vorliegen der gewünschten antiparallelen Faltblattstruktur des Peptids.

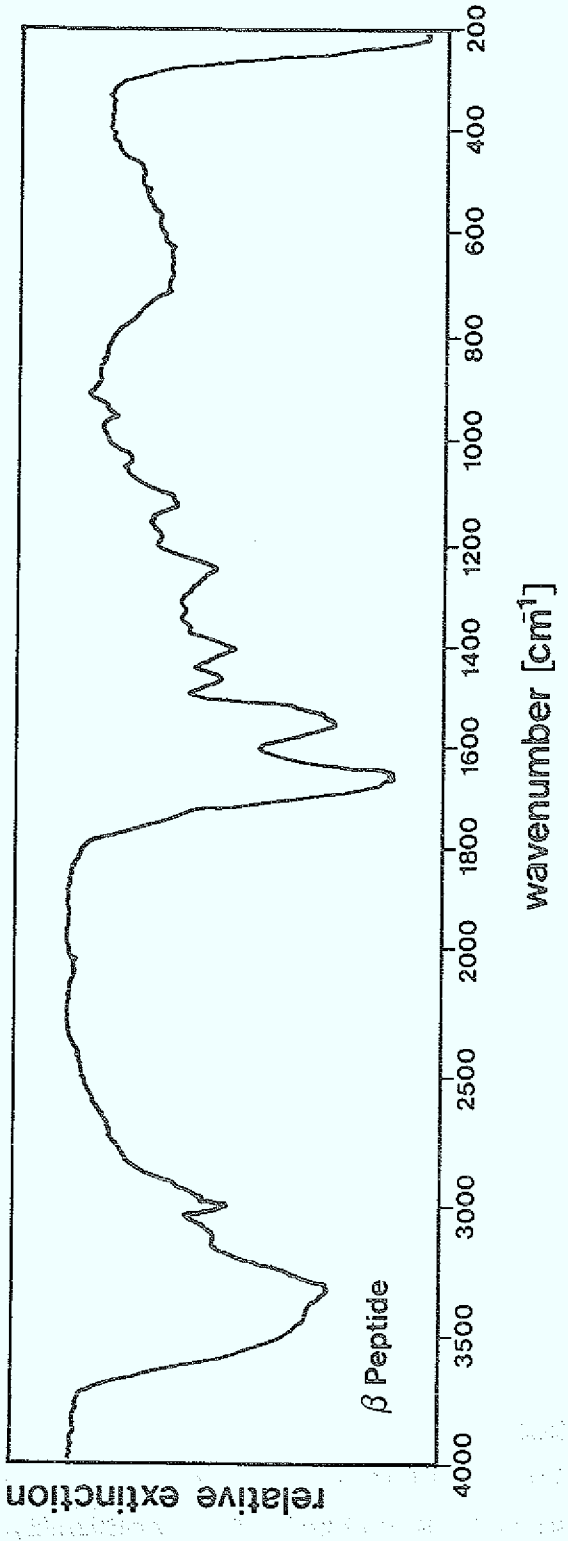


Bild 5.1.2: IR-Spektrum des ß-Peptids

Bande (cm^{-1})		Zuordnung
3420	M, sh	NH s
3340	sh	Amid A
3290	S	Amid A
3080	MW	Amid B
2970	S	CH_3/CH_2 s
2930	MW	CH_3/CH_2 s
2875	W	C H s
1725	sh	Amid I, COOH (Asp)
1685	sh	Amid I
1655	sh	Amid I
1630	VS	Amid I
1535	S	Amid II
1450	M	CH_2 b (Seitenkette)
1390	M	CH_3 sb
1325	W	Amid III
1280	VW	Amid III, u.U. OH s (Thr)
1265	sh	Amid III
1230	M	Amid III
1170	W	
1155	W	
1110	M	
1085	M	
1015	MW	
930	MW	
695	MW	Amid V
665	MW	Amid V
610	MW	Amid V
540	W	
450	MW	

Tabelle 5.1.1: Moden des ß-Peptids
Intensität der Banden: VS sehr stark, S stark, M mittel, W schwach, sh Schulter
Art der Schwingung: s Streckschwingung, b Biegeschwingung, sb symm. Biegeschwingung

Im Vergleich zu den Spektren anderer Peptide (Kap. 5.2, 5.3) ist die Amid I - Bande zu höheren Wellenzahlen hin verbreitert (starke Schulter bei 1640 - 1650 cm^{-1}). Eine solche Lage des Amid I - Signals tritt bei α-Helices, ungeordneten Strukturen und parallelen Faltblättern auf (56, 57,71). Folglich liegt das ß-Peptid vorwiegend als antiparalleles ß-Faltblattes vor, ist jedoch so flexibel, daß gleichzeitig auch andere Konformationen angenommen werden.

Die Amid A - Region des Spektrums unterstützt diese Aussage. Hier ist das intensive Signal bei 3290 cm^{-1} für intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken charakteristisch (14, 42). Eine fast ebenso starke Bande bei 3420 cm^{-1} belegt jedoch, daß ein hoher Anteil der NH-Gruppen "ungebunden" vorliegt, was für ungeordnete Strukturen typisch ist.

Auf ß- oder γ-Turns kann aus dem hier diskutierten Spektrum nur indirekt geschlossen werden. Die charakteristischen Amid I - und II - Banden überlagern sich teilweise mit denjenigen für α-Helix oder ß-Faltblatt (Tabelle 4.1 (57)).

Die schwache Strukturierung der Amid A - Bande (Maximum: 3290 cm^{-1}, Schulter: 3340 cm^{-1}) ist auf Wasserstoffbrücken verschiedener Bindungsstärken zurückzuführen. Das Signal stärkster Intensität, 3290 cm^{-1}, kann in Übereinstimmung mit Messungen von (28, 58, 72, 73) an $ß(Ala)_n$: ν_A = 3280 cm^{-1} dem antiparallelen Faltblatt, die niederfrequente Schulter einem X_1-Pro-Gly-X_2 ß-Turn (14, 42) zugeordnet werden.

Für einen ß-Turn sprechen weiterhin die deutlich erkennbaren Signale der Amid I -Region bei 1655 und 1685 cm^{-1}, sowie 1725 (+/- 20) cm^{-1} (57). Die zu erwartende intensive Amid III -Bande oberhalb von k = 1260 cm^{-1} (57) ist im Spektrum nicht eindeutig verifizierbar. Bei 1265 (+/- 5) cm^{-1} befindet sich jedoch eine Schulter der Amid III - Bande, sowie bei 1325 und 1280 cm^{-1} eine schwache

Linie. Diese Signale können einem Turn zugeordnet werden. Ein Vergleich der Messungen und Berechnungen an Modellpeptiden (75, 76) mit den Banden des vorliegenden IR-Spektrums ergibt die beste Übereinstimmung mit ß-Turns des Typ II. Das schwache und zu niedrigen Wellenzahlen verschobene Signal in der Amid III Region kann auf Wasserstoffbrücken des Turns mit kleiner Kraftkonstante zurückgeführt werden (8, 47).
In der Region der ebenfalls struktursensitiven Amid V - Bande (570 bis 710 cm^{-1}, Übersicht: (57)) überlappen zahlreiche Banden einander und sind nicht mehr als einzelne zu identifizieren. Aus diesem Grund werden die Signale dieser Region nicht interpretiert.

Zusammenfassend ergibt sich somit für die Struktur des ß-Peptids folgendes: im KBr-Pressling liegt das Molekül zu einem großen Teil als antiparalleles Faltblatt (APPS) vor; es sind zusätzlich helicale und/oder ungeordnete Komponenten auszumachen.
Für das Vorliegen eines ß-Turns des Typ II gibt es mehrere Hinweise (Regionen der Amid - Banden), es können jedoch keine quantitativen Aussagen über den Gesamtgehalt an Turns getroffen werden.
Die eingangs erwähnten CD-spektroskopischen Untersuchungen ergaben einen Gehalt von 20% ß-Turn für das ß-Peptid. Eine solche quantitative Angabe ist jedoch in diesem speziellen Fall problematisch, da Prolin enthaltende ß-Turns über CD-Messungen nur schwer zu identifizieren sind. Die Beiträge des Turns hängen sehr stark von der lokalen Konformation des Pro-Restes sowie der Seitenketteneffekte des Restes in Position 3 des Turns ab (42).
Anzumerken ist, daß IR- und CD-Messungen übereinstimmend eine flexible Struktur mit vorherrschenden Anteilen an ß-Faltblatt ergaben, obwohl die Messungen in verschiedenen Aggregatzuständen der Probe vorgenommen wurden.

In einigen Fällen (wie z.B. Glucagon (127)) konnte nachgewiesen werden, daß die Struktur der Proteine oder Peptide im Kristall erheblich von der in Liquid abweicht. Daher wurde vom ß-Peptid eine Vergleichsmessung in wässriger Lösung durchgeführt (Bild 5.1.3). Diese Messung erfolgte bei der Fa. BIORAD, Düsseldorf an einem FTS40-Spektrometer.

Im Unterschied zum KBr-Pressling sind ν_A - Bande bzw. Region der OH-Streckschwingungen in einzelne Linien aufgelöst. Ähnliches zeigt sich im Bereich der weiteren Amid - Signale: innerhalb der Amid I - Bande werden zwei (1631 und 1663 cm^{-1}), innerhalb der Amid II - Bande drei Linien deutlich (1520, 1535 und 1570 cm^{-1}). Die scheinbar erhöhte Auflösung des FTIR-Spektrometers ist nicht gerätebedingt, da beide Spektrometer im Bereich der Amid I - und II - Banden eine Auflösung von 2 cm^{-1} haben (Auflösung des Perkin-Elmer 283B (dispersiv): Bild 4.1.3).
Die Lage der dominierenden Banden in der Amid I -, II - und III - Region ist unverändert, d.h. das Peptid liegt auch in wässriger Lösung als antiparalleles Faltblatt vor.

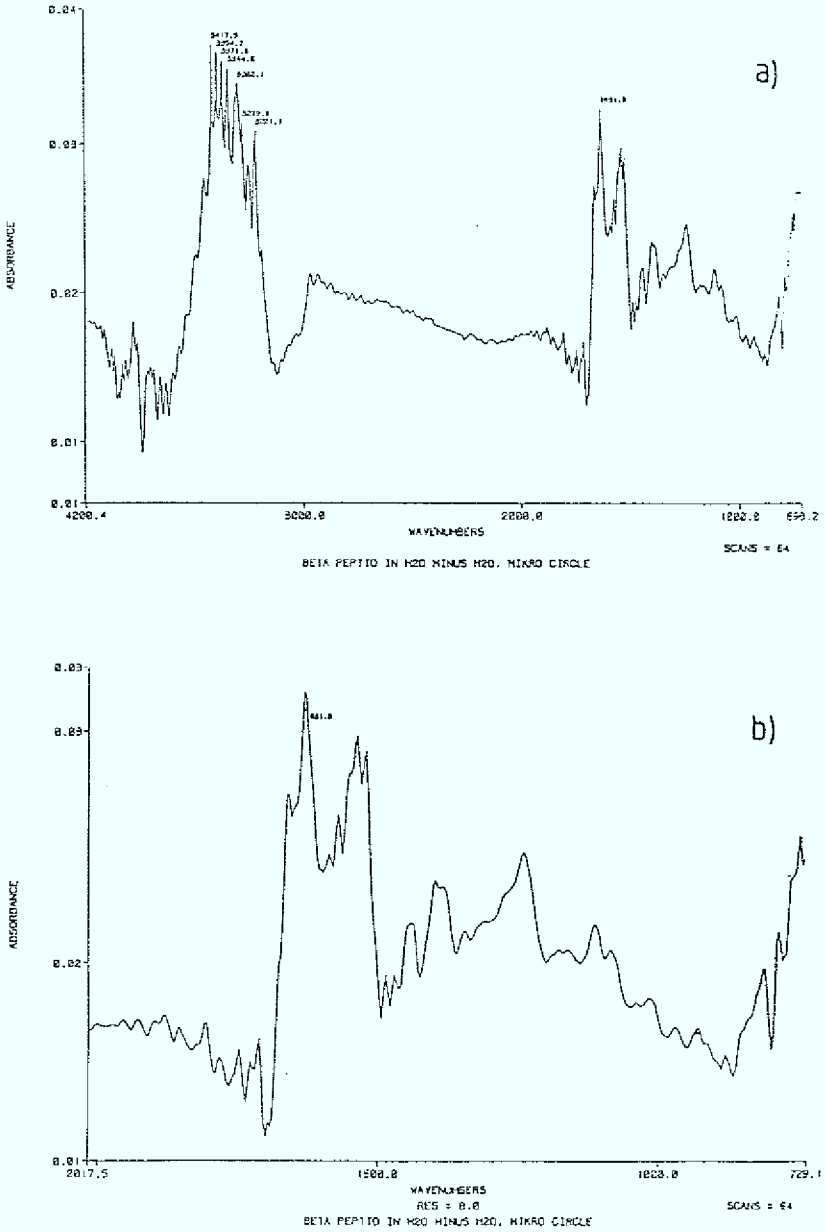


Bild 5.1.3: FTIR-Spektrum des ß-Peptids in wässriger Lösung; H_2O-Spektrum subtrahiert
Probengefäss: Micro-Circle-Cell, Fassungsvermögen ca. 0.1 ml
Konzentration: 40 mg Peptid/ml H_2O
a) Übersichtsspektrum
b) Ausschnitt: Amid I, II und III Region
Auflösung: +/- 2 cm^{-1}

5.2 Con A 1/4

Dieses Oktapeptid (Sequenz: H_2N-S-A-T-A-K-A-T-A-COOH) wurde von H. Prinz zur Überprüfung der immunologischen Identität von α-Helix und ß-Faltblatt entworfen (92).

Das IR-Spektrum des Peptids (Bild 5.2.1 a) enthält zahlreiche H_2O-Rotationsbanden im Bereich 3500 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1}, sowie 1400 cm^{-1} bis 1900 cm^{-1}. Zur Identifikation der auf das Peptid zurückzuführenden Banden wurde ein Leerspektrum aufgenommen (Bild 5.2.1 b). Die Peptidbanden und ihre Zuordnung sind in Tabelle 5.2.1 zusammengefaßt.

Bande (cm^{-1})	Zuordnung
3440 M	NH (frei) s, OH s
3270 S	Amid A
3080 MW	Amid B
2980 MW	CH_2, CH_3
2930 MW	CH_2, CH_3
2860 W	CH_2, CH_3
1675 - 1695 sh	Amid I
1625 S	Amid I
1535 +/- 10 S	Amid II
1455 M	
1405 M	
1220 W	Amid III
1230 W	Amid III
1160 MW	
1085 M	
690 +/- 30 M	Amid V

Tabelle 5.2.1: Con A 1/4 Schwingungsmoden
Abkürzungen: s. Kap 3.2

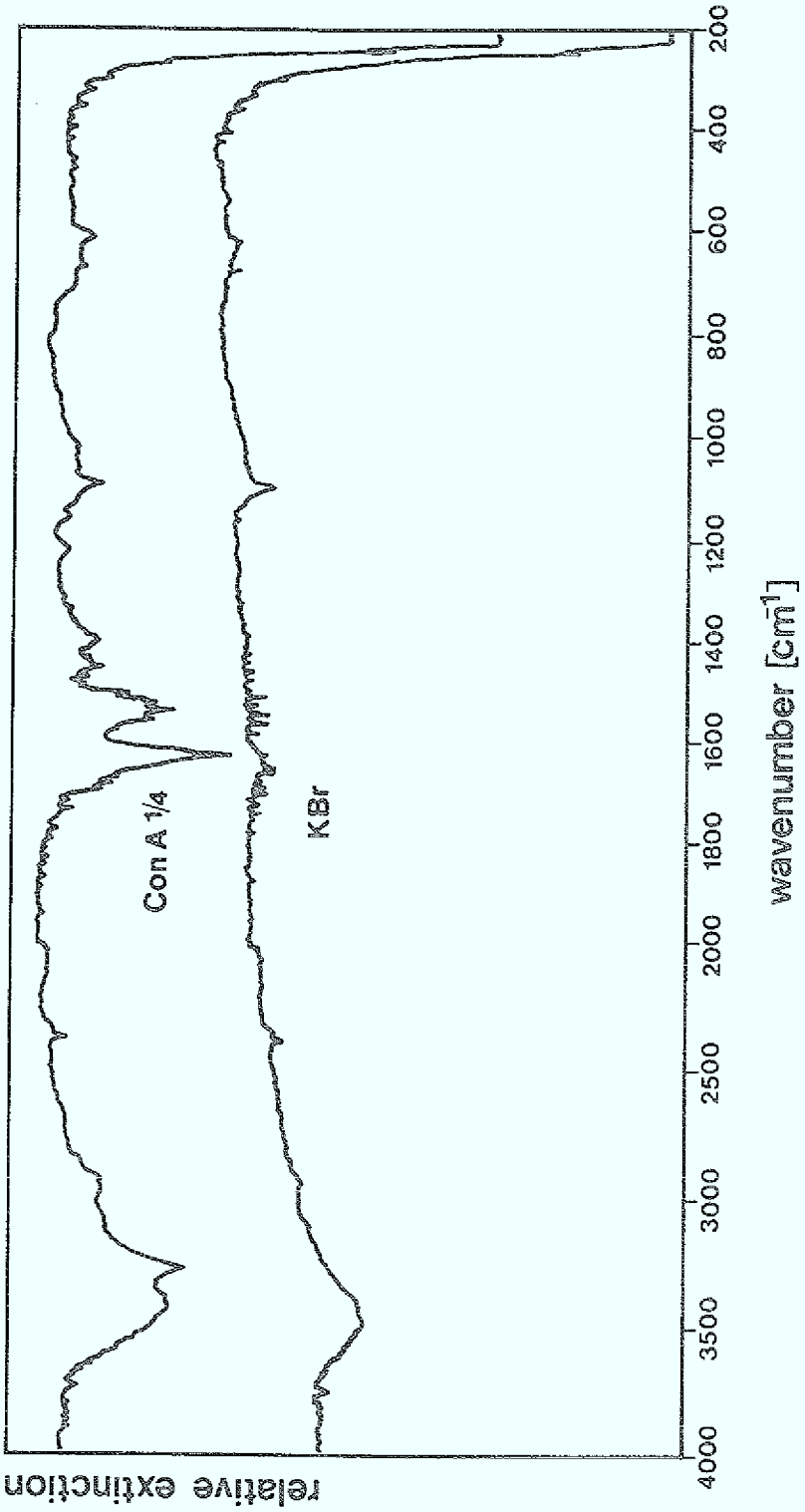


Bild 5.2.1: a) IR-Spektrum von Con A 1/4
b) KBr, nicht getrocknet

Im Unterschied zum in Kapitel 5.1 diskutierten ß-Peptid handelt es sich hier um eine weniger flexible Struktur, wie aus der ν_A- und Amid I- Region hervorgeht: die Amid A - Bande bei 3270 cm^{-1} dominiert eindeutig über das für "ungebundene" NH-Gruppen charakteristische Signal bei 3440 cm^{-1}.

Im Vergleich zum Spektrum des ß-Peptids ist die ν_A - Bande zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben (3290 cm^{-1} $\rightarrow$ 3270 cm^{-1}) und nicht "gesplittet". Dies spricht für einen einheitlichen Typ von inter- oder intramolekularen Wasserstoffbrücken mit größerer Kraftkonstante als die entsprechenden Bindungen im ß-Peptid. Ähnliches gilt für die Amid I - Region: die steilflankige Bande bei 1625 cm^{-1} (Schulter bei 1680 +/- 20 cm^{-1}) ist auf ein antiparalleles ß-Faltblatt zurückzuführen (55). Bei dem hier vorliegenden Spektrum ist das Signal nicht durch weitere Konformationen "verschmiert", so daß trotz einer Verbreiterung der Amid II - Bande (1535 +/- 10) cm^{-1} von einer homogenen, geordneten Struktur des Peptids ausgegangen werden kann. Eine Faltblatt-Struktur wird sowohl durch das Amid III - Signal (1220, 1230 cm^{-1}) als auch durch die relativ zum ß-Peptid zu höheren Wellenzahlen verschobene Amid V - Bande bestätigt.

Das im Unterschied zu den oxidierten Formen der Peptide II und III (Kap. 5.3) bei 3440 cm^{-1} intensive Signal ist auf die Streckschwingungen "ungebundener" NH-Gruppen zurückzuführen.

Die für ein Oktapeptid sehr starr und eindeutig ausgeprägte Struktur ist wahrscheinlich durch eine antiparallele, "sandwichartige" Polymerisierung der Moleküle - zumindest im KBr-Pressling - zu erklären, wie in Bild 5.2.2 skizziert.

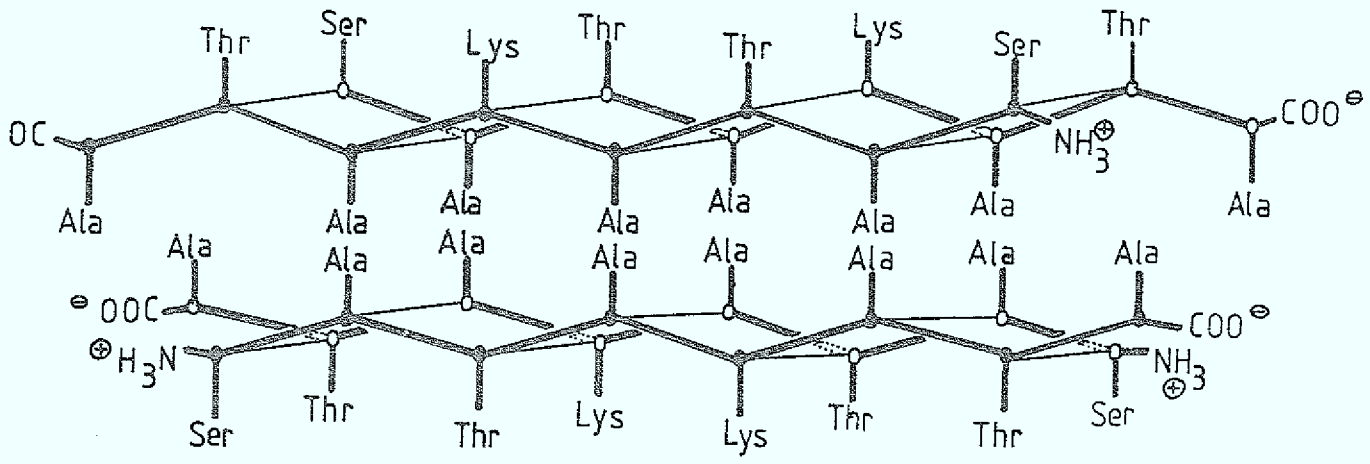


Bild 5.2.2: Modell Con A 1/4

In diesem Modell sind die hydrophoben Alanin-Reste nur aus Gründen der Übersichtlichkeit gegenüberliegend dargestellt. Zur Verkleinerung der hydrophoben Oberfläche des Aggregates werden die Ebenen ineinander verschoben vorliegen, so daß die Alanine direkt benachbart sind.

5.3 Peptide zur Nachbildung der primären Bindungsstelle von BPTI

Der basische pankreatische Trypsin-Inhibitor (BPTI) inhibiert trypsinartige Serin-Proteasen, indem er als Substratanalogon das aktive Zentrum der Enzyme blockiert. Das Molekül besteht aus 58 Aminosäuren; es besitzt drei Disulfidbrücken (Bild 5.3.1).
Nicht nur die Struktur von BPTI selbst, sondern auch die des BPTI/Trypsin - Komplexes wurde durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt (12, 13, 43, 44, 101). Somit ist bekannt, welche Aminosäuren an der Bildung und Stabilisierung des Komplexes beteiligt sind (13, 101). Durch diese Untersuchungen wurde das aktive Zentrum (Lys 15) an der Spitze des eiförmigen Inhibitors lokalisiert (Bild 5.3.1).

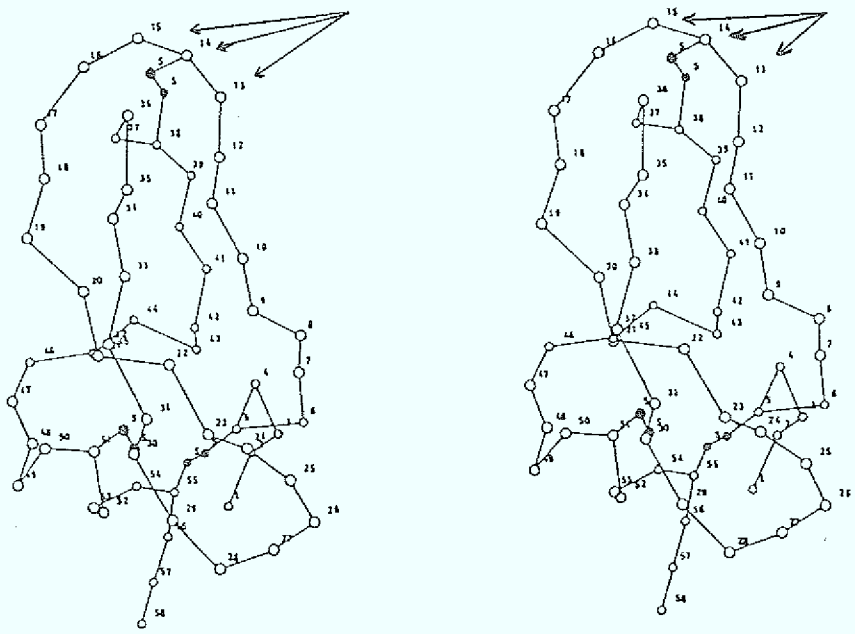


Bild5.3.1:BPTI, dreidimensionale Struktur
Stereobild des Gesamt-Moleküls, angegeben sind die Positionen der α-Kohlenstoffatome (44)
Pfeile: aktives Zentrum des Moleküls

Zur Simulation der Bindungsstelle (Bild 5.3.1) von BPTI wurden drei Peptide synthetisiert (Tabelle 5.3.1, (41)).

Da das aktive Zentrum von BPTI nur den oberen Bereich eines antiparallelen Faltblattes einnimmt (Bild 5.3.1), wurden die beiden "Peptidstränge" unterhalb dieses Bereichs beim Entwurf der synthetischen Peptide unterbrochen und eine neue Verbindung (Pro-Gly) zwischen ihnen eingefügt. Diese Sequenz favorisiert stark einen ß-Turn (23); sie stabilisiert das - im Peptid angestrebte - Faltblatt.

BPTI, nativ	...T-G-P-C-K-A-R-I-I-R.....F-V-Y-G-G-C-R-A...
Peptid I	T-G-P-C-K-A-R--------P-G----Y-G-G-C-G-G
Peptid II	T-G-P-C-K-A----C---I-P-G----Y-C-G-C-R-G
Peptid III	T-G-P-C-K------C-R-I-P-G----Y-G-C-C-R-G

Tabelle 5.3.1: Sequenzen der untersuchten BPTI-Analoga im Vergleich zum aktiven Zentrum von BPTI (41)

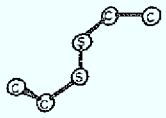
Von Peptid I wurde erwartet, daß bei einer eher groben Ähnlichkeit mit BPTI ein "klassisches", antiparalleles Faltblatt zwischen zwei Turns oder Loops ausgebildet wird, das relativ stabil ist.
Peptid II und III sollten bei einer BPTI eher entsprechenden Struktur ebenfalls zwischen zwei Turns oder Loops ein antiparalleles Faltblatt besitzen. Zur Stabilisierung des weniger regelmäßigen Faltblattes (52, 95) wurde jeweils eine zweite, unterhalb des aktiven Zentrums liegende Disulfidbrücke eingeführt.

Zur Untersuchung der Konformation der Peptide wurde sowohl normale Raman- als auch Infrarot-Spektroskopie eingesetzt. Weiterhin wurden "oberflächenverstärkte Raman"-Messungen (SERS) durchgeführt. Bei dieser

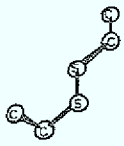
speziellen Methode wird die Probe durch Anlegen einer Potentialdifferenz auf der Oberfläche einer Silber-Elektrode "fixiert" und dort gemessen (s. Kap. 4.1.2). Da die Ergebnisse der Raman- Messungen (NRS und SERS) jedoch bereits weitgehend beschrieben wurden (41), sollen sie im folgenden nur kurz rekapituliert werden.

5.3.1 Raman-Messungen (NRS und SERS) an Peptid I, II und III

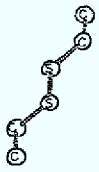
Peptid I kann in der oxidierten Form nur eine Disulfidbrücke ausbilden, deren Position demzufolge festgelegt ist. Da Peptid II und III jedoch jeweils vier Cysteine besitzen, können die Disulfidbrücken hier theoretisch in jeweils drei verschiedenen Konformationen vorliegen. Eine Bestimmung der Konformation von Disulfidbrücken ist über die Lage ihrer S-S Streckschwingungen möglich (107, 108) (Bild 5.3.2).



Gauche-Gauche-Gauche 510 cm^{-1}



Gauche-Gauche-Trans 525 cm^{-1}



Trans-Gauche-Trans 540 cm^{-1}

C-S Streckschwingung	Gauche	630 - 670 cm^{-1}
	Trans	700 - 745 cm^{-1}
S-H Streckschwingung		2560 - 2590 cm^{-1}

Bild 5.3.2: Disulfidbrücken: Konformation und charakteristische Frequenz (107, 108)

Raman-Spektren konnten nur von Peptid II (oxidiert) und III (reduziert) aufgenommen werden, da alle anderen Proben stark lumineszierten (Bild 5.3.3).

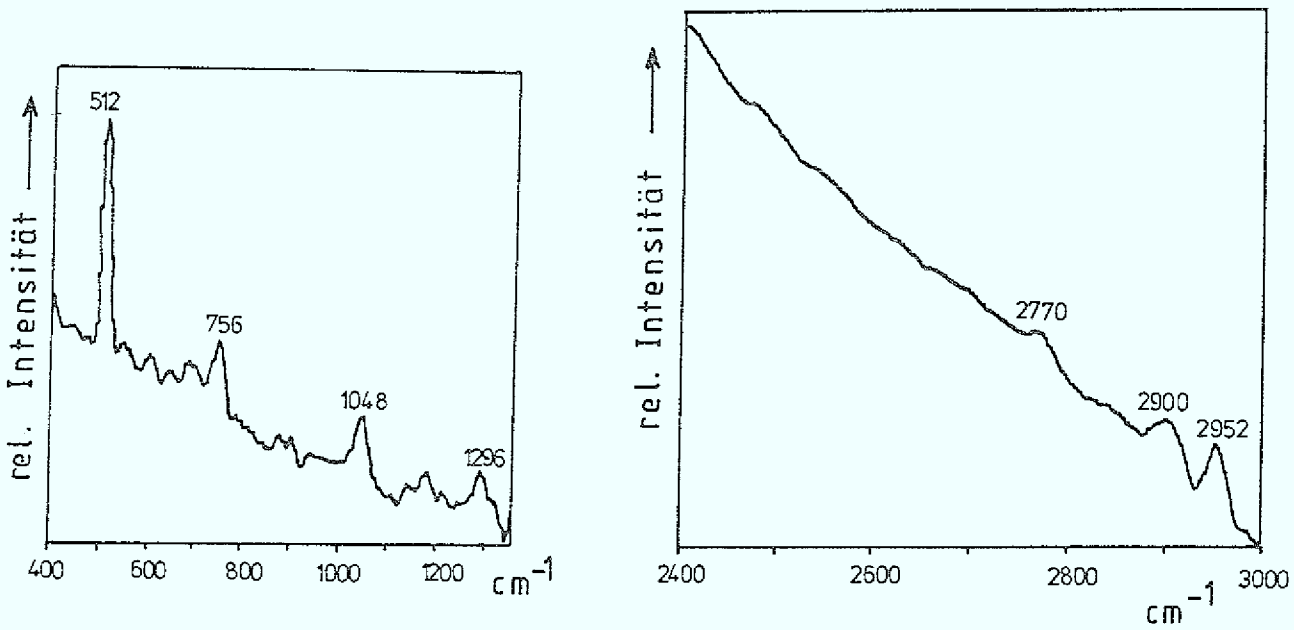


Bild 5.3.3 a): Raman-Spektrum, Peptid II oxidiert
Probe: polykristallin, RT
514.5 nm, 20 mW, Spaltenbreite: 500 µm
4 cm^{-1}/Step, 2 sec Integr./Step

Das Spektrum von Peptid II, oxidiert (Bild 5.3.3 a) ergibt eindeutig eine ausschließlich GGG - Struktur der Disulfidbrücken. Signale freier SH-Gruppen treten nicht auf, d.h. das Peptid war vollständig oxidiert. Bezüglich der Cysteine war die vorliegende Probe also völlig homogen.

Im Gegensatz dazu sind in dem für Disulfidbrücken charakteristischen Bereich von 500 - 550 cm^{-1} des reduzierten Peptid III (Bild 5.3.3 b) keine Signale zu finden, wohl aber bei 646 und 745 cm^{-1}, der Region der C-S Streckschwingungen. Somit kann auch hier von einer - bezüglich der Disulfidbrücken - homogenen Probe ausgegangen werden, obwohl die Existenz freier Sulfhydryl-

gruppen (2560 - 2590 cm^{-1}) nicht direkt durch eine Messung nachgewiesen wurde (Bild 5.3.3 b).

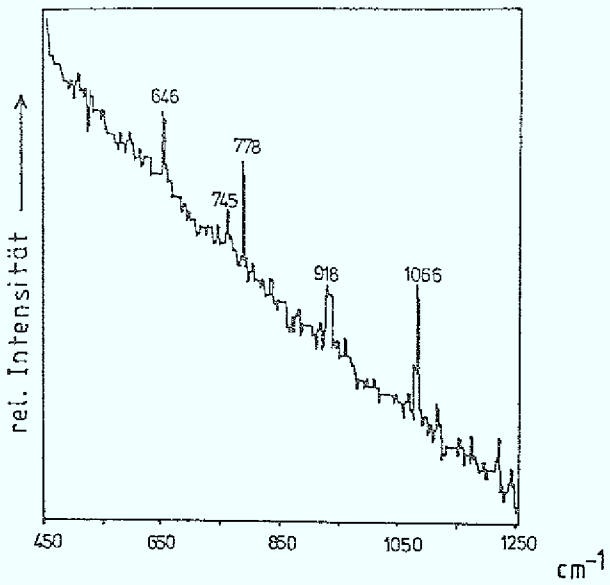


Bild 5.3.3 b): Raman-Spektrum, Peptid III reduziert
Probe: polykristallin, RT
676.4 nm (Kr-Laser)

Die SERS-Spektren (Bild 5.3.4) können nur über solche Gruppen Aufschluß geben, die der Elektrodenoberfläche eng benachbart liegen (die Distanz sollte ca. 5 Å nicht überschreiten (33, 142)). Demzufolge werden die Signale hauptsächlich von den Seitenketten und nicht vom "backbone" des Peptids erzeugt. Die Ergebnisse der SERS - Spektroskopie lassen sich wie folgt zusammenfassen: Peptid II und III haben eine sehr ähnliche Struktur bzw. Oberflächen-Ladungsverteilung, da sie in ähnlicher Weise an die Elektrode adsorbieren. Peptid I zeigt ein stark abweichendes Spektrum, das von einer anderen Adsorption des Moleküls an die Elektrode verursacht wird. Hieraus ist eine von den anderen Peptiden abweichende (Sekundär-) Struktur abzuleiten. Wie von C. Hilbich beschrieben (41), bestätigen die spektroskopischen Ergebnisse die in

der Planung aufgestellten Modelle.
Aus bisher ungeklärter Ursache ist das Spektrum von Peptid II ungewöhnlich intensiv.

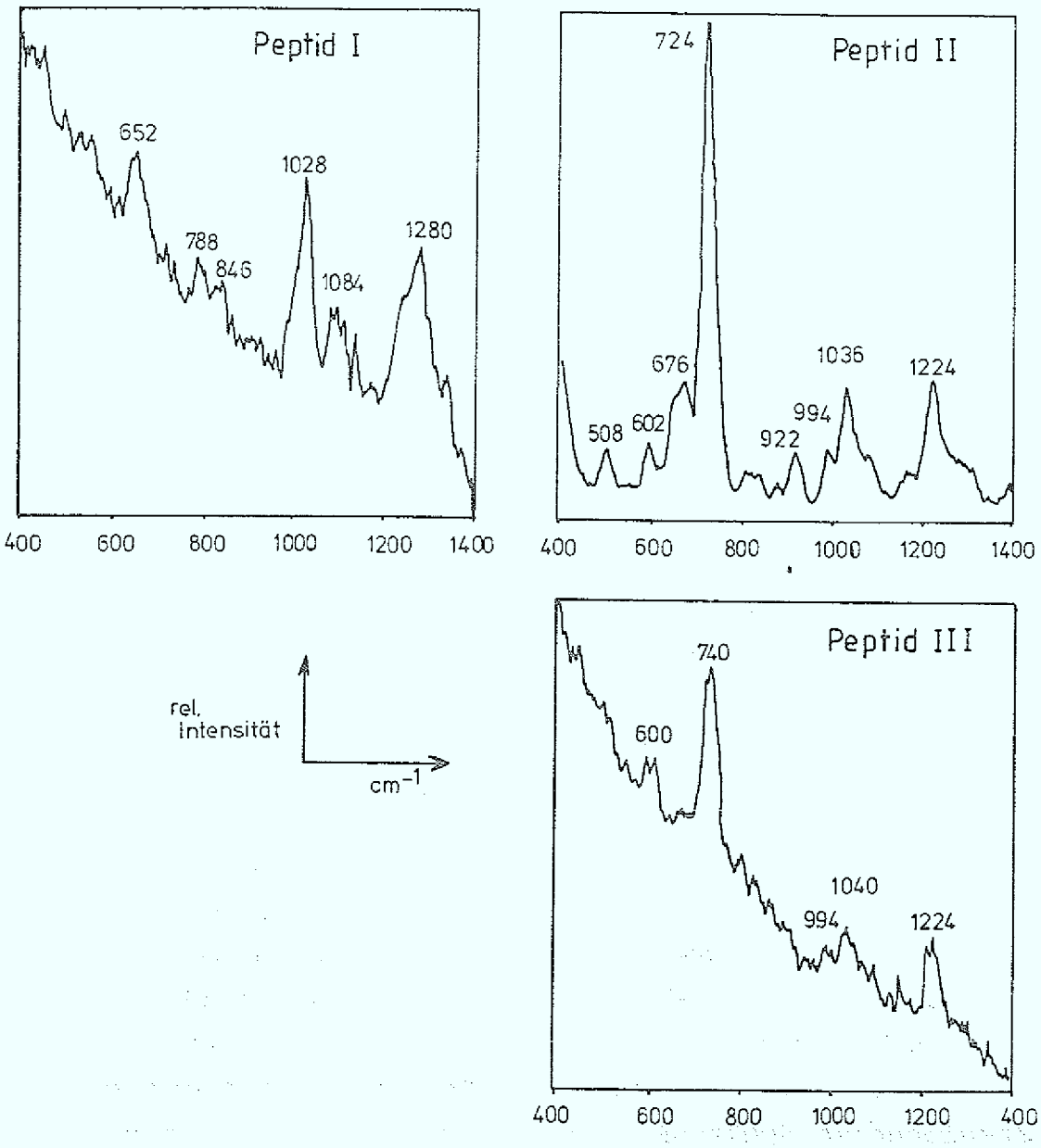


Bild 5.3.4:SERS-Spektren der oxidierten Peptide I, II und III

Direkte Information über die Sekundärstruktur der Peptide im oxidierten bzw. reduzierten Zustand konnte durch IR-Spektroskopie erhalten werden.

5.3.2 IR-spektroskopische Untersuchungen (dispersiv und ATR)

Die Spektren der Peptide (KBr-Pressling) in reduzierter bzw. oxidierter Form sind in Bild 5.3.5, die entsprechenden Frequenzen in Tabelle 5.3.2 zusammengestellt.

Zuordnung	Peptid I	Peptid II	Peptid III
freie NH_3	3270-3390 VS br	3460 MS	3450 M sh
Amid A		3230 VS	3230 VS
		3190 S sh	3190 sh
		3110 W	3100 MW
Amid B	3080 M	3040 W	3050 MW
CH_2/CH_3 s	2980 MW	2990 S	2990 S
	2940 MW	2940 W sh	2950 W
			2940 W sh
		2920 W sh	2920 W sh
	2880 VW sh	2890 M sh	2980 W sh
Amid I			1730 VW
	1725 sh	1715 VW	1715 VW sh
	1685 sh	1690VW sh	1695 VW sh
		1675 VW sh	
	1650 S br	1627 S	1627 VS
Amid II		1560 sh	1575 VW sh
	1550 sh	1550 S	1550 VS
	1540 S	1530 sh	
	1520 M sh		1520 sh
		1500 sh	1505 sh
Amid III	1450 M	1460 MS	1460 M
	1400 MS	1400 S	1400 S
		1390 sh	1395 M sh
		1355 MW	1355 M sh
	1335 MW		
		1290 S	1290 S

Zuordnung	Peptid I	Peptid II	Peptid III
		1280 sh	
	1260 S		
	1240 S		
		1205 M	1205 M
		1185 W sh	1185 sh
	1160 M	1135 M	1130 M
	1110 M		
	1090 M		
	1045 MW	1060 sh	1055 VS
		1050 S	1045 VS
	1020 M	1035 VS	1030 VS
	920 W sh br	905 M	910 M
	880 W sh br	895 M	895 MW
			785 sh
Amid V		750 M	745 M
	665 M		665 M sh
	650 M	650 S	650 MS
	610 M	620 MW	620 MS
	600 W sh	605 MW	610 sh
		590 S	595 S
	550 W br		
			485 W
	460 W br		455 VW
		380 S	390 S

Tabelle 5.3.2 a): Frequenzen der IR-Spektren der reduzierten Peptide (Abkürzungen s. Kap. 3.2)

Tabelle 5.3.2 b): Frequenzen der IR-Spektren der oxidierten Peptide

(Abkürzungen s. Kap. 3.2)

Zuordnung	Peptid I		Peptid II		Peptid III	
freie NHs	3300-3400 VS br				3400	sh
Amid A			3320	sh	3320	sh
			3230	VS	3230	Vs
Amid B			3100	MW	3100	MW
	3080	M	3050	MW sh	3060	MW sh
CH_2/CH_3 s			2990	S	2990	S
	2935	MS	2940	MS sh	2940	W sh
			2920	W sh	2920	W sh
			2890	W sh	2890	M sh
Amid I	1720	sh			1735	VW
			1715	VW	1715	VW
	1675	sh	1675	W sh	1695	W sh
			1665	W sh		
	1650	S br	1627	S	1627	VS
Amid II	1565	sh			1575	W
	1540	S	1550	S	1550	VS
	1520	M sh			1535	W sh
Amid III	1445	M	1460	MS	1455	SM
	1400	MS	1400	S	1400	VS
			1390	sh	1380	M sh
			1385	sh	1360	sh
	1335	MW	1330	VW	1315	M sh
	1260	S br	1295	S	1290	S
	1240	S br	1260	VW	1260	M
					1230	M sh
			1210	MW	1210	M
	1160	M	1185	VW sh	1185	M sh
					1155	M
					1140	M
	1100+/-15 M br		1130	M	1130	M
			1060	S sh	1080	sh
	1050	MW sh	1045	S	1055	S
	1020	M	1035	VS	1035	VS
					980	MW
					920	M
	920	W sh br	905	MW	905	M
	880	W sh br	875	WM	860	M
			785	W	815	MW
Amid V			740	W	740	M
					680	W
	650	M br sh	665	M	660	MW
			625	S	625	MS
	610	M	610	sh	610	sh
			595	S	595	S
	540	MW br	545	W	550	MW
	455	MW	455	MW	430	MW
	390	W	390	S	390	S

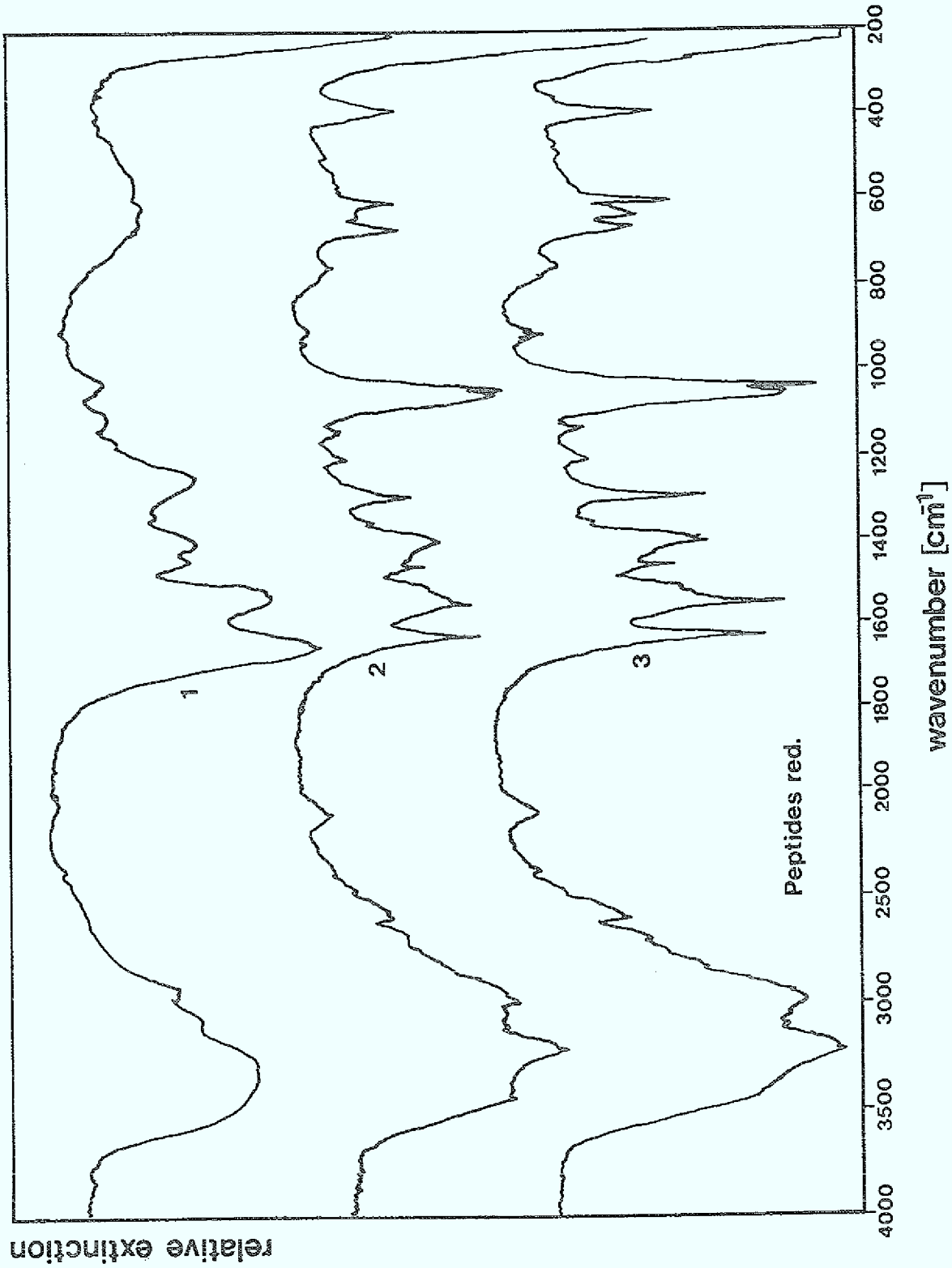


Bild 5.3.5 a): IR-Spektren der reduzierten Formen der Peptide I bis III

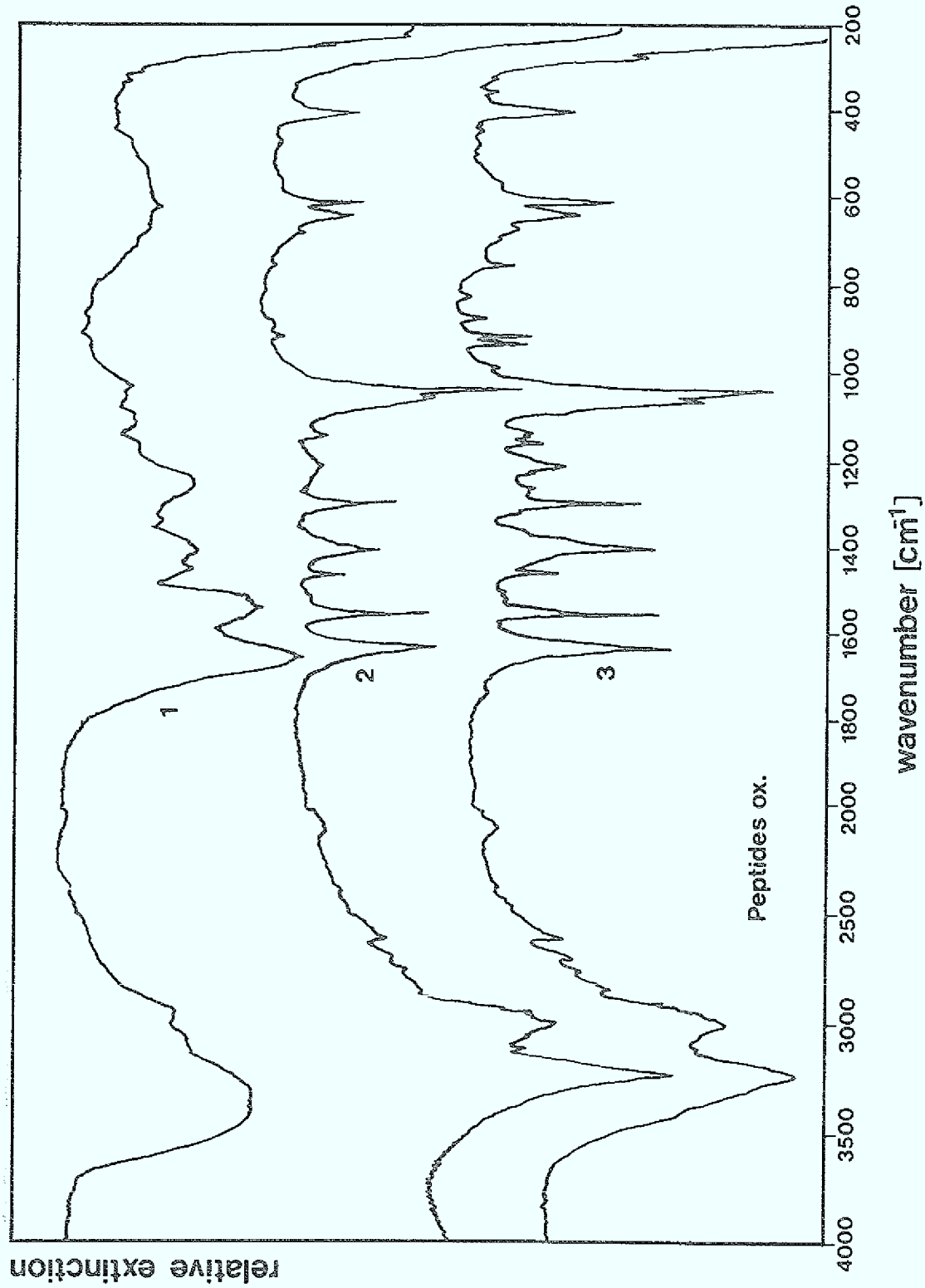


Bild 5.3.5 b): IR-Spektren der oxidierten Formen der Peptide I bis III

5.3.2.1 Peptid I

Im Gegensatz zu Peptid II und III nimmt Peptid I keine regelmäßige Sekundärstruktur ein, wie aus den Amid I -, III - und A - Banden ersichtlich ist (Bild 5.3.6). Welche Konformation überwiegt, ist im IR-Spektrum nicht feststellbar, da ein Amid I - Signal bei 1650 cm^{-1} typisch für helicale und ungeordnete Strukturen sowie parallele Faltblattkonformationen ist. Klar auszuschließen ist jedoch ein regelmäßiges antiparalleles ß-Faltblatt.

Die Oxidation des Peptids bewirkt außer einer leichten Verschiebung der Amid A - Bande zu niedrigeren Wellenzahlen (ca. 30 cm^{-1}) keine gravierende Veränderung der Konformation.
Hinweise auf einen ß-Turn liefern die Amid I - und III - Signale. Eine Schulter (1725 cm^{-1}) der Amid I - Bande kann durch CO s - Schwingungen der Carboxylgruppen von Asp und Glu hervorgerufen werden. Da diese Aminosäuren in keinem der drei Peptide enthalten sind, ist das besonders in Peptid I intensive Signal der Amid I - Bande wahrscheinlich einem "nicht idealen" ß-Turn zuzuordnen. Diese Annahme wird durch die schwache Aufspaltung des Amid III - Signals unterstützt, wobei der niederfrequente Bereich (größer als 1250 cm^{-1}) einem Loop zuzuordnen wäre. Die oben erwähnte Verschiebung der Amid A - Bande nach Oxidation des Peptids kann in diesem Fall einfach durch die Stabilisierung der intramolekularen Wasserstoffbrücken des Turns erklärt werden.

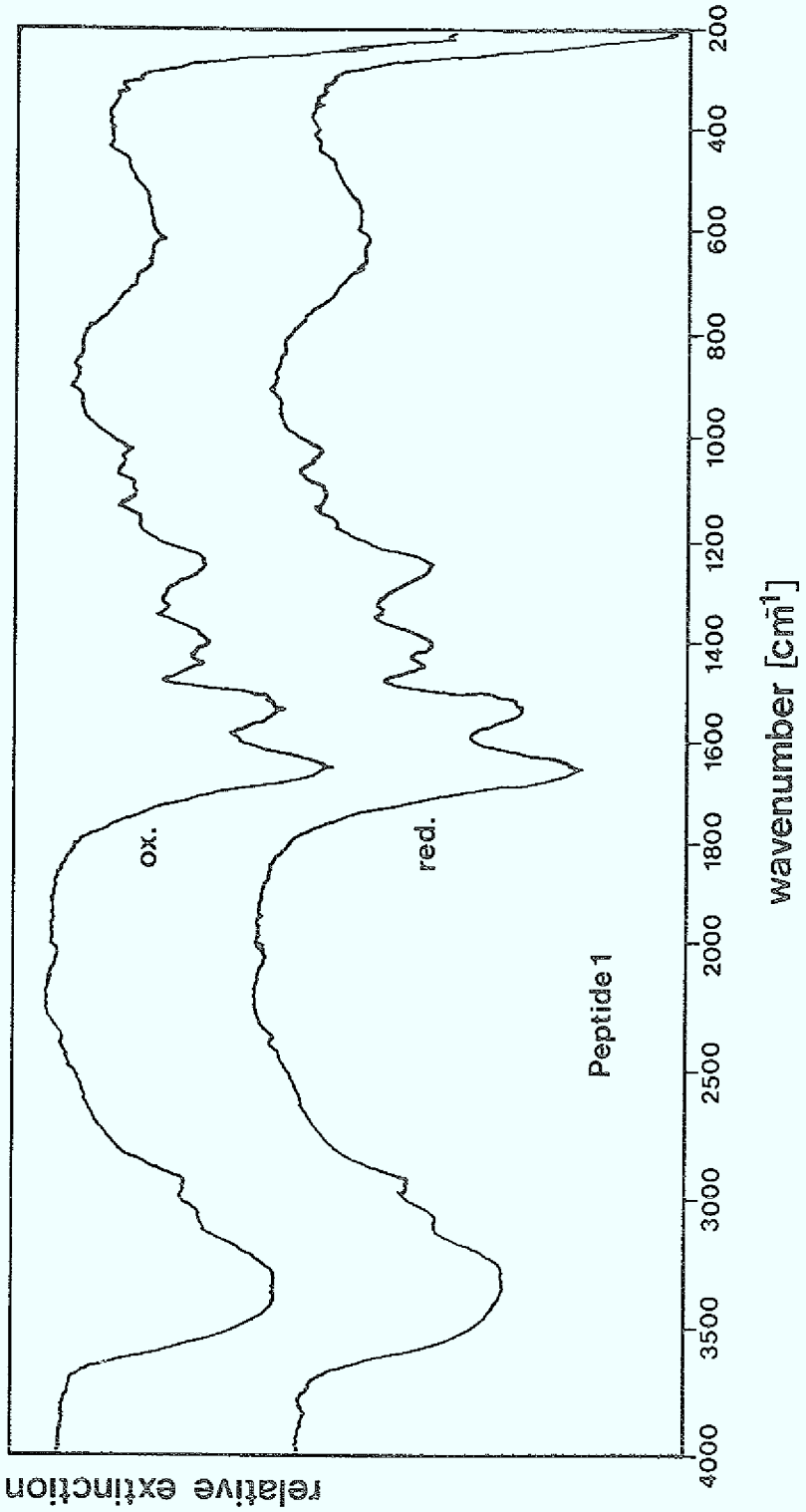


Bild 5.3.6: Vergleich der IR-Spektren des Peptid I
a) oxidiert
b) reduziert

5.3.2.2 Peptid II

Die Sekundärstruktur des Peptid II, oxidiert oder reduziert, erscheint im IR-Spektrum als außergewöhnlich stabil und uniform, da die Amid - Banden besonders des oxidierten Peptids nicht verbreitert sind (Bild 5.3.7).

Beide Formen des Peptids werden durch ihre Amid I - Bande (1627 cm^{-1}) eindeutig als regelmäßiges, antiparalleles ß-Faltblatt charakterisiert (55, 57). Diese Zuordnung wird in beiden Fällen von einer Amid III - Bande bei 1210 cm^{-1} bestätigt; hierbei kann nicht entschieden werden, ob es sich um ein ein APRS oder APPS handelt. Eine weitere Bande bei 1290 cm^{-1} könnte OH-Deformationsschwingungen des Threonin zugeordnet werden. Da ein entsprechendes Signal in den Spektren des Peptid I nicht vorhanden ist, ist die Linie auf die Amid III - Schwingung eines oder mehrerer ß-Turns zurückzuführen (56a), was den Erwartungen entspricht.

In ähnlicher Weise wie beim Peptid I scheint die Oxidation des Peptids das ß-Faltblatt als prinzipielle Struktur des Moleküls nicht gravierend zu beeinflussen. Unterschiede zeigen sich jedoch im Bereich der Amid A - Bande. Abgesehen von - ungewöhnlich stabilen - Wasserstoffbrücken (3230 cm^{-1}) liegt in der reduzierten Form ein Anteil der NH-Gruppen "frei" vor (3460 cm^{-1}). Die oxidierte Form besitzt ausschließlich "gebundene" NH-Gruppen. Es sind zwei Formen zu unterscheiden: ein bei weitem überwiegender Anteil bei 3230 cm^{-1}, sowie eine schwache Schulter bei 3320 cm^{-1}.

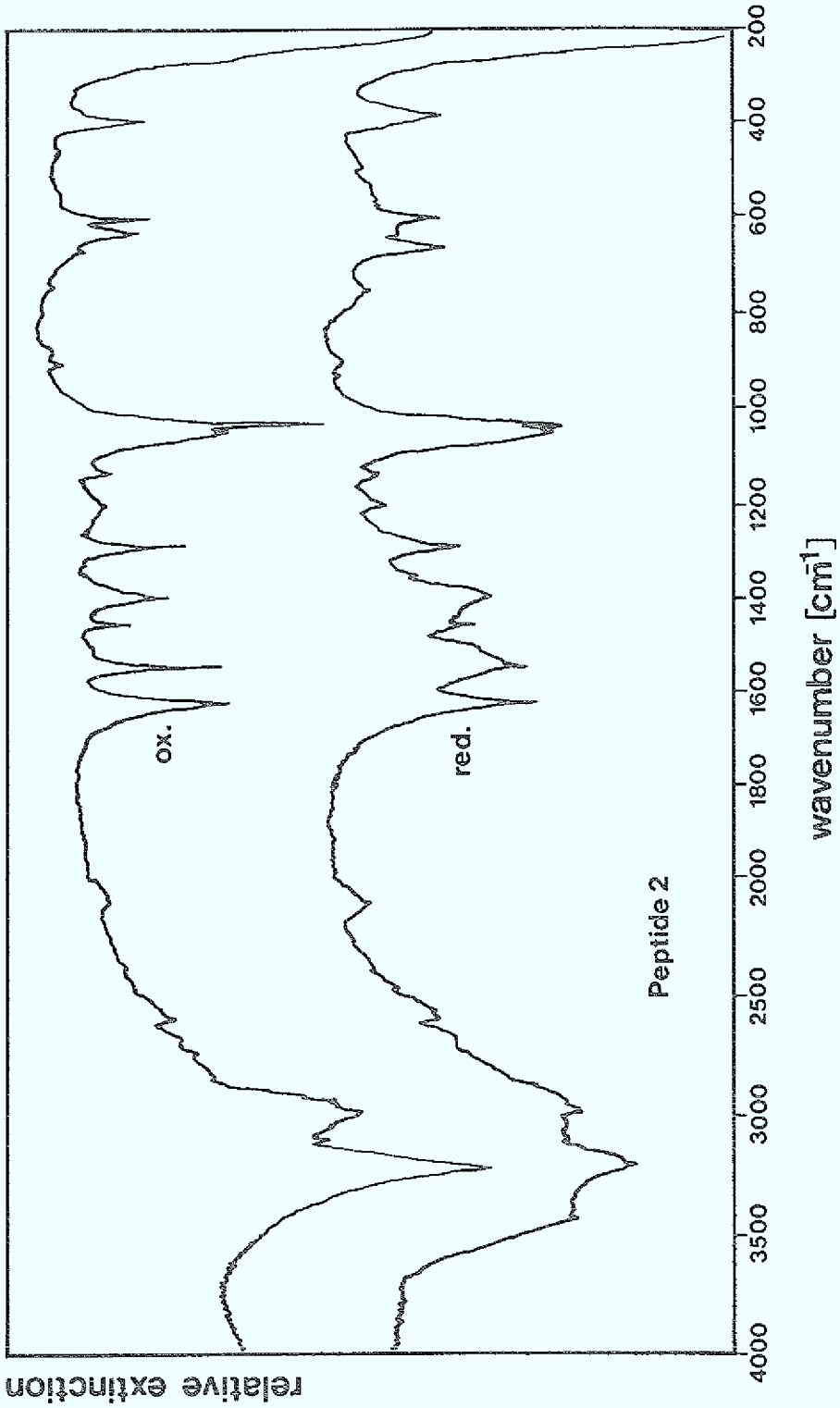


Bild 5.3.7: IR-Spektren des Peptid II
a) oxidiert
b) reduziert

Im Vergleich zu anderen Peptiden (vgl. z.B. Kap 5.2) sind die inter- und/oder intramolekularen Wasserstoffbrücken des oxidierten Peptids von einer extremen Homogenität und Stabilität, was mit der Struktur der Amid I, II und III - Banden übereinstimmt. Die Oxidation des Peptids bewirkte also eine "Fixierung" der antiparallelen ß-Faltblattstruktur und mindestens eines Turns. Auch die reduzierte Form von Peptid II nimmt schon diese Sekundärstruktur an, jedoch weniger rigide.

Die bis jetzt diskutierten Spektren von Peptid II wurden alle im KBr-Pressling aufgenommen. Es stellt sich somit die Frage, inwieweit die im Pressling "pseudokristallin" vorliegende Struktur in wässriger Lösung erhalten bleibt. Deshalb wurden FTIR-Messungen in einer "Macro-Circle Cell" durchgeführt (Bild 5.3.8).

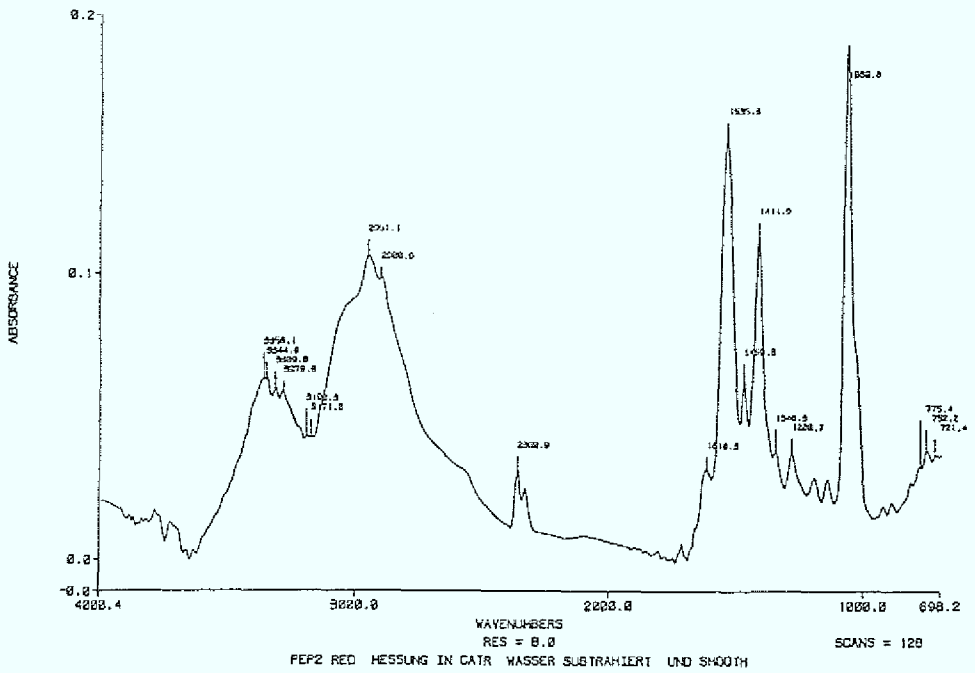


Bild 5.3.8: FTIR-Spektrum des Peptid II, reduziert in wässriger Lösung, Wasser subtrahiert
Macro C-ATR, Fassungsvermögen des Probengefäß: ca. 5 ml
Konzentration: 40 mg Peptid/ml H_2O

Das dargestellte Spektrum wurde an einem FTS40 - Spektrometer der Fa. BIORAD, Düsseldorf aufgenommen. Identische Ergebnisse wurden mit einem SDX 20-Spektrometer der Fa. NICOLET, Offenbach erzielt.

Die gegenüber "normalen" IR-Spektren veränderten Intensitäten der Linien sind zum einen auf das Messverfahren, C-ATR, zurückzuführen , zum anderen auf die Subtraktion des Wassers.
Die Amid I, II und III - Banden sind zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben (1625 → 1616 cm^{-1}, 1550 → 1535 cm^{-1}, 1290 → 1281 cm^{-1}), dies liegt jedoch aufgrund der vorgenommenen Manipulationen des FTIR-Spektrums (H_2O-Subtraktion und Glättung) innerhalb der Fehlerbreite. Die Amid A - Banden sind im Verhältnis zu denen des "normalen" Spektrums zu höheren Wellenzahlen verschoben, d.h. sie sind weniger stabil. Dies war zu erwarten, da hier H-Brücken auch zwischen Peptid und umgebenden Wassermolekülen ausgebildet werden.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, daß die Sekundärstruktur des reduzierten Peptid II in wässriger Lösung abgesehen von einer leichten Destabilisierung oder "Lockerung" der Wasserstoffbrücken gegenüber der in KBr nicht verändert ist. Auch in Liquid liegt das Peptid als antiparalleles Faltblatt mit Turn vor.

5.3.2.3 Peptid III

Die IR-Spektren des Peptid III zeigen ein ähnliches Bild wie die des Peptid II, was aufgrund der SERS-Messungen (Kap. 5.3.1, Bild 5.3.4 (41)) zu erwarten war. Auch dieses Peptid nimmt schon im reduzierten Zustand eine relativ starre ß-Faltblattstruktur an, in der min-

destens ein Turn integriert ist (Bild 5.3.9, Lage der Amid - Banden).

Amid A - Bande sowie die Amid III - Bande des oxidierten Peptid III zeigen im Unterschied zum Peptid II, oxidiert, eine deutliche Strukturierung. Da die Amid I - Bande jedoch ebenso eindeutig ist wie bei Peptid II, ist die Inhomogenität der ν_A-Schwingung sowie das zusätzliche Signal bei 1260 cm^{-1} auf eine lokale Verzerrung der Gesamtstruktur zurückzuführen. Obwohl der "Deformation" freie NH-Gruppen zuzuordnen sind, ist sie nicht flexibel, da die Amid III - Linie sehr schmal ist (vgl. Bild 5.3.9). Das ß-Faltblatt sowie Turn(s) als prinzipielle Struktur werden nicht beeinflußt, da ihre Signale unverändert sind. Bei der "Deformation" muß es sich somit um den Bereich der Disulfidbrücken bzw. des Lys-Restes handeln.

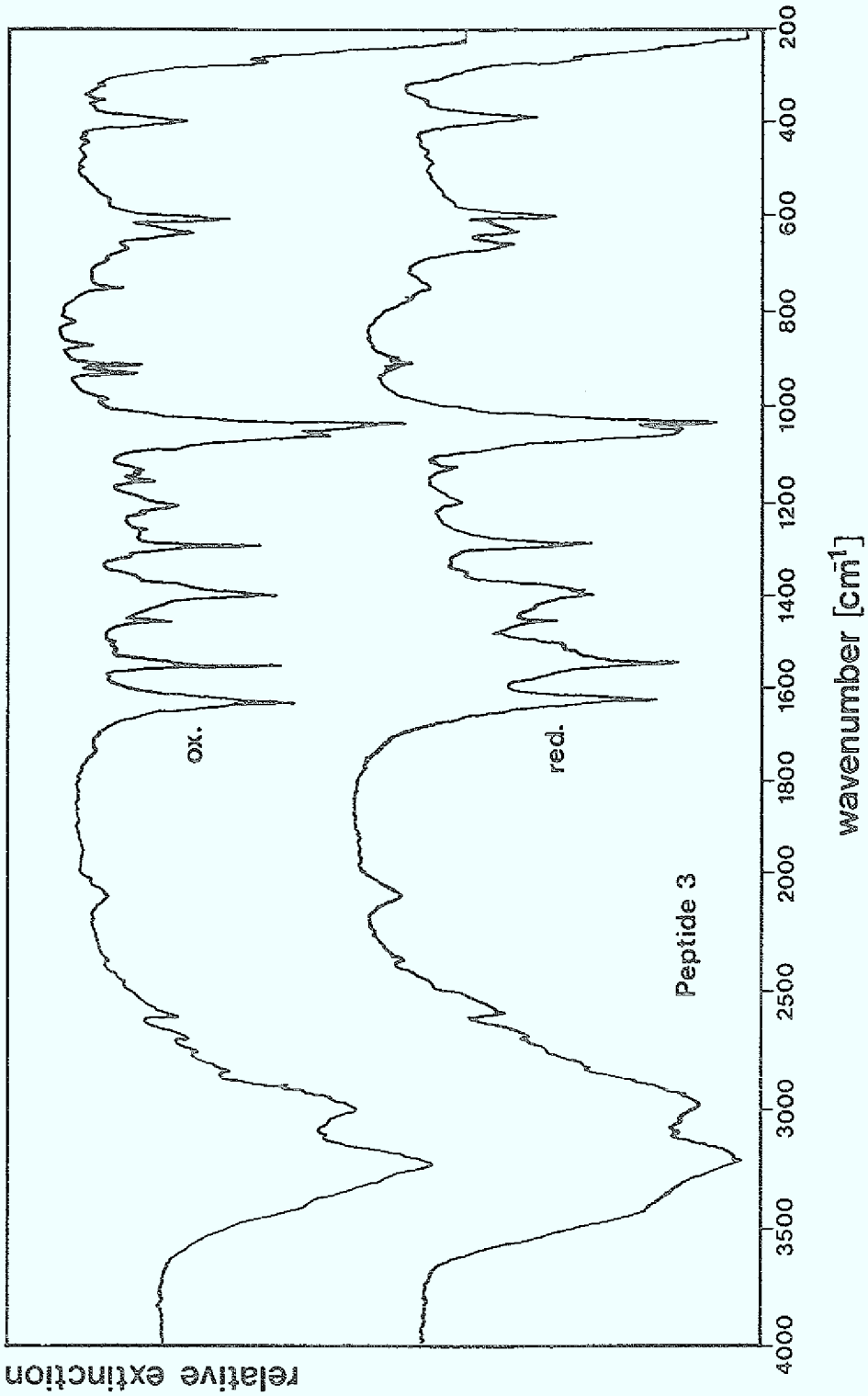


Bild 5.3.9: IR-Spektren des Peptid III

a) oxidiert

b) reduziert

5.3.2.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Aus den spektroskopischen Untersuchungen ergibt sich zusammenfassend folgendes Bild für die Struktur der Peptide:

- Die Sekundärstruktur von Peptid I kann nicht eindeutig identifiziert werden. Es handelt sich jedoch nicht um ein regelmäßiges antiparalleles ß-Faltblatt, wahrscheinlich eher um eine unregelmäßige Struktur, in die ein ß-Turn eingebettet ist.

- Peptid II und III nehmen eine überaus rigide, antiparallele ß-Faltblattstruktur an, in die ein oder mehrere ß-Turns eingebettet sind. Falls mehrere Turns vorliegen, müssen sie dieselbe Struktur besitzen.

- Die Strukturen der reduzierten Peptide II und III sind identisch. Infolge der Oxidation wird in Peptid III eine "Deformation" im Bereich der Disulfidbrücken fixiert.

- Es wurde nachgewiesen, daß in der oxidierten Probe des Peptid II Disulfidbrücken vorliegen, in der reduzierten Probe des Peptid III fehlen.
  Disulfidbrücken in der oxidierten Probe des Peptid III, sowie die Reduktion des Peptid II (red.) wurden nicht durch Messungen belegt. Von diesen Formen der Peptide in den entsprechenden Proben kann jedoch aufgrund der IR- und SERS- Messungen ausgegangen werden.

- Die Disulfidbrücken der oxidierten Peptide II und III liegen in der GGG-Form vor. Diese Konformation wurde für Peptid II nachgewiesen. Die identische Struktur

von Peptid II und III, nämlich ein antiparalleles Faltblatt, sowie gleiches Adsorptionsverhalten an der Elektrode schließt stark abweichende Konformationen der S-S - Brücken in Peptid III aus.

- Die Sekundärstruktur der Peptide wird durch eine Oxidation nicht verändert, sondern nur fixiert. Dies trifft in ähnlicher Weise für ihre Struktur im KBr-Pressling zu. Sie ist gegenüber der Konformation in wässriger Lösung quasi "eingefroren", wie für Peptid II (red.) gezeigt wurde.

Diese Daten sind konsistent zu den aus biochemischen Untersuchungen gewonnenen:
Inhibitionstest belegen, daß Peptid III , gefolgt von Peptid II der in BPTI vorliegenden Konformation des aktiven Zentrums am ehesten entspricht. Es wurde angenommen, daß dies auf der Stabilisierung der Struktur durch die in Peptid III anders angeordnete zweite Disulfidbrücke beruht (41). Die Inhibitionskonstante von Peptid I liegt deutlich über der der beiden anderen Peptide. Wie oben beschrieben, haben die oxidierten Formen der Peptide II und III bis auf eine, lokal begrenzte, Verzerrung identische Sekundärstrukturen. Diese "Modifikation" von Peptid III konnte der Region der Disulfidbrücken zugoordnet werden. Peptid I zeigt nicht nur eine abweichende Sekundärstruktur, sondern darauf beruhend, eine andere Anordnung der Seitenketten. Eine Auswirkung dieser strukturellen Gegebenheiten auf die Inhibitionskonstanten deckt sich vollständig mit den Erwartungen.

Es kann nicht generell davon ausgegangen werden, daß Peptide in wässriger Lösung und als Einkristall dieselbe Sekundärstruktur annehmen (127), obwohl dies oft zutrifft. Aufgrund der bis jetzt vorliegenden Ergebnisse

im Vergleich KBr-Pressling zu wässriger Lösung (Kap. 5.1: ß-Peptid, sowie (91)) scheint die Sekundärstruktur der (lyophilisierten) Peptide im Pressling einer quasi "eingefrorenen" Struktur in wässriger Lösung zu entsprechen. Diese Aussage wird durch Messungen an Peptid-Aggregaten (Kap. 5.4.3) bestätigt. Somit sind Messungen zur Struktur von Peptiden im KBr-Pressling für deren Verhalten im biologischen, wässrigen Medium sinnvoll und relevant.

5.4 Natürliches und synthetisches Amyloid des Morbus Alzheimer

Die bei der Autopsie einer dementen Patientin von A. Alzheimer festgestellten, atypischen pathologischen Gehirnveränderungen führten 1907 zur Definition und Charakterisierung einer später nach ihrem Entdecker benannten präsenilen Demenz (31, 69). Aufgrund statistischer Untersuchungen wurde der Morbus Alzheimer später abhängig vom Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs und der Schwere des Verlaufs in zwei Formen untergliedert (112, 124):

- die Alzheimersche Krankheit im engeren Sinn (AD), heute als familiäre Form der Alzheimer Demenz bezeichnet.
  Sie beginnt vor dem 65. Lebensjahr, oft mit 40-50 Jahren, und verhält sich wie eine autosomale, dominante Erbkrankheit.
- senile Demenzen vom Alzheimertyp (SDAT), heute als sporadische Form der Alzheimer Demenz bezeichnet.
  Diese Form tritt nicht familiär gehäuft auf. Die Erkrankten werden erst mit 65 - 75 Jahren klinisch auffällig. Es handelt sich um eine mildere Form der Demenz, die aber stetig progressiv verläuft und nach 6 - 12 Jahren indirekt zum Tode führt.

Beide Varianten werden häufig zusammengefaßt und sind die Ursache der Mehrzahl aller senilen Demenzen. AD und SDAT gelten mittlerweile nach Herz-/Kreislauferkrankungen, Tumoren und Diabetes als vierthäufigste Todesursache in den USA (38). Die soziale und auch ökonomische Bedeutung dieser Krankheit kann somit kaum überschätzt werden, zumal von einem weiteren Anstieg des mittleren Lebensalters der Bevölkerung ausgegangen werden muß.

Der klinische Verlauf des Morbus Alzheimer wird in sieben Stufen eingeteilt (96): Gedächtnis- und Sprachstörungen werden von Störungen im Bewegungsablauf und der zeitlichen/räumlichen Orientierung gefolgt. Die anfängliche Verwirrtheit der Patienten entwickelt sich zur schweren Demenz, bei der ständige Betreuung und Pflege erforderlich ist.
Histologisch sind AD und SDAT neben anderen Veränderungen, z.B. Neuronenverlust und Gliose, durch Proteinablagerungen in jeweils typischen Hinregionen zu charakterisieren (Bild 5.4.1):

- intrazelluläre Neurofibrillenbündel (NFT)
- extrazelluläre amyloide und neuritische Plaques (APC), sowie
- amyloide Proteine der congophilen Angiopathie (ACA).

Die Dichte der NFTs und APCs ist ungefähr proportional zum Grad der Demenz (87, 113). Solche, für den Morbus Alzheimer charakteristischen Strukturen sind weiterhin bei Patienten mit Down' Syndrom ab dem 35.-40. Lebensjahr in analogen Hirnregionen nachzuweisen (2, 16, 99).

Im Cortex treten NFTs ausschließlich in den Pyramidenzellen auf, meist im Perikaryon, das fast vollständig ausgefüllt wird (45, 112). Vereinzelt findet man neurofibrilläre Bündel auch in Dendriten oder Neuriten, vorwiegend dort, wo diese durch amyloide Plaques verlaufen (122).
Die vorherrschende Komponente der NFTs besteht nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen aus linksgewundenen, gepaarten helicalen Filamenten mit einem Durchmesser von 160-220 Å (Bild 5.4.1). Bei einer Ganghöhe von 800 Å verengen sie sich regelmäßig zu einem Durchmesser von 60-100 Å (50, 81, 111, 123).

Bild 5.4.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme gepaarter helicaler Filamente

1986 konnte von Kirschner et al. (51) durch Röntgenstreuung an partiell orientierten PHF-Pellets eine ß-Faltblattstruktur vom cross-ß Typ nachgewiesen werden (frühere Ergebnisse hierzu vgl. (34, 36)). Die Orientierung der Polypeptidketten verläuft demnach senkrecht zur Fibrillenachse. Bild 5.4.2 faßt die Ergebnisse dieser Untersuchung an PHFs für einen Kristalliten zusammen.

Korrelation der Röntgenstrukturanalysen mit den elektronenoptischen Ergebnissen ergibt, daß die cross-ß Kristallite wahrscheinlich als strukturelle Einheit die beiden Protofilamente der PHFs aufbauen. In Richtung der Filament-Achse entsprechen ca. 10 Kristallite (≙ 760 Å) der Ganghöhe der "Helix". Zwei nebeneinanderliegende Kristallite, entweder "side-to-side" oder "face-to-face", entsprechen sowohl dem minimalen (60-100 Å) als auch dem maximalen (160-220 Å) Durchmesser eines PHF.

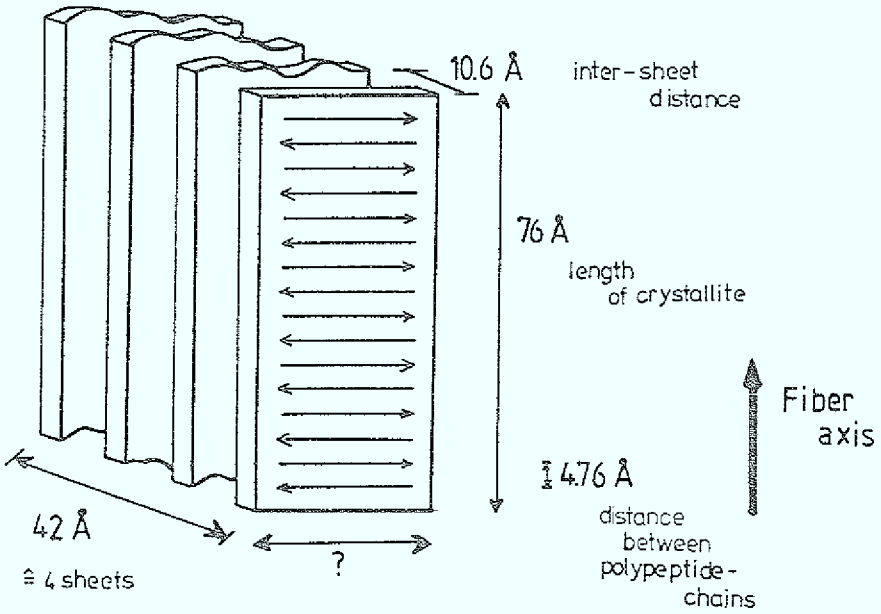


Bild 5.4.2: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse von Kirschner et al. für einen cross-ß Kristalliten.
Die Breite des Kristalliten wurde nicht bestimmt, sollte aber 3-5 nm betragen, da dies ungefähr der Durchmesser eines Protofilamentes ist.
Die antiparallele Anordnung des Faltblattes konnte in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden, wurde aber als wahrscheinlich angenommen.

Amyloide Plaques bestehen im Gegensatz zu NFTs aus einfachen, geraden Filamenten mit einem Durchmesser von 70-100 Å. Der Gesamtdurchmesser des Plaques beträgt 10-200 µm, ist also sehr variabel. Kirschner et al. wiesen durch Röntgenstrukturanalysen an unorientierten, gereinigten Proben von APCs nach, daß auch diese Filamente eine cross-ß Struktur besitzen (51). Es können keine Angaben über die Dimensionen eines APC-Kristalliten gemacht werden.

Die Proteine der congophilen Angiopathie stellen ein weiteres charakteristisches Symptom des Morbus Alzheimer dar. Dieses extrazelluläre Proteinaggregat aus ebenfalls einzelsträngigen, geraden Filamenten wird im Cortex und den Leptomeningen beobachtet (37). ACAs sind in die Tunica media der Blutgefäßwand eingelagert und dehnen sich mit zunehmendem Alter in Richtung Gefäßlumen aus. Der Apoplex, der bei einem Drittel der Alzheimer-Patienten auftritt, ist auf das Durchbrechen des Endothels durch das Proteinaggregat zurückzuführen (35). Auch für diese Proteine konnte durch Röntgenstrukturanalyse eine ß-Faltblattstruktur nachgewiesen werden (17).

Die Aminosäuresequenzen der oben beschriebenen Proteine sind bekannt (39, 68, 88). NFT-, APC- und ACA-Protein entstehen demnach aus einem identischen primären Translationsprodukt, das jedoch in unterschiedlichem Ausmaß N-terminaler Proteolyse unterworfen wird (Bild 5.4.3). Die entsprechenden DS-Proteine besitzen die identische Sequenz, sie weichen nur im Grad der "Raggedness" geringfügig vom jeweiligen AD-Protein ab (68).

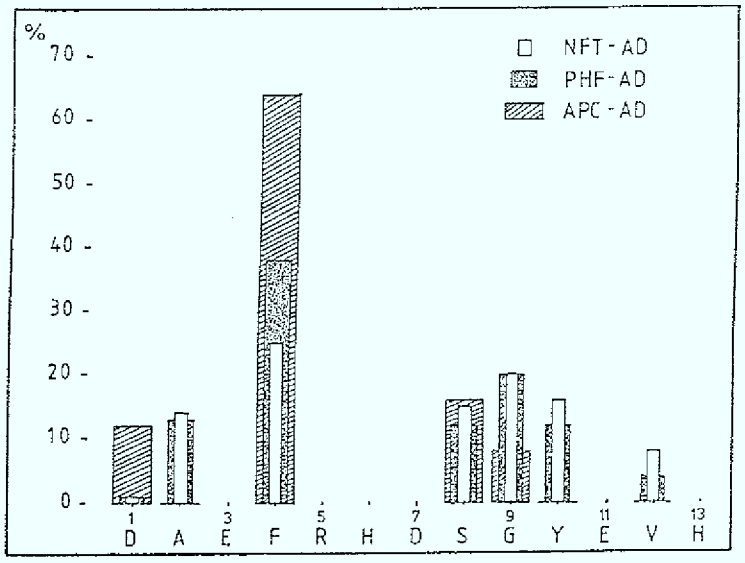


Bild 5.4.3 Vergleich der Raggedness von NFT, PHF und APC (39, 68, 88)

Die unterschiedliche Morphologie des jeweiligen Filaments ließe sich dementsprechend durch verschiedene Längen bzw. Konformationen der zugrundeliegenden Monomere erklären. Eine Entstehung der "ragged ends" durch postmortem einsetzende Autolyse der Zellen und nicht während des Krankheitsverlaufs kann nicht völlig ausgeschlossen werden, bleibt aber unwahrscheinlich (10).

Die in Bild 5.4.3 dargestellte Proteinsequenz wurde durch die DNA-Sequenz des humanen Alzheimer-Gens bestätigt (49). Der Thr-Rest in Position 43 wird nur bei NFT enthaltenden neuritischen Plaques gefunden, nicht jedoch bei amyloiden Plaques (49). Das für den Morbus Alzheimer (und Down Syndrom) charakteristische Protein stellt somit ein Fragment eines bedeutend größeren (695 As) Vorläuferproteins dar. Sekundärstrukturvorhersagen lassen erwarten, daß es sich zum Teil um einen Ausschnitt aus der Transmembranregion des "Precursors" handelt.

Das entsprechende Gen wurde im Genom der Ratte identifiziert (104a). Das Ratten-"Precursor"protein besteht laut DNA-Sequenzanalyse ebenfalls aus 695 As, die in der amyloiden Region gegenüber dem Human-Protein nur drei Austausche zeigen: Arg (Position 601 Homo sapiens) zu Gly, Tyr (606 Homo s.) zu Phe und His (609 Homo s.) zu Arg.

5.4.1 Sekundärstrukturvorhersagen

Die Sekundärstrukturvorhersage nach Chou und Fasman (21, 22, 23) für Peptid 1-42 (bzw. 1-43) ergibt einen N-terminalen α-helicalen Bereich von ca. 15 As, der mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem Turn bei As 9 unterbrochen wird. Der folgende Teil des Peptids (15-42)

bildet entsprechend dieser Vorhersage ein ß-Faltblatt, das möglicherweise durch eine Loop-Struktur bei As 24-29 unterbrochen wird. Die Hydrophobizität (60) entlang des Peptids wechselt analog zur vorhergesagten Sekundärstuktur von einem stark hydrophilen, N-terminalen Bereich (As 1-15) zu einer gleichbleibend hydrophoben Region, die nur im Bereich der Loop-Struktur (≈As 25) relativ hydrophile Werte annimmt (Bild 5.4.4)

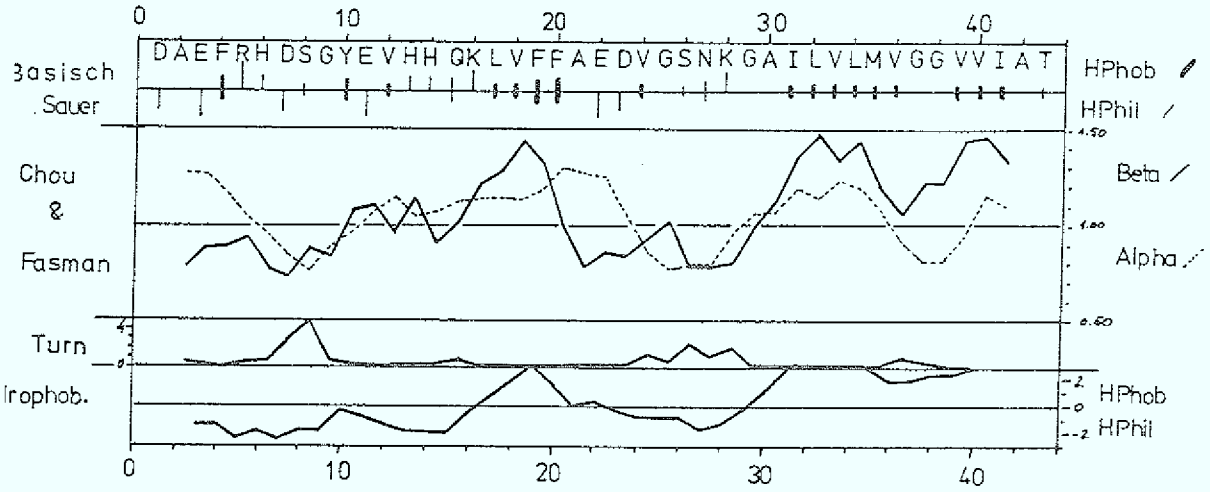


Bild 5.4.4: Strukturvorhersage für Peptid 1-43
nach (21, 22, 23, 60)
Die Hydrophobizität wurde über ein Fenster von jew. 5 As bestimmt.
(modifiziert nach einem Ausdruck des Programms PEPPLOT der UWGCG-Biliothek)

Obwohl NFT-, APC- und ACA-Protein aus einem identischen primären Translationsprodukt entstehen (39, 68, 88), werden sie nicht nur in unterschiedlichem Ausmaß N-terminal abgebaut (Bild 5.4.3), sie unterscheiden sich auch in ihrem Aggregationsverhalten. Im Gegensatz zu PHF ist die Aggregation von APC pH-abhängig (88): im Sauren (ph ≤ 6.5) wird die Monomerisierung der Peptide unter-

stützt, im Basischen treten Dimere und höhere Aggregate auf. Aus dieser pH-Abhängigkeit wurde eine Beteiligung der Histidin-Reste an der Dimerisierung des APC-Proteins gefolgert.
Ausgehend von diesen Strukturvorhersagen für Peptid 1-43 wurde eine Reihe von Peptiden synthetisiert (Tabelle 5.4.1) ((74), sowie C. Hilbich, pers. Mitteilung). Sie werden zur Isolierung von Antipeptid-Antikörpern eingesetzt, zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens und zur Aufklärung der Struktur der der Filamentbildung zugrundeliegenden Einheiten.

Die im folgenden beschriebenen spektroskopischen Untersuchungen zur Strukturbestimmung beschränken sich auf IR-Messungen, da die bei den meisten Peptiden vorhandene Lumineszenz unter Laserbestrahlung (682 nm $\leq \lambda \leq$ 488 nm) Raman-Spektroskopie unmöglich machte. Alle Messungen wurden im KBr-Pressling vorgenommen, wobei zur Interpretation der Spektren davon ausgegangen wurde, daß sich die Struktur der Peptide im Pressling nicht prinzipiell von der in Liquid (wässrig, pH=7.0) unterscheidet (vgl. Kap. 5.1 und 5.3.2.2).

5.4.2 IR-spektroskopische Untersuchungen der synthetischen Peptide

Die Sequenzen der Peptide sind in Tabelle 5.4.1, ihre Spektren in den folgenden Bildern 5.4.5 bis 5.4.12 dargestellt. Tabelle 5.4.2 enthält eine Zusammenfassung der Schwingungsmoden.

APC/NFT	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT
1-42	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAILVLMVGGVVIA
1-11	DAEF--DSGYE
11-23	EVHHQKLVFFAED
1-15	DAEFRHDSGYEVHHQ
4-15	FRGDSGYEVHHQ
8-15	SGYEVHHQ
9-17	GYEVHHQKL
17- 9	LKQHHVEYG
1-28	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSAG
4-28	FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSAG
10-23h	YEVHHQKLVFFAED-NH_2
10-23r	FEVRHQKLVFFAED-NH_2
25-42	GSNKGAILVLMVGGVVIA
12-43	VHHQKLVFFAEDVGSNKGAILVLMVGGVVIAT
10-43	FEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAILVLMVGGVVIAT

Tabelle 5.4.1: Liste der synthetischen Peptide
h = human, r = Ratte
Zum Vergleich ist die Sequenz des APC/PHF-Peptids angegeben (68)

Tabelle 5.4.2 a): Schwingungsmoden der Peptide im Amid - Bereich

Bande	Peptide 1-15	4-15	1-11
NH s	3420 S	3430 VS	3460 S
Amid A	3280 VS	3290 S	3300 S
	3210 sh W	-	-
Amid B	3150 M	-	-
	3070 br sh M	3060 br sh W	3060 M
	-	-	-
CH s	2960 M	2960 W	-
	2930 M	2930 VW	2940 M
	2860 W	-	-
Amid I	1755 W sh	1750 W	-
	1715 sh MW	1720 WM	1715 S
	1695 sh	-	1695 sh
	-	1670 M sh	1665 W sh
	1650 S sh	1650 VS	1650 VS
	1635 VS	-	-
Amid II	1555 M sh	1555 S	1555 W sh
	1535 S	1540 S	1535 S
	1520 S sh	1520 M sh	1520 S
Amid III	1395 MS br	1395 MS	1395 MS
	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-
	1285 W sh	-	1290 sh
	1250 MS br	1250 M	1235 MS br
Amid V	745 sh MW		745 VW sh
	695 sh MW		695 sh W
	665 W	n.d.	-
	605-620 br M		-
			605 M br

Bande	Peptide 4-28	11-23	10-23 NH_2
NH s	3420 sh	3420 S	3430 M sh
Amid A	3280 VS	3280 VS	3280 VS
	-	-	-
Amid B	-	-	-
	3080 MW br	3060 MW	3080 W
	-	3030 W sh	3060 W
CH s	2960 M	2960 MS	2960 MS
	2930 W	2930 S	2930 S
	2870 VW sh	2870 M sh	2870 M
Amid I	-	-	-
	1715 sh	1710 S sh	1720 sh
	1685 VW sh	1690 VW sh	1690 M sh
	1660 W sh	1660 VW sh	-
	-	-	1655 sh
	1635 VS	1635 VS	1630 VS
Amid II	1555 S sh	1555 S sh	1555 sh
	1540 S	1535 S	1535 S
	1520 S sh	1520 sh	1520 sh
Amid III	1400 M	1390 M	1395 M
	1375 W sh	-	1385 M sh
	-	-	-
	-	-	1345 MW
	-	-	-
	1290 W sh	1290 Vbr, MW	1230-1260
	1240 M br	1230 MW br sh	M Vbr
Amid V	745 MW	745 MW sh	745 W
	695 M	695 M	695 M
	665 MW	665 VW	665 MW
	625 MW	620 M	625 M br
	610	605 MW	-

Bande	Peptide 9-17	8-15	1-28
NH s	3440 S sh br	3430 S sh	3430 S sh br
Amid A	3290 VS	3280 VS	3280 VS
	3180 S sh	-	-
Amid B	-	3140 W sh	-
	3060 MW	3070 W sh	3080 WM br
	3040 MW	-	-
CH s	2960 MS	2960 MW	2960 MW
	2930 M	2930 W	2930 MW
	2860 M	2870 VW sh	2870 VWsh
Amid I	-	1745 S	-
	1725 W sh	1715 W sh	1720 sh
	-	1695 W sh	1690 W sh
	1645-1675 VS br	-	1660 sh
	-	1635 VS	1630 VS
Amid II	1555 S sh	1555 S	-
	1540 VS	1540 VS	1545 S
	1520 S sh	1520 S	-
Amid III	1400 S	1395 S	1395 M
	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-
	-	1315 W	-
	-	-	1275 VW sh
	1255 MS br	1240 S	1230 M br
Amid V	-	715 sh	745 sh W
	690 W sh	-	695 MW
	650 M	650 M	-
	-	625 M	-
	610 M	-	605 W br

Bande	Peptide 1-42	25-42	12-43
NH s	3450 sh	3450 MS sh	3440 sh
Amid A	3290 VS	3280 VS	3280 VS
	-	-	-
Amid B	-	-	-
	3080 M br	3080 M sh	3070 MS
	-	-	-
CH s	2960 S	2960 S	2960 S
	2930 M	2930 MS	2930 MS
	2860 M	2870 M	2870 M
Amid I	-	-	-
	1715 S sh	-	1725 sh
	1695 S sh	1695 W sh	-
	1680 br S	1665 VW sh	1665 Vbr sh
	1650	-	-
	1635 VS	1630 VS	1630 VS
Amid II	1555 sh	1550 MW sh	-
	1540 S	1540 S	1535 S
	1515 br sh	1520 MW sh	1520 S sh
Amid III	1395 sh	1400 MS	1395 br sh
	1385 M	1385 M sh	1380 MS
	1370 sh	-	-
	1340 MW sh	1345 M	1345 M
	-	-	-
	1285 MW sh	1275 MW	1285 MW
	1225 M	1225 M	1230 M
Amid V	745 sh	750 W	750 W sh
	695 MS	695 M sh br	695 M
	665 VW	665 MW	665 W
	620 W	-	625 MW br
	-	610 MW sh	-

Bande	Peptide 10-43	17-9	10-23 Ratte
NH s	3470 S sh	3410 S sh	3420 S br
Amid A	3290 VS	3280 VS	3280 VS
	-	3190 sh	-
Amid B	3150 sh	-	-
	3090 M sh	3050 br	3080 M sh
	3060 M sh	-	3030 W
CH s	2960 S	2960 MS	2960 M
	2930 MS	2930 sh	2930 MW sh
	2870 M	2870 W	2870 sh
Amid I	1730 sh	1745 sh br	1730 br sh
	1715 M sh	-	-
	1695 M sh	1695 M sh	1690 M sh
	-	1670 br sh	1660 W sh
	-	-	-
	1630 VS	1630 VS	1630 VS
Amid II	1555 sh	1555 VS sh br	1555 S sh
	1535 S	1535 VS	1535 S
	1520 M sh	1515 VS	-
Amid III	1395 sh	1400 MS	1395 MS sh
	1380 MS	1385 W sh	1385 MS
	1365 sh	1365 W sh	-
	1345 M	1335 W	1345 MW
	1315 VW	1315 W	-
	1280 MW	1285 W sh	1280 VW
	1230 M	1240 M br	1230 W br
Amid V	745 VW	715 sh	745 MW
	695 M	690 sh	695 M
	665 M	665 MW sh	665 W
	-	650 M	-
	610 MW br	615 M br	610 M br

Tabelle 5.4.2 b): Schwingungsmoden der Peptide im Amid - Bereich

5.4.2.1 Peptid 1-15, 4-15, 1-11

Für diese N-terminalen Peptide war aufgrund der oben beschriebenen Vorhersagen allgemein eine α-helicale Struktur zu erwarten, die von einem Turn unterbrochen wird. Dies trifft zumindest für Peptid 1-15 weitgehend nicht zu, da die Lage der Amid I- und II-Banden (1635 cm^{-1}, 1535 cm^{-1}) typisch für ein antiparalleles ß-Faltblatt ist (Tabelle 4.1). Die starke Schulter der Amid I-Bande bei 1650 cm^{-1} belegt, daß noch andere Strukturen, möglicherweise helicale Anteile, vorhanden sind. Mit der Vorhersage übereinstimmend gibt es jedoch deutliche Anzeichen für einen ß-Turn (1695 cm^{-1}, 1285 cm^{-1}). Die regelmäßige, über Wasserstoffbrücken stabilisierte Konformation des Peptid 1-15 wird durch die sehr starke Amid A-Bande bei 3280 cm^{-1} bestätigt.
Peptid 1-11 und 4-15 nehmen im Gegensatz hierzu eine weit weniger regelmäßige Struktur ein, wie aus dem verhältnismäßig schwachen Signal bei 3300 cm^{-1} hervorgeht. Die Amid I - Bande beider Peptide liegt bei 1650 cm^{-1}, was eine klare Identifikation der Sekundärstruktur aus dem IR-Spektrum erschwert. Die Moleküle liegen jedoch auf keinen Fall als antiparalleles Faltblatt vor; ein paralleles Faltblatt oder helicale Struktur ist wegen der schwachen Linie $k < 3300$ cm^{-1} jedoch auch unwahrscheinlich. Demzufolge ist für diese beiden Peptide eine eher ungeordnete Struktur anzunehmen, wobei in Peptid 1-11 möglicherweise ein Loop vorliegt (1290 cm^{-1}, 1695 cm^{-1}), der nicht über interne Wasserstoffbrücken stabilisiert ist.

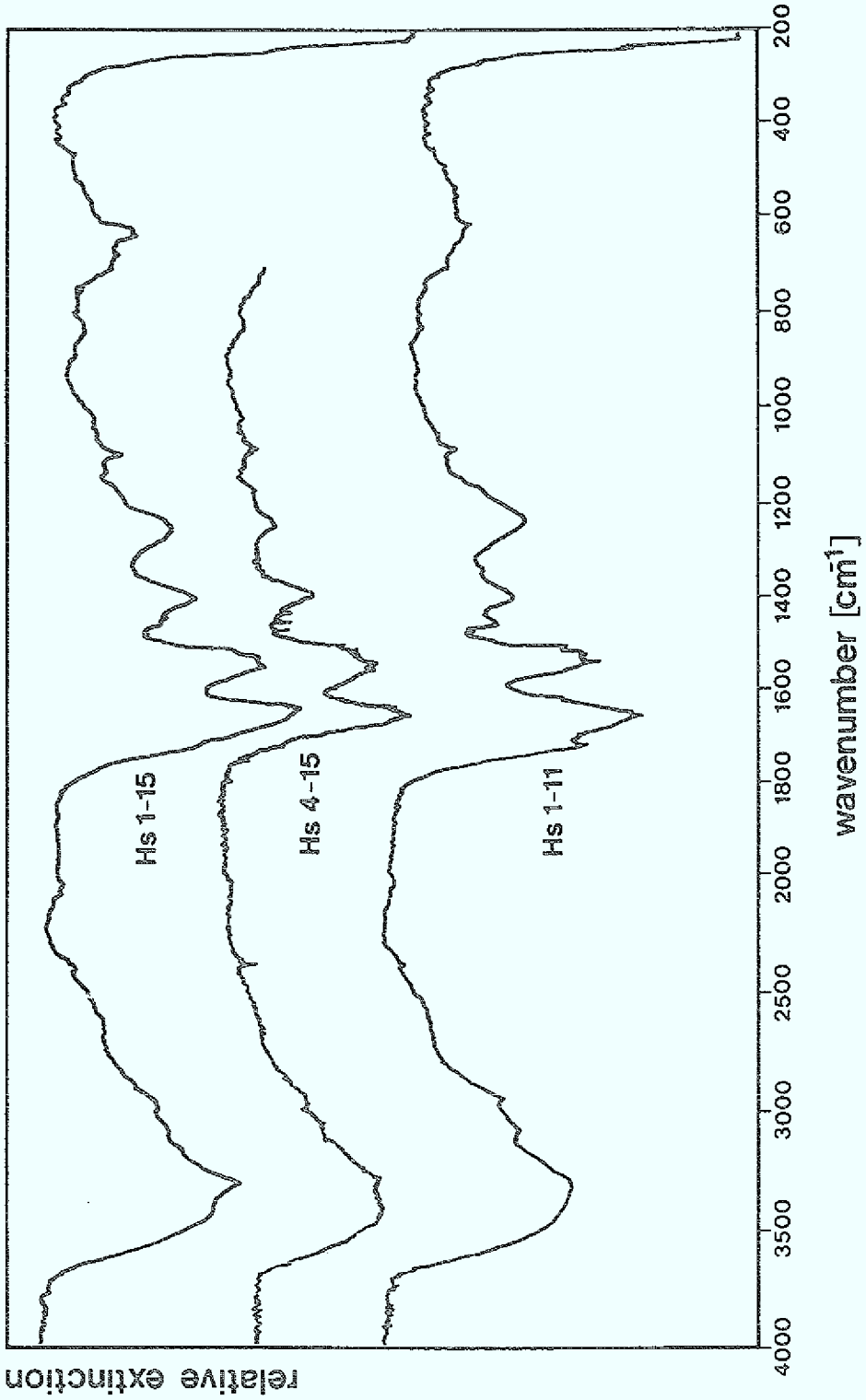


Bild 5.4.5: IR-Spektren von 1-15,
4-15,
1-11

Zusammenfassend kann aus den Spektren der drei Peptide für den N-Terminus des APC- bzw. NFT-Monomers eine antiparallele Faltblattstruktur, in die ein Turn eingebettet ist, erwartet werden. Zur Ausbildung des Turns werden die N-terminalen Aminosäuren benötigt, die ebenso wie die C-terminalen Aminosäuren (As 12-15) bzw. Arg 5-His 6 zur Stabilisierung des Faltblattes dienen. Unterschiedliche N-terminale Proteolyse des APC/NFT-Monomers kann folglich drastische Auswirkungen auf die Konformation zumindest der N-terminalen Region haben.

5.4.2.2 Peptid 9-17, 8-15

Die Strukturvorhersage (Bild 5.4.4) für Peptid 8-15 bzw. 9-17 ist indifferent: helicale und Faltblatt-Anteile werden mit gleicher Wahrscheinlichkeit erwartet. Bei As 16 könnte nach dieser Vorhersage ein Loop vorliegen.

Für Peptid 8-15 wird eine helicale Struktur durch das IR-Spektrum ausgeschlossen, das Molekül liegt eindeutig als antiparalleles Faltblatt vor (Amid I-, II- und III-Banden, Tabelle 4.1 (57)). Eine solche, regelmäßig über Wasserstoffbrücken stabilisierte Struktur wird durch die sehr starke Amid A-Bande (3280 cm^{-1}) bestätigt, wobei die antiparallele Anordnung mangels Turn auf eine entsprechende Aggregation der Moleküle zurückzuführen ist.

Peptid 9-17 hat überraschenderweise eine von Peptid 8-15 völlig abweichende Struktur. Es handelt sich nicht um ein antiparalleles ß-Faltblatt, vielmehr muß von einer ungeordneten und/oder helicalen Struktur ausgegangen werden, wie aus den Frequenzen der Amid I-, II- und III-Signale direkt abzulesen ist (Tabelle 5.4.2). Die starke Verbreiterung der Amid I-Bande ist durch mehrere,

gleichberechtigte Konformationen des Peptids zu erklären. Die Amid A-Bande bei 3290 cm^{-1} stellt ein sehr intensives, allerdings entsprechend zur Amid I-Bande nicht homogenes Signal dar. Folglich werden die verschiedenen Konformationen des Peptid 9-17 durch Wasserstoffbrücken stabilisiert.

Zusammenfassend kann anhand der Konformationen der beiden Peptide 8-15 und 9-17 davon ausgegangen werden, daß die entsprechenden Regionen im zugrundeliegenden Peptid 1-42 prinzipiell flexibel sind. Es ist möglich, daß diese Flexibilität durch den N-terminalen Turn eingeschränkt und so eine bestimmte Struktur bis hin zu As 17 stabilisiert wird. Die unterschiedliche "Raggedness" des PHF- bzw. APC-Proteins hätte dementsprechend weitreichende Auswirkungen auf die Struktur des Monomers.

5.4.2.2.1 Vergleich der Peptide 9-17 und 17-9

Wie bereits dargestellt wurde (Kap. 5.1 und 5.3.2.2), kann die im KBr-Pressling bestimmte Struktur eines Peptids auf wässriges Milieu übertragen werden. Bei den bereits beschriebenen Molekülen handelt es sich um ein Hexadecamer (Peptid II) bzw. ein Tridecamer (ß-Peptid), wogegen das hier behandelte Peptid nur ein Nonapeptid ist. Es stellt sich die Frage, inwieweit eine im Pressling vorliegende Struktur solcher kleiner, relativ flexibler Moleküle für die Probe charakteristisch ist. In diesem Zusammenhang wurde von H. Prinz als "reverses" Molekül das Peptid 17-9 synthetisiert.

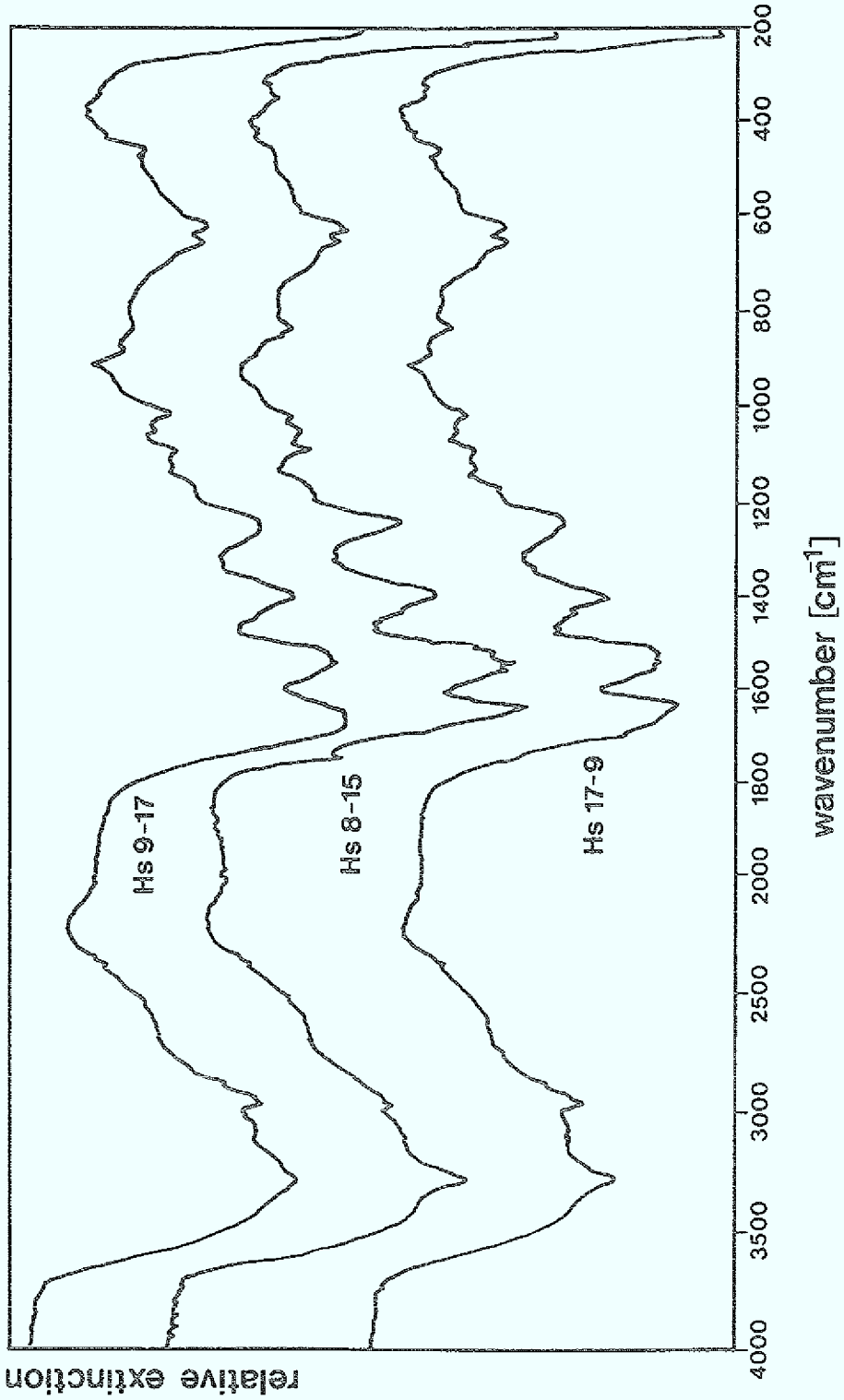


Bild 5.4.6: IR-Spektren von 9-17,
8-15
17-9

Die Spektren beider Peptide, "Original" und "rückwärtig" sind in Bild 5.4.6 vergleichend gegenübergestellt. Offensichtlich unterscheiden sich die Konformationen dieser beiden Peptide drastisch: während Peptid 9-17 ungeordnet bzw. helical vorliegt, nimmt Peptid 17-9 vorwiegend eine antiparallele ß-Faltblattstruktur an (Amid I-Bande: 1665 cm^{-1} vs. 1630 cm^{-1}), in die wahrscheinlich ein Turn eingebettet ist. Eine solche Struktur des reversen Nonapeptids wird durch die sehr stark ausgeprägte und strukturierte Amid A-Bande bestätigt.

Der Vergleich dieser beiden Proben belegt die Relevanz und Selektivität der KBr-IR-Technik in der Aufklärung von Sekundärstrukturen auch relativ kleiner und damit flexibler Peptide. Weiterhin wurde erneut die Sequenzspezifität der Sekundärstruktur auch von Peptiden gezeigt (63).

5.4.2.3 Peptid 11-23 (Homo s.), 10-23 NH_2 (Homo s.), 10-23 NH_2 (Rattus n.)

Sowohl Peptid 11-23 als auch 10-23 NH_2 (Homo s.) bilden ein antiparalleles ß-Faltblatt (Amid I: 1630 cm^{-1}, Amid II: 1535 cm^{-1}). Die beiden Peptide unterscheiden sich allerdings in der Stabilität dieser Struktur, wie aus einem Vergleich der Intensitäten der Amid A-Banden (relativ zum jeweiligen NH s - Signal) der Spektren hervorgeht. Demnach ist Peptid 10-23 NH_2 im Vergleich zu Peptid 11-23 stärker durch Wasserstoffbrücken fixiert.
Die weniger rigide Struktur von Peptid 11-23 (Homo s.) wird durch eine Verbreiterung der Amid I- und III-Bande zu höheren Wellenzahlen hin bestätigt. Eine solche Strukturierung der Amid-Banden bietet nicht nur Hinweise auf "random"-Anteile des Peptids, sondern auch auf Turns oder Loops. Da aber auch die Spektren von Peptid 10-23 NH_2 (Homo s. und Rattus n.) Anhaltspunkte für Loops zeigen (starke Schulter der Amid I-Bande bei 1690 cm^{-1} und ein sehr schwaches Signal bei 1675 cm^{-1}), sind die "non-sheet" Anteile des Peptid 11-23 nicht zu lokalisieren. Diese Regionen des Moleküls sind darüberhinaus nicht durch Wasserstoffbrücken stabilisiert (sehr intensive Bande bei 3420 cm^{-1}) und werden aus diesem Grund besonders in Liquid sehr flexibel sein.

Die Spektren des Human- und Ratten-Peptids 10-23 NH_2 zeigen im Bereich der Amid-Banden nur geringe Abweichungen voneinander. Ein deutlicher Unterschied ist nur im Bereich der NH-Streckschwingungen zu finden: das Human-Peptid ist stärker durch Wasserstoffbrücken stabilisiert als dasjenige der Ratte. Diese Stabilisierung spiegelt sich nicht als Konformationsänderung in den anderen Amid - Banden wider und ist möglicherweise auf den Tyr / Phe-Austausch des Ratten- gegenüber Human-Peptids zurückzuführen.

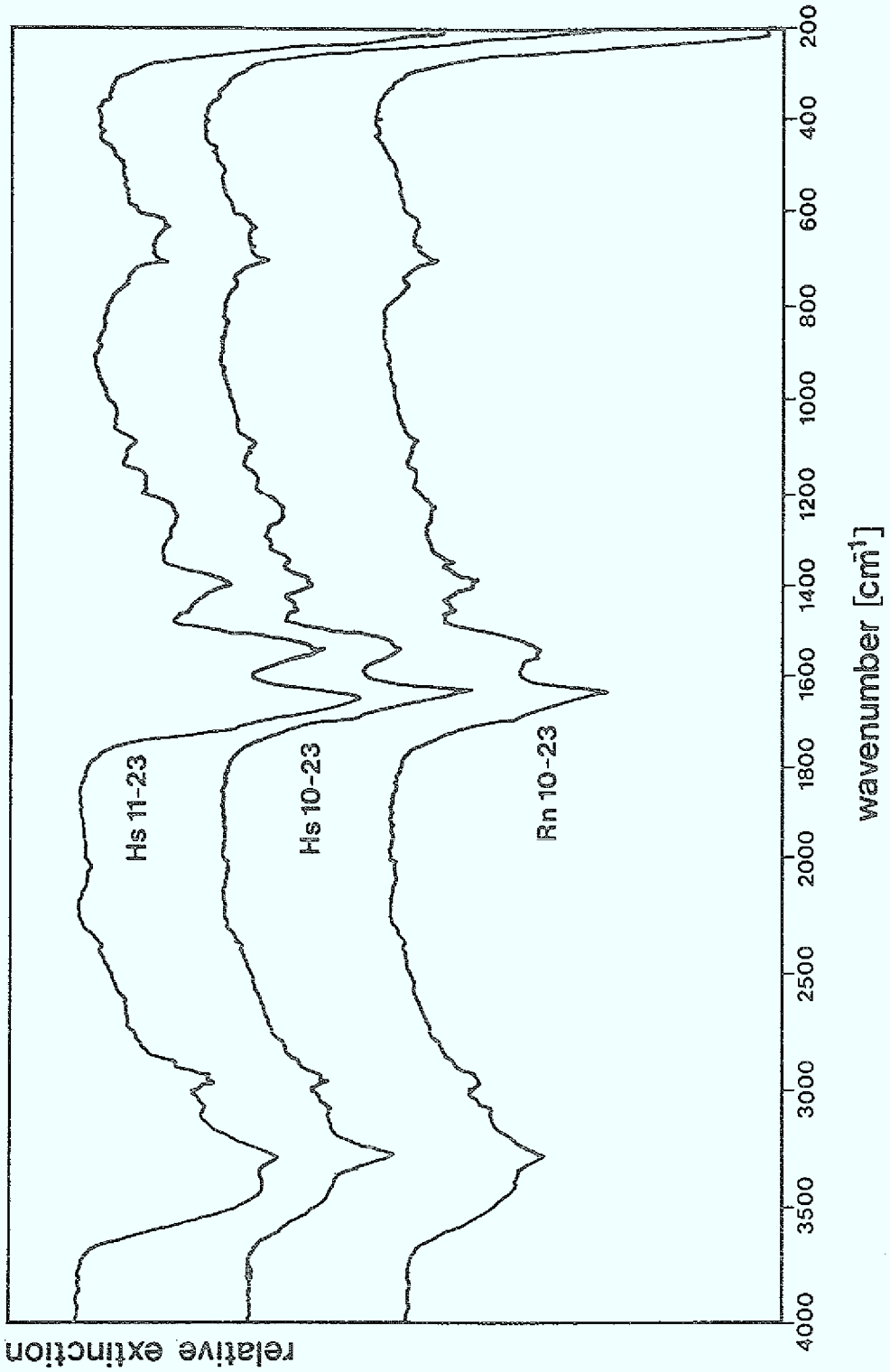


Bild 5.4.7: IR-Spektren von 11-23 (Homo s.),
10-23 NH_2 (Homo s.),
10-23 NH_2 (Rattus n.)

Beide Peptide 10-23 NH_2 können zu Fibrillen aggregieren (C. Hilbich, pers. Mitt.). Die Morphologie der Fibrillen wird durch den Austausch der zwei Aminosäuren (s. Tabelle 5.4.1: Tyr10 → Phe, His13 → Arg) offensichtlich nicht beeinflußt (Bild 5.4.8). Die Aggregationsform der Moleküle scheint in diesem Fall also weniger von entstehenden Seitenketten-Wasserstoffbrücken als von der übereinstimmenden Sekundärstruktur bestimmt zu werden.

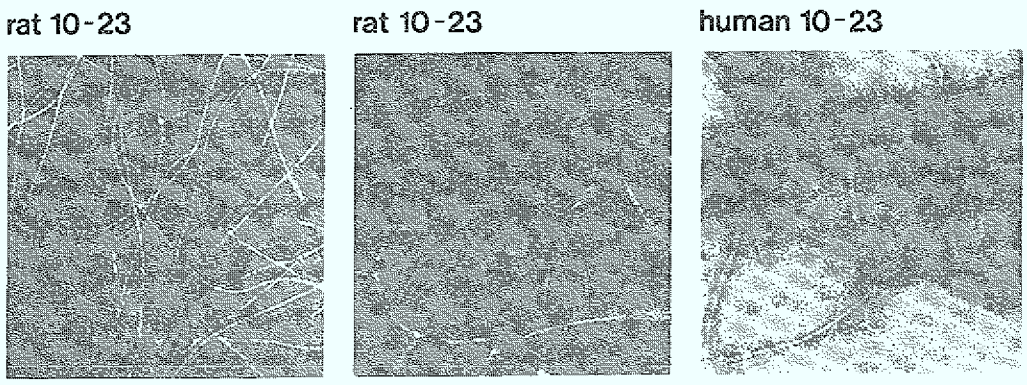


Bild 5.4.8: Elektonenmikroskopische Aufnahmen der Fibrillen der Peptide 10-23 NH_2 (C. Hilbich, pers. Mitt.)

5.4.2.4 Peptid 1-28, 4-28

Sowohl Peptid 1-28 als auch 4-28 liegt hauptsächlich als antiparalleles ß-Faltblatt vor (Amid I: 1630 cm^{-1}). Von dieser Konformation abweichende Strukturen verursachen die in beiden Spektren auftretende Verbreiterung der Amid I-Bande zu höheren Wellenzahlen (Bild 5.4.9).

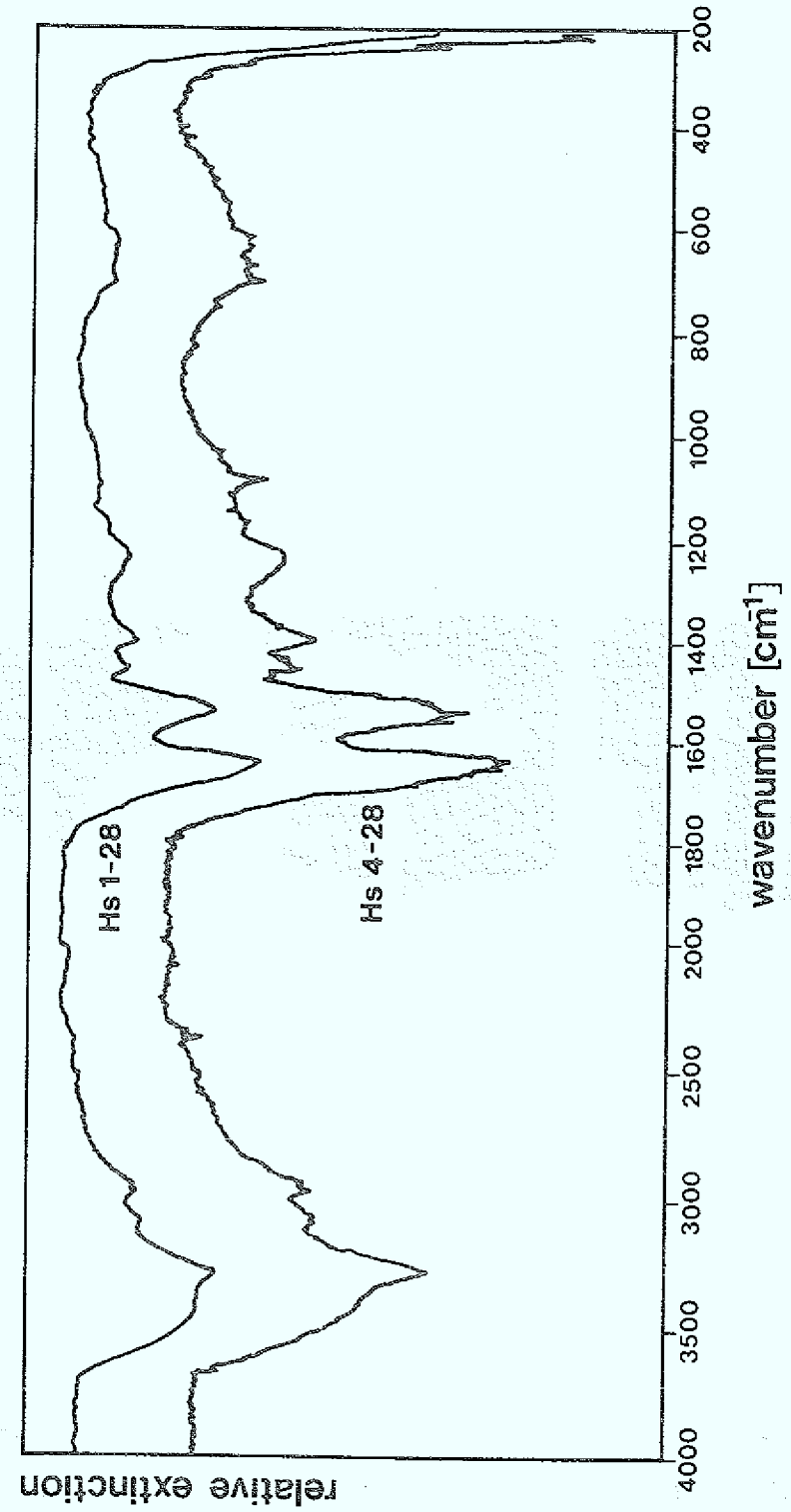


Bild 5.4.9: IR-Spektren von 1-28,
4-28

Diese Verbreiterung ist in beiden Fällen zum Teil auf Loops zurückzuführen, da im charakteristischen Bereich der Amid I - und III - Bande Signale vorliegen ($\geq$1690 cm^{-1}; 1290 bzw. 1275 cm^{-1}, sowie oberhalb 1300 cm^{-1}). Aus der besonders bei Peptid 4-28 geringen Intensität dieser Banden sind auf noch andere Konformationen der Peptide zu schließen:

Im Spektrum von Peptid 4-28 ist die Amid III-Bande bis 1250 cm^{-1} verbreitert. Peptid 1-28 erzeugt dagegen ein eindeutiges Signal ohne Verbreiterung bei 1230 cm^{-1}. Peptid 4-28 ist im Unterschied zu 1-28 stärker durch Wasserstoffbrücken stabilisiert (3280 cm^{-1} / 3420 cm^{-1}). Bei den in der Probe des Peptid 1-28 vorliegenden "non-sheet" Konformationen handelt es sich demnach hauptsächlich um Loops bzw. "ungeordnete" Anteile der Moleküle. Die Probe des Peptid 4-28 besitzt darüberhinaus wahrscheinlich noch helicale Anteile.

Zusammenfassend ist für die Struktur der beiden Peptide folgendes anzunehmen:
Beide Moleküle liegen hauptsächlich als antiparalleles Faltblatt vor. Die für Turns charakteristischen Signale sind im Spektrum des Peptid 1-28 deutlicher, allerdings auch bei Peptid 4-28 vorhanden. Besonders das letztere Peptid zeigt vom antiparallelen Faltblatt und Loops abweichende Konformationen, möglicherweise helicaler Art, die weitgehend durch intra- oder intermolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert sind. Bei den in beiden Peptiden vorhandenen Loops wird es sich um sehr flexible Strukturen handeln, da die ihnen zuzuordnenden Signale nicht intensiv sind und sie wahrscheinlich nur teilweise durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Aus diesem Grund ist zu erwarten, daß ein Loop oder Turn nur in einem Teil der Moleküle vorhanden ist.

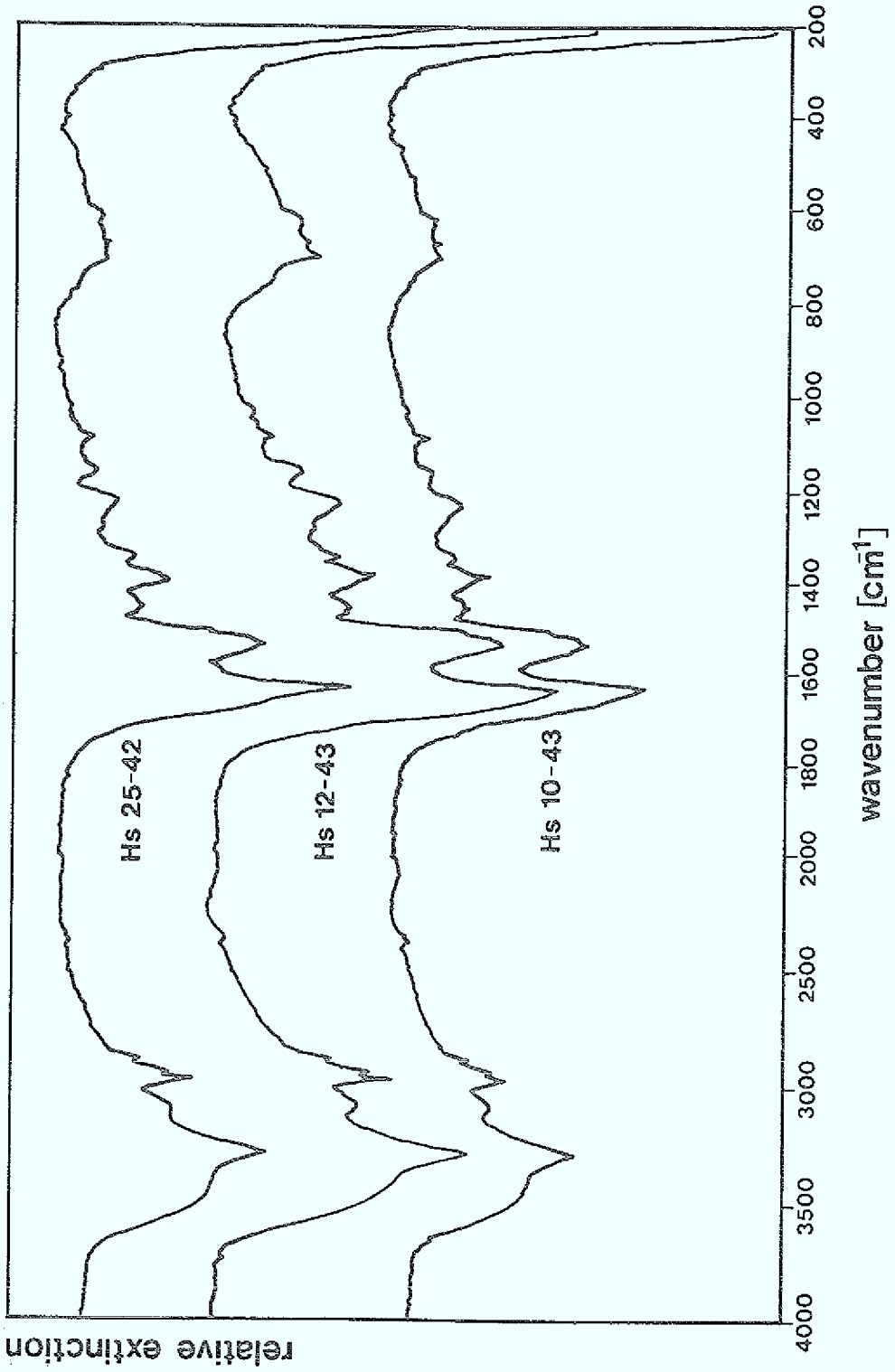


Bild 5.4.10: IR-Spektren von 25-42,
12-43,
10-43

5.4.2.5 Peptid 25-42, 12-43, 10-43

Diese drei Peptide zeigen eine weitestgehend identische Struktur, ein antiparalleles ß-Faltblatt, in das Turns eingebettet sind (Amid I-, II-, III-Bande, Bild 5.4.10, Tabelle 4.1).

Im Unterschied zu den im vorigen Kapitel beschriebenen Spektren ist hier eine Verbreiterung der Amid I-Bande bei 1630 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen hin alleine auf Anteile des Signals, die von Turns veruracht werden, zurückzuführen. Das geht aus den eindeutigen Amid III-Banden bei 1230 bzw. 1280 cm^{-1} (jew. +/- 5 cm^{-1}) hervor.

Die antiparallele Struktur des Peptid 25-42 ist auf eine lineare Aggregation der Moleküle zurückzuführen, da der Turn in Übereinstimmung mit den Spektren der Peptide 1-28 und 4-28 sowie 1-15 bei Aminosäure 27 (+/- 1 As) zu lokalisieren ist. Diese Anordnung bietet eine einfache Erklärung für die unterschiedliche Ausprägung der Schulter bei $>$ 3400 cm^{-1} ("ungebundene" NH-Streckschwingungen) der hier diskutierten Peptide. Die nahezu vollständige "Absättigung" der NH-Gruppen über Wasserstoffbrücken in Peptid 12-43 resultiert aus der fast vollständigen Symmetrie des Faltblattes, während aus demselben Grund, der Anordung des Turns, in Peptid 10-43 einige As ungebunden bleiben.
Ein solcher Loop kann in Peptid 25-42 durch intramolekulare Wasserstoffbrücken fixiert werden, stört jedoch die Aggregation der Moleküle, so daß das antiparallele Faltblatt nicht vollständig fehlerfrei ausgebildet wird. Analog zu Peptid 10-43 bleiben Amingruppen ungebunden (Schulter bei 3450 cm^{-1}).

Ein C-terminaler Loop der Peptide 1-28 bzw. 4-28 muß dagegen sehr flexibel bleiben, da er nicht oder nur unvollkommen durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert wird (Kap. 5.4.2.4).

5.4.2.6 Peptid 1-42, APC-Isolat

Dieses Peptid entspricht in seiner Primärsequenz bis auf die Austausche Leu32 → Ile und Val33 → Gly vollständig der des APC-AD Proteins (49). Für die amyloiden APC/PHF/ACA - Proteine war aufgrund ihrer Anfärbbarkeit mit Kongorot und folgender Doppelbrechung im Polarisationsmikroskop eine ß-Faltblattstruktur anzunehmen, wie im nachhinein durch Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen wurde (s. Kap. 5.4, 35, 36, 51).
Zum Vergleich dieser bekannten Sekundärstruktur des nativen Proteins wurden das synthetische Peptid 1-42 sowie ein APC-Isolat IR-spektroskopisch im KBr-Preßling untersucht (Bild 5.4.11, 5.4.12).

Das synthetische Peptid 1-42 zeigt im IR-Spektrum klar die Struktur eines regelmäßigen, antiparallelen ß-Faltblattes (Amid I: 1635 cm^{-1}, Amid II: 1540 cm^{-1}, Amid III: 1225 cm^{-1}).
Aufgrund der ausgeprägten Schulter der vorherrschenden Amid I-Bande bei 1695 cm^{-1} sowie des Amid II und III-Signals (1275 cm^{-1} und oberhalb 1300 cm^{-1}) ist ein Turn zu erwarten. Ob mehrere, möglicherweise in ihrer Konformation abweichende "ß-bends" pro Molekül vorliegen, ist aus dem vorliegenden Spektrum nicht zu erkennen.

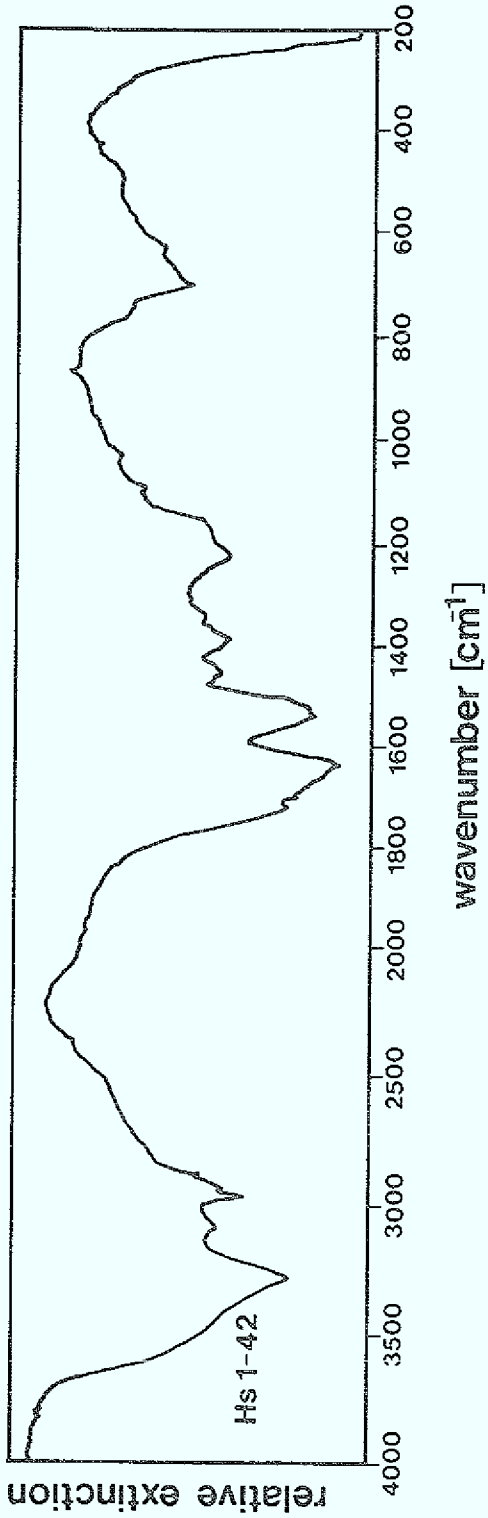


Bild 5.4.11: IR-Spektrum von 1-42

Die Struktur der untersuchten Probe ist in ihrer Gesamtheit durch Wasserstoffbrücken stabilisiert (Intensität des Signal bei 3290 cm^{-1} > Schulter bei 3450 cm^{-1}). Ob diese Wasserstoffbrücken vorwiegend inter- oder intramolekular ausgebildet sind, kann wiederum mit den im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Methoden nicht festgestellt werden. Möglicherweise wird NMR-Spektroskopie hier konkrete Aussagen ermöglichen.

Das freundlicherweise von Dr. C.L. Masters, University of Western Australia, Perth, zur Verfügung gestellte APC-Isolat wurde als Micro-Pellet im KBr-Pressling in Offenbach, Fa. NICOLET an einem 20 SDX-FTIR Spektrometer vermessen. Das Absorptionsspektrum ist in Bild 5.4.12 dargestellt.

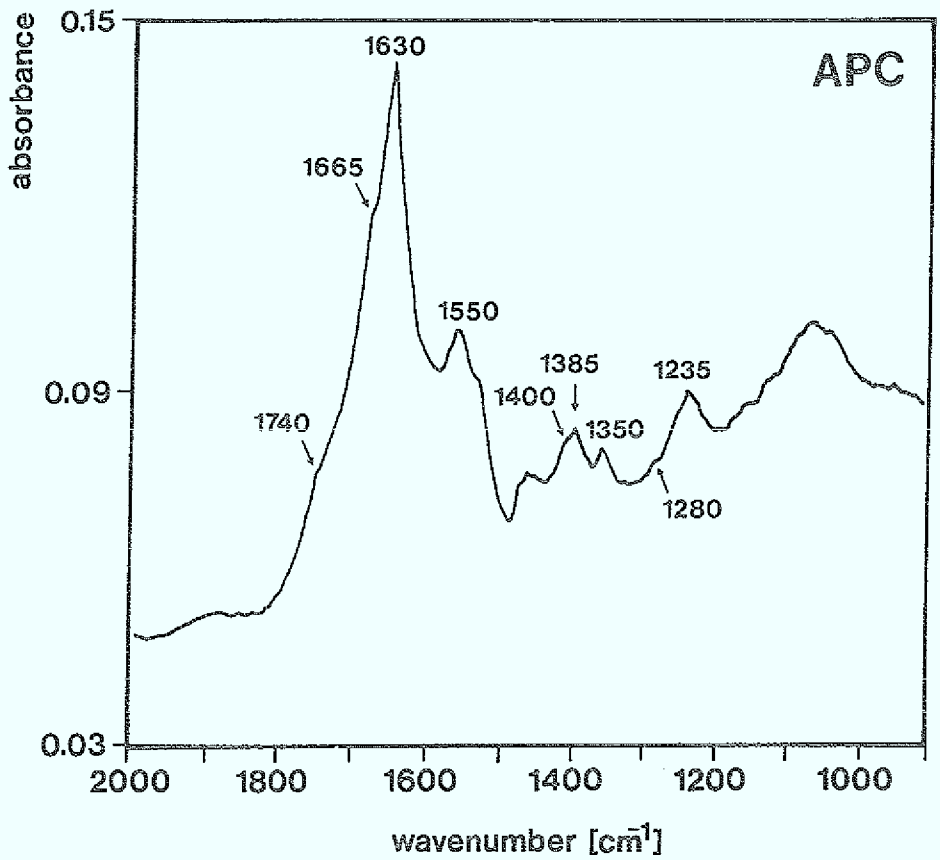


Bild 5.4.12: FTIR-Spektrum des APC-Isolates

Eine weitgehend mit der des synthetischen Peptids übereinstimmende Sekundärstruktur ist aus dem Spektrum abzuleiten. Die eindeutigen Maxima der Amid I-, II-, bzw. III-Banden (1630, 1550, 1235 cm^{-1}) belegen die antiparallele Faltblattstruktur. Turns implizierende Signale (Schulter der Amid I-Bande bei ≈ 1690 cm^{-1}, Amid III-Signal bei 1280 und oberhalb 1300 cm^{-1} (57)) sind auch im APC-Spektrum erkennbar, jedoch weniger deutlich als in dem des synthetischen Peptids 1-42. Dies kann jedoch durch die verschiedenen Mengen (Peptid 1-42: 2.2 mg; APC: ≈ 0.2 mg) und unterschiedlichen Reinheitsgrade der Proben (s.u.), sowie die Typen der dargestellten Spektren (Peptid 1-42: Transmission, APC: Absorption) erklärt werden und muß nicht auf einem unterschiedlichen Gehalt bzw. Konformation der Loops beruhen.
Eine weitere, "natives" NFT/APC-enthaltende Probe wurde ebenfalls vermessen. Die starke Beimengung unbekannter Verunreinigungen machen eine sinnvolle Interpretation dieser Spektren unmöglich.

5.4.2.7 Zusammenfassung und Diskussion der IR-spektroskopischen Untersuchungen der APC- /NFT-Peptide

Aus den beschriebenen Untersuchungen der synthetischen Peptide ergibt sich für ein N-terminal nicht abgebautes APC- bzw. PHF-Protein folgendes Modell:

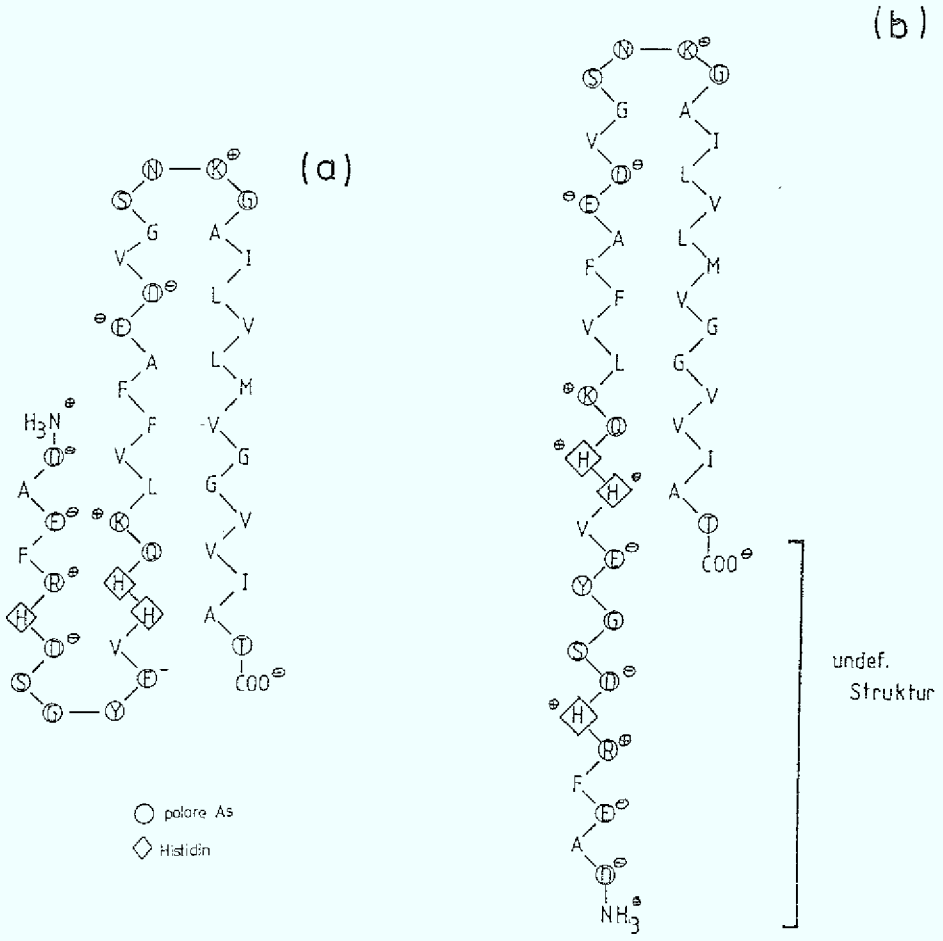


Bild 5.4.13: Modell des Peptid 1-43

Das Molekül liegt durchgehend als ß-Faltblatt vor (Bild 5.4.13 a). Zwei Loops sind in diese Struktur eingebettet. Sie verkleinern die zugängliche Oberfläche und komprimieren somit die Struktur des Peptids. Die auf den Turn folgende Region des Moleküls (bis ungefähr As 15) ist relativ flexibel, wird jedoch durch Wasserstoffbrücken der N- oder C-terminalen Aminosäuren zu einem ß-Faltblatt stabilisiert. Bis zum C-Terminus des Peptids

wird ein stabiles ß-Faltblatt ausgebildet, welches durch einen Turn bei As 27 (+/- 1) antiparallel zurückgefaltet wird.
Das längste Faltblattsegment ist demnach aus 18 Aminosäuren aufgebaut. Der von Kirschner et al. angegebene Schätzwert für die Breite eines "sheets" entsprechend einem PHF-Protofilament als ungefähr 50 Å (51) wird von diesem Modell um ca. 5 Å überschritten. Aufgrund der variierenden Angaben für den Durchmesser der Protofilamente (50, 51, 111, 122) liegt dieser Wert innerhalb der Fehlergrenzen. Weiterhin erklären sich mit diesem Modell die Ergebnisse der IR-Spektroskopie der einzelnen Peptide.

- Die Lokalisation des zweiten Turns wurde aufgrund der Ergebnisse der Peptide 10-43 und 12-43 vorgenommen (s. Kap. 5.4.2.5), die beide ein regelmäßiges antiparalleles ß-Faltblatt ausbilden.
- As 1 bis 3 stabilisieren den N-terminalen Loop: Glu 3 kann mit Lys 16 über Coulomb-Kräfte wechselwirken.
- Die negativen Ladungen von Asp 7 und Glu 11 liegen auf verschiedenen Seiten des Faltblattes, sind also räumlich durch mehr als 6 Å getrennt (9).
- Peptid 1-11 kann einen Turn ausbilden. An diesem müssen aber nicht notwendigerweise dieselben Aminosäuren beteiligt sein wie im Peptid 1-43, da die As 5 (Arg) und 6 (His) im Peptid 1-11 fehlen (Tabelle 5.4.1).
- Es wurde eine pH-abhängige Dimerisierung des APC-Proteins beobachtet (74). Möglich wäre, daß die Dimerisierung der APC-bildenden Moleküle, die zu 68% bei Phe 4, zu 12% bei Asp 1 beginnen, von einer Ausbildung des N-terminalen Faltblattes und Turns abhängt. Die Stabilisierung einer solchen N-terminalen Struktur wird in dem hier vorgeschlagenen Modell durch die wechselseitige Absättigung der negativen Asp 1-Ladungen durch die N-Termini verstärkt. Dagegen werden

bei erhöhtem pH Wert positiv geladene Histidine in der vorgeschlagenen Peptid-Konformation eine Entstehung dieses Faltblattes durch elektrostatische Abstoßung verhindern (Bild 5.4.13 b). Damit wird für den - wie gezeigt - flexiblen N-Terminus eine andere Sekundärstruktur möglich und der Vorgang der Dimerisierung gestört.

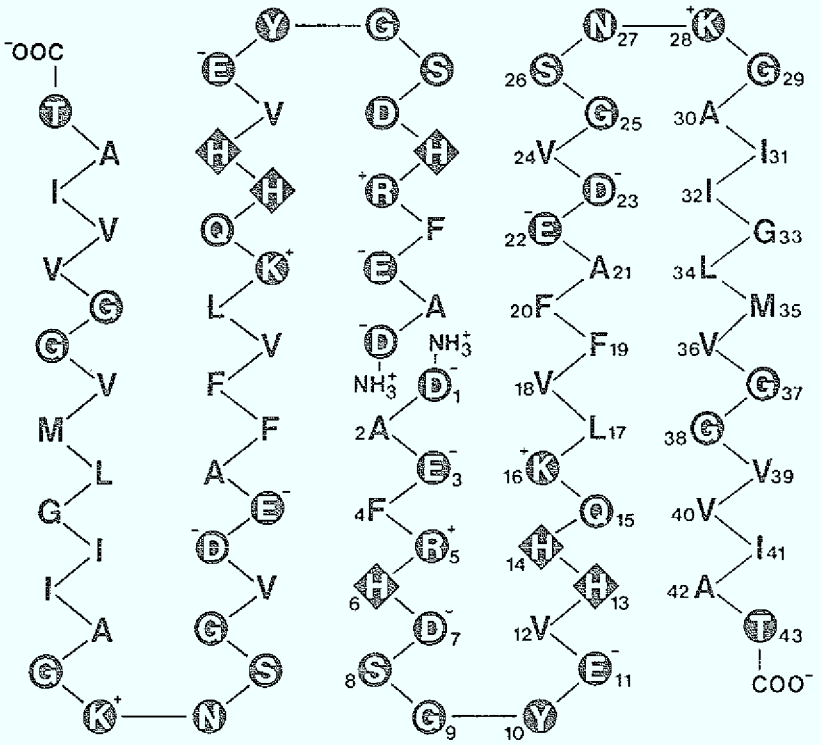


Bild 5.4.14: Hypothetisches Modell zur Dimerisierung der zu APC aggregierenden Peptide bzw. zur Dimerisierung von Peptid 1-42

Eine weitere Aggregation zu Tetrameren etc. kann dann pH-unabhängig über den C-terminalen, unpolaren Bereich der Moleküle erfolgen.

Das hier vorgeschlagene Modell der Aggregation von APC- und "Full-length" Peptiden legt der fehlenden Torsion

der APC-Filamente die Regelmäßigkeit der angenommenen Struktur zugrunde. Die vorliegenden IR-Spektren des Peptid 1-42 sprechen nicht gegen eine partiell parallele Anordnung der Faltblattsegmente, da kurze parallele Segmente aufgrund der Verbreiterung der Amid I-Bande zum niederfrequenten Bereich nicht ausgeschlossen werden können (Tabelle 4.1).

Eine Dimerisierung der stärker N-terminal abgebauten, zu PHF's aggregierenden Peptide dagegen (Bild 5.4.15)wird durch eine Verschiebung des pH-Wertes nicht oder nur positiv beeinflußt, wie von G. Multhaup gezeigt werden konnte (74).

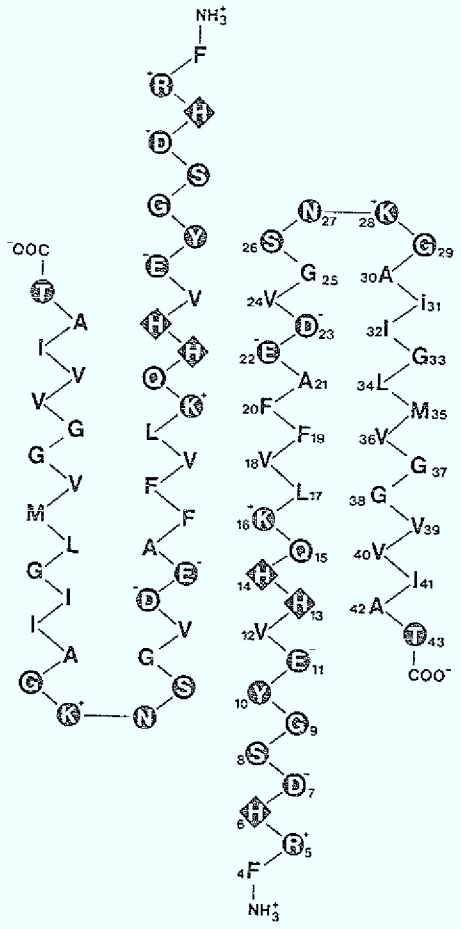


Bild 5.4.15: Hypothetisches Modell zur Dimerisierung der PHF's aufbauenden Peptide

Das Dimer bestände demnach aus vier, leicht gegeneinander verschobenen Faltblattsegmenten, wobei die N-terminalen Regionen der PHF-Peptide nicht in das Faltblatt integriert sind. Diese Peptide beginnen nur zu 0-2% mit Asp 1, zu 13% dagegen mit Ala 2 (Bild 5.4.3, (39, 68, 88)). Eine, wie bei den APC-Peptiden mögliche Stabilisierung des N-terminalen Turns infolge der Coulomb-Wechselwirkung zwischen N-Terminus und Asp 1 des zweiten Moleküls (Bild 5.4.14), ist deshalb bei PHF-Peptiden nicht möglich (Bild 5.4.15).
Die im Modell vorgeschlagene Verschiebung der Peptide gegeneinander könnte im entstehenden Polyaggregat eine Torsion induzieren. Eine Dimerisierung der Protofilamente oder Wechselwirkungen mit benachbarten Proteinen wie z.B. Tau (40) wäre über die aus dem Aggregat "heraushängenden" N-Termini möglich.
Von Kirschner et al. wurde für den PHF-Kristalliten ein Aufbau aus vier hintereinander liegenden "sheets" mit jeweils 16 +/- 2 Faltblattsegmenten vorgeschlagen (51). Ein "sheet" würde hiernach einem Oktamer des Peptids entsprechen.

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Modellen wurde auf eine Fortführung der Aggregation in die nächste Ebene, d.h. das nächste "sheet" verzichtet. Spätestens in diesem Stadium wird der Einsatz einer CAD-Anlage zur Rechner-unterstützten Entwicklung von Molekülmodellen sinnvoll und wünschenswert.

5.4.3 Sekundärstruktur der Peptid-Aggregate

Die mit den beschriebenen Peptiden erzeugten Anti-Peptid-Antikörper zeigten zum Teil sehr unterschiedliche Bindungsspezifitäten gegenüber Peptiden, NFT's und APC's. So reagiert á 1-11, über Glutardialdehyd an KLH gekoppelt, mit NFTs, nicht aber mit APCs oder synthetischem monomeren Peptid 1-42 (U. Mönning, pers. Mitt.). Schon zur Klärung dieser Befunde war es notwendig, Aggregate der verschiedenen Peptide herzustellen und immunologisch sowie in ihrer Sekundärstruktur zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang muß sichergestellt sein, daß die untersuchten Aggregate nicht "Cluster" jeweils eines der beteiligten Peptide, sondern "Heteroaggregate" darstellen.
Durch langsame Dialyse der synthetischen Peptide erzeugte Filamente (C. Hilbich, pers. Mitt.) dienen zur Aufklärung des Aggregationsmechanismus' und somit zur Begründung der unterschiedlichen Morphologie von APC und PHF. Bei dieser Fragestellung ist eine zumindest grobe Abschätzung der Temperaturabhängigkeit der Sekundärstruktur der zu Filamenten aggregierten Peptide wünschenswert, da die nativen Amyloide bei 37°C über Jahre unverändert stabil sind. Die im folgenden beschriebenen IR-Messungen wurden nicht mit Filamenten, sondern einfachen Aggregaten der jeweiligen Peptide durchgeführt, da das Mörsern der Probe im KBr die Filamente zu kleineren Aggregationsformen der Peptide "auftrennt".
Bis auf eine Ausnahme, Peptid 1-28 / 4-28, wurde daher jedes Aggregat nach dem Lyophilisieren in zwei Proben geteilt. Eine der beiden Proben wurde bis zur Anfertigung des Presslings, d.h. 15 Minuten vor Beginn der Messung bei -20°C gelagert. Das entsprechende "Gegenstück" wurde 2 h bei 37°C und danach über Nacht bei 4°C aufbewahrt (C.Hilbich, pers. Mitt.).

Die Spektren der Aggregate sind in den Bildern 5.4.16 bis 5.4.19 dargestellt, Tabelle 5.4.3 gibt die Frequenzen der in den Amid-Regionen vorhandenen Signale wieder.

	Aggregate				1-11 des RH/11-23/25-42		1-28/4-28
	1-28/25-42		1-11 des RH/10-23 NH_2/25-42		-20°C	37°C	
Bande	-20°C	37°C	-20°C	37°C			
NH s	3450 VS	3440 S sh	3410 S sh br	3410 S sh	3420 S sh br	3420 S sh br	3400 S sh
Amid A	3280 VS	3280 VS	3280 VS	3280 VS	3280 VS	3280 VS	3280 VS
Amid B	3080 MS sh	3080 MS	3070 MS	3080 MS	3060 MS sh	3060 MS sh	3080 M
	-	3050 sh	-	-	-	-	3030 sh
CH s	2960 MS	2960 S	2960 S	2960 S	2960 S	2960 S	2960 MS
	2930 M	2930 M	2930 M	2930 M	2930 sh	2930 MS	2930 MS
	2870 M sh	2870 M sh	2870 sh	2870 M sh	2870 M sh	2870 M sh	2870 sh
Amid I	1735 W sh	1735 W sh	-	-	-	-	1725 M sh
	1715 W sh	1715 M sh	1715 M sh	1715 M sh	1715 MS sh	1715 sh	-
	1680 sh	1695 sh	-	-	-	-	1695 MS sh
	1660 VW sh	1665 sh	1650 sh	1665 sh	1650 sh	1655 sh	1650 MS sh
	1635 VS	1635 VS	1630 VS	1630 VS	1635 VS	1635 VS	1625 VS
Amid II	1555 MS sh	1555 sh	-	1555 MS s	1555 M sh	1555 MS sh	-
	1540 S	1540 S	1540 S	1540 S	1540 S	1540 S	1530 S br
	1520 MS sh	1520 sh	1520 sh	1520 MS s	1520 M sh	1520 M sh	-
Amid III	1400 M	1395 M	1395 MS	1395 MS	1395 MS	1395 MS	1395 M br
	1380 M	1380 M	1385 sh	1385 sh	1380 MS sh	1380 MS sh	1375 sh
	-	1340 W	1345 M	1345 M	1340 MW	1340 MW	1345 MW
	1315 VW	-	-	-	-	-	-
	1285 VW	1275 W	1280 VW sh	1285 M sh	1270 VW br sh	1275 MW	1275 W
	-	-	1255 sh	1255 sh	-	1255 sh	-
	1230 MW	1230 MW	1235 M	1235 M	1230 M	1230 M	1230 M
Amid V	-	-	-	-	-	-	745 MW
	695 MW br	695 MW br	695 M	695 M	695 M	695 MW	695 M
	665 MW	665 MW	665 W	665 W	665 WM	665 WM	665 W
	610 MW br	610 MW	625 M br	610 MW b	615 M Vbr	610 MW Vbr	620 VW br

Tabelle 5.4.3: Amidbanden der Peptidaggregate

5.4.3.1 Peptidgemisch 1-28 / 25-42

Wie durch die Lage der Maxima der Amid I-, II- und III-Banden deutlich wird (Bild 5.4.16), handelt es sich bei beiden Aggregaten um antiparallele ß-Faltblätter (Amid I: 1635 cm^{-1}, Amid II: 1540 cm^{-1}, Amid III: 1230 cm^{-1}).

Scheinbar geringe Unterschiede in der Ausprägung der niederfrequenten Schultern der Amid I- und III-Bande lassen sich anhand der Region der NH-Streckschwingungen erklären. Werden die relativen Intensitäten der NH s-Bande bei 3445 +/- 5 cm^{-1} und 3280 cm^{-1} verglichen, so findet sich für die -20°C-Probe gegenüber der 37°C-Probe ein weit höherer Anteil an "freien" Aminogruppen. In der temperierten Probe wiederum liegt ein höherer Anteil der NH-Gruppen über H-Brücken gebunden vor. Somit ist die Verbreiterung der Amid I- und II-Bande der gekühlten Probe ungeordneten, nicht über Wasserstoffbrücken stabilisierten Regionen der aggregierten Peptide zuzuordnen. Diese Regionen sind in der 37°C-Probe im Faltblatt integriert und über H-Brücken stabilisiert. Beiden Spektren sind, wenn auch nicht stark ausgeprägt, Signale für Loops gemeinsam (Schultern der Amid I- Bande 1695 cm^{-1}, 1715 cm^{-1}; Amid III: 1275 cm^{-1}, > 1300 cm^{-1}). Wie in Kap. 5.4.2.4 und 5.4.2.5 gezeigt, kann in beiden am Aggregat beteiligten Peptiden ein Loop oder Turn vorliegen. Es ist nicht auszuschließen, daß nur einer dieser beiden Loops auch im Aggregat ausgebildet wird. In diesem Fall kann anhand der Spektren nicht entschieden werden, um welchen es sich handelt. Da sich die beiden beteiligten Peptide in ihrer Sequenz um vier Aminosäure-Positionen überlappen (Tabelle 5.4.1), ist dann anzunehmen, daß der zweite Turn (As 27+/- 1) aufgrund sterischer Hinderung nicht ausgebildet wird.

Die vorliegenden Spektren (Bild 5.4.16) belegen, daß beide Peptidaggregate vorwiegend als antiparalleles Faltblatt mit einem oder mehreren Turns vorliegen (Tabelle 4.1). Die temperierte Probe besitzt die regelmäßigere Struktur. Hier sind "Verunreinigungen" durch abweichende Konformationen weitestgehend auszuschließen.

Die im Peptid 1-28 vorhandenen Anteile "ungeordneter" Konformationen (Kap. 5.4.2.4, Bild 5.4.9) sind in der "temperierten" Probe nicht mehr nachzuweisen. Damit ist für diese Probe nachgewiesen, daß sie aus "Heteroaggregaten" der Peptide aufgebaut sind.

Die beiden hier vorliegenden Spektren zeigen besonders deutlich (vergl. Bild 5.4.17) die Temperaturabhängigkeit der Aggregation der Peptide. Im Verlauf dieses Vorgangs wird die energetisch günstigste Konformation und Position der Moleküle zueinander eingenommen, wobei Änderungen der Lagebeziehungen ganzer Atomgruppen zueinander (ungeordnet/ helical/ paralleles Faltblatt zu antiparallelem Faltblatt) überraschend schnell auch im nichtkristallinen Festkörper stattfinden.

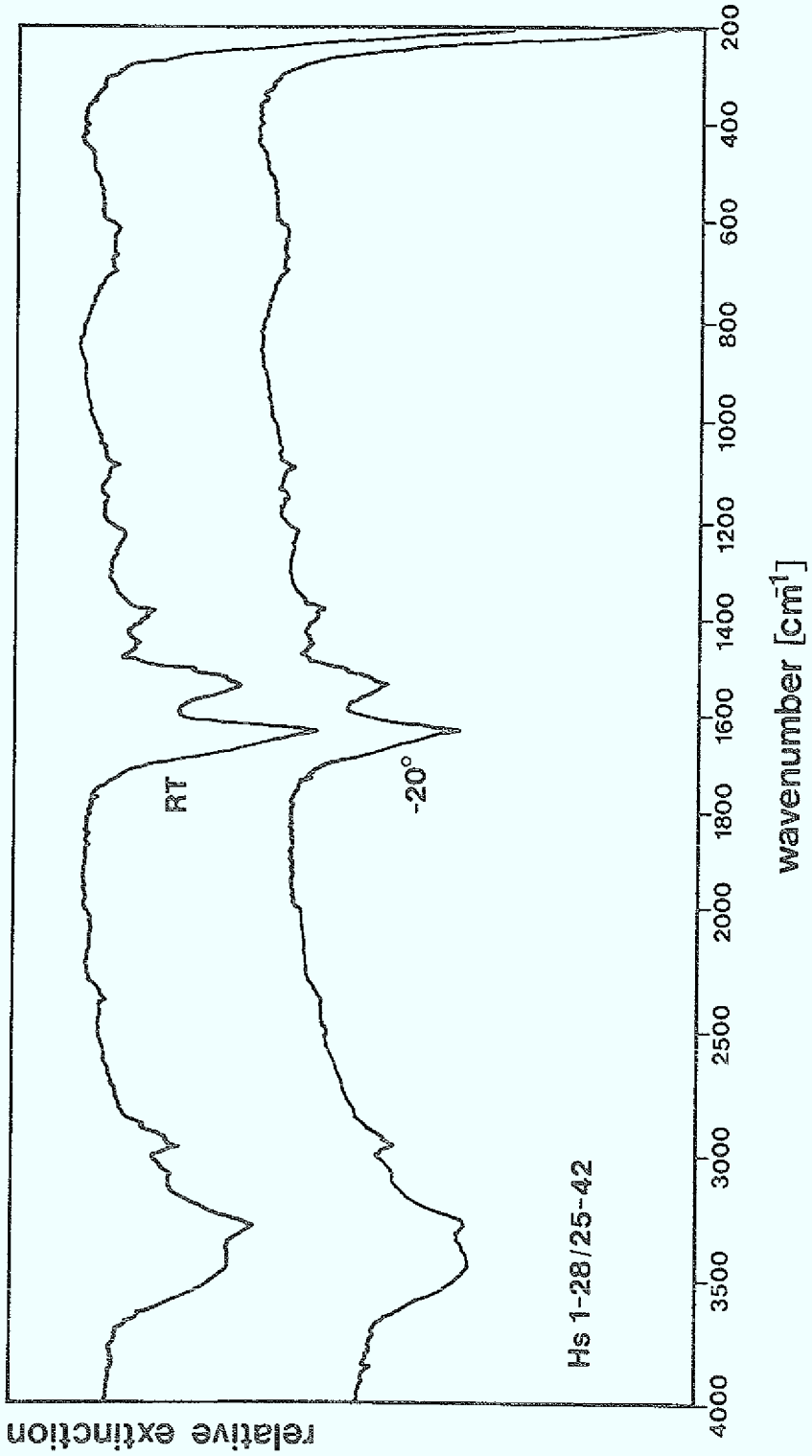


Bild 5.4.16: IR-Spektren der Aggregate 1-28 / 25-42

5.4.3.2 Peptidgemisch 1-11 des Arg-His/10-23 NH_2/25-42

Die vorwiegend antiparallele Faltblattstruktur beider Proben geht aus den Amid I-, II- und III-Banden hervor (1630 cm^{-1}, 1540 cm^{-1}, 1235 cm^{-1}).
Die Aggregate unterscheiden sich im Gegensatz zu den im vorhergehenden Abschnitt besprochenen nicht in der Region der NH-Streckschwingungen (Bild 5.4.17). Das Verhältnis von "gebundenen" zu "freien" Aminogruppen ist somit nicht temperaturabhängig. Der Anteil der vom antiparallelen Faltblatt abweichenden Konformationen ist ebenfalls nicht temperaturabhängig, da die niederfrequente Schulter der Amid I-Bande unbeeinflußt bleibt. Veränderungen innerhalb der "non-sheet"- Anteile ergeben sich jedoch aus Unterschieden im Bereich der Amid II- und besonders der Amid III-Banden. Das in der 37°C-Probe deutliche Signal bei 1285 cm^{-1} kann einem zunehmenden Gehalt an Loops zugeordnet werden (56a, 57).

Ein hoher Anteil einzeln oder als Homoaggregat vorliegender Peptide ist auszuschließen, da die Amid I-Bande des Aggregats im Vergleich zum Spektrum des Peptids 1-11 des Arg-His eine kleinere Halbwertsbreite zeigt.
Auch unter der Annahme einer idealen Aggregation der drei Peptide im molaren Verhältnis 1:1:1 würde dies keinesfalls vollständig dem Molekül 1-42 bzw. den Verhältnissen im APC-/PHF-Monomer entsprechen. Den Hauptgrund hierfür liefert das Fehlen der Aminosäuren 5 und 6 (Arg, His) in Peptid 1-11. Weiterhin überlappen die Primärsequenzen der Peptide 1-11 und 10-23 NH_2.

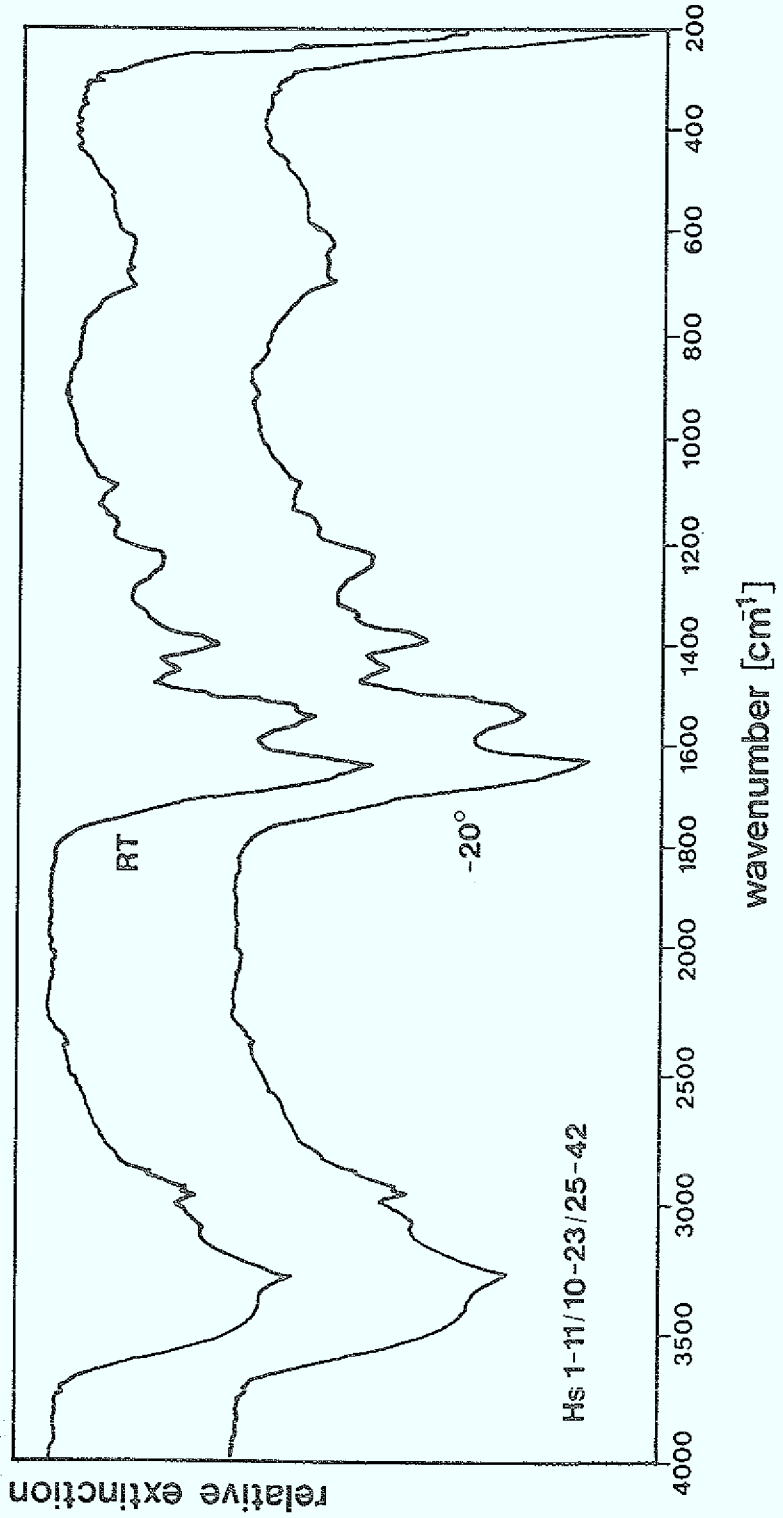


Bild 5.4.17: IR-Spektrum der Aggregate 1-11 des RH / 10--23NH_2 / 25-42

5.4.3.3 Peptidgemisch 1-11 des Arg-His / 11-23 / 25-42

Die Aggregate dieser Peptide ergeben nahezu identische Spektren zu den im vorigen Abschnitt beschriebenen. Dies betrifft auch die Temperaturabhängigkeit der Signale. Eine Beeinflussung der Amid I-Bande durch Lagerung der Probe bei 37°C bzw. Raumtemperatur tritt nicht ein, während Amid II- und besonders die Amid III-Signale deutlich verändert werden (Bild 5.4.18).

Die Frequenzen der Amid-Banden charakterisieren beide Proben als homogenes antiparalleles Faltblatt, das über Wasserstoffbrücken stabilisiert ist (Tabelle 5.4.3, Bild 5.4.18). Auf Turns hinweisende Signale im Bereich der Amid III-Moden sind im Unterschied zur 37°C-Probe (1275 cm^{-1}) im Spektrum der -20°C-Probe nur sehr schwach ausgeprägt.
Bei diesen Proben ist demnach in ähnlicher Weise wie bei den Aggregaten der Peptide 1-28 / 25-42 eine temperaturabhängige Änderung der Konformation beobachtbar. Dort erfolgt die Konformationsänderung von einer ungeordneteren in die stärker geordnete Struktur. Die Anzahl der Wasserstoffbrücken wird durch diesen Übergang erhöht (Kap. 5.4.3.1). Im Gegensatz dazu werden bei den hier diskutierten Aggregaten eher ungeordnete Anteile der Gesamtstruktur, Turns, verstärkt. Wasserstoffbrücken werden von dieser Änderung entweder überhaupt nicht betroffen oder aber durch andere mit gleicher Bindungskonstante ersetzt, da die Amid A-Bande keine Veränderung zeigt.
Bei beiden beschriebenen Fällen (Kap. 5.4.3.2 und 5.4.3.3) handelt es sich jedoch um nur graduelle Veränderungen der Spektren. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß die Sekundärstruktur der Peptidaggregate im relevanten Temperaturbereich (20°C bis 40°C) keine gravierenden Veränderungen erfährt.

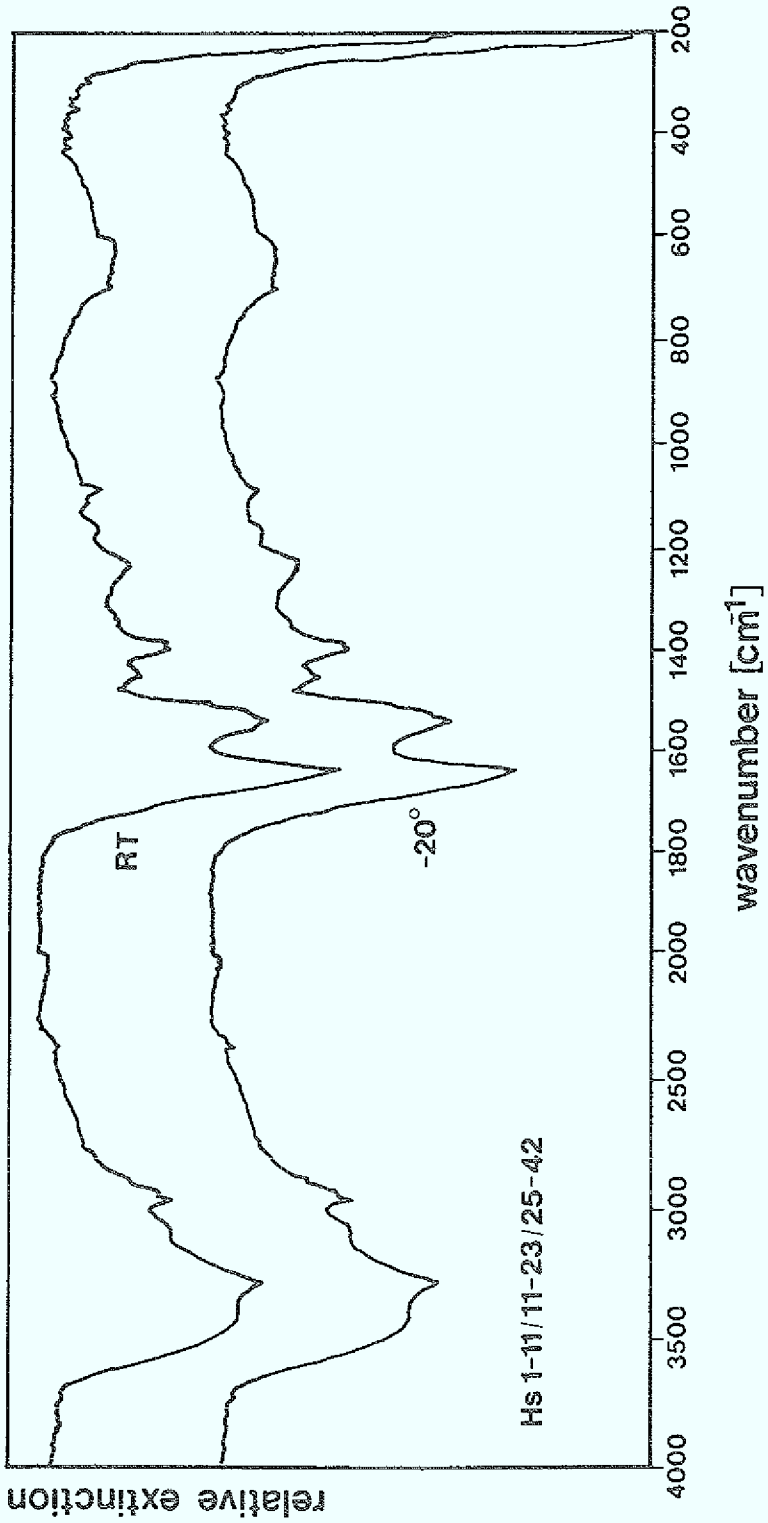


Bild 5.4.18: IR-Spektrum des Gemisches aus 1-11 des Arg-His / 11-23 / 25-42

5.4.3.4 Peptidgemisch 1-28 / 4-28

Das Spektrum der aggregierten Peptide 1-28 / 4-28 zeigt ein antiparalleles Faltblatt (Amid I: 1625 cm^{-1}, Amid II: 1530 cm^{-1}, Amid III: 1250 cm^{-1}) mit klaren Hinweisen auf einen Turn (Schulter der Amid I - Bande bei 1650, 1695 cm^{-1}, Signal der Amid III - Bande bei 1275 cm^{-1}).

Die starke Verbreiterung der Amid I-Bande ist wahrscheinlich nicht nur auf Turns zurückzuführen. Eine Beteiligung ungeordneter Strukturanteile wird durch den Aufbau der NH-Streckschwingungsregion belegt: nicht über Wasserstoffbrücken fixierte Konformationen sind für die starke Schulter bei $k \geq 3400$ cm^{-1} verantwortlich. Die stark ausgeprägte Amid A-Bande ist der geordneten Faltblattstruktur und/oder intramolekular über H-Brücken stabilisierten Turn(s) zuzuordnen.

Vergleicht man die Spektren der einzelnen Peptide (Kap. 5.4.3.4, Bild 5.4.9) mit denen des Aggregates, so wird sofort ersichtlich, daß die Peptide im aggregierten Zustand eine stärker geordnete Struktur annehmen (Amid-Banden). Die Ausbildung eines regelmäßigen antiparallelen Faltblattes ist im Aggregat deutlich verstärkt, wobei Anteile einer "non-sheet" Struktur weiterhin vorhanden sind.

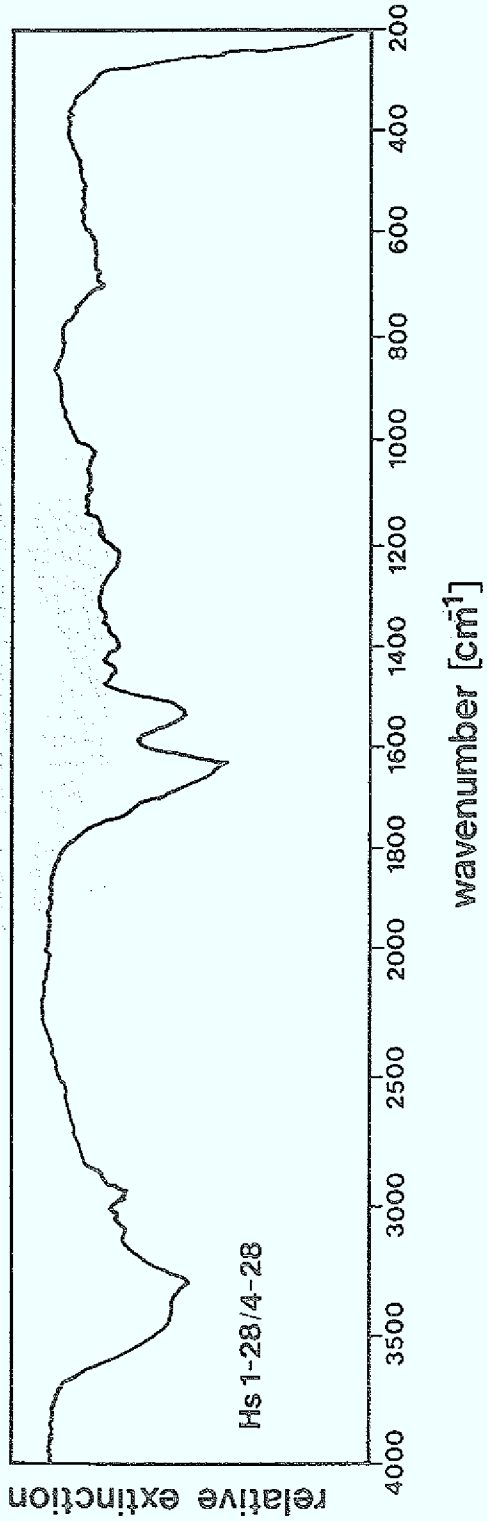


Bild 5.4.19: IR-Spektrum von 1-28 / 4-28

Aufgrund der molaren Verhältnisse der "ragged-ends" in NFTs wurde vermutet (C. Hilbich, K. Beyreuther, pers. Mitt.), daß mit diesen Peptiden erzeugte Fbrillen als den PHFs entsprechende, gepaarte helicale Filamente vorliegen. Diese Erwartung konnte elektronenmikroskopisch bestätigt werden (Bild 5.4.20).

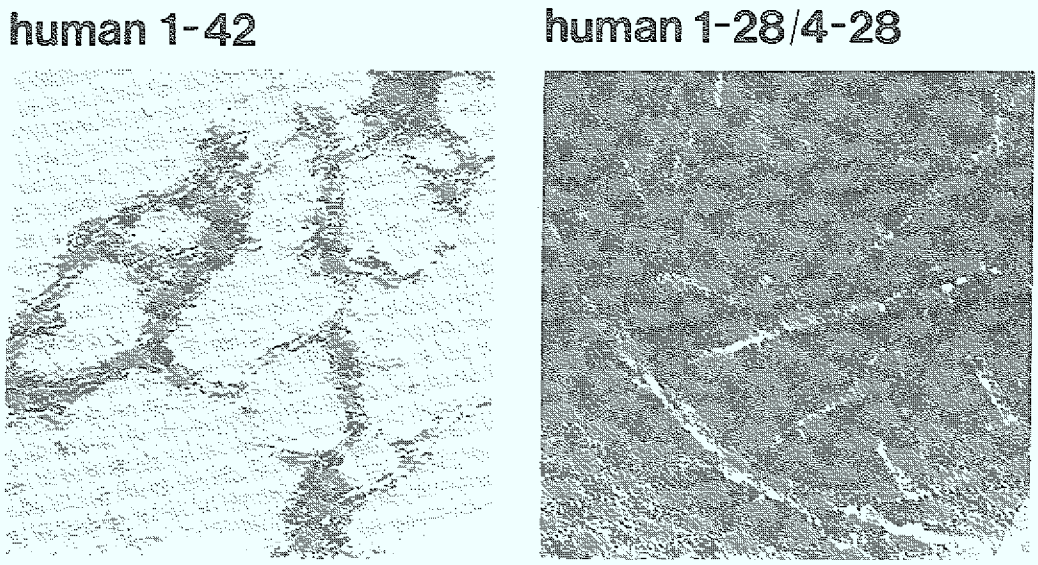


Bild 5.4.20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen:
Filamente des synthetischen Peptid 1-42
Filamente des Aggregates der
Peptide 1-28/4-28

Nach den in Kap. 5.4.3.7 vorgestellten hypothetischen Modellen für NFT- bzw. APC-Filamente wäre auch für die Fibrillen der Peptide 1-28 / 4-28 ein "abgeschrägtes" Dimer als zugrundeliegende Einheit zu postulieren (Bild 5.4.21).

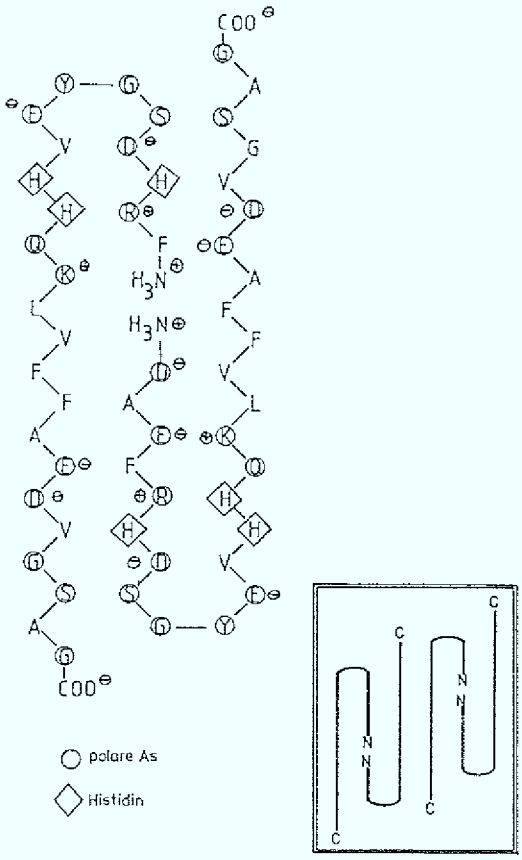


Bild 5.4.21: Modell zur Dimerisierung von
Peptid 1-28 / 4-28
Insert: Modell des Tetramers

Das in Bild 5.4.21 dargestellte, hypothetische Dimer liegt weitgehend als antiparalleles ß-Faltblatt mit integrierten Loops vor. Die freien C-Termini erklären die im IR-Spektrum darüberhinaus erkennbaren ungeordneten Strukturanteile.
Ein Abbruch der Aggregation kann durch die inhärente Flexibilität der Peptide erklärt werden, die durch die nicht im Faltblatt integrierten C-Termini verstärkt wird. Die gegenüber Peptid 1-42 erhöhte Flexibilität läßt erwarten, daß die synthetisch erzeugten Filamente kürzer als native PHFs sind. Auch dies wurde elektronenmikroskopisch bestätigt (Bild 5.4.20, Bild 5.4.1).

6. LITERATURVERZEICHNIS

(1) Admiraal, G., Vos, A.
Int. J. Pep. Protein Res. 23 (1984), 151 - 157

(2) Allsop, D., Landon, M., Kidd, M.
Manuskript in Vorbereitung

(3) Arnott, S., Dover, S.D.
J. Mol. Biol. 30 (1967), 209 - 212

(4) Arnott, S., Dover, S.D., Elliott, A.
J. Mol. Biol. 30 (1967), 201 - 208

(5) Ashida, T., Kojima, T., Tanaka, I., Yamane, T.
Int. J. Pep. Protein Res. 27 (1986), 61 - 69

(6) Astbury, W.T., Street, A.
Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A 230 (1931), 75 - 101

(7) Astbury, W.T., Woods, H.J.
Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A 232 (1933), 333 - 394

(8) Bandekar, J., Krimm, S.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979), 774 - 777

(9) Barlow, D.J., Thornton, J.M.
Biopolymers 25 (1986), 1717 - 1733

(10) Beal, M.F., Mazurek, M.F., Lorenz, L.J., Chattha, G.K., Ellison, D.W., Martin, J.B.
Neurosci. Lett. 64 (1986), 69 - 74

(11) Blake, C.C.F., Johnson, L.N.
TIBS 9 (1984), 147 - 151

(12) Blow, D.M., Wright, C.S., Kukla, D., Rühlmann, A., Steigemann, W., Huber, R.
J. Mol. Biol. 69 (1972), 137

(13) Bode, W., Schwager, P., Huber, R.
in: "Proceedings of the 10th FEBS Meeting" (1975), S.3

(14) Boussard, G., Marraud, M.
J. Am. Chem. Soc. 107 (1985), 1825 - 1828

(15) Bradbury, E.M., Brown, L., Downie, A.R., Elliott, A., Fraser, R.D.B., Hanby, W.E.
J. Mol. Biol. 5 (1962), 230 - 247

(16) Burger, P.C., Vogel, F.S.
Am. J. Pathol. 73 (1973), 457

(17) Canes, E.D., Glenner, G.G.
J. Histo. Cytochem. 16 (1968), 673 - 805

(18) Chatterjee, A., Parthasarathy, R.
Int. J. Pep. Protein Res. 24 (1984), 447 - 452

(19) Chothia, C.
J. Mol. Biol. 75 (1973), 295 - 302

(20) Chou, K.-C., Pottle, M., Nemethy, G., Ueda, Y., Scheraga, H.A.
J. Mol. Biol. 162 (1982), 89 - 112

(21) Chou, P.Y., Fasman, G.D.
J. Mol. Biol. 115 (1977), 135

(22) Chou, P.Y., Fasman, G.D.
Adv. Enz. 47 (1978), 45 - 147

(23) Chou, P.Y., Fasman, G.D.
Biophys. J. 26 (1979), 367 - 383

(24) Cruse, W.B.T., Egert, E., Viswamitra, M.A., Kennard, O.
Acta Crystallogr. Sect. B 38 (1982), 1758 - 1764

(25) Deisenhofer, J., Steigemann, W.
in: "Proteinase Inhibitors" (1984), S.484

(26) Donohue, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 39 (1953), 470 - 478

(27) Dwivedi, A.M., Krimm, S.
Biopolymers 23 (1984), 923 - 943

(28) Elliot, A.
Proc. R. Soc. London Ser. A 226 (1954), 408 - 421

(29) Ervin, K.E., Koglin, E., Séquaris, J.-M., Valenta, P., Nürnberg, H.W.
J. Electroanal. Chem. 114 (1980), 179

(30) Fawcett, J.K., Camerman, N., Camerman, A.
Acta Crystallogr. Sect. B 31 (1975), 658 - 665

(31) Finckh (1907) Zentralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie, März, 177 - 179

(32) Fraser, R.D.B., MacRae, T.P., Parry, D.A.D., Suzuki, E.
Polymer 10 (1969), 810 - 826

(33) Gersten, J.I., Nitzan, A.
J. Chem. Phys. 73 (1980), 3023

(34) Glenner, G.G.
New Engl. J. Med. 302 (1980), 1283 - 1292

(35) Glenner, G.G., (1983) in "Banbury Report 15", Katzmann, R. (ed.), pp. 137 - 143, Cold Spring Harbor Laboratory

(36) Glenner, G.G., Ein, D., Eanes, E.D., Bladen, H.A., Terry, W., Page, D.L.
Science 174 (1971), 712 - 714

(37) Glenner, G.G., Henry, J.M., Fujihara, S.
Ann. Pathol. 1 (1981), 105

(38) Glenner, G.G., Wong, C.W.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 122 (1984), 885 - 890

(39) Glenner, G.G., Wong, C.W.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 122 (1984), 1131 - 1135

(40) Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.-C., Zaidi, M., Wisniewski, H.M.
J. Biol. Chem. 261 (1986), 6084 - 6089

(41) Hilbich, C.
Diplomarbeit, Universität zu Köln, 1985

(42) Hollosi, M., Kawai, M., Fasman, G.D.
Biopolymers 24 (1985), 211 - 242

(43) Huber, R. et al.
in: "Proteinase Inhibitors" (1974), S.497

(44) Huber, R., Kukla, D., Rühlmann, A., Epp, O., Formanek,H.
Naturwissenschaften 57 (1970), 389

(45) Iqbal, K., Wisniewski, H.M. (1983) in "Alzheimer Disease" Reisberg, B. (ed.) pp. 48, Free Press, New York

(46) Jardetzky, O.
Biochem. Biophys. Acta 621 (1980), 227 - 232

(47) Kawai, M., Fasman, G.D.
J. Am. Chem. Soc. 100 (1978), 3630 - 3632

(48) Kendrew, J.C., Klyne, W., Lifson, S., Miyazawa, T., Némethy, G., Phillips, D.C., Ramachandran, G.N., Scheraga, H.A.
Biochemistry 9 (1970), 3471 - 3479

(49) Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Müller-Hill, B.
Nature 325 (1987), 733 - 736

(50) Kidd, M.
Nature 197 (1963), 192 - 193

(51) Kirschner, D.A., Abraham, C., Selkoe, D.J.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 503 - 507

(52) Kishore, R., Balaram, P.
J. Chem. Soc., Chem. Comm. (1984)

(53) Koglin, E., Séquaris, J.-M., Valenta, P.
in: Surface Studies with Lasers, Springer Series in Chemical Physics 33, (Aussenegg, F.R., Leitner, A., Lippitsch, M.E., Eds.), Springer Verlag 1983, p.64

(54) Koglin, E., Séquaris, J.-M.
Topics in Curr. Chem. 134 (1986), 1 - 57

(55) Krimm, S.
J. Mol. Biol 4 (1962), 528 - 540

(56) Krimm, S., Abe, Y.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (1972), 2788 - 2792

(56a) Krimm, S., Bandekar, J.
Biopolymers 19 (1980), 1 - 29

(57) Krimm, S., Bandekar, J.
Adv. Prot. Chem. 38 (1986), 181 - 364

(58) Krimm, S., Dwivedi, A.M.
J. Raman Spectrosc. 12 (1982), 133 - 137

(59) Krishnan, K., Ferraro, J.R.
Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Vol.3, Academic Press, 1982, pp. 149 - 209

(60) Kyte, J., Doolittle, R.F.
J. Mol. Biol. (1982), 105 - 132

(61) Lalitha, V., Murali, R., Subramanian, E.
Int. J. Pep. Protein Res. (1987) in press

(62) Levitt, M., Chothia, C.
Nature 261 (1976), 552 - 557

(63) Lerner, R.

(64) Lotz, B., Colonna-Cesari, F., Heitz, F., Spach, G.
J. Mol. Biol. 106 (1976), 915 - 942

(65) Loudon, R.
"Quantum Theory of Light", Carendon Press, Oxford, 1973

(66) Low, B., Baybutt, R.B.
J. Am. Chem. Soc. 74 (1952), 5806 - 5807

(67) Marsh, R.E., Glusker, J.P.
Acta Crystallogr. 14 (1961), 1110 - 1116

(68) Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., Mc Donald, B.L., Beyreuther, K.
PNAS 82 (1985), 4245 - 4249

(69) Meyer (1959) in "Große Nervenärzte" Vol. 2, Kolle (ed.), pp. 32 - 38, Thieme, Stuttgart

(70) Meyer, K.H., Mark, H.F.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. B61 (1928), 1932 - 1936

(71) Moore, H., Krimm, S.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975), 4933 - 4935

(72) Moore, W.H., Krimm, S.
Biopolymers 15 (1976), 2439 - 2464

(73) Moore, W.H., Krimm, S.
Biopolymers 15 (1976), 2465 - 2483

(74) Multhaup, G.
Dissertation, Universität zu Köln, 1986

(75) Naik, V.M., Bandekar, J. Krimm, S.
Proc. Int. Conf. Raman Spectrosc. 7th (1980), pp. 596 - 597

(76) Naik, V.M., Krimm, S.
Int. J. Pept. Protein Res. 23 (1984), 1 - 24

(77) Naik, V., Krimm, S.
Biophys. J. 45 (1984), 109 - 112

(78) Naik, V., Krimm, S.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 125 (1984), 1131 - 1145

(79) Naik, V., Krimm, S.
Biophys. J. 49 (1986), 1131 - 1145

(80) Naik, V., Krimm, S.
Biophys. J. 49 (1986), 1147 - 1154

(81) Narang, H.K.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 39 (1980), 621 - 631

(82) Némethy, G., Printz, M.P.
Macromolecules 5 (1972), 755 - 758

(83) Olinger, J.M., Hill, D.M., Jakobsen, R.J., Brody, R.S.
Biochim. Biophys. Acta 869 (1986), 89 - 98

(84) Pauling, L., Corey, R.B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37 (1951), 235 - 240

(85) Pauling, L., Corey, R.B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 39 (1953), 253 - 256

(86) Pauling, L., Corey, R.B., Branson, H.R.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37 (1951), 205 - 211

(87) Perry, E.K., Tomlinson, B.E., Blesset, G., Bergmann, K., Perry, R.H.
Br. Med. J. 2 (1978), 1457

(88) Pottgießer, J.
Diplomarbeit, Universität zu Köln, 1985

(89) Poulet, H., Mathieu, J.P.
"Vibration Spectra Symmetry of Crystals", Gordon and Breach, New York, 1976

(90) Prasad, B.V.V., Sasisekharan, V.
Macromolecules 12 (1979), 1107 - 1110

(91) Prescott, B., Renugopalakrishan, V., Glimcher, M.J., Bhushan, A., Thomas, G.J.Jr.
Biochemistry 25 (1986), 2792 - 2798

(92) Prinz, H.
Dissertation, Universität zu Köln, 1986

(93) Raghavendra, K., Sasisekharan, V.
Int. J. Pep. Protein Res. 14 (1979), 326 - 338

(94) Rao, S.N., Parthasarathy, R.
Acta Crystallogr. Sect. B 29 (1973), 2379 - 2388

(95) Ravi, Balaram, P.
Tetrahedron 40 (1984), 2577

(96) Reisberg, B. (1983) in "Alzheimer Disease" Reisberg, B. (ed.) pp. 173, Free Press, New York

(97) Renugopalakrishnan, V., Strawich, E.S., Horowitz, P.M., Glimcher, M.J.
Biochemistry 25 (1986), 4879 - 4887

(98) Richardson, J.S.
Adv. Protein Chem. 34 (1981), 167 - 339

(99) Ropper, A.H., Williams, R.S.
Neurology 30 (1980), 639 - 644

(100) Rose, G.D., Gierasch, L.M., Smith, J.A.
Adv. Protein Chem. 37 (1985), 1 - 109

(101) Rühlmann, A. et al.
J. Mol. Biol. 77 (1973), 417

(102) Sasaki, S., Yasumoto, Y., Uematsu, E.
Macromolecules 14 (1981), 1797 - 1801

(103) Schulze-Gahmen, U., Prinz,H., Glatter,U., Beyreuther, K.
EMBO 4 (1985), 1731 - 1737

(104) Séquaris, J.-M., Koglin, E., Valenta, P., Nürnberg H.W.
Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 85 (1981), 512

(104a) Shivers, B., Hilbich, C., Multhaup, G., Seeburg, P., Beyreuther, K.
submitted for press

(105) Sternberg, M.J.E.
in: Computing in Biological Science (Geisow, M.J., Barrett, A., Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1983, pp. 143 - 177

(106) Sternberg, M.J.E., Thornton, J.M.
Nature 271 (1978), 15 - 20

(107) Sugeta, H., Go, A., Miyazawa, T.
Chem. Lett. 83 (1972)

(108) Sugeta, H., Go, A., Miyazawa, T.
Bull. Chem. Soc. Japan 46 (1973), 3407

(109) Suschtschinskij, M.M.
"Ramanspektren von Molekülen und Kristallen", Heyden & Son, Rheine, 1974

(110) Tanaka, I., Ashida, T.
Acta Crystallogr. Sect. B 36 (1980), 2164 - 2167

(111) Terry, R.D.
Neuropathol. Exp. Neurol. 22 (1963), 629 - 642

(112) Thompson, R.J.
TIBS 8 (1983), 389 - 390

(113) Tomlinson, B.E., Blesset, G., Roth, M.
J. Neurol. Sci. 11 (1970), 205 - 243

(114) Tu, A.T.
"Raman Spectroscopy in Biology", John Wiley & Sons, 1982

(115) Urry, D.W.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 (1971), 672 - 676

(116) Van Duyne, R.P.
J. Phys. (Paris) 38 C-5 (1977), 239

(117) Veatch, W.R., Fossel, E.T., Blout, E.R.
Biochemistry 13 (1974), 5249 - 5256

(118) Venkatachalam, C.M.
Biopolymers 6 (1968), 1425 - 1436

(119) Vogel, H., Jähnig, F.
J. Mol. Biol. 190 (1986), 191 - 199

(120) Vogel, H., Wright, J.K., Jähnig, F.
EMBO J. 4 (1985), 3625 - 3631

(121) Williams, R.W., Dunker, A.K.
J. Mol. Biol. 152 (1981), 783 - 813

(122) Wisniewski, H.M., Merz, G.S. (1983) in "Banbury Report 15", Katzmann, R. (ed.), pp. 145 - 152, Cold Spring Harbor Laboratory

(123) Wisniewski, H.M., Narang, H.K., Terry, R.D.
J. Neurol. Sci. 27 (1976), 173 - 181

(124) Wurtmann, R.J.
Sci. Am. 252 (1985), No. 1, 48 - 56

(125) Yamada, Y., Tanaka, I., Ashida, T.
Acta Crystallogr. Sect. B 36 (1980), 331 - 335

(126) Yamane, T., Shiraishi, Y., Ashida, T.
Acta Crystallogr. Sect. B 41 (1985), 946 - 950

(127) Yu, N.-T., Liu, C.S.
J. Am. Chem. Soc. 94 (1972), 5127

(128) Zimmermann, S.S., Scheraga, H.A.
Biopolymers 16 (1977), 811 - 843

(129) Adrian, F.J.
Chem. Phys. Lett. 78 (1981), 45

(130) Barber, P.W., Chang, R.K., Massoudi, H.
Phys. Rev. Lett. 50 (1983), 997

(131) Barber, P.W., Chang, R.K., Massoudi, H.
Phys. Rev. B 27 (1983), 7251

(132) Burstein, E., Chen, Y.J., Chen, C.Y., Lundquist, S., Tosath, E.
Solid State Comm. 29 (1979), 567

(133) Burstein, E., Chen, Y.J., Lundquist, S.
Bull. Am. Phys. Soc. 23 (1978), 130

(134) Chen, Y.J., Chen, W.P., Burstein, E.
Phys. Rev. Lett. 36 (1976), 1207

(135) Chen, W.P., Ritchie, G. Burstein, E.
Phys. Rev. Lett. 37 (1976), 993

(136) Chew, H., Wang, D.S., Kerker, M.
Phys. Rev. B 28 (1983), 4169

(137) Chew, H., Wang, D.S., Kerker, M.
J. Opt. Soc. Am. B 1 (1984), 56

(138) Furtak, T.E., Reyes, J.
Surf. Sci. 93 (1980), 351

(139) Furtak, T.E., Roy, D.
J. Chem. Phys. 81 (1984), 4168

(140) Gersten, J.I., Nitzan, A.
J. Chem. Phys. 73 (1980), 3023

(141) Jha, S.S., Kirtley, J.R., Tsang, J.C.
Phys. Rev. B22 (1980), 3973

(142) Kerker, T.E., Wang, D.S., Chew, H.
Appl. Opt. 19 (1980), 4159

(143) Liao, P.F., Bermann, J.G., Chemla, D.S., Wokaun, A., Melngailis, J., Hawryluk, A.M., Economou, N.P.
Chem. Phys. Lett. 82 (1981), 355

(144) McCall, S.L., Platzmann, P.M., Wolff, P.A.
Phys. Lett. A 7 (1980), 381

(145) Moskovits, M.
J. Chem. Phys. 69 (1978), 4159

(146) Moskovits, M.
Reviews of Mod. Phys. 57 (1985), 783

(147) Otto, A., Billmann, J., Eickmans, J., Ertürk, U., Pettenhofer, C.
Surf. Sci. 138 (1984), 319

(148) Persson, B.N.J.
Chem. Phys. Lett. 82 (1981), 561

(149) Ueba, H.
in: Surface Enhanced Raman Scattering (Chang, R.K., Furtak, T.E., Eds.) Plenum Press, New York, 1982, p. 173

(150) Ueba, H.
Surf. Sci. 131 (1983), 328

(151) Ueba, H.
Surf. Sci. 131 (1983), 347

(152) Wang, D.S., Kerker, M.
Phys. Rev. B24 (1981), 1777

(153) Wokaun, A.
ETH Habilitationsschrift, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich 1982

(154) Engelke, F.
"Aufbau der Moleküle", Teubner Studienbücher, 1985

(155) Hayes, W., Loudon, R.
"Scattering of Light by Crysals", John Wiley & Sons, New York, 1978

Anmerkungen

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.T. Beyreuther für seine Unterstützung dieser Arbeit, sowie den gewährten experimentellen Freiraum.

Der Leitung des Institutes für angewandte physikalische Chemie der KFA Jülich möchte ich für die Aufnahme als Gast danken.

Ich möchte allen Mitarbeitern danken. Sie wurden nie müde, Probenmaterial für Messungen zur Verfügung zu stellen.

Frau C. Hilbich gilt mein besonderer Dank für ihre unermüdliche Unterstützung und zahlreiche anregende Diskussionen.

Für ihre Ermutigung während dieser Arbeit möchte ich Frau Dr. B. Bieseler und Frau Dr. J. Bovens danken.

Herrn Dr. J.-M. Séquaris und Herrn Dr. E. Koglin möchte ich für ihre hilfreiche Unterstützung in allen biophysikalischen Fragen herzlich danken.

Herrn Dr. Th. Woike gilt mein Dank für sein reges Interesse an dieser Arbeit und nicht zuletzt für unterstützende Raman-Messungen.

FTIR-Spektrometer wurden von den Firmen NICOLET, Offenbach und BIO-RAD, Düsseldorf zur Verfügung gestellt, denen ich an dieser Stelle danken möchte.