

Teilprojekt B6: Analyse kohärent gekoppelter Amid Zustände in Peptiden und Proteinen.

Teilprojektleiter: **Prof. Dr. Peter Hamm**
Dienstanschrift: Physikalisch Chemisches Institut
Universität Zürich
Winterthurerstr. 190
8057 Zürich
Schweiz

Kommunikation: Tel: 0041 1 6354431 Fax: 0041 1 6356838
E-Mail: hamm@pci.unizh.ch
Internet: http://pciwww.unizh.ch/staff.epl?pers_id=116

Fachgebiet und **Biophysik, Schwingungsspektroskopie, Ultrakurzzeitspektroskopie**
Arbeitsrichtung:

Keywords: Peptidstruktur, Peptiddynamik, Proteinstruktur, Energietransfer, Exziton, Polaron

Summary of results in the period 2001

The research during this period focused on the femtosecond IR spectroscopy of coupled vibrational modes in proteins, peptides and model peptide structures. The linear and nonlinear couplings between certain vibrational modes of these molecules have been investigated, addressing two distinctly different aspects: (I) Since the coupling between amide I modes of various peptide units depends on the relative geometric configuration, structural and dynamical properties can be extracted from a measured 2D spectrum. We have investigated the conformational heterogeneity and stability of two small peptides, revealing the structural propensities of these molecules in a unique way. (II) Nonlinear coupling of amide modes to low frequency phonons in extended protein aggregates may lead to soliton and polaron formation. Such states have been discussed extensively in the literature as a means of storing and

transporting energy in biomacromolecules. We have, for the first time, investigated directly the formation of such states with the help of nonlinear spectroscopy in a model peptide crystal.

Übersicht über Ergebnisse aus den Jahren 2001

Ich habe am 24.8.2001 einen Ruf an die Universität Zürich erhalten, den ich zum 1.10.2001 angenommen habe. Meine Arbeitsgruppe war seit Dez. 2001 ebenfalls in Zürich, so dass ich meine Mitgliedschaft am SFB 450, was die finanzielle Unterstützung betrifft, mit Ende des Jahres 2001 beendete. Trotz der Kürze der durch den SFB geförderten Periode konnten einige wesentliche Punkte des Antrags erfolgreich bearbeitet werden [EHS02, EH02, WPH02, HWR02]. Der vorliegende Bericht bezieht sich nur auf Resultate aus der durch den SFB 450 geförderten Periode. Die Arbeiten laufen in Zürich lückenlos weiter, gefördert nun durch den Schweizer Nationalfond (siehe Ref. [BHS03, BHB03, BH03a, BH03b, EH03, BHH04]).

Gegenstand des Projektes waren kohärent gekoppelte Schwingungsmoden des Rückgrates kleiner Peptide (d.h. Schwingungsexzitonen der sog. Amid Zustände), die (a) der Analyse ihrer Struktur und deren ultraschnellen Dynamik dienen kann und (b) deren Rolle für einen eventuell kohärenten Transport von Energie durch Proteine studiert werden sollte.

Einzelberichte aus dem letzten Berichtszeitraum (2001)

(a) Struktur und Dynamik kleiner Peptide

Nichtlineare 2D-IR Spektroskopie erlaubt es, Kopplungen zwischen Amid Zuständen direkt zu messen. Aufgrund der einfachen Natur des Kopplungsmechanismus (im Wesentlichen elektrostatische Coulombwechselwirkung) gelingt es, einen quantitativen Zusammenhang zwischen Kopplung und Geometrie herzustellen. Das Potential der 2D-IR Spektroskopie als Strukturanalysemethode liegt in der hohen Zeitauflösung (1 ps), die in der Lage ist, auch die schnellsten Bewegungen des Peptidrückgrates 'einzufrieren'. Dies wurde an einer Reihe von Beispielen demonstriert [1-4], und ist Gegenstand aktueller Arbeiten in Zürich [BHB03, BHH04]. In der laufenden Periode konzentrierten sich die Arbeiten auf die Strukturverteilung

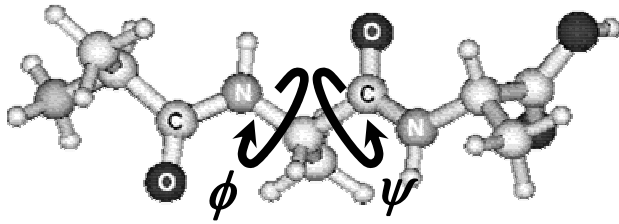


Abb. 1 Das Peptid Trialanin mit den zentralen Strukturwinkeln (ϕ, ψ).

eines Proteinbausteins, Trialanin [WPH02], sowie die thermische Stabilität sog. β -Peptide [HWR02].

Trialanin: In Ref. [WPH02] gelang es, äusserst detaillierte Aussagen über die Strukturverteilung eines kleinen Peptids, Trialanin, zu machen. Trialanin besitzt genau eine zentrale Aminosäure, dessen Struktur durch ein Paar von (ϕ, ψ)-Winkel charakterisiert ist (Abb. 1). Trialanin kann deshalb als Benchmarktest für Strukturbestimmungsmethoden sowie Strukturmodelle angesehen werden. Konventionelle NMR Methoden versagen als Strukturanalysemethode für Trialanin, so dass die Strukturverteilung dieses Proteinbausteins unbekannt war. In Ref. [WPH02] gelang es mit Hilfe einer Kombination von 2D-IR Spektroskopie und MD Simulationen eindeutig zu zeigen, dass Trialanin zu ca. 80% in der sog. PP_{II} Struktur (i.e. $\phi=-67^\circ$, $\psi=132^\circ$) vorliegt, zu ca. 20% in der α -Struktur ($\phi=-76^\circ$, $\psi=-44^\circ$), und dass die β -Struktur ($\phi=-122$, $\psi=130$) so gut wie keine Rolle spielt. Dieses Ergebnis ist auf den ersten Blick etwas unerwartet, da die in Trialanin dominante PP_{II} Struktur in längeren Sequenzen sowie in Proteinen keine besondere Rolle spielt. In Proteinen werden Strukturen durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert, die im kurzen Trialanin nicht möglich sind. Ref. [WPH02] dürfte die am meisten detaillierte und fundierte Strukturbestimmung eines Proteinbausteins sein. Es wurde eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht, die mit unabhängigen spektroskopischen Methoden unsere Strukturvorhersage nun bestätigen [5-9].

Die neuen experimentellen Eckdaten triggerten mehrere theoretische Arbeiten, die versuchen mit Hilfe von Molekulardynamik- (MD) Simulationen die Strukturpräferenz kleiner Peptide zu modellieren und vorherzusagen. MD-Potentiale werden im grossen Umfang eingesetzt, Strukturen und Dynamik grosser Proteine oder gar Proteinkomplexe, die sich einer direkten spektroskopischen Beobachtung entziehen, zu verstehen. Deshalb darf man zu Recht fordern, dass die Ergebnisse einer MD Simulation auch für extrem kleine Systeme, wie Trialanin, mit dem Experiment übereinstimmen sollten. Es zeigt sich jedoch, dass die verschiedenen gängigen MD Potentiale (CHARMM, AMBER, GROMOS) für Trialanin komplett

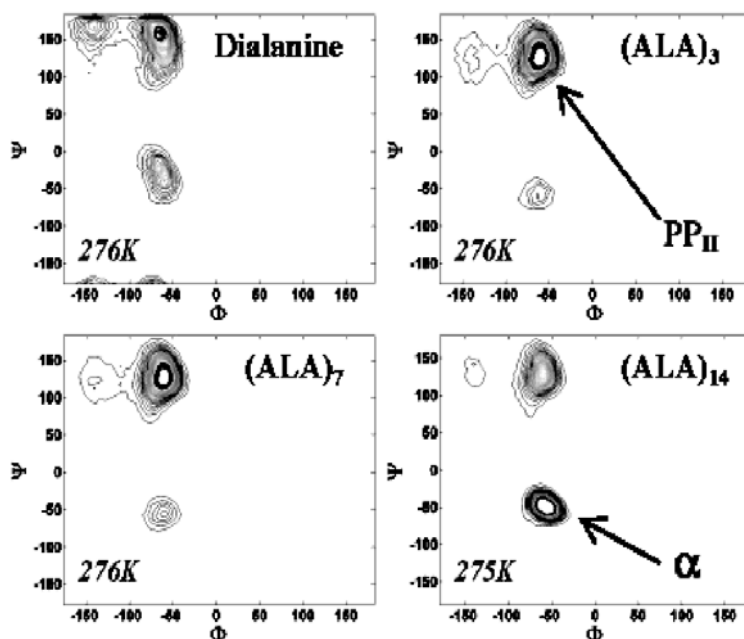


Abb. 2 Strukturverteilung einiger Polyalanine unterschiedlicher Länge als Ergebnis einer Molekulardynamik Simulation. Die MD-Simulation verwendet das AMBER-Kraftfeld, welches jedoch modifiziert wurde, um den kontinuierlichen Übergang von der dominanten PP_{II} Struktur in Ala₃ zur α -Struktur in Ala₁₄ richtig und selbstkonsistent zu beschreiben. Kopie von Ref. [12].

unterschiedliche Strukturverteilungen liefern, von der keine mit dem experimentellen Ergebnis übereinstimmt [10,11]. Deshalb wurden Modifikationen zum AMBER-Potential vorgeschlagen [12], die in der Lage sind, den Übergang der dominanten PP_{II} Struktur in Trialanin zur α -Struktur in längeren Polyalaninen richtig und selbstkonsistent zu beschreiben (Abb. 2). Ref. [WPH02], sowie die Vorarbeiten in Refs. [1,2], stellen dafür zum ersten Mal zuverlässige und fundierte experimentelle Werte zur Verfügung. Zusammenfassend kann man also feststellen, dass 2D-IR Spektroskopie mit Refs. [WPH02, 1, 2] erstmals einen Impact in einer grösseren Wissenschaftsgemeinde erzielt hat, der weit über die Entwicklung neuer spektroskopischer Methoden zum reinen Selbstzweck hinausgeht.

β -Peptide: β -Peptide, die in der Arbeitsgruppe von Prof. D. Seebach, ETH Zürich, synthetisiert werden, bilden außerordentlich stabile Strukturen schon für sehr kurze Peptidsequenzen. β -Peptide unterscheiden sich von natürlichen α -Peptiden durch ein zusätzliches C _{β} -Atom im Peptidrückgrat. Die Arbeitsgruppe von Prof. D. Seebach gelang es, eine ganze Reihe verschiedener Sekundärstrukturen (Helices, Faltblätter) zu 'designen'. Aufgrund der Stabilität und Kürze der Sequenzen eignen sich β -Peptide hervorragend als Modellsysteme, an dem das Strukturaufklärungsvermögen der 2D-IR Spektroskopie getestet und optimiert werden kann. In Ref. [HWR02] wurde die Stabilität eines β -Peptids bei hohen Temperaturen mit Hilfe der 2D-IR Spektroskopie untersucht. Zwar nimmt die Flexibilität der Helix (eine Grösse, die ebenfalls

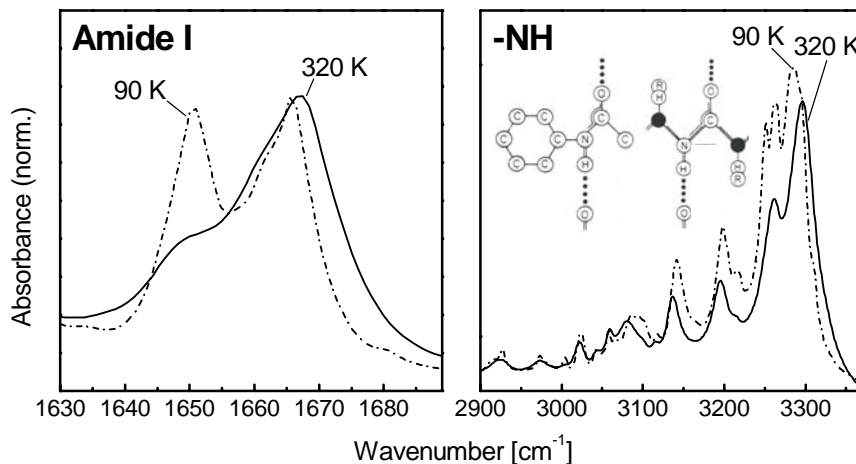


Abb. 3 IR-Absorptionsspektrum von Acetanilid (ACN) bei 90 K (gestrichelte Linie) und 320 K (durchgezogene Linie) im Bereich der Amid I und der NH-Streckschwingung. Die Struktur von ACN (Insert links) ähnelt der einer α -Helix (Insert rechts).

gemessen werden kann) mit steigender Temperatur zu, aber Kopplungen im 2D-IR Spektrum, die die räumliche Nähe zweier Peptidgruppen widerspiegeln, bleiben im Wesentlichen erhalten. Die Sekundärstruktur ist auch bei 80°C noch stabil, im Gegensatz zu den meisten α -peptiden. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen ist die Arbeitsgruppe von Prof. D. Seebach auch mit Hilfe konventioneller CD-Spektroskopie und NMR-Spektroskopie gekommen. Allerdings wurde die Aussagekraft beider Spektroskopiemethoden für kleine β -Peptide in Frage gestellt, so dass eine unabhängige Verifizierung willkommen war.

2D-IR Spektroskopie ist gegenwärtig nicht in der Lage, für Peptide der Grösse des in Ref. [HWR02] behandelten Systems (6 Aminosäuren) eine eindeutige Strukturaussage zu machen. Grund ist das fehlende Auflösungsvermögen der untersuchten Amid I Bande, die bei Peptiden dieser Grössenordnung meist zu einer breiten, strukturlosen Bande 'verwascht'. Ein erfolgversprechender Ausweg aus diesem Dilemma ist die Isotopenmarkierung. In Ref. [BH03a] wurden mit Hilfe einer Computersimulation solide Designstrategien zur Isotopenmarkierung eines zyklischen Pentapeptids erarbeitet, das derzeit experimentell verifiziert werden.

(b) Nichtlineare Anregungen (Polaronen) in Proteinmodellsystemen

Nichtlineare Kopplung zwischen Amid-Banden und Phononen von kristallinem Acetanilid (ACN, $\text{CH}_3\text{-CO-NH-C}_6\text{H}_5$), einem Modellsystem für wasserstoffverbrückte Ketten von Peptidgruppen wie sie auch entlang einer α -Helix gefunden werden, führt zur Selbstlokalisierung von Schwingungsexzitonen. Dieses Phänomen, das im Zusammenhang eines gezielten Ener-

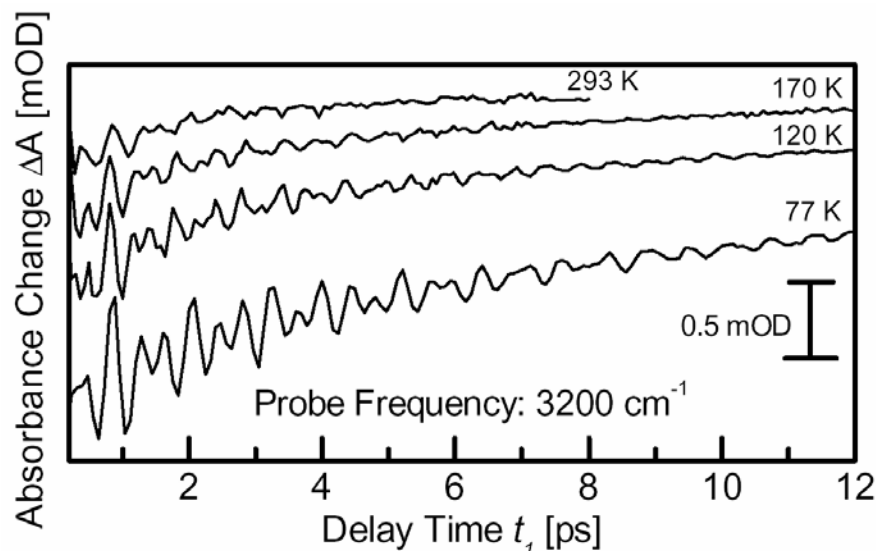


Abb. 4 Pump-Probe-Signal der NH-Bande von kristallinen ACN bei variierenden Temperaturen. Ausgeprägt Oszillationen werden beobachtet, die diejenigen Phononen widerspiegeln, welche für die Selbstlokalisierung der NH Bande verantwortlich sind.

gietransport durch Proteine diskutiert wurde und unter dem Begriff Davidov-Soliton bekannt wurde [13, 14], wurde mit Hilfe verschiedener nichtlinearer spektroskopischer Methoden (IR-Pump-IR-Probe, 2D-IR-Spektroskopie, IR-Quantenbeat-Spektroskopie) studiert. Wir haben sowohl die NH Bande [EHS02] als auch die Amide I (i.e. C=O) Bande [EH02] von kristallinem Acetanilid untersucht.

NH-Bande: Die NH Bande besteht aus einer Hauptbande bei ca. 3300 cm⁻¹ und einer Sequenz äquidistanter Satellitenbanden zu tieferen Frequenzen (siehe Abb. 3). Es konnte mit Hilfe von IR-Quantenbeatexperimenten eindeutig nachgewiesen werden, dass diese spektrale Signatur durch eine ausgesprochen starke Kopplung der NH Bande an bestimmte Kristallphononen zustande kommt (Abb.4) [EHS02]. Ferner konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Hauptbande bei 3300 cm⁻¹ um einen delokalisierten Zustand (freies Exziton) handelt, der nach direkter Anregung auf einer ultraschnellen Zeitskala von 400 fs in selbstlokalisierte, polaronartige Zustände (i.e. die Satellitenbanden) kollabiert. Regt man jedoch die Satellitenbanden direkt an, wird kein Rücktransfer in den delokalisierten Zustand beobachtet. Wir betrachten diese Beobachtung als direkte Manifestation von Selbstlokalisierung ('self-trapping') der NH-Bande. Die Exziton-Phonon-Kopplung ist im Falle der N-H so stark, dass sie auch bei Zimmertemperatur relevant ist.

C=O-Bande: Im Gegensatz dazu ist die Exziton-Phonon-Kopplung der C=O Bande deutlich schwächer, und kann nur bei tiefen Temperaturen (ca. 90 K) beobachtet werden, bei denen ebenfalls eine Satellitenbande auftaucht (siehe Abb. 3). Auch in diesen Fall konnte mit Hilfe von IR-Pump-Probe Experimenten eindeutig nachgewiesen werden, dass die Hauptbande bei 1666 cm⁻¹ bei einer Temperatur von 90 K ein perfekt delokalisierten Zustand ist (i.e. ein freies

Exziton), während die Satellitenbande bei 1650 cm^{-1} ein selbstlokalisierter Zustand (Polaron) ist [EH02]. Bei Raumtemperatur ist der Mechanismus der Selbstlokalisierung instabil gegen thermische Anregungen. Interessanterweise lokalisiert bei Erwärmung die freie Exziton-Bande als Resultat von thermischer Unordnung ('Anderson Localisation').

Kristallines ACN wurde in den 80'er Jahren intensiv sowohl mit Hilfe konventioneller spektroskopischer Methoden, als auch von theoretischer Seite untersucht. Damals wurde postuliert, dass die Anomalien im IR-Absorptionsspektrum auf die Bildung selbstlokalisierter Zustände zurückzuführen sind. Allerdings beruhten diese Resultate auf sehr indirekten Schlussfolgerungen und arbeiteten eher nach einem Ausschlussprinzip, als mit positiven Argumenten. Unsere Arbeiten konnten zum ersten Mal den Vorgang der Selbstlokalisierung direkt beobachten, und ferner umfangreiches Datenmaterial zum Mechanismus sammeln. Unsere Experimente haben bereits eine Reihe von theoretischen Arbeiten ausgelöst und haben dazu beigetragen, das Interesse an der Problematik zu erneuern [15-19].

Der nichtlineare Respons eines linearen (harmonischen) Systems verschwindet exakt. In anderen Worten, nichtlineare Spektroskopie misst selektiv den anharmonischen Anteil der molekularen Potentialfläche. Gleichzeitig sind es anharmonische Kopplungen, die zu kollektiven Anregungen, wie Polaronen und Solitonen, führen. Deshalb sind nichtlineare spektroskopische Methoden besonders geeignet, diese Phänomene zu studieren. Eindeutige experimentelle Evidenz für Selbstlokalisierung in Proteinen wurde bisher nur in einem Modellsystem, kristallinen ACN, gefunden. Wir (sowie auch die Gruppe von Prof. Robert Austin, Princeton [20]) sind gegenwärtig damit beschäftigt zu zeigen, dass Selbstlokalisierung ein weit verbreitetes Phänomen ist, welches auch in anderen wasserstoffverbrückten Kristallen (wie etwa in kristallinen N-Methyl-Acetamid, NMA) sowie in Polypeptiden und Proteinen auftritt. Damit wäre die Voraussetzung geschaffen, die Frage anzugehen, inwieweit polaron- oder solitonartige Zustände biologisch relevant sind.

Referenzen

- [1] S. Woutersen, P. Hamm, *J. Phys. Chem. B* **104** (2000) 11316-11320.
- [2] S. Woutersen, P. Hamm, *J. Chem. Phys.* **114** (2001) 2727-2737.
- [3] S. Woutersen, Y. Mu, G. Stock, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (2001) 11254-11258
- [4] S. Woutersen, P. Hamm, *J. Chem. Phys.* **115** (2001) 7737-7743
- [5] R. Schweitzer-Stenner, F. Eker, Q. Huang, K. Griebenow, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 9628-9633.
- [6] E. Spek, C. Olson, Z. Shi, N. Kallenbach, *N. J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 5571-5572.
- [7] Z. Shi, C. Olson, G. Rose, R. Baldwin, N. Kallenbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** (2002) 9190-9195.
- [8] F. Eker, X. Cao, L. Nafie, R. Schweitzer-Stenner, *R. J. Am. Chem. Soc.*, **124**, (2002) 14330-14341.
- [9] H. Schwalbe, unpublished results
- [10] Y. Mu, D. S. Kosov, G. Stock, *J. Phys. Chem. B* **107** (2003) 5064-5073.
- [11] H. Hu, M. Elstner, J. Hermans, *Proteins* **50**, (2003), 451-463.
- [12] S. Gnanakaran, A. E. Garcia, *J. Phys. Chem. B.* **107** (2003) 12555-12557.
- [13] A. S. Davydov, *J. Theor. Biol* **66** (1977) 379-387.
- [14] A. Scott, *Phys. Report* **217** (1992) 1-67.
- [15] P. A. S. Silva, L. Cruzeiro-Hansson, *Phys. Lett. A* **315** (2003) 447-451
- [16] V. Pouthier, *Phys. Rev. E* **68** (2003) art. no. 021909.
- [17] S. Komarnicki, D. Hennig, *J. Phys. Condens. Mat.* **15** (2003) 441-456
- [18] J. M. Khalack, Y. Zolotaryuk, P. L. Christiansen, *Chaos* **13** (2003) 683-692
- [19] G. Tsironis, private communication
- [20] A. H. Xie, L. van der Meer, W. Hoff, R. H. Austin, *Phys. Rev. Lett.* **84** (2000) 5435-5438.
- [20] X. Daura, I. Antes, W. F. van Gunsteren, W. Thiel, A. E. Mark, *Proteins* **36** (1999) 542.
- [21] A. Glättli, X. Daura, D. Seebach, W. F. van Gunsteren. *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 12972.

Veröffentlichungen des Teilprojekts

(Die mit * markierten Arbeiten würden vom SFB 450 finanziert, die mit + wurden vom SNF)

- [WPH02]* S. Woutersen, R. Pfister, P. Hamm, Y. Mu, D. S. Kosov, and G. Stock, *Peptide conformational heterogeneity revealed from nonlinear vibrational spectroscopy and molecular dynamics simulations*, J. Chem. Phys. **117** (2002) 6833.
- [HWR02]* P. Hamm, S. Woutersen and M. Rueping, *On the thermal stability of β -peptides: A Two-dimensional Vibrational Study*, Helv. Chim. Acta. **85** (2002) 3883-3894.
- [EHS02]* J. Edler, P. Hamm and A.C. Scott, *Femtosecond study of self-trapped vibrational excitons in crystalline acetanilide*, Phys. Rev. Lett. **88** (2002) art.no. 067403
- [EH02]* J. Edler and P. Hamm, *Self-trapping of the amide I band in a peptide model crystal*, J. Chem. Phys. **117** (2002) 2415-2424
- [BHS03]⁺ J. Bredenbeck, J. Helbing, A. Sieg, T. Schrader, W. Zinth, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl and P. Hamm, *Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptid*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100** (2003) 6452
- [BHB03]⁺ J. Bredenbeck, J. Helbing, R. Behrendt, C. Renner, L. Moroder, J. Wachtveitl and P. Hamm, *Transient 2D-IR spectroscopy: snapshots of the nonequilibrium ensemble during the picosecond conformational transition of a small peptide*. J. Phys. Chem. B **107** (2003) 8654
- [BH03a]⁺ J. Bredenbeck and P. Hamm, *Peptide structure determination by two-dimensional infrared spectroscopy in the presence of homogeneous and inhomogeneous broadening*. J. Chem. Phys. **119** (2003) 1569
- [BH03b]⁺ J. Bredenbeck and P. Hamm *Versatile small volume closed-cycle flow cell system for transient spectroscopy at high repetition rates* Rev. Sci. Instrum. **74** (2003) 3188
- [EH03]⁺ J. Edler and P. Hamm *Two-dimensional vibrational spectroscopy of the amide I band of crystalline acetanilide: Fermi resonance, conformational substates, or vibrational self-trapping?* J. Chem. Phys. **119** (2003) 2709

[BHH04]⁺ J. Bredenbeck, J. Helbing and P. Hamm *Labeling vibrations by light-ultrafast transient 2D-IR spectroscopy tracks vibrational modes during a photoreaction* J. Am. Chem. Soc., (2004) available as a.s.a.p

Mitarbeiter

Dr. Sander Woutersen, PostDoc., Dez. 1999-Dez. 2001, Julian Edler Doktorand, Sept. 2000 -, Prof. Dr. Peter Hamm, Jens Bredenbeck, Doktorand, Mai 2001-, Dr. Jan Helbing, PostDoc.