

Collagen

DOI: 10.1002/ange.200601432

Lichtgesteuerte Faltung und Entfaltung einer Collagen-Tripelhelix^{**}

Ulrike Kusebauch, Sergio A. Cadamuro, Hans-Jürgen Musiol, Martin O. Lenz, Josef Wachtveitl, Luis Moroder* und Christian Renner

Collagene bestehen aus drei identischen oder unterschiedlichen Polypeptidketten, die sich in einer tripelhelicalen Superstruktur variabler Stabilität umwinden. Obwohl die Form insgesamt einem biegsamen Stab entspricht, enthalten Collagene auch Bereiche geringer Tripelhelixstabilität und sogar Unterbrechungen dieser Struktur. Die lokale Stabilität und die Erkennungsmotive für Wechselwirkungen mit anderen Proteinen der extrazellulären Matrix werden durch die Aminosäuren in X- und Y-Position der sich wiederholenden Gly-Xaa-Yaa-Triplets definiert und feinjustiert, wobei der Glycinrest an jeder dritten Position notwendig ist, um das kompakte Verdrillen der drei linkshändigen Polyprolin-II-Helices in die rechtshändige Tripelhelix zu ermöglichen.^[1] Ausführliche Studien an synthetischen Modellpeptiden haben klar das Tripeptid Gly-Pro-Hyp als günstigstes Triplet zur Stabilisierung der Tripelhelix identifiziert,^[1b,2] und Kristallstrukturen von Collagenpeptiden ermöglichten detaillierte Einblicke in die Wasserstoffbrückennetzwerke dieser sehr regulären periodischen Tertiärstruktur.^[3]

Aus Faltungsstudien an natürlichen Collagenen und ihren Fragmenten wurde ein Reißverschluss-artiger Faltungsmechanismus abgeleitet, bei dem die *cis-trans*-Isomerisierung des Prolins der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.^[1d,4] Ohne *cis*-Prolinisomere ist die Faltung sehr schnell und in der Zeitskala vergleichbar mit der Faltung anderer periodischer Strukturen wie der α -Helix.^[5] Um besseren Einblick in die Faltung und Stabilität der Collagentripelhelix zu erhalten, sollte jedoch ein Modellsystem vorhanden sein, das, mit einem ultraschnellen Konformationschalter ausgestattet, ein

Verfolgen der Faltungseignisse mit zeitaufgelöster Spektroskopie ermöglicht. Diese Aufgabe wurde hier gelöst, indem ein speziell entwickeltes Azobenzolderivat in Form einer Seitenkettenverbrückung als lichtschaltbare strukturelle Klammer in die Collageneinzelketten eingebaut wurde, um die notwendigen Änderungen im Konformationsraum für Faltung und Entfaltung der Collagentripelhelix auszulösen.

Das Konzept der ultraschnellen Modulation von Konformationszuständen und zugehörigen biophysikalischen Eigenschaften mithilfe eines Azobenzolchromophors wurde in früheren Arbeiten von uns und anderen etabliert.^[6] Die erfolgreiche Anwendung dieses Konzepts zur Lichtsteuerung von α -Helices^[7] und kürzlich auch von β -Haarnadelstrukturen^[8] als einfachste Tertiärstruktur führte uns dazu, die günstigen optischen Eigenschaften des Azobenzols mit der regulären Superstruktur der Tripelhelix zu einem Modellsystem zu kombinieren, das für die zeitaufgelöste Spektroskopie der Collagenfaltung gut geeignet ist. Die Strategie bestand darin, zwei Seitenketten in (Pro-Hyp-Gly)_n-Collagenpeptiden durch das Azobenzolchromophor zu verknüpfen (Schema 1). Als Collagenpeptid wurde das N-acetylierte und C-amidierte (Gly-Pro-Hyp)₇-Gly-Gly wegen seiner relativ hohen thermischen Tripelhelixstabilität gewählt.^[9] Geeignete Sequenzpositionen für die Anbindung der intramolekularen Azobenzolklammer wurden mit Molecular Modeling so bestimmt, dass das *trans*-Azobenzolisomer eine stabilere Tripelhelix bildet als das *cis*-Isomer. Da 100% *trans*-Azobenzolisomer durch thermische Relaxation im Dunkeln erreicht werden können, kann die Entfaltung von einem vollständig gefalteten Zustand aus gestartet werden.

Um den Effekt der Chromophorisomerisierung zu maximieren, wurde zusätzlich ein relativ starres Acetylen-Verbindungsstück zwischen Azobenzol und Peptids Seitenkette erdacht. Dementsprechend wurde das bifunktionelle Diiodderivat **1** zur Reaktion mit den beiden Thiolen verwendet (Schema 1). In Anbetracht der stabilisierenden Wirkung von Iminosäuren in X- und Y-Position der Collagentripletts wurden 4-Mercaptoprolin(Mpc)-Reste gewählt, um die Thiolfunktionen zur intramolekularen Verbrückung bereitzustellen. Während Cys-Reste in X- oder Y-Position die Tripelhelixstabilität deutlich beeinträchtigen,^[10] wurde von einem 4-Mercapto- oder 4-Thioethersubstituenten am Pyrrolidinring, wie in **2** bzw. **3** enthalten (Schema 1), unabhängig von der Konfiguration ein geringerer Effekt auf die Tripelhelix erwartet als bei (4*R*)- und (4*S*)-Hydroxyprolin. Letztere beeinflussen durch stereoelektronische Effekte sehr unterschiedlich die *cis-trans*-Isomerisierung sowie die C'-*exo*- bzw. C'-*endo*-Konformation des Pyrrolidinrings.^[2b, 9a, 11]

Entsprechend des Peptiddesigns sollte trotz der bekannten Stabilisierung der Tripelhelix durch C'-*endo* in X- und C'-*exo* in Y-Position,^[2c, 3i, 9a, 11] sowohl ein Pro-Rest in X- als auch ein Hyp-Rest in Y-Position durch (2*S,4S*)-Mpc ersetzt werden, um Peptid **2** herzustellen (Schema 1). Der Schmelzpunkt (als Merkmal für die Stabilität) der Tripelhelix von **2** in wässriger Lösung ($T_m = 34.5^\circ\text{C}$) war dementsprechend 8.5°C niedriger als beim Referenzpeptid Ac-(Pro-Hyp-Gly)₇-Gly-Gly-NH₂ ($T_m = 43^\circ\text{C}$; in Übereinstimmung mit ähnlichen Peptiden^[9a, b]).

[*] Dipl.-Ing. (FH) U. Kusebauch,^[1] Dr. S. A. Cadamuro,^[1] H.-J. Musiol, Prof. Dr. L. Moroder, Priv.-Doz. Dr. C. Renner^[++]

Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Deutschland)
Fax: (+49) 89-8578-2847
E-Mail: moroder@biochem.mpg.de

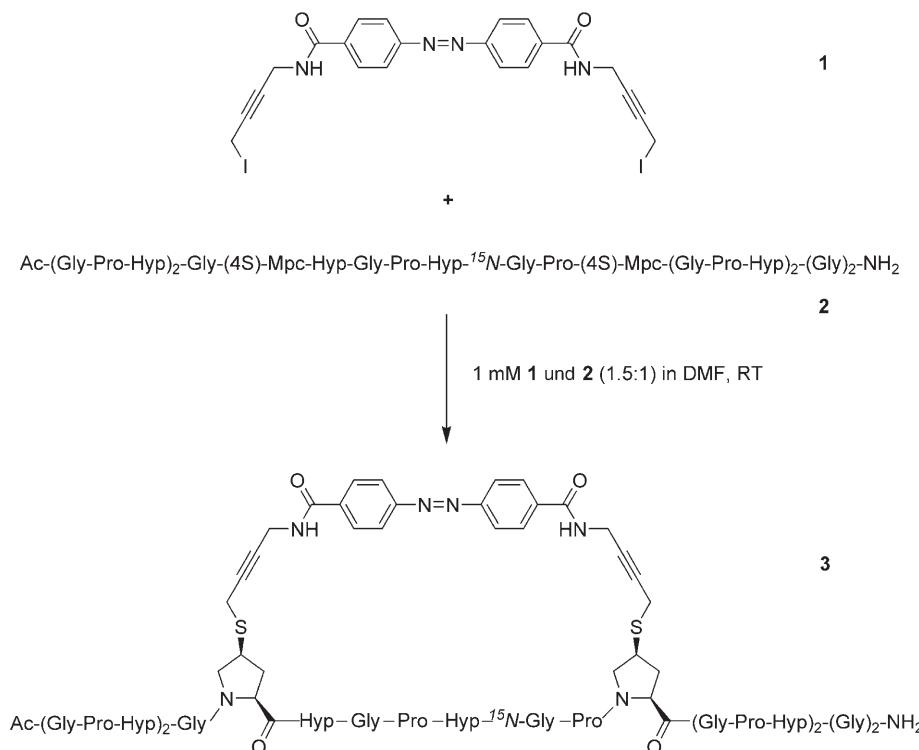
Dr. M. O. Lenz, Prof. Dr. J. Wachtveitl
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt (Deutschland)

[†] Beide Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Arbeit bei.

[+++] Aktuelle Adresse: Deutsche Forschungsgemeinschaft
Kennenallee 40, 53175 Bonn/Bad-Godesberg (Deutschland)

[**] Die Arbeit wurde in Teilen durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert (SFB 533, A8).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 1. Synthese eines Collagenpeptids mit einer intramolekularen Seitenkette-Seitenkette-Verknüpfung über eine lichtsteuerbare Azobenzolverbindung. Das Collagenpeptid ist aus präparativen Gründen C-terminal mit zwei Glycinresten verlängert, um eine Bildung von Diketopiperazin zu vermeiden.^[10a] Mpc = (2S,4S)-Mercaptopyrrolidin-2-carbonsäure (4-Mercaptoprolin).

Reaktion des Peptids **2** mit 4,4'-(Diazien-1,2-diyl)bis(*N*-(4-iodbut-2-ynyl)benzamid (**1**) ergab das Azobenzolpeptid **3** als analytisch gut charakterisierte Substanz, die aber nicht ausreichend wasserlöslich für spektroskopische Untersuchungen war. Daher wurde CD₃OH/0.1 M AcOH (4:1) als Lösungsmittel verwendet, zumal die Tripelhelix-stabilisierende Wirkung von Wasser/Alkohol-Mischungen lange bekannt ist.^[2a,12] Für CD-, NMR- und IR-Messungen wurden Lösungen von **3** mit 1 mM Konzentration verwendet, um schnelle Selbstassoziation der Monomere zu Homotrimeren zu erreichen.^[1d,13] Nach Aufbewahrung bei 4°C war das CD-Spektrum von Peptid **3** (Abbildung 1) als *trans*-Azobenzolisomer unter diesen Bedingungen konsistent mit einer tripelhelicalen Faltung und einem Rpn-Wert von 0.190,^[14] der dem Wert von Peptid **2** (Rpn = 0.190) entspricht, aber sogar höher ist als beim Referenzpeptid Ac-(Gly-Pro-Hyp)₇-Gly-Gly-NH₂ (Rpn = 0.161). Form und Intensität der CD-Banden sind jedoch nicht völlig aussagekräftig, da die monomeren Formen dieser prolinreichen Peptide bekanntlich Polyprolin-II-Konformationen annehmen, die CD-Spektren ganz ähnlich der Tripelhelix ergeben. Im Vergleich zu Polyprolin-II-Helices, die unkooperativ entfalten, erfolgen thermisch induzierte Übergänge der Tripelhelix sehr kooperativ.^[1d] Der niedrigere Siedepunkt von wässrigem MeOH verhindert durch die hohe Stabilität der Collagensuperhelix in diesem Lösungsmittel den direkten Vergleich von Schmelzpunkten des Referenzpeptids Ac-(Gly-Pro-Hyp)₇-Gly-Gly-NH₂ und des Vorläufers **2** mit dem des Azobenzolpeptids **3**. Ein Vergleich der Abnahme der dichroischen Intensität bei 225 nm im Tempera-

turbereich von 4 bis 60°C ermöglicht es jedoch, eine qualitative Rangordnung der Tripelhelixstabilität festzustellen: **3** > Referenzpeptid > **2**. Der endgültige Nachweis der tripelsträngigen Collagenstruktur von **3** wurde mit NMR-Messungen erbracht. Diffusionsexperimente weisen den trimeren Charakter der Peptide unter diesen Bedingungen nach. Die chemischen Verschiebungen der ¹⁵N-Gly-Amidprotonen von etwa $\delta = 7.7$ ppm sind typisch für die gefaltete Tripelhelixstruktur (entfaltete und Polyprolin-II-Spezies zeigen Werte größer als $\delta = 8.0$ ppm), während ihre Temperaturabhängigkeit (weniger negativ als -4.5 ppb K⁻¹) die Wasserstoffbrücken der Collagensuperhelix anzeigt.^[15] 2D-¹H,¹⁵N-Korrelationsspektren (FHSQC) ermöglichen die selektive Beobachtung der Glycinreste vor dem zweiten Mpc-Rest in **3**. Die linke Seite von Abbildung 2 zeigt, dass entsprechend der Verschiebung der Einzelketten in der Tripelhelix um einen Rest die ¹⁵N-Gly-Reste der drei Stränge nicht äquivalent sind.

Nach Belichtung bei 330 nm und 4°C wurde die Bildung von 27 % *cis*-Isomer festgestellt,^[16] aber die Änderungen im 2D-¹H,¹⁵N-FHSQC-Spektrum (fast heteronuclear single quantum correlation) zeigten keine Entfaltung der Tripelhelix. Bei einer höheren Temperatur vom 27°C führte Photoisomerisation zu 45% *cis*-Isomer und zusätzlichen Signalen

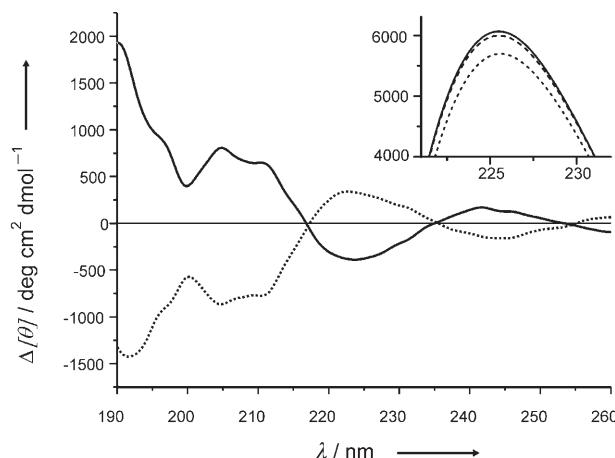


Abbildung 1. CD-Differenzspektren („nachher minus vorher“) des Peptids **3** bei 1 mM Konzentration in CD₃OH/0.1 M AcOH (4:1) nach Belichtung bei 330 nm, entsprechend *trans-cis*-Isomerisierung (—), und bei 420 nm, entsprechend *cis-trans*-Isomerisierung (····). Einsetzungsdiagramm: CD-Spektren des thermisch relaxierten, zu 100% vorliegenden *trans*-Azobenzolpeptids **3** (—), nach Belichtung bei 330 nm für maximalen *cis*-Anteil (····) und erneuter Belichtung bei 420 nm zur Rückisomerisierung in die *trans*-Form (----).

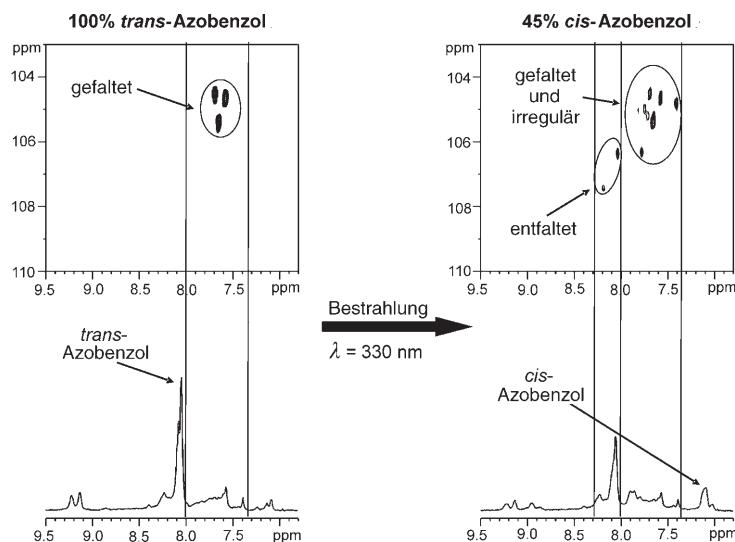


Abbildung 2. $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -FHSQC- (oben) und ^1H -NMR-Spektren (unten) des Peptids 3 (1 mm) in $\text{CD}_3\text{OH}/0.1\text{ M AcOH}$ (4:1), aufgenommen bei 27°C und 500 MHz vor (links) und nach Belichtung (rechts) bei 330 nm. Neue Signale nach Belichtung werden irregulären Tripelhelices und entfalteten Monomeren zugeordnet; die beiden Signale für das Monomer entsprechen der trans - und cis -Konformation der (^{15}N -Gly)-Pro-Peptidbindung.

im NMR-Spektrum (Abbildung 2, rechts), die entfalteten Peptid und irregulären Tripelhelixformen entsprechen. Belichtung bei 420 nm stellte die Tripelhelix nahezu quantitativ wieder her mit einem Anteil von cis -Azobenzol < 8%. Da die thermische cis - trans -Azobenzol-Isomerisierung auch bei 37°C langsam ist ($t_{1/2} = 8.9\text{ h}$ für 3, $t_{1/2} = 25.4\text{ h}$ für 1 als Dichlorde-
rivat), kann der photostationäre Zustand von 3 mit ca. 45% cis -Azobenzolgehalt nach Belichtung bei 27°C NMR-spek-
troskopisch untersucht werden.

Die lichtinduzierte Faltung und Entfaltung von 3 kann auch mit CD-Spektroskopie verfolgt werden. Die Änderung der CD-Intensität ist jedoch gering, da sich CD-Spektren von tripelhelicalen und Polyprolin-II-helicalen Collagenpeptiden kaum unterscheiden. Im IR-Spektrum von 3 führt Belichtung hingegen zu deutlichen Änderungen (Abbildung 3). Ein Vergleich mit dem lichtinduzierten Differenzspektrum von 1 (als stabiles Dichlorde-
rivat) ermöglicht es, die zur trans - cis -Isomerisierung des Azobenzolteils gehörenden Banden zu identifizieren. Außerdem lassen sich starke Peptidbanden im Bereich um 1650 cm^{-1} (Amid-I) und 1450 cm^{-1} erkennen, die der Konformationsänderung bei der Tripelhelixentfaltung entsprechen.^[20a] Die Lichtschaltung zwischen trans - und cis -Azobenzol ist völlig reversibel, wie die CD-Spektren im Einschub in Abbildung 1 belegen, und Anzeichen von Ausbleichen oder Zersetzung wurden auch nach langer Belichtung nicht beobachtet. Da bei niedrigeren Temperaturen (< 20°C) nach den NMR-Spektren auch das cis -Azobenzol-
isomer in die Tripelhelix gefaltet ist, kann Lichtschaltung des gefalteten Anteils nur bei Temperaturen erfolgen, bei denen der Stabilitätsunterschied zwischen Tripelhelix und Monomeren relativ gering ist, wobei trans -Azobenzolmoleküle mehr zur Tripelhelix und cis -Isomere mehr zum entfalteten Zustand neigen.

Zusammen mit der ultraschnellen Isomerisierung des Chromophors^[17] sollte das Azobenzolcollagenpeptid 3 Col-

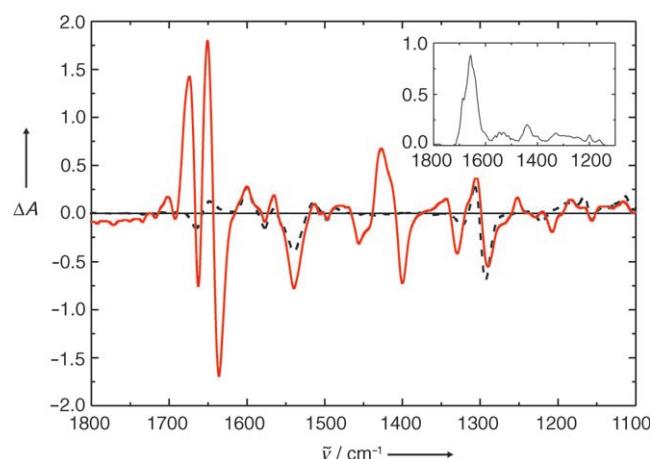


Abbildung 3. FTIR-Differenzspektren („cis minus trans“) des Peptids 3 (rot) im Vergleich zum Chromophor 1 (gestrichelt), beide in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ nach Belichtung. Dem Peptidteil können zusätzliche Banden im Bereich 1650 (Amid-I) und 1450 cm^{-1} zugeordnet werden. Einschub: IR-Spektrum des Peptids 3 in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$.

lagenfaltungsexperimente mit noch nicht da gewesener Zeitauflösung bis zum Pikosekundenbereich durch ultraschnelle CD-^[18] und besonders IR-Spektroskopie ermöglichen.^[19] Die IR-Spektren von Collagenpeptiden sind durch gut ausgeprägte Amidbanden charakterisiert^[20] und könnten, zeitaufgelöst aufgenommen, wertvolle Information z. B. über die Geschwindigkeiten liefern, mit denen das periodische Wasserstoffbrückennetzwerk gebildet wird. Insbesondere wird der direkte Vergleich mit Molekulardynamiksimulatio-
nen möglich, die momentan auf den Nanosekundenbereich beschränkt sind. Erst kürzlich wurde in der Tat beobachtet, dass die schnellsten Faltungs-Entfaltungs-Vorgänge der Tripelhelixstruktur schneller als die Mikrosekundenauflösung von Stopped-Flow-Experimenten sind.^[5]

Insgesamt ist es uns somit gelungen, ein Collagenmo-
dellpeptid zu konstruieren, in dem die Stabilität der Tripel-
helixstruktur vom isomeren Zustand eines Azobenzolchro-
mophors abhängt. Bei Raumtemperatur kann die Faltung oder Entfaltung durch Photoisomerisierung des „Lichtschal-
ters“ moduliert werden. Dieses Modellpeptid sollte ultra-
schnelle Faltungs-Entfaltungs-Experimente ermöglichen und somit eine Verbindung zwischen experimentellen und theo-
retischen Studien der Tripelhelixcollagenstruktur schaffen.

Eingegangen am 11. April 2006,
veränderte Fassung am 9. August 2006
Online veröffentlicht am 28. September 2006

Stichwörter: Collagen · Faltung/Entfaltung · Lichtschalter · Peptide · Tripelhelix

[1] a) R. D. B. Fraser, T. P. MacRay, E. Suzuki, *J. Mol. Biol.* **1979**, *129*, 463–481; b) P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **1982**, *35*, 1–104; c) K. Beck, B. Brodsky, *J. Struct. Biol.* **1998**, *122*, 17–29; d) H. P. Bächinger, J. Engel in *Protein Folding Handbook, Part I* (Hrsg.: J. Buchner, T. Kiefhaber), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 1059–1109.
 [2] a) J. Engel, H. T. Chen, D. J. Prockop, H. Klump, *Biopolymers* **1977**, *16*, 601–622; b) E. S. Eberhardt, N. Panasik, R. T. Raines,

J. Am. Chem. Soc. **1996**, *118*, 12261–12266; c) L. Vitagliano, R. Berisio, L. Mazzarella, A. Zagari, *Biopolymers* **2001**, *59*, 459–464.

[3] a) K. Okuyama, N. Tanaka, T. Ashida, M. Kakudo, S. Sakakibara, Y. Kishida, *J. Mol. Biol.* **1972**, *72*, 571–576; b) J. Bella, M. Eaton, B. Brodsky, H. M. Berman, *Science* **1994**, *266*, 75–81; c) R. Z. Kramer, L. Vitagliano, J. Bella, R. Berisio, L. Mazzarella, B. Brodsky, A. Zagari, H. M. Berman, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 623–638; d) K. Okuyama, V. Nagarajan, S. Kamitori, *Proc. Indian Acad. Sci. Chem. Sci.* **1999**, *111*, 19–34; e) C. Hongo, V. Nagarajan, K. Noguchi, S. Kamitori, K. Okuyama, Y. Tanaka, N. Nishino, *Polym. J.* **2001**, *33*, 812–818; f) R. Berisio, L. Vitagliano, L. Mazzarella, A. Zagari, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 262–270; g) J. Stetefeld, S. Frank, M. Jenny, T. Schulthess, R. A. Kammerer, S. Boudko, K. Landwehr, K. Okuyama, J. Engel, *Structure* **2003**, *11*, 339–346; h) J. Bella, B. Brodsky, H. M. Berman, *Structure* **1995**, *3*, 893–906; i) L. Vitagliano, R. Berisio, A. Mastrangelo, L. Mazzarella, A. Zagari, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2627–2632.

[4] a) H. P. Bächinger, P. Bruckner, R. Timpl, D. J. Prockop, J. Engel, *Eur. J. Biochem.* **1980**, *106*, 619–632; b) P. Bruckner, E. F. Eikenberry, D. J. Prockop, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *118*, 607–613; c) J. Engel, D. J. Prockop, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 137–152.

[5] A. Bachmann, T. Kiehhaber, S. Boudko, J. Engel, H. P. Bächinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13897–13902.

[6] a) C. Renner, U. Kusebauch, M. Löweneck, A. G. Milbradt, L. Moroder, *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 4–14; b) G. A. Woolley, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 486–493; c) C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 868–878.

[7] J. R. Kumita, O. S. Smart, G. A. Woolley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3803–3808.

[8] a) V. Kräutler, A. Aemisegger, P. H. Hünenberger, D. Hilvert, T. Hanson, W. F. van Gunsteren, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4935–4942; b) S.-L. Dong, M. Löweneck, T. Schrader, W. J. Schreier, W. Zinth, L. Moroder, C. Renner, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1114–1120.

[9] a) L. E. Bretscher, C. L. Jenkins, K. M. Taylor, M. L. DeRider, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 777–778; b) D. Barth, O. Kyrieleis, S. Franke, C. Renner, L. Moroder, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3703–3714.

[10] a) A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, A. Kirkpatrick, B. Brodsky, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14960–14967; b) A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, B. Brodsky, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 19343–19349.

[11] a) N. Panasik, E. S. Eberhardt, A. S. Edison, D. R. Powell, R. T. Raines, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 262–269; b) M. L. DeRider, S. J. Wilkens, M. J. Waddell, L. E. Bretscher, F. Weinhold, R. T. Raines, J. L. Markley, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2497–2505; c) C. L. Jenkins, L. E. Bretscher, R. T. Raines, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8658–8658.

[12] Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10351–10358.

[13] S. P. Boudko, J. Engel, *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 1289–1297.

[14] Rpn ist das Verhältnis von maximal positiver zu maximal negativer Intensität und wird als Index für die Tripelhelixfaltung und -stabilität genutzt (siehe auch Lit. [12]).

[15] Die chemischen Verschiebungen der gefalteten Glycinreste betragen $\delta = 7.691$, 7.653 und 7.574 ppm bei 27°C , und die entsprechenden Temperaturabhängigkeiten sind -2.5 , -3.8 bzw. -4.1 ppb K^{-1} . Die Translationsdiffusionskonstanten (in $10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$) bei 4°C zeigen für Peptid **2** (1.09) und Peptid **3** (0.90 vor und 0.82 nach Belichtung) die trimere Spezies an. Bei 27°C entsprechen die Werte für Peptid **2** (1.34) und Peptid **3** vor Belichtung (1.15) wieder Trimeren, während nach Belichtung von **3** zusätzlich zu den Trimeren (0.61 und 1.07) eine zweite Spezies gebildet wird, deren Diffusionskonstante von 1.55 das Vorhandensein der entfalteten monomeren Form stützt.

[16] Die relativen Anteile an *trans*- und *cis*-Isomer wurden im $1\text{D}^1\text{H}$ -NMR-Spektrum durch Integration der Amidsignale des Chromophors bei $\delta = 9.34$ und 9.08 ppm (4°C), 9.21 und 8.94 ppm (22°C) sowie 9.18 und 8.86 ppm (27°C) bestimmt.

[17] a) R. Nägele, R. Hoche, W. Zinth, J. Wachtveitl, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *272*, 489–495; b) I. K. Lednev, T.-Q. Ye, P. Matousek, M. Towrie, P. Foggi, F. V. R. Neuwahl, S. Umapathy, R. E. Hester, J. N. Moore, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *290*, 68–74.

[18] T. Dartigalongue, F. Hache, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *415*, 313–316.

[19] a) J. Helbing, H. Breyg, J. Bredenbeck, R. Pfister, P. Hamm, R. Huber, J. Wachtveitl, L. De Vico, M. Olivucci, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8823–8834; b) J. Bredenbeck, J. Helbing, A. Sieg, T. Schrader, W. Zinth, J. Wachtveitl, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6452–6457.

[20] a) Y. A. Lazarev, B. A. Grishkovsky, T. B. Khromova, *Biopolymers* **1985**, *24*, 1449–1478; b) K. J. Payne, A. Veis, *Biopolymers* **1988**, *27*, 1749–1760; c) Y. A. Lazarev, A. V. Lazareva, V. M. Komarov, *J. Biol. Phys.* **1999**, *24*, 217–221.