
PHYSIKALISCHE BIOCHEMIE II

1. Einführung:

PBC I

ausgewählte Grundlagen der Physik und Mathematik

2. Methoden zur Charakterisierung von biologischen Makromolekülen (MM):

PBC I

inbes. Spektroskopie, Hydrodynamik, Chromatografie, Elektrophorese, Streumethoden, Kristallografie, EM, MS

3. Verhalten von biologischen MM:

PBC II

Thermodynamik; intermolekulare Wechselwirkungen (WW), wässrige Lösungen, Einwirkung verschiedener Agenzien, Konformationsänderungen und -umwandlungen; Eigenschaften, Struktur und Stabilität von MM und Bestandteilen (Proteine, NS, Polysaccharide, Lipide und Membranen)

PHYSIKALISCHE BIOCHEMIE II:

A. Physikalische und chemische Grundlagen:

- Thermodynamik und Kalorimetrie
- Ligandenbindung
- Proteinfaltung und Proteinstabilität; thermodynamische Analyse der Proteindenaturierung
- Intermolekulare Wechselwirkungskräfte; kovalente und nichtkovalente Bindungskräfte
- Wässrige Lösungen; Wasser, Additiva (Salze, Detergenzien, Denaturierungsmittel); Volumen, Oberfläche und Hydratation von Proteinen

B. Biologische Makromoleküle:

- Polypeptide: Eigenschaften der Aminosäuren, Polypeptidkonformation
- Proteine: Protein-Struktur, physikal. Eigenschaften gefalteter Proteine, Proteindenaturierung, Ligandenbindung an Proteine
- Nukleinsäuren: DNA-Struktur und -Topologie, RNA-Struktur
- Nukleinsäure-Protein-WW
- Kohlenhydrate, Polysaccharide
- Lipide und Membranen

LITERATUR: Physikalische Biochemie und Biophysik

deutsch:

- Autorenkollektiv: Strukturuntersuchungen an Biopolymeren
- Daune: Molekulare Biophysik
- Gey: Instrumentelle Bioanalytik
- Holtzhauer: Biochemische Labormethoden
- **Holtzhauer: Methoden in der Proteinanalytik** ←
- **Hoppe et al.: Biophysik (2nd ed.)** ←
- **Lottspeich & Zorbas: Bioanalytik** ←
- **Pingoud & Urbanke: Arbeitsmethoden der Biochemie** ←
- **Winter & Noll: Methoden der Biophysikalischen Chemie** ←

englisch:

- Bull: An Introduction to Physical Biochemistry
- **Cantor & Schimmel: Biophysical Chemistry, Vol. I-III** ←
- **Creighton: The Physical and Chemical Basis of Molecular Biology, Helvetian Press (2010)** ←
- **Creighton: The Biophysical Chemistry of Nucleic Acids & Proteins, Helvetian Press (2010)** ←
- Freifelder: Physical Biochemistry
- Marshall: Biophysical Chemistry
- Scientific American: Biophysical Chemistry
- **Serdyuk et al.: Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function (2007)** ←
- Sheehan: Physical Biochemistry
- Van Holde: Physical Biochemistry (1971)
- **Van Holde et al.: Principles of Physical Biochemistry (1998)** ←
- Wold: Macromolecules: Structure and Function

- **Tanford: Physical Chemistry of Macromolecules** ←

THERMODYNAMIK

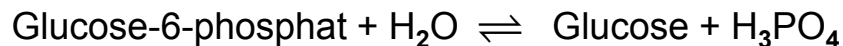
Thermodynamische Untersuchungen helfen bei Aufklärung biochemischer und biologischer Systeme (Analyse von Triebkräften): einfache und komplexe biochemische Reaktionen, Bindungsphänomene, Prozesse der Strukturbildung, Membrantransport, lebende Systeme

Analyse von Biopolymeren: **Struktur – Funktion – Energetik**

Vorgangsweise: Grundgleichungen zur Bestimmung thermodynamischer Größen
Kalorimeter in Biochemie und Biophysik
Ligandenbindung, Bindungsstudien
Proteinfaltung und Proteinstabilität
Weitere analytische Anwendungen thermodynamischer Methoden

GRUNDGLEICHUNGEN

Wenn eine **biochemische Reaktion** betrachtet wird, so **beschreibt die Reaktionsgleichung den stofflichen Umsatz**. *Beispiel: Hydrolyse von Glucose-6-Phosphat:*



Beschreibung des Umsatzes von Glucose-6-Phosphat zu Glucose bei gleichzeitiger Bildung von anorganischem Phosphat. Die Reaktionsgleichung in dieser Form macht keine Aussage über die Gleichgewichtslage und über freiwerdende Energie.

Im vorliegenden Fall beträgt die Standard-Reaktionsenthalpie $\Delta H^\circ = -12.6 \text{ kJ/mol}$, d.h. es liegt eine exotherme Reaktion vor. Die Gleichgewichtskonstante $K = 261$ besagt, dass das Reaktionsgleichgewicht mehr auf der Seite der Hydrolyseprodukte liegt. Unter Standardbedingungen entspricht dies wegen $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ einer freien Reaktionsenthalpie von $\Delta G^\circ = -13.8 \text{ kJ/mol}$.

Wenn man mit Hilfe der **Gibbs-Helmholtz-Gleichung**

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

die Reaktionsentropie berechnet, so ergibt sich diese zu $\Delta S^\circ = 4 \text{ J/K/mol}$. *Bei der betrachteten Reaktion* ist der Entropieanteil, verglichen mit dem Enthalpieanteil, relativ gering. Die Hydrolyse des Glucose-6-Phosphats ist somit eine im Wesentlichen enthalpiegetriebene Reaktion.

Analyse von Triebkräften biochemischer Reaktionen: Entropie-Term kann bei biochemischen Prozessen sehr unterschiedlich ausfallen!

Standardbedingungen: Thermodynamische Parameter sind im Allgemeinen von Temp., Druck und weiteren Zustandsvariablen abhängig. Dementsprechend bezieht man sich häufig auf Standardbedingungen (Index: °): Standardtemp. $T^\circ = 298.16 \text{ K}$, zuweilen auch 310.16 K (entsprechend 25 bzw. 37°C); Standarddruck $p^\circ = 1 \text{ atm} = 1.013 \text{ bar} = 1.013 \times 10^5 \text{ Pa}$. Für gelöste Stoffe, auch für verdünnte Lösungen, bezieht man sich allgemein auf 1 M (exakt bei der Aktivität $a = 1$). Bei pH-empfindlichen Reaktionen legt man als Standard pH° = 7.0 fest, ggf. bei einer Ionenstärke $I^\circ = 0.1 \text{ mol/l}$.

Standardgrößen, die sich auf 1 molare Konzentrationen beziehen, sind **in biochem. Systemen** oft unrealistisch! Um die freie Reaktionsenthalpie ΔG bei anderen Konzentrationen (exakter bei anderen Aktivitäten a) zu bestimmen, kann von folgender Gleichung Gebrauch gemacht werden:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \sum \nu_i \ln \{a_i\}$$

In der Thermodynamik wird die Temperatur in allen Gleichungen grundsätzlich als absolute Temp. T , d.h. in K, angegeben - im Text zuweilen auch als Temp. θ in $^\circ\text{C}$.

Gaskonstante $R = 8.3143 \text{ J/K/mol}$

Einige Symbole und Einheiten:

T	Temperatur	K
T°	Standard-Temp., T = 298.16 K	
T _{trs}	Übergangstemperatur	
T _m	Schmelztemperatur	
pH	pH-Wert	
pH°	Standard-pH-Wert, pH = 7.0	
I	Ionenstärke	mol/l
I°	Standard-Wert der Ionenstärke, I=0.1	
G	Gibbs-Energie, Gibbs'sche freie Energie, Gibbs-Potential, Freie Enthalpie	kJ/mol
$\Delta G, \Delta_{\text{unf}} G$	Änderung der Gibbs-Energie bei der (Protein-)Auffaltung (unfolding)	
$\Delta(\Delta G)$	Änderung der Gibbs-Energie bei der (Protein-)Auffaltung, Differenzwert (bezogen auf einen Referenzwert, z.B. wt Protein)	
$\Delta_{\text{unf}} G_{\text{res}}$	Änderung der Gibbs-Energie bei der Protein-Auffaltung, bezogen auf 1 Aminosäurerest	
$\Delta_{\text{unf}} G^\circ$	Änderung der Gibbs-Energie bei der (Protein-)Auffaltung unter Standardbedingungen und in Abwesenheit von Denaturierungsmitteln	
$\Delta_{\text{trs}} G$	Änderung der Gibbs-Energie bei einem beliebigen Strukturübergang (transition), anders als (Protein-)Auffaltung	
H	Enthalpie	kJ/mol
$\Delta H, \Delta_{\text{unf}} H$	Enthalpie-Änderung bei der Protein-Auffaltung	
$\Delta_{\text{unf}} H_{\text{res}}$	Enthalpie-Änderung bei der Protein-Auffaltung, bezogen auf 1 Aminosäurerest	

$\Delta_{\text{unf}}H^{\text{cal}}$	Enthalpie-Änderung bei der (Protein-)Auffaltung, bestimmt mittels Kalorimetrie	
$\Delta_{\text{unf}}H^{\text{v.H.}}$	Enthalpie-Änderung bei der (Protein-)Auffaltung, bestimmt mittels van't Hoff Gleichung	
$\Delta_{\text{unf}}H^{\circ}$	Enthalpie-Änderung bei der (Protein-)Auffaltung unter Standardbedingungen	
S	Entropie	kJ/mol/K
$\Delta S, \Delta_{\text{unf}}S$	Entropie-Änderung bei der (Protein-)Auffaltung	
$\Delta_{\text{unf}}S^{\circ}$	Entropie-Änderung bei der (Protein-)Auffaltung unter Standardbedingungen	
C_p	Wärmekapazität (heat capacity) bei konstantem Druck	kJ/mol/K
$\Delta C_p, \Delta_{\text{unf}}C_p$	Änderung der Wärmekapazität bei der (Protein-)Auffaltung	
$\Delta g, \Delta_{\text{unf}}g$	spezifischer Wert für die Änderung der Gibbs-Energie bei der (Protein-)Auffaltung	J/g
$\Delta h, \Delta_{\text{unf}}h$	spezifischer Wert für die Enthalpie-Änderung bei der Protein-Auffaltung	J/g
$\Delta s, \Delta_{\text{unf}}s$	spezifischer Wert für die Entropie-Änderung bei der (Protein-)Auffaltung	J/g/K
$\Delta c_p, \Delta_{\text{unf}}c_p$	spezifischer Wert für die Änderung der Wärmekapazität bei der (Protein-)Auffaltung	J/g/K
$\Delta_{\text{unf}}v$	Differenz der Protonenzahl zwischen aufgefaltetem und nativem Proteinzustand	

K, K_{unf}	Gleichgewichtskonstante für die (Protein-)Auffaltung	
K_{unf}°	Gleichgewichtskonstante für die (Protein-)Auffaltung bei der Denaturierungsmittel-Konzentration null	
K_b	Bindungskonstante	
k_i	Geschwindigkeitskonstante	
a	Aktivität	
a_x	mittlere Ionenaktivität	
c	Konzentration	$M = \text{mol/l}$
$c_{1/2}$	Denaturierungsmittelkonzentration beim Übergangspunkt	
m	Abhängigkeit des ΔG von der Denaturierungsmittelkonzentration (bei linearer Extrapolationsmethode)	$\text{kJ/mol/M} = \text{kJ/mol(Protein)/M(Denaturierungsmittel)}$
n	Molzahl	
α	Umwandlungsgrad bei einer Gleichgewichtsreaktion	
N	Nativer Zustand (eines Proteins)	
D	Denaturierter Zustand (eines Proteins)	
U	Aufgefalteter Zustand (eines Proteins)	
I oder X	Zwischenzustand (bei der Proteinauffaltung) (intermediate state)	
A	Saure Form (acid form)	

Allgemeine Formulierungen:

Für die Reaktionsgleichung $\alpha A + \beta B \rightleftharpoons \gamma C + \delta D$

ergibt sich die Gleichgewichtskonstante K wie folgt: $K = \frac{[C]^\gamma \cdot [D]^\delta}{[A]^\alpha \cdot [B]^\beta}$

Aus K errechnet sich die freie Reaktionsenthalpie ΔG : $\Delta G = -RT \ln K$

Die **Gleichgewichtskonstante K** ist eine wichtige Schlüsselgröße; daher exp. Bestimmung in der biochemischen Praxis erforderlich, z.B. durch spektralfotometrische Titrationstechniken (siehe Ligandenbindung).

Eine Reaktionsgleichung ist erst dann vollständig, wenn sie außer dem stofflichen Umsatz auch die Reaktionswärme enthält: $\alpha A + \beta B \rightleftharpoons \gamma C + \delta D + \Delta H$

Die **Reaktionsenthalpie ΔH** ist eine weitere Schlüsselgröße. Sie kann auf 2 Wegen exp. bestimmt werden:

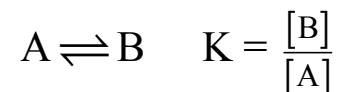
(i) Messung von Reaktionswärmern mit kalorimetrischen Techniken.

(ii) Bestimmung von ΔH mit Hilfe der **van't Hoff Gleichung** aus der Temp. Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

Um mit dieser Gleichung zu arbeiten, wird K bei versch. Temp. experimentell bestimmt.

Beispiel: Temp.-induzierter Konformationsübergang eines Proteins (reversible Gleichgewichtsreaktion)



Dabei wird in einem Temp.-abhängigen Prozess die Konformation A in eine Konformation B überführt.

Weil sich bei diesem Prozess die Gesamtkonz. des Proteins nicht ändert (wohl aber die Verteilung der beiden Konformeren), kann mit dem Umwandlungsgrad α gearbeitet werden:

$$K = \frac{[\alpha]}{[1-\alpha]}$$

Wenn sich die beiden Konformeren in ihren biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden (z.B. in der Extinktion), so können diese Eigenschaften zur Bestimmung von α benutzt werden.

Mit Hilfe von α und obiger Gl. kann die Gleichgewichtskonstante K bestimmt werden.

Aus einer Auftragung $\ln K = \ln [\alpha/(1-\alpha)]$ über $1/T$ ergibt sich als Anstieg $\Delta H/R$. Dieser Weg zur Bestimmung der Reaktionsenthalpie ist ein indirektes Bestimmungsverfahren – im Gegensatz zur direkten Messung von Wärmemengen mit kalorimetrischen Verfahren.

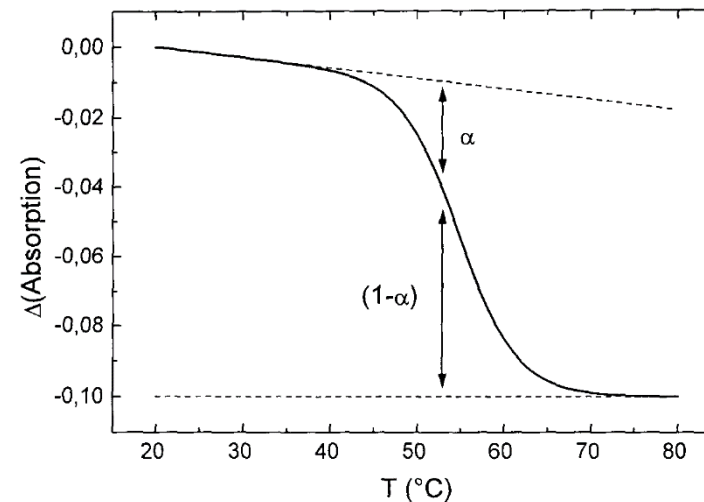


Abb. 8.1. Umwandlungskurve einer temperaturinduzierten Reaktion, gemessen durch Differenzspektroskopie. Dargestellt ist die Bestimmung des Umwandlungsgrades α

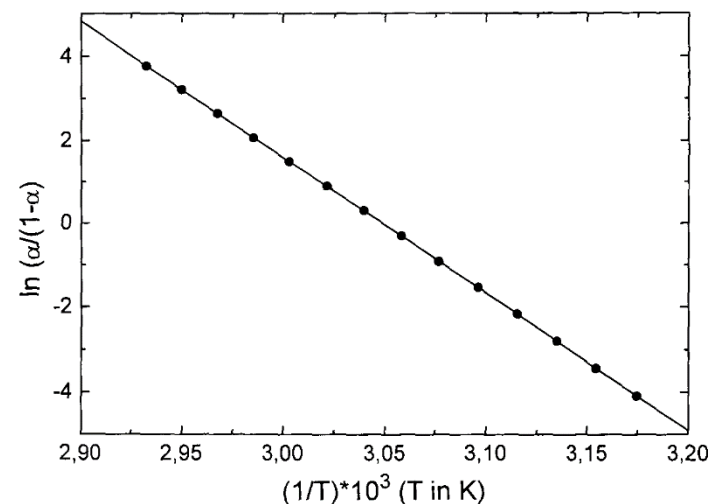


Abb. 8.2. Der VAN'T HOFF-Plot. Für die Darstellung von $\ln K$ über $1/T$ wurden aus Abb. 8.1 α -Werte zwischen 48 und 68°C im Abstand von jeweils 2° abgegriffen. Es ergibt sich eine Umwandlungstemperatur $T_{\text{trs}} = 55^\circ\text{C}$ und Reaktionsenthalpie $\Delta H = 270 \text{ kJ/Mol}$

Diese Unterscheidung ist wichtig, weil bei der indirekten Bestimmung von ΔH vorausgesetzt wird, dass außer den Konformeren A und B keine weiteren Reaktionspartner auftreten. Ein solcher Nachweis ist schwierig, es sei denn man kann auf die Scanning-Kalorimetrie zurück greifen (siehe später). Um diesen Besonderheiten Rechnung zu tragen, wird in der Nomenklatur unterschieden:

ΔH^{cal} : kalorimetrisch bestimmte Werte

$\Delta H^{\text{v.H.}}$: nach der van't Hoff-Gl., also indirekt bestimmte Werte

Gemäß dem **Kirchhoff'schen Satz** kann die Reaktionsenthalpie temperaturabhängig sein:

$$\frac{d(\Delta H)}{dT} = \Delta C_p$$

Die Wärmekapazitätsänderung, ΔC_p , ist die Differenz der Molwärmern der Reaktionspartner A und B, d.h.

$$\Delta C_p = [C_p]_B - [C_p]_A$$

Die Größe ΔC_p hat u.a. für die Beurteilung hydrophober WW bei biochemischen Reaktionen Bedeutung.

KALORIMETRIE

Es gibt unterschiedliche Konstruktionsprinzipien für Kalorimeter:

Mischungskalorimeter, Titrationskalorimeter und Scanning-Kalorimeter

Mischungs- und Titrationskalorimeter

dienen zur Untersuchung von Reaktionen, bei denen 2 oder mehr Komponenten miteinander umgesetzt werden: z.B. Bindungsreaktionen vom Typ Antigen-Antikörper oder Enzym-Inhibitor; Überführung von Biopolymeren von einem Medium in ein anderes (LM 1 in LM 2) mit voneinander abweichender Zusammensetzung (pH, Salz, Detergens etc.)

Mischungskalorimeter: die kalorimetrische Messanordnung befindet sich in einem exakt temperierten Raum, der eine Abschirmung von Schwankungen der Umgebungs-Temp. sicher stellt. Die Messanordnung besteht aus einem nochmals thermisch isolierten Metallblock, der eine Mess- und Referenz-Zelle enthält. Die Zellen sind jeweils mit Thermoelementen versehen, so dass die Reaktionswärme in einer der Kammern erfasst werden kann. Die entstehende Temp.Differenz ΔT zwischen Messkammer und Metallblock bringt einen Wärmefluss (dQ/dt) und als Mess-Signal eine elektrische Spannung (U) an den Thermoelementen hervor.

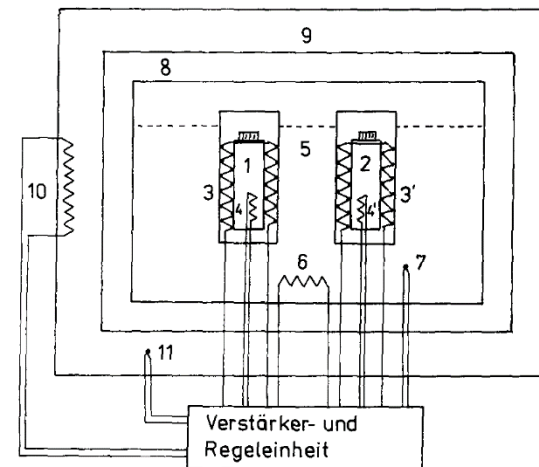


Abb. 8.3. Schematische Darstellung eines Mischungskalorimeters. 1, 2 – Meß- und Referenzzelle, 3, 3' – Thermoelemente, 4, 4' – Kalibrationsheizer, 5 – Metallblock, 6, 7 – Heizelement und Temperaturfühler für den Metallblock, 8 – thermische Isolierung, 9 – Thermostat, 10, 11 – Heizung und Temperaturfühler des Thermostaten

Das **Zusammenführen der Reaktionspartner** kann in Mischzellen (Batch-Kalorimeter) oder in einem Durchfluss-System (Flow-Kalorimeter) erfolgen. Mischungskalorimeter werden häufig als sog. Differential-Kalorimeter gebaut (und sind mit einer Proben- und Referenzzelle ausgestattet).

Batch Kalorimeter

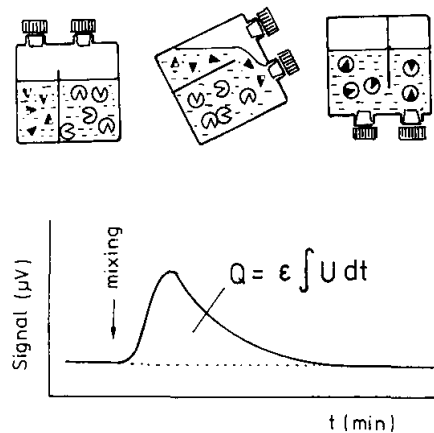


Abb. 8.4. Zusammenführung der Komponenten in einem Mischungskalorimeter (batch calorimeter) durch Drehen des kalorimetrischen Blockes und die entsprechende Signal/Zeit-Kurve

Flow Kalorimeter

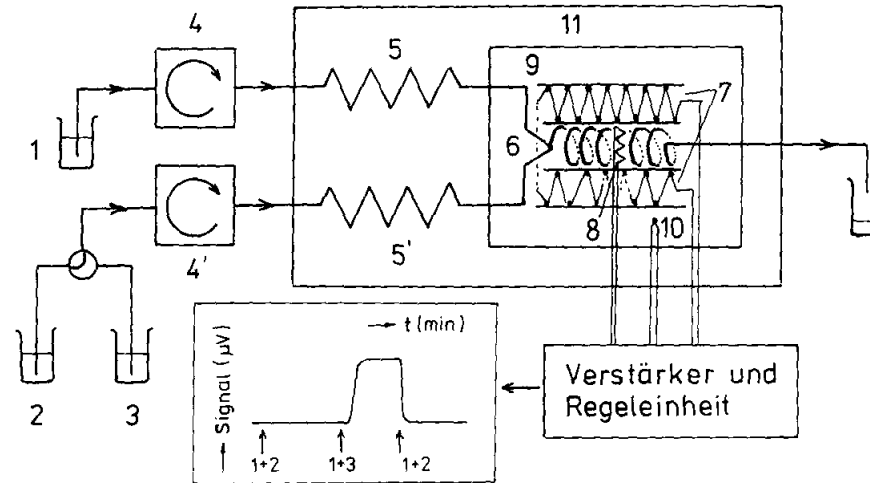
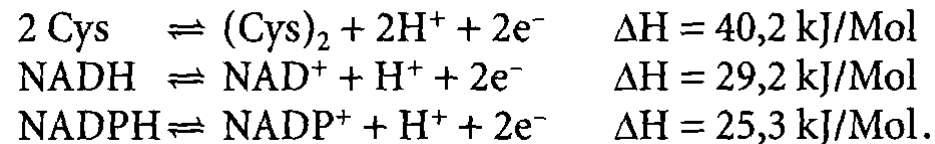


Abb. 8.5. Zusammenführung der Komponenten in einem Durchflußkalorimeter mit einer entsprechenden Signal/Zeit-Kurve. 1 - Lösung des Liganden, 2 - Pufferlösung, 3 - Proteinlösung, 4, 4' - peristaltische Pumpen, 5, 5' - Wärmeaustauscher, 6 - Mischkammer mit Wärmeaustauscher, 7 - Thermoelemente, 8 - Kalibrationsheizer, 9 - Metallblock, 10 - Temperaturfühler, 11 - Thermostat

Batch Kalorimeter: Mess- und Referenz-Zellen werden mit Spritzen gefüllt; die Füllmengen werden durch Differenzwägung bestimmt (Dichte muss bekannt sein!). Wenn nach ausreichender thermischer Äquilibriumierung der Proben im Kalorimeter eine konstante Basislinie vorliegt, kann der Mischungsvorgang gestartet werden (Drehen der Messzelle). Die Reaktionswärme ergibt sich bei bekannter Probenmenge durch Integration des Mess-Signals über der Gerätegrundlinie (ϵ = Kalibrierungskonstante).

Flow Kalorimeter: die Lösungen werden mittels peristaltischer Pumpen kontinuierlich in die Kalorimeteranordnung gebracht; sie durchlaufen einen Wärmeaustauscher zur Angleichung an die Messtemperatur. Nach Registrierung der Gerätegrundlinie wird die Reaktionswärme bestimmt, indem für einen bestimmten Zeitraum der Zufluss der Pufferlösung gegen den der Probenlösung ausgetauscht wird. Die Reaktionswärme ergibt sich direkt aus der Amplitude des Mess-Signals (bei Kenntnis der Probenkonzentration, der Durchflussgeschwindigkeit und der Gerätekonstante). Durch Variation der Pumpengeschwindigkeit ist das Erreichen des Reaktionsgleichgewichts sicher zu stellen.

Die Mischungskalorimetrie erfordert mehrere Versuche mit unterschiedlichem Mischungsverhältnis der Reaktanden, um einen vollständigen Umsatz sicher zu stellen. Zusätzliche **Korrekturgrößen** sind zu bestimmen: Verdünnungswärme, mechanische Reibungswärme, überlagerte Ionisationsgleichgewichte, z.B.



In ungepufferten Probenlösungen können durch freiwerdende Protonen unerwünschte pH-Änderungen eintreten. Bei Verwendung von Pufferlösungen sind dagegen die Ionisationsenthalpien der Puffersubstanzen zu berücksichtigen. Die daraus resultierenden Korrekturen können beträchtlich sein: z.B. beträgt die Ionisationsenthalpie des unvorteilhaften Tris-Puffers $\Delta H = 47.4 \text{ kJ/mol}$; Phosphat-Puffer mit $\Delta H = 3.3 \text{ kJ/mol}$ wäre jedoch okay.

Tabelle 8.1. pK und Ionisationsenthalpie von ausgewählten Puffersubstanzen

Puffersubstanz	pK	ΔH_i	$d(\text{pH})/dT$
Glycin(-COOH)	2,35	4,2	-0,002
Acetat	4,75	0	0
PIPES	6,9	11,3	-0,007
MOPS	7,2	20,5	-0,012
Phosphat	7,2	3,3	-0,002
HEPES	7,5	20,5	-0,012
TRIS	8,0	47,4	-0,028
HEPPS	8,0	20,9	-0,012
Glycin(-NH ₃ ⁺)	9,8	44,4	-0,026

Die Titrationskalorimetrie ist eine Version der Mischungskalorimetrie, bei der eine wiederholte Zugabe des Reaktanden (Liganden) zur Probe in bestimmten Inkrementen erfolgt. Besonderheit: die Injektionsspritze dient zugleich als Rührer; computergesteuert (automatische Registrierung der Signale, erneute Äquilibrierung, nächste Probenzugabe etc.). Vorteil: es wird eine komplette Messkurve erhalten, deren Analyse nicht nur die Reaktionsenthalpie ΔH , sondern auch die freie Enthalpie ΔG liefert. Die Bestimmung von ΔG basiert darauf, dass die Halbumwandlungskonzentration bestimmt wird, bei der definitionsgemäß $K = 1$. Die Titrationskurven ermöglichen auch die Analyse komplizierter Bindungsgleichgewichte [Vorhandensein multipler (mehrerer) Bindungsplätze].

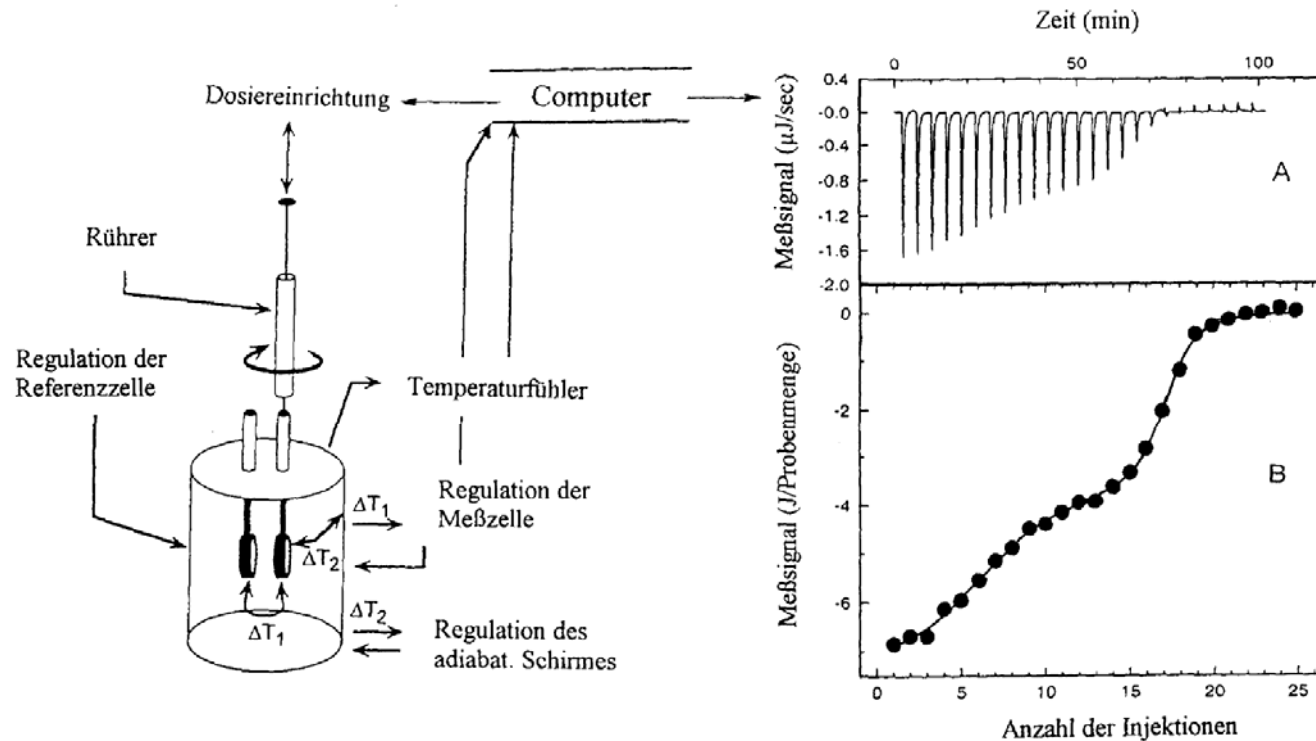


Abb. 8.6. Schematischer Aufbau eines Titrationskalorimeters. Der rechte Teil der Abb. enthält Meßergebnisse für die Bindung eines Eisenkomplexes an Ovotransferrin bei 27°C und pH 7.5. Das Protein besitzt zwei Bindungsplätze: $K_1 = 25 \cdot 10^{-6}$ und $\Delta H_1 = -32$ kJ/Mol, $K_2 = 2.3 \cdot 10^{-6}$ und $\Delta H_2 = -15$ kJ/Mol (nach Daten aus LIN et al. (1990) Biochemistry 30, 11660)

Scanning-Kalorimetrie

Die Technik der Scanning-Kalorimetrie unterscheidet sich wesentlich von der Mischungs- und Titrationskalorimetrie:

Bei der **Mischungs- und Titrationskalorimetrie** werden Wärmemengen bestimmt, die bei der Zusammenführung von Reaktanden entstehen, wobei die Temperatur nahezu konstant bleibt (daher auch als **isotherme Kalorimetrie** bezeichnet).

Bei der **Scanning-Kalorimetrie** werden dagegen vorbereitete Proben, deren stoffliche Zusammensetzung unverändert bleibt, einer programmierten Aufheizung ausgesetzt. Die Methode ist damit geeignet, thermotrope Übergänge von Biopolymeren in Lösung nachzuweisen (wie das Aufschmelzen von Protein- oder Nukleinsäurestrukturen, aber auch Phasenübergänge in Lipidsuspensionen).

Der Aufbau eines Scanning-Kalorimeters besteht aus je einer Proben- und Referenzzelle, die mit einem System von Temp.Fühlern und Heizelementen ausgestattet sind. Beide Zellen haben exakt das gleiche Volumen (0.5-1.0 ml); sie werden durch genau dimensionierte Heizwicklungen simultan aufgeheizt.

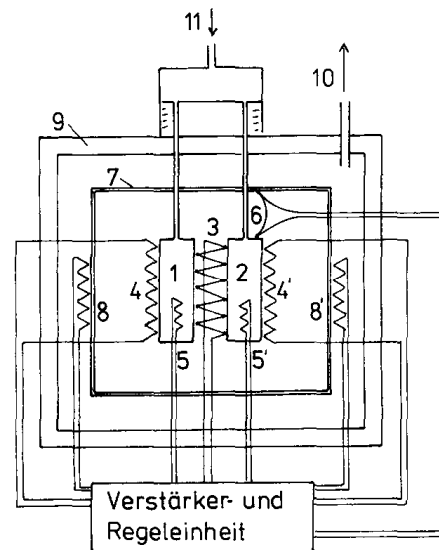


Abb. 8.7. Schematische Darstellung eines Scanning-Kalorimeters. 1, 2 – Meß- und Referenzzelle, 3 – Differentialthermoelemente zwischen beiden Zellen, 4, 4' – Heizelemente, 5 – Zusatzheizelemente, 6 – Differentialthermoelement zwischen Zelle und adiabatischem Schirm, 7 – adiabatischer Schirm, 8, 8' – Heizelemente für den adiabatischen Schirm, 9 – thermische Isolierung und Thermostat, 10 – Anschluß zur Vakuumpumpe, 11 – Anschluß für Stickstoffdruck

Wenn sich in einer der Kammern eine Temp.-induzierte Reaktion vollzieht, würde die auftretende Reaktionswärme zu einer minimalen Temp.Diff ΔT führen. Sobald die Steuerelektronik des Gerätes ein solches Temperaturungleichgewicht von Mess- und Referenzzelle erkennt, wirkt sie dahin, dass sich in der einen Zelle der Heizstrom um ΔI erhöht und in der anderen erniedrigt. Damit wird der auftretende Wärmeeffekt kompensiert und die Bedingung $\Delta T=0$ aufrecht erhalten. Es genügt also, wenn bei konstanten Versuchsbedingungen der zusätzliche Heizstrom ΔI registriert wird.

Voraussetzung bei biochemische Untersuchungen: hohe Empfindlichkeit, arbeitsfähig bei kleinen Substanzmengen und niederen Konz. (um WW der MM untereinander, z.B. Aggregationen, auszuschließen; Aggregationen würden Wärmeeffekte hervorbringen). Dies wird durch besondere Bauweise erreicht: als Differentialkalorimeter gebaut; Zellenanordnung wird mit adiabatischen Schirmen umgeben.

Praktische Durchführung: mit Pufferlösung in Mess- und Referenzzelle wird eine Gerätegrundlinie registriert, dann Messung Probe gegen Puffer. Vorhergehende Äquilibrierung der Probenlösung durch Chromatografie oder Dialyse erforderlich; Entgasung aller Lösungen (da ja konstantes Volumen vorausgesetzt wird); Verwendung von Substanzen mit geringer Ionisationsenthalpie (und damit verbundener geringer Änderung des pH-Wertes):

Entsprechend der van't Hoff-Gl. und mit $\text{pH} = -\log H^+$ ergibt sich:

$$-\frac{d(\text{pH})}{dT} = \frac{\Delta H_i}{2.303 RT^2}$$

vgl. die Daten für Tris- und Phosphatpuffer in der Tabelle auf #14!

Ergebnis Scanning-kalorimetrischer Messungen:

Die Basislinie ('B'), die mit Pufferlösung in beiden Zellen registriert wird, zeigt einen gerätetypischen Verlauf. Die Messkurve ('M') ist gegenüber der Basislinie versetzt und zeigt einen Wärmeabsorptionspeak (bei α -Lactalbumin bei 60°C).

Die Verschiebung der Messkurve gegenüber der Basislinie resultiert daraus, dass die partielle spezifische Wärme des Proteins von der spezifischen Wärme des Wassers ($C_p = 4.18 \text{ J/g/K}$ bei 20°C) abweicht.

Diese Verschiebung kann (bei Kenntnis von Probenkonz., Kalibrierungskonstante etc.) zur Bestimmung der part. spezif. Wärme des Proteins verwendet werden. Allgemein haben globuläre Proteine eine part. spezif. Wärmekapazität von $C_p \approx 1.3 \text{ J/g/K}$ bei 20°C. Dieser Wert ist selbst temperaturabhängig.

Die part. spezif. Wärme von Proteinen kann zur Beurteilung von Konformationszuständen genutzt werden, weil C_p bei teilweise oder ganz entfalteten Proteinen aufgrund der Solvation apolarer Reste deutlich höher ausfällt.

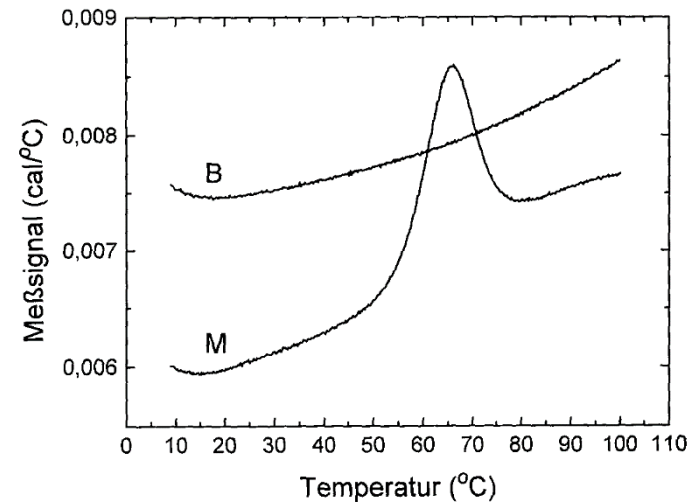


Abb. 8.8. Unbearbeitete scanning-kalorimetrische Kurven. B - Basislinie des Gerätes (10 mM HEPES-Puffer, mit 0,1 mM CaCl_2 , pH 7,0, in beiden Zellen). M - Meßkurve mit α -Lactalbumin (3,52 mg/ml) im gleichen Puffer. Heizrate 60 K/h

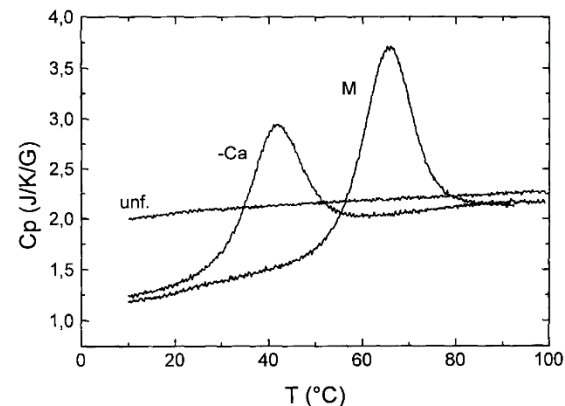


Abb. 8.9. Scanning-kalorimetrische Kurven aufbereitet als Temperaturfunktionen der partiellen spezifischen Wärme in $\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. M - α -Lactalbumin in Gegenwart von 0,1 mM CaCl_2 (Kurve M aus Abb. 8.8), -Ca - Calcium-freies α -Lactalbumin, unf. - entfaltetes α -Lactalbumin nach reduktiver Spaltung der Disulfidbrücken

Das **Hauptinteresse an kalorimetrischen Untersuchungen von Proteinen** gilt in der Regel den **Temp.induzierten Strukturübergängen**, bei denen die gefaltete Struktur des nativen Proteins in eine mehr oder weniger ungeordnete Struktur des thermisch entfalteten Proteins übergeht. Eine derartige Entfaltung der Tert.- und Sek.-Struktur ist die Ursache des endothermen Peaks in der Abb. 8.8 auf #18 oben. Die Auswertung vereinfacht sich, da man in der Regel auf die Bestimmung der spezif. Wärme verzichtet. Man subtrahiert die Basislinie von der Messkurve und setzt die Wärmekapazität des nativen Proteins gleich null: → Wärmekapazitätsüberschuss, $C_{p,ex}$. (excess heat capacity).

Aus einer Wärmekapazitätsfunktion können folgende Größen erhalten werden:

(i) die Temp. des Peakmaximums, die in etwa der Halbumwandlungstemp. T_{trs} (bei der $\Delta G = 0$) entspricht.

(ii) die molare Reaktionsenthalpie ΔH^{cal} (die wegen $\int C_{p,ex} \cdot dT$ der Fläche des kalorimetrischen Peaks oberhalb der punktierten Basislinie entspricht)

(iii) die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p , die sich als Stufe ergibt, wenn man die linearen Abschnitte der Wärmekapazitätsfunktion vor und nach dem Peak extrapoliert

(iv) die effektive Reaktionsenthalpie ΔH^{eff} , die sich aus der Peakhöhe ergibt:

$$\Delta H^{eff} = 2 \cdot T_{trs} \cdot \sqrt{\Delta C_{trs} \cdot R \cdot M} \quad (M = \text{Molmasse des Proteins, } \Delta C_{trs} = \text{Peakhöhe})$$

ΔH^{eff} kann auch aus der Halbwertsbreite ($\Delta T_{1/2}$) des Peaks abgeschätzt werden: $\Delta H^{eff} = \frac{4 \cdot R \cdot T_{trs}^2}{\Delta T_{1/2}}$

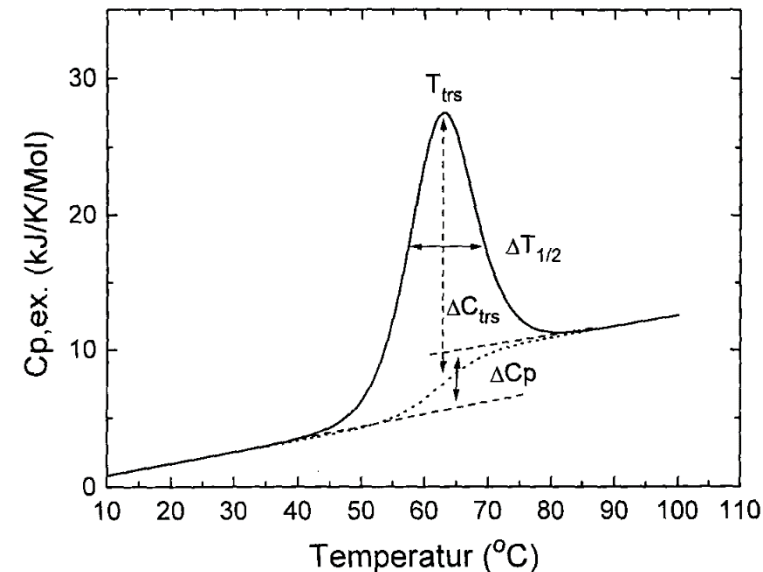
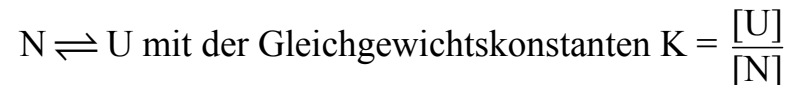


Abb. 8.10. Molare Wärmekapazitätsfunktion eines Proteins mit $T_{trs} = 62^\circ\text{C}$, $\Delta H = 270 \text{ kJ/Mol}$ und $\Delta C_p = 4,2 \text{ kJ/K/Mol}$. Erläuterung siehe Text

Damit sind alle wichtigen thermodyn. Größen aus einer einzigen Scanning-kalorimetrischen Kurve bestimmbar! Zusätzliche Information kann etwa durch Variation der Milieubedingungen (z.B. pH-Wert) erhalten werden: → Messkurven mit unterschiedl. Halbumwandlungstemp.

Aus dem resultierenden Zusammenhang der erhaltenen ΔH -Werte in Abhängigkeit von den T_{trs} -Werten kann dann ΔC_p zusätzlich mit Hilfe des Kirchhoff'schen Satzes (#11) bestimmt werden.

Es ist wichtig hervor zu heben, dass die Scanning-kalorimetrisch ermittelte Enthalpieänderung ΔH^{cal} modellfrei ist, während für die Bestimmung von ΔH^{eff} eine Annahme über den Reaktionsmechanismus gemacht werden muss. Diese ist als 2-Zustandsmodell ('two-state' Annahme) bereits in der Formulierung des Denaturierungsgleichgewichtes verborgen:



und den Proteinkonformationen N = 'nativ' und U = 'unfolded' bzw. 'denaturiert'. Für diesen Fall würde sich $\Delta H^{\text{eff}} = \Delta H^{\text{cal}}$ ergeben!

Bei der Kompliziertheit von Proteinstrukturen kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Entfaltung schrittweise erfolgt, d.h. dass 1 (oder mehrere) Intermediat(e) X vorliegen:



In diesem Fall wären 3 Zustände (N, X und U) zu berücksichtigen. Das 2-Zustandsmodell wäre hier unzutreffend. Dies hätte eine Nichtübereinstimmung von $\Delta H^{\text{v.H.}}$ und ΔH^{cal} zur Folge. Man kann deshalb ein Kooperativitätsverhältnis CR (cooperative ratio)

$$CR = \Delta H^{\text{cal}} / \Delta H^{\text{eff}}$$

als diagnostisches Hilfsmittel benutzen. CR = 1 bedeutet, dass ein Temp.-induzierter Konformationsübergang dem 2-Zustandsmodell folgt. Wenn weitere Zustände am Reaktionsgleichgewicht beteiligt sind, würde $CR > 1$ resultieren.

Beispiel: durch Simulation erzeugte Scanning-kalorimetrische Kurven für folgende 3 Fälle:

- (1) $N \rightleftharpoons U$ mit $T_{\text{trs}} = 50^\circ\text{C}$ und $\Delta H^{\text{cal}} = \Delta H^{\text{v.H.}} = 400 \text{ kJ/mol}$
 (2) $N \rightleftharpoons X \rightleftharpoons U$ mit $T_{\text{trs1}} = T_{\text{trs2}} = 50^\circ\text{C}$ und $\Delta H_1^{\text{cal}} = \Delta H_1^{\text{v.H.}} = \Delta H_2^{\text{cal}} = \Delta H_2^{\text{v.H.}} = 200 \text{ kJ/mol}$
 (3) $N \rightleftharpoons X \rightleftharpoons U$ mit $T_{\text{trs1}} = T_{\text{trs2}} = 50^\circ\text{C}$ und $\Sigma (\Delta H_1 + \Delta H_2)^{\text{cal}} = 400 \text{ kJ/mol}$

Die Kurven 1 und 2 repräsentieren entsprechend den vorgegebenen Werten jeweils 2-Zustands-Übergänge (CR=1), allerdings mit unterschiedlicher Enthalpie und deshalb auch unterschiedlicher Fläche. Infolge des geringeren ΔH -Wertes weist die Kurve 2 eine doppelt so große Halbwertsbreite auf wie Kurve 1 (s. letzte Gl. auf #19). In Kurve 3 sind 2 2-Zustandsübergänge mit insgesamt 400 kJ/mol enthalten. Dementsprechend resultiert die gleiche Peakfläche wie bei 1, aber ein breiteres und flacheres Profil mit einer doppelt so großen Halbwertsbreite. In diesem Fall ergibt sich CR zu 2.

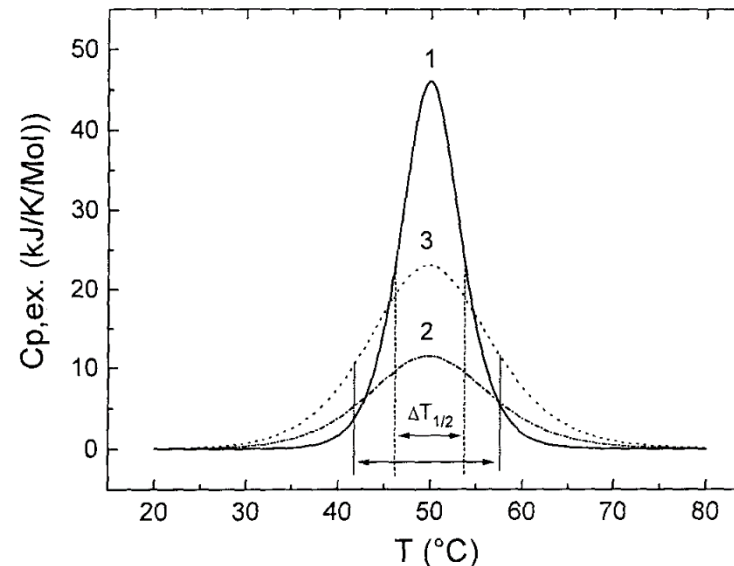


Abb. 8.11. Simulierte (excess) Wärmekapazitätsfunktionen mit den im Text angegebenen Parametern

An Hand von Scanning-kalorimetrischen Kurven kann die Gültigkeit des 2-Zustandsmodells überprüft werden. Die Scanning-Kalorimetrie liefert somit nicht nur modellfreie thermodynamische Größen, sondern darüber hinaus Information über die An-/Abwesenheit von Intermediaten bei der Proteinfaltung. Diese Zusammenhänge ermöglichen eine mathematische Analyse überlagerter Peaks (Dekonvolution): die exp. bestimmte Wärmekapazität $C_{p,\text{ex}}$ (excess heat capacity) wird rechnerisch in 2 Teilpeaks zerlegt, die ihrerseits 'two-state'-Übergänge sind.

Weil beim 'two-state'-Übergang die dargestellten Zusammenhänge zwischen Peakhöhe, Halbwertsbreite und Peakfläche bestehen, basiert die Dekonvolution (Kurvenzerlegung) auf eindeutigen Kriterien. Die Dekonvolution ist eine Art Iterationsverfahren zur nichtlinearen Kurvenanpassung. Das Verfahren liefert im Ergebnis die Anzahl der Teilpeaks und deren T_{trs} sowie ΔH . Das Verfahren ist insbes. für die Aufklärung der Domänenstruktur größerer Proteine nützlich (s. später: Proteinfaltung und Protein-stabilität).

LIGANDENBINDUNG

Die **Bindung von Liganden an MM (Proteine, NS, Lipide)** ist in der Biochemie ein wichtiger Prozess. Bindungsreaktionen sind enzymatischen Prozessen, metabolischen Rückkopplungsmechanismen, Immunreaktionen, Signaltransduktion etc. vorgelagert.

∃ riesige Zahl an Liganden: z.B. Gase, gelöste Stoffe, nieder- und hochmolekulare Verbindungen (auch biol. MM). Es gibt unspezifische und hochspezifische Bindungsreaktionen, sowie einfache und multiple Bindungsphänomene.

Für das **einfache Bindungsgleichgewicht**



Gleichgewichtskonstante (Bindungskonstante) aus

$$K = \frac{[ML]}{[M] \cdot [L]}$$

In der angelsächsischen Literatur wird dagegen vielfach die Dissoziationskonstante K_D angegeben

$$K_D = \frac{1}{K} = \frac{[M] \cdot [L]}{[ML]}$$

Man kann als Definition den Sättigungsgrad θ einführen, der den Anteil gebundener Moleküle darstellt. Dies ist die Molzahl gebundener Liganden pro Mol MM, ausgedrückt durch die Konz. des Komplexes [ML] bezogen auf die Gesamtkonz. an MM. Letztere ergibt sich aus der Konz. der noch freien MM [M] und der Konz. des Komplexes [ML]. Daraus folgt:

$$\theta = \frac{[ML]}{[M] + [ML]}$$

Durch Ersetzen von [ML] ergibt sich

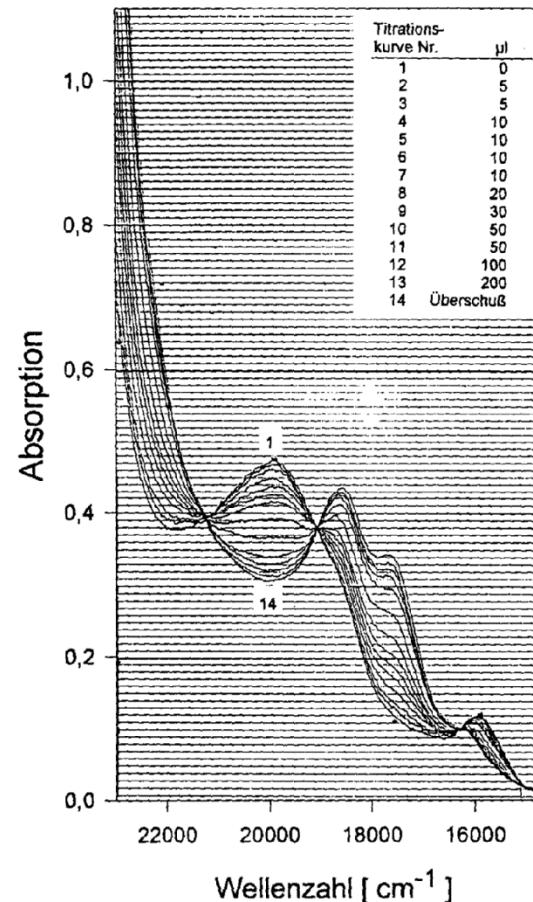
$$\theta = \frac{K[L]}{1 + K[L]}$$

bzw. nach Umformung

$$K \cdot [L] = \frac{\theta}{1 - \theta}$$

Für die exp. Bestimmung von Bindungskonstanten ist entsprechend der letztgenannten Gl. der Sättigungsgrad θ in Abhängigkeit von der Ligandenkonz. [L] zu ermitteln.

Man bezeichnet eine solche Messung, die bei konstanter Temp. durchgeführt wird, als die **Aufnahme einer Bindungsisotherme**. Die Bestimmung von θ kann vorteilhaft durch spektralfotometrische Titrations geschehen (s. Abbildung).



isosbestische
Punkte
(vgl. #26, #29)

Abb. 8.12. Spektrale Änderungen von *Chironomus th.th.*-Methämoglobin bei Azidbindung; pH 7.2, 21 °C, 1-cm-Küvette, 1,0 mM NaN₃. Siehe Text

Beispiel für eine spektralfotometrische Titration: Azidbindung an Methämoglobin. Met-Hb und Met-Hb-Azid-Komplex weisen in der sichtbaren Region unterschiedl. Absorptionsspektren auf. Zu einer Met-Hb-Lösung bekannter Konz. wird eine Azid-Lösung ebenfalls bekannter Konz. zugegeben, so dass die schrittweise Umwandlung des Ausgangsspektrums (mit $\theta = 0$) in das des Komplexes (mit $\theta = 1$) verfolgt werden kann. Für die einzelnen Titrationsschritte kann bei einer geeigneten Wellenlänge der Sättigungsgrad θ bestimmt werden. Die unvermeidliche Verdünnung der Probenlösung bei Zugabe der Ligandenlösung muss (rechnerisch) berücksichtigt werden.

Die **Auswahl der methodischen Hilfsmittel für Bindungsstudien** hängt von den Eigenschaften des zu untersuchenden Systems ab. Sehr verschiedene Messtechniken können zur Bestimmung des Sättigungsgrades in Abhängigkeit von der Ligandenkonz. genutzt werden, insbes. radiochemische Methoden und spektroskopische Verfahren bei versch. Wellenlängen (Absorption, Fluoreszenz, Kernresonanz). Häufig macht man auch von markierten Ligandenmolekülen Gebrauch (Fluoreszenzmarker, radioaktive Markierung, Spinlabel); auch kalorimetrische Verfahren können verwendet werden.

Neben der Bestimmung des Umwandlungsgrades muss die **Ligandenkonz.** (Gleichgewichtskonz., 'freie Ligandenkonz.') bekannt sein.

$$[L]_{\text{frei}} = [L]_{\text{gesamt}} - [L]_{\text{gebunden}}$$

Am genannten Beispiel wurde die Gleichgewichtseinstellung anhand einer Titration mit Lösungen bekannter Konz. verfolgt. Man ermittelt danach rechnerisch den Anteil des freien und gebundenen Liganden unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie der Bindung. Andere Verfahren beruhen auf der direkten Messung der Gleichgewichtskonz.: bei der Gleichgewichtsdialyse trennt man eine Messkammer mit einer halbdurchlässigen Membran in 2 Teile: während Protein und Komplex in einem Teil verbleiben, kann der Ligand die Dialysemembran passieren und steht zur Bestimmung der Gleichgewichtskonz. zur Verfügung.

Die **Ergebnisse von Bindungsstudien** können gemäß der (auf #23 bereits erwähnten) Gleichung

$$K \cdot [L] = \frac{\theta}{(1-\theta)} \quad \Leftarrow \text{('Gl.')}$$

als Bindungsisothermen dargestellt werden. Dafür sind verschiedene Plots gebräuchlich (#27 und 28):

Plot a: Man trägt in einer Grafik den Sättigungsgrad θ über der Ligandenkonz. $[L]$ auf. Aus obiger Gl. folgt, dass bei $[L] \rightarrow 0$ auch θ gegen 0 tendiert, während sich bei großen Ligandenkonz., $[L] \rightarrow \infty$, der Sättigungsgrad $\theta \rightarrow 1$ nähert. Bei Halbsättigung, $\theta = 1/2$, wird $K \cdot [L] = 1$. Die Ligandenkonz., die zur Halbsättigung benötigt wird, ist somit identisch mit der Gleichgewichtskonstanten für das Bindungsgleichgewicht.

Es ist üblich, Ligandenbindungsdaten in geeigneten Plots darzustellen, die aus einer Umformung obiger Gl. resultieren und zumeist eine Geradendarstellung ermöglichen. Diese Plots beruhen auf einem gemeinsamen Ansatz und die zugrunde liegenden Gleichungen können leicht ineinander überführt werden.

Plot b: Analog zu Plot a wird der Sättigungsgrad θ über dem $\log [L]$ aufgetragen, womit die Messkurve über ein weiteres Konzentrationsintervall besser beurteilt werden kann. Auch diese Darstellung ergibt $\log K$ bei $\theta = 1/2$.

Plot c: Ohne Umformung obiger Gl., durch Darstellung $[\theta/(1-\theta)]$ über $[L]$ ergibt sich eine Gerade, deren Anstieg gleich K ist.

Plot d: Die reziproke obere Gl. führt zu:

$$\left(\frac{1}{\theta}\right) = 1 + \left(\frac{1}{K}\right) \cdot \left(\frac{1}{[L]}\right)$$

mit einer doppelt reziproken Darstellung von $1/\theta$ über $1/[L]$. Es folgt eine Gerade, deren Anstieg $1/K$ ergibt.

Plot e: Durch eine Umformung, Multiplikation obiger Gl. mit $(1-\theta)/[L]$, erhält man:

$$\frac{\theta}{[L]} = K - K \cdot \theta$$

Die Darstellung von $\theta/[L]$ über θ ergibt den verbreiteten **Scatchard-Plot**, eine Gerade mit dem Anstieg $-K$ und den Achsenschnittpunkten 1 und K .

Plot f: Durch Logarithmieren der Gl. erhält man folgenden Ausdruck:

$$\log \left[\frac{\theta}{1-\theta} \right] = \log K + \log [L]$$

Die Auftragung von $\log [\theta/(1-\theta)]$ über $\log [L]$ ergibt eine Gerade mit dem Anstieg 1. Bei Halbumwandlung gilt wegen $\log [\theta/(1-\theta)] = 0$ die Beziehung $-\log K = \log [L]$. Diese Darstellung ist als **Hill-Plot** bekannt.

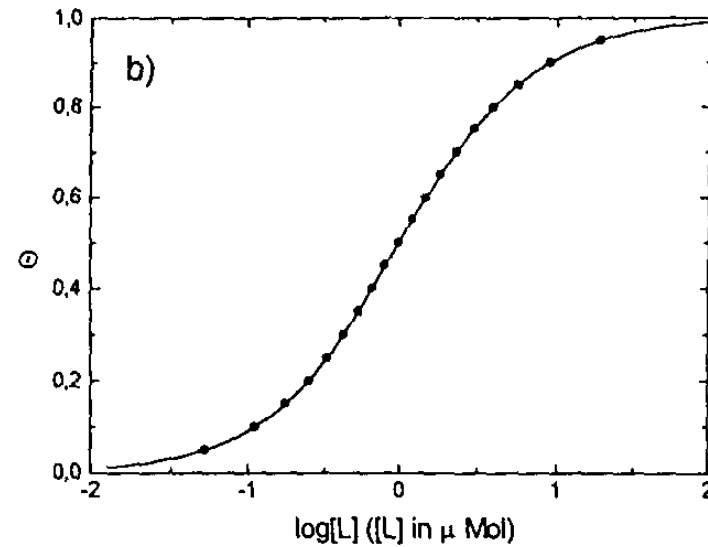
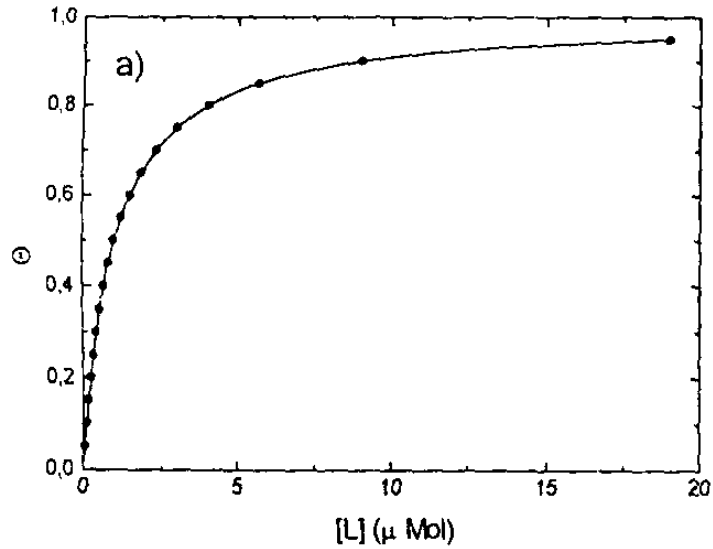
Die **Darstellung der Bindungsdaten in den angeführten Plots hat** – trotz der Verfügbarkeit geeigneter Computerprogramme - für die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten **Bedeutung**. Anhand der Plots können Unzulänglichkeiten der exp. Durchführung oder auch eine Nichtübereinstimmung mit dem vorgegebenen Ansatz erkannt werden.

Bei der **Durchführung von Ligandenbindungstudien** in der dargestellten Weise muss strikt der Ansatz einer spezifischen Bindung eines Liganden an ein MM mit einer 1:1 Stöchiometrie vorgegeben werden. Es kann **jedoch nicht immer ausgeschlossen werden, dass das zu untersuchende Protein weitere Bindungsstellen** aufweist. Um dies zu erkennen, gibt es 2 notwendige, aber nicht hinreichende Kriterien:

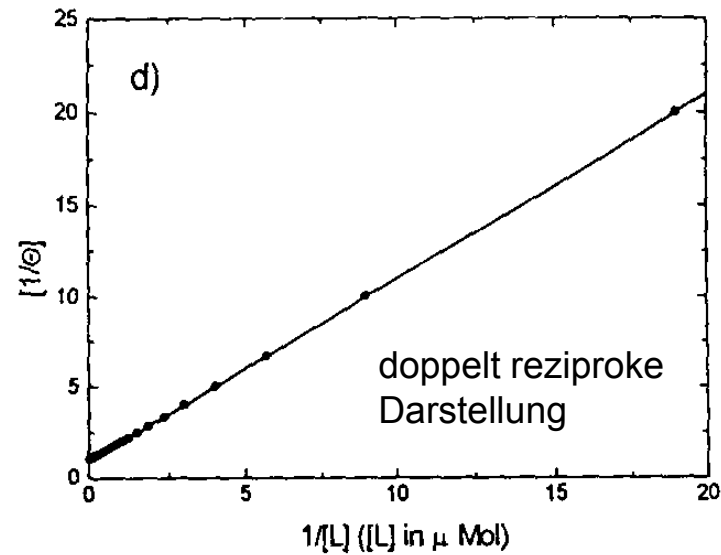
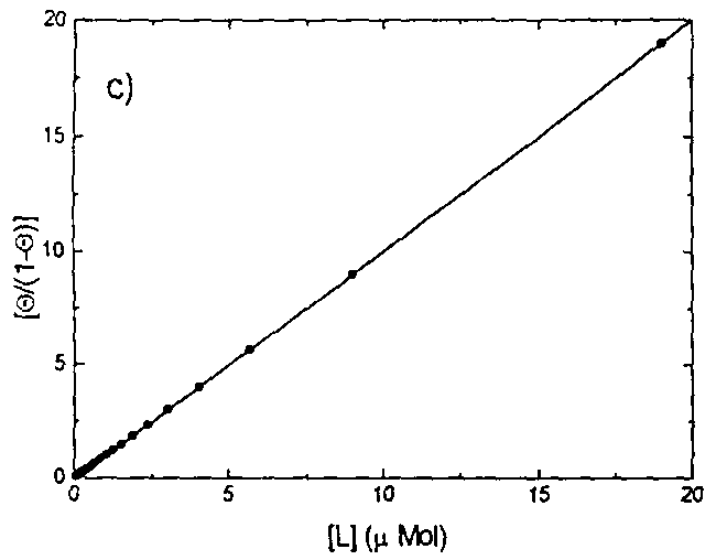
(i) Das eine dieser Kriterien besteht darin, dass keine Abweichung von der Linearität in den Plots (z.B. Knickpunkte im Scatchard Plot) auftreten.

(ii) Ein weiteres Kriterium für das Vorliegen eines Bindungsmodells mit 1:1 Stöchiometrie ist das Vorhandensein gemeinsamer Schnittpunkte in den Spektren (sog. isosbestischer Punkte, s. Abb. 26 auf #23).

Verschiedene Darstellungen für Bindungskurven, Plots a-d (Legende s. nächste Seite)



Achtung:
#27 und 28:
Konz. In μM
(= $\mu\text{mol/l}$) !!!



Achtung:

#27 und 28:

Konz. in μM
(= $\mu\text{mol/l}$) !!!

Verschiedene Darstellungen für Bindungskurven, Plots e-f

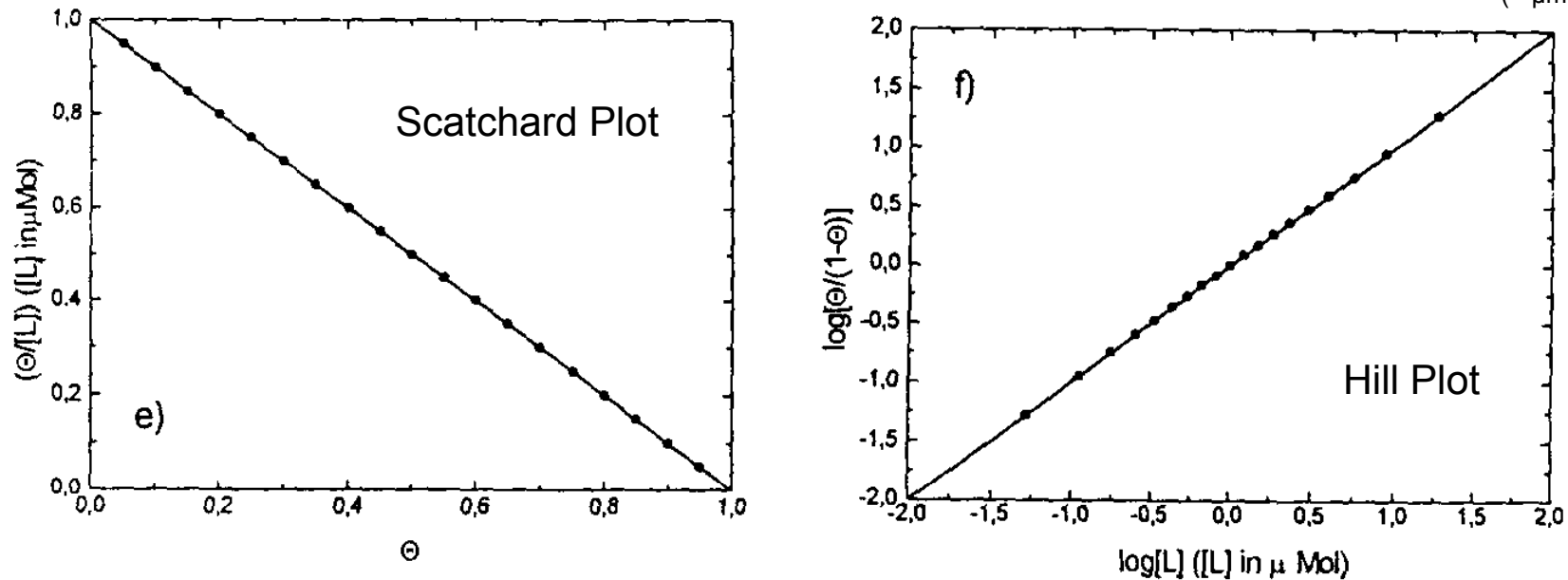


Abb. 8.13. Verschiedene Darstellungen für Bindungskurven (siehe Text): a Darstellung einer Bindungsisotherme in den Koordinaten Θ über $[L]$ mit einer Bindungskonstante $K = 1/\mu\text{Mol}$. b Halblogarithmische Darstellung der Bindungsisotherme von Abb. 8.13 a; c Darstellung des Ausdruckes $[\Theta/(1-\Theta)]$ über $[L]$. Das Punktmuster von Abb. 8.13 a wird erheblich verzerrt. Zugleich tritt eine komplizierte Fehlerfortpflanzung auf; d Doppelt reziproke Darstellung ($1/\Theta$ über $1/[L]$). Auch hier wird das Punktmuster von Abb. 8.13 a verzerrt; e SCATCHARD-Plot, Darstellung von $\Theta/[L]$ über Θ ; f HILL-Plot unter Verwendung der Bindungsdaten von Abb. 8.13 a

Isosbestische Punkte treten nicht auf, wenn außer dem Ausgangsspektrum der Substanz M und dem Spektrum des Komplexes ML eine 3., spektral erkennbare Komponente, etwa ML_2 , vorliegt.

Schließlich hilft der Hill-Plot, kooperative Bindungsphänomene zu erkennen, die einen Anstieg >1 zur Folge hätten (siehe später: Sauerstoffbindung an Hb: #31).

Ein Nachteil der grafischen Darstellung besteht in der komplizierten Fehlerfortpflanzung, z.B. wenn reziproke Größen gebildet werden. Insofern ist für die **exakte Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten aus Bindungskurven** die rechnerische, nichtlineare Kurvenanpassung an das Ursprungsmodell am günstigsten; auf diese Weise können auch sehr rasch alternative Modelle überprüft werden. Ein weiterer Vorteil der Rechenverfahren liegt darin, dass mit ihrer Hilfe das zu erwartende Messsignal für eine 100%ige Sättigung der Bindungsstellen errechnet werden kann (z.B. erlaubt bei hydrophoben Verbindungen die begrenzte Löslichkeit der Liganden nicht, den Endwert der Titrationskurve unter exp. Bedingungen zu erreichen).

Die bisherigen Betrachtungen galten gemäß unseren Annahmen (#22) für ein einfaches Bindungsgleichgewicht, bei dem ein Mol eines Liganden pro Mol MM gebunden wurde. Liegen jedoch **mehrere Bindungsstellen** vor, ergeben sich neue Aspekte, wie sie vom Beispiel der Sauerstoffbindung an Myoglobin (Mb) und Hämoglobin (Hb) bekannt sind.

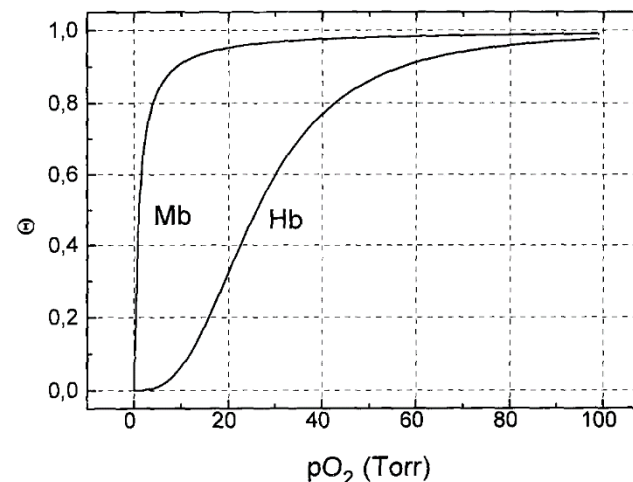


Abb. 8.14. Sauerstoff-Bindungskurven an Myoglobin (Mb) mit $n = 1,0$ und $pO_{2(50\%)} = 1,0$ Torr und Hämoglobin mit $n = 2,8$ und $pO_{2(50\%)} = 26$ Torr

Beispiel Sauerstoffbindungskurve an Mb und Hb: hierbei wird das Gleichgewicht eines MM in Lösung mit einem gasförmigen Liganden gemessen. Unter Stickstoff-Begasung wird zunächst die Probe vorbereitet; anschließend wird der Sauerstoff zudosiert; der Sauerstoffpartialdruck wird unter Beachtung von Gaskorrekturen berechnet.

Um ein entsprechendes Bindungsgleichgewicht zu formulieren, soll zur Vereinfachung als Beispiel die **Ligandenbindung an ein MM mit 2 Bindungsstellen** diskutiert werden. Dies führt zur schrittweisen Reaktion mit den Konstanten K_1 und K_2 :



Analog ergibt sich mit Hilfe des Sättigungsgrades θ :

$$\theta = ([ML] + 2[ML_2]) / ([M] + [ML] + [ML_2])$$

$$\theta = (K_1 \cdot [L] + 2K_1 \cdot K_2 \cdot [L]^2) / (1 + K_1 \cdot [L] + K_1 \cdot K_2 \cdot [L]^2).$$

Der Hill-Plot ergibt sich wie vorhin beschrieben, allerdings muss der Sättigungsgrad für 2 Bindungsplätze angesetzt werden, d.h. für $[\theta/(2-\theta)]$:

$$[\theta/(2-\theta)] = (K_1 \cdot [L] + 2K_1 \cdot K_2 \cdot [L]^2) / (2 + K_1 \cdot [L]).$$

Bei obiger Gl. ist die Extremwertbetrachtung aufschlussreich: bei geringer Sättigung, also $[L] \rightarrow 0$, ergibt sich $[\theta/(2-\theta)] = (1/2) \cdot K_1 \cdot [L]$ und bei hoher Sättigung, also $[L] \rightarrow \infty$, ergibt sich $[\theta/(2-\theta)] = 2 \cdot K_2 \cdot [L]$.

In den Ausläufern wird der Hill-Plot linear und symmetrisch. Im Mittelbereich besitzt die Kurve infolge der Kooperativität der Bindung eine größere Steigung (vgl. Abb. 8.16 auf der nächsten Seite (#31)). Bei Halbsättigung ist $\theta=1$ und $[\theta/(2-\theta)]=1$. Mit der Halbsättigungskonz. $[L_{1/2}]$ ergibt sich $K_1 \cdot K_2 \cdot [L_{1/2}]^2 = 1$. Das dargestellte Beispiel hat durchaus biol. Bedeutung (z.B. \exists dimere Hämoglobine bei niederen Organismen, bei denen der Hill-Plot eine Steigung von ca. 1.5 anzeigt).

Analog den dargestellten Ansätzen lassen sich **Gleichungen auch für kompliziertere Bindungssituationen** entwickeln, z.B. wenn weitere Bindungsplätze vorliegen, wenn eine Bindung von 2 unterschiedl. Liganden erfolgen kann, oder wenn das bindende Protein ligandenabhängigen Assoziations-Dissoziations-Gleichgewichten unterliegt.

In gleicher Weise können **Bindungskonstanten bei unterschiedl. Temp.** bestimmt werden. Damit kann unter Anwendung der van't Hoff Gl. (#9) die Bindungsenthalpie ermittelt werden.

Bei derartigen Untersuchungen ist die Anwendung der Titrationskalorimetrie vorteilhaft:

- (i) Sie liefert gleichzeitig ΔG und ΔH als thermodynamische Schlüsselgrößen.
- (ii) Die Technik ist auch dann anwendbar, wenn andere Untersuchungsverfahren, wie Spektroskopie, (z.B. wegen mangelnder optischer Transparenz) versagen.
- (iii) Schließlich können **multiple Bindungsgleichgewichte** erkannt werden, auch wenn sie sich einer direkten Beobachtung mit opt. Methoden oder Markierungstechniken entziehen. Die Titrationskalorimetrie ist geeignet, Annahmen über Bindungsmodelle zu überprüfen, die unvermeidlich bei der Anwendung indirekter Methoden gemacht werden müssen (Ähnlichkeit mit den Überlegungen, die im Zusammenhang mit der 2-Zustandshypothese in der Scanning-Kalorimetrie angestellt wurden).

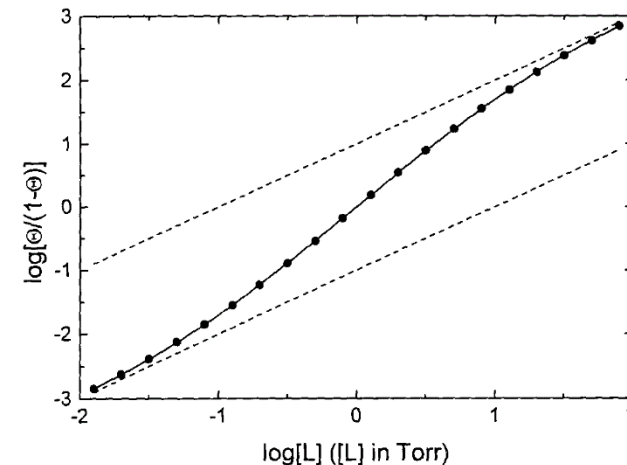


Abb. 8.16. Hill-Plot für ein dimeres Hämoglobin mit $K_1 = 0,2$ und $K_2 = 5$ sowie den entsprechenden Asymptoten

In der nebenstehenden Tabelle sind **Ligandenbindungsreaktionen** zusammengefasst, an denen als Liganden sowohl niedrigmolekulare Stoffe als auch Proteine beteiligt sind.

Tabelle 8.2. Ausgewählte thermodynamische Daten zur Protein-Ligand-Wechselwirkung

Protein	Ligand	ΔG° kJ/Mol	ΔH° kJ/Mol	ΔS° J/Mol/K	ΔC_p kJ/Mol/K
Alkohol-Dehydrogenase	NADH	-37,1	2,5	116	-1,70
Alkohol-Dehydrogenase	NAD ⁺	-21,6	-3,6	60,2	-0,45
Alkohol-Dehydrogenase	ADP	-20,4	-40,2	-66,5	-0,56
Flavodoxin	FMN	-46,0	-120,8	-250,8	
Flavodoxin	FAD	-33,8	-72,7	-129,6	
Glutamat-Dehydrogenase	L-Glutamat	-11,7	-2,5	30,9	0,04
Hämoglobin	Haptoglobin	-38,5	-139	-337	-3,93
Hexokinase	D-Glucose	-21,3	-3,1	61,1	
Lysozym	GlcNAc ^a	-9,0	-24,3	-51	-0,22
Ribonuclease S-Peptid	S-Protein	-44,3	-166,5	-410	-6,1
Trypsin (Rind)	Inhibitor (Soja)	-54,8	-16,7	128	

^a GlcNAc = N-Acetylglucosamin.

Die thermodynamischen Daten zeigen:

- (i) Gibbs-Energien zwischen etwa -10 und -50 kJ/mol;
- (ii) überwiegend exotherme Reaktionen mit Bindungsenthalpien von nahe 0 bis zu mehr als -150 kJ/mol;
- (iii) die Bindungsentropien variieren sehr stark, so dass positive und negative Werte möglich sind;
- (iv) die Wärmekapazitätsänderung ΔC_p ist allgemein <0 und besagt, dass bei der Ligandenbindung apolare Reste vom Wasserkontakt abgeschirmt werden.

Als *Beispiel* für eine Bindungsreaktion mit 2 unabhängigen Bindungsplätzen sei die Abb. auf #15 (Bindung eines Eisenkomplexes an Ovotransferrin) genannt. Dieses Beispiel zeigt überzeugend die Vorzüge der Titrationskalorimetrie.

PROTEINFALTUNG UND PROTEINSTABILITÄT

Proteine besitzen eine unikale 3D-Struktur. Die Faltung der ungeordneten Polypeptidkette ist ein thermodynamisch kontrollierter Vorgang.

Auf Grundlage exp. Untersuchungen konnte Anfinsen 1973 die thermodynamische Hypothese der Proteinfaltung formulieren. Diese besagt, dass die **3D-Struktur eines nativen Proteins** diejenige ist, bei der das Gesamtsystem Protein-Wasser den niedrigsten Wert der freien Enthalpie (ΔG) annimmt. D.h. letztlich, dass die native Konformation von Proteinen durch die Aminosäure-Sequenz bestimmt wird. Dem steht entgegen, dass der Zeitbedarf für eine Zufallssuche der richtigen Struktur selbst bei einem kleinen globulären Protein (100-150 AA) astronomisch wäre (Levinthal's Paradox). Man hat daraus abgeleitet, dass sich zunächst begrenzte Faltungsbezirke bilden. Ein solcher Faltungsvorgang kann mit großer Geschwindigkeit ablaufen, wenn nur eine begrenzte Anzahl von AA-Resten an diesem Prozess beteiligt ist.

Thermodynamische Untersuchungen zur Proteinfaltung haben somit 2 Aufgaben:
(i) am 'fertig' gefalteten Protein die strukturstabilisierenden Kräfte zu untersuchen, und
(ii) den Nachweis für thermodynamisch stabile Intermediate bei der Proteinfaltung zu erbringen.

Wenn man die **thermische Auffaltung von Proteinen** untersucht, kann man die **thermodynamischen Schlüsselgrößen** der Halbumwandlungstemperatur T_{trs} , der Enthalpieänderung ΔH und der Wärmekapazitätsänderung ΔC_p erhalten.

Einige Beispiele sind in der folgenden Tabelle enthalten:

Die Daten der Tabelle sind etwas vereinfacht: es wurden nur Proteine ausgewählt, deren thermische Auffaltung einem 2-Zustandsmodell (CR=1) folgt. Außerdem wird vernachlässigt, dass ΔC_p selbst auch Temp.-abhängig ist.

Aus diesen Schlüsselgrößen (T_{trs} , ΔH , ΔC_p) kann man die **Temp.-Abhängigkeit der Denaturierungsenthalpie, Denaturierungsentropie und der freien Enthalpie** berechnen:

Tabelle 8.3. Thermodynamische Größen für die thermische Auffaltung ausgewählter globulärer Proteine

Protein	pH	T_{trs} °C	ΔH^a kJ/Mol	ΔC_p kJ/Mol/K
Adrenodoxin	8,5	51,4	355	6,9
Chymotrypsin	3,8	57	675	13,2
Cytochrom b_5	7,4	71	336	6,0
Cytochrom c	4,8	78	445	4,7
α -Lactalbumin	6,3	62	276	4,0
Lysozym, Hühnereiweiß	4,5	78,5	590	6,6
Lysozym, Phage T4	2,8	51,7	517	9,8
Myoglobin-CN	9,5	82	763	11,7
Ribonuclease A	5,5	64	487	4,0
Ribonuclease T1	7,0	52	445	5,9
Trypsin-Inhibitor	7,0	103	293	0,1

^a ΔH bei der Halbumwandlungstemperatur T_{trs} .

$$\Delta H(T) = \Delta H - \Delta C_p \cdot (T_{trs} - T)$$

$$\Delta S(T) = \Delta S - \Delta C_p \cdot (T_{trs} - T)/T_{trs} = \Delta H/T_{trs} - \Delta C_p \cdot (T_{trs} - T)/T_{trs}$$

$$\Delta G(T) = \Delta H \cdot (T_{trs} - T)/T_{trs} - \Delta C_p \cdot (T_{trs} - T) + T \cdot \Delta C_p \cdot \ln(T_{trs}/T)$$

$\Delta_{unf}H(T)$, $\Delta H(T)$ Temperaturfunktion der Enthalpie-Änderung bei der Proteinauffaltung

$\Delta_{unf}S(T)$, $\Delta S(T)$ Temperaturfunktion der Entropie-Änderung bei der Proteinauffaltung

$\Delta_{unf}G(T)$, $\Delta G(T)$ Temperaturfunktion der Änderung der Gibbs-Energie (Freien Enthalpie) bei der Proteinauffaltung

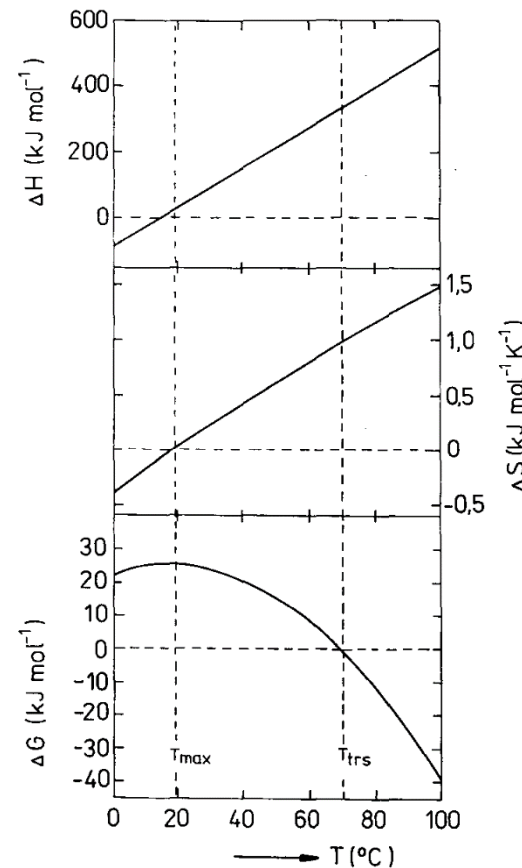
Beispiel:

Verlauf dieser Temperaturfunktionen

- ΔH und ΔS haben bei der Umwandlungs-Temp. beträchtliche Werte.
- Die Temp.-Funktion von ΔH ist eine Gerade, die von ΔS eine leicht gekrümmte Kurve. Beide Funktionen nehmen, wenn man sie in Richtung abnehmender Temp. verfolgt, den Wert 0 an und wechseln das Vorzeichen.
- Die Temp.-Funktion für die Änderung der Freien Enthalpie, ΔG , ist stark gekrümmt und die numerischen Werte sind deutlich kleiner als etwa die für ΔH nahe der Halbumwandlungstemp. T_{trs}

Diskutiert man die Kurve, so sind 2 Punkte wichtig:

- Die Funktion ist definitionsgemäß gleich 0 bei T_{trs} wegen $K=1$, und
- die Funktion hat einen Maximalwert bei einer Temp., bei der wegen $d(\Delta G)/dT = -\Delta S = 0$ der Schnittpunkt der Entropiefunktion mit der Nullachse vorliegt.



Temperaturabhängigkeit von ΔH , ΔS und ΔG für die thermische Entfaltung der Struktur eines Proteins

Abb. 8.17. Darstellung der Temperaturabhängigkeit von ΔH , ΔS und ΔG für die thermische Entfaltung der Struktur des Cytochroms b_5 bei pH 7.4

Die Temp.-Funktion für ΔG fällt zu tieferen Temperaturen wiederum ab, d.h. es gibt neben der thermischen Denaturierung auch eine Kältedenaturierung von Proteinen!

Die Größe $-\Delta G$, d.h. die **Änderung der freien Enthalpie bei der Entfaltung der Proteinstruktur**, ist ein **Maß für die Konformationsstabilität eines Proteins**.

Die Tabelle enthält **Stabilitätsdaten für globuläre Proteine**; sie wurden mit der Gl. für $\Delta G(T)$ aus den Daten der Tabelle 8.3 auf #34 berechnet. Sie zeigen, dass Proteine allgemein eine durch ΔG ausgedrückte Stabilität zw. 25 und 60 kJ/mol aufweisen.

Zur Beachtung: Manche Forscher (z.B. Pfeil) geben solche Stabilitätsdaten als positive Werte an (exakt ist: $\Delta G_{\text{unf}} = -\Delta G_{\text{stab}}$) !!!!!

Tabelle 8.4. Stabilitätsdaten für ausgewählte Proteine bei 25 °C, ausgedrückt durch ΔG für die Auffaltung der Struktur

Protein	M kDa	pH	ΔG kJ/Mol
Adrenodoxin	14,0	8,5	22
Chymotrypsin	23,8	3,8	44
Cytochrom b_5	10,5	7,4	25
Cytochrom c	12,4	4,8	47
α -Lactalbumin	14,2	6,3	22
Lysozym, Hühnereiweiß	14,3	4,5	61
Lysozym, Phage T4	16,7	2,8	31
Myoglobin-CN	17,0	9,5	65
Ribonuclease A	13,6	5,5	47
Ribonuclease T1	11,1	7,0	30
Trypsin-Inhibitor	6,5	7,0	60

Wenn ausschließlich ΔG ermittelt werden soll, ohne dass T_{trs} , ΔH und ΔC_p benötigt werden, stehen auch andere Bestimmungsverfahren für ΔG zur Verfügung. Sehr verbreitet ist in diesem Fall die **Proteindenaturierung durch Harnstoff (urea) oder Guanidiniumchlorid (GdmCl)**.

Hierzu wird das zu untersuchende Protein mit einem dieser Stoffe in steigenden Konzentrationen inkubiert und mittels geeigneter Methoden (meist Absorptionsspektroskopie, Fluoreszenz oder CD) der Umwandlungsgrad der Auffaltungsreaktion (analog α in Abb. 8.1 auf #10) gemessen. Die daraus bestimmbaren Gleichgewichtskonstanten werden dann auf die Denaturant-Konz. $c=0$ extrapoliert (vgl. div. Durchführungsbeschreibungen in Arbeiten von Pace).

Die **Konformationsstabilität globulärer Proteine** ist mit $\Delta G = 25$ bis 60 kJ/mol **sehr gering**. Proteine sind dementsprechend **empfindliche Substanzen**. Dies reflektiert biol. Erfordernisse.

Proteine müssen eine ausreichende Stabilität besitzen, um im Organismus bestehen zu können. Gleichzeitig müssen sie eine hinreichende Flexibilität aufweisen, um (etwa als Enzyme) eine bestimmte Funktion erfüllen zu können. Schließlich müssen Proteine hinreichend labil sein, damit aus regulatorischen Gründen eine Degradation stattfinden kann. Die Konformationsstabilität von Proteinen korreliert mit der *in-vivo*-Stabilität gemessen am Turnover in der lebenden Zelle. Die **Ursache für die mäßige Stabilität von globulären Proteinen** liegt darin, dass betragsmäßig **große stabilisierende und destabilisierende Anteile** vorliegen. Diese Anteile werden am *Beispiel eines Proteins* (ca. 100 AA) diskutiert:

Tabelle 8.5. Beiträge verschiedener Faktoren zur Proteinstabilität ^a

Faktor	Beitrag zu ΔG kJ/Mol	Beitrag zu ΔH
Konformationsentropie (25°C)	- 1400 bis - 4000	vernachlässigbar
unvorteilhafte Wechselwirkungen im gefalteten Protein	- 800	positiv
hydrophobe Wechselwirkung	+ 1100	positiv
Zunahme der VAN-DER-WAALS-Wechselwirkung infolge dichter Packung im gefalteten Protein	+ 950	negativ
Beiträge der Wasserstoffbrückenbindungen	+ 200 bis + 3000	negativ
beobachteter Nettoeffekt	+ 20 bis + 50	

^a Die Tabelle wurde entnommen aus CREIGHTON, T.E. (1983) Proteins – Structures and Molecular Principles. W.H. Freeman Co., New York.

Der Tabelle 8.5 (#37) kann man entnehmen, dass die **Balance der stabilisierenden und destabilisierenden Anteile** leicht gestört werden kann. Die Proteinstabilität ist tatsächlich sehr leicht durch externe Faktoren beeinflussbar, z.B. pH-Wechsel, Zugabe von Liganden, Trägerfixierung etc. Besonders interessant ist es auch, die Rolle einzelner AA-Reste für die Stabilität und Faltung zu ermitteln.

Das folgende *Beispiel* zeigt eine Situation beim *Lysozym aus dem Phagen T4*: Wenn im Lysozym T4 der Rest Thr 157 durch Ile substituiert wird, entsteht eine Störung in einem lokalen H-Brücken-Netzwerk mit erheblichen Konsequenzen für die Stabilität. Dennoch zeigt die Röntgenkristallstrukturanalyse, dass alle in Tabelle 8.6 aufgeführten Mutanten die gleiche Raumstruktur aufweisen.

Tabelle 8.6. Aminosäuresubstitutionen in Position 157 des Lysozyms aus Phagen T4 ^a

Mutante	ΔT^b (°C)	$\Delta(\Delta G)^c$ (kJ/Mol)	Bemerkungen
Wildtyp (Thr157)	0,0	0,0	Referenzprotein ^d
Thr157 → Ala	- 5,4	- 5,4	
Thr157 → Arg	- 5,1	- 5,1	
Thr157 → Asn	- 1,7	- 1,9	
Thr157 → Asp	- 4,2	- 4,6	
Thr157 → Cys	- 4,9	- 5,4	
Thr157 → Glu	- 5,8	- 6,3	
Thr157 → Gly	- 4,2	- 4,6	
Thr157 → His	- 7,9	- 8,8	
Thr157 → Ile	- 11	- 12,1	TS-Mutante ^e
Thr157 → Leu	- 5	- 5,4	
Thr157 → Phe	- 9,2	- 2,4	
Thr157 → Ser	- 2,5	- 2,8	
Thr157 → Val	- 6	- 6,7	

^a Daten nach ALBER, T et al. (1987) Nature 330, 41.

^b $\Delta T = (T_{trs})_{Mutante} - (T_{trs})_{Wildtyp}$

^c $\Delta(\Delta G) = (\Delta G)_{Mutante} - (\Delta G)_{Wildtyp}$

^d T_{trs} des Wildtyps beträgt $42,0 \pm 0,5$ °C bei pH 2.

^e TS-Mutante = temperatursensitive Mutante.

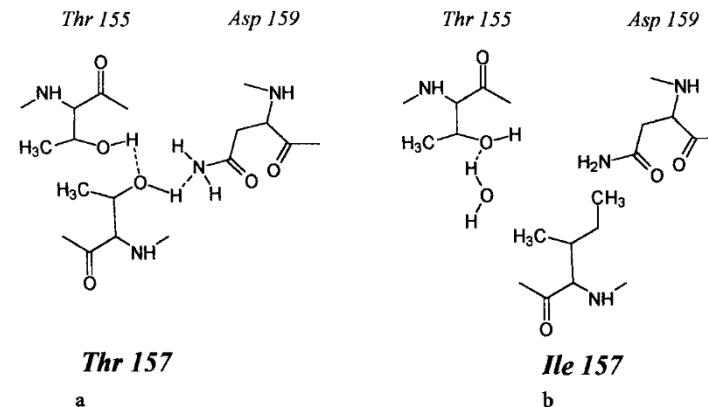


Abb. 8.18. Wasserstoffbrücken des Lysozyms T4 in der Umgebung von Threonin 157 (Wildtyp, a) sowie in der temperatursensitiven Mutante Thr157 → Ile b

Die bisherigen Betrachtungen gelten für kleine, globuläre Proteine mit einer molaren Masse bis zu etwa 25 kDa. **Proteine mit >30 kDa sind in der Regel aus Domänen aufgebaut.** Domänen sind im Sinne der thermodynamischen Ansätze separate Faltungseinheiten.

Solche Domänen sind dann leicht erkennbar, wenn sie sehr unterschiedliche Thermostabilität aufweisen. Dann können sie als aufeinander folgende Peaks in einer Scanning-kalorimetrischen Kurve identifiziert werden.

Haben sie eine sehr ähnliche Thermostabilität, so führt dies lediglich zu einem verbreiterten Schmelzpeak. Die Verbreiterung bewirkt, dass das Kooperativitätskriterium (vgl. #20) $CR = \Delta H^{cal} / \Delta H^{eff} > 1.0$ wird. Mit Hilfe einer rechnerischen Kurvenanalyse können die Teilpeaks identifiziert werden. Erkenntnisse über Domänenstruktur sollten abgesichert werden (Gewinnung separater Domänen durch limitierte Proteolyse und wiederum kalorimetrische Untersuchung).

Während bei der Domänenstruktur die Abweichungen vom 2-Zustandsmodell offenkundig sind, können solche Abweichungen mitunter auch bei der Entfaltung von kleinen globulären Proteinen auftreten. Dies ist der Fall, wenn ein **Intermediat X** vorliegt:



Dieser Fall ist am *Beispiel der GdmCl-induzierten Auffaltung des α -Lactalbumins* erstmals eingehend analysiert worden und hat zur Formulierung der **'molten-globule'-Hypothese** geführt. Sie besagt, dass es relativ kompakte Intermediate bei der Proteinfaltung gibt, die eine stark fluktuierende Sek.Struktur aufweisen.

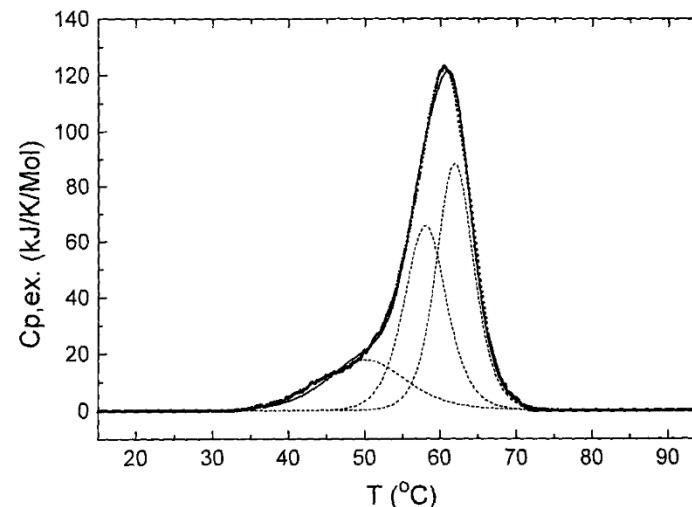


Abb. 8.19. Experimentelle (excess) Wärmekapazitätsfunktion von Cytochrom P₄₅₀ aus *Pseudomonas putida* (M ~ 46 kDa) in Gegenwart des Substrates Campher (Punkte). Durch Dekonvolution wurden die drei Teilpeaks erhalten (punktierter Linien). Die Summe der Teilflächen ergibt die ausgezogene Kurve

Faltungsintermediate sind im Allgemeinen instabil und proteaseempfindlich. **In der lebenden Zelle sind deshalb besondere Mechanismen wirksam, die den Faltungsprozess unterstützen und der Fehlfaltung entgegen wirken.** Besondere Bedeutung haben hierbei: Chaperone, Disulfidisomerasen, und cis/trans-Prolinisomerasen. Dennoch nimmt die **Polypeptidkette** sowohl unter *in-vivo*- wie auch unter *in-vitro*-Bedingungen die **thermodynamisch vorteilhafteste Konformation** ein, die bereits durch die AA-Sequenz vorbestimmt ist.

WEITERE ANALYTISCHE ANWENDUNGEN THERMODYNAMISCHER METHODEN

Der Enzymthermistor: Die Wärmeentwicklung biochem. Reaktionen kann in der Analytik genutzt werden, ohne dass zur Messung Kalorimeter benötigt werden: z.B. kann als Messprinzip ein Thermistor in eine kleine Säule mit trägerfixiertem Enzym eingebracht werden. Die Reaktionswärme der enzymkatalysierten Reaktion führt zu einem Signal, das der angebotenen Substratkonz. proportional ist (thermometrisches Messprinzip). Die Methode ist hochspezifisch; Kalibrierung mit Eichsubstanzen; präzise Temperierung erforderlich bzw. Temp.-Kompensation durch einen 2. Messfühler.

Beispiel: Bestimmung von Glucose in Serumproben, wofür trägerfixierte Hexokinase verwendet wird.

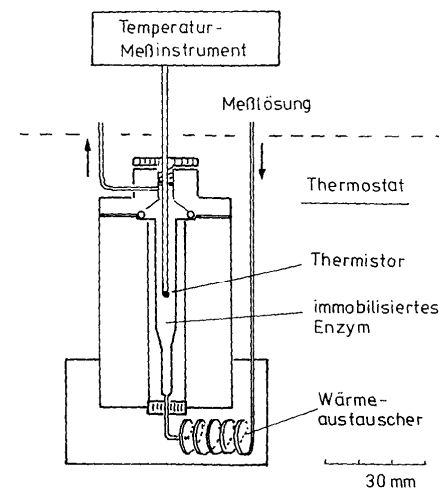


Abb. 8.20. Prototyp eines Enzymthermistors. Nach Angaben von MOSBACH, K., B. DANIELSSON, A. BORGERUD und M. SCOTT (1975) Biochim. Biophys. Acta 403, 256

Die kalorimetrische Reinheitsanalyse von Lipiden:

Lipide zeigen in der Scanning-Kalorimetrie gut beobachtbare Phasenübergänge. *Beispiel: Thermogramm des Dimyristoylphosphatidylcholins.* Im Vergleich zu Proteinen ist der Hauptübergang hochkooperativ, d.h. schmal und hoch. Bei Lipiden wird die kooperative Einheit von vielen Einzelmolekülen gebildet.

Wenn Lipide verunreinigt sind, kommt es wegen des Vorliegens von Mischphasen zur Verkleinerung der kooperativen Einheit (entsprechender Verbreiterung der Phasenübergänge); diese sind auf Grundlage der van't Hoff-Enthalpie auswertbar und zum Spurennachweis von Verunreinigungen geeignet. Der Ansatz von Sturtevant beschreibt eine

Funktion von der Temp. T: $(T_0 - T)^{v.H.} = (RT_0^2 / \Delta H^{v.H.}) \ln[(1 - \alpha) / \alpha]$

wobei T_0 = Phasenübergangstemp. der reinen Hauptkomponente, $\Delta H^{v.H.}$ = exp. bestimmte van't Hoff Wärme, α = Umwandlungsgrad (Anteil geschmolzenen Lipids)

Kalorimetrie an lebenden Mikroorganismen:

Kulturen von Mikroorganismen können in die Messzelle eines Mischungskalorimeters eingebracht werden. Das Gerät registriert dann die Stoffwechselwärme über einen längeren Zeitraum, bis der Stoffwechsel durch Verbrauch des Mediums oder andere Faktoren zum Erliegen kommt.

Beispiele: Untersuchung von durch die Umwelt (Xenobiotika) belastete Proben.

Empfindliche *in-vivo*-Testung auf Umweltschadstoffe; versuchstierfreie Testung von Arzneimitteln; Biomonitoring (kalorimetr. Bestimmung von Stoffwechselwärmern an mikrobiellen Kulturen)

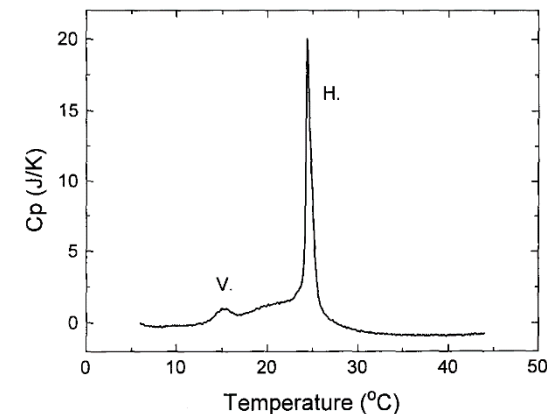


Abb. 8.21. Scanning-kalorimetrische Kurve für eine Dimyristoylphosphatidylcholin-Suspension (1 mg/ml). V – Vorpeak, H – Hauptpeak

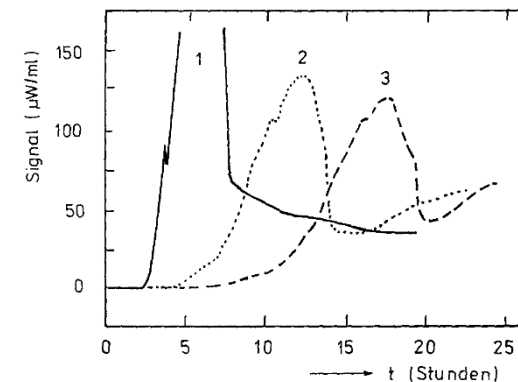


Abb. 8.22. Thermogramme von *Escherichia coli*-Kulturen. 1 – Kontrollkurve, 2 – *E. coli* in Gegenwart von Tetracyclin, 3 – *E. coli* in Gegenwart von Doxycyclin (jeweils 4 µg/ml). Nach Daten von P.-A. MÅRDH, K.-E. ANDERSSON, T. RIPA und I. WADSO (1976) Scand J. Infect Dis. Suppl. 9, 12

Differenz-Thermoanalyse (DTA):

Zentrale Messgröße ist die Temp.-Differenz zw. Messprobe und einer Vergleichsprobe (Referenz).

Aufbau: 2 Tiegel in einem beheizbaren Ofenblock; zur Messung der Proben- und Referenz-Temp. dienen Thermo-elemente in/nahe den Tiegeln; programmierbare Regelungseinheit (Steuerung der Heizung des Ofenblocks, langsames Ansteigen oder Abkühlen)

Darstellung der Temp.-Differenz als Funktion der Proben-Temp. oder Zeit; Fläche unter dem Mess-Signal = qualitatives Maß für zusätzlich zugeführte Wärme; Phasenübergangstemperaturen können jedoch genau bestimmt werden!

Beispiel: DTA-Messkurve von DPPC

DPPC = Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin

Aufgetragen ist die Temp.-Differenz beim Aufheizen als Funktion der Proben-Temp.

Vorübergang bei niedriger Temp. (Phasenübergang: $L_{\beta'}$ → $P_{\beta'}$ -Gel-Phase) +

Hauptübergang (in die fl.-kristalline L_{α} -Phase) bei höheren Temp.

Beide Phasenübergänge sind endotherm

Der Hauptübergang besitzt eine weitaus größere Phasenumwandlungsenthalpie als der Vorübergang

DTA-Gerät

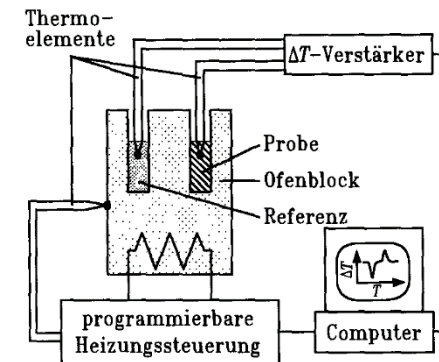


Abb. II.1:
Schematische Darstellung eines DTA-Geräts.

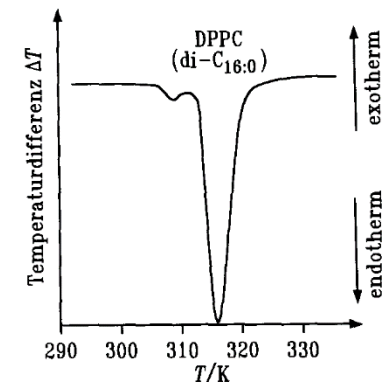


Abb. II.2:
DTA-Meßkurve von DPPC (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin, di-C_{16:0}).

Beispiel: DTA-Thermogramm einer DEPC-Dispersion bei verschiedenen Drücken

DEPC = Dielaidoyl-Phospatidylcholin

Endotherme Umwandlung von der L_{β} -Phase in die fluide L_{α} -Phase bei 284 K und 1 bar

Je höher der Druck, um so höher die Temp., bei der die Phasenumwandlung einsetzt

Die Phasengrenzkurve für die L_{α}/L_{β} -Umwandlung steigt mit etwa 20 K/kbar an.

Zur Beachtung:

Es besteht kein quantitativer Zusammenhang zw. der Fläche unter dem DTA-Mess-Signal und der Phasenumwandlungsenthalpie!

Für spezielle Fragestellungen (z.B. Bestimmung der Kooperativität eines Phasenüberganges) ist die quantitative Bestimmung von ΔH° notwendig! Dafür wird eine kompliziertere Technik, die Differenz-Scanning-Kalorimetrie (DSC; s. #16), die sich aus der DTA entwickelt hat, benutzt.

DEPC bei
versch. Drücken

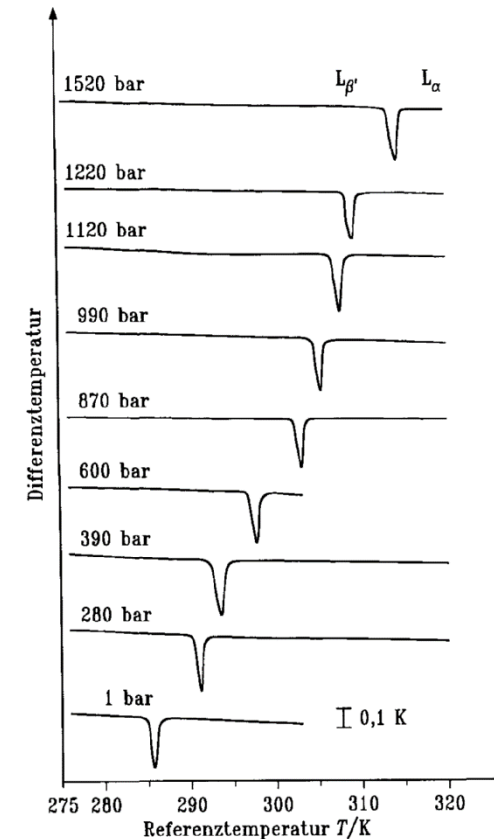


Abb. II.3:
DTA-Thermogramme einer DEPC-Dispersion in Wasser bei verschiedenen Drücken.

WEITERE BEISPIELE

DSC-Thermogramm einer Lysozymlösung bei versch. pH-Werten

Bei bekannter Heizrate lässt sich aus dem Thermogramm die Wärmekapazitätsdifferenz ΔC_p zw. Probe und Referenz bestimmen.

Man erkennt die mit der Denaturierung (pH) des Proteins einsetzende Enthalpieänderung.

Kommerzielle DSC-Geräte arbeiten meist zw. 77 und 1000 K.

Thermotrope Phasenumwandlungen von Modellbiomembranen

Mit Hilfe von DSC-Messungen lassen sich die bei den thermotropen Phasenübergängen auftretenden Umwandlungsenthalpien messen.

Beispiel: Thermogramme wässriger Lipid-Dispersionen von DMPC, DPPC, DSPC (Di-myristoyl-/palmitoyl-/stearoyl-Phosphatidylcholin), also von Phosphatidylcholinen unterschiedlicher Länge der Kohlenwasserstoff-Ketten (di-C_{14/16/18:0}).

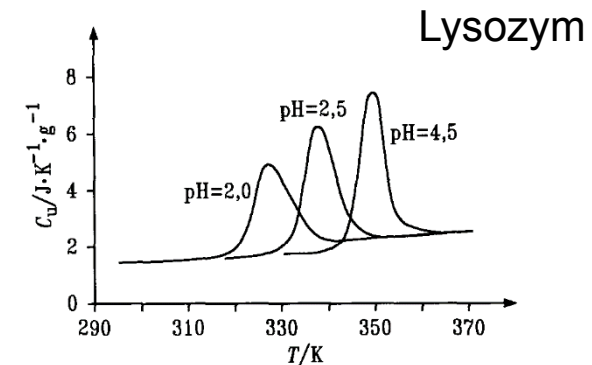


Abb. II.5:

DSC-Thermogramme einer Lysozym-Lösung ($1,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) bei verschiedenen pH-Werten. Dargestellt ist die partielle spezifische Wärmekapazität der Proteinlösung als Funktion der Temperatur (nach: P.L. Privalov, Adv. Protein Chemistry **33** (1979) 167).

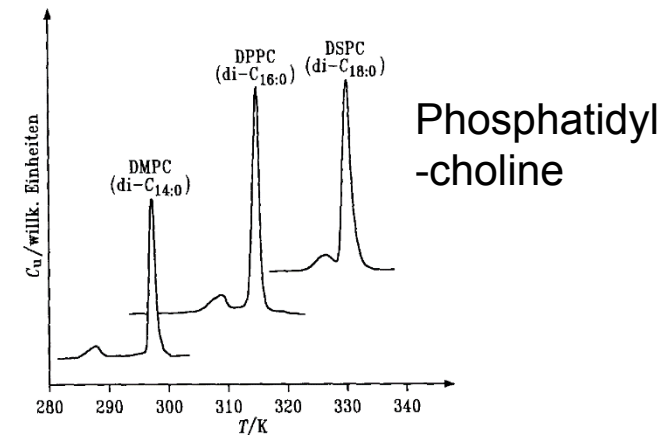


Abb. II.6:

Wärmekapazitätskurven $C_p(T)$ wässriger Dispersionen dreier Phosphatidylcholone mit unterschiedlicher Länge der Kohlenwasserstoffketten (die Kurven sind gegeneinander nach oben versetzt).

Jedes **Lipid** (#44) durchläuft 2 endotherme Phasenumwandlungen, eine **Gel/Gel-Vorübergang** und eine **Gel/flüssig-kristallin-Hauptumwandlung** bei höherer Temp.

Aus den Messkurven erhält man neben den Umwandlungstemperaturen T_u durch Ausmessen der Fläche unter den DSC-Peaks die Enthalpieänderung $\Delta_u H$ beim Phasenübergang. Unter Annahme eines reversiblen Phasenübergangs 1. Ordnung lässt sich daraus (mit Hilfe der Temperatur T_u im DSC-Thermogramm, bei der der Phasenübergang einsetzt) die entsprechende Entropieänderung $\Delta_u S$ berechnen.

Mit Hilfe der maximalen Wärmekapazität $C_{p,u}^{\max}$, die den DSC-Thermogrammen weiterhin entnommen werden kann, sowie Kenntnis von T_u und $\Delta_u H$, lässt sich die **mittlere kooperative Länge der Umwandlung**, N_0 , bestimmen (Voraussetzung: Annahme eines reversiblen 2-Zustands-Modells für die Umwandlung). Die **kooperative Einheit** für die Gel/flüssig-kristallin-Umwandlung der Lipide hängt empfindlich von der Reinheit des Lipidsystems ab. N_0 liegt in der Größenordnung von 200, d.h. dass auch die Phospholipid-Hauptumwandlung ein hochkooperativer Prozess ist.

Tabelle II.1:

Ergebnisse aus DSC-Messungen an verschiedenen Phospholipid-Dispersionen.

Lipid	Vorübergang		Hauptübergang		
	$T_{u,V}/K$	$\Delta_u H_V/kJ \cdot mol^{-1}$	$T_{u,H}/K$	$\Delta_u H_H/kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta_u S_H/J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$
DMPC	285	3	297	26	88
DPPC	307	5	315	36	115
DSPC	324	7	328	45	137
DOPC			~ 251	~ 33	~ 131
DPPE			337	33	98
DSPE			347	44	127

Aus der Tabelle (#45) und der Abb. rechts folgt, dass die Hauptumwandlungstemp., T_u , und die Enthalpie- und Entropieänderung am Übergang, ΔH_u und ΔS_u , drastisch von der Kettenlänge abhängen. T_u und $\Delta_u H$ hängen jedoch nicht nur von der Länge sondern auch vom Sättigungsgrad der Acylketten und von der Art der Phospholipidkopfgruppe ab.

Das di-cis-ungesättigte DOPC besitzt eine um 77 K tiefer liegende T_u als das entsprechende DSPC.

DOPC = Dioleoyl-Phosphatidylcholin (di-C_{18:1,cis}).

DSPC = Distearoyl-Phosphatidylcholin (di-C_{18:0}).

Die T_u -Werte der Phosphatidylethanolamine DPPE und DSPE liegen höher und die $\Delta_u S$ -Werte etwas niedriger als die entsprechenden Werte der Phosphatidylcholine gleicher Acylkettenlänge (DPPC und DSPC).

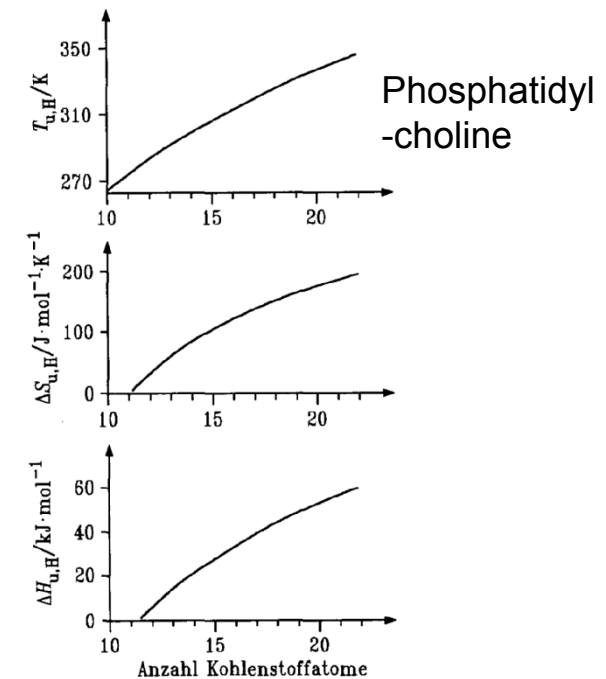


Abb. II.7: Abhängigkeit der Hauptumwandlungstemperatur, der Umwandlungsentropie und -enthalpie von der Länge der Acylketten gesättigter Phosphatidylcholines (nach: R. Winter, Chem. unserer Zeit 24 (1990) 71).

Die **Einführung von cis-Doppelbindungen in die Lipidkette** ist eine effiziente Methode, die 'Fluidität' der Membran (flüssig-kristalline Phase) über einen weiten Temp.-Bereich zu erhalten. Dies hat bedeutsame physiol. Konsequenzen: Da die physiol. Funktionen natürlicher Membranen den fluiden Zustand erfordern, müssen lebende Organismen den Effekt tiefer Temperaturen (und auch hoher Drücke) durch Anpassung ihrer Membrananteile kompensieren ('homöoviskose Adaptation').

Tiefe Temp. und hohe Drücke (bis 1.2 kbar), z.B. in Tiefseegräben, üben einen stark ordnenden Einfluss auf die Struktur der Membran aus. Daher müssen Tiefseeorganismen kompensierende Strukturmerkmale in ihren Zellmembranen besitzen, um ihre Fluidität zu erhalten. Der Einbau von cis-Doppelbindungen ist ein effizienter Weg dafür.

Biologische Membranen bestehen nicht nur aus Phospholipiden – ein weiterer wichtiger Bestandteil ist das Cholesterin (4-50 mol%). Cholesterin wird als amphiphiles Molekül in Lipid-Doppelschichten eingebaut.

DSC-Messungen an Lipid/Cholesterin-Mischungen zeigen, dass mit zunehmender Cholesterinkonz. der Hauptübergang verschmiert wird und bei etwa 50 mol% ganz verschwindet. Ab einer Konz. von einigen mol% Cholesterin in Membranen treten bereits Entmischungserscheinungen mit 2-Phasen-Koexistenzbereichen auf, über die eine detaillierte Analyse der DSC-Thermogramme Auskunft geben kann.

Die Natur hat mit dem Einbau von Cholesterin in Lipid-Doppelschichten einen weiteren, sehr effizienten Regelmechanismus gefunden, um die Struktur und Dynamik der Membran-Matrix zu beeinflussen.

Durch Analyse oder Simulation der DSC-Thermogramme binärer Lipidmischungen lassen sich **Temp./Konz.-Phasendiagramme der Systeme** erstellen (Sturtevant etc. etc.)

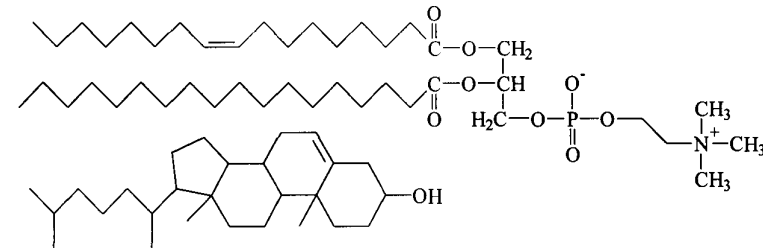


Abb. II.8:

Die Lage von Cholesterin relativ zu einem Phospholipid in der Membran.

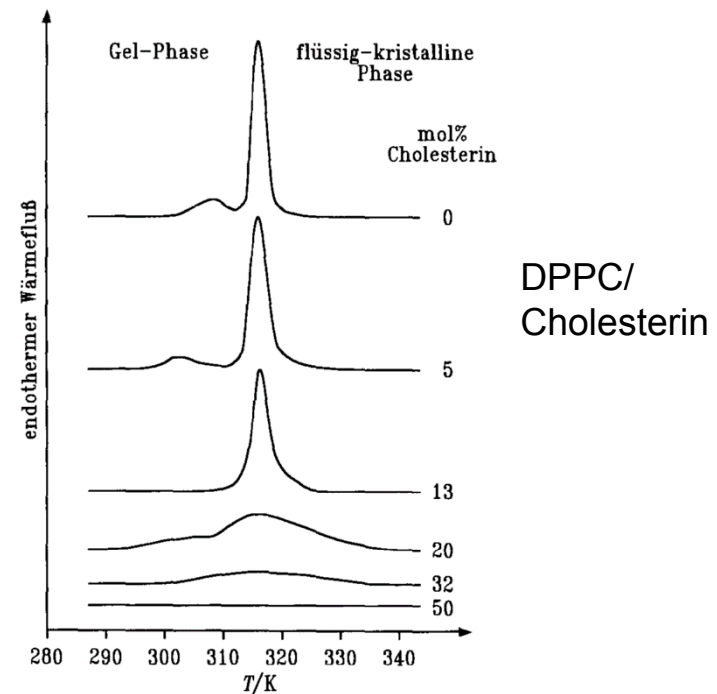


Abb. II.9:

DSC-Thermogramme von DPPC/Cholesterin-Dispersionen unterschiedlicher Konzentrationen. Der molare Anteil an Cholesterin in der Lipidmischung ist mit angegeben.

Polypeptide und Proteine

In der Regel denaturieren/entfalten Proteine bei Temp. oberhalb von ca. 330 K, wobei ihre biochem. Aktivität verloren geht. Es gibt eine Reihe von Einzellern (Thermophilen), z.B. in heißen Vulkanquellen, deren Proteine höhere Denaturierungstemp. aufweisen. Aus Messungen der Denaturierungsenthalpie lassen sich Hinweise auf die **Stabilität von Proteinstrukturen** und die **Natur der Helix-Knäuel-Phasenumwandlung** gewinnen.

Beispiel: Messungen am Modell-Polypeptid **Poly- γ -benzyl-L-glutamat** (PBG) in einem LM-Gemisch aus 1,2-Dichlorethan (DCE) und Dichloressigsäure (DCES; stark solvatisierend). In diesem nichtwässr. LM-Gemisch ist die α -Helix die bei höheren Temp. stabile Konformation, während bei tiefen Temp. das Polypeptid als ungeordnetes Knäuel (random coil) vorliegt.

In einer Mischung aus 19% DCE und 81% DCES erhält man aus kalorimetrischen Messungen einen Temp.-Verlauf des Umwandlungsanteils der Wärmekapazität (s. Abb.). Die Knäuel-Helix-Umwandlung erfolgt für PBG, das aus ca. 1100 Monomeren besteht ($n=1100$), in einem Temp.-Bereich von 297-313 K; das Maximum der Wärmekapazität liegt bei 305 K. Aus der Messung der Wärmekapazität als Funktion der Temp. wurde die Phasenumwandlungsenthalpie $\Delta_u H$ bestimmt. Da diese von der Peptidkonz. abhängt, wurde der Wert auf den Standardzustand idealer Verdünnung extrapoliert und zu 4 kJ/(mol Monomer) bestimmt. Mit Hilfe dieses Werts und des Maximalwerts der Wärmekapazität bei T_u ergibt sich die mittlere kooperative Länge zu $N_0=100$. Die Knäuel-Helix-Umwandlung von PBG ist offensichtlich auch ein hochkooperativer Prozess!

Abb. II.10:
Poly- γ -benzyl-L-glutamat.

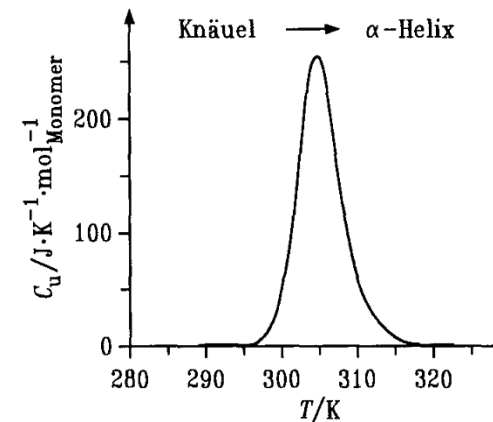
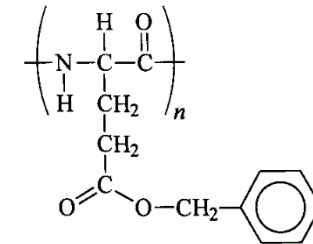


Abb. II.11:

Temperaturverlauf der Wärmekapazität bei der Phasenumwandlung von Poly- γ -benzyl-L-glutamat in einer Lösungsmittelmischung aus DCE und DCES (nach: T. Ackermann, H. Rüterjans, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **68** (1964) 850).

Für **einfache, kleine globuläre Proteine** (wie RNase, Lysozym) wurden $\Delta H^{\text{v.H.}}/\Delta H^{\text{cal}}$ -Werte nahe 1 gefunden, was 2-Zustandsprozesse für Helix-Knäuel-Übergänge der Proteine nahe legt (Privalov).

Oft treten bei der Denaturierung jedoch Zwischenzustände auf, wodurch eine geeignetere Analyse der DSC-Kurven notwendig wird (Deconvolutions-Methode zur Bestimmung der Zustandssumme und damit der Population intermediärer Zustände (Freire)).

Polynucleotide

Thermisch-kalorimetrische Messungen an Polynucleotiden liefern wichtige Information über deren Primär- und Sek.-Struktur.

Beispiel: DSC-Thermogramm von DNA.

Für DNA-Moleküle hat man einen systematischen Zusammenhang zw. der Doppelhelix-Einzelstrang-Umwandlungsenthalpie $\Delta_u H$ und dem Gehalt an G und C festgestellt (3 H-Brückenbindungen!).

Wenn für die Phasenumwandlung von Doppelhelix zu Einzelsträngen nur der Bruch von H-Brücken verantwortlich wäre, sollte man für die Phasenumwandlungsenthalpie einer reinen GC-DNA relativ zu einer AT-DNA ein Verhältnis von 3:2 erwarten. Die gefundene Abhängigkeit des $\Delta_u H$ vom GC-Gehalt war jedoch geringer (Ursache: Doppelhelixstruktur); primär (70 %) durch WW zw. den übereinander liegenden Basen (Stapel-WW) stabilisiert, erst sekundär durch H-Brücken. Die mit der kalorimetrischen Methode erhaltenen Enthalpiewerte können als analytische Methode zur Bestimmung der relativen Basenzusammensetzung von Polynucleotiden herangezogen werden.

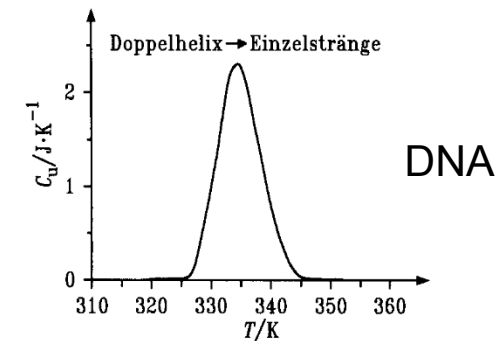


Abb. II.12:

DSC-Thermogramm für DNA, die aus Lachssperma gewonnen wurde (nach: H. Klump, T. Ackermann, Biopolymers **10** (1971) 513).

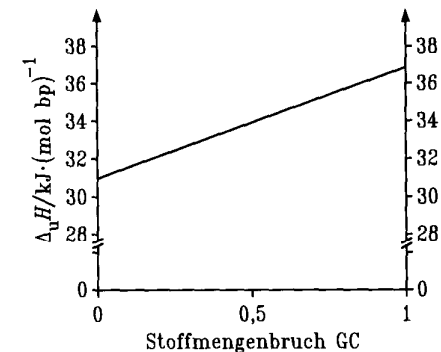


Abb. II.13:

Phasenumwandlungsenthalpie $\Delta_u H$ pro Mol Basenpaare (bp) bei der DNA-Denaturierung als Funktion des Guanin-Cytosin (GC)-Gehalts (nach: T. Ackermann, Angew. Chem. **101** (1989) 1005).

Fallbeispiel Proteinestabilität: (i) Vorgangsweise, (ii) Harnstoff- und GdmCl-Denaturierungskurven, (iii) Einwirkung von Detergenzien bzw. ionisierender (X) oder nichtionisierender (UV) Strahlung (i und ii: Pace & Shirley; ii und iii: Tiefenbach & Durchschlag)

THERMODYNAMIC ANALYSIS OF PROTEIN DENATURATION

(1) Approaches to follow protein unfolding

- Aiming at the **conformational stability of a protein** means comparing the native folded (F) conformation with the denatured unfolded (U) state
- The $F \longleftrightarrow U$ transition is considered to be **reversible**
- Determination of the **equilibrium constant** (K) and the **free-energy change** (ΔG) for the $F \longleftrightarrow U$ transition
- Difference between $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ and ΔG at 25 °C is considered to be representative to describe the conformational stability of a protein
- **Analysis of equilibrium transitions:** hydrodynamic and spectroscopic measurements (AUC; absorption, fluorescence, CD): mass and/or size, changes of tertiary and secondary structure of proteins
- **Transition curves:** pre-transition, transition, post-transition

(2) Analysis of unfolding curves

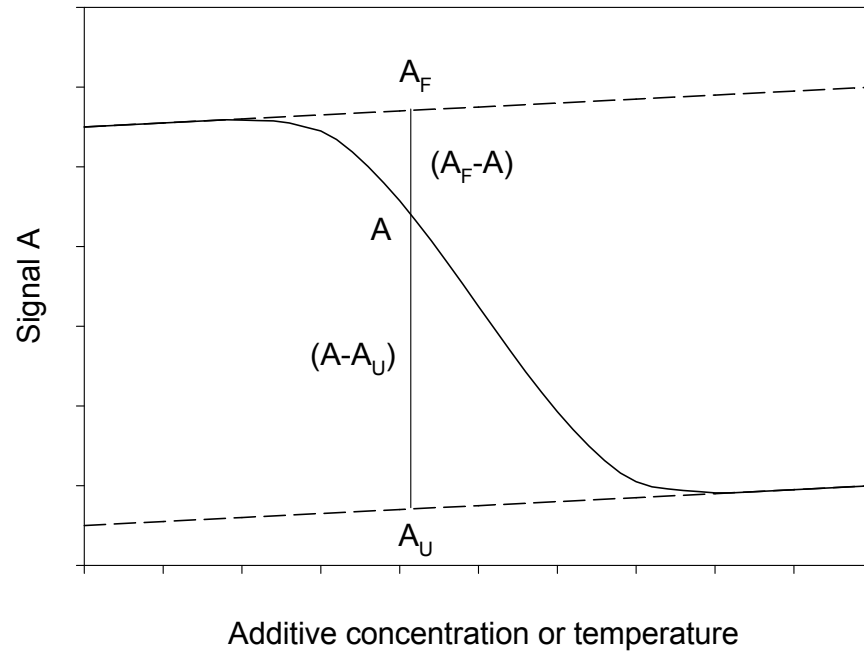
- Assumption of 2-state or multistate transitions for the $F \longleftrightarrow U$ reaction
- In the case of a 2-state folding mechanism:
$$f_F + f_U = 1$$
- The experimental parameter y at any point along the denaturation profile is given by
$$y = y_F f_F + y_U f_U$$
- Thus, K and ΔG may be derived:
$$K = f_U / f_F = (y_F - y) / (y - y_U)$$
$$\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln [(y_F - y) / (y - y_U)]$$
- The values in the transition range, y_F and y_U , are obtained by extrapolating the pre- and post-transition ranges, and values of K from a series of data points near the midpoint of the denaturation curves

- Usually ΔG varies linearly with the denaturant concentration
- Therefore, $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ can be determined by extrapolating the experimental data points to zero denaturant concentration:
$$\Delta G = \Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m c_{\text{denaturant}}$$
where m is the cooperativity parameter
- The determination of $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ from reversible thermal unfolding curves requires extrapolation of ΔG from data points near the midpoint of thermal unfolding to 25 °C
- Enthalpy change ΔH can be derived from the van't Hoff equation:
$$d(\ln K) / d(1/T) = - \Delta H / R$$
- Owing to differences in the heat capacities C_p , the van't Hoff plots are nonlinear, so ΔH may be temperature dependent
- At T_m the free energy vanishes:
$$\Delta G(T_m) = 0 = \Delta H_m - T_m \Delta S_m$$
 $\Delta G(T)$ can be derived by plotting ΔG vs. T

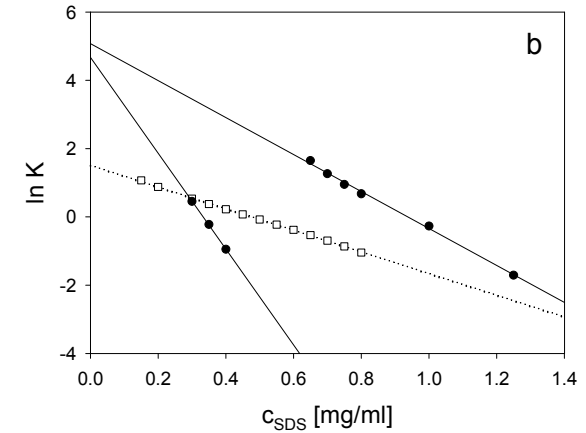
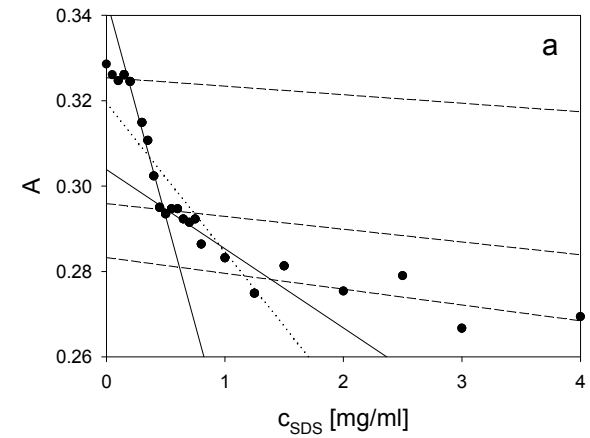
(3) Establishing stability differences

- To compare the differences in the conformational stabilities: easily accessible parameters ($c_{1/2}$ and T_m) can be applied
- Cooperativity parameter m : indicator of multistate behavior
- Estimates of Gibbs free energy of stabilization may be afflicted with large errors
- Evaluation rests on the validity of several assumptions:
 - folding model (2-state or multistate behavior)
 - reaching equilibrium conditions
 - influence/neglect of pre- and posttransition ranges
 - choice of extrapolation methods
 - reduction state of protein
 - etc.
- Nevertheless: powerful tool for determining protein stability

Analysis of unfolding curves



- - - pre- and post-transition regions



2-state (.....) or 3-state (—) evaluation ?

Hinweise zur Vorgangsweise: siehe Pace & Shirley

Eigenschaften von Harnstoff und GdmCl:

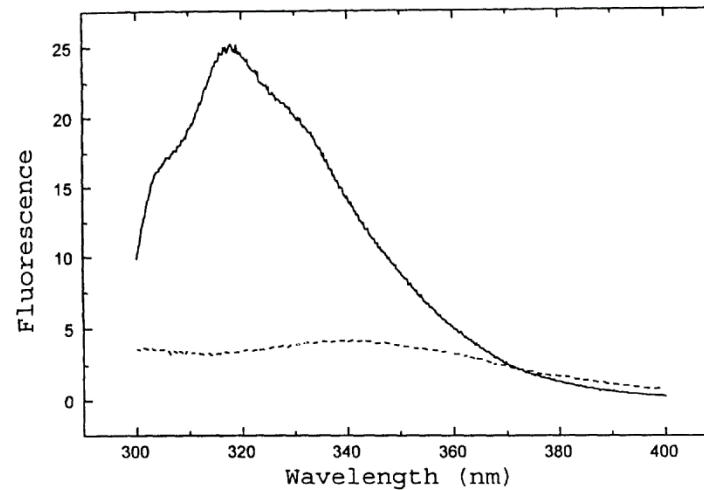
Table 1
Urea and Guanidine Hydrochloride Stock Solutions

Property	Urea	GuHCl
Mol wt	60.056	95.533
Solubility, 25°C	10.49M	8.54M
d/d_0^a	$1 + 0.2658W + 0.0330W^2$	$1 + 0.2710W + 0.0330W^2$
Molarity ^b	$117.66(\Delta N) + 29.753(\Delta N)^2 + 185.56(\Delta N)^3$	$57.147(\Delta N) + 38.68(\Delta N)^2 - 91.60(\Delta N)^3$
Grams of denaturant/ gram of water to prepare		
6M	0.495	1.009
8M	0.755	1.816
10M	1.103	—

^aW is the weight fraction of denaturant in the solution, d is the density of the solution and d₀ is the density of water (6).

^bΔN is the difference in refractive index between the denaturant solution and water (or buffer) at the sodium D line. The equation for urea solutions is based on data from Warren and Gordon (7), and the equation for GuHCl solutions is from Nozaki (8).

Registrierung der Signale (aus Spektroskopie, Hydrodynamik, Streuung etc.) der gefalteten und aufgefalteten Proteine



$\lambda_{\text{evaluation}} = ?$

Fig. 1. Intrinsic fluorescence emission spectra upon excitation at 278 nm for folded (—) and urea unfolded (---) RNase T1. (Figure supplied courtesy of Lanette Fee, Texas A&M University.)

Exakte Analyse einer Denaturierungskurve:
Annahme eines 2-Zustands-Mechanismus

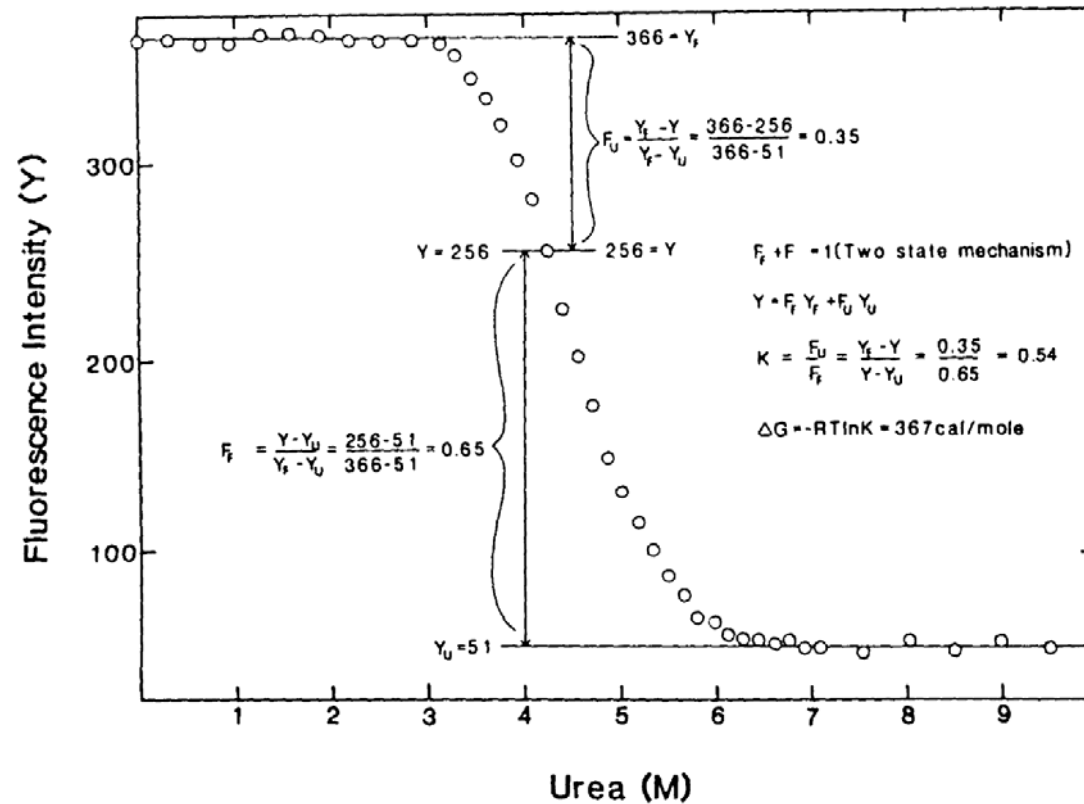


Fig. 2. The analysis of a urea denaturation curve of ribonuclease T1 (30 mM MOPS, pH 7.0, 25°C) assuming a two-state mechanism. The fluorescence intensity at 320 nm was measured after excitation at 278 nm. Reprinted with permission from ref. 11.

Bestimmung der Denaturierungskurve

Table 3
Determination of a Urea Denaturation Curve

Urea, mL ^a	Buffer, mL ^b	Protein, mL ^c	Urea, M ^d	y ^e
0.20	2.80	0.20	0.62	362
0.30	2.70	0.20	0.94	364
0.40	2.60	0.20	1.25	365
0.50	2.50	0.20	1.56	369
0.60	2.40	0.20	1.87	368
1.25	1.75	0.20	3.90	301
1.30	1.70	0.20	4.06	282
1.35	1.65	0.20	4.21	256
1.40	1.60	0.20	4.37	227
1.45	1.55	0.20	4.53	203
1.50	1.50	0.20	4.68	177
1.55	1.45	0.20	4.83	150
1.60	1.40	0.20	5.00	133
1.65	1.35	0.20	5.15	115
1.70	1.30	0.20	5.31	101
2.20	0.80	0.20	6.87	51
2.25	0.75	0.20	7.02	51
2.40	0.60	0.20	7.49	50
2.55	0.45	0.20	7.96	53
2.70	0.30	0.20	8.42	49

^a9.99M urea stock solution (30 mM MOPS, pH 7).

^bBuffer stock solution (30 mM MOPS, pH 7).

^c0.01 mg/mL ribonuclease T1 stock solution (30 mM MOPS, pH 7).

^dUrea molarity = [9.99][(mL urea)/(total volume of experimental solution in mL)].

^eFluorescence intensity (278 nm excitation, 320 nm emission) was measured with a Perkin-Elmer MPF 44B spectrofluorometer. Solutions were incubated at 25°C for 6 h before measurements were taken (12).

Analyse der Denaturierungskurve

Table 4
Analysis of a Urea Denaturation Curve

Urea, M	y ^a	f _U	K _U	ΔG _U , cal/mol ^b
3.90	301	0.21	0.26	800
4.06	282	0.27	0.36	600
4.21	256	0.35	0.53	370
4.37	227	0.44	0.79	140
4.53	203	0.52	1.08	-40
4.68	177	0.60	1.50	-240
4.83	150	0.69	2.19	-460
5.00	133	0.74	2.87	-620
5.15	115	0.79	3.93	-810
5.31	101	0.84	5.35	-990

^aThese data are the points in the transition region of Fig. 2. For each point, y_F = 366 and y_U = 51.

^bA least squares analysis of this data fit to Eq. 7 yields: ΔG(H₂O) = 5.7 kcal/mol, m = 1280 (cal/mol/M), and [urea]_{1/2} = 4.50M urea. These parameters describe the solid line in Fig. 3.

Variation von ΔG mit der Denaturierungsmittelkonz.

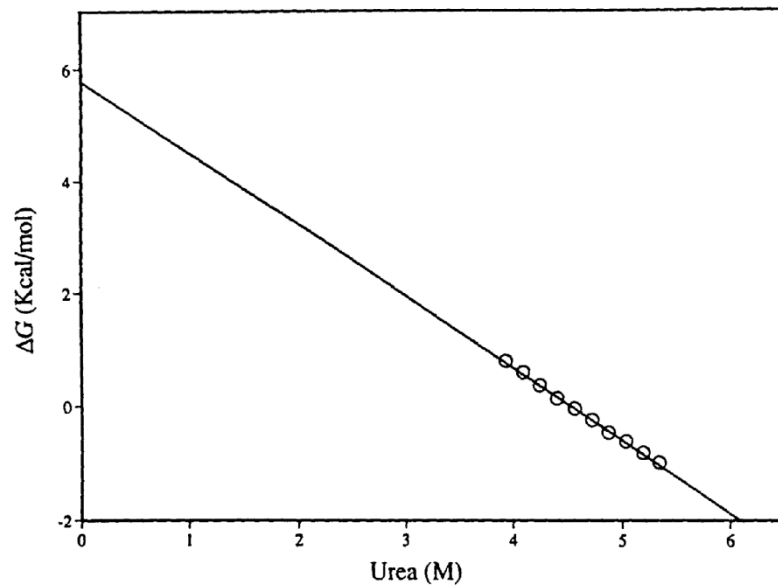


Fig. 3. The variation of ΔG_U with urea concentration for ribonuclease T1. The data points are from the transition region of Fig. 2 as analyzed in Table 4.

⇒ m

Anteil des aufgefalteten Proteins als Funktion der Denaturierungsmittelkonz.

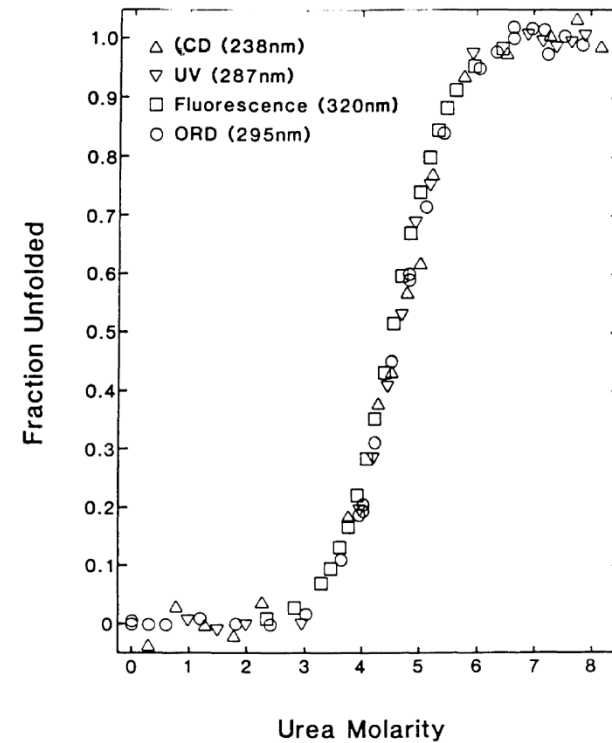
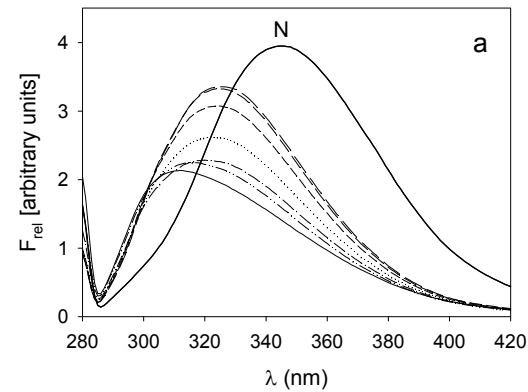
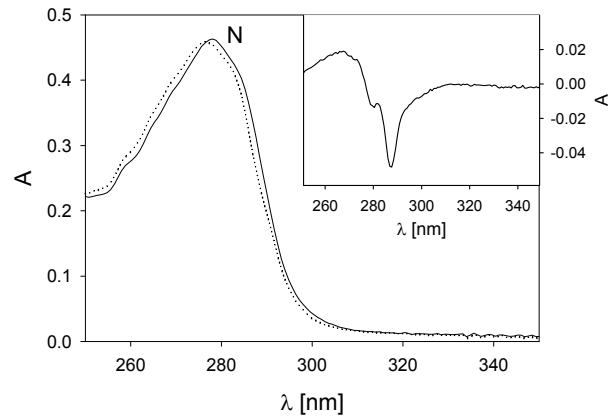


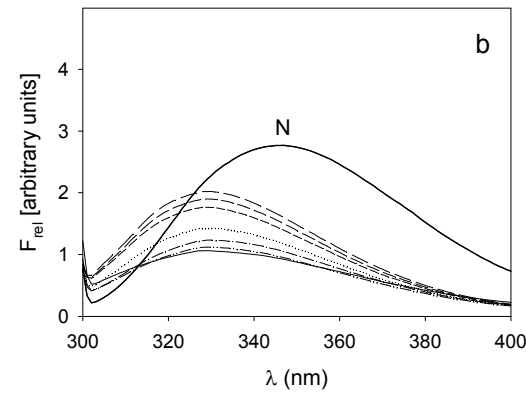
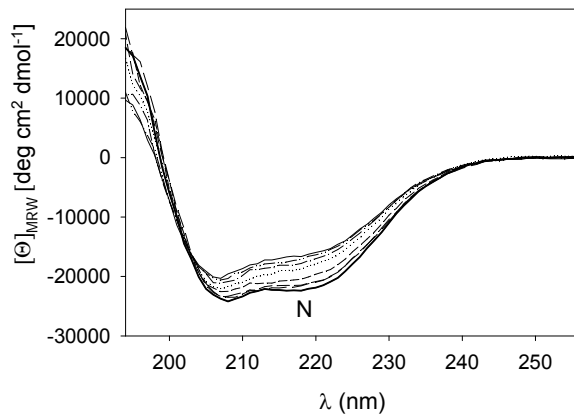
Fig. 4. Fraction unfolded ribonuclease T1 as a function of urea molarity from data obtained using the techniques indicated on the figure to follow unfolding. The fraction unfolded ribonuclease T1 was calculated using Eq. (4). Reprinted with permission from ref. 18.

ABSORPTION, FLUORESCENCE and CD SPECTRA

BSA and BSA-SDS complexes: 0-4 g/l SDS



$\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$
(excitation of Tyr and Trp)



$\lambda_{exc} = 295 \text{ nm}$
(excitation of Trp)

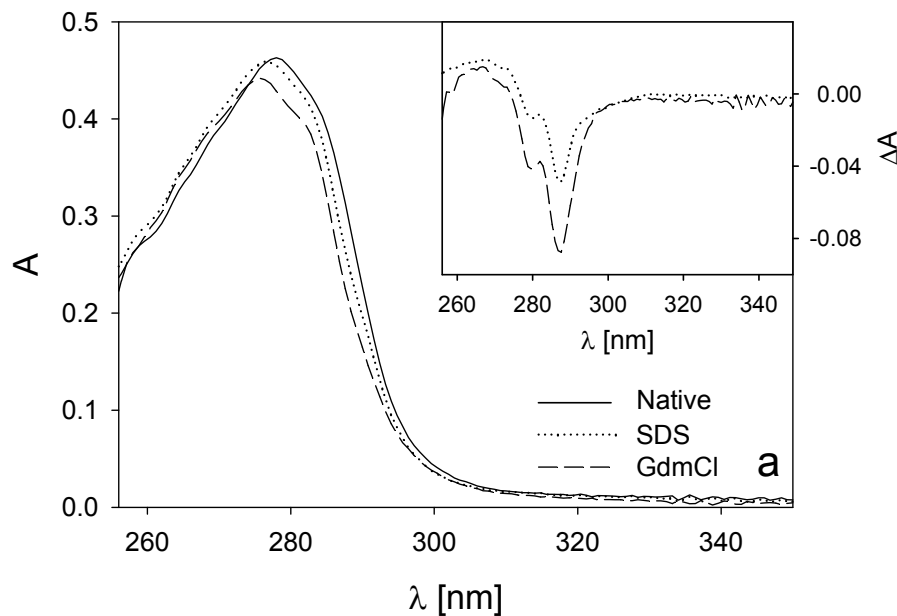
UV Absorption and CD

Fluorescence Emission

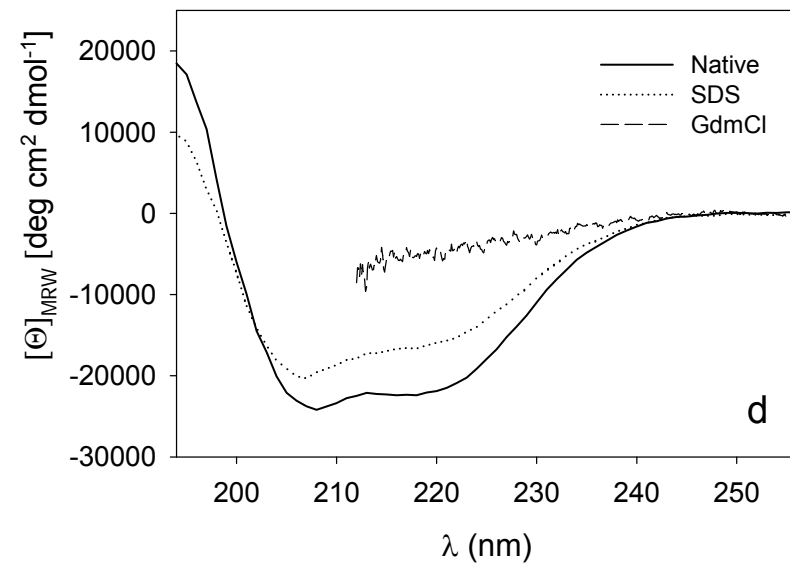
ABSORPTION and CD SPECTRA

BSA, + 6 M GdmCl, + 3 g/l SDS

Effects are more pronounced for GdmCl



UV Absorption

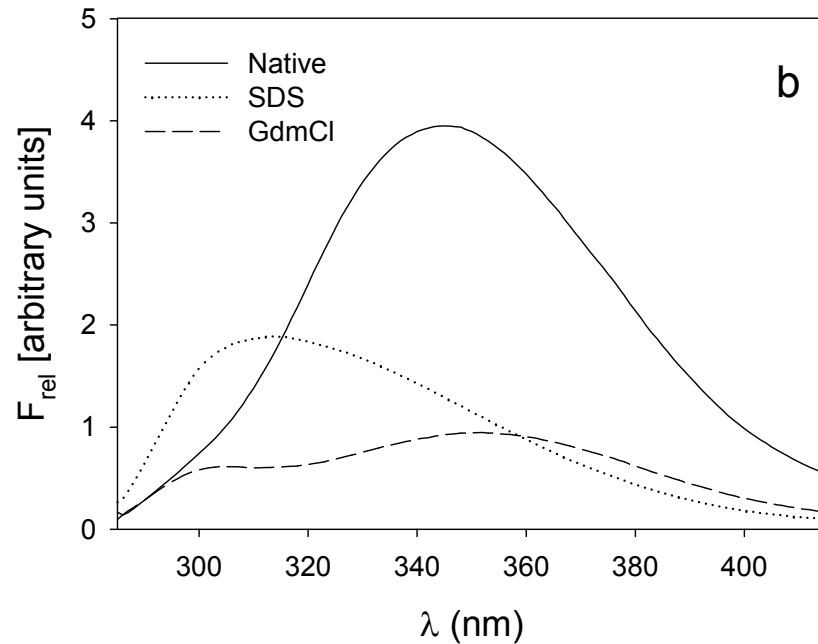


Far-UV CD

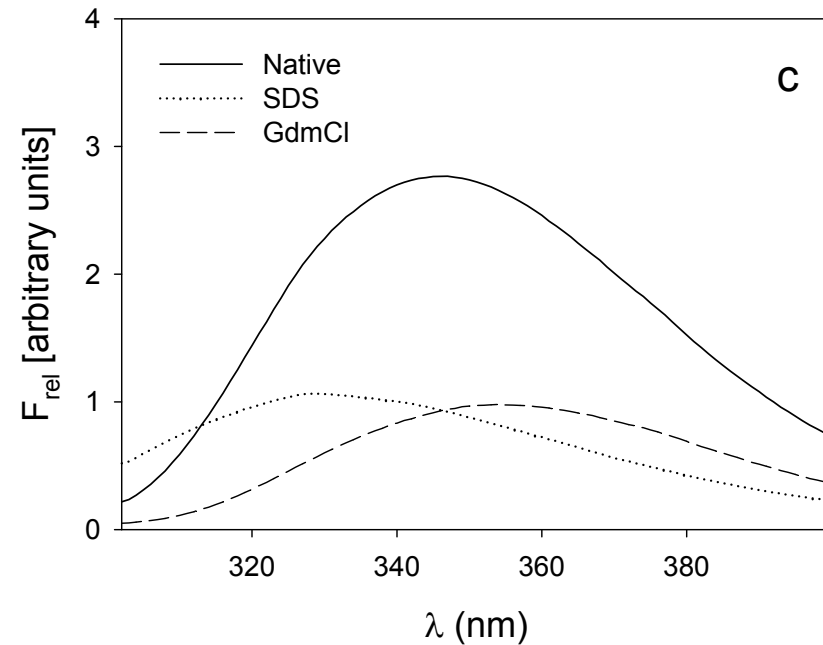
FLUORESCENCE EMISSION SPECTRA

BSA, + 6 M GdmCl, + 3 g/l SDS

Effects are more pronounced for GdmCl ?



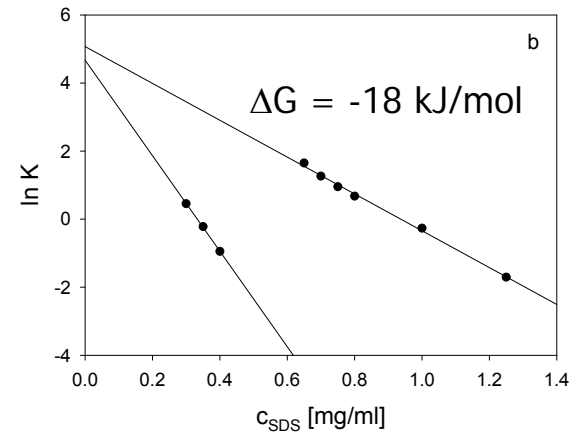
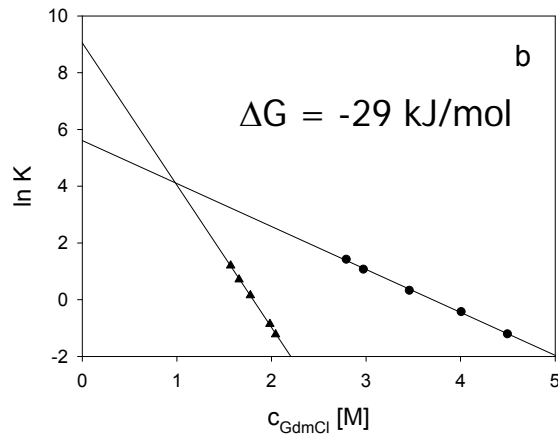
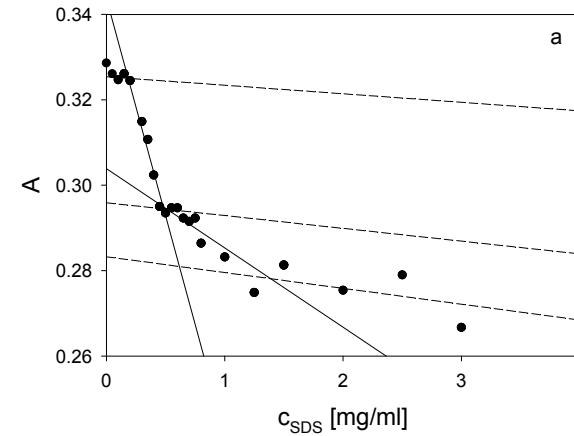
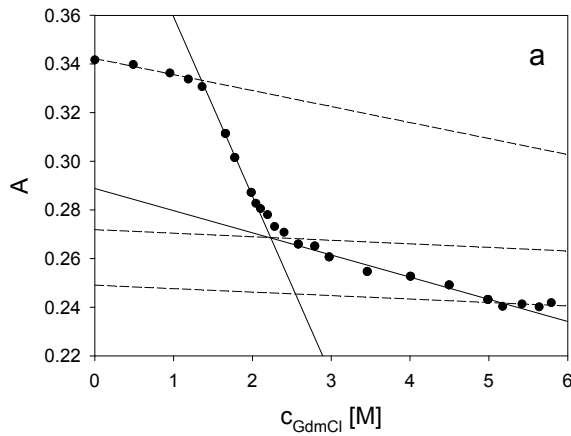
$$\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$$



$$\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$$

TRANSITION from Absorption: A at 287 nm

BSA, 0-6 M GdmCl or 0-4 g/l SDS; 3-state evaluation

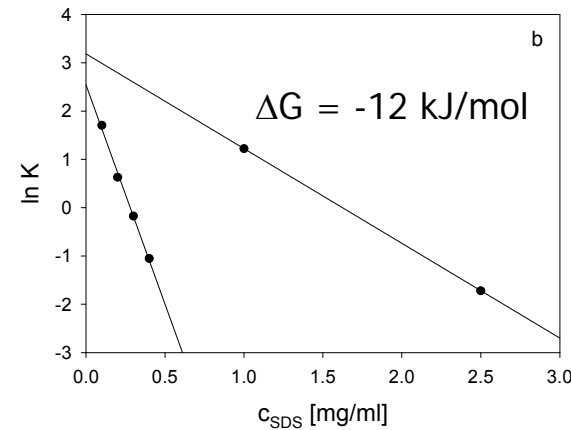
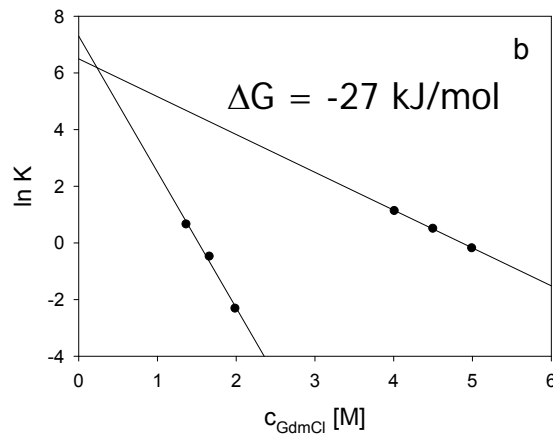
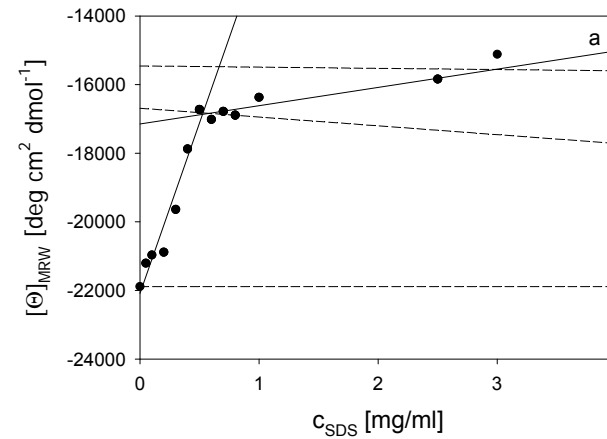
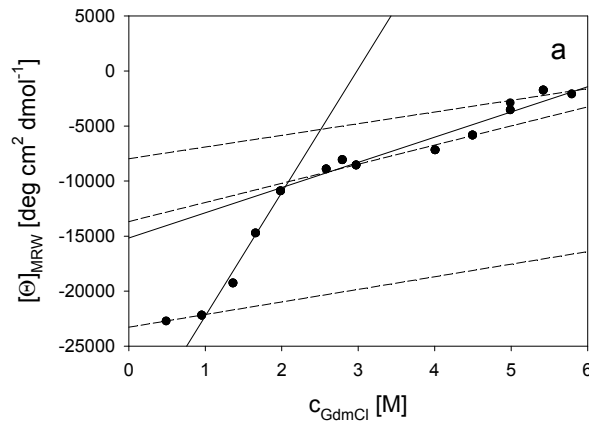


GdmCl

SDS

TRANSITION from CD: $[\Theta]$ at 220 nm

BSA, 0-6 M GdmCl or 0-4 g/l SDS; 3-state evaluation

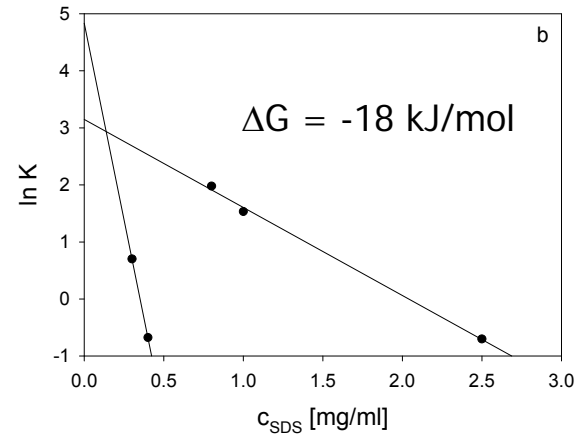
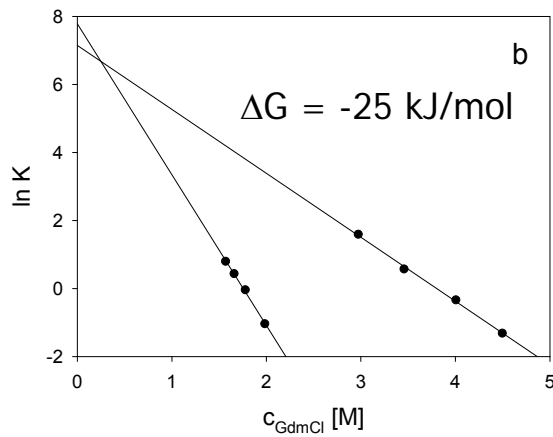
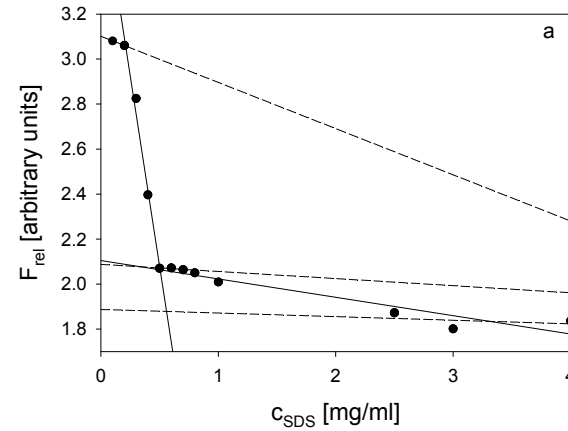
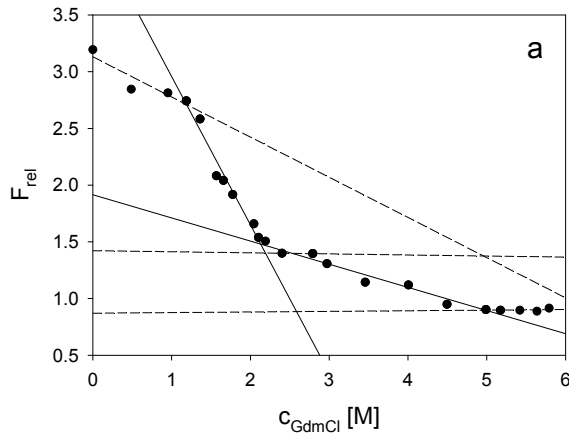


GdmCl

SDS

TRANSITION from Fluorescence: $\lambda_{exc}=280nm$, $\lambda_{em}=320nm$

BSA, 0-6 M GdmCl or 0-4 g/l SDS; 3-state evaluation

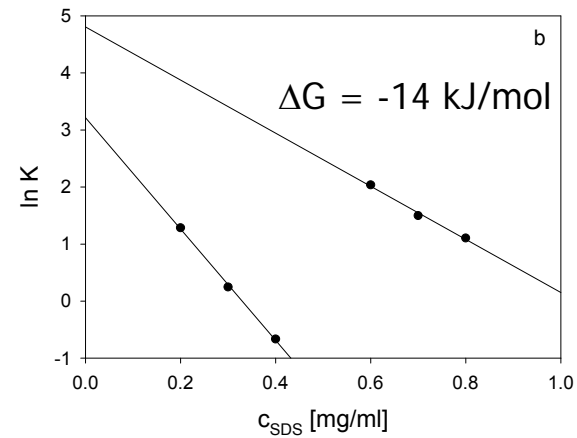
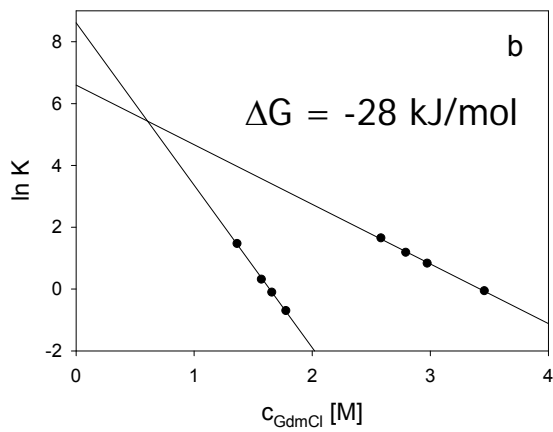
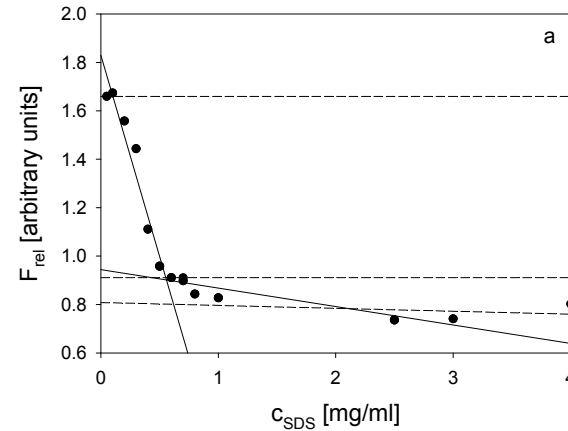
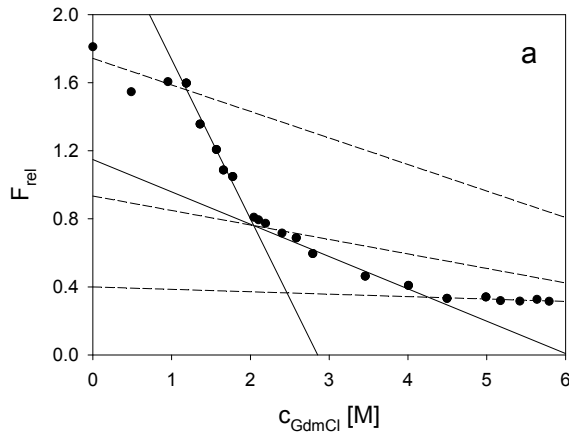


GdmCl

SDS

TRANSITION from Fluorescence: $\lambda_{exc} = \underline{295nm}$, $\lambda_{em} = \underline{320nm}$

BSA, 0-6 M GdmCl or 0-4 g/l SDS; 3-state evaluation



GdmCl

SDS

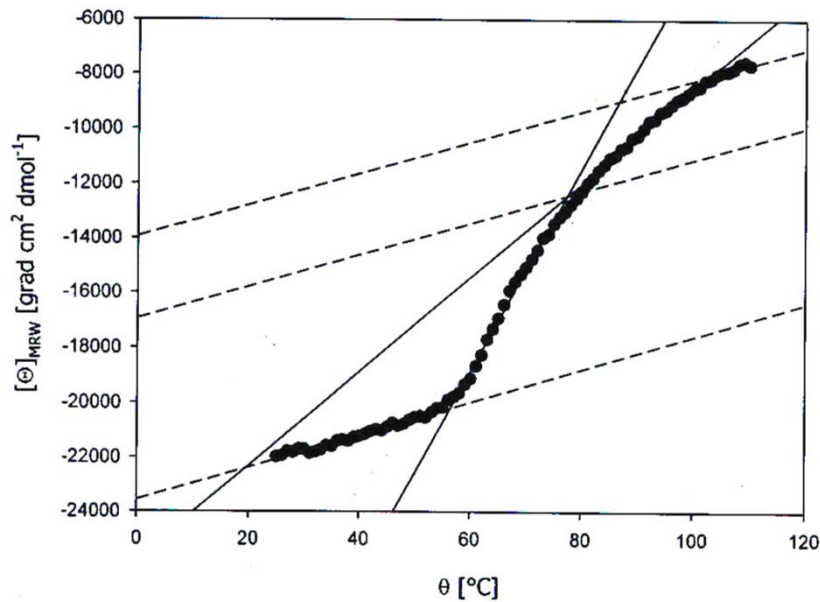
TRANSITION from CD: $[\Theta]$ at 220 nm

BSA, + heat; 3-state evaluation

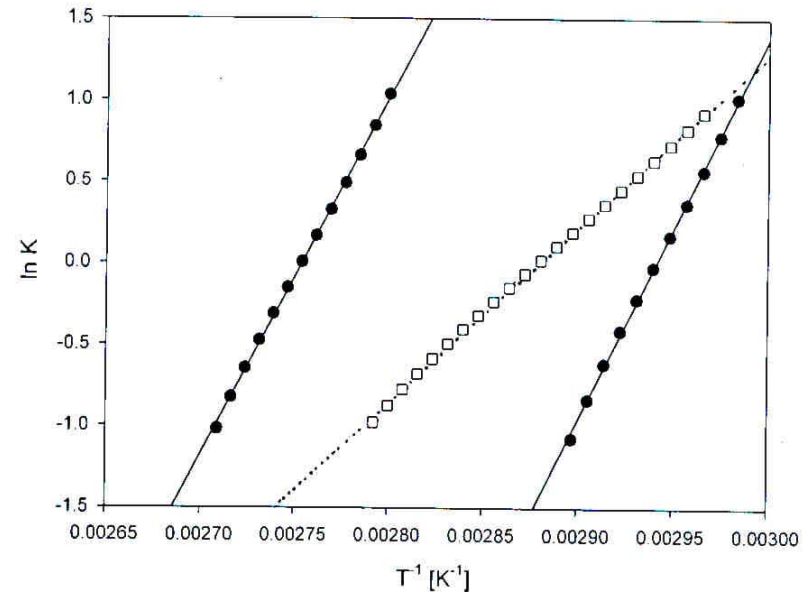
$$\Delta G = -30 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta H = -380 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta S = -1.2 \text{ kJ/(mol K)}$$



Transition curve

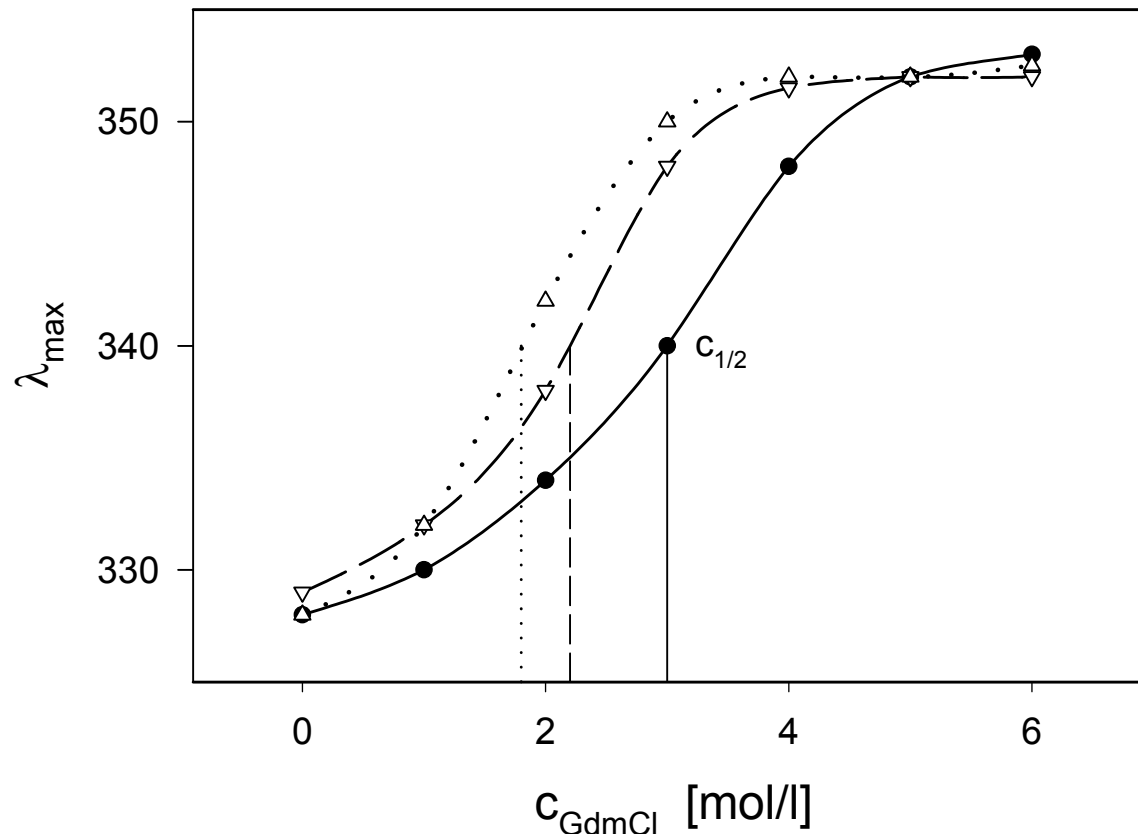


Calculation of ΔG

DENATURATION ANALYSIS

Maxima of fluorescence emission ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$)

X- and UV-irradiated CRYSTALLIN EXTRACT (CE)



$c = 0.1 \text{ g/l CE}$

— unirradiated

- - - X-irradiated
($D = 2 \text{ kGy}$)

..... UV exposure
(100 kJ m^{-2})

THERMODYNAMIC QUANTITIES (ΔG , $c_{1/2}$, $T_{1/2}$, m) obtained by SPECTROSCOPIC TECHNIQUES BSA, 2-state or 3-state evaluation

Type of denaturation	Technique	ΔG_1 (kJ/mol)	ΔG_2 (kJ/mol)	$\Sigma \Delta G$ (kJ/mol)	$(c \text{ or } T)_{1/2,1}$ (g/l, M, °C)	$(c \text{ or } T)_{1/2,2}$ (g/l, M, °C)	m_1 [1/(...)]	m_2 [1/(...)]
Heat	CD	-24.1	-5.5	-29.6	66.8 °C	90.0	23500	22000
GdmCl	UV	-24.4	-5.0	-29.4	1.8 M	4.1 M	5.4	1.1
	F280	-19.3	-5.4	-24.7	1.8 M	3.8 M	4.4	1.9
	F295	-21.3	-6.5	-27.8	1.6 M	3.4 M	5.3	1.9
	CD	-18.1	-9.3	-27.4	1.5 M	4.9 M	4.8	1.3
SDS	UV	-11.6	-6.1	-17.7	0.33 g/l	0.9 g/l	14.0	5.4
	F280	-12.0	-5.9	-17.9	0.35 g/l	2.0 g/l	13.8	1.5
	F295	-8.0	-5.5	-13.5	0.33 g/l	1.0 g/l	9.8	4.7
	CD	-6.3	-5.3	-11.6	0.28 g/l	1.6 g/l	9.1	2.0
Z3-10	F280			-6.4	0.66 g/l		3.9	
	F295			-4.8	0.63 g/l		3.1	

FREE ENERGY CHANGES (ΔG) obtained by SPECTROSCOPIC TECHNIQUES - Summary

characterizing the conformational stability of BSA after preceding addition of additives at 25 °C, together with the results for heat denaturation

Technique	Approach	Type of denaturation	ΔG (kJ/mol)
Various techniques		None	- 30 to - 39
CD	$[\Theta]_{MRW}$ at 220 nm	Heat	- 29.6
UV Absorption	A at 287 nm	GdmCl	- 29.4
Fluorescence	$\lambda_{exc} = 280$ or 295 nm, $\lambda_{em} = 320$ nm	GdmCl	- 24.7 to - 27.8
CD	$[\Theta]_{MRW}$ at 220 nm	GdmCl	- 27.4
UV Absorption	A at 287 nm	SDS	- 17.7
Fluorescence	$\lambda_{exc} = 280$ or 295 nm, $\lambda_{em} = 320$ nm	SDS	- 13.5 to - 17.9
CD	$[\Theta]_{MRW}$ at 220 nm	SDS	- 11.6
Fluorescence	$\lambda_{exc} = 280$ or 295 nm, $\lambda_{em} = 320$ nm	C14TMABr	- 3.9 to - 14.0
CD	$[\Theta]_{MRW}$ at 220 nm	C14TMABr	- 6.8
Fluorescence	$\lambda_{exc} = 280$ or 295 nm, $\lambda_{em} = 320$ nm	Z3-10	- 4.8 to - 6.4

Ergänzende hydrodynamische Untersuchungen: analytische Ultrazentrifugation (AUC)**HIGH-SPEED SEDIMENTATION EQUILIBRIUM****Molar masses of proteins and amount of ligand binding**

Dialyzed samples: → masses of ligand-free proteins (M)
(e.g., protein + 6 M GdmCl)

$$M = \frac{2RT}{(1 - v'_s \rho_s) \cdot \omega^2} \cdot \frac{d \ln c}{dr^2}$$

Undialyzed samples: → masses of protein-ligand complexes (M_c)
(e.g., protein + 0-3 g/l SDS, δ_1 = ligand)

$$M_c = \frac{2RT}{(1 - \bar{v}_c \rho) \cdot \omega^2} \cdot \frac{d \ln c}{dr^2}$$

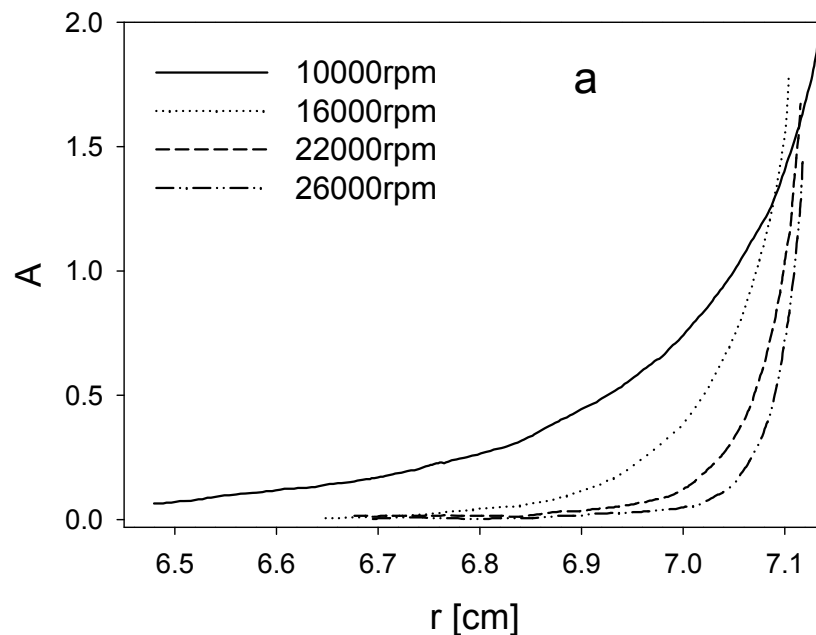
$$M_c = M \cdot (1 + \delta_1)$$

$$\bar{v}_c = \frac{\bar{v} + \delta_1 \bar{v}_1}{1 + \delta_1}$$

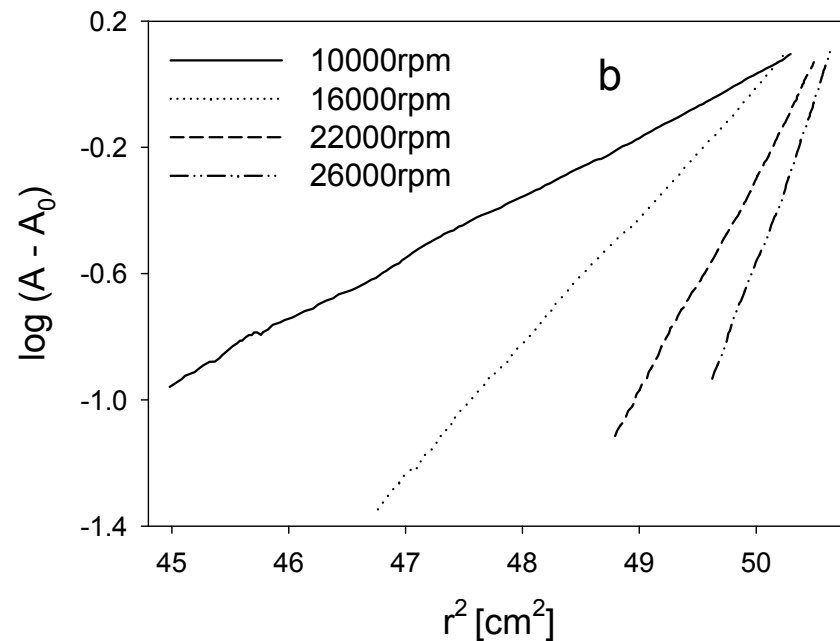
HIGH-SPEED SEDIMENTATION EQUILIBRIUM

**Molar masses of native BSA at different rotor speeds;
slopes proportional to M and buoyancy term and ω^2**

AUC conditions: 10,000-26,000 rpm; $\lambda = 230-295$ nm, AF = 1-4



Original data: A vs. r

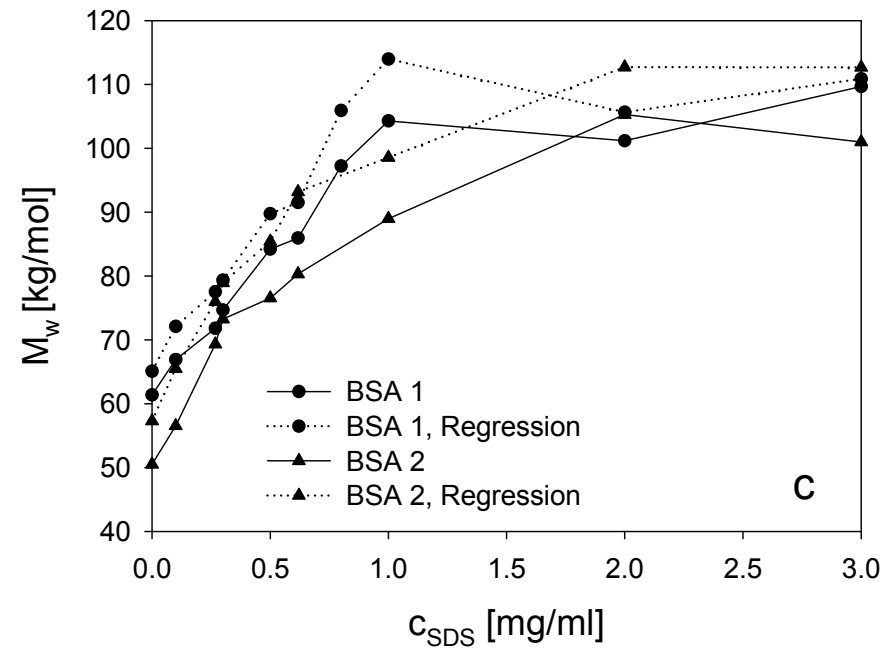
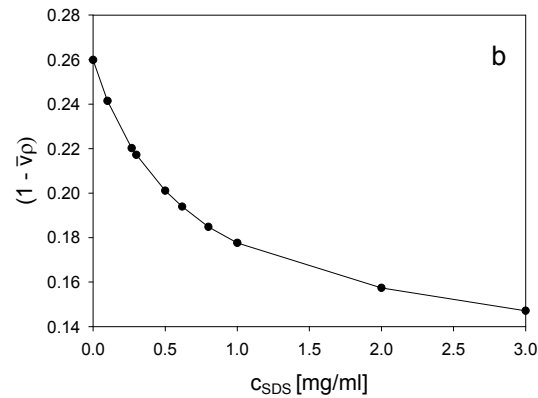
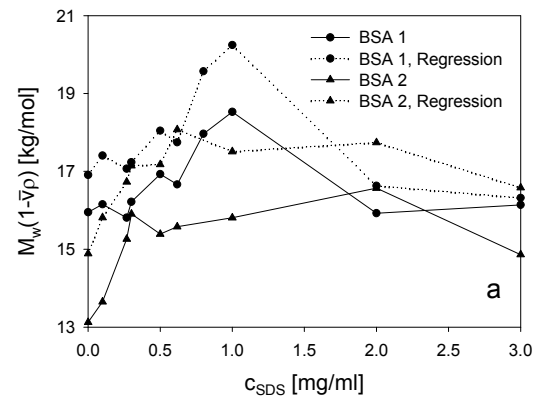


Evaluation of M: $\log A$ vs. r^2

HIGH-SPEED SEDIMENTATION EQUILIBRIUM

Molar masses of BSA-SDS complexes

AUC conditions: average over all conditions used (rpm, λ , AF)

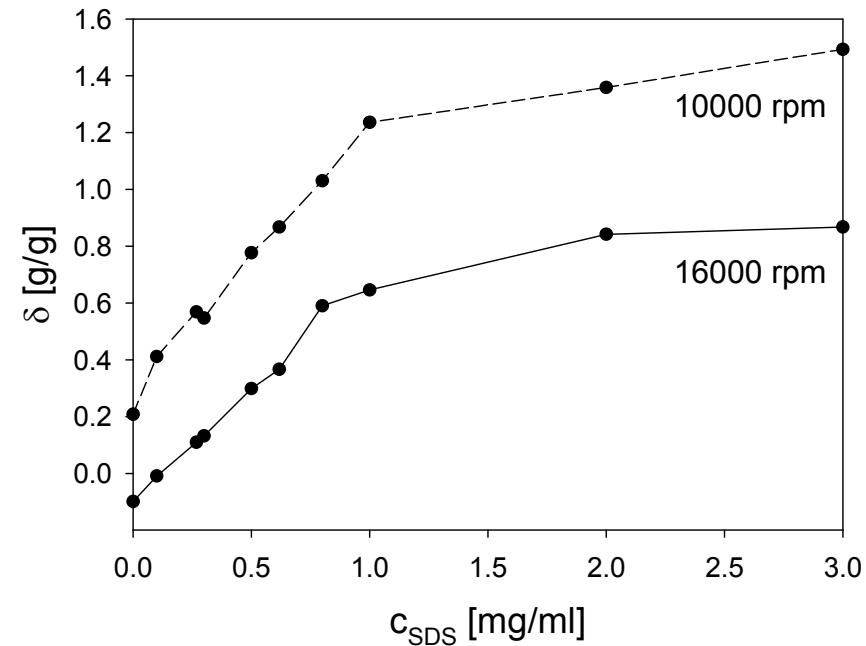
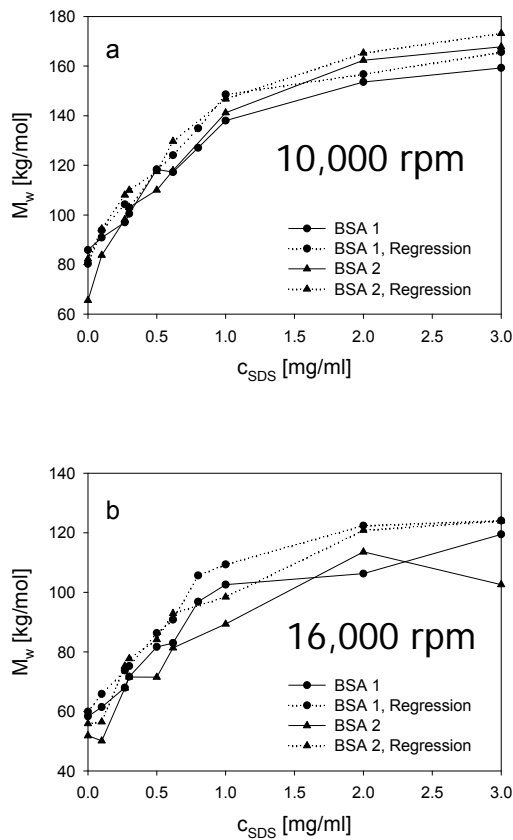


→ molar mass weight averages

HIGH-SPEED SEDIMENTATION EQUILIBRIUM

Molar masses of BSA-SDS complexes and binding isotherms

AUC conditions: 10,000 and 16,000 rpm, average over (λ , AF)



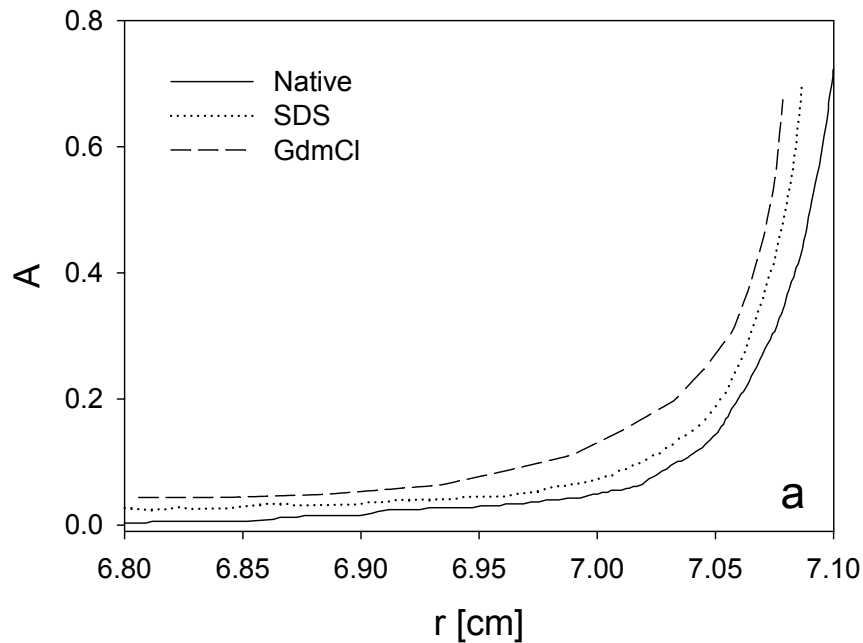
→ binding isotherms

HIGH-SPEED SEDIMENTATION EQUILIBRIUM

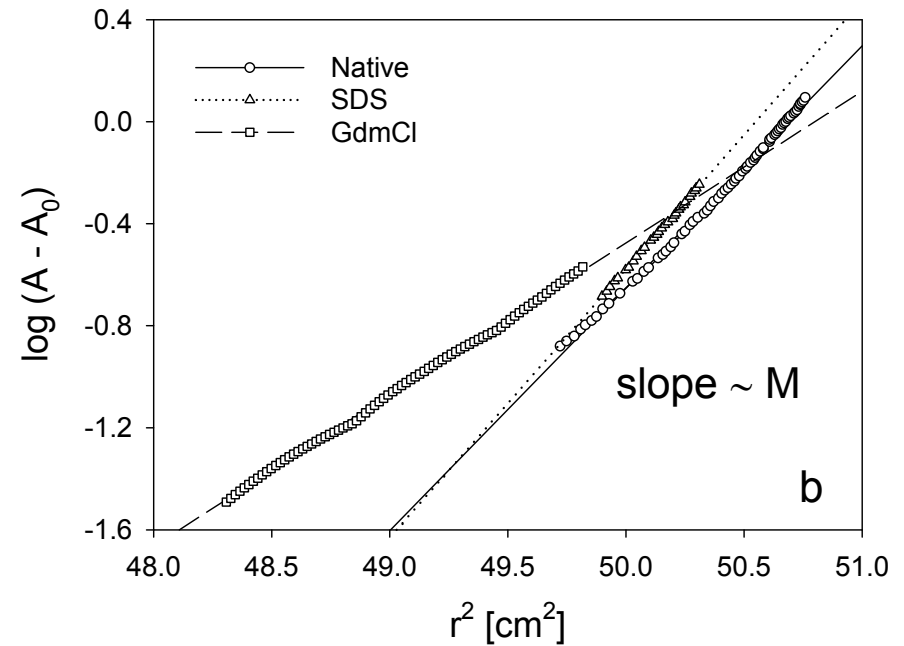
Molar masses of proteins and protein-ligand complexes

BSA, + 6 M GdmCl, + 3 g/l SDS

AUC conditions: 26,000 rpm; $\lambda = 280 \text{ nm}$, $AF = 1$



Original data: A vs. r

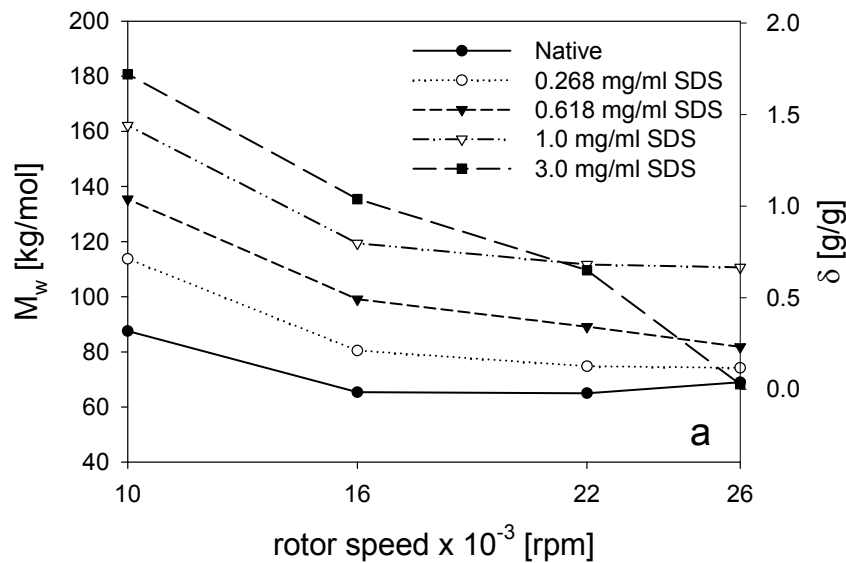


Evaluation of M : $\log A$ vs. r^2

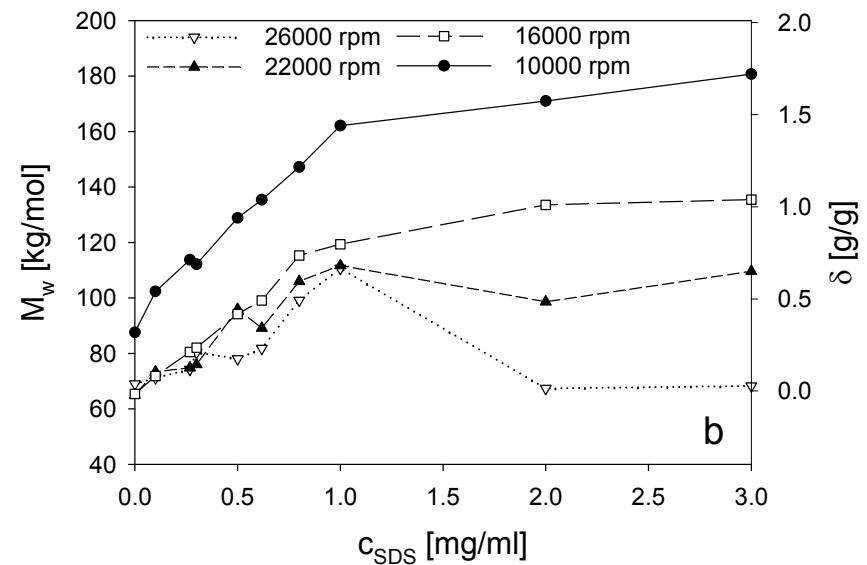
HIGH-SPEED SEDIMENTATION EQUILIBRIUM

Molar masses of protein-detergent complexes and amount of detergent binding: **BSA + 0-3 g/l SDS**

AUC conditions: 10,000-26,000 rpm, $\lambda = 230, 280, 295 \text{ nm}$, $AF = 1-4$



M_w vs. rpm



M_w vs. c (SDS)

HIGH-SPEED SEDIMENTATION EQUILIBRIUM

Molar masses of proteins and amount of detergent binding BSA, + 6 M GdmCl, + 0-3 g/l SDS

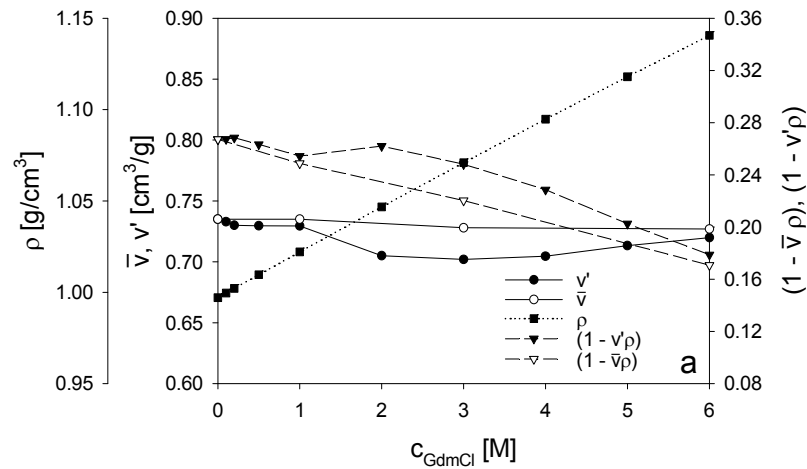
Additive	Protein	Solvent	Ultracentrifugation					
			c_3 [M or g/l]	\bar{v}_2 or ϕ'_2 [cm ³ /g]	ρ [g/cm ³]	Rotor speed [rpm × 10 ⁻³]	M_w [kg/mol]	δ [g/g]
					DE	RA	DE	RA
None	0.735 (\bar{v}_2, ϕ'_2)	1.0074	26	61.7	69.0			
6 M GdmCl	0.720 (ϕ'_2)	1.1411	26	64.5	68.3			
None	0.735 (\bar{v}_2, ϕ'_2)	1.0074	16	71.0	65.3			
0.100 g/l SDS	0.753 ($\bar{v}_{2,calc}$)	1.0074	16	74.8	71.8	0.126	0.081	
0.268 g/l SDS	0.774 ($\bar{v}_{2,calc}$)	1.0074	16	82.7	80.5	0.245	0.211	
0.300 g/l SDS	0.777 ($\bar{v}_{2,calc}$)	1.0075	16	87.2	82.1	0.312	0.236	
0.500 g/l SDS	0.793 ($\bar{v}_{2,calc}$)	1.0075	16	99.4	94.1	0.497	0.417	
0.618 g/l SDS	0.800 ($\bar{v}_{2,calc}$)	1.0076	16	101.0	99.1	0.520	0.492	
0.800 g/l SDS	0.809 ($\bar{v}_{2,calc}$)	1.0077	16	117.9	115.3	0.774	0.735	
1.000 g/l SDS	0.816 ($\bar{v}_{2,calc}$)	1.0078	16	124.9	119.4	0.880	0.797	
2.000 g/l SDS	0.836 ($\bar{v}_{2,calc}$)	1.0079	16	129.3	133.6	0.947	1.011	
3.000 g/l SDS	0.846 ($\bar{v}_{2,calc}$)	1.0081	16	145.4	135.4	1.189	1.039	

CORRELATION between HYDRODYNAMIC DATA

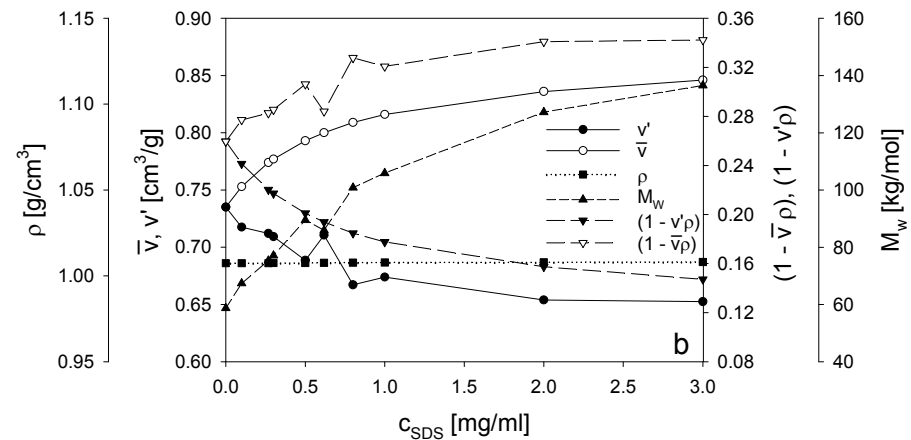
Isopotential specific volume, partial specific volume, solvent density,

buoyancy, molar mass: BSA, 0-6 M GdmCl, 0-3 g/l SDS

Densimetry, analytical ultracentrifugation (HSSE)



GdmCl

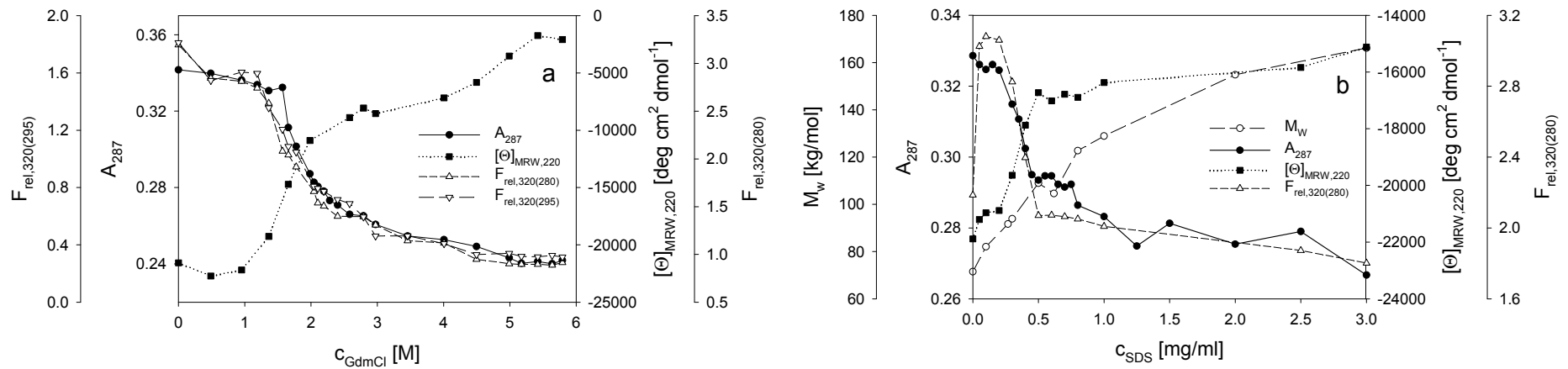


SDS

CORRELATION between SPECTROSCOPIC and HYDRODYNAMIC DATA

A at 287 nm, F_{rel} at $\lambda_{em} = 320$ nm ($\lambda_{exc} = 280$ or 295 nm), $[\Theta]_{MRW}$ at 220 nm, molar mass: BSA, 0-6 M GdmCl, 0-3 g/l SDS

Absorption, fluorescence emission, CD, HSSE



GdmCl

SDS

LITERATUR: Thermodynamik

Thermodynamik:

- Hammes: Thermodynamics and Kinetics for the Biological Sciences
- Haynie: Biological Thermodynamics
- **Holtzhauer: Methoden in der Proteinanalytik** ←
- **Jones: Biochemical Thermodynamics, 2nd ed.** ←
- **Serdyuk et al.: Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function (2007)** ←
- **Van Holde et al.: Principles of Physical Biochemistry (1998)** ←
- Winter & Noll: Methoden der Biophysikalischen Chemie

Struktur und Stabilität:

- Creighton: Proteins
- Creighton: Protein Structure: A Practical Approach
- Harding & Chowdhry: Protein-Ligand Interactions: A Practical Approach
- Hinz: Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology ←
- Pace: Methods in Enzymology, Vol. 131
- Pace et al.: in: Protein Structure: A Practical Approach ←
- Pfeil: Protein Stability and Folding: A Collection of Thermodynamic Data
- Privalov: J.Mol.Biol. 226(1992)491
- Shirley: in: Methods in Molecular Biology, Vol. 40 ←
- Shriver: Protein Structure, Stability, and Interactions ←
- Tiefenbach, Durchschlag & Jaenicke: Prog. Colloid Polym. Sci. 127(2004)136

INTERMOLEKULARE WECHSELWIRKUNGSKRÄFTE

Während **kovalente Bindungskräfte** (Bindungsenergien etwa zw. 200 und 500 kJ/mol) für den Zusammenhalt der Monomerbausteine (z.B. der AA in einer Proteinkette) verantwortlich sind, hängt die räumliche Struktur biologischer MM wesentlich von den **nichtkovalenten Bindungskräften** ab (**Ionenbindung, van-der-Waals-Bindung, H-Brücken-Bindung**); diese 3 Bindungstypen unterscheiden sich in ihrer Bindungsstärke und Spezifität; sie werden durch Wasser als LM unterschiedlich stark beeinflusst.

Tabelle I.1:
Größen verschiedener Wechselwirkungsenergien.

Art der Wechselwirkung	Stärke der Wechselwirkung/ kJ·mol ⁻¹	Beispiel
kovalent	200-500	H-CH ₃ ; 435 kJ·mol ⁻¹
ionisch	10-30	1 M NaCl-Lösung
van-der-WAALS	1-4	Ar ... Ar
Wasserstoffbrücken	10-30	H ₃ C-CH ₂ OH...OH ₂

Ionenbindung

Entgegengesetzt geladene Moleküle oder Molekülgruppen ziehen sich gegenseitig an (z.B. eine neg. geladene Carboxylgr. und eine pos. geladene, protonierte Amidgr.).

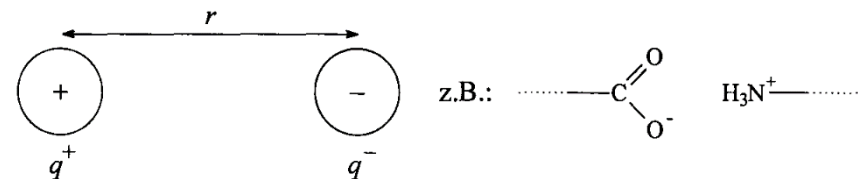


Abb. I.1:
Elektrostatische Wechselwirkung zwischen ungleichnamig geladenen Gruppen.

Eine solche elektrostatische Anziehung besitzt nach dem Coulomb'schen Gesetz die WW-Energie:

$$E_{\text{Coul}} = \frac{q^+ \cdot q^-}{\epsilon_0 \epsilon_r r}$$

wobei q_+ und q_- die Ladungen der beiden Gruppen, r ihr Abstand voneinander, ϵ_0 die elektr. Feldkonstante und ϵ_r die relative Dielektrizitätskonstante (Dielektrizitätszahl) des umgebenden Mediums sind.

Biol. Vorgänge laufen in wässrigem Medium ab. Aufgrund des hohen ϵ_r -Wertes von Wasser ($\epsilon_r = 78.5$ bei 25°C) (Beachte: ϵ_r steht im Nenner!) wird die elektrostatische Anziehung drastisch abgeschwächt, so dass ionische Bindungsenergien in Wasser klein sind (nur **zw. 10 und 30 kJ/mol** liegen). Innerhalb von Proteinen ist ϵ_r klein ($\epsilon_r \approx 4$), so dass elektrostatische WW-Kräfte groß sind!

Van-der-Waals-Bindung

In einem Abstandsbereich von etwa 0.3-0.4 nm (atomare Größenordnung) werden vdW-Kräfte wirksam. Obwohl viele Atome kein permanentes Dipolmoment besitzen, so fluktuiert doch die Verteilung ihrer Elektronendichte mit der Zeit; es entsteht ein momentanes elektr. Dipolmoment, das kurzfristig eine Asymmetrie der El. Verteilung der Nachbaratome induziert.

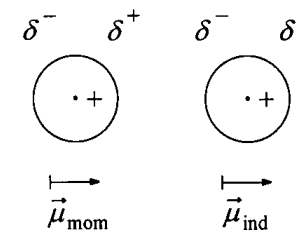


Abb. I.2:

Darstellung zweier Argonatome mit unsymmetrischer Ladungsverteilung. Zur Verdeutlichung der Asymmetrie der Elektronenverteilung ist diese so dargestellt, daß der Schwerpunkt der Elektronenhülle (•) und der Atomkern (+) sich nicht an derselben Stelle im Raum befinden. Dies führt zu einer partiellen Ladungstrennung (δ^+ , δ^-) und dadurch zu den beiden Dipolmomenten $\vec{\mu}_{\text{mom}}$ und $\vec{\mu}_{\text{ind}}$.

Dadurch kommt es zu einer anziehenden WW von momentanem und induziertem elektr. Dipol; ihre Stärke hängt von der Polarisierbarkeit α und dem Abstand r der wechselwirkenden Atome 1 und 2 ab:

$$E_{\text{vdW}} \propto \frac{\alpha_1 \cdot \alpha_2}{r^6}$$

Die vdW-Anziehungskräfte zw. 2 Atomen nehmen also bei Annäherung der Atome **stark zu**; wenn sich die El.-Wolken schließlich überlappen, stoßen sie sich ab (Pauli-Prinzip). Die Energie der vdW-Bindung liegt bei etwa **1-4 kJ/mol** (entsprechend etwa der mittleren thermischen Energie bei RT (2.5 kJ/mol bei 25°C), ist demnach aber beträchtlich kleiner als die ionischer Bindungen!

vdW-Kräfte spielen immer dann eine wesentliche Rolle, wenn viele Atome in einem Molekül gleichzeitig mit vielen Nachbaratomen wechselwirken (z.B. bei dichtgepackten langen Kohlenwasserstoffketten). Dies geschieht jedoch nur dann, wenn die beiden Moleküle in ihrer Konformation zusammenpassen.

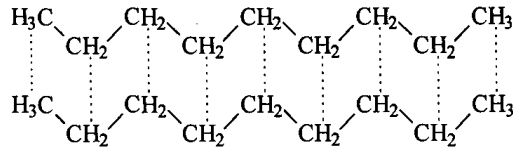


Abb. I.4:
Ein langes, gesättigtes Kohlenwasserstoffmolekül kann über viele Kettenglieder mit einem Nachbarmolekül van-der-WAALS-Bindungen eingehen, wie es hier für n-Nonan dargestellt ist.

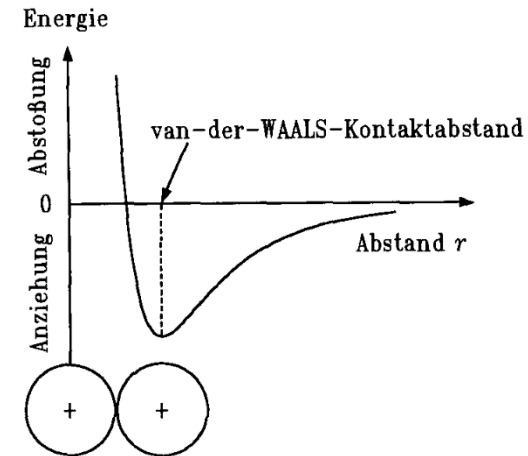


Abb. I.3:
Van-der-WAALS-Wechselwirkungsenergie als Funktion des Abstands r zweier Atome. Die stärkste Anziehung beider Atome erfolgt beim Kontaktabstand.

H-Brücken-Bindungen

Auch H-Brücken basieren im Wesentlichen auf elektrost. WW; sie entstehen zw. ungeladenen oder geladenen protonenhaltigen Molekülen. Dabei teilen sich jeweils 2 benachbarte Atome ein H-Atom. Die Bindungsenergien reichen von etwa **10-30 kJ/mol** (in Extremfällen bis über 100 kJ/mol). Ein wesentl. Unterschied zu den bisher erwähnten, nicht-kovalenten Bindungsarten liegt in ihrer Richtungscharakteristik: Die stärkste Bindung liegt vor, wenn Donor- und Akzeptor-H-Atom auf einer Linie angeordnet sind (z.B. im HF_2^- -Ion).

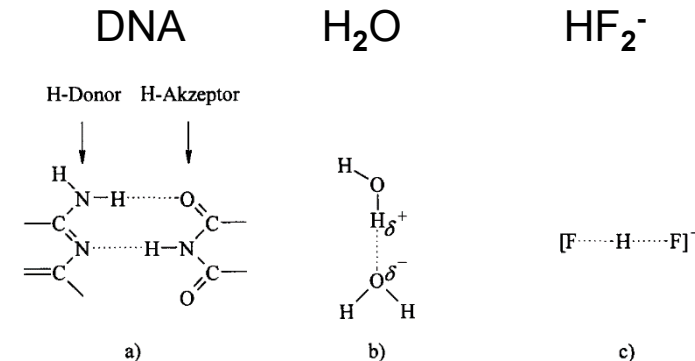


Abb. I.5:
Beispiele für Wasserstoffbrückenbindungen, wie sie in a) DNA, b) Wasser und c) im HF_2^- -Ion vorliegen.

H-Brücken-Bindungen besitzen in biologischen Systemen eine herausragende

Bedeutung: Stabilisierung der (i) α -Helix in Proteinen (H-Brücken zw. Amid- und Carboxylgruppen) und (ii) der beiden Ketten der DNA-Doppelhelix (H-Brücken zw. Nukleotidbasen der beiden Ketten); (iii) Wasser selbst ist das Paradebeispiel für die Ausbildung von H-Brücken-Bindungen.

Wasser

Da die Struktur biol. MM auch von ihrem LM, also Wasser, abhängt, sind dessen physikal.-chem. Eigenschaften von bes. Bedeutung.

Wasser ist ein gewinkeltes Molekül, das stark polaren Charakter (gr. Elektronegativitätsdifferenz zw. H und O; nach Pauling: 2.20 für H und 3.44 für O) und damit ein großes elektr. Dipolmoment hat.

Wasser bildet in festem Zustand eine Struktur mit einer maximalen Anzahl von H-Brücken aus. In der normalen hexagonalen Eisstruktur ist jedes Wassermolekül von 4 Nachbarmolekülen umgeben (Koordinationszahl 4), zu denen es H-Brücken ausbildet (2 als Donor, 2 als Akzeptor).

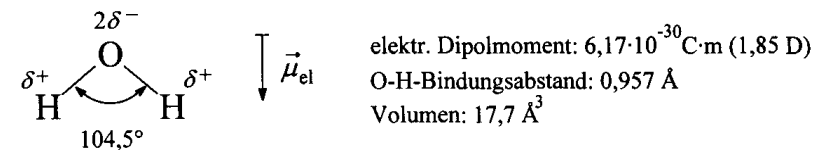


Abb. I.6: Schematische Darstellung eines Wassermoleküls und seines permanenten elektrischen Dipolmoments $\vec{\mu}_{el}$ (1 D (Debye) = $3,336 \cdot 10^{-30} \text{ C} \cdot \text{m}$).

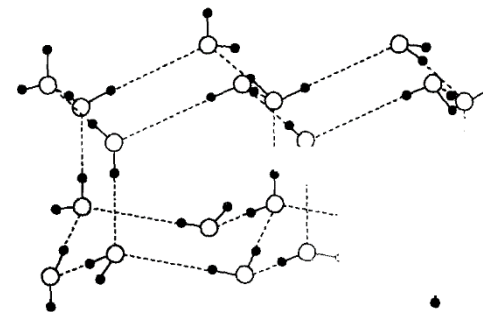


Abb. I.7: Die Struktur von hexagonalem Eis, welches sich bei 273 K bildet. Sauerstoffatome sind als offene, Wasserstoffatome als ausgefüllte Kreise dargestellt. Kovalente Bindungen sind als durchgezogene Linien, Wasserstoffbrückenbindungen als gestrichelte Linien symbolisiert (Donor-Akzeptor-Abstand $2,76 \text{ \AA}$, Bindungsenergie ca. $20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Die Struktur flüssigen Wassers ist wesentlich komplexer. Wasser besitzt bei RT eine um 9% höhere Dichte als Eis. Die mittlere Anzahl nächster Nachbarn ist etwa 4.5 (Röntgen- und Neutronenstreuexperimente), der mittlere Abstand nächster Nachbarn ist um etwa 0.01 nm größer als im Eis. Isolierte Wassermoleküle (d.h. Wassermoleküle ohne H-Brücken) oder isolierte Wassercluster existieren in flüssiger Phase nicht! Die H-Brücken-Bindungen bleiben bei RT großteils (ca. 80 %) erhalten (Lebensdauer: ps).

Flüssiges Wasser lässt sich durch eine ungeordnete, dreidimensionale, wasserstoffverbrückte Netzwerkstruktur beschreiben, die eine lokale Präferenz für tetraedrische Symmetrie besitzt, statistisch aber auch viele gebrochene H-Brücken-Bindungen aufweist. Durch diese partielle Netzwerkstruktur wird ein **sehr schneller Transport der H⁺- und OH⁻-Ionen in Wasser** möglich (Grotthuß-Mechanismus); ihre Beweglichkeiten sind um etwa 1 Größenordnung größer als die anderer Ionen!

Aufgrund seines **polaren Charakters** ist Wasser ein ausgezeichnetes LM für polare und ionische Moleküle; es schwächt die zw. polaren Molekülen bestehenden elektrostatische Bindungen gegenüber dem Zustand im Vakuum drastisch ab (Faktor 78.5 bei RT, was dem Wert seiner Dielektrizitätszahl entspricht).

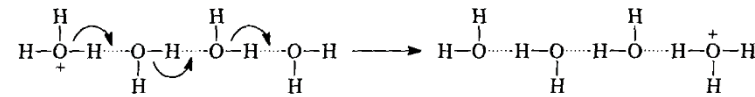


Abb. I.8:

Protonentransport in Wasser. Anstelle des Transports eines einzelnen hydratisierten Protons erfolgt die effektive Bewegung eines Protons durch Umlagerung von Bindungen entlang einer langen Kette von Wassermolekülen. Dadurch kann die hohe Beweglichkeit von Protonen in Wasser erklärt werden. Den Transport von Hydroxidionen hat man sich analog vorzustellen.

Tabelle I.2:

Ionenbeweglichkeiten in Wasser bei 298 K.

$\mu_{\text{ion}}/10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$			
→ H ⁺	36,23	OH ⁻	20,64 ←
Na ⁺	5,19	Cl ⁻	7,91
K ⁺	7,62	Br ⁻	8,09
Zn ²⁺	5,47	SO ₄ ²⁻	8,29

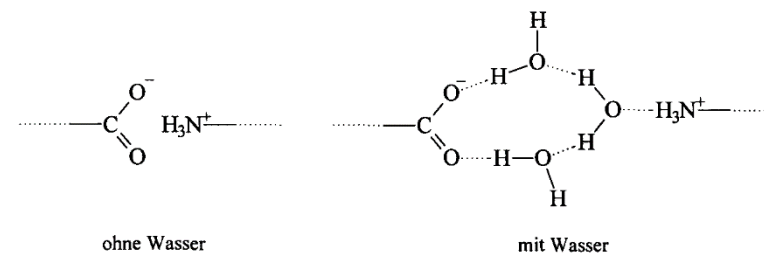


Abb. I.9:

Wassermoleküle schwächen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen aufgrund ihrer Polarität und der Fähigkeit, gerichtete Lösungsmittelhüllen um Ionen auszubilden.

Der hydrophobe Effekt

Für die Existenz von Leben ist essentiell, dass sich polare oder geladene Moleküle (wie KHe und Proteine) in Wasser lösen, diffundieren und dadurch in Kontakt treten können. Die Fähigkeit des Wassers, gerichtete LM-Hüllen ('Hydrathüllen') ausbilden zu können, ist jedoch ebenfalls von zentraler Bedeutung). Sie ist die Grundlage des sog. **'hydrophoben Effekts'**. Darunter versteht man das Phänomen, dass unpolare Moleküle (wie z.B. Kohlenwasserstoffe) dazu neigen, sich in Wasser zu größeren Aggregaten zusammenzulagern.

Bringt man z.B. ein Methan- oder Ethanmolekül in Wasser, so orientieren sich die Wassermoleküle unter Bildung einer maximalen Zahl von H-Brückenbindungen um dieses unpolare Teilchen. Die Ausbildung dieser geordneten Wasserstruktur ist mit einer **Entropie-Abnahme des Wassers** verbunden (also ein ungünstiger Prozess). Das Einbringen eines weiteren Methan- oder Ethanmoleküls führt dann allerdings nicht zur Bildung eines 2. Käfigs, sondern die beiden unpolaren Teilchen lagern sich in einem einzigen Wasserkäfig zusammen. Dem hydrophoben Effekt liegt keine neue Bindungsart zugrunde, er ist im Wesentlichen entropischen Ursprungs; **er bestimmt wesentlich die Konformation biol. Molekülaggregate.**

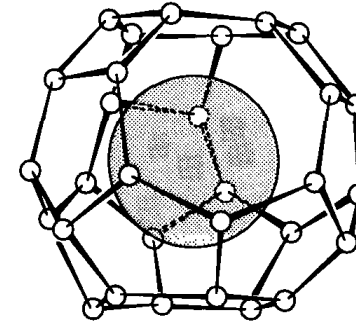


Abb. I.10:

Hypothetischer Wasserkäfig (Clathrat-Struktur) um ein unpolares, sphärisches Molekül. Jede kleine Kugel symbolisiert ein Wassermolekül mit den Sauerstoffatomen auf den Vertices. Die Zahl der möglichen Orientierungen der H_2O -Moleküle in der Hydratationssphäre ist drastisch reduziert.

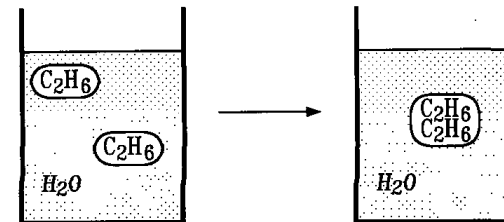


Abb. I.11:

Bildung eines einzigen Lösungsmittelkäfigs um zwei unpolare Moleküle in Wasser als Folge des hydrophoben Effekts. Thermodynamische Messungen zeigen, daß die Freie Enthalpieänderung durch Entfernen einer CH_2 -Gruppe aus der wäßrigen Lösung etwa $-3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ beträgt.

Der hydrophobe Effekt bestimmt z.B. die **Struktur amphiphiler Moleküle** (Teilchen mit hydrophiler Kopfgruppe und hydrophober aliphatischer Kette) **in Wasser**, wie z.B. SDS oder DPPC.

Oberhalb einer krit. Konz., der sog. kritischen Mizellkonz. (**CMC** z.B. 8×10^{-3} M für SDS, 10^{-10} M für DPPC), bilden die Monomere molekulare Aggregate (SDS: Mizellen aus ca. 60 Monomeren; DPPC: Lipiddoppelschichten)

SDS = Natriumdodecylsulfat

DPPC = Dipalmitoylphosphatidyllcholin

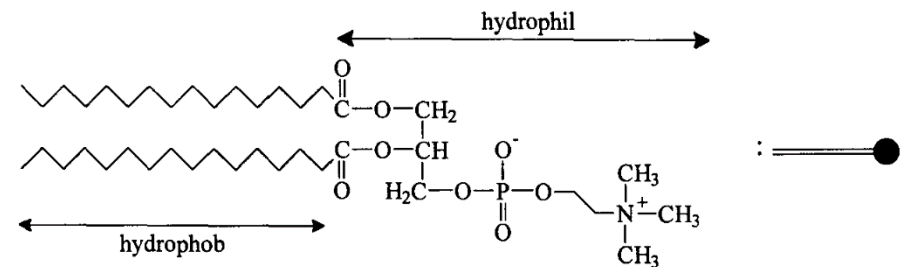
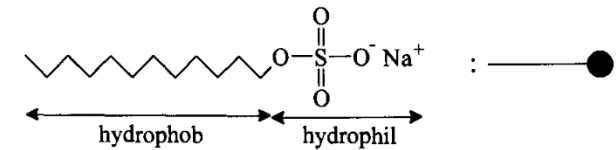


Abb. I.12:

Strukturformeln und symbolische Kurzschreibweise von SDS (Natriumdodecylsulfat, engl.: Sodium Dodecyl Sulfate, oben) und DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin, unten).

SDS-
Micelle

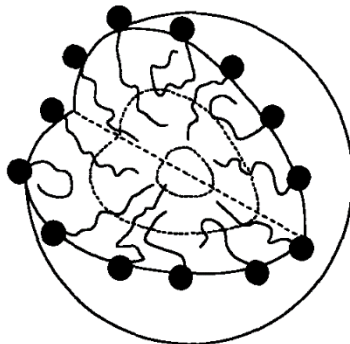


Abb. I.13:

Schematische Darstellung des Aufbaus einer SDS-Micelle. Ihr Durchmesser beträgt ca. 3,5 nm.

DPPC-
Lipiddoppel-
schicht

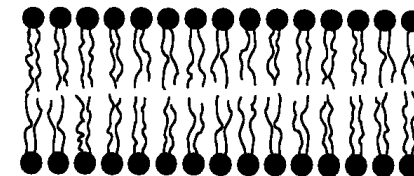


Abb. I.14:

Schematische Darstellung einer planaren Lipiddoppelschicht.

Die Tendenz zur Mizellbildung ist umso größer (und damit die CMC umso kleiner), je größer der hydrophobe Anteil im amphiphilen Molekül.

Geometrische Packungsfaktoren sowie die Ladung der Kopfgruppe bestimmen wesentlich die **Gestalt des Aggregats**. Der Packungsfaktor kann mit Hilfe des kritischen Packungsparameters CPP (Verhältnis von Volumen der hydrophoben Kette zur benötigten Fläche der Kopfgruppe, normiert auf die Kettenlänge) beschrieben werden; Ionenstärke und pH-Wert der Lösung sowie die Temp. beeinflussen die Kopfgruppenfläche.

Ein weiteres Konzept zur Beschreibung amphiphiler Aggregatstrukturen basiert auf dem Konzept der Krümmungsenergie.

Mögliche Aggregatstrukturen amphiphiler Moleküle

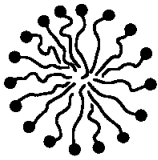
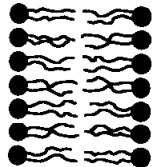
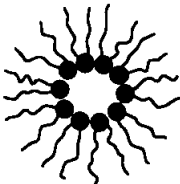
Struktur	Platzbedarf	$CPP, \frac{V}{A \cdot l}$	Beispiel
Kugelmicelle		Kegel Volumen V Fläche A $R \leq l$	$< \frac{1}{3}$ SDS
Doppelschicht		Zylinder $R \approx l$	$\frac{1}{2}$ bis 1 Phosphatidylcholine
inverse Micelle		Kegelstumpf $R \approx l$	> 1 ungesättigte Phosphatidylethanolamine

Abb. I.15:

Einige Aggregatstrukturen, ihr molekularer Platzbedarf und ihr kritischer Packungsparameter CPP (V Volumenbedarf der hydrophoben Ketten, l Kettenlänge, A Flächenbedarf der Kopfgruppe, R Radius bzw. halbe Schichtdicke der Aggregatstruktur).

MOLEKULARE VOLUMINA UND OBERFLÄCHEN

Atomen und Molekülen lassen sich definierte Dimensionen und Volumina zuordnen, die für andere Moleküle undurchdringlich sind (obwohl ihr Äußeres von einer Elektronenwolke gebildet wird). Einzelne Atome approximiert man üblicherweise als Kugeln; das undurchdringliche Volumen ist durch den **van der Waals-Radius** definiert.

Zuweilen werden für die vdW-Radien Bereiche angegeben, je Bindungsnachbar (z.B. H: 1 Å, wenn an ein arom. C gebunden; 1.54 Å, wenn an ein neg. Ion gebunden).

2 Atome sind üblicherweise in engem vdW-Kontakt, wenn der Abstand zw. ihren Zentren etwa 0.8 Å größer als bei kovalenter Bindung ist (siehe Tabelle).

Der vdW-Abstand repräsentiert die Mindestgröße des Atoms. Optimale vdW-Anziehungen zu anderen Molekülen finden bei einem Radius statt, der um 0.2 Å größer als der vdW-Radius ist.

Table 2-1. Values of the van der Waals radius (r_{vdw}) and covalent radius (r_{cov}) of common elements in biochemistry

Element	r_{vdw} (Å)	r_{cov} (Å)
H	1.0–1.54	0.37
He	1.50–1.80	0.30
Li	1.80	1.34
C	1.65–1.70	0.77
N	1.55	0.75
O	1.50	0.73
F	1.35–1.60	0.71
Na	2.30	1.54
Mg	1.70	1.45
P	1.85–1.90	1.10
S	1.80	1.20
Cl	1.70–1.90	0.99
K	2.80	1.96
I	1.95–2.15	
Organic groups		
CH ₃	2.00	
C ₆ H ₆	1.70 (perpendicular to the ring)	

Data are from J. Israelachvili (1991) *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd edn, Academic Press, London, pp. 176–212; J. E. Huheey (1983) *Inorganic Chemistry: principles of structure and reactivity*, 3rd edn, Harper and Row, NY, Chapter 6; G. M. Barrow (1988) *Physical Chemistry*, 5th edn, McGraw-Hill, NY, pp. 30–53; A. Bondi (1964) *J. Phys. Chem.* **68**, 441–451.

Molekulare Oberflächen und Volumina

Bei größeren, aus mehreren Atomen bestehenden Molekülen, wird jedes Atom durch eine Kugel mit geeignetem vdW-Radius dargestellt. Die entstehende, komplexe Oberfläche wird **vdW-Oberfläche** genannt; sie hat eine definierte Oberfläche und umfasst ein bestimmtes **Volumen** (siehe Tabelle). Die Volumina und Oberflächen von Gesamtmolekülen lassen sich aus den Parametern für die Einzelteile durch Summation ermitteln (sofern keine strukturellen Abnormitäten vorliegen).

Beachte: Die vdW-Oberfläche ist jedoch für ein gefaltetes MM (Protein, NA) nicht relevant (da innen gelegene Atome bzw. Kavitäten zw. Atomen normalerweise dem LM oder anderen Molekülen nicht zugänglich sind).

Eine relevantere Oberfläche ist eine, die mit dem LM in Kontakt ist. Dies kann durch Abrollen einer kugelförmigen Probe (die das LM darstellt) über die vdW-Oberfläche des MM erreicht werden.

Table 2-2. van der Waals surface areas and volumes of chemical groups when bonded to C atoms

Chemical group	Surface area (Å ²)	Volume (Å ³)
—C—	1.0	5.5
—CH	10.9	11.5
—CH ₂ —	20.9	16.8
—CH ₃	33.4	22.3
—C ₆ H ₅	94.9	76.1
—OH	19.3	12.6
—C(=O)—	22.3	18.2
—C(=O)OH	43.4	
—SH		24.6
—NH—	26.5	17.5
—NH ₂	16.4	13.4

From T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, W. H. Freeman, NY.

Jene Teile der **vdW-Oberfläche**, die in Kontakt mit der Oberfläche der LM-Moleküle sind, werden als **Kontakt-Oberfläche** bezeichnet; die eingedellten Teile als **Wiedereintritts-(Reentrant)-Oberfläche**. Die Kontakt-Oberfläche und die Reentrant-Oberfläche zusammen bilden die **molekulare Oberfläche** und definieren das **molekulare Volumen**. Die Oberfläche, die vom Zentrum der Probe gebildet wird, wird **zugängliche Oberfläche (accessible surface (area) ASA)** genannt; die im Molekülinnern gelegenen Atome haben keine ASA. Die ASA hängt von der Größe der gewählten Probe ab. Wenn der Probenradius zunimmt, nimmt die Zahl der Atome, mit denen die Probe Kontakt hat, ab, die ASA wird glatter. D.h. je kleiner die Probe, desto größer die ASA, desto kleiner V und desto rauer die Oberfläche (Terminus '**Oberflächenrauigkeit**'). Üblicherweise wird die ASA mit einem Probenradius von 1.4 Å (entsprechend einem Wassermolekül) gemessen.

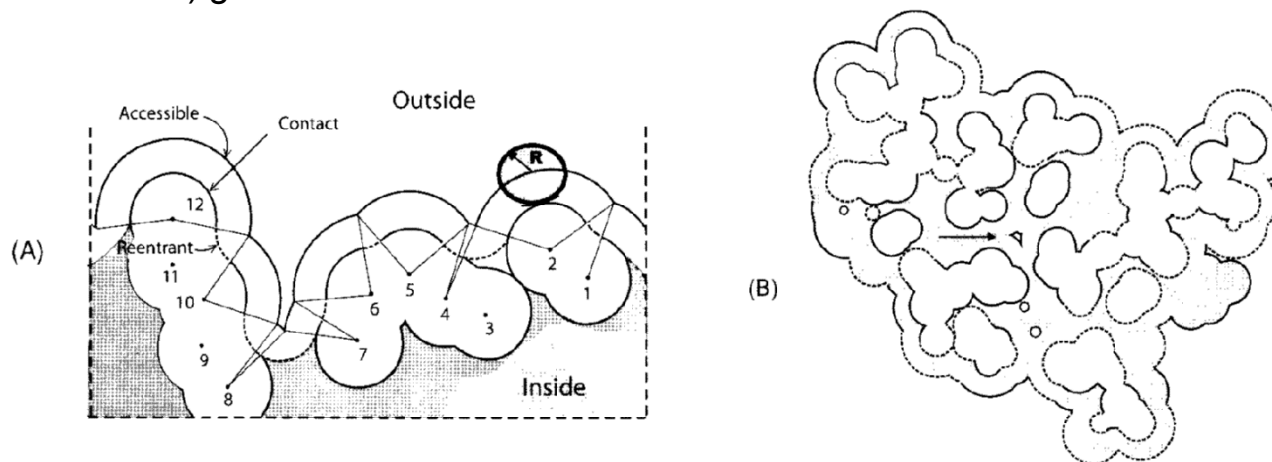


Figure 2-1. Analysis of molecular surfaces. (A). Definition of the various surfaces for a two-dimensional slice through atoms 1–12 of a hypothetical macromolecule. The sphere of radius R is the probe that is rolled over the surface in van der Waals contact with all possible atoms of the macromolecule. (B). The van der Waals and accessible surfaces of a section through a folded protein. The outer surface is the accessible surface, the inner surface is the van der Waals surfaces of the individual atoms. The solid lines outline C and S atoms; the dashed lines N and O. In places, the accessible surface is controlled by atoms above or below the section shown. The arrow indicates a cavity inside the molecule large enough to accommodate a solvent molecule with a radius of 1.4 Å, which was used to define the accessible surface. Adapted from F. M. Richards.

Packungsdichte

Die vdW-Radien der Atome erlauben die Berechnung der **Packungsdichte** einer Substanz oder eines MM: Die Packungsdichte ist der Anteil des Raums, der von Atomen mit vdW-Radius besetzt ist.

Beispiele: Die enge Packung identischer Kugeln erzeugt eine Packungsdichte von 74 %; für Kristalle von kleinen Molekülen findet man Werte zw. 70 und 80 %; Flüssigkeiten haben niedrigere Packungsdichten (z.B. 44 % für Cyclohexan).

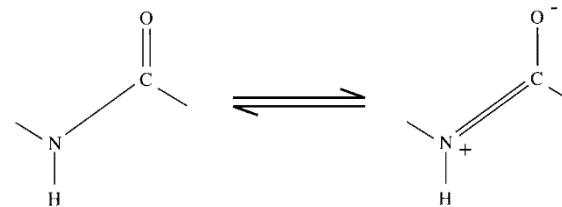
Elektronegativität

Ein Molekül braucht keine Nettoladung zu haben, um an elektrostatischen WW teilzunehmen, da die El.-Dichte ungleichförmig verteilt sein kann, falls kovalent gebundene Atome versch. Elektronegativitäten haben:

Relative Elektronegativitäten von
Atomen in biol. MM:

O	3.45
N	2.98
C	2.55
S	2.53
P	2.2
H	2.13

Bedeutung der Elektronegativitäten:
Peptidbindungen von Proteinen haben
einen partiellen Doppelbindungscharakter



Die **Längen von H-Brücken-Bindungen** und deren Stärken hängen von den Elektronegativitäten von Akzeptor und Donor ab. Je größer deren Elektronegativitäten, desto kürzer ist der Abstand zw. ihnen und desto stärker ist die H-Brücke. Geladene Gruppen ergeben ebenfalls kürzere und stärkere H-Brücken.

Table 2-3. Typical dimensions of hydrogen bonds

Hydrogen bond	Distance between atoms (Å)		
	X - Y	X - H	H - Y
X - H...Y			
O - H...O	2.75	1.00	1.7
N - H...O	2.99	0.90	2.1
O - H...N	2.78	1.10	1.7
N - H...N	3.08	0.90	2.2
P - OH...O = P			1.55-1.69
P - OH...OH			1.65-1.89
O _w - H...O = P			1.66-1.88
P - O - H...O _w			1.59-1.68
Other O - H...O			1.74-2.18
N - H...O = P			1.58-1.89
N - H...O = C			1.69-2.32
N - H...N			1.73-2.23
NH - H...O = P			1.67-2.07
NH - H...O = C			1.68-2.76
NH - H...N			1.85-2.76

O_w = oxygen atom of water molecule.

Die WW zw. einzelnen Molekülen in Lösung sind relativ schwach (siehe Tabelle).

Andererseits wird ein Polyelektrolyt mit einer großen Zahl von geladenen Gruppen Ionen entgegengesetzter Ladung sehr fest binden.

Die **Kooperativität multipler WW** ist der Schlüssel der makromolekularen Faltung.

Table 2-5. Association in water of small molecules typical of noncovalent interactions in nucleic acids and proteins

Type of interaction	Example	Association constant (M ⁻¹)
Salt bridge	Acetate • guanidinium	0.37
	Acetate • amine	0.31
	Phenoxide • amine	0.20
Hydrogen bond ^a	Formic acid dimers	0.04
	Urea dimers	0.04
	N-methylacetamide dimers	0.005
	δ-Valerolactam dimers	0.013
van der Waals	Benzene dimers	0.4
	Cyclohexane • Cyclohexanol	0.9
	Benzene • Phenol	0.6

a. Interactions other than hydrogen bonding may contribute to the dimerization of these molecules, so the association constants are maximum values for hydrogen bonding.

From T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn, W. H. Freeman, NY, p. 155.

WÄSSRIGE LÖSUNGEN

Wasser alleine ist biologisch nicht relevant, meist Anwesenheit von Salzen und Puffern; zum Studium der Eigenschaften von MM (Protein, NA) werden häufig Substanzen in hohen Konz. (Alkohole, Urea, GdmCl) zugegeben. Die Anwesenheit zusätzlicher Substanzen [zusätzliche LM-Komponenten (**Co-Solvents**), zusätzlich gelöste Substanzen (**Co-Solutes**)] vergrößert die Komplexität relativ einfacher Lösungen von MM: mindestens 3-Komponentensysteme: (1) Wasser, (2) MM, (3) Co-Solvents/Co-Solutes. Wenn die Co-Solutes in hoher Konz. anwesend sind, sind die Lösungen thermodynamisch nicht mehr ideal, da die Co-Solutes untereinander wechselwirken und die zur Beschreibung der Nichtidealität üblicherweise verwendeten Aktivitätskoeffizienten ungleich 1 sind.

Im Folgenden Beschreibung (i) der Struktur und Eigenschaften von flüssigem Wasser,
(ii) der physikal. WW in komplexen wässrigen Lösungen mit MM.

(1) Flüssiges Wasser

Die Betrachtung intermolekularer WW im Vakuum ist relativ geradlinig. In Flüssigkeiten und in Festkörpern kommt es jedoch zu zusätzlichen, gleichzeitig ablaufenden WW zw. Atomen und Molekülen, so dass die exakte Behandlung all dieser WW höchst problematisch ist.

Beispiele: (i) die Beteiligung einer O-H Gr. als Donor einer H-Brücke (HB) vergrößert die negative Ladung auf einem Donor O Atom: somit wird es ein besserer HB Akzeptor einer 2. HB;
(ii) die vdW-WW zw. Atomen beeinflussen ihre Polarisierbarkeiten und die Größe der vdW-WW zw. 2 Molekülen ist etwa 30 % größer, wenn sie Teil einer Flüssigkeit sind (verglichen zum Vakuum).

Flüssigkeiten: Nah-WW ohne Ordnung

Flüssigkeiten sind üblicherweise 5-15 % leichter als die entsprechenden Festkörper, haben somit vergrößerte Abstände, vergrößerte Flexibilität und verringerte WW zw. den Molekülen.

Packungsdichte: 0.48 - 0.61; diese Dichten von Fl. ändern sich kaum mit dem Druck (d.h. die Moleküle sind normalerweise mit den Nachbarn in vdW-Kontakt). Andererseits nimmt das Volumen von Fl. mit der Temp. zu (d.h. die Moleküle fluktuieren substantziell).

Die beste **Beschreibung der Fl. Struktur** erhalten wir aus Röntgen- oder Neutronenstreuexperimenten: Bestimmung der radialen Abstandsverteilungsfunktion, $g(r)$: in einer simplen Fl. sind etwa 9-11 Nachbar-Moleküle (= 1. Hülle nächster Nachbarn) in vdW-Kontakt rund um ein zentrales Molekül (d = vdW-Durchmesser des Moleküls); 2. Hülle von Nachbaratomen bei etwa $2d$ (Maximum wesentl. niedriger, d.h. die Ordnung nimmt mit der Entfernung ab); nach der noch schwächer ausgeprägten 3. Hülle erfolgt ein Angleich an die homogene Bulk-Fl. Je niedriger die Temp., desto größer ist der Ordnungsgrad in Flüssigkeiten.

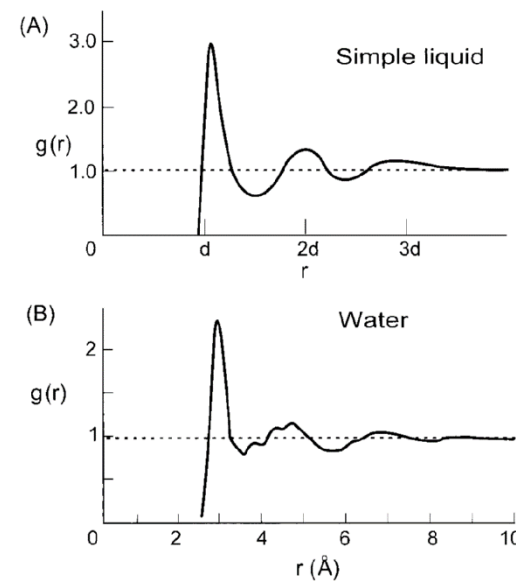
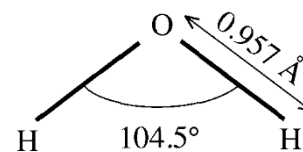


Figure 3-1. Radial distribution function of (A) a normal liquid and (B) water at 4°C. The probability of finding another atom at radial distance r from a reference atom is given by $g(r)$ times the density of the liquid. The distance r is expressed in (A) in terms of the van der Waals diameter of the molecule, d . The experimental curve for water measured using X-rays is given in (B); X-rays are scattered primarily by the O atoms of water molecules. Data from A. H. Narten & H. A. Levy.

Wasser: Bedeutung der HB

Das Wasser-Molekül ist einzigartig (hat dieselbe Anzahl an H Atomen und Ionenpaar El. Akzeptoren für HB), d.h. die Anzahl der HB Donoren und Akzeptoren ist gleich groß und die HB-Bindung zw. Wassermolekülen ist vorherrschend.



Wasser-Molekül:
gewinkelt,
OH Bindungslänge: 0.957 Å,
Bindungswinkel: 104.5°

(s. auch #83-84)

Mit vdW-Radien von 1.2 Å für H und 1.45 Å für O hat das Wasser-Molekül ein Volumen von 17.7 Å³.

Die übliche Darstellung des Wasser-Moleküls (stick representation) legt eine asymmetrische Struktur nahe – die elektronische Struktur ist jedoch fast kugelförmig (O: 8 El.); deshalb **kann das Wassermolekül als Kugel mit dem Radius 1.4 Å dargestellt werden!**

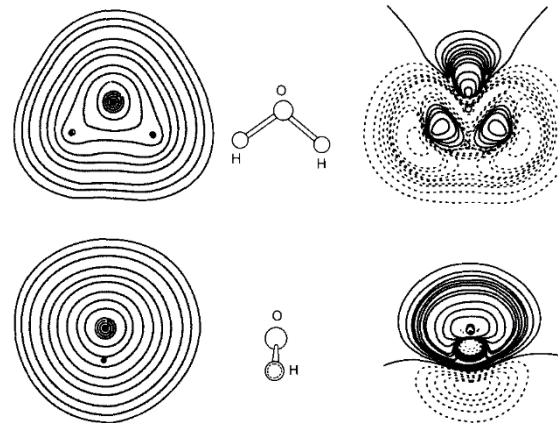


Figure 3-2. The electronic structure of the water molecule, shown as contour maps of electron density through the center of the molecule, viewed from two perpendicular angles. The total electron density is shown on the *left*, illustrating the nearly spherical shape of the molecule. The difference between this total electron density of the molecule and the density that would result from the superposition of individual spherical atoms is shown on the *right*. This illustrates the effect of covalent bonding on the electron density. The shift of electrons to the O atom is indicated by the positive electron density (*solid curves*) on the O atom and the negative electron density (*dashed lines*) on the H atoms. Data from I. Olovsson.

Die Nettoladung ist asymmetrisch verteilt: Überschusselektronen am elektronegativen O. Deshalb hat das Wasser ein Dipolmoment von 1.85 Debye und die O-H Bindung hat zu 33 % ionischen Charakter. Die pos. Ladung an den H-Atomen ist nahe der Oberfläche des Moleküls platziert, während die neg. Ladung nahe dem Zentrum gelegen ist, d.h. dass die pos. Ladung näher an andere Atome gelangen und somit stärker wechselwirken kann. Wasser wirkt also eher als Donor als als Akzeptor von HB!

Trotz vieler exp. und theoret. Studien ist die genaue Struktur des flüssigen Wassers ungewiss. Kein Modell kann alle Eigenschaften des Wassers (#96) erklären. Die bekannteste Eigenschaft ist die anomale Dichteänderung. Wasser-Moleküle wechselwirken miteinander stärker als andere Flüssigkeiten (als Folge der HB-Bindung). Wasser kann mindestens 12 versch. Eisstrukturen ausbilden. Die tetraedrische Anordnung scheint auch in fl. Wasser zu existieren, jedoch sind die relativen Positionen der H Atome auf den Nachbar-Molekülen nicht scharf definiert. Die Dielektrizitätskonstante des Wassers ist sehr groß. Hohe Drucke verursachen Kompression (zunächst Zerstörung des tetragonalen HB-Bindung zw. Molekülen, Erzeugung größerer Mobilität).

Die starke HB-Bindung zw. Wasser-Molekülen ist die grundlegende Erklärung für viele der außergewöhnlichen Eigenschaften des Wassers. Änderung der Entropie und Enthalpie kompensieren sich gegenseitig, nur kleine Änderungen der Freien Energie ('**enthalpy-entropy-compensation**').

Physikalische Eigenschaften des Wassers

Table 3-1. Physical properties of water at 25°C

Molecular weight	18.01529 Da	Packing density	36.29%
O–H bond length	0.9572 Å	Coordination number	4.4
H–O–H bond angle	104.52°	Heat of fusion (0°C)	6.008 kJ/mol
Effective diameter	2.75 Å	Heat of vaporization	43.991 kJ/mol
Normal vibrations as gas		Specific heat capacity	4.1796 J K ⁻¹ g ⁻¹
Symmetric stretching	3656.65 cm ⁻¹	Vapor pressure	3.1675 kPa
Deformation	1594.59 cm ⁻¹	Surface tension	71.96 mJ/m ²
Asymmetric stretching	3755.79 cm ⁻¹	Refractive index	1.33287
Dipole moment, gas	1.834 D	Thermal expansivity	2.5721 × 10 ⁻⁴ K ⁻¹
Dipole moment, liquid	2.45 D	Isothermal compressibility	0.452472 GPa ⁻¹
Polarizability	1.470 × 10 ⁻³⁰ m ³	Translational diffusion coefficient	2.14 × 10 ⁻⁹ m ² /s
Dielectric constant	78.54	Rotational diffusion coefficient	6.06 × 10 ¹⁰ s ⁻¹
Density	0.997045 g/cm ³	Viscosity	0.8904 mPa s
		Ionic product	1.0 × 10 ⁻¹⁴ M

(2) Die hydrophobe WW: Vermeidung der Wasserphobie

Wasser ist (verglichen mit organ. Fl.) ein schlechtes LM für nichtpolare Moleküle. Nichtpolare Moleküle können an der wichtigen HB-Bindung nicht partizipieren; wässrige Lösungen solcher Moleküle haben viele anomale physikal. Eigenschaften. Diese Abwesenheit einer günstigen WW zw. nichtpolaren Molekülen und Wasser verursacht eine alternative, günstige WW zw. nichtpolaren Gruppen (wichtiger als in einem normalen LM): **hydrophobe WW** (siehe auch #85-87). Diese WW sind der wesentliche stabilisierende Faktor in Proteinen, NA, und Membranen; wiederum ungewöhnliche Eigenschaften.

Verteilungskoeffizienten messen die Präferenzen für verschiedene Umgebungsbedingungen: z.B. gilt für den Verteilungskoeffizienten K_D für den Transfer einer Substanz X vom Vakuum ins Wasser:

$$K_D = \frac{[X]_{\text{water}}}{[X]_{\text{vapor}}}$$

Die **Freie Energie des Transfers** kann dann aus dem Verteilungskoeffizienten abgeleitet werden:

$$\Delta G_{\text{tr}} = -RT \log K_D$$

Diese Freie Energie ist ein Maß für die relativen Freien Energien des Moleküls unter den 2 Umgebungsbedingungen. Ein Molekül im Vakuum hat keine WW mit anderen Molekülen; somit ist die Freie Energie des Transfers primär ein Maß für die WW des Moleküls mit Wasser. Ein neg. Wert für ΔG_{tr} würde implizieren, dass in diesem Fall das Molekül in Wasser stabiler als im Vakuum ist. Seine Präferenz für die wässrige Phase ist ein Maß für die Hydrophilizität des Moleküls. Im Gegensatz dazu ist die Tendenz eines Moleküls ein nichtpolares LM (vom Wasser aus) zu bevorzugen, ein Maß für die Hydrophobizität.

Um Komplikationen (z.B. Aggregation von Molekülen) zu vermeiden, müssen Messungen bei verschiedenen Konz. und Extrapolation auf unendliche Verdünnung ($c \rightarrow 0$) durchgeführt werden. Z.B. assoziieren polare Moleküle gerne in nichtpolaren LM (um polare Gruppen zu akkumulieren), während nichtpolare Moleküle in Wasser aggregieren (um ihre Exposition in Wasser zu verkleinern).

Die **Löslichkeit** eines Moleküls in einer Flüssigkeit wird durch den Energieaufwand, eine entsprechend große Kavität (Loch) in der Fl. zu machen, bestimmt; dies wird durch das Ausmaß günstiger WW zw. Molekül und Fl. kompensiert.

Je mehr polare Gruppen auf einem Molekül, desto größer die **Hydrophilizität** (siehe Tabelle): gesättigte KWe sind am wenigsten hydrophil; Moleküle mit geladenen Gr. sind am hydrophilsten; Ionisation von Molekülen vergrößert ihre Hydrophilizität.

Die Verteilungskoeffizienten eines komplexen Moleküls können aus den Vert.Koeff. der chemischen Gruppen, die das Molekül enthält, abgeschätzt werden.

Table 3-2. Hydrophilicities of simple small organic compounds in uncharged form

Class	Example	Log hydrophilicity
Guanidines	$\text{CH}_3 - \text{NH} - \text{C} \begin{array}{l} \text{=NH} \\ \text{NH}_2 \end{array}$	8.2
Amides	$\text{CH}_3 - \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{NH}_2 \end{array}$	7
Diols	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	7
Peptides	$\text{CH}_3 - \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{NH}(\text{CH}_3) \end{array}$ $\text{CH}_3 - \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{N}(\text{CH}_3)_2 \end{array}$	7
Phosphotriesters	$(\text{CH}_3\text{O})_3\text{P} = \text{O}$	6.2
Carboxylic acids	$\text{CH}_3 - \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	5
Water	H_2O	5
Amines	$\text{C}_2\text{H}_5 - \text{NH}_2$	3.5

Alcohols	$\text{C}_2\text{H}_5 - \text{OH}$	3.6
Nitriles	$\text{CH}_3 - \text{CN}$	2.8
Ketones, Aldehydes	$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - (\text{CH}_3, \text{H})$	2.7
Esters	$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \text{O} - \text{CH}_3$	2
Thioethers, ethers	$\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_3, \text{CH}_3 - \text{O} - \text{CH}_3$	1.3
Chlorides	$\text{C}_2\text{H}_5 - \text{Cl}$	1.2
Thiols	$\text{C}_2\text{H}_5 - \text{SH}$	1
Alkynes	$\text{CH} \equiv \text{CH}$	0
Alkenes	$\text{CH}_2 = \text{CH}_2$	-1
Alkanes	$\text{CH}_3 - \text{CH}_3$	-0.9

The hydrophilicity is measured by the equilibrium constant for partitioning of the molecule from vapor to an aqueous solution. Data from R. V. Wolfenden.

Die **Thermodynamik des Transfers nichtpolarer Moleküle ins Wasser ist anomal: sehr temp.abhängig!** (*Beachte:* ΔH ist ein Maß für die Größe nichtkovalenter WW in den 2 Phasen, ΔS für die Unordnung des Systems)

Transfer eines gelösten Moleküls in eine Fl. beinhaltet:

- (i) Erzeugung einer geeigneten Kavität in der Fl.,
- (ii) Einschleusung des gelösten Moleküls in die Kavität,
- (iii) Umordnung der gelösten und umgebenden Fl.-Moleküle, um WW zw. ihnen zu optimieren.

Bei RT ist der ungünstige Transfer eines nichtpolaren Moleküls von einer nichtpolaren Fl. ins Wasser primär das Ergebnis einer ungünstigen Änderung der Entropie. Bei RT ist $\Delta H \approx 0$; die genaue Temp., wo $\Delta H_{tr}=0$, nennt man T_H .

Wenn die Temp. ansteigt, wird die geordnete Wasserhülle rund um die nichtpolaren gelösten Moleküle 'ausschmelzen' und ähnelt immer mehr dem umgebenden Wasser ('bulk water'): \rightarrow anomal großes C_p !

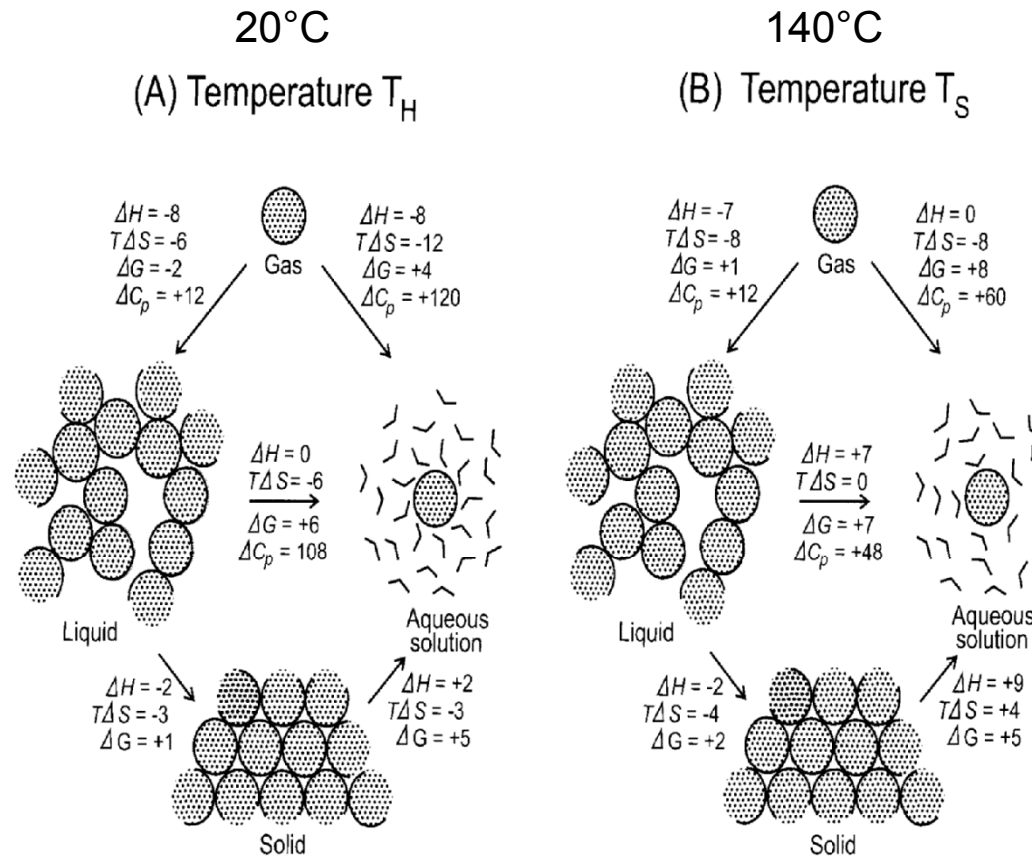


Figure 3-4. Typical thermodynamics of transfer of a nonpolar molecule the size of cyclohexane between the gas, liquid and solid phases and aqueous solution at temperatures (A) T_H , approximately 20°C, where $\Delta H_{tr} = 0$ for transfer between liquid and water, and (B) T_S , approximately 140°C, where $\Delta S_{tr} = 0$. The values of ΔH , $T\Delta S$ and ΔG are in units of kcal/mol, that of ΔC_p in units of cal/°K mol. Adapted from T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn, W. H. Freeman, NY, p. 157.

Großes C_p ist charakteristisch für die Thermodynamik wässriger Lösungen nichtpolarer Moleküle: Ursache für die ausgeprägte Temp.-Abhängigkeit der thermodynamischen Parameter, da C_p die Temp.-Abhängigkeit von H, S und G definiert:

$$C_p = \frac{\partial H}{\partial T} = T \frac{\partial S}{\partial T} = T^2 \frac{\partial^2 G}{\partial T^2} = \frac{\langle H^2 \rangle}{kT^2}$$

Der Wert für C_p ist der nichtpolaren ASA der dem Wasser exponierten gelösten Moleküle proportional (Fig. 3-6).

G_{tr} ist bei T_S maximal; $T_S \approx 140^\circ\text{C}$

Bei hohen Temp. verhält sich Wasser eher wie ein normales LM

Basis des hydrophoben Effekts:

(i) Die vdW-WW in einer nichtpolaren Fl. ist größer als jene zw. Wasser und dem nichtpolaren LM

(ii) HBs, die in Wasser existieren, können sich nicht mit dem nichtpolaren Molekül ausbilden; sie werden bei dessen Lösung in Wasser zerstört.

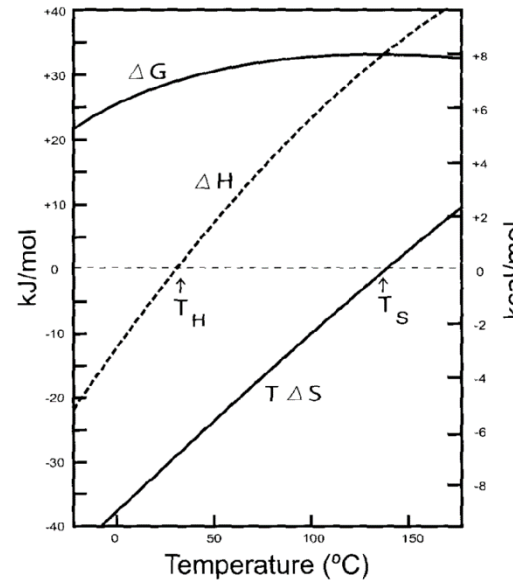


Figure 3-5. Typical thermodynamics of transfer of a hydrocarbon from the liquid to aqueous solution, using pentane as an example. The strong temperature-dependence of both the enthalpy and entropy difference between the two phases is a result of the different heat capacities of the two phases. The free energy difference is the net difference between the enthalpic and entropic contributions. It reaches a maximum where $\Delta S^\circ = 0$, whereas the equilibrium constant (which is proportional to $-\Delta G^\circ/T$) reaches a maximum where $\Delta H^\circ = 0$. Data from P. L. Privalov & S. J. Gill.

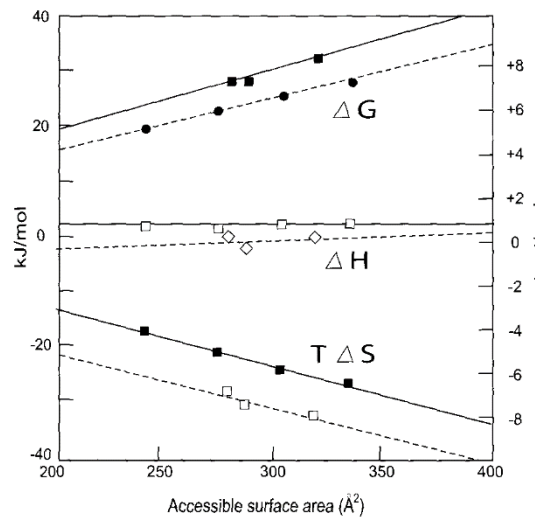


Figure 3-6. Thermodynamics of dissolution of hydrocarbon liquids into water at 25°C as a function of the accessible surface area of the hydrocarbon. The enthalpy change is virtually zero at this temperature. The dashed lines are for aliphatic molecules, the solid lines for aromatics. Kindly provided by S. J. Gill. Adapted from T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn, W. H. Freeman, NY, p. 159.

(3) Membranen: Hydrophobe Doppelschichten in wässriger Umgebung

Membranen separieren versch. Zellkompartimente; sie stellen sehr nichtpolare Umgebungen für spezifische Proteine dar; sie entstehen als Folge hydrophober WW zw. versch. Lipiden (amphiphile Moleküle mit polaren Kopf-Gr. + nichtpolaren Fettsäure-Schwänzen); Konzept des hydrophoben Moments (analog Dipolmoment der elektr. Ladung)

Einfluss von Doppelbindungen auf die Struktur von Fettsäuren:

trans: wenig Einfluss
cis: Biegung!

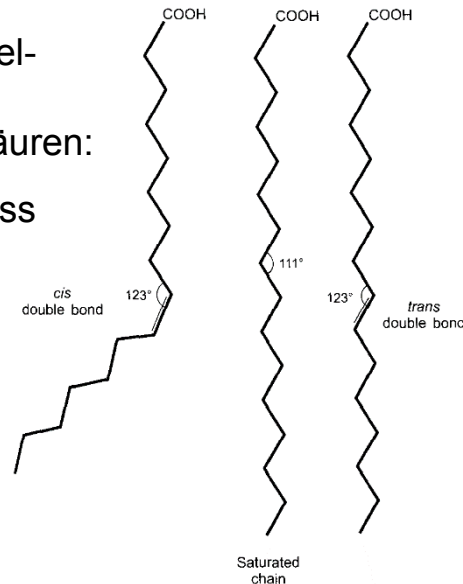


Figure 3-8. The structure of the common, saturated fatty acid palmitic acid, with 16 C atoms (*center*), and the effects of double bonds on the structure. A *trans* double bond (*right*) causes little change in structure of a saturated chain, but a *cis* double bond (*left*) produces a bend. The *trans* double bond is rare in naturally occurring fatty acids.

Struktur der Lipide in Membranen

(A) Phospholipide
(B) Glycolipide

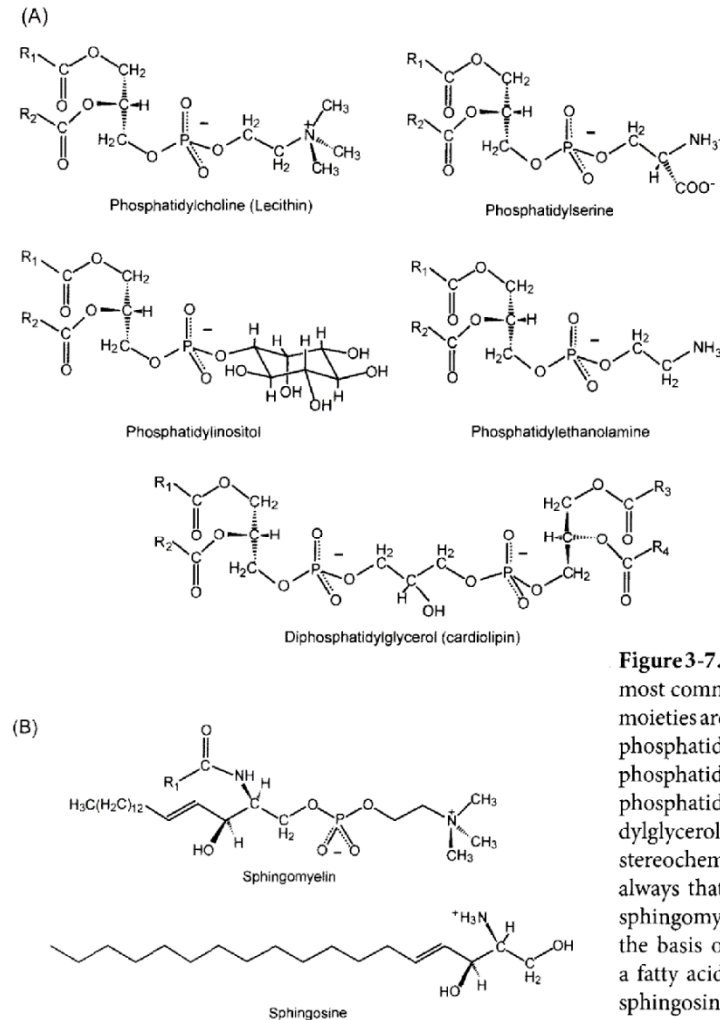


Figure 3-7. The structures of the lipids that are most common in membranes. The R_1 and R_2 moieties are fatty acids. (A) The phospholipids phosphatidylcholine (also known as lecithin), phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine and diphosphatidylglycerol (also known as cardiolipin). The stereochemistry of the glycerol moiety is always that indicated. (B) The structures of sphingomyelin and sphingosine, which are the basis of glycolipids. Sphingomyelin has a fatty acid attached to the amino group of sphingosine, and phosphorylcholine attached to the hydroxyl group. Glycolipids have sugars in place of the phosphorylcholine.

Die meisten natürlichen Fettsäuren enthalten eine terminale Carbonsäuregr. und eine gerade Anzahl (14-20) von aliphatischen C-Atomen in der Kette; bis zu 6 nichtkonj. Doppelbindungen (meist cis); komplexe Nomenklatur (z.B. ω , Δ); großer Einfluss der cis Doppelbindung (Erniedrigung der Schmelztemp.; vgl. Stearin- mit Oleinsäure: 70 vs. 13°C; 1 cis Doppelbindung) und der Kettenlänge (vgl. Stearin- mit Palmitinsäure: 70 vs. 63°C; 18C vs. 16C) [siehe auch #45-46]

Table 3-3. Some common fatty acids

Fatty acid	Chemical name	ω -formula	Δ -formula	Melting temperature (25°C)	Solubility (μM)
<i>Saturated</i>					
Lauric	Dodecanoic acid		12.0	44.2	11.5
Myristic	Tetradecanoic acid		14.0	54.4	0.79
Palmitic	Hexadecanoic acid		16.0	62.9	0.12
Stearic	Octadecanoic acid		18.0	69.6	0.02
Arachidic	Eicosanoic acid		20.0	75.4	0.0003
Behenic	Docosanoic acid		22.0	80.0	
Lignoceric	Tetracosanoic acid		24.0	84.2	
<i>Monounsaturated</i>					
Myristoleic	<i>cis</i> -Tetradecenoic acid	c14:1 ω 5	14.1 9C		2
Palmitoleic	<i>cis</i> -9-Hexadecenoic acid	c16:1 ω 7	16.1 9C	0.5	0.3
Oleic	<i>cis</i> -9-Octadecenoic acid	c18:1 ω 9	18.1 9C	α : 13.4 β : 16.3	0.05
Elaidic	<i>trans</i> -9-Octadecenoic acid	t18:1 ω 9	18.1 9T	46.5	
<i>cis</i> -Vaccenic	<i>cis</i> -11-Octadecenoic acid	c18:1 ω 7	18.1 11C	14.5	
Petroselinic	<i>cis</i> -6-Octadecenoic acid	c18:1 ω 12	18.1 6C	30	
Erucic	<i>cis</i> -13-Docosenoic acid	c22:1 ω 9	22.1 13C	34.7	0.007
<i>Polyunsaturated</i>					
Linoleic	<i>cis</i> -9,12-Octadecadienoic acid	c18:2 ω 6		-5	
γ -Linolenic	<i>cis</i> -6,9,12-Octadecatrienoic acid	c18:3 ω 6			
Linolenic	<i>cis</i> -9,12,15-Octadecatrienoic acid	c18:3 ω 3		-10	
Eicosatrienoic	<i>cis</i> -5,8,11-Eicosatrienoic acid	c20:3 ω 9			
Arachidonic	<i>cis</i> -5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid	c20:4 ω 6		-50	
Eicosapentenoic	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	c20:5 ω 3			

Wenn in Wasser gelöst, aggregieren Lipide spontan mittels ihrer nichtpolaren Schwänze, um den Kontakt mit Wasser zu minimieren. Die angenommene Struktur hängt von den Bedingungen und den Strukturen der polaren und nichtpolaren Anteile der Lipide ab. In allen Fällen ist die hydrophobe WW die treibende Kraft; es gibt auch polare WW zw. benachbarten Kopfgruppen. Bei niederen Temp. sind Lipid-Doppelschichten ziemlich starre Gebilde (quasi-kristallin), können jedoch bei höheren Temp. in eine flüssig kristalline Phase übergehen.

Lipid-Doppelschichten: das nichtpolare Innere ist nur gegen nichtpolare Moleküle permeabel, jedoch impermeabel gegenüber polaren Molekülen und Ionen (Na^+ , K^+ , Cl^-); Wasser kann jedoch durchdiffundieren (Wasser: klein, hohe Konz., keine Nettoladung)

Strukturen amphiphiler Moleküle

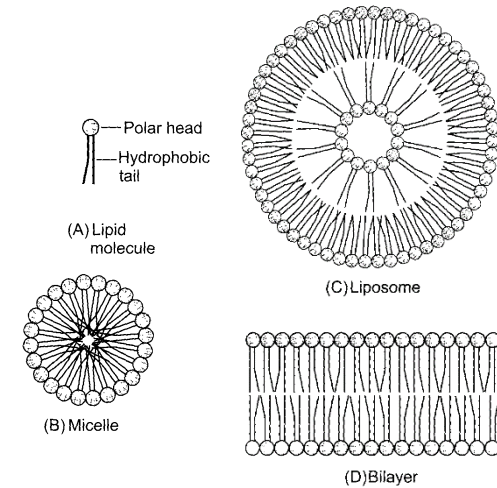
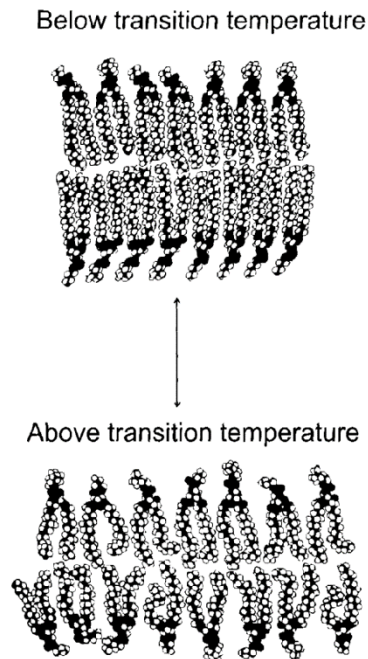


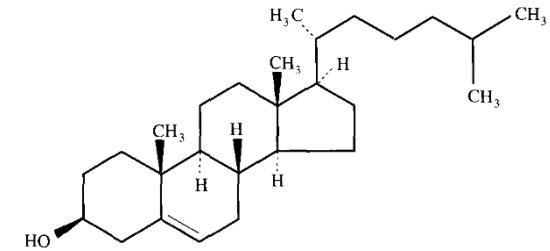
Figure 3-9. Schematic illustrations of the structures formed by amphiphiles in aqueous solution. (A) Schematic diagram of a single amphipathic lipid molecule. (B) Lipids with single long nonpolar tails tend to form micelles, in which the molecules aggregate into spheres with the tails in the interior, not in contact with the water. (C) Curved bilayers tend to result when the two layers have different structures, and they can close up to form spherical liposomes. They have an aqueous interior. (D) Lipids with two long nonpolar tails, such as phospholipids, have similar cross-sections for their polar head groups and the tails, so they form planar monolayers and bilayers. Monolayers are generated at nonpolar surfaces, such as the interface between water and air, where the polar head groups are in contact with the water. Bilayers are formed in aqueous solution, to minimize the contact of the nonpolar tails with water.



Schmelzen einer Lipid-Doppelschicht

Figure 3-10. Schematic illustration of the 'melting' of a lipid bilayer composed of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine as the temperature is increased. At low temperatures (*top*), the lipid molecules are in an orderly array, a gel-like solid. Above the transition temperature (*bottom*), the lipid molecules and their nonpolar tails are highly mobile in the plane of the bilayer. Adapted from R. N. Robertson.

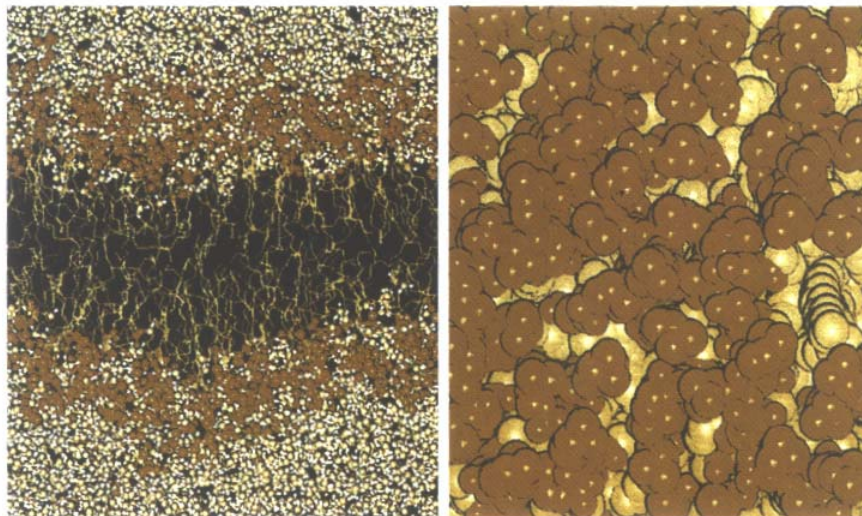
Cholesterin (mehr Steroid als Lipid) ist ebenfalls Bestandteil vieler natürlicher Membranen; in Tieren der primäre Regulator der Membranfluidität; kompaktes, starres, hydrophobes Molekül; ebenfalls amphiphil (polare Hydroxyl-Gr.); formt selbst keine Doppelschicht, seine Anwesenheit in Membran verstärkt jedoch diese; die Hydroxylgr. interagiert vermutlich mit polaren Kopfgruppen von Lipiden.



Die Heterogenität und fluide Natur der Membranen erlaubt es, deren atomare Struktur durch Computer-Simulationen (MD, Molecular Dynamics) zu beschreiben:

(A): Fluide Phase, vollständig hydratisierte Doppelschicht des DMPC;

(B): Blick von oben



(A)

(B)

Figure 3-11. Membrane structure in water as revealed by molecular dynamics simulations. (A) Details of a fluid-phase, fully hydrated bilayer of dimyristoylphosphatidylcholine. The phospholipid head groups are dark, the hydrocarbon tails light; water molecules are white. The sizes of the atoms are reduced from their van der Waals dimensions to permit seeing the interior of the structure and the interpenetration of water with the phospholipid head groups. (B) A view of the same membrane but from the top, looking down onto the membrane surface. The water molecules have been removed, and the atoms are shown with their full van der Waals radii. The gaps between the head groups through which the hydrocarbon tails are visible would be filled with water.

Detergenzien

Um Membranen aufzubrechen, werden meist Detergenzien eingesetzt. **Detergenzien sind ebenfalls amphiphile Moleküle, die Membranlipide ersetzen können, aber keine membranähnlichen Strukturen bilden; gut in Wasser löslich; bilden (über der CMC) Mizellen**

Einteilung nach der Kopfgruppe:

- (i) ionisch (anionisch wie SDS, kationisch wie Cetylpyridiniumchlorid),
- (ii) nichtionisch (z.B. MEGA-8, Thesit, Dodecylmaltosid, Octylglucosid; Triton X-100 und X-114): ungeladene Kopfgruppen, haben jedoch viele HB-Gruppen
- (iii) zwitterionisch (z.B. CHAPS, CHAPSO); pos. und negative Ladungen

Detergenzien unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit Proteine und Lipide aus Membranen zu solubilisieren:

Menge des verwendeten Detergenz: 0.5-2.0 % (w/v) = 0.5-2.0 g/100 ml; 1-3fache Menge des vorhandenen Proteins

Ionische Detergenzien (wie SDS) denaturieren Proteine, zwitterionische und insbes. nichtionische in der Regel nicht !

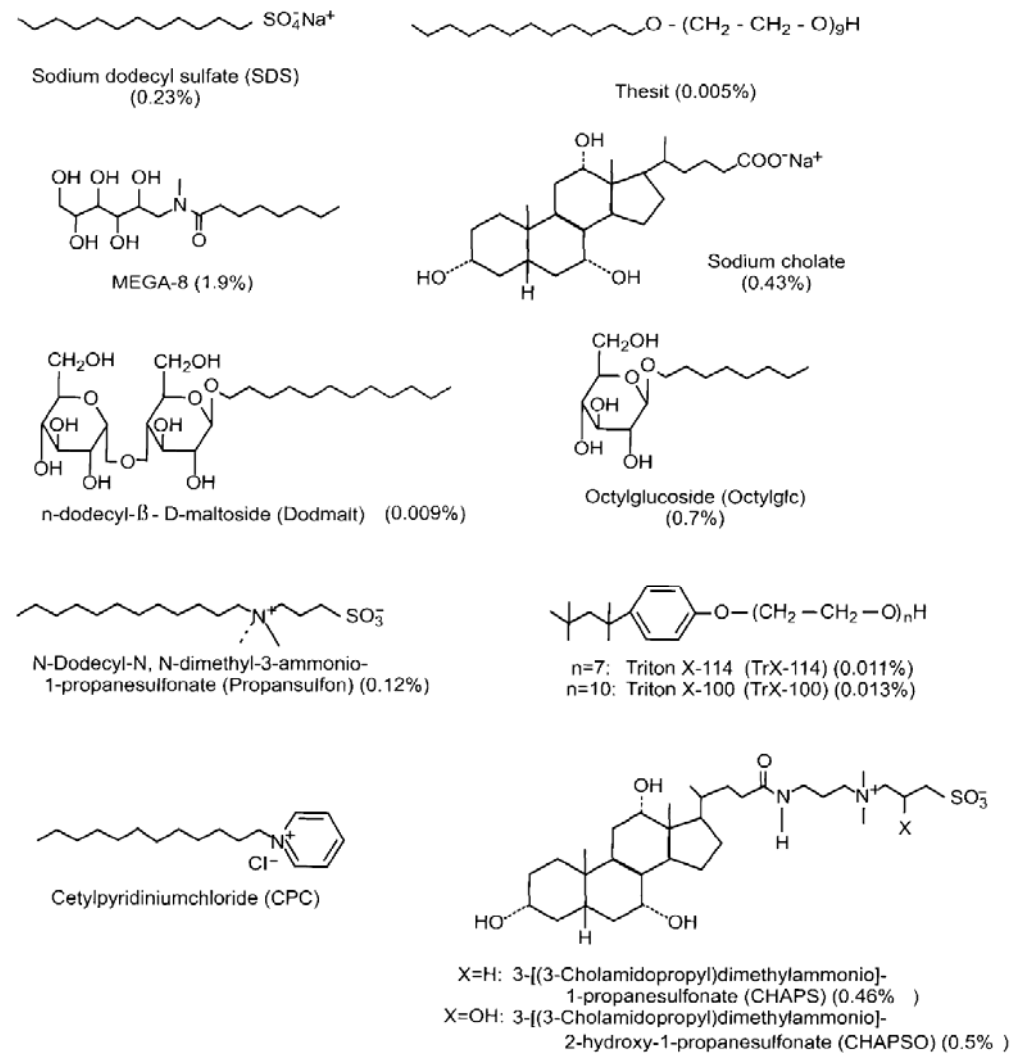


Figure 3-12. The structures of some commonly used detergents and their abbreviations. The critical micelle concentration of each is given in units of weight of detergent per volume of aqueous solution.

Überschuss an Detergenz kann durch folgende Prozeduren entfernt werden: Dialyse, Gelfiltration, hydrophobe Chromatografie.

Überschüssige Lipide können leichter in monomerer als in mizellarer Form entfernt werden.

Der physikalische Zustand von mit Detergenzien komplexierten Lipiden und Proteinen ist nicht besonders gut charakterisiert.

Table 3-4. Extraction and solubilization of proteins and lipids from membranes by various detergents

Detergent	Solubilized material (mg/ml)	
	Proteins	Lipids
Cetylpyridinium chloride (CPC)	9.1	1.3
Triton X-100	6.2	1.5
Thesit	5.9	2.0
Propane sulfonate	5.1	4.4
SDS	4.6	5.4
Octyl glucoside	4.4	4.0
Dodecyl maltoside	3.9	5.8
Triton X-114	2.9	2.8
Sodium cholate	2.5	4.9
CHAPSO	2.5	6.5
CHAPS	2.5	7.7

After treatment of the membranes with the detergents of Figure 3-12, the soluble fraction was dialyzed to remove the free detergents and centrifuged to remove insoluble material. The lipids and proteins present in the soluble material were measured. Data from P. Banerjee (1999), in *Encyclopedia of Molecular Biology* (T. E. Creighton, ed.), Wiley-Interscience, NY, p. 664.

(4) Ionisation

Wasser dissoziiert spontan in ein Proton und ein Hydroxid Ion; der Wert für K_{eq} ändert sich etwas mit der Temp.; Definitionen für pH und pK_a

Gleichung von Henderson-Hasselbach: fundamental für alle Betrachtungen betr. pH und Ionisation

$$pH = pK_a - \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Komplette Ionisation einer einzelnen, isolierten Gruppe erfordert eine pH-Änderung von mehr als 2 pH Einheiten. Die Variation der Ionisation einzelner Gruppen wird meist durch Ionisationskurven beschrieben.

Ionisationskurve

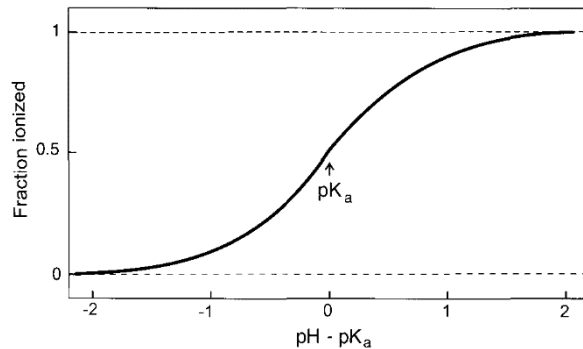


Figure 3-13. An ionization curve for a single group in isolation. The fraction of the basic form (A^-) of a monobasic acid (HA) is depicted as a function of the pH. The pH is expressed relative to the pK_a of the group.

Intrinsische pK_a -Werte einiger biol. relevanter Gruppen in biol. MM

Table 3-5. The pK_a values for amino acids in peptides and bases in nucleosides

Amino acid residues in peptides	pK_a	Bases in nucleosides	pK_a
α -NH ₂	7.8	Adenine (N ¹)	3.52
α -COOH	3.6	Cytosine (N ³)	4.17
Asp (C ^γ OOH)	4.0	Guanine (N ¹)	9.42
Glu (C ^δ OOH)	4.5	Guanine (N ⁷)	3.3
His (imidazole)	6.4	Uracil (N ³)	9.38
Lys (ϵ -NH ₂)	10.4	Thymine (N ³)	9.93
Arg (guanidine)	≈ 12		
Tyr (O ¹ H)	9.7		
Cys (S ¹ H)	9.1		

Data from A. R. Fersht (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd edn, Freeman, NY, Table 5.1, and G. M. Blackburn (1996) in *Nucleic Acids in Chemistry and Biology: DNA and RNA structure*, 2nd edn (G. M. Blackburn and M. J. Gait, eds), Oxford University Press, Oxford, Table 6-TAB.

Die Titrationsskurve einer ionisierenden Gruppe kann auf verschiedene Art beeinflusst werden:

- (i) durch die Ionisation anderer, in der Nähe liegender Gruppen;
- (ii) durch die Zugänglichkeit zum LM und dessen Polarität (z.B. Abnahme der Polarität des LM hemmt die Ionisation zugänglicher Amino- und Carboxylgruppen; vgl. Fig. 3-14)
- (iii) Sperrigkeit von umgebenden aliphatischen Gruppen (vgl. Tabelle 3-6)

Diffusionskontrollierte Protonierungsreaktionen erfolgen mit Geschw.Konstanten (2. Ordnung) von etwa $10^{10} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; bei niedrigen H^+ Konzentrationen (z.B. pH 10) kann die Geschw.Konstante auch nur 1 s^{-1} betragen.

Einfluss nichtwässriger LM

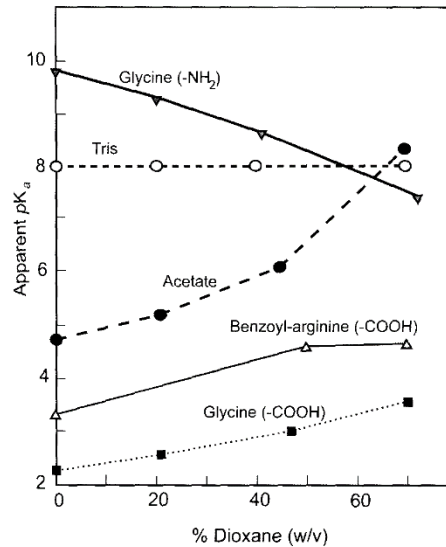


Figure 3-14. Effect of a nonaqueous environment on the pK_a values of amino and carboxyl groups. The apparent pK_a was measured at various concentrations of dioxane. Data from A. Fersht (1977) *Enzyme Structure and Mechanism*, W. H. Freeman, Reading.

Sterische Effekte

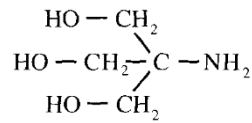
Table 3-6. Steric effects on the ionization of carboxyl groups

Model compound	pK_a value
$H_3C - CO_2H$	5.55
$ \begin{array}{c} CH_3 \quad H \\ \quad \\ CH_3 - C - C - CO_2H \\ \quad \\ CH_3 \quad CH_3 \end{array} $	6.25
$ \begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH_2 \\ \\ CH_3 - CH_2 - C - CO_2H \\ \\ CH_2 \\ \\ CH_3 \end{array} $	6.44
$ \begin{array}{c} CH_3 \quad CH_3 \\ \quad \\ CH_3 - C - C - CO_2H \\ \quad \\ CH_3 \quad CH_3 \end{array} $	6.71
$ \begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH_3 - C - CH_2 - C - CO_2H \\ \quad \\ CH_3 \quad CH_3 \end{array} $	6.97

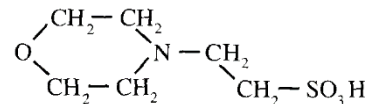
The pK_a values were measured in equal volumes of methanol and water at 40°C by G. S. Hammond & D. H. Hogle (1955) *J. Am. Chem. Soc.* 77, 338-340.

pH-Messungen: meist mit Glaselektroden; nur für Protonen selektiv permeabel; jedoch auch ein wenig für Na⁺ Ionen; somit können hohe Na⁺ Konzentrationen, insbes. im Alkalischen, den gemessenen pH-Wert verfälschen. Weitere Fehlerquellen: Kalibrierung bei Messtemp., mangelnde Temp.-Konstanz; alle Puffer/Lösungen mit hohem pH absorbieren Kohlendioxid (werden also mit der Zeit saurer!)

Puffer: besteht aus hohen Konz. einer Base (A) und der konjugierten Säure (HA); muss einen pK_a-Wert nahe dem Wert des gewünschten pH haben (vgl. Tabelle 3-7); leider gibt es wenig Puffer mit pK_a-Werten nahe Neutralpunkt; die meisten nützlichen Puffer sind Amine mit elektronenziehenden Substituenten, z.B. Tris (pK_a = 8.1) und Morpholinethansulfonsäure (pK_a = 6.2)



Tris



2-Morpholinoethanesulfonic acid

Puffer mit Aminogruppen haben den Nachteil, dass ihre pK_a-Werte sich mit der Temp. ändern und die primäre Aminogr. mit diversen chem. Reagenzien reagieren kann! Phosphatpuffer pK_a nahe 7.0; Phosphat jedoch in viele biochem. Reaktionen involviert; pK_a auch von Salzkonz. abhängig!

Die Variation der pK_a-Werte mit der Temp. hängt von der Änderung der Enthalpie bei der Titration der puffernden Gruppe ab (vgl. Tab. 8.1 auf #14)

Phosphat-Puffer: obwohl 3 pK_a-Werte (etwa 2, 7 und 12), kein guter Puffer für die pH-Bereiche 3-6 und 8-11; Henderson-Hasselbach Gl. für Orthophosphat:

$$\text{pH} = 2 + \log \frac{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}{[\text{H}_3\text{PO}_4]} = 7 + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} = 12 + \log \frac{[\text{PO}_4^{3-}]}{[\text{HPO}_4^{2-}]}$$

Table 3-7. Some common buffers used in molecular biology

Buffer	pK _a
Histidine	1.82, 5.98, 9.17
Phosphate	1.96, 6.7, 12.3
Formate	3.75
Barbiturate	3.98
Acetate	4.8
Pyridine	5.23
Bis-tris (bis-(2-hydroxyethyl)imino-tris-(hydroxymethyl)-methane)	6.46
Pipes (1,4-piperazinebis-(ethanesulfonic acid))	6.8
Imidazole	7.0
Bes (N,N-bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethane-sulfonic acid)	7.15
Mops (2-(N-morpholino)propane-sulfonic acid)	7.2
Hepes (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-ethanesulfonic acid)	7.55
Tris-hydroxymethyl-amino-methane	8.1
Taps (N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminopropane sulfonic acid)	8.4
Borate	9.39
Ethanolamine	9.44
Caps (3-cyclohexylamino-1-propane-sulfonic acid)	10.4
Methylamine	10.64
Triethylamine	10.72
Dimethylamine	10.75

Vorteil von Phosphat-Puffer: transparent für UV-Licht

Nachteil von Phosphat-Puffer: unterstützen Algen- und Pilzwachstum; pK_a -Wert empfindlich gegenüber Ionenstärke (elektrostat. WW mit Phosphatgr.)

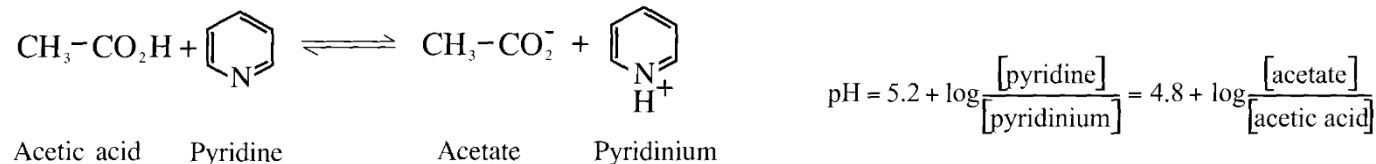
Alternative: Pyrophosphat-Puffer

Henderson-Hasselbach Gl. für Orthophosphat:
$$pH = 6.2 + \log \frac{[HP_2O_7^{3-}]}{[H_2P_2O_7^{2-}]} = 8.4 + \log \frac{[P_2O_7^{4-}]}{[HP_2O_7^{3-}]}$$

Tris-Puffer: Tris(hydroxymethyl)methylamin, $pK_a = 8.1$, wesentl. Änderung mit der Temp.!

Membran-undurchlässige 'Good'-Puffer (ca. 20): z.B. Morpholinethansulfonsäure

Flüchtige Puffer: Puffer, die durch Lyophilisation und Trocknen entfernt werden können; die beiden Komponenten müssen ähnliche pK_a -Werte besitzen, z.B. Pyridin (pK_a 5.2) / Essigsäure (pK_a 4.8)



oder: Ammoniumcarbonat, Gemisch aus Triethylamin und Kohlendioxid, Ammoniumacetat, Ammoniumformiat

(5) Salze und Ionen

Salze wechselwirken sehr stark mit Wasser; die meisten Ionen in Lösung sind von Wassermolekülen umgeben: unterschiedl. Ordnungsgrad (abhängig von Größe und Ladung). Folglich **verhalten sich Ionen in wässriger Lösung als ob sie wesentlich größer wären** (vgl. Tabelle 3-8). Die **Hydratation eines Ions** bezieht sich auf eine Durchschnittszahl von Wassermolekülen, die so fest gebunden sind, dass sie nicht vom LM entfernt werden können.

Bei konzentrierten Ionenlösungen treten Abweichungen vom idealen Verhalten auf.

Die Hydratations-WW ist primär elektrostatisch: zw. der Ladung des Ions und dem Dipol des Wassers (Fig. 3-15).

Die kleinsten Ionen haben die stärkste WW mit Wasser:

Mg²⁺ (2fache Ladung, kleiner Radius: 0.65 Å) bindet 6 Wassermoleküle fest in der 1. Hydratationshülle (oktaedr. Anordnung); ∃ eine 2. und vielleicht auch eine 3. Wasserhülle; die Wasserhülle zu entfernen, würde eine freie Energie von 455 kcal/mol erfordern.

Im Gegensatz dazu: **K⁺** (1fache Ladung, großer Radius: 1.3 Å) bindet 8-9 Wassermoleküle rund um das Ion; etwas weniger geordnet; die Hydratationsenergie ist nur 80 kcal/mol.

Anionen haben eine stärkere WW mit Wassermolekülen als Kationen, vermutl. aus sterischen Gründen (vgl. Abb. 3-2 auf #95): weil die pos. Ladung an den H-Atomen des Wassermoleküls nahe der Oberfläche platziert und somit näher dem Ion ist, während die neg. Ladung des O-Atoms im Innern verborgen und somit entfernter vom Ion ist. Diese WW zw. Ion und Wasser sollte auch die Wasserdipole (und die Beteiligung an HB) vergrößern.

Table 3-8. Comparison of the radii of ions in crystal structures and as interred from their hydrodynamic properties

Ion	Radius (Å)	
	Crystal	Hydrodynamic
Li ⁺	0.6	3.7
Na ⁺	0.95	3.3
Mg ²⁺	0.65	4.4
Ca ²⁺	0.99	4.2
Zn ²⁺	0.74	4.4

Data from M. Daune (1999) *Molecular Biophysics: structures in motion*, Oxford University Press, Oxford, p. 324.

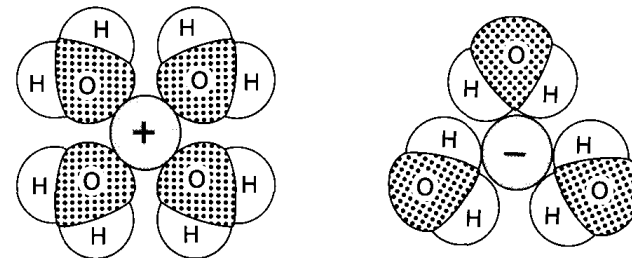


Figure 3-15. Simple schematic diagram of the interaction of cations (+) and anions (-) with surrounding water. Note that this electrostatic interaction should increase the electrostatic dipole of the water molecules and the tendency of the outer atoms of the water molecules to participate in further hydrogen bonds.

(6) Elektrostatische WW in Wasser: Debye und Hückel

Elektrostatische WW in Wasser werden mit steigender Temp. stärker.

Ionen neigen dazu, sich in der Nähe von Ladungen des entgegengesetzten Vorzeichens anzusammeln. Der Debye'sche Abschirmungsradius (Debye screening distance) ist ein Maß für die Distanz, bei der elektrost. WW durch mobile Ionen abgeschwächt werden (oft als Dicke der Ionenwolke rund um ein Ion interpretiert).

Die Poisson-Boltzmann Gl. wird für die meisten Berechnungen elektrost. WW verwendet.

(7) Löslichkeiten in Wasser

Um in Wasser löslich zu sein, muss ein Molekül das erforderliche Volumen einnehmen und die Wasserstruktur (zumindest) innerhalb dieses Volumens aufbrechen können. Das erforderliche Volumen (partielles molekulares Volumen) reflektiert nicht nur das vdW-Volumen sondern auch Änderungen, die durch die Anordnung der Flüssigkeit ringsherum verursacht sind (vgl. #90).

Die Löslichkeit eines Moleküls in Wasser hängt davon ab, wie viele ungünstige Aspekte (Kreation einer Kavität im Wasser) durch günstige WW mit den umgebenden Wassermolekülen (d.h. seine Hydrophilizität) kompensiert werden.

Es gilt ganz allgemein: je polarer die Oberfläche eines MM, desto größer ist seine Löslichkeit in Wasser. Andererseits hängt die Löslichkeit eines Moleküls von seiner Freien Energie in Lösung bzw. im Festzustand ab. Wenn der Festzustand (wegen WW zw. den Molekülen) energetisch günstiger ist, wird das Molekül in Wasser nicht besonders löslich sein. Das macht die Vorhersage von Löslichkeiten (z.B. Proteinen) etwas problematisch.

Einsalzen, Aussalzen (Salting In, Salting Out): Die Löslichkeiten von Molekülen in Wasser hängen von der Salzkonz. ab. Salzkonz. werden zumeist durch die Ionenstärke I definiert:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i Z_i^2$$

wobei c_i die molare Konz. des Ions i und Z dessen ionische Ladung ist.

Die Abhängigkeit der Löslichkeit eines Moleküls von der Salzkonz. durchläuft im Allgemeinen ein Maximum (Fig. 3-16), abhängig von der Art des Salzes; hauptsächlich bei wasserlöslichen Proteinen untersucht, Ursache: 2 Phänomene:

(i) Bei niedrigen Salzkonz.: Einsalzen von Proteinen, die Proteinlöslichkeit steigt. Dieser Effekt hängt von den pos. und neg. Gruppen auf der ASA ab; diese Gruppen werden von den Salzionen umgeben, was die Löslichkeit entsprechend der Debye-Hückel Gl. steigert: $\log\left(\frac{S_s}{S_w}\right) = Z^2 I^{1/2} A$

wobei S_s und S_w die Löslichkeiten in An- bzw. Abwesenheit von Salz sind, Z = Nettoladung des Proteins, I = Ionenstärke, A = Kombination von (z.T. proteinspezifischen) Konstanten.

(ii) Bei hohen Salzkonz. (>0.5 M): Aussalzeffekt dominiert, die Proteinlöslichkeit nimmt gemäß Smoluchowski-Gl. mit zunehmender Salzkonz. ab: $\log S_s = \beta - K^s I$, wobei β = proteinspezifische empirische Konstante, K^s = salzspezifische Aussalz-Konstante (vgl. Fig. 3-17).

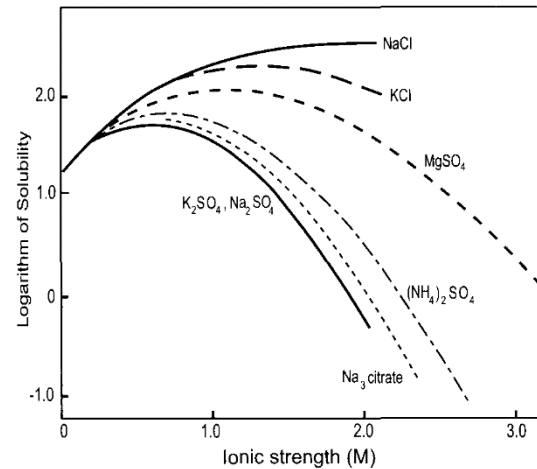


Figure 3-16. The solubility of hemoglobin with carbon monoxide bound in various electrolytes at 25°C. The solubility is expressed as grams per 1000 grams of H₂O. Data from A. A. Green.

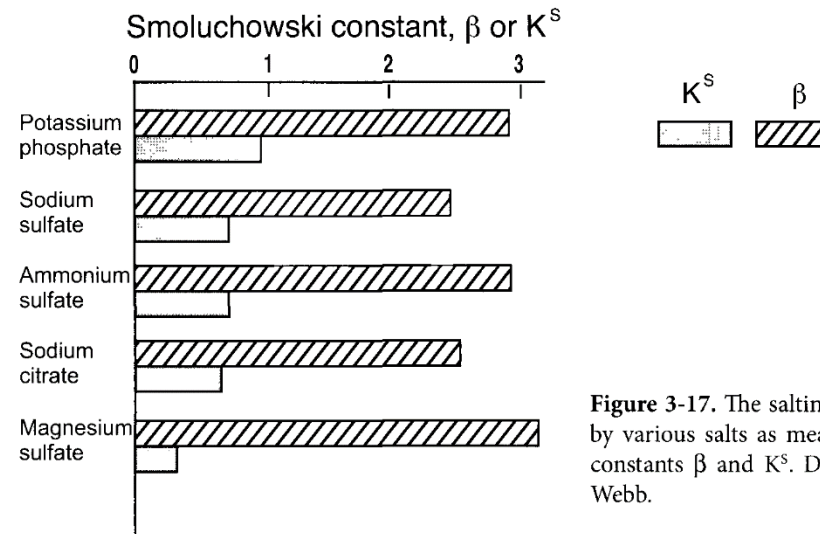


Figure 3-17. The salting-out of carboxyhemoglobin by various salts as measured by the Smoluchowski constants β and K^s . Data from M. Dixon & E. C. Webb.

Die Reihenfolge der Aussalz-Effektivität verschiedener Salze ist für die meisten Proteine ähnlich und folgt den **Hofmeister Reihen**. Die Größe von K^s wird durch die präferentielle Bindung des betr. Salzes an das Protein bestimmt. Salze, die eine präferentielle Hydratation induzieren (= negative Bindung von Salz), reduzieren die Löslichkeiten von Proteinen, während Salze, die eine präferentielle Bindung aufweisen, zu einer Zunahme der Löslichkeit führen.

(8) Hofmeister Reihen

Die Hofmeister Reihen (lyotrope Reihen) wurden von Hofmeister 1888 (!) beschrieben (Arbeiten betr. Präzipitation von Serumglobulinen durch versch. Salze). Die gefundene Reihenfolge von Ionen (betr. Effektivität beim Aussalzen von Proteinen) wurde immer wieder und vielfach bestätigt: Stabilisierung von NA und Proteinen durch diese Ionen, Assoziations-/Dissoziations-Gl. von MM, Enzymaktivitäten und andere biochem. Funktionen, Löslichkeiten kleiner Moleküle, pH-Messungen von Lösungen etc.

← Stabilization Destabilization →

← Salting out Salting in →

Anions: $\text{SO}_4^{2-} > \text{CO}_3^{2-} > \text{F}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$

Cations: $\text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ = \text{K}^+ > \text{Na}^+ = \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Gdm}^+$

Anionen und Kationen sind in ihrer Wirkung voneinander unabhängig; ihre Effekte sind additiv.

Z.B. LiBr ist ein Einsalz-Agenz, während KF ein Aussalz-Agenz ist. Umstrukturierung der Ionen zeigt, dass sowohl KBr als auch LiF die Löslichkeit nicht beeinflussen (d.h. dass die Einsalzkapazität des einen Ions (Li^+ oder Br^-) durch die Aussalz-Charakteristika des Gegenions (F^- oder K^+) kompensiert wird.

In ähnlicher Weise ist das Guanidinium-Ion (Gdm^+) ein starkes Einsalz- und destabilisierendes Ion; GdmCl ist ein starkes Denaturierungsmittel; aber GdmSCN ist ein wesentlich stärkeres Denaturierungsmittel, während Gdm_2SO_4 tatsächlich Proteine stabilisiert (der stabilisierende Effekt des Sulfats macht den destabilisierenden Effekt des Gdm -Ions wett). Anionen scheinen einflussreicher als Kationen zu sein (vgl. auch #111).

Die Ionen auf der linken Seite jeder Serie (#114) sind klein oder haben hohe Ladungsdichten; sie vergrößern die Wasserstruktur; werden als **kosmotrop** bezeichnet. Sie verkleinern die Löslichkeiten der nichtpolaren Moleküle (d.h. sie salzen aus) und vergrößern die Oberflächenspannung des Wassers (die für die Bildung einer Kavität in Wasser erforderlich ist); sie stärken die hydrophobe WW.

Die Ionen auf der rechten Seite jeder Serie (#114) haben niedere Ladungsdichten; sie zerstören die Wasserstruktur; sie werden **chaotrop** genannt. Sie vergrößern die Löslichkeiten der nichtpolaren Moleküle (d.h. sie salzen ein) und schwächen den hydrophoben Effekt ab.

Die Trennlinie zw. den beiden Effekten liegt etwa bei Na^+ und Cl^- ; NaCl ist bezügl. der beiden Effekte praktisch 'neutral'.

Der Mechanismus der Ionenwirkung hängt vermutlich mit der Hydratation der Ionen zusammen, d.h. ihren Effekten auf die Orientierung der Wassermoleküle (durch elektrostatische Effekte auf HB Donor- und Akzeptor-Eigenschaften).

Ein Großteil der Effekte ist darauf zurückzuführen, dass Ionen in unterschiedlichem Ausmaß von Grenzflächen ausgeschlossen werden (Wasser/Luft bzw. Wasser/nichtpolare Oberflächen). Die Oberfläche ist für die Bestimmung der Löslichkeit essentiell (Messung der Oberflächenspannung). Die meisten Anionen, die Prozesse begünstigen, die Proteinoberflächen mit Wasser in Kontakt bringen (z.B. SCN^-) und demnach mit Proteinoberflächen interagieren müssen, akkumulieren präferentiell an der Luft-Wasser-Grenzfläche.

(9) Hydratation von MM

Funktionen und Eigenschaften nahezu aller biol. MM werden von ihrer WW mit Wasser bestimmt: Löslichkeit in Wasser, WW mit anderen MM oder Membranen. Die WWen eines MM mit dem LM werden hauptsächlich durch seine Oberfläche bestimmt. Die Hydratation eines MM ist der Betrag an Wasser, der vom MM immobilisiert oder präferentiell an das MM gebunden ist.

Die Hydratation wird durch die Summe aller WW der Wassermoleküle mit einzelnen Stellen der ASA des Moleküls bestimmt. Solche WW stammen von:

- (i) sehr starken WW (z.B. innerhalb von Proteinkavitäten)
- (ii) schwachen WW (z.B. Hydratation geladener oder anderer polarer Gruppen auf der Proteinoberfläche)
- (iii) sehr schwache WW (Wassermoleküle, deren Rotation oder Translation vorübergehend – wegen ihrer Nähe zum MM – gestört ist; entropisch)

All diese WW verursachen eine effektive Bindung des Wassers, d.h. eine Immobilisierung des Wassers durch das MM. Solch eine Bindung kann zwar nur für einen Augenblick an einer bestimmten Stelle bestehen, summiert sich aber bezogen auf die Gesamtoberfläche zu einem beachtlichen Betrag.

Die Messung der Gesamthydratation ist äußerst schwierig!

Das Ergebnis scheint eine Funktion der verwendeten Technik zu sein (Table 15-2) oder die verwendeten Messungen & Interpretationen sind unzureichend.

Die Interpretation der Details ist ebenfalls äußerst schwierig, da Wassermoleküle nahezu 'unsichtbar' sind.

Table 15-2. Hydrations of proteins and DNA measured in various ways, and expressed as grams of H₂O bound per gram of anhydrous molecule

Molecule	NMR freezing	Calorimetric	Hydrodynamic	Isopiestic
Ovalbumin	0.33	0.32	0.14	0.30
Lysozyme	0.34	0.3	0.46	0.25
Bovine serum albumin	0.40	0.4	0.41	0.32
Hemoglobin	0.42	0.32	0.63	0.37
Myoglobin	0.42	–	0.45	0.32
DNA	0.59	0.61	–	0.84

Data from C. R. Cantor & P. R. Schimmel (1980) *Biophysical Chemistry*, W. H. Freeman, NY, p. 552.

Röntgenkristallografie scheint nur die in einer bestimmten Position ganz stark wechselwirkenden Wassermoleküle zu detektieren; die anderen Wassermoleküle können in vielen Positionen vorkommen (→ über die Zeit gemittelte El.Dichte, Verschmierung der El.Dichte). NMR-Spektroskopie kann Wassermoleküle, deren Gefrieren durch die Anwesenheit des MM gestört wird, detektieren; aber der Großteil der Hydratationswässer wird, was die NMR-Eigenschaften betrifft, nicht perturbiert.

Also: weder Kristallografie noch NMR finden alle präferentiell gebundenen Wassermoleküle!

Präferentielle Hydratation vs. Präferentielle Bindung:

Die in einer wässrigen Lösung zusätzlich gelösten Stoffe (Co-Solutes) interagieren auch mit den Oberflächen biol. MM und beeinflussen deshalb ebenfalls deren Löslichkeiten und Stabilitäten. Sie können besser oder schlechter als das Wasser aus dem Überschuss des LM (bulk solvent) reagieren und werden üblicherweise als Liganden des MM behandelt.

Extrem schwach wechselwirkende Liganden (wie etwa die Agenzien, die die Proteinstabilität und -löslichkeit beeinflussen) sind in hohen Konz. (>1M) erforderlich; folglich muss auch Wasser von den Liganden-Bindungsstellen entfernt werden.

Die exp. Resultate einer Bindungsmessung (z.B. durch Gleichgewichtsdialyse) können dementsprechend neg. oder pos. Werte für das Ausmaß der Bindung anzeigen. In anderen Worten: Größe und Vorzeichen hängen nur von der Differenz zw. den 2 gemessenen Konzentrationen ab.

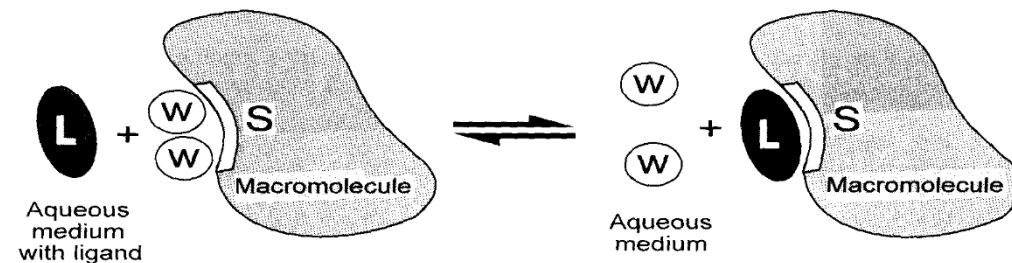


Figure 3-18. Schematic representation of the replacement of water molecules (W) by a ligand (L) at a binding site (S) on a macromolecule. Adapted from S. N. Timasheff.

Viele Substanzen, die Proteinstrukturen stabilisieren, ergeben, wenn man so vorgeht, neg. Bindungswerte.

Beispiel: RNase A in 1 M Sucrose ergibt -7.6 mol gebundenen Zucker pro mol Protein, d.h. es gibt ein Manko an Zuckermolekülen auf der Proteinoberfläche verglichen zur Zuckerkonz. im LM (bulk solvent); vgl. Fig. 3-19 bzw. Teil I (#135 und 138); dies nennt man präferentiellen Ausschluss (preferential exclusion). Der Mangel an Zuckermolekülen auf der Proteinoberfläche bedingt andererseits, dass jetzt dort ein Überschuss an Wasser vorliegen muss, eine präferentielle Hydratation (preferential hydration).

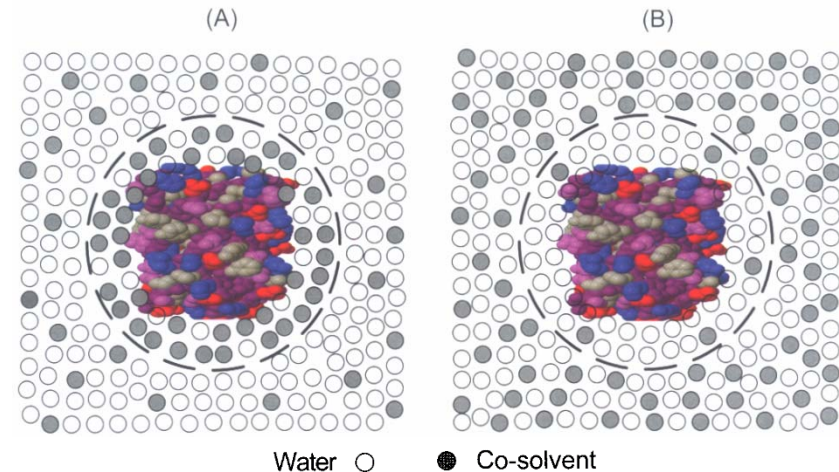


Figure 3-19. Schematic illustration of (A) preferential binding by a co-solvent and (B) preferential hydration. Preferential binding causes the co-solvent to be present in the solvation shell of the macromolecule at higher concentrations than in the bulk solvent. In preferential hydration, the co-solvent is excluded from the hydration shell and there is an enrichment of water. Adapted from G. C. Na & S. N Timasheff.

Die Anzahl der Moleküle der LM-Komponente (Wasser oder Co-Solvens), die Kontakte mit der MM-Oberfläche bilden, nennt man totale Bindung (total binding). Eine Messung kann mit allen Methoden erfolgen, die für die Ligandenbindung an MM in Frage kommen, z.B. kalorimetrische Titration oder spektrosk. Methoden (UV Absorption, Fluoreszenz); die meisten anderen Techniken messen nur die präferentielle Bindung.

Chemisches Potential

In Multikomponentensystemen müssen die Effekte der Konz.-Änderungen aller Komponenten betrachtet werden, d.h. thermodynamisch: die Gibbs'sche Freie Energie G des Systems. Dies wird üblicherweise erreicht, indem man das **chem. Potential** jeder Komponente i , μ_i , definiert: Änderung der Freien Energie des gesamten Systems bei Änderung der Konz. der Komp. i , n_i :

$$\mu_i = \frac{\partial G}{\partial n_i}$$

(10) Volumen, Oberfläche, Hydratation von MM (insbes. Proteinen): # 119-150 Beispiele & Fortgeschrittene Modeling-Techniken (Durchschlag & Zipper)

Hydration

Very many water molecules

Hydration Peculiarities:

Preferentially bound water molecules

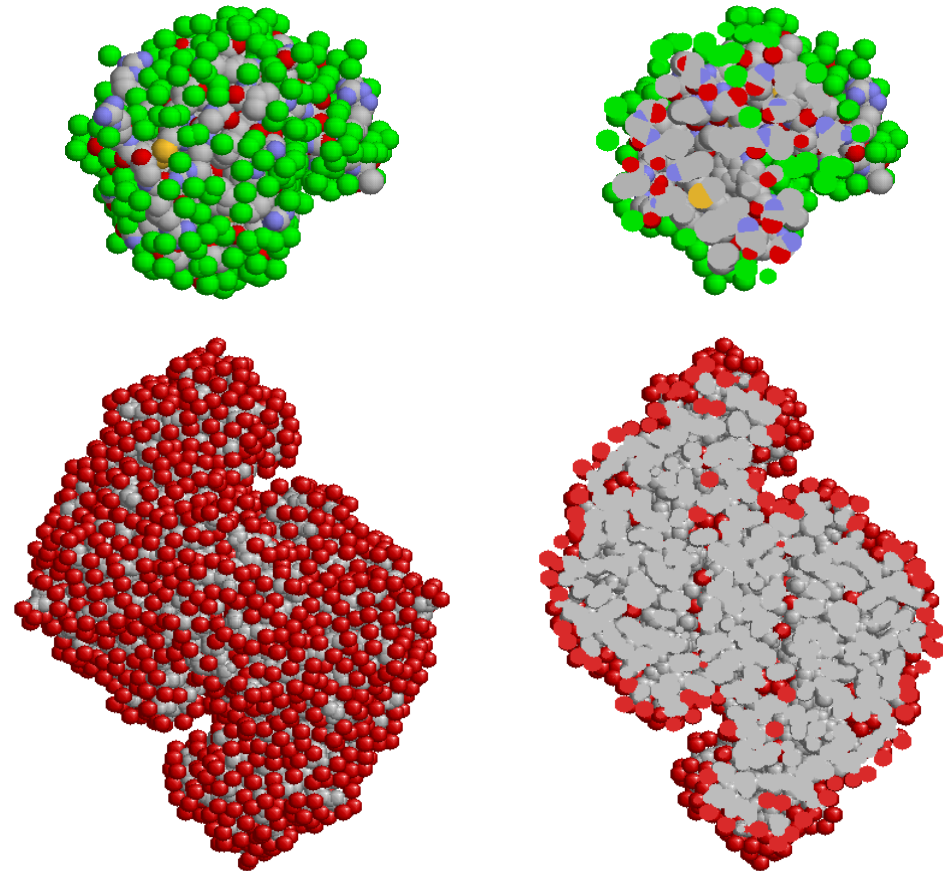
Peculiarities of bound water (e.g. density, retention time)

No complete water shell

Approx. 0.35 g water / g protein

Waters on the surface and in crevices and channels

Biologically highly relevant



Hydrated models for lysozyme (2LYZ.PDB; top) and citrate synthase (1CTS.PDB; bottom); green or red: water molecules; not to scale

I. Experiments

EXPERIMENTAL DETERMINATION of VOLUMES, SURFACES, and HYDRATION

(1) Partial specific volume: e.g., densimetry

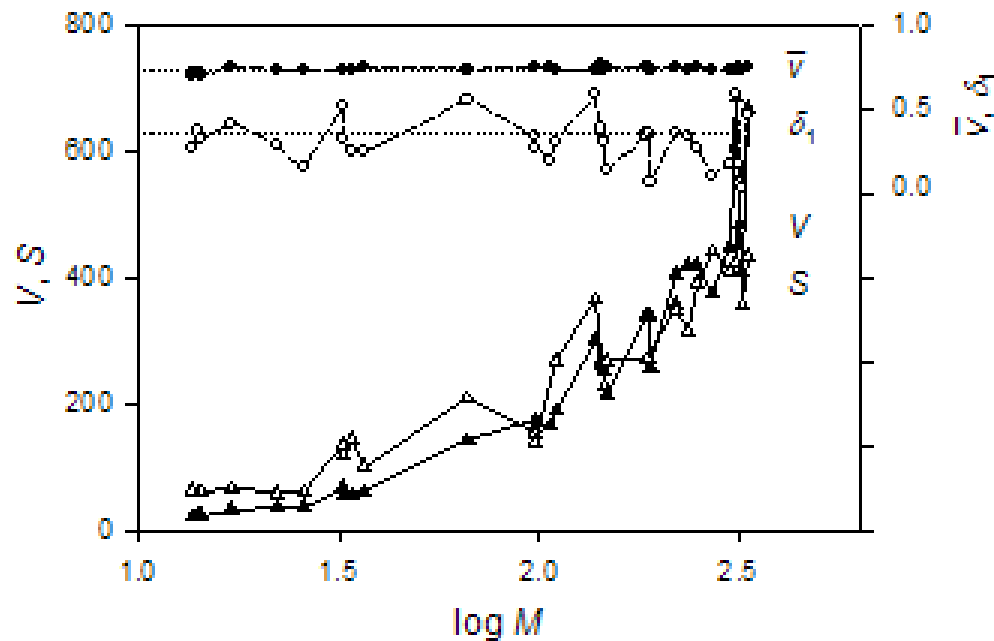
(2) Volume: e.g., SAXS

(3) Surface: e.g., SAXS

(4) Hydration: various physicochemical techniques [isopiestic, calorimetric, and hydrodynamic methods (AUC, densimetry); spectroscopy (IR, Raman, NMR); SAXS]

Investigated biomolecules: all types of small molecules and biological macromolecules, in particular proteins and their ligands

EXPERIMENTAL DETERMINATION



Protein properties as obtained by SAXS and densimetry: **volume** V (nm³), **surface area** S (nm²), **partial specific volume** (cm³/g), and **hydration** δ_1 (g/g)

Experimental determinations of V, S and δ_1 of proteins are rather inaccurate

AA	Kuntz	Hopfinger
Ala	1.5	1.0
Arg	3	2.3
Asn	2	2.2
Asp	6	6.5
Cys	1	
Gln	2	2.1
Glu	7.5	6.2
Gly	1	1.1
His	4	2.8
Ile	1	0.8
Leu	1	0.8
Lys	4.5	5.3
Met	1	0.7
Phe	0	1.4
Pro	3	0.9
Ser	2	1.7
Thr	2	1.5
Trp	2	1.9
Tyr	3	2.1
Val	1	0.9

- I.D. Kuntz: J. Am. Chem. Soc. 93 (1971) 514-516.
 - A.J. Hopfinger: Intermolecular Interactions and Biomolecular Organization, New York, Wiley, 1977.

Hydration of amino acids at pH 7 (in mol/mol) as obtained by NMR and thermodynamics (yellow: major differences); different data for different pH values

The values of AAs seem to be precise

II. Predictions

(1) PREDICTION of VOLUMES

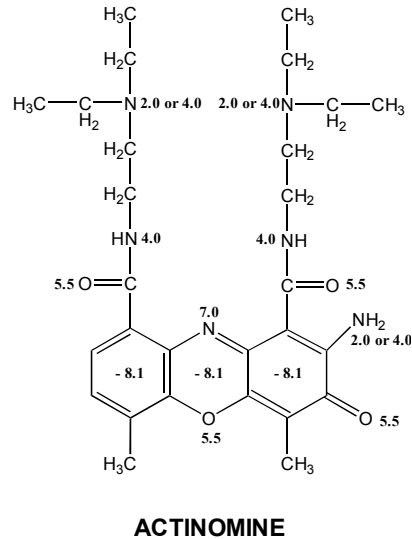
(1) Partial specific volume: procedures by Traube (organic molecules, 1899); Cohn & Edsall (proteins, 1943); calculations based on crystal data (no improvement); the universal *ab initio* approach (all types of small and large biomolecules, nonionic and ionic, and including any interactions with the solvent and other effects (ionization, electrostriction, hydration, ring formation))

(2) Anhydrous volume: modern analytical procedures and programs (e.g., SIMS) yield the anhydrous volume (van der Waals volume), summing up the contributions of the constituents

(3) Hydrated volume: consideration of hydration contributions are required; our hydration approaches (HYDCRYST, HYDMODEL)

Investigated molecules: small molecules and biological macromolecules

CALCULATION OF PARTIAL SPECIFIC VOLUMES

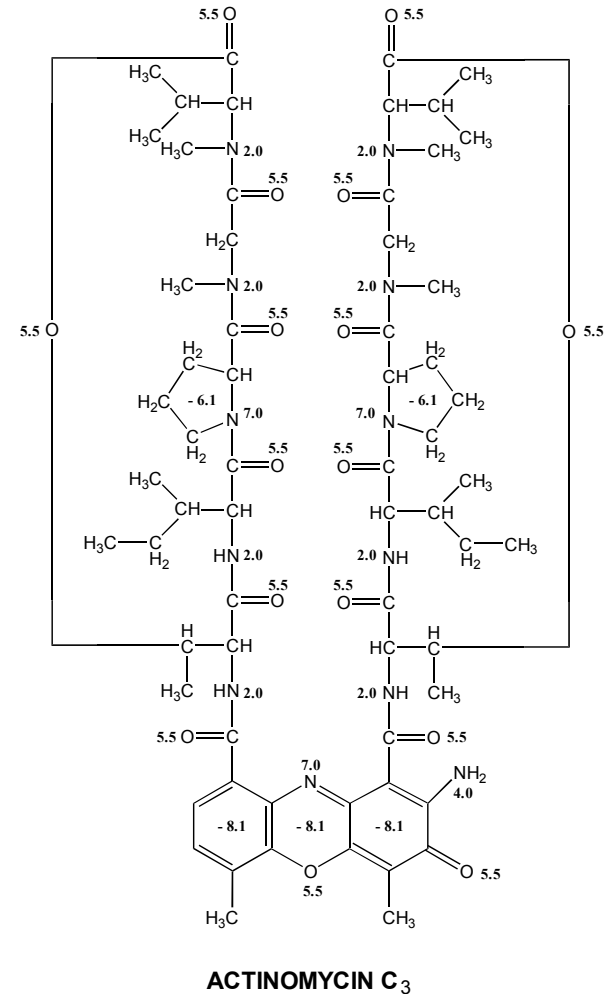


Calculation of the partial specific volume of actinomine and actinomycin C₃ using the 'universal volume approach' (Durchschlag & Zipper, 1994) and appropriate volume increments:

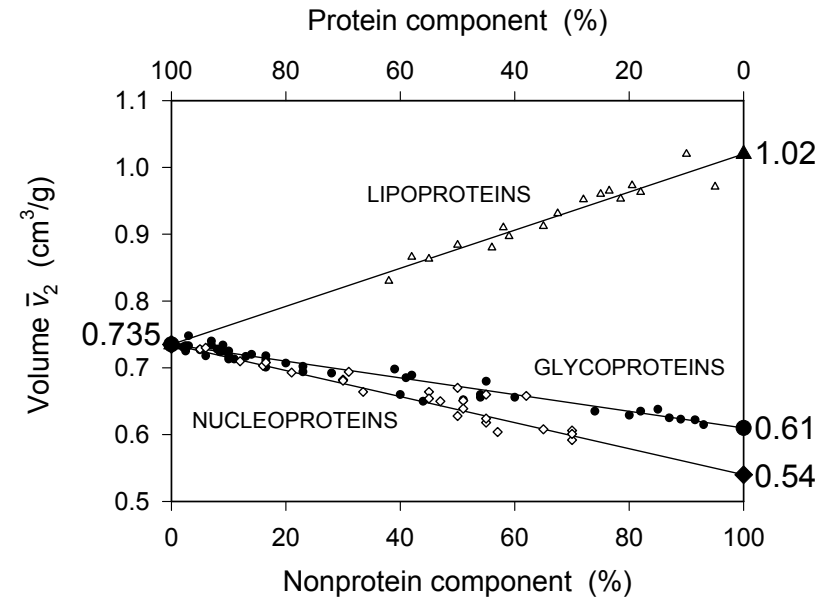
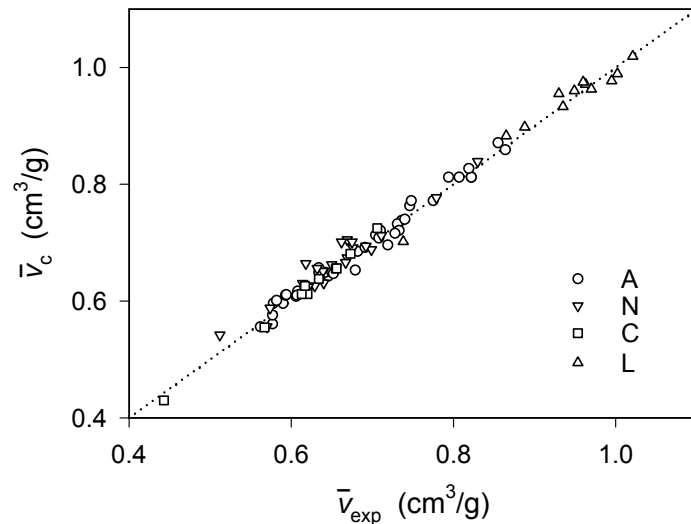
Actinomine: 0.830 cm³/g (calc.); 0.829 cm³/g (exp.)

Actinomycin C₃: 0.793 cm³/g (calc.); 0.795 cm³/g (exp.)

Good agreement between calc. and exp. values



COMPARISON OF CALCULATED AND EXPERIMENTAL PARTIAL SPECIFIC VOLUMES:



Different types of biomolecules:

Application of the universal approach

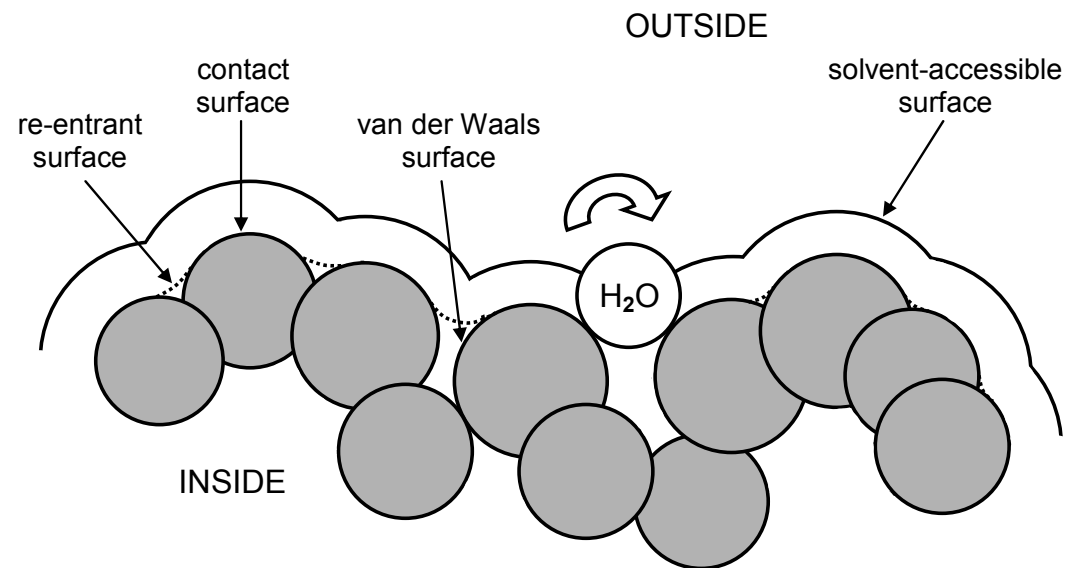
- A: amino acids, peptides, betaines
- N: nucleobases, nucleosides, nucleotides
- C: carbohydrates
- L: lipids and constituents

Conjugated proteins:

Additivity principle using default values for the major constituents (proteins, nucleic acids, carbohydrates, lipids)

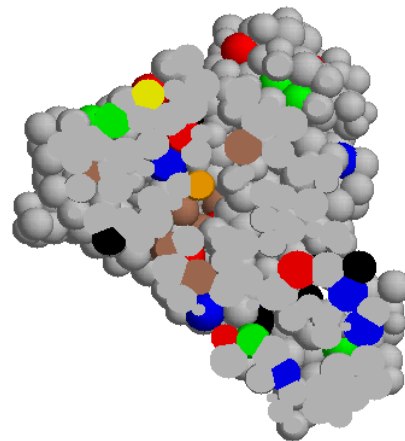
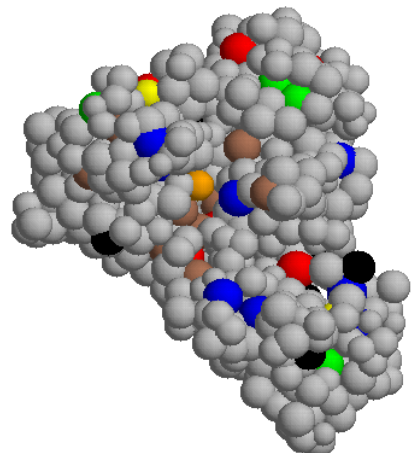
(2) PREDICTION of SURFACES

- Problems:**
- Surfaces are not well defined (different definitions for the molecular surface, smooth surfaces?)
 - different programs (e.g., SIMS, MSRoll) may yield quite different results, characteristic of an anhydrous or a hydrated protein



Visualization of 3D Models and of molecular dot surface points

E. coli Malate Synthase (1P7T.PDB); exhibits sulfhydryls sensitive to oxidation



Color code:

CYS: yellow

CEA: orange

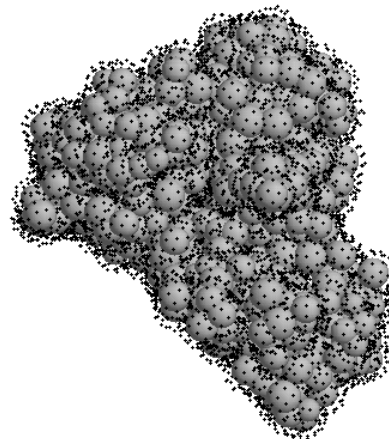
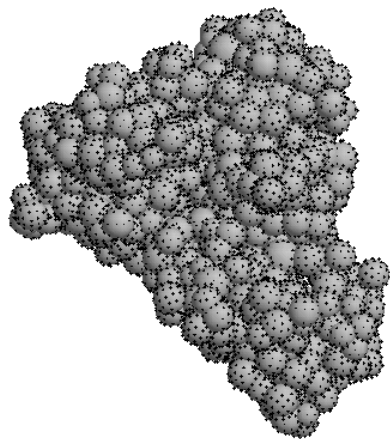
MET: brown

TRP: red

TYR: blue

PHE: green

HIS: black



Surface calculation:

SIMS

Creation of dot surface points, directly on the surface or in a certain distance

PREDICTION OF VOLUMES AND SURFACES OF SELECTED ANHYDROUS PROTEINS

Protein data from PDB and SWISS-PROT databanks

Surface calculations by SIMS or AA-SIMS ($r_{\text{probe}} = 1.45 \text{ \AA}$)

Protein	$N_{\text{chain}} (N_{\text{AA}}),$ M (kg/mol)	Surface approach	N_a	d_{dot} (\AA^{-2})	N_{dot}	S (\AA^2)	V (\AA^3)
Lysozyme	1 (129), 14.31	SIMS	1001	5.0	29613	5724	16115
Malate synthase	1 (722), 80.36	SIMS	5414	5.0	130974	24699	90987
		AA-SIMS	706	0.5	12008	23353	96277
				5.0	117434	23281	92743
Citrate synthase	2 (874), 97.84	SIMS	6888	3.0	104595	32119	118359
Bacteriophage fr capsid	180 (23220), 2472	AA-SIMS	23220	0.5	406388	756803	3119751
<i>L.t.</i> Haemoglobin, HBL complex	180 (29808), 3475 (including 144 haem groups)	AA-SIMS	28908	1.0	1078871	1088497	4162778

(3) PROBING DIFFERENT HYDRATION STRATEGIES

(1) **Approaches to the problem area:** estimation of δ , water shell, blowing up surface AAs, **use of individual waters**

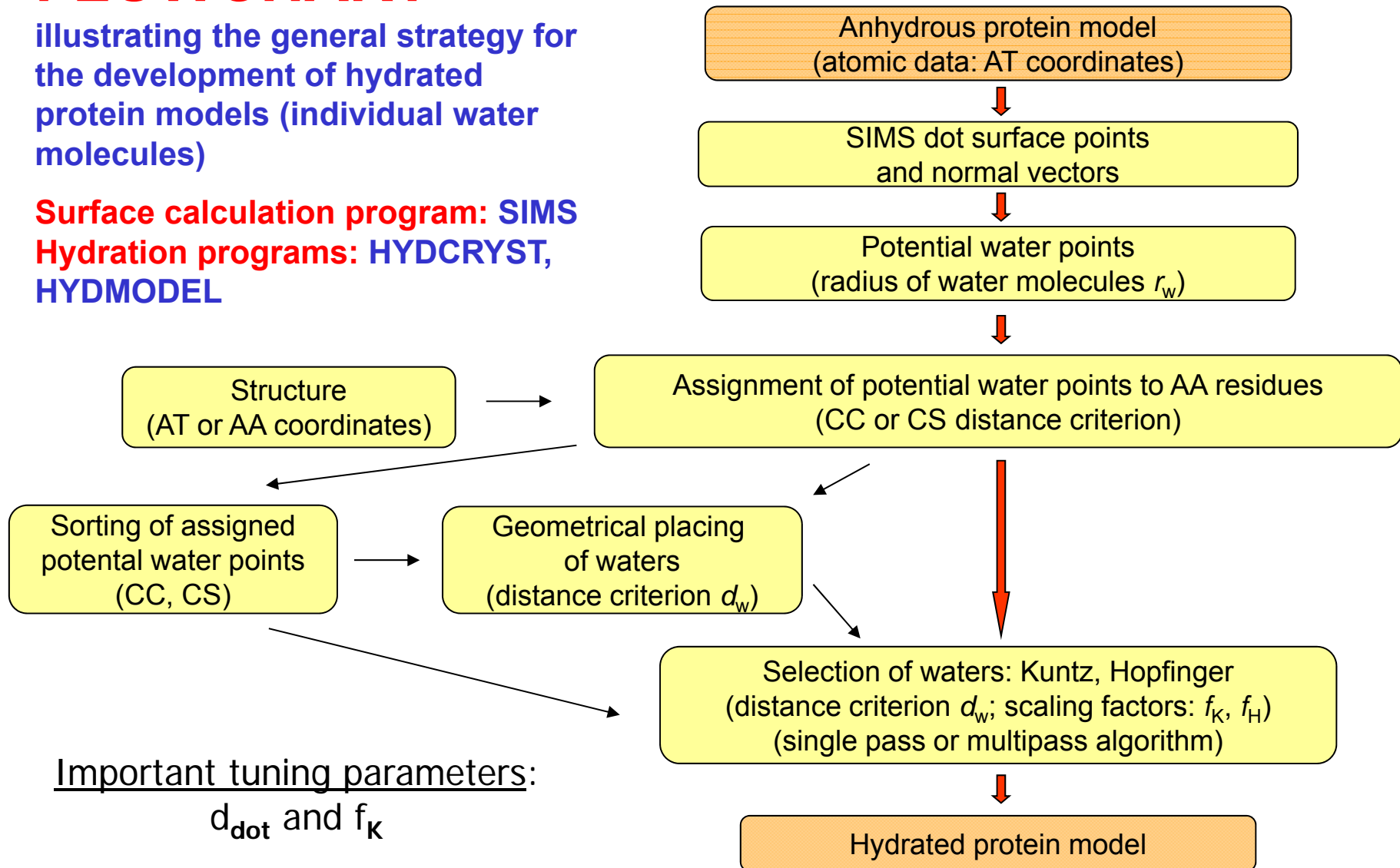
(2) **Application of examined approaches to a variety of small and large proteins in the absence/presence of ligands:** Insulin, BPTI, RNase A, Lysozyme, Myoglobin, Cellobiose Dehydrogenase, Malate Synthase, Citrate Synthase, Phosphorylase, LDH, Catalase, Apoferritin, Bacteriophage fr Capsid, *L.t.* Haemoglobin

(3) Comparison of **anhydrous and hydrated models**, structural and hydrodynamic parameters, in addition to $l(h)$ profiles and $p(r)$ functions; crucial comparison with crystal data

FLOWCHART

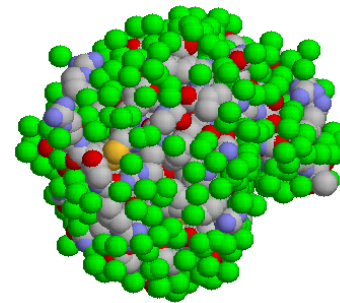
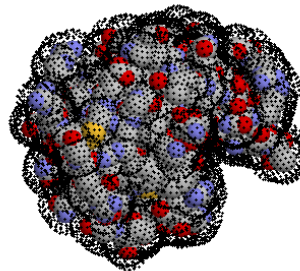
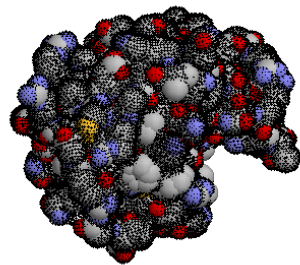
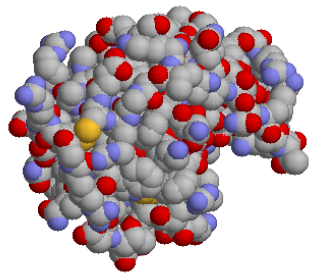
illustrating the general strategy for the development of hydrated protein models (individual water molecules)

Surface calculation program: SIMS
 Hydration programs: HYDCRYST, HYDMODEL

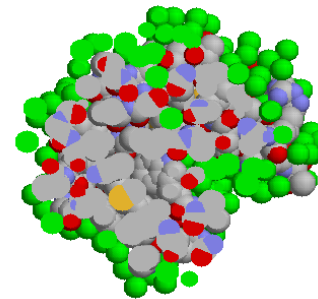
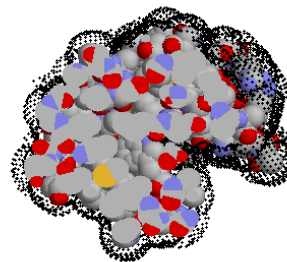
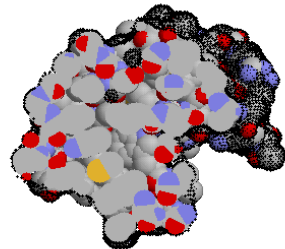
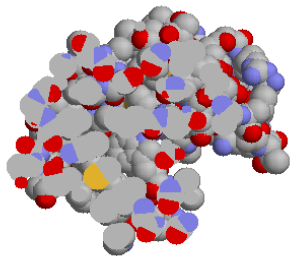


MODELING OF PROTEINS AND INDIVIDUAL WATER MOLECULES:

THE STEPS OF THE APPLIED APPROACH



**SPACE-FILLING
MODELS FOR
ANHYDROUS AND
HYDRATED
LYSOZYME,
TOGETHER WITH
CENTRAL SLABS**



**PDB file (2LYZ.PDB):
atomic coordinates**

**Program SIMS
(Vorobjev & Hermans):
surface topography**

Anhydrous
model (CPK
colors)

Anhydrous
model + dot
surface points

Anhydrous
model +
potential water
points

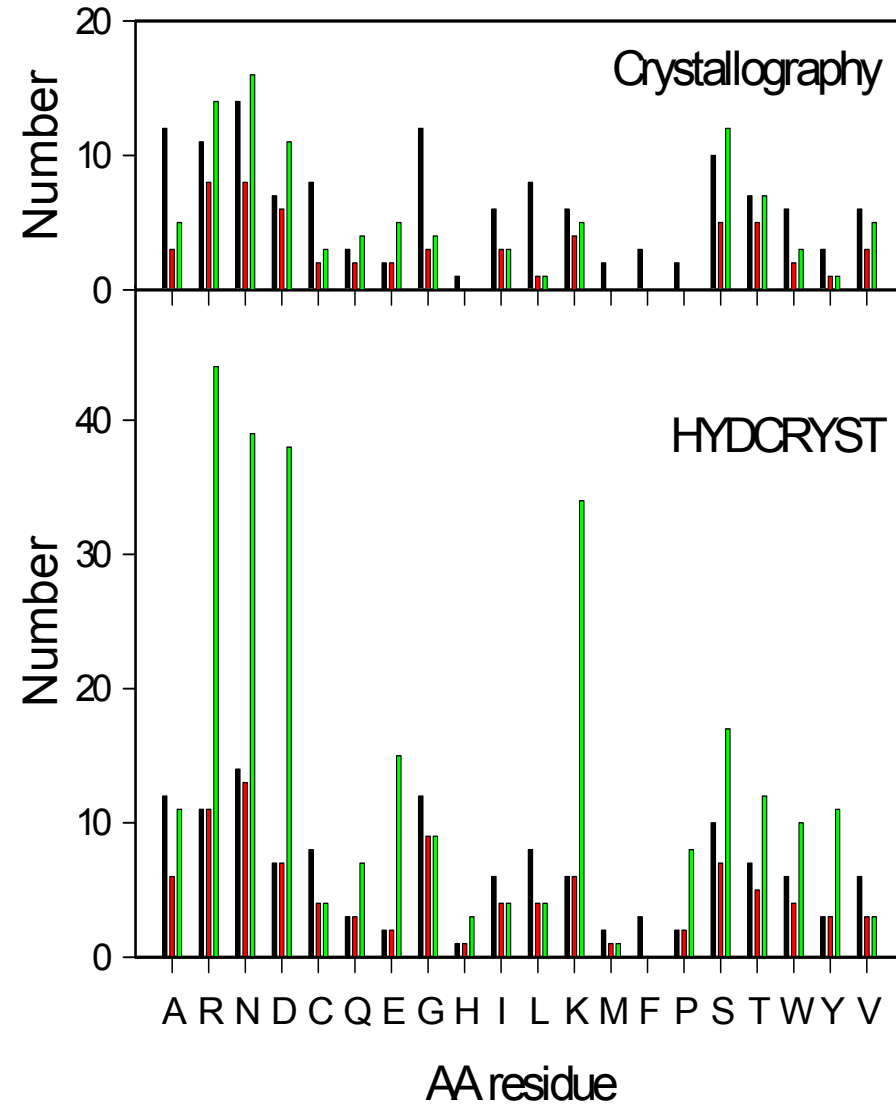
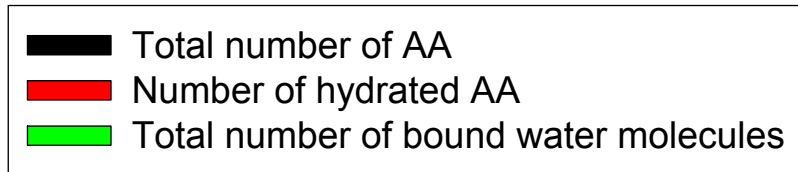
Hydrated model
(green: water
molecules)

**Programs HYDCRYST
or HYDMODEL:
potential hydration
sites**

COMPARISON OF PREDICTED HYDRATION SITES WITH REFERENCE DATA

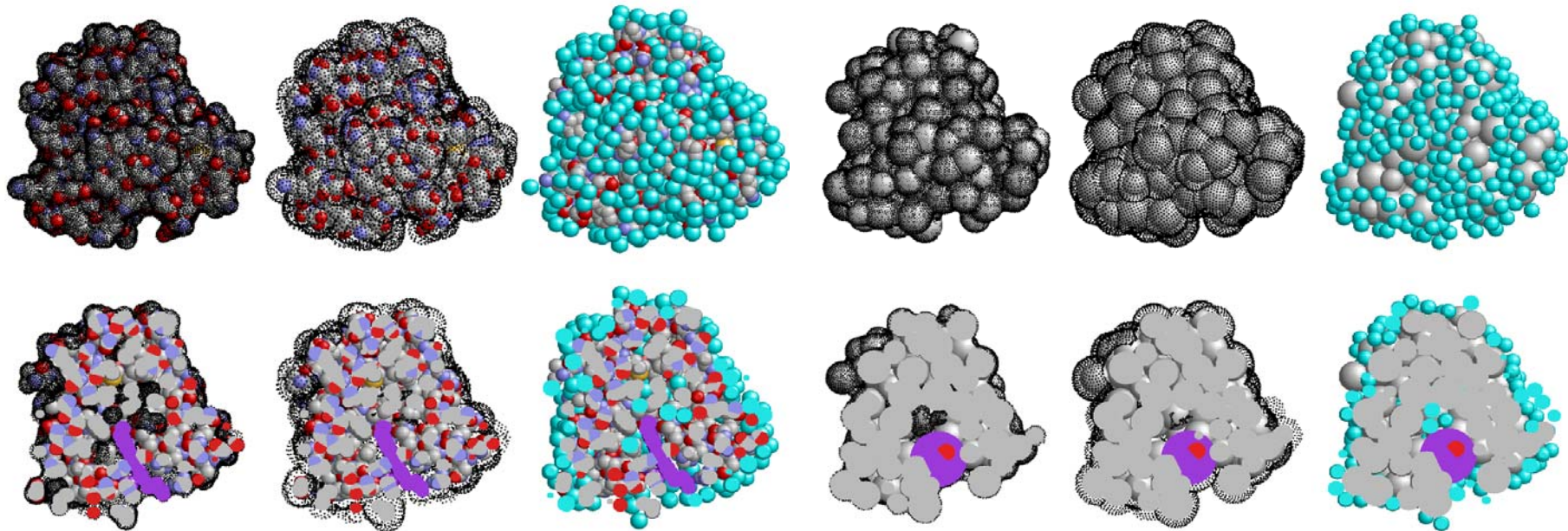
LYSOZYME:

Comparison of **crystallographic** and **HYDCRYST** data for hydration sites



MODELING OF PROTEINS, LIGANDS AND INDIVIDUAL WATER MOLECULES: CARBONMONOXIDE MYOGLOBIN (1VXC.PDB)

Protein (CPK) , Ligands: Haem (purple) and CMO (red)



Use of atom coordinates:

Unreduced model:

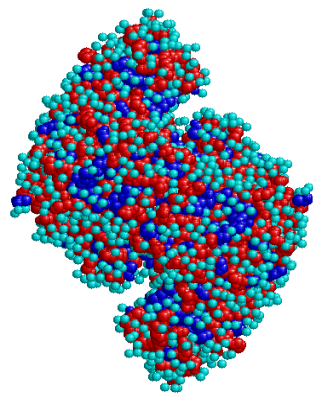
$N(\text{Protein}+\text{HOH}) \cong 1632 (1262+370)$

Use of amino acid coordinates:

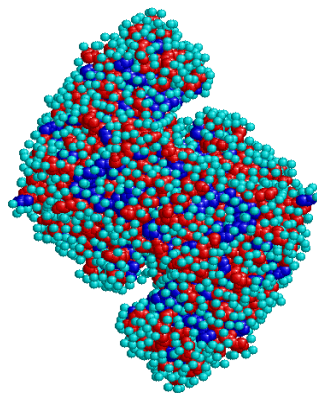
Reduced model:

$N(\text{Protein}+\text{HOH}) \cong 498 (155+343)$

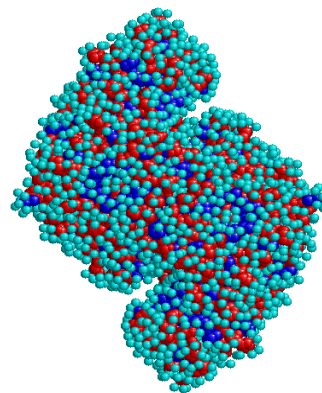
VISUALIZATION of MINIMUM, MEDIUM, AND MAXIMUM HYDRATION OF CS, plus central slabs



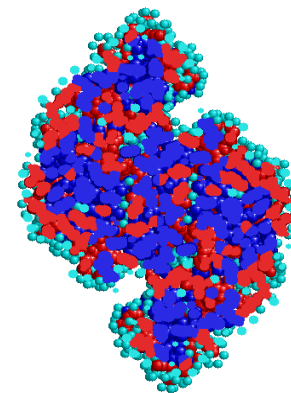
a



b



c

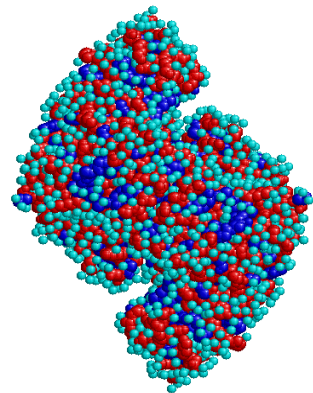


d

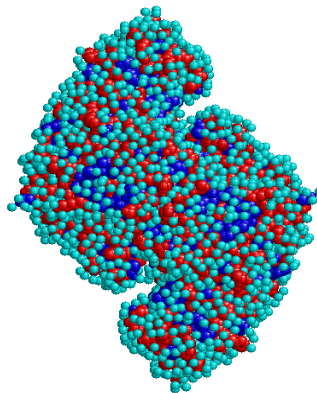
red:
polar AA

blue:
apolar AA

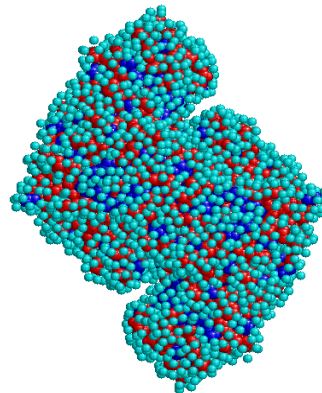
cyan:
O of bound
waters



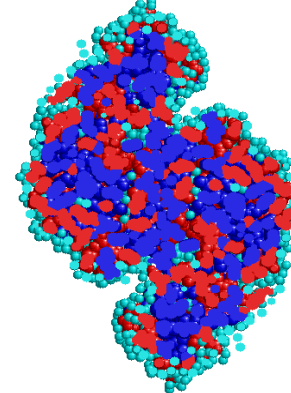
e



f



g



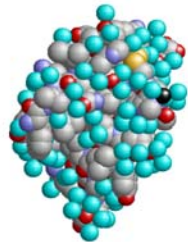
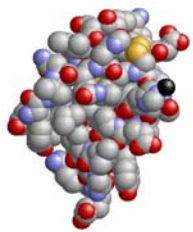
h

$d_{\text{dot}} =$
 0.1 \AA^{-2} (*a-d*)
 or
 3.0 \AA^{-2} (*e-h*)

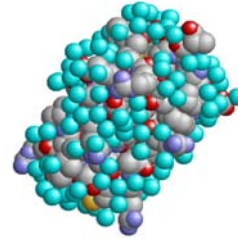
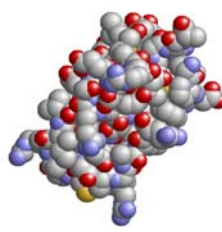
ANHYDROUS and HYDRATED MODELS

of Insulin, Trypsin Inhibitor, Ribonuclease A, Lysozyme, Malate Synthase

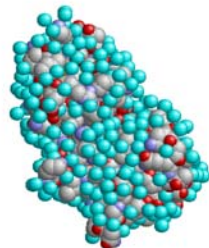
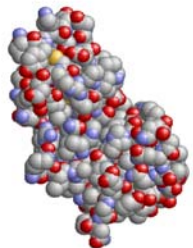
4INS



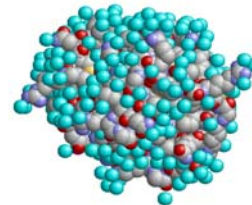
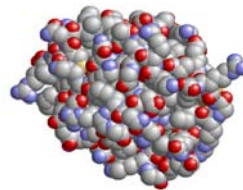
4PTI



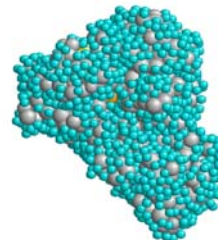
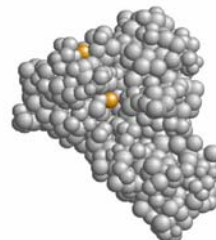
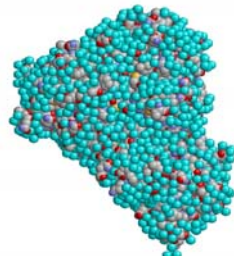
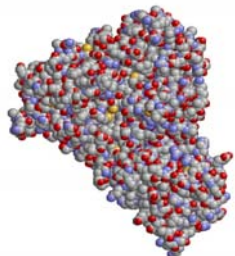
1RBX



2LYZ



1P7T



Approx. 2 waters per AA residue

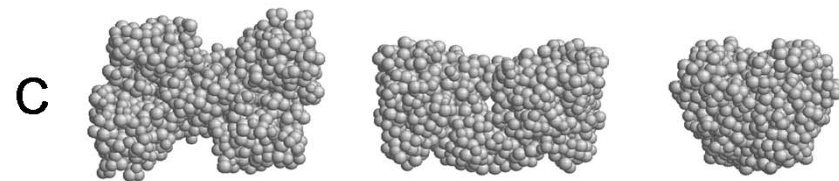
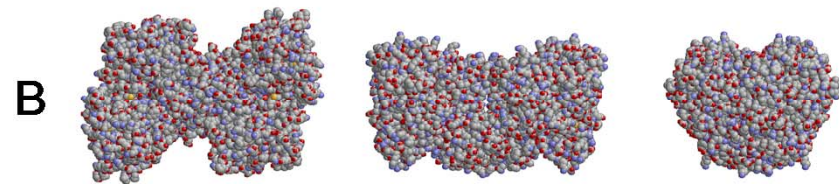
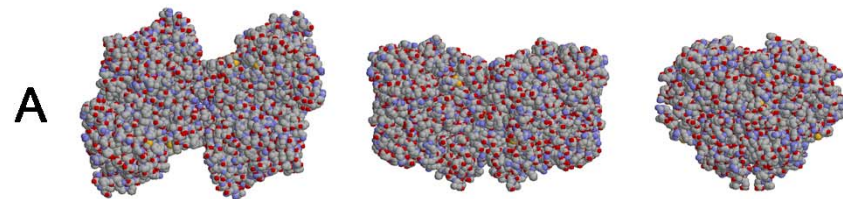
No complete water shell has been found

There are always hydrophobic patches on the surface (without significant hydration)

For precise considerations:
The influence of hydration is important

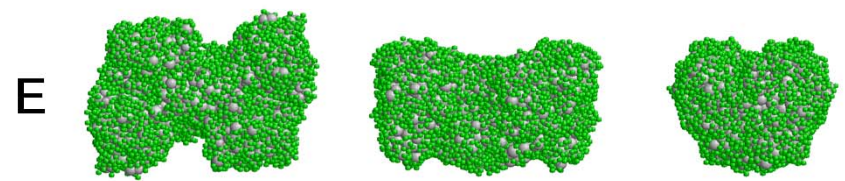
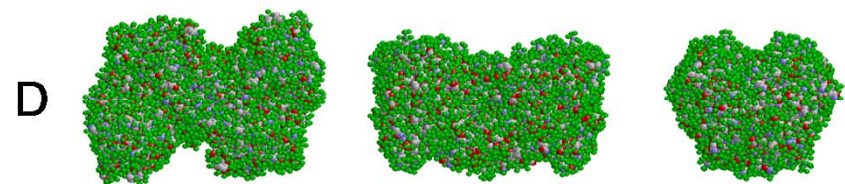
ANHYDROUS and HYDRATED MODELS

of rabbit GP (A) and *E.coli* MalP (B-E) based on the CRYSTAL STRUCTURE + SURFACE CALCULATIONS + HYDRATION ALGORITHMS



Anhydrous models

PHOSPHORYLASES



Hydrated models

E.coli MaIP PHOSPHORYLASE

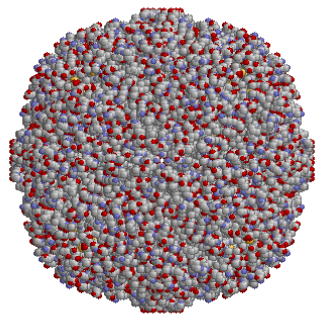
Anhydrous and hydrated models

	f_K	N_w	N_b	R_G (nm)	V (nm ³)	D (10 ⁻⁷ cm ² /s)	s (10 ⁻¹³ s)
Crystal structure, anhydrous	0	0	12732	3.830	219.9		
Reduced anhydrous model	0	0	1592	3.843	219.9	4.73	9.52
Hydrated models (HYDCRYST)							
$r_w = 0.145$ nm, $V_w = 0.0244$ nm ³	1.0	2569	15301	3.906	282.6		
			4161	3.937	282.6	4.52	9.10
	1.5–4.0	3481	16213	3.951	305		
			5073	3.991	305	4.49	9.03
Hydrated models (HYDMODEL)							
$r_w = 0.145$ nm, $V_w = 0.0244$ nm ³	1.0	2611	4203	3.906	283.6	4.57	9.19
				3.943			
	1.5–4.0	3669	5261	3.956	309 ± 8	4.51	9.07
				4.003			

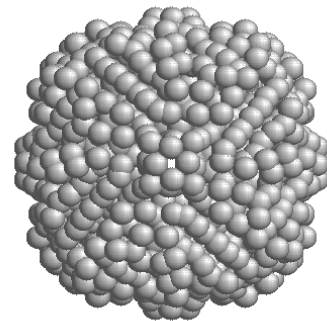
Substantial differences between the data for anhydrous and hydrated models

APOFERRITIN (2W0O.PDB)

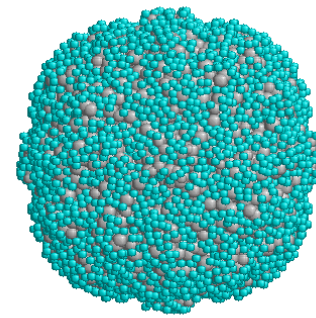
Unreduced and reduced bead models based on the crystal structure



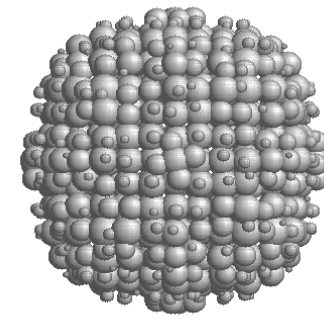
$N=32736$



RM, BD=1.0nm
 $N=1056$



$N=10594$
($N_w=6514$)



CG, GC, VS=1.0nm
 $N=1239$

Anhydrous models

Hydrated models

APOFERRITIN

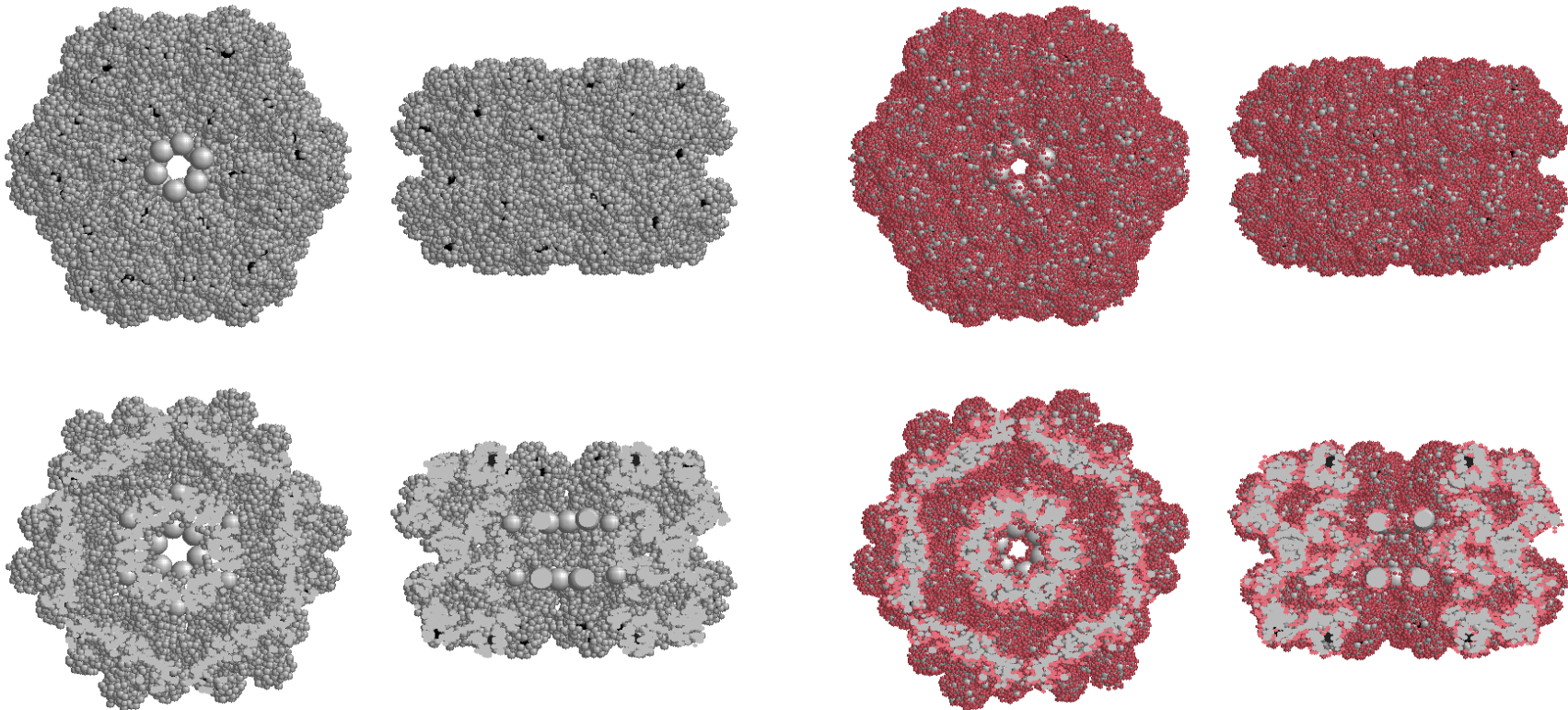
Anhydrous and hydrated models

	f_K	N_w	N_b	V (nm ³)	R_G (nm)	D (10 ⁻⁷ cm ² /s)	s (10 ⁻¹³ s)
Crystal structure, anhydrous			32736	564.0	5.305		
Anhydrous RM models:							
AT, BD=1.0nm			1056	564.0	5.289	3.52	18.64
AM, ICOM=10			408	564.0	5.282	3.54	18.72
Anhydrous CG models:							
AT, VS=1.0nm			1082	564.0	5.296	3.48	18.38
AM, VS=1.0nm			854	564.0	5.303	3.51	18.56
Hydrated models:							
AM, SC0 (minimum hydr.)	1.0	6519	10599	723.0	5.323	3.33	17.64
AM, SC0, CG, VS=1.0nm			1235	723.0	5.324	3.40	17.96
AM, EC0	1.0	[6519]	4080	723.0	5.318	3.42	18.09
AM, SC9 (maximum hydr.)	4.0	8347	12427	767.6	5.365		
AM, SC9, CG, VS=1.0nm			1262	767.6	5.360	3.37	17.83
AM, EC9	4.0	[8347]	4080	767.6	5.361	3.39	17.92

Significant differences between the data for anhydrous and hydrated models

***L.t.* HAEMOGLOBIN HBL COMPLEX**

AAs, modified, not reduced



Anhydrous
($N_b=28908$)

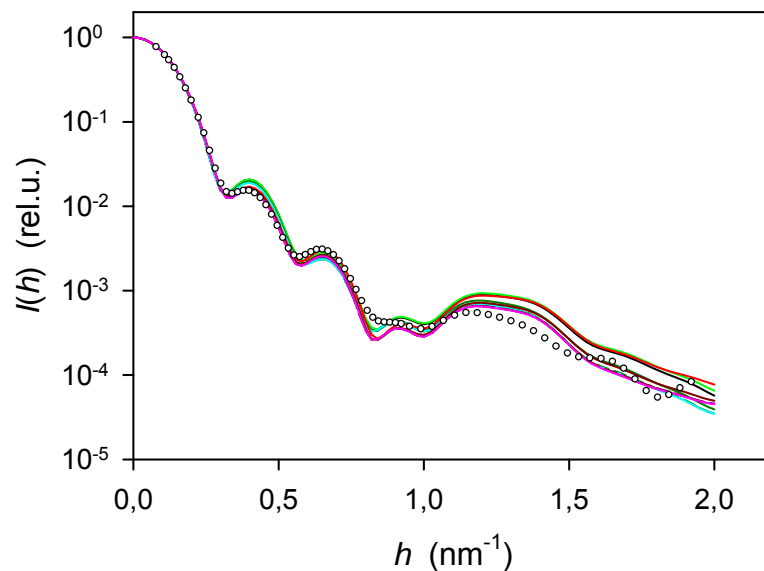
Hydrated
($N_w=51562$)

L.t. HAEMOGLOBIN HBL COMPLEX

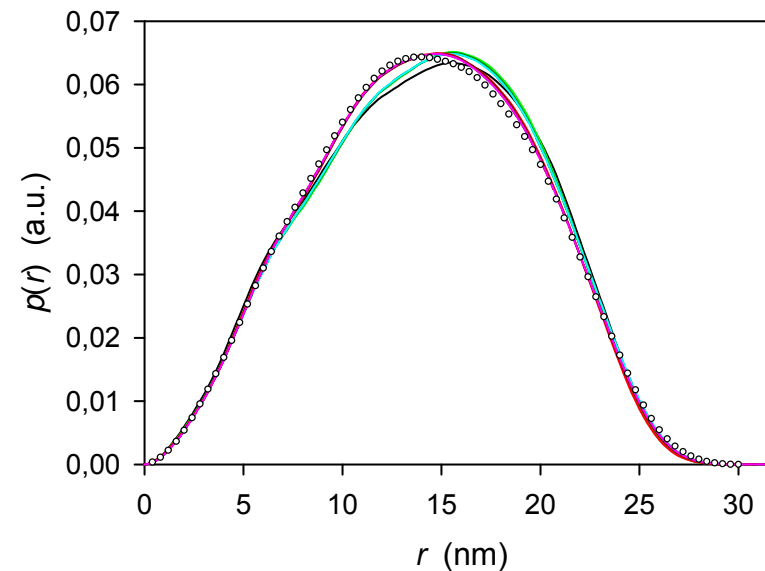
2GTL_A-O_(CU24N)

Comparison of SAXS functions (Hydrated models vs. SAXS experiment)

o: Exp.; lines: crystal-data-based models; ____: anhydrous, not reduced; **green**: anhydrous, reduced, not modified; **red**: anhydrous, reduced, modified (plus 24 additional beads)



Scattering curves $I(h)$



PDDF $p(r)$

Good accordance in particle dimensions

(4) COMPARISON OF PROTEIN MODELS

(many beads required)

(1) Comparison of protein models obtained by SAXS/SANS or EM and crystallography/NMR

(2) *Ab initio* modelling based on SAXS data

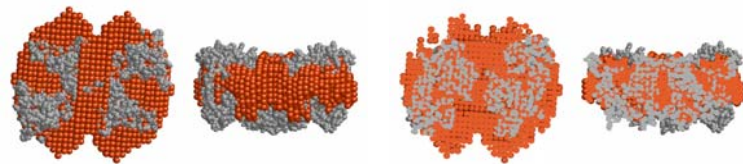
(3) Protein models obtained by cryo-EM

(4) Anhydrous and hydrated models (V/M-ratios 1.2 and 1.6-1.7, respectively)

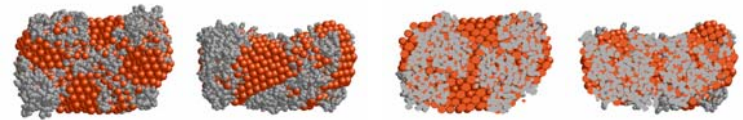
COMPARISON OF PROTEIN MODELS

obtained by SAXS and crystallography

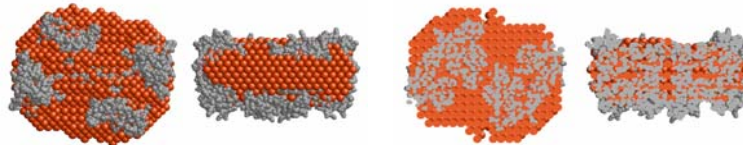
ab initio modelling (DAMMIN) based on experimental SAXS data



Trial-and-error



DAMMIN (av. P2U)

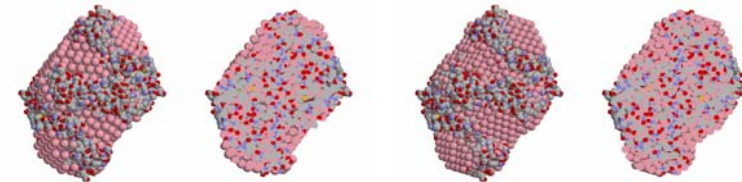


DAMMIN (av. P2OL)

Glycogen Phosphorylase

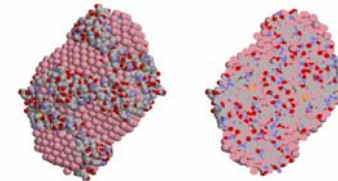
grey: crystal structure

red: SAXS models



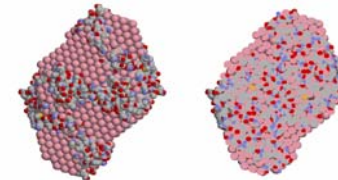
av. P1U

av. P2U



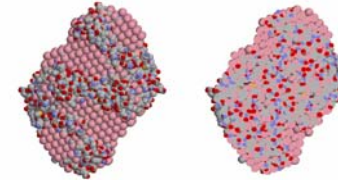
av. P2PU

av. P2OU



av. P2PL

av. P2OL



av. P2PC

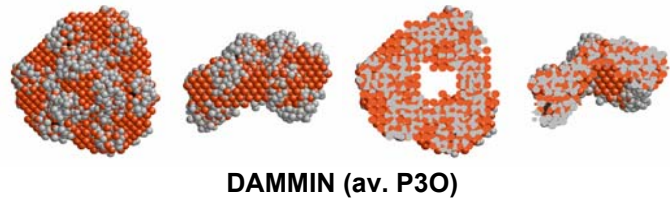
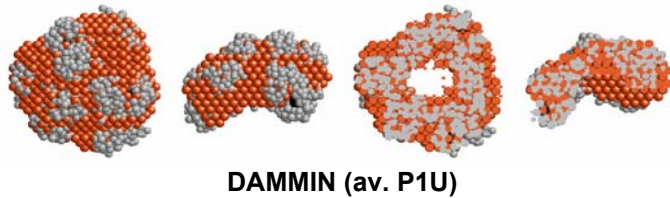
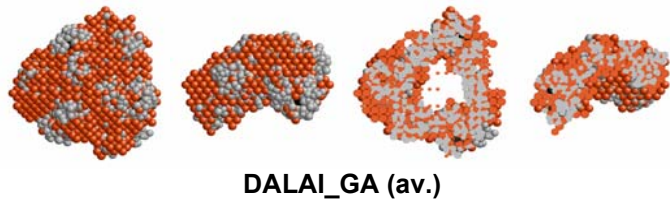
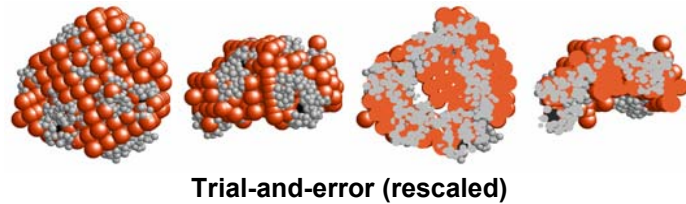
av. P2OC

Citrate Synthase

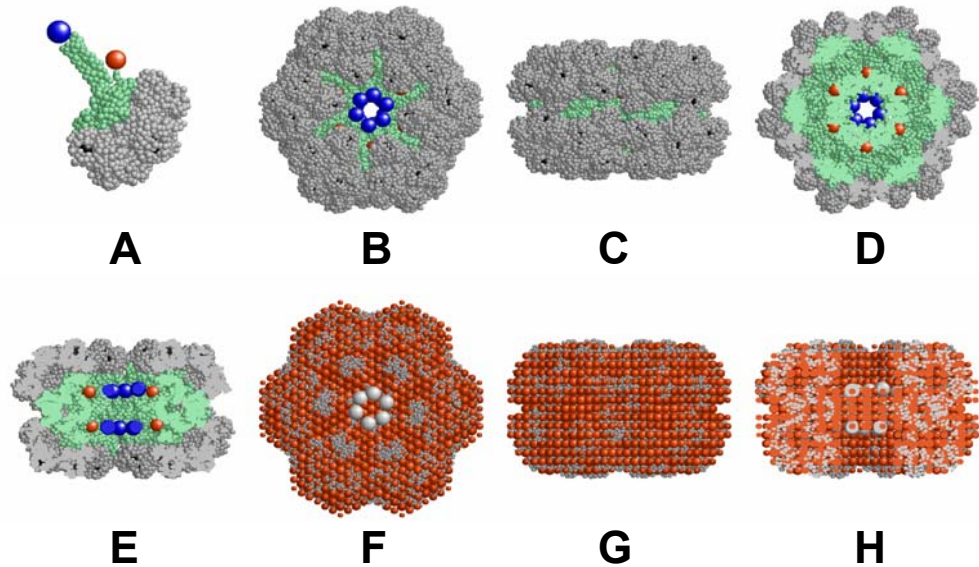
COMPARISON OF PROTEIN MODELS

obtained by SAXS and crystallography

ab initio modelling (DAMMIN, GA) based on experimental SAXS data



L.t. Haemoglobin subunit



A: Asymmetric unit of *L.t.* Haemoglobin

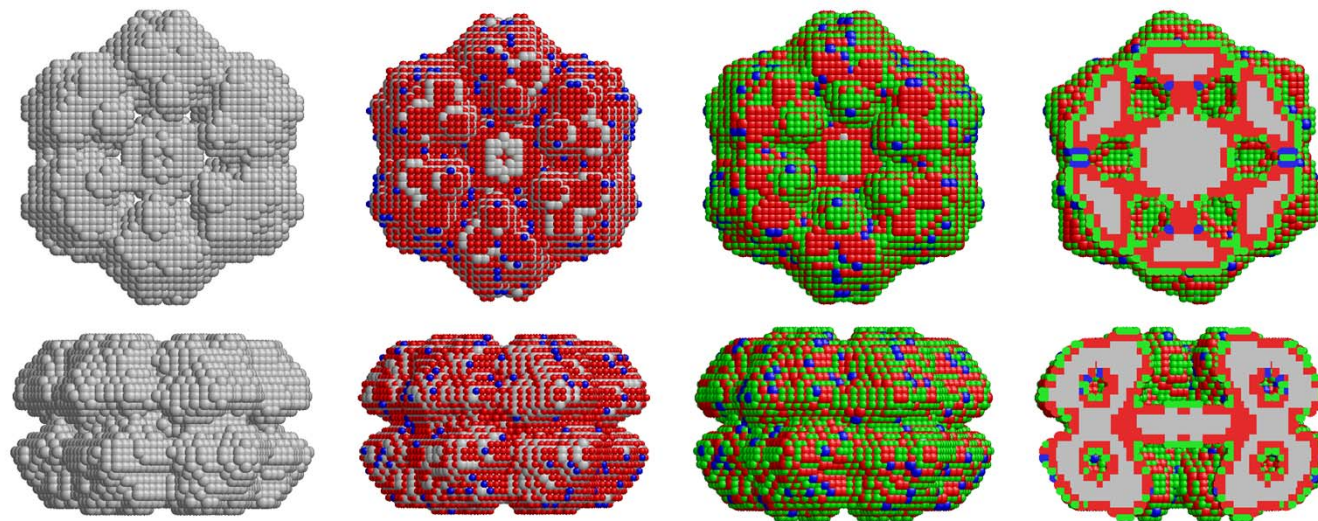
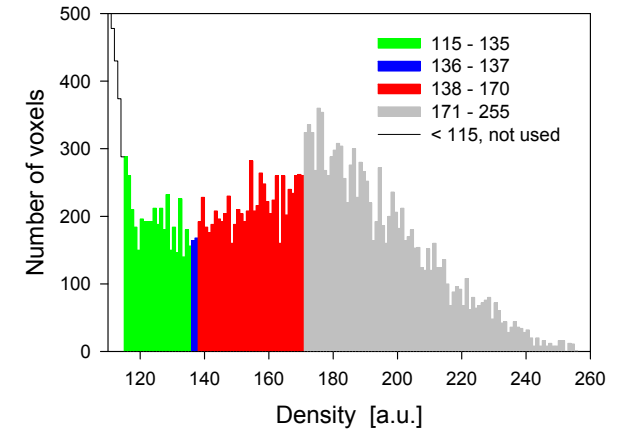
B-E: entire HBL complex

(grey: globin chains; green: linker chains; black: haem groups; blue and red beads: substitutes for missing AA residues)

F-H: superpositions

COMPARISON OF PROTEIN MODELS obtained by EM

Voxel density distribution of a 3D reconstruction of *L.t.* haemoglobin complex obtained from cryo-EM. The density peak between 115 and 255 is caused by the protein; the **threshold at 171 is compatible with the anhydrous protein volume**, while lower thresholds correspond to hydrated volumes



Top and side views of initial **EM models**. The different colors represent different ranges of voxel densities: anhydrous model (grey), hydrated models (colored as given above)

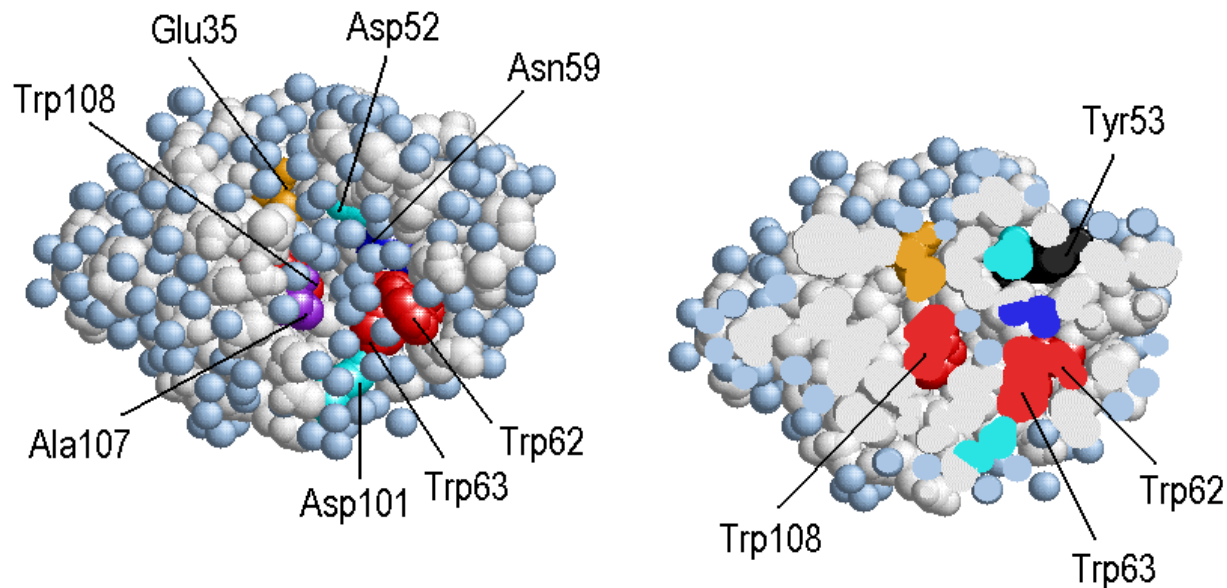
(5) PROTEINS – SELECTED

APPLICATIONS (for precise modelling purposes: many beads are required)

- (1) Hydration and radiation research projects:** modelling preferentially bound water molecules and AA residues of special concern (near the active centre, radiosensitive residues)
- (2) Hydration and drug-design projects:** modelling water positions and water channels (e.g. in aquaporins)
- (3) Prediction** of such binding sites and channels (geometrical and energetic constraints), comparison to crystallographic data; **further possibilities:** modelling other ligand positions (e.g. surfactants) and other types of channels (variation of channel width)

HYDRATION and RADIATION RESEARCH

LYSOZYME (2LYZ.PDB): VISUALIZATION OF AAs AND INDIVIDUAL WATERS NEAR THE ACTIVE CENTRE

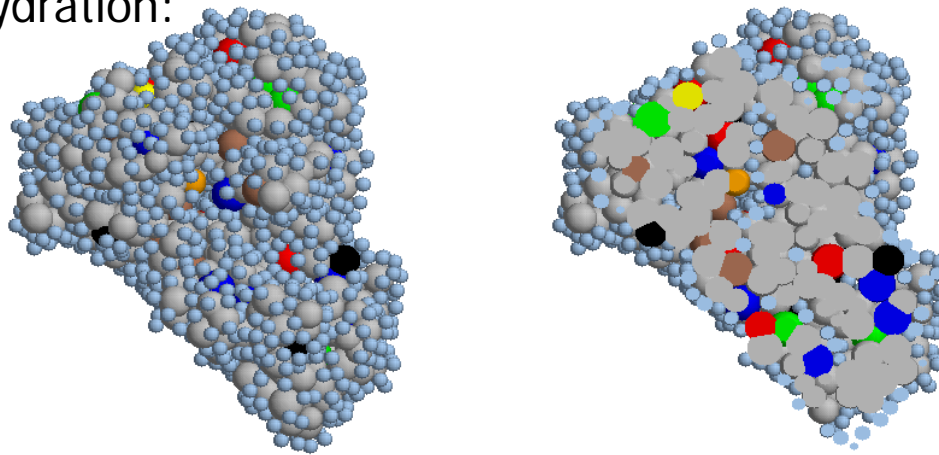


AA residues of the **active centre and further AA residues required for enzyme-substrate interactions** are highlighted and labeled (HYDMODEL data); bluetint: water molecules

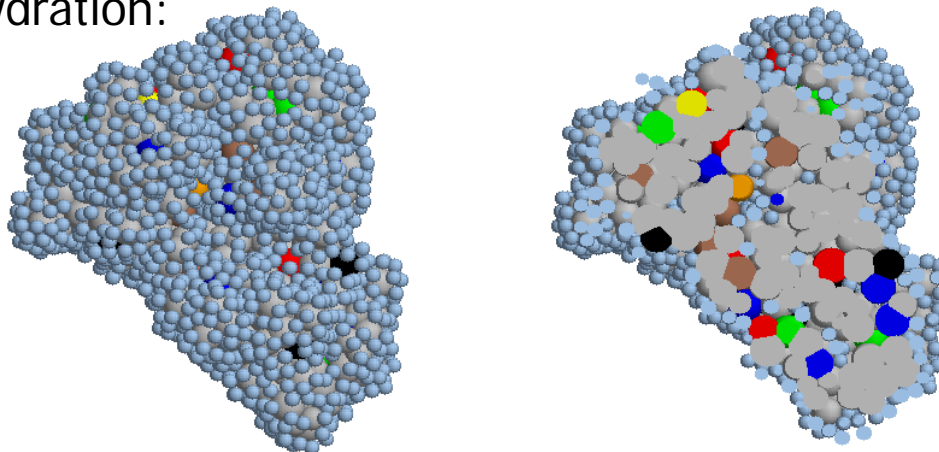
HYDRATION and RADIATION RESEARCH

***E.coli* MALATE SYNTHASE (1 P7T.PDB): VISUALIZATION OF RADIOSENSITIVE AAs AND INDIVIDUAL WATERS**

Low hydration:



High hydration:



Color code:

CYS: yellow

CEA: orange

MET: brown

TRP: red

TYR: blue

PHE: green

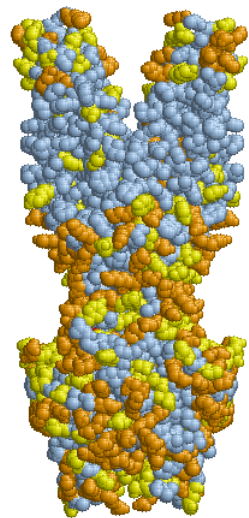
HIS: black

H₂O: light blue

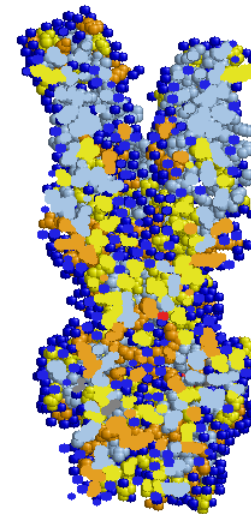
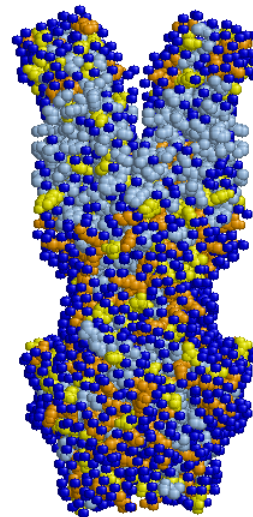
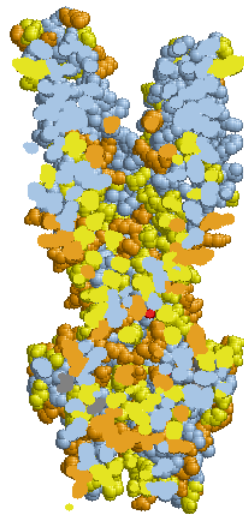
HYDRATION and DRUG-DESIGN PROJECTS

Modelling water positions and water channels (in-house programs HYDCRYST, HYDMODEL)

**MULTIDRUG RESISTANCE TRANSPORTER Sav1866 (2ONJ.PDB):
VISUALIZATION OF SPECIAL GROUPS of AAs AND INDIVIDUAL WATERS**



Crystallographic model



HYDCRYST model

bluetint:
hydrophobic AAs

yellow:
polar AAs

orange:
charged AAs

grey: ligands

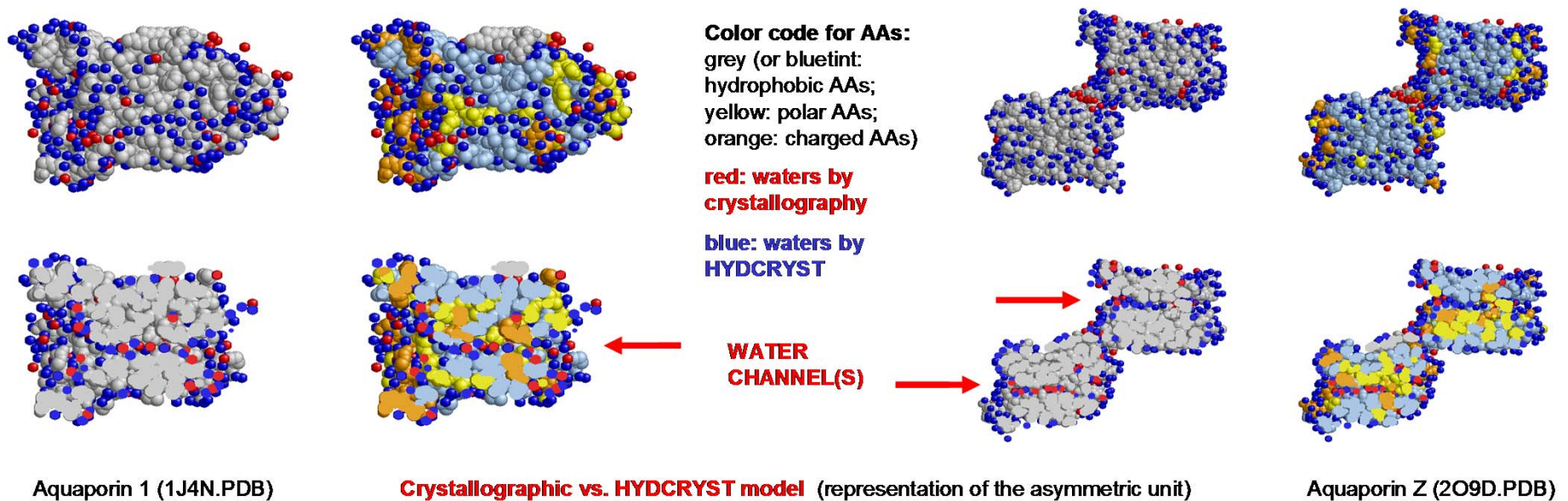
**red: waters by
crystallography**

**blue: waters by
HYDCRYST**

HYDRATION and DRUG-DESIGN PROJECTS

Modelling water positions and water channels (in-house programs HYDCRYST, HYDMODEL)

AQUAPORINS : VISUALIZATION OF WATER CHANNELS IN MEMBRANE PROTEINS



Conclusions

- In many cases (in particular when starting from a multitude of atomic coordinates), a drastic **reduction of the bead number** is required for modelling
- For the **consideration of hydration** contributions, sophisticated hydration algorithms allow the **prediction of the number and position of individual water molecules**, even in those cases where no crystallographic waters or water channels have been identified
- The approaches applied allow the **correct prediction of structural and hydrodynamic data**, irrespective of size and shape of the models/proteins.
- There is far-reaching **agreement between the results from quite different high-resolution and low-resolution techniques** (crystallography – SAS – EM – hydrodynamics)

Reference: open access

Durchschlag & Zipper, in: Protein Structure (2012)

<http://www.intechopen.com/articles/show/title/anhydrous-and-hydrated-protein-models-derived-from-high-resolution-and-low-resolution-techniques>

POLYPEPTID-STRUKTUR

Polypeptid-Ketten: strukturelle und katalytische Rollen; aufgebaut aus 20 versch. AA; bei physiol. pH: Zwitterionen; L-Isomere (außer Gly); **'CORN'-Regel** (Blick H→C; dann im Uhrzeigersinn: CO, R, N)

Einteilung der AA:

- (i) Gly: nicht chiral
- (ii) Nichtpolare AA: Ala, Leu, Ile, Val (einfache KW)
- (iii) Hydroxyl-Reste: Ser, Thr (OH ist polar und hydrophil)
- (iv) Basische Reste: Arg, Lys [pK_a der Seitenketten 12 bzw. 11.1; ionisiert unter physiol. Bedingungen; Amino-Gr. des Lys nimmt an vielen Reaktionen teil (vgl. Table 7-2 auf #152)]
- (v) His: Imidazolgruppe (pK_a nahe 7; Imidazol eine starke Base bei neutralem pH, Affinität für Metallionen)
- (vi) Saure Reste: Asp, Glu (pK_a der Carboxylgruppen 3.9 bzw. 4.3; ionisiert und sehr polar unter physiol. Bedingungen)
- (vii) Amid-Reste: Asn, Gln (polar, ionisieren nicht)

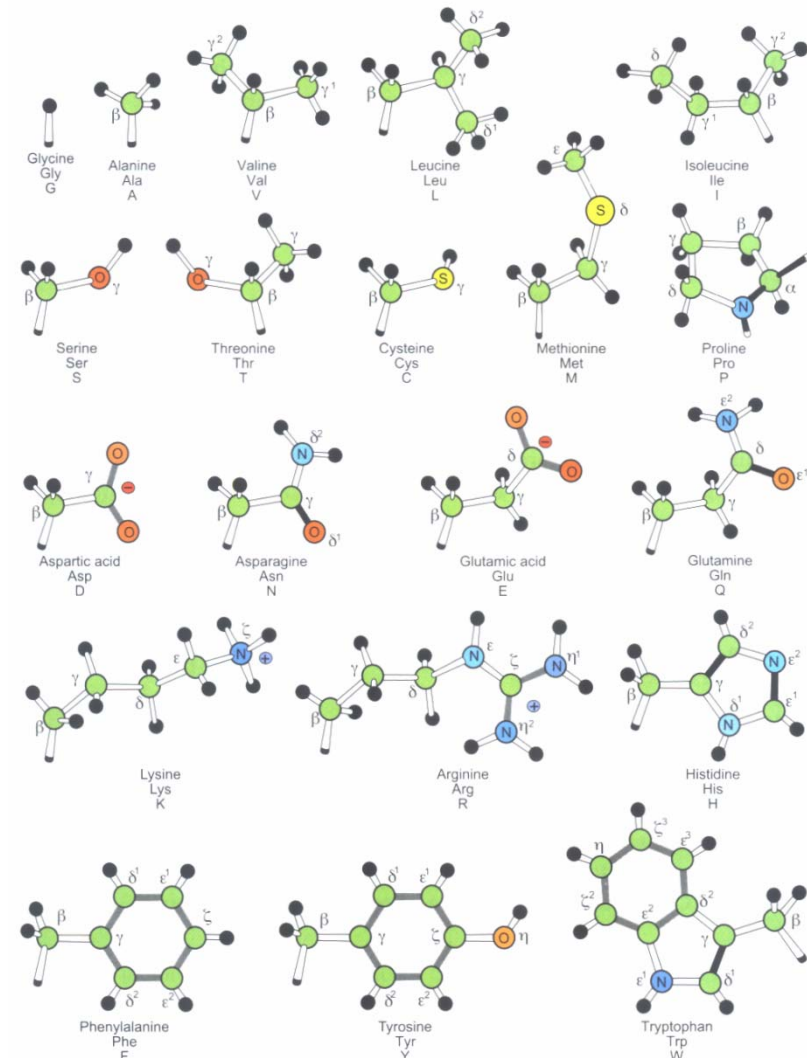
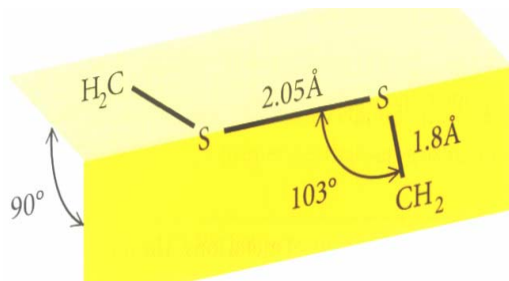


Figure 7-2. The side-chains of the 20 amino acids that occur naturally in proteins. *Small black spheres* are H atoms and *larger green spheres* are C atoms; other atoms are labeled. Double bonds are *black*, and partial double bonds are *gray*. In the case of Pro, the bonds of the polypeptide backbone are included and are *black*. Below the name of the amino acid are the three-letter and one-letter abbreviations commonly used for the residues. Note that Ile and Thr have asymmetric centers in their side-chains and only the isomer illustrated is used biologically.

(viii) S-Reste: Cys, Met

SH-Gr. in Cys reaktiv; Tendenz zu ionisieren (zum Thiolat-Anion, -S⁻); pK_a 8.7 (aber in Proteinen, je nach Umgebung, auch Werte zw. 3.5 und >11!); Komplexe mit vielen Metallionen; Oxidation durch Sauerstoff (\rightarrow Disulfide, -S-S-; Sulfonsäuren, -SO₃⁻): das Endprodukt der Ox. durch Luftsauerstoff sind normalerweise Disulfide; durch Perameisensäure, HCO₃H, entstehen Sulfonsäuren.

Disulfidbrücken: können um 360° rotieren (was aber die Freie Energie beeinflusst), sind aber bei einem Torsionswinkel von 90° am stabilsten:



Disulfidbrücken sind stabil, können aber durch ionisierte Thiolgr. gebrochen werden, in sog. Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen.

Table 7-2. Chemical modifications of amino groups of proteins

Reaction	Reagent	Optimum pH
Acylation	Acetic anhydride	5.5–8
	Citraconic anhydride	8.2
	Maleic anhydride	6–10
	Succinic anhydride	7–10
	Acetylimidazole	>5
	N-Acetylsuccinimide	>4
Alkylation and arylation	N-Hydroxysuccinimide acetate	6.9–8.5
	Iodoacetic acid	7.5–9
	1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene	7–11
Reductive alkylation	2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid	9.5
	Formaldehyde + sodium borohydride	8–10
Amidination	Methyl acetamidate	7–10.5
Carbamylation	Potassium cyanate	>7
Guanidination	1-Guanyl-3,5-dimethylpyrazole nitrate	9.5
	O-Methylisourea	10–11

Protein-Disulfide können durch einen Überschuss eines Thiol-Reagenz (2-Mercaptoethanol, DTT, DTE) reduziert werden, aber auch durch viele andere Reagenzien [Borhydrid, Tributylphosphin, Tris-(2-Carboxyethyl)-Phosphin (TCEP)]

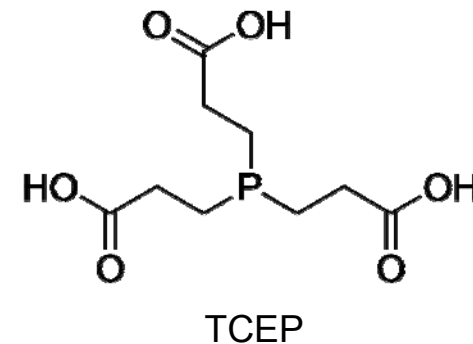
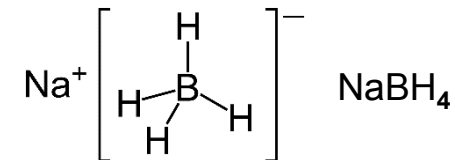
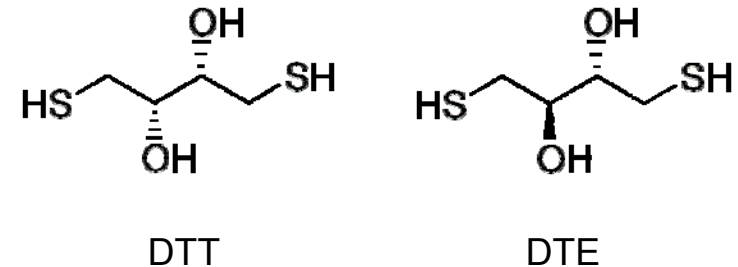
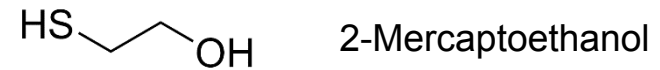
Die Anzahl der Disulfidbrücken, die durch zufällige Kombination von Cys-Resten gebildet werden können, steigt mit der Anzahl der Cys-Reste dramatisch an (Table 7-3).

Die Thiol- und Disulfid-Formen von Mercaptoethanol bzw. DTT/DTE können leicht unterschieden werden, da nur die Disulfidform im nahen UV absorbiert (Max. nahe 280 nm).

Messung von SH-Gr.: DTNB (Dithionitrobenzoesäure, Ellman's Reagenz)

Messung von -S-S-: NTSB (2-Nitro 5-Thio Sulfobenzoesäure) Methode nach Thannhauser et al.

S in Met: ebenfalls gegen Luftoxidation oder potentere Ox.-Mittel empfindlich (→ Sulfoxide, Sulfone)



(ix) Aromatische Reste: Phe, Tyr, Trp; für die meisten UV-Abs. und Fluoreszenz-Eig. der Proteine verantwortlich

Phe: unpolar

Tyr: die phenolische Gr. verleiht dem Tyr wertvolle spektrale Eigenschaften (Table 7-4), polarer als Phe; pK_a der OH-Gr. 11.1, d.h. sie ionisiert nur bei sehr alkal. pH-Werten

Trp: größte AA (Indol-Ring); 5-Ring oxidationsempfindlich; Ozon öffnet den Indol-Ring (\rightarrow N-Formylkynurenin), hydrophobste AA (siehe #157)

(x) Pro: außergewöhnlich, eine cyclische Iminosäure; Einschränkungen bezügl. Rotation; Seitenkette ist nichtpolar und chemisch inert; Tendenz, die cis-Konformation einzunehmen

(xi) Selenocystein, Sec: Cys mit Se statt S; pK_a 5.2, d.h. bei physiol. pH voll ionisiert [Beachte: Cys hat höheren pK_a (8.7; vgl. #152); Cys ist bei physiol. pH nur leicht ionisiert]

Table 7-3. The number of ways in which $2n$ sulfhydryl groups can combine to form n disulfide bonds

n	Number of combinations		
1	1		
2	3		
3	15	14	2.1×10^{14}
4	105	15	6.2×10^{15}
5	945	16	1.9×10^{17}
6	1.0×10^4	17	6.3×10^{18}
7	1.4×10^5	18	2.2×10^{20}
8	2.0×10^6	19	8.2×10^{22}
9	3.4×10^7	20	3.2×10^{24}
10	6.5×10^8	21	1.3×10^{25}
11	1.4×10^{10}	22	5.6×10^{26}
12	3.2×10^{11}	23	2.5×10^{28}
13	7.9×10^{12}	24	1.1×10^{30}
		25	5.8×10^{31}

Table 7-4. UV absorbance properties of tyrosine and several derivatives

Amino acid	pK_{app} of -OH group	Nonionized -OH		Ionized -OH	
		λ_{max} (nm)	Molar absorbance ($M^{-1} cm^{-1}$)	λ_{max} (nm)	Molar absorbance ($M^{-1} cm^{-1}$)
Tyrosine	10.1	274.5	1400	293	2400
ϵ -Iodotyrosine	8.2	283	2750	305	4100
ϵ^1, ϵ^2 -Diiodotyrosine	6.5	287	2750	311	6250
ϵ -Nitrotyrosine	7.2	360	2790	428	4200
ϵ -Aminotyrosine	10.0 ^a	275	1600	320	4200
O-Acetyltyrosine	-	262	262	-	-

^aThe pK_{app} of the aromatic amino group is approximately 4.8. Data from A. N. Glazer (1976) in *The Proteins*, Vol. 2, 3rd edn (H. Neurath & R. L. Hill, eds), Academic Press, NY, pp. 1-103.

Physikalische Eigenschaften der AA-Reste

Table 7-1: vdW und partielle Volumina von AA-Resten in Proteinen

Table 7-5: ASA (\AA^2) von AA-Resten in einem Gly-X-Gly Tripeptid

Table 7-6: Hydrophilizitäten und Hydrophobizitäten von AA-Resten

Table 7-7: Thermodynamische Parameter für die Hydratation pro 1\AA^2 ASA der nichtpolaren und polaren Teile von Polypeptidketten

Table 7-8: Thermodynamische Parameter für die Hydratation der Seitenketten der AA-Reste

^a Volume enclosed by the van der Waals radii of the atoms.

^b Increase in volume of water after adding either one molecule or 1 g of residue.

^c Weighted by frequency of occurrence in proteins to give the value for an average residue in proteins.

Volumina

Table 7-1. Properties of individual amino acid residues

Residue	Mass (Da)	Van der Waals volume ^a (\AA^3)	Partial volume in solution ^b (\AA^3)	Partial specific volume ^b (cm^3/g)	Frequency in proteins (%)
Ala (A)	71.09	67	86.4	0.732	8.3
Arg (R)	156.19	148	197.4	0.756	5.7
Asn (N)	114.11	96	115.6	0.610	4.4
Asp (D)	115.09	91	108.6	0.573	5.3
Cys (C)	103.15	86	107.9	0.630	1.7
Gln (Q)	128.14	114	142.0	0.667	4.0
Glu (E)	129.12	109	128.7	0.605	6.2
Gly (G)	57.05	48	57.8	0.610	7.2
His (H)	137.14	118	150.1	0.659	2.2
Ile (I)	113.16	124	164.6	0.876	5.2
Leu (L)	113.16	124	164.6	0.876	9.0
Lys (K)	128.17	135	166.2	0.775	5.7
Met (M)	131.19	124	160.9	0.739	2.4
Phe (F)	147.18	135	187.3	0.766	3.9
Pro (P)	97.12	90	120.6	0.748	5.1
Ser (S)	87.08	73	86.2	0.596	6.9
Thr (T)	101.11	93	113.6	0.676	5.5
Trp (W)	186.21	163	225.0	0.728	1.3
Tyr (Y)	163.18	141	190.5	0.703	3.2
Val (V)	99.14	105	136.8	0.831	6.6
Weighted					
average ^c	119.40	104	137.6	0.703	

ASA

ad Table 7-6 auf #157:

Hydrophilizitäten der AA-Seitenketten wurden durch Bestimmung der Verteilungskoeffizienten zw. Gasphase und Wasser ermittelt (Verwendung von Modellverbindungen); normalisiert auf Hydrophilizität = 0 für Gly. Moleküle mit polaren HB Donoren oder Akzeptoren bevorzugen die wässrige Umgebung, da sie HB zum Wasser bilden. Maximale Hydrophilizität wird bei ionisierten Molekülen gefunden; nichtpolare Moleküle wechselwirken nicht vorteilhaft mit dem Wasser, haben geringe Löslichkeiten, aber sind immer noch hydrophiler (negative Werte) als das H Atom der Referenz Gly (Wert: 0).

Hydrophobizitäten der AA-Seitenketten wurden durch Bestimmung der Verteilung in einer Reihe von nichtpolaren LM ermittelt (Verwendung von freien oder geblockten AA). Die hydrophobe WW ist hierbei definiert als Freie Energie des Transfers, ΔG_{tr} , von Wasser in eine nichtpolare Fl.; die hydrophoberen Moleküle haben negativere Hydrophobizitäten; die Absolutwerte sind nicht relevant; der für Gly gemessene Wert wird jeweils von Seitenketten-Hydrophobizitäten der anderen AA subtrahiert.

Table 7-5. Accessible surface areas (\AA^2) of amino acid residues in a Gly-X-Gly tripeptide in an extended conformation

Residue	Total	Main-chain atoms	Side-chain atoms		
			Total	Nonpolar atoms	Polar atoms
Ala	113	46	67	67	
Arg	241	45	196	89	107
Asn	158	45	113	44	69
Asp	151	45	106	48	58
Cys	140	36	104	35	69
Gln	189	45	144	53	91
Glu	183	45	138	61	77
Gly	85	85			
His	194	43	151	102	49
Ile	182	42	140	140	
Leu	180	43	137	137	
Lys	211	44	167	119	48
Met	204	44	160	117	43
Phe	218	43	175	175	
Pro	143	38	105	105	
Ser	122	42	80	44	36
Thr	146	44	102	74	28
Trp	259	42	217	190	27
Tyr	229	42	187	144	43
Val	160	43	117	117	

Data from S. Miller *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* **196**, 641–656.

Die apparenten Hydrophobizitäten der AA-Seitenketten variieren beträchtlich, (abhängig von der Präsenz polarer Gruppen).

Die Diversität polarer und nichtpolarer Gr. in AA-Seitenketten legt nahe, auch die Hydratation einzelner Gruppen wie auch der ganzen Seitenketten zu betrachten und durch thermodynamische Parameter zu charakterisieren (Tables 7-7 und 7-8).

^a Hydrophilicity was measured by the partition coefficient (K_D) of the model for each side-chain (backbone replaced by H atom) from vapor \rightarrow water, hydrophobicity from water \rightarrow cyclohexane. For ionizing side-chains, the values were corrected for the fraction of each side-chain that was ionized at pH 7. Both scales were normalized to zero for the value for Gly. Data from A. Radzicka & R. Wolfenden (1988) *Biochemistry* 27, 1664–1670.

^b Some values were measured from the relative solubilities of the amino acids in water and ethanol or dioxane. Data from Y. Nozaki & C. Tanford (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 2211–2217. Other values were extrapolated from these data; M. Levitt (1976) *J. Mol. Biol.* 104, 59–107.

^c Measured from the partition coefficient between water and octanol of the *N*-acetyl amino acid amides. Data from J. Fauchère & V. Pliska (1983) *Eur. J. Med. Chem.* 18, 369–375.

^d Calculated from the hydrophobicities of the individual groups that make up each side-chain, using data for the partition coefficient between water and octanol of many model compounds.

Hydrophilizität und Hydrophobizität; Gly = 0

Table 7-6. Relative hydrophilicities and hydrophobicities (kcal/mol) of amino acid side-chains

Amino acid residue	Hydrophilicity ^a	Hydrophobicity			
		Side-chain analogs ^a	Amino acids ^b	<i>N</i> -acetyl amides ^c	Calculated ^d
Arg	-22.31	15.86	3.0	1.84	3.95
Asp	-13.34	9.66	2.5	1.40	3.81
Glu	-12.63	7.75	2.5	1.17	2.91
Asn	-12.07	7.58	0.2	1.09	1.91
Lys	-11.91	6.49	3.0	1.81	2.77
Gln	-11.77	6.48	0.2	0.39	1.30
His	-12.66	5.60	-0.5	-0.23	0.64
Ser	-7.45	4.34	0.3	0.07	1.24
Thr	-7.27	3.51	-0.4	-0.48	1.00
Tyr	-8.50	1.08	-2.3	-1.75	-1.47
Gly	\rightarrow 0	0	0	0	0
Pro	-1.4	-0.96	-0.99		
Cys	-3.63	-0.34	-1.0	-2.80	-0.25
Ala	-0.45	-0.87	-0.5	-0.57	-0.39
Trp	-8.27	-1.39	-3.4	-4.11	-2.13
Met	-3.87	-1.41	-1.3	-2.24	-0.96
Phe	-3.15	-2.04	-2.5	-3.26	-2.27
Val	-0.40	-3.10	-1.5	-2.22	-1.30
Ile	-0.24	-3.98	-1.8	-3.28	-1.82
Leu	-0.11	-3.98	-1.8	-3.10	-1.82

Thermodynamische Parameter für die Hydratation

Table 7-7. Thermodynamic parameters for the hydration by water at 25°C of each 1 Å² of accessible surface area of the nonpolar and polar parts of polypeptide chains

Surface	Enthalpy (J/mol Å ²)	Entropy (J/K mol Å ²)	Free energy (J/mol Å ²)	Heat capacity (J/K mol Å ²)
Aliphatic	-122	-0.578	50	2.22
Aromatic	-148	-0.319	-53	1.23
Polar part of				
Arg	-827	-0.478	-685	-0.20
Asn	-894	-0.654	-699	-0.96
Asp	-715	-0.469	-575	-1.35
Cys	-271	-0.402	-151	-3.88
Gln	-703	-0.591	-527	-0.19
Glu	-562	-0.436	-432	-0.52
His	-1128	-0.693	-922	-1.28
Lys	-714	-0.482	-570	-1.57
Met	-473	-0.412	-350	-3.88
Ser	-1045	-0.983	-752	-1.30
Thr	-1287	-1.053	-972	-1.25
Trp	-1161	-0.693	-954	3.78
Tyr	-854	-0.415	-730	0.08
-CO-NH-	-1702	-1.026	-1396	-1.64

To convert Joules (J) to calories, divide by 4.16.

Data from P. L. Privalov & G. I. Makhatadze (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 715–723 and (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 660–679; G. I. Makhatadze & P. L. Privalov (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 639–659.

Table 7-8. Thermodynamic parameters for the hydration by water at 25°C of the side-chains of the amino acid residues

Residue	Enthalpy (kJ/mol)	Entropy (J/K mol)	Free energy (kJ/mol)	Heat capacity (J/K mol)
Ala	-8.28	-40.3	3.72	166.7
Arg	-99.38	-102.6	-68.80	273.4
Asn	-67.05	-70.6	-46.02	88.8
Asp	-47.33	-54.9	-30.96	89
Cys	-22.95	-48.0	-8.65	237.6
Gln	-70.44	-84.5	-45.27	180.2
Glu	-50.72	-68.8	-30.21	179
His	-69.63	-74.0	-47.58	179.6
Ile	-17.12	-79.5	6.57	402.3
Leu	-17.12	-79.5	6.57	381.7
Lys	-48.78	-91.9	-21.39	249.8
Met	-34.62	-85.3	-9.19	175.9
Phe	-25.31	-62.0	-6.83	383
Pro	-10.17	-41.7	2.25	177.7
Ser	-42.99	-60.8	-24.87	81.2
Thr	-45.05	-72.2	-23.52	184.5
Trp	-58.79	-57.2	-41.73	458.5
Tyr	-57.37	-70.3	-36.43	301.7
Val	-13.73	-65.6	5.82	314.4
-CO-NH-	-59.57	-35.9	-48.87	-57.4

To convert Joules (J) to calories, divide by 4.16.

Data from P. L. Privalov & G. I. Makhatadze (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 715–723 and (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 660–679; G. I. Makhatadze & P. L. Privalov (1993) *J. Mol. Biol.* **232**, 639–659 and (1995) *Adv. Protein Chem.* **47**, 307–425.

Die Freie Energie des Transfers der AA-Reste mit nichtpolaren Seitenketten vom Wasser in nichtpolare LM ist mit der ASA korreliert; die Werte für die anderen AA-Reste werden durch ihre polaren Gruppen bestimmt.

Die Wärmekapazitäten der wässrigen Lösungen der Seitenkettenanaloge sind den nichtpolaren ASA direkt proportional (Ringstrukturen und S-enthaltende AA geben etwas geringere Werte).

Das hydrophobe Moment (vgl. #167) einer Polypeptidkette kann aus den Beiträgen der einzelnen AA-Reste berechnet werden; dieser Parameter wird oft zur Beschreibung der Architektur und der WW großer Moleküle (Proteine) verwendet.

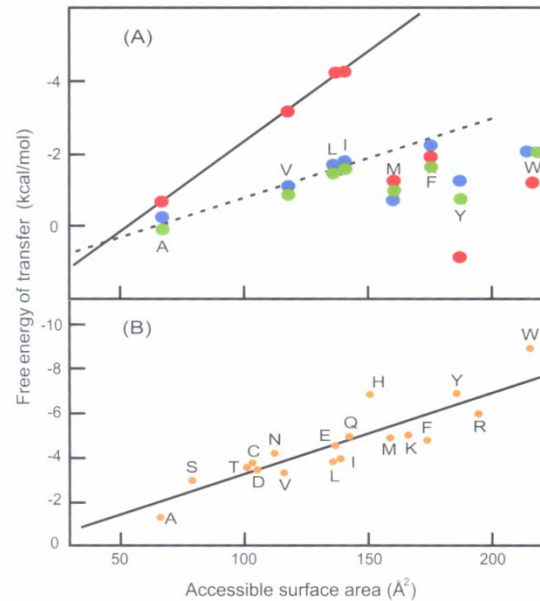


Figure 7-4. Relationship between the accessible surface areas of the nonpolar amino acid side-chains and their free energies of transfer (A) from water to nonaqueous solvent and (B) from vapor to cyclohexane. The free energies of transfer in (A) are from Table 7-6; red points represent measurements with the side-chain analogs, using cyclohexane as the nonpolar solvent; the green points were obtained with the free amino acids and ethanol and dioxane as the nonpolar solvent; the blue points were calculated from the hydrophobicities of the parts of each side-chain. The slope of the solid line in (A) is 43 cal/Å², for the dashed line 20 cal/Å². The slope of the line in (B) is 41 cal/Å². Adapted from T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn, W. H. Freeman, NY, p. 161.

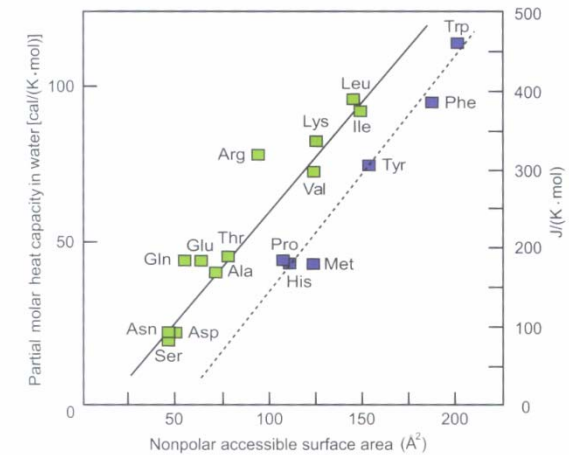


Figure 7-5. Correlation of the heat capacities in aqueous solution at 25°C of analogs of the amino acid side-chains with the accessible surface areas of their nonpolar atoms. The upper straight line fits all the side-chains (green points) except those with ring structures and the sulfur-containing Met (blue points, dashed line). The slope of the upper line is 0.72 cal/°C mol Å² (300 J/K mol nm²). Data from G. I. Makhatadze & P. L. Privalov (1990) *J. Mol. Biol.* **213**, 375–384.

POLYPEPTID-KONFORMATION

Die Strukturen aller Moleküle erstrecken sich in 3 Dimensionen. 2D, chemische Darstellungen genügen für kleine Moleküle, da ihre 3D-Strukturen durch Bindungslängen und -winkel der kovalenten Strukturen genügend genau definiert sind. Diese Darstellungen sind für große Moleküle (NA, Proteine) unzureichend, da Rotationen um die vielen kovalenten Bindungen die relativen Positionen aller Atome dramatisch ändern.

Polymere haben die Tendenz sehr flexibel zu sein, falls nicht eine einzige Struktur oder Konformation vorherrscht. Die Fähigkeit der Polypeptidketten, eine Reihe von 3D-Konformationen anzunehmen, ist für die Wahrnehmung vieler Funktionen von Bedeutung. Die **Konformationseigenschaften der Polypeptidketten** werden großteils durch die Flexibilität des Polypeptidrückgrats und durch lokale WW mit AA-Seitenketten kontrolliert.

(1) Lokale Flexibilität des Polypeptidrückgrats: Der Ramachandran Plot

Ein Ausschnitt aus einer Polypeptidkette zeigt die übliche Konvention zur Darstellung der Polypeptid-Konformation (Abb. 8-1): Rotationen um kovalente Bindungen werden als Torsionswinkel (Diederwinkel, Dihedralwinkel) angegeben (-180° bis $+180^\circ$).

Bezeichnung der **Torsionswinkel des Peptidrückgrats**: Phi (φ) um die N-C $^\alpha$ Bindung; Psi (ψ) um die C $^\alpha$ -C' Bindung, und Omega (ω) um die Peptidbindung (C'-N). Der maximale Wert von 180° (oder -180°) wird für jeden Torsionswinkel in der maximal gestreckten Kette erreicht (wenn die N, C $^\alpha$ und C' Atome alle in trans-Stellung stehen; in cis-Stellung hätten die Rotationswinkel den Wert 0). Rotationen im Uhrzeigersinn: positive Werte.

Torsionswinkel der Seitenkette werden mit Chi, χ_j , bezeichnet (siehe Abb. 7-2 auf #151).

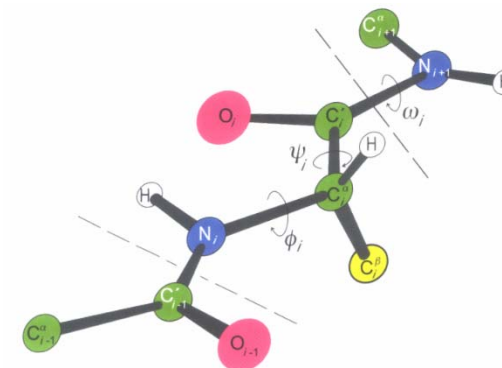
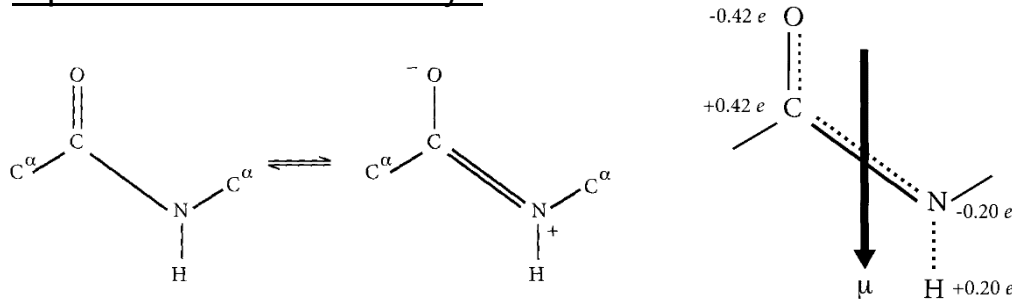


Figure 8-1. Perspective drawing of a segment of polypeptide chain comprising two peptide units. Only the C $^\beta$ atom of each side-chain is shown. The limits of a single residue (number i of the chain) are indicated by the *dashed lines*. The recommended notations for atoms and torsion angles are indicated. The polypeptide chain is shown in the fully extended conformation, where $\varphi = \psi = \omega = \pm 180^\circ$.

Die Peptidbindung (Abb. 8.2) hat aus Resonanzgründen partiellen Doppelbindungscharakter: die Peptidbindung und die 2 C^α Atome fungieren als starre planare **Peptid-Einheit**; die Resonanz verursacht eine Ladungstrennung und gibt der Peptidbindung ein Dipolmoment von 3.5 Debye.



Der partielle Doppelbindungscharakter der Peptidbindung impliziert auch, dass diese nicht frei rotieren kann und üblicherweise nur 2 Konformationen vorhanden sind (definiert durch den Winkel ω ; die cis- und trans-Konformationen, s. Abb. 8-1 und Abb. rechts).

Der Winkel ω hat den Wert 0, wenn die Peptidbindung cis ist, und den Wert $\pm 180^\circ$, wenn trans. In der cis-Stellung sind die C^α Atome zu nahe, so dass die trans-Stellung 1000× wahrscheinlicher ist.

Falls der Rest (i+1) Pro ist (Abb. rechts unten), besteht jedoch wenig Unterschied zw. cis und trans; in diesem Fall ist trans nur um Faktor 4 wahrscheinlicher; kein Doppelbindungscharakter.

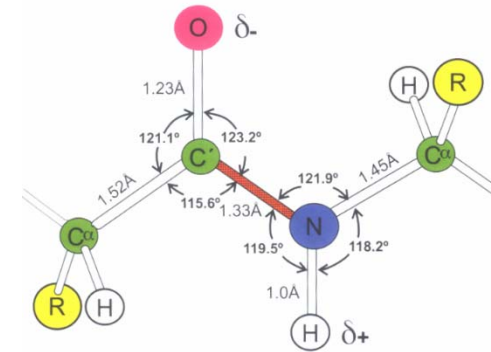
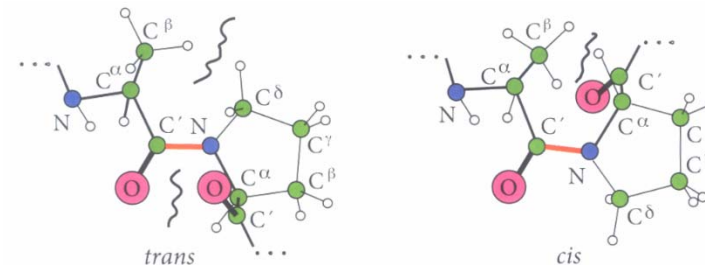
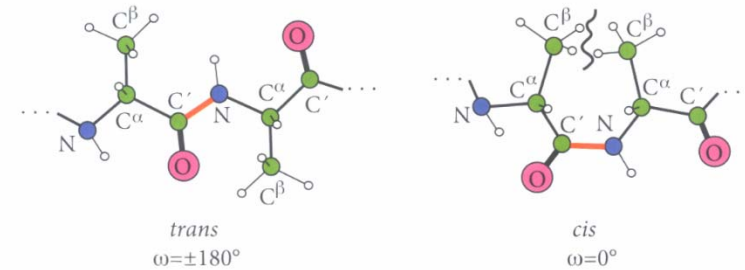


Figure 8-2. Section of a polypeptide structure showing the *trans* peptide bond (orange) connecting two amino acid residues. The dimensions given are the averages observed crystallographically in amino acids and small peptides. The partial charges arise from the partial double-bond character of the peptide bond (Equation 8.1).



Die möglichen Werte für ϕ und ψ sind geometrisch eingeschränkt (sterische Konflikte zw. benachbarten Atomen); die erlaubten Werte wurden erstmals von **Ramachandran** bestimmt (Verwendung von hard-sphere Modellen; fixe Geometrie der Bindungen). Üblicherweise werden die erlaubten Werte für ϕ und ψ in einer 2D-Auftragung dargestellt (**Ramachandran-Plot**). *Beispiele: Ala (A), Gly (B), Ala-Ala (C): Erklärungen siehe nächste Seite*

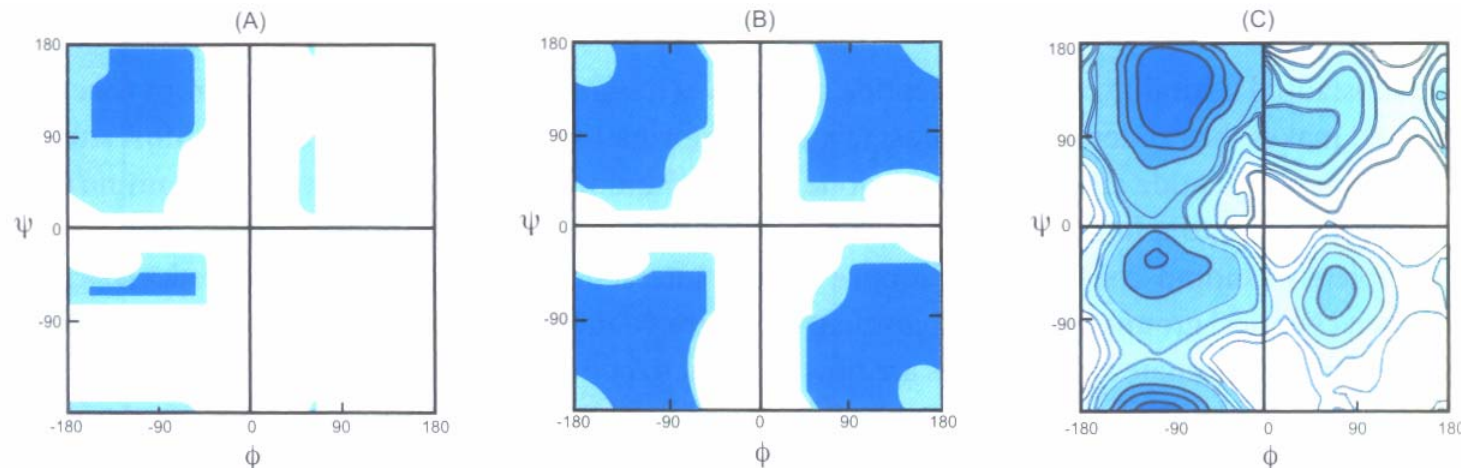


Figure 8-3. Ramachandran plots of the permitted values of ϕ and ψ for different residues. The original plots that considered only repulsions between hard-sphere atoms are shown in (A) and (B) for Ala and Gly residues, respectively. The fully allowed regions are *darkest*, the partially allowed regions *less colored*. The connecting regions in the *lightest color* are permissible with slight flexibility of bond angles. Each 2-D plot is continuous at the edges, because a rotation of -180° is the same as one of $+180^\circ$. The much greater flexibility of the Gly residue compared with Ala is apparent in (B), as is the symmetry of the plot for Gly residues resulting from the absence of a chiral side-chain. Data from G. N. Ramachandran & V. Saisekharan (1968) *Adv. Protein Chem.* **23**, 283–437. (C). Ramachandran plot computed for the dipeptide N-acetyl-Ala-Ala-amide using molecular dynamics simulations and including water as the solvent. The apparent free energies for the various values of ϕ and ψ are given as contours of 2 kJ/mol (0.5 kcal/mol) relative to the lowest free energy in the upper left-hand corner that is colored *darkest*. Note that the differences between allowed and disallowed regions are much less distinct than in (A) and (B). Data from a figure kindly provided by J. Hermans in T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn, W. H. Freeman, NY, p. 173.

Ala (Abb. A): dunkle Farben signalisieren die normalerweise erlaubten Werte (ohne sterische Überlappungen), hellere Farben bedeuten ungünstige Kontakte (Extremwerte; leichte Änderungen der Bindungswinkel möglich). Nur 7.5% der Fläche sind uneingeschränkt erlaubt, 22.5% sind partiell möglich (quantitatives Maß für die Flexibilität der Polypeptidkette).

Gly (Abb. B): Gly hat kein C β ; die Einschränkungen betr. erlaubte Konformationen sind weniger restriktiv: 45 bzw. 61%; in diesem Fall ist der Ramachandran Plot symmetrisch (da Gly nicht chiral ist); Extra-Flexibilität des Gly erlaubt es der Kette, die Richtung leicht zu wechseln; → Vergrößerung der konformationellen Entropie; Abnahme der Tendenz, fixe Konformationen einzunehmen

AA mit längeren, größeren Seitenketten (ohne Abb.): zusätzliche Restriktionen; die erlaubten Bereiche sind kleiner. Pro ist ein Spezialfall: der rel. starre 5-Ring beschränkt den φ -Wert auf etwa -60° .

Präzise Ramachandran-Plots lassen sich aus MD Berechnungen der rel. Energien der einzelnen Konformationen ableiten (→ Flexibilität der Bindungslängen und -winkel; Auswertung aller WW incl. der mit dem LM Wasser). Beispiel N-Acetyl-Ala-Ala-Amid (Abb. C): → geringere Differenzen zw. erlaubten und nicht erlaubten Bereichen.

Die Ramachandran Plots zeigen, dass die Einschränkungen der Flexibilität der Polypeptidkette beträchtlich sind, da nur 30% der Kombinationen der lokalen φ/ψ -Winkel bei den meisten Resten möglich sind. Nichtsdestoweniger kann jeder Rest einer Polypeptidkette einen Bereich von Konformationen annehmen und eine Random-Coil (RC) Polypeptidkette billigt sehr viele Konformationen.

(2) Polypeptidketten in Random-Coil (RC) Konformation

Die ausgeprägte Flexibilität der Polypeptidkette verleiht ihr eine wesentliche konformationelle Entropie und macht das RC zur favorisiertesten Konformation unter vielen Bedingungen; die meisten Untersuchungen wurden an Poly-AAs durchgeführt; komplette RC Konformation? (zahlreiche WW zw. benachbarten Gruppen); Poly-Pro sicher kein reines RC

Statische Eigenschaften: → nur Mittelwerte
(gemittelt über Zeit und alle Moleküle der Population)

Simplifizierte Berechnungen (fiktive Bindungslänge, Endpunktsabstand etc.)

Der Streumassenradius R_G eines RC (erhalten aus SAXS/SANS, LS) unterscheidet sich wesentlich von dem anderer Konformationen (Abb. 8-4); der Kettenlänge nicht direkt proportional

Der Abstand zw. 2 Resten in einem RC wurde durch Messung des Fluoreszenz-Energie Transfers zw. eingebautem FI.Donor und FI.Akzeptor gemessen: → radiale Abstandsfunktion der Abstände zw. den 2 Gruppen (Abb. 8-5).

Austauschraten: Die Barrieren der Freien Energie (die die Rotationen aller φ und ψ Winkel trennen) betragen nur 0.5-1.5 kcal/mol (2-6 kJ/mol), so dass jede dieser 2 Bindungen mit Geschw.Konstanten von 10^{12} s^{-1} rotieren müsste; eine exakte Beschreibung der Rotationen ist jedoch komplizierter und erfordert Computer-Simulationen.

Durch Messung der Relaxationsgeschw. (^{13}C NMR). Relaxationszeiten der C^α -Atome: 1.4-2.6 ns; die der Seitenketten sind kürzer und nehmen mit der Entfernung vom Rückgrat ab (s. Lys in Table 8-1).

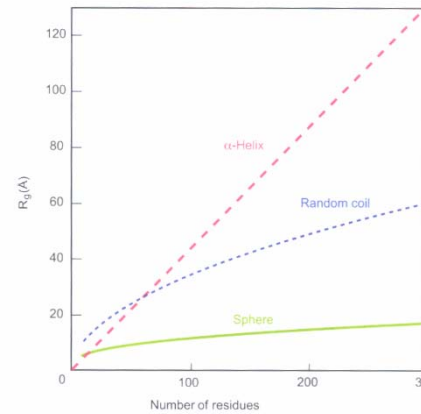


Figure 8-4. The radius of gyration, R_g , for polypeptide chains of various lengths in α -helical, random coil and compact spherical conformations. Adapted from T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn, W. H. Freeman, NY, p. 177.

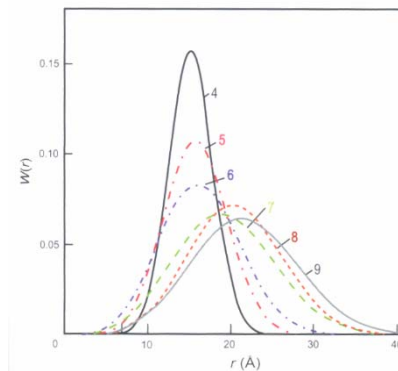


Figure 8-5. Radial distribution function of the distances between naphthalene and dansyl groups attached to the ends of peptides of 4–9 residues of *N*-hydroxyethyl-Gln, measured by fluorescence energy transfer. Data from E. Haas *et al.* (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1808–1811.

Table 8-1. Rotational relaxation times in a random polypeptide chain

Residue	Carbon atom	Relaxation time (10^{-9} s)
Ala	C^β	0.21
Thr	C^β	1.56
	C^γ	0.18
	C^δ	0.60
Lys	C^β	0.81
	C^γ	0.54
	C^ϵ	0.27
Peptide	C^α	1.4 to 2.6

The values were measured at 45°C on performic acid-oxidized ribonuclease A using ^{13}C nuclear magnetic resonance by V. Glushko *et al.* (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 3176–3195.

Die cis/trans Isomerisierung der X-Pro Peptidbindung: Die einzige Bindung in ungeordneten Polypeptidketten, die relativ langsam rotiert, ist die um eine Peptidbindung mit cis/trans Umwandlung ($\omega = 0^\circ$ bzw. $\pm 180^\circ$). Sowohl die normale Amid-CO-NH-Peptid Gruppe als auch Imid-CO-N<, die durch ein Pro gebildet wird, kann eine **cis/trans-Isomerisierung** durch Rotation um den Torsionswinkel ω der Peptidbindung erleiden.

Die cis/trans Isomerisierung des –CO-NH-Anteils **erfolgt** mit einer Halbwertszeit < 1 s bei RT und führt im Gleichgewicht nur zu kleinem Anteil ($< 1\%$) an cis-Isomeren. Bei der X-Pro Bindung ist das cis-Isomere vorherrschend und es besteht eine hohe Rotationsbarriere (83 kJ/mol); die Halbwertszeit für die X-Pro Bindungsisomerisierung liegt zw. s und h; sehr Temp.abhängig; Einfluss auf Konformationsänderungen des Polypeptidrückgrats.

(3) Reguläre Strukturen

RC könnte als natürlicher Zustand eines Polymers angesehen werden, begünstigt durch konformationelle Entropie und WW mit dem LM. Einzelne stabilisierende HB, Salzbrücken oder vdW-WW, die in einer einzigen RC-Polypeptidkette möglich sind, werden allerdings in den meisten Fällen nicht stabil sein.

Andererseits stabilisieren sich multiple WW jedoch gegenseitig; eine so erzielte Konformation sollte genügend stabil sein und vorherrschen, z.B. bei vielen synthetischen **Poly-AA**. Wenn alle Reste dieselbe Konformation haben, würde eine helikale Konformation vorliegen. Werte für reguläre Konformationen siehe Table 8-2; liegen auch in natürl. Proteinen vor (Sek. Struktur). Welche Konformation letztlich vorliegt, hängt von AA-Sequenz und den Bedingungen ab.

Table 8-2. Parameters for classical regular polypeptide conformations

Conformation	Torsion angle ($^\circ$)			Residues per turn (n)	Translation per residue (\AA)
	ϕ	ψ	ω		
Antiparallel β -sheet	-139	+135	-178	2.0	3.4
Parallel β -sheet	-119	+113	180	2.0	3.2
→ Right-handed α -helix	-57	-47	180	3.6	1.50
3_{10} -helix	-49	-26	180	3.0	2.0
Π -helix	-57	-70	180	4.4	1.15
Polyproline I	-83	+158	0	3.33	1.9
Polyproline II	-78	+149	180	3.0	3.12
Polyglycine II	-80	+150	180	3.0	3.1

Data from G. N. Ramachandran & V. Sasisekharan (1968) *Adv. Protein Chem.* **23**, 283–437; IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1970) *Biochemistry* **9**, 3471–3479.

(i) **α -Helix**: α -Helices sind die einfachsten regulären Konformationen; vorherrschende Sek.-Strukturform in gefalteten Proteinen; jede Kehre (Schleife, turn) enthält 3.6 Reste; Ganghöhe 5.4 Å (1.5 Å pro Rest); φ etwa -60° und ψ etwa -50° ; rechtsgängige α -Helix (α_R ; Normalfall) im Quadranten links unten im Ramachandran Plot. Alle HB und Dipole jeder Peptidbindung sind in derselben Richtung angeordnet; die Helix hat deshalb ein signifikantes Dipolmoment mit einer partiellen pos. Ladung am N-Terminus und einer partiellen neg. Ladung am C-Terminus. Seitenketten mit verzweigten C-Atomen (Val, Ile, Thr) sind in ihren Konformationen eingeschränkt; polare Gruppen (Ser, Thr, Asp, Asn) findet man oft an den Enden von α -Helices.

Die linksgängige α -Helix (α_L) ist möglich, φ etwa $+60^\circ$ und ψ etwa $+50^\circ$; sehr selten.

Helices in gefalteten Proteinen sind oft amphipatisch (polare oder geladene Reste am einen Ende der Helix, hydrophobe am anderen); dies erlaubt der α -Helix die Bindung an eine nichtpolare Oberfläche an einem Ende (z.B. Membran) und die WW mit dem wässr. LM am anderen.

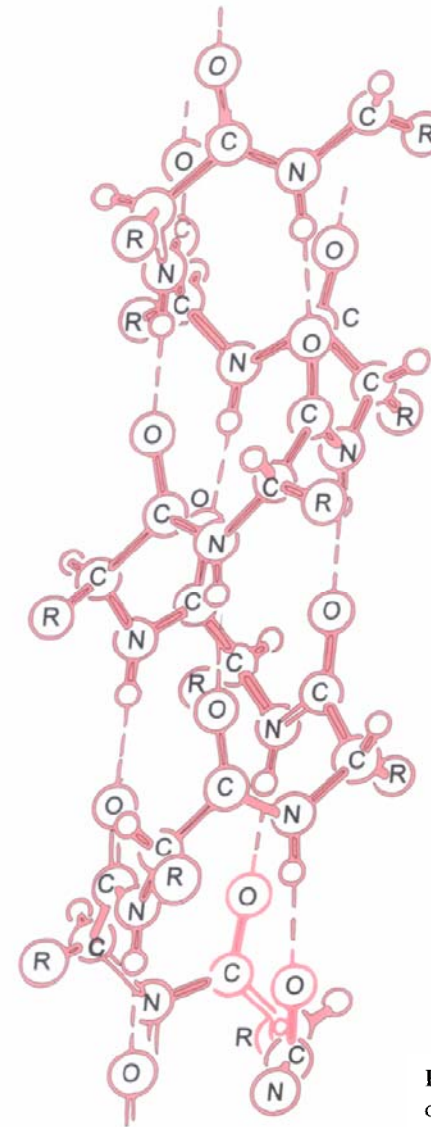
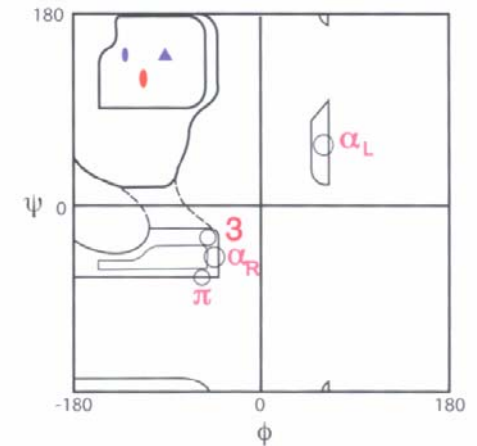


Figure 8-6. A classical α -helix.

Reguläre Konformationen von Polypeptiden in einem Ramachandran Plot



- α_R Right-handed α -helix
- α_L Left-handed α -helix
- 3 Right-handed 3_{10} -helix
- π Right-handed π -helix
- ▭ Anti-parallel β -sheet
- ▭ Parallel β -sheet
- ▴ PolyPro I, polyPro II, polyGly II

Figure 8-7. The positions of the regular conformations of polypeptides on a Ramachandran plot. Data from G. N. Ramachandran & V. Sasisekharan (1968) *Adv. Protein Chem.* 23, 283–437.

Eine amphipathische Helix kann aus der AA-Sequenz unter Verwendung eines 'Helical Wheel' (Helixrades) vorhergesagt werden; dabei wird eine versetzte Anordnung der Seitenketten rund um die Helix in einer 2D Projektion entlang der Helixachse verwendet. Polare Gruppen sind auf der einen Seite der amphipathischen Helix, und nichtpolare auf der anderen; wird oft als hydrophobes Moment bezeichnet (siehe auch #157); analog dem Dipolmoment der elektr. Ladung - misst aber die räuml. Trennung der polaren von den nichtpolaren Gruppen (und nicht die Trennung der positiven von den negativen Ladungen).

3₁₀- und Π -Helices: 2 mögliche Variationen der α -Helix-Konformation werden durch ihre HB-Muster definiert:

Die 3₁₀-Helix hat Rückgrat-HB zw. den Resten (i) und (i+3), so dass sie etwas enger als die α -Helix gewunden ist. Name: 3 Reste pro Windung und 10 Atome zw. HB-Donor und -Akzeptor. Die 3₁₀-Helix ist alleine nicht stabil, wird meist nur an den Enden von α -Helices gefunden.

Im Gegensatz dazu, ist die Π -Helix etwas lockerer gewunden, mit HB zw. den Resten (i) und (i+5). Die Π -Helix ist nicht stabil, wird normalerweise nicht gefunden.

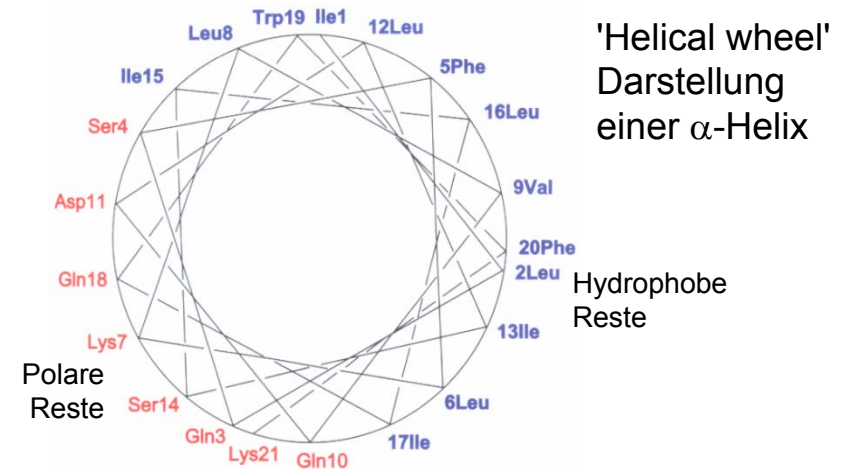


Figure 8-8. Helical wheel representation of an α -helix. The positions of the side-chains are shown in projection down the helix axis. In an ideal α -helix, there are 3.6 residues per complete turn, or a rotation of 100° per residue. The helical wheel consequently repeats after five turns of 18 residues; the 19th to 21st residues would overlap with the 1st to 3rd residues here, but are offset slightly to make them visible. With the amphipathic helix shown, the hydrophobic residues are indicated in *blue* and they lie solely on one side of the helix; the opposite side is composed solely of polar residues (*red*). This peptide has the sequence Ile-Leu-Gln-Ser-Phe-Leu-Lys-Leu-Val-Gln-Asp-Leu-Ile-Ser-Ile-Leu-Ile-Gln-Trp-Phe-Lys.

(ii) **β-Faltblatt**: Ein β-Faltblatt (β-sheet, β-pleated sheet) besteht aus 2 oder mehr benachbarten, durch HB verknüpften β-Strängen; im linken, oberen Quadranten des Ramachandran Plot; ein einzelner β-Strang ist nicht stabil; β-Stränge sind nur im β-Faltblatt stabil; ∃ parallele und antiparallele Faltblätter (versch. HB); ihre Rückgrat-Konformationen unterscheiden sich (parallel: $\varphi = -119^\circ$, $\psi = 113^\circ$; antiparallel: $\varphi = -139^\circ$, $\psi = 135^\circ$). Klassische β-Faltblätter sollten planar und flach sein; haben meist einen rechtsgängigen Twist von 10° (→ stabiler; verbirgt mehr nichtpolare Oberfläche als ein flaches Faltblatt).

Die verschiedenen AAs haben eine unterschiedl. Neigung, β-Stränge und β-Faltblätter auszubilden.

Die Bildung von β-Faltblättern in Poly-AA wurde nicht systematisch untersucht. Das einfachste β-Faltblatt besteht aus 2 antiparallelen β-Strängen, verbunden durch eine Kehre (reverse turn); solche Strukturen sind in Wasser stabil; bilden sich in wenigen μs ; die Kehre ist Bestandteil der Struktur. Die Stabilität des antiparallelen Faltblatts scheint mit der Länge (bis zu 7 Resten) und der Anzahl der Stränge zuzunehmen.

Anlass für eine detaillierte Untersuchung der Bildung von β-Faltblättern war der Befund, dass Amyloid-Proteine in Zellen Protein-Aggregate bilden (Alzheimer!), die aus β-Faltblättern bestehen.

(iii) **Poly-Gly**: hat (wegen der Abwesenheit einer Seitenkette) eine wesentlich größere Flexibilität als andere Poly-AAs; nimmt in Lösung eine gestreckte (extended) Konformation an; poly(Gly) mit mehr als 9 Resten ist in Wasser unlöslich; im festen Zustand kann sein Rückgrat (abhängig von den Bedingungen) 2 alternative Konformationen annehmen: poly(Gly) I und poly(Gly) II.

Antiparallele und parallele β-Faltblätter

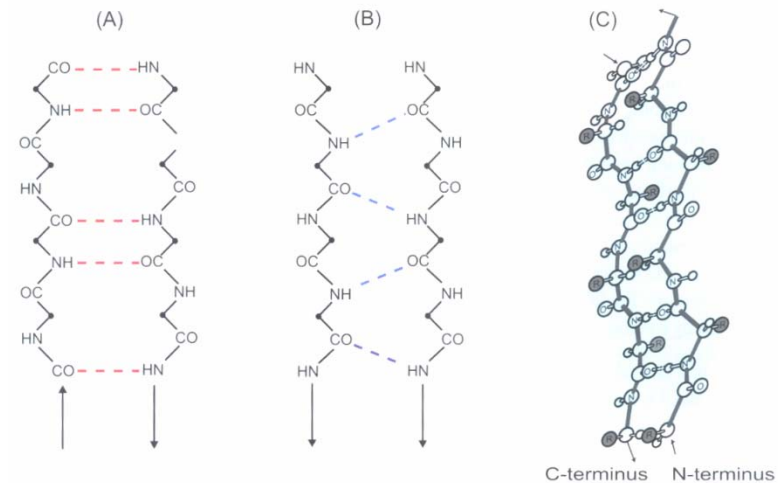


Figure 8-9. Hydrogen-bonding patterns in (A) antiparallel and (B) parallel β -sheets. The dashed lines are hydrogen bonds between the backbone carbonyl and NH groups of the peptide bonds. (C) Two strands of an antiparallel β -sheet, with the planes of the peptide bonds highlighted to emphasize the pleated appearance. Note that the side-chains of residues adjacent in the sequence are on opposite sides of the sheets, but those on adjacent strands project in the same direction.

Poly(Gly) I kann (abhängig von der Länge der Polypeptidkette) wiederum 2 verschiedene Konformationen annehmen; poly(Gly) II ist helikal mit 3 Resten pro Turn, seine Konformation ist dem poly(Pro) II ähnlich; poly(Gly) verursacht medizinische Anomalien im Menschen.

(iv) **Poly-Pro**: ein Pro-Rest hat kein H-Atom am N des Rückgrats und ist somit nicht in der Lage, die üblichen HB der Sek.Struktur auszubilden; die cycl. Seitenkette des Pro begrenzt die Konformation des Rückgrats, so dass φ etwa -80° betragen muss.

Folglich kann poly(Pro) keine α -Helix- oder β -Faltblatt-Konformation einnehmen; stattdessen nimmt das poly(Pro)-Rückgrat (abhängig von den Bedingungen) eine der beiden möglichen Konformationen, **poly(Pro) I** oder **poly(Pro) II**, ein. Form I ist eine rechtsgängige Helix (3.3 Reste pro Turn), während Form II eine linksgängige Helix (3 Reste pro Turn) repräsentiert. Der Hauptunterschied besteht darin, dass Form I alle Peptidbindungen in der cis Konformation ($\omega = 0^\circ$) und Form II in trans ($\omega = 180^\circ$) hat.

Die poly(Pro) II Konformation ist insofern ungewöhnlich, als (aus sterischen Gründen) das Polypeptid-Rückgrat nicht leicht HB bilden kann. Der bestimmende Faktor der Konformation des poly(Pro) II Rückgrats ist die Solvatation der polaren Gruppen seines Rückgrats. Minimale WW zw. den Resten, so dass die Auffaltung der helikalen Konformation nicht kooperativ ist (im Gegensatz zu α -Helices; siehe #170).

Die poly(Pro) I und II Formen können durch Änderung des LM ineinander übergeführt werden. Die gegenseitige Umwandlung erfolgt durch einen 'Zipper'-Mechanismus (bei dem die langsame cis-trans Isomerisierung jeder der Peptidbindungen an einem Ende beginnt und sequenziell entlang der Polypeptidkette fortschreitet; die I \rightarrow II Umwandlung beginnt am Amino-Ende der Kette, die II \rightarrow I Umwandlung am anderen Ende).

Poly(Pro) II Konformationen in gefalteten Proteinen sind an vielen biol. Phänomenen beteiligt, möglicherweise auch an Konformationen aufgefalteter Proteine.

poly(Pro) II Konformation

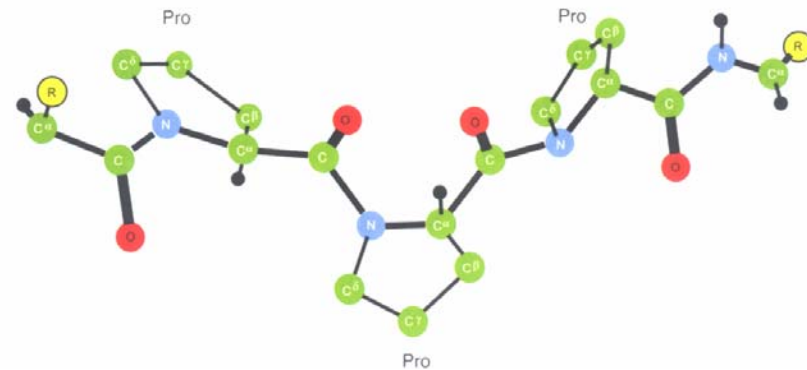


Figure 8-10. Schematic representation of the poly(Pro) II-helix for three sequential Pro residues. The small black spheres are H atoms on C α atoms; the others are labeled.

(4) Bildung von α -Helices aus einem RC

Die α -Helix ist eine relativ einfache Struktur; sie beinhaltet nur ein einziges, fortlaufendes Segment der Polypeptidkette; deshalb gutes Modellsystem, um Konformationsänderungen in Proteinen zu studieren.

Um die Helixbildung zu studieren, wurden zunächst Poly-AA verwendet; solche Systeme sind in der Theorie simpel, im Experiment (in Wasser) jedoch nicht. In Wasser lösliche Poly-AA bilden keine α -Helix, und die, die eine α -Helix bilden, sind nicht in Wasser löslich. Aussagekräftige Untersuchungen erfordern die Verwendung kurzer Peptide mit bestimmten AA-Sequenzen (Design: wasserlöslich und in nennenswertem Ausmaß die α -helikale Konformation einnehmend).

(i) Die α -Helix stabilisierende Faktoren: Alle Peptid- α -Helices entfalten sich mit steigender Temp., d.h. die Helixbildung ist ein enthalpisch günstiger Prozess, der mit der Abgabe von Wärme voranschreitet. Die HB zw. den Atomen im Peptid-rückgrat ($>C=O \dots H-N<$) leisten den größten Teil der Enthalpie-Stabilisierung der helikalen Konformation. Der günstigen Enthalpie-Änderung steht der konformationelle Entropie-Verlust, der beim Einfrieren der Rückgratskonformation auftritt, gegenüber. Diese ungünstige Entropie-Änderung ist etwa von derselben Größenordnung wie die günstige Enthalpie-Änderung, d.h. isolierte α -Helices sind bestenfalls geringfügig stabil.

Verschiedene AAs haben verschieden große Neigung (helix propensity), Helices auszubilden (Table 8-3).

Bereitschaft von AA zur Helixbildung
(helix propensity); Gly = 0

Table 8-3. Relative helical propensities of amino acid residues

Amino acid residue	Relative stabilization of α -helical conformation (kcal/mol)
Ala	0.77
Arg	0.68
Lys	0.65
Leu	0.62
Met	0.50
Trp	0.45
Phe	0.41
Ser	0.35
Gln	0.33
Glu	0.27
Cys	0.23
Ile	0.23
Tyr	0.17
Asp	0.15
Val	0.14
Thr	0.11
Asn	0.07
His	0.06
Gly	→ 0
Pro	≈ -3

Measured by substituting each amino acid residue into a solvent-accessible position in a synthetic peptide that forms an α -helical dimer that is in equilibrium with a randomly coiled monomeric state. The equilibrium constants for the monomer-dimer equilibrium were determined with the various peptides to provide a measure of the differences in stabilities of the α -helical conformation. The value for Gly was arbitrarily chosen as zero. Data from K. T. O'Neil & W. F. DeGrado (1990) *Science* **250**, 646-651.

WW zw. den Seitenketten können ebenfalls die Helixstabilität beeinflussen, zumal in der AA-Sequenz 3-4 Reste voneinander entfernte Reste in einer helikalen Konformation räumlich sehr nahe gelegen sein können (Abb. 8-11). Folglich können günstige elektrostat. WW, HB oder hydrophobe Kontakte zw. diesen Seitenketten bis zu 1 kcal/mol zur Helixstabilität beitragen; umgekehrt werden günstige WW in der nichthelikalen Form den Betrag an α -Helix verringern.

Die speziellen AAs Pro und Gly sind außergewöhnlich: Gly hat ein sehr flexibles Rückgrat, begünstigt keinesfalls irgendeine fixierte Konformation (wie die α -Helix). Einzelne Pro-Reste können in langen α -Helices untergebracht werden, stören aber lokal die helikale Geometrie; aber häufig am N-Terminus einer Helix.

Viele andere WW beeinflussen die Stabilität einer isolierten α -Helix. Polare Gruppen ohne HB zum Wasser oder anderen Proteingruppen sind destabilisierend, d.h. dass alle polaren Gruppen möglichst hydratisiert sein oder andere intramolekulare Partner haben sollten; die Seitenkette des 1. Restes der Helix ('N-cap') kann diese Rolle übernehmen; analoge 'C-cap' WW können am C-Terminus stattfinden. Diese 'capping'-HBs könnten wichtige Faktoren bei der Erkennung von Helix-Anfang und -Ende sein.

Bei der helikalen Konformation sind Peptidgruppen und assoziierte Dipole axial ausgerichtet (während die Dipole in RCs willkürlich verteilt sind). Die axiale Ausrichtung der Dipole ergibt einen sog. Helix-Makrodipol (= Addition der einzelnen Dipole): der N-Terminus der Helix hat eine partielle pos. Ladung, während der C-Terminus eine partielle neg. Ladung trägt (Abb. 8-11). Reste mit geladenen Seitengruppen am Ende einer Helix können mit diesem Dipol günstig oder ungünstig interagieren. Substanzielle WW scheinen jedoch eher auf HB oder elektrostat. WW mit den Mikrodipolen der einzelnen Peptidbindungen zurückzuführen sein.

WW der AA-Seitenketten, die die Stabilität von isolierten α -Helices vergrößern

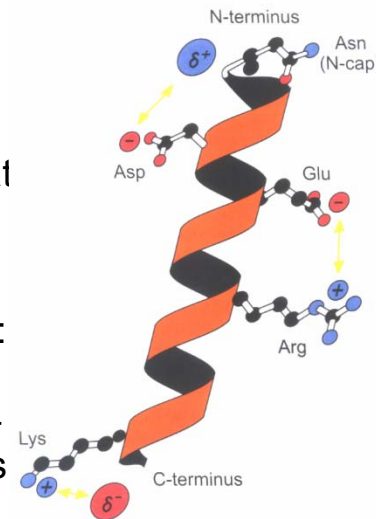


Figure 8-11. Interactions involving amino acid side-chains that increase the stability of isolated α -helices. A ribbon model of an α -helix is illustrated, with stabilizing interactions involving hydrogen bonding of the N-cap Asn side-chain at the N-terminus, favorable electrostatic interactions of ionized Asp and Lys side-chains with the helix dipole, and electrostatic interactions between oppositely charged Glu and Arg side-chains on adjacent turns of the helix. Of course, interactions between side-chains with the same charge will destabilize the helix, but hydrophobic interactions between nonpolar side-chains can also be significant.

(ii) Helix-Coil Übergänge: Isolierte α -Helices sind nicht besonders stabil, in wässriger Lösung sind sie eher dynamische Systeme (schnell gebildet, schnell aufgefalt, 10^3 - $10^7 \times$ pro s); die Erzeugung der Helix hängt nicht von der Länge der Polypeptidkette ab, wohl aber die Auftrennung und die Gesamtstabilität der α -Helices.

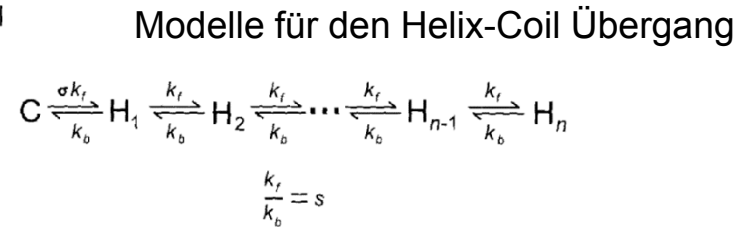
Die Initiation zur Helixbildung in einem RC ist der langsamste Schritt, während das Helixwachstum schnell erfolgt; die Initiation erfolgt irgendwo im RC, aber Wachstum und Auftrennung nur an den Enden der helikalen Segmente.

Für eine Poly-AA mit einer einzelnen helikalen Region kann dies durch Umwandlung von 2 Konformationen ausgedrückt werden: C (coil) und H_i (helikales Segment zunehmender Länge); i = Anzahl der HB, die an der helikalen Konformation beteiligt ist); k_f und k_b sind die Geschw.Konstanten für das Hinzufügen bzw. Entfernen eines Restes.

Der α -Helix \rightarrow Coil Übergang ist kooperativ.

(iii) Helix-Coil Modelle: Zimm-Bragg bzw. Lifson-Roig Modell; ähnliche Charakteristika aber einige wesentliche Unterschiede.

(A) Zimm-Bragg model



(B) Lifson-Roig model

	Hydrogen bond								
Peptide bond numbering	0	1	2	3	4	5	6	7	8
C^α numbering	CO-NH-C $^\alpha$	CO-NH-C $^\alpha$	CO-NH-C $^\alpha$	CO-NH-C $^\alpha$	CO-NH-C $^\alpha$	CO-NH-C $^\alpha$	CO-NH-C $^\alpha$	CO-NH-C $^\alpha$	CO-NH
Conformation	c	c	h	h	h	c	c	c	
Weights	1	1	ω	ω	ω	1	1	1	

Figure 8-12. Two models for the α -helix-coil transition. (A) The relatively simple model of Zimm and Bragg treats the transition of a polypeptide chain, or a long segment of one, as simply being the equilibrium between one state, C, in which there is no helix, and other states, in which there is a helical segment of increasing lengths, H_i . The rate constants for adding and subtracting helical residues from the ends of the helical segment are assumed to be constant, except that the rate of forming the first turn of helix is lower by the nucleation parameter σ . The helix propensity of a residue is given by the equilibrium constant s . (B) The Lifson-Roig theory denotes the conformation of each residue as being either random coil (c) or helical (h). The statistical weights are defined using the coil state as a reference (weight = 1), with helix nucleation sites having weight ν and internal helical residues ω .

Gemeinsamkeiten: 3 Grundparameter: (1) Kettenlänge (oder Anzahl der Reste im Polypeptid), (2) Helix-Fortschrittparameter (s- oder w-Wert), (3) Helix-Nukleationsparameter (σ oder v^2); Verwendung statistischer Gewichte \rightarrow Verteilungsfunktion für das System, Berechnung der Durchschnittseigenschaften der Population: Anteil der helikalen Reste, Durchschnittslänge und Anzahl der helikalen Strecken

Das Lifson-Roig Modell verwendet (andere) statische Gewichte (v oder w) für spezifische Reste (vgl. Abb. 8-12); häufig verwendetes Modell.

(iv) Trifluorethanol (TFE): $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ als Co-Solvens stabilisiert die α -helikale Konformation in Peptiden; maximale Stabilisierung erfordert hohe Konz. (40-50% (v/v) TFE); manchmal stabilisiert TFE zusätzlich die β -Struktur; Ursache und Mechanismus der Stabilisierung unklar (mögliche Ursachen: Hydratation von Peptidgruppen im Polypeptidrückgrat oder präferentielle Aggregation von TFE-Molekülen rund um Peptide (verbunden mit der Entfernung von Wasser).

TFE reagiert mit nichtpolaren Resten nur schwach, so dass geringe Konz. hydrophobe WW in Peptiden nicht aufbrechen; in hohen Konz. schwächt TFE hydrophobe WW und kann als Denaturierungsmittel von Proteinen verwendet werden (um diese aufzufalten); das aufgefaltete Protein ist kein RC (enthält beträchtliche helikale Segmente – entsprechend dem Anteil im nativen Protein).

(5) Faserproteine

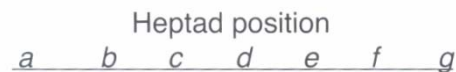
Natürliche Faserproteine sind den erwähnten regulären Strukturen ähnlich, entsprechend ihren AA-Sequenzen; haben meist beträchtliche Größe, Unlösbarkeit, schwer charakterisierbar.

Bei klassischen Faserproteinen: 3 Gruppen von Strukturen: (1) α -fibrilläre Proteine, (2) β -fibrilläre Proteine, (3) Kollagene.

Alle Faserproteine haben repetitive Elemente in ihrer AA-Sequenz (oft in der Form von Tandem-Sequenz Motiven).

(i) α -fibrilläre Strukturen: Coiled Coils: α -fibrilläre Strukturen treten in Form von einzelnen länglichen Molekülen auf (Laminin, Fibrinogen, Myosin, Desmin, Fibrin); alle Vertreter haben α -helikale Konformation und ihre Protein-Sequenzen haben eine hohe Neigung zur Helixbildung (helix propensity); die einzelnen α -Helices aggregieren zu seilartigen Strukturen, bei denen 2-5 α -Helices ineinander verflochten ('superspiralisiert') sind; diese Anordnungen werden durch nichtpolare WW zw. den Helices und elektrostat. WW gewisser AA-Seitenketten stabilisiert.

Die Sequenzen von α -fibrillären Strukturen sind durch Heptad(en)- Wiederholungen (a-b-c-d-e-f-g)_n charakterisiert, bei denen sich nichtpolare Reste (3-4 Reste voneinander getrennt) abwechseln; 75% der a- und d-Positionen sind von nichtpolaren Resten (Leu, Ile, Val) besetzt. Diese Sequenzen führen zu einer rechtsgängigen α -helikalen Konformation (3.6 Reste pro Turn); die apolaren Reste in der Heptad-Wiederholung bilden einen apolaren Streifen an der Oberfläche der α -Helix, der sich linksgängig um die Helix windet.



Arg-

Met- Lys- Gln- Leu- Glu- Asp- Lys-
 Val- Glu- Glu- Leu- Leu- Ser- Lys-
 Asn- Tyr- His- Leu- Glu- Asn- Glu-
 Val- Ala- Arg- Leu- Lys- Lys- Leu-
 Val-Gly- Glu- Arg

Figure 8-13. Heptad distribution of residues in the amino acid sequence of the GCN4 leucine zipper. The nonpolar residues are blue whereas the ionized residues are red.

AA-Häufigkeit in Heptad-Wiederholungen

Table 8-4. Frequency of occurrence of amino acid residues in the heptad repeats of the coil-coil proteins myosin, tropomyosin and paramyosin and intermediate filaments

Residue	% Average occurrence at position						
	a	b	c	d	e	f	g
Ala	10.2	12.3	8.1	22.2	4.4	11.1	9.3
Cys	0.9	0.0	0.4	0.3	0.2	0.5	0.1
Asp	0.1	13.4	13.0	1.0	4.0	9.8	8.0
Glu	0.8	21.2	19.3	5.5	31.5	14.7	20.1
Phe	2.0	0.4	1.4	2.1	0.4	0.4	0.0
Gly	0.6	1.7	3.5	1.0	1.3	4.2	1.2
His	1.2	2.7	1.6	1.1	0.8	2.6	0.7
Ile	13.2	0.9	2.2	6.3	2.4	2.2	2.2
Lys	7.7	15.3	11.5	0.6	9.0	10.5	14.9
Leu	32.2	1.6	3.9	34.7	6.4	3.9	5.6
Met	4.9	0.9	0.9	2.3	0.9	1.0	0.4
Asn	3.6	4.3	4.6	1.1	5.7	4.8	2.7
Pro	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Gln	0.8	8.7	7.5	4.1	14.0	6.1	13.2
Arg	5.5	6.2	8.2	0.9	6.6	13.2	10.7
Ser	2.1	3.6	8.1	2.2	5.2	8.1	4.5
Thr	1.2	3.8	3.7	2.2	5.1	3.6	3.5
Val	8.9	1.9	1.9	6.0	1.9	3.1	2.7
Trp	0.1	0.0	0.0	0.7	0.0	0.1	0.0
Tyr	4.1	0.9	0.3	5.7	0.3	0.2	0.2

Data from C. Cohen & D. A. D. Parry (1990) *Proteins* 7, 1-15.

2 oder mehr solcher α -Helices können zusammenkommen, optimieren die Packung der apolaren Reste entlang ihrer Grenzfläche, umschlingen sich (und bilden so eine linksgängige Coiled-Coil, seilartige Struktur); die einzelnen rechtsgängigen α -Helices werden von ihrer normalen geraden Geometrie in eine linksgängige superhelikale Konformation (leicht) verzerrt.

In vielen dieser Coiled Coils sind die nichtpolaren Reste in den a- und d-Positionen überwiegend Leu (**Leu zippers**; vgl. Table 8-4): Leu-Reste in Position d zeigen direkt auf die Grenzfläche, während Val-Reste, die in Position a dominieren, davon wegweisen.

Günstige elektrostat. WW können auch zw. den Ketten gemacht werden; ihre AA-Sequenzen enthalten eine sehr regelmäßige, lineare Anordnung von sauren und basischen Resten. Assemblierungen in Filament-Form werden großteils durch WW zw. geladenen Gruppen benachbarter Helices erzeugt (**ionic zippers**). Die ionischen WW zw. den Ketten ereignen sich primär zw. gegenläufig geladenen Resten in den Positionen e und g verschiedener Ketten (Abb. 8-15 auf #176); diese Reste sind oft Glu oder Gln an Position e, und Arg und Lys an Position g.

Coiled Coils sind helikale Strukturen, die eine Achse haben, die selbst helikal ist; die einzelnen Helices sind rechtsgängig, aber die Verdrillung der Helices zueinander ist linksgängig. Dies entspricht auch dem Prinzip, wie Seile gemacht werden: Maximierung der WW zwischen den Strängen und Minimierung des Slippage (Schlupf)

Struktur von α -helikalen Coiled Coils

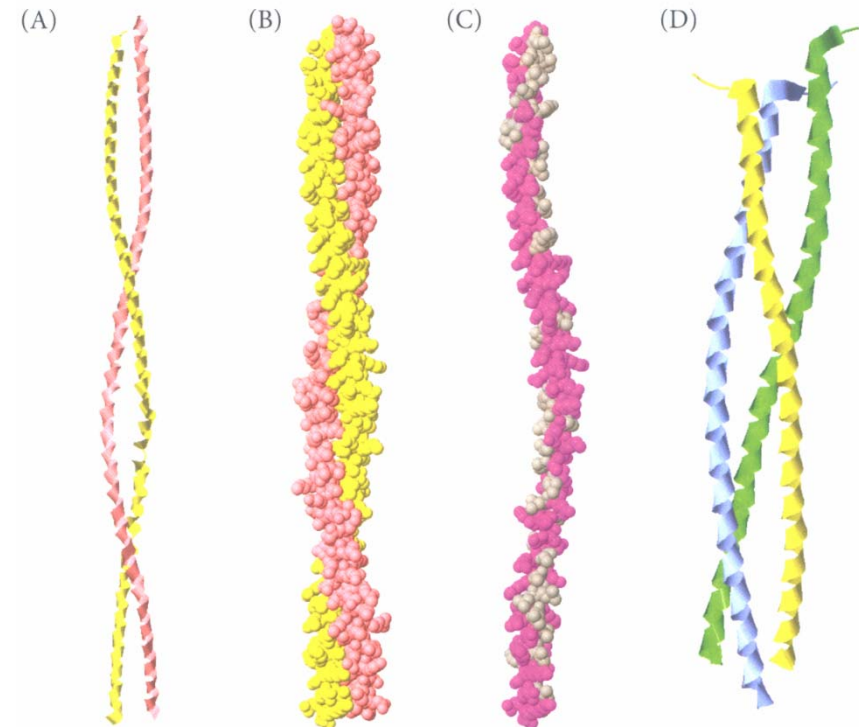


Figure 8-14. The structure of α -helical coiled coils. (A) A parallel dimeric coiled coil from the C-terminus of rabbit skeletal α -tropomyosin (PDB file 2d3e). The coiled ribbon represents the α -helical course of the polypeptide backbone of each polypeptide chain. (B) A space-filling model of the same structure, with the two polypeptide chains differentiated. (C) One polypeptide chain of the structure has been removed, to expose the nonpolar surface that had been buried in the other chain. Nonpolar groups are colored grey, polar groups blue. (D) Example of a trimeric parallel coiled coil (PDB file 1wt6). Figure generated using the program Jmol.

Die Arten der apolaren Reste an den Positionen a und d sind für die genaue Spezifizierung der Anzahl der Ketten in Coiled-Coil Molekülen wie auch der elektrost. WW zw. den Resten in Positionen e und g maßgebend. Die Polypeptidketten können identisch oder auch verschieden sein.

3-strängige Strukturen gibt es in vielen Proteinen; 4-strängige Strukturen in den Seiden von Bienen, Wespen, Ameisen sowie in einigen globulären Proteinen; auch 5-strängige Coiled Coils wurden gefunden. Welche Strukturen sich letztlich entwickeln, hängt von den AA-Sequenzen, von der Effektivität, wie die apolaren Streifen eine effiziente Packung erreichen können, sowie von elektrost. WW ab.

Es gibt auch Ausnahmen von den Heptad-Wiederholungen: manchmal werden Pro-Reste innerhalb der Heptaden gefunden. Manche Sequenzen zeigen Diskontinuitäten (stutters, stammers): Löschung von 3 oder 4 Resten. Stutter (Stottern): strukturell führt dies zu einer lokalen Auftrennung des Coiled Coil, Zunahme der superhelikalen Ganghöhe. Stammer (Stammeln): lokale Überverdrillung, Verkürzung der superhelikalen Ganghöhe.

Viele Proteine mit Coiled-Coil Strukturen haben Segmente mit versch. Konformationen an einem Ende oder an beiden Enden; Myosin ist ein langes, 2-strängiges Coiled Coil mit globulären Köpfchen an jedem der 2 Carboxylenden (verantwortlich für katalytische und Bewegungs-Funktionen). Intermediat-Filamente haben zentrale doppelhelikale Stäbchen (310 Reste lang).

Die α -fibrillären Proteine ohne Periodizitäten in den geladenen Resten bilden keine regulären Filament-Strukturen, haben stattdessen nichthelikale Domänen, meist an ihren N- oder C-Termini.

'Helical wheel' Darstellung einer Heptad-Wiederholung der einzelnen α -Helices eines Coiled Coil (2 bzw. 3 Stränge)

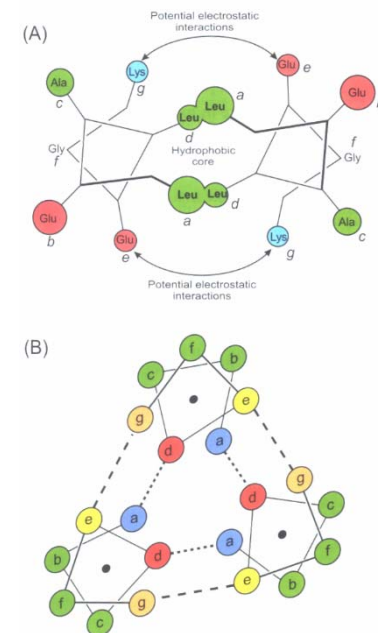


Figure 8-15. Helical wheel representations of one heptad repeat of the individual α -helices of a coiled coil, illustrating how the side-chains of residues pack together and interact in coiled coils with (A) two or (B) three strands.

(ii) β -fibrilläre Strukturen: Seidenproteine sind die bekanntesten Vertreter; Grundstruktur ist eine längliche Anordnung von β -Strängen \rightarrow antiparalleles β -Faltblatt, 2 oder mehrere solcher Faltblätter aggregieren dann; repetitive AA-Sequenzen (insbes. Gly, Ala, Ser, Gln), häufig Dipeptidwiederholungen

(iii) Kollagene: Hauptbestandteil extrazellulärer Matrices incl. Knochen, Sehnen etc.; Ketten meist über 1000 Reste; charakteristische repetitive Sequenzen: jeder 3. Rest = Gly, d.h. $(\text{-Gly-Xaa-Yaa})_n$, mit Vorherrschen von Pro an den Stellen Xaa und Yaa; viele Pro (und Lys) sind hydroxyliert; die Ursache für die Wiederholungssequenzen wird aus der 3D-Struktur klar (Fig. 8-16): 3 Polypeptidketten sind ineinander verdrillt (die Gly-Reste kommen den beiden anderen Ketten in der Tripelhelix nahe, so dass keine Seitenkette möglich ist); die Seitenketten der Xaa- und Yaa-Positionen sind an der Oberfläche der Tripelhelix exponiert; die Pro-Reste verleihen Starrheit und Stabilität; OH-Gruppen erlauben HBs (und erhöhen die thermische Stabilität); niederer Gehalt an hydrophoben Resten. Die 3 Polypeptide sind nicht identisch (Kollagen 1: 2 α_1 und 1 α_2); 1000 Reste ergeben eine Kollagen-Tripelhelix mit 14 Å Durchmesser und 3000 Å Länge; bis 28000 Å Länge möglich); Auffaltung der Tripelhelix durch Erhitzen über physiol. Temp. (Umwandlung in Gelatine); keine Regeneration durch Abkühlen. Synthese *in vivo* über Prokollagen: korrekte Assemblierung. Quer-gestreifte periodische Struktur in EM-Aufnahmen (quarter-staggered array).

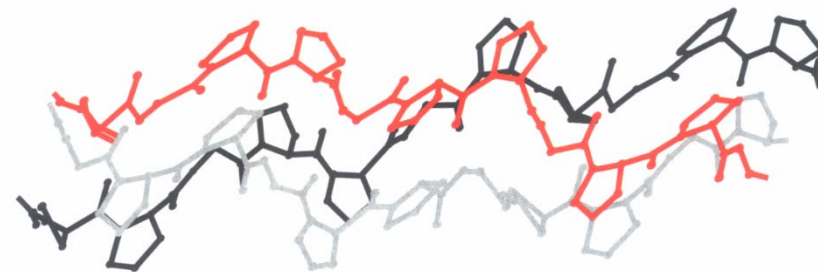
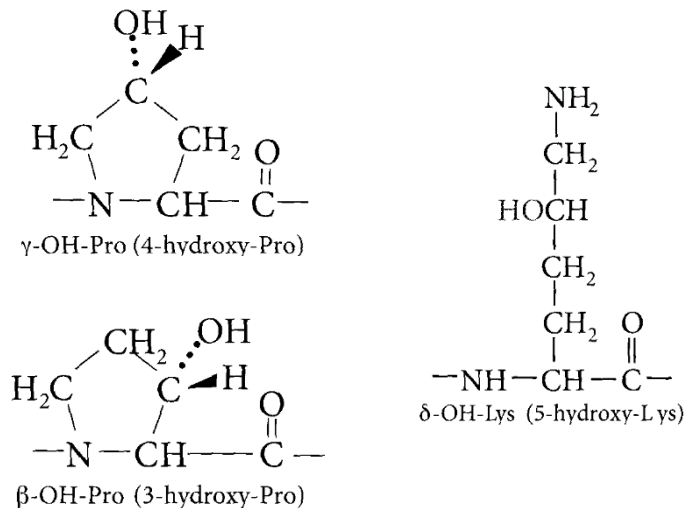


Figure 8-16. The structure of the triple helix of $(\text{Pro-Pro-Gly})_{10}$, which is an idealized version of collagen. Adapted from K. Okuyama *et al.* (1981) *J. Mol. Biol.* **152**, 427.

PROTEIN-STRUKTUR

Proteine: präzise 3D Strukturen, hohe Diversität;
üblicherweise 4 Levels: **Pr., Sek., Tert., Qu.-Struktur**;
2 Intermediat-Levels: **Supersek.-Struktur (Motive, superfold)**, versch. Elemente der Sek.-Str. zusammen-
gepackt; **Domäne**, eigenständiger Teil der Tert.-Str.

(1) 3D-Strukturen globulärer Proteine: Molekulare Komplexität

Globuläre Pr.: unterscheiden sich drastisch von synthet. Polypeptiden mit RC oder repetitiver Konformation; nahezu kugelförmig (globulär); physikal. Eig. ändern sich nicht wesentl. mit Temp., pH, Druck (im Gegensatz zu RC-Polypeptiden) bis ein gewisser Punkt erreicht ist, wo es dann zu plötzl. drastischen Änderungen und dem Verlust der physiol. Funktion kommt (Denaturierung); das denaturierte Pr. ähnelt dann eher dem RC-Polypeptid.

Die Konformation & Struktur eines Proteins wird in einem Kristallgitter nicht wesentlich verändert (ausgenommen flexible Seitenketten, Loops an der Oberfläche), d.h. Struktur in Kristall und Lösung sehr ähnlich; verwandte Pr. haben zumeist ähnlich gefaltete Konformationen.

Röntgen-Kristallografie: → EI.Dichte, die dann Atomen zugeordnet wird, → 3D Koordinaten; nützliche Information: Konformationswinkel (φ , ψ , ω , χ_j)

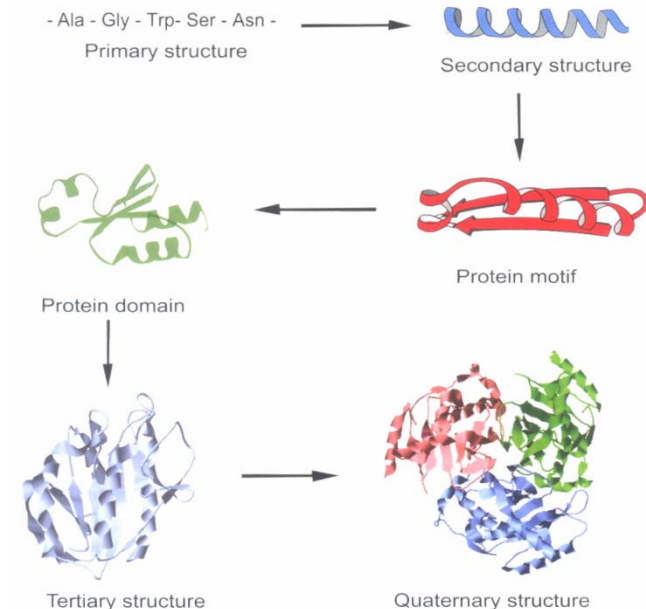


Figure 9-1. Different levels of protein structure, from primary to quaternary. Helices are depicted as *coils* and β -strands as *arrows*. The primary structure is the amino acid sequence of the polypeptide chain. The secondary structure example shown is an α -helix; the protein motif is a $\beta\alpha$ motif, where β is a β -strand, α an α -helix and the motif produces a parallel β -sheet. The protein domain is a folded structure that is stable in isolation. The tertiary structure is the folded structure of a complete polypeptide chain, in this case that of flavodoxin. The quaternary structure is produced by the aggregation of multiple polypeptide chains; in this case it is the homotrimer of chloramphenicol acetyltransferase.

Table 9-1. Conformational angles ($^\circ$) of bovine pancreatic trypsin inhibitor

Residue	ϕ	ψ	ω	χ^1	χ^2	χ^3	χ^4	χ^5
Arg1		137	178	82	176	57	76	5
Pro2	-60	149	180	177	171	-165		
Asp3	-58	-33	179	-80	-10			
Phe4	-63	-16	177	66	75			
Cys5	-70	-19	177	-65	-84	-81		
Leu6	-89	-3	178	-53	-179			
Glu7	-78	150	177	-51	168	162		
Pro8	-72	158	-177	-174	-172	172		
Pro9	-67	143	-176	180	-174	168		
Tyr10	-121	115	-177	177	82			
etc.								

Die außergewöhnlichste Eig. gefalteter Konformationen globulärer Pr. ist ihre Komplexität; ∃ versch. Darstellungsweisen (Fig. 9-2)

(i) Tertiär-Struktur: Overall Fold

Die gefalteten Strukturen kleiner globulärer Pr. sind kompakt und nahezu kugelförmig, haben aber eine sehr unregelmäßige Oberfläche; >200 Reste: Struktur besteht aus 2 oder mehr Einheiten (Domänen; vgl. Fig. 9-3); die einzelnen Domänen sind assoziiert, aber wechselwirken schwächer als die einzelnen Strukturelemente innerhalb der Domänen; Begriff der Domäne ist nicht rigoros; einzelne Domänen erkennt man an ihrer Kompaktheit (Verhältnis ASA der Domäne zu Oberfläche einer volumengleichen Kugel: 1.64)

Strukturelle Domänen: (A) Regenbogendarstellung (N-Terminus blau; C-Terminus rot; dazwischen: Regenbogenfarben); (B) vdW-Oberfläche

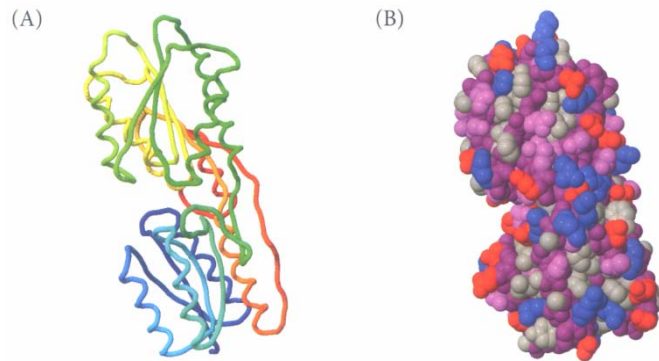


Figure 9-3. The structure of arabinose-binding protein, illustrating its separation into two structural domains. (A) The course of the polypeptide chain; the N-terminus is blue, the C-terminus red, in between varying with the colors of the rainbow. Note that the polypeptide chain crosses between the two domains three times. (B) A space-filling model of the van der Waals surface, with acidic groups red, basic groups blue and the polypeptide backbone mauve. Generated from PDB file 1abe using the program Jmol.

Darstellungsweisen für die 3D-Struktur globulärer Pr.: (A) Detaillierte Struktur; (B) vdW-Oberfläche; (C) ionisierte Gr.; (D) Schema für Sek.Str.; (E) Cartoon; (F) Regenbogen-Darstellung (Rainbow Representation) des Rückgrats

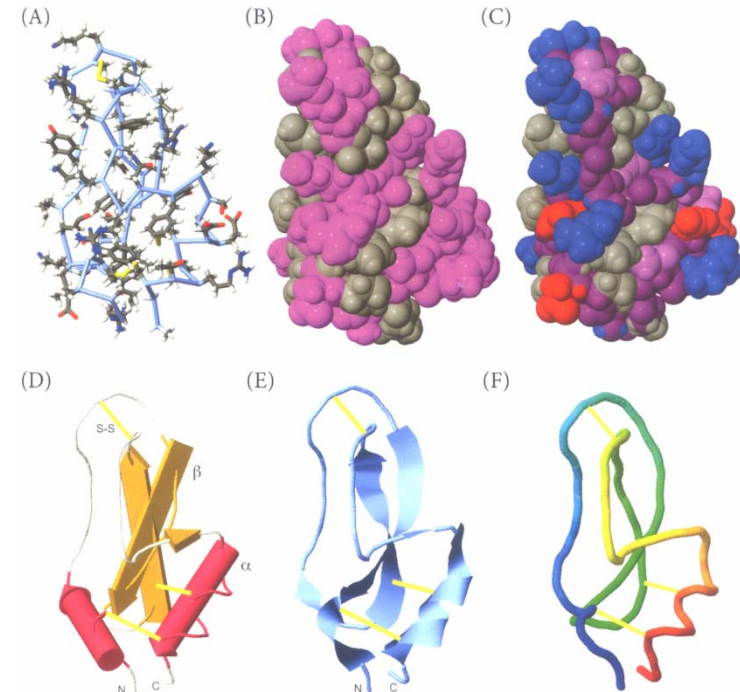


Figure 9-2. Various ways to represent the 3-D structures of globular proteins. The protein shown is one of the smallest known, bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI), consisting of 58 residues, including three disulfide bonds. (A) Detailed structure showing the covalent bonds linking all the atoms, including the hydrogens, except that a single virtual bond links adjacent C^α atoms in place of the peptide bond. (B) The van der Waals surface of the atoms. Hydrophobic groups are gray, polar groups colored. (C) The ionized groups of the protein; acidic groups are red, basic groups blue and the polypeptide backbone mauve. (D) Schematic illustration of the secondary structure. Only the polypeptide backbone is shown, with rockets for α-helices and slabs for β-strands. The arrowheads point towards the C-terminus. The three yellow rods are the three disulfide bonds. (E) Cartoon version of the polypeptide backbone, using ribbons for β-strands and coils for α-helices. (F) Rainbow representation of the polypeptide backbone. The N-terminus is colored blue, the C-terminus red, progressing through the normal spectrum in between. Generated from PDB file 5pti using the program Jmol.

Innerhalb einer Domäne ist der Verlauf des Polypeptid-rückgrats keineswegs regelmäßig, verläuft aber durch die Domäne durch halbwegs gerade, biegt an der Oberfläche ab und bewegt sich wieder mehr oder weniger gerade zur anderen Seite (Fig. 9-4); (Verhalten wie ein Feuerwehrschauch).

Das Rückgrat bildet keine eindeutige Knoten.

Rotationen um einzelne Bindungen des Rückgrats und Seitenketten sind ähnlich den Konformationen in der isolierten Struktureinheit, d.h. Peptidbindungen des Rückgrats sind planar und favorisieren das trans-Isomere (falls nicht der nächste Rest ein Pro ist).

Die Diederwinkel φ und ψ des Polypeptidrückgrats liegen innerhalb der Grenzen, die auch für isolierte Peptideinheiten gefunden wurden (Fig. 9-5).

Rotationen um Seitenkettenbindungen erfolgen so, dass weitestgehende Separierung sperriger Gruppen ermöglicht wird (Fig. 9-6).

Manche Proteine enthalten verschiedenartige Liganden: prosthet. Gr., Coenzyme, Metallionen etc.

Verschiedene Polypeptid-Rückgrate

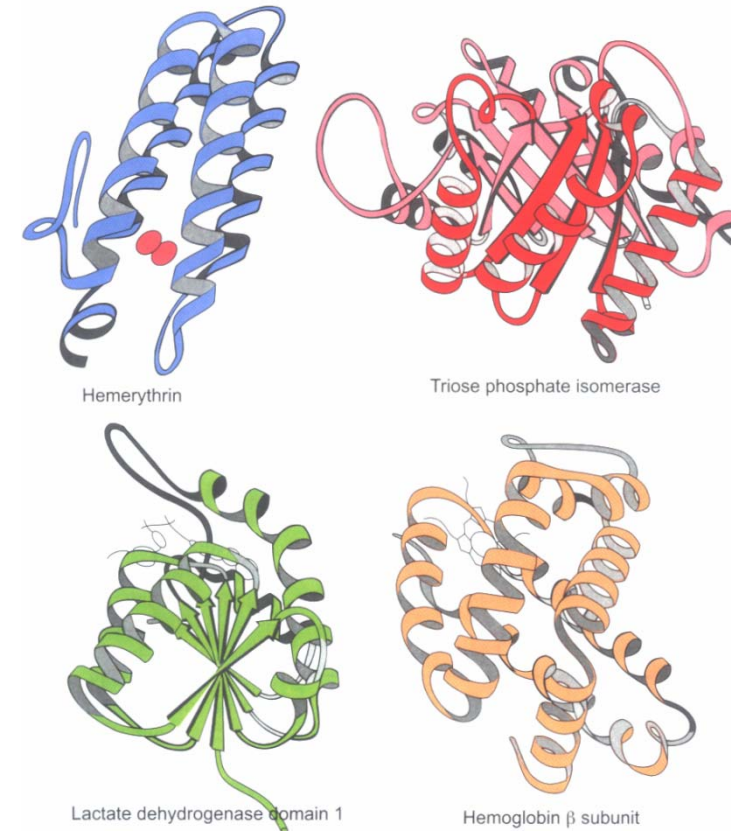


Figure 9-4. Artistic drawings of the polypeptide backbones of four proteins. α -Helices are depicted as helical ribbons, β -strands as arrows. The hemoglobin β -subunit has a heme group bound; hemerythrin has two iron atoms. Lactate dehydrogenase domain 1 has a molecule of the coenzyme NAD illustrated schematically. Adapted from drawings by J. S. Richardson.

Ramachandran Plots:

(A) alle Reste in einem bestimmten

Protein (□: Gly);

(B) Gly in vielen Proteinen

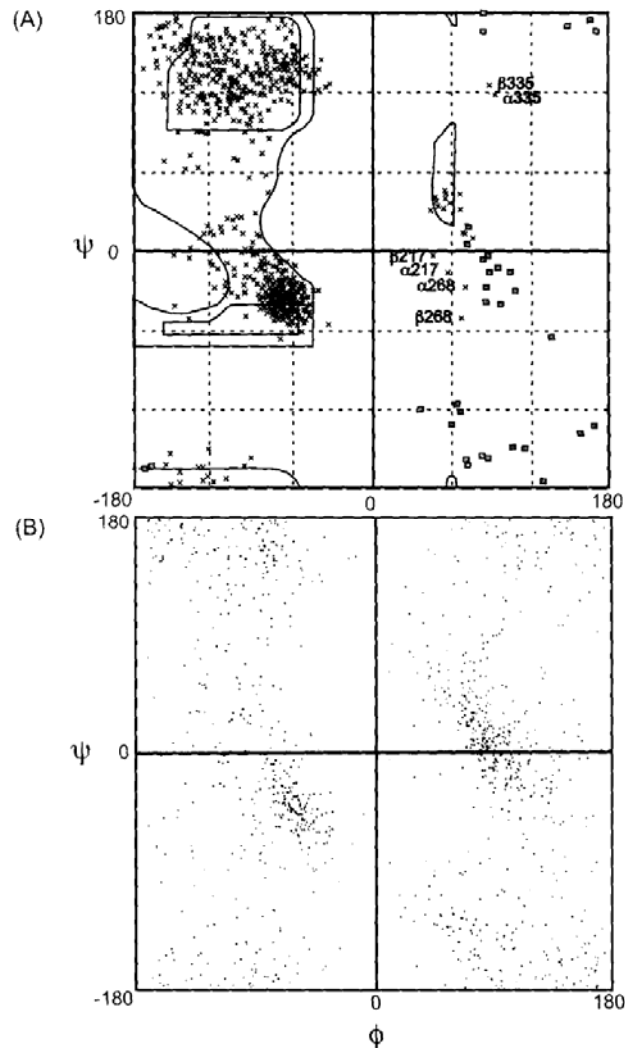


Figure 9-5. Ramachandran plots of the observed values of ϕ and ψ for all residues in creatine amidinohydrolase refined at 1.9 Å with an R-value of 17.7% (A) and for Gly residues in many proteins (B). Gly residues in (A) are indicated with *squares*. The only other residues to lie well outside the areas considered normally allowed are Asp217, Asp268 and Arg335, which are labeled. The α and β preceding the residue numbers refer to the two crystallographically independent subunits. Data from H. W. Hoeffken *et al.* (1988) *J. Mol. Biol.* **204**, 417–433 and C. Ramakrishnan *et al.* (1987) *Int. J. Peptide Protein Res.* **29**, 629–637.

C^{α} - C^{β} -Torsionswinkel χ_1 für Val-Reste in vielen Proteinen; ähnliche Histogramme für andere Reste

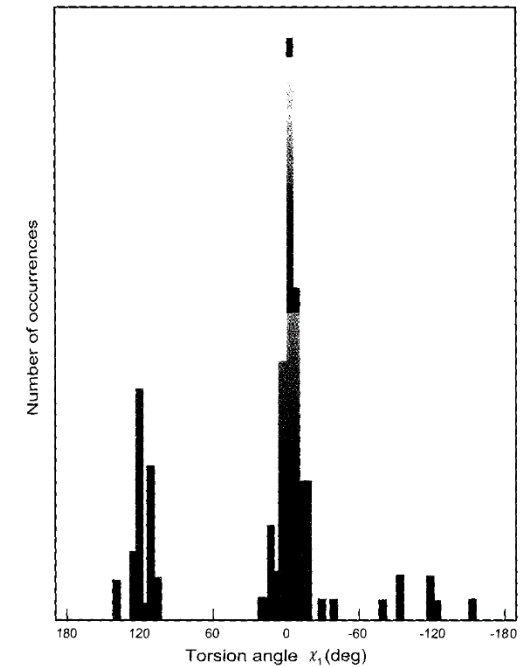


Figure 9-6. Histogram of the values of the C^{α} - C^{β} torsion angle, χ_1 , observed for 151 Val residues in highly refined protein structures. Similarly sharp histograms are observed for other residues, but Val is special in having the greatest predominance of just one rotamer. Data from J. W. Ponder & F. M. Richards (1987) *J. Mol. Biol.* **193**, 775–791.

(ii) Sek.-Struktur: Reguläre lokale Strukturen

Die länglichen Segmente der Polypeptidkette, die die gefalteten Domänen durchqueren, haben meist reguläre Konformationen, wie wir sie von den Modellpeptiden kennen, d.h. insbes. rechtsgängige α -Helices (ca. 31%) und β -Faltblätter (ca. 28%); vgl. #165-169. HBs unter Einbeziehung der C=O und N-H Gruppen des Polypeptid-Rückgrats definieren die Sek.Str.; die Segmente der α -Helices (meist 10-15 Reste) und β -Faltblätter (3-10 Reste) in globulären Proteinen sind relativ kurz (begrenzt durch den Durchmesser des Pr.); 50 α -Helix-Reste in Influenza Hämagglutinin, 31 α -Helix-Reste in Calmodulin und Troponin C.

Helices: typische α -Helix (Fig. 8-6, #166) hat 12 Reste, nur die zentralen 4 haben die 2 HBs, die diese Struktur charakterisieren (die 4 an den Enden haben nur je 1 HB; sind oft irregulär, bilden manchmal eine lokale 3_{10} -Helix). Problem: welche Reste gehören zu Helix? Die Helix-Achse ist manchmal gekrümmt. Die Π -Helix wird in Proteinstrukturen nicht gefunden. Linksgängige Helices werden nur verwendet, wenn dies aus wichtigen strukturellen oder funktionellen Gründen erforderlich ist; bestehen meist nur aus 4 Resten (1 Turn).

β -Struktur: β -Faltblätter in gefalteten Pr. sind im Allgemeinen etwas verbogen ($0-30^\circ$), und nicht planar; β -Faltblätter können aus parallelen oder antiparallelen β -Strängen oder einem Gemisch aus beiden bestehen (am häufigsten sind die rein antiparallelen Faltblätter).

Parallele oder antiparallele Faltblätter aus 6 oder 8 Strängen bilden mitunter ein β -Barrel (β -Fass); die spektakulärsten Vertreter bestehen aus 8 parallelen β -Strängen mit einer α -Helix an der Außenseite des Barrels (TIM-, $(\beta\alpha)_8$ - oder $(\alpha\beta)_8$ -Barrel).

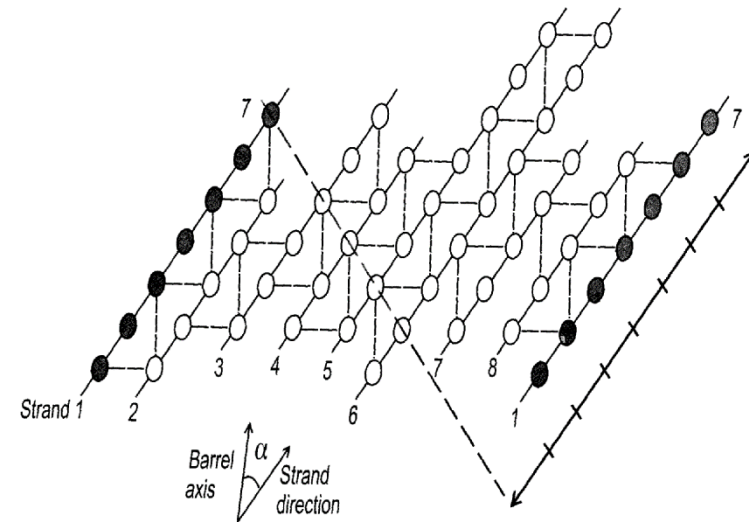


Figure 9-7. The geometry of β -sheet barrels, illustrated with the structure of TIM, $(\beta\alpha)_8$ or $(\alpha\beta)_8$ barrels. The β -sheet barrel of triosephosphate isomerase (TIM) has been unrolled schematically; the positions of the residues along the backbone are depicted by circles, hydrogen bonds are indicated by dashed lines. The N-terminal β -strand (number 1) is shown twice, at both sides of the sheet. The thick dashed line connects residues that are opposite each other in the β -sheet, starting on the left with residue number 7 of strand 1. At the other side of the sheet, it would intersect a residue that would be number -1 of strand 1, eight positions away from residue 7. The shear number is therefore 8. If the strands were vertical, with no shear, the dashed line would connect residue 7 in strand 1 at both sides of the sheet. The angle α gives the tilt of the β -strands from the vertical; its value in this case is 36° . Adapted from C. Chothia (1988) *Nature* 333, 598-599.

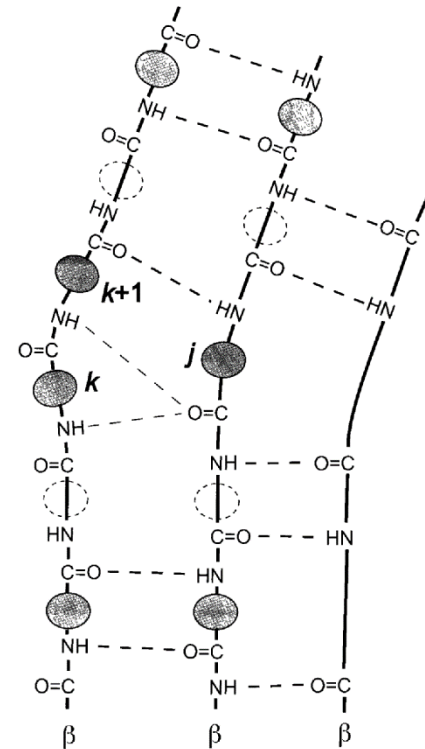
β -Bulge (Ausbuchtung, Beule): tritt auf, wenn die regulären HB-WW und die Rückgrat-Konformation eines β -Stranges durch die Anwesenheit eines zusätzlichen Restes gestört werden; die meisten Proteine haben 2 oder mehrere Bulges; haben mitunter eine funktionelle Rolle; die strukturelle Rolle besteht darin, die Richtung eines β -Stranges etwas zu ändern; der Großteil der Bulges tritt zw. antiparallelen β -Strängen auf; 'klassische β -Bulges' und 'G1 β -Bulges' (Rest in Position 1 ist meist Gly); destabilisierender Faktor; dieselbe Struktur kann auch durch Einfügen von D-AAs induziert werden.

(iii) Reverse Turns (Kehren): Änderung der Richtung.

Die Polypeptidkette macht an der Oberfläche plötzliche Biegungen; Gly oder Pro werden in Turns oft gefunden. Reverse Turns: β -Turns, γ -Turns, Ω Loops (β -Kehren/Schleifen, γ -Kehren/Schleifen, Omega Schlaufen); häufig in β -Hairpins (β -Haarnadelkehren); werden häufig als 3. Typ der Sek.Str. angesehen (haben aber keine repetitive Rückgrat-Konformationen oder HB-Muster).

β -Turns: Ein β -Turn hat eine HB zw. Rückgrat-Carbonyl-O des Restes (i) und Rückgrat-Amid-NH des Restes (i+3) (Fig. 9-9); es gibt versch. Typen von β -Turns (Typ I-VIII), klassifiziert nach den vorliegenden Diederwinkeln (Table 9-2).

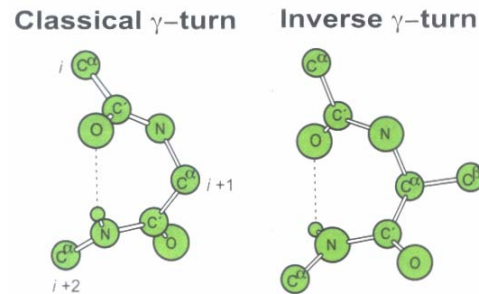
γ -Turns: Ein γ -Turn hat eine HB zw. Rückgrat-Carbonyl-O des Restes (i) und Rückgrat-Amid-NH des Restes (i+2) (Fig. 9-9); es gibt klass. und inverse Typen von γ -Turns (Table 9-2).



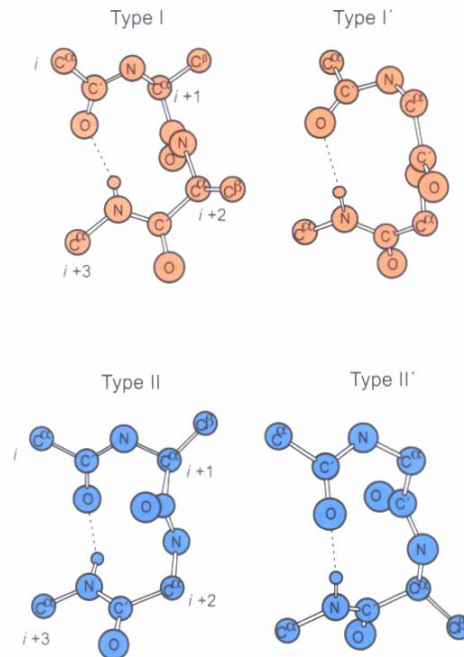
klass. β -Bulge

Figure 9-8. Schematic of a classic β -bulge caused by an additional residue in the β -strand on the left edge of the β -sheet. Residue j from the middle β -strand forms backbone hydrogen bonds (shown as *dashed lines*) with two residues (k and $k + 1$) from the left β -strand. For clarity, side-chains are indicated only as *ellipses*, *dashed* when below the plane of the paper.

Figure 9-9. The most common γ - and β -turns connecting adjacent strands of an antiparallel β -sheet. The three and four residues, respectively, that are considered to define the turns are shown, with the first residue designated i . C^β atoms are shown only in positions where nonGly residues occur frequently. The last hydrogen bond of the β -sheet is shown as a *dashed line*. Only the H atoms involved in hydrogen bonds are shown. Adapted from G. D. Rose *et al.* (1985) *Adv. Protein Chem.* 37, 1-109.



β -turns



Omega Loops: die Rückgrat-Konformation ähnelt einem Ω ; enthält 6 oder mehr AA-Reste, die eine Umkehrung der Polypeptidkettenrichtung verursachen und gleichzeitig die beiden Enden der Schlaufe sehr nahe bringen; keine reguläre HB; die Strukturen sind relativ kompakt und globulär (die Seitenketten oft im Innern des Loops). Mitunter (z.B. P Loop, Phosphat-bindende Schlaufe von Nukleotid-bindenden Proteinen oder hypervariable Regionen von AK, die mit Antigenen reagieren) haben Ω -Loops-spezifische Funktionen und sind in Substratbindung, Katalyse und molekularer Erkennung involviert.

γ - und β -Turns

Table 9-2. Structural features of γ - and β -turns

Bend type	Dihedral angles of central residues ($^\circ$) ^a			
	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
γ				
Classical	70 to 85	-60 to -70		
Inverse	-70 to -85	60 to 70		
β				
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
III	-60	-30	-60	-30
III'	60	30	60	30
IV	Any bend with two or more angles differing by $>40^\circ$ from those given here			
V	-80	80	80	-80
V'	80	-80	-80	80
VIa ^b	-60	120	-90	0
VIb ^b	-120	120	-60	0
VII	Kink in chain created by $\psi_{i+1} \sim -180^\circ$, $ \phi_{i-2} < 60^\circ$, or $ \psi_{i-1} < 60^\circ$, $ \phi_{i+2} \sim 180^\circ$			
VIII	-60	-30	-120	120

^aThe central residue of a γ -turn is numbered $i + 1$; the two central residues of a β -turn are $i + 1$ and $i + 2$.

^bThe peptide bond between residues $i + 1$ and $i + 2$ is *cis*, and residue $i + 2$ is Pro.

(iv) Super-Sek.-Strukturen: Allgemeine Motive

Gewisse Anordnungen einer Reihe von Sek.Str.Elementen, incl. der verbindenden Segmente der Polypeptidketten, wurden oft beobachtet, so dass man sie heute als weitere Strukturebene einstuft: Super-Sek.Strukturen oder Motive genannt; sie sind eine höhere Struktur-Ebene als die Sek.Str., bilden aber nicht vollständige Strukturdomänen.

Die Architektur der meisten Proteine ist offensichtlich aus zusammengepackten Sek.Str.-Segmenten aufgebaut; insofern sind die WW zw. Helices, zw. Faltblättern, und zw. Helices und Faltblättern von Bedeutung; häufig sind nichtpolare Seitenketten in WW involviert.

1. β -Hairpin und β -Meander:

Ein β -Hairpin besteht aus 2 benachbarten antiparallelen β -Strängen, die durch eine β -Kehre (β -Turn) verbunden sind; mehrfach verbundene β -Hairpins bilden ein β -Meander (Fig. 9-10-C)

Super-Sek.Strukturen in Proteinen: (A) β - α - β Einheit; (B) Greek Key Motiv; (C) β -Meander

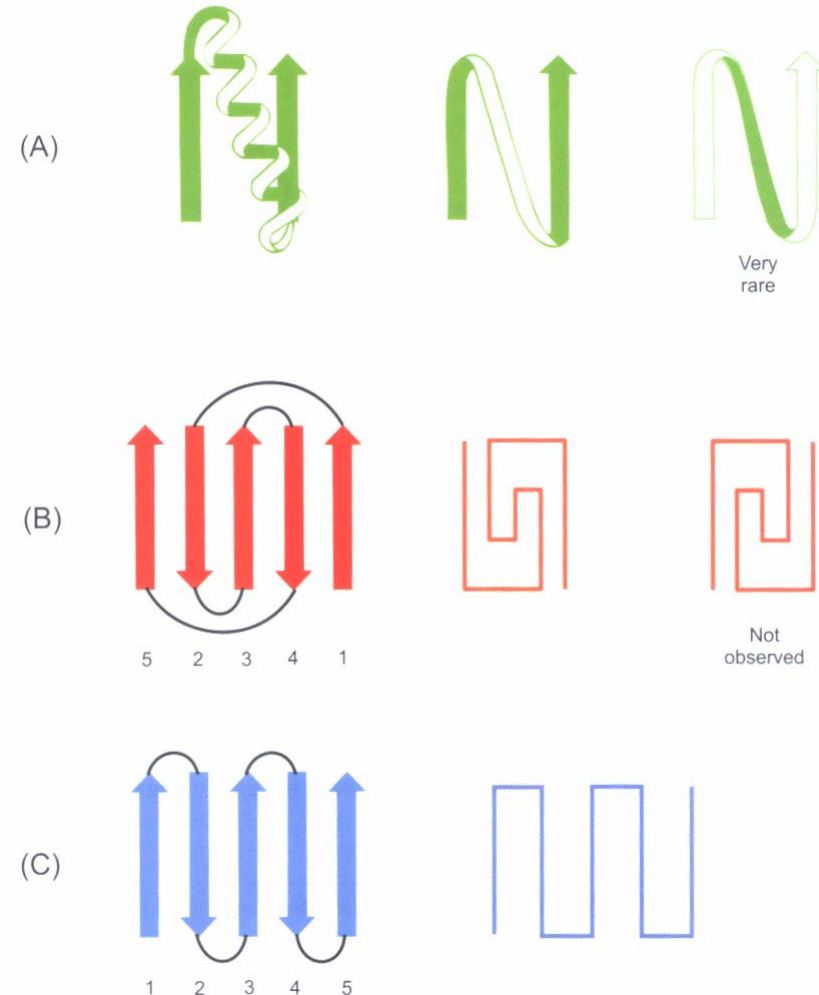


Figure 9-10. Super-secondary structures observed in proteins. (A) A β - α - β unit; the segment joining the two β -strands is almost always above their plane, not below. (B) The Greek key motif of antiparallel β -sheets, which also is always of one 'handedness'. (C), A so-called β -meander. Adapted from T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn, W. H. Freeman, NY.

2. β -Helix und β -Roll (β -Rolle): β -Solenoids

Die β -Helix wird durch eine ungewöhnliche, parallele β -Faltblatt-Topologie aus 3 parallelen β -Faltblättern gebildet, die so zusammen gewickelt sind, dass sie eine rechtsgängige helikale Struktur bilden (Fig. 9-11); die einzelnen β -Stränge sind kurz (2-5 Reste); die Struktur ist repetitiv. Die Seitenketten der sich wiederholenden Reste werden ins Zentrum der Helix gepackt und interagieren, so dass versch. Strukturen gebildet werden (Asp Ladders, Ser Stacks, Aromatic Stacks); heute mit dem Überbegriff β -Solenoids (Magnetspulen, Zylinderspulen) bezeichnet.

β -Helix in 2 orthogonalen Ansichten

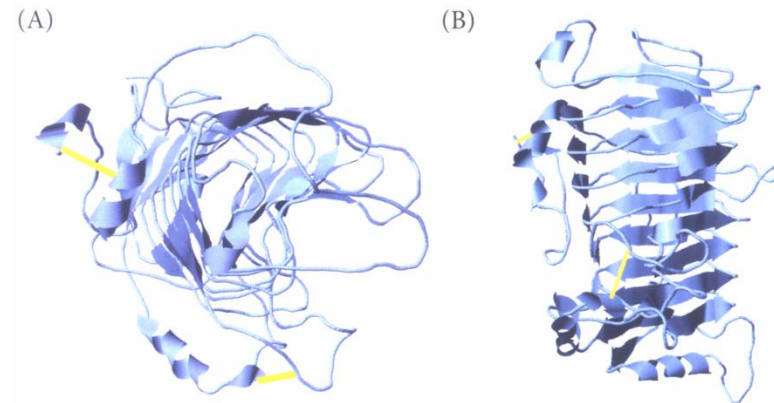


Figure 9-11. The β -helix of pectate lyase C from *Erwinia chrysanthemi*, illustrated in two orthogonal views. Each turn of the helix contains three β -strands, which associate into three parallel β -sheets that make up the sides of the resulting triangular prism shape. Generated from PDB file *2pec* using the program Jmol.

3. Cystine Knot

Der Cystin-Knoten besteht aus einem antiparallelen β -Faltblatt und 3 Disulfidbrücken, eine davon durchläuft einen Ring, der von den beiden anderen gebildet wird (Fig. 9-12); Benennung der 6 Cys: CI-CVI bzw. der 3 Disulfide: CI-IV, CII-V, CIII-VI; 2 Familien bekannt: 'growth-factor cystine knots' bzw. 'inhibitor cystine knots'.



Cystin Knoten

Figure 9-12. The backbone structure of the cystine knot protein cycloviolacin. β -strands are shown as *arrows* and the three disulfide bonds are shown as *straight cylinders* connecting the two Cys residues. Generated from PDB file *1df6* using the program Jmol.

4. Greek Key Motiv

Das Greek Key Motiv (griechischer Schlüssel) ist eine spezielle Topologie, bei der 4 β -Stränge in ein antiparalleles β -Faltblatt angeordnet sind (Fig. 9-13); alle Greek Key Motive haben dieselbe Chiralität (Fig. 9-10-B auf #185); das 'Greek-Key β -Barrel' ist eine Art antiparalleles β -Barrel (2 Greek-Key β -Faltblätter falten zusammen, so dass ein 8-strängiges antiparalleles β -Barrel entsteht).

Greek Key Motiv

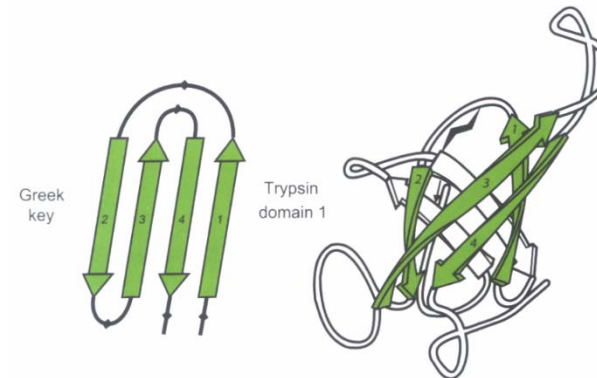


Figure 9-13. The Greek key motif (*left*) and its occurrence in domain 1 of trypsin (*right*). The four β -strands are numbered according to their occurrence in the primary structure. Adapted from drawings by J. S. Richardson.

5. Jelly Roll Motiv

Das Jelly Roll Motiv (Biskuitrolle) ist eine Anordnung aus 8 β -Strängen in einem antiparallelen β -Faltblatt, die häufig in Proteinstrukturen gefunden wird (Fig. 9-14); das Jelly Roll Motiv bildet häufig eine Art antiparalleles β -Barrel ('Jelly-Roll β -Barrel').

Jelly Roll Motiv

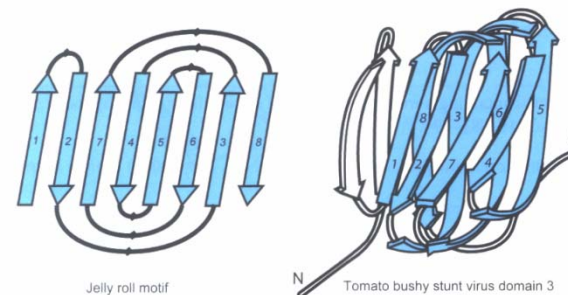


Figure 9-14. The jelly roll motif (*left*) and its occurrence in domain 3 of the tomato bushy stunt virus (*right*). The eight β -strands are numbered according to their order in the primary structure. Adapted from drawings by J. S. Richardson.

6. Four-Helix Bundle

Das 4-Helix-Bündel ist eine der einfachsten Protein-Faltungen und kann als isolierte 3D-Faltung oder als Domäne innerhalb einer größeren komplexen Protein-Struktur \exists ; die 4 α -Helices (aus versch. oder gleichen Polypeptidketten) sind der Länge nach und antiparallel angeordnet (Fig. 9-15); die antiparallele Anordnung ist durch elektrost. WW zw. den Dipolen der Helices bedingt (Fig. 8-11, #171); die α -Helices sind ca. 20 Reste lang (also länger als die üblichen 10 Reste); sie sind amphipatisch (Fig. 8-8, #167), die hydrophobe Helix-Seite ist verborgen und interagiert mit den anderen 3 Helices.

\exists versch. Topologien: 'up-down-up-down', 'up-down-down-up', 'up-up-down-down', mit entsprechend langen Loops oder Kreuzungen. Viele Proteine verwenden das 4-Helix-Bündel (Bindungstasche für Cofaktoren und Metallionen); die 4 Helices können auch ein Coiled Coil (#174) bilden.

7. Epidermal Growth Factor (EGF) Motiv

Das EGF Motiv besteht aus 45 Resten (6 davon sind Cys) (Fig. 9-16); in EGF und anderen Wachstumsfaktoren und \exists mehrfach als Kopie in großen Proteinen (Fibrillin besitzt 30 EGF Domänen), häufig in Kombination mit anderen Modulen (Krigle Domäne); die AA-Sequenz sowie die 3D Struktur des EGF Motivs ist gut konserviert; es besteht aus einem 2-strängigen antiparallelen β -Faltblatt und 3 Disulfidbrücken, die die N- und C-terminale Region mit dem Kern verbinden.

Four-Helix Bundle Motiv



Figure 9-15. The four-helix bundle motif, as found in a single subunit of bullfrog ferritin. Only the polypeptide backbone is depicted, with the helices as *coils*. The topology is 'up-down-down-up', with a long loop connecting the two 'down' helices. There is an additional short helix at the C-terminus. Generated from PDB file *1mfr* using the program Jmol.

EGF Domäne



Figure 9-16. An EGF domain, that of epidermal growth factor. The two β -strands are depicted as *arrows* and the three disulfide bonds are indicated by *straight lines* connecting the pairs of Cys residues.

8. Interleukin-1 Motiv: Trefoils (Dreiblatt)

Das Interleukin-1 Motiv hat eine ungewöhnliche pseudo-3fach Symmetrie, bei der 12 β -Stränge 6 Hairpins bilden; 3 Hairpins bilden ein 6-strängiges antiparalleles β -Barrel mit hydrophobem Kern; die anderen 3 Hairpins bilden eine Triplet-Struktur, die das Barrel abdeckt (Fig. 9-17). Das Interleukin-1 Motiv (β -Trefoil) kann in 3 äquivalente, Y-förmige β -Struktur-Einheiten zerlegt werden.

9. Kringle Domäne

Die Kringle Domäne wird häufig in Proteasen gefunden, in Zusammenhang mit Blutgerinnung (Thrombin, Plasminogen); die Kringle Domäne ist ein Modul aus 80 Resten mit 6 konservierten Cys (CI-CVI), die 3 SS-Brücken bilden (Paarungen I-VI, II-IV, III-V) (Fig. 9-18). Pro Polypeptidkette \exists 1-5 Kopien (Apolipoprotein a hat jedoch 38); oft von multiplen Kopien anderer Module (wie EGF Motiv) begleitet.

Die Tert.Struktur einer Kringle Domäne aus einem 2-strängigen antiparallelen β -Faltblatt und naher Anordnung von 2 der 3 Disulfidbrücken; die AA-Sequenz der Kringle Domänen ist hochgradig konserviert.

Funktion: vermutlich molekulare Erkennung (von Proteinen mit N-terminalem Lys)

Interleukin-1 3D Struktur

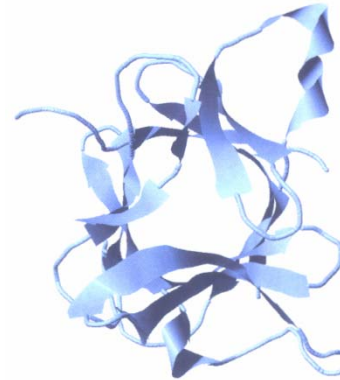


Figure 9-17. The interleukin-1 3-D structure. Generated from PDB file *1l2h* using the program Jmol.

Kringle Domäne

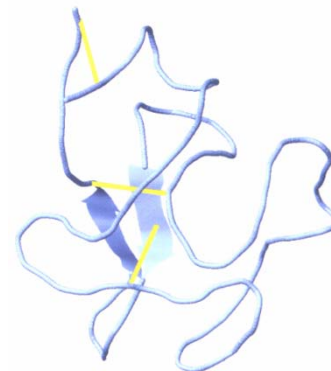


Figure 9-18. A kringle domain. The two β -strands are depicted as *arrows* and the three disulfide bonds by *straight lines* connecting the pairs of Cys residues. Generated from PDB file *1krn* using the program Jmol.

(v) Kontakt-Karten

Kontakt-Karten sind Fingerprints einer Protein-Struktur: 2D-Darstellungen der 3D Tertiär-Str.; verraten Sek.Str. Faltungstopologie, Seitenketten-Packungsmuster. Ein Protein aus N Struktureinheiten wird als NxN Anordnung der Abstände zw. jedem Paar von Struktureinheiten ausgedrückt; Einheiten können sein: einzelne Atome, Atomtypen (z.B. C α -Atome), Atomgruppen (Seitenketten-Schwerpunkte), AA-Reste.

Strukturelle Ähnlichkeit zw. Protein-Paaren wird sofort aus der Ähnlichkeit ihrer Kontakt-Karten ersichtlich (Fig. 9-20).

Kontakt-Karten, die auf C α -Atomen basieren (Fig. 9-19), reflektieren die Gesamt-Topologie der Protein-Faltung, liefern aber keine Struktur-Details. Seitenketten-Kontakt-Karten liefern weitergehende Information.

Es gibt auch Kontakt-Karten für HB.

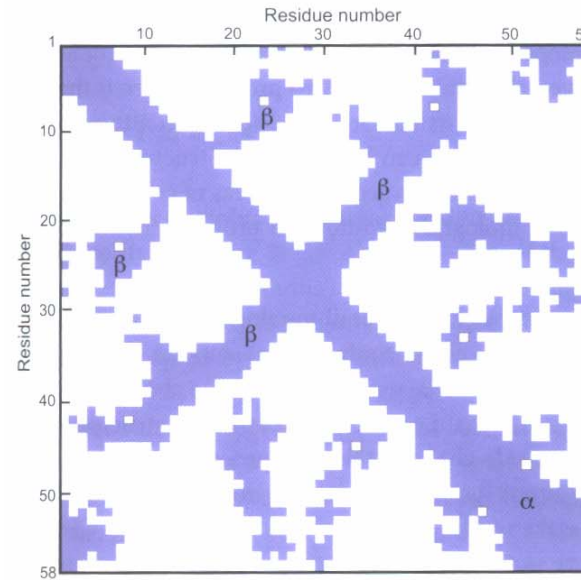


Figure 9-19. Contact map for bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI. Both axes represent the amino acid sequence of the polypeptide chain; shading is present whenever two residues are within 10 Å of each other. The single α -helix at the C-terminus of the polypeptide chain is apparent from the broadening of the diagonal. The three-stranded antiparallel β -sheet generates the two features perpendicular to the diagonal. Adapted from a figure kindly provided by M. Levitt.

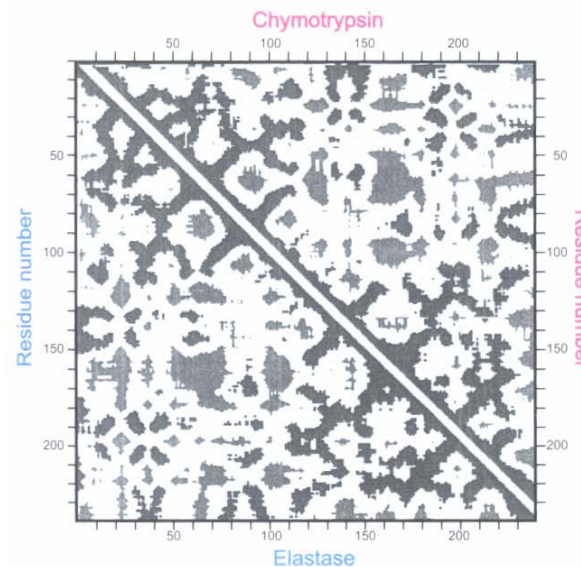


Figure 9-20. The similar contact maps of the homologous proteinases chymotrypsin (*top right*) and elastase (*bottom left*). Distances greater than 30 Å are light gray, whereas distances less than 15 Å are dark gray. Data from L. Sawyer *et al.* (1978) *J. Mol. Biol.* 118, 137–208.

(vi) Innen- und Außenbereiche

Die **Oberfläche** von MM wird üblicherweise als ASA behandelt (= Oberfläche in Kontakt mit dem LM Wasser); die ASA von Proteinen ist ungefähr $M^{2/3}$ proportional, jedoch 2x so groß als für eine Kugel derselben Größe (Maß für die Oberflächenrauigkeit): $A_s = 4.7 M_r^{0.76}$ (A_s in \AA^2)

Dies entspricht nur 23-45% der Oberfläche der entfalteten Polypeptidkette.

Das **vdW-Volumen** eines typischen monomeren Proteins ist dem M direkt proportional: $V = 1.27 M_r$ (V in \AA^3)

Das Innere von globulären Pr. ist dichtgepackt, häufig mit benachbarten Atomen in vdW-Kontakt (Fig. 9-21); 72-78% des Innenvolumens ist mit Atomen angefüllt (entspricht der Packungsdichte von Kugeln: 0.74).

Die Durchschnittsvolumina der Reste in gefalteten Proteinen (Table 9-3) entsprechen denen der AA im Kristall (Fig. 9-22, #192).



Schnitt durch ein globuläres Protein

Figure 9-21. The dense packing of atoms in the interior of a globular protein, demonstrated by a thin slice through the interior of flavodoxin. Atoms of the protein are drawn with their van der Waals radii. Generated from PDB file *1czn* using the program Jmol.

Table 9-3. The packing of residues in the interiors of proteins

Residue	Average volume of buried residues (\AA^3) ^a	Fraction of residues at least 95% buried ^b	Relative free energy ^c of residue in interior to that on surface (kcal/mol)
Gly	66	0.36	0
Ala	92	0.38	-0.14
Val	142	0.54	-0.55
Leu	168	0.45	-0.59
Ile	169	0.60	-0.68
Ser	99	0.22	0.40
Thr	122	0.23	0.32
Asp	125	0.15	0.78
Asn	125	0.12	0.75
Glu	155	0.18	1.15
Gln	161	0.07	0.80
Lys	171	0.03	2.06
Arg	202	0.01	1.40
His	167	0.17	0.02
Phe	203	0.50	-0.61
Tyr	204	0.15	0.28
Trp	238	0.27	-0.39
Cys-SS-	106	0.40	-0.61
Cys-SH	118	0.50	
Met	171	0.40	-0.65
Pro	129	0.18	0.50

^a From C. Chothia (1975) *Nature* **254**, 304-308.

^b Average for 12 proteins; from C. Chothia (1976) *J. Mol. Biol.* **105**, 1-14.

^c Calculated as $-RT \log_e f$, where f is the ratio of the occurrence of this amino acid residue in the interior to that on the surface, relative to the value for Gly, which was set to zero. From S. Miller *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* **105**, 641-656.

Innerhalb eines Proteins bilden alle polaren Gruppen HBs. Wasser-Moleküle werden meist vom Protein-Innenraum ausgeschlossen; falls doch im Innern (in internen Kavitäten), dann wesentlicher Teil der Struktur (Fig. 9-23) und sind dann an HBs mit internen polaren Proteingruppen beteiligt; bis zu 24 verborgene Wassermoleküle in Proteinen gefunden (Carboxypeptidase).

Wasserlösl. Proteine haben alle ionisierten Gruppen an der Oberfläche, zum LM (Wasser) exponiert (Asp, Glu, Lys, Arg stellen 27% der Oberfläche dar; 1-2 geladene Gruppen bzw. eine Ladungsdichte zw. 0.5-25 Ladungen pro 100 Å² Oberfläche); entgegengesetzt geladene Gruppen sind an der Oberfläche nahe gelegen (bilden Salzbrücken); Paare von ionisierten sauren und basischen Gruppen gibt es kaum im Protein-Innern; die Oberflächen von Proteinen binden offensichtlich nicht an andere Proteine.

Nichtpolare Seitenketten dominieren im Protein-Innern. Val, Leu, Ile, Phe, Ala und Gly Reste machen 63% der internen Reste aus; es herrscht eine Korrelation zw. den Hydrophobizitäten der Reste und ihrer Tendenz, sich im Protein-Innern aufzuhalten (Fig. 9-24, #193). Reste sind im Protein-Innern versteckt (vergraben) oder an der Oberfläche exponiert ('buried or exposed').

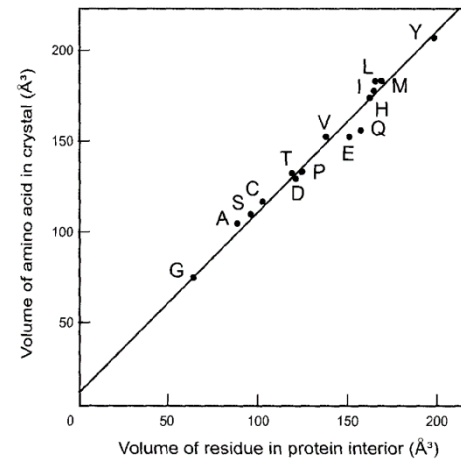


Figure 9-22. The amino acid residues are as tightly packed in protein interiors as in crystals of the amino acids. The mean volumes of the various amino acid residues buried in protein interiors are plotted against the volume of the corresponding amino acid in crystals. The line has a slope of 1 and an intercept of 11 Å³; the volume of the water molecule lost by an amino acid upon becoming a residue. Data from C. Chothia (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53, 537-572.

Interne Wassermoleküle in Proteinen

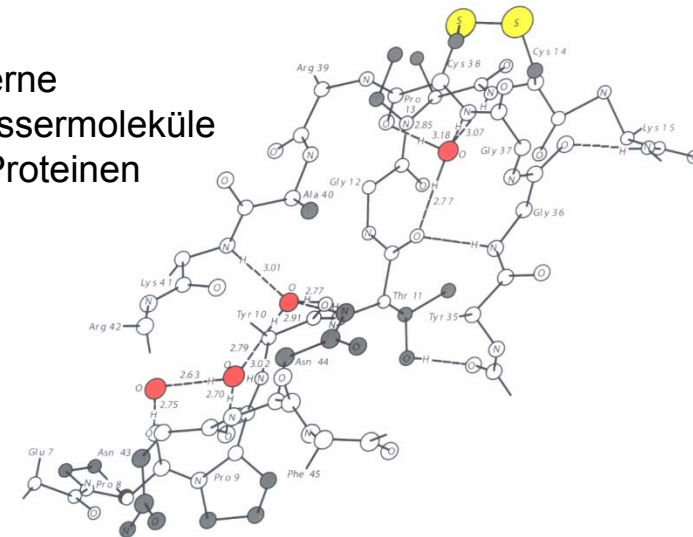


Figure 9-23. The four internal water molecules of bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI. The O atoms observed crystallographically are shown in red, with the presumed positions of the H atoms indicated. The lengths in Ångströms of the hydrogen bonds between N and O atoms are indicated. Adapted from T. E. Creighton (1978) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 33, 231-297.

Ein Rest wird als vergraben definiert, wenn mehr als 95% seiner Oberfläche dem LM unzugänglich sind.

Es gibt keine Tendenz für die 20 versch. AA-Seitenketten, nebeneinander im Protein-Inneren angeordnet zu sein (abgesehen von der Tendenz hydrophobe Cluster zu bilden, HB-Paarungen von polaren Gruppen).

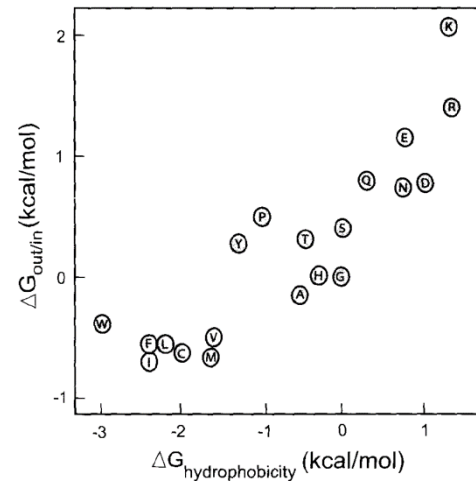


Figure 9-24. Correlation between the hydrophobicities of amino acid residues and their tendency to be in the interiors of folded globular proteins. The hydrophobicity was measured by the free energy of transfer of the N-acetyl amide forms of individual amino acids from water to nonpolar solvent (Table 7-6), and the tendency to occur in the interior of proteins was measured similarly as a free energy of transfer from the protein surface to the interior (Table 9-3). The amino acids are designated by their one-letter abbreviations (Figure 7-2). Data from T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd ed., W. H. Freeman, NY, p. 254.

(vii) Das LM: WW mit Wasser

Das wässrige LM, das Proteinmoleküle umgibt, ist wesentlicher Aspekt der Proteinstruktur, aber zu beschreiben höchst schwierig. Kristallografisch kann man jedoch EI.Dichte-Peaks als Folge einiger fixierter LM-Moleküle nahe der Proteinoberfläche feststellen; die fixierten Wassermoleküle befinden sich insbes. an Stellen, wo sie HB zu polaren Gruppen bilden können.

Aus dem hydrophoben Effekt folgt, dass geordnete Wassermoleküle rund um nichtpolare Oberflächen nicht oder nur in Ausnahmefällen (Crambin) zu erwarten sind.

(viii) Quartärstruktur: Bildung makromolekularer Anordnungen

Viele Proteine \exists als 'Aggregate' aus 2 oder mehr (identischen oder nichtidentischen) Polypeptidketten, z.B. Hämoglobin ($\alpha_2\beta_2$), ATCase (r_6c_6); die Assoziation 2er Moleküle erfordert räuml. und physikal. Komplementarität der wechselwirkenden Oberflächen.

Jede Untereinheit einer Qu.Str. ist gefaltet in Form einer unabhängigen, globulären Struktur (Fig. 9-26-A); es gibt auch Ausnahmen (Fig. 9-26-C: dimerer trp Repressor, Verflechtung der 2 ident. Polypeptidketten).

2 fundamental versch. Arten von WW zw. identischen Untereinheiten sind möglich: isologe und heterologe (Fig. 9-27).

Isolog: Verwendung derselben Oberflächen auf beiden Monomeren; Dimer mit 2facher Symmetrie-Achse

Heterolog: Assoziation 2er versch. Seiten des Monomeren

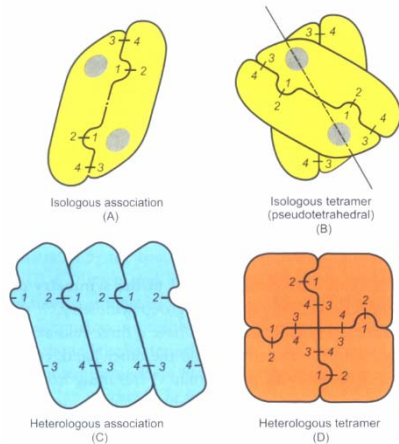


Figure 9-27. Schematic illustrations of isologous and heterologous association between protein subunits. (A) Isologous association to form a dimer with a two-fold symmetry axis perpendicular to the plane of the figure. (B) Forming a tetramer by isologous association, using two different bonding interactions, 1-2 and 3-4, and the cross-hatched circles of (A). (C) Heterologous association leading possibly to infinitely long polymers. (D) Heterologous association to form a closed, finite structure, in this case a tetramer, with a four-fold symmetry axis. Adapted from J. Monod *et al.* (1965) *J. Mol. Biol.* **13**, 88–118.

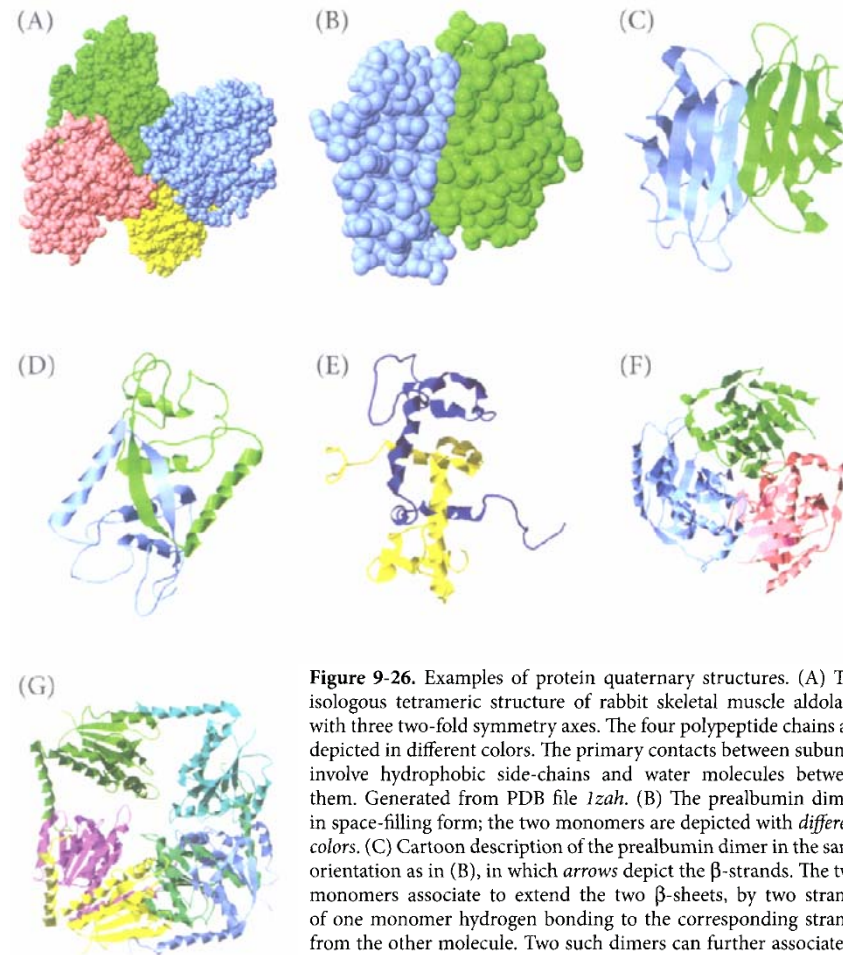


Figure 9-26. Examples of protein quaternary structures. (A) The isologous tetrameric structure of rabbit skeletal muscle aldolase, with three two-fold symmetry axes. The four polypeptide chains are depicted in different colors. The primary contacts between subunits involve hydrophobic side-chains and water molecules between them. Generated from PDB file *1zah*. (B) The prealbumin dimer, in space-filling form; the two monomers are depicted with *different colors*. (C) Cartoon description of the prealbumin dimer in the same orientation as in (B), in which *arrows* depict the β -strands. The two monomers associate to extend the two β -sheets, by two strands of one monomer hydrogen bonding to the corresponding strands from the other molecule. Two such dimers can further associate at nearly right angles to each other to form a tetramer by isologous interactions between the side-chains protruding outwards from the β -sheets. Generated from PDB file *2pab*. (D) The *met* repressor dimer, showing the course of the polypeptide chain schematically. The two polypeptide chains are depicted with *different colors*. Generated from PDB file *1mjf*. (E) Unusual quaternary structure of the *trp* repressor dimer, with the two polypeptide chains depicted with *different colors*. Instead of two independently folded polypeptide chains, the two polypeptide chains of the *trp* repressor are entwined. Generated from PDB file *1wrs*. (F) The heterologous trimeric structure of chloramphenicol acetyltransferase, in which each subunit interacts with its neighbor by extending its β -sheet by one strand, near the center of the molecule. Generated from PDB file *2id9*. (G) The octameric structure of bacterial phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunits; two of the subunits at the top of the top layer have been removed to illustrate the lower layer. Each layer is a heterologous tetramer, with four-fold symmetry. The two layers are joined together by isologous interactions. Generated from PDB file *1d7a*. Figure generated using the program Jmol.

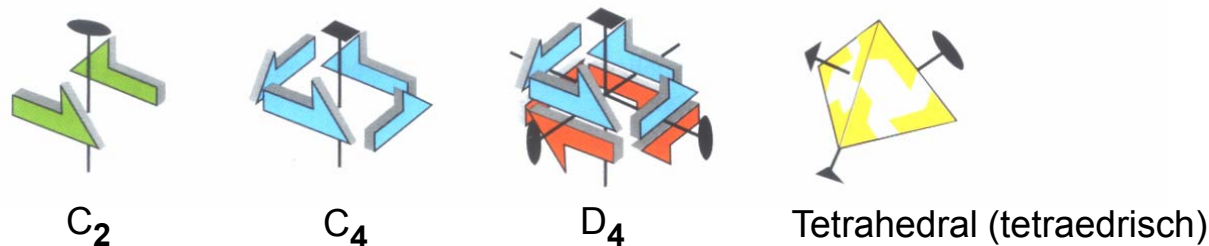
Symmetrie:

Molekulare Symmetrie ist für Quartär-Strukturen entscheidend. Eine Polypeptidkette ist chiral und kann nicht symmetrisch sein; die Symmetrie oligomerer Proteine muss daher von der Anwesenheit multipler identischer Polypeptidketten abhängen.

Die individuellen identischen Einheiten in einem oligomeren Protein werden als Protomer bezeichnet. Ein Protomer kann mehr als eine Polypeptidkette enthalten, falls diese sich in Sequenz und Konformation unterscheiden.

In einem symmetrischen Homo-Oligomer muss ein Protomer zu einem anderen durch Rotation und/oder Translation (rotation, translation, screw rotation) in Beziehung stehen. Wiederholte Anwendung dieser Symmetrie-Operationen auf das Protomer sollte eine Rekonstitution des ganzen Objektes erlauben.

∃ Sets von Symmetrie-Gruppen: Punktgruppen (vgl. Kristallografie). Jede ist durch die Anzahl asymmetrischer Einheiten charakterisiert (auch Multiplizität m genannt).



Cyclische Symmetrie C_n hat $m = n$; die n Protomere stehen zueinander durch Rotation (von $360/n$ Grad) um eine einzelne Symmetrieachse c (und einen ganzzahligen Wert für n) in Beziehung.

Dihedrale (zweiflächige) Symmetrie D_n wird auch als n_2 bezeichnet, da das Oligomer $m = 2n$ Protomere enthält.

Kubische Symmetrie tritt in Tetraedern (Vierflächnern), Oktaedern (Achtflächnern), Ikosaedern (Zwanzigflächnern) auf.

Die Anzahl der Protomeren und Polypeptidketten stehen in Beziehung zur Symmetrie eines oligomeren Proteins (Tab. 9-4).

Ein Homodimer kann nur die Punktgruppen-Symm. C_2 haben (eine einzelne Zweifach-Achse und $m = 2$).

Ein symmetrisches Homotrimer muss eine Dreifachachse mit 120° Rotationen und eine cyclische C_3 Symmetrie mit $m = 3$ haben.

Ein Homotetramer kann jedoch 2 versch. Symmetrien haben: Vierfachachse in der cyclischen Punktgruppe C_4 (als Ergebnis einer heterologen Assoziation) oder 3 orthogonale Zweifachachsen in der dihedralen Punktgruppe D_2 (auch 222 genannt; als Ergebnis zweier Arten von isologer Assoziation). Beide Punktgruppen haben $m = 4$, ergeben aber sehr versch. Quartär-Strukturen; D_2 ist viel häufiger als C_4 .

Dihedrale Symmetrie ($m = 2n$) kommt häufig in wasserlöslichen globulären Proteinen vor.

Homohexamere haben meist D_3 Symmetrie.

Oktamere haben D_4 Symmetrie (Fig. 9-26-G, #194).

Membranproteine haben oft ungerade Anzahlen von Untereinheiten und cyclische Symmetrie (als Ergebnis einer heterologen Assoziation).

Kubische Symmetrie ist selten (jedoch z.B. in Apoferritin und Ikosaeder-Viren).

Table 9-4. Symmetries of oligomeric proteins

Structure	Protein	Quaternary structure	Point group
Cyclic	HIV proteinase	α_2	C_2
	Porin	α_3	C_3
	Neuraminidase (viral)	α_4	C_4
	Pentraxins	α_5	C_5
	α -Hemolysin	α_7	C_7
	Hemoglobin	$\alpha_2\beta_2$	C_2^a
	Light harvesting complex II	$\alpha_9\beta_9$	C_9
Dihedral	Phosphofructokinase	α_4	D_2
	Hemerythrin	α_8	D_4
	GTP cyclohydrolase	α_{10}	D_5
	GroEL chaperonin	α_{14}	D_7
	Aspartate transcarbamoylase	$\alpha_6\beta_6$	D_3
Cubic	Phaseolin	α_{12}	Tetrahedral
	Apoferritin	α_{24}	Octahedral
	Virus coats	$\alpha_{60}, \alpha_{180}$	Icosahedral

^a Hemoglobin also has approximate D_2 symmetry because the α - and β -chains are homologous and have very similar structures (see Figure 9-34).

Data from T. L. Blundell & N. Srinivasan (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14243–14248.

Asymmetrie und ungefähre Symmetrie:

Symmetrie ist die Norm in oligomeren Strukturen. Jedes Auffinden von Asymmetrie ist bemerkenswert, hat dann aber meist irgendeine spezielle Bedeutung (katalytische Funktion).

Ungefähre Symmetrie kommt in Assemblierungen, die nicht exakt identische chemische Einheiten besitzen, vor.

Beispiele: menschliches Hämoglobin (C_2 und D_2); Ferredoxin [Fig. 9-28; jede der 2 symmetrischen Struktur-Hälften enthält beide Hälften der Primär-Struktur (vgl. Fig. 7-33)]

Oligomere Proteine haben gelegentlich Symmetrien, die nicht exakt einer der erwähnten Punktgruppen entsprechen (als Folge von Domänen-Bewegungen).

Ein Ikosaeder (Zwanzigflächner) hat 60 Monomere an identischen symmetrischen Positionen und stellt die größte symmetrische geschlossene Struktur dar. Die Hüllen von Ikosaeder-Viren bestehen jedoch aus mehr als 60 Monomeren; z.B. haben die 180 Monomeren mancher Viren-Hüllen (coats) nicht äquivalente Positionen (Struktur-Quasiäquivalenz).

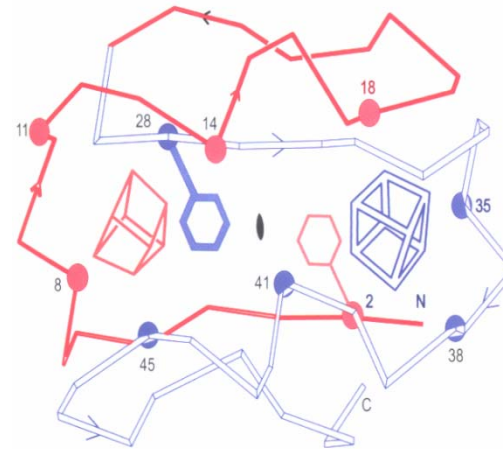


Figure 9-28. Internal symmetry in the structure of ferredoxin, reflecting the internal homology in its primary structure (Figure 7-33). The amino-terminal half of the polypeptide chain is in red, the other half blue. Note that each of the two symmetry-related halves of the structure involves both halves of the primary structure. The *distorted cubes* are the iron-sulfur clusters that bind electrons reversibly in the function of ferredoxin. *Circles* indicate Cys residues that are attached to the iron-sulfur clusters. Data from A. D. McLachlan (1979) *J. Mol. Biol.* **128**, 49–79.

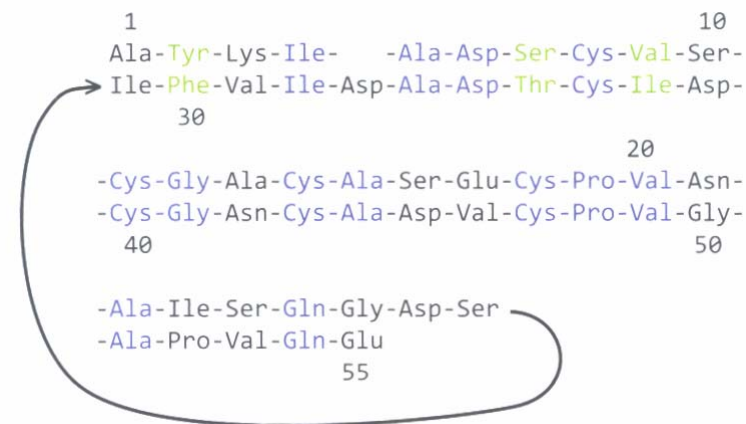


Figure 7-33. Homology between the two halves of the primary structure of *Clostridium pasteurianum* ferredoxin. Identical residues are in blue, similar residues green.

2 dimere HIV Proteine, die HIV Proteinase und die HIV Reverse Transcriptase, weichen von einer Zweifach-Symmetrie ab.

Das HIV Proteinase Dimer alleine weist exakte C_2 Symmetrie auf; die Symmetrie der HIV Proteinase wird jedoch bei der Substrat-Bindung (eines asymmetrischen Peptid-Substrats) gebrochen (als Folge von kleinen Strukturänderungen, um den asymmetrischen Liganden einzufügen); der Komplex bewahrt jedoch eine **ungefähre Symmetrie**.

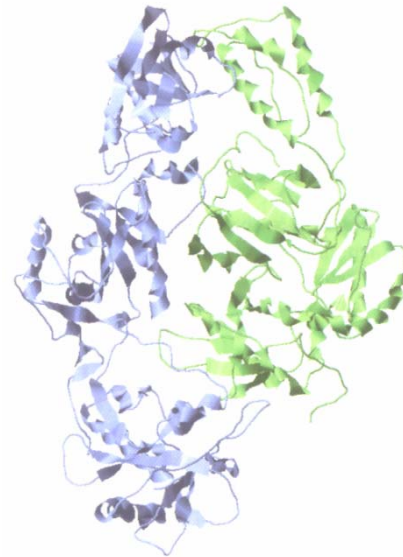


Figure 9-29. The asymmetric dimer of HIV reverse transcriptase. The two polypeptide chains were originally identical but the green one has had part of the polypeptide chain removed. The dimer that results is very asymmetric. Generated from PDB file *1bqm* using the program Jmol.

Die HIV Reverse Transcriptase zeigt eine wesentlich größere **Asymmetrie**. Ihre 2 Polypeptidketten sind zunächst identisch, aber eine erleidet ein proteolytisches Processing (d.h. eine Veränderung der Primärstruktur). Die Originalkette und die prozessierte Kette nehmen im Dimeren ganz verschiedene Faltungen an (Fig. 9-29) und haben auch ganz verschiedene funktionelle Rollen. In diesem Fall sind sowohl Primärstruktur als auch 3D-Struktur asymmetrisch, → Probleme beim Drug Design

Grenzflächen:

Die Kontakte zwischen Untereinheiten bestimmen die Stabilität von Quartär-Strukturen.

Die **Grenzflächen (interfaces)** sind im Allgemeinen dem Innern der einzelnen Untereinheiten oder Domänen ähnlich. Das Ausmaß der Kontakte zw. Untereinheiten wird durch die Grenzfläche (**interface area**) bestimmt (Anteil der Proteinoberfläche, der dem LM unzugänglich ist ('verborgene Oberfläche', vgl. Table 9-5, #199).

Die insgesamt dem LM verborgene Oberfläche, B_{tot} , der Qu.Struktur ist bei verschiedenen oligomeren Proteinen mindestens 1400 Å² groß; dies ist offenbar das Minimum, das für eine stabile Assoziation erforderlich ist. Die meisten oligomeren Proteine haben wesentlich größere Untereinheiten-Grenzflächen (besonders groß bei der tetrameren Catalase mit D₂ Symmetrie: 70 %; 6 isologe Grenzflächen).

Die verborgene Oberfläche, B_{tot} , wird üblicherweise durch mehrere Paare von Grenzflächen (**pairwise interfaces**), B_{pair} , beschrieben: \exists maximal $n_{pair} = n(n-1)/2$ für eine Ansammlung aus n Untereinheiten (und falls jede Untereinheit in Kontakt mit jeder anderen ist), d.h. $n_{pair} = 1$ für Dimere, $n_{pair} = 6$ für Tetramere.

Die Unterteilung von großen Oligomeren in kleinere Gebilde auf Basis ihrer 3D-Struktur ist manchmal problematisch (vgl. die oktamere Struktur der Carboxylase in Fig. 9-26G auf #194: Entscheidung unmöglich, ob Dimer von zyklischen Tetrameren oder zyklisches Tetramer von Dimeren)

Table 9-5. Interface areas between subunits of oligomeric proteins (Å²)

Protein	Total accessible surface area	Interface areas			
		B_{tot}	B_{pair}		
Dimers					
Avian pancreatic peptide	5300	1400			
Uteroglobin	7500	3000			
Superoxide dismutase	13,800	1350			
Triosephosphate isomerase	20,300	3180			
Alcohol dehydrogenase	29,000	3260			
Citrate synthase	28,500	9800			
Tetramers					
Mellitin	6300	4160	880	820	520
Glutathione peroxidase	28,600	6280	1520	1520	180
Phosphofructokinase	40,600	14,400	4500	2520	180
Catalase	60,900	42,300	9260	9140	4120
Hexamer					
Insulin	13,100	8600	1280	1400	180 ^a
Octamer					
Hemerythrin	35,900	13,600	1780	260	1420 ^a

Dimers have C₂ symmetry, while tetramers have D₂ symmetry, with isologous interfaces. Tetramers and larger oligomers contain several interfaces, with areas given per pair of subunits. Larger oligomers also contain heterologous interfaces, which are marked^a.

Data from J. Janin *et al.* (1988) *J. Mol. Biol.* **204**, 155–164.

Oligomerisierung und Domänen-Austausch:

Ein monomeres Protein in ein dimeres oder höher oligomeres umzuwandeln erfordert nur, dass die Oberflächenreste eine **Oberfläche** darstellen, die halbwegs **komplementär** ist. So haben sich etwa die Globin-Polypeptidketten aus dem monomeren Myoglobin in die tetrameren $\alpha_2\beta_2$ Formen der Hämoglobine entwickelt (siehe später: Fig. 9-34 auf #209).

Komplementäre Oberflächen existieren bereits innerhalb der monomeren Struktur (intramolekulare WW) zw. den versch. Elementen der Sek.Str., die miteinander interagieren (um die Faltung des Monomeren zu bewirken).

Eine andere Art der Oligomerisierung wäre die intermolekulare WW (Fig. 9-30). Dieses Phänomen nennt man Domänen-Austausch (domain swapping): eine Domäne eines

monomeren Multidomän-Proteins wird durch eine gleiche Domäne einer anderen, identischen Proteinkette ersetzt. Das Ergebnis ist ein ineinander verflochtenes Dimer (oder höheres Oligomer). Die ausgetauschte Domäne kann so groß wie eine vollständige globuläre Domäne sein oder so klein wie eine einzelne α -Helix oder ein β -Strang.

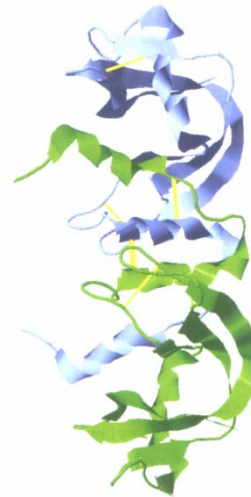


Figure 9-30. An example of a dimeric protein generated by domain swapping, the dimeric bovine seminal ribonuclease. The two identical polypeptide chains are colored as *blue* and *green*. The two protomers are identical but both are made up of *blue* and *green* portions of polypeptide chain, because each N-terminal α -helix is situated in the other monomer. An unswapped monomeric structure occurs in bovine ribonuclease A. Generated from PDB file *1y92* using the program Jmol.

Filamente:

Filamentäre Anordnungen umfassen Proteinmoleküle, die eine globuläre Gestalt haben, aber sich entweder helikal oder sonstwie filamentär anordnen. *Beispiele:* Actin (globuläre G-Aktin Monomere \rightarrow fadenförmige F-Aktin Filamente), Titin, Laminin

(ix) Klassifikation der Tertiärstrukturen:

Ausgehend von ihren Sek.Strukturen können Proteinstrukturen in 4 Klassen eingeteilt werden:

α : besitzen nur α -Helices

β : bestehen hauptsächlich aus β -Faltblättern

$\alpha+\beta$: haben sowohl Helices als auch Faltblätter (aber in separaten Teilen der Struktur)

$\alpha\beta$: Helices und Faltblätter interagieren und wechseln sich häufig ab

Die Unterschiede sind verwaschen ('die Proteinstrukturen bilden ein Kontinuum im Faltungsraum'); Klassifikationssystem wird trotzdem weiter verwendet.

α -Strukturen: Der Kern dieser Strukturen wird durch kurze, zusammengepackte α -Helices gebildet, die durch Loop-Regionen verbunden sind. Die Packung im Innern ist hauptsächlich hydrophob, während die hydrophilen Gruppen an der Oberfläche das Protein wasserlöslich machen. Die einfachste (und häufigste) α -helikale Domäne besteht aus 4 Helices (angeordnet als 4-Helix Bundle, #188). Ein anderes Beispiel ist die Globin-Faltung in Mb und Hb (#180). Es gibt auch außergewöhnliche Ausnahmen: die 450 N-terminalen Reste der bakt. Muramidase enthalten eine einzige α -helikale Domäne, die aus 27 α -Helices besteht (2-layered ring, doughnut-like central hole). α -Strukturen werden durch WW zw. benachbarten α -Helices bestimmt.

β -Strukturen: Proteine der β -Klasse bestehen hauptsächlich aus β -Strängen (4 bis mehr als 10); die β -Stränge sind üblicherweise in antiparalleler Orientierung, so dass sie 2 β -Faltblätter bilden, die miteinander verbunden sind; bilden gern fassartige (barrel-like) Strukturen mit hydrophoben Seitenketten innerhalb des Barrels. Up-and-down β -Barrels stellen die einfachste Topologie dar (bestehen aus 8 oder 10 β -Strängen). Alle Verbindungsstellen zw. β -Strängen sind Hairpins, so dass in der Sequenz benachbarte β -Stränge auch räumlich benachbart sind. Diese Topologie ist einem β -Meander (Fig. 9-10-C, #185) äquivalent, aber das Barrel ist durch WW zw. 1. und letztem Strang geschlossen. Die hydrophoben Seitenketten füllen das Innere des Barrels. *Beispiele:* Transporter von hydrophoben Liganden, Fettsäuren, Gallensalzen, die im Innern des Barrels gebunden werden.

Andere Beispiele für β -Strukturen umfassen das Greek Key Barrel (bestehend aus 2 Greek Key Motiven, Fig. 9-13, #187), das Jelly Roll Barrel (Fig. 9-14, #187), das Interleukin-1 Barrel (Fig. 9-17, #189). All diese Protein Barrels bestehen nur aus antiparallelen β -Strängen und werden deshalb als 'All- β Structural Domains' bezeichnet. [Sie unterscheiden sich signifikant vom TIM-Barrel (vgl. Fig. 9-4, #180 und unten), welches aus einem parallelen β -Barrel gebildet wird, das außen von α -Helices umgeben ist, und als $\alpha\beta$ -Domäne bezeichnet wird.]

$\alpha+\beta$ -Strukturen: Die $\alpha+\beta$ -Strukturen werden aus einer Kombination von eigenständigen α - und β -Motiven aufgebaut; sie haben meist ein kleines antiparalleles β -Faltblatt in einem Teil der Domäne und eine Reihe von zusammen gepackten α -Helices an einem oder beiden Enden des β -Faltblatts.

$\alpha\beta$ -Strukturen: Die $\alpha\beta$ -Strukturen werden aus Kombinationen von β - α - β -Motiven aufgebaut, die vorwiegend ein paralleles β -Faltblatt, das von α -Helices umgeben ist, bilden. Die α -Helix, die die 2 parallelen β -Stränge verbindet, liegt immer an einer Seite des Faltblatts (Fig. 9-10-A, #185).

Es gibt 2 Typen von $\alpha\beta$ -Strukturen:

(i) ein Kern mit wie Fassdauben verbogenen parallelen β -Strängen; die α -Helices verbinden die parallelen Stränge und liegen außen am Fass; dies nennt man üblicherweise ein TIM-Barrel; (ii) ein offenes, verbogenes β -Faltblatt, das an beiden Seiten von α -Helices umgeben ist; Beispiel: Nukleotid-Bindungs-Domäne.

TIM-Barrel, auch $(\beta\alpha)_8$ - oder $(\alpha\beta)_8$ -Barrel genannt (Fig. 9-4, #180 und Fig. 9-7, #182): es hat einen zentralen Zylinder (ein Fass) von β -Faltblättern (gebildet aus 8 parallelen β -Strängen); benachbarte β -Stränge sind durch eine α -Helix verbunden, und die 8 α -Helices bilden eine Art Hülle für das zentrale β -Fass. Sowohl Stränge wie Helices haben eine rechtsgängige Verdrillung. Der Faltungstyp ist sehr häufig.

Andere Strukturen: Andere Pr.Strukturen sind irregulär und haben wenig Sek.Struktur; vorwiegend in sehr kleinen Proteinen.

Datenbanken für die Klassifikation der Proteinstruktur: im Jahre 2007 waren etwa 1×10^5 Domänen und etwa 1×10^5 Polypeptidketten in den Datenbanken enthalten.

SCOP (Structural Classification of Proteins): Einteilung nach struktureller und evolutionärer Verwandtschaft; Einteilung in Familien (>30% Homologie), Superfamilien

CATH (Class, Architecture, Topology and Homology): Einteilung nach Klasse, Architektur, Topologie und Homologie; die Architektur wird durch die Orientierung der Sek.Struktur-Elemente definiert (vernachlässigt aber die Verbindungen zw. ihnen), während die Topologie die Konnektivitäten mit einschließt; Homologie impliziert, dass die Proteine einen gemeinsamen evolutionären Vorfahren haben (und eine gewisse Sequenzidentität und Ähnlichkeiten in Struktur und Funktion).

(2) Membranproteine: Vermeidung von Wasser

Proteine, die in die Lipid-Doppelschicht einer biol. Membran eindringen und diese zumeist durchqueren, werden als intrinsische oder **integrale Membranproteine** (IMP) bezeichnet. Sie halten sich primär im Lipid-Inneren einer Membran, weniger in der wässrigen Lösung, auf und unterscheiden sich fundamental von Proteinen, die nur an der Membran (z.B. mittels einer Fettsäure) verankert sind.

IMPs haben charakteristische chemische und strukturelle Eigenschaften. Sie haben viele hydrophobe AA und sind in ihren Sek.Struktur-Elementen eingeschränkt. Als Folge der hydrophoben externen (äußeren) Oberfläche kann ein IMP in wässriger Lösung nur in Anwesenheit eines Detergenz solubilisiert werden (Bildung einer geeigneten Grenzfläche zw. Protein und Wasser; wesentlich für Stabilität und biol. Aktivität). Die Aufreinigung von Membranproteinen ist ähnlich der der löslichen Proteine, sofern alle Lösungen ein Detergenz ($c > CMC$) enthalten.

Wegen ihrer großen Bedeutung wurde die 3D-Struktur einiger weniger Membranproteine bei atomarer Auflösung bestimmt. Problem: Kristallisation von Membran-Proteinen. In zunehmendem Maße auch Verwendung der Elektronen-Kristallografie.

Die bekannten **Membranproteinstrukturen** lassen sich in 4 Kategorien einteilen: α -helikal, β -Barrel, monotopisch und bitopisch (Fig. 9-31).

Sie unterscheiden sich von globulären Pr. insofern als ihre äußeren Oberflächen in Kontakt mit dem nichtpolaren Teil der Membran-Doppelschicht (also nichtpolar) sind, während das Innere dieser Proteine dem der wasserlöslichen Proteine durchaus ähnlich ist. Die Elemente der Sek.Str., die das Innere bilden, neigen dazu länger als bei den wasserlösl. Proteinen zu sein (um die Membran durchqueren zu können).

Arg und Lys sind auf Seiten der Membran, die zum Zell-Inneren schaut, häufig vertreten (positive-inside rule). Tyr und Trp finden sich häufig an Grenzflächen-Positionen zw. Wasser und Membran-Innerem.

Die Bildung von Membranprotein-Strukturen wird durch HB-WWen bestimmt.

Verschiedene Strukturtypen integraler Membranproteine:

(A) Helikaler Membranprotein-Komplex

(B) β -Barrel Membranprotein

(C) Monotopisches Membranprotein

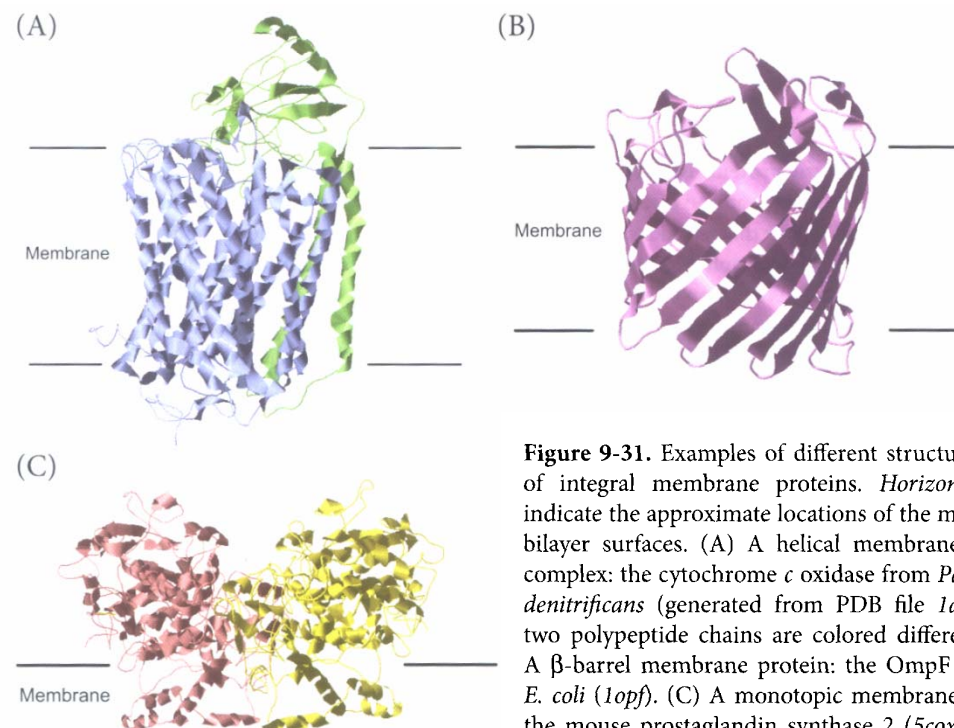


Figure 9-31. Examples of different structural types of integral membrane proteins. *Horizontal lines* indicate the approximate locations of the membrane bilayer surfaces. (A) A helical membrane protein complex: the cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans* (generated from PDB file *1ar1*). The two polypeptide chains are colored differently. (B) A β -barrel membrane protein: the OmpF porin of *E. coli* (*1opf*). (C) A monotopic membrane protein: the mouse prostaglandin synthase 2 (*5cox*). Figure generated using the program Jmol.

Helikale Supersekundär-Strukturen (helical superfolds)

Helikale Membranproteine werden aus Transmembran- α -Helices, die die Membran durchqueren, aufgebaut (Fig. 9-31-A). Jede Transmembran-Helix besteht aus 20-30 Resten (ausreichend, um die Dicke der Membran zu durchqueren); die Reste sind in der Regel hydrophob, wenngleich einzelne polare bzw. geladene Reste in dem Teil der Sequenz, der für die Membrandurchquerung zuständig ist, vorkommen können.

Beispiele: die Strukturen des Photosynthese-Reaktionszentrums (Fig. 9-32) und die mitochondriale Cytochrom c Oxidase enthalten viele Transmembran- α -Helices mit den folgenden, für Transmembran- α -Helices typischen Eigenschaften:

- (i) Die Helices brauchen nicht länger als 40 Å sein, um die Doppelschicht gerade durchqueren zu können (meistens jedoch etwas schräger Durchtritt, deshalb geringfügig länger)
- (ii) Polare Reste an den Enden der Helices
- (iii) Die Helices haben einen hydrophoben Kern (≈ 20 Å, bestehend aus Phe, Val, Leu, Met, Ile)
- (iv) an beiden Seiten des Kerns werden polare aromatische AA (Tyr und Trp) gefunden
- (v) die Region außerhalb des Kerns enthält häufig Asn und Gln Reste (entweder zur Oberfläche hin exponiert oder in der Pr.Struktur vergraben)
- (vi) Pro-Reste kommen etwa 25 Å vom Mittelpunkt des Kerns entfernt vor; Pro und Gly des hydrophoben Kerns sind in der Struktur vergraben

Das Photosynthese-Reaktionszentrum

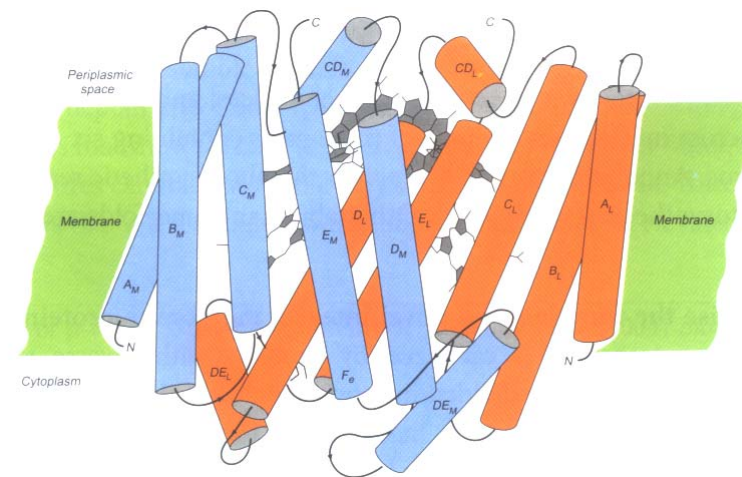


Figure 9-32. The photosynthetic reaction center. The two main subunits, L and M, are illustrated schematically, along with cofactors and prosthetic groups involved in the function. The major α -helices of each subunit are labeled A–E; minor helices are labeled by the major helices they connect. Note the approximate two-fold symmetry axis; the L and M subunits probably arose from a common ancestral protein that functioned as a dimer of identical subunits. The functional protein also contains an H subunit (not shown) that is located on the cytoplasmic face of the membrane but has one transmembrane helix. A cytochrome subunit (not shown) also binds to the L and M subunits on the cytoplasmic face. Adapted from H. Michel & H. Deisenhofer (1988) *Biochemistry* 27, 1.

Beim Auftreten von Kanälen (wie beim Transport von Gelöstem durch die Membran) kleiden α -Helices den Kanal aus, durch den die gelösten Moleküle transportiert werden. Diese Helices sind relativ zur Membrannormalen leicht schräg angeordnet.

Verschiedene Supersek.Strukturen werden durch die Zahl ihrer membranumfassenden Segmente und Innen/Außen-Topologie charakterisiert, z.B. \exists eine große Proteinfamilie mit 7 Transmembran-Helices ('7TM Superfamily'), wie im Falle des Bacteriorhodopsins (Fig. 9-33). Alle Mitglieder dieser Familie haben 7 α -Helices; der N-Terminus befindet sich an der äußeren Membranseite. Viele G-Protein gekoppelte Rezeptoren gehören hierher. Der 7-Helix-Faltungstyp ermöglicht verschiedene Funktionen, da unterschiedliche Liganden und prosthetische Gruppen untergebracht werden können.

Einige Proteine haben 12 Transmembran-Helices. Auch der Typ des 4-Helix Bundles kommt vor.

Wegen der Vielfältigkeit der Strukturen lässt sich die Funktion eines neuartigen IMP aus der Struktur kaum vorhersagen.

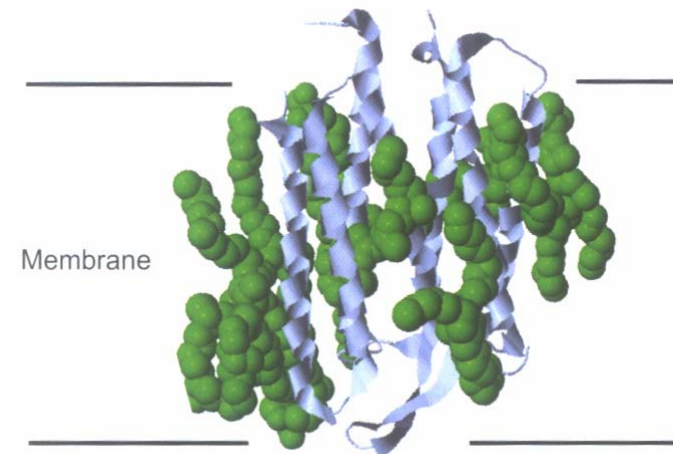


Figure 9-33. The structure of bacteriorhodopsin with lipid molecules bound. The seven transmembrane α -helices are indicated schematically as *coils*. The atoms of the bound lipid molecules are shown as *spheres* with their van der Waals radii. The bilayer will extend horizontally across the structure, encompassing the bound lipid molecules. The only parts of the protein exposed to the aqueous solvent are those at the top and bottom. Generated from PDB file *1c3w* using the program Jmol.

β -Barrel Membranproteine

Der Transmembran-Teil einiger weniger Membranproteine besteht aus einem Up-and-down β -Barrel (vgl. #182), bestehend aus 8, 14, 16 oder 18 antiparallelen β -Strängen (Fig. 9-31-B, #204). Diese Struktur kommt in **Porinen** und membrangebundenen Formen einiger Toxine (z.B. α -Hämolysin, ein heptameres Toxin aus *Staphylococcus aureus*) vor. Diese Proteine erleichtern die Diffusion kleiner Moleküle durch das Barrel und quer zur Membran; das Innere des Barrels ist hydrophil. Wegen der Größe der β -Stränge werden nur etwa 10 Reste benötigt, um die Doppelschicht zu durchqueren; die β -Stränge des Porin- β -Barrels umfassen 6-17 Reste.

Die β -Barrel-Membranproteine weisen einige Eigenheiten auf:

- (i) Die Sequenzen sind so hydrophil wie die löslicher Proteine. Die zum Lipid exponierte Oberfläche des β -Barrels ist jedoch höchst hydrophob; Porine sind nur in Anwesenheit eines Detergenz löslich. Im Gegensatz dazu ist das monomere α -Hämolysin ein lösl. Protein.
- (ii) Die Primärstrukturen der Porine weisen zumindest 10 Familien ohne klare Sequenzhomologie auf.
- (iii) Porine sind ungewöhnlich stabil, bilden Trimere, die gegen Denaturierung (selbst bei erhöhter Temp.) resistent sind.

Monotopische und bitopische Membranproteine

Einige Membranproteine benötigen zwar zur Solubilisierung Detergenzien, haben aber keine Transmembran- α -Helices oder β -Stränge (Fig. 9-31-C, #204). Sie werden als **monotopische Membranproteine** bezeichnet. Sie assoziieren mit der Membranoberfläche unter Verwendung von 4 kurzen α -Helices, die nahezu parallel zur Ebene der Membran verlaufen; die α -Helices sind amphipatisch und enthalten einige aromatische Seitenketten; sie sind echte Membranproteine, aber keine Transmembranproteine.

Ein **bitopisches Membranprotein** enthält eine einzelne Transmembran- α -Helix, die 2 Domänen auf entgegengesetzten Seiten der Membran verbindet. Diesen Transmembran-Helices hat man zunächst die Rolle von rein hydrophoben Membran-Ankern zugeschrieben, sie dürften aber wichtige und funktionelle Bedeutung haben.

Wechselwirkungen mit der Membran

In Membranen eingebettete Proteine unterscheiden sich von wasserlöslichen Proteinen primär in ihren Oberflächen, mit denen sie mit Lipiden statt mit Wasser interagieren. Ein wesentlicher Parameter dabei ist die hydrophobe Dicke der Lipid-Doppelschicht (definiert durch die Länge der Lipid-Fettsäureketten). Die Bindung an Lipide ist für die vertikale Positionierung und feste Integration der Proteine in die Membran wesentlich, sowie für Assemblierung, Stabilisierung und funktionelle Rollen der oligomeren Multi-Untereinheiten-Komplexe und Superkomplexe. Manche Membranproteine binden selektiv ganz bestimmte Lipid-Spezies. Die Bindung resultiert aus multiplen nichtkovalenten WW zw. Protein-Resten und den Kopfgruppen und hydrophoben Schwänzen der Lipide.

Im Mittel sind Transmembranproteine, die den Lipid-Schwänzen zugänglich sind, wesentlich hydrophober als verborgene Reste; sie sind weniger konserviert und enthalten verschiedene Arten von Resten. Membranproteine sind keine starren Gebilde, sie können sich verformen, um ein entsprechend gutes **hydrophobes Matching** mit der umgebenden Lipid-Doppelschicht sicher zu stellen. Ein wesentlicher Teil der geladenen und polaren Reste, die in Kontakt mit den hydrophoben Lipid-Schwänzen steht, bildet mit anderen Resten in ganz bestimmten Stellungen HBs aus. Reste, die eine Pore durch das Protein umgeben, können hydrophil oder hydrophob sein.

(3) Proteine mit ähnlichen Faltungskonformationen: Evolution in 3D

In Anbetracht der großen Mannigfaltigkeit an AA-Sequenzen, könnte man eine entsprechende Vielfalt an Faltungskonformationen erwarten. Ganz im Gegenteil: Ähnlichkeiten zw. Protein-Strukturen werden häufig beobachtet. Insbes. die Tertiärstrukturen von Proteinen sind während der Evolution viel eher konserviert worden als die Primär-Strukturen. Ähnlichkeiten in der Tert.Struktur wurden auch in Fällen gefunden, wo keine erkennbare Sequenz-Homologie entdeckt wurde. Auch die Zahl möglicher Faltungen ist Gegenstand intensiver Diskussionen.

Homologe Proteine: Protein-Familien

Proteine, die substantielle Ähnlichkeiten in Primär-Struktur und Funktion aufweisen, sind mit großer Wahrscheinlichkeit während der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden, und sie haben ausnahmslos sehr ähnliche Faltungskonformationen, so sind z.B. die 3D-Strukturen des Pferde- und Human Hb nahezu identisch, obwohl sich 43 der 287 Reste der α - und β -Ketten unterscheiden.

Auch für die Konformationen des Pottwal-Mb und Pferde-Hb ist die Ähnlichkeit groß. Die einzelnen Polypeptid-Ketten des Mb und der α -, β - und γ -Ketten des Hb sind in der Topologie ihres Polypeptid-Rückgrats erstaunlich ähnlich (Fig. 9-34). Auch andere Sauerstoff-bindende, Häm-enhaltende Proteine haben ähnliche Konformationen. Diese Proteine werden der **Globin-Familie** zugerechnet. In einigen Fällen sind die Primär-Strukturen keineswegs ähnlich; die bekannten Globine haben nur 2 AA-Reste gemeinsam.

Andere Protein-Familien sind die Proteine vom **Cytochrom c** Typ oder die Trypsin-ähnlichen **Ser-Proteinasen** (Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Thrombin).

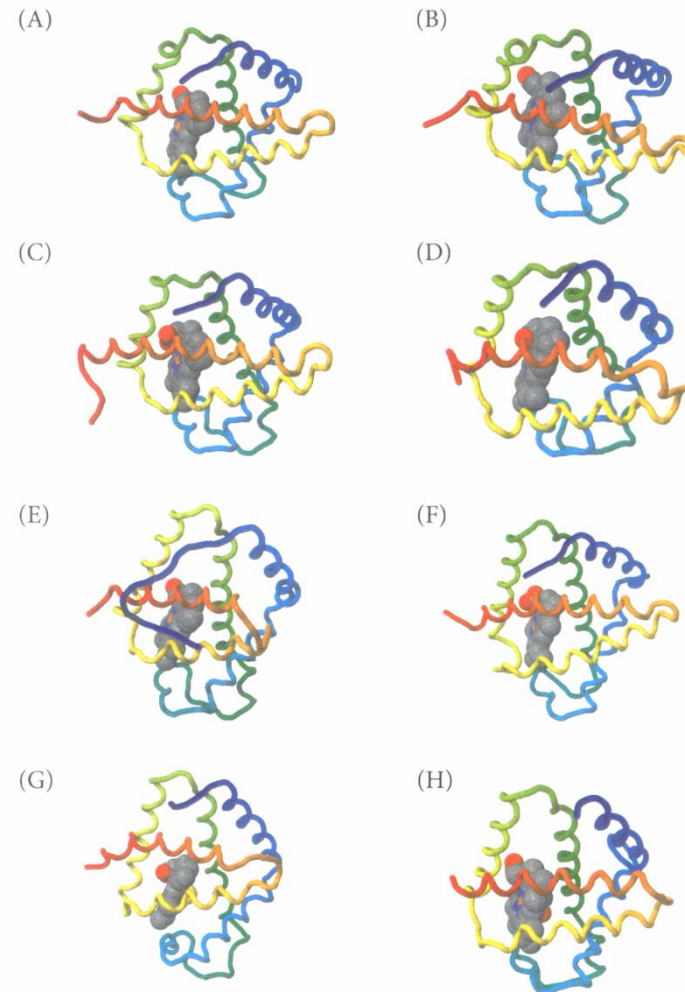


Figure 9-34. The similar folded structures of various globins. The course of each polypeptide chain is shown, with the N-terminus *blue*, the C-terminus *red* and the colors of the rainbow in between. The van der Waals surface of each heme group is shown. (A) Human hemoglobin α -chain (generated from PDB file *1a3n*). (B) Human hemoglobin β -chain (*1a3n*). (C) Sperm whale myoglobin (*1vxg*). (D) Erythrocyruorin (*1eca*). (E) Lamprey hemoglobin (*1f5o*). (F) Glycera hemoglobin (*1jf3*). (G) Clam ferric hemoglobin (*1moh*). (H) *Ascaris* hemoglobin (*1ash*). Some of these proteins have minimal similarities in their amino acid sequences. Figure generated with the program Jmol.

Wie sind so große Variationen in der AA-Sequenz mit derart ähnlichen Faltungskonformationen vereinbar?

Die größte Variation ereignet sich an Positionen der Polypeptidkette, wo die Seitenkette sich an der Oberfläche befindet. Hier wird die chemische Natur der Seitenkette häufig verändert; Gly und Pro findet sich häufig bei Reverse Turns (Table 9-6).

Die geringsten Veränderungen ereignen sich an den Resten im Inneren (die nichtpolaren Reste sind eher konserviert).

Strukturänderungen ereignen sich hauptsächlich nach mehrfachen AA-Substitutionen.

Die am meisten konservierten Reste sind die, die direkt in die funktionellen Eigenschaften eines Proteins involviert sind.

Insertionen und Deletionen innerhalb der Polypeptidkette ereignen sich häufig an Reverse Turns an der Oberfläche eines gefalteten Proteins, meist ohne große Perturbationen im Inneren. Disulfid-Brücken bestimmen nicht die Konformation und sind auch nicht absolut notwendig.

Elemente der Sek.-Str. können sich zueinander bewegen, können ihre Länge verändern oder sogar verschwinden, aber eine α -Helix wird in der Regel nicht durch ein β -Faltblatt ersetzt und umgekehrt.

Table 9-6. Conformational preferences of the amino acid residues^a

Amino acid	Conformation			α -Helix ^b			Turn		
	α -Helix (P_α)	β -strand (P_β)	Reverse turn (P_T)	N-term	Middle	C-term	Type I	Type II	Other
Glu	1.59	0.52	1.01	2.12	1.18	1.21	1.12	0.84	1.06
Ala	1.41	0.72	0.82	1.33	1.60	1.46	0.74	0.94	0.58
Leu	1.34	1.22	0.57	1.03	1.50	1.46	0.61	0.53	0.75
Met	1.30	1.14	0.52	0.75	1.44	1.92	0.66	0.73	0.96
Gln	1.27	0.98	0.84	1.39	1.22	1.24	0.79	1.45	1.02
Lys	1.23	0.69	1.07	0.98	1.05	1.68	0.70	0.73	1.04
Arg	1.21	0.84	0.90	1.26	1.25	1.23	0.88	1.22	0.84
His	1.05	0.80	0.81	0.68	0.97	1.57	0.78	0.64	1.00
Val	0.90	1.87	0.41	1.00	1.09	1.08	0.39	0.61	0.48
Ile	1.09	1.67	0.47	0.96	1.31	0.99	0.39	0.43	0.93
Tyr	0.74	1.45	0.76	0.63	0.61	1.00	0.71	0.91	0.97
Cys	0.66	1.40	0.54	0.78	0.66	0.56	1.38	0.99	0.78
Trp	1.02	1.35	0.65	1.20	1.34	0.78	1.35	0.15	0.52
Phe	1.16	1.33	0.59	0.94	1.45	1.20	0.77	0.76	0.53
Thr	0.76	1.17	0.90	0.75	0.87	0.80	1.25	0.67	0.93
Gly	0.43	0.58	1.77	0.60	0.47	0.31	1.14	2.61	1.38
Asn	0.76	0.48	1.34	0.80	0.80	0.75	1.79	0.99	1.37
Pro	0.34	0.31	1.32	0.90	0.19	0.06	0.95	1.80	1.51
Ser	0.57	0.96	1.22	0.67	0.44	0.73	1.47	0.76	1.49
Asp	0.99	0.39	1.24	1.35	1.03	0.67	1.98	0.71	1.28

^aThe normalized frequencies for each conformation (e.g. P_α , P_β , P_T) were calculated from the fraction of residues of each amino acid that occurred in that conformation, divided by this fraction for all residues. Random occurrence in a conformation would give a value of unity.

^bN-terminal and C-terminal include the four helical residues at the ends of a helical segment eight or more residues long, and three residues at the ends of segments six or seven long. Middle includes all helical residues between N- and C-terminals.

Data from R. W. Williams *et al. Biochim Biophys. Acta* (1987) **916**, 200–204; C. M. Wilmot & J. M. Thornton (1988) *J. Mol. Biol.* **203**, 221–232.

Strukturähnlichkeiten ohne offensichtliche Sequenz-Homologie: Überraschungen

Naheliegende Kandidaten für evolutionäre Divergenz sind die $(\beta\alpha)_8$ -Barrels, die zuerst im TIM beobachtet wurden (Fig. 9-4, #180). Diese Struktur wurde in >16 versch. Proteinen beobachtet – ohne erkennbare AA-Homologie. Die Proteine mit dieser Struktur haben funktionelle Ähnlichkeiten; alle sind Enzyme, die ihre aktiven Zentren/Stellen am C-terminalen Ende des β -Barrels haben; dies deutet darauf hin, dass sie sich durch drastische Divergenz aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben.

Andere Beispiele für strukturelle Ähnlichkeiten ohne Primärstruktur-Homologie und Funktionsähnlichkeiten: die Mononucleotid-Bindungsdomäne in vielen Proteinen

Sequenzähnlichkeiten ohne Struktur-Homologie: Neue Faltungstypen?

Das Auftreten einer signifikanten Sequenzähnlichkeit impliziert in der Regel, dass die 3D-Struktur ebenfalls homolog ist. Jedoch in Proteinen mit Leu-reichen Wiederholungen (Leu-rich repeats, LRR) hat man eine Sequenzähnlichkeit ohne Struktur-Homologie beobachtet, z.B. fand man folgende Sequenz in einem solchen Wiederholungsmodul: XLXXLXLXXNXaXXaXXXXaaXXLX [wobei L = Leu, a = aliphatischer Rest (oft Leu), X = irgendein Rest]; Anzahl der Reste in einer Wiederholung (repeat): 20-29; Anzahl der Wiederholungen in einem Protein: 1-41.

LRR-Proteine: bei Signal-Transduktion, Zell-Adhäsion, Protein-Protein-WW

Die Strukturen versch. LRR-Proteine bilden Supercoils, aber die Motive unterscheiden sich.

(i) Beim Ribonuclease-Inhibitor (Fig. 9-36): kurzer β -Strang, gefolgt von Loop und α -Helix, nahezu parallel zueinander angeordnet; die sich wiederholenden α -loop- β Einheiten erzeugen eine Superhelix ('Hufeisen').

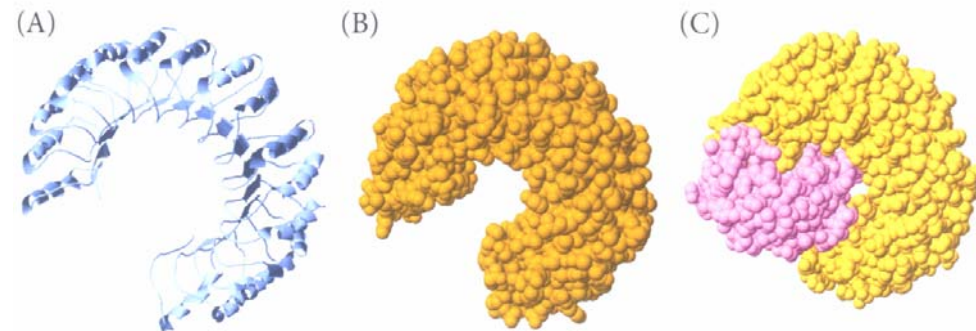


Figure 9-36. The structure of the leucine-rich repeat (LRR) protein ribonuclease inhibitor. (A) The cartoon depiction of the course of the polypeptide backbone shows β -strands as arrows and α -helices as coils. (B) Space-filling model, with the atoms depicted as their van der Waals volumes. (C) The complex with the enzyme ribonuclease A. Generated from PDB files *2bnh* and *1dff* using the program Jmol.

(ii) Im **LRV-Protein** (Leu-rich variant protein): keine β -Faltblatt-Struktur; die Wiederholungen bilden abwechselnde α -Helix und 3_{10} -Helix Motive, angeordnet in Form einer rechtsgängigen Superhelix ('Komma').

Andere Substrukturen in der LRR-Architektur: Pectat-Lyase: die sich wiederholenden β -Stränge bilden eine β -Helix Struktur (Fig. 9-11, #186)

(4) Vorhersagen der Proteinstruktur

Es sollte möglich sein, die 3D-Struktur eines jeden Proteins aus der zugehörigen AA-Sequenz abzuleiten, da bekanntlich viele Proteine sich *in vitro* falten und rückfalten - und dies ohne weitere Faktoren. Deshalb muss die **3D-Struktur eines Proteins durch seine AA-Sequenz determiniert** sein. Trotz vieler Versuche innerhalb der letzten 40 Jahre ist das Problem jedoch keineswegs gelöst.

Die Lösung des Problems besteht im Prinzip darin, die gefaltete Konformation mit der niedersten apparenten Freien Energie zu finden. Die apparente Freie Energie einer Konformation kann berechnet werden, indem man die verschiedenen Arten von WW innerhalb eines Protein-Moleküls und zw. Protein und umgebendem Medium (Wasser) berücksichtigt. Die Konformation kann dann allmählich geändert werden, um die berechnete Freie Energie zu senken. Das Problem ist jedoch aus 2 Gründen schwierig:

- (i) Die extrem große Zahl von Konformeren, die eine Polypeptidkette annehmen kann
- (ii) Proteinfaltung ist ein kooperativer Übergang zw. aufgefaltetem und gefaltetem Zustand; die Beziehung zw. Sequenz und Struktur ist probabilistisch und nicht deterministisch (eine Frage der Wahrscheinlichkeit und nicht eindeutig festgelegt)

Empirische Regeln für die Vorhersage (prediction) von Proteinstrukturen (Beziehungen zw. Sequenz und Struktur) sind weniger zielführend: einige funktionieren bei der Vorhersage von Sek.-Strukturen, aber nicht bei Tertiär-Strukturen!

Ein anderer Ansatz verwendet das sog. 'Threading Protein Sequences' (Sequenz-Struktur-Alignment, 'Zurechtschneiden' von Proteinsequenzen). Dabei wird vorausgesetzt, dass die gefaltete Konformation bereits bekannt und in einer Struktur-Datenbank vorhanden ist; es wird letztlich untersucht, ob die neue Sequenz mit einer der bekannten Strukturen vereinbar ist. Neuartige Strukturen können so jedoch nicht vorhergesagt werden.

(i) *Ab initio* Vorhersagen: das Endziel (Wunschziel)

Vorhersagen ohne irgendeine Kenntnis einer Protein-Struktur; ungeheuer schwierig.

Um die Effektivität versch. Methoden zu vergleichen, gibt es jährlich einen Wettbewerb (**CASP**, Critical Assessment of Techniques for Structure Prediction)

(ii) Sek.-Struktur Vorhersagen: ein 1D-Problem

Ziel: die Vorhersage der Lokalisation von α -Helices und β -Strängen entlang der Polypeptidkette (jedoch ohne Vorhersage von β -Faltblättern). Die Vorhersage ist nur ein 1D-Problem: Korrelation von 2 linearen Strings (AA-Sequenz und lineare Sequenz von Sek.-Str.-Elementen). Die Sek.Str. der Reste wird mit Buchstaben bezeichnet: **A** (α -helikal), **B** (β -strängig), **C** (coil, irreguläre Konformation), **T** (turns)

Vorhersagemethode nach Chou und Fasman: jeder AA-Rest hat eine bestimmte Neigung (propensity) A, B, C oder T einzunehmen (Table 9-6, #210). Zuweilen werden Computer-Algorithmen der Informationstheorie eingesetzt (Neurale Netzwerke, genetische Algorithmen, 'Hidden Markov' Methode)

Die einfache Chou-Fasman-Methode (Genauigkeit ca. 55%) benötigt bereits 60 Parameter (20 AA-Reste \times 3 Konformationszustände); detailliertere Methoden etwa 1000 Parameter (20 AA-Reste \times 17 Positionen der Nachbarreste \times 3 Konformationszustände; >10000 Parameter werden benötigt, wenn die Propensities von AA-Paaren miteinbezogen werden (70% Genauigkeit). 100% Genauigkeit ist nicht zu erwarten, da die Sek.-Struktur nicht nur durch die Sequenz bestimmt wird, sondern in Zusammenhang mit der 3D-Struktur, in der sie vorkommt, gesehen werden muss.

Identifikation von Transmembran Helices: Hydrophathie

Transmembran- α -Helices umfassen eine Reihe von hauptsächlich hydrophoben AA-Resten und können dementsprechend in der Primärstruktur eines Membranproteins mit hoher Verlässlichkeit mittels einer sog. Hydrophathie-Analyse identifiziert werden. Der Ausdruck **Hydrophathie** bezieht sich auf die Hydrophilizitäts-Hydrophobizitäts-Skala (Table 7-6, #157). Solche Skalen basieren auf den Freien Energien des Transfers von Modellverbindungen (besser: AA-Resten) von Wasser ins Vakuum (besser: Öl).

Ein Hydrophathie-Profil wird erstellt, indem die Hydrophobizitäten einer ausgewählten Zahl von Nachbarresten innerhalb eines Ausschnittes (window) der Sequenz aufsummiert und durch die Zahl der Reste im Ausschnitt dividiert werden. Das sich ergebende Ergebnis (average score) wird dem Rest in der Mitte des Ausschnitts zugeordnet. Dann wird der Ausschnitt der Sequenz um einen Rest verschoben und die Prozedur wiederholt (Fig. 9-37).

Die 'positive-inside' Regel (vgl. #204) wird zuweilen verwendet, um die Orientierung der Polypeptide in der Membran anzuzeigen (Arg und Lys treten häufig auf der Innenseite der Membran auf, und nicht an der Oberfläche).

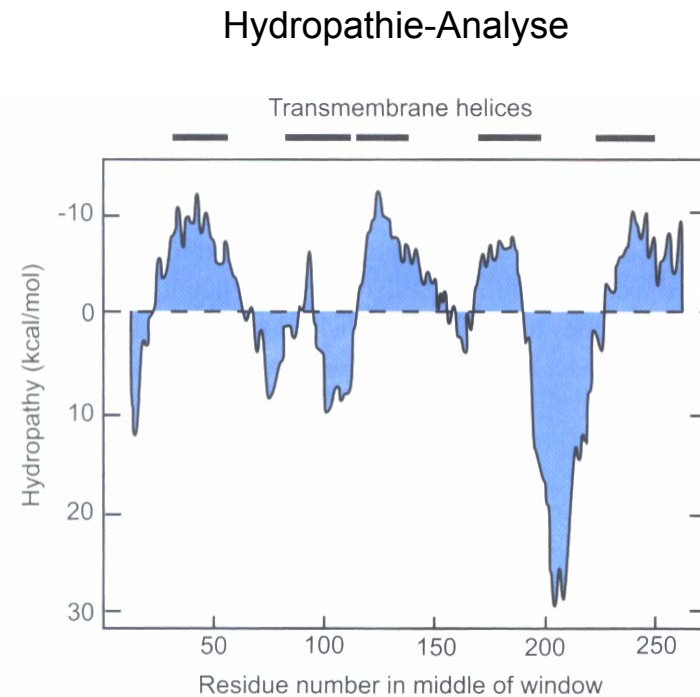


Figure 9-37. Hydrophathy analysis of the L subunit of the photosynthetic reaction center of *Rhodospirillum rubrum*. A window length of 19 residues was used. The known locations of the transmembrane helices are indicated above, demonstrating that the method identifies them at least approximately.

(iii) Homology Modeling (Homologie Modellieren)

2 Proteine (> 100 Reste) mit einer Sequenz-Identität von 30% oder mehr sind nahezu **homolog**, gehören derselben Familie an und haben im Wesentlichen dieselbe Struktur. Wenn die Struktur des einen Proteins bekannt ist, kann die Struktur des homologen Proteins modelliert werden.

1. Schritt: Alignment (Abgleich) der neuen Sequenz gegen die Sequenz eines Proteinhomologen bekannter Struktur. Unsicherheiten des Sequenz-Alignments sind durch Insertionen und Deletionen bedingt, produzieren zuweilen 'Gaps' (Lücken) in einer der Sequenzen. Mit abnehmender Sequenz-Ähnlichkeit nimmt die Zahl der Gaps zu, das Alignment wird schlechter.

Für genaues Modellieren ist eine Sequenz-Identität von 40-50% erforderlich, zuweilen reichen heute 30% (entspricht einer schlecht aufgelösten Röntgenstruktur). Die neue AA-Sequenz wird auf ein Rückgrat-Template der bekannten Struktur montiert und die AA-Seitenketten werden ersetzt. Orientierungen können aus Rotamer-Bibliotheken entnommen werden.

2. Schritt: Berücksichtigung der Insertionen und Deletionen. Es gibt kein Template für Insertionen (sie ereignen sich in der Regel an der Oberfläche); es wird ein geeigneter Loop erzeugt. Durch 'Simulated Annealing' wird letztlich die Struktur variiert und die optimale, energetisch stabilste Konformation gesucht.

Das **Inverse Faltungsproblem** (inverse folding problem): Die Prozedur ist das Gegenteil der Vorhersage der Proteinstruktur, wo man mit der Sequenz beginnt und versucht, die 3D-Struktur zu finden. Hier startet man von einer bekannten 3D-Struktur und versucht, eine Sequenz zu finden, die mit der Struktur kompatibel ist (und gewünschte neue Eigenschaften hat). Die Geeignetheit jedes AA-Restes für jede Stelle in der Protein-Struktur wird unter Verwendung eines WW-Energie-Potenzials (Krauffeld-Analyse, mean force energy potential) berechnet.

Sequenz-Struktur Alignment (threading protein sequences, #213): Identifizierung einer bekannten Struktur, die mit einer bestimmten Sequenz vereinbar ist. Auch unter anderen Namen bekannt (3D-1D compatibility method, fold recognition (Erkennen eines Faltungselementes), prediction by threading).

Das Alignment (Threading) einer gegebenen Primär-Sequenz durch eine gegebene Tertiär-Struktur schließt eine große Menge von Möglichkeiten ein (sog. 'Alignment Problem'). Um die Berechnungsmöglichkeiten einzuschränken, wird eine **3D-Profil-Tabelle** eingeführt (Table 9-38): Dies ist eine (20×n)-Tabelle, die aus der bekannten Protein-Struktur konstruiert wird, wobei die Spalten der 20 AA-Reste entlang den n Resten der Struktur angeordnet werden.

Die Tabelle beschreibt die Geeignetheit eines jeden Typs eines AA-Restes für eine gegebene Stelle, abhängig von Sek.Struktur, hydrophiler/hydrophober Umgebung etc.

Die Vereinbarkeit einer Sequenz mit einer Struktur wird durch Berechnung der WW-Energien (eines Restes mit allen Resten in der Nachbarschaft) erreicht. Das Problem besteht darin, dass die Nachbarn nicht bekannt sind, bis das Alignment fix ist.

Andere Methoden kommen ohne 3D-Profil-Tabellen aus; Verwendung versch. Energie-Potenzial-Funktionen; zeitlich aufwendig; führt letztlich zu quasi-ab initio Methoden (bei denen das Rückgrat nicht fixiert ist, vielmehr variieren kann).

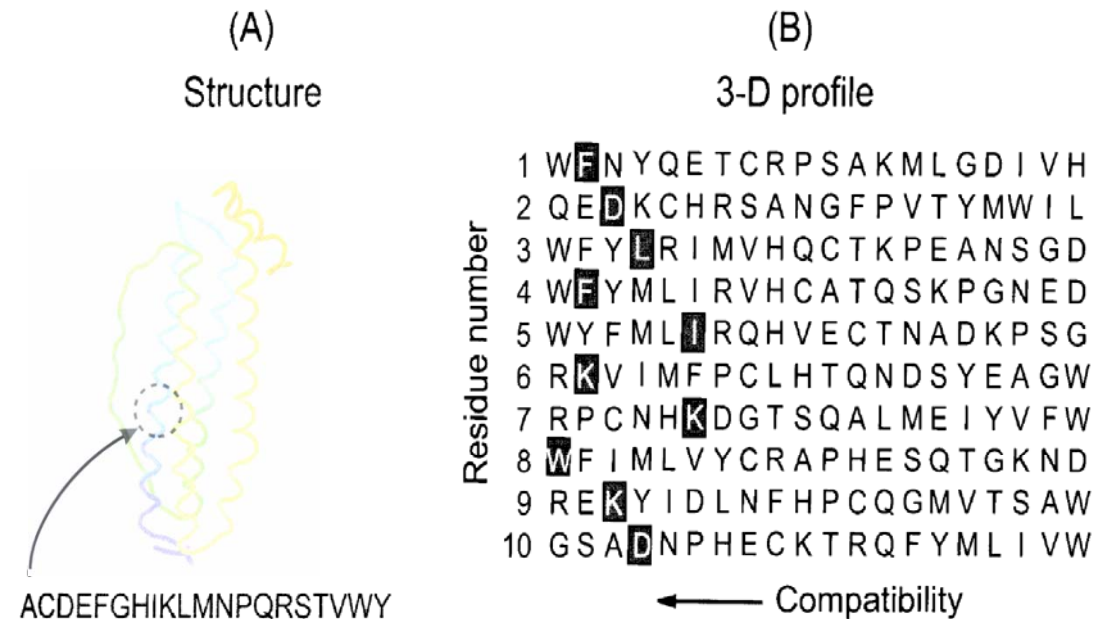


Figure 9-38. Testing the compatibility of a protein sequence with a known 3-D structure by threading the sequence through the structure. (A) Each of the 20 amino acid residues is placed one at a time at each of the residues of a known 3-D protein structure to evaluate its compatibility with each position of that structure. The 20 residues are then sorted in decreasing order of their compatibility with each position. (B) A '3-D profile table' is assembled, using the one-letter abbreviation for each amino acid residue. The residues in the native original protein are highlighted; not surprisingly, all are on the left side of the table, implying that they are compatible with the 3-D structure. Other sequences might be even more compatible, and the 3-D profile table will indicate the relative compatibility of any other amino acid sequence with that structure.

(iv) De novo Protein Design

Obwohl es keineswegs Routine ist, die 3D-Struktur eines Proteins aus seiner AA-Sequenz vorher zu sagen, werden die Prinzipien der Protein-Struktur heute genügend genau verstanden, um Protein-Sequenzen zu entwerfen, die zumindest einige wenige Faltungskonformationen annehmen können.

Die AA-Sequenz muss so entworfen werden, dass (i) die gewünschte Konformation angenommen werden kann und (ii) die Ausbildung falscher Strukturen vermieden wird.

Ein erfolgreicher Ansatz (Fig. 9-39) kann z.B. für das Design einer 4- α -Helix-Bundle-Konformation (die in vielen natürlich vorkommenden Proteinen vorliegt; #188) vorgenommen werden.

(i) Zunächst wird ein 16-Reste umfassendes Peptid entworfen; für die hydrophobe Grenzfläche zw. den gewünschten Helices werden nur Leu-Reste, die eine Tendenz zur Helix-Bildung haben (Table 8-3, #170), verwendet; Gly-Reste werden an den Helix-Enden eingesetzt, um diese zu terminieren; an der dem LM zugewandten Seite jeder Helix werden Lys oder Glu verwendet. (ii) Dann wird ein Loop mit der Sequenz -Gly-Pro-Arg-Arg-Gly- entworfen, um Paare von Helices in antiparalleler Orientierung zu verbinden. Dieses 2-Helix Peptid bildet stabile Dimere. (iii) Letztendlich wird ein ähnlicher Loop eingesetzt, um 2 solcher Peptide zu verbinden. Endprodukt ist ein sehr stabiles monomeres Peptid aus 74 Resten, das in etwa den Erwartungen entspricht.

Ähnliche Ansätze gibt es für ein synthetisches $(\beta\alpha)_8$ Barrel.

Um ein neues Protein mit gewünschter Funktion zu erhalten, ist es in der Regel jedoch einfacher, von einem vorhandenen Protein auszugehen, dessen AA-Sequenz willkürlich zu verändern und die Sequenzen mit der gewünschten Funktion auszuwählen.

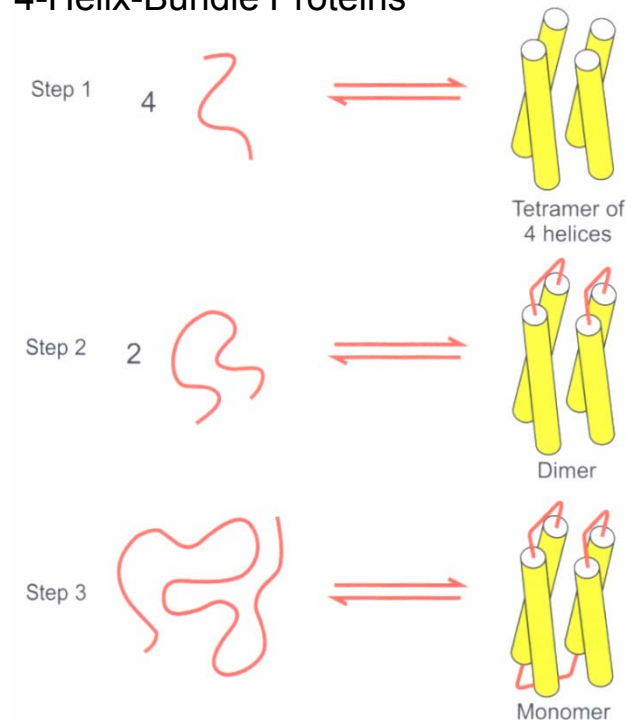
Inkrement-Ansatz für das Design eines 4-Helix-Bundle Proteins

Figure 9-39. Schematic illustration of the incremental approach to the design of a four-helix bundle protein. Kindly provided by W. E. DeGrado in T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn, W. H. Freeman, NY, p. 258.

PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN GEFALTETER PROTEINE

Natürlich vorkommende Proteine in ihrer biol. Umgebung befinden sich in der Regel in Lösung oder in Membranen eingebettet, wo sie auf mannigfaltige Weise mit der Umgebung interagieren können. Diese WW haben zahlreiche Effekte auf die physikal. und biol. Eigenschaften eines Proteins, so dass es zu verstehen wichtig ist, wie Protein-Strukturen auf ihre Umgebung reagieren. Die gefalteten Konformationen von Proteinen haben physikal., chem. und biol. Eigenschaften, die sich von denen der ungefalteten oder von der Summe der sie aufbauenden AA unterscheiden.

- Die Kompaktheit gefalteter Konformationen bedingt, dass native Proteine relativ schnell diffundieren und rotieren

- Die einzelnen Proteindomänen sind gegen Proteinasen relativ resistent, solange sie gefaltet sind; Multidomänen-Proteine können oft spezifisch zw. den Domänen gespalten werden.

- Die Tertiär-Struktur einer kompakt gefalteten Protein-Struktur ist einzigartig, ausgenommen einige lokale Aspekte ihrer Oberfläche; ein natives Protein hat in der Regel nicht 2 oder mehr wesentlich verschieden gefaltete Konformationen (außer nach Änderungen der kovalenten Struktur). Konformationsänderungen sind in der Regel nur ganz lokal oder Änderungen der Flexibilität, Änderungen in der Anordnung der Untereinheiten (Quartärstruktur) oder der Domänen; die einzelnen Untereinheiten und Domänen behalten ihre Konformation.

- Sehr kleine Proteine scheinen die mobilsten Konformationen zu besitzen; ab einer Größe von etwa 50 AA-Resten scheinen sie in Lösung eine einzelne Konformation zu besitzen.

Proteine sind in Lösung keine starren Moleküle. Aus thermodynamischen Gründen haben Moleküle von der Größe von Proteinen substantielle kurzzeitige Fluktuationen ihrer Größe (Vibrationen ihrer Bindungslängen und -winkel, wie mit IR- und Raman-Spektr. feststellbar: Frequenzen zw. 10^{12} und $10^{14}/s$). 218

Längere Zeitskalen erlauben größere Bewegungen [Bewegung einzelner Domänen großer Proteine, die durch relativ flexible Hinge-Regionen (Scharnier-Bereiche) verbunden sind (z.B. Antikörper-Regionen)]. Proteinflexibilität schließt verschiedenste Bewegungen ein (26 Größenordnungen auf der Zeitskala).

- Proteine können als Bereich bestimmter, nahe verwandter Mikrokonformationen, die sich bei RT schnell ineinander umwandeln, angesehen werden. Sie bilden eine Durchschnitts-Makrokonformation (= die Größe, die üblicherweise beobachtet wird). Bei sehr tiefen Temp können mitunter solche Mikrozustände fixiert werden.

(i) Löslichkeiten und Volumina von Proteinen in Wasser

Wasser muss bei allen Betrachtungen in Rechnung gestellt werden, um die Eigenschaften von Proteinen zu verstehen; Wasser hat sowohl eine dynamische als auch eine strukturelle Rolle.

- Die WW eines Proteins mit dem LM werden durch die Proteinoberfläche bestimmt. Die günstigsten WW von Proteinen mit dem wässrigen LM werden durch geladene und polare Gruppen der Polypeptidkette und hydrophiler Seitenketten bewerkstelligt.

- Die Löslichkeit eines Proteins wird durch die relative Freie Energie in einem amorphen oder festen Zustand bestimmt. Die Löslichkeit eines globulären Proteins ist ein Minimum am I.P., an dem pH, an dem die Nettoladung null ist. Die Löslichkeit nimmt zu, wenn man sich von diesem pH-Wert weg bewegt (Fig. 10-1). Je größer die Nettoladung eines Proteins und je niedriger die Ionenstärke, desto größer sind die elektrost. Abstoßungen zw. versch. Molekülen, die sie in Lösung halten.

- Auffaltung hat für ein Protein drastische Konsequenzen für die Löslichkeit eines Proteins (Freilegen der nichtpolaren Oberflächen).

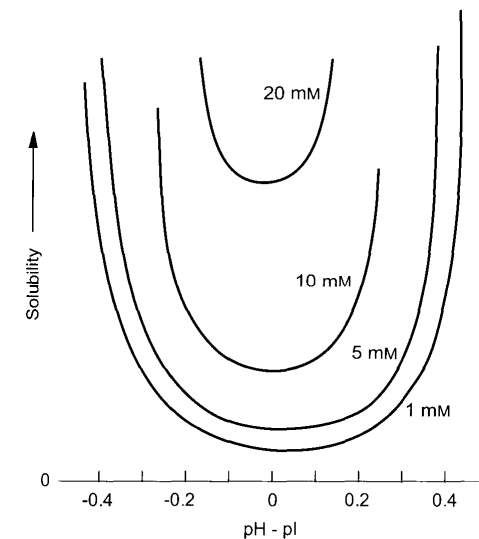


Figure 10-1. The variation with pH of the solubility of a typical globular protein at several different NaCl concentrations. The pH is expressed relative to the isoelectric point (pI) of the protein.

Wasserhülle:

Die Hydratationsschicht, die an Proteine gebunden wird (präferentielle Hydratation), ist geordneter und weniger mobil als das Wasser in der Umgebung (bulk water); sie hat eine um 10% größere Dichte und eine um 15% größere Wärmekapazität; entspricht 0.3 g Wasser pro g Protein (= 2 Wassermoleküle pro AA-Rest; entspricht Zunahme des Volumens um 43% und Zunahme des Radius um 12%. Die WW zw. Proteinen und Wassermolekülen sind sehr kurzlebig (<0.3 ns).

Partielle Volumina:

Die partiellen spezif. Volumina gefalteter Proteine in wässriger Lösung bewegen sich im Bereich zw. 0.70 und 0.75 cm³/g, abhängig von Struktur und AA-Zusammensetzung (Table 10-1), während diese Volumina für die AA-Reste zw. 0.57 und 0.88 liegen (Table 7-1, #155). Die Volumina der AA-Reste in gefalteten Proteinen sind mit den Volumina der Reste nahezu identisch (Fig. 9-22, #192). Die partiellen Volumina der Reste in Lösung sind jedoch um 18-39% größer als die van der Waals Volumina: die größten Zunahmen gibt es bei nichtpolaren Seitenketten, die kleinsten bei polaren, da polare Atome intensiver mit dem Hydratationswasser interagieren ('Elektrostriktion').

Table 10-1. Partial specific volumes (\bar{v}_2^0), adiabatic and isothermal compressibilities (β_s and β_T) and volume fluctuations (δV_{rms}) of proteins in water at 20 to 25°C

Protein	\bar{v}_2^0 (cm ³ g ⁻¹)	β_s (10 ⁻¹² cm ² dyn ⁻¹)	β_T (10 ⁻¹² cm ² dyn ⁻¹) ^a	δV_{rms} (cm ³ mol ⁻¹) ^b
Globular proteins				
Peroxidase	0.702	2.36	6.70	68.3 (0.24)
Ribonuclease A	0.704	1.12	5.48 (5)	36.2 (0.38)
Lysozyme	0.712	4.67	7.73 (12.3)	44.2 (0.43)
Soybean trypsin inhibitor	0.713	0.17	4.44	41.1 (0.20)
α -Chymotrypsin	0.717	4.15	8.32	62.2 (0.33)
Trypsin	0.719	0.92	5.16	46.0 (0.28)
Cytochrome c	0.725	0.07	4.27	30.8 (0.34)
Serum albumin	0.735	10.5	14.6 (13.4)	135.0 (0.27)
α -Lactalbumin	0.736	8.27	12.4	56.9 (0.54)
Carbonic anhydrase	0.742	6.37	10.5	76.0 (0.34)
Ovalbumin	0.746	9.18	12.1	101.0 (0.30)
Myoglobin	0.747	8.98	13.1	64.1 (0.51)
β -Lactoglobulin	0.751	8.45	11.8	63.6 (0.46)
Fibrous proteins				
Gelatin	0.689	-2.5		
F-actin	0.720	-6.3		
Myosin	0.724	-18.0		
Tropomyosin	0.733	-41.0		

^aThe values in parentheses represent values measured experimentally; other values were estimated from β_s .

^bThe values in parentheses express δV_{rms} as the percentage of the total protein volume.

Data from K. Gekko (1999) in *Encyclopedia of Molecular Biology* (T. E. Creighton, ed.), Wiley-Interscience, NY, pp. 553–555.

Das apparente part. spezif. Volumen eines Proteins kann aus der AA-Zusammensetzung abgeschätzt werden (z.B. mittels Cohn-Edsall-Methode); Veränderungen in der Umgebung (LM, Temp., Druck), die mitunter sehr groß sein können, werden damit jedoch nicht erfasst.

Das part. spezif. Volumen eines Proteins in Wasser bei unendlicher Verdünnung (\bar{v}_2^0) kann als Summe 3er Beiträge angesehen werden:

- (i) konstitutives Volumen (\bar{v}_c), = Summe der van der Waals Volumina der konstitutiven Atome,
- (ii) Volumen der Kavitäten als Folge mangelhafter Atompäckung (\bar{v}_{cav}),
- (iii) Volumenbeiträge, die durch Solvatation und Hydratation verursacht werden ($\Delta\bar{v}_{sol}$):

$$\bar{v}_2^0 = \bar{v}_c + \bar{v}_{cav} + \Delta\bar{v}_{sol}$$

Der Wert für \bar{v}_{sol} ist üblicherweise negativ, da die Hydratation eine Kontraktion des LM Wasser verursacht. Jeder Prozess der die ASA vergrößert (Auffaltung, Dissoziation in Unter-einheiten) wird in der Regel negative Volumensänderungen verursachen (da dabei die Hydratation vergrößert wird).

Die Werte für \bar{v}_2^0 hängen auch mit den Werten für die adiabatische und isotherme Kompressibilität (β_s und β_T) zusammen (Table 10-1); Proteine werden dabei ohne jeden Wärmeaustausch oder bei konstanter Temp. (d.h. unter Wärmeabgabe) komprimiert.

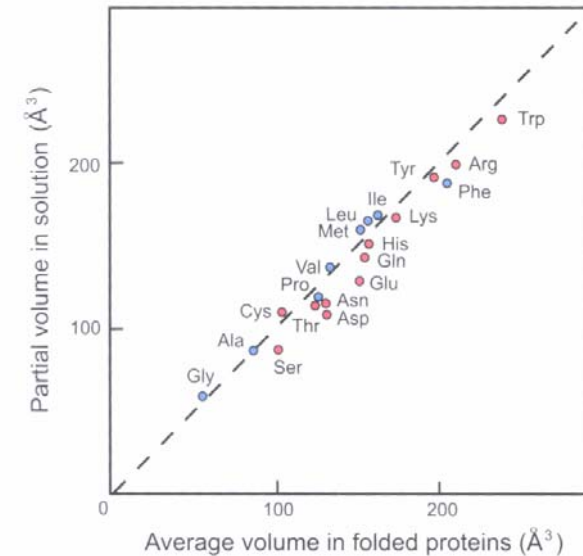


Figure 10-2. Correspondence between the average volume occupied by each amino acid residue in solution and in folded proteins. The line has a slope of unity. Data from T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn, W. H. Freeman, NY.

(ii) Chemische Reaktivitäten

Die Reaktivität von Proteingruppen mit versch. chem. Reagenzien wird schon lange verwendet, um Struktur, Funktion und Dynamik von Proteinen zu untersuchen (#151). Die Reaktion mit einer chem. Gruppe erfordert eine gewisse Zugänglichkeit der Gruppe, d.h. die Proteingruppe muss an der Oberfläche sein oder das Reagenz muss durch die Struktur diffundieren können. Mitunter reagieren vollkommen vergrabene Gruppen bis zu einem gewissen Anteil mit dem Reagens (in Abhängigkeit von der Flexibilität der Proteinstruktur).

Der Bereich chem. Reaktivitäten von Proteingruppen kann von totaler Unreaktivität bis zur Hyperreaktivität reichen, abhängig von der Umgebung (Einfluss der Umgebung auf den Elektronenzustand einer Gruppe) oder von sterischen Effekten; häufig ist die lokale Konz. des Reagenzes für die Reaktivität mitentscheidend.

Beispiel für **Hyperreaktivität**: Reaktivität des Ser195 in Ser-Proteinasen (Trypsin, Chymotrypsin, Elastase) mit DFP (Diisopropylfluorophosphat); Reaktivität des His12 und His119 der RNase A mit Jodacetat, Jodacetamid etc. (Tab. 10-2).

Um die chem. Eigenschaften spezif. Gruppen in Proteinen zu quantifizieren, wird häufig kompetitives Labeling verwendet (Verwendung einer kleinen Menge eines radioaktiv markierten Reagenzes).

Table 10-2. Rates of alkylation of histidine and two His residues of ribonuclease A

Alkylating reagent	Second-order rate constant ($10^{-4} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) ^a		
	Ribonuclease A ^b		
	L-Histidine	His12	His119
Iodoacetate		7.3	51.1
Iodoacetamide	0.012	1.1	0
Bromoacetate	0.086	20.5	184.5
L- α -Bromopropionate	0.0027	0.19	0.66
D- α -Bromopropionate	0.0028	4.16	1.84
D- α -Bromo- <i>n</i> -butyrate		3.60	1.11
β -Bromopyruvate		0	911
β -Bromopropionate	0.0229	0	6.33

^a At 25°C and pH 5.3–5.5.

^b His12 is always alkylated at atom N^{ε2} atom, whereas His119 reacts at N^{δ1}; reaction of one N atom inhibits reaction at the other.

Data from R. L. Heinrickson *et al.* (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 2921–2934 and R. G. Fruchter & A. M. Crestfield (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 5807–5812.

Im Allgemeinen reagiert nur die nichtionisierte Form von Amino-Gr. mit den meisten Reagenzien. Deshalb kann die Änderung der Reaktivität mit dem pH-Wert dazu verwendet werden, um den app. pK_a -Wert der Amino-Gr. in Proteinen und die rel. Reaktivität der nichtionisierten Form zu bestimmen (Verwendung eines Brønsted-Plots; Fig. 10-3).

Die Nachbarschaft von Gruppen in einem gefalteten Protein kann zu unerwarteten intramolekularen Reaktionen führen!

Ionisation: elektrostatische Effekte

Die gefalteten Konformationen von Proteinen beeinflussen die Ionisation einzelner Proteingruppen essentiell. Viele geladene Gruppen kommen an der Proteinoberfläche in unmittelbare Nachbarschaft. Spezifische WW (HB, Salzbrücken), die auch die Ionisation spezieller Gruppen beeinflussen, treten auf. Die pK_a -Werte einzelner Gruppen können durch viele Umgebungs- und elektrost. Faktoren beeinflusst werden (pK_a -Werte können um 3-4 pH-Einheiten variieren).

Der Einfluss geladener Gruppen auf die Ionisation einzelner Reste kann durch Mutationen anderer Gruppen verändert werden (Beispiel: Ionisation des Restes His64 von Subtilisin; Tab. 10-3).

Es gibt noch viele ungelöste Probleme betr. elektrost. Effekte auf Proteine.

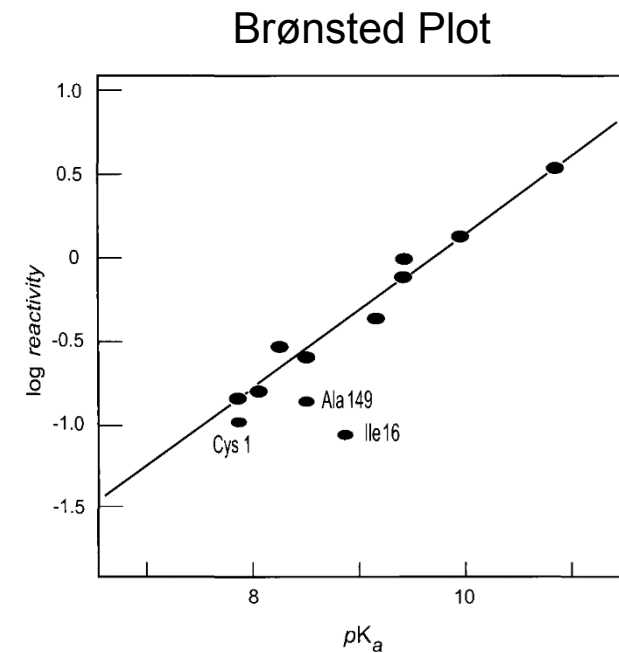


Figure 10-3. Brønsted plot of the reactivities of the three α -amino groups of α -chymotrypsin (Cys1, Ile16 and Ala149, *red circles*) with acetic anhydride compared with those of model compounds (*blue circles*). The extent to which the reactivities of the protein α -amino groups differ from those of the model compounds is due to the effects of the protein conformation. Data from H. Kaplan (1972) *J. Mol. Biol.* 72, 153–162.

(iii) Isotopen-(H)-Austausch

Der fundierteste Beweis für eine weitreichende Flexibilität der Proteinstruktur besteht darin, dass im Proteininneren liegende Gruppen, die dem LM unzugänglich sind, bis zu einem gewissen Grad (und manchmal sehr langsam) mit geeigneten Reagenzien in Lösung reagieren. Das dafür geeignetste Reagenz ist **Wasser in verschiedenen Isotopenformen** ($^1\text{H}_2\text{O}$, $^2\text{H}_2\text{O}$, $^3\text{H}_2\text{O}$): Messung des Austausches der H-Atome des Proteins mit dem LM.

H-Atome an O-, N- oder S-Atomen tauschen schnell aus, während der Austausch von H-Atomen an C-Atomen eher insignifikant ist; zumeist werden -NH-Gruppen des Polypeptidrückgrats verwendet (^1H gibt ein NMR-Signal, ^2H jedoch nicht).

Reaktion: $\text{MH} + \text{-OH} \leftrightarrow \text{M}^{\text{H}} + \text{-OH}$, wobei M den MM-Rest und O den Sauerstoff im Wasser repräsentiert.

Austausch in MM:

Beispiel: Insulin (relativ flexibel) vs. BPTI (relativ inflexibel); Fig. 10-5.

Table 10-3. Measurement of the effective dielectric constant of subtilisin by the effects of various replacements of ionized residues on the apparent pK_a value of His64 at low ionic strength

Replacement	Measured ΔpK_a^a	Mean distance from charge to His64 N atoms (Å) ^b	Effective dielectric constant (D^{eff}) ^c
Glu156 → Ser	-0.38	14.4	45
Asp99 → Ser	-0.40	12.6	48
Glu156 → Lys	-0.63	15.5	50
Asp99 → Lys	-0.64	13.8	55
Ser156 → Lys	-0.25	16.5	59
Ser99 → Lys	-0.25	15.0	65
Asp36 → Gln	-0.18	15.1	90
Lys213 → Thr	+0.08	17.6	173
Asp99 → Ser and Glu156 → Ser	-0.63		
Asp99 → Lys and Glu156 → Lys	-1.00		

^a Values for the pK_a shifts are the mean values of the two His imidazole N atoms; the normal pK_a value for His64 is 7.0–7.1, depending upon the ionic strength.

^b Mean distances are the average from the side-chain N or O atoms of the ionized side-chain to the two His imidazole N atoms. Mean distances for the replacement side-chain were obtained assuming the side-chain to be fully extended.

^c The effective dielectric constant was calculated using the equation:

$$D_{\text{eff}} = \frac{244}{(\Delta q)r(\Delta pK_a)}$$

where Δq is the change in the number of charges and r is the distance in Ångstroms.

Data from M. J. E. Sternberg *et al.* (1987) *Nature* **330**, 86–88.

Durch pH-Variation zw. 3 und 9 können Austauschraten über 8 Größenordnungen gemessen werden (ähnlicher Kurvenverlauf; Fig. 10-5).

2 Modelle:

(i) Lokale Auffaltung der Proteinstruktur (local unfolding, breathing)

(ii) Durchdringen der Proteinstruktur mit LM (solvent penetration)

Bindung eines Liganden verringert häufig die Austauschraten der inneren Gruppen.

Durch geringe Mengen an Denat.Mittel (wie Harnstoff) wird die Austauschrate nicht vergrößert. Nach vollständiger Auffaltung tauschen alle Reste mit derselben Rate aus (Fig. 10-6).

Durch zunehmenden Druck wird die Austauschrate verringert.

Die Austauschrate, die durch die native Proteinstruktur verzögert wird, wird zuweilen durch einen Schutzfaktor P (protection factor) ausgedrückt.

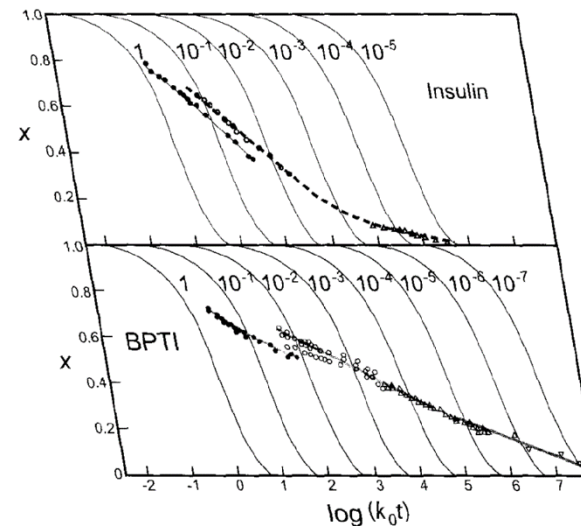


Figure 10-5. Exchange-rate curves of insulin and bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) at 25° C. x is the fraction of original isotope remaining, k_0 is the exchange rate of an average solvent-exposed peptide group, and t is time. The measurements were made in the time interval from about 5 min to 10 h after dissolution of the protein and at the following values of pH: insulin 3.0 (closed circles), 4.1 (open circles), 7.7 (triangles); bovine pancreatic trypsin inhibitor 3.4 (closed circles), 5.1 (open circles), 7.3 (triangles), 9.2 (inverted triangles). The solid curves are calculated for the various probabilities of exposure to solvent of the peptide groups indicated. Data from A. Hvidt & E. J. Pedersen (1974) *Eur. J. Biochem.* **48**, 333–338.

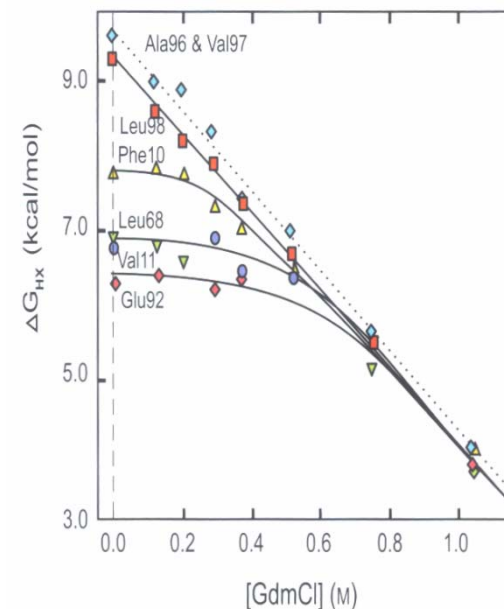


Figure 10-6. Dependence of the rate of exchange of backbone NH groups of cytochrome *c* as a function of guanidinium chloride (GdmCl) concentration. The rate of exchange is inversely proportional to the free energy change required (corrected for the various intrinsic exchange rates), so the fastest-exchanging rates are at the bottom. The rates of exchange of the rapidly exchanging residues Glu92, Val11 and Leu68 barely change at low concentrations of denaturant, until complete unfolding becomes significant, when all the residues exchange at the same rate. Residues Leu98, Val97 and Ala96 appear to exchange only when the protein unfolds completely. Data from Y. Bai *et al.* (1994) *Proteins* **20**, 4–14.

(iv) Bestimmung der Protein-Flexibilität durch Kristallografie bzw. NMR

Die Proteinmodelle, die aus **Kristallstrukturanalysen** folgen, werden üblicherweise als statisch deklariert. D.h. jedoch nicht, dass das Molekül wirklich statisch ist, nicht einmal im Kristallgitter. Die kristallografisch beobachtete El.-Dichte stellt ein Mittel aller Moleküle im Kristall und der Messzeit dar. Indirekter Beweis für Proteinflexibilität im Kristall folgt aus dem chem. Austausch von verborgenen H-Atomen des Proteins mit dem LM (Neutronen-Diffraktion an ^1H und ^2H verschieden). Häufig kann man jedoch nicht zw. Proteinflexibilität und Unordnungen/Fehlanordnungen im Kristallgitter unterscheiden; Interpretation der sog. B-Werte ist nicht zielführend (Einfluss des Temp.-Faktors).

NMR liefert dynamische Information über MM-Flexibilität. Protein-Dynamik und -Thermodynamik können durch NMR-Messungen der Relaxationszeiten charakterisiert werden (Seitenketten: ^1H und ^{13}C ; Rückgrat: ^{15}N); Information über Bewegungsraten folgen aus den NMR-Spektren (line shapes). Beste Interpretation der NMR-Daten, wenn ^1H und ^{15}N Kerne verwendet werden.

Interpretationshilfen:

(i) Ordnungsparameter S (Order Parameter): zw. 0 (total flexibel) und 1 (inflexibel). In gefalteten Proteinen ist S der meisten Kerne >0.9, d.h. nur geringer Flexibilitätsgrad. In einem partiell gefalteten Faltungsintermediat ist S wesentlich geringer (Fig. 10-7).

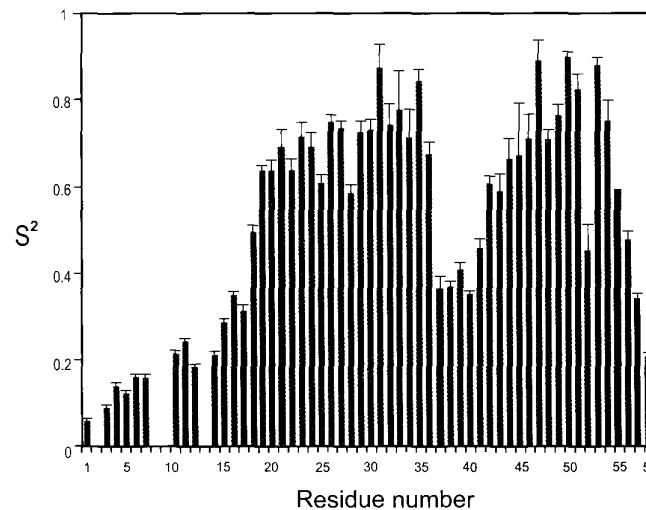


Figure 10-7. The flexibility of a partly folded protein molecule expressed as the order parameter S. The protein is the intermediate with only the Cys30–Cys51 disulfide bond in the disulfide folding pathway of BPTI (Figure 11-26). Residues 19–36 and 42–54 are largely folded; they comprise the main elements of secondary structure of the native protein. In contrast, the other residues, especially the N-terminal 17 residues, are much more flexible. Residues without values indicated are Pro residues, for which the procedure is not appropriate. Data from C. P. M. van Mierlo *et al.* (1993) *J. Mol. Biol.* 229, 1125–1146.

(ii) Aromatic Ring Flipping (schnelle 180° Rotationen der Ringe um C^β-C^γ Bindung).

Die meisten Proteine geben gemittelte Spektren für Phe und Tyr; Flips mit Frequenzen nicht größer als $5 \times 10^7/s$; Ring Flipping ist jedoch nicht häufig.

Trp und His gefalteter Proteine zeigen kein Ring Flipping.

Table 10-4. Flipping of aromatic rings in BPTI

Residue	Frequency of 180° rotations (s ⁻¹) at temperature			Activation parameters		
	4°C	40°C	80°C	Enthalpy ΔH [‡] (kcal/mol)	Entropy ΔS [‡] (cal/mol K)	Volume ΔV [‡] (Å ³)
Tyr10	Rapid	Rapid	Rapid			
Tyr21	Rapid	Rapid	Rapid			
Tyr23	<5	3×10^2	5×10^4	26	35	
Tyr35	<1	16	5×10^4	37	68	60
Phe4	Rapid	Rapid	Rapid			
Phe22	Rapid	Rapid	Rapid			
Phe33	Rapid	Rapid	Rapid			
Phe45	30	1.7×10^3	5×10^4	17	11	50

Data from G. Wagner *et al.* (1976) *Biophys. Struct. Mech.* **2**, 139–159 and (1987) *J. Mol. Biol.* **196**, 227–231.

(v) Temperatur-Variation

Die Ausdehnung eines MM mit zunehmender Temperatur reflektiert seine atomare Packung und Flexibilität. Die apparenten und partiellen spezifischen Volumina (\bar{v}_2^0) von Proteinen in wässriger Lösung (#221) ändern sich linear mit der Temp. (im Bereich zw. 4 und 45°C); die Werte für $d\bar{v}_2^0/dT$ sind positiv (ca. $5 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Aus kristallografischen Daten folgt, dass Kristallgitter und Proteinstruktur mit zunehmender Temp. expandieren. In Lösung werden größere Volumeneffekte gemessen (Einfluss der Hydratationshülle).

Alle Proteine weisen bei 220 K (-53°C) eine dramatische Änderung der dynamischen Eigenschaften auf (**Glass Transition**; Glas-Übergang, benannt in Analogie zum Übergang von Flüssigkeiten in den Glaszustand) : bei hohen Temp. gibt es größere kollektive Bewegungen von Atomgruppen; bei niederen Temp. nur einfache harmonische Vibrationen. Analysen nur in Cryo-Solvents möglich.

(vi) Einfluss hoher Drücke

Der Effekt zunehmender Drücke besteht in der Begünstigung von Strukturen mit kleineren Volumina. Die Volumenabnahmen werden mittels Analyse der **Kompressibilität** bestimmt. Die intrinsische Kompressibilität globulärer Proteine in Lösung beträgt etwa $25 \times 10^{-6} \text{ bar}^{-1}$. Proteine sind weniger kompressibel als Flüssigkeiten, aber ähnlich inkompressibel wie kristalline Festkörper. Die Kompressibilität hängt mit der Packung im Proteininnern, der Möglichkeit Kavitäten zu verkleinern und der Hydratation zusammen (also mit Volumen und ASA).

2 Arten von Messungen: Bestimmung der adiabatischen Kompressibilität β_s (Messung bei konstanter Entropie) oder Bestimmung der isothermen Kompressibilität β_T (Messung bei konstanter Temperatur); Beispiele vgl. Tab. 10-1 auf #220.

Einfluss von hohen Drücken auf die Protein-Architektur wurde kristallografisch bestimmt. Mit zunehmendem Druck nimmt das Volumen ab (Beispiel: Lysozym-Kristalle + 1000 Atm, \Rightarrow Volumenabnahme um nur 0.3 %).

(vii) Spektrale Eigenschaften

Die Chromophore in gefalteten Proteinen existieren in vielen verschiedenen Umgebungen, die ihre Lichtabsorption und Emission auf verschiedene Weise beeinflussen; vgl. Vorlesung im WS!

(i) Phe, Tyr, Trp sind für die Absorptionseigenschaften von Proteinen im Nah-UV-Bereich (250-300 nm) verantwortlich. Die Abs.Spektren verschieben sich in nichtpolaren LM zu längeren Wellenlängen, z.B. Tyr + CCl_4 : 3 nm Rot-Shift im Vergleich zu Tyr + H_2O . Mittels LM-Perturbations-Spektroskopie quantifizierbar (Aussagen über Zugänglichkeit von aromatischen Gruppen der gefalteten Struktur dem LM gegenüber).

(ii) Die Fluoreszenz aromatischer Seitenketten ist äußerst empfindlich gegenüber Umgebungsänderungen, aber weniger leicht vorhersagbar. Die Fluoreszenzintensität kann (je nach Anwesenheit von benachbarten Quenchergruppen) zu- oder abnehmen.

Die Größe der Fluoreszenzintensität ist nicht besonders informativ, kann aber als empfindlicher Indikator von Änderungen der Proteinstruktur betrachtet werden. Die Wellenlänge, bei der Licht emittiert wird (λ_{\max}), ist aussagekräftiger; z.B. haben Trp-Reste, die dem Wasser zugänglich sind, ein Fl.-Maximum bei ca. 350 nm, während total vergrabene Seitenketten bei ca. 330 nm emittieren.

Die Fluoreszenz eines gefalteten Proteins ist besonders komplex, wenn mehr als eine aromatische Seitenkette vorhanden ist (Normalfall). Die gefaltete Struktur bringt verschiedene Gruppen in unmittelbare Nachbarschaft, so dass ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer) stattfinden kann: Transfer der von einem Chromophor absorbierten Lichtenergie auf einen anderen (der bei einer längeren Wellenlänge absorbiert); die Lichtemission erfolgt dann vom zweiten Rest. Die Fluoreszenz von Tyr-Resten wird nur in Abwesenheit von Trp beobachtet, während die von Phe-Resten nur dann beobachtet wird, wenn nur Phe vorhanden ist.

(iii) Die CD-Spektren von Proteinen sind sehr informativ. Das Spektrum im Nah-UV Bereich (250-300 nm) wird durch die aromatischen Reste dominiert und spiegelt den Grad der Asymmetrie ihrer Umgebungen wider. Das Spektrum bei kürzeren Wellenlängen (Fern-UV Bereich) wird hauptsächlich durch die chirale Natur des Polypeptidrückgrats bestimmt und hängt primär von der im Protein vorhandenen Sek.Struktur ab. Durch Vergleich des Proteinspektrums mit Spektren von Standardkonformationen können die Beträge der versch. Sek.Struktur-Typen abgeschätzt werden.

(viii) **Integrale Membranproteine**

Natürliche Membranen sind üblicherweise sehr konzentrierte Proteingemische, die in die Membran-Doppelschicht eingebettet sind: ca. 50 % Protein (Variationsbreite: 25-75 %). Als Folge der hohen Konzentrationen interagieren Proteine in Membranen miteinander stärker als Proteine in Lösung. Es gibt einen großen Excluded Volume Effect (ausgeschlossenes Volumen), da nicht viel leerer Platz in der Doppelschicht vorhanden ist, in den sich Proteine bewegen könnten; Proteine sind in ihrer Orientierungsmöglichkeit eingeschränkt.

PROTEIN-DENATURIERUNG: AUFFALTUNG UND RÜCKFALTUNG

Grobe Definition: Denaturierung (Denat.) = Zerstörung der nativen Struktur

Beispiele: Eierkochen (Eiweiß präzipitiert), Erhitzen von Kollagen führt zu Gelatine (Separierung in 3 Stränge). In diesen Fällen ist die Denat. irreversibel; aber es gibt viele Fälle (insbes. bei kleinen Proteinen), bei den sie reversibel ist und eine Umkehrung der Auffaltung darstellt. Dieser Denat.-Typ erlaubt es, die Kräfte, die die gefaltete Struktur aufrecht halten (schwache WW: elektrost., van der Waals, HB), zu untersuchen. WW schwach, aber es \exists viele solcher WW innerhalb von MM.

1. Reversible Auffaltung beim Gleichgewicht

Schärfere Definition: Protein Denaturierung = Verschwinden der spezif. Eig. eines nativen, funktionsmäßig aktiven Proteins unter nichtphysiolog. Bedingungen; üblicherweise schließt dies die Auffaltung der Polypeptidketten mit ein, kann jedoch auch durch einfache Präzipitation oder chem. Modifikation verursacht sein.

Denat. kann durch Erhitzen, Abkühlen, hohen Druck, pH-Extrema oder Hinzufügen chem. Reagenzien (Denat.-Mittel) erreicht werden, aber auch durch ionisierende oder nichtionisierende Strahlung.

Protein-Denat. ist in der BC von hohem Interesse, insbes. wenn es die Auffaltung der Polypeptidkette mit einschließt und reversibel ist. Im Allgemeinen nimmt man an, dass die Beobachtungen im Gleichgewichtszustand gemacht werden.

Auffaltung und Rückfaltung können exp. mit jeder Technik, die die konformationellen Änderungen der Polypeptidkette empfindlich erfassen kann, verfolgt werden (Fig. 11-1).

Temp.

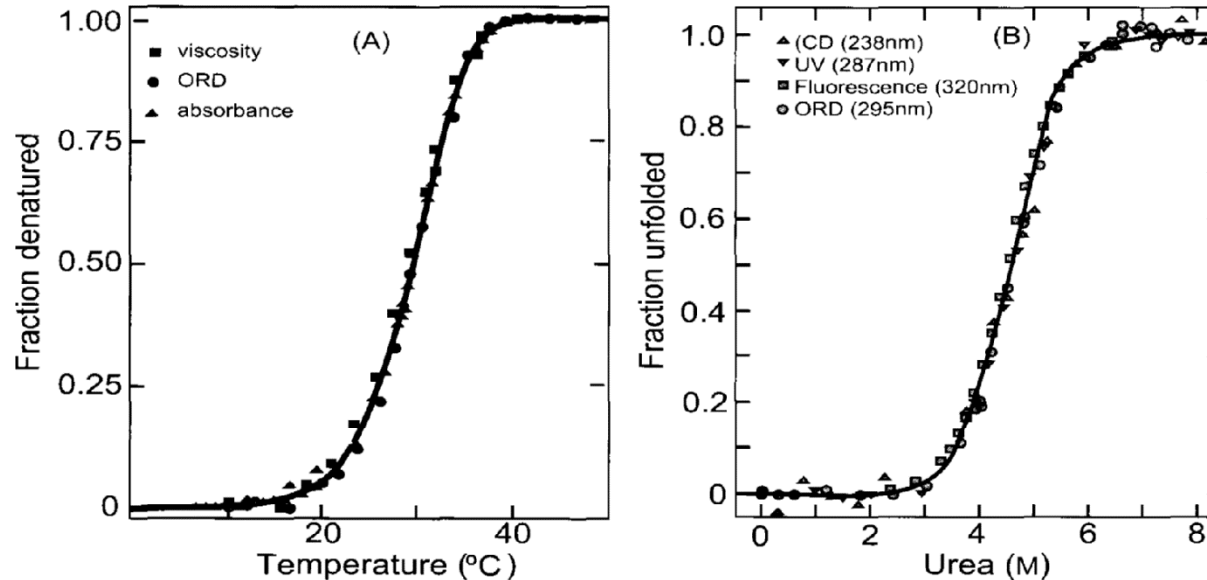
Denat.
Mittel

Figure 11-1. Typical denaturation of a small globular protein caused by heating (A) or the addition of the denaturant urea (B). (A) Thermal denaturation of ribonuclease A was followed by changes in the intrinsic viscosity, optical rotatory dispersion (ORD) at 365 nm and ultraviolet (UV) absorbance. (B) Urea denaturation of ribonuclease T₁ was measured by changes in the circular dichroism (CD) at 238 nm, UV absorbance at 287 nm, ORD at 295 nm and fluorescence emission at 320 nm. Data from A. Ginsburg & W. R. Carroll (1965) *Biochemistry* 4, 2159, and J. A. Thomson *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 11614.

(i) Reversibilität der Denat.

Die native Konformation eines Proteins kann oft durch Entfernen der Denat.-Bedingungen wieder hergestellt werden. Die Konf.-Änderung eines Pr. bei der Denat. kann selbst nach kompletter Auffaltung der Polypeptidkette ein reversibler Prozess sein, der nur von den exp. Bedingungen und der AA-Sequenz des Pr. bestimmt wird - d.h. **ein denat. Pr. kann üblicherweise in einem Selbstassemblierungsprozess, der nur durch die AA-Sequenz bestimmt ist, in die native Konformation zurück falten.**

Dies gilt nicht, wenn die Polypeptidkette nach der Faltung chem. modifiziert wurde (z.B. Umwandlung des Proinsulins zum Insulin durch proteolyt. Spaltung der Precursor-Polypeptidkette nach Erreichen der gefalteten Konf.). Chem. Modifikationen können auch während der Denat. auftreten. Einige Pr.Gruppen (wie Cys-SH) sind extrem reaktiv und können auch leicht kovalent modifiziert werden: Reaktion mit kl. Molekülen (\Rightarrow SS), Bildung von Aggregaten. Exponierung nichtpolarer Pr.-Gruppen bei der Auffaltung führt zur Abnahme der Pr.-Löslichkeit (\Rightarrow Aggregation). Insbes. bei großen Pr. ist also die Pr.-Denat. nicht zwangsläufig reversibel!

Pr., die aus vielen Domänen bestehen, neigen dazu, wenn die Denat. noch nicht vollständig ist, intermolekular zu interagieren und Pr.-Aggregate zu bilden [statt intramolekular zu assoziieren (Fig. 11-2); ähnlich dem Domain Swapping, #200]

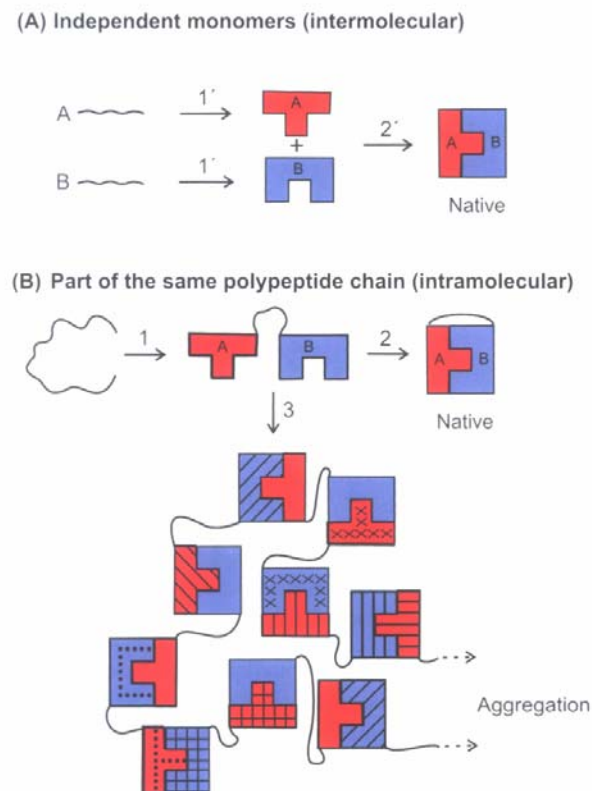


Figure 11-2. Schematic illustration of the possibility of intermolecular interactions between the folded domains of a two-domain protein. (A) The folding (step 1') and assembly (step 2') of the two domains when they are independent polypeptide chains. (B) Intermolecular interactions between the folded domains of a two-domain protein. The interactions are the same as those in (A) but they should occur intramolecularly in this case. Intermolecular interactions can happen at the midpoint of the unfolding transition, where about half the domains are unfolded, or if the association step 2 is slower than the rate of folding of the monomers, step 1. This is believed to be one reason why multi-domain proteins often precipitate upon refolding. It is similar to the phenomenon of domain swapping (Figure 9-30).

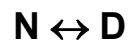
Für eine reversible Denat. sind meist spezielle Bedingungen erforderlich:

- (1) niedere Pr.-Konz., um die Tendenz des ungefalteten Pr. Aggregate zu bilden, zu minimieren,
- (2) vergrößerte elektrost. Abstoßungen zw. den Molekülen (geeigneter pH und geeignete I),
- (3) Vermeidung aller Bedingungen, die zu einer irreversiblen Reaktion mit dem Pr. führen könnten,
- (4) Verwendung von Co-Solutes, die die Löslichkeit der gefalteten Pr. vergrößern [Denat.-Mittel (DM) wie Harnstoff, GdmCl]

Die Auffaltung wird bei höheren Temp. (>70°C) in zunehmendem Maße irreversibel, ebenso bei großen Inkubationszeiten insbes. bei alkal. pH (z.B. Rearrangement von SS, Desamidierung von Asn- oder Gln-Resten).

(ii) Kooperativität der Auffaltung

Im Falle **kleiner Proteine** (<200 AA) ändern sich alle für eine Pr.-Struktur charakteristischen Parameter nahezu schlagartig mit Temp., pH, Druck oder Denat.-Konz. (Fig. 11-1, #231). In solchen Fällen scheint die **Denat. ein Einzelschritt-Prozess** zu sein, **bei dem das gesamte Protein einen einzelnen kooperativen Übergang von einem nativen Zustand, N, zu einem denaturierten, aufgefalteten Zustand, D, durchmacht**. In diesem Fall gibt es keinerlei Intermediate (partiell gefalteter Zustände) in nennenswerten Mengen, so dass die Denat. solcher Proteine im Gleichgewicht als **2-Zustandsübergang** (2-state transition, 2-Zustandsmodell, vgl. Thermodynamik: # 20, 33, 51ff.) approximiert werden kann:



d.h. die native Struktur bricht in einem Alles-oder-Nichts (all-or-none) Prozess zusammen und faltet sich ebenso zurück (Fig. 11-3, #234). Jeder partiell gefaltete Intermediat-Zustand ist instabil und \exists im Gleichgewicht nur in untergeordnetem Maße. Alle AA-Reste solcher Pr. ändern ihre Konf. gleichzeitig und kooperativ. Solche Pr. bestehen üblicherweise nur aus einer einzigen strukturellen Domäne.

Die Differenz der Gibbs'schen Freien Energie, ΔG° , zw. N und D hängt von allen exp. Parametern (Temp., Druck, Konz. des DM) ab; man misst ΔG° durch thermodynamische Analyse des Prozesses der Pr.-Denat. durch Variation eines Parameters und Fixierung der übrigen. Eine quant. Best. von ΔG° ist jedoch nur möglich, wenn der Auffaltungsprozess vollständig, reversibel und hochkooperativ ist (Bedingungen des 2-Zustandsmodells). In diesem Fall bestimmen die rel. Konz. von N und D die Gl.Gew.Konstante K der Reaktion, die letztlich ΔG° ergibt ($\Delta G^\circ = -RT \ln K$; Best. des exp. Parameters y).

Im Gegensatz dazu ist für große Pr. ein Mehrzustandsmodell charakteristisch und zeigt die Präsenz multipler Domänen an. In einigen Fällen sind die Domänen relativ unabhängig voneinander, können aus dem Pr. heraus geschnitten werden und behalten ihre gefaltete Struktur (Fig. 11-4, #235).

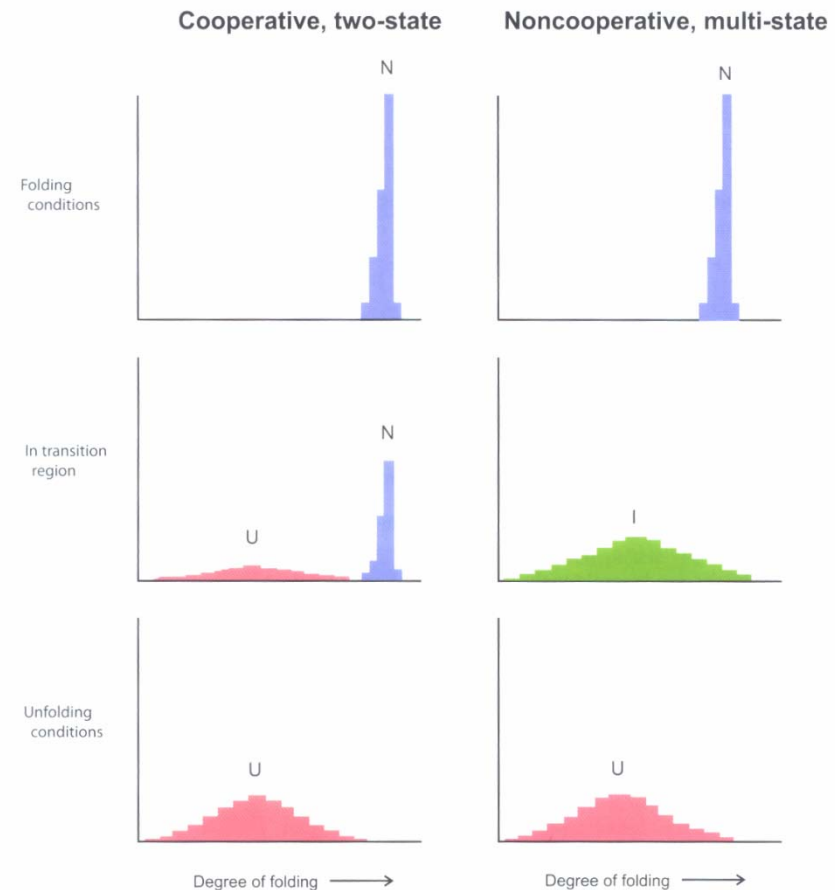


Figure 11-3. Illustration of a cooperative two-state folding transition (*left*), as normally observed with single-domain proteins, compared with a noncooperative multi-state transition (*right*). Histograms of the numbers of molecules (*vertical axis*) with different degrees of folding (*horizontal axis*) are illustrated for conditions favoring folding (*top*) and unfolding (*bottom*) and the transition region (*middle*). The folded state, N, is represented as a narrow distribution of folded conformations, the unfolded state, U, as a broad distribution of less compact conformations. Within the transition region, a two-state transition will have two distinct populations in equilibrium, similar to those at the two limiting conditions of folding and unfolding. In contrast, a noncooperative transition will have the distribution of the entire population shifted so that most molecules have intermediate partially folded conformations (I) within the transition region.

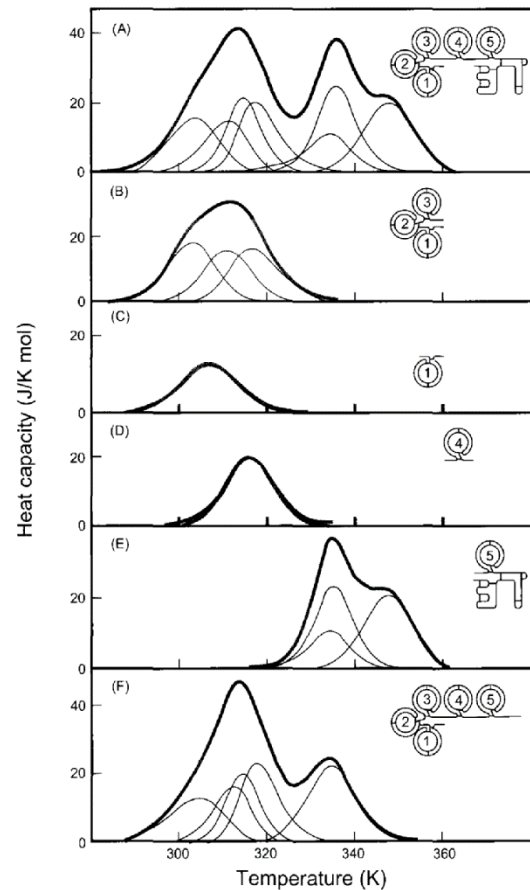


Figure 11-4. Calorimetric characterization of the thermal unfolding of plasminogen and its proteolytically liberated domains. The *thin lines* show the deconvolution of the excess heat absorption profiles into individual two-state transitions for the various domains of each of the molecules. The *inserts* show schematically the domain structures of the protein molecule used; complete plasminogen is at the *top*. Starting from the N-terminus, there are five homologous regions, labeled 1 to 5, which are known as kringle domains from their disulfide bond connectivities (Section 9.1.D.9). At the other end is a serine proteinase domain that appears to unfold as two structural domains. The first four kringle domains unfold independently, but the stabilities of the fifth kringle and of the serine proteinase domain are mutually dependent, indicating that they interact and stabilize each other. Data from V. V. Novokhatny *et al.* (1984) *J. Mol. Biol.* 179, 215–232.

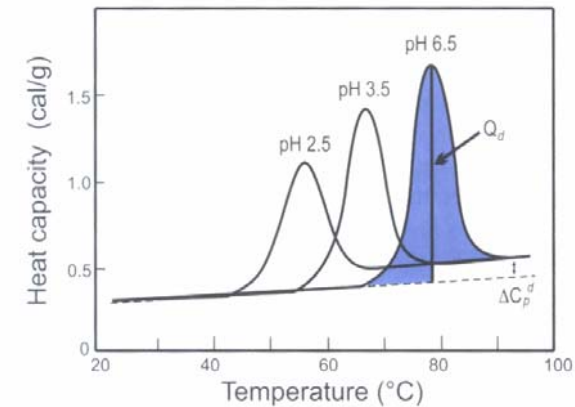


Figure 11-5. Typical unfolding of a small globular protein as a function of temperature measured calorimetrically at three different pH values. The parameter measured is the heat capacity at constant pressure (C_p) of the sample. The simplicity of each curve, with a single peak, and its shape are consistent with the protein unfolding reversibly in a single-state cooperative transition. The *shaded region* denotes the heat of the transition Q_d at a temperature of 78°C, the midpoint of the unfolding transition at pH 6.5. The difference in heat capacities of the folded and unfolded states is indicated by the *double-headed arrow* at the far right.

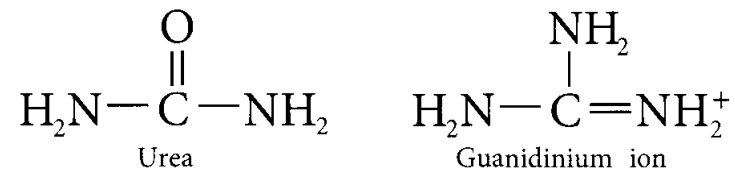
Ein einfacher Kooperativitätstest für den Denat.-Prozess besteht darin, die mittels Gleichgew.-Analyse ermittelten, effektiven thermodyn. Parameter mit wirklichen, mittels exp. Methoden bestimmten Parametern zu vergleichen. So kann das therm. Auffalten eines Pr. durch ein Differential Scanning-Kalorimeter bestimmt werden (Beispiel: Best. von C_p eines kleinen globulären Pr. bei 3 versch. pH-Werten, $\Rightarrow \Delta C_p^d$; Fig. 11-5).

Wenn ein reversibler thermischer Auffaltungsübergang tatsächlich ein 2-Zustandsübergang ist, so ist die kalorimetrisch gemessene Enthalpieänderung identisch mit der nach van't Hoff berechneten (van't Hoff Plot).

Die Kooperativität der Auffaltung zeigt, dass die gefaltete Konf. nur dann stabil ist, wenn alle stabilisierenden WW gleichzeitig vorhanden sind. Zerstörung eines Teils der Struktur erfordert und verursacht Auffaltung der gesamten Polypeptidkette.

(iii) Denaturierungsmittel (DM)

DM sind verschiedene Co-Solutes, die Pr. denaturieren. Die gebräuchlichsten sind Harnstoff (Urea) und Guanidiniumchlorid (GdmCl):



Die meisten Pr. denaturieren in konz. Lösungen dieser Verbindungen (bis 8 M) und bleiben auch löslich. Die Abhängigkeit der Pr.-Konf. von der DM-Konz. ist die einfachste und gebräuchlichste Methode zur quant. Best. der Pr.-Stabilität. Konz. Lösungen dieser DM verursachen auch vollständigste Auffaltung der Polypeptidketten. Obwohl es dafür keinen offensichtlichen Grund gibt, ändert sich der app. Wert für ΔG° linear mit der DM-Konz.: $\Delta G^{\text{app}} = \Delta G^\circ - m [D]$ (vgl. #52). Der Wert für m ist der dem LM zugänglichen Oberfläche des Pr. bei der Auffaltung proportional.

Harnstoff ist nur ein destabilisierendes Agens, während **GdmCl** eine zweifache Rolle hat: in hohen Konz. destabilisiert es den nativen Pr.-Zustand, während es in niederen Konz. stabilisiert. Ursache: GdmCl ist (im Gegensatz zu Harnstoff) ein Salz, so dass seine Konz.-Zunahme auch eine Zunahme der Ionenstärke I der Lösung verursacht (was die elektrost. WW innerhalb von Pr. reduziert und diese deshalb destabilisiert).

Wenn bei Variation der GdmCl-Konz. und Zugabe von Neutralsalzen die Ionenstärke der Lösung konstant gehalten wird, wird die Pr.-Stabilität direkt proportional zur GdmCl-Konz. gefunden. Die mittels der Gl. $\Delta G^{app} = \Delta G^\circ - m [D]$ gefundene Pr.-Stabilität in Abwesenheit von DM ist in Übereinstimmung mit anderen Abschätzungen für ΔG° .

Der **Wirkungsmechanismus dieser DM** ist nicht vollständig klar, es scheinen jedoch 2 Mechanismen zu überwiegen. (1) DM erhöhen die wässr. Löslichkeit kleiner nichtpolarer Moleküle und nichtpolarer Seitenketten, die die kompakten Kerne globulärer Pr. bilden (Fig. 11-6). (2) Diese DM sind hochpolar; sie besitzen viele Gruppen, die HB bilden können. Sie scheinen die Struktureigenschaften des flüssigen Wassers zu zerstören; sie können HBs mit polaren Pr.-Gruppen (bes. Peptid Gr.) bilden.

Kalorimetrische Untersuchungen zeigen, dass Harnstoff und GdmCl mit Pr. sowohl im gefalteten wie im aufgefalteten Zustand interagieren. Mit zunehmender Temp. dissoziieren beide DM vom Protein ab.

Durch eine Analyse der kalorimetrischen Daten können Anzahl der Bindungsstellen und Bindungskonstante erhalten werden.

Spezif. WW von Harnstoff mit polaren Gr. an der Pr.-Oberfläche wurden mittels Röntgenkristallografie nachgewiesen.

Jedes Harnstoff- oder GdmCl-Molekül interagiert gleichzeitig mit versch. Pr.-Gruppen (Bildung multipler HBs).

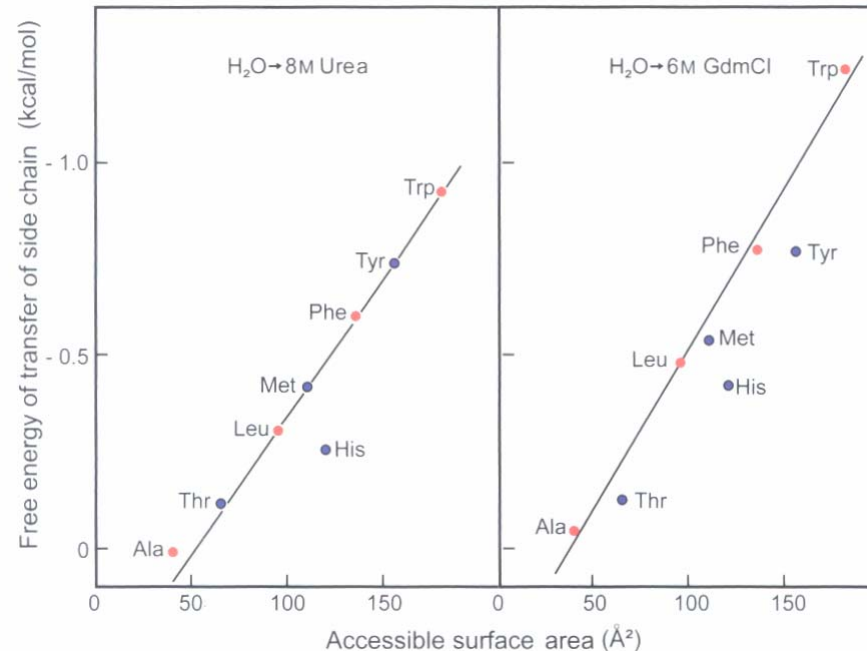


Figure 11-6. Correlation between the accessible surface areas of the amino acid side-chains and their free energy of transfer from water to either 8 M urea or 6 M GdmCl. The *solid lines* have slopes of 7.1 and 8.3 cal/mol/Å², respectively, but note that they do not pass through the origin. Residues indicated by *blue circles* have polar groups on their side-chains. Data from T. E. Creighton (1979) *J. Mol. Biol.* **129**, 235–264.

Die Denat.-Wirksamkeit der Gdm-Salze wird gemäß den Hofmeister'schen Reihen (#114) durch die Natur ihrer Anionen bestimmt. GdmSCN ist potenter als GdmCl, während $(\text{Gdm})_2\text{SO}_4$ tatsächlich Pr. stabilisiert (Fig. 11-7). Der Stabilisierungseffekt des Sulfations ist größer als der destabilisierende Effekt des Gdm-Ions. Andere Salze beeinflussen die Stabilität der gefalteten Pr. entsprechend ihrer Stellung in den Hofmeister Reihen (Fig. 11-8).

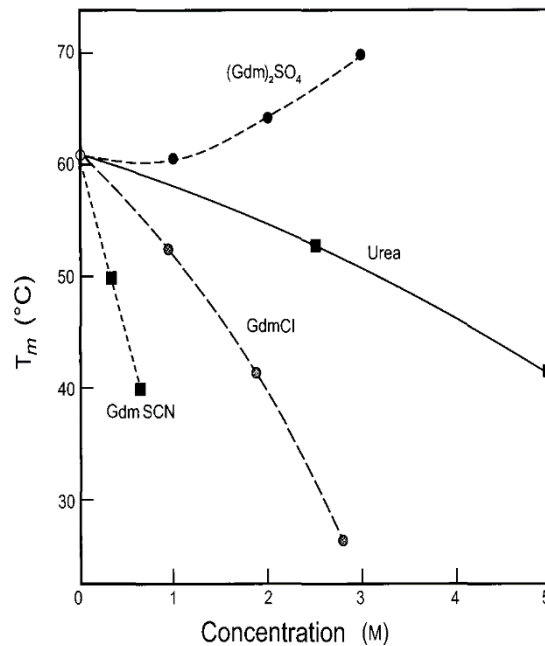


Figure 11-7. Thermal stability of ribonuclease A as a function of the concentration of urea and various guanidinium (Gdm^+) salts. The stability is expressed as the temperature at the midpoint of the thermal unfolding transition, T_m . Data from P. H. Von Hippel & K.-Y. Wong (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 3909–3923.

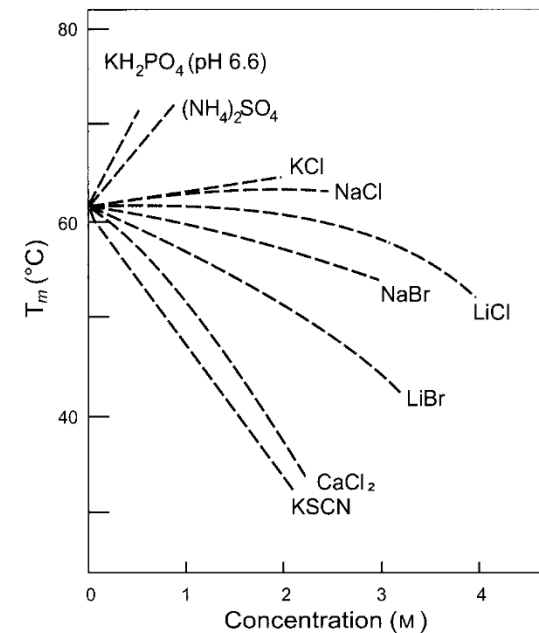


Figure 11-8. The effects of salts of the Hofmeister series on the thermal stability of ribonuclease A. Data from P. H. Von Hippel & K.-Y. Wong (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 3909–3923.

(iv) Hitzedenaturierung

Gesteigerte thermische Bewegung bei höheren Temp. kann zu einem Aufbrechen der nativen Pr.-Konf. führen. Bei kleinen glob. Pr. erfolgt dies in einem engen Temp.-Bereich und ist offenbar ein 2-Zustands Übergang (Fig. 11-1, #231).

Wenn die Auffaltung durch erhöhte Temp. induziert wird, ist sie von einer Zunahme der Enthalpie und Wärmeabsorption begleitet. Die Thermodynamik der Wärmedenaturierung kann durch Scanning Mikrokolorimetrie als intensiver Peak der Wärmeabsorption gemessen werden (Fig. 11-5, #235).

Bei einem 2-Zustandsübergang gibt es bei der Schmelztemp. T_m gleich große Konz. an gefalteten und ungefalteten Zuständen, die Gl.Gew.-Konstante hat den Wert 1 und die Änderung der freien Energie $\Delta G(T_m)$ ist 0.

Die partielle Wärmekapazität des denat. Pr. ist 25-50% größer als jene des nativen Zustandes - vermutlich durch das Freilegen von mehr nichtpolaren Gr. dem Wasser gegenüber verursacht. Die Größe der Wärmekapazitätzunahme ΔC_p ist ungefähr der nichtpolaren (in der nativen Konf. vergrabenen und bei der Auffaltung LM-exponierten) Oberfläche proportional (Fig. 11-9).

Eine Konsequenz der Wärmekapazitätsänderung ist die Tatsache, dass Enthalpie und Entropie der Denat. Temp.-abhängig sind. Dies führt zu einer komplexen Thermodynamik des Auffaltungsübergangs und kann auch eine Denat. bei niederen Temp. erzeugen (nächstes Kapitel).

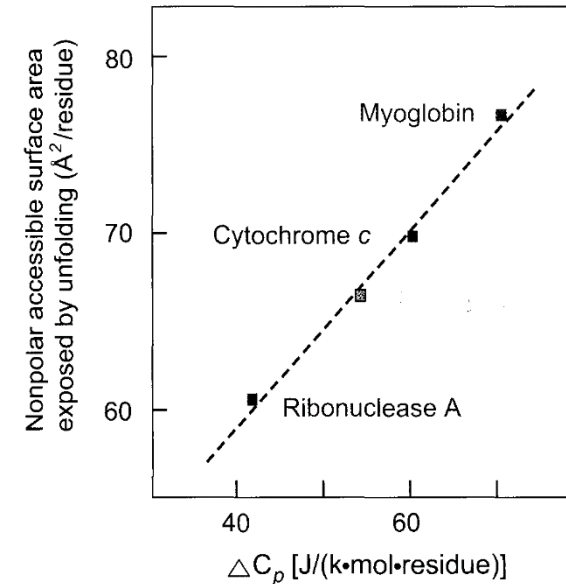


Figure 11-9. Relationship between the measured change in heat capacity per residue upon unfolding of several proteins and the nonpolar surface area buried within the interior of the protein and assumed to be exposed to solvent upon unfolding. Note that the relationship is not one of direct proportionality, in that it does not extrapolate to the origin. Data from P. L. Privalov & G. I. Makhatadze (1990) *J. Mol. Biol.* **213**, 385–391.

(v) Kältedenaturierung

Einige Enzyme werden in wässr. Lösg. (in Abwesenheit von Harnstoff oder GdmCl) bei niederen Temp. (ca. 0°C) inaktiviert, ihre Aktivitäten werden jedoch bei RT wieder hergestellt. Die meisten dieser Pr. sind oligomer; die Kälte-Inaktivierung wird vermutlich durch eine Dissoz. in Untereinheiten verursacht. Die Qu.Struktur von Pr. ist gewöhnlich weniger stabil als ihre Tert.Struktur. Sogar kleine Modellproteine scheinen bei niederen Temp. reversibel aufzufalten.

Das Auffalten bei niederen Temp. zeigt gegenläufige thermodynam. Charakteristika als bei hohen Temp., d.h. bei der Auffaltung bei niederen Temp. wird Wärme abgegeben, während bei der Auffaltung bei hohen Temp. Wärme aufgenommen wird (Fig. 11-10); für ΔC_p gilt dasselbe. Der Kälte-denat. Zustand erscheint ziemlich kompakt zu sein, wenn gleich die Teilchen-Dimensionen mit abnehmenden Temp. etwas abnehmen.

Das große ΔC_p der Pr.-Auffaltung ist für die Kälte-Denat. verantwortlich. Es führt zu einer Temp., bei der die Stabilität des gefalteten Zustandes ein Maximum ist (Fig. 11-11) und die Netto-Stabilität sowohl bei höheren wie bei niederen Temp. abnimmt.

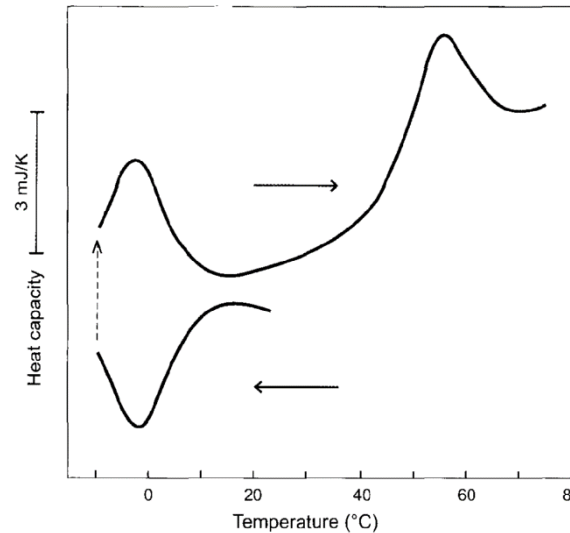


Figure 11-10. Unfolding of apomyoglobin at both high and low temperatures measured calorimetrically. In the *lower trace*, folded apomyoglobin at room temperature was cooled to -10°C. The trough in the heat capacity is caused by the release of heat upon unfolding at -6°C. The cooled solution was then warmed, to produce the *upper trace*. The peak at -6°C corresponds to the uptake of heat as the apomyoglobin refolds. This is followed by a second peak of heat uptake as the protein unfolds above 50°C. Data from Y. Griko *et al.* (1988) *J. Mol. Biol.* **202**, 127-138.

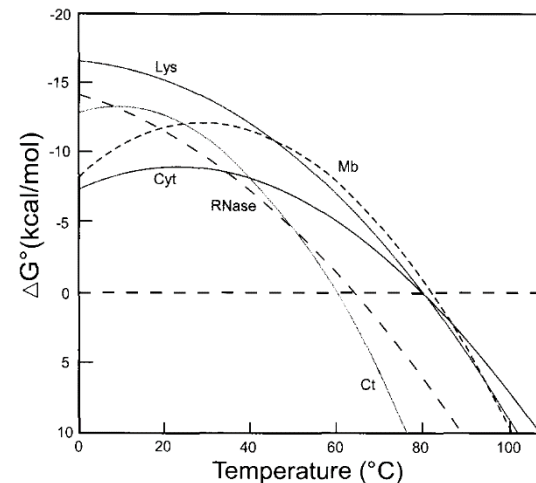


Figure 11-11. Temperature dependence of the difference in free energy between the folded and unfolded states of several proteins, expressed per mole of protein. Lys, hen lysozyme; RNase, ribonuclease A; Mb, metmyoglobin; Ct, α -chymotrypsin; Cyt, cytochrome *c*. The pH of each solution was that at which the protein is most stable. Data from P. L. Privalov & N. N. Khechinashvili (1974) *J. Mol. Biol.* **86**, 665-684.

Von allen Pr. mit einem großen ΔC_p der Auffaltung kann man erwarten, dass sie bei hohen und tiefen Temp. auffalten, wenngleich die Auffaltung bei niederen Temp. nur unter best. Bedingungen (zugängl. Temp.-Bereich) auftritt (Fig. 11-12).

Die Temp. der Kälte-Denat. ist für Pr. mit dem größten ΔC_p der Auffaltung am größten – das sind die Pr., die den größten Anteil nichtpolarer Oberfläche exponieren. Durch geeignete Wahl von pH, I, Puffer und Anwesenheit von DM kann die Temp. der Kälteinaktivierung signifikant vergrößert werden; nur in diesen Fällen tritt Kälte-induzierte Auffaltung bei Temp. über 0° auf.

Die gegenläufigen Werte von ΔH und ΔS bei der Auffaltung bei hohen und niederen Temp. sind einfach eine Konsequenz des großen ΔC_p . Die Kälte-induzierte Auffaltung kann als Resultat der bei niederen Temp. zunehmenden Tendenz des geordneten Wassers, die nichtpolaren Pr.-Oberflächen, die bei der Auffaltung exponiert werden, zu solvatisieren, angesehen werden (was gleichzeitig die Größe des hydrophoben Effektes bei niederen Temp. verringert).

(vi) pH Denaturierung

Viele Pr. denaturieren bei pH-Werten <5 oder >10. Im Falle kleiner Eindomänen-Pr. tritt in einem engen pH-Bereich eine reversible Auffaltung auf, z.B. ändert Staphylococccen Nuclease den Zustand von total gefaltet zu total aufgefalt, wenn der pH nur um 0.3 Einheiten geändert wird (Fig. 11-13, #242):

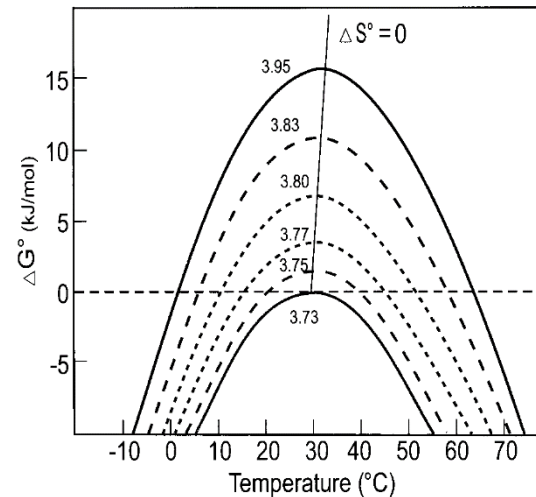


Figure 11-12. The Gibbs free energy difference between the denatured and native states of metmyoglobin in acetate buffer solution at the pH values indicated on the curves. Under these conditions, the protein cold denatures within the temperature range 0–30°C. Each curve is at a maximum when the entropy of unfolding is zero. Adapted from P. L. Privalov *et al.* (1986) *J. Mol. Biol.* **190**, 487–498.

Solch ein abrupter Übergang kann nicht durch Titration einer einzelnen ionisierbaren Gruppe verursacht sein; das würde 2 pH-Einheiten erfordern, um die Ionisation von 9 auf 91 % zu bringen! Der abrupte Auffaltungs-Übergang zeigt eher einen sehr kooperativen Übergang unter Beteiligung vieler ionisierbarer Gr. an. Die pH-induzierte Denaturierung wird von einer Protonen-Abgabe oder Aufnahme begleitet.

Die Auffaltung bei pH-Extrema tritt auf, da das gefaltete Pr. viele Gr. hat, die in nichtionisierter Form vergraben sind, aber nach Auffaltung ionisiert werden können, insbes. His- und Tyr-Reste, die bei saurem und alkal. pH die Auffaltung verursachen können.

Die elektrostat. Abstoßung zw. ionisierten Gr. an der Pr.-Oberfläche kann ebenfalls die Auffaltung bewirken (da solche Abstoßungen im aufgefalteten Zustand verkleinert würden). Obwohl Pr. dazu neigen, nahe dem I.P. sehr stabil zu sein, gibt es kaum Evidenz, dass Abstoßungen zw. Gr. mit derselben elektrostat. Ladung ausreichend sind, eine Auffaltung zu erzeugen, insbes. hat die Umkehr der Nettoladung der wesentl. Gr. keinen gravierenden Einfluss auf die Pr.-Stabilität.

Spezif. Salzbrücken zw. ionisierten Gr. können in einigen Fällen wesentlich zur Stabilität des gefalteten Zustandes beitragen und können ebenfalls bei pH-Extrema (bei denen eine der Gr. nicht länger ionisiert ist) zerstört werden.

Die pH-induzierte Auffaltung hängt von der Temp. ab bzw. die Temp.-induzierte Denaturierung hängt vom pH ab (linked functions). Die Differenz der Gibbs'schen Freie Energie, $\Delta G^\circ(\text{pH})$, zw. nativem und denaturiertem Zustand kann aus der pH-Abhängigkeit der Protonierungsdifferenz zw. den 2 Zuständen bestimmt werden.

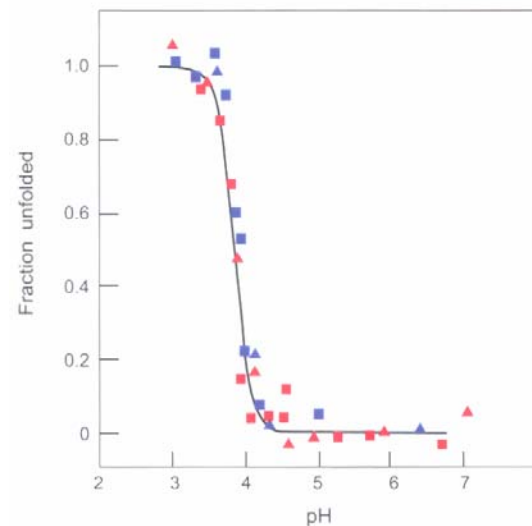


Figure 11-13. The acid-induced unfolding of staphylococcal nuclease A, measured by viscosity (*squares*) and CD at 220 nm (*triangles*). The *red* symbols were measurements made during acidification, the *blue* symbols upon raising the pH. Data from C. B. Anfinsen (1972) *Biochem. J.* **128**, 737–749.

Die pH-induzierte Auffaltung kann als 2-Zustandsübergang angesehen werden.

Die pH-Denat. von Pr. wird von signifikanten Wärme-Effekten begleitet (Fig. 11-14). Die Enthalpie pH-induzierter Pr.-Übergänge scheint mit der Enthalpie Temp.-induzierter Übergänge identisch zu sein und zeigt dieselbe Art der Temp.-Abhängigkeit. Somit zeigt die pH-induzierte Pr.-Denat. eine Wärmekapazitätszunahme die ähnlich jener ist, die bei Temp.-induzierter Denaturierung beobachtet wird.

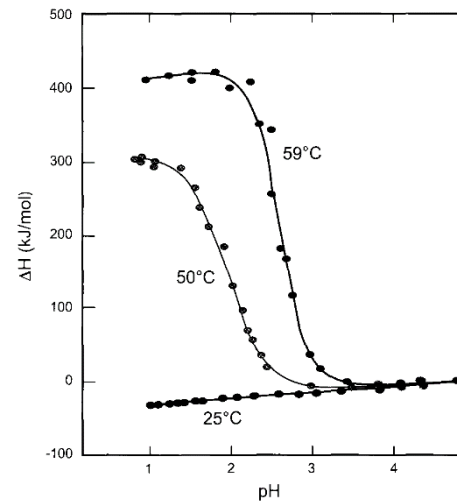


Figure 11-14. Enthalpy change of lysozyme upon acid-induced unfolding. The native protein was transferred from pH 4.8 to the indicated acidic pH values, at constant temperature. At 298 K (25°C) the protein remains folded at all pH values, but it unfolds at low pH at the higher temperatures. Data from W. Pfeil & P. L. Privalov (1976) *Biophys. Chem.* 4, 23–32.

(vii) Denaturierung durch hohe Drücke

Pr. sind gegenüber Druck nicht bes. empfindlich; sie sind sehr inkompressibel (#228); sie scheinen erst bei sehr hohen Drücken (> 2kbar) aufzufalten.

Die Druck-induzierte Pr.-Denat. findet in einem engen Druck-Bereich statt - abhängig von Temp., LM-Bedingungen, insbes. pH (Fig. 11-15). Umgekehrt hängen Temp. und pH, bei denen Denat. stattfindet, vom Druck ab.

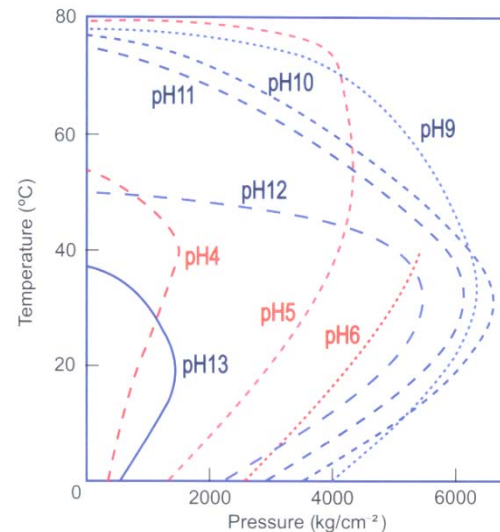


Figure 11-15. Pressure-denaturation of myoglobin at various temperatures and pH values. Isobars of its half-conversion to the denatured state are shown in the pressure–temperature plane at various pH values. At low pressures, to the left of each curve, the protein is folded, whereas it is predominantly unfolded at higher pressures. The protein is more easily denatured by high pressure at pH values more acidic or more basic than neutrality. Data from A. Zipp & W. Kauzmann (1973) *Biochemistry* 12, 4217–4228.

Diese 3 Parameter (Temp., pH, Druck) sind gegenseitig voneinander abhängig (interdependent); d.h. Variation einer Größe, bei Fixierung der restlichen Größen, kann zu einer Auffaltung der nativen Pr.-Struktur führen.

Druck-induzierte Denat. ist vermutlich ebenfalls ein kooperativer 2-Zustands-Übergang, obwohl es in diesem Fall auch gegenteilige Befunde gibt. Druck-denat. Pr. scheinen mehr Reststruktur zu besitzen als durch Wärme, pH oder DM bewirkte. Im Falle oligomerer Pr. ist der erste Schritt wiederum eine Dissoziation in Untereinheiten, gefolgt vom eigentlichen Auffaltungsprozess.

Die Druckzunahme verursacht eine Verschiebung der Gleichgewichtslage bzw. eine Volumsabnahme. Die Volumenänderung ist bei RT sehr klein (10-100 ml/mol). Das Innere eines glob. Pr. kann nicht mit einem Öltröpfchen oder einem festen Kohlenwasserstoff verglichen werden, da das Innere eines nativen Pr. zwar dicht gepackt ist, aber mitunter noch Kavitäten oder lose Teile aufweist (#228) und die Druck-Zunahme zu einem Füllen der Kavitäten und letztlich zu einem Zusammenbruch der Pr.-Struktur führt.

(viii) Aufbrechen von Disulfidbrücken

Viele Pr., die SS-Bindungen zw. Cys-Resten besitzen (#152), brauchen diese zur Stabilisierung ihrer gefalteten Konf.; das Pr. wird erst nach Bruch der SS-Bindungen auffalten. Dies kann reduktiv oder oxidativ erfolgen. Die Auffaltung durch **Reduktion der SS-Bindungen** wurde extensiv untersucht (Umkehrung der Disulfid-gekoppelten Pr.-Rückfaltung; siehe später: #262).

Das Aufbrechen der versch. SS-Bindungen in einem Pr. hängt von deren Position in der gefalteten Pr.-Struktur und deren Stabilitäten ab. SS-Bindungen an der Pr.-Oberfläche sind sehr schwach und dem Red.-Mittel leicht zugänglich; sie werden als erste reduziert.

Die Reduktion von SS-Bindungen, die für die gefaltete Konf. essentiell sind, ist üblicherweise ein kooperativer Prozess.

Der Vorteil der Verwendung der SS-Bindungen besteht darin, dass der Auffaltungsprozess unter denselben Bedingungen studiert werden kann wie das SS-Brücken verknüpfte, stabile Pr.; es bedarf keinerlei DM, nur das Red.-Mittel wird benötigt.

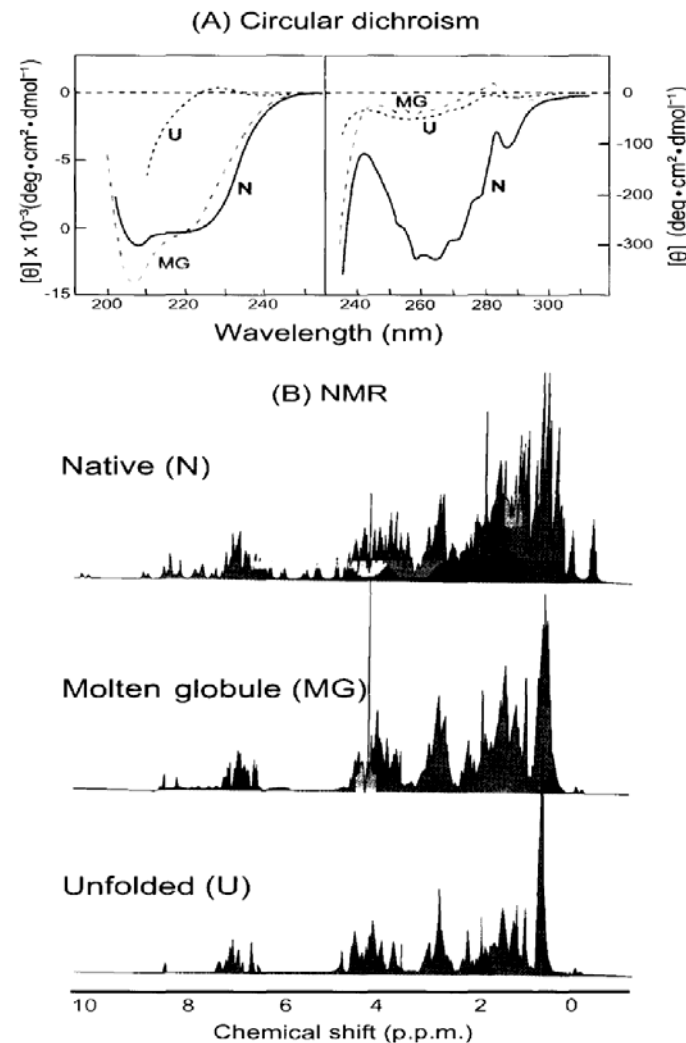
2. Aufgefaltete Proteine

Die gefalteten Konf. von Pr. sind gut charakterisiert (#178), die durch versch. Denat.-Arten aufgefalteten Zustände jedoch weniger gut. Die Vollständigkeit der Auffaltung der Polypeptidkette wird kontrovers diskutiert.

Die ideal voll aufgefaltete Polypeptidkette würde ein Random Coil (RC) sein, bei dem die konformationellen Eigenschaften eines jeden Restes unabhängig von allen anderen Resten sind. Die Charakterisierung ist auch wegen der schnellen Umwandlung versch. Konformere schwierig: Kristallografie ist nicht anwendbar; auch NMR ist nicht aussagekräftig (Fig. 11-16); es gibt kein θ -LM (theta-LM, das WW eliminiert) für aus 20 AA bestehende Polypeptidketten.

Spektroskop. Untersuchungen legen eine Poly(Pro)II-ähnliche Konf. nahe (#169).

Aufgefaltete Pr. haben viel größere molekulare Dimensionen als die gefalteten Formen von Pr.



Spektrale Eigenschaften von α -Lactalbumin:

N: nativ (pH 7)

MG: Molten Globule (pH 2)

U: vollständig aufgefaltet (pH 2 + 6 M GdmCl)

Figure 11-16. Spectral properties of the native, molten globule, and fully unfolded states of α -lactalbumin. (A) CD spectra at 4.5°C in the far-UV and near-UV regions of bovine α -lactalbumin in the native state at pH 7.0 (N), the molten globule at pH 2.0 (MG) and the fully unfolded state in 6 M GdmCl at pH 2.0 (U). Data from K. Kuwajima *et al.* (1985) *Biochemistry* 24, 874–881. (B) ^1H NMR spectra at 52°C of guinea-pig α -lactalbumin in the following states: native at pH 5.4, molten globule at pH 2.0 and fully unfolded at pH 2.0 in 9 M urea. Data from J. Baum *et al.* (1989) *Biochemistry* 28, 7–13.

Im Allgemeinen wird angenommen, dass Pr. in konz. Lösungen von Harnstoff oder GdmCl am besten aufgefaltet werden, da diese Co-Solutes signifikant die intrinsischen Viskositäten $[\eta]$ von Pr. bei RT vergrößern und bei CD-Messungen die Elliptizität bei 220 nm nahezu auf 0 verringern (wie für ein RC zu erwarten ist). Die Viskosität ist ein Maß für das hydrodynamische Volumen der Polypeptidkette, während das CD-Signal bei 220 nm die helikale Struktur widerspiegelt (siehe Vorlesung im WS). Die Durchschnitts-Dimensionen der meisten chem. denaturierten Pr. sind von einem RC-Ensemble nicht unterscheidbar (Zunahme mit der 0.598ten Potenz der Polypeptid-Kettenlänge – im Vergleich zur 0.588ten Potenz bei idealem RC).

Die am wenigsten aufgefalteten Pr. sind die bei hohen Temp. thermisch aufgefalteten Pr.; Messungen von ΔC_p deuten ebenfalls darauf hin, dass die Auffaltung durch DM weitergehend als die Temp.-induzierte Auffaltung geht.

Andererseits nehmen die intrinsischen Viskositäten der aufgefalteten Polypeptidkette mit steigender Temp. signifikant ab (Fig. 11-17). Dies scheint die Primär-Reaktion zu sein, warum $[\eta]$ eines Hitze-denat. Pr. (gemessen bei hohen Temp.) wesentlich niedriger ist als in konz. Lösungen von GdmCl oder Harnstoff (gemessen bei RT).

Die CD-Elliptizität von Pr. in konz. Lösungen von DM hängt ebenfalls von der Temp. ab; sie ist bei hohen Temp. ähnlich der der Hitze-denat. Pr. in Wasser.

Mit steigender Temp. neigen Denat.-Moleküle dazu, vom Pr. abzu-dissoziieren und Wärme zu absorbieren (was den Wert für das app. ΔC_p vergrößert). Wenn man dies in Rechnung setzt, resultieren ähnliche Werte für ΔC_p bei DM und Temp. Zunehmende Temp. führt dazu, dass Polypeptidketten in Lösungen von DM sich dem RC-Zustand nähern (Zunahme der therm. Bewegung, Abdissoziation der gebundenen Denat.-Moleküle).

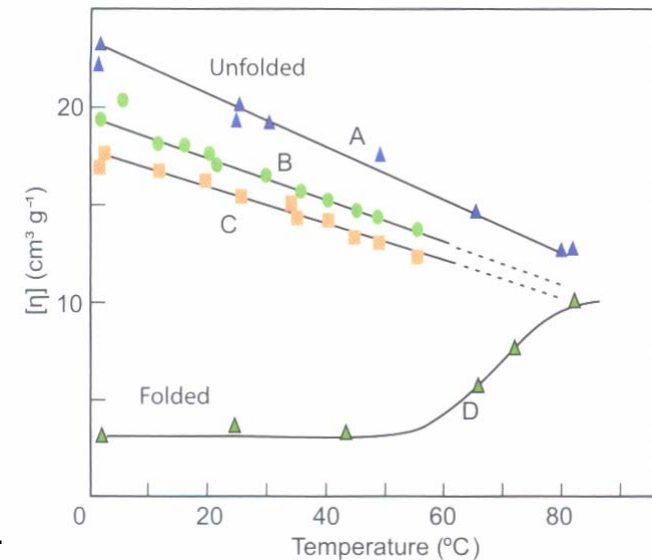


Figure 11-17. Temperature-dependence of the intrinsic viscosity of proteins that are folded at low temperatures and undergo thermal unfolding transitions (D) compared with those that are unfolded at all temperatures (A-C). (A) apomyoglobin and myoglobin at pH 3.0; (B) lysozyme without disulfide bonds at pH 2.2; (C) ribonuclease A without disulfide bonds at pH 2.2; (D) myoglobin at pH 5.0. Data from P. L. Privalov *et al.* (1989) *J. Mol. Biol.* **205**, 737–750.

Die kalorimetrisch gemessenen Enthalpien für die Auffaltung kleiner glob. Pr. durch GdmCl, Säure und Temp. legen nahe, dass die Enthalpie der Auffaltung eine Funktion der Temp. ist.

Der denat. Zustand eines kleinen Ein-Domänen Pr. kann üblicherweise als Referenz für den aufgefalteten Zustand (Erreichen des idealen RC-Zustandes) angesehen werden. Bei großen Polypeptidketten (bestehend aus mehr als einer strukturellen Einheit oder Subdomäne) ist die Situation weniger klar. In diesen Fällen ist der denat. Zustand nicht immer voll aufgefaltete (eine oder mehrere Subdomänen neigen dazu, ihre native Struktur zu behalten; der Auffaltungsübergang ist kein reiner 2-Zustandsübergang).

Polypeptidketten, die einfach durch Bruch der (für die Stabilität der gefalteten Konf. verantwortlichen) SS-Bindungen aufgefaltete wurden, sind einfach zu untersuchen, da hierzu keinerlei DM benötigt werden bzw. die Untersuchung des gefalteten und aufgefalteten Zustandes unter denselben Bedingungen durchgeführt werden kann. Die meisten Untersuchungen dieser Art zeigen an, dass die reduzierten Formen der kleinen Modell-Pr. (wie BPTI, RNase A) RCs gut approximieren.

Viele Auffaltungs- und Stabilitäts-Analysen werden an kovalent (meist SS) verknüpften Pr. durchgeführt. Wenn diese Cross-Links nicht bei der Auffaltung aufgebrochen werden, bestehen sie auch noch in den aufgefalteten Pr., so dass die Pr. keinesfalls vollständig aufgefaltete sind!!!

Einige wenige Pr. sind als **nativ aufgefaltete Pr. (natively unfolded proteins)** bekannt, da sie sogar unter physiol. Bedingungen aufgefaltete sind! Nur nach Interaktion mit anderen Molekülen nehmen sie gefaltete Konf. ein und werden erst dann funktionsfähig. In diesem Fall ist also die Faltung an die Bindung eines Liganden gekoppelt. Die Ursachen dafür sind unbekannt, obwohl einige dieser Pr. physiologisch höchst bedeutend sind. *Beispiele:* Nukleoporeine (Teile der nuklearen Poren), und *tau* Pr. (das die Organisation neuronaler Mikrotubuli regelt, aber auch in hohen Konz. im neurofibrillären Wirrwarr bei Alzheimer oder bei anderen neurodegenerativen Funktionsstörungen gefunden wird).

Viele nativ aufgefaltete Pr. sind in kritischen Schritten des Zell-Cyclus und regulatorischen Prozessen involviert. Möglicherweise ermöglicht erst die Annahme einer gefalteten Struktur (nach WW mit einem Liganden) die WW mit mannigfaltigen Zielen.

Der Molten Globule (MG) Zustand

Der Molten Globule Zustand (molten globule = geschmolzenes Kügelchen) (#39 und 245) ist ein Konf.-Zustand, der ein Intermediat zw. nativem und aufgefaltetem Zustand **gewisser glob. Pr.** darstellt. Er wird häufig unter eher milden Denat.-Bedingungen [z.B. leicht saurer pH, oder als kurzlebige (transient) kinetische Intermediat-Spezies, die beim Transfer vom aufgefaltetem Zustand zu Rückfaltungsbedingungen gebildet wird] beobachtet.

Charakteristika des MG-Zustandes: (1) nativ-ähnl. Gehalt an Sek.Str., (2) Abwesenheit einer normalen Tert.Str., (3) relativ kompakte Gesamtstruktur des Pr.-Moleküls (mit einem Radius der nur 10-30% größer als der des nativen Zustandes ist), (4) locker gepackter hydrophober Kern, der dem LM gegenüber zugänglich ist, (5) eine - verglichen mit dem gefalteten Zustand - vergrößerte Kompressibilität (im Gegensatz zum voll aufgefalteten Zustand, der weniger kompressibel ist). Zusammenfassend: Der MG-Zustand charakterisiert ein kompaktes Kügelchen mit einer 'geschmolzenen' Seitenketten-Struktur, die primär durch nichtspezif. hydrophobe WW stabilisiert wird. Abgesehen davon ist alles andere ungewiss.

Der MG-Zustand wird durch ein nativ-ähnl. CD-Peptid-Spektrum unterhalb von 250 nm sowie durch ein CD-Spektrum zw. 250 und 320 nm ähnlich dem aufgefalteter Pr. charakterisiert (Fig. 11-16 A, #245). Ersteres deutet auf die Anwesenheit eines nativ-ähnl. Gehalts an Sek.Str. hin, während Letzteres einen Mangel an spezif. Packung der arom. Seitenketten indiziert. Einige H-Atome des Peptid-Rückgrats werden vor einem H-Austausch mit dem LM geschützt – wohl infolge der Sek.Struktur (aber weniger geschützt als im nativen Zustand).

Das NMR-Spektrum des MG ist dem aufgefalteten Pr. ähnlicher und bestätigt die Abwesenheit einer spezif. Tert.Struktur (Fig. 11-16 B, #245). Im MG-Zustand gibt es offensichtlich Konf.-Fluktuationen.

Hydrophobe Fluoreszenz-Farbstoffe, die an die LM-zugängliche hydrophobe Oberfläche des Pr.-Moleküls binden, wie 8-Anilidonaphthalin-1-sulfonat (ANS), binden an das MG stärker als an die voll gefalteten oder aufgefalteten Pr.-Formen.

In einigen Fällen (Carboanhydrase, α -Lactalbumin) kann der MG-Zustand bei Intermediat-Konz. eines starken DM (2 M GdmCl) beobachtet werden. Auch die sauren und basischen Auffaltungsübergänge dieser Pr. weisen einen MG-Zustand auf. Im Gegensatz dazu haben viele andere glob. Pr. bei der Auffaltung durch DM oder pH-Extrema einen kooperativen 2-Zustandsübergang (ohne Auftreten irgendwelcher signifikanter Intermediat-Anteile).

Die sauren und basischen Auffaltungsübergänge bei Cytochrom c, Apomyoglobin und β -Lactamase erzeugen einen extensiver aufgefalteten Zustand und die Zugabe von Salz faltet das Pr.-Molekül vom aufgefalteten in den MG-Zustand zurück. Die Salz-induzierte Rückfaltung des MG-Zustandes wird durch die Bindung von Gegen-Ionen an das Pr.-Molekül verursacht (Eliminierung von elektrost. Abstoßungen zw. den geladenen Gr.).

Der MG-Zustand kann auch durch hydrostat. Drücke, Alkohole, Entfernen von gebundenen Metall-Ionen von Metall-Ionen-bindenden Pr. (z.B. Entfernen des gebundenen Ca^{2+} beim Apo- α -Lactalbumin) erzeugt werden. Ob der MG-Zustand als stabiles Intermediat detektierbar ist oder nicht, hängt von seiner Stabilität relativ zum nativen und aufgefalteten Zustand ab.

Der MG-Zustand kann auch als kinetisches Intermediat während der Rückfaltung einiger Pr. beobachtet werden.

Ob der MG-Zustand ein thermodynamischer Zustand ist (vergleichbar dem aufgefalteten und gefalteten Zustand), ist letztlich bisher nicht beantwortbar.

Konformationsgleichgewichte in Polypeptid-Fragmenten

Irgendeine Nichtzufalls-Konf. (nonrandom conformation), die in Fragmenten von Polypeptidketten vorhanden ist, müsste auch in aufgefalteten Pr. vorhanden sein, falls nicht andere Teile des intakten Pr. damit interagieren.

3. Proteinstabilität

Wie gelingt es Pr., eine spezif. gefaltete Konf. anzunehmen und aufrecht zu halten (verglichen mit der Vielzahl von Konf., die der aufgefaltete Zustand umfasst)? Eine Messmöglichkeit besteht darin, die Differenz der Gibbs'schen Freien Energie zw. aufgefaltetem (denaturiertem) und nativem Pr.-Zustand zu bestimmen, während irgendeine Bedingung (x), die die Auffaltung bewirkt, variiert wird. Der für $\Delta G^\circ(x)$ bestimmte Wert kann nur in der Denat.-Übergangszone gemessen werden, wo die Konz. von N und U gemessen werden und der Wert unter physiol. Bedingungen durch Extrapolation bestimmt wird. Nur im Falle der therm. und pH-Denat. kann die Extrapol. exakt ausgeführt werden, da die funktionelle Abhängigkeit der ΔG° -Werte von Temp. und pH exp. bestimmt werden kann. Daneben \exists auch die empir. (lineare) Abhängigkeit des ΔG° von Harnstoff- und GdmCl-Konz. (#52, 236).

Die gefalteten Konf. der meisten Pr. sind selbst unter optimalen Bed. nicht sehr stabil. Die Freie Energie des gefalteten Zustandes ist meist nur 5-15 kcal/mol (20-60 kJ/mol) geringer als jene des aufgefalteten Zustandes. D.h. selbst unter optimalen Bedingungen herrscht eine gewisse Wahrscheinlichkeit dass Moleküle vollständig entfaltet werden. Größere Moleküle sind nicht notwendigerweise stabiler als kleine.

Die komplette thermodyn. Charakterisierung des Proteins Lysozym (Fig. 11-19, #251 A-D) zeigt die Komplexität der physikal. Basis der Pr.-Struktur: die **beobachtete Netto-Stabilität des gefalteten Zustandes besteht in der sehr kleinen Differenz zw. sehr großen, aber einander kompensierenden, höchst individuellen Faktoren**. So sind z.B. die Enthalpien und Entropien (A-B) sowohl des gefalteten wie auch des ungefalteten Zustandes sehr Temp.abhängig (wie aus ihren Wärmekapazitäten folgt), aber Enthalpie und Entropie ändern sich in ähnlicher Weise und kompensieren sich so (**Enthalpie-Entropie-Kompensation**), so dass die Freie Energie eine kleine Differenz darstellt (C); die Freien Energien des gefalteten und ungefalteten Zustandes ändern sich außerdem in ähnlicher Weise, so dass ihre Differenz sehr klein ist (D).

Die Stabilitäten der verschiedenen kleinen Eindomän-Pr. lassen sich vergleichen, indem man ihre thermodyn. Größen so normalisiert, dass die unterschiedliche Molekülgrößen berücksichtigt werden (Fig. 11-20, #251). Die so bestimmten Entropie- und Enthalpie-Änderungen der versch. Pr. unterscheiden sich etwas, konvergieren aber bei hoher Temp. (T^* : ca. 110-140°C).

Thermodynamische Parameter für die gefalteten und ungefalteten Formen von Lysozym

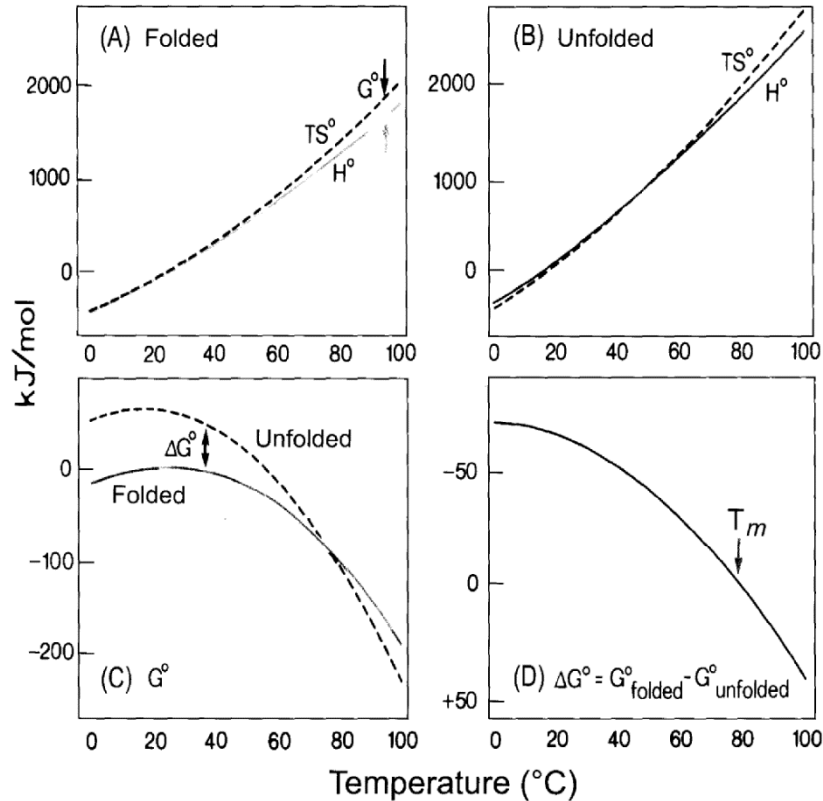


Figure 11-19. Thermodynamic parameters for the folded and unfolded forms of lysozyme at pH 7.0 and various temperatures. (A, B) The enthalpic (H) and entropic (T S) contributions to the free energies of the folded and unfolded states are plotted as a function of temperature. (C) The Gibbs free energy (G°) of each state is plotted as a function of temperature for both the folded and unfolded states; it is the difference between the enthalpic and entropic contributions, as indicated in (A). The net stability of the folded state, ΔG° , is plotted in (D) as a function of temperature; it is the difference between the free energies of the two states, as indicated in (C). Note the change in energy scale from (A) and (B) to (C) and then to (D); the final ΔG° illustrated in (D) is a very small difference between the individual enthalpy and entropy contributions of (A) and (B). Data from W. Pfeil and P. L. Privalov, *Biophys. Chem.* 4, 41–50 (1976). Adapted from T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn, W. H. Freeman, NY, p. 298.

Die Stabilitäten vieler kl. Pr. können bei den meisten Temp. durch eine einfache Gl. beschrieben werden; einzige Variable = ΔC_p der Auffaltg.

$$\Delta G_{\text{unfold}} = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger + \Delta C_p[(T-T^*) - T \ln(T/T^*)] \quad (\text{Eq. 11.18})$$

Spezif. Enthalpie-Differenz, ΔH , zw. gefaltetem und ungefaltetem Zustand von 5 versch. Proteinen

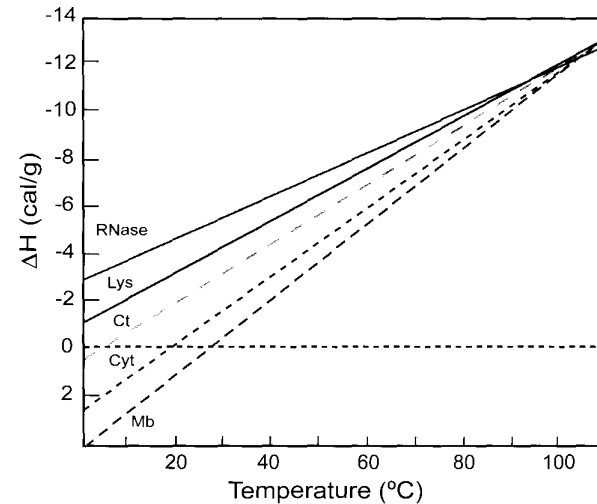


Figure 11-20. The specific enthalpy difference, ΔH per gram of protein, between the folded and unfolded states of five proteins: RNase, ribonuclease A; Lys, hen lysozyme; Ct, bovine α -chymotrypsin; Cyt, cytochrome c; Mb, metmyoglobin. The pH of each solution was that at which the protein is most stable. Data from P. L. Privalov and N. N. Khechinashvili (1974) *J. Mol. Biol.* 86, 665–684.

Physikalische Basis der Protein-Stabilität

Die Physikal. Basis der Pr.-Stabilität gefalteter Pr. ist höchst umstritten: bedingt durch die Komplexität der Pr.-Strukturen (gefaltet und ungefaltet), Vielzahl der WW, verschiedene Beiträge (accounting procedure).

Hauptbeiträge zur Stabilisierung gefalteter Pr. (Reihenfolge in abnehmender Bedeutung):

(1) HBs, (2) van der Waals WW, (3) Hydratation nichtpolarer Gr.

HBs können nur insofern zur Nettostabilität des gefalteten Pr.-Zustandes beitragen als ihre (intramolekul.) HBs in einem gefalteten Pr. viel stärker als die (intermolekul.) HBs zw. ungefaltetem Pr. und Wasser sind. Die Stärke der intramol. WW hängt von den effektiven Konz. der interagierenden Gr. ab [bis zu 10^{10} M, im Vergleich zur LM-Konz. (55 M für Wasser, 110 M für H-Atome)].

Die **Kooperativität** gefalteter Pr.-Strukturen entsteht, da partiell gefaltete Konf. - verglichen mit den voll gefalteten oder voll aufgefalteten Konf. - instabil sind.

Disulfid-Brücken sind die einzige WW innerhalb von Pr., deren Freie Energie direkt gemessen werden kann (relativ zu einer Referenz-SS). In einem aufgefalteten Pr. sind die gebildeten SS nur schwach (effekt. Konz.: mM), jedoch in der nativen Konf. 10^5 - 10^8 mal stärker (100 - 10^5 M). Eine SS-Brücke stabilisiert eine gefaltete Konf. und eine gefaltete Konf. stabilisiert eine SS-Brücke (linked functions); # Fig. 11-21. Die SS-Brücken bestimmen jedoch nicht die gefaltete Struktur (obwohl dies häufig behauptet wird).

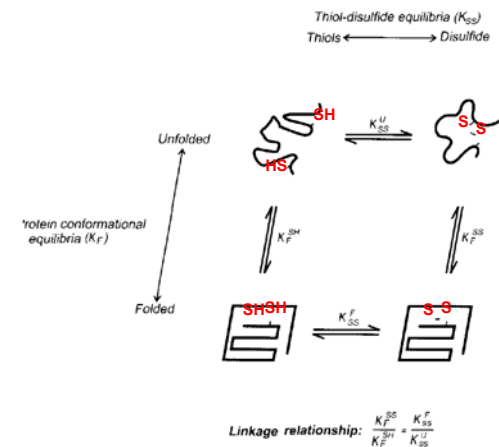


Figure 11-21. An example of linked functions, in this case of protein disulfide bond stability and conformational stability. A protein with two Cys residues that can form a disulfide bond is illustrated in the unfolded and folded conformations. The folded conformation has the two Cys residues in proximity for forming a disulfide bond. The indicated equilibrium constants represent the stabilities of the disulfide bonds, K_{SS}^U , and of the folded conformation, K_F . The thiol and disulfide reagent that is used to interconvert the thiols and disulfide bond of the protein (Equation 7.34) are omitted. The linkage relationship results from the general requirement that the free energy change around any cycle be zero. In this case, it states that whatever effect the folded conformation has on the stability of the disulfide bond, the disulfide bond must have the same effect on the stability of the folded conformation. Any two phenomena that affect each other may be represented in this way, and they are subject to the same linkage relationship. In particular, comparable linkage relationships pertain to all interactions within the folded conformation, not just disulfide bonds.

Das Konzept der **Hydrophobizität** hat weniger Bedeutung für die Stabilität gefalteter Pr.-Strukturen als man früher angenommen hat. Dies wird durch entsprechende thermodynamische Analysen bestätigt.

Wasser und Co-Solvents: Salze beeinflussen die Pr.-Stabilität entsprechend ihrem Ranking in den Hofmeister-Reihen.

Häufig verwendete Stabilisatoren:

- (i) 1 M Zucker-Lösungen (Sucrose, Trehalose, Glucose)
- (ii) 3-4 M Glycerin
- (iii) 1 M neutrale AA (Gly, Pro, Ala)
- (iv) Methylamine einschl. Betaine, Sarcosin, Trimethyl-N-oxid
- (v) Polyole (Sorbitol, Inositol, Mannitol)
- (vi) Sulfat-Salze (Na- und Amm.-Sulfat)

All diese Stabilisatoren haben die Eig. präferentiell von der Pr.-Oberfläche ausgeschlossen zu werden, was den Proteinen Stabilität verleiht und ihren Kontakt mit der Oberfläche verhindert. Viele der genannten Stabilisatoren finden mannigfaltige Verwendung (wirken als Osmolyte und Cryoprotectants).

Die sog. Destabilisatoren destabilisieren als DM (Harnstoff, GdmCl, SDS, TCA, CaCl₂, LiBr). Sie binden präferentiell an Proteine (insbes. im aufgefalteten Zustand, z.B. SDS).

Die Rolle des Wassers: Anders als man erwarten würde: Gefaltete Pr.-Strukturen können in Abwesenheit von Wasser stabiler sein und Wasser destabilisiert gefaltete Strukturen (Ursache: HBs im gefalteten Zustand).

Table 11-1. Contributions to the free energy of folding at 25°C of a typical protein the size of hen lysozyme, with 129 residues, estimated on the basis of Equation 11.18

Contribution	$G_N^\circ - G_U^\circ$ (kcal/mol)
Greater conformational entropy of U ^a	+167
Net stabilizing interactions ^b	-198
Solvation of increased nonpolar surfaces in U ^c	+17
Net stability	-14

^a $T \Delta S_{\text{conf}}^\circ$; $\Delta S_{\text{conf}}^\circ = 4.35 \text{ cal}/(\text{residue mol K})$.

^b Sum of van der Waals interactions in N and net greater stability of hydrogen bonds and other polar interactions in N relative to U, minus any conformational strain. Calculated from $\Delta H^* = 1.54 \text{ kcal/mol residue}$.

^c Favorable interactions of nonpolar surface with water at 25°C, calculated from $\Delta C_p [T - T^* - T \log (T/T^*)]$, where $T^* = 112^\circ\text{C}$ and $\Delta C_p = 12.5 \text{ cal}/(\text{residue mol K})$, the measured value for hen lysozyme.

Data from T. E. Creighton (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2nd edn, W. H. Freeman, NY.

$$\Delta G_{\text{unfold}} = \Delta H^* - T\Delta S^* + \Delta C_p [(T-T^*) - T \ln(T/T^*)] \quad (\text{Eq. 11.18})$$

vgl. #251

Effekte variabler Primär-Struktur

Die Stabilität eines Pr. hängt in komplexer Weise von der Prim.-Str. ab.

Natürliche Pr. mit außergewöhnlicher Stabilität:

Pr., die in der Natur unter sog. physiol. Bedingungen (37°C, 0.15 M Salz, neutraler pH, 1 Atm) vorliegen, neigen dazu, ähnliche Stabilitäten gegenüber Auffaltung zu haben (obwohl sie versch. Faltungsmotive und versch. AA-Sequenzen aufweisen); diese Pr. stammen aus Organismen, die als **Mesophile** bekannt sind. Viele Organismen sind jedoch an andere Umgebungsbedingungen [Psychrophile (nied. Temp.), Thermophile (hohe Temp.), Halophile (hohe Salzkonz.)] adaptiert. Normale mesophile Pr. würden unter diesen extremen Bed. auffalten oder unlösl. werden. Die Interpretation von Ergebnissen unter extremen Bedingungen erfordert umfangreiches Wissen in Physikal. (Bio-)Chemie.

Thermophile Pr. sind resistenter gegen hohe Temp. als ihre mesophilen Pendanten. Es ist jedoch schwierig, sie an Hand ihrer Struktur zu unterscheiden; die thermophilen Pr. haben meist mehr Salzbrücken an der Oberfläche oder beinhalten Ionen in der gefalteten Struktur.

Halophile Pr. existieren oft in ionischer Umgebung (entsprechend einer ges. KCl-Lösung). Im isolierten Zustand benötigen sie hohe Ionenstärken zur Aufrechterhaltung ihrer gefalteten Struktur; sie binden große Mengen Wasser und Salz.

Es gibt jedoch auch einige wenige simple Pr., die außergewöhnliche Stabilitäten aufweisen: z.B. faltet mesophiles BPTI erst bei 100°C oder bei pH-Extrema oder in 6M GdmCl oder 8M Harnstoff auf.

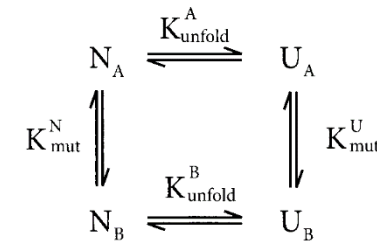
Mutagenese:

Die Prinzipien der Pr.-Stabilität wurden häufig nach Änderung der Prim.-Struktur (chem., durch gezielte Mutagenese) untersucht. Der Effekt 2er Mutationen kann additiv, partiell additiv, synergistisch, antagonistisch oder abwesend sein (d.h. die 2 geänderten Reste reagieren unabhängig voneinander, reagieren kooperativ, antikooperativ, oder haben gegenläufige strukturelle Effekte).

Die Effekte individueller Mutationen auf die Stabilität der gefalteten Struktur variieren beträchtlich – insofern können nur wenige Verallgemeinerungen gemacht werden: AA-Austausch an der Oberfläche hat nur geringen Einfluss (z.B. können geladene Reste durchaus gegen nichtpolare Reste ausgetauscht werden); das Pr.-Innere ist im Allgemeinen gegen Mutationen am empfindlichsten.

⇒ AA-Austausch hat in der Regel nur einen geringen Einfluss auf die Stabilität des gefalteten Zustandes: meist geringe Abnahme, selten eine Zunahme (Erzeugung thermophiler Pr.); SS-Brücken, Gly- und Pro-Reste können die konf. Entropie (und somit die Pr.-Stabilität) des aufgefalteten Zustandes ändern.

Die Ergebnisse von AA-Austauschen werden meist dem Einfluss des gefalteten oder aufgefalteten Zustandes zugeschrieben. Das ist nicht ganz korrekt. Man kann bestenfalls Auffaltung (N → U) und Mutationsereignis (A → B) als miteinander verbundene Funktionen (**linked functions**) betrachten.

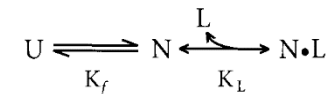


Die Stabilitätsdifferenz, die durch den Ersatz A → B bedingt wird, sollte der Differenz der Freien Energien bei der Erzeugung der Mutation im gefalteten und aufgefalteten Zustand entsprechen. $\Delta G_{\text{mut}}^\circ$ kann nicht exp. gemessen werden, kann aber durch Computersimulation erhalten werden (graduelle Veränderungen von A nach B; Gleichungen rechts). AA-Austausche beeinflussen meist den gefalteten Zustand.

$$\frac{K_{\text{unfold}}^A}{K_{\text{unfold}}^B} = \frac{K_{\text{mut}}^N}{K_{\text{mut}}^U}$$

$$\Delta\Delta G_{\text{unfold}}^\circ = \Delta G_{\text{mut}}^\circ$$

Der einfachste Weg, die **gefaltete Konf. eines Pr. zu stabilisieren**, besteht darin, einen Liganden L, der spezifisch und nur an die gefaltete Konf. (N) bindet, hinzuzufügen.



$$K_{f,L} = \frac{[N] + [N \cdot L]}{[U]} = \frac{[N]}{[U]} (1 + K_L[L]) = K_f (1 + K_L[L])$$

Strukturstabilität von Membranproteinen

Das Studium der Faltung und Stabilität von Membranpr. ist wesentlich komplizierter als bei wasserlösl. Pr. Das Hauptproblem besteht in deren Unlöslichkeit in wässr. Lösg. bzw. die meisten Auffaltungsreagenzien würden auch die Membran zerstören. Im Gegensatz zu wasserlösl. Pr. falten Membranpr. und verbleiben in einer Umgebung, von der Wasser weitgehend ausgeschlossen wird. Die Abwesenheit von Wasser zwingt das Pr. HBs zw. Peptid-Gr. innerhalb des Moleküls zu bilden (Bildung von Transmembranelices und β -Barrels; #205 und 207). Die HBs in α -Helices und β -Faltblättern innerhalb der Membran sind vermutlich viel stärker als solche Bindungen in wasserlösl. Pr. (da es keine Konkurrenz zu HBs mit Wasser gibt).

Aus Mutagenese-Versuchen folgt, dass die Optimierung der van der Waals WW für die Packung von Pr.- α -Helices innerhalb des Bilayers verantwortlich ist.

Als Folge der größeren Stabilität der Membran-Helices, sind diese gegen Denat. durch Temp., SDS, Harnstoff und GdmCl weniger empfindlich.

4. Proteinrückfaltung *in vitro*

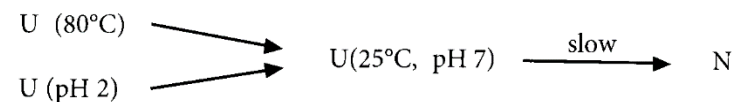
Natürlich vorkommende Pr. können oft denaturiert und dann wieder zu ihrer Ausgangskonf. renaturiert werden. Ursachen für das Nichtgelingen der Renaturierung: Präzipitation, Aggregation, kovalente Modifikation (Spaltung durch Proteinasen).

Pr.-Faltung ist einfach eine Konf.-Änderung, aber mit einer immensen Anzahl an Konf., die ein aufgef. Pr. einnehmen kann: eine kl. Polypeptidkette aus 100 AA sollte 10^{89} versch. Konf. einnehmen können. Aufgefaltete Konf. können sich nicht schneller als 10^{13} mal pro s verändern, so dass es 10^{66} Jahre brauchen würde, um 10^{89} Konf. auszuprobieren. Weitere Probleme: Überlappung von Atomen. Selbst bei vereinfachenden Annahmen bleiben für eine Zufallssuche noch riesige Zeiten (10^7 y) übrig. Nichtsdestoweniger beobachtet man, dass manche Pr. in s oder min (einige in μ s) rückfalten. Offensichtlich ist die Pr.-Faltung keine Zufallssuche nach einer einzigen nativen Konf. aus allen möglichen Konf., sondern scheint irgendwelchen Faltungswegen zu folgen.

Weitere Aspekte: Die exp. Beobachtung der Pr.-Faltung benötigt bei den meisten Methoden meist 10^{15} - 10^{18} Moleküle. Aufgefaltete Pr. unter denaturierenden Bedingungen (8M Harnstoff oder 6M GdmCl) nähern sich zumindest RCs an, so dass man annehmen kann, dass jedes aufgefaltete Molekül zu jedem Zeitpunkt eine andere Konf. hat. Mit anderen Worten: Jedes Molekül einer großen Population beginnt die Faltung von einem anderen Ausgangspunkt aus. In vielen Fällen falten alle Moleküle mit derselben Geschw.Konstante (d.h. dass alle zu jedem Zeitpunkt dieselbe Faltungs-Wahrscheinlichkeit haben).

Die Rückfaltung von Ein-Domänen Proteinen

Die exp. Vorgehensweisen starten vom voll aufgefalteten Pr. unter Auffaltungs-Bedingungen und das Rückfalten wird durch abruptes Ändern der Bedingungen initiiert (z.B. Verdünnen des DM oder pH- oder Temp.-Änderung). Die Konf.-Eig. werden dann als Funktion der Zeit registriert. Der voll gefaltete Zustand N erscheint sofort, ohne nennenswerte Mengen an Intermediaten.

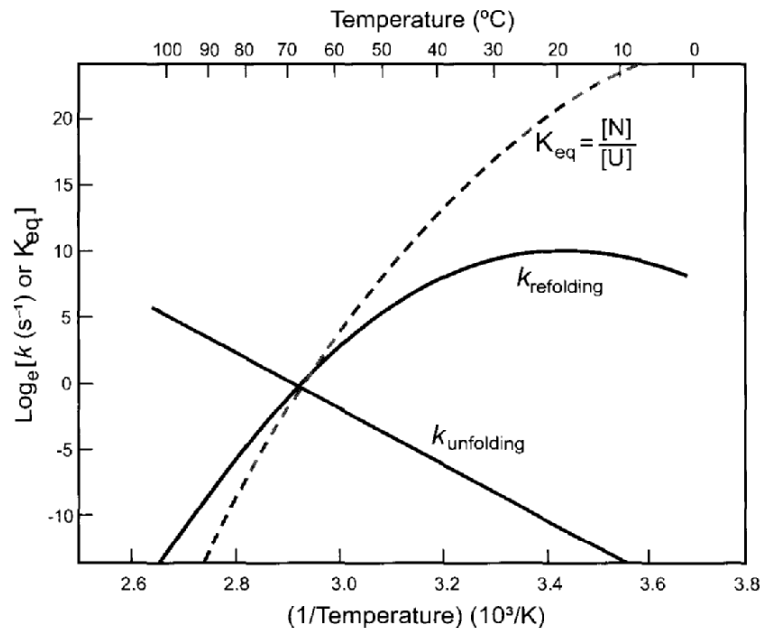


Auffaltung wird durch den umgekehrten Prozess (abruptes Ändern der Bedingungen, die die Auffaltung begünstigen) erzeugt.

Je größer die Zahl der Pro-Reste und cis-Isomeren im gefalteten Zustand, desto größer der Anteil an aufgefalteten Molekülen mit nicht-nativen cis/trans-Isomeren. Eine cis/trans-Isomerisierung ist relativ langsam; die Faltungsrates kann somit durch die Isomerisierung bestimmt werden.

In Abwesenheit von Pro-Peptidbindungs-Isomerisierungen folgen sowohl Auffaltung als auch Rückfaltung einer Kinetik 1. Ordnung (mit jeweils einer einzelnen Geschw.Konstante; keine lag-Periode).

Typische Ergebnisse für Auffaltung und Rückfaltung:

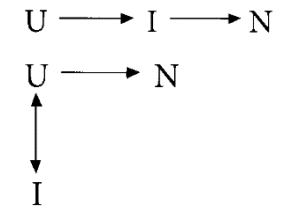


Beachte: die Pr.-Rückfaltung ist ungewöhnlich, da die Geschw. mit steigender Temp. abnimmt (außer bei sehr niederen Temp.)!

Alle Moleküle einer Population aufgefalteter Moleküle falten mit derselben Geschw.-Konstante zurück (unabhängig davon, wie das Pr. aufgefaltet wurde).

Figure 11-22. Typical temperature-dependence of the rates and equilibria of protein folding transitions not involving intrinsically slow isomerizations. The natural logarithms of the rate constants for unfolding and refolding are plotted as a function of $(\text{temperature})^{-1}$ in an Arrhenius plot. A similar plot of the equilibrium constant (K_{eq}) between the folding (N) and unfolded (U) states is a van't Hoff plot. The curvature of the van't Hoff plot is due to the greater apparent heat capacity of U than N. The linear Arrhenius plot for the rate of unfolding indicates that the folding transition state has the same heat capacity as N. The greater heat capacity of U is reflected entirely in the curvature of the Arrhenius plot for the rate of refolding, because $\log_e K_{\text{eq}} = \log_e k_{\text{refolding}} - \log_e k_{\text{unfolding}}$. As a consequence of this curvature, the rate of refolding decreases with increasing temperature, in contrast to most chemical reactions. The data used to construct this diagram are for hen egg white lysozyme at pH 3, extrapolated to the absence of GdmCl. Although $k_{\text{refolding}} = k_{\text{unfolding}}$ at $K_{\text{eq}} = 1$, it is a coincidence that the rate constants also had the value 1 s^{-1} at this temperature, so that all three curves intersect at a common point. The experimental data are from S.-I. Segawa & M. Sugihara (1984) *Biopolymers* **23**, 2473–2488, and W. Pfeil & P. L. Privalov (1976) *Biophys. Chem.* **4**, 41.

Einige aufgefaltete Pr. nehmen unter Rückfaltungs-Bedingungen partiell gefaltete oder MG-Konf. sehr schnell ein, und die native Konf. wird eher langsam erzeugt. Es ist im Allgemeinen nicht möglich festzustellen, auf welchem Wege Intermediate I entstanden sind (on- or off-pathway intermediates).



Die Anwesenheit stabiler partiell gefalteter Intermediate ist nicht notwendigerweise für eine schnelle Pr.-Faltung erforderlich; die Anwesenheit von Intermediaten in beträchtlicher Menge ist eher für eine langsame Rückfaltung charakteristisch.

Die Pr.-Auffaltung ist fast immer ein Alles-oder-Nichts Prozess (all-or-nothing transition). Partiiell gefaltete Spezies werden während der Auffaltung in der Regel nicht detektiert, auch nicht bei den Pr., die partiell gefaltete Intermediate bei der Rückfaltung einnehmen.

Charakterisierung des Übergangszustandes für die Faltung:

Für den Faltungsprozess ist der Übergangszustand von Bedeutung. Er kann nur indirekt charakterisiert werden: durch Messung der Auffaltungs-oder Rückfaltungsgeschw. als Funktion der Pr.-Struktur oder der sich ändernden Bedingungen (Fig. 11-22, #258).

Die Rolle jeder AA bei der Faltung kann mittels Protein Engineering bestimmt werden (systematische Änderung der Pr.-Struktur bzw. der Effekte auf die Geschw. von Auffaltung bzw. Rückfaltung).

Der Übergangszustand bindet Liganden nicht fest.

Kinetische Faltungs-Schemata:

Üblicherweise werden 3 Typen von Faltungsmechanismen diskutiert (Fig. 11-23, #260):

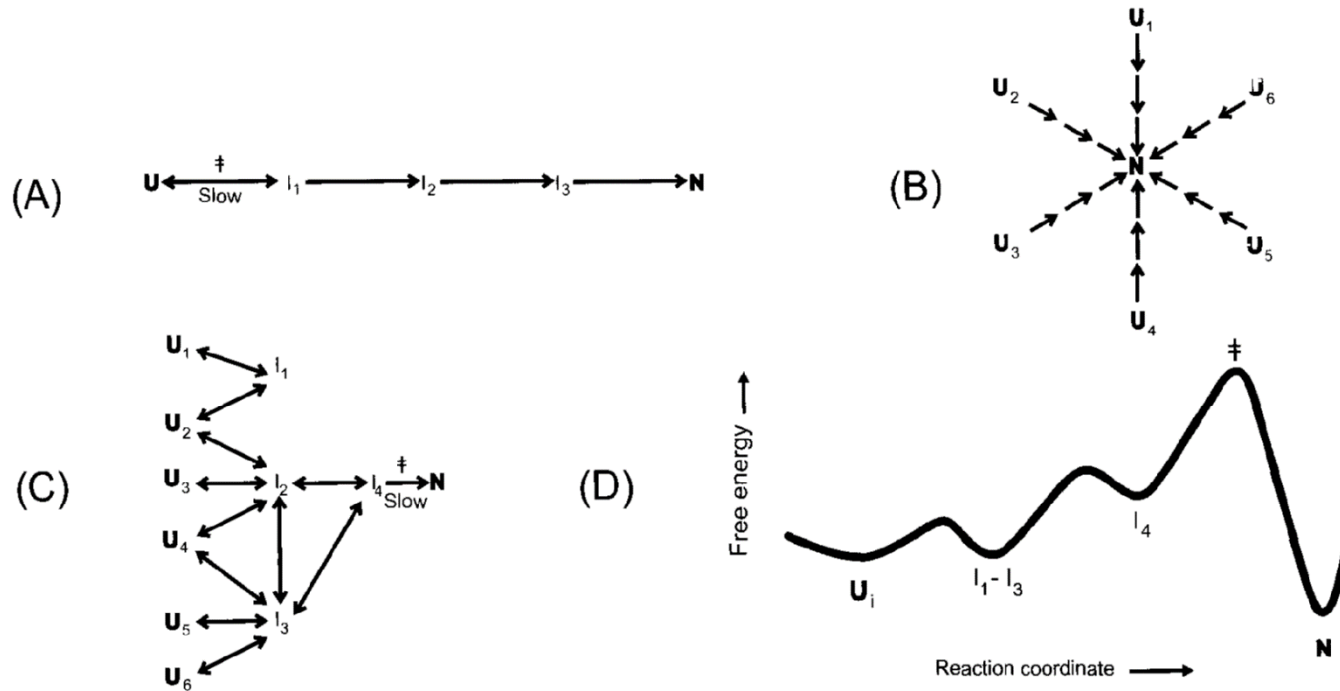


Figure 11-23. Examples of kinetic schemes for protein folding, in the absence of intrinsically slow isomerizations.

- (A): Das Nukleations-Ereignis findet bereits im aufgefalteten Zustand statt; dann folgt eine schnelle Faltung; unwahrscheinlich
- (B): Jedes aufgefaltete Molekül folgt einem bestimmten Faltungsweg; widerspricht der Kinetik 1.Ordnung; unwahrscheinlich
- (C): Alle aufgefalteten Moleküle befinden sich vor der Rückfaltung in einem Gleichgewicht (infolge einer beschränkten Zahl von partiell gefalteten, aber sehr instabilen Intermediaten), bevor die Faltung mittels eines einzelnen Übergangszustandes (oder einer Familie von nahe verwandten Übergangszuständen) vervollständigt wird. Dieses Schema ist mit der Kooperativität der Pr.-Faltung konsistent (D). Die höchste Freie Energie-Barriere (d.h. der Übergangszustand) erfolgt im Faltungsprozess zum Schluss. Die Kooperativität ist der Schlüssel für das Verständnis von Pr.-Struktur und Pr.-Faltung!

Kinetische Bestimmung der Faltung (∃ wenige Beispiele)

Bakterielle Proteinase (wie die α -lytische Protease): Die aufgefaltete Proteinase nimmt MG-ähnliche Konf. ein.

Serpin Proteinase Inhibitoren: die Faltung erzeugt nicht direkt die stabilste gefaltete Konf., sondern durchläuft ein metastabiles Intermediat (Unterschied zw. den 2 Formen: große Veränderung in einem β -Pr.-Faltblatt: Fig. 11-24):

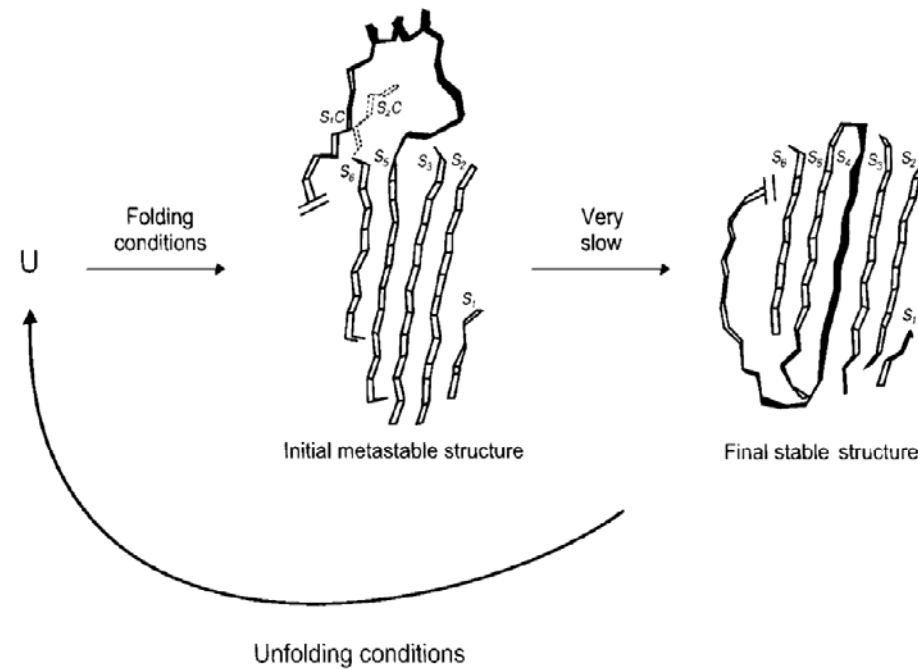


Figure 11-24. Kinetic determination of the folding pathway of α 1-antitrypsin. The unfolded protein folds initially to a metastable structure that slowly converts to the final stable structure. Although the final structure is the more stable, it is not generated directly from the unfolded protein without going through the metastable intermediate. The final slow step involves insertion of a new β -strand into the middle of a β -sheet. The rest of the protein structure is barely changed and is not shown.

An SS-Bildung gekoppelte Faltung

Gefaltete Pr., die SS-Brücken zw. Thiol-Gr. der Cys-Reste enthalten, falten oft auf, falls diese Brücken gebrochen sind oder reduziert wurden. In diesem Fall sind keine DM erforderlich und das reduzierte Pr. bleibt sogar unter physiol. Bed. aufgefaltet. Wenn sich wieder SS-Brücken bilden können, kann das Pr. zur nativen Konf. regenerieren. In diesem Fall ist die Faltung an SS-Bildung gekoppelt. Dies bietet vielerlei Vorteile. *Beispiel: Disulfid-Faltungsweg des BPTI.* Die Bildung der ersten SS-Brücke ist eher zufällig.

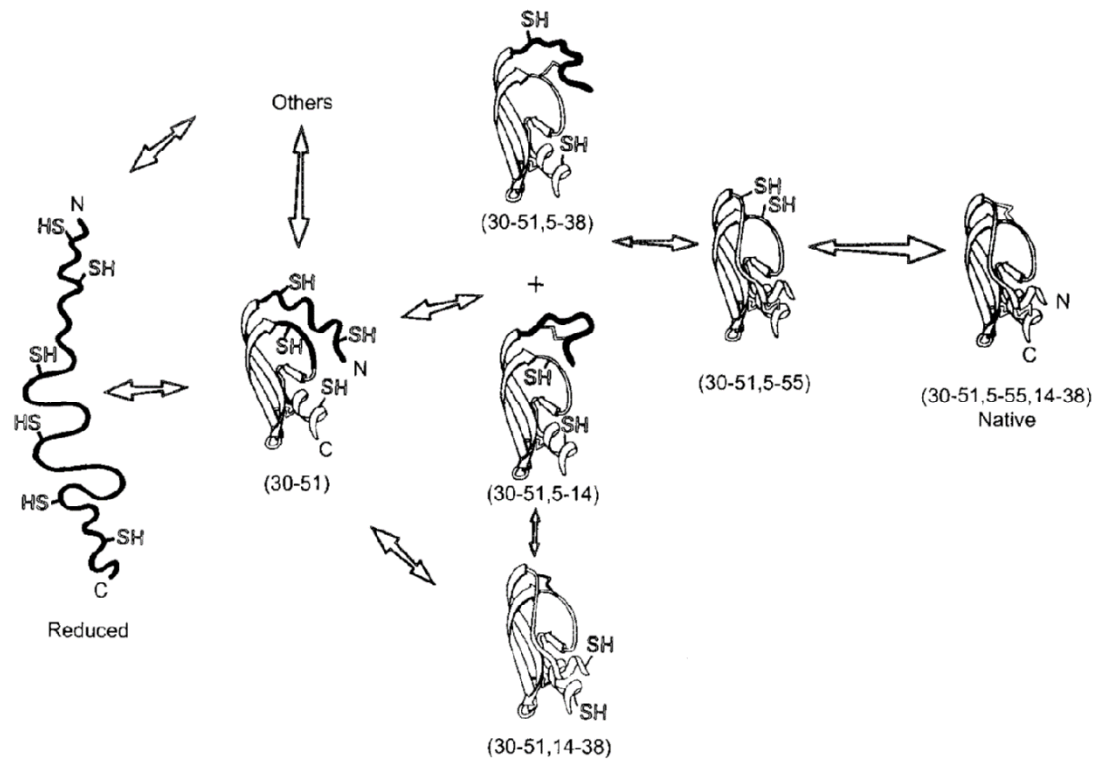


Figure 11-26. The disulfide folding pathway of BPTI. The polypeptide backbone of the protein (Figure 9-2)

Proteine mit mehreren Domänen

Große Pr. bestehen aus 2 oder mehreren Domänen. Solche Multi-Domänen-Pr. wechselwirken miteinander und stabilisieren sich. Die Faltung einer einzelnen Domäne innerhalb eines Multi-Domänen-Pr. folgt denselben Prinzipien wie ein Ein-Domänen-Pr.; Multi-Domänen-Pr. falten ihre Domänen in modularer Weise und assoziieren dann. Der letzte Schritt, bei dem die Domänen interagieren, ist dann häufig der Geschw.-bestimmende. Multi-Domänen-Pr. sind bei der Rückfaltung besonders gegen Aggregation empfindlich.

Proteine mit mehreren Untereinheiten

Qu.-Strukturen bestehen aus multiplen Polypeptidketten, die unter denat. Bed. dissoziiert und aufgefalteter werden können; oft können sie zurückfalten und reassemblieren, um die originale Tert.- und Qu.-Str. wieder einzunehmen. Faltung der einzelnen Domänen und Reassemblierung können als separate Übergänge angesehen werden (Fig. 11-4, #235). Der Assemblierungs-Prozess kann durch kovalentes Cross-Linking zu bestimmten Zeiten verfolgt werden. Ob Faltung oder Assemblierung Geschw.-bestimmend ist, hängt von der Pr.-Konz. ab. Die Assemblierung ist von 2. oder höherer Ordnung und deshalb bei höherer Pr.-Konz. schneller, während die Faltung unimolekular und von 1. Ordnung ist. Während der Rückfaltung herrscht wieder eine gewisse Tendenz zur Aggregation, insbes. bei hohen Pr.-Konz.

Wettstreit zwischen Aggregation und Präzipitation

Aufgefaltete Pr. sind in der Regel unlöslich und präzipitieren häufig, falls die Auffaltung durch therm. Denat. oder pH-Extrema verursacht wurde. Im Gegensatz dazu wirken Harnstoff und GdmCl, indem sie Pr. solubilisieren und die aufgefalteten Pr. bleiben auch löslich – aber häufig präzipitieren diese, sobald das DM verdünnt wird, um eine Rückfaltung zu erlauben (diese Präzipitation ist üblicherweise Pr.-spezifisch).

Die Präzipitation kann oft durch Verringern der Pr.-Konz. (= Verdünnen) vermieden werden. Dies erfordert andererseits das Arbeiten mit großen Lösungsansätzen.

Präzipitation ist das Hauptproblem bei der Produktion nützlicher Pr.; viele dieser Pr. werden durch Genetic Engineering erzeugt und werden in sehr großen Mengen in Zellen synthetisiert, die üblicherweise nicht ihr Host sind. Die neu synthetisierten Polypeptidketten neigen dazu, mit anderen Zell-Komponenten zu aggregieren. Dies führt zur Produktion sog. **Inclusion Bodies** [dichtgepackte, aggregierte Pr. ('Einschluss-Körper'), die nur unter extremen Bed. löslich gemacht werden können]. Die dann freigesetzten Pr. sind ausnahmslos aufgefaltete und müssen renaturiert werden, bevor man sie verwenden kann. Manchmal umgeht man das Problem der hohen Verdünnung, indem man die aufgefalteten Pr. (während ihres Aufenthaltes im DM wie Harnstoff) an eine feste Matrix adsorbiert (z.B. an ein Ionenaustauscher-Harz, an dem auch gleich die Rückfaltung erfolgen kann).

Unterschiede zur Faltung in vivo

Pr.-Faltung in vivo (nach der Biosynthese der Polypeptidkette) **unterscheidet sich fundamental von der Rückfaltung in vitro**: (1) Domänen können sequentiell (nacheinander) falten, während die Polypeptidkette vom N-Terminus her synthetisiert wird; (2) die Faltung verwendet die Mithilfe von sog. Chaperon-Pr. (Faltungshelfer, 'Anstandsdamen'), die an die Polypeptidkette vor der Faltung binden und somit unerlaubte WW minimieren; (3) die langsamen Schritte (wie cis-trans Peptidbindungs-Isomerisierungen, SS-Bildung, Brüche und Wieder-Arrangements) werden durch spezielle Proteine (Cyclophiline, Pr.-Disulfid-Isomerase) katalysiert.

STRAHLENWIRKUNG AUF BIOMOLEKÜLE

Einwirkung ionisierender bzw. nichtionisierender Strahlung [Röntgen- & γ -Strahlen; radioaktive Isotope (Radionuclide); UV-Licht, etc.] auf Biomoleküle [Proteine, NA (insbes. DNA), Polysaccharide, Lipide, Membranen etc., kleine Biomoleküle]. **Fragestellungen:** Mechanismen der Einwirkung [Primärprozesse, Folgeprozesse (Sekundärreaktionen); biologische Reaktionsketten, medizinische Wirkungen], Strahlenschädigung (Spätschäden), Schutzmaßnahmen? Reparatur?

Strahlung und ihre Messung

Strahlenarten: Ionisierend nennt man alle Strahlenarten, deren Quantenenergie hoch genug ist (>10 eV), um Elektronen aus dem Molekül- oder Atomverband herauszulösen. Dabei können sie selbst geladen (direkt ionisierend) oder ungeladen (indirekt ionisierend) sein (Tab. 6.1). Ihre Energie wird im Allgemeinen in eV angegeben [1 eV ist die kinetische Energie, die ein einfach geladenes Teilchen erhält, wenn es ein Spannungsgefälle von 1 V durchläuft; $1 \text{ eV} = 1.602 \times 10^{-19} \text{ J}$].

Tab. 6.1. Ionisierende Strahlen

Name	Art	Masse	Ladung	Erzeugung
<i>Direkt ionisierende Strahlung</i>				
α	${}^4_2\text{He}$	4	2+	Kernzerfall
β^-	e	0,000549	-	Kernzerfall, Betatron
β^+	e	0,000549	+	Kernzerfall
p	${}^1_1\text{H}$	1	+	Beschleuniger
d	${}^2_1\text{H}$	2	+	Beschleuniger
<i>Indirekt ionisierende Strahlung</i>				
γ	el.-magn. Str.	0	0	Kernzerfall
Rö	el.-magn. Str.	0	0	Röntgenröhre
n	0_1n	1	0	Kernreaktion, Kernspaltung

Beim Kernzerfall und in Beschleunigern werden normalerweise Strahlen erzeugt, deren Quantenenergie ein hohes Vielfaches der Ionisierungsenergie ist, so dass diese Strahlen auf der Spur jedes ihrer Quanten beim Durchgang durch Materie eine große Zahl von Ionisationen und Anregungen erzeugen, die alle zu **chem. und biol. Folgeprozessen** führen können.

Neben dem Einfluss **äußerer Bestrahlung** auf biol. Systeme ist auch die Wirkung inkorporierter, d.h. direkt in das System eingebauter **Radionuklide**, von Interesse. Hier kann auch noch die Transmutation (d.h. die beim

radioaktiven Zerfall erfolgende Umwandlung des Radionuklids in ein anderes chem. Element) und die Rückstoßenergie (die auf den emittierenden Kern wirkt) von Bedeutung sein.

WW Strahlung – Materie

Die **primäre WW** ist qualitativ und quant. **für die versch. Strahlenarten und -energien unterschiedlich.**

Direkt ionisierende Strahlen: Die Energieabgabe pro Weglänge, das Massenbremsvermögen, lässt sich für direkt ionisierende Strahlen (also für alle geladenen schweren Partikel) durch die Bethe-Formel beschreiben; für Elektronen gilt (wegen ihrer stärkeren Ablenkung) eine etwas veränderte Gleichung.

In der Strahlenbiophysik wird oft auch ein sog. **LET-Wert** (Linear Energy Transfer) verwendet; er entspricht im Wesentlichen dem Massenbremsvermögen (berücksichtigt aber nur Ionisationen und Anregungen in der Nähe der Primärbahn, also nicht die von Sekundärteilchen). Vgl. #268

Neben dem Prozess der direkten Ionisation spielt die Erzeugung von Bremsstrahlung noch eine wesentl. Rolle bei der Energieabgabe geladener Teilchen an Materie.

Indirekt ionisierende Strahlen:

(i) Röntgen- und γ -Strahlung: die Absorption dieser elektromagnet. Strahlung in Materie lässt sich durch einen einfachen exp. Ausdruck beschreiben: $I_x = I_0 \times e^{-\mu x}$, wobei I_0 und I_x die Strahlenintensitäten vor und nach Durchtritt durch die Schichtdicke x , und μ der Abs.Koeff. sind.

Der Abs.Koeff. μ setzt sich aus 3 Komponenten, die versch. WW-Prozesse beschreiben, zusammen: Photoabsorptionskoeff., Compton-Absorptionskoeff., Paarbildungskoeff.; die einzelnen WW-Prozesse überwiegen in versch. Bereichen von γ -Energie und Ordnungszahl (Fig. 6.1).

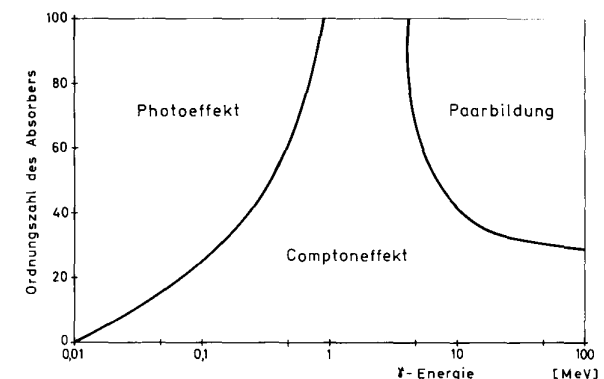


Abb. 6.1. Bereiche des Vorherrschens von Photoeffekt, Comptoneffekt und Paarbildung

(ii) Neutronen: Neutronen geben ihre Energie ebenfalls vorwiegend in 3 Prozessen an biol. Material ab: Elastische Streuung, unelastische Streuung und n-Einfang.

Dosis und Dosisleistung

Um die biol. Strahlenwirkung quantifizieren zu können, braucht man eine Angabe über die pro Masseneinheit absorbierte Strahlenenergie. Die Einheit dieser **Energiedosis** ist das **Gray (Gy)**, wobei $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$.

Da die Strahlenwirkung häufig nicht nur vom Betrag der absorbierten Dosis abhängt, sondern auch von der Zeit, während der die Dosis appliziert wurde, führt man zusätzlich den Begriff der **Dosisleistung** ein [**Gy/s**].

Man benutzt zur Dosismessung meist die Eig. ionisierender Strahlen, Gase zu ionisieren, und definiert eine **Ionendosis** in Coulomb pro kg [C/kg]. In Luft gilt $1 \text{ C/kg} = 34 \text{ Gy}$, in Wasser und Gewebe (für Röntgen- und β -Strahlen): $1 \text{ C/kg} = 36\text{-}38 \text{ Gy}$.

In der Literatur finden sich häufig noch die alten Einheiten rad [rd] und Röntgen [R], wobei $1 \text{ rd} = 0.01 \text{ Gy}$ bzw. $1 \text{ R} = 2.58 \times 10^{-4} \text{ C/kg}$ bzw. $1 \text{ R} = 0.877 \text{ rd}$ in Luft und $1 \text{ R} = 0.93\text{-}0.98 \text{ rd}$ in Wasser und Gewebe.

Auch gleiche Energiedosen versch. Strahlenarten können in biol. Systemen sehr unterschiedl. Wirkung haben. Als **Relative Biol. Wirksamkeit (RBW)** einer Strahlung bezeichnet man daher das Verhältnis der Dosis einer Standardstrahlung (200 kV Röntgen) zu einer beliebigen Strahlung, die zum gleichen biol. Effekt führt. Die genannte Standardstrahlendosis gibt man häufig **als Äquivalentdosis** in Sievert [Sv] an. Dann ist $D'[\text{Sv}] = \text{RBW} \times D[\text{Gy}]$.

Die alte Einheit der Äquivalentdosis ist das rem (roentgen equivalent men), wobei $1 \text{ rem} = 0.01 \text{ Sv}$.

Die rel. biol. Wirksamkeit (RBW) einer Strahlung hängt u.a. eng mit dem LET-Wert zusammen (Fig. 6.2).

LET-Wert = Linear Energy Transfer Wert, lineare Energieabgabe des Strahlenpartikels auf seinem Weg [keV/μm], vgl. #266.

Dosimetrie

Zur Messung von Dosis und Dosisleistung im Bereich der biol. Strahlenwirkung werden vorwiegend folgende Verfahren eingesetzt:

Ionisationskammer, Fricke-Dosimeter, Film-Dosimeter, Thermolumineszenz-Dosimetrie, Kalorimetrische Verfahren, Sonstige Dosimetrie-Verfahren (Trübung von Gläsern oder Polymeren, Verfärbung von Kristallen, Änderung der Leitfähigkeit von Halbleitern, Abtötungsrate von Bakterien).

Fricke-Dosimeter: Bei diesem Dosimeter wird die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} in wässr. Lösung durch ionisierende Strahlung zur Dosismessung benutzt. Das gebildete Eisen(III)-Ion wird im Spektral-Fotometer bei 304 nm gemessen. Vorteile: einfache Messmethode; weitgehende Unabhängigkeit von der Dosisleistung; sowie die Möglichkeit, beliebige Dosimeterformen herstellen zu können.

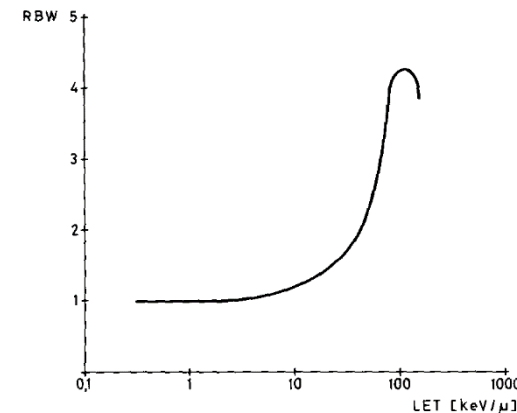
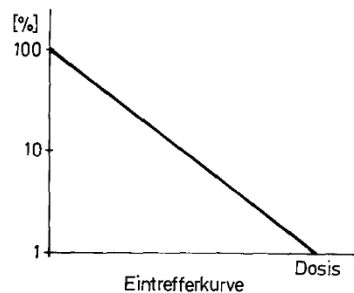


Abb. 6.2. Beziehung zwischen der relativen biologischen Wirksamkeit ionisierender Strahlung und ihrem LET-Wert in Gewebe

Beschreibung und Deutung der Strahlenwirkung

Dosis-Effekt-Kurven und Treffertheorie

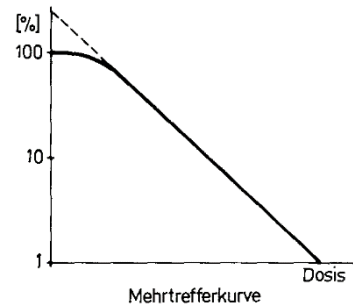
Zur quantitativen Beschreibung biol. Strahlenwirkungen werden häufig **Dosis-Effekt-Kurven** verwendet:
 Ordinate: Logarithmus des Effekts (z.B. Überlebensrate von Viren, Restaktivität von Enzymen),
 Abszisse: Dosis. Es ergeben sich 4 typische Kurvenformen:



Exponentielle Ein-Treffer-Kurve:
 bei der Inaktivierung von Viren oder Enzymen

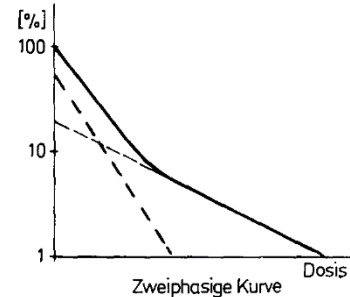
$$N = N_0 \times e^{-D/D_0}$$

Zur Inaktivierung in nur einem vorhandenen Treffbereich findet gerade ein Treffereignis statt (Ein-Treffer-Kurve)



Schulter-Kurve:
 bei der Bestrahlung von Bakterien und höheren Organismen

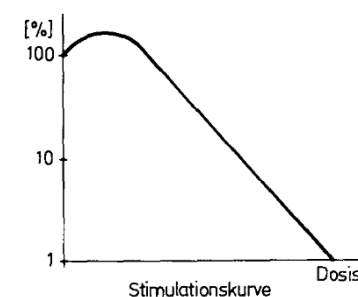
Bei geringen Dosen nur geringe Strahleneffekte; mehrere Treffbereiche getroffen oder in einem Treffbereich mehrere Treffereignisse



Zweiphasige Dosis-Effekt-Kurve:

bei Bakterienstämmen unterschiedl. Sensibilität oder Zellen in versch. Stadien des Zellcyclus

Bei niedrigen Dosen wird bevorzugt der empfindliche Teil der Population geschädigt, bei höheren auch der weniger empfindliche



Stimulations-Kurve:

bei der Bestrahlung höherer Pflanzen, aber auch bei Bakterien, Pilzen und Tieren

Bei niedrigen Dosen 'positive' Strahleneffekte (Ertrag, Pflanzenlänge, RNA-Syntheserate).

Die Kurve steigt zunächst über die 100%-Linie, bevor sie bei höheren Dosen wieder exp. abfällt *

* Stimulationskurven: Durch das Inaktivieren nur eines oder weniger Treffbereiche werden Prozesse in Gang gesetzt, die den entstandenen Schaden reparieren oder sogar überkompensieren

Direkte und indirekte Strahlenwirkung

Die Treffertheorie geht davon aus, dass innerhalb einer Zelle ein definierter Bereich direkt getroffen werden muss, um die Zelle zu schädigen. Wegen der statistischen Verteilung der Ionisierungen und Anregungen in Materie werden aber die meisten Energie-Absorptionen außerhalb dieser Bereiche stattfinden und hier chem. reaktive Produkte bilden. Diese können in der Zelle diffundieren und sekundär biol. wichtige MM oder Strukturen schädigen. Die Wahrscheinlichkeit für eine solche indirekte Strahlenwirkung hängt natürlich von den Konz.-Verhältnissen in der Zelle ab, und davon ob dritte Reaktionspartner vorhanden sind (Konkurrenz-Reaktionen).

In welchem Maße eine Strahlenschädigung in vivo auf direkter oder indirekter Wirkung beruht, ist nur schwer festzustellen. In vitro lässt sich die Entscheidung leichter durchführen: Bei direktem Strahleneffekt muss bei konstanter Dosis die Anzahl der geschädigten Moleküle in Lösung proportional der Konz. sein, bei indirekter Wirkung aber unabhängig davon.

Energieübertragungsprozesse, Reaktionsgeschwindigkeiten, Impulsphotolyse und Impulsradiolyse

Unabhängig von der Kenntnis des Ablaufs der Strahlenreaktion kann man **die Energieausbeute** angeben:

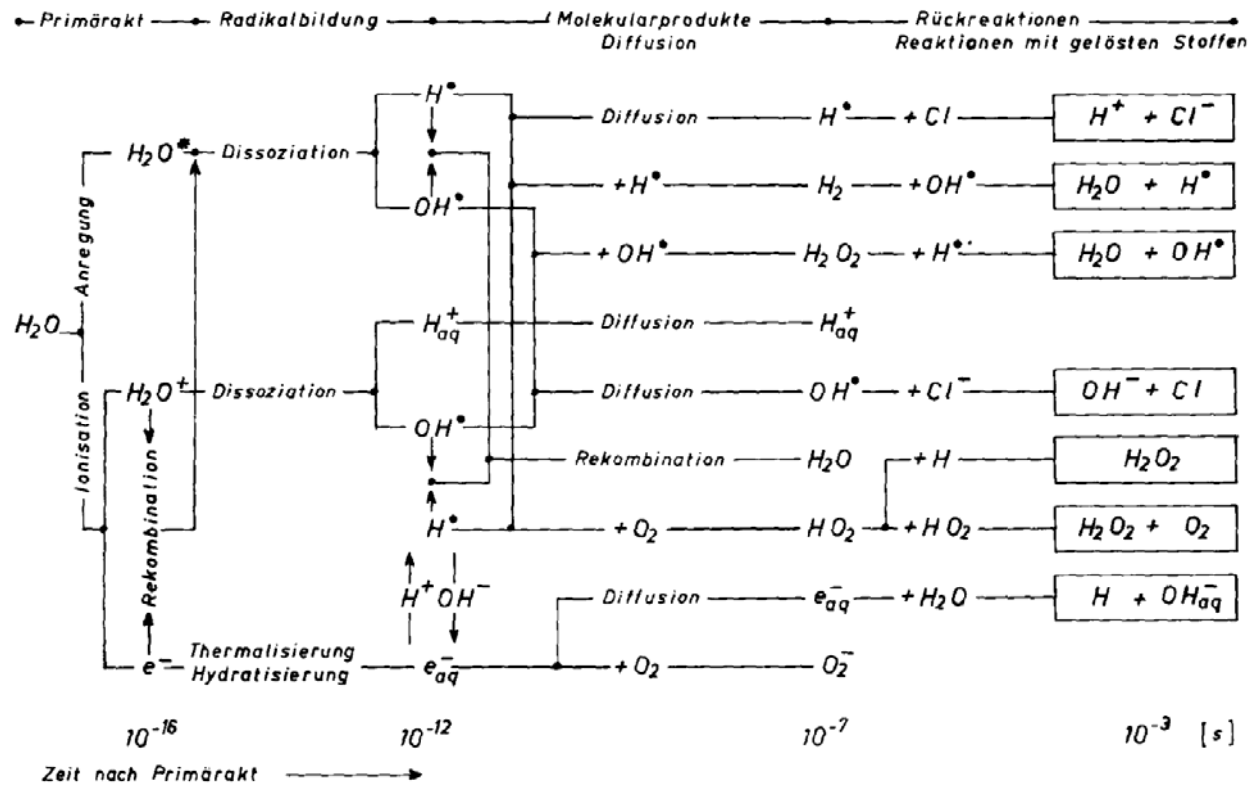
$$G = \text{Zahl der gebildeten oder veränderten Moleküle} / (100 \text{ eV absorbierte Energie})$$

Eine exakte Beschreibung des Reaktionsablaufs ist nur bei Kenntnis der einzelnen Reaktionsschritte und ihrer Darstellung durch Reaktionsgleichungen möglich. Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von Strahlen- und Photoreaktionen sind die Methoden der Impulsradiolyse und Impulsphotolyse geeignet (Einstrahlen eines kurzen Impulses ionisierender oder optischer Strahlung hoher Intensität in das zu untersuchende System; Erzeugung von Primärprodukten in hoher Konz., die dann schnell analysiert werden).

Molekulare Strahleneffekte

Strahlenchemie des Wassers

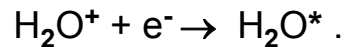
Wegen des Wassergehalts der meisten biol. Systeme hat die sog. **Wasserradiolyse** und die **Reaktion ihrer Folgeprodukte** eine bes. große **Bedeutung für die indirekte Strahlenwirkung**. Nach der primären Ionisation $\text{H}_2\text{O} + h\nu \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + e^-$ können vielerlei Sekundärreaktionen stattfinden (Fig. 6.5)



Eine Kaskade von Reaktionen bricht in Sekundenbruchteilen los!

Abb. 6.5. Ablauf der Strahlenreaktion in Wasser

Das freie El. verliert noch im Nahfeld des Mutterions seine kinetische Energie und rekombiniert mit ihm:

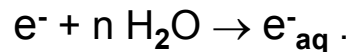


Das angeregte Wassermolekül dissoziiert dann zu den **Radikalen H• und OH•**:



die genug kinetische Energie besitzen, um frei diffundieren und mit 3. Reaktionspartnern reagieren zu können.

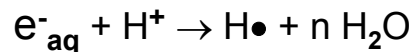
Das freie El. gibt seine Energie nur in kleinen Schritten ab; seine Rekombination ist eher unwahrscheinlich. Es ist von einer Hülle orientierter Wasserdipole umgeben, die die Reaktionsfähigkeit des **hydratisierten Elektrons** stark verringern.



Das Mutterion dissoziiert zu

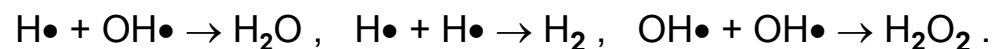


während das hydratisierte El. im Sauren zu

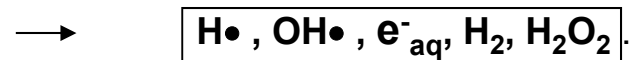


reagiert. Auch hier entstehen als Hauptprodukte H• und OH• Radikale.

Daneben entstehen durch Rückreaktionen Molekularprodukte:



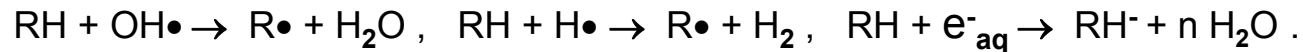
Diese Prozesse sind nach etwa 10^{-7} s abgeschlossen, so dass in reinem Wasser dann im Wesentlichen folgende Produkte für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen:



Radikale und Molekularprodukte

Radikale zeichnen sich durch ein ungepaartes EI. in ihrer äußeren Schale aus und sind darum bes. reaktionsfähig ($H\bullet$, $OH\bullet$, e^-_{aq}).

Typische Beispiele für die Reaktion dieser Radikale mit organ. Molekülen der Form RH sind:

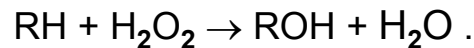


Bei direkter Strahlenwirkung tritt dagegen vorwiegend die Reaktion



auf.

Unter den Molekularprodukten ist bes. das H_2O_2 sehr reaktionsfähig:



Als Folge der Wasserradiolyse überwiegen also Oxidationsreaktionen.

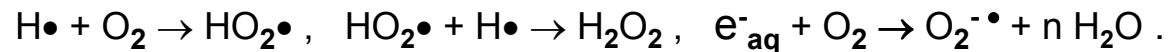
Tab. 6.3 gibt die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von Wasserradikalen mit einigen wichtigen Reaktionspartnern an:

Tabelle 6.3. Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_2 von Wasserradikalen mit einigen wichtigen Reaktionspartnern [$l \cdot mol^{-1} s^{-1}$]. (Nach Hart, 1971)

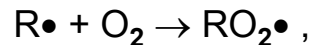
Reaktionspartner	Radikal		
	e^-_{aq}	$H\bullet$	$OH\bullet$
e^-_{aq}	$6 \cdot 10^9$	$2,5 \cdot 10^{10}$	$3,0 \cdot 10^{10}$
$H\bullet$	$2,5 \cdot 10^{10}$	$2,0 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$
$OH\bullet$	$3,0 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$	$6 \cdot 10^9$
H_2O	16,0		
O_2	$1,9 \cdot 10^{10}$	$2,2 \cdot 10^{10}$	
H_2O_2	$1,23 \cdot 10^{10}$	$9 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^7$
CO_2	$7,7 \cdot 10^9$	$< 10^6$	$3,0 \cdot 10^8$
CH_3OH	$< 1,0 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^8$
Thymin	$1,7 \cdot 10^{10}$	$2,3 \cdot 10^8$	$4,6 \cdot 10^9$
Thymidin		$2,5 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^9$
Uracil	$7,7 \cdot 10^9$		$4,5 \cdot 10^9$
Cytosin	$8,0 \cdot 10^9$		$4,2 \cdot 10^9$
Cytidin	$1,2 \cdot 10^{10}$		$3,9 \cdot 10^9$
Adenin	$3,1 \cdot 10^{10}$	$7,9 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^9$
Adenosin	$1,0 \cdot 10^{10}$	$1,4 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^9$

Modifizierung der Strahlenwirkung

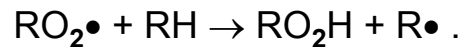
(i) Sauerstoffeffekt und Rückreaktionen: **Sauerstoff** ist in biol. Systemen meistens in ziemlich hoher Konz. vorhanden und beeinflusst wesentlich die Weiterreaktion der Wasserradikale. Dies geschieht durch die Bildung hochreaktiver und z.T. langlebiger Molekular- und Radikalprodukte:



Andererseits werden **organische Peroxide** gebildet:



welche mit weiteren org. Molekülen zu einer Kettenreaktion führen können:



Diese Reaktionen bewirken, dass bei Röntgen- und γ -Bestrahlung der biol. Effekt durch die Anwesenheit von O_2 wesentlich verstärkt wird. Der **Sauerstoffverstärkungsfaktor OER** (Oxygen Enhancement Ratio) liegt allgemein zw. 2 und 3; bei Strahlung hoher LET ist er wesentlich geringer.

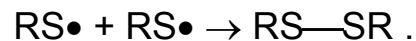
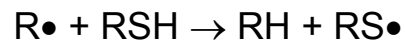
Andere anorgan. Reaktionspartner (z.B. Cl^-) können dagegen die Wirkung der Wasserradikale drastisch reduzieren:



Auch hier ist also eine Kettenreaktion von wesentlicher Bedeutung.

(ii) Reparaturprozesse, Sensibilisatoren: Modifikationen der Strahlenwirkung sind auf 3 Ebenen möglich: auf der Radikalstufe, auf der Stufe der MM und im Bereich metabolischer Prozesse.

Ebenso wie O_2 und Cl^- auf der Radikalebene wirken und deren Wirksamkeit drastisch erhöhen oder erniedrigen, gibt es zahlreiche **Radikalfänger (Scavenger)** wie His, die durch ihre hohe Reaktionsgeschwindigkeit mit Wasserradikalen deren biol. Wirksamkeit stark reduzieren können. Eine Reihe organ. Verbindungen (wie Cys oder Cysteamin) haben die Fähigkeit, org. Radikale durch Wasserstoff-Übertragung zu 'heilen' und dabei selbst in die Dimerenform überzugehen:



All diese Modifikationen der Strahlenwirkung auf der Radikal- oder Molekülbasis werden nur dann wirksam, wenn die **Strahlenschutzstoffe** oder die **Sensibilisatoren** bereits während der Bestrahlung in der Zelle vorhanden sind. Auch langsame metabolische Prozesse können mitunter Strahlenschäden reparieren.

Zellen oder Organismen sind häufig neben einer Bestrahlung weiteren chem. oder physikal. Belastungen ausgesetzt, die bereits für sich allein Schädigungen hervorrufen können. Mitunter addieren sich die Effekte, es können aber auch Synergismen auftreten (Verstärkung oder Verminderung der Gesamtwirkung).

Strahlenwirkung auf Biomoleküle und molekulare Strukturen

Strahlenwirkung auf Proteine

Die Schädigungsdosen *in vitro* und *in vivo* liegen bei einigen 10 Gy, wobei die indirekte Strahlenwirkung eine wesentl. Rolle spielt. Mit dem OH• Radikal reagieren bes. schnell die aromat. AA sowie die S-haltigen AA. Wegen ständiger Neusynthese könnte der Ausfall der meisten Enzyme biol. relativ irrelevant sein; Problem: Ausfall von Reparatur-Enzymen.

Strahlenwirkung auf Nukleinsäuren (NA)

NAs werden häufig als bestimmendes Element für die Strahlenschädigung biol. Systeme angesehen (DNA als Träger des genetischen Codes). Besonders Kettenbrüche und Basenänderungen sind von Bedeutung.

Es gibt Doppelstrang- und Einzelstrangbrüche. *In vivo* herrscht direkte Strahlenwirkung vor – offenbar infolge einer Abschirmung der DNA gegenüber Radikaleinwirkung durch Proteine (Histone); in wässr. Lösung gibt es jedoch auch indirekte Strahlenwirkung.

Basenschäden können ebenfalls durch direkte und indirekte Strahlenwirkung auftreten. UV-Bestrahlung führt bei den Pyrimidinbasen (bes. beim Thymin) zur Bildung von Dimeren, die bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht wieder zerfallen.

Strahlenwirkung auf Membranstrukturen

Strahlenwirkungen auf Membransysteme lassen sich bei sehr unterschiedlichen Strahlendosen nachweisen (0.5 – 100 Gy). Die oxidative Phosphorylierung ist recht strahlenempfindlich, Proteinsynthese und Photosynthese scheinen sehr strahlenunempfindlich zu sein.

Strahlenwirkung auf Zellen und Organismen

Strahlenwirkung auf die Zelle

Nach Bestrahlung mit Dosen von einigen 10 Gy erleiden alle Zellen den Interphasetod, der gesamte Zellmetabolismus bricht zusammen.

Die Strahlenempfindlichkeit während des Zellcyclus variiert stark, man findet allgemein eine Abnahme in der Richtung $M > G_2 > G_1 > S$ -Phase. Vermutlich existieren Reparaturprozesse, die subletale Strahlenschäden zu eliminieren versuchen.

Genetische Strahlenwirkungen

Als Folge der erwähnten Strahlenwirkungen an der DNA können Chromatid- und Chromosomenbrüche auftreten sowie punktuelle Änderungen der genetischen Information. Beide Erscheinungen können letal sein oder zu Mutationen führen; die meisten Mutationen sind allerdings rezessiv.

Bereits geringste Strahlendosen führen zu einer Erhöhung der Mutationsrate und die Strahlenwirkung akkumuliert sich über lange Zeiträume.

Auch für genetische Strahlenwirkungen gibt es möglicherweise Reparaturmechanismen.

Strahlenstimulation

Durch niedrige Strahlendosen werden offenbar Reparaturprozesse in Gang gesetzt, die den gesetzten Strahlenschaden überkompensieren und damit zu einem im Ganzen erhöhten Metabolismus führen. Dies wird z.B. zur Steigerung der Ertragsleistung von Pflanzen verwendet, jedoch ist sein Auftreten stark und in nicht vorhersehbarem Maße von Umwelteinflüssen abhängig und oft nur schwer reproduzierbar.

Strahlengefährdung und Strahlenschutz

Natürliche und zivilisatorische Strahlenbelastung

Eine wesentliche Grundlage für die **Abschätzung des Strahlenrisikos** ist die Kenntnis der natürlichen Strahlenbelastung und ihrer Relation zu zivilisatorischen Strahlenquellen.

Die **natürliche Strahlenbelastung** wirkt sowohl von außen als auch intern (durch Aufnahme von Radionukliden in den Körper) auf den Menschen. Sie setzt sich aus 2 Komponenten zusammen:

(i) Die **Höhenstrahlung** stammt von der Sonne und aus dem Weltraum und enthält primär Röntgenstrahlen und sehr energiereiche Protonen. Durch WW mit den äußeren Luftschichten entstehen zahlreiche Folgeprodukte (e^- , e^+ , γ , n , ...), die z.T. schon in der Atmosphäre absorbiert werden, teilweise die Erdoberfläche erreichen oder auch tief in die Erde eindringen können. Durch Kernreaktionen mit Luftkomponenten entstehen auch die Radionuklide ^{14}C und ^3H aus der Höhenstrahlung.

(ii) Die **terrestrische Strahlung** stammt von natürlichen Radionukliden in der Erdoberfläche (vorwiegend ^{40}K , ^{238}U , ^{232}Th ; Halbwertszeiten von über 10^9 Jahren). Die natürlichen Radionuklide und ihre Folgeprodukte können sowohl über die Nahrungskette als auch über die Atemluft in den Körper aufgenommen werden und bewirken dort eine zusätzliche 'interne' Bestrahlung.

Die Werte für die natürliche Strahlenbelastung (Tab. 6.4) variieren stark mit der Höhe über dem Meeresspiegel und der geologischen Formation.

Eine zusätzliche zivilisatorische Strahlenbelastung resultiert aus der med. Anwendung von ionisierender Strahlen und Radionukliden (Kernkraftwerke, Kernwaffentests, Industrie, Forschung).

Tabelle 6.4. Natürliche Strahlenbelastung in $\mu\text{Sv}/\text{Jahr}$

	Fortpflanzungsorgane	Knochenmark
(1) Höhenstrahlung		
Ionisierende Komponente	280	280
Neutronen	7	7
(2) Terrestrische Strahlung einschl. Luft	500	500
(3) Interne Bestrahlung durch in den Körper aufgenommene Radionuklide	216	175
	<u>1003</u>	<u>962</u>

Strahlenschutz

Auf Grund der Kenntnisse über die natürliche Strahlenbelastung des Menschen und unter der Annahme, dass es für genetische Strahlenwirkungen keine Schwellendosis gibt, hat die ICRP (International Commission for Radiation Protection) **maximal zulässige Dosen für die äußere Bestrahlung von Individuen der Gesamtbevölkerung** sowie für verschiedene Kategorien beruflich strahlenexponierter Personen empfohlen.

Die empfohlenen Höchstwerte (Tab. 6.5 und 6.6) berücksichtigen einerseits die unterschiedl. Strahlensensibilität versch. Organe und das unterschiedl. genetische Risiko von Strahlenarbeitern.

Bei der Festlegung der pro Jahr maximal dem Körper über Luft oder Nahrungsmittel (Wasser) zugeführten Aktivitäten müssen die unterschiedl. Anreicherung der Radionuklide in einzelnen Organen, deren unterschiedl. Strahlenempfindlichkeit sowie die biol. Halbwertszeiten berücksichtigt werden.

Physikal. Halbwertszeit: Zeit, in der die Menge (und damit die Aktivität) eines Radionuklids durch den Zerfall auf die Hälfte gesunken ist.

Biol. Halbwertszeit: Zeit, nach der sich die Menge einer vom Körper aufgenommenen Substanz durch Ausscheidung auf die Hälfte verringert hat

Beispiele: ^{131}I : 8 d bzw. 80 d; \Rightarrow ^{131}Xe (β , γ)

^{137}Cs : 30 a bzw. 110-140 d; \Rightarrow ^{137}Ba (β , γ)

Tabelle 6.5. Maximal zulässige Strahlendosen in mSv/Jahr für Einzelpersonen. (Nach ICRP-Empfehlungen)

	Gesamtbevölkerung	Beruflich strahlenexponierte Personen	
		Kategorie A	Kategorie B
Ganzkörper, Gonaden, rotes Knochenmark	5	50	15
Haut, Knochen, Schilddrüse	30	300	100
Hände, Unterarme, Füße u. Unterschenkel	75	750	250
Andere Einzelorgane	15	150	50

Tabelle 6.6. Jährlich maximal dem Körper zuzuführende Aktivitäten, für beruflich strahlenexponierte Personen der Kategorie A. (Nach ICRP-Empfehlungen)

	in Luft (Inhalation) [Bq/Jahr]	in Wasser (Ingestion) [Bq/Jahr]	Die für die Gesamtbevölkerung geltenden Werte sind bis zu einem Faktor 333 niedriger!
^3H	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$	
^{32}P	$3 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	
^{56}Mn	$6 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$	
^{54}Mn	$3 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	
^{60}Co	$6 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$	
^{90}Sr	$7 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	
^{131}I	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	
^{137}Cs	$6 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	
^{226}Ra	$2 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^4$	

LITERATUR: Wechselwirkungen, Wässrige Lösungen & Strukturprinzipien

WW und Wässrige Lösungen:

- **Creighton: The Physical and Chemical Basis of Molecular Biology, Helvetian Press (2010)** ←
- **Serdyuk et al.: Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function (2007)** ←
- **Winter & Noll: Methoden der Biophysikalischen Chemie** ←

Wirkung von Strahlung:

- **Niemann: in Hoppe: Biophysik, 2. Auflage** ←
- **Durchschlag et al.: in Radiation Physics and Chemistry etc.**

Strukturprinzipien und Denaturierung:

- **Creighton: Proteins** ←
- **Creighton: The Physical and Chemical Basis of Molecular Biology, Helvetian Press (2010)** ←
- **Creighton: The Biophysical Chemistry of Nucleic Acids & Proteins, Helvetian Press (2010)** ←
- **Serdyuk et al.: Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function (2007)** ←