

Druckabhängige Strukturuntersuchungen an Proteinen und Protein-Mikroemulsion-Komplexen

Vom Fachbereich Chemie der Universität Dortmund genehmigte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

vorgelegt von

Dipl. Chem. Rudolf Köhling

aus Münster

Dortmund 2003

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit begleitet und unterstützt haben.

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Roland Winter für die Möglichkeit, dieses interessante Thema bearbeiten zu können und dabei interdisziplinär mit Wissenschaftlern aus unterschiedlichen Fachrichtungen zusammenarbeiten zu können. Bei Fragen fand ich in ihm immer den richtigen Ansprechpartner, so dass in den Diskussionen viele aufgetretene Probleme gelöst werden konnten.

Herrn Prof. Dr. Alfons Geiger danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Jürgen Woenckhaus für die immer wieder spannenden und äußerst produktiven Messzeiten an den Kleinwinkelstreuanlagen. Allen anderen Mitarbeitern des Arbeitskreises Physikalische Chemie I danke ich für die schöne gemeinsame Zeit.

Den Mitarbeitern in der feinmechanischen und elektronischen Werkstatt danke ich für die Lösung vieler kleiner experimenteller Probleme.

Besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium ermöglichten und mir während der gesamten Zeit immer zur Seite gestanden haben.

Erster Gutachter: Prof. Dr. R. Winter

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. A. Geiger

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Februar 2004

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 8 |
| 2 | Angewendete Untersuchungsmethoden und deren Grundlagen | 12 |
| 2.1 | Kleinwinkelstreuung | 12 |
| 2.1.1 | Methoden zur Berechnung der Paarabstandsverteilung – Indirekte Fourier-Transformation | 16 |
| 2.1.2 | Modellierung von dreidimensionalen Strukturen und Vergleich von Kristallstrukturen mit Kleinwinkelstreudaten | 18 |
| 2.2 | Aufbau und Besonderheiten der Kleinwinkelstreuinstrumente | 23 |
| 2.2.1 | Kratky-Kamera | 23 |
| 2.2.2 | Hochdruck-Kleinwinkelstreuexperimente | 27 |
| 2.2.3 | Neutronenkleinwinkelstreuung | 30 |
| 3 | Zeitaufgelöste und druckabhängige Strukturuntersuchungen an Proteinen | 33 |
| 3.1 | Drucksprungdenaturierung an Snase | 33 |
| 3.1.1 | Strukturelle und biologische Eigenschaften von Snase | 33 |
| 3.1.2 | Probenpräparation und experimentelle Durchführung des Drucksprungs | 34 |
| 3.1.3 | Struktur und Dynamik der Faltung/ Entfaltung von Snase | 34 |
| 3.1.4 | Kinetik der Faltung/Rückfaltung von Snase | 47 |
| 3.2 | Trp-Repressor: Strukturelle Änderungen durch Druckerhöhung | 52 |
| 3.2.1 | Struktur und biologische Funktion des Trp-Repressors | 52 |
| 3.2.2 | Experimentelle Durchführung | 52 |
| 3.2.3 | Auswertung der SAXS-Daten | 54 |
| 3.3 | Zusammenfassung | 60 |
| 4 | Hochdruckuntersuchungen von Mikroemulsionen mit eingekapselten Enzymen | 62 |
| 4.1 | Eigenschaften, Phasenverhalten und Einfluss des Drucks | 64 |
| 4.1.1 | Elastische Energie gekrümmter Oberflächen | 65 |
| 4.2 | Eigenschaften der verwendeten Enzyme – Struktur und Funktion | 70 |
| 4.2.1 | α -Chymotrypsin | 70 |
| 4.2.2 | Alkoholdehydrogenase der Leber (LADH) | 76 |
| 4.3 | Allgemeine Präparationsvorschrift für die untersuchten Mikroemulsionen | 83 |
| 4.4 | Hochdruck-SAXS-Messungen an verdünnten AOT- <i>n</i> -Oktan-Lösungen | 84 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.4.1 | 0.1 M AOT-Mischungen mit unterschiedlicher Hydratation w_0 – A-Schnitt | 85 |
| 4.4.2 | Einfluss des Drucks auf das Phasenverhalten 0.1 M AOT-Lösungen | 92 |
| 4.5 | Hochdruck-SAXS-Messungen an konzentrierten AOT- n -Oktan-Lösungen . | 97 |
| 4.5.1 | Phasenverhalten von 0.66 M AOT-Mischung mit unterschiedlicher Hydratation w_0 – B-Schnitt | 101 |
| 4.5.2 | 1.0 M AOT-Mischungen mit unterschiedlicher Hydratation w_0 – C-Schnitt | 109 |
| 4.5.3 | AOT/ n -Oktan/ H_2O -Mischungen mit unterschiedlichen Gewichtsanteilen – D-Schnitt | 113 |
| 4.5.4 | 1.57 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 5$ | 115 |
| 4.5.5 | 1.57 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 15.6$ und LADH | 117 |
| 4.5.6 | 1.7 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 23$ | 119 |
| 4.5.7 | 1.97 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 5.2$ | 120 |
| 4.6 | Zusammenfassung | 122 |
| 5 | Zusammenfassung der Arbeit | 124 |

Verwendete Symbole und Abkürzungen

| | |
|---------------------|---|
| \AA | Ångström [10^{-10} m] |
| α | Thermischer Ausdehnungskoeffizient [m^3/K] |
| a.u. | arbitrary units (s. w.E.) |
| β | Kompressibilitätskoeffizient [m^3/bar] |
| b | Streulänge [m] |
| χ^2 | Mittlerer quadratischer Fehler |
| c | Lichtgeschwindigkeit ($2.998 \cdot 10^8$ m/s) |
| C_p, C_V | Wärmekapazität bei konstantem Druck, Volumen [$\text{J}/(\text{g}\cdot\text{K})$] |
| ΔH_0 | Enthalpieänderung bei Standardbedingungen (1 bar, 293 K) [J/mol] |
| ΔG_0 | Änderung der freien Enthalpie bei Standardbedingungen [J/mol] |
| ΔS_0 | Entropieänderung bei Standardbedingungen [$\text{J}/(\text{K}\cdot\text{mol})$] |
| d | Netzebenenabstand [m] |
| f | Atomformfaktor |
| $F(Q)$ | Strukturformamplitude |
| $\tilde{\gamma}(r)$ | Korrelationsfunktion des Teubner-Strey-Modells |
| Γ | Gamma-Funktion |
| G_{curv} | Krümmungsenergie [J] |
| H | Mittlere Krümmung [m^{-1}] |
| $I(Q)$ | Gestreute Intensität |
| κ_T | isotherme Kompressibilität [bar^{-1}] |
| K | Gaußsche Krümmung [m^{-1}] |
| K_M, K_G | Elast. Modul, Krümmungsmodul [J/m^2] |
| \vec{k} | Wellenvektor [m^{-1}] |
| λ | Wellenlänge [m] |
| μ | chemisches Potential [J/mol] |
| μ_{abs} | linearer Absorptionskoeffizient |
| m_e | Masse des Elektrons ($9.1094 \cdot 10^{-31}$ kg) |
| m_n | Masse des Neutrons ($1.675 \cdot 10^{-27}$ kg) |
| N | Teilchenanzahl |
| Ω | Raumwinkelement ($f(r, \theta, \phi)$) |
| $p(r)$ | Paarabstandsverteilung |
| $P(Q)$ | intrapartikulärer Strukturfaktor |
| P | Polydispersitätsgrad |
| \vec{Q} | Streuvektor [m^{-1}] |
| θ | Streuwinkel [$^\circ$] |
| r | Radius [m] |
| r_0 | BOHRscher Bahnradius (52.92 pm) |
| R | allg. Gaskonstante (8.3144 J/(K·mol)) |
| R_g | Gyrationsradius [m] |
| $d\sigma/d\Omega$ | Differentieller Streuquerschnitt [cm^2] |
| $d\Sigma/d\Omega$ | Differentieller Streuquerschnitt [cm^{-1}] |
| $S(Q)$ | Interpartikulärer Strukturfaktor |
| T | Temperatur [$^\circ\text{C}$] |

| | |
|-------|--|
| t | Zeit [s] |
| U | Innere Energie [J/mol] |
| V | Volumen [m ³] |
| w.E. | willkürliche Einheit |
| W | Spalt-, Strahlverschmierungsfunktion |
| w_0 | Hydratationsgrad ($c(\text{H}_2\text{O})/c(\text{AOT})$) |
| x | Stoffmengenanteil |
| Z | Breite der Schultz-Verteilung |

Abkürzungen für Stoffnamen

| | |
|---------|---|
| AOT | Aerosol-OT (Bis-(2-ethyl-hexyl)-sulfosuccinat) |
| CT | α -Chymotrypsin |
| HRP | Peroxidase (Horse Radish Peroxidase) |
| LADH | Alkoholdehydrogenase der Leber |
| NADH | Nikotinamid-adenin-dinukleotid |
| SAAPPNA | Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilin |
| SAATPNA | Succinyl-Ala-Ala-Trp-Phe- <i>p</i> -nitroanilin |
| SPPNA | Succinyl-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilin |
| Snase | Staphylokokken Nuclease (Wildtyp) |
| RTT | Rattenschwanzkollagen |

1 Einleitung

Auch wenn das menschliche Genom katalogisiert, der Mechanismus der Proteinbiosynthese und vieles über den Metabolismus von Zellen und Organismen bekannt ist, existieren immer noch Unklarheiten über den Faltungsmechanismus von Proteinen, die Funktionsweise von Enzymen innerhalb von Zellen oder Protein-Lipidmembran-Wechselwirkungen, um nur eine Auswahl zu nennen. Allein das Phänomen der Faltung von Proteinen zu einer bestimmten stabilen und biologisch aktiven Form wirft noch viele Fragen auf.

Die Translation der mRNA und die Bildung einer Polypeptidkette durch die Ribosome ist ein linearer Prozess. DNA wird sequentiell ausgelesen und die Peptidkette Aminosäure für Aminosäure zusammengesetzt (s. Abb. 1.1). Im einfachsten Fall bildet sich aus der Polymerkette aus Aminosäuren (Primärstruktur) spontan und innerhalb kurzer Zeit ein aktives globuläres Protein (Tertiärstruktur). Es gilt nun herauszufinden, warum die Primärsequenz vieler Proteine unter physiologischen Bedingungen anscheinend eine intrinsische Strukturinformation besitzt und in jedem Fall zu der einen aktiven Struktur führt bzw. warum die Entstehung der Struktur so schnell erfolgt. Geht man z.B. von einem Polymer aus 100 Aminosäuren und einer Reorientierungszeit von 10^{-13} s aus, so würde es auf Grund der vielen Konformationsmöglichkeiten am C_α -Atom ca. 10^{52} Jahre dauern, bis ein nativer Zustand rein statistisch betrachtet erreicht wäre (Levinthal-Paradoxon) [1]. Es bedarf also eines passenden Modells, um die Diskrepanz zwischen der genannten Zeit im Bereich von Jahren und den im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Faltungsgeschwindigkeiten im Bereich von Sekunden und Minuten zu verstehen. Das Trichtermodell [2, 3] oder die aus einer Gittersimulation kalkulierte Energiehyperfläche [4] bieten zum Verständnis der relativ schnellen Proteinfaltung und für das Auftreten von Intermediaten eine mögliche Erklärung.

Neben der Geschwindigkeit der Faltung ist die Vorhersage der Proteinstruktur ein weiterer zentraler Punkt biologischer Forschung. Aus der Kenntnis der Kodierung im Genom und der Primärsequenz lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch keine Schlussfolgerung über den späteren dreidimensionalen Aufbau und die Funktion des Proteins ableiten. Dennoch werden auch in dieser Richtung Versuche unternommen, Prognosen der Sekundärstruktur aus der Primärsequenz zu machen, sei es durch Kartografieren der möglichen Konformationen von Aminosäuren am C_α -Atom (Ramachandran-Diagramm [5]), durch empirisch gefundene Verteilungen von Aminosäuren in Sekundärstrukturmerkmalen (Chou-Fasman-Schema [6]) oder durch molekulardynamische Simulationen [7].

Der Faltungsprozess stellt eine Art Phasenübergang vom nativen in den denaturierten Zustand dar, dabei können diverse Intermediate durchlaufen werden. Die mit der Zustandsänderung verbundenen Enthalpie- und Volumenänderungen sind fundamentale thermodynamische Eigenschaften, die sich über kalorimetrische bzw. densitometrische Messungen bestimmen lassen und zur Klassifizierung des Phasenübergangs dienen [9].

Wird das Gleichgewicht zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand gestört, relaxiert

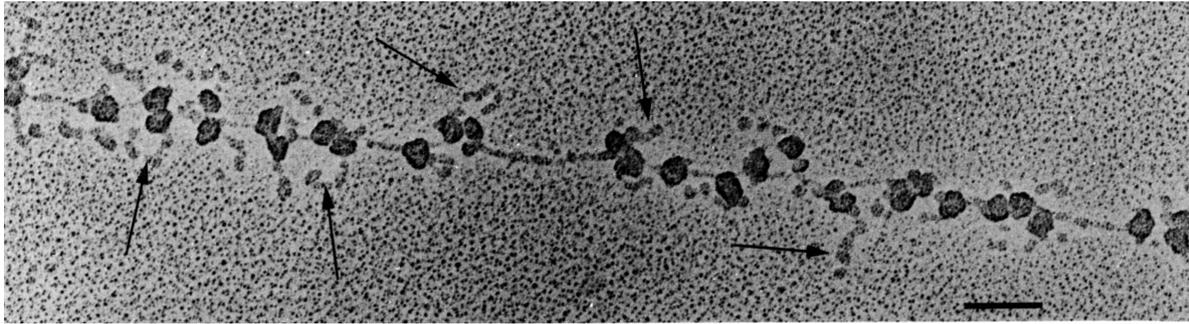


Abb. 1.1: Ausschnitt aus der Zelle der Seidendrüse des Seidenwurms *Bombyx mori*. Dargestellt ist die Translation der mRNA mit gebundenen Ribosomen und z.T. synthetisierten fibrionalen Peptidketten (Pfeile). Das 3'-Ende der mRNA befindet sich auf der rechten Seite. Der schwarze Balken repräsentiert eine Länge von 1 μm [8].

das System wieder in den entsprechenden Ausgangszustand und aus der Kinetik können Rückschlüsse über den Faltungsmechanismus gewonnen werden. Die Variation des Drucks stellt dabei eine Methode ohne Zusatz von Hilfsagenzien dar, um eine reversible Denaturierung eines Proteins zu bewirken. Die Dichte des Gesamtsystems lässt sich sehr fein einstellen, so dass auch kritische Bereiche entlang der Stabilitätslinie des Phasendiagramms eingestellt werden können. Die Geschwindigkeitskonstanten des dynamischen Gleichgewichtes zwischen gefalteter und entfalteter Spezies lassen sich durch die Anwendung der Drucksprungtechnik in Verbindung mit der Kleinwinkelstreuung (Small-Angle Scattering, SAS) bestimmen.

Neben der Entstehung eines Proteins über die Transkription der DNA, Translation der mRNA, Modifikationen an der Peptidkette und der Faltung zur endgültig aktiven Form, ist auch das Verständnis der Funktionsweise von Proteinen von fortwährendem Interesse. Proteine und Enzyme werden meist isoliert von der restlichen Zellumgebung untersucht. Wechselwirkungen mit der Zellmembran bleiben aus diesem Grunde häufig unberücksichtigt, obwohl Proteine unter normalen Bedingungen innerhalb einer Zelle oft in engem Kontakt mit Membranen oder weiteren Proteinen stehen.

Für das Studium von Proteinen bzw. Enzymen in eingrenzenden Geometrien hat sich das ternäre System AOT/*n*-Oktan/Wasser als geeignetes Modell erwiesen, da es die Funktion von Enzymen nicht inhibiert und die Matrixstrukturen in weiten Grenzen variiert werden kann. Die Mischungen sind optisch transparent, so dass spektroskopische Methoden ohne Probleme verwendet werden können. Die Größe der sich in einem weiten Mischungsbereich ausbildenden Mizellen ist variabel und lässt sich über den Wasseranteil einstellen. Enzyme können problemlos in die Mikroemulsion einbaut werden und sind dabei ähnlich der Lipidmatrix in einer Zelle oder einer Zellorganelle von einer AOT-Membran umschlossen [12, 13, 14]. Durch Variation der Zusammensetzung können weitere lyotrope mesoskopische Lipidphasen (lamellar, hexagonal) erzeugt werden. Der Einfluss unterschiedlicher Phasen, wie sie z.B. innerhalb biologischer Membransysteme bei der Exocytose oder Mythese auftreten [15], kann somit simuliert und die Auswirkungen auf die Funktion eines Proteins verfolgt werden. Die Strukturen aller Phasen zeichnen sich dabei durch eine hohe

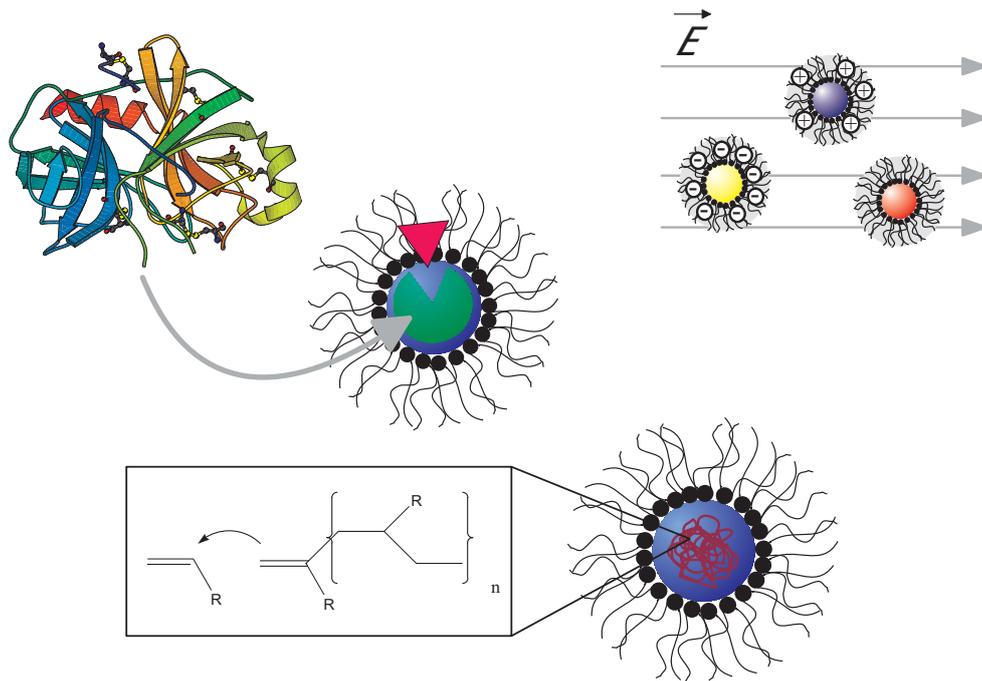


Abb. 1.2: Mikroemulsionen können als Modellsystem für Protein-Membran-Wechselwirkungen und für den Einfluss von eingrenzenden Geometrien auf die Funktion von Proteinen und Enzymen dienen. Außerdem leiten sich neue Flachbildschirmtechnologien (REED) von Mikroemulsionen ab, wobei die mögliche Modifikation der elektrophoretischen Eigenschaften ausgenutzt wird [10]. Die Mizellen eignen sich ebenfalls als Templat für die Herstellung anorganischer Verbindungen und neuer Werkstoffe [11].

Stabilität und wohldefinierte Dimensionen aus. Neben der Verwendung als biologisches Modellsystem eignen sich die AOT-Mikroemulsionen auch für technischen Applikationen oder als Templat für die Kristallisation anorganischer Verbindungen (Abb. 1.2). In der Funktion als Schablone für das Kristallwachstum hat sich gezeigt, dass sich darüber Minerale erzeugen lassen, deren Vorbilder in der Flora und Fauna wiederzufinden sind (Biomineralisation) [16].

Diese Eigenschaft lässt sich für die Herstellung neuer nanokristalliner Werkstoffe ausnutzen, die auf schon bekannten Verbindungen basieren, aber bei der erzeugten Partikelgröße andere Eigenschaften als Einkristalle oder mikrokristalline Keramiken zeigen [19, 20]. Gerade Biomminerale wie sie z.B. unter erhöhtem hydrostatischen Druck von Meerestieren gebildet werden, zeigen eine sehr hohe Festigkeit bei geringer Dichte. Neben der beschriebenen Verwendung des Systems AOT/ n -Oktan/Wasser als Modell für Protein-Membran-Wechselwirkungen steht dementsprechend auch die Charakterisierung neuer mesoskopischer Hochdruckphasen im Mittelpunkt dieser Studie. Bei Kenntnis des Phasenverhaltens nicht nur bei verschiedenen Temperaturen und Zusammensetzungen sondern auch bei verschiedenen Drücken lassen sich sicherlich weitere interessante Applikationen ableiten.

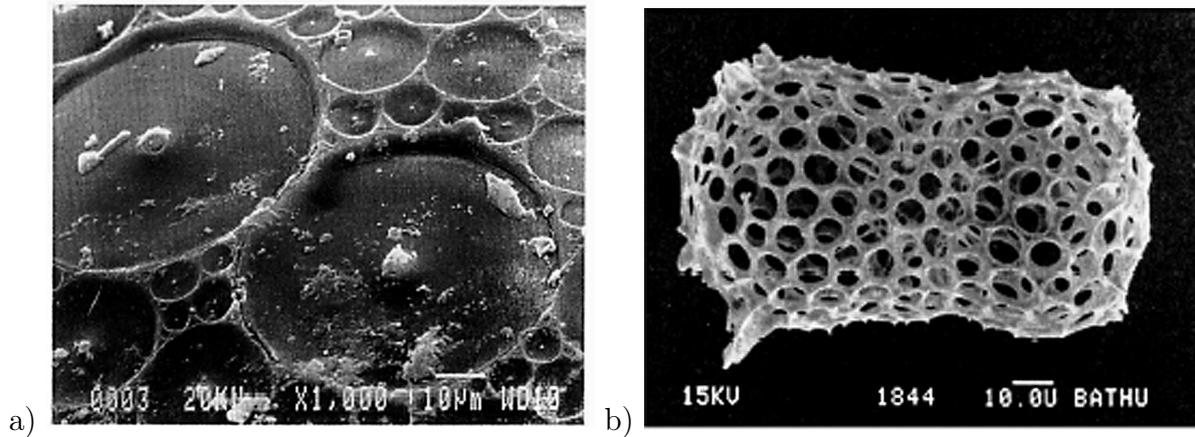


Abb. 1.3: a) Vergrößerung der Oberfläche einer lamellaren Aluminophosphatverbindung durch Kristallisation mit multilamellaren Vesikeln als Templat (der Balken entspricht einer Länge von $10\ \mu\text{m}$) [17]. b) Als Vergleich zu a) und als Beispiel für die Biomineralisation ist hier das Skelett eines Radiolarien (Rhizopoda Radiaria, einzelliger Meeresorganismus) dargestellt (Balken entspricht $10\ \mu\text{m}$) [18].

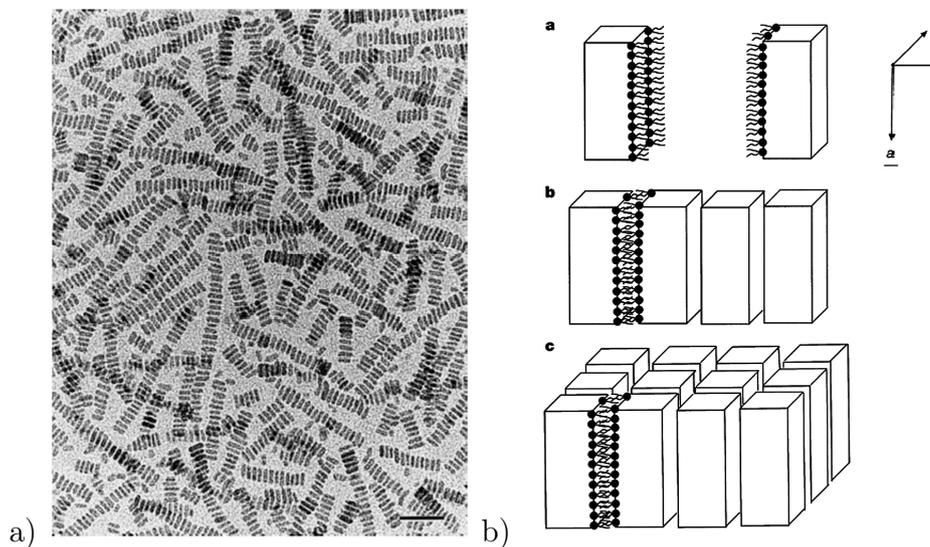


Abb. 1.4: a) TEM-Bild von BaCrO_4 kristallisiert in einer AOT-Mikroemulsion. b) Die selbstorganisierten Nanostrukturen entstehen durch Bildung einer Lipiddoppelschicht und Wechselwirkung der polaren Kopfgruppen mit den Kristalliten. Der dargestellte Balken entspricht $50\ \text{nm}$ [21].

2 Angewendete Untersuchungsmethoden und deren Grundlagen

Zur Untersuchung von Biomolekülen, biologischen Modellmembranen oder Mikroemulsionen, in die Biomoleküle eingebracht werden, steht im Bereich der mesoskopischen bis nanoskopischen Längenskala ein breites Spektrum unterschiedlicher Kleinwinkelstreuungsmethoden zur Verfügung. Als Sonden werden sowohl Photonen (Röntgen-, Synchrotronstrahlung) als auch Neutronen (Reaktor-, Spallationsquellen) benutzt. In Bezug auf biologische Modellsysteme bieten die Streusonden verschiedene Vorteile, auf die im Folgenden bei der Beschreibung der entsprechenden Experimente näher eingegangen wird.

Synchrotronstrahlungsquellen der neuesten Generation verfügen über eine hohe Brillianz. Das bedeutet, der Photonenfluss ist im Vergleich zu konventionellen Quellen mit höherer Intensität und geringeren Verlusten auf eine kleinere Fläche kollimiert. Selbst zeitabhängige Druckexperimente mit Diamant als Fenstermaterial lassen sich somit durchführen, obwohl ca. 60 % der Strahlung allein durch die Diamanten absorbiert wird.

Im Gegensatz dazu ist die Intensität bei Neutronenstreuexperimenten wesentlich geringer. Spallationsquellen wie das ISIS stellen zu diesem Zeitpunkt die leistungsfähigsten Standorte dar, sind aber nicht vergleichbar mit Röntgenstrahlungsquellen. Zeitaufgelöste Experimente im Bereich von Sekunden sind momentan nicht durchführbar. Schnellere Prozesse im Bereich $10^{-6} - 10^{-12}$ s, wie die Formfluktuation von Mizellmembranen, lassen sich jedoch durch energiedispersive Streuexperimente (Spin-Echo-, Flugzeit-, Rückstreuungsspektrometer) untersuchen [22, 23]. Eine Besonderheit der Neutronen ist, dass der Streuprozess am Kernort stattfindet und die Intensität der konstruktiv gestreuten Neutronen, ausgedrückt durch die Streulängen b , abhängig von der Sorte des Kerns und somit auch vom vorliegenden Isotop ist. Durch Anreicherung oder Austausch von Isotopen lässt sich folglich der Kontrast des Streubeitrages einzelner Probenkomponenten manipulieren und die Struktur und Dynamik der entsprechenden Bestandteile kann separat betrachtet werden.

2.1 Kleinwinkelstreuung

Unabhängig von der Art der Streusonde, sei es Röntgenstrahlung (SAXS) oder Neutronen (SANS), die Geometrie des Streuprozesses, wie sie in Abb. 2.1 dargestellt ist, bleibt in allen Experimenten gleich und es gilt für den Impulsübertrag $|\vec{Q}| = |\vec{k}_1 - \vec{k}_0|$; \vec{k}_0 entspricht dabei dem Richtungsvektor der einfallenden Welle und \vec{k}_1 dem der gestreuten Welle. Es wird elastische Streuung angenommen, d.h. die Energie $E = h \cdot c / \lambda$ und der Betrag der Wellenvektoren $|\vec{k}_0| = |\vec{k}_1| = 2\pi / \lambda$ bleibt konstant. Es folgt damit

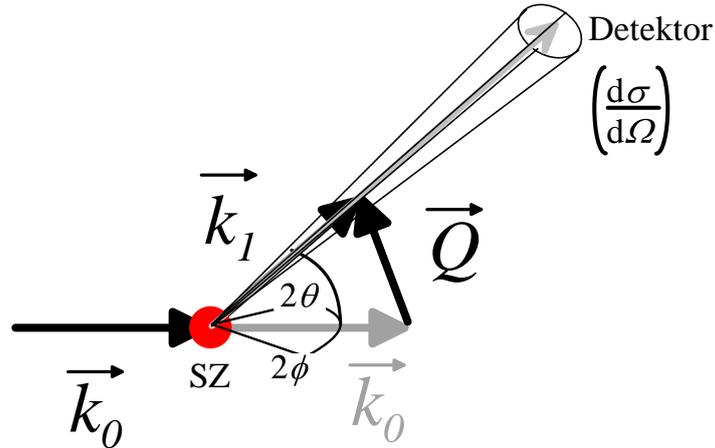


Abb. 2.1: Kinematik des Streuprozesses und Zusammenhang des Impulsübertrags Q , des Streuwinkels 2θ mit dem differentiellen Streuquerschnitt $d\sigma/d\Omega$. Der Streuquerschnitt kann auch als die in das Raumwinkelement $d\Omega(\theta, \phi)$ gestreute Intensität ausgehend vom Streuzentrum SZ verstanden werden.

$$Q = |\vec{Q}| = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \theta \approx \frac{4\pi n}{\lambda} \frac{r_{\text{det}}}{L_{\text{sd}}} \quad (2.1)$$

Der differentielle Anteil der gestreuten Intensität $d\sigma$ mit dem Impulsübertrag Q verteilt sich auf das Raumwinkelement $d\Omega$, das durch die zwei sphärischen Polarkoordinaten θ und ϕ beschrieben wird und im experimentellen Aufbau einem Detektorelement entspricht (vgl. Abb. 2.1). Das Betragsquadrat der Streulänge, d.h. das Betragsquadrat der Amplitude der gestreuten Welle, wird als Streuquerschnitt $d\sigma = 4\pi b^2$ bezeichnet. Aus der Definition des Impulsübertrags Q lassen sich zwei unterschiedlich konzeptionierte Instrumente ableiten. Bei fester Wellenlänge und Detektorgröße r_{det} ist der Q -Bereich durch den Probe-Detektor-Abstand L_{sd} definiert, wie dies bei den SAXS-Anlagen (APS, ESRF, HASYLAB) und auch bei der Kratky-Kamera der Fall ist. Wird bei einer fest vorgegebenen Geometrie eine Wellenlängeverteilung eingesetzt, erweitert sich aufgrund dessen der Q -Bereich. Dies wird bei der Beamline LOQ an der Spallationsquellen (ISIS) ausgenutzt.

$$\lambda = 2d \sin \theta \quad (2.2)$$

Der Vergleich von Gl. (2.1) mit dem Braggschen Gesetz in Gl. (2.2) liefert den Zusammenhang $d = 2\pi/Q$, mit dem sich zum einen der Q -Bereich und zum anderen die Größenordnung der vorliegenden Struktur bzw. die Größenaufösung $\Delta d = \pi/Q_{\text{max}}$ abschätzen lässt. Die Dimensionen der untersuchten biologischen Modellsysteme bewegen sich im Bereich von 2–20 nm, so dass ein Q -Bereich von 0.01 bis 0.2 \AA^{-1} optimal ist.

Ein prinzipieller Unterschied zwischen dem SANS- und SAXS-Experiment besteht in der Art der Wechselwirkungen der verwendeten Strahlung mit der zu untersuchenden Probe. Neutronen sind Elementarteilchen mit einer Ruhemasse m_n . Sie tragen keine Ladung und passieren dadurch die Elektronenhülle eines Atoms; die Wechselwirkung erfolgt beim Streuprozess also mit dem Kern. Die Geschwindigkeit von Neutronen und somit deren Energie- bzw. deren de-Broglie-Wellenlängenverteilung lässt sich thermisch beeinflussen.

Tab. 2.1: Streulängen einiger Elemente bei Verwendung von Neutronen oder Röntgenstrahlung als Streusonden. Dargestellt sind die mittleren kohärenten Streulängen \bar{b}_{coh} der natürlichen Isotopengemische bis auf Lithium und Deuterium.

| Element | $b_{\text{coh}}/10^{-12}\text{cm}$ | $f(2\theta = 0)/10^{-12}\text{cm}$ |
|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Wasserstoff | -0.3742 | 0.28 |
| Deuterium (^2H) | 0.6674 | 0.28 |
| Lithium (^6Li , 7 %) | 0.201 | 0.84 |
| Lithium (^7Li , 93 %) | -0.222 | 0.84 |
| Kohlenstoff | 0.6648 | 1.69 |
| Stickstoff | 0.936 | 1.97 |
| Sauerstoff | 0.5805 | 2.25 |
| Fluor | 0.5654 | 2.67 |
| Natrium | 0.363 | 3.09 |
| Magnesium | 0.5375 | 3.38 |
| Phosphor | 0.513 | 4.23 |
| Schwefel | 0.2847 | 4.5 |
| Chlor | 0.9579 | 4.8 |
| Calcium | 0.49 | 5.6 |

Der Streubeitrag eines Elements ist im Fall der Neutronen bestimmt durch die kohärente Streulänge b_{coh} . Diese weist in Bezug auf das Periodensystem der Elemente jedoch ein vollkommen unsystematisches Verhalten auf und kann sich schon bei Isotopen eines Elements, wie z.B. Wasserstoff (vgl. Tab. 2.1), stark unterscheiden. Der Umstand, dass Isotope unterschiedliche Streulängen besitzen, macht es möglich, Isotopengemische herzustellen, die eine mittlere Streulänge $\bar{b}_{\text{coh}} \leq 0$ ergeben und im Verlauf des SANS-Experiments den Streubeitrag der Probe oder der Umgebung auslöschen (Kontrastvariation) [24]. Diese Methode wird bei der Untersuchung der Mikroemulsionen angewendet.

Bei der Röntgenstrahlung handelt es sich um Photonen, die sich mit der Geschwindigkeit des Lichts c ausbreiten und über eine vernachlässigbare Ruhemasse verfügen. Die elektromagnetischen Wechselfelder interagieren mit der Elektronenhülle des Atoms. Im Falle der Röntgenstrahlung ist die Streulänge $f(2\theta = 0)$ (Atomformfaktor) proportional zur Ordnungszahl Z des Elements und hängt somit von der Anzahl der Elektronen ab.

Die untersuchten Strukturen bestehen aus einem Ensemble von Streuzentren mit den räumlichen Abständen \vec{r}_i innerhalb eines Probenvolumens V_p . Der betrachtete Q -Bereich wird bei den Kleinwinkelstreuexperimenten so gewählt, dass die Partikelstruktur in der oben genannten Größenordnung von einigen Nanometern aufgelöst wird. Es werden also nicht mehr Atome als Streuzentren betrachtet, sondern einzelne Volumenelemente dV mit einer mittleren Streulängendichte ρ . Aus diesem Grund wird der auf das Volumen V_p und die Partikelanzahl N_p bezogene differentielle Streuquerschnitt $d\Sigma/d\Omega(Q) = N_p/V d\sigma/d\Omega(Q)$ mit der Einheit cm^{-1} definiert.

Ausgehend von den M Streuzentren überlagern sich die gestreuten Wellen (Superposition) und es erfolgt konstruktive Interferenz. Je häufiger ein Abstandsvektor \vec{r}_i in Betrag und

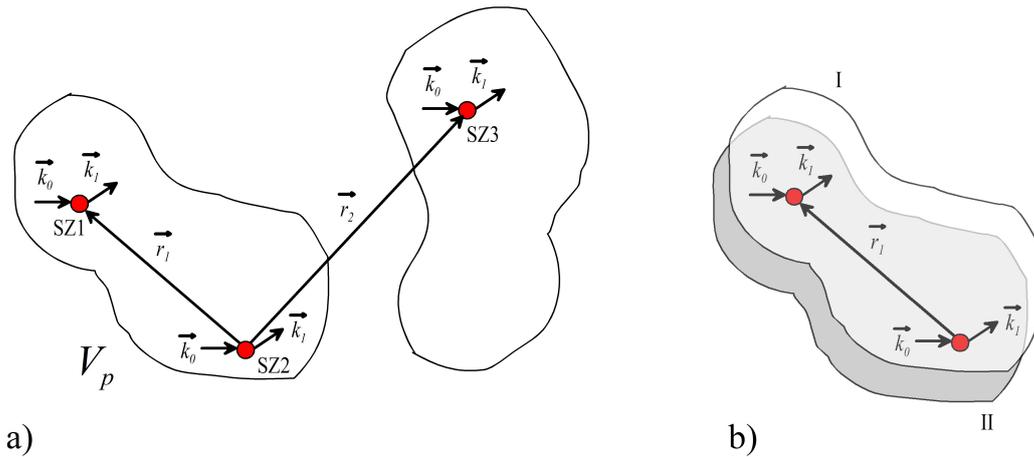


Abb. 2.2: Übertragung des Streuprozesses auf ein Ensemble von Streuzentren. **a)** Betrachtet man z.B. die dreidimensionale Struktur eines Proteins mit einem Gesamtvolumen V_p , so setzt sich dieses aus einzelnen Volumenelementen dV mit konstanter Streulängendichte ρ zusammen, die die Abstände \vec{r}_i zueinander haben. Konstruktive Interferenz erfolgt, wenn zwischen Volumenelementen innerhalb eines Proteins (\vec{r}_1) oder durch Wechselwirkung zwischen Volumenelementen zweier Proteine (\vec{r}_2) eine Phasenbeziehung besteht. **b)** Die Streuintensität hängt von der Häufigkeit ab, einen Abstandsvektor r_1 innerhalb von Fläche II wiederzufinden (vgl. Gl. 2.3 und 2.8). Diese Aufsummierung der Streuwellen sei hier durch die Verschiebung der Struktur I in der Fläche II bzw. auch senkrecht zu Fläche II grafisch angedeutet ("Shifted Volume").

Richtung innerhalb der durchstrahlten Volumens zu finden ist, desto höher summiert sich der Streuanteil [25, 26]:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) = \frac{1}{V_p} \left\langle \left| \sum_{i=1}^{N_p} \sum_{j=1 \neq i}^M b_{ij} \exp(i\vec{Q} \cdot \vec{r}_{ij}) \right|^2 \right\rangle \quad (2.3)$$

$$F_i(Q) = \sum_{j=1}^M b_{ij} \exp(i\vec{Q} \cdot \vec{r}_j) \quad (2.4)$$

$$\Rightarrow \frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) = \frac{1}{V_p} \left\langle \sum_{i=1}^{N_p} \sum_{j=1 \neq i}^{N_p} F_i(Q) F_j^*(Q) \exp(i\vec{Q} \cdot \vec{r}_{ij}) \right\rangle \quad (2.5)$$

$$S(Q) = \frac{1}{N_p} \left\langle \sum_{i=1}^{N_p} \sum_{j=1}^{N_p} \exp(i\vec{Q} \cdot \vec{r}_{ij}) \right\rangle \quad (2.6)$$

$$\Rightarrow \frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) = \frac{N_p}{V_p} P(Q) S(Q). \quad (2.7)$$

Das Betragsquadrat der Summe in Gl. 2.3 wird als Formfaktor $P(Q) = |F(Q)|^2$ des Partikels zusammengefasst. Interagieren Partikel miteinander, liegt eine Fernordnung vor, wie sie in Abb. 2.2 (a) skizziert wird. Von den Streuzentren der aggregierten Partikel

(SZ2, SZ3) entstehen zusätzliche interferierende Streuwellen der übergeordneten Struktur, die sich wiederum mit den einzelnen Partikelformfaktoren $P_i(Q)$ überlagern. Diese Überlagerung der Streuwellen wird durch Gl. 2.5 ausgedrückt, wobei sich die Summe der Streuwellen, also der Summe der Exponentialfunktion $\exp(-i\vec{Q} \cdot \vec{r}_{ij})$, zu einem Faktor zusammenfassen lässt und als interpartikulärer Strukturfaktor $S(Q)$ definiert wird (vgl. Gl. 2.6). Der gemessene differentielle Streuquerschnitt setzt sich also allein aus dem intrapartikulären $P(Q)$ und interpartikulären Strukturfaktor $S(Q)$ zusammen (vgl. Gl. 2.7) [26]. Betrachtet man Gl. 2.3 rein analytisch als Summe von Wellenfunktionen, so entspricht dies einer Fourier-Synthese. Durch die große Anzahl an Streuzentren lässt sich aus der Summe wiederum das Fourier-Integral bilden, das durch die Fourier-Transformation den Zugang zu Abstandsinformationen im realen Raum (Abstand $r/\text{Å}$) aus den Streudaten im reziproken Raum (Impulsübertrag $Q/\text{Å}^{-1}$) schafft [27]. Auf Grund der schwierigeren Normierung wird im Falle der Röntgenkleinwinkelstreuung häufig die Intensität als Funktion des Impulsübertrages $I(Q)$ gemessen, diese ist proportional zum Streuquerschnitt, so dass auch in diesem Fall die Fourier-Transformation (FT) durchgeführt werden kann.

$$I(Q) \propto \frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) = 4\pi \int_0^\infty p(r) \frac{\sin(Qr)}{Qr} dr \quad (2.8)$$

$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty I(Q) \frac{\sin(Qr)}{Qr} Q^2 dQ \quad (2.9)$$

Die Funktion $p(r)$ wird als Paarabstandsverteilungsfunktion bezeichnet und entspricht der Wahrscheinlichkeit, einen Abstandsvektor \vec{r}_i innerhalb eines Partikels oder einer Domäne von aggregierten Partikeln wiederzufinden. D.h. aus dieser Verteilungsfunktion lassen sich Informationen über Form und Größe bzw. Größenverteilung der einzelnen Partikel gewinnen. Der Informationsgehalt der Paarabstandsverteilungsfunktion ist nochmals in Abb. 2.2 (b) dargestellt. Das Prinzip entspricht dem in [27] beschriebenen "Shifted Volume". Der Wert von $p(r)$ bei $r = |\vec{r}_1|$ gibt dabei die Wahrscheinlichkeit an den Vektor \vec{r}_1 durch Verschiebung des virtuellen Partikels I innerhalb des grauen Partikels II in Betrag und Richtung wiederzufinden. Analog zur Mechanik lässt sich aus der Kenntnis der Lage der Streuzentren zueinander der Gyrationradius R_g aus $p(r)$ über Gl. 2.10 berechnen [28]:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^\infty p(r)r^2 dr}{2 \int_0^\infty p(r) dr} \quad (2.10)$$

2.1.1 Methoden zur Berechnung der Paarabstandsverteilung – Indirekte Fourier-Transformation

Zur Berechnung der Paarabstandsverteilung aus den Daten von Kleinwinkelstreuexperimenten, also die Lösung der Integralgleichung Gl. 2.8, gibt es unterschiedliche, in den nachfolgenden Abschnitten beschriebene Ansätze.

Je nach Art des Streuexperimentes sind die Daten mit weiteren instrumentabhängigen Funktionen gefaltet, die jedoch zu einem Integraloperator zusammengefasst und in den Lösungsalgorithmus einbezogen werden können.

Allgemeine Regularisierungsmethode

Allgemein sei eine Funktion \mathbf{J} im Q -Raum bestehend aus N Datenpunkten und diskreten Werten für Q_i mit $i = 1, \dots, N$ bekannt. Über einen beliebigen linearen Operator \mathbf{K} ist \mathbf{J} mit einer unbekannten Lösungsfunktion \mathbf{p} im r -Raum mit ebenfalls diskreten Werten für r_j mit $j = 1, \dots, M$ verknüpft. Daraus leitet sich ein Gleichungssystem in Form einer $M \times M$ -Matrix mit M unbekanntenen Werten für $p_j(r_j)$ ab.

$$\|\mathbf{J} - \mathbf{K}\mathbf{p}\| + \alpha\|\mathbf{p}\| = \text{MIN} \quad (2.11)$$

Vergleicht man Gl. 2.11 mit der folgenden Gl. 2.12 so wird deutlich, dass sich das Problem der Fourier-Transformation und der Berechnung der Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ mit der Regularisierungsmethode lösen lässt. \mathbf{J} entspricht der angepassten Funktion an das Feld aus N experimentellen Datenpunkten $\mathbf{I}_{\text{exp}} = I_{\text{exp},i}(Q_i)$ und \mathbf{p} ist die gesuchte Funktion $p_j(r_j)$, die durch den Operator \tilde{K} wiederum mit den experimentellen Streudaten verknüpft ist.

$$I_{\text{exp}}(Q) = \int_0^{r_{\text{max}}} \tilde{K}(Q, r)p(r)dr \quad (2.12)$$

Der Integraloperator \mathbf{K} enthält im Vergleich zu \tilde{K} neben der Faltung der Instrumentenfunktionen (Strahlprofil, Wellenlängenverteilung) und der trigonometrischen Funktion des Fourier-Integrals (vgl. Gl. 2.8) auch die in Gl. 2.12 angegebene Integration. In einem Schritt lassen sich somit instrumentbedingte Verzerrungen der Streufunktion beseitigen und die Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ berechnen. Aufgrund der experimentellen Fehler ist es nicht möglich, das Gleichungssystem nur mit der Minimierungsbedingung der kleinsten Fehlerquadrate zu lösen. Die Regularisierung durch den Term $\alpha\|\mathbf{p}\|$ mit einem Konvergenzkriterium α wird erforderlich [29]. Die Variation dieses einen Parameters reicht jedoch aus, um die Anpassung an die Messdaten und die sich ergebende Paarabstandsverteilung $p(r)$ zu optimieren. Dabei ist entscheidend, dass eine glatte Funktion \mathbf{J} durch die fehlerbehafteten Messdaten \mathbf{I}_{exp} und eine physikalisch sinnvolle Ergebnisfunktion \mathbf{p} gefunden wird. Als weitere Optimierungskriterien werden folgende Punkte mitberücksichtigt, die Einfluss auf die Steuerung des Regularisierungsparameters α nehmen:

- Minimierung von Oszillationen bei \mathbf{p} .
- Minimierung der Abweichung von der angepassten Funktion und den experimentellen Datenpunkten.
- Gewichtung positiver Werte von $p(r)$ (es können auch negative Werte zulässig sein).
- Gewichtung der Datenpunkte im Zentrum des Bereichs 0 bis r_{max} von $p(r)$.

Die Umsetzung dieser Berechnungsmethode ist mit dem Programm GNOM von D. I. Svergun *et al.* realisiert. [30, 31]. Dieses Programm wird für die Entschmierung von experimentelle Daten verwendet, die mit der Kratky-Kamera gemessen werden, und dient zur Berechnung der Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ von Proteinen in wässriger Lösung.

Verwendung des "Sampling Theorems"

Eine weitere Möglichkeit zur Berechnung der Paarabstandsverteilung ist die Formulierung eines analytischen Ausdrucks für $p(r)$, der eine geschlossene Lösung nach der Fourier-Transformation (Gl. 2.8) und somit einen funktionalen Zusammenhang für $I(Q)$ liefert. Sinnvoll ist die Verwendung einer Fourier-Reihe, da sie schon ein diskretes Abbild des Fourier-Integrals darstellt. Formuliert wurde dieser Ansatz von Moore [32].

$$\frac{p(r)}{r} = \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} c_n \sin\left(\frac{n\pi r}{r_{\max}}\right) \quad (2.13)$$

Die Fourier-Transformation von Gl. 2.13 liefert Gl. 2.14. Die Parameter c_n sind in beiden Gleichungen identisch, so dass durch Anpassung von $I(Q_i)$ an die N experimentellen Datenpunkte $I_{\text{exp}}(Q_i)$ sich $p(r)$ berechnen lässt.

$$I(Q_i) \cdot Q_i = 4 \sum_i \sum_{n=1}^{\infty} c_n B(n, i) \quad (2.14)$$

$$\text{mit } B(n, i) = \pi n r_{\max} (-1)^{n+1} \sin(2\pi r_{\max} Q_i) \left((\pi n)^2 - (2\pi r_{\max} Q_i)^2 \right)^{-1}$$

Voraussetzung für diese Methode sind allerdings Messdaten, die schon von instrumentellen Verschmierungseffekten bereinigt sind und die nach Abzug der Untergrundstreuung immer noch ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen. Die einfache Parametrisierung mit trigonometrischen Funktionen birgt allerdings die Gefahr, dass die Paarabstandsverteilung durch künstliche Oszillationen aufgrund von Abbrucheffekten oder einer falsch gewählten Anzahl an trigonometrischen Funktionen n keinen glatten Verlauf aufweist. Dadurch vergrößert sich im ungünstigsten Fall der Fehler des Gyrationradius R_g . Der Vergleich mit weiteren Methoden, z.B. der genannten Regularisierungsmethode oder der von Glatter vorgeschlagenen Verwendung von Spline-Funktionen mit variablen Knotenpunkten (Programmpaket GIFT) [33, 34], zeigt allerdings eine sehr gute Übereinstimmung bei den untersuchten Proteinen und zum größten Teil auch bei den mizellaren Systemen. Die Grenzen der Methode nach Moore werden bei frei verteilten elongierten Mizellen erreicht, jedoch können die in einigen Fällen sichtbaren Oszillationen aber immer noch vernachlässigt und ein glatter Verlauf von $p(r)$ aufgrund der dargestellten Fehler angenommen werden. Die berechneten Gyrationradii der unterschiedlichen Methoden weichen im Mittel um $\pm 0.5 \text{ \AA}$ voneinander ab.

2.1.2 Modellierung von dreidimensionalen Strukturen und Vergleich von Kristallstrukturen mit Kleinwinkelstreudaten

Bei Kenntnis einer Struktur mit atomarer Auflösung lässt sich die Streufunktion über die Debye-Gleichung (Gl. 2.15) aus den n Atomkoordinaten $r_{ij} = |\vec{r}_i - \vec{r}_j|$ und Atomformfak-

toren $f(Q)_{i,j}$ berechnen. Im Fall der Kleinwinkelstreuung können die Formfaktoren dabei als unabhängig vom Streuwinkel angenommen werden.

$$I(Q) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n f_i f_j \frac{\sin(Qr_{ij})}{Qr_{ij}} \quad (2.15)$$

Liegt statt eines Koordinatensatzes eine Streulängendichteverteilung $\rho(\vec{r})$ vor, so nimmt die Debye-Gleichung folgende Form an:

$$I(Q) = \int \int_V \rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2) \frac{\sin(Qr_{12})}{Qr_{12}} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \quad (2.16)$$

Mit Gl. 2.16 lässt sich nun die Streufunktion eines beliebig gearteten Modellkörpers berechnen und mit den experimentellen Daten vergleichen. Eine elegante Methode, um die Streulängendichteverteilung inkl. der Fourier-Transformation zu parametrisieren, ist die Verwendung der sphärisch-harmonischen Funktionen $Y_{lm}(\theta, \phi)$ (vgl. S. 159 in [27]). Erforderlich ist jedoch die Verlegung des Koordinatenursprungs in den Schwerpunkt des Modellkörpers und die Transformation von kartesischen Koordinaten in sphärische Polarkoordinaten r, θ, ϕ , die als $\Omega = \Omega(r, \theta, \phi)$ bzw. ohne den Radius r als $\omega = \omega(\theta, \phi)$ zusammengefasst werden.

$$A(Q) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^{+l} A_{lm}(Q, \vec{r}) Y_{lm}(\omega) \quad (2.17)$$

Für die Beschreibung des Modellkörpers und die Berechnung der Streukurve reicht die Kenntnis der partiellen Amplituden $A_{lm}(Q, \vec{r})$ aus. Das Betragsquadrat $|A_{lm}(Q, \vec{r})|^2$ ist wiederum der intrapartikuläre Strukturfaktor des Modellkörpers.

Es existieren nun verschiedene Möglichkeiten, um eine Modellstruktur zu erhalten. Vorgestellt und zur Auswertung der Streudaten herangezogen werden vier von Svergun *et al.* entwickelte Methoden, die in beiden Fällen auf Strukturdaten im PDB-Format (Protein Datenbank Brookhaven) zurückgreifen und in den folgenden Abschnitten beschrieben werden [35, 36].

Berechnung der Kleinwinkelstreckurve aus NMR- oder XRD-Strukturen

Die erste Möglichkeit geht von dem Vorhandensein einer Proteinstruktur mit atomarer Auflösung aus, auf die zur Berechnung der Streukurve zurückgegriffen werden kann. D.h. die Art und Position der Atome eines Moleküls sind durch Kristall- oder NMR-Strukturanalyse bestimmt worden und liegen im PDB-Format vor. Über Gl. 2.18 wird eine theoretische Streukurve berechnet, wobei ein zusätzlicher negativer Streubeitrag durch das Ausschlussvolumen $C_{lm}(Q)$ mit der Streulängendichte des Lösungsmittels ρ_0 und ein additiver Streubeitrag der Solvathülle $B_{lm}(Q)$ mit der Streulängendichte $\delta\rho = \rho_b - \rho_0$ zu berücksichtigen ist. Die Atomformfaktoren der individuellen Atome sind den *International Tables for X-ray Crystallography* entnommen [37].

$$I(Q) = \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^{+l} |A_{lm}(Q) - \rho_0 C_{lm}(Q) + \delta\rho B_{lm}(Q)|^2 \quad (2.18)$$

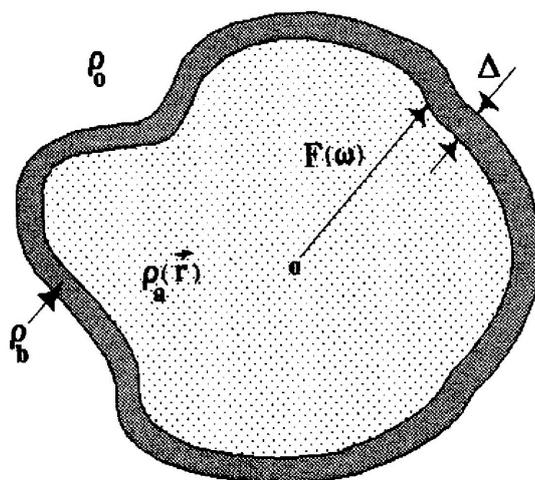


Abb. 2.3: Definition der Streubeiträge einer Modellstruktur in Lösung. Sind die Atomkoordinaten, z.B. aus der Kristallstruktur eines Proteins, und somit die Streulängendichte $\rho_a(\vec{r})$ bekannt, lässt sich daraus die Hüllenfunktion $F(\omega)$ bestimmen. Ausgehend von der Hüllenfunktion wird der zusätzliche Streubeitrag einer Hydrathülle mit der Streulängendichte ρ_b und der Schichtdicke Δ mitberücksichtigt.

In Abb. 2.3 sind die einzelnen Streubeiträge basierend auf der NMR- bzw. XRD-Struktur dargestellt. Mit den in der PDB-Datei gespeicherten Atomkoordinaten lässt sich die Streulängendichte $\rho_a(\vec{r})$ für die einzelnen Koordinaten \vec{r} berechnen. Vom Massenschwerpunkt als Ursprung ausgehend, werden iterativ die Koordinaten der Oberfläche abgetastet und in der Hüllenfunktion $F(\omega)$ gespeichert. Mit der Hüllenfunktion wird eine theoretische Hydratschicht der Schichtdicke Δ um das Protein gelegt, so dass der Formfaktor $B_{lm}(Q)$ berechnet werden kann [35].

Ab-initio Gestaltbestimmung

Liegen keine Informationen über die atomare Struktur des Proteins vor, existiert die Möglichkeit aus einzelnen "Dummy"-Atomen (DA) einen dreidimensionalen Körper (Programm DAMMIN) oder aus "Dummy"-Aminosäureresten (DR) eine Polypeptidkette anhand der Kleinwinkelstreudaten nachzumodellieren (Programm GASBOR). Beide Programme wurden von D. Svergun *et al.* entwickelt [36, 38].

Um ein "Dummy Atom Model" (DAM) zu kreieren, wird zunächst von einer Startkonfiguration ausgegangen. Im einfachsten Fall ist dies eine Kugel aus einer beliebigen Anzahl dichtgepackter Streuzentren. Ausgehend von Gl. 2.17 wird die Streukurve über Gl. 2.19 berechnet und mit den gemessenen Daten verglichen. K entspricht der Anzahl der Phasen, in diesem Fall zwei (Solvathülle und Protein), mit dem entsprechenden Streukontrast $\Delta\rho_k = \langle \rho_k(\vec{r}) \rangle - \rho_0$ im Vergleich zur Streulängendichte des Lösungsmittels mit ρ_0 .

$$I(Q) = 2\pi^2 \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^{+l} \left[\sum_{k=1}^K (\Delta\rho_k A_{lm}^{(k)}(Q))^2 + 2 \sum_{n>k} \Delta\rho_k A_{lm}^{(k)}(Q) \Delta\rho_n A_{lm}^{*(n)}(Q) \right] \quad (2.19)$$

Ähnlich wie bei molekulardynamischen Simulationen wird in beiden Programmen, DAMMIN und GASBOR, die Konfiguration nach dem Zufallsprinzip geändert. Das wiederum bedeutet, dass ein Konvergenzkriterium als zusätzliche Abbruchbedingung implementiert werden muss. Bei DAMMIN dient für die Konfiguration \mathbf{r} die Konvergenzbedingung $f_{\text{DA}}(\mathbf{r}) = \chi^2 + \alpha P_{\text{DA}}(\mathbf{r}) = \text{MIN}$. Es geht darin der kleinste quadratische Fehler von experimenteller und berechneter Streukurve χ^2 und das "Looseness Criterion" $P_{\text{DA}}(\mathbf{r}) = 1 - \langle C(N_{\text{DA}}) \rangle$ ein. Das "Looseness Criterion" wird deshalb eingeführt, da im nativen Zustand eines Proteins von einer dichtgepackten Anordnung der Peptidkette und somit auch der Streuzentren ausgegangen wird. Der von DAMMIN erzeugte Modellkörper sollte also ebenfalls eine dichte Packung der N_{DA} DAs ergeben. Bei jedem Iterationsschritt wird zunächst die Lage der einzelnen DAs verändert, die Streukurve $I(Q)$ berechnet und mit den experimentellen Daten $I_{\text{exp}}(Q)$ verglichen; zusätzlich wird die mittlere Konnektivität $\langle C(N_{\text{DA}}) \rangle$ der einzelnen DAs zueinander berechnet und mit der vorherigen Konfiguration verglichen. Die Gewichtung des "Looseness Criterion" wird mit dem Faktor α reguliert.

Die Rekonstruktion einer Polypeptidkette über das Programm GASBOR erfolgt in ähnlicher Weise wie bei DAMMIN, jedoch erfordert die Modellierung einer Peptidkette zusätzliche Kriterien bezüglich der Anordnung der DRs. Diese Kriterien gehen direkt in die Konvergenzbedingung $f_{\text{DR}}(\mathbf{r}) = \chi^2 + \alpha P_{\text{DR}}(\mathbf{r})$ bzw. $P_{\text{DR}}(\mathbf{r})$ ein und werden aus den Mittelwerten verschiedener Proteinstrukturen (NMR, XRD) erhalten, wie z.B. der mittlerer Abstand zwischen zwei C_{α} -Atomen von 0.38 nm. Analog zum "Looseness Criterion" wird die Konnektivität der DRs und somit das Einhalten des mittleren Abstandes in einer Konfiguration \mathbf{r} durch den Term $G(\mathbf{r})$ in Gl. 2.20 geprüft.

$$P_{\text{DR}}(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^{N_{\text{DR}}} \left[\frac{N_{\text{DR}}(\vec{r}_{i,i'}) - \langle N_{C_{\alpha}}(\vec{r}_{i,i'}) \rangle}{\langle N_{C_{\alpha}}(\vec{r}_{i,i'}) \rangle} \right]^2 + G(\mathbf{r}) + [\text{MAX}\{0, (|\vec{r}_c| - r_0)\}]^2 \quad (2.20)$$

Desweiteren wird aus der Mittelung der Strukturinformationen in den PDB-Datensätzen eine empirische Verteilungsfunktion $\langle N_{C_{\alpha}}(|\vec{r}_{i,i'}|) \rangle$ benachbarter C_{α} -Atomen erhalten, die der mittleren Anzahl von C_{α} -Atomen in einem Abstand $|\vec{r}_{i,i'}|$ entspricht. Gemittelt wird über die C_{α} -Atome mit den Koordinaten \vec{r}_i und den Abständen zu allen weiteren C_{α} -Atomen $|\vec{r}_{i,i'}|$ mit $i' \neq i = 1 \dots N_{C_{\alpha}}$. In gleicher Weise wird aus der Anordnung der DRs in der Konfiguration \mathbf{r} die Verteilungsfunktion benachbarter DRs $N_{\text{DR}}(\vec{r}_{i,i'})$ berechnet und mit der empirischen Verteilungsfunktion verglichen; die mittlere quadratische Abweichung der beiden Verteilungsfunktionen entspricht dem ersten Term in Gl. 2.20. Sinnvollerweise entspricht die Anzahl der DR N_{DR} der Anzahl an C_{α} -Atomen $N_{C_{\alpha}}$ des betrachteten Proteins. Der letzte Term sorgt dafür, dass die Position des Schwerpunktes \vec{r}_c in der Nähe des Ursprungs bleibt, $r_0 \approx 0.1 r_{\text{max}}$ entspricht in diesem Zusammenhang der zulässigen Toleranz bezogen auf die maximale Ausdehnung des Proteins r_{max} . Die Gewichtung der

Konvergenzbedingung $P_{\text{DR}}(\mathbf{r})$ wird wiederum durch den Faktor α reguliert. Primäre Optimierungsbedingung bleibt die Minimierung des mittleren quadratischen Fehlers χ^2 von der berechneten Streukurve des Modellproteins und den experimentellen Daten [38].

"Rigid Body Modelling"

Eine weitere Methode, um aus den Kleinwinkelstreudaten Strukturinformationen zu erhalten, ist die Methode des "Rigid Body Modelling". Dabei wird angenommen, dass das untersuchte Protein ein Dimer ist und sich aus gleichen (Homodimer) oder unterschiedlichen Untereinheiten (Heterodimer) zusammensetzt, deren Kristallstrukturen in der Form von Atomkoordinaten (PDB-File) bekannt sind. Die Streuteile der Untereinheiten lassen sich somit über Gl. 2.18 berechnen. In den nachfolgenden Gleichungen bezieht sich die Notation jedoch auf die Untereinheiten A und B. Die Streuamplitude von A ist somit durch $A_{lm}(Q)$ und jene von B durch $B_{lm}(Q)$ definiert. Implizit enthalten die Streuamplituden die Beiträge der Solvathülle bzw. des Ausschlussvolumens. Weiterhin wird angenommen, dass sich die Strukturen der Unterheiten durch die Bildung des Dimers im Vergleich zur Kristallstruktur nicht verändern. Die Unterheiten werden also als rigide Körper definiert, deren Lage zueinander so lange verändert wird, bis die Streufunktion $I(Q)$ der theoretische Quartärstruktur mit dem Resultat des Experiments übereinstimmt. Dementsprechend wird die Streufunktion $I(Q)$ als Summe der Streufunktionen $I_A(Q)$ der Untereinheit A und der Streufunktion $I_B(Q)$ der Untereinheit B formuliert. Aus der quadratischen Gleichung folgt ein Kreuzterm, bestehend aus dem Produkt der Streuamplituden $A_{lm}(Q)$ der Untereinheit A und der konjugiert komplexen Streuamplitude $\tilde{B}_{lm}^*(Q)$ der Untereinheit B:

$$I(Q) = I_A(Q) + I_B(Q) + 2\pi^2 \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^{+l} 2 \operatorname{Re} [A_{lm}(Q) \tilde{B}_{lm}^*(\vec{Q})] \quad (2.21)$$

Die Streuamplituden der Untereinheiten $A_{lm}(Q)$ und $B_{lm}(Q)$ werden analog Gl. 2.17 berechnet. Jedoch wird die Untereinheit B gegenüber A um die Winkel α , β und γ gedreht bzw. um den Betrag $|\vec{u}|$ im realen Raum bewegt, bis die berechnete Streukurve optimal mit den gemessenen Daten übereinstimmt. Die modifizierte Streuamplitude $\tilde{B}(Q) = f(B_{lm}(Q), \alpha, \beta, \gamma, \vec{u})$ beschreibt die Translations-Rotations-Bewegung im Verlauf des Optimierungsprozesses [39]. Als Optimierungskriterium wird wiederum das kleinste Fehlerquadrat χ^2 von theoretischer und experimenteller Streukurve mit N Datenpunkten verwendet:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \left(\frac{I_i(Q_i) - I_{\text{exp}}(Q_i)}{\sigma(Q_i)} \right)^2 \quad (2.22)$$

2.2 Aufbau und Besonderheiten der Kleinwinkelstreuinstrumente

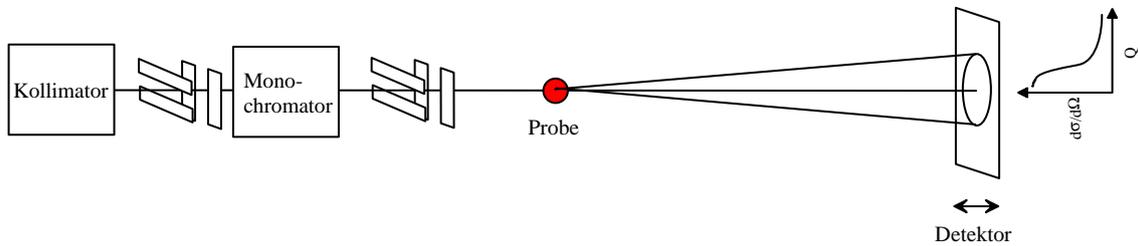


Abb. 2.4: Allgemeiner Aufbau des Kleinwinkelstreuexperimentes unabhängig von der verwendeten Streusonde oder dem verwendeten Kollimationssystem.

Prinzipiell lassen sich alle durchgeführten Experimente auf den in Abb. 2.4 dargestellten Aufbau zurückführen. Im Idealfall liegt am Probenort ein punktförmiger monochromer Strahl vor, so dass von einem einfallenden Wellenvektor \vec{k}_i mit einer Wellenlänge λ ausgegangen werden kann. SAXS-Beamlines insbesondere "High-Brilliance Beamlines" an Synchrotronen entsprechen diesem Ideal noch am nächsten. Weitere Möglichkeiten zur Messung der Kleinwinkelstreuung stellen Kratky-Kompaktsysteme und Beamlines an Neutronenquellen dar, die hier ebenfalls genutzt wurden. Diese weisen allerdings aufgrund der geringeren Intensität der Strahlungsquelle Abweichungen von den geforderten optischen Eigenschaften des Strahls bzw. des Kollimationssystems auf. Zum einen liegt eine Wellenlängenverteilung und zum anderen eine endliche Ausdehnung des Strahls am Probenort vor. Daraus folgt eine Verteilung von einfallenden und gestreuten Wellenvektoren \vec{k}_f , die wiederum die Überlagerung einer Summe von Streufunktionen $\tilde{I}(Q)$ mit der eigentlichen Streufunktion $I(Q)$ bedeutet ("Versmierung", vgl. Gl. (2.23)):

$$I_{\text{exp}}(Q) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_0^{\infty} W_3(y)W_2(x)W_1(\lambda) I\left(\sqrt{x^2 + (Q - y)^2}/\lambda\right) d\lambda dx dy \quad (2.23)$$

Die gemessene Intensität als Funktion des Streuvektors ist also zusätzlich mit den Gewichtungsfunktionen der einzelnen Verschmierungseffekte gefaltet: $W_1(\lambda/\lambda_0)$ mit λ_0 als Referenzwellenlänge (z.B. K_{α} -Linie von Kupfer) steht für die Wellenlängenverteilung, $W_2(x)$ für das Breitenprofil bzw. $W_3(y)$ für das Längenprofil des Primärstrahls. x und y entsprechen der in die Einheiten des Streuvektors umgerechneten Ordinate der Profile. Alle Gewichtungsfunktionen W_i lassen sich messen und die experimentelle Streukurve lässt sich somit nach den oben dargestellten Gl. 2.23 korrigieren.

2.2.1 Kratky-Kamera

Durch das Kollimationssystem liegt in der Probenebene ein in der Länge stark verbreiteter Röntgenstrahl vor (ca. 20 mm). Die Breite des Eingangsspalts ist allerdings sehr viel

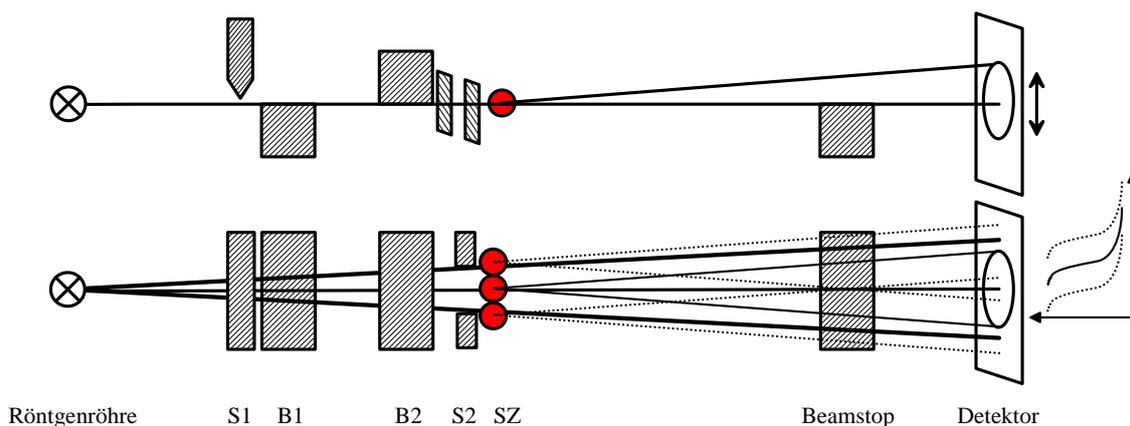


Abb. 2.5: Aufbau der Kleinwinkel-Kompaktkamera (Anton Paar KG) nach O. Kratky. Blende S1 begrenzt die Strahlbreite am Eingang. Die Anordnung der Brücken B1 und B2 sorgen für die Minimierung der diffusen Röntgenstrahlung. Die Strahlhöhe wird mit der Blende S2 begrenzt und wird im Vergleich zur Breite sehr groß gewählt, um einen Intensitätsgewinn am Probenort zu erzielen. Der Intensitätsunterschied zwischen Primärstrahl und der durch die Probe gestreuten Strahlung beträgt mehrere Größenordnungen, so dass die Empfindlichkeit des Szintillationszählrohres entsprechend groß gewählt ist. Aus diesem Grund schneidet der Beamstop den Primärstrahl auf Höhe des Winkels $2\theta = 0$ ab, um den Detektor vor Beschädigungen zu schützen.

kleiner (ca. $80 \mu\text{m}$), so dass die gemessene Streufunktion hauptsächlich durch die Längsverschmierung $W_3(y)$ beeinflusst wird. Durch Diskriminierung der K_{β} -Linie über einen Nickelfilter kann auch eine Wellenlängenverteilung vernachlässigt werden. In Abb. 2.5 ist das Kollimationssystem zur Minimierung der Streustrahlung in der Nähe des Primärstrahls und der Einfluss der Strahlhöhe auf die gemessene Streukurve skizziert [40, 41]. Der in Abb. 2.5 skizzierte Strahlengang und die drei sich in diesem Strahlengang befindlichen Streuzentren (z.B. Proteine) sollen den Effekt der Verschmierung aufgrund des breiten Strahlprofils veranschaulichen. Selbst mit der Vereinfachung einer punktförmigen Strahlungsquelle kommt es zu einer verschobenen Überlagerung mehrerer Streukurven (---) auf die eigentliche Streukurve (—). Durch die Verwendung einer Röntgenröhre mit breitem Fokus und durch den kompakten Strahlengang ist die Divergenz des Strahls kleiner als dargestellt, wie dies auch aus dem Strahlprofil in Abb. 2.7 zu entnehmen ist. Zur Entschmierung der gemessenen Streudaten wird das Programm GNOM von D.I. Svergun *et al.* verwendet. Das Programm GIFT von O. Glatter *et al.* liefert gleiche Ergebnisse [42, 33, 34], lässt aber die einfache nachträgliche Berechnung eines dreidimensionalen Strukturvorschlages (DAMMIN, GASBOR) und den Vergleich mit Kristallstrukturen von Proteinen aus der Brookhaven Proteindatenbank (CRYSOL, MASSHA) nicht zu. Das Programm GIFT ermöglicht hingegen die Bestimmung von Wechselwirkungspotentialen zwischen den Partikeln und die Berechnung des interpartikulären Strukturfaktors $S(Q)$ anhand gegebener Modelle (z.B. Percus-Yevick, Ornstein-Zernike). Die Präzision der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hochdruckmessungen reicht für jene weiterge-

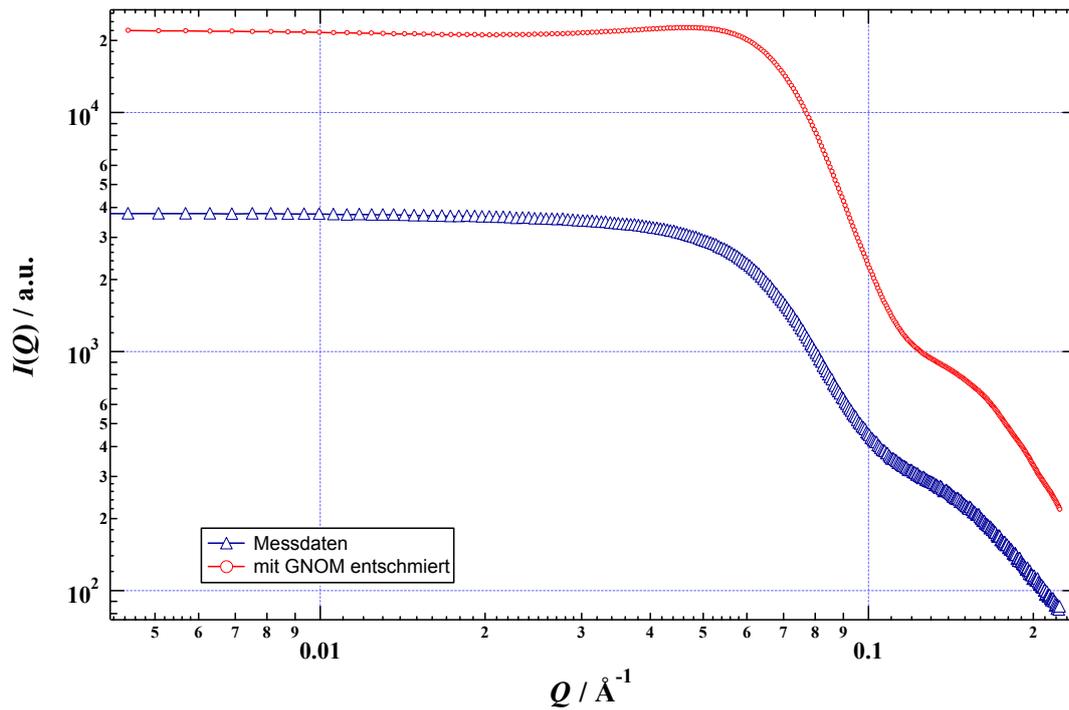


Abb. 2.6: Einfluss der Längsverschmierung durch das Kollimationssystem der Kratky-Kamera auf die gemessene Streufunktion. Ohne die Korrektur des Strahlprofils wäre der breite Korrelationspeak nicht erkennbar.

henden Berechnungen allerdings nicht aus.

Die Längsverschmierung hat einen signifikanten Einfluss und muss aus den Streudaten herausgerechnet werden, wie dies am Beispiel von Abb. 2.6 und Abb. 2.8 verdeutlicht wird. Die Kalibrierung der Q -Achse über Bragg-Reflexe erfolgte in beiden Fällen mit einem Rattenschwanzkollagen- (RTT-) bzw. Silberstearat-Präparat.

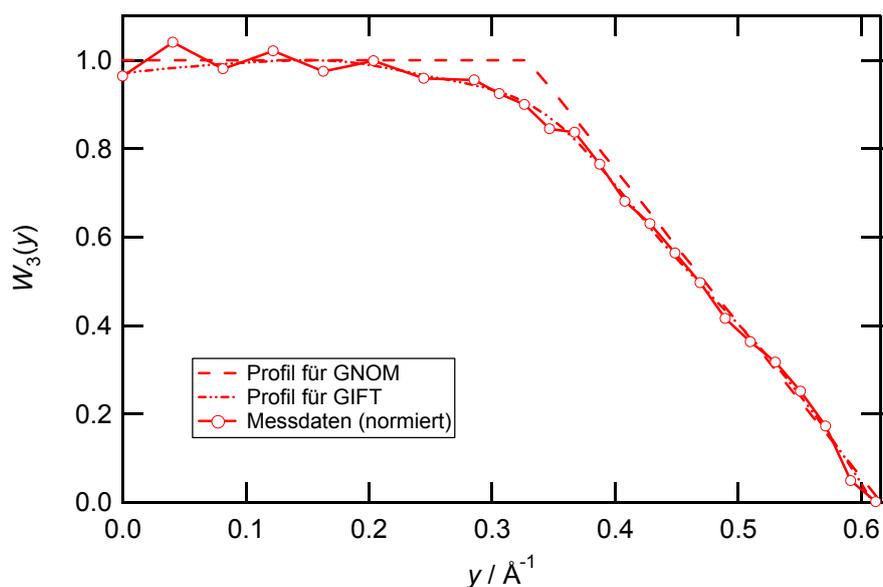


Abb. 2.7: Strahlhöhenprofil der verwendeten Kratky-Kamera (Anton Paar KG, Graz). Die Vermessung des Primärstrahls erfolgt mit einer beweglichen Schlitzblende, die über eine Millimeterskalierung verfügt. Der Primärstrahl wird mit Bleifolie abgeschwächt.

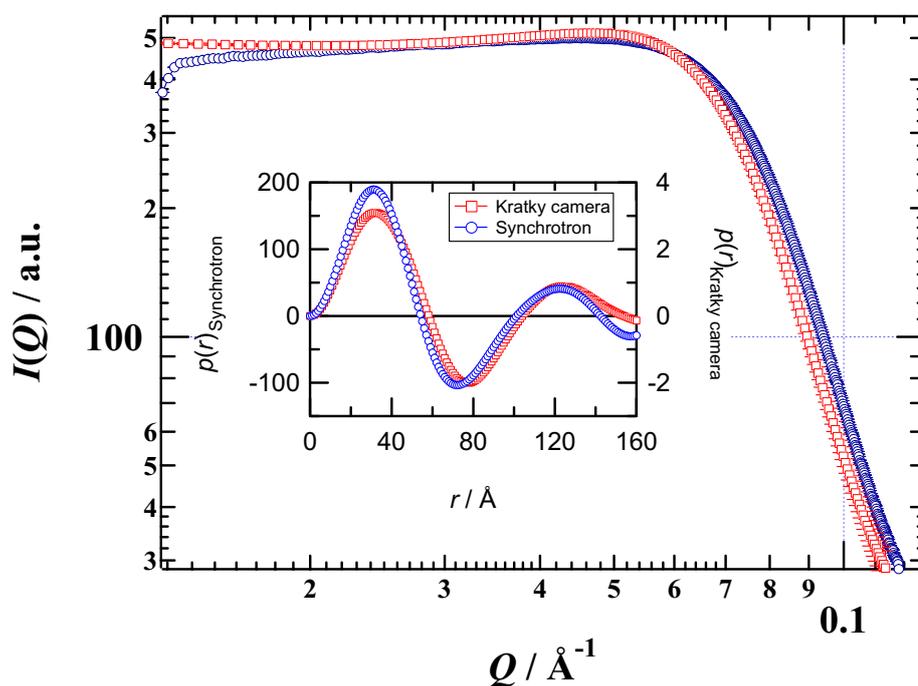


Abb. 2.8: Vergleich der Streudaten zweier unabhängig voneinander präparierter Proben gleicher Zusammensetzung (0.66 M AOT, $w_0 = 15.6$) unter gleichen Bedingungen (25 °C, 1 bar) untersucht mit unterschiedlichen Methoden. Die Kratky-Daten wurden mit dem Programm GNOM unter Verwendung des oben dargestellten Strahlprofils entschmiert, die Ergebnisse der Synchrotron-Messungen bedürfen keiner Korrektur. Beide Streukurven stimmen gut überein.

2.2.2 Hochdruck-Kleinwinkelstreuexperimente an Synchrotron-Strahlungsquellen

Die Hochdruckexperimente wurden an Synchrotron-Strahlungsquellen DORIS III (Beamline A2, DESY, Hamburg), ESRF (Beamline ID2, Grenoble) und APS (Beamline 11ID, BESSRC-CAT, Argonne) unternommen. Prinzipiell ist der Aufbau bei allen Beamlines vergleichbar mit der in Abb. 2.4 dargestellten Skizze. Die Quelle ist in allen Fällen ein Synchrotron, jedoch erfolgt die Erzeugung der Strahlung auf unterschiedlichen Wegen: Entweder durch Ablenkmagnete (A2, DORIS III) oder durch magnetische Wechselfelder (Wiggler bei 11ID und Undulator bei ID2). Als Kollimationssystem werden eine Bank aus mehreren Nickelspiegeln (A2) oder gewölbte Einzelspiegel mit Metallbeschichtung (Pt, Pd oder Rh) benutzt (11ID und ID2). Die weitere Fokussierung des Strahls erfolgt über vertikale und horizontale Blendensysteme. Je nach Konstruktion variiert die Position des Monochromators im Strahlengang und kann sowohl nach dem Kollimationssystem (gekrümmter Ge-(111)-Monochromator, A2) als auch davor geschaltet sein (Doppelkristall-Si-(220)-Monochromator, 11ID bzw. Doppelkristall-Si-(111)-Monochromator, ID2). Die Detektion der gestreuten Strahlung erfolgt inzwischen ausnahmslos mit 2D-CCD-Detektoren (FReLoN-CCD-Kamera oder MAR-CCD-Detektor). Die Auflösung beträgt 1024×1024 Punkte bezogen auf die 4 einzelnen CCD-Quadranten. Es können maximal 14 Frames pro Sekunde vom Detektor übertragen werden. Die zweidimensionalen Rohdaten werden auf die unterschiedliche Empfindlichkeit der Quadranten (Dark Exposure) und auf die Intensität des nicht-gestreuten Strahls normiert (Intensität der Ionisationskammer). Bedingt durch die Messwerterfassung beträgt die Totzeit zwischen 2 Diffraktogrammen 1 s, die Belichtungszeit beträgt dabei nur 0.1 s (APS, ESRF). Als Probenkammer wird eine Hochdruckzelle mit Diamantfenstern auf einen horizontal und vertikal beweglichen Tisch montiert [43]. Die Druckerzeugung erfolgt über eine Spindelpresse, zugelassen bis 7000 bar (Nova Swiss, Efretikon, CH), die über eine entsprechende Stahlkapillare (1/4", 7000 bar) mit der Zelle verbunden ist. Nadelventile (7000 bar, Nova Swiss) riegeln die Apparatur gegenüber dem Atmosphärendruck ab. Zur Messung des Drucks wird ein elektronischer Sensor von Sensotec ($0 - 12000 \pm 50$ bar, baugleich mit Burster A5-UHP Typ 8275) verwendet.

Drucksprungapparatur

Zur Durchführung der Drucksprungexperimente wurde ein spezieller Aufbau entwickelt, der es ermöglicht, Druckänderungen von mehreren 1000 bar innerhalb von ca. 50 ms in der Diamantfensterzelle zu erzeugen. Hauptbestandteile sind die Hochdruckzelle mit Diamantfenstern, die modifizierten Pneumatikventile (Typ 530.3431-7, normal offen, Nova Swiss, CH), die Handpumpe mit Spindelantrieb (Typ 550.0400.2, Nova Swiss, CH) und das Druckreservoir mit Spezialdichtung (Anfertigung der mechanischen Werkstatt, Universität Dortmund, FB Chemie). Stahlkapillare mit einer Belastungsgrenze von 7000 bar verbinden die einzelnen Komponenten, wobei einzelne Abschnitte mittels Nadelventilen (Typ 530.0431, Nova Swiss, CH) abgedichtet werden können.

Ausschlaggebend für die Dimensionierung des Reservoirs mit einem Füllvolumen von 20 ml ist die Kompressibilität des Druckmediums Wasser mit $\kappa_T(25^\circ\text{C}) = 4.57 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ bei

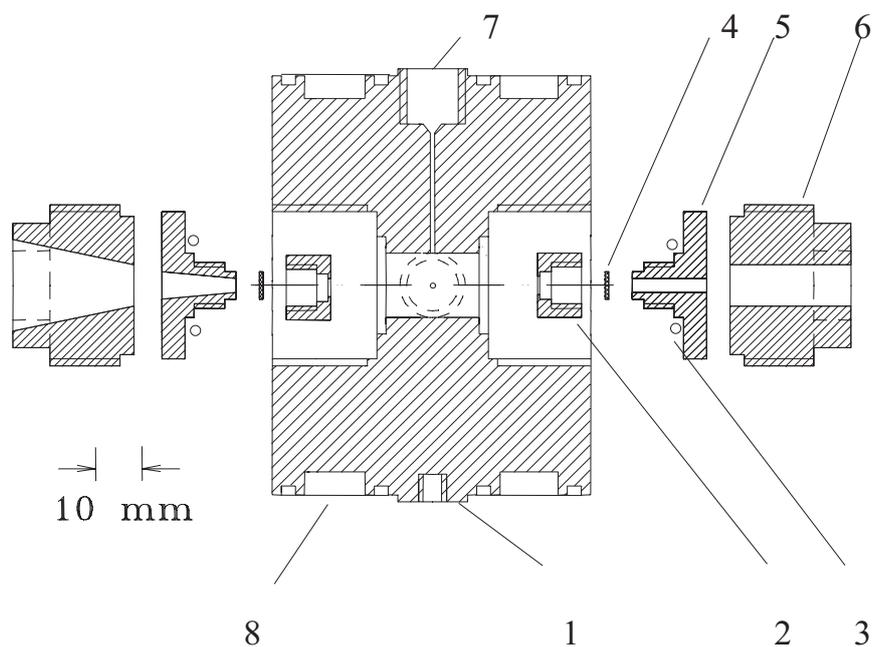


Abb. 2.9: Hochdruckzelle für SAXS-Experimente. (1) Körper aus NIMONIC 90. (2) Überwurfschraube zur Fixierung des Diamantfensters. (3) O-Ringdichtung aus Viton500. (4) Diamantfenster (Naturdiamant Typ IIa). (5) Fensterträger (Fixierung des Diamanten mit Uhu Endfest300, 10 min Aushärtung bei 100 °C ergibt eine Zugfestigkeit von 2500 N/cm²). (6) Druckschraube. (7) Druckanschluss für 1/4"-Kapillare (HIP-System).

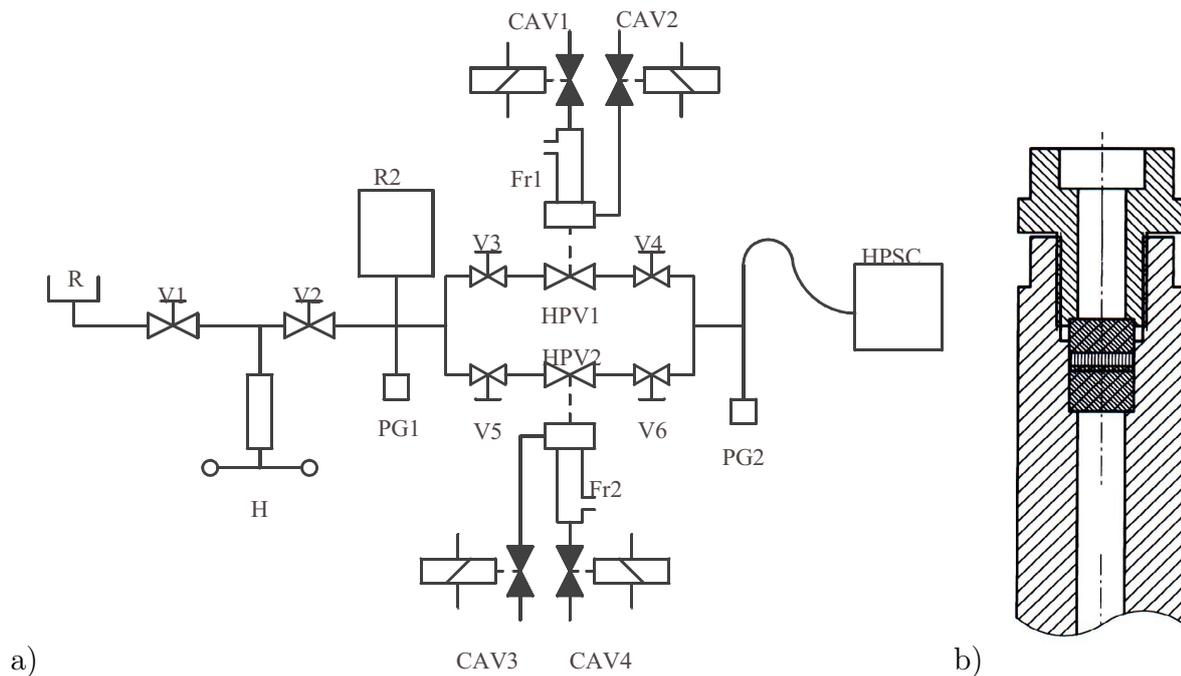


Abb. 2.10: a) Schematischer Aufbau der Drucksprungapparatur. (CAV) Magnetventile. (Fr) Schnellentlüftungsventile. (H) Handpumpe mit Spindelvortrieb. (HPSC) Hochdruck-SAXS-Zelle. (PG) Drucksensoren. (R) Reservoir. b) Hochdruck-Reservoir mit Bridgman-Dichtung.

1 bar und $\kappa_T(25^\circ\text{C}) = 3.48 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ bei 1000 bar [44], also einer Volumenänderung von ca. 4 % pro kbar. Verteilt über die gesamte Apparatur und abhängig von der eingesetzten Kapillarlänge zwischen Sprungapparatur und Zelle sind somit Amplituden von 3 kbar möglich. Die Bohrung des Reservoirs ist mit einer Bridgman-Dichtung versehen. Der Dichtring aus Kupfer wird durch zwei Druckringe über die Druckschraube und eine zur Konterung des unteren Druckrings eingesetzten Mittelachse (nicht dargestellt) gequetscht, so dass der Maximaldruck von 7000 bar auch hier erreicht werden kann.

Der Aufbau ist für die Durchführung von Drucksprüngen mit positiver und negativer Amplitude aus Sicht des Probenautoklaven ausgelegt. Die Funktionsweise lässt sich dabei in vier Schritte einteilen:

1. Einstellen des Drucks p_1 auf der Seite der Hochdruckzelle HPSC. Die Erfassung des Drucks erfolgt mit dem Drucksensor PG2. Die Ventile V5 und V6 sind geschlossen.
2. Schließen des Pneumatikventils Fr1. Dazu werden die Magnetventile CAV1 und CAV2 über die Fernauslösung geöffnet.
3. Einstellen des Drucks p_{extern} auf der Seite des Reservoirs R2. Gemessen wird p_2 über den Drucksensor PG1. Ventil V2 wird geschlossen.
4. Auslösen des Pneumatikventils Fr1 durch die Shutter-Steuerung. Die Fernsteuerung ist mit der Steuerung zur Öffnung des Strahlganges (Shutter) über einen TTL-

Ausgang verbunden. Ein Countdown von maximal 9 Einzelmessungen vor Öffnung von Fr1 kann eingestellt werden. Die Flanke des TTL-Signals kann wahlweise steigend oder abfallend sein. PG1 und PG2 erfassen den Enddruck p_2 .

Die zeitliche Verfolgung der Druckänderung mit einem Oszilloskop nach Auslösen des Drucksprungs zeigt, dass dieser innerhalb von 5 ms erfolgt. Diese schnelle Auslösezeit ist nur nach Modifikation der Pneumatikventile mit Schnellentlüftungsventilen möglich, wie sie in handelsüblichen Pressluftbremssystemen zum Einsatz kommen (hier z.B. MAN Fahrzeugtechnik). Der ursprüngliche Pressluftanschluss des pneumatischen Hochdruckventils wird dabei aufgebohrt und mit dem Schnellentlüftungsventil versehen. Die Steuerung des Schnellentlüftungsventils erfolgt mit einem Pressluftmagnetventil (CAV1 o. CAV4, variables Dreiwegventil von Festo). Damit das Pneumatikventil mit Pressluft versorgt wird, muss eine weitere Öffnung neben dem Schnellentlüftungsventil gebohrt werden. Die Pressluftversorgung des Pneumatikventils erfolgt über die Magnetventile CAV2 oder CAV3 und ist parallel zu den anderen Magnetventilen geschaltet [45].

2.2.3 Neutronenkleinwinkelstreuung

Als Strahlungsquellen wurden die Spallationsquelle ISIS (Oxford, UK) und die Reaktorquelle FRJ-2 (FZ Jülich, D) benutzt. Bei der Spallationsquelle werden Neutronen durch Beschuss eines Tantal-Targets mit Protonen freigesetzt. Die Protonen werden von einem Linearbeschleuniger (LINEAC) in ein 800 MeV-Synchrotron gespeist, aus dem sie in 100 ns Pulsen mit einem zeitlichen Abstand von 230 ns auf das Target geleitet werden. Aus den Pulsen wird vor dem Erreichen des Kollimationssystems durch einen Geschwindigkeitsselektor ein bestimmter Wellenlängenbereich herausgeschnitten (<http://www.isis.rl.ac.uk>). Die Reaktorquelle beruht auf dem Prinzip der Kernspaltung von Uran in den Brennelementstäben. Die Moderation und Kühlung des Reaktors erfolgt mit D_2O . Die freigesetzten Neutronen verfügen über unterschiedliche Geschwindigkeiten und werden, bevor sie über Strahlrohre zu den Instrumenten geleitet werden, mit flüssigem Wasserstoff gekühlt. Das Maximum der Geschwindigkeitsverteilung (nach Maxwell-Boltzmann) verschiebt sich, so dass nach de Broglie mit $\lambda = h/(m_n \cdot v)$ ein Großteil der Neutronen den gewünschten Wellenlängenbereich aufweist. Zur Steigerung des Neutronenflusses werden Graphitreflektoren verwendet. Es wird wiederum ein Geschwindigkeitsselektor vor das Kollimationssystem geschaltet, jedoch schneidet dieser bis auf eine Wellenlänge alle weiteren ab (vgl. <http://www.fz-juelich.de/iff>).

Neben der Kontrastvariation besitzen Neutronen den Vorteil der einfachen Normierung auf den differentiellen Streuquerschnitt.

$$I(Q) = I(Q = 0, \lambda) \Delta\Omega \eta(\lambda) T(\lambda) V_s \frac{d\Sigma}{d\Omega}(Q) \quad (2.24)$$

Um von der in dem Detektorelement $\Delta\Omega$ gemessenen Intensität $I(Q)$ auf $d\Sigma/d\Omega(Q)$ umzurechnen, muss die Ausgangsintensität $I(Q = 0, \lambda)$, die Detektoreffizienz $\eta(\lambda)$, die Transmission $T(\lambda)$ und das Volumen V_s eines definierten Standards bekannt sein. Die von der Wellenlänge λ abhängigen Parameter lassen sich dabei zu einem Skalierungsfaktor zusammenfassen. Geeignet sind Standards, deren Streudaten sich durch eine Modellstruktur beschreiben lassen und sich somit $I(Q = 0)$ durch Extrapolation erhalten lässt. Dies gelingt

z.B. für Polymergemische oder homogene monodisperse Partikel. Am Beispiel des ISIS-Standards TK48/49 ist dies in Abb. 2.11 dargestellt. Analog dazu werden auch die an der Reaktorquelle FRJ-2 aufgenommenen Daten normiert, als Standard dient hier ebenfalls ein Polymer (Lupolen).

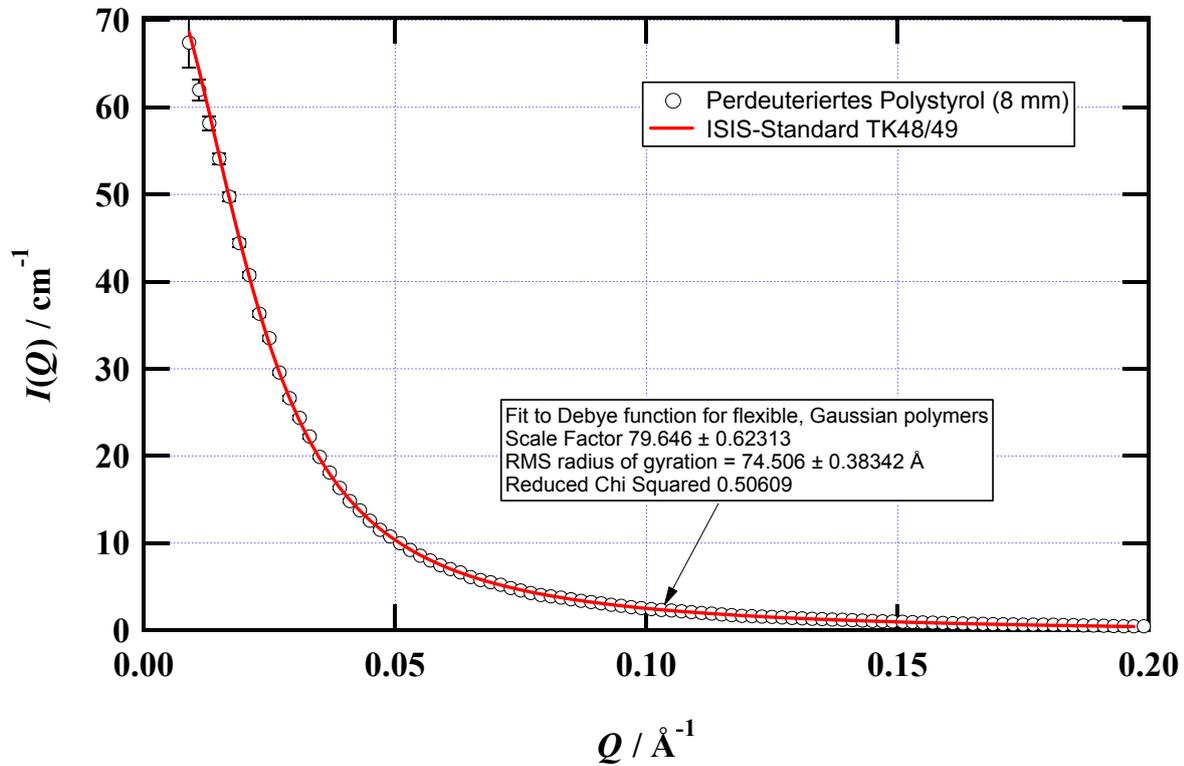


Abb. 2.11: Streudaten des ISIS-Standards TK48/49, ein Gemisch aus protoniertem und deuteriertem Polystyrol mit 4 mm Schichtdicke und 8 mm Durchmesser. Der Normierungsfaktor für absolute Intensitäten ergibt sich aus dem Verhältnis $I_{\text{soll}}(Q = 0)/I_{\text{ist}}(Q = 0) = 78.2/79.6 \text{ cm}^{-1}$. Als Modell wird eine Polymerkette mit Gaußscher Verteilung der Kettensegmente um den Masseschwerpunkt angenommen. Die aus dem Modell abgeleitete Streufunktion (vgl. [25]) beschreibt die gemessenen Daten über den gesamten Bereich von $Q = 0.009 - 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ sehr gut.

Hochdruckmessungen mit Neutronen

SANS-Experimente erfordern einen größeren Strahlquerschnitt und ein anderes Fenstermaterial, als es für die SAXS-Experimente erforderlich ist. Es werden Saphir-Zylinder mit einem Durchmesser von 20 mm und einer Höhe von 10 mm verwendet. Der Probenraum wird durch O-Ringdichtungen aus Viton500 (C. Otto Gehrken, D) abgedichtet. Der kreisförmige Neutronenstrahl wird durch eine Cadmiumblende, die auf der Druckschraube seitens des einfallenden Strahls montiert ist, auf einen Strahlquerschnitt von 8 mm begrenzt. Die Schichtdicke der Probe beträgt ca. 1 mm, abhängig von den eingesetzten Dichtringen und des angelegten Drucks.

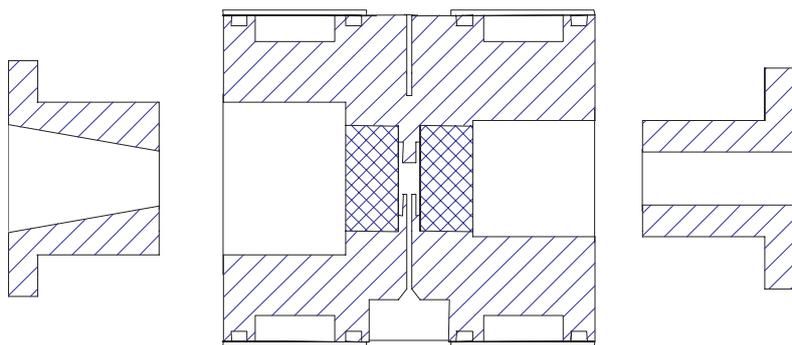


Abb. 2.12: Hochdruckprobenbehälter für SANS-Experimente mit Saphir-Fenstern. Der Aufbau ist ähnlich der SAXS-Zelle, jedoch dienen die Fenster hier direkt als Dichtfläche und sind nicht auf spezielle Träger geklebt. Die Temperierung erfolgt durch den Anschluss eines separaten Thermostaten an die Kühlmittelkanäle. Die Auslegung der Zelle ist auf einen Druckbereich von 1–3000 bar begrenzt und die Übertragung des Drucks ist wiederum über 1/4"-Kapillare mit HIP-Anschluss realisiert. Als Druckmedium dienen Oktan bzw. Pufferlösung bei Proteinproben.

In Abb. 2.12 ist die für die Hochdruckexperimente verwendete Hochdruckzelle dargestellt. Material und prinzipieller Aufbau sind mit der SAXS-Hochdruckzelle vergleichbar. Der Vorteil dieser Zelle besteht darin, dass sie aufgrund der kleineren Außendimensionen und des größeren Strahlquerschnitts auch für enzymkinetische Untersuchungen in ein UV/VIS-Spektrometer (Lambda2 o. Lambda25, Perkin-Elmer, USA) eingebaut werden kann.

3 Zeitaufgelöste und druckabhängige Strukturuntersuchungen an Proteinen

3.1 Entfaltungskinetik von Staphylokokken Nuclease durch Drucksprungdenaturierung

Die in den Grundlagen beschriebene Drucksprungapparatur wird in Verbindung mit der Diamantfensterzelle und hochbrillanter Synchrotronstrahlung für kinetische Röntgenkleinwinkelstreudaten (TRSAXS) eingesetzt. Dabei wird die Faltung und Entfaltung der Staphylokokken Nuclease A (Snase) in Abhängigkeit der Drucksprungamplitude Δp und der Temperatur untersucht. Als Maß für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten dient die Änderung des Gyrationradius R_g in Abhängigkeit der Zeit. Der Gyrationradius wird durch die Methode nach Guinier [46] bzw. aus der Integration der Paarabstandsverteilung $p(r)$ nach Gl. 2.10 bestimmt. Aus der Druck- und Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten werden die Aktivierungsvolumina ΔV^\ddagger und freien Aktivierungsenthalpien ΔG^\ddagger bestimmt. Zusätzlich lassen sich aus den Kleinwinkelstreudaten Aussagen über die dreidimensionale Form des Proteins und deren Änderung im Verlauf des Entfaltungs- und Rückfaltungsprozesses machen. Die Programme CRY SOL, DAMMIN und GASBOR werden für die Strukturbestimmung herangezogen. Schließlich wird ein hypothetischer Faltungsweg aus der Summe der SAXS-, XRD- und FTIR-Daten vorgeschlagen.

3.1.1 Strukturelle und biologische Eigenschaften von Snase

Snase wird als Nuclease A aus dem V8-Strang des Bacillus *Staphylococcus aureus* durch λ -Expression, in diesem Fall durch Einbau in den Ar λ 9-Strang von *E. coli*, gewonnen. Die Aufarbeitung und Reinigung ist in [47, 48] beschrieben. In Abb. 3.1 ist die Röntgenstruktur aus der Brookhaven Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org>) dargestellt [49]. Snase ist aus einem einzelnen Aminosäurestrang aufgebaut und weist neben ungeordneten Bereichen nur α -Helices und Domänen aus β -Faltblattstrukturen auf. Die molekulare Masse beträgt 16.8 kDa. Durch Kalottendarstellung sind die an der Spaltung beteiligten Aminosäurereste (Arg35, Tyr85, Arg87, Tyr113) inklusive des Metallions Ca^{2+} und der für die koordinative Bindung verantwortlichen Reste (Asp21, Asp40, Glu43) im katalytisch wirksamen Bereich des Proteins hervorgehoben. Snase ist für die Spaltung sowohl von DNA als auch von RNA verantwortlich. Das Protein lagert sich dabei an das Rückgrat der Nukleinsäure an, so dass die Phosphatgruppe direkt angegriffen werden kann [50, 51].

3.1.2 Probenpräparation und experimentelle Durchführung des Drucksprungs

Snase wurde von der Arbeitsgruppe von C. Royer (Centre de Biochimie Structurale, Faculté de Pharmacie, Montpellier) in der in [47, 53] beschriebenen Weise präpariert und für die Drucksprungexperimente zur Verfügung gestellt. Die Probenkonzentration betrug 20 mg Snase in 1 ml 10 mM BIS-TRIS-Pufferlösung bei einem pH von 5.5. Der pH-Wert wurde dabei durch Zugabe von 0.5 M HCl eingestellt. Als Druckmedium wurde ebenfalls die Pufferlösung verwendet. Alle für diese Experimente genannten Chemikalien stammen von Sigma-Aldrich und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die SAXS-Experimente wurden an den Beamlines 11ID (APS, Argonne) und ID2 (ESRF, Grenoble) bei einer Wellenlänge von 1.5 Å und mit einem Q -Bereich von 0.01 bis 0.3 Å⁻¹ durchgeführt. Die Temperatur wurde über einen Thermostaten zwischen 25 und 40 °C variiert.

3.1.3 Struktur und Dynamik der Faltung/ Entfaltung von Snase

Am Beispiel eines Drucksprungs von 1000 nach 3500 bar wird die Strukturanalyse der zeitabhängigen SAXS-Daten von Snase beschrieben. Ausgangspunkt sind die in der Abb. 3.2 dargestellten untergrundkorrigierten Streudaten der gefalteten und entfalteten Form. Aus Gründen der Übersicht werden in diesem Abschnitt nur die Start- und Enddaten behandelt, das Prozedere ist schließlich für jeden Zeitschritt gleich und beruht auf den in den Grundlagen beschriebenen Verfahren zur Bestimmung struktureller Informationen aus Kleinwinkelstreudaten.

Zur Beschreibung des betrachteten Systems wird von einem einfachen Modell zweier Zustände U (entfaltet) und F (gefaltet) ausgegangen. An der Stabilitätsgrenze liegen beide Zustände im Gleichgewicht vor. Durch den Drucksprung wird das Gleichgewicht schlagartig verschoben und es kann die Relaxation des Systems in den unter den Endbedingungen stabilen Zustand beobachtet werden. Spektroskopische Studien bestätigen dieses Modell [47, 43].



Der Gyrationradius der entfalteten Form beträgt unter Gleichgewichtsbedingungen 33 Å bei 3000 bar [53]. Da hier jedoch der zeitliche Verlauf der Entfaltung beobachtet wird und somit keine Gleichgewichtsbedingungen vorliegen, befindet sich möglicherweise nach dem Drucksprung noch eine bestimmte Anzahl der gelösten Proteine im gefalteten Zustand. Im Mittel ist der Gyrationradius folglich etwas kleiner, so dass sich aus den Paarabstandsverteilungen der entfalteten Form (u) ein Gyrationradius von 31 Å ergibt. Dies ist auch hinsichtlich der Berechnung der dreidimensionalen Modellstrukturen und der in Abb. 3.3 dargestellten Paarabstandsverteilung zu berücksichtigen. Dem Umstand, dass eine Summe aus beiden Populationen mit unterschiedlichen Anteilen an gefalteten $f_f = N_f/N_p$ und entfalteten Proteinen $f_u = N_u/N_p$ beobachtet wird, wird mit Gl. 3.2 Rechnung getragen [54]:

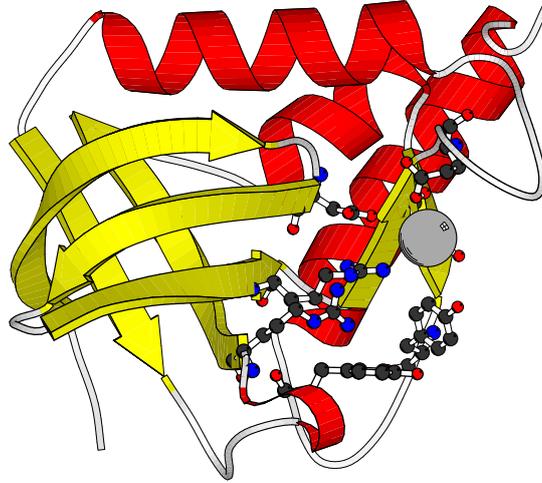


Abb. 3.1: Molscript-Diagramm von Snase (PDB-Eintrag der Röntgenstruktur 1STG) [52].

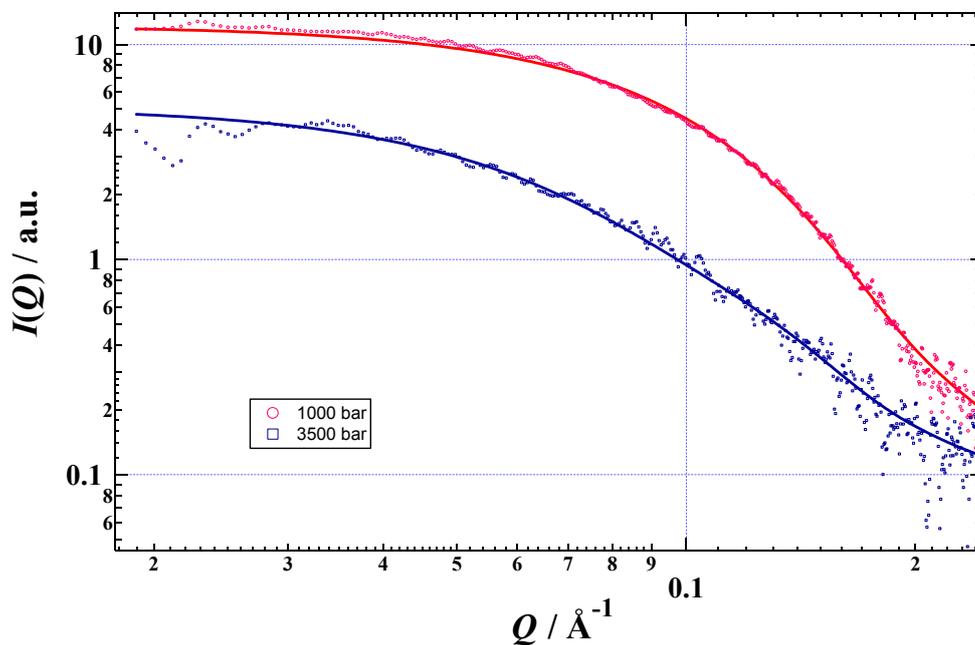


Abb. 3.2: Darstellung der korrigierten Streudaten der gefalteten (rot) und entfalteten Form (blau) nach einem Drucksprung von 1000 nach 3500 bar bei 25 °C. Die Paarabstandsverteilung $p(r)$ wird mit dem Programm GNOM aus den Streudaten berechnet, die durchgezogenen Linien entsprechen der Fourier-Transformierten der Paarabstandsverteilungsfunktion.

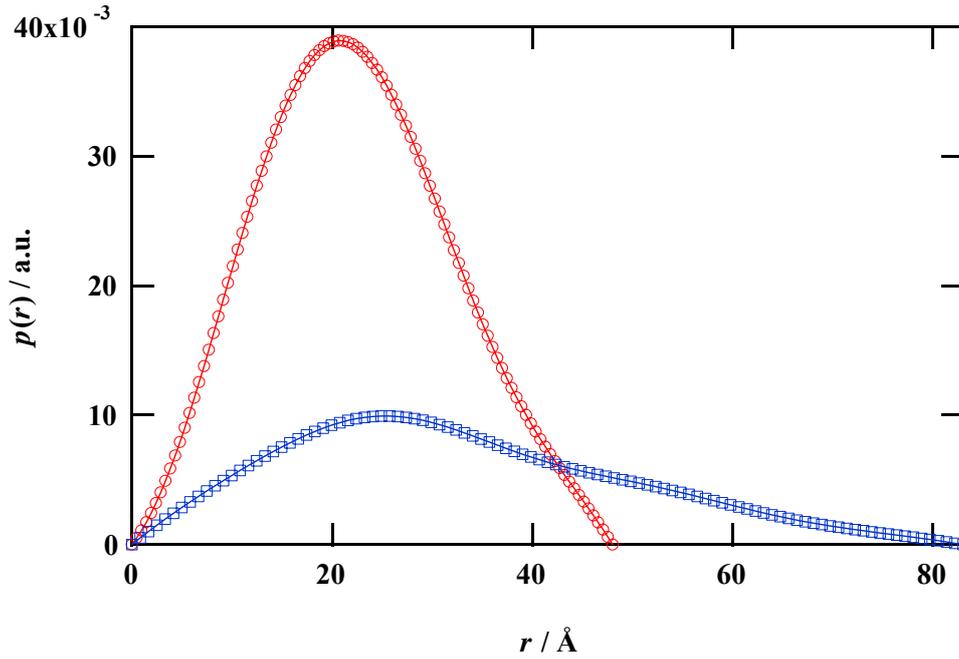


Abb. 3.3: Paarabstandsverteilungsfunktionen $p(r)$ vor (rot) und 1200 s nach dem Drucksprung (blau) von 1000 nach 3500 bar bei 25 °C.

$$R_g^2 = f_f \cdot R_{g,f}^2 + f_u \cdot R_{g,u}^2 \quad (3.2)$$

N_f und N_u entsprechen der Anzahl der gefalteten bzw. entfaltenen Spezies, N_p ist die Gesamtzahl der Proteine in der Probe. Für die Zeitabhängigkeit des Gyrationradius ergibt sich aus dem kinetischen Modell ein einfacher exponentieller Zusammenhang, der über einen "Least-Squares"-Algorithmus angepasst wird und als Ergebnis die Relaxationszeit τ ergibt:

$$R_g(t) = R_g^\infty + A e^{(-t/\tau)} \quad (3.3)$$

Die Geschwindigkeitskonstanten des Faltungs- $k_f(p)$ und Entfaltungsprozesses $k_u(p)$ als Funktion des Drucks p lassen sich in der Nähe des Gleichgewichts mit Gl. 3.4 aus der reziproken Relaxationszeit $\tau(p)$ berechnen:

$$\frac{1}{\tau(p)} = k_f(p) + k_u(p) \quad (3.4)$$

Dabei gelten unter Annahme des Zweizustandsmodells folgende exponentielle Zusammenhänge für die Geschwindigkeitskonstanten.

$$k_f(p) = k_{0,f} e^{(-p\Delta V_f^\ddagger/(RT))} \quad (3.5)$$

$$k_u(p) = k_{0,u} e^{(-p\Delta V_u^\ddagger/(RT))} \quad (3.6)$$

Sind die Drucksprungamplituden und Ausgangsdrücke jedoch so gewählt, dass diese weit außerhalb der Gleichgewichtsbedingung liegen, so beschreibt eine einfache Exponentialfunktionen die Faltungs- bzw. Entfaltungsgeschwindigkeit. Je nach Richtung gilt Gl. 3.5 oder Gl. 3.6 und die Aktivierungsvolumina ΔV_u^\ddagger und ΔV_f^\ddagger bzw. die Geschwindigkeitskonstanten bei 1 bar $k_{0,f}$ und $k_{0,u}$ können durch eine geeignete Auftragung für jeden Prozess separat bestimmt werden, woraus sich wiederum die Volumenänderung der Entfaltung ΔV_u^0 berechnen lässt:

$$\Delta V_u^0 = \Delta V_u^\ddagger - \Delta V_f^\ddagger \quad (3.7)$$

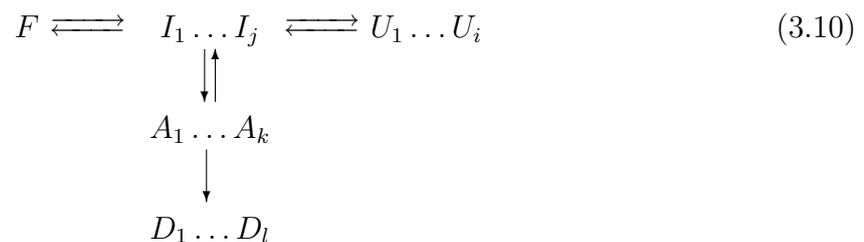
Über die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten $K_{eq,u}$ besteht nach van't Hoff zudem ein Zusammenhang zwischen den Geschwindigkeitskonstanten und der freien Entfaltungsenthalpie ΔG_u^0 , so dass weitere thermodynamische Größen des Faltung-/ Entfaltungsprozesses ermitteln und mit spektroskopischen Daten verglichen werden können [53]:

$$\Delta G_u^0 = -RT \ln K_{eq,u} = RT \ln \left(\frac{k_{0,f}}{k_{0,u}} \right) \quad (3.8)$$

Die freie Enthalpie G des Proteins setzt sich aus mehreren Beiträgen zusammen und stellt einen Ausdruck für die Stabilität des Proteins dar. Die Beiträge werden bestimmt durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken etc. Änderungen der freien Enthalpie durch den Faltungsprozess sind mit der Änderung der inneren Energie ΔU_0 , der Volumenarbeit $p\Delta V_0$ und der Entropie ΔS_0 ausgehend von einem nativen Standardzustand (0) verbunden:

$$\Delta G_0 = \Delta U_0 + p\Delta V_0 - T\Delta S_0 \quad (3.9)$$

Nach dem Prinzip von Le Chatelier lässt sich das Gleichgewicht durch Variation der thermodynamischen Größen Druck, Temperatur, Zusammensetzung in Richtung einer Form verschieben. Im Gegensatz zur Druck- und Kältedenaturierung ist die Hitzedenaturierung oft irreversibel. Es erfolgt vielfach die vollständige Entfaltung inkl. einer anschließenden irreversiblen Aggregation. Die in einem Stabilitätsdiagramm dargestellte Grenze unterscheidet aber nur zwischen dem nativen Zustand und einem beliebigen entfalteten Zustand. Gl. 3.10 zeigt verschiedene Möglichkeiten für die Bildung von entfaltenen und aggregierten Zuständen eines Proteins. Allgemein betrachtet ist beim Übergang von einer nativen Form F immer davon auszugehen, dass unterschiedliche entfaltete Formen U_i mit $i = 1, 2, \dots, n$ und diverse Intermediate I_j mit $j = 1, 2, \dots, m$ gebildet werden können. Aus Aggregaten (A_k) können sich desweiteren fibrilare Strukturen (D_l) bilden [55].



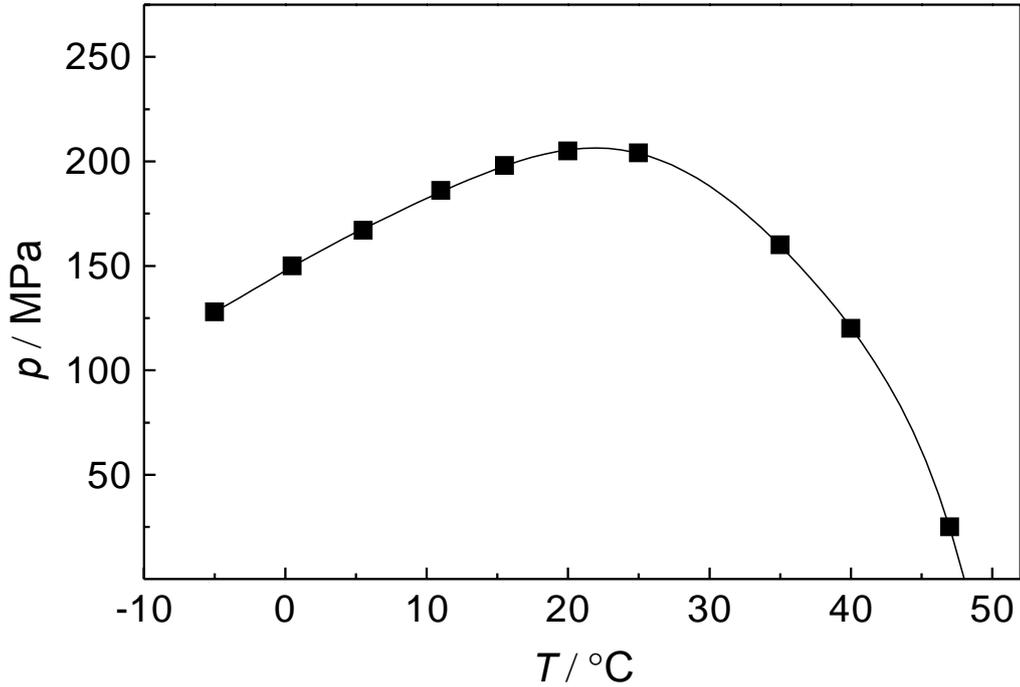


Abb. 3.4: Stabilitätsdiagramm von Snase (Wildtyp) in TRIS-Puffer bei einem pH von 5.5.

Exemplarisch ist das durch IR- und SAXS-Studien bestimmte Stabilitätsdiagramm von Snase in Abb. 3.4 dargestellt. Es weist die für Proteine typische elliptische Form auf [53, 56]. Sie ergibt sich aus der Annahme eines Zweizustandsmodell, wie es Hawley [57] in seinem phänomenologischen Ansatz in Gl. 3.11 formuliert. Dadurch wird ein Zusammenhang hergestellt, der die experimentell ermittelte Grenze im p - T -Diagramm mit thermodynamischen Größen als Maß für die Stabilität des Proteins verbindet.

$$\Delta G = \frac{\Delta\beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\alpha(p - p_0)(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 + \Delta V_0(p - p_0) - \Delta S_0(T - T_0) + \Delta G_0 \quad (3.11)$$

Mit $\Delta G = 0$ ergibt sich die Bedingung $\Delta\alpha^2 > \Delta C_p \Delta\beta/T_0$ für den elliptischen Verlauf der Stabilitätsgrenze. Der thermische Ausdehnungskoeffizient $\alpha = (\partial V/\partial T)_p$ und der isotherme Kompressibilitätskoeffizient $\beta = (\partial V/\partial p)_T$ sind dabei wie hier angegeben definiert. Für den Fall $\Delta S = 0$ und $\Delta V = 0$ ergeben sich zwei durch den Mittelpunkt verlaufende Geraden, die das Phasendiagramm in Bereiche unterschiedlicher Entropie- und Volumenänderungen unterteilen, wie sie in Abb. 3.5 dargestellt sind.

Das Zweizustandsmodell von Hawley ist bei der Interpretation von Stabilitätsdiagrammen limitiert und kann durch die mathematische Entwicklung von Gl. 3.11 über eine Taylor-Reihe in Bezug auf Druck und Temperatur erweitert werden [58]. Daraus ergeben sich Terme dritter Ordnung mit T^3 , T^2p , Tp^2 und p^3 . Physikalisch lassen sich diese der

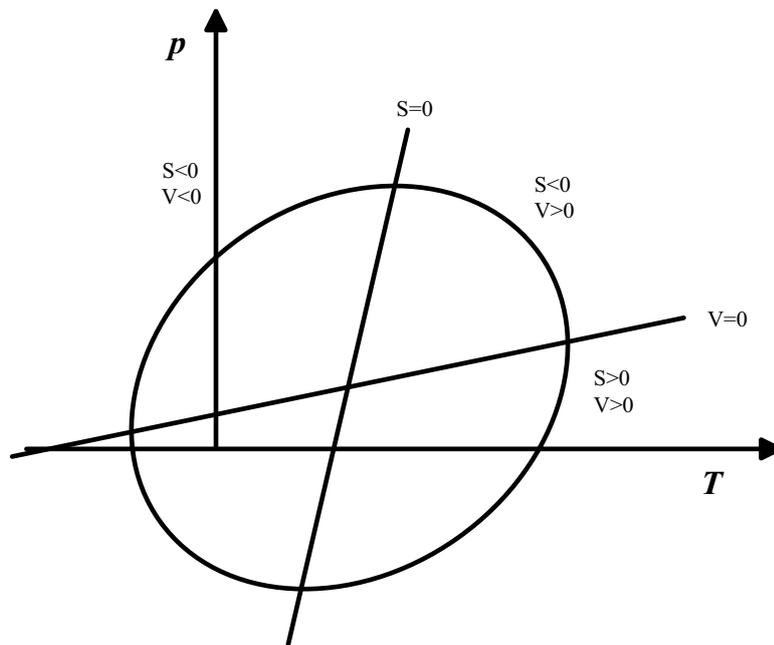


Abb. 3.5: Lage der isochoren und isentropischen Graden durch das Stabilitätsdiagramm nach dem Modell von Hawley inkl. der Einteilung in Bereiche unterschiedlicher Änderungen von ΔS und ΔV .

Temperatur- und Druckabhängigkeit von ΔC_p , $\Delta\alpha$ und $\Delta\kappa_T$ zuordnen und ergeben ein detaillierteres Bild des Stabilitätsdiagramms. Je nach dominierenderem Einfluss verzerrt sich das elliptische Phasendiagramm in Richtung der Druck- oder Temperatur-Achse (vgl. [59]).

Bei Snase ist der Verlauf der elliptischen Stabilitätskurve leicht nach unten verschoben. Jenseits des Hitzedenaturierungspunktes bei 1 bar wird in Pufferlösung deshalb keine Druckstabilisierung beobachtet, also eine Rückfaltung in den nativen Zustand durch Erhöhung des Drucks.

Charakterisierung der gefalteten Struktur

Neben den kinetischen und thermodynamischen Größen wird die Änderung der Struktur mit der Zeit über die in den Grundlagen beschriebenen Methoden untersucht. Ausgangspunkt sind die Kleinwinkelstreudaten der nativen Form von Snase bei 1000 bar. Diese lassen sich zunächst mit der Kristallstruktur 1STG (s. Abb. 3.1) vergleichen. Weiterhin liefert das Programm CRY SOL den Gyrationradius inklusive und exklusive einer theoretischen Hydrathülle sowie die Volumina und Oberflächen der in Abb. 3.7 b dargestellten Form des Proteins.

Durch Densitometrie wurde von Seemann ein partiell spezifisches Volumen von $0.71 \text{ cm}^3/\text{g}$ gefunden, was dem Volumen des Proteins in der Kristallstruktur entspricht [9]. Das gemessene spezifische Volumen und das aus der Röntgenstruktur berechnete Volumen sind somit im Rahmen der Messgenauigkeit miteinander vergleichbar.

Der aus der Kristallstruktur berechnete Gyrationradius R_g^{hydr} inkl. einer Hydrathülle mit einer Dicke von 3 Å weicht mit 12 % allerdings stärker von dem im Rahmen dieser und anderer Arbeiten [43] mittels SAXS gefundenen $R_g = 17.1$ Å ab. Dennoch kann man davon ausgehen, dass die durch Densitometrie und SAXS gefundenen Dimensionen auf eine Proteinstruktur in Lösung hinweisen, die mit der im Einkristall vergleichbar ist. Die Größe des Fehlers ist sicherlich bedingt durch die unterschiedlichen Methoden und den Vergleich eines Proteineinkristalls mit einer wässrigen Proteinlösung. Dabei ist die Festlegung der Hydratschicht auf 3 Å sicherlich mit einer größeren Unsicherheit verbunden. Wäre diese Schicht im Falle eines globulären Proteins wie Snase z.B. nur um 3 % größer, so Vergrößert sich das Volumen um 12 %, geht man dabei von einem sphärischen Wassermolekül mit einem Durchmesser von 3 Å aus. Auf Grund des Fehlers lässt sich die ebenfalls durch Densitometrie gefundene Volumenänderung bei der Entfaltung des Proteins $\Delta V_u = -72 \pm 12 \text{ cm}^3/\text{mol}$ [9] über die Rekonstruktion von Strukturen aus SAXS-Daten nicht verifizieren. Die Volumenänderung entspricht auf molekularer Ebene gerade einer Anzahl von 8–9 Wassermolekülen, nimmt man dabei einen Molekülradius von 1.5 Å als Berechnungsgrundlage. Bei dem genannten Fehler des Gesamtvolumens eines Proteins von 12 % ergibt sich eine Ungenauigkeit im Fall der SAXS-Messungen bezüglich der Anzahl der Wassermoleküle von ca. 560.

Aus den SAXS-Daten lässt sich durch das Programm DAMMIN eine dreidimensionale Modellstruktur erzeugen. Die Streufunktion dieser Modellstruktur entspricht der Kurvenanpassung aus der indirekten Fourier-Transformation der Messdaten, so dass Gyrationradius und Paarabstandsverteilung in beiden Fällen übereinstimmen. Die Daten werden direkt aus der Ausgabedatei von GNOM übernommen. Die aus einzelnen DAs aufgebaute Form repräsentiert die Struktur des Proteins in Lösung inkl. einer Solvathülle höherer Dichte. In Abb. 3.7 a ist der durch Ab-initio-Modellierung von DAMMIN erzeugte Strukturvorschlag von Snase aus den bei 1000 bar und 25 °C gemessenen SAXS-Daten dargestellt. Auch der rein optische Vergleich zeigt bereits eine gute Übereinstimmung von Kristallstruktur und dem DAM.

Neben der Modellierung einer massiven Form ermöglicht das Programm GASBOR die Ermittlung eines Strukturvorschlags auf der Basis einer dichtgepackten Polypeptidkette. Snase ist aus 149 Aminosäuren aufgebaut, so dass die Anzahl der DRs entsprechend übernommen wird. 90 Wasseratome werden zusätzlich einkalkuliert. Das von GASBOR berechnete Strukturmodell ist zusammen mit der Kristallstruktur 1STG in Abb. 3.8 dargestellt. Über das Programm MASSHA werden die beiden Strukturen überlagert und die Positionen der DRs mit den Positionen der Aminosäure in der Kristallstruktur verglichen

Tab. 3.1: Gyrationradien und Volumina aus der Kristallstruktur.

| | |
|--|--------------------------|
| Gyrationradius der Hülle R_g^{env} | 14.37 Å |
| Volumen der Hülle v_{env} | 20960 Å ³ |
| Partielles spezifisches Volumen der Hülle v_{env}^* | 0.751 cm ³ /g |
| Gyrationradius inkl. Hydrathülle R_g^{hydr} | 19.48 Å |

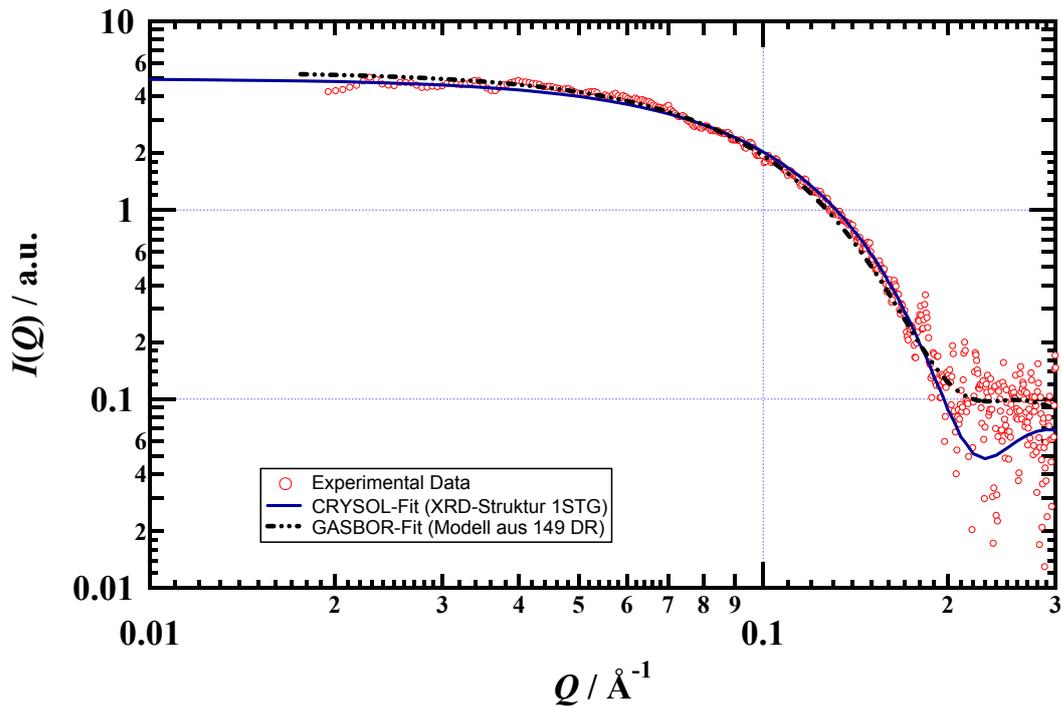


Abb. 3.6: Vergleich der über das Programm CRYSOLE aus der Kristallstruktur 1STG berechneten theoretischen SAXS-Kurve (—) mit gemessenen Daten (\circ). Die sehr gute Übereinstimmung über den gemessenen Q -Bereich verifiziert das Vorliegen einer kristalähnlichen Struktur in Lösung bei 1000 bar. Die Solvathülle kann mit einer Dicke von 3 \AA angenommen werden. Das von GASBOR erstellte Snase-Modell (- ··· -) gibt die experimentellen Daten ebenfalls sehr gut wieder, so dass auch mit dieser Methode das untersuchte Protein beschrieben werden kann.

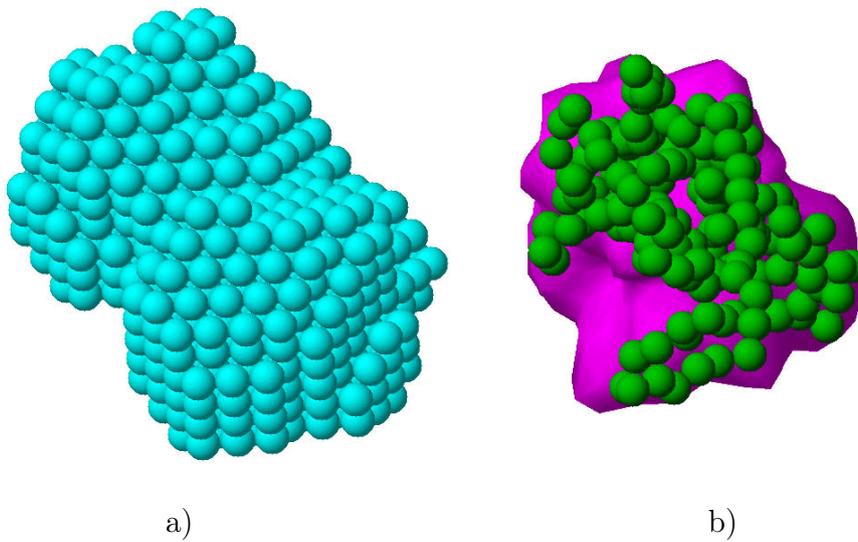


Abb. 3.7: a) DAMMIN-Modell von Snase bei 1000 bar und 25 °C ausgehend von den Streudaten in Abb. 3.2 (rot). b) Röntgenstruktur 1STG von Snase (grün) inkl. der von CRY SOL erzeugten Hülle aus Voronoi-Polyedern (violett).

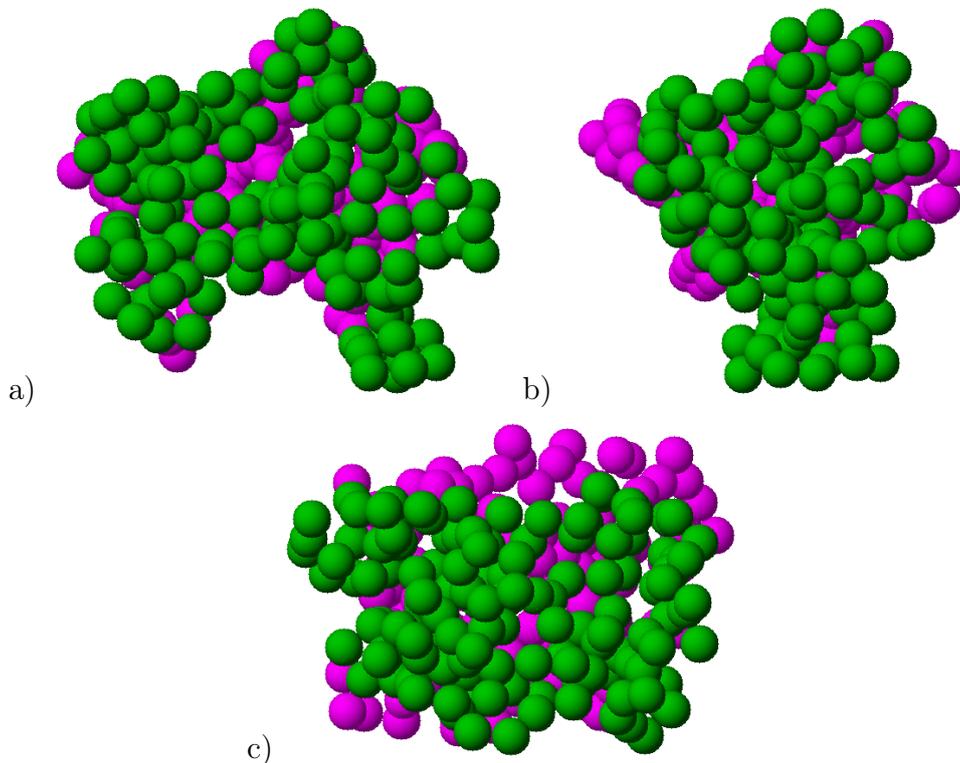


Abb. 3.8: Vergleich der Kristallstruktur 1STG (grün) mit dem von GASBOR (violett) berechneten Strukturvorschlag (a,b,c entsprechen unterschiedlichen Ansichten).

($\chi^2 = 1.09$). Die Streukurven aller vorliegenden Strukturmodelle sind in Abb. 3.6 dargestellt und unterstreichen die Übereinstimmung der Kristallstruktur mit der Struktur in Lösung. Die Aminosäuren (DR) im Strukturvorschlag von GASBOR sind jedoch zufällig angeordnet, so dass sich keine Sekundärstrukturelemente zuordnen lassen. Ein absoluter Vergleich von Kristallstruktur und Kleinwinkelstruktur ist nicht möglich.

Charakterisierung der entfalteten Struktur

Es werden Strukturmodelle der denaturierten Spezies bei 25 °C und 3000 bar aus den Kleinwinkelstreudaten über die Programme DAMMIN und GASBOR berechnet. Im nächsten Schritt werden die Strukturen des gefalteten und entfalteten Proteins verglichen. Aus den FTIR-Experimenten ist die relative Verteilung von Sekundärstrukturelementen für beide Zustände bekannt, so dass eine weitere Vergleichsmöglichkeit zwischen zwei unterschiedlichen Methoden besteht.

Zunächst wird die Form des Proteins über ein DAM rekonstruiert. Basis für die Strukturrechnung sind die von GNOM angepasste Streukurve in Abb. 3.2 und deren Fourier-Transformierte, die Paarabstandsverteilungsfunktion, dargestellt in Abb. 3.3. Führt man verschiedene Rechnungen mit unterschiedlich großen DAs durch, so ergeben diese immer eine vergleichbare Struktur, wie sie in Abb. 3.9 zu sehen ist. Im Gegensatz dazu liefert GASBOR auch bei gleichen Startparametern en détail unterschiedliche Strukturvorschläge, die erst durch Überlagerung Ähnlichkeiten aufweisen (s. Abb. 3.10). In allen

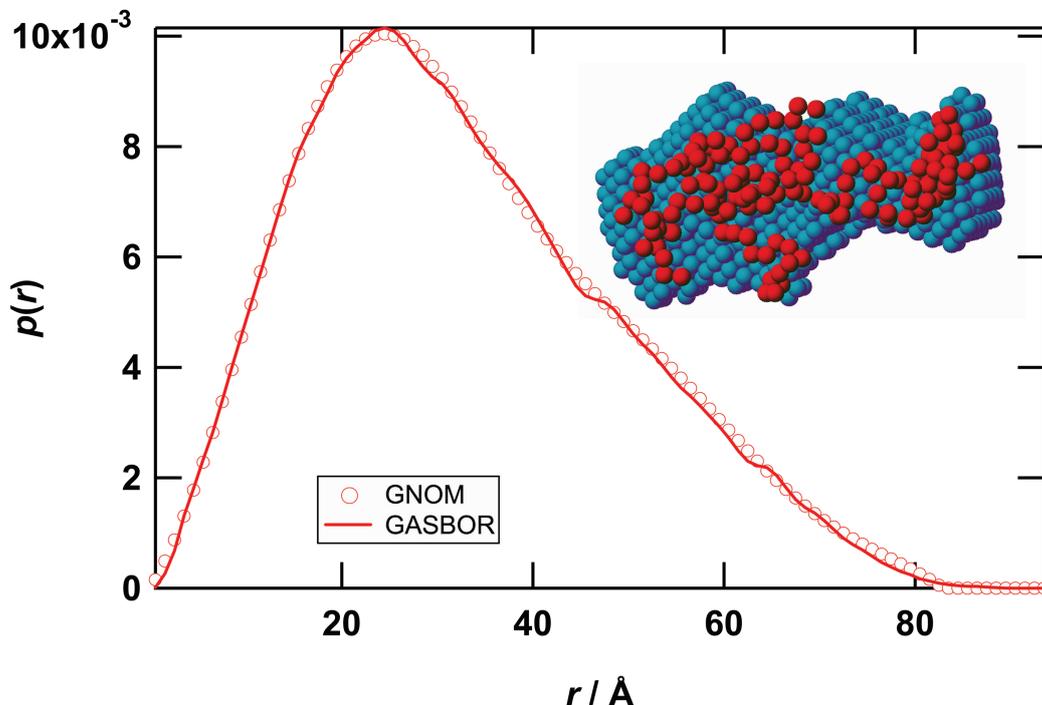


Abb. 3.9: Vergleich der Paarabstandsverteilungen, die sich aus den Messdaten (indirekte FT mit GNOM) und der von GASBOR berechneten Struktur aus DRs ergeben. Eingefasst ist der entsprechende Strukturvorschlag von DAMMIN (grün) und von GASBOR (rot) dargestellt.

Tab. 3.2: Partikelvolumina der über die Programme GASBOR und DAMMIN berechneten Strukturen von gefalteter (1 bar) und druckdenaturierter Snase (3000 bar).

| | $V_{\text{GASBOR}}/10^5 \text{Å}^3$ | $V_{\text{DAMMIN}}/10^5 \text{Å}^3$ |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| gefaltet | 0.107 | 0.410 |
| entfaltet | 0.193 | 0.652 |

Tab. 3.3: Anteil der Strukturelemente in Snase im gefalteten und einem möglichen entfaltenen Zustand.

| | α -Helix | β -Faltblatt | Zufallsknäuel |
|-------------------------------|-----------------|--------------------|---------------|
| Kristallstruktur (nativ) | 23.7 % | 23.1 % | 53.1 % |
| Entfaltet (Annahme 1) | 9.0 % | 15.4 % | 75.6 % |
| Entfaltet (Annahme 2) | 0.0 % | 15.4 % | 84.6 % |
| IR-Ergebnis (nativ, normiert) | 23.7 % | 23.1 % | 53.1 % |
| – ” – (entfaltet, normiert) | 11.0 % | 18.0 % | 70.0 % |

Fällen stimmen Streukurve $I(Q)$ und Paarabstandsverteilung $p(r)$ mit den Messdaten überein. Außerdem lassen sich alle Strukturvorschläge mit dem DAM in Einklang bringen (s. Abb. 3.9). Durch die vielen Möglichkeiten, die 149 Reste in dem größeren Partikel anzuordnen, stößt diese Methode mit der Berechnung eines hypothetischen Polypeptids an ihre Grenzen. Über das Programm CRY SOL lassen sich wiederum die Partikelvolumina aller Strukturvorschläge bestimmen und mit dem Volumen der gefalteten Struktur vergleichen (s. Tab. 3.2). In beiden Fällen ergibt sich eine Zunahme des molekularen Volumens um den Faktor 1.6–1.8.

Bezieht man an dieser Stelle die Primärsequenz von Snase bzw. die Sekundärstruktur in die Betrachtung des entfaltenen Zustands ein, so lässt sich ein möglicher Verlauf des druckinduzierten Entfaltungsprozesses rekonstruieren. In Tab. 3.3 sind die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen, bezogen auf die Anzahl der Aminosäuren, dargestellt; diese lassen sich aus der Kristallstruktur direkt ermitteln. Legt man diese Anteile auch den Ergebnissen der IR-Spektroskopie zu Grunde und normiert die angegebenen relativen Intensitäten der Sekundärstrukturbanden darauf, so lässt sich aus den Änderungen der Intensitäten weiterhin eine Änderung in der Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente abschätzen. Der α -helikale Anteil nimmt um -57% , der Anteil an β -Faltblättern um -23% ab, während die Zufallsknäuel um $+30\%$ zunehmen. Die Anteile der Sekundärstrukturen verändern sich somit auf die absoluten Werte von 11% α -Helix, 18% β -Faltblatt und 70% Zufallsknäuel. Die Summe ergibt nahezu 100% , so dass die Berechnung der einzelnen Änderungen zu einem sinnvollen Ergebnis führt. Von einem Fehler im Bereich von $\pm 5\%$ muss allerdings ausgegangen werden.

Nimmt man nun an, dass das Protein vom C-Terminus beginnend bis zum ersten β -Faltblatt (Ile72–Phe76 und Gly88–Ala95) einschließlich entfaltet, so verändert sich die

Zusammensetzung der Strukturelemente in der in Tab. 3.3 angegebenen Art und Weise (Annahme 1). Annahme 2 beinhaltet neben der Annahme 1 die zusätzliche Entfaltung der letzten α -Helix (Gly55–Asn68), die in der Sequenz nach dem genannten β -Falblatt folgt.

Fasst man die strukturellen und spektroskopischen Informationen zusammen, so liegt die Vermutung nahe, dass der Entfaltungsprozess über die Annahme 1 beschrieben werden kann. Weiterhin lässt sich feststellen, dass durch die Berechnung der entfalteten Struktur mittels der Programme GASBOR und DAMMIN eine signifikante Zunahme der Hydrathülle beobachtet wird (vgl. Abb. 3.9). Die von GASBOR berechnete denaturierte Struktur weist dabei im Vergleich mit der gefalteten Struktur die zwei- bis dreifache Menge an Wassermolekülen auf. Zusätzlich berechnet das Programm DAMMIN für die entfaltete Struktur einen dreidimensionalen Körper aus DAMs mit einem wesentlich größeren Volumen als jenem der gefalteten Struktur.

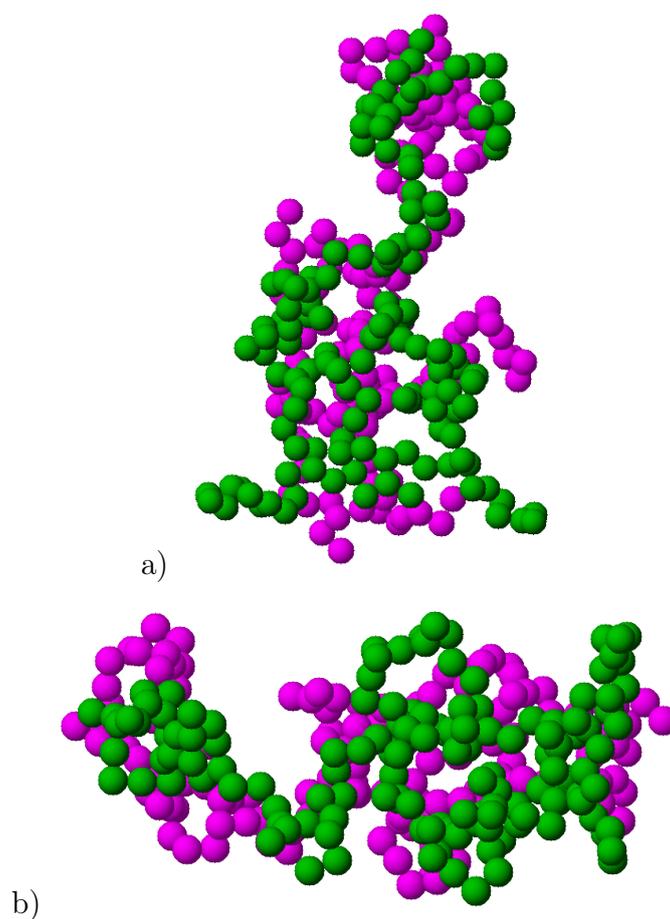


Abb. 3.10: Zwei Strukturvorschläge des Programms GASBOR für eine theoretische Peptidkette aus "Dummy Residues" (DR), berechnet aus den Messdaten von Snase bei 3000 bar und 25 °C nach einer Zeit von 2400 s. Wie man erkennen kann, bleibt ein kompakter weiterhin gefalteter Teil erhalten. Die FTIR-spektroskopischen Daten bestätigen diesen Sachverhalt, da der Rückgang großer Teile der α -helikalen Strukturen aber ein Bestehenbleiben von β -Faltblattelementen beobachtet wird.

3.1.4 Kinetik der Faltung/Rückfaltung von Snase

Zu Beginn dieses Kapitels wurde die druckinduzierte Denaturierung und Rückfaltung als reversibler Prozess mit zwei Zuständen beschrieben, d.h. während der Entfaltung bzw. Rückfaltung des Proteins liegt eine Population beider Zustände nebeneinander vor. Die in Abb. 3.11 angegebenen Gyrationradien und dargestellten Formen von Snase sind somit immer als zeitliches Ensemblemittel zu verstehen. Während druckabhängige Dichtemessungen eine Abnahme des partiellen Volumens von Snase durch die Abnahme von Totvolumina aufzeigen, wird hier der zusätzlich auftretende Prozess der Hydratisierung und eine Zunahme des Gesamtvolumens durch eine dichter gepackte Hydrathülle registriert. Während die Entfaltung in einem Zeitfenster von einigen Minuten stattfindet, erfolgt die Rückfaltung bei wesentlich kürzeren Zeiten, wie dies aus Abb. 3.12 erkennbar wird. Die Dehydratisierung der hydrophoben Abschnitte der Peptidkette und die Rückfaltung sind ein entropisch und energetisch favorisierter Prozess. Auch in Bezug auf ablaufenden Transportprozesse sollte die Freisetzung von Wassermolekülen an schon freiliegenden, entfalteten Proteinsequenzen schneller ablaufen, als es bei der Penetration in ein gefaltetes Protein der Fall ist.

Die folgenden zwei Tabellen enthalten alle gemessenen Relaxationszeiten in Abhängigkeit von der Drucksprungamplitude, Richtung des Drucksprungs und der Temperatur. Die Fehlerangaben ergeben sich aus der Bandbreite der angepassten Exponentialfunktion, hervorgerufen durch den Fehler bei der Bestimmung des Gyrationradius (vgl. Abb. 3.11). Aus dem Stabilitätsdiagramm werden die Denaturierungsdrücke p_{tr} für die entsprechenden Temperaturen entnommen und ebenfalls angegeben.

Ausgehend von Gl. 3.5, 3.6 werden die reziproken Relaxationszeiten halblogarithmisch gegen den Enddruck $p = p_2$ aufgetragen, so dass sich daraus die Aktivierungsvolumina ΔV_u^\ddagger und ΔV_f^\ddagger bestimmen lassen. Durch die großen Drucksprungamplituden Δp und die entsprechend gewählten Start- (p_1) und Enddrücke (p_2) liegen die Anfangs- und Endbedingungen weit außerhalb der Gleichgewichtsbedingungen. Es wird also die Vereinfachung gemacht, dass die Faltungs- und Entfaltungsgeschwindigkeiten nur von einem Prozess bestimmt werden und dadurch die Druckabhängigkeit mit einem einfachen Exponentialausdruck beschrieben werden kann. Die Resultate sind in Tab. 3.6 angegeben. Die Fehler der Relaxationszeiten $\tau(p)$ sind sehr groß und mit der Präzision der spektroskopischen Messungen nicht vergleichbar. Zur besseren Übersicht sind deshalb die Fehlerbalken in den Abb. 3.13 und 3.14 nicht dargestellt. Die Änderung der freien Enthalpie ΔG_u^0 wird über Gl. 3.8 berechnet. Die erhaltenen Ergebnisse werden mit den in [53] angegebenen Werten verglichen. Trotz des großen Fehlers der SAXS-Resultate und der zusätzlichen Vereinfachung des Modells kann eine gute Übereinstimmung festgestellt werden.

Die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten kann hier nur qualitativ betrachtet werden, da auch nur Ergebnisse bei zwei Temperaturen experimentell ermittelt wurden. Dennoch lässt sich ein erheblicher Einfluss der Temperatur auf die druckinduzierte Entfaltung von Snase feststellen, die Relaxationszeiten von Drucksprüngen mit vergleichbaren Enddrücken und Amplituden betragen bei 40 °C nur noch einen Bruchteil der Zeiten bei 25 °C. Auch hier werden wiederum die spektroskopischen Ergebnisse herangezogen, da die thermodynamischen Größen $\Delta G_u^0 = 5.4$ kJ/mol und $\Delta V_u^0 = 52$ ml/mol für 40 °C aus fluoreszenzspektroskopischen Messungen bekannt sind [53]. Über Gl. 3.5 lässt

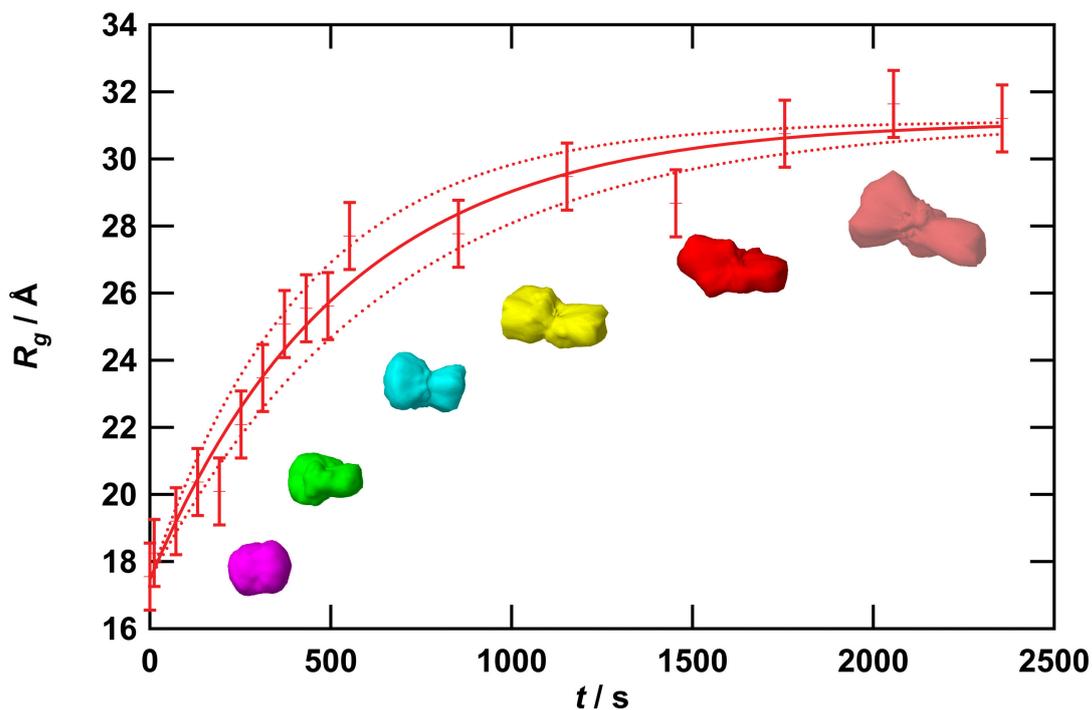


Abb. 3.11: Änderung des Gyrationradius von Snase nach einem Drucksprung von 1000 nach 3000 bar bei 25 °C. Zusätzlich sind die von DAMMIN und CRY SOL berechneten Formen zur Veranschaulichung dargestellt. Aus der Anpassung mit Gl. 3.3 ergibt sich eine Geschwindigkeitskonstante $\tau = 534$ s.

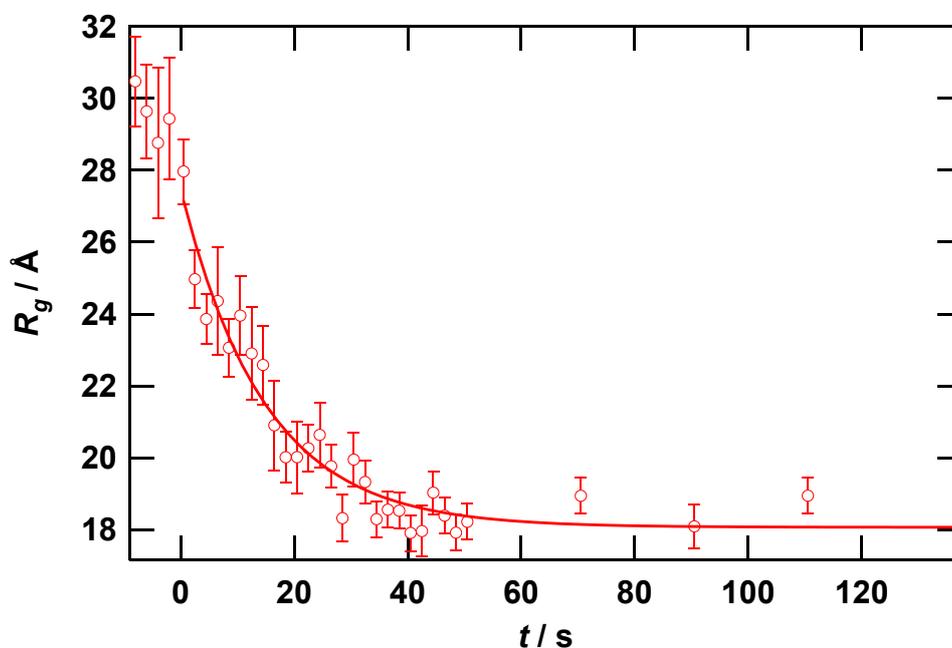


Abb. 3.12: Zeitabhängigkeit des Gyrationradius nach einem Drucksprung von 3000 nach 1000 bar bei 25 °C. Die Rückfaltung erfolgt wesentlich schneller, es wird eine Relaxationszeit von $\tau = 15$ s gefunden.

Tab. 3.4: Relaxationszeiten τ des Entfaltungsvorgangs von Snase bei unterschiedlichen Temperaturen T und Drucksprungamplituden Δp ($p_{\text{tr}}(25^\circ\text{C}) = 2050$ bar, $p_{\text{tr}}(40^\circ\text{C}) = 1250$ bar [47]).

| $T/^\circ\text{C}$ | p_1/kbar | p_2/kbar | $\Delta p/\text{kbar}$ | $p_2 - p_{\text{tr}}/\text{kbar}$ | τ/s |
|--------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| 25 | 1.5 | 2.5 | 1.0 | 0.45 | 1340 (+622 / -203) |
| | 1.5 | 3.0 | 1.5 | 0.95 | 840 (+274 / -170) |
| | 1.0 | 3.0 | 2.0 | 0.95 | 534 (+72 / -109) |
| | 1.0 | 3.0 | 2.0 | 0.95 | 492 (+66 / -90) |
| | 1.0 | 3.5 | 2.5 | 1.45 | 690 (+311 / -162) |
| 40 | 1.5 | 2.5 | 1.0 | 1.25 | 39.0 (+11 / -23) |
| | 1.0 | 3.0 | 2.0 | 1.75 | 59.7 (+32 / -35) |
| | 0.8 | 4.0 | 3.2 | 2.75 | 25.2 (+4.3 / -6.5) |

Tab. 3.5: Relaxationszeiten τ der Renaturierung von Snase bei unterschiedlichen Temperaturen T und Drucksprungamplituden Δp .

| $T/^\circ\text{C}$ | p_1/kbar | p_2/kbar | $\Delta p/\text{kbar}$ | $p_2 - p_{\text{tr}}/\text{kbar}$ | τ/s |
|--------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 25 | 2.5 | 1.4 | 1.1 | -0.65 | 10.9 (+2.0 / -3.2) |
| | 3.0 | 1.4 | 1.6 | -0.65 | 20.4 (+10.8 / -3.0) |
| | 3.0 | 1.0 | 2.0 | -1.05 | 14.8 (+1.5 / -2.0) |
| | 3.0 | 1.0 | 2.0 | -1.05 | 6.0 (+1.0 / -1.5) |
| | 4.0 | 0.8 | 3.2 | -1.25 | 4.5 (+0.5 / -0.5) |
| 40 | 2.5 | 1.4 | 1.1 | 0.15 | 4.1 (+0.8 / -1.4) |
| | 3.0 | 1.0 | 2.0 | -0.25 | 5.1 (+0.7 / -0.9) |
| | 4.0 | 0.8 | 3.2 | -0.45 | 4.7 (+0.7 / -1.0) |

Tab. 3.6: Thermodynamische Daten der Faltungs-/ Entfaltungskinetik von Snase ermittelt durch die Drucksprungtechnik bei 25 °C.

| $\Delta V_u^\ddagger / (\text{ml}\cdot\text{mol}^{-1})$ | $\Delta V_f^\ddagger / (\text{ml}\cdot\text{mol}^{-1})$ | $\Delta G_u^0 / (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ |
|---|---|--|
| -17 | 60 | 22 ^{a)} |
| -23 | 57 | 13 ^{b)} |

a) SAXS, b) Fluoreszenzspektroskopie [53]

sich der Unterschied mit einem Faktor von 30 zwischen den Geschwindigkeitskonstanten bei 25 und 40 °C allein durch die starke Abnahme der freien Enthalpie ΔG_u^0 begründen. Einen wesentlich kleineren Effekt beobachtet man hingegen bei der Rückfaltung des Proteins, die Zeiten unterscheiden sich höchstens um den Faktor 3.

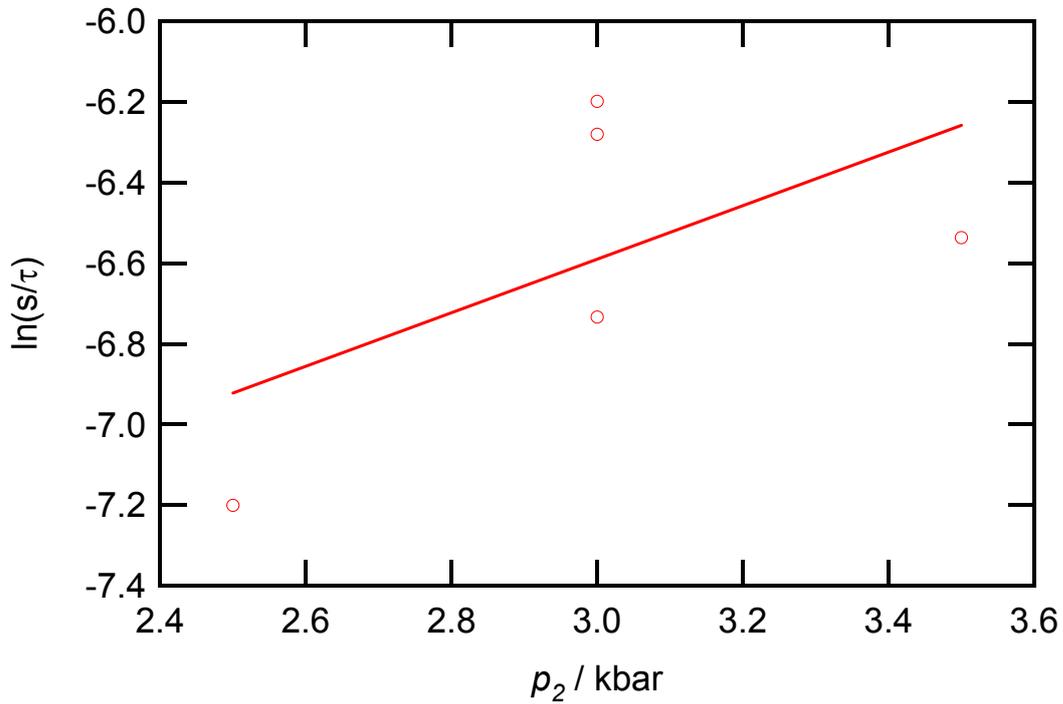


Abb. 3.13: Bestimmung des Aktivierungsvolumens der Entfaltung von Snase bei 25 °C aus den Relaxationszeiten τ in Abhängigkeit des Enddrucks p_2 .

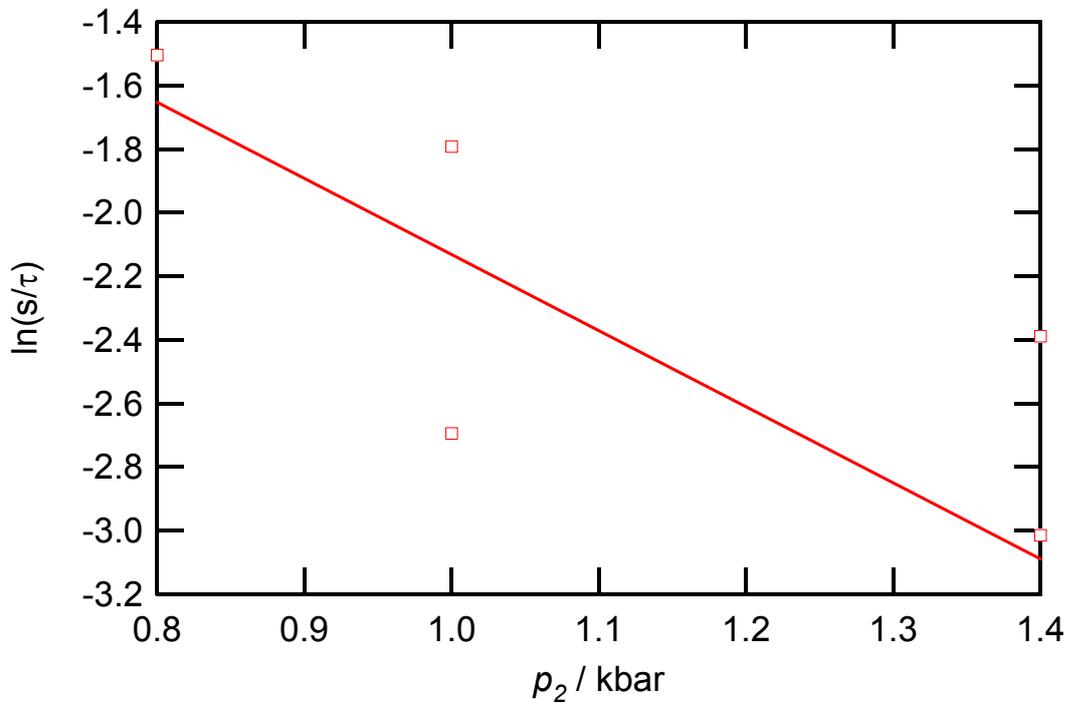


Abb. 3.14: Bestimmung des Aktivierungsvolumens der Faltung von Snase bei 25 °C aus den Relaxationszeiten τ in Abhängigkeit des Enddrucks p_2 .

3.2 Trp-Repressor: Strukturelle Änderungen durch Druckerhöhung

Neben den Drucksprungdenaturierungsexperimenten werden Gleichgewichtsmessungen am Trp-Repressor bei Raumtemperatur und verschiedenen Drücken dargestellt, deren Ziel die Bestimmung der Phasenumwandlungspunkte für die Entfaltung des Proteins ist, um Start- und Endparameter für Drucksprünge zu erhalten. Zur Abschätzung des Gyrationradiuses des Dimers werden NMR- und Röntgenstrukturdaten aus der Proteindatenbank Brookhaven herangezogen und mit den Programmen CRY SOL bzw. MASSHA unter Verwendung der Kleinwinkelstreudaten ausgewertet. Verglichen werden die Ergebnisse mit denen des Programms DAMMIN, das ausgehend von den gemessenen SAXS-Daten eine dreidimensionalen Strukturvorschlag generiert.

3.2.1 Struktur und biologische Funktion des Trp-Repressors

Beim Trp-Repressor handelt es sich um ein Regulatorprotein, das in die Proteinbiosynthese eingreift und die Transskription, also das Auslesen der auf dem DNA-Strang gespeicherten Information, und somit die Bildung des RNA-Stranges verhindert. Nach dem Binden des Substrats, in diesem Fall L-Tryptophan, bildet der Repressor mit der DNA-Doppelhelix einen stabilen Komplex und knickt diese leicht ab [60]. Das Binden der RNA-Polymerase an die DNA wird somit verhindert. Im Falle des Trp-Repressors von *E. coli* handelt es sich bei der Bindungsstelle (Operon) um ein 18 Basenpaare langes Palindrom (TGTACTAGTTAACTAGTAC, die DNA-Protein-Kontaktstellen sind unterstrichen). Die RNA und auch die für die Produktion von L-Tryptophan notwendigen Proteine können in diesem Fall so lange nicht mehr synthetisiert werden, bis die Substratkonzentration soweit gesunken ist, dass der Repressor wieder inaktiviert wird und der Repressor-Operon-Komplex sich wieder gelöst wird [61]. In Abb. 3.15 ist der Komplex aus Regulatorprotein, Substrat und DNA-Doppelhelix an Hand der Röntgenstruktur dargestellt.

Die symmetrische Sekundärstruktur des Apo-Repressors (Abb. 3.16) zeichnet sich durch einen hohen Anteil an α -Helices aus. Diese können untereinander hydrophobe Wechselwirkungen eingehen und führen zur Bildung eines Dimers. Aktiv wird der Repressor durch Bindung von L-Tryptophan und wird dann als Holo-Repressor bezeichnet.

3.2.2 Experimentelle Durchführung

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um C. Royer wird der aus *E. coli* gewonnene und nach dem in [62] beschriebenen Verfahren gereinigte Wildtyp des Dimers ohne gebundenes Tryptophan für die SAXS-Messungen verwendet. Für die 2 gew.-%ige Proteinlösung wird BIS-TRIS (10 mM) als druckstabiler Puffer verwendet. Ein pH-Wert von 5.5 wurde durch Ansäuern mit HCl eingestellt. Die statischen Druckexperimente wurden an der Beamline ID-2 (ESRF, Grenoble) unter Verwendung der zuvor beschriebenen Diamantfensterzelle durchgeführt. Vor jeder Messung wird eine Equilibrierungsphase des Systems von 45 min angesetzt und ggf. die Einstellung des Gleichgewichts durch Wiederholung der

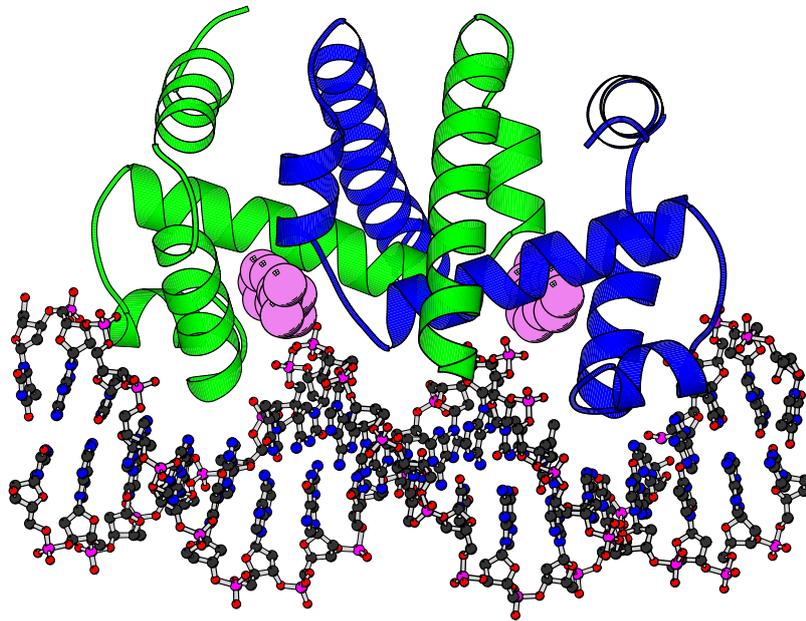


Abb. 3.15: Molscript-Darstellung der Röntgenstruktur des Trp-Repressors mit gebundenem Substrat (L-Tryptophan, violett) an einer synthetischen DNA-Doppelhelix (PDB-Eintrag: 1TRO).

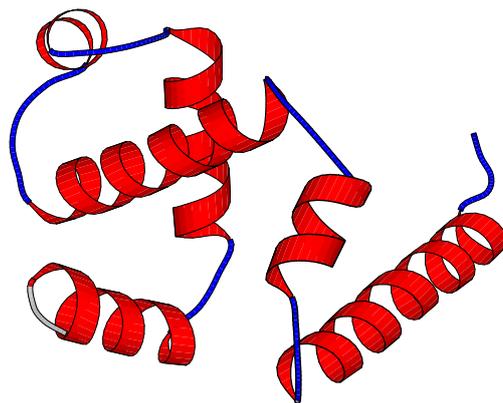


Abb. 3.16: Molscript-Darstellung des Monomers (Apo-Repressor). Die Röntgenstruktur ist in der PDB-Datenbank unter 1WRP gespeichert.

Messung überprüft. Als Untergrund dienen die Streudaten der Pufferlösung bei entsprechenden Drücken. Die Belichtungszeit bei jeder Einzelmessung beträgt 0.1 s bei vollem Photonenfluss. Um Strahlungsschäden auszuschließen, werden die Proben nach ca. 30 Einzelmessungen ausgetauscht.

3.2.3 Auswertung der SAXS-Daten

Struktur des Trp-Repressors bei 1 bar

Aus den korrigierten Streudaten lässt sich durch indirekte Fourier-Transformation die Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ extrahieren und somit lässt sich auch der Gyrationradius R_g , der Durchmesser und die maximale Ausdehnung der in erster Näherung ellipsoiden Proteingestalt bestimmen. Ein schrittweiser Verlauf der Analysemethode ist in Abb. 3.17 skizziert. Es werden wiederum die Programme CRY SOL, DAMMIN und MASSHA verwendet, um vorhandene Kristallstrukturen mit den SAXS-Daten zu vergleichen oder ein Strukturmodell aus diesen zu berechnen. Weiterhin wird die Methode des "Rigid Body Modelling", ein Bestandteil des Programms MASSHA, zur Erzeugung eines hypothetischen Dimers eingesetzt.

Zunächst wird die theoretische Streukurve des Holo-Repressors, dessen NMR-Struktur unter dem Datenbankeintrag 1WRS zu finden ist, mit den experimentellen Streudaten verglichen. Der Gyrationradius inklusive einer theoretischen Hydrathülle von 3 Å wird berechnet. Die Hydrathülle wird in konstantem Abstand zu der Hülle um die Tertiärstruktur des Proteins angenommen und schließt auch Leerräume zwischen den Sekundärstrukturelementen mit ein, wie dies in Abb. 3.19 dargestellt ist.

Von dem Trp-Repressor liegen in der Proteindatenbank Brookhaven neben der NMR-Struktur des Dimer-Substrat-Komplexes in Lösung und der Einkristallröntgenstruktur des Dimer-Substrat-Komplexes an DNA noch der Komplex aus Operon, Dimer und Substrat und die Röntgenstruktur des Monomers vor. Aus dem Monomer lässt sich wiederum über das Programm MASSHA ein Modelldimer erzeugen (Abb. 3.19, links). Die Lage der beiden Dimere zueinander wird mit der aus den in Abb. 3.15 und Abb. 3.19 (rechts) verglichen und angepasst. Zusätzlich wird eine Strukturverfeinerung mit gemessenen SAXS-Daten bei 1 bar durchgeführt. Ein "Least Squares"-Algorithmus variiert dabei die dreidimensionale Lage der Monomere so, dass die Streukurve des resultierenden Dimers optimal mit den Messdaten übereinstimmt (vgl. Abb. 3.20).

Ausgehend von der an die Messdaten angepassten Streufunktion (vgl. Abb. 3.18) wird über das Programm DAMMIN eine Modellstruktur aus einzelnen sphärischen Streuzentren erstellt. Das endgültige Strukturmodell ist in Abb. 3.21 dargestellt. Die Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ des Modells entspricht wiederum dem Ergebnis aus der indirekten Fourier-Transformation der Messdaten und somit entspricht auch der aus der Paarabstandsverteilung berechnete Gyrationradius der Modellstruktur. Zur Übersicht sind alle über die drei Methoden erhaltenen Gyrationradien in Tab. 3.7 angegeben.

Die Modellstruktur kann mit Strukturen aus der PDB-Datenbank verglichen werden, in dem sowohl die NMR- oder Röntgenkristallstruktur als auch das aus dem Monomer künstlich generierte Dimer mit dem Programm MASSHA zusammen dargestellt und relativ zueinander in drei Dimensionen bewegt werden können. Mit der Routine SUPREF ist eine

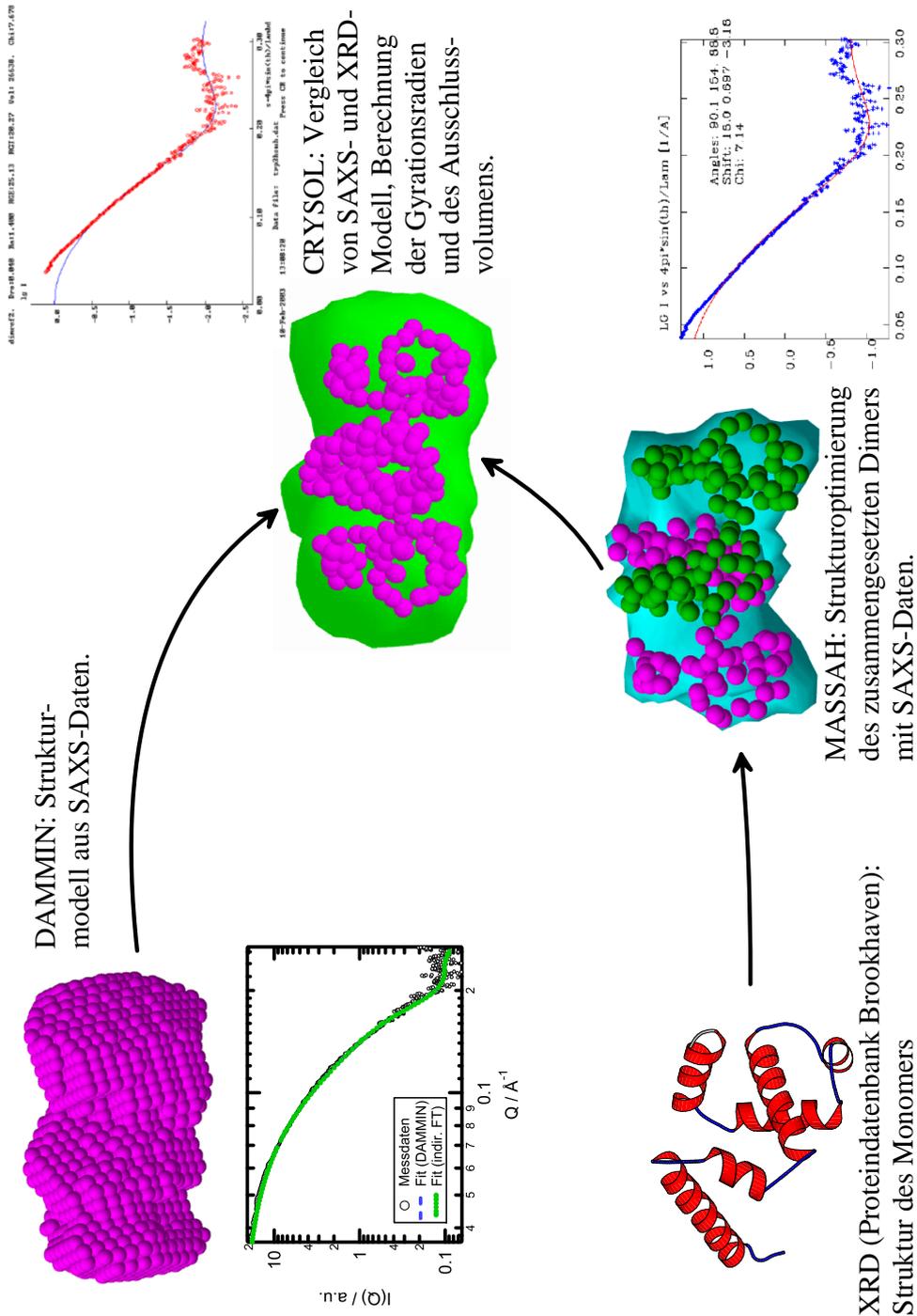


Abb. 3.17: Skizze für die schrittweise Auswertung der Kleinwinkelstreuendaten. Aus den kristallografischen Daten des Trp-Repressor-Monomers wird ein künstliches Modell dimer erzeugt und mit der NMR-Struktur des dimeren Holo-Repressors (PDB-Eintrag 1WRS) verglichen.

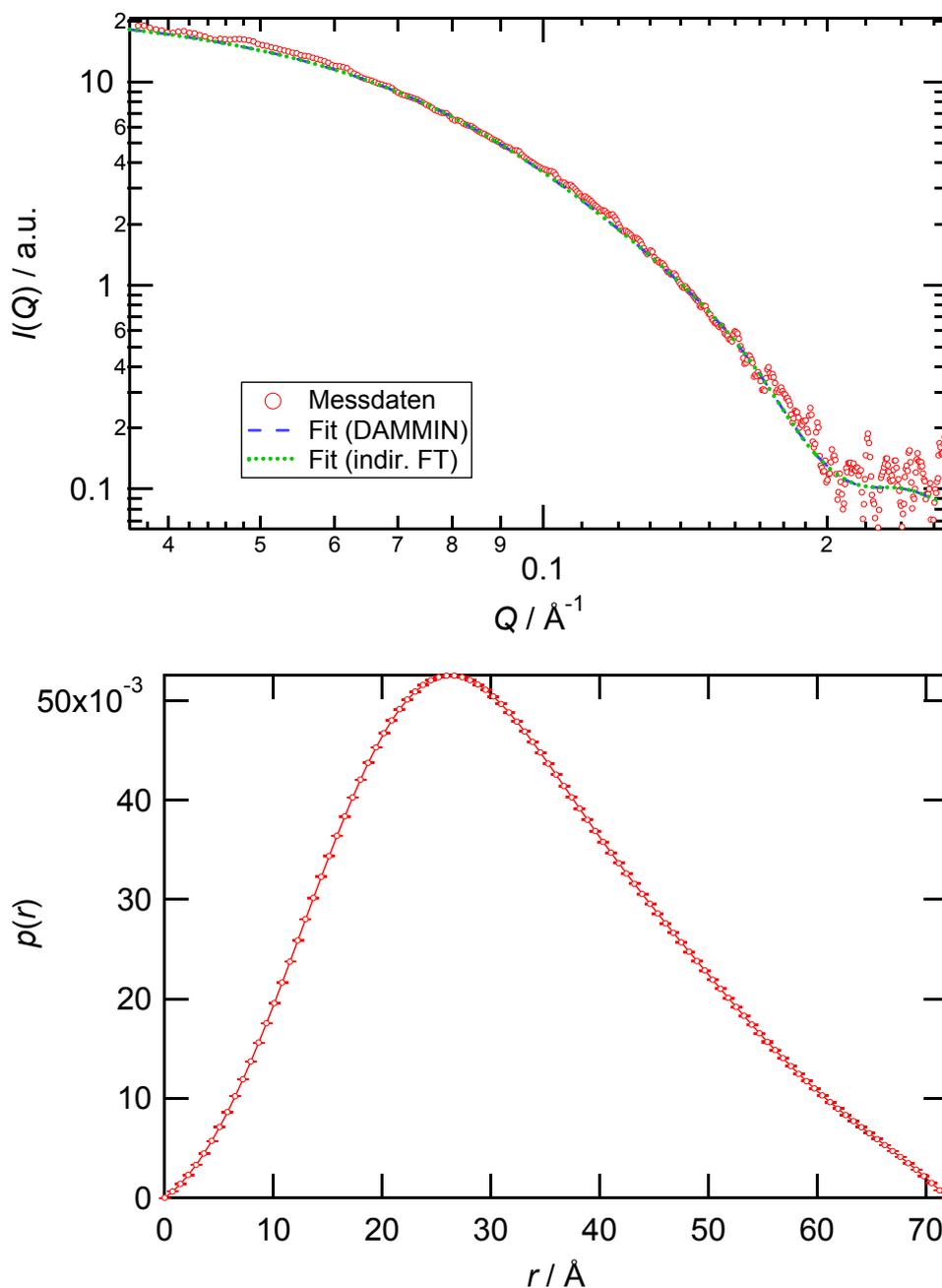


Abb. 3.18: Oben: Kleinwinkelstreuendaten des Trp-Repressors bei 1 bar und 25 °C. Der Streubeitrag der Diamantfenster bzw. der Pufferlösung wurde zuvor abgezogen. **Unten:** Ergebnis der indirekten Fourier-Transformation ist die Paarabstandsverteilung $p(r)$. Der daraus ermittelte Gyrationradius R_g beträgt 24.6 Å.

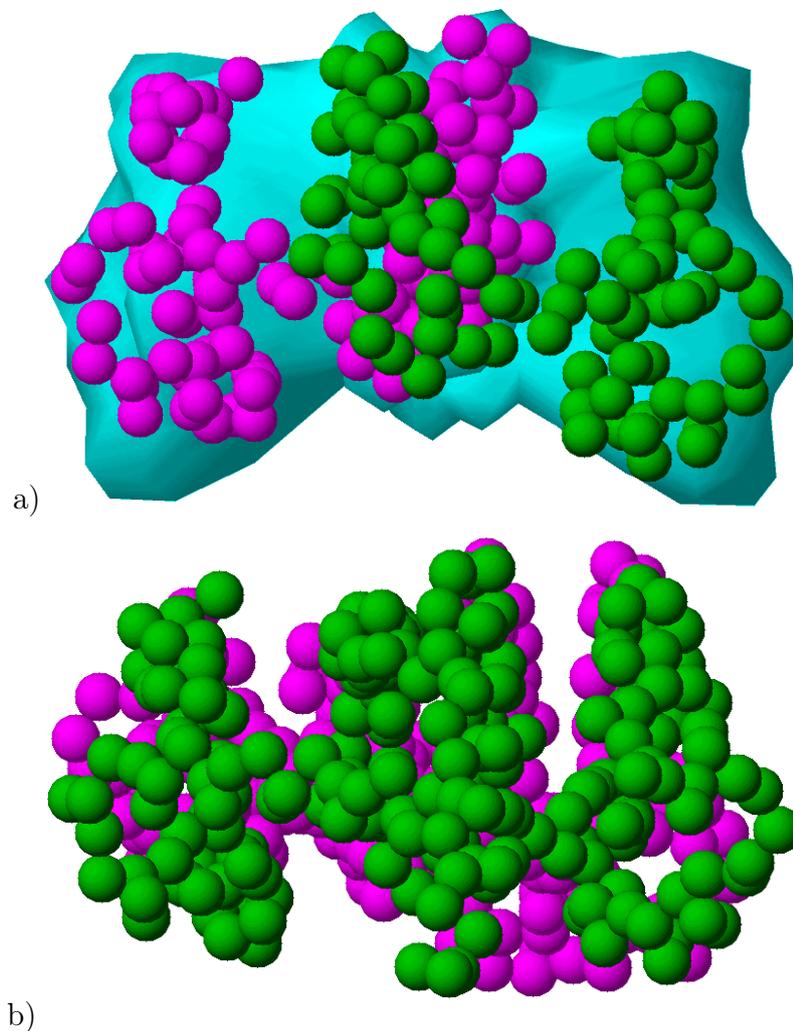


Abb. 3.19: a) Darstellung des aus der Röntgenstruktur des Monomers generierten Dimers. Die dreidimensionale Anordnung der Monomere zueinander wurde mit dem Programm MASSAH an die SAXS-Daten bei 1 bar angepasst und optimiert. Mit CRY SOL lässt sich aus dem erzeugten Dimer (rot) der Gyrationradius R_g bestimmen. Dazu wird eine Hülle aus Voronoi-Polyedern (grün) um das Protein gelegt und eine Hydrathülle mit einer Dicke von 3 Å addiert. Der R_g beträgt 24.1 Å. b) Vergleich der NMR-Struktur des Dimer-Substrat-Komplexes (PDB-Eintrag: 1WRS) mit dem berechneten Homodimer (MASSHA). Beide Strukturen und auch deren Streudaten sind miteinander vergleichbar.

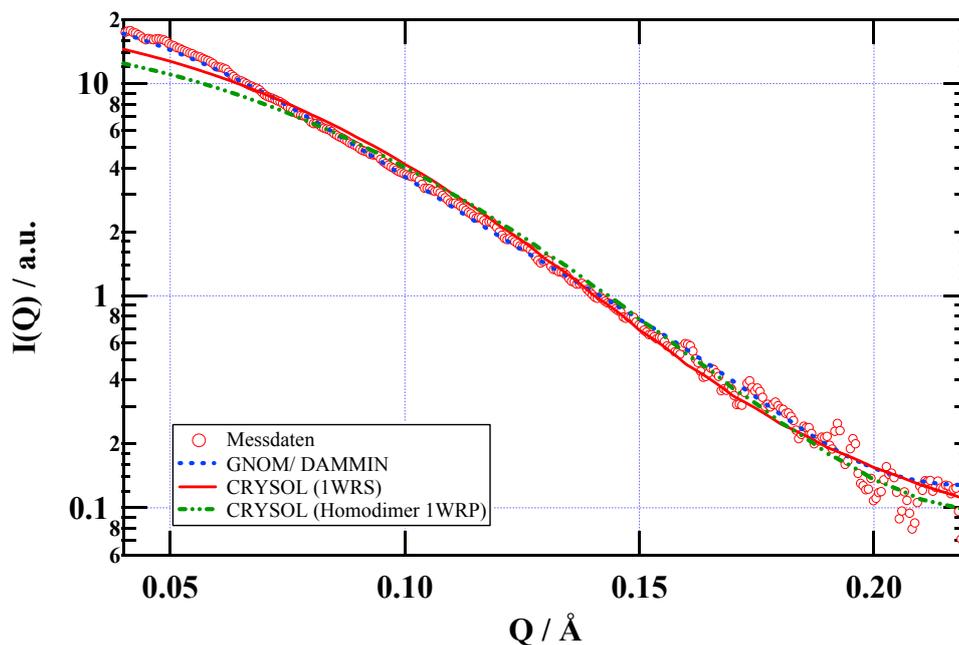


Abb. 3.20: Streukurve des Modelldimers aus Abb. 3.19 (a) (— · —), generiert aus der Röntgenstruktur des Monomers (PDB-Eintrag 1WRP), im Vergleich zu den Streukurven der indirekten FT (GNOM) bzw. aus der Strukturberechnung mit DAMMIN (- - -), der NMR-Struktur 1WRS (—) und den gemessenen SAXS-Daten bei 1 bar und 25 °C (○).

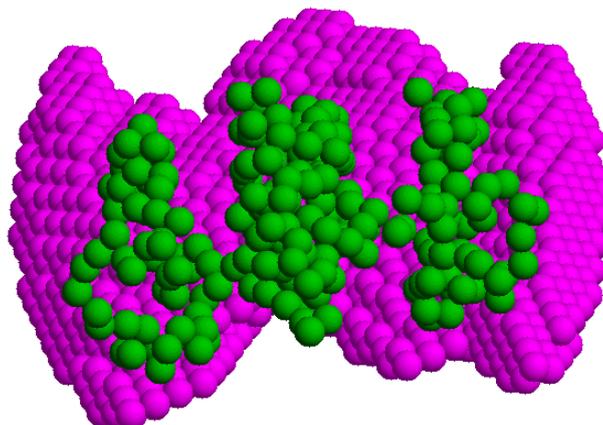


Abb. 3.21: Strukturmodell des Trp-Repressors zusammengesetzt aus sphärischen Streuzentren und berechnet über das Programm DAMMIN aus den gemessenen SAXS-Daten (violett). Durch das Programm MASSAH wird das Modelldimer (grün) aus Abb. 3.19 in dem Strukturmodell (DAMMIN) zur optimalen Übereinstimmung gebracht. In der dreidimensionalen Ansicht kann somit das Modelldimer aus der Einkristallstruktur mit der SAXS-Struktur in Pufferlösung visuell verglichen werden.

anschließende Positionsverfeinerung möglich, so dass die Strukturen optimal zur Deckung gebracht werden können (Abb. 3.21).

Nach Durchführung aller Einzelschritte, Erstellung des Dimerstrukturmodells aus dem Monomer, Berechnung der theoretischen Streukurve und des Gyrationradiuses, Erstellung eines Modellstreckkörpers aus den Messdaten und Vergleich der beiden Modelle, lässt sich zur Quartärstruktur des Trp-Repressors ohne Substrat in Lösung bei 1 bar und 25 °C feststellen, dass zwischen dem künstlich generierten Dimer im Vergleich zur gefundenen NMR-Struktur kein signifikanter Unterschied besteht. Die von DAMMIN vorgeschlagene Form ist jedoch wesentlich länger, wie aus den in Tab. 3.7 angegebenen Längen der unterschiedlichen Strukturen hervorgeht. Die w-förmige Anordnung des Dimers muss also weiter aufgeklappt sein, so dass die Substratbindungsstellen offen zugänglich sind. Daraus folgt wiederum, dass die Erzeugung eines künstlichen Dimers durch die "Rigid Body Modelling"-Methode in diesem Fall an ihre Grenzen stößt.

Tab. 3.7: Vergleich der Partikeldurchmesser und Gyrationradien von Kristall-, NMR- und Modellstruktur aus den SAXS-Daten.

| | Durchmesser / Å | R_g / Å |
|--|-----------------|-----------|
| XRD-Struktur 1TRO/1WRS | 62 | 23.8 |
| Homodimer aus zwei XRD-Strukturen (3WRP) | 64 | 24.1 |
| DAMMIN-Struktur (exkl. 6 Å-Hydrathülle) | 77 | 24.6 |

Strukturänderungen durch Druckerhöhung auf 4000 bar

Änderungen der Struktur durch Erhöhung des Drucks sind erst ab 4000 bar signifikant detektierbar. Der Gyrationradius ändert sich dabei von 24.5 Å auf 27.7 Å. In Abb. 3.22 sind die entsprechenden Paarabstandsverteilungen bei 1 und 4000 bar dargestellt. Erkennbar ist eine Zunahme der maximalen Ausdehnung r_{\max} von 71 auf 82 Å, während die Position des Maximums konstant bei 26.5 Å bleibt. Das Protein dehnt sich also etwas entlang seiner Längsachse aus.

Weitere Experimente bei einer Temperatur von 60 °C und einem hydrostatischen Druck von 2000 bar bewirken die Vergrößerung des Gyrationradius von 23.0 Å bei 1 bar auf 28.0 Å. Vergleicht man die beiden Paarabstandsverteilungen, so bleibt die Position des Maximums konstant, während der maximale Radius zunimmt. Es erfolgt also eine teilweise Entfaltung entlang der Längsachse; dies bestätigt die Annahme, dass das Protein bei 1 bar schon in einer leicht aufgeklappten Form vorliegt und durch die Erhöhung des Drucks ein weiteres Aufklappen und somit die zusätzliche Ausdehnung beobachtet wird.

Die hohe Druckstabilität des Trp-Repressors wird auch durch FTIR-Messungen bestätigt [62]. Eine signifikante Änderung der Sekundärstruktur wird hier ebenfalls erst ab 4000 bar beobachtet. Der Helixanteil nimmt von 60 % bei 1 bar auf 30 % bei 8000 bar ab. Als Übergangspunkt wird ein Druck von 5500 bar angegeben. Die Intensität der Bande für solvatisierte α -Helices nimmt von 20 % nach 40 % zu [62]. Betrachtet man die Anteile der Sekundärstrukturelemente aus der Kristallstruktur 1TRO [60], so setzt sich das Protein

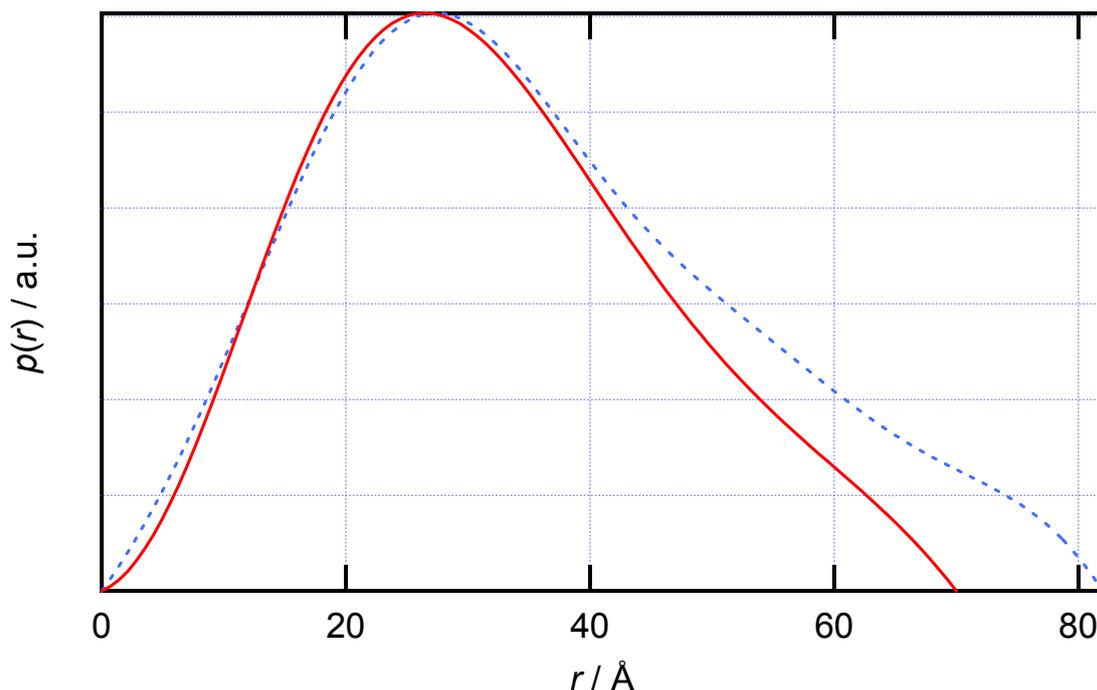


Abb. 3.22: Paarabstandsverteilung einer Trp-Repressor-Probe bei 25 °C, 1 bar (—) bzw. 4000 bar (- -).

zu 69 % aus α -Helices zusammen, der Rest sind Turns und ungeordnete Strukturelemente. Die Gesamtzahl der Aminosäuren beträgt 216, davon entsprechen 34 Aminosäure ungeordneten Strukturen. Dieser Anteil nimmt bei 4000 bar um ca. 10 % also ca. 4 Aminosäuren zu. Wenn die 4 Aminosäuren zuvor noch in einer α -Helix relativ dicht gepackt eine Länge von ca. 6 Å eingenommen haben, nimmt die Länge im Falle von 4 gestreckten Peptidbindungen auf ca. 15 Å zu (vgl. [63, 8]). Mit dieser einfachen Abschätzung aus den FTIR-Resultaten kann jedoch schon die Zunahme der maximalen Ausdehnung der Paarabstandsverteilung um 11 Å erklärt werden. Es kann also angenommen werden, dass zunächst kleinere α -Helices in der Länge von 5–9 Aminosäuren entfalten und zwar im Bereich der Bindungsstelle des Cofaktors L-Tryptophan. Zusätzlich nimmt entlang der Helices die Anzahl dichter gepackter Solvatmoleküle zu.

3.3 Zusammenfassung

Mittels der Drucksprungtechnik und der zeitaufgelösten Kleinwinkelstreuung konnte die reversible Faltung und Entfaltung der Staphylokokken Nuclease (Snase) experimentell verfolgt werden. Moderne Auswertungsroutinen ermöglichen die Berechnung eines Strukturvorschlags aus den Streudaten und neben einer dreidimensionalen Visualisierung des Faltungs- und Entfaltungsprozesses auch die Bestimmung von Strukturparametern des entfalteten Proteins. Die native Form in Lösung ist in diesem Zusammenhang mit der Kristallstruktur vergleichbar, die berechneten Streudaten aus den Atomkoordinaten geben exakt die Messdaten wieder. Ein Vergleich mit der Primärsequenz und spektroskopischen Daten lässt dabei eine Annahme für den Mechanismus der Faltung zu, wobei unter den

gewählten Bedingungen (Druck und Temperatur) und ausgehend von den Strukturvorschlägen der Programme DAMMIN und GASBOR von einem partiell entfaltetem Protein (*molten globule*) auszugehen ist. Die aus den Geschwindigkeitskonstanten bestimmten Aktivierungsvolumina und freien Energien sind mit den spektroskopischen Ergebnissen vergleichbar. Die zeitaufgelöste Kleinwinkelstreuung lässt sich somit als komplementäre Methode zu spektroskopischen Kinetikexperimenten einsetzen.

Ein Großteil der Strukturparameter von Proteinen lässt sich auch ohne atomare Auflösung bestimmen. Die von Svergun *et al.* entwickelten Programme ermöglichen dies durch die Rekonstruktion der Proteinform über unterschiedliche Wege und den Vergleich der berechneten Form mit experimentell bestimmten Streudaten. Am Beispiel des Trp-Repressors ist dies in diesem Kapitel vorgestellt worden. Die aus einzelnen DAs generierte dreidimensionale Form des Proteins aus den Kleinwinkelstreudaten wird mit einer NMR-Struktur und einem künstlichen Dimer aus der Kristallstruktur des Apo-Repressors verglichen. Der Trp-Repressor liegt als Dimer vor und scheint aufgrund des fehlenden Cofaktors Tryptophan z.T. entfaltet vorzuliegen. Die Erhöhung des Drucks auf 4000 bar bewirkt nur ein geringes "Aufklappen" des Proteins, was die hohe Druckstabilität aus spektroskopischen Untersuchungen bestätigt.

4 Hochdruckuntersuchungen von Mikroemulsionen in Verbindung mit eingekapselten Enzymen am System AOT/*n*-Oktan/Wasser

Ziel dieses Kapitels ist die Beschreibung des Phasenverhaltens von AOT/*n*-Oktan/Wasser-Mischungen und der Einfluss von eingebauten Proteinen. Die ternäre Mischung aus oberflächenaktiver Substanz AOT, Wasser und dem Öl Oktan bildet in einem weiten Bereich des Phasendiagramms (s. Abb. 4.1) eine Mikroemulsion (Wasser in Öl). Bei 1 bar Umgebungsdruck bilden sich spärlich-symmetrische inverse Mizellen mit einem variablen Durchmesser abhängig vom eingestellten Wasser-AOT-Konzentrationsverhältnis $w_0 = c(\text{H}_2\text{O})/c(\text{AOT})$. Je nach AOT-Konzentration sind die Mizellen frei verteilt oder bei höheren Konzentrationen dicht gepackt, so dass sie untereinander wechselwirken und eine größere Fernordnung ausgebildet wird. Neben der beschriebenen L_2 -Phase werden weitere lyotrope Phasen mit lamellarer (D), hexagonaler (F) und normaler mizellarer Struktur (L_1) beobachtet. Die gemessenen Strukturparameter liegen auf einer mesoskopischen Längenskala im Bereich von einigen Nanometern. Die von der Ölphase abgegrenzt vorliegenden wohl definierten Wasserkavitäten eignen sich sehr gut für den Einschluss von Proteinen und für die Durchführung von enzymatischen Reaktionen, also auch als Modellsystem für das Verhalten von Proteinen in Zellen und die Wechselwirkung von Proteinen mit Zellwänden [64]. Um den Effekt der Lipidmatrix auf das Enzym studieren zu können, werden sowohl die enzymkinetischen Experimente als auch die druckabhängigen Strukturuntersuchungen separat in Pufferlösung durchgeführt. In einigen Arbeiten ist bereits ein starker Einfluss des Drucks auf die Reaktion und desweiteren auf die Stabilität der hier eingesetzten Enzyme α -Chymotrypsin, Alkoholdehydrogenase und Peroxidase gezeigt worden [65, 66, 67, 68, 69]. Unter diesen Voraussetzungen wird nun die Kleinwinkelstreuung von Mikroemulsionen mit und ohne die genannten Proteine bzw. von den Proteinen in Pufferlösung in Abhängigkeit des Drucks verfolgt, um eine Verbindung zwischen den Ergebnissen der enzymkinetischen Untersuchungen unter dem Einfluss der vorliegenden Struktur und dem Phasenverhalten des Systems herzustellen. Desweiteren wird die Struktur der Proteine bestimmt, so dass Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen zwischen Protein und Membran möglich sind.

Die zusätzlich in Abb. 4.1 eingetragenen Linien A, B, C und D repräsentieren Schnitte durch das Phasendiagramm, auf denen sich die Mischungsverhältnisse der untersuchten Proben befinden. Zum Einen wird von einer AOT-*n*-Oktan-Stammlösung mit den Konzentrationen 0.1 M (A), 0.66 M (B) und 1.0 M (C) ausgegangen und das Verhältnis w_0

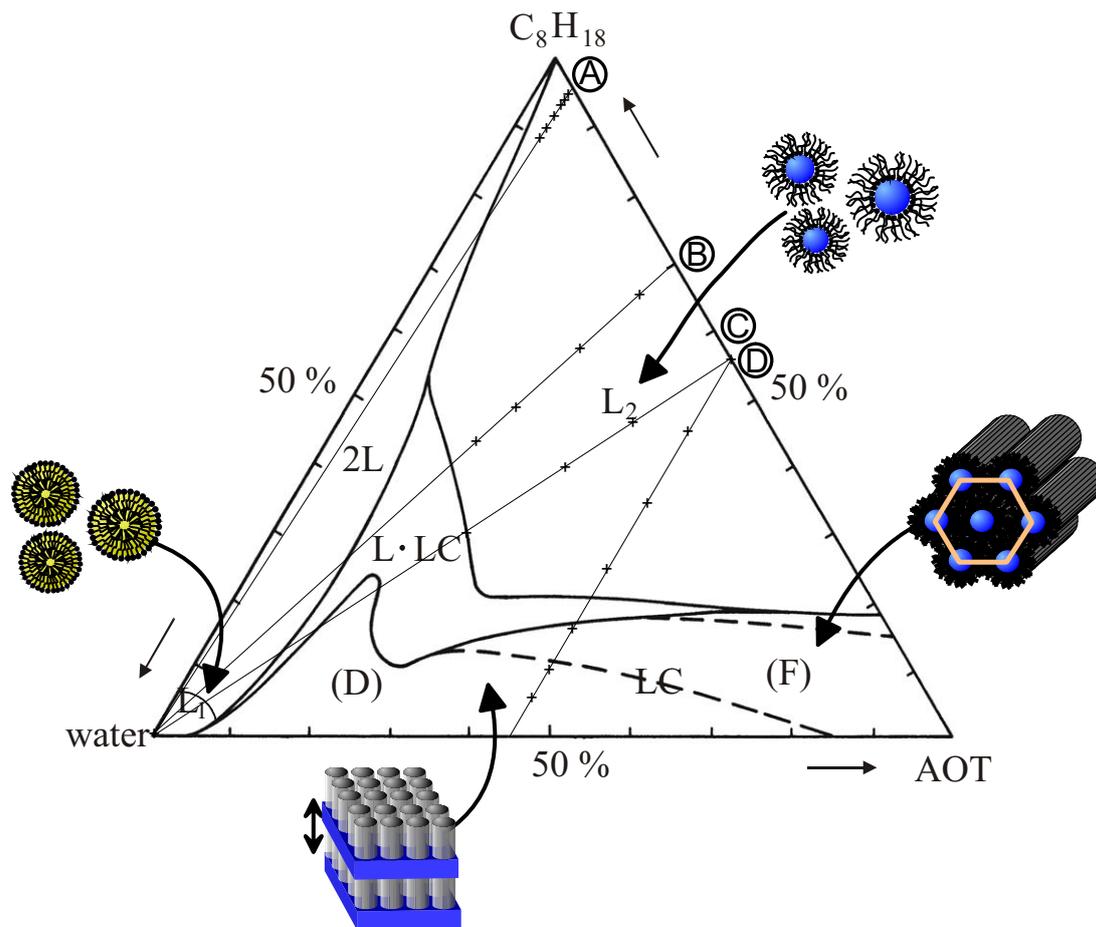
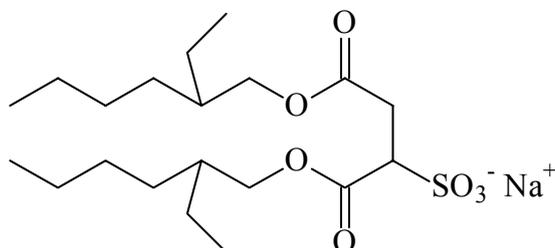


Abb. 4.1: Phasendiagramm des ternären Systems AOT/*n*-Oktan/Wasser bei 300 K und 1 bar.

durch Wasserzugabe variiert, zum Anderen wird der AOT-Anteil konstant bei 45 Gew.-% (D) gehalten und das Verhältnis des zugewogenen Wasser- und *n*-Oktan-Anteils verändert. Weitere Hochdruckmessungen mit SAXS und SANS werden außerdem an ausgewählten Punkten auf den Schnittlinien und entlang der Phasengrenze L_2 nach F durchgeführt. Änderungen des Phasenverhaltens durch Wechselwirkungen der Proteine mit der Lipidmembran werden mit Enzymen studiert, deren Aufbau und Funktion sehr gut bekannt sind und somit als Sonden für den Einfluss der eingrenzenden Membranstrukturen in den Mikroemulsionen geeignet sind. Das globuläre Protein α -Chymotrypsin und das aus zwei Einheiten aufgebaute Protein Alkoholdehydrogenase (Leber) bieten sich für diese Verwendung an.

4.1 Eigenschaften, Phasenverhalten und Einfluss des Drucks

AOT ist ein ionisches Amphiphil (Abb. 4.2), d.h. Aggregate aus diesem Molekül verfügen über eine negative Oberflächenladung, die durch Gegenionen, in diesem Fall Na^+ , zum größten Teil abgeschirmt ist. Durch Einbau von anderen positiv oder negativ geladenen Amphiphilen, wie z.B. SDS, oder durch Änderung der Ionenstärke bzw. des pH-Wertes kann diese Oberflächenladung variiert werden. Zu beachten ist dies beim Einbau von Proteinen in die Mikroemulsion. Je nach eingestelltem pH-Wert der Pufferlösung verfügen diese auf Grund geladener Aminosäuren ebenfalls über eine Oberflächenladung.



AOT (Bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinat)

Abb. 4.2: Strukturformel von Aerosol-OT. Zu berücksichtigen ist der geladene Sulfonäurerest bzw. die Verzweigung der aliphatischen Kohlenwasserstoffkette.

Bilden sich an der Grenze zwischen Öl- und Wasserphase spontan Aggregate aus oberflächenaktiven Substanzen, so sind die attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Molekülen ausschlaggebend für die sich ausbildenden mesoskopischen Strukturen. Unterschieden wird zwischen den hydrophoben Wechselwirkungen der Alkylseitenketten, sterischen Abstoßungen zwischen verzweigten Alkylresten und repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen. Als Folge der Wechselwirkungsbeiträge besitzt das einzelne amphile Molekül eine bestimmte Form mit einem entsprechenden Volumen, wie dies in Abb. 4.3 verdeutlicht wird. Im Falle von AOT erhöhen sich durch die Verzweigung mit

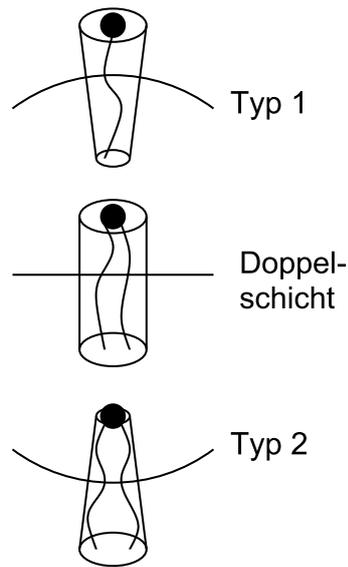


Abb. 4.3: Einfluss der Molekülgestalt innerhalb eines Aggregats aus amphiphilen Molekülen auf die Krümmung der ausgebildeten mesoskopischen Struktur.

Ethylresten die sterisch bedingten repulsiven Kräfte innerhalb der unpolaren Seitenkettenbereiche, so dass die Molekülform kegelförmig ist. Die im Bereich der hydrophilen Kopfgruppen vorliegenden elektrostatischen Abstoßung kompensiert den sterischen Einfluss nicht, so dass in dem in Abb. 4.1 dargestellten ternären Phasendiagramm ein sehr weiter Bereich durch lyotrope Phasen mit negativer Krümmung (Typ 2) dominiert wird.

4.1.1 Elastische Energie gekrümmter Oberflächen

In diesem Zusammenhang muss auf das Prinzip der Krümmung und die im Bereich der Grenzfläche zwischen Öl- und Wasserphase auftretenden elastischen Kräfte eingegangen werden. Es existieren dabei zwei fundamentale Arten der Krümmung, die jeden Punkt der Oberfläche charakterisieren: Die mittlere Krümmung H und die Gaußsche Krümmung K [70]:

$$H = \frac{1}{2}(c_1 + c_2) \quad (4.1)$$

$$K = c_1 \cdot c_2 \quad (4.2)$$

c_1 und c_2 entsprechen dem reziproken Wert der Krümmungsradien R_1 und R_2 (vgl. Abb. 4.4). Je nach Definition des Vorzeichens der mittleren Krümmung lässt sich eine positive (Typ 1) und eine negative Krümmung (Typ 2) festlegen, so dass inkl. planarer Bi- bzw. Monolayer zwischen 3 Typen unterschieden wird. In Bezug auf die Molekülform von AOT wird durch die kegelförmige Form eine negative Krümmung (Typ 2) bevorzugt, wie dies auch durch die weiten Bereiche inverser Strukturen (L_2 , F) im Phasendiagramm

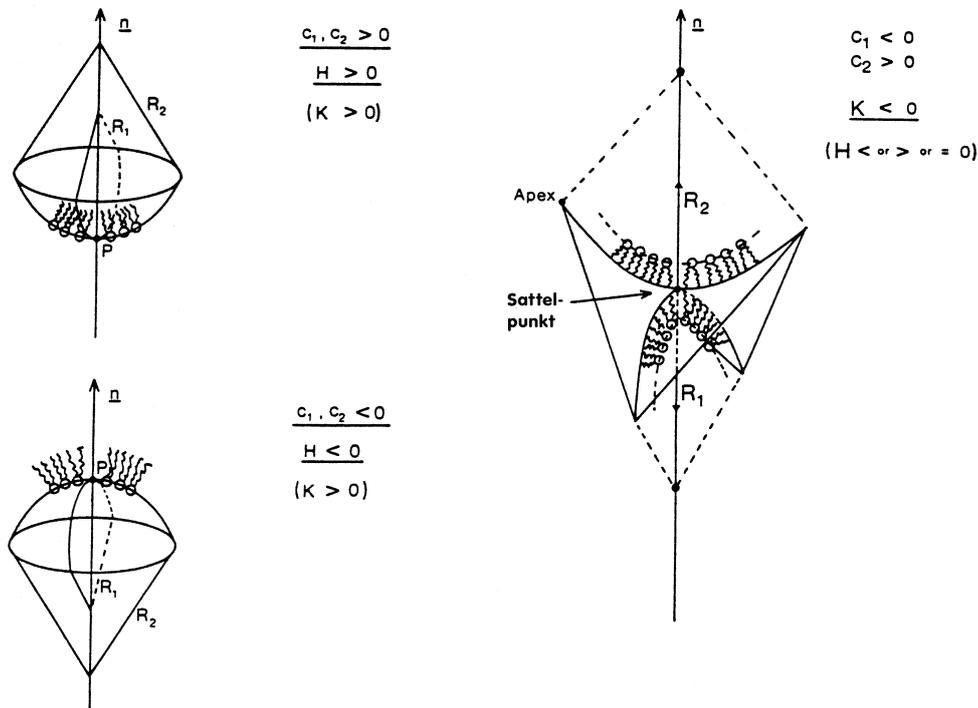


Abb. 4.4: Vorzeichendefinition in Bezug auf die mittlere Krümmung H . Möglich sind die Krümmungsarten mit positiver (Typ 1), negativer (Typ 2) und nicht vorhandener Krümmung (Doppelschicht). Eine Besonderheit stellen Sattelpunkte dar, da an dieser Stelle die mittlere Krümmung 0 beträgt.

Tab. 4.1: Mittlere und Gaußsche Krümmung unterschiedlicher Aggregatstrukturen.

| Phase/Struktur | Mittlere Krümmung $H = 1/2(c_1 + c_2)$ | Gaußsche Krümmung $K = c_1 \cdot c_2$ |
|---|---|--|
| Sphärische Mizelle | $+1/R$ | $+1/R^2$ |
| Zylindrische Mizelle o. H_I -Phase | $1/(2R)$ | 0 |
| Bikontinuierliche kubische o. intermediäre Phasen | 0 bis $1/(2R)$ | $-1/R^2$ bis 0 |
| Planare Bilayer | 0 | 0 |
| Inverse bikontinuierliche kubische o. intermediäre Phasen | $-1/(2R)$ bis 0 | $-1/R^2$ bis 0 |
| Inverse zylindrische Mizelle o. H_{II} -Phase | $-1/(2R)$ | 0 |
| Inverse sphärische Mizelle | $-1/R$ | $-1/R^2$ |

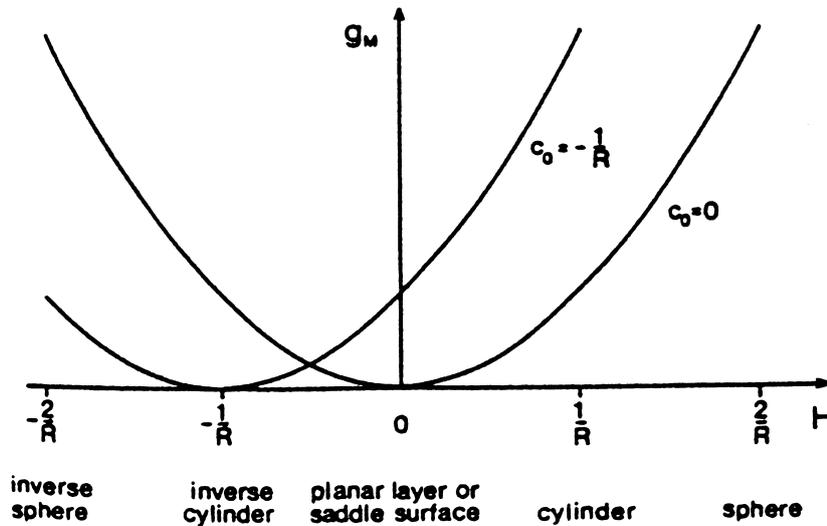


Abb. 4.5: Änderung der elastischen Energie als Funktion der mittleren Krümmung H . Im Falle von $c_0 \neq 0$ verschiebt sich die Parabel um den entsprechenden Ordinatenwert.

bestätigt wird. Neben den inversen Mizellen und der inversen hexagonalen Struktur werden auch lamellare Strukturen und reguläre Mizellen beobachtet. Um das Phasenverhalten bei Normaldruck und Strukturänderungen durch Druckerhöhung verstehen zu können, ist es notwendig, sich die Änderung der einzelnen Krümmungsbeiträge in Abhängigkeit von der auftretenden Struktur zu vergegenwärtigen (vgl. Abb. 4.6) [71, 72].

Ausgehend von den zwei Krümmungsbeiträgen, der mittleren und der Gaußschen Krümmung, lässt sich die Energie der elastischen Krümmung pro Einheitsfläche, g_{curv} , formulieren. Für die Gesamtenergie wird über die gesamte Oberfläche A integriert und man erhält G_{curv} .

$$g_{\text{curv}} = g_M + g_G \quad (4.3)$$

$$G_{\text{curv}} = \int g_{\text{curv}} dA = \int \frac{1}{2} K_M (c_1 + c_2 - c_0)^2 dA + \int K_G (c_1 \cdot c_2) dA \quad (4.4)$$

K_M und K_G repräsentieren die Moduli der mittleren und Gaußschen Krümmung. Es tragen somit zwei Anteile zur gesamten elastischen Biegeenergie bei. Der energetische Beitrag der mittleren Krümmung g_M ist abhängig von H und somit von der vorliegenden Struktur. Der Beitrag g_M nimmt von sphärischen zu zylindrischen und planaren Aggregaten ab. Zusätzlich tritt ein Beitrag durch spontane Krümmung c_0 auf, der zu einer Verschiebung der mittleren Krümmungsenergie führt (Abb. 4.5). Der Gaußsche Anteil entscheidet über die tendenzielle Ausbildung von elliptischen Flächen, wie z.B. Mizellen ($K_G > 0$), oder sattelähnlichen Flächen ($K_G < 0$).

Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt das Phasendiagramm des verwendeten Modellsystems (Abb. 4.1), so werden die ausgehend von der inversen mizellaren Phase (L_2) durch zunehmenden Wasser- bzw. AOT-Anteil induzierten Phasenübergänge durch das vorgestellte Modell erklärbar. Verändert man die Zusammensetzung in der Art, dass man

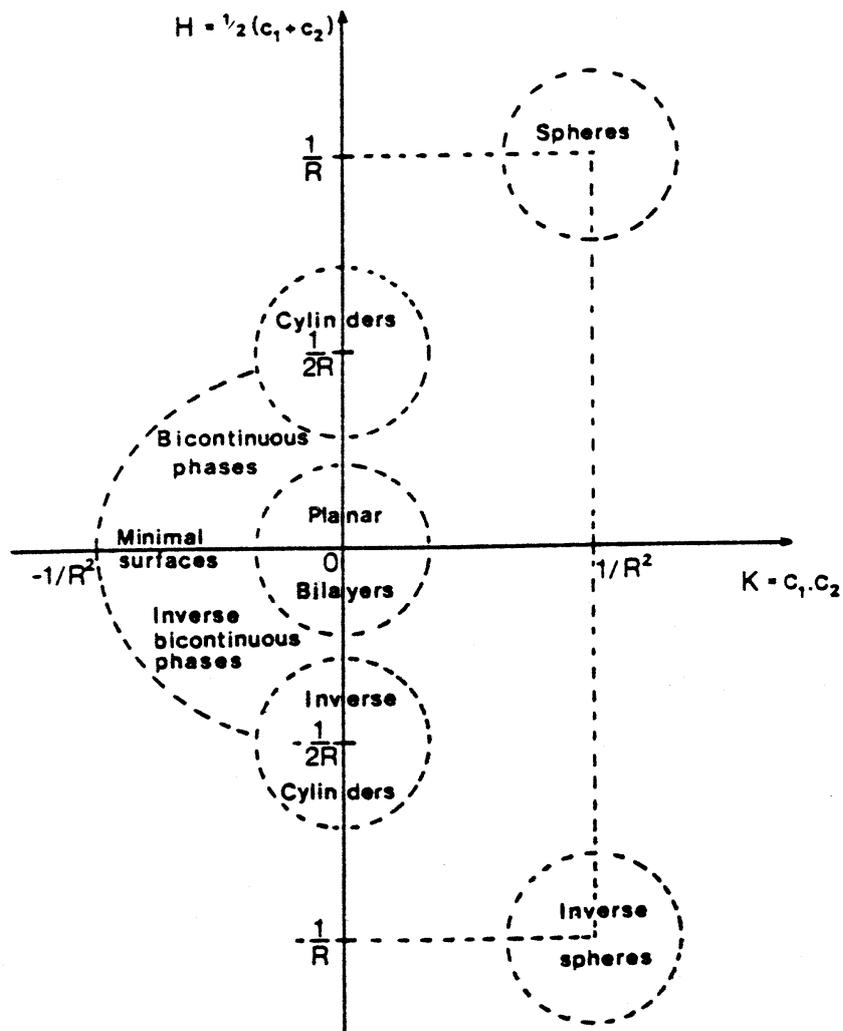


Abb. 4.6: Schematische Darstellung verschiedener Membrangeometrien als Funktion von mittlerer und Gaußscher Krümmung.

den AOT-Anteil erhöht, sich also in Richtung AOT-Ecke bewegt, so beobachtet man zuerst frei verteilte inverse Mizellen, dann dicht gepackte Mizellen und schließlich den Phasenübergang in die invers-hexagonale Phase (Benennung: H_{II} oder F). Die Grenzflächenkonzentration von AOT-Molekülen und somit der Flächendruck an der Öl-Wasser-Grenzfläche nimmt dabei stetig zu, bis das System in Richtung einer kleineren Krümmung und damit kleineren Krümmungsenergie ausweicht. Erhöht man nun von diesem Punkt aus den Wasseranteil, erfolgt eine weitere Minimierung der Krümmung/ Krümmungsenergie und die Ausbildung einer lamellaren Phase (D). Bei sehr hohen Wasserkonzentrationen kehrt sich der Vorgang um; die Kopfgruppen sind stark hydratisiert und durch die starken hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den AOT-Seitenketten und den *n*-Oktan-Molekülen invertiert sich die Molekülform von AOT, so dass reguläre Mizellen (L_1) gebildet werden. Zur Strukturierung der Ergebnisse wird im Folgenden dieser Weg von niedriger zu hoher AOT-Konzentration beibehalten. Mit der Einführung des Drucks als weitere thermodynamische Variable zeigt sich, dass sich das untersuchte Modellsystem ebenfalls entsprechend dem beschriebenen Prinzip der Krümmung verhält. Das System weicht bei Erhöhung des Drucks, also bei der Änderung der inneren Energie mit dem Volumen $p = -(\partial U/\partial V)_T$, aus und es werden Phasen mit geringerer Krümmung bzw. niedrigerer Krümmungsenergie beobachtet; dabei treten auch neue Hochdruckphasen auf.

4.2 Eigenschaften der verwendeten Enzyme – Struktur und Funktion

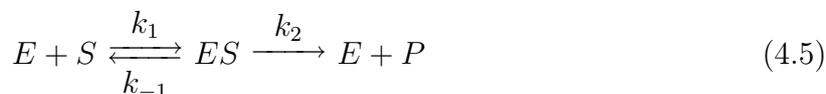
4.2.1 α -Chymotrypsin

Das Verdauungsenzym α -Chymotrypsin (CT) wird aus dem Vorläuferprotein Chymotrypsinogen A durch Spaltung und Neuverknüpfung des Proteinstranges über Disulfid-Brücken gebildet. Dies geschieht erst während des Transports in den extrazellulären Bereich. Somit ist innerhalb der Zelle gesichert, dass das Enzym nach der Proteinbiosynthese nicht als aktive Form ins Cytosol gelangt und dort mit der Zerstörung von Proteinen beginnt. α -Chymotrypsin trennt selektiv die Peptidbindung der L-Isomere von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan durch Hydrolyse. Aus diesem Grund wird das Enzym auf Trägermaterialien immobilisiert und zur Aufreinigung von Zellextrakten verwendet [73]. Das *p-T*-Stabilitätsdiagramm von α -Chymotrypsin in Pufferlösung wurde von Z. Sun [74] durch FTIR-Spektroskopie bestimmt und zeigt, dass unter den gewählten Bedingungen, pH=7.5, 25 °C und 1–4000 bar, keine Denaturierung beobachtet wird. Der isoelektrische Punkt liegt bei 9.1, d.h. das Protein liegt bei den genannten Bedingungen positiv geladen vor.

Modellreaktionen zur Untersuchung der Enzymkinetik

Um Effekte von biologischen Membranen auf die Funktion von Proteinen zu studieren, können z.B. Enzymreaktionen in Mikroemulsionen durchgeführt werden. Bedient man sich eines gut untersuchten Systems, bei dem sowohl der Mechanismus und die kinetischen Daten, Gleichgewichtskonstanten K_m und Geschwindigkeitskonstanten k_2 bekannt sind, so lässt sich der Unterschied zwischen der Reaktion in der Pufferlösung und in der Mikroemulsion direkt feststellen.

Chemische Reaktionen in einer biologischen Umgebung (Zelle) basieren häufig auf Fließgleichgewichten, d.h. das Enzym beschleunigt die Umsetzung eines dem System zugeführten Edukts S (Substrat) zu einem Stoffwechselprodukt P . Bei einem Substratüberschuss stellt sich ein stationärer Zustand ein, der durch Gl. 4.5 beschrieben wird und zuerst von L. Michaelis und M. Menten formuliert wurde [8, 28]. Selbst RNA-katalysierte Reaktionen (Ribozyme) können mit dieser Kinetik beschrieben werden [77].



Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt stellt die Produktbildung dar, so dass $k_2 \gg k_1$ und $k_2 \gg k_{-1}$ angenommen werden kann. Die Konzentrationen sind so verteilt, dass die Produktkonzentration sehr klein gegenüber der Substratkonzentration ist und das Gleichgewicht in Richtung der Produktseite verschoben wird. Mit den von G. E. Briggs und J. B. S. Haldane zusätzlich in das Michaelis-Menten-Modell implementierten Bedingung einer konstanten Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes bei $c_s \ll K_m$, ergibt sich aus Gl. 4.5 Gl. 4.6:

$$v = -\frac{dc_s}{dt} = \frac{k_2 c_{E,ges} c_{es}}{c_s K_m} \quad (4.6)$$

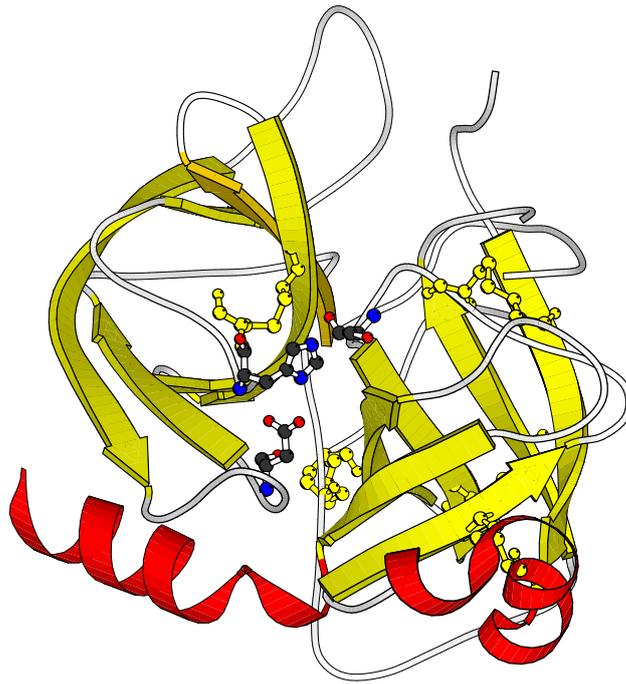


Abb. 4.7: Molscript-Diagramm von α -Chymotrypsin (PDB-Eintrag 2CHA). In der Ball-and-Stick-Darstellung sind sowohl die an der Katalyse beteiligten Gruppen Ser 195, His 57 und Asp 102 ("katalytische Triade") als auch die Disulfid-Brücken dargestellt. Letztere verknüpfen die einzelnen Polypeptid-Stränge und stabilisieren die Tertiärstruktur des Proteins. Die hohe Stabilität prädestiniert dieses Protein für den Einbau in Lösungen mit Detergentien und Hochdruckuntersuchungen. Die Form dieses globulären Proteins lässt sich auf ein Ellipsoid mit den Dimensionen $51 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$ vereinfachen [75, 76]. Nach dem Binden des Substrats wird ein tetraedrischer Übergangszustand durchlaufen, bei dem das Substrat kovalent gebunden wird. Die als "katalytische Triade" bezeichnete Anordnung des Substrats und der aktiven Zentren bewirkt einen schnellen Ladungstransport über ein System aus delokalisierten π -Bindungen und H-Brücken [76, 8].

Im Falle einer überschüssigen Substratkonzentration erfolgt die Sättigung aller Bindungsstellen und die maximale Produktbildungsrate v wird unabhängig von der Substratkonzentration und bleibt konstant ("steady-state"-Phase, Reaktion 0. Ordnung). Daraus folgt wiederum ein linearer Bereich im Konzentrations-Zeit-Diagramm der Reaktion (s. Abb. 4.8):

$$\lim_{c_s \rightarrow \infty} v = k_2 \cdot c_{E, \text{ges}} = v_{\text{max}} \quad (4.7)$$

Fällt die Substratkonzentration c_s unter die Gesamtenzymkonzentration $c_{E, \text{ges}}$, so gilt auch $c_s \ll K_m$ und Gl. 4.6 wird zu

$$v = \frac{v_{\text{max}}}{K_m} \cdot c_s \quad (4.8)$$

und entspricht einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung. Die Parameter der Enzymreak-

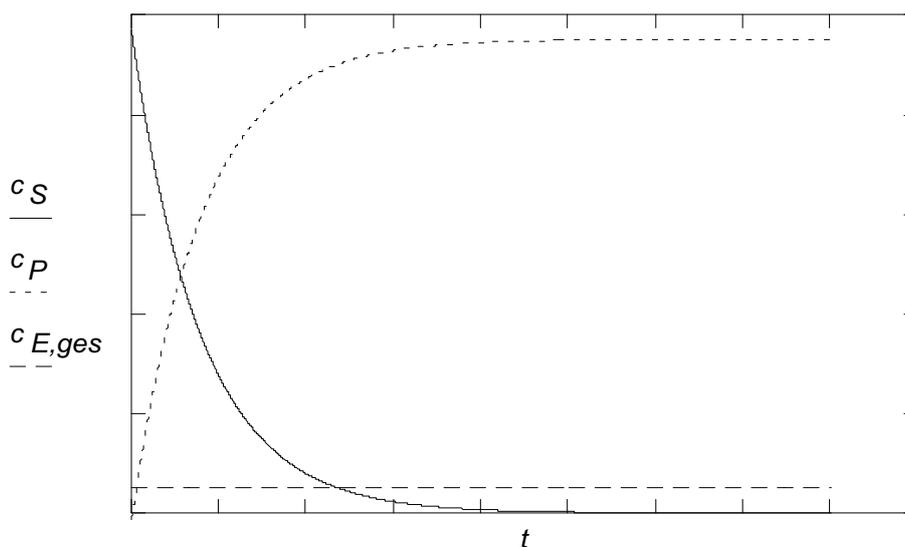


Abb. 4.8: Konzentrationsverläufe von Substrat und Produkt im Falle der Michaelis-Menten-Kinetik. Im Anfangsbereich bei hohen Substratkonzentrationen ist ein ausgeprägter linearer Verlauf erkennbar, der auch als "steady-state"-Phase bezeichnet wird; die Reaktionsgeschwindigkeit v ist unter diesen Bedingungen konstant.

tion lassen sich spektroskopisch über die Substrat- bzw. Produktabsorption reproduzierbar bestimmen und mit den tabellierten Angaben vergleichen.

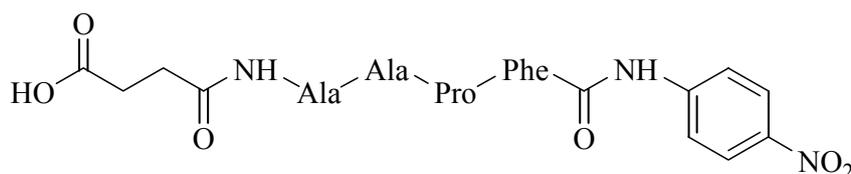
Als Substrat für die Modellreaktion mit α -Chymotrypsin in Mikroemulsionen unter erhöhten hydrostatischen Druck dient SAAPPNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-4-Nitroanilin). Die Peptidbindung zwischen Phenylalanin und p -Nitroanilin wird vom Enzym gespalten, dabei kann die Kinetik der Bildung von p -Nitroanilin mit einem UV/VIS-Spektrometer verfolgt werden. Da das Aktivierungsvolumen $\Delta V^\ddagger < 0$, erhöht sich mit dem Anstieg des hydrostatischen Drucks die Aktivität des Enzyms [68].

Über die Einstellung der Enzym- oder Substratkonzentration lässt sich die Geschwindigkeit so regulieren, dass ein ausgedehnter linearer Anfangsbereich vorliegt. Dieser kann für die Methode der Anfangsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Drücken genutzt werden.

Tab. 4.2: Michealis-Menten-Konstanten für bestimmte Enzyme und Substrate unter "steady-state"-Bedingungen.

| Enzym | Substrat | k_2/s^{-1} | $K_m/\mu M$ |
|--|----------|--------------|-------------|
| α -Chymotrypsin ^a | SAAPPNA | 45 | 43 |
| | SAATPNA | 14.1 | 160 |
| | SPPNA | 0.011 | 720 |
| Alkoholdehydrogenase (Pferd) ^b | Ethanol | 3.3 | 0.36 |
| Alkoholdehydrogenase (Mensch) ^c | Ethanol | 0.55 | 110 |

^a [78], ^b [79], ^c [80]



SAAPPNA (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilin)

Abb. 4.9: Enzymatische Modellreaktion von α -Chymotrypsin mit SAAPPNA. Die Bildung von *p*-Nitroanilin kann zeitabhängig mit einem Standard-UV/VIS-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 380 nm verfolgt werden.

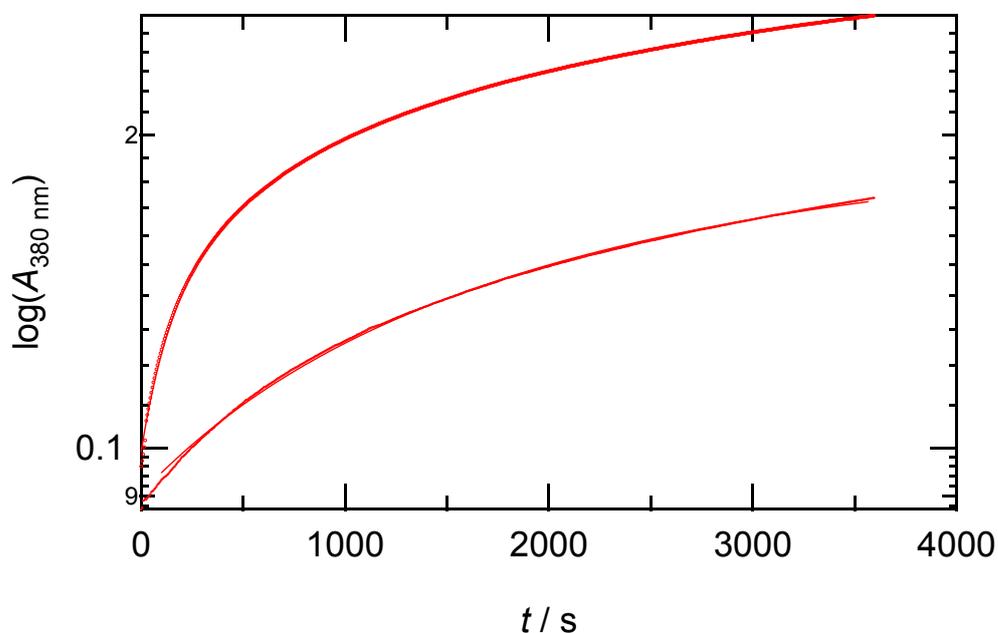


Abb. 4.10: Zeitabhängigkeit der *p*-Nitroanilin-Bildung in einer 0.1 M AOT-Lösung mit $w_0 = 36$ bei 1 bar, 25 °C, $c(\text{CT}) = 11 \mu\text{M}$. $c(\text{SAAPPNA}) = 10 \text{ mM}$ (obere Kurve) wird auf das 100fache verdünnt (untere Kurve).

In Abb. 4.10 ist der Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei 100facher Verdünnung der Substratlösung dargestellt. Für einen Überschuss an Substrat ist aber in jedem Fall zu sorgen, um eine Absättigung des Enzyms und somit vergleichbare Geschwindigkeiten zu garantieren [67]. Eine exakte Aufschlüsselung des Mechanismus, wie z.B. die Bildung von Intermediaten und die Bestimmung von deren Geschwindigkeitskonstanten, ist bei den Druckexperimenten in Mikroemulsionen zunächst nicht gefordert. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang die Abhängigkeit der Geschwindigkeit v_{\max} und folglich der Geschwindigkeitskonstanten k_2 vom Druck und der Größe der Mesostrukturen.

In vorhergehenden Untersuchungen konnte von N.L. Klyachko *et al.* ein stabilisierender Einfluss der AOT-Matrix auf das Enzym in Abhängigkeit des Drucks und des eingestellten Hydratationsgrades w_0 festgestellt werden. Die Stabilisierung unter Druck wird darauf zurückgeführt, dass die in Abb. 4.11 dargestellten Aktivitäten von CT in einer Mikroemulsion nach 180 min unter inaktivierenden Bedingungen bei 1000 bar und 35 °C im Vergleich zur Aktivität bei 35 °C und 1 bar wesentlich erhöht ist. Die Aktivität bezieht sich dabei auf die Anfangsgeschwindigkeiten v [81]. Insbesondere der in Abb. 4.16 dargestellte Vergleich von LADH in Pufferlösung und in einer AOT-Mikroemulsion bei verschiedenen Drücken verdeutlicht den Stabilisierungseffekt.

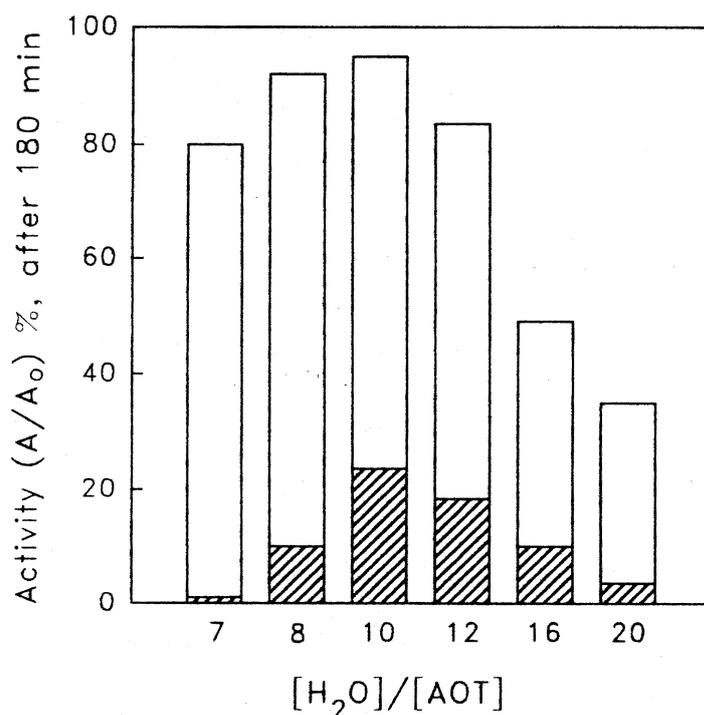


Abb. 4.11: Aktivität $A \equiv v$ von α -Chymotrypsin ($11 \mu\text{M}$) in einer 0.1 M AOT-Lösung mit unterschiedlichen Hydratationsgraden w_0 nach einer Zeitspanne von 180 min bezogen auf die Anfangsaktivität A_0 vor der Inkubation bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Bei 1 bar erkennt man eine deutliche Inaktivierung des Enzyms (schraffierte Flächen), wobei die Abhängigkeit von w_0 auch hier erhalten bleibt. Die Druckerhöhung auf 1000 bar führt zu einer Erhöhung der Enzymaktivität und es wird nahezu die Ausgangsaktivität bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (97%) erreicht, das Maximum liegt wiederum bei $w_0 = 10$ (nicht schraffierte Flächen). Die Größe des Wasserkerns beträgt bei $w_0 = 10$ 52 \AA , entspricht also den maximalen Proteindimensionen. Zu beachten ist eine deutliche Zunahme der relativen Aktivität auch bei kleineren Hydratationsgraden, was durch die druckinduzierte Vergrößerung der Mizellen erklärt werden kann.

4.2.2 Alkoholdehydrogenase der Leber (LADH)

Das Enzym Alkohol Dehydrogenase aus der Pferdeleber eignet sich ebenfalls als Modell für Enzymreaktionen, da es gut untersucht ist und in ausreichenden Mengen verfügbar ist. Es spielt beim Abbau von Ethanol in Organismen eine entscheidende Rolle, denn die Oxidation von Alkohol zu Aldehyd ist der zeitbestimmenden Schritt innerhalb dieses Stoffwechselprozesses und dadurch ein potentieller Angriffspunkt für die Therapie von Intoxikationen mit Ethylenglykol oder Methanol bzw. der ethanolinduzierten Hypoglykämie und Lactacidämie durch Inhibition des Enzyms [82].

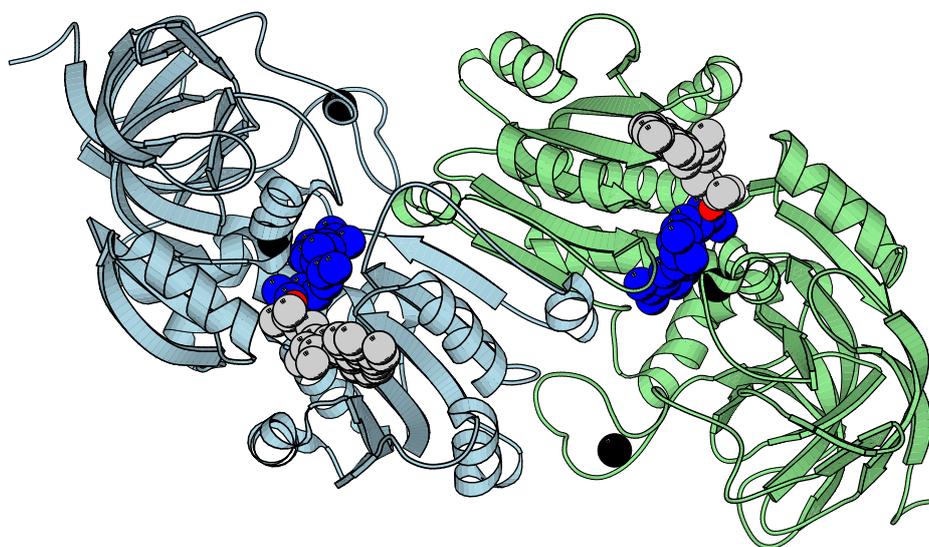


Abb. 4.12: Kristallstruktur von LADH (Apo-Form). Farblich abgesetzt sind die beiden Untereinheiten zu je 40 kDa. In Kalottendarstellung sind zum einen der Cofaktor NAD^+ (blau-rot-grau) und die Zink-Ionen (schwarz) dargestellt. Zwei der vier Zink-Ionen sind in der katalytisch wirksamen Region der Untereinheiten lokalisiert, während die anderen beiden weiter entfernten Zink-Ionen einen Einfluss auf die Faltung und Stabilität des Proteins haben. Die Dimensionen der ellipsoiden Form des Dimers betragen $45 \times 55 \times 110 \text{ \AA}$ [83]. Der isoelektrische Punkt liegt bei $\text{pH} = 5.4$, unter den gewählten Bedingungen ($\text{pH} = 8.5$) ist das Protein somit negativ geladen.

Neben kinetischen Untersuchungen mit unterschiedlichen Cofaktoren lässt sich das Enzym reproduzierbar kristallisieren, so dass sich der Mechanismus und die Stereoselektivität auf Grund der Lage der reaktiven Zentren zueinander aufklären lässt. Direkt an der Reaktion beteiligt ist das über His-67, Cys-174 und Cys-46 koordinierte Zn-Ion, das eine Koordinationsverbindung mit dem alkoholischen Sauerstoff eingeht. Zusammen mit einer Wasserstoffbrückenbindung mit Ser-48 wird Ethanol präorientiert und in die Nähe des als Oxidationsmittel agierenden NAD^+ positioniert. Die Oxidation des Alkohols und Reduktion von NAD^+ zu NADH durch Hydridtransfer kann in einem Schritt erfolgen. Die

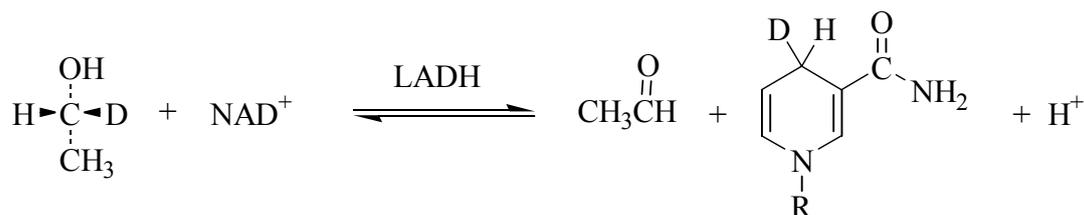


Abb. 4.13: Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd durch Enzymkatalyse mit LADH. Durch Deuterierung kann die Stereospezifität der Reaktion und die hohe Selektivität der Bindungsstelle gezeigt werden. Die Reaktion wird bei pH=8.5 mit einem NAD^+ -Überschuss durchgeführt.

Kinetik dieser Reaktion kann spektroskopisch (UV/VIS bei 366 nm) über die Bildung des Produkts NADH verfolgt werden.

LADH kann problemlos in AOT-Mikroemulsionen eingebaut werden und auch in diesem Fall kann ein Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit, also die Aktivität des Enzyms, durch die Einkapselung beobachtet werden. Wie diverse andere Enzyme zeigt LADH eine starke Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Hydratationsgrades w_0 (vgl. Abb. 4.14) und besitzt bei einem bestimmten Wert ($w_0 = 34$) ein Aktivitätsmaximum. Wie sich im Rahmen der Strukturuntersuchungen zeigen wird, kann dies mit der Größe der Wasserkavitäten korreliert werden.

Die für die SANS-Experimente verwendete Hochdruckzelle mit Saphirfenstern konnte problemlos in ein Perkin-Elmer-Spektrometer (λ_2 / λ_{25}) integriert werden, so dass die in Kooperation mit Prof. Dr. N. L. Klyachko (Department of Chemical Enzymology, Moscow State University) vorbereiteten kinetische Experimente in der gleichen Probenkammer durchgeführt werden konnten [69]. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.15 und 4.16 dargestellt und zeigen die Druckabhängigkeit der LADH-Aktivität in einer 0.1 M AOT-Mikroemulsion von verschiedenen Hydratationsgraden w_0 bzw. den Effekt der Mikroemulsion auf die Enzymaktivität im Vergleich zur reinen Pufferlösung.

Betrachtet man zunächst die Isobare bei 50 bar in Abb. 4.15, so findet sich der glockenförmige Verlauf der Enzymaktivität als Funktion des Hydratationsgrades wieder, wie er bei 1 bar in Abb. 4.14 dargestellt ist. Das Maximum befindet sich bei $w_0 = 34$. Mit zunehmenden Druck steigt die Aktivität bei allen Hydratationsgraden weiter an, so dass selbst bei $w_0 = 15$ und 1000 bar vergleichbare Aktivitäten gefunden werden wie bei $w_0 = 34$ und 500 bar. Dieser Effekt einer drastischen Aktivitätszunahme ist bei $w_0 < 34$ größer als bei $w_0 > 34$. Wie sich im Abschnitt über das Phasenverhalten der Mikroemulsionen zeigen wird, ist dies auf die Elongation der Mizellen durch Druckerhöhung zurückzuführen. Nach der Erhöhung des Drucks auf 2000 bar wird das System wieder auf 50 bar entspannt, dabei wird die Wiederherstellung der Ausgangsaktivität beobachtet. In Abb. 4.16 ist der reversible Prozess sehr gut erkennbar.

Wird die Enzymreaktion in Pufferlösung unter gleichen Bedingungen durchgeführt, so zeigt die Druckabhängigkeit der Aktivität einen starken Rückgang ab 1000 bar. Die Ergebnisse der Strukturuntersuchungen mit Kleinwinkelstreuung im folgenden Abschnitt zeigen,

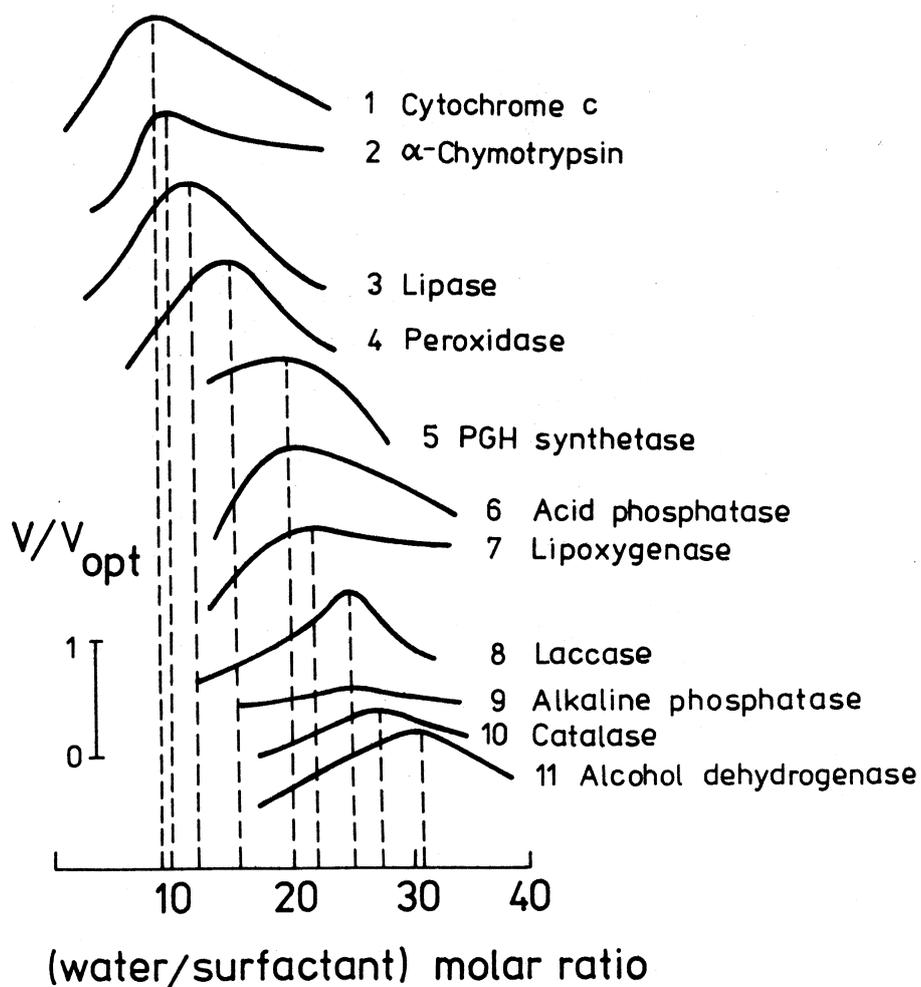


Abb. 4.14: Relative Enzymaktivität in Abhängigkeit des Hydratationsgrades w_0 für verschiedene Proteine aus [64]. Die Maxima der verwendeten Proteine liegen für α -Chymotrypsin bei $w_0 = 10$ und für Alkoholdehydrogenase (Pferdeleber) bei $w_0 = 34$.

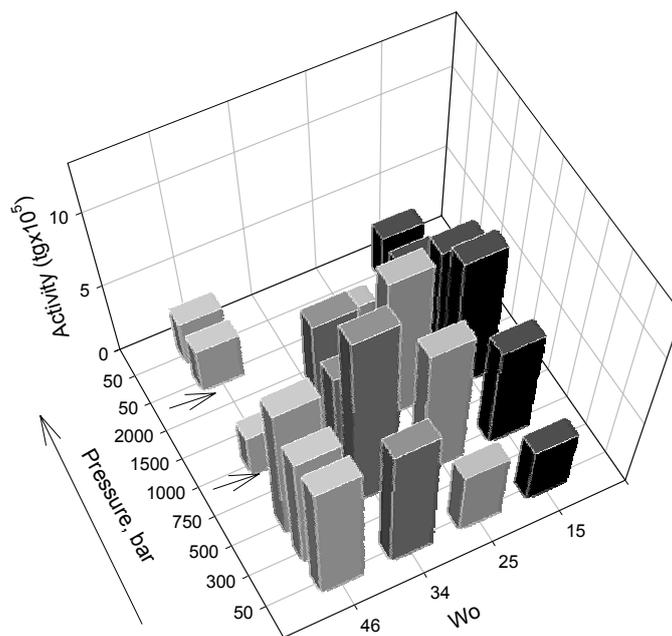


Abb. 4.15: LADH-Aktivitäten in 0.1 M AOT-Mikroemulsionen bei unterschiedlichen Hydratationsgraden w_0 , pH = 8.5 (TRIS-Puffer) und 25 °C. Die Größe des Wasserkerns bei $w_0 = 34$ entspricht der maximalen Ausdehnung des Enzyms von 110 Å. Das Optimum der Enzymaktivität befindet sich bei $w_0 = 34$ und 500 bar. Der Einbruch der Aktivität bei $w_0 = 46$ und 1000 bar (kurze Pfeile) ist bedingt durch eine Umwandlung in die optisch nicht mehr transparente Phase L_3 [69, 84].

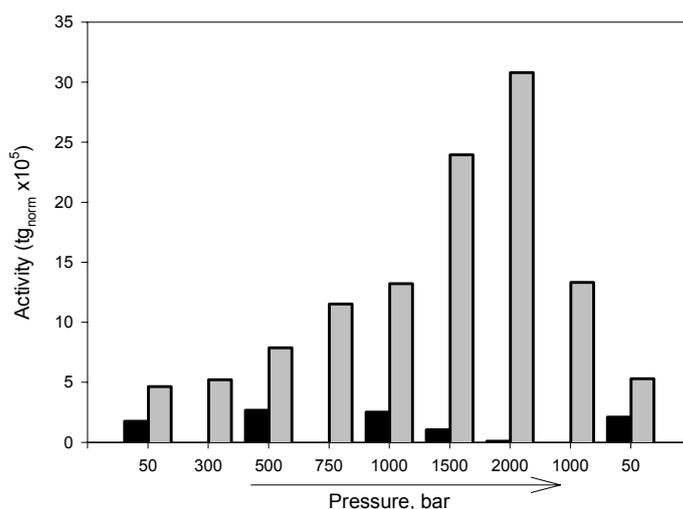


Abb. 4.16: Druckabhängigkeit der LADH-Aktivität in 0.66 M AOT bei $w_0 = 15.6$ (grau) im Vergleich zur Aktivität in TRIS-Pufferlösung (nicht gemischt mit AOT und n -Oktan) [69].

das das dimere LADH unter Druck in Pufferlösung nicht stabil ist und ab 1000 bar dissoziiert. Im Gegensatz dazu steigt die Aktivität der in eine Mikroemulsion eingekapselten Alkoholdehydrogenase bei den ebenfalls in Abb. 4.16 dargestellten Ergebnissen unter gleichen Bedingungen deutlich an. Das lässt darauf schließen, dass die aus AOT-Molekülen gebildete Matrix das Protein wie ein Korsett stabilisiert.

Druckdenaturierung von LADH – Strukturelle Charakterisierung mit SAXS

Die kinetischen Daten deuten durch die Inaktivierung von LADH ab einem Druck von 1000 bar eine Denaturierung des Proteins an. Unklar ist, ob das Protein entfaltet oder dissoziiert. Aus diesem Grund werden SAXS-Hochdruckexperimente von LADH (2 % (w/w)) in TRIS-Puffer bei 25 °C, pH = 8.5 und NAD⁺ im Überschuss durchgeführt. Bei 1 bar zeigt sich, dass die Streukurve sehr gut durch die in Abb. 4.12 dargestellte Kristallstruktur beschrieben werden kann. Abb. 4.17 zeigt die aus dem PDB-Datensatz 1HET über das Programm CRY SOL berechnete theoretische Streukurve im Vergleich mit gemessenen Daten.

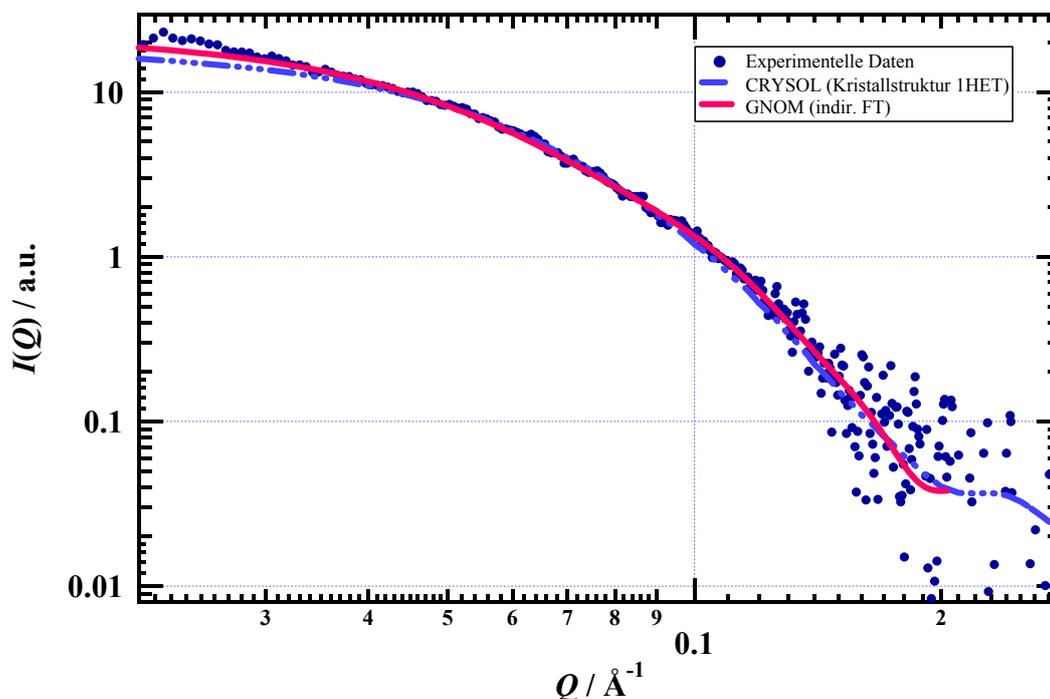


Abb. 4.17: SAXS-Daten LADH (2 % (w/w)) in TRIS-Puffer bei 25 °C, pH=8.5 inkl. gelöstem NAD⁺. Die durch das Programm GNOM angepasste Kurve ergibt durch indirekte Fourier-Transformation die Paarabstandsverteilung $p(r)$. CRY SOL liefert eine fest vorgegebene Streukurve aus der Röntgenkristallstruktur (1HET), die durch Variation von $I(0)$ und des Untergrundes an die Messdaten angepasst wird. Beide Streukurven stimmen gut mit dem Experiment überein.

Die über Fourier-Transformation (GNOM) berechnete Paarabstandsverteilung $p(r)$ ist in Abb. 4.19 dargestellt. Mit zunehmenden Druck nehmen die maximale Ausdehnung und der aus $p(r)$ berechnete Gyrationradius ab stark ab. Die Darstellung des Gyrationradius als

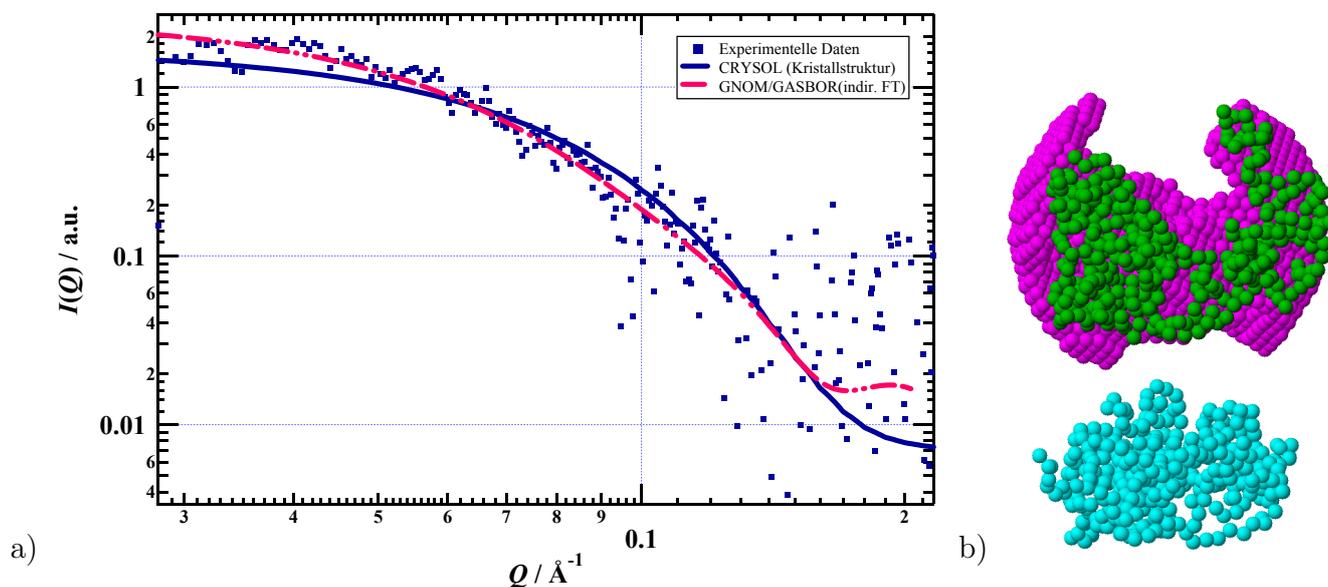


Abb. 4.18: (a) Vergleich der Kristallstruktur einer monomeren Untereinheit von LADH mit den SAXS-Daten bei 3500 bar. Deutlich ist der Unterschied zwischen den Messpunkten, der Funktion der indir. FT und der von CRY SOL aus der SAXS-Struktur (türkis) berechneten Streukurve sichtbar. (b) Der von DAMMIN (violett) und GASBOR (grün) modellierte Strukturvorschlag stimmt konsequenterweise mit der Streukurve der IFT bei 3500 bar überein und deutet im Vergleich zur Kristallstruktur (türkis) eine teilweise Entfaltung der Untereinheit an.

Tab. 4.3: Ergebnisse der Programme GNOM (FT) und CRY SOL (Kristallstruktur) aus den Streudaten einer 2 % (w/w) LADH-Lösung bei 1 bar, pH = 8.5 und 25 °C. Der max. Radius und der Gyrationradius werden aus der Paarabstandsverteilungsfunktion bestimmt und sind mit dem Gyrationradius bzw. dem Durchmesser der Kristallstruktur inklusive einer theoretischen Hydrathülle von 3 Å vergleichbar. Die aus der Kristallstruktur berechneten Volumina und Oberflächen können somit auf das SAXS-Strukturmodell übertragen werden.

| | GNOM | CRY SOL |
|--|----------------|-------------------|
| Gyrationradius R_g (inkl. Hydr.-Hülle) [Å] | 36.9 ± 0.4 | 37.5 |
| Max. Radius $p(r)$ / Radius der Hülle [Å] | 112 ± 4 | 110.8 |
| Volumen (nur Protein) [Å ³] | | $1.09 \cdot 10^5$ |
| Volumen inkl. Hydrathülle [Å ³] | | $1.25 \cdot 10^5$ |
| Oberfläche inkl. Hydrathülle [Å ²] | | $1.07 \cdot 10^4$ |

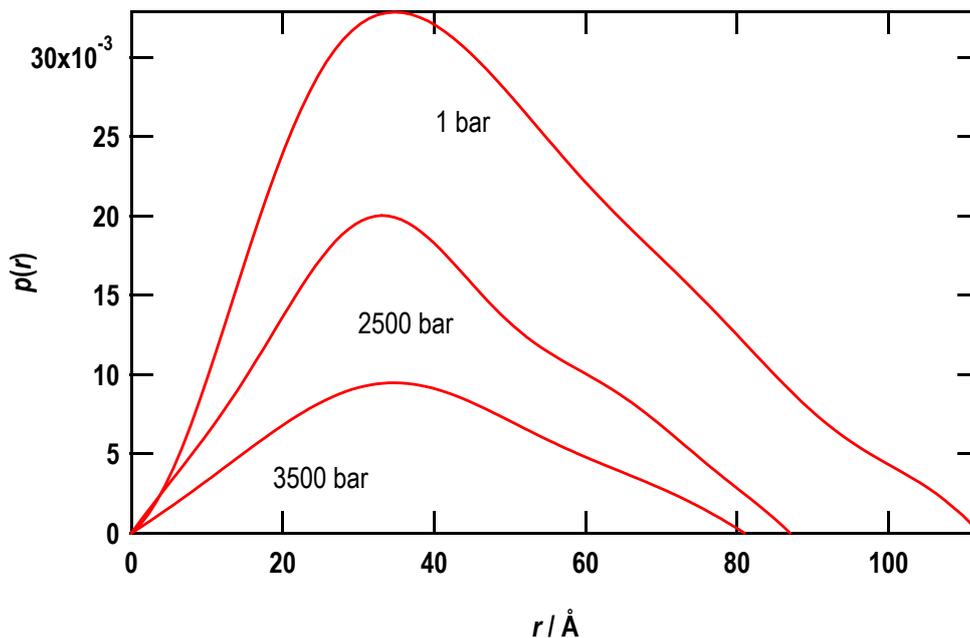


Abb. 4.19: Ausgewählte Paarabstandsverteilungsfunktionen von LADH bei verschiedenen Drücken und 25 °C. Die aus kristallografischen Messungen bestimmten Dimensionen $45 \times 55 \times 110 \text{ Å}$ werden durch $p(r)$ bei 1 bar bestätigt.

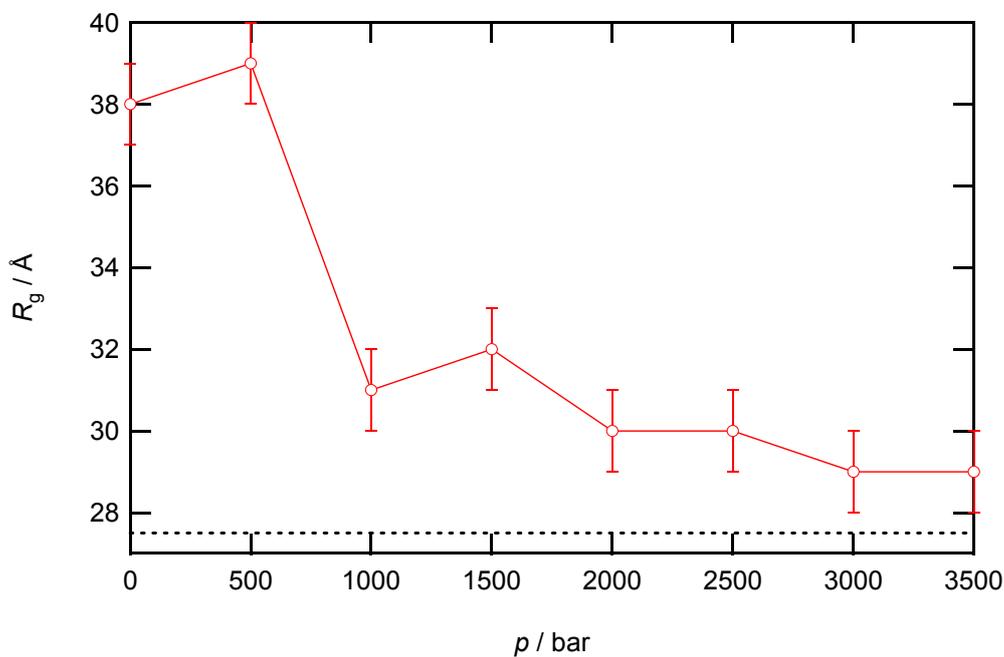


Abb. 4.20: Gyrationradius von LADH als Funktion des Drucks bei 25 °C. Eine signifikante Abnahme erfolgt bei 1000 bar. CRYSOLO ermöglicht aus der Kristallstruktur die Berechnung der theoretischen Größe einer monomeren Untereinheit (- - -).

Funktion des Drucks verdeutlicht, dass im Bereich von 1000 bar eine deutliche Änderung erfolgt und dass der R_g gegen den aus dem Monomer berechneten Gyrationradius strebt (Abb. 4.20).

4.3 Allgemeine Präparationsvorschrift für die untersuchten Mikroemulsionen

Die Substanzen AOT, *n*-Oktan und D₂O werden von Sigma-Aldrich bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Ausgangspunkt bilden die Stammlösungen von AOT in *n*-Oktan mit unterschiedlicher Konzentration (0.1 bis 1.97 M). Entsprechend dem Hydratationsgrad w_0 wird bidest. Wasser bzw. D₂O den AOT-Stammlösungen zugegeben und kurz geschüttelt. Alle im Folgenden genannten Enzyme, Substrate und Cofaktoren stammen ebenfalls von Sigma-Aldrich und werden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Für die Hochdruckexperimente wird eine TRIS-Pufferlösung mit einem vom verwendeten Enzym abhängigen pH-Wert eingestellt. Die entsprechenden Bedingungen, wie die Konzentration der Pufferlösung und der pH-Wert, werden in den Abschnitten der einzelnen Enzyme genannt. Die Enzyme liegen als lyophilisiertes Pulver vor und werden mit der angegebenen Konzentration in der Pufferlösung gelöst. Die Inkorporation der Enzyme in die Mikroemulsion erfolgt durch Zudosierung der Enzym-Pufferlösung zu der AOT-Stammlösung entsprechend dem Hydratationsgrad w_0 . Auch hier werden die Mischungen geschüttelt, bis eine klare Lösung entsteht.

Tab. 4.4: Zusammensetzung y der Mikroemulsionen in Gew.-% von 0.1 M, 0.66 M, 1 M AOT-Stammlösungen in *n*-Oktan mit ansteigendem Wassergehalt.

| w_0 | $y(\text{AOT})$ wt.-% | $y(\text{n-Octane})$ wt.-% | $y(\text{water})$ wt.-% |
|------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 0.1 M AOT | | | |
| 5 | 4.52 | 94.5 | 0.92 |
| 10 | 4.49 | 93.7 | 1.82 |
| 25 | 4.45 | 92.8 | 2.70 |
| 0.66 M AOT | | | |
| 46 | 19.1 | 44.5 | 36.4 |
| 1 M AOT | | | |
| 20 | 33.0 | 40.3 | 26.7 |

Beim D-Schnitt kann die Zusammensetzung direkt dem ternären Phasendiagramm in Abb. 4.1 nach Gew.-% entnommen werden. Die einzelnen Bestandteile werden hier in der Reihenfolge AOT, dann *n*-Oktan und schließlich Wasser bzw. Protein-Pufferlösung zugewogen. Hochviskose Proben im Bereich der lamellaren und hexagonalen Phase werden gerührt und für einige Tage im Kühlschrank gelagert [69, 84, 85, 81].

Die Neutronenstreuexperimente wurden zum einen an dem Kleinwinkelstreuinstrument KWS-2 (FZJ Jülich, D) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 7 \text{ \AA}$ mit einer Detektorposition

von 4 und 8 m und zum anderen an dem Kleinwinkelstreuinstrument LOQ (ISIS, Oxford, GB) bei einer fixen Detektorentfernung von 4.1 m mit einem Wellenlängenbereich von 2–10 Å durchgeführt. Die Röntgenkleinwinkelstreuexperimente erfolgten mit einer Kratky-Kleinwinkel-Kompaktkamera bzw. an dem Kleinwinkelinstrument A2 (HASYLAB, Hamburg, D). Die Wellenlänge bei der Röntgenröhre als Strahlungsquelle betrug 1.54 Å, der Monochromator liefert aus der "weißen" Synchrotronstrahlung eine Wellenlänge $\lambda = 1.5$ Å. Die Temperatur betrug bei allen Experimenten 25 °C.

4.4 Hochdruck-SAXS-Messungen an verdünnten AOT-*n*-Oktan-Lösungen

Bei den Mischungen von 0.1 M AOT-Lösungen mit variierenden w_0 liegen frei verteilte inverse Mizellen vor, die vernachlässigbar miteinander wechselwirken, so dass der interpartikuläre Strukturfaktor mit $S(Q) = 1$ angenommen werden kann. Die Streudaten lassen sich mit dem Formfaktor $P(Q)$ sphärisch symmetrischer Partikel mit konstanter Streulängendichte beschreiben. Die Aggregate sind naturgemäß nicht monodispers, da die Anzahl an AOT-Molekülen und somit der Radius der Mizellen variieren kann, weshalb mit einer Größenverteilung $f(r)$ gefaltet. Bei der Streufunktion $I(Q)$ wird von Gl. 2.7 ausgegangen, in diesem Fall wird neben der Anzahl der Partikel N_p und dem durchstrahlten Probenvolumen V auch der Kontrast $\Delta\rho = \rho - \rho_s$ zwischen der Streulängendichte der Probe ρ und des Solvens ρ_s berücksichtigt:

$$I(Q) \propto \frac{\partial \Sigma}{\partial \Omega}(Q) = N_p V (\Delta\rho)^2 \langle P(Q) \rangle \quad (4.9)$$

$$\text{mit } \langle P(Q) \rangle = \int_0^\infty F_{\text{sphere}}^2(Q, r) \cdot f(r) dr \quad (4.10)$$

Als Größenverteilung wird eine Schultz-Verteilung $f(r)$ angenommen, die den Vorteil bietet je nach Wert des Parameters Z eine Gauß-Verteilung und ebenso eine unsymmetrische Verteilung mit Anteilen bei größeren Radien wiedergeben zu können (Abb. 4.21) [86]:

$$f(r) = \frac{\left(\frac{Z+1}{\langle r \rangle}\right)^{Z+1} r^Z \exp\left(-\frac{Z+1}{\langle r \rangle} r\right)}{\Gamma(Z+1)} \quad (4.11)$$

$$Z = \frac{\left(1 - \frac{\Delta r^2}{\langle r \rangle^2}\right)}{\frac{\Delta r^2}{\langle r \rangle^2}} \Leftrightarrow \Delta r = \frac{\langle r \rangle}{\sqrt{Z+1}} \quad (4.12)$$

Als Ergebnis liefert das Streugesetz den mittleren Radius $\langle r \rangle$ und die Standardabweichung des Radius Δr der sphärischen Aggregate.

Eine komplementäre Methode zur Bestimmung der Aggregatdimensionen stellt die indirekte Fourier-Transformation (IFT) dar, wie sie in den Grundlagen beschrieben wird. Aus den erhaltenen Paarabstandsverteilungen $p(r)$ lassen sich ebenfalls die mittleren Radien der Mizellen $\langle r \rangle$ aus dem berechneten Gyrationradius R_g bzw. über das Maximum der

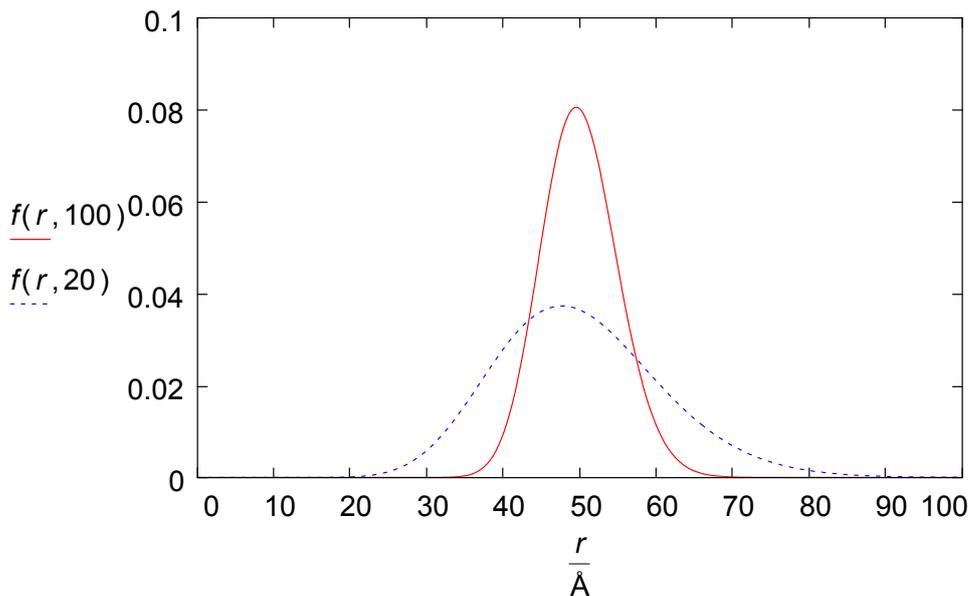


Abb. 4.21: Darstellung der Schultz-Verteilung für einen mittleren Radius $\langle r \rangle = 50 \text{ \AA}$ und variierenden Z -Werten (20, 100). Die Standardabweichung Δr beträgt 5 \AA für $Z = 100$ und 11 \AA für $Z = 20$.

Verteilung bestimmen. Im monodispersen Fall befindet sich das Maximum bei $0.525 \cdot r_{\max}$, dem Wert für den maximalen Radius und Schnittpunkt der Verteilung mit der Ordinate [27]. Die Abweichung vom Idealwert für monodisperse Systeme ist wiederum ein Maß für die Polydispersität $P = \Delta r / \langle r \rangle$.

Da die Kleinwinkelstreuexperimente mit unterschiedlichen Streusonden, Röntgenstrahlen und Neutronen, durchgeführt wurden, muss der unterschiedliche Kontrast berücksichtigt werden. Im Falle der SANS-Experimente wurde D_2O verwendet, so dass nur der Wasserkern der Mizellen einen konstruktiven Streubeitrag liefert. Bei den SAXS-Experimenten liefern sowohl Kern als auch Schale einen Streubeitrag, die jedoch über unterschiedlichen Streulängendichten verfügen und separat betrachtet werden müssen. Es zeigt sich jedoch, dass das einfache Modell polydisperser Kugeln zur Beschreibung der SAXS-Daten ebenfalls genügt und die ermittelten Größenunterschiede zwischen SANS und SAXS mit theoretischen Berechnungen aus Angaben über die Dicke der AOT-Schale übereinstimmen.

4.4.1 0.1 M AOT-Mischungen mit unterschiedlicher Hydratation $w_0 - A$ -Schnitt

Zur Untersuchung der Struktur verdünnter AOT-Lösungen wurden hauptsächlich SANS-Experimente mit D_2O als Wasserkomponente durchgeführt. Der gewählte Streulängendichtekontrast $\Delta\rho$ ermöglicht die Betrachtung ausschließlich der wässrigen Phase innerhalb der Mizellen, die AOT-Wände bzw. das umgebende *n*-Oktan sind praktisch "unsichtbar" und liefern nur inkoherente Untergrundstreuung. Die Streulängendichten der einzelnen Komponenten für Neutronen und Röntgenstrahlen ($\rho = f^2(2\theta = 0)/V_p$) sind in

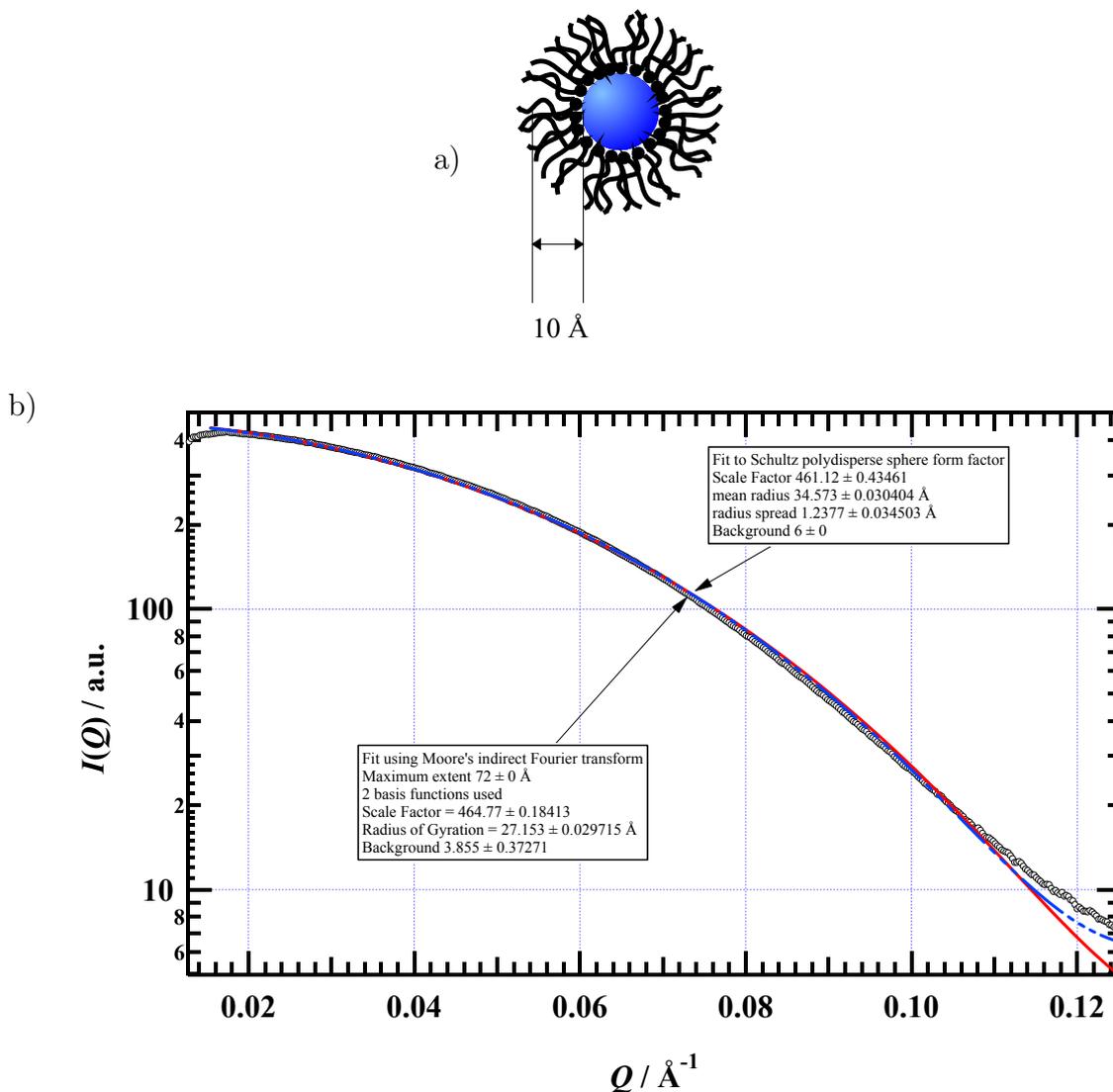


Abb. 4.22: a) Darstellung einer AOT-Mizelle, bestehend aus einem Wasserkern (blau) und den AOT-Molekülen (schwarz). Aus den SANS-Daten (Kontrastvariation) ergibt sich eine Schichtdicke der AOT-Membran von 10.8 Å [87]. Eine Penetration in diese Schicht von 2.4 Å durch Lösungsmittelmoleküle wird mitberücksichtigt, so dass eine Nettoschichtdicke von 8.4 Å angenommen wird. b) SAXS-Daten einer 0.1 M AOT-Lösung mit einem Wasseranteil von $w_0 = 15.6$ bei 25 °C und 1 bar . Die Verwendung des Modells polydisperser Kugeln beschreibt die SAXS-Daten sehr gut. Das Ergebnis der IFT ist nahezu deckungsgleich mit den Messdaten und der Modellstreu Kurve, so dass sich vergleichbare Ergebnisse bezüglich des mittleren Radius und des Polydispersitätsgrades ergeben (vgl. Abb. 4.25)

Tab. 4.5: Streulängendichten von AOT, *n*-Oktan und H₂O bzw. D₂O bei Verwendung unterschiedlicher Streusonden (Neutronen, Röntgenstrahlen).

| | Neutronen $\rho/10^{12} \text{ cm}^{-2}$ | Röntgen $\rho/10^{12} \text{ cm}^{-2}$ |
|------------------|---|---|
| <i>n</i> -Oktan | -0.45 | 8.6 |
| D ₂ O | 6.34 | 9.4 |
| AOT | 1.03 | 8.9 |

Tab. 4.5 aufgeführt. Der Vergleich mit den Streulängendichten der Röntgenstrahlung als Streusonde zeigt, dass die Kontrastunterschiede geringer sind und die Streuanteile aller Komponenten sich überlagern.

Abb. 4.23 demonstriert die Vergleichbarkeit der beschriebenen Auswertungsmethoden. Die Streukurven der IFT und der Modellfunktion polydisperser sphärischer Partikel liegen direkt übereinander und liefern im Rahmen des Messfehlers vergleichbare Ergebnisse; mit zunehmenden Wasseranteil stellt sich dabei ein konstanter Unterschied zwischen den beiden Methoden von $\pm 5\%$ in $\langle r \rangle$ und $\pm 10\%$ in P ein.

Die Größe ebenso wie die Polydispersität der Mizellen nimmt mit steigendem Wasseranteil w_0 zu, wie dies anhand der Paarabstandsverteilungen in Abb. 4.24 erkennbar ist. Im Falle

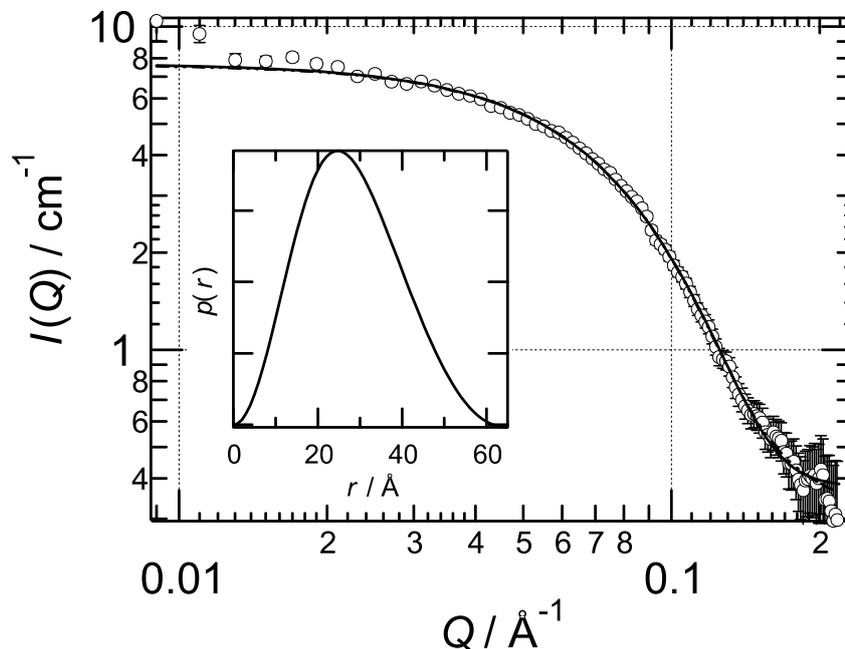


Abb. 4.23: Streukurve einer 0.1 M AOT mit $w_0 = 10$ bei 25 °C und 1 bar. Die Anpassung mit dem Modell polydisperser Sphären ergibt $\langle r \rangle = 25 \text{ \AA} \pm 1\%$ und $P = 0.05 \pm 10\%$. Die resultierende Streukurve aus der IFT nach der Methode von Moore ist fast deckungsgleich und ergibt $\langle r \rangle = 26 \text{ \AA} \pm 1\%$ und $P = 0.1 \pm 10\%$.

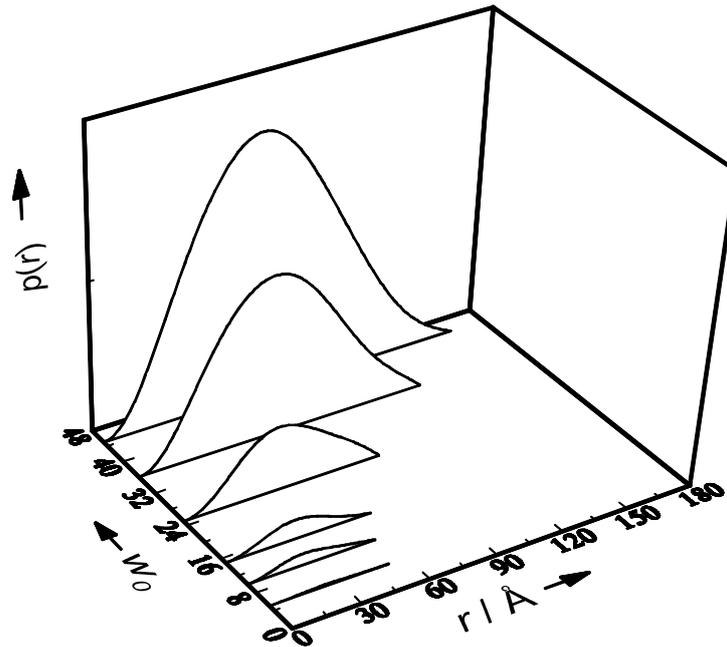


Abb. 4.24: Paarabstandsverteilungsfunktionen $p(r)$ von 0.1 M AOT-Mikroemulsionen mit unterschiedlichen Hydratationsgraden $w_0 = c(\text{H}_2\text{O})/c(\text{AOT})$.

des größten w_0 -Wertes von 45 beträgt $\langle r \rangle = 71 \text{ \AA}$, $\Delta r = 15 \text{ \AA}$ und $P = 0.21$. Aus den gefundenen Parametern $\langle r \rangle$ und P lässt sich ein Zusammenhang mit dem Hydratationsgrad w_0 herstellen [88] und aus einer geeigneten Auftragung $(1 + 2P^2) \langle r \rangle$ gegen w_0 kann die Fläche der Kopfgruppe a_H abgeschätzt werden (Abb. 4.25):

$$(1 + 2P^2) \langle r \rangle = \frac{3v_W}{a_H} w_0 + \frac{3v_H}{a_H} \quad (4.13)$$

Bei einer Dichte von 1.1 g/cm^3 für D_2O ergibt sich ein molekulares Volumen $v_W = 27 \text{ \AA}^3$. Aus dem Diagramm wird eine Steigung von 1.442 \AA ermittelt, woraus wiederum eine mit bekannten Werten vergleichbare Kopfgruppenfläche $a_H = 57 \text{ \AA}^2$ folgt [87].

Neben den SANS-Experimenten werden zusätzlich SAXS-Experimenten von 0.1 M AOT-Mikroemulsionen mit den gleichen Zusammensetzungen durchgeführt. Die Verwendung der Diamantfensterzelle eröffnet weiterhin die Möglichkeit, höhere Drücke einstellen zu können und dadurch in Bereiche neuer barotroper Phasen zu gelangen. Im Unterschied zu Neutronen ist der Streukontrast bei der Röntgenstrahlung verändert, zusätzlich zum Wasserkern trägt auch die AOT-Schale mit einer vergleichbaren Streulängendichte konstruktiv zur gestreuten Intensität bei. Die ermittelten Paarabstandsverteilungen verschieben sich im Fall der SAXS-Ergebnisse zu größeren Radien r , sind aber in puncto Verlauf und maximale Ausdehnung mit den SANS-Daten vergleichbar.

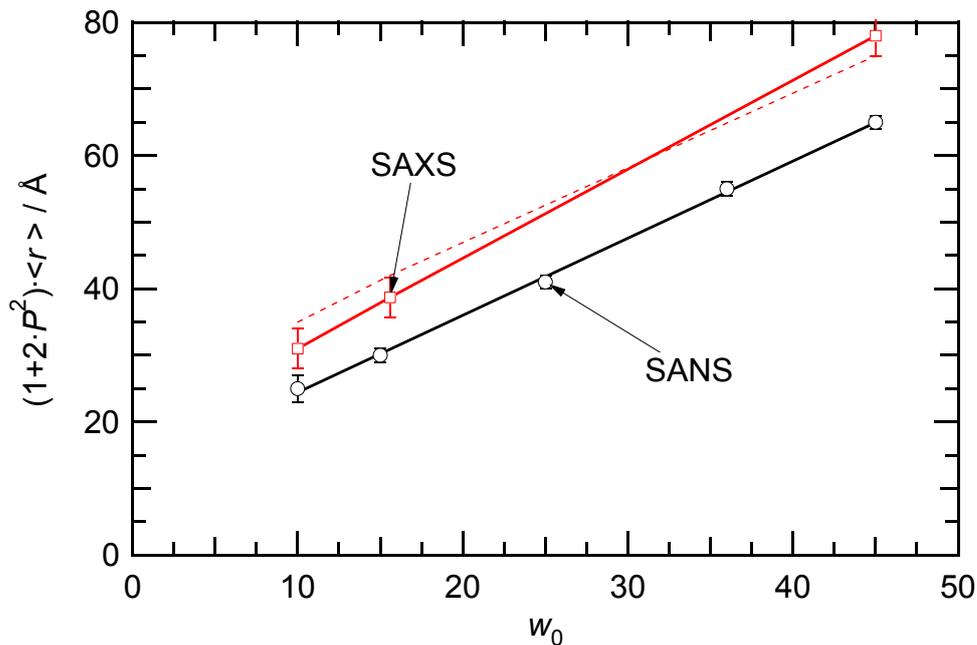


Abb. 4.25: Zusammenhang zwischen dem mittleren Radius $\langle r \rangle$, der Polydispersität P und dem Wasseranteil w_0 von 0.1 M AOT-Mikroemulsionen bei 1 bar und 25 °C. Verglichen werden die SANS- mit SAXS-Daten. Durch den unterschiedlichen Streulängengedichtekontrast ergibt sich ein erkennbarer Größenunterschied. Dieser lässt sich auf die Dicke der AOT-Schale zurückführen, da im Fall der SANS-Experimente nur der Wasserkern bzw. im Fall der SAXS-Experimenten die gesamte Mizelle erfasst wird. Die in Abb. 4.22 angegebene Schichtdicke von 8.4 Å wird auf die SANS-Ergebnisse aufaddiert (- - -) und mit den SAXS-Daten verglichen.

Einfluss des Proteineinbaus auf die mizellare Struktur

Neben der Variation des Hydratationsgrades w_0 wird durch Änderung der Konzentration von α -Chymotrypsin bzw. durch die Verwendung unterschiedlicher Proteine (Alkoholdehydrogenase (LADH), Peroxidase (HRP)) der Einfluss auf die Struktur und das Phasenverhalten der 0.1 M AOT-Mikroemulsionen untersucht. In Tab. 4.6 ist der Einfluss von α -Chymotrypsin und Peroxidase auf die Größe der sphärischen Wasserkerne in den Mizellen und deren Polydispersität wiedergegeben. Mit einem zunehmenden Proteinanteil nehmen die Größe und die Polydispersität ab, was sowohl für α -Chymotrypsin (MW.: 25 kDa, Isoelektr. Punkt: 9.2, $R_g = 22.5 \text{ Å}$) als auch für Peroxidase (MW.: 33 kDa, Isoelektr. Punkt: 7.2, $R_g = 25.4 \text{ Å}$) zutrifft. Der eingestellte pH-Wert bedingt eine positive bzw. neutrale Ladung der Proteine. Die Größe der Proteine ist so gewählt, dass diese bei einem Hydratationsgrad $w_0 = 25$ bzw. $w_0 = 36$ kleiner als die Wasserkerne sind (vgl. Abb. 4.25) und somit in die Mizellen passen. Der Einbau der Enzyme CT und HRP führt also zu einer Kontraktion der Mizellen, möglicherweise bedingt durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Membran und den partiell geladenen Proteinen.

Auf der anderen Seite wird Alkoholdehydrogenase (MW.: 80 kDa, Isoelektr. Punkt = 6.8, $R_g = 37.5 \text{ Å}$) in für dieses Enzym zu kleine Mizellen ($w_0 = 15.6$) eingebaut. Das Enzym ist auf Grund eines pH-Wertes der Pufferlösung von 8.5 negativ geladen. Die Paarabstands-

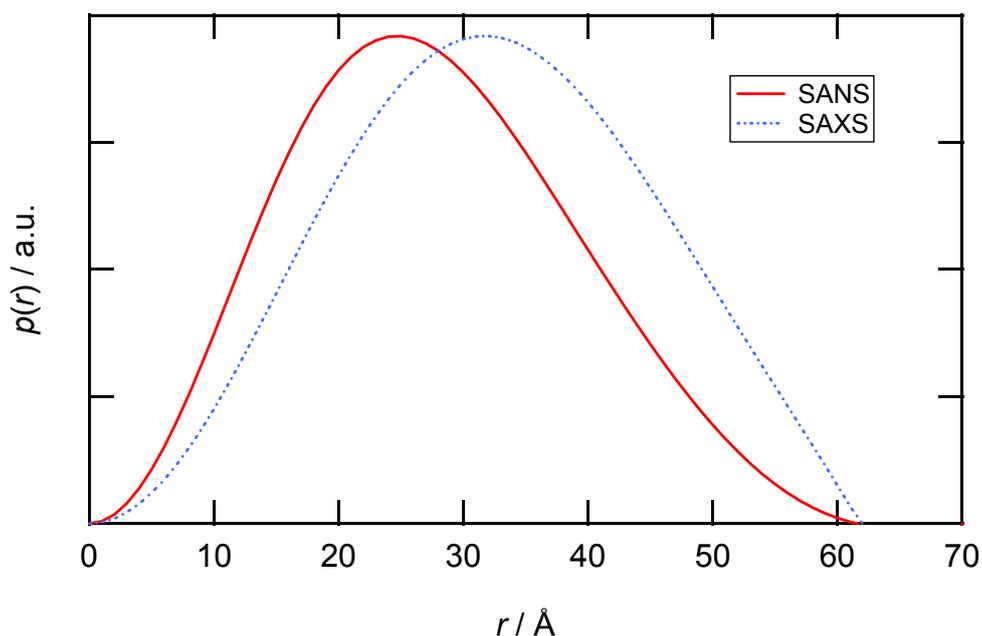


Abb. 4.26: Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ einer 0.1 M AOT-Mikroemulsion mit $w_0 = 10$ bei 1 bar und 25 °C in Abhängigkeit des experimentell vorgegebenen Kontrastes. Im Falle des Neutronenstreuxperimentes (SANS) mit D_2O trägt nur der Kern der Mizelle konstruktiv zur Streuung bei. Durch Verwendung von Synchrotron- oder Röntgenstrahlung (SAXS) liefert auch auf die AOT-Schale einen Streubeitrag, deren Dicke in [87] mit 8.4 Å angegeben wird und mit der Verschiebung des Maximums von 25 Å auf 33 Å gut übereinstimmt.

Tab. 4.6: Mittlerer Radius r und Breite der Radienverteilung Δr des Wasserkerns von 0.1 M AOT-Mikroemulsionen in Abhängigkeit des Hydratationsgrades w_0 und der Proteinkonzentration c bei 25 °C und pH=7.0.

| | w_0 | $r / \text{Å}$ | $\Delta r / \text{Å}$ | $c / 10^{-5} \text{ M}$ |
|------------------------|-------|----------------|-----------------------|-------------------------|
| α -Chymotrypsin | 25 | 38.3 | 6.6 | 0 |
| | 25 | 36.6 | 6.2 | 1.8 |
| | 25 | 36.2 | 5.9 | 3.8 |
| | 25 | 36.1 | 5.9 | 7.6 |
| | 36 | 50.1 | 10.5 | 0 |
| | 36 | 45.7 | 8.6 | 11.3 |
| Peroxidase | 25 | 37.4 | 6.2 | 1.2 |
| | 25 | 35.5 | 5.6 | 2.4 |
| | 25 | 35.6 | 5.3 | 3.6 |

verteilungen aus den SAXS-Messungen der 0.1 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 15.6$ sind im folgenden Abschnitt in Abb. 4.31 dargestellt und zeigen eine Zunahme des mittleren Radius von 35 auf 39 Å. Unter Berücksichtigung der enzymkinetischen Daten in Abb. 4.15 lässt sich daraus schließen, dass LADH in den Mizellen von AOT-Molekülen umschlossen wird und durch elektrostatische Wechselwirkungen zur Vergrößerung der Mizellen führt.

4.4.2 Einfluss des Drucks auf das Phasenverhalten 0.1 M AOT-Lösungen

Ausgehend von der Verdünnungsreihe (A-Schnitt) wurden Druckmessungen der Zusammensetzungen 0.1 M AOT mit $w_0 = 5, 10, 15, 25$ bei 25 °C durchgeführt.

0.1 M AOT, $w_0 = 5$: Beginnend mit dem Hydratationsgrad $w_0 = 5$ werden bei 1 bar frei verteilte inverse Mizellen beobachtet (Abb. 4.27).

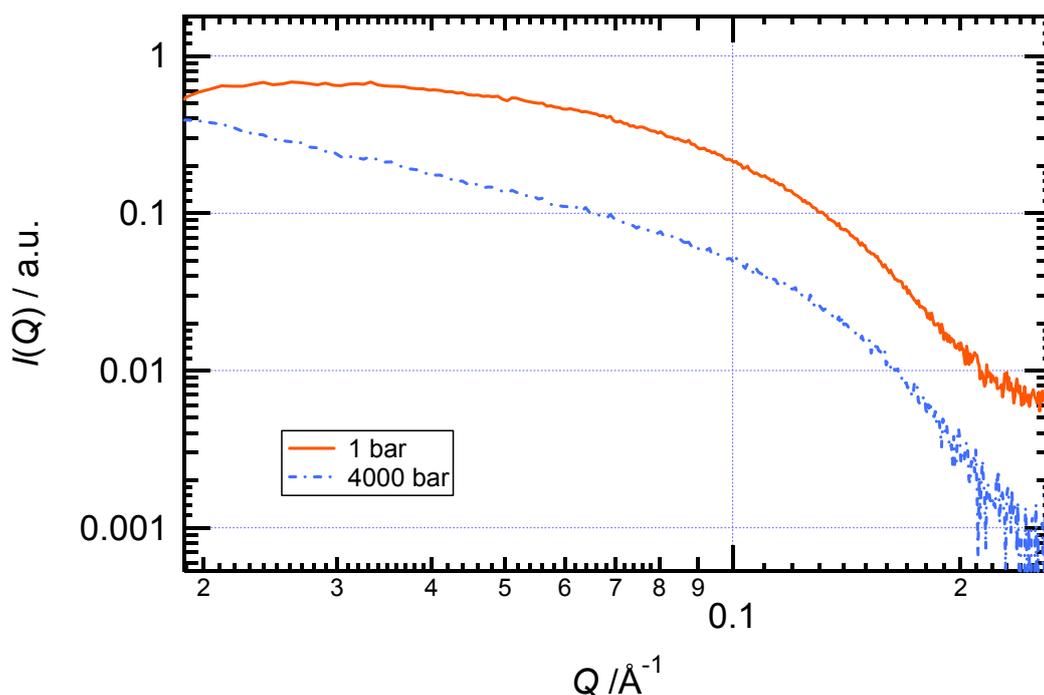


Abb. 4.27: SAXS-Daten einer 0.1 M AOT-Lösung mit $w_0 = 5$ bei 25 °C und verschiedenen Drücken. Bei 4000 bar ergibt sich im Porod-Plot ein linearer Zusammenhang. Die Streukurve fällt mit Q^{-1} ab und weist somit auf zigarrenförmige homogene Partikel hin [89].

Mit zunehmendem Druck verbreitert sich die Paarabstandsverteilung, die Polydispersität nimmt zu, bis schließlich die charakteristische Form elongierter, stäbchenförmiger Mizellen erkennbar wird (Abb. 4.28) [42]. Die maximale Ausdehnung der Paarabstandsverteilung r_{\max} nimmt schon ab 500 bar stark zu, hingegen bleibt die Position des Maximums nahezu konstant. Daraus folgt, dass der Durchmesser der Mizellen erhalten bleibt und diese nur länger werden. Eine Erklärung dafür ist das Verschmelzen einzelner Mizellen zu größeren Aggregaten. Bezieht man das Prinzip der Krümmung in die Betrachtung der Resultate ein, so lässt sich eine Abnahme sowohl der mittleren als auch der Gaußschen Krümmung (vgl. Abb. 4.5) bei Druckerhöhung feststellen und die Bildung einer bikontinuierlichen Phase prognostizieren.

0.1 M AOT, $w_0 = 10$: Analoges gilt für den Hydratationsgrad $w_0 = 10$. Auch hier wird bis zu einem Druck von 4000 bar bei 25 °C die Bildung von Stäbchenmizellen beobachtet. Im Unterschied zu den SAXS-Daten der Mischungen mit $w_0 = 5$ sind in Abb. 4.30 die SANS-Daten dargestellt, so dass in Bezug auf den unterschiedlichen Kontrast die

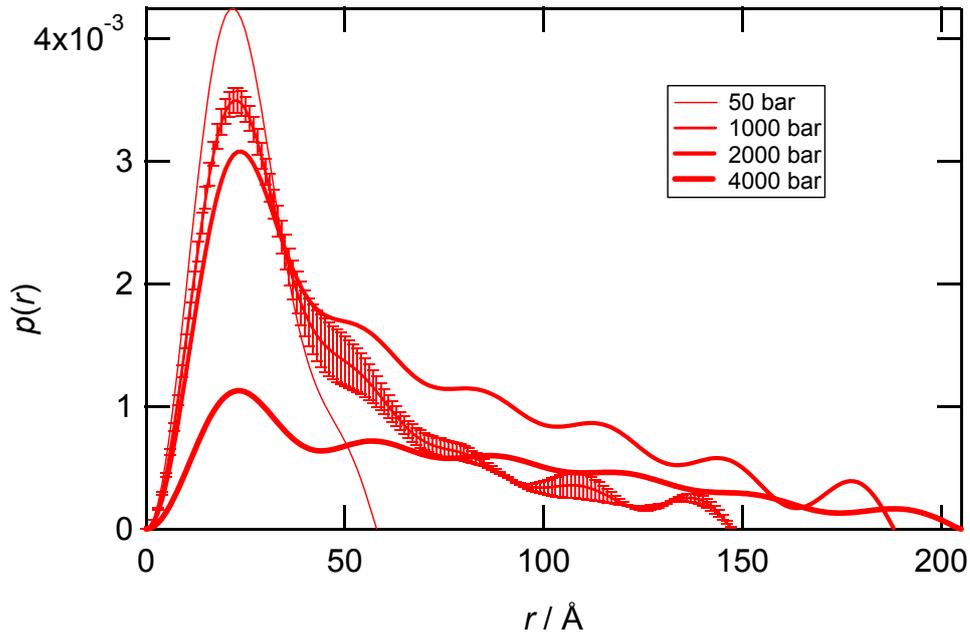


Abb. 4.28: Paarabstandsverteilungen aus den SAXS-Daten einer 0.1 M AOT-Lösung mit $w_0 = 5$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und verschiedenen Drücken. Die Ausdehnung der Mizellen beträgt maximal ca. 205\AA , ihr Querschnitt ca. 30\AA .

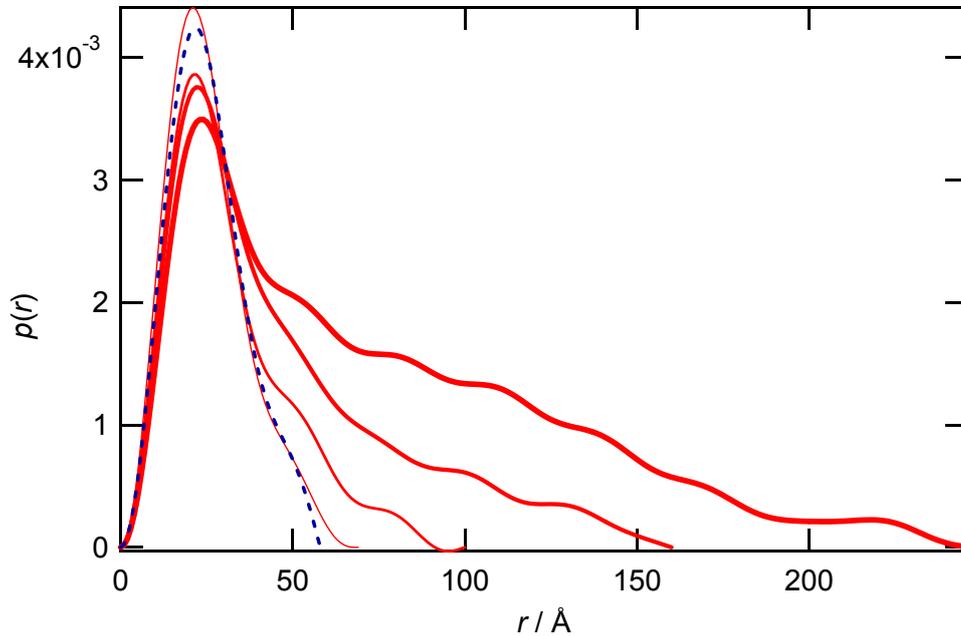


Abb. 4.29: Einfluss des Einbaus von CT auf die Paarabstandsverteilungen einer 0.1 M AOT-Lösung mit $w_0 = 5$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und den gleichen Drücken wie in Abb. 4.28. Die Ausdehnung der Mizellen beträgt maximal ca. 250\AA , ihr Querschnitt bleibt bei ca. 30\AA . Vergleichend dazu ist die Paarabstandsverteilung ohne CT (- - -) bei 50 bar dargestellt. In diesem Fall liegt ein wesentlich größerer Anteil von Stäbchenmizellen vor.

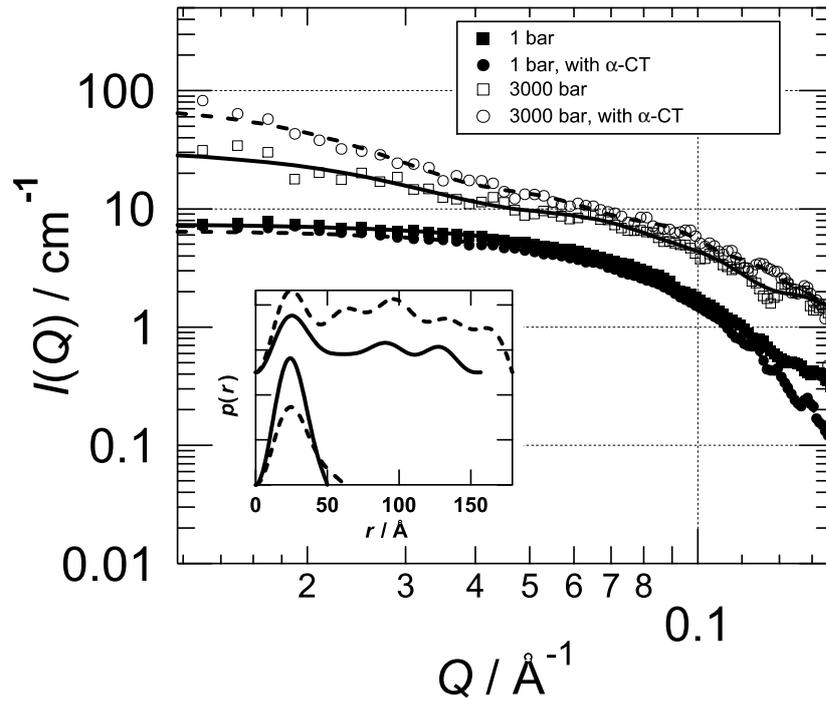


Abb. 4.30: SANS-Daten (außen) und Paarabstandsverteilungen (innen) von 0.1 M AOT mit $w_0 = 10$ bei 25 °C (—). Dargestellt sind ebenfalls die Daten mit inkorporiertem α -Chymotrypsin (- -). Wie auch bei $w_0 = 5$ ist der Einfluss des Proteins deutlich zu beobachten; die Polydispersität und der Anteil an elongierten Mizellen nimmt signifikant zu.

Größenparameter zu kleineren Werten verschoben sind. Die Paarabstandsverteilung $p(r)$ verbreitert sich mit zunehmendem Druck ebenso stark und der Maximalradius erreicht Werte im Bereich von 150 bis 200 Å.

0.1 M AOT, $w_0 = 15.6$: Bis zu einem Druck von 1000 bar bilden sich bei dem Hydratationsgrad $w_0 = 15.6$ wiederum elongierte Mizellen. Jedoch unterscheidet sich die Form der Paarabstandsverteilung ab einem Druck von 1500 bar deutlich von kleineren Hydratationsgraden und ist mit einer periodischen Funktion überlagert. Der periodische Verlauf kann mit der Korrelationsfunktion $\tilde{\gamma}(r)$ des Teubner-Strey-Modells (s. Gl. 4.18) beschrieben werden und lässt auf eine L_3 -Phase schließen. Eine Bestimmung von Längensparametern ist aber auf Grund der bei Drücken bis 4000 bar zu schwach ausgeprägten Strukturmerkmale nicht möglich.

0.1 M AOT, $w_0 = 25$: Deutlicher wird die Bildung der L_3 -Phase bei Erhöhung des Wasseranteils auf $w_0 = 25$ erkennbar. Hierzu liegen SANS-Daten mit und ohne α -Chymotrypsin vor, die in Abb. 4.32 (a) dargestellt sind. Die Paarabstandskorrelation der bikontinuierlichen Phase überlagert sich ab einem Druck von 1500 bar ebenfalls mit der Paarabstandskorrelation der Stäbchenmizellen und ab 2500 bar wird in den Streudaten der Korrelationspeak dieser Phase deutlich sichtbar.

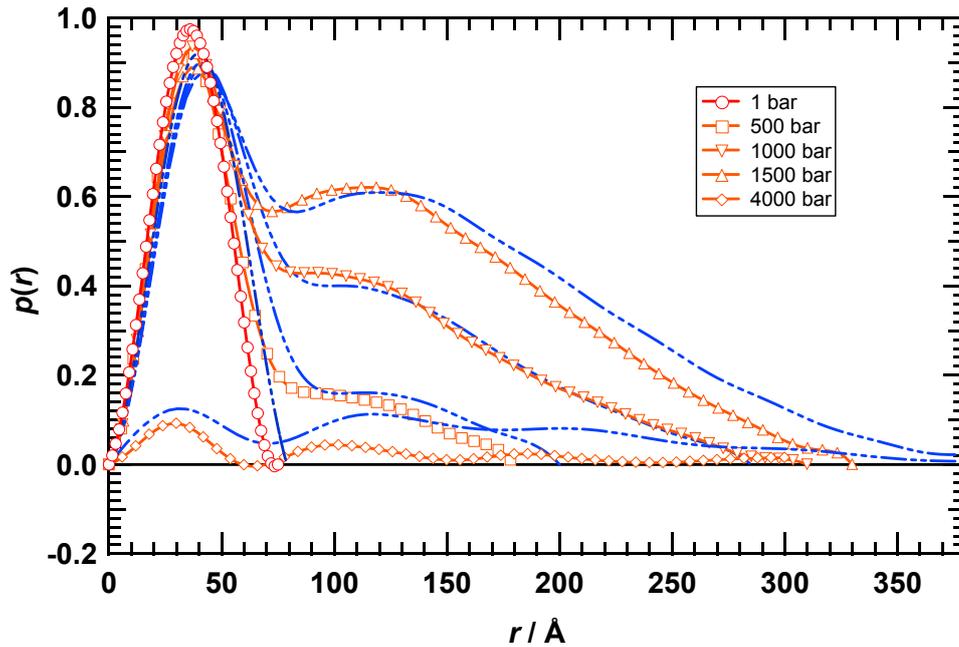


Abb. 4.31: Paarabstandsverteilungen $p(r)$ aus SAXS-Daten von 0.1 M AOT mit $w_0 = 15.6$ bei 25 °C bei verschiedenen Drücken (—). Ebenfalls dargestellt sind die Ergebnisse von Mikroemulsionen mit 0.1 M AOT mit $w_0 = 15.6$ inklusive einer Proteinlösung mit 40 μM LADH (— · — · —). Erkennbar ist ein Größenunterschied von 4 Å bei 1 bar durch die Inkorporation des Proteins, das Phasenverhalten und ebenso die Bildung der L_3 -Phase bleiben davon unbeeinflusst.

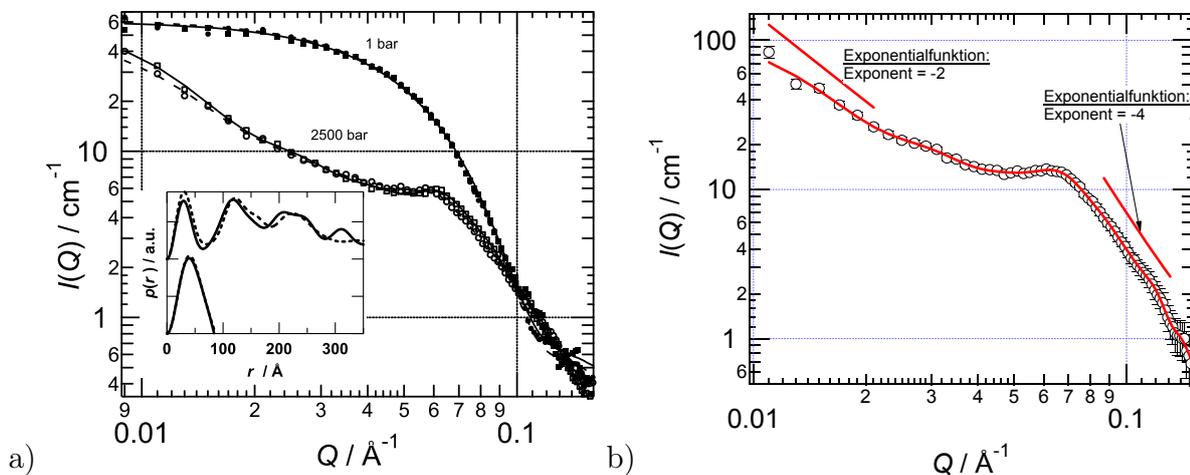


Abb. 4.32: a) SANS-Daten von 0.1 M AOT mit $w_0 = 25$ bei 25 °C bei 1 und 2500 bar (—). Zusätzlich sind die Ergebnisse bei gleicher Zusammensetzung inklusive einer Proteinlösung mit 14 μM CT (- -) dargestellt. Hier ist kein signifikanter Einfluss durch das Protein erkennbar, sowohl die Streudaten als auch die Paarabstandsverteilungsfunktionen sind im Rahmen der Genauigkeit deckungsgleich. b) SANS-Daten einer vergleichbaren AOT-Mikroemulsion ohne CT bei 3000 bar. Verdeutlicht werden die Eigenschaften der Streukurve der L_3 -Phase durch den Korrelationspeak, die Q^{-2} -Abhängigkeit bei kleinen und die Q^{-4} -Abhängigkeit der Streuintensität bei großen Impulsüberträgen.

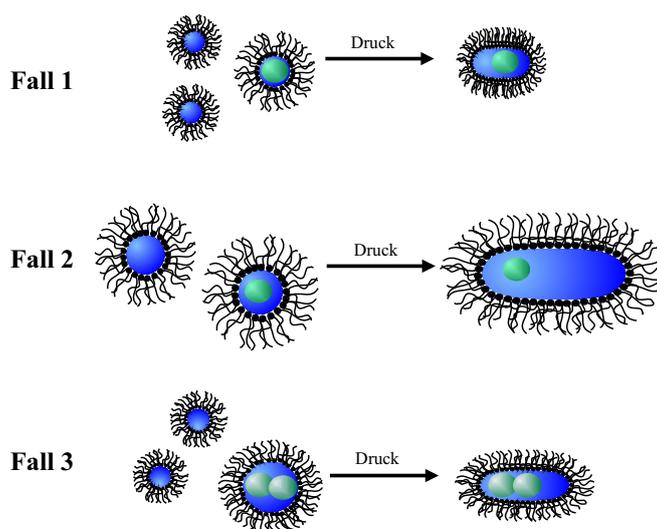


Abb. 4.33: Visualisierung der Ergebnisse aus den durchgeführten Hochdruck-SAXS- und -SANS-Experimenten an 0.1 M AOT-Mischungen mit unterschiedlichen Hydratationsgraden w_0 .

Einfluss von Proteinen auf die druckinduzierten mizellaren Strukturen

Welchen Einfluss Proteine auf die mizellare Struktur insbesondere unter erhöhtem hydrostatischen Druck haben, hängt von der Größen und Form der Mizellen bzw. von der Größe, Form und Oberflächenladung der Proteine ab. Daraus ergeben sich drei unterschiedliche Fälle, wie sie Abb. 4.33 skizziert sind. Fall 1 setzt ein globuläres Protein (grün) voraus, dessen Dimensionen gleich groß oder größer sind als die vorliegende Größenverteilung der Mizellen. Dies trifft für das System α -Chymotrypsin in 0.5 M AOT mit $w_0 = 5, 10$ zu, bei dem eine sichtliche Zunahme größerer Stäbchenmizellen beobachtet wird (vgl. Abb. 4.29 und 4.30). Wie die kinetischen Untersuchungen von α -Chymotrypsin bei 1 bar zeigen, ist die Aktivität des Enzyms bei dem Hydratationsgrad $w_0 = 10$ maximal, wenn die entsprechenden sphärischen Wasserkerne gleich den Dimensionen des Proteins sind (vgl. Abb. 4.14). Durch Erhöhung des Drucks steigt die Aktivität des Enzyms auch bei kleineren Mizellen drastisch an, was durch die Vergrößerung bzw. Deformation der Mizellen und somit einer Anpassung der Amphiphilmatrix an die Gegebenheiten des Enzyms begründet werden kann. Besonders deutlich wird dieser Stabilisierungseffekt in Abb. 4.11 durch den Vergleich der relativen Aktivität bei einem Hydratationsgrad $w_0 = 7$ und 1 bar mit der relativen Aktivität bei 1000 bar.

Fall 2 behandelt die Situation größerer Mizellen im Vergleich zur Größe des Proteins und wird durch das System α -Chymotrypsin in 0.1 M AOT mit einem Hydratationsgrad $w_0 = 25$ repräsentiert. Die Ergebnisse der Neutronenstreudaten in Abb. 4.32 zeigen keinen Einfluss auf die bei einem bestimmten Druck vorliegende Struktur der Mizellen.

Fall 3 berücksichtigt den Unterschied zwischen zwei verschiedenen Proteinen. Wie auch bei Fall 1 wird wiederum eine für das Protein zu kleine mizellare Matrix gewählt. Als Vergleichssystem dient LADH in 0.1 M AOT mit $w_0 = 15.6$. Im Gegensatz zu α -Chymotrypsin

ist LADH aus zwei Monomeren aufgebaut, so dass die Möglichkeit einer Dissoziation in zwei Monomere besteht, wie dies aus den Hochdruck-SAXS-Daten des in Pufferlösung und nicht in Mikroemulsionen gelösten Enzyms hervorgeht. Die Ergebnisse der Kleinwinkelstreuexperiment in Abb. 4.31 zeigen jedoch die analog zu Fall 1 erwartete Vergrößerung der Mizellen auch bei Drücken oberhalb der Dissoziationsgrenze von LADH bei 1000 bar. Im Falle einer Dissoziation müsste eine Kontraktion der Paarabstandsverteilung auftreten. Die enzymologischen Experimente unter diesen Bedingungen zeigen jedoch, dass LADH in der Mikroemulsion und bei Drücken größer 1000 bar nicht nur weiterhin aktiv ist, sondern auch eine erhebliche Erhöhung der Aktivität aufweist. Wie in Abb. 4.33 skizziert, lässt sich die Erhöhung der Aktivität und somit die Herstellung optimalerer Reaktionsbedingungen für das Enzym durch die Bildung ausgedehnter Mizellen begründen. Die mizellare Matrix wirkt dabei wie eine Art Korsett und stabilisiert den Zusammenhalt des Dimers, so dass die Umsetzung von Ethanol zu Acetaldehyd auch noch bei Drücken von 2000 bar weiterhin möglich ist.

4.5 Hochdruck-SAXS-Messungen an konzentrierten AOT-*n*-Oktan-Lösungen

Höher konzentrierte AOT-*n*-Oktan-Lösungen ab 0.66 M mit verschiedenen Wasseranteilen weisen deutlich andere Streukurven auf, als dass diese noch durch das Modell frei verteilter, polydisperser Kugeln beschrieben werden könnten. Es liegt zwar bei 1 bar und 25 °C nach wie vor die L₂-Phase bestehend aus kugelförmigen inversen Mizellen vor, dennoch bilden sich übergeordnete Aggregate dicht gepackter Mizellen und es tritt ein Korrelationspeak auf. Das bedeutet, dass der Formfaktor der Mizellen $F(Q)$ von dem interpartikulären Strukturfaktor $S(Q)$ überlagert ist und somit eine räumliche Korrelation auf Grund der Wechselwirkungen zwischen den Partikeln besteht. In den Strukturfaktor geht neben der Korrelationsfunktion deshalb auch ein Wechselwirkungspotenzial ein. Ansatzpunkt für die Formulierung einer modellspezifischen Streufunktion $I(Q)$ ist die von von Ornstein und Zernike allgemein formulierte Korrelationsfunktion $h(r)$ mit einer direkte Korrelation $c(r)$ von Streuzentren zu einem Ursprung O und der indirekte Korrelation $\rho h(|\vec{r}' - \vec{r}''|)$ zwischen den Streuzentren [90].

$$h(r) = c(r) + \int d^3r' c(r') \rho h(|\vec{r}' - \vec{r}''|) \quad (4.14)$$

Die Korrelationsfunktion stellt somit einen Zusammenhang zu den durch Kleinwinkelstreuung messbaren Paarkorrelationsfunktionen $p(r)$ und $g(r)$ her. Die Verbindung mit einem Wechselwirkungspotenzial gelingt im einfachsten Fall, der statistisch-thermodynamischen Betrachtung von Flüssigkeiten oder Gasen, durch den Vergleich von $h(r)$ mit dem zweiten Term der inneren Energie U in Gl. 4.15, dieser enthält die Paarkorrelationsfunktion $g(r)$ [91].

$$U = \frac{3}{2} N k_B T + \frac{1}{2} N \int d^3r \rho g(r) V(r) \quad (4.15)$$

Wird ein bestimmtes Wechselwirkungspotenzial $V(r)$ vorausgesetzt, z.B. elektrostatische

oder van-der-Waals-Wechselwirkungen, so kann ein mathematischer Ausdruck für $g(r)$ und nach anschließender Fourier-Transformation auch für $S(Q)$ bzw. $I(Q)$ ermittelt werden und mit experimentellen Daten verglichen werden.

Das Teubner-Strey-Modell

Eine allgemeinere Beschreibung ohne die Annahme eines bestimmten Wechselwirkungspotenzials bietet das von Teubner und Strey formulierte Modell basierend auf der o.g. Ornstein-Zernike-Gleichung 4.14. Es wird in diesem Fall statt der inneren Energie U die von Landau formulierte phänomenologischen Gleichung der freien Energie F mit folgender Parametrisierung a_1 , c_1 und c_2 eingesetzt [92]:

$$F = \int a_2 \psi(r)^2 + c_1 (\nabla \psi(r))^2 + c_2 (\Delta \psi(r))^2 d^3r \quad (4.16)$$

Der Ordnungsparameter $\psi(r)$ beschreibt eine beliebige Korrelation von räumliche fluktuierenden Domänen gleicher Streulängendichte mit variabler Größe und Form. Durch Fourier-Transformation vom r -Raum (Abstand) in den Q -Raum (Impulsübertrag) ergibt sich die Streufunktion $I(Q)$:

$$I(Q) \propto \frac{1}{a_1 + c_1 \cdot Q^2 + c_2 \cdot Q^4} \quad (4.17)$$

Daraus leitet sich wiederum die Korrelationsfunktion $\tilde{\gamma}(r)$ ab. Der Parameter d_m gibt den Abstand zwischen den Domänen an und die Korrelationslänge ξ_m entspricht der mittleren Größe der Domänen. Damit lässt sich auch zwischen der mizellaren L_2 -Phase und der ungeordneten bikontinuierlichen L_3 -Phase unterscheiden, da d_m und ξ_m abhängig von der vorliegende Phase sind. Der Unordnungsparameter D_m dient in diesem Fall als Unterscheidungsmerkmal. Ist $D_m < 0.54$ so kann von einer L_2 -Phase ausgegangen werden.

$$\tilde{\gamma}(r) = \frac{d_m}{2\pi r} \exp\left(-\frac{r}{\xi_m}\right) \sin\left(\frac{2\pi r}{d_m}\right) \quad (4.18)$$

$\tilde{\gamma}$ ist wiederum mit der charakteristischen Funktion $\gamma(r)$ und der Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ durch den Zusammenhang $\tilde{\gamma}(r) = \gamma(r) r^2 = p(r)$ verbunden, so dass durch inverse Fourier-Transformation aus $\tilde{\gamma}(r)$ die Streufunktion $I(Q)$ erhalten wird und umgekehrt [93]:

Aus den Parametern a_1 , c_1 und c_2 lassen sich die Domänengröße d_m und die Korrelationslänge ξ_m durch Anpassung von $I(Q)$ an die SANS-/ SAXS-Daten ermitteln.

$$d_m = \frac{2\pi}{\sqrt{\frac{1}{2} \left(\sqrt{\frac{a_1}{c_2}} - \frac{c_1}{4c_2} \right)}} \quad (4.19)$$

$$\xi_m = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{2} \left(\sqrt{\frac{a_1}{c_2}} + \frac{c_1}{4c_2} \right)}} \quad (4.20)$$

$$D_m = \frac{d_m}{2\pi\xi_m} \quad (4.21)$$

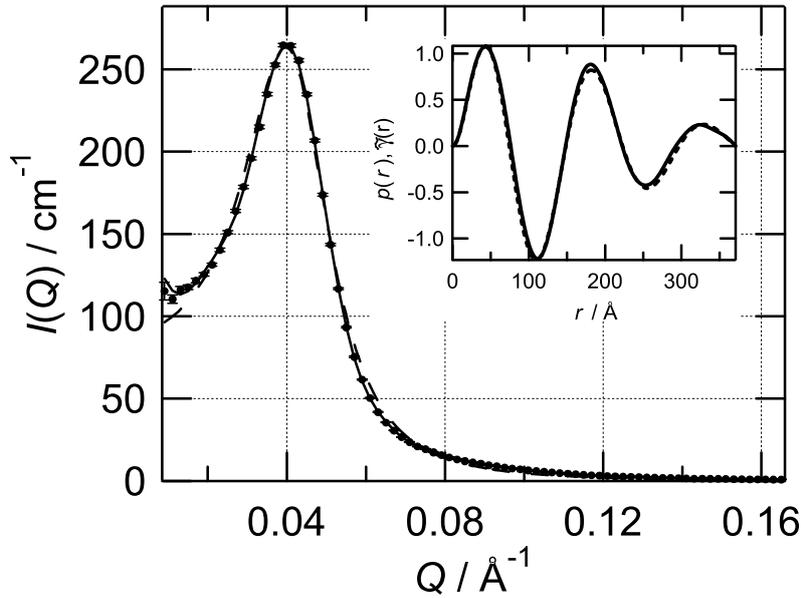


Abb. 4.34: Vergleich zweier Methoden zur Bestimmung der Domänengröße d_m und der Korrelationslänge ξ_m am Beispiel von 0.66 M AOT mit $w_0 = 46$ bei 1 bar und 25 °C. Gl. (4.17) lässt sich direkt an die Streudaten anpassen und somit können d_m bzw. ξ_m berechnet werden. Werden diese Größen in Gl. (4.18) eingesetzt, kann die Korrelationsfunktion $\tilde{\gamma}(r)$ wiederum mit der durch indirekte Fourier-Transformation erhaltenen Paarabstandsverteilung $p(r)$ direkt verglichen werden. Sowohl die direkte (---) als auch die indirekte Methode (—) ergeben vergleichbare Streukurven $I(Q)$ und Korrelationsfunktionen $\tilde{\gamma}(r) = p(r)$.

Weiterhin kann durch indirekte Fourier-Transformation aus der Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ die Korrelationsfunktion $\tilde{\gamma}(r) = p(r)$ rekonstruiert und durch Anpassung mit Gl. 4.18 wiederum d_m und ξ_m bestimmt werden. Die beiden Methoden ergeben analoge Ergebnisse, wie dies am Beispiel in Abb. 4.34 ersichtlich wird.

Das Nallet-Roux-Modell

Zur Wiedergabe von Kleinwinkelstreudaten lyotroper lamellarer Phasen, im Bereich der Kolloidforschung werden diese auch als smektische Phase bezeichnet, wird von Nallet und Roux ein allgemeiner Ansatz unter Berücksichtigung von elastischen (vgl. Gl. 4.4) und elektrostatischen Beiträgen zur freien Energie vorgeschlagen [94]. Ähnlich den Ansätzen über die Ornstein-Zernike-Gleichung (vgl. Gl. 4.14) wird eine ortsabhängige Korrelationsfunktion formuliert, die die Konzentrationsfluktuationen und die gestapelte Anordnung der Lamellen berücksichtigt. Die Fourier-Transformation der Korrelationsfunktion liefert die Streufunktion $I(Q)$ in Gl. 4.22 [95].

$$I(Q) = \frac{E}{Q^2 \xi_\rho^2 + 1} + \frac{F}{(Q - Q_0)^2 \xi_t^2 + 1} \quad (4.22)$$

Die Streufunktion besteht aus zwei Termen, die über die Parameter E und F gewichtet werden. Die Korrelationslänge ξ_ρ bezieht sich auf die Größe von Dichtefluktuationen

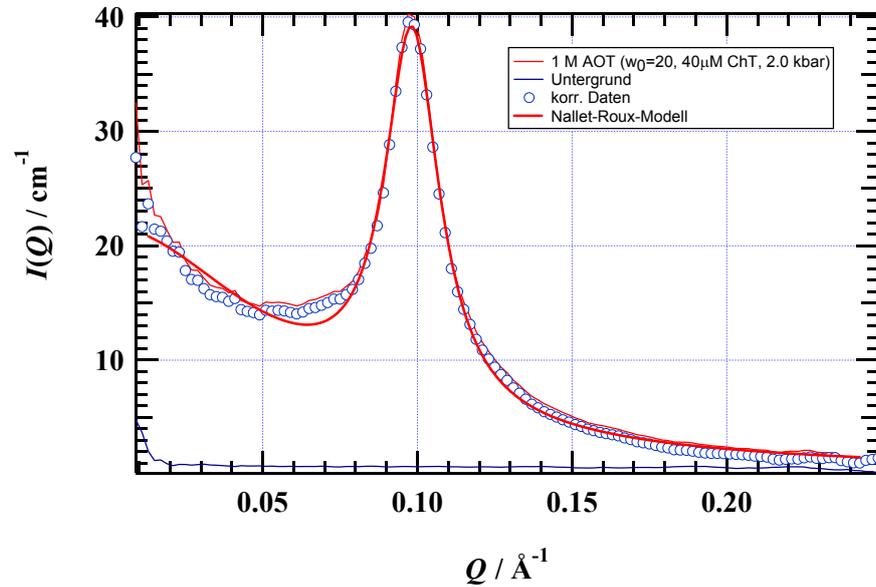


Abb. 4.35: SANS-Daten von 1 M AOT mit $w_0 = 20$ und $40 \mu\text{M}$ CT bei 2000 bar. Durch die Anpassung der Modellfunktion ergeben sich für den lamellaren Gitterabstand $d_l = 64 \text{ \AA}$ und für die Korrelationslänge $\xi_l = 93 \text{ \AA}$.

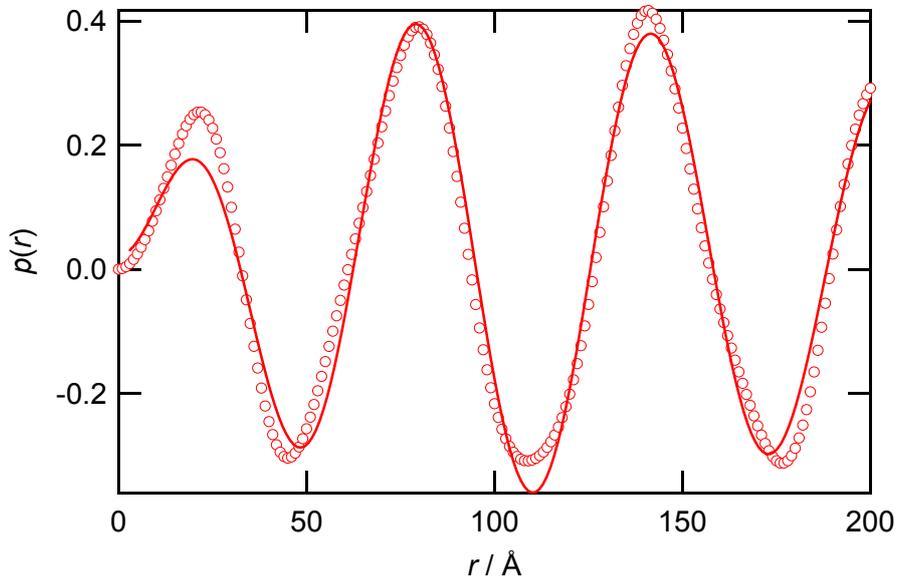


Abb. 4.36: Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ von 1 M AOT mit $w_0 = 20$ und $40 \mu\text{M}$ CT bei 2000 bar durch indirekte Fourier-Transformation der Streudaten aus Abb. 4.35. Durch Anpassung der Korrelationsfunktion $\tilde{\gamma}(r)$ des Teubner-Strey-Modells ergeben sich eine Domänengröße $d_m = 64 \text{ \AA}$ und eine Korrelationslänge $\xi_m = 96 \text{ \AA}$.

im Bereich kleiner Impulsüberträge Q , die im Rahmen der Auswertung konzentrierter AOT-Mikroemulsion auf Grund des Auftretens koexistierender Phasen nicht berücksichtigt werden. Der zweite Term beschreibt den Bragg-Peak in den Streudaten. Dabei gibt Q_0 die Position des Peakmaximums an, während die Korrelationslänge ξ_l sich auf Fluktuationen innerhalb der lamellaren Struktur (z.B. Dicke und Abstand der Lamellen) bezieht. ξ_l hängt umgekehrt proportional von der Breite des Peaks ab.

In Abb. 4.35 ist die Anpassung von Gl. 4.22 an SANS-Daten dargestellt. Vergleichend dazu wird durch indirekte Fourier-Transformation die Paarabstandsverteilung $p(r)$ berechnet und mit Gl. 4.18 angepasst. Die Abstandsparameter und Korrelationslängen ergeben vergleichbare Ergebnisse und zeigen, dass die Modelle von Teubner und Strey bzw. Nallet und Roux auf ähnlichen Annahmen, der regelmäßigen Fluktuation von Volumenelementen gleicher Streulängendichte, basieren.

4.5.1 Phasenverhalten von 0.66 M AOT-Mischung mit unterschiedlicher Hydratation w_0 – B-Schnitt

Die Streudaten der Proben mit unterschiedlichen Hydratationsgraden ausgehend von einer 0.66 M AOT-Stammlösung zeigen generell einen Korrelationspeak. Die aus den Streudaten erhältliche Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ wird durch indirekte Fourier-Transformation (Moore-Methode) bestimmt und mit der aus dem Teubner-Strey-Modell hervorgehenden Korrelationsfunktion $\tilde{\gamma}(r)$ angepasst. Eine Unterscheidung zwischen L_2 - und L_3 -Phase ist durch die Domänengröße d_m und Korrelationslänge ξ_m über den Unordnungsparameter D_m möglich. Ist $D_m > 0.54$, besteht nur noch eine kurzreichweitige Ordnung und es kann von einer bikontinuierlichen schwammartigen Phase (L_3) oder der Koexistenz mehrere Phasen, also Domänen mit teilgeordneten Strukturen, ausgegangen werden.

Wie auch bei der 0.1 M AOT-*n*-Oktan-Lösung wird ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Domänengröße d_m und Korrelationslänge ξ_m mit dem Hydratationsgrad w_0 beobachtet (Abb. 4.37). Das verwendete Teubner-Strey-Modell lässt allerdings keine Analyse der Polydispersität zu, so dass kein entsprechender Index P berechnet werden kann. Im Rahmen der experimentellen Genauigkeit liegt eine lineare Abhängigkeit der Domänengröße d_m vom Hydratationsgrad w_0 vor.

Der Einfluss von Proteinen auf die Struktur und Strukturparameter d_m , ξ_m , d_l und ξ_l wird durch die Inkorporation von LADH und α -Chymotrypsin untersucht. Neben der unterschiedlichen Größe und Gestalt weisen die beiden Enzyme durch die pH-Bedingungen in den Pufferlösungen auch unterschiedliche Ladungen auf, so dass die Wechselwirkung mit der ionischen Amphiphilmembran gegensinniger Natur sind.

0.66 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 15$

Ausgangspunkt sind die Ergebnisse aus den SANS-Messungen bei 1 bar, dargestellt in Abb. 4.37, die bei $w_0 = 15$ die Abstandsparameter $d_m = 77 \text{ \AA}$, $\xi_m = 31 \text{ \AA}$ und den Unordnungsparameter $D_m = 0.40$ ergeben. Auch bei 1 bar ist der Unordnungsparameter D_m ungewöhnlich hoch, so dass in diesem Fall wechselwirkende, aber frei verteilte Mizellen als Modellstruktur angenommen werden. Weiterhin liegen SAXS-Resultate die-

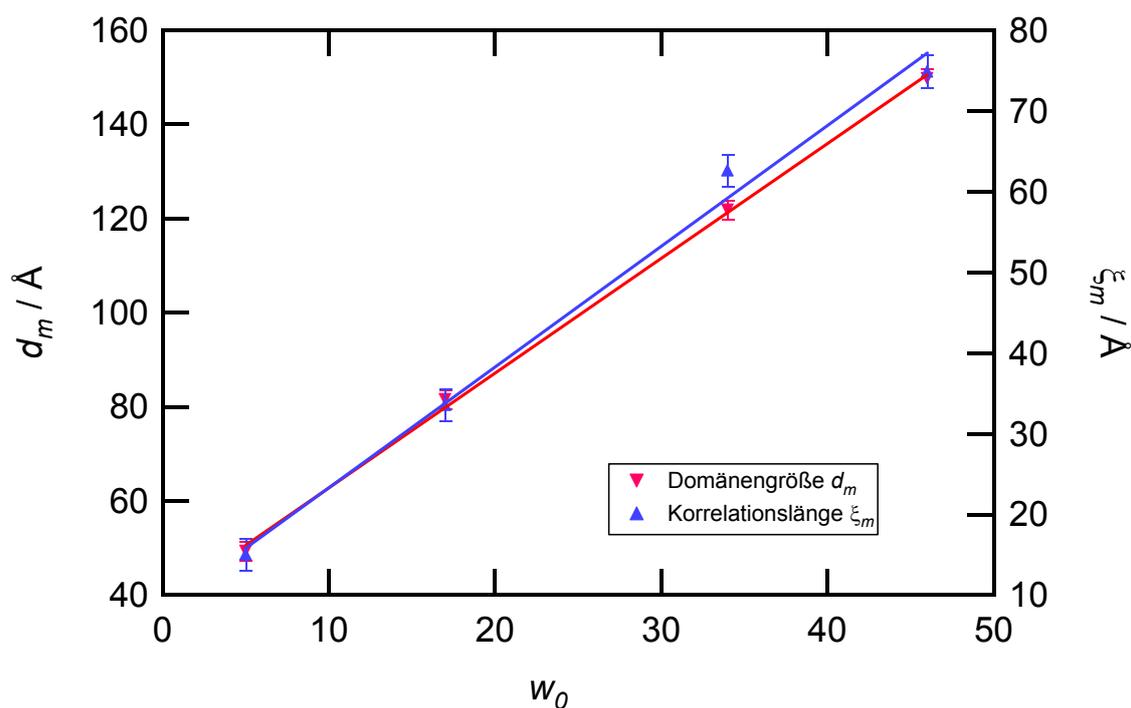


Abb. 4.37: Abhängigkeit der Domänengröße d_m und der Korrelationslänge ξ_m von 0.66 M AOT-Mikroemulsionen mit unterschiedlichen Hydratationsgraden w_0 bei 1 bar und 25 °C.

ser Zusammensetzung bei unterschiedlichen Drücken vor. Zu beachten ist wiederum der unterschiedliche Streukontrast und die sich daraus ergebende Vergrößerung der Abstandsparemeter. Das Verhältnis beider Längenparameter bleibt dabei konstant, so dass der Unordnungsparameter $D_m = d_m/(2\pi\xi_m)$ vergleichbar bleibt.

Schon bei einem Druck von 50 bar liegt eine vollständig ungeordnete L_3 -Phase vor ($d_m = 96$ Å, $\xi_m = 14$ Å, $D_m = 1.0$); dabei wird die Korrelationslänge stark herabgesetzt und führt zu einem schrittweisen Übergang in die L_3 -Phase, also der Ausbildung eines schwammartigen Netzwerks aus Wasser- und Öldomänen. Ein vergleichbares Verhalten wird ebenfalls bei 1.0 M AOT mit $w_0 = 20$ beobachtet; auch hier fällt die Korrelationslänge ξ_m von 50 Å auf 22 Å ab. Es ist also eine starke Abhängigkeit vom eingestellten Wassergehalt, sowie ein signifikanter Einfluss des Drucks gerade im Bereich 1 bis 100 bar auf die mikzellare L_2 -Phase erkennbar. Die Ausbildung der L_3 -Phase erfolgt im Vergleich zu 0.1 M AOT-Proben mit $w_0 = 15$ bei wesentlich kleineren Drücken.

Durch weitere Erhöhung des Drucks ändern sich die Längengrößen nicht signifikant, bei 2500 bar betragen $d_m = 95$ Å, $\xi_m = 13$ Å und $D_m = 1.0$. Es wird bei diesem Druck im Porot-Plot ein linearer Bereich von 0.02–0.04 Å⁻¹ mit einem Exponenten von 0.4 beobachtet. Ab einem Druck von 3500 bar tritt neben dem Korrelationspeak ein Bragg-Reflex mit einer Gitterkonstante von 56 Å auf. Im Vergleich zu dem System 1 M AOT mit $w_0 = 20$ und 1.57 M AOT mit $w_0 = 15.6$ kann die hier auftretende druckinduzierte Phase der lamellaren Phase, wie sie auch bei den genannten Zusammensetzungen auftritt, zugeordnet werden. Zur weiteren Charakterisierung der internen Struktur (Packung und Ausrichtung der AOT-Moleküle), bedarf es weitergehender ggf. spektroskopischer Experimente.

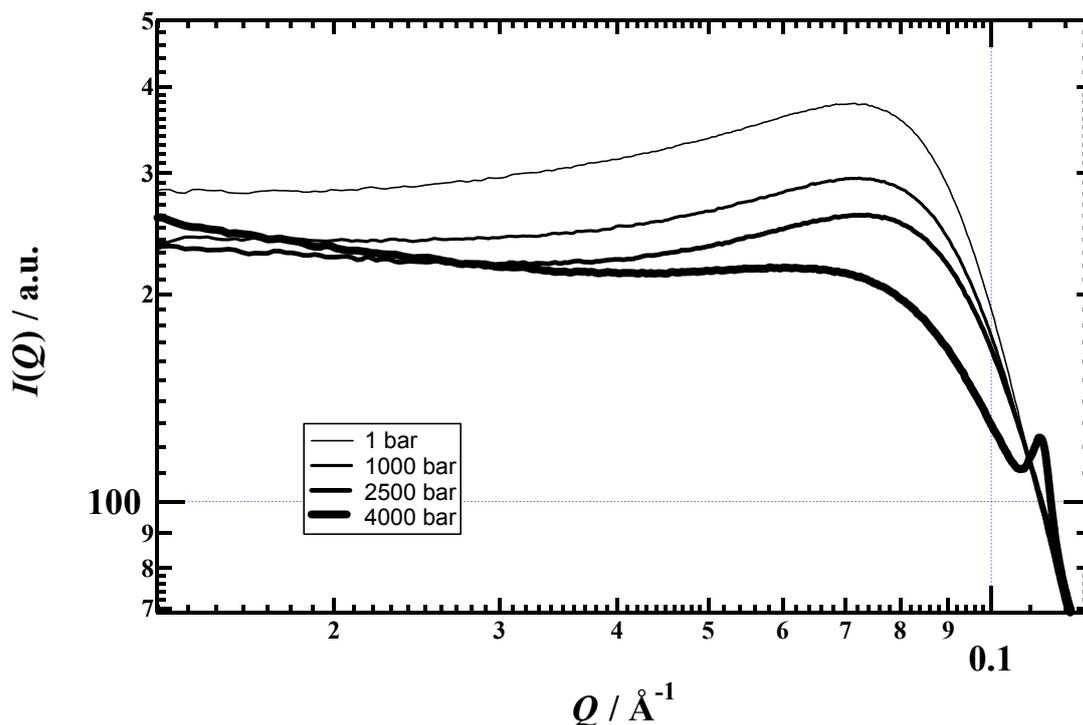


Abb. 4.38: Röntgenkleinwinkelstreuendaten einer 0.66 M AOT-Lösung mit $w_0 = 15$ bei verschiedenen Drücken.

0.66 M AOT-Mischungen mit $w_0=34$ und LADH

Die Erhöhung des Hydratationsgrades führt im Vergleich zu $w_0 = 15$ neben der lamellaren Phase zur Bildung einer weiteren Hochdruckphase. Ausgehend von der L_2 -Phase ist die lamellare Phase mit einer Gitterkonstanten von 88 \AA nur ansatzweise bei 1000 bar erkennbar und liegt bei 1500 bar parallel neben einer unbekanntem Hochdruckphase vor. Die Eigenschaften der SAXS-Daten dieser Phase, die bei 4500 bar am ausgeprägtesten erscheint, sind in Abb. 4.39 dargestellt. Das Nallet-Roux-Modell liefert bei 4500 bar die Längenparameter $\xi_\rho = 55 \text{ \AA}$, $d_l = 100 \text{ \AA}$ und $\xi_l = 96 \text{ \AA}$ als Ergebnis, die auch durch das Teubner-Strey-Modell mit den in Tab. 4.7 aufgelisteten Werten bestätigt werden. In der doppeltlogarithmischen Darstellung der Streudaten entspricht der lineare Bereich einer Steigung von -1 . Zusammengefasst lässt sich daraus schlussfolgern, dass ab einem Druck von 1500 bar wiederum eine hochgeordnete periodische Struktur aus möglicherweise länglichen wechselwirkenden Aggregaten vorliegt (smektische Hochdruckphase).

Die Inkorporation des Enzyms LADH bedingt zunächst eine Stabilisierung der L_2 -Phase, so dass die lamellare Phase erst bei 1500 bar statt bei 1000 bar auftritt. Parallel dazu liegt die beschriebene smektische Hochdruckphase vor. Bis zu einem Enddruck von 4000 bar liegen beide Phasen nebeneinander vor und es lassen sich keine sinnvollen Strukturparameter aus den Streudaten ermitteln. Der Einbau des Enzyms sorgt also für eine Art Phasenentmischung, wobei das Protein möglicherweise nur in eine der Phasen eingebaut ist.

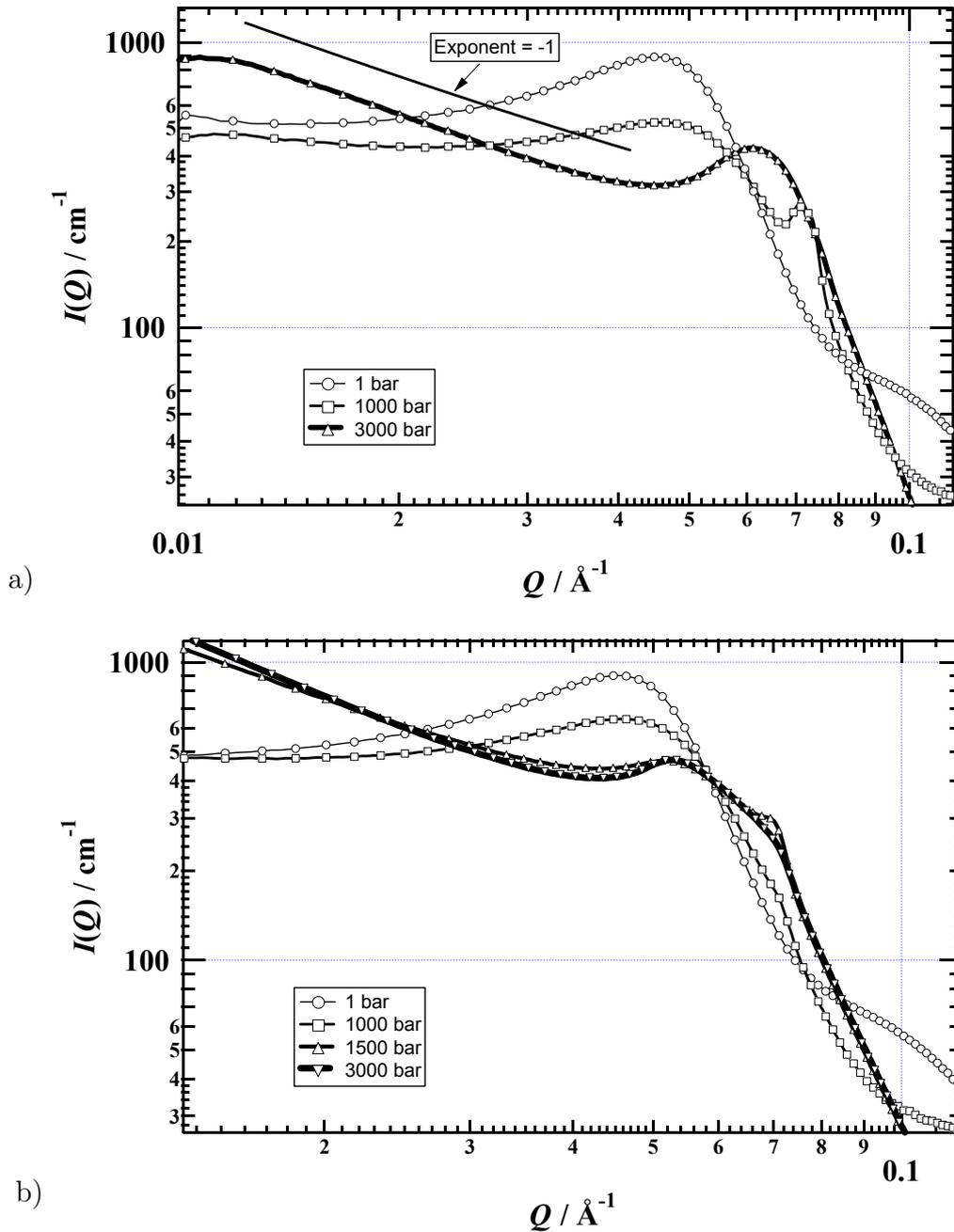


Abb. 4.39: Röntgenkleinwinkelstreudaten von 0.66 M AOT-Mikroemulsionen mit $w_0 = 34$ bei 25 °C und verschiedenen Drücken ohne LADH (a) und mit 25 μM LADH (pH = 8.5, 10 mM TRIS) (b).

Tab. 4.7: Strukturparameter d_m (Domänengröße) und ξ_m (Korrelationslänge) einer 0.66 M AOT-Mikroemulsion mit $w_0 = 34$ und $25 \mu\text{M}$ LADH aus der Anpassung der Korrelationsfunktion $\tilde{\gamma}(r)$. Die eingeklammerten Werte sind die Gitterkonstanten d_l der zusätzlich auftretenden lamellaren Phase. Die Strukturparameter im Koexistenzbereich zweier Phasen sind nicht angegeben, da keine sinnvollen Werte ermittelt werden können.

| p/bar | $d_m/\text{\AA}$ | $\xi_m/\text{\AA}$ | $d_m^{\text{LADH}}/\text{\AA}$ | $\xi_m^{\text{LADH}}/\text{\AA}$ |
|----------------|------------------|--------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 134 | 70 | 132 | 71 |
| 50 | 131 | 71 | 132 | 70 |
| 500 | 125 | 66 | 128 | 62 |
| 1000 | (88) | | 111 | 56 |
| 1500 | 98 | 67 | (91) | |
| 2000 | 102 | 70 | | |
| 2500 | 101 | 71 | | |
| 3000 | 99 | 78 | | |
| 3500 | 99 | 82 | | |
| 4000 | 99 | 85 | | |
| 4500 | 98 | 95 | | |

0.66 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 46$ und α -Chymotrypsin

Wie schon bei den Hydratationsgraden $w_0 = 15$ und $w_0 = 34$ wird ebenfalls ein signifikanter Druckeinfluss beobachtet. Bei einem Druck von 1 bar und einer Temperatur von 25°C liegt eindeutig die L_2 -Phase vor, deren Streudaten sehr gut mit dem Teubner-Strey-Modell beschrieben werden (vgl. Abb. 4.34). Über die Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ aus der indirekten Fourier-Transformation bzw. die Korrelationsfunktion $\tilde{\gamma}(r)$ lassen sich die Streudaten auch bei höheren Drücken beschreiben und die strukturellen Parameter d_m und ξ_m angeben. Wie aus Tab. 4.8 zu entnehmen ist, fällt sowohl die Domänengröße als auch die Korrelationslänge schon bei 50 bar stark ab.

Tab. 4.8: Strukturparameter der Korrelationsfunktion $\tilde{\gamma}(r)$ einer 0.66 M AOT mit $w_0 = 46$ und $40 \mu\text{M}$ CT in Abhängigkeit des Drucks.

| p/bar | $d_m/\text{\AA}$ | $\xi_m/\text{\AA}$ | $d_m^{\text{CT}}/\text{\AA}$ | $\xi_m^{\text{CT}}/\text{\AA}$ |
|----------------|------------------|--------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 149 | 80 | | |
| 50 | 113 | 60 | 134 | 59 |
| 500 | 110 | 87 | 118 | 132 |
| 1000 | 109 | 85 | 116 | 133 |
| 3000 | 109 | 117 | | |

Die SAXS-Messungen bestätigen unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Streukontrastes in puncto Strukturparameter die SANS-Messungen. Bei 50 bar betragen $d_m =$

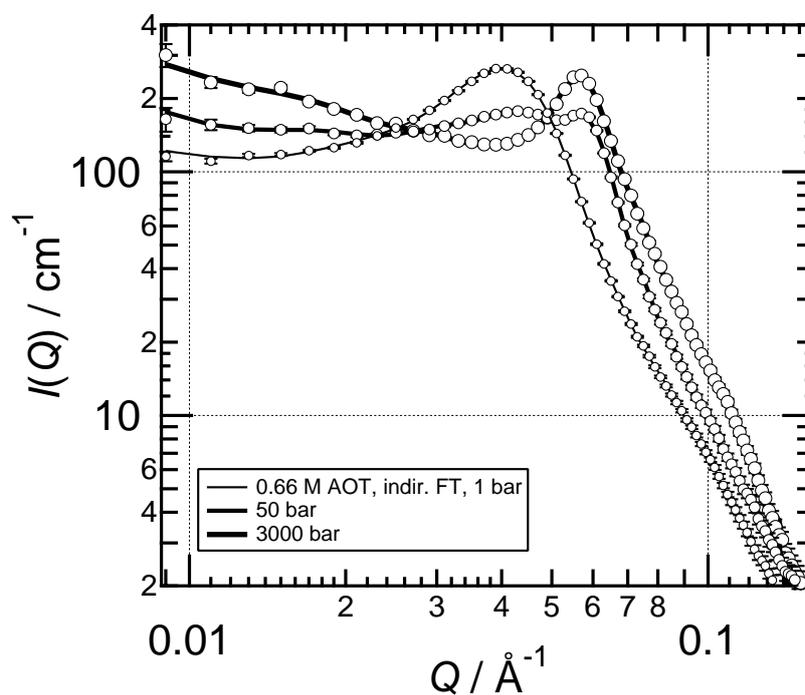


Abb. 4.40: SANS-Daten von einer 0.66 M AOT-Mikroemulsion mit $w_0 = 46$ und $25\text{ }^\circ\text{C}$ bei verschiedenen Dr\u00fccken. Ab 50 bar beginnt das Koexistenzgebiet mit einer lamellaren Phase, die bis zu einem Enddruck von 3000 bar vorliegt.

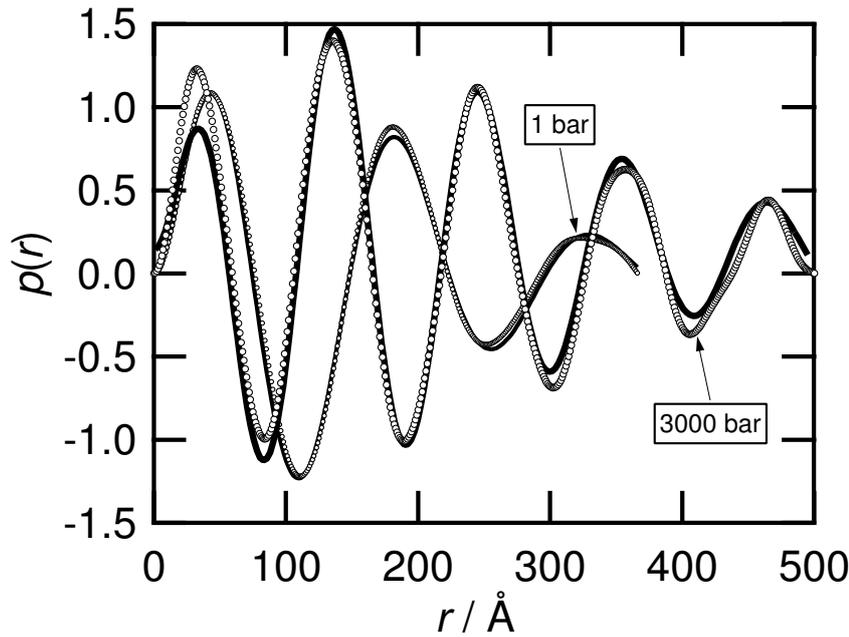


Abb. 4.41: Paarabstandsverteilungsfunktionen $p(r)$ von 0.66 M AOT mit $w_0 = 46$ bei verschiedenen Drücken. Neben der L_2 - und der L_3 -Phase ist eine Unterscheidung zwischen den genannten und der lamellaren Phase möglich. Durch die größere Fernordnung nimmt ξ_m zu und die Einhüllende der Korrelationsfunktion fällt weniger stark ab.

138 Å, $\xi_m = 45$ Å und $D_m = 0.49$ (SANS: $d_m = (120 \pm 7)$ Å, $\xi_m = (50 \pm 5)$ Å, $D_m = 0.40 \pm 0.04$). Ab 500 bar fallen diese Werte auf $d_m = 110$ Å, $\xi_m = 32$ Å bzw. steigen auf $D_m = 0.56$ und bleiben bis 2000 bar konstant. Ab 3000 bar wird analog zu den SANS-Messungen eine lamellare Phase beobachtet ($d_{lam} = 114 - 106$ Å), die im Gegensatz zu allen anderen untersuchten AOT-Mikroemulsionen ein anisotropes Streumuster zeigt, wie dies in Abb. 4.42 deutlich zu erkennen ist. Da dieser richtungsabhängige Streuteil reversible und reproduzierbar in y -Richtung erfolgt bzw. die Gitterkonstanten in x - und y -Richtung gleich sind, kann von einer orientierten Anordnung der lamellaren Phase innerhalb der Hochdruckzelle ausgegangen werden; die Druckerzeugung erfolgt ebenfalls in y -Richtung (vgl. Abb. 2.9).

Der Einbau von α -Chymotrypsin wirkt sich insofern auf die Struktur aus, als die Bildung der lamellaren Hochdruckphase zu kleineren Drücken verschoben wird. Domänenabstand d_m und Korrelationslänge ξ_m entsprechen schon bei 500 bar den Werten der Hochdruckphase (vgl. Tab. 4.8).

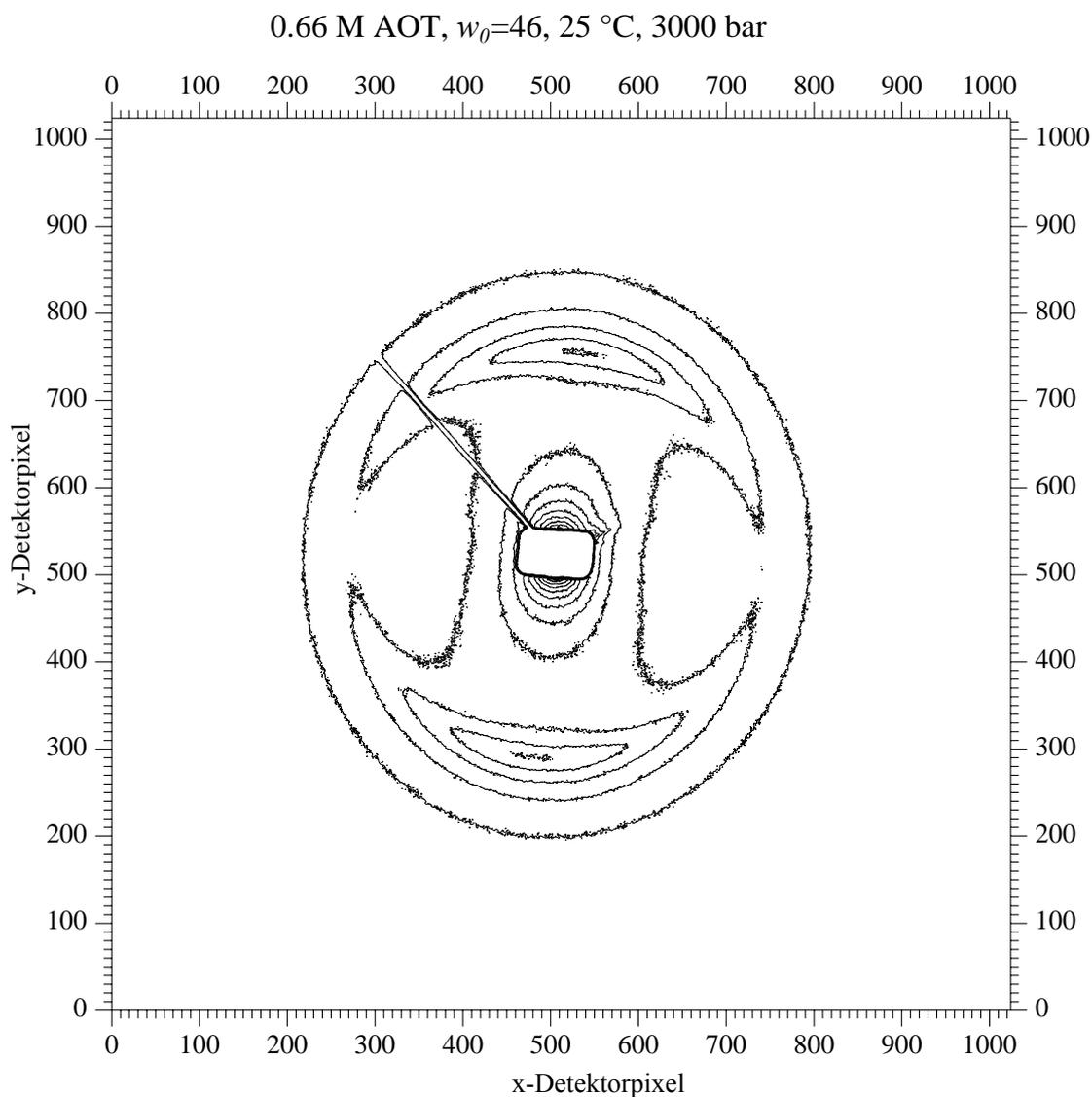


Abb. 4.42: Konturliniendarstellung der zweidimensionalen SAXS-Daten einer 0.66 M AOT-Mikroemulsion mit $w_0 = 46$ bei 3000 bar und 25 °C (MAR-CCD-Detektor). Deutlich zu erkennen ist der in y -Richtung erhöhte Streuanteil, der sich reproduzierbar und reversibel bei verschiedenen Experimenten mit vergleichbaren Proben ausbildet. Die separate Auswertung der anisotropen Streukurven durch Schnitte in x - und y -Richtung ergibt die gleichen Gitterkonstanten $d_l = 112 \text{ \AA}$, wie sie auch durch die radiale Mittelung erhalten werden.

4.5.2 1.0 M AOT-Mischungen mit unterschiedlicher Hydratation w_0 – C-Schnitt

Verglichen werden Mischungen mit den Hydratationsgraden $w_0 = 15.6$ und $w_0 = 20$. Der Einfluss durch den Einbau von α -Chymotrypsin und LADH soll ebenfalls untersucht werden. Unter den eingestellten Bedingungen liegt immer noch die inverse mizellare Phase L_2 vor, jedoch sind durch die hohe AOT-Konzentration die Mizellen noch dichter gepackt und der Korrelationspeak ist ausgeprägter als bei 0.66 M AOT-Mischungen.

1.0 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 15.6$ und LADH

Hochdruck-SAXS-Untersuchungen wurden an Proben dieser Zusammensetzung durchgeführt. Zusätzlich wurde auch in diesem Fall ein Enzym eingebaut; es handelt sich dabei um LADH (25 μ M, 10 mM TRIS-Puffer, pH = 8.5). Im betrachteten Druckbereich von 1–4000 bar treten in beiden Fällen die L_2 und die druckinduzierte lamellare Phasen auf. Die Korrelationspeaks lassen sich wiederum mit dem Teubner-Strey-Model auswerten. Wie aus Tab. 4.9 hervorgeht, unterscheiden sich die Ergebnisse mit und ohne Protein nur begrenzt. Die lamellare Phase bildet sich bei Anwesenheit des Proteins erst bei 3000 bar, also bei einem um 500 bar höheren Druck. Beide Phasen liegen bis 4000 bar nebeneinander vor; als Beispiel sind dazu die Röntgenkleinwinkelstreudaten in Abb. 4.43 dargestellt. Ein signifikanter Einfluss von LADH auf die mizellare bzw. lamellare Struktur kann somit nicht festgestellt werden.

Tab. 4.9: Parameter des Teubner-Strey-Modells einer 1 M AOT-Mikroemulsion mit $w_0 = 15.6$ in Abhängigkeit des Drucks p und der Inkorporation von LADH. Die Werte in den Klammern entsprechen den Gitterkonstanten der lamellaren Phase.

| p/bar | $d_m/\text{\AA}$ | $\xi_m/\text{\AA}$ | $d_m^{LADH}/\text{\AA}$ | $\xi_m^{LADH}/\text{\AA}$ |
|----------------|------------------|--------------------|-------------------------|---------------------------|
| 1 | 76 | 36 | 74 | 42 |
| 50 | 75 | 44 | 73 | 42 |
| 500 | 75 | 41 | 71 | 41 |
| 1000 | 72 | 40 | 68 | 39 |
| 1500 | 72 | 40 | 70 | 40 |
| 2000 | 71 | 39 | 69 | 40 |
| 2500 | 71 (53) | 38 | 69 | 39 |
| 3000 | 72 (54) | 31 | 69 (52) | 35 |
| 3500 | 71 (54) | 30 | 70 (52) | 33 |
| 4000 | 76 (55) | 30 | 71 (52) | 32 |

1.0 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 20$ und α -Chymotrypsin

Im Bereich von 1 bis 4000 bar werden bei den durchgeführten SAXS- und SANS-Messungen die L_2 - und die druckinduzierte lamellare Phase beobachtet. Bei 50 bar beträgt die Domänengröße im Falle der SAXS-Messungen 106 \AA (SANS: 77 \AA) und verringert sich auf 100 \AA

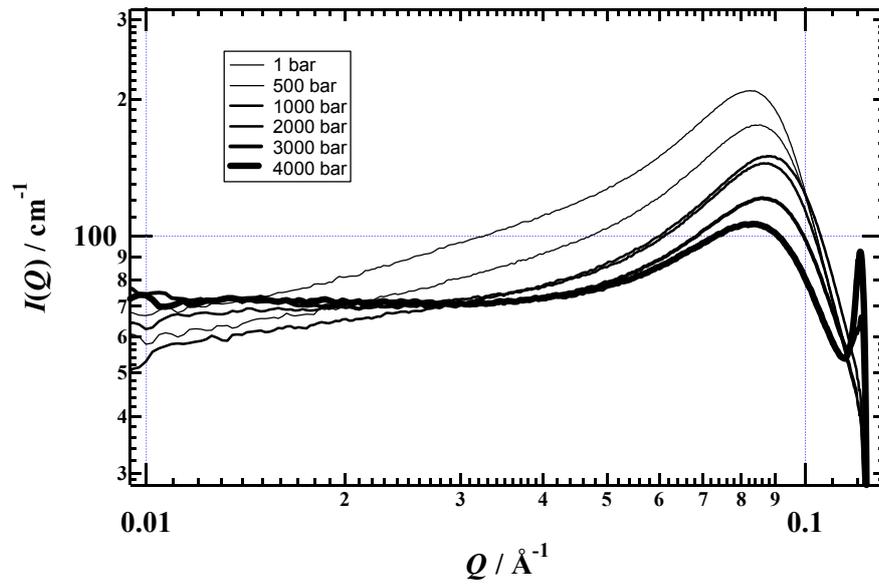


Abb. 4.43: SAXS-Daten von 1.0 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 15.6$ und 25 mM LADH (pH = 8.5, 10 mM TRIS) bei 25 °C und verschiedenen Drücken. Die Daten der Mischungen ohne LADH unterscheiden sich nur marginal.

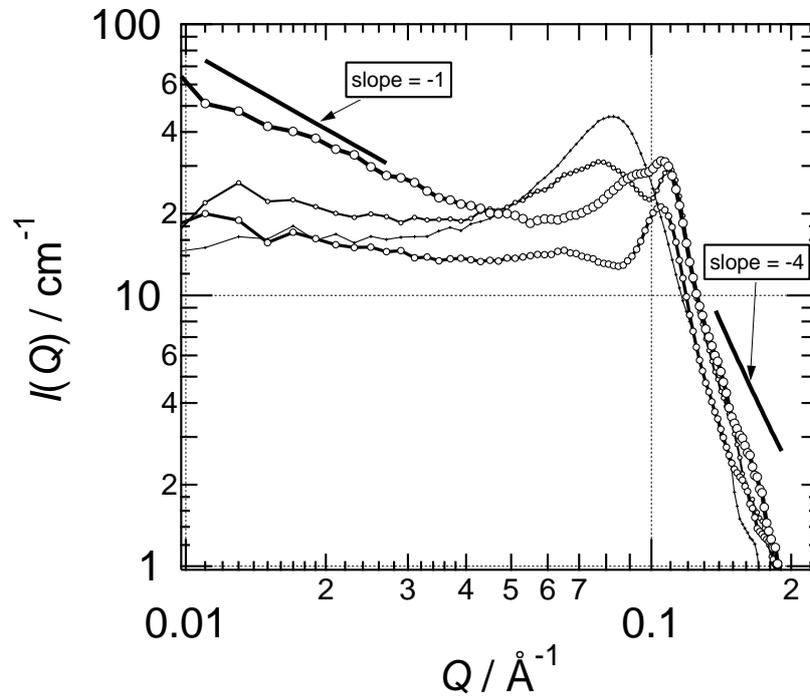


Abb. 4.44: SANS-Daten der 1.0 M AOT-Mischung mit $w_0 = 20$ als Funktion des Drucks p bei 25 °C. Der Druckbereich beträgt 50 bis 3500 bar.

Tab. 4.10: Parameter des Teubner-Strey-Modells einer 1.0 M AOT-Mikroemulsion mit $w_0 = 20$ in Abhängigkeit des Drucks p und der Inkorporation von CT. Die eingeklammerten Werte beziehen sich auf den Korrelationspeak (L_2) im Bereich koexistierender Phasen.

| p/bar | $d_m/\text{Å}$ | $\xi_m/\text{Å}$ | $d_m^{CT}/\text{Å}$ | $\xi_m^{CT}/\text{Å}$ |
|----------------|----------------|------------------|---------------------|-----------------------|
| 1 | 77 | 50 | | |
| 50 | 77 | 45 | 72 | 39 |
| 500 | 74 | 42 | 71 | 39 |
| 1000 | 73 | 41 | 70 | 38 |
| 1500 | 72 | 40 | 68 | 32 |
| 2000 | 57 (73) | 141 (28) | 64 | 96 |
| 2500 | 59 (76) | 89 (19) | 63 | 97 |
| 3000 | 60 | 57 | 62 | 99 |

(SANS: 73 Å) bei 1500 bar. Die Größendifferenz ist wiederum durch den unterschiedlichen Kontrast der verschiedenen Streusonden bedingt. Die lamellare Phase tritt ab 2000 bar auf und liegt parallel neben der mizellaren Phase bis zu einem Druck von 2500 bar vor. Eine weitere smektische Phase mit einer größeren Gitterkonstante tritt bei 3000 bar auf und ist von der bei niedrigeren Drücken auftretenden smektischen Phase überlagert. Vergleicht man das Phasenverhalten mit den Resultaten des niedrigeren Hydratationsgrades $w_0 = 15.6$ bei gleicher AOT-Konzentration, so beobachtet man ein analoges Auftreten des Bragg-Peaks der lamellaren Phase neben dem Korrelationspeak der L_2 -Phase. Die lamellare Phase tritt bei dem Hydratationsgrad $w_0 = 20$ jedoch schon bei 2000 bar auf. Bei 3000 bar wird dann wiederum die Zunahme der Kleinwinkelstreuung im Porod-Plot mit einem linearen Bereich der Steigung ca. -1 und ein weiteres breites Signal beobachtet, wie dies für die bei 0.66 M AOT-Mischung mit einem Hydratationsgrad $w_0 = 46$ auftretende Hochdruckphase typisch ist.

Der Einbau des Enzyms in die Mikroemulsion beeinflusst das Phasenverhalten bei isothermer Druckerhöhung. Ab 2000 bar wird nur noch eine smektische Phase beobachtet, deren Gitterkonstante mit der Hochdruckphase bei 3000 bar ohne CT übereinstimmt. Die Koexistenz der mizellaren neben der smektischen Phase wird unterdrückt. Der auftretende Bragg-Peak kann, wie in Abb. 4.35 dargestellt, durch mehrere Modelle reproduzierbar beschrieben werden. Der Einbau dieses Proteins führt also in diesem System zu einer bevorzugten Bildung einer schichtartigen Struktur mit großen Krümmungsradien.

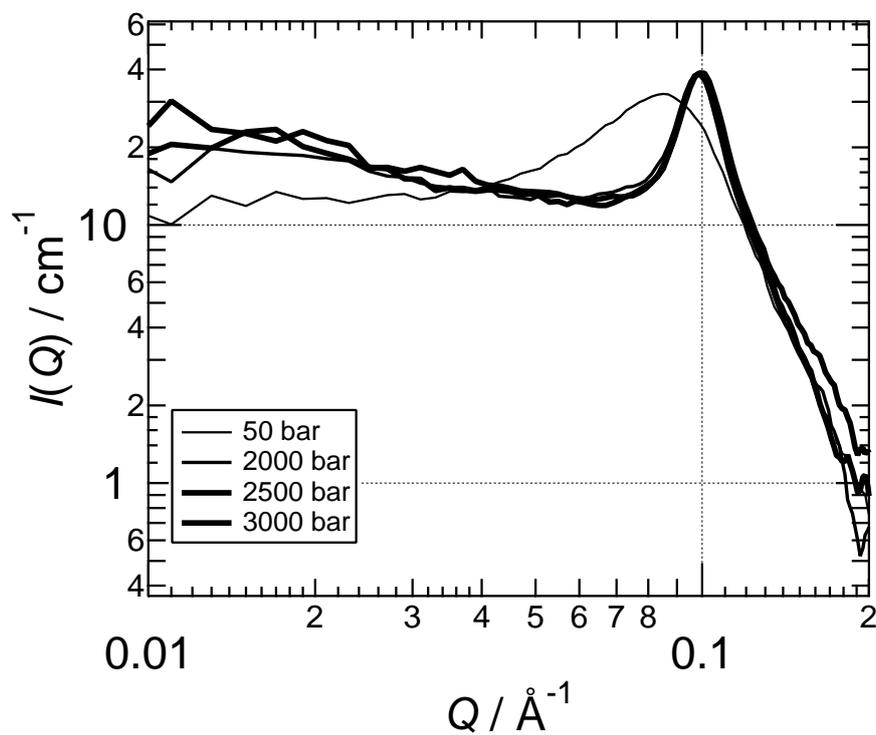


Abb. 4.45: SANS-Daten von 1.0 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 20$ und $40 \mu\text{M}$ CT bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Der dargestellte Druckbereich reicht von 50 bis 3000 bar.

4.5.3 AOT/*n*-Oktan/H₂O-Mischungen mit unterschiedlichen Gewichtsanteilen – D-Schnitt

Der D-Schnitt durch das ternäre Phasendiagramm wurde so gewählt, dass er parallel zur Strecke Wasser-*n*-Oktan verläuft und der Massenanteil von AOT konstant 45 % beträgt. Dadurch werden die über die Schnitte A–C nicht zugänglichen Phasen D, LC und F erfasst. Zu den Mischungen liegen SANS-Daten bei 1 bar und 25 °C vor, die in Abb. 4.46 dargestellt sind. Bis zu einem D₂O-Anteil von 30 % liegt die dichtgepackte L₂-Phase vor, die wiederum mit dem Teubner-Strey-Modell beschrieben werden kann. Die aus der Streudatenanpassung gewonnenen Parameter der Abstandskorrelationsfunktion können aus Tab. 4.11 entnommen werden. Bei einem Wasseranteil von 40 % liegt die hexagonale Phase (F) mit einer Gitterkonstanten von 60 Å vor. Die Intensität der Bragg-Reflexe der Ordnungen $\sqrt{3}$ (2. Peak) und 2 (3. Peak) sind sehr gering und durch Pfeile markiert. Bei 45 %-Wasseranteil wird das Dreiphasengebiet aus F, LC und D erreicht, so dass in den SANS-Daten die hexagonale und die smektische LC-Phase ($d_l = 48$ Å) nebeneinander beobachtet werden. Bei 50 Gew.-% liegt schließlich die lamellare Phase (D) vor, deren SANS-Daten sich wiederum mit der Streufunktion des Nallet-Roux-Modells anpassen lassen ($\xi_\rho = 39$ Å, $d_l = 40$ Å, $\xi_l = 120$ Å).

Tab. 4.11: Parameter des Teubner-Strey-Modells von Mischungen mit konstanten 45 Gew.-% AOT.

| D ₂ O-Anteil / Gew.-% | d_m / Å | ξ_m / Å | D_m |
|----------------------------------|-----------|-------------|-------|
| 10 | 52.2 | 33.0 | 0.252 |
| 20 | 58.7 | 47.7 | 0.196 |
| 30 | 59.7 | 55.1 | 0.173 |

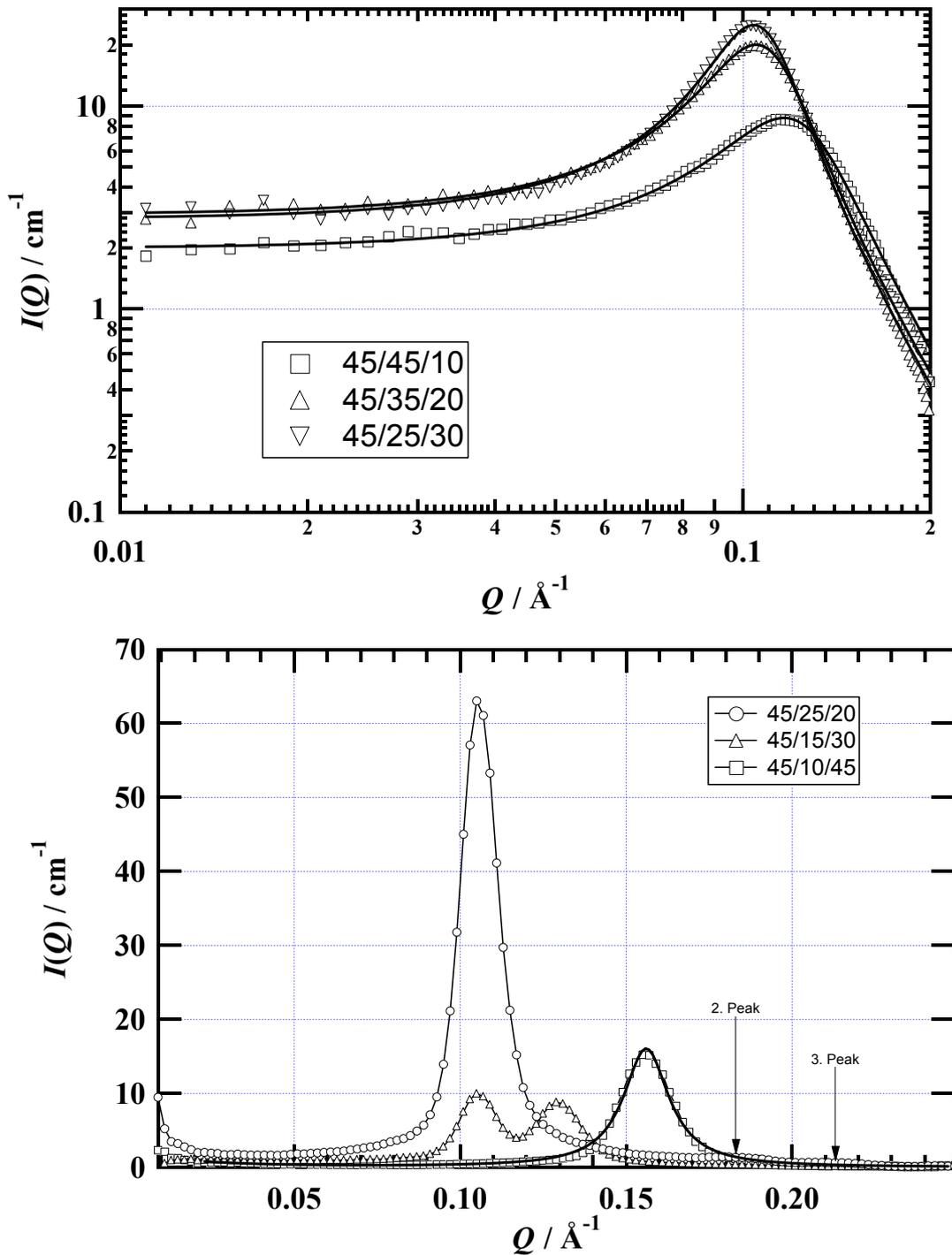


Abb. 4.46: SANS-Daten von AOT-Mikroemulsionen des D-Schnitts bei 1 bar und 25 °C. Angegeben sind die Massenverhältnisse der einzelnen Komponenten AOT/*n*-Oktan/D₂O. Im Bereich von 45/45/10 bis 45/25/30 (oben) liegt die L₂-Phase vor. Im Bereich von 45/25/20 bis 45/10/45 (unten) kann man sehr gut die hexagonale Phase F, den Koexistenzbereich von F- und LC-Phase bzw. die lamellare Phase D erkennen.

4.5.4 1.57 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 5$

Bei 1 bar liegt bei dieser Zusammensetzung die L_2 -Phase vor und es kann ein ausgeprägter Korrelationspeak in den SAXS-Daten beobachtet werden. Dieser lässt sich mit dem Teubner-Strey-Modell beschreiben. Exemplarisch ist für 50 bar die durch IFT erhaltene Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ und die Korrelationsfunktion des Teubner-Strey-Modells in Abb. 4.47 dargestellt. Wie auch bei der 0.1 M AOT-Lösung mit $w_0 = 5$ wird durch Druckerhöhung eine strukturelle Änderung aber kein Phasenübergang beobachtet (Abb. 4.48). Eine signifikante Änderung der Abstandsparameter wird nur bei 500 bar beobachtet, d.h. bei 1 bis 50 bar ist die Domänengröße $d_m = 38 \text{ \AA}$ und die Korrelationslänge $\xi_m = 19 \text{ \AA}$, ab 500 bar erhöht sich d_m auf 41 \AA und ξ_m auf 26 \AA und bleibt bis 4000 bar innerhalb des Fehlers konstant. Der Unordnungsparameter D_m verändert sich nur gering und beträgt 0.33 bei 50 bar bzw. 0.26 bei 4000 bar.

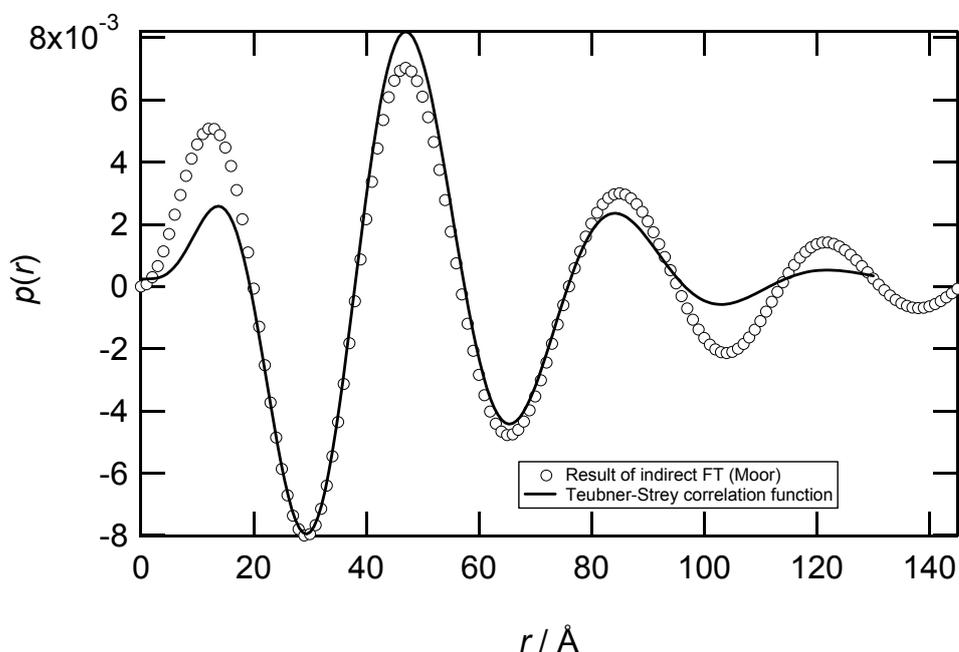


Abb. 4.47: Anpassung der Korrelationsfunktion $\tilde{\gamma}(r)$ an die durch IFT (Moore-Methode) erhaltene Paarabstandsverteilung $p(r)$ einer 1.57 M AOT-Mikroemulsion mit $w_0 = 5$ bei 50 bar und 25 °C.

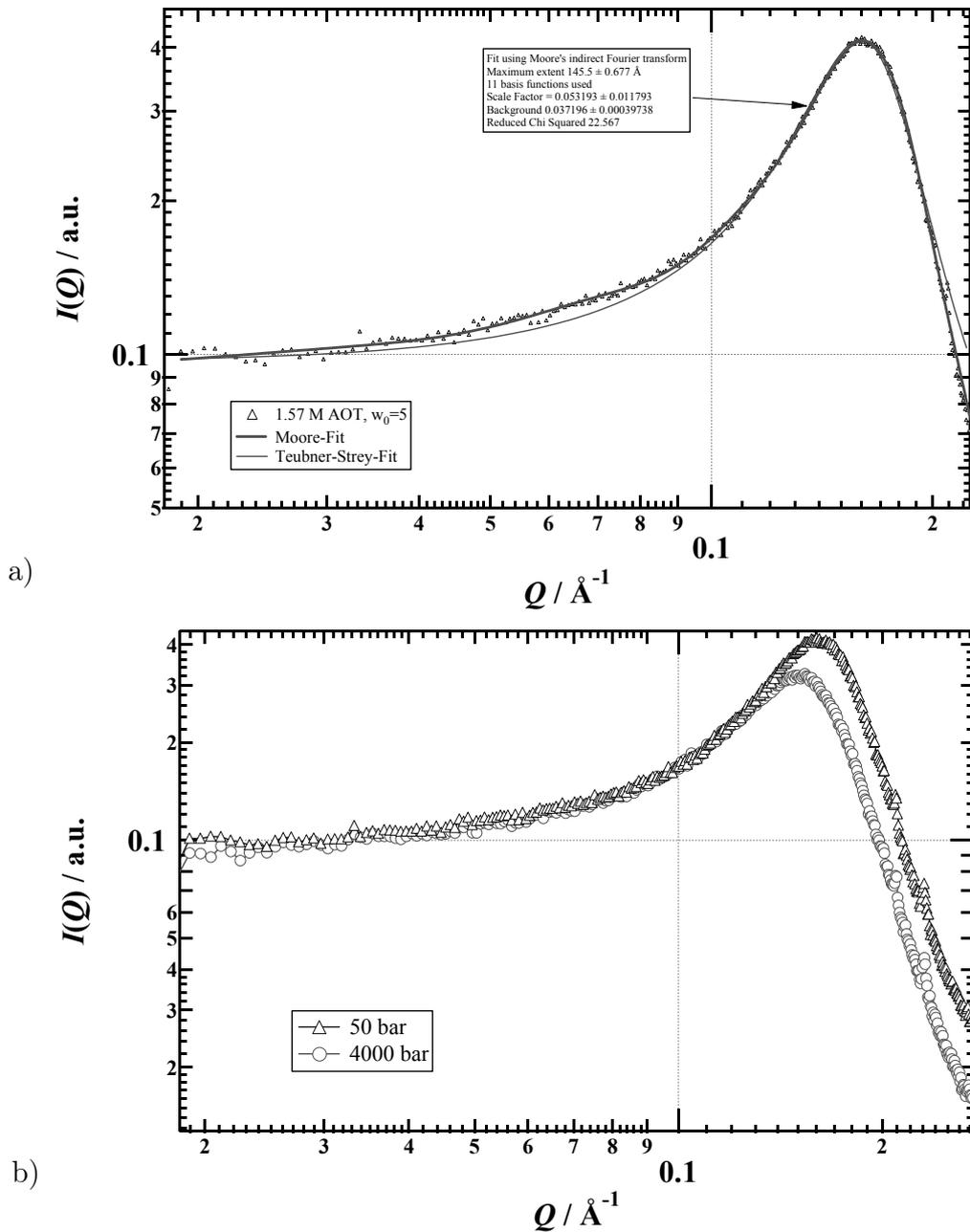


Abb. 4.48: Röntgenkleinwinkelstreuendaten von 1.57 M AOT-Mikroemulsionen mit $w_0 = 5$ bei 25 °C und 50 bar (a,b) und 4000 bar (b). Die Streudaten lassen sich in beiden Fällen mit der Streufunktion des Teubner-Strey-Modells anpassen. Weiterhin lässt sich durch indirekte Fourier-Transformation IFT (Moore-Methode) über die Paarabstandsverteilungsfunktion $p(r)$ die Korrelationsfunktion des Teubner-Strey-Modells extrahieren.

4.5.5 1.57 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 15.6$ und LADH

Durch die Erhöhung des Wassergehaltes auf $w_0 = 15.6$ verändert sich das Phasenverhalten unter erhöhten Drücken grundlegend. Ausgehend von der L_2 -Phase ($d_m = 66 \text{ \AA}$, $\xi_m = 22 \text{ \AA}$) bei 1 bar erfolgt bei 1500 bar die Bildung einer lamellaren Phase (Abb. 4.49) mit einer Gitterkonstanten $d_{\text{lam}} = 50 \text{ \AA}$. Bei dieser hohen AOT-Konzentration ist die lamellare Phase sehr gut ausgeprägt, so dass in Abb. 4.49 ein Bragg-Peak 2. Ordnung erkennbar wird. Mit Hilfe des Teubner-Strey- und Nallet-Roux-Modells lassen sich strukturelle Parameter der entsprechenden Phasen aus den Röntgenkleinwinkelstreudaten ermitteln. Wie aber schon bei den Systemen 0.66 M AOT mit $w_0 = 46$ und 1.0 M AOT mit $w_0 = 20$ nimmt mit dem Druck der Anteil der Kleinwinkelstreuung ($Q < 0.05 \text{ \AA}^{-1}$) zu und bei 4000 bar kann neben dem Bragg-Peak eine zusätzliche Schulter bei $Q \approx 0.09 \text{ \AA}^{-1}$ ($d_l = 70 \text{ \AA}$) und die Bildung der Hochdruckphase beobachtet werden.

Neben der Charakterisierung der unterschiedlichen barotropen Phasen wird der Einfluss des Enzyms LADH auf dieses System in die Untersuchung einbezogen. Auch hier zeigt sich, wie beim System LADH in 1.0 M AOT mit $w_0 = 15.6$, kein signifikanter Einfluss auf die strukturellen Parameter der beobachteten Phasen. Zur besseren Übersicht sind die Abstands- und Längenparameter d_m , ξ_m , d_l und ξ_l in Abb. 4.50 als Funktion des Drucks aufgetragen. Auffällig ist in diesem Zusammenhang die stetige Abnahme der Korrelationslängen ab 1500 bar, während die Gitterkonstante d sich sprunghaft bei 2000 bar verändert und die Koexistenz von mizellarer und lamellarer Phase nur bei 2000 bar auftritt. Die Korrelationslänge hängt stark von der Kompressibilität der Membran und somit vom scheinbaren Volumen der AOT-Moleküle ab, deren Packung und Form sich durch den Phasenübergang zu einer Phase mit kleinerer Krümmung stark verändert (vgl. 4.4). Die abnehmende Korrelationslänge ξ_l deutet ebenfalls daraufhin, dass die Ordnung innerhalb der lamellaren Packung abnimmt und mit der Bildung einer bikontinuierlichen Phase oberhalb von 4000 bar zu rechnen ist.

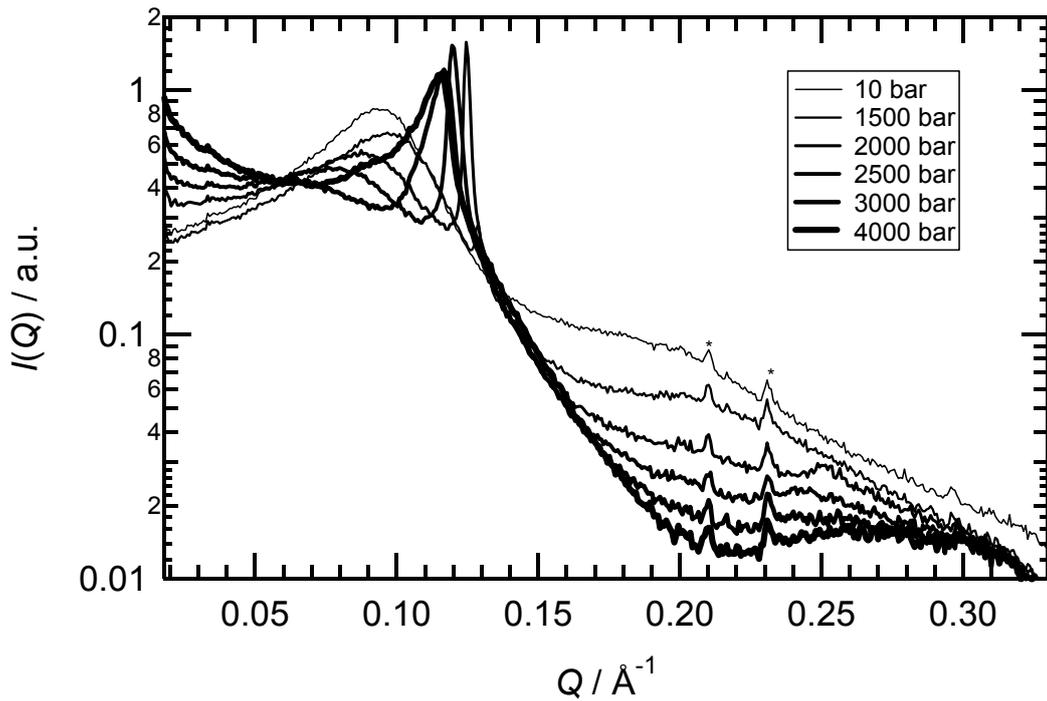


Abb. 4.49: Röntgenkleinwinkelstreudaten von 1.57 M AOT-Mikroemulsionen mit $w_0 = 15$ bei 25 °C und Drücken von 10 bis 4000 bar. Die mit einem * markierten Peaks sind Artefakte des Detektors.

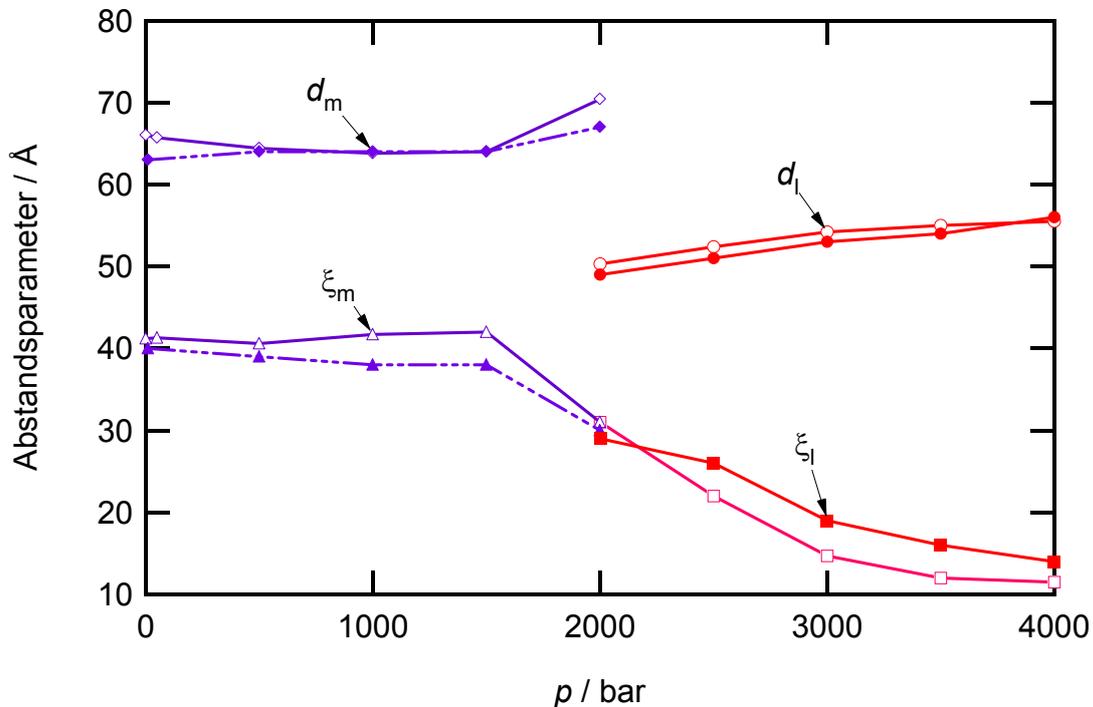


Abb. 4.50: Abhängigkeit der Abstands- und Längenparameter d_m , ξ_m (Teubner-Strey-Modell), d_l und ξ_l (Nallet-Roux-Modell) vom Druck. Die offenen Symbole (\circ) repräsentieren die Resultate der Mischungen ohne LADH, die geschlossenen Symbole (\bullet) entsprechend mit eingebautem LADH.

4.5.6 1.7 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 23$

In Übereinstimmung mit dem Phasendiagramm liegt bei kleinen Drücken von 1 bis 50 bar die L₂-Phase vor ($d_m = 72 \text{ \AA}$, $\xi_m = 67 \text{ \AA}$, $D_m = 0.17$). Bei 500 bar wird ein zusätzlicher Peak bei $d_{\text{lam}} = 57 \text{ \AA}$ beobachtet, der sich einer koexistierenden lamellaren Phase zuordnen lässt. Im Bereich von 1000 bis 3000 bar liegt diese als einzige Phase vor. Bei 3500 bar kann eine weitere lamellare Struktur mit $d_{\text{lam}} = 54 \text{ \AA}$ eindeutig unterschieden werden und ab 4000 bar erfolgt der Übergang zu einer weiteren Hochdruckphase mit einer koexistierenden lamellaren Phase. Die lamellare Phase wird ab 4500 bar nicht mehr beobachtet und es lassen sich die Domänengröße d_m und die Korrelationslänge ξ_m durch IFT und Anpassung von $\tilde{\gamma}(r)$ an die Paarabstandsverteilung $p(r)$ ermitteln. Im Vergleich zu L₂-Phase nimmt bei der Hochdruckphase d_m auf 83 \AA zu, während sich ξ_m auf 35 \AA verringert. Der Unordnungsparameter D_m beträgt somit 0.4. Wie man in Abb. 4.51 erkennen kann, liegt bei den Streukurven ab 4500 bar der typische Verlauf der L₃-Phase vor.

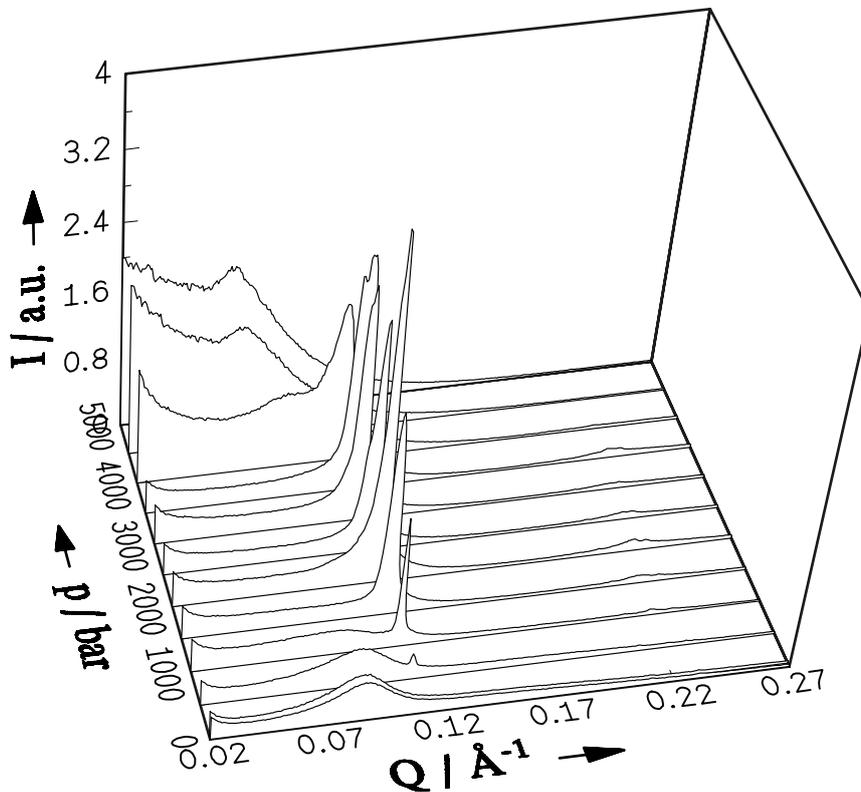


Abb. 4.51: SAXS-Diffraktogramme einer 1.7 M AOT-Lösung mit $w_0 = 23$ als Funktion des Drucks. Erkennbar sind mit zunehmendem Druck die Phasenübergänge von der L₂-Phase über die lamellare in die L₃-Phase.

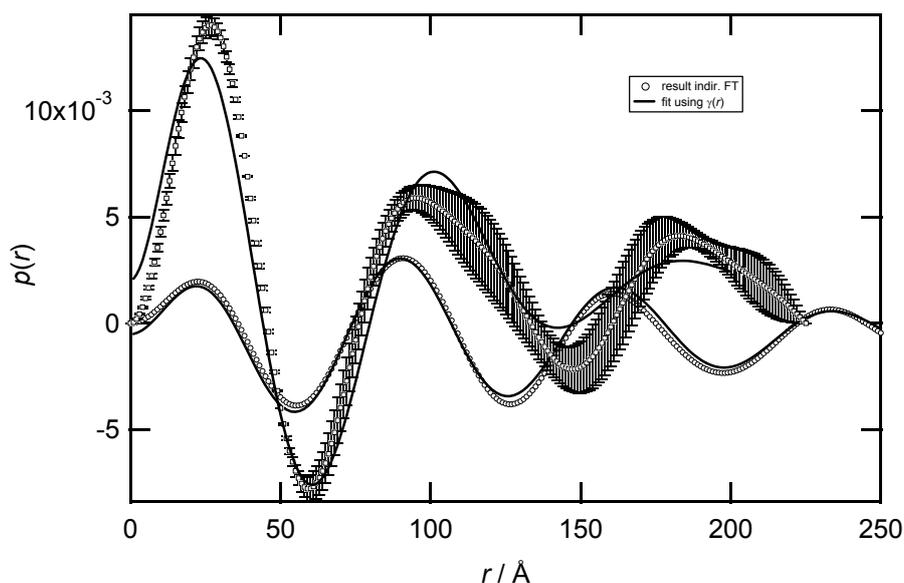


Abb. 4.52: Vergleichende Darstellung der Paarabstandsverteilung $p(r)$ der L_2 - (1 bar, \circ) und L_3 -Phase (4500 bar, \square) von einer 1.7 M AOT-Mikroemulsion mit $w_0 = 23$. Eine Beschreibung der gemessenen Daten mit der Korrelationsfunktion $\tilde{\gamma}(r)$ gelingt hier im Rahmen des Fehlers über einen größeren Längenbereich als durch direktes Anpassen der Streufunktion $I(Q)$.

4.5.7 1.97 M AOT-Mischungen mit $w_0 = 5.2$

Analog zu den Ergebnissen der 1.7 M AOT-Mikroemulsionen mit einem Wasseranteil $w_0 = 5$ wird nur ein geringer Druckeinfluss beobachtet. Bei 1 bar liegt die L_2 -Phase mit einer Domänengröße d_m von 46 Å und einer Korrelationslänge ξ_m von 31 Å vor, der Unordnungsparameter D_m beträgt somit 0.23. Durch Erhöhung des Drucks auf 2500 bar sind nur geringe Auswirkungen auf die Parameter der Korrelationsfunktion erkennbar ($d_m = 44$ Å, $\xi_m = 32$ Å, $D_m = 0.22$).

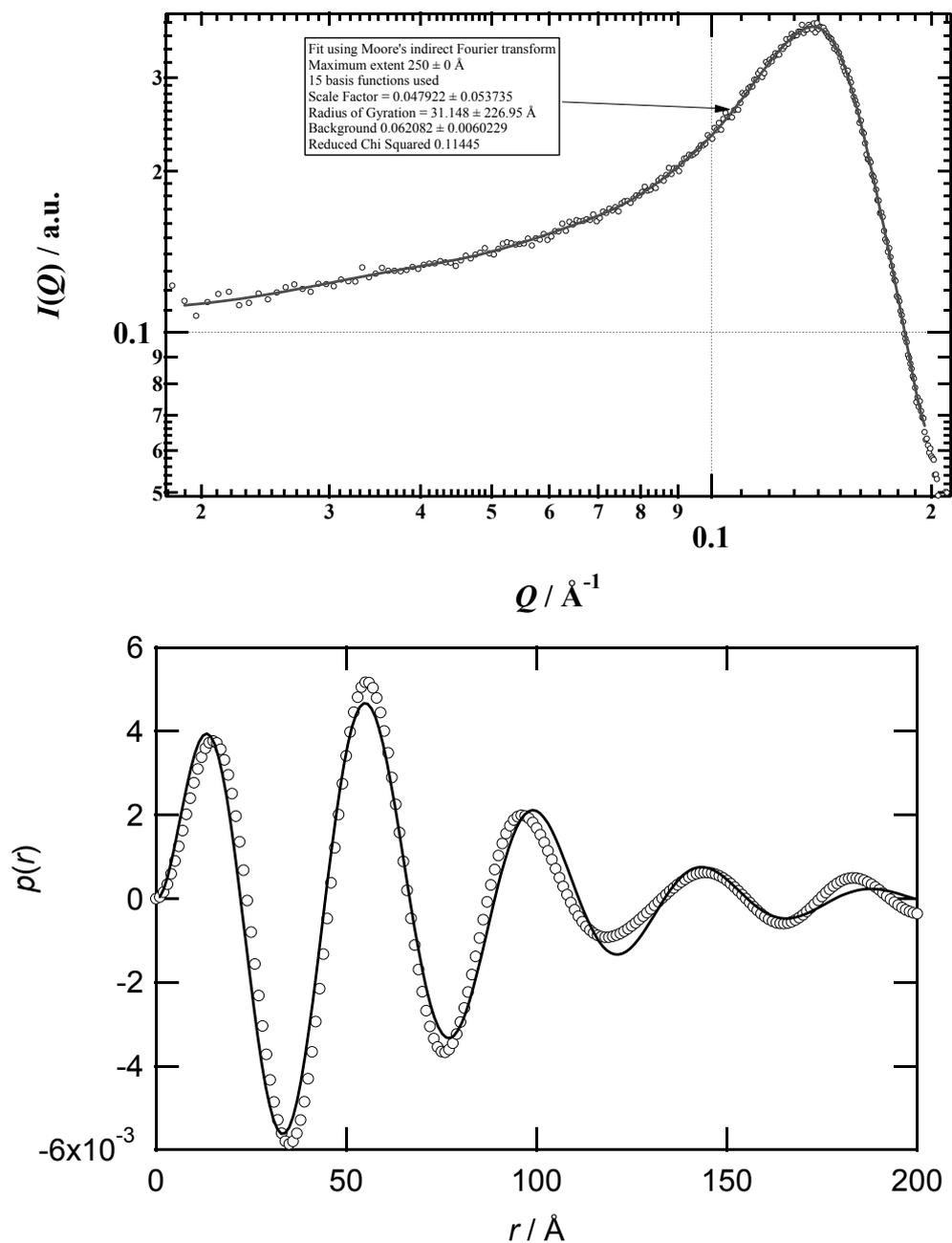


Abb. 4.53: Dargestellt sind die Streudaten und die durch indirekte Fourier-Transformation erhaltene Paarabstandsverteilung $p(r)$ einer 1.97 M AOT-Mischung mit einem Wasser-AOT-Verhältnis von $w_0 = 5.2$ bei einem Druck von 2500 bar.

4.6 Zusammenfassung

Sowohl die Hochdruck-SAXS-Studien und die von Klyachko *et al.* durchgeführten enzymkinetischen Hochdruckexperimente zeigen eine deutliche Stabilitätszunahme der verwendeten Proteine durch die Inkorporation in eine Mikroemulsion; z.B. dissoziiert das Protein LADH in Lösung schon bei 1000 bar, ist jedoch innerhalb einer Mikroemulsion noch bei weitaus höheren Drücken bis 2000 bar aktiv.

Durch Neutronenkleinwinkelstreuung konnte gezeigt werden, dass die Größe der Wasserkern in den Mizellen und die Breite der Größenverteilung vom Hydratationsgrad w_0 abhängig ist. Durch analoge Röntgenkleinwinkelstreuexperimente lässt sich die gesamte Mizellgröße und somit die Schichtdicke der hydratisierten AOT-Moleküle bestimmen. Ausgehend davon lässt sich der Einfluss der Inkorporation von Proteinen in frei verteilte Mizellen studieren. Umgekehrt ist die Größe und Form der Mizellen bzw. der Wasserkavitäten innerhalb der Mizellen entscheidend für die Aktivität und Stabilität eines Enzyms. Ein Aktivitätsoptimum wird immer dann erreicht, wenn Wasserkern und Protein gleich groß sind. Daraus folgt wiederum, dass sowohl die Wechselwirkungen zwischen Membran und Protein als auch ein gewisser Wasseranteil für ein optimales Funktionieren des Enzyms innerhalb dieses Modellsystems entscheidend sind. Weiterhin zeigt sich, dass je nach Größe und Ladung des Proteins auch die mizellare Struktur beeinflusst wird.

Die Anwendung hydrostatischen Drucks auf ein System frei verteilter Mizellen, wie dies bei 0.1 M AOT-Lösungen mit unterschiedlichen w_0 der Fall ist, bewirkt eine Elongation zu stäbchenförmigen Mizellen. Mit zunehmenden Hydratationsgrad wird die Bildung einer L_3 -ähnlichen Phase beobachtet. Durch die Vergrößerung der Mizellen passen zu große Enzyme besser in diese hinein, so dass durch Druckerhöhung auch bei kleineren Hydratationsgraden eine erhebliche Zunahme der Enzymaktivität beobachtet wird.

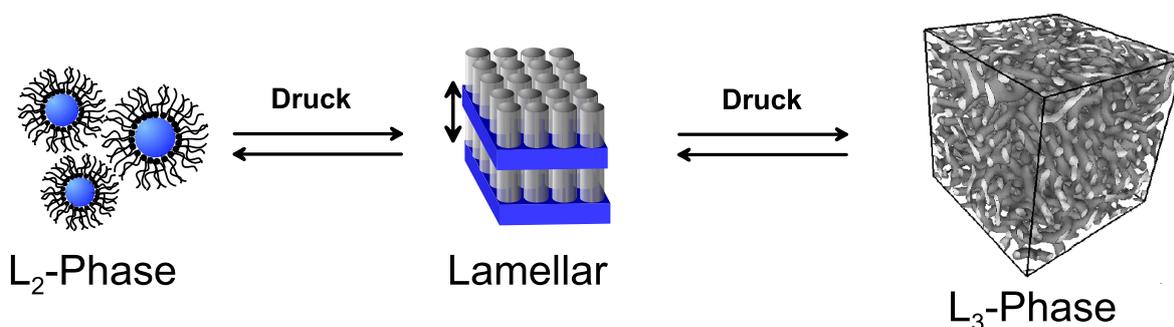


Abb. 4.54: Schema der druckabhängigen Phasengleichgewichte konzentrierter AOT-Mischungen ($c(\text{AOT}) > 0.1 \text{ M}$ bei $w_0 = 5 - 25$).

Mit der Erhöhung der AOT-Konzentration werden weitere Hochdruckphasen beobachtet. Darunter befinden sich ebenfalls neue Phasen, die im Phasendiagramm bei 1 bar und 25 °C nicht beobachtet werden. Eine Charakterisierung kann mit den von Teubner und Strey bzw. Nallet und Roux vorgeschlagenen Modellen anhand der Kleinwinkelstreudaten vorgenommen werden. Es werden dabei zwei unterschiedliche Methoden vorgeschlagen: Die direkte Anpassung einer Streufunktion an die Messdaten oder die Anpassung der

entsprechenden Korrelationsfunktion an die Paarabstandsverteilungsfunktion, also dem Resultat der indirekten Fourier-Transformation (IFT).

Mit zunehmender AOT-Konzentration und zunehmendem Hydratationsgrad werden durch Erhöhung des Drucks die L_2 -Phase und unterschiedliche druckinduzierte lamellare Hochdruckphasen gefunden. Ab einer Konzentration von 1.7 M AOT in *n*-Oktan mit einem Hydrationsgrad $w_0 = 23$ ist bei 4500 bar jedoch die L_3 -Phase stabiler als eine lamellare Anordnung der Lipidmembranen. Vergleicht man alle untersuchten Mischungen mit höherer AOT-Konzentration und somit wechselwirkenden Mizellen, so lässt sich das vorliegen der in Abb. 4.54 dargestellten Gleichgewichte der verschiedenen Phasen annehmen.

Der Einfluss von Enzymen auf das Phasenverhalten bzw. die Strukturparameter einer Phase in konzentrierteren AOT-Mischungen zeigt Parallelen zu frei verteilten Mizellen. α -Chymotrypsin und LADH wirken sich abhängig vom Hydratationsgrad signifikant auf die Gitterkonstanten, Domänengrößen und Korrelationslängen aus, so dass sogar Phasen unterdrückt und ein Koexistenzbereich zweier Phasen nicht beobachtet wird.

5 Zusammenfassung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung von Proteinen und Protein-Mikroemulsions-Komplexen in Abhängigkeit des Drucks, der Temperatur und Zusammensetzung. Als Methoden werden die Kleinwinkelstreuung und in Kooperation mit Prof. Dr. N. L. Klyachko auch die UV/VIS-Spektroskopie unter Verwendung spezieller Hochdruckzellen eingesetzt, so dass neben strukturellen auch enzymkinetische Informationen gesammelt werden konnten. Dabei werden neben der statischen Kleinwinkelstreuung auch zeitaufgelösten Experimente in Kombination mit der Drucksprungtechnik durchgeführt, wozu ein geeigneter Aufbau mit modifizierten Hochdruckventilen und einem für den Bereich von 1 bis 7000 bar ausgelegten Druckspeicher konstruiert und erfolgreich eingesetzt wurde. Somit kann zum ersten Mal die Geschwindigkeit der Faltung und Entfaltung von Proteinen, in diesem Fall Snase, mit der Röntgenkleinwinkelstreuung und einer Zeitauflösung < 1 s verfolgt werden. Dabei wird ein Enddruck bis 4000 bar und eine Drucksprungamplitude von bis zu 3500 bar erreicht. Neben der Bestimmung von kinetischen und thermodynamischen Größen, wie die Geschwindigkeitskonstanten k , Aktivierungsvolumina ΔV^\ddagger der Ent- und Rückfaltung sowie der freien Energie des Entfaltungsprozesses ΔG_u° , sind durch moderne Strukturbestimmungsmethoden aus SAXS- und SANS-Daten auch Informationen über den Aufbau der Peptidkette, sowie die Form und Größe des Proteins zugänglich. Durch den Vergleich von Kristall- und NMR-Strukturen des nativen Proteins mit den Strukturmodellen aus den SAXS-Daten und der über die FTIR-Spektroskopie bekannten Verteilung von Sekundärstrukturelementen lassen sich zudem Aussagen über mögliche Faltungs-/ Entfaltungswege treffen. Die Struktur der nativen und denaturierten Spezies konnte dadurch für die Proteine Snase, trp-Repressor und Alkoholdehydrogenase charakterisiert und der Einfluss des Drucks studiert werden.

Neben der Struktur und Dynamik von reinen Proteinen wird mit Hilfe der Hochdruck-Kleinwinkelstreuung und -UV/VIS-Spektroskopie die Wechselwirkung von Proteinen und einer eingrenzenden Amphiphilmatrix, in diesem Fall AOT/ n -Oktan/Wasser-Mikroemulsionen, untersucht. Dazu werden die Dimensionen der in den Mikroemulsionen bei verschiedenen Drücken und Zusammensetzungen vorliegenden mesoskopischen Strukturen ermittelt. Der Einbau von Proteinen verändert die Abstände und das Phasenverhalten der Strukturen abhängig von der Größe und Oberflächenladung des Proteins. Umgekehrt kann der stabilisierende oder destabilisierende Einfluss der Amphiphilmembranen auf die Enzymaktivität und deren Abhängigkeit von der Größe und Form der Amphiphilmatrix bei verschiedenen Drücken studiert werden. Im Falle des hier behandelten Modellsystems AOT/ n -Oktan/Wasser in Verbindung mit den Enzymen α -Chymotrypsin, Alkoholdehydrogenase und Peroxidase wird ein starker stabilisierender Einfluss der Mikroemulsion auf die Proteine beobachtet. Optimale Bedingungen für das Funktionieren der Enzyme liegen in Mizellen vor, deren Dimensionen mit denen des Proteins übereinstimmen. Reaktionen, bei denen durch die negative Volumenänderung der Reaktion $\Delta V_{\text{reac}}^0 < 0$ unter Druck

schon in Pufferlösungen eine Aktivitätszunahme beobachtet wird, können in Mikroemulsionen nochmals beschleunigt werden. In der L_2 -Phase verändert sich durch die Erhöhung des Drucks die Form der Mizellen und die Größe nimmt zu. Es bilden sich größere zigarrenförmige Aggregate, in die vormals zu große Proteine besser hineinpassen, was die Stabilisierung durch die Amphiphilmatrix erklärt. Ein Besonderheit stellt in diesem Zusammenhang das Verhalten der Alkoholdehydrogenase dar. In Pufferlösung denaturiert das Enzym schon bei 1000 bar, wohingegen es in einer Mikroemulsion bis zu einem Druck von 2000 bar noch immer aktiv ist.

Außer den Strukturänderungen der Mizellen wurden in Mikroemulsionen bei höheren Wasser- und AOT-Konzentrationen Phasenübergänge weiterer druckinduzierter lamellarer und bikontinuierlicher Phasen indentifiziert und deren Strukturparameter durch die Kombination von indirekter Fourier-Transformation mit dem Teubner-Strey- bzw. Nallet-Roux-Modell bestimmt. Es zeigt sich, dass die mit ansteigendem Druck auftretenden Phasen mit der Minimierung der Krümmungsenergie einhergehen. Der Wasseranteil spielt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle, da erst ab einem Verhältnis von 15 Wassermolekülen auf 1 AOT-Molekül ein polymorphes Phasenverhalten beobachtet wird. Durch Hochdruck-Kleinwinkelstreuexperimente wurden damit auch wichtige Informationen über das barotrope und lyotrope Phasenverhalten des ternären Systems AOT/*n*-Oktan/Wasser erhalten. Es stellt dies die erste detaillierte Studie des Hochdruckphasenverhaltens einer Mikroemulsion dar

Abschließend sei bemerkt, dass die vorgestellte Drucksprungtechnik in Kombination mit der Kleinwinkelstreuung, modernen Synchrotronstrahlungsquellen und Auswertungsverfahren eine einzigartige Methode ist, mit der sich die Struktur und Geschwindigkeit der druckinduzierten Faltung und Entfaltung von Proteinen studieren lässt. In dem betrachteten Druckbereich und der erzielten Zeitauflösung ist dies bislang weder durch NMR- noch durch XRD-Experimente als komplementäre Methoden möglich. Ausdehnen lassen sich die Drucksprungexperimente auf zahlreiche andere Proteine.

Literaturverzeichnis

- [1] C. Levinthal, *J. Chim. Phys.*, **65**, 44 (1968).
- [2] B. A. Shoemaker, J. Wang, G. Wolynes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 777 (1997).
- [3] H. S. Chan, K. A. Dill, *Proteins*, **30**, 2 (1998).
- [4] C. M. Dobson, A. Šali, M. Karplus, *Angew. Chem.*, **68**, 908 (1998).
- [5] G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan, *Adv. Protein Chem*, **23**, 283 (1968).
- [6] P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 251 (1978).
- [7] B. A. Shirley (Hg.), Protein Stability and Folding: Theory and Practice, Bd. 40 von *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., Totowa (1995).
- [8] D. Voet, J. G. Voet, Biochemistry, zweite Aufl., Wiley, NY (1995).
- [9] H. Seemann, Thermodynamische Untersuchungen zum Phasenverhalten von Phospholipid/Cholesterol-Mischungen und Proteinen in Lösung, Dissertation, Universität Dortmund (2000).
- [10] Z. Bryning, R. Cromer, Electrophoretic display utilizing phase separation of liquids (US. Pat. No. 543707), Techn. Ber., Zikon Corporation (1995).
- [11] D. Walsh, S. Mann, *Nature*, **377**, 320 (1995).
- [12] A. H. Maddy (Hg.), Biochemical Analysis of Membranes, Chapman and Hall, New York (1976).
- [13] B. I. Kurganov, in: Catalytic Facilitation in Organized Multienzyme Systems (Hg. G. R. Welsh), 241–270, Academic Press (1985).
- [14] V. Moses, in: Microenvironments and Metabolic Compartmentation (Hg. P. A. Srere, R. W. Estabrook), 169–185, Academic Press, New York (1978).
- [15] R. Winter, *Curr. Opin. Colloid & Interf. Sci.*, **6**, 303 (2001).
- [16] L. Addadi, S. Weiner, in: Biomineralization (Hg. S. Mann), 133–152, VCH, New York (1989).
- [17] S. Oliver, A. Kuperman, N. Coombs, A. Lough, G. A. Ozin, *Nature*, **378**, 47 (1995).

- [18] S. Mann, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 3953–3961 (1997).
- [19] C. Petit, A. Taleb, M. P. Pileni, *Adv. Mater.*, **10**, 295 (1998).
- [20] A. Taleb, C. Petit, M. P. Pileni, *J. Phys. Chem.*, **102**, 2214 (1998).
- [21] M. Li, H. Schnablegger, S. Mann, *Nature*, **402**, 393 (1999).
- [22] B. N. Brockhouse, in: *Inelastic Scattering of Neutrons in Solids and Liquids*, 113, IAEA, Vienna (1961).
- [23] M. Monkenbusch, in: *Neutronenpraktikum 1999 – Vorlesungen*, 11.1–12.16, IFF, FZ Jülich (1999).
- [24] H. B. Stuhmann, *Chem. Unserer Zeit*, **13**, 11 (1979).
- [25] S. M. King, in: *Modern Techniques for Polymer Characterisation* (Hg. R. A. Pethrick, J. V. Dawkins), 171–232, John Wiley & Sons (1999).
- [26] J. B. Hayter, J. Penfold, *Colloid Polymer Sci.*, **261**, 1022 (1983).
- [27] D. I. Svergun, L. A. Feigin, *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*, Plenum Press, New York, London (1987).
- [28] R. Winter, F. Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Studienbücher Chemie, erste Aufl., Teubner, Stuttgart (1998).
- [29] A. N. Tikhonov, V. Y. Arsenin, *Solution of Ill-Posed Problems*, Wiley, NY (1977).
- [30] D. I. Svergun, A. V. Semenyuk, L. A. Feigin, *Acta. Cryst.*, **A44**, 244 (1988).
- [31] D. I. Svergun, *J. Appl. Cryst.*, **25**, 495 (1992).
- [32] P. B. Moore, *J. Appl. Cryst.*, **13**, 168 (1980).
- [33] O. Glatter, *J. Appl. Cryst.*, **26**, 512 (1993).
- [34] O. Glatter, *J. Appl. Cryst.*, **30**, 431 (1997).
- [35] D. Svergun, C. Barberato, M. H. J. Koch, *J. Appl. Cryst.*, **28**, 768 (1995).
- [36] D. I. Svergun, *Biophys. J.*, **76**, 2879 (1999).
- [37] A. J. C. Wilson (Hg.), *Tables for Crystallography*, Bd. C, erste Aufl., Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, Boston, London (1995).
- [38] D. I. Svergun, M. V. Petoukhov, M. H. J. Koch, *Biophys. J.*, **80**, 2946 (2001).
- [39] P. V. Konarev, M. V. Petoukhov, D. I. Svergun, *J. Appl. Cryst.*, **34**, 527 (2001).
- [40] O. Kratky, *Z. Elektrochem.*, **58**, 49 (1954).

- [41] O. Kratky, *Z. Elektrochem.*, **62**, 66 (1958).
- [42] O. Glatter, *J. Appl. Cryst.*, **12**, 166 (1979).
- [43] R. Malessa, Statische und zeitaufgelöste Röntgen- und Neutronen-Kleinwinkelstreuung zur Untersuchung wäßriger Biopolymerlösungen, Dissertation, Universität Dortmund (1998).
- [44] R. C. Weast (Hg.), Handbook of Chemistry and Physics, 65. Aufl., CRC Press, Boca Raton, Florida (1984–1985).
- [45] J. Woenckhaus, R. Köhling, R. Winter, P. Thiyagarajan, S. Finet, *Rev. Sci. Instrum.*, **71**, 3895 (2000).
- [46] A. Guinier, G. Fournet, Small-Angle Scattering of X-Rays, Wiley, New York (1955).
- [47] G. Panik, R. Malessa, R. Winter, G. Rapp, K. J. Frey, C. A. Royer, *J. Mol. Biol.*, **275**, 389 (1998).
- [48] C. Cusumano, H. Taniuchi, C. Anfinsen, *J. Biol. Chem.*, **243**, 4769 (1968).
- [49] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Research*, **28**, 235 (2000).
- [50] I. M. Chaiken, C. B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.*, **246**, 2285 (1971).
- [51] P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, **245**, 574 (1970).
- [52] P. Kraulis, *J. Appl. Cryst.*, **24**, 946 (1991).
- [53] G. Panick, G. J. A. Vidugiris, R. Malessa, G. Rapp, R. Winter, C. A. Royer, *Biochemistry*, **38**, 4157 (1999).
- [54] J. Woenckhaus, R. Köhling, P. Thiyagarajan, K. C. Littrell, S. Seifert, C. A. Royer, R. Winter, *Biophys. J.*, **80**, 1518 (2001).
- [55] C. Balny, P. Masson, K. Heremans, *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 3 (2002).
- [56] F. Meersmann, L. Smeller, K. Heremans, *Biophys. J.*, **82**, 2635 (2002).
- [57] S. A. Hawley, *Biochemistry*, **10**, 2436 (1971).
- [58] N. A. Clark, *J. Phys.*, **40**, 345 (1979).
- [59] L. Smeller, *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 11 (2002).
- [60] A. Joachimiak, R. Q. Marmorstein, R. W. Schevitz, W. Mandrecki, J. L. Fox, P. B. Sigler, *J. Biol. Chem.*, **262**, 4917 (1987).
- [61] C. Yanofsky, *J. Am. Med. Assoc.*, **218**, 1026 (1971).
- [62] G. Desai, G. Panik, M. Zein, R. Winter, C. A. Royer, *J. Mol. Biol.*, **288**, 461 (1999).

- [63] L. Stryer, Biochemie, völlig Neubearb. Aufl., Spektrum Verlag, Berlin, Heidelberg (1988).
- [64] N. L. Klyachko, A. V. Levashov, A. V. Kabanov, Y. L. Khmel'nitsky, K. Martinek, in: Kinetics and Catalysis in Microheterogeneous Systems (Hg. M. Gratzel, K. Kalyanasundaram), Bd. V.38 von *Surfactant Sci. Ser.*, 135–181, Marcel Dekker, NY, Basel (1991).
- [65] V. V. Mozhaev, K. Heremans, J. Frank, P. Masson, C. Balny, *TIBTECH*, **12**, 493 (1994).
- [66] C. Balny, F. Travers, T. Barman, P. Douzou, *Eur. Biophys. J.*, **14**, 375 (1987).
- [67] V. Mozhaev, N. Bec, C. Balny, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **34**, 191 (1994).
- [68] N. L. Klyachko, C. Balny, in: High Pressure Molecular Science (Hg. R. Winter, J. Jonas), 423–436, Kluwer, Netherlands (1990).
- [69] N. Klyachko, R. Köhling, J. Woenckhaus, A. Kazarov, S. Smirnov, A. Levashov, R. Winter, in: Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II (Hg. R. Winter), 235–239, Springer Verlag, Heidelberg (2003).
- [70] J. M. Seddon, *Biochim. Biophys. Acta*, **1031**, 1 (1990).
- [71] J. S. Huang, S. Millner, B. Farago, D. Richter, *Phys. Rev. Letter*, **59**, 2600 (1987).
- [72] B. Farago, D. Richter, J. S. Huang, in: Time Dependent Effects in Disordered Materials (Hg. R. Pynn, T. Riste), Plenum Press, New York (1987).
- [73] J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, zweite Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- [74] Z. Sun, R. Winter, in: Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II (Hg. R. Winter), 117–120, Springer Verlag, Heidelberg (2003).
- [75] J. Peyrelasse, C. Boned, *J. Phys. Chem*, **89**, 370 (1985).
- [76] J. J. Birktoft, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.*, **68**, 187 (1972).
- [77] B. Lewin, Molekularbiologie der Gene, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin (2002).
- [78] E. G. DelMar, C. Largman, J. W. Brodrick, M. C. Geokas, *Anal. Biochem.*, **99**, 316 (1979).
- [79] J. D. Shore, H. Gutfreund, *Biochemistry*, **9**, 4655 (1970).
- [80] H. A. Charlier, B. V. Plapp, *J. Biol. Chem*, **275**, 11569 (200).
- [81] R. Rary, N. Bec, J. Saldana, S. Nametkin, V. Mozhaev, N. Klyachko, A. Levashov, C. Balny, *FEBS Letters*, **364**, 98 (1995).

- [82] H. Li, H. Hallows, J. Punzi, K. Pankiewicz, K. Watanabe, B. Goldstein, *Biochemistry*, **33**, 11734 (1994).
- [83] P. Squire, M. Himmel, *Arch. Biochem. Biophys.*, **196**, 165 (1979).
- [84] R. Köhling, J. Woenckhaus, N. L. Klyachko, R. Winter, *Langmuir*, **18**, 8626 (2002).
- [85] K. Martinek, V. Levashov, N. Klyachko, S. Namyotkin, I. Berezin, *Eur. J. Biochem.*, **155**, 453 (1986).
- [86] M. Kotlarchyk, S. H. Chen, *J. Chem. Phys.*, **79**, 2461 (1983).
- [87] S. H. Chen, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **37**, 351 (1986).
- [88] M. Kotlarchyk, S. H. Chen, J. S. Huang, M. W. Kim, *Phys. Rev. A*, **29**, 2054 (1984).
- [89] C. G. Windsor, *J. Appl. Cryst.*, **21**, 582 (1988).
- [90] L. S. Onrstein, F. Zernike, *Proc. Ned. Akad. Sci.*, **17**, 793 (1914).
- [91] G. H. Findenegg, Statistische Thermodynamik, Nr. II in Grundzüge der Physikalischen Chemie, Steinkopff Verlag, Darmstadt (1985).
- [92] M. Teubner, R. Strey, *J. Chem. Phys.*, **5**, 3195 (1987).
- [93] D. I. Svergun, *J. Appl. Cryst.*, **24**, 485 (1991).
- [94] F. Nallet, D. Roux, S. T. Milner, *J. Phys. France*, **51**, 2333 (1990).
- [95] M. Nagao, H. Seto, *Physical Review E*, **59**, 3169 (1999).

Lebenslauf

Name: Rudolf Köhling
Geburtsdatum: 23. November 1972
Geburtsort: Münster

Schule

von 1979 bis 1983 Grundschule (Goethe-Schule, Bönen)
von 1983 bis 1989 Realschule (Realschule Bönen)
von 1989 bis 1992 Gymnasium (Ernst-Barlach-Gymnasium, Unna)
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife 1992-06-11

Studium

1993-10-01 Beginn des Studiums Chemie (Diplom) an der Universität Dortmund
1999-09-15 Abschluss als Dipl.-Chem.
1999-11-01 bis
2003-07-30 Promotion im Fachbereich Chemie der Universität Dortmund bei Prof. Dr. R. Winter (Lehrstuhl für Physikalische Chemie I) mit dem Thema "Druckabhängige Strukturuntersuchungen an Proteinen und Protein-Mikroemulsion-Komplexen."