

**Untersuchungen von
Aminosäuren, kleinen Peptiden und Proteinen
mit Druck-Perturbations Kalorimetrie (PPC)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht beim
Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Dortmund

von
Dipl.-Chem. Lally Mitra
aus Kalkutta (Indien)

Dortmund 2008

Erstgutachter: Prof. Dr. Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Mootz

Danke!

Mein besonderer Dank gilt zuallererst Herrn Prof. R. Winter für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl zu promovieren. Das von ihm ausgesuchte Thema war spannend und sehr lehrreich. Mein Dank gilt besonders dem Ermöglichen des Forschungsaufenthaltes in Montpellier und der Teilnahme an verschiedenen Konferenzen.

Ein spezieller Dank geht an Frau Dr. Shuang Zhao für die Einführung und Anleitung der DSC und PPC Messungen. Diskussionen mit ihr waren sehr angenehm und aufschlußreich.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Vytautas Smirnovas, der mir viel bei den FTIR-, Ultraschall- und Dichtemessungen geholfen hat. Auch Diskussionen mit ihm haben mich weitergebracht und motiviert. Seine Erklärungen waren stets besser als jedes Skript.

Ich danke Herrn Prof. H. Mootz für die Übernahme des Korreferats.

Selbstverständlich möchte ich an dieser Stelle sehr Frau Bertina Schuppan danken. Es war immer eine große Hilfe, arbeiten zu können und gleichzeitig mit der notwendigen Literatur versorgt zu werden.

Ich möchte mich sehr bei Frau Dr. A. Oleinikova für die ständige Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Frau Andrea Kreusel für das Korrigieren meiner Bewerbungsanschreiben.

Ich danke Mathias Pühse und Christoph Jeworrek für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich möchte mich sehr bei Herrn Dr. Nadeem Javid für das ständige Korrigieren meiner englischen Texte und seine Diskussionsbereitschaft bedanken.

Aber natürlich möchte ich mich bei allen, die in diesem Arbeitskreis arbeiten, bedanken, insbesondere bei Dr. Claus Czeslik, Dr. Roland Krivanek, Dr. Katrin Weise, Andrea Gohlke, Michael Sulc, Kirsten Skodzik, Gupreet Singh, Christian Reichhart und anderen für die ständigen Diskussionen und Hilfestellungen.

Bei Frau Dr. C. Royer bedanke ich mich sehr für die Bereitstellung der Mutationen der Staphylokokkennuklease und ihre herzliche Betreuung während meines Aufenthalts in Montpellier.

Natürlich danke ich auch sehr Marc Menningmann, meinem besten Freund und Partner, der mir in jeder Krisensituation beigestanden und mich wieder aufgerichtet hat. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Struktur von Proteinen	1
1.2	Proteinhydratation	3
1.3	Proteinfaltung	4
1.3.1	Übergangszustands Ensemble und ϕ -Wert Analyse	5
1.4	Stabilität von Proteinen	6
1.5	Zielsetzung	8
1.6	Staphylokokken Nuklease	10
1.6.1	Wildtyp	10
1.6.2	Mutationen	11
2	Methoden	13
2.1	Differenz-Scan Kalorimetrie (DSC)	13
2.2	Druck-Perturbation Kalorimetrie (PPC)	15
2.3	Ultraschall- und Dichtemessung	22
2.4	Fourier Transformation Infrarot Spektroskopie (FT-IR Spektroskopie)	25
2.5	Druck-Sprung Fluoreszenz	26
3	Experimenteller Teil	29
3.1	Präparation und Messung	29
3.1.1	Aminosäuren, Tripeptide	29
3.1.2	Links- und rechtsdrehende Trialanine	31
3.1.3	Staphylokokken Nuklease und Mutationen	32
4.	Ergebnisse und Diskussion	33
4.1	Aminosäuren und Tripeptide	33
4.1.1	Seitenketteneffekt in Aminosäuren	33
4.1.2	Seitenketteneffekte in Tripeptiden	36
4.1.3	Konzentrationseffekte am Beispiel von Alanin	39
4.1.4	Ladungseffekte am Beispiel von Alanin	40
4.1.5	Blockiertes Alanin und Trialanin	41

4.2	Links- und rechtsdrehende Trialanine	45
4.2.1	Links- und rechtsdrehende Trialanine gemessen mit PPC und DSC	47
4.2.2	Links- und rechtsdrehende Trialanine gemessen mit FT-IR-Spektroskopie	49
4.2.3	Links- und rechtsdrehende Trialanine gemessen mit Dichte- und Ultraschallmessungen	52
4.2.3.1	Überprüfung der PPC-Daten durch temperaturabhängige Dichtemessungen	56
4.2.4	Berechnung der intrinsischen Volumina und Expansivitäten	57
4.2.4.1	Darstellung der Hydratdichte, bulk-Wasserdichte und Volumendefekt für LLL und LDL	63
4.2.4.2	Vergleich der apparenten und intrinsischen Volumendaten von LLL und LDL	64
4.2.4.3	Vergleich der intrinsischen Expansivitäten von LLL und LDL	65
4.3	Staphylokokken Nuklease und Mutationen	67
4.3.1	Messungen der SNase und Mutationen mit PPC und DSC	67
4.3.1.1	Wildtyp Staphylokokken Nuklease bei pH 4,5, 7 und 9	69
4.3.1.2	Stabilisierte Form der Staphylokokken Nuklease bei pH 4,5, 7 und 9	72
4.3.1.3	Punktmutation V66K der stabilisierten Form der SNase	75
4.3.1.4	Punktmutation V66R	77
4.3.1.5	Punktmutation V66E	79
4.3.1.6	Ergebnisse und Diskussion	81
4.3.1.6.1	Berechnung der Gibbsenergie von SNase und ihrer Mutationen	84
4.3.2	Druck-Sprung Fluoreszenzspektroskopie	85
4.3.2.1	Δ +PHS V74K	86

4.3.2.2	Δ +PHS L36K	88
4.3.2.3	Ergebnisse und Diskussion	90
5.	Zusammenfassung	91
6.	Symbolverzeichnis	93
7.	Literaturverzeichnis	95

1. Einleitung

Da Proteine eine wichtige Rolle in biologischen Abläufen spielen (z. B. als Strukturproteine für den Aufbau von Zellen, als Enzyme bei Biokatalysevorgängen), ist es von großem Interesse, ihre physikalischen Eigenschaften (z. B. Löslichkeit, Ladung) näher zu untersuchen. Anhand von zahlreichen physikalischen Meßmethoden (z. B. Dichtemessungen oder Kalorimetrie) können viele Daten über die physikalischen Eigenschaften von Proteinen (z. B. Faltung) erhalten werden.

1.1 Aufbau und Struktur von Proteinen

Die kleinsten monomeren Einheiten, aus denen Proteine bestehen, sind Aminosäuren. Diese sind für die Eigenschaften (z. B. Löslichkeit, Faltung) des Proteins in Lösung verantwortlich. Bis auf Glycin können Aminosäuren rechts- und linksdrehend vorliegen. Die meisten Proteine jedoch bestehen aus den 20 natürlich vorkommenden links drehenden Aminosäuren. Aminosäuren bestehen aus einer Aminogruppe ($-\text{NH}_3$) und einer Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$). Je nach pH-Wert, liegen diese Gruppen dissoziiert vor:

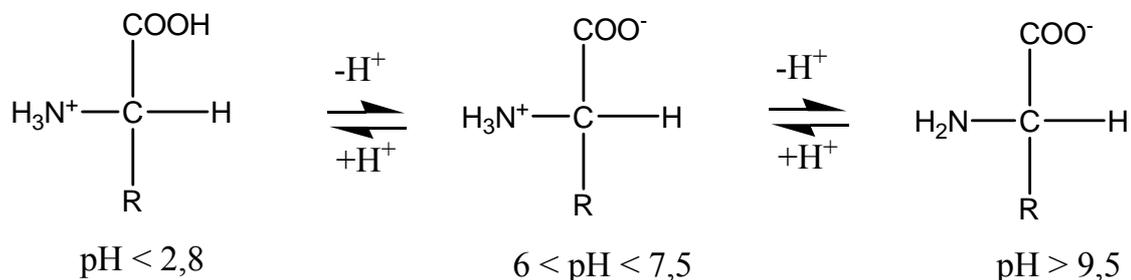


Abbildung 1: Ladungsverhältnisse von Aminosäuren bei verschiedenen pH-Werten (Bild: R. Winter, F. Noll, 1998).

Im niedrigen pH Bereich liegt die Aminogruppe $-\text{NH}_3$ positiv geladen vor. Im basischen Bereich (pH größer als 9,5) ist die Carboxylgruppe $-\text{COOH}$ negativ geladen. Im pH Bereich zwischen pH 6 und 7,5 ist die Nettoladung des Moleküls Null, da beide funktionellen Gruppen geladen vorliegen. Am isoelektrischen Punkt liegen beide funktionellen Gruppen zu 50% dissoziiert vor. Verantwortlich für die Natur einer Aminosäure ist die Seitenkette, in Abbildung 1 als „Rest“ R bezeichnet. Bei Glycin handelt es sich um Wasserstoff, $-\text{H}$, daher liegt hier kein chirales Zentrum vor. Alanin besitzt eine Methylgruppe, $-\text{CH}_3$. Daher kann Alanin sowohl links- als auch rechts-drehend vorliegen. Die Methylgruppe besteht zum größten Teil aus unpolaren Bindungen, daher wird Alanin im Allgemeinen als hydrophobe

Aminosäure bezeichnet. Die Seitenkette in einer Aminosäure ist ausschlaggebend für ihre physikalischen Eigenschaften.

Aminosäuren reagieren unter Kondensationsreaktion zu einer Peptidbindung:

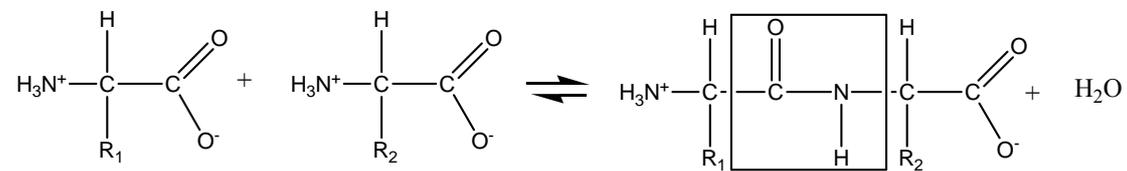


Abbildung 2: Kondensationsreaktion zweier Aminosäuren und Bildung einer Peptidbindung (schwarzes Viereck).

Die Polymerisation von Aminosäuren kann beinahe endlos fortgesetzt werden und führt von Peptiden bis hin zu Proteinen. Proteine erhalten, wie bereits erwähnt, ihre Eigenschaften durch ihre Zusammensetzung der jeweiligen Aminosäuren. Die Sequenz der Aminosäuren und die Position der Disulfidbrücken wird als Primärstruktur bezeichnet. Disulfidbrücken sind kovalente Bindungen zwischen Schwefelatomen zweier Cysteinreste. Die Sekundärstruktur bezieht sich auf die räumliche Anordnung der Aminosäuren innerhalb einer linearen Sequenz (Stryer, L., 1990). Diese können periodischer Natur sein und in Form von α -Helices und β -Faltblättern vorliegen. Die α -Helix wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den NH- und CO-Gruppen stabilisiert. Es handelt sich um eine stabförmige Struktur, die aus einer eng aufgewickelten Polypeptidhauptkette im Inneren des Stabes besteht und deren Seitenketten schraubenartig nach außen weisen. Die Helix kann links- oder rechtsgängig sein, jedoch wurden bis jetzt in Proteinen nur rechtsgängige (im Uhrzeigersinn) Helices gefunden. Das β -Faltblatt hingegen weist eine eher „plattenförmige“ Struktur auf, da die Polypeptidkette beinahe gestreckt ist. Das β -Faltblatt entsteht durch die Bildung von Wasserstoffbrücken der CO- und NH-Gruppe unterschiedlicher Polypeptidketten, während bei der α -Helix es sich um Wasserstoffbrückenbindungen derselben Polypeptidkette handelt. Diese Stränge können die selbe Richtung aufweisen (parallele β -Faltblätter) oder entgegengesetzt sein (antiparallele β -Faltblätter). Durch β -Schleifen ist es einer Polypeptidkette möglich, abrupt die Richtung zu ändern („Haarnadelschleifen“). Eine dritte Art der sogenannten Sekundärstrukturelemente ist die Kollagenhelix, die für die besondere Elastizität in Kollagen (Vorkommen in Haut, Knochen oder Sehnen) verantwortlich ist. Die Tertiärstruktur gibt die räumliche Beziehung der Aminosäurereste wieder, die innerhalb einer Sequenz weit voneinander entfernt liegen. Proteine, die aus mehreren

Polypeptidketten bestehen, verfügen über Untereinheiten, die als Quartärstruktur zusammengefaßt werden.

1.2 Proteinhydratation

Da Lebewesen zum größten Teil aus Wasser bestehen, macht es Sinn, das Verhalten von Proteinen in Wasser näher zu untersuchen. Eine wesentliche Fähigkeit von Wasser besteht darin, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, da es stark kohäsiv ist. Dieses beeinflusst die Bindung zu einem Molekül im Wasser bzw. in ihrer Bindung zueinander. Für Proteine spielen Wasserstoffbrückenbindungen eine essentielle Rolle, da die Hydratisierung wichtig für ihre dreidimensionale Struktur und die Aktivität des Proteins ist (Franks, F., 2002). Ohne Wasser verlieren Proteine ihre Aktivität. Wird nun ein Biomolekül in Wasser in Lösung gebracht, so führt dies zu einer veränderten Anordnung des H-Brücken Netzwerks in Wasser (Ludwig, R., Paschek, D., 2005). Da auf der einen Seite das Wasser für das Biomolekül „Platz schaffen“ muss, aber auch bestrebt ist, sein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen um beispielsweise eine unpolare Seitenkette zu verstärken, orientieren sich drei der Tetradederrichtungen des Wassermoleküls tangential an die Oberfläche des Biomoleküls. Dies führt zu einer räumlichen Einschränkung der Orientierung des Wasserstoffbrückennetzwerks in Wasser. Unpolare Moleküle wie Ethan lagern sich zu Aggregaten im Wasser zusammen. Das Wasser bildet eine Art Käfig um das unpolare Molekül. Die Ordnung im Wasser um das hydrophobe Molekül ist stark erhöht („strukturbildend“), was zu einer Entropieabnahme führt und einen ungünstigen Prozeß darstellt. Weil aber nach dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik die Entropie in einem abgeschlossenen System nicht abnehmen kann, wirkt das Zusammenlagern der unpolaren Moleküle diesem Effekt entgegen (hydrophober Effekt). Das führt zu einer Verringerung der wasserzugänglichen Fläche („Accessible Surface Area“, ASA) und damit zu einer Abnahme der Anzahl der geordneten Moleküle im gesamten System, was insgesamt zu einem Entropieanstieg führt (Southall, N. T. *et al.*, 2002). Während der Proteinfaltung wandern die hydrophoben Seitenketten des Proteins ins Innere des Proteinmoleküls. Die hydrophilen Seitenketten bilden nach außen hin eine hydrophile Proteinoberfläche. Welches der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Proteinfaltung ist, wird in vielen theoretischen Ansätzen diskutiert (s. Kapitel 1.3).

1.3 Proteinfaltung

Die physikalischen Eigenschaften eines Proteins, z. B. seine enzymatische Reaktivität, werden bereits durch seine dreidimensionale Struktur festgelegt. Es ist daher von großem Interesse, den Proteinfaltungsprozeß genauer zu verstehen. Die als „Levinthal Paradoxon“ bekannte Aussage (Levinthal, C., 1968), beruht auf der Tatsache, dass ein Faltungsprozeß für eine Polypeptidkette Jahrmillionen bräuchte, um die richtige Konformation einzig durch „Ausprobieren“ aller Bindungswinkel zu finden. Daher wurde vermutet, dass bestimmte bevorzugte Faltungspfade existieren, die zur gefalteten Struktur führen.

Ein Modell für die Proteinfaltung ist beispielsweise der hydrophobe Kollaps (Dill, K. A., 1985). Die treibende Kraft stellt hier der hydrophobe Effekt dar (s. Abschnitt 1.1.3). Die hydrophoben Seitenketten im Protein bilden zunächst einen hydrophoben Kern aus. Durch den stark eingeschränkten Raum bildet sich nun die native Proteinstruktur aus. Dieses Modell geht von einem Faltungs-Intermediat aus, dem sogenannten *Molten Globule*, den man kinetisch und im Gleichgewicht als eine expandierte Form des gefalteten, nativen Zustands charakterisiert hat. Das „nucleation-condensation-model“ geht von einem Faltungskern aus, der nur schwach in seiner Struktur festgelegt ist und durch langreichweitige Wechselwirkungen stabilisiert wird. Hierbei geht die Struktur nicht vom Faltungskern aus, sondern entsteht erst während der der Faltung im Übergangszustand. Es wird nicht zwingend ein Intermediat, wie beim hydrophoben Kollaps, benötigt. Daher kann es zur Erklärung von sehr schnellen Zwei-Zustands-Faltungsvorgängen herangezogen werden. Nach Daggett, V., Fersht, A. R., 2003, ist der Mechanismus der Proteinfaltung von zwei extremen Szenarien abhängig. „Framework“ bedeutet, dass sich die Sekundärstrukturelemente zuerst falten. „nucleation condensation“ ist ein Kompromiss zwischen den beiden Extremfällen. Bisher wurde kein Protein gefunden, das einen reinen hydrophoben Kollaps zeigt, also während des Kollapses keine Sekundärstruktur bildet. Daher erscheint der „nucleation condensation“ Mechanismus eine sehr gute Beschreibung für die Faltung kleiner Proteine zu sein (Schymkowitz, J. W. H. *et al.*, 2002).

Manche Proteine falten sich jedoch so, dass sich ein Teil der Struktur sehr früh bildet und andere Abschnitte bis zuletzt unstrukturiert bleiben. Diese führte zu einer Entwicklung von theoretischen Konzepten, mit denen faltende von sich nicht

faltenden Sequenzen unterschieden werden können (Kim, P. S., Baldwin, R. L., 1990). Die Faltung geschieht entlang von Pfaden mit wohldefinierten Intermediaten. Diese Sichtweise wurde seit Beginn der '90er Jahre durch das Bild der Faltung eines Proteins in einem Faltungstrichter der Energie ersetzt (Shakhnovich, E. I., 1997). Dieser ermöglicht es nun, die Energielandschaft eines Heteropolymers zu beschreiben, so dass der gefaltete Zustand in kurzer Zeit erreicht werden kann. Die Faltung geschieht entlang einer Vielzahl von Routen bis auf den Boden des Faltungstrichters. Sie ist ein kollektiver (d.h. die Faltung der Aminosäurenkette beginnt an vielen Positionen gleichzeitig) und stellt einen selbst-organisierten Prozeß dar. Ist die Energielandschaft glatt, werden lediglich zwei Zustände – der gefaltete und der ungefaltete - beobachtet. Der Quotient aus der Faltungs- und der Entfaltungsgeschwindigkeitskonstante gibt hierbei das Besetzungsverhältnis aus gefaltetem und ungefaltetem Zustand wieder. Sind diese Energielandschaften „zerklüftet“, wirken partiell gefaltete oder gar falsch gefaltete Zustände diesem Prozess entgegen, so dass langsamere oder sogar mehrphasige Faltungskinetiken beobachtet werden. Für eine bessere Beschreibung der Übergangszustände während der Proteinfaltung wurde eine Φ -Wert Analyse entwickelt.

1.3.1 Übergangszustands Ensemble und ϕ -Wert Analyse

Die Übergangszustands-Theorie geht von der Annahme aus, dass ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen dem Grundzustand und dem aktivierten Zustand existiert und postuliert, dass jeder Übergangsweg, der die Barriere überquert, als Produkt endet (Übersichtsartikel Royer, C., 2008). Dieses Modell auf die Proteinfaltung anzuwenden entstammt aus der physikalischen organischen Chemie und wurde erstmals von A. Fersht verwendet, um Enzymreaktionen zu erklären (Winter, G. *et al.*, 1982) und später für Proteinfaltungen erweitert (Fersht, A. R. *et al.*, 1992, Matouschek, A. *et al.*, 1992, Serrano, L. *et al.*, 1992).

Die ϕ -Wert Analyse wurde von A. Fersht eingeführt (Fersht, A. R. *et al.*, 1992, Matouschek, A. *et al.*, 1992, Serrano, L. *et al.*, 1992). Hierfür werden Mutationen an geeigneter Stelle im Protein eingeführt, von denen ausgegangen wird, dass sie für die Stabilität im Protein verantwortlich sind. Durch das Messen der Faltungskinetiken und -gleichgewichte kann die Differenz der freien Energieänderung der Faltung $\Delta\Delta G_{f-u}$, d. h. die Differenz des gefalteten f und des entfalteten u Zustands, und die Differenz der freien Energieänderung des Übergangszustands während der Faltung $\Delta\Delta G_{f*}$, d. h. die

Differenz zwischen dem gefalteten Zustand f und dem Übergangszustand $*$, berechnet werden:

$$\phi = \frac{(\Delta\Delta G_{f-*})}{(\Delta\Delta G_{f-u})} \quad (1.1).$$

(Übersichtsartikel Royer, C., 2008). Ein Wert von 1 bedeutet, dass sich die Mutation an einer destabilisierenden Position des gefalteten Zustands befindet, und nur einen geringen Effekt auf den Übergangszustand oder den entfaltenen Zustand ausübt. Umgekehrt besitzt eine Mutante, die den Übergangszustand im gleichen Maße destabilisiert wie den gefalteten Zustand, einen ϕ Wert von 0.

1.4 Stabilität von Proteinen

Die Wechselwirkungen in Proteinlösungen, die die Sekundär- und Tertiärstrukturen bzw. die Konformation des Proteins stabilisieren, hängen vom Lösungsmittel, dem pH-Wert der Lösung, der Ionenstärke, der Temperatur und dem Druck ab. Die native Form eines Proteins ist entscheidend für seine Funktion. Im Falle von Enzymen (z. B. Staphylokokken Nuklease) hat eine Denaturierung auch den Verlust der Enzymaktivität zur Folge. Die Untersuchung der Konformationsumwandlung von Proteinen liefert Informationen über die Stabilität und den Mechanismus eines biologischen Systems. Um die Stabilität von Proteinen zu interpretieren, ist es sinnvoll die Gibbsenergie zu berechnen:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.2).$$

Im einfachsten Fall wird die Proteinfaltung auf ein Zwei-Zustands-Modell reduziert, nativ und denaturiert. Die Gibbsenergie beschreibt das Gleichgewicht zwischen der Enthalpieänderung und der Entropieänderung. Die Entropie des Systems beschreibt die Änderung der Ordnung während eines Umwandlungsprozesses. Bei einem Phasenübergang bzw. hier die Proteinfaltung, wird die Entropie am Entfaltungspunkt durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\Delta S(T_m) = \frac{\Delta H(T_m)}{T_m} \quad (1.3).$$

Die Entfaltungstemperatur T_m gibt die Temperatur an, bei der 50% des Proteins nativ und 50% des Proteins denaturiert vorliegt. Bei einem exothermen Prozeß besitzt ΔH_u negative Werte, welches auch eine negative Entropieänderung zur Folge hat. Dieses heißt für ein System, dass die Ordnung nach dem Übergang höher wird. Ein Beispiel

hierfür ist ein flüssig-fest Übergang (Gefrieren). Bei der Proteinaggregation werden ebenfalls negative Enthalpieänderungen (z. B. Fibrillenbildung bei Insulin) beobachtet. Bei einem endothermen Phasenübergang, z.B. flüssig-gasförmig (Verdampfen), besitzt die Enthalpieänderung positive Werte und somit auch positive Werte für die Entropieänderung. Dies bedeutet, dass das System vom geordneten Zustand in einen weniger geordneten Zustand übergeht. Die Proteindenaturierung ist stark abhängig von dem Druck oder der Temperatur, welches im Allgemeinen in einem Zustandsdiagramm dargestellt werden kann (Brandts, J. F. *et al.*, 1970, Hawley, S. A. 1971):

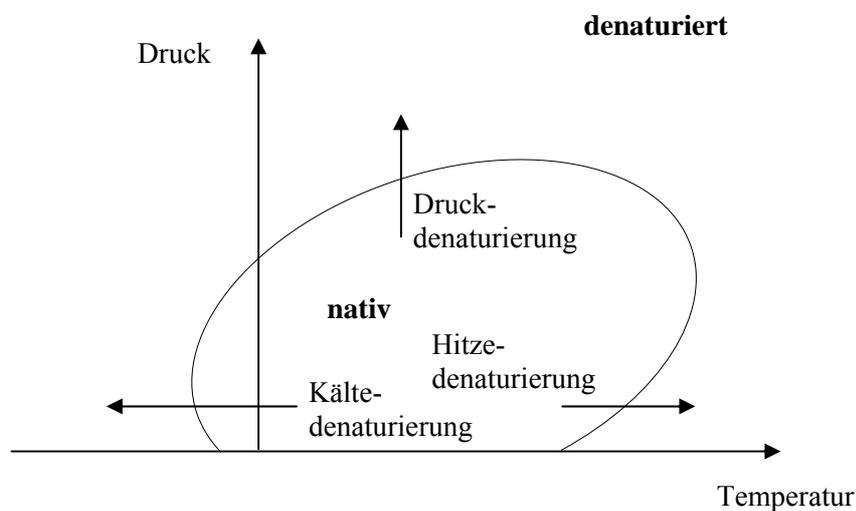


Abbildung 3: Schematisches Zustandsdiagramm eines Proteins in Abhängigkeit des Drucks und der Temperatur.

Um die Standard-Gibbsenergie für eine thermische Entfaltungsreaktion zu berechnen, ist es notwendig, die Entropie- und die Enthalpieänderung als eine Funktion der Temperatur zu berechnen (nach Kirchhoff):

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_m) + \Delta C_p (T - T_m) \quad (1.4)$$

mit der Randbedingung, dass die Wärmekapazitätsänderung ΔC_p am Entfaltungspunkt temperaturunabhängig ist. Analog dazu kann die Entropieänderung beschrieben werden:

$$\Delta S(T) = \Delta S(T_m) + \Delta C_p \ln(T/T_m) \quad (1.5).$$

1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde die Änderung des thermischen Ausdehnungskoeffizienten α von verschiedenen Aminosäuren, Tripeptiden und Mutationen der Staphylokokken Nuklease (SNase) mit Hilfe der Druck-Perturbation-Kalorimetrie (PPC) untersucht.

Die Strukturen der in dieser Arbeit gemessenen Aminosäuren sind in Abbildung 4 dargestellt:

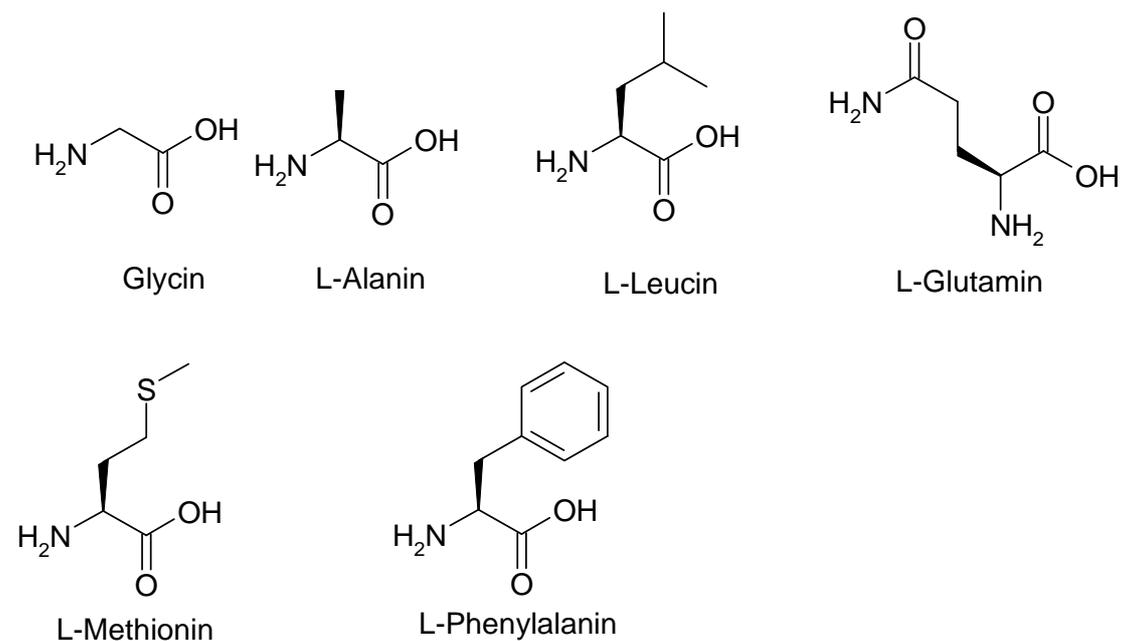


Abbildung 4: Strukturen der gemessenen Aminosäuren.

Die Änderung der Expansivität der Aminosäuren wurde in Bezug auf die Ladung (s. Abbildung 4) und die Konzentration der Aminosäuren als Funktion der Temperatur untersucht. Ziel bei den Tripeptiden, die ein GXG Schema aufwiesen (X war die zuvor einzeln gemessene Aminosäure), war, die bereits einzeln gemessenen Seitenketten in der Aminosäure in einen proteinähnlichen Verband zu vermessen (Reading, J. F., Hedwig, G. R., 1990) und somit Rückschlüsse über die Änderung der Expansivität in Bezug auf die chemische Umgebung, beispielsweise in einem Protein, zu erhalten.

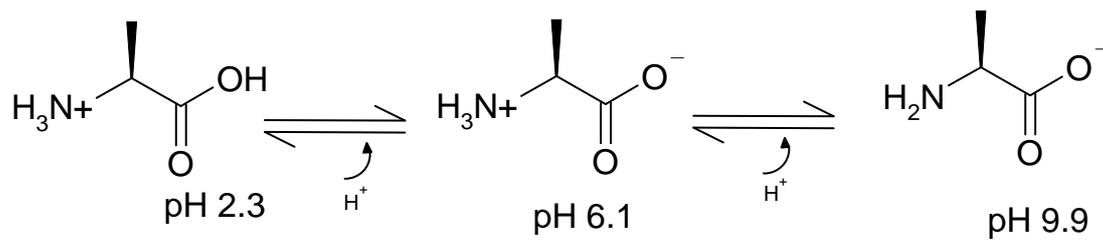


Abbildung 5: Ladungsverhältnisse von Alanin bei seinem pK_1 , pK_2 und am isoelektrischen Punkt (Ip).

Um den Effekt der unterschiedlichen optischen Aktivität in Trialanin zu untersuchen, wurden vier verschiedene Isomere, Trialanin mit nur linksdrehenden, nur rechtsdrehenden und gemischt, mit links- und rechtsdrehenden Komponenten, kalorimetrisch (PPC, DSC) und spektroskopisch (FTIR) untersucht. Für die Messung der Kompressibilität wurden Dichte- und Ultraschallmessungen durchgeführt.

Nach dem Messen der einzelnen Aminosäuren und in einem proteinähnlichen Verband, wurde eine stabilisierte Form der Staphylokokken Nuklease (SNase) gemessen sowie drei verschiedene Punktmutationen der stabilisierten Form. Die SNase und die Punktmutationen wurden kalorimetrisch, mit PPC und DSC, als Funktion der Temperatur gemessen, um auch hier ein Bild über die Temperaturabhängigkeit der verschiedenen Mutationen zu ermitteln und etwas über ihre Hydratisierung aussagen zu können.

In Montpellier (Frankreich) am CBS Institut wurden ebenfalls Mutationen der SNase gemessen (mit Hilfe der Druck-Sprung Fluoreszenz Spektroskopie), wobei es sich allerdings um andere Punktmutationen handelte als die, die mit der Kalorimetrie hier gemessen wurden. Sie wurden auf ihre Faltungskinetiken als eine Funktion des Drucks untersucht.

1.5 Staphylokokken Nuklease

1.6.1 Wildtyp



Abbildung 6: Die Abbildung zeigt die Kristallstruktur des Wildtyps der Staphylokokken Nuklease (PDB: 1ey0). Die Farben bezeichnen die einzelnen Positionen, die später verändert worden sind (Grau: Position 44-49, Zyan: Position 50 Glycin, Rot: Position 51 Valin, Pink: Position 117 Prolin, Gelb: Position 124 Histidin, Magenta: Position 128 Serin).

Der Wildtyp (s. Abbildung 6) der Staphylokokken Nuklease besteht aus 149 Aminosäuren und fungiert als Enzym, welches die Hydrolyse von DNS und RNS in Di- und Mononukleotide in Gegenwart von Ca^{2+} katalysiert (Cotton, F. A. *et al.*, 1979). Die Enzymaktivität ist bei pH 8,6 bis 10,3 am höchsten, variiert aber sehr stark mit der Ca^{2+} -Konzentration. Staphylokokken Nuklease besitzt keinerlei Disulfidbrücken und weist einen Tryptophanrest an der 140. Stelle auf, der für Fluoreszenzmessungen eine entscheidende Bedeutung besitzt. Die Tertiärstruktur des Wildtyps besteht aus drei α -Helices und 5 β -Strängen (Hynes, T. R., Fox, R. O., 1991).

1.6.2 Mutationen

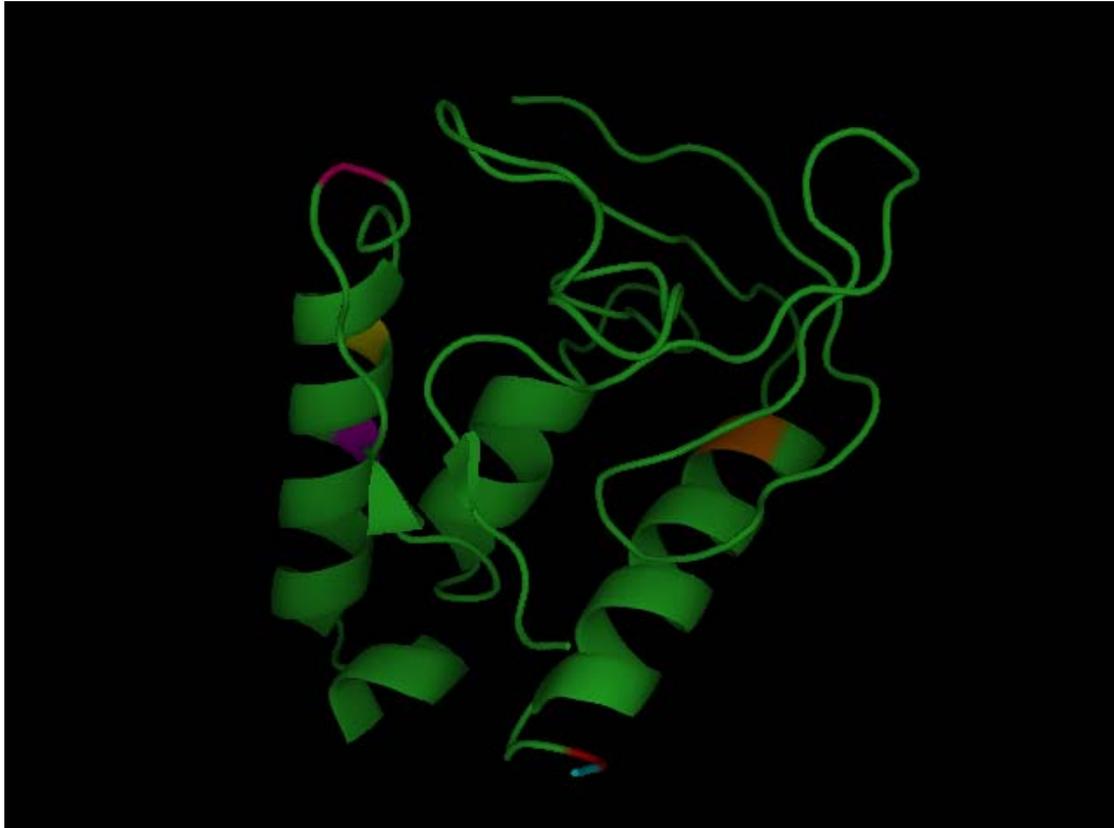


Abbildung 7: Die Abbildung zeigt die Kristallstruktur der „PHS V66K“ Mutation der Staphylokokken Nuklease (PDB: 2snm). Position 44-49 nicht dargestellt, Zyan: Position 50 Phenylalanin, Rot: Position 51 Asparagin, Pink: Position 117 Glycin, Gelb: 124 Leucin, Magenta: 128 Alanin; Orange: Position 66 (hier Lysin).

Die hier verwendete SNase wies zahlreiche Mutationen auf, kurz Δ +PHS genannt: Die PHS Substitution bedeutet, dass Prolin an der 117. Stelle durch Glycin, Histidin an der 124. Stelle durch Leucin und Serin an der 128 Stelle durch Alanin ersetzt wurde (P117G, H124L and S128A). Δ bezieht sich auf zwei Substitutionen (G50F und V51N, d. h. dass an der 50. Stelle Glycin durch Phenylalanin und Valin an der 51. Stelle durch Asparagin ausgetauscht wurde). Eine Schleife (Aminosäuren der Position 44-49) wurde rausgeschnitten (Garcia-Moreno E., *et al.*, 1997).

Bei der Δ +PHS Mutation befindet sich an der 66. Position ein Valin. An dieser Stelle wurden Punktmutationen eingefügt (durchgeführt an der Johns Hopkins Universität, nach der Methode von Kunkel, T. A., 1985, bzw. aufgereinigt nach der Methode von Shortle, D., Meeker, A. K., 1989), indem Valin (s. Abbildung 7: orange; hier Lysin) gegen Aminosäuren ausgetauscht wurde, die über ionisierbare Seitenketten verfügen. Die 66. Stelle befindet sich in einer hydrophoben Tasche (Stites, W. E. *et al.*, 1991).

Da gerade diese Stelle empfindlich gegenüber Mutationen reagiert, wurde die stabilisierte Form verwendet (Brun, L. *et al.*, 2006). Lysin, Arginin und Glutaminsäure besitzen polare Seitenketten, deren Ladung pH-Wert abhängig ist. Die Seitenkette von Arginin und Lysin reagiert stark basisch. Die Seitenkette von Glutaminsäure ist sauer. Alle Aminosäuren sind als hydrophil einzustufen, was Auswirkungen auf die Faltung haben sollte, da sie sich in einer stark hydrophoben Umgebung im Protein befinden. Aufgrund ihrer verschiedenen Ladungen bei verschiedenen pH-Werten wird erwartet, dass sie unterschiedliche Auswirkungen auf die Faltung und auf die Stabilität des Proteins haben. In dieser Arbeit wurden die Mutationen Δ +PHS V66E (E = Glutaminsäure, $pK_a = 8,8$, (Dwyer, J. J. *et al.*, 2000)), Δ +PHS V66R (R = Arginin), Δ +PHS V66K (K = Lysin, $pK_a = 5,76$ (Garcia-Moreno, B. *et al.*, 1997)) mit DSC und PPC vermessen.

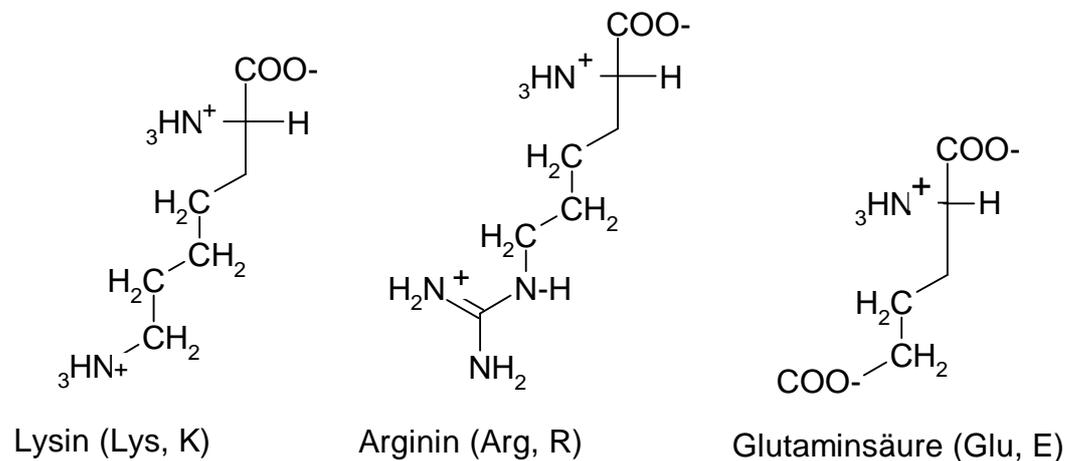


Abbildung 8: Strukturen der verwendeten Aminosäuren Lysin, Arginin und Glutaminsäure.

2. Methoden

2.1 Differenz - Scan Kalorimetrie (DSC)

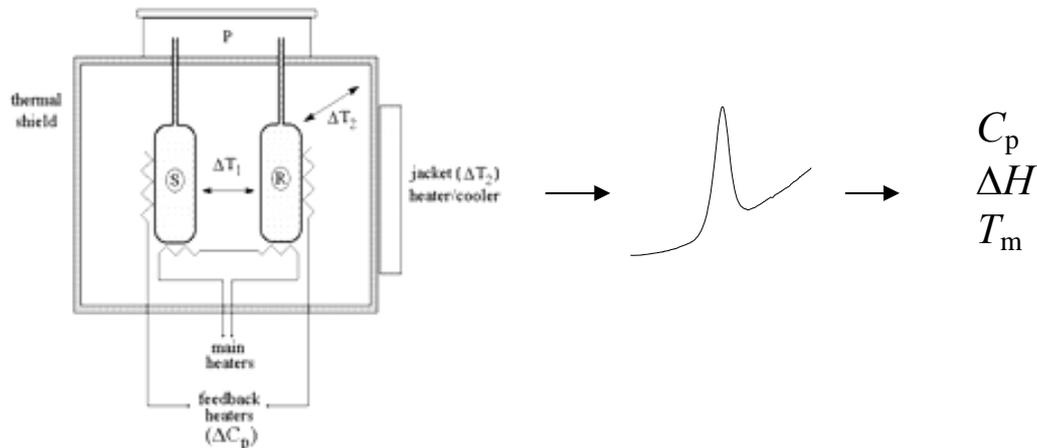


Abbildung 9: Schematischer Aufbau der DSC (Quelle: MicroCal), schematische Meßkurve und Parameter.

Für die Differenz-Scan Kalorimetrie wurde ein Instrument der Firma MicroCal (Northampton, MA, USA) verwendet. Die Meßzellen des Instruments besitzen eine Füllmenge von ca. 0,5 mL und bestehen aus Tantal 61TM. Die DSC-Methode ist eine sehr sensitive Methode und liefert aussagekräftige Ergebnisse bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 0,1 Gewichtsprozent (ca. 1 mg/mL).

Das Meßprinzip beruht auf einer Leistungskompensation zwischen der zu messenden Probe und der Referenz. Gibt die Probe aufgrund einer Reaktion einen Wärmestrom ab (z. B. während der Proteinfaltung), so wird durch einen Regler die elektrische Leistung um den Betrag kompensiert, damit die Temperatur beider Lösungen gleich bleibt (Hemminger, W. F., Cammenga, H. K., 1989). Detektiert wird demnach die Leistungsdifferenz $\Delta P = P_S - P_R$ (Die Indizes S und R stehen für Probe und Referenz), die während der Reaktion entsteht. Diese ist der Differenz der Wärmekapazitäten von C_S (Probe) und C_R (Referenz) proportional (R. Winter, F. Noll, 1998):

$$\Delta C(T) = C_S - C_R = \Delta P(T) / \beta \quad (2.1).$$

mit der vorgegeben Heizrate $\beta = \Delta T / \Delta t$ (T : Temperatur, t : Zeit).

Die Enthalpieänderung ΔH , die Wärmemenge, die während der Entfaltung frei wird (exotherm) bzw. benötigt wird (endotherm), kann durch Integration der Messkurve bestimmt werden:

$$\int_{T_1}^{T_2} C(T) \cdot dT = \Delta H \quad (2.2).$$

Ein Biomolekül in Lösung befindet sich im Gleichgewicht zwischen seinem nativen (gefalteten) und seinem denaturierten (entfalteten) Zustand. Der Übergangspunkt bzw. die Entfaltungstemperatur (T_m) ist der Punkt, an dem 50% des Proteins denaturiert vorliegen. Mit der DSC kann die spezifische Wärme als eine Funktion der Temperatur bestimmt werden, z. B. während eines Entfaltungsvorgangs eines Proteins (Sturtevant, J. M., 1987). Mit dieser Methode können also die Eigenschaften, die für die Entfaltung und die Stabilität verantwortlich sind, detektiert werden, z. B. das hydrophobe Verhalten von Biomolekülen in Lösung.

Abbildung 9 zeigt den schematischen Aufbau der DSC-Apparatur: S und R stehen für „sample“ und „reference“ (Probe und Referenz). Das mittlere Bild zeigt eine schematische DSC Kurve und als drittes werden die Parameter gezeigt, die in dieser Arbeit anhand dieser Methode berechnet wurden. In die Probenzelle wurde die Proteinlösung und in die Referenzzelle die Lösung ohne Protein gefüllt. Beide Zellen wurden fest mit einer Druckkappe verschlossen. Dies gewährleistet auch bei hohen Temperaturen einen Druckausgleich. Das ganze System ist gegenüber der Außentemperatur abgeschlossen, so dass dem System nur eine definierte Temperaturänderung hinzugefügt wird. Die in Abbildung 9 dargestellte Kurve zeigt eine schematische Darstellung einer DSC-Messkurve. Das Maximum der Kurve beschreibt die Entfaltungstemperatur T_m des Proteins.

Die Auswertung der gemessenen DSC-Kurve erfolgte durch die Software Origin 7 mit einer speziellen Anwendung für die Kalorimetrie.

2.2 Druck-Perturbation Kalorimetrie (PPC)

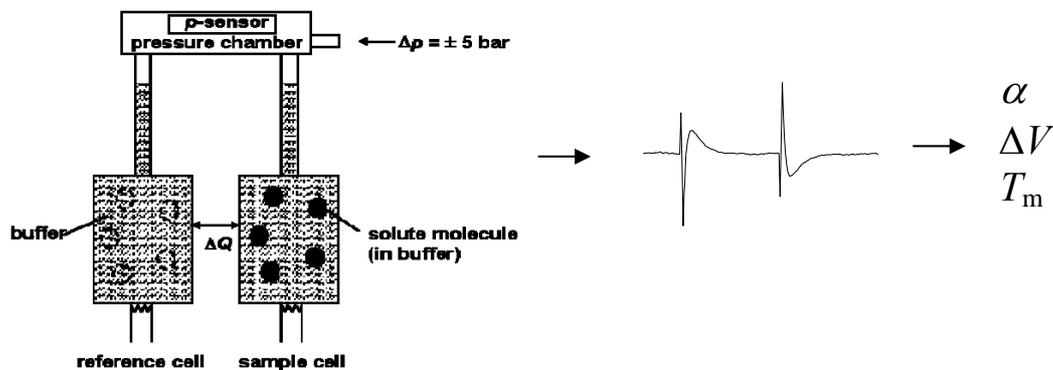


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der PPC bzw. schematische Abbildung einer Messkurve und die daraus bestimmbaren Parameter (Microcal user note, 2000).

Bei dieser Methode wurde zwar das Equipment der DSC (s. Abbildung 9) verwendet, jedoch wurde hier ein Drucksensor eingesetzt, der mit einer Stickstoffgasflasche verbunden ist. Das Meßprinzip dieser Methode besteht darin, dass ein Druck über beide Zellen ausgeübt wird und dann wieder gesenkt wird (± 5 bar). Durch diese Druckänderung ergibt sich ebenfalls eine Wärmeänderung, die meßbar ist (Plotnikov, V. V. *et al.*, 1997, Brandts, J. F., *et al.*, 2002). Durch die Software Origin 7 (MicroCal) wurde der Ausdehnungskoeffizient α berechnet und als Funktion der Temperatur dargestellt. Der Ausdehnungskoeffizient α eines Systems ist ein Maß für die Temperaturabhängigkeit des Volumens (Atkins, P. W., 1988):

$$\alpha = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_p \quad (2.3)$$

Das Volumen einer Lösung mit einer bestimmten Menge an Probe, m_s , und einer bestimmten Menge an Lösungsmittel, m_0 , wird näherungsweise durch

$$V = m_0 V_0 + m_s V_s^\circ \quad (2.4)$$

beschrieben, wobei V_0 das spezifische Volumen des Lösungsmittels und V_s° das partielle spezifische Volumen der Probe bezeichnet. Für einen reversiblen Prozeß folgt daraus

$$\left(\frac{\partial Q_{\text{rev}}}{\partial p} \right)_T = -TV\alpha = -T(m_0 V_0 \alpha_0 + m_s V_s^\circ \bar{\alpha}_s) \quad (2.5)$$

mit Q Wärme, p den Druck und T , die Temperatur. Der Ausdehnungskoeffizient für das Lösungsmittel wird mit $\alpha_0 = (1/V)(\partial V_0 / \partial T)_p$ bezeichnet und für die Probe gilt

analog: $\bar{\alpha}_s = (1/V_s^\circ)(\partial V_s^\circ / \partial T)_p$, wobei der Strich über dem Symbol bedeutet, dass es sich um den partiellen thermischen Ausdehnungskoeffizienten der Probe handelt. Für das PPC-Experiment beträgt das Probenvolumen $m_s V_s^\circ$ bzw. analog dazu der Puffer in der Referenzzelle, $m_0 V_0$. Da es sich bei dieser Methode um kleine Druckintervalle (± 5 bar in diesem Fall) handelt, kann die Druckabhängigkeit von V und α in diesem Fall vernachlässigt werden. Nach Integration folgt nun für die Wärmeänderung:

$$\Delta Q_{rev} = -T(m_s V_s^\circ \bar{\alpha}_s - m_s V_s^\circ \alpha_0) \Delta p \quad (2.6).$$

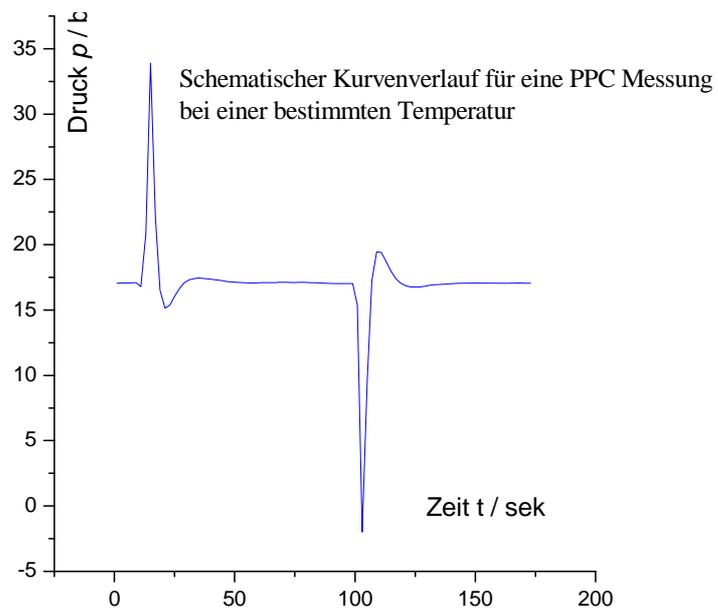
Anhand dieser Beziehung kann die Expansivität der Probe folgenderweise ausgedrückt werden (Kujawa, P., Winnik, F. M., 2001, Brandts, J. F., *et al.*, 2002, Batchelor, J. D. *et al.*, 2004):

$$\bar{\alpha}_s = \alpha_0 - \frac{\Delta Q_{rev}}{T m_s V_s^\circ \Delta p} \quad (2.7),$$

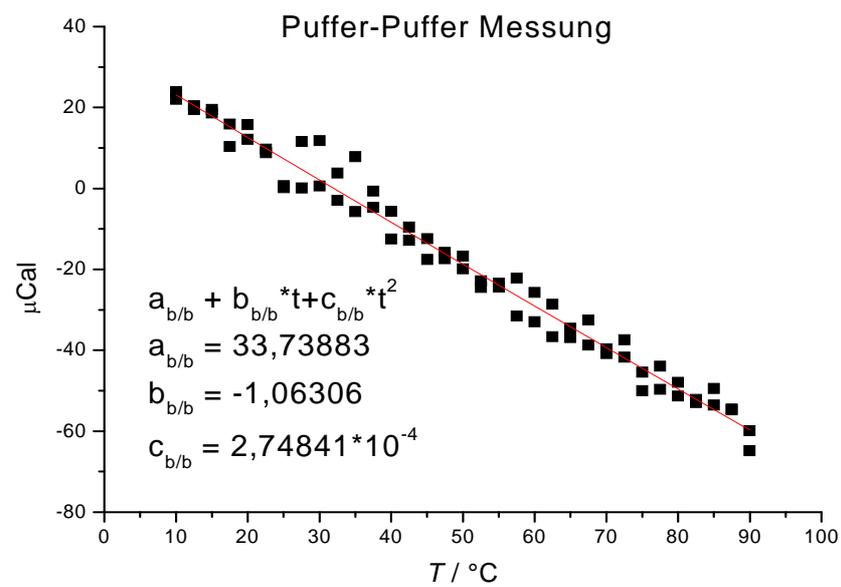
mit m_s gleich Masse der Probe. Wenn es sich um ein reines Lösungsmittel handelt, kann α_0 aus Dichtedaten bestimmt werden. Sind hohe Konzentrationen an Elektrolyten (Puffer) oder andere Lösungen (Kosolvenzien) enthalten, wird α_0 durch separate Messungen gemessen. Der thermische Ausdehnungskoeffizient ist ein sensitives Maß für die Untersuchung der strukturellen Änderungen eines Biomoleküls (Mitra, L. *et al.*, 2006, Ravindra, R. *et al.*, 2004, Smirnovas, V. *et al.*, 2006).

Für einen kompletten Messdurchlauf wurde als erstes ein Wasser-Wasser Scan (Wasser in beiden Zellen), ein Puffer-Wasser Scan (die Referenzzelle wurde durch Puffer ausgetauscht, das Wasser verblieb in der Probenzelle) und zuletzt ein Puffer-Puffer Scan (Puffer in beiden Zellen) gemessen. Das Befüllen der Zellen verlief analog zur DSC-Messung. Für die Auswertung wurden die Daten der Lösungsmittel (Wasser, Puffer) von der Messung (Probe in der Probenzelle und Puffer in der Referenzzelle) abgezogen. Ein ausführliches Beispiel für die Auswertung der PPC Messung soll hier am Beispiel der Wildtyp SNase (4 mg/mL, pH 7, in 10 mM Phosphatpuffer) gezeigt werden. Die Reihenfolge der Abbildung beschreibt die Vorgehensweise im Auswertungsprogramm (Origin 7, Microcal).

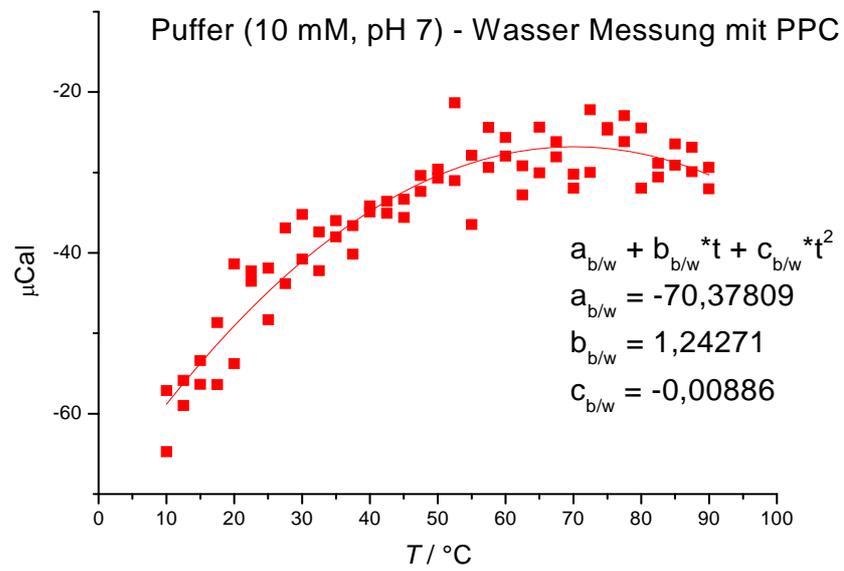
a)



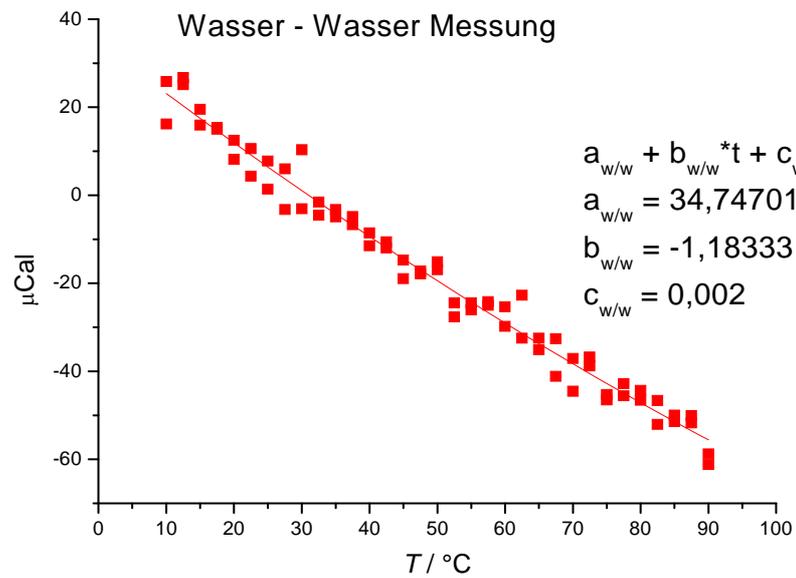
b)



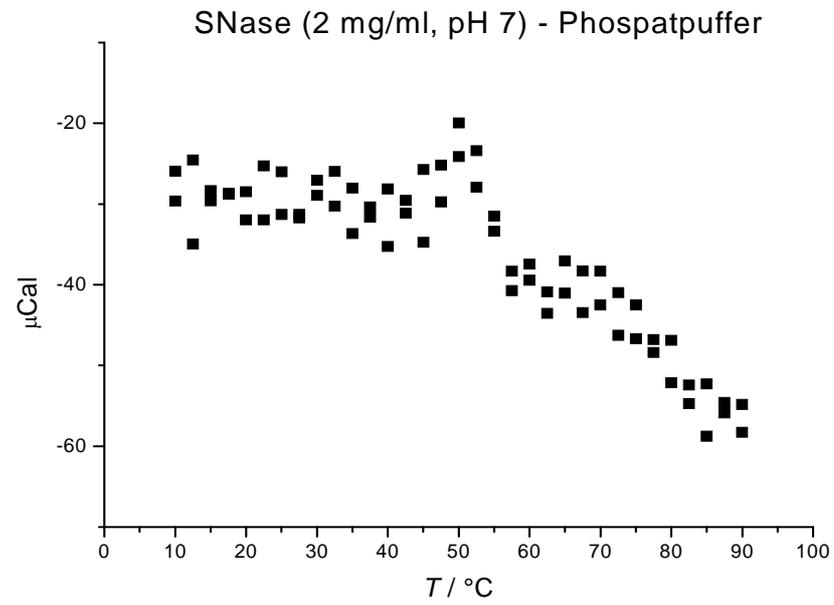
c)



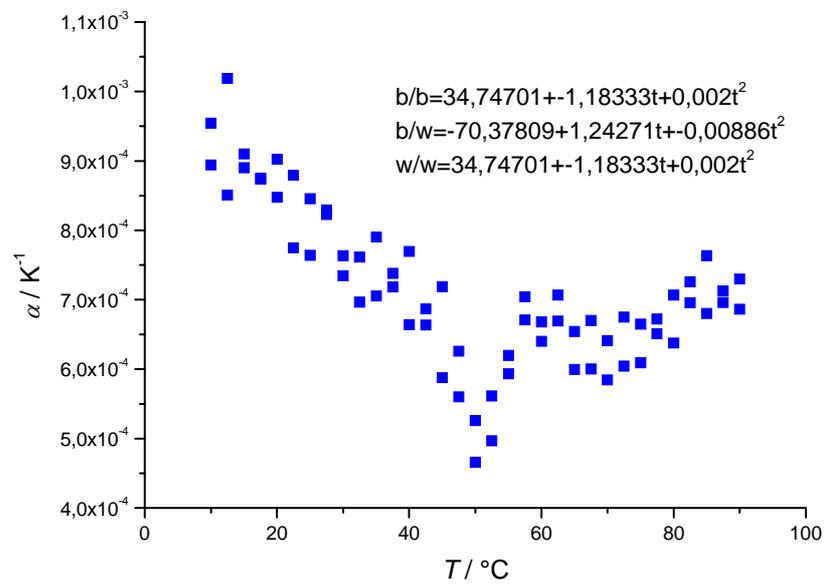
d)



e)



f)



g)

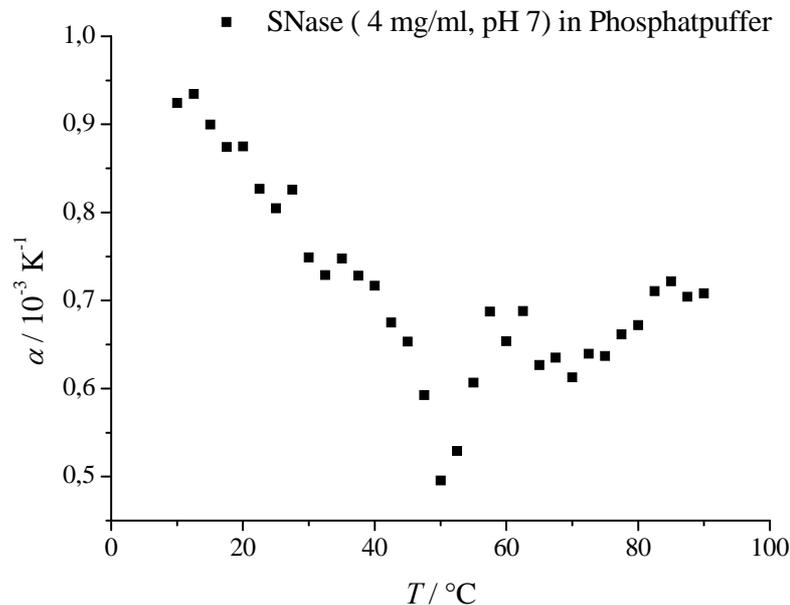


Abbildung 11: a) zeigt einen schematischen Kurvenverlauf eines Drucksprungs einer Lösung bei einer bestimmten Temperatur. b) bis e) zeigt die Wärmedifferenzen in Abhängigkeit der Temperatur für die einzelnen gemessenen Lösungsmittel und das Protein. Die Abbildung f) stellt den erhaltenen Ausdehnungskoeffizienten α der Wildtyp SNase als Funktion der Temperatur dar. Abbildung g) zeigt die untergrundkorrigierte und gemittelte Abbildung des Wildtyps der SNase.

Abbildung 11a) stellt einen schematischen Scan einer PPC-Messung bei einer Temperatur dar. Die beiden Peaks zeigen die Differenz der Wärmeänderung zwischen den beiden Zellen bei einem Drucksprung von ± 5 bar. Der erste Peak zeigt diese Veränderung bei einer Druckverringerung, der zweite Peak zeigt den Peak für eine Druckerhöhung. Die Fläche unter den Peaks sollte gleich groß sein, welches stark von der Füllhöhe (0,514 mL) der beiden Zellen abhängt. Die Abbildungen 11b)-g) dokumentieren einen kompletten Auswertungszyklus am Beispiel für Staphylokokken Nuklease (WT SNase). Die in den Abbildungen dargestellten quadratischen Gleichungen und ihre Parameter werden von Origin 7 (MicroCal) festgelegt (ebenfalls in den Thermogrammen zu sehen). Nach der Berechnung des Ausdehnungskoeffizienten (Abbildung 11f)) fällt auf, dass zwei Messpunkte pro Temperaturschritt erhalten werden (ein Punkt für die Druckerhöhung, ein Punkt für die Druckerniedrigung). Abbildung 11g) zeigt nun den für jeden Temperaturschritt gemittelten Expansionskoeffizienten der WT SNase als Funktion der Temperatur.

Anhand von Abbildung 11g) wird ΔV nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{\Delta V}{V_s^\circ} = \int_{T_1}^{T_2} \alpha \cdot dT \quad (2.8).$$

Die Grenzen für das Integral, T_1 und T_2 , folgen aus der jeweiligen DSC Messung (s. Abbildung 12). ΔV beschreibt die Volumenänderung während der Entfaltung, V_s° (Einheit mL/g) ist das partielle spezifische Volumen der Probe (für SNase 0,754 mL/g), T die Temperatur und α ist der thermische Ausdehnungskoeffizient. Der rote Balken des Abbildungs soll die Grenzen T_1 und T_2 veranschaulichen. Die Integration der PPC Fläche erfolgt innerhalb dieser Grenzen. Die Fläche beträgt in diesem Beispiel $\Delta V/V^\circ = -0,98319 \cdot 10^{-3}$. Für die Volumenänderung folgt daraus: $\Delta V = V \cdot (-0,98319 \cdot 10^3) \cdot M$ in der Einheit mL/mol. M ist die molare Masse der WT SNase.

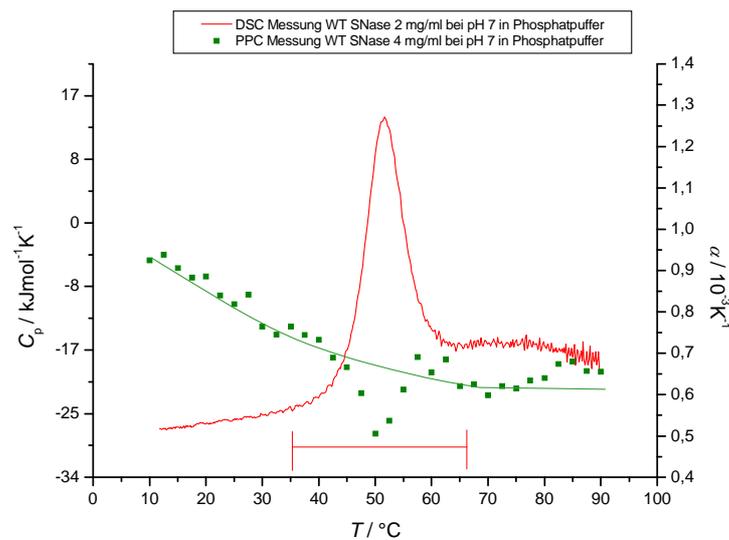


Abbildung 12: Die Abbildung zeigt eine DSC-Messung (rote Kurve) und eine PPC-Messung (grüne Vierecke) des Wildtyps der SNase. Der rote Balken veranschaulicht die Integrationsgrenzen (s. Gleichung 2.8), um den Zusammenhang mit der DSC-Kurve darzustellen. Die grüne Linie zeigt die Basislinie der PPC Kurve der Probe (grüne Vierecke). Die Fläche unter der Basislinie wird mit den festgelegten Grenzen, die in der DSC-Kurve abgelesen werden, integriert.

2.3 Ultraschall- und Dichtemessungen

Die Dichtemessungen wurden an einem DMA 5000 (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) durchgeführt. Die Messergebnisse wurden für die Berechnungen der adiabatischen Kompressibilität verwendet.

Bei der Dichtemessung handelt es sich um ein oszillierendes U-Rohr. Wichtig für diese Messungen war, dass die Lösungen lange entgast wurden. In kalten Lösungen löst sich Luft besser als in warmen. Diese tritt bei hohen Temperaturen in Form von Blasen aus. Die Blasenbildung würde die Dichtemessung im großen Maße verfälschen. Auch bei dieser Methode wurde, wie bei den kalorimetrischen Messungen, zuerst der Puffer als Referenz gemessen. Mit der anschließenden Dichtemessung der Probe (Probe+Puffer) konnte somit das partielle Molvolumen berechnet werden:

$$V^0 = \frac{1}{c} - \frac{\rho - c}{\rho_0 \cdot c} \quad (2.9).$$

wobei c die Konzentration der Probe bezeichnet (g/mL), ρ_0 und ρ sind die Dichten der Lösung und der Probe in Lösung.

Die Messung der Ultraschallgeschwindigkeit wurde an einem Ultraschallgerät der Firma Reso Scan System (TF Instrumente GmbH, Heidelberg) mit einem Signalüberträger aus einem Einkristall aus Lithium Niobat mit einer Grundfrequenz von 9,5 MHz durchgeführt. Das Instrument besteht aus zwei Zellen, die sich in einem Metallblock mit einem Peltiér Thermostat befinden. Auch bei dieser Methode wurde eine Puffer-Puffer Messung (Puffer in beiden Zellen) gemessen und anschließend der Puffer in einer Zelle gegen die zu messende Probe ausgetauscht. Die Ultraschallgeschwindigkeit von Lösungen basiert auf der Messung der Geschwindigkeit und Dämpfung einer akustischen Welle, die mit hoher Ultraschallfrequenz durch die Lösung geht. Ein elektronisches Signal wird durch einen piezoelektronischen Signalüberträger (hier ein Einkristall aus Lithium Niobat) in einen Schallimpuls umgewandelt. Ein anderer elektronischer Signalwandler konvertiert die erhaltene Ultraschallwelle in ein elektronisches Signal für die Analyse. Die Schallgeschwindigkeit kann durch das Messen eines Zeitintervalls zweier aufeinander folgender Pulse bestimmt werden. Mit dieser Methode können Rückschlüsse auf die Veränderung der Hydratation der Probe mit der Temperatur geschlossen werden. Als Referenz wird das reine Lösungsmittel (Puffer) gemessen.

Dabei befindet sich in beiden Zellen (Füllmenge 0,2 mL) Puffer. Bei der Probenmessung verbleibt der Puffer in der linken Zelle. Die rechte Probe wird mit der zu messenden Probe befüllt. Für jeden Temperaturschritt müssen die Geschwindigkeiten voneinander abgezogen werden (Probe-Puffer).

Die adiabatische Kompressibilität ist die negative erste Ableitung des Volumens nach dem Druck bei konstanter Entropie (Taulier, N., Chalikian, T. V., 2002):

$$K_s = -\left(\frac{\partial V}{\partial p}\right)_s \quad (2.10).$$

Anhand der Ultraschalldaten kann nun die partielle, molare adiabatische Kompressibilität berechnet werden

$$K_s^0 = \beta_{s0} \cdot (2V^0 - 2[U] - M / \rho_0) \quad (2.11)$$

mit V^0 , partielles Molvolumen, M , Molmasse der Probe (g/mol) und $[U] = U - U_0 / U_0 C$ die relative molare Ultraschallgeschwindigkeit der Lösung mit C , der molaren Konzentration der Probe, U_0 und U sind die Ultraschallgeschwindigkeiten der Lösung und der Probe in Lösung.

Anhand dessen kann der adiabatische Kompressibilitätskoeffizient der Lösung berechnet werden:

$$\beta_{s0} = (U_0^2 \cdot \rho_0)^{-1} \quad (2.12)$$

mit U_0 und ρ_0 , der Ultraschallgeschwindigkeit und der Dichte des Puffers.

Gemäß

$$K_s^0 = V^0 \cdot \beta_s \quad (2.13)$$

kann β_s , der adiabatische Kompressibilitätskoeffizient der Probe, berechnet werden.

Die partielle molare Kompressibilität einer Probe kann als eine Summe der intrinsischen Kompressibilität K_{SM} und der Differenz zwischen der Kompressibilität der Hydratschicht und der bulk Schicht ΔK_{Sh} ausgedrückt werden:

$$K_s^0 = K_{SM} + \Delta K_{Sh} \quad (2.14).$$

Im Falle von Tripeptiden, auf die diese Methode angewendet wurde, ist die intrinsische Kompressibilität K_{SM} , welche größtenteils durch die kovalenten Bindungen und die äußeren Elektronenhüllen beeinflusst wird, bei diesem Modell sehr klein und kann daher vernachlässigt werden (Kharakoz, D. P., Sarvazyan, A. P., 1993, Chalikian; T. V. *et al.*, 1994, Taulier, N., Chalikian, T. V., 2002).

Die partiell molare isotherme Kompressibilität kann durch folgende Beziehung berechnet werden:

$$K_T^0 = K_s^0 + \left(\frac{T\alpha_0^2}{\rho_0 C_{p,0}} \right) \cdot \left(\frac{2E^0}{\alpha_0} - \frac{C_p^0}{\rho_0 C_p^0} \right) \quad (2.15).$$

$C_{p,0}$ bezeichnet die spezifische Wärmekapazität bei konstantem Druck des Puffers, α_0 ist der Ausdehnungskoeffizient des Puffers, $E^0 = \alpha \cdot V^0$ ist die partielle molare Ausdehnung der Probe und wird mit dem Expansionskoeffizienten und molaren Volumen der Probe berechnet; $C_p^0 = C_p \cdot M$ bezeichnet die partielle molare Wärmekapazität, die aus den Absolutdaten der C_p -Werte und der molaren Masse der Probe berechnet werden kann. Die Absolutwerte der Wärmekapazitäten, die aus der DSC-Messung erhalten werden, werden durch folgende Beziehung ausgerechnet:

$$C_p = \frac{\Delta C_p}{m} + \frac{V^0 \cdot C_{p,0}}{V_0^0} \quad (2.16).$$

ΔC_p ist die aus der DSC erhaltenen Differenz der Wärmekapazitäten zwischen Probe und Puffer, V^0 und V_0^0 sind die partiellen spezifischen Volumina des Puffers und der Probe. Der isotherme Kompressibilitätskoeffizient β_T kann, analog der Beziehung in Gleichung 2.13, anhand der gewonnen isothermen Kompressibilitäten K_T bestimmt werden:

$$K_T = \beta_T \cdot V^0 \quad (2.17).$$

Der adiabatische und der isotherme Kompressibilitätskoeffizient stehen miteinander in Korrelation:

$$\beta_T = \frac{\beta_s + T\alpha^2}{\rho \cdot C_p} \quad (2.18).$$

Analog kann die isotherme Kompressibilität als eine Funktion der intrinsischen isothermen Kompressibilität und dem Kompressibilitätseffekt der Hydratation ausgedrückt werden (vgl. Gleichung 2.14):

$$K_T = K_{TM} + \Delta K_{Th} \quad (2.19).$$

Auch hier kann über kleine Moleküle gesagt werden, dass sie wahrscheinlich hauptsächlich vom Hydratationsterm, das heißt nur von der Wechselwirkung des Moleküls mit dem Lösungsmittel, abhängen und dass der intrinsische Term, analog zur adiabatischen Kompressibilität, vernachlässigt werden kann (Taulier, N., Chalikian, T. V., 2002).

In beiden Fällen, Gleichung 2.14 und Gleichung 2.19, drücken der Hydratationsterm die Wechselwirkung zwischen Probe und Lösungsmittel aus und stellen daher eine Möglichkeit dar etwas über die Stärke dieser Wechselwirkungen aussagen zu können. Dieses ist auch abhängig von der Natur der Bindung (Ladung oder Polarität) im Molekül.

2.4 FT-IR Spektroskopie

Mit dieser Methode können Moleküle untersucht werden, die entweder über ein permanentes oder ein während der Schwingung sich änderndes Dipolmoment aufweisen. Bei Proteinen bzw. in diesem Fall Peptiden, sind die wesentlichen meßbaren Schwingungen auf das Peptidrückgrat zurückzuführen. In dieser Arbeit wurden sämtliche FT-IR Kurven der Trialanine in Bezug auf ihre Amid I Bande (ca. $1710-1550\text{ cm}^{-1}$) untersucht. Die Messungen wurden an einem Nicolet 5700 Spektrometer von Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt, welches über einen Quecksilber-Cadmium-Tellur Detektor (MCT) verfügt, der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird. Für die Messungen wurden CaF_2 Plättchen und Mylar Folie verwendet. Die Füllmenge betrug bei jeder Messung $20\ \mu\text{l}$. Die Temperaturzelle wurde durch ein Thermostat (Lauda) temperiert. Jedes Spektrum bestand aus 256 Interferogrammen mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} . Da Wasser eine hohe Absorption direkt in der Amid I Bandenregion besitzt, wurde die ganze Messung über die Probenkammer mit trockener Luft gespült. Die Spektren wurden hintergrundkorrigiert (mit D_2O -Werten bei der jeweiligen Temperatur), basislinienkorrigiert und mit einer Gauß+Lorentz-Funktion gefittet.

2.5 Druck-Sprung-Fluoreszenz-Spektroskopie

Fluoreszenz und Phosphoreszenz sind Lumineszenzprozesse. Nach Anregung eines Moleküls in einen elektronisch angeregten Zustand erfolgt die Relaxation in den elektronischen Grundzustand durch Emission eines Photons.

Die Hochdruckexperimente wurden an einer Hochdruckzelle aus Stahl, die am CBS Institut in Montpellier (Frankreich) konstruiert wurde und aus Saphirfenstern besteht, durchgeführt. Eine ausführliche Beschreibung ist bei Royer, C. A. *et al.*, 1993, zu finden. Die Fluoreszenzmessungen wurden am CBS Institut in Montpellier (Frankreich) unter der Anleitung von Frau Dr. C. Royer durchgeführt. Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem ISS KOALA Instrument (ISS, Champaign, IL, USA) durchgeführt. Die ISS Anregungsquelle und der Monochromator waren mit einer Hochdruckzelle (aus Stahl) über optische Fasern verbunden. Für die Anregung und die Emission wies der Monochromator Schlitze von 8 nm auf und die Anregungswellenlänge betrug 295 nm. Während der Emission wurde sie auf 335 nm gesetzt.

Für die Messungen wurde die Änderung der Tryptophan-Bande als Funktion des Drucks gemessen. Tryptophan besitzt eine aromatische Seitenkette und läßt sich daher als Fluorophor im UV-Bereich verwenden. Der Vorteil liegt darin, dass Tryptophan bereits in der SNase vorkommt und daher ein intrinsischer Fluorophor ist. Es muß daher kein zusätzlicher Fluorophor verwendet werden. Tryptophan stellt einen guten Sensor für die Strukturänderung eines Proteins dar. SNase besitzt nur einen Tryptophanrest. Dieses macht die Fluoreszenzmessung recht eindeutig, da sämtliche gemessenen Änderungen dann nur diesem einen Tryptophanrest zugeordnet werden können.

Die erste Messung wurde immer bei Normaldruck aufgenommen, um einen Vergleichswert zu haben und um zu überprüfen, ob sich das Protein im nativen Zustand befand. Es wurde eine GuHCl-Konzentration von 0,5 M gewählt, da bei höheren Konzentrationen das Protein bereits bei Normaldruck denaturiert vorlag, bei geringeren Konzentrationen jedoch ein höherer Druck notwendig war, um das Protein vollständig zu entfalten. Die Proteine wurden bis 2500 bar mit dieser Methode vermessen. Die Drucksprünge betragen 100 bar. Der Druck wurde aufgebaut und nach 10 Sekunden das Ventil geöffnet, um somit einen Drucksprung von 100 bar zu erreichen. Die Relaxationsprofile wurden in einem Zeitraum von ca. 400-600

Sekunden aufgenommen. Die finale Fluoreszenzintensität bei jedem Druck wurde als ein Integral des Emissionsspektrums (315-450 nm) gemessen. Die integrierten Intensitätswerte wurden mit dem Programm BIOQS analysiert mit Hilfe eines analytischen Parameters für die freie Energie der Entfaltung:

$$\partial\Delta G / \partial p = -\Delta V_f \quad (2.20)$$

$$\text{mit } \Delta G_f^0 = -RT \ln K_f \text{ und } K_f = [F]/[U] = \frac{(I_p - I_f)}{(I_i - I_p)}.$$

I_i , I_p und I_f entsprechen den Fluoreszenzintensitäten bei Atmosphärendruck, einem Druck p und dem finalen Druck. Unsicherheiten der freien Energie und der Volumenänderungen wurden durch ein Intervall abgeschätzt. Die Druck-Sprung-Relaxationsprofile wurden als Funktion der Zeit nach einem Druck-Sprung aufgenommen, angezeigt bei 335 nm, und analysiert nach der klassischen Transition-State-Ensemble-Theorie (TSE-Theorie) für eine abklingende Exponentialfunktion:

$$I_t = I_0 e^{-t/\tau} + C \quad (2.21).$$

Für einfache Zwei-Zustands-Reaktionen ist die Relaxationszeit $\tau_{(p)}$ bei jedem Druck gleich der inversen Summe der beiden Geschwindigkeitskonstantenkonstanten bei diesem Druck:

$$\ln \tau = \frac{1}{(k_{f(p)} + k_{u(p)})} \quad (2.22).$$

Die Druckabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten hängt von den Aktivierungsvolumina für die Faltung und die Entfaltung, ΔV_f^* und ΔV_u^* ab bzw. von den Geschwindigkeitskonstanten k_{fo} und k_{uo} bei Atmosphärendruck

$$k_{f(p)} = k_{fo} e^{-p\Delta V_f^*/RT} \text{ und } k_{u(p)} = k_{uo} e^{p\Delta V_u^*/RT} \quad (2.23).$$

Die Analyse wurde auf zwei Parameter, Faltung oder Entfaltung, beschränkt. Dieses ist abhängig davon, ob der Druckeffekt mehr auf der Seite der Faltung oder der Entfaltung liegt. Es wurde die Gleichgewichtsvolumenänderung und die freie Energie für die Faltung eingesetzt gemäß der Beziehung

$$\Delta G_f^0 = -RT \ln K_f = -RT \ln \frac{k_f}{k_u} \text{ und } \Delta V_f^0 = \Delta V_f^* - \Delta V_u^* \quad (2.24),$$

$$\text{so dass } k_f = k_u \cdot K_f \text{ oder } k_u = \frac{K_f}{k_f} \quad (2.25)$$

$$\text{und } \Delta V_f^* = \Delta V_f^0 + \Delta V_u^* \text{ oder } \Delta V_u^* = \Delta V_f^* - \Delta V_f^0 \quad (2.26)$$

folgt (Methodenbeschreibung und Gleichungen entnommen aus Mitra, L. *et al.*, 2007).

3. Experimenteller Teil

3.1 Präparation und Messung

3.1.1 Aminosäuren, Tripeptide

Die Aminosäuren (L)-Glycin, (L)-Alanin, (L)-Leucin, (L)-Methionin, (L)-Phenylalanin und (L)-Methionin und die Tripeptide (L)-Triglycin (GGG), Di-(L)-glycyl-(L)-alanin (GAG), Di-(L)-glycyl-(L)-leucin (GLG), Di-(L)-glycyl-(L)-glutamin (GQG), Di-(L)-glycyl-(L)-methionin (GMG), Di-(L)-glycyl-(L)-phenylalanin (GFG), Ac-AAA-OMe, Ac-A-OMe wurden von der Firma Bachem (Deutschland) beschafft und wurden ohne weitere Aufreinigung in einem 10 mM Phosphatpuffer (Merck, Na₂HPO₄) gelöst. Die verschiedenen pH-Werte wurden mit HCl (Merck) und NaOH (Merck) eingestellt. Es wurden in diesem Versuchsteil ausschließlich linksdrehende Aminosäuren verwendet. Nach den Lösemittelmessungen (siehe Kapitel 1.2) wurden die Aminosäuren mit dem jeweiligen Puffer desselben pH-Wertes gemessen. Alle Messungen wurden dreimal mit frisch angesetzten Lösungen wiederholt, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Anschließend wurden Triglycin, die Tripeptide GXG, deren Mitte dieselben zuvor gemessenen reinen Aminosäuren enthielten (GXG, X = reine gemessene Aminosäure), gemessen. Diese Messungen wurden alle bei einem pH-Wert von 5,5 und einer Konzentration von einem Gewichtsprozent (ca. 10 mg/ml) durchgeführt. Ausnahmen stellten die konzentrationsabhängigen Messungen von Alanin (Konzentration 10, 20 und 50 mg/ml) und die pH-Messungen von Alanin (verwendete pH-Werte: pK₁ = 2,3, pK₂ = 9,9, isoelektrische Punkt = 6,1) dar. Die blockierten Aminosäuren Ac-A-OMe und Ac-AAA-OMe wurden unter den gleichen Bedingungen (pH-Wert, Konzentration) gemessen. Für sie wurde näherungsweise dasselbe partielle Molvolumen der korrespondierenden Aminosäuren verwendet; Alanin für Ac-A-OMe und Alanin für Ac-AAA-OMe.

Für die PPC wurde das partielle spezifische Molvolumen benötigt, welches nicht nur das intrinsische sondern auch das verdrängte Volumen in der Lösung beschreibt (Brandts, J. F., *et. al.*, 2002). Die partiellen spezifischen Molvolumina für die Aminosäuren konnten in der Literatur gefunden werden (Häckel, M. *et al.*, 1999). Anhand dieser Informationen konnte auch das partielle spezifische Molvolumen der

Tripeptide berechnet werden (Reading, J. F., Hedwig, G. R., 1990). Denn nach Gleichung 3.1)

$$V^{\circ}(X) = V_2^{\circ}(\text{GXG}) - V_2^{\circ}(\text{GGG}) \quad (3.1)$$

folgt, dass die Seitenkette eines Tripeptids GXG durch die Differenz des Tripeptids und des korrespondierenden Tripeptids GGG errechnet werden kann. $V^{\circ}(X)$ ist das partielle spezifische Molvolumen der Seitenkette, V_2° sind die partiellen spezifischen Molvolumina von Triglycin GGG und dem substituierten Triglycin GXG. Wird Gleichung 3.1) nach $V_2^{\circ}(\text{GXG})$ umgestellt,

$$V_2^{\circ}(\text{GXG}) = V^{\circ}(X) + V_2^{\circ}(\text{GGG}) \quad (3.2)$$

wird ersichtlich, dass das gesuchte partielle spezifische Molvolumen für jedes substituierte Triglycin errechnet werden kann, sofern die partiellen spezifischen Molvolumina der Seitenkette und des Triglycins bekannt sind. Sämtliche Tripeptide wurden nach diesem Schema berechnet:

X	$V^{\circ}(X)^1$ ml/g	$V_2^{\circ}(\text{GXG})$ ml/g	$V_2^{\circ}(\text{AXA})$ ml/g	V° ml/g
Glycin	0,49 ¹	0,59 ²	0,68 ⁵	
Alanin	0,61 ¹	0,64 ²	0,71 ⁶	
Leucin	0,77 ¹	0,72 ²		
Phenylalanin	0,70 ³	0,68 ⁴		
Methionin	0,67 ³	0,66 ⁴		
Glutamin	0,60 ³	0,63 ⁴		
Ac-A-OMe				0,61 ¹
Ac-AAA-OMe				0,71 ⁶

Tabelle 1: Partielle Molvolumina der Tripeptide GXG, AAA und AGA

¹ Werte aus Häckel, M. *et al.*, 1999

² Werte aus Reading, J. F., Hedwig, G. R., 1990

³ nach Gleichung 3.1 berechnete Werte

⁴ nach Gleichung 3.2 berechnete Werte

⁵ (3.3) $V_2^{\circ}(\text{AGA}) = V_2^{\circ}(\text{GGG}) + 2 \cdot V^{\circ}(-\text{CH}_3)$

⁶ (3.4) $V_2^{\circ}(\text{AAA}) = V_2^{\circ}(\text{GGG}) + 3 \cdot V^{\circ}(-\text{CH}_3)$

3.1.2 Links- und rechtsdrehende Trialanine

Die vier Isomere von Trialanin (L)-Alanyl-(L)-alanyl-(L)-alanin (LLL), (D)-Alanyl-(D)-alanyl-(D)-alanin (DDD), (L)-Alanyl-(D)-alanyl-(L)-alanin (LDL), (D)-Alanyl-(L)-alanyl-(L)-alanin (DLL) stammten von der Firma Bachem (Deutschland) und wiesen eine Reinheit von > 98% auf. Sie wurden mit PPC, DSC, Ultraschall-, Dichte- und FT-IR-Messungen untersucht. Für alle Messungen sind sämtliche Trialanine ohne jegliche Aufreinigung verwendet worden. Die Konzentration betrug bei allen Messungen 10 mg/ml mit einem pH-Wert von 5,7 (isoelektrischer Punkt, berechnet mit Hilfe der pK Daten von Ellenbogen, E., 1952) in Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 mit Ausnahme FT-IR: Na_2DPO_4 (Merck) und eine Justierung des pH-Werts mit DCl (Merck)) gewählt, um eine direkte Vergleichbarkeit der Messungen zu haben. Die Wahl des isoelektrischen Punkts (5,7) sollte Ladungseffekte minimieren, da die Nettoladung des Gesamtmoleküls an diesem Punkt neutral ist.

Sämtliche Messungen sind mindestens einmal wiederholt worden. Dafür wurde jedesmal eine frische Probe verwendet. Der Temperaturbereich für sämtliche Trialanin-Messungen bei allen verwendeten Methoden betrug 5°C bis 60°C. Die PPC- und DSC-Messungen wurden wie in Kapitel 1.2 beschrieben durchgeführt bzw. ausgewertet. Die Heizrate für die DSC-Messungen entsprach 40°C/h (ca. 1,5°C/Minute). Die PPC-Messungen wurden in 2°C-Schritten durchgeführt. Für die Dichtemessungen war es notwendig, die Lösungen lange (ca. 10 Minuten) zu entgasen, um eine Blasenbildung bei höheren Temperaturen zu vermeiden, und entsprechend Kapitel 1.3 gemessen und ausgewertet. Für diese Methode wurden Temperaturschritte von 2,5°C verwendet. Auch für die Ultraschallgeschwindigkeitsmessungen sind Temperaturschritte von 2,5°C verwendet worden.

Da Wasser genau im Bereich der Amid I Bande absorbiert, wurde das Gerät ständig mit CO_2 gespült. Für die FT-IR Messungen wurde ein 10 mM deuterierter Phosphatpuffer (Na_2DPO_4) verwendet. Als Referenzlösung wurden D_2O Meßwerte bei der jeweiligen Temperatur verwendet und von den Probenmessungen abgezogen. Alle Trialanine wurden von 5°C bis 60°C in 5°C-Schritten vermessen.

3.1.3. Staphylokokken Nuklease und Mutationen

Der Wildtyp der SNase (WT SNase) (Nuklease A eines V8 Stranges des *Staphylococcus Aureus* aus einer λ Expression eines *Escherichia coli* Strangs Ar λ 9) und die Mutationen wurden von Frau C. A. Royer (CBS Institut, Montpellier, Frankreich) zur Verfügung gestellt und ohne jegliche Aufreinigung im jeweiligen Puffer gelöst. Für pH 4,5 wurde ein 10 mM Citrat-Phosphatpuffer (Merck), für pH 7 ein 10 mM Phosphatpuffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, Merck) und für pH 9 ein 10 mM Glycin-NaOH (Glycin, Bachem, NaOH, Merck) Puffer verwendet (Anleitung zur Erstellung der Pufferlösungen erfolgte nach Mohan, C., 2003).

Es wurde eine Konzentration von 2 mg/ml für die DSC-Messungen und 5 mg/ml für die PPC-Messungen verwendet.

Die Messungen wurden an SNase mit DSC und PPC wie in Kapitel 1.2 beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

Die Messungen mit der Druck-Sprung Fluoreszenz-Methode wurden in Montpellier (Frankreich) am CBS Institut unter der Anleitung von Frau Dr. Royer durchgeführt. Die Konzentrationen betragen 0,25 μL . Der verwendete Puffer war ein 50 mM Tris (Merck, Frankreich) Puffer. Für die Mutationen der SNase wurde der jeweilige pH-Wert mit NaOH (Sigma Aldrich, Frankreich) oder HCl (Sigma Aldrich, Frankreich) justiert. Um eine leichtere Entfaltung zu erhalten, wurde eine 0,5 mM Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl , Merck (Frankreich)) Lösung verwendet.

4. Ergebnisse und Diskussion

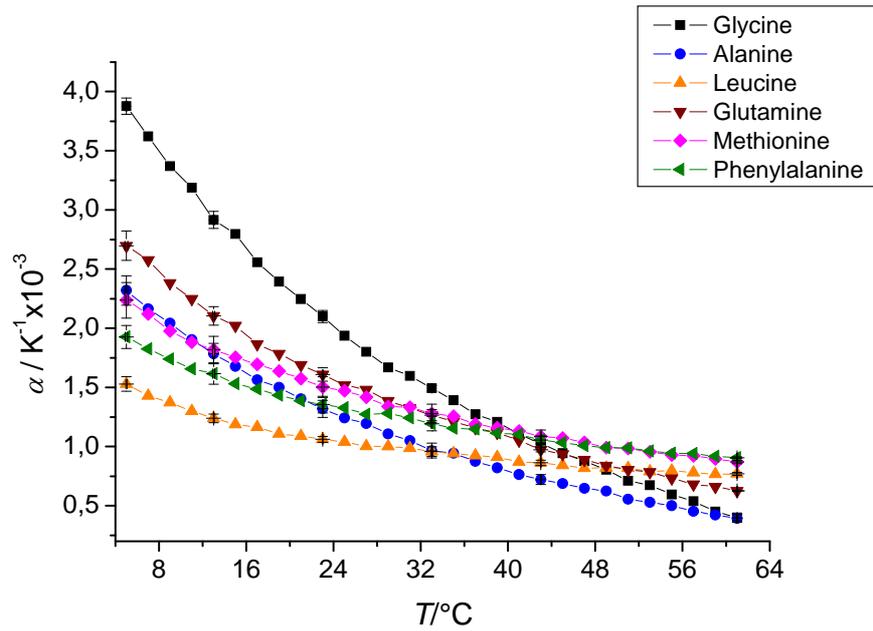
4.1 Aminosäuren und Tripeptide

Die Aminosäuren Glycin, Alanin, Methionin, Phenylalanin, Glutamin, Ac-A-H bzw. die Tripeptide GGG, GAG, GMG, GFG, GQG, AAA, AGA und Ac-AAA-H wurden mit der Druck-Perturbation-Kalorimetrie (PPC) vermessen (Präparation s. Kapitel 2.1.1). Jede Messung wurde mindestens zweimal reproduziert. Die Abbildungen zeigen gemittelte Werte, die Fehlerbalken (gezeigt an ausgewählten Punkten) veranschaulichen das Fehlerintervall. Die Daten wurden publiziert in Mitra, L. *et al.*, 2006.

4.1.1 Seitenketteneffekt in verschiedenen Aminosäuren

Um Informationen über den Seitenketteneffekt zu erlangen, wurden die Expansionswerte α der jeweiligen Aminosäure von den α -Werten des Glycins abgezogen (Brandts, J. F., *et al.*, 2002, Gleichung s. Kapitel 2.1.1), gezeigt in Abbildung 13b):

a)



b)

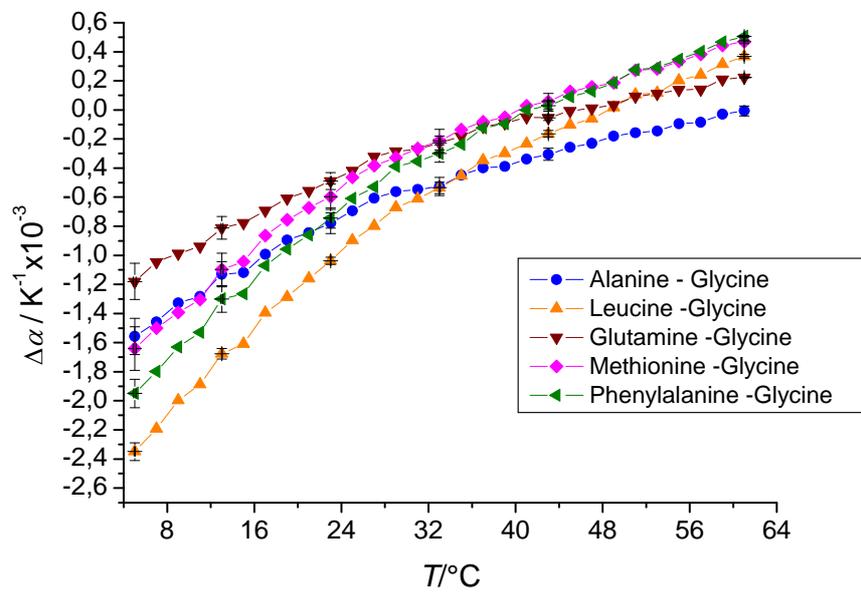


Abbildung 13: a) Thermischer Ausdehnungskoeffizient α als Funktion der Temperatur verschiedener Aminosäuren in Phosphatpuffer (10 mM) bei pH 5,5 und einer Konzentration von 1 Gew. %. b) zeigt den Seitenketteneffekt nach Berechnung $\Delta\alpha_{x-Gly} = \alpha_x - \alpha_{Gly}$.

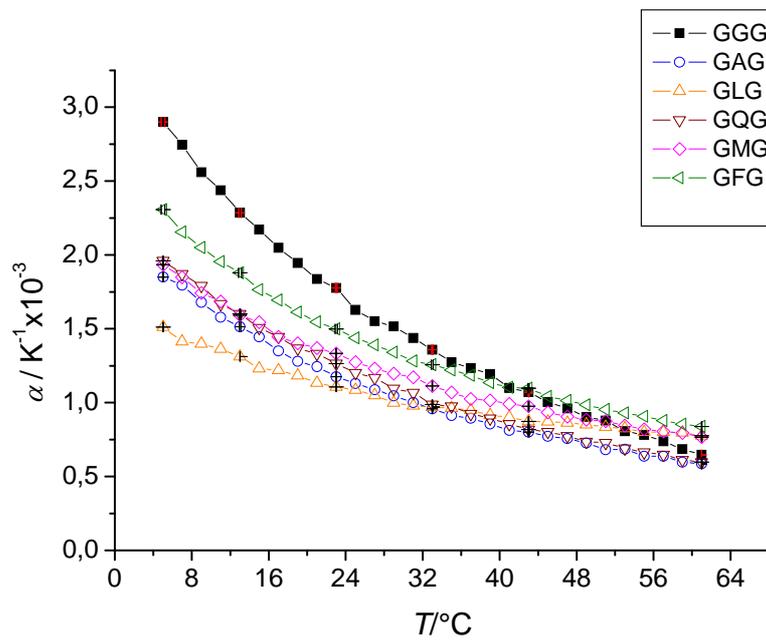
Abbildung 13a) zeigt die Temperaturabhängigkeit der Expansivitäten der Aminosäuren Glycin, Glutamin, Leucin, Alanin, Methionin und Phenylalanin in Natriumphosphatpuffer (Na_2HPO_4) bei pH 5,5 und einer Konzentration von 1 Gew. % (ca. 10 mg/ml). Im Vergleich zu anderen Aminosäuren, weist Glycin einen sehr hohen α -Wert bei tiefen Temperaturen auf (ca. $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$). Dagegen zeigt Leucin den tiefsten Expansionswert (ca. $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$) bei ca. 7°C . Alle gemessenen Aminosäuren zeigen den gleichen Kurvenverlauf mit steigender Temperatur, der α -Wert nimmt in Abbildung 13 a) ab. Glycin und Glutamin sind Beispiele für hydrophile Aminosäuren im Gegensatz zu Leucin, Alanin, Methionin und Phenylalanin, welche hydrophobe Seitenketten aufweisen und demzufolge niedrigere α -Werte und $\alpha(T)$ Werte zeigen (J. F. Brandts *et. al.*, 2002). Um den Ionisationseffekt zu eliminieren bzw. um die Natur der Seitenkette R der Aminosäure näher zu untersuchen, wurde die Differenz nach Gleichung $\Delta\alpha_{x-\text{GLY}} = \alpha_x - \alpha_{\text{Gly}}$ (Abbildung 13b)) berechnet. Es fällt auf, dass alle Kurven negative α -Werte bei tiefen Temperaturen aufweisen, welche erst ab Temperaturen oberhalb von ca. 40°C positive Werte annehmen, Alanin sogar erst ab 60°C . Leucin besitzt den negativsten Ausdehnungskoeffizienten bei tiefen Temperaturen. In Absolutwerten zeigt allerdings Glutamin den niedrigsten Wert. Bei J. F. Brandts *et. al.*, 2002 wurde bereits darauf hingewiesen, dass Moleküle in Lösung, die die Struktur in flüssigem Wasser verstärken, kleine oder sogar negative α -Werte bei niedrigen Temperaturen aufweisen sollten bzw. über sehr große Temperaturkoeffizienten verfügen. Gelöste Moleküle, die die Struktur des Wassers vermindern, zeigen demzufolge ein gegensätzliches Verhalten und besitzen große positive Expansionswerte bei niedrigen Temperaturen bzw. negative Temperaturkoeffizienten. Damit kann begründet werden, warum $\Delta\alpha$ der Seitenkette der Aminosäure bei tiefen Temperaturen immer negativer wird, je hydrophober die Natur der Seitenkette ist. Die gemessenen Werte korrelieren im Allgemeinen recht gut mit einer Hydrophobizitätsskala bzw. mit Messungen der freien Übergangsenergie der Seitenketten von Aminosäuren (z. B. von Cyclohexan zu Wasser [kJ/mol]: Leucin, 20,95; Phenylalanin, 12,47; Methionin, 9,83; Alanin, 7,57; Alanin, 7,57; Glycin, 3,93; und Glutamin: -23,18; Fersht, A., 1999). Die Werte beschreiben sowohl hydrophobe Aminosäuren (z. B. Leucin) als auch hydrophile Aminosäuren (z. B. Glutamin). Anhand der Werte können die verschiedenen Aminosäuren gemäß ihrer Polarität geordnet werden. Bei Betrachtung von Abbildung 13b), fällt auf, dass die Lage der

Kurven der Seitenketten mit diesen Werten recht gut korreliert. Der tiefste Wert liegt bei Leucin (gemäß der Skala die hydrophobste Aminosäure im Vergleich zu den anderen gemessenen Aminosäuren) und der höchste Expansionswert bei tiefen Temperaturen bei Glutamin (die hydrophilste Aminosäure gemäß Skala). Auch die Kurven dazwischen stimmen in ihrer Lage mit der Hydrophobizitätsskala überein.

4.1.2 Seitenketteneffekte in Tripeptiden

Doch treten Aminosäuren für gewöhnlich nicht einzeln, sondern verknüpft in Verbänden auf, wie beispielsweise in Polypeptiden oder Proteinen. Allerdings würden hier wieder sehr viele Effekte die Interpretation der Messungen beeinflussen (z. B. Faltung, Aggregation, Löslichkeit). Daher wurde ein einfaches Modellmolekül gewählt, GXG. Das X bezieht sich auf die zu bestimmende Aminosäure, die zuvor bereits einzeln gemessen wurde (siehe Abschnitt 3.1.1), um so zu gewährleisten, dass die Seitenkette benachbart von zwei Peptidgruppen liegt, vergleichbar mit einer linearen Sequenz in einem Protein (Häkel, M. *et al.*, 1999). Somit ist die Seitenkette auch genügend weit von der ionisierten Endgruppe entfernt, die das Hydratationsverhalten beeinflussen würde (Häcke, M., *et al.*, 2000). Um Information über die Seitenkette zu erhalten, wurde in diesem Fall Triglycin (GGG) als Referenz gemessen (Abbildung 14a). Nach Messung der GXG-Sequenz, wurden die Expansionswerte von denen des Triglycins abgezogen (Abbildung 14b)).

a)



b)

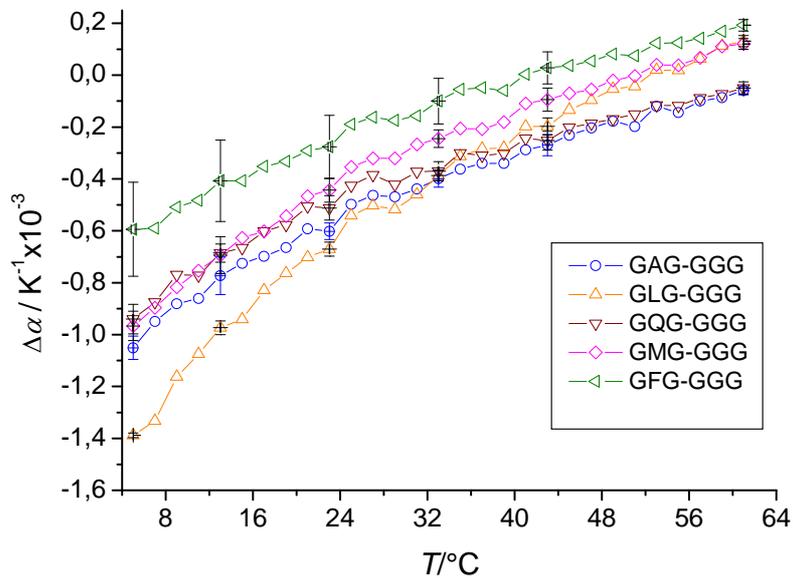


Abbildung 14: a) Thermischer Ausdehnungskoeffizient α als Funktion der Temperatur der GXG-Sequenz (X identisch mit Aminosäure gezeigt in Abbildung 13 und GGG in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 5,5 und einer Konzentration von 1 Gew. %). b) zeigt den Seitenketteneffekt nach der Berechnung von Gleichung $\Delta\alpha_{\text{GGG-GXG}} = \alpha_{\text{GGG}} - \alpha_{\text{GXG}}$.

Abbildung 14a) zeigt die Messergebnisse der Ausdehnungskoeffizienten der gemessenen GXG-Kurven ($X = G, A, L, M, F, Q$). Die Triglycin-Kurve (GGG) zeigt den höchsten Expansionswert (ca. $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$, vgl. Glycin in Abbildung 13a) bei einer Temperatur von ca. 7°C . Jedoch liegt der Wert um eine Größeneinheit unter der des Glycins (ca. $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$). Alle GXG-Kurven zeigen größere oder geringere Werte im Vergleich zu ihren einzelnen Aminosäuren. Eine Ausnahme bildet Leucin; in diesem Fall weisen beide Kurven einen ähnlichen Ausdehnungskoeffizienten auf. Abbildung 14b) verdeutlicht den Seitenketteneffekt der eingebetteten Aminosäuren. In diesem Fall wurden die Expansionswerte der GXG-Messungen von den GGG-Werten abgezogen ($\Delta\alpha_{\text{GGG-GXG}} = \alpha_{\text{GGG}} - \alpha_{\text{GXG}}$). Im Vergleich zu den reinen Aminosäuren fällt auf, dass sämtliche Expansionswerte bei tiefen Temperaturen weniger negative α -Werte aufweisen (z. B. hat die Seitenkette von Alanin einen Wert von ca. $-1,5 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ bei 7°C , in GAG beträgt er ca. $-1,0 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$). Leucin zeigt den negativsten Wert in beiden Fällen, doch auch hier wird der Wert weniger negativ (ca. $-2,4 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ für die Aminosäure bzw. ca. $-1,4 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ in GLG). Der Effekt kann als ein „Abschirmungseffekt“ beschrieben werden. Die benachbarten Glycine (Glycin ist stark hydrophil), schirmen die hydrophobe Seitenkette der mittleren Aminosäure ab, so dass die Hydrophobizität der Seitenkette abnimmt. Dieses kann mit dem Anstieg der α -Werte zu weniger negativen Werten begründet werden. Gerade das Beispiel von Leucin zeigt, dass der hydrophobe Beitrag der Seitenkette des Leucins zum Ausdehnungskoeffizienten durch die äußeren Glycine abnimmt. Die Temperaturabhängigkeit des partiellen Molvolumens der Tripeptidsequenz GXG wurde mit Differenz-Scan-Dichtemessungen untersucht, um eine mögliche Gruppenadditivität für die Proteinfaltung zu untersuchen (Häckel, M., *et al.*, 1999, Häckel, M. *et al.*, 2000). Es erscheint daher sinnvoll, die Seitenketten ebenfalls in zwei Gruppen aufzuteilen, typischerweise in hydrophob („struktur-bildend“ in Bezug auf ihre Wirkung auf die Struktur des Lösemittels) und polar/ionisch („struktur-brechend“). Diese Volumen-Temperaturprofile weisen Steigungen auf, die vergleichbar mit diesen PPC-Daten sind.

4.1.3 Konzentrationseffekte am Beispiel von Alanin

Die Wahl der richtigen Konzentration ist gerade bei großen Molekülen wie Proteinen sehr wichtig, da Interaktionseffekte eine große Rolle spielen und beispielsweise zu Aggregation führen können. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurde die Aminosäure Alanin in verschiedenen Konzentrationen (1, 2, 5 und 10 Gew. %) mit PPC gemessen, s. Abbildung 15.

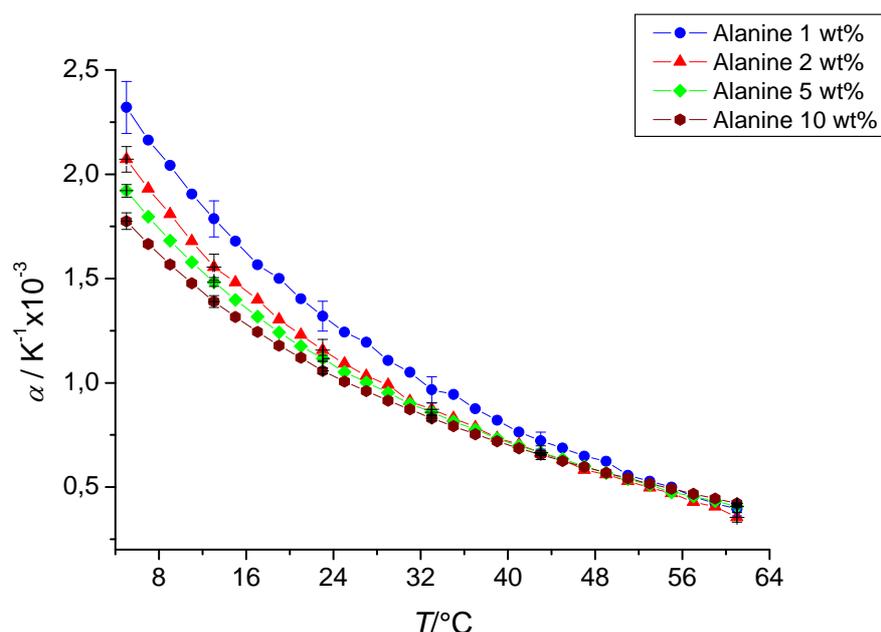


Abbildung 15: Temperaturabhängigkeit des thermischen Ausdehnungskoeffizienten α von Alanin als Funktion der Konzentration (1, 2, 5 und 10 Gew. %) in Phosphatpuffer bei pH 5,5.

Die 1 Gew. % (ca. 10 mg/ml) Alanin-Lösung weist den höchsten Expansionswert bei 7°C auf. Mit ansteigender Konzentration sinkt der Wert bei tiefen Temperaturen um etwa 25% von ca. $2,3 \cdot 10^{-3} K^{-1}$ auf $1,7 \cdot 10^{-3} K^{-1}$. Dies bedeutet, dass α bereits bei solchen Konzentrationen durch intermolekulare Wechselwirkungen beeinflusst wird. Daher scheint es ratsam im Allgemeinen niedrige Konzentrationen zu verwenden. Bei den Proteinmessungen wurden, je nach Sensitivität der Methode, Konzentrationen von 2 oder 4 mg/mL verwendet, um etwaige Interaktionseffekte zu vermeiden. Bei zu hohen Konzentrationen konnte sogar ein Aggregationsverhalten beobachtet werden.

4.1.4 Ladungseffekte am Beispiel von Alanin

Die Natur der Seitenkette (z. B. ihre Ladung) in einer Aminosäure ist entscheidend für ihr chemisches und physikalisches Verhalten in Lösung. Es wurde bereits in der Einleitung darauf hingewiesen, dass die Ladung einer Seitenkette sich mit dem pH-Wert der Lösung ändert (siehe Abbildung 1). Doch wie wirkt sich diese Ladungsänderung auf die PPC-Messung und damit auf den Ausdehnungskoeffizienten α aus? Um dieses zu untersuchen, wurde Alanin bei verschiedenen pH-Werten mit PPC vermessen. Bei pH 2,3 (saurer Bereich, pK_1 Wert von Alanin) liegt die Aminogruppe $-NH_3$ positiv geladen vor. Bei pH 9,9 befindet sich der pK_2 -Wert von Alanin (basischer Bereich). Dies führt dazu, dass die Carboxylgruppe $-COOH$ negativ geladen vorliegt ($-COO^-$). Am isoelektrischen Punkt ($(pK_1 + pK_2)/2$) liegen beide Gruppen zu 50% dissoziiert vor (Stryer, L., 1990) was zu einer neutralen Nettoladung im Alanin führt.

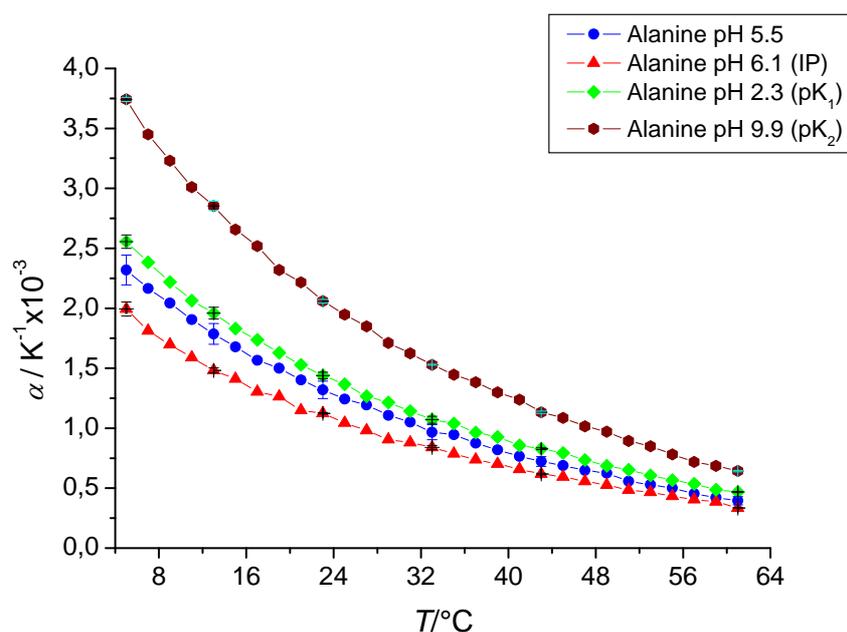


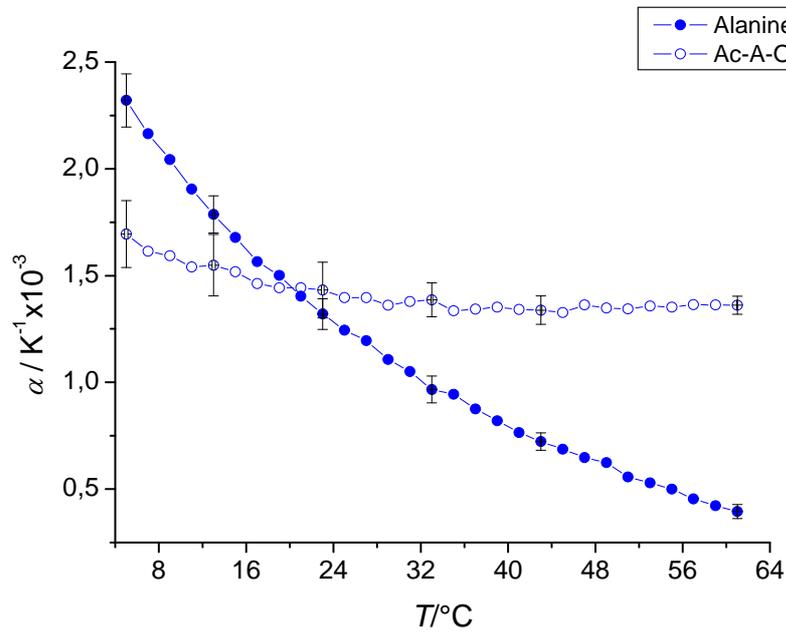
Abbildung 16: Temperaturabhängigkeit des thermischen Ausdehnungskoeffizienten α von Alanin bei ausgewählten pH-Werten (isoelektrischer Punkt von Alanin = 6,1, $pK_1 = 2,3$, $pK_2 = 9,9$).

Abbildung 16 zeigt die pH-Abhängigkeit des Ausdehnungskoeffizienten am Beispiel der Aminosäure Alanin. Den niedrigsten Wert erreicht α bei einem pH-Wert von 6,1 (isoelektrischer Punkt von Alanin), $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ bei einer Temperatur von 7°C , der unter dem Wert bei pH 5,5 liegt. Die Messung bei pH 2,3 weist bereits höhere Expansionswerte auf (geladene Aminogruppe) als die Messung bei pH 5,5 (nahe des isoelektrischen Punkts). Den höchsten Wert erreicht α bei einem pH-Wert von 9,9 (pK_2 -Wert von Alanin), $3,75 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ bei 7°C . Dieses kann auf die starke Hydratation der Carboxylgruppe COO^- zurückgeführt werden. Dieses Ergebnis läßt vermuten, dass geladene Gruppen, in diesem Fall NH_3^+ und COO^- , zu einem Anstieg der α -Werte führen, da ihre stärkere Hydratation einen großen Beitrag zu α liefert. Dieser Beitrag ist, gemäß der experimentellen Daten (s. Abbildung 16), bei der negativ geladenen Carboxylgruppe COO^- am größten.

4.1.5 Blockiertes Alanin und Trialanin

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, wirken sich Ladungen im Molekül auf sein Hydratationsverhalten und somit stark auf die Expansionswerte aus. Um dieses deutlich zu machen, wurde im nächsten Schritt Alanin und Trialanin mit substituierten Gruppen (Ac-N für H-N und $-\text{OMe}$ für $-\text{OH}$) mit PPC gemessen. Im Vergleich dazu wurden in den Abbildungen 7a) und b) jeweils auch das nicht substituierte Alanin (7a)) und Trialanin (7b)) dargestellt.

a)



b)

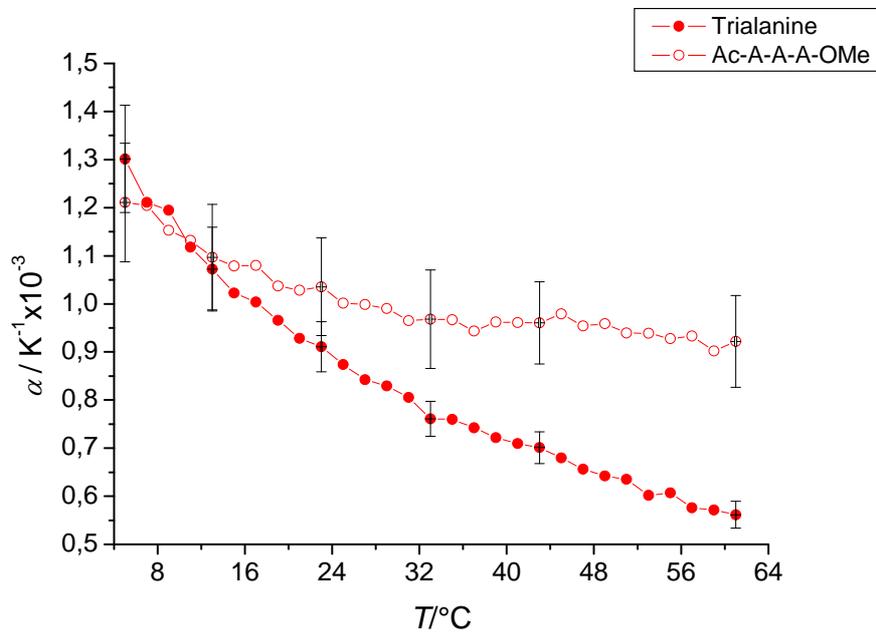


Abbildung 17: Temperaturabhängigkeit des thermischen Ausdehnungskoeffizienten von a) Alanin und b) Trialanin mit „geblockten“ Enden gemessen in Phosphatpuffer bei pH 5,5 und einer Konzentration von 1 Gew. %.

Abbildung 17a) zeigt die PPC-Kurven von Alanin und Alanin mit „blockierten“ Enden. In Abbildung 17b) werden die korrespondierenden Werte für Trialanin gezeigt. In beiden Systemen sind die α -Werte für die Moleküle mit geblockten Gruppen kleiner und weisen eine sehr viel kleinere Steigung für $\alpha(T)$ auf. Dies veranschaulicht, dass die geladenen Gruppen einen starken Hydratationsbeitrag zum Ausdehnungskoeffizienten liefern.

4.2 Links- und rechtsdrehende Trialanine

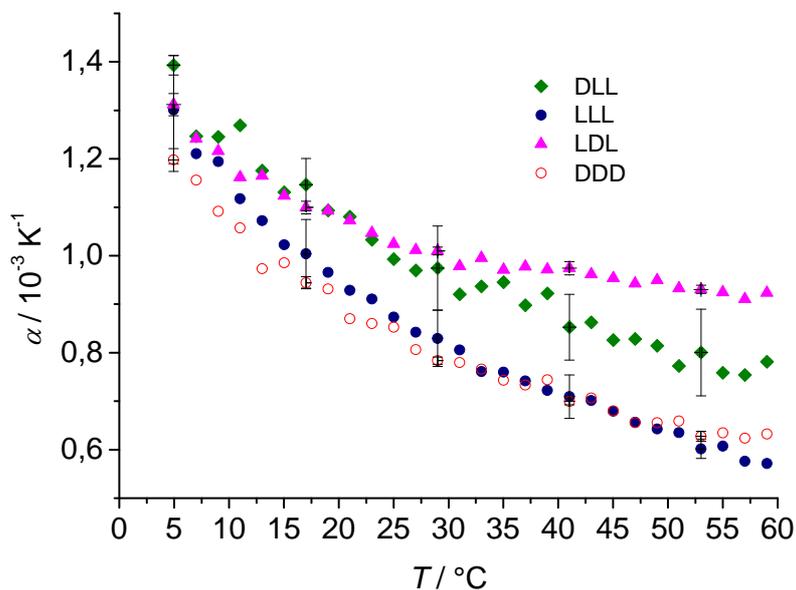
Die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Kapitel zeigen, dass der Expansionskoeffizient α ein sensibler Parameter für das Hydratationsverhalten eines Moleküls ist. Er beschreibt die Volumenänderung als Funktion der Temperatur für ein System aus Molekül und Hydrathülle. Wie bereits erwähnt, besitzt, außer Glycin, beinahe jede Aminosäure ein chirales Zentrum, d. h. sie kann in einer rechts (D) oder links (L) drehenden Form vorkommen. Die 20 existierenden essentiellen Aminosäuren kommen in der Natur bis auf wenige Ausnahmen in Proteinen in ihrer linksdrehenden Form vor. Doch was geschieht eigentlich, wenn eine Verbindung rechtsdrehende Aminosäurekomponenten aufweist, oder gar links- und rechtsdrehende Komponenten beinhaltet? Ändert sich dadurch die Hydratation oder bleibt der Kontakt zum Wasser derselbe, da doch eigentlich dieselben funktionellen Gruppen vorliegen. Ellenbogen (Ellenbogen, E., 1952, 1956a, 1956b, 1956c) untersuchte verschiedene Isomere von Peptiden, unter anderem auch Trialanin in den erwähnten Konformationen. Seine IR-Daten zeigen markante Änderungen der Frequenzen für sämtliche Isomere (Ellenbogen, E., 1955) z. B. auch in der Amid I-Region (1700-1580 cm^{-1}). Die Unterschiede im physikalischen Verhalten werden damit erklärt, dass die Peptidbindung drehbar ist und sich, je nachdem welche funktionelle Gruppe benachbart ist, ihren Winkel verändert. Die Änderungen in den IR-Daten und in den pK-Werten sind demnach auf die Asymmetrie der beiden chiralen Zentren im Trialanin zurückzuführen (Ellenbogen, E., 1952). Die unterschiedlichen Winkel führen zu einer eingeschränkten Rotation der benachbarten Atome des Peptidrückgrates. Daher wurde von Ellenbogen ebenfalls ein Solvenseffekt suggeriert. (Ellenbogen, E., 1952). Schweitzer-Stenner (Schweitzer-Stenner, R. *et al.*, 2001, Ecker, F. *et al.*, 2002, Schweitzer-Stenner, R. *et al.*, 2003) und Woutersen und Hamm (Woutersen, S., Hamm, P., 2000, Woutersen, S. *et al.*, 2002) untersuchten den Dreheffekt von Trialanin mit FT-IR- bzw. VCD-Spektroskopie und dass, im Wesentlichen eine rechtsdrehende α -helicale bzw. eine 3_1 -helicale Konformation für linksdrehendes Trialanin (LLL) und für ein gemischtes Trialanin (LDL, Schweitzer-Stenner, R. *et al.*, 2003) vorliegt, dass sich jedoch die Winkel der Peptidgruppe stark voneinander unterscheiden (Ecker, F. *et al.*, 2002). Dieses kann ebenfalls durch die unterschiedliche Rotation der Peptidbindung in den Isomeren begründet werden, die somit unterschiedliche Diederwinkel aufweisen. Die vorgefundenen Winkel wurden

dann verschiedenen Sekundärstrukturformen zugeordnet. Jedoch konnte die rechtgängige Helix in späteren Arbeiten eher selten beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen eher auf eine P_{II}- und β -Struktur hin (Mu, Y., Stock, G., 2002, Gorbunov, R. D. *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden verwendet, um die Unterschiede der Isomere von Trialanin in Lösung zu untersuchen. Untersucht wurden linksdrehendes Trialanin (LLL), zwei gemischte Isomere (LDL und DLL) und rechtsdrehendes Trialanin (DDD). Die Präparation wurde, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, durchgeführt. Für alle Messungen wurde eine Konzentration von einem Gewichtsprozent (ca. 10 mg/mL) bei pH 5,7 (isoelektrischer Punkt der vier Isomere, berechnet anhand der pK-Werte von Ellenbogen, E., 1952) verwendet. Alle Messungen wurden in 10 mM Phosphatpuffer durchgeführt mit Ausnahme der FT-IR-Messung, bei der Na₂DPO₄-Puffer verwendet wurde. Im Anschluß an die experimentell erhaltenen Daten erfolgt eine Berechnung der volumetrischen Eigenschaften bezogen auf die experimentell erhaltenen Ergebnisse, um das intrinsische Volumen V_p und die intrinsische Expansivität α_p der Tripeptide zu berechnen.

4.2.1 Links- und rechtsdrehende Trialanine gemessen mit PPC und DSC

a)



b)

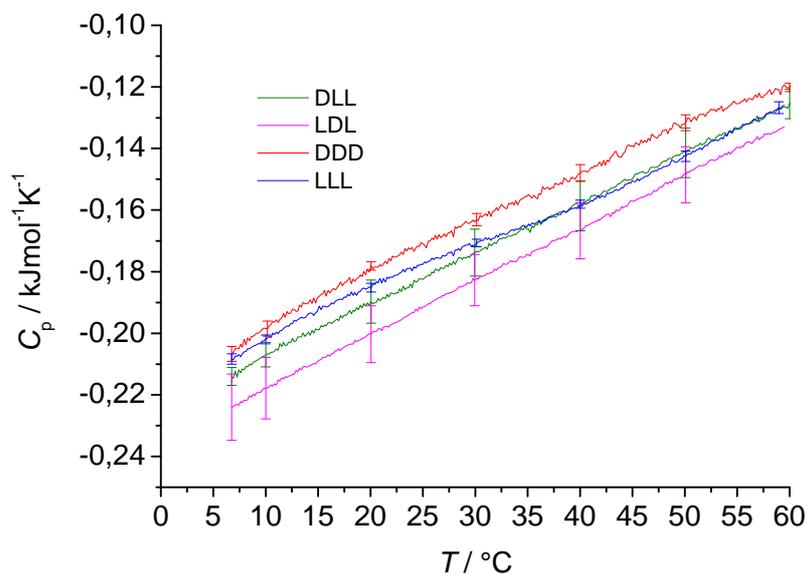


Abbildung 18: a) zeigt den thermischen Ausdehnungskoeffizienten der links- und rechtsdrehenden Isomere des Trialanins (1 Gew. % in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 5,7 (isoelektrischer Punkt) von 5-60°C in 2,5°C Schritten). b) zeigt das hintergrundkorrigierte DSC-Thermogramm der 4 verschiedenen Isomere von Trialanin (Scanrate 40°C/h, hintergrundkorrigiert).

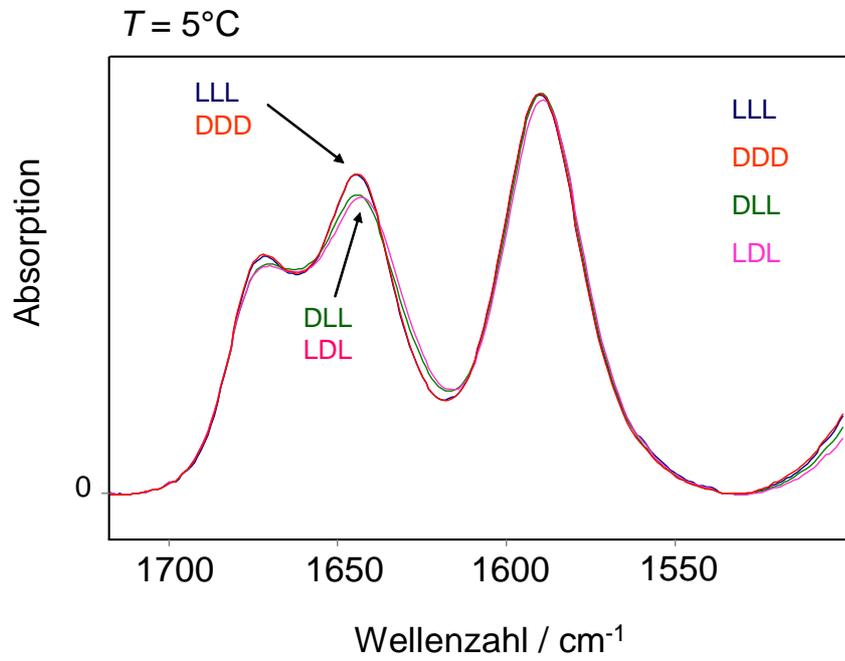
Abbildung 18a) stellt den Ausdehnungskoeffizienten der vier verschiedenen Isomere des Trialanins dar (1 Gew. % in Phosphatpuffer bei pH 5,7 gemessen, von 5 bis 60°C in 2,5°C Schritten). Der Expansionswert α für DLL beginnt bei $1,39 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ bei 5°C, bei LDL bei $1,31 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$, bei LLL bei $1,30 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ und bei DDD $1,19 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$. Bei tiefen Temperaturen wird ein signifikanter Unterschied in der Hydratation von DLL- und DDD gefunden. Bei höheren Temperaturen, ca. 41°C, kann ein markanter Unterschied zwischen DLL ($0,85 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$) und LDL ($0,97 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$) festgehalten werden. Dies deutet auf ein unterschiedliches Hydratationsverhalten der beiden Spezies in Abhängigkeit mit der Temperatur hin. Mit steigender Temperatur erreicht die LDL Kurve den höchsten α -Wert von $0,9 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ im Vergleich zu den anderen Isomeren. DDD und LLL weisen hingegen bei höheren Temperaturen sehr ähnliche α -Werte auf, $0,56 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ (LLL) und $0,61 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ (DDD). Auch der Verlauf der beiden Kurven für DDD und LLL erscheint ähnlich im Abbildung, im Gegensatz zu DLL und LDL. Die beiden Kurven zeigen einen ersten markanten Unterschied im Kurvenverlauf ab ca. 41°C.

Die Abnahme des Ausdehnungskoeffizienten α mit steigender Temperatur kann im Allgemeinen damit begründet werden, dass der Grad der Wechselwirkung zwischen Molekül und Wasser abnimmt (Mitra, L. *et al.*, 2006). Dieses stimmt mit den PPC-Daten der Trialanin-Isomere überein. Somit kann festgehalten werden, dass der Grad der Hydratisierung der gemischten Trialanine (DLL und LDL) unterschiedlich ist und sich stark von dem der DDD- und LLL-Trialanine unterscheidet.

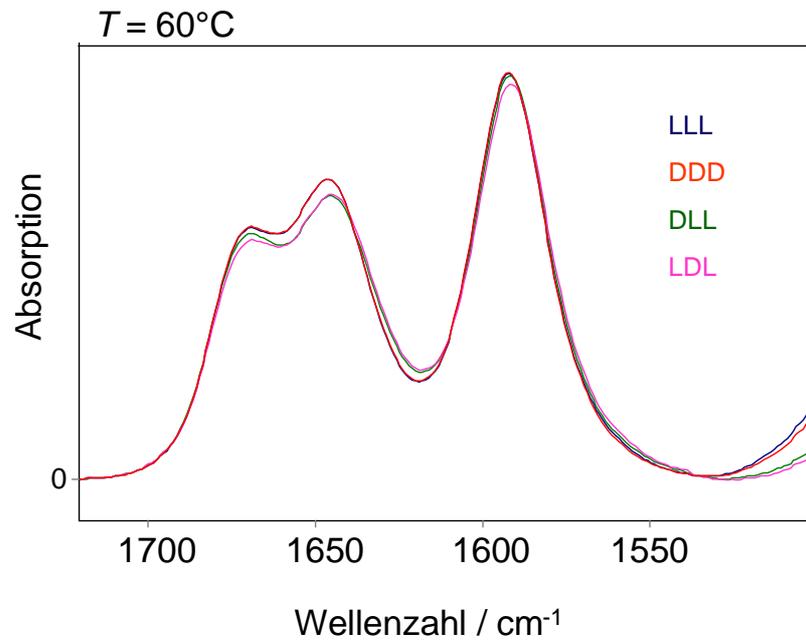
Abbildung 18b) zeigt die DSC-Messungen der vier Isomere. Es fällt auf, dass das LDL den geringsten Wärmekapazitätswert C_p und DDD den höchsten C_p -Wert aufweist.

4.2.2 Links- und rechtsdrehende Trialanine gemessen mit FT-IR-Spektroskopie

a)



b)



c)

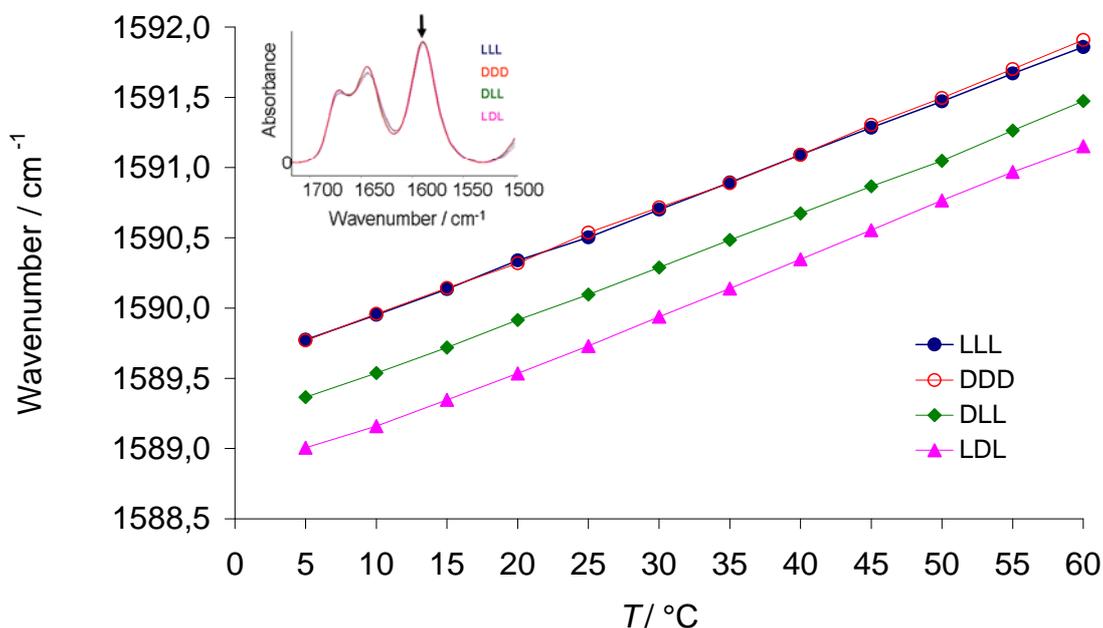


Abbildung 19: a) und b) zeigen die Hintergrund und Basislinien korrigierten FT-IR Spektren der links- und rechtsdrehenden Trialanine bei ausgewählten Temperaturen (5°C, 60°C). c) zeigt den Peakfit der CO-Bande im Bereich der Amid I-Bande (GRAMS, Gauß+Lorentz Funktion).

Um die Konformationsänderungen der Isomere mit der Temperatur zu untersuchen, wurden FT-IR-Messungen durchgeführt. Abbildung 19a) und b) zeigen die basislinien- und hintergrundkorrigierten Spektren der vier Trialanin-Isomere bei 5°C (19a) und 60°C (19b). Wie bereits erwähnt, wurde hierbei das Augenmerk speziell auf die Amid I-Bande gerichtet, da sie sensitiv gegenüber den Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol Wechselwirkungen ist und somit Aufschluß über die Konformation des Peptidrückgrates gibt. Experimentell und auch theoretisch (Gorbunov, R. D., *et al.*, 2007, Mu, Y., Stock, G., 2002) wird angenommen, dass die Trialanin-Isomere hauptsächlich in einer poly-L-Prolin II (P_{II}) Konformation bzw. in einer β -Konformation auftreten. Die rechtsgängige Helix (α_R) wurde eher selten beobachtet. Die Werte bei, denen die erwähnten Sekundärstrukturelemente beobachtet wurden, sind in Tabelle 3 dargestellt (Gorbunov, R. D. *et al.*, 2007). Der dritte Peak, dessen Maximum bei ca. 1590 cm^{-1} liegt, kann auf die terminale Carboxylgruppe des Moleküls zurückgeführt werden (s. Abbildung 19c). Eine nähere Betrachtung zeigt, dass die P_{II} - und β -Struktur auch bei hohen Temperaturen nahezu unverändert verbleibt, welches auch mit theoretischen Berechnungen übereinstimmt (welches

zeigt, dass wahrscheinlich eine geringe Population an α_R bei 73°C auftritt (Mu, Y., Stock, G., 2002)).

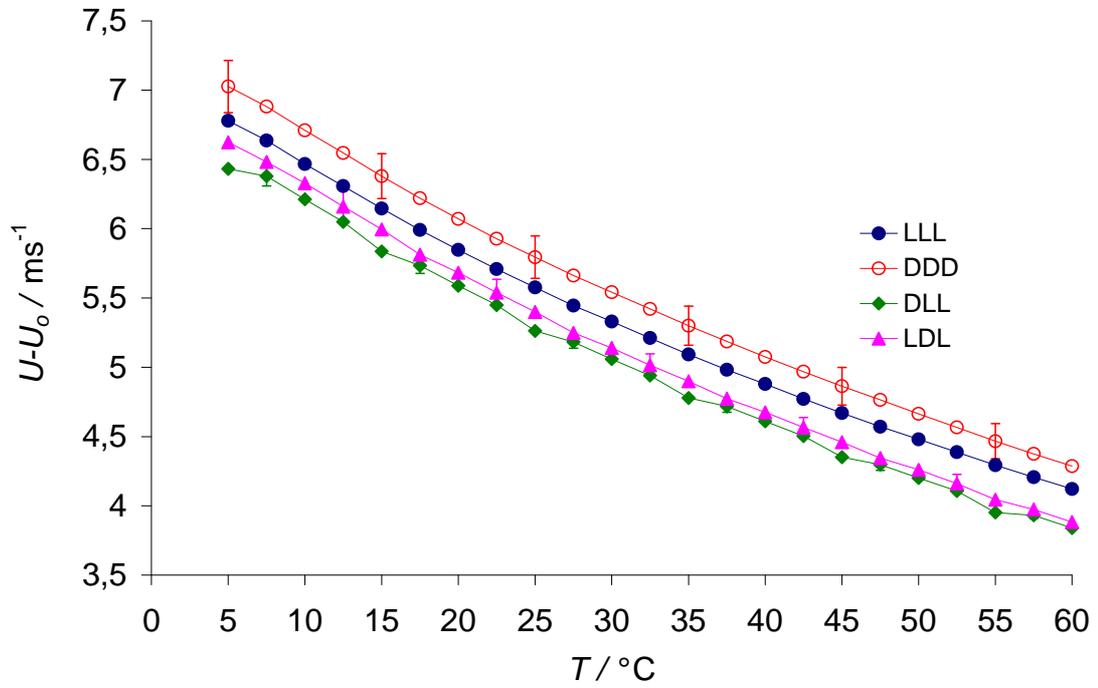
Wellenzahl / cm^{-1}	Sekundärstrukturelement
1643 1674	P_{II}
1650 1676	β
1665	α_R
1590	Carboxylgruppe

Tabelle 3: Wellenzahlen der Sekundärstrukturelemente (Gorbunov, R. D. *et al.*, 2007).

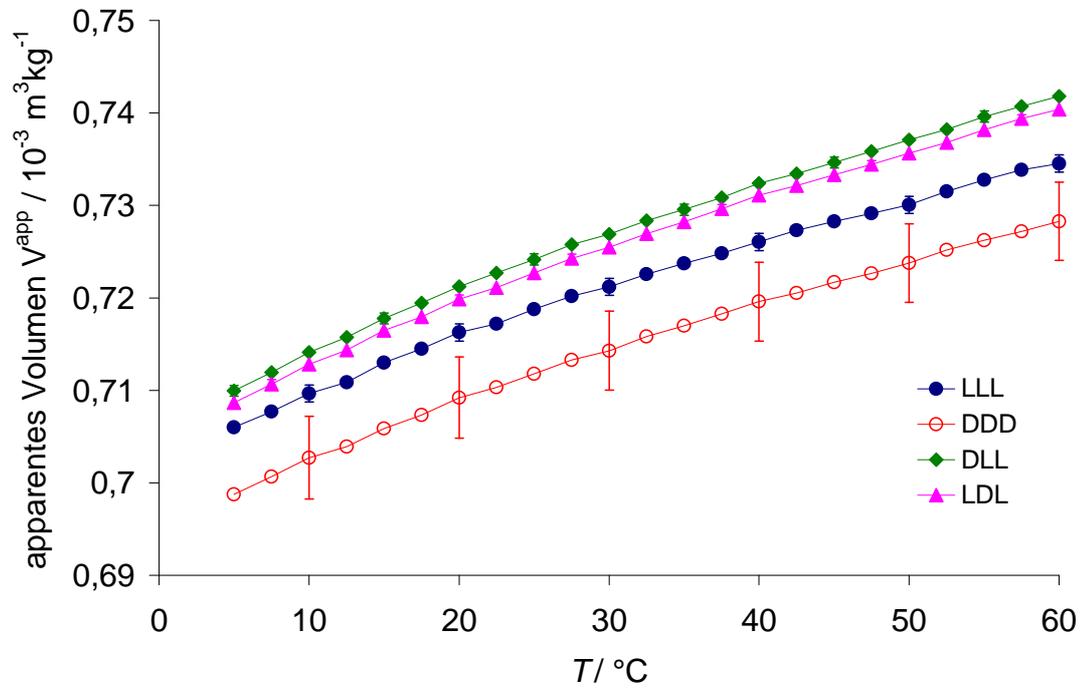
Abbildung 19c) zeigt die Lage des Peaks der Carboxylgruppe. Die $\tilde{\nu}(p)_{\max}$ -Kurven sind nahezu linear für alle isomeren Spezies und zeigen einen deutlichen Anstieg mit steigender Temperatur. Ähnlich der PPC-Messung gleichen sich die Kurven für das rechts- und linksdrehende (LLL, DDD) sowohl in ihrer Lage als auch ihrer Form. Im Vergleich zu den LLL- und DDD-Trialaninen weisen sie die höchsten Wellenzahlen auf (1589,5 cm^{-1} bei 5°C bzw. 1591,5 cm^{-1} bei 60°C). Für die gemischten Trialanine (DLL und LDL) kann durchschnittlich eine Differenz zwischen den beiden Kurven von ca. 0,4 cm^{-1} beobachtet werden. Es ist bekannt, dass, je stärker die Wasserstoffbrückenbindung ist, desto kleiner wird die Frequenz der Schwingung, da Elektronendichte an der Carboxylgruppe abgezogen wird. Der Anstieg der Wellenzahl für die Carboxylgruppe kann also damit erklärt werden, dass die Bindungsstärke der Wasserstoffbrückenbindungen mit steigender Temperatur abnimmt. Dieser Effekt ist für die DDD- und LLL-Isomere identisch und zeigt die höchsten Werte, jedoch sind die Unterschiede zwischen 5°C und 60°C, also die Steigungen mit steigender Temperatur, bei allen vier Isomeren ähnlich (die Differenz beträgt ca. 2 cm^{-1} zwischen 5°C und 60°C).

4.2.3 Links- und rechtsdrehende Trialanine gemessen mit Dichte- und Ultraschallmessungen

a)



b)



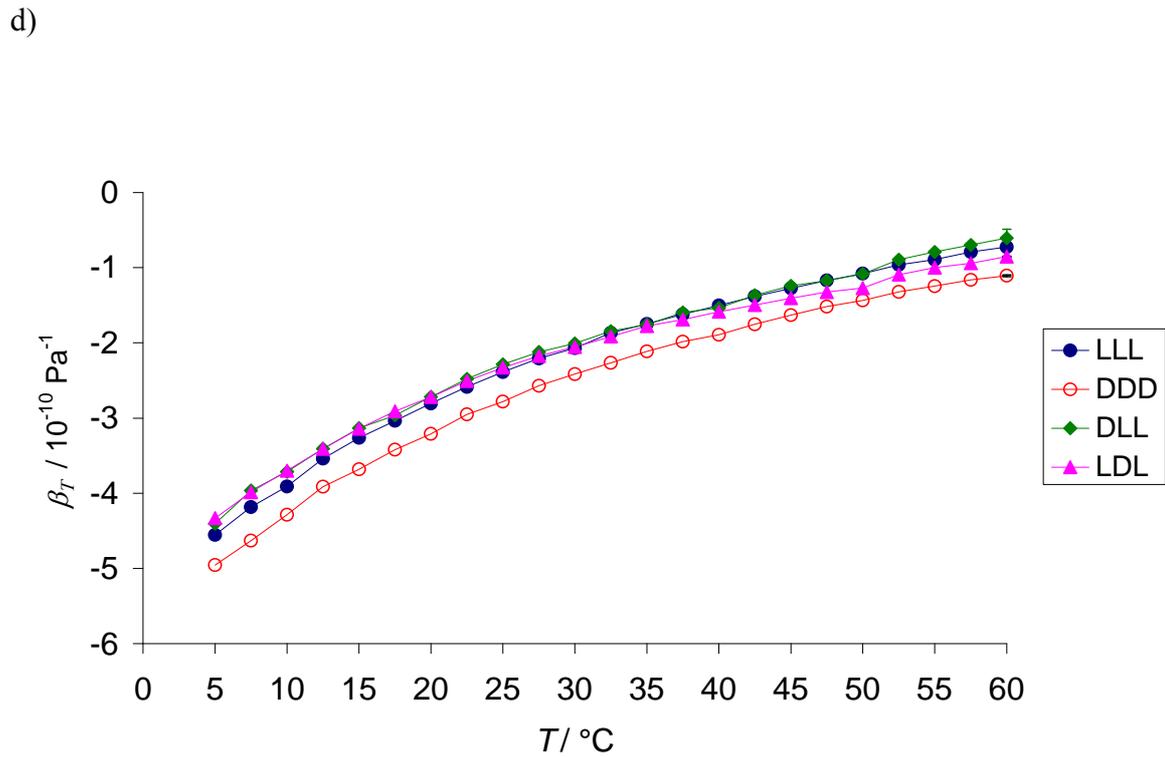
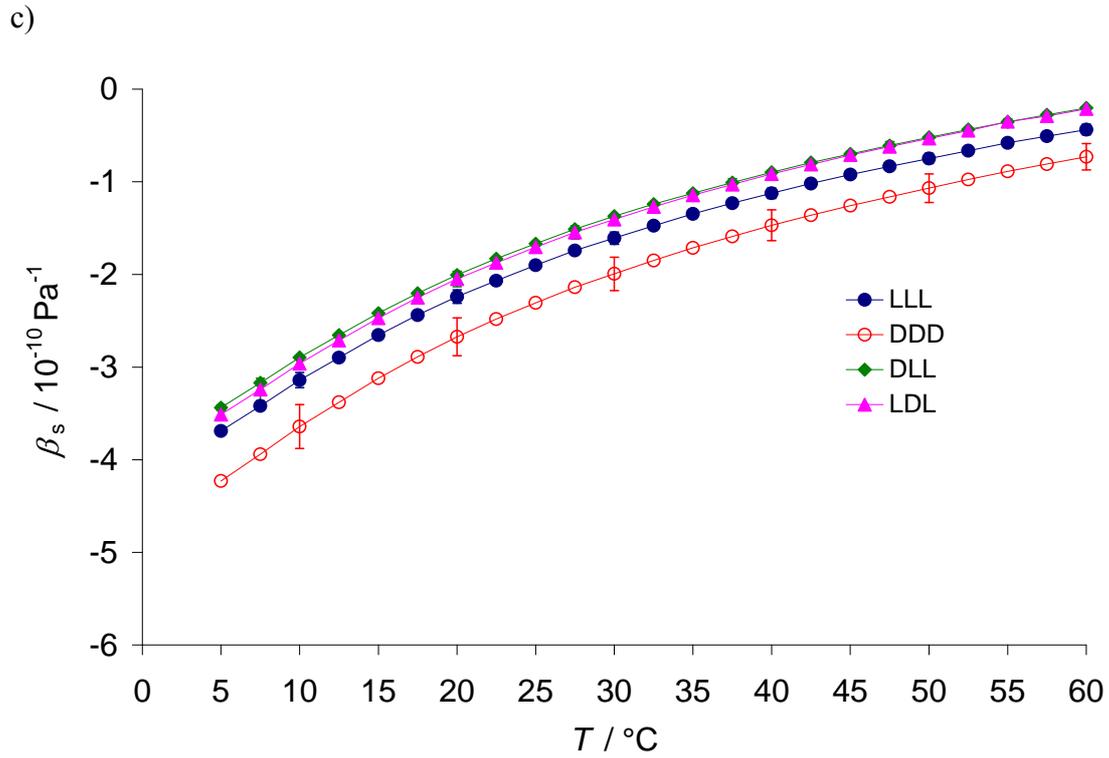


Abbildung 20: a) zeigt das partielle Molvolumen, b) die Ultraschallgeschwindigkeit, c) den adiabatischen Kompressibilitätskoeffizienten und d) den isothermen Kompressibilitätskoeffizienten als Funktion der Temperatur von LLL, DDD, LDL und DLL (1 Gew. % in Phosphatpuffer bei pH 5,7).

Abbildung 20a) zeigt den Verlauf der relativen Ultraschallgeschwindigkeiten $U - U_0$ der vier isomeren Spezies von Trialanin als Funktion der Temperatur. Die Geschwindigkeiten nehmen für alle gemessenen Trialanine mit steigender Temperatur ab. Auch hier ist ein deutlicher Unterschied zwischen reinen (LLL, DDD) und gemischten (DLL, LDL) Trialaninen zu erkennen. Das DDD besitzt die höchste Ultraschallgeschwindigkeit bei 5°C, das DLL die niedrigste. Die Differenz zwischen DDD und LLL beträgt durchschnittlich ca. $0,3 \text{ ms}^{-1}$. Im Gegensatz zu Abbildung 18a) (PPC-Daten) weisen die gemischten Trialanine ähnliche Steigungen mit steigender Temperatur auf. Abbildung 20b) zeigt das apparente spezifische Volumen V^{app} (berechnet aus Dichtemessungen) der Isomere. Das apparente Volumen bezeichnet das durch die Dichtemessungen bestimmte Volumen aus Lösung und Tripeptid und sagt nichts über das Volumen des reinen, unhydratisierten Tripeptids aus. Die Werte nehmen mit steigender Temperatur zu. Das DDD zeigt eindeutig die niedrigsten Werte. Die anderen drei Isomere besitzen ähnliche Steigungen und Werte, jedoch ist ein leichtes Aufspreizen der drei Kurven bei 60°C zu erkennen. Hierbei zeigt DLL den höchsten Wert. Abbildung 20c) stellt den adiabatischen Kompressibilitätskoeffizienten β_s als Funktion der Temperatur dar. DDD zeigt den niedrigsten Wert, $-4,2 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$, welcher bis auf $-0,7 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ ansteigt. Das LLL fängt bei $-3,7 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ bei 5°C an und steigt auf $-0,4 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ bei 60°C an. β_s von DLL und LDL starten beide bei ca. $-3,5 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ und wachsen bis ca. $-0,2 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ an. Die gemischten Trialanine zeigen auch hier, vgl. mit Abbildung 20a) und b), ähnliche Kurvenverläufe. Der adiabatische Kompressibilitätskoeffizient wurde anhand der Ultraschalldaten berechnet. Schon die Ultraschalldaten (Abbildung 20a)) zeigen, gegensätzlich zu den anderen gezeigten Messungen, ähnliche Verläufe für die gemischten und unterschiedliche Werte für DDD und LLL mit steigender Temperatur. Es kann eine durchschnittliche Differenz der Werte in Abbildung 20c) von ca. $0,5 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ abgeschätzt werden.

Es fällt auf, dass die Kurven negative Kompressibilitäten zeigen, die mit steigender Temperatur abnehmen. Die negativen Werte können damit begründet werden, dass die Differenz aus der Kompressibilität der Hydrathülle und der Kompressibilität der „bulk“ Region, ΔK_{Sh} , den größten Beitrag zur adiabatischen Kompressibilität ausmacht und negativ ist (Chalikian, T. V. *et al.*, 1994, Chalikian, T. V. *et al.*, 2002). Daher kann bei diesem Modell die intrinsische Kompressibilität K_{SM} , welche

größtenteils durch die kovalenten Bindungen und den äußeren Elektronenhüllen beeinflusst wird und daher sehr klein bei Tripeptiden ist, für diesen Fall wahrscheinlich vernachlässigt werden.

Nach Chalikian *et al.*, 1994, kann für aliphatische Gruppen bemerkt werden, dass Wasser ab ca. 35°C in der Umgebung aliphatischer Gruppen leichter kompressibel ist als die „bulk“-Wasser-Phase. Dieses kann in Abbildung 20c) beobachtet werden, da sämtliche Kurven einen Anstieg in ihrem Kompressibilitätsfaktor mit der Temperatur zeigen. Das bedeutet auch, dass der Beitrag von ΔK_{sh} mit steigender Temperatur abnimmt. In Abbildung 20d) ist der aus den Dichte- und Ultraschalldaten bzw. den kalorimetrischen Daten (siehe Formel 2.18) berechnete isotherme Kompressibilitätskoeffizient als Funktion der Temperatur dargestellt. Die Werte sind, ähnlich wie β_s , negativ und weisen die gleiche Größenordnung auf. Nach Taulier, N., Chalikian, T. V., 2002, gilt auch für die isotherme Kompressibilität, dass sie wesentlich von der Wechselwirkung zwischen Molekül und Lösungsmittel abhängt, das heißt von ΔK_{th} (analog zu der adiabatischen Kompressibilität). Dieser Beitrag ist ebenfalls negativ (Seemann, H. *et al.*, 2001). Der Hydratationsterm bezeichnet die Differenz zwischen Wasser und in der Hydrathülle und dem bulk-Wasser. Es ist bekannt, dass die Hydratation von Proteinoberflächen zu einer Abnahme der Kompressibilität bei 25°C führt (Gekko, K., Noguchi, H., 1979, Seemann, H. *et al.*, 2001). Je höher die gesamte lösungsmittelzugängliche Moleküloberfläche ist, desto negativer ist der Hydratationsbeitrag (Seemann, H. *et al.*, 2001). Abbildung 20c) und d) zeigen einen ähnlichen Verlauf, der andeutet, dass der Unterschied der Kompressibilitäten zwischen Hydratationsschale und bulk-Phase mit steigender Temperatur geringer wird. Dieser Effekt ist bei dem rechtsgängigen Trialanin, DDD, am geringsten. Die anderen drei Isomere zeigen einen ähnlichen Verlauf mit der Temperatur.

4.2.3.1 Überprüfung der PPC-Daten durch temperaturabhängige Dichtemessungen

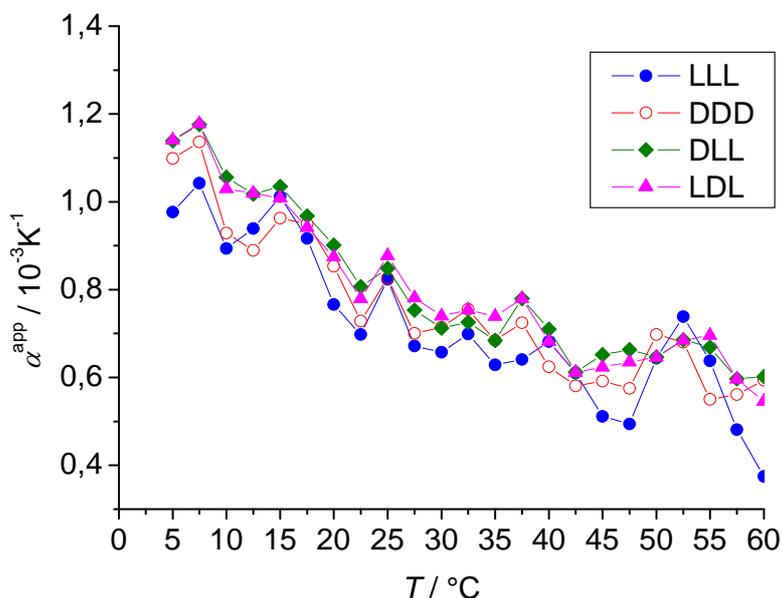


Abbildung 21: Darstellung des Ausdehnungskoeffizienten α^{app} , bestimmt aus den mit Hilfe der Dichtemessungen ermittelten $V^{\text{app}}(T)$ -Daten der Isomere von Trialanin.

Abbildung 21 zeigt den aus den Dichtemessungen erhaltenen Ausdehnungskoeffizienten der vier Isomere von Trialanin. Die aus den PPC-Daten ermittelten Werte für den Ausdehnungskoeffizienten wurden anhand der Beziehung $\frac{\partial \ln V}{\partial T} = \frac{1}{V} \frac{\partial V}{\partial T} = \alpha$, rechnerisch überprüft, indem die Ableitung des Logarithmus des partiellen molaren Volumens (Daten aus den Dichtemessungen) bestimmt wurde. Die Auftragung als Funktion der Temperatur ist in Abbildung 21 dargestellt und zeigt nun die berechnete Expansivität der vier Isomere. Der Vergleich mit Abbildung 18a) zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf. Auch hier besitzen die Kurven negative Steigungen. Die gleiche Größenordnung (10^{-3} K^{-1}) zeigt, dass eine Reproduzierung der PPC-Daten durch Dichtemessungen möglich ist. Die Werte sind jedoch weniger genau. Die erhaltenen Daten aus den Dichtemessungen sind um ca. 0,2 nach unten verschoben. Auch zeigt die PPC-Kurve in Abbildung 18a) eine deutlichere Aufspaltung der Isomere, die in Abbildung 21 nicht zu erkennen ist. Die Dichtemessungen sind jedoch in sehr großen Temperaturschritten durchgeführt worden, welches die stark temperaturabhängige Messung ungenau werden läßt. Um vergleichbare Werte zu

bekommen, müßte wahrscheinlich die Dichtemessung in sehr viel kleineren Temperaturschritten erfolgen.

4.2.4 Berechnung der intrinsischen Volumina und Expansivitäten

Das intrinsische Volumen V_p eines Proteinmoleküls bezeichnet das geometrische Volumen des gelösten Proteins, welches für die umgebenden Wassermoleküle nicht durchdringbar ist. Es spiegelt somit die spezielle Architektur des Proteininneren wieder. Die mit den bereits erwähnten Methoden gemessenen Parameter, werden in diesem Abschnitt als apparente Parameter bezeichnet und mit app (V^{app} bzw. α^{app}) gekennzeichnet, um sie deutlich von den berechneten, intrinsischen Parametern zu unterscheiden. Das gemessene apparente partielle Volumen wird nicht nur durch die chemische Struktur des Proteins und die Packung der Proteinatome bestimmt. Es wird auch durch die Änderung der Wassereigenschaften in der Hydratschale des Proteins unter Berücksichtigung der Eigenschaften des bulk Wassers beeinflusst. Der apparente Ausdehnungskoeffizient α^{app} ist äußerst sensitiv gegenüber strukturellen Änderungen des Proteins (Mitra, L. *et al.*, 2006, Seemann, H. *et al.*, 2001, Smirnovas, V. *et al.*, 2006). Diese werden auch durch die Änderungen der wasserzugänglichen Oberfläche beeinflusst. Die Änderung der Lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (solvent accessible surface area, SASA) bestimmt die Menge an Hydratwasser. Die Oberflächenstruktur des Biomoleküls hingegen bestimmt die volumetrischen Eigenschaften des Hydratwassers. Deshalb erfordert die Berechnung der intrinsischen Volumen- und Expansionsdaten aus den apparenten Volumen- und Expansionsdaten, die Kenntnis über die volumetrischen Eigenschaften des Hydratwassers bei den selben thermodynamischen Zustandspunkten.

Die gesamte Masse eines Tripeptids in Lösung kann folgenderweise beschrieben werden:

$$M_{\text{ges}} = m_p + m_h + m_b \quad (4.1),$$

wobei m_p die Masse des Tripeptids, m_h die Masse des Hydratwassers und m_b die Masse der bulk-Wasser Phase ist.

Die Dichte für die Tripeptidlösung kann unter Berücksichtigung von Gleichung 4.1 geschrieben werden als:

$$\rho = \frac{M_{\text{ges}}}{V} = \frac{m_p + m_h + m_b}{V_p + V_h + V_b} \quad (4.2),$$

mit einem Volumen V , welches sich aus den Einzelkomponenten V_p , das Volumen des Proteins, V_h , das Volumen des Hydratwassers und dem Volumen V_b , das Volumen für die bulk-Wasser Phase, zusammensetzt.

Das apparente spezifische Volumen, V^{app} , für ein Peptid in Lösung, kann unter Vernachlässigung des Unterschieds zwischen dem bulk- und des Hydratwassers in folgender Weise berechnet werden:

$$V^{app} = \frac{1}{c} - \frac{\rho - c}{\rho_{buffer} c} \quad (4.3),$$

wobei c die Konzentration des Peptids in einer mg/mL Lösung, ρ die Dichte der Lösung und ρ_{buffer} die Dichte des Puffers ist. Die Konzentration c ist allerdings ein temperaturabhängiger Parameter. Daher wurde im Folgenden die Massenfraktion ϕ_m des Peptids verwendet, da sie temperaturunabhängig ist. Die Massenfraktion ist über die Beziehung

$$c = \rho \phi_m \quad (4.4)$$

mit der Konzentration verknüpft und beträgt 0,010 für die hier eingesetzten Tripeptide. Einsetzen der Gleichung 4.4 in Gleichung 4.3 führt zu:

$$V^{app} = \frac{1}{\rho \phi_m} - \frac{1 - \phi_m}{\rho_{buffer} \phi_m} \quad (4.5).$$

Die Temperaturabhängigkeit des gemessenen apparenten spezifischen Volumens, V^{app} , wurde in Abbildung 20b bereits gezeigt. Die korrespondierenden PPC-Daten für den apparenten thermischen Ausdehnungskoeffizienten $\alpha^{app}(T)$ wurden in Abbildung 18a gezeigt. Für die weiteren Berechnungen wurden die anhand der PPC-Daten bestimmten Expansivitäten verwendet und nicht die in Abbildung 21 dargestellten Expansivitäten, die durch Dichtemessungen berechnet wurden, da die PPC-Methode Daten mit einer höheren Genauigkeit liefert. Ganz allgemein kann das apparente Volumen eines Proteins als eine Summe aus den folgenden zwei Beiträgen ausgedrückt werden:

$$V^{app} = V_p + V^{def} \quad (4.6),$$

wobei V_p das spezifische intrinsische Volumen des Proteins in Lösung bezeichnet. Der „defekte“ Hydratbeitrag, V^{def} , resultiert aus den Dichteunterschieden des bulk-Lösungsmittels (ρ_b) und dem Lösungsmittel in der Hydratschale (ρ_h). Der „defekte“ Hydratbeitrag kann folgenderweise ausgedrückt werden:

$$V^{\text{def}} = V_h \left(1 - \frac{\rho_h}{\rho_b} \right) \quad (4.7).$$

Gleichung 4.7 beschreibt den „Defekt“ des Volumens und besteht aus dem Hydratwasservolumen, V_h , und der Dichte für das Hydratwasser bzw. der Dichte für die bulk-Wasser Phase. Diese Daten können jedoch nicht experimentell bestimmt werden. Daher ist es an dieser Stelle sinnvoll, Simulationsdaten einzusetzen und somit die benötigten Werte zu erhalten.

Sind keine Cluster vorhanden, bezeichnet das Hydratwasservolumen, V_h , das Volumen einer einzelnen Hydratschale multipliziert mit der Peptidanzahl in Lösung. V_h kann durch das Produkt der Lösungsmittelzugänglichen Fläche, SASA bzw. jetzt kurz S genannt, und der Breite D der Hydratschale bestimmt werden. Die Breite D der Hydratschale wurde anhand von Simulationsdaten zu ca. 0,3 nm berechnet unter der Annahme, dass D nicht merklich von der Oberflächenstruktur abhängt (Smolin, N., Winter, R., 2004). Aus MD-Simulationen für die LLL- und LDL-Isomere wurde S zu 3,777 nm² bzw. zu 3,804 nm² bestimmt (Arnold Perez Goicochea, Kommunikation, 2007).

Wie bereits oben erwähnt, sind die Dichtedaten, ρ_h und ρ_b nicht experimentell zugänglich. Es existieren unterschiedliche Modelle, um theoretische Daten von Wasser zu berechnen. Unterschiedlich sind insbesondere die Temperaturabhängigkeiten der verschiedenen Wassermodele. Um eine simulierte Dichte zu verwenden, um das Verhalten von realem Wasser bzw. Pufferlösungen in der Hydratschale zu beschreiben, sollte das simulierte Wassermodele die volumetrischen Eigenschaften des realen Lösungsmittels für das experimentell untersuchte Temperaturintervall möglichst genau reproduzieren. Da die Dichte einer Pufferlösung und ihre Temperaturabhängigkeit sehr ähnlich zu reinem Wasser ist (siehe Abbildung, unten links), sollte das SPCE-Modell eine gute Lösung zu sein, da die in diesem Modell verwendeten volumetrischen Eigenschaften nahe dem des realen Wassers sind.

Die Fits für die Dichtebestimmung der bulk-Wasser Dichte sowie der thermische Expansionskoeffizient sind in Abbildung 22 dargestellt.

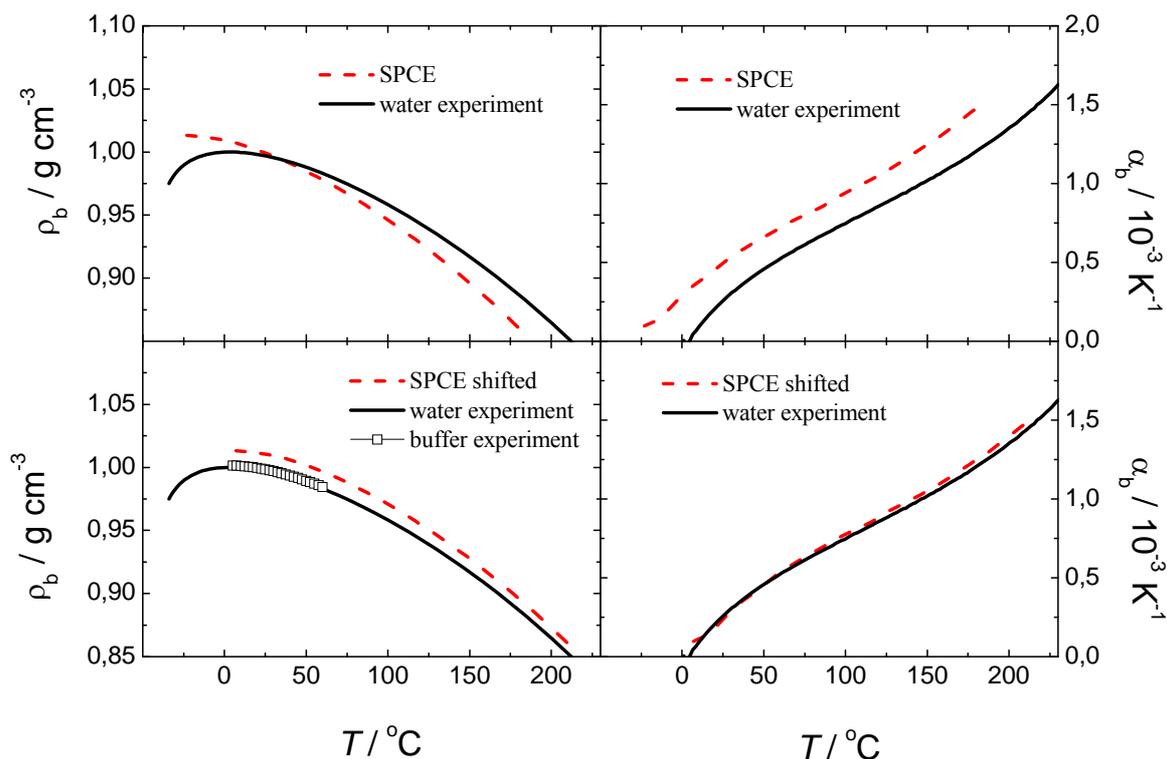


Abbildung 22: Fits für die Dichte- und Expansionsdaten für bulk-Wasser aus Simulationsdaten anhand Gleichung 4.8.

Abbildung 22 oben links zeigt die erhaltenen SPCE-Dichtedaten für das bulk-Wasser im Vergleich zu realem Wasser. Die Temperatur entspricht dem Nullpunkt (273,15 K). Die Werte stimmen nicht gut mit den realen Werten für Wasser überein und der im oberen rechten Bild dargestellte Expansionskoeffizient für die bulk-Wasser Phase zeigt einen großen Shift im Vergleich zu den realen Wasserdaten. Daher wurden die Werte für eine Temperatur, die 30°C tiefer liegt als der Nullpunkt, der in der Simulation gewählt wurde, berechnet. Die unteren Abbildungen zeigen, dass im Falle des Temperaturshifts von 30°C, die theoretischen und experimentellen Daten sowohl für die bulk-Wasserdichte als auch für den Ausdehnungskoeffizienten, α_b , sehr gut im untersuchten Temperaturintervall übereinstimmen. Es standen jedoch keine Computersimulationen über das volumetrische Verhalten von Wasser in der Hydratschale von Trialanin in SPCE-Wasser zur Verfügung. Daher wurde für die Berechnungen der Dichte die Temperaturabhängigkeit der Dichte von Simulationen des Amyloid- β -Peptids $A\beta_{16-22}$ verwendet (Brovchenko, I. *et al.*, b). Obwohl dieses Peptid aus sieben Aminosäuren besteht und sich somit in seiner Struktur von Trialanin

unterscheidet, sind die erhaltenen Parameter für die gemittelten Werte für die Wechselwirkung zwischen der Oberfläche mit Wasser, die die Dichte bestimmen, nicht sehr unterschiedlich. Die Hydratdichte ρ_h konnte auf die selbe Weise berechnet werden. Die Werte für ρ_b bzw. ρ_h für die Hydrat und die bulk-Wasser Phase wurden nun unter der Annahme berechnet, dass die Dichte des Hydratwassers der ersten Hydratschicht sich nahezu linear verhält und sich stark von der Dichte für die bulk-Wasser Phase ρ_b unterscheidet (Brovchenko, I. *et al.*, a, Brovchenko, I. *et al.*, b):

$$\rho_{\text{bulk}} = 1,0150 - 9,024 \cdot 10^{-5} (T / ^\circ\text{C}) - 3,815 \cdot 10^{-6} (T / ^\circ\text{C})^2 + 3,556 \cdot 10^{-9} (T / ^\circ\text{C})^3 \quad (4.8)$$

$$\rho_{\text{Hydrat}} = 1,0242 - 0,00152 (T / ^\circ\text{C}) \quad (4.9).$$

Die korrespondierenden Ausdehnungskoeffizienten, α_h und α_b , sind jedoch nur im Temperaturbereich für $T > 7^\circ\text{C}$ bzw. 37°C (siehe Abbildung 22) gültig. Eine Extrapolation zu tieferen Temperaturen sollte kritisch daher betrachtet werden. Die Dichtewerte für ρ_h und ρ_b sind in Abbildung 24 dargestellt. Unter Verwendung von Gleichung 4.8 und 4.9 und des „defekten“ Volumenbeitrags, V^{def} , kann nun das spezifische intrinsische Volumen des Tripeptids berechnet werden:

$$V_p = V^{\text{app}} - S \cdot D \frac{N_A}{M} \left(1 - \frac{\rho_h}{\rho_b} \right) \quad (4.10),$$

mit M , der molaren Masse der Peptide und N_A , der Avogadro Zahl. V^{app} , V^{def} und V_p sind in den nachfolgenden Abbildungen 23-26 dargestellt.

Anhand der folgenden Beziehungen kann der intrinsische Ausdehnungskoeffizient, α_p anhand der gewonnen apparenten Volumendaten aus Gleichung 4.10 berechnet werden. Der thermische Ausdehnungskoeffizient für das Hydratwasser, α_h , und für die bulk-Wasser Phase, α_b , für Gleichung 4.14 wurden anhand der Gleichungen 4.12 und 4.13 (siehe unten) berechnet:

$$\alpha_p = \frac{1}{V_p} \frac{\partial V_p}{\partial T} \quad (4.11).$$

$$\alpha_h = \frac{1}{V_h} \frac{\partial V_h}{\partial T} = - \frac{1}{\rho_h} \frac{\partial \rho_h}{\partial T} \quad (4.12).$$

$$\alpha_b = \frac{1}{V_b} \frac{\partial V_b}{\partial T} = - \frac{1}{\rho_b} \frac{\partial \rho_b}{\partial T} \quad (4.13).$$

Der intrinsische thermische Ausdehnungskoeffizient, α_p , kann nun anhand der apparenten Daten und vorangegangenen Beziehungen für das Volumen nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$\alpha_p V_p = \alpha^{app} V^{app} - S \cdot D \frac{N_A}{M} \frac{\rho_h}{\rho_b} (\alpha_h - \alpha_b) \quad (4.14).$$

Der Term $\alpha_h - \alpha_b$ kann anhand der Gleichungen 4.8 und 4.9 berechnet werden, V^{app} folgt aus den Dichtedaten und V_p wurde durch Gleichung 4.10 berechnet.

V^{app} steigt leicht mit steigender Temperatur an. Offensichtlich ist dieser Anstieg in V^{app} mit der Temperatur abhängig vom „defekten“ Volumen, V^{def} . Denn wie in Abbildung 24 zu sehen ist, steigt die Dichte für das Hydratwasser, ρ_h , mit steigender Temperatur sehr viel schneller an, als die der bulk-Wasser Phase.

Daher ist der berechnete intrinsische thermische Expansionskoeffizient, α_p , für LLL und LDL negativ (siehe Abbildung 25, 26). Eine Berechnung des intrinsischen thermischen Expansionskoeffizienten durch Gleichung 4.11 ist natürlich möglich (nicht gezeigt). Die Werte korrelieren mit den Werten aus Gleichung 4.14 recht gut ($\pm 0,2$). Die Trends der Kurven können jedoch nicht mit einander verglichen werden, da die Genauigkeit der Dichtedaten zu gering ist.

4.2.4.1 Darstellung der Hydratdichte, bulk-Wasserdichte und Volumendefekt für LLL und LDL

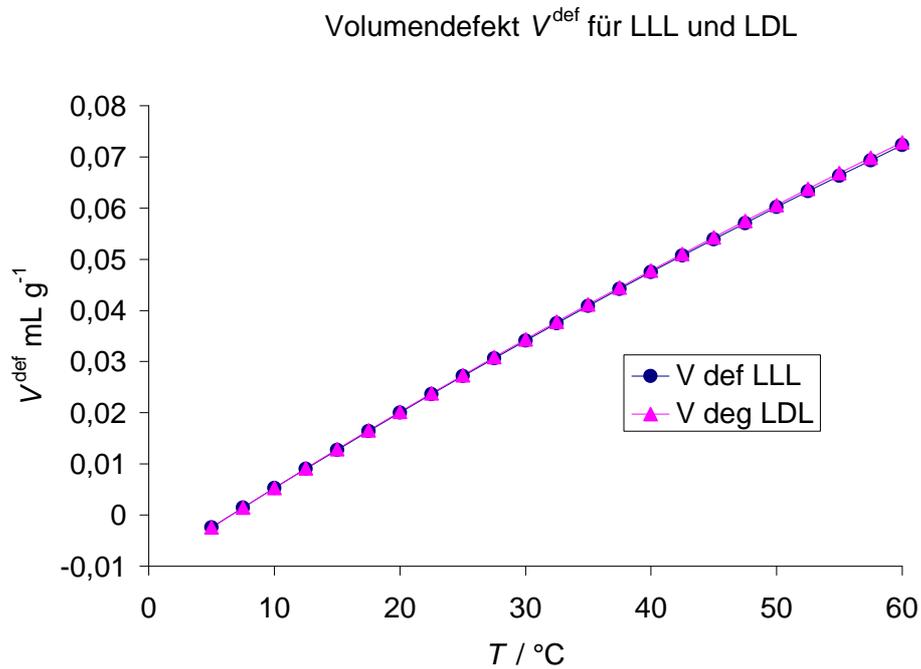


Abbildung 23: Berechnete „Defekt“ Volumendaten für LLL und LDL nach Gleichung 4.7.

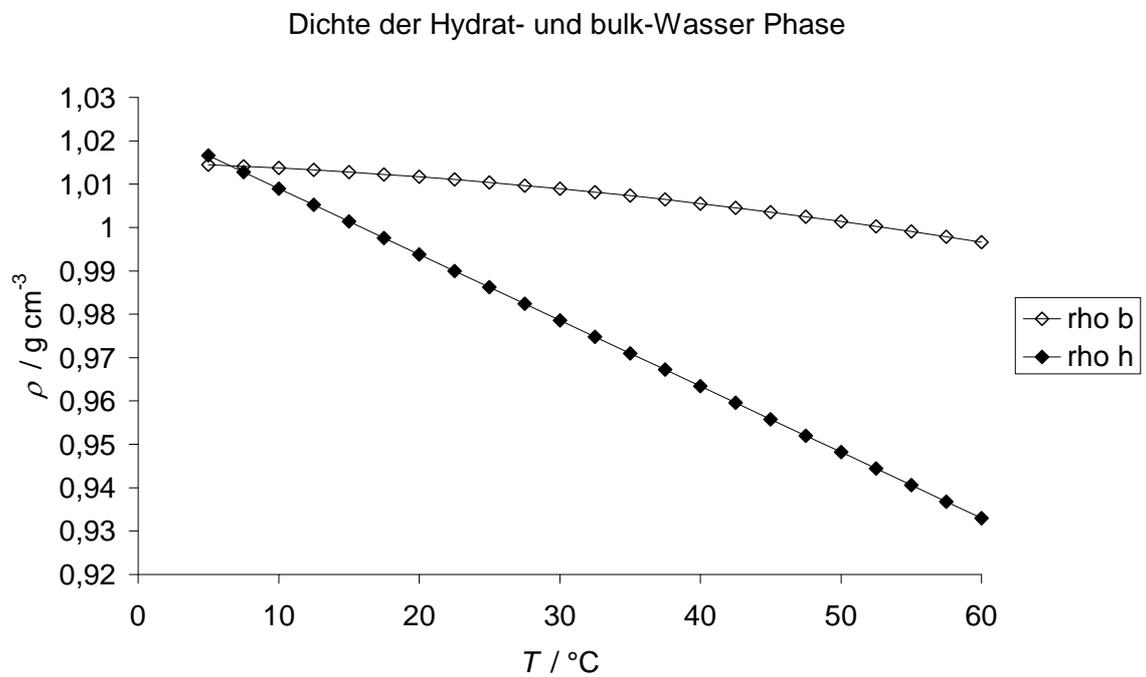


Abbildung 24: Berechnete Dichtedaten für Hydrat- und bulk-Wasser.

4.2.4.2 Vergleich der apparenten und intrinsischen Volumendaten von LLL und LDL

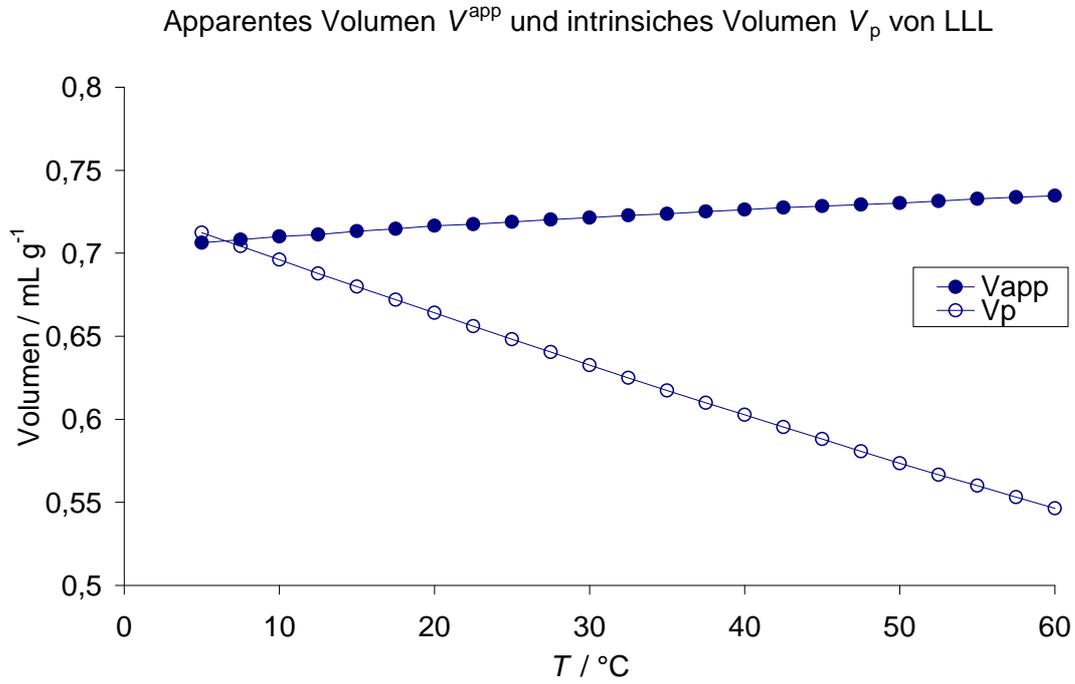


Abbildung 25: Apparentes und intrinsisches Volumen von LLL bestimmt aus Dichtemessungen.

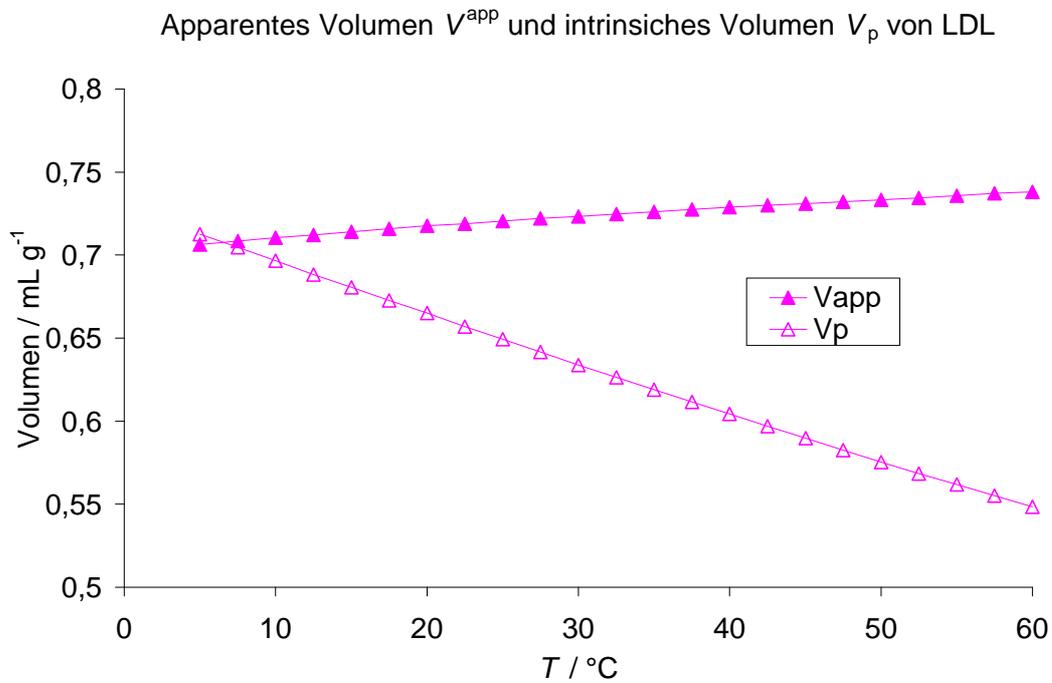


Abbildung 26: Apparentes und intrinsisches Volumen von LDL bestimmt aus Dichtemessungen.

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen die aus den Dichtemessungen bestimmten Volumina, V^{app} , bzw. die anhand der im vorangegangenen Kapitel bestimmten intrinsischen Volumina, V_p , für das LLL und das LDL. Es konnten leider nur die intrinsischen Daten für diese zwei Isomere bestimmt werden, da nur für diese beiden Isomere S bekannt war (Arnold Perez Goicochea, 2007). Beide Abbildungen zeigen einen ähnlichen Unterschied zum zuvor berechneten partiellen molaren Volumen, welches aus Dichtedaten berechnet wurde. V_p zeigt eine stärkere Temperaturabhängigkeit, und dies mit umgekehrtem Vorzeichen, als das apparente Volumen V^{app} .

4.2.4.3 Vergleich der intrinsischen Expansivitäten von LLL und LDL

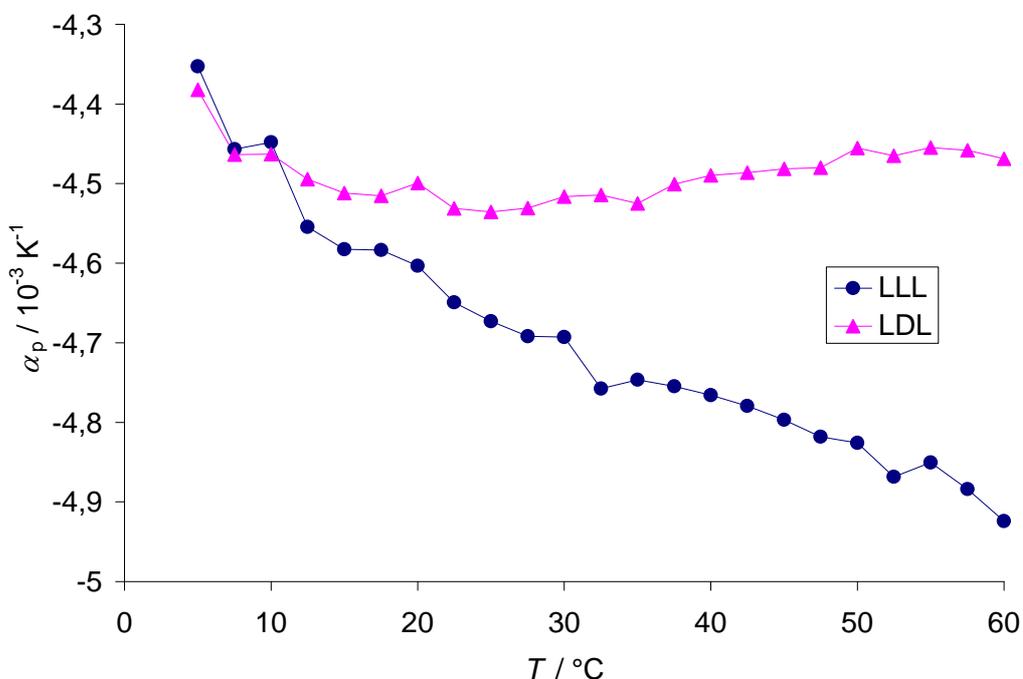


Abbildung 27: Berechnete α_p -Werte anhand der Simulationsdaten (Gleichung 4.14).

Abbildung 27 zeigt die berechneten intrinsischen Expansivitäten für LLL und LDL. Es werden negative Werte für α_p für beide Isomere erhalten. Dies weist auf den großen Einfluß, den das Hydratwasser auf die Messungen hat, hin. Für das Hydratwasser wurden positive Expansivitäten berechnet (Brovchenko, I. *et al*, eingereicht). Obwohl beide Isomere negative Expansivitäten aufweisen und bei tiefen Temperaturen ähnliche Startwerte besitzen, so besitzen sie jedoch bei hohen Temperaturen stark unterschiedliche Werte und zeigen, dass die Expansionswerte für das LDL größer (weniger negativ) sind, als für das LLL. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den gemessenen PPC-Daten überein (s. Abbildung 18a). Ein negativer

Expansionskoeffizient zeigt, dass das void-Volumen im Tripeptid, das unzugänglich für die Wassermoleküle ist, mit steigender Temperatur abnimmt. Die IR-Daten deuten auf eine ausgedehnte Konformation, die hauptsächlich aus P_{II} und β besteht, hin. Vergleichbar sind diese Werte mit Messungen von Amyloiden A β ₁₆₋₂₂, für das ebenfalls die Sekundärstrukturelemente P_{II} und β dominieren (Brovchenko, I *et al.*, c). Für ein einzelnes A β ₁₆₋₂₂-Molekül in Wasser wurden jedoch positive α_p -Werte (Brovchenko, I *et al.*, c) gefunden, da die Population an α -helicalen Sekundärstrukturelementen für einzelne A β ₁₆₋₂₂ weitaus größer ist, als in den Aggregaten. Dieses zeigt, dass die P_{II}- und β -Strukturen verantwortlich für die negativen intrinsischen thermischen Ausdehnungskoeffizienten der Peptide sind, wohingegen die α -Helix eine eher starre Struktur von Biomolekülen repräsentiert, welches zu einem positiven Beitrag in α_p führt. Die höheren Werte des LDL-Isomers könnten also von einer höheren Population an α_R herrühren. Dieser Trend kann jedoch nicht experimentell (siehe Abschnitt 4.2.2), sondern nur theoretisch (Arnold Perez Goicochea, 2007) durch Simulationsstudien belegt werden.

4.3 Staphylokokken Nuklease und Mutationen

4.3.1 Messungen der SNase und Mutationen mit PPC und DSC

In der Natur treten häufig Mutationen auf, die zu Veränderungen und damit zu Schädigungen des Erbguts führen können. Daher erscheint es sinnvoll, Proteine mit Mutationen zu versehen und zu untersuchen, ob sie eine strukturelle Veränderung aufzeigen. Gezielte Mutationen an bestimmten Stellen in einem Protein, helfen dabei zu untersuchen, ob diese Stelle im Protein einen großen Einfluß auf die Stabilität besitzt (ϕ - Wert Analyse, s. Kapitel 1: Einleitung). Als Referenz dienen kalorimetrische Messungen des Wildtyps (hier: WT SNase), die bereits von R. Ravindra bei pH 5,5 durchgeführt wurden (R. Ravindra *et al.*, 2004). Die Ergebnisse wurden in dieser Arbeit durch pH abhängige (pH 4,5, 7 und 9) Messungen erweitert. Im Vergleich dazu wurde eine Mutation vermessen, die im Folgenden als Δ +PHS bezeichnet wird (B. Garcia-Moreno *et al.*, 1997). Diese Messungen wurden ebenfalls bei verschiedenen pH-Werten (4,5, 7 und 9) mit PPC und DSC gemessen und als Referenz für die darauf folgenden Messungen verwendet. Des Weiteren wurde Valin (in der Δ +PHS Mutation an der 66. Stelle) gegen verschiedene Aminosäuren ausgetauscht. Ausgewählt wurden Δ +PHS V66R (R = Arginin), Δ +PHS V66K (K = Lysin, W. E. Stites *et al.*, 1991, B. Garcia-Moreno *et al.*, 1997), und Δ +PHS V66E (E = Glutaminsäure). Die Aminosäuren unterscheiden sich in ihren Ladungen: Lysin und Arginin besitzen eine stark hydrophile Seitenkette, die bei pH 7 positiv geladen ist (Stryer, 1990). Glutaminsäure verfügt über eine stark hydrophile, saure Seitenkette, die bei pH 9 negativ geladen ist (L. Stryer, 1990). Um den Einfluss einer Veränderung der Ladung zu untersuchen (wie bereits in Kapitel 3.1.4 gezeigt wurde, führen unterschiedliche Ladungen zu erheblichen Änderungen im thermischen Ausdehnungskoeffizienten), wurden Δ +PHS V66R und Δ +PHS V66K bei pH 4,5 und 7 bzw. Δ +PHS V66E bei pH 4,5 und 9 gemessen. Der isoelektrische Punkt liegt bei ca. 9,5 für den Wildtyp der SNase und bei ca. 9,8 für die Δ +PHS Mutation. Die DSC- und PPC-Messungen wiesen große Unterschiede zwischen den Mutationen auf, wie in den folgenden Abbildungen zu sehen ist. Es konnten große Unterschiede in den thermodynamischen Parametern T_m , ΔH , α und ΔV beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Änderung der Primärstruktur, also die Änderung der Aminosäuresequenz, bei

Änderung von nur einer Aminosäure bereits zu erheblichen Veränderungen der Konformation und damit der thermodynamischen Daten führt (Y. Levy, J. N. Onuchic, 2006). In Tabelle 4 sind sämtliche Ergebnisse der WT SNase, der Δ +PHS Mutation und der V66R, K und E Varianten dargestellt:

	pH	T_m °C	ΔC_p kJ mol ⁻¹ K	ΔH kJ mol ⁻¹	ΔV mL mol ⁻¹
SNase WT	4,5	50,7 ²	11,2 ²	299,2 ²	-35 ²
	5,5	51,7*	5,7*	178*	-19*
	7	51,7 ²	7,6 ²	322,6 ²	-19,9 ²
	9	51,2 ²	n. b. ¹	n. b. ¹	n. b. ¹
Δ +PHS	4,5	72,7 ± 1	1,8 ± 0,7	380,5 ± 26	16,7 ± 0,7
	7	72,3 ± 0.1	3,9 ± 1	377 ± 127	11,7 ± 1
	9	70,9 ± 0.1	2 ± 0,5	467,3 ± 47	0 ± 0,3
Δ +PHS V66K	4,5	40 ± 1	8 ± 1	164 ± 5	-16 ± 1
	7	47 ± 1	6,1 ± 2	223 ± 5	-22 ± 1
Δ +PHS V66R	4,5	37,7 ²	11,9 ²	124,3 ²	-10,4 ²
	7	42,3 ²	10 ²	225,3 ²	-14,5 ²
Δ +PHS V66E	4,5	61 ± 1	3 ± 1	400 ± 1	0 ± 2
	9	49 ± 2	6,6 ± 2	317 ± 5	+15 ± 1

Tabelle 4: Berechnete thermodynamische Daten für die Entfaltung der WT SNase und Mutationen gemessen mit DSC und PPC.

*Die Werte stammen aus Ravindra, R. *et al.*, 2004

¹nicht bestimmbar

²Die Werte wurden nur einmal gemessen, da zu wenig Protein zur Verfügung stand, daher liegt keine Fehlerabschätzung vor

4.3.1.1 Wildtyp Staphylokokken Nuklease bei pH 4,5, 7 und 9

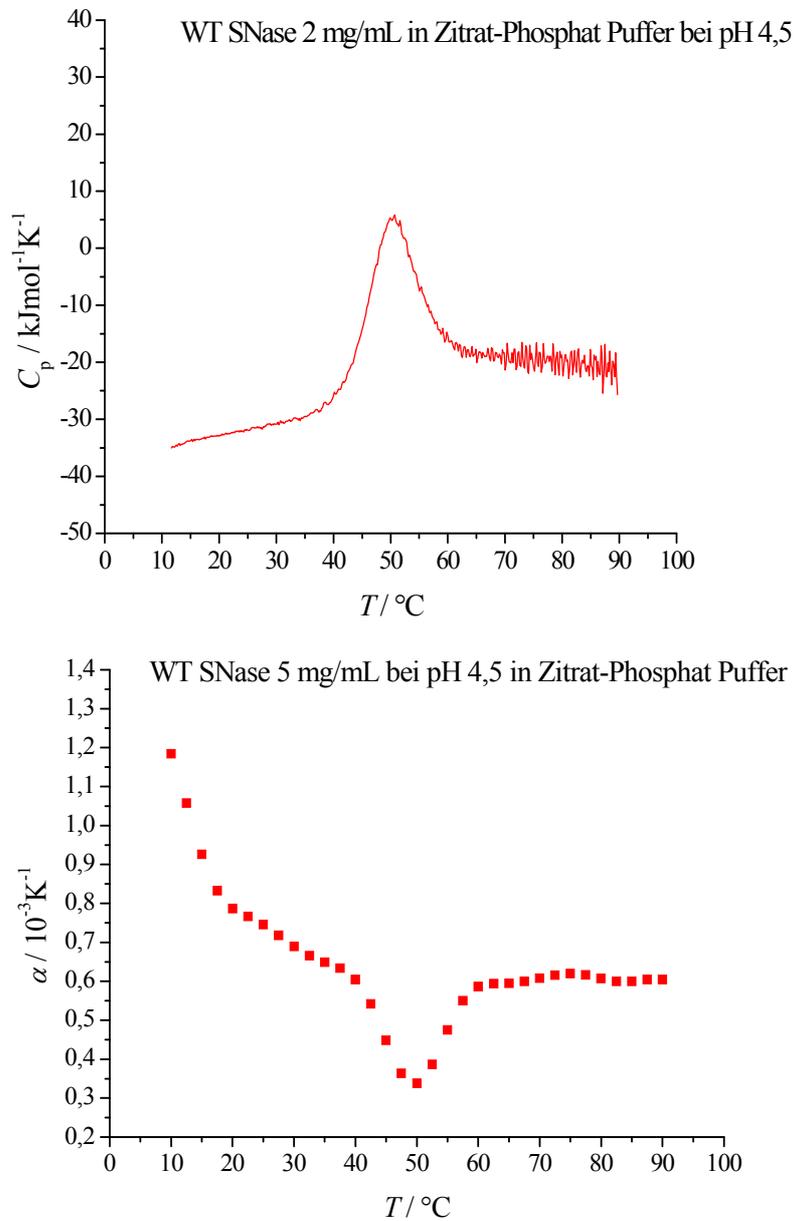


Abbildung 28: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate 40 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$) und unten die PPC-Kurve (2,5 $^{\circ}\text{C}$ / Meßpunkt) des Wildtyps der SNase bei pH 4,5 dargestellt.

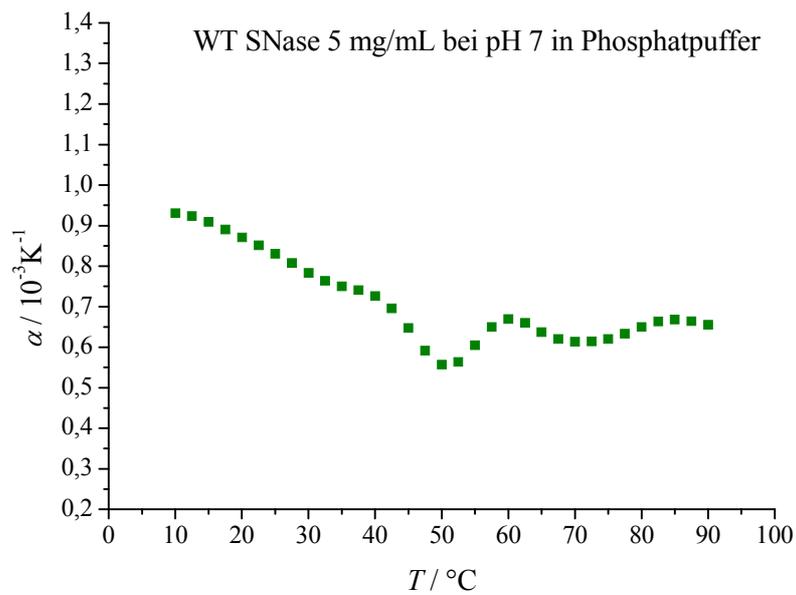
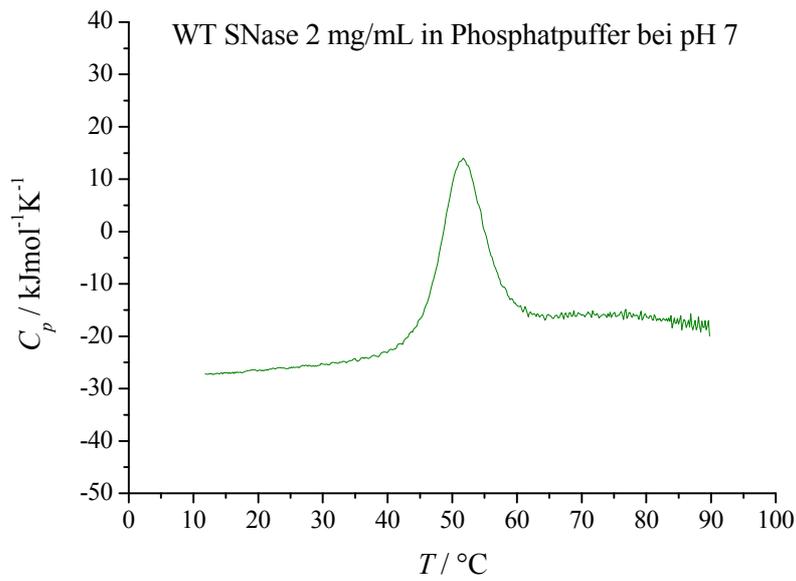


Abbildung 29: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate $40^{\circ}\text{C}/\text{h}$) und unten die PPC-Kurve ($2,5^{\circ}\text{C} / \text{Me\ss}$ punkt) des Wildtyps der SNase bei pH 7 dargestellt.

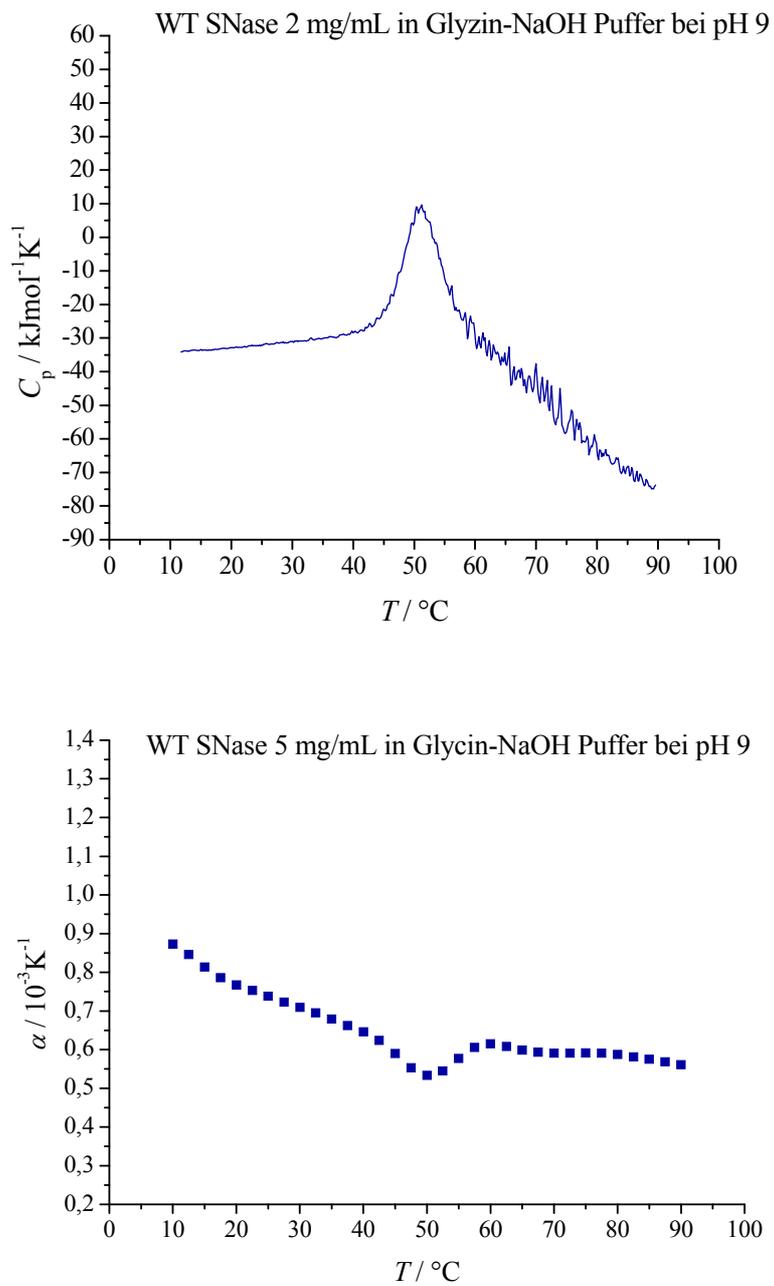


Abbildung 30: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate $40^{\circ}\text{C}/\text{h}$) und unten die PPC-Kurve ($2,5^{\circ}\text{C}/\text{Me\ss}$ punkt) des Wildtyps der SNase bei pH 9 dargestellt.

4.3.1.2 Stabilisierte Form der Staphylokokken Nuklease bei pH 4,5, 7 und 9

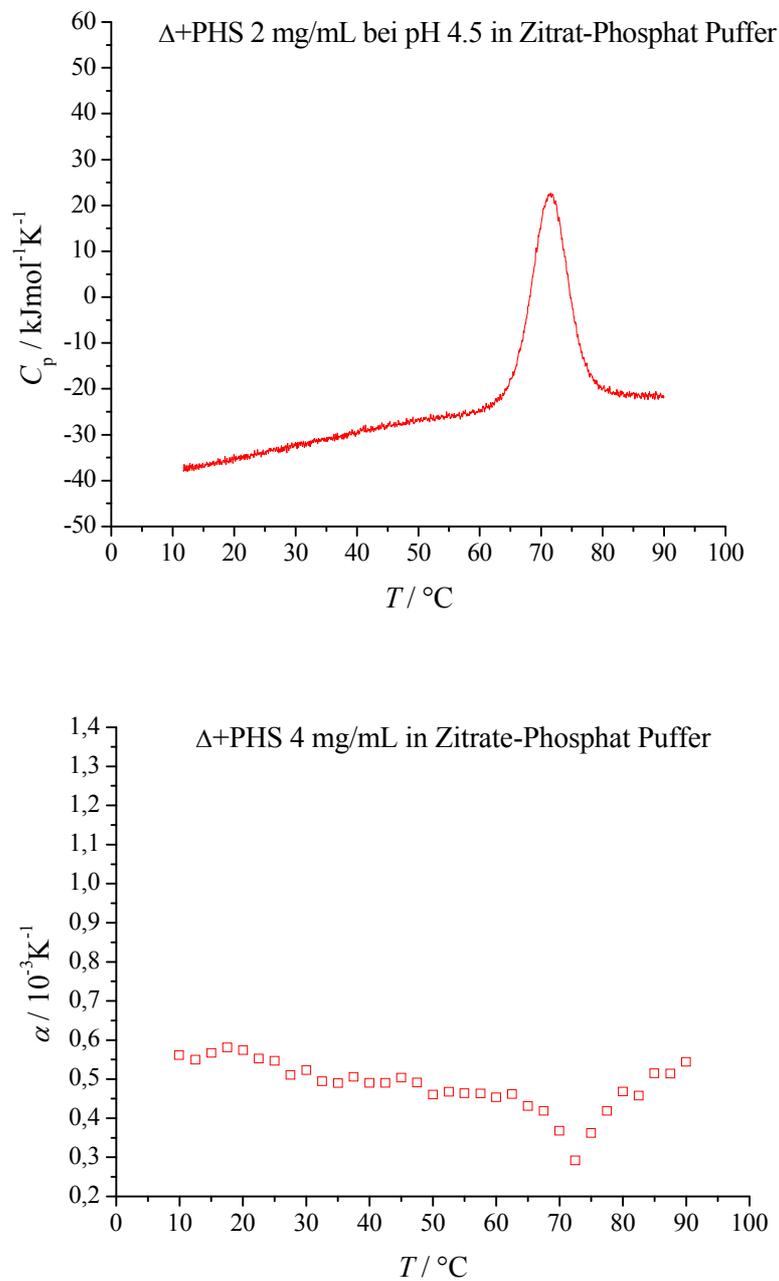


Abbildung 31: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate 40 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$) und unten die PPC-Kurve (2,5 $^{\circ}\text{C}$ / Meßpunkt) der stabilisierten Form der SNase, Δ +PHS, bei pH 4,5 dargestellt.

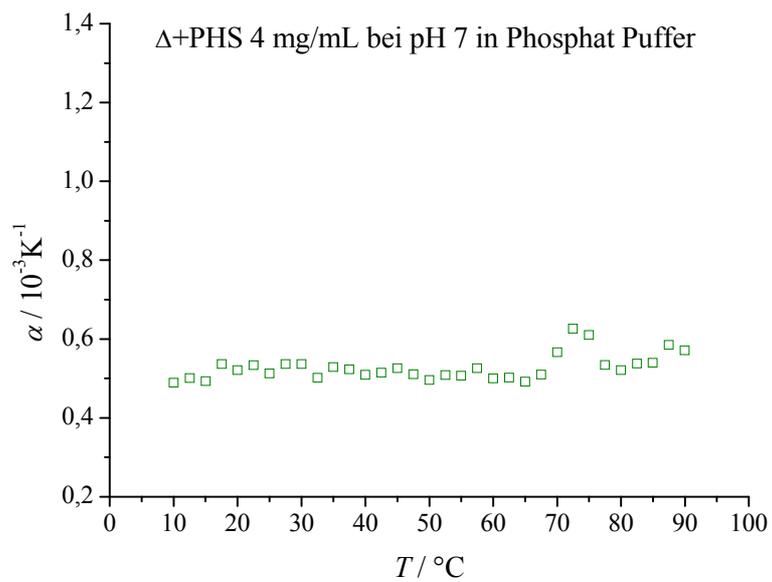
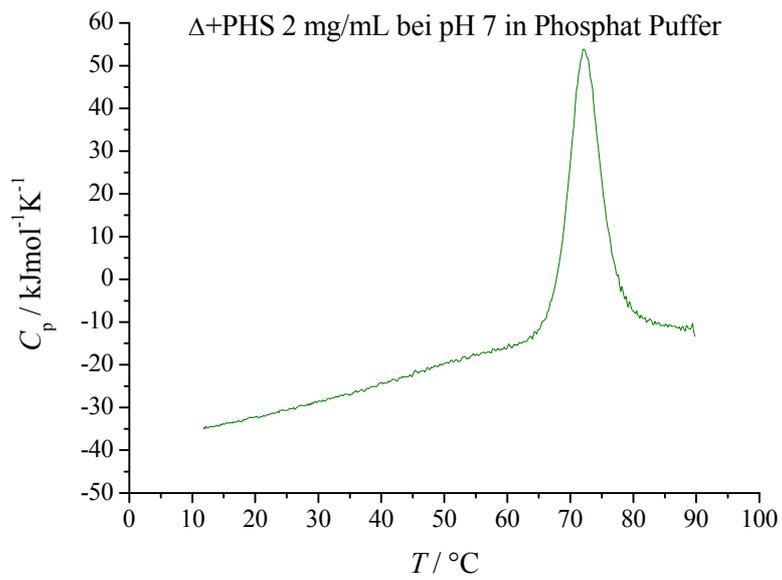


Abbildung 32: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate 40°C/h) und unten die PPC-Kurve der stabilisierten Form der SNase, Δ +PHS, bei pH 7 dargestellt.

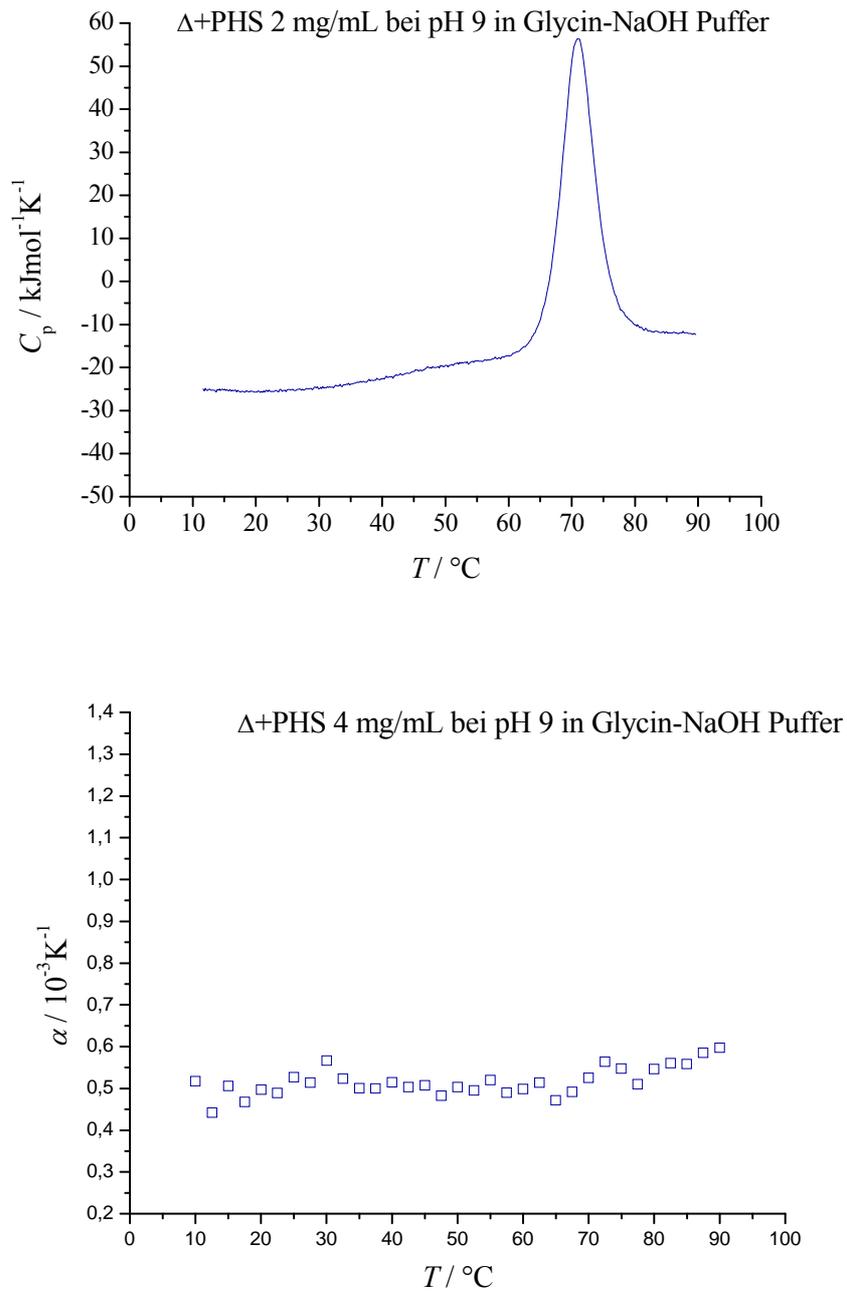


Abbildung 33: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate 40°C/h) und unten die PPC (2,5 °C / Meßpunkt) Kurve der stabilisierten Form der SNase, Δ +PHS, bei pH 9 dargestellt.

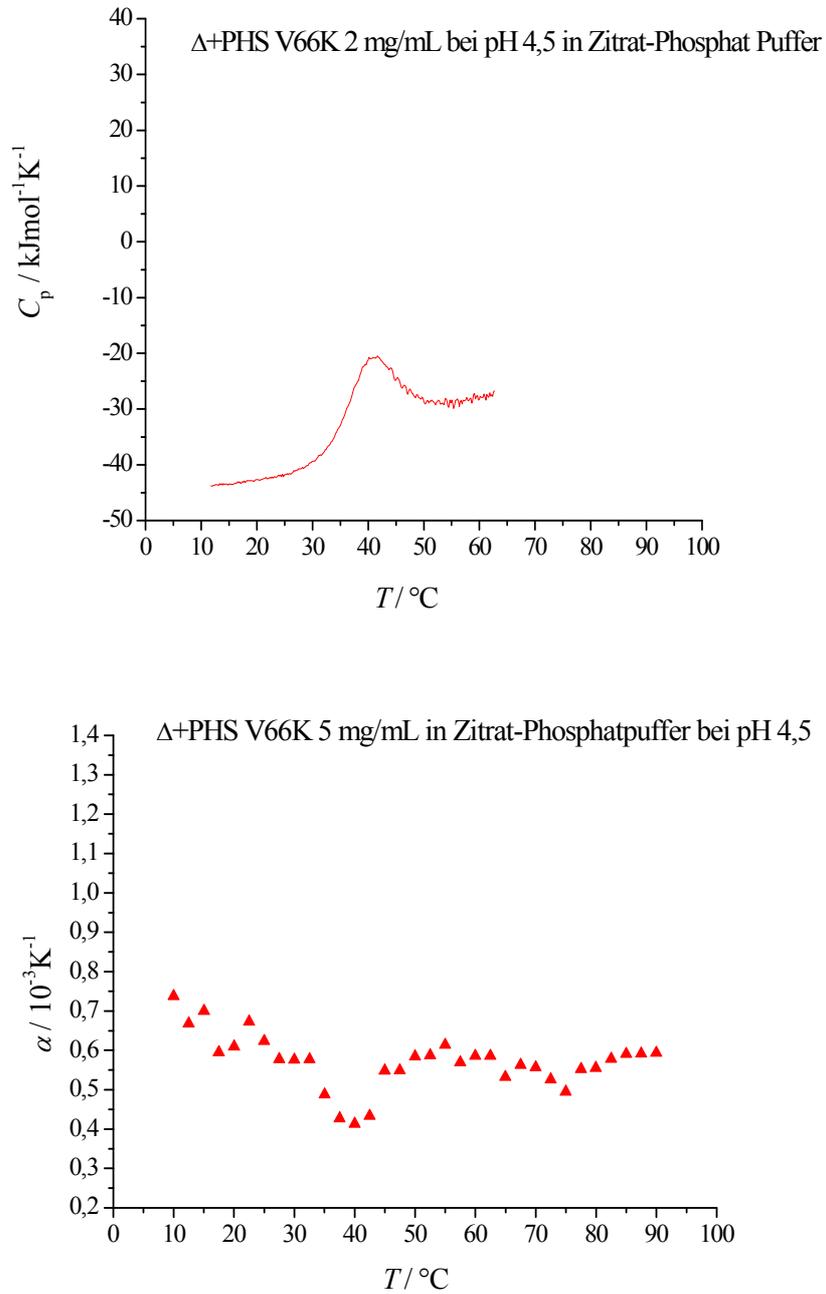
4.3.1.3 Punktmutation V66K der stabilisierten Form der SNase

Abbildung 34: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate $40^{\circ}\text{C}/\text{h}$) und unten die PPC-Kurve ($2,5^{\circ}\text{C} / \text{Me\ss}$ punkt) der Mutation Δ +PHS V66K bei pH 4,5 dargestellt.

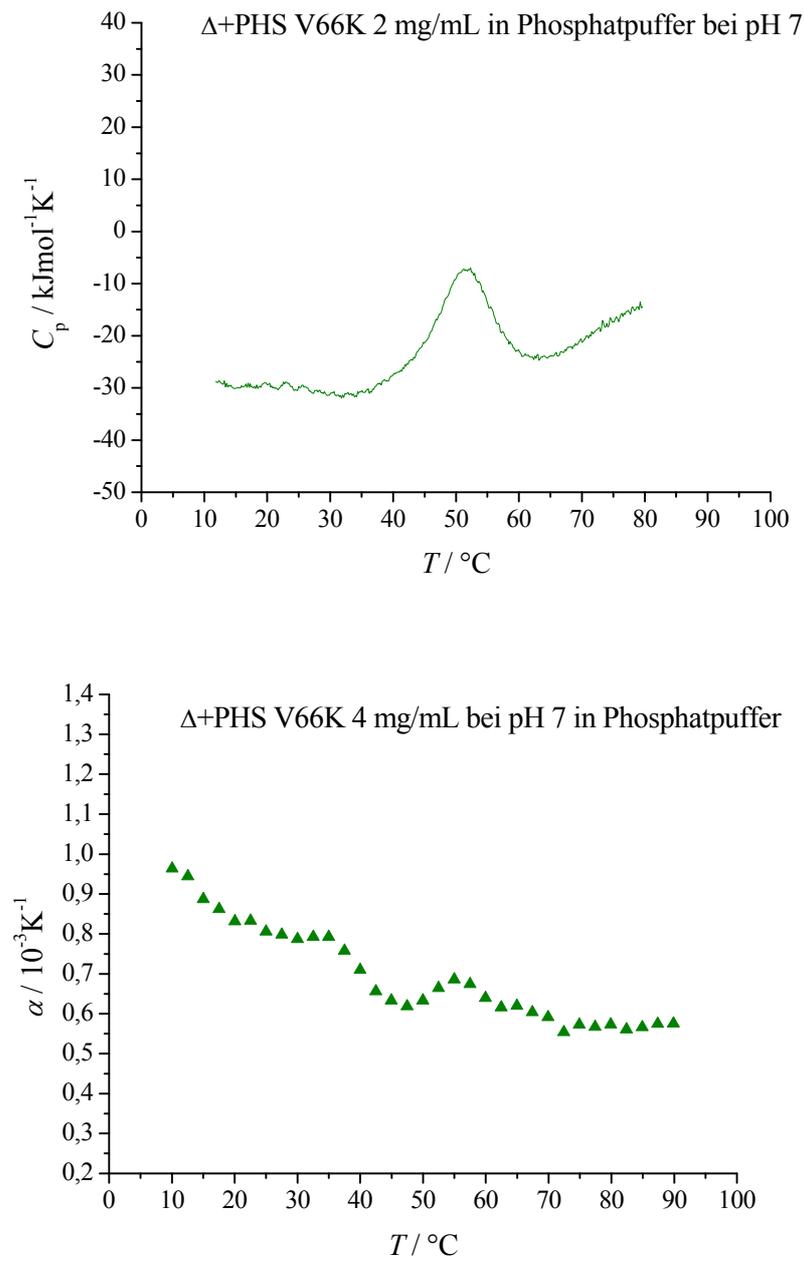


Abbildung 35: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate $40^{\circ}\text{C}/\text{h}$) und unten die PPC-Kurve ($2,5^{\circ}\text{C} / \text{Me\ss}$ punkt) der Mutation Δ +PHS V66K bei pH 7 dargestellt.

4.3.1.4 Punktmutation V66R

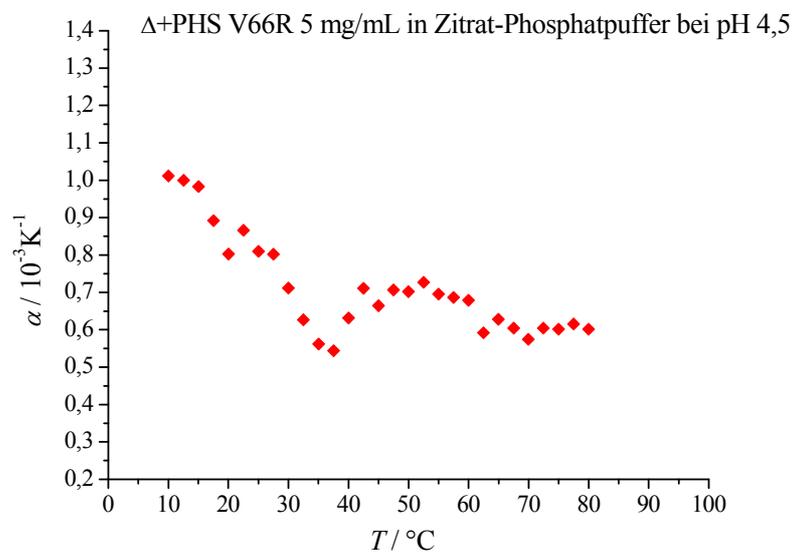
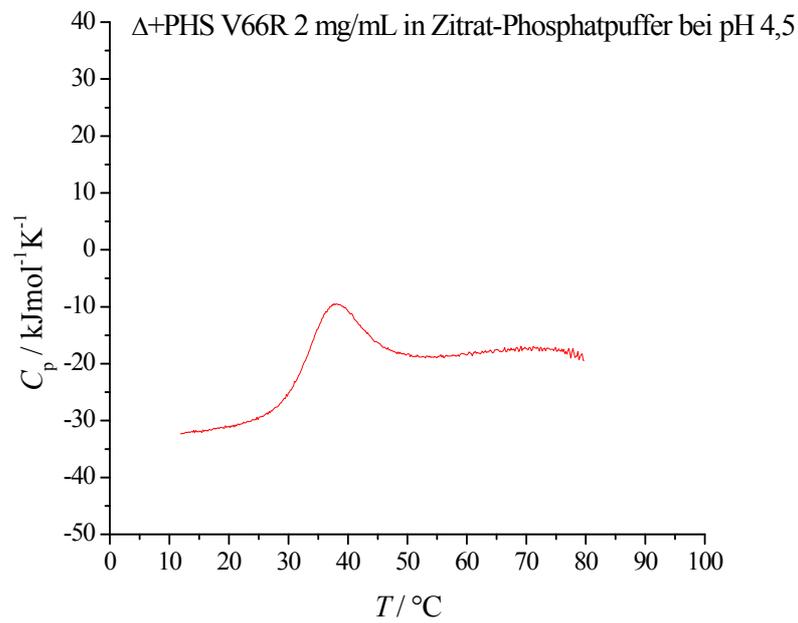


Abbildung 36: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate $40^{\circ}\text{C}/\text{h}$) und unten die PPC-Kurve ($2,5^{\circ}\text{C} / \text{Me\ss}$ punkt) der Mutation Δ +PHS V66R bei pH 4,5 dargestellt.

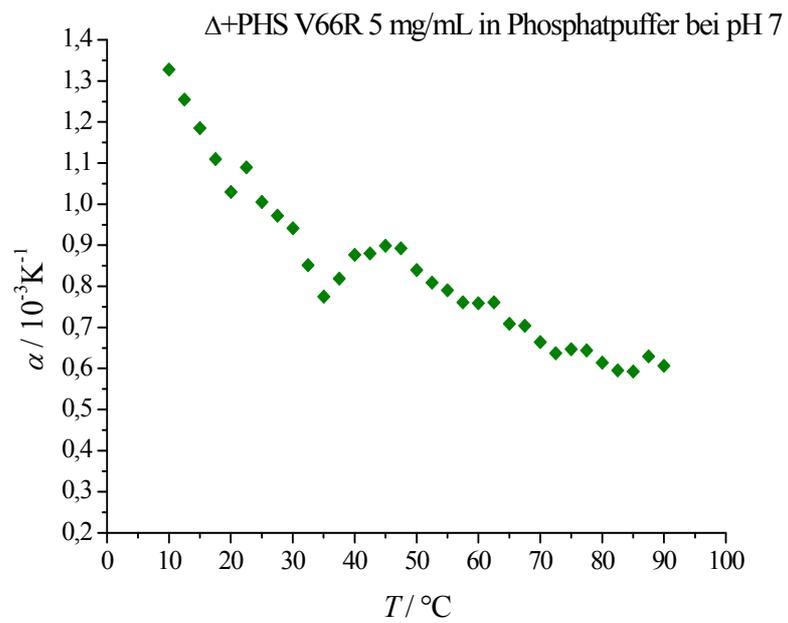
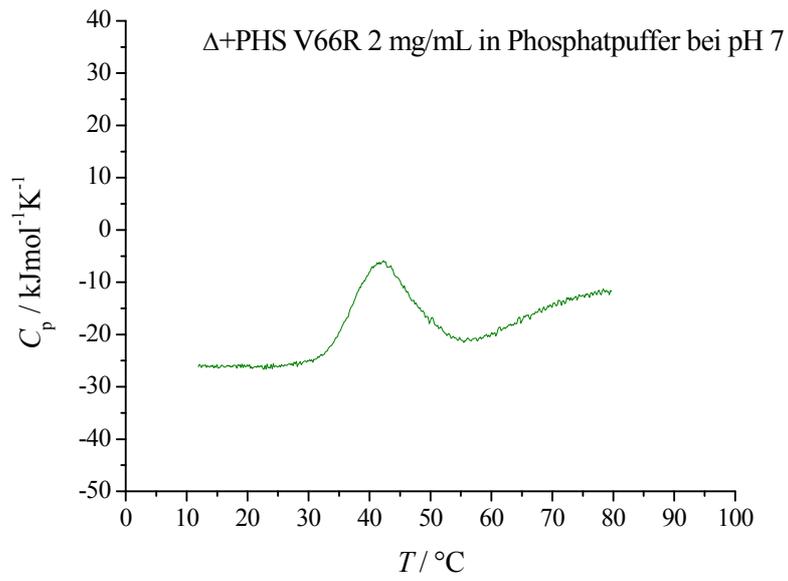


Abbildung 37: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate 40°C/h) und unten die PPC-Kurve (2,5 °C / Meßpunkt) der Mutation Δ +PHS V66R bei pH 7 dargestellt.

4.3.1.5 Punktmutation V66E

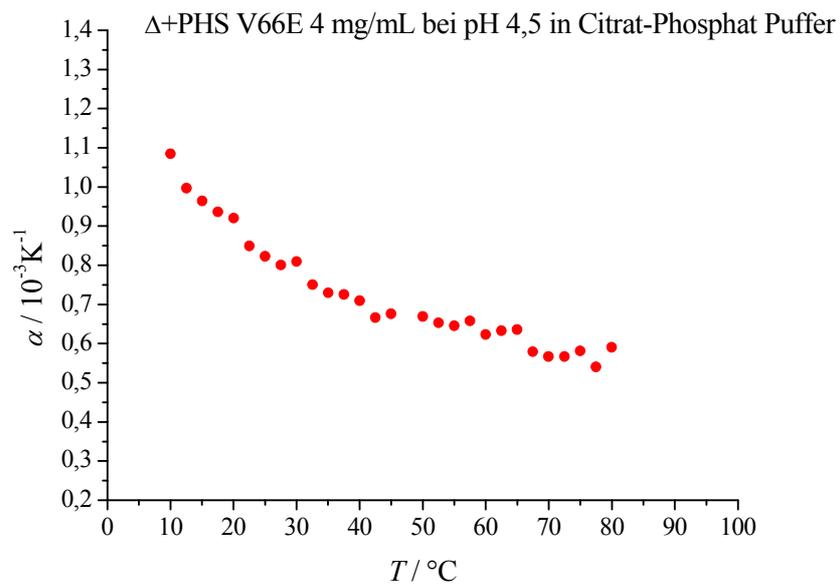
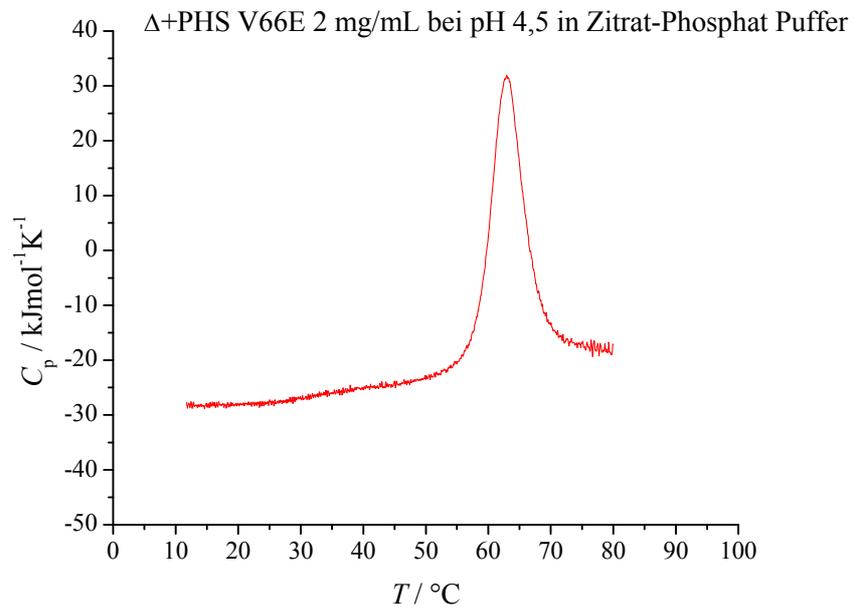


Abbildung 38: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate 40°C/h) und unten die PPC-Kurve der Mutation Δ +PHS V66E bei pH 4,5 dargestellt.

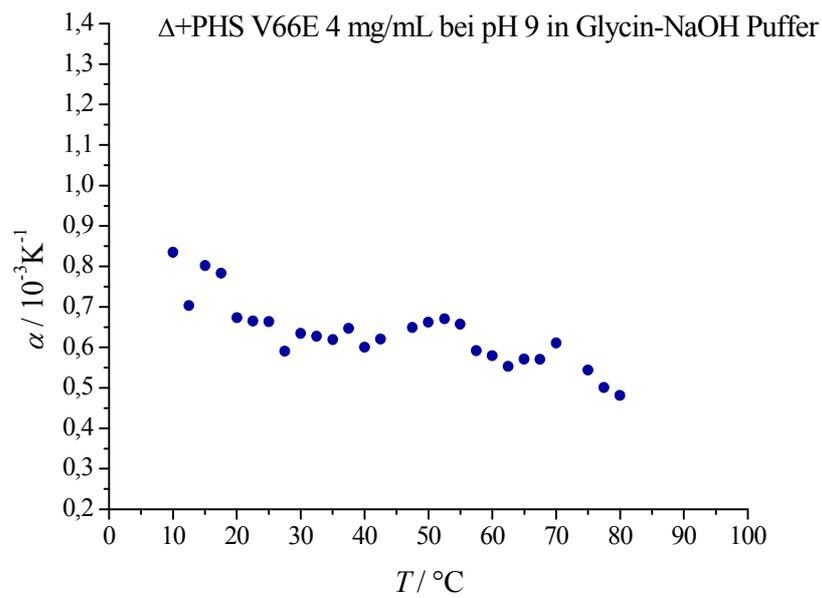
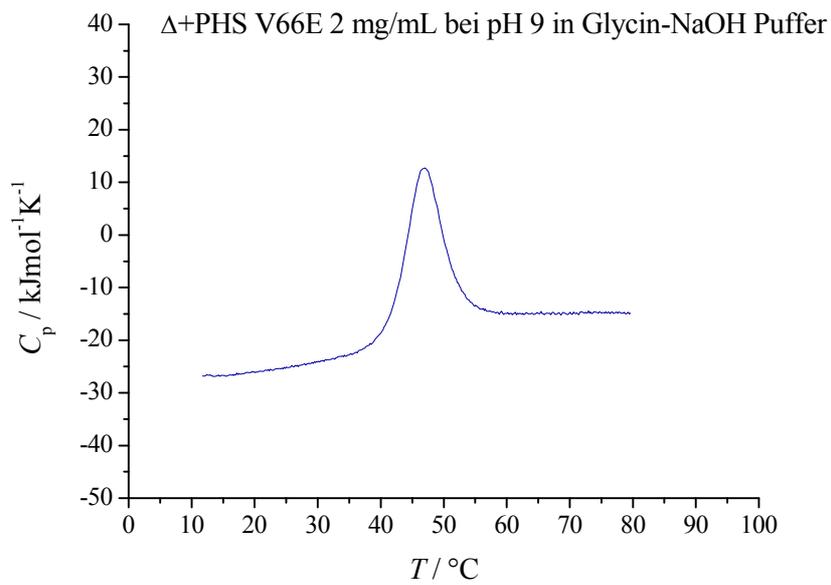


Abbildung 39: Oben ist die DSC-Kurve (Scanrate $40^{\circ}\text{C}/\text{h}$) und unten die PPC Kurve ($2,5^{\circ}\text{C} / \text{Me\ss}$ punkt) der Mutation Δ +PHS V66E bei pH 9 dargestellt.

4.3.1.6 Ergebnisse und Diskussion

Die Abbildungen 28-39 zeigen die verschiedenen DSC- und PPC-Kurven der WT SNase und ihren Mutationen. Die DSC-Thermogramme weisen unterschiedliche Entfaltungstemperaturen und -enthalpien auf. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, dient die DSC-Messung auch zur Festsetzung der Integrationsgrenzen der PPC-Messung, um die Volumenänderung der Mutation beim Entfaltungsvorgang genauer bestimmen zu können. Es ist bekannt, dass Unterschiede im Hydratationsverhalten, hier ausgelöst durch die unterschiedliche Seitenkette im Protein, unweigerlich zu mehr oder weniger großen Volumenänderungen unter Druck führen (J. F. Brandts *et al.*, 2002, Winter *et al.*, 2006). Also sollte die Untersuchung von Druckeffekten an Proteinen Aufschluss über die Veränderung der Hydratation und den energetischen und strukturellen Einfluss des Lösungsmittels auf die freie Energielandschaft des Proteins geben (Bryngelson, J. D., Wolynes, P. G., 1987). Die PPC-Messungen der Aminosäuren, gezeigt in Kapitel 2.1, weisen große Unterschiede in ihren Expansionsprofilen auf. Valin 66 (V66) ist auf der hydrophoben Seite einer α -Helix lokalisiert und liegt versteckt in einer hydrophoben Tasche (Lattman, E. E. *et al.*, 1991). Sind die Seitenketten der Mutation V66K, R und E neutral geladen, so trifft dies ebenfalls auf sie zu. Eine Änderung ihrer Ladung führt nun zu einer strukturellen Veränderung im Protein (Denisov, V. P. *et al.*, 2004). Die Abbildungen 34-39 zeigen die Varianten V66K, R und E gemessen mit PPC und DSC bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Startwerte der PPC-Daten für den neutralen Zustand ähneln sich für die V66K Variante, V66R Variante (bei pH 7) und für die V66E Variante (bei pH 4,5) mit den Ergebnissen für die WT SNase (s. Tabelle 4). Innerhalb ihrer unterschiedlichen pH-Werte bzw. unterschiedlich geladenen Ladungen ihrer Seitenkette, unterscheiden sich die PPC- und DSC-Profile stark voneinander. So liegt für die Variante V66K bei pH 4,5 eine geringere Entfaltungstemperatur T_m vor als bei pH 7 (geladene Seitenkette des Lysins). Bei der Variante V66E verhält es sich umgekehrt. Bei pH 4,5 ist die Entfaltungstemperatur erheblich größer als bei pH 9 (Seitenkette ist neutral geladen). Mit Blick auf die in Abbildung 28-30 dargestellten Kurven der WT SNase und in Abbildung 31-33 der Δ +PHS Mutation wird ersichtlich, welcher großen Unterschied die unterschiedlichen Sequenzen auf ihre thermodynamischen Parameter haben. Wie bereits in Kapitel 1.5.2 erwähnt, handelt es sich bei den eingesetzten Aminosäuren um stark polare (hydrophile) Seitenketten. Es ist bekannt, dass hydrophile

Aminosäureseitenketten große positive thermische Ausdehnungskoeffizienten bei tiefen Temperaturen aufweisen, die mit steigender Temperatur abnehmen (Brandts, J. F. *et al.*, 2002). Denn, wenn die Temperatur ansteigt, werden die Wassermoleküle von der Proteinoberfläche abgegeben und führen so zu einer Abnahme des thermischen Expansionskoeffizienten α .

Expansivitätsprofile nativer Proteine ähneln im Allgemeinen denen polarer Komponenten, da sich an der Oberfläche gefalteter Proteine für gewöhnlich polare Seitenketten befinden. Die kleinen Expansionswerte bei tiefen Temperaturen für die V66K, V66R und V66E Varianten der Δ +PHS SNase, können durch das Ansteigen des hydrophoben Charakters während der partiellen Entfaltung erklärt werden. Eine Abnahme von α mit der Temperatur kann zum Teil durch die Abnahme des Beitrags des void-Volumens erklärt werden (Smolin, N., Winter, R., 2006). Die relative Volumenänderung $\Delta V/V$ (s. Kapitel 2.2) wird durch Integration bestimmt bzw. unter Berücksichtigung der molaren Masse der jeweiligen Variante der SNase und des partiellen spezifischen Volumen (0,754 mL/g,) die absolute Volumenänderung ΔV berechnet (s. Tabelle 4). Zur Interpretation der PPC-Kurve ist es notwendig, die bei Chalikian, T. V., Breslauer, K. J., 1998 und Chalikian, T. V., 2003, beschriebene Theorie mit in die Diskussion einzuschließen. Veränderungen im partiellen spezifischen Volumen V° und somit auch in α können in drei Beiträge aufgeteilt werden: In das intrinsische Volumen, V_{intr} , welches aus dem van der Waals-Volumen der Atome und dem intrinsischen Hohlvolumen des wasserunzugänglichen Proteininneren resultiert; das Hydratationsvolumen, ΔV_{hydr} , auch als „Wechselwirkungsvolumen“ bezeichnet, da es sich aus der Wechselwirkung zwischen der „bulk“-Phase und der Hydratation der lösungsmittelzugänglichen Proteingruppen zusammensetzt; und das thermische Volumen, V_{therm} , welches aus der thermischen induzierten molekularen Vibration und der Reorientierung des Proteins mit dem Lösungsmittel entsteht. Daraus folgt: $V \approx V_{\text{intr}} + \Delta V_{\text{hydr}} + V_{\text{therm}}$. Das thermische Volumen steigt mit steigender Temperatur und führt zu einem positiven Beitrag in α (Seemann, H. *et al.*, 2001, Ravindra, R., Winter, R., 2003, Ravindra, R., Winter, R., 2004a, Winter, R. *et al.*, 2007). Der Solvationseffekt nimmt mit steigender Temperatur ab, da die thermische Aktivierung zu einer kontinuierlichen Freigabe des „kondensierten“ Wassers an der Proteinoberfläche führt. Danach leistet es keinerlei Beitrag mehr zum thermischen Ausdehnungskoeffizienten. Dieses Verhalten kann

anhand der bisher gelieferten PPC-Daten, aber auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Dies führt zu der Annahme, dass das Hydratationsvolumen, ΔV_{hydr} , neben dem Beitrag des void-Volumens ebenfalls einen großen Beitrag für die Expansivität liefert (Winter, R. *et al.*, 2007). Somit kann eine negative Volumenänderung (s. Tabelle 4) durch das Öffnen des void-Volumens und der dadurch anwachsenden hydrophilen Hydratation der geladenen und polaren Gruppen begründet werden (Ravindra, R. *et al.*, 2004, Winter, R. *et al.*, 2007). Im entfalteten Zustand steigt α aufgrund der größeren lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (solvent accessible surface area, SASA) und dem damit verbundenen größer werdenden Hydratationsbeitrag an, da zusätzlich zum positiven Effekt des thermischen Volumens auch die hydrophobe Hydratation im entfalteten Zustand zunimmt. Die tiefen Werte für den thermischen Ausdehnungskoeffizienten bei tiefer Temperatur für die geladenen Zustände der Mutationen, verbunden mit den relativ konstanten Werten für den entfalteten Zustand, veranschaulichen, dass die volumetrischen Eigenschaften der hydrophoben und der polaren Hydratation sich gegenseitig zu einer großen Fläche kompensieren. Die Ionisierung der Seitenkette in der V66E Mutation bei pH 9 führt beispielsweise zu einer stärkeren Hydratation des gefalteten Zustands. Dieses führt zu einem Shift des Volumenprofils zu niedrigeren Werten und somit zu einer tieferen Übergangstemperatur, so dass ΔV positiv wird (Tabelle 4). Würde die Ionisierung lediglich den gefalteten Zustand destabilisieren, ohne eine strukturelle Veränderung herbeizuführen, die die Hydratation verstärkt, würde ΔV sogar negativer werden, als bei seiner neutralen Form, da in diesem Fall die thermische Entfaltungstemperatur niedriger wäre. Dieser Effekt ist bei der V66K und V66R Mutation eher gering, da sich die Werte für ΔV bei beiden gemessenen pH-Werten recht ähnlich sind.

4.3.1.6.1 Berechnung der Gibbsenergie der SNase und ihrer Mutationen

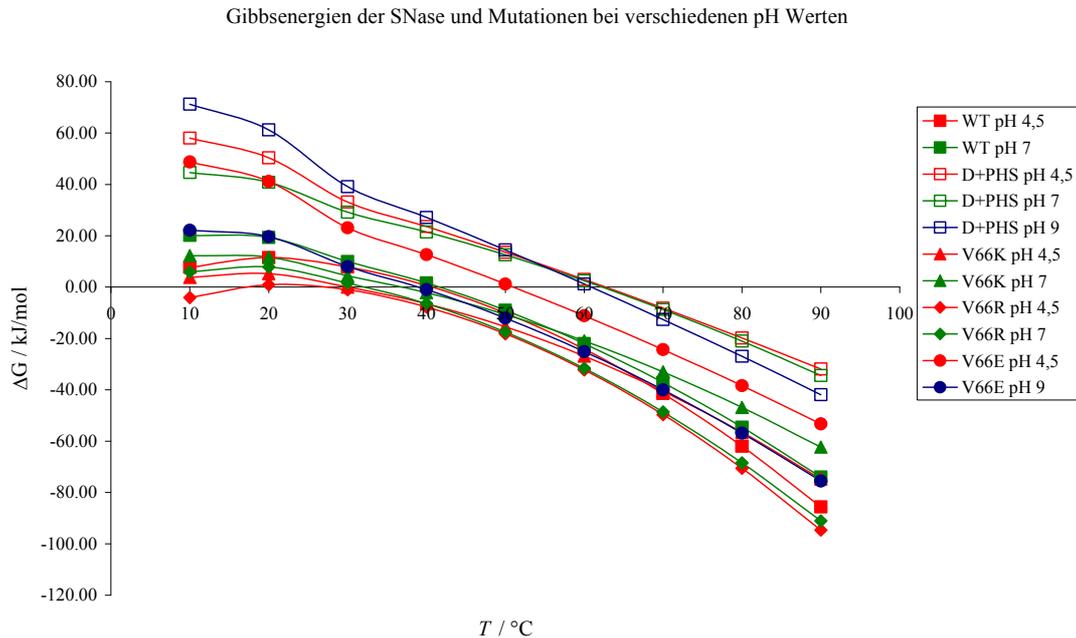


Abbildung 40: Berechnete Gibbsenergien der SNase und ihrer Mutationen als Funktion der Temperatur.

Abbildung 40 zeigt die berechneten Standard-Gibbsenergien der WT SNase und ihrer Mutationen. Diese wurden nach Gleichung 1.2 berechnet. Die Berechnung der Standard-Gibbsenergie erlaubt eine Aussage über die Stabilität der Proteine. Der Wildtyp der SNase (Vierecke) zeigt für pH 4,5 und 7 unterschiedliche Werte (bei 10 °C für pH 4,5 7,68 kJ/mol und bei pH 7 20,14 kJ/mol). Die thermische Denaturierung fängt beim Schnittpunkt mit der T -Achse an, da hier der Beitrag der Enthalpie und der Entropie, $-T\Delta S$, identisch ist. Bei pH 7 und 4,5 ist dieser Punkt bei ca. 40°C erreicht. Die Mutation Δ +PHS liegt sowohl bei tiefen Temperaturen (kalte Denaturierung) als auch nach dem Schnittpunkt mit der T -Achse (bei ca. 60°C) für sämtliche pH-Werte über den Werten des Wildtyps. Bei pH 9 weist die stabilisierte Form den höchsten Wert für die Gibbsenergie auf (ca. 70 kJ/mol). Interessant ist, dass die V66E Mutation bei pH 4,5 (neutrale Seitenkette) einen ähnlichen Wert aufweist wie die stabilisierte Form der SNase bei pH 7. Ebenso weisen die Gibbs-Werte für die WT SNase bei pH 7 ähnliche Werte wie die V66E Mutation bei pH 9 auf. Und die V66K und V66R Mutationen ähneln stark dem Wildtyp bei pH 4,5.

4.3.2 Druck-Sprung Fluoreszenzspektroskopie

Die folgenden Messungen wurden am CBS-Institut in Montpellier (Frankreich) durchgeführt. Mit Hilfe der Druck-Sprung Fluoreszenzspektroskopie wurden zwei verschiedene Punktmutationen der stabilisierten Form der SNase gemessen um zu zeigen, wie Druck verwendet werden kann, um die Hydratation des Transition State Ensemble (TSE) und seine Struktur zu untersuchen. Auch hier wurde die stabilisierte Form der SNase verwendet, Δ +PHS (Stites, W. E. *et al.*, 1991, Garcia-Moreno, B. *et al.*, 1997, Denisov, P. D. *et al.*, 2004). Für die Druck-Sprung-Messungen wurde Δ +PHS V74K (Austausch an der 74. Stelle von Valin durch Lysin) und Δ +PHS L36K (Austausch an der 36. Stelle von Leucin durch Lysin) vermessen. Ziel war es, mit Hilfe der V_i -Wert-Analyse herauszufinden, welche Stellen im SNase Protein für die Stabilität verantwortlich sind. Hierfür wurden Veränderungen an bestimmten Stellen (Mutationen) der SNase vorgenommen. Wie bereits erwähnt haben die Seitenketten in Aminosäuren einen großen Einfluß auf den Entfaltungsvorgang im Protein. Ionisierbare Seitenketten in einer Aminosäure sollten zu einer Veränderung der Proteinstruktur und somit seines Entfaltungsverhaltens führen. Der Vorteil der V_i -Analyse besteht darin, dass sie eine direkte Information über die Hydratation des TSE liefert, die eine essentielle Rolle für die Proteinfaltung darstellt (Levy, Y., Onuchic, J. N., 2006). Der V_i -Wert ist direkt mit der Hydratationsänderung während des Faltungsprozesses verbunden. Zuvor wurde gezeigt, dass das Aktivierungsvolumen für die Faltung des Wildtyps große, positive Werte aufweist und damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist und somit, wie bei vielen Proteinen (G. Desai, G. *et al.*, 1999, Tan, C. Y. *et al.*, 2005), während der Faltung eine signifikante Dehydratisierung einschließt (Panick, G. *et al.*, 1999, Vidugiris, G. J. *et al.*, 1995). Die Druck-Sprung-Relaxationsprofile wurden mit einer abnehmenden Exponentialkurve analysiert (s. Gleichung 2.16). Der Logarithmus der Relaxationszeit $\ln \tau$ wurde gegen den Druck aufgetragen und für die Faltung bzw. Entfaltung gefittet, um die Geschwindigkeitskonstante k (Gleichung 2.18) und das Faltungs- bzw. Entfaltungsaktivierungsvolumen (Gleichung 2.21) zu berechnen. Da es sich um die stabilisierte Form der SNase handelte (auch mit den Punktmutationen wiesen die Substanzen eine recht große Druckstabilität auf), wurde GuHCl hinzugefügt (0,5 M), um eine Faltung in dem zugänglichen Druckbereich (bis 2500 bar) realisieren zu können. Im Nachfolgenden werden ausgewählte Relaxationsprofile für die Mutation

V74K und L36K bzw. die $\ln \tau$ -Profile in Abhängigkeit des Drucks gezeigt. Anschließend werden die Ergebnisse in Tabelle 5 zusammengefaßt.

4.3.2.1 Δ +PHS V74K

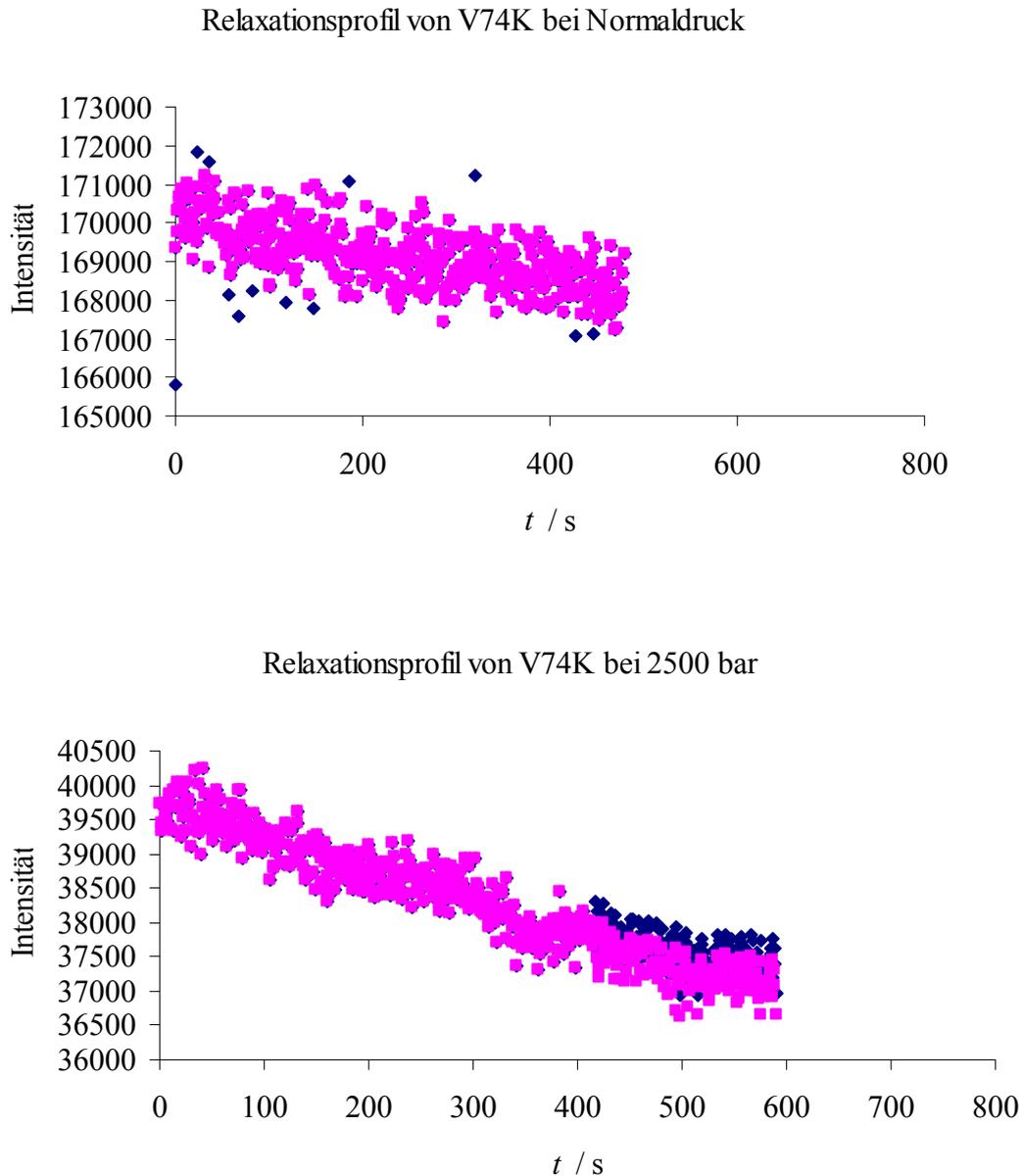


Abbildung 41: Relaxationsprofile der Δ +PHS V74K Mutation gemessen mit Hilfe der Druck-Sprung Fluoreszenzspektroskopie. Die blauen Punkte zeigen das Relaxationsprofil, die violetten Punkte zeigen das korrigierte und für die Berechnungen verwendeten Profil. Das untere Bild zeigt die Messung bei 2500 bar.

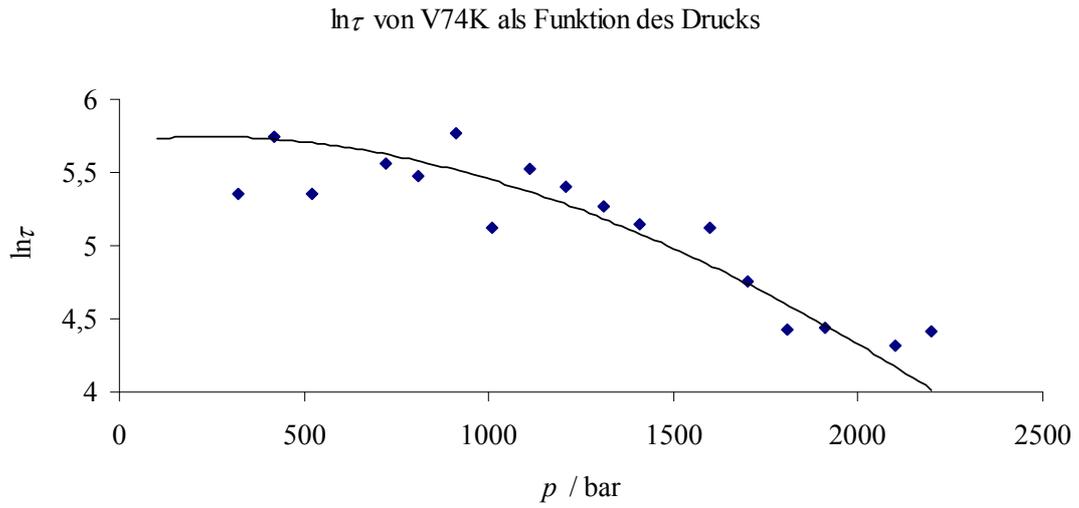


Abbildung 42: Logarithmus der Relaxationszeit von V74K als Funktion des Drucks.

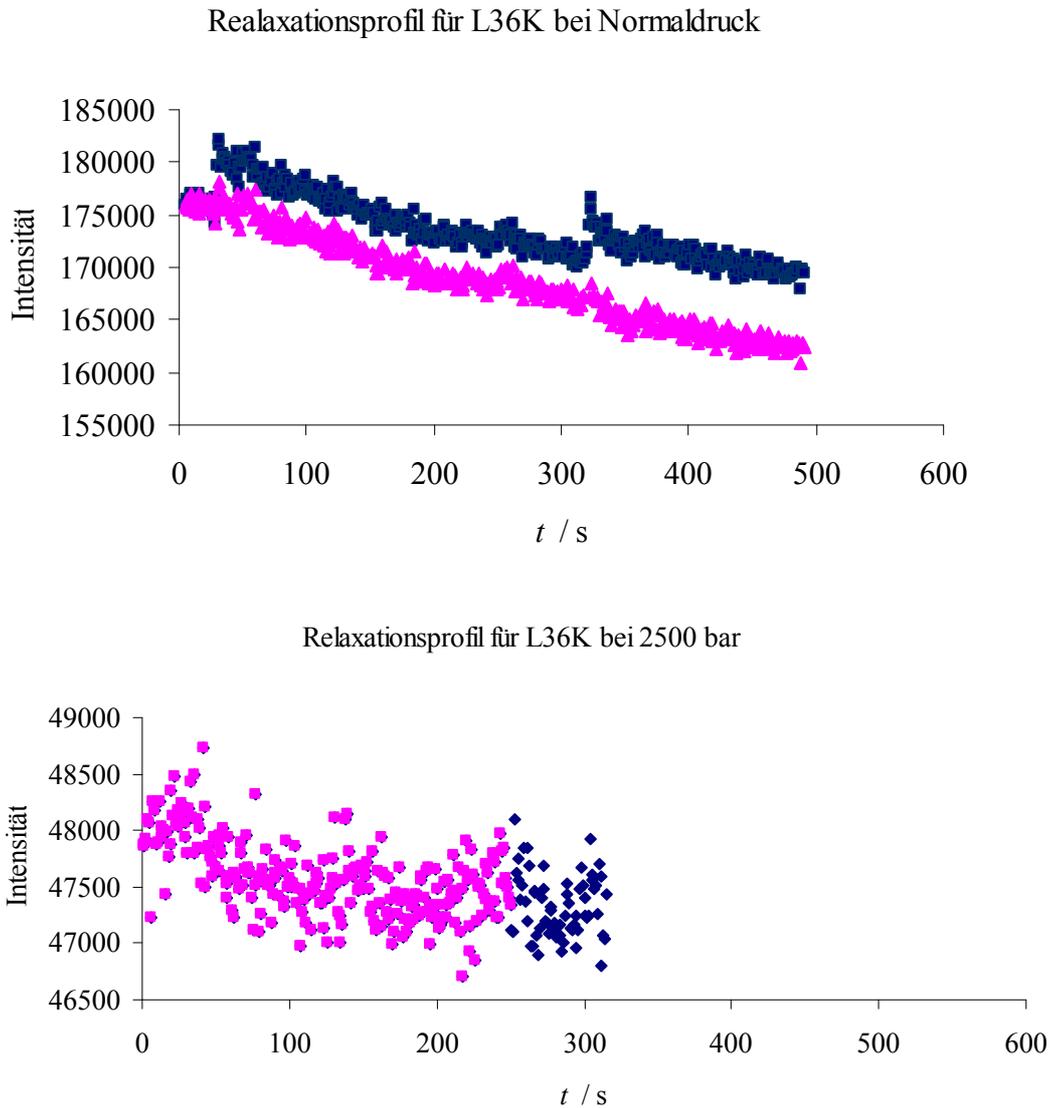
4.3.2.2 Δ +PHS L36K

Abbildung 43: Relaxationsprofile der Δ +PHS L36K Mutation gemessen mit Hilfe der Druck-Sprung Fluoreszenzspektroskopie. Die blauen Punkte zeigen das gemessene Relaxationsprofil, die violetten Punkte zeigen das korrigierte und für die Berechnungen verwendeten Profil. Das untere Bild zeigt die Messung bei 2500 bar.

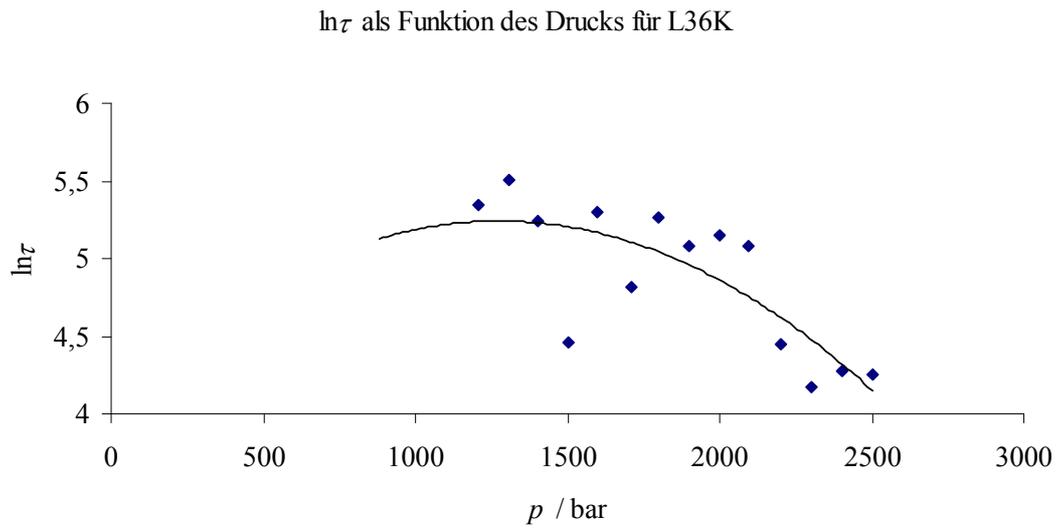


Abbildung 44: Logarithmus der Relaxationszeit von L36K als Funktion des Drucks.

4.3.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Mutante	pK _a	ΔG° kcal/mol	ΔV_f° mL/mol	ΔV_f^* mL/mol	ΔV_u^* mL/mol	V_i	K_f° s ⁻¹	K_u° s ⁻¹
T74K	7,5	1,8	58	+9	-51	0,2	0,00 35	0,00 016
L36K	6,5	2,5	83	+49	-34	0,7	0,02 8	0,00 04

Tabelle 5: Ergebnisse der Gleichgewichts- und Kinetikuntersuchungen der Varianten der SNase gemessen mit Druck-Sprung Fluoreszenzspektroskopie in Tris Puffer bei pH 8 und 0,5 M GuHCl. Fehlerabschätzung: ca. ± 4 mL/mol für die unterschiedlichen Volumina. Der V_i -Wert hat eine $\pm 0,12$ Toleranz.

Die Aktivierungsvolumina betragen für die V74K Mutation 58 mL/mol und 83 mL/mol für die L36K Mutante. V74K besitzt ein sehr großes negatives Aktivierungsvolumen ΔV_u° von -51 mL/mol. Dieses impliziert, dass die Faltung dieser Mutation in Bezug auf die Hydratationseigenschaften näher am entfalteten Zustand als am nativen Zustand liegt. Das L36K zeigt ein intermediates Verhalten, da es mit Druck einen Anstieg in der Geschwindigkeitskonstanten für die Entfaltung zeigt und gleichzeitig eine Abnahme für die Faltung aufweist. Aufgrund des großen negativen Gleichgewichtsvolumen wird vermutet, dass der Grundzustand durch Substitution der Position 36 im SNase-Molekül gestört wird. Dies führt jedoch nur zu einer geringen Änderung des V_i -Werts, da sich die Struktur des SNase-Moleküls durch die Mutation nicht ändert. Die Substitution an der Stelle 36 führt demnach dazu, dass das TSE destabilisiert wird (der V_i -Wert liegt in der Nähe von 1) im Vergleich zu der anderen Mutation, V74K, die sich in einer hydrophoben Tasche befindet.

Die Abbildungen bei 2500 bar der beiden Mutationen werden hier gezeigt, um die geringen Intensitäten bei diesem Druck zu veranschaulichen. Die Abnahme der Intensität zeigt eine vollständige Denaturierung des Proteins an.

5. Zusammenfassung

Die Druck-Perturbations-Kalorimetrie (PPC) eignet sich sehr gut um Aussagen über die temperaturabhängige Hydratation von Molekülen in Lösung zu bekommen. Der mit ihrer Hilfe bestimmbare isotherme Ausdehnungskoeffizient α ist ein sensitiver Parameter für die Strukturänderung eines Biomoleküls. Die Aminosäuren Glycin, Alanin, Leucin, Methionin, Phenylalanin und Glutamin wurden mit PPC untersucht. Hierbei konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Natur der Seitenkette der Aminosäure und der Expansivität festgestellt werden. In einem proteinähnlichen Verband GXG (X= A, L, Q, M und F) wiesen die Seitenketten höhere Expansivitäten auf als bei den einzeln gemessenen Aminosäuren, welches auf einen Abschirmungseffekt durch die hydrophilen Glycine zurückzuführen ist, da hydrophile Moleküle aufgrund einer stärkeren Hydratation zu einem Anstieg in α führen. Es konnte ebenfalls eine starke Abhängigkeit von der Konzentration (Beispiel Alanin: Interaktionseffekte meßbar bereits ab 2 Gew.%) bzw. der Ladung (Beispiel Alanin: $pK_1 = 2,3$, $pK_2 = 9,9$, isoelektrischen Punkt = 6,1) und der gemessenen Expansivität beobachtet werden. Letzteres wurde dadurch belegt, dass die Ergebnisse für Moleküle, deren geladene Gruppen blockiert wurden (Beispiel Alanin und Trialanin: Ac-N für H-N und -OMe für -OH), eine geringere Temperaturabhängigkeit von α aufwiesen als die natürlichen Spezies.

Des Weiteren wurden vier Isomere des Trialanins (linksdrehend (LLL), rechtsdrehend (DDD), und gemischt (LDL, DLL)) mit PPC-, DSC-, FT-IR-, Dichte- und Ultraschallmessungen untersucht, wobei sichtbare Unterschiede im Temperaturverhalten beobachtet werden konnten. Die berechneten intrinsischen Volumina und Expansivitäten der Isomere wiesen deutliche Änderungen in Bezug auf die apparenten experimentellen Daten auf, da sie die Eigenschaften des unhydratisierten Peptids widerspiegeln und damit veranschaulichen, welchen großen Einfluß das Hydratwasser auf die Eigenschaften der Biomoleküle hat.

Als ein Beispiel für ein Proteinsystem wurden Mutationen der stabilisierten Form der Staphylokokken Nuklease (Δ +PHS SNase), welche sich nur in einer Aminosäure unterschieden, kalorimetrisch untersucht. Sowohl die PPC- als auch die DSC-Daten zeigen große Unterschiede in Bezug auf die ermittelten thermodynamischen Parameter der Proteinfaltung (T_m , ΔH , C_p , α , ΔV), was zeigt, dass die Änderung von

nur einer Aminosäure in einer Proteinsequenz bereits zu signifikanten Änderungen der thermodynamischen Eigenschaften führen kann.

Für die Druck-Sprung-Fluoreszenzspektroskopischen Messungen, die Auskunft über die Kinetik der Proteinfaltung geben, wurden ebenfalls Mutationen der stabilisierten SNase eingesetzt. Der V_i -Wert für die V74K Mutation zeigt einen von Null ähnlichen Wert, was bedeutet, dass die Stabilität zwischen mutiertem und nichtmutiertem Übergangszustandsmodell (TSE) ähnlich ist. Der V_i -Wert für die L36K Mutation weist einen Wert nahe 1 auf, was zeigt, dass diese Form sehr viel instabiler ist als die nichtmutierte Form. Dieses bedeutet, dass die Stabilität des Proteins unter anderem von dieser Position stark beeinflusst wird.

6. Symbolverzeichnis

α bzw. α^{app}	thermischer Ausdehnungskoeffizient bzw. apparerther thermischer Ausdehnungskoeffizient
τ	Relaxationszeit
ΔV^*	Aktivierungsvolumen
ΔV	Volumenänderung im Verlaufe der Proteinfaltung
ΔV_{hydr}	Hydratationsvolumen
K_s	adiabatische Kompressibilität
β_s	adiabatischer Kompressibilitätskoeffizient
ΔH	Enthalpieänderung
ΔS	Entropieänderung
β	Heizrate
ΔK_{Sh}	Hydratationsterm der adiabatischen Kompressibilität
ΔK_{Th}	Hydratationsterm der isothermen Kompressibilität
K_{SM}	intrinsische Kompressibilität
K_{TM}	intrinsische Kompressibilität
K_T^0	isotherme Kompressibilität
β_T	isothermer Kompressibilitätskoeffizient
E^0	partielle molare Expansivität
C_p^0	partielle molare Wärmekapazität
K_s^0	partielle molare adiabatische Kompressibilität
$\bar{\alpha}$	partieller thermaler Expansionskoeffizient
ΔG	Gibbsenergieänderung
T	Temperatur
ΔC_p	Wärmekapazitätsänderung
t	Zeit
c	Konzentration
C	molare Konzentration
C_m	Massenfraction
D	Schichtdicke der ersten Wasserschicht der Hydrathülle (0,3 nm)

I :	Intensität
K :	Gleichgewichtskonstante
K_f :	Gleichgewichtskonstante für den nativen Zustand
K_u :	Gleichgewichtskonstante für den entfalteten Zustand
m :	Masse
M :	Molmasse
N_A :	Avogadrokonstante ($6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
N_p :	Anzahl der Moleküle in Lösung
p :	Druck
P :	Leistung
Q :	Wärmemenge
R :	Gaskonstante ($8,314 \text{ J/K}\cdot\text{mol}$)
T_m :	Entfaltungstemperatur
U :	Ultraschallgeschwindigkeit
V bzw. V^{app} :	Volumen bzw. apparentes Volumen
V° :	partielles spezifisches Volumen
V_u^* :	Volumenänderung des entfalteten Zustands
V_f^* :	Volumenänderung des nativen Zustands
V^0 :	partielles Molvolumen
V_{intr} :	intrinsisches Volumen
V_{therm} :	thermisches Volumen
ϕ -Wert:	Quotient aus $\Delta\Delta G_{f,*}$ und $\Delta\Delta G_{f,u}$
$\Delta\Delta G_{f,*}$:	Differenz der freien Energieänderung bei einer Mutation zwischen dem gefalteten Zustand f und dem Übergangszustand *
$\Delta\Delta G_{f,u}$:	Differenz der freien Energieänderung bei einer Mutation zwischen gefaltetem f und entfaltetem u Zustand
ρ :	Dichte

7. Literatur

- Arnold Perez Goicochea (Kommunikation, 2007)
- Atkins, P. W. (2. Auflage, VCH, 1996)
- Batchelor, J. D. Olteanu, A., Tripathy, A., Pielak, G. J. (*J. A. C. S.*, 2004, **126**, 1958-1961)
- Brandts, J. F., Oliveira, R. J., Westort, C. (*Biochemistry*, 1970, **9**, 1038-1047)
- Brovchenko, I. *et al.*, a: Intrinsic thermal expansivity and hydrational properties of amyloid peptide A β ₄₂ in liquid water
- Brovchenko, I. *et al.*, b
- Brovchenko, I. *et al.*, c (eingereicht)
- Brovchenko, I., Burri, R. R., Krukau, A., Oleinikova, A., Winter, R.
- Brovchenko, I., Krukau, A., Smolin, N., Oleinikova, A., Geiger, A., Winter, R. (*J. Chem. Phys.*, 2005, **123**, 224905)
- Brun, L., Isom, D. G., Velu, P., García-Moreno, B., Royer, C. A. (*Biochemistry*, 2006, **45**, 3473-3480)
- Bryngelson, J. D., Wolynes, P. G. (*P. N. A. S.*, 1987, **84**, 7524-7528)
- Chalikian, T. V. (*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2003, **32**, 207-235)
- Chalikian, T. V., Breslauer, K. J. (*Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1998, **8**, 657-664)
- Chalikian; T. V. Sarvazyan, A. P., Funck, T., Breslauer, K. J. (*Biopolymers*, 1994, **34**, 541-553)
- Cotton, F. A. Hazen, E. E., Margaret, J. L. (*P. N. A. S.*, 1979, **76**, 2551-2555)
- Dagget, V., Fersht, A. R. (*Trends in Biochemical Sciences*, 2003, **28**, 18-25)
- Denisov, P. D., Schlessman, J. L., García-Moreno E., B., Halle, B. (*Biophysical Journal*, 2004, **87**, 3982-3994)
- Desai, G., Panick, G., Zein, M., Winter, R., Royer, C. A. (*J. Mol. Biol.*, 1999, **288**, 461-475)
- Dill, K. A. (*Biochemistry*, 1985, **24**, 1501-1509)
- Dwyer, J. J., Gittis, A. G., Karp, D. A., Lattman, E. E., Spencer, D. S., Stites, W. E., García-Moreno E., B. (*Biophysical Journal*, 2000, **79**, 1610-1620)
- Eker, F., Cao, X., Nafie, L., Huang, Q., Schweitzer-Stenner, R. (*J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 358-365)
- Eker, F., Cao, X., Nafie, L., Schweitzer-Stenner, R. (*J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 14330-14341)

- Eker, F., Griebenow, F., Cao, X., Nafie, L. A., Schweitzer-Stenner, R. (*P. N. A. S.*, 2004, **101**, 10054-10059)
- Ellenbogen, E. (*J. A. C. S.*, 1952, **74**, 5198-5201)
- Ellenbogen, E., a (*J. A. C. S.*, 1956, **78**, 363-366)
- Ellenbogen, E., b (*J. A. C. S.*, 1956, **78**, 366-368)
- Ellenbogen, E., c (*J. A. C. S.*, 1956, **78**, 369-372)
- Fersht, A. (*W. H. Freeman and Co.*, New York, 1999)
- Fersht, A. R., Matouschek, A., Serrano, L. (*J. Mol. Biol.*, 1992, **224**, 771-782)
- Franks, F. (*Biophysical Chemistry*, 2002, **96**, 117-127)
- García-Moreno E., B., Dwyer, J. J., Gittis, A. G., Lattman, E. E., Spencer, D. S., Stites, W. E. (*Biophysical Chemistry*, 1997, **64**, 211-224)
- Gekko, K., Noguchi, H. (*The Journal of Physical Chemistry*, 1979, **83**, 2706-2714)
- Gorbunov, R. D., Nguyen, P. H., Kobus, M., Stock, G. (*J. Chem. Phys.*, 2007, **126**, 054509-1-10)
- Häckel, M., Hinz, H.-J., Hedwig, G. R. (*Biophysical Chemistry*, 1999, **82**, 35-50)
- Häckel, M., Hinz, H.-J., Hedwig, G. R. (*Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2000, **2**, 4843-4849)
- Hawley, S. A. (*Biochemistry*, 1971, **10**, 2436-2442)
- Hemminger, W. F., Cammenga, H. K. (*Springer Verlag*, 1989)
- Hynes, T. R., Fox, R. O. (*Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1991, **10**, 92-105)
- Itzhaki, L. S., Otzen, D. E., Fersht, A. R. (*J. Mol. Biol.*, 1995, **254**, 260-288)
- Jacob, M. H., Saudan, C., Holtermann, G., Martin, A., Perl, D., Merbach, A. E., Schid, F. X. (*J. Mol. Biol.*, 2002, **318**, 837-845)
- Kharakoz, D. P., Sarvazyan, A. P. (*Biopolymers*, 1993, **33**, 11-26)
- Kim, P. S., Baldwin, R. L. (*Annual Review of Biochemistry*, 1990, **59**, 631-660)
- Kitahara, R., Royer, C., Yamada, H., Boyer, M., Saldana, J.-L., Akasaka, K., Roumestand, C. (*J. Mol. Biol.*, 2002, **320**, 609-628)
- Kujawa, P., Winnik, F. M. (*Macromolecules*, 2001, **34**, 4130-4135)
- Kunkel, T. A. (*P. N. A. S.*, 1985, **82**, 488-492)
- Lee, O., Roberts, G. M., Diem, M. (*Biopolymers*, 1989, **28**, 1759-1770)
- Levinthal, C. (*Extrait du Journal de Chimie Physique*, 1968, **65**, 44-45)
- Levy, Y., Onuchic, J. N. (*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2006, **35**, 389-415)

- Lin, L.-N., Brandts, J. F., Brandts, J. M., Plotnikov, V. (*Analytical Biochemistry*, 2002, **302**, 144-160)
- Ludwig, R., Paschek, D. (*Chem. Unserer Zeit*, 2005, **39**, 164-175)
- Mantsch, H. H., Chapman, D. (*Wiley-Liss, Inc, New York*, 1995)
- Measey, T., Hagarman, A., Eker, F., Griebenow, K., Schweitzer-Stenner, R. (*J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 8195-8205)
- Microcal user note, 2000: Pressure Perturbation Calorimetry
- Mitra, L., Hata, K., Kono, R., Maeno, A., Isom, D., Rouget, J.-B., Winter, R., Akasaka, K., García-Moreno, B., Royer, C. A. (*J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 14108-14109)
- Mitra, L., Smolin, N., Ravindra, R., Royer, C., Winter, R. (*Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, **8**, 1241-1348)
- Mohan, C. (CALBIOCHEM[®], Merck EMD Biosciences, Inc., An Affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 2003)
- Mohana-Borges, R., Silva, J. L., Rutz-Sanz, J., Prat-Gay, De. G. (*P. N. A. S.*, 1999, **96**, 7888-7893)
- Mu, Y., Stock, G. (*J. Phys. Chem. B.*, 2002, **106**, 5294-5301)
- Panick, G., Malessa, R., Winter, R., Rapp, G., Frye, K. J., Royer, C. A. (*J. Mol. Biol.*, 1998, **275**, 389-402)
- Panick, G., Vidugiris, G. J. A., Malessa, R., Rapp, G., Winter, R., Royer, C. A. (*Biochemistry*, 1999, **38**, 4157-4164)
- Plotnikov, V. V., Brandts, J. M., Lin, L.-N., Brandts, J. F. (*Analytical Biochemistry*, 1997, **250**, 237-244)
- Ravindra, R., Royer, C., Winter, R. (*Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**, 1952-1961)
- Ravindra, R., Winter, R. (*Chem. Phys. Chem.*, 2003, **4**, 359-365)
- Ravindra, R., Winter, R., a (*Chem. Phys. Chem.*, 2004, **5**, 566-571)
- Reading, J. F., Hedwig, G. R. (*J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1990, **86**, 3117-3123)
- Röntgen, W. C. (*Ann. d. Phys. u. Chem.*, 1891, **45**, 91-97)
- Royer, C. A. (*Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, **469**, 34-45)
- Royer, C. A., Hinck, A. P., Loh, S. N., Prehoda, K. E., Peng, X., Jonas, J., Markley, J. L. (*Biochemistry*, 1993, **32**, 5222-5232)
- Schweitzer-Stenner, R., Eker, F., Huang, Q., Griebenow, K. (*J. A. C. S.*, 2001, **123**, 9628-9633)
- Schymkowitz, J. W. H., Rouseau, F., Serrano, L. (*P. N. A. S.*, 2002, **99**, 15846-16848)

- Seemann, H., Winter, R., Royer, C. A. (*J. Mol. Biol.*, 2001, **307**, 1091-1102)
- Serrano, L., Matouschek, A., Fersht, A. R. (*J. Mol. Biol.*, 1992, **224**, 771-782)
- Shakhnovich, E. I. (*Current Opinion in Structural Biology*, 1997, **7**, 29-40)
- Shortle, D., Meeker, A. K. (*Biochemistry*, 1989, **28**, 936-944)
- Siegrist, K., Bucher, C. R., Mandelbaum, I., Walker, A. R. H., Balu, R., Gregurick, S. K., Plusquellic, D. F. (*J. A. C. S.*, 2006, **128**, 5764-5775)
- Smirnovas, V., Funck, T., Dzwolak, W., Winter, R. (*J. Phys. Chem. B Letters*, 2005, **109**, 19043-19045)
- Smirnovas, V., Winter, R., Funck, T., Dzwolak, W. (*Chem. Phys. Chem.*, 2006, **7**, 1046-1049)
- Smolin, N., Winter R. (*J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 15928-15937)
- Southall, N. T., Dill, K. A., Haymet, A. D. J. (*J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 521-533)
- Stites, W. E., Gittis, A. G., Lattman, E. E., Shortle, D. (*J. Mol. Biol.*, 1991, **221**, 7-14)
- Stryer, L. (*Spektrum Der Wissenschaft*, 1991)
- Sturtevant, J. M. (*Ann. Rev. Phys. Chem.*, 1987, **38**, 463-488)
- Tan, C.-Y., Xu, C.-H., Wong, J., Shen, J.-R., Sakuma, S., Yamamoto, Y., Lange, R., Balny, C., Ruan, K.-C. (*Biophysical Journal*, 2005, **88**, 1264-1275)
- Taulier, N., Chalikian, T. V. (*Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, **1595**, 48-70).
- Vidugiris, G. J. A., Markley, J. L., Royer, C. A. (*Biochemistry*, 1995, **34**, 4909-4912)
- Winter, R., Lopes, D., Grudzielanek, S., Vogtt, K. (*J. Non-Equilib. Thermodyn.*, 2007, **32**, 41-97)
- Winter, R., Noll, F. (*Teubner Studienbücher, Chemie*, 1998)
- Woutersen, S., Hamm, P. (*J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 11316-11320)
- Woutersen, S., Pfister, R., Hamm, P., Mu, Y., Kosov, D. S., Stock, G. (*J. Chem. Phys.*, 2002, **117**, 6833-6840)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lally Mitra
Geburtsdaten: 15.05.1978

Schulbildung

08/1984 - 07/1988 Grundschule Hufelandschule in Bochum
08/1988 - 06/1997 Gymnasium Schillerschule in Bochum

Studium

10/1997 - 12/2004 Chemiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
07/2004 - 12/2004 Diplomarbeit mit dem Titel:
„Kritische Erscheinungen in binären flüssigen
Gemischen“
12/2004 Abschluß Diplom
02/2005 - z. Z. Promotion bei Prof. Dr. Winter an der Technischen
Universität Dortmund

Berufspraxis

02/2004 - 12/2007 wissenschaftliche Angestellte an der Technischen
Universität Dortmund
03/2008 - 06/2008 Internationaler Junior Projekt Manager am IFE in Essen
07/2008 - z. Z. Dipl.-Chemikerin bei BP Bitumen in Gelsenkirchen