

Temperatur-, hydrostatische Druck- und Kosolvens- effekte auf Protein-Liganden-Systeme

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Nisrine Jahmidi-Azizi

aus Velbert (Deutschland)

eingereicht an der
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
der Technischen Universität Dortmund

Dortmund

Juni 2023

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2019 bis Juni 2023 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Technischen Universität Dortmund unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Roland Winter angefertigt.

Prüfungskommission:

Erstgutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Claus Czeslik

Für meine Familie

لَنْ يَشْبَعَ الْمُؤْمِنُ مِنْ خَيْرٍ يَسْمَعُهُ حَتَّىٰ يَكُونَ مِنْتَهَا الْجَنَّةُ

”The believer is never satisfied from learning good until he arrives in Paradise.”

PROPHET MOHAMMED

(Peace be upon him)

Danksagung

Schreiben musste ich diese Arbeit zwar allein – doch an ihrem guten Gelingen beteiligt waren jede Menge mir nahestehender Menschen, denen ich Dank schulde.

An erster Stelle, mein Doktorvater Prof. Dr. Roland Winter. Ich danke ihm für das interessante Thema und für seine große Unterstützung während dieser Zeit.

Herrn Prof. Dr. Claus Czeslik danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Einen großen Dank für ihre Hilfe, den tollen Gesprächen als auch Ratschlägen möchte ich auch Frau Andrea Jeworrek zurufen. Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Hasan Cinar, Dr. Rosario Oliva und Magiliny Manisegaran für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich auch bei allen Mitarbeitern sowie ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls Physikalische Chemie I für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Herzlichen Dank an Arzu, Duygu, Vjosa und Seher für die erfrischenden und abwechslungsreichen Gespräche und den bereichernden Austausch.

Natürlich möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken. Wenn ich mit den Gedanken nicht zu Hause, sondern bei der Arbeit war, hat sie mich wachgerüttelt und mich immer unterstützt und motiviert. Unter anderem meine Schwestern Fairouz, Jihane, Narjess und Aryam Jahmidi, die immer ein offenes Ohr für mich haben. Großer Dank gebührt auch meinen Eltern, Hayat Akliya und Mamoun Jahmidi ohne deren unermüdliche Unterstützung und großen Ansporn die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Meinem Ehemann Mohammed Azizi danke ich für seine große Unterstützung, seinen Rückhalt und vor allem seine Geduld in etlichen Lebenslagen. Erwähnen möchte ich noch mein Gottes Geschenk, mein Sohn Hudhayfa Azizi, der mir die größte Motivation auf dieser Reise verlieh. Eure Hilfe bedeutet mir mehr, als sich irgendetwas überhaupt vorstellen kann. Das war schon immer so und beschränkt sich nicht nur auf die Dissertation. Dafür bin ich euch auf ewig dankbar.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Verwandten, Freunden und Bekannten, die mein Jammern und Klagen jahrelang ertragen und mich immer wieder aufgerichtet haben. Ihr könnt euch nicht vorstellen, wie wichtig dieser Rückhalt für mich war.

Zuletzt danke ich dem Wohltäter, der der Menschheit alle Wohltaten dieser Welt schenkt, An-Naafi.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	5
Kurzzusammenfassung	7
1 Einleitung	9
1.1 Protein-Liganden Bindungen.....	9
1.2 Physikalisch-chemische Mechanismen der Protein-Ligand-Wechselwirkung	10
1.3 Einsatz von hohem hydrostatischem Druck zur Erforschung von Liganden-Bindungen.....	13
2 Experimentelle Methoden	18
2.1 Chemikalien und Proteine	18
2.2 Steady-state Fluoreszenzspektroskopie	19
2.2.1 Thermodynamische Grundlagen für quantitative spektroskopische Titrations ^[27] ...	19
2.2.2 Bindungsmodelle	20
2.2.2.1 Äquivalente und unabhängige Bindungsstellen ^[20]	20
2.2.3 Zwei Klassen von nicht-äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellen.....	22
3 Osmolyte in der Tiefsee: Ihre Wirkung auf die Protein-Liganden-Bindung unter hohem Druck	25
3.1 Experimentelles.....	26
3.1.1 Probenpräparation	26
3.1.2 Steady-state Fluoreszenzspektroskopie	26
3.1.3 Zirkulardichroismus-Spektroskopie	29
3.1.4 Identifizierung von Bindungsstellen	29
3.2 Ergebnisse	30
3.2.1 Einfluss von Osmolyten auf die Protein-Proflavin-Bindung durch Fluoreszenzspektroskopie bei Atmosphärendruck.....	30
3.2.2 Konformationsanalyse durch CD-Spektroskopie	32
3.2.3 Druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie	34
3.2.4 3D-Darstellung der Proteinbindungstaschen	39
3.3 Diskussion.....	41

3.4 Zusammenfassung & Fazit.....	46
4 Die Auswirkungen von Temperatur und Druck auf die Protein- Ligandenbindungen in Anwesenheit von marsrelevanten Salzen.....	49
4.1 Experimentelles.....	51
4.1.1 Probenpräparation	51
4.1.2 Steady-state Fluoreszenzspektroskopie	51
4.1.3 Zirkulardichroismus-Spektroskopie	52
4.2 Ergebnisse.....	53
4.2.1 Einfluss marsrelevanter Salze auf die BSA-ANS-Komplexbildung.....	53
4.2.2 Druckabhängige Fluorezenzspektroskopie	56
4.2.3 Konformationsanalyse durch CD-Spektroskopie	62
4.3 Diskussion.....	64
4.4 Zusammenfassung & Fazit.....	67
5 Ionen im tiefen Untergrund von Erde, Mars und eisigen Monden: Ihre Auswirkungen in Kombination mit Temperatur und Druck auf die tRNA- Liganden-Bindung.....	69
5.1 Experimentelles.....	72
5.1.1 Probenpräparation	72
5.1.2 Steady-State Fluoreszenzspektroskopie.....	72
5.1.3 Zirkulardichroismus-Spektroskopie	73
5.2 Ergebnisse.....	74
5.2.1 Einfluss der Magnesiumsalze auf die Ligandenbindung unter Standardbedingungen	74
5.2.2 Bindungsstudie durch druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie.....	78
5.2.3 Konformationsanalyse durch CD-Spektroskopie	83
5.3 Diskussion.....	86
5.4 Zusammenfassung & Fazit.....	89
6 Tannine im Wein: Einfluss von Alkohol auf die Protein-Liganden-Bindung.....	91
6.1 Experimentelles.....	93

6.1.1 Probenpräparation	93
6.1.2 Steady-State-Fluoreszenzspektroskopie.....	93
6.1.3 Zirkulardichroismus-Spektroskopie	94
6.2 Ergebnisse	95
6.2.1 Bindungsstudie durch Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie	95
6.2.2 Konformationsanalyse durch CD-Spektroskopie	101
6.2.3 Enthalpiebestimmung mit Hilfe Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC)	103
6.3 Diskussion.....	105
6.4 Zusammenfassung & Fazit.....	109
7 Zusammenfassung	112
8 Anhang.....	115
8.1 Protein-Proflavin-Bindungen unter Einfluss von Osmolyten	115
8.2 BSA-ANS Bindung unter Einfluss von marsrelevanten Salzen	117
8.3 Ionen im tiefen Untergrund von Erde, Mars und eisigen Monden: Ihre Auswirkungen in Kombination mit Temperatur und Druck auf die tRNA-Liganden-Bindung	122
8.4 Tannine im Wein: Einfluss von Alkohol auf die Protein-Liganden Bindung	124
Abkürzungsverzeichnis	126
Publikationsliste.....	127
Konferenzbeiträge	127
Literaturverzeichnis	129

Abstract

For a comprehensive understanding of the interactions between ligands and proteins, detailed knowledge of all thermodynamic parameters describing the complexation reaction is necessary. These parameters should be able to explain the underlying molecular forces responsible for complex formation. Binding studies are typically conducted under ambient pressure conditions. However, pressure-dependent studies performed in conjunction with temperature variations can provide additional information to uncover enthalpic and entropic contributions to ligand binding. In particular, pressure-dependent investigations of the volumetric properties of the reaction can be beneficial. Changes in the partial molar volume can provide insights into alterations in the structure and hydration during ligand binding. This work encompasses extensive binding studies on ligand-protein interactions under various extreme conditions.

Firstly, the binding of 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid (ANS) to bovine serum albumin (BSA) was examined at different temperatures and high pressures in the presence of Mars-like salts. It was found that magnesium perchlorate strongly influenced interaction between ANS and BSA, while magnesium chloride and sulfate had minimal effects. Both decreasing temperature and increasing pressure favored the ligand binding process and resulted in a negative change in the protein-ligand binding volume.

Next, the effect of trimethylamine-N-oxide (TMAO) and glycine betaine (GB), two osmolytes, was investigated on the binding of proflavin to bovine serum albumin (BSA) and human albumin serum (HSA) was investigated. Pressure-dependent fluorescence spectroscopy, circular dichroism spectroscopy, and computer modeling were used to analyze the effects of the osmolytes on ligand binding. It was demonstrated that TMAO and GB can modulate the ligand binding process in a specific manner, depending on chemical composition of the protein binding pockets. The addition of osmolytes increased the binding constant under pressure, with TMAO exhibiting the strongest effect.

Subsequently, the impact of selected salts (MgCl_2 , MgSO_4 , and $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$) and high hydrostatic pressures was examined on the complex formation between ThT and tRNA was examined. It was observed that magnesium salts reduced the binding constant of ThT, with the interaction with salt anions playing a crucial role. Nevertheless, binding was still observed at millimolar concentrations, which is largely driven by entropy. Interestingly, pressure favored ligand binding regardless of the type of salt.

Finally, the binding of ellagic acid (EA), a tannin, to various proteins, including BSA, the

salivary proteins IB7-14, and IB9-37, was investigated. Spectroscopic and calorimetric techniques were employed to analyze the binding process under different conditions, including the presence of ethanol. The binding strength of EA to the proteins varied, with the longer salivary protein IB9-37 exhibiting the strongest binding. The presence of ethanol led to an increased binding constant in most proteins, likely due to improved polyphenol solubility. Volumetric analyses revealed different binding volumes for BSA and the salivary proteins, while the thermodynamics of complex formation was controlled both by enthalpic and entropic contributions.

These studies provide comprehensive knowledge about the thermodynamic properties and molecular forces that affect the ligand-protein interactions studied. They offer valuable insights into the role of temperature, pressure, ions, and osmolytes in these interactions, contributing to a broader understanding of biochemical processes, particularly regarding the adaptability of organisms to extreme environmental conditions.

Kurzzusammenfassung

Für ein fundiertes Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Liganden und Proteinen sind detaillierte Kenntnisse über alle thermodynamischen Parameter, die die Komplexbildungsreaktion beschreiben, notwendig. Diese Parameter sollten die zugrunde liegenden molekularen Kräfte, die für die Bildung des Komplexes verantwortlich sind, erklären können. In der Regel werden Bindungsstudien unter Umgebungsdruckbedingungen durchgeführt. Jedoch können druckabhängige Studien, die zusätzlich zu Temperaturvariationen durchgeführt werden, um enthalpische und entropische Beiträge zur Ligandenbindung aufzudecken, ergänzende Informationen liefern. Insbesondere können druckabhängige Untersuchungen volumetrische Eigenschaften der Reaktion bestimmen. Das partielle molare Volumen kann Aufschluss über Veränderungen der Struktur und Hydratation während der Ligandenbindung liefern. Diese Arbeit umfasst umfangreiche Bindungsstudien zu Ligand-Protein-Interaktionen unter verschiedenen extremen Bedingungen.

Zunächst wurde die Bindung von 8-Anilino-naphthalen-1-sulfonsäure (ANS) an bovines Serumalbumin (BSA) bei verschiedenen Temperaturen und hohen Drücken in Anwesenheit von Magnesiumsalzen untersucht. Es wurde festgestellt, dass Magnesiumperchlorat die Interaktion zwischen ANS und BSA stark beeinflusst, während Magnesiumchlorid und -sulfat nur geringe Auswirkungen haben. Sowohl eine Abnahme der Temperatur als auch eine Erhöhung des Drucks begünstigten den Ligandenbindungsprozess und führten zu einer Verringerung des Protein-Ligand-Bindungsvolumens.

Sodann wurde die Wirkung von Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) und Glycinbetain (GB), auch zwei Osmolyte, auf die Bindung von Proflavin an Bovines Serumalbumin (BSA) und Human serum albumin (HSA) untersucht. Druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie, zirkuläre Dichroismus-Spektroskopie und Computermodellierung wurden verwendet, um die Effekte der Osmolyten auf die Ligandenbindung zu analysieren. Es wurde gezeigt, dass TMAO und GB den Ligandenbindungsprozess, abhängig von den Triebkräften und der chemischen Zusammensetzung der Bindungstaschen der Proteine, auf spezifische Weise modulieren können. Die Zugabe der Osmolyte erhöhte die Bindungskonstante bei Druckerhöhung, wobei TMAO die stärkste Wirkung zeigte.

Anschließend wurden die Auswirkungen ausgewählter Salze (MgCl_2 , MgSO_4 und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$) und hoher hydrostatischer Drücke auf die Komplexbildung zwischen

Thioflavin T (ThT) und tRNA untersucht. Es zeigte sich, dass Magnesiumsalze die Bindungskonstante verringern, wobei die Wechselwirkung mit den Salzanionen eine wesentliche Rolle spielt. Trotzdem wurde bei millimolaren Konzentrationen immer noch eine Bindung beobachtet, die thermodynamisch insbesondere von der Entropie getrieben war. Interessanterweise begünstigte der Druck die Ligandenbindung unabhängig von der Art des Salzes.

Schließlich wurde die Bindung von Ellagsäure (EA), einem Tannin, an verschiedene Proteine, darunter BSA und die Speichelproteine IB7-14 und IB9-37 untersucht. Spektroskopische und kalorimetrische Techniken wurden verwendet, um den Bindungsprozess unter verschiedenen Bedingungen, einschließlich der Anwesenheit von Ethanol, zu analysieren. Die Bindungsstärke von EA an die Proteine variierte, wobei das längere Speichelprotein IB9-37 die stärkste Bindung aufwies. Die Anwesenheit von Ethanol führte zu einer erhöhten Bindungskonstante bei den meisten Proteinen, wahrscheinlich aufgrund einer verbesserten Löslichkeit von Polyphenolen. Die Volumetrische Analyse zeigte unterschiedliche Bindungsvolumina für BSA und die Speichelproteine, während die Thermodynamik der Komplexbildung von verschiedenen Beiträgen von enthalpischen und entropischen Beiträgen geprägt war.

Diese Ergebnisse dieser Studien liefern neue Einsichten über die thermodynamischen Eigenschaften und die molekularen Kräfte, der hier untersuchten Ligand-Protein-Interaktionen. Sie liefern wichtige Erkenntnisse über die Rolle von Temperatur, Druck, Salzen und Osmolyten auf den Liganden-Bindungsprozess und sind insbesondere von Interesse in Bezug auf die Anpassungsfähigkeit von Organismen an extreme Umweltbedingungen.

1 Einleitung

1.1 Protein-Liganden Bindungen

Protein-Ligand-Wechselwirkungen sind für alle biochemischen Prozesse von grundlegender Bedeutung und unerlässlich für alle Lebensformen. Der Prozess der molekularen Erkennung (engl.: *molecular recognition*) wird durch folgende zwei Merkmale definiert.^[1] Zum einen die Spezifität, die den hochspezifischen Bindungspartner von weniger spezifischen Partnern unterscheidet und die Affinität, welche die Stärke der Bindung definiert.^[2] Von größter Bedeutung ist die Tatsache, dass die molekulare Erkennung kein Prozess an sich ist, sondern ein Element eines komplexeren, funktionell wichtigen Mechanismus, der die wesentlichen Elemente des Lebens –Selbstreplikation, Stoffwechsel und Informationsverarbeitung – umfasst. So wird beispielsweise die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Replikation vor der Zellteilung durch eine Reihe komplizierter enzymkatalysierter Reaktionen vollzogen, die auf der Erkennung und Bindung zwischen Helikase und DNA-Doppelhelix (verantwortlich für das Aufspalten der DNA), DNA-Polymerase und Einzelstrang-DNA (verantwortlich für das Einfügen von Basen und die DNA-Synthese) sowie Ligase und diskontinuierlichen DNA-Segmenten (verantwortlich für das Zusammenfügen dieser Segmente) beruhen. In ähnlicher Weise spielen die hocheffiziente und spezifische molekulare Erkennung und Bindung als Voraussetzung für enzymkatalysierte Reaktionen eine entscheidende Rolle bei der Steuerung und Regulierung eines metabolischen Netzwerks, das aus einer Vielzahl von parallel ablaufenden chemischen Reaktionen besteht.^[3]

Im Wesentlichen realisieren Proteine ihre biologischen Funktionen durch ihre direkte Interaktion mit anderen Molekülen, einschließlich Proteinen und Peptiden, Nukleinsäuren, Membranen, Substraten und Liganden kleiner Moleküle, wie Sauerstoff, Lösungsmittel und Metalle. Eine Voraussetzung für ein tieferes Verständnis der Proteinfunktionen ist eine detaillierte Erforschung der Mechanismen, die für die Protein-Ligand-Wechselwirkungen verantwortlich sind. Hierfür ist die vollständige Charakterisierung und Quantifizierung der Energetik, die die Bildung eines Komplexes bestimmt oder antreibt, von entscheidender Bedeutung.^[4]

1.2 Physikalisch-chemische Mechanismen der Protein-Ligand-Wechselwirkung

Um ein tieferes Verständnis der molekularen Erkennung zwischen einem Protein und seinem Liganden zu erlangen, ist es notwendig, die physikalisch-chemischen Mechanismen zu verstehen, die der Protein-Ligand-Wechselwirkung zugrunde liegen. In diesem Abschnitt werden die Bindungskinetik, die grundlegenden thermodynamischen Konzepte und Beziehungen, die für die Protein-Ligand-Bindung relevant sind sowie die treibenden Kräfte für die Ligandenbindung und die Enthalpie-Entropie-Kompensation erläutert.^[5]

Kinetik und Thermodynamik der Protein-Ligand-Bindung

Die Protein-Ligand-Bindungskinetik beschreibt den Prozess der Assoziation zwischen Protein und Ligand, wobei die Geschwindigkeit, mit der sich die beiden Partner aneinander binden, im Vordergrund steht. In einem einfachen Fall, in dem ein Proteinmolekül P und ein Ligand L mit gegenseitiger Affinität in einer Lösung gemischt werden, kann die zeitabhängige Assoziation zwischen ihnen wie folgt formuliert werden^[5]:



Hierbei steht PL für den Protein-Ligand-Komplex und k_{on} und k_{off} für die kinetischen Geschwindigkeitskonstanten, die die Hin- bzw. Rückreaktion (oder Dissoziation) beschreiben. Die Einheiten von k_{on} und k_{off} sind $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bzw. s^{-1} .

Im Gleichgewicht wird die Hinreaktion $P + L \rightarrow PL$ durch die Rückreaktion $PL \rightarrow P + L$ ausgeglichen, welches wie folgt beschrieben wird^[5]:

$$k_{\text{on}}[P][L] = k_{\text{off}}[PL] \quad (2)$$

Die Bindungskonstante K_b mit der Einheit M^{-1} wird durch folgende Gleichung definiert:

$$K_b = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d} \quad (3)$$

wobei K_d (in der Einheit M) als Dissoziationskonstante bezeichnet wird. Zur Erklärung der Protein-Ligand-Bindungsmodelle existieren drei grundlegende Modelle: das „Schlüssel-Schloss-Modell“ (engl. *Lock-and-Key*), die „*induced fit*“ und die „*conformational selection*“.^[5]

Protein-Ligand-Bindungsmodelle

Voraussetzung für das Schlüssel-Schloss-Modell ist, dass sowohl das Protein als auch der Ligand starr sind und ihre Bindungsstellen perfekt aufeinander passen. Das hat zur Folge, dass nur der Ligand (Schlüssel) mit der richtigen Größe in die Bindungstasche (das entsprechende Schloss) des Proteins eindringen kann (Abbildung 1.1).^[5,6]

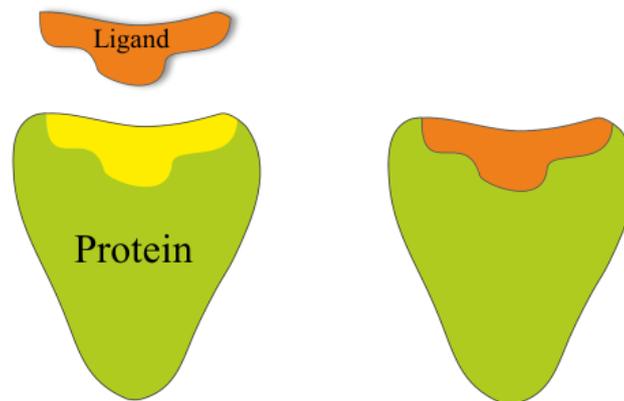


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Schlüssel-Schloss-Prinzips in biochemischen Prozessen.^[5]

Das Schloss-Schlüssel-Modell liefert jedoch keinen experimentellen Beweis dafür, dass ein Protein seinen Liganden bindet, wenn die ursprünglichen Formen nicht genau übereinstimmen.^[5,6]

Bezüglich dieser Problematik kann das Modell der induzierten Anpassung herangezogen werden. Es wird angenommen, dass die Bindungsstelle im Protein eine gewisse Flexibilität aufweist und dass der Ligand, der mit ihr interagiert, eine Konformationsänderung an der Bindungsstelle auslöst (Abbildung 1.2).^[5,6]

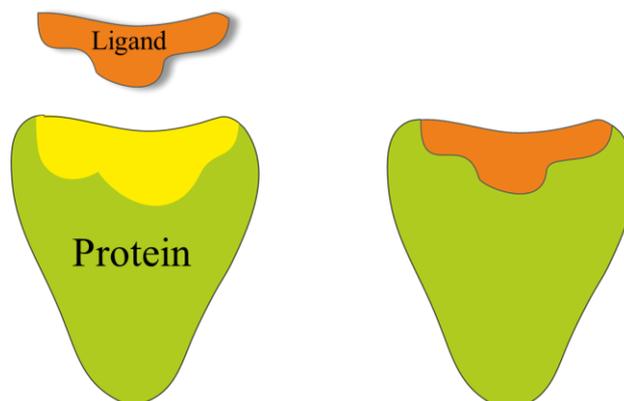


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des „induced-fit“-Modells in biochemischen Prozessen.^[5]

Da der Mechanismus der induzierten Anpassung nur die Konformationsflexibilität der Ligandenbindungsstelle berücksichtigt, scheint dieses Modell nur für Proteine geeignet zu sein, die eine geringe Konformationsänderung nach der Ligandenbindung durchlaufen. Diese Erkenntnis warf bereits vor 61 Jahren die Frage nach dem Mechanismus der Konformationsänderung auf.^[5] Die zwei bekanntesten Modelle, das *Lock-and-Key*- und auch das *Induced-Fit*-Modell, behandeln das Protein als eine einzige, stabile Konformation unter bestimmten experimentellen Bedingungen. Die meisten Proteine sind jedoch von Natur aus dynamisch und das Modell der *conformational selection* berücksichtigt diese inhärente Flexibilität (Abbildung 1.3).^[5,7]

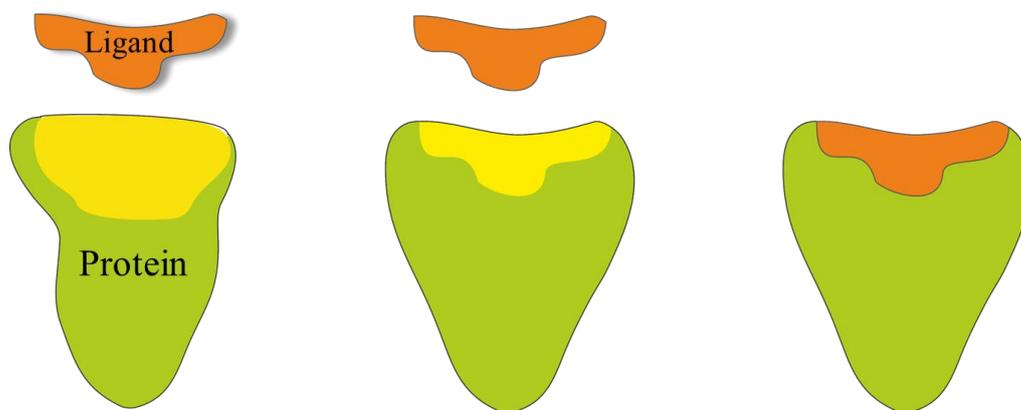


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des „conformational selection“-Modells in biochemischen Prozessen.^[5]

Das Modell der *conformational selection* leitet sich aus der Theorie der freien Energielandschaft (FEL) der Proteinstruktur und -dynamik ab. Es postuliert, dass der native Zustand eines Proteins nicht als eine einzige, starre Konformation existiert, sondern vielmehr als ein großes Ensemble von Konformationszuständen, die im Gleichgewicht mit unterschiedlichen Populationsverteilungen koexistieren (sog. *conformational substates*). Der Ligand bindet selektiv an den am besten geeigneten Konformationszustand, wodurch sich das Gleichgewicht letztendlich in Richtung dieses Zustands verschiebt.^[5,7]

1.3 Einsatz von hohem hydrostatischem Druck zur Erforschung von Liganden-Bindungen

Im Allgemeinen werden Bindungsstudien bei Atmosphärendruck durchgeführt. Neben der Verwendung von Temperaturvariationen zur Ermittlung der enthalpischen und entropischen Beiträge zur Ligandenbindung (z. B. mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie), können auch ergänzende druckabhängige Studien von Vorteil sein. Die Anwendung von Druck ermöglicht die Modulation von intra- und intermolekularen Wechselwirkungen und ist eine wichtige physikochemische Sonde zur Erforschung der freien Energie und der Konformationslandschaft von Proteinen.^[8–12] Letzteres ist von besonderem Interesse, da unterschiedliche Konformationszustände des Proteins sich in ihrer Reaktivität unterscheiden können.^[8,9,13] Im Allgemeinen begünstigt der Druck Zustände mit kleinerem Partialvolumen. So verschiebt sich das Gleichgewicht infolge einer Druckerhöhung, nach dem Prinzip von Le Châtelier in Richtung des Zustands, der das kleinstmögliche Gesamtvolumen einnimmt.^[8,10] Diese Verringerung des Volumens V kann auf eine engere Packung der Moleküle oder auf eine chemische Reaktion zurückzuführen sein. Daher wird ein Prozess, der mit einem positiven ΔV einhergeht, durch Druck gestört, während umgekehrt ein Prozess, der durch Druck verstärkt wird, mit einem negativen ΔV einhergeht. Darüber hinaus sind Experimente entlang der Druckachse von erheblichem biologischem Interesse.

Die tiefen Ozeane der Erde sind Heimat einer Vielzahl von Organismen, die kontinuierlich hohem hydrostatischem Druck (HHP) ausgesetzt sind. In den tiefsten Ozeanrampen und im Bereich des Meeresbodens erreicht dieser Druck Werte von über 1000 bar (100 MPa)^[14,15] Ferner gilt der Ozean als Geburtsort der Evolution und beherbergt weitreichende unbekannte Geheimnisse unserer Entstehung. Daher ist das Wissen über die Auswirkungen hohen hydrostatischen Drucks auf biologische Systeme von immenser Bedeutung für unser Verständnis vom Leben und für die Erkenntnisse der physikalischen Grenzen unseres Daseins. Die molekularen Auswirkungen von Druck auf Bindungsgleichgewichte sind jedoch noch weitgehend unbekannt und die Literatur weist bislang erhebliche Lücken über Druckeffekte auf Liganden-Bindungen auf.^[16–21]

Die Bildung eines Protein-Liganden-Komplexes verläuft im Allgemeinen über drei Stufen: (i) die Bildung (schwacher) chemischer Bindungen zwischen Protein und Ligand, (ii) die schließlich mit Änderungen der Hydratation der interagierenden Spezies einhergeht und (iii) Konformationsänderungen des Proteins, z. B. durch einen „Induced-fit“-Mechanismus. Bei

größeren Liganden können auch Konformationsänderungen des Liganden auftreten. Durch die Dehydratisierung werden mehr dichtgepackte Wassermoleküle (typischerweise 3-10 %, abhängig von der Art der lokalen Wasser-Protein-Wechselwirkung) um die wechselwirkenden Partner herum an die Umgebung abgegeben, was zu einer entropisch induzierten Gesamtvergrößerung des Systemvolumens führt.^[12] Ähnlich wie die Dichte ist auch die Kompressibilität von wasserlöslichen Proteinen geringer (etwa 20 %) als die von Wasser.^[16,17]

Nach der Ligandenbindung kann es durch induzierte Anpassung zu einer dichteren Packung der Atome des Proteinmoleküls kommen, was zu einer Verringerung der Volumenschwankungen des Proteins (im aktiven Zentrum und wahrscheinlich auch in den vom aktiven Zentrum entfernten Regionen) und damit zu einer Verringerung des partiellen molaren Volumens und der Kompressibilität des Proteins führt. Dies könnte eine Zunahme des Volumens und der Kompressibilität bei der Dehydratisierung der Reaktionspartner kompensieren. Dabei ist zu beachten, dass das intrinsische Volumen, V_{intr} , und die Kompressibilität, β_{intr} , des Proteins mit den mittleren quadratischen Fluktuationen des intrinsischen Volumens des Proteins durch folgende Gleichung (4) zusammenhängen:^[22]

$$\langle \delta V_{\text{intr}}^2 \rangle = k_{\beta} V_{\text{intr}} \beta_{\text{intr}} \quad (4)$$

Eine solche Verringerung der Volumenfluktuation bei der Ligandenbindung würde sich auch in einer Verringerung der durch Röntgenkristallographie ermittelten Temperatur-B-Faktoren der mit dem Liganden wechselwirkenden Reste widerspiegeln. Ungünstige Anpassungen von Liganden an das Protein könnten jedoch zu einer Vergrößerung des Porenvolumens und damit zu einer Erhöhung des partiellen Molvolumens des Systems führen. Die Kenntnis der Volumenänderung bei einem Ligandenbindungsprozess kann auch wertvolle Informationen über die Art der zugrunde liegenden Wechselwirkungen liefern. Dazu muss eine bestimmte Art von Wechselwirkung vorherrschen. Außerdem ist dies nur möglich, wenn keine Konformationsänderungen im Protein auftreten, was experimentell mit Hilfe spektroskopischer Instrumente (z. B. *nuclear magnetic resonance* (NMR)- oder Fluoreszenzspektroskopie) überprüft werden kann.

In einer Reihe von Fällen wurde festgestellt, dass die Volumenänderung bei der Bindung von kleinen Molekülen an Proteine negativ ist.^[16] Andererseits könnte ein positiver Wert auf Dehydratisierung oder Ladungsneutralisierung (aufgrund von Elektrostriktion ist Wasser um geladene Reste dichter gepackt) und Dehydratisierung in der aktiven Stelle oder auf eine

Konformationsänderung der aktiven Stelle des Proteins zurückzuführen sein. Es wurde vorgeschlagen, dass „arzneimittelwirksame“ Bindungsstellen oft auch durch „unglücklich“ hochenergetische Hydratationsstellen gekennzeichnet sind, die die Komplexbildung durch Entropiegewinn durch Wasserabgabe begünstigen.^[22] Eine beobachtete negative Volumenänderung ist beispielsweise auf die Wechselwirkung eines aromatischen Liganden mit einer aromatischen Gruppe des Proteins zurückzuführen, wodurch eine dichte Assoziation aromatischer Moleküle entsteht. Druckstabilisierte Bindungen sind häufig durch weiche Bindungsstellen gekennzeichnet, d. h. Stellen, an denen die Rotation um Proteintrückgratbindungen eine Verkleinerung der Bindungsstelle unter Druck ermöglicht, wie z. B. durch Stapelung der Ringe in einem Flaviny-Tryptophan-Peptid. Starre Bindungsstellen verkleinern sich unter Druck nicht und die Bindung kann zur Entstehung von Hohlräumen führen. In diesem Fall destabilisiert der Druck die Bindung, wie bei der Bindung einiger Liganden an Cyclodextrine.^[16]

In einigen wenigen Fällen gelang es Chalikian et al., die verschiedenen volumetrischen Beiträge zur Gesamtvolumenänderung bei Ligandenbindung unter Umgebungsdruck quantitativ zu berechnen.^[22-24] Zu diesem Zweck wurde eine Kombination aus hochpräzisen Dichtemessungen, Ultraschallgeschwindigkeitsmessungen (zur Bestimmung der adiabatischen Kompressibilität), Spektroskopie (zur Bestimmung der Konzentrationen der Reaktanden) und Strukturdaten aus der Röntgenkristallographie und Computersimulationen (zur Berechnung der für Lösungsmittel zugänglichen Oberflächen) verwendet.^[22,23] Beispielsweise führt die Bindung von Tri-N-Acetylglucosamin an Lysozym zu einer Freisetzung von etwa 80 Wassermolekülen, einer Verringerung des intrinsischen Volumens um 2 % und einer Verringerung der intrinsischen Kompressibilität des Proteins um 4 % nach der Ligandenbindung, d. h. die Ligandenbindung führt zu einer Versteifung des Enzyms und zu einer Verringerung seiner Dynamik im Vergleich zum ungebundenen Zustand. Die damit einhergehende Abnahme der Konfigurationsentropie des Proteins und des Liganden führt zu einem insgesamt enthalpiegetriebenen Bindungsprozess.^[22]

Während es zahlreiche Studien über die Wirkung von Druck auf die Entfaltung von Proteinen und das p,T -Stabilitätsdiagramm von Proteinen gibt, liegen nur wenige Arbeiten über die Wirkung von Druck auf die Ligandenbindung und Daten über Volumenänderungen aufgrund der Ligandenbindung vor.^[16-21,25]

Petrauskas, Matulis und Mitarbeiter verwendeten die Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit Untersuchungen der Druckentfaltung von Proteinen, um die

Bindungskonstante K_b und das Bindungsvolumen ΔV_b° zu ermitteln. Die Standard-Gibbs-Energie der Entfaltung eines Proteins, $\Delta G_u^\circ(p)$, als Funktion des Drucks, p , bei konstanter Temperatur, T , in Bezug auf einen Referenzzustand (Index 0; z. B. 1 bar), $\Delta G_{u,0}^\circ$, ist gegeben durch Gleichung (5).

$$\Delta G_u^\circ(p) = \Delta G_{u,0}^\circ(p) + \Delta V_u^\circ(p - p_0) + \frac{\Delta \beta_u^\circ}{2}(p - p_0)^2 \quad (5)$$

ΔG_0° , ΔV_b° und $\Delta \beta_b^\circ$ bezeichnen Änderungen der thermodynamischen Parameter bei der Proteinentfaltung - Gibbs-Energie, Volumen bzw. Kompressibilitätsfaktor (Standardzustand (hochgestelltes °): 1 mol/L, Aktivitätskoeffizient = 1). $\Delta G_0^\circ = -RT \ln K_u(p)$ bezieht sich auf die Gleichgewichtskonstante der Entfaltung, $K_u(p) = f_u/f_f$ (f = Anteil der entfalteten (u) /gefalteten (f) Zustände). Die Zugabe eines Liganden zur Proteinlösung führt in der Regel zu einem Anstieg des Entfaltungsdrucks (und der Entfaltungstemperatur), was bedeutet, dass ein höherer hydrostatischer Druck erforderlich ist, um den Entfaltungspunkt des Proteins nach Zugabe eines stabilisierenden Liganden zu erreichen. Zur Bestimmung des Protein-Liganden-Bindungsvolumens muss eine Reihe von druckinduzierten Proteinentfaltungsexperimenten bei verschiedenen Konzentrationen des zugesetzten Liganden durchgeführt werden.^[26]

Aus der Abhängigkeit der Gesamtkonzentration des Liganden für die Druck-induzierte Entfaltung, dem ΔV_u° -Wert in Abwesenheit des Liganden und der Gleichgewichtskonstante für Entfaltung und Bindung im Referenzzustand kann dann das Bindungsvolumen ΔV_b° bestimmt werden.^[19,21] Eine Voraussetzung und damit eine Einschränkung der Methode sind die Anforderungen an einen Entfaltungsprozess nach dem Zweizustandsmodell, was nur selten der Fall ist. Darüber hinaus ist das Modell nur für 1:1-Bindungsstöchiometrien gültig.

Alternativ kann die druckabhängige Bindungskonstante, $K_b(p)$, direkt an geeignete Bindungsmodelle angepasst werden, welches die in dieser Arbeit angewandte Vorgehensweise ist. Aus der Druckabhängigkeit der Standard-Gibbs-Energie resultiert die Gleichung (6) :

$$\left(\frac{\delta \ln K_b}{\delta p} \right)_T = - \frac{\Delta V_b^\circ}{RT} \quad (6)$$

und damit das Bindungsvolumen, ΔV_b° , welches aus spektroskopischen Messungen der Druckabhängigkeit von K_b gewonnen werden kann. Das Bindungsvolumen ist die Differenz zwischen den partiellen Molvolumina des Protein-Ligand-Komplexes (PL) und des unkomplexierten Zustands (P + L). Die Auswirkung von Kosolventien auf Bindungsgleichgewichte in Verbindung mit einer Druckapplikation ist noch weitgehend *terra incognita*.^[26]

2 Experimentelle Methoden

2.1 Chemikalien und Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Proteine aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und Proteine.

Bezeichnung	CAS- Nummer	Bezugsquelle
8-Anilino-1-naphthalin- sulfonsäure	82-76-8	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Albumin aus Humanserum	70024-90-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Betain	107-43-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Bovine serum albumin	9048-46-8	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Ellagsäure	476-66-4	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	64-17-5	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
IB9-37		GenScript (Piscataway, USA)
IB7-14		GenScript (Piscataway, USA)
Mg(ClO₄)₂	10034-81-8	Alfa Aeser (Ward Hill, USA)
MgCl₂	7786-30-3	Merck KGaA (Darmstadt)
MgSO₄	10034-99-8	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Proflavin	952-23-8	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Tris	1185-53-1	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Thioflavin	2390-54-7	Sigma Aldrich (Taufkirchen)

2.2 Steady-state Fluoreszenzspektroskopie

2.2.1 Thermodynamische Grundlagen für quantitative spektroskopische Titrationsen^[27]

Zur Untersuchung einer Bindungsisotherme bei Untersuchungen von Ligand-Makromolekül-Wechselwirkungen können zwei Arten von Titrationsen durchgeführt werden. In einem Fall wird das Makromolekül mit einem Liganden titriert und als „normale“ Titration bezeichnet, da der mittlere Gesamtbindungsgrad $\sum v_i$ (durchschnittliche Anzahl der gebundenen Ligandenmoleküle im Verhältnis zur Gesamtzahl der Bindungsstellen des Makromoleküls, L_B/M_T) mit fortschreitender Titration zunimmt^[28]. Es ist zu beachten, dass das Symbol $\sum v_i$ anstelle von v verwendet wird, um den durchschnittlichen Gesamtbindungsgrad zu beschreiben, da im allgemeinen Fall eines Systems mit mehreren Ligandenbindungen die gebundenen Ligandenmoleküle auf „i“ mögliche verschiedene Bindungszustände verteilt sein können, die alle zum durchschnittlichen Gesamtbindungsgrad $\sum v_i$ beitragen.

Im zweiten Fall wird der Ligand mit dem Makromolekül titriert. Diese Art der Titration wird als „reverse“ Titration bezeichnet, da der Bindungsgrad während der Titration abnimmt^[29]. Im Allgemeinen hängt die Art der durchgeführten Titration davon ab, ob das zu überwachende Signal vom Makromolekül, welches meist der Fall ist oder vom Liganden stammt. Grundsätzlich besteht die erste Aufgabe bei der Untersuchung der Ligand-Makromolekül-Wechselwirkungen darin, eine spektroskopische Titrationskurve, d. h. eine Änderung des überwachten Signals in Abhängigkeit von der Titrantkonzentration, in eine thermodynamisch wohldefinierte, modellunabhängige Bindungsisotherme umzuwandeln, die dann mit Hilfe eines geeigneten Bindungsmodells analysiert werden kann, um die Bindungsparameter zu extrahieren.

Die thermodynamische Grundlage dieser Methoden liegt darin, dass der mittlere Gesamtbindungsgrad $\sum v_i$ des Liganden an ein Makromolekül, einschließlich aller unterschiedlichen Verteilungen der gebundenen Liganden in den verschiedenen möglichen Zuständen "i", eine einzige Funktion der Konzentration des freien Liganden L_F im Gleichgewicht ist. Daher ist der Durchschnittswert von $\sum v_i$ bei einer gegebenen Konzentration des freien Liganden gleich, unabhängig von der Konzentration des Makromoleküls M_0 . Die eindeutigen Werte von L_F und $\sum v_i$ und die entsprechenden Gesamtliganden- (L_0) und Gesamtmakromolekülkonzentrationen (M_0) müssen die

Massenerhaltungsgleichung erfüllen:

$$L_T = \left(\sum v_i \right) M_0 + L_0 \quad (7)$$

Wenn also der Satz an Konzentrationen (L_T, M_T) gefunden werden kann, für den $\sum v_i$ und L_F konstant sind, dann können $\sum v_i$ und L_F aus der Steigung bzw. dem Achsenabschnitt eines Diagramms von L_T gegen M_T auf der Grundlage von Gleichung 7 bestimmt werden.

2.2.2 Bindungsmodelle

2.2.2.1 Äquivalente und unabhängige Bindungsstellen^[20]

In der folgenden Betrachtung bezeichnet S das Substrat z. B. ein Protein, dessen Konzentration während der Titration mit dem Liganden L konstant gehalten wird. Falls der Wechselwirkungsprozess durch ein Modell mit äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellen beschrieben werden kann, d. h. es gibt n äquivalente und unabhängige Stellen auf dem Substrat S , an die L gebunden werden kann, kann die Reaktion, bei der n Liganden L an ein Molekül S gebunden werden, wie folgt beschrieben werden:



Für dieses Modell kann eine mikroskopische Bindungskonstante, K_b , definiert werden, die die Bindungskonstante pro Stelle darstellt (d. h. K_b drückt das Gleichgewicht aus, das gemessen wurde, wenn nur ein Ligand gebunden werden kann),:^[30]

$$K_b = \frac{[SL_1 \dots L_n]}{[S][L_1] \dots [L_n]} \quad (9)$$

Dabei stellt $[SL_1 \dots L_n]$ die Konzentration des Komplexes dar, der durch die Besetzung der einzelnen Stellen auf dem Substrat gebildet wird, $[S]$ ist die Konzentration des freien Substrats und $[L_1] \dots [L_n]$ ist das Produkt der Konzentrationen der freien Liganden. In jedem Schritt der Titration kann K_b , sobald das Gleichgewicht erreicht ist, gemäß dem Gesetz der Massenerhaltung wie folgt beschrieben werden:

$$K_b = \frac{[x]}{([S_0] - [x])([L_0] - n[x])} \quad (10)$$

wobei $[S_0]$ und $[L_0]$ die Gesamtkonzentrationen des Substrats bzw. des Liganden bezeichnen, $[x]$ die unbekannte Konzentration des gebildeten Komplexes ($[SL_1 \dots L_n]$) ist und n die Anzahl der pro Mol S gebundenen Mole von L angibt.

Der folgende quadratische Ausdruck ergibt sich nach Umformung der Gleichung:

$$ax^2 - bx + c = 0 \quad (11)$$

$$\text{mit } a = nK_b; b = (1 + n[S_0]K_b + [L_0]K_b); c = [S_0][L_0]K_b$$

Die Lösung von Gl. 3 ermöglicht die Berechnung der Konzentration des bei jedem Schritt der Titration gebildeten Komplexes ($[SL_1 \dots L_n]$):

$$x = -\frac{\sqrt{b^2 - 4ac} - b}{2a} \quad (12)$$

Der Bindungsgrad, auch als fraktionelle Sättigung θ bezeichnet und den Anteil des gebundenen Substrats beschreibt, ist gegeben durch:

$$\theta = \frac{[SL_1 \dots L_n]}{[S_0]} \quad (13)$$

der von 0 (kein Ligand ist Substrat gebunden) bis 1 (alle Plätze des Substrats sind vom Liganden besetzt) reicht.

Aus den Gleichungen 11 und 12, wobei $x = [SL_1 \dots L_n]$ ist, ergibt sich die letzte Gleichung, die den Ligandenbindungsprozess beschreibt:

$$\theta = \frac{1}{[S_0]} \left(-\frac{\sqrt{b^2 - 4ac} - b}{2a} \right) \quad (14)$$

Die Sättigung ist direkt mit den Veränderungen einer gemessenen physikalischen Größe, ΔY , verbunden durch:^[31]

$$\theta = \frac{\Delta Y}{(\Delta Y)_{\text{total}}} \quad (15)$$

Dabei kann ΔY die Änderung einer beliebigen physikalischen Messgröße sein, z. B. der UV/Vis-Absorption oder der Fluoreszenzintensität. Es ist wichtig zu beachten, dass

Gleichung 7 nur gültig ist, wenn die Änderung von Y linear mit dem Ausmaß der Bindung, d. h. der Bildung des Komplexes, ist. Hier wird davon ausgegangen, dass nur das Substrat S zu einer Änderung der beobachtbaren Größe Y führt, wenn L der Lösung zugesetzt wird. Unter dieser Annahme ist $\Delta Y = Y - Y_0$ und $(Y)_{total} = Y_{sat} - Y_0$, wobei Y der Wert der physikalischen Messgröße bei jedem Schritt der Titration darstellt, Y_0 der Wert in Abwesenheit von L und Y_{sat} der Wert von Y am Ende der Titration ist, wenn S vollständig mit L gesättigt ist. Durch Kombination der Gleichungen 13 und 14 erhält man die endgültige Bindungsisotherme unter der Annahme, dass n Liganden L unabhängig voneinander an S binden können und dass alle Stellen äquivalent sind, d. h. durch dieselbe Bindungskonstante beschrieben werden können:

$$\frac{\Delta Y}{(\Delta Y)_{total}} = \frac{1}{[S_0]} \left(-\frac{\sqrt{b^2 - 4ac} - b}{2a} \right) \quad (16)$$

Zur Anwendung von Gleichung 15 muss der Sättigungsgrad erreicht werden. In der Regel wird das Experiment durch Aufzeichnung der Veränderung von Y des Substrats nach aufeinanderfolgender Zugabe des Liganden durchgeführt, wobei die Bindungsisotherme einer Hyperbel ähnelt. Zu Beginn der Titration, wenn $[S_0] > [L_0]$ ist, wird eine lineare Veränderung von Y beobachtet. Dann, wenn die Konzentrationen vergleichbar sind, sind die Veränderungen von Y weniger ausgeprägt und die Linearität geht verloren. Wenn $[S_0] < [L_0]$ ist, wird schließlich ein Plateau erreicht. In diesem Bereich führen aufeinanderfolgende Zugaben des Liganden zu keiner Änderung von Y mehr, was bedeutet, dass die Sättigung erreicht ist. Manchmal ist es nicht möglich, die Sättigung zu erreichen, und folglich kann θ nicht direkt berechnet werden. Dies könnte im Falle einer schwachen Bindung der Fall sein. In diesem Fall ist $(\Delta Y)_{total}$ ebenfalls ein Anpassungsparameter.^[20]

2.2.3 Zwei Klassen von nicht-äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellen

Die Bindungsgleichung 8 kann leicht erweitert werden, wenn zwei Klassen von Bindungsstellenvorhanden sind. In diesem Modell gibt es n_1 und n_2 Stellen der ersten bzw. zweiten Klasse. Jede Klasse wird durch eine mikroskopische Bindungskonstante, K_{b1} bzw. K_{b2} , beschrieben. Da in diesem Modell davon ausgegangen wird, dass die beiden Klassen von Bindungsstellen völlig unabhängig sind, d. h. die Bindung eines Liganden der ersten Klasse keinen Einfluss auf die Bindung eines Liganden der zweiten Klasse hat und

umgekehrt, lautet das Endergebnis für die Anzahl der Gesamtstellen^[31]:

$$\frac{\Delta Y}{(\Delta Y)_{\text{total}}} = \frac{\left\{ \frac{1}{[S_0]} \left[\left(-\frac{\sqrt{b^2 - 4ac} - b}{2a} \right) + \left(-\frac{\sqrt{g^2 - 4fh} - g}{2f} \right) \right] \right\}}{(n_1 + n_2)} \quad (17)$$

mit:

$$a = n_1 K_{b1}; \quad b = (1 + n_1 [S_0] K_{b1} + [L_0] K_{b1}); \quad c = [S_0] [L_0] K_{b1};$$

$$f = n_2 K_{b2}; \quad g = (1 + n_2 [S_0] K_{b2} + [L_0] K_{b2}); \quad h = [S_0] [L_0] K_{b2};$$

Wenn die Sättigung nicht erreicht werden kann, ist $(\Delta Y)_{\text{total}}$ ein zusätzlicher Anpassungsparameter. Die obigen Gleichungen (Gl. 15, 16) können leicht in handelsübliche Software, wie Microsoft Excel® oder Origin von OriginLab®, implementiert werden.^[20]

3 Osmolyte in der Tiefsee: Ihre Wirkung auf die Protein-Liganden-Bindung unter hohem Druck^{†‡}

Im Laufe der Evolution haben sich Extremophile Strategien angeeignet, um mit Umweltstressfaktoren wie extremen Temperaturen, Austrocknung, hohem osmotischem oder hohem hydrostatischem Druck fertig zu werden. Eine Strategie zur Bewältigung von Umweltstressfaktoren ist die verstärkte Synthese von Osmolyten, die Biomoleküle stabilisieren. Trimethylamin-N-oxid (TMAO) z. B. wird von Tiefseeorganismen bei hohem hydrostatischem Druck produziert und kann in Konzentrationen von mehreren hundert mM in der Zelle vorliegen. Es wurde festgestellt, dass TMAO ein sehr wirksames Kosolvens ist, das Proteine stabilisiert, indem es die schädlichen Auswirkungen von Temperatur und Druck ausgleicht.^[33,34,35] Eine Vermutung besteht darin, dass TMAO eine indirekte Wirkung auf Biomoleküle wie Proteine hat, indem es starke Wechselwirkungen mit Wasser eingeht, sodass das Protein von Wassermolekülen umgeben ist.^[33,34] Kelly et al. haben eine Korrelation zwischen dem TMAO-Gehalt in den Zellen mariner Lebensformen und der zunehmenden Tiefe des Meeres festgestellt. Da der hydrostatische Druck der einzige Umweltparameter ist, der linear mit der Tiefe des Ozeans ansteigt, zeigten Studien, dass TMAO den destabilisierenden Wirkungen des hydrostatischen Drucks entgegenwirken kann. So erwiesen die Studien eine Proportionalität zwischen dem TMAO-Gehalt in den Lebewesen und dem hydrostatischen Druck, dem sie ausgesetzt sind.^[32,36] Dadurch werden die biomolekularen Prozesse, vermutlich einschließlich der Ligandenbindungsreaktionen, in der Art angepasst, dass die damit verbundenen Volumen-änderungen gering bleiben, um effizient zu funktionieren.^[32]

[†] Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in der folgenden Referenz publiziert:

A.Kamali, N. Jahmide-Azizi, R. Oliva, R. Winter, Phys. Chem. Chem. Phys. 2022, 24, 17966.^[32]

[‡] Die Fluoreszenz- und CD-Experimente und Analysen wurden von Armin Kamali und Nisrine Jahmide-Azizi durchgeführt. Die Computermodellierungsstudien wurden von Dr. Rosario Oliva erstellt.

3.1 Experimentelles

3.1.1 Probenpräparation

Für alle Proben wurde ein Tris-HCl-Puffer verwendet, der durch Zugabe von HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und mit einem Spritzenfilter, mit einer Trenngrenze von 0,45 μm , filtriert wurde. Die Stammlösungen der Proteine BSA und HSA wurden durch Auflösen des lyophilisierten Pulvers in Tris-HCl-Puffer bereitgestellt. Durch Messung der Absorption bei 280 nm mit einem UV-1800-Spektrometer der Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan) und unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von 43 600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für BSA und 35 700 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für HSA^[20,37] wurden die genauen Konzentrationen der Proteine bestimmt. Die Stammlösung von Proflavin wurde ebenfalls durch Auflösen von Proflavin in einem Tris-HCl-Puffer hergestellt. Anschließend wurde die Konzentration durch Verdünnen einer kleinen Menge der Stammlösung und Messen der Absorption bei 444 nm unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von 33 400 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bestimmt.^[26] Alle Proben wurden durch Verdünnen von BSA, HSA und Proflavin in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, in Abwesenheit und Anwesenheit von 0,5 M Betain oder TMAO hergestellt.^[32]

3.1.2 Steady-state Fluoreszenzspektroskopie

Die Wechselwirkung zwischen Proflavin und den Proteinen wurde mittels *Steady-state* Fluoreszenzspektroskopie bei Raumtemperatur (25°C) mit einem K2-Fluorometer von ISS (Champaign, IL, USA) verfolgt. Zur Bestimmung der Bindungsisothermen wurde die Fluoreszenzintensität von Proflavin bei Anregung der Probenlösungen bei 448 nm und Aufzeichnung der Emissionsintensität bei 504 nm gemessen. Die gemessenen Proben wiesen eine konstante Proflavinkonzentration von 5 μM auf und unterschieden sich in ihrer Proteinkonzentration. Die Proteinkonzentration variierte zwischen 0 und 400 μM . Dieselben Experimente wurden in Kombination mit 0,5 M TMAO oder 0,5 M Betain durchgeführt. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten (K_b) wurde ein Diagramm von F/F_0 ((wobei F und F_0 die Fluoreszenzintensitäten des Liganden L (in diesem Fall Proflavin) in Gegenwart bzw. Abwesenheit der Proteine darstellen)) als Funktion der Konzentration des freien Proteins ($[P]$) verwendet.^[32,38]

Anschließend wurden die experimentellen Daten nach einem 1: 1-Bindungsmodell gefittet:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1 + \varphi K_b [P]}{1 + K_b [P]} \quad (18)$$

In dieser Gleichung ist φ das Verhältnis zwischen den Quantenausbeuten von komplexiertem und unkomplexiertem Liganden, d. h. $\varphi = \varphi_{\text{Ligand-Protein}}/\varphi_{\text{Ligand}}$. Dieser Parameter wird nach dem Anpassungsverfahren ermittelt. Ist $\varphi > 1$, weist die Bindungsisotherme eine positive Krümmung auf, was bedeutet, dass die Intensität der fluoreszenzaktiven Spezies nach der Bindung zunimmt. Umgekehrt ist die Krümmung negativ, wenn $\varphi < 1$ ist und die Intensität bei der Komplexbildung abnimmt. K_b ist die Bindungskonstante der Komplexbildung zwischen Proflavin und dem Protein, definiert als $K_b = [L - P]/([L][P])$, wobei $[L - P]$, $[L]$ und $[P]$ die Konzentrationen des gebildeten Komplexes, des freien Liganden bzw. des freien Proteins sind. Da die Konzentration des freien Proteins ein unbekannter Parameter ist, lässt sich aus der Massenbilanz ein Ausdruck ableiten, der die Gesamtproteinkonzentration ($[P]_T$) mit der Konzentration des freien Proteins, der Bindungskonstante und der Gesamtligandenkonzentration ($[L]_T$) verbindet:

$$[P]_T = [P] \frac{K_b [P] [L]_T}{1 + K_b [P]} \quad (19)$$

Löst man diese Gleichung (8) für $[P]$, wird der endgültige Ausdruck erhalten, der die freie Proteinkonzentration mit der Gesamtproteinkonzentration verknüpft:

$$[P] = \frac{(1 + [L]_T K_b - [P]_T K_b) + \sqrt{(1 + [L]_T K_b - [P]_T K_b)^2 + 4 K_b [P]_T}}{2 K_b} \quad (20)$$

Um die Bindungsisotherme zu erhalten, muss Gleichung (20) in Gleichung (18) eingesetzt werden. Die Bindungskonstante K_b konnte bestimmt werden, indem die experimentellen Daten F/F_0 gegen $[P]_T$ aufgetragen und mit den oben genannten Gleichungen bis zur Konvergenz angepasst wurden. Die Datenanalyse wurde mit der Software Origin 2021b (OriginLab, Northampton, MA, USA) durchgeführt.^[32]

Für die Durchführung der Messungen unter hohem hydrostatischem Druck wurde ein Hochdruckzellensystem von ISS in Kombination mit zylindrischen Quarzküvetten verwendet. Der Druck wurde mit einer Handpumpe der Nova Werke AG, Illnau-Effretikon,

Schweiz, mit Wasser als Druckmedium und einem Druckbereich von 1 bis 2000 bar geregelt. Die Messungen erfolgten innerhalb dieses Druckbereichs. Die vorbereiteten Proben wurden in die Küvetten gefüllt, mit DuraSeal™-Laborstretchfolie versiegelt und anschließend in die Hochdruckzelle eingesetzt. Die Hochdruckzelle (Abbildung 3.1) wurde dann mit Wasser gefüllt und über ein Kapillarrohr an die Handpumpe angeschlossen. Eine Kunststoffolie ermöglichte die Übertragung des Drucks auf die Probe und verhinderte, dass dieser in die mit Wasser gefüllte Hochdruckzelle entweicht.

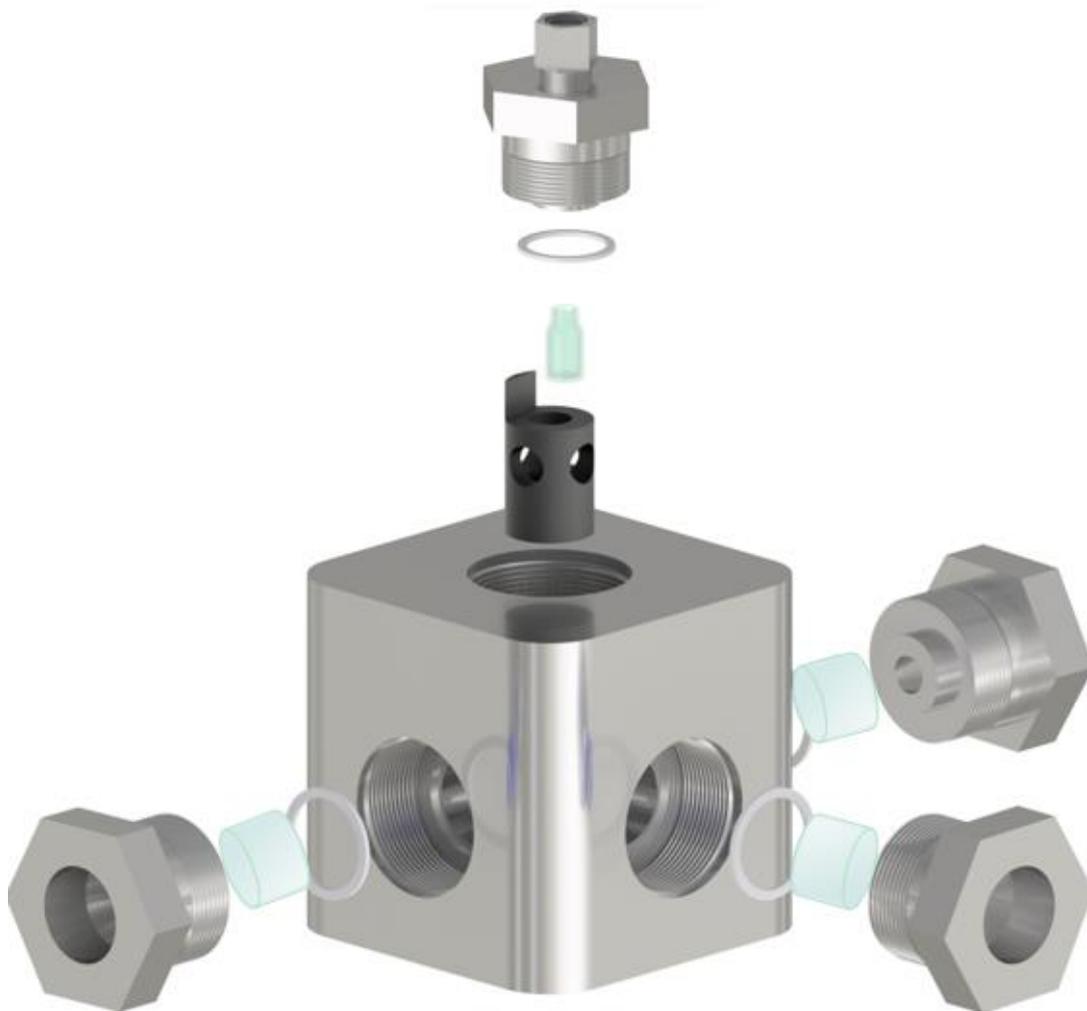


Abbildung 3.1: Darstellung der verwendeten Fluoreszenz-Hochdruckzelle.^[33]

Zur Überprüfung der Fähigkeit der zugesetzten Osmolyte, Proflavin zu binden und somit die Ligandenaktivität zu beeinflussen, wurden Emissionsspektren von proteinfreien Proben aufgenommen. Dabei wurden die Spektren im Wellenlängenbereich von 465 bis 650 nm erfasst, wobei eine Anregungswellenlänge von 448 nm verwendet wurde. Die Wellenlänge des Maximums wurde durch Auswertung des Massenschwerpunkts (CM , in nm) bestimmt,

der wie in Gleichung 21 definiert ist, wobei F_i die Fluoreszenzintensität bei der Wellenlänge λ_i ist.^[32]

$$CM = \frac{\sum_i F_i \lambda_i}{\sum_i F_i} \quad (21)$$

3.1.3 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Um die Auswirkungen der Proflavinbindung und der in Lösung befindlichen Osmolyte auf die Sekundärstruktur der Proteine zu untersuchen, wurden Experimente zur Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie im Fern-UV-Bereich (190-260 nm) durchgeführt. Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-715 Spektropolarimeter (Jasco Corporation, Tokio, Japan) und Quarzküvetten mit einer Weglänge von 0,1 cm aufgenommen. Es wurden CD-Spektren von 12 μM Protein und 120 μM Proflavinlösung erfasst. Die CD-Spektren in Anwesenheit von Osmolyten wurden bei einer TMAO- und Betain-Konzentration von 0,1 M aufgezeichnet. Die Geräteparameter wurden wie folgt eingestellt: eine Scanrate von 50 nm min^{-1} , eine Antwortzeit von 2 s und eine Bandbreite von 4 nm. Der Hintergrundleerwert (reiner Puffer oder Osmolyt-haltiger Puffer) wurde für jede Probe subtrahiert. Die aufgezeichneten Spektren sind das Ergebnis dreier aufeinanderfolgender Akkumulationen und wurden auf ein Mol an Aminosäuren normiert.

3.1.4 Identifizierung von Bindungsstellen

Die mögliche Bindungsstelle für Proflavin an BSA und HSA wurde mit Hilfe der Software CavityPlus identifiziert, die unter <https://www.pkumdl.cn:8000/cavityplus/index.php> verfügbar ist. Ausführliche Informationen zu dieser Software finden sich auch in der angegebenen Referenz.^[38] Zur Identifizierung der Bindungsstelle wurden die Proteinstrukturen mit den folgenden PDB-Codes verwendet: 3V03 für BSA (2,70 Å Auflösung) und 1BM0 für HSA (2,50 Å Auflösung). Die Proteinstrukturen mit den ermittelten Bindungsstellen wurden mit der Software VMD (Visual Molecular Dynamics) visualisiert.^[40]

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Einfluss von Osmolyten auf die Protein-Proflavin-Bindung durch Fluoreszenzspektroskopie bei Atmosphärendruck[§]

Um den Einfluss der Kosolventien TMAO und GB (Abbildung 3.2) auf die Komplexbildung zwischen dem kleinen aromatischen Liganden Proflavin und den Serumproteinen BSA und HSA bei Umgebungsbedingungen ($T = 25\text{ °C}$ und $p = 1\text{ bar}$) zu bewerten, wurden Fluoreszenztitrationsexperimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Lösungen mit einer festen Proflavinkonzentration hergestellt, während die Konzentration der Proteine variiert wurde.^[40–42]

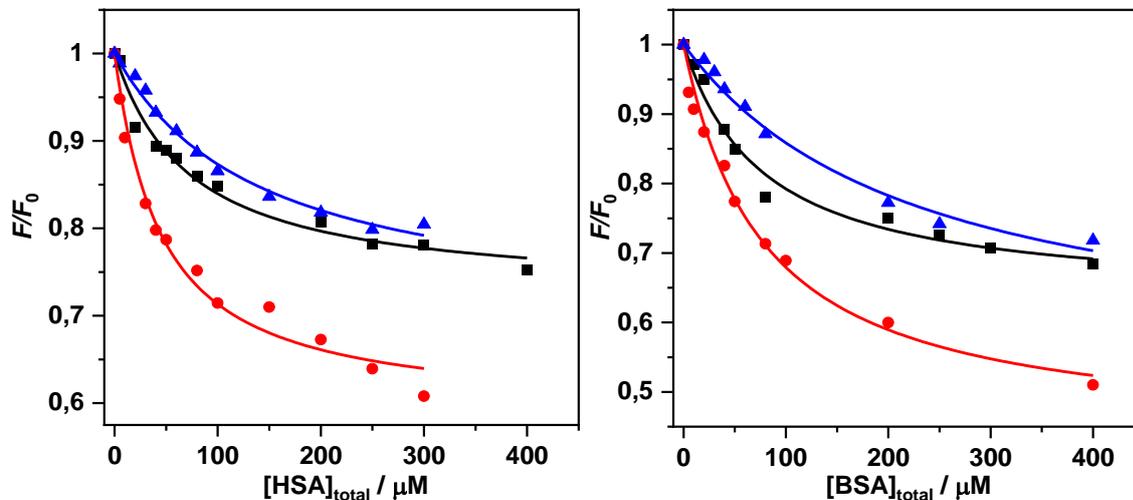
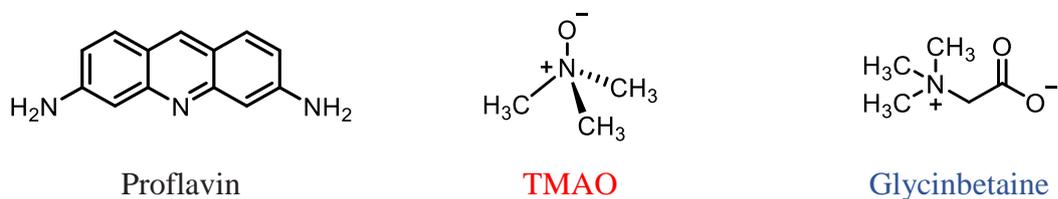


Abbildung 3.2: Durch Fluoreszenzspektroskopie ermittelte Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen Proflavin, HSA (links) und BSA (rechts) bei den folgenden Lösungsbedingungen: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 (schwarze Quadrate); 20 mM Tris-HCl, 0,5 M TMAO, pH 7,4 (rote Kreise); 20 mM Tris-HCl, 0,5 M GB, pH 7,4 (blaue Dreiecke). Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung der experimentellen Daten nach einem 1: 1-Bindungsmodell dar. Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von 25 °C und einem Druck von 1 bar durchgeführt.

[§] Die Fluoreszenz- und CD-Experimente und Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Armin Kamali durchgeführt.

Die Komplexbildung zwischen Proflavin und BSA in reinem Puffer bei Umgebungstemperatur und Druck ist durch eine Bindungskonstante von $K_b = (1,6 \pm 0,2) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ gekennzeichnet, die sehr gut mit der Literatur übereinstimmt.^[42]

Die jeweiligen Werte der Bindungskonstanten sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Bindungskonstanten, K_b , für die Proflavinkomplexbildung mit BSA und HSA in Abwesenheit und in Gegenwart von TMAO und Betain, ermittelt bei $T = 25 \text{ °C}$ und $p = 1 \text{ bar}$. Die Experimente wurden mindestens in dreifacher Ausführung durchgeführt.^[32]

Proflavin–BSA		Proflavin–HSA	
Lösungsmittelbedingungen	$K_b/\text{M}^{-1} \cdot 10^4$	Lösungsmittelbedingungen	$K_b/\text{M}^{-1} \cdot 10^4$
Tris–HCl buffer	1.6 ± 0.2	Tris–HCl buffer	1.4 ± 0.2
+0.5 M TMAO	1.5 ± 0.4	+0.5 M TMAO	2.1 ± 0.3
+0.5 M GB	0.45 ± 0.07	+0.5 M GB	1.2 ± 0.4

Die Zugabe des Kosolvents TMAO zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungsstärke von Proflavin an BSA. Der erhaltene K_b -Wert ist im Rahmen der experimentellen Genauigkeit identisch mit dem in reinem Puffer gemessenen Wert. Erstaunlicherweise hat jedoch die Zugabe der gleichen Konzentration an GB eine starke Auswirkung auf die Komplexbildung und reduziert den K_b -Wert um etwa eine Größenordnung. Das bedeutet, dass die Anwesenheit von GB die Affinität von Proflavin für BSA deutlich verringert. Für das Protein HSA zeigt sich eine ähnliche Bindungskonstante wie für BSA in reinem Puffer, was mit früheren Berichten übereinstimmt.^[43] Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die für BSA erzielt wurden, ist die Wirkung der beiden Kosolventien bei HSA unterschiedlich. In Gegenwart von TMAO wurde ein signifikanter Anstieg von K_b beobachtet. Dagegen hatte die Zugabe von GB keine signifikante Auswirkung auf die Bindungseigenschaften von Proflavin an HSA. Bemerkenswert ist, dass die Grenzwerte von F/F_0 (bei der höchsten Proteinkonzentration) in Gegenwart der beiden Osmolyte anders sind als bei den reinen Pufferbedingungen. Diese Beobachtung zeigt, dass die relative Veränderung der Fluoreszenzintensität von Proflavin durch die Lösungsmittelbedingungen beeinflusst wird.

3.2.2 Konformationsanalyse durch CD-Spektroskopie

Um einen möglichen Einfluss der Ligandenbindung und der Kosolventien auf die Struktur der Proteine aufzudecken, wurden Experimente zur Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) durchgeführt.^[44] Die CD-Spektren von BSA und HSA in Abwesenheit und in Gegenwart von Proflavin unter reinen Pufferbedingungen sind in Abbildung 3.3 aufgeführt. Das linke CD-Spektrum zeigt BSA in reinem Puffer, welches durch das Vorhandensein von zwei Minima gekennzeichnet ist, die bei etwa 208 nm bzw. 222 nm liegen. Darüber hinaus ist eine positive Bande bei 194 nm sichtbar, die mit den Literaturdaten übereinstimmt. Diese spektralen Eigenschaften deuten auf eine überwiegend α -helikale-Struktur des Proteins hin.^[20,32]

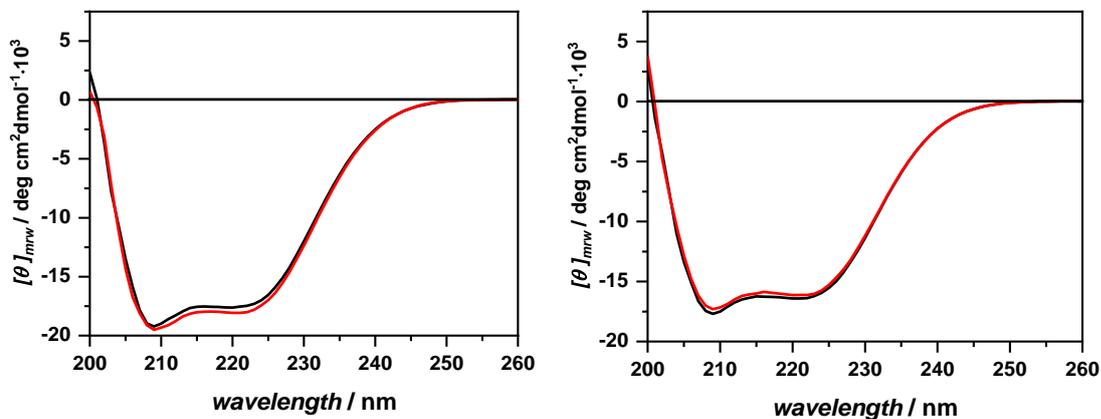


Abbildung 3.3: Zirkulardichroismus-Spektren (mean residue weight ellipticity, $[\theta]_{mrw}(\lambda)$) von BSA (links) und HSA (rechts) in Abwesenheit (schwarz) und in Anwesenheit (rot) des Liganden Proflavin unter reinen Pufferbedingungen. Die Konzentration der Proteine betrug 12 μ M, die Konzentration von Proflavin 120 μ M. Alle Experimente wurden in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, bei Umgebungstemperatur (25 °C) und Druck (1 bar) durchgeführt.^[32]

Die Intensitäten der beiden Minima weisen jedoch Unterschiede auf, was darauf hindeutet, dass das Protein nicht zu 100 % in einer vollständig gefalteten Helixstruktur vorliegt, sondern auch einige Bereiche mit Windungen und ungeordneten Strukturen aufweist.^[45] Nach Zugabe des Liganden wurden nur sehr geringe Änderungen im CD-Spektrum beobachtet, was darauf schließen lässt, dass die Bindung von Proflavin keine signifikanten Konformationsänderungen der Sekundärstruktur des Proteins hervorruft. Die rechten CD-Spektren in Abbildung 3.3 zeigen HSA in Abwesenheit und in Anwesenheit von Proflavin in 20 mM Tris-HCl-Puffer. Die Ähnlichkeit des CD-Spektrums von HSA mit dem von BSA deutet daraufhin, dass auch HSA im Wesentlichen eine α -helikale Faltung aufweist, was mit vorhandenen Literaturdaten übereinstimmt.^[20,46]

Wie im Falle von BSA ändert HSA seine Konformation nach der Bindung von Proflavin nicht, d. h. das Protein behält seine wichtigsten strukturellen Merkmalen bei.**

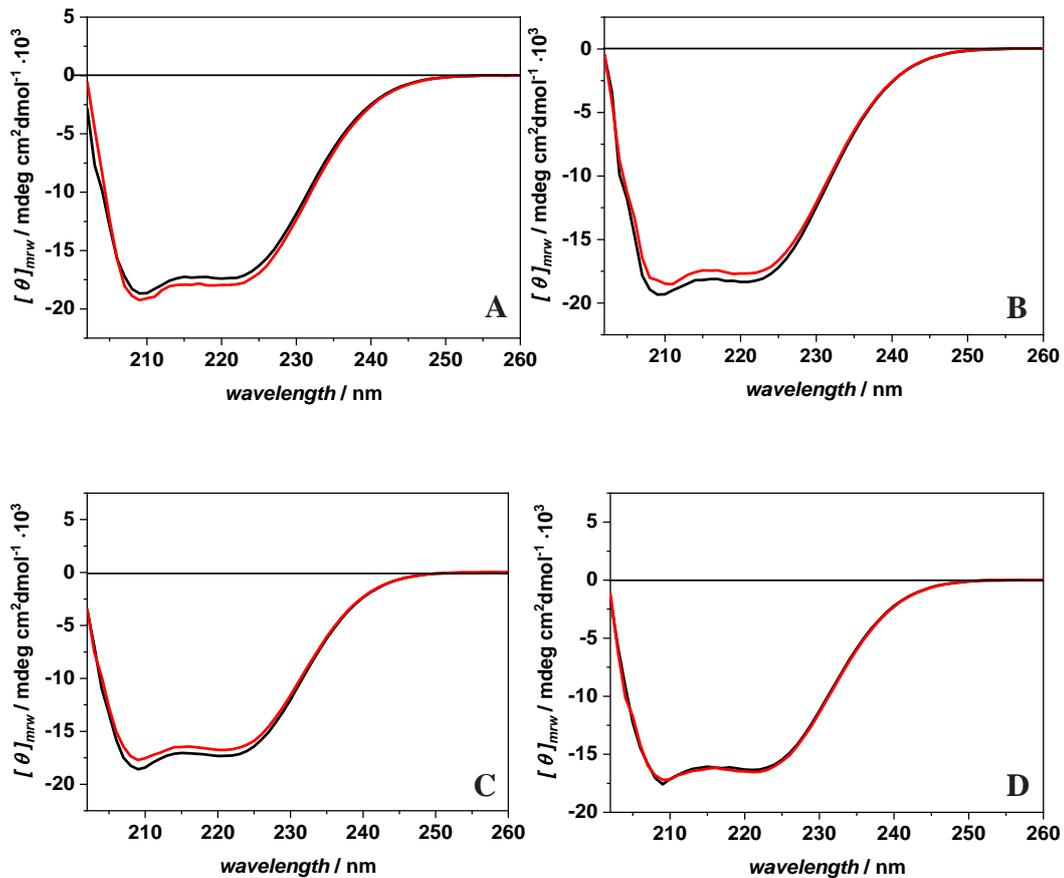


Abbildung 3.4: Zirkulardichroismus-Spektren von BSA in Puffer mit 0,1 M TMAO (A) und 0,1 M Betain (B). Die Felder C und D zeigen die Spektren von HSA in einem Puffer mit 0,1 M TMAO bzw. 0,1 M Betain. Die schwarzen und roten Linien zeigen die Spektren der Proteine in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit des Liganden Proflavin. Alle Experimente wurden in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt.

Abbildung 3.4 zeigt die CD-Spektren der Proteine in Gegenwart der beiden Kosolventien und von Proflavin. Es ist wichtig zu beachten, dass TMAO und GB ebenfalls Licht in dem untersuchten Wellenlängenbereich absorbieren. Obwohl ihre Extinktionskoeffizienten gering sind, war es nicht möglich, aussagekräftige CD-Spektren bei denselben relativ hohen Konzentrationen an Kosolventien aufzunehmen, die in der Studie verwendet wurden.^[47] Aus diesem Grund wurden die CD-Spektren bei einer Osmolytkonzentration von 0,1 M erfasst. Es wurden keine signifikanten Veränderungen in den spektralen Eigenschaften des BSA/HSA-Proflavin-Komplexes beobachtet, als TMAO oder GB hinzugefügt wurde, was

** Die Zirkulardichroismus-Messungen wurden von Armin Kamali durchgeführt, ausgewertet und von Dr. Rosario Oliva interpretiert. Die entsprechenden Daten wurden in der Referenz^[32] publiziert.

im Einklang mit den Erwartungen für diese beiden bekannten Osmolyte steht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Einflüsse auf die Bindungsstärke nicht auf eine signifikante Konformationsänderung der Proteine durch die Kosolventien zurückzuführen sind.

3.2.3 Druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie ††

Um eine mögliche Erklärung für die beobachteten Veränderungen der Bindungskonstanten in Gegenwart der beiden Kosolventien zu finden, wurden Fluoreszenzbindungsexperimente unter hohem hydrostatischem Druck (HHP) durchgeführt. Die HHP-Methode hat sich als leistungsfähiges Instrument zur Untersuchung der volumetrischen Eigenschaften biomolekularer Reaktionen, wie Ligandenbindung und enzymatische Reaktionen, erwiesen und liefert wertvolle Informationen über Veränderungen in der Packung und Hydratation der am Prozess beteiligten Moleküle.^[10,20,48] Als repräsentatives Beispiel zeigt Abbildung 3.5 die Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen Proflavin und den beiden Proteinen in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, im Druckbereich zwischen 1 und 2000 bar. Die entsprechenden Bindungskurven in Gegenwart der Osmolyte sind in Abbildung 8.1 hinterlegt.

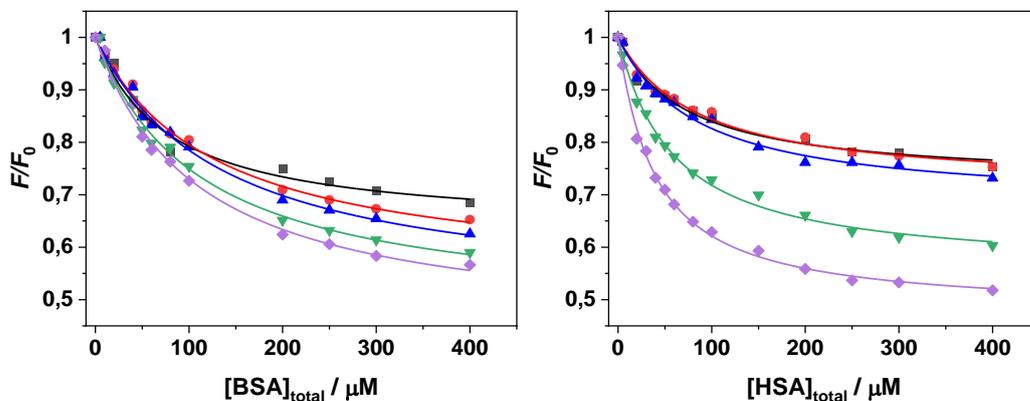


Abbildung 3.5: Mittels HHP-Fluoreszenzspektroskopie gemessene Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen Proflavin und (links) BSA und (rechts) HSA in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, bei den Drücken von 1 bar (schwarze Quadrate), 500 bar (rote Kreise), 1000 bar (blaue Dreiecke), 1500 bar (grüne umgekehrte Dreiecke) und 2000 bar (violette Rauten). Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung der experimentellen Daten gemäß einem 1:1-Bindungsmodell dar. Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt.^[32]

†† Die druckabhängigen Fluoreszenz-Messungen wurden von Armin Kamali und Nisrine Jahmidi durchgeführt, ausgewertet und mit Dr. Rosario Oliva interpretiert. Die entsprechenden Daten wurden in der Referenz^[32] publiziert.

Tabelle 3.2 zeigt die ermittelten Daten für die Druckabhängigkeit der Bindungskonstante unter verschiedenen Lösungsmittelbedingungen. Die Daten zeigen, dass die Wirkung von HHP auf die Komplexbildung zwischen BSA und Proflavin lösungsabhängig ist. Bei reinen Pufferbedingungen wurde zunächst eine anfängliche Abnahme der Bindungskonstante K_b beobachtet, während jenseits von 1500 bar ein signifikanter Anstieg von K_b zu beobachten war. Trotzdem erwies sich diese Bindungskonstante immer noch kleiner als unter Umgebungsdruck. Durch die Anwendung von Druck hatte jedoch die Präsenz von 0,5 M TMAO in der Lösung keine Auswirkung auf die Stärke der Komplexbildung. Hingegen war der K_b -Wert in Gegenwart von 0,5 M GB anfangs etwa um den Faktor drei kleiner und stieg mit dem Druck leicht an, was darauf hinweist, dass die Anwendung von Druck die Bildung des Komplexes begünstigte.

Tabelle 3.2: Bindungskonstanten (K_b) für die Proflavinkomplexbildung mit BSA und HSA in Abwesenheit und in Anwesenheit von TMAO und Betain bei $T = 25\text{ °C}$ und bei Drücken von 1, 500, 1000, 1500 und 2000 bar

	Tris-HCl buffer	+0.5 M TMAO	+0.5 M GB
<i>p</i>/bar	$K_b/M^{-1} \cdot 10^4$	$K_b/M^{-1} \cdot 10^4$	$K_b/M^{-1} \cdot 10^4$
BSA-Proflavine			
1	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.4	0.45 ± 0.07
500	0.66 ± 0.15	1.2 ± 0.5	0.52 ± 0.16
1000	0.67 ± 0.15	1.4 ± 0.4	0.50 ± 0.12
1500	0.84 ± 0.09	1.4 ± 0.2	0.73 ± 0.23
2000	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.76 ± 0.09
HSA-Proflavine			
1	1.4 ± 0.2	2.1 ± 0.3	1.2 ± 0.4
500	1.2 ± 0.1	2.2 ± 0.5	1.0 ± 0.4
1000	1.2 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.5 ± 0.4
1500	1.8 ± 0.1	2.0 ± 0.4	1.7 ± 0.4
2000	3.0 ± 0.2	2.6 ± 0.5	2.0 ± 0.3

Ein ähnliches Szenario wurde bei der Bindung von Proflavin an HSA in reiner Pufferlösung beobachtet: Die Bindungskonstante nahm zunächst mit dem Druck leicht ab und stieg jenseits von etwa 1500 bar drastisch an, wobei bei 2000 bar-Werte erreicht wurden, die etwa doppelt so hoch waren wie der Wert bei 1 bar. Im Gegensatz zur BSA-Komplexbildung, wurde die Komplexbildungsstärke im TMAO-haltigen Puffer nicht durch den Druck beeinflusst. Durch Zugabe von 0,5 M GB zum Puffer stieg die Bindungskonstante K_b von

$1,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ bei 1 bar auf $2,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ bei 2000 bar. Wie unter Atmosphärendruck hängen die Grenzwerte von F/F_0 vom Protein und von den in Lösung befindlichen Osmolyten ab.^[32] Die Messung der Druckabhängigkeit der Bindungskonstante ermöglicht die Bestimmung der Volumenänderung bei der Ligandenbindung. Die Steigung des Plots von $\ln(K_b)$ gegen p ergibt das Bindungsvolumen ΔV_b , das als partielle molare Volumendifferenz zwischen dem komplexierten Zustand und der Summe der Proflavin- und Proteinvolumina definiert ist, d. h. $\Delta V_b = V_{\text{Komplex}} - (V_{\text{Proflavin}} + V_{\text{Protein}})$. Nach dem Braun-Le Châtelier-Prinzip begünstigt die Druckerhöhung den Zustand, der das kleinstmögliche Volumen einnimmt.^[10] Wenn also $\Delta V_b > 0$ ist, nimmt der Komplex ein größeres Volumen ein als der nicht-komplexierte Zustand, und die Komplexbildung wird nicht begünstigt. $\Delta V_b < 0$ bedeutet hingegen, dass der Komplex ein kleineres Volumen einnimmt als der unkomplexe Zustand. In dem Fall begünstigt ein steigender Druck die Komplexbildung. Abbildung 3.6 stellt die Diagramme von $\ln(K_b)$ gegen p für die Komplexbildung zwischen Proflavin und BSA und HSA dar.

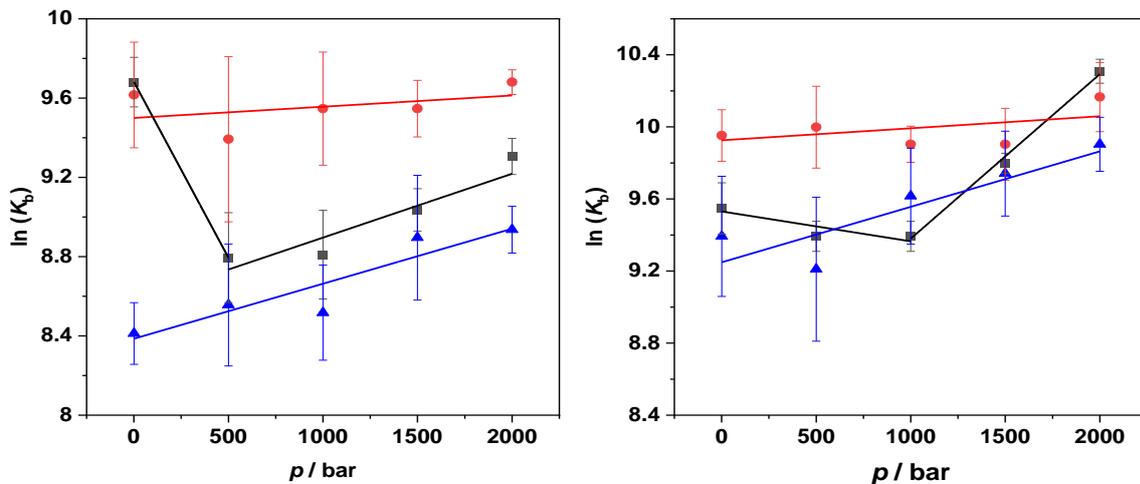


Abbildung 3.6: Druckabhängigkeit der Bindungskonstante, K_b , für die Komplexbildung zwischen dem Liganden Proflavin und (links) BSA und (rechts) HSA in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 (schwarze Quadrate) und in Puffer mit 0,5 M TMAO (rote Kreise) und 0,5 M GB (blaue Dreiecke) bei $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Aus der Steigung von $\ln(K_b)$ gegen p wurde das Bindungsvolumen, ΔV_b , ermittelt.

Die resultierenden Bindungsvolumina ΔV_b befinden sich in Tabelle 3.3. Unter reinen Pufferbedingungen waren die ΔV_b -Werte im Niederdruckbereich (unter etwa 1000 bar) positiv und bei höherem Druck negativ. Jedoch in Gegenwart von 0,5 M TMAO lag ΔV_b in beiden Fällen nahe bei Null, was auf eine vernachlässigbare Auswirkung des Drucks auf die Komplexbildung in Gegenwart dieses Kosolventien hinweist. Umgekehrt wurde bei Anwesenheit von 0,5 M GB in der Lösung für beide Proteine eine Volumenänderung ΔV_b

von etwa -7 mL mol^{-1} ermittelt. Dieser Wert, auch wenn er gering ist, zeigt, dass der Druck die Wechselwirkung des Liganden mit den Serumproteinen leicht begünstigt und dass der komplexierte Zustand ein etwas geringeres Volumen einnimmt als der nicht komplexierte Zustand. Es sei daran erinnert, dass die Volumenänderung nur ein Bruchteil des Volumens eines Wassermoleküls ist (das molare Volumen von Wasser beträgt $\sim 18 \text{ mL mol}^{-1}$).

Tabelle 3.3: Bindungsvolumina (ΔV_b) für die Proflavin-Komplexbildung mit BSA und HSA in Abwesenheit und in Anwesenheit von TMAO und Betain bei $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

$\Delta V_b/\text{mL mol}^{-1}$	Tris-HCl buffer	+0.5 M TMAO	+0.5 M GB
BSA-Proflavin	$43.9 \pm 11.4/-9.9 \pm 1.9^a$	-1.4 ± 1.7	-7.2 ± 1.9
HSA-Proflavin	$43.9 \pm 11.4/-9.9 \pm 1.9^a$	-1.4 ± 1.7	-7.2 ± 1.9

^{a,b}Der erste ΔV_b -Wert bezieht sich auf die Volumenänderung im Bereich von 1-500 bar. Der zweite ΔV_b -Wert bezieht sich auf die Volumenänderung im Bereich von 500-2000 bar.

Untersuchung der Liganden-Umgebung^{‡‡}

Um schließlich herauszufinden, ob die beiden Kosolventien einen Einfluss auf den Liganden Proflavin bei hohem Druck haben, wurden druckabhängige Fluoreszenz-Emissionsspektren von Proflavin in Abwesenheit und in Anwesenheit der Kosolventien aufgezeichnet. Es ist bekannt, dass die Position des Emissionsmaximums von der Polarität der Umgebung abhängt. Fluorophore, die sich in einer eher hydrophoben Umgebung befinden, zeigen ein blau verschobenes Maximum (niedrigere Wellenlängen) im Vergleich zu einer hydrophilen Umgebung. Zunächst wurde das Intensitätsmaximum des Proflavinspektrums bei reinen Pufferbedingungen und in Gegenwart von 0,5 M TMAO und GB bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1 bar verfolgt. Die Beobachtungen ergaben, dass das Maximum (bei einer Wellenlänge von 525 nm) in Anwesenheit beider Kosolventien unverändert blieb. Dies deutet darauf hin, dass keine unmittelbare Interaktion mit dem Liganden stattfand. Mit anderen Worten, die Aktivität des Liganden schien durch die Kosolventien nicht wesentlich beeinflusst worden zu sein. Abbildung 3.7 zeigt die Wellenlängenverschiebung $\Delta\lambda = \lambda_p - \lambda_{p0}$ für Proflavin bei reinen Pufferbedingungen (20 mM Tris-HCl, pH 7,4) und in Gegenwart von 0,5 M TMAO und 0,5 M GB als Funktion des Drucks. Dabei sind λ_p und λ_{p0} das Intensitätsmaximum der Spektren bei einem bestimmten Druck p bzw. bei 1 bar; ein positiver Wert

^{‡‡} Diese Fluoreszenz-Messungen wurden von Armin Kamali durchgeführt und von Dr. Rosario Oliva ausgewertet und interpretiert. Die entsprechenden Daten wurden in der Referenz^[32] publiziert.

von $\Delta\lambda$ bedeutet also eine Rotverschiebung, ein negativer Wert eine Blauverschiebung.

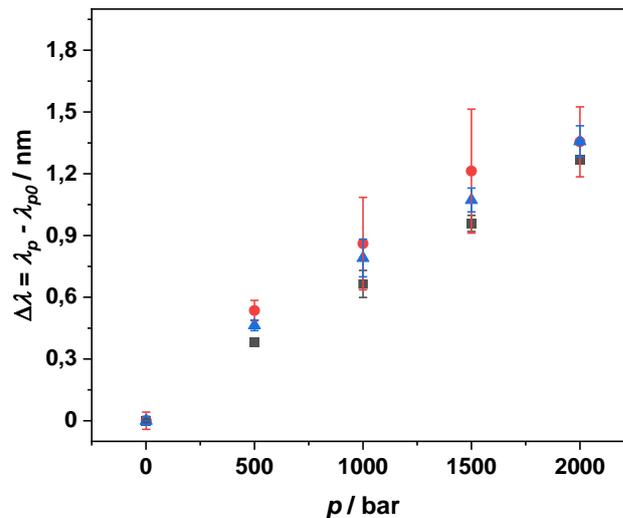


Abbildung 3.7: Druckabhängigkeit der Wellenlängenverschiebung $\Delta\lambda = \lambda_p - \lambda_{p0}$, Maximalwerts des Fluoreszenzspektrums von Proflavin bei reinen Pufferbedingungen (schwarze Quadrate) und in Gegenwart von 0,5 M TMAO (rote Kreise) und 0,5 M GB (blaue Dreiecke). Alle Experimente wurden bei 25 °C durchgeführt.

In reiner Pufferlösung zeigte sich ein linearer Anstieg des Emissionsmaximums, der typisch für eine Verstärkung der Wasser-Proflavin-Wechselwirkungen im angeregten Zustand ist. Ausgelöst durch die Anwendung von Druck kommt es zu einer Kompression der Wassermoleküle in der Hydratationsschale des Liganden. In Anwesenheit der beiden Kosolventien wurde eine ähnliche Druckverschiebung beobachtet. Dies deutet daraufhin, dass die Anwesenheit von TMAO und GB die Hydratationsschale unter allen Druckbedingungen nicht mit dem Liganden interagiert. Eine Interpretation im Sinne einer ausgeprägten thermodynamischen Abreicherung der Osmolyte von der Ligandengrenzfläche lässt sich mit diesen Daten jedoch nicht belegen. Mit anderen Worten: Die Aktivität des Liganden kann selbst bei der hier verwendeten hohen Konzentration als weitgehend unbeeinflusst angesehen werden, und dies gilt für den gesamten erfassten Druckbereich. Somit sind alle beobachteten Änderungen der Bindungskonstanten höchstwahrscheinlich auf Änderungen zurückzuführen, die ausschließlich in der Bindungstasche der Proteine auftreten.

3.2.4 3D-Darstellung der Proteinbindungstaschen^{§§}

Die genaue Position von Proflavin in der BSA- und HSA-Struktur ist noch nicht bekannt. Mögliche Bindungsstellen konnten vorläufig anhand der 3D-Strukturen der beiden Proteine in der Proteindatenbank und unter Verwendung der Software CavityPlus identifiziert werden.^[45,49] CavityPlus ermöglicht die zuverlässige Erkennung von Proteinbindungsstellen unter Verwendung von 3D-Strukturinformationen von Proteinen als Input. (Abbildung 3.8).^[38]

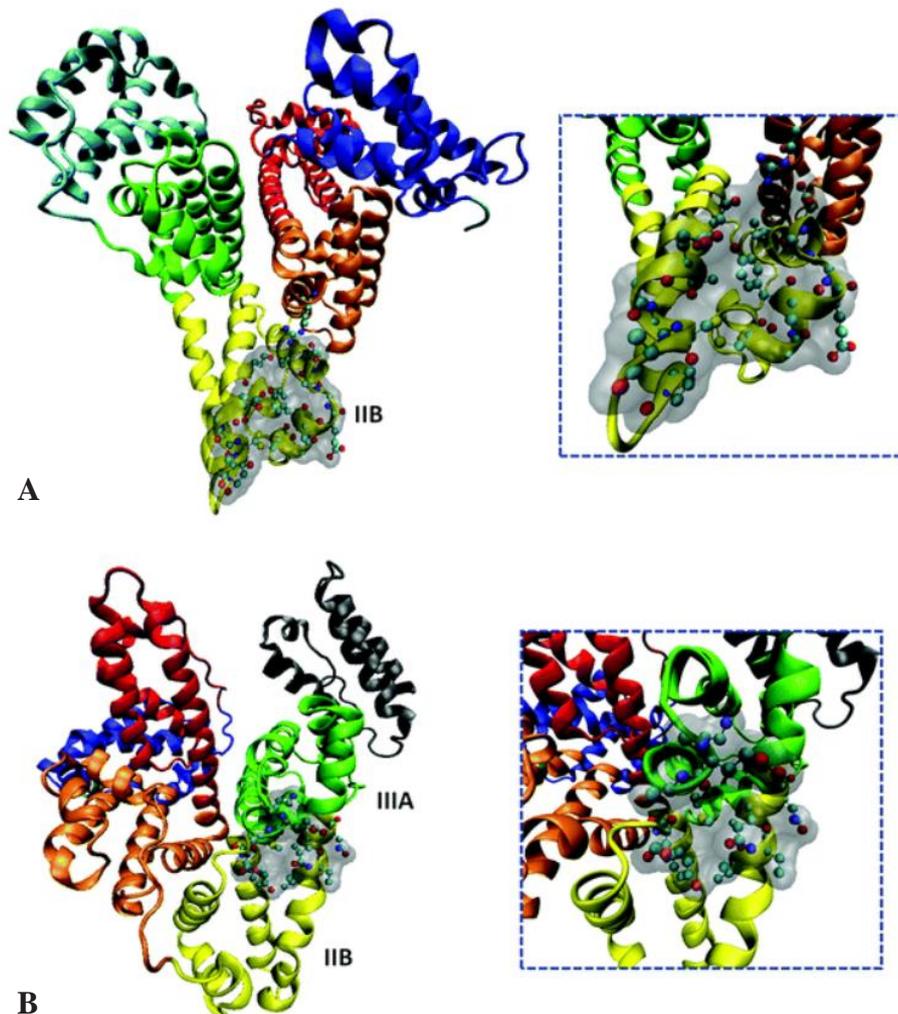


Abbildung 3.8: (A) Die Struktur des Proteins BSA (pdb-Code: 3V03) und (B) HSA (pdb-Code: 1BM0), dargestellt als Banddiagramme. Die identifizierten Bindungstaschen sind durch transparente hellgraue Flächen dargestellt. Die Einschübe zeigen Vergrößerungen der Bindungshohlräume, wobei die Reste, die den Hohlraum bilden, hervorgehoben sind (die Reste sind als Kugeln und Stäbchen dargestellt; die C-Atome sind in Cyan, die O-Atome in Rot, die N-Atome in Blau und die S-Atome in Gelb gefärbt). Die verschiedenen Subdomänen der Strukturen sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet: IA (blau), IB (rot), IIA (orange), IIB (gelb), IIIA (grün) und IIIB (grau).

^{§§} Die 3D-Darstellung der Bindungstaschen wurde von Dr. Rosario Oliva entworfen, ausgewertet und interpretiert. Die entsprechenden Daten wurden in der Referenz^[32] publiziert.

Im Falle von BSA wurde nur eine Bindungstasche für Proflavin gefunden, die sich in der Subdomäne IIB befindet, was mit den Literaturdaten übereinstimmt, die eine 1:1-Bindungsstöchiometrie für mehrere aromatische Liganden zeigen.^[50] Auch in der Studie von Chakraborty und Basu wurde nur eine einzige Bindungsstelle festgestellt.^[42] In ihrer Studie zeigten FRET-Experimente eine hohe Energieübertragungseffizienz zwischen den beiden Trp-Resten und Proflavin, was darauf hindeutet, dass die Bindungstasche nicht allzu weit von den aromatischen Resten entfernt ist. Die Inspektion der BSA-Struktur zeigt, dass ein Trp-Rest in der Subdomäne IIA lokalisiert ist (Abbildung 3.8, Tafel A), die sich in der Tat in der Nähe der identifizierten Bindungstasche befindet. Für das HSA-Protein wurde ebenfalls eine einzelne Bindungstasche identifiziert (Abbildung 3.8, Feld B). Diese Tasche befindet sich zwischen den Subdomänen IIB und IIIA. Diese Lage stimmt mit einer früheren Studie überein, in der mit Hilfe der FRET-Methode der Abstand zwischen dem einzelnen Trp-Rest (in der Subdomäne IIA) von HSA und Proflavin auf $\sim 2,7$ nm bestimmt wurde.^[43] Die in diesen Hohlräumen vorhandenen Aminosäuren (siehe Tabelle 8.1(im Anhang)) für die Liste der Aminosäurereste in den Bindungstaschen von BSA und HSA) offenbaren verschiedene Arten potenzieller Wechselwirkungen mit Proflavin, z. B. Wasserstoffbrückenbindungen mit seinen Stickstoffatomen, hydrophobe, π - π - sowie π -Kationen-Wechselwirkungen. Darüber hinaus können Hydratationsänderungen an der Ligandenbindung in den Taschen zu einem entropischen Beitrag zur freien Energie der Bindung führen. Obwohl das Ausmaß dieser Beiträge zum Ligandenbindungsprozess für die verschiedenen Stellen der beiden Proteine unterschiedlich sein kann, sind die gesamten freien Bindungsenergien und damit die Größenordnung der beobachteten Bindungskonstanten ähnlich.

3.3 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Bindungseigenschaften des Modellliganden Proflavin an zwei bekannte Serumproteinen, BSA (Rind) und HSA (Mensch) in Gegenwart von zwei prominenten Osmolyten, Trimethylamin-N-oxid (TMAO) und Glycinbetain (GB), untersucht. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung und Anpassung des Lebens in Tiefseeorganismen.^[41,51] Proteine können durch TMAO und GB stabilisiert werden, wobei TMAO als Kompensator identifiziert wurde für die destabilisierenden Auswirkungen von Harnstoff und hohem Druck auf Proteinstabilität und -funktion.^[34,41,52–54]

Außerdem wurden druckabhängige Messungen durchgeführt, um die komplexe Bildung im Zusammenhang mit der Hydratation und den durch die Anwesenheit der Kosolventien verursachten Packungsänderungen zu untersuchen. Darüber hinaus wurde die Druckabhängigkeit der Komplexbildung bestimmt, um einen Einblick in die Auswirkungen hydrostatischer Drücke auf Ligandenbindungsreaktionen in Tiefseeorganismen zu erhalten. Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass die Bindung von Proflavin an BSA und HSA unter reinen Pufferbedingungen, d. h. in Abwesenheit der beiden Osmolyte, durch sehr ähnliche Bindungskonstanten ($\sim 1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) und eine biphasische Druckabhängigkeit gekennzeichnet ist. Die Bindungskonstante K_b nahm zunächst mit dem Druck ab und stieg bei höherem Druck wieder an. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass der Druck in Anwesenheit der beiden kompatiblen Osmolyte immer eine stabilisierende oder sogar begünstigende Wirkung auf die Ligandenbindung hat. Bei Umgebungsbedingungen hatte der Zusatz von 0,5 M TMAO zu der Pufferlösung keine Auswirkungen auf die Komplexbildung zwischen dem Liganden und BSA. Im Gegensatz dazu wurde ein signifikanter Anstieg der Bindungskonstante bei der Wechselwirkung von Proflavin mit HSA beobachtet. Dieser Anstieg von K_b könnte auf eine Konformationsänderung der Bindungstasche durch TMAO zurückgeführt werden. Die berichteten CD-Daten zeigten jedoch, dass TMAO, ebenso wie GB, keine signifikanten Auswirkungen auf die Sekundärstruktur von HSA und BSA hatte, obwohl eine geringfügige lokale Konformationsänderung nicht ausgeschlossen werden kann. Ein weiterer Faktor, der zu dem beobachteten Ergebnis beitragen könnte, ist eine Veränderung der Aktivität des Liganden und/oder des Proteins durch das Kosolventien. Aufgrund der Fluoreszenzdaten kann eine Änderung der Ligandenaktivität (Koeffizient) höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden, da in Gegenwart der Osmolyte keine Änderungen der Emissionsspektren von

Proflavin beobachtet wurden (Abbildung 3.7).

Eine andere Möglichkeit wäre eine direkte Wechselwirkung von TMAO mit bestimmten Aminosäureresten im aktiven Zentrum des Proteins. In der Tat wurde berichtet, dass TMAO Wasserstoffbrücken mit dem Amid des Rückgrats und basischen Resten wie Lys bilden kann.^[54] Ein solcher Effekt müsste jedoch zu einer Verringerung der Bindungskonstante führen. TMAO mit seinem großen Dipolmoment von ~ 8 D kann starke Wechselwirkungen mit Wassermolekülen eingehen, indem es mit mindestens drei dieser Moleküle H-Bindungen bildet^[34,55], was zu einer ausgeprägten Verdrängung von TMAO an den Proteinoberflächen führt (solvophober Effekt). Mit anderen Worten, es würde zu einer bevorzugten Hydratisierung der Proteinoberfläche führen, die die Grundlage für die stabilisierende Wirkung von TMAO auf die Proteinstruktur ist. Wie kann diese einzigartige Eigenschaft von TMAO den Ligandenbindungsprozess beeinflussen?

Es wurde festgestellt, dass die Komplexbildung für BSA enthalpiegetrieben ist (-47 kJ mol^{-1}) und mit einer ungünstigen Entropieänderung von $-69 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ einhergeht,^[42] was auf einen Verlust an Konformationsentropie des Proteins zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu ist die Bindung von Proflavin an HSA entropiegetrieben. Die Entropieänderung bei der Bindung, ΔS_b , beträgt $510 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, und die Enthalpieänderung, ΔH_b , beträgt 127 kJ mol^{-1} ,^[43] d. h. die Bindung ist ein endothermer Prozess. Der große und positive Enthalpie-Wert ΔH_b ist höchstwahrscheinlich auf das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen während der Bindung zurückzuführen, möglicherweise einschließlich derjenigen von hydratisierenden Wassermolekülen. Der beobachtete Entropieanstieg kommt durch die Freisetzung des strukturierten Hydratationswassers, das die Bindungstasche umgibt, zustande.

Folglich ist es plausibel anzunehmen, dass die Zugabe von TMAO eine Abnahme der Hydratation der Bindungsstelle von HSA induziert, was zu dem beobachteten Anstieg der Bindungskonstante K_b führt. Ein solches Szenario wäre mit einer geringeren Enthalpieänderung für die Komplexbildung in Gegenwart von TMAO vereinbar. Aus diesem Grund wurde die Enthalpieänderung für einen solchen Prozess in Gegenwart von TMAO (Abbildung 8.2) ermittelt, indem der Wert von K_b bei drei verschiedenen Temperaturen ($5 \text{ }^\circ\text{C}$, $15 \text{ }^\circ\text{C}$ und $25 \text{ }^\circ\text{C}$) bestimmt und die van't-Hoff-Beziehung angewandt wurde.^[56]

Es ist wichtig anzumerken, dass der gleiche Ansatz verwendet wurde, um die Enthalpieänderung für die Komplexbildung zwischen BSA, HSA und Proflavin unter reinen

Pufferbedingungen zu bestimmen, wie oben berichtet.

Der Wert der erhaltenen Enthalpieänderung beträgt $12,9 \pm 8,0 \text{ kJ mol}^{-1}$, was etwa zehnmal niedriger ist als der Wert in reiner Pufferlösung. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass TMAO aufgrund seiner starken Hydratationsneigung in der Lage ist, den entropischen Beitrag zur Ligandenbindung effizient zu modulieren. Umgekehrt ist der TMAO-induzierte Wasserverlust in BSA weniger ausgeprägt, da der Bindungsprozess, wie die oben genannten thermodynamischen Parameter nahelegen, enthalpiegetrieben ist, was zu einer vernachlässigbaren Wirkung von TMAO auf die Komplexbildung zwischen dem Liganden und BSA führt.

In Gegenwart von 0,5 M GB ändert sich die Bindungskonstante für die Wechselwirkung von Proflavin mit HSA im Vergleich zu den reinen Pufferbedingungen nicht. Überraschenderweise wurde jedoch ein signifikanter Rückgang der Bindungskonstante K_b für die Komplexbildung des Liganden mit BSA beobachtet. Die berichteten CD-Daten deuten darauf hin, dass in Gegenwart von GB keine signifikanten Konformationsänderungen von BSA auftraten. Somit kann eine Konformationsänderung aufgrund des Kosolvens höchstwahrscheinlich als mögliche Ursache für die Abnahme von K_b ausgeschlossen werden. GB ist wie TMAO ein zwitterionischer Stabilisator von Proteinen und kann von der Proteinoberfläche dissoziieren und in die umgebende Lösung übergehen. (bei hohen Konzentrationen).^[52,57,58] GB ist jedoch in der Lage, spezifische Wechselwirkungen mit einigen Aminosäureresten des Proteins herzustellen, wie z. B. π -Kationen-Wechselwirkungen mit aromatischen Resten und H-Bindungen mit den Amid- und kationischen Gruppen.^[52,57,59] Ein Blick auf Tabelle 8.1 (im Anhang) zeigt, dass der Bindungshohlraum von BSA drei Lys-Reste und einen Arg-Rest beherbergt, die zu einer direkten Wechselwirkung mit der Carboxylatgruppe von GB fähig sind. Eine solche Wechselwirkung könnte zu einem teilweisen Verschluss der Bindungsstelle führen, was die beobachtete Abnahme der Bindungskonstante K_b zur Folge hat. Eine Inspektion der in Abbildung 3.8 dargestellten Bindungsstelle zeigt, dass nicht alle geladenen Reste für eine Wechselwirkung mit GB zur Verfügung stehen können. Ein Arg- und ein Asp-Rest liegen nahe beieinander und bilden möglicherweise eine Salzbrücke. In Abhängigkeit von ihrer Position sind jedoch nicht alle Lys-Reste in der Lage, mit GB in Wechselwirkung zu treten. Im Vergleich dazu hat die Bindungstasche von HSA nur einen Arg-Rest, was die Bindungstasche weniger anfällig für die GB-Bindung macht und die Bindung von Proflavin an HSA erschwert. Wie hier für die beiden kompatiblen Osmolyte TMAO und GB gezeigt

wurde, können Osmolyte also aufgrund ihres unterschiedlichen chemischen Aufbaus und der unterschiedlichen Beschaffenheit und räumlichen Verteilung der Aminosäurereste in der Bindungstasche der beiden Proteine drastisch unterschiedliche Auswirkungen auf die Bindung eines Liganden an diese beiden ähnlichen Proteine haben. Ein genaueres molekulares Bild könnte möglicherweise mit Hilfe von Molekulardynamik-Simulationsstudien gewonnen werden, wofür geeignete Kraftfelder erforderlich sind, die sowohl die Auswirkungen von Osmolyten als auch von hohem Druck berücksichtigen sollten, um präzise volumetrische Informationen zu erhalten. Solche Kraftfelder sind wahrscheinlich noch nicht immer verfügbar, sodass unsere Studie zur Identifizierung der Bindungsstellen immer noch ein wertvolles Instrument für das Verständnis der Protein-Ligand-Interaktion unter solchen Bedingungen darstellt. Für TMAO wurden jedoch in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte bei der Entwicklung druckabhängiger Kraftfelder erzielt, die die Lösungsthermodynamik reproduzieren und erfolgreich zur Erklärung der thermodynamischen Stabilisierung verschiedener Peptidsequenzen eingesetzt wurden.^[55,60] Veränderungen in der Proteindynamik können auch durch das Lösungsmittel verursacht werden.^[61] Osmolyte können die Bewegungsfähigkeit, Neuordnung und sogar die innere Proteinbewegung von Aminosäureresten beeinflussen. Kürzlich wurde die elastische inkohärente Neutronenstreuung (EINS) verwendet, um die durch den Druck verursachten Veränderungen in der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) der Wasserstoffatome von Lysozym zu bestimmen und um Erkenntnisse über die Auswirkungen von Cosolvents wie TMAO auf die durchschnittliche Sub-Nanosekunden-Dynamik des Proteins im Druckbereich von Umgebungsdruck bis 4 kbar zu gewinnen. Al-Ayoubi et al. stellten einen klaren Effekt von TMAO auf die innere Wasserstoffdynamik fest, nämlich eine signifikant verringerte Beweglichkeit (MSD-Wert), was bedeutet, dass die Proteinbewegung weniger empfindlich auf Druckänderungen reagiert.^[62,63] Es sei daran erinnert, dass die durchschnittlichen quadrierten Volumenschwankungen mit dem Kompressibilitäts-Koeffizienten β_T des Systems, $\langle \partial V^2 \rangle = k_B T V \beta_T$, korreliert sind und die größten Volumenschwankungen im Allgemeinen in der Nähe der aktiven Tasche von Proteinen beobachtet werden.^[64,65] Die Volumenschwankungen eines Proteinmoleküls sind in der Tat beträchtlich ($\sim 30 \text{ mL mol}^{-1}$) und von der Größenordnung vergleichbar mit der Volumenänderung, die bei der Entfaltung von Proteinen beobachtet wird.^[65] Des Weiteren wurde kürzlich festgestellt, dass eine Veränderung der kollektiven Rotationsdynamik von Wasser in Osmolytlösungen wahrscheinlich auch eine dominierende Wirkung auf die

Denaturierung von Proteinen hat.^[66] Die THz-Spektroskopie-Analyse zeigt, dass proteinstabilisierende Osmolyte wie TMAO von stärker gebundenem Hydratationswasser mit langsamerer Dynamik begleitet werden, was zu einer höheren Proteinstabilität führt (höhere Proteindenaturierungstemperaturen), während die kollektive Rotationsdynamik des Wassers im Fall von denaturierenden Osmolyten wie Harnstoff beschleunigt wird.

Die Druckmodulation ermöglichte es uns, die volumetrischen Eigenschaften der Komplexbildung in Bezug auf die Packung (einschließlich Fluktuationen) und die Hydratationsänderungen sowie die Auswirkungen der Kosolventien auf diese zu entschlüsseln.^[24,67] Unter reinen Pufferbedingungen wurde eine biphasische Druckabhängigkeit von $\ln K_b$ beobachtet, ΔV_b ist für beide Proteine im Niederdruckbereich positiv und wird bei höheren Drücken (oberhalb von etwa 1400 bar) negativ. Dieses Verhalten könnte auf strukturelle Fluktuationen des Protein-Liganden-Komplexes im unteren Druckbereich zurückzuführen sein, die positiv zur Volumenänderung beitragen (d. h. der erste Term in $\Delta V_b = V_{Komplex} - (V_{Proflavin} + V_{Protein})$ dominiert den zweiten Term) und mit zunehmender Kompression abnehmen dürften. Es wird erwartet, dass dieser Effekt in Gegenwart von kompatiblen Osmolyten wie TMAO, die bekanntermaßen zu einer Verringerung der strukturellen Fluktuationen führen (siehe oben), geringer ausfällt und $V_{Komplex}$ kleiner wird. Im Falle einer effizienten Bindung wirkt sich die Volumenänderung für das eigentliche Bindungsereignis im Allgemeinen negativ aus, und dieser Effekt scheint bei höheren Drücken zu dominieren. In der Tat wurde in Gegenwart von TMAO festgestellt, dass das Bindungsvolumen für die Komplexbildung von Proflavin mit den Serumproteinen nahe bei Null liegt, $\Delta V_b \approx 0$, was bedeutet, dass unter diesen Lösungsbedingungen die Packung zwischen dem Liganden und den Proteinen nahezu perfekt ist. Packungsdefekte, d. h. leere Nanoporen, würden zu einem Anstieg von $V_{Komplex}$ und damit von ΔV_b führen. Positive ΔV_b -Werte würden auch bei einer erheblichen Freisetzung von hydratisierenden Wassermolekülen in das Wasser auftreten (was zu einem Anstieg von $V_{Komplex}$ führen würde), da das Hydratationswasser von Proteinen im Vergleich zu reinem Wasser in der Regel etwa 10 % dichter ist und die Kompressibilität der Hydratationsschicht ~ 75 % der des Bulkwassers beträgt.^[24] In Anwesenheit von TMAO dürfte eine solche Volumenänderung ΔV_b abgeschwächt werden, da die Zugabe von TMAO zu Wasser zu einem geringen Anstieg der Dichte und einer Zunahme der Wasserstoffbrückenbindungsstärke des Lösungsmittels führt.^[55] In Gegenwart von 0,5 M GB wurde festgestellt, dass das Bindungsvolumen von Proflavin an beide Proteine leicht negativ ist

($\Delta V_b = -7,4 \text{ mL mol}^{-1}$). Solche negativen Werte lassen sich durch eine geringe Abnahme des Porenvolumens bei der Bindung erklären,^[68] zum Beispiel durch verringerte Fluktuationen des Proteingerüsts aufgrund der Komplexbildung, was zu einer geringen Abnahme des Gesamtvolumens des Systems führt.

3.4 Zusammenfassung & Fazit

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass druckabhängige Untersuchungen wertvolle neue Informationen über die thermodynamischen Eigenschaften von Ligandenbindungsreaktionen liefern können. Im Gegensatz zur Temperatur hängt die Wirkung des Drucks auf eine Ligandenbindungsreaktion ausschließlich von der Volumenänderung im Verlauf der Wechselwirkung ab, da die thermische Energie konstant bleibt, weshalb die aufgezeichneten Druckänderungen zur Bestimmung genauer volumetrischer Daten von Komplexierungsreaktionen verwendet werden können. Größe und Vorzeichen des Bindungsvolumens liefern wertvolle Informationen über Packungseigenschaften, strukturelle Fluktuationen, den Wechselwirkungsmechanismus und Hydratationsänderungen des Proteins und des Liganden, die von besonderer Bedeutung sind, wenn Kosolventien in der Lösung vorhanden sind. Da Organismen, die in der Tiefsee leben, mit hydrostatischen Drücken von bis zu 1000 bar oder mehr zurechtkommen müssen, müssen ihre biomolekularen Prozesse, einschließlich der Ligandenbindungsreaktionen, darauf abgestimmt haben, die damit verbundenen Volumenänderungen gering zu halten, damit sie effizient funktionieren. Wie aufgezeigt wurde, kann eine solche Anpassung durch die Anwesenheit bestimmter Kosolventien erreicht werden. Neben der Verbesserung der Proteinstabilität durch die Einführung stabilisierender Mutationen in der Sequenz ihrer Aminosäuren verwenden fast alle Organismen organische Lösungsmittel wie Polyole (z. B. Glukose, Sorbitol, Trehalose), Aminosäuren (z. B. Glycin) und Methylamine (z. B., TMAO, GB, Beta-Hydroxybutyrat), um ihre Zellen vor ungünstigen Bedingungen zu schützen, osmotische Ungleichgewichte auszugleichen und Proteine gegen ungünstige Umweltbedingungen zu stabilisieren.^[51,68] Es wurde gezeigt, dass sie nicht nur die Temperaturstabilität, sondern auch die Druckstabilität ($+1,5 \dots 2,5 \text{ kbar M}^{-1}$) von Proteinen deutlich erhöhen.^[69] Die Ergebnisse zeigen, dass die Osmolyte auch in der Lage sind, Liganden-Bindungsprozesse zu modulieren, und zwar auf spezifische Weise. Je nach chemischer Beschaffenheit der Bindungsstellen und damit der thermodynamischen Kräfte (ΔH_b vs. ΔS_b), die den Bindungsprozess antreiben, können Osmolyte mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften (solvophobe vs. spezifische Bindung an Oberflächengruppen) und

Wechselwirkungsstärken mit Wasser (kosmotrop vs. chaotrop) gewählt werden. Im Falle der Bindung von Proflavin an BSA und HSA führt die Zugabe beider Kosolventen zu einem Anstieg der Bindungsstärke K_b bei Druckbeaufschlagung, wobei TMAO das effizienteste Kosolvent ist, das den Bindungsprozess auch recht unempfindlich gegenüber Druckbeaufschlagung bis zu 2 kbar macht, da die Volumenänderung ΔV_b nahe Null bleibt. Dieser Effekt kann durch die Auswirkungen von Co-Lösungsmitteln auf die Stärke und Dynamik des Hydratationswassers sowie auf die Konformationsdynamik des Proteins untermauert werden, z. B. durch die Verringerung der Fluktuationen des Proteingerüsts, wie sie durch TMAO-Wasser-Lösungen verursacht werden, was dazu führt, dass die Dynamik des Proteins ziemlich druckunempfindlich wird.^[62]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein besseres Verständnis der Rolle von Kosolventen bei Liganden-Bindungsprozessen nicht nur zum Verständnis der Anpassungsmechanismen von Organismen beitragen, die in Hochdruckumgebungen und anderen rauen geologischen Umgebungen gedeihen, sondern auch wichtige Auswirkungen auf die Regulierung von Bindungsaffinitäten in biotechnologischen und pharmazeutischen Anwendungen haben wird

4 Die Auswirkungen von Temperatur und Druck auf die Protein-Ligandenbindungen in Anwesenheit von marsrelevanten Salzen***

Wie bereits zu Beginn dieser Arbeit erklärt, sind Protein-Ligandenbindungen unerlässlich für sämtliche Lebensformen und von grundlegender Bedeutung für alle biochemischen Prozesse. Wie solche Reaktionen durch raue Umweltbedingungen wie niedrige Temperaturen, hohe Drücke und hohe Konzentrationen von biologisch zerstörerischen Salzen beeinflusst werden, ist noch weitgehend unbekannt. Von Interesse ist die Erforschung der theoretischen Möglichkeit anderer planetarer Körper, wie dem Mars, Leben zu ermöglichen. Es ist bekannt, dass der Mars in seiner frühen Geschichte ein starkes hydrologisches System aufwies. Da die Existenz von Leben auf dem Mars bislang unbekannt ist, sind folgende Fragen für die Wissenschaft von Interesse: Unterstützen Bedingungen auf diesem Planeten theoretisch ähnliche biologische Prozesse wie auf der Erde? Sind der Mars oder marsähnliche geologische Bedingungen auf einem anderen Planeten ein Hindernis für Leben, wie wir es kennen? Insbesondere kennzeichnen die hohen Salzkonzentrationen die Verdampfung von eventuell früher dagewesenem Wasser. Heute weist der Planet lokal hohe Konzentrationen an Salzen wie Chloriden^[70], Sulfaten^[71] und Perchloraten^[72] auf. Obwohl sich die Oberfläche des Mars heute am Tripelpunkt des Wassers befindet, kann der Untergrund wie in der Vergangenheit flüssiges Wasser enthalten.^[72,73] Die chemischen Bestandteile der planetarischen Umgebung werfen die Frage auf, inwiefern sie in Kombination mit dem hohen Druck im Untergrund die potenzielle Bewohnbarkeit des Planeten beeinflussen könnten.

Im Fokus dieses Kapitels steht die Frage, ob der möglicherweise flüssige und wasserreiche Untergrund des Planeten Bedingungen bietet, die die Entstehung von Leben begünstigen. Aus diesem Grund wurden die im Mars entdeckten Salze genauer untersucht, die Hinweise auf früher vorhandenes Wasser darstellen. Unsere Daten zeigen, dass Magnesiumchlorid und -sulfat die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Liganden nicht wesentlich verändern,

*** Die in diesem Kapitel vorgestellte Studie wurde in der Referenz^[67] publiziert: N. Jahmide-Azizi, R. Oliva, S. Gault, C. S. Cockell, R. Winter, *Biology* **2021**, *10*.

während das Perchlorat-Ion die Bindung zwischen Proteinen und Liganden stark beeinflusst. Die auf dem Mars herrschenden Temperatur- und Druckbedingungen schließen jedoch Protein-Ligand-Wechselwirkungen der hier untersuchten Art nicht unbedingt aus.

Diese Studie konzentriert sich auf die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem kleinen Liganden 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS) und dem multifunktionalen Protein Rinderserumalbumin (BSA) in Anwesenheit von Ionen, die mit der Oberfläche und dem Untergrund des Mars assoziiert sind, wie beispielsweise Perchlorat-Ionen. Dabei wurden verschiedene Bedingungen wie Raumtemperatur, niedrige Temperaturen und hoher Druck berücksichtigt. Unsere Untersuchungen haben ergeben, dass Salze wie Magnesiumchlorid und -sulfat eine nur minimale Auswirkung auf die Bildung des Protein-Liganden-Komplexes haben. Hingegen hat Magnesiumperchlorat die Interaktion zwischen ANS und BSA auf der Ebene einzelner Bindungsstellen erheblich beeinflusst und führte zu einer Änderung der Stöchiometrie und Stärke der Ligandenbindung. Interessant ist, dass eine Absenkung der Temperatur oder eine Erhöhung des Drucks den Prozess der Ligandenbindung begünstigte, was letztendlich zu einer negativen Veränderung des Protein-Liganden-Bindungsvolumens führte. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass biochemische Reaktionen, die für die Regulierung biologischer Prozesse von Prokaryoten von grundlegender Bedeutung sind, auch unter den rauen Bedingungen des Marsuntergrunds möglich sein könnten, die von den Standardtemperatur- und -druckbedingungen abweichen.

4.1 Experimentelles

4.1.1 Probenpräparation

Das Protein Rinderserumalbumin (BSA, Molekulargewicht 66 kDa, 583 Reste) in Form von gefriergetrocknetem Pulver, das Fluorophor 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS), die Salze $MgCl_2$, $Mg(ClO_4)_2$ und $MgSO_4$ wurden alle von Sigma Aldrich Chemicals (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Alle Probenlösungen wurden in dem druckstabilen 10 mM Tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 hergestellt. Zur Herstellung der Puffer- und Probenvorbereitungen wurde deionisiertes Wasser verwendet.

Die Stammlösung des Proteins BSA wurde durch Auflösen des gefriergetrockneten Pulvers in Tris-HCl-Puffer hergestellt. Die genaue Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm mit einem UV-1800-Spektrometer der Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan) unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von $43\,600\,M^{-1}\,cm^{-1}$ bestimmt.^[20]

4.1.2 Steady-state Fluoreszenzspektroskopie

Das Maß der Komplexbildung zwischen ANS und BSA wurde mit Hilfe der stationären Fluoreszenzspektroskopie unter Verwendung eines K2-Fluorometers von ISS, Inc. (Champaign, IL, USA) verfolgt. Um die Bindungsisothermen zu bestimmen, wurden die ANS-Emissionsspektren aufgezeichnet, indem die Lösungen bei 350 nm angeregt und die Emissionsintensitäten im Bereich von 400-550 nm gemessen wurden. Dabei wurde die Spaltbreite der Anregungs- und Emissionsmonochromatoren auf jeweils 8 nm eingestellt. Eine Serie von Lösungen mit einer festen ANS-Konzentration von etwa 5 μM wurde hergestellt und die BSA-Konzentration zwischen 0 und etwa 40 μM variiert. Anschließend wurden die Bindungskonstanten (K_b) anhand eines Diagramms von $\Delta F = F - F_0$ (wobei F die maximale Fluoreszenzintensität von ANS in Anwesenheit von BSA und F_0 die Intensität von ANS in Abwesenheit von BSA ist) in Abhängigkeit von der BSA-Gesamtkonzentration bestimmt. Die experimentellen Daten wurden anschließend nach einem Modell mit äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellen oder nach zwei Klassen von Modellen mit nicht-äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellen, wie in Abschnitt 2.2.2 und in Referenz [19] ausführlich beschrieben, angepasst.^[20]

Für die Messungen unter verschiedenen Druckbedingungen kam das Hochdruckzellensystem des ISS und Quarzküvetten zum Einsatz, wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Die Druckregulierung erfolgte mithilfe einer Handpumpe und Wasser, wodurch ein Druckbereich von 1 bis 2000 bar abgedeckt wurde. Die ANS- und BSA-Lösungen wurden gemischt, verwirbelt und anschließend in die Probenzelle gefüllt. Die Zelle wurde mit DuraSeal™-Laborstretchfolie versiegelt und in den Hochdruckbehälter platziert. Durch die Verwendung der Dehnfolie konnte der Druck auf die Probenküvette kräftefrei übertragen werden.

4.1.3 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie-Experimente wurden im Fern-UV-Bereich (190-260 nm) durchgeführt, um die Sekundärstruktur des Proteins BSA in Gegenwart von 250 mM MgCl₂, Mg(ClO₄)₂ oder MgSO₄ und bei Temperaturen von 5, 15 und 25 °C zu bestimmen. CD-Spektren einer 14 µM BSA-Lösung wurden mit einem Jasco J-715 Spektropolarimeter (Jasco Corporation, Tokio, Japan) unter Verwendung eines Quarzes mit 0,01 cm Weglänge aufgenommen. Die Geräteparameter wurden mit einer Scanrate von 50 nm min⁻¹, einer Antwortzeit von 2 s und einer Bandbreite von 4 nm eingestellt. Von jeder Probe wurde ein Hintergrundleerwert (reiner Puffer oder salzhaltiger Puffer) subtrahiert. Die aufgezeichneten Spektren sind das Ergebnis dreier aufeinanderfolgender Akkumulationen und wurden auf ein Mol an Aminosäuren normiert.

4.2 Ergebnisse

In dieser Studie wurde die Wirkung von Temperatur, Druck und marsrelevanten Salzen, d. h. MgCl_2 , $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und MgSO_4 , auf die Bindungseigenschaften des kleinen aromatischen Liganden 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS) an das multifunktionale Protein Rinderserumalbumin (BSA) untersucht. Die druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie wurde verwendet und durch Zirkulardichroismus (CD)-Experimente ergänzt.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass ANS in reinem Puffer (10 mM Tris-HCl-Puffer) bei Raumtemperatur (25 °C) mit einer Bindungskonstante (K_b) im Bereich von 10^6 M^{-1} an BSA binden kann. Es wurde beobachtet, dass im Durchschnitt drei ANS-Moleküle an ein BSA-Molekül binden. Diese Bindungsprozesse lassen sich gut beschreiben, indem angenommen wird, dass alle drei ANS-Moleküle mit gleicher Affinität binden.^[20] Darüber hinaus wurden fluoreszenzspektroskopische Experimente durchgeführt, um den Einfluss der marsrelevanten Salze auf die Bildung von Komplexen zwischen ANS und BSA zu untersuchen. Dabei wurden Temperaturen von 5 bis 25 °C und Drücke von Umgebungsdruck (1 bar) bis 2000 bar durch Variation von Temperatur und Druck abgedeckt.

4.2.1 Einfluss marsrelevanter Salze auf die BSA-ANS-Komplexbildung

Zunächst wurde der Einfluss von 250 mM MgCl_2 , $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ und MgSO_4 auf den Bindungsprozess des Liganden bei 25 °C und Umgebungsdruck (1 bar) untersucht. Um die Bindungskonstante bestimmen zu können, ist es von grundlegender Bedeutung, die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes genau zu kennen. Auf diese Weise kann bei der Datenanalyse der gemessenen Bindungsisothermen ein geeignetes Bindungsmodell angewandt werden, welches den am besten geeigneten Wert für die Bindungskonstante K_b liefert.

Zur Schätzung der Bindungsstöchiometrie mittels Steady-State-Fluoreszenzspektroskopie wurde die Methode der kontinuierlichen Variation (oder Job's Plot) angewendet.^[74,75]

Eine Reihe von Lösungen wurde so hergestellt, dass die Gesamtkonzentration (d. h. $[\text{ANS}] + [\text{BSA}]$) konstant blieb, während die Molanteile der interagierenden Partner variiert wurden. Unstetigkeiten in der Darstellung der Fluoreszenzintensität gegen x_{ANS}

(wobei x_{ANS} der Molanteil von ANS ist) sind ein Hinweis auf die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes. Abbildung 4.1 zeigt die Job'schen Diagramme, die in Gegenwart der drei Salze bei $T = 25\text{ °C}$ und $p = 1\text{ bar}$ erhalten wurden.

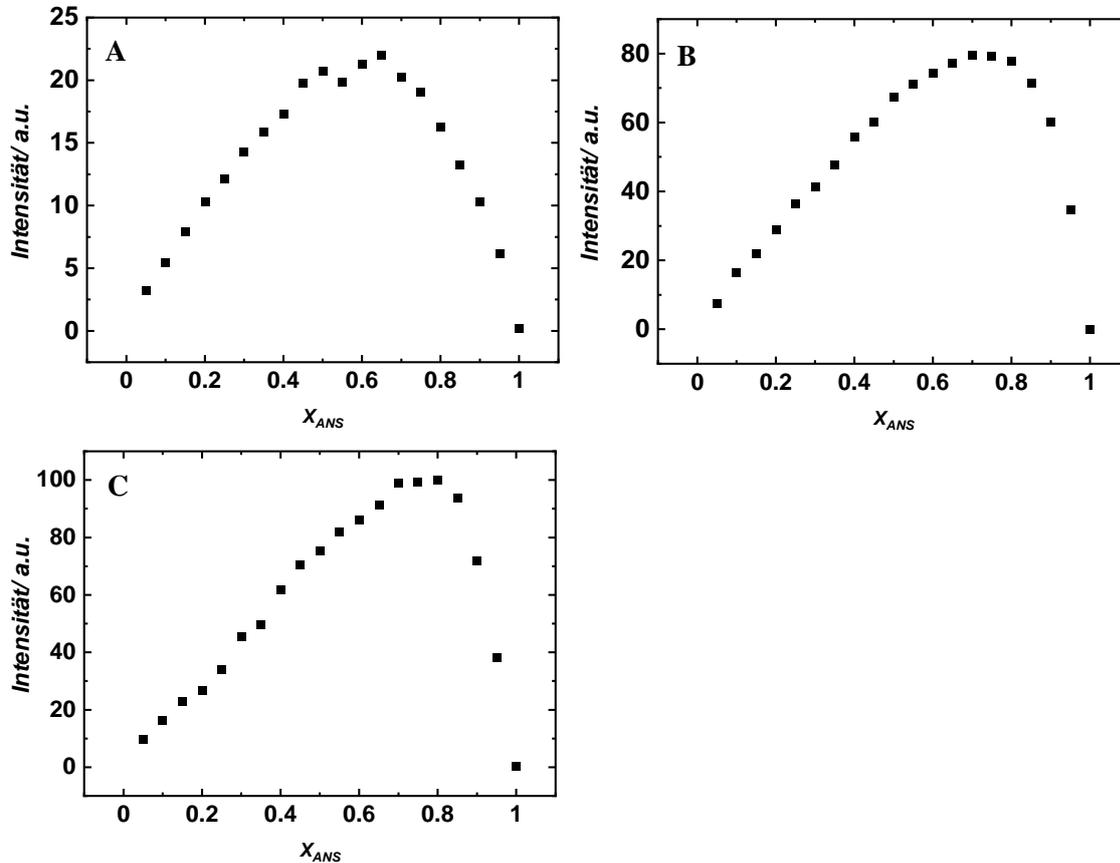


Abbildung 4.1: Job'sche Diagramme für die Bildung des ANS/BSA-Komplexes bei einer Temperatur von 25 °C und einem Druck von 1 bar in Gegenwart von 250 mM (A) MgCl_2 , (B) MgSO_4 und (C) $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Die Gesamtkonzentration ($[\text{ANS}] + [\text{BSA}]$) betrug $35\text{ }\mu\text{M}$. Die Fluoreszenzintensität ist in willkürlichen Einheiten (a. u. (arbitrary units)) angegeben.

Eine Analyse von Abbildung 4.1A zeigt das Vorhandensein eines Wendepunkts in Gegenwart von MgCl_2 , der bei $x_{ANS} \approx 0,75$ zentriert ist, was auf die Bildung eines 1:3-Komplexes (BSA:ANS) hinweist. Qualitativ gesehen wurde das gleiche Ergebnis auch in der MgSO_4 -haltigen Lösung erzielt. Das Vorhandensein eines Wendepunkts bei $x_{ANS} \approx 0,75$ deutet darauf hin, dass ebenfalls drei ANS-Moleküle an ein BSA-Molekül gebunden sind (Abbildung 4.1B). Die gleiche Stöchiometrie wurde zuvor im gleichen Puffer, jedoch ohne Salz, beobachtet,^[20] was nahelegt, dass sowohl Magnesiumchlorid als auch -sulfat keinen wesentlichen Einfluss auf die Stöchiometrie des BSA:ANS-Komplexes haben. Ein völlig anderes Szenario wurde in Gegenwart von $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ beobachtet. Das Job'sche Diagramm ist durch das Vorhandensein von zwei Wendepunkten gekennzeichnet

(Abbildung 4.1C). Einer liegt in der Mitte bei $x_{ANS} = 0,5$, der andere bei $x_{ANS} \approx 0,65$, was darauf schließen lässt, dass nur zwei ANS-Moleküle an ein BSA-Molekül gebunden sind. Das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Wendepunkten deutet auf eine Nichtgleichheit der Bindungsstellen hin. Andernfalls sollte nur ein Wendepunkt zu beobachten sein, wie im Fall der $MgCl_2$ - und $MgSO_4$ -Lösungen. $Mg(ClO_4)_2$ ist also in der Lage, die Bildung des Komplexes auf der Ebene der einzelnen Bindungsstellen stark zu modulieren, indem es die Bindung an eine Stelle hemmt und zum Verlust der Gleichwertigkeit der beiden verbleibenden Stellen führt.

Folglich wurde der Einfluss der Temperatur auf die Stöchiometrie des ANS:BSA-Komplexes untersucht. Die Job's Plots wurden auch bei 5 und 15 °C erstellt. Die Daten, die in Gegenwart von $MgCl_2$, $MgSO_4$ und $Mg(ClO_4)_2$ erhalten wurden, sind in den Abbildung 8.3 bis Abbildung 8.5 im Anhang dargestellt. Ein Blick auf die genannten Abbildungen zeigt, dass eine Senkung der Temperatur auf 5 °C die Stöchiometrie des Protein-Liganden-Komplexes nicht verändert. Wie bei $T = 25$ °C wurden für die Komplexbildung in Gegenwart von $MgCl_2$, $MgSO_4$ bzw. $Mg(ClO_4)_2$ Stöchiometrien von 3:1, 3:1 und 2:1 ANS:BSA beobachtet (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Bindungskonstanten (K_b) und Stöchiometrien für die BSA:ANS-Komplexbildung in 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, in Gegenwart der angegebenen Salze und bei Temperaturen (T) von 5, 15 und 25 °C.

Lösungsmittelbedingungen	$T/^\circ C$	$K_{b1}/M^{-1} \cdot 10^6$	$K_{b2}/M^{-1} \cdot 10^6$	1n
250 mM $MgCl_2$	5	1.0 ± 0.1	-	1:3
	15	0.36 ± 0.13	-	1:3
	25	4.9 ± 0.2	-	1:3
250 mM $MgSO_4$	5	0.62 ± 0.15	-	1:3
	15	0.39 ± 0.14	-	1:3
	25	2.9 ± 0.3	-	1:3
250 mM $Mg(ClO_4)_2$	5	0.19 ± 0.13	0.19 ± 0.13	1:2
	15	0.15 ± 0.04	0.13 ± 0.02	1:2
	25	0.59 ± 0.22	1.2 ± 0.1	1:2

¹n: stellt die Stöchiometrie der Bindung BSA:ANS dar.

4.2.2 Druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie

Sobald die Stöchiometrien des Komplexes in Gegenwart der Salze und unter den drei verschiedenen Temperaturen bekannt sind, können die Bindungskonstanten K_b durch Titrationsexperimente mit Hilfe der stationären Fluoreszenzspektroskopie bestimmt werden. Bei diesen Experimenten wurde eine Lösung von ANS mit einer BSA-Lösung titriert. ANS zeichnet sich durch eine sehr geringe Quantenausbeute aus, wenn es frei in Lösung vorliegt.^[76] Wenn der aromatische Ligand an die hydrophoben Taschen des Proteins gebunden ist, wird ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet. Somit kann das Ausmaß der Bindung leicht durch Verfolgen des Fluoreszenzanstiegs von ANS bestimmt werden.

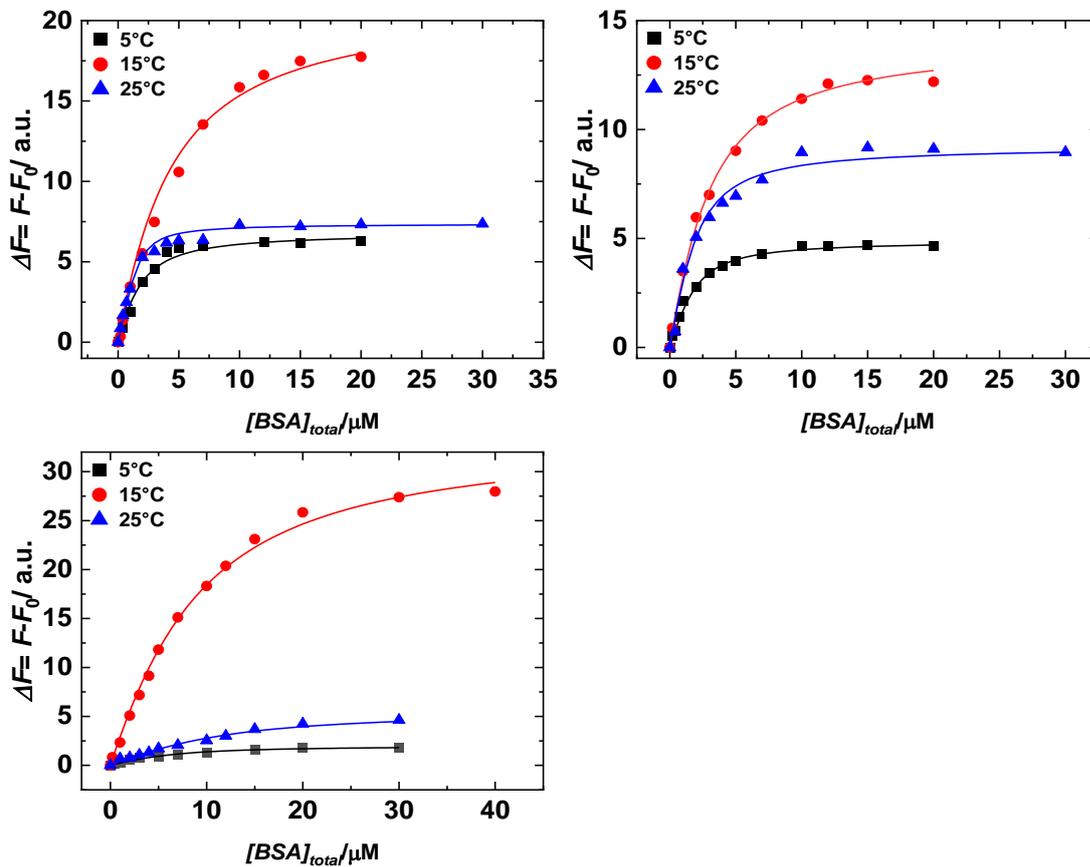


Abbildung 4.2: Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen Rinderserumalbumin (BSA) und 8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure (ANS), erhalten bei 5 °C (schwarze Quadrate), 15 °C (rote Kreise) und 25 °C (blaue Dreiecke) bei $p = 1$ bar in Gegenwart von 250 mM (A) MgCl_2 , (B) MgSO_4 und (C) $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung der experimentellen Daten nach einem äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellenmodell für die in Gegenwart von MgCl_2 und MgSO_4 durchgeführten Experimente dar, und nach zwei Klassen von unabhängigen Bindungsstellenmodellen für die in Gegenwart von $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ durchgeführten Experimente. Die Bindungsisothermen wurden durch Auftragen von $\Delta F = F - F_0$ (wobei F die Fluoreszenzintensität von ANS beim Maximum in Gegenwart von BSA und F_0 die Intensität von ANS in Abwesenheit von BSA ist) als Funktion der BSA-Gesamtkonzentration ermittelt.

Die anschließende Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Stöchiometrie, die aus den Job's-Plot-Experimenten abgeleitet wurden. In MgCl_2 - und MgSO_4 -haltigen Puffern mit nur einer Klasse von Bindungsstellen, wurden die experimentellen Punkte des Titrationsexperiments nach einem Modell mit äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellen angepasst (2.2.2.1). Stattdessen wurden in Gegenwart von $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ zwei unterschiedliche Bindungsmodi beobachtet. Folglich wurde ein Modell mit zwei Klassen unabhängiger Bindungsstellen verwendet (2.2.3). In Abbildung 4.2 sind die Bindungsisothermen bei Umgebungsdruck dargestellt, die in Gegenwart von 250 mM MgCl_2 , MgSO_4 und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ bei 5, 15 und 25 °C ermittelt wurden. Die entsprechenden ermittelten Bindungskonstanten sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

In Anwesenheit von MgCl_2 wurde bei Abnahme der Temperatur von 25 auf 15 °C ein deutlicher Rückgang der Bindungskonstante K_b (~90 %) beobachtet. Hingegen ist bei 5 °C der Wert der Bindungskonstante K_b im Vergleich zum Wert bei 15 °C nur geringfügig höher. Das System weist also eine komplexe nichtlineare Temperaturabhängigkeit der gemessenen Gesamtbindungskonstante auf. Ein sehr ähnliches Verhalten wurde auch in Gegenwart von MgSO_4 beobachtet, d. h. die Abnahme der Temperatur beeinträchtigt die Bildung des Komplexes, allerdings auf nichtlineare Weise. Im Falle von $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ sinken die K_b -Werte ebenfalls mit sinkender Temperatur. Die Abnahme von K_{b1} scheint im Vergleich zur Abnahme von K_{b2} weniger ausgeprägt zu sein, was auf die beiden verschiedenen Bindungsstellen hinweist, die durch unterschiedliche Bindungsenergien gekennzeichnet sind. Dieser Vorgang lässt sich wahrscheinlich auf die Unterschiede in den nicht-kovalenten Wechselwirkungen zurückzuführen, die bei der Bindung entstehen. Es ist wichtig zu beachten, dass eine Senkung der Temperatur zu ähnlichen Werten der beiden Bindungskonstanten führt: In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss von hohem hydrostatischem Druck (HHP) auf die Bindung von ANS an BSA in Gegenwart der drei Salze und im Temperaturbereich zwischen 5 und 25 °C untersucht. Zu diesem Zweck wurden die gleichen Titrationsexperimente durchgeführt, wobei die Komplexbildung mit Hilfe der HHP-Fluoreszenzspektroskopie verfolgt wurde. In Abbildung 4.3 sind beispielhaft die Bindungsisothermen dargestellt, die für die ANS-Titration mit einer BSA-Lösung in Gegenwart von 250 mM MgCl_2 bei $T = 25$ °C und im Druckbereich zwischen 1 und 2000 bar ermittelt wurden. Die für alle Proben ermittelten Bindungskonstanten sind in Tabelle 8.2 im Anhang aufgeführt.

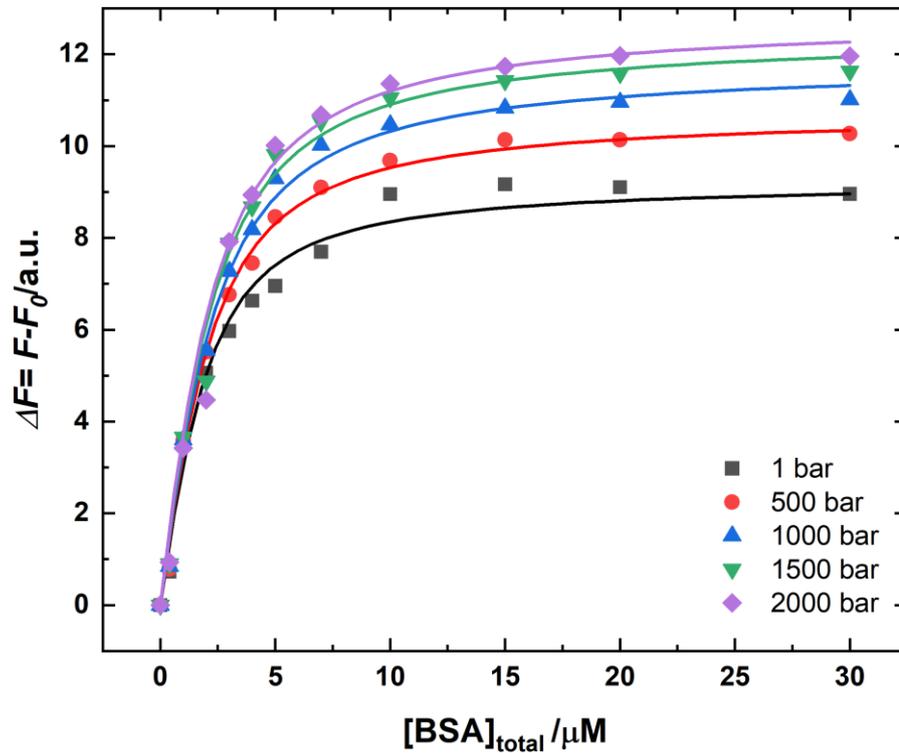


Abbildung 4.3: Bindungsisothermen für die Bildung des ANS/BSA-Komplexes, erhalten bei $T = 25\text{ °C}$ in Gegenwart von 250 mM MgCl_2 bei den angegebenen Druckwerten. Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung der experimentellen Daten nach einem äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellenmodell dar. Alle Experimente wurden in 10 mM Tris-HCl-Puffer durchgeführt. Die Bindungsisothermen wurden durch Auftragen von $\Delta F = F - F_0$ (wobei F die Fluoreszenzintensität von ANS beim Maximum in Anwesenheit von BSA und F_0 die Intensität von ANS in Abwesenheit von BSA ist) als Funktion der gesamten BSA-Konzentration ermittelt.

Ein Blick auf Abbildung 4.4 zeigt, dass der Druck die Bindungsstärke in Abhängigkeit von der Temperatur und der Art des in der Lösung vorhandenen Salzes beeinflusst. Es ist wichtig zu beachten, dass BSA in dem gesamten erfassten Druckbereich stabil ist und keine Entfaltung und Denaturierung des Proteins stattfindet.^[77] Daher können die beobachteten Schwankungen der Bindungskonstante K_b höchstwahrscheinlich nicht auf druckbedingte Konformationsänderungen des Proteins zurückgeführt werden. In Gegenwart von MgCl_2 wurden bei 25 °C nur geringe Auswirkungen auf die Bindungsaffinität beobachtet. Das Gleiche gilt für $T = 15\text{ °C}$. Stattdessen scheint der Druckeffekt bei $T = 5\text{ °C}$ ausgeprägter zu sein, wo ein deutlicher Anstieg von K_b bei einem Druckanstieg von 1 auf 2000 bar beobachtet wurde. Somit begünstigt die Anwendung von Druck die Bildung des Komplexes bei niedrigeren Temperaturen.

Stattdessen wird im MgSO_4 -haltigen Puffer bei 25 °C eine leichte Abnahme der Affinität bei Druckanstieg festgestellt. Die beobachteten Volumenänderungen sind in diesem Fall

sehr gering (zum Vergleich: das molare Volumen eines Wassermoleküls beträgt etwa 18 mL mol^{-1}). Der Druckeinfluss scheint die Bindung bei 15 °C leicht zu begünstigen, wobei bei $T = 5 \text{ °C}$ die Bindungskonstante K_b mit zunehmendem Druck leicht abnimmt. Die Komplexbildung in Gegenwart von MgSO_4 wird also je nach Temperatur leicht begünstigt oder benachteiligt. Die Änderungen sind jedoch recht gering oder sogar vernachlässigbar. In Gegenwart von $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ bei $T = 25 \text{ °C}$ nimmt die erste Bindungskonstante der beiden verbleibenden Bindungsstellen, K_{b1} , mit zunehmendem Druck leicht ab. Die zweite Bindungskonstante, K_{b2} , scheint dagegen durch Druckänderungen bis zu 2000 bar nicht wesentlich beeinflusst zu werden. Bei einer Temperatur von 15 °C steigen K_{b1} , und K_{b2} bei Druckanstieg leicht an wobei bei weiterer Temperaturabnahme, $T = 5 \text{ °C}$, die Bindungskonstanten K_{b1} , und K_{b2} mit zunehmendem Druck weiter zunehmen. Die beiden Bindungsarten reagieren also auf unterschiedliche Weise auf Druck, was zeigt, dass die Packungseigenschaften und die Hydratationseffekte bei der Bindung, die weitgehend zu den Volumenänderungen beitragen, für jede Bindungsstelle des Proteins unterschiedlich sind.

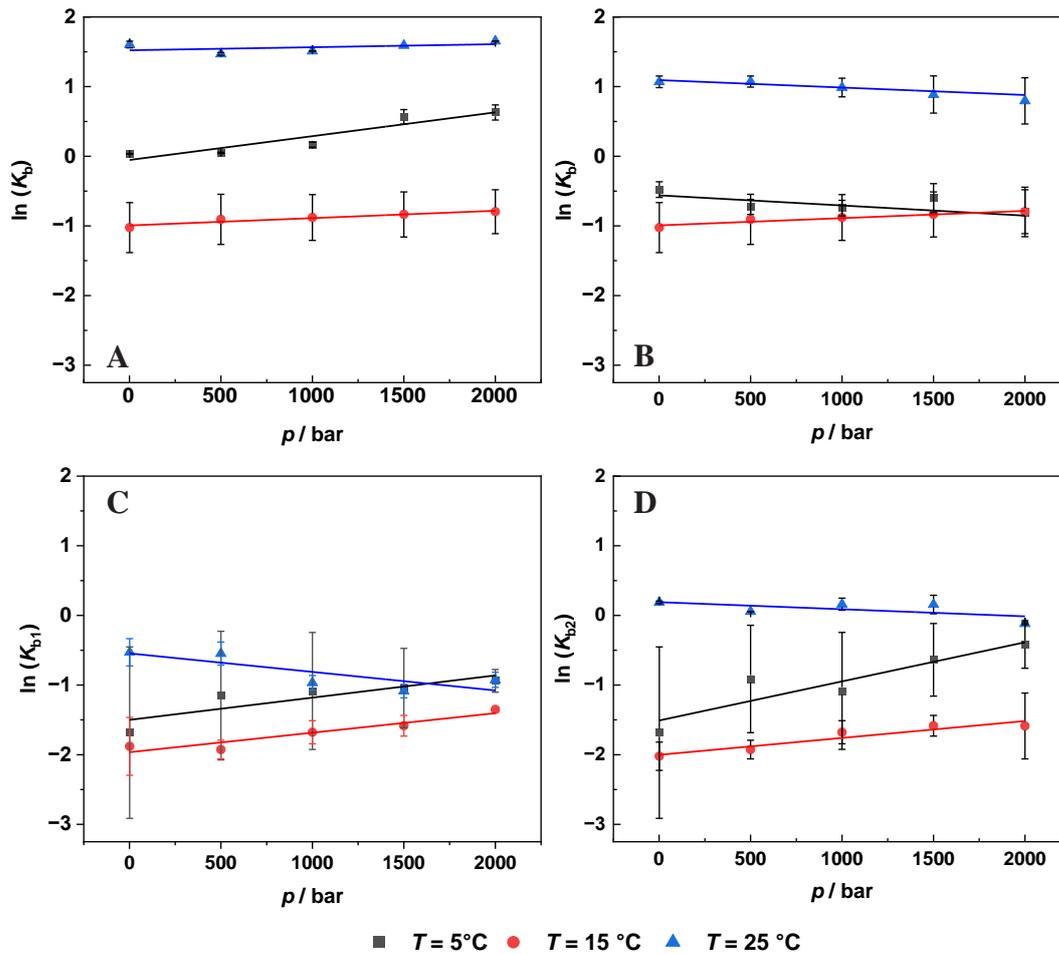


Abbildung 4.4: Druckabhängigkeit der Bindungskonstante (K_b) für die Komplexbildung zwischen BSA und ANS in Gegenwart von 250 mM MgCl_2 (A), MgSO_4 (B) und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (C) und (D) bei den Temperaturen von 5 °C (schwarze Quadrate), 15 °C (rote Kreise) und 25 °C (blaue Dreiecke). Die Darstellung in (C) bezieht sich auf die Druckabhängigkeit der Bindungskonstante der ersten Bindungsstelle (K_{b1}), die Darstellung in (D) auf die der zweiten Bindungsstelle (K_{b2}). Aus den Steigungen von $\ln(K_b)$ gegen p kann das Bindungsvolumen (ΔV_b) mit Hilfe von Gleichung (6) berechnet werden.

Wie im Kapitel 3 konnte mithilfe der Druckabhängigkeit der K_b -Werte das Protein-Liganden-Bindungsvolumen ΔV_b bestimmt werden, dass die Änderung des Volumens bei der Bindung widerspiegelt. Eine detaillierte Diskussion der Auswirkungen von Druck auf die Ligandenbindung ist in Referenz^[26] und den darin enthaltenen Quellen zu finden.^[26]

$$\left(\frac{\partial \ln K_b}{\partial p}\right)_T = -\frac{\Delta V_b}{RT} \quad (6)$$

Somit konnte das Bindungsvolumen direkt aus der Steigung bestimmt werden, unter der Annahme, dass die Volumenänderung unabhängig vom Druck in dem hier eher kleinen erfassten Druckbereich ist.

Die resultierenden Bindungsvolumina ΔV_b sind in Tabelle 4.2 zusammengestellt.

Tabelle 4.2: Bindungsvolumina (ΔV_b) für die BSA:ANS-Komplexbildung bei den angegebenen Temperaturen und in Gegenwart von 250 mM MgCl_2 , MgSO_4 und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Die (ΔV_b) -Werte sind in mL mol^{-1} des Proteins angegeben.

	MgCl_2	MgSO_4	$\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$	$\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$
$T/^\circ\text{C}$	$\Delta V_b/\text{mL mol}^{-1}$	$\Delta V_b/\text{mL mol}^{-1}$	${}^a\Delta V_{b1}/\text{mL mol}^{-1}$	${}^a\Delta V_{b2}/\text{mL mol}^{-1}$
5	-7.9 ± 0.1	2.0 ± 1.0	-7.4 ± 2.4	-12.9 ± 3.2
15	-2.5 ± 0.4	-2.0 ± 1.0	-6.0 ± 1.0	-5.0 ± 1.0
^b 25	-1.0 ± 1.0	3.6 ± 0.5	6.0 ± 2.0	2.0 ± 1.0

a ΔV_{b1} und V_{b2} beziehen sich auf die Volumenänderung des ersten bzw. zweiten Bindungsmodus.

b Als Referenz beträgt die Volumenänderung in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, $14,5 \pm 1,5 \text{ mL mol}^{-1}$.

Bei $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ beträgt das Bindungsvolumen in Gegenwart von MgCl_2 nahezu Null, wodurch die vernachlässigbare Wirkung des Drucks auf die Komplexbildung deutlich wird. Hingegen ist die Volumenänderung in der sulfathaltigen Lösung leicht positiv, d. h. die Anwendung von Druck hat keine positive Wirkung auf die Wechselwirkung zwischen dem Protein und Liganden. In Gegenwart von Perchlorat sind die Bindungsvolumina beider Bindungsstellen positiv, wobei $\Delta V_{b1} > \Delta V_{b2}$ ist. Dies zeigt die unterschiedliche Packungs- und Hydratationseigenschaften der beiden Bindungsstellen auf. In Anwesenheit von MgCl_2 geht die Abnahme der Temperatur mit negativeren ΔV_b -Werten einher, d. h. abnehmende Temperatur und zunehmender Druck begünstigen die Komplexbildung. Im MgSO_4 -haltigen Puffer hingegen sind die ΔV_b -Änderungen mit der Temperatur weniger ausgeprägt. Es wurde nur eine geringe Abnahme des Bindungsvolumens ΔV_b beobachtet. Interessanterweise hatte die Temperatur in Gegenwart von $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ einen vergleichsweise starken Einfluss auf die Volumenänderungen. Beide Bindungsvolumina werden negativ und erreichen Werte von -7,4 bzw. -12,9 mL mol^{-1} für die erste bzw. die zweite Bindungsstelle. Wenn also Magnesiumperchlorat in Lösung vorliegt, wird die Komplexbildung durch die kombinierte Erhöhung des Drucks und die Senkung der Temperatur stark begünstigt. Um die Änderungen des Bindungsvolumens mit der Temperatur hervorzuheben, ist $\Delta V_b(T)$ für die verschiedenen Salze in Abbildung 4.5 dargestellt.

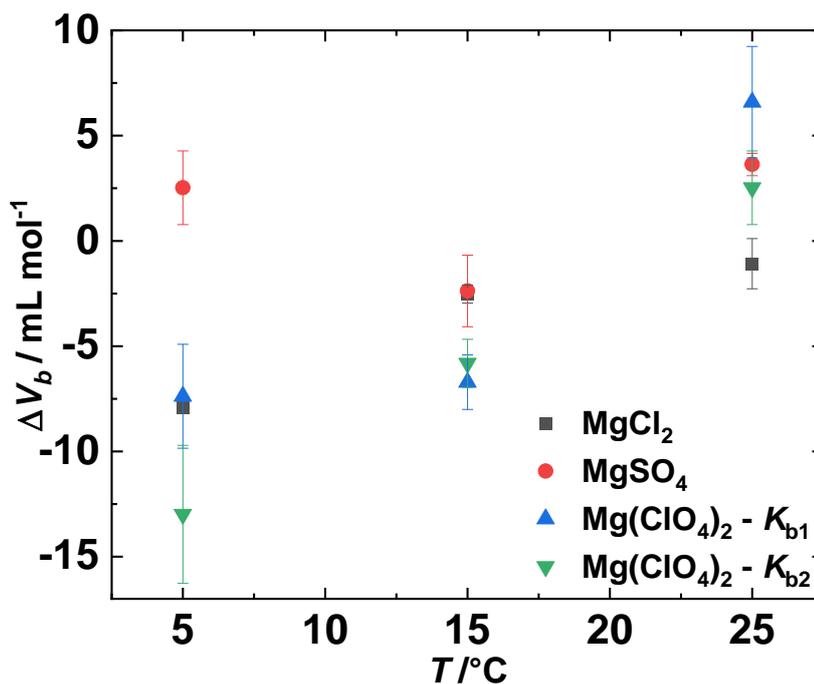


Abbildung 4.5: Darstellung der Bindungsvolumina, ΔV_b , als Funktion der Temperatur für die angegebenen 250 mM Salzlösungen.

4.2.3 Konformationsanalyse durch CD-Spektroskopie

Die Unterschiede, die bei der Auswirkung von Temperatur und Salz auf die Komplexbildung beobachtet wurden, könnten in erster Linie auf Konformationsänderungen der Proteinstruktur zurückgeführt werden. Um diese Frage zu klären, wurden zirkulardichroistische (CD) Spektren von BSA im Fern-UV-Bereich aufgenommen. In diesem Spektralbereich lassen sich Informationen über die Sekundärstruktur des Proteins gewinnen.^[44,78] Die Spektren wurden bei Temperaturen von 5, 15 und 25 °C und in Gegenwart der drei verschiedenen Salze aufgenommen. Abbildung 4.6 zeigt die CD-Spektren von BSA, die bei 25 °C in Gegenwart von 250 mM MgCl₂, Mg(ClO₄)₂ und MgSO₄ aufgenommen wurden. Als Referenz ist auch das CD-Spektrum von BSA in reinem Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4) dargestellt.

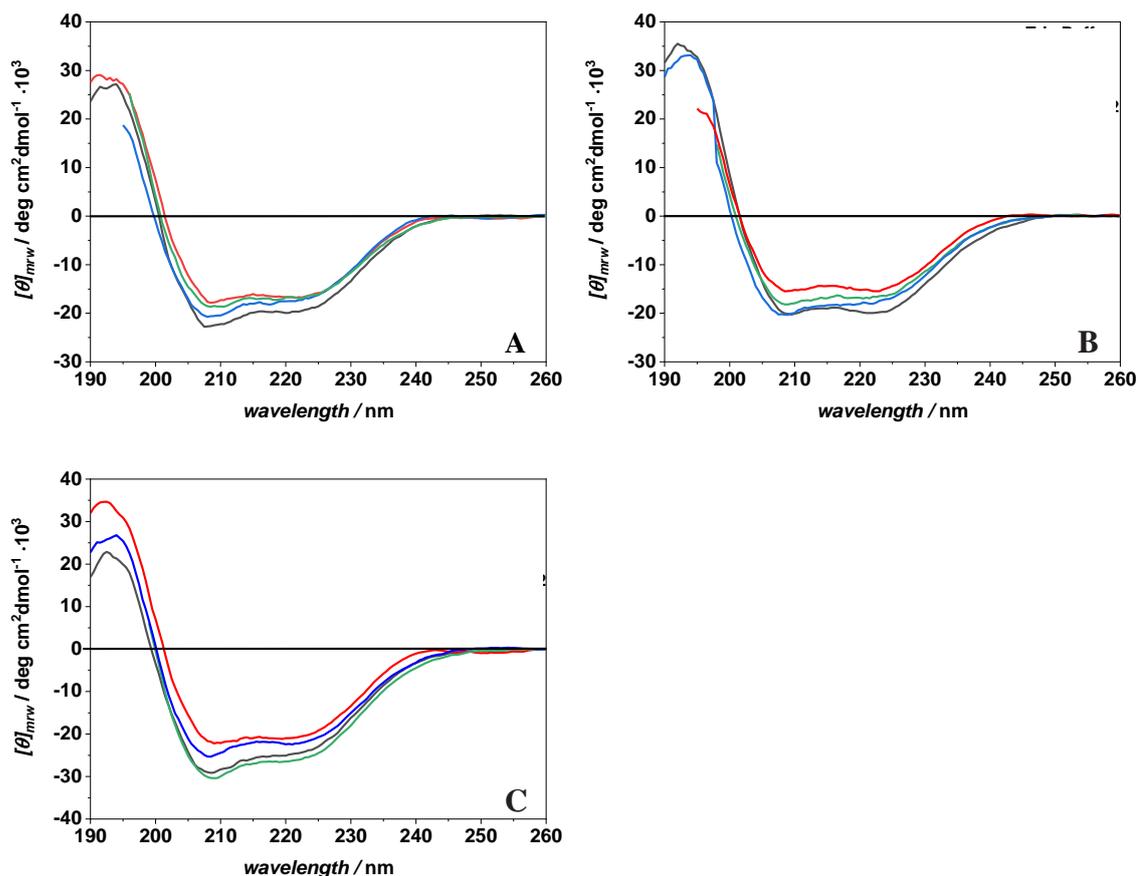


Abbildung 4.6: Fern-UV-CD-Spektren von BSA bei 25°C (A), 15°C (B) und 5°C (C). In Gegenwart von 250 mM MgCl₂ (rotes Spektrum), MgSO₄ (blaues Spektrum) und Mg(ClO₄)₂ (grünes Spektrum). Als Referenz ist auch das CD-Spektrum von BSA in reiner Pufferlösung (schwarzes Spektrum) angegeben. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 25 °C in 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, aufgenommen. Die CD-Spektren sind durch Auftragen der molaren Elliptizität ($[\theta]_{mrv}$) als Funktion der Wellenlänge in nm dargestellt.

Das CD-Spektrum von BSA bei reinen Pufferbedingungen ist durch das Vorhandensein von zwei Minima bei etwa 208 und 222 nm gekennzeichnet. Darüber hinaus ist eine positive Bande bei etwa 195 nm erkennbar. Diese spektralen Merkmale sind charakteristisch für ein Protein, das eine α -helicale Konformation annimmt, welche in Übereinstimmung mit der berichteten Struktur steht.^[45] In den salzhaltigen Medien zeigen die CD-Spektren von BSA die gleichen allgemeinen Merkmale wie im Falle des reinen Puffers, was darauf hindeutet, dass die Sekundärstruktur des Proteins auch in Gegenwart hoher Konzentrationen dieser für den Mars relevanten Salze erhalten zu bleiben scheint. Das gleiche Ergebnis ergab sich bei den Messungen, die bei 5 und 15 °C durchgeführt wurden. Die beobachteten Unterschiede in den Bindungsaffinitäten und Stöchiometrie scheinen also nicht auf eine Konformationsänderung der Proteinstruktur zurückzuführen zu sein. Kleine und lokal begrenzte Änderungen können jedoch a priori nicht ausgeschlossen werden.

4.3 Diskussion^{†††}

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass die Bindung des kleinen aromatischen Liganden ANS an BSA stark von der Art des Salzes, d. h. dem Anion, von der Temperatur und vom Druck abhängt. Bei Umgebungsbedingungen ($T = 25\text{ °C}$ und $p = 1\text{ bar}$) hat das Vorhandensein von 250 mM MgCl_2 und MgSO_4 keinen Einfluss auf die Stöchiometrie und keine wesentlichen Auswirkungen auf die Bindungsstärke des gebildeten Komplexes. Sowohl die Bindungsstöchiometrie als auch K_b sind ähnlich wie die zuvor in reiner Pufferlösung ermittelten Werte (drei ANS-Moleküle werden an ein BSA mit einem $K_b = 4,2 \cdot 10^6\text{ M}^{-1}$ bei 25 °C gebunden).^[20] Umgekehrt jedoch werden durch die Anwesenheit von Perchlorat die Bindungseigenschaften von ANS an BSA gestört. Es sind nur noch zwei ANS-Moleküle an BSA gebunden, und die beiden Bindungsstellen sind durch unterschiedliche Bindungskonstanten gekennzeichnet, d. h. die Gleichwertigkeit der Bindungsstellen ist verloren gegangen. Dieses Phänomen könnte auf die direkte Wechselwirkung des Perchlorat-Anions mit BSA zurückzuführen sein. In der Tat wurde bereits früher über eine Wechselwirkung von Perchlorat-Ionen mit geladenen Resten von Lysozym berichtet.^[79] Ebenfalls wurden auch Informationen über die Wechselwirkung von anderen Anionen mit niedriger Ladungsdichte (wie z. B. Iodid) und BSA veröffentlicht.^[80] Außerdem hat Perchlorat aufgrund seiner geringen Ladungsdichte nahezu hydrophobe Eigenschaften, sodass die Möglichkeit besteht, auch mit hydrophoben Bereichen von Proteinen Wechselwirkungen einzugehen.

BSA ist ein herzförmiges Protein von etwa 66 kDa , das eine hohe Homologie mit dem menschlichen Gegenstück, HSA, aufweist.^[45,81] Seine Struktur besteht aus drei Domänen, von denen sich jede aus zwei Unterdomänen zusammensetzt. Eine an diesem System durchgeführte Docking-Studie ergab zwei potenzielle Bindungsstellen für ANS in der Unterdomäne IIIA und eine weitere in der Unterdomäne IB.^[20] Die beiden Stellen in der Subdomäne IIIA sind im inneren Kern des Proteins vergraben. Im Gegensatz dazu ist die andere Stelle in der stärker lösungsmittel-exponierten Subdomäne IB lokalisiert. Daher ist es möglich, dass Perchlorat leichten Zugang zu der Stelle in der Subdomäne IB erhält, wodurch die Bindung von ANS an diese Stelle vollständig verhindert wird. Die Bindung von

^{†††} Die hier beschriebenen Analysen und Interpretationen entstanden in Kooperation mit Prof. Dr. Charles S. Cockell und Stewart Gault.

Perchlorat kann sowohl durch hydrophobe als auch durch elektrostatische Wechselwirkungen erfolgen. Eine Untersuchung der Kristallstruktur ergab tatsächlich das Vorhandensein mehrerer positiv geladener Reste (Lys, Arg und His), die mit Anionen wie Perchlorat Wechselwirkungen eingehen könnten. Stattdessen sind die beiden Stellen in der Subdomäne IIIA im inneren Kern des Proteins vergraben. In dieser Unterdomäne sind auch einige positiv geladene Reste vorhanden. Der Verlust der Äquivalenz zwischen den beiden verschiedenen Stellen kann höchstwahrscheinlich auf die Wechselwirkung von Perchlorat mit einer der Stellen zurückgeführt werden, die in diesem Fall teilweise verschlossen werden, was zu der beobachteten Abnahme der Bindungsaffinität führt ($K_{b1} = 5,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $K_{b2} = 1,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ bei $T = 25 \text{ °C}$). Eine Senkung der Temperatur bei Umgebungsdruck führt zu einer allgemeinen Abnahme der Bindungskonstante des Liganden. Eine solche Abnahme könnte auf eine Verstärkung der vorübergehenden Wechselwirkungen zwischen den Salzanionen und dem Protein im Bindungsbereich und möglicherweise auch zwischen dem Mg^{2+} -Kation und dem Liganden zurückzuführen sein, wodurch die Aktivität (dessen Koeffizient) des Liganden ANS sinkt. Die Bindung von Anionen wie Chlorid und Perchlorat ist an die Kohlendensäureanhydrase II durch negative Enthalpieänderungen gekennzeichnet^[82], was darauf hinweist, dass eine Senkung der Temperatur den Bindungsprozess begünstigen sollte. Es ist wichtig daran zu erinnern, dass die Bindung von ANS an Proteine hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Der negativ geladene Sulfatanteil von ANS ist in der Lage, elektrostatische Wechselwirkungen mit positiv geladenen Resten des Proteins einzugehen.^[83] Folglich kann das Vorhandensein von gebundenen Anionen die Bindung von ANS teilweise beeinflussen, was zu einer Verringerung der K_b -Werte mit abnehmender Temperatur führt.

Aus der Temperaturabhängigkeit von K_b kann die Enthalpieänderung für den Bindungsprozess mit Hilfe der Van't-Hoff-Beziehung bestimmt werden, wobei davon ausgegangen wird, dass die Enthalpieänderung unabhängig von der Temperatur ist.^[84] Hier zeigte sich, dass die $\ln K_b$ vs. $1/T$ -Plots für alle untersuchten Lösungsbedingungen nicht linear sind (Abbildung 8.6). Die Nichtlinearität könnte auf die Komplexität der Systeme zurückgeführt werden, bei denen mehr als ein ANS-Molekül an BSA gebunden ist, wobei die Bindungsstellen aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung verschiedene Bindungsenthalpien aufweisen. Darüber hinaus ist die kompetitive Bindung durch Salzanionen wie SO_4^{2-} und ClO_4^- ebenfalls temperaturabhängig.

Für den Bindungsprozess von ANS an BSA wurden geringe, aber signifikante Auswirkungen des Drucks beobachtet, wobei die Wirkung sowohl von der Temperatur als auch von der Art des Salzanions abhing. Die Betrachtung von Tabelle 4.2 und Abbildung 4.5 offenbart mehrere interessante Punkte. In Anwesenheit von MgCl_2 ist das Bindungsvolumen ΔV_b bei 25 °C nahe Null, d. h. es gibt keinen Druckeffekt auf die Komplexbildung bei Raumtemperatur (bis zu 2 kbar).

Bei niedrigeren Temperaturen begünstigt der Druck jedoch die Wechselwirkung und erreicht bei $T = 5$ °C einen ΔV_b -Wert von etwa -8 mL mol^{-1} , was einer Erhöhung von K_b um etwa einen Faktor zwei entspricht. Ein ähnliches Verhalten wurde in Gegenwart von $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ beobachtet, für das ein negativer ΔV_b -Wert für beide Bindungsstellen bei 5 °C gefunden wurde. Negative ΔV_b -Werte bedeuten, dass das partielle molare Volumen des komplexierten Zustands (V_{PL}) kleiner ist als das partielle molare Volumen des nicht komplexierten Zustands ($V_P + V_L$). Ein möglicher Grund für ein solch negatives Bindungsvolumen könnte die dichte Packung und eine Abnahme des Hohlraumvolumens in der Bindungsstelle nach der Ligandenbindung sein, die bei niedrigen Temperaturen, bei denen die Dynamik der Oberflächengruppen des Proteins vermutlich geringer ist, stärker ausgeprägt sein dürfte. Nach der Ligandenbindung könnte es in einem Szenario mit induzierter Anpassung zu einer Verengung der internen atomaren Packung des Proteinmoleküls kommen, was zu einer Verringerung der Volumenschwankungen des Proteins und damit zu einer Verringerung des partiellen Molvolumens des Proteins führt. Eine mögliche Ursache für einen positiven ΔV_b -Wert ist höchstwahrscheinlich eine Änderung der Hydratation der Proteinbindungsstelle und/oder des/der Liganden. Da das Hydratationswasser von Proteinen im Allgemeinen eine geringfügig höhere Dichte als das Volumenwasser hat,^[24] führt die Dehydratation zu einer geringen Volumenvergrößerung des Systems, wobei der Effekt bei niedrigen Temperaturen stärker ausgeprägt ist. In Lösungen mit hoher Ionenstärke, in denen große elektrostriktive Effekte in der Bulk-Lösung vorherrschen, insbesondere in Gegenwart von kleinen Kationen und Anionen mit hoher Ladungsdichte, könnte ein solcher Effekt jedoch weniger ausgeprägt sein oder sich sogar umkehren. Positive ΔV_b -Werte könnten auch auf die Schaffung von Hohlraumvolumen bei der Ligandenbindung zurückzuführen sein, wenn z. B. die Bindungsstelle teilweise durch Salzionen blockiert wird, was bei niedrigen Temperaturen für das Sulfatanion der Fall sein könnte. Außerdem könnte die Stärke der Bindung der Anionen an das Protein auch druckabhängig sein. Die Anwendung von hohem Druck könnte die Bindung der Salzanionen an die Proteine durch Schwächung der elektrostatischen

Wechselwirkungen ungünstig beeinflussen, welche eine Verstärkung der Wechselwirkung zwischen dem Liganden ANS und BSA ermöglichen würde und so zu einer Erhöhung von K_b führt.

4.4 Zusammenfassung & Fazit

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Bindung zwischen dem Liganden ANS und dem Protein BSA sowohl von der Temperatur, als auch von der Art des Salzes und in geringerem Maße vom Druck abhängig ist. Unter Umgebungsbedingungen wird eine signifikante Abnahme der Bindungskonstante nur in Gegenwart hoher Perchloratkonzentrationen beobachtet. Interessanterweise begünstigen ein Anstieg des Drucks und ein Rückgang der Temperatur den Bindungsprozess des Liganden, was zu einem negativen Bindungsvolumen führt.

Neben der Erweiterung unseres allgemeinen Verständnisses darüber, wie Ionen die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Liganden bei nicht standardmäßigen Temperaturen und Drücken beeinflussen, lag der Fokus unserer Arbeit speziell auf den Ionen, die auf dem Mars vorkommen. Ziel war herausfinden, ob die vergangene wasserreichere Umgebung und der potenziell flüssige, wasserreichere Untergrund des Mars theoretisch Bedingungen bieten könnten, die die Entstehung von Leben erlauben. Insbesondere stellt sich die Frage, ob Bedingungen wie hoher Druck und das Vorhandensein von Perchlorat-Ionen eines Planeten für unsere bekannte Biochemie unbewohnbar machen. Wie unsere Daten zeigen, haben Chlorid- und Sulfationen unter einer Reihe von Temperatur- und Druckbedingungen keinen wesentlichen Einfluss auf die Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Das chaotrope Perchlorat-Ion hingegen wirkt sich stärker auf die Protein-Ligand-Bindung aus, hebt sie jedoch nicht vollständig auf. Dies legt nahe, dass die Bedingungen auf dem Mars in Bezug auf Temperatur, Druck und das Vorhandensein von Perchlorat-Ionen Protein-Ligand-Wechselwirkungen der untersuchten Art nicht zwangsläufig ausschließen. Möglicherweise sind jedoch Veränderungen an den Bindungsstellen erforderlich, damit Leben unter solchen geochemischen Bedingungen möglich ist.

Des Weiteren deuten unsere Daten darauf hin, dass Protein-Ligand-Wechselwirkungen bei hohen Konzentrationen von Sulfat-Ionen, die mit Krustenflüssigkeiten im tiefen Untergrund der Erde assoziiert sind, nicht wesentlich verändert werden.

5 Ionen im tiefen Untergrund von Erde, Mars und eisigen Monden: Ihre Auswirkungen in Kombination mit Temperatur und Druck auf die tRNA-Liganden-Bindung

Die umfassende Untersuchung der mechanistischen Aspekte bezüglich der Bildung, Stabilität und Reaktivität biomolekularer Systeme wie Membranen, Nukleinsäuren und Proteine unter extremen Umweltbedingungen, einschließlich hoher hydrostatischer Drücke und hoher Salzkonzentrationen, ist von grundlegender biologischer, astrobiologischer und biotechnologischer Bedeutung.^[14,15,85,86] Im Allgemeinen haben Biopolymere die Fähigkeit, verschiedene Konformationszustände einzunehmen, von denen jeder ein spezifisches Volumen aufweist. Durch den Einfluss von Druck kommt es zu einer Umverteilung dieser Zustände, wobei Konformationen mit geringerem Volumen bevorzugt werden.^[8,10,11,87,88,89] Darüber hinaus können Salzkationen und -anionen durch direkte oder durch Wasser vermittelte Wechselwirkungen die Konformation und die Hydratationseigenschaften von Biomolekülen und damit deren Funktion beeinflussen.^[90] Während die Auswirkungen von Druck auf Membranen und Proteine in den letzten Jahren ausgiebig untersucht wurden, sind die Auswirkungen von Temperatur, Druck und hohen Salzkonzentrationen auf die Konformation und Stabilität von Nukleinsäuren und ihrer Reaktivität, z. B. die Bindung von Liganden, abgesehen von einigen wenigen Arbeiten, wenig erforscht.^[10,88,91,92] Der aus Watson-Crick-Basenpaaren gebildete kanonische DNA-Duplex weist jedoch im Allgemeinen ein negatives partielles Molvolumen auf, was darauf hindeutet, dass die Anwendung von Druck den Duplex stabilisiert.^[89,91,93] Im Gegensatz zur Stabilität von DNA-Duplexen haben sich nicht-kanonische DNA-Strukturen, wie G-Quadruplexe oder i-Motive, als empfindlicher gegenüber Druck erwiesen.^[94] Über die Auswirkungen von Druck auf die Stabilität und Reaktivität von RNA-Strukturen ist viel weniger bekannt. Der RNA-Duplex mit AU-Basenpaaren wird durch Druck leicht destabilisiert, und erhöhter Druck führt auch zu einer Destabilisierung der Bindung an Tetraloop-Rezeptoren.^[95] Studien haben gezeigt, dass die druckbedingten strukturellen Veränderungen in tRNAPhe geringfügig sind, wobei nur etwa 15 % ungepaarte Basen bei Drücken von bis zu 10 kbar (1 GPa) beobachtet wurden.^[96]

In den letzten Jahren hat das Interesse daran zugenommen, wie extreme Bedingungen auf anderen Planeten das Potenzial für das Vorhandensein von Leben beeinflussen könnten.

Selbst wenn es kein Leben gibt, stellt sich die Frage, ob die physikalischen und chemischen Bedingungen, die dort herrschen, die bekannte Biochemie einschränken würden. Dies würde uns grundlegende Erkenntnisse über die Auswirkungen chemischer und physikalischer Extreme auf biochemische Grenzen liefern. Der Untergrund des Mars gilt als potenziell lebensfreundlicher als seine Oberfläche aus zwei Gründen: Zum einen fehlt an der Oberfläche flüssiges Wasser, während im Untergrund möglicherweise Wasserreservoirs in Form von gefrorenem Wasser oder salzhaltigen Lösungen existieren. Zum anderen schützen die Gesteinsschichten im Untergrund besser vor der hohen kosmischen und solaren Strahlung, die an der Oberfläche vorhanden ist.^[97] Es ist jedoch bekannt, dass der Mars örtlich begrenzte Konzentrationen von Salzen aufweist, darunter Chloride^[70], Sulfate^[71] und Perchlorate^[72]. Diese Beobachtungen veranlassen uns zu der Frage, wie sich hohe Konzentrationen dieser Salze in Kombination mit hohem Druck auf grundlegende biochemische Prozesse, wie die molekulare Erkennung, auswirken würden. Diese Erkenntnisse geben uns nicht nur Aufschluss über die Bewohnbarkeit des Mars, sondern haben auch Auswirkungen auf die Bewohnbarkeit des salzigen Hochdruck-Innenraums der Eismonde von Jupiter (z. B. Europa) und Saturn (z. B. Enceladus) sowie einiger Asteroiden wie Ceres, wo Sulfate und Chloride wahrscheinlich vorkommen.^[98] Darüber hinaus können im tiefen Untergrund der Erde hohe Ionenkonzentrationen wie Sulfat- und Chloridionen in Verbindung mit hohem Druck auftreten. Allerdings ist uns sehr wenig darüber bekannt, wie diese Bedingungen die biochemischen Anpassungen beeinflussen, die erforderlich sind, damit das Leben in solchen Extremen bestehen kann. Es bleibt eine offene Frage, welche spezifischen Mechanismen und Anpassungsstrategien von Organismen entwickelt wurden, um unter hohem Druck und in Verbindung mit hohen Ionenkonzentrationen im tiefen Untergrund der Erde zu überleben. Weitere Forschung ist erforderlich, um dieses Thema zu untersuchen und ein umfassenderes Verständnis dafür zu entwickeln, wie das Leben sich diesen extremen Umgebungen anpasst.^[85]

In dieser Studie wurden die Auswirkungen von Temperatur, Ionenkonzentration ein- und zweiwertiger Salze sowie hohem hydrostatischem Druck auf die Ligandenbindungseigenschaften der Transfer-RNA (tRNA) aus *E. coli* untersucht. Transfer-RNAs sind kurze, nicht-kodierende RNA-Moleküle, wobei typische zytoplasmatische tRNAs etwa 70-90 Ribonukleotide lang sind. Sie haben eine L-förmige, kleeblattartige Sekundärstruktur, mit der Anticodon-Region an einem Ende und der CCA-Akzeptorsequenz für die Aminoacyl-tRNA-Synthetase am anderen Ende^[99] Die Tertiärstruktur der tRNA wird

durch Stapelwechselwirkungen und Basenpaarungen innerhalb und zwischen ihren helikalen Stämmen aufrechterhalten, wobei viele der tertiären Basenpaarungswechselwirkungen keine Watson-Crick-Bindungen sind. Ihre Struktur ist in allen Lebensbereichen ,Eukaryonten, Bakterien und Archaeen, weitgehend konserviert. Sie fungieren als Adaptormoleküle, die als Bindeglieder zwischen den mRNAs und den Aminosäuresequenzen der Proteine dienen. In den meisten Fällen wird die Proteinbindung an die tRNA durch drei konservierte Reste vermittelt, einen Arg/Lys-Rest, der eine Salzbrücke zum Phosphodiester-Rückgrat bildet und zwei aromatische Reste, die Stapelwechselwirkungen mit den Nukleobasen erzeugen.^[100] Als Ligand wurde Thioflavin T (ThT; 4-(3,6-Dimethyl-1,3-benzothiazol-3-ium-2-yl)-*N,N*-dimethylanilin-chlorid)) verwendet, eine bekannte Fluoreszenzsonde, die auch dem Nachweis von Amyloidfibrillen dient. Der erhebliche Anstieg der Fluoreszenzemission nach der Bindung ist auf die Einschränkung der Rotation zurückzuführen, wodurch die Planarisierung des Farbstoffmoleküls verstärkt wird. ThT wurde auch als spezifischer Fluoreszenzsensor für den menschlichen telomeren G-Quadruplex verwendet, eine viersträngige Nukleinsäurestruktur, die durch das Stapeln von Hoogsteen-basengepaarten koplanaren Guaninen gebildet wird.^[101] Kürzlich wurde auch gezeigt, dass ThT als RNA-bindende Sonde zur Überwachung des RNA-Stoffwechsels sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verwendet werden kann.^[102] Darüber hinaus hat die Suche nach kleinen Molekülliganden für RNA hauptsächlich positiv geladene und planare Moleküle identifiziert. Diese Moleküle können sich zwischen den Basen der RNA einlagern und daran binden.^[103] Einige kleine, positiv geladene Liganden mit antibakteriellen Eigenschaften (z. B. Tobramycin) können tRNAs binden, was ebenfalls zu erheblichen Konformationsänderungen führt.^[104] Auch andere neutrale aromatische Liganden binden nachweislich an tRNA.^[105] Schließlich sind einige Medikamente mit antioxidativer Wirkung (z. B. Safranal) aromatische Moleküle, die tRNA vor schädlichen Reaktionen schützen können.^[106] Daher wird davon ausgegangen, dass das ThT-Molekül mit einer positiven Ladung und einer aromatischen Ringstruktur ein geeigneter Prototyp-Ligand ist, der viele tRNA-relevante Bindungsmotive widerspiegelt.

5.1 Experimentelles

5.1.1 Probenpräparation

Die Nukleinsäure tRNA aus *E. coli* (mittleres Molekulargewicht von 25 kDa) wurde von Sigma Aldrich Chemicals (Taufkirchen, Deutschland) erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das Fluoreszenzmolekül Thioflavin T (ThT: 4-(3,6-Dimethyl-1,3-benzothiazol-3-ium-2-yl)-*N,N*-dimethylanilinchlorid), die Salze Natriumchlorid (NaCl), Kaliumchlorid (KCl), Magnesiumchlorid (MgCl₂), Magnesiumsulfat (MgSO₄), Magnesiumperchlorat (Mg(ClO₄)₂) und Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl) zur Herstellung der Puffer wurden ebenfalls von Sigma Aldrich Chemicals bezogen. Für alle Puffer- und Probenvorbereitungen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Die konzentrierte Stammlösungen der fluoreszierenden Sonde (ThT) und der Nukleinsäure (tRNA) wurden durch Auflösen des gefriergetrockneten Pulvers in einem druckstabilen Puffer (20 mM Tris-HCl, 40 mM KCl) mit einem pH-Wert von 6,9 hergestellt. Die genauen Konzentrationen wurden spektrophotometrisch mit einem UV-1800-Spektrometer der Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan) bestimmt. Für ThT wurde die Konzentration durch Auswertung der Absorption bei 412 nm unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{(412 \text{ nm})} = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt.^[107] Für die tRNA wurde die Konzentration durch Auswertung der Absorption bei 260 nm bestimmt, wobei berücksichtigt wurde, dass 1 mg Trockensubstanz in 1 mL gelöst 16 A₂₆₀-Einheiten entspricht, wie vom Hersteller angegeben. Die Pufferlösungen, die Salze (NaCl, KCl, MgCl₂, MgSO₄ und Mg(ClO₄)₂) enthalten, wurden durch Auflösen einer entsprechenden Menge Salz im Tris-HCl-Puffer hergestellt.

5.1.2 Steady-State Fluoreszenzspektroskopie

Mittels stationärer Fluoreszenzspektroskopie wurde die Interaktion zwischen Thioflavin T und tRNA untersucht. Eine Reihe von Lösungen mit einer konstanten ThT-Konzentration von 0,5 μM wurde hergestellt, während die tRNA-Konzentration je nach Mediumsbedingungen zwischen 0 und $\approx 70 \mu\text{M}$ variierte. Vor den Messungen wurden die Proben für 15 Minuten bei 900 U/min gemischt. Die Aufzeichnungen der Fluoreszenzemissionsspektren erfolgten mit einem K2-Fluorometer (ISS, Inc., Champaign, IL, USA), wobei die Anregung bei 438 nm lag und die Emission im Bereich von 460 bis

560 nm gemessen wurde. Die Spaltbreite des Anregungs- und Emissionsmonochromators betrug 8 nm. Die Messungen wurden unter Umgebungsdruck mit einer 0,3 cm langen Quarzküvette bei Temperaturen von 5, 15 und 25 °C durchgeführt. Anschließend kontrollierte ein direkt an den Probenhalter angeschlossenes zirkulierendes Wasserbad die Temperatur. Zur Untersuchung des Druckeinflusses wurden ein ISS-Hochdruckzellensystem und zylindrische Quarzküvetten verwendet, um einen Druckbereich von 1 bis 2000 bar abzudecken (Abbildung 3.1). Der Druck wurde mit Hilfe einer Handpumpe reguliert, wobei Wasser als Druckmedium diente. Die Proben wurden in die Küvette gefüllt, mit DuraSeal™-Laborstretchfolie versiegelt und in die Hochdruckzelle platziert. Die Hochdruckexperimente fanden bei einer konstanten Temperatur von 25 °C statt, wobei die Temperatur über ein Wasserumlaufbad, das direkt an die Hochdruckzelle angeschlossen war, stabilisiert wurde. Die Bindungskonstanten (K_b) wurden durch Aufzeichnung eines ΔF -Diagramms in Abhängigkeit der Gesamt tRNA-Konzentration bestimmt. Die experimentellen Daten wurden anhand eines zuvor beschriebenen 1:1-Bindungsmodells (siehe Kapitel 2.2) angepasst.

5.1.3 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Um die Sekundärstruktur der tRNA in den verschiedenen Medien und in Gegenwart von ThT (1 mM) zu untersuchen, wurde die Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) eingesetzt. Die CD-Spektren von 20 μ M tRNA-Lösungen wurden im Bereich von 300 bis 190 nm mit einer 0,1 cm dicken Quarzküvette, in einem Jasco J-715 Spektropolarimeter (Jasco Corporation, Tokio, Japan), aufgenommen. Als Geräteparameter wurde eine Scanrate von 50 nm min⁻¹, einer Antwortzeit von 2 s, und eine Bandbreite von 4 nm verwendet. Schließlich wurde von jeder Probe eine Blindkurve (reiner Puffer oder Kochsalzpuffer in Abwesenheit oder Anwesenheit von ThT) abgezogen.

5.2 Ergebnisse^{†††}

Die Wechselwirkungen von Liganden mit Nukleinsäuren sind für zahlreiche Reaktionen in der biologischen Zelle von zentraler Bedeutung. Wie solche Reaktionen durch raue Umweltbedingungen wie niedrige Temperaturen, hohe Drücke und hohe Konzentrationen zerstörerischer Ionen beeinflusst werden, ist noch weitgehend unbekannt. Um die Rolle der Ionen bei der Erforschung der Bewohnbarkeit extraterrestrischer Umgebungen und des tiefen Erduntergrundes im Hinblick auf grundlegende biochemische Prozesse zu klären, wurde die Wirkung ausgewählter Salze (MgCl_2 , MgSO_4 und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$) und hohen hydrostatischen Drucks (relevant für den Erduntergrund) auf die Komplexbildung zwischen tRNA und dem Liganden ThT untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Mg^{2+} -Salze die Bindungstendenz von ThT an tRNA verringern. Dieser Effekt ist weitgehend auf die Wechselwirkung von ThT mit den Salzanionen zurückzuführen, die zu einer starken Abnahme der Aktivität des Liganden führt. Bei mM-Konzentrationen wird die Bindung jedoch weiterhin begünstigt. Die Ionen verändern die Thermodynamik der Bindung, sodass die Komplexbildung eher entropiegetrieben ist. Bemerkenswert ist, dass der Druck die Ligandenbindung unabhängig von der Art des Salzes begünstigt. Obwohl die Bindungskonstante bei Anwesenheit der Salze verringert ist, schließen die rauen Bedingungen im Untergrund von Erde, Mars und Eismonden nicht unbedingt Nukleinsäure-Ligand-Wechselwirkungen der hier untersuchten Art aus.

5.2.1 Einfluss der Magnesiumsalze auf die Ligandenbindung unter Standardbedingungen

In früheren Studien wurde berichtet, dass ThT die Fähigkeit besitzt, sich an verschiedene Nukleinsäuremoleküle wie G-Quadruplexe, DNAs und RNAs zu binden,^[75,101,102] u. a. auch an die tRNA.^[75] Es wurde festgestellt, dass ThT in der Lage ist, sich an tRNA mit einer Bindungskonstante von $5,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ in Tris-HCl-Puffer in Gegenwart von 40 mM K^+ (pH 7,0) zu binden, wobei eine 1:1-Bindungsstöchiometrie angenommen wird. Um die Auswirkungen von MgCl_2 , MgSO_4 und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ auf die Bindungseigenschaften von ThT an tRNA aufzuzeigen, wurde eine Reihe von Fluoreszenzexperimenten durchgeführt, mit

^{†††} Die hier dargestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Rosario Oliva analysiert.

dem Ziel, die Komplexbildung durch die Bestimmung der Bindungskonstante K_b quantitativ zu erfassen. Zunächst wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen dieser Salze auf die ThT-Bindung untersucht, indem Fluoreszenzemissionsspektren von 0,5 μM ThT mit 100 μM tRNA in Gegenwart der drei Salze in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und 20 mM aufgezeichnet wurden. Die Fluoreszenzemissionsspektren sind in Abbildung 5.1 dargestellt.

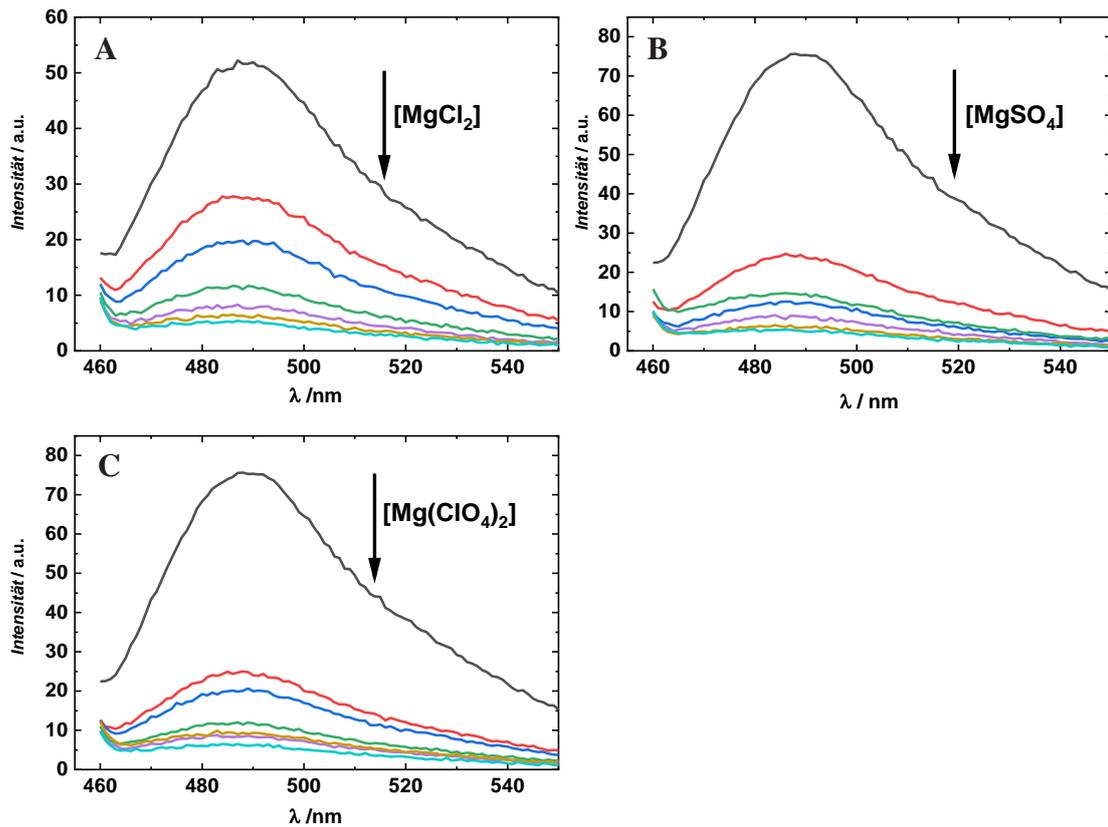


Abbildung 5.1: Fluoreszenzemissionsspektren einer 0,5 μM ThT-Lösung, gemischt mit 100 μM tRNA aus *E. coli* in Gegenwart von (A) MgCl_2 , (B) MgSO_4 und (C) $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Die Pfeile zeigen die Richtung zunehmender Konzentration des Magnesiumsalzes an. Farbcode: schwarz (0 mM Mg-Salz), rot (0,5 mM Mg-Salz), blau (1 mM Mg-Salz), dunkelcyan (2 mM Mg-Salz), magenta (5 mM Mg-Salz), dunkelgelb (10 mM Mg-Salz) und marineblau (20 mM Mg-Salz). Alle Spektren wurden in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9, bei einer Temperatur von 25 $^\circ\text{C}$ und einem Druck von 1 bar aufgenommen. Die Intensität ist in arbitrary units (a.u.) angegeben.

Die ThT-Emission ist durch eine sehr niedrige Quantenausbeute gekennzeichnet, wenn es sich frei in Lösung befindet.^[75] Nach der Bindung an Nukleinsäuren tritt ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute auf, der von der spezifischen Zielstruktur abhängt. Thioflavin T (ThT) kann daher hauptsächlich in gebundener Form fluoreszieren, was das Vorhandensein eines Fluoreszenzsignals als ein Indiz für die Bindung kennzeichnet. Die Spektren in Abbildung 5.1 zeigen, dass die Fluoreszenzintensität des gebundenen ThT mit

zunehmender Salzkonzentration deutlich abnimmt. Eine visuelle Beurteilung der Daten weist auf eine eher schwache Bindung des Liganden an tRNA in Anwesenheit von Magnesiumsalzen hin. Die Reduktion der Intensität hängt jedoch von der Art des Salzes in der Lösung ab. Zum Beispiel beträgt der Abfall der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Spektren ohne Salz bei einer Magnesiumsalzkonzentration von 0,5 mM 47%, 66% bzw. 68 % in Gegenwart von MgCl_2 , MgSO_4 und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$.

Da die Bindung von ThT an tRNA bereits bei niedrigen Konzentrationen durch Magnesiumsalze stark beeinflusst wird, wurden die Bindungskonstanten für die Komplexbildung in Gegenwart von 1 mM Magnesiumsalzen bestimmt. In diesen Experimenten wurde eine Lösung mit einer konstanten ThT-Konzentration (0,5 μM) mit einer Lösung von tRNA titriert, um das Ausmaß der Komplexbildung durch Verfolgung des Anstiegs der Fluoreszenzintensität von ThT bei Zugabe von tRNA zu bestimmen.

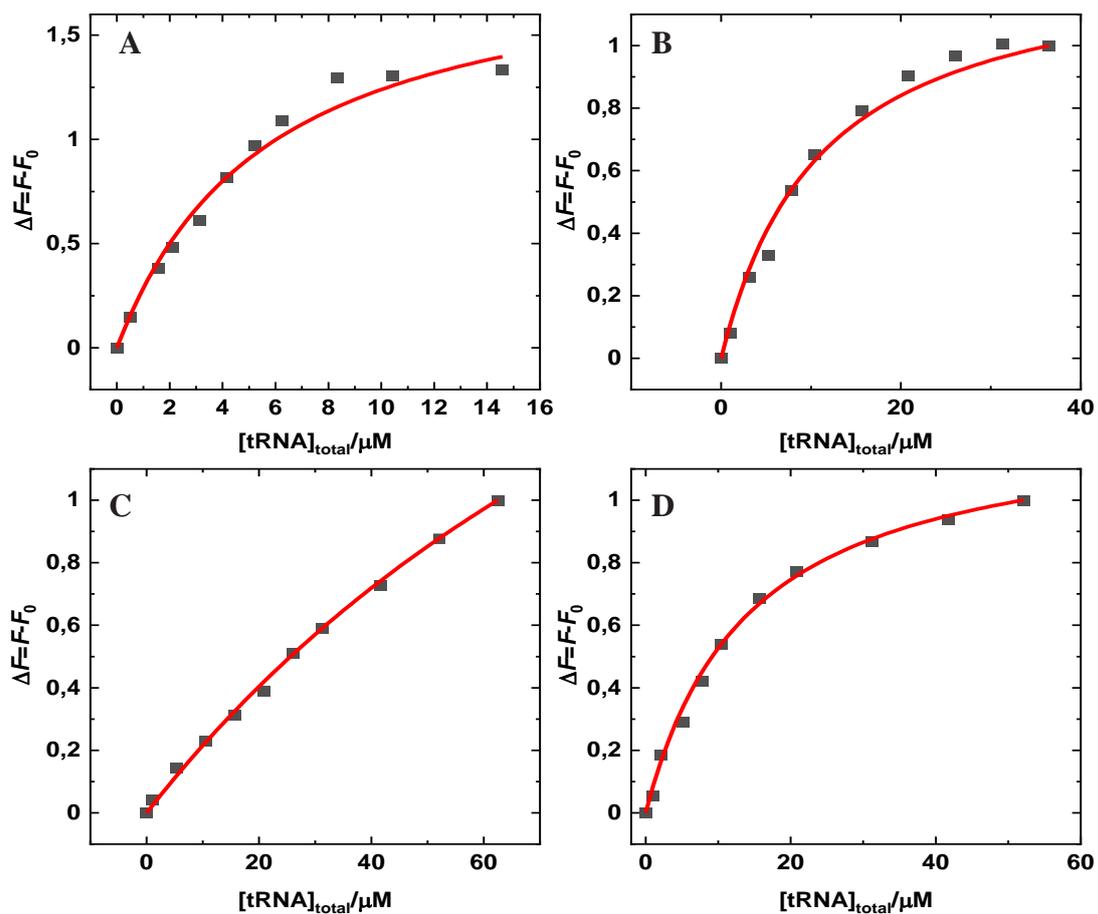


Abbildung 5.2: Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen tRNA und ThT bei einer Temperatur von 25 °C und einem Druck von 1 bar in Abwesenheit (A) und in Gegenwart von 1 mM MgCl_2 (B), MgSO_4 (C) und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (D). Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung an die experimentellen Daten gemäß einem 1:1-Bindungsmodell dar. Die Bindungsisothermen wurden durch Auftragen von $\Delta F = F - F_0$ gegen die Gesamtkonzentration der tRNA ermittelt. Dabei sind F und F_0 die ThT-Fluoreszenzintensitäten in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von tRNA. Alle Experimente wurden in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9 durchgeführt.

Der Wert der Bindungskonstanten kann, wie zuvor beschrieben, durch Anpassung der experimentellen Daten mit einer 1:1-Bindungsmodellgleichung bestimmt werden.^[20] Anschließend wurden die Bindungsisothermen, aus den jeweiligen Messungen die bei Umgebungsbedingungen ($T = 25\text{ °C}$ und $p = 1\text{ bar}$), in Abwesenheit (Abbildung 5.2A) und in Gegenwart von 1 mM MgCl_2 (Abbildung 5.2B), MgSO_4 (Abbildung 5.2C) und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (Abbildung 5.2D) durchgeführt wurden erhalten.

Zum Vergleich ist die in Gegenwart von 150 mM NaCl erhaltene Bindungsisotherme in Abbildung 8.7 dargestellt (siehe Anhang). Die numerischen Werte aller ermittelten Bindungskonstanten sind in Tabelle 5.1 zusammengestellt.

Tabelle 5.1: Bindungskonstanten, K_b , für die Bildung des tRNA-ThT-Komplexes in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9, in Abwesenheit und in Gegenwart der angegebenen Salze bei einer Temperatur von 25 °C.

Lösungsmittelbedingungen	$K_b/10^6\text{M}^{-1}$
Tris-HCl 20 mM, 40 mM KCl, pH 6.9	0.16 ± 0.01
+150 mM NaCl	0.12 ± 0.01
+1 mM MgCl_2	0.078 ± 0.010
+1 mM MgSO_4	0.009 ± 0.002
+1 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$	0.053 ± 0.019

Die Komplexbildung zwischen ThT und tRNA bei reinen Pufferbedingungen ist durch eine Bindungskonstante von $0,16 \cdot 10^6\text{ M}^{-1}$ gekennzeichnet. Überraschenderweise hat die Zugabe von 150 mM NaCl nur einen geringen Einfluss auf den Bindungsprozess. Es wurde lediglich ein geringer Rückgang von K_b im Vergleich zur reinen Pufferbedingung beobachtet. Stattdessen wurde in Gegenwart der Mg-Salze ein deutlicher Rückgang der K_b -Werte beobachtet. In Anwesenheit von MgCl_2 wurde ein Rückgang von K_b auf $0,078 \cdot 10^6\text{ M}^{-1}$ beobachtet, wohingegen in Gegenwart von $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ein etwas niedrigerer K_b -Wert ($0,053 \cdot 10^6\text{ M}^{-1}$) festgestellt wurde. Außerdem wurde in der MgSO_4 -Lösung ein drastischer Rückgang der Bindungskonstante K_b beobachtet, der einen Wert von $K_b = 0,009 \cdot 10^6\text{ M}^{-1}$ erreichte. Dies kann auf die Bindung von Sulfat an ThT zurückgeführt werden kann, was zeigt, dass die Interaktion mit der tRNA behindert wird. Insgesamt unterstreichen diese Daten die Fähigkeit von Mg-Salzen, die Komplexbildung zwischen ThT und tRNA stark zu modulieren, ein Phänomen, das zuvor auch bei Protein-Ligand-Interaktionen beobachtet wurde.^[67]

5.2.2 Bindungsstudie durch druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie

Um mehr Einsicht in den Bindungsprozesses zu erlangen, wurde die druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt. Diese Methode soll Aufschluss über die volumetrischen Veränderungen geben, welche durch den Bindungsvorgang auftreten.^[20] Zu diesem Zweck wurden die Werte der Bindungskonstanten im Druckbereich zwischen 1 und 2000 bar in Abwesenheit und in Anwesenheit der Mg-Salze in einer Konzentration von 1 mM bestimmt. Zum Vergleich wurde das Experiment auch in Gegenwart von 150 mM NaCl durchgeführt (Abbildung 8.8).

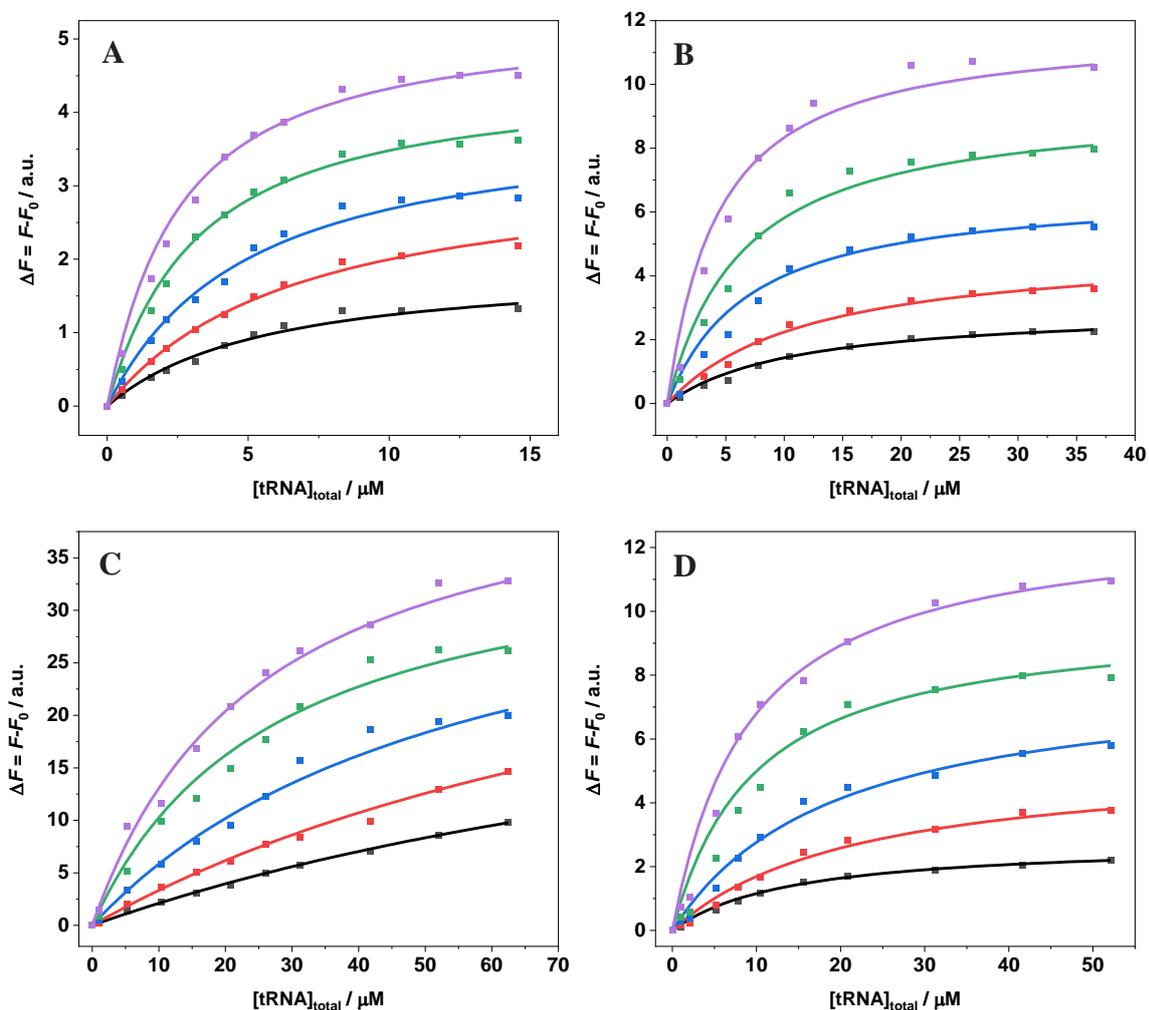


Abbildung 5.3: Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen tRNA und ThT, die bei einer Temperatur von 25 °C in Abwesenheit (A) und in Gegenwart von 1 mM MgCl₂ (B), MgSO₄ (C) und Mg(ClO₄)₂ (D) bei den folgenden Druckwerten erhalten wurden: 1 bar (schwarze Quadrate), 500 bar (rote Kreise), 1000 bar (blaue Dreiecke), 1500 bar (grüne umgekehrte Dreiecke) und 2000 bar (magentafarbene Rauten). Die Konzentration von ThT betrug 0,5 μM. Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung an die experimentellen Daten gemäß einem 1:1-Bindungsmodell dar. Die Bindungsisothermen wurden durch Auftragen von $\Delta F = F - F_0$ gegen die Gesamtkonzentration der tRNA ermittelt. Dabei sind F und F_0 die ThT-Fluoreszenzintensitäten in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von tRNA. Alle Experimente wurden in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 6,9, durchgeführt.

Die jeweiligen Bindungsisothermen für $T = 25\text{ °C}$ und entsprechenden K_b -Werte, die durch das Anpassungsverfahren ermittelt wurden, sind in Tabelle 8.3 (siehe Anhang) und in Abbildung 5.3 dargestellt. Die in Tabelle 5.2 aufgeführten Daten zeigen, dass die Anwendung von Druck in allen Fällen zu einer Erhöhung der Bindungskonstante führt, was bedeutet, dass die Bildung des ThT-tRNA-Komplexes begünstigt wird. Eine Betrachtung von Tabelle 8.3 (siehe Anhang) zeigt, dass die druckbedingte Erhöhung der Bindungskonstanten vom verwendeten Salztyp abhängt. Bei reinen Pufferbedingungen sowie in Gegenwart von NaCl und MgCl₂ wurde eine 3,1-, 3,6- und 3,2-fache Erhöhung von K_b bei einer Druckerhöhung von 2 kbar beobachtet. In Anwesenheit des Sulfatsalzes beträgt der Anstieg von K_b hingegen das 4,3-Fache und in Gegenwart von Perchlorat betrug der Anstieg von K_b dagegen nur das 1,7-Fache.

Aus der Druckabhängigkeit der K_b -Werte lässt sich das Bindungsvolumen, ΔV_b , wie bisher bestimmen.

$$\left(\frac{\partial \ln K_b}{\partial p}\right)_T = -\frac{\Delta V_b}{RT} \quad (6)$$

mit R als die universelle Gaskonstante und T die Temperatur (in K-Einheiten). Das Bindungsvolumen ΔV_b , ist definiert als die Differenz zwischen dem partiellen Molvolumen des gebildeten tRNA-ThT-Komplexes, $V_{komplex}$, und der Summe der partiellen Molvolumina von ThT, V_{ThT} , und tRNA, V_{tRNA} , d. h. $\Delta V_b = V_{komplex} - (V_{tRNA} + V_{ThT})$. Das Bindungsvolumen kann also direkt aus der Steigung des Plots von $\ln K_b$, gegen p bestimmt werden, wobei davon ausgegangen wird, dass die Volumenänderung in dem (hier eher kleinen) Druckbereich unabhängig vom Druck ist. Nach dem Prinzip von Le Châtelier begünstigt der Druck denjenigen Zustand, der das kleinste Volumen einnimmt. Abbildung 5.4 zeigt die Kurven von $\ln K_b$ gegen p für die Experimente, die in Abwesenheit und in Gegenwart von 1 mM MgCl₂, MgSO₄ und Mg(ClO₄)₂ durchgeführt wurden. Zum Vergleich ist auch die entsprechende Kurve für das Experiment in Gegenwart von 150 mM NaCl abgebildet.

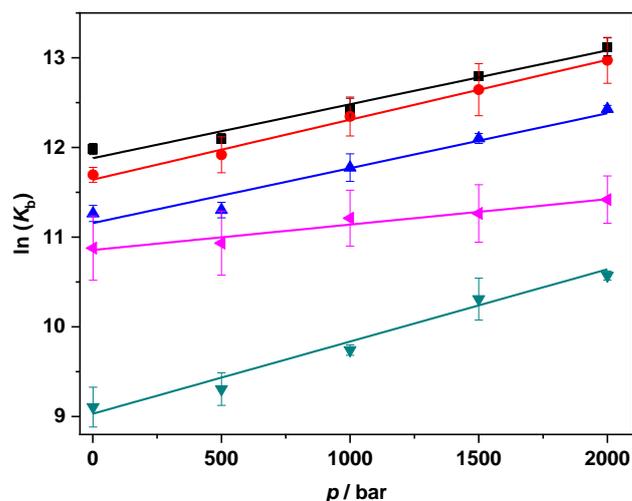


Abbildung 5.4: Darstellung von $\ln K_b$ gegen Druck (p) für die Komplexbildung zwischen tRNA und ThT in Abwesenheit (schwarze Quadrate) und in Gegenwart von 150 mM NaCl (rote Kreise), 1 mM MgCl_2 (blaue Dreiecke), 1 mM MgSO_4 (umgekehrte dunkel-cyanfarbene Dreiecke) und 1 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (gekippte magentafarbene Dreiecke). Alle Experimente wurden in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9 durchgeführt. Die durchgezogenen Linien stellen lineare Anpassungen an die experimentellen Daten dar. Aus den Steigungen von $\ln K_b$ gegen p können die Bindungsvolumina, ΔV_b , bestimmt werden (Gleichung (6)).

Die in Tabelle 5.2 angegebenen Bindungsvolumina sind für alle getesteten Lösungsbedingungen negativ. Ein negatives Bindungsvolumen bedeutet, dass das vom Komplex eingenommene Volumen kleiner ist als die Summe der von tRNA und ThT im ungebundenen Zustand eingenommenen Volumina.

Unter reinen Pufferbedingungen, in Gegenwart von NaCl und MgCl_2 , sind die ΔV_b -Werte recht ähnlich ($\approx -15 \text{ mL mol}^{-1}$). Umgekehrt ist die mit der Komplexbildung einhergehende Volumenänderung ausgeprägter (negativer), wenn MgSO_4 in der Lösung vorhanden ist. Stattdessen wurde für das perchlorathaltige Medium eine geringere Volumenänderung ermittelt ($-7,0 \text{ mL mol}^{-1}$). Zu beachten ist, dass die Struktur des tRNA-Moleküls bis zu dem in dieser Studie verwendeten Maximaldruck druckstabil ist^[96], d. h. die berichteten Volumenänderungen beziehen sich ausschließlich auf den Bindungsprozess. Um schließlich die Thermodynamik der tRNA-ThT-Komplexbildung vollständig zu charakterisieren, wurde auch die Enthalpieänderung bei der Bindung, die Bindungsenthalpie ΔH_b° bestimmt, indem die Änderung der Bindungskonstante mit der Temperatur ausgewertet wurde. Der Temperaturbereich zwischen 5 und 25 °C wurde dafür abdeckt. In Abbildung 5.5 sind die Bindungsisothermen für 5, 15 und 25 °C bei Umgebungsdruck dargestellt.

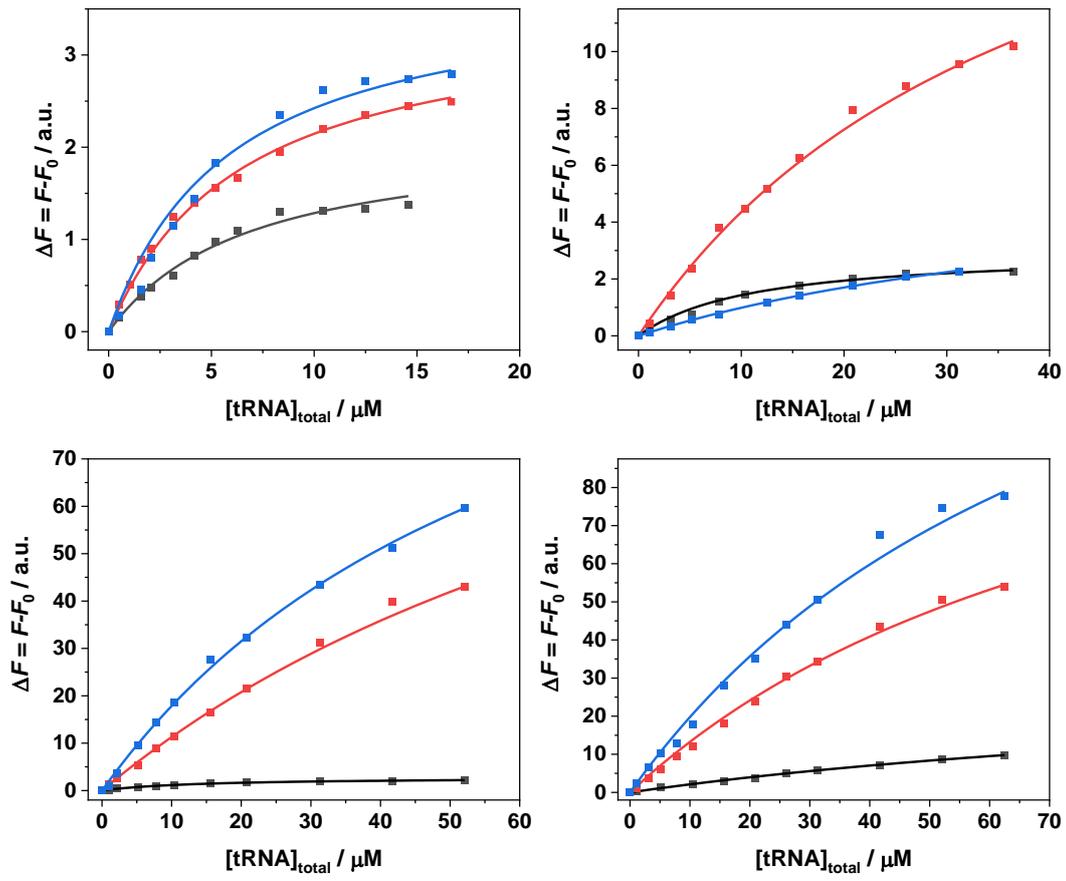


Abbildung 5.5: Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen tRNA und ThT, die bei einem Druck von 1 bar und bei Temperaturen von 25 °C (schwarze Quadrate), 15 °C (rote Quadrate) und 5 °C (blaue Quadrate) in Abwesenheit (A) und in Gegenwart von 1 mM von: MgCl₂ (B), MgSO₄ (C) und Mg(ClO₄)₂ (D). Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung an die experimentellen Daten gemäß einem 1:1-Bindungsmodell dar. Die Bindungsisothermen wurden durch Auftragen von $\Delta F = F - F_0$ gegen die Gesamtkonzentration der tRNA ermittelt. Dabei sind F und F_0 die ThT-Fluoreszenzintensitäten in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von tRNA. Alle Experimente wurden in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9 durchgeführt.

Die Werte der Bindungskonstanten sind in Tabelle 8.4 zusammengefasst. Nach der VAN'T-HOFF-Gleichung ist die Steigung des Plots von $\ln(K_b)$ gegen $1/T$ gleich $-\Delta H_b^\circ/R$, unter der Annahme, dass die Enthalpieänderung unabhängig von der Temperatur ist (eine hinreichende Annahme für diesen kleinen Temperaturbereich):

$$\left[\frac{\partial \ln K_b}{\partial (1/T)} \right]_p = -\frac{\Delta H_b^\circ}{R} \quad (22)$$

Tabelle 5.2: Thermodynamische Parameter für die Bildung des tRNA-ThT-Komplexes in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9, in Abwesenheit und in Gegenwart der angegebenen Salze bei einer Temperatur von 25 °C.

Lösungsmittelbedingungen	$K_b/10^6 \text{ M}^{-1}$	$\Delta G_b^\circ/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H_b^\circ/\text{kJ mol}^{-1}$	$T\Delta S_b^\circ/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta V_b/\text{mL mol}^{-1}$
Tris-HCl 20 mM, 40 mM KCl, pH 6.9	0.16 ± 0.01	-29.7 ± 0.2	-4.1 ± 0.2	25.6 ± 0.2	-14.9 ± 1.3
+150 mM NaCl	0.12 ± 0.01	-29.0 ± 0.2	N.D. *	N.D. *	-16.6 ± 0.8
+1 mM MgCl ₂	0.078 ± 0.007	-27.9 ± 0.2	40.5 ± 2.2	68.4 ± 2.2	-15.2 ± 2.1
+1 mM MgSO ₄	0.009 ± 0.002	-22.6 ± 0.6	14.2 ± 2.0	36.7 ± 2.1	-19.9 ± 1.9
+1 mM Mg(ClO ₄) ₂	0.053 ± 0.019	-27.0 ± 0.9	42.6 ± 6.7	69.6 ± 6.7	-7.0 ± 0.9

*Not determined (Daten sind nicht bestimmt worden)

In Abbildung 5.6 sind die Darstellungen von $\ln(K_b)$ gegen $1/T$ gezeigt, die bei reinen Pufferbedingungen und in Gegenwart von 1 mM MgCl₂, MgSO₄ und Mg(ClO₄)₂ erhalten wurden. Die ΔH_b° -Werte sind in Tabelle 5.2 zusammengestellt.

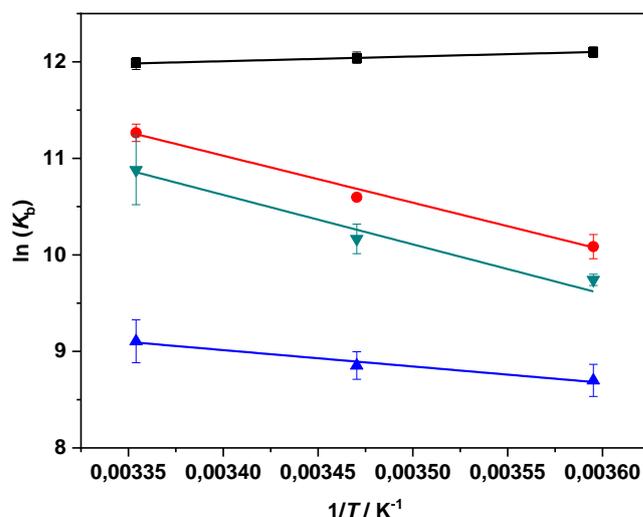


Abbildung 5.6: Darstellungen von $\ln(K_b)$ gegen $1/T$ für die Komplexbildung zwischen tRNA und ThT in Abwesenheit (schwarze Quadrate) und in Gegenwart von: 1 mM MgCl₂ (rote Kreise), 1 mM MgSO₄ (blaue Dreiecke) und 1 mM Mg(ClO₄)₂ (umgekehrte dunkelcyanfarbene Dreiecke). Alle Experimente wurden in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9 durchgeführt. Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung an die experimentellen Daten dar. Die Steigung von $\ln(K_b)$ gegen $1/T$ ist gleich $-\Delta H_b^\circ/R$ (Gleichung (22)) und ermöglicht die Schätzung der Bindungsenthalpieänderung ΔH_b° .

Unsere Datenanalyse zeigt, dass die Enthalpieänderung der Bindung bei der Komplexbildung im reinen Puffer gering und negativ ist. Stattdessen ist ΔH_b° in Gegenwart der Mg-Salze immer positiv, d. h. der Bindungsprozess ist unter diesen Salzbedingungen ein endothermes Ereignis. In Anwesenheit von Chlorid- und Perchlorat-Mg-Salzen wurde ein

Wert von $\approx 40 \text{ kJ mol}^{-1}$ ermittelt. Wenn Sulfat im Medium gelöst ist, ist der ΔH_b° -Wert kleiner ($\approx 14 \text{ kJ mol}^{-1}$), aber noch immer positiv. Aus den bekannten thermodynamischen Beziehungen $\Delta G_b^\circ = -RT \ln K_b$ und $\Delta G_b^\circ = \Delta H_b^\circ - T\Delta S_b^\circ$ können die Standard-Gibbs-Energie der Bindung ΔG_b° , und die Bindungsentropie ΔS_b° , berechnet werden, um eine vollständige Charakterisierung der Energetik der Komplexbildung zu erhalten. Alle thermodynamischen Daten sind in Tabelle 5.2 aufgeführt. Die ΔG_b° -Werte sind in allen untersuchten Fällen sehr ähnlich und negativ, woraus hervorgeht, dass die Komplexbildung in allen Salzlösungen thermodynamisch begünstigt ist. Die $T\Delta S_b^\circ$ -Werte sind in allen Fällen positiv, was höchstwahrscheinlich auf die Freisetzung von Hydratationswasser zurückzuführen ist, welches die interagierenden Partner bei der Bindung umgibt. Dies bedeutet, dass sich die Änderungen von Enthalpie und Entropie weitgehend kompensieren. Die positiven Werte von ΔS_b° und die positiven Werte von ΔH_b° (bzw. die leicht negativen Werte bei reinen Pufferbedingungen) machen die Bildung des tRNA-ThT-Komplexes entropiegetrieben.

5.2.3 Konformationsanalyse durch CD-Spektroskopie

Eine mögliche Ursache für die beobachteten K_b -Änderungen könnte eine Konformationsänderung der tRNA sein, die durch die Anwesenheit der Mg-Salze verursacht wird. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden Zirkulardichroismus-Spektren (CD) der tRNA aufgenommen. Abbildung 5.7 zeigt die CD-Spektren von tRNA in Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9 und in Gegenwart von Mg-Salzen.

Das CD-Spektrum der tRNA unter reinen Pufferbedingungen (ohne Mg-Salze) ist durch eine negative Bande bei 210 nm gekennzeichnet. Zwei weitere Banden sind bei 223 und 235 nm zu sehen und eine starke positive Bande ist bei 265 nm zentriert. Die Intensität der Bande bei 223 nm ist jedoch recht gering. Diese spektralen Merkmale deuten auf eine gefaltete tRNA in der A-Konformation hin.^[105,108] Die relativen Intensitäten der Banden um 210 und 235 nm können zur Unterscheidung zwischen A- und B-Duplexformen verwendet werden,^[109] wobei bei der A-Form die Intensität der Bande bei 210 nm wesentlich höher ist als die Intensität der Bande bei 235 nm. Bei der B-Form ist das Gegenteil zu beobachten.^[110]

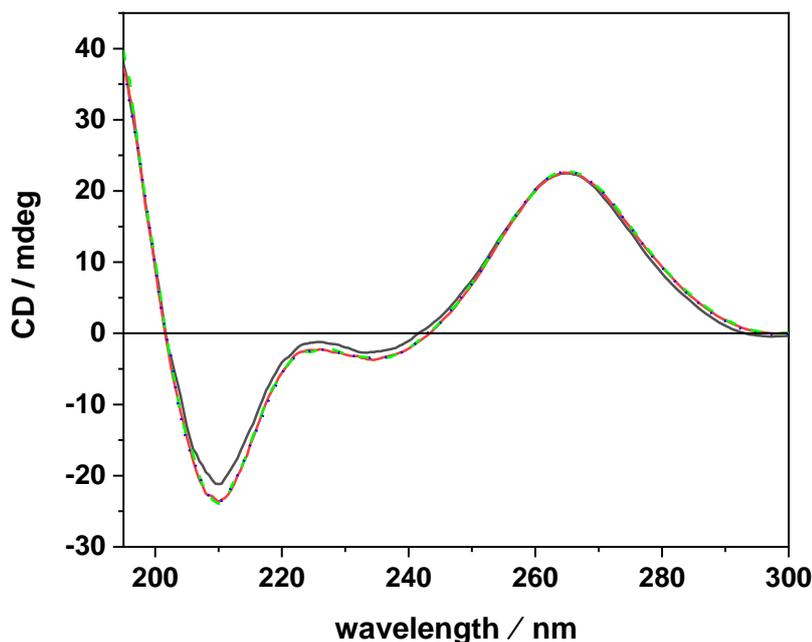


Abbildung 5.7: Zirkulardichroismus-Spektren einer 20 µM tRNA-Lösung in Abwesenheit (schwarzes Spektrum) und in Gegenwart von 1 mM MgCl₂ (rotes Spektrum), MgSO₄ (gepunktetes blaues Spektrum) und Mg(ClO₄)₂ (grün gestricheltes Spektrum). Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von 25 °C in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9, unter Verwendung einer Quarzküvette mit 0,1 cm Schichtdicke durchgeführt.

Die tRNA nimmt also unter reinen Pufferbedingungen, bei denen 40 mM K⁺-Kationen vorhanden sind, eine gefaltete A-Konformation an. Im Allgemeinen werden ein- und zweiwertige Kationen benötigt, um die gefaltete Tertiärstruktur von tRNAs zu stabilisieren.^[96,111,112] Es wurde über eine direkte Wechselwirkung von K⁺-Ionen mit Bindungsstellen an N7- und O6-Atomen von Nukleobasen berichtet.^[113] Mehrere Mg²⁺-Ionen können sich mit hoher Affinität an tRNA binden^[112], wobei sie mit Phosphatgruppen des Nukleinsäuregerüsts interagieren.^[113] Bemerkenswert ist, dass die in dieser Studie verwendete tRNA aus *E. coli* extrahiert wurde. Daher ist davon auszugehen, dass einige Mg²⁺-Kationen bereits an die tRNA gebunden sind, was zur Stabilität der gefalteten Struktur beiträgt, wie aus dem CD-Spektrum in reinem Puffer zu schließen ist. Nach der Zugabe von 1 mM Magnesiumchlorid, -sulfat und -perchlorat wurden keine signifikanten Konformationsänderungen festgestellt, was darauf hindeutet, dass die strukturelle Integrität der A-Form der tRNA auch in Gegenwart der drei verwendeten marrelevanten Salze erhalten bleibt. Im nächsten Schritt wurde die Auswirkungen der ThT-Bindung auf das Konformationsverhalten der tRNA in reinem Puffer und in Anwesenheit der Mg-Salze untersucht. Die entsprechenden CD-Spektren sind in Abbildung 5.8 dargestellt.

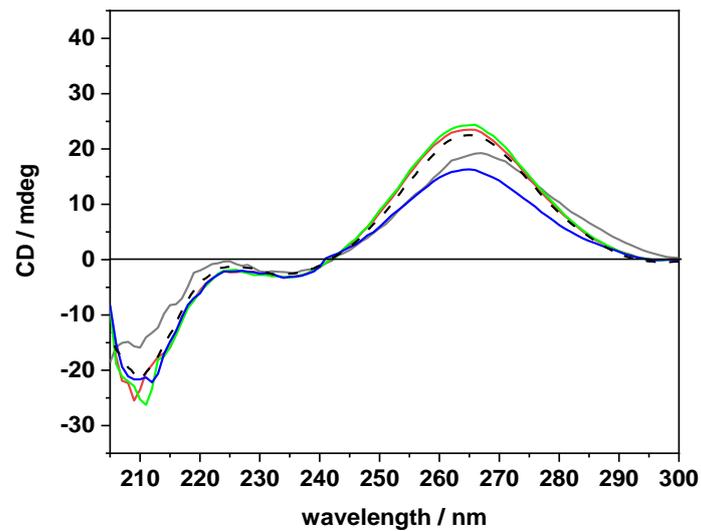


Abbildung 5.8: Zirkulardichroismus-Spektren einer 20 μM tRNA-Lösung in Gegenwart von 1 mM ThT, gelöst in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9, in Abwesenheit (graues Spektrum) und in Gegenwart von 1 mM MgCl_2 (rotes Spektrum), MgSO_4 (blaues Spektrum) und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (grünes Spektrum). Zum Vergleich ist auch das CD-Spektrum von tRNA in reinem Puffer in Abwesenheit von ThT angegeben (gestricheltes schwarzes Spektrum).

Die CD-Spektren von tRNA (20 μM) in Gegenwart von ThT (1 mM) waren qualitativ ähnlich wie die in Abwesenheit des Liganden. Es wurden nur geringe Veränderungen in der Intensität der positiven Bande um 265 nm festgestellt (bitte beachten Sie die Verschiebung dieser Bande in Abwesenheit von Magnesium, die möglicherweise auf eine kleine Konformationsänderung der tRNA-Struktur zurückzuführen ist). Die allgemeinen spektralen Merkmale, d. h. das Vorhandensein der positiven Bande bei 265 nm, der beiden Banden bei etwa 223 und 235 nm und der negativen Bande bei etwa 210 nm, deuten darauf hin, dass die tRNA immer noch in der A-Form gefaltet ist. Daraus lässt sich schließen, dass die native gefaltete Struktur der tRNA nach der ThT-Bindung erhalten bleibt, auch wenn es bei der ThT-Bindung zu einigen kleinen (und lokalen) Konformationsänderungen kommen kann. Folglich können die deutlichen Unterschiede, die in den K_b -Daten beobachtet wurden, nicht auf eine größere Konformationsänderung des tRNA-Moleküls zurückgeführt werden, die durch die Salze und/oder die ThT-Bindung ausgelöst wurden; d. h., es müssen andere Gründe angeführt werden, um diese Ergebnisse zu erklären. (Diese folgen in Abschnitt 5.3.)

5.3 Diskussion^{§§§}

Es ist bekannt, dass verschiedene Salze in tiefen, unterirdischen Umgebungen bei hohem Druck vorkommen, z. B. in der Erde, dem Mars, den Eismonden der Gasriesenplaneten und sogar den Asteroiden wie Ceres. Um festzustellen, wie die mit diesen Salzen assoziierten Ionen grundlegende biochemische Prozesse beeinflussen und somit die Bewohnbarkeit dieser Orte im Hinblick auf die uns bekannte Biochemie bestimmen könnten, wurden die Auswirkungen ausgewählter Salze und hohen hydrostatischen Drucks auf die Komplexbildung zwischen tRNA und dem Liganden ThT untersucht. Zu den verwendeten Salzen gehörten MgCl_2 , MgSO_4 und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Es zeigte sich, dass Mg-Salze die Bindung von ThT an tRNA bereits bei niedrigen Konzentrationen und in Abhängigkeit vom Salztyp stark modulieren (Abbildung 5.1 und Tabelle 5.1). Bereits bei einer Konzentration von 1 mM Mg^{2+} -Salz wurde ein signifikanter Rückgang der Bindungskonstante im Vergleich zu reinen Pufferbedingungen beobachtet. Dieser Rückgang könnte auf einen Debye-Hückel-Effekt zurückzuführen sein, der durch die Anwesenheit der Salze verursacht wird, zumal ThT positiv geladen ist und es sich bei tRNA um ein Polyanion handelt. Die Salzkonzentration ist jedoch recht niedrig und die bei 150 mM NaCl durchgeführten Kontrollexperimente zeigen eindeutig, dass dies nicht der Fall ist. Daher muss eine direkte Bindung der Magnesiumsalze für die Beeinflussung des Bindungsprozesses verantwortlich sein. Es ist bekannt, dass Mg^{2+} stark elektrostatisch an Nukleinsäuren wie tRNA binden kann^[112] und auf diese Weise die Bindung des positiv geladenen ThT behindert. Die unterschiedlichen K_b -Werte der Mg^{2+} -Salze deuten darauf hin, dass auch ihre Anionen eine wichtige Rolle spielen müssen. Eine Schlüsselrolle bei der Modulation der Bindungseigenschaften von ThT an tRNA spielen also die Anionen, d. h. Cl^- , SO_4^{2-} und ClO_4^- , in Verbindung mit Mg^{2+} . Da ThT bei neutralem pH-Wert ein positiv geladenes Molekül ist, kann davon ausgegangen werden, dass Wechselwirkungen der Anionen mit dem Liganden, die die Aktivität des Liganden verringern, ebenfalls zu der beobachteten Abnahme von K_b beitragen. Aus den Daten in Tabelle 5.1 geht hervor, dass die Bindungsaffinität von ThT für tRNA in Gegenwart von Mg^{2+} -Salzen der Reihenfolge: $\text{Cl}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SO}_4^{2-}$ folgt, was auf eine zunehmende Affinität des Anions für den Liganden in dieser Reihenfolge

^{§§§} Die hier beschriebenen Analysen und Interpretationen entstanden in Kooperation mit Prof. Dr. Charles S. Cockell und Stewart Gault.

hinweist. Das Sulfat ist ein zweiwertiges Anion, das durch eine hohe negative Oberflächenladungsdichte gekennzeichnet ist.^[114] Folglich ist eine ausgeprägte Bindung des Anions an ThT zu erwarten. Das Perchlorat-Anion hat eine geringere Ladungsdichte und einen leicht hydrophoben Charakter, wodurch es in dieser Reihenfolge der Anionen einen Zwischenplatz einnimmt.

Bei reinen Pufferbedingungen wurde eine leicht negative Bindungsenthalpie ΔH_b° ermittelt, die mit einer positiven Bindungsentropie, ΔS_b° , verbunden war (Tabelle 5.2). Der negative ΔH_b° -Wert ist wahrscheinlich auf die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen ThT und tRNA zurückzuführen, die sowohl elektrostatische (mit Phosphatgruppen) als auch hydrophobe (Stapelung mit Nukleobasen) Wechselwirkungen hervorrufen. Das positive ΔS_b° kann auf die Freisetzung von Hydratationswasser zurückgeführt werden, das die interagierenden Partner umgibt.^[5] Umgekehrt ist ΔH_b° in Gegenwart von Mg^{2+} -Salzen immer positiv, was darauf hinweist, dass einige schwache Bindungen während der Komplexbildung gebrochen werden. Ein solcher Effekt könnte auf eine Kombination mehrerer Faktoren zurückzuführen sein: die Dissoziation von zuvor an ThT gebundenen Anionen, die Freisetzung von tRNA-gebundenem Mg^{2+} , das die Bindungsstelle besetzt, und Hydratationsänderungen, die diese Prozesse vor der Bindung von ThT an tRNA begleiten, was mit einer (teilweisen) Desolvatisierung der interagierenden Partner verbunden ist.

Mit Hilfe der HHP-Fluoreszenzspektroskopie war es möglich, eine volumetrische Analyse der Komplexbildung durchzuführen (Tabelle 5.2). Es zeigte sich, dass das Bindungsvolumen ΔV_b bei allen untersuchten Lösungsbedingungen negativ ist, was bedeutet, dass der Komplex ein kleineres Volumen als der unkomplexierte Zustand einnimmt. Dies bedeutet, dass die Anwendung von Druck die Bildung des Komplexes begünstigt. Außerdem wurden nur sehr geringe Volumenänderungen beobachtet, welche die Größenordnung von nur einem H_2O -Molekül ($V_{H_2O} = 18 \text{ mL mol}^{-1}$) einnehmen. Je nach Salztyp erhöhte sich die Bindungskonstante K_b bei einem Druck von bis zu 2 kbar um einen Faktor von 2 bis 4 (Tabelle 8.4). Die negativen Bindungsvolumina könnten auf eine geringfügige Abnahme des Porenvolumens bei der Bindung von ThT an tRNA beruhen, was auf eine Verringerung der Volumenfluktuationen des Makromoleküls bei der Bindung zurückgeführt werden könnte, wodurch die interne atomare Packung der tRNA größer wird. Ein weiterer kleiner Beitrag zur Verringerung von ΔV_b könnte vom Liganden ThT selbst stammen, da seine konformationellen Freiheitsgrade bei der Bindung abnehmen (durch Blockierung der Rotation der beiden aromatischen Ebenen von ThT, die durch eine

Einfachbindung verbunden sind). Die Bildung von Komplexen zwischen zwei interagierenden Partnern geht im Allgemeinen mit einer (teilweisen) Dehydratisierung einher.^[5] Dies steht im Einklang mit einem entsprechenden positiven Wert von ΔS_b° , der in der Tat beobachtet wurde. Im Allgemeinen nimmt Wasser, das an polare und geladene Gruppen gebunden ist (z. B. an Phosphate in Nukleinsäuren), aufgrund von elektrostriktiven Effekten (d. h. der Kontraktion der Hydrathülle um die Biomoleküle mit höheren Dichten als die des Wassers) ein kleineres Volumen als das Wasser in der Bulkphase.^[24] So geht beispielsweise die Entfaltung von G-Quadruplexen mit einer Wasseraufnahme einher, die sich negativ auf die Gesamtänderung des Entfaltungsvolumens auswirkt.^[115] Folglich sollte der Dehydratisierungsprozess bei der Bindung des Liganden an die tRNA durch eine kleine positive Volumenänderung gekennzeichnet sein, die in unserem Fall die zu ΔV_b° beitragenden Packungsfaktoren nicht ausgleichen kann. Variationen von ΔV_b der verschiedenen Mg^{2+} -Salze könnten auf eine Modulation des Hydratationsbeitrags in Gegenwart der verschiedenen Anionen zurückzuführen sein, die die Wasserstruktur durch Elektrostriktion (am stärksten ausgeprägt für SO_4^{2-} und am wenigsten oder sogar umgekehrt für das Chaotrop ClO_4^- ^[114]) in unterschiedlichem Ausmaß bei der Dissoziation vom Liganden nach der Bindung verändern. Dieser Effekt kann auch die Ursache für den weniger ausgeprägten Anstieg der Bindungskonstante bei Druckbeaufschlagung sein, wenn Perchlorat in die Gesamtlösung freigesetzt wird.

Was die astrobiologischen Folgen betrifft, so lassen sich die lokalen Ionenkonzentrationen an einem bestimmten Ort von der lokalen Ablagerung von Ionen und dem Grad der Verdünnung bestimmen. Die Konzentration von Perchloraten variiert auf der Marsoberfläche erheblich. Hecht et al.^[72], die die Perchloratkonzentration in den Marsböden der nördlichen Breiten untersuchten, fanden beispielsweise heraus, dass Sickerwässer 10 mM an gelösten Salzen enthielten, wobei 0,4 bis 0,6 % Perchlorat aus den Proben ausgelaugt wurden. Diese Konzentration ist höher als die 1 mM, bei der eine verminderte Ligandenbindung beobachtet wurde. Die Perchloratkonzentration wäre niedriger, wenn die Ionen in größeren Wassermassen gelöst wären als in der begrenzten Versuchskammer des nasschemischen Labors der Landefähre. Dennoch zeigen die Daten vom Mars, dass die von uns beobachteten Effekte weitgehend mit potenziell relevanten Konzentrationen übereinstimmen.

5.4 Zusammenfassung & Fazit

Diese Studie zeigt, dass die Mg^{2+} -Salze $MgCl_2$, $MgSO_4$ und $Mg(ClO_4)_2$, die auf dem Mars weit verbreitet sind, sowie die $MgCl_2$ - und $MgSO_4$ -Salze, die im Inneren von Eismonden, einigen Asteroiden und im tiefen Untergrund der Erde vorkommen, die Affinität von ThT an tRNA deutlich verringern. Bei mM-Konzentrationen wird die Bindung jedoch weiterhin begünstigt. Diese nachteilige Wirkung ist größtenteils auf die Wechselwirkung von ThT mit den Salzanionen zurückzuführen, die zu einer starken Abnahme der Aktivität des Liganden führt (d. h. zu einer Abnahme seines Aktivitätskoeffizienten). Die thermodynamische Triebkraft ändert sich in Gegenwart der Mg^{2+} -Salze und wird in Gegenwart der Mars-Salze stärker entropisch getrieben. Bemerkenswert ist, dass ein Anstieg des hydrostatischen Drucks die Ligandenbindung unabhängig vom Salztyp begünstigt. Obwohl die Bindungskonstante reduziert ist, schließen die rauen Salz- und Druckbedingungen im tiefen Untergrund planetarer Körper die hier untersuchten Nukleinsäure-Ligand-Wechselwirkungen also nicht unbedingt aus. Die Bindung von kleinen Liganden und Proteinen an andere RNA-Typen (wie rRNA, mRNA und nicht-kanonische Nukleinsäure-Strukturen) sollte ebenfalls untersucht werden, um die Rolle von Sequenz und Konformation bei der Komplexbildung in Gegenwart von auf dem Mars relevanten Salzen zu beurteilen.

6 Tannine im Wein: Einfluss von Alkohol auf die Protein-Liganden-Bindung

Polyphenole sind in der täglichen Ernährung des Menschen weit verbreitet und begegnen ihm beispielsweise beim Verzehr von Schokolade oder beim Trinken von Wein. Das damit einhergehende Gefühl ist weltweit bekannt und dennoch ein geheimnisvolles Phänomen.^[116-118] Die ersten Pharaonen wurden mit Hunderten von Amphoren mit Wein begraben. Später haben die Gallier begonnen, die von den Römern während der Anfangszeit unserer Ära eingeführten Rebsorten an ihr Gebiet anzupassen, darunter die *vitis biturica* in Bordeaux, die als Vorläufer des Cabernet diente, und die *vitis allobroica* in Burgund, aus der später der Pinot Noir, Syrah und Chardonnay hervorgingen. Die Weinherstellung blieb jedoch lange Zeit unreguliert und erforderte die Zugabe von bestimmten Zusätzen wie Harz oder Gewürzen, um eine akzeptable Stabilität des Produkts sicherzustellen. Dies stellte ein ernstes Problem für die Vermarktung dar, wie es beim berühmten "Claret" im 15. Jahrhundert am Hof des englischen Königs auftrat. Zu Beginn des 14. Jahrhunderts begannen die Menschen nämlich, den Wein aus Bordeaux in die nordeuropäischen Länder und insbesondere nach England zu exportieren. Es handelte sich um einen Primeur-Wein, der das ganze Jahr über getrunken wurde, dessen geringe Stabilität jedoch eine Veränderung während des Transports zur Folge hatte. Die Herstellung von Weinen, die über längere Zeit stabil sind, war erst durch die Bemühungen von Napoleon III. und die Entdeckung der Rolle von Hefen bei der alkoholischen Gärung durch Louis Pasteur im Jahr 1866 möglich. In jüngster Zeit hat sich der Ausdruck "französisches Paradoxon" in der Literatur etabliert,^[117,119] um die Resistenz der Menschen im Mittelmeerraum gegenüber Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu erklären. Diese Resistenz wird unter anderem auf die Wirkung von Polyphenolen und ungesättigten Fettsäuren zurückgeführt, die in Rotweinen und in der mediterranen Ernährung reichlich vorhanden sind.

Polyphenole, insbesondere Tannine, die in unserer Nahrung vorkommen, sind aufgrund ihrer nachgewiesenen gesundheitsfördernden Eigenschaften bekannt. Tannine, einschließlich der im Tee enthaltenen Tannine, besitzen antikarzinogene und antimutagene Eigenschaften, die mit ihrer antioxidativen Wirkung und der Hemmung der Bildung von Superoxidradikalen zusammenhängen.^[120] Verschiedene wissenschaftliche Untersuchungen haben gezeigt, dass polyphenolische Verbindungen eine direkte Verbindung zur Vorbeugung von schwerwiegenden Krankheiten wie Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Nephropathie

aufweisen.^[118,121] Darüber hinaus können sie auch dazu beitragen, die toxischen Wirkungen von Schwermetallen wie Blei und Cadmium zu reduzieren.^[122] Die antioxidative Wirkung von phenolischen Verbindungen beruht auf ihren Redox-Eigenschaften, die ihnen die Fähigkeit verleihen, Sauerstoffradikale abzufangen und Wasserstoff zu spenden, um reaktive Sauerstoffspezies zu neutralisieren. Untersuchungen haben auch gezeigt, dass Gerbsäure das Risiko von Haut-, Lungen- und Magentumoren reduzieren kann. Während des Zweiten Weltkriegs wurde Tanninsäure zur Behandlung von Brandverletzungen durch Bomben, Lewisit oder Senfgas eingesetzt, indem sie dazu beitrug, die verletzte Haut zu regenerieren.^[118,120,122]

In den letzten hundert Jahren hat das Verständnis der physikalischen und chemischen Mechanismen zugenommen, die der natürlichen Weinherstellung zugrunde liegen. Es wurde auch ein besseres Verständnis für die Wechselwirkungen der Tannine mit den Geschmacksrezeptoren während der Weinverkostung erreicht^[118]

Bei der Weinverkostung stoßen Polyphenole auf den menschlichen Speichel, welcher meist aus 99 % Wasser, Elektrolyten, Proteinen, Glycolipiden, Kohlenhydraten und einigen Enzymen besteht.^[123] Die Anteile dieser verschiedenen Komponenten variieren von Person zu Person und je nach äußeren Einflüssen.^[124] Speichel wirkt als antimikrobielles Mittel und Schmiermittel und schützt die Mundschleimhaut und die Zähne. Er puffert, hilft bei der Verdauung der Nahrung und ermöglicht es uns, den Geschmack der Speisen zu genießen. In einer Studie über das Proteom des Speichels wurden über 2.500 verschiedene Proteine identifiziert.^[125] Ihre durchschnittliche Konzentration liegt bei ca. 3,5 mg/ml^[126] und kann je nach zirkadianem Rhythmus, Ernährung und von Person zu Person schwanken.

Eine Person, die regelmäßig Rotwein trinkt, ist beispielsweise eher in der Lage, Proteine zu produzieren, die an der Wahrnehmung von Adstringenz beteiligt sind, wie zum Beispiel prolinreiche Proteine (PRP). Die Aufrechterhaltung der ionischen Calciumkonzentration, die antimikrobielle Wirkung und der Schutz des oralen Gewebes vor proteolytischem Abbau sind Funktionen, die von anderen Proteinen wahrgenommen werden^[127]. Bis zu 40 % des Speichelproteoms können aus prolinreichen Proteinen bestehen.^[128] Im Vergleich zu anderen Speichelproteinen sind die basischen PRPs ausschließlich für ihre Schmiereigenschaften bekannt, und es gibt keine anderen bekannten biologischen Funktionen.^[127] Natürliche Weine enthalten zwischen 10 und 15 Volumenprozent Alkohol, d. h. zwischen 80 und 120 g Ethanol pro Liter Wein. Im Vergleich dazu beträgt der Tanningehalt nicht mehr als 5 g/L. Der Einfluss dieser relativ hohen Konzentration an Ethanol, auf das Bindungsverhalten, gilt als noch relativ unerforscht.^[117,129]

In diesem Kapitel wird der Einfluss von Ethanol auf die Bindung von Tanninen an Proteine untersucht. Hierfür wurde das Modell-Protein BSA mittels Hochdruckspektroskopie einer Bindungsstudie unterzogen. Zusätzlich wurden zwei Aminosäuresequenzen analysiert, die als Modell für Speichelproteine (Salivaproteine) dienen und Einblicke in das Bindungsverhalten der Interaktion liefern sollen. Anschließend wurde der Effekt von 10--volumenprozentigem Ethanol auf die Bindung von Tanninen an die Proteine untersucht, um die Ursache der Adstringenz bei der Weinverkostung helfen zu beleuchten. Als charakteristisches Tannin wurde Ellagsäure (EA) verwendet.

6.1 Experimentelles

6.1.1 Probenpräparation

Der für alle Experimente verwendete Tris-HCl-Puffer wurde durch Zugabe von HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und mit einem Spritzenfilter mit einer Trenngrenze von 0,45 µm filtriert. Die Stammlösungen der Proteine BSA IB7-14 und IB9-37 wurden durch Auflösen des lyophilisierten Pulvers in Tris-HCl-Puffer hergestellt. Durch Messung der Absorption bei 280 nm mit einem UV-1800-Spektrometer der Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan) und unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von $43\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ für BSA und $5600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ für Tryptophan von IB7-14 und IB9-37 wurden die genauen Konzentrationen der Proteine bestimmt.^[20,38] Die Stammlösung von Ellagsäure (EA) wurde ebenfalls durch Auflösen des Tannins in einer 0,1M NaOH-Lösung in einem Tris-HCl-Puffer hergestellt, und die Konzentration wurde durch Verdünnen einer kleinen Menge der Stammlösung und Messen der Absorption bei 260 nm unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von $32\,099\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ bestimmt.^[130]

6.1.2 Steady-State-Fluoreszenzspektroskopie

Zur näheren Untersuchung der Wechselwirkungen von Tanninen mit Salivaproteinen, wurden beispielhaft zwei Salivaproteine IB7-14 und IB9-37 ausgewählt (IB7-14: SPPGKPQGPPPQGG und IB9-37 SPPGKPQGPPQGGNQPQGGPPPPGKPQG PPPQGGNR). Das Ausmaß der Komplexbildung zwischen EA und BSA, IB7-14 und IB9-37 wurde mit Hilfe der stationären Fluoreszenzspektroskopie unter Verwendung eines K2-Fluorometers von ISS, Inc. (Champaign, IL, USA) verfolgt. Die Bindungsisothermen

wurden durch Aufzeichnung von EA-Emissionsspektren ermittelt, indem die Lösungen bei 371 nm angeregt und die Emissionsintensitäten im Bereich von 400-550 nm aufgezeichnet wurden. Bei dieser Wellenlänge weisen die Proteine keine Intensitäten auf, sodass die gemessene Intensität allein vom Liganden stammt. Die Spaltbreite der Anregungs- und Emissionsmonochromatoren wurde jeweils auf 8 nm eingestellt. Es wurde eine Reihe von Lösungen mit einer festen EA-Konzentration von ~15 μM hergestellt, und die Konzentration von BSA IB7-14 und IB9-37 wurde zwischen 0 und ~400 μM variiert. Die Bestimmung der Bindungskonstanten (K_b) erfolgte anhand eines Diagramms von $\Delta F = F - F_0$ (wobei F die maximale Fluoreszenzintensität von EA in Anwesenheit von Protein und F_0 die Intensität von EA in Abwesenheit von Protein ist) als Funktion der Gesamtproteinkonzentration. Die erhaltenen Daten wurden alle unter der Annahme einer 1:1-Stöchiometrie analysiert, wie zuvor beschrieben.^[20] Für die druckabhängigen Messungen wurden das Hochdruckzellensystem von ISS verwendet. Die Proben wurden sorgfältig in eine Quarzküvette mit einem Fassungsvermögen von etwa 1 ml pipettiert. Um sie vom Druckmedium abzutrennen, wurde die Küvette mit einer langlebigen Dura-Seal-Folie und einem Gummi-O-Ring luftblasenfrei versiegelt. Der Druck wurde mit einer manuellen Pumpe geregelt, wobei Wasser als druckübertragende Flüssigkeit verwendet wurde. Es wurde ein Druckbereich von 1 bis 2000 bar erforscht.

6.1.3 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopieexperimente wurden im Fern-UV-Bereich (190-260 nm) durchgeführt, um die Sekundärstruktur der Proteine und den Einfluss von Ethanol 10 % Vol. und EA auf diese zu bestimmen. Die CD-Spektren von 15 μM Proteinen und 200 μM EA-Lösung wurden mit einem Jasco J-715 Spektropolarimeter (Jasco Corporation, Tokio, Japan) mit Quarzküvetten von 0,1 cm Weglänge aufgenommen. Die Geräteparameter wurden wie folgt eingestellt: Scanrate von 50 nm min^{-1} , Antwortzeit von 2 s und Bandbreite von 4 nm. Der Hintergrundwert (reiner Puffer oder ethanolhaltiger Puffer) wurde für jede Probe subtrahiert. Die aufgezeichneten Spektren sind das Ergebnis dreier aufeinanderfolgender Akkumulationen und wurden auf ein Mol an Aminosäuren normiert. Der Anteil der von BSA angenommenen α -Helixstruktur wurde durch Berechnung des Helixanteils (f_H) bewertet.^[131]

Es wird angenommen, dass die Elliptizität bei 222 nm, θ_{222} , linear mit dem mittleren Helixgehalt, f_H , zusammenhängt, der anhand des Helix-Spiralen-Modells nach LIFSON-ROIG

berechnet werden kann. Die Umrechnung von θ_{222} in f_H erfordert die Kenntnis der Grundlinienelliptizitäten sowohl der zufälligen Windungen θ_C als auch der vollständigen Helix θ_H :

$$f_H = (\theta_{222} - \theta_C)/(\theta_H - \theta_C) \quad (21)$$

Die Werte von θ_C und θ_H sind temperaturabhängig und werden durch die folgenden Ausdrücke angegeben:

$$\theta_C = 2220 - 53T \quad (22)$$

$$\theta_H = (-44\,000 + 250T)(1 - 3/N_r) \quad (23)$$

wobei T für die Temperatur in °C und N_r für die Kettenlänge in Resten steht.^[131]

6.2 Ergebnisse****

Polyphenole sind seit etwa 6.000 Jahren Teil der menschlichen Kultur. Sie zeichnen sich vor allem durch ihre positiven gesundheitlichen Eigenschaften aus. Außerdem sind sie für die Adstringenz im Mund bekannt, das raue pelzige Gefühl nach einem Schluck Wein.^[132] Dieses Mundgefühl wird durch die Tannine im Wein hervorgerufen. Während die Geschmacksempfindungen höchstwahrscheinlich auf Interaktionen mit den Geschmacksrezeptoren zurückzuführen sind, resultiert die Adstringenz aus der starken Bindung der Tannine an prolinreiche Speichelproteine, die so die Schmierfähigkeit am Gaumen reduzieren.^[117]

6.2.1 Bindungsstudie durch Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie

Die Stärke der Wechselwirkung zwischen Ellagsäure (EA), einem sehr bekannten und gängigem Tannin, und den Proteinen (BSA, IB7-14 und IB9-37) sowie der Einfluss einer alkoholischen Lösung (mit 10 Vol-% Ethanol) auf die Komplexbildung wurde mit Hilfe der stationären Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Lösung konstanter EA-Konzentration mit einer Lösung von Proteinen im Konzentrationsbereich 0-500 μ M titriert. Der Ligand EA ist in Lösung grundsätzlich nicht fluoreszierend.^[133] Bei

**** Die vorliegenden Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Rosario Oliva analysiert.

der Interaktion mit Proteinen kommt es jedoch zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität (siehe Abbildung 8.9, im Anhang, die Spektren von EA bei verschiedenen IB7-14-Konzentrationen, die als Beispiel aufgeführt sind), ein Verhalten, das dem des bekannten Fluorophors ANS sehr ähnlich ist.^[20] Im vorliegenden Fall ist die Fluoreszenzspektroskopie also sehr gut geeignet, um die Bindung zwischen EA und Proteinen nachzuweisen, da die Intensität direkt mit dem Grad der Bindung zusammenhängt. In Abbildung 6.1 sind die Bindungsisothermen in reinem Puffer und in Gegenwart von 10 Vol.-% Ethanol bei Umgebungsbedingungen von $T = 25\text{ °C}$ und $p = 1\text{ bar}$ dargestellt. Zusätzlich sind die nach der Datenanpassung erhaltenen Bindungskonstanten in Tabelle 6.1 aufgeführt.

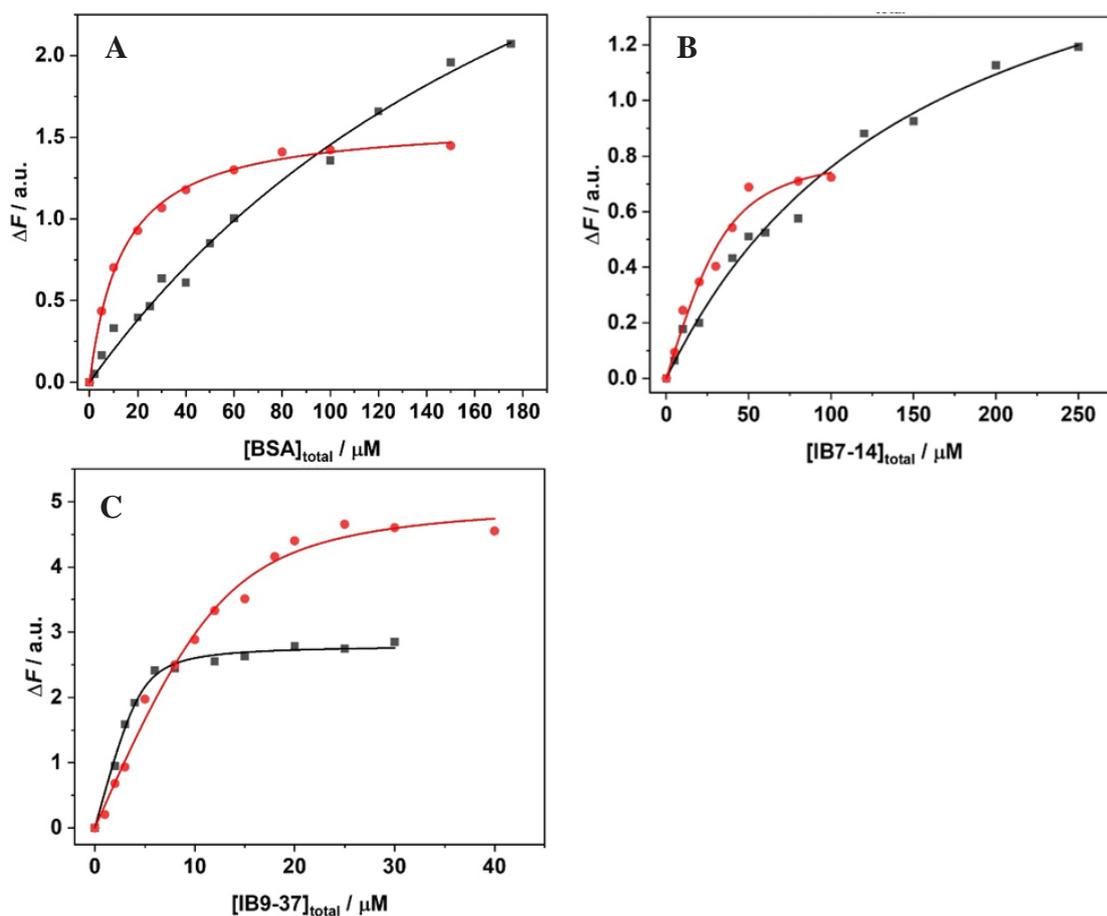


Abbildung 6.1: Mittels Steady-State-Fluoreszenzspektroskopie ermittelte Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen Ellagsäure (EA) und: (A) BSA, (B) IB7-14 und (C) IB9-37 in reinem Puffer (schwarze Quadrate) und in Anwesenheit von 10 Vol.-% Ethanol. Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von 25 °C in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, durchgeführt. Die durchgezogenen Linien sind die beste Anpassung der experimentellen Daten.

Um die Stärke des gebildeten Komplexes, die durch die Bindungskonstante K_b beschrieben wird, zu bewerten, wurden die experimentellen Daten mit einem geeigneten Bindungsmodell angepasst werden. Im vorliegenden Fall konnten die Daten mit Hilfe eines 1:1-Bindungsmodells für die Wechselwirkung von EA mit BSA und IB7-14 gut angepasst. Es

wird also angenommen, dass ein Molekül EA mit einem Molekül Protein interagiert. In der Tat wurden bereits von 1:1-Stöchiometrien für die Komplexbildung EA-BSA berichtet.^[134] Für Speichelproteine wurde ein Bindungsmotiv vorgeschlagen, das aus PQGPP besteht.^[133,134] Da die Sequenz von IB7-14 nur ein solches Motiv besitzt, ist es vernünftig anzunehmen, dass auch in diesem Fall eine 1:1-Bindung vorliegt. Umgekehrt wurde für IB9-37 in reiner Pufferlösung anhand der Daten festgestellt, dass 2 Moleküle EA an ein Molekül Protein binden. In der IB9-37 Sequenz sind zwei PQGPP-Motive vorhanden, was die gefundene Stöchiometrie rechtfertigt. Eine Betrachtung der in Tabelle 6.1 aufgeführten Daten zeigt, dass die Wechselwirkung zwischen EA und Proteinen bei Normaldruck unter reinen Pufferbedingungen recht schwach ist, mit einem K_b in der Größenordnung von 10^3 M^{-1} für BSA und IB7-14. Für IB9-37 hingegen trat eine starke Bindung auf ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$). Aus den Daten in Tabelle 6.1 geht also hervor, dass EA die stärkste Affinität für IB9-37 aufweist, gefolgt von IB7-14 und schließlich BSA.

Tabelle 6.1: Bindungskonstanten (K_b) für die Komplexbildung zwischen Ellagsäure (EA) und den Proteinen BSA, IB7-14 und IB9-37 bei einer Temperatur von 25 °C unter 1 bar.

Tris-HCl, pH 7.4			Tris-HCl, Ethanol 10 Vol.-%, pH 7.4		
System	p / bar	$K_b / \text{M}^{-1} \cdot 10^3$	System	p / bar	$K_b / \text{M}^{-1} \cdot 10^3$
BSA/EA	1	5.54 ± 0.91	BSA/EA	1	142 ± 26
IB7-14/EA	1	6.00 ± 1.14	IB7-14/EA	1	42.6 ± 12.8
*IB9-37/EA	1	1247 ± 940	*IB9-37/EA	1	858 ± 346

*für dieses System ist die Stöchiometrie IB9-37:EA = 1:2

Als nächstes wurden die Auswirkungen der Anwesenheit von Ethanol auf die Komplexbildung untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Bindungsexperimente in Gegenwart von 10 Vol.-% Ethanol durchgeführt, einer typischen Konzentration in Weinen.^[135] Die erhaltenen Bindungsisothermen sind in Abbildung 6.1 dargestellt. Die zugehörigen Werte der Bindungskonstanten sind auf der rechten Seite in Tabelle 6.1 angegeben. Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von Ethanol einen starken Einfluss auf die Komplexbildung zwischen BSA und EA hat. In der Tat wurde ein deutlicher Anstieg der Bindungskonstante K_b (um mehr als eine Größenordnung) festgestellt, was darauf hindeutet, dass Ethanol die Bindung von EA an BSA erheblich verstärkt. Den gleichen Einfluss hatte Ethanol ebenfalls in Kombination mit dem kürzerem Salivaprotein IB7-14, wobei in diesem Fall der Anstieg der Bindungskonstante geringer ausfällt. Umgekehrt scheint Ethanol keine Auswirkungen auf die Bindung zwischen EA und IB9-37 zu haben,

denn der Anstieg von K_b ist recht bescheiden und liegt innerhalb der experimentellen Unsicherheit.

Um weitere Einblicke in die zugrunde liegenden molekularen Faktoren der Komplexbildung zu erhalten, wurden Bindungsexperimente auch unter hohem Druck (bis zu 2000 bar) mit Hilfe der Hochdruck-Fluoreszenzmethode durchgeführt. In Abbildung 6.2 sind die Bindungsisothermen dargestellt, die für die Komplexbildung zwischen BSA und IB7-14 und EA im Druckbereich von 1-2000 bar in reinem Puffer (A und C) und in Gegenwart von Ethanol (B und D) erhalten wurden. Die Bindungskurven unter Hochdruck für die anderen Systeme sind in Abbildung 8.10 wiedergegeben. Die ermittelten Bindungskonstanten K_b als Funktion des Drucks sind in Tabelle 6.2 zusammengestellt.

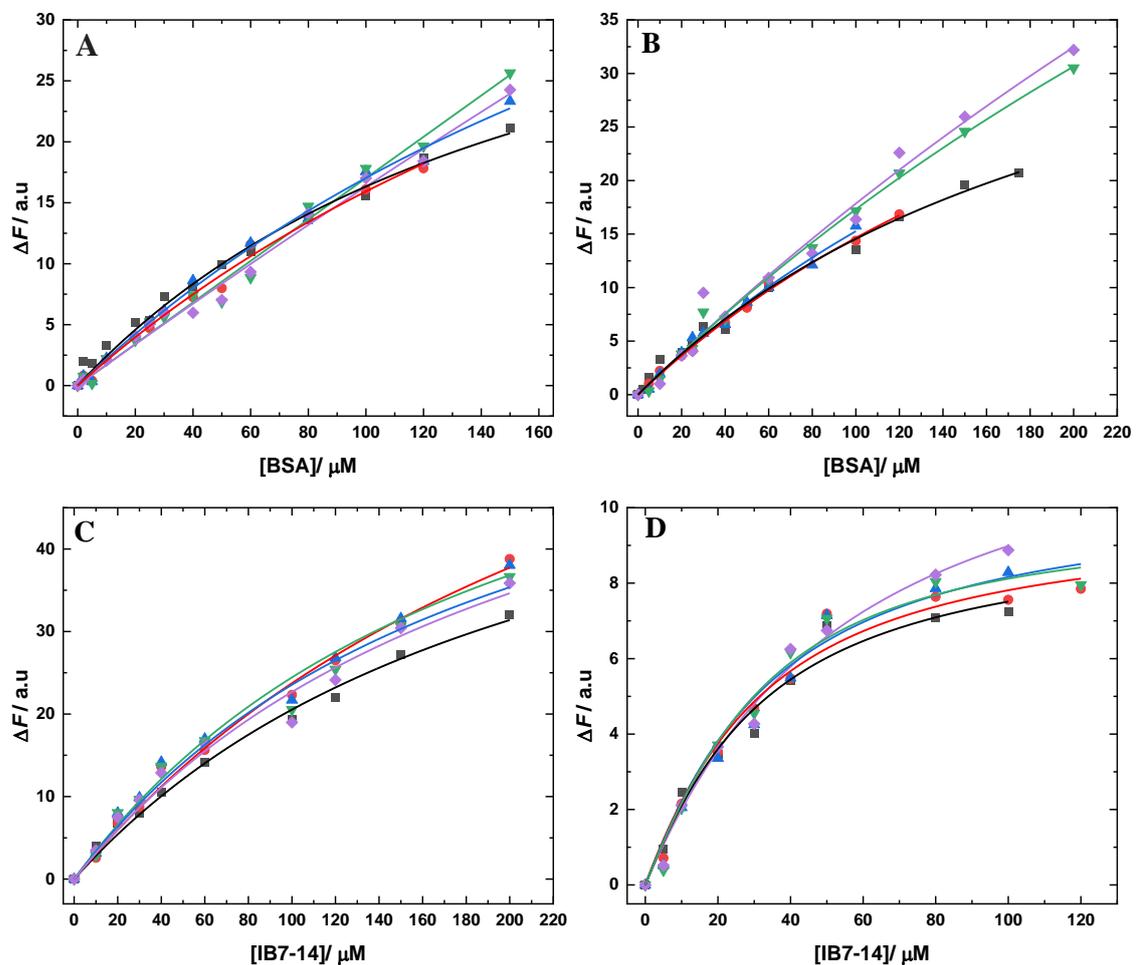


Abbildung 6.2: Mittels HHP-Steady-State-Fluoreszenzspektroskopie ermittelte Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen Ellagsäure und BSA oder IB7-14 in reinen Pufferbedingungen (A oder B) und in Anwesenheit von 10 Vol.-% Ethanol (C oder D) bei Druckwerten von: 1 bar (schwarze Quadrate), 500 bar (rote Kreise), 1000 bar (blaue Dreiecke), 1500 bar (grüne umgekehrte Dreiecke) und 2000 bar (violette Rauten). Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von 25 °C in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, durchgeführt. Die durchgezogenen Linien sind die beste Anpassung der experimentellen Daten gemäß dem 1:1-Bindungsmodell.

Aus Tabelle 6.2 geht hervor, dass bei der Bildung des EA-BSA-Komplexes ein deutlicher Rückgang der K_b -Werte (um nahezu das 7-fache bei 2000 bar im Vergleich zu 1 bar) mit zunehmendem Druck auftrat, d. h., der Druck begünstigt die Komplexbildung nicht. In Gegenwart von Ethanol wurde wiederum eine geringere Abnahme der K_b -Werte mit dem Druck beobachtet, sodass Ethanol die Bindung gegenüber erhöhtem Druck stabilisiert. Ein völlig anderes Szenario wurde für die Komplexbildung zwischen EA und dem Speichelprotein IB7-14 beobachtet: Bei einem Druckanstieg von 1 bar auf 2000 bar scheinen sich die Werte der Bindungskonstante K_b kaum zu ändern. Interessanterweise verliert die Bindung in Anwesenheit von Ethanol unter erhöhtem Druck ihre Stabilität. Der Wert von K_b sinkt im Vergleich zu 1 bar um etwa die Hälfte ab. Auch die Bindung mit dem Salivaprotein IB9-37 scheint keine Druckabhängigkeit aufzuweisen, wobei die Bindungsstärke im Rahmen der Messunsicherheiten in Abhängigkeit des Drucks konstant ist. In Anwesenheit von Ethanol erhöhen sich die Werte der Bindungskonstante mit zunehmendem Druck, d. h. die Komplexbildung wird stärker.

Tabelle 6.2: Bindungskonstanten (K_b) für die Komplexbildung zwischen Ellagsäure (EA) und den Proteinen BSA, IB7-14 und IB9-37 bei einer Temperatur von 25 °C und den angegebenen Drücken (in bar).

Tris-HCl, pH 7.4			Tris-HCl, Ethanol 10 Vol.-%, pH 7.4		
System	p / bar	K_b / $M^{-1} \cdot 10^3$	System	p / bar	K_b / $M^{-1} \cdot 10^3$
BSA/EA	1	5.54 ± 0.91	BSA/EA	1	142 ± 26
	500	3.48 ± 0.15		500	134 ± 15
	1000	3.39 ± 1.01		1000	126 ± 19
	1500	0.82 ± 0.55		1500	76.0 ± 40.7
	2000	0.81 ± 0.33		2000	71.2 ± 21.6
ΔV_b / $mL mol^{-1}$	28.3 ± 8.1		ΔV_b / $mL mol^{-1}$	9.9 ± 2.2	
IB7-14/EA	1	6.00 ± 1.14	IB7-14/EA	1	42.6 ± 12.8
	500	6.21 ± 2.48		500	42.9 ± 9.8
	1000	6.78 ± 1.46		1000	24.2 ± 6.2
	1500	6.81 ± 1.37		1500	24.2 ± 8.0
	2000	6.09 ± 1.20		2000	22.8 ± 4.8
ΔV_b / $mL mol^{-1}$	-0.65 ± 1.02		ΔV_b / $mL mol^{-1}$	9.1 ± 2.6	
*IB9-37/EA	1	1247 ± 940	IB9-37/EA	1	858 ± 346
	500	3302 ± 1543		500	2475 ± 1383
	1000	1042 ± 378		1000	2082 ± 1015
	1500	3087 ± 2114		1500	2408 ± 810
	2000	1142 ± 391		2000	2653 ± 1239
ΔV_b / $mL mol^{-1}$	-3.0 ± 9.8		ΔV_b / $mL mol^{-1}$	-10.2 ± 6.1	

*für dieses System ist die Stöchiometrie IB9-37:EA = 1:2

Wie in den vorangegangenen Studien konnte die Volumenänderung aus der Druckabhängigkeit der Bindungskonstante bestimmt werden. [20,26]

In Abbildung 6.3 sind die Diagramme von $\ln(K_b)$ gegen p für alle untersuchten Systeme dargestellt. Die erhaltenen Bindungsvolumina sind hingegen in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

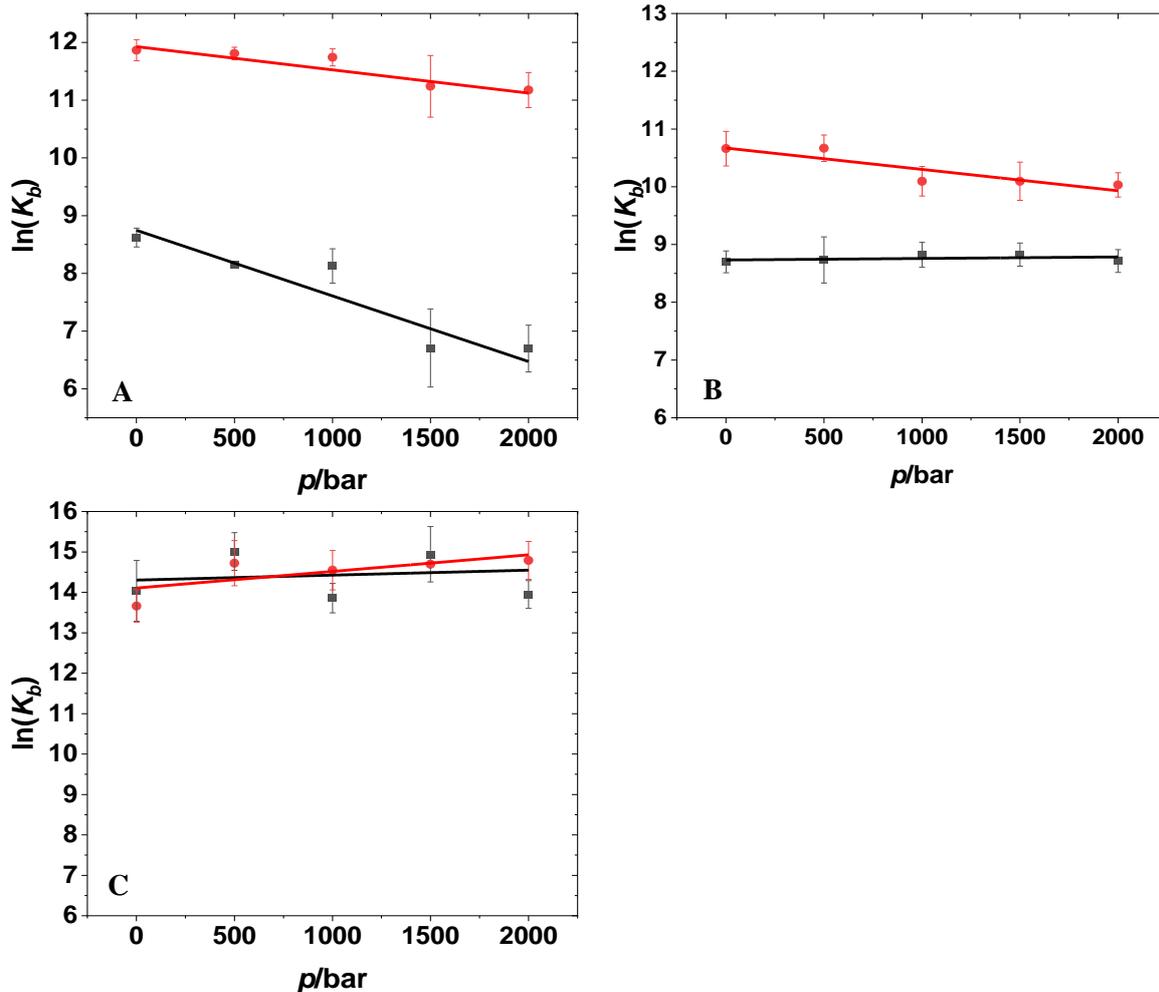


Abbildung 6.3: Darstellung von $\ln(K_b)$ gegen p für die (A) EA-BSA-, (B) EA-IB7 und (C) EA-IB9 Komplexbildung unter reinen Pufferbedingungen (schwarze Quadrate) und in Gegenwart von 10 Vol.-% Ethanol (rote Kreise). Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von 25 °C in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, durchgeführt. Der Wert des Bindungsvolumens (ΔV_b) wurde aus der Steigung der Diagramme bestimmt.

Aus den Daten in Tabelle 6.2 geht hervor, dass das Bindungsvolumen für das Serumproteine BSA in beiden Lösungszuständen positiv ist, was quantitativ unterstreicht, dass der Druck die Komplexbildung nicht begünstigt ($V_{Komplex} > V_{Ligand} + V_{Protein}$). Bemerkenswert ist, dass das Bindungsvolumen für das EA-BSA-System in Ethanollösung halb so groß ist wie das in reinen Pufferbedingungen erhaltene.

Beim IB7-14 Protein ist das ΔV_b unter reinen Pufferbedingungen nahe Null, was bedeutet, dass das partielle Molvolumen des Komplexes sich nicht vom unkomplexierte Zustand unterscheidet und der Druck daher diesen Zustand nicht beeinflusst. In Gegenwart von Ethanol ist das Bindungsvolumen positiv, was unterstreicht, dass der Druck die Komplexbildung nicht begünstigt.

Interessanterweise zeigt das Salivaprotein ein gegensätzliches Verhalten. Genauso wie beim

IB7-14 scheint der Druck die Bindung unter reinen Pufferbedingungen nicht zu beeinflussen, jedoch wird das Bindungsvolumen in Kombination mit Alkohol negativ, was bedeutet, dass die Komplexbildung in Gegenwart von Ethanol begünstigt wird.

6.2.2 Konformationsanalyse durch CD-Spektroskopie

Um mögliche Gründe für die beobachteten Veränderungen des Bindungsverhalten zu finden, wurden Experimente mit Zirkulardichroismus (CD) durchgeführt. CD ist die Technik der Wahl zum Nachweis von Konformationsänderungen in Proteinen, die durch die Lösungsbedingungen und die Bindung von Liganden verursacht werden. In Abbildung 6.4 sind die CD-Spektren von BSA (A), und IB7-14 (B) und IB9-37 (C) in Abwesenheit und in Anwesenheit des Liganden EA sowohl unter reinen Pufferbedingungen als auch nach Zugabe von Ethanol dargestellt.

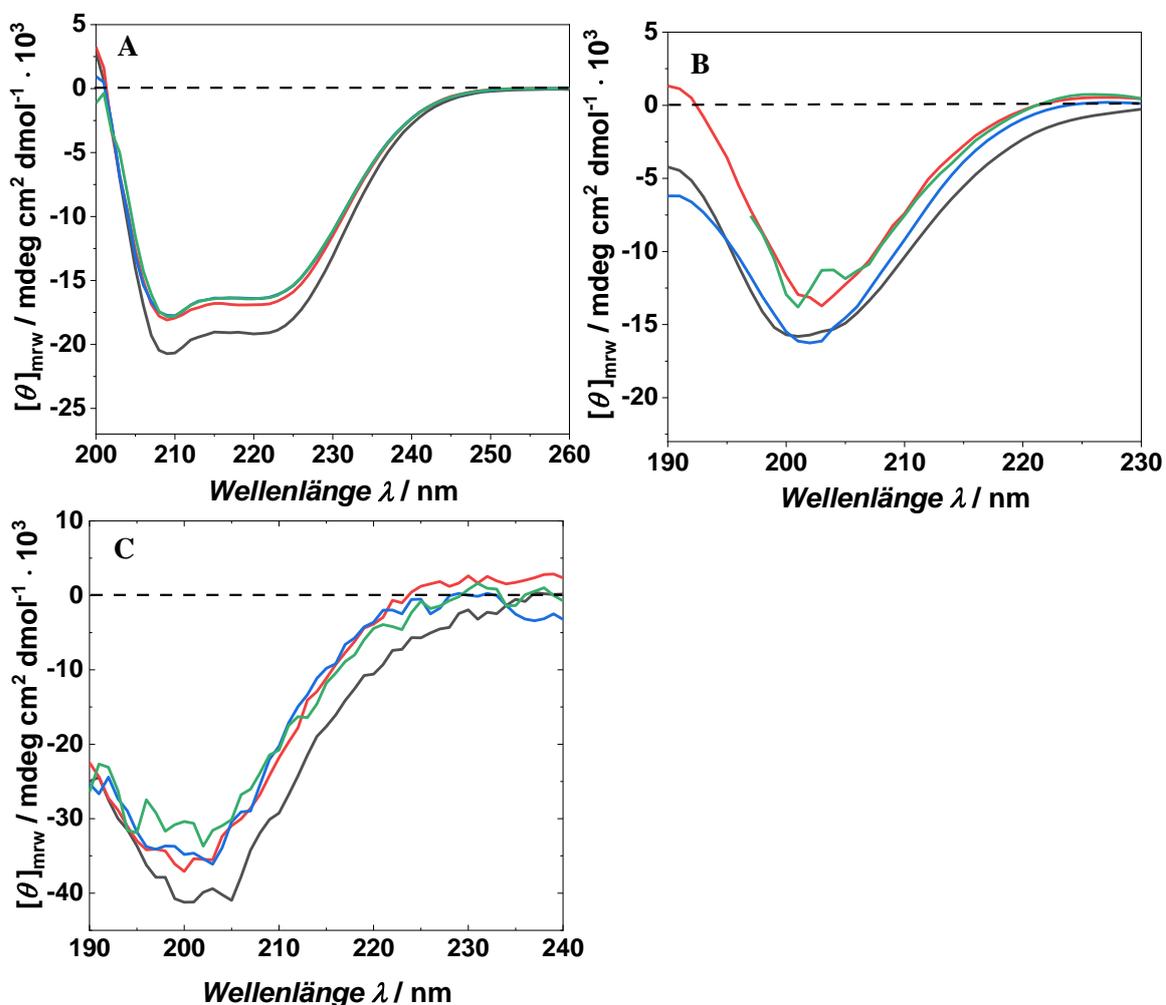


Abbildung 6.4: Zirkulardichroismus (CD)-Spektren von (A) BSA, (B) IB7-14 und (C) IB9-37 unter folgenden Bedingungen: reiner Puffer (schwarze Spektren); mit EA in reinem Puffer (rote Spektren); in Gegenwart von 10 Vol.-% Ethanol (blaue Spektren); mit EA in Gegenwart von 10 Vol.-% (grüne Spektren). Alle Experimente wurden in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, bei einer Temperatur von 25 °C und einem Druck von 1 bar durchgeführt.

Das CD-Spektrum von BSA in reinem Puffer (Tafel A in Abb. 3) ist durch zwei Minima bei ~ 222 nm und ~ 209 nm gekennzeichnet. Eine positive Bande tritt bei 200 nm auf. Diese Merkmale deuten auf ein Protein hin, das hauptsächlich eine α -helikale Struktur aufweist, was im Einklang mit früheren Daten der bereits ermittelten Struktur von BSA steht.^[20] Durch die Zugabe von EA wird die allgemeine Form des Spektrums nicht beeinträchtigt. Die Intensität der beiden negativen Banden nahm jedoch ab. Dies könnte auf eine geringe Konformationsänderung durch die Ligandenbindung zurückzuführen sein, die zu einer Verringerung des Helixanteils führte. In der Tat beträgt der berechnete Helixanteil (f_H) von BSA in Abwesenheit von EA 60 % und in Gegenwart von EA 54 %. Bei Anwesenheit des Alkohols in Lösung wurde ebenfalls eine Verringerung der Spektralintensität beobachtet (im Vergleich zu reinen Pufferbedingungen). Hier liegt der f_H -Wert bei etwa 52 %, was darauf hindeutet, dass Ethanol in dieser Konzentration die Sekundärstruktur des Proteins leicht verändern und möglicherweise ungefaltete Strukturmerkmale erhöhen kann, wie bereits berichtet.^[136] Das kleine Protein IB7-14 zeigte ein völlig anderes Konformationsverhalten als die beiden anderen Proteine. Sein CD-Spektrum (reiner Puffer) hat ein Minimum bei 203 nm. Unterhalb von 200 nm nimmt die Intensität dann zu und bewegt sich in Richtung positiver Werte. Eine weitere schwache Bande befindet sich bei 220 nm. Diese Merkmale könnten auf das Vorhandensein einer Polyprolin II (PP-II)-Helix hinweisen.^[135] Ein Minimum bei etwa 200 nm deutet jedoch auch auf eine Random-Coil-Struktur hin.^[135] Daher scheint es plausibel, dass IB7-14 nicht vollständig in Form einer PP-II-Helix gefaltet ist, wie in einer anderen Studie berichtet wurde.^[135] Nach Zugabe von EA verringerte sich die Intensität des Minimums und verschob sich leicht zu höheren Wellenlängen; die Bande bei 220 nm ist ausgeprägter und unterhalb von 200 nm ist sie positiver. Es scheint also, dass IB7-14 eine geordnetere Struktur annimmt, möglicherweise hat sich der Anteil von PP-II erhöht. In Anwesenheit von Ethanol ist das aufgezeichnete Spektrum qualitativ ähnlich wie das unter reinen Pufferbedingungen, nur die Bande bei 220 nm ist deutlicher, was darauf hindeutet, dass der Anteil an PP-II wahrscheinlich höher ist. Bei Zugabe von EA ist das Spektrum dem in Puffer mit EA aufgenommenen Spektrum sehr ähnlich. Daraus lässt sich schließen, dass EA in beiden Lösungsmitteln kleine Konformationsänderungen von IB7 verursacht und möglicherweise die geordnetere PP-II-Struktur reduziert.

Das Salivaprotein IB9-37 zeigt in reinem Puffer das typische Spektrum einer PP-II-Helix, wobei sich das Minimum bei Anwesenheit von Ethanol und/oder dem Liganden zu kleineren Wellenlängen sowie zu geringeren Intensitäten verschiebt. Die Anwesenheit des Liganden EA oder des Alkohols scheint einen etwa ähnlichen Effekt auf die Konformation des Proteins

zu haben, die von der geordneten Struktur der PP-II-Helix zum ungeordneten random coil übergeht. Den größten Effekt scheint sogar die Kombination von Ligand und Ethanol zu haben. Aus den gegebenen Informationen lässt sich ableiten, dass sowohl EA als auch das verwendete Lösungsmittel dazu führen, dass IB9-37 geringfügige Veränderungen in der Konformation erfährt. Dies könnte möglicherweise die strukturierte PP-II-Konformation stören.

6.2.3 Enthalpiebestimmung mit Hilfe Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC)^{†††}

Ergänzend wurde mit Hilfe von ITC-Messungen die thermodynamische Signatur der Komplexbildung erforscht. Die Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Wechselwirkung ist in der Tat nützlich, um unsere Ergebnisse besser deuten zu können. In Abbildung 6.5 sind die ITC-Spektren dargestellt, die bei der Titration von Proteinen in eine EA-Lösung erhalten wurden, sowohl unter reinen Pufferbedingungen als auch in Gegenwart von Ethanol. Alle thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 6.3 zusammengestellt.

Tabelle 6.3: Thermodynamische Parameter für die Komplexbildung zwischen EA und BSA, IB7-14 und IB9-37 in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 und in Anwesenheit von 10 Vol.-% Ethanol. Die Experimente wurden bei einer Temperatur von 25 °C (298 K) und einem Druck von 1 bar durchgeführt.

System	^a ΔH°_b / kJ mol ⁻¹	$T\Delta S^\circ_b$ / J mol ⁻¹	^b ΔG°_b / kJ mol ⁻¹
BSA-EA buffer	-107 ± 20	-85.6 ± 20.4	-21.4 ± 0.4
+ 10 Vol.-% ethanol	-58.6 ± 6.0	-29.2 ± 6.5	-29.4 ± 0.5
IB7-EA buffer	22.7 ± 6.5	44.3 ± 7.0	-21.6 ± 0.5
+ 10 Vol.-% ethanol	23.4 ± 3.4	49.8 ± 4.1	-26.4 ± 0.7
IB9-EA buffer	1.57 ± 0.35	36.4 ± 2.2	-34.8 ± 1.9
+ 10 Vol.-% ethanol	0.40 ± 0.20	34.3 ± 1.2	-33.9 ± 1.0

^a Normiert pro Mol gebundenes Protein; ^b erhalten aus den in Tabelle 6.1 angegebenen Daten bei $p = 1$ bar.

Da die K_b -Werte recht klein sind, kann die ITC nicht auf die übliche Weise zur Bestimmung der Bindungskonstanten durchgeführt werden.^[137] Die Enthalpieänderung aufgrund der Komplexbildung kann jedoch auf folgende Weise bestimmt werden. Das Kalorimetriegefäß wird mit einem großen Überschuss des Liganden EA gefüllt. In die Spritze werden stattdessen die Proteine gegeben. Dann wird eine kleine Menge der Proteine in das Gefäß injiziert. Unter diesen Bedingungen sollte eine Folge ähnlicher Peaks erhalten werden. Die aufgezeichneten Wärmewerte, normiert auf die Molzahl der gebundenen Proteine, ergeben

^{†††} Die ITC-Experimente und Analysen wurden von Dr. Rosario Oliva durchgeführt.

die Enthalpieänderung für die Komplexbildung, ΔH_b° (in kJ mol^{-1}). Die Menge des gebundenen Proteins kann anhand der in Tabelle 6.1 angegebenen Bindungskonstanten leicht berechnet werden. Die in Tabelle 6.3 aufgeführten Daten zeigen, dass die Änderung der freien Energie zwar bei allen untersuchten Systemen ähnlich ist, die enthalpischen und entropischen Beiträge dazu jedoch unterschiedlich sind und von den Lösungsbedingungen abhängen.

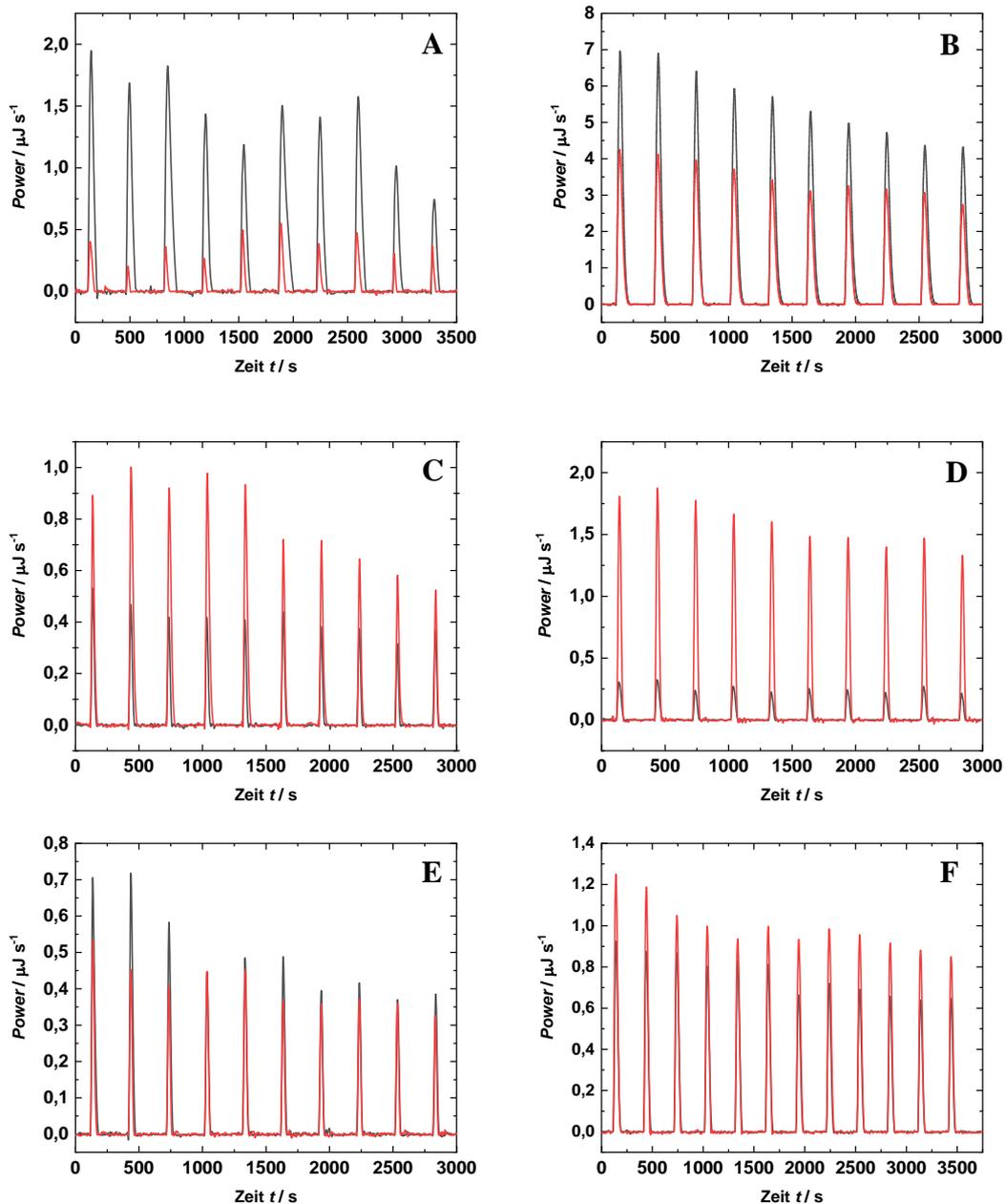


Abbildung 6.5: ITC-Kurven aus der Titration einer Lösung von (A) BSA, (C) IB7-14 und (E) IB9-37 in eine Lösung von Ellagsäure (EA) in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 (schwarze Linien) und unter Zugabe von 10 Vol.-% Ethanol (B),(D) und (F). Die Experimente wurden bei einer Temperatur von 25 °C und einem Druck von 1 bar durchgeführt. Entsprechende Kontrollmessungen für die Verdünnungswärme der Ellagsäure wurden ebenfalls durchgeführt und anschließend subtrahiert (rote Linien).

Im Falle von BSA ist die Enthalpieänderung unter reinen Pufferbedingungen als auch in alkoholischer Lösung negativ, welches auf die Bildung attraktiver nichtkovalenter Wechselwirkungen (wie Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen) zwischen dem Liganden und dem Protein hinweist. Die negative Entropieänderung ΔS_b° bei der Bindung deutet auf eine ausgeprägte Enthalpie-Entropie-Kompensation und einen Verlust an Konformations- und Rotations-/Translationsentropie des Proteins und des Liganden bei der Bindung hin, wodurch der Bindungsprozess letztlich enthalpiegetrieben ist. In Gegenwart von Ethanol ist der enthalpische Beitrag niedriger, was auf einen Verlust an möglichen Interaktionen bei deutet, d. h. dass der Alkohol die Wechselwirkung zwischen dem Liganden und dem Protein schwächt. Interessanterweise ist die Abnahme der Enthalpie mit einer Zunahme der Entropie verbunden, d. h. ΔS_b° wird weniger negativ. Der Entropiegewinn im Vergleich zur reinen Pufferlösung ist möglicherweise auf die Freisetzung von EtOH-Molekülen aus der Proteintasche bei der Bildung des PL-Komplexes zurückzuführen. Aufgrund der Enthalpie-Entropie-Kompensation sind die Änderungen in der Gibbs-Energie der Bindung jedoch gering. Im Falle der Salivaproteine sind sowohl die enthalpischen als auch die entropischen Beiträge positiv, wobei die Gibbsenergien sehr ähnlich sind. Die Erhöhung des K_b -Wertes in Anwesenheit von Ethanol im Falle von IB7-14 ist also im Wesentlichen auf einen Anstieg der Wechselwirkungen zurückzuführen, wobei sich die Thermodynamik des Systems kaum ändert. Sowohl beim IB7-14 als auch beim IB9-37 scheint die Anwesenheit des Ethanol keinen Einfluss zu haben. Interessanterweise wird die Bindung an das längere Salivaprotein allein von der Entropie getrieben, da die Enthalpie ΔH_b° unter beiden Lösungsmittelbedingungen bei etwa Null liegt.

6.3 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Bindung des kleinen aromatischen Polyphenols Ellagsäure (EA) an Serumproteine, BSA und an den Modellspeichelproteinen IB7-14 und IB9-37 untersucht, wobei sowohl spektroskopische als auch kalorimetrische Techniken eingesetzt wurden. Die Experimente wurden unter reinen Pufferbedingungen und in Gegenwart von Ethanol (10 Vol.-%) durchgeführt, was die typischerweise in Weinen vorhandene Alkoholmenge nachahmt.^[117] Es wurden auch druckabhängige Bindungsexperimente durchgeführt, um die volumetrischen Eigenschaften der Komplexbildung zu bewerten. Dieser multitechnische

Ansatz ermöglichte es uns, eine vollständige Beschreibung des Bindungsprozesses zu erhalten und die zugrundeliegenden molekularen Determinanten aufzudecken. Es wurde festgestellt, dass die Bindung von EA an die drei verwendeten Proteine durch unterschiedliche Bindungskonstanten (Stärke) gekennzeichnet ist. Es wurde insbesondere festgestellt, dass sich die K_b -Werte unter Umgebungsbedingungen und in einem reinen Puffer in der folgenden Reihenfolge verhalten: IB9-37>IB7-14>BSA. Dies ist aus mehreren Gründen ein bemerkenswertes Ergebnis. Das IB7-14-Protein besteht nur aus 14 Resten und weist daher keine geordnete dreidimensionale Struktur auf, d. h. es gibt keine klar definierte Bindungstasche, in der EA untergebracht werden kann. Der K_b -Wert liegt jedoch in der gleichen Größenordnung wie der des Serumalbuminproteins. Schließlich weist IB9-37 die stärkste Bindung auf, in einem Größenbereich von $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$, wobei seine Konformation sowohl von Ethanol als auch von dem Liganden EA beeinflusst wird.

Die Bindungsstelle von EA an BSA wurde zuvor durch molekulare Docking-Studien bestimmt.^[133,134] Es wurde festgestellt, dass EA an die Subdomäne IIA von BSA über die Reste Tyr160, Tyr137, Leu115 und His145 über vier Wasserstoffbrückenbindungen gebunden ist. Im Gegensatz dazu wird bei Speichelproteinen wie IB7-14 die Sequenz PQGPP,^[135] die im vorliegenden Fall an den Resten 6-10 lokalisiert ist, als verantwortliches Glied für die Interaktion mit dem Polyphenol angesehen. Genauso beim IB9-37, welches dieses Merkmal an den Resten 6-10,17-21 und 27-31 aufweist. Somit besitzt das längere Salivaprotein viel mehr Bindungsmöglichkeiten, d. h. auch mehr konformationelle Zustände. Bei Anwesenheit von Ethanol in der Lösung wurde eine deutliche Änderung des K_b -Wertes für alle Proteine bis auf IB9-37 festgestellt.

Es wird berichtet, dass Polyphenole, wenn sie in wässriger Lösung dispergiert werden, kolloidale Nanopartikel in Nanometergröße mit einem *cmc*-Wert von 1 bis 5 g L⁻¹ bilden können. Ethanol erhöht die *cmc*-Werte der Polyphenole,^[117] sodass sie eine erhöhte Löslichkeit aufweisen. Als Folge sollte die Bindungsaffinität für Proteine zunehmen,^[117] was die bisherigen Ergebnisse anteilig rechtfertigt. Darüber hinaus liegen die in unseren Experimenten verwendeten EA-Konzentrationen deutlich unter den *cmc*-Werten, was darauf hindeutet, dass der Anteil der EA-Moleküle, die an der Bildung von Nanopartikeln beteiligt sind, vernachlässigbar ist.

Es müssen also andere Erklärungen herangezogen werden, um die berichteten Ergebnisse zu erklären. Die CD-Daten (Abbildung 6.4) zeigen, dass einige Konformationsänderungen von Proteinen sowohl in Gegenwart von Ethanol als auch bei der Bindung an EA auftreten. In der Tat wurde bei BSA nach Zugabe von Ethanol ein deutlicher Rückgang des Helixanteils

beobachtet, der auf eine lokale Entfaltung zurückzuführen ist, was mit früheren Daten übereinstimmt.^[136]

Weiterhin ist bekannt, dass Ethanol einen Übergang der BSA-Konformation von der β -Faltblatt- zur α -Helix-Struktur induziert und die Umwandlung von intramolekularen wasserstoffgebundenen β -Faltblättern in intermolekulare wasserstoffgebundene β -Faltblätter fördert.^[138] Unter reinen Pufferbedingungen hat die Bindung von EA also die gleiche Wirkung wie Ethanol: eine Verringerung der Helixfraktion. Kombiniert man all diese Beobachtungen, scheint es, dass der Anstieg von K_b für die Bildung des EA-BSA-Komplexes in alkoholischer Lösung auf die durch Ethanol induzierte Konformationsänderung zurückzuführen ist, die zu einer offeneren Struktur führen kann. Durch Freilegung der aromatischen Seitenketten wird die EA-Bindung möglicherweise erleichtert^[138] und somit die Interaktion von EA mit den Resten in der Bindungstasche verstärkt.

Um den molekularen Aspekt der Komplexbildung näher zu beleuchten, wurde auch eine volumetrische Analyse durchgeführt. Die Bindungsvolumina sind alle in Tabelle 6.1 aufgeführt. Es wurde festgestellt, dass die ΔV_b -Werte für BSA positiv und relativ klein sind. Ein positives Bindungsvolumen bedeutet, dass der Komplex ein größeres Volumen einnimmt als der unkomplexierte Zustand. Ein $\Delta V_b > 0$ könnte auf eine Vergrößerung des Leervolumens bei der Bindung zurückzuführen sein, was auf eine unvollständige Packung des Liganden in der Bindungstasche hinweist. Das positive Bindungsvolumen könnte auch auf die Freisetzung von Wassermolekülen bei der Bindung zurückgeführt werden. Höchstwahrscheinlich sind beide Einflüsse wirksam, was den beobachteten positiven Wert von ΔV_b erklären würde.

Das Bindungsvolumen für die Komplexbildung von EA-IB7-14 und EA-IB9-37 in reinem Puffer liegt nahe bei Null, $\Delta V_b \approx 0$, was bedeutet, dass unter diesen Lösungsbedingungen die Packung zwischen dem Liganden und den Proteinen nahezu perfekt ist. Dies bestätigt die starke Bindung zwischen Taninen und den Salivaproteinen.

Die Anwesenheit von Ethanol führte bei allen Proteinen bis auf IB9-37, zu kleinen positiven Bindungsvolumina, was ebenfalls auf vergrößerte Hohlvolumina oder eine weniger effiziente Packung des Liganden in der Bindungstasche hinweist. Diese können durch den Einfluss des Ethanols auf die Konformation des Proteins als auch durch Wechselwirkung mit dem Liganden zurückgeführt werden.

Im Fall von IB9-37 führt die Kombination mit Ethanol zu einem negativem Bindungsvolumen, wobei das partielle Molvolumen des Komplexes, im Vergleich zu dem

des unkomplexierten Zustands, geringer ist. Solche negativen Werte lassen sich durch eine geringfügige Verringerung des Hohlraumvolumens bei der Bindung erklären, z. B. durch verringerte Fluktuationen des Proteingerüsts aufgrund der Komplexbildung, was zu einer geringfügigen Verringerung des Gesamtvolumens des Systems führt.^[48]

PRP-Proteine weisen in Ethanol-Wassermischungen eine eher offene hydrophile Seite auf, an die sich Tannine binden und den Liganden umschließen.^[117] Um das Bindungsverhalten und seine treibende Kraft besser zu verstehen, wurden ITC-Experimente durchgeführt, die einen genaueren Einblick in die Thermodynamik der Komplexbildung geben sollen.

Die berichteten ITC-Daten zeigen, dass im Falle von BSA sowohl die Enthalpie- als auch die Entropiewerte bei beiden Lösungsmittelbedingungen negativ sind. Die Anwesenheit von Ethanol führt jedoch zu positiveren Werten, wobei die freie Energie gleichbleibt, was auf eine Enthalpie-Entropie-Kompensation hinweist. Ein positives ΔS_b° kann auf die Abgabe von Wassermolekülen, die Teil der Hydratschale der Bindungsstelle und/oder des Liganden sind, an die Volumenphase hindeuten. Es ist bisher bekannt, dass die Ethanol-Methylgruppe im Gegensatz zu ihrer Hydroxylgruppe sich an oder mehrere hydrophoben Taschen des BSA bindet.^[139] Dies führt meist zu einer Ethanol-induzierten Veränderungen in der Aktivität, was den stark erhöhten K_b -Wert in Anwesenheit des Alkohols für das Serumprotein erklärt. Die erhöhte Enthalpieänderung weist auf einen Verlust an Wechselwirkungen hin. Dies kann durch Verdrängung der mit dem Serumalbumin interagierenden Ethanolmoleküle durch den Liganden zustande kommen, was ebenfalls die erhöhte Entropieänderung erklärt.

Im Fall der Salivaproteine sind die thermodynamischen Beiträge der Enthalpie- und Entropieänderungen positiv. Ein Blick auf Tabelle 6.3 zeigt, dass sich die Entropieänderung also auch die Enthalpieänderung des Systems in Anwesenheit des Alkohols nicht signifikant ändert. Jedoch weist die IB7-14 Bindung im alkoholischen Medium einen um ein Vielfaches höheren K_b -Wert auf. Es ist bekannt, dass Ellagsäure eine erhöhte Löslichkeit in Ethanol aufweist, wodurch der Ligand polarisiert wird und so die Bindung stabilisiert.^[133] Die positive Entropie lässt sich durch Freisetzung des Hydratwassers durch die Bindung erklären.

Interessanterweise zeigt das längere Salivaprotein IB9-37 im Vergleich deutlich variabelere Werte. Sowohl in reinem Puffer als auch in Kombination mit Ethanol ist die Komplexbildung komplett entropiegetrieben, da ΔH_b° einen Wert nahe Null aufweist. Dies weist auf ein darauf hin, dass weder zusätzlich Interaktionen gebildet werden noch verloren gehen. Die positive Entropie ΔS_b° resultiert aus der möglichen Konformationsänderung durch

Störung der PP-II-Konformation. Diese Beobachtung wird ebenfalls durch die CD-Spektren (Abbildung 6.4) gestützt. Unter alkoholischen Lösungsmittelbedingungen weist die Enthalpieänderung einen leicht positiven Wert auf, was bedeuten könnte, dass der Zugang einer der beiden Bindungsmodi beeinträchtigt sein könnte und somit die Entropieänderung leicht erhöht wird.

6.4 Zusammenfassung & Fazit

Zusammenfassend liefert diese Studie wichtige Erkenntnisse über die Bindung von Tanninen an verschiedene Proteine sowie die Auswirkungen von Alkohol auf die Komplexbildung. In dieser Studie wurde die Bindung des kleinen aromatischen Polyphenols Ellagsäure (EA) an verschiedene Proteine wie BSA und den Salivaproteinen IB7-14 bzw. IB9-37 untersucht. Dabei kamen spektroskopische und kalorimetrische Techniken zum Einsatz, um den Bindungsprozess zu analysieren. Die Experimente wurden sowohl unter reinen Pufferbedingungen als auch in Anwesenheit von Ethanol durchgeführt, um die Alkoholkonzentration in Wein nachzuahmen.

Die Ergebnisse zeigten unterschiedliche Bindungsstärken von EA an den untersuchten Proteinen. Das längere Salivaprotein IB9-37 zeigte die stärkste Bindung, gefolgt von IB7-14 und dem Serumprotein BSA.

Die Anwesenheit von Ethanol führte zu einem Anstieg der Bindungskonstante K_b bei den meisten Proteinen. Im Allgemeinen erhöht Ethanol die Löslichkeit von Polyphenolen, wodurch die Liganden für die Proteine zugänglicher werden. Die Bindung von EA führte zu Konformationsänderungen, welche durch den Alkohol stabilisiert wurden.

Volumetrische Analysen ergaben bei BSA positive Werte für ΔV_b° , was auf eine nicht perfekte Packung des Liganden in der Bindungstasche hinweist. Bei den Salivaproteinen war das Bindungsvolumen nahezu Null, was auf eine perfekte Anordnung zwischen EA und den Proteinen hinweist. Die Anwesenheit von Ethanol führte zu geringfügig positiven Bindungsvolumina bei den meisten Proteinen, welche durch Konformationsänderungen oder Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel zustande kam.

Die thermodynamische Analyse mittels isothermer Kalorimetrie (ITC) zeigte unterschiedliche Werte für die Enthalpie- und Entropieänderung bei der Komplexbildung. Bei BSA sind die Werte der Enthalpie- sowie der Entropieänderung negativ, aber in Anwesenheit von Ethanol wurden positivere Werte beobachtet, die durch geschwächte

Interaktionen mit dem Alkohol und Abgabe von Hydratwasser an die Bulkphase erklärt werden können. Bei den Salivaproteinen sind die thermodynamischen Beiträge positiv, wobei die Bindung durch positive ΔS_b° -Werte angetrieben wird. Die erhöhte Bindungsstärke in Anwesenheit von Ethanol wurde auf eine erhöhte Löslichkeit von EA und eine stabilisierende Wirkung auf die Bindung zurückgeführt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Bindung von EA an die untersuchten Proteine von verschiedenen Faktoren, wie die Konformation der Proteine bzw. der Bindungsstellen und den Lösungsmittelbedingungen beeinflusst wird. Die Ergebnisse tragen zum Verständnis der molekularen Faktoren bei der Komplexbildung von Polyphenolen an Proteine bei und liefern wichtige Informationen über die Auswirkungen von Ethanol auf die Komplexbindung von Tanninen an Salivaproteine

7 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass druckabhängige Untersuchungen neue Erkenntnisse über die thermodynamischen Eigenschaften von Ligandenbindungsreaktionen liefern können. Im Gegensatz zur Temperatur wirkt sich der Druck ausschließlich durch die Volumenänderung während der Wechselwirkung aus, da die thermische Energie konstant bleibt. Die gemessenen Druckabhängigkeiten liefern präzise volumetrische Daten der Komplektierungsreaktionen, die wichtige Informationen über Packungseigenschaften, strukturelle Fluktuationen, den Mechanismus der Wechselwirkung und Veränderungen in der Hydratation von Proteinen und Liganden liefern.

Protein-Ligand-Wechselwirkungen sind entscheidend für alle biochemischen Prozesse und unverzichtbar für alle Lebensformen. Die molekulare Erkennung, die durch Spezifität und Affinität definiert ist, spielt eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen, der Selbstreplikation, dem Stoffwechsel und der Informationsverarbeitung. Während Bindungsstudien normalerweise bei Atmosphärendruck durchgeführt werden, können druckabhängige Studien intra- und intermolekulare Wechselwirkungen modulieren. Druck beeinflusst die freie Energie und die Konformationslandschaft von Proteinen, wodurch unterschiedliche Konformationszustände mit unterschiedlicher Reaktivität realisiert werden können. Studien entlang der Druckachse sind biologisch interessant, da Organismen in den tiefen Ozeanen hohem hydrostatischem Druck ausgesetzt sind. Das Verständnis der Auswirkungen von Druck auf biologische Systeme ist wichtig, um das Leben und die physikalischen Grenzen von Leben so wie wir es kennen besser zu verstehen. Allerdings gibt es noch große Wissenslücken hinsichtlich der Auswirkungen von Druck auf biomolekulare Prozesse wie die Protein-Ligand-Wechselwirkungen.

Organismen in der Tiefsee haben ihre biomolekularen Prozesse, einschließlich Liganden-Bindungsreaktionen wahrscheinlich, so angepasst, dass sie Volumenänderungen geringhalten, um effizient zu funktionieren. Dies wird u. a. durch die Anwesenheit bestimmter Kosolventien erreicht, die die Proteinstabilität erhöhen und vor Temperatur- und Druckänderungen schützen können. Kosolventien können Liganden-Bindungsprozesse auf spezifische Weise modulieren, abhängig von den thermodynamischen Kräften und chemischen Eigenschaften der Bindungsstellen. Die Auswahl des Kosolvens und ihre Wechselwirkung mit Wasser beeinflussen die Bindungsstärke. In bestimmten Fällen kann der Druck die Stabilität von Proteinen und die vom Liganden erhöhen, wobei TMAO als

effizientestes Kosolvens wirkt. Das Verständnis der Rolle von Kosolventien bei Liganden-Bindungsprozessen trägt nicht nur zum Verständnis der Anpassungsmechanismen von Organismen in extremen Umgebungen bei, sondern hat auch wichtige Auswirkungen auf die Regulierung von Bindungsaffinitäten in biotechnologischen und pharmazeutischen Anwendungen.

Eine Studie untersuchte die Eignung des salzreichen wasserreichen Untergrunds des Mars für die Existenz von Leben. Insbesondere wurde die Rolle von Salzen wie Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat und Magnesiumperchlorat bei Protein-Ligand-Wechselwirkungen analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bindung eines Liganden an das Protein BSA von verschiedenen Faktoren abhängt, von der Temperatur, der Salzart und dem Druck. Hohe Konzentrationen von Perchlorat-Ionen hatten einen signifikanten Einfluss auf die Bindungskonstante. Interessanterweise begünstigen erhöhter Druck und niedrigere Temperaturen den Liganden-Bindungsprozess und führen zu einem negativen Bindungsvolumen. Die Studie untersuchte die Auswirkungen der auf dem Mars vorhandenen Ionen auf Protein-Ligand-Interaktionen. Es zeigte sich, dass Protein-Ligand-Interaktionen unter den Bedingungen auf dem Mars theoretisch möglich sein könnten, jedoch Anpassungen an den Bindungsstellen erforderlich wären, um Leben zu ermöglichen. Die Ergebnisse trugen auch zum Verständnis der Biochemie der Tiefsee unserer Erde und dem Absorptionsmöglichkeiten von Organismen, die hohen Drücken ausgesetzt sind, bei. Des Weiteren wurden die Auswirkungen von Temperatur, Ionenkonzentration und hohem hydrostatischem Druck auf die Bindungseigenschaften der Transfer-RNA (tRNA) aus *E. coli* untersucht. Thioflavin T (ThT), ein Fluoreszenzsondenligand, wurde verwendet, um die Bindungseigenschaften zu analysieren. Die Anwesenheit von Mg^{2+} -Salzen beeinflusste die Bindung von ThT an tRNA, wobei die Salze die Bindungsstärke verringerten, aber die Bindung noch immer stattfand. Der Einfluss der Salze wurde hauptsächlich durch die Wechselwirkung zwischen ThT und den Salzanionen verursacht, was zu einer geringeren Aktivität des Liganden führte. Interessanterweise begünstigte ein erhöhter hydrostatischer Druck die Ligandenbindung unabhängig vom Salztyp. Die Ergebnisse zeigten, dass diese extremen Umweltbedingungen die untersuchten Wechselwirkungen zwischen Nucleinsäuren und Liganden nicht zwangsläufig ausschließen. Zukünftige Studien sollten die Bindung von Liganden und Proteinen an andere RNA-Typen untersuchen, um die Rolle von Sequenz und Konformation bei der Komplexbildung unter den Bedingungen von marsrelevanten Salzen besser zu verstehen.

Schließlich wurde der Einfluss von Ethanol auf die Bindung von Tanninen an Proteine

untersucht. Dabei wurden verschiedene Proteine wie BSA und die Speichelproteine IB7-14 und IB9-37 analysiert. Die Zugabe von Ethanol beeinflusste die Bindungsaffinität der Proteine zu den Tanninen und führte zu Konformationsänderungen der Proteine. Die Bildung der Komplexe führte zu Volumenänderung der Proteine, wobei verschiedene Effekte wie Änderungen der Packung und Freisetzung von Wassermolekülen bei der Komplexbildung eine Rolle spielten. Ethanol verstärkte diese Effekte und begünstigte die Komplexbildung. Auch bei den Salivaproteinen IB7-14 und IB9-37 wurde eine starke Bindung beobachtet, die ebenfalls von Ethanol beeinflusst wurde. Diese Erkenntnisse liefern wichtige Informationen über den Bindungsprozess von Tanninen an Proteine und die Auswirkungen von Ethanol auf organoleptische Eigenschaften, wie die Adstringenz tanninhaltiger Weine.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Untersuchungen gezeigt haben, dass druckabhängige Studien neue Erkenntnisse über die thermodynamischen Eigenschaften von Ligandenbindungsreaktionen liefern können. Der Druck beeinflusst die Reaktion ausschließlich durch die Volumenänderung während der Wechselwirkung, da die thermische Energie konstant bleibt. Die gemessenen Druckänderungen können verwendet werden, um präzise volumetrische Daten von Komplexbildungsreaktionen zu bestimmen. Das Bindungsvolumen liefert wichtige Informationen über Packungseigenschaften, strukturelle Fluktuationen, den Mechanismus der Wechselwirkung und Veränderungen in der Hydratation des Proteins und des Liganden. Protein-Ligand-Wechselwirkungen spielen eine grundlegende Rolle in biochemischen Prozessen, und das Verständnis der Auswirkungen von Druck, Salzen und anderen Faktoren auf diese Wechselwirkungen ist sowohl für das Verständnis des Lebens und seine physikalisch-chemischen Grenzen als auch möglicherweise für biotechnologische und pharmazeutische Anwendungen von Bedeutung. Durch das Verständnis, wie Proteine und Liganden unter extremen Bedingungen interagieren, könnten neue Enzyme oder Wirkstoffe entwickelt werden, die unter spezifischen Umweltbedingungen besonders effektiv sind. Dies könnte beispielsweise in der Bioremediation, der Produktion von Biokraftstoffen oder der Entwicklung von Medikamenten für bestimmte Krankheiten von Nutzen sein. Insgesamt bietet die Erforschung von Protein-Ligand-Interaktionen unter extremen Bedingungen ein faszinierendes und vielversprechendes Feld für zukünftige Untersuchungen. Durch den Einsatz moderner experimenteller und theoretischer Methoden an weiteren Modellsystemen können weitere Erkenntnisse gewonnen werden, die dazu beitragen, die Grenzen des Lebens und seine Anpassungsfähigkeit an extreme Umgebungen besser zu verstehen.

8 Anhang

8.1 Protein-Proflavin-Bindungen unter Einfluss von Osmolyten

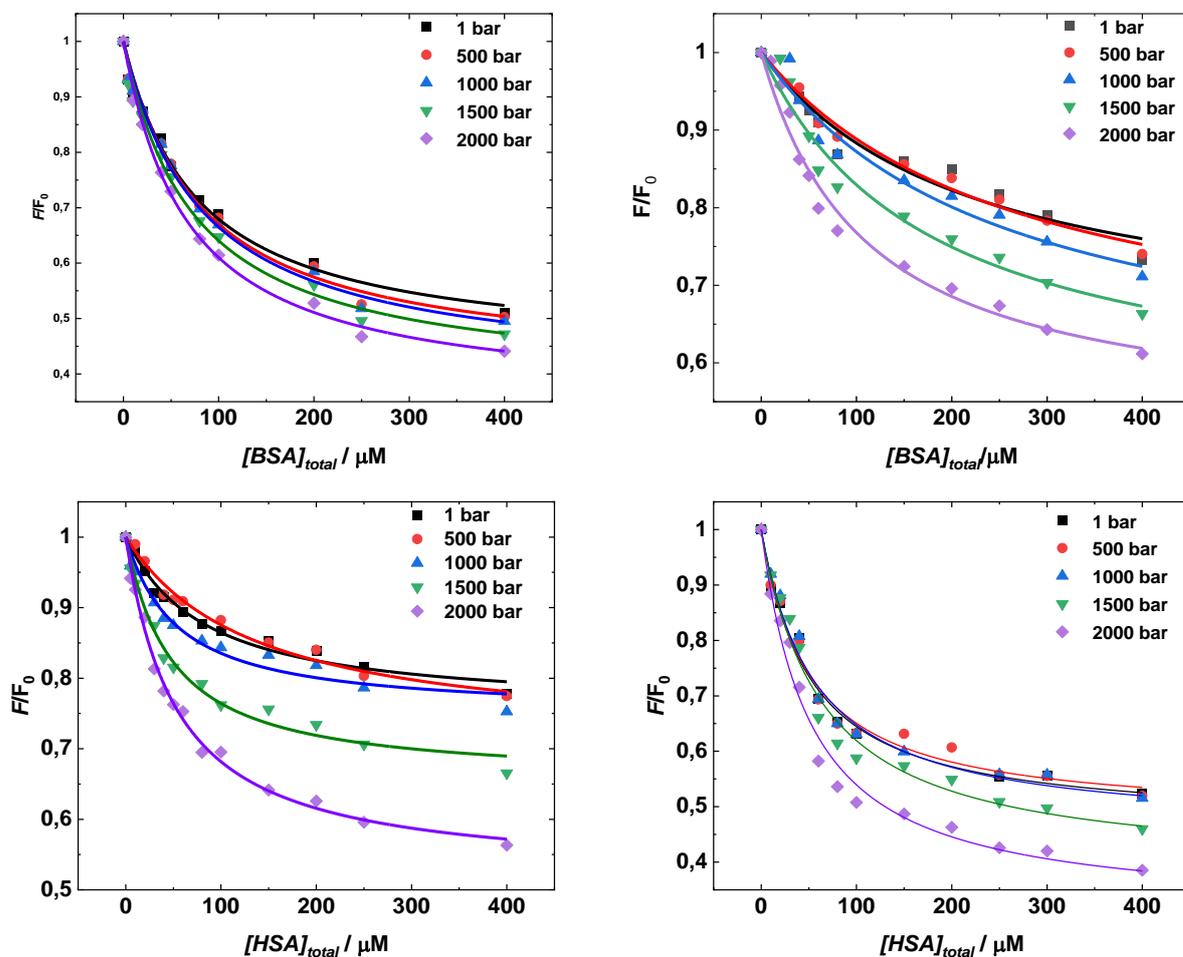


Abbildung 8.1: Mittels HHP-Fluoreszenzspektroskopie gemessene Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen Proflavin und (A und B) BSA und (C und D) HSA in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, in Gegenwart von 0,5 M TMAO (A und C) und 0,5 M Glycinbetain (B und D) bei einem Druck von 1 bar (schwarze Quadrate), 500 bar (rote Kreise), 1000 bar (blaue Dreiecke), 1500 bar (grüne umgekehrte Dreiecke) und 2000 bar (violette Rauten). Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung der experimentellen Daten gemäß einem 1:1-Bindungsmodell dar. Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt.

Tabelle 8.1: Identifizierte Reste im Bindungshohlraum für die Bindung von Proflavin an BSA und HSA, ermittelt mit Hilfe der CavityPlus-Software. Die polaren, hydrophoben, basischen (positiv geladenen) und sauren (negativ geladenen) Reste sind in Grün, Orange, Blau bzw. Rot dargestellt.

Protein	Subdomäne	Reste in der Kavität
BSA	IIB	R; V; C; K; N; Y; Q; E; A; K; D; L; E; L; E; E; C; C; A, K; P
HSA	IIB - IIA	D; Y; V; E; P; Q; N; P; E; A; R; M

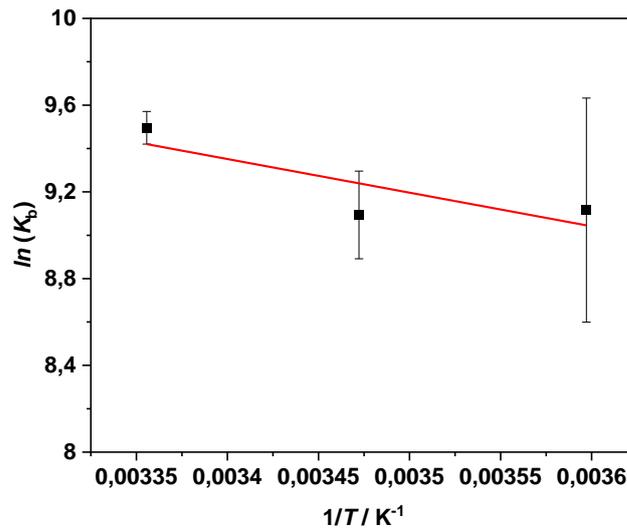


Abbildung 8.2: Plot von $\ln(K_b)$ gegen $1/T$ für die Bindung von Proflavin an HSA in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 0,5 M TMAO, pH 7,4. Die Steigung von $\ln(K_b)$ gegen $1/T$ ist gleich $-\Delta H_b^{\circ}/R$, welches die Bestimmung der Bindungsenthalpieänderung ΔH_b ermöglicht. $\Delta H_b = 12,9 \pm 8,0 \text{ kJ mol}^{-1}$.

8.2 BSA-ANS Bindung unter Einfluss von marsrelevanten Salzen

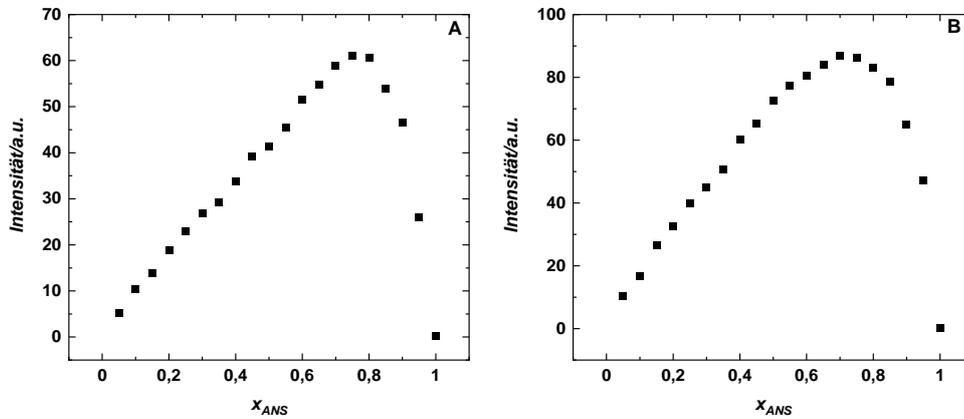


Abbildung 8.3: Jobsches Diagramm für die Bildung des ANS:BSA-Komplexes in Gegenwart von 250 mM MgCl₂ bei den Temperatur von (A) 5 °C und (B) 15 °C und bei einem Druck von 1 bar. Die Gesamtkonzentration ((ANS) + (BSA)) betrug 35 µM.

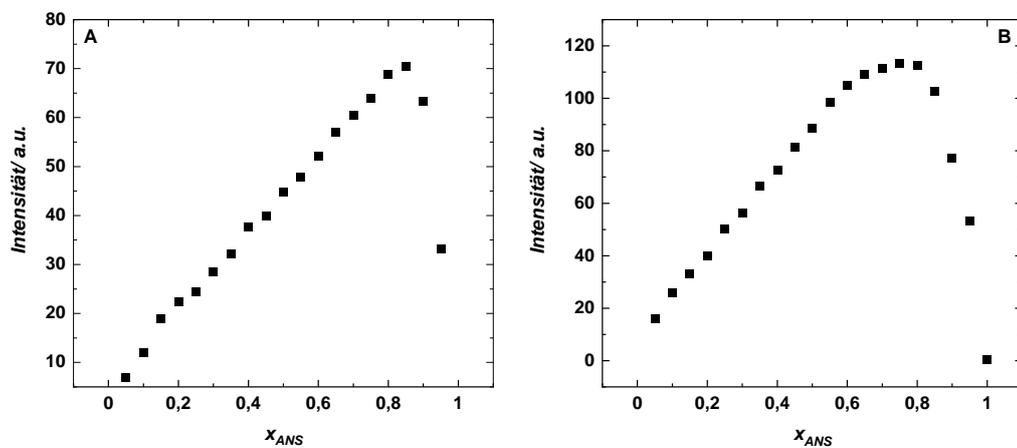


Abbildung 8.4: Job'sches Diagramm für die Bildung des ANS:BSA-Komplexes in Gegenwart von 250 mM MgSO₄ bei den Temperatur von (A) 5 °C und (B) 15 °C und bei einem Druck von 1 bar. Die Gesamtkonzentration ((ANS) + (BSA)) betrug 35 µM.

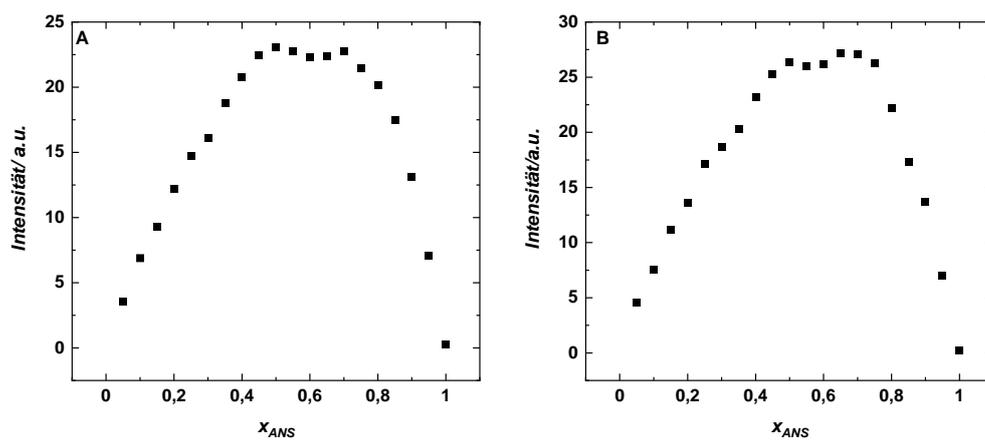


Abbildung 8.5: Job'sches Diagramm für die ANS:BSA-Komplexbildung in Gegenwart von 250 mM $Mg(ClO_4)_2$ bei (A) 5 °C und (B) 15 °C und bei einem Druck von 1 bar. Die Gesamtkonzentration ((ANS) + (BSA)) betrug 35 μ M.

Tabelle 8.2: Bindungskonstanten (K_b) und Stöchiometrien (n) für die BSA:ANS-Komplexbildung in 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, in Gegenwart der angegebenen Salze, Temperaturen und Drücke.

Lösungsmittelbedingungen	$T/^\circ\text{C}$	p/bar	$K_{b1}/\text{M}^{-10}\cdot 10^6$	$K_{b2}/\text{M}^{-10}\cdot 10^6$	1n
250 mM MgCl₂	5	1	1.0 ± 0.1		1:3
	5	500	1.0 ± 0.2		1:3
	5	1000	1.2 ± 0.3		1:3
	5	1500	1.8 ± 0.3		1:3
	5	2000	1.9 ± 0.3		1:3
250 mM MgCl₂	15	1	0.36 ± 0.13		1:3
	15	500	0.40 ± 0.16		1:3
	15	1000	0.41 ± 0.16		1:3
	15	1500	0.43 ± 0.17		1:3
	15	2000	0.45 ± 0.18		1:3
250 mM MgCl₂	25	1	4.9 ± 0.2		1:3
	25	500	4.3 ± 0.1		1:3
	25	1000	4.5 ± 0.1		1:3
	25	1500	4.9 ± 0.2		1:3
	25	2000	5.2 ± 0.1		1:3
250 mM MgSO₄	5	1	0.62 ± 0.15		1:3
	5	500	0.48 ± 0.07		1:3
	5	1000	0.47 ± 0.07		1:3
	5	1500	0.55 ± 0.20		1:3
	5	2000	0.44 ± 0.20		1:3
250 mM MgSO₄	15	1	0.39 ± 0.14		1:3
	15	500	0.40 ± 0.16		1:3
	15	1000	0.42 ± 0.15		1:3
	15	1500	0.43 ± 0.17		1:3
	15	2000	0.45 ± 0.18		1:3
250 mM MgSO₄	25	1	2.9 ± 0.3		1:3
	25	500	2.9 ± 0.3		1:3
	25	1000	2.7 ± 0.4		1:3
	25	1500	2.4 ± 0.7		1:3
	25	2000	2.2 ± 0.9		1:3

	5	1	0.19± 0.13	0.19 ± 0.13	1:2
250 mM Mg(ClO₄)₂	5	500	0.32 ± 0.25	0.40 ± 0.33	1:2
	5	1000	0.34 ± 0.26	0.34 ± 0.26	1:2
	5	1500	0.35 ± 0.19	0.52 ± 0.43	1:2
	5	2000	0.39 ± 0.07	0.66 ± 0.53	1:2
	15	1	0.15± 0.04	0.13 ± 0.13	1:2
250 mM Mg(ClO₄)₂	15	500	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.10	1:2
	15	1000	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.18	1:2
	15	1500	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.21	1:2
	15	2000	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.20	1:2
	25	1	0.59 ± 0.22	1.2 ± 0.1	1:2
250 mM Mg(ClO₄)₂	25	500	0.59 ± 0.17	1.1 ± 0.1	1:2
	25	1000	0.38 ± 0.10	1.2 ± 0.2	1:2
	25	1500	0.34 ± 0.03	1.2 ± 0.3	1:2
	25	2000	0.40 ± 0.05	0.89 ± 0.05	1:2

¹n steht für die Stöchiometrie der Bindung als BSA:ANS.

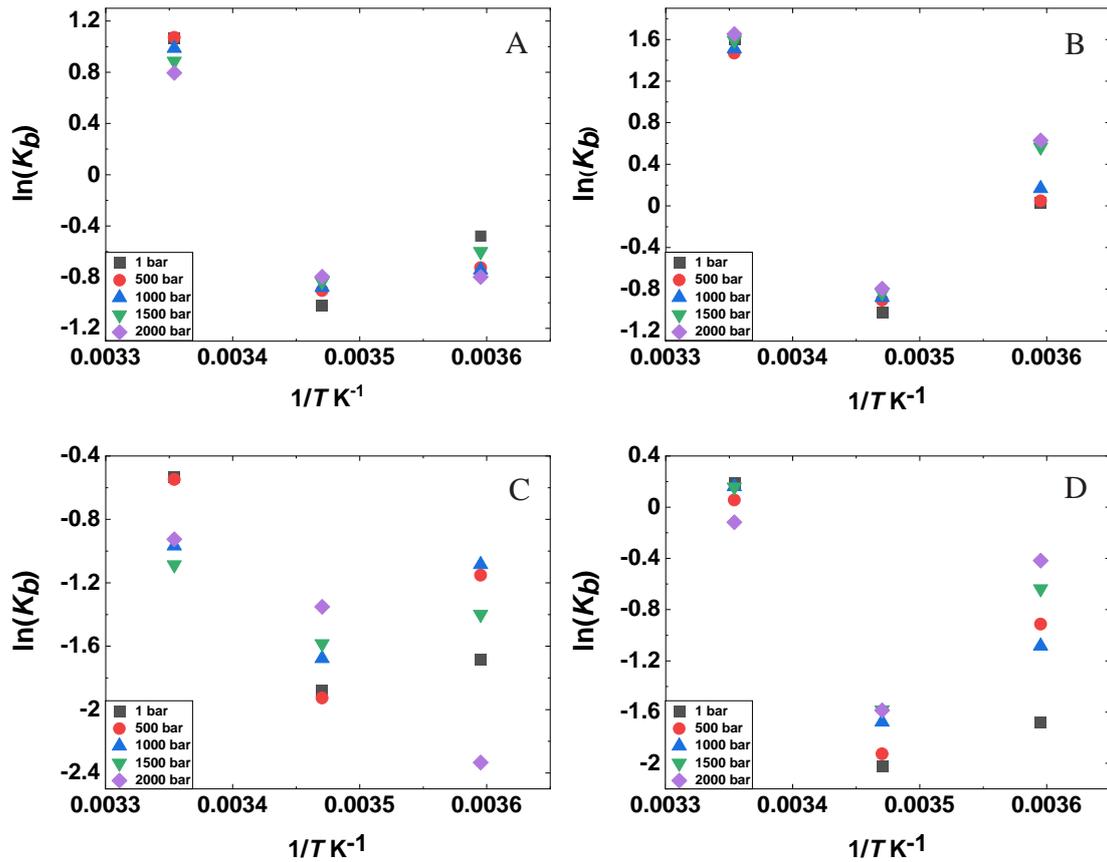


Abbildung 8.6: Plot von $\ln(K_b)$ gegen $1/T$ für die Bindung BSA und ANS in 10 mM Tris-HCl-Puffer, 250mM , pH 7,4. In Anwesenheit von MgCl_2 (A), MgSO_4 (B) und $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ (C) und (D). Die Darstellung in (C) bezieht sich auf die Druckabhängigkeit der Bindungskonstante der ersten Bindungsstelle (K_{b1}), die Darstellung in (D) auf die der zweiten Bindungsstelle (K_{b2}).

8.3 Ionen im tiefen Untergrund von Erde, Mars und eisigen Monden: Ihre Auswirkungen in Kombination mit Temperatur und Druck auf die tRNA-Liganden-Bindung

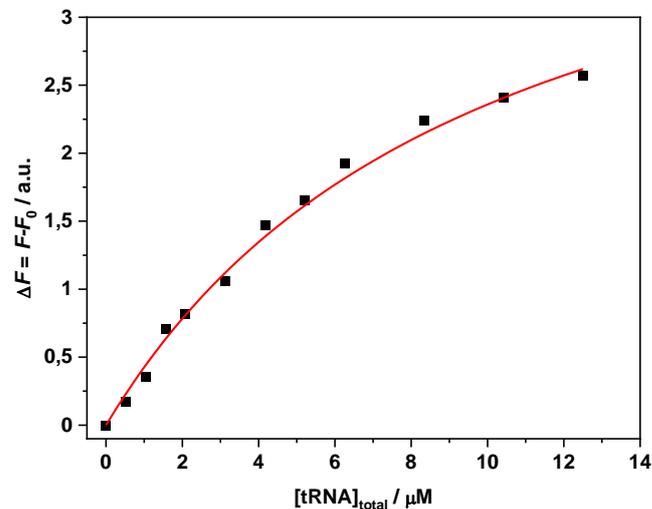


Abbildung 8.7: Bindungsisotherme für die Komplexbildung zwischen tRNA und ThT bei einer Temperatur von 25 °C und einem Druck von 1 bar in Gegenwart von 150 mM NaCl. Die durchgezogene Linie stellt die beste Anpassung an die experimentellen Daten gemäß dem 1:1-Bindungsmodell dar. Die Bindungsisothermen wurden durch Auftragen von $\Delta F = F - F_0$ gegen die Gesamtkonzentration der tRNA ermittelt. Dabei sind F und F_0 die ThT-Fluoreszenzintensitäten in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von tRNA. Das Experiment wurde in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9 durchgeführt.

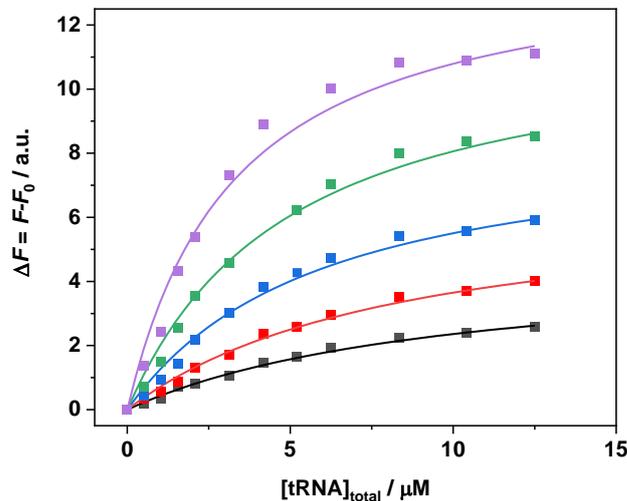


Abbildung 8.8: Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen tRNA und ThT, die bei einer Temperatur von 25 °C in Abwesenheit (A) und in Gegenwart von 1 mM $MgCl_2$ (B), $MgSO_4$ (C) und $Mg(ClO_4)_2$ (D) bei den folgenden Druckwerten erhalten wurden: 1 bar (schwarze Quadrate), 500 bar (rote Kreise), 1000 bar (blaue Dreiecke), 1500 bar (grüne umgekehrte Dreiecke) und 2000 bar (magentafarbene Rauten). Die Konzentration von ThT betrug 0,5 μM . Die durchgezogenen Linien stellen die beste Anpassung an die experimentellen Daten gemäß einem 1:1-Bindungsmodell dar. Die Bindungsisothermen wurden durch Auftragen von $\Delta F = F - F_0$ gegen die Gesamtkonzentration der tRNA ermittelt. Dabei sind F und F_0 die ThT-Fluoreszenzintensitäten in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von tRNA. Alle Experimente wurden in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 6,9, durchgeführt.

Tabelle 8.3: Bindungskonstanten, K_b , für die Bildung des tRNA-ThT-Komplexes in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9, in Abwesenheit und in Gegenwart der angegebenen Salze bei einer Temperatur von 25 °C und bei den angegebenen Drücken.

Lösungsmittelbedingungen	p/bar	$K_b/10^6 \text{ M}^{-1}$
Tris-HCl 20 mM, 40 mM KCl, pH 6.9	1	0.16 ± 0.01
	500	0.18 ± 0.01
	1000	0.25 ± 0.03
	1500	0.36 ± 0.01
	2000	0.50 ± 0.05
+150 mM NaCl	1	0.12 ± 0.01
	500	0.15 ± 0.03
	1000	0.23 ± 0.05
	1500	0.31 ± 0.09
	2000	0.43 ± 0.11
+1 mM MgCl₂	1	0.078 ± 0.007
	500	0.081 ± 0.007
	1000	0.13 ± 0.02
	1500	0.18 ± 0.01
	2000	0.25 ± 0.01
+1 mM MgSO₄	1	0.009 ± 0.002
	500	0.011 ± 0.002
	1000	0.017 ± 0.001
	1500	0.030 ± 0.007
	2000	0.039 ± 0.002
+1 mM Mg(ClO₄)₂	1	0.053 ± 0.019
	500	0.056 ± 0.020
	1000	0.074 ± 0.023
	1500	0.078 ± 0.025
	2000	0.091 ± 0.024

Tabelle 8.4: Bindungskonstanten (K_b) für die tRNA/ThT-Komplexbildung in 20 mM Tris-HCl-Puffer, 40 mM KCl, pH 6,9, in Abwesenheit und in Gegenwart der angegebenen Salze bei Temperaturen von 5 °C, 15 °C und 25 °C und $p = 1$ bar.

Lösungsmittelbedingungen	$T / ^\circ\text{C}$	$K_b / 10^6 \text{ M}^{-1}$
Tris-HCl 20 mM, pH 6.9	5	0.18 ± 0.1
Tris-HCl 20 mM, pH 6.9	15	0.17 ± 0.1
Tris-HCl 20 mM, pH 6.9	25	0.16 ± 0.1
+ 1 mM MgCl_2	5	0.024 ± 0.003
+ 1 mM MgCl_2	15	0.040 ± 0.001
+ 1 mM MgCl_2	25	0.078 ± 0.007
+ 1 mM MgSO_4	5	0.006 ± 0.001
+ 1 mM MgSO_4	15	0.007 ± 0.001
+ 1 mM MgSO_4	25	0.009 ± 0.002
+ 1 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$	5	0.017 ± 0.001
+ 1 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$	15	0.026 ± 0.004
+ 1 mM $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$	25	0.053 ± 0.019

8.4 Tannine im Wein: Einfluss von Alkohol auf die Protein-Liganden Bindung

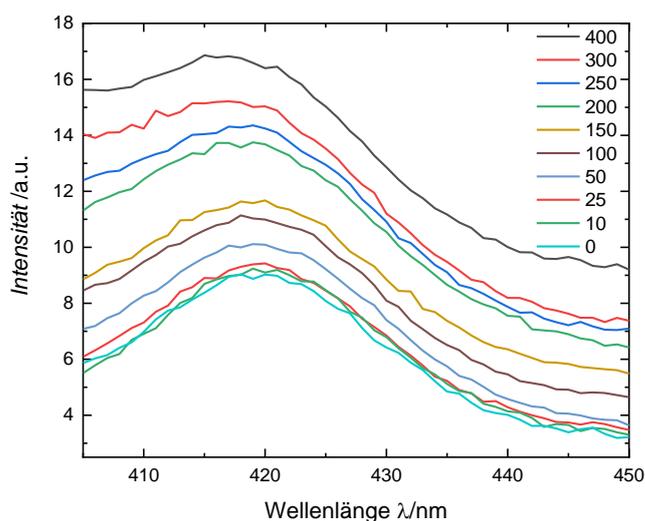


Abbildung 8.9: Fluoreszenz-Emissionsspektren von EA (15 μM) in Abwesenheit und in Gegenwart von 0-400 μM IB714 in reinem Puffer.

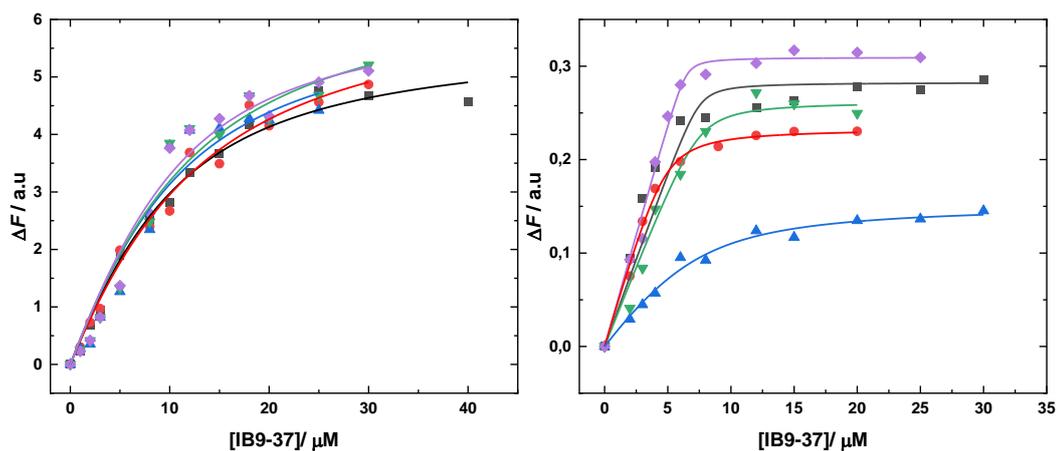


Abbildung 8.10: Mittels HP-Steady-State-Fluoreszenzspektroskopie ermittelte Bindungsisothermen für die Komplexbildung zwischen Ellagsäure IB9-37 in reinen Pufferbedingungen und oder in Anwesenheit von 10 Vol.-% Ethanol (links oder rechts) bei Druckwerten von: 1 bar (schwarze Quadrate), 500 bar (rote Kreise), 1000 bar (blaue Dreiecke), 1500 bar (grüne umgekehrte Dreiecke) und 2000 bar (violette Rauten). Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von 25 °C in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, durchgeführt. Die durchgezogenen Linien sind die beste Anpassung der experimentellen Daten gemäß dem 1:1-Bindungsmodell und dem 1:2 Bindungsmodell für IB9-37.

Abkürzungsverzeichnis

a.u.	Willkürliche Einheit (<i>arbitrary unit</i>)
ANS	8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure
atm	Atmosphärendruck
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
CD	Zirkulardichroismus-Spektroskopie
EA	Ellagsäure
EtOH	Ethanol
GB	Glycine Betaine
HHP	Hoher hydrostatischer Druck (<i>high hydrostatic pressure</i>)
HSA	Human serum albumin
Mg(ClO ₄) ₂	Magnesiumperchlorat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Pf	Proflavin
THT	Thioflavin T (<i>4-(3,6-Dimethyl-1,3-benzothiazol-3-ium-2-yl)-N,N-dimethylanilinchlorid</i>)
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
u. a.	unter anderem

Publikationsliste

- [1] R. Oliva, N. Jahmide-Azizi, S. Mukherjee, R. Winter, *The journal of physical chemistry. B* **2021**, *125*, 539. „Harnessing Pressure Modulation for Exploring Ligand Binding Reactions in Cosolvent Solutions”
- [2] A. Kamali, N. Jahmide-Azizi, R. Oliva, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2022**, *24*, 17966. „Deep sea osmolytes in action: their effect on protein–ligand binding under high pressure stress”
- [3] N. Jahmide-Azizi, R. Oliva, S. Gault, C. S. Cockell, R. Winter, *Biology* **2021**, *10*. „The Effects of Temperature and Pressure on Protein-Ligand Binding in the Presence of Mars-Relevant Salts”
- [4] N. Jahmide-Azizi, S. Gault, C. S. Cockell, R. Oliva, R. Winter, *International journal of molecular sciences* **2021**, *22*. „Ions in the Deep Subsurface of Earth, Mars, and Icy Moons: Their Effects in Combination with Temperature and Pressure on tRNA–Ligand Binding”

Konferenzbeiträge

- [1] Extreme Biology and Biophysics – Hybrid Meeting – (24 – 26 März 2022) Santa Fe – **Poster**
- [2] Tag der Chemie der Technischen Universität Dortmund (1. April 2023), Dortmund, Deutschland – **Poster**

Literaturverzeichnis

- [1] J. Janin, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **1995**, 64, 145.
- [2] A. P. Demchenko, *J. Mol. Recognit.* **2001**, 14, 42.
- [3] a) T. Steinbrecher, A. Labahn, *Current medicinal chemistry* **2010**, 17, 767; b) S. H. Strogatz, *Nature* **2001**, 410, 268.
- [4] R. Perozzo, G. Folkers, L. Scapozza, *Journal of receptor and signal transduction research* **2004**, 24, 1.
- [5] X. Du, Y. Li, Y.-L. Xia, S.-M. Ai, J. Liang, P. Sang, X.-L. Ji, S.-Q. Liu, *International journal of molecular sciences* **2016**, 17.
- [6] D. W. Miller, K. A. Dill, *Protein science : a publication of the Protein Society* **1997**, 6, 2166.
- [7] J.-P. Changeux, S. Edelstein, *F1000 biology reports* **2011**, 3, 19.
- [8] K. Akasaka, H. Matsuki (Eds.) *Subcellular Biochemistry*, Vol. 72, Springer Netherlands, Dordrecht, s.l., **2015**.
- [9] J. L. Silva, A. C. Oliveira, T. C. R. G. Vieira, G. A. P. de Oliveira, M. C. Suarez, D. Foguel, *Chemical reviews* **2014**, 114, 7239.
- [10] R. Winter, *Annual review of biophysics* **2019**, 48, 441.
- [11] J. Roche, J. A. Caro, D. R. Norberto, P. Barthe, C. Roumestand, J. L. Schlessman, A. E. Garcia, B. E. García-Moreno, C. A. Royer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, 109, 6945.
- [12] K. Heremans, L. Smeller, *Biochimica et biophysica acta* **1998**, 1386, 353.
- [13] T. Q. Luong, N. Erwin, M. Neumann, A. Schmidt, C. Loos, V. Schmidt, M. Fändrich, R. Winter, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2016**, 55, 12412.
- [14] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chemical Society reviews* **2006**, 35, 858.
- [15] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, P. F. McMillan, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **2013**, 75, 607.
- [16] K. Heremans, *Annual review of biophysics and bioengineering* **1982**, 11, 1.
- [17] S. Marchal, R. Lange, P. Tortora, C. Balny, *J. Phys.: Condens. Matter* **2004**, 16, S1271-S1275.
- [18] Z. Toleikis, V. A. Sirotkin, G. Skvarnavičius, J. Smirnovienė, C. Roumestand, D. Matulis, V. Petrauskas, *The journal of physical chemistry. B* **2016**, 120, 9903.
- [19] G. Skvarnavičius, Z. Toleikis, M. Grigaliūnas, J. Smirnovienė, P. Norvaišas, P. Cimperman, D. Matulis, V. Petrauskas, *J. Phys.: Conf. Ser.* **2017**, 950, 42001.
- [20] R. Oliva, S. Banerjee, H. Cinar, C. Ehrt, R. Winter, *Scientific reports* **2020**, 10, 8074.

-
- [21] A. Abou-Hamdan, P. Bugnon, C. Saudan, P. G. Lye, A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 592.
- [22] I. Son, Y. L. Shek, D. N. Dubins, T. V. Chalikian, *Biochemistry* **2012**, *51*, 5784.
- [23] I. Son, T. V. Chalikian, *Biochemistry* **2016**, *55*, 6475.
- [24] T. V. Chalikian, R. B. Macgregor, *Biophysical chemistry* **2019**, *246*, 8.
- [25] a) P. M. Torgerson, H. G. Drickamer, G. Weber, *Biochemistry* **1979**, *18*, 3079; b) A. Levin, S. Cinar, M. Paulus, J. Nase, R. Winter, C. Czeslik, *Biophysical chemistry* **2019**, *252*, 106194.
- [26] R. Oliva, N. Jahmidi-Azizi, S. Mukherjee, R. Winter, *The journal of physical chemistry. B* **2021**, *125*, 539.
- [27] a) W. Bujalowski, M. J. Jezewska (Eds.) *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry*, Oxford University Press, **2000**; b) W. Bujalowski, M. J. Jezewska in *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry* (Eds.: W. Bujalowski, M. J. Jezewska), Oxford University Press, **2000**.
- [28] a) W. Bujalowski, T. M. Lohman, *Biochemistry* **1987**, *26*, 3099; b) W. Bujalowski, M. J. Jezewska, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8513; c) W. Bujalowski, M. M. Klonowska, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5888; d) W. Bujalowski, M. M. Klonowska, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4682; e) W. Bujalowski, M. M. Klonowska, M. J. Jezewska, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 31350; f) W. Bujalowski, D. Porschke, *Biophysical chemistry* **1988**, *30*, 151; g) M. J. Jezewska, W. Bujalowski, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 4261; h) M. J. Jezewska, U. S. Kim, W. Bujalowski, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2129; i) M. J. Jezewska, S. Rajendran, W. Bujalowski, *Biochemistry* **1997**, *36*, 10320.
- [29] M. J. Jezewska, W. Bujalowski, *Biophysical chemistry* **1997**, *64*, 253.
- [30] J. Haiech, Y. Gendrault, M.-C. Kilhoffer, R. Ranjeva, M. Madec, C. Lallement, *Biochimica et biophysica acta* **2014**, *1843*, 2348.
- [31] K. E. van Holde, W. C. Johnson, P. S. Ho, *Principles of physical biochemistry*, Pearson Education, Estados Unidos, **2006**.
- [32] A. Kamali, N. Jahmidi-Azizi, R. Oliva, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2022**, *24*, 17966.
- [33] D. R. Canchi, P. Jayasimha, D. C. Rau, G. I. Makhatadze, A. E. Garcia, *The journal of physical chemistry. B* **2012**, *116*, 12095.
- [34] D. R. Canchi, A. E. García, *Annual review of physical chemistry* **2013**, *64*, 273.
- [35] a) S. R. Al-Ayoubi, P. K. F. Schinkel, M. Berghaus, M. Herzog, R. Winter, *Soft matter* **2018**, *14*, 8792; b) S. Sukenik, S. Dunskey, A. Barnoy, I. Shumilin, D. Harries, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 29862.
- [36] R. H. Kelly, P. H. Yancey, *The Biological bulletin* **1999**, *196*, 18.
- [37] C. Leggio, L. Galantini, N. V. Pavel, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6741.

- [38] Y. Xu, S. Wang, Q. Hu, S. Gao, X. Ma, W. Zhang, Y. Shen, F. Chen, L. Lai, J. Pei, *Nucleic acids research* **2018**, *46*, W374-W379.
- [39] Süleyman Cinar, *Dissertation*, Technische Universität Dortmund, Dortmund, **2017**.
- [40] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *Journal of molecular graphics* **1996**, *14*, 33-8, 27-8.
- [41] P. H. Yancey, J. F. Siebenaller, *The Journal of experimental biology* **2015**, *218*, 1880.
- [42] B. Chakraborty, S. Basu, *Journal of Luminescence* **2009**, *129*, 34.
- [43] E. Gökoğlu, F. Kıpçak, Z. Seferoğlu, *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence* **2014**, *29*, 872.
- [44] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochimica et biophysica acta* **2005**, *1751*, 119.
- [45] K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor, *Molecular immunology* **2012**, *52*, 174.
- [46] T. R. C. Guizado, *Journal of molecular modeling* **2014**, *20*, 2450.
- [47] a) S. A. Fahmy, F. Ponte, I. M. Fawzy, E. Sicilia, H. M. E.-S. Azzazy, *RSC advances* **2021**, *11*, 24673; b) T. Kubota, M. Yamakawa, I. Tanaka, *Journal of Molecular Spectroscopy* **1966**, *20*, 226.
- [48] R. Oliva, S. Banerjee, H. Cinar, R. Winter, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2020**, *56*, 395.
- [49] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, *Protein engineering* **1999**, *12*, 439.
- [50] a) F. Macii, T. Biver, *Journal of inorganic biochemistry* **2021**, *216*, 111305; b) L. Fielding, S. Rutherford, D. Fletcher, *Magnetic resonance in chemistry : MRC* **2005**, *43*, 463.
- [51] Macdonald, *Life at High Pressure*, Springer International Publishing, [S.l.], **2021**.
- [52] E. J. Guinn, L. M. Pegram, M. W. Capp, M. N. Pollock, M. T. Record, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 16932.
- [53] Z. Su, C. L. Dias, *Journal of Molecular Liquids* **2019**, *293*, 111443.
- [54] S. S. Cho, G. Reddy, J. E. Straub, D. Thirumalai, *The journal of physical chemistry. B* **2011**, *115*, 13401.
- [55] C. Hölzl, P. Kibies, S. Imoto, R. Frach, S. Suladze, R. Winter, D. Marx, D. Horinek, S. M. Kast, *The Journal of chemical physics* **2016**, *144*, 144104.
- [56] a) N. Jahmidi-Azizi, S. Gault, C. S. Cockell, R. Oliva, R. Winter, *International journal of molecular sciences* **2021**, *22*; b) J. R. Lai, R. F. Epand, B. Weisblum, R. M. Epand, S. H. Gellman, *Biochemistry* **2006**, *45*, 15718.
- [57] A. Acharyya, D. Shin, T. Troxler, F. Gai, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 7794.
- [58] a) S. Cozzolino, R. Oliva, G. Graziano, P. Del Vecchio, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 29389; b) M. M. Santoro, Y. Liu, S. M. Khan, L. X. Hou, D. W. Bolen,

- [59] Y. L. Shek, T. V. Chalikian, *Biochemistry* **2013**, *52*, 672.
- [60] A. Folberth, J. Polák, J. Heyda, N. F. A. van der Vegt, *The journal of physical chemistry. B* **2020**, *124*, 6508.
- [61] J. C. Smith, P. Tan, L. Petridis, L. Hong, *Annual review of biophysics* **2018**, *47*, 335.
- [62] S. R. Al-Ayoubi, P. H. Schummel, M. Golub, J. Peters, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 14230.
- [63] M. Erkkamp, J. Marion, N. Martinez, C. Czeslik, J. Peters, R. Winter, *The journal of physical chemistry. B* **2015**, *119*, 4842.
- [64] a) D. J. Wilton, R. Kitahara, K. Akasaka, M. J. Pandya, M. P. Williamson, *Biophysical journal* **2009**, *97*, 1482; b) A. Cooper, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **1984**, *44*, 181.
- [65] A. Cooper, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1976**, *73*, 2740.
- [66] M. Hishida, R. Anjum, T. Anada, D. Murakami, M. Tanaka, *The journal of physical chemistry. B* **2022**, *126*, 2466.
- [67] N. Jahmide-Azizi, R. Oliva, S. Gault, C. S. Cockell, R. Winter, *Biology* **2021**, *10*.
- [68] E. Bremer, R. Krämer, *Annual review of microbiology* **2019**, *73*, 313.
- [69] a) H. Herberhold, C. A. Royer, R. Winter, *Biochemistry* **2004**, *43*, 3336; b) C. Krywka, C. Sternemann, M. Paulus, M. Tolan, C. Royer, R. Winter, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* **2008**, *9*, 2809.
- [70] M. M. Osterloo, V. E. Hamilton, J. L. Bandfield, T. D. Glotch, A. M. Baldrige, P. R. Christensen, L. L. Tornabene, F. S. Anderson, *Science (New York, N.Y.)* **2008**, *319*, 1651.
- [71] A. Gendrin, N. Mangold, J.-P. Bibring, Y. Langevin, B. Gondet, F. Poulet, G. Bonello, C. Quantin, J. Mustard, R. Arvidson et al., *Science (New York, N.Y.)* **2005**, *307*, 1587.
- [72] M. H. Hecht, S. P. Kounaves, R. C. Quinn, S. J. West, S. M. M. Young, D. W. Ming, D. C. Catling, B. C. Clark, W. V. Boynton, J. Hoffman et al., *Science (New York, N.Y.)* **2009**, *325*, 64.
- [73] a) R. Orosei, S. E. Lauro, E. Pettinelli, A. Cicchetti, M. Coradini, B. Cosciotti, F. Di Paolo, E. Flamini, E. Mattei, M. Pajola et al., *Science (New York, N.Y.)* **2018**, *361*, 490; b) S. E. Lauro, E. Pettinelli, G. Caprarelli, L. Guallini, A. P. Rossi, E. Mattei, B. Cosciotti, A. Cicchetti, F. Soldovieri, M. Cartacci et al., *Nat Astron* **2021**, *5*, 63.
- [74] a) K. A. Connors, *Binding constants. The measurement of molecular complex stability*, Wiley, New York, Chichester, **1987**; b) F. Ulatowski, K. Dąbrowa, T. Bałakier, J. Jurczak, *The Journal of organic chemistry* **2016**, *81*, 1746.

- [75] R. Oliva, S. Mukherjee, R. Winter, *Scientific reports* **2021**, *11*, 9714.
- [76] D. I. Cattoni, S. B. Kaufman, F. L. González Flecha, *Biochimica et biophysica acta* **2009**, *1794*, 1700.
- [77] a) V. K. Aswal, S. Chodankar, J. Kohlbrecher, R. Vavrin, A. G. Wagh, *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **2009**, *80*, 11924; b) I. HAYAKAWA, J. KAJIHARA, K. MORIKAWA, M. ODA, Y. FUJIO, *J Food Science* **1992**, *57*, 288; c) P. Masson, J. Reybaud, *Electrophoresis* **1988**, *9*, 157.
- [78] E. Pizzo, R. Oliva, R. Morra, A. Bosso, S. Ragucci, L. Petraccone, P. Del Vecchio, A. Di Maro, *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* **2017**, *1859*, 2106.
- [79] J. W. Bye, R. J. Falconer, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2013**, *22*, 1563.
- [80] L. Medda, M. Monduzzi, A. Salis, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2015**, *51*, 6663.
- [81] V. Levi, F. L. González Flecha, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2003**, *31*, 333.
- [82] J. M. Fox, K. Kang, W. Sherman, A. Héroux, G. M. Sastry, M. Baghbanzadeh, M. R. Lockett, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3859.
- [83] a) J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy (3rd ed)*, Springer, New York, Berlin, **2006**; b) D. Matulis, R. Lovrien, *Biophysical journal* **1998**, *74*, 422; c) J. J. Ory, L. J. Banaszak, *Biophysical journal* **1999**, *77*, 1107; d) E. Schonbrunn, S. Eschenburg, K. Luger, W. Kabsch, N. Amrhein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 6345.
- [84] A. Zhukov, R. Karlsson, *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 379.
- [85] S. J. Payler, J. F. Biddle, B. Sherwood Lollar, M. G. Fox-Powell, T. Edwards, B. T. Ngwenya, S. M. Paling, C. S. Cockell, *Frontiers in microbiology* **2019**, *10*, 426.
- [86] S. Kriegler, M. Herzog, R. Oliva, S. Gault, C. S. Cockell, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23*, 14212.
- [87] a) J. L. Silva, D. Foguel, C. A. Royer, *Trends in biochemical sciences* **2001**, *26*, 612; b) L. Smeller, P. Rubens, K. Heremans, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3816.
- [88] K. Akasaka, *Chemical reviews* **2006**, *106*, 1814.
- [89] D. N. Dubins, A. Lee, R. B. Macgregor, T. V. Chalikian, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9254.
- [90] a) K. D. Collins, M. W. Washabaugh, *Quarterly reviews of biophysics* **1985**, *18*, 323; b) P. Lo Nostro, B. W. Ninham, *Chemical reviews* **2012**, *112*, 2286.
- [91] M. Lingam, A. Loeb, *Life in the cosmos. From biosignatures to technosignatures*, Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, **2021**.
- [92] P. L. Luisi, *The emergence of life. From chemical origins to synthetic biology*,

- [93] a) D. J. Wilton, M. Ghosh, K. V. A. Chary, K. Akasaka, M. P. Williamson, *Nucleic acids research* **2008**, *36*, 4032; b) E. Girard, T. Prangé, A.-C. Dhaussy, E. Migianu-Griffoni, M. Lecouvey, J.-C. Chervin, M. Mezouar, R. Kahn, R. Fourme, *Nucleic acids research* **2007**, *35*, 4800.
- [94] a) S. Patra, C. Anders, N. Erwin, R. Winter, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2017**, *56*, 5045; b) S. Patra, V. Schuabb, I. Kiesel, J.-M. Knop, R. Oliva, R. Winter, *Nucleic acids research* **2019**, *47*, 981.
- [95] a) S. Takahashi, N. Sugimoto, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2013**, *52*, 13774; b) F. Hughes, R. F. Steiner, *Biopolymers* **1966**, *4*, 1081; c) C. D. Downey, R. L. Crisman, T. W. Randolph, A. Pardi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9290.
- [96] C. Schuabb, M. Berghaus, C. Rosin, R. Winter, *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* **2015**, *16*, 138.
- [97] S. M. Clifford, J. Lasue, E. Heggy, J. Boisson, P. McGovern, M. D. Max, *J. Geophys. Res.* **2010**, *115*.
- [98] a) T. H. Vu, R. Hodyss, M. Choukroun, P. V. Johnson, *ApJ* **2016**, *816*, L26; b) M. Y. Zolotov, *Icarus* **2017**, *296*, 289.
- [99] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer, *Biochemistry*, WH Freeman, New York, **2015**.
- [100] B. M. Lunde, C. Moore, G. Varani, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2007**, *8*, 479.
- [101] S. Xu, Q. Li, J. Xiang, Q. Yang, H. Sun, A. Guan, L. Wang, Y. Liu, L. Yu, Y. Shi et al., *Scientific reports* **2016**, *6*, 24793.
- [102] S. Sugimoto, K. Arita-Morioka, Y. Mizunoe, K. Yamanaka, T. Ogura, *Nucleic acids research* **2015**, *43*, e92.
- [103] K. D. Warner, C. E. Hajdin, K. M. Weeks, *Nature reviews. Drug discovery* **2018**, *17*, 547.
- [104] B. Wang, K. A. Wilkinson, K. M. Weeks, *Biochemistry* **2008**, *47*, 3454.
- [105] D. Agudelo, P. Bourassa, M. Beauregard, G. Bérubé, H.-A. Tajmir-Riahi, *PloS one* **2013**, *8*, e69248.
- [106] L. Fernández-Sánchez, P. Lax, G. Esquivá, J. Martín-Nieto, I. Pinilla, N. Cuenca, *PloS one* **2012**, *7*, e43074.
- [107] V. Gabelica, R. Maeda, T. Fujimoto, H. Yaku, T. Murashima, N. Sugimoto, D. Miyoshi, *Biochemistry* **2013**, *52*, 5620.
- [108] a) R. Pawlowska, M. Janicka, D. Jedrzejczyk, A. Chworos, *Molecular biology reports* **2016**, *43*, 295; b) K. Suga, T. Tanabe, H. Tomita, T. Shimanouchi, H. Umakoshi,

Nucleic acids research **2011**, 39, 8891.

[109] D. M. Lilley, J. E. Dahlberg (Eds.) *Methods in enzymology*, vol.211, Academic Press, San Diego...[etc.], **C. 1992**.

[110] B. D. Wells, J. T. Yang, *Biochemistry* **1974**, 13, 1317.

[111] D. E. Draper, *Biophysical journal* **2008**, 95, 5489.

[112] V. K. Misra, D. E. Draper, *Biopolymers* **1998**, 48, 113.

[113] S. Cruz-León, N. Schwierz, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2020**, 36, 5979.

[114] L. Lavelle, J. R. Fresco, *Biophysical chemistry* **2003**, 105, 681.

[115] T. V. Chalikian, R. B. Macgregor, *Biology* **2021**, 10.

[116] P. McGovern, M. Jalabadze, S. Batiuk, M. P. Callahan, K. E. Smith, G. R. Hall, E. Kvavadze, D. Maghradze, N. Rusishvili, L. Bouby et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2017**, 114, E10309-E10318.

[117] E. J. Dufourc, *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* **2021**, 1863, 183670.

[118] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouységu, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2011**, 50, 586.

[119] a) B. Catalgol, S. Batirel, Y. Taga, N. K. Ozer, *Frontiers in pharmacology* **2012**, 3, 141; b) J. Constant, *Clinical cardiology* **1997**, 20, 420; c) S. Renaud, M. de Lorgeril, *Lancet (London, England)* **1992**, 339, 1523; d) A. Y. Sun, A. Simonyi, G. Y. Sun, *Free radical biology & medicine* **2002**, 32, 314.

[120] K. T. Chung, T. Y. Wong, C. I. Wei, Y. W. Huang, Y. Lin, *Critical reviews in food science and nutrition* **1998**, 38, 421.

[121] S. Quideau (Ed.) *Chemistry and biology of ellagitannins. An underestimated class of bioactive plant polyphenols*, World Scientific, Singapore, London, **op. 2009**.

[122] E. Haslam, *Practical polyphenolics. From structure to molecular recognition and physiological action*, Cambridge University Press, Cambridge, **2005**.

[123] a) S. P. Humphrey, R. T. Williamson, *The Journal of prosthetic dentistry* **2001**, 85, 162; b) A. M. Wu, G. Csako, A. Herp, *Molecular and cellular biochemistry* **1994**, 137, 39.

[124] a) A. Walz, K. Stühler, A. Wattenberg, E. Hawranke, H. E. Meyer, G. Schmalz, M. Blüggel, S. Ruhl, *Proteomics* **2006**, 6, 1631; b) E. Neyraud, T. Sayd, M. Morzel, E. Dransfield, *Journal of proteome research* **2006**, 5, 2474; c) F. Gho, A. Peña-Neira, R. O. López-Solís, *Journal of cellular biochemistry* **2007**, 100, 487.

[125] P. Sanguanserm Sri, H. F. Jenkinson, J. Thanasak, K. Chairatvit, S. Roytrakul, S. Kittisenachai, D. Puengsurin, R. Surarit, *PloS one* **2018**, 13, e0208317.

[126] A. Bennick, *Molecular and cellular biochemistry* **1982**, 45.

[127] A. Bennick, M. Cannon, G. Madapallimattam, *Caries research* **1981**, 15, 9.

-
- [128] E. Scarano, A. Fiorita, P. M. Picciotti, G. C. Passali, L. Calò, T. Cabras, R. Inzitari, C. Fanali, I. Messina, M. Castagnola et al., *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale* **2010**, *30*, 125.
- [129] I. Pianet, Y. André, M.-A. Ducasse, I. Tarascou, J.-C. Lartigue, N. Pinaud, E. Fouquet, E. J. Dufourc, M. Laguerre, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2008**, *24*, 11027.
- [130] V. Singh, A. K. Mishra, *Dyes and Pigments* **2016**, *125*, 362.
- [131] C. A. Rohl, R. L. Baldwin, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8435.
- [132] M. Joslyn, *Methods in Food Analysis. Applied to Plant Products*, Elsevier Science, Saint Louis, **2014**.
- [133] F. Liu, Y. Zhang, Q. Yu, Y. Shen, Z. Zheng, J. Cheng, W. Zhang, Y. Ye, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2019**, *134*, 110867.
- [134] R. Pattanayak, P. Basak, S. Sen, M. Bhattacharyya, *Biochemistry and biophysics reports* **2017**, *10*, 88.
- [135] C. Simon, I. Pianet, E. J. Dufourc, *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2003**, *9*, 125.
- [136] H. Yoshikawa, A. Hirano, T. Arakawa, K. Shiraki, *International journal of biological macromolecules* **2012**, *50*, 1286.
- [137] G. Bruylants, R. Wintjens, Y. Looze, C. Redfield, K. Bartik, *European biophysics journal : EBJ* **2007**, *37*, 11.
- [138] S.-Y. Lin, Y.-S. Wei, M.-J. Li, S.-L. Wang, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2004**, *57*, 457.
- [139] N. A. Avdulov, S. V. Chochina, V. A. Daragan, F. Schroeder, K. H. Mayo, W. G. Wood, *Biochemistry* **1996**, *35*, 340.