

3 Apparative Methoden

3.1 UV-Spektroskopie

Die Messung der Absorption von Proteinen bietet eine Möglichkeit zur Bestimmung des Proteingehaltes in einer Lösung. Ein wesentlicher Vorteil der spektroskopischen Konzentrationsbestimmung besteht darin, daß die Proben durch die Messung nicht zerstört werden und für weitere Untersuchungen verwendbar bleiben. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ist es möglich die Konzentration eines Proteins über die Extinktion E zu ermitteln.

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3.1)$$

Dabei bedeuten I_0 und I die einfallende beziehungsweise aus der Meßlösung austretende Intensität, c die Konzentration des absorbierenden Stoffes und d die vom Meßstrahl durchlaufene Schichtdicke der Lösung. Der Extinktionskoeffizient ε ist eine stoffspezifische Konstante. Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt nur für monochromatisches Licht, da die Größen I_0 , I , ε und somit auch E wellenlängenabhängig sind. Enthält die zu untersuchende Probe mehrere absorbierende Komponenten, so überlagern sich diese additiv.

$$E = \sum_i \varepsilon_i \cdot c_i \cdot d \quad (3.2)$$

Proteine enthalten Chromophore, welche als Molekülbestandteile definiert werden, die durch eine bestimmte räumliche Ladungsverteilung eine Absorption hervorrufen können. Als Chromophore von Proteinen gelten zum Beispiel die Peptidbindung und aromatische Aminosäureseitenketten. Die Absorption der Peptidgruppe liegt im nahen UV-Bereich bei ungefähr 190 nm. Bei höheren Wellenlängen absorbieren die aromatischen Aminosäureseitenketten Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Die Meßmethode bei einer Wellenlänge von 280 nm orientiert sich maßgeblich an dem Aminosäurerest des Tryptophans. Die beiden anderen aromatischen Aminosäurereste Tyrosin und Phenylalanin tragen vergleichsweise wenig zu diesem Wert bei, wobei der Beitrag von Phenylalanin bei dieser Wellenlänge vernachlässigt werden kann [H. Zorbas & F. Lottspeich, 1998].

3. Apparative Methoden

Tabelle 3.1 zeigt die unterschiedlichen Einflüsse, die die drei Aminosäuren zu einer Absorption bei 280 nm beitragen.

Aminosäure	ϵ [$\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$] bei 280 nm	Absorptionsmaxima [nm]
Tryptophan	5559	219, 279
Tyrosin	1197	193, 222, 275
Phenylalanin	0,7	188, 206, 257

Tabelle 3.1: Molare spektrale Extinktionskoeffizienten ϵ und Absorptionsmaxima von aromatischen Aminosäuren in wäßrigen Lösungen bei pH 7,1 [H. Zorbas & F. Lottspeich, 1998]

In erster Näherung hat eine Proteinlösung der Konzentration 1 mg/ml in einer 1 cm Küvette bei 280 nm eine Extinktion von 1,0. Da jedoch der Gehalt an absorbierenden Aminosäureresten bei unterschiedlichen Proteinen verschieden ist, variieren die Extinktionskoeffizienten der Proteine. Beispielsweise wird bei gleicher Konzentration und gleichem Lichtweg für Rinderserumalbumin ein experimentell bestimmter E_{280} -Wert von 0,70 erreicht, während eine α -Amylase einen E_{280} -Wert von 2,42 zeigt.

Bei einer bekannten Aminosäurezusammensetzung kann die Konzentration einer Proteinlösung folgendermaßen ermittelt werden [H. Mach et al., 1992]:

$$c = \frac{A_{280} - 10^{(2,5 \cdot \log A_{320} - 1,5 \cdot \log A_{350})}}{5540 \cdot n_{\text{Trp}} + 1480 \cdot n_{\text{Tyr}} + 134 \cdot n_{\text{S-S}}} \quad (3.3)$$

In diese Berechnung geht ein Korrekturfaktor ein, in dem Streulichteffekte berücksichtigt werden. Die Absorption bei 280 nm wird beispielsweise durch Aggregatbildung in der Proteinlösung verfälscht. Ist dies der Fall, macht sich das bei einer Wellenlänge von 320 nm und 350 nm bemerkbar. Aus diesem Grund muß eine Korrektur vorgenommen werden, die den experimentellen A_{280} -Wert um einen bestimmten Korrekturwert verringert. Die Anzahl an Tryptophan-, Tyrosin- und Disulfid-Gruppen wird durch die Parameter n_{Trp} , n_{Tyr} und $n_{\text{S-S}}$ repräsentiert. Davor stehen die jeweiligen mittleren molaren Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren. In einer von Verunreinigungen und Aggregaten

freien Lösung eines Proteins ist eine Korrektur der Konzentrationsbestimmung nicht erforderlich. Allerdings sollte zur Kontrolle immer eine Absorptionsmessung im Wellenlängenbereich von 320-350 nm vorgenommen werden.

Für die Messungen wurde ein 1024-Diodenarray-x-dap Spektrophotometer der Firma IKS Optoelektroniks verwendet. Hierbei ermöglicht die Verwendung eines CCD-Arrays die Simultanmessung vieler (bis 1024) Spektralelemente zur schnellen Aufnahme von Spektren. Eine Messung dauert dadurch nur wenige Millisekunden, so daß eine Untersuchung von zeitabhängigen Reaktionen im Sekundenbereich und schneller möglich ist. Es handelt sich um ein Einstrahlphotometer, bei dem Referenz und Spektrum der Probe nacheinander gemessen werden. Ein entsprechendes Lösungsmittel wird als Referenz bei jeder Messung subtrahiert. Die Schichtdicke der Küvetten betrug ausschließlich 1 mm. In Abbildung 3.1 ist ein für Proteine typisches UV-Spektrum dargestellt.

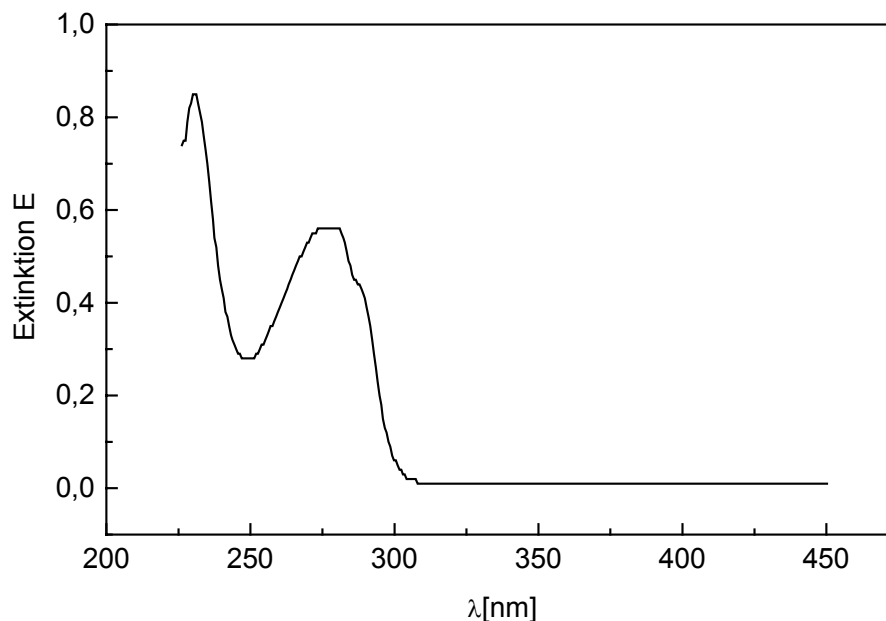


Abbildung 3.1: UV-Spektrum von Lysozym in einem Puffer pH 4,0 (20 mM Citronensäure, 25 mM Phosphat); $E_{280} = 0,5615$; $c=2,01$ ml/mg

3.2 Densitometrische Messungen

Zur Bestimmung der Dichte von Proteinlösungen wurde ein Densitometer verwendet, das nach dem Prinzip der Biegeschwingermethode arbeitet [O. Kratky et al., 1973]. Das wesentliche Element dieser Dichtemeßapparatur ist ein U-förmiger Oszillator, der aus einem Glashohlkörper besteht. Dieser wird mit einer Probenflüssigkeit gefüllt und elektronisch zu einer ungedämpften Schwingung angeregt. Aus der Änderung der Eigenfrequenz im gefüllten Zustand kann die Dichte der Probenlösung bestimmt werden.

Für einen schmalen Frequenzbereich und nicht zu große Amplituden kann der Schwinger mit einem einfachen Masse-Feder-Modell beschrieben werden. Es gilt:

$$m = m_0 + \rho \cdot V \quad (3.4)$$

mit m als Gesamtmasse, m_0 als Masse des Oszillators, ρ als Dichte der Probenlösung und V als Probenvolumen. Die Schwingungsdauer T des schwingenden Hohlkörpers hängt von der Gesamtmasse m des Probenkörpers und somit von der Dichte der Lösung ab.

$$T = 2\pi \cdot \sqrt{\frac{m}{D}} = 2\pi \cdot \sqrt{\frac{m_0 + \rho \cdot V}{D}} \quad (3.5)$$

Die Größe D entspricht einer spezifischen Federkonstante. Nach Quadrieren dieser Gleichung und durch Einführung der Auxiliarkonstanten A und B , ergibt sich:

$$T^2 = A \cdot \rho + B \quad (3.6)$$

$$\text{mit } A = \frac{4\pi^2 \cdot V}{D} \quad \text{und} \quad B = \frac{4\pi^2 \cdot m_0}{D} \quad (3.7, 3.8)$$

Für die Dichte zweier verschiedener Medien gilt somit:

$$\rho_1 = \frac{1}{A} \cdot T_1^2 - B \quad \text{und} \quad \rho_2 = \frac{1}{A} \cdot T_2^2 - B \quad (3.9)$$

Die Differenz der Dichten $\Delta\rho$ beider Lösungen ergibt:

$$\Delta\rho = \rho_1 - \rho_2 = \frac{1}{A} \cdot (T_1^2 - T_2^2) \quad (3.10)$$

Die Konstante A kann aus den Schwingungswerten T_1 und T_2 mit Proben bekannter Dichte in Abhängigkeit von der Temperatur in zwei Eichmessungen bestimmt werden. Als geeignete Eichmedien bieten sich Luft und entgasetes Wasser an, da deren temperaturabhängige Dichtewerte sehr genau bekannt sind.

Die Temperaturabhängigkeit der Dichte von Luft und Wasser wird mit $b1 = 1,296 \cdot 10^{-3}$ und $b2 = 3,67 \cdot 10^{-3}$ durch folgende Gleichungen beschrieben:

$$\rho_{\text{Luft}} = \frac{b1}{(1 + b2 \cdot t)}, \quad (3.11)$$

$$\rho_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{a7}{(1 + a6 \cdot t)} \quad (3.12)$$

Hierzu wird das Polynom $a7 = (a0 + a1 \cdot t + a2 \cdot t^2 + a3 \cdot t^3 + a4 \cdot t^4 + a5 \cdot t^5)$ mit den Koeffizienten $a0 = 0,99$, $a1 = 16,94 \cdot 10^{-3}$, $a2 = -7,98 \cdot 10^{-6}$, $a3 = -46,17 \cdot 10^{-9}$, $a4 = 105,56 \cdot 10^{-12}$, $a5 = -280,54 \cdot 10^{-15}$ und $a6 = 16,87 \cdot 10^{-3}$ verwendet. Die Eichkonstante k läßt sich aus den Schwingungswerten $T_{\text{H}_2\text{O}}$ und T_{Luft} mit bekannter Dichte der beiden Medien über einen bestimmten Temperaturbereich aus folgender Gleichung berechnen:

$$k = \frac{1}{A} = \frac{\rho_{\text{H}_2\text{O}} - \rho_{\text{Luft}}}{T_{\text{H}_2\text{O}}^2 - T_{\text{Luft}}^2} \quad (3.13)$$

Die Dichte der Referenzlösung ρ_{Ref} beziehungsweise des Lösungsmittels wird aus

$$\Delta\rho_{\text{Ref}} = (T_{\text{Ref}}^2 - T_{\text{H}_2\text{O}}^2) \cdot k \quad (3.14)$$

$$\rho_{\text{Ref}} = \rho_{\text{H}_2\text{O}} + \Delta\rho_{\text{Ref}} \quad (3.15)$$

berechnet.

3. Apparative Methoden

Die Dichte der Proteinlösung ρ_{Prot} wird analog ermittelt:

$$\Delta \rho_{\text{Prot}} = (T_{\text{Prot}}^2 - T_{\text{Ref}}^2) \cdot k \quad (3.16)$$

$$\rho_{\text{Prot}} = \rho_{\text{Ref}} + \Delta \rho_{\text{Prot}} \quad (3.17)$$

Aus den densitometrischen Messungen kann das partielle spezifische Volumen \bar{v} von Proteinen abgeleitet werden:

$$\bar{v} = \frac{1}{\rho_{\text{Ref}}} \cdot \left(1 - \frac{\rho_{\text{Prot}} - \rho_{\text{Ref}}}{c_{\text{Prot}}} \right) \quad (3.18)$$

Die densitometrischen Messungen wurden mit der Differentialdichtemeßapparatur DMA 60 (Anton Paar, Graz, Österreich) durchgeführt, deren zentrale Funktionseinheit zwei baugleiche Dichtemeßzellen des Typs DMA 602HAT sind. Jede Zelle besteht aus einer U-förmigen Kapillare, die aus Borosilikatglas (Duran 50) gefertigt ist. Eine der Zellen stellt die Referenzzelle dar, in der sich destilliertes Wasser befindet. Die andere Zelle ist die Probenzelle, welche mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt wird. An der Spitze der Kapillare befindet sich ein kleiner Magnet, welcher bei einer Auslenkung der oszillierenden Zelle in einer Spule eine Spannung induziert (Abbildung 3.2). Durch einen Verstärker und Begrenzer wird das System entdämpft und in seiner Amplitude begrenzt. Die Eigenschwingung der Zelle wird über einen Schmitt-Trigger in ein Rechtecksignal umgewandelt und anschließend zu einem Zähler weitergeleitet. Beide Meßzellen werden simultan durch einen Kryostaten aufgeheizt und über thermisch isolierte Zu- und Ableitungsschläuche temperiert. Die aktuelle Temperatur wird über einen an der Oberfläche der Meßzelle angebrachten Temperaturfühler (Pt 100) gemessen. Diese wird anschließend durch ein Voltmeter (Keithley 195A-Multimeter) digitalisiert und von einem Meßrechner aufgezeichnet. Der Kryostat wird mit einem Temperaturprogrammgeber (Haake PG20) gesteuert.

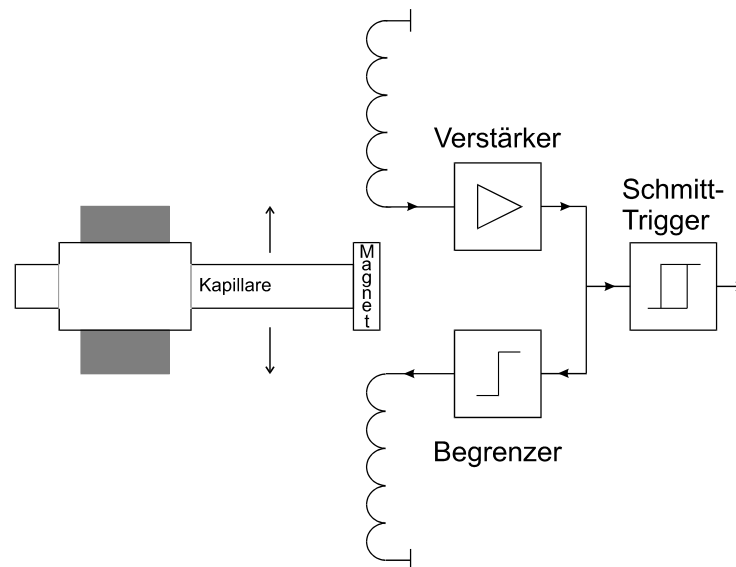


Abbildung 3.2: schematische Darstellung eines Densitometers

Durch Schwankungen von Umgebungsparametern können Dichteänderungen hervorgerufen werden. Um dies zu kompensieren, wird jede Messung im sogenannten PLL-Mode (Phase-Locked-Loop-Mode) durchgeführt. Hierbei dient die Frequenz der Referenzzelle als Zeitbasis zur Bestimmung der Schwingungsperiode der Probenzelle. Eine Rechereinheit der Apparatur steuert den Programmgeber und nimmt die Temperatur/Schwingungsdauer-Datenpaare auf.

Für die Dichtemessungen wurde Lysozym in einem Citronensäure-Phosphatpuffer (20 mM Citronensäure, 25 mM Phosphat) gelöst. Hierdurch war es möglich, unterschiedliche pH-Werte einzustellen. Die Konzentrationen der Lösungen variierten zwischen 17 mg/ml und 20 mg/ml. Jede Lösung wurde in einem Temperaturintervall von 15 °C - 95 °C gemessen. Vor jeder Proteinmessung erfolgte eine Aufnahme für die Kalibrierung mit Luft, Wasser und der entsprechenden Pufferlösung. Es sind folgende spezifische Meßparameter vorgegeben:

- Heizrate: 1 K/min
- Meßfrequenz: 5000 Hz
- Temperaturintervall der Datenaufnahme: 0,4 K

Um die unterschiedlichen vom pH-Wert abhängigen Messungen zu verifizieren, wurde jede Proteinlösung eines pH-Wertes vier bis sechs mal mit leicht variierenden Konzentrationen wiederholt.

3.3 Differentialmikrokalorimetrie

Für thermodynamische Untersuchungen an Biopolymeren gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Konstruktionsprinzipien für Kalorimeter. Für Anwendungen an Proteinen wird im wesentlichen in die drei Gerätetypen Mischungs-, Titrations- und Differentialmikrokalorimetrie (*engl.*: **differential scanning calorimetry**) unterschieden. Die Differentialmikrokalorimetrie ist eine Technik, die sich wesentlich von den anderen beiden Methoden unterscheidet. Bei der Mischungs- und Titrationskalorimetrie werden Wärmemengen bestimmt, die bei einer Zusammenführung von Reaktanden entstehen, wobei die Temperatur konstant gehalten wird. Dagegen werden bei der Differentialmikrokalorimetrie die Proben einer gezielten Aufheizung ausgesetzt, während ihre stoffliche Zusammensetzung unverändert bleibt. Sie ist eine geeignete Methode, um thermotrope Übergänge von Biopolymeren in Lösung zu beobachten. Von einem einzelnen DSC-Scan an Biopolymeren in Lösung ist es möglich, die Übergangsenthalpie, die Wärmekapazitätsänderung, die Kooperativität und die Stöchiometrie des Übergangs zu bestimmen.

Für biochemische Untersuchungen muß ein Kalorimeter empfindlich genug sein, um mit äußerst geringen Substanzmengen arbeiten zu können. Vor allem muß eine möglichst niedrige Konzentration der Biopolymeren eingesetzt werden können, um Wechselwirkungen der Makromoleküle untereinander auszuschließen. So haben beispielsweise bestimmte Konformationszustände von Proteinen eine Tendenz zur Aggregation. Dadurch werden Versuchsergebnisse verfälscht, da diese Prozesse häufig mit Wärmeeffekten verbunden werden. Die notwendige Empfindlichkeit der Kalorimeter für biochemische Zwecke wird durch eine besondere Bauweise erreicht.

Der Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten DASM-4 Kapillar-Mikrokalorimeters besteht aus je einer Proben- und Referenzzelle, die mit einem System von Temperaturfühlern und Heizelementen ausgestattet sind. Beide Zellen bestehen aus physikalisch identischen spiralförmigen Zellen aus Platin mit exakt identischem Volumen

von 0,47 ml. Die spiralförmige Bauweise hat den Vorteil einer großen Zelloberfläche im Vergleich zum Probenvolumen. Da die Proben an der Zelloberfläche beheizt werden, kann mit dieser Konstruktion ein Temperaturgradient vermieden werden. Auf die Zellen wird ein Überdruck von 2,5 bar angelegt, um ein Sieden der Lösung bei 100 °C zu verhindern. Somit kann ein Temperaturintervall von 10 °C – 130 °C durchlaufen werden. Die Zellen sind von zwei adiabatischen Schilden aus vergoldetem Silber umgeben, deren Temperatur exakt mit der Temperatur der Meßzellen mitgeführt wird. Durch diese Anordnung wird gewährleistet, daß kein Wärmeaustausch zwischen System und Umgebung stattfindet. Damit reduziert sich laut dem 1. Hauptsatz der Thermodynamik

$$dU = \delta Q + \delta W \quad (3.19)$$

die Änderung der inneren Energie dU des Systems auf die von außen zugeführte elektrische Energie δW :

$$dU = \delta W \quad (3.20)$$

Proben und Referenzzelle werden durch genau dimensionierte Heizwicklungen simultan aufgeheizt, so daß zu jedem Zeitpunkt die Temperaturdifferenz zwischen den Zellen 0 °C beträgt. Wenn sich in einer der Zellen eine temperaturinduzierte Reaktion, wie beispielsweise die endotherme Denaturierung eines Proteins, vollzieht, führt die auftretende Reaktionswärme zu einer minimalen Temperaturdifferenz zwischen den Zellen. Sobald die Steuerelektronik des Kalorimeters ein solches Temperaturungleichgewicht von Proben- und Referenzzelle erkennt, wird in der einen Zelle der Heizstrom um ΔI erhöht und in der anderen erniedrigt. Damit wird der auftretende Wärmeeffekt kompensiert und die Bedingung $\Delta T = 0$ für die beiden Zellen aufrecht erhalten. Die zusätzliche Heizleistung wird von einem Computer als Spannungswert U in Temperaturabständen von 0,1 °C gespeichert. Zur Bestimmung der Wärmekapazität einer Probe muß das Kalorimeter durch die Aufnahme mehrerer identischer Grundlinien kalibriert werden. Zu diesem Zweck wird die jeweilige Pufferlösung in Meß- und Referenzzelle gefüllt und mehrmals eine Grundlinie aufgenommen. Während der Aufnahme einer Grundlinie wird der Meßzelle über ein Temperaturintervall von mindestens 5 °C eine zusätzliche Heizleistung von 50 μW zugeführt. Diese Zusatzleistung führt zu einer Änderung der Regelspannung ΔU_1 , welche mit der Heizrate r multipliziert, der Eichleistung P_{Eich} proportional ist.

3. Apparative Methoden

Aus der Eichleistung läßt sich die Eichkonstante K_{Eich} berechnen:

$$K_{\text{Eich}} = \frac{P_{\text{Eich}}}{\Delta U_1 \cdot r} \left[\frac{\text{J} \cdot \text{s}^{-1}}{\text{V} \cdot \text{K} \cdot \text{s}^{-1}} \right] \quad (3.21)$$

Die Grundlinie und die Eichmessung zeigen einen gerätetypischen Verlauf. Danach wird in einer weiteren Messung die zu untersuchende Proteinlösung gegen die entsprechende Pufferlösung gemessen.

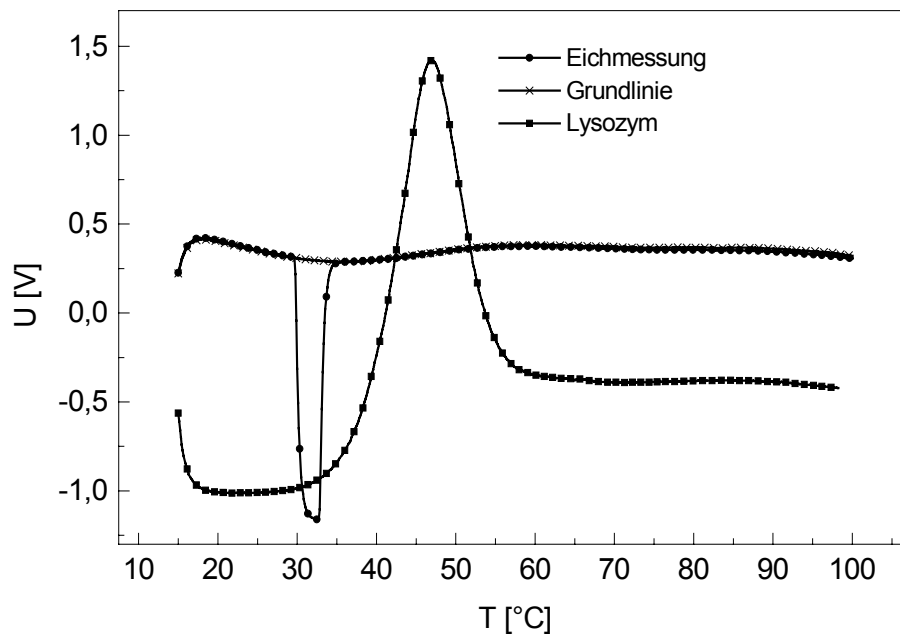


Abbildung 3.3: Rohdaten einer Lysozymmessung in Puffer pH 1,5 (20 mM Citronensäure, 25 mM Phosphat), Eichlinie (Eichleistung 50 μW) und Probenlinie, Lysozymkonzentration: 8,45 mg/ml

Da die Wärmekapazität von nativem und denaturiertem Protein in Lösung geringer ist als die Wärmekapazität des gleichen Volumens an wässrigem Lösungsmittel, liegt die Probenlinie unterhalb der Referenzlinie. Hieraus ergibt sich für kalorimetrische Messungen ein apparentes $\Delta C_{p,\text{app}}^{\text{Prot}}$. Das $\Delta C_{p,\text{app}}^{\text{Prot}}$ läßt sich aus der Eichkonstanten und der

Spannungsdifferenz ΔU_2 zwischen Grundlinie und Probenlinie berechnen:

$$\Delta C_{p,app}^{\text{Prot}} = \Delta U_2 \cdot K_{\text{Eich}} \quad (3.22)$$

Die spezifische Wärmekapazität des Proteins c_p^{Prot} kann nach folgender Gleichung in Abhängigkeit von der Temperatur berechnet werden

$$c_p^{\text{Prot}}(T) = c_p^{\text{Lm}}(T) \cdot \frac{v_{\text{Prot}}(T)}{v_{\text{Lm}}(T)} - \frac{\Delta C_{p,app}^{\text{Prot}}(T)}{m_{\text{Prot}}} \quad (3.23)$$

wobei c_p^{Lm} [J/(g·K)] die spezifische Wärmekapazität des Lösungsmittels, v_{Prot} [ml/g] das partielle spezifische Volumen des Proteins, v_{Lm} [ml/g] das partielle spezifische Volumen des Lösungsmittels, m_{Prot} [g] die Masse des Proteins und $\Delta C_{p,app}^{\text{Prot}}$ [J/(g·K)] die experimentelle apparente Wärmekapazitätsdifferenz darstellt. Damit ergibt sich:

$$c_p^{\text{Prot}} = c_p^{\text{Lm}} \cdot \frac{v_{\text{Prot}}(T)}{v_{\text{Lm}}(T)} - \frac{\Delta U_2 \cdot K_{\text{Eich}}}{m_{\text{Prot}}} \quad (3.24)$$

Üblicherweise wird für v_{Prot} ein einheitlicher Wert von 0,73 ml/g in die Berechnung der Wärmekapazitätskurve eingesetzt. Für das spezifische Volumen des Lösungsmittels v_{Lm} wird in der Regel 1 ml/g eingesetzt und für die spezifische Wärmekapazität des Lösungsmittels c_p^{Lm} die spezifische Wärmekapazität des Wassers 4,184 J/(g·K). Diese Werte werden als temperaturunabhängig angesehen und als Standardwerte bei Raumtemperatur verwendet. Diese Vereinfachung wurde in dieser Arbeit nicht gemacht, sondern es wurden die wahren Dichtewerte für alle Temperaturen gemessen, und $v_{\text{Lm}}(T)$ sowie $v_{\text{Prot}}(T)$ in Gleichung 3.24 eingesetzt. Gleichzeitig wurde in einem Kalorimeter die tatsächliche spezifische Wärmekapazität des Lösungsmittels gemessen, indem die Grundlinien mit Wasser in beiden Zellen aufgenommen wurden und die Probenmessung mit Lösungsmittel gegen Wasser verglichen wurde. Die damit erhaltenen wahren Wärmekapazitätskurven werden in dieser Arbeit mit den durch bisher mit Standardwerten berechneten Wärmekapazitätskurven verglichen.

Das Hauptinteresse an kalorimetrischen Untersuchungen von Proteinen gilt den temperaturinduzierten Strukturübergängen, bei denen die gefaltete Struktur des nativen

3. Apparative Methoden

Proteins in eine denaturierte Struktur des thermisch entfalten Proteins übergeht. Eine derartige Entfaltung der Tertiär- und Sekundärstruktur eines Proteins ist die Ursache des endothermen Peaks (Abb. 3. 4).

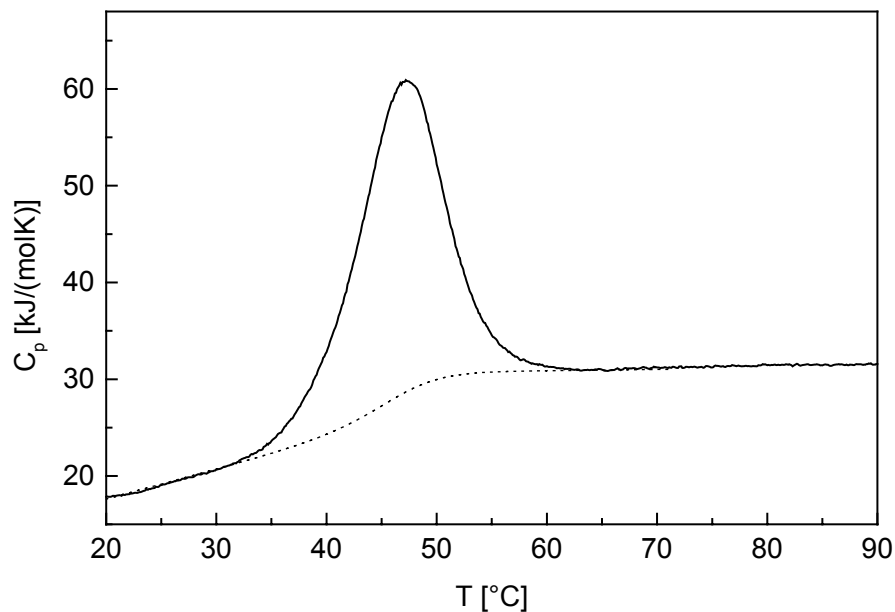


Abbildung 3.4: Wärmekapazitätskurve von Lysozym in Puffer pH 1,5 (25 mM Phosphat, 20 mM Citronensäure, Lysozymkonzentration: 8,45 mg/ml, $\Delta H_{cal} = 388$ kJ/mol, $T_m = 48$ °C, Heizrate: 1 K/min, Auswertung nach Gleichung 3.24; Punktlinie: sigmoide Grundlinie

Das Vorhandensein eines Δc_p -Wertes spiegelt die Tatsache wieder, daß zur Aufheizung einer Lösung mit aufgefaltetem Protein mehr Wärme nötig ist, als zur Erwärmung einer Proteinlösung gleicher Konzentration nativen Proteins. Aus einer Wärmekapazitätskurve können folgende Größen erhalten werden:

1. Die Temperatur des Peakmaximums, die in erster Näherung der Umwandlungstemperatur T_m entspricht.
2. die van't Hoff Enthalpie ΔH_{vH} :

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2} \quad (3.25)$$

3. Die molare Auffaltungsenthalpie ΔH_{cal}^0 , die der Fläche unter dem Umwandlungspeak proportional ist und welche durch numerische Integration erhalten wird. Hierbei stellt $C_{p,\text{Prot}}$ die molare Wärmekapazität des Proteins und T_a beziehungsweise T_e die Anfangs- und Endtemperatur des Umwandlungspeaks dar.

$$\Delta H_{\text{cal}}^0 = \int_{T_a}^{T_e} C_{p,\text{Prot}} \cdot dT \quad (3.26)$$

4. die Entropieveränderung ΔS_{cal}^0 , welche während des Übergangs gemessen werden kann und der Fläche unter der C_p/T gegen T Kurve proportional ist:

$$\Delta S_{\text{cal}}^0 = \int_{T_a}^{T_e} \frac{C_{p,\text{Prot}}}{T} \cdot dT \quad (3.27)$$

Nach van't Hoff kann die Enthalpie einer temperaturinduzierten Reaktion für einen Zweizustandsübergang $N \Leftrightarrow D$ auch aus der Änderung der Gleichgewichtskonstanten mit der Temperatur bestimmt werden. Bei ΔH_{vH} handelt es sich um eine Standardenthalpie ΔH^0 . Die Bezeichnung van't Hoff Enthalpie deutet lediglich darauf hin, daß sie mit Hilfe von Gleichung 3.25 gewonnen wurde. ΔH_{vH} gibt die Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten von der Temperatur wieder und stellt somit ein Maß für die Schärfe des Übergangs dar. Ein breiter Übergangsbereich entspricht einer kleinen Enthalpiedifferenz zwischen Anfangs- und Endzustand. Demgegenüber entspricht ein schmaler, scharfer Übergangsbereich einer größeren Enthalpiedifferenz. Dieser Zusammenhang läßt sich mit Hilfe der beiden Formeln

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad (3.28)$$

und

$$\Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln(K) \quad (3.29)$$

als Geradengleichung darstellen:

$$-R \cdot \ln(K) = \Delta H_{\text{vH}} \cdot \frac{1}{T} - \Delta S^0 \quad (3.30)$$

3. Apparative Methoden

Eine Auftragung von $-R \cdot \ln(K)$ gegen $1/T$ liefert als Steigung die van't Hoff Enthalpie. Aus kalorimetrischen Daten kann ΔH_{vH} zusätzlich zu ΔH_{cal} nach folgender Formel berechnet werden [P.L. Privalov & S.A. Pothekin, 1986]:

$$\Delta H_{vH} = \frac{4 \cdot R \cdot T_m^2 \cdot \Delta C_{p, \max}}{\Delta H_{m, cal}} \quad (3.31)$$

R steht für die allgemeine Gaskonstante, $C_{p, \max}$ für die molare Wärmekapazität des Proteins bei 50% Umwandlung und $\Delta H_{m, cal}$ für die molare kalorimetrische Umwandlungsenthalpie.

Die Enthalpieänderung ΔH_{cal} ist modellfrei, während für die Bestimmung von ΔH_{vH} eine Annahme über den Reaktionsmechanismus gemacht werden muß. Diese ist als Zweizustandsmodell bereits in der Formulierung des Denaturierungsgleichgewichts $N \Leftrightarrow D$ mit der Gleichgewichtskonstanten

$$K = \frac{[D]}{[N]} \quad (3.32)$$

verborgen. In diesem Fall gilt

$$\Delta H_{vH} = \Delta H_{cal}^0 \cdot \quad (3.33)$$

Bei der Komplexizität einiger Proteinstrukturen kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Entfaltung der Struktur schrittweise erfolgt und somit ein oder mehrere Intermediate vorliegen können:



In diesem Fall sind die drei Zustände N, X und D zu berücksichtigen. Das Zweizustandsmodell, welches der Gleichung für ΔH_{vH} zugrunde liegt, ist in diesem Fall unzutreffend und hätte eine Nichtübereinstimmung von ΔH_{vH} und ΔH_{cal}^0 zur Folge.

Als Hilfsmittel zur Überprüfung der Richtigkeit des angenommenen Modells gilt das Kooperativitätsverhältnis CR (cooperative ratio):

$$\text{CR} = \frac{\Delta H_{\text{cal}}^0}{\Delta H_{\text{vH}}} \quad (3.35)$$

Für kleine globuläre Proteine liegt der Wert für CR bei eins. Dies bedeutet, daß ein temperaturinduzierter Konformationsübergang dem Zweizustandsmodell folgt. Wenn weitere Übergangszustände beteiligt sind, ergibt sich ein Wert für CR größer eins. Ist das Verhältnis CR kleiner als eins kann das ein Hinweis darauf sein, daß die Stöchiometrie höher ist als angenommen oder die Reaktion irreversible Schritte beinhaltet. Anhand von Wärmekapazitätskurven kann somit nicht nur die Gültigkeit eines Zweizustandsmodells überprüft werden, sondern darüber hinaus können auch Informationen über die An- und Abwesenheit von Intermediaten bei der Proteinfaltung erhalten werden.

3.4 Circular dichroismus- Spektroskopie

Die Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) ist eine Form der Absorptionsspektroskopie im UV/VIS-Bereich. Circular dichroismus entsteht durch unterschiedliche Absorption von rechts und links circular polarisiertem Licht durch eine Probe. Diese rührt von den Absorptionsbanden asymmetrischer Verbindungen her. Der Circular dichroismus der Proteine wird von strukturdeterminierten asymmetrischen Elementen im Bereich des Peptidrückgrats und von den chiralen Aminosäuren hervorgerufen. Bei allen Aminosäuren, mit der Ausnahme von Glycin, ist das der Peptidgruppe benachbarte C_{α} -Atom asymmetrisch substituiert. Dies führt zu einer Asymmetrie in der Elektronenkonfiguration der Peptidbindung und damit zu einer unterschiedlichen Absorption von rechts und links circular polarisiertem Licht. Daher sind Proteine intrinsisch optisch aktiv. Die konkrete Elektronenkonfiguration der Peptidbindungen wird weiterhin ganz entscheidend von den Sekundärstrukturen bestimmt. Dies führt schließlich zu den spezifischen und im wesentlichen von der Konformation der Proteine bestimmten CD-Spektren im Peptidbereich (Abbildung 3.5).

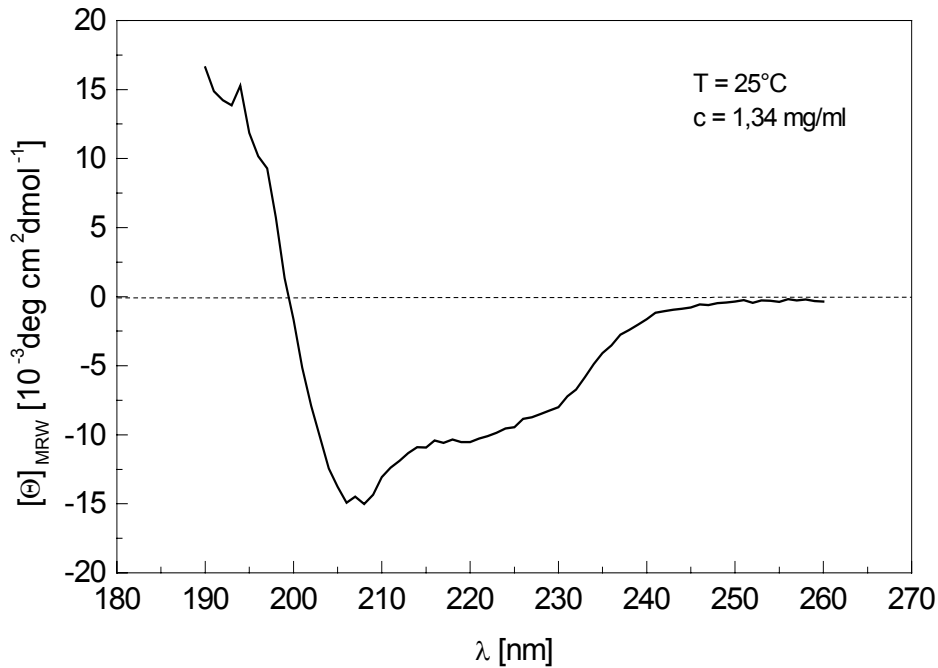


Abbildung 3.5: CD-Spektrum von Lysozym bei pH 7, Puffer: 20 mM Citronensäure, 25 mM Phosphat, Küvette: 0,1 mm

Aromatische Aminosäuren weisen in Lösung keine asymmetrischen Eigenschaften auf und zeigen damit auch keinen Circular dichroismus [M. Holtzhauer, 1999]. Auch in einer aufgefalteten Polypeptidkette sind die aromatischen Aminosäuren weitgehend frei beweglich und zeigen somit keine Unterschiede in der Absorption von rechts und links zirkular polarisiertem Licht. In einer gefalteten Polypeptidkette hingegen kommt es zu Effekten, welche von der Umgebung abhängen. Benachbarte Aminosäurereste prägen den aromatischen Aminosäuren eine asymmetrische Elektronenkonfiguration auf und es kommt zu einer unterschiedlichen Absorption des polarisierten Lichts.

Die CD-Spektren von Proteinen werden in zwei charakteristischen spektralen Bereichen beobachtet. Der erste Bereich befindet sich zwischen 160 nm und 230 nm und wird als Peptidbereich bezeichnet. Im zweiten Bereich von 240 nm bis 300 nm wird der CD-Effekt von den Eigenschaften der aromatischen Aminosäuren bestimmt. Messungen an synthetischen Peptiden und Proteinen bekannter Struktur haben gezeigt, wie die CD-Spektren von α -Helices, β -Faltblattstrukturen und zufällig verknäuelten Proteinen (random coils) aussehen. Eine α -Helix beispielsweise hat zwei ausgeprägte negative CD-Banden bei 208 nm und 222 nm und eine positive Bande bei 192 nm. Eine zufällig gefaltete Polypeptidkette hingegen weist eine negative CD-Bande bei 190 nm auf.

Abschätzungen des α -Helixanteils von Proteinen, die aus CD-Spektren gewonnen werden, stimmen sehr gut mit Werten aus Röntgenstrukturanalysen überein. Der Anteil an β -Faltblattstrukturen kann auch aus CD-Spektren entnommen werden. Da β -Strukturen nicht so regelmäßig wie α -Helices sind, tragen sie nur in einem geringen Ausmaß zum CD-Spektrum bei. Eine quantitative Sekundärstrukturanalyse ist mit einem Programm von G. Böhm *et al.* (1992) möglich.

Wird durch die Lösung einer optisch aktiven Verbindung linear polarisiertes Licht geschickt, resultiert nach Austritt aus der Probe elliptisch polarisiertes Licht. Solches Licht entsteht, wenn zwei linear polarisierte Lichtwellen gleicher Frequenz mit senkrecht aufeinander stehenden Schwingungsebenen zur Überlagerung kommen und sich die Komponenten in Amplitude und Phase unterscheiden. Dieses Phänomen äußert sich in unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten ε_L und ε_R der optisch aktiven Substanz für links und rechts zirkular polarisiertes Licht. Der Unterschied $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ kann positiv oder negativ sein, je nachdem ob der links oder der rechts zirkular polarisierte Strahl stärker absorbiert wird. Gebräuchlicherweise wird die eigentliche Meßgröße $\Delta\varepsilon$ in die Elliptizität Θ umgerechnet. Die Elliptizität gibt an, in welchem Ausmaß die chirale Probe linear polarisiertes in elliptisch polarisiertes Licht umwandelt. $\Delta\varepsilon$ und die Elliptizität Θ sind durch die in Gleichung 3.36 angegebene Beziehung miteinander verknüpft [M. Holtzhauer, 1999].

$$\Theta_\lambda = \text{konst} \cdot 100 \cdot \Delta\varepsilon \quad (3.36)$$

Der Index λ bedeutet, daß die Elliptizität wellenlängenabhängig ist. Die Konstante in Gleichung 3.26 hat den Betrag:

$$\text{konst} = \ln 10 \cdot \frac{180}{4\pi} = 32,98 \quad (3.37)$$

Häufig wird das Ergebnis einer CD-Messung als molare Elliptizität $[\Theta]_\lambda$ angegeben.

Die molare Elliptizität ergibt sich aus der Elliptizität Θ nach Gleichung 3.38:

$$[\Theta]_{\lambda} = \frac{\Theta_{\lambda}}{c \cdot d} \left[\frac{\text{grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right] \quad (3.38)$$

wobei c die Einheit [mol/l] besitzt und der Lichtweg d in cm angegeben wird.

Für Makromoleküle, die aus vielen Bausteinen bestehen und sehr unterschiedliche Molmassen besitzen, ist es nicht sinnvoll, die Elliptizität auf die molare Masse des Gesamtmoleküls zu beziehen. Bei einem Protein ist es zweckmäßiger, die Elliptizität auf die berechnete mittlere molare Masse aller enthaltenen Aminosäurereste (MRW = mean residue weight) zu beziehen. Je nach dem Anteil der Aminosäuren an der Zusammensetzung des Proteins liegt dieser Wert im allgemeinen zwischen 110 g/mol und 115 g/mol. Die mittlere molare Elliptizität $[\Theta]_{\text{MRW}}$ ist dann gegeben durch Gleichung 3.39

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta_{\lambda} \cdot \text{MRW}}{c \cdot d} \left[\frac{\text{grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right] \quad (3.39)$$

mit MRW in g/mol. Durch diese normierte Größe wird gewährleistet, daß CD-Spektren von verschiedenen Proteinen miteinander verglichen werden können, wobei $[\Theta]_{\text{MRW}}$ als Meßgröße fungiert.

Alle CD-Messungen wurden mit einem CD6-Spektropolarimeter der Firma Jobin-Yvon durchgeführt. Die Proteinlösungen wurden dabei in Spezial-CD-Quarzküvetten der Firma Hellma mit einer Schichtdicke von 0,1 mm gefüllt. Dabei wurden Proteinkonzentrationen zwischen 0,7 mg/ml und 1,0 mg/ml verwendet. Alle Proben wurden vor der Versuchsdurchführung auf 25 °C thermostatisiert. Hierzu diente ein Kryostat Haake F6, wobei die Temperaturmessung mit einem Pt100-Widerstandsthermometer in der Küvette erfolgte. Jede Referenzmessung erfolgte unter denselben Bedingungen und wurde anschließend von der Proteinmessung subtrahiert. Die Abschätzung verschiedener Strukturanteile innerhalb des Proteins erfolgte anhand einiger exemplarisch ausgewählter Spektren innerhalb des Programms CDNN [G. Böhm et al., 1992], welches auf einem maximal implementierten Basissatz von 33 bekannten Proteinen basiert.

3.5 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden in dieser Arbeit verwendet:

Lysozyme from chicken egg white for molecular biology von der Firma Sigma

RNaseA Type II-A from bovine pankreas von der Firma Sigma

Essigsäure 100% zur Analyse von der Firma AppliChem

Salzsäure 1mol/l von der Firma Merck

Phosphorsäure 85% zur Analyse von der Firma Merck

Natronlauge 1 mol/l von der Firma Merck

Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat von der Firma Merck

Trinatriumphosphat-dodecahydrat von der Firma Merck

L-Glutaminsäure-monokaliumsalz-monohydrat von der Firma Fluka

L-Histidin von der Firma Fluka BioChemika

L-Asparaginsäure-mononatriumsalz-monohydrat von der Firma Merck

Citronensäure-Monohydrat von der Firma AppliChem

Trinatriumcitrat-dihydrat von der Firma Merck