

Hydrophobe Wechselwirkungen

VON G. NÉMETHY [1]

Es wird über Fortschritte in der theoretischen und experimentellen Untersuchung hydrophober Wechselwirkungen berichtet. Besonders behandelt werden die Theorie der Wasserstruktur in ihrer Anwendung auf die hydrophobe Bindung, theoretische Abschätzungen der freien Energie der Auffaltung von Proteinen und die statistisch-mechanische Theorie der hydrophoben Bindung in Polyaminosäuren. Experimentell lassen sich die thermodynamischen Parameter der hydrophoben Bindung aus Löslichkeits- und Dimerisierungsverhalten niedermolekularer Verbindungen abschätzen. Untersuchungen über die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und unpolaren Lösungsbestandteilen werden diskutiert. Hydrophobe Bindungen können auch für andere Wechselwirkungen bei Proteinen wichtig sein. In diesem Zusammenhang wird der Harnstoff-Effekt erwähnt, obwohl es bis jetzt keine theoretische Deutung für diesen Effekt gibt. Schließlich wird gezeigt, welche Methoden zum Nachweis hydrophober Wechselwirkungen zur Verfügung stehen.

Einleitung

In den letzten Jahren ist die Rolle, die hydrophobe Bindungen bei der Aufrechterhaltung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine (und anderer Makromoleküle) in wässriger Lösung spielen, immer deutlicher geworden. Die Bezeichnung „hydrophobe Bindung“ oder besser „hydrophobe Wechselwirkung“ bringt zum Ausdruck, daß unpolare Gruppen in wässriger Lösung die Tendenz haben, sich zu assoziieren und auf diese Weise die Berührung mit benachbarten Wassermolekülen zu vermindern. Der Grund für diese Tendenz liegt nicht darin, daß der Kontakt unpolarer Gruppen mit dem Wasser energetisch ungünstig wäre. Im Gegenteil: die Bildungsenthalpie einer hydrophoben Bindung ist sogar positiv ($\Delta H^\circ > 0$). Die Bildung hydrophober Bindungen ist lediglich durch einen Entropie-Effekt begünstigt: in der Umgebung einer verfügbaren unpolaren Gruppe sind die Wassermoleküle stärker geordnet. Bildet sich eine hydrophobe Bindung, so nimmt die Ordnung ab, was zu günstigeren Entropieverhältnissen und damit zu einer negativen freien Bildungsenergie führt.

Hydrophobe Bindungen werden häufig herangezogen, um Anomalien in der Struktur und Reaktionsfähigkeit eines Proteins zu deuten. Zweifellos gehören hydrophobe Wechselwirkungen zu den wichtigsten Effekten, welche die Konformation eines Proteins in wässriger Lösung stabilisieren. Sie dürfen jedoch nicht kritiklos zur Deutung jeglicher experimenteller Ergebnisse verwendet werden. Hydrophobe Bindungen sind nicht die einzigen nicht-kovalenten Wechselwirkungen in Proteinen, obwohl sie einen großen oder sogar den wichtigsten Teil zur Stabilisierung einer Konformation beitragen können. Sie sind aber nicht genügend spezifisch, um die Bildung einer bestimmten Struktur zu erzwingen: die Zahl der in Wechselwirkung tretenden unpolaren Gruppen, ihre gegenseitige Orientierung und das Ausmaß des Kontaktes zwischen ihnen ist nur einer mäßigen

Beschränkung unterworfen. Die Faltung eines Proteinkomplexes zu einer ganz bestimmten Konformation dürfte daher das Zusammenwirken verschiedener nicht-kovalenter Wechselwirkungen verlangen.

Theoretische Behandlung der hydrophoben Bindung

Bei der Besprechung der hydrophoben Bindung kommt man nicht ohne eine Diskussion der Struktur des flüssigen Wassers aus. Wichtig ist in diesem Zusammenhang vor allem die Fähigkeit der Wassermoleküle, über zwischenmolekulare Wasserstoffbrücken dreidimensional vernetzte Strukturen (sogenannte Cluster) zu bilden (Abb. 1). Versuche, die Wasserstruktur theoretisch und experimentell zu bestimmen, sind von Némethy und Scheraga [1] sowie von Kavanau [2] zusammenfassend dargestellt worden. Andere Autoren haben seither versucht, die Struktur des Wassers noch genauer zu be-

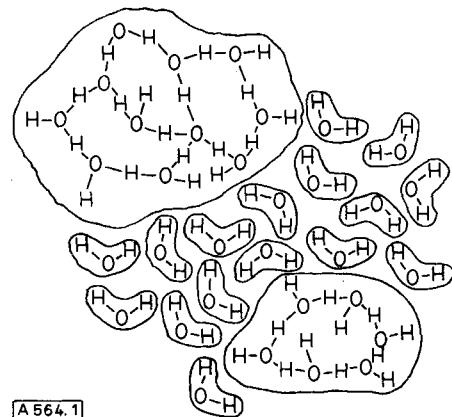


Abb. 1. Schematische Darstellung der Struktur flüssigen Wassers nach der Theorie von Némethy und Scheraga [1]. Man erkennt die Cluster, in denen die Wassermoleküle durch Wasserstoffbrücken verknüpft sind, und Gebiete, in denen keine Wasserstoffbrücken auftreten.

[1] G. Némethy u. H. A. Scheraga, J. chem. Physics 36, 3382 (1962).

[2] J. L. Kavanau: Water and Solute-Water Interactions. Holden-Day, Inc. San Francisco, 1964.

[*] Dr. G. Némethy
The Rockefeller University
New York, N.Y. 10021 (USA)

schreiben, beispielsweise durch die Annahme mehrerer, miteinander in Wechselwirkung stehender multimolekularer Strukturen^[3,4] oder durch eine Verallgemeinerung^[5,6] des Konzepts der verschiedenen Energieniveaus, das Bestandteil der Theorie von Némethy und Scheraga^[11] ist. Zur Deutung von IR- und Raman-Spektren wird oft die Annahme gemacht^[7-9], daß der Anteil nicht geschlossener Wasserstoffbrücken klein ist (unterhalb 10 %) und damit wesentlich unter früheren Abschätzungen^[1,2] liegt. Welche Schwierigkeiten sich der Interpretation einiger Beobachtungen über die Wasserstruktur entgegenstellen, hat kürzlich Frank^[10] erläutert.

Obwohl Einzelheiten der Struktur des flüssigen Wassers noch Gegenstand der Diskussion sind, kann man sich von den Einflüssen unpolarer Lösungsbestandteile auf die Wasserstruktur und von der Natur der hydrophoben Bindung bereits ein recht gutes Bild machen. Alles deutet darauf hin, daß die zuerst von Frank und Evans^[11] vorgeschlagene und später von Kauzmann^[12] sowie von Némethy und Scheraga^[13] erweiterte Annahme zutrifft, die besagt, daß die strukturelle Ordnung des Wassers in der Nachbarschaft unpolarer Lösungsbestandteile zunimmt. Thermodynamische Parameter und das Löslichkeitsverhalten verschiedener unpolarer Substanzen lassen sich am besten mit der Vorstellung deuten, daß die Zahl der Wasserstoffbrücken *pro mol Wasser* in der Umgebung unpolarer Lösungsbestandteile größer ist (Abbildung 2)^[13].

Die Anwesenheit von stark durch Wasserstoffbrücken verknüpften Wassermolekülen in unmittelbarer Nachbarschaft unpolarer gelöster Moleküle ist begünstigt,

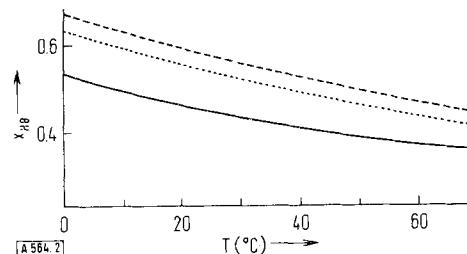


Abb. 2. Relative Zahl x_{HB} (berechnet) der Wasserstoffbrücken in reinem Wasser (—) und in der ersten Schicht von Wassermolekülen in der Umgebung eines aliphatischen (---) oder aromatischen (···) Kohlenwasserstoffmoleküls. Die Werte von x_{HB} , deren Temperaturabhängigkeit hier gezeigt ist, sind auf den Wert $x_{HB} = 1$ für ideal kristallisiertes Eis bezogen. Sie wurden nach der Theorie von Némethy und Scheraga [13] berechnet.

- [3] C. M. Davis jr. u. T. A. Litovitz, J. chem. Physics 42, 2563 (1965).
- [4] E. Wicke, Angew. Chem. 78, 1 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 106 (1966).
- [5] V. Vand u. W. A. Senior, J. chem. Physics 43, 1869 (1965).
- [6] J. H. Griffith u. H. A. Scheraga, Abstr. 150th Meeting American Chem. Society, Atlantic City, Sept. 1965, S. 18-I.
- [7] T. T. Wall u. D. F. Hornig, J. chem. Physics 43, 2079 (1965).
- [8] W. A. P. Luck, (a) Ber. Bunsenges. physik. Chem. 69, 626 (1965); (b) Fortschr. chem. Forsch. 4, 653 (1964).
- [9] K. A. Hartmann jr., J. physic. Chem. 70, 270 (1966).
- [10] H. S. Frank, (a) Natl. Acad. Sci-NRS (USA), Publ. 942, 141 (1963); (b) Federat. Proc. 24, Suppl. 15, S-1 (1965).
- [11] H. S. Frank u. M. W. Evans, J. chem. Physics 13, 507 (1945).
- [12] W. Kauzmann, Advances Protein Chem. 14, 1 (1959).
- [13] G. Némethy u. H. A. Scheraga, J. chem. Physics 36, 3401 (1962).

weil in dieser Umgebung die Anzahl anziehender zwischenmolekularer (van der Waalsscher) Kontakte zunimmt. Das Ergebnis ist eine Stabilisierung von Wasserstoffketten oder Clusters, die durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden. Da hierdurch mehr Wassermoleküle immobilisiert werden als in reinem Wasser, findet man eine negative Überschußentropie^[13] und eine große positive freie Energie der Lösung (Abb. 3).

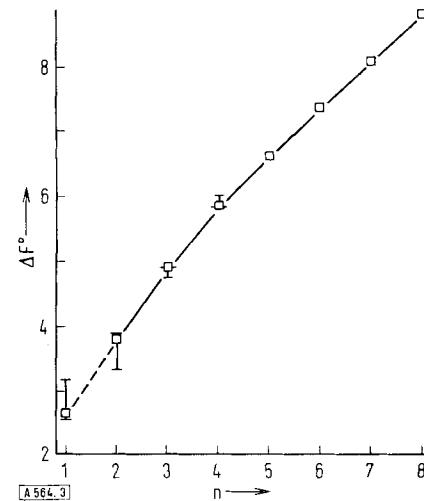


Abb. 3. Vergleich der experimentellen (I) und der theoretischen (—□—□—) freien Überschußenergien (kcal/mol) von wässrigen Lösungen geradkettiger aliphatischer Kohlenwasserstoffe bei 25 °C. n ist die Zahl der Kohlenstoffatome im Kohlenwasserstoff. Die Kurve verbindet die theoretischen Punkte miteinander, die nach Némethy und Scheraga [13] berechnet wurden.

Der mit der Bildung neuer Wasserstoffbrücken und mit der Zunahme der van der Waalsschen Wechselwirkungen einhergehende Enthalpie-Gewinn erklärt^[13] die Beobachtung, daß sich aliphatische Kohlenwasserstoffe in Wasser exotherm lösen.

Die Bildung hydrophober Bindungen (Abb. 4) kann im wesentlichen als eine teilweise oder vollständige Umkehrung der Auflösung eines Kohlenwasserstoffs in Wasser betrachtet werden. Kauzmann^[12] hat darauf hingewiesen, daß die stabilen Konformationen eines

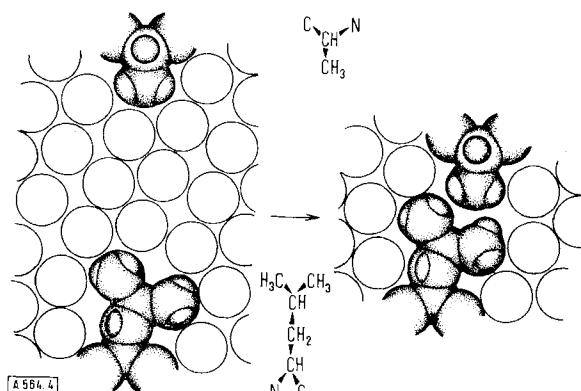


Abb. 4. Schematische Darstellung der Bildung einer hydrophoben Bindung zwischen einer Alanyl- und einer Leucyl-Seitenkette an einem Protein. Die beiden Seitenketten nähern sich, bis sie einander berühren, wobei die Zahl der unmittelbar benachbarten Wassermoleküle (schematisch durch Kreise angedeutet, ohne daß damit eine Vorstellung über die Struktur zum Ausdruck gebracht werden soll) abnimmt [14].

- [14] G. Némethy u. H. A. Scheraga, (a) J. physic. Chem. 66, 1773 (1962); (b) 67, 2888 (1963).

Proteins in wässriger Lösung diejenigen sind, in denen unpolare Gruppen miteinander in Kontakt stehen und so dem Wasser teilweise oder vollständig entzogen sind^[14]. Die Bildung solcher Kontakte hat eine große negative freie Energie (ΔF°), die sich aus einem großen positiven Entropieanteil (ΔS°) und einem kleinen positiven Enthalpieanteil (ΔH°), der auch nahe Null sein kann, zusammensetzt^[14]. Das Enthalpieglied ΔH° ist in der Nähe der Raumtemperatur ungefähr Null für aromatische Gruppen und positiv für aliphatische Gruppen^[14]. Die freie Energie ΔF° ist ein Maß für die Tendenz unpolarer Gruppen, sich zusammenzulagern, und damit für die Stärke der hydrophoben Bindung. Treibende Kraft für die Bildung hydrophober Bindungen ist die Entropieänderung.

In anderen polaren Lösungsmitteln können unpolare Gruppen gleichfalls die Tendenz haben, miteinander in Kontakt zu kommen, aber dies geschieht dann, weil die Energiebilanz der Wechselwirkungen Lösungsmittel/Lösungsmittel und Gelöstes/Gelöstes günstiger ist als die der Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und Gelöstem. Die treibende Kraft solcher lyophober^[15] Wechselwirkungen röhrt also von Enthalpieänderungen her.

Eine Folge dieser thermodynamischen Eigenart hydrophober Bindungen besteht also darin, daß sie bei tiefen Temperaturen mit steigender Temperatur fester werden^[14, 16]. Das Maximum der Bindungsstärke liegt für aliphatische Seitenketten schätzungsweise bei etwa 58 °C und für aromatische Seitenketten bei etwa 42 °C^[14].

Das partielle Molvolumen eines Kohlenwasserstoffs ist in wässriger Lösung wesentlich kleiner als in unpolaren Lösungsmitteln ($\Delta V^\circ < 0$ für den Lösungsvorgang). Dies läßt sich aus der strukturellen Anordnung der Wassermoleküle in der Umgebung des gelösten Stoffes erklären^[13]: Durch Wasserstoffbrücken verknüpfte Wassermoleküle haben zwar ein größeres spezifisches Volumen als die nicht so verbundenen Wassermoleküle, doch werden die so entstehenden Hohlräume teilweise von den gelösten inerten Molekülen ausgefüllt, so daß sich der Volumenbedarf durch die Entstehung dieser Strukturen verringert. Umgekehrt erscheint daher bei der Bildung hydrophober Bindungen eine Volumenzunahme^[14].

Klotz^[17, 18] hat eine andere Deutung für den Effekt unpolarer Gruppen in wässrigen Lösungen vorgeschlagen. Danach sollen sich in der Nachbarschaft unpolarer Gruppen Gebiete geordneter Struktur in Form eisähnlicher Hölle („Hydrokristalle“^[18]) bilden, weil unpolare Gruppen derartige Strukturen stabilisieren (Analogie mit kristallinen Gashydraten)^[19, 20]. Solche Eishölle würden reaktionsfähige Gruppen maskieren. Diese Theorie stößt aber aus thermodynamischen und strukturellen Gründen auf Schwierigkeiten. Es gibt keinen direkten Hinweis für die Existenz stabiler, langlebiger und unbeweglicher Wasserschichten an Makromolekülen, wie man sie für permanente Maskierung von Gruppen annehmen müßte. Außerdem müßten große un-

[15] H. J. Sage u. S. J. Singer, *Biochem. I*, 305 (1962).

[16] H. A. Scheraga, G. Némethy u. I. Z. Steinberg, *J. biol. Chemistry* 237, 2506 (1962).

[17] I. M. Klotz, *Brookhaven Symp. Biology* 13, 25 (1960).

[18] I. M. Klotz, *Federat. Proc.* 24, Suppl. 15, S-24 (1965).

[19] M. v. Stackelberg u. H. R. Müller, *Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem.* 58, 25 (1954).

[20] R. McMullan u. G. A. Jeffrey, *J. chem. Physics* 31, 1231 (1959).

polare Flächen an Makromolekülen zur Aggregation führen, ähnlich wie bei der Micell-Bildung^[12].

Némethy und *Scheraga*^[14] befaßten sich besonders mit Wechselwirkungen in Proteinen, an denen nur wenige Aminosäure-Seitenketten beteiligt sind, beispielsweise mit „paarweisen“ Wechselwirkungen (Abb. 4). Auf Grund der Löslichkeit von Kohlenwasserstoffen und der statistisch-thermodynamischen Theorie für Kohlenwasserstoff-Lösungen^[13] wurden für ΔF° , ΔH° und ΔS° solcher Wechselwirkungen zwischen unpolaren Aminosäure-Seitenketten obere und untere Grenzwerte abgeschätzt. Tabelle 1 enthält eine Auswahl dieser Werte.

Tabelle 1. Thermodynamische und strukturelle Parameter (berechnete Werte) für die Bildung paarweiser hydrophober Bindungen maximaler Stärke zwischen einigen Aminosäure-Seitenketten [a] bei 25 °C.

	Thermodynamische Parameter			Strukturelle Parameter [c]	
	$\Delta F_{H\varphi}^\circ$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta H_{H\varphi}^\circ$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta S_{H\varphi}^\circ$ (cl)	ΔY^s	Z_R
Aia-Ala [b]	-0,3	0,4	2,1	4	2
Ileu-Ileu	-1,5	1,8	11,1	10	5
Phe-Leu	-0,5	0,9	4,7	6	3
Phe-Phe	-1,4	0,8	7,5	12	6

[a] Ala = Alanin, Ileu = Isoleucin, Leu = Leucin, Phe = Phenylalanin.

[b] Die hier angegebenen Werte gelten näherungsweise auch für eine paarweise hydrophobe Bindung minimaler Stärke zwischen zwei beliebigen Aminosäure-Seitenketten.

[c] Die Bedeutung von ΔY^s und Z_R wird im Text erklärt.

Die freie Energie $\Delta F_{H\varphi}^\circ$ einer hydrophoben Bindung setzt sich aus mehreren Teilstücken zusammen: aus der Änderung der freien Energie (ΔF_W°) bei der Strukturänderung im Wasser, an der sich ΔY^s Wassermoleküle beteiligen, die nach der Bildung der hydrophoben Bindung nicht mehr Nachbarn der vorher offenliegenden unpolaren Gruppen sind; aus der Differenz der Energien der van der Waalschen Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Gruppen ($Z_R E_R$, wobei E_R die Energie für eine paarweise Wechselwirkung und Z_R die Zahl solcher Paare ist) und den Energien der Wechselwirkungen zwischen den freiliegenden unpolaren Gruppen und den ΔY^s Wassermolekülen, die ihre Nachbarn waren ($0,5 \Delta Y^s E_R$); und aus der Entropieänderung, die mit dem teilweisen Verlust der Flexibilität der unpolaren Seitenketten (am Makromolekül) einhergeht, wenn sich die hydrophobe Bindung bildet ($\Sigma \Delta F_{rot}$). Man erhält also die Gleichung:

$$\Delta F_{H\varphi}^\circ = \Delta Y^s \Delta F_W^\circ + Z_R E_R - 0,5 \Delta Y^s E_R + \Sigma \Delta F_{rot} \quad (1)$$

Die beiden Energie-Parameter der van der Waals-Wechselwirkungen sind $E_R = -0,15$ kcal/mol für aliphatische und $-0,50$ kcal/mol für aromatische Gruppen sowie $0,5 E_R = -0,031$ kcal/mol für aliphatische und $-0,16$ kcal/mol für aromatische Gruppen. Für die in Proteinen auftretenden Aminosäuren liegt ΔF_{rot} je nach Größe der Seitenkette zwischen 0 und 0,3 kcal/mol. ΔF_W° ist temperaturabhängig. Bei 25 °C hat es den Wert von $-0,123$ kcal/mol^[13]. Tabelle 1 enthält typische Werte für ΔY^s und für Z_R .

Diese Berechnungen wurden auf hydrophobe Bindungen zwischen den unpolaren Teilen von Seitenketten ausgedehnt^[14, 21], die auch polare Gruppen enthalten, beispielsweise auf Glutaminsäure, Glutamin, Lysin und Tyrosin. Es ließ sich zeigen^[21], daß solche Seitenketten hydrophobe Bindungen mit anderen Seitenketten oder sogar selbst mit der Peptidkette des Proteins bilden können, während ihre endständigen polaren Gruppen mit dem Lösungsmittel oder mit anderen polaren Gruppen in Kontakt stehen. So findet man beispielsweise in kristallinem Myoglobin Seitenketten, die parallel zur Oberfläche des Moleküls laufen^[22].

Auch für Wechselwirkungen, an denen mehrere Seitenketten beteiligt sind, wurden die freien Energien berechnet^[14]. Insbesondere wurden die thermodynamischen Parameter für den Übergang einer unpolaren Seitenkette aus einer vollkommen wäßrigen Umgebung in ein bereits existierendes unpolares Gebiet abgeschätzt^[14]. Die Spalten 2 bis 4 der Tabelle 2 enthalten

Tabelle 2. Berechnete thermodynamische Parameter für den Übergang von Aminosäure-Seitenketten und entsprechenden Kohlenwasserstoffen aus Wasser in ein unpolares Lösungsmittel bei 25 °C.

Aminosäure-Seitenketten [a]				Kohlenwasserstoffe		
ΔF_{tr}^0 (kcal mol ⁻¹)	ΔH_{tr}^0 (kcal mol ⁻¹)	ΔS_{tr}^0 (cl)	Δf_t [d] (kcal mol ⁻¹)		ΔF_{tr}^0 (kcal mol ⁻¹)	
Ala	-1,3	1,5	9,4	-0,73	Methan	-2,6
Val	-1,9	2,2	13,7	-1,69	Propan	-5,0
Leu	-1,9	2,4	14,3	-2,42	Butan	-5,8
Ileu	-1,9	2,4	14,5	-2,97		
Met	-2,0	2,7	16,0	-1,30		
Pro	-2,0	2,2	14,0			
Phe	-0,3 [b]	2,7	10,1	-2,65	Toluol	-5,3
	-1,8 [c]	1,0	9,5			
Inkrement für eine Methylgruppe				-0,73		-0,8 [e]
Lit.	[14]	[14]	[14]	[23]		[13]

[a] Ala = Alanin, Ileu = Isoleucin, Leu = Leucin, Met = Methionin, Phe = Phenylalanin, Pro = Prolin, Val = Valin.

[b] Übergang in ein aliphatisches Lösungsmittel.

[c] Übergang in ein aromatisches Lösungsmittel.

[d] Beitrag der Seitenkette zur freien Energie des Übergangs einer Aminosäure aus Wasser in Äthanol nach Berechnungen von Tanford [23].

[e] Inkrement für eine Methylgruppe. Nach [13]. Für unverzweigte Kohlenwasserstoffe ist $\Delta H^0 = -0,23$ kcal/mol und $\Delta S^0 = 1,76$ cl.

berechnete Werte für diesen Vorgang. Sie sind zum Vergleich der freien Energie des Übergangs von Kohlenwasserstoffen ähnlicher Größe von Wasser in einen Kohlenwasserstoff als Lösungsmittel gegenübergestellt (Spalte 6). Beim Vergleich der Werte für Kohlenwasserstoffe und für Aminosäure-Seitenketten muß man berücksichtigen, daß die Parameter für den Übergang einer Seitenkette aus einem Medium in ein anderes kleiner sein müssen als für die Lösung eines freien Kohlenwasserstoffs mit der gleichen Zahl von Kohlenstoffatomen, da das Volumen der Peptid-Hauptkette die Zahl der Lösungsmittelmoleküle vermindert, die mit der Seitenkette in Berührung stehen können.

Ein andersartiger Versuch, die Stabilisierung von Protein-Konformationen durch hydrophobe Bindungen ab-

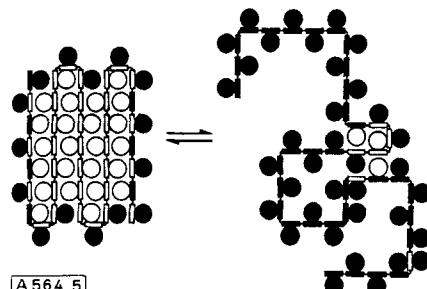
[21] G. Némethy, J. Z. Steinberg u. H. A. Scheraga, *Biopolymers* 1, 43 (1963).

[22] J. C. Kendrew, *Brookhaven Symp. Biology* 15, 216 (1962).

zuschätzen, stammt von Tanford^[23-26]. Er nahm an^[23], daß die freie Energie für die Auffaltung eines Proteins gegeben ist durch

$$\Delta F = -\Delta S_{conf} + \sum \Delta f_u, \quad (2)$$

wobei ΔS_{conf} die Änderung der Konformationsentropie der Polypeptidkette bedeutet und $\sum \Delta f_u$ die Änderung der freien Energie für den Übergang der Gruppen des Proteinmoleküls aus ihrer Umgebung in der nativen Form des Proteins in ihre Umgebung in der aufgefalteten Form (Abb. 5). Er nahm weiter an, (a) daß $\sum \Delta f_u$



A 564.5

Abb. 5. Schematische Darstellung des nativen (links) und des aufgefalteten Zustands (rechts) eines Proteinmoleküls nach Tanford [25]. Die Rechtecke symbolisieren Peptidgruppen, die Kreise deuten Seitenketten an. Schwarze gezeichnete Symbole entsprechen Gruppen, die in Berührung mit dem Lösungsmittel stehen, weiße gezeichnete Symbole sind gegen das Lösungsmittel abgeschirmt. Nachgedruckt aus [25] mit Genehmigung der American Chemical Society.

zum größten Teil durch die Freigabe vorher abgeschirmter unpolarer Gruppen an die wäßrige Umgebung entsteht, (b) daß sich $\sum \Delta f_u$ additiv aus den Δf_u -Werten für die einzelnen Aminosäure-Seitenketten des Proteins zusammensetzt und (c), daß Δf_u für den Übergang einer Aminosäure-Seitenkette gleichgesetzt werden kann mit Δf_t , d.h. mit der Änderung der freien Energie beim Übergang der gleichen Seitenkette aus einer äthanolischen Lösung in eine wäßrige Lösung. Er berechnete Δf_t für Aminosäure-Seitenketten, indem er von der freien Energie des Übergangs der Aminosäure den Wert für den Übergang des Glycins subtrahierte. Durch die Bestimmung der Löslichkeiten verschiedener Aminosäuren in gemischten Lösungsmitteln wurden die Werte von $\sum \Delta f_u$ für die durch das Lösungsmittel hervorgerufene Denaturierung abgeschätzt^[23, 24]. Tanford hat auch ein Verfahren für die numerische Ermittlung der Unterschiede der konformativen Stabilität von Proteinen in verschiedenen Lösungsmitteln beschrieben, das auf einem Vergleich der Δf_u -Werte für den Übergang von einem Lösungsmittel zum anderen beruht.

Die von Tanford^[23] für den Übergang aus Äthanol in Wasser experimentell bestimmten Δf_t -Werte sind in Tabelle 2 berechneten Werten (ΔF_{tr}^0) gegenübergestellt^[14]. Der Unterschied zwischen beiden Reihen kann zwei Gründe haben: ist $|\Delta f_t| > |\Delta F_{tr}^0|$, so kann darin der sterisch bedingte Unterschied zwischen einer freien Aminosäure und ihrer Seitenkette im Protein zum Ausdruck kommen. Die andere Ursache kann in der Natur der Lösungsmittel begründet liegen. Die berechneten

[23] C. Tanford, *J. Amer. chem. Soc.* 84, 4240 (1962).

[24] Y. Nozaki u. C. Tanford, *J. biol. Chemistry* 238, 4074 (1963).

[25] C. Tanford, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 2050 (1964).

[26] Y. Nozaki u. C. Tanford, *J. biol. Chemistry* 240, 3568 (1965).

Werte gelten für den Übergang aus einem Kohlenwasserstoff in Wasser, während *Tanford* und *Nozaki* Äthanol als organisches Medium verwendeten. Dessen polare OH-Gruppe kann Unterschiede verursachen.

Es ist zu hoffen, daß man eines Tages in der Lage sein wird, die freie Energie der Stabilisierung einer Protein-Konformation aus der Aminosäure-Zusammensetzung und der Gesamtzahl der möglichen Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten abzuleiten. In der Anwendung von Gleichung (2) ist jedoch Vorsicht geboten. Nicht alle Aminosäure-Seitenketten müssen im nativen Protein verborgen sein, und einige unpolare Wechselwirkungen treten vermutlich auch im aufgefalteten Zustand auf^[27a]. Beide Effekte führen dazu, daß $\Sigma \Delta f_u$ kleiner ist als man es aus den Δf_t -Werten und der Aminosäure-Zusammensetzung berechnet. Auf das Problem der Additivität kommen wir später zurück.

Der Einfluß innermolekularer hydrophober Bindungen auf die Konformation einer Polyaminosäure-Helix läßt sich mit der statistischen Mechanik erfassen^[27]. Hydrophobe Bindungen können sich zwischen ausreichend großen Seitenketten in benachbarten Windungen der α -Helix^[14] und sogar zwischen dem β -Kohlenstoffatom einer L-Aminosäure und dem α -Kohlenstoffatom des vierten vorangehenden Aminosäurerestes in einer rechts-gängigen α -Helix bilden^[14]. Diese Bindungen können zur Stabilität der α -Helix beitragen^[16]. Die Theorie von *Lifson* und *Roig*^[28] für den Helix-Knäuel-Übergang von Polyglycin wurde so erweitert^[29], daß sie auch die hydrophobe C(β)-C(α)-Bindung berücksichtigt, die in Poly-L-alanin auftritt. Bei einer Kettenlänge von 100 Aminosäureresten ergibt sich dann rechnerisch auf Grund des von *Némethy* und *Scheraga*^[14] angegebenen $\Delta F_{H\phi}^0$ -Wertes, daß die Temperatur des Helix-Knäuel-Übergangs für Poly-L-alanin um 175 °C höher liegt als für ein Polyglycin gleicher Größe. Experimentell findet man^[29a], daß Poly-L-alanin mit einer Kettenlänge von etwa 175 Aminosäureresten selbst bis zumindest 95 °C die α -Helix-Konformation beibehält. Hingegen existiert Poly-glycin (das allerdings in Wasser nicht löslich ist) nicht einmal in nichtwässrigen Lösungsmitteln als eine α -Helix.

Bei einer ausführlicheren Behandlung der nicht-kovalenten Bindungen in Polyaminosäuren haben *Poland* und *Scheraga*^[27] auch die hydrophoben Bindungen im statistischen Knäuel berücksichtigt. Sie zeigten, daß hydrophobe Bindungen in helixförmigen Sequenzen die Helix beträchtlich stabilisieren, daß dieser Effekt aber weitgehend ausgeglichen wird, wenn hydrophobe Bindungen auch im statistischen Knäuel auftreten. Die (berechnete) Temperaturabhängigkeit des Helix-Knäuel-Umwandlung ist in völliger Abwesenheit hydrophober Bindungen sehr ähnlich derjenigen, die man errechnet, wenn sowohl Helix als auch Knäuel hydrophobe Bindungen enthalten (Abb. 6). Im statistischen Knäuel ist

[27] D. C. *Poland* u. H. A. *Scheraga*, *Biopolymers* 3, (a) 283, (b) 305, (c) 335 (1965).

[28] S. *Lifson* u. A. *Roig*, *J. chem. Physics* 34, 1963 (1961).

[29] M. *Bixon*, H. A. *Scheraga* u. S. *Lifson*, *Biopolymers* 1, 419 (1963).

[29a] W. B. *Gratzer* u. P. *Doty*, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 1193 (1963).

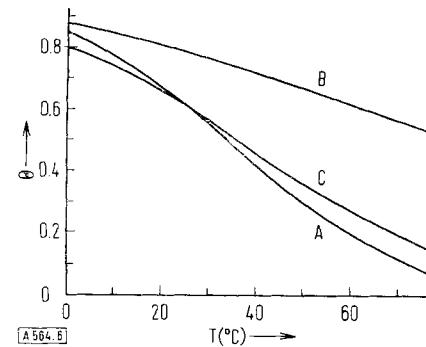


Abb. 6. Berechnete Kurven für den Helix-Knäuel-Umwandlung einer aus 20 Aminosäure-Resten bestehenden Polypeptidkette (A) in Abwesenheit hydrophober Bindungen, (B) mit hydrophoben Bindungen nur in der Helix und (C) mit hydrophoben Bindungen sowohl in der Helix als auch im statistischen Knäuel. Auf der Ordinate ist die relative Zahl der Wasserstoffbrücken aufgetragen. Nach *Poland* und *Scheraga* [27a].

die Wahrscheinlichkeit, daß sich zwischen den Seitenketten benachbarter Aminosäurereste hydrophobe Bindungen bilden, relativ hoch. Sie beträgt etwa 0,2 für Ala-Ala, 0,3 für Leu-Leu und 0,6 für Ileu-Ileu (Tabelle III in^[27c]). Die Wahrscheinlichkeit, daß sich im Knäuel große Schlaufen bilden, nimmt mit der Größe solcher Schlaufen rasch ab. Ist t die Zahl der Peptidgruppen zwischen zwei gegenseitig hydrophob gebundener Seitenketten, so beträgt die Wahrscheinlichkeit 0,03 bis 0,04 für $t = 2$ und 0,02 für $t = 3$ ^[27c].

Poland und *Scheraga* haben jedoch gezeigt, daß die Helix wiederum beträchtlich stabilisiert wird, wenn hydrophobe Bindungen zwischen den Helices in Betracht gezogen werden (interhelical hydrophobe Bindungen). Man findet dann rechnerisch einen scharfen Helix-Knäuel-Übergang^[27b], 27c]. Normalerweise bilden kurze Polyaminosäureketten eine einzige helixartige Sequenz. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit, daß an Stelle einer einzigen Helix mehrere kürzere auftreten, ziemlich groß, wenn sich dadurch Bindungen zwischen den Seitenketten mehrerer Helices formen können.

So berechneten *Poland* und *Scheraga*^[27b], daß eine aus 20 Aminosäureresten bestehende Poly-L-alaninkette unter bestimmten Bedingungen bei niedrigen Temperaturen (< 40 °C) vorzugsweise in einer Struktur vorliegt, in der zwei parallele Helices miteinander in Wechselwirkung stehen. Die Einzelkette und drei miteinander in Wechselwirkung stehende parallele Helices haben

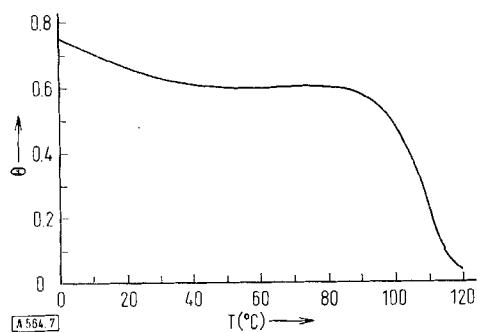


Abb. 7. Berechnete Kurve für den Helix-Knäuel-Übergang einer aus 20 Aminosäure-Resten bestehenden Poly-L-alaninkette unter der Annahme von Wechselwirkungen zwischen den Helices. Auf der Ordinate ist die relative Zahl der Wasserstoffbrücken aufgetragen. Nach *Poland* und *Scheraga* [27b].

geringere Wahrscheinlichkeiten. Zwischen 40 und 80 °C ist die stabilste Struktur diejenige mit drei in Wechselwirkung stehenden Helices, während sich oberhalb 80 °C ein statistisches Knäuel bildet (Abb. 7). Ähnliche Ergebnisse sind für längere Helices errechnet worden [27c]. Die so ermittelten Wahrscheinlichkeiten und Übergangstemperaturen hängen jedoch sehr empfindlich von der Wahl der Parameter ab.

Gegenwärtig sind derartige Berechnungen noch rein theoretisch, denn die von ihnen geforderten Übergänge sind bisher nicht beobachtet worden. Es könnte sogar sein, daß sie mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden zur Untersuchung von Polyaminosäuren gar nicht nachzuweisen sind. Man hat jedoch für ein Copolymer aus L-Leucin und L-Glutaminsäure [30] drei thermische Übergangspunkte beobachtet, und *Poland* und *Scheraga* [27c] nehmen an, daß darin Unterschiede in den Wechselwirkungen zwischen Helices zum Ausdruck kommen könnten. Bemerkenswert ist auch, daß der berechnete Helix-Knäuel-Übergang wesentlich schärfster wird, wenn man annimmt, daß zwischen den Helices Wechselwirkungen bestehen, und daß die mit dieser Annahme berechneten Kurven denjenigen ähnlich sind, die man für die Umwandlungen globulärer Proteine beobachtet [27b].

Experimentelle Studien an Modellverbindungen

Der Hauptzweck von Löslichkeitsuntersuchungen an Modellverbindungen ist die Bestimmung der freien Energie des Übergangs unpolarer Gruppen (a) aus einer wäßrigen in eine unpolare Lösung und (b) aus Wasser in ein gemischtes Lösungsmittel. Im Falle (a) erhält man Anhaltspunkte für die Änderung der freien Energie beim Eintritt unpolarer Gruppen in die hydrophoben Bereiche eines Proteins, während man bei (b) Auskunft über den Beitrag bekommt, den hydrophobe Bindungen zur Stabilisierung von Proteinen gegen eine Denaturierung durch das Lösungsmittel leisten.

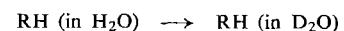
1. Löslichkeiten von Kohlenwasserstoffen und der Einfluß von schwerem Wasser

Durch eine Bestimmung der thermodynamischen Eigenschaften von Kohlenwasserstoffen gewinnt man den direktesten Aufschluß über das Verhalten unpolarer Gruppen. Aus diesem Grund wurden Löslichkeitswerte aus der Literatur bei der Entwicklung der Theorie der Wasserstruktur und der hydrophoben Bindung verwendet [13, 14]. Neuerdings haben *Kresheck* et al. [31] die Löslichkeiten von Propan und Butan zwischen 0 und 60 °C mit Hilfe einer gasometrischen Technik neu bestimmt und die Ergebnisse früherer Messungen (in [13] zitiert) bestätigt. Sie untersuchten auch die Löslichkeiten dieser Kohlenwasserstoffe in D_2O und fanden, daß

[30] G. D. Fasman, C. Lindblow u. E. Bodenheimer, *Biochemistry* 3, 155 (1964).

[31] G. C. Kresheck, H. Schneider u. H. A. Scheraga, *J. physic. Chem.* 69, 3132 (1965).

sie um weniges größer sind als die Löslichkeiten in H_2O . Die freie Energie ΔF_t° für den Übergang



beträgt bei 0 °C etwa -40 ± 10 cal/mol und wird bei 50 °C nahezu Null. Andererseits ergaben Messungen der Löslichkeit von Aminosäuren in D_2O und H_2O für die Beiträge der Seitenketten (Δf_t) kleine positive Werte [31]. Auch die kritische Mizellbildungskonzentration in leichtem und schwerem Wasser [31] spricht für eine etwas geringere Löslichkeit unpolarer Gruppen in D_2O . *Kresheck* et al. [31] schlossen daraus, daß hydrophobe Bindungen in D_2O etwas fester sind. Für Argon hat ΔF_t° dagegen das gleiche Vorzeichen [32] wie für Kohlenwasserstoffe. Entweder stört also die polare Gruppe, mit der die Seitenkette einer Aminosäure verbunden ist, die Wechselwirkungen, oder enthalten die für vollkommen unpolare Stoffe mitgeteilten Beobachtungen einen Fehler. Da aber die Löslichkeitsunterschiede in leichtem und schwerem Wasser sehr gering sind, ist auch für die Stärke der hydrophoben Bindungen in diesen Lösungsmitteln kein großer Unterschied zu erwarten.

Wetlaufer et al. [33] untersuchten die Löslichkeiten verschiedener Kohlenwasserstoffe in 7 M Harnstoff- und 4,9 M Guanidiniumchlorid-Lösung (Abb. 8). Außer für Methan und Äthan bei niedrigen Temperaturen ist die freie Energie des Übergangs aus Wasser in diese Lösungen negativ (d.h. die Löslichkeit nimmt beim Übergang zu). Hauptkomponente der Änderung der freien

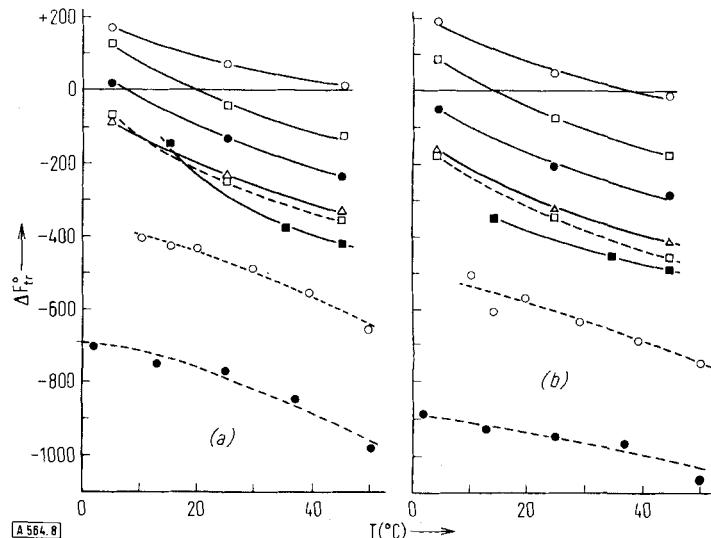


Abb. 8. Temperaturabhängigkeit der Änderung der freien Energie (cal/mol) beim Übergang von Kohlenwasserstoffen aus wäßriger Lösung (a) in eine 7 M Lösung von Harnstoff und (b) eine 4,9 M Lösung von Guanidiniumchlorid, bezogen auf Konzentrationen, ausgedrückt in Molenbrüchen. Nach *Wetlaufer* et al. [33], nachgedruckt mit Erlaubnis der American Chemical Society.

○ — ○ Methan	□ — □ Butan
□ — □ Äthan	■ — ■ Neopentan
● — ● Propan	○ — ○ Toluol
△ — △ Isobutan	● — ● Skatol

[32] A. Ben-Naim, *J. chem. Physics* 42, 1512 (1965).

[33] D. B. Wetlaufer, S. K. Malik, L. Stoller u. R. L. Coffin, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 508 (1964).

Energie ist die positive Entropie des Übergangs, die die ebenfalls positive Enthalpie überwiegt. Bei 25 °C liegt ΔF_{tr}° zwischen +60 cal/mol für Methan und -770 cal/mol für Skatol, das Analoge der Seitenkette des Tryptophans. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen von Löslichkeitsbestimmungen bei Aminosäuren durch *Nozaki* und *Tanford*^[24] (siehe unten) überein und zeigen, daß Harnstoff und Guanidiniumchlorid hydrophobe Bindungen schwächen^[34].

Kohlenwasserstoffe haben als Modellverbindungen zwei Nachteile: Infolge ihrer geringen Löslichkeit in Wasser ist es schwierig, ausreichend genaue Werte zu bekommen, und man gelangt zu falschen Folgerungen, falls polare Substituenten in Proteinen oder anderen mehrfunktionellen Lösungsbestandteilen einen störenden Einfluß haben, d.h. wenn sich die Wechselwirkungen der verschiedenen funktionellen Gruppen mit dem Wasser nicht genau additiv verhalten. Aus diesen Gründen sind für viele Untersuchungen Alkohole, Amide, Carbonsäuren oder Aminosäuren als Modellverbindungen verwendet worden.

2. Löslichkeiten von Aminosäuren

Die Folgerungen, die *Tanford*^[23] aus Löslichkeitsdaten gezogen hat, sind oben beschrieben worden. In späteren Arbeiten^[24, 26] wurden auch Lösungen von Harnstoff und Äthyenglykol in die Messungen einbezogen. Es ergab sich, daß die meisten Aminosäuren in diesen Lösungen stärker löslich sind, was bedeutet, daß Harnstoff und Äthyenglykol hydrophobe Bindungen schwächen. Einige Meßergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Man erkennt, daß Harnstoff ein sehr viel wirksameres Denaturierungsmittel als Äthyenglykol ist. *Wetlaufer*^[33] hat darauf hingewiesen, daß es besser ist, sich auf die Löslichkeiten von Aminosäuren als auf die von Kohlenwasserstoffen zu beziehen, wenn durch die Peptidgruppe das Prinzip der Additivität der Einflüsse

Tabelle 3. Experimentelle Werte für die Beiträge der Seitenketten zur freien Energie des Übergangs von Aminosäuren aus Wasser in wäßrige Lösungen von Harnstoff und Äthylenglykol bei 25 °C. Nach *Nozaki* und *Tanford* [24, 26].

	Δf_f (cal/mol)		
	Harnstoff		Äthylenglykol 30 %
	6 M	8 M	
Ala [a]	10	10	30
Leu	-225	-295	-130
Met	-325	-415	-65
Phe	-470	-600	-215
Try	-730	-920	-515
Tyr	-580	-735	-305
Gln	-190	-230	10

[a] Ala = Alanin, Gln = Glutamin, Leu = Leucin, Met = Methionin, Phe = Phenylalanin, Try = Tryptophan, Tyr = Tyrosin.

[34] Die denaturierende Wirkung des Harnstoff- und des Guanidiniumchlorids ist vielleicht nicht ausschließlich auf die Verringerung hydrophober Wechselwirkungen zurückzuführen. *Robinson* und *Jencks* [35] schlossen aus Löslichkeitsstudien am *N*-Acetyl-triglycylglycin-äthylester, daß in Gegenwart von Harnstoff- oder Guanidiniumchlorid die Peptidgruppe selbst löslicher wird.

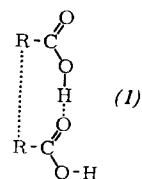
[35] D. R. Robinson u. W. P. Jencks, J. biol. Chemistry 238, PC 1558 (1963).

funktioneller Gruppen verletzt wird. Es ist jedoch zweifelhaft, ob freie Aminosäuren als vollkommen adäquate Modelle für die Peptide in einer Proteinkette angesehen werden können, denn freie Aminosäuren enthalten geladene NH_3^+ - und COO^- -Gruppen.

3. Wechselwirkungen zwischen anderen niedermolekularen Verbindungen

Löslichkeitsmessungen gestatten Schlüsse auf die Verhältnisse beim Übergang unpolarer Gruppen aus einem wässrigen Medium in das Innere eines Proteins, wo sie „verborgen“ sind. Will man die Stabilisierung von Proteinen durch hydrophobe Bindungen abschätzen, ist es ebenso wichtig, die Wechselwirkungen zwischen nichtvollständig „verborgenen“ unpolaren Gruppen zu kennen. Sie entsprechen den „paarweisen“ hydrophoben Bindungen, für die Némethy und Scheraga^[14] eine Theorie entwickelt haben.

Schrier, Pottle und *Scheraga*^[36] haben gezeigt, daß man die Zunahme der Dimerisierungskonstanten von Carbonsäuren mit der Kettenlänge (Ameisensäure < Essigsäure < Propionsäure < Buttersäure < Phenylessigsäure) in Wasser erklären kann, wenn man zwischen den unpolaren Seitenketten der dimeren Säuren hydrophobe Bindungen annimmt, wie dies Formel (1) zeigt.



Zwischen den Carboxylgruppen bildet sich eine einfache Wasserstoffbrücke, während Dimere in der Gasphase vermutlich durch zwei Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden (in der Gasphase ist die Dimerisierungs- konstante von der Kettenlänge unabhängig). Die Inkremente der Dimerisierungskonstanten in wässriger Lösung stimmen mit den Werten, welche die Theorie der hydrophoben Bindung liefert [14], ungefähr überein.

Auch für die Adsorption verschiedener Carbonsäuren und Alkohole aus Wasser an Polystyrol wurden die thermodynamischen Parameter bestimmt [37]. Während man für den Einfluß der unpolaren Seitenketten der Säuren eine ungefähre Übereinstimmung zwischen den theoretischen [14] und experimentellen Werten findet, gilt dies für die Alkohole nicht. Die Deutung der experimentellen Ergebnisse ist mit einigen Unsicherheiten behaftet, weil die polare Gruppe bei der Adsorption eine sehr bedeutende Rolle spielt und weil die Art der unpolaren Wechselwirkungen im System Polystyrol/adsorbierte Verbindung nicht so gut definiert ist wie in einem Lösungssystem.

Auch Mukerjee^[38] hat die Dimerisierung höherer Carbonsäuren mit der Bildung von hydrophoben Bindun-

[36] E. E. Schrier, M. Pottle u. H. A. Scheraga, J. Amer. chem. Soc. 86, 3444 (1964).

[37] H. Schneider, G. C. Kresheck u. H. A. Scheraga, J. phys. Chem. 69, 1310 (1965).

[38] P. Mukerjee, J. physic. Chem. 69, 2821 (1965).

gen zu erklären versucht. Nach seinen Ergebnissen bleibt der Beitrag hydrophober Bindungen von einer bestimmten Länge der Seitenkette ($C_{16}H_{31}COOH$) an konstant, vermutlich infolge einer Verknäuelung der langen Seitenketten und der damit einhergehenden Änderungen im Kontakt zwischen den Methylengruppen und dem Wasser (vgl. [13]).

Nach einer Untersuchung von *Eagland* und *Franks* [39] hängt die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Fettsäurealkalisalzen in einer solchen Weise von der Kettenlänge ab, daß man auf eine Assoziation der Fettsäure-Moleküle zu Aggregaten der Form $HX \cdot X^-$ schließen kann. Dabei stimmen die experimentell ermittelten thermodynamischen Parameter mit denjenigen Werten überein, die sich aus der Theorie der hydrophoben Bindung [14] ergeben.

Micellen

Die Micellbildung ist ein ausgezeichnetes Beispiel für die Stabilisierung unpolarer Aggregate durch hydrophobe Bindungen. Bei der Bildung von Micellen spielen die Kopfgruppen der Moleküle eine ausgeprägte Rolle, was aus der starken Variation der kritischen Micellbildungskonzentration, der Micellgröße und -gestalt in verschiedenen Systemen hervorgeht. Daß die Wechselwirkung zwischen unpolaren Gruppen ein entscheidender Faktor ist, war schon in den frühen Theorien der Micellbildung [40,41] erkannt worden. *Poland* und *Scheraga* [42] haben die Stabilität nicht-ionischer Micellen unter Berücksichtigung hydrophober Bindungen studiert. Danach setzt sich die freie Energie einer Micelle aus Anteilen zusammen, die sich auf die Micelle als Ganzes, auf die Bewegungsfreiheit der Kohlenwasserstoffketten in ihr und auf Beiträge des Lösungsmittels beziehen. Auf letztere wurde die Theorie der hydrophoben Bindung [14] angewendet. Auf diese Weise läßt sich die Abhängigkeit der Micellgröße von Konzentration und Temperatur erklären [43].

Micellen können auch als Modelle bei der Untersuchung des Einflusses anderer Lösungsbestandteile auf hydrophobe Bindungen dienen. Besonders die Wirkung von Harnstoff auf Micellen ist wiederholt studiert worden [45,46]. Harnstoff erhöht die kritische Micellbildungskonzentration, was für eine Schwächung der hydrophoben Bindungen spricht (vgl. die oben erwähnten Löslichkeitsdaten). Ähnliche Resultate erhielt man bei der Untersuchung der Assoziation von Farbstoffmolekülen [47].

[39] *D. Eagland u. F. Franks*, *Trans. Faraday Soc.* **61**, 2468 (1965).
 [40] *P. Debye*, *J. physic. Colloid Chem.* **53**, 1 (1949).

[41] *E. D. Goddard, C. A. J. Hoeve u. G. C. Benson*, *J. physic. Chem.* **61**, 593 (1957).

[42] *D. C. Poland u. H. A. Scheraga*, *J. physic. Chem.* **69**, 2431 (1965).

[43] Die Theorie kann auch zur Behandlung von Micellen erweitert werden, deren Moleküle Ladungen tragen [44].

[44] *D. C. Poland u. H. A. Scheraga*, *J. Colloid Sci.* **21**, 273 (1966).

[45] *W. Bruning u. A. Holtzer*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 4865 (1961).

[46] *P. Mukerjee u. A. Ray*, *J. physic. Chem.* **67**, 190 (1963).

[47] *P. Mukerjee u. A. K. Ghosh*, *J. physic. Chem.* **67**, 193 (1963).

1. Wechselwirkungen mit unpolaren Lösungsbestandteilen

Eine Möglichkeit zum Studium hydrophober Bindungen in Proteinen ist die Untersuchung der Wechselwirkungen mit niedermolekularen, unpolaren Lösungsbestandteilen. Die Bindung unpolarer Lösungsbestandteile an unpolare Bereiche eines Proteins kann zwei Wirkungen haben: (a) die Löslichkeit des unpolaren Stoffes steigt durch Adsorption an die Proteinoberfläche oder durch Einlagerung in hydrophobe Bereiche oder (b) die unpolare Verbindung ruft konformative Änderungen im Protein hervor, indem sie in Wechselwirkung mit unpolaren Gruppen des Proteins tritt und dadurch dessen hydrophobe Bereiche aufbricht.

Ein Beispiel für den Effekt (a) fand *Wishnia* [48]. Er bestimmte die Löslichkeit von Äthan, Propan und Butan in wäßrigen Lösungen von Rinder-Serumalbumin, Hämoglobin und Lysozym. Die Löslichkeiten in den Proteinlösungen sind wesentlich höher als in reinem Wasser. Das Verhältnis der Löslichkeiten ist über einen Temperaturbereich von 25 °C nahezu konstant, was dafür spricht, daß die Bindungsenthalpie gering ist und daß hinter der erhöhten Löslichkeit eine Entropiezunahme steht. Ein ähnlicher Effekt wurde beim Lösen der gleichen Kohlenwasserstoffe in einer micellaren wäßrigen Lösung von Dodecylsulfat beobachtet [49].

Wishnia und *Pinder* [50] haben gezeigt, daß die F-Form von Rinder-Serumalbumin, die bei $pH < 4$ stabil ist, Kohlenwasserstoffe wesentlich schwächer bindet als die N-Form. Das Bindungsverhältnis beträgt 1:4 für Butan und 1:5 für Pentan. Für den Übergang von Butan aus Wasser in die Proteinlösung ist $\Delta S^\circ = 17 \text{ cl}$ und ΔH° nahezu Null. Beide Werte sind denen ähnlich, die man für den Übergang eines Kohlenwasserstoffs aus Wasser in eine unpolare Lösung ermittelt hat [13], was als Anzeichen dafür interpretiert wurde [50], daß die Bindungsstellen für Kohlenwasserstoffe in hydrophoben Bereichen der Proteinmoleküle liegen und durch Konformationsänderungen (Aufbrechen der hydrophoben Bereiche) verändert werden. Aus ähnlichen Untersuchungen am β -Lactoglobulin A und B schlossen *Wishnia* und *Pinder* [51], daß es in diesen Proteinen nur einen hydrophoben Bereich begrenzter Größe gibt, der mit Kohlenwasserstoffen in Wechselwirkung treten kann.

Bei Proteinen geringer konformativer Stabilität kann die Bindung eines unpolaren Lösungsbestandteils zu Änderungen der Konformation führen. *Wetlaufer* und *Lovrien* [52] haben rasche reversible Änderungen in der Viscosität, im Verhalten bei der Titration, in der optischen Drehung und im UV-Spektrum von Rinder-Serumalbumin bei alkalischem pH und von β -Lactoglobulin bei neutralem pH beobachtet, wenn sie wäß-

[48] *A. Wishnia*, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **48**, 2200 (1962).

[49] *A. Wishnia*, *J. physic. Chem.* **67**, 2079 (1963).

[50] *A. Wishnia u. T. Pinder*, *Biochemistry* **3**, 1377 (1964).

[51] *A. Wishnia u. T. W. Pinder jr.*, *Biochemistry* **5**, 1534 (1966).

[52] *D. B. Wetlaufer u. R. Lovrien*, *J. biol. Chemistry* **239**, 596 (1964).

riegen Lösungen dieser Proteine verschiedene Kohlenwasserstoffe zusetzen.

Andererseits kann die hydrophobe Bindung kleiner Moleküle an der Oberfläche eines Proteins dieses vor der Auffaltung schützen. So bewahrt Natrium-dodecylsulfat Rinder-Serumalbumin vor der Denaturierung^[53, 54]. Voraussetzung dafür ist, daß die anionische Kopfgruppe des Detergents von einer kationischen Gruppe an der Proteinoberfläche gebunden wird^[54]. Das Detergent wirkt also als bifunktionelles Agens, was vermutlich der Grund für den Unterschied zwischen seiner Wirkung und der eines Kohlenwasserstoffs ist. Den Einfluß unpolarer Verbindungen auf die Denaturierung von Proteinen haben Schrier und Scheraga^[55, 56] systematisch untersucht. Setzt man einer wäßrigen Lösung von Ribonuclease Alkohol zu, so sinkt die Temperatur T_{tr} der thermischen Denaturierung. Die Änderung ist der Alkoholkonzentration (bis zu mehreren mol pro Liter) proportional und wächst mit der Kettenlänge des Alkohols (Abb. 9 und Tabelle 4). Die Abnahme der Umwandlungstemperatur T_{tr} läßt sich mit Hilfe der Theorie der hydrophoben Bindung berechnen,

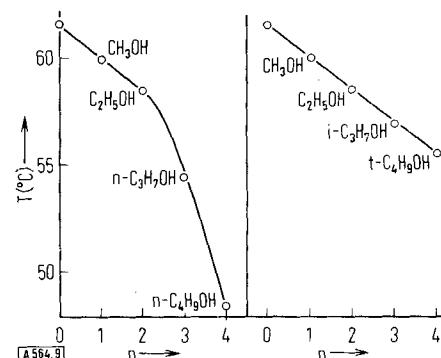


Abb. 9. Temperatur der thermischen Denaturierung von Ribonuclease (1 mol Lösungen in verschiedenen Alkoholen). Links geradkettige Alkohole als Lösungsmittel, rechts verzweigte Alkohole als Lösungsmittel. n ist die Zahl der C-Atome in der Alkylkette der Alkohole. Nach Schrier, Ingwall und Scheraga [56], nachgedruckt mit Erlaubnis der American Chemical Society.

Tabelle 4. Erniedrigung der Temperatur T_{tr} der thermischen Denaturierung von Ribonuclease in wäßriger Lösung bei Zusatz verschiedener Alkohole (Konzentration: 1 M).

	$\Delta F_{H\phi}^0$ [a] (kcal mol ⁻¹)	ΔT_{tr} (°K) [b]		
		Ber. [56]	Beob. [56] [c]	Beob. [57]
Methanol	-0,80	- 1,9	- 1,6	- 1,4
Äthanol	-1,15	- 3,3	- 3,1	- 3,0
n-Propanol	-1,55	- 6,0	- 7,1	- 7,5
n-Butanol	-1,95	-11,0	-13,1	

[a] Freie Energie für die Bildung einer hydrophoben Bindung zwischen dem unpolaren Teil des Alkohols und einem unpolaren Bereich ähnlicher Größe an der Ribonuclease. Für 62 °C berechnete Werte. Nach [56].

[b] In rein wäßriger Lösung ($\text{pH} = 6,7$) beträgt die Übergangstemperatur $T_{tr} = 61,5^\circ\text{C}$ [55].

[c] Vgl. Abbildung 9.

[53] R. Lovrien, J. Amer. chem. Soc. 85, 3677 (1963).

[54] G. Markus, R. L. Love u. F. C. Wissler, J. biol. Chemistry 239, 3687 (1964).

[55] E. E. Schrier u. H. A. Scheraga, Biochim. biophysica Acta 64, 406 (1962).

[56] E. E. Schrier, R. T. Ingwall u. H. A. Scheraga, J. physic. Chem. 69, 298 (1965).

wenn man für die Bindung des Alkohols an das Protein aus der freien Energie $\Delta F_{H\phi}^0$ der beteiligten Bindungen und aus dem mit der Assoziation einhergehenden Entropieverlust eine Bindungskonstante ermittelt (Tabelle 4)^[56].

Merkwürdigerweise wird die Temperatur der Denaturierung durch einen Alkohol mit verzweigter Alkylkette (z.B. durch Isopropanol) nur etwa so stark herabgesetzt wie durch das niedrigere Homologe mit unverzweigter Alkylkette (Äthanol), während der entsprechende Alkohol mit gerader Alkylkette (n-Propanol) stärker wirkt^[55]. Möglicherweise haben die unpolaren Bindungsstellen eine begrenzte Größe oder Gestalt, so daß sie nicht den gesamten unpolaren Teil eines verzweigten Alkohols binden können. Vielmehr muß man den Alkoholen eine effektive Kettenlänge zuschreiben, die dem unverzweigten Teil der Alkylkette entspricht. Ähnliche Ergebnisse erhielten von Hippel und Wong^[57], als sie den Einfluß verschiedener Tetraalkylammonium-Salze und Alkohole auf die Denaturierungstemperatur der Ribonuclease untersuchten. Die Übergangstemperatur sinkt umso stärker, je länger die Alkylkette ist. Die effektive Kettenlänge für die Tetraalkylammonium-Salze unterscheidet sich jedoch von der für die Alkohole. Beispielsweise setzen Isopropanol und Tetra-n-propylammonium-Salz die Übergangstemperatur um nahezu den gleichen Betrag herab. Tabelle 4 zeigt, daß die beobachteten Abnahmen der Übergangstemperatur für Lösungen, die 1 mol Alkohol pro Liter enthalten, in beiden Untersuchungsreihen gut übereinstimmen. Von Hippel und Wong interpretieren ihre Ergebnisse nicht durch die Annahme einer direkten Bindung des gelösten Stoffes an unpolare Gruppen des Proteins, sondern sie vermuten, daß für offenliegende unpolare Seitenketten des Proteins durch Konkurrenz mit dem gelösten Stoff weniger Wassermoleküle zur Bildung eines „Eisbergs“ zur Verfügung stehen. Die Annahme einer direkten Wechselwirkung zwischen den Molekülen des gelösten Stoffs und unpolaren Gruppen des Proteins^[56] könnte indessen die Ergebnisse besser erklären: Bestünde der Grund nämlich tatsächlich in einer verminderten Verfügbarkeit von Wassermolekülen, so müßte Tetra-n-propylammonium-bromid mindestens viermal so wirksam sein wie Äthanol, da es vier längere Kohlenwasserstoff-Ketten besitzt. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Während sich die Effekte hier eindeutig hydrophoben Wechselwirkungen zuschreiben lassen, ist es bei anderen multifunktionellen Zusätzen nicht immer leicht, die Natur der Wechselwirkung zu bestimmen, welche die Denaturierung verursacht, oder vorauszusagen, welche Funktion der wichtigste stabilisierende oder destabilisierende Faktor ist. Jencks et al.^[58, 59] untersuchten den Einfluß verschiedener Denaturierungsmittel auf Proteine und Desoxyribonucleinsäure und fanden, daß die denaturierende Wirkung nicht in allen Fällen mit dem hydrophoben Charakter eines Reagens in Beziehung steht.

[57] P. H. v. Hippel u. K.-Y. Wong, J. biol. Chemistry 240, 3909 (1965).

[58] J. A. Gordon u. W. P. Jencks, Biochemistry 2, 47 (1963).

[59] L. Levine, J. A. Gordon u. W. P. Jencks, Biochemistry 2, 168 (1963).

2. Andere Effekte

Die Assoziation von Protein-Untereinheiten kann durch hydrophobe Bindungen stabilisiert werden. Beispielsweise ist die Zusammenlagerung von Tabak-Mosaikvirus-Protein^[60] ein endothermer Vorgang und von der Freigabe großer Mengen gebundenen Wassers und einer Zunahme des partiellen Molvolumens begleitet ($\Delta V^\circ > 0$). Ursache der Assoziation kann entweder die Bildung zwischenmolekularer Ionenpaare sein, wobei das an die Ionen gebundene Wasser freigegeben wird, oder sie kann in der Bildung zwischenmolekularer hydrophober Bindungen liegen.

Konformationsänderungen bei Enzymen, die durch Substrate, Aktivatoren oder Inhibitoren hervorgerufen werden, sind oft durch die Annahme hydrophober Bindungen erklärt worden, doch vermißt man in den meisten Veröffentlichungen (auch neueren Datums) eine quantitative Auswertung der Daten.

Nur in wenigen Fällen ist der Einfluß hydrophober Bindungen auf die Bindung eines Substrates oder Inhibitors an einem Enzym quantitativ untersucht worden. Ein Beispiel findet sich in einer Arbeit von *Anderson et al.*^[61], die die Hemmung von Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe durch 1-Alkyl-3-aminocarbonylpyridinium-chloride als Funktion der Alkyl-Kettenlänge von C₁ bis C₁₁ untersuchten. Von C₃ bis C₁₁ nimmt die Wirksamkeit des Inhibitors (gemessen an der Bindungskonstante für die Hemmung) linear mit der Kettenlänge zu. Das Inkrement der freien Bindungsenergie ist $-0,37$ kcal/mol pro CH₂-Gruppe, was gut mit theoretisch berechneten Werten übereinstimmt (siehe Tabelle 4, Spalte 2).

Zahn^[62] hat auf die Rolle hydrophober Bindungen in Faserproteinen hingewiesen; beispielsweise schwächt Alkohol die Zugfestigkeit von Wollkeratin-Fasern und setzt die Schrumpfungstemperatur von Kollagen herab^[62,63]. Dabei tritt eine ähnliche Abhängigkeit von der Länge der Alkylkette im Alkohol auf, wie bei der thermischen Denaturierung der Ribonuclease^[55,56], und die Übereinstimmung geht so weit, daß man auch hier eine effektive Kettenlänge braucht, um die Ergebnisse zu interpretieren. Die Reaktionsfähigkeit der SH-Gruppen von Wolle wird durch Alkohole erhöht, durch Natrium-dodecylsulfat dagegen herabgesetzt (vergleiche den Einfluß dieser Stoffe auf Rinder-Serumalbumin).

3. Konformativ Stabilität von Polyaminoäuren

Hydrophobe Bindungen dürften auch bei der Stabilisierung sowohl der α -Helix wie der β -Strukturen von Polyaminoäuren eine Rolle spielen (Abb. 10 und 11)^[14]. *Fasman et al.*^[30] fanden für Poly-L-glutaminsäure und für ein Copolymer aus L-Glutaminsäure und L-Leucin in einem begrenzten Temperaturbereich eine Zunahme des Helixgehaltes (ausgedrückt durch b_0 der

[60] C. L. Stevens u. M. A. Lauffer, *Biochemistry* 4, 31 (1965).
[61] B. M. Anderson, M. L. Reynolds u. C. D. Anderson, *Biochim. biophysica Acta* 99, 46 (1965).

[62] H. Zahn, *Kolloid-Z.* 197, 14 (1964).

[63] J. Schnell u. H. Zahn, *Makromolekulare Chem.* 84, 192 (1965).

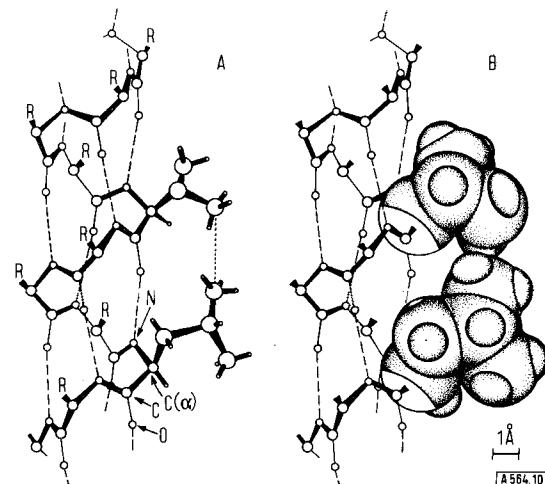


Abb. 10. Hydrophobe Bindung zwischen einer L-Leucyl- und einer L-Valyl-Seitenkette in benachbarten Windungen einer rechtsgängigen α -Helix. Die gestrichelten Linien sind Peptid-Wasserstoffbrücken. A: Zeichnung des Molekülgerüstes, das die Atomlagen erkennen läßt; die punktierte Linie deutet die Methylgruppen an, die miteinander in Berührung stehen. B: Raumfüllendes Modell der Seitenketten, maßstabsgerecht gezeichnet [14].

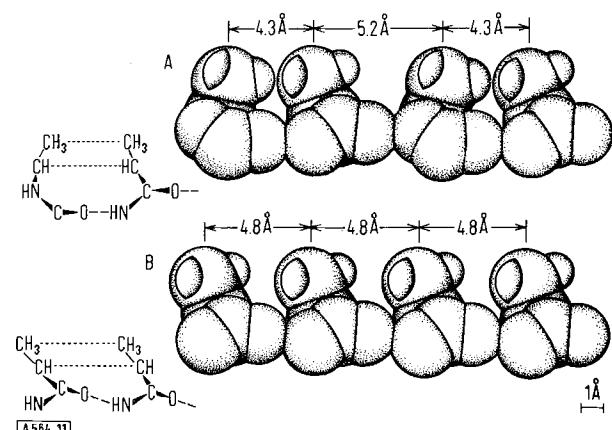


Abb. 11. Hydrophobe Bindungen zwischen mehreren Peptidketten in Falzblattstrukturen. (A) Antiparallel, (B) parallel laufende Ketten. Die von der Waalsschen Radien sind maßstabsgerecht gezeichnet [14]. Die Peptidketten stehen senkrecht zur Zeichenebene. Dargestellt sind Alanin-Seitenketten. Rechts Kalottenmodelle, links entsprechende Strukturformeln. Die Abstände zwischen den β -CH₃-Gruppen sind korrigierte Werte [14a].

Moffit-Gleichung) mit steigender Temperatur. Diese Umkehrung der thermischen Stabilität ist hydrophoben Bindungen zugeschrieben worden^[27c, 30].

Wie erwähnt, ist nach *Gratzer* und *Doty*^[64] eine Poly-L-alanin-Helix aus 175 Aminosäureresten in Wasser sehr beständig. Auch diese Beobachtung läßt sich mit der Annahme hydrophober Bindungen erklären^[16,27a, b, 29]. Der Theorie entsprechend^[27a, 29] sollten kürzere Poly-L-alanin-Ketten Helix-Knäuel-Übergänge in einem niedrigeren Temperaturbereich haben, was qualitativ bestätigt wurde^[65]. Bei diesen Untersuchungen wurde die unpolare Polyaminoäure dadurch wasserlöslich gemacht, daß man sie an beiden Enden mit Blöcken aus statistisch geknäuelter Poly-D,L-glutaminsäure oder

[64] W. B. Gratzer u. P. Doty, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 1193 (1963).

[65] N. Lotan, A. Berger, E. Katchalski, R. T. Ingwall u. H. A. Scheraga, *Biopolymers* 4, 239 (1966).

statistisch geknäueltem Poly-D,L-lysin versah. *Auer* und *Doty*^[66] zeigten, daß α -Helices von Poly-L-leucin und Poly-L-phenylalanin in Chloroform weniger beständig sind als es die α -Helix von Poly-L-alanin ist, was vermutlich auf abstoßende Wechselwirkungen zwischen den voluminösen Seitenketten in den beiden zuerst genannten Fällen zurückzuführen ist. Dagegen nimmt die Stabilität der Helices in Wasser in der Reihenfolge Poly-L-leucin > Poly-L-phenylalanin > Poly-L-alanin ab, und für diese Reihenfolge dürften hydrophobe Bindungen zwischen den Seitenketten verantwortlich sein.

Wirkungen des Harnstoffs

Früher glaubte man, daß die denaturierende Wirkung des Harnstoffs ausschließlich seiner Fähigkeit zuzuschreiben sei, mit den intramolekularen Wasserstoffbrücken der Peptidgruppen eines Proteins in Konkurrenz zu treten. Neuerdings hat man erkannt, daß Harnstoff auch hydrophobe Bindungen zu schwächen vermag. Messungen von Löslichkeiten^[24, 33] und der Micellstabilität^[45, 46] haben ergeben, daß unpolare Gruppen in wäßrigen Harnstofflösungen löslicher sind als in Wasser. Gleichermaßen beobachtet man für Azofarbstoffe, für welche thermodynamische Daten vorhanden sind^[67]. Kalorimetrische Untersuchungen^[68] an verschiedenen Aminosäuren und Peptiden mit unpolaren Seitenketten ergaben, daß diese Stoffe in wäßriger Lösung eine große partielle Molwärme C_{p2} haben, was mit dem Postulat einer in ihrer Umgebung stärker geordneten Wasserstruktur^[13] übereinstimmt. C_{p2} ist jedoch in Harnstofflösungen geringer. Wahrscheinlich werden bei der Denaturierung von Proteinen durch Harnstoff hydrophobe Gebiete aufgebrochen. Es gibt aber auch Fälle, in denen Harnstoff anders wirkt, als man es auf Grund von Modellstudien erwarten würde. Beispiele sind die Thermodynamik der Chymotrypsinogen-Denaturierung^[69] oder die Differenz zwischen den Molwärmen des Ovalbumins^[68] in Wasser und in wäßriger Harnstofflösung. *Tanford*^[25] hat nach Untersuchungen an Modellverbindungen^[24] die Änderung der freien Energie abgeschätzt, die mit der Aufaltung von Proteinketten in wäßriger Harnstofflösung verbunden ist. Eine Gleichgewichtskonstante ließ sich a priori nicht berechnen. Der Vergleich zwischen experimentellen und berechneten Werten läßt aber vermuten, daß die Auffaltung in mehreren Schritten vor sich geht^[25].

Es gelang bisher nicht, die Wirkung des Harnstoffs mit Änderungen der Wasserstruktur oder der Wasser-Kohlenwasserstoff-Wechselwirkung quantitativ zu verknüpfen. Nach *Frank* und *Franks*^[70] sollen bei Zusatz von Harnstoff auftretende Änderungen im Mengenverhältnis von strukturell geordnetem und ungeordnetem Was-

ser maßgebend sein. Aus geometrischen Gründen kann sich Harnstoff nur dort aufhalten, wo die Wasserstruktur ungeordnet ist. Auf diese Weise setzt er das chemische Potential der ungeordneten Bereiche herab und veranlaßt einige Bereiche geordneter Struktur zu schmelzen, so daß das Gleichgewicht wieder hergestellt wird. Eine ins Einzelne gehende theoretische Behandlung des Problems auf Grund dieser Überlegungen ist jedoch noch nicht veröffentlicht worden. Die Wirkung des Harnstoffs auf hydrophobe Wechselwirkungen und damit auf die Denaturierung von Proteinen bleibt also eine der wichtigsten ungelösten Fragen auf diesem Gebiet.

Untersuchungen an anderen Makromolekülen

Hydrophobe Wechselwirkungen in anderen Makromolekülen sind nur sehr wenig untersucht worden.

Man darf annehmen, daß die Basenstapelung in Polynucleotiden und Nucleinsäuren durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den großen, teilweise unpolaren Gebieten der in Berührung kommenden Basen mitbegünstigt wird. *Fasman* et al.^[71] haben die Rotationsdispersion einstranger Polycytidylsäure untersucht. In wäßriger Lösung bei pH = 7,0 ist das Molekül weitgehend geordnet. Setzt man Methanol oder Äthylenglykol hinzu, so wird die Ordnung zerstört. Daraus ist auf die Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen für die Basenstapelung geschlossen worden. Andererseits haben Untersuchungen an Trinucleotiden^[72] und an Polyadenylsäure^[73] gezeigt, daß hier der Hauptbeitrag zur Stabilisierung der Basenstapelung sicher nicht von hydrophoben Bindungen herrührte, obwohl diese einen wichtigen Beitrag leisten mögen.

Sinanoğlu^[74] hat versucht, die Denaturierung von Desoxyribonucleinsäure mit Vorstellungen über hydrophobe Wechselwirkungen zu erklären. Er deutet jedoch die Änderung der freien Energie beim Übergang einer unpolaren Gruppe in die Lösung als Energie, die für die Bildung einer Lösungsmittelblase um diese Gruppe erforderlich ist und bringt diese Energie in Beziehung zur Oberflächenspannung. Strukturelle Annahmen werden hier also durch die Beschreibung an Hand einer makroskopischen Eigenschaft der Flüssigkeit ersetzt.

Es gibt sehr wenige Untersuchungen über das Verhalten synthetischer Polymere in wäßriger Lösung, denn hier tritt das Problem der Löslichkeit auf. *Eliassaf*^[75] hat die Unterscheide einiger thermodynamischer Eigenschaften von Polyacrylsäure- und Polymethacrylsäure-Lösungen darauf zurückgeführt, daß nur in ersteren hydrophobe Bindungen auftreten können.

- [66] H. E. Auer u. P. Doty, *Biochemistry* 5, 1716 (1966).
- [67] A. Katayama, T. Matsuura, K. Konishi u. N. Kuroki, *Kolloid-Z.* 202, 157 (1965).
- [68] G. C. Kresheck u. L. Benjamin, *J. physic. Chem.* 68, 2476 (1964).
- [69] J. F. Brandts, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 4302 (1964).
- [70] H. S. Frank u. F. Franks, persönliche Mitteilung.

- [71] G. D. Fasman, C. Lindblow u. L. Grossman, *Biochemistry* 3, 1015 (1964).
- [72] J. N. Vournakis, H. A. Scheraga, G. W. Rushizky u. H. A. Sober, *Biopolymers* 4, 33 (1966).
- [73] D. Poland, J. N. Vournakis u. H. A. Scheraga, *Biopolymers* 4, 223 (1966).
- [74] O. Sinanoğlu u. S. Abdulnur, *Federat. Proc.* 24, Suppl. 15, S-12 (1965).
- [75] J. Eliassaf, *J. Polymer Sci. B* 3, 767 (1965).

Methoden zum Nachweis hydrophober Wechselwirkungen

Die meisten Überlegungen über den Einfluß unpolarer Stoffe auf die Wasserstruktur und über hydrophobe Wechselwirkungen in Makromolekülen beruhen auf indirekten Beweisen, vor allem auf thermodynamischen Daten, denn es gibt kein Verfahren für die direkte Messung hydrophober Wechselwirkungen.

Es wäre jedoch wünschenswert, eine Methode zum direkten Nachweis der Zunahme der Wasserstruktur in der Umgebung unpolarer gelöster Stoffe zu haben, damit sich die Richtigkeit der Theorien über die Strukturen wäßriger Lösungen prüfen läßt und zum Nachweis der Bildung und Öffnung hydrophober Bindungen. Die NMR-Spektroskopie sollte sich zu solchen Untersuchungen eignen, da sie es gestattet, die Beziehungen zwischen benachbarten Molekülen und deren relative Bewegungen zu messen. Die bisherigen Messungen chemischer Verschiebungen der Signale haben jedoch nicht zu eindeutigen Resultaten geführt, so daß sie nur schwer zu interpretieren sind (siehe z.B. die Diskussion von *Clifford* und *Pethica*^[76]). Andererseits ist die Relaxationszeit der Wassermoleküle in der Nachbarschaft gelöster unpolarer Stoffe etwa doppelt so groß wie in reinem Wasser^[77, 78], was für eine größere Ordnung der Wassermoleküle in Anwesenheit eines gelösten Stoffes spricht. *Hertz* hat auf Grund seiner NMR-Messungen^[77] eine neue Theorie^[79] der wäßrigen Lösungen entwickelt, um strukturelle Änderungen zu erklären. Bisher ist diese Theorie aber nur qualitativ beschrieben worden, so daß sich ihr Geltungsbereich noch nicht übersehen läßt.

Das Vorhandensein hydrophober Gebiete im Inneren oder an der Oberfläche von Proteinmolekülen ist oft aus der Bindung kleiner Moleküle [z.B. ^[48, 53, 61]] oder aus Änderungen der Reaktionsfähigkeit funktioneller Gruppen [z.B. ^[52, 62]] erschlossen worden. Auch Änderungen der UV-Absorption der im Makromolekül enthaltenen chromophoren Gruppen lassen sich mit der Annahme deuten, daß diese Gruppen in unpolaren Gebieten des Makromoleküls „begraben“ werden und dadurch nicht in Berührung mit dem Wasser kommen können^[80, 81].

[76] *J. Clifford* u. *B. A. Pethica*, Trans. Faraday Soc. 60, 1483 (1964).

[77] *H. G. Hertz* u. *M. D. Zeidler*, Ber. Bunsenges. physik. Chem. 68, 821 (1966).

[78] *S. S. Danyluk* u. *E. S. Gore*, Nature (London) 203, 748 (1964).

[79] *H. G. Hertz*, Ber. Bunsenges. physik. Chem. 68, 907 (1964).

[80] *S. Yanari* u. *F. Bovey*, J. biol. Chemistry 235, 2818 (1960).

[81] *T. T. Herskovits* u. *M. Laskowski jr.*, J. biol. Chemistry 237, 2481 (1962).

Derartige chromophore Gruppen können im Makromolekül von vornherein enthalten sein (beispielsweise Tyrosin oder Tryptophan in Proteinen^[80]) oder sie können künstlich eingeführt werden, wodurch man ein leicht zu deutendes Spektrum erhält und bestimmte Stellen des Moleküls markieren kann^[82].

Die Fluoreszenz einiger Farbstoffe hängt stark von der Natur ihrer Umgebung im gelösten Zustand ab. Fluoreszierende Farbstoffe, die von unpolaren Gruppen adsorbiert werden, sind daher zur Untersuchung hydrophober Bereiche in Proteinen vorgeschlagen worden^[83, 84]. *McClure* und *Edelman*^[84] haben mit derartigen Untersuchungen in verschiedenen Lösungsmitteln begonnen.

Schluß

Hydrophobe Wechselwirkungen sind in wäßrigen Lösungen von biologischen Makromolekülen und niedermolekularen Stoffen weit verbreitet. Während man die Bedingungen kennt, unter denen sie auftreten, und während es möglich ist, ihre Stärke auf Grund theoretischer Überlegungen zu berechnen, gibt es hinsichtlich ihres Nachweises und der Interpretation ihrer Wirkungen noch zahlreiche offene Fragen.

Zuverlässige und genaue Verfahren zum Nachweis und zur Messung hydrophober Bindungen gibt es noch nicht. Die Frage der Additivität verschiedenartiger Wechselwirkungen und ihres Einflusses auf das thermodynamische Verhalten gelöster Stoffe und auf die Konformation von Makromolekülen ist ungelöst: Ist der Gesamteffekt der nicht-kovalenten Wechselwirkungen die Summe aller einzelnen durch Molekülzusammensetzung und räumliche Anordnung bestimmter Wechselwirkungen, deren Größe sich aus Versuchen mit Modellverbindungen ableiten läßt, oder beeinflussen sich die einzelnen Wechselwirkungen gegenseitig? Besonders *Némethy* et al.^[21], *Tanford*^[23] und *Wetlaufer* et al.^[33] haben sich mit dieser Frage beschäftigt. Danach scheint es, daß sich die Wirkungen verschiedener funktioneller Gruppen in recht guter Näherung additiv verhalten. Bei sehr genauen Rechnungen wird man jedoch Abweichungen von der Additivität berücksichtigen müssen.

Eingegangen am 4. Juli 1966 [A 564]

[82] *M. Burr* u. *D. E. Koshland jr.*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 1017 (1964).

[83] *L. Stryer*, J. molecular Biol. 13, 482 (1965).

[84] *W. O. McClure* u. *G. M. Edelman*, Biochemistry 5, 1908 (1966).