

# Kinetik kooperativer Konformationsumwandlungen von linearen Biopolymeren

Von Gerhard Schwarz und Jürgen Engel<sup>[\*]</sup>

Kooperative Konformationsumwandlungen von Proteinen und Nucleinsäuren sind von entscheidender Bedeutung für viele molekularbiologische Prozesse, insbesondere für deren Regelung. Sie verlaufen über eine Vielzahl sich gegenseitig beeinflussender Elementarprozesse und weisen daher oft eine komplizierte Kinetik auf. Zudem sind sie häufig sehr schnell. Mit chemischen Relaxationsmethoden ist es trotzdem möglich, kinetische Analysen durchzuführen. Vergleichsweise einfach wird die theoretische Interpretation für lineare Biopolymere. Die Anwendung des für die Kinetik erweiterten linearen Ising-Modells auf Modellpeptide und Polynucleotide brachte einen Einblick in die Grundlagen der kooperativen Umwandlungen.

## 1. Einführung

Die biologische Funktion von Nucleinsäuren und Proteinen wird wesentlich durch ihre spezifische Konformation bestimmt. Diese kann durch Wechsel äußerer Bedingungen verändert werden. Tatsächlich sind Konformationsumwandlungen häufig wichtige Teilschritte in molekularbiologischen Reaktionen (Beispiele: Allosterische Regelung der Enzymaktivität<sup>[1, 2]</sup>, Reduplikation von Nucleinsäuren<sup>[3]</sup>). Wichtig ist dabei, daß geringfügige Einwirkungen große Änderungen induzieren. Das kann nur durch eine positiv-kooperative Wechselwirkung zwischen den Elementarschritten der Gesamtumwandlung erreicht werden, wodurch eine bereits eingetretene Elementarumwandlung an einer Stelle des Makromoleküls stark fördernde Wirkung auf andere noch nicht erfolgte Elementarumwandlungen hat.

Wir haben früher bereits<sup>[4]</sup> die allgemeinen Eigenschaften kooperativer Konformationsumwandlungen von Biopolymeren am Beispiel linearer Systeme behandelt, da diese sowohl theoretisch als auch experimentell vergleichsweise einfache Bedingungen bieten und somit eine gute Grundlage für die Interpretation komplizierterer Systeme sind. Gleichgewichtsdaten der Helix-Coil-Umwandlung einiger aus gleichen Untereinheiten aufgebauter synthetischer Polypeptide oder Oligonucleotide sowie der Strukturumwandlung zwischen zwei Konformationen des Poly-L-prolins wurden mit dem linearen Ising-Modell analysiert. Auf die in diesem Zusammenhang diskutierten grundlegenden experimentellen und theoretischen Betrachtungen wird in diesem Fortschrittsbericht aufgebaut.

Will man kooperative Konformationsumwandlungen vollständig verstehen, so stellt sich auch die Frage nach der Kinetik solcher Prozesse. Allerdings ist selbst im Falle der oben zitierten linearen Modellsysteme aus chemisch gleichen Resten von vornherein ein recht komplizierter Reaktionsverlauf zu erwarten. Werfen wir zum Beispiel einen

Blick auf die  $\alpha$ -Helix-Coil-Umwandlung einer Polyamino-säure mit N möglichen Wasserstoffbrücken zwischen den CO- und NH-Gruppen komplementärer Peptidbindungen. Die Umwandlung in das statistische Knäuel (Coil) erfordert hier offenbar N Elementarschritte, nämlich N Brüche von Wasserstoffbrücken. Wegen der Kooperativität der Umwandlung müssen diese Einzelschritte verschieden schnell ablaufen, je nachdem, ob benachbarte Wasserstoffbrücken bereits gelöst sind oder nicht.

Eine sinnvolle Interpretation und Auswertung kinetischer Experimente an Systemen mit sehr vielen Reaktionsschritten kann nicht unmittelbar auf den klassischen Methoden der Kinetik aufgebaut werden. Daher sind hier die in der Literatur nicht selten zu findenden Auftragungen nach der 1. oder 2. Ordnung von zweifelhaftem Wert, solange sie nicht theoretisch untermauert werden.

Vorteile bietet die Relaxationsmethode, bei der die Einstellung eines neuen Gleichgewichts nach im allgemeinen kleiner Störung des alten Gleichgewichts (z. B. durch einen Temperatursprung) kinetisch verfolgt wird. Derartige Relaxationskurven spiegeln im Prinzip nicht nur die Kinetik des langsamsten Teilprozesses, sondern auch diejenige der anderen Zwischenreaktionen wider. Ihre theoretische Berechnung für einen postulierten Mechanismus ist erleichtert, da die kinetischen Differentialgleichungen für kleine Störungen linearisiert werden können. Allerdings sind die für einfache Reaktionen mit einem oder zwei Reaktionsschritten bewährten Auswertemethoden<sup>[5]</sup> oft nicht anwendbar. Durch Messung und Berechnung mittlerer Relaxationszeiten<sup>[6, 7]</sup> ist es jedoch selbst in komplizierten Fällen möglich, den erwünschten quantitativen Zusammenhang zwischen einem sinnvollen Reaktionsmechanismus und den Meßkurven herzustellen.

Konformationsumwandlungen können so schnell ablaufen, daß die Anwendung von Relaxationsverfahren höchster Zeitauflösung notwendig wird. So ließ sich im Falle der  $\alpha$ -Helix-Coil-Umwandlung mit der Temperatursprungmethode lediglich zeigen, daß die Umwandlungszeit offenbar kürzer ist als die Aufheizzeit der Meßzelle (etwa 1 Mikrosekunde)<sup>[8, 9]</sup>. Erst mit noch „schnelleren“ Methoden konnten Umwandlungszeiten im Bereich von  $10^{-8}$  bis  $10^{-6}$  Sekunden ermittelt werden (s. Abschnitt 3.1).

[\*] Prof. Dr. G. Schwarz und Prof. Dr. J. Engel  
Abteilung Biophysikalische Chemie  
Biozentrum der Universität  
CH-4056 Basel, Klingelbergstraße 70 (Schweiz)

Andere Umwandlungen können mit konventionelleren Methoden verfolgt werden. So liegt die Denaturierungszeit sehr langkettiger Desoxyribonucleinsäuren im Sekunden- bis Minutenbereich; die Helix-I $\rightleftharpoons$ Helix-II-Umwandlung des Poly-L-prolins ist sogar noch langsamer.

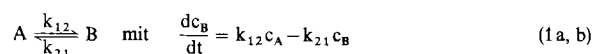
## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Durchführung und Auswertung chemischer Relaxationsexperimente

Eine kinetische Analyse mit chemischen Relaxationsverfahren umfaßt im wesentlichen drei Schritte: Die Störung eines stationären Zustandes des Reaktionssystems (in der Regel des chemischen Gleichgewichts), die Messung der Zeitabhängigkeit der daraufhin erfolgenden Änderung einer von den Konzentrationen der Reaktionspartner abhängigen Meßgröße  $P$  (z. B. optische Dichte, optische Drehung) und schließlich die Interpretation der Daten im Rahmen einer Gesamtreaktion. Während die beiden ersten Schritte höchstens technisch-experimentelle Probleme aufwerfen, können sich beim dritten komplizierte mathematisch-theoretische Fragen erheben, wenn man es mit einer aus vielen Teilschritten zusammengesetzten Reaktion zu tun hat.

Als konkretes Beispiel sei ein experimentell verhältnismäßig durchsichtiges und vielseitiges Verfahren betrachtet: die Temperatursprungmethode. Aufgrund der bekannten van't Hoff'schen Beziehung für die Temperaturabhängigkeit chemischer Gleichgewichtskonstanten wird ein chemisches Gleichgewicht durch eine Temperaturänderung in definierter Weise verschoben. Dies läßt sich technisch in etwa einer Mikrosekunde durchführen, z. B. durch elektrische Aufheizung<sup>[5]</sup>. Sofern sich das neue Gleichgewicht langsamer einstellt, kann man die zeitliche Änderung der Meßgröße  $P$  als Relaxationskurve auf dem Bildschirm eines Oszillographen verfolgen. Ähnliche Kurven erhält man bei sprunghafter Änderung anderer Parameter, wenn sie die Gleichgewichtslage beeinflussen: Druck, elektrisches Feld, Lösungsmittelzusammensetzung, pH-Wert etc. Wie in Abbildung 1 dargestellt, wird so eine experimentell direkt zugängliche Relaxationsfunktion  $\Phi(t)$  definiert. Diese muß nun in quantitativer und eindeutiger Weise mit dem zugrunde liegenden Reaktionsverlauf in Beziehung gebracht werden.

Die Situation ist einfach bei einem einstufigen Prozeß, z. B.



Wegen der Massenerhaltung ist stets  $c_A + c_B = \text{const.}$ , daher tritt lediglich eine unabhängige Konzentrationsvariable auf. Dafür kann z. B.  $c_B$  gewählt werden. Die zeitliche Änderung jeder konzentrationsabhängigen Meßgröße läßt sich dann durch Lösung von Gl. (1b) ausrechnen. Wir finden hier

$$\Phi(t) = e^{-t/\tau} \quad \text{mit} \quad \frac{1}{\tau} = k_{12} + k_{21} \quad (2a, b)$$

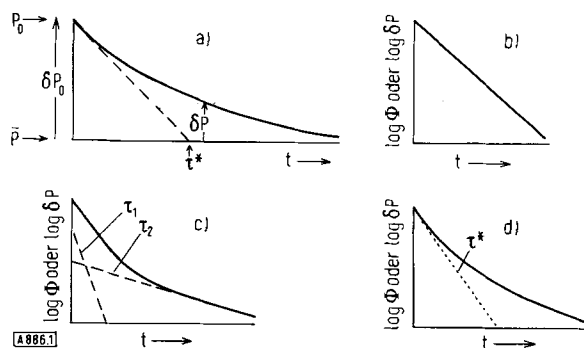


Abb. 1. Schematische Darstellung von Relaxationskurven bei Sprungexperimenten.

a) Nach gegenüber der Reaktionszeit schneller Änderung der Temperatur, des Drucks oder anderer äußerer Parameter stellt sich ausgehend vom Anfangsgleichgewicht (Meßgröße  $P_0$ ) ein neues Gleichgewicht (Meßgröße  $\bar{P}$ ) ein. Durch  $\Phi(t) \equiv \delta P / \delta P_0$  wird eine (normierte) Relaxationsfunktion definiert, die direkt experimentell zugänglich ist. Die Tangente an  $\Phi(t)$  bei  $t=0$  schneidet die Asymptote bei  $t=\tau^*$  [s. Gl. (4)]. b) Bei Auftragung von  $\log \Phi(t)$  (oder  $\log \delta P$ ) gegen die Zeit ergibt sich im einfachsten Fall eine Gerade mit der Steigung  $= 0.434 \cdot 1/\tau$ , nämlich wenn  $\Phi(t)$  aus einer einzigen Exponentialfunktion besteht. c) Treten zwei Exponentialfunktionen mit genügend verschiedenen Werten von  $\tau_1$  und  $\tau_2$  auf (gestrichelt), beobachtet man eine Kurve mit linearem Auslauf. Diese läßt sich noch gut in ihre Komponenten zerlegen. d) Für mehrere sich überlappende Relaxationsterme ist eine eindeutige Zerlegung nicht mehr möglich, jedoch kann die mittlere Relaxationszeit  $\tau^*$  aus der Anfangssteigung (gepunktet) bestimmt werden.

Die Relaxationszeit  $\tau$  kann, wie in Abbildung 1 gezeigt, aus der gemessenen Relaxationsfunktion  $\Phi(t)$  leicht graphisch ermittelt werden. Kennt man die Gleichgewichtskonstante  $K = k_{12}/k_{21}$ , so sind aufgrund der Beziehung (2b) die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten direkt zugänglich.

Auch bei komplizierteren Reaktionen mit mehr als einer Stufe kann die zeitliche Änderung der Konzentration eines jeden Reaktionspartners durch eine Differentialgleichung beschrieben werden. Diese faßt die Geschwindigkeitsbeiträge aller Elementarprozesse zusammen, die zu einer Änderung des betreffenden chemischen Zustandes führen.

Ist die Differenz zwischen der Anzahl der Reaktionspartner und der Anzahl der Massenerhaltungsbedingungen gleich  $n$  (dem entspricht die Anzahl der „unabhängigen“ Reaktionsstufen, die man nach Streichung aller Stufen erhält, die zu Reaktionszyklen führen), so wird die Gesamtreaktion durch  $n$  kinetische Differentialgleichungen vollständig beschrieben. Diese können natürlich äußerst kompliziert sein. Sie lassen sich allerdings bei kleinen Abweichungen von einem zeitunabhängigen Bezugzustand (kleine Störungen!) linearisieren (Wegfall quadratischer und höherer Konzentrationsglieder). Prinzipiell ist jetzt immer eine mathematische Lösung des Problems in geschlossener Form möglich<sup>[6]</sup>. Diese wird charakterisiert durch  $n$  Zeitkonstanten, die Relaxationszeiten  $\tau_1, \tau_2, \tau_3 \dots \tau_n$ . Sie hängen in definierter Weise vom Reaktionsverlauf, den kinetischen Konstanten und den Konzentrationen der einzelnen Reaktionspartner ab. Es ist dabei jedoch zu beachten, daß die einzelnen Relaxationszeiten nicht direkt mit einzelnen Reaktionsstufen korreliert sind. Insbesondere ergibt die Theorie für die Relaxationsfunktion  $\Phi(t)$  einer sprunghaften Störung des Gleichgewichts

$$\Phi(t) = \sum_{i=1}^n \beta_i e^{-t/\tau_i} \quad \text{mit} \quad \sum_i \beta_i = 1 \quad (3a, b)$$

also eine Summe von  $n$  Exponentialfunktionen mit den  $\tau_i$  als Zeitkonstanten. Die entsprechenden Amplitudenfaktoren  $\beta_i$  enthalten keine direkten kinetischen Größen mehr. Sie sind außerdem noch von den verwendeten Meßgrößen sowie vom Störparameter abhängig. Die  $\beta_i$  ändern sich daher in der Regel, wenn man z. B. die zeitliche Änderung der optischen Dichte bei einer anderen Wellenlänge verfolgt oder statt eines Temperatursprungs eine sprunghafte Druckänderung anwendet. Solche Manipulationen haben jedoch keinen Einfluß auf die  $\tau_i$ .

Die Gesamtheit der Relaxationszeiten  $\tau_i$  zusammen mit den zugehörigen Amplitudenfaktoren  $\beta_i$  wird als Relaxationsspektrum bezeichnet. Eine eindeutige Zuordnung eines Relaxationsspektrums zu einer Meßkurve ist praktisch nur möglich, wenn nur wenige in ihrer Größenordnung stark unterschiedliche  $\tau_i$  mit vergleichbaren  $\beta_i$  auftreten (s. Abb. 1b–1d). Ist das nicht der Fall, kann eine kinetische Analyse mit anderen experimentell direkt zugänglichen Parametern durchgeführt werden. Dafür eignet sich besonders die mittlere (reziproke) Relaxationszeit  $\tau^*$ <sup>[6]</sup>, wie sie durch folgende Relation definiert ist:

$$\frac{1}{\tau^*} \equiv \sum_i \frac{\beta_i}{\tau_i} = - \left( \frac{d\Phi}{dt} \right)_{t=0} = - \frac{1}{\delta P_0} \left( \frac{dP}{dt} \right)_{t=0} \quad (4)$$

(Der Zusammenhang mit  $\Phi$  ist leicht aus Gl. (3a) zu verifizieren.) Wie in Abbildung 1a und 1d angedeutet, ergibt sich  $\tau^*$  aus der Tangente an die Relaxationskurve zur Zeit  $t=0$  (Zeitpunkt der Störung). Wegen dieses Zusammenhangs ist  $\tau^*$  auch theoretisch verhältnismäßig leicht zugänglich<sup>[6]</sup>, sofern bei  $t=0$  (wie üblich) ein Gleichgewichtszustand des Systems vorliegt. Dann sind neben einer Kenntnis der Elementarprozesse und ihrer kinetischen Konstanten nur Gleichgewichtseigenschaften zur Berechnung von  $\tau^*$  notwendig. Man braucht also keine Differentialgleichungen zu lösen!

Sehr schnelle Relaxationsvorgänge ( $\tau \lesssim 1 \mu\text{sec}$ ) sind bisher nur mit Methoden untersucht worden, die eine periodische Störung in Form einer Sinusfunktion verwenden, z. B. eine Schallwelle oder ein alternierendes elektrisches Feld. Auf diese Weise werden kleine Schwankungen des Gleichgewichtszustandes des Reaktionssystems erzeugt. Erfolgen die Schwingungen schnell genug im Vergleich zur Reaktionsdauer, kann die tatsächliche zeitliche Konzentrationsänderung der Reaktionspartner dem Gleichgewicht nicht mehr im gleichen Takt folgen. Die Theorie ergibt dann im Bereich um die Relaxationsfrequenz  $\nu_R = 1/(2\pi\tau)$  eine Energieabsorption (z. B. Schallabsorption bei der Anwendung von Ultraschall und Ohmsche oder dielektrische Verluste in einem elektrischen Wechselfeld). Durch Auswertung entsprechender Messungen lassen sich die chemischen Relaxationszeiten erhalten<sup>[6]</sup>.

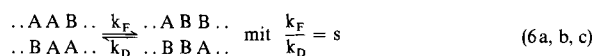
## 2.2. Die Kinetik des linearen Ising-Modells

Wie früher ausführlich beschrieben wurde<sup>[4]</sup>, läßt sich das thermodynamische Verhalten kooperativer Konformationsumwandlungen von linearen Biopolymeren quantitativ mit Hilfe des linearen Ising-Modells verstehen. In diesem Zusammenhang wurden die den beiden extremen

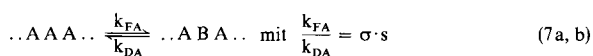
Konformationen entsprechenden elementaren Zustände der Einzelsegmente mit A und B bezeichnet. Als kinetische Elementarprozesse der Umwandlung ergeben sich damit an irgendeiner Stelle des Kettenmoleküls Reaktionen der Art



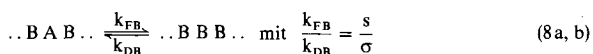
wobei die Geschwindigkeitskonstanten gemäß der Grundannahme des Ising-Modells noch von den beiden nächsten Nachbarzuständen X und Y, die jeweils auch gleich A oder B sein können, abhängen. Wir müssen daher zwei Arten von Elementarreaktionen unterscheiden. Die Wachstumschritte



beschreiben das Wachstum von bestehenden A- bzw. B-Sequenzen, wobei die Gleichgewichtskonstante  $s$  mit dem entsprechenden Parameter der Zimm-Bragg-Theorie<sup>[4]</sup> identisch ist. Bei den Keimbildungs- und Zerfallsschritten



und



sind die Gleichgewichtskonstanten  $\sigma s$  bzw.  $s/\sigma$  durch die Gleichgewichtstheorie festgelegt, wobei der kooperative Parameter  $\sigma \ll 1$  angibt, um wieviel mal schwieriger die Keimbildung gegenüber dem Wachstum ist (kleines  $\sigma$  bedeutet große Keimbildungsschwierigkeit, d. h. hohe Kooperativität). Da nur das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten durch die Thermodynamik festgelegt ist, bleibt für jeden der Prozesse ein kinetischer Parameter offen. Im allgemeinen Fall müssen auch noch spezielle Keimbildungs- und Zerfallsschritte für die Enden des Moleküls berücksichtigt werden, da dort jeweils nur ein nächster Nachbarzustand existiert<sup>[10]</sup>.

Bei einer Kette mit  $N$  Segmenten muß die Summe der Moleküle in den maximal  $2^N$  verschiedenen Konformationszuständen natürlich konstant bleiben. Mit dieser auf den ersten Blick einzigen Massenerhaltungsbedingung wird man ein praktisch kontinuierliches Spektrum aus  $2^N - 1$  Relaxationszeiten erwarten. Glücklicherweise läßt sich das Problem je nach den speziellen Bedingungen noch mehr oder weniger vereinfachen. Zum Beispiel kann man mit Hilfe der Gleichgewichtstheorie ohne sonderliche Schwierigkeiten die mittlere Relaxationszeit berechnen und mit experimentellen Daten vergleichen.

Im häufigen Grenzfall sehr langer Ketten mit großer Kooperativität, d. h. für

$$N \gg \text{kooperative Länge } N_0 = \frac{1}{\sqrt{\sigma}} \gg 1$$

kann man die Effekte an den Moleküleenden vernachlässigen<sup>[4]</sup>. Außerdem werden im Umwandlungsbereich (wo A und B in einigermaßen vergleichbarer Menge vorliegen) die

Beiträge der Prozesse (7) und (8) zur Gesamtreaktion verschwindend klein, da die „Keime“ ABA und BAB in sehr geringer Konzentration gegenüber AAB, ABB etc. existieren. Demzufolge wird der Anteil  $\Theta$  der B-Segmente sich praktisch nur über Wachstumsschritte gemäß Gl. (6) ändern, also

$$\frac{d\Theta}{dt} = 2k_F\gamma_{AAB} - 2k_D\gamma_{ABB} = 2k_D\{s\gamma_{AAB} - \gamma_{ABB}\} \quad (9)$$

wo  $\gamma_{AAB}$ ,  $\gamma_{ABB}$  die Bruchteile von A- bzw. B-Segmenten mit den Nachbarn A (links) und B (rechts) bedeuten (der Faktor 2 kommt herein wegen  $\gamma_{AAB} = \gamma_{BAA}$ ,  $\gamma_{ABB} = \gamma_{BBA}$ ). Wird bei  $t=0$  das Gleichgewicht sprunghaft gestört, wobei  $s \rightarrow s + \delta s$  und der Gleichgewichtswert  $\Theta_0 \rightarrow \bar{\Theta} = \Theta_0 + \delta\bar{\Theta}$ , so folgt nach Gl. (4) (mit  $P = \Theta$ ,  $\delta P_0 = -\delta\bar{\Theta}$ )<sup>[11, 12]</sup>

$$\frac{1}{\tau^*} = \frac{1}{\delta\bar{\Theta}} \left( \frac{d\bar{\Theta}}{dt} \right)_{t=0} = 2k_D \frac{\bar{\gamma}_{AAB}}{(\delta\bar{\Theta}/\delta s)} \quad (10)$$

(Überstrichene Werte sind Gleichgewichtswerte). Die thermodynamische Theorie erlaubt es,  $\bar{\gamma}_{AAB}$  und  $\delta\bar{\Theta}/\delta s$  durch  $\Theta$  und  $\sigma$  auszudrücken. Damit wird<sup>[10]</sup>

$$\tau^* = 4\Theta(1-\Theta)\tau_{\max}^* \quad \text{wobei} \quad \tau_{\max}^* = \frac{1}{4\sigma k_F} \quad (11 \text{ a, b})$$

Die maximale Relaxationszeit  $\tau_{\max}^*$  liegt demnach am Umwandlungsmittelpunkt ( $\Theta = 0.5$ ).

Für  $N \lesssim N_0$  können Endeffekte und Keimbildung bei der Kinetik der Umwandlung nicht mehr vernachlässigt werden. Unter plausiblen Annahmen für die Keimbildungsgeschwindigkeiten erhält man  $\tau^*$  als komplizierte Funktion der allgemeinen Form<sup>[10]</sup>

$$\tau^* = f(\Theta, \sigma, \beta', \beta'', N) \cdot \tau_{\max}^* \quad (12)$$

( $\beta'$ ,  $\beta''$ , beschreiben die Endeffekte<sup>[4, 10]</sup>). Die Funktion  $f$  liegt stets unterhalb der für  $N \gg N_0$  gemäß Gl. (11 a) gültigen Grenzfunktion  $4\Theta(1-\Theta)$ , d. h. die Umwandlung wird mit abnehmender Kettenlänge schneller.

Eine über den Mittelwert  $\tau^*$  hinausgehende Berechnung des chemischen Relaxationsverhaltens kooperativer Umwandlungen läßt sich unter Ausnutzung spezieller Eigenschaften des Systems und spezieller experimenteller Bedingungen unter Umständen relativ einfach durchführen. Beispiele dafür sind das „Alles-oder-Nichts“-Verhalten kurzketziger Poly-L-proline (s. Abschnitt 3.2) und Oligonucleotide (s. Abschnitt 3.3) sowie die „unterdrückte Keimbildung“ beim Poly-L-prolin (s. Abschnitt 3.2). Vollständigere Berechnungen kinetischer Kurven wurden auch für den Fall langer Ketten versucht. Dies geschah unter vereinfachenden Annahmen für die Kinetik der Elementarprozesse<sup>[13-15]</sup> oder durch Computerrechnungen<sup>[16, 17]</sup>.

Kürzlich gelang es, die Theorie auf eine allgemeingültige Grundlage zu stellen. Es konnte für beliebige Kettenlängen gezeigt werden, daß die vollständige Kinetik des linearen Ising-Modells durch  $4N-5$  unabhängige, nicht-lineare Differentialgleichungen beschrieben wird<sup>[18]</sup>. Für  $N \rightarrow \infty$  (d. h.  $N \gg N_0$ ) verringert sich deren Zahl auf vier. Drei von den dadurch definierten Relaxationszeiten treten bei genügend starker Kooperativität ( $N_0 \gg 1$ ) im Umwandlungs-

bereich mit verschwindender Amplitude auf, so daß die vierte mit  $\tau^*$  identisch sein muß. In diesem praktisch wichtigen Grenzfall wird also die Umwandlung trotz des komplizierten Reaktionsverlaufes durch eine einzelne Relaxationszeit [wie Gl. (2a)] beschrieben<sup>[19]</sup>.

### 3. Experimente an einfachen linearen Modellsystemen

#### 3.1. Die $\alpha$ -Helix $\rightleftharpoons$ Coil-Umwandlung

Die Versuche wurden mit genügend langen Polypeptidketten ( $N \gg N_0$ ) durchgeführt, so daß im Umwandlungsbereich eine Relaxationszeit gemäß Beziehung (11) zu erwarten ist. Der wesentliche Elementarprozeß der Umwandlung besteht im Wachstum bzw. Abbau von Helixfragmenten innerhalb einer Polypeptidkette durch Bildung bzw. Bruch von Wasserstoffbrücken an den Nahtstellen zwischen Coil- und Helixbereichen. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_F$  beschreibt das Schließen einer solchen Wasserstoffbrücke. Ihre Bildung bedarf keiner merklichen Aktivierungsenergie<sup>[20]</sup>, es muß jedoch eine günstige sterische Position der richtigen CO- und NH-Gruppen durch entsprechende Drehungen um zwei dazwischenliegende C—C- oder C—N-Bindungen erreicht werden (s. Abb. 2). Mit einer für die Drehung erforderlichen Aktivierungsenergie von einigen kcal/mol ist deshalb ein  $k_F$ -Wert um  $10^{10}$ – $10^{11} \text{ s}^{-1}$  zu erwarten. Da die  $\sigma$ -Werte bei Polypeptiden je nach System im Bereich  $10^{-4}$ – $10^{-2}$  liegen, ergeben sich nach Gl. (11 b) maximale Relaxationszeiten der Helix-Coil-Umwandlung um  $10^{-8}$  bis  $10^{-6}$  Sekunden<sup>[11, 12]</sup>.

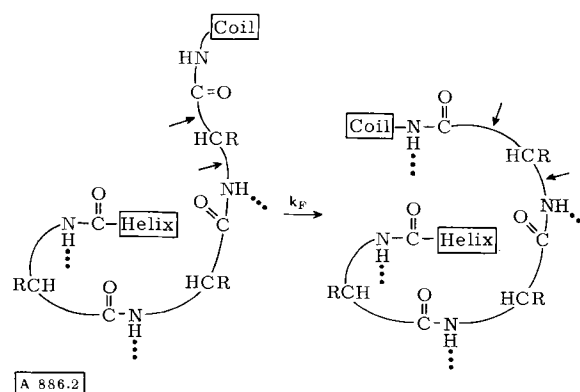


Abb. 2. Übergang einer Peptidbindung vom Coilzustand in den Helixzustand an einer Helix/Coil-Nahtstelle unter Knüpfung einer für die  $\alpha$ -Helix charakteristischen Wasserstoffbrücke zwischen NH- und CO-Gruppe. Die im Coilzustand frei drehbaren C—C- und C—N-Einfachbindungen des Aminosäurerestes (durch Pfeile markiert) werden dabei fixiert.

Diese Abschätzung stimmt gut mit den wenigen bisher vorliegenden Meßdaten überein. Schallabsorptionsmessungen an Polyglutaminsäure (s. Abb. 3) zeigen den maximalen Effekt bei  $\Theta = 0.5$  und 15 MHz<sup>[21]</sup>. Nach der Theorie ist für den durch Helix-Coil-Umwandlung erzeugten zusätzlichen Schallabsorptionskoeffizienten  $\alpha$  pro Wellenlänge  $\lambda$  (in wäßriger Lösung) ein Beitrag von

$$\alpha\lambda = \frac{\pi\rho v_\infty^2}{RT} (\Delta V)^2 \frac{2}{\sqrt{\sigma}} \{\Theta(1-\Theta)\}^{3/2} c_0 \frac{\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (13)$$

zu erwarten ( $\rho$ =Dichte,  $v_\infty$ =Schallgeschwindigkeit im Lösungsmittel,  $\Delta V$ =molare Volumenänderung bei der Umwandlung Coil  $\rightarrow$  Helix,  $c_0$ =Konzentration des Polypeptids in mol Monomer pro Volumeneinheit<sup>[24, 50]</sup>). Aus  $v_R = 15$  MHz kann  $\tau_{\max}$  zu  $1 \cdot 10^{-8}$  s bestimmt werden. Mit  $\sigma = 3 \cdot 10^{-3}$ <sup>[4]</sup> ergibt sich somit aus Gl. (11 b)  $k_F = 8 \cdot 10^9$  s<sup>-1</sup>. Weiterhin erhält man aus dem maximalen Wert von  $\alpha\lambda$  mit Gl. (13)  $\Delta V = 0.5$  cm<sup>3</sup>/mol in Übereinstimmung mit direkten Messungen von  $\Delta V$ <sup>[22]</sup>.

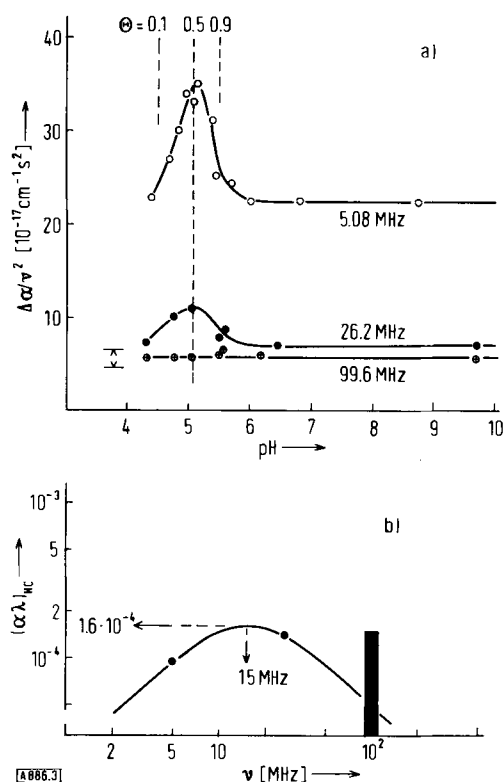


Abb. 3. Ultraschallmessungen des Helix-Coil-Übergangs von Polyglutaminsäure in wässriger Lösung (nach Saksena et al. [21]). Die Umwandlung erfolgt (reversibel) durch pH-Änderungen im Bereich pH=4 bis 6. Der Mittelpunkt ( $\Theta=0.5$ ) liegt bei etwa pH=5.1.

a) Nach Gl. (13) sollte  $\Delta\alpha/v^2$  ( $\Delta\alpha$ =Schallabsorptionskoeffizient der Lösung minus desjenigen des Lösungsmittels,  $v$ =Schallfrequenz) bei  $\Theta=0.5$  ein Maximum aufweisen. Die eingezeichneten Meßdaten zeigen das auch deutlich für die Frequenzen 5.08 MHz und 26.2 MHz, während bei 99.6 MHz die angegebene Meßgenauigkeit dazu offenbar nicht mehr ausreicht.

b) Die durch den Helix-Coil-Übergang (bei  $\Theta=0.5$ ) hervorgerufene Schallabsorption pro Wellenlänge  $(\alpha\lambda)_{hc}$  ist doppellogarithmisch gegen die Frequenz aufgetragen. Nach Gl. (13) sollte ein charakteristischer, bereits durch zwei Meßpunkte festgelegter Kurvenverlauf gemäß der Funktion  $A\omega\tau/(1+\omega^2\tau^2)$  auftreten ( $\omega=2\pi\nu$ ,  $A$ =konstanter Faktor), der bei  $\omega=2\pi\nu_R=1/\tau$  ein Maximum besitzt. Die sich hier ergebenden Werte für  $\nu_R$  und  $A/2$  sind eingetragen. Sie liefern  $\tau$  sowie unter Verwendung von Gl. (13) das Reaktionsvolumen  $\Delta V$ .

Ähnliche Experimente mit Poly-L-ornithin<sup>[23]</sup> ergaben ebenfalls  $\tau_{\max} \approx 10^{-8}$  s. Die gemessene Abhängigkeit vom Umwandlungsgrad  $\Theta$  bestätigt die Formel (11 a).

Für Messungen an Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamat) wurde ein neues chemisches Relaxationsprinzip angewendet, welches darauf beruht, daß ein elektrisches Feld ein chemisches Gleichgewicht in Richtung stärkerer dielektrischer Polarisation verschiebt<sup>[20]</sup>. Sofern die damit verbundene chemische Relaxation wesentlich schneller verläuft als die Rotation der in die Reaktion verwickelten Dipole, tritt außer der üblichen dielektrischen Relaxation infolge Rotations-

diffusion bei noch höheren Frequenzen ein weiterer Relaxationseffekt auf, der die chemische Relaxation widerspiegelt<sup>[24]</sup>. Diese Voraussetzungen sind für Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamat) erfüllt: Im Umwandlungsbereich bestehen die Polypeptidketten aus einer Folge von Coilgebieten und Helixfragmenten, wobei die letzteren ein erhebliches elektrisches Dipolmoment besitzen. Das angelegte elektrische Feld verschiebt nun das Gleichgewicht zwischen Helix- und Coilbereichen in der Weise, daß in Feldrichtung die Helixdipole wachsen, während sie in umgekehrter Richtung kleiner werden. Da die Rotationsdiffusion der Helices wegen ihrer Länge weit langsamer als die chemische Relaxation des Helixwachstums erfolgt, kommt es so noch zu einer vergleichsweise schnellen dielektrischen Polarisation über den chemischen Relaxationsprozeß. Wie erwartet wird analog zur Schallabsorption ein Maximum dieses Effekts im Mittelpunkt der Umwandlung gefunden (s. Abb. 4). Die ebenfalls gemessene  $\Theta$ -Abhängigkeit stimmt gut mit Gl. (11 a) überein<sup>[25]</sup>. Der Effekt wurde kürzlich auch für das ähnliche System Poly( $\beta$ -benzyl-L-aspartat) in *m*-Kresol gefunden<sup>[26]</sup>.

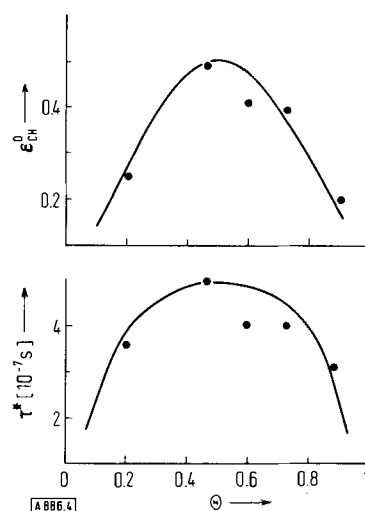


Abb. 4. Durch die Helix-Coil-Umwandlung einer konzentrierten Lösung von Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamat) bedingtes (maximales) Inkrement der Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon'_{ch}$ ) in Abhängigkeit vom Umwandlungsgrad  $\Theta$  (nach [25]).

Die  $\tau^*$ -Werte sind aus den dielektrischen Daten berechnet. Die eingezeichneten Kurven entsprechen dem berechneten Verlauf.

Mit dem für Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamat) ermittelten  $\tau_{\max}^*$  von  $5 \cdot 10^{-7}$  s und dem für dieses Polypeptid bei den verwendeten hohen Konzentrationen geltenden  $\sigma = 0.4 \cdot 10^{-4}$ <sup>[25]</sup> errechnet sich  $k_F$  zu  $1.3 \cdot 10^{10}$  s<sup>-1</sup>, womit wir im Rahmen unserer früheren Abschätzung bleiben. Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Experimente ist der damit gelungene Nachweis, daß ein elektrisches Feld eine Konformationsumwandlung unmittelbar beeinflussen kann. Durch Umrechnung ergibt sich, daß eine Feldstärke von 200 kV/cm (wie sie an biologischen Membranen durchaus vorkommt) im hier diskutierten System eine fast vollständige Strukturumwandlung bewirken kann, und zwar in Zeiten um 1  $\mu$ sec. Es ist daher denkbar, daß z. B. Nervenimpulse über eine kooperative Konformationsänderung direkt in molekulare Prozesse eingreifen können.

Eine diesen Ergebnissen widersprechende Interpretation von Doppelsignalen der  $C_\alpha$ H- und NH-Protonen in der

kernmagnetischen Resonanz als Austausch  $\text{Helix} \rightleftharpoons \text{Coil}$  mit einem Wert für  $\tau$  von nur  $10^{-2}$  s<sup>[27, 28]</sup> ist kürzlich durch eine andere Deutung der Signale entkräftet worden<sup>[29, 30]</sup>.

### 3.2. Die Helix-I $\rightleftharpoons$ Helix-II-Umwandlung des Poly-L-prolins

Diese Umwandlung zwischen zwei geordneten Konformationen ist sehr kooperativ<sup>[4]</sup>. Ein Keim der I-Form (= *cis*-Zustand der Peptidbindung) inmitten einer II-Helix (= *trans*-Zustand der Peptidbindungen) ist bei  $\Theta = 0.5$  etwa  $10^5$ -mal unwahrscheinlicher als eine ununterbrochene Helix und umgekehrt ( $\sigma \approx 10^{-5}$ ,  $N_0 \approx 300$ ). Das ist bedingt durch energetisch ungünstige Verhältnisse an den I/II- und II/I-Nahtstellen. Diese kommen daher nur verhältnismäßig selten vor. Bei kurzen Ketten ist selbst der Anteil an Molekülen, die nur eine einzige Nahtstelle enthalten, klein gegen die Konzentration der Moleküle in den reinen Formen (ohne solche Nahtstellen).

Tabelle 1. Anteil der Polyprolinmoleküle, die I/II- oder II/I-Nahtstellen enthalten, relativ zum Anteil der reinen Formen I...I und II...II in Benzylalkohol/n-Butanol bei 70°C und  $\Theta \approx 0.5$  (berechnet aus den Gleichgewichtsdaten [4]).

Kette enthält	Kettenlänge N		
	20	100	200
nur I	1	1	1
eine Nahtstelle	0.113	0.6	1.22
zwei Nahtstellen	0.003	0.09	0.37
nur II	1	1	1

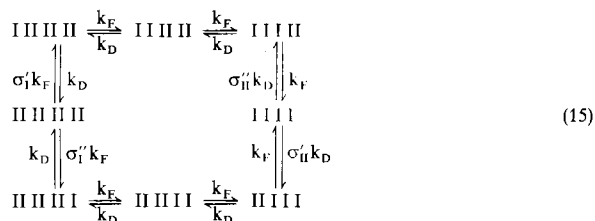
Tabelle 1 zeigt, daß dieser „Alles-oder-Nichts“-Fall noch für  $N = 20$  gut erfüllt ist. Natürlich nimmt die Wahrscheinlichkeit, daß irgendwo in der Kette eine Nahtstelle auftritt, mit wachsender Kettenlänge zu. Quantitativ ergibt sich (Tabelle 1), daß bereits bei  $N = 100$  (das ist etwa  $1/3$  der kooperativen Länge  $N_0$ ) der Anteil an Molekülen mit einer Nahtstelle nicht mehr vernachlässigt werden darf, während der Anteil von Keimen (zwei Nahtstellen) immer noch sehr klein ist („unterdrückte Keimbildung“<sup>[7]</sup>). Etwa ab  $N = 200$  entfällt auch diese Vereinfachung.

Durch plötzliche Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung kann ein Relaxationsprozeß der Umwandlung in Gang gesetzt werden. Infolge der ziemlich langsamen Elementarschritte der *cis*  $\rightleftharpoons$  *trans*-Isomerisierung der Peptidbindung (mit einer Aktivierungsenergie von ca. 20 kcal/mol) ist der Zeitverlauf der Umwandlung bequem und sehr genau (polarimetrisch) meßbar. Dadurch wird das System zu einem idealen Modell zur Prüfung detaillierter Vorausagen über die Kinetik kooperativer Umwandlungen. Es seien zunächst einige interessante Spezialfälle diskutiert.

Die Kinetik des „Alles-oder-Nichts“-Falles ist besonders einfach. Da fast nur Ketten mit praktisch gleichen Elementarzuständen auftreten, erhalten wir formal einen Einstufenprozeß mit Reaktionen 1. Ordnung, z. B. für  $N = 4$



Natürlich müssen dabei Zwischenzustände durchlaufen werden. In Frage kommen nur solche, die höchstens eine Nahtstelle aufweisen (da alle anderen noch unwahrscheinlicher sind). Nehmen wir noch der Einfachheit halber an, daß alle Wachstumsschritte (einschließlich der an den Enden) durch die gleiche Geschwindigkeitskonstante beschrieben werden, ergibt sich für (14) als vollständiger kinetischer Mechanismus



( $\sigma'_I$ ,  $\sigma'_I$ ,  $\sigma''_{II}$ ,  $\sigma''_{II}$  = Keimbildungsparameter an den Kettenenden<sup>[4]</sup>). Da alle Zwischenzustände Z in sehr geringer Konzentration vorliegen, kann man die bekannte quasistationäre („steady-state“) Bedingung  $dc_Z/dt = 0$  annehmen. Damit errechnet sich aus Gl. (15) für die in Gl. (14) auftretenden Geschwindigkeitskonstanten<sup>[31]</sup>

$$\bar{k} = (\sigma'_I + \sigma'_I)s^{N-1} \frac{1-s}{1-s^N} k_F, \quad \bar{k} = (\sigma''_{II} + \sigma''_{II}) \frac{1-s}{1-s^N} k_D \quad (16a, b)$$

( $s = k_F/k_D$ ). Gemäß Gl. (2) sollte die chemische Relaxation von Gl. (14) durch eine einzige Relaxationszeit  $\tau = 1/(\bar{k} + \bar{k})$  beschrieben werden. In der Tat wurde experimentell bei  $N < 20$  ein entsprechendes Verhalten gefunden (s. Abb. 5a).

Relaxationskurven von Ketten mittlerer Länge (z. B.  $N \approx 100 \approx N_0/3$ ), für welche die Näherung „unterdrückter Keimbildung“ gültig ist (s. Tabelle 1), verlaufen während einer gewissen Zeit formal nach der 0. Ordnung, wenn das anfängliche Gleichgewicht im Umwandlungsbereich liegt (s. Abb. 5b). Die Unabhängigkeit von der Konzentration der jeweils noch vorhandenen I- oder II-Zustände erklärt sich damit, daß unter obigen Bedingungen die Zahl der eigentlichen Reaktionsstellen, nämlich der I/II- und II/I-Nahtstellen, einige Zeit konstant bleibt. Die Umwandlung erfolgt im wesentlichen über eine Verschiebung dieser Stellen durch Wachstumsschritte. Neue Nahtstellen entstehen und verschwinden nur sehr langsam und in vergleichsweise geringer Zahl. Dieser Effekt fällt daher erst gegen Ende der Reaktion ins Gewicht. Somit ist die Anfangsgeschwindigkeit in Abbildung 5b proportional dem Produkt aus  $k_F - k_D = (1 - 1/s)k_F$  und der Zahl der Nahtstellen. Ist letztere für das Anfangsgleichgewicht (z. B. durch Tabelle 1) sowie  $s$  für den Endzustand bekannt, kann  $k_F$  bestimmt werden<sup>[31]</sup>.

Ein weiterer instruktiver Spezialfall liegt vor, wenn für lange Ketten der Anfangszustand außerhalb des Umwandlungsbereichs gewählt wird, so daß zunächst nur eine praktisch reine Form existiert ( $\Theta = 0$  oder 1). Jetzt können die schnellen Wachstumsschritte erst zum Zuge kommen, nachdem – sehr viel langsamer – die ersten Nahtstellen durch Keimbildung entstanden sind. Das Ergebnis ist eine sigmoide Anlaufkinetik (s. Abb. 5c). Deren experimentelle Verifizierung beweist für diesen Fall die Gültigkeit der Annahme, daß die Geschwindigkeitskonstante der Keim-

bildung tatsächlich erheblich kleiner als die des Wachstumsschritts ist. Die kleine Gleichgewichtskonstante der Keimbildung  $\sigma \cdot s$  wäre ja auch durch eine entsprechend schnelle Rückreaktion (Zerstörung eines Keims) erklärbar.

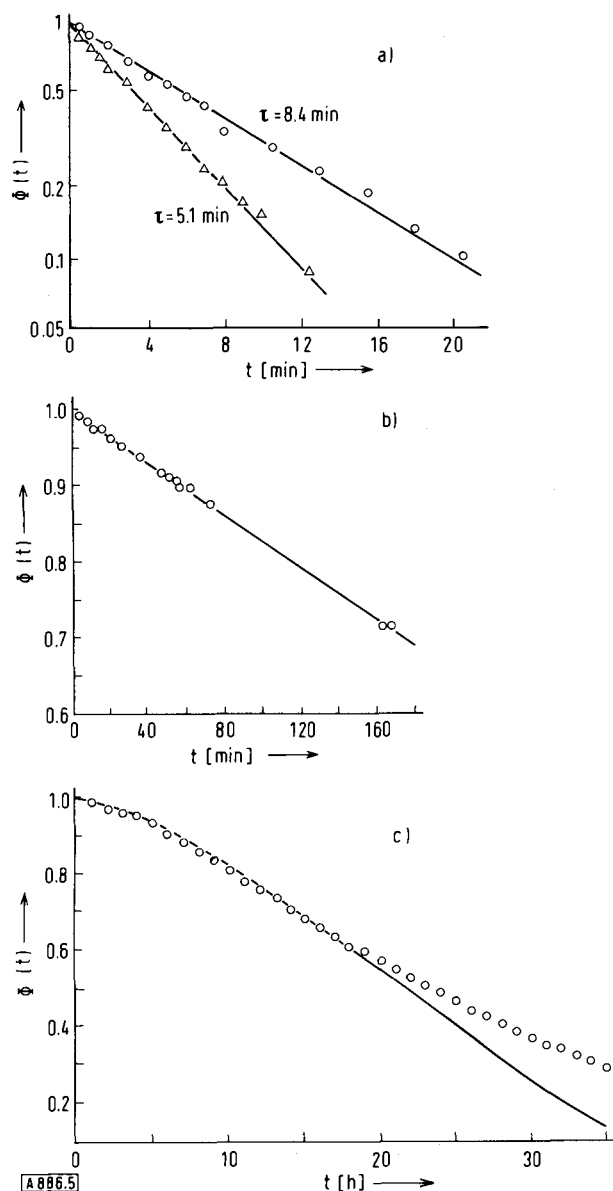


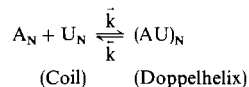
Abb. 5. Drei Grenzfälle der Kinetik der  $I \rightleftharpoons II$ -Umwandlung des Poly-L-prolins (aus [31]). a) Halblogarithmische Auftragung von zwei Relaxationskurven im „Alles-oder-Nichts“-Bereich  $N=18$ . Sprung von 90 auf 60 Vol.-% n-Butanol in Benzylalkohol, wobei  $\Theta_1 = 0.5 \rightarrow 0.1$  (—O—) und  $0.1 \rightarrow 0.5$  (—Δ—). Die  $\tau$ -Werte unterscheiden sich wegen der verschiedenen Anfangsbedingungen [entsprechend verschiedenen  $s$ -Werten in Gl. (16)]. b) Zeitverlauf der Umwandlung (in linearer Auftragung!) im Fall der unterdrückten Keimbildung ( $N=217$ , Sprung von  $\Theta_1 = 0.34$  auf  $0.71$ ). Die Reaktionsgeschwindigkeit bleibt längere Zeit konstant. c) Sigmoidale Anlaufkurve der Umwandlung für  $\Theta_1 = 1 \rightarrow 0$  bei  $N=113$ . Gefundene Werte  $\circ \circ \circ \circ$ , berechnete Werte —

Während in den beschriebenen Spezialfällen wenigstens näherungsweise eine Berechnung der gesamten Relaxationskurve möglich war, wurden der kinetischen Analyse im allgemeinen Fall die mittlere Relaxationszeit zugrunde gelegt<sup>[31–33]</sup>. Dabei zeigte sich wie bei der  $\alpha$ -Helix  $\rightleftharpoons$  Coil-Umwandlung das von der Theorie<sup>[10]</sup> geforderte Maximum von  $\tau^*$  im Bereich von  $\Theta = 0.5$ . Aus der Kettenlängenabhängigkeit von  $\tau^*$  konnte  $\tau_{\max}^*$  bestimmt werden. Damit und

mit Gl. (11 b) ergab sich die Geschwindigkeitskonstante für das Wachstum von *cis*-(Helix-I-)Sequenzen zu  $k_F = 1.5 \text{ s}^{-1}$  (bei 70°C in 60 Vol.-% n-Butanol in Benzylalkohol), ein Wert, welcher befriedigend mit dem durch Auswertung der oben beschriebenen Spezialfälle erhaltenen übereinstimmt. Tatsächlich sind ähnliche Werte völlig unabhängig auch für die *cis*  $\rightleftharpoons$  *trans*-Isomerisierung der Amidbindung in *N,N*-Dimethylacetamid durch Messung der kernmagnetischen Resonanz<sup>[34–36]</sup> sowie aus IR-Daten<sup>[37, 38]</sup> erhalten worden.

### 3.3. Die Doppelhelix $\rightleftharpoons$ Coil-Umwandlung von Oligonucleotiden

Die Bildung und der Zerfall von kurzen Doppelhelices aus Polyriboadenylsäure (Poly-A) sowie von Polyribouridylsäure (Poly-U) mit Poly-A wurde von Pörschke und Eigen<sup>[39, 40]</sup> mit der Temperatursprungmethode und durch schnelles Mischen in einer Strömungsapparatur untersucht. Zur Interpretation der kinetischen Daten bewährte sich, wie schon bei den Gleichgewichtsuntersuchungen<sup>[4, 41]</sup>, das „ReiBverschleißmodell“ (s. Abb. 6, ebenfalls Abb. 10 in<sup>[41]</sup>). Für die von Pörschke und Eigen gewählten kurzen Ketten ( $N \leq 18$ ) gilt die Alles-oder-Nichts-Näherung:



In der Tat wird nur eine einzige Relaxationszeit gefunden, welche nach den für bimolekulare Einstufenreaktionen gültigen Beziehungen<sup>[5]</sup> gemäß

$$1/\tau = 4\bar{k}c_{A_N} + \bar{k} \quad (18a, b)$$

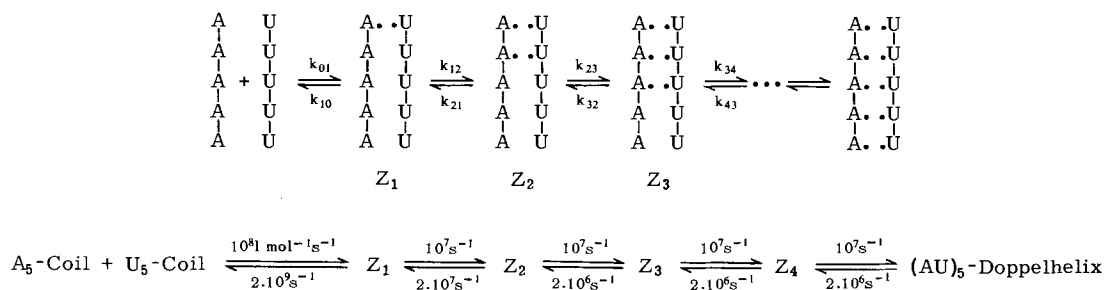
$$1/\tau = \bar{k}(c_{A_N} + c_{U_N}) + \bar{k}$$

von der Konzentration der Ketten in Coilform abhängt. Wie beim „Alles-oder-Nichts“-Fall des Polyprolins (s. Abschnitt 3.2) lassen sich  $\bar{k}$  und  $\bar{k}$  mit der „quasi-stationären“ Bedingung für alle Zwischenzustände durch die elementaren kinetischen Konstanten des Schemas in Abbildung 6 ausdrücken. Diese werden dadurch bei Messung der Kettenlängenabhängigkeit von  $\bar{k}$  und  $\bar{k}$  experimentell zugänglich.

Die Diskussion wird hier allerdings etwas anders als im Falle des Polyprolins. Dort gelang eine befriedigende Deutung der „Alles-oder-Nichts“-Kinetik durch die Annahme, daß im Inneren der Kette alle Elementarschritte gleiche Geschwindigkeitskonstanten besitzen [ $k_F$  und  $k_D$  in Gl. (15)] und daß nur jeweils ein Elementarschritt, der Keimbildungsschritt, eine davon verschiedene Konstante hat. Bei Übertragung dieser einfachsten Annahme auf die Bildung der Doppelhelix wäre  $\bar{k}$  gleich der elementaren Geschwindigkeitskonstante des Keimbildungsschrittes  $k_{01}$ , denn analog Gl. (16a) wäre

$$\bar{k} = k_{01} \frac{s^{N-1}(1-s)}{1-s^N} \approx k_{01} \quad (19)$$

da unter den von *Pörschke* und *Eigen* gewählten experimentellen Bedingungen  $s \gg 1$  ist. Es zeigte sich jedoch, daß Gl. (19) und damit das zugrunde gelegte einfachste Reaktionsschema in diesem Fall nicht stimmen kann. Die Messung der Temperaturabhängigkeit der Reaktion ergab nämlich eine stark negative Aktivierungsenergie  $E_a$  für  $\bar{k}$ , während für Geschwindigkeitskonstanten von Elementarreaktionen, also



[A 886,6]

Abb. 6. Oben: Reißverschußmodell der Bildung einer Doppelhelix aus einem Poly-A- und einem Poly-U-Strang für  $N=5$ . Helices, in denen noch nicht alle Basenpaare (..) gebildet sind, treten in kleiner Konzentration als Zwischenstufen ( $Z_1$  bis  $Z_4$ ) auf („Alles-oder-Nichts“-Fall). Unten: Zahlenwerte der Geschwindigkeitskonstanten.

auch für  $k_{01}$ , nur positive Aktivierungsenergien möglich sind. Eine Zunahme der Geschwindigkeit mit abnehmender Temperatur deutet auf ein oder mehrere sich schnell einstellende Vorgleichgewichte, die vor den folgenden langsameren Schritten liegen. Die (hier offenbar negativen)  $\Delta H$ -Werte dieser Gleichgewichte tragen zur gemessenen Aktivierungsenergie bei. Aus den quantitativen Daten (für  $\Delta H$  und  $E_a$ ) wurde geschlossen, daß sich  $Z_1$ , der erste Zwischenkomplex zweier Ketten (mit einer Basenpaarung), zwar schnell bildet, aber auch schnell wieder zerfällt. Auch der nächste Zwischenzustand mit zwei Basenpaarungen erwies sich noch als labil. Erst der dann folgende Schritt ( $k_{23}$ ) ergibt einen stabilen Keim.

Die mit den experimentellen Daten am besten übereinstimmenden Geschwindigkeitskonstanten für das Poly-A/Poly-U-System<sup>[42]</sup> am Umwandlungsmittelpunkt sind in der unteren Zeile von Abbildung 6 eingetragen. Man erkennt, daß das Schließen und Öffnen eines Basenpaares sehr schnell erfolgt (innerhalb von  $10^{-7}$  bis  $10^{-6}$  s). Trotzdem kann das Aufschmelzen eines längeren Helixabschnitts erhebliche Zeiten benötigen (bei  $N=15$  etwa 1 s), da sich jedes geöffnete Paar im Innern der Kette im Mittel zwei- bis fünfmal wieder schließt, bevor das nächste Paar geöffnet wird. Dies folgt aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der Propagationsschritte  $s=2-5$ .

*Eigen*<sup>[43]</sup> hat darauf hingewiesen, daß die gegenseitige Erkennung eines Nucleinsäure-Codons und -Anticodons aus mehr als drei Nucleotiden ein für die Biosynthese viel zu langsamer Vorgang wäre, obwohl damit eine erhöhte Spezifität erreicht werden könnte. Die wirkliche Länge des Codons von drei stimmt mit der für eine stabile Paarung gefundenen Länge überein; die Zeit für die Bildung und für die Wiederauflösung beträgt ca.  $10^{-7}$  s.

#### 4. Ausblick auf kompliziertere Systeme

Für die Geschwindigkeit der Aufknäuelung natürlicher Nucleinsäuren wird wegen deren sehr großen Kettenlängen ein bei kurzen Ketten vernachlässigbarer Effekt maßge-

bend. Da die Ketten in der Helix stark miteinander verdrillt sind, muß bei der Aufknäuelung längerer Ketten ein erheblicher hydrodynamischer Widerstand überwunden werden. Bei der theoretischen Behandlung dieses Falls war *Crothers*<sup>[44]</sup> am erfolgreichsten, doch gelang wegen verschiedener Komplikationen noch keine endgültige Aussage<sup>[45]</sup>.

Bei Proteinen sind die Verhältnisse wegen deren komplizierter dreidimensionaler Struktur noch unübersichtlicher. Bei sehr starker Kooperativität kann man einen „Alles-oder-Nichts“-Verlauf mit nur zwei merklich besetzten Zuständen und einer entsprechend langsamen Umwandlung erwarten<sup>[46]</sup>. Es sei an dieser Stelle auch auf den Fortschrittsbericht von *Pohl*<sup>[47]</sup> hingewiesen.

Ein Gesichtspunkt, der für alle kooperativen Systeme gilt, soll zum Schluß noch herausgestellt werden. Je größer die Kooperativität eines Systems ist, desto größer ist auch die durch unter Umständen sehr schwache Wechselwirkungen bedingte Stabilität z. B. einer Proteinstruktur, und desto spezifischer kann auch z. B. ein Enzym sein. Die Geschwindigkeit kooperativer Vorgänge, z. B. einer für die allosterische Regelung wichtigen Konformationsumwandlung, nimmt jedoch ab. Es ist anzunehmen, daß bei der Evolution von biologischen Makromolekülen in vielen Fällen ein Kompromiß zwischen Stabilität und Dynamik geschlossen worden ist.

Eingegangen am 21. Mai 1971

[A 886]

- [1] J. Monod, J. Wyman u. J. P. Changeux, J. Mol. Biol. 12, 88 (1965).
- [2] M. Kirtley u. D. E. Koshland, J. Biol. Chem. 242, 4192 (1967).
- [3] J. D. Watson: Molecular Biology of the Gene. Benjamin, New York 1965.
- [4] J. Engel u. G. Schwarz, Angew. Chem. 82, 468 (1970); Angew. Chem. internat. Edit. 9, 389 (1970).
- [5] M. Eigen u. L. DeMaeyer in S. L. Friess, E. S. Lewis u. A. Weißberger: Techniques of Organic Chemistry. Wiley, New York 1963, Bd. VIII/2, S. 895.
- [6] G. Schwarz, Rev. Mod. Phys. 40, 206 (1968).
- [7] G. Schwarz, Habilitationsschrift, Technische Universität Braunschweig 1966.
- [8] R. Lumry, R. Legare u. W. G. Miller, Biopolymers 2, 489 (1964).
- [9] E. Hamori u. H. A. Scheraga, J. Phys. Chem. 71, 4147 (1967).
- [10] G. Schwarz, Biopolymers 6, 873 (1968).
- [11] G. Schwarz, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 68, 843 (1964).
- [12] G. Schwarz, J. Mol. Biol. 11, 64 (1965).
- [13] D. A. McQuarry, J. P. McTague u. H. Reiss, Biopolymers 3, 657 (1965).
- [14] J. B. Keller, J. Chem. Phys. 37, 2584 (1962); 38, 325 (1963).



- [15] A. C. Pipkin u. J. H. Gibbs, *Biopolymers* 4, 3 (1966).  
 [16] M. E. Craig u. D. M. Crothers, *Biopolymers* 6, 385 (1968).  
 [17] A. Silberberg u. R. Simha, *Biopolymers* 6, 479 (1968).  
 [18] G. Schwarz, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 75, 40 (1971).  
 [19] G. Schwarz, *J. Theor. Biol.*, im Druck.  
 [20] K. Bergmann, M. Eigen u. L. DeMaeyer, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 67, 819 (1963).  
 [21] T. K. Saksena, B. Michels u. R. Zana, *J. Chim. Phys.* 65, 597 (1968).  
 [22] H. Noguchi u. J. T. Yang, *Biopolymers* 1, 359 (1963).  
 [23] G. G. Hammes u. P. B. Roberts, *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 1862 (1969).  
 [24] G. Schwarz, *J. Phys. Chem.* 71, 4021 (1967).  
 [25] G. Schwarz u. J. Seelig, *Biopolymers* 6, 1263 (1968).  
 [26] A. Wada, *Chem. Phys. Lett.* 8, 211 (1971).  
 [27] E. M. Bradbury, C. Crane-Robinson, H. Goldman u. H. W. E. Rattle, *Nature* 217, 812 (1968).  
 [28] J. A. Ferretti u. L. Paolillo, *Biopolymers* 7, 155 (1969).  
 [29] R. Ullmann, *Biopolymers* 9, 471 (1970).  
 [30] J. A. Ferretti, B. W. Ninham u. V. A. Parsegian, *Macromolecule* 3, 34 (1970).  
 [31] D. Winklmair, J. Engel u. V. Ganser, *Biopolymers* 10, 721 (1971).  
 [32] J. Engel, *Biopolymers* 4, 945 (1966).  
 [33] J. Engel, *Proceedings of the Symposium on Peptide Chemistry* 1969, North-Holland Co., im Druck.  
 [34] R. C. Neumann, Jr. u. V. Jonas, *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 1970 (1968).  
 [35] K.-I. Dahlquist, S. Forsén u. T. Alm, *Acta Chem. Scand.*, im Druck.  
 [36] P. A. Temussi, T. Tancredi u. F. Quadrioglio, *J. Phys. Chem.* 73, 4227 (1969).  
 [37] T. Miyazawa, *Bull. Chem. Soc. Japan* 34, 691 (1961).  
 [38] T. Miyazawa in M. A. Stahlmann: *Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins*. Wisconsin Press, Madison 1962, S. 201.  
 [39] D. Pörschke, Diplomarbeit, Universität Göttingen 1966, und Dissertation, Technische Universität Braunschweig 1968.  
 [40] D. Pörschke u. M. Eigen, *J. Mol. Biol.* 62, 316 (1971).  
 [41] M. Eigen u. D. Pörschke, *J. Mol. Biol.* 53, 123 (1970).  
 [42] M. Eigen, Vortrag auf der Tagung Biochemische Analytik, München 1970.  
 [43] M. Eigen, *Nobelsymposium* 1967.  
 [44] D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.* 9, 712 (1964).  
 [45] H. C. Spatz u. D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.* 42, 196 (1969).  
 [46] R. Lumry, R. Bilton u. J. F. Brandts, *Biopolymers* 4, 917 (1966).  
 [47] F. Pohl, *Angew. Chem.*, im Druck; *Angew. Chem. internat. Edit.*, im Druck.

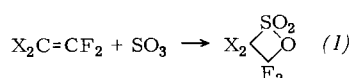
## Fluorhaltige $\beta$ -Sultone

Von I. L. Knunjanz und G. A. Sokolski<sup>[\*]</sup>

Fluorhaltige  $\beta$ -Sultone entstehen durch Anlagerung von Schwefeltrioxid an fluorhaltige Olefine. Besonders gut untersucht wurde das Tetrafluoräthan-sulton. Charakteristisch für derartige Verbindungen ist ihre Neigung zur Ringöffnung, bei der sich z. B. Derivate der  $\alpha$ -Sulfocarbonsäuren, der Sulfonsäuren, der Carbonsäuren sowie der Schwefelsäure bilden können. Präparativ besonders wertvoll sind solche fluorhaltigen Verbindungen mit einem  $\alpha$ -Wasserstoffatom.

### 1. Einleitung

Sultone nennt man innere Ester der Hydroxyalkansulfonsäuren; man kann sie als schwefelhaltige Analoga der Lactone betrachten. Ähnlich den Lactonen sind  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -Sultone und viele andere derartige cyclische Sulfonate möglich. Bei den unsubstituierten Verbindungen sind die  $\gamma$ - und  $\delta$ -Sultone mit penta- bzw. hexacyclischem Ring am beständigsten. Unsubstituierte  $\beta$ -Sultone zersetzen sich äußerst leicht und konnten noch nicht isoliert werden. Im



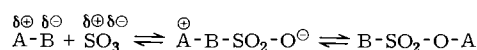
Gegensatz dazu sind die fluorhaltigen  $\beta$ -Sultone vom Typ (1), die sich durch Anlagerung von Schwefeltrioxid an Polyfluorolefine bilden, verhältnismäßig beständig. Diese

Bildungsreaktion wurde an zahlreichen Beispielen gut erforscht. Ferner ist eine Synthese über intermediäre Sulfene beschrieben worden<sup>[1a]</sup>.

### 2. Synthese der $\beta$ -Sultone

Die Möglichkeit der Umsetzung von Olefinen mit Schwefeltrioxid wurde schon zu Anfang des 19. Jahrhunderts am Beispiel der Reaktion von Schwefeltrioxid mit Äthylen gezeigt<sup>[1b, 2]</sup>. Danach wurde diese Reaktion auf eine große Anzahl substituierter Äthylene<sup>[3-6]</sup>, auf einige Chlorolefine<sup>[7-11]</sup> und in den letzten Jahren auch auf Fluorolefine<sup>[12-18]</sup> ausgedehnt.

Die Reaktionen von Schwefeltrioxid mit polaren Reagentien des Typs A—B lassen sich durch eine Reihe von Gleichgewichten beschreiben.



Der Anfangsschritt bei der Reaktion von Schwefeltrioxid mit Olefinen ist der elektrophile Angriff des Schwefeltri-

[\*] Prof. Dr. I. L. Knunjanz und Dr. G. A. Sokolski  
 Institut für Organoelement-Verbindungen  
 der Akademie der Wissenschaften der UdSSR  
 Moskau W 312, Ul. Wawilowa 28