

Kooperative Konformationsänderungen von globulären Proteinen

Von Fritz M. Pohl^[*]

In globulären Proteinen ist die komplizierte räumliche Anordnung der Polypeptidkette durch mehrere voneinander abhängige, kooperative Wechselwirkungen bestimmt. Auf Änderungen der Umwelt wie Temperatur und Druck sowie Konzentration verschiedenster Verbindungen können diese Makromoleküle durch Änderung ihrer Konformation und damit ihrer biologischen und chemischen Eigenschaften reagieren. Sie sind dadurch für Regelvorgänge oder Informationsspeicherung in Lösung mit sehr unterschiedlichen Zeitkonstanten geeignet. Am zeitlichen Verhalten bei der reversiblen Entfaltung einiger Proteine, die gut durch eine stark kooperative „Alles-oder-Nichts“-Umwandlung zwischen zwei Zuständen beschrieben werden kann, lassen sich solche Einflüsse der Umwelt verfolgen und zum Teil auf molekularer Ebene erklären.

1. Einleitung

Proteine oder Eiweißmoleküle gehören zu den kompliziertesten, zugleich aber auch faszinierendsten organischen Molekülen^[1]. Zusammen mit den „linearen“ Makromolekülen der Nucleinsäuren, die besonders der Speicherung und Übertragung der genetischen Information dienen, den „zweidimensionalen“ Membranen, die unter anderem als Grenz- und Trennflächen für die räumliche Aufteilung sorgen, und Wasser mit seinen besonderen Eigenschaften als Matrix^[2-5] sind sie für eine Fülle von Strukturen und Vorgängen in der Biologie verantwortlich. Als Enzyme etwa dienen die Proteine der Beschleunigung von chemischen Reaktionen und erhöhen deren Spezifität beträchtlich. Proteine sind wichtige Moleküle für Regelvorgänge in der Zelle, ohne die ein geordneter Ablauf der vielen Reaktionen unter wechselnden Umweltbedingungen nicht möglich ist^[6, 7].

Die Vielfalt der natürlichen Proteine ist aus ihrem chemischen Aufbau zu verstehen. Durch Verknüpfen von 20 Arten von Aminosäuren zu kettenartigen Polypeptiden von meist 100–500 Gliedern ergibt sich eine sehr große Zahl von möglichen Sequenzen. Zwischen den Gliedern der Kette selbst, aber auch zwischen der Kette und anderen kleinen und großen Molekülen, kommt es zu schwachen Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, „hydrophoben“ Bindungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen, „Ionenbindungen“ etc.^[8-10].

Diese Wechselwirkungen beeinflussen einander und führen zur kooperativen Stabilisierung bestimmter räumlicher Anordnungen. Solche kooperativen Effekte sind bei kleinen Molekülen in der Form von Phasenübergängen wie Schmelzen und Verdampfen vertraut.

Viele biologische und biochemische Eigenschaften der Proteine sind an eine oft als „nativ“ bezeichnete dreidimensionale Anordnung von funktionellen Gruppen gebunden. Ändert sich diese Anordnung oder „Konformation“, so

werden auch die entsprechenden Eigenschaften der Proteine verändert: Damit ist es möglich, molekulare Regel- und Schaltkreise aufzubauen, in denen Änderungen der Umwelt sich in den oft durch Kooperativität verstärkten Änderungen der makromolekularen Konformation wider spiegeln^[11].

Die Umwelteinflüsse lassen sich dabei am besten durch Gl. (1) zusammenfassen^[12]. Dabei ist ΔG_p° die Änderung der Freien Energie eines Proteins, wenn die Temperatur um ΔT , der Druck um ΔP und der Molenbruch der i-ten Partikel sorte um ΔM_i verändert wird (Einflüsse etwa eines elektrischen Feldes $\Delta \mathcal{E}$ werden vernachlässigt):

$$\Delta G_p^{\circ} = \sum_i \mu_i \Delta M_i - S \Delta T + V \Delta P \quad (1)$$

(μ_i bezeichnet das chemische Potential, S die Entropie des Systems, V das Volumen). Zur Veranschaulichung von Gl. (1) können etwa die Sinneseindrücke dienen wie Geruch und Geschmack (ΔM_i), Hitze und Kälte (ΔT), Geräusche und Wahrnehmungen des Tastsinns (ΔP). In allen diesen Fällen ist sehr wahrscheinlich die Konformationsänderung bestimmter „Receptor“-Proteine, also ΔG_p° , von Bedeutung für die Auslösung des Reizes.

Neben der möglichst genauen Bestimmung der nativen Konformation selbst sind Fragen nach dem Ausmaß, der Geschwindigkeit und dem Grund der Konformationsänderung eines Proteins bei Variation der Umgebung von besonderem Interesse. Neben allgemeinen Ausführungen zur Konformation globulärer Proteine werden hier an einem speziellen Beispiel – der Kinetik der reversiblen Entfaltung von einigen miteinander „verwandten“ Proteinen^[13] – mit Gl. (1) zusammenhängende Probleme der Konformationsänderung von natürlichen Proteinen diskutiert.

Als Konformation eines Proteins bezeichnet man dabei die räumliche Anordnung der in vielen Fällen aus 1000–10000 Atomen bestehenden Polypeptidkette. Die Konformeren können durch Rotation um kovalente Bindungen ineinander übergeführt werden^[14]. Eine Konformationsänderung bedeutet, daß – mit Ausnahme von Wasserstoff-

[*] Priv.-Doz. Dr. F. M. Pohl
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
34 Göttingen-Nikolausberg

brücken – keine chemischen Bindungen verändert werden und die Torsionswinkel θ um die Bindungen die wesentliche Variable sind. Abbildung 1 gibt einen Ausschnitt aus einer Peptidkette mit den Bezeichnungen der wichtigsten Torsionswinkel wieder.

Streng genommen schließt diese Definition eine Änderung von Bindungslängen b und Bindungswinkeln α aus. Für die allgemeine räumliche Anordnung der Haupt- und Seitenketten ist dies in erster Näherung auch gerechtfertigt^[15, 16]. So verschiebt sich z. B. die relative Position eines C^z-Atoms bei einem Energieaufwand von kT bei Variation von b um $\pm 0.04\text{ \AA}$, von α um $\pm 0.15^\circ$, von θ aber um $\pm 1^\circ$. Das schließt natürlich nicht aus, daß gerade solche Änderungen von b oder α , etwa bei der enzymatischen Katalyse, von besonderer Bedeutung sein können.

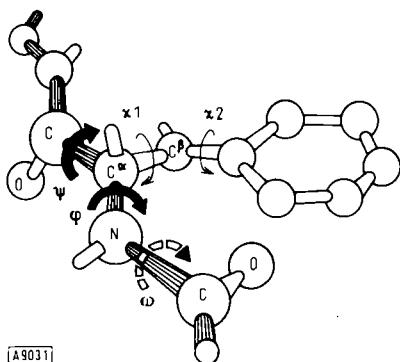


Abb. 1. Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus einer Polypeptidkette mit Bezeichnung der Torsionswinkel um Bindungen der Hauptkette (ϕ , ψ , ω) und der Seitenkette von Phenylalanin (χ_1 , χ_2) [14].

Diese „geometrische“ Definition, die besonders an den Bedürfnissen der Röntgen-Strukturanalyse von Proteinkristallen ausgerichtet ist, gibt keine untere Grenze für Konformationsänderungen. In diesem Fortschrittsbericht wird nur dann von „Konformationsänderungen“ gesprochen, wenn sich ein Torsionswinkel um mindestens 30° ändert.

Die Ermittlung von Änderungen bestimmter Torsionswinkel in Lösung ist trotz der Fortschritte, etwa bei cyclischen Oligopeptiden^[17], bei Makromolekülen zur Zeit noch ziemlich hoffnungslos. Hier ist in vielen Fällen die Beobachtung, daß Reaktionsschritte unabhängig von der Proteinkonzentration sind oder solche Schritte für die quantitative Erklärung eines Reaktionsschemas erforderlich sind, ein wesentlicher Hinweis auf Konformationsänderungen^[18–20]. Am besten lassen sich Konformationsänderungen *direkt* verfolgen, bei denen sich Proteineigenschaften wie etwa Absorption oder Fluoreszenz aromatischer Seitenketten ändern.

Reversible Konformationsänderungen können die Rotation einer einzigen Seitenkette, aber auch den Zusammenbruch der gesamten räumlichen Struktur umfassen. Dies macht oft sehr verschiedenartige Meßmethoden erforderlich. Für Vorgänge, an denen ein großer Teil eines Proteinmoleküls beteiligt ist, erscheint zumindest eine grobe Einteilung gerechtfertigt:

1. Die Änderung z. B. der Aktivität ist auf einen Übergang von der nativen zu einer „flexiblen“ Konformation ($A \rightleftharpoons F$) zurückzuführen, die praktisch nur in Lösung untersucht werden kann. Dabei kommt es zu gut messbaren Änderungen etwa der hydrodynamischen und thermodynamischen Eigenschaften. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase (GAPDH) aus Hefe^[20–22]. Hierher sind aber auch Vorgänge wie die reversible Denaturierung (durch extreme Temperaturen und pH-Werte oder Änderung des Lösungsmittels) zu zählen, die sich am besten mit Umwandlungen zwischen fester und flüssiger Phase vergleichen läßt.

2. Die Änderung ist auf den Übergang von der „aktiven“ zu einer „verklemmten“ oder „verspannten“ Konformation zurückzuführen, d.h. beide haben festkörperartige Eigenschaften und können durch Röntgen-Analyse im Kristall untersucht werden. Ein Beispiel ist die Umwandlung der arteriellen Form von Hämoglobin in die venöse ($A \rightleftharpoons V$) bei der Abgabe von Sauerstoff^[23], die sich am besten mit Umwandlungen zwischen zwei festen Phasen vergleichen läßt.

2. Konformation globulärer Proteine

2.1. Anatomie von Proteinen

Zwei Methoden ergänzen sich hervorragend bei der Ermittlung der statischen dreidimensionalen Anordnung der Polypeptidkette:

1. Die Bestimmung der Elektronendichtevertteilung mit atomarer Auflösung durch die Beugung von Röntgenstrahlen an Proteinkristallen^[24–26]. (In jüngster Zeit kann durch Beugung von Neutronen auch die Verteilung der Wasserstoffkerne ermittelt werden^[27].)

2. Die Bestimmung der Aminosäuresequenz mit chemischen Methoden^[28–30].

Beide Methoden zusammen erlauben es, Modelle für globuläre Proteine zu bauen, in denen die Art und die räumliche Lage einiger tausend Atome angegeben sind. Der

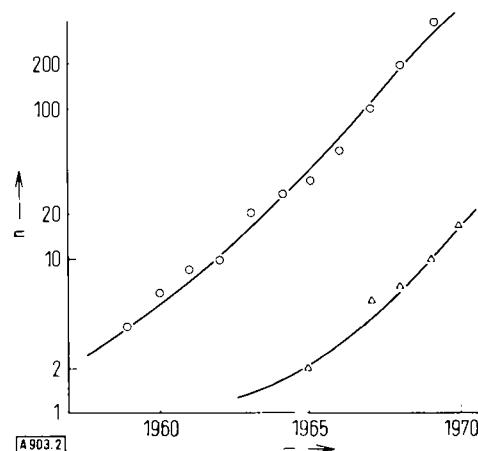


Abb. 2. Zahl n von globulären Proteinen, deren Primärstruktur (○ – ○ –) [30] und deren dreidimensionale Kristallstruktur in atomarer Auflösung besser als 3.5 \AA (– △ – △ –) in den letzten Jahren bestimmt wurden [25, 26]. Selbst die logarithmische Darstellung gibt noch eindrucksvoll die rasche Entwicklung wieder.

rasche Fortschritt auf diesem Gebiet ist in Abbildung 2 angedeutet.

Aus den erhaltenen Strukturen lassen sich keine einfachen „geometrischen“ Bauprinzipien ableiten. Selbst die Beschreibung der Sekundärstruktur, d.h. der Anordnung kleinerer Bereiche der Hauptkette, durch α -Helix- und β -(Faltblatt-)Strukturen, ist nur eine relativ grobe Näherung; es ergeben sich beträchtliche Abweichungen von der bei Polyaminosäuren beobachteten Geometrie. Ein Beispiel

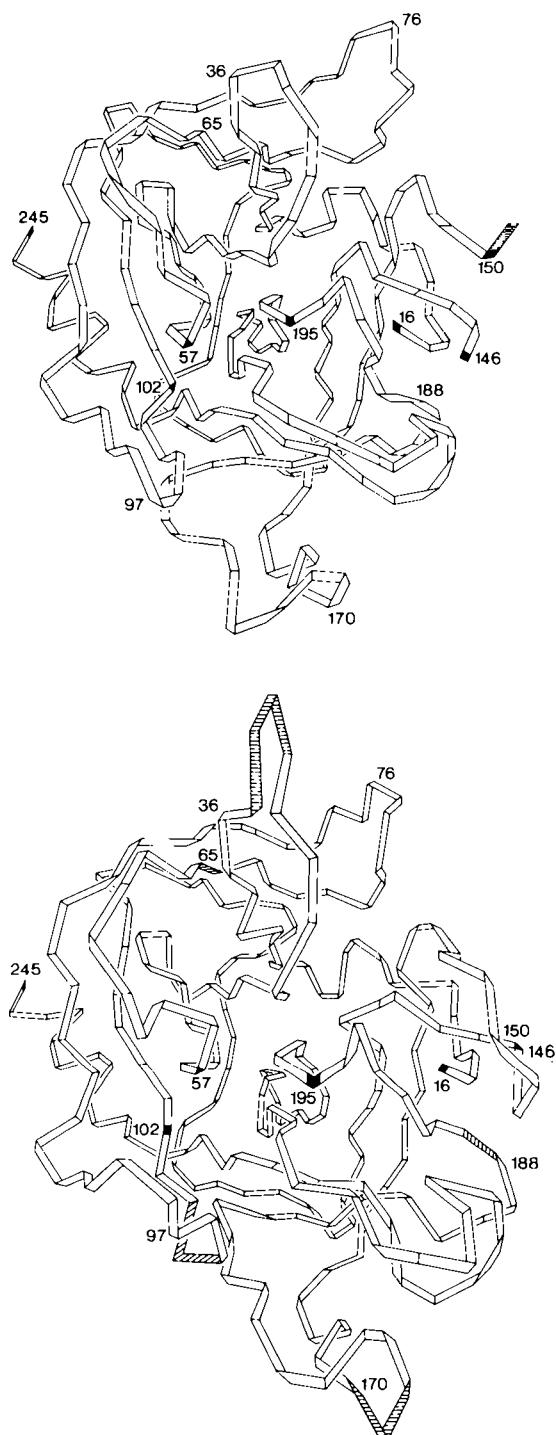


Abb. 3. Konformation der Polypeptidkette von α -Chymotrypsin (oben) und Elastase (unten), zwei verwandte Proteine, wie sie aus der Beugung von Röntgen-Strahlen an Proteinkristallen folgt. Das Band, das an jedem C^α-Atom geknickt ist, stellt die Hauptkette dar (nach [33]). Obwohl eine Reihe von Aminosäuren in den beiden Enzymen verschieden ist, ergibt sich eine sehr ähnliche räumliche Faltung.

für die komplizierte Struktur von zwei verwandten Enzymen ist in Abbildung 3 wiedergegeben, wobei nur der Verlauf der Peptidkette gezeichnet ist^[31-33]. Diese große Ähnlichkeit der Konformationen, obwohl nur 39% der Aminosäuren homolog sind, findet sich auch bei anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie, Chymotrypsinogen A^[34] und Trypsin^[35].

Auch verschiedene Kristallformen desselben Proteins wie α - und γ -Chymotrypsin^[36] oder Subtilisin Novo und Subtilisin BPN^[37, 38] zeigen nur geringe Unterschiede der Konformation. Kleine Unterschiede der Konformation selbst innerhalb des gleichen Kristalls können aber bei den beiden Proteinen beobachtet werden, aus denen die Dimeren von α -Chymotrypsin und Insulin bestehen^[31, 39]. Große Ähnlichkeiten, wie sie schon bei Myoglobin und Hämoglobin gefunden wurden, lassen erwarten, daß der Einfluß des Austauschens von Aminosäuren auf die Konformation von Proteinen verschiedener Spezies relativ genau vorausgesagt werden kann, wenn die entsprechende Grundstruktur bekannt ist.

Es ist angebracht, die Konformation von gelösten Proteinen auf die Konformation im Kristall zu beziehen. Die bisherigen Befunde sprechen dafür, daß sich beide unter vergleichbaren Bedingungen wahrscheinlich oft nur durch die Beweglichkeit einiger Seitenketten unterscheiden.

Ein „energetisches“ Bauprinzip wird durch alle Röntgen-Strukturanalysen zumindest als sehr gute Näherung bestätigt: Die polaren Seitenketten stehen fast alle in Kontakt mit der wäßrigen Lösung, und im Innern sind vorwiegend unpolare oder hydrophobe Seitenketten angeordnet^[8, 40]. Die Größe dieser Wechselwirkungen kann aus der Löslichkeit von Aminosäuren in Wasser und in organischen Lösungsmitteln abgeschätzt werden^[41]. Die Änderung der Freien Energie für die Überführung von Aminosäuren aus Äthanol in Wasser (ΔG_i°)^[42, 43] ist als Funktion ihres Volumens^[44] in Abbildung 4 wiedergegeben.

Gefahren einer einfachen Anwendung dieser Zahlenwerte auf Konformationsänderungen liegen darin, daß nicht völlig geklärt ist, ob und wie weit sich die Freie Energie bei Makromolekülen additiv verhält. Modelle für Flüssigkeitsmischungen lassen z.B. eine stärkere als lineare Abhängigkeit vom relativen Volumen erwarten^[45]. Auch ist nicht gesichert, wie gut eine thermodynamische Beschreibung des Proteininnern als flüssige organische oder ölige Phase zutrifft. Die Ergebnisse der Röntgen-Beugung sind besser mit einer „festen“ Phase und sehr dichter Packung der Aminosäuren zu vereinbaren^[49, 43]. Darüber hinaus sind die für die Peptidkette anzunehmenden ΔG_i° -Werte für die Überführung schwer abzuschätzen und deshalb in Abbildung 4 nur angedeutet. Diese Werte sowie Angaben über den Einfluß von Lösungsmittelgemischen auf die Thermodynamik von Konformationsänderungen sollten aber eine zumindest grobe Abschätzung der Zahl von Aminosäuren erlauben, die dabei zusätzlich in Kontakt mit der Lösung kommen^[41, 46].

Dieses Beispiel einer „Hydrophobie-Skala“ zeigt, daß, selbst wenn das Verhalten von kleinen Molekülen relativ gut bekannt ist, sich bei der Übertragung der Daten auf Proteine zusätzliche Probleme ergeben und quantitative

Aussagen daher nur beschränkt möglich sind. Ähnliches gilt auch für die Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken oder elektrostatische Wechselwirkungen^[47, 48].

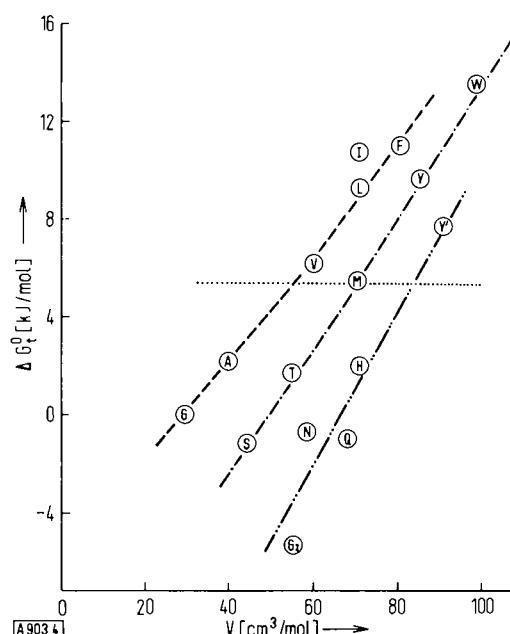


Abb. 4. Änderung der Freien Energie ΔG^0 für die Überführung mehrerer Aminosäuren aus Wasser in Äthanol bei 25 °C [42, 43], dargestellt als Funktion des Molekülvolumens [44]. Die Kurven verbinden Aminosäuren, deren Seitenketten keine polaren Atome (—), ein polares Atom (— · —) oder zwei polare Atome (— · · —) wie Stickstoff oder Sauerstoff enthalten. ΔG^0 ist aus der Löslichkeit [43] abgeleitet worden; der Wert für Glycin wurde als Nullpunkt gewählt. Wird auch noch der Löslichkeitsunterschied der Peptidgruppe berücksichtigt, wie er sich aus dem Unterschied zwischen Glycin und Diglycin ergibt, so stellt die gestrichelte Linie etwa den Nullpunkt für den Transfer eines Peptids dar [71].

Die Teile der Polypeptidkette, die Seitenketten oberhalb dieser Linie haben, werden eine nichtwäßrige Umgebung bevorzugen, während der Rest vor allem Kontakt zum Wasser sucht. Die Aminosäuren sind nach dem Ein-Buchstaben-Code [30] bezeichnet: A (Alanin), F (Phenylalanin), G (Glycin), G₂ (Diglycin), H (Histidin), I (Isoleucin), L (Leucin), M (Methionin), N (Asparagin), Q (Glutamin), S (Serin), T (Threonin), V (Valin), W (Tryptophan), Y (Tyrosin) und Y' (Dihydroxytyrosin).

In diesem Zusammenhang ist es angebracht, darauf hinzuweisen, daß praktisch keine systematischen Untersuchungen über die Packungseigenschaften von „unregelmäßigen“ Polymeren vorliegen. Das erforderliche Minimum an freiem Raum im Innern eines Polypeptids ist nicht bekannt. Gerade die Gesetzmäßigkeiten für die Packung von Polypeptidketten sind aber besonders wichtig für das Verständnis der Konformation von globulären Proteinen^[49]. In Wasser muß relativ viel Energie aufgebracht werden, um ein „leeres“ Volumen zu erzeugen.

Eine andere Schwierigkeit, die thermodynamische Stabilität von Proteinen aus der Kristallstruktur abzuleiten, liegt auch darin, daß zu wenig über die Höhe der Rotationsbarrieren um einzelne Bindungen in Polypeptidketten bekannt ist, zumindest nicht in der benötigten Genauigkeit^[50]. Nachdem Werte für einige tausend Bindungen zusammengezählt werden müssen, ergibt sich auch hier ein schwieriges Problem. Eine mögliche Vereinfachung durch Berücksichtigung der an einigen Proteinen selbst beobachteten Verteilung der einzelnen Konformationen ist in Abschnitt 2.2 diskutiert.

2.2. Konformationsanalyse

Die Fülle der experimentell aufgeklärten Konformationen (Abb. 2) erlaubt es, zusätzliche Informationen abzuleiten. Die wahrscheinlichsten Konformationen um bestimmte Bindungen lassen sich dadurch ermitteln, daß alle entsprechenden Daten, die in vielen Proteinen bei hoher Auflösung beobachtet wurden, zur Konstruktion von „Empirischen Protein-Energie-Mustern“ (EPEM) verwendet werden^[50]. Durch die Mittelung gehen zwar Besonderheiten eines speziellen Proteins verloren, die zugrunde liegenden „Konformationsmuster“ werden aber sehr deutlich.

Um dies an einem Beispiel zu verdeutlichen, ist in Abbildung 5 die Verteilung der Konformationen aromatischer Seitenketten wiedergegeben, wie sie an elf Proteinen beobachtet wurde, und zwar für die Torsion um die C^a—C^b-Bindung, die durch den Torsionswinkel χ_1 beschrieben wird (Abb. 1). Dabei wurde eine logarithmische Auftragung gewählt, aus der sich nach

$$E_{x1} = RT(\ln q_{x1} + \ln Q) \quad (2)$$

bis auf eine Konstante Q eine Konformationsenergie E_{x1} ableiten läßt.

Die relative Dichte von Meßwerten q_{x1} aus möglichst vielen Proteinen ist dabei gleich der Zahl n_{x1} von beobachteten Konformationen im Winkelintervall $\chi_1 \pm \Delta\chi_1$, geteilt durch die Gesamtzahl der beobachteten Werte N. In Abbildung 5 sind die Konformationen von N = 230 aromatischen Seitenketten zusammengefaßt und jeweils für ein Intervall von $\pm 10^\circ$ angegeben^[50]. Die ebenfalls eingezeichnete Kurve ergibt sich aus der Überlagerung von zwei harmonischen Funktionen

$$E_{x1} = \frac{E_1}{2} \cdot \sin(\chi_1) + \frac{E_3}{2} \cdot \cos(3\chi_1) \quad (3)$$

E_3 , die dreifache „Rotationsbarriere“ um die C^a—C^b-Bindung, beträgt 8.6 kJ/mol, was durchaus mit den bei kleinen Molekülen mit sehr verschiedenen Methoden gefundenen Werten vergleichbar ist^[51]. Der andere Beitrag zur Konformationsenergie, $E_1 = -5.4$ kJ/mol, gibt die Wechselwirkung zwischen der Peptidkette und dem aromatischen Ring wieder. Die relative Population der drei Konformationen I, II und III ist in Tabelle 1 angegeben. Diese Verteilung ist praktisch für die Seitenketten von Phenylalanin, Tyrosin, Histidin und Tryptophan gleich und stimmt mit den aus NMR-Messungen an Modellmolekülen erhaltenen Werten gut überein^[52].

Ein Vorteil dieses hier skizzierten Verfahrens liegt darin, daß aus der immensen Datenfülle der Röntgen-Strukturanalyse von Proteinen in relativ einfacher Weise wichtige Informationen gewonnen werden können. Dies ist natürlich nicht auf die hier besprochene Drehung um eine einzige Bindung beschränkt. Sobald genügend Daten vorliegen, können zwei- und mehrdimensionale Korrelationen aufgestellt werden, die von beträchtlichem Wert bei der Voraussage unbekannter Konformationen sein werden und zur molekularen Erklärung von Konformationsänderungen beitragen sollten. Daneben lassen sich solche

empirisch gewonnenen Verteilungen mit Berechnungen der Konformationsenergie vergleichen^[16, 53, 54].

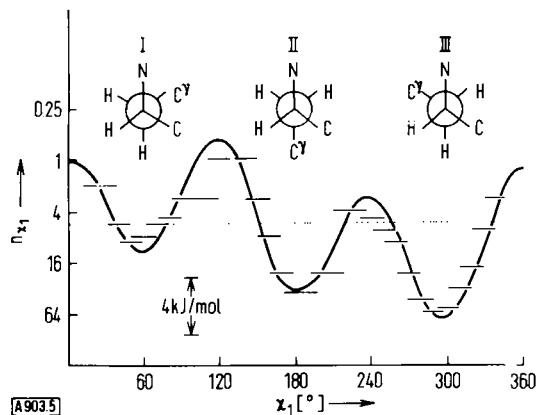


Abb. 5. Verteilung der Konformationen von 230 aromatischen Seitenketten, wie sie an elf Proteinen durch Röntgen-Strukturanalyse bei einer Auflösung von 2.8 Å oder besser beobachtet wurden [50]; die Konformationen I, II und III, die sich durch Torsion um die C^a-C^b-Bindung unterscheiden, sind als Newman-Projektionen abgebildet. Die beobachtete Zahl von Konformationen n_x pro 20° des Torsionswinkels χ_1 (kurze Striche) ist in logarithmischer Darstellung wiedergegeben, um den Vergleich mit der Konformationsenergie nach Gl. (2) zu erleichtern. Die durchgezogene Kurve ist die Überlagerung zweier harmonischer Funktionen nach Gl. (3).

Tabelle 1. Relative Population der drei Konformeren I, II und III (Abb. 5), die sich durch Rotation um die C^α-C^β-Bindung unterscheiden, bei den Seitenketten aromatischer Aminosäuren. Zum Vergleich sind NMR-spektroskopisch ermittelte Daten für das Tripeptid Gly-Phe-Gly in D₂O angeführt [52]. Die Daten für die Seitenketten (siehe Abb. 5) sind aus den an elf Proteinen beobachteten Werten gewonnen worden [50].

Seitenketten von	Zahl der Beobachtungen N	Populationen		
		P _I	P _{II}	P _{III}
Histidin	53	0,09	0,36	0,55
Tryptophan	34	0,15	0,35	0,50
Tyrosin	65	0,11	0,29	0,60
Phenylalanin	78	0,09	0,37	0,54
Summe: 230		0,11	0,34	0,55
Gly-Phe-Gly [52]		0,14	0,34	0,52

3. Reversible Konformationsänderungen

3.1. Theoretische Erwägungen

Über die Theorie kooperativer Strukturänderungen von linearen Polymeren, wie Helix-Knäuel-Umwandlungen von Polypeptiden, liegt eine umfangreiche Literatur vor, sowohl über die statistische Mechanik und Thermodynamik als auch über die Kinetik solcher Systeme^[55-57]. Dabei hat sich besonders das „lineare Ising-Modell“ bewährt, in dem Wechselwirkungen zu nächsten Nachbarn berücksichtigt werden.

Für den Fall kooperativer Umwandlungen globulärer Proteine sind numerische Rechnungen an einem einfachen dreidimensionalen Ising-Modell durchgeführt worden^[58]. Erschwerend ist hier aber noch, daß der Zustand eines Elements im dreidimensionalen Netzwerk der Wechselwirkungen nicht nur vom Zustand des nächsten Nachbarn

in der Kette oder im Raum abhängt, sondern durch den Zustand relativ weit entfernter Teile des Makromoleküls beeinflußt werden kann. (Ein Beispiel dafür sind die durch die Unterbrechung der Peptidkette in Chymotrypsinogen A bei der Aktivierung hervorgerufenen Änderungen der Position einiger weit entfernter Gruppen^[59].)

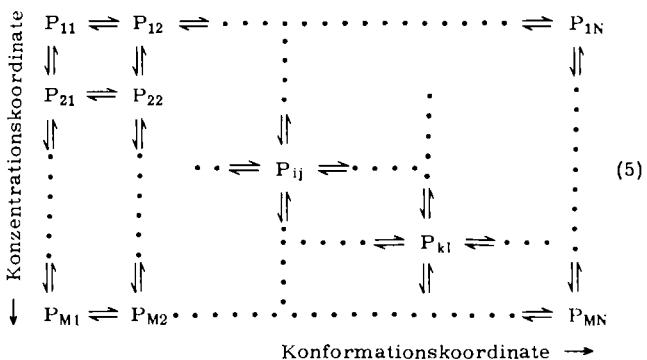
Das Falten von Proteinen kann auch in Analogie zu den Keimbildungs- und Kondensationsphänomenen bei Phasenumwandlungen gesehen werden^[60–63].

Die schwerwiegendsten Probleme liegen aber darin, daß eine Vielzahl von Parametern bekannt sein muß, bevor eine einigermaßen realistische quantitative Beschreibung auf molekularer Ebene möglich ist. Darüber hinaus sind relativ wenige Konformationsänderungen bisher experimentell so systematisch untersucht worden, daß eine Entscheidung zugunsten eines von mehreren Modellen möglich ist.

Wenn von „kleinen“ Konformationsänderungen, wie der Umorientierung einer einzigen Seitenkette, abgesehen wird, für welche die bei kleinen Molekülen übliche Beschreibung ausreicht, so ist bei kooperativen Änderungen immer eine größere Anzahl von Elementarschritten zu erwarten, wie Öffnen und Schließen von Wasserstoffbrücken und Rotation um eine oder mehrere Bindungen gleichzeitig. In sehr vereinfachter Form lässt sich dies durch eine allgemeine Konformationskoordinate

$$P_1 \rightleftharpoons P_2 \rightleftharpoons \dots \rightleftharpoons P_i \rightleftharpoons P_N \quad (4)$$

wiedergeben, wobei P_i jeweils eine unterschiedliche Konformation bezeichnet. Selbst unter der Annahme, daß jede der n Aminosäuren in nur zwei Konformationen vorliegen kann, ergeben sich schon $N = 2^n$ mögliche Zustände, die allerdings mit sehr unterschiedlichen Gewichten besetzt sein werden. Nachdem die Konformationsänderungen aber nicht im Vakuum, sondern in Lösung stattfinden, muß darüber hinaus noch der Einfluß anderer Moleküle berücksichtigt werden^[64, 65]. Dazu dient die allgemeine Konzentrationskoordinate. Beide Koordinaten lassen sich zu (5) zusammenstellen.



Dabei unterscheiden sich die Zustände durch Zahl und Lage von „gebundenen“ Wassermolekülen, Kationen, Anionen etc. Wichtig für die Beschreibung eines derartigen Systems sind die relativen Konzentrationen der Zustände und ihre Abhängigkeit von äußeren Variablen. Für die

Kinetik ist im allgemeinen ein Relaxationsspektrum zu erwarten,

$$\phi(i) = \sum_i \beta_i \exp(-t/\tau_i) \quad (6)$$

wenn eine kleine sprungartige Störung des Gleichgewichtes erfolgt, d.h. daß im allgemeinen eine Überlagerung von Exponentialfunktionen mit unterschiedlichen Zeitkonstanten τ_i und Amplituden β_i zu beobachten sein sollte, wenn die verschiedenen Zustände in vergleichbaren Konzentrationen vorliegen^[56].

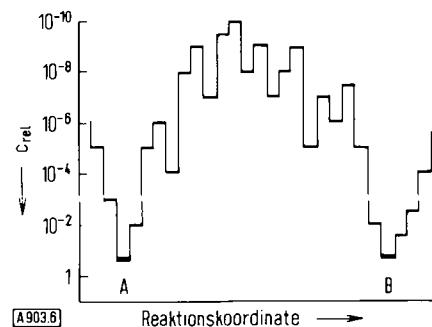


Abb. 6. Schematische Darstellung einer Konzentrationsverteilung (relative Konzentration C_{rel} in willkürlichen Einheiten) der unterscheidbaren Konformationen eines Proteins, wie sie zu erwarten ist, wenn z.B. eine Einfaltung bei der Schmelztemperatur T_m als „Alles-oder-Nichts“-Prozeß beschrieben werden kann. Die Zustände A und B können dabei jeweils eine Ansammlung von sehr ähnlichen Konformationen darstellen, die experimentell nicht unterschieden werden [79].

Eine bedeutende Vereinfachung ergibt sich, wenn, wie in Abbildung 6 schematisch angedeutet, nur die beiden Zustände P_{ij} und P_{kl} nachweisbar sind. Wenn die Konzentration von Zwischenzuständen und deren zeitliche Änderung vernachlässigt werden kann, so handelt es sich um einen „Alles-oder-Nichts“-Prozeß, der durch zwei Brutto- oder „steady state“-Geschwindigkeitskonstanten beschrieben wird:

$$A \xrightleftharpoons[k]{\tilde{k}} B. \quad (7)$$

Dabei gehen Informationen über die einzelnen Zwischenzustände weitgehend verloren. Die Vereinfachung erlaubt aber auch eine einfache geschlossene Lösung von umfangreichen kinetischen Gleichungssystemen, da unter quasistationären Bedingungen die zeitliche Änderung der Konzentration von Zwischenzuständen Null ist; die Bruttogeschwindigkeitskonstanten \tilde{k} und \tilde{k} sind dann durch das Produkt aus der Konzentration des geschwindigkeitsbestimmenden Zustands und der elementaren Geschwindigkeitskonstanten gegeben.

3.2. Modellsysteme

In Lösung sind bisher nur relativ wenige kooperative Konformationsänderungen an Proteinen untersucht worden, die völlig reversibel sind, d.h. in denen der Ausgangszustand nach einer Störung wieder hergestellt wird und in denen ein Parameter experimentell verfolgt wird, der die Konformation des Proteins direkt charakterisiert. Oft verhindern die geringen Konzentrationen – in vielen Fällen $10^{-4} \text{--} 10^{-5} \text{ mol/l}$ – Messungen. Manchmal ist es auch

schwierig, zwischen Änderungen der Konformation selbst und der Bindung von kleinen Molekülen klar zu unterscheiden.

Wie eingangs erwähnt, sind gerade die kooperativen Effekte von besonderer Bedeutung. Leider gibt es keine einfach gebauten Makromoleküle, die eine ähnliche *drei-dimensionale* Faltung wie eine Polypeptidkette aufweisen, so daß zur Zeit natürliche Proteine untersucht werden müssen. Um diese kooperativen Effekte innerhalb eines Moleküls zu beobachten, sollte auch keine Aggregation zwischen den Molekülen stattfinden, wodurch intramolekulare Prozesse überdeckt werden können. Das Hauptproblem ist, daß in vielen Proteinen, die aus Untereinheiten bestehen^[65, 66], eine kooperative Entfaltung oft nicht völlig reversibel ist^[67]; thermodynamische und kinetische Aussagen haben dann nur beschränkte Gültigkeit.

Die Säuredenaturierung einiger gut untersuchter Proteine wie Chymotrypsinogen, Trypsin, Ribonuclease, Lysozym etc. ist zur Zeit das einfachste Modellsystem für die Untersuchung kooperativer und reversibler Konformationsänderungen bei globulären Proteinen, an dem sich auch viele biologisch interessante Phänomene simulieren lassen. Diese auch als Umwandlung I bezeichnete Reaktion kann am besten als Übergang von einer kompakten zu einer beweglicheren Konformation beschrieben werden, der aber nur Teile des Proteins erfaßt^[9].

Über diese Umwandlung liegen eine Reihe ausgezeichneter Übersichten vor, welche sich besonders mit den Gleichgewichtseigenschaften befassen^[9, 68, 69]. In Abbildung 7 ist als typisches Beispiel die Umwandlung von Chymotrypsinogen A in saurer Lösung als Funktion der Temperatur gezeigt^[70, 71]. Dabei ist die Änderung der Tryptophanabsorption des Proteins nach Erreichen des Gleichgewichts bei verschiedenen Temperaturen gemessen worden.

Beim Abkühlen der Lösung ergeben sich wieder die ursprünglichen Werte; die Umwandlungskurve kann unter

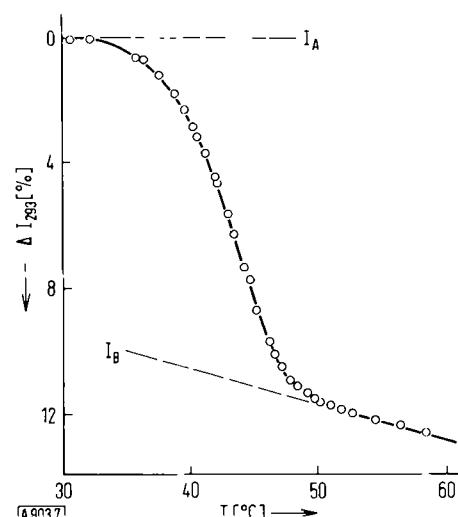


Abb. 7. Gleichgewichtskurve der Umwandlung I von Chymotrypsinogen A bei pH = 2.0 als Funktion der Temperatur. Dabei wurde die prozentuelle Abnahme der Tryptophanabsorption bei 293 nm (I_{293}) nach Erreichen des Gleichgewichts gemessen. I_A und I_B (---) geben die aus dem optischen Verhalten bei niedriger bzw. bei hoher Temperatur extrapolierten Werte für die Formen A und B im Umwandlungsbereich wieder.

den gegebenen Bedingungen mehrmals durchlaufen werden, ohne daß es zu einer Abweichung von der ursprünglich gemessenen kommt, d. h. die Umwandlung ist völlig reversibel. (Im Fall von α -Chymotrypsin werden auch die enzymatischen Eigenschaften völlig wiederhergestellt, wenn die Renaturierung in saurer Lösung erfolgt, nur zum Teil aber in neutraler Lösung^[71].)

Innerhalb eines Bereichs von etwa 15°C gehen mehrere Eigenschaften der bei niedriger Temperatur vorliegenden nativen Form A in die der entfalteten Form B über. Die Umwandlung kann auch als Schmelzvorgang innerhalb des Makromoleküls angesehen werden^[79]. Die Temperatur in der Mitte der Umwandlung wird auch als Schmelztemperatur T_m bezeichnet.

Die Umwandlung kann mit den verschiedenen experimentellen Methoden ausgelöst werden; Änderungen der Temperatur, des pH-Werts oder des Drucks [Gl. (1)]^[70-73] spiegeln „Umweltänderungen“ wider. Ein spektroskopischer Nachweis der Konformationsänderung ist unter anderem bei kinetischen Messungen bis in den Bereich von Nanosekunden von Vorteil. Die wichtigsten bisher zur Verfolgung der Umwandlung I angewendeten Messungen schließen neben der Aufnahme von UV- und IR-Absorption, optischer Drehung, Fluoreszenz und NMR-Spektren^[68-74] auch Messungen der Viskosität, des Sedimentationsverhaltens, des spezifischen Volumens^[75], der spezifischen Wärme^[76], der Löslichkeit^[77] und des Tritiumaustauschs^[78] ein.

Eine strittige Frage ist, wie weit sich diese Umwandlung als „Alles-oder-Nichts“-Prozeß zwischen zwei makroskopischen Konformationen des Proteins beschreiben läßt, ob also bei der Temperatur T_m die Hälfte aller Moleküle in der Form A, die andere Hälfte in der Form B vorliegt, oder ob etwa die Hälfte eines jeden einzelnen Moleküls verändert ist und sehr viele verschiedene Konformationen in meßbarer Konzentration vorliegen, ähnlich wie es für die Helix-Knäuel-Umwandlung von langen Polypeptiden erwartet wird^[80].

Eine Entscheidung dieser Frage aufgrund von Gleichgewichtsmessungen ist schwierig. Folgende Tests können angewandt werden^[79]:

1. Ein Zwei-Zustände-Modell ist anzunehmen, wenn mehrere Meßgrößen sich bei Änderung einer äußeren Variablen um den gleichen relativen Betrag ändern. Die eben angeführten Methoden sollten daher unter vergleichbaren Bedingungen – dieselbe Gleichgewichtskonstante K [Gl. (7)] ergeben. Für einen solchen Vergleich ist oft eine extrem hohe Meßgenauigkeit erforderlich: isobestische Punkte in den Proteinspektrien im Umwandlungsbereich erfüllen z. B. dieses Kriterium.

2. Ein anderer Test ist die Übereinstimmung von kalorimetrisch gemessener und aus der van't Hoff-Gleichung bestimmter Enthalpie. Dieser Test hat für die bisher untersuchten Proteine Chymotrypsinogen^[76], Ribonuclease A^[81] und Lysozym^[82] in saurer Lösung ein Zwei-Zustände-Modell gut bestätigt.

3. Ein weiterer Test, der auch bei sehr kleinen Substanzmengen angewendet werden kann, ist die Prüfung des kinetischen Verhaltens nach einer schnellen Störung des Gleichgewichts.

4. Kinetik der reversiblen Faltung

Kinetische Messungen liefern neben Informationen zur Thermodynamik noch zusätzlich Angaben über das zeitliche Verhalten des Systems. Dies ist besonders bei biologischen Phänomenen mit ihrer starken Zeitgebundenheit wichtig. Es können auch Zwischenzustände mit sehr kurzer Lebensdauer nachgewiesen werden, wodurch eine Entscheidung zwischen mehreren möglichen Reaktionsmechanismen wesentlich erleichtert werden kann.

4.1. Methoden

Die Entwicklung kinetischer Methoden erlaubt es, die zeitliche Änderung der Konformation nach einer sprunghaften oder periodischen Störung eines äußeren Parameters in Gl. (1) über viele Größenordnungen zu verfolgen^[83-85]. Für sehr schnelle Reaktionen sind das rasche Mischen von Lösungen in „stop-flow“-Apparaten (ΔM_i) sowie Relaxationsmethoden, z. B. Temperatursprung- (ΔT) und Drucksprungmethoden (ΔP), neben Ultraschallmessungen und Messungen der Magnetischen Kernresonanz besonders wichtig.

Um die Kinetik der Umwandlung I (Abb. 7) zu verfolgen, muß nur die Temperatur schnell genug verändert werden und die Einstellung eines neuen Gleichgewichts, z. B. anhand der Absorptionsänderung, verfolgt werden. Dies ist ein relativ langsamer Prozeß im Sekunden- bis Minutenbereich. Dafür hat sich eine sehr einfache Temperatursprungmethode gut bewährt^[70]:

Die zu untersuchende Lösung befindet sich in einer thermostabilen Mikrokuvette, die einen besonders raschen Temperatursprung (Halbwertszeit ≈ 1 s) zwischen Thermostattierflüssigkeit und Lösung erlaubt. Die Lösung kann positiven und negativen Temperatursprüngen beliebiger Größe unterworfen werden, wenn man die Flüssigkeiten von zwei auf verschiedener Temperatur befindlichen Thermostaten mit Magnetventilen wahlweise durch den Thermostattiermantel der Kuvette leitet. Die zeitliche Änderung der Absorption, Fluoreszenz, optischen Drehung etc. wird mit einem Schreiber registriert.

4.2. Kinetische Kriterien für einen „Alles-oder-Nichts“-Prozeß

Im allgemeinen ist für ein vielstufiges Reaktionssystem vom Typ (5), mit welchem beim Entfalten eines Proteins sicherlich gerechnet werden muß, bei einer kleinen Gleichgewichtsstörung ein Relaxationsspektrum nach (6) zu erwarten. Im Fall der Denaturierung hochmolekularer DNA beispielsweise wird es auch beobachtet^[86, 71]. Entspricht die meßbare Konzentrationsverteilung, sowohl vor als auch nach der Störung, ungefähr der in Abbildung 5 angedeuteten,

so müssen sehr einschneidende Bedingungen für die Kinetik erfüllt sein (s. Abb. 8)^[13, 87]:

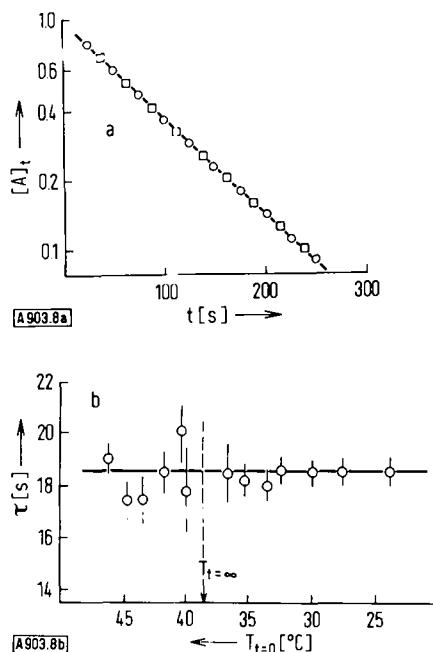


Abb. 8. „Alles-oder-Nichts“-Umwandlung von Trypsin bei $\text{pH} \sim 1.8$ [87, 13]. Die Relaxationszeit τ hängt für Temperatursprünge von 38.4°C nach 26.5°C und umgekehrt nicht von der Proteinkonzentration (10^{-7} bis 10^{-5} mol/l) ab. a) Zeitliche Änderung der optischen Drehung bei 315 nm ($-○-○-$) und der Absorption bei 293 nm ($-□-□-$), geteilt durch die jeweilige Gesamtänderung zwischen $t=0$ und $t=\infty$. (Temperatursprung aus dem Umwandlungsbereich bei 39°C nach 20.2°C .) b) Unabhängigkeit der Relaxationszeit τ vom Ausgangszustand (Temperatur zur Zeit Null, $T_{t=0}$) und der Größe der Störung. Die Endtemperatur ist dabei konstant gleich 38.4°C . Die Fehlergrenzen sind durch die unterschiedlichen Amplituden der Relaxationskurven und das dadurch beeinflußte Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt.

1. Die zeitliche Einstellung des neuen Gleichgewichts nach einer sprungartigen Störung folgt einer einfachen Exponentialfunktion, die in halblogarithmischer Darstellung eine Gerade ergibt (Abb. 8a), aus deren Steigung dann die Relaxationszeit oder Zeitkonstante τ bestimmt wird. (Änderungen, wie sie die veränderte Dichte der Lösung nach einem Temperatursprung oder die veränderte Bindung von kleinen Molekülen bedingen, müssen getrennt berücksichtigt werden).
2. Die Relaxationszeit ist unabhängig davon, welcher Parameter verfolgt wird, wie Absorption bei verschiedener Wellenlänge, Löslichkeit, etc.
3. Die Zeitkonstante τ hängt nur von dem nach der Störung erreichten Endzustand und nicht vom Ausgangszustand ab (Abb. 8b), wie es aufgrund der Gleichung^[88]

$$[\text{A}]_t = ([\text{A}]_{t=0} - [\text{A}]_{t=\infty}) e^{-\frac{t}{\tau}} + [\text{A}]_{t=\infty} \quad (8)$$

zu erwarten ist, welche die zeitliche Änderung der Konzentration von A nach einer sprungartigen Störung beschreibt.

Sind diese Kriterien gut erfüllt, wie bei der hier diskutierten Umwandlung I, so ist eine Beschreibung der Konformationsänderung in der Näherung eines „Alles-oder-Nichts“-

Prozesses gerechtfertigt. (Mit sehr empfindlichen kinetischen Methoden lassen sich auch noch schnelle vorgelagerte Gleichgewichte nachweisen, die aber meist nur wenige Prozent der Gesamtänderung ausmachen^[108].) Es können die Bruttogeschwindigkeitskonstanten für das Falten \bar{k} und das Entfalten \bar{k} ermittelt werden. Die Gleichgewichtskonstante K kann z. B. nach Gl. (9)

$$K = [\text{A}]_{t=\infty} / (1 - [\text{A}]_{t=\infty}) = \bar{k} / k \quad (9)$$

aus der relativen Amplitude $[\text{A}]_{t=0} - [\text{A}]_{t=\infty}$ abgeleitet werden, die auch die gesamte thermodynamische Information enthält. Zusammen mit der Definition der Relaxationszeit

$$\tau^{-1} = \bar{k} + k \quad (10)$$

sind zwei Bestimmungsgleichungen für die beiden Unbekannten \bar{k} und k gegeben.

Diese beiden Bruttogeschwindigkeitskonstanten lassen sich nach der Theorie des aktivierten Zustandes^[89] als „quasi-thermodynamische Größen“ verstehen, wobei als Nullpunkt der Freien Energie der Aktivierung ($\Delta\tilde{G}$ oder $\Delta\tilde{G}$) $RT \ln(kT/h)$ gewählt wird (k ist die Boltzmann-Konstante und h das Plancksche Wirkungsquantum). Für die Entfaltung etwa führt dies zu

$$\bar{k} = (kT/h) \cdot \exp(-\Delta\tilde{G}/RT) = (kT/h) \cdot \exp(-\Delta\tilde{H}/RT + \Delta\tilde{S}/R) \quad (11)$$

mit $\Delta\tilde{H}$ als Enthalpie und $\Delta\tilde{S}$ als Entropie der Aktivierung. Dabei kann $\Delta\tilde{H}$ aus der Arrhenius-Gleichung oder der ersten Ableitung von $\Delta\tilde{G}$ nach der Temperatur erhalten werden.

$$\Delta\tilde{H} = RT^2 \frac{d \ln \bar{k}}{dT} \sim RT. \quad (12)$$

Ist $\Delta\tilde{H}$ selbst noch von der Temperatur abhängig, so kann auch noch eine „spezifische Wärme der Aktivierung“ definiert werden.

$$\Delta\tilde{C} = d\tilde{H}/dT. \quad (13)$$

Analoge Gleichungen ergeben sich für k ; die Verbindung zu den üblichen thermodynamischen Funktionen im Fall des Gleichgewichts wird durch Gl. (9) und den Ausdruck für die Freie Energie ΔG° hergestellt:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K. \quad (14)$$

4.3. Temperaturabhängigkeit

Die Relaxationszeit als Funktion der Temperatur für die Umwandlung I von Chymotrypsinogen A, ein typisches Beispiel, ist in Abbildung 9 gezeigt^[93]. (Auch die entsprechende Abhängigkeit der Bruttogeschwindigkeitskonstanten ist angegeben). Daraus ist ersichtlich, daß unterhalb der Umwandlungstemperatur die reziproke Relaxationszeit τ^{-1} gleich der Geschwindigkeitskonstante für das Falten \bar{k} wird; bei hohen Temperaturen wird τ^{-1} gleich \bar{k} . Außerdem sind die Meßwerte eingezzeichnet, die Eisenberg und

Schwert vor rund 20 Jahren ermittelten^[77]. Sie nahmen nicht die Tryptophanabsorption, sondern die Löslichkeit des Proteins in einem Präzipitationspuffer als Meßgröße. Die gute Übereinstimmung ist u. a. auch eine Stütze für den vorgeschlagenen Ablauf der Umwandlung.

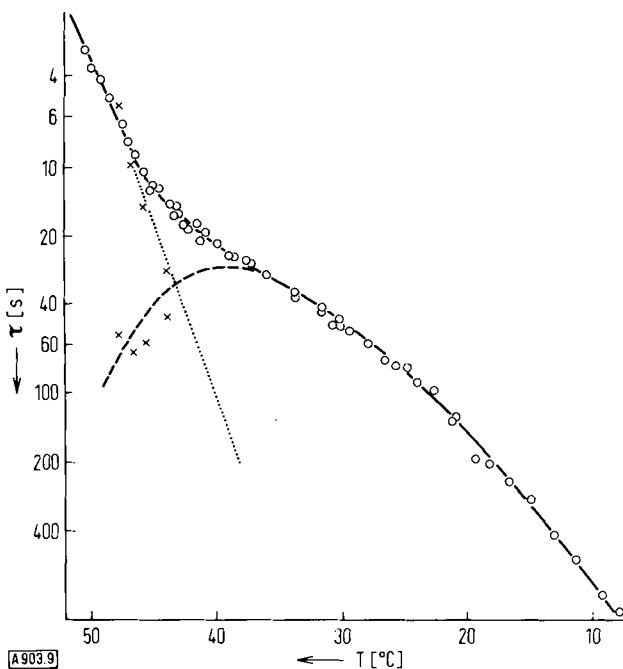


Abb. 9. Relaxationszeit τ (—○—) für die Umwandlung I von Chymotrypsinogen A bei pH = 2.0 in Abhängigkeit von der Endtemperatur, bestimmt durch Verfolgung der zeitlichen Änderung der Tryptophanabsorption des Proteins [70, 71]. Im Umwandlungsbereich sind die Bruttogeschwindigkeitskonstanten für das Entfalten \bar{k} (···) und Falten \bar{k} (---) wiedergegeben. Die Werte + bzw. X erhielten Eisenberg und Schwert [77] durch Verfolgung der zeitlichen Änderung der Löslichkeit des Proteins.

Auffallend im Vergleich mit üblichen chemischen Reaktionen in diesem Temperatur- und Zeitbereich ist die hohe positive Aktivierungsenergie für das Entfalten ($\Delta\bar{H}$) und die starke Temperaturabhängigkeit von $\Delta\bar{H}$ für das Falten mit negativen Werten bei hoher Temperatur (Abb. 10). Beide Befunde sprechen dafür, daß bei dieser Konformationsänderung mehrere Elementarschritte notwendig sind^[103, 108]. Eine ähnliche Temperaturabhängigkeit wird bei der De- und Renaturierung heterogener Biopolymere wie DNA und Kollagen^[190, 91], aber auch bei Phasenumwandlungen^[63] beobachtet. Damit läßt sich die Umwandlung I in den größeren Problemkreis der kooperativen, von einer Keimbildung abhängigen, Prozesse einordnen.

Ein wichtiges Ergebnis ist, daß bei solchen Konformationsänderungen von Proteinen sehr hohe positive, aber auch negative Temperaturkoeffizienten für die Kinetik zu beobachten sind. Die negative Aktivierungsenergie von $\Delta\bar{H}$ bei hoher Temperatur kann darauf zurückgeführt werden, daß mehrere Schritte für die Keimbildung notwendig sind, die ihrerseits die Geschwindigkeit der Faltung bestimmt. Mit abnehmender Temperatur ist nicht mehr die Bildung eines richtigen Keims, sondern die weitere Faltung der Polypeptidkette geschwindigkeitsbestimmend.

Eine andere Erklärung ist, daß sich mit abnehmender Temperatur mehr und mehr „falsche“ Keime bilden, die

erst wieder geöffnet werden müssen, bevor sich ein richtiger bilden kann. Beides führt zu $\Delta\bar{H} < 0$ bei hoher Temperatur.

Sehr wichtig dabei ist wahrscheinlich auch die Wechselwirkung von unpolaren Gruppen mit Wasser, wie sie in Form der Konzentrationskoordinate [siehe (5)] und der damit verbundenen Beiträge zur Freien Energie zum Ausdruck kommt. Solche hydrophoben Wechselwirkungen können für die Temperaturabhängigkeit der Aktivierungsenergie verantwortlich sein, da es sich dabei ja auch um schnelle Vorgleichgewichte handelt, die in die Bruttogeschwindigkeitskonstanten eingehen.

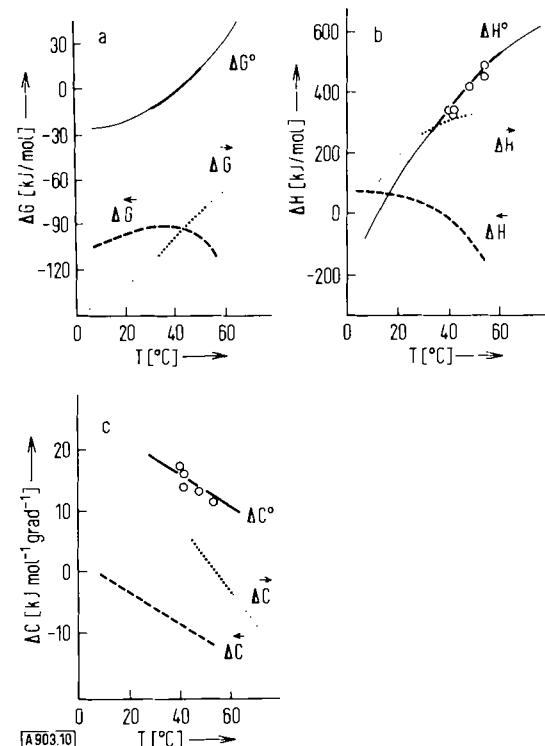


Abb. 10. Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen und kinetischen Parameter für die Umwandlung I von Chymotrypsinogen A. a) Freie Energie, b) Enthalpie, c) Spezifische Wärme. Die dünnen Linien geben jeweils die Extrapolation der experimentellen Daten an, wenn die Änderung der spezifischen Wärme ΔC durch eine lineare Abhängigkeit von der Temperatur beschrieben wird. (—○—) bezeichnet Daten aus kalorimetrischen Messungen [76] und (—) die Gleichgewichtsdaten. Die kinetischen Größen für das Entfalten (···) und Falten (---) sind angegeben. (Ein Fehler in der Messung der Temperatur von $\pm 0.1^\circ\text{C}$ und der Geschwindigkeitskonstanten von 5% über einen Temperaturbereich von 10°C ergibt eine Unsicherheit von rund $\pm 4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ grad}^{-1}$ bei ΔC .)

In Abbildung 10 sind die zur Zeit für wahrscheinlich gehaltenen Abhängigkeiten der thermodynamischen und kinetischen Funktionen von der Temperatur wiedergegeben, wobei für die Änderung der spezifischen Wärme eine lineare Abhängigkeit von der Temperatur angenommen ist. (Die Meßgenauigkeit läßt eine eindeutige Entscheidung – ob und wie ΔC von der Temperatur abhängt – nicht zu). Durch Integration ergeben sich dann die entsprechenden Funktionen für die Enthalpie und die Freie Energie. Schneiden sich die Kurven für \bar{k} und \bar{k} bei niedriger Temperatur, so kann auch eine Kälteumwandlung beobachtet werden^[92, 93].

Auf die beträchtliche Änderung der spezifischen Wärme wurde besonders von Brandts aufmerksam gemacht^[92]. In

Tabelle 2 sind entsprechende Ergebnisse für eine Reihe von Proteinreaktionen zusammengefaßt. Kalorimetrische Messungen an kleinen – unpolaren und polaren – Molekülen zeigen, daß ihre Wechselwirkung mit dem Wasser zu Änderungen der spezifischen Wärme führt^[5].

Tabelle 2. Änderung der spezifischen Wärme bei konstantem Druck, $\Delta C'$, für mehrere Proteinreaktionen.

Reaktion	$\Delta C'$ [kJ mol ⁻¹ grad ⁻¹]	Lit.
Chymotrypsinogen A		
Solvatation	10	[76]
Umwandlung I, pH = 2.0, A \rightleftharpoons B	14	[76]
Ribonuclease A: Umwandlung I, pH = 2.8	8.2	[81]
S-Protein + S-Peptid \rightarrow RNase S	2.9	[112]
GAPDH (Hefe) \rightarrow Holoenzym + NAD	2.2	[22]
α -Chymotrypsin: Dimer \rightarrow Monomer	2.8	[113]

4.4. pH-Abhängigkeit

Die Umwandlung I zeigt nicht nur eine starke und komplizierte Temperaturabhängigkeit, sondern die pH-Abhängigkeit spiegelt auch die Kooperativität der Umwandlung wider. So nimmt bei den bisher untersuchten Proteinen die Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung \bar{k} mit der zweiten bis dritten Potenz der H_3O^+ -Aktivität zu (Abb. 11). Protonen beeinflussen die native Form A als „negative“ Effektoren, indem sie diese mit wachsender Konzentration destabilisieren^[93]. Die Geschwindigkeitskonstante der Fal tung \bar{k} wird dagegen nur wenig verändert; sie nimmt etwas ab. Bei Proteinen, die aus Untereinheiten aufgebaut sind, können wesentlich kompliziertere Moleküle als kooperative Effektoren (E)^[6] wirken und z. B. die native Form stabilisieren, wie es im Fall von GAPDH aus Hefe durch NAD bei höheren Temperaturen und pH-Werten zu beobachten ist^[19].

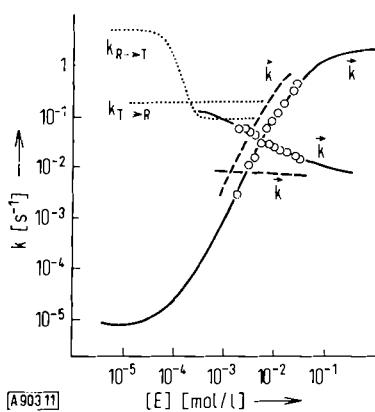
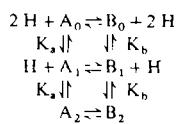


Abb. 11. Geschwindigkeitskonstanten für die Konformationsänderung als Funktion der Effektor Konzentration [E]. (—o—) \bar{k} und k für Chymotrypsinogen A mit H_3O^+ als Effektor: Für die Extrapolation sind zusätzliche Messungen in Harnstofflösungen herangezogen worden [71, 95]. (---) \bar{k} und k nach chemischer Modifikation (Entfernung der negativen Ladung) von 13 der 16 Carboxygruppen des Chymotrypsinogens A [97, 71]. Die geringen Änderungen in der pH-Abhängigkeit von \bar{k} sind ein Hinweis auf die Stabilisierung der Form A durch spezielle „Triggergruppen“. (···) Zum Vergleich die Kinetik einer „allosterischen Umwandlung“ bei einem aus vier gleichartigen Untereinheiten aufgebauten Enzyme, der GAPDH aus Hefe, mit NAD als Effektor Molekül (nach [19]).

Die Abhängigkeit der Bruttogeschwindigkeitskonstanten \bar{k} , \bar{k}' der Konformationsänderung läßt sich in beiden Fällen durch ein sehr ähnliches Reaktionsschema beschreiben. So gilt für Trypsin mit zwei Bindungsstellen^[87]



Die Konzentrationsabhängigkeit von τ ergibt sich im Fall von vereinfachenden und gut erfüllten Annahmen in geschlossener Form^[83]. Die Annahmen sind:

1. Die Bindung des Effektors ist schnell gegenüber der Konformationsänderung (bei Protonierungsreaktionen sind Geschwindigkeitskonstanten von etwa $10^{10} \text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ zu erwarten^[96]).
2. Die Änderung der Konzentration an freiem Effektor infolge der Gleichgewichtsstörung und Konformationsänderung kann vernachlässigt werden.
3. Innerhalb der Formen A und B weisen alle n Bindungsstellen jeweils gleiche Bindungskonstanten für den speziellen Effektor auf; die Werte für die beiden Formen sind aber verschieden ($pK_a \neq pK_b$)^[6, 87, 92].

Aus den Werten von \bar{k} und \bar{k}' , z. B. für die bei Chymotrypsinogen oder α -Chymotrypsin gemessene pH-Abhängigkeit, ergibt sich unter der Annahme eines „Alles-oder-Nichts“-Prozesses, daß drei Bindungsstellen für Protonen mit einer Bindungskonstante von $K_a = 0.05 \text{ mol/l}$ die native Form A in der unprotonierten Form ganz beträchtlich stabilisieren, etwa um einen Faktor 100–1000 pro Bindungsstelle. Für die Bindungsstellen im Zustand B ergeben sich dementsprechend 100- bis 1000-mal kleinere Konstanten K_b , die sich (pK -Werte von 3.5–4.5) den für Carboxygruppen in Wasser erwarteten Werten nähern.

Eine Erklärung für diesen Einfluß der Protonen auf die Konformation ist dadurch gegeben, daß sich Ionenbindungen zwischen bestimmten Carboxygruppen und positiv geladenen Gruppen, z. B. von Lysin, bilden, die Form A stabilisieren^[93] (vergleichbar den Schnappverschlüssen eines Koffers). Bis zu fünf solcher Ionenbindungen sind in kristallinem α -Chymotrypsin vorhanden, zwei davon völlig von der Lösung abgeschirmt^[113].

Ein experimenteller Hinweis auf solche „Triggergruppen“ ist die Beobachtung, daß durch Entfernung der negativen Ladung von 13 der insgesamt 16 Carboxygruppen in Chymotrypsinogen A durch chemische Modifikation die pH-Abhängigkeit der Umwandlung I nicht wesentlich beeinflußt wird (Abb. 11)^[97, 71]. Dies ist zu erwarten, wenn die elektrostatische Abstoßung der positiven Nettoladung des Proteins in Wasser nur wenig zur Destabilisierung der Form A beiträgt. Bei einem solchen allgemein elektrostatischen Effekt wäre eine monotone Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Ionenstärke zu erwarten, was aber nicht beobachtet wird (Abb. 12a). Derartige Ionenverbindungen erklären auch den für Carboxygruppen in Form A gefundenen sehr niedrigen pK -Wert:

Die Nähe einer positiven Ladung bewirkt auch in kleinen Molekülen eine beträchtliche pK-Verschiebung^[98].

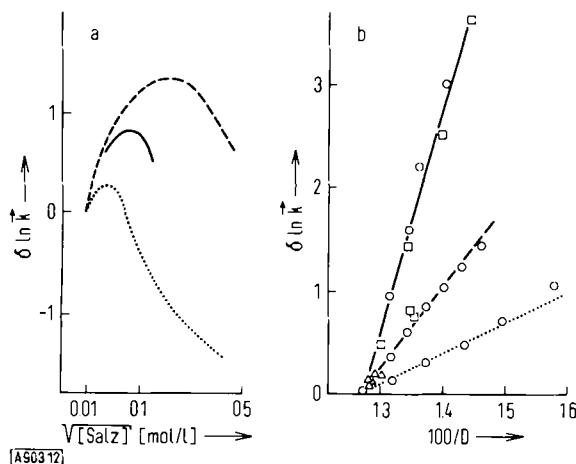


Abb. 12. Einfluß von einwertigen Ionen (a) und kleinen Molekülen (b) auf die Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung \bar{k} in $8 \cdot 10^{-3} \text{ M HCl}$ für (—) Chymotrypsinogen A, (---) Trypsin und (....) Ribonuclease [13, 93]. $\delta \ln \bar{k}$ gibt das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten im entsprechenden Lösungsmittelgemisch zu der in $8 \cdot 10^{-3} \text{ M HCl}$ wieder. a) Änderung durch Zugabe von Salzen wie NaCl und korrigiert für den sekundären Salzeffekt; b) Änderung in Lösungsmittelgemischen bei 30 °C. aufgetragen gegen die reziproke makroskopische Dielektrizitätskonstante D des Gemisches [93]. (—□—) bis zu 15 Vol.-% Dioxan, (—○—) bis zu 25% Äthanol und (—△—) bis 25% Äthylenglykol.

4.5. Salzeffekte

Die Entfaltungsreaktion hängt in komplizierter Weise von der Salzkonzentration ab. Für \bar{k} wird ein Maximum gefunden, ein Verhalten, das auf zwei entgegengesetzt wirkende Einflüsse hinweist. Eine Erklärung für die Salzabhängigkeit von \bar{k} ist, daß bei niedriger Ionenstärke durch Bindung von Gegenionen die Ionenbindungen destabilisiert werden (und damit Form A), während bei höheren Salzkonzentrationen die elektrostatische Abschirmung der Nettoladung des Proteins überwiegt und \bar{k} abnimmt^[93]. Solche bei kleinen Molekülen vertrauten und berechtigten Schlüssefolgerungen sind aber bei Proteinen nicht immer zulässig^[94]. Bei sehr hohen Salzkonzentrationen kann es darüber hinaus wiederum zur Destabilisierung der nativen Form kommen, weil die Ionen die Wasserstruktur verändern^[99, 5].

4.6. Variation des Lösungsmittels

Geringfügige Unterschiede bei der Umwandlung I sind zu beobachten, wenn sie in schwerem Wasser statt in Wasser stattfindet (siehe Tabelle 3). Möglicherweise ist das bei komplizierten biologischen Systemen^[100] gefundene unterschiedliche Verhalten in H_2O und D_2O zum Teil auf die gleichen Ursachen zurückzuführen; dafür kommen geringfügige Veränderungen der Wasserstruktur in Frage^[101].

Mit Lösungsmittelgemischen können unter anderem kontinuierliche Änderungen der Dielektrizitätskonstante, der Viskosität etc. erreicht werden, auch können die thermodynamischen Eigenschaften von kleinen Molekülen in diesen Gemischen mit denen von Makromolekülen verglichen werden^[92].

In Abbildung 12b sind Meßwerte für \bar{k} in mehreren Lösungsmittelgemischen zusammengefaßt. Eine Auftragung der relativen Freien Energie der Aktivierung $\delta \bar{G}$ gegen die reziproke Dielektrizitätskonstante D ergibt eine überraschend gute lineare Korrelation, wie es für elektrostatische Wechselwirkungen erwartet werden kann. Für die Faltung ergeben sich jedoch keine so einfachen Korrelationen, insbesondere bei tiefen Temperaturen^[87], $\delta \bar{G}$ hängt in sehr ähnlicher Weise wie die Löslichkeit unpolarer Moleküle^[102] von der Lösungsmittelzusammensetzung und der Temperatur ab; dies kann als Hinweis auf die Wechselwirkungen unpolarer Gruppen mit dem Wasser in Form B gedeutet werden^[92, 93].

4.7. Änderung der kovalenten Proteinstruktur

Quantitative Daten über den Einfluß von chemischen Modifikationen oder den Austausch von Aminosäuren auf die Stabilität der Proteine sind nicht zuletzt bei ihrer technischen oder medizinischen Anwendung von Bedeutung. Dabei eröffnen die jüngsten Erfolge bei der chemischen Synthese von Proteinen die Möglichkeit, den Einfluß eines Aminosäureaustauschs systematisch zu untersuchen^[104]. Eine andere, weniger systematische Methode ist der Vergleich von Proteinfamilien oder Proteinen von Mutanten oder verschiedenen Spezies.

4.7.1. Austausch mehrerer Aminosäuren

Ein Beispiel ist die Familie der Serin-Proteinasen wie Chymotrypsinogen A und B, Trypsin, Elastase etc., in denen ein Teil der Aminosäuresequenz übereinstimmt und auch die Kristallstruktur sehr ähnlich ist (Abb. 3). Auch Stabilität und Kinetik bei der Umwandlung in saurer Lösung sind bei diesen Proteinen sehr ähnlich (Abb. 13 und Tabelle 3).

4.7.2. Chemische Modifikationen

Mehrere chemische Reaktionen erlauben eine mehr oder weniger gezielte, milde und spezifische Änderung der Seitenketten von Proteinen^[105]. Eine Modifikation von Carboxygruppen und ihr Einfluß auf die pH-Abhängigkeit wurde bereits erwähnt (Abb. 11).

Ein anderes Beispiel ist die Änderung am aktiven Zentrum von α -Chymotrypsin durch eine Diisopropylphosphoryl-(DIP-CT) oder eine Anthraniloyl-Gruppe (AN-CT), die jeweils am aktiven Zentrum kovalent gebunden werden. Es ergeben sich Unterschiede in der Stabilität, die vor allem auf eine kleinere Entfaltungsgeschwindigkeit zurückzuführen sind (Tabelle 3). Die fluoreszierende AN-Gruppe erlaubt aber auch, die Energieübertragung von Tryptophan-Seitenketten zu diesem Chromophor zu verfolgen. Diese Energieübertragung ist sehr abstandsempfindlich^[106], so daß während der Entfaltung oder Faltung Abstandsmessungen innerhalb des Proteinmoleküls durchgeführt werden können. Auch die auf diese Weise erhaltenen kinetischen Ergebnisse stimmen mit dem für einen „Alles-oder-Nichts“-Prozeß erwarteten Verhalten überein^[71].

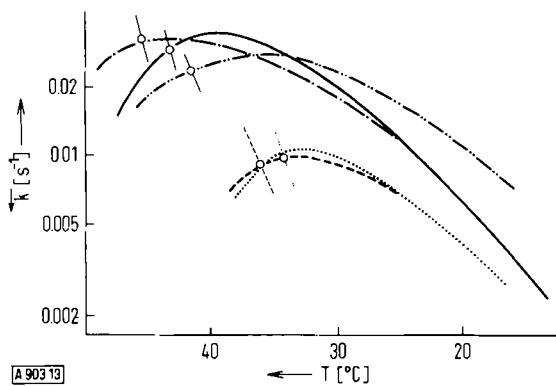


Abb. 13. Geschwindigkeitskonstante der Faltung (k) für mehrere Mitglieder einer Proteinfamilie bei $\text{pH} = 2.0$ in Abhängigkeit von der Temperatur [13, 93] nach Änderung der kovalenten Struktur: Austausch von mehreren Aminosäuren: (—) Chymotrypsinogen A, (···) Chymotrypsinogen B und (---) Trypsin; spezifische Unterbrechung der Polypeptidkette von Chymotrypsinogen A; einmal: (- -) ergibt δ -Chymotrypsin, zweimal: (···) α -Chymotrypsin. Die Kreise geben die Mitte der Umwandlung (T_m) wieder, bei der k gleich \bar{k} ist. Die kurzen Linien deuten die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante für die Entfaltung (\bar{k}) an.

Tabelle 3. Kinetische Parameter für die Faltung (+) und Entfaltung (→) bei der Umwandlung I für mehrere Proteine in 0.01 M HCl bei 30 °C [13].

Protein	$- \ln \bar{k}$ [s^{-1}]	$- \ln k$ [s^{-1}]	$\Delta \bar{H}$ [kJ/mol]	$\Delta \bar{H}$ [kJ/mol]	$\Delta \bar{C}$ [kJ mol ⁻¹ grad ⁻¹]
Chymotrypsinogen A	11.1	3.90	340	70	6
δ -Chymotrypsin	6.8	4.88	230	33	12
α -Chymotrypsin	6.8	4.88	350	33	12
AN-Chymotrypsin [a]	6.8	5.10	320	25	14
DIP-Chymotrypsin [b]	7.5	5.30	330	42	10
Chymotrypsinogen B	10.8	4.05	370	80	8
Trypsin	8.4	3.77	280	50	14
Trypsin (D_2O)	8.2	3.44	190	50	14
Ribonuclease A	6.0	3.5	280	20	5

[a] AN = Anthraniloyl.

[b] DIP = Diisopropylphosphoryl.

Die Einführung von kovalent gebundenen „Reportergruppen“ eröffnet darüber hinaus eine Möglichkeit, auch in solchen Systemen Konformationsänderungen zu messen, in denen andere Parameter optisch schlecht verfolgt werden können^[107].

4.7.3. Spaltung der Peptidkette

Wird die Polypeptidkette in globulären Proteinen gespalten, so vermindert sich in den bisher untersuchten Fällen deren Stabilität. Bei der enzymatischen Aktivierung von Chymotrypsinogen A zu δ - und α -Chymotrypsin wird jeweils die Peptidkette ein- bzw. zweimal unterbrochen. Die erste Spaltung führt auch zu den wichtigsten Änderungen in der Kristallstruktur^[37]. Dies spiegelt sich auch in der Kinetik der Umwandlung I wider. Dabei ändert sich die Reaktionsordnung nicht; die Reaktion bleibt intramolekular, da die Teile der Kette noch durch Disulfidbrücken verbunden sind (Abb. 13 und Tabelle 3).

5. Schlußbemerkungen

Am Beispiel der Umwandlung I von einigen „einfachen“ globulären Proteinen kann der Einfluß einer „Umweltänderung“ (pH, Temperatur etc.) oder einer Änderung der

kovalenten Proteinstruktur auf die Thermodynamik und Kinetik der kooperativen Konformationsänderung in Proteinen relativ einfach untersucht und beschrieben werden. Dies ist dadurch wesentlich erleichtert, daß sich diese reversible, partielle Entfaltung mit einem „Alles-oder-Nichts“-Prozeß zwischen zwei makroskopischen Zuständen des Proteins in sehr guter Näherung wiedergeben läßt. Diese Näherung ist bei anderen reversiblen Faltungsreaktionen weniger gut erfüllt^[109, 110], so daß Verallgemeinerungen nicht möglich und bei solch komplizierten, von vielen Parametern abhängigen Systemen auch nicht zu erwarten sind. Als Modell für „molekulare Schalter“ sind solche reversiblen Umwandlungen aber gut geeignet.

Im Gegensatz zu den kooperativen Umwandlungen von linearen Homopolymeren, für die eine quantitative Beschreibung der Thermodynamik und Kinetik auf molekularer Basis gelingt, ist man bei globulären Proteinen von diesem Ziel noch weit entfernt. Selbst die Kenntnis der Kristallstruktur, z. B. einer Proteinfamilie (Abb. 3), führt noch nicht zu befriedigenden Korrelationen mit der in

Lösung beobachteten Kinetik von kooperativen Umwandlungen oder z. B. zu einer Voraussage über den Zeitbereich, in dem sie ablaufen.

Durch die vielfältigen Wechselwirkungen bei der dreidimensionalen Faltung der Polymerenkette können die Zeitkonstanten für verschiedene Umwandlungen um viele Größenordnungen variieren und durch kleine äußere Änderungen ganz wesentlich vergrößert und verkleinert werden. Dabei sind für biologische Regelsvorgänge nicht nur schnelle Konformationsänderungen wichtig^[111]. Es ist denkbar, daß selbst Prozesse wie die Differenzierung von Zellen, das Phänomen einer biologischen „Uhr“ oder die Informationsspeicherung im Gedächtnis wesentlich auf kooperativen Konformationsänderungen mit Zeitkonstanten von Sekunden bis Jahren beruhen können. Eine Zeitkonstante von einem Jahr entspricht einem Unterschied der Freien Energie der Aktivierung gegenüber den in Tabelle 3 angeführten Werten von rund -35 kJ/mol, d. h. einem Energiebetrag, der z. B. durch den Transfer von drei Tryptophan-Seitenketten aus Wasser in eine organische Phase (Abb. 4) oder das Aufbrechen von drei Ionenbrücken (Abb. 11) kompensiert wird. Solche langsam, kaum untersuchten Konformationsänderungen können wahrscheinlich innerhalb eines einzigen Proteinmoleküls verwirklicht werden, und zwar infolge der spezifischen dreidimensionalen Struktur des Proteins.

dimensionalen Wechselwirkung zwischen den Teilen der Kette.

Bei biologisch wichtigen Prozessen ist aber darüber hinaus noch eine Kopplung zu weiteren Reaktionen und Wechselwirkungen mit anderen Makromolekülen zu erwarten, wodurch die Kooperativität und die Spezifität von Antworten auf Änderung der Umwelt noch beträchtlich erhöht werden kann.

Diese Arbeit wurde zum Teil durch eine „EMBO-longterm fellowship“ während des Aufenthalts im Molecular Enzymology Laboratory (University Bristol) unterstützt. All den Kollegen, die mir Informationen vor, aber auch nach der Publikation zur Verfügung gestellt haben, möchte ich hier ganz besonders danken.

Eingegangen am 4. August 1971 [A 903]

- [1] R. E. Dickerson u. I. Geis: Struktur und Funktion der Proteine. Verlag Chemie, Weinheim 1971; The Structure and Action of Proteins. Harper & Row, New York 1969.
- [2] J. D. Watson: The Molecular Biology of the Gene. Benjamin, New York 1971.
- [3] D. Eisenberg u. W. Kauzmann: The Structure and Properties of Water. Oxford University Press, London 1969.
- [4] L. P. Kayushin: Water in Biological Systems. Plenum Publ. Corp., New York 1969.
- [5] E. Wicke, Angew. Chem. 78, 1 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 106 (1966).
- [6] J. Monod, J. Wyman u. J. P. Changeux, J. Mol. Biol. 12, 88 (1965).
- [7] B. Müller-Hill, Angew. Chem. 82, 195 (1971); Angew. Chem. internat. Edit. 10, 160 (1971).
- [8] W. Kauzmann, Advan. Protein Chem. 14, 1 (1959).
- [9] R. Lumry u. R. Biltonen in S. Timasheff u. G. Fasman: Structure and Stability of Biological Macromolecules. Dekker, New York 1969.
- [10] J. A. Schellman u. C. Schellman in H. Neurath: The Proteins. Bd. II, Academic Press, New York 1964.
- [11] M. Eigen, Nobel Symposium 5, Almquist & Wiksell, Stockholm 1966; Angew. Chem. 80, 892 (1968).
- [12] K. G. Denbigh: The Principles of Chemical Equilibrium. Cambridge University Press, London 1968.
- [13] F. M. Pohl, Habilitationsschrift, Universität Konstanz 1970.
- [14] J. Mol. Biol. 52, 1 (1970).
- [15] M. Levitt u. S. Lifson, J. Mol. Biol. 46, 269 (1969).
- [16] G. N. Ramachandran u. V. Sasisekharan, Advan. Protein Chem. 23, 283 (1968).
- [17] T. Funk, F. Eggers u. E. Grell, 1. Eur. Biophys. Congress 5, 37 (1971).
- [18] H. Gut freund: An Introduction to the Study of Enzymes. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1967.
- [19] J. D. Shore u. H. Gut freund, Biochemistry 9, 4655 (1970).
- [20] K. Kirschner, M. Eigen, R. Bittman u. B. Voigt, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 1661 (1966).
- [21] H. Durchschlag, G. Puchwein, O. Kratky, I. Schuster u. K. Kirschner, Eur. J. Biochem. 19, 9 (1971).
- [22] S. F. Velick, J. P. Bagott u. J. M. Sturtevant, Biochemistry 10, 779 (1971).
- [23] M. Perutz, New Scientist 50, 676 (1971).
- [24] J. C. Kendrew, Angew. Chem. 75, 595 (1963).
- [25] D. Eisenberg in L. Boyer: The Enzymes. 2. Aufl., Bd. I. Dekker, New York 1970.
- [26] D. M. Blow u. T. A. Seitz, Annu. Rev. Biochem. 39, 63 (1970).
- [27] B. P. Schoenborn, A. C. Nunes u. R. Nathans, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 74, 1202 (1970).
- [28] B. S. Hartley, Biochem. J. 119, 805 (1970).
- [29] S. B. Needleman: Protein Sequence Determination. Chapman & Hall, London, und Springer, Heidelberg 1970.
- [30] M. O. Dayhoff: Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Md. 1969.
- [31] J. J. Birktoft, B. W. Matthews u. D. M. Blow, Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 131 (1969).
- [32] D. M. Shotton u. H. C. Watson, Phil. Trans. Roy. Soc. London B 257, 111 (1970).
- [33] B. S. Hartley u. D. M. Shotton in L. Boyer: The Enzymes. 3. Aufl., Bd. III, Dekker, New York 1971.
- [34] S. T. Freer, J. Kraut, J. D. Robertus, H. T. Wright u. Ng. H. Xiong, Biochemistry 9, 1997 (1970).
- [35] R. M. Stroud, L. M. Kay u. R. E. Dickerson, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 36, 125 (1971).
- [36] D. M. Segal, G. H. Cohen, D. R. Davies, J. C. Powers u. P. E. Wilcos, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 85 (1971).
- [37] C. S. Wright, R. A. Alden u. J. Kraut, Nature 221, 236 (1969).
- [38] W. G. J. Hol, Dissertation, Universität Groningen 1971.
- [39] T. L. Blundell, J. F. Cutfield, S. M. Cutfield, E. J. Dodson, D. C. Hodgkin, D. A. Mercola u. M. Vijayan, Nature 231, 506 (1971).
- [40] B. Lee u. F. M. Richards, J. Mol. Biol. 55, 379 (1971).
- [41] C. Tanford, J. Amer. Chem. Soc. 86, 2050 (1964).
- [42] Y. Nozaki u. C. Tanford, J. Biol. Chem. 246, 2211 (1971).
- [43] E. J. Cohn u. J. T. Edsall: Proteins, Aminoacids and Peptides. Reinhold, New York 1943.
- [44] M. H. Klapper, Biochem. Biophys. Acta 229, 557 (1971).
- [45] J. S. Rowlinson, Discuss. Faraday Soc. 49, 30 (1970).
- [46] R. Biltonen u. R. Lumry, J. Amer. Chem. Soc. 93, 224 (1971).
- [47] A. Rich u. N. Davison: Structural Chemistry and Molecular Biology. Freeman, San Francisco 1968.
- [48] P. Flory: Statistical Mechanics of Chain Molecules. Wiley, New York 1969.
- [49] A. C. T. North u. D. C. Phillips, Progr. Biophys. Mol. Biol. 19, 1 (1969).
- [50] F. M. Pohl, Nature New Biol. 234, 277 (1971).
- [51] E. L. Eliel, N. L. Allinger, S. J. Angyal u. W. A. Morrison: Conformational Analysis. Interscience, New York 1965.
- [52] R. A. Newmark u. M. A. Miller, J. Phys. Chem. 75, 505 (1971).
- [53] H. A. Scheraga, Advan. Phys. Org. Chem. 6, 103 (1968).
- [54] B. Pullmann in D. Daudel u. A. Pullmann: Aspects de la Chimie Quantique Contemporaine. Coll. Int. CNRS, Paris 1971.
- [55] J. Engel u. G. Schwarz, Angew. Chem. 82, 468 (1970); Angew. Chem. internat. Edit. 9, 389 (1970).
- [56] G. Schwarz u. J. Engel, Angew. Chem. 84, 615 (1972); Angew. Chem. internat. Edit. 11, 568 (1972).
- [57] D. C. Poland u. H. A. Scheraga: Theory of Helix-Coil Transitions. Academic Press, New York 1970.
- [58] J. Hermanns, D. Lohr u. D. Ferro, Nature 224, 175 (1969).
- [59] J. Kraut in L. Boyer: The Enzymes. 3. Aufl., Bd. III, Dekker, New York 1971.
- [60] M. Joly: A Physico-Chemical Approach to the Denaturation of Proteins. Academic Press, New York 1965.
- [61] O. B. Ptitsyn, A. K. Kron u. Yu. Ye. Eizner, J. Polymer Sci. C 16, 3509 (1968).
- [62] G. I. Likhitestein u. T. V. Troshkina, Mol. Biol. 2, 654 (1968).
- [63] A. C. Zettlemoyer: Nucleation. Dekker, New York 1969.
- [64] J. Steinhardt u. J. A. Reynolds: Multiple Equilibria in Proteins. Academic Press, New York 1969.
- [65] H. Sund u. K. Weber, Angew. Chem. 78, 217 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 231 (1966).
- [66] I. M. Klotz, N. R. Langerman u. D. W. Darnall, Annu. Rev. Biochem. 39, 25 (1970).
- [67] J. W. Teipel u. D. E. Koshland, Jr., Biochemistry 10, 792 (1971).
- [68] C. Tanford, Advan. Protein Chem. 23, 121 (1969).
- [69] J. F. Brandts in S. Timasheff u. G. Fasman: Structure and Stability of Biological Macromolecules. Dekker, New York 1969.
- [70] F. M. Pohl, Eur. J. Biochem. 4, 373 (1968).
- [71] F. M. Pohl, noch unveröffentlicht.
- [72] J. F. Brandts, R. J. Oliveira u. C. Westort, Biochemistry 9, 1038 (1970).
- [73] S. A. Hawley, Biochemistry 10, 2436 (1971).
- [74] D. F. Hollis, G. McDonald u. R. Biltonen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 1038 (1970).
- [75] D. N. Holcomb u. K. E. Van Holde, J. Phys. Chem. 66, 1999 (1962).
- [76] W. M. Jackson u. J. F. Brandts, Biochemistry 9, 2294 (1970).
- [77] M. A. Eisenberg u. G. W. Schwert, J. Gen. Physiol. 34, 583 (1951).
- [78] A. Rosenberg u. C. K. Woodward, J. Biol. Chem. 245, 4677 (1970).
- [79] R. Lumry, R. Biltonen u. J. F. Brandts, Biopolymers 4, 997 (1966).
- [80] D. C. Poland u. H. A. Scheraga, Biopolymers 3, 401 (1965).
- [81] T. Y. Tsong, R. P. Hearn, D. P. Wrathall u. J. M. Sturtevant, Biochemistry 9, 2666 (1970).
- [82] J. M. O'Reilly u. F. E. Karasz, Biopolymers 9, 1429 (1970).
- [83] M. Eigen, Quart. Rev. Biophys. 1, 3 (1968).
- [84] A. N. Schechter, Science 170, 273 (1970).
- [85] B. Harste in S. J. Leach: Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry. Academic Press, New York 1969.
- [86] D. M. Crothers, J. Mol. Biol. 9, 712 (1964).
- [87] F. M. Pohl, Eur. J. Biochem. 7, 146 (1968).
- [88] M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 31, 241 (1948).
- [89] F. H. Johnson, H. Eyring u. M. J. Pollissar: Kinetic Basis of Molecular Biology. Wiley, New York 1954.
- [90] J. G. Wetmur u. N. Davidson, J. Mol. Biol. 31, 349 (1968).
- [91] W. F. Harrington u. G. M. Karr, Biochemistry 9, 3725 (1970).
- [92] J. F. Brandts, J. Amer. Chem. Soc. 86, 4291 (1964).
- [93] F. M. Pohl, FEBS Lett. 3, 60 (1969).

- [94] A. Kurosky, J. E. S. Graham, J. W. Dixon u. T. Hofmann, Can. J. Biochem. 49, 529 (1971).

[95] C. H. Cherenka, J. Amer. Chem. Soc. 83, 473 (1961).

[96] M. Eigen, Angew. Chem. 75, 489 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 1 (1964).

[97] M. Ladzunski, M. Delaage, J. P. Abita u. J. P. Vincent: Structure-Function Relationships in Proteolytic Enzymes. Munksgaard, Copenhagen 1969.

[98] J. J. Christensen, J. L. Oscarson u. R. M. Izatt, J. Amer. Chem. Soc. 90, 5949 (1968).

[99] P. v. Hippel u. T. Schleich in S. Timasheff u. G. Fasman: Structure and Stability of Biological Macromolecules. Dekker, New York 1969, S. 417.

[100] E. Lehr, M. Wenzel u. G. Werner, Naturwissenschaften 57, 521 (1970).

[101] G. Nemerly u. H. A. Scheraga, J. Chem. Phys. 41, 680 (1964).

[102] A. Ben-Naim u. S. Baer, Trans. Faraday Soc. 89, 4826 (1962).

[103] R. Cerf, C. R. Acad. Sci. Paris 271, 60 (1970).

[104] R. B. Merrifield, Advan. Enzymol. 32, 221 (1969).

[105] L. A. Cohen, Annu. Rev. Biochem. 37, 695 (1968).

[106] L. Stryer, Science 163, 526 (1968).

[107] D. J. Birkeff, R. A. Dwek, G. K. Radda, R. E. Richards u. A. G. Salmon, Eur. J. Biochem. 20, 494 (1971).

[108] T. Y. Tsong, R. L. Baldwin, P. McPhie u. E. L. Elson, J. Mol. Biol. 63, 453 (1972).

[109] A. N. Schechter, R. F. Chen u. C. B. Anfinsen, Science 167, 886 (1970).

[110] M. Brunori, E. Antonini, P. Fasella, J. Wyman u. A. Rossi Fanelli, J. Mol. Biol. 34, 497 (1968).

[111] C. Frieden, J. Biol. Chem. 245, 5788 (1970).

[112] R. P. Hearn, F. M. Richards, J. M. Sturtevant u. G. D. Watt, Biochemistry 10, 806 (1971).

[113] K. C. Aune, L. C. Goldsmith u. S. N. Timasheff, Biochemistry 10, 1617 (1971).

ZUSCHRIFTEN

Orbitalreihenfolge in Sulfonen und Sulfodiimidien^[1]

Von Bahman Solouki^[*], Hans Bock^[*] und Rolf Appel^[**]

Gegenüber Dialkylsulfoxiden $R_2SO^{[2]}$ ist in Dialkylsulfonen R_2SO_2 die Zahl der „Schwefel-Valenzelektronen“ auf insgesamt 12 erhöht. Zur Beschreibung der σ - und π -Bindungen ($d_{SO}^{R_2SO} = 1.47 \text{ \AA}$, $d_{R_2SO_2}^{R_2SO_2} = 1.45 \text{ \AA}^{[3]}$) müssen daher auch hier 3d-Schwefel-Atomorbitale herangezogen werden^[3,4]. Ein qualitatives MO-Schema für die $\geq SO_2$ -Gruppe kann man durch symmetriegerechte Kombination von vier Sauerstoff-2p-, zwei σ -Bindungs- und zwei Schwefel-3d-Orbitalen ableiten (Abb. 1).

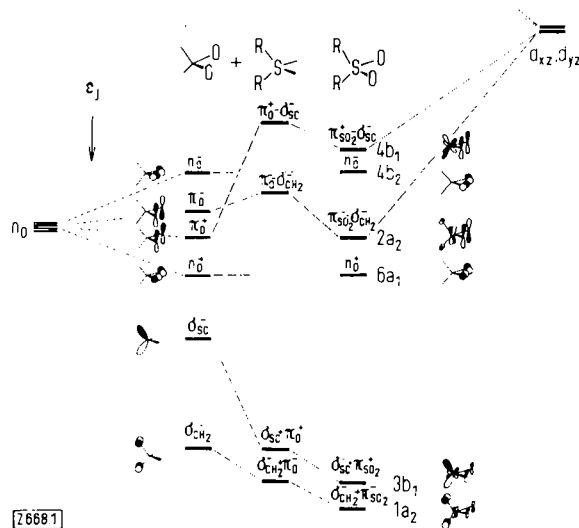


Abb. 1. Qualitatives MO-Schema für Dialkylsulfone.

[*] Prof. Dr. H. Bock und Dipl.-Chem. B. Solouki
 Chemische Institute der Universität
 6 Frankfurt 70, Ludwig-Rehn-Str. 14

[**] Prof. Dr. R. Appel
Anorganisch-chemisches Institut der Universität
53 Bonn, Meckenheimer Allee 168

Die qualitativ abgeleitete Reihenfolge der vier obersten besetzten Molekülorbitale, die sich auch durch CNDO/2-Rechnungen^[5] reproduzieren lässt, soll hier durch den Vergleich der photoelektronenspektroskopisch bestimm-

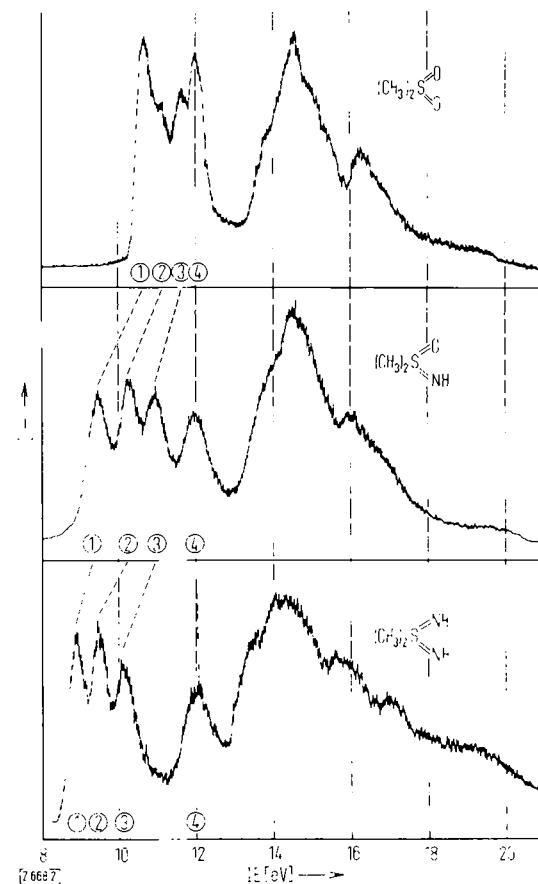


Abb. 2. PE-Spektren von Dimethylsulfon, Dimethylsulfonimid und Dimethylsulfodiimid.