

# Molekulare Maschinen: Wie Bewegung und andere Funktionen lebender Organismen aus reversiblen chemischen Änderungen entstehen

Von Dan W. Urry\*

Einige Modellproteine zeigen das ungewöhnliche Verhalten, in einen geordneteren stark gefalteten Zustand überzugehen, wenn eine bestimmte Temperatur überschritten wird. Durch Temperaturerhöhung läßt sich daher erreichen, daß diese Modellproteine Gewichte heben und Arbeit verrichten, d.h. Bewegung hervorrufen. In Warmblütern wird die Körpertemperatur jedoch konstant gehalten. Bewegung kann also nicht aus einer Temperaturerhöhung resultieren. In diesem Fall kann eine Änderung der Gibbs-Energie, z.B. durch Erhöhung der Konzentration eines chemischen Stoffes, die Temperatur, bei der die Proteinfaltung und der Übergang zu Assoziaten erfolgen, von oberhalb auf unterhalb der physiologischen Temperatur erniedrigt werden. In der Tat konnte gezeigt werden, daß eine solche isotherme Konzentrationserhöhung Bewegung und effiziente Leistung von Arbeit zur Folge haben kann. Diese Modellproteine und der Mechanismus, dessen sie sich bedienen, ermöglichen Einblicke in die molekularen Grundlagen einer ganzen Reihe von biologischen Funktionen; sie liefern zum einen Modelle für die molekularen Maschinen, die den lebenden Organismus ausmachen, zum anderen eine neue Klasse von Materialien für medizinische und nichtmedizinische Anwendungen.

## 1. Einleitung

Eine molekulare Maschine, meist ein Polymerenassoziat, ist ein strukturelles Gebilde, das Energieformen oder -zustände ineinander umwandelt. Lebende Organismen repräsentieren die synergistische Integration molekularer Maschinen mit unterschiedlichsten Aufgaben, die sich aus einer einzigen Klasse von Polymeren zusammensetzen, nämlich der Klasse der Proteine.

Es gibt viele Möglichkeiten zur Umwandlung von Energie, insbesondere der Gibbs-Energie, deren der lebende Organismus fähig ist und die für seine Existenzfähigkeit ursächlich sind. Die Funktionen lebender Organismen werden durch Gibbs-Energie-Änderungen, z.B. durch Änderungen der mechanischen Kraft und/oder der Länge, durch Temperaturänderungen und/oder Änderungen im Ordnungsgrad, durch Druck- und/oder Volumenänderungen, durch Änderungen des chemischen Potentials und/oder des Anteils einer chemischen Spezies durch Änderungen der Oxidationsstufe und/oder der Zahl der Elektronen molekularer Einheiten oder durch Änderungen, die auf die Absorption von Licht oder anderer elektromagnetischer Strahlung zurückzuführen sind, möglich. Wenn Gibbs-Energie in einer der oben genannten Formen dem korrekten „Proteinkonstrukt“ (d.h. einer spezifischen molekularen Maschine) zur Verfügung steht, kann sie vom ihm in irgendeine der anderen Formen überführt werden.

Obwohl die molekularen Maschinen lebender Organismen unterschiedliche Aufgaben erfüllen, könnte ein gemeinsamer molekularer Mechanismus für die vielen paarweisen Umwandlungen von Gibbs-Energien, die zum Leben benötigt werden, existieren<sup>[1]</sup>. Das Ziel dieser Übersicht ist es,

solch einen Mechanismus zu diskutieren und die zugrundeliegenden Prozesse verständlich zu machen.

An den Anfang unserer Betrachtungen können wir – ganz im Sinne von Albert Szent-Gyorgyi, der sagte<sup>[2]</sup>, daß Bewegung immer als *das Zeichen von Leben* gesehen wurde, – die Frage stellen, wie Bewegung entsteht. Wir beginnen jedoch auch deshalb mit der Diskussion von Bewegung, weil sie die direkte Folge von Faltung und Assoziation oder Entfaltung und Dissoziation von Proteinkonstrukten sein kann und weil der zugrundeliegende Mechanismus für diverse Umwandlungen von Gibbs-Energien direkt in einem einfachen Experiment gezeigt werden kann, in dem die reversible Faltung und Aggregation bestimmter Modellproteine Bewegung auslöst. Diese Modellproteine können als elastische, proteinartige Polymere bezeichnet werden, weil sie sich von Wiederholungssequenzen des in Säugetieren auftretenden elastischen Proteins Elastin ableiten.

Die Wiederholungssequenzen und Modifizierungen von ihnen werden zu Polymeren mit hohen Molekulargewichten polymerisiert; deshalb auch der Name elastische, proteinartige Polymere oder einfach elastomere, d.h. gummiartige Polypeptide. Von besonderer Bedeutung ist, daß sich diese Verbindungen in Wasser bei Temperaturerhöhung spontan falten und/oder zu geordneteren Strukturen assoziieren. Man nennt diese Zunahme des Ordnungsgrades von Polypeptiden mit steigender Temperatur einen *inversen Temperaturübergang*, und die Temperatur, bei der die Faltung einsetzt, wird als  $T_f$  bezeichnet. Nur indem man die Regeln, nach denen sich die Moleküle bei Temperaturerhöhung falten und aggregieren, erkennt, lassen sich Einblicke in die diversen Umwandlungsmöglichkeiten von Gibbs-Energien gewinnen.

In warmblütigen Tieren allerdings werden Faltung und Assoziation nicht dadurch erreicht, daß die Temperatur erhöht wird. Vielmehr wird die Temperatur, bei der Faltung und Assoziation erfolgen, von oberhalb auf unterhalb der physiologischen Temperatur erniedrigt. Dies bezeichnet man als den  $\Delta T_f$ -Mechanismus. Die Zufuhr an Gibbs-Energie, die benötigt wird, um die Faltung und Assoziation zu bewirken, ist so gering, daß sie die physiologische Temperatur nicht erhöht, sondern erniedrigt.

[\*] Prof. Dr. D. W. Urry  
Laboratory of Molecular Biophysics  
The University of Alabama at Birmingham  
VH300  
Birmingham, AL 35294-0019 (USA)  
Telefax: Int. + 205/934-4256

tigt wird, um die Übergangstemperatur zu erniedrigen, wird zu Gibbs-Kontraktionsenergie und damit zu nutzbarer mechanischer Arbeit. Wenn die Zufuhr an Gibbs-Energie durch Änderung der Konzentration eines chemischen Stoffes bewirkt wird und die Faltung eine Kontraktion zur Folge hat, spricht man von einer chemomechanischen Umwandlung, d. h. man hat eine chemisch hervorgerufene Bewegung. Die Leistungsfähigkeit dieses Mechanismus, bei dem durch Verschiebung der Temperatur eines inversen Temperaturübergangs eine chemomechanische Umwandlung erreicht wird, scheint um eine Größenordnung effizienter zu sein als Mechanismen, die über Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen oder Proteindenaturierung wirken (siehe Abschnitt 7). Inzwischen konnte zudem gezeigt werden, daß bei allen sechs zu Beginn der Einleitung genannten Methoden zur Umwandlung von Gibbs-Energie der  $\Delta T_i$ -Mechanismus zur Faltung und Assoziation genutzt wird, so daß tatsächlich den verschiedenen molekularen Maschinen lebender Organismen ein gemeinsamer Mechanismus zugrunde liegen könnte.

Mit einem rationalen Design von Modellproteinen und einem brauchbaren Mechanismus – beides wird im folgenden im Detail erläutert – wird es möglich, biologische Prozesse zu simulieren. Für derartige Biomimetica sind viele attraktive Anwendungen sowohl im medizinischen als auch im nichtmedizinischen Bereich, von der Geweberekonstruktion bis hin zur Robotertechnologie, denkbar.

## 2. Modellproteine, deren Ordnungsgrad bei Temperaturerhöhung zunimmt

### 2.1. Polypeptide, die bei Temperaturerhöhung aus Wasser auskristallisieren

Ein Polypeptid mit einer ausgeglichenen Verteilung von apolaren (hydrophoben) und polaren Aminosäuren kann sich bei niedriger Temperatur in Wasser lösen und bei Temperaturerhöhung ausfallen. Das Peptid *cyclo*(Val-Ala-Pro-

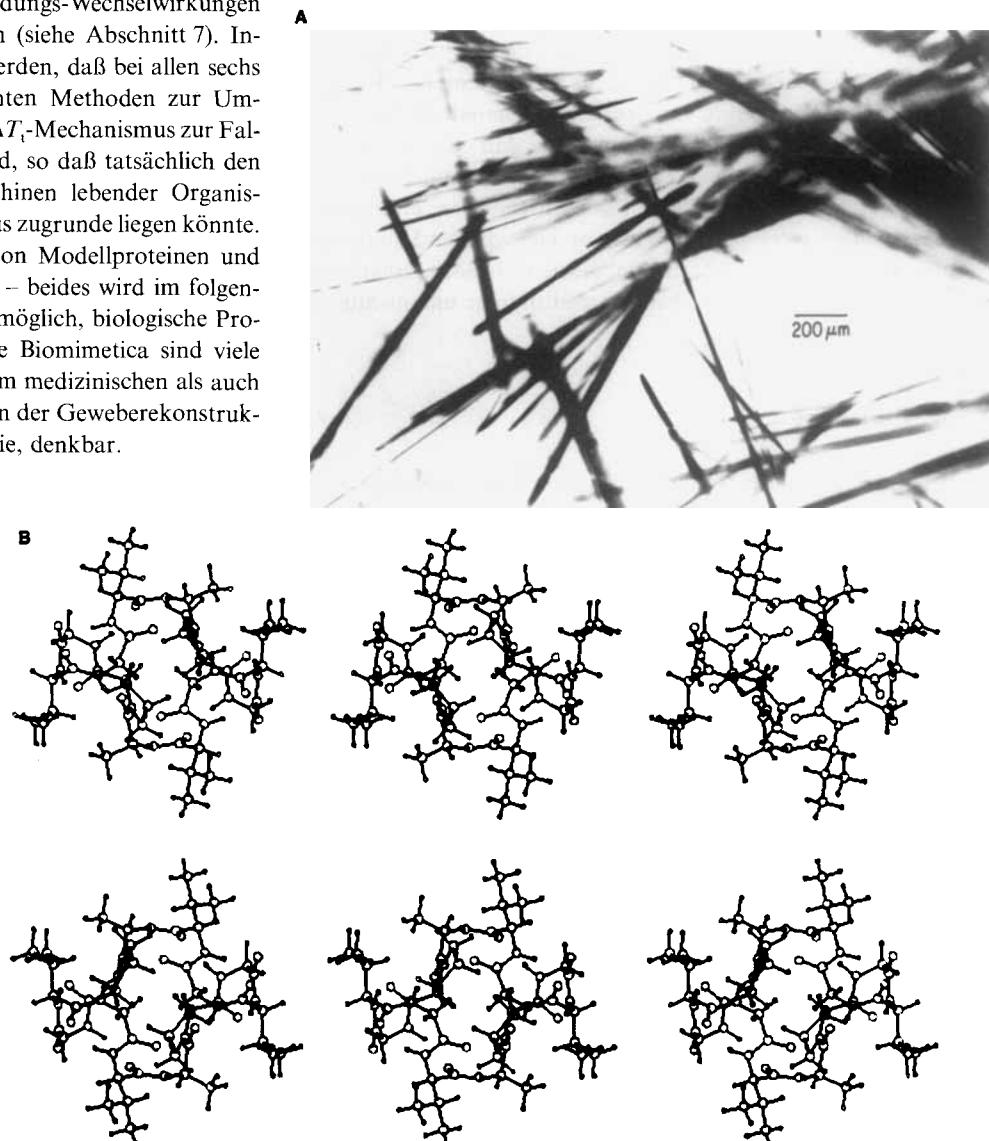


Abb. 1. A) Kristalle aus *cyclo*(VAPGVG)<sub>2</sub> bilden sich bei Temperaturerhöhung und lösen sich bei Temperaturerniedrigung (aus [3]). B) Ein auf NMR-Daten sowie Molekülmekanik- und -dynamik-Berechnungen basierendes Arbeitsmodell für die Struktur von *cyclo*(VAPGVG)<sub>2</sub> (aus [14]). Oben: Molekül von vorne (Peptidrückgrat im Uhrzeigersinn N → C); unten: Molekül von hinten. Das linke und das mittlere Bild einer Reihe ergeben mit „gekreuzten“ Augen („cross-eye“) betrachtet (d. h. linkes Bild mit rechtem, mittleres mit linkem Auge) ein Stereobild, das mittlere und das rechte normal betrachtet ebenfalls. Interne Wassersstoffbrücken und extern ausgerichtete aliphatische Seitenketten charakterisieren die Struktur.



Dan. W. Urry, geb. 1935, machte an der University of Utah, Salt Lake City, seinen BA in medizinischer Biologie und promovierte 1964 bei H. Eyring in Physikalischer Chemie. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der Harvard University waren seine weiteren Stationen die University of California in Berkeley, die University of Chicago und die University of Alabama at Birmingham. Seit 1970 ist er dort Direktor des Laboratory of Molecular Biophysics und Professor für Biochemie, seit 1979 zusätzlich Professor für Physiologie und Biophysik. Zu seinen Auszeichnungen gehören der Wright A. Gardner Award 1991 und die Wahl zum Scientist of the Year 1988 durch das Research & Development Magazine. Er ist Mitglied in den Herausgebergruppen vieler Fachzeitschriften und hat über 400 Publikationen veröffentlicht. Seine Forschungsschwerpunkte sind die Untersuchung von Proteinstrukturen und -funktionen, die Strukturen und Anwendungen von proteinartigen Polymeren, biomolekulare Materialien, der Tunnelmechanismus beim Ionentransport und der  $\Delta T_i$ -Mechanismus der Energieumwandlung.

$\text{Gly-Val-Gly})_2$  ist solch ein Molekül; es handelt sich um ein cyclisches Analogon des sich in Elastin wiederholenden Hexapeptids VAPGVG. Tatsächlich kristallisiert *cyclo*(VAPGVG)<sub>2</sub> bei Temperaturerhöhung aus und löst sich wieder wenn man die Temperatur senkt (Abb. 1)<sup>[3]</sup>. Dieser Übergang bei Temperaturerhöhung von einer willkürlichen Verteilung in Lösung in einen hochgeordneten, kristallinen Zustand erhöht den Ordnungsgrad des Peptids, da ein Kristall der Inbegriff von Ordnung schlechthin ist.

## 2.2. Polypeptide, die sich bei Temperaturerhöhung zu Fasern zusammenlagern

Entfernt man den neutralen, d. h. weder apolaren noch polaren Alaninrest aus dem Hexapeptid (VAPGVG), so erhält man das Pentapeptid (VPGVG). Dies ist der prominenteste Baustein von Elastin, der mehr als elfmal in einer Sequenz wiederholt wird, d. h. als  $(\text{VPGVG})_{11}$  vorkommt<sup>[4–6]</sup>. Proteinartige Polymere mit hohem Molekulargewicht, die diese Sequenzfolge enthalten, poly(VPGVG), sind ebenfalls

in Wasser (unter 25 °C) löslich. Erhöht man die Temperatur auf über 25 °C, so aggregieren sie und vollziehen einen Phasenübergang hin zu einem viskoelastischen Zustand, der durch Gewichtsanteile von 50% Peptid und 50% Wasser gekennzeichnet ist<sup>[7]</sup>. Wenn man die entstehenden Assoziate mit einem Kohlenstoff-beschichteten Netz abfängt, zeigt die Transmissionselektronenmikroskopie nach Negativkontrastierung das Assoziat als 5 nm dicke Filamente mit einer verknäulten oder gewundenen Substruktur<sup>[8]</sup>. Unter Bedingungen, unter denen eine chemische Quervernetzung erfolgen kann, kann man diese proteinartigen Polymere im Lichtmikroskop als selbstaggregierte Fasern mit einigen  $\mu\text{m}$  im Durchmesser erkennen (Abb. 2A)<sup>[9]</sup>. Im Rasterelektronenmikroskop erscheinen die Fasern als parallel gebündelte Fibrillen (Abb. 2B und C). Im Transmissionselektronenmikroskop sieht man dann nach Negativkontrastierung, daß sich diese Fibrillen wiederum aus Filamenten mit 5 nm Durchmesser zusammensetzen (Abb. 2D)<sup>[7, 10, 11]</sup>. Das proteinartige Polymer lagert sich also zu anisotropen Fasern zusammen, sobald man die Temperatur erhöht.

## 2.3. Grundlagen für das inverse Temperaturverhalten

Das Cyclopentadekapeptid *cyclo*(VPGVG)<sub>3</sub> liegt in einer nahezu identischen Konformation wie poly(VPGVG) vor<sup>[12]</sup>; es aggregiert ebenfalls bei Temperaturerhöhung, und seine Kristallstruktur ist durch einen hohen Wasseranteil, der ein Viertel des Gewichts ausmacht, gekennzeichnet. Dabei bildet das Wasser innerhalb der Stapel aus Cyclopentadekapeptiden hydrophile Kanäle, während zwischen den Molekülen kein Wasser nachweisbar ist (Abb. 3)<sup>[13]</sup>. Außerdem weist das Cyclopeptid im Kristall sechs hydrophobe „Antennen“ auf. Apolare Seitenketten bilden diese hydrophoben Antennen, die parallel zu den Molekülstapeln angeordnet sind, so daß die intermolekularen Wechselwirkungen

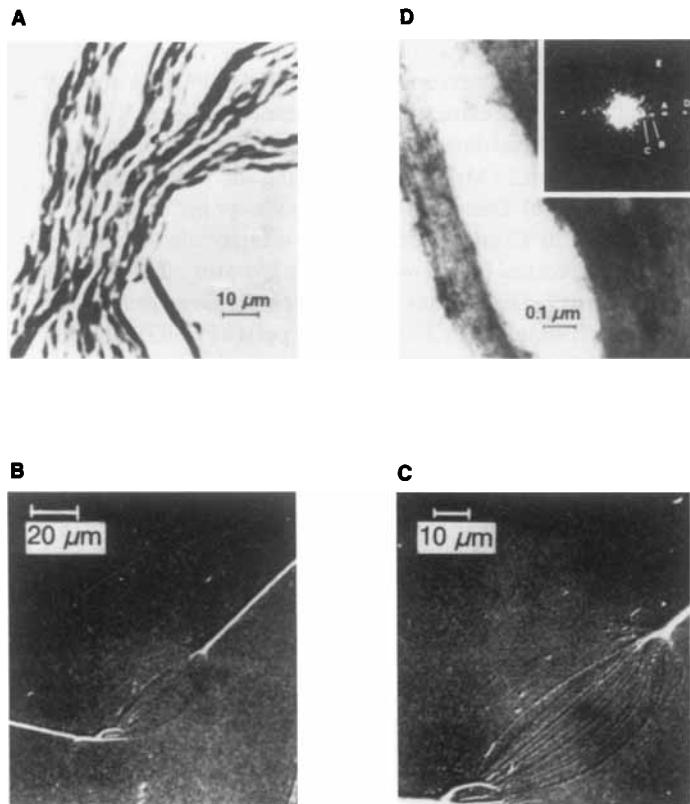


Abb. 2. Selbstassoziation von  $\text{poly}[V_x(\text{VPGVG})_f_x(\text{VPGVG})]$  zu anisotropen Fasern ( $X = \text{Glu, Lys}; 0.1 \leq f_x \leq 0.2$ ), die durch Aggregation in Gegenwart eines wasserlöslichen Carbodiimids, um die Glu- und Lys-Seitenketten zu verknüpfen, entstanden [10]. A) Die lichtmikroskopische Aufnahme (es wurde nicht angefärbt, sondern nur Doppelbrechung zur Kontrastierung genutzt) zeigt die Bildung von Fasern mit einigen  $\mu\text{m}$  im Durchmesser (aus [9]). B) und C) Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nach Aluminiumbeschichtung zeigen eine einzelne, 2–3  $\mu\text{m}$  dicke Faser, die zum Teil in viele parallel angeordnete Fibrillen aufgespleißt ist, welche dann wieder zur Faser gleicher Dicke verschmelzen (aus [10]). D) In der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahme der Fibrillen (Negativkontrastierung) erkennt man, daß diese sich aus parallel ausgerichteten Filamenten mit ungefähr 5 nm Dicke zusammensetzen (aus [11]). Einschub: Lichtbeugung an negativkontrastierten, nascenten Aggregaten von poly(VPGVG) zeigt einen dominanten Meridionalreflex nahe 5 nm und Diagonalreflexe, die auf eine helicale Grundstruktur hinweisen (aus [87]).

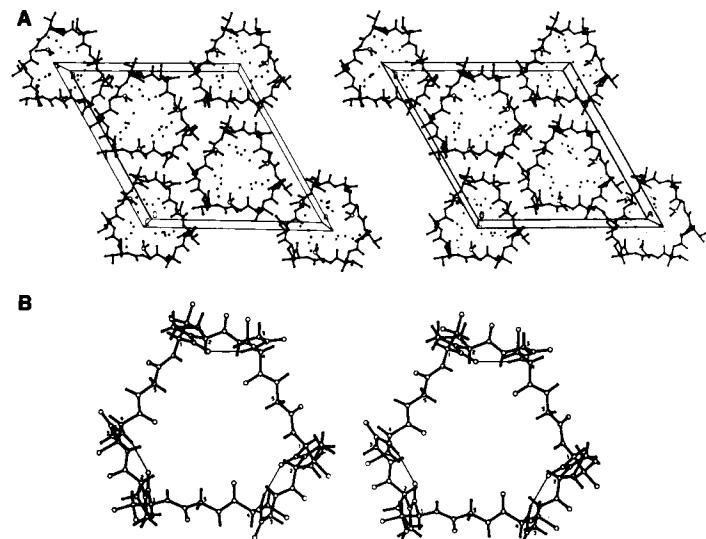


Abb. 3. *cyclo*(VPGVG)<sub>3</sub>: A) Stereodarstellung (cross-eye) der Kristallstruktur, die die intermolekularen Kontakte der hydrophoben Seitenketten und das in die  $C_3$ -symmetrischen Molekülstapel eingeschlossene Wasser veranschaulicht. B) Stereodarstellung (cross-eye) der Molekülstruktur aus  $\beta$ -Schleifen und Segmenten, die diese verbinden (aus [13]). Es konnte gezeigt werden, daß diese Konformation, abgesehen von leichten Veränderungen der Rückgrattorsionswinkel, der von helicalem poly(VPGVG) entspricht, d. h. *cyclo*(VPGVG)<sub>3</sub> ist das cyclische konformativ Gegenstück zu linearem poly(VPGVG) [12].

von Kontakten zwischen den hydrophoben Seitenketten dominiert werden. Auch *cyclo*(VAPGVG)<sub>2</sub> scheint eine Struktur aufzuweisen, bei der die polaren Peptidreste im Innern verborgen und die eher apolaren (hydrophoben) Seitenketten nach außen orientiert sind, um für hydrophobe Kontakte zur Verfügung zu stehen, wenn bei steigender Temperatur der Kristall gebildet wird (siehe Abb. 1 B)<sup>[14]</sup>.

Diese Verbindungen sind also in aggregierter oder kristalliner Form als hydrophobe Assoziate zu beschreiben. Vor der Zusammenlagerung sind die hydrophoben Seitenketten von Wasser umgeben. Für Wassermoleküle, die an apolare Reste angrenzen, konnte in Alkangashydraten und in der Kristallstruktur des Proteins Crambin nachgewiesen werden, daß sie als Fünfecke angeordnet sind. Im Methangashydrat gibt es z. B. zwölf solcher Fünfecke um ein Methanmolekül, d. h. ein pentagonales Dodekaeder (Abb. 4 A)<sup>[15]</sup>. Im Crambin sind die Fünfecke aus Wassermolekülen der aliphatischen Seitenkette von Leucin benachbart (Abb. 4 C)<sup>[16]</sup>.

Hydrophobe Hydratation, wie sie in der pentagonalen Anordnung von Wassermolekülen deutlich wird, ist ein günstiger, da exothermer Prozeß, d. h. die Hydrationsenthalpie  $\Delta H$ (Hydratation) ist negativ. Die Löslichkeit in Wasser ist jedoch durch die Gibbs-Solvationsenergie, die gemäß  $\Delta G$ (Hydratation) =  $\Delta H$ (Hydratation) –  $T\Delta S$ (Hydratation) definiert ist, begrenzt. In unserem Fall ist die Hydrationsentropie  $\Delta S$ (Hydratation) negativ, da der Ordnungsgrad des Wassers zunimmt<sup>[17–19]</sup>. Folglich geht, wenn man die Temperatur dieser proteinartigen Polymere in Wasser erhöht, das stärker geordnete Wasser, das die hydrophoben Bereiche umgibt, in einen weniger geordneten Zustand über; die dabei auftretende positive Entropieänderung ist größer als der Betrag der negativen Entropieänderung, die darauf zurückzuführen ist, daß der Polypeptidteil des Systems in einen höhe-

ren Ordnungsgrad übergeht. Die einzigartige Strukturierung und Destrukturierung von Aggregaten aus Wassermolekülen durch hydrophobe Hydratation und Dehydratation ist also die Ursache dafür, daß bei diesen Polypeptiden mit steigender Temperatur die Ordnung zunimmt; damit ist ihr Verhalten auch in Einklang mit dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik.

Die Hauptursache für die Änderung der Gibbs-Energie, die letztendlich zur Faltung oder Entfaltung der Polypeptide und damit zu Energieumwandlungen führt, sind die Störungen, die die Wasserstruktur um hydrophobe Reste beeinflussen oder stabilisieren, z. B. die Carboxy- und die Carboxylatgruppe in den Abbildungen 4 A bzw. 4 B.

### 3. Bewegung (Kontraktion) aufgrund thermisch induzierter Faltung

Zahlreiche physikalische Untersuchungen zeigen<sup>[20, 21]</sup>, daß sich poly(VPGVG) in eine dynamische, helicale Struktur faltet, in der intramolekulare hydrophobe Kontakte optimiert sind. Diese gefaltete Form, eine  $\beta$ -Spirale, auch Zustand II genannt, ist in Abbildung 5 A gezeigt, die gestreckte Struktur, der Zustand I, in Abbildung 5 B<sup>[22]</sup>.

Diese auf molekularer Ebene gezogenen Schlüsse lassen sich auf makroskopischer Ebene überprüfen. Durch  $\gamma$ -Strahlungs-induzierte Quervernetzung von poly(VPGVG) im Zustand II wird eine elastomere Matrix gebildet, die als X<sup>20</sup>-poly(VPGVG) bezeichnet wird (diese Schreibweise gibt an, daß eine Dosis von 20 Mrad  $^{60}\text{Co}$ -Strahlung zur Vernetzung verwendet wurde). Diese Matrix quillt in Wasser bei Temperaturen unter 20 °C und schrumpft auf weniger als die Hälfte ihrer gestreckten Länge, wenn die Temperatur auf 40 °C erhöht wird<sup>[11]</sup>. Dies ist das makroskopische Gegenstück zur thermisch induzierten Faltung von poly(VPGVG). Bringt man bei 20 °C ein Gewicht an die elastische Matrix an, so dehnt sie sich; erhöht man dann die Temperatur auf 40 °C, zieht sie sich zusammen und hebt das Gewicht an (Abb. 6). Es handelt sich um eine thermisch induzierte Kontraktion, d. h. um die Umwandlung thermischer Energie in nutzbare mechanische Arbeit, also eine thermomechanische Umfor-

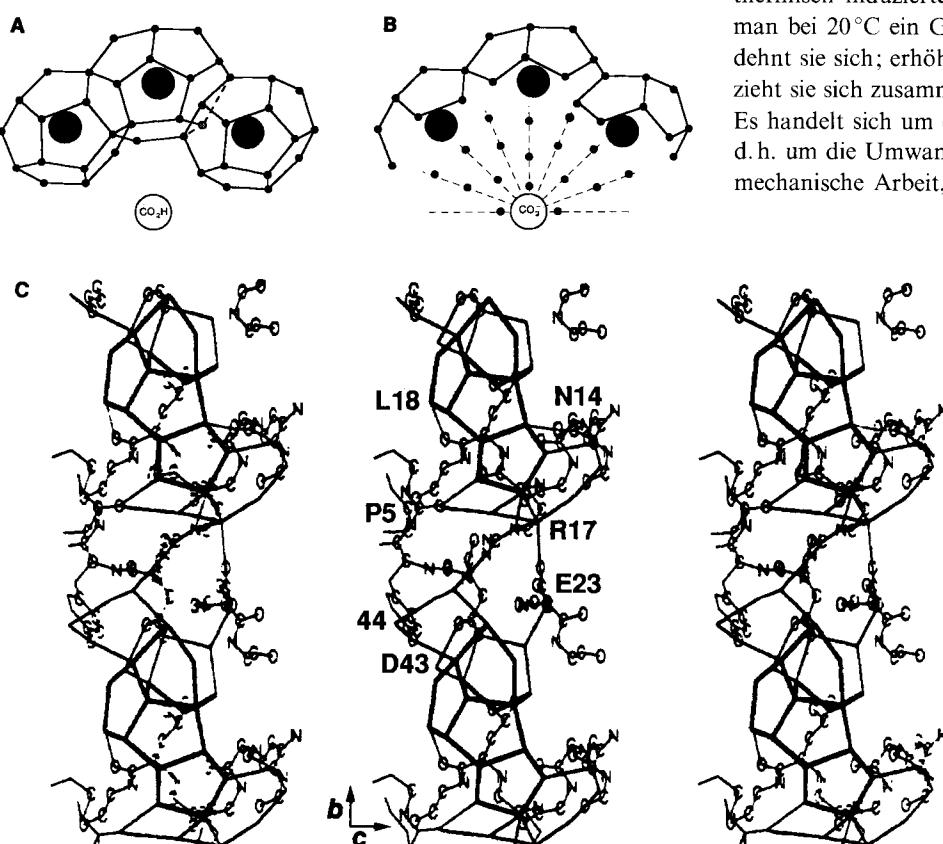


Abb. 4. A) Im Kristall eines Alkangashyrats umgeben die Wassermoleküle die Alkanmoleküle in Form von Fünfecken: Jedes Alkanmolekül befindet sich im Innern eines Gebildes aus etwa zwölf Fünfecken (aus [15]). Diese recht geordnete Anordnung von Wassermolekülen um hydrophobe Gruppen geht in eine weniger geordnete über, wenn die Moleküle über diese hydrophoben Gruppen aggregieren. B) Eine Carboxylatgruppe zerstört die Fünfeckanordnung der Solvensmoleküle bei der Bildung ihrer eigenen Hydrathülle. ●: hydrophobe Einheit; ○: polare (z. B. ionisierbare) Einheit; ●: O-Atom eines Wassermoleküls. C) Die Stereodarstellungen (siehe Erläuterung zu Abb. 1B) eines Bereichs aus der Kristallstruktur von Crambin verdeutlichen die Fünfeckanordnung der Wassermoleküle z. B. in Nachbarschaft zur Leucin-18 (L18)-Seitenkette ([16]).

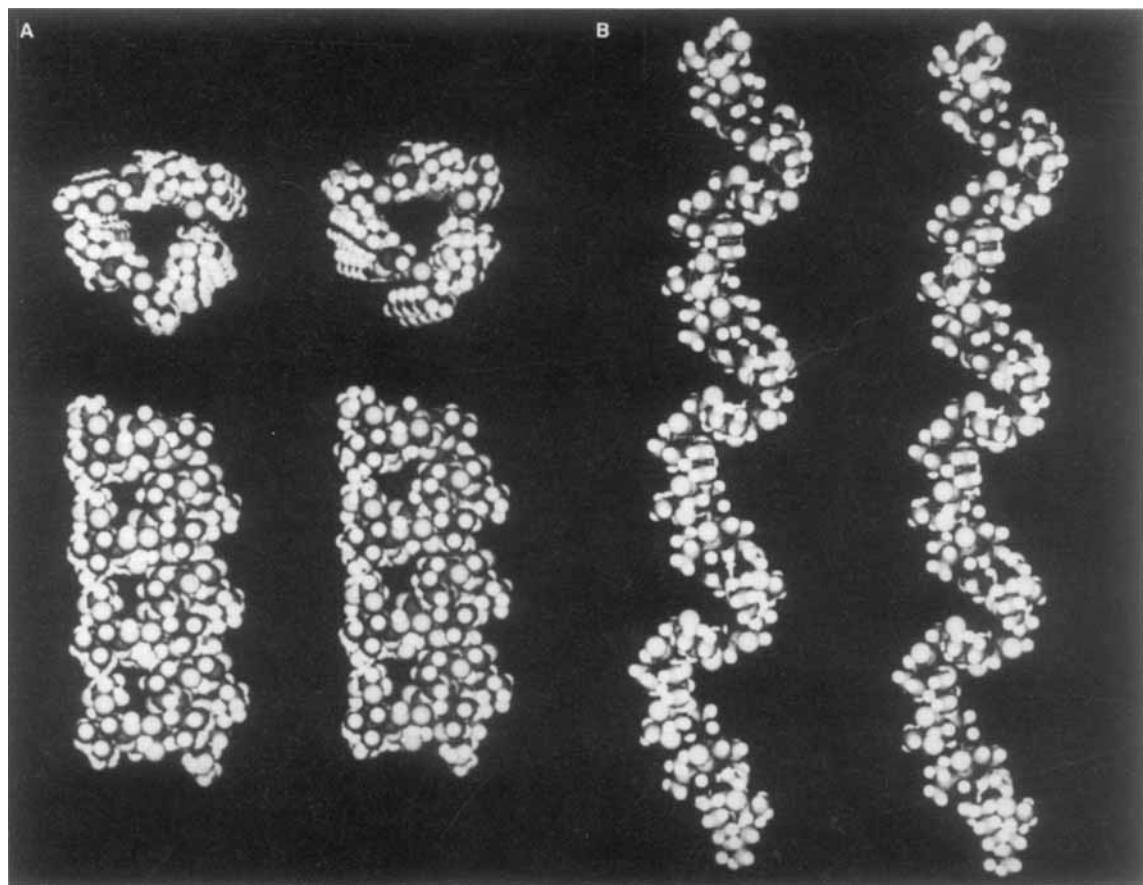


Abb. 5. Stereodarstellungen (cross-eye) der Molekülstruktur von poly(VPGVG). A) Annähernd drei Pentamere bilden in der  $\beta$ -Spiralstruktur eine Windung, und Kontakte bestehen zwischen der Val- $^1\gamma$ -CH<sub>3</sub>-Gruppe in Pentamer  $i$  und der Pro- $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe in Pentamer  $i + 3$ . Die Ansicht oben zeigt den Hohrraum für Wassermoleküle im Innern der Spirale; die Anordnung ähnelt der bei den *cyclo*(VPGVG)<sub>3</sub>-Molekülen (Abb. 3 A). Die Seitenansicht unten zeigt die lineare, helicale Konformation, die der Konformation des cyclischen Isomers in Abbildung 3 entspricht. B) In diesem gestreckten Zustand, in dem die hydrophoben Kontakte zwischen den Schleifen aufgehoben sind, werden die hydrophoben Gruppen von starker strukturiertem Wasser, wie in Abbildung 4 gezeigt, umgeben (aus [22]).

mung (thermische Energie  $\leftrightarrow$  mechanische Arbeit). Die elastische, quervernetzte Matrix ist eine wärmegetriebene molekulare Maschine.

Im allgemeinen arbeiten die Proteine lebender Organismen aber nicht als wärmegetriebene, sondern als chemisch getriebene molekulare Maschinen. Wie kann nun dieser Mechanismus für biologische Funktionen an Bedeutung gewinnen? Die Antwort liegt darin, chemische Bedingungen zu identifizieren, mit denen die Temperatur für den Faltungs- und Assoziationsvorgang verändert und kontrolliert werden kann. Liegt z. B. die Temperatur für die Faltung über der physiologischen Temperatur, wird das Modellprotein bei

37 °C ungefaltet vorliegen. Wenn aber auf chemischem Weg die Temperatur  $T_f$  des Faltungsübergangs auf unter 37 °C erniedrigt werden kann, sollte das Modellprotein bei physiologischer Temperatur gefaltet vorliegen. Durch Änderung und Steuerung von  $T_f$  auf chemischem Weg sollte es also möglich sein, chemisch getriebene molekulare Maschinen zu entwickeln. Im folgenden wird ein Überblick über chemische und andere Möglichkeiten zur Änderung von  $T_f$  gegeben.

#### 4. Gezielte Änderung der Temperatur $T_f$ , bei der die Faltung stattfindet

Die chemischen Parameter, anhand derer  $T_f$  moduliert werden kann, lassen sich in intrinsische und extrinsische einteilen. Zu den intrinsischen zählen bei unseren Modellproteinen mit Molekulargewichten von > 50 000 Da: 1) die Konzentration des Polypentapeptids selbst, 2) die Aminosäurezusammensetzung des Polypentapeptids, 3) der über pH-Änderungen steuerbare Ionisationsgrad funktioneller Seitenketten, 4) die Phosphorylierung von Seitenketten wie der von Serin durch Kinasen, 5) die elektrochemische, chemische oder enzymatische Oxidation oder Reduktion einer an das Modellprotein gebundenen prosthetischen Gruppe, 6) photochemische Reaktionen gebundener Chromophore. Der Einfluß, den Änderungen der Aminosäurezusammen-

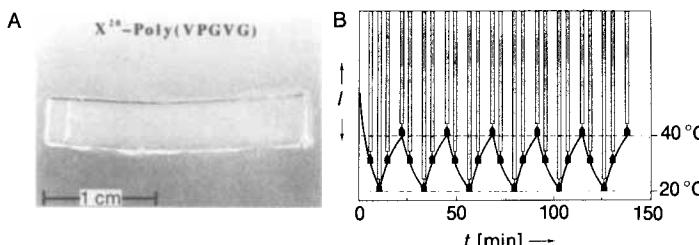


Abb. 6. A) Ein elastomerer Streifen aus X<sup>20</sup>-poly(VPGVG). B) Eine Reihe thermisch induzierter Kontraktions-/Relaxations-Cyclen, bei denen ein Gewicht angehoben und wieder abgesenkt wird. Die Kontraktion ist das makroskopisch sichtbare Ergebnis hydrophober Faltung und Assoziation des Polypeptids, wenn die Temperatur erhöht wird (aus [35]).

setzung auf den Wert von  $T_t$  ausüben, kann unter Beachtung des Konzentrationseffekts und gewisser konformativer Einschränkungen bestimmt werden. Als Ergebnis erhält man eine Hydrophobieskala, die direkt auf dem interessierenden Prozeß der hydrophoben Faltung und Assoziation beruht. Zu den extrinsischen chemischen Parametern zählen die Einflüsse 1) von Salzen und 2) von organischen Lösungszusätzen. Es gibt bereits Beispiele für  $T_t$ -Veränderungen über jede der genannten intrinsischen und extrinsischen Variablen einschließlich photochemischer Reaktionen. Ebenso erkannte man den Druck als eine weitere extrinsische Variable, die den Wert von  $T_t$  ändert. Es muß außerdem angemerkt werden, daß eine Abhängigkeit von der Kettenlänge besteht, die bei Molekülen mit niedrigerem Molekulargewicht signifikanter wird, wobei die Verkürzung der Kettenlänge zu einer Erhöhung von  $T_t$  führt.

#### 4.1. Intrinsische chemische Änderungen

Das chemische Äquivalent zu einer Temperaturerhöhung, um in molekularen Systemen mit inversen Temperaturübergängen Ordnung zu erzeugen, ist die Erniedrigung der Übergangstemperatur  $T_t$ , bei der die Faltung stattfindet, auf chemischem Weg.

##### 4.1.1. Einfluß der Konzentration

Erhöht man die Konzentration von poly(VPGVG), so sinkt die Temperatur des inversen Übergangs bis zu einem oberen Konzentrationsgrenzwert von ungefähr  $40 \text{ mg mL}^{-1}$ <sup>[7]</sup>. In Abbildung 7 A ist eine Reihe von Temperatur-Trübungs-Korrelationen (TPt-Kurven) dargestellt. Sie zeigen, daß bis zum Konzentrationsgrenzwert die Temperatur für das Einsetzen der Trübung mit Zunahme der Konzentration sinkt und die Steigung der Kurven zunimmt. Bei diesem Grenzwert ist  $T_t$  definiert als die Temperatur, bei der die Trübung bezüglich der geeichten Trübungsskala 50% beträgt. Die Konzentration von  $40 \text{ mg mL}^{-1}$  wurde auch verwendet, um Polypentapeptide unterschiedlicher Zusammensetzung zu vergleichen; daran sollte man sich bei der Diskussion alternativer Möglichkeiten zur Änderung des Wertes  $T_t$  erinnern.

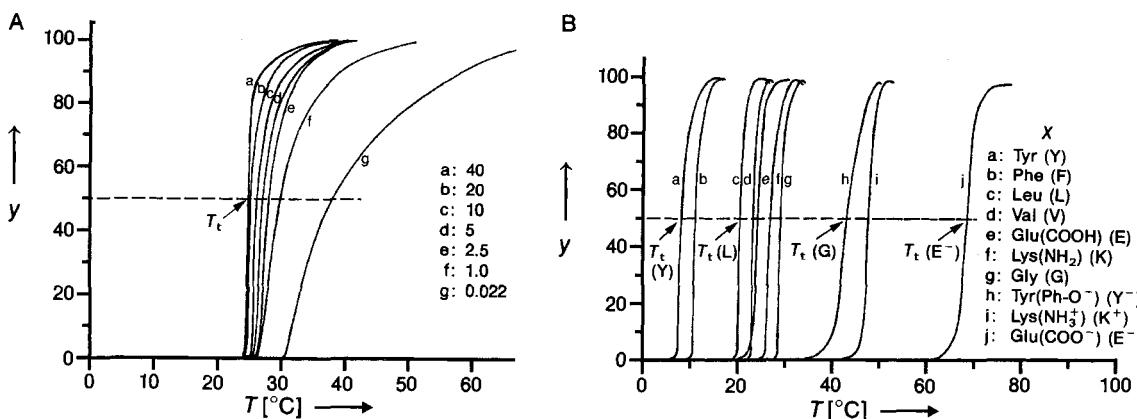


Abb. 7. TPt-Kurven für die Aggregation von poly( $f_v$ (VPGVG),  $f_X$ (VPGXG)), wobei die Trübung  $y$  [%] bei 300 nm verfolgt wird. A) Konzentrationsabhängigkeit von  $T_t$  für  $f_v = 1$ , d.h. für poly(VPGVG); die Konzentrationen für a-g sind in mg mL<sup>-1</sup> angegeben (aus [7]). B) Abhängigkeit von  $T_t$  von der Zusammensetzung für  $f_X = 0.2$  (aus [1]). Die Änderung von  $T_t$  mit der Zusammensetzung liefert die Grundlage für eine neue Hydrophobieskala (vgl. Abb. 8 und Tabelle 1).

#### 4.1.2. Einfluß der Zusammensetzung

Die allgemeine Formel für das Polypentapeptid lautet poly[ $f_v$ (VPGVG),  $f_X$ (VPGXG)], wobei  $f_v$  und  $f_X$  für die Molenzüge mit  $f_v + f_X = 1$  stehen; dabei kann X jede beliebige natürlich vorkommende oder modifizierte Aminosäure sein. In Abbildung 7 B ist eine Reihe von TPt-Kurven für  $f_X = 0.2$  abgebildet<sup>[1]</sup>. Wiederum ist  $T_t$  als die Temperatur definiert, bei der die halbmaximale Trübung vorliegt.

Wie man aus der Auftragung von  $f_X$  gegen  $T_t$  in Abbildung 8 erkennt, gilt für alle natürlich vorkommenden Aminosäuren<sup>[23]</sup>, daß hydrophobere Reste als Val, z.B. Ile(I) und Phe(F), die Übergangstemperatur erniedrigen, während weniger hydrophobe Reste wie Ala(A) und Gly(G) sowie polare Reste wie Asp(COO<sup>-</sup>) (D<sup>-</sup>) und Lys(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) (K<sup>+</sup>) die Übergangstemperatur erhöhen. Die Graphen sind im wesentlichen linear. Deshalb erhält man durch ihre Extrapolation auf  $f_X = 1$   $T_t$ -Werte, die ein Maß für die relativen Hydrophobien der Aminosäuren X sind. Diese Werte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt<sup>[23]</sup>.

#### 4.1.3. Einfluß der Änderung des Ionisationsgrades durch Änderung des pH-Wertes

Ein sehr effektives Mittel zur Erhöhung von  $T_t$  ist die Erhöhung des Ionisationsgrades  $\alpha$  einer Aminosäure wie Asp(COO<sup>-</sup>), Lys(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) oder Glu(COO<sup>-</sup>). Die wirksamste Aminosäure in dieser Hinsicht ist Glu(E) (vgl. Tabelle 1 sowie Abb. 7 B und 8). Für  $f_E = 0.2$  liegt die Übergangstemperatur oberhalb der Meßgrenze von 80 °C. Gibt man 0.15 N NaCl zu, so ist  $T_t$  für  $\alpha = 1$ , d.h. Glu(COO<sup>-</sup>), 69 °C, während  $T_t$  für  $\alpha = 0$ , d.h. Glu(COOH), 24 °C ist. Für den Referenzzustand mit  $f_E = 1$  ergibt sich extrapoliert ein  $T_t$  von 250 bzw. 30 °C (siehe auch Abb. 18).

#### 4.1.4. Einfluß der Phosphorylierung einer Serinseitenkette

Auf molarer Basis erwies sich bisher die Phosphorylierung als das potenteste Hilfsmittel, um den Wert von  $T_t$  zu verändern<sup>[24]</sup>. Sie ist viermal so wirksam wie die Glu(COO<sup>-</sup>)-Störung. Für den Referenzzustand mit  $f_X = 1$  beträgt der extrapolierte  $T_t$ -Wert für Ser(PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) mehr als 1000 °C. Während in

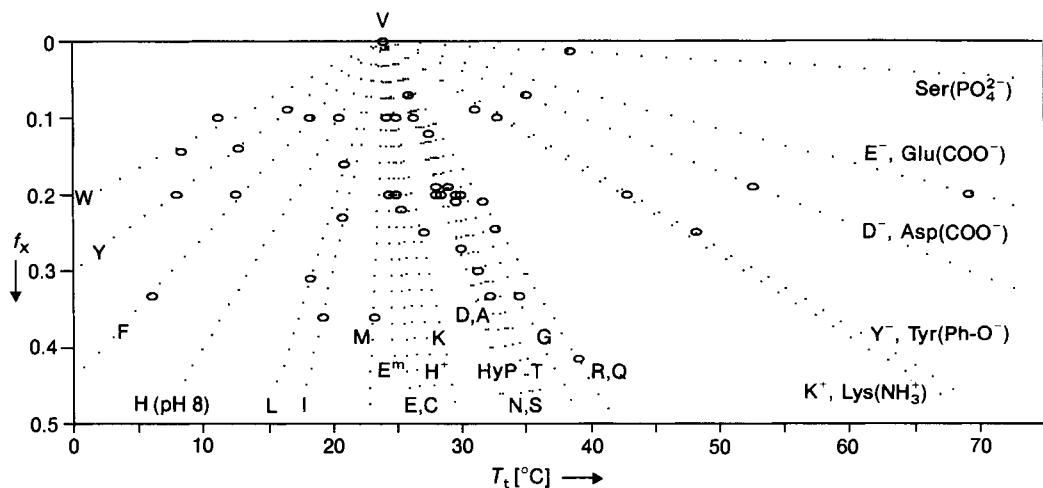


Abb. 8. Auftragung von  $T_t$  für poly-[ $f_v$ (VPGVG),  $f_x$ (VPGXG)] in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung als Funktion von  $f_x$  für kleine  $f_x$ . Bei diesen niedrigen X-Anteilen sind die Graphen im wesentlichen linear, so daß die relativen Werte für eine Referenzzusammensetzung verglichen werden können (siehe Tabelle 1) (aus [23]).

der Vergangenheit elektrostatische Wechselwirkungen als Erklärung dafür angeführt wurden, daß Phosphorylierung/Dephosphorylierung in der Biologie auffallend genutzt wird, um die Proteinstruktur zu modifizieren und damit spezifische Wirkungen zu erzielen, bietet der hier vorgestellte Mechanismus eine brauchbarere Erklärung für die Vorgänge in wäßrigen Systemen. Dies soll in Abschnitt 8.1.1 diskutiert werden.

#### 4.1.5. Einfluß elektrochemischer oder chemischer Reduktion einer prosthetischen Gruppe

Man konnte vermuten, daß die Reduktion eines Molekülbausteins den  $T_t$ -Wert des proteinartigen Polymers, das ihn

Tabelle 1. Temperatur des inversen Temperaturübergangs für poly-[ $f_v$ (VPGVG),  $f_x$ (VPGXG)] auf den Grenzwert  $f_x = 1$  extrapoliert.

Aminosäure X	$T_t$ [°C]	Korrelationskoeffizient
Lys(NMeN, red.) [a]	-130	1.000
Trp (W)	-90	0.993
Tyr (Y)	-55	0.999
Phe (F)	-30	0.999
His (pH 8) (H)	-10	1.000
Pro (P)	(-8)	[b]
Leu (L)	5	0.999
Ile (I)	10	0.999
Met (M)	20	0.996
Val (V)	24	[c]
Glu(COOCH <sub>3</sub> ) (E <sup>m</sup> )	25	1.000
Glu(COOH) (E)	30	1.000
Cys (C)	30	1.000
His (pH 4) (H <sup>+</sup> )	30	1.000
Lys(NH <sub>2</sub> ) (K)	35	0.936
Asp(COOH) (D)	45	0.994
Ala (A)	45	0.997
HyP	50	0.998
Asn (N)	50	0.997
Ser (S)	50	0.997
Thr (T)	50	0.999
Gly (G)	55	0.999
Arg (R)	60	1.000
Gln (Q)	60	0.999
Lys(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) (K <sup>+</sup> )	120	0.999
Tyr(Ph-O <sup>-</sup> ) (Y <sup>-</sup> )	120	0.996
Lys(NMeN, ox.) [a]	120	1.000
Asp(COO <sup>-</sup> ) (D <sup>-</sup> )	170	0.999
Glu(COO <sup>-</sup> ) (E <sup>-</sup> )	250	1.000
Ser(PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	1000	1.000

[a] NMeN steht für den N-Methylnicotinamidrest an einer Lysinseitenkette, d.h. N-Methylnicotinsäure ist über eine Amidbindung mit der ε-NH<sub>2</sub>-Gruppe von Lysin verknüpft. Die reduzierte Form ist der N-Methyl-1,6-dihydronicotinamid-Rest. [b] Berechnet. [c] Dient als Referenzsubstanz.

enthält, verändert. Neuere Studien haben gezeigt, daß die elektrochemische Reduktion von N-Methylnicotinamid (NMeN), das an eine Lysinseitenkette gebunden ist, den  $T_t$ -Wert des Polymers erheblich erniedrigt. Für poly[0.73-(GVGVP), 0.27(GK(NMeN)GVP)] beträgt  $T_t$  48 °C, und nach einer teilweisen Reduktion erhält man als  $T_t$ -Wert 31 °C (Abb. 9 A). Bei Extrapolation auf  $f_x = 1$  ergibt sich für den oxidierten Zustand  $T_t = 120$  °C und bei vollständiger Reduktion zu 6-Hydroxy-N-methyl-1,4,5,6-tetrahydronicotinamid wäre ein  $T_t$  von 37 °C zu erwarten. Sollte die Reduktion im Experiment nicht vollständig sein, wäre der Wert für  $T_t$  niedriger. Die bis jetzt beste Schätzung legt den Wert auf kleiner 0 °C fest. In Abbildung 9 B sind die zu den TP<sub>t</sub>-Kurven in Abbildung 9 A gehörenden UV-Spektren gezeigt (Urry, Hayes, Gowda und Harris, unveröffentlichte Ergebnisse).

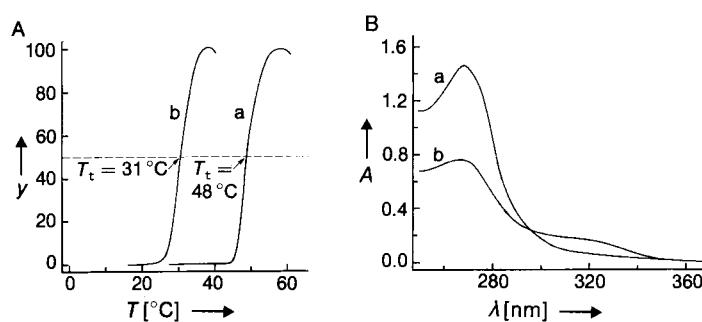


Abb. 9. Abhängigkeit von  $T_t$  vom Redoxzustand des N-Methylnicotinamidrestes in poly[0.73-(GVGVP), 0.27(GK(NMeN)GVP)]. Bei einer Konzentration von 10 mg mL<sup>-1</sup> beträgt  $T_t$  im oxidierten Zustand (a) 48 °C, im reduzierten (b) 31 °C; zur Reduktion wurde 30 min in einem Carbonat/KCl-Puffer-System bei pH 9 eine Spannung von ca. 1.8 V angelegt. B) Den Kurven aus A entsprechende Absorptionsspektren nach einer Verdünnung der Proben mit Puffer auf 50%.

Bei der chemischen Reduktion mit Dithionit sinkt  $T_t$  von 49 auf 9 °C, wobei die Reduktion laut N-Methyl-1,6-dihydronicotinamid-Absorption zu ca. 60 % erfolgt war. Bei der Extrapolation auf  $f_x = 1$  ergibt sich für den oxidierten Zustand derselbe  $T_t$ -Wert von 120 °C wie beim elektrochemischen Experiment und für den reduzierten Zustand ein Wert von -130 °C. Die Differenz  $\Delta T_t$  ist mit 250 K für das NMeN-Redoxpaar etwas größer als für das Säure-Base-Paar Glu(COOH)/Glu(COO<sup>-</sup>) mit einem  $\Delta T_t$  von 220 K<sup>[25]</sup>.

#### 4.1.6. Einfluß photochemischer Reaktionen

Ebenfalls angenommen und inzwischen auch bewiesen ist, daß photochemische Reaktionen die Hydrophobie oder Polarität einer photoreaktiven Seitenkette oder eines an eine Aminosäureseitenkette gebundenen Chromophors ändern. Da die Produkte einer photochemischen Reaktion sehr unterschiedlich sein können, dürften einige Reaktionen den  $T_i$ -Wert senken, während andere ihn erhöhen sollten. Dieser interessante Gesichtspunkt sollte weiter verfolgt werden. Nach den bisherigen Befunden (K. Heimbach, T. Parker, D. W. Urry, unveröffentlichte Ergebnisse) bewirkt die photochemische Reaktion eines über eine Esterbindung an einen Glu-Rest gebundenen Spiropyrans eine Abnahme des  $T_i$ -Wertes und die einer gebundenen Zimtsäureeinheit eine Zunahme, die im Dunkeln wieder verschwindet.

#### 4.2. Extrinsische chemische Änderungen

Mittlerweile konnten viele extrinsische chemische Störungen durch Salze oder organische Lösungszusätze, die  $T_i$  verändern, identifiziert werden. In beiden Kategorien gibt es Beispiele für Störungen, die den  $T_i$ -Wert erhöhen, und solche, die ihn erniedrigen.

##### 4.2.1. Einfluß von Salzen

Der erste Nachweis eines Salzeffekts gelang bei poly-(VPGVG) mit NaCl, das den  $T_i$ -Wert um  $14 \text{ K mol}^{-1}$  herabsetzt<sup>[26]</sup>. NaBr erniedrigt  $T_i$  weniger effektiv, während NaI und NaSCN eine geringfügige Erhöhung bewirken. Die auf Normalität N bezogen wirkungsvollsten Salze sind jene mit multivalenten Anionen wie Carbonate, Sulfate und Phosphate. Eine ganze Reihe dieser Salzeffekte ist in Abbildung 10A dargestellt. Alle diese Salze können entweder zur chemisch induzierten Faltung oder – in den wenigen Fällen, in denen sie  $T_i$  erhöhen, – zur chemisch induzierten Entfaltung genutzt werden.

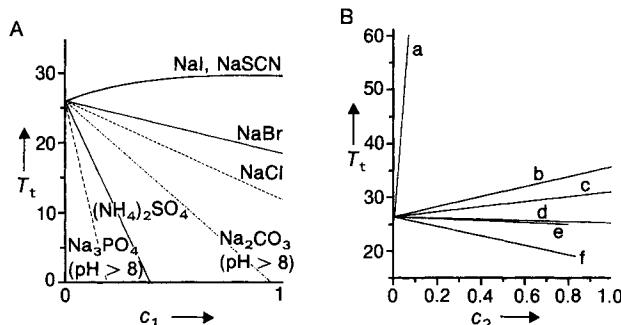


Abb. 10. Einfluß von Salzen (A) oder organischen Lösungszusätzen (B) auf  $T_i$  von poly(VPGVG). A)  $c_1$  = Salzkonzentration in N (aus [35]). B)  $c_2$  = Konzentration an organischer Verbindung in M. a: Natriumdodecylsulfat; b: Guanidiniumchlorid; c: Harnstoff; d: Ethylenglycol; e: Glycerin; f: Trifluorethanol (unveröffentlichte Ergebnisse).

##### 4.2.2. Einfluß organischer Lösungszusätze

Auch hier sind sowohl Erhöhungen als auch Erniedrigungen von  $T_i$  möglich (Abb. 10 B). Einige der Substanzen be-

wirken sogar je nach Konzentration mal das eine, mal das andere. Zu den organischen Verbindungen, die  $T_i$  erhöhen, zählen nach abnehmender Aktivität geordnet Natriumdodecylsulfat ( $600 \text{ K mol}^{-1}$  bei  $0.1 \text{ M}$ ), Guanidiniumchlorid ( $12 \text{ K mol}^{-1}$  bei  $0.3 \text{ M}$ ), Harnstoff ( $5.5 \text{ K mol}^{-1}$  bei  $0.3 \text{ M}$ ) und Triton X-100, das auch eine Erniedrigung bewirken kann ( $22 \text{ K mol}^{-1}$  bei  $0.3 \text{ M}$ ). Ethylenglycol, Trifluorethanol ( $-11 \text{ K mol}^{-1}$  bei  $0.4 \text{ M}$ ), Trifluoressigsäure und Glycerin ( $-2.2 \text{ K mol}^{-1}$  bei  $0.4 \text{ M}$ ) gehören zu den organischen Verbindungen, die  $T_i$  erniedrigen. Dimethylsulfoxid bei niedrigen und Ethylenglycol bei sehr niedrigen Konzentrationen erhöhen beide  $T_i$ ; bei höheren Konzentrationen erniedrigen sie dann  $T_i$ .

#### 4.3. Eine weitere extrinsische Variable: der Druck

Es konnte gezeigt werden, daß auch Druckerhöhungen  $T_i$  erhöhen<sup>[27]</sup>, und zwar besonders effektiv, wenn das Polypeptid aromatische Aminosäuren wie Phe(F), Tyr(Y) oder Trp(W) enthält (Abb. 11). Ursache für diesen Effekt ist, daß das von Wassermolekülen beanspruchte Volumen geringer ist, wenn die Wassermoleküle aromatische Reste in geordneter Weise umgeben, als wenn sie als weniger geordnete Lösungsmittelmoleküle vorliegen. Dies bedeutet, daß durch Druckerhöhung Entfaltung initiiert werden kann, während eine Druckerniedrigung Faltung bewirken sollte.

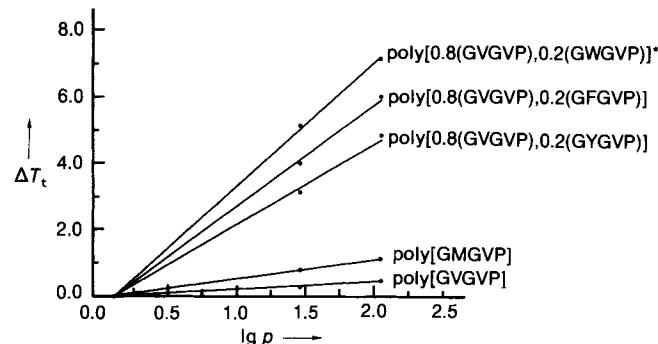


Abb. 11. Der Einfluß des Drucks auf den  $T_i$ -Wert. Dargestellt ist gemäß der Clausius-Clapeyron-Gleichung die Änderung der Übergangstemperatur,  $\Delta T_i$ , als Funktion von  $\lg p$  (in atm), so daß die Steigung durch  $p\Delta V/\Delta S$  gegeben ist. Wertet man die Daten von Differentialthermoanalysen (DSC) aus, um  $\Delta S$  ( $= \Delta H/T$ ) zu bestimmen, lassen sich die Volumenänderungen berechnen (aus [27]).

#### 5. Eine einheitliche Grundlage für die verschiedenen Energieumwandlungen: der $\Delta T_i$ -Mechanismus

Der  $\Delta T_i$ -Mechanismus wird zur Zeit intensiv untersucht, um herauszufinden, wie allgemeingültig er tatsächlich ist. Bisher konnte gezeigt werden, daß viele intrinsische und viele extrinsische chemische Änderungen die Temperatur beeinflussen, bei der der inverse Temperaturübergang erfolgt, d.h. hydrophobe Faltung und Übergang in ein Assoziat stattfinden. Dies sind die zunächst nötigen Studien, um zu zeigen, daß geeignete elastische, proteinartige Polymere herstellbar sind, bevor Bedingungen für den Umgang mit der viskoelastischen Phase, die in eine quervernetzte, elastische Matrix überführt wird, ausgearbeitet werden. Es konnte bereits ge-

zeigt werden, daß die Zufuhr von chemischer Energie und von Kompressionsenergie zur Kontraktion der elastischen Materialien führen kann, wobei nutzbare mechanische Arbeit entsteht, und man kann sich vorstellen, daß eine ganze Reihe anderer Energieumwandlungen ebenfalls möglich wäre. Ein kurzer Überblick über die Entwicklung des  $\Delta T_i$ -Mechanismus soll in diese Diskussion und die Einteilung der Energieumwandlungen einführen.

Man erkannte zunächst, daß Polypeptide oder Modellproteine mit einem ausgewogenen Anteil apolarer (hydrophober) und polarer Aminosäuren bei Temperaturerhöhung in einen geordneteren Zustand übergehen. Diesen Prozeß nannte man einen inversen Temperaturübergang. Bei einigen Polypeptiden handelt es sich um einen reversiblen Phasenübergang, der durch Bildung einer dichten, polypeptidreichen viskoelastischen Phase bei Temperaturerhöhung charakterisiert ist. Wenn die viskoelastische Phase quervernetzt wurde, bildete sich eine elastische Matrix, die sich, sobald man die Temperatur über die des inversen Temperaturübergangs erhöhte, zusammenzog und dabei Gewichte heben konnte, die das Tausendfache des Trockengewichts der Matrix betragen, d. h. nutzbare mechanische Arbeit verrichtete. Matrices dieser Art werden als molekulare Maschinen nullter Ordnung bezüglich eines inversen Temperaturübergangs ( $T_i$ ) bezeichnet.

Nachdem bewiesen war, daß die Änderung der Zusammensetzung eines proteinartigen Polymers die Übergangstemperatur systematisch moduliert, nahm man als nächstes an, daß auch eine intrinsische chemische Änderung, die Änderung des Ionisationsgrades einer funktionellen Seitenkette in einem Polypeptid, die Temperatur  $T_i$  ändern würde, da dies einer Änderung der Zusammensetzung ohne Synthese eines neuen Polymers entspräche. Man nahm weiterhin an, daß die quervernetzte viskoelastische Phase eines solchen Polypeptids einer isothermen, pH-abhängigen Kontraktion zur Erzeugung nutzbarer mechanischer Arbeit fähig wäre, was auch tatsächlich beobachtet wurde<sup>[28]</sup>. Eine derartige elastische Matrix, in der durch chemische Energie oder eine andere Energiequelle  $T_i$  verändert wird und die dadurch zur Kontraktion und Leistung nutzbarer mechanischer Arbeit veranlaßt wird, bezeichnet man als molekulare Maschine erster Ordnung des  $T_i$ -Typs. Die verrichtete Arbeit ist das direkte Ergebnis hydrophober Faltung und Assoziation. Die Energieumwandlung, die entweder direkt nachgewiesen, indirekt abgeleitet oder auch nur vermutlich nach dem  $\Delta T_i$ -Mechanismus ablaufen, sind in Abbildung 12 zusammengefaßt. Die Energieumwandlungen erster Ordnung des  $T_i$ -Typs entsprechen denen, bei denen die Pfeile direkt am Begriff „mechanisch“ enden. Jene Umwandlungen, die bereits bewiesen wurden, sind durch breite Pfeile, die eine Umwandlung für die die  $T_i$ -Verschiebung in einem geeignet entworfenen Polypeptid vor der Quervernetzung nachgewiesen wurde, durch durchgehogene, jene, für die es indirekte Daten gibt, durch gestrichelte und die bis jetzt nur hypothetischen Umwandlungen durch gepunktete Pfeile gekennzeichnet.

Die Energieumwandlungen, die durch Pfeile charakterisiert werden, die nicht am Begriff „mechanisch“ enden, bezeichnet man als Energieumwandlungen zweiter Ordnung des  $T_i$ -Typs. Obwohl sie sich der hydrophoben Faltung und Assoziation der elastischen Matrix bedienen, ist mechanische Arbeit nicht Bestandteil der ineinander umwandelbaren Energiepaare.

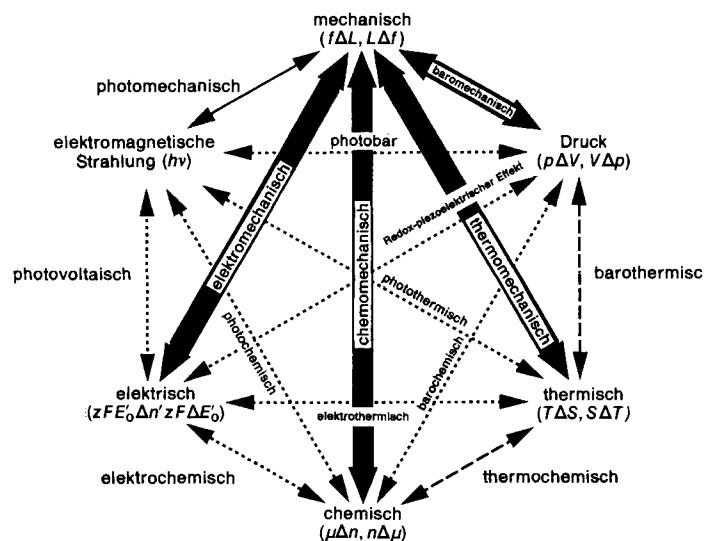


Abb. 12. Nachgewiesene und vermutete Energieumwandlungen durch molekulare Maschinen des  $T_i$ -Typs. Die breiten Pfeile markieren Energieumwandlungen, die bei elastischen, proteinartigen Matrices beobachtet wurden. Die photomechanische Energieumwandlung leitet sich aus der Photoreduktion von Nicotinamid und z. B. aus der Photosomerasierung eines an eine Seitenkette gebundenen Zimtsäurechromophors ab [90]. Unseres Wissens schließen die Pfeile in dieser Abbildung alle Energieumwandlungen ein, die in lebenden Organismen ablaufen können, und es scheint plausibel, daß ihnen allen molekulare Maschinen des  $T_i$ -Typs zugrunde liegen.

## 5.1. Molekulare Maschinen erster Ordnung des $T_i$ -Typs

### 5.1.1. Umwandlung chemischer Energie in mechanische Arbeit

Die Fähigkeit, auf chemischem Weg die Temperatur  $T_i$  zu variieren, bei der Faltung und Aggregation erfolgen, impliziert, daß die Umwandlung chemischer Energie in mechanische Arbeit isotherm verlaufen kann, d. h. unter den homöothermen Bedingungen warmblütiger Tiere.

#### 5.1.1.1. Protoneninduzierte Kontraktion

Der  $\Delta T_i$ -Mechanismus wurde erstmals für die chemomechanische Umwandlung am Beispiel der in Abbildung 13 A gezeigten, durch  $\gamma$ -Strahlung quervernetzten Matrix X<sup>20</sup>-poly[0.8(VPGVG), 0.2(VPGEG)] nachgewiesen. Zuvor wurden jedoch die Bedingungen, unter denen eine *thermisch induzierte Kontraktion* erfolgt, untersucht. Bei niedrigem pH (2.2) beginnt sich die Matrix in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (0.15 N NaCl, 0.01 M Phosphat) zusammenzuziehen, sobald die Temperatur über 20 °C erhöht wird. Diese thermisch induzierte Kontraktion ist bei 40 °C abgeschlossen. Bei höherem pH (4.5) setzt thermisch induzierte Kontraktion dagegen erst knapp unter 45 °C ein. Mit dem  $\Delta T_i$ -Mechanismus sollte es möglich sein, die Temperatur bei 37 °C konstant zu halten und eine Kontraktion durch Erniedrigung des pH-Werts auszulösen. Genau das gelang auch, wie in Abbildung 13 A gezeigt ist. Die Erhöhung der Protonenkonzentration überführt den Glu(COO<sup>-</sup>)-Rest in Glu(COOH), und die Matrix zieht sich bei 37 °C zusammen, wobei sie ein Gewicht anhebt<sup>[28]</sup>. Die quervernetzte, Glu-haltige Matrix wandelt chemische Energie in mechanische Arbeit um; sie ist damit eine chemisch getriebene mo-

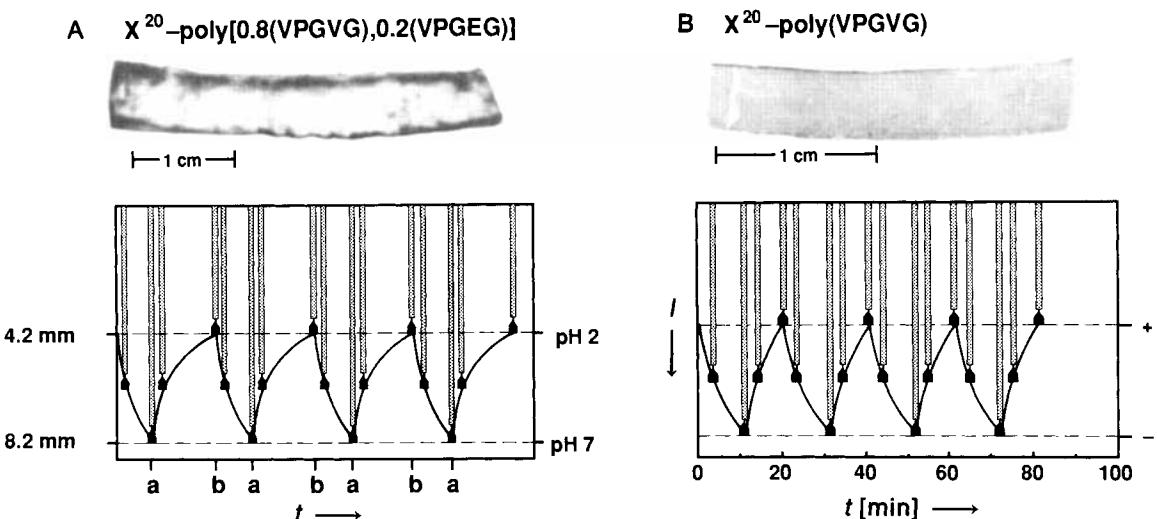


Abb. 13. A) Ein Streifen einer quervernetzten, Glu-haltigen, elastischen Matrix, hier  $X^{20}$ -poly[0.8(VPGVG), 0.2(VPGEG)], als protonengetriebene molekulare Maschine. Bei niedrigem pH-Wert betrug die Länge der mit einem Gewicht versehenen elastischen Matrix 42 mm; erhöhte man den pH-Wert (b, Neutralisation), so dehnte sich der Streifen, und das Gewicht senkte sich ab. Sobald man den pH-Wert erniedrigte (a, Säurezugabe), zog sich der Streifen wieder zusammen und hob das Gewicht an. Man kann diese protonengetriebene molekulare Maschine viele Cyclen lang verwenden (aus [35]). B) Ein Streifen aus quervernetztem poly(VPGVG) als salzgetriebene molekulare Maschine. Der Streifen wird ohne Salz gespannt. Die Zugabe von Salz verursacht eine Kontraktion, wobei das Gewicht angehoben wird. Dieser Zyklus kann über Tage hinweg ohne Verluste bezüglich der Stärke der Kontraktion wiederholt werden. Bei umgekehrter "Fahrtweise", d. h. wenn man mechanische Dehnungsenergie in die molekulare Maschine hineinsteckte, könnte man sie zur Entsalzung verwenden (aus [35]). + : Salz vorhanden; - : ohne Salz.

lekulare Maschine und bewirkt die Umwandlung chemische Energie  $\leftrightarrow$  mechanische Arbeit.

#### 5.1.1.2. Salzinduzierte Kontraktion

Wie in Abbildung 10 A gezeigt, erniedrigt die Zugabe von NaCl den  $T_c$ -Wert von poly(VPGVG) um  $14 \text{ K N}^{-1}$ . Schon der Übergang von reinem Wasser zu 0.15 N NaCl (physiologische Kochsalzlösung) induziert eine so starke Änderung des  $T_c$ -Wertes, daß bei  $25^\circ\text{C}$  eine deutliche Kontraktion resultiert<sup>[29]</sup>. Abbildung 13 B zeigt eine Reihe salzinduzierter Kontraktionen und Relaxationen am Beispiel der elastischen Matrix  $X^{20}$ -poly(VPGVG). Diese Befunde belegen, daß eine extrinsische chemische Änderung dazu verwendet werden kann, eine Kontraktion auszulösen, um nutzbare mechanische Arbeit zu verrichten. Man kann erwarten, daß alle Salze, einschließlich der in Abbildung 10 A gezeigten, die den  $T_c$ -Wert beeinflussen, auch eine Kontraktion induzieren können.

Wenn das proteinartige Polymer einen geladenen Rest wie eine Glu( $\text{COO}^-$ )-Seitenkette enthält, ist die Sensitivität des  $T_c$ -Wertes gegenüber der Salzkonzentration im niedrigen Konzentrationsbereich um eine Größenordnung höher (Luan und Urry, unveröffentlichte Daten). Beträgt die Polymerkonzentration  $40 \text{ mg mL}^{-1}$ , stellt man die Sensitivitätssteigerung bei Salzkonzentrationen bis 0.2 N fest. Bei höherer Konzentration ist der Koeffizient wieder  $15 \text{ K N}^{-1}$ . Ursache ist vermutlich eine schwache Ionenpaar-Bildung zwischen dem Natrium-Ion des Salzes und dem Carboxylat-Ion des proteinartigen Polymers. In diesem Fall sollte eine geringere Änderung der chemischen Energie ausreichen, um eine definierte mechanische Arbeit zu verrichten. Im weiteren wird ohne Berücksichtigung dieser Empfindlichkeitssteigerung die Effektivität eines Mechanismus, der auf Ladungs-Ladungs-Abstoßung basiert, mit der des  $\Delta T_c$ -Mechanismus verglichen.

#### 5.1.1.3. Durch Reduktion induzierte Kontraktion

An einer durch Bestrahlung mit 20 Mrad quervernetzten, *N*-Methylnicotinamid enthaltenden elastischen Matrix,  $X^{20}$ -poly[0.73(GVGVP), 0.27(GK(NMeN)GVP)], konnte beobachtet werden, daß die teilweise Reduktion mit Dithionit den Temperaturbereich, in dem eine thermisch induzierte Kontraktion erfolgt, absenkt. So zieht sich bei einer Temperatur von  $40^\circ\text{C}$ , wenn Dithionit zugegeben wird, die Matrix zusammen und hebt ein Gewicht an<sup>[30]</sup>. Da eine Reduktion auch elektrochemisch durchgeführt werden kann, werden diese Umformungen, wie in den Abbildungen 12 und 14 angegeben, als elektrochemische Umwandlungen bezeichnet.

#### 5.1.2. Umwandlung von Kompressionsenergie in mechanische Arbeit

In Abschnitt 4.3 wurde bereits der Druck als weitere extrinsisch auf das Polypeptid wirkende Variable vorgestellt, die den  $T_c$ -Wert speziell in proteinartigen Polymeren mit aromatischen Resten verändern kann. Aus der Erhöhung des Wertes für  $T_c$  bei Druckerhöhung und der experimentellen Wärmemenge dividiert durch die Übergangstemperatur wurde berechnet, daß das Volumen, das von einem Wassermolekül im Waserverband eingenommen wird, größer ist als das, welches ein Wassermolekül beansprucht, wenn es die am stärksten hydrophoben Reste, aromatische Reste wie die Phe(F)-, Tyr(Y)- und Trp(W)-Seitenketten umgibt<sup>[27]</sup>. Bei passender Temperatur und bei erhöhtem Druck dehnt sich die elastische Matrix, an der ein Gewicht hängt, und die aromatischen Reste werden von einer geordneteren, dichten Wasserschicht umgeben. Nimmt man den Druck zurück, gehen die geordneteren Wassermoleküle in den ungeordneteren Lösungsmittelzustand über, das Modellprotein faltet sich hydrophob, zieht sich dabei zusammen und hebt ein Gewicht an. Diese baromechanische Umwandlung wur-

de kürzlich beschrieben<sup>[31]</sup>. Bei der richtigen Temperatur ist somit eine geeignete konzipierte elastische Matrix eine auf Druck ansprechende molekulare Maschine.

In diesem Beispiel einer molekularen Maschine, die zwei Arten von Gibbs-Energien ineinander umwandeln kann, ist die intensive Größe „mechanische Kraft“ multipliziert mit der extensiven Größe „Weg“ (Bewegung des Gewichts gegen die Schwerkraft) die eine und die intensive Größe „Druck“ multipliziert mit der extensiven Größe „Volumenänderung“ die zweite dieser Energien.

## 5.2. Molekulare Maschinen zweiter Ordnung des $T_t$ -Typs

Als Beispiel für eine Energieumwandlung zweiter Ordnung des  $T_t$ -Typs betrachten wir die gequollene Matrix eines ungefalteten Polypeptids, das zum einen die oxidierte Komponente eines Redoxpaars in sich trägt, z. B. N-Methylnicotinamid, und zum anderen die geladene Gruppe eines chemischen Paars, z. B. (COO<sup>-</sup>), wobei die Zusammensetzung des proteinartigen Polymers so gewählt wurde, daß  $T_t$  gerade über der Betriebstemperatur liegt. Unter diesen Bedingungen würde sowohl eine Erniedrigung des pH-Wertes, um

COO<sup>-</sup> in COOH zu überführen, als auch die Reduktion des Nicotinamids, der prosthetischen Gruppe (Redoxpaar), zu hydrophober Faltung und Assoziation führen. Wird die oxidierte Gruppe reduziert, sollte die resultierende Faltung eine Verschiebung des pK<sub>a</sub>-Wertes der Carboxygruppe bewirken und unter geeigneten Bedingungen resultiere als „chemisches“ Ergebnis die Aufnahme von Protonen (eine Abnahme des chemischen Potentials der Protonen). Wenn dagegen der pH-Wert erniedrigt und so das Carboxylat-Ion protoniert wird, dann erwartet man, daß sich das elektrochemische Potential der oxidierten prosthetischen Gruppe zugunsten der reduzierten Spezies verschiebt, und das „elektrische“ Ergebnis könnte die Aufnahme von Elektronen sein. Jedes dieser Ereignisse könnte man als elektrochemische Umwandlung bezeichnen, so wie sie die Pfeile in Abbildung 12 verdeutlichen, die die Begriffe „elektrisch“ und „chemisch“ verbinden. Beide würden die hydrophobe Faltung nutzen, jedoch wäre die erzeugte Energie oder die geleistete Arbeit nicht mechanischer Natur. Eine elastische Matrix, konzipiert um eine elektrochemische Umwandlung zu erreichen, wäre nach unserer Bezeichnungsweise eine molekulare Maschine zweiter Ordnung des  $T_t$ -Typs.

Ähnliche Abläufe lassen sich auch für die anderen Energieumwandlungen zweiter Ordnung des  $T_t$ -Typs wie photo-

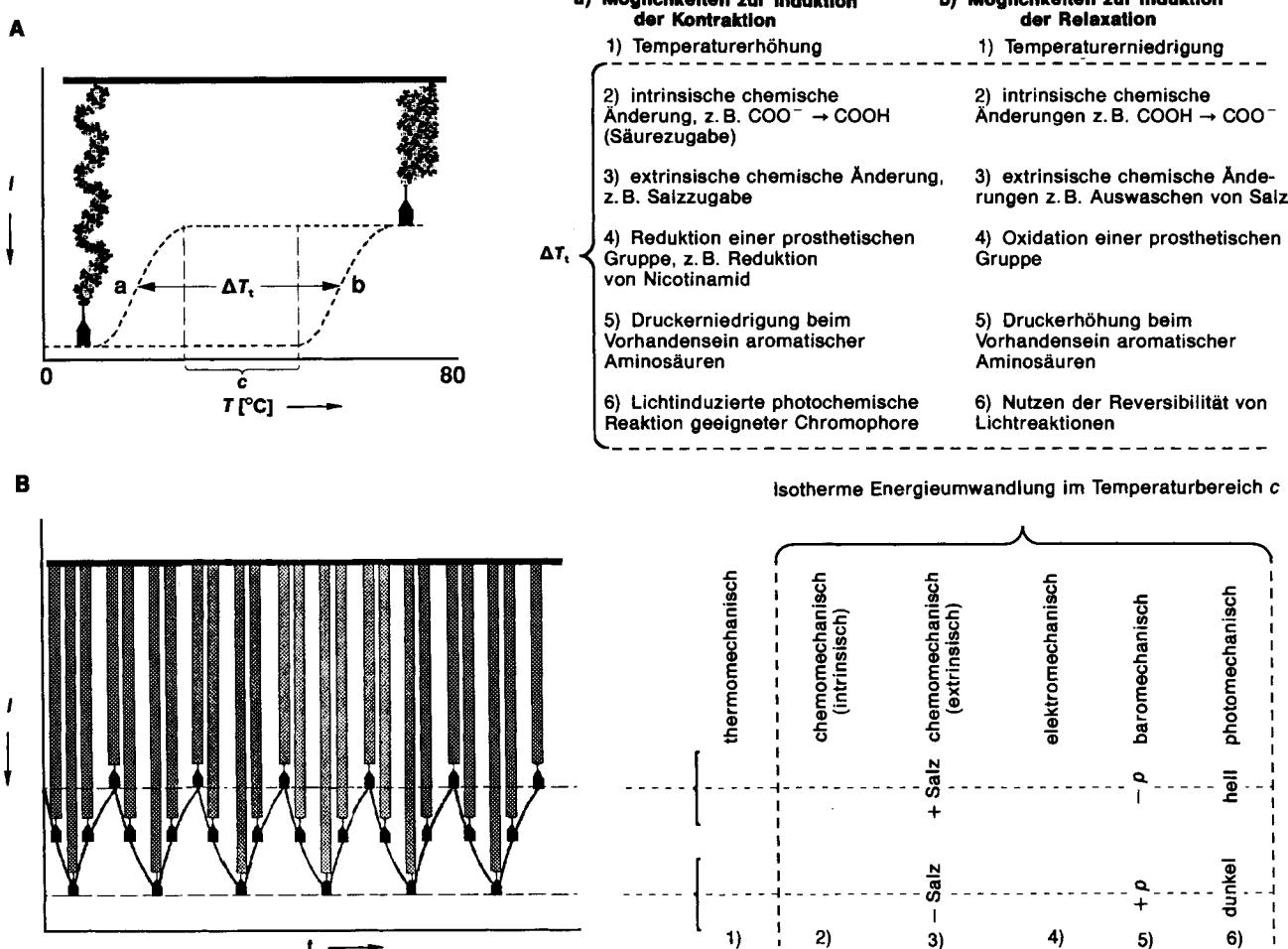


Abb. 14. Zusammenfassende Darstellung und aktueller Stand der Entwicklung des  $\Delta T_t$ -Mechanismus. A) Links ist die  $\beta$ -Spirale von poly(VPGVG) bei niedriger Temperatur in gestrecktem (ungefaltetem) Zustand und bei höherer Temperatur in kontrahiertem (gefaltetem) Zustand abgebildet. Der Temperaturbereich, in dem der Übergang erfolgt, ist mit  $\Delta T_t$  bezeichnet; der Temperaturbereich c markiert den Bereich maximaler Kontraktion. Rechts sind die Möglichkeiten,  $T_t$  zu beeinflussen, zusammengefaßt. B) Links: Schematische Darstellung eines elastischen, proteinartigen Polymeren, das im Temperaturbereich c reversibel kontrahiert und relaxiert. Rechts sind die zu den Punkten 1)–6) aus A gehörenden Energieumwandlungen und die dafür erforderlichen Maßnahmen aufgeführt. Die photochemische Reaktion kann den  $T_t$ -Wert sowohl erhöhen als auch erniedrigen; beides wurde bereits beobachtet.

chemische, photovoltaische und thermochemische, d. h. für alle paarweisen Energieumwandlungen, die nicht am Begriff „mechanisch“ in Abbildung 12 enden, formulieren.

Es gibt also zahlreiche Energieumwandlungen, die möglicherweise auf den grundlegenden  $\Delta T_c$ -Mechanismus zurückzuführen sind. Künftige Untersuchungen werden darauf abzielen, proteinartige Polymere und die entsprechenden experimentellen Geräte und Bedingungen für das jeweilige Polymer zu entwerfen, um diese Energieumwandlungen veranschaulichen zu können. Unseres Wissens sind das alle Energieumwandlungen, die in lebenden Organismen ablaufen. Die Leistungsfähigkeit und Wirtschaftlichkeit des  $\Delta T_c$ -Mechanismus bleibt dabei für jede einzelne Energieumwandlung noch zu bestimmen. Man kann aber annehmen, daß sich lebende Organismen durch den Prozeß der natürlichen Auslese in der Weise entwickeln, daß sie den ihren Anlagen entsprechend leistungsfähigsten Mechanismus zur Energieumwandlung nutzen. In Abbildung 14 ist eine Zusammenfassung des  $\Delta T_c$ -Mechanismus zur Umwandlung von Gibbs-Energien für molekulare Maschinen nullter und erster Ordnung des  $T_c$ -Typs gegeben.

## 6. Physikalische Grundlagen für die Energieumwandlungen vom $\Delta T_c$ -Typ

Aus physikalischer Sicht beruht der  $\Delta T_c$ -Mechanismus der Energieumwandlung auf einer Änderung des Hydratationsgrades im System. Für die Umwandlung chemischer Energie in mechanische Arbeit durch intrinsische chemische Änderungen bedeutet dies, daß hydrophobe und stärker polare Reste, z. B. Val-Seitenketten und Carboxylatgruppen als Bestandteile desselben amphiphilen Polymers, um die Hydratation konkurrieren. Als Teile desselben Moleküls unterliegen diese Gruppen Einschränkungen bezüglich ihres Abstandes. Da dieser nur über den Faltungszustand des Polymers verändert werden kann, ist es möglich, den Faltungs-/Entfaltungsprozeß zu steuern.

### 6.1. Wenn in amphiphilen Polymeren hydrophobe Hydratation dominiert

In diesem Fall resultiert unserer Meinung nach aus dem Vorherrschen der geordneteren Anordnung von Wassermolekülen um die hydrophoben Spezies eine für die Hydratation geladener Reste ungünstige Wasserstruktur. Die Gibbs-Energie der Hydratation der geladenen Reste ist ungünstiger (höher), und eine Ionisation wird damit unwahrscheinlicher. Dies zeigt sich experimentell in einer Hydrophobie-induzierten Erhöhung des  $pK_a$ -Wertes.

Das Polymer poly[0.8(VPGVG), 0.2(VPGEG)] hat in Wasser bei  $37^\circ\text{C}$  einen  $pK_a$ -Wert von 4.6; unter den gleichen Bedingungen liegt der  $pK_a$ -Wert des hydrophoberen Polymers poly[0.8(IPGVG), 0.2(IPGEG)] bei 6.0<sup>[32]</sup>. Mit einer optimal gewählten Primärstruktur lassen sich sogar noch größere Verschiebungen erzielen.

Gezielte Änderungen im Nanometer-Bereich können zu außerordentlichen  $pK_a$ -Verschiebungen führen. In Abbildung 15 sind  $\beta$ -Spiralen von poly(GVGVP) und Polypentapeptiden, die sich von poly(GVGVP) durch Einbau von

Glu(E)- und Phe(F)-Resten ableiten, schematisch wiedergegeben.

Im Polypeptid von Abbildung 15 D sind die Phe(F)-Reste optimal um die Glu(E)-Reste angeordnet. Abbildung 16 enthält Säure-Base-Titrationsdiagramme für die Polypeptide aus Abbildung 15 B–D (I, IV bzw. V) sowie für zwei weitere Polypeptide, die sich aus denselben Pentameren wie die in Abbildung 15 C und D zusammensetzen, nur daß die Pentamere randomisiert vorliegen (II bzw. III)<sup>[33]</sup>. Es zeigt sich,

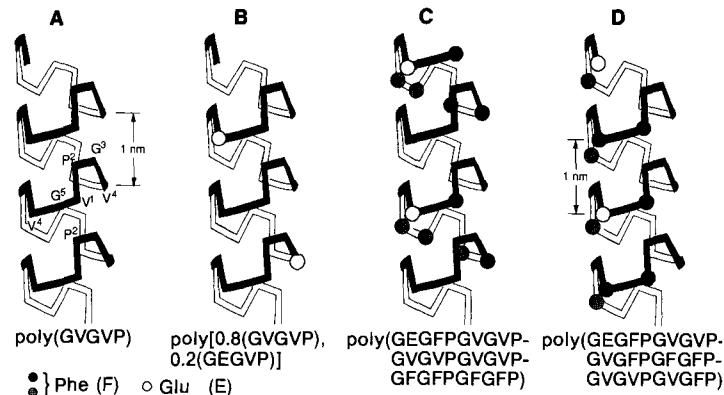


Abb. 15. Schematische Darstellungen der  $\beta$ -Spiralstruktur von Polypeptiden. A) poly(GVGVP). B) Willkürliche Verteilung von Glu(E)-Resten in 20% der poly(GXGVP)-Pentamere. C) Das Polytricosapeptid poly(GEGFPGVGVPGVGVPGVGPGEFPFGFP), in dem die Phe(F)-Reste in einer festen Beziehung zu den Glu(E)-Resten stehen. D) Das Polytricosapeptid poly(GEGFPGVGVPGVGFPFGFPGVGPGVGP), in dem durch die spezielle Faltung der  $\beta$ -Spirale mit drei Pentameren pro Windung die Phe-Reste optimal um die Glu-Reste angeordnet sind (aus [33]).

daß die wegen der  $\beta$ -Spiralstruktur optimale Ausrichtung der Phe(F)-Reste im Polymer V zu einem bemerkenswerten  $pK_a$ -Wert für den Glu(E)-Rest von 8.1 in Wasser bei  $20^\circ\text{C}$  führt; unter denselben Bedingungen weist Polymer I einen  $pK_a$ -Wert von 4.3 auf. Als Ursache dafür, daß die Hydratation der COO<sup>-</sup>-Gruppe im Polymer V so ungünstig ist, kann die Nähe der aromatischen (Phenyl-) Seitenketten, die von einer wohlstrukturierten Hydrathülle umgeben sind, gesehen werden.

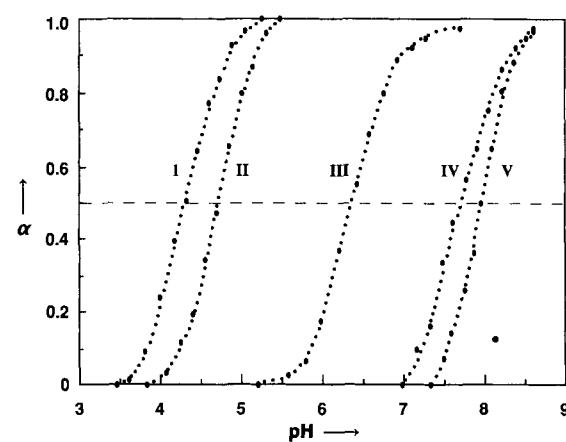


Abb. 16. Die Säure-Base-Titrationskurve für die Polypeptide aus Abbildung 15 B–D (I, IV und V) sowie für je ein Isomer von IV und V, die durch direkte Polymerisation der Pentamereinheiten und nicht über die Tricosamere synthetisiert wurden (II bzw. III), belegen die strukturabhängige Hydrophobie-induzierte  $pK_a$ -Verschiebung (aus [33]).  $\alpha$  = Ionisationsgrad.

Eine Abschätzung der repulsiven Gibbs-Hydratationsenergie erhält man aus dem chemischen Potential  $\mu$  der Protonen, das notwendig ist, um die Glu-Seitenkette in einem Zustand 50proz. Ionisation zu halten. Mit  $\mu = RT\ln a$  ergibt sich für geringe Protonenkonzentrationen  $[H^+]$  als Potential  $\mu = RT\ln[H^+]$ , da für diesen Grenzfall die Aktivität  $a$  der Protonen ihrer Konzentration  $[H^+]$  gleichgesetzt werden kann. Umformung auf den dekadischen Logarithmus liefert  $\mu = 2.3 RT \lg[H^+]$ , und mit  $pH = -\lg[H^+]$  erhält man für das chemische Potential  $\mu = -2.3 RT pH$ . Die Änderung des chemischen Potentials der Protonen,  $\Delta\mu$ , die nötig ist, die 50proz. Ionisation (d.h.  $pK_a = pH$ ) der Glu-Seitenkette zu erhalten, ist nun einfach durch  $\Delta\mu = -2.3 RT\Delta pK_a$  gegeben. Da  $R = 1.987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , ist  $RT$  bei  $20^\circ\text{C}$  ( $293 \text{ K}$ )  $582 \text{ cal mol}^{-1}$ , und mit einem  $\Delta pK_a$  von  $4.3 - 8.1 = -3.8$  erhält man für  $\Delta\mu = 5 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Es handelt sich dabei um die durch Hydratation vermittelte, repulsive Gibbs-Energie  $\Delta G_{ap}$  apolar-polarer Wechselwirkungen, die auch das Entfalten des Peptids bei Ionisation der Glu-Seitenketten auslöst. Ein Versuch,  $\Delta G_{ap}$  graphisch zu veranschaulichen, wird in Abbildung 17 gemacht<sup>[34]</sup>.

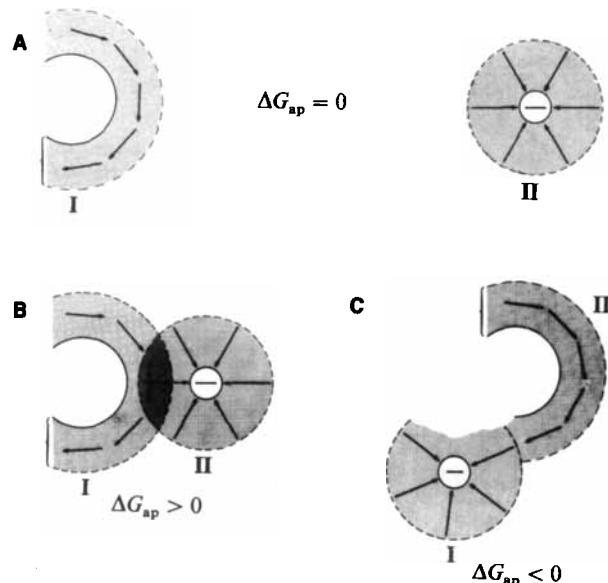


Abb. 17. Zusammenhang zwischen Entfernung und  $\Delta G_{ap}$  für hydrationsvermittelte apolar-polare Wechselwirkungen. Wassermoleküle werden als Dipolmoment-Vektoren dargestellt. Bei hydrophober Hydratation stehen die Wasservektoren tangential zur Oberfläche des hydrophoben Bereichs I, während sie auf negativ geladene Gruppen II direkt gerichtet sind. A) Bei großem Abstand gibt es keine Wechselwirkung. Jede Spezies gewinnt ihre volle Gibbs-Hydratationsenergie. B) Überlappen der Hydrationshüllen der hydrophoben und der polaren Reste, stellt man einen Verlust an Gibbs-Hydratationsenergie fest, und  $\Delta G_{ap}$  ist positiv. Dies kann, wenn die apolaren Gruppen dominieren, die Hydrophobie-induzierten  $pK_a$ -Verschiebungen hervorrufen: Wenn sich geladene Spezies bilden, kommt es zu einer Zerstörung der Strukturierung der hydrophoben Hydrationshülle. C) Besondere Orientierung apolarer und polarer Bereiche, die Wassermolekülen gleichzeitig beide Arten der Hydratation ermöglicht, so daß  $\Delta G_{ap}$  negativ wird. Man kann diesen Effekt an der Struktur von Crambin im Kristall (Abb. 4 C) feststellen (aus [34]).

## 6.2. Wenn in amphiphilen Polymeren ionische Hydratation dominiert

In diesem Fall wird unserer Meinung nach die Ordnung der Wassermoleküle um die hydrophoben Bereiche entscheidend dadurch gestört, daß sie sich ausrichten, um benachbarte geladene Gruppen zu hydratisieren. Mit dem Verlust

der strukturierten Wasseranordnung um hydrophobe Reste geht auch die Gibbs-Energie als treibende Kraft für den inversen Temperaturübergang, d.h. für die hydrophobe Faltung, verloren. Deshalb entfaltet sich das Polymer.

Erinnern wir uns, daß die Hydratation hydrophober Reste exotherm,  $\Delta H(\text{Hydratation})$  also negativ ist und daß trotzdem die Löslichkeit eines solchen Stoffes begrenzt ist, weil die hydrophobe Hydratation strukturbildend wirkt, wobei weniger geordnete Wassermoleküle in einen geordneteren Zustand übergehen, so daß  $\Delta S(\text{Hydratation})$  negativ ist. Die Löslichkeit ist daher eingeschränkt, weil  $-T\Delta S(\text{Hydratation})$  positiv und dem Betrag nach dem negativen  $\Delta H(\text{Hydratation})$  ähnlich ist. Im Polymer entspricht Löslichkeit dem ungefalteten Zustand, und die Unlöslichkeit der hydrophobe Reste enthaltenden Spezies ist mit dem gefalteten Zustand gleichzusetzen. Faltung und Entfaltung des Polymers folgen somit aus einer Änderung der relativen Größe beider Terme. Liegt die geladene Spezies vor, ist geringer strukturiertes Wasser um die hydrophoben Reste zu erwarten;  $\Delta S(\text{Hydratation})$  wäre für den Übergang kleiner, und eine höhere Temperatur  $T$  würde benötigt, bevor  $-T\Delta S(\text{Hydratation})$  dominieren würde.  $T_i$  sollte deshalb mit steigender Zahl an geladenen Resten ansteigen. Daß die Übergangstemperatur tatsächlich mit zunehmendem Ionisationsgrad  $\alpha$  steigt, ist in Abbildung 18 deutlich zu erkennen<sup>[35]</sup>. Parallel zur Erhöhung des Ionisationsgrades und

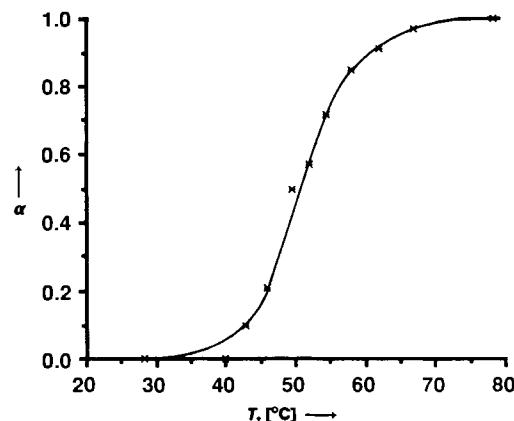


Abb. 18. poly[0.8(VPGVG), 0.2(VPGEG)] weist in 0.15 N NaCl einen vom Ionisationsgrad  $\alpha$  abhängigen  $T_i$ -Wert auf. Die Säure-Base-Titration wurde bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt (aus [35]).

zum  $T_i$ -Anstieg nimmt die Wärmemenge, die zur Zerstörung der geordneten Wasserstruktur um hydrophobe Reste benötigt wird, ab (Abb. 19)<sup>[36]</sup>. Selbst wenn nur zwei  $\text{COO}^-$ -Gruppen unter 100 Resten vorhanden sind, beträgt diese endotherme Wärmemenge nur noch ein Viertel. Unserer Deutung zufolge zerstören also zwei  $\text{COO}^-$ -Gruppen unter 100 Resten, um ihre polare Hydratation zu erreichen, effektiv drei Viertel der geordneten Struktur des Wassers, welches die hydrophoben Reste umgab.

Wie man aus der Hydrophobieskala in Tabelle 1 erkennt, besteht eine weitgehende Kontinuität von den am stärksten hydrophoben Resten, Trp(W), hin zu den polarsten Gruppen,  $\text{PO}_4^{2-}$ . Geladene Spezies konkurrieren effektiver und extremer um die Hydratation. Qualitativ kann jedoch unser Argument immer angeführt werden, wenn eine intrinsische

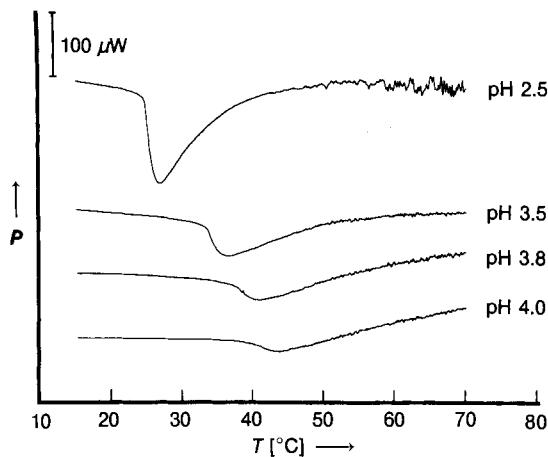


Abb. 19. Differentialthermoanalyse von poly[0.8(VPGVG), 0.2(VPGEG)] in Wasser bei mehreren pH-Werten. Bei pH 2.5, wenn im wesentlichen alle Glu-Reste als COOH vorliegen, beträgt die endotherme Wärme, die benötigt wird, um die Struktur der hydrophoben Hydratation zu zerstören, 0,97 kcal pro mol Pentamer. Wird der pH-Wert und damit die Zahl der  $\text{COO}^-$ -Gruppen erhöht, so steigt auch in Einklang mit den in Abbildung 18 gezeigten Daten die Übergangstemperatur, und die endotherme Wärme des Übergangs nimmt deutlich ab. Schon bei weniger als 2  $\text{COO}^-$ -Gruppen auf 100 Reste (pH 4.0) reduziert sich die zur Zerstörung der Struktur der hydrophoben Hydratation benötigte Wärmemenge auf 0,27 kcal pro mol Pentamer (aus [36]).  $P$  = Wärmefluß; negativer Peak = endothermer Prozeß; positiver Peak = exothermer Prozeß.

chemische Änderung zu einem polareren Rest in einem Anstieg von  $T_c$  resultiert.

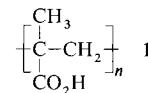
## 7. Relative Effizienz für die Umwandlung chemischer Energie in mechanische Arbeit (Bewegung)

Man weiß viel über die Muskelkontraktion im Rahmen des Gleitfasermodells, nach dem Actinfilamente über Myosinstränge gleiten<sup>[37]</sup> und ein drittes elastisches Filament, Titin, wahrscheinlich für die Aggregation von Bedeutung ist<sup>[38]</sup>. Dennoch ist man sich noch nicht über die Ursachen der Kraftentstehung einig. Das weit verbreitete „Ruderboot“-Modell wird durch zwei Gruppen von Wissenschaftlern angegriffen, die Längenänderungen und Kraftentstehung den Myosinsträngen<sup>[39]</sup> bzw. den Actinfilamenten zuschreiben<sup>[40]</sup>. Die Berechnung der Effizienz erfordert darüber hinaus mehr als die Berücksichtigung des in den Filamenten verbrauchten ATP; man muß auch die ATP-Äquivalente berücksichtigen, die für die wichtigen Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erforderlich sind.

Es ist durchaus möglich, die Effizienz von Modellsystemen zu vergleichen. Der Ladungs-Ladungs-Abstoßungsmechanismus bei Polymethacrylsäure und der salzinduzierte Zusammenbruch der Collagenstruktur sind mit Phänomenen in proteinartigen Polymeren vergleichbar. Ein Maß für die Effizienz,  $\eta$ , kann man z. B. erhalten, indem man die mechanische Arbeit  $w$ , d. h. das Produkt aus der Kraft  $f$  und der Längenänderung  $\Delta L$ , durch die chemische Energie  $\Delta\mu\Delta n$  dividiert, die aufgebracht werden muß, um die Arbeit zu verrichten.  $\Delta\mu$  ist dabei die zuvor diskutierte Änderung des chemischen Potentials und  $\Delta n$  die der intrinsischen Änderung entsprechende Molzahländerung.  $\Delta n$  kann z. B. in mol die Zahl der in Carboxygruppen (COOH) umgewandelten Carboxylatgruppen sein. Der Ausdruck für den Wirkungsgrad  $\eta$  ergibt sich dann zu Gleichung (a).

$$\eta = \frac{f\Delta L}{\Delta\mu\Delta n} \quad (a)$$

Glücklicherweise beruht Polymethacrylsäure **1** auf demselben chemischen Paar (COOH/COO<sup>-</sup>) wie das proteinartige Polymer poly[0.8(VPGVG), 0.2(VPGEG)], und die querg



vernetzten Matrices beider Verbindungen können sich in analoger Weise auf ungefähr die Hälfte ihrer gedehnten Länge zusammenziehen und dabei Gewichte anheben, die etwa das Tausendfache ihres Trockengewichts betragen; somit ergibt sich für den Zähler  $f\Delta L$  ein ähnlicher Wert<sup>[41-43]</sup>. Unterschiede gibt es dagegen in der zur Verrichtung dieser Arbeit benötigten chemischen Energie.

Bei Polymethacrylsäure erreicht man eine Dehnung aufgrund von Ladungs-Ladungs-Abstoßungen, wenn 50 bis 60 % der Carboxyreste in COO<sup>-</sup> umgewandelt sind; die Aufhebung des gestreckten Zustandes und damit eine Kontraktion ist bei 0 bis 10 % Ionisation abgeschlossen<sup>[41-43]</sup>, d. h. es müssen um die 40 Carboxylatgruppen pro 200 Rückgrataten protoniert werden, um die Kontraktion zu erreichen. In X<sup>20</sup>-poly[0.8(VPGVG), 0.2(VPGEG)] dagegen brauchen dafür nur 4 Carboxylatgruppen pro 300 Rückgratatome protoniert zu werden. Folglich ist  $\Delta n$  im Polymethacrylsäuresystem mehr als zehnmal so groß. Auch die Änderung des chemischen Potentials der Protonen,  $\Delta\mu$ , die für das Erreichen eines bestimmten Ionisationsgrades nötig ist, ist – wie in Abbildung 20 verdeutlicht – im Fall von Ladungs-Ladungs-Abstoßung (Polymethacrylsäure) größer<sup>[11]</sup>. Um von 50–60

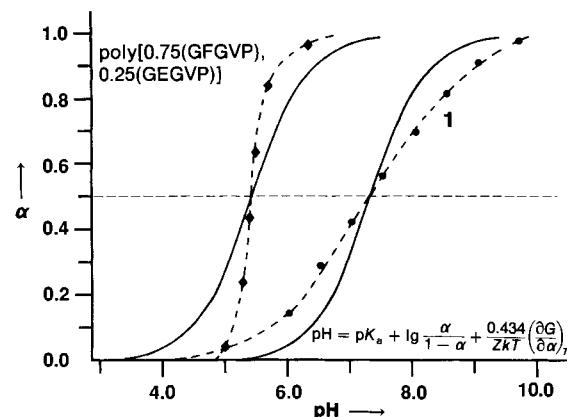


Abb. 20. Säure-Base-Titrationskurven. Für poly[0.75(GFGVP), 0.25(GEGVP)] ist die Steigung der Kurve größer als die der Vergleichskurve (durchgezogene Linie), während sie für Polymethacrylsäure **1** kleiner ist. Die Vergleichskurven wurden aus den ersten beiden Termen der unten rechts angegebenen Gleichung berechnet. Ob die Meßkurve steiler oder flacher als die Vergleichskurve ausfällt, hängt vom Vorzeichen von  $(\delta G/\delta\alpha)_T$  ab, das für die apolar-polare Abstoßung positiv und für die Ladungs-Ladungs-Abstoßung negativ ist (aus [1]).

auf 0–10 % Ionisation zu kommen, muß für Polymethacrylsäure das chemische Potential um ungefähr 2 pH-Einheiten geändert werden, weil negative Kooperativität die Titrationskurve beeinflußt<sup>[1, 42]</sup>. Im proteinartigen Polymer zeigt die Titrationskurve eine positive Kooperativität, und schon

die Änderung des pH-Wertes um den Bruchteil einer Einheit genügt, um den Ionisationsgrad von 50–60 auf 0–10% zu drücken. Dieser Vergleich ist in Schema 1 zusammengefaßt.

$\eta_{ee}$  = Effizienz der Ladungs-Ladungs-Abstoßung (wie an Polymethacrylsäure exemplarisch gezeigt)

w:  $\Delta L \approx 0.5$ ;  $f \approx 1000 \times$  Trockengewicht

$\Delta n$ : > 40 ( $\text{COO}^- \rightarrow \text{COOH}$ ) pro 200 Rückgratatome

$\Delta\mu$ :  $(\Delta\alpha \approx 0.6 - \Delta p\text{H} \approx 2.0) \approx 2.8 \text{ kcal mol}^{-1}$

$\eta_{ap}$  = Effizienz der apolar-polaren Abstoßung (wie an  $X^{20}\text{-poly}[4(\text{VPGVG})\text{-VPGEG}]$  exemplarisch gezeigt)

w:  $\Delta L \approx 0.5$ ;  $f \approx 1000 \times$  Trockengewicht

$\Delta n$ : 4 ( $\text{COO}^- \rightarrow \text{COOH}$ ) pro 300 Rückgratatome

$\Delta\mu$ :  $(\Delta\alpha \approx 0.8 - \Delta p\text{H} \approx 0.7) \approx 0.94 \text{ kcal mol}^{-1}$

Resultat:  $\frac{\eta_{ap}}{\eta_{ee}} > 10$

Schema 1. Vergleich der Effizienz chemomechanischer Umwandlungen. Zur Definition von  $\eta$  siehe Gleichung (a) und den zugehörigen Text.

Als Ergebnis läßt sich festhalten, daß die Umwandlung chemischer Energie in mechanische Arbeit nach dem  $\Delta T_t$ -Mechanismus mehr als zehnmal so effizient ist wie die durch Ladungs-Ladungs-Abstoßung.

Man muß dazu anmerken, gerade weil Polymethacrylsäure als Modell für Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen verwendet werden kann, daß inverse Temperaturübergänge, die als untere kritische Lösungstemperatur (LCST: Lower Critical Solution Temperature) bezeichnet werden, in Polymeren wie poly(*N*-Isopropylacrylamid) nachgewiesen wurden. Für eine umfassende Übersicht sei auf Schild<sup>[44]</sup> verwiesen. Man hat dort ähnliche Eigenschaften aufgrund des ausgewogenen Verhältnis apolarer und polarer Gruppen beobachtet, stieß dabei aber nicht auf einen Mechanismus des  $\Delta T_t$ -Typs, möglicherweise weil die Zusammensetzung nicht so gut kontrolliert werden konnte.

Die salzgetriebene Kontraktion läßt sich bei  $X^{20}\text{-poly(VPGVG)}$  sehr gut auslösen, wenn man von 0 auf 1 N NaCl übergeht; selbst eine Änderung von 0 auf 0.15 N NaCl induziert bereits eine recht deutliche Kontraktion<sup>[28]</sup>. Im Falle von Collagen benötigt man dagegen Harnstoff oder spezielle Salze wie LiBr und NaSCN. Diese Lösungszusätze erniedrigen die Temperatur, bei der es zur Denaturierung kommt. Bei LiBr als dem am besten untersuchten Beispiel entsprach 0 bis 0.3 N dem niederkonzentrierten und 11.25 N dem hochkonzentrierten Bereich<sup>[45]</sup>. Wieder ist eine über eine Größenordnung höhere Änderung des chemischen Potentials erforderlich, um im Collagen-Modell eine Kontraktion zu bewirken.

## 8. Der $\Delta T_t$ -Mechanismus und Einblicke in einige biologische Geheimnisse

Die bisher vorgestellten Effekte, die durch Änderung der Protonenkonzentration und durch das Äquivalent, eine Änderung des  $pK_a$ -Wertes einer protonierbaren funktionellen Einheit, hervorgerufen werden können, waren anschauliche Beispiele zur Erläuterung des  $\Delta T_t$ -Mechanismus. Daß Protonengradienten in lebenden Organismen fundamentale Bedeutung zukommt, wird heute allgemein akzeptiert. So wird zum Beispiel in dem umfassenden Biochemie-Lehrbuch von Stryer<sup>[46a]</sup> hervorgehoben, daß „... proton gradients are a

central interconvertible currency of free energy in biological systems“<sup>[46b]</sup>. Und tatsächlich wird im „Stryer“ gezeigt, daß Protonengradienten all jenen Formen von Gibbs-Energie gleichzusetzen sind, die in Abbildung 12 den Endpunkten der Pfeile entsprechen. Die von Druck beeinflußten Umwandlungen sind hiervon ausgenommen.

### 8.1. Der $\Delta T_t$ -Mechanismus bei der Proteininfaltung und -assoziation

Entsprechend dem  $\Delta T_t$ -Mechanismus erhöht z. B. die Verringerung der Protonenkonzentration die Zahl der polaren  $\text{COO}^-$ -Gruppen, was nach unserer Interpretation die geordnete Wasserstruktur rund um hydrophobe Reste zerstört und zu einem Verlust der treibenden Kraft für die hydrophobe Faltung führt. An dieser Stelle soll nun die Analogie zwischen der polaren  $\text{COO}^-$ -Gruppe und dem sogar noch polareren Phosphatrest  $\text{PO}_4^{2-}$  aufgezeigt werden. Da der Phosphatrest nach der  $T_t$ -Hydrophobieskala (siehe Tabelle 1) wesentlich polarer ist, scheint es durchaus schlüssig, daß in der Thylakoidmembran von Chloroplasten „About three protons flow through the  $\text{CF}_1\text{-CF}_0$  complex per ATP synthesized ...“<sup>[47]</sup>. ATP, Adenosintriphosphat, ist in lebenden Organismen die verbreitetste Energiespeicherform, die meist dazu verwendet wird, Proteine unter Bildung von ADP, Adenosindiphosphat, zu phosphorylieren und sie so zu aktivieren.

#### 8.1.1. Einfluß der Phosphorylierung auf elementare Aspekte der Proteininfaltung

Um den  $\Delta T_t$ -Mechanismus der Proteininfaltung zu veranschaulichen, betrachten wir ein muschelförmiges, globuläres Protein, das in geöffnetem oder in geschlossenem Zustand vorliegen kann (Abb. 21 A). Die Bedingungen seien so gewählt, daß  $T_t$  unter der Betriebstemperatur liegt. Deshalb liegt das Gleichgewicht auf der Seite des hydrophob gefalteten, geschlossenen Zustands. Bei einer Öffnung werden die hydrophoben Bereiche von wohlstrukturiertem Wasser umgeben, was aber ungünstig ist, da sich das System über der Übergangstemperatur befindet. Wird nun eine Hydroxygruppe nahe der Öffnungsspalte phosphoryliert, so ist die Hydrationsneigung des negativ geladenen Phosphatrestes so groß, daß die Bildung einer geordneten Wasserstruktur

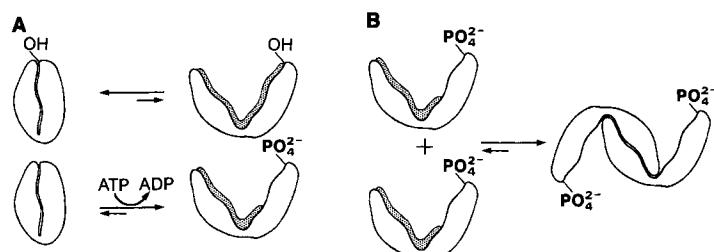


Abb. 21. A) Phosphorylierungsinduzierte Entfaltung am Beispiel eines hypothetischen muschelförmigen, globulären Proteins. Vor der Phosphorylierung liegt das Gleichgewicht auf der linken, nach der Phosphorylierung durch ATP auf der rechten Seite, ohne daß die Temperatur geändert wird. Für Einzelheiten siehe Text. B) Phosphorylierungsinduzierte Dimerisierung; für Einzelheiten siehe Abschnitt 8.1.3. Die punktierten Bereiche symbolisieren in A und in B Bereiche hydrophober Hydratation.

um die unmittelbar benachbarten hydrophoben Gruppen verhindert wird. Die Temperatur für den hydrophoben Übergang wird über die Betriebstemperatur hinaus erhöht, und das Gleichgewicht wird zugunsten des offenen Zustands verschoben.

Der Einfluß der Phosphorylierung auf  $T_c$  konnte am Beispiel des elastischen, proteinartigen Polymers poly[30-(IPGVG), (RGYSLG)] gezeigt werden<sup>[24]</sup>, wobei RGYSLG die cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase-Bindungsregion des Enzyms Lysozym ist<sup>[48, 49]</sup>. Wie in Abbildung 22 dargestellt, liegt die Übergangstemperatur  $T_c$  des Testpolymers in dem für die Kinase geeigneten Puffersystem bei 18 °C. Bei Zugabe der Proteinkinase und von ATP wird der Ser-Rest in RGYSLG zu etwa 50% phosphoryliert, und die Temperatur für die hydrophobe Faltung und Assoziation steigt auf 32 °C an<sup>[24]</sup>. Somit würde bei einer mittleren Temperatur von 25 °C ein Phosphatrest auf 300 Aminosäureresten die Entfaltung des elastischen, proteinartigen Polymers auslösen. Im Falle von poly[0.8(IPGVG), 0.2 (IPGEG)] erhöhte die Bildung von 4 COO<sup>-</sup>-Gruppen pro 100 Aminosäureresten die Übergangstemperatur um 40 K<sup>[50]</sup>. Berücksichtigt man die Hydrophobieskala von Tabelle 1, so erkennt man, daß ca. vier COO<sup>-</sup>-Gruppen einem Phosphatrest äquivalent sind, und dies ist wiederum, wie am Beispiel der Thylakoidmembran von Chloroplasten gezeigt, mit einem Verhältnis von drei bis vier Protonen pro eingeführtem Phosphatrest konsistent<sup>[43]</sup>.

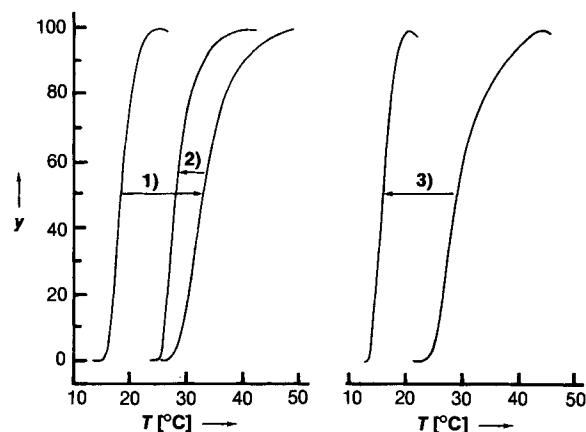


Abb. 22. Einfluß der Proteinkinase-Phosphorylierung des Serinbausteins in RGYSLG auf die Temperatur  $T_c$  des inversen Temperaturübergangs von poly[30(IPGVG),(RGYSLG)]. 1) Phosphorylierung mit Hilfe einer Proteinkinase; 2) Protonierung (pH 7.3 → pH 2.0); 3) Dephosphorylierung mit Hilfe einer Phosphatase (aus [24]).  $y$  = prozentuale Trübung.

### 8.1.2. Hitzeschockproteine, Chaperone und wie die Biologie die hydrophobe Faltung reguliert

Wenn *E. coli*-Bakterien einem abrupten Temperaturanstieg ausgesetzt werden, reagieren sie mit der Produktion spezieller Proteine, der Hitzeschockproteine (hsp). In Einklang damit, daß eine Temperaturerhöhung die gefaltete Struktur begünstigt, spielen die hsp für den Transport und die Faltung von Proteinen immer dann eine herausragende Rolle, wenn hydrophobe Assoziationen ausschlaggebend sind. Im Rahmen des Modells inverser Temperaturübergänge und des  $\Delta T_c$ -Mechanismus fördert eine Temperaturerhöhung die hydrophobe Faltung und könnte so das Fal tungsgleichgewicht in der Art verschieben, daß Proteine in

inaktiven, hydrophob determinierten Zuständen vorliegen. Diese Überlegung lenkte das Interesse auf eine Reihe von Proteinen, Chaperone genannt<sup>[51]</sup>, aus anderen Organismen, die über eine ATP-Modulation der hydrophoben Assoziation die Proteinfaltung beeinflussen.

Der Transport im Zellkern codierter Proteine durch die Lipiddoppelschicht der äußeren Mitochondrienmembran und die Erzeugung des richtigen Faltungszustands der Lipidschicht der inneren Mitochondrienmembran sind komplexe Prozesse, die auf der Modulation hydrophober Assoziationsbildung beruhen<sup>[52, 53]</sup>. Die 70 kDa Chaperone, die diese Aufgabe ausführen, werden durch ATP-Hydrolyse freigesetzt. Vermutlich zerstörte dabei eine Phosphorylierung das hydrophobe Assoziat. Daß Phosphorylierung tatsächlich die hydrophobe Assoziation beeinflußt, wird anhand einer ganzen Reihe chaperonunterstützter Proteinsysteme deutlicher, in denen hydrophobe Faltung direkt eine Rolle spielt.

Bei der Denaturierung und Rückfaltung eines Proteins oder bei der Faltung eines Proteins im Anschluß an seine Synthese geht man davon aus, daß das aktive Protein dem thermodynamisch günstigeren Zustand entspricht<sup>[54]</sup>. Trotzdem können Proteine auch in metastabilen Zuständen fixiert werden. So können sich metastabile hydrophobe Assoziate mit Übergangstemperaturen weit unter der physiologischen Temperatur bilden. Nach unserer Interpretation besteht die Aufgabe der Chaperone darin, diese hydrophoben Bereiche eines Proteins so lange zu schützen, bis die richtigen Bedingungen herrschen, damit sie günstige Assoziate bilden können. Die Untersuchungen von Landry und Giersch deuten darauf hin, daß Chaperon 60 an die hydrophoben Seiten einer  $\alpha$ -Helix des Enzyms Rhodanese bindet<sup>[55]</sup>. Aus Studien zur Wechselwirkung zwischen Chaperon 70 und T4-Lysozym schlossen Matsumura et al.<sup>[56]</sup>, daß bevorzugt aliphatische Reste involviert sind. Dabei konnte eine Proportionalität zwischen den wechselwirkenden Resten und der Wahrscheinlichkeit, diese im hydrophoben Innern des Proteins zu finden, festgestellt werden.

In Anbetracht der Tatsache, daß die Assoziate aus Chaperonen und schwierig zu faltenden Proteinen hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen basieren, gibt es gute Gründe dafür, daß die Assoziation durch die Hydrolyse von ATP, z. B. durch Phosphorylierung, gesteuert wird. Ein Zitat aus dem Übersichtsartikel von Lorimer<sup>[51]</sup> besagt: „The formation of native Rubisco (dimeric ribulose biphosphate carboxylase), from the binary chaperonin 60-Rubisco complex, requires the presence of chaperonin 10 and Mg ATP<sup>[57, 58]</sup>. The hydrolysis of ATP appears necessary because non-hydrolyzable analogs do not support the reaction ...“. Lorimer fährt in seiner Übersicht fort: „Of particular interest is the striking similarity between the structures of muscle actin (375 residues) and the ATPase fragment (386 residues) of chaperone 70<sup>[59]</sup>. This has prompted the intriguing idea that both proteins may share a similar mechanism for coupling the hydrolysis of ATP to the association-dissociation of protein-protein complexes.“ Schließlich findet man in Lorimers Zusammenfassung: „Although this permits the mechanism of ATP hydrolysis to be understood at the atomic level, the manner in which this is coupled to folding, assembly or release of the target protein remains obscure“. Der vorliegende Übersichtsartikel wird hoffentlich diese Unklarheit ausräumen. Die ATP-Hydrolyse beeinflußt z. B. durch Phosphorylierung, Faltung und Assoziation in der Art, daß sie

die thermodynamisch treibende Kraft für die hydrophobe Assoziation wie in Abbildung 21 A beschrieben ausschaltet.

Die Proteinkonstrukte können so beschaffen sein, daß eine Phosphorylierung entweder hydrophobe Faltung und Assoziatbildung stört oder, wie in Abschnitt 8.1.3 gezeigt, hydrophobe Assoziation fördert.

### 8.1.3. Elementare Beschreibung der Proteinassoziation

Die Assoziation/Dissoziation eines Filaments, wie sie in Abbildung 23 gezeigt ist, läßt sich als eindrucksvollstes Beispiel für den Einfluß der Phosphorylierung auf hydrophobe Assoziation anführen. Die Proteinuntereinheiten, die nicht in sehr vielen verschiedenen Konformationen vorliegen können, sind an jedem Ende mit hydrophoben Oberflächen abgedeckt, die durch Phosphorylierung gestört werden können.

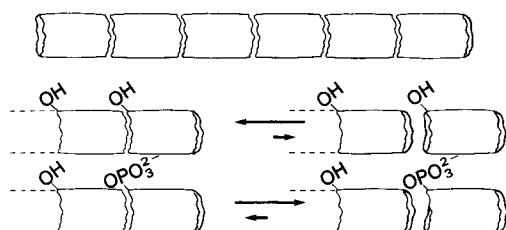


Abb. 23. Darstellung der Modulation der Filamentassoziation bei globulären Proteinen, die nur eine einzige Konformation einnehmen können. Oben: Die Enden der globulären Proteine sind hydrophob, so daß ihre Assoziation (Mitte) das Ergebnis eines inversen Temperaturübergangs wäre. Es konnte gezeigt werden, daß eine Phosphorylierung das Gleichgewicht zu ungünstigen der Filamentbildung verschiebt, d. h. Phosphorylierung führt zur Dissoziation (unten). Dies ist der einfachste Fall. Oft treten jedoch zusätzlich konformativ Veränderungen auf, so daß eine Phosphorylierung, wie in Abbildung 24 gezeigt, auch zur Assoziation führen kann (aus [88]). Die schattierten Bereiche symbolisieren Hydrathüllen.

Wenn das Protein, wie in Abbildung 21 A dargestellt, in zwei Zuständen vorliegen kann, gibt es noch weitere Möglichkeiten. Selbst im phosphorylierten Zustand gibt es noch hydrophobe Oberflächen, mit einer geordneten hydrophoben Hydratationssphäre. Wie in Abbildung 21 B dargestellt, kann es zu einer phosphorylierungsinduzierten, hydrophoben Dimerisierung kommen, sofern die verbleibenden funktionellen hydrophoben Oberflächen im offenen Zustand komplementär sind. Bei komplexeren Strukturen, die mehrere Konformationen einnehmen können und komplexe Oberflächen exponieren, kann z. B. die Filamentbildung durch Phosphorylierung induziert werden. So könnte die Bindung von GTP, einem Analogon des ATP, beim Wachstum und der Verkürzung von Mikrotubuli<sup>[60–62]</sup> eine Entfaltung hervorrufen. Dadurch werden hydrophobe Oberflächen, die das Tubuliwachstum fördern, exponiert, während die Umwandlung in das weniger polare GDP mit nur zwei Phosphatresten zur Bildung stabilerer Dimere führen könnte, welche, sobald sie dissoziieren, eine Verkürzung der Tubuli induzieren.

### 8.2. Ein prototypisches Gleitfasermodell einer molekularen Maschine des $T_t$ -Typs

Statt der in Abbildung 5 gezeigten hydrophoben Faltung könnte auch ein Paar von Filamenten mit je einer hydropho-

ben Oberfläche als Ursache für die Verkürzung während des Kontraktionsprozesses angesehen werden. Dies entspräche einem Vorgehen, bei dem man das muschelförmige Protein aus Abbildung 21 zu einem Strang oder Filament, wie in Abbildung 24 gezeigt, auseinanderzieht. Unter Bedingungen, die eine Optimierung der hydrophoben Überlappung zweier Stränge begünstigen, erhielte man die Struktur oben rechts. Aufgrund hydrophober Hydratation, oben links dargestellt, würden Versuche, ein Filament über das andere gleiten zu lassen, auf einen Widerstand stoßen. Das Gleichgewicht läge dennoch auf Seiten maximaler Überlappung, also auf Seiten des kontrahierten Zustands.

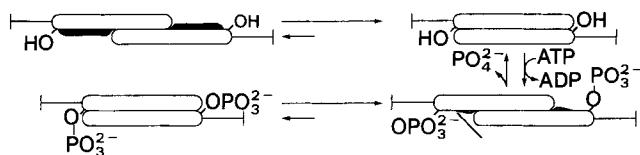


Abb. 24. Phosphorylierungsinduzierte Dehnung am Beispiel eines prototypischen Gleitfasermodells. Zur genaueren Erläuterung siehe Text (aus [1]).

Phosphoryliert man die beiden Filamente, wie im unteren Teil von Abbildung 24 dargestellt, so gleiten sie unter Bildung eines gestreckten, relaxierten Zustands auseinander. Jedes Filament kann sich aus verschiedenen, ja sogar mehreren verschiedenen Proteinen zusammensetzen; Querbrücken können zwischen Filamenten aufgrund komplexer hydrophober Wechselwirkungen auftreten. Die Grundlage für Wechselwirkungen zwischen Filamenten könnte jedoch, wie grob in Abbildung 24 skizziert, die Modulation hydrophober Assoziation durch ATP sein. Dies entspräche einer molekularen Maschine erster Ordnung des  $T_t$ -Typs.

### 8.3. Molekulare Maschinen erster Ordnung des $T_t$ -Typs: gestreckte extrazelluläre Matrix induziert eine intrazelluläre chemische Antwort

Die elastische, proteinartige, polymere Matrix X<sup>20</sup>-poly[0.8(VPGVG), 0.2(VPGEG)] zeigt direkt, wie die Dehnung einer elastischen Matrix eine chemische Antwort hervorruft. Wie in Abbildung 25 dargestellt, wurde der  $pK_a$ -Wert, wenn die Matrix nicht unter Spannung stand, per Säure-Base-Titration zu 3.99 bestimmt<sup>[63]</sup>. Bringt man ein kleines Gewicht von 1 g an, um die Matrix zu dehnen, erhöht sich der  $pK_a$ -Wert auf 4.84. Befände sich die Matrix in einer Lösung mit pH 4.5, würde die Dehnung eine Protonenaufnahme als chemisch induzierte Reaktion bewirken.

Wie in den Abbildungen 15 und 16 gezeigt, kann bei geeignetem Aufbau des proteinartigen Polymers der ursprüngliche  $pK_a$ -Wert bis zu 8 betragen, und eine Dehnung würde ihn noch weiter erhöhen. Wäre z. B. der  $pK_a$ -Wert 7 und die Matrix würde gedehnt, so daß man einen  $pK_a$ -Wert von 8 erhielte, dann würden bei physiologischem pH Protonen aufgenommen. Ersetzte man die funktionelle Gruppe durch einen Lys-Rest, würde sich die Richtung des Effekts umkehren, und es würden Protonen freigesetzt. So kann also das Design der dehbaren Matrix darüber entscheiden, wie die Reaktion ausfällt, die bei dieser mechanoochemischen Umformung ausgelöst wird.

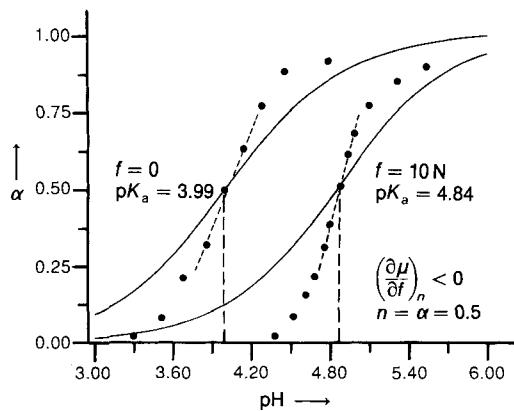


Abb. 25. Dehnungsinduzierte Verschiebung des  $pK_a$ -Wertes am Beispiel von  $X^{20}\text{-poly}[0.8(\text{VPGVG}), 0.2(\text{VPGEG})]$ . Die durchgezogenen Linien bezeichnen wie in Abbildung 20 die Vergleichskurven. Eine Vergrößerung der Kraft  $f$  verringert das chemische Potential  $\mu$  der Protonen, das nötig ist, um die elastische Matrix in einem Zustand 50proz. Ionisation zu halten. Damit ist  $(\partial\mu/\partial f)_n$  negativ, hat also genau entgegengesetztes Vorzeichen zu dem Ausdruck des in Abbildung 20 erläuterten Ladungs-Ladungs-Abstoßungsmechanismus. Dies charakterisiert den neuen Mechanismus. Besonders wichtig ist, daß die Dehnung, die Zunahme der mechanischen Kraft, eine chemische Antwort auslösen kann. Für Einzelheiten siehe Text. Ein weiterer Punkt, auf den hingewiesen sei, ist, daß die Kurven sowohl vor als auch nach der Dehnung steiler sind als die aus den ersten beiden Termen der Gleichung in Abbildung 20 berechneten. Diese positive Kooperativität läßt sich auf die apolar-polare, repulsive Gibbs-Hydratationsenergie zurückführen (aus [63]).

Die Erhöhung des  $pK_a$ -Wertes eines chemischen Paares  $\text{COOH}/\text{COO}^-$ , die durch die Dehnung verursacht wird, läßt sich unserer Interpretation zufolge dadurch erklären, daß die Dehnung der hydrophob gefalteten Matrix eine Freilegung hydrophober Bereiche bewirkt. Um diese bildet sich eine geordnete Wasserstruktur. Obwohl nun mehr Wasser in der Matrix ist, eignet es sich nicht dazu, die polaren  $\text{COO}^-$ -Gruppen zu hydratisieren; damit steigt die Gibbs-Energie dieser Spezies an, wie die Erhöhung des  $pK_a$ -Wertes verdeutlicht. Analog kann man erwarten, daß bei Peptiden mit Phosphatresten die Gibbs-Energie durch Dehnung erhöht wird, so daß eine Dephosphorylierung als wahrscheinliche Antwort angenommen werden darf. Es sollte sogar möglich sein, durch Erhöhung der Gibbs-Energie des Phosphats andere Verbindungen zu phosphorylieren. Dies müßte folgendermaßen getestet werden können: Die Dehnung einer  $X^{20}\text{-poly}[30(\text{IPGVG}), (\text{RGYS}(\text{PO}_4^{2-})\text{LG})]$ -Matrix sollte die Proteinkinase-Reaktion umkehren und eine Phosphorylierung von ADP ermöglichen. Sobald aufgetretene technische Schwierigkeiten gelöst sind, wird dieser Test des  $\Delta T_i$ -Mechanismus in Angriff genommen werden.

Momentan entwickelt sich in lebenden Zellen ein klareres Bild davon, daß in lebenden Zellen Spannkräfte, die die extrazelluläre Matrix, an die die Zellen gebunden sind, dehnen, intrazelluläre chemische Reaktionen hervorrufen können<sup>[64]</sup>. Man nimmt an, daß dabei die Integrine, Rezeptoren in der Zellmembran, eine Rolle spielen, die an spezifische Bindungsregionen von Proteinen der extrazellulären Matrix binden. Eine dieser Zelladhäsionssequenzen ist die berühmte Sequenz GRGDSP aus Fibronectin, in der RGD als Schlüsselsequenz identifiziert wurde<sup>[65-69]</sup>. Fibroblasten und andere Zellen lagern sich an diese Sequenz an. Eine verwandte Sequenz im Protein Laminin repräsentiert eine bevorzugte Bindungsregion für die Endothelzelladhäsion, die über den Vitronectinrezeptor anstelle des Fibronectinrezeptors abläuft<sup>[70]</sup>.

Die Adhäsion einer Zelle an eine dehbare Matrix ist in Abbildung 26 schematisch dargestellt. Es konnte gezeigt werden, daß an die Matrix  $X^{20}\text{-poly}[20(\text{GVGVP}), (\text{GRGDSP})]$  Zellen adhären, sich auf ihr ausbreiten und sich vermehren können<sup>[71]</sup>. Im natürlichen Gewebe würde die Adhäsion an Proteine der extrazellulären Matrix erfolgen, wo dann eine Dehnung charakteristischen Ausmaßes induziert werden kann. Wie in Abbildung 26 beschrieben, lagert sich eine Zelle mit Hilfe zweier Integrine in der Zellmembran an ihre extrazelluläre Matrix an. Zwischen den beiden Bindungsregionen der Zelle befinden sich Cytoskelett-(muskelähnliche) Fasern, die sich gegenüber der Matrix zusammenziehen und somit eine gewisse Krümmung erzeugen. Wenn nun die Matrix gedehnt wird, dehnen sich die Cytoskelettfasern, und das Integrin selbst kann verformt werden (was sich als Übergang von einer sphärischen in eine ellipsoide Form zeigt). Da, wie Abbildung 25 beschreibt, die Dehnung von  $X^{20}\text{-poly}[4(\text{VPGVG}), (\text{VPGEG})]$  eine chemische Reaktion auslöst, könnte dies auch durch Dehnung der Zellkomponenten passieren. Zitat aus einem Übersichtsartikel von Ingber<sup>[64]</sup>: „... mechanical stimuli can alter many cell functions, including ion transport, release of chemical second messengers, protein syntheses, secretion and even expression of specific genes“. So kann also eine Zelle den Erfordernissen entsprechend ein Gewebe aufrechterhalten oder verändern, damit es die Anforderungen erfüllt, die seine physikalische Aufgabe verlangt. Viel früher schon zeigten Glagov et al., daß vaskuläre Wandzellen, z. B. glatte Muskelzellen, die an die gereinigte innere elastische Lamina (=Kernfaserschicht) der Aorta gebunden waren und cyclisch gedehnt wurden, dadurch stimuliert wurden, die makromolekularen Komponenten zu produzieren, die für eine vaskuläre extrazelluläre Matrix benötigt werden<sup>[72-74]</sup>.

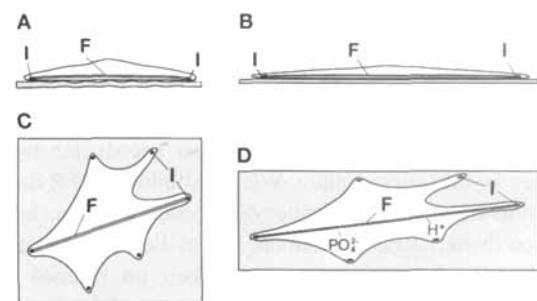


Abb. 26. Einfluß der Dehnung auf eine an ein elastisches Substrat gebundene Zelle. A) Querschnitt durch eine über Integrine I an Zelladhäsionsregionen GRGDSP innerhalb der als Substrat dienenden elastischen Matrix  $X^{20}\text{-poly}[20(\text{GVGVP}), (\text{GRGDSP})]$  (gerastert) gebundene Zelle. Cytoskelettfasern F, die sich zwischen den Integrinen zusammenziehen, rufen eine Krümmung des Substrats hervor. B) Querschnitt durch die gespannte elastische Matrix. C) Aufsicht zu A. D) Aufsicht zu B. Die Spannung wird durch die Dehnung der elastischen Matrix, an die die Zelle gebunden ist, hervorgerufen. Das physikalische Ergebnis besteht darin, daß die Cytoskelettfasern dehnt und möglicherweise auch die Integrine deformiert werden. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

Eine molekulare Maschine erster Ordnung des  $T_i$ -Typs könnte das Stimulans dafür sein, daß eine Zelle in einer dem örtlichen Gewebe entsprechenden Art reagiert. Die Dehnungsspannung könnte die Zugänglichkeit hydrophober Oberflächen erhöhen. Dies könnte wiederum eine Änderung der Protonenkonzentration mit all ihren möglichen Folgeerscheinungen bewirken<sup>[46]</sup>. Es könnte aber auch zu einer

direkteren Übertragung eines Phosphatrestes kommen, um andere Folgereaktionen zu aktivieren, oder es könnte die Freisetzung von Calcium-Ionen induziert werden, etc.

#### 8.4. Molekulare Maschinen zweiter Ordnung des $T_i$ -Typs: Oxidation von Nahrung als Energiequelle der Zellen

Chemische Energie wird durch Änderungen des chemischen Potentials, d.h. durch Konzentrationsänderungen oder Konzentrationsgradienten, gewonnen. Wenn man an chemische Energie aus der Nahrung denkt, meint man deren Oxidation zu Kohlendioxid, Wasser und Energie, die gewöhnlich in Form von Wärme freigesetzt wird. Eigentlich verläuft die Oxidation von Nahrung jedoch über eine Reduktion bestimmter prosthetischer Gruppen, die anschließend, indem sie Elektronen auf Sauerstoff übertragen, einen Protonenkonzentrationsgradienten erzeugen. Dieser Gradient führt schließlich zur Bildung von ATP, dem in lebenden Organismen allgegenwärtigen und universellen Energieäquivalent (für einen allgemeinen Überblick sei auf Stryer<sup>[46]</sup> verwiesen). Man bezeichnet diesen Ablauf als oxidative Phosphorylierung; sie schließt die Elektronentransportkette, eine Reihe von Proteinen mit prosthetischen Gruppen, die reduziert und oxidiert werden können, ein.

In Abschnitt 5.2 wurde ein Beispiel für eine molekulare Maschine zweiter Ordnung des  $T_i$ -Typs angeführt, mit deren Hilfe entweder die Reduktion eines Nicotinamidrestes zu einer Protonenaufnahme oder die Protonierung einer Carboxylatgruppe zu einer Elektronenaufnahme führte. In der Elektronentransportkette bewirkt die Oxidation eines reduzierten Nicotinamid- oder eines reduzierten Flavinrestes eine Protonenfreisetzung auf einer Seite der Zellmembran, was einen Protonenkonzentrationsgradienten induziert. Mit der diskutierten molekularen Maschine zweiter Ordnung des  $T_i$ -Typs könnte man bei richtigem Aufbau die Oxidation eines reduzierten Nicotinamidrestes und damit die Freisetzung von Protonen erreichen. Unter Bedingungen, die denen in der inneren Membran eines Mitochondriums entsprechen, und bei Freisetzung der Protonen zwischen einer inneren und einer äußeren Membran könnte sich dadurch ein Protonenkonzentrationsgradient aufbauen, der die Synthese von ATP durch Phosphorylierung von ADP ermöglichte. Auch hier könnte also die Art, wie polare und apolare Gruppen in Makromolekülen, die zu inversen Temperaturübergängen fähig sind, um Hydratation konkurrieren, den Ablauf einer Umwandlung von Gibbs-Energien in lebenden Organismen erklären.

#### 8.5. Medizinische Bedeutung und Pathologie der Bildung von Elastinfasern

Die bemerkenswerteste Fähigkeit von Elastin besteht darin, Geweben die erforderliche Elastizität zu verleihen, ohne für pathologische Zustände von großer Bedeutung zu sein, und das, obwohl Elastin im Körper sehr langsam umgesetzt wird. Seine Halbwertszeit liegt, wie mit drei unabhängigen Methoden bestimmt wurde, in der Größenordnung von sieben Jahren und mehr<sup>[75, 76]</sup>! Das weist auf eine bemerkenswerte Haltbarkeit speziell im Aortenbogen und in der Thoraxaorta hin, in denen die elastischen Fasern in diesem Zeitraum um die 2 Milliarden sie beanspruchende Kontraktions-/Relaxations-Cyclen durchlaufen.

Dennoch kann es auch zu Störungen kommen, infolge chronischer Prozesse wie einer sehr langsamen, pathologischen Verkalkung oder „katastrophaler“ Ereignisse wie des arteriosklerotischen *Aneurysma dissecans*. In der Lunge, die ständig einer oxidierenden oder anderweitig toxischen Atmosphäre ausgesetzt ist, kann die Zerstörung der elastischen Fasern stark sein und zu einem Lungenemphysem führen, ein Krankheitsbild, an dem allein in den USA jährlich mehr als 100000 Menschen sterben.

##### 8.5.1. Eine neue Perspektive bei Lungenemphysemen

Gewöhnlich beschreibt man Lungenemphyseme als einen biochemischen Prozeß ohne wesentliche biophysikalische Komponente. Der biochemische Prozeß ist durch herabgesetzte Antiproteaseaktivität gekennzeichnet, die eine proteolytische Verdauung und Fragmentierung von Elastinfasern in der Lunge ermöglicht. Bei der genetischen Anomalie einer  $\alpha_1$ -Antiproteasedefizienz manifestiert sich das Lungenemphysem als fokaler Krankheitsherd, und man geht im allgemeinen davon aus, daß der primäre Prozeß auf unkontrollierter proteolytischer Elastinverdauung beruht. Warum tritt aber diese primäre Schädigung in der Lunge und nicht in den Arterien auf, in denen Elastizität so dringend erforderlich ist?

Auf der Grundlage des  $\Delta T_i$ -Mechanismus läßt sich das primäre pathologische Geschehen zum einen als Oxidation der hydrophob gefalteten und assoziierten Elastinfasern auffassen und zum anderen auf toxische Reaktionen zurückführen, die polare Gruppen erzeugen, welche zu einem Anstieg von  $T_i$  über die physiologische Temperatur und damit zur Entfaltung des Proteins führen. Dieses teilweise entfaltete Protein würde dann proteolytisch verdaut. Warum sonst sollte die Lunge das von diesem genetischen Defekt am meisten betroffene Gewebe sein? Und warum sonst sollte ein Protein angegriffen werden, das für seine Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau bekannt ist, was durch seine lange Halbwertszeit selbst unter sehr beanspruchenden Bedingungen belegt ist. Der experimentelle Beweis dafür, daß Oxidationsmittel eine Entfaltung der Elastinfasern hervorrufen, konnte mit einem  $O_2^-$ -erzeugenden System und Wasserstoffperoxid erbracht werden<sup>[77]</sup>.

##### 8.5.2. Das Fehlen von Elastinfasern in Narbengewebe

Während des Wundheilungsprozesses ist die Prolyl-Hydroxylase-Aktivität deutlich erhöht. Dieses Enzym steuert die Hydroxylierung der Prolylreste in neu gebildetem Collagen, wie es zur Bildung eines starken Bindegewebes nötig ist. Dasselbe Enzym hydroxyliert auch die Prolylreste in neu gebildetem Elastin. Dies erhöht allerdings dessen  $T_i$  über die physiologische Temperatur, so daß sich keine Elastinfasern bilden können. Das erklärt hinreichend den Mangel an Elastinfasern in Narbengeweben<sup>[77]</sup>.

## 9. Biomimetica und Anwendungsgebiete für elastische, proteinartige Polymere

Die zur Verdeutlichung der Prinzipien von Gibbs-Energie-Umwandlungen nach dem  $\Delta T_c$ -Mechanismus vorgestellten Substanzen beschreiben eine neue Klasse von Biomaterialien. Aus den Ausführungen über die auf  $T_c$  basierende Hydrophobieskala und die zahlreichen Möglichkeiten,  $T_c$  zu beeinflussen, ließen sich neue Erkenntnisse ableiten. Mit diesem Know-how wird es möglich sein, gezielt Biomaterialien zu entwerfen, die als außerordentlich vielseitige „Werkzeuge“ im medizinischen und nichtmedizinischen Bereich eingesetzt werden können. Derzeit gibt es bereits 20 US-Patente und Patentanmeldungen sowie Bemühungen um Patentschutz in Europa und im Fernen Osten. Bis heute werden nur die frühen Patente in der Literatur zitiert, so daß die neuen Entwicklungen aus meinem Arbeitskreis auf diesem Gebiet den Stand der Forschung wiedergeben.

Zu den in der Entwicklung befindlichen medizinischen Anwendungen gehört die Verwendung der elastomeren Matrices als Barriere zur Verhinderung von Adhäsionen nach einem operativen Eingriff oder einem anderen Trauma. Weiterhin entwickelt man Zelladhäsionsmatrices mit dem Ziel, Gewebe wiederaufzubauen oder Medikamente freizusetzen. Letzteres beinhaltet all die Möglichkeiten zur Beeinflussung von  $T_c$ , d. h. der vielen Arten, Gibbs-Energie in nutzbare mechanische Arbeit zur Freisetzung von Medikamenten umzuwandeln, sowie die Möglichkeiten zur Steuerung der Abbaugeschwindigkeit. Im nicht-medizinischen Bereich geht es beispielsweise statt um die Freisetzung von Medikamenten um die kontrollierte Freisetzung von Pestiziden. In der Robotertechnologie können unsere Materialien simultan als Sensor und als Aktuator eingesetzt werden, wobei die vielen Formen von Gibbs-Energie-Umwandlungen, die auf die verschiedenen Bedingungen zugeschnitten werden können, genutzt werden. Die chemomechanische Umwandlung könnte mit hoher Effizienz, hoher Empfindlichkeit und enzymatischer Spezifität erfolgen. Darüber hinaus kann sich die elastische Matrix, die hauptsächlich entropischer Natur ist, auch durch außerordentliche Haltbarkeit auszeichnen. Genau wie die natürlichen elastischen Fasern, die ein vorwiegend entropisches Elastomer sind und im Körper eine Halbwertzeit von rund siebzig Jahren haben<sup>[75, 76]</sup>, sollten die künstlichen elastischen Matrices Milliarden von Dehnungs-/Relaxations-Cyclen überstehen.

### 9.1. Medizinische Anwendungen

Für den Einsatz im Körper muß das Material natürlich biokompatibel sein. Für poly(GVGVP) und seine quervernetzte Matrix X<sup>20</sup>-poly(GVGVP) konnte die Erfüllung dieser Forderung nachgewiesen werden. Die biologischen Tests, die durchgeführt wurden, sind im folgenden genannt, in Klammern ist jeweils das Ergebnis angegeben: 1) Ames-Test auf Mutagenität (nicht mutagen), 2) Cytotoxizitätstest auf Agarosemedium (nicht toxisch), 3) Test auf akute systemische Toxizität (nicht toxisch), 4) Test auf intrakutane Toxizität (nicht toxisch), 5) Muskelimplantation (vielversprechend), 6) Test auf akute intraperitoneale Toxizität (nicht toxisch), 7) Test auf das systemische antigene Potential (nicht antigen), 8) Test auf dermale Sensibilisierung mit

der Magnusson-und-Kligman-Maximierungsmethode (nicht sensibilisierend), 9) Test auf Pyrogenität (nicht pyrogen), 10) Lee-White-Gerinnungsstudie (normale Gerinnungszeit) und 11) in-vitro-Hämolysetest (nicht hämolytisch). „Thus this new elastomeric polypeptide biomaterial ... exhibits an extraordinary biocompatibility<sup>[78]</sup>“.

Diese sehr gute biologische Verträglichkeit gewinnt im Hinblick auf die Komplikationen, die mit Siliconen und Polyurethanen aufraten (z. B. ist in den USA die Genehmigung dieser Materialien zur Verwendung für Brustimplantate zurückgezogen worden), und im Hinblick auf Sensibilisierungen durch und allergische Reaktionen auf Implantate aus behandelten natürlichen Proteinen zusätzlich an Bedeutung.

#### 9.1.1. Verhinderung postoperativer Adhäsionen

In den USA und Europa zählt man um die 60 Millionen Operationen im Jahr, bei denen eine der möglichen postoperativen Komplikationen die Bildung von Adhäsionen ist. Die Resultate könnten verbessert werden, wenn man ein Material einsetzen würde, das das Auftreten unerwünschter Adhäsionen verhinderte oder reduzierte. Die Verwendung elastischer, proteinartiger Polymere, die man in diesem Zusammenhang als bioelastische Materialien bezeichnet, wird hinsichtlich ihrer Effizienz in drei Arten von Tierexperimenten untersucht: an Ratten mit kontaminiertem Bauchraum (Peritonealmodell), im Hasenauge in Verbindung mit Strabismus (Schielen) und retinalen operativen Eingriffen und bei Kälbern, denen ein vollständig künstliches Herz als Überbrückung bis zu einer Herztransplantation eingesetzt wird.

Am weitesten sind die Untersuchungen mit dem Peritonealmodell fortgeschritten<sup>[79]</sup>; hier wiesen unter 29 Kontrolltieren alle Adhäsionen auf, während bei Verwendung von mit Ethylenoxidgas sterilisiertem X<sup>20</sup>-poly(GVGVP) 80 % der 29 Testtiere nur geringfügige Adhäsionen ausbildeten (59 % keine Adhäsionen und 21 % Adhäsionen 1. Grades). Ein Beispiel für eine Adhäsion 1. Grades ist in Abbildung 27 gezeigt, in der sich die dünne Schicht aus X<sup>20</sup>-poly(GVGVP) gegen die Abdomenwandlung abhebt und ein schmales Adhäsionsband erkennbar wird, das um die optisch transparent-

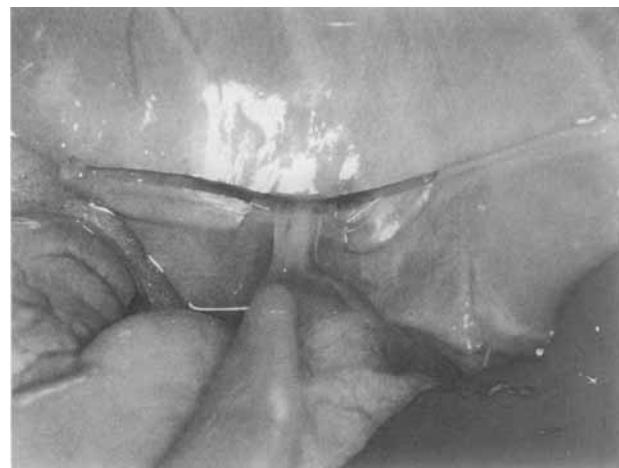


Abb. 27. Blick in den Bauchraum, in dem eine Schicht aus X<sup>20</sup>-poly(GVGVP), um die ein Adhäsionsstreifen gewachsen ist, auf der Bauchwandung aufliegt. Siehe Text für weitere Erläuterungen (aus [80]).

te Matrix gewachsen und an eine Darmwindung gebunden ist<sup>[80]</sup>. Das bioelastische Material wurde nicht, wie es für fremdes Material sonst üblich ist, von einer fibrösen Kapsel umschlossen. Es gab auch nach zweiwöchigem Kontakt mit der Bauchdecke keine Entzündung, und, da die Adhäsion nur schwach ausgeprägt war, konnte man sie durch leichtes Ziehen lösen<sup>[79]</sup>.

### 9.1.2. Zelladhäsionsmatrices und Gewebewiederaufbau

Während die einfache Matrix X<sup>20</sup>-poly(GVGVP) nur in sehr geringem Maße die Zelladhäsion unterstützt, können an einer Matrix, die die Zelladhäsionssequenz GRGDSP enthält, wie bereits in Abschnitt 8.3 erwähnt, Zellen nicht nur binden, sondern sich ausbreiten und vermehren<sup>[71, 81]</sup>. In Abbildung 28 sind am Beispiel der bioelastischen Matrices X<sup>20</sup>-poly[n(GVGVP), (GRGDSP)] mit n zwischen 20 und 100 dünne Auflagen von Aorta-Endothelzellen von Rind (A) und *ligamentum-nuchae*-Fibroblasten (B) gezeigt. In C und D sind analoge Oberflächen nach dreitägigem Zellwachstum abgebildet.

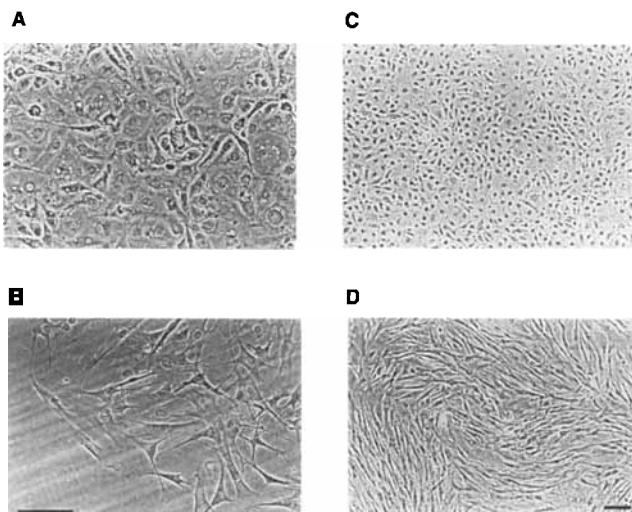


Abb. 28. Zellwachstum auf den elastischen Matrices X<sup>20</sup>-poly[n(GVGVP), (GRGDSP)] mit n zwischen 20 und 100. Für A und B wurden die Zellen in hoher Dichte aufgetragen, für C und D dagegen in geringerer Dichte (10<sup>4</sup> Zellen pro mL). Die Aufnahmen für C und D wurden erst gemacht, nachdem sich die Zellen über einen Zeitraum von drei Tagen vermehren konnten. Die Zellen adhärierten, breiteten sich aus und vermehrten sich (aus [71]). Die Balken in B und D entsprechen 100 µm.

Kommen wir nochmals auf die Diskussion von Abschnitt 6.1 bezüglich Abbildung 26 zurück, daß eine gedehnte extrazelluläre Matrix intrazelluläre Reaktionen hervorruft, und erinnern wir uns, daß so stimulierte Zellen jene Makromoleküle produzieren, die benötigt werden, um den wirkenden Kräften standzuhalten. Vor diesem Hintergrund ist das Ziel bei den bioelastischen Materialien, eine biologisch verträgliche Zelladhäsionsmatrix zu entwerfen, die als ein temporäres, funktionelles Gerüst dienen kann, während sie in ein natürliches Gewebe umgearbeitet wird, das in der Lage ist, die Belastungen, die aus seinen Funktionen resultieren, auszuhalten.

### 9.1.3. Freisetzung von Medikamenten

Die Möglichkeit zur Steuerung von  $T_1$  bei bioelastischen Matrices sollten besonders effektiv zur dosierten Freisetzung von Medikamenten genutzt werden können. Man könnte z. B. „chemische Uhren“ mit ausgeklügelten „Weck“(Halbwerts)zeiten einsetzen, die eine Kontraktion oder eine Quellung einleiten würden, um die Freisetzung des Medikaments hervorzurufen. So kann – abhängig von der Sequenz, in der es sich befindet, – Asparagin Asn(N) in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung zu Asparaginsäure Asp(D) hydrolysiert werden<sup>[84]</sup>. Bei physiologischem pH-Wert könnte diese Umwandlung eines Carbamids in ein Carboxylat-Ion die Änderung von  $T_1$  genauso effektiv beeinflussen, wie eine Erhöhung des pH-Wertes. Eine Anwendung der Hydrolyse eines Säureamids (CONH<sub>2</sub>) zu einem Carboxylat (COO<sup>-</sup>) ist in Abbildung 29 dargestellt; die Geschwindigkeit der Medikamentenfreisetzung aus einer dotierten homogenen Platte hängt von der Halbwertszeit des Asparagin(Asn(N))- oder Glutamin(Gln(Q))-Säureamidrestes ab<sup>[82]</sup>. N- und Q-Reste enthaltende Sequenzen können so gewählt werden, daß sie Halbwertszeiten von Tagen bis Jahrzehnten aufweisen<sup>[84]</sup>. Außerdem können Verbrückungen mit unterschiedlichen Hydrolysezeiten in das Rückgrat des proteinartigen Polymers eingebaut werden. Mit einer Reihe kürzlich synthetisierter proteinartiger Polymere wurden unter Bedingungen, unter denen die Halbwertszeit der Kontrollpolymere poly(GVGVP) oder X<sup>20</sup>-poly(GVGVP) im Bereich von vielen Jahren zu liegen scheint, Halbwertszeiten zwischen mehreren Tagen und ein paar Dutzend Tagen erreicht<sup>[83]</sup>.

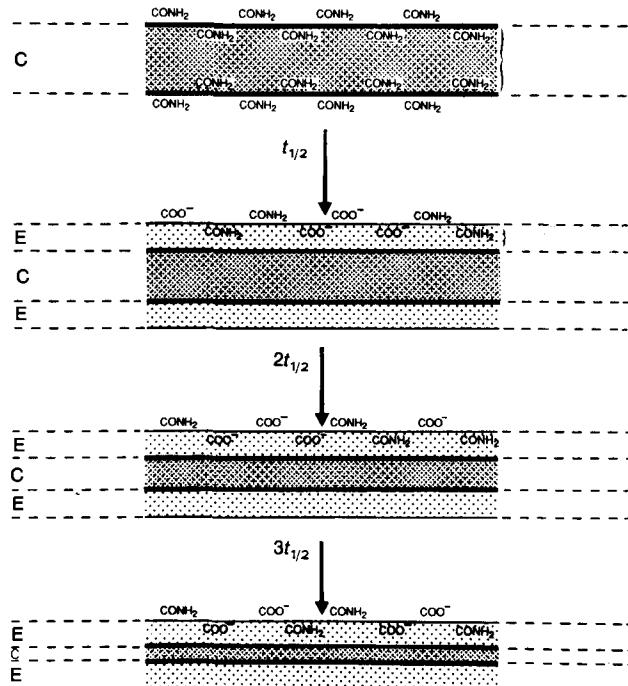


Abb. 29. Homogene Platten aus quervernetzten, bioelastischen Matrices, die Carbamideinheiten aus Asparagin- und Glutaminresten enthalten (C). Am Übergang zur wässrigen Phase werden die CONH<sub>2</sub>- hydrolytisch zu COO<sup>-</sup>- Gruppen gespalten; dadurch erhält die Oberflächenschicht ein höheres  $T_1$  und quillt bis zum zehnfachen Volumen (E). Dies ermöglicht z. B. die diffusionsgesteuerte Freisetzung von Medikamenten, die zuvor in die Platte eingebracht worden waren. Die Geschwindigkeit, mit der die Oberflächenschicht quillt und ein Medikament freigesetzt wird, hängt von der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  der Asn- oder Gln-Carbonamideinheiten ab; sie kann darüber gesteuert werden, in welche Sequenz man die Reste plaziert (aus [89]).

Da es viele Möglichkeiten gibt, die für die Freisetzung von Medikamenten erforderliche mechanische Arbeit zu erzeugen, wie dies in Abbildung 12 mit dem Satz von Pfeilen, die am Begriff „mechanisch“ enden, verdeutlicht wird, existiert sicherlich für jede Situation eine optimale Variante. Das „Transportvehikel“ könnte so konzipiert werden, daß die Wirkstoffe als Antwort auf eine chemische Abnormalität des kranken, zu behandelnden Gewebes ausgeschüttet werden. Das Vehikel selbst würde dabei in Aminosäuren und einen Sensor abgebaut, der wiederum selbst eine Aminosäure oder eine natürliche prosthetische Gruppe sein könnte.

Ein System, das in der Lage ist, die veränderte Chemie des kranken Zustands zu erkennen und darauf mit der Freisetzung des Medikaments zu antworten, wurde als diagnostisch-therapeutisches Paar bezeichnet. Im Falle von gezielt entwickelten elastischen, proteinartigen Polymeren, also bioelastischen Materialien, könnte die molekulare Maschine erster Ordnung so funktionieren, daß die abweichende chemische Konzentration einer Substanz im krankhaften Zustand die chemische Energie für die mechanische Reaktion zur Verfügung stellt, die die Medikamentenfreisetzung bewirkt. Wie wir gezeigt haben, kann eine Änderung des Redoxzustands eine Kontraktion oder eine Quellung induzieren (siehe Abschnitt 5.1.1.3). Könnte dies mit einem Redoxenzym wie Glucose-Oxidase oder Glucose-Reduktase gekoppelt werden, dann könnten veränderte Glucosekonzentrationen die Ausschüttung des therapeutischen Agens bewirken. Dies sind die ersten Schritte, sich dem eigentlichen Ziel der Medikamentenfreisetzung zu nähern, das nach Pitt und Schindler<sup>[85]</sup> folgendermaßen definiert ist: „... to develop delivery systems which respond to the biochemical need for the drug, comparable to the way the human body exercises control over releases and distribution of its own endogenous biological agents“.

## 9.2. Nichtmedizinische Anwendungen

### 9.2.1. Biomimetica

Als Biomimetica bezeichnet man Substanzen, mit denen man biologische Materialien und Prozesse nachahmen oder nutzen kann. Ziel könnte z. B. sein, eine Faser mit der *Festigkeit* eines Seidenfadens oder der *Haltbarkeit* des biologischen Elastomers oder der *Härte* einer Keramikzusammensetzung, wie sie in einer Muschelschale vorliegt, oder der speziellen *Haftfähigkeit* des Miesmuschelproteinklebstoffs in wäßriger Umgebung zu gewinnen. Man könnte sich damit beschäftigen, ein prosthetisches Material als *temporäres funktionelles Gerüst* zum Gewebewiederaufbau zu entwerfen, wie es in Abschnitt 9.1.2 diskutiert wurde. Oder man könnte sich vorstellen, molekulare Maschinen zu bauen, die so *klein* sind wie der „Motor“ der Flagellatengeißeln oder eine Effizienz bezüglich der Energieumwandlung haben wie die in Abschnitt 7 diskutierte chemomechanische Umwandlung oder eine *Spezifität*, wie sie bei Enzymen gefunden wird, oder die *Verlässlichkeit*, viele Anwendungscyclen zu durchlaufen, die *Sensitivität* bestimmter funktioneller Kanäle, die auf einen chemischen Reiz, einen Lichtreiz, eine Druckänderung usw. reagieren, oder die die *einzigartige Nutzung* neuer Energiequellen ermöglichen.

### 9.2.2. Reversible mechanochemische Motoren

In der *McGraw-Hill Concise Encyclopedia of Science and Technology*<sup>[86]</sup> wird ein Motor definiert als „a machine designed for the conversion of energy into useful mechanical motion“. Wenn nutzbare mechanische Bewegung oder Arbeit von einer molekularen Maschine erster Ordnung des  $T_i$ -Typs geleistet wird, handelt es sich um einen reversiblen molekularen Motor. Wenn die Energiequelle chemischer Natur ist, kann die molekulare Maschine erster Ordnung ein reversibler mechanochemischer Motor sein. Diese mechanochemischen Motoren können jede der in den Abschnitten 4.1–4.2 genannten intrinsischen oder extrinsischen chemischen Konzentrationsänderungen nutzen, um mechanische Arbeit zu leisten. Als ein Extremfall können die chemischen Konzentrationsunterschiede zwischen Süßwasser und Meerwasser dazu verwendet werden, eine Turbine anzureiben. Im anderen Extremfall können mit Hilfe spezifischer Bindungsstellen von Enzymen Enzymaktivitäten nachgewiesen werden. Da der  $\Delta T_i$ -Mechanismus reversibel ist, könnte umgekehrt mechanische Arbeit als Energiezufuhr dienen, um z. B. chemische Trennungen wie bei der Entsalzung zu erzielen. Diese reversiblen mechanochemischen Motoren sind so vielseitig wie die Möglichkeiten zur chemischen Energiezufuhr, um die Temperatur  $T_i$  des inversen Temperaturübergangs zu ändern.

### 9.2.3. Umwandler

Ein Umwandler wird in *Webster's International Dictionary* definiert als „a device actuated by power from one system and supplying power in the same or any other form to a second system ...“ Da Kraft der Quotient aus Energie und Zeit ist, könnten die molekularen Maschinen des  $T_i$ -Typs, die in Abbildung 12 dargestellten Energieumwandlungen durchführen können, als molekulare Umwandler des  $T_i$ -Typs bezeichnet werden. Bei den Prozessen selbst spricht man normalerweise von Gibbs-Energie-Umwandlungen.

Wenn das Gerät die Form der elastomeren Bänder von Abbildung 13 hat, würde es sich aufgrund der relativ langen Zeit, die es für die Kontraktion auf die Hälfte benötigt (sie liegt in der Größenordnung von Minuten), um einen Umwandler geringer Leistung handeln. Da aber die Dehnungsspannung ein elastomeres Band über längere Zeit bei vorgegebener Länge halten kann, ermöglicht das Zurückschnellen des Bandes bei Wegnahme der Spannung eine sehr schnelle Energiefreisetzung (in Bruchteilen einer Sekunde). Eine Optimierung der Herstellung könnte die Zeitkonstante des elastomeren Bänderkonstrukts auch noch weiter herabsetzen. Wollte man leistungsstärkere molekulare Umwandler des  $T_i$ -Typs schaffen, bräuchte man andere Konzepte, z. B. das, das dem Gleitfasermodell in Abbildung 24 zugrunde liegt. Dieses System wäre von der langsamen Faltung und Entfaltung unabhängig, die für den Übergang von einem Zustand in den anderen in Abbildung 5 benötigt wird. Die Reaktionszeit in quergestreiften Muskeln, einem Gleitfasersystem, liegt bei Bruchteilen einer Sekunde. Eine ähnliche Zeitkonstante gilt für den rotierenden Geißelantrieb von Bakterien.

Genauso wie die Integration des diagnostisch-therapeutischen Paars in ein einziges System zur Freisetzung von Medikamenten verwendet werden kann, sollte hier die Integra-

tion des Sensors und des Aktuators in ein System in der Robotertechnologie Anwendung finden.

#### 9.2.4. Superabsorber

Elastomere Schichten oder viskoelastische Materialen bestehen normalerweise im kontrahierten oder Coacervatzustand zu 50 % aus Wasser. Sie können lyophilisiert werden und gehen dabei in einen trockenen, papierähnlichen oder sogar styroporähnlichen Zustand über. Sind sie jedoch gequollen, so bestehen sie zu über 90 % ihres Gewichts aus Wasser. Dementsprechend könnten die Materialien als Superabsorber eingesetzt werden, in denen die Bildung des superabsorbierenden Zustands durch jede der Möglichkeiten zur Steuerung der in Abbildung 12 zusammengefaßten Übergänge ausgelöst, also ungewöhnlich vielfältig beeinflußt werden könnte.

Nachdem wir bisher esoterische, vielleicht sogar verwirrende Anwendungen diskutiert haben, darf diese Übersicht mit dem anderen Extrem enden, einer sehr praxisbezogenen Anwendung molekularer Maschinen in Form biologisch abbaubarer Windeln. Machen wir uns die Eigenschaften klar, die sie aufweisen könnten: die Fähigkeit, Flüssigkeiten bis zum Zehnfachen ihres eigenen Gewichts zu absorbieren, ein Wärmekontrollelement, durch das Flüssigkeit von Bereichen höherer zu solchen niedrigerer Temperatur transportiert würde, ein Ansprechen auf Druck, das Wasser, anstatt es wie aus einem Schwamm auszupressen, in einen dichteren Zustand überführen könnte, und die Fähigkeit, sich innerhalb eines vorgewählten Zeitraums zu zersetzen oder sich bei lediglich milder chemischer Behandlung innerhalb von Minuten in die Bestandteile aufzulösen.

## 10. Zusammenfassung und Ausblick

### 10.1. Zusammenfassung

Es wurde eine Reihe von Modellproteinen untersucht, die bei Temperaturerhöhung einen Anstieg im intra- und intermolekularen Ordnungsgrad zeigen. Dieser Vorgang wird als inverser Temperaturübergang bezeichnet, und die Temperatur, bei der er stattfindet, wird mit  $T_i$  gekennzeichnet. Die Erhöhung der Proteinordnung ist darauf zurückzuführen, daß stärker strukturierte Solvatschichten, die die hydrophoben Bereiche ummanteln, in eine weniger geordnete Wasserstruktur übergehen, sobald Faltungs- und Assoziationsvorgänge einsetzen, die durch intra- und intermolekulare Kontakte zwischen hydrophoben Gruppen vermittelt werden. Durch Quervernetzung lassen sich elastomere Matrices herstellen, in denen sich der inverse Temperaturübergang in einer Kontraktion äußert. Dabei kann nutzbare mechanische Arbeit, z. B. das Anheben eines Gewichts entgegen der Erdanziehung, verrichtet werden.

Durch Variation der Aminosäurezusammensetzung des Modellproteins läßt sich  $T_i$  stetig ändern und so eine Hydrophobieskala für alle natürlichen Aminosäuren aufstellen. Es hat sich dann gezeigt, daß es viele Wege gibt, den Wert von  $T_i$  zu ändern. Chemische Änderungen des Modellproteins wie die Änderung des Ionisationsgrades einer Seitenkette, die Phosphorylierung und Dephosphorylierung einer Seiten-

kette oder die Reduktion einer redoxaktiven Einheit, z. B. einer Nicotinamideinheit, können  $T_i$  drastisch beeinflussen. Dieselbe Wirkung erzielt man durch Zugabe von Salzen oder organischen Verbindungen zum Medium, aber auch eine Druckänderung kann den Wert von  $T_i$  ändern.

Als nächstes wurde erkannt, daß die Erniedrigung von  $T_i$  von über auf unter die Betriebstemperatur gleichbedeutend mit einer Erhöhung der Temperatur von unter auf über  $T_i$  ist. Somit sind bei quervernetzten Matrices alle Hilfsmittel, die  $T_i$  erniedrigen, zugleich Werkzeuge für eine isotherm ablauende Kontraktion und für die Leistung von Arbeit. Dies bedeutet, daß die elastischen Matrices als molekulare Maschinen angesehen werden können, die in der Lage sind, eine Form von Gibbs-Energie in eine andere umzuwandeln. Einschließlich photochemischer Reaktionen, für die der endgültige Beweis kürzlich gelang, gibt es sechs Formen der Gibbs-Energie, die mit Hilfe des  $\Delta T_i$ -Mechanismus ineinander umgewandelt werden können. Die intensiven Variablen dieser Energieformen sind die mechanische Kraft, die Temperatur, der Druck, das chemische Potential und die elektromagnetische Strahlung. Unseres Wissens schließt dies alle Gibbs-Energie-Umwandlungen in lebenden Organismen ein. Proteine, die diese Energieumwandlungen ausführen können, könnte man als molekulare Maschinen bezeichnen. Bei der thermisch induzierten Faltung oder Kontraktion bei Temperaturerhöhung spricht man von einer molekularen Maschine nullter Ordnung des  $T_i$ -Typs. Bei anderen Energieumwandlungen, die in einer Kontraktion resultieren, nennt man sie molekulare Maschinen erster Ordnung des  $T_i$ -Typs. Sind an der Energieumwandlung keine mechanischen Kräfte beteiligt, spricht man von molekularen Maschinen zweiter Ordnung des  $T_i$ -Typs. Bei diesen Umwandlungen wird zwar der Faltungsübergang genutzt, doch die daraus direkt resultierende Kraft gehört nicht zu den intensiven Variablen. So mit bietet also der  $\Delta T_i$ -Mechanismus eine einheitliche Grundlage für verschiedene Energieumwandlungen.

Die physikalische Grundlage der Energieumwandlungen des  $\Delta T_i$ -Typs läßt sich als Wettbewerb zwischen apolaren (hydrophoben) und polaren Gruppen in Polymeren um Wasser zur Hydratation beschreiben, wobei Einschränkungen bezüglich der Abstände zwischen den Gruppen existieren. Es wurde eine Analyse vorgestellt, die zeigt, daß der  $\Delta T_i$ -Mechanismus für die Umwandlung chemischer Energie in mechanische Arbeit in wäßrigen Systemen um eine Größenordnung effizienter arbeitet als der Ladungs-Ladungs-Abstoßungsmechanismus.

Man erwartet, daß sich lebende Organismen unter dem Druck der natürlichen Selektion so entwickelt haben sollten, daß sie den wirkungsvollsten ihren Anlagen verfügbaren Mechanismus nutzen. Entsprechend gewährt der  $\Delta T_i$ -Mechanismus neue Einblicke in viele nicht so ohne weiteres erklärbare biologische Prozesse. Die Korrelation zwischen der zentralen Rolle der Phosphorylierung bei proteingesteuerten Reaktionen und der Phosphorylierung als der drastischsten chemischen Störung zur Änderung des  $T_i$ -Wertes ist unserer Meinung nach sicherlich nicht zufällig.

Abschließend wurden Perspektiven für die möglichen medizinischen Anwendungen der neuen Biomaterialien, als die sich diese elastischen, proteinartigen Modellproteine darstellen, eröffnet. Dabei wurden die Verhinderung postoperativer Adhäsionen, der Gewebewiederaufbau und die gezielte Freisetzung von Medikamenten diskutiert. Am Ende wurde

noch kurz die Möglichkeit vorgestellt, diese Materialien als reversible mechanochemische Motoren und Umwandler einzusetzen.

## 10.2. Ausblick

Hier sollen Ideen sowohl für den Bereich der Grundlagenforschung als auch für den der anwendungsorientierten Forschung genannt werden. So stellt sich die Aufgabe, alle Energieumwandlungen aus Abbildung 12 mit geeignet konzipierten proteinartigen Polymeren und dem für das Studium der Energieumwandlung notwendigen apparativen Aufbau nachzuweisen. Des weiteren besteht Interesse daran, die apolar-polaren repulsiven Gibbs-Ionisationsenergien jedes relevanten Aminosäurerestes zu quantifizieren, die Einflüsse von Naturierungs-/Denaturierungsvorgängen und von Reinigungszusätzen auf die hydrophobe Faltung und Assoziation abzuschätzen, die Unabhängigkeit der Größe hydrophober Domänen und ihrer Hydrophobie von Faltung und Assoziation sowie hydrophobieverstärkte Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen zu quantifizieren. Außerdem sollten die Proteinstruktur und -funktion mit spezifischen Fragen untersucht werden, z.B. nach dem Einfluß von Phosphorylierung und Ionisation von Aminosäureresten und dadurch verschobenen  $pK_a$ -Werten auf die Auflösung hydrophober Assoziate.

Das Auftreten eines neuen Materials ist zwangsläufig mit der Suche nach einer Anwendung verbunden. Wenn das Material verspricht, die vielen Gibbs-Energie-Umwandlungen ausführen zu können, an denen die intensiven Variablen mechanische Kraft, Temperatur, Druck, chemisches Potential, elektrochemisches Potential und elektromagnetische Strahlung beteiligt sind, steigt die Zahl der Anwendungsmöglichkeiten. Wenn das Grundmaterial biologisch verträglich ist und sich herausstellt, daß es ähnlich funktioniert wie die nativen Proteine wird allein die medizinische Anwendungspalette extrem breit. Wenn das Grundmaterial vom Körper nicht als fremd erkannt wird, aber durch die Einführung von Zelladhäsionsregionen, von spezifischen enzymatisch aktiven Zentren, von natürlichen chemischen Uhren, von prosthetischen Gruppen bestimmter Enzyme usw. modifiziert werden kann, damit es definierte Funktionen übernimmt, scheinen die Möglichkeiten nur durch die finanziellen Mittel, mit denen man sie verfolgt, begrenzt zu sein. Die Möglichkeit, mit einem harmlosen, elastischen, proteinartigen Polymer, das in der Lage ist, einen inversen Temperaturübergang zu vollziehen, anzufangen und dann jede der vielen möglichen Funktionalitäten oder Kombinationen aus Funktionalitäten „einzubauen“, eröffnet für die Zukunft aufregende Herausforderungen. Hinter all diesem steht die Freude daran, Konzepte in molekulare Maschinen mit praktischem Wert zu übertragen.

*Ich möchte den zahlreichen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern im Laboratory of Molecular Biophysics danken, die so viel zu den hier dargelegten Arbeiten beigetragen haben. Diese Forschung wurde teilweise vom Department of the Navy, Office of Naval Research (N 00014-89-J-1970) und von den National Institutes of Health (Grant HL-29578) gefördert.*

Eingegangen am 17. August 1992 [A 905]  
Übersetzt von Dr. Marion Gurrath, Padua

- [1] D. W. Urry, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1992**, *57*, 23–57.
- [2] A. Szent-Györgyi, *Acta Physiol. Scand.* **1945**, *9*, 1–116.
- [3] D. W. Urry, M. M. Long, H. Sugano, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6301–6302.
- [4] L. B. Sandberg, N. T. Soskel, J. B. Leslie, *N. Engl. J. Med.* **1981**, *304*, 566–579.
- [5] L. B. Sandberg, J. B. Leslie, C. T. Leach, V. L. Torres, A. R. Smith, D. W. Smith, *Pathol. Biol.* **1985**, *33*, 266–274.
- [6] H. Yeh, N. Ornstein-Goldstein, Z. Indik, P. Sheppard, N. Anderson, J. C. Rosenbloom, G. Cicila, K. Yoon, J. Rosenbloom, *Collagen Relat. Res.* **1987**, *7*, 235–247.
- [7] D. W. Urry, T. L. Trapane, K. U. Prasad, *Biopolymers* **1985**, *24*, 2345–2356.
- [8] D. W. Urry in *Methods in Enzymology* (Hrsg.: L. W. Cunningham, D. W. Frederiksen), Academic Press, New York, **1982**, S. 673–716.
- [9] D. W. Urry, *Ultrastruct. Pathol.* **1983**, *4*, 227–251.
- [10] D. W. Urry, K. Okamoto, R. D. Harris, C. F. Hendrix, M. M. Long, *Biochemistry* **1976**, *15*, 4083–4089.
- [11] D. W. Urry, M. M. Long in *Elastin and Elastic Tissue (Adv. Exp. Med. Biol.)* **1977**, *79*, S. 685–714.
- [12] D. W. Urry, T. L. Trapane, H. Sugano, K. U. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2080–2089.
- [13] W. J. Cook, H. M. Einspahr, T. L. Trapane, D. W. Urry, C. E. Bugg, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5502–5505.
- [14] C.-H. Luan, N. R. Krishna, D. W. Urry, *Int. J. Quantum Chem. Quantum Biol. Symp.* **1990**, *17*, 145–159.
- [15] M. V. Stackelberg, H. R. Müller, *Naturwissenschaften* **1951**, *38*, 456.
- [16] M. M. Teeter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6014–6018.
- [17] J. T. Edsall, H. A. McKenzie, *Adv. Biophys.* **1983**, *16*, 53–183.
- [18] H. S. Frank, M. W. Evans, *J. Chem. Phys.* **1945**, *13*, 507–532.
- [19] W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **1959**, *14*, 1–63.
- [20] D. W. Urry, *J. Protein Chem.* **1988**, *7*, 1–34.
- [21] D. W. Urry in *Molecular Conformation and Biological Interactions* (Hrsg.: P. Balaram, S. Ramaseshan), Indian Acad. Sci., Bangalore, Indien, **1991**, S. 555–583.
- [22] D. W. Urry, *Polym. Mater. Sci. Eng.* **1990**, *62*, 587–593.
- [23] D. W. Urry, D. C. Gowda, T. M. Parker, C.-H. Luan, M. C. Reid, C. M. Harris, A. Pattaiaik, R. D. Harris, *Biopolymers* **1992**, *32*, 1243–1250.
- [24] A. Pattaiaik, D. C. Gowda, D. W. Urry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *178*, 539–545.
- [25] D. W. Urry, L. C. Hayes, D. C. Gowda, C. M. Harris, R. D. Harris, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *188*, 611–617.
- [26] C.-H. Luan, T. M. Parker, K. U. Prasad, D. W. Urry, *Biopolymers* **1991**, *31*, 465–475.
- [27] D. W. Urry, L. C. Hayes, D. C. Gowda, T. M. Parker, *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *182*, 101–106.
- [28] D. W. Urry, B. Haynes, H. Zhang, R. D. Harris, K. U. Prasad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 3407–3411.
- [29] D. W. Urry, R. D. Harris, K. U. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3303–3305.
- [30] D. W. Urry, L. C. Hayes, D. C. Gowda, C. M. Harris, S. Q. Peng, R. D. Harris, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [31] D. W. Urry, L. C. Hayes, T. M. Parker, R. D. Harris, *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *201*, 336–340.
- [32] D. W. Urry, S. Q. Peng, T. M. Parker, *Biopolymers* **1992**, *32*, 373–379.
- [33] D. W. Urry, D. C. Gowda, S. Q. Peng, T. M. Parker, R. D. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8716–8717.
- [34] D. W. Urry, C. Sandorfy in *Drug and Anesthetic Effects on Membrane Structure and Function (Adv. Membr. Fluid. 5)*, **1991**, S. 91–131.
- [35] D. W. Urry, C.-H. Luan, B. A. Cox, „Proteins I: Structure, Hydrophobicity, Elasticity and Energy Conversion“ in *Treatise on Bioelectrochemistry: Biomacromolecules*, Vol. 4 (Hrsg.: G. Lenaz), Bologna, Italien, **1993**, im Druck.
- [36] D. W. Urry, C.-H. Luan, R. D. Harris, K. U. Prasad, *Polym. Prepr. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* **1990**, *31*, 188–189.
- [37] R. Cooke, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1986**, *21*, 53–118.
- [38] J. Trinick, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1991**, *3*, 112–119.
- [39] G. H. Pollack, *Muscles & Molecules: Uncovering the Principles of Biological Motion*, Ebner & Sons, Seattle, WA, USA, **1990**.
- [40] C. E. Schutt, U. Lindberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 319–323.
- [41] A. Katchalsky, S. Lisson, I. Michaeli, M. Zwick in *Size & Shape of Contractile Polymers: Conversion of Chemical & Mechanical Energy* (Hrsg.: A. Wasserman), Pergamon, New York, **1960**, S. 1–40.
- [42] A. Katchalsky, *J. Polym. Sci.* **1951**, *7*, 393–412.
- [43] W. Kuhn, B. Hargitay, A. Katchalsky, H. Eisenberg, *Nature* **1950**, *165*, 514–516.
- [44] H. G. Schild, *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17*, 163–249.
- [45] I. Z. Steinberg, A. Oplatka, A. Katchalsky, *Nature* **1966**, *210*, 568–571.
- [46] a) L. Stryer, *Biochemistry*, 3. Aufl., Freeman, New York, **1988**; b) Lit. [46a], S. 423.
- [47] Lit. [46a], S. 529.
- [48] D. C. Phillips in *Lysozyme* (Hrsg.: E. F. Osserman, R. E. Canfield, S. Beychok), Academic Press, New York, **1974**, S. 9–30.
- [49] B. E. Kemp, E. Benjamini, E. G. Krebs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 1038–1042.

- [50] D. W. Urry, D. K. Chang, H. Zhang, K. U. Prasad, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *153*, 832–839.
- [51] G. H. Lorimer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 26–34.
- [52] U. C. Manning-Krieg, P. E. Scherer, G. Schatz, *EMBO J.* **1991**, *10*, 3273–3280.
- [53] P. J. Kang, J. Ostermann, J. Schilling, W. Neupert, E. A. Craig, N. Pfanner, *Nature* **1990**, *348*, 137–143.
- [54] C. B. Anfinsen, *Science* **1973**, *181*, 223.
- [55] S. J. Landry, L. Giersch, *Biochemistry* **1992**, *30*, 7359–7362.
- [56] M. Matsumura, W. J. Becktel, B. J. Matthews, *Nature* **1988**, *334*, 406–410.
- [57] P. Goloubinoff, J. T. Christeller, A. A. Gatenby, G. H. Lorimer, *Nature* **1989**, *342*, 884–889.
- [58] P. V. Viitanen, T. H. Lubben, J. Reed, P. Goloubinoff, D. P. O'Keefe, G. H. Lorimer, *Biochemistry* **1991**, *29*, 5665–5671.
- [59] K. M. Flaherty, D. B. McKay, W. Kabsch, K. C. Holmes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5041–5045.
- [60] T. Mitchison, M. Kirschner, *Nature* **1984**, *312*, 237.
- [61] M. Kirschner, T. Mitchison, *Cell* **1986**, *45*, 329.
- [62] R. A. Walker, E. T. O'Brien, N. K. Pryer, M. F. Soboeiro, W. A. Voter, H. P. Erickson, E. D. Salmon, *J. Cell. Biol.* **1988**, *107*, 1437–1488.
- [63] D. W. Urry, S. Q. Peng, L. Hayes, J. Jaggard, R. D. Harris, *Biopolymers* **1990**, *30*, 215–218.
- [64] D. Ingber, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1991**, *3*, 841–848.
- [65] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, *238*, 491–497.
- [66] C. A. Buck, A. F. Horwitz, *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1987**, *3*, 179–205.
- [67] M. J. Humphries, *J. Cell. Sci.* **1990**, *97*, 585–592.
- [68] E. Ruoslahti, *J. Clin. Invest.* **1991**, *87*, 1–5.
- [69] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30–33.
- [70] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17294.
- [71] A. Nicol, D. C. Gowda, D. W. Urry, *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, *26*, 393–413.
- [72] D. Y. M. Leung, S. Glagov, M. B. Mathews, *Exp. Cell Res.* **1977**, *109*, 285–298.
- [73] D. Y. M. Leung, S. Glagov, M. B. Mathews, *Science* **1976**, *191*, 475–477.
- [74] H. Holinsky, S. Glagov, *Circ. Res.* **1964**, *14*, 400–413.
- [75] J. T. Powell in *The Cause and Management of Aneurysms* (Hrsg.: R. M. Greehalgh, J. A. Marrick), W. B. Saunders, London, **1990**, S. 89–96.
- [76] R. B. Rucker, D. Tinker, *Int. Rev. Exp. Pathol.* **1977**, *17*, 1–44.
- [77] D. W. Urry, *J. Protein Chem.* **1988**, *7*, 81–114.
- [78] D. W. Urry, T. M. Parker, M. C. Reid, D. C. Gowda, *J. Bioact. Compat. Polym.* **1991**, *6*, 263–282.
- [79] L. D. Hoban, M. Pierce, J. Quance, I. Hayward, A. McKee, D. C. Gowda, D. W. Urry, T. Williams, *J. Surg. Res.* **1993**, im Druck.
- [80] D. W. Urry, A. Nicol, D. C. Gowda, L. D. Hoban, A. McKee, T. Williams, D. B. Olsen, B. A. Cox, *Biotechnology Polymers: Medical, Pharmaceutical and Industrial Applications in Conferences in Print Series* (Hrsg.: C. G. Gebelein), Technomic, Lancaster, PA, USA, **1993**, im Druck.
- [81] A. Nicol, D. C. Gowda, D. W. Urry, *J. Vasc. Surg.* **1991**, *13*, 746–748.
- [82] D. W. Urry in *Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers* (Hrsg.: C. G. Gebelein, T. C. Cheng, V. C. Yang), Plenum, New York, **1991**, S. 181–192.
- [83] D. W. Urry, D. C. Gowda, C. Harris, R. D. Harris, B. A. Cox, *Polym. Prepr. Am. Chem. Soc. Div. Poly. Chem.* **1992**, *33*, 84–85.
- [84] A. B. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 885–888.
- [85] C. G. Pitt, A. Schindler in *Progress in Contraceptive Delivery Systems* (Hrsg.: E. Hafez, W. Van Os), MTP (Kluwer, Lancaster, Großbritannien) **1980**, S. 17–46.
- [86] *McGraw-Hill Concise Encyclopedia of Science and Technology*, 2. Aufl., McGraw-Hill, **1989**, S. 711.
- [87] D. Volpin, D. W. Urry, I. Pasquali-Rocchetti, L. Gotte, *Micron* **1976**, *7*, 193–198.
- [88] D. W. Urry in *Protein Folding: Deciphering the Second Half of the Genetic Code* (Hrsg.: L. Giersch, J. King), Am. Assoc. Sci., Washington, DC, **1990**, S. 63–71.
- [89] D. W. Urry, *Polym. Mater. Sci. Eng.* **1990**, *63*, 329–336.
- [90] K. Kalayanasundaram, T. Colassis, R. Humphry-Baker, P. Savarino, E. Barni, E. Pelizzetti, M. Grätzel, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3300–3311.

... meine  
**ANGEWANDTE**  
CHEMIE  
gehört <sup>zu</sup> mir !



Hans-Wilhelm G., Jr., Habilitand,  
nach der Lektüre seines persönlichen  
Exemplars der **ANGEWANDTEN** im  
kreativen Aufschwung

Bestellen auch Sie gleich Ihr  
persönliches Abonnement der **Angewandten**!  
Anruf beim VCH-Leserservice genügt:  
0 62 01/ 606-199 (Fax -117).

