

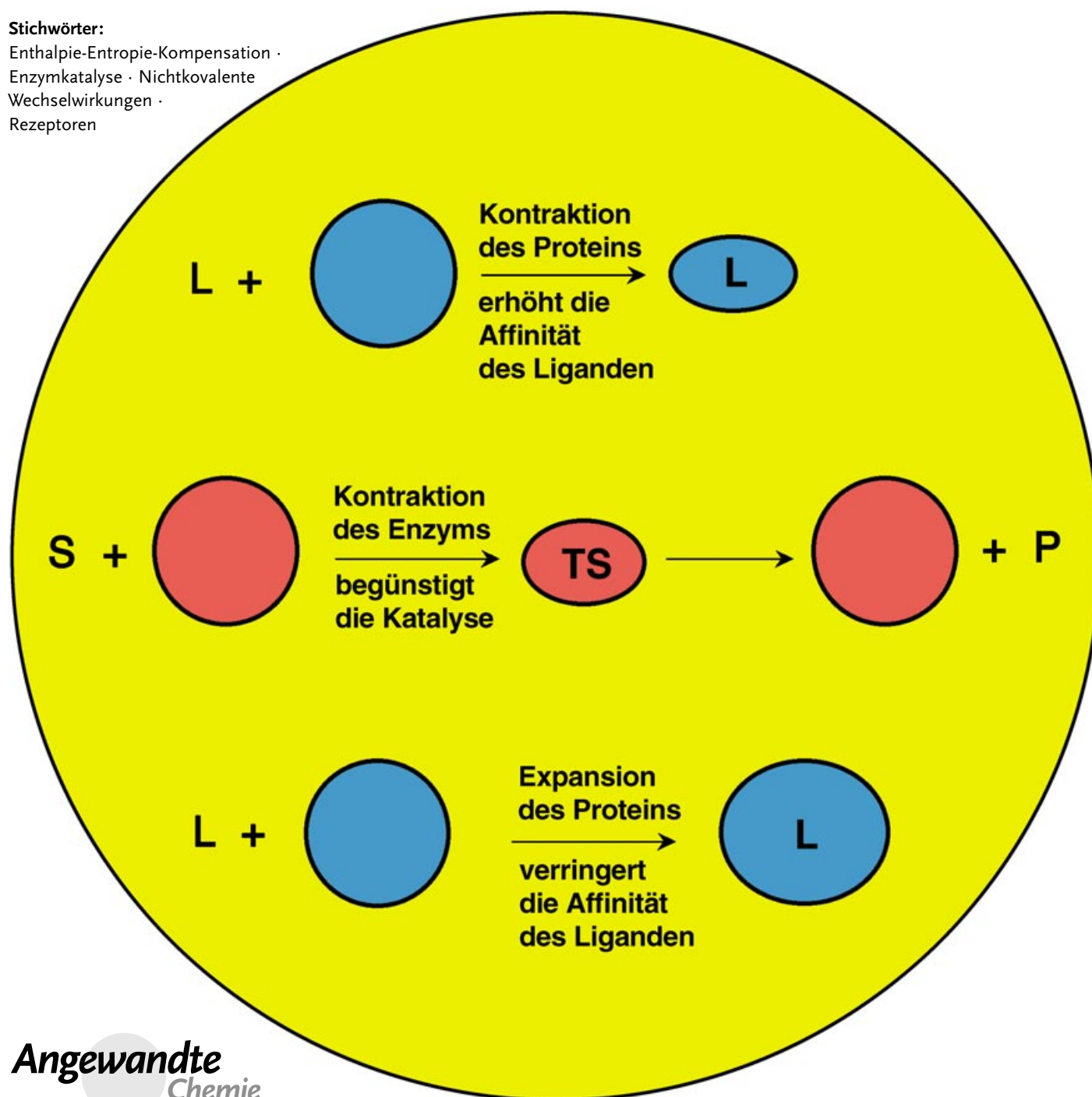
Ligandenbindungsenergien

Ligandeninduzierte Bewegungseinschränkung mit Stärkung nichtkovalenter Wechselwirkungen in Rezeptoren und Enzymen: Quelle für Bindungsenergie und katalytische Wirkung

Dudley H. Williams,* Elaine Stephens, Dominic P. O'Brien und Min Zhou

Stichwörter:

Enthalpie-Entropie-Kompensation ·
Enzymkatalyse · Nichtkovalente
Wechselwirkungen ·
Rezeptoren



Nichtkovalente Wechselwirkungen werden bisweilen als additiv behandelt. Mit diesem Verfahren lassen sich brauchbare mittlere Bindungsenergien für typische Wechselwirkungen in wässriger Lösung ableiten, der Ansatz scheitert jedoch in vielen Fällen, da sich nichtkovalente Wechselwirkungen oft gegenseitig verstärken (positiv kooperativ sind) oder abschwächen (negativ kooperativ sind). Bindungsenergie wird gewonnen, wenn ein Ligand die innere Beweglichkeit seines Rezeptors einschränkt (positiv kooperative Bindung). Auf ähnliche Weise wird bei enzymatisch katalysierten Reaktionen Energie für die Bindung des Übergangszustands gewonnen, wenn das Substrat im Übergangszustand innere Bewegungen des Enzyms einschränkt. Liganden und Substrate erhöhen auf diese Weise ihre Affinitäten für Proteine. Diese Organisation geht einher mit einem Gewinn an Bindungsenthalpie und einer Einschränkung der Dynamik (einem Entropieaufwand), erfordert aber nicht, dass neue nichtkovalente Wechselwirkungen entstehen, sondern lediglich, dass die bereits existierenden Wechselwirkungen gestärkt werden. Negativ kooperative Effekte wirken sich umgekehrt aus: Die Packungsdichte wird verringert, und Enthalpie wird aufgewendet, während Entropie gewonnen wird.

1. Einleitung

Mit der Entschlüsselung einer großen Zahl von Genomsequenzen hat sich die Proteomik zu einem erstrangigen Forschungsgebiet entwickelt. Die Proteomik beschäftigt sich mit der Identifizierung von Proteinen (ein Beispiel ist die Identifizierung von 1484 Proteinen aus dem Hefestamm *S. cerevisiae*),^[1] deren Wechselwirkungen untereinander und mit den Ligand-Protein-Bindungen. Die Bindungskonstanten dieser Wechselwirkungen hängen davon ab, wie sich nichtkovalente Bindungen in den freien und gebundenen Zuständen unterscheiden. Bindungskonstanten können nicht vorausbestimmt werden und sind folglich unzureichend verstanden, weshalb auch die molekulare Basis biologischer Funktionen oft ungeklärt ist.

In diesem Aufsatz präsentieren wir zunächst einen additiven Ansatz, der Systeme mit mehreren Wechselwirkungen durch Summierung der Einzelbeiträge beschreibt. Diese Näherung ist nützlich, reale Wechselwirkungen sind allerdings oft größer (positiv kooperativ) oder kleiner (negativ kooperativ) als die Summe ihrer Einzelbeiträge. Derartige kooperative Wechselwirkungen werden im zweiten Teil des Aufsatzes behandelt. Folgerungen für biologische Systeme werden in den Abschnitten 9 und 11–14 diskutiert, wobei die Relevanz für die Erklärung von Ligandenbindungsenergien und Enzymkatalyse im Mittelpunkt steht.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	6761
2. Der additive Ansatz	6763
3. Eine Gleichung zur Abschätzung von Bindungskonstanten	6764
4. Warum ist der gegenläufige $\Delta G_{\text{t}+}$ -Term relativ klein?	6765
5. Kooperative Bindungsprozesse: Definitionen	6767
6. Kooperative Bindung an einer einzelnen Schnittstelle	6767
7. Kooperative Bindung über mehrere Schnittstellen	6769
8. Positiv kooperative Effekte über mehrere Schnittstellen	6770
9. Negativ kooperative Effekte über mehrere Schnittstellen – Hämoglobin	6771
10. Aufbrechen von Schnittstellen durch negativ kooperative Effekte	6773
11. Einschränkung der Dynamik in Proteinrezeptoren als Quelle für Ligandenbindungsenergie	6773
12. Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen mit starker enthalpischer oder entropischer Triebkraft	6775
13. Änderungen der Rezeptoraggregation bei der Signaltransduktion	6775
14. Katalytische Wirkung durch Schrumpfen der Enzymstruktur	6776
15. Allgemeine strukturelle Auswirkungen der positiven kooperativen Bindung	6778
16. Zusammenfassung	6779

[*] Prof. Dr. D. H. Williams, Dr. E. Stephens, Dr. D. P. O'Brien, M. Zhou
Department of Chemistry
University of Cambridge
Lensfield Road, Cambridge, CB2 1EW (Großbritannien)
Fax: (+44) 1-223-336913
E-mail: dhw1@cam.ac.uk

1.1. Woher nehmen Veränderungen ihre Triebkraft?

Der zweite Hauptsatz der Thermodynamik besagt, dass die Entropie des Weltalls bei einem spontanen Vorgang zunimmt. Am einfachsten beschrieben, ist die Entropie S ein Maß für die Unordnung; sie steigt mit zunehmender Unordnung, d. h. mit zunehmender Zahl möglicher Konfigurationen eines Systems. Der zweite Hauptsatz verrät uns also, dass bei einem spontanen Vorgang die Unordnung insgesamt zunehmen wird. Wenn die Entropie des Weltalls vor dem Vorgang S_0 beträgt und nach dem Vorgang S_1 , dann ist die Änderung der Gesamtentropie $\Delta S_{\text{gesamt}} = S_1 - S_0$. Je positiver ΔS_{gesamt} ist, desto bereitwilliger wird der Prozess ablaufen. Um den Wert von ΔS_{gesamt} für einen beliebigen Prozess zu berechnen, ist es sinnvoll, die Entropieänderung in zwei Teile zu zerlegen, nämlich in die Entropieänderung des Systems (des untersuchten Gegenstands) und der Umgebung (des restlichen Weltalls). Da die Umgebung praktisch unendlich groß ist, geht die Entropieänderung in einem abgeschlossenen Volumelement gegen null.

Das Ausmaß, zu dem sich der Ordnungszustand der Umgebung eines Systems ändert, hängt von der Enthalpieänderung während des Prozesses ab (exotherm: ΔH negativ, endotherm: ΔH positiv) und von der Temperatur T , bei der der Prozess abläuft. Ein exothermer Prozess führt zu einer stärkeren Unordnung in der Umgebung (dort findet nun mehr Bewegung statt). Die Zunahme an Unordnung ist umgekehrt proportional zur Temperatur; dies kann qualitativ verstanden werden: Eine Umgebung mit wenig kinetischer Energie (niedriger Temperatur) kann durch einen gegebenen exothermen Beitrag proportional stärker in Unordnung versetzt werden als eine Umgebung mit hoher kinetischer Energie (hoher Temperatur). Da ein exothermer Prozess einen positiven Beitrag zur Änderung der Gesamt-

entropie leistet, beträgt der Entropieanstieg durch diesen Term $-\Delta H/T$.

Der zweite Teil der Entropieänderung besteht in der Änderung des Ordnungszustands des Systems, ΔS_{sys} . Positive Werte von ΔS_{sys} fördern eine Veränderung des Systems. Durch Kombination der beiden Terme lässt sich quantifizieren, inwieweit ein System eine spontane Änderung eingehen kann [Gl. (1); der Index „sys“ wird normalerweise vereinfachend weggelassen].

Zunahme der Unordnung bei einem Prozess: $-\Delta H/T + \Delta S_{\text{sys}}$ (1)

Diese wichtige Beziehung geht letztlich auf Arbeiten von Boltzmann und Gibbs zurück. Möglicherweise um Generationen von Studenten zu verwirren, wurde für diesen Nettoanstieg der Entropie in einem spontanen Prozess der Term $-\Delta G/T$ eingeführt. Somit ergibt sich der Ausdruck $-\Delta G/T = -\Delta H/T + \Delta S$, aus dem sich die Gibbs-Gleichung [Gl. (2)] ableitet.

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (2)$$

Die Gibbs-Gleichung besagt, dass ein spontan ablaufender Prozess einen negativen ΔG -Wert erfordert, d. h. eine negative Änderung der freien Enthalpie (der Gibbs-Energie). Der Definition von ΔG als *negativem* Wert der Änderung der Gesamtentropie eines Prozesses multipliziert mit T ist weniger befremdlich als es zunächst scheint. Studenten der Anfangssemester haben häufig die Vorstellung, dass spontane Änderungen durch eine Freisetzung von Wärme, d. h. durch einen exothermen Prozess (ΔH negativ) angetrieben werden. Obgleich dies nur *einer* der bestimmenden Faktoren ist, verstehen wir bereits früh, dass die Triebkraft einer spontanen Änderung ein Parameter mit der Einheit der Energie und



Dudley Williams erwarb seinen Bachelortitel in Chemie (1958) an der Universität Leeds (Großbritannien) und promovierte dort 1961 in Organischer Chemie. Nach einem Postdoc-Aufenthalt in Stanford (USA) wechselte er 1964 an die Universität Cambridge (Großbritannien). Er ist dort Fellow am Churchill College und Professor für Biologische Chemie. 1983 wurde er zum Fellow der Royal Society gewählt.



Dominic O'Brien erwarb 1996 seinen Bachelortitel in Naturwissenschaften an der Universität Cambridge (Großbritannien). 1998 promovierte er unter der Anleitung von Dudley Williams mit einer Arbeit über die Biosynthese und Wirkungsweise von Antibiotika der Vancomyngruppe. Derzeit untersucht er zusammen mit Dudley Williams den Einfluss kooperativer Effekte bei der molekularen Erkennung.



Elaine Stephens promovierte unter der Anleitung von Anne Dell am Imperial College, London, mit einer Arbeit über massenspektrometrische Studien an Glycoproteinen. Am Fachbereich Chemie der Universität Cambridge (Großbritannien) beschäftigt sie sich nun mit biologischen Anwendungen der Massenspektrometrie.



Min Zhou erwarb ihren Bachelor- und Mastertitel an der Universität Nanjing (China). Derzeit promoviert sie bei Dudley Williams am Churchill College an der Universität Cambridge (Großbritannien).

einem negativen Wert ist. Um gedankliche Kontinuität herzustellen, nehmen wir nun die Determinante einer spontanen Änderung – also eine *positive* Entropieänderung –, ändern ihr Vorzeichen, multiplizieren sie mit T (um die Einheit einer Energie zu erhalten) und nennen sie „freie Enthalpie“.

Das Phänomen der spontanen Entstehung hoch geordneter Organismen sorgt bei Studenten oft für Verwirrung, denn schließlich scheint es dem zweiten Hauptsatz zu widersprechen. Der entscheidende Punkt ist natürlich, dass die Entstehung des geordneten Organismus mit einer steigenden Unordnung in der Umgebung gekoppelt ist.

Eine Bindungsaffinität kann entweder als Differenz der freien Enthalpien des freien und gebundenen Zustandes beschrieben werden oder als Gleichgewichtskonstante K , die über den Zusammenhang $\Delta G = -RT \ln K$ mit der freien Enthalpie in Verbindung steht (R ist die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur). Je negativer ΔG ist, desto größer ist die Bindungskonstante. Bei 300 K entspricht ein ΔG -Wert von -5.7 kJ mol^{-1} einer Bindungskonstanten von 10 M^{-1} , $-11.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ entspricht 100 M^{-1} , usw. Indem wir die Gibbs-Gleichung zur Beschreibung eines Bindungsvorgangs verwenden, beziehen wir uns auf die Änderung der Bindungssituation des Systems (in Form von ΔH) und auf die Entropieänderung des Systems (in Form von $T\Delta S$). Genau genommen beträgt die Entropieänderung natürlich ΔS und nicht $T\Delta S$, für Experimente bei gleicher Temperatur sind die Terme aber proportional. Der Ausdruck $T\Delta S$ hat den Vorteil, dass sich der entropische Effekt auf ΔG direkt mit dem Effekt durch ΔH vergleichen lässt.

1.2. Enthalpie-Entropie-Kompensation

Eine Bewegungseinschränkung bedeutet, dass weniger Zustände zugänglich sind und somit eine Verringerung der Entropie resultiert. Betrachten wir die Bildung einer spezifischen nichtkovalenten Bindung (z.B. $\mathbf{A} + \mathbf{B} \rightarrow \mathbf{A} \cdots \mathbf{B}$): Mit zunehmender Stärke der Wechselwirkung (entsprechend einem größeren negativen Beitrag zu ΔH ; günstig für den Bindungsprozess) wird die relative Beweglichkeit von \mathbf{A} und \mathbf{B} zunehmend eingeschränkt (entsprechend einem zunehmend negativen Beitrag zu ΔS ; ungünstig für den Bindungsprozess). Dieses gegenläufige Wechselspiel zwischen Enthalpie und Entropie wird als Enthalpie-Entropie-Kompensation bezeichnet; es ist ein fundamentales Merkmal nichtkovalenter Wechselwirkungen^[2–4] und sollte nicht etwa Messfehlern zugeschrieben werden.^[6] Das Phänomen der Enthalpie-Entropie-Kompensation beschränkt sich nicht auf Wechselwirkungen in wässriger Lösung.^[5] Ursache der Enthalpie-Entropie-Kompensation ist die gegenläufige Natur von Bindung und Bewegung. Die beiden Effekte können sich ausbalancieren, weil die Stärke nichtkovalenter Bindungen mit der thermischen Energie bei Raumtemperatur vergleichbar ist. Dagegen spielt die Enthalpie-Entropie-Kompensation für kovalente Bindungen keine große Rolle, da deren Energien typischerweise viel größer sind als die Energie der thermischen Bewegung.

2. Der additive Ansatz

Wenn wir kooperative Effekte zunächst vernachlässigen, können die einzelnen Beiträge von ΔG zur Gesamtbindungsenergie addiert werden; Beiträge zur Bindungskonstanten K werden entsprechend multipliziert.

2.1. Energieaufwand bei der Bildung eines bimolekularen Komplexes ($\mathbf{L} + \mathbf{R} \rightarrow \mathbf{L} \cdots \mathbf{R}$)

Wenn ein Ligand \mathbf{L} an einen Rezeptor \mathbf{R} bindet, werden seine Translations(t)- und Rotationsbewegungen (r) relativ zum Rezeptor eingeschränkt. Für die Koordination muss ein Beitrag ΔG_{t+r} aufgewendet werden, der einem ungünstigen Entropieterm entspricht ($\Delta G_{t+r} = -T\Delta S_{t+r}$).^[7–9] Würde der Ligand seine *gesamte* Beweglichkeit relativ zum Rezeptor einbüßen, so ergäbe sich ein Entropieaufwand von ca. $+57 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Assoziation eines Liganden mit einer Masse von einigen hundert Dalton bei Raumtemperatur. Dies würde die Bindung um einen Faktor 10^{-10} schwächen.^[7–9] In typischen Ligand-Rezeptor-Komplexen sind aber die Stärken nichtkovalenter $\mathbf{A} \cdots \mathbf{X}$ - und $\mathbf{B} \cdots \mathbf{Y}$ -Bindungen (Abbildung 1) von der Größenordnung der thermischen Energie,

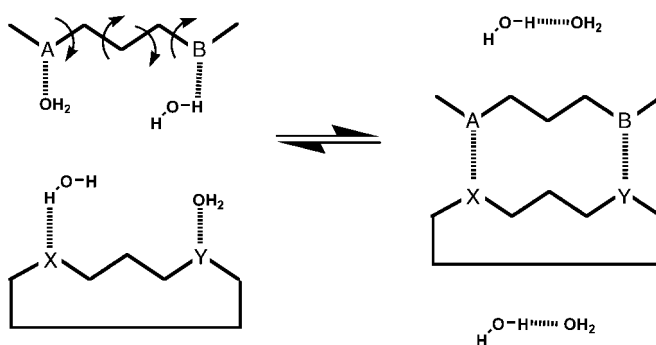


Abbildung 1. Komplexbildung zwischen einem Liganden (mit den polaren funktionellen Gruppen \mathbf{A} und \mathbf{B}) und einem Rezeptor (mit den polaren funktionellen Gruppen \mathbf{X} und \mathbf{Y}) unter Freisetzung von vier Wassermolekülen in das Lösungsmittel. (Gestrichelte Linien: Wasserstoffbrücken.)

sodass die Bindungen hoch elastisch sind und für die Einschränkung der Beweglichkeit weitaus weniger als $+57 \text{ kJ mol}^{-1}$ aufgewendet werden müssen (siehe Abschnitte 3 und 4).

Wenn die inneren Rotationsfreiheitsgrade eines Moleküls beim Übergang vom freien in den gebundenen Zustand eingeschränkt werden, muss ein entropischer Beitrag von $-T\Delta S_r = \Delta G_r$ für jeden eingeschränkten Rotationsfreiheitsgrad aufgewendet werden. Zum Beispiel hat der in Abbildung 1 oben links gezeigte Ligand vier interne Rotationsfreiheitsgrade (durch Pfeile gekennzeichnet), die dem freien Molekül eine hohe Beweglichkeit verleihen. Diese wird bei der Komplexbildung erheblich eingeschränkt, sodass sich die Bindungsenergie um einen entropischen Beitrag von $4\Delta G_r$ verringert (oder allgemein um $n\Delta G_r$ für n eingeschränkte Rotationsfreiheitsgrade).

Um eine interne Rotation bei Raumtemperatur vollständig einzuschränken, müsste eine Energie $\Delta G_r \approx 5 \text{ kJ mol}^{-1}$ aufgewendet werden.^[8,9] Auch dieser Wert ist größer als reale Werte für Wirkstoff-Rezeptor-Komplexe, da die Wechselwirkungsenergien, die das dynamische Verhalten des Komplexes einschränken, von der gleichen Größenordnung sind wie die thermische Energie, die den Komplex zu dissoziieren versucht. Infolgedessen sind die internen Rotationen im gebundenen Zustand zwar blockiert, der Ligand führt aber immer noch Wippbewegungen aus.

Die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor kann mit sterischen Spannungen oder repulsiven Wechselwirkungen einhergehen. Die experimentelle Untersuchung dieser Effekte ist schwierig. Aus praktischen Gründen werden wir sie in unserem einfachen Ansatz zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten vernachlässigen (Abschnitt 3), bei der negativen kooperativen Bindung sind sie aber relevant (Abschnitte 6, 9 und 10).

2.2. Energiegewinn bei der Bildung bimolekularer Komplexe

Eine Komplexbildung profitiert energetisch von einer polaren Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung, wenn dabei die gesamte freie Enthalpie abnimmt. Die Entstehung zweier polarer Wechselwirkungen ($\mathbf{A} \cdots \mathbf{X}$ und $\mathbf{B} \cdots \mathbf{Y}$) in Wasser als Lösungsmittel ist in Abbildung 1 illustriert: Wassermoleküle, die vor der Komplexbildung die polaren Gruppen \mathbf{A} , \mathbf{B} , \mathbf{X} und \mathbf{Y} solvatisieren, werden bei Annäherung der Wechselwirkungspartner in die Volumenphase überführt. Der Energiegewinn kann halbquantitativ beschrieben werden, indem man für jede dieser Wechselwirkungen den Gewinn an freier Enthalpie (ΔG_p) berechnet; dieser Term berücksichtigt auch die Entropieänderungen, die mit den Änderungen der Solvenbeweglichkeit einhergehen.

Die erste halbquantitative Beschreibung von Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen, die die oben genannten energetischen und entropischen Beiträge einschließt, geht auf Andrews, Craig und Martin zurück.^[10] Wir haben einen ähnlichen Ansatz mit einem zusätzlichen Term für den hydrophoben Effekt verwendet.^[11]

Der hydrophobe Effekt ist klassisch definiert als ein Beitrag, der eine Komplexbildung in wässriger Umgebung begünstigt.^[12,13] Diese Begünstigung beruht darauf, dass infolge der Komplexbildung weniger Kohlenwasserstoffoberfläche mit dem Lösungsmittel Wasser in Kontakt ist. Der Effekt kann durch Solvenstransferexperimente gemessen werden. Im Beispiel in Abbildung 1 sind \mathbf{A} und \mathbf{B} sowie \mathbf{X} und \mathbf{Y} jeweils durch drei Methylengruppen voneinander getrennt; die gegenseitige Annäherung der beiden Kohlenwasserstoffoberflächen fördert den Bindungsprozess dadurch, dass sie nicht mehr mit dem Lösungsmittel Wasser in Kontakt sind. Der Betrag des hydrophoben Effekts ist proportional zur Oberfläche des Kohlenwasserstoffteils, der bei der Komplexbildung dem Wasser entzogen wird, und wird als ΔG_h pro vergrabener Kohlenwasserstoffoberfläche A angegeben. Diese Fläche kann leicht mit computergraphischen Verfahren bestimmt werden. Der Beitrag des hydrophoben Effekts zur Gesamtbindungsenergie beträgt somit $A \Delta G_h$.

Der hydrophobe Effekt geht letztlich darauf zurück, dass Wassermoleküle an der Kohlenwasserstoffoberfläche stärker geordnet sind als Wassermoleküle in der Volumenphase.^[14] Somit ist der hydrophobe Effekt bei Raumtemperatur weitgehend ein entropischer Effekt – er ist aber auch enthalpisch begünstigt, und zwar in den Fällen, in denen bei der Bindung des Liganden Wasser aus Hohlräumen des Rezeptors verdrängt wird.^[15]

3. Eine Gleichung zur Abschätzung von Bindungskonstanten

Zur Abschätzung von Bindungskonstanten in wässriger Lösung kann Gleichung (3) herangezogen werden, die sich aus den obigen Betrachtungen ableitet.

$$\Delta G = \Delta G_{\text{itr}} + n \Delta G_r + A \Delta G_h + \sum \Delta G_p \quad (3)$$

ΔG ist die beobachtete Bindungsenergie und $\sum \Delta G_p$ die Summe der freien Bindungsenergien aller polaren Wechselwirkungen in der Bindungstasche;^[11] die übrigen Terme sind in Abschnitt 2 definiert. Böhm verfeinerte eine Variante von Gleichung (3),^[16a] indem er einen Satz von 45 röntgenographisch untersuchten Wechselwirkungen mit niedermolekularen Liganden (66–1047 Da) berechnete; die experimentellen Bindungskonstanten waren bekannt. Die ΔG_p -Werte wurden in zwei Gruppen unterteilt: solche für ionische Wechselwirkungen ($\Delta G_{\text{ionisch}}$) und solche für Wasserstoffbrücken zwischen neutralen Gruppen (hierfür wurde der Term ΔG_p beibehalten). Da diese modifizierte Form der Gleichung (3) nur fünf ΔG -Terme enthält und die 45 Bindungsstellen durch unterschiedliche Kombinationen dieser fünf Terme beschreibbar sind, können für die einzelnen Beiträge zu ΔG Durchschnittswerte erhalten werden (Tabelle 1). Diese Werte haben sich als sehr nützlich für die pharmazeutische Forschung erwiesen.

Tabelle 1: Durchschnittliche Werte der in Gleichung (3) enthaltenen Parameter.

Parameter	physikalischer Vorgang	Wert [kJ mol ⁻¹]	Faktor ^[a]
ΔG_{itr}	Energieaufwand für die Assoziation zweier Moleküle	+5.4	(ca. 10)
ΔG_r	Energieaufwand für die Einschränkung einer internen Rotation	+1.4	(ca. 2 ^[b])
ΔG_h	Energiegewinn durch hydrophoben Effekt (pro Å ² vergrabener Kohlenwasserstofffläche)	-0.17 (Å ⁻²)	ca. 10 ^[c]
ΔG_p	Energiegewinn bei Bildung einer neutralen Wasserstoffbrücke mit Idealgeometrie	-4.7	ca. 7
$\Delta G_{\text{ionisch}}$	Energiegewinn bei Bildung einer ionischen Wasserstoffbrücke mit Idealgeometrie	-8.3	ca. 28

[a] Faktor, um den ein Bindungsprozess bei Raumtemperatur verstärkt/geschwächt wird. [b] Pro Rotor. [c] Bei Vergraben von 33 Å² Kohlenwasserstofffläche.

Mit den Werten in Tabelle 1 reproduzierte die modifizierte Gleichung die Bindungskonstanten des Testsatzes (mit experimentellen Werten zwischen 40 M^{-1} und $2.5 \times 10^{13}\text{ M}^{-1}$) mit einer Standardabweichung von 7.9 kJ mol^{-1} , entsprechend einem Faktor von 24 an Bindungsaffinität.^[16a] Bei einem weiteren Satz von Wirkstoffen betrug die Standardabweichung einen Faktor von 50 an Bindungsaffinität. Angesichts des kleinen Datensatzes ist dieses Ergebnis erstaunlich, es sollte aber darauf hingewiesen werden, dass die Übereinstimmung etwas schlechter ausfällt, wenn sich die Wirkstoffstrukturen deutlicher unterscheiden (z.B. wenn der Anteil heterocyclischer Strukturen größer ist).^[16b] Einige weitere erfolgreiche Ansätze zur Bestimmung von Bindungskonstanten wurden seither veröffentlicht, allerdings sind die dort verwendeten Terme (und Koeffizienten) physikalisch schwieriger zu interpretieren.^[17,18]

Die in Tabelle 1 verzeichneten Bindungsenergien für die jeweiligen Wechselwirkungen stimmen mit den Ergebnissen aus anderen Ansätzen, z.B. Mutationsexperimenten, gut überein.^[19–21] Bindungen werden durch polare Wechselwirkungen (am häufigsten Wasserstoffbrücken zwischen Amidgruppen und ionische Wechselwirkungen) in wässriger Lösung moderat verstärkt (ΔG ist dann negativ). Warum der Beitrag zur Bindungsstärke relativ gering ausfällt, geht aus Abbildung 1 hervor: Die vier Wasserstoffbrücken im dissoziierten Zustand werden durch vier neue Wasserstoffbrücken im gebundenen Zustand ersetzt.^[19]

Der für den hydrophoben Effekt angegebene Betrag stimmt mit den Werten aus anderen Arbeiten weitgehend überein. Er ist etwas größer als die auf Grundlage der (niedrigen) Löslichkeit von Kohlenwasserstoffen in Wasser bestimmten Werte ($0.10\text{--}0.14\text{ kJ mol}^{-1}\text{ pro } \text{\AA}^2$ an vergrabener hydrophober Oberfläche).^[22–28] Hingegen ist er etwas kleiner als Beträge aus Deletionsexperimenten (Deletion von Methylgruppen in Bindungsstellen), sowohl in Proteinen wie auch bei Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen. Dabei werden zumeist $0.18\text{ bis }0.26\text{ kJ mol}^{-1}\text{ \AA}^{-2}$ gefunden,^[20,29–32] die Werte streuen aber über einen breiten Bereich von $0.06\text{ bis }0.64\text{ kJ mol}^{-1}\text{ \AA}^{-2}$.^[33–38] Vermutlich spiegeln sich darin zumindest teilweise die vielen Varianten positiv und negativ kooperativer Effekte wider.

Die Platzierung eines Liganden in der Bindungsstelle und die Einschränkung seiner inneren Rotationsfreiheitsgrade (siehe Abschnitt 2.1) müssen sich in Gleichung (3) als bindungsschwächende Terme niederschlagen (gleichbedeutend mit positiven Werten von ΔG_{tr} und ΔG_r in Tabelle 1). Der durchschnittliche Wert $\Delta G_{\text{tr}} = +5.4\text{ kJ mol}^{-1}$ ist relativ klein und entspricht nur etwa 10% des maximalen theoretischen Entropieverlusts, der bei vollständiger Immobilisierung des Liganden zu erwarten wäre (siehe Abschnitt 2), sodass der Ligand im Ligand-Rezeptor-Komplex sehr beweglich bleibt. Der durchschnittliche Energieaufwand für die Einschränkung der Rotation einer inneren Bindung des Wirkstoffs ($+1.4\text{ kJ mol}^{-1}$) ist etwas größer als der Betrag, der für die Bildung von Kristallen aus Flüssigkeiten mit internen Rotationsfreiheitsgraden aufgewendet werden muss ($2\text{--}3\text{ kJ mol}^{-1}$).^[39] Die Rotationen wären demzufolge in Proteinrezeptorstellen weniger stark eingeschränkt als in Kristallen.

Gleichung (3) liefert also in vielen Fällen brauchbare Näherungen für Bindungskonstanten.

4. Warum ist der gegenläufige ΔG_{tr} -Term relativ klein?

Der durchschnittliche Wert $\Delta G_{\text{tr}} = +5.4\text{ kJ mol}^{-1}$ erscheint relativ klein, wenn man bedenkt, dass er für das gesamte Wirkstoffmolekül gilt. Warum ist das so? Je stärker die nichtkovalenten Bindungen sind, die einen Komplex zusammenhalten, desto stärker sollte auch die Einschränkung der Gesamtbeweglichkeit ausfallen (für den damit verbundenen Entropieverlust ist ΔG_{tr} ein Maß). Um diese Hypothese zu prüfen, müssen wir Komplexbildungsreaktionen betrachten, bei denen die Entropieänderung ausschließlich – oder zumindest weitgehend – auf ΔG_{tr} zurückgeht. Entropieänderungen durch Änderungen der Solvation müssen vernachlässigbar oder minimal sein, was bedeutet, dass Studien in Wasser oder anderen polaren Lösungsmitteln nicht infrage kommen. Darüber hinaus dürfen bei der Komplexbildung möglichst keine internen Rotationen eingeschränkt werden, damit die Interpretation der Entropieänderungen nicht durch einen signifikanten $n\Delta G_r$ -Term gestört wird [Gl. (3)]. Unter diesen Voraussetzungen wird der Entropieaufwand bei der Komplexbildung ausschließlich – oder zumindest weitgehend – durch den ΔG_{tr} -Term bestimmt.^[40]

Erfüllt sind die obigen Bedingungen bei einfachen bimolekularen Komplexbildungsreaktionen relativ starrer Gruppen in der Gasphase ($\mathbf{A} + \mathbf{B} \rightarrow \mathbf{A} \cdots \mathbf{B}$). Der günstige Beitrag zu einer nichtkovalenten Bindung zwischen den beiden Komponenten kann nur von der Wechselwirkungsenthalpie ΔH stammen, während als einziger ungünstiger Beitrag der Verlust an Translations- und Rotationsentropie ($T\Delta S_{\text{tr}}$) auftritt. Abbildung 2 zeigt die erwartete Korrelation zwischen freigesetzter Wärme (ΔH) und erzeugter Ordnung ($T\Delta S_{\text{tr}}$, identisch mit $-\Delta G_{\text{tr}}$).^[2] Es gibt einen Grenzwert für die bei der Komplexbildung zu investierende Entropie. Dieser wird erreicht, wenn die Bindungsstärke groß gegenüber der thermischen Energie ist; $\delta(\Delta H)/T\delta(\Delta S)$ wird in diesem Fall sehr groß. Wenn die Bindungsstärke und die thermische Energie vergleichbar sind, wird die Beweglichkeit weniger eingeschränkt und $\delta(\Delta H)/T\delta(\Delta S)$ ist kleiner. Deshalb dürfen wir annehmen, dass die Steigung der $(-\Delta H)$ - $(-T\Delta S)$ -Kurve (Abbildung 2) im „nichtkovalenten Bereich“ mit zunehmender Bindungsstärke ebenfalls zunimmt.

Tatsächlich leitete Dunitz eine sehr ähnliche Kurve mit einem halbquantitativen Ansatz auf der Basis flacher Energiesenken ab.^[3] Mit abnehmender Tiefe der Energiesenken sollten die Bindungsdehnung und dynamische Aspekte wichtiger werden. Dieser Aspekt ist in Abbildung 2 durch abnehmend exotherme Komplexe illustriert (grüner, roter und schwarzer Punkt auf der Kurve). In weniger exothermen Komplexen sind die Bindungen loser, und es steht weniger freie Bindungsenthalpie ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) zur Verfügung, um geordnete Zustände zu besetzen. Dies folgt daraus, dass bei der schwächsten nichtkovalenten Wechselwirkung (schwarzer Punkt) die wirksamste Enthalpie-Entropie-Kompensation auftritt.^[3,4]

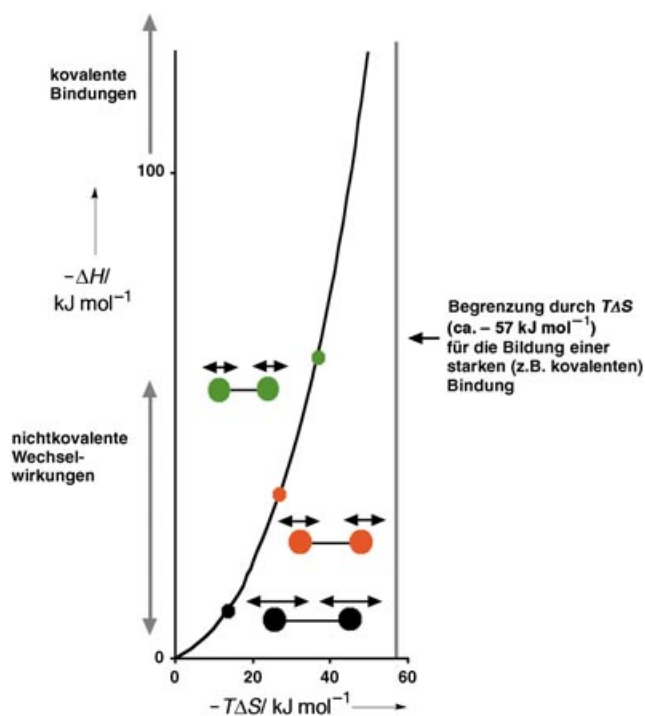


Abbildung 2. Erwartete Beziehung zwischen der Exothermie (ΔH) und dem Entropieaufwand ($T\Delta S$) einer Komplexbildung $A + B \rightarrow A \cdots B$ in der Gasphase oder in einem nichtpolaren Lösungsmittel bei 298 K (schwarze Kurve). Unter diesen Bedingungen ist $-T\Delta S$ ein Maß für ΔG_{tr} . Wenn die relativen Bewegungen von **A** und **B** in $A \cdots B$ hochgradig eingeschränkt sind, dann tendiert der Entropieaufwand gegen den Grenzwert $T\Delta S \approx -57 \text{ kJ mol}^{-1}$. Bei Raumtemperatur wird dieser Grenzwert bei Enthalpien erreicht, die der Bildung einer kovalenten Bindung entsprechen. Bei schwächeren $A \cdots B$ -Bindungen bleibt die Restbeweglichkeit von **A** höher. Die höhere Beweglichkeit und die damit verbundenen längeren Bindungen sind durch die drei „Molekülhanteln“ illustriert, die dem grünen, roten und schwarzen Punkt auf der Kurve entsprechen. Der Entropieaufwand wird mit abnehmender Exothermie kleiner.

Diese Rückschlüsse werden von experimentellen Daten gestützt. Wenn die Enthalpie der Komplexbildung abnimmt (d.h. die Senke flacher wird), wird auch der gegenläufige ΔG_{tr} -Term (entsprechend $T\Delta S_{\text{tr}}$) kleiner.^[2,40] Bei schwach exothermen Komplexbildungen (weniger als 20 kJ mol^{-1}) beträgt der gegenläufige ΔG_{tr} -Term weniger als 13 kJ mol^{-1} . Bildlich ausgedrückt: „Schwache Federn“ zeigen höhere Restbeweglichkeit an der Bindungsstelle.

Eine ähnliche Beziehung sollte auch für nichtkovalente Wechselwirkungen in unpolaren Lösungsmitteln gelten, die in erster Näherung Wechselwirkungen in der Gasphase gleichen. Dies folgt daraus, dass die günstige Entropieänderung bei der Desolvatation der polaren Gruppen, die bei der Komplexbildung in Wechselwirkung treten, relativ klein sein dürfte. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden 233 solcher Komplexbildungen^[41] untersucht (Abbildung 3):^[42] 215 Datenpunkte gaben die erwartete Korrelation gut wieder, die 18 deutlich abweichenden Datenpunkte stellten sich bei einer Überprüfung als fehlerhaft heraus.^[42]

Viele Punkte für Komplexbildungen in unpolaren Lösungsmitteln, die weniger als 10 kJ mol^{-1} exotherm sind,

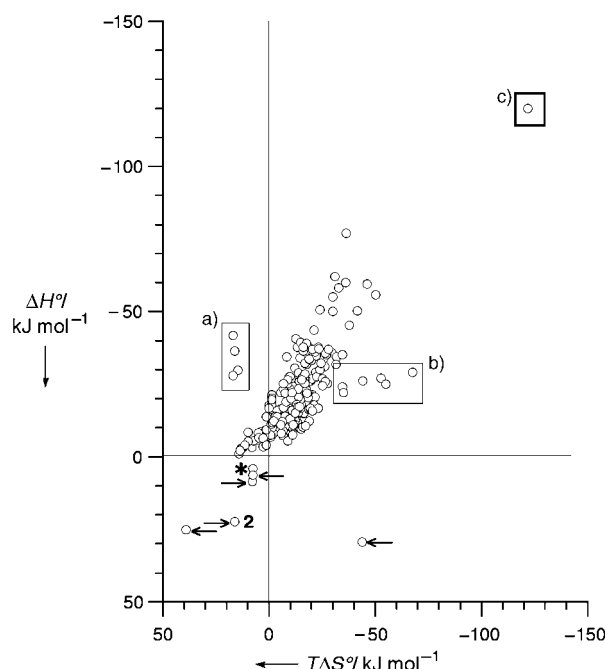


Abbildung 3. Enthalpie-Entropie-Diagramm für die Komplexbildung von Makrocyclen mit neutralen Molekülen in nichtpolaren Lösungsmitteln.^[41] Man erkennt sechs Gruppen von Datenpunkten, die mit der allgemeinen Form der Enthalpie-Entropie-Kompensation nicht konsistent sind; in allen Fällen können aber Fehler^[42] ausgemacht werden (was angesichts der Themenbreite der Übersicht in Lit. [41] durchaus nachvollziehbar ist). Drei Beispiele werden angeführt: a) Vier Datenpunkte wurden mit dem falschen Vorzeichen für ΔS übertragene; sie müssen deshalb vom linken oberen Quadranten in den rechten oberen Quadranten verschoben werden. b) Bei sechs Datenpunkten wurde ein zu großer Faktor für die Umrechnung von ΔS verwendet (Faktor 4.18, entsprechend Joule-Kalorie); die Punkte müssen daher in den Bereich mit normaler Korrelation verschoben werden. c) Diesem Punkt liegt kein Übertragungsfehler zugrunde, der durch uns ermittelte experimentelle Wert weist aber darauf hin, dass ein Fehler vorliegt. Werden diese Werte, sowie weitere, durch Pfeile und Sternchen markierte Punkte korrigiert, so stimmen die Kurvenverläufe in Abbildung 2 und 3 grundsätzlich überein.

liegen im oberen linken Quadranten (Abbildung 3). Der Grund ist, dass schwach exotherme Komplexbildungen wenig geordnete Komplexe $A \cdots B$ ergeben und folglich nur einen sehr geringen Entropieaufwand erfordern. Obwohl also der Entropiegewinn durch Desolvatation für Komplexbildungen in unpolaren Lösungsmitteln gering ausfällt, reicht dieser Betrag bei schwach exothermen Komplexbildungen aus, um den geringen Entropieaufwand zu kompensieren oder zu übertreffen.

Es scheint, dass es unter den 233 Datenpunkten keine Ausnahmen zu der in Abbildung 2 illustrierten Beziehung gibt. Die allgemeine Gültigkeit dieser Funktion wurde genutzt, um fehlerhafte Literaturwerte zu identifizieren und zu korrigieren. Die Vorstellung, dass eine stärker exotherme nichtkovalente Wechselwirkung mit einem größeren Entropieaufwand (d.h. einer stärkeren Einschränkung der Beweglichkeit) einhergeht, bestätigt sich vollauf.

Die Daten für nichtkovalente Komplexbildungen in der Gasphase und in unpolaren Lösungsmitteln untermauern

auch die Rückschlüsse aus dem zur Überprüfung von Gleichung (3) herangezogenen Datensatz für Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen; so treten beispielsweise bei nichtkovalenten Komplexbildungen relativ kleine gegenläufige $\Delta G_{\text{t+r}}$ -Terme auf. Im Durchschnitt bewahren die Wirkstoffmoleküle eine beträchtliche Beweglichkeit relativ zum Rezeptor, d. h., der Wirkstoff-Rezeptor-Komplex bleibt dynamisch.

5. Kooperative Bindungsprozesse: Definitionen

Ziel bei der Untersuchung von Bindungsaffinitäten ist es, die strukturellen Ursachen von ΔG zu verstehen. Aus den obigen Abschnitten geht klar hervor, dass die Einflüsse auf die Bindungs- (ΔH) und Ordnungsterme ($T\Delta S$) bei der Bindung von flexiblen Molekülen in wässriger Lösung sehr zahlreich sind. Es ist daher ratsam, die Variablen dieses komplexen Problems so zu separieren, dass eine physikalisch anschauliche Interpretation möglich ist. Dies gelang bereits für die Einflüsse von nichtkovalenter Wechselwirkung und Desolvatation auf die Komplexbildung (durch Betrachtung der Komplexbildung in der Gasphase bzw. in nichtpolaren Lösungsmitteln, siehe Abschnitt 4). Ein kooperatives Verhalten zwischen nichtkovalenten Wechselwirkungen wurde bislang nicht diskutiert. Wir werden im Folgenden erläutern, dass der Einfluss von kooperativem Verhalten auf die Bindungs- (ΔH) und Ordnungsterme ($T\Delta S$) einigermaßen zuverlässig bestimmt werden kann.

Wenn die Bindungsenergie kooperativer nichtkovalenter Wechselwirkungen größer ist als die Summe der einzelnen Wechselwirkungen, sprechen wir von einem positiven kooperativen Effekt. Entsprechend liegt ein negativer kooperativer Effekt vor, wenn die Bindungsenergie kooperativer nichtkovalenter Wechselwirkungen kleiner ist als die Summe der einzelnen Wechselwirkungen. Die Gleichung (3) wurde eingeführt, um Probleme in Zusammenhang mit kooperativem Verhalten zu umgehen. Sie basiert auf der Vorstellung, dass die freie Enthalpie für die Komplexbildung ($\Delta G_{\text{t+r}}$) nur einmal aufgewendet werden muss. Es wurde gefolgert, dass alle Freie-Enthalpie-Terme additiv behandelt werden können, wenn dieser gegenläufige Term getrennt von den übrigen Beiträgen zur freien Enthalpie behandelt werden kann.

Die Abbildungen 2 und 3 verdeutlichen, dass dieser Ansatz allgemein hin unzulänglich ist, da der gegenläufige $\Delta G_{\text{t+r}}$ -Term mit steigender Bindungsstärke zunimmt. Eine zusätzliche polare Wechselwirkung an der Bindungsschnittstelle kann die lokale Dynamik einschränken, sodass sich die freie Enthalpie in der Nähe befindlicher Wechselwirkungen erhöht (siehe Abschnitt 6).^[40] Dieses Auftreten unterschiedlich starker positiv kooperativer Effekte, die durch das Wechselspiel zwischen Bewegung und Bindung hervorgerufen werden, verhindert eine exakte Analyse der Bindungsaffinitäten als Summe der Einzelbeiträge.

Dennoch sind viele Systeme (insbesondere synthetische) ohne signifikante kooperative Effekte bekannt, bei denen die Bindungsenergie sehr wohl der Summe der Einzelbeiträge entspricht. Zum Beispiel kann die Bindungsaffinität von

Polyaminen für DNA einfach als Funktion der Beiträge der einzelnen Ammoniogruppen beschrieben werden.^[43]

6. Kooperative Bindung an einer einzelnen Schnittstelle

6.1. Positiv kooperatives Verhalten

Um zu sehen, wie sich positive Kooperativität in einem einfachen System mit polaren Wechselwirkungen äußert, betrachten wir einen Rezeptor, der die Liganden **X**, **Y** und **Z** mit den Affinitäten ΔG_X , ΔG_Y bzw. ΔG_Z bindet (Abbildung 4). Wenn die in beliebiger Kombination gebundenen

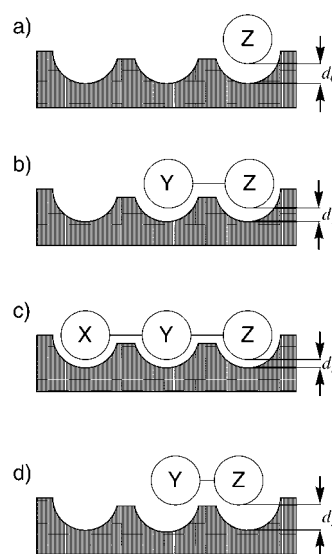


Abbildung 4. Schematische Darstellung eines Rezeptors, der die Liganden **X**, **Y** und **Z** mit den Affinitäten ΔG_X , ΔG_Y bzw. ΔG_Z bindet. a) Der Ligand **Z** bindet im Abstand d_0 an den Rezeptor. b) Wenn **Y** und **Z** durch einen starren, spannungsfreien Linker verknüpft sind, dann bindet das Konjugat **Y–Z** positiv kooperativ (ΔG_{Y-Z} ist negativer als $\Delta G_Y + \Delta G_Z$), und die Struktur wird dichter ($d_1 < d_0$). c) Wenn **Y–Z** durch einen starren, spannungsfreien Linker mit einem weiteren Liganden **X** verknüpft wird, verstärkt sich der kooperative Effekt, und die Struktur wird weiter verdichtet (**X–Y–Z**; $d_2 < d_1$). d) Ein zu kurzer Linker zwischen **Y** und **Z** verhindert, dass die Liganden die für eine bindende Wechselwirkung optimale Geometrie einnehmen. **Y–Z** bindet folglich negativ kooperativ an den Rezeptor (ΔG_{Y-Z} ist positiver als $\Delta G_Y + \Delta G_Z$), und die Struktur wird gelockert ($d_3 > d_0$).

Liganden *separate* Wechselwirkungen eingehen, dann setzt sich die Gesamtänderung der freien Enthalpie einfach aus der Summe der Einzelbeiträge der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zusammen. Betrachten wir nun aber den Fall, dass **Y** und **Z** durch einen Linker verknüpft sind (**Y–Z**) (Abbildung 4b). Hier bewirkt der klassische entropische Chelateffekt, wie er durch Jencks und Page beschrieben wurde, eine Verstärkung der Bindung.^[7–9] In anderen Worten: Wenn **Y** und **Z** separat mit einem gegenläufigen $T\Delta S_{\text{t+r}}$ -Term vom Betrag N binden, dann beträgt der Entropieaufwand für die Bindung von **Y–Z** weniger als $2N$. Zu diesem Entropiegewinn müssen wir nun die oben diskutierten günstigen Beiträ-

ge durch kooperative Effekte hinzuzählen. Zunächst wäre zu berücksichtigen, dass die Bewegungseinschränkungen, die **Y** und **Z** bei einer Koordination in Form von **Y–Z** gegenseitig aufeinander ausüben, die Exothermie der nichtkovalenten Bindungen zum Rezeptor *erhöhen*; das bedeutet, dass die Struktur des Ligand-Rezeptor-Komplexes stärker komprimiert wird (Abbildung 4, $d_1 < d_0$). Die erhöhte Exothermie setzt ihrerseits die Beweglichkeit von **Y** und **Z** (in **Y–Z**) relativ zum Rezeptor herab. Diese beiden Effekte resultieren somit in einem günstigen enthalpischen und einem ungünstigen entropischen Beitrag. Entsprechend wird die Anknüpfung eines weiteren Liganden **X** durch einen spannungsfreien Linker (in **X–Y–Z**) zu einer weiteren Komprimierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes ($d_2 < d_1$) und einer weiteren kooperativen Verstärkung der Bindung führen (Abbildung 4c).

In Untersuchungen von Glycopeptid-Antibiotika wurde die in den Abbildungen 4a–c illustrierte Abnahme von Abständen nachgewiesen.^[44] Mehrere Peptidliganden, die alle die in Abbildung 5 unten rechts gezeigte Carboxylatgruppe enthalten, wurden separat an die Antibiotika koordiniert. In allen Fällen wurde eine starke Tieffeldverschiebung ($\Delta\delta = 1\text{--}3\text{ ppm}$) des Amid-NH-Protons H^2 des Antibiotikums bei der Koordination eines Liganden beobachtet. Eine Tieffeldverschiebung dieses Protons zeigt eine Verkürzung und Stärkung der Carboxylat-HN-Wasserstoffbrücke an.^[44–46] Diese Wasserstoffbrücke ist umso stärker, je mehr Wasserstoffbrücken und andere die Beweglichkeit einschränkende

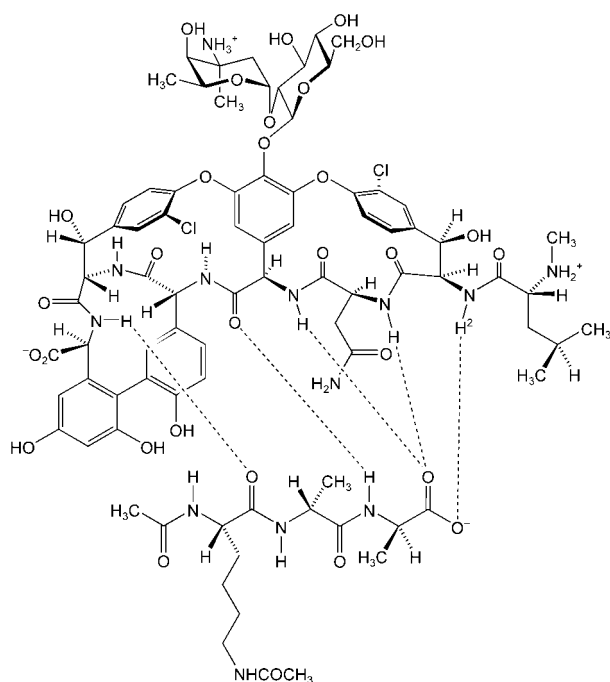


Abbildung 5. Bindende Wechselwirkungen zwischen dem Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin und dem Peptidliganden *N*- α -Acetyl-Lys-(*N*- ϵ -acetyl)-D-Ala-D-Ala. Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien markiert. Die Bindung wird außerdem durch hydrophobe Wechselwirkungen unterstützt, insbesondere zwischen den Methylgruppen von Ala und den aromatischen Ringen des Antibiotikums. Das im Text diskutierte Amid-NH-Proton H^2 ist gekennzeichnet.

Wechselwirkungen in der unmittelbaren Umgebung gebildet werden. Die Einschränkung der Beweglichkeit der Carboxylatgruppe führt zu einer Stärkung ihrer Wasserstoffbrücken.

Der gleiche Effekt wird bei Dimeren von Glycopeptid-Antibiotika beobachtet (Abbildung 6). Bei der Dimer-Bil-

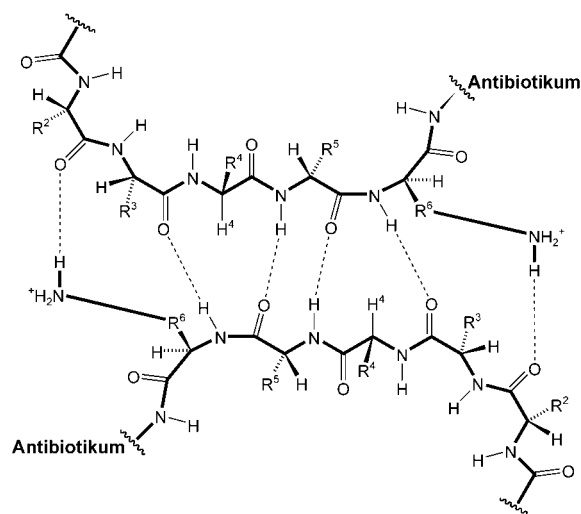


Abbildung 6. Rückgratstruktur eines Dimers des in Abbildung 5 gezeigten Glycopeptids. Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien markiert. Das im Text besprochene α -Proton H^4 ist gekennzeichnet. Die vier zentralen Wasserstoffbrücken an der Schnittstelle des Dimers kommen bei allen Glycopeptid-Dimeren vor, wogegen die beiden äußeren Wasserstoffbrücken nur bei Antibiotika auftreten, die an R^6 eine Aminosäure-Einheit tragen.

dung wird die Resonanz der Protonen H^4 an der Schnittstelle zwischen den Monomeren tieffeldverschoben. Das Ausmaß der Tieffeldverschiebung steigt mit der Bewegungseinschränkung an der Schnittstelle, wobei auch Bindungen beitragen, die sich weiter entfernt von H^4 befinden als die vier zentralen, in Abbildung 6 gezeigten Wasserstoffbrücken, da auch derartige Wechselwirkungen den Abstand zwischen den Peptidoberflächen in der Umgebung von H^4 verringern. In β -Faltblatt-Strukturen wird eine analoge Korrelation zwischen der Tieffeldverschiebung der α -Protonen von Aminosäuren und dem Abstand zwischen den Schichten beobachtet.^[47,48]

Die Verdichtung der Struktur im gebundenen Zustand ist somit eine Folge einer positiven Kooperativität.^[49] Thermodynamische Messungen beweisen außerdem, dass diese Verdichtung mit einem Enthalpiegewinn (ΔH) und einem geringeren Entropieaufwand (in Form von $T\Delta S$) einhergeht.^[49]

6.2. Negativ kooperatives Verhalten

Anhand des in Abbildung 4 gezeigten Modells kann auch das Auftreten von negativer Kooperativität illustriert werden. Nehmen wir an, **Y** und **Z** sind so verknüpft, dass **Y–Z** nicht auf die in Abbildung 4b gezeigte bevorzugte Weise an den Rezeptor binden kann. Diese Situation könnte entstehen, wenn der Linker zwischen **Y** und **Z** zu kurz ist (Abbil-

dung 4d). Wenn **Y** seine bevorzugte Bindungskonformation einnimmt, wird die Bindung von **Z** beeinträchtigt und umgekehrt. Die Folge ist, dass ΔG_{Y-Z} weniger negativ wird als die Summe $\Delta G_Y + \Delta G_Z$. **Y** bindet also mit negativer Kooperativität bezüglich **Z** und umgekehrt. Durch dieses negativ kooperative Verhalten wird die Wechselwirkung zwischen **Z** und der Rezeptortasche geschwächt (Abbildung 4d, $d_3 > d_0$), was mit einem Enthalpieverlust, dafür aber mit einem Entropiegewinn einhergeht.

Untersuchungen des Schmelzverhaltens von DNA-Duplexen stützen das Modell eines negativ kooperativen Bindungsprozesses. Beispielsweise bildet sich der selbstkomplementäre Duplex **1** aus den Einzelsträngen in wässriger Lösung exotherm mit -430 kJ mol^{-1} .^[50] Durch Einführung von nur zwei Basenfehlpaarungen in die Sequenz (Bildung von **2** mit $X = {}^m\text{G}$, entsprechend einer Methylierung an O6 des Purinrings) sinkt die Exothermie der Duplexbildung um 220 kJ mol^{-1} . Dieser extrem starke Rückgang der Exothermie geht mit einem entsprechend drastischen Abfall der Entropie bei der Duplexbildung einher ($-1164 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ für **1** gegenüber $-577 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ für **2**).



Weil die mit der Einführung zweier Basenfehlpaarungen verbundene negative Kooperativität die Schmelztemperatur des Duplexes verringert, muss ein Korrekturterm für die Änderung der Wärmekapazität beim Schmelzen der DNA eingeführt werden.^[51–53] Mit Berücksichtigung solcher Wärmekapazitätseffekte ergibt sich,^[54] dass die Einführung von nur zwei Basenfehlpaarungen die Enthalpie der Duplexbildung um $123 \pm 53 \text{ kJ mol}^{-1}$ verringert. Die gesamte Duplexstruktur wird somit stark geschwächt, obwohl formal nur zwei $\text{C}=\text{O} \cdots \text{HN}$ -Wasserstoffbrücken durch zwei repulsive $\text{C}=\text{O} \cdots \text{OR}_2$ -Wechselwirkungen ersetzt wurden. Es ist daher wahrscheinlich, dass die T-X-Fehlpaarungen in **2** benachbarte Wechselwirkungen schwächen. Eine ähnliche Rechnung für den Entropieterm zeigt, dass die Schwächung der Duplexstruktur in **2** mit einem starken Anstieg der Dynamik einhergeht. Es tritt eine Enthalpie-Entropie-Kompensation auf, die zur Folge hat, dass sich die Einführung der beiden Basenfehlpaarungen weitaus geringer auf die relativen Stabilitäten der beiden Duplexe auswirkt ($\Delta\Delta G = 46 \text{ kJ mol}^{-1}$) als ohne Kompensation zu erwarten wäre.

7. Kooperative Bindung über mehrere Schnittstellen

Positiv oder negativ kooperative Bindungen über mehrere Schnittstellen sind von herausragender Bedeutung in der Biologie. Wir betrachten zunächst die freie Enthalpie von positiv und negativ kooperativen Bindungen über zwei Schnittstellen.

Abbildung 7 zeigt einen thermodynamischen Zyklus für die Dimerisierung eines Rezeptors. Das Dimer bildet sich

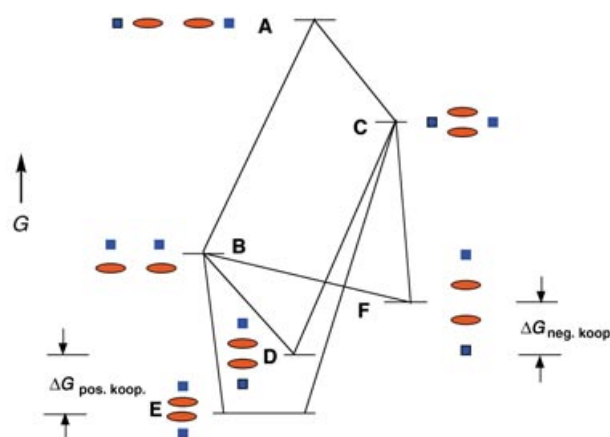


Abbildung 7. Bildung eines vollständig koordinierten Dimers aus zwei Monomeren eines Rezeptors (rot) und zwei Molekülen Ligand (blau). Übereinander angeordnete Spezies sind verknüpft, nebeneinander angeordnete nicht. Ausgehend von den freien Komponenten (**A**) kann die Bildung des koordinierten Dimers über zwei Ligand-Monomer-Komplexe **B** oder über ein ligandenfreies Dimer **C** verlaufen. Die koordinierten Dimere können ohne kooperative Effekte (**D**), mit positiver Kooperativität (**E**) oder mit negativer Kooperativität (**F**) gebildet werden.

entweder in Gegenwart oder in Abwesenheit eines Liganden. Ein Dimer kann zwei Ligandmoleküle binden.^[55]

Zum Übergang **A**→**C** gehört die freie Enthalpie der Dimerisierung, zum Übergang **A**→**B** die der Bindung zweier Liganden an zwei Monomere und zum Übergang **C**→**D** die der Bindung zweier Liganden an ein Dimer (ohne kooperative Effekte). Letztere ist per Definition gleich der Änderung der freien Enthalpie für den Übergang **A**→**B**. Zum Übergang **B**→**D** gehört die freie Enthalpie der Dimerisierung der Ligand-Monomer-Komplexe (ohne kooperative Effekte); diese ist per Definition gleich der Änderung der freien Enthalpie für den Übergang **A**→**C**.

Wenn die Dimer- und Ligandenschnittstellen in einer positiv kooperativen Weise gebildet werden, entsteht anstelle von **D** die stabilere Spezies **E**. Der Unterschied in der freien Enthalpie zwischen **E** und **D** ($\Delta G_{\text{pos. koop.}}$) entspricht dem Gewinn an freier Enthalpie durch den positiv kooperativen Effekt. Werden die Dimer- und Ligandenschnittstellen dagegen in einer negativ kooperativen Weise gebildet, entsteht die weniger stabile Spezies **F** anstelle von **D**. Der Unterschied in der freien Enthalpie zwischen **F** und **D** ($\Delta G_{\text{neg. koop.}}$) entspricht dem Verlust an freier Enthalpie durch den negativ kooperativen Effekt.

Angenommen, die Dimerisierungs-konstante für die Bildung eines symmetrischen Dimers steigt um einen Faktor x (z.B. 100), wenn beide Ligandenbindungsstellen besetzt werden (positiv kooperative Bindung, Abbildung 7). Die Konstante für die Bindung jedes der beiden Liganden an die beiden identischen Bindungsstellen des Dimers muss dann um \sqrt{x} (im Beispiel 10) größer sein als die Konstante für die Bindung an das Monomer. Allgemeiner ausgedrückt: Wenn ein Rezeptorsystem durch Bindung eines Liganden stabilisiert wird, muss dadurch die Affinität des Liganden für den Rezeptor steigen. Dieser wichtige Punkt wird in Abschnitt 11 in einem allgemeineren Zusammenhang diskutiert.

8. Positiv kooperative Effekte über mehrere Schnittstellen

8.1. Monomere Proteinrezeptoren

Ein Strukturmodell^[56] zur Erläuterung des Phänomens der positiv kooperativen Bindung ist in Abbildung 8 dargestellt. Abbildung 8a zeigt einen Ausschnitt eines Proteinrezeptors vor und nach der Koordination eines Liganden. Betrachten wir zunächst den freien Rezeptor (oben): Die Bildung der beiden eingezeichneten internen Wasserstoffbrücken konkurriert mit den Relativbewegungen der beiden Peptid-Rückgratstrukturen. Die Bewegungen derjenigen Kette, die sich dem Liganden präsentiert, können durch die Bildung von Wasserstoffbrücken zum Liganden eingeschränkt werden (Abbildung 8a, unten). Wegen der Konkurrenz zwischen Dynamik und Bindung sollte eine solche Einschränkung der internen Bewegungen eine Verstärkung der Wasserstoffbrücken innerhalb des Rezeptors verursachen.

Diese durch Bindung eines Liganden bewirkte Einschränkung der Dynamik kann auch nichtkovalente Bindungen tiefer im Inneren des Rezeptors verstärken. Ein solcher Übertragungsprozess verstärkt nichtkovalente Bindungen im gesamten Rezeptor, vorausgesetzt, sie reagieren mit positiver Kooperativität auf die Koordination eines Liganden. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor wird unterstützt, weil der Rezeptor durch die Bindung des Liganden stabilisiert wird.

Die Verstärkung von Bindungen innerhalb eines Rezeptors durch positiv kooperative Ligandenbindung hat einen verringerten H-D-Austausch von Amid-NH-Protonen des Rezeptors zur Folge (siehe Abschnitt 11).

8.2. Dimere Rezeptoren

Das Modell in Abbildung 8a trifft auch dann zu, wenn der blau gezeichnete Ausschnitt nicht einen einzelnen Rezeptor darstellt, sondern verknüpfte Peptidketten, die zu zwei verschiedenen Proteinrezeptoren gehören (wir ignorieren also die gewellten Linien). In diesem Fall bewirken die blau gezeichneten Wasserstoffbrücken, die beispielsweise bei der Dimerisierung eines Rezeptors entstehen, dass sich dem Liganden ein höher organisiertes Templat präsentiert. Aus diesem Grund wird der Entropieaufwand bei der Bindung des Liganden an das Dimer geringer ausfallen als bei der Bindung an das Monomer. Moleküldynamikstudien untermauern,^[57] dass ein positiv kooperativer Effekt in diesem Fall einen günstigen entropischen Beitrag liefert.

Wie wirkt sich dieser Templateffekt bei der Bindung von Liganden an dimere Rezeptoren auf die übrige Struktur des Rezeptors aus? Da Dynamik und Bindung konkurrieren, werden die Ligand-Rezeptor-Bindungen sowie die Bindungen zwischen den Rezeptoren dadurch verstärkt, dass die Oberfläche (des dimeren Rezeptors) höher geordnet wird (Abbildung 8a). Spannungsfreiheit vorausgesetzt, verstärken sich die Wasserstoffbrücken zwischen den Ketten gegenseitig. Als Folge davon werden die Relativbewegungen der Ketten eingeschränkt, was wiederum die Entropie verringert.

In der Summe sollte die positiv kooperative Bindung eines Liganden an einen dimeren Rezeptor enthalpisch günstig sein (die beteiligten nichtkovalenten Bindungen werden verkürzt). Die Änderung der Gesamtentropie hingegen kann anhand dieses Modells nicht vorausgesagt werden. Durch den Templateffekt zur Bindung des Liganden ergibt sich ein Entropiegewinn, wohingegen die Entropie-Enthalpie-Kompensation einen Entropieverlust bewirkt. Zur genauen Klärung dieses Sachverhalts sind Experimente erforderlich.

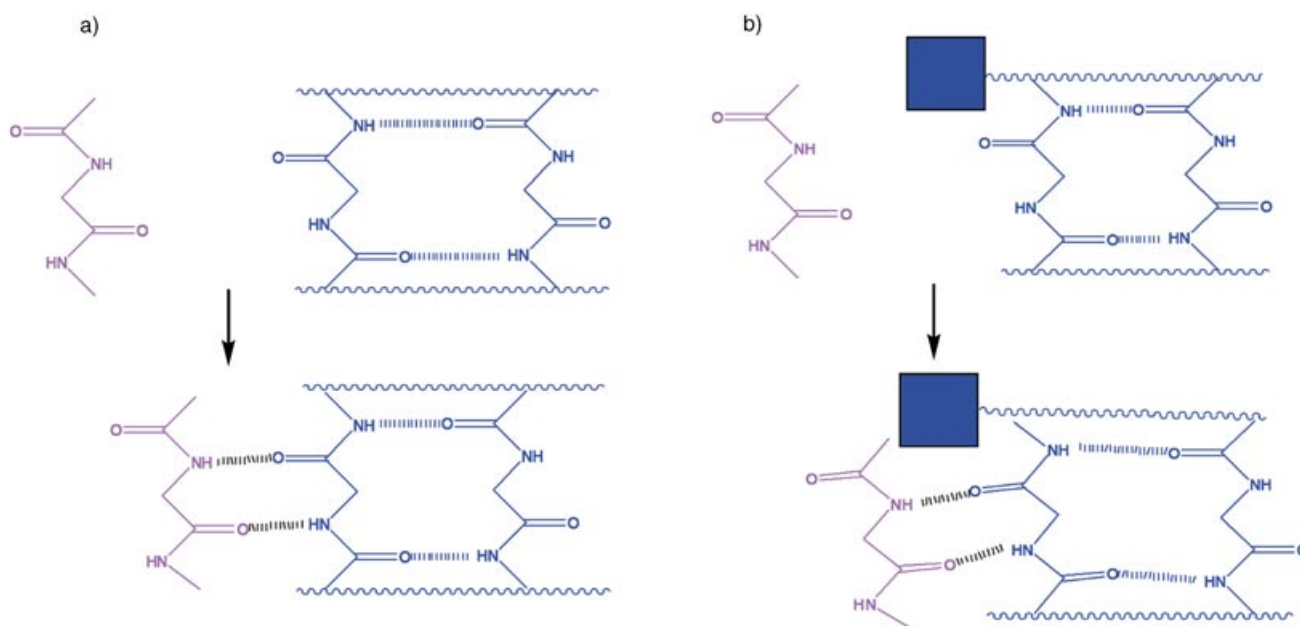


Abbildung 8. Modellstrukturen zur Erläuterung einer positiv kooperativen Bindung (a) und einer negativ kooperativen Bindung (b; Diskussion siehe Text).

Die strukturellen und thermodynamischen Auswirkungen einer positiv kooperativen Bindung über mehrere Schnittstellen wurden experimentell untersucht. Dimere von Glycopeptid-Antibiotika der Vancomycin-Gruppe werden durch die Koordination von zwei Molekülen Bakterienzellwand-Analoga weiter stabilisiert und zugleich in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt (Abbildung 9). Laut NMR-Daten werden

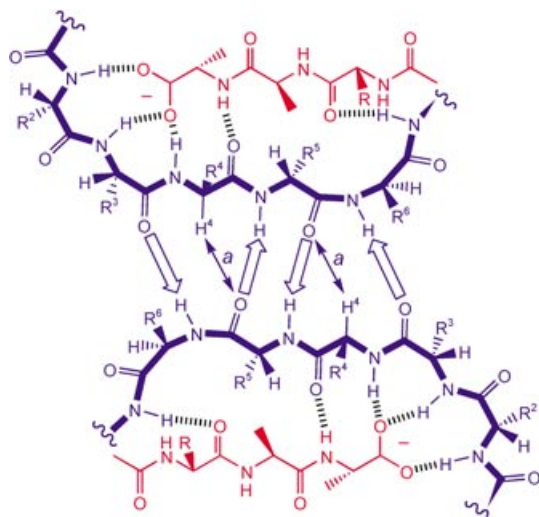


Abbildung 9. Peptid-Rückgrat eines dimeren Glycopeptid-Antibiotikums (blau), das zwei Moleküle eines Bakterienzellwand-Analogons (rot) koordiniert. Die Bindung der Analoga geht mit einem positiv kooperativen Effekt einher, der das Dimer stabilisiert und die Abstände *a* verkleinert. Der Effekt ergibt einen Enthalpiegewinn und erfordert einen Entropieaufwand.

dadurch die Abstände an der Monomer-Monomer-Schnittstelle des dimeren Rezeptorsystems verkleinert.^[46] Das Ausmaß, zu dem sich die Beweglichkeit des dimeren Rezeptors verringert, steigt mit der Stärke der Ligand-Rezeptor-Bindung.^[58] Der positiv kooperative Effekt ist typischerweise mit einem Enthalpiegewinn und einem Entropieaufwand verbunden.^[59] In derartigen Fällen übertrifft die Bewegungseinschränkung, die mit den verstärkten Bindungen einhergeht, den entropisch günstigen Effekt der Bindung an ein hoch geordnetes Templat.

Die Strukturänderungen bei einer positiv kooperativen Bindung sind analog zu den Vorgängen beim Abkühlen. Das Abkühlen einer Reinsubstanz (flüssig oder fest) führt generell zu enthalpisch günstigen und entropisch ungünstigen Strukturänderungen.^[60] Fast genauso allgemeingültig ist die Beobachtung, dass sich Strukturen beim Abkühlen kontrahieren (eine der seltenen Ausnahmen ist der Phasenübergang Wasser-Eis). Die physikalische Grundlage dieser Analogie liegt auf der Hand: Sowohl beim positiv kooperativen Effekt als auch beim Abkühlen einer Substanz führt die Einschränkung der Beweglichkeit zu einer Verstärkung und Verkürzung von nichtkovalenten Bindungen.

9. Negativ kooperative Effekte über mehrere Schnittstellen – Hämoglobin

Da kooperative Bindungsprozesse von großer Bedeutung in der chemischen Biologie sind, sollte man annehmen, dass dieses Phänomen bereits einheitlich definiert wäre – aber dies ist nicht der Fall. Bei Vorliegen mehrerer Bindungsstellen für Liganden^[61,62] spricht man gemeinhin von einer positiv kooperativen Bindung, wenn aufeinanderfolgend bindende Liganden mit steigender Affinität koordinieren. Entsprechend liegt negativ kooperative Bindung dann vor, wenn aufeinanderfolgend bindende Liganden mit sinkender Affinität koordinieren.

An dieser Stelle ist es wichtig, auf einen Widerspruch hinzuweisen: Die Bindung von Liganden kann unter Anwendung obiger Definition für Systeme mit mehreren Bindungsstellen positiv kooperativ sein, mit der in diesem Aufsatz verwendeten Definition (siehe Abschnitt 5) aber negativ kooperativ. Der Vorteil der in diesem Aufsatz verwendeten Definition für positive Kooperativität besteht darin, dass sich ihr zufolge die untersuchten Sätze von nichtkovalenten Wechselwirkungen *gegenseitig verstärken* müssen. Diese Bedingung erscheint als eine zwingende Voraussetzung für ein Auftreten von positiver Kooperativität. Wir veranschaulichen im Folgenden die Konsequenzen dieser Betrachtungsweise am Beispiel der Bindung von O₂ an Hämoglobin.

Abbildung 8b zeigt ein Modell für einen negativ kooperativen Bindungsprozess über zwei Schnittstellen. Die exponierte Aminosäurekette an der Proteinrezeptor-Oberfläche enthält ein Strukturelement, das die Bindung von Liganden an den freien Rezeptor inhibiert (z.B. eine sterisch anspruchsvolle Gruppe, gekennzeichnet durch ein blaues Quadrat). Wie es eine sinnvolle Definition von negativer Kooperativität verlangt, sind die beiden Sätze von Wechselwirkungen (die jeweils bevorzugten nichtkovalenten Wechselwirkungen an der Ligand-Rezeptor-Schnittstelle und innerhalb des Rezeptors) nicht kompatibel. Aus diesem Grund muss die bevorzugte Grundzustandsstruktur (Abbildung 8b, oben) des Rezeptors bei der Bindung eines Liganden verzerrt werden. Dabei entsteht eine Struktur, in der die internen nichtkovalenten Bindungen geschwächt sind (unten). Eine negativ kooperative Bindung von Liganden sollte daher zu einer Lockerung der Rezeptorstruktur und damit zu einer höheren Beweglichkeit führen. Folglich sollte der H-D-Austausch der Amid-NH-Protonen des Peptidrückgrats unter Einwirkung von D₂O nach Bindung eines Liganden erleichtert sein. Wegen der insgesamt geschwächten Bindungen innerhalb des Rezeptors bei negativ kooperativer Koordination eines Liganden wirkt sich die Koordination des Liganden nachteilig auf die Enthalpie und vorteilhaft auf die Entropie aus. Hinweise, die diese Aussage untermauern, werden im Folgenden präsentiert.

Das Sauerstofftransportprotein Hämoglobin liegt als Tetramer vor. Die klassische Arbeit von Monod, Wyman und Changeux (MWC)^[62] gibt genauen Aufschluss über die Strukturänderungen bei der Bindung von O₂ an Hämoglobin. Die zunächst bevorzugte Struktur des Tetramers wird als „gespannte“ Form beschrieben (T-Form, „tense form“; Abbildung 10a). Die T-Form ist aus geometrischen Gründen

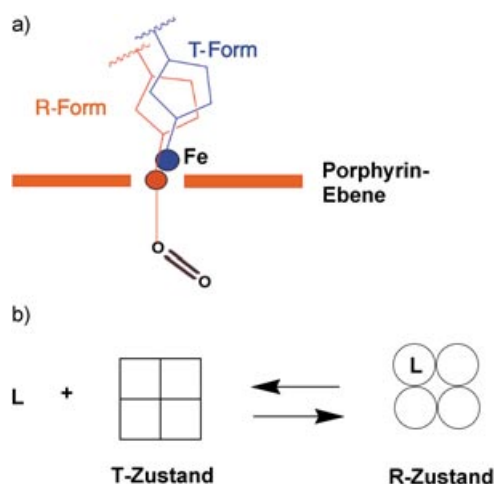


Abbildung 10. a) Negativ kooperative Bindung von O₂ an Hämoglobin; in der T-Form (blau) ist das Hämoglobin nicht in der Lage, wirksam O₂ zu binden, weil der Zugang zum Eisenzentrum für O₂ blockiert ist. Die Struktur des Hämoglobins wird gestört (gelockert, wobei interne nichtkovalente Bindungen geschwächt werden; vergleiche Abbildung 8b), sodass sich die R-Form (rot) bildet, die O₂ besser bindet. b) MWC-Modell für die Bindung des ersten Ligandmoleküls (L) an ein tetrameres Protein, das in einem gespannten (T) und entspannten Zustand (R) vorliegen kann.

nicht in der Lage, O₂ wirksam zu binden. Eine wirksamere Bindung von O₂ wird möglich, wenn die T-Form zu einer „entspannten“ Struktur (R-Form, „relaxed form“; Abbildung 10a) verzerrt wird. Dem Modell zufolge führt die Bindung eines einzigen O₂-Moleküls an das Tetramer dazu, dass sich alle vier Untereinheiten zur R-Form verzerren (Abbildung 10b) und weitere O₂-Moleküle mit steigender Affinität koordiniert werden. In der Sprache des MWC-Modells ist die Bindung von O₂ „positiv kooperativ“: Die für die Umwandlung der T- in die R-Form aufzuwendende Energie wird weitgehend durch die Bindung des ersten O₂-Moleküls bereitgestellt. Nachfolgend bindenden O₂-Molekülen steht eine relativ hohe Besetzungsdichte des R-Zustands zur Verfügung, und die Koordination erfolgt mit höheren Affinitäten.^[63]

Im Rahmen der hier verwendeten Definition ist die Bindung von O₂ an Hämoglobin indes „negativ kooperativ“: Im T-Zustand ist keine effektive Bindung von O₂ möglich, sodass die Koordination von O₂ mit einem Strukturübergang zum R-Zustand einhergeht (Abbildung 10a). Dies ist analog zu der in Abbildung 8b gezeigten Situation.

Die negativ kooperative Koordination erzwingt eine Lockerung des T-Zustands des Tetramers durch Aufbrechen von ionischen Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten.^[64] Wichtig ist hierbei, dass der Übergang vom T- zum R-Zustand zu weitläufigen Strukturänderungen führen kann, denn in einem Rezeptorsystem können alle nichtkovalenten Wechselwirkungen gelockert werden, die mit einem negativ kooperativen Effekt gekoppelt sind.

Um diese Annahmen experimentell zu überprüfen, untersuchten wir das dynamische Verhalten des Polypeptidrückgrats von Pferde-Hämoglobin bei der Bindung von O₂ mithilfe von ESI-Massenspektrometrie.^[65] Als Folge der

Bindung von O₂ konnten 7 bis 8 zusätzliche Amid-NH-Wasserstoffatome pro α -Kette (5.2–6 % der Gesamtzahl) und 16 zusätzliche Amid-NH-Wasserstoffatome pro β -Kette (11.4 % der Gesamtzahl) gegen Wasserstoffatome des Lösungsmittels ausgetauscht werden. Bei einer vollständigen Sättigung des Hämoglobin-Tetramers mit O₂ erhöht sich die Zahl der austauschbaren NH-Wasserstoffatome des Polypeptidrückgrats folglich um 46–48. Dieser drastische Anstieg ist in Einklang mit den Vorhersagen zu Strukturänderungen bei einer negativ kooperativen Bindung. Eine solche erhöhte Dynamik der Hämoglobin-Untereinheiten war zuvor in Röntgenstrukturanalysen nicht bemerkt worden. Vermutlich werden die Änderungen im dynamischen Verhalten durch Packungskräfte im Kristall überdeckt.

Ebenfalls erfüllt ist die Forderung, dass ein negativ kooperativer Effekt, der im T-Zustand auftritt, mit einer Enthalpie-Entropie-Kompensation einhergeht (im Sinne eines Entropiegewinns und eines Enthalpieaufwands). Daher ist davon auszugehen, dass bei der Bindung von O₂ Wärme verbraucht wird und die Unordnung innerhalb des Hämoglobin-Tetramers größer wird. Für die Bindung von O₂ an Forellen-Hämoglobin^[66] wurden folgende thermodynamische Parameter ermittelt (pro Untereinheit): Das erste Molekül O₂ bindet mit $\Delta H = 0 \text{ kJ mol}^{-1}$ und einem günstigen $T\Delta S$ -Term von $+21 \text{ kJ mol}^{-1}$. Demgegenüber bindet das vierte Molekül O₂ exotherm ($\Delta H = -32 \text{ kJ mol}^{-1}$) und mit einem leicht ungünstigen Entropieterm ($T\Delta S = -3 \text{ kJ mol}^{-1}$). Die Bindung von O₂ an das Eisenzentrum von Hämoglobin ist isoliert betrachtet sicher exotherm. Da dieser Prozess jedoch die Umwandlung der T- in die R-Form voraussetzt (Abbildung 8c), bei der Bindungsenergie innerhalb der Hämoglobinstruktur verlorengeht, wird der Enthalpiegewinn bei der Koordination an das Eisenzentrum aufgebraucht. So lässt sich der Wert $\Delta H = 0 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Bindung des ersten Moleküls O₂ an die T-Form verstehen. Der günstige $T\Delta S$ -Term von $+21 \text{ kJ mol}^{-1}$ spiegelt die mit dem Verlust an innerer Bindungsstärke einhergehende Lockerung der Hämoglobinstruktur wider. Es könnte eine nützliche Näherung sein, die Koordination von O₂ an die R-Form von Hämoglobin als isoliertes Bindungsereignis mit den Parametern $\Delta H = -32 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $T\Delta S = -3 \text{ kJ mol}^{-1}$ zu beschreiben. Tatsächlich sollte die Bindung von O₂ isoliert betrachtet nur eine geringe ungünstige Entropieänderung bewirken (entsprechend der dynamischen Koordination eines kleinen Liganden an einen Rezeptor). Mit dieser Näherung ergeben sich für den isolierten T \rightarrow R-Übergang die thermodynamischen Parameter $\Delta H = +32 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $T\Delta S = +24 \text{ kJ mol}^{-1}$. Diese Werte sind plausibel für einen Prozess, bei dem eine Struktur mit geringerer Bindungsstärke und höherer Dynamik entsteht (siehe die Angaben zum NH-Austausch bei Pferde-Hämoglobin). Mit $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ergibt sich $\Delta G \approx +8 \text{ kJ mol}^{-1}$ für den T \rightarrow R-Übergang. Bei Raumtemperatur sollte der freie T-Zustand von Forellen-Hämoglobin also etwa 25fach höher besetzt sein als der freie R-Zustand. Die errechneten thermodynamischen Parameter sind demnach physikalisch sinnvoll.

Interessant ist ein Vergleich mit analogen Untersuchungen am monomer vorliegenden Myoglobin. Monod, Wyman und Changeux gingen in ihrem klassischen Beitrag davon aus,

dass die Konformation von Myoglobin der R-Form von monomeren Hämoglobin-Untereinheiten ähneln würde und betrachteten Myoglobin daher als eine entspannte Hämoglobin-Untereinheit.^[62] Entsprechend dieser Annahme bindet O₂ fest an Myoglobin, weil keine Energie für eine T→R-Umwandlung aufgewendet werden muss.

An dieser Stelle sei daran erinnert, dass die interne Struktur der R-Form von Hämoglobin lockerer ist als diejenige der T-Form und dass diese Lockerung durch die Bindung von O₂ verursacht wird. Somit könnte auch die Struktur von Myoglobin durch Bindung von O₂ intern gelockert werden. Um dies zu prüfen, wurde der H-D-Austausch der Amidgruppen im Peptidrückgrat von freiem und O₂-koordiniertem Myoglobin mithilfe von ESI-MS untersucht. Durch die Koordination von Sauerstoff werden 13–15 zusätzliche Amid-NH-Wasserstoffatome mit dem Lösungsmittel austauschbar.^[56] Damit steht fest, dass Myoglobin entgegen der ursprünglichen Annahme eine dichte („gespannte“) innere Struktur hat. Perutz erklärte diesen Befund physikalisch damit, dass erst die Koordination von O₂ zur Verzerrung der Proteinstruktur führt.^[67] Myoglobin, wie auch die T-Form von Hämoglobin, binden O₂ gemäß dem hier verwendeten Modell mit negativer Kooperativität (siehe Abbildung 8b und 10a). In Einklang mit dem Modell bleibt der Verlust an Bindungsenergie, der durch die Koordination von O₂ bewirkt wird, nicht räumlich auf die Schnittstellen des Tetramers beschränkt, sondern er verteilt sich auf das gesamte Netzwerk nichtkovalenter Wechselwirkungen innerhalb der Monomereinheiten.

Die Verwendung des Modells der negativen Kooperativität zur Erklärung der Bindung von O₂ an Hämoglobin hat dreierlei Vorzüge: 1) Es ist Teil eines Modells des kooperativen Effekts (Abbildung 8), das mit der am häufigsten verwendeten Auffassung von „Kooperativität“ in Einklang ist. Die gegenseitige *Verstärkung* von kompatiblen Sätzen von Wechselwirkungen wird als *positiv* kooperative Bindung beschrieben (Abbildung 8a; Beispiele sind die Proteinfaltung^[68,69] und Kristallisationen). Die gegenseitige *Schwächung* von anfangs inkompatiblen Sätzen von Wechselwirkungen wird als *negativ* kooperative Bindung beschrieben (Abbildung 8b; dieser Fall tritt bei der Bindung von O₂ an Hämoglobin ein (Abbildung 10a)). 2) Das Modell postuliert spezifische Auswirkungen auf die Struktur. Zum Beispiel sagt es aus, dass alle nichtkovalenten Wechselwirkungen innerhalb eines Rezeptors, die negativ kooperativ mit der Ligandenbindung gekoppelt sind, gelockert werden. (Die Lockerung der inneren Struktur der Hämoglobin-Untereinheiten bei der Bindung von O₂ wird durch H-D-Austauschexperimente bestätigt.)^[65,70] 3) Die Begriffe T- und R-Zustand geben die physikalischen Gegebenheiten anschaulich wieder, da die negativ kooperative Koordination von O₂ einen Verlust an Bindungsstärke im T-Zustand (Enthalpieverlust) und die Entstehung des stärker dynamischen R-Zustands (Entropiegewinn) bewirkt.

Wäre die Bindung von O₂ an Hämoglobin in dem hier verwendeten Sinne positiv kooperativ (hinsichtlich nichtkovalenter Bindungen), dann würde die Koordination des ersten O₂-Moleküls „normal“ ablaufen, und die nachfolgenden Bindungsereignisse würden mit einer gegenseitigen Verstär-

kung der nichtkovalenten Wechselwirkungen innerhalb des O₂-Hämoglobin-Komplexes einhergehen. Beobachtet wird aber etwas anderes: Die größte Hürde tritt bei der Bindung des ersten O₂-Moleküls auf, weil der Zugang von O₂ an das Eisenzentrum in der T-Form durch den Porphyrinring sterisch gehindert ist (Abbildung 10a). Die zunehmend günstigen O₂-Bindungsschritte, die im Modell von Monod, Wyman und Changeux als positiv kooperativ beschrieben werden, sind also in Wirklichkeit aufeinander folgende Schritte mit abnehmender negativer Kooperativität.

Literaturdaten sind mit den hier geschilderten allgemeinen Merkmalen einer negativ kooperativen Bindung in Einklang. Die Bindung des Cofaktors (6R)-L-erythro-5,6,7,8-Tetrahydrobioptin an die rekombinante tetramere Isoform 1 der menschlichen Tyrosin-Hydroxylase verläuft mit negativer Kooperativität.^[71] Der Cofaktor-Enzym-Komplex ist anfälliger für Trypsinverdau als das freie Enzym – ein Befund, wie man ihn bei einer Auflockerung der Enzymstruktur erwarten würde. Beim Vergleich der Koordination von Liganden mit ein, zwei oder drei Kohlenhydrat-Einheiten an Lectine nimmt die inkrementelle Affinität für jedes hinzugefügte Epitop mit zunehmender Einheitenzahl ab;^[72,73] die Bindung ist folglich negativ kooperativ. Liganden mit mehreren Kohlenhydrat-Einheiten koordinieren mit höheren positiven Bindungsentropien als ihre Analoga mit einer Einheit,^[74] was die in den Lectinen erzeugte Unordnung aufgrund der negativ kooperativen Bindung des zweiten und dritten Epitops widerspiegelt.

Es wurde auch über die verringerte Stabilität und höhere Flexibilität von Proteinen nach Koordination eines Liganden berichtet.^[75]

10. Aufbrechen von Schnittstellen durch negativ kooperative Effekte

Führt die negativ kooperative Bindung zu einer hinreichend großen Änderung der freien Enthalpie, so kann **F** ein höheres Energieniveau einnehmen als **B** (Abbildung 7). Unter diesen Bedingungen bindet ein Ligand mit negativer Kooperativität an einen Rezeptor, der in ligandenfreiem Zustand als Dimer vorliegt, und löst dadurch dessen Dissoziation aus. Solche Fälle wurden experimentell bestätigt,^[76] und bereits Monod, Wyman und Changeux^[62] hatten die Dissoziation einer oligomeren Spezies als Grenzfall der Strukturlockerung betrachtet.

11. Einschränkung der Dynamik in Proteinrezeptoren als Quelle für Ligandenbindungsenergie

In den Abschnitten 7 und 8 hatten wir erläutert, dass der Energiegewinn bei der positiv kooperativen Bindung eines Liganden an einen Rezeptor (ein kleines Dimer) mit einer strukturellen Verfestigung (d.h. einem lokalen Schrumpfen) des Rezeptorsystems einhergeht. Betrachten wir einen thermodynamischen Kreislauf: Wenn sich ein Rezeptorsystem durch Bindung eines Liganden stabilisiert, wird notwendigerweise auch die Ligandenbindungsenergie erhöht.^[55] Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 11 dargestellt.

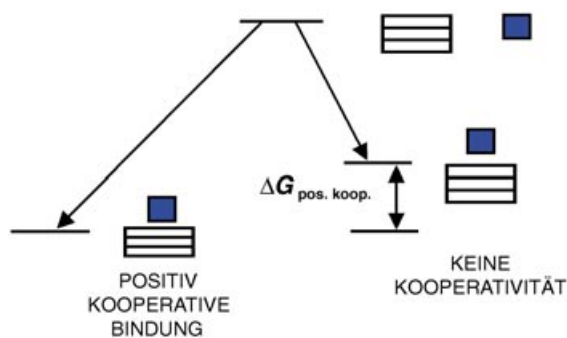


Abbildung 11. Wenn sich ein Rezeptorsystem (Rechteck) durch die Bindung eines Liganden (blaues Quadrat) stabilisiert, steigt auch die Ligandenbindungsenergie. Bei Ausbleiben eines positiv kooperativen Effekts (rechts) bindet der Ligand ohne Modifizierung (Verfestigung) der Rezeptorstruktur. Tritt ein positiv kooperativer Effekt auf (links), so bindet der Ligand unter Verfestigung der gesamten Rezeptorstruktur. Die Erhöhung der Ligandenbindungsenergie durch den positiv kooperativen Effekt beruht auf einer erhöhten Stabilität des Ligand-Rezeptor-Systems und kann prinzipiell an jeder beliebigen nichtkovalenten Schnittstelle des Ligand-Rezeptor-Systems zum Ausdruck kommen.

Nutzen natürliche Systeme die Verringerung der Dynamik von Proteinrezeptoren als Quelle für die Ligandenbindungsenergie? Ein solcher Effekt kommt in erster Linie für Systeme infrage, bei denen sich die beobachteten Affinitäten nicht durch lokale nichtkovalente Wechselwirkungen erklären lassen.

Die bemerkenswert feste Bindung von Biotin an das Streptavidin (STV)-Tetramer ($K = 10^{13.4} \text{ M}^{-1}$) wird in biologischen Systemen vielfältig genutzt. Sie ist jedoch noch nicht ausreichend verstanden und bildet verglichen mit anderen Affinitäten einen „Ausreißer“.^[16,77] Genau betrachtet ist die Bindung etwa 1000-mal stärker, als anhand der Summe der Einzelbeiträge zu erwarten wäre.^[16,77] Bei massenspektrometrischen Untersuchungen des H-D-Austauschs der Amid-NH-Einheiten von STV mit und ohne Biotin fanden wir, dass durch Koordination von Biotin 22 Amid-NH-Protonen am Rückgrat des STV-Monomers gegen H-D-Austausch geschützt werden (RT, pH 8, 2 h).^[65] Die Position der geschützten NH-Protonen wurde durch Pepsinverdau ermittelt. Die Daten zeigen, dass die Rückgrat-NH-Protonen von STV nach der Koordination von Biotin für das Lösungsmittel schlechter zugänglich sind (Abbildung 12).

Zu beachten ist, dass der Effekt in bestimmten Abschnitten der Struktur stärker ausgeprägt ist als in anderen: Eine Verdichtung tritt nur in den Teilen des Rezeptors auf, in denen die positive kooperative Bindung zum Ausdruck kommt. Wir wissen, dass die Bindungsenergie der Biotin-STV-Bindung weiträumig delokalisiert ist. Ein Vergleich der Röntgenkristallstrukturen des freien und koordinierten Tetramers^[78–81] bestätigt jedoch nicht, dass das freie Tetramer eine höhere Beweglichkeit aufweist – wahrscheinlich wird der Effekt durch Kristallpackungseffekte überdeckt.

Das STV-Biotin-System ist ein anschauliches Beispiel für einen Komplex, bei dem die Bindungsaffinität eine Eigenschaft des gesamten Systems ist und nicht durch Betrachtung der Ligand-Rezeptor-Schnittstelle beschrieben werden kann.

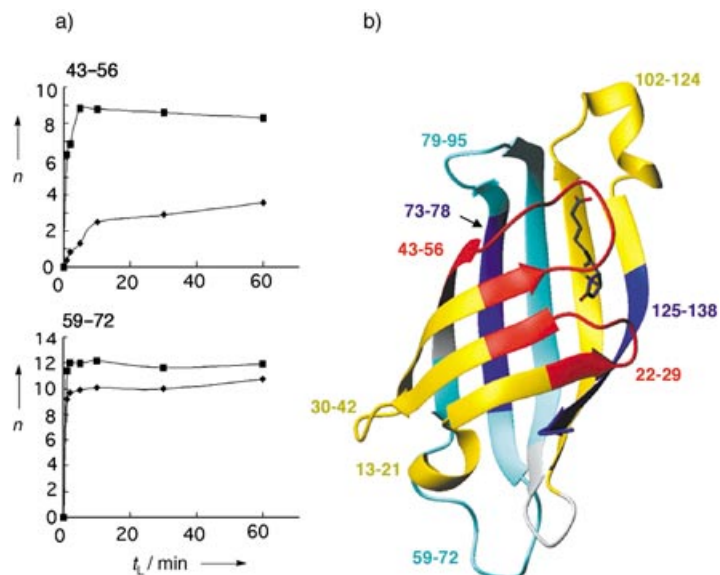


Abbildung 12. a) Deuteriumeinbau in Streptavidin in Abwesenheit (■) und in Gegenwart von Biotin (◆) als Funktion der Zeit t_L . Untersucht wurden zwei Peptide (43–56 und 59–72), die durch Pepsinverdau erhalten wurden. b) Position der Peptide im Bändermodell einer STV-Untereinheit mit gebundenem Biotin (erzeugt mit dem Programm MOLMOL^[108]). Der Grad, zu dem die Bindung von Biotin den H-D-Austausch vermindert, ist mit Farbcodes angegeben: rot > 30%, gelb 20–30%, hellblau 10–20%, dunkelblau < 10%.

Die obigen experimentellen Ergebnisse sind in Einklang mit anderen, weniger strukturspezifischen Messungen. Der Einfluss der Biotin-Bindung auf die thermische Stabilität von STV wurde mit dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) untersucht.^[79,81] Durch Bindung von Biotin erhöht sich die Denaturierungstemperatur von STV in Phosphatpuffer von $T_m = 75$ auf 112°C . Der Biotin-STV-Komplex ist damit weitaus stabiler gegen thermische Entfaltung als freies STV. Darüber hinaus ist die Koordination von Biotin an STV bemerkenswert exotherm und entropisch ungünstig ($\Delta H = -134 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $T\Delta S = -57 \text{ kJ mol}^{-1}$,^[81] nach einer anderen Arbeit ist $\Delta H = -102 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $T\Delta S = -26 \text{ kJ mol}^{-1}$).^[79] Alle experimentellen Befunde decken sich mit der Vorstellung einer positiv kooperativen Bindung, bei der ein Teil der Ligandenbindungsenergie durch die Einschränkung des dynamischen Verhaltens des Rezeptor eingebracht wird. Die Bildung neuer nichtkovalenter Wechselwirkungen innerhalb des Rezeptors ist nicht gefordert – es genügt die Verstärkung der existierenden Bindungen. Aus diesem Grund kommt es auch nicht zu ausgeprägten Konformationsänderungen.

Die obigen Schlussfolgerungen werden durch den Befund gestützt, dass die Bindung eines Liganden die Stabilität eines Proteins erhöht und seine Flexibilität verringert.^[75] Eine weitere Bestätigung liefert die Beobachtung von Sturtevant, dass die Bindung eines Liganden an ein Protein gewöhnlich die Wärmekapazität senkt, was gleichbedeutend mit einem Verlust an inneren Schwingungsfreiheitsgraden ist.^[82] Weiterhin kamen Cooper und Dryden zu dem Schluss,^[83] dass die positiv kooperative Bindung eines Liganden eine „Verstei-

fung“ des Proteins bewirkt (die der hier geschilderten Verfestigung entspricht). Die beschriebenen H-D-Austauschexperimente weisen zwar nur die Verstärkung von Wasserstoffbrücken direkt nach, es werden aber *alle* bindenden Wechselwirkungen verstärkt, die mit diesen gekoppelt sind.

Der durch Ligandenbindung ausgelöste Übergang eines freien Proteins in eine dichter gepackte Struktur erfordert nicht zwangsläufig einen Aufwand an freier Enthalpie (für die Änderung der Proteinstruktur), da als Folge der Ligandenbindung ein neues System Ligand-Protein entsteht. Im Fall einer positiv kooperativen Bindung schränkt der Ligand die Dynamik des Proteins ein, und ein kompakterer Zustand wird energetisch begünstigt.

12. Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen mit starker enthalpischer oder entropischer Triebkraft

Ein positiv kooperativer Effekt fördert enthalpiegetriebene, ein negativ kooperativer Effekt hingegen entropiegetriebene Bindungsprozesse. Diese Zusammenhänge können genutzt werden, um zu untersuchen, inwiefern Wirkstoffe eine höhere Ordnung/Unordnung in ihrem Rezeptor verursachen. Die thermodynamischen Parameter für die Bindung von 136 Wirkstoffen an ihre biologischen Rezeptoren sind in Abbildung 13 in Form eines ΔH° - ΔS° -Diagramms aufgetra-

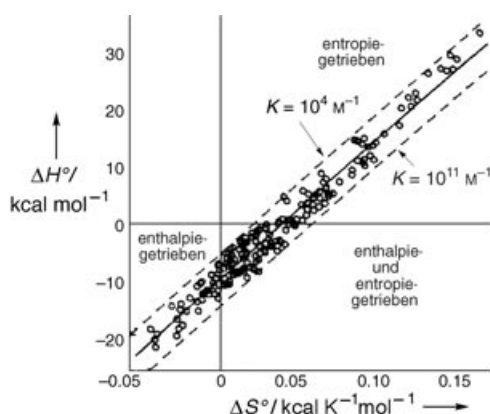


Abbildung 13. Auftragung der Standardenthalpien (ΔH°) gegen die Standardentropien (ΔS°) für die Bindungsgleichgewichte zwischen 136 Liganden und zehn biologischen Rezeptoren, einer DNA und zwei Enzymen. Die beiden gestrichelten Linien entsprechen Assoziationskonstanten K der Ligand-Makromolekül-Komplexe von 10^4 M^{-1} und 10^{11} M^{-1} . Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [84].

gen.^[84] Einige Komplexe sind um bis zu 30 kcal mol^{-1} (125 kJ mol^{-1}) endotherm, am anderen Ende der Skala finden sich Komplexe, die um ca. 20 kcal mol^{-1} exotherm sind (84 kJ mol^{-1}). Diese beträchtlichen Unterschiede (ca. 200 kJ mol^{-1}) können auf zwei Szenarien zurückgeführt werden:

- 1) Die Wirkstoffe binden stark endotherm und negativ kooperativ; dies bewirkt einen Verlust an Bindungsstärke innerhalb der Rezeptorstruktur sowie eine erhöhte Beweglichkeit und somit eine günstige, positive Entropieän-

derung ($T\Delta S$ in der Größenordnung von 160 kJ mol^{-1} bei Raumtemperatur).

- 2) Die Wirkstoffe binden stark exotherm und positiv kooperativ; dies bewirkt eine Verstärkung der Bindungen innerhalb der Rezeptorstruktur sowie eine eingeschränkte Beweglichkeit und damit eine ungünstige, negative Entropieänderung ($T\Delta S$ in der Größenordnung von -47 kJ mol^{-1} bei Raumtemperatur).

Es ist möglich, dass positiv und negativ kooperative Wechselwirkungen innerhalb desselben Systems auftreten; in diesem Fall geben die thermodynamischen Parameter den Nettoeffekt wieder. Wir haben bereits Beispiele angeführt, bei denen die Bindung eines Liganden mit einer Enthalpie-Entropie-Kompensation einhergeht, und man kennt Proteine, deren Flexibilität durch die Bindung eines Liganden in einigen Bereichen erhöht und in anderen verringert wird.^[85] Außerdem sei darauf verwiesen, dass wir in diesem Aufsatz ausschließlich Fälle betrachten, bei denen der kooperative Effekt eine Lockerung oder Verfestigung der bestehenden Rezeptorstruktur bewirkt. Eine wesentlich komplexere Situation entsteht, wenn die Bindung eines Liganden die Bildung neuer nichtkovalenter Wechselwirkungen im Rezeptor auslöst.

13. Änderungen der Rezeptoraggregation bei der Signaltransduktion

Im vorigen Abschnitt haben wir die beiden Extremfälle enthalpisch und entropisch angetriebener Bindungsprozesse als Ausdruck einer Verfestigung oder Lockerung der Rezeptorstruktur interpretiert. Ein generelles Merkmal der Signalübertragung in Zellen ist, dass membrangebundene Rezeptoren bei der Bindung ihres natürlichen Liganden den Aggregationsgrad ändern (Abbildung 14).^[86]

In einigen Fällen induzieren Agonisten (die einen Rezeptor aktivieren, indem sie an ihn binden^[87]) die Aggregation von Rezeptoren.^[86] Die Koordination eines Agonisten sollte sich daher besonders günstig auf die Bindungsstärke

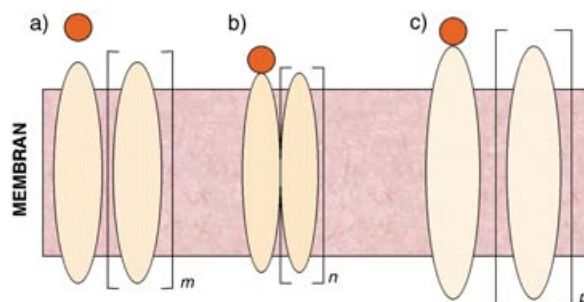


Abbildung 14. Bindung eines Liganden (roter Kreis) durch Rezeptoren (Ellipsen) in einer Membran: a) ligandenfreier Rezeptor; b), c) Rezeptoren mit Liganden: b) Die Bindung des Liganden induziert eine verstärkte Oligomerisierung ($n > m$) und gegebenenfalls eine dichtere Packung des Oligomers; c) die Bindung des Liganden induziert die Dissoziation des Rezeptors ($p < m$) und gegebenenfalls eine weniger dichte Packung des Oligomers. Die Rezeptoren können partiell koordiniert (wie in b und c) oder vollständig abgesättigt sein.

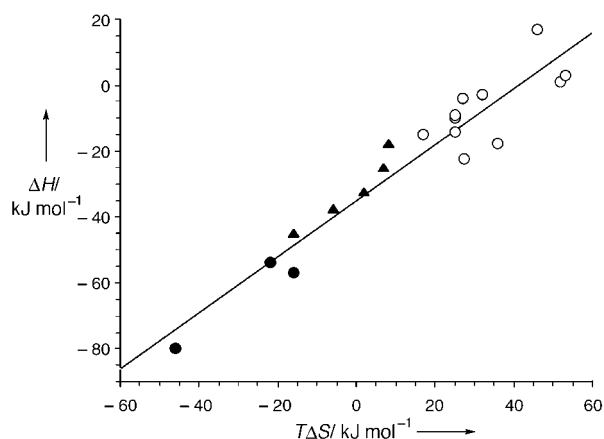


Abbildung 15. ΔH - $T\Delta S$ -Diagramm für die Bindung von Agonisten (●), Antagonisten (○) und Partialagonisten (▲) an den β -adrenergen Rezeptor.

(negativer Beitrag zu ΔH) und ungünstig auf die Entropie (negativer Beitrag zu $T\Delta S$) auswirken. Die Abbildung 15 bestätigt diesen Sachverhalt für die Bindung von Agonisten (●) an den β -adrenergen Rezeptor.^[88]

In anderen Fällen induzieren Agonisten die Dissoziation von Rezeptormultimeren.^[86] Ein derartiger Bindungsprozess sollte sich relativ ungünstig auf die Gesamtbindungsstärke und günstig auf die Entropie auswirken. Die Abbildungen 16a und 16b bestätigen diesen Sachverhalt für die

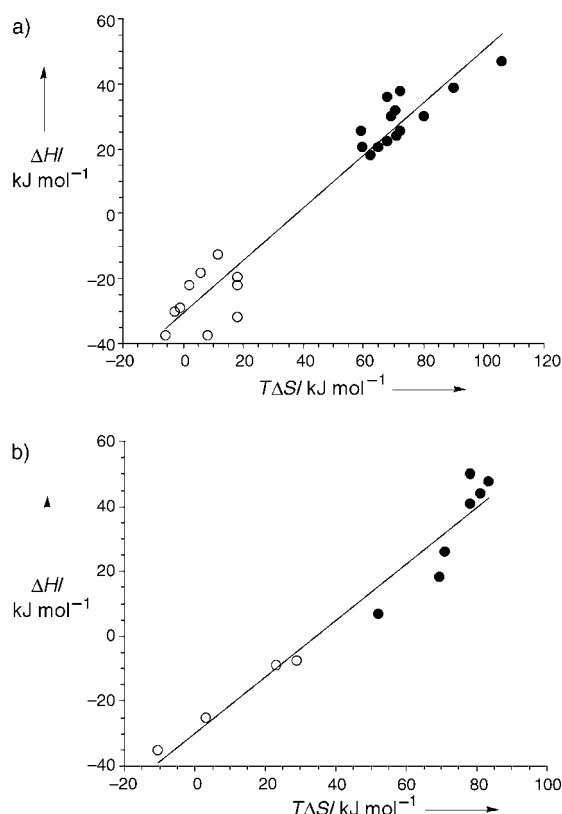


Abbildung 16. ΔH - $T\Delta S$ -Diagramm für die Bindung von Agonisten (●) und Antagonisten (○) an a) den Adenosin- A_1 -Rezeptor und b) den Adenosin- A_2 -Rezeptor.^[91]

Bindung von Agonisten (●) an den Adenosin- A_1 - und den Adenosin- A_2 -Rezeptor.^[89–91]

Antagonisten binden zwar an Rezeptoren, aktivieren diese aber nicht.^[87] Daher lösen Antagonisten im Rezeptor nicht die gleichen Ordnungs- oder Unordnungsvorgänge aus wie Agonisten. Verursacht also ein Agonist eine Oligomerisierung des Rezeptors (z. B. des β -adrenergen Rezeptors), dann induziert der Antagonist keine Oligomerisierung – sondern vielleicht sogar das Gegenteil, nämlich die Bildung von Monomeren des Rezeptors. Dieser Typ der Antagonisten-Bindung wirkt sich daher relativ ungünstig auf den Gesamtbindungszustand und günstig auf die Entropie aus (○ in Abbildung 15).

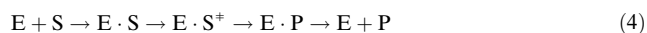
Wenn hingegen Agonisten eine Dissoziation von Rezeptormultimeren verursachen (z. B. der Adenosin- A_1 - und Adenosin- A_2 -Rezeptoren), dann dürfen Antagonisten keine Dissoziation induzieren – sondern vielleicht sogar die Oligomerisierung des Rezeptors. Dieser Typ der Antagonisten-Bindung wirkt sich relativ günstig auf den Gesamtbindungszustand und ungünstig auf die Entropie aus (○ in Abbildung 16).

Analoge Effekte werden bei zahlreichen Systemen beobachtet.^[89–91] Agonisten und Antagonisten scheinen also häufig unterschiedliche Einflüsse auf die Enthalpie-Entropie-Kompensation auszuüben. In solchen Fällen können Thermodynamikstudien herangezogen werden, um Änderungen des Aggregationsgrads von Rezeptoren bei der Koordination eines Liganden zu analysieren.

14. Katalytische Wirkung durch Schrumpfen der Enzymstruktur

14.1. Der Effekt höherer Bindungsstärke in der Enzymkatalyse

Eine Reaktion $S \rightarrow P$ [Gl. (4)], die durch ein Enzym E katalysiert wird, ist gegenüber der gleichen Reaktion in freier Lösung begünstigt, weil die ungünstige Entropie der Reaktion in freier Lösung durch die Präorganisation der katalytischen Gruppen im Enzym reduziert ist.^[63] Ein zweiter günstiger Effekt kommt hinzu, wenn das Enzym mit positiver Kooperativität an den Übergangszustand des Substrats (S^\ddagger) bindet.



Gemäß dem hier vorgestellten Modell geht eine solche positive kooperative Bindung mit einem Entropieaufwand (wegen der verringerten Beweglichkeit) und einem Enthalpiegewinn (wegen der Verkürzung nichtkovalenter Bindungen) in Teilen der Enzymstruktur im Übergangszustand einher. Während der Entropieaufwand im Übergangszustand den Entropiegewinn durch Präorganisation zumindest teilweise verbraucht, sollte die enzymatische Katalyse stets mit einem hohen Enthalpiegewinn verbunden sein.

Die experimentellen Daten der durch Cytidin-Desaminase katalysierten Reaktion bestätigen diese Aussage.^[92] Das Enzym beschleunigt die Reaktion um einen Faktor 10^{16} , wobei sich die Enthalpien der katalysierten und nichtkataly-

sierten Reaktion um $\Delta\Delta H^\ddagger = -84 \text{ kJ mol}^{-1}$ unterscheiden, die Entropien aber nur um $T\Delta\Delta S^\ddagger = 7 \text{ kJ mol}^{-1}$. Nach der Boltzmann-Gleichung entsprechen -5.7 kJ mol^{-1} bei Raumtemperatur einer Verzehnfachung der Reaktionsgeschwindigkeit. Der beschleunigende Effekt, der allein durch die Verstärkung der Bindungen hervorgerufen wird, entspricht somit einem Faktor 10^{15} , wohingegen die Präorganisation nur einen Faktor 10^1 beisteuert (Abbildung 17). Die Daten sind in

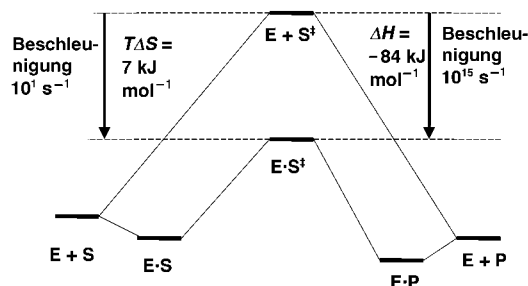


Abbildung 17. Profil der freien Enthalpien bei der unkatalysierten (oben; $E + S \rightarrow E + S^\ddagger \rightarrow E + P$) und katalysierten Desaminierung von Cytidin (unten; $E + S \rightarrow E \cdot S \rightarrow E \cdot S^\ddagger \rightarrow E \cdot P \rightarrow E + P$).^[92] Die enzymkatalysierte Reaktion ist um den Faktor 10^{16} beschleunigt. Die Bindung macht dabei einen Faktor von 10^{15} aus, während die Ordnung nur mit 10^1 zu Buche schlägt.

Einklang mit der Vorstellung, dass der katalytische Effekt zum Teil auf eine Verstärkung der Bindungen *innerhalb des Enzyms* im Übergangszustand mit dem Substrat zurückgeht.

Die relativen Geschwindigkeitskonstanten von sechs Reaktionen (enzymatischen und nichtenzymatischen, $k_{\text{kat}}/k_{\text{unk.}}$) wurden durch Wolfenden und Mitarbeiter gemessen.^[93,94] Die enzymatisch katalysierten Reaktionen werden durch die Verstärkung von Bindungen im Übergangszustand zum Teil eindrucksvoll beschleunigt (Tabelle 2). Der Beitrag der neu entstehenden Bindungen zwischen dem Übergangszustand des Substrats und dem Enzym zur katalytischen Wirkung ist offensichtlich, zusätzlich werden aber auch bereits existierende nichtkovalente Bindungen innerhalb des Enzyms verstärkt.

Tabelle 2: Enthalpieunterschiede $\Delta\Delta H^\ddagger$ zwischen unkatalysierten und enzymatisch katalysierten Reaktionen.^[88,89]

Nr.	Enzym	$\Delta\Delta H^\ddagger [\text{kJ mol}^{-1}]$	$k_{\text{kat.}}/k_{\text{unk.}}^{[a]}$
1	Chorismat-Dismutase	-33	$\times 10^6$
2	Chymotrypsin	-66	$\times 10^{12}$
3	Nuclease aus <i>Staphylococcus</i>	-63	$\times 10^{11}$
4	bakterielle α -Glucosidase	-80	$\times 10^{14}$
5	Urease	-93	$\times 10^{16}$
6	Hefe-OMP-Decarboxylase	-143	$\times 10^{25}$

[a] Beschleunigung der enzymatischen Reaktion gegenüber der unkatalysierten Reaktion als Folge von $\Delta\Delta H^\ddagger$.

14.2. Verminderte Dynamik von Enzymstrukturen im Übergangszustand

Wenn die oben genannten Effekte tatsächlich zu einem beträchtlichen Ausmaß auf Änderungen innerhalb des

Enzyms zurückgehen und nicht auf die Bildung von starken Bindungen zwischen dem Enzym und dem Übergangszustand des Substrats, dann sollten die Amid-NH-Gruppen der Enzyme im Komplex mit dem Übergangszustand einen deutlich geringeren H-D-Austausch eingehen. Zwei neuere Studien stützen diesen Vorschlag.

Anhand des H-D-Austauschs an Amidbindungen des Proteinrückgrats von Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) wurden die dynamischen Eigenschaften von humaner HGPRT im freien Zustand, in Komplexen mit Reaktant/Produkt und im Komplex mit einem Übergangszustandsanalogon verglichen.^[95] Von 207 austauschbaren Amid-NH-Protonen des Enzyms waren nach 1 h bei Raumtemperatur in D_2O ausgetauscht: 160 in freiem HGPRT, 139 in einer Gleichgewichtsmischung der Komplexe mit dem Reaktanten/dem Produkt und 126 im Komplex mit dem Übergangszustandsanalogon. Folglich wird die Struktur des freien Enzyms insgesamt kompakter, um Energie für die Bindung des Reaktanten/des Produkts bereitzustellen. Die Struktur kontrahiert weiter, um noch mehr Energie für die Bindung des Übergangszustandsanalogons zu liefern.

Ähnlich eindrucksvolle Ergebnisse wurden für die Bindung eines Übergangszustandsanalogons an eine als Trimer vorliegende Purinnucleosid-Phosphorylase (PNP) erhalten.^[96] Das Übergangszustandsanalogon, Immucillin-H, bindet extrem fest an das Enzym ($K_d = 23 \text{ pM}$), wenn nur eine der drei katalytischen Stellen besetzt ist. An 167 Stellen wurde ohne Liganden über einen Zeitraum von 2 h ein langsamer H-D-Austausch beobachtet. Ein Substratanalogon und das Produkt verhielten einen H-D-Austausch an 10 dieser Stellen. Durch Koordination von Immucillin-H an nur eine der drei Stellen des Trimers waren in allen drei Untereinheiten jeweils 27 der langsam austauschenden Protonen geschützt. Die entscheidende Wirkung der positiv kooperativen Bindung des Übergangszustandsanalogons besteht also darin, das dynamische Verhalten des gesamten trimeren Rezeptorsystems so stark einzuschränken, dass 81 NH-Protonen des Proteinrückgrats gegen Austausch geschützt werden. Die Bindungsenergie des Übergangszustandsanalogons ist stark delocalisiert, sodass das dynamische Verhalten fast über das gesamte Trimer hinweg eingeschränkt wird.^[96]

Wie auch bei der positiv kooperativen Bindung von Liganden an Rezeptoren (Abschnitt 11), unterscheidet sich die dichtere Packung der Substrat-Enzym-Übergangszustände von Strukturänderungen infolge Druckerhöhung. Die Verkürzung von Abständen tritt an denjenigen nichtkovalenten Schnittstellen auf, an denen der Übergangszustand des Substrats einen positiv kooperativen Bindungsprozess induziert (Abbildung 18).

14.3. Stabilisierung des Enzyms in einem enzymgebundenen Intermediat

Man kann erwarten, dass enzymgebundene Intermediate (enzyme-bound intermediates, EBIs) oft strukturelle Ähnlichkeiten zu den Übergangszuständen von Reaktionen haben. Wenn ein EBI 1) eine höhere Schmelztemperatur (T_m) aufweist als das freie Enzym und 2) weniger anfällig

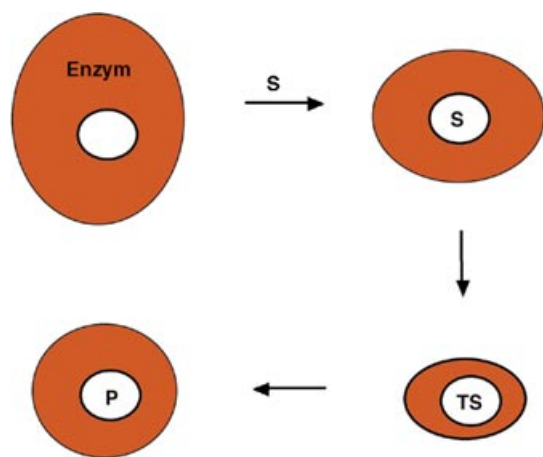


Abbildung 18. Verdichtung von Teilen der Enzymstruktur im Komplex mit dem Substrat (S), mit dem Übergangszustand des Substrats (TS) und mit dem Produkt (P). Die Änderungen sind stark übertrieben dargestellt.

gegen Trypsinverdau ist, dann sollte der katalytische Vorgang gefördert werden. Dies wurde anhand einer Halogenalkan-Dehalogenase (DhlA) vorgeführt, die die Hydrolyse von Halogenalkanen katalysiert. Die Reaktion verläuft über ein Alkyl-Enzym-Intermediat, das durch ein durch His289 aktivierte Wassermolekül gespalten wird.^[97] Die durch Austausch von His289 gegen Gln erhaltene Mutante (His289Gln-DhlA) reichert das Alkyl-Enzym-Intermediat an. Sowohl im mutierten Enzym als auch im Alkyl-Enzym-Intermediat (im Beispiel der Komplex mit 1,2-Dibromethan) ist die Konformation des Wildtyp-Proteins unverändert. Erwartungsgemäß ist die His289Gln-DhlA-Mutante thermisch weniger stabil ($T_m = 41^\circ\text{C}$) als das native Enzym ($T_m = 48^\circ\text{C}$). Das Alkyl-Enzym-Intermediat von His289Gln-DhlA ist wiederum beträchtlich stabiler ($T_m = 51^\circ\text{C}$) als die zugrundeliegende Mutante. Höhere Schmelztemperaturen spiegeln eine geringere Dynamik und stabilere Strukturen wider, und folglich sind einige Trypsin-Spaltungsstellen im Alkyl-Enzym-Intermediat weit weniger reaktiv als im freien Enzym. Der Umstand, dass das Alkyl-Enzym-Intermediat stabilisiert wird, ist in Einklang damit, dass sich die katalytische Wirkung zum Teil aus der verminderten Dynamik des Alkyl-Enzym-Intermediats ableitet.

15. Allgemeine strukturelle Auswirkungen der positiv kooperativen Bindung

Wir haben wie folgt argumentiert: Wenn zwei Sätze nichtkovalenter Bindungen ihre Bewegungen wechselseitig einschränken, dann entsteht der höher geordnete Zustand unter Enthalpiegewinn. Gleiches gilt bei analogen (positiv kooperativen) Änderungen, die auftreten, wenn ein homogenes System von n auf $n + m$ Moleküle vergrößert wird. Die klassische Behandlung dieses Effekts geht zurück auf Hill.^[98] Betrachten wir ein Aggregat aus n Molekülen mit periodischer Struktur im festen Zustand. Eine Vergrößerung des Aggregats bewirkt normalerweise zweierlei: 1) Der Festkör-

per wird thermodynamisch stabiler. 2) Der Fest-flüssig-Übergang wird schärfer ausgeprägt.^[99,100]

Tabelle 3 zeigt dies für eine steigende Zahl von Schichten von N_2 -Molekülen auf einer Oberfläche.^[99] Die physikalische

Tabelle 3: Stabilität von N_2 -Schichten in Abhängigkeit von der Schichtenzahl.

Zahl der Schichten	Schmelztemperatur
2.2	ca. 52 K (sehr breit)
3.1	56 K (breit)
4.0	58 K (mäßig breit)
4.8	61 K (mäßig scharf)
unendlich	63.14 K (sehr scharf)

Grundlage des Effekts ist folgende: Wenn das Aggregat vergrößert wird, tragen zusätzliche Moleküle in größerer Entfernung dazu bei, die Lage eines jeden Moleküls innerhalb des Festkörpers zu stabilisieren. Je größer ein Aggregat ist, desto stärker wird das dynamische Verhalten der enthaltenen Moleküle eingeschränkt, weil jedes von den übrigen $n-1$ Molekülen an seinem Platz gehalten wird. Als Folge daraus werden die Bindungen zu den unmittelbaren Nachbarmolekülen verstärkt.

Nach der Van't-Hoff-Gleichung [Gl. (5)] gilt: Je stärker sich die Gleichgewichtskonstante eines Schmelzprozesses in einem Temperaturbereich ändert, desto größer ist auch die mit dem Prozess verbundene Enthalpieänderung.

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (5)$$

Die bei größer werdenden Systemen schärfer ausgeprägten Schmelztemperaturen (Tabelle 3) spiegeln daher größer werdende Änderungen in der Enthalpie wider. Diese wiederum lassen sich auf zwei Ursachen zurückführen: 1) die zunehmende Größe des Systems (vergleiche z. B. 2.2 und 4.8 Schichten) und 2) die wirksamere Bindung eines Moleküls zu seinen Nachbarn in größeren Systemen. Die Abscheidung einer zusätzlichen Schicht von N_2 -Molekülen ist analog zur (spannungsfreien) Bindung eines Liganden an einen Rezeptor. Abbildung 19 zeigt schematisch die Kontraktion eines solchen Systems bei steigender Größe.

Analog zu homogenen Festkörpern kontrahieren auch supramolekulare Aggregate, die sich wie eine Einheit verhalten, und ihre van't Hoff'schen Schmelzenthalpien sinken. Aus genau diesem Grund zeigen Kristalle gewöhnlich (breitere) Schmelzübergänge bei niedrigeren Temperaturen, wenn

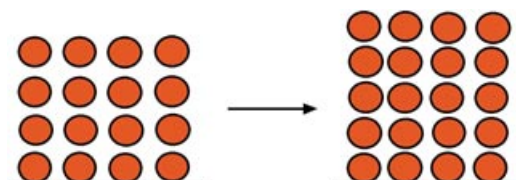


Abbildung 19. Verdichtung und wirksamere Bindungen in einem geordneten System von Molekülen bei der Abscheidung einer zusätzlichen Schicht.

sie mit zunehmenden Anteilen an Fremdschubstanz versetzt werden. Im Beispielsystem (Tabelle 3) wären die Oberfläche, auf der die N_2 -Moleküle adsorbiert sind, und der über diesen befindliche Gasraum als „Fremdschubstanz“ zu betrachten. In biologischen Systemen kann sich das Wasser an der Oberfläche eines Rezeptors wie eine „Fremdschubstanz“ gegenüber den positiv kooperativen Bindungen im Ligand-Rezeptor-System verhalten.

In Einklang mit den obigen allgemeinen Aussagen verringert der Einbau von steigenden Anteilen der Fremdschubstanz Cholesterin die Temperatur, die Enthalpie und die Kooperativität des Phasenübergangs Gel→Flüssigkristall bei Lipiddoppelschichten aus Phosphatidylserin.^[101]

16. Zusammenfassung

Ein Ansatz, der auf der Vereinfachung beruht, dass nichtkovalente Wechselwirkungen charakteristische, isolierte Bindungsenergien haben, hat seine Berechtigung als nützliches Verfahren zur Abschätzung von Bindungsenergien. In der Realität allerdings sind alle Wechselwirkungen im Zusammenhang zu betrachten, und es kommt zur Enthalpie-Entropie-Kompensation.

Die Enthalpie-Entropie-Kompensation, bisweilen als experimentelles Artefakt interpretiert, ist eine fundamentale Eigenschaft von nichtkovalenten Wechselwirkungen (eine zusammenfassende Diskussion von Veröffentlichungen, in denen eine Enthalpie-Entropie-Kompensation physikalisch validiert ist oder aber auf eine fehlende Validierung geschlossen wird, findet sich bei Houk et al.^[102]). Sie tritt bei jedem Fest-flüssig-Übergang auf und auch immer dann, wenn die Temperatur von Festkörpern oder Flüssigkeiten, die nichtkovalente Bindungen enthalten, geändert wird. Die Existenz einer Enthalpie-Entropie-Kompensation ergibt sich nicht nur aus fundamentalen theoretischen Überlegungen,^[2–4] der Effekt ist in vielen Experimenten auch viel zu groß, um als Artefakt abgetan zu werden (siehe z.B. die Abbildungen 13 und 16). In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass sich die Ungenauigkeiten bei der kalorimetrischen Bestimmung von ΔG und ΔH nur geringfügig unterscheiden.^[59]

Die hier vorgestellten Korrelationen zwischen der Enthalpie-Entropie-Kompensation und den Änderungen des dynamischen Verhaltens von Proteinen (wie es durch den H-D-Austausch angezeigt wird) führen uns unmittelbar zu einem physikalischen Ursprung der Enthalpie-Entropie-Kompensation in biologischen Systemen. In Abbildung 20 ist dargestellt, wie die Enthalpiesenke einer lokalen Wechselwirkung auf diese Weise beeinflusst wird. Das Absenken der Enthalpie eines Systems erfordert einen Entropieaufwand. Eine solche Änderung ist positiv kooperativ, weil Liganden besser binden, je höher organisiert das Templat ist. Wird umgekehrt ein System aus der Enthalpiesenke aufwärts befördert, so wird auf Kosten eines Enthalpieaufwands Entropie erzeugt. Eine solche Änderung ist negativ kooperativ, weil Liganden in einem solchen Prozess ihren Rezeptor stören müssen und dieser dadurch beweglicher wird. Wenn die Energiebarriere für das Aufbrechen einer Wechselwir-

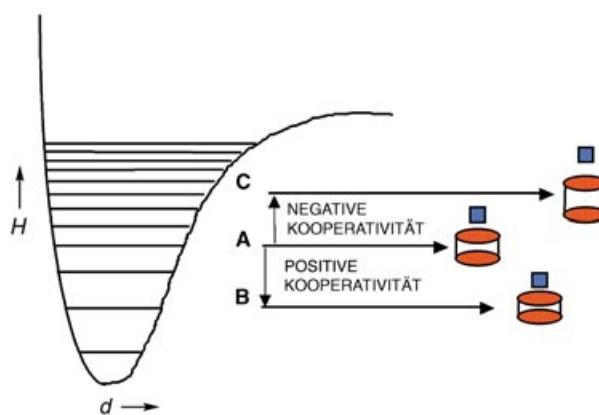


Abbildung 20. Relative Schwingungsniveaus, die eingenommen werden, wenn die Stärke der Wasserstoffbrücken im Rezeptor (rot) und die Koordination des Liganden (blau) A) nicht kooperativ gekoppelt sind, B) positiv kooperativ gekoppelt sind und C) negativ kooperativ gekoppelt sind. Wechselwirkungen mit günstiger (negativer) Enthalpie entsprechen tiefer in der Senke gelegenen Punkten. Wegen der Form der Senke führen enthalpisch günstige Wechselwirkungen zu kurzen Bindungen.

kung sehr klein ist, kann die verfügbare thermische Energie einige Bindungen spalten (d.h., die Wechselwirkung wird durch Verlassen der Senke aufgebrochen). Wenn die Bindung extrem schwach ist, wird die Vergrößerung der Bindungslängen (einhergehend mit einem negativ kooperativen Effekt oder dem Wegfall eines positiv kooperativen Effekts) somit von einem „Ausfransen“ begleitet.^[103]

Wenn die Bindung des Liganden die elektrostatische Polarisierung einer Wechselwirkung innerhalb des Rezeptors (z.B. einer Wasserstoffbrücke zwischen zwei Amid-Einheiten) verstärkt, dann wird die in Abbildung 20 gezeigte Senke zusätzlich vertieft, was zu einer weiteren Verkürzung von Bindungen führen kann. Umgekehrt ist es möglich, dass die Bindung eines Liganden den Rezeptor so verzerrt, dass die Senke flacher wird; dies kann den Effekt der Verlängerung von Bindungen verstärken, der mit einem negativ kooperativen Effekt einhergeht.

Die Gesamtänderungen der freien Enthalpie in den geordneten Systemen (Abbildung 20) könnten bestimmt werden, indem man über alle nichtkovalenten Wechselwirkungen summiert, die auf die gezeigte Weise beeinflusst werden. Dabei macht es für die Enthalpie eines bindenden Zustands keinen Unterschied, ob dieser tiefer oder weniger tief in einer bestimmten Senke liegt (Abbildung 20) oder in einer Senke, die entsprechend tiefer bzw. flacher ist (Abbildung 2).

Dass die Packung von Teilen der Rezeptorstruktur bei der Bindung eines Liganden dichter wird, kann im Gegenzug zur Unterstützung der Ligandenbindung genutzt werden. Man kann sich dies so vorstellen, dass der Ligand eine „Pseudokristallisation“ von Teilen des Rezeptors auslöst.^[56] In anderen Fällen scheint die Lockerung von Teilen der Rezeptorstruktur die Ligandenbindung zu behindern. Diese Effekte sind am einfachsten anhand der Abbildungen 18 und 21 zu verstehen. Die in Abbildung 21 (stark übertrieben) dargestellte Volumenreduktion als Folge einer positiv kooperativen

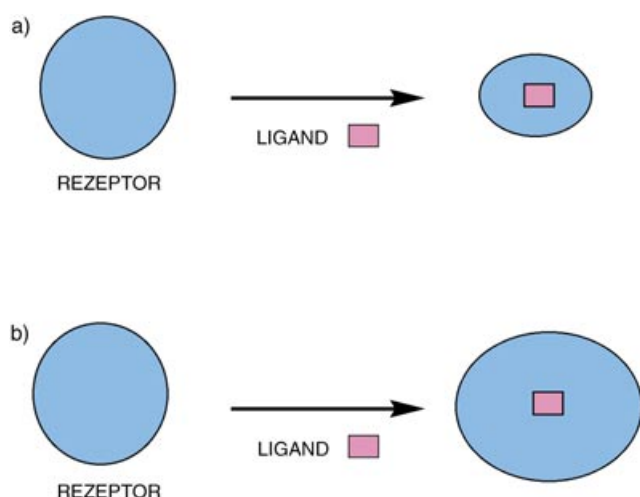


Abbildung 21. Änderung der Packung in Teilen einer Rezeptorstruktur bei der Koordination eines Liganden mit a) positiv kooperativem Effekt und b) negativ kooperativem Effekt. Die Änderungen sind übertrieben dargestellt. Die nichtsymmetrischen Formen der Ligand-Protein-Komplexe sollen illustrieren, dass sich kooperative Effekte meist auf bestimmte Teile einer Struktur verstärkt auswirken. Sie unterscheiden sich damit von den Effekten einer Druckänderung.

Bindung von Liganden an Proteine wurde durch Volumenmessungen direkt nachgewiesen. Bei der Koordination von *N*-Acetyl-D-glucosamin-Oligomeren an das Lysozym beträgt diese Volumenreduktion ca. 1 %.^[104] Es zeigte sich auch, dass der Ligand mit der höchsten Affinität die stärkste Kontraktion bewirkt.

Die Koordination kleiner Moleküle wird gefördert, wenn das Rezeptorprotein einige oder alle der folgenden Eigenschaften aufweist:

- 1) verminderter H-D-Austausch der Amid-Einheiten;^[59,87,88]
- 2) erhöhte Schmelztemperatur T_m ;^[59,73]
- 3) verstärkte innere Bindungen und eingeschränktes dynamisches Verhalten (negativere Werte von ΔH und ΔS für die Ligandenbindung);^[65,81]
- 4) höhere Resistenz gegen enzymatischen Verdau; möglicherweise auch die Unterstützung oligomerer Formen des Proteins.^[105]

Negativ kooperative Bindung bewirkt bei den hier diskutierten Beispielen die gegenteiligen Effekte.^[65,71]

Die katalytische Wirksamkeit wird gefördert, wenn Substrat-Übergangszustände das dynamische Verhalten von Enzymen stark einschränken. Möglicherweise beantwortet ein solcher Mechanismus die Frage, warum Enzyme relativ große Strukturen sind.

Addendum

Um zu prüfen, ob die in diesem Aufsatz beschriebenen Effekte auch große Bindungsenergien zur Verfügung stellen können, haben wir kürzlich die Einschränkung des dynamischen Verhaltens der Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bei der Anlagerung von vier Molekülen ihres

Cofaktors Nicotinamidadenindinucleotid (NAD^+) untersucht.^[107] Die Bindung des ersten Moleküls NAD^+ an das tetramere Enzym führt dazu, dass 60 Amid-NH-Protonen des Rückgrats gegen einen H-D-Austausch geschützt werden, wohingegen die Bindung des vierten NAD^+ -Moleküls keinen vergleichbaren Einfluss auf den H-D-Austausch ausübt. Die Bindungskonstante für das erste Molekül NAD^+ ist um den Faktor 10^6 größer als diejenige für das vierte Molekül NAD^+ . Dieser Effekt ist auf die Einschränkung des dynamischen Verhaltens des Enzym-Cofaktor-Systems zurückzuführen, die bei der Bindung des ersten Moleküls NAD^+ auftritt, nicht jedoch bei der Anlagerung des vierten Moleküls NAD^+ .

Wir haben auch gezeigt,^[107] dass eine Abnahme der mittleren Länge der Amid-Wasserstoffbrücken von Streptavidin um ca. 1 % (beim Senken der Temperatur von 55 auf 5 °C)^[108] die Stabilität erhöht und die Dynamik in einer Weise einschränkt, dass anstelle von 99 nur noch 61 der Rückgrat-Amidprotonen einen H-D-Austausch eingehen (unter den in Abschnitt 11 beschriebenen Bedingungen). Dieses Experiment deutet in Zusammenhang mit den Ergebnissen in Abschnitt 11 und den oben für GAPDH präsentierten Daten darauf hin, dass sehr hohe Ligandenbindungsenergien und eine Steigerung der Katalyseeffizienz (mit einem Faktor um eine Million) resultieren können, wenn sich die vielen Wasserstoffbrücken eines Proteins (bei der Koordination eines kleinen Liganden) lediglich um ca. 1 % verkürzen. Daher überrascht es nicht, dass Röntgenstrukturanalysen bisher noch keine strukturelle Grundlage für die hier postulierten Effekte geliefert haben.

Für finanzielle Unterstützung wird gedankt: dem Churchill College (M.Z.), dem EPSRC (D.H.W. und D.O'B.) und dem BBRSC (D.H.W. und E.S.).

Eingegangen am 4. Dezember 2003,
veränderte Fassung am 5. April 2004

- [1] M. P. Washburn, D. Wolters, J. R. Yates, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 242.
- [2] M. S. Searle, M. S. Westwell, D. H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 141.
- [3] J. D. Dunitz, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 709.
- [4] M. S. Searle, D. H. Williams, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 2051.
- [5] R. Lumry, S. Rajender, *Biopolymers* **1970**, 9, 1125.
- [6] O. Exner, *Prog. Phys. Org. Chem.* **1973**, 10, 411.
- [7] W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 4046.
- [8] M. I. Page, W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 1678.
- [9] M. I. Page, *Angew. Chem.* **1977**, 89, 456; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, 16, 449.
- [10] P. R. Andrews, D. J. Craik, J. L. Martin, *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 1648.
- [11] D. H. Williams, J. P. L. Cox, A. J. Doig, M. Gardner, U. Gerhard, P. T. Kaye, A. L. Lal, I. A. Nichols, C. J. Salter, R. C. Mitchell, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7020.
- [12] W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **1959**, 14, 1.
- [13] C. Tanford, *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Wiley, New York, **1980**.
- [14] N. Muller, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 23.
- [15] D. B. Smithrud, T. B. Wyman, F. Diederich, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5420.

- [16] a) H.-J. Böhm, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1994**, 8, 243; b) H.-J. Böhm, persönliche Mitteilung.
- [17] M. D. Eldridge, C. W. Murray, T. R. Auton, G. V. Paolini, R. P. Mee, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, 11, 425.
- [18] R. D. Head, M. L. Smythe, T. I. Oprea, C. L. Waller, S. M. Green, G. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3959.
- [19] A. R. Fersht, *TIBS* **1987**, 12, 301.
- [20] M. S. Searle, D. H. Williams, U. Gerhard, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10697.
- [21] B. A. Shirley, P. Stanssens, U. Hahn, C. N. Pace, *Biochemistry* **1992**, 31, 725.
- [22] C. Chothia, *Nature* **1974**, 248, 338.
- [23] C. Chothia, *Nature* **1975**, 254, 304.
- [24] R. B. Hermann, *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 2754.
- [25] G. I. Makhatadze, P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **1995**, 47, 307.
- [26] J. A. Reynolds, D. B. Gilbert, C. Tanford, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, 71, 2925.
- [27] J. M. Sanchez-Ruiz, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 12076.
- [28] J. M. Sanchez-Ruiz, *Eur. Biophys. J.* **1996**, 24, 261.
- [29] J. T. Kellis, K. Nyberg, A. R. Fersht, *Biochemistry* **1989**, 28, 4914.
- [30] A. Nicholls, K. A. Sharp, B. Honig, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1991**, 11, 281.
- [31] C. N. Pace, *J. Mol. Biol.* **1992**, 226, 29.
- [32] L. Serrano, J.-L. Neira, J. Sancho, A. R. Fersht, *Nature* **1992**, 356, 453.
- [33] K. Goto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 206, 497.
- [34] M. Matsumura, W. J. Becktel, B. W. Matthews, *Nature* **1988**, 334, 406.
- [35] P. D. Ross, M. V. Rekharsky, *Biophys. J.* **1996**, 71, 2144.
- [36] D. Shortle, W. E. Stites, A. K. Meeker, *Biochemistry* **1990**, 29, 8033.
- [37] K. Takano, Y. Yamagata, K. Yutani, *J. Mol. Biol.* **1998**, 280, 749.
- [38] B. Vallone, A. E. Miele, P. Vecchini, E. Chiancone, M. Brunori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6103.
- [39] M. S. Searle, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10690.
- [40] D. H. Williams, M. S. Westwell, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 57.
- [41] R. M. Izatt, J. S. Bradshaw, K. Pawlak, R. L. Bruening, B. J. Tarbet, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1261.
- [42] M. S. Westwell, M. S. Searle, J. Klein, D. H. Williams, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 16000.
- [43] H.-J. Schneider, A. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [44] M. S. Searle, G. J. Sharman, P. Groves, B. Benhamu, D. A. Beauregard, M. S. Westwell, R. J. Dancer, A. J. Maguire, A. C. Try, D. H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, 2781.
- [45] P. Groves, M. S. Searle, M. S. Westwell, D. H. Williams, *Chem. Commun.* **1994**, 1519.
- [46] D. H. Williams, A. J. Maguire, W. Tsuzuki, M. S. Westwell, *Science* **1998**, 280, 711.
- [47] G. Wagner, A. Pardi, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 5948.
- [48] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, 222, 311.
- [49] C. T. Calderone, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6262.
- [50] G. A. Leonard, J. Thomson, W. P. Watson, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 9573.
- [51] T. V. Chalikian, J. Voelker, J. G. E. Plum, K. J. Breslauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 7853.
- [52] J. A. Holbrook, M. W. Capp, R. M. Saecker, M. T. Record, *Biochemistry* **1999**, 38, 8409.
- [53] I. Jelesarov, C. Crane-Robinson, P. L. Privalov, *J. Mol. Biol.* **1999**, 294, 981.
- [54] D. H. Williams, C. T. Calderone, D. P. O'Brien, R. J. Zerella, *Chem. Commun.* **2002**, 1266.
- [55] B. Bardsley, D. H. Williams, *Chem. Commun.* **1998**, 2305.
- [56] D. H. Williams, E. Stephens, M. Zhou, *Chem. Commun.* **2003**, 1973.
- [57] S. Jusuf, P. J. Loll, P. H. Axelsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3490.
- [58] D. H. Williams, N. L. Davies, R. Zerella, B. Bardsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2042.
- [59] D. McPhail, A. Cooper, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1997**, 93, 2283.
- [60] *CRC Handbook of Physics and Chemistry*, 73. Aufl. (Hrsg.: D. R. Lide), New York, **1992–1993**.
- [61] D. E. Koshland, Jr., G. Nemethy, D. Filmer, *Biochemistry* **1996**, 35, 365.
- [62] J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux, *J. Mol. Biol.* **1965**, 12, 88.
- [63] A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman, New York, **1999**.
- [64] M. F. Perutz, A. J. Wilkinson, M. Paoli, G. G. Dodson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, 27, 1.
- [65] D. H. Williams, E. Stephens, M. Zhou, *J. Mol. Biol.* **2003**, 329, 389.
- [66] A. Colosimo, M. Coletta, G. Falcioni, B. Giardina, S. J. Gill, M. Brunori, *J. Mol. Biol.* **1982**, 160, 531.
- [67] M. F. Perutz, *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, 48, 327.
- [68] F. J. Blanco, G. Rivas, L. Serrano, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 584.
- [69] P. E. Wright, H. J. Dyson, R. A. Lerner, *Biochemistry* **1988**, 27, 7167.
- [70] S. W. Englander, J. J. Englander, R. E. McKinnie, G. K. Ackers, G. J. Turner, J. A. Westrick, S. J. Gill, *Science* **1992**, 256, 1684.
- [71] T. Flatmark, B. Almas, P. M. Knappskog, S. V. Berge, R. M. Svebak, R. Chehin, A. Muga, A. Martinez, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 262, 840.
- [72] T. K. Dam, R. Roy, S. K. Das, S. Oscarson, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 14223.
- [73] T. K. Dam, R. Roy, D. Page, C. F. Brewer, *Biochemistry* **2002**, 41, 1351.
- [74] T. K. Dam, R. Roy, D. Page, C. F. Brewer, *Biochemistry* **2002**, 41, 1359.
- [75] M. Celej, C. Montich, G. Fidelio, *Protein Sci.* **2003**, 12, 1496.
- [76] H.-P. Biemann, D. E. Koshland, Jr., *Biochemistry* **1994**, 33, 629.
- [77] I. D. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P. A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 9997.
- [78] S. Freitag, I. Le Trong, L. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, *Protein Sci.* **1997**, 6, 1157.
- [79] D. E. Hyre, I. Le Trong, S. Freitag, R. E. Stenkamp, *Protein Sci.* **2000**, 9, 878.
- [80] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* **1989**, 243, 85.
- [81] P. C. Weber, J. J. Wendoloski, M. W. Pantoliano, F. R. Salemme, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3197.
- [82] J. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74, 2236.
- [83] A. Cooper, D. T. F. Dryden, *Eur. Biophys. J.* **1984**, 11, 103.
- [84] P. Gilli, V. Ferretti, G. Gilli, P. A. Borea, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 1515.
- [85] M. J. Stone, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 379.
- [86] A. Yesilaltay, D. D. Jenness, *Mol. Biol. Cell* **2000**, 11, 2873.
- [87] J. Kendrew, *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell, Oxford, **1994**.
- [88] G. A. Weiland, K. P. Minneman, P. B. Molinoff, *Nature* **1979**, 281, 114.
- [89] P. A. Borea, K. Varani, L. Guerra, P. Gilli, G. Gilli, *Mol. Neuropharmacol.* **1992**, 2, 273.
- [90] P. A. Borea, A. Dalpiaz, K. Varani, L. Guerra, G. Gilli, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 49, 461.
- [91] P. A. Borea, K. Varani, S. Gessi, P. Gilli, A. Dalpiaz, *Farmaco* **1998**, 53, 249.

- [92] M. J. Snider, S. Gaunitz, C. Ridgeway, S. A. Short, R. Wolfenden, *Biochemistry* **2000**, 39, 9746.
- [93] A. Radzicka, R. Wolfenden, *Science* **1995**, 267, 90.
- [94] R. Wolfenden, M. Snider, C. Ridgeway, B. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7419.
- [95] F. Wang, W. Shi, E. Nieves, R. H. Angeletti, V. L. Schramm, C. Grubmeyer, *Biochemistry* **2001**, 40, 8043.
- [96] F. Wang, R. W. Miles, G. Kicsa, E. Nieves, V. L. Schramm, R. H. Angeletti, *Protein Sci.* **2000**, 9, 1660.
- [97] G. H. Krooshof, Dissertation, Groningen, **2000**.
- [98] T. L. Hill, *Thermodynamics of Small Systems, Bd. 1*, Benjamin, New York, **1963**.
- [99] J. A. Morrison, L. E. Drain, J. S. Dugdale, *Can. J. Chem.* **1952**, 30, 890.
- [100] D. H. Williams, M. S. Westwell, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 695.
- [101] T. P. W. McMullen, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biophys. J.* **2000**, 79, 2056.
- [102] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Zhang, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5020; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4872.
- [103] C. A. Hunter, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 1023.
- [104] K. Gekko, K. Yamagami, *Chem. Lett.* **1998**, 839.
- [105] O. H. Laitinen, A. T. Marttila, J. Kari, K. J. Airene, T. Kulik, O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek, M. S. Kulomaa, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 8219.
- [106] R. B. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Graphics* **1996**, 14, 51.
- [107] D. H. Williams, M. Zhou, E. Stephens, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [108] F. Cordier, S. Grzesiek, *J. Mol. Biol.* **2002**, 715, 739.

Chemie

rund um die Uhr

Das Buch zum Jahr der Chemie

Das offizielle Buch der Gesellschaft Deutscher Chemiker und des BMBF ist ein wahrer Lesespaß und Augenschmaus.



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Wiley-VCH, Kundenservice
Postfach 10 11 61, 69451 Weinheim
Tel.: +49 (0) 6201 606-400, Fax: +49 (0) 6201 606-184
E-Mail: service@wiley-vch.de, www.wiley-vch.de



Mädefessel-Herrmann, K. /
Hammar, F. /
Quadbeck-Seeger, H.-J.
Herausgegeben von der
Gesellschaft Deutscher
Chemiker
2004. X, 244 Seiten, mehr
als 300 Abbildungen kom-
plett in Farbe. Gebunden.
€ 19,90 / sFr 30,-
ISBN 3-527-30970-5



WILEY-VCH

15793411_gu