

Helix-Knäuel-Übergang von Biopolymeren

Dr. P. Schiller

February 12, 2001

1 Aufgabenstellung

Es sind verschiedene thermodynamische und kinetische Modelle auf die Helix-Knäuel-Umwandlung anzuwenden und ihre Vereinbarkeit mit experimentellen Befunden zu überprüfen.

2 Einführung

Proteine und Nucleinsäuren sind in einem begrenzten Temperaturintervall und bei festgelegter Zusammensetzung des umgebenden wäßrigen Mediums biologisch wirksam. Die experimentelle Beobachtung zeigt, daß ein bestimmter Strukturtyp, z. B. die α -Helix eines Polypeptides oder die native Struktur eines Proteins, nur in einem bestimmten Existenzbereich erhalten bleibt. Temperaturänderungen oder die Änderung des pH-Wertes können zu einer Konformationsumwandlung (Welche Bindungen in einer Polypeptidkette erlauben Drehungen?) der Biopolymer-Moleküle führen, die eine Funktionsminderung (Denaturierung) zur Folge hat. Modellfälle für derartige Denaturierungsprozesse sind die Helix-Knäuel-Umwandlung von Polypeptidketten und die Doppelhelix-Denaturierung von Polynucleotiden. Bevorzugt im nativen Zustand sind Molekülkonfigurationen, die nur eine relativ geringe Anzahl von Knäuelbereichen zwischen großen Helixbereichen haben. Das auffällige Merkmal der Helix-Knäuel-Umwandlung ist ihr Auftreten innerhalb eines sehr engen Intervalls der Temperatur oder eines anderen physikalischen Parameters (z. B. des pH-Wertes der wäßrigen Lösung). Bei dieser Konformationsumwandlung finden vorwiegend konzertierte Übergänge zusammenhängender Helixbereiche in den Knäuelzustand statt. Der Gesamtvorgang ist ein kooperativer Prozeß, der Ähnlichkeiten mit einem Phasentübergang aufweist. Der Helix-Knäuel-Übergang kann zum Beispiel durch Messung des optischen Drehvermögens oder der Extinktion im UV-Bereich untersucht werden.

Auch doppelhelikale DNA und RNA lassen sich durch Temperaturänderung oder Änderung des pH-Wertes denaturieren. Hierbei werden die Wasserstoffbrücken zwischen den gepaarten Basen gelöst und die hydrophoben Wechselwirkungen überwunden. Infolgedessen kommt es zu einer Aufwindung der Doppelhelix in zwei Einzelstränge, die entweder über die ganze Länge des Moleküls vollständig voneinander getrennt sind oder aber nur zum Teil (partielle Denaturierung). Die Renaturierung der DNA ist ein schneller einstufiger Prozeß, solange noch eine Verbindung zwischen den beiden Einzelsträngen besteht. Bringt man Temperatur und pH-Wert wieder in den physiologischen Bereich, so winden sich die beiden Stränge wieder umeinander, so daß die ursprüngliche Doppelhelix entsteht. Jede DNA hat eine bestimmte Denaturierungstemperatur.

3 Gleichgewichtseinstellung bei einer einfachen chemischen Reaktion und Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten

Als Modell für die Einstellung eines Gleichgewichts soll die einfache chemische Reaktion $C \rightleftharpoons H$ betrachtet werden. Z. B. könnten die Reaktanten H und C Konformere sein, die zu einem Anfangszeitpunkt nicht in der Gleichgewichtskonzentration vorliegen. Es sei zum Anfangszeitpunkt $t = 0$ die Konzentration des Stoffes C gleich $[C]_0$ und diejenige des Stoffes H gleich $[H]_0$. Das Geschwindigkeits-Zeit-Gesetz für die Gleichgewichtseinstellung beschreibt die Gleichung

$$\frac{d[H]}{dt} = -k_{zur} [H] + k_{hin} [C], \quad (3.1)$$

wobei k_{hin} und k_{zur} die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- bzw. Rückreaktion sind. Wenn sich nach genügend langer Zeit das chemische Gleichgewicht G eingestellt hat, sollte nach dem Massenwirkungsgesetz der Quotient aus den beiden Gleichgewichtskonzentrationen $s = [H]_G / [C]_G = k_{hin} / k_{zur}$ konstant sein. Unter Beachtung der Bilanz $[H] + [C] = [H]_0 + [C]_0 \equiv [S]$ kann die Differentialgleichung durch Variablentrennung integriert werden. Man erhält dann das Ergebnis

$$[H] = \frac{s}{1+s} [S] + \left([H]_0 - \frac{s}{1+s} [S] \right) \exp(-kt) \quad (3.2)$$

$$[C] = \frac{1}{1+s} [S] - \left([H]_0 - \frac{s}{1+s} [S] \right) \exp(-kt) \quad (3.3)$$

mit $k = k_{hin} + k_{zur}$. Im Spezialfall $[C]_0 = 0$ ergeben sich die einfacheren Beziehungen

$$[H] = [H]_0 \left(\frac{s + \exp(-kt)}{1 + s} \right) \quad \text{und} \quad [C] = [H]_0 \left(\frac{1 - \exp(-kt)}{1 + s} \right) \quad (3.4)$$

(i) Aufgabe 1 Wie kann die kinetische Gleichung 3.1 aufgestellt werden? Zeigen Sie durch Einsetzen der Lösung 3.4, daß die Differentialgleichung 3.1 erfüllt ist (oder lösen Sie einfach Differentialgleichung 3.1).

Der zeitlichen Verlauf der Gleichgewichtseinstellung ist für den Spezialfall $[C]_0 = 0$ in der nachfolgenden Graphik veranschaulicht. Die Konzentrationsverhältnisse $[H] / [H]_0$ und $[C] / [H]_0$ sind gegen t aufgetragen, wobei die Geschwindigkeitskonstante k und die Gleichgewichtskonstante s gleich eins gesetzt wurden.

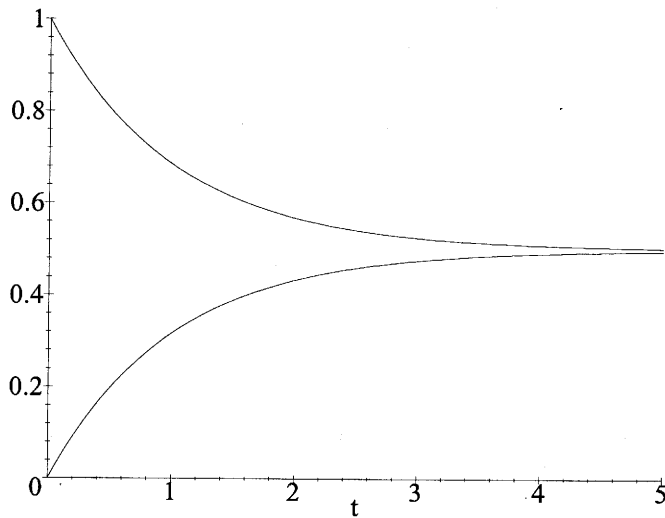


Abb. 1: Gleichgewichtseinstellung bei der chemischen Reaktion $C \rightleftharpoons H$.

Offensichtlich hat sich das Gleichgewicht, bei dem hier $[H]_G / [H]_0 = [C]_G / [H]_0 = 1/2$ gilt, nach etwa $t = 5$ fast vollständig eingestellt. Die Lage des Gleichgewichtes läßt sich durch Temperaturänderung verschieben. Die Massenwirkungskonstante s ändert sich hierbei nach dem thermodynamischen Gesetz (van't Hoffsche Reaktionsisobare)

$$\frac{d \ln s}{dT} = \frac{\Delta_R h}{RT^2}, \quad (3.5)$$

wobei T die Temperatur, $R = 8.31 \text{ J}/(\text{mol} * \text{K})$ die universelle Gaskonstante und $\Delta_R h$ die molare Reaktionswärme (bei konstantem Druck) sind. Setzt man voraus, daß $\Delta_R h$ nicht von der Temperatur abhängt, dann erhält man nach der Integration der Gleichung 3.5 den Zusammenhang

$$s = s_0 \exp\left(-\frac{\Delta_R h}{RT}\right),$$

wobei s_0 eine Konstante ist. Anstelle der Konzentrationen kann auch der Umsatzgrad

$$\theta = \frac{[H]}{[H] + [C]} = \frac{s}{s + 1} \quad (3.6)$$

verwendet werden. Die dimensionslose Größe θ gibt an, wie groß der Anteil des gebildeten Stoffes H an der Gesamtmenge ist. Dementsprechend gilt $0 \leq \theta \leq 1$. In Abb. 2 sind die Temperaturverläufe von θ für $\Delta_R h = 5 \text{ kJ/mol}$ und $\Delta_R h = 400 \text{ kJ/mol}$ dargestellt.

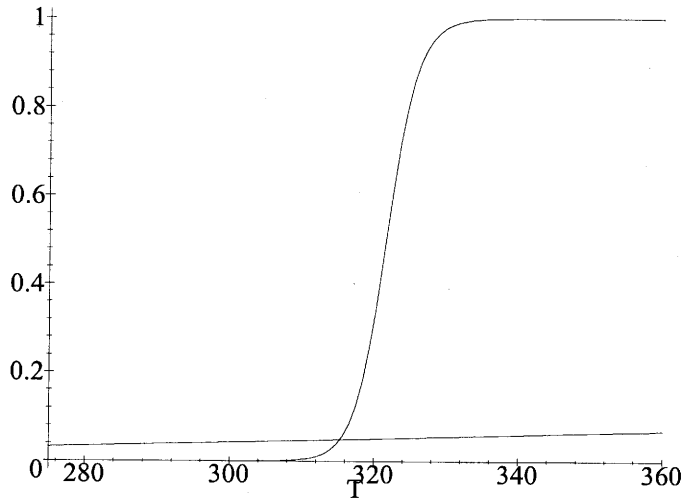


Abb. 2: Der Umsatzgrad θ für das Gleichgewicht $C \rightleftharpoons H$ in Abhängigkeit von der Temperatur. Nur im Fall einer unrealistisch großen Reaktionsenthalpie ($\Delta_R h = 400 \text{ kJ/mol}$) ergibt sich ein steiler Kurvenanstieg. Die andere Kurve bezieht sich auf den Fall $\Delta_R h = 5 \text{ kJ/mol}$.

4 Modelle für den Helix-Knäuel-Übergang

A. Modell ohne Kooperativität

Es ist naheliegend, das im 3. Abschnitt behandelte einfache Modell für die Reaktion $C \rightleftharpoons H$ auf den Helix-Knäuel-Übergang von Biopolymeren anzuwenden. Die Polymerkette möge aus N Segmenten bestehen und h soll die Anzahl der Segmente sein, die sich in Helixabschnitten der Kette befinden. Dementsprechend sind $c = N - h$ Polymersegmente im Knäuelzustand. Das Massenwirkungsgesetz nimmt dann die Form $s = h/c$ an. Der Umsatzgrad einer Polymerkette in den Helixzustand ist durch $\theta = h/(h + c) = h/N$ gegeben. Im Falle einer Kette ohne Kooperativität beeinflussen sich die Segmente nicht gegenseitig, d. h. jedes einzelne Segment kann unabhängig von den übrigen Segmenten betrachtet werden. Bei einer nicht kooperativen Umwand-

lung $C \rightleftharpoons H$ zwischen den beiden Zuständen H und C wären die im 3. Abschnitt angegebenen Gleichungen anwendbar.

Es stellt sich die Frage, ob ein derartig vereinfachtes Modell den Helix-Knäuel-Übergang adäquat beschreiben kann. Tatsächlich findet man experimentell einen Temperaturverlauf des Umsatzgrades θ (oder von $1 - \theta$ für $\Delta_R h < 0$), wie er durch die S-förmige Kurve in der Abb. 2 wiedergegeben wird. Die Konformationsumwandlungen langkettiger biologischer Polymere vollziehen sich in der Regel innerhalb eines engen Temperaturintervalls von wenigen Grad Celsius (siehe experimentelle Daten auf der letzten Seite). Die pro Segment berechnete Umwandlungswärme $\Delta_R h$ müßte dann entsprechend Abb. 2 einige hundert kJ/mol betragen. Aus theoretische Überlegungen und mit experimentellen Untersuchungen findet man jedoch, daß $|\Delta_R h|$ nur wenige kJ/mol beträgt. Hieraus wird gefolgert, daß Modelle ohne Berücksichtigung kooperativer Effekte Konformationsübergänge von Biopolymeren nicht beschreiben können.

(i) Aufgabe 2 Schätzen Sie mit der temperaturabhängigen Extinktionskurve aus dem Biophysik-Praktikum (Abt. Biophysikalische Chemie, Beutenberg) den Wert von $\Delta_R h$ ab, der sich ergibt, wenn man das nicht kooperative Modell für die Beschreibung der Denaturierung einer DNA zugrunde legt. Wie groß ist bei der Hälfte des Umsatzes (d. h. für $\theta = 0.5$) der Differentialquotient $d\theta/dT$? Vergleichen Sie diesen experimentell ermittelten Anstieg mit dem Wert von

$$\left(\frac{d\theta}{dT}\right)_{\theta=0.5} = \frac{\Delta_R h}{4RT_m^2}$$

bei einer realistischen Vorgabe der Reaktionswärme $|\Delta_R h| = 5kJ/mol$.

B. Die Alles-oder-Nichts (AON)-Näherung

Die AON-Näherung setzt voraus, daß alle Segmente C (z. B. Knäuelzustand) einer Kette kooperativ in den Zustand H (z. B. α -Helix) übergehen. Irgendwelche Konformere zwischen den beiden Grenzfällen werden als sehr unwahrscheinlich und somit ihre Konzentration als vernachlässigbar klein vorausgesetzt. Zur Erläuterung geben wir eine Kette mit vier Segmenten vor. Bei der Alles-oder-Nichts-Näherung wird das Massenwirkungsgesetz für das Gleichgewicht der beiden Grenzzustände $H - H - H - H$ und $C - C - C - C$ aufgestellt. Bezeichnen eckige Klammern wieder die Konzentrationen, dann kann das Massenwirkungsgesetz in der Form

$$K_{AON} = \frac{[H - H - H - H]}{[C - C - C - C]}$$

aufgeschrieben werden. Bei der Umwandlung des Knäuelzustandes in die Helixkonfiguration und beim umgekehrten Prozeß müssen jedoch Zwischenzustände durchlaufen werden, obwohl nach Voraussetzung diese (aus H und C -Segmenten bestehenden) Konformere eine sehr geringe Konzentration haben. Die erste Bildung eines H -Zustandes in einer reinen Sequenz von C -Zuständen (Nucleation) ist relativ schwierig. Ist einmal ein erstes H -Segment (Keim) vorhanden, dann können sich die anderen Segmente vergleichsweise leicht durch Wachstumsschritte in H umwandeln. Dementsprechend ist die Keimbildungskonstante $\sigma s = \frac{[H-C-C-C]}{[C-C-C-C]}$ sehr viel kleiner als die Massenwirkungskonstante für die Wachstumsschritte $s = \frac{[H-H-C-C]}{[H-C-C-C]} = \frac{[H-H-H-C]}{[H-H-C-C]} = \frac{[H-H-H-H]}{[H-H-H-C]}$, d. h. es gilt die Ungleichung $\sigma \ll 1$. Die Massenwirkungskonstante für den Alles-oder-Nichts-Übergang ergibt sich zu $K_{AON} = \frac{[H-H-H-H]}{[C-C-C-C]} = \frac{[H-C-C-C]}{[C-C-C-C]} * \frac{[H-H-C-C]}{[H-C-C-C]} * \frac{[H-H-H-C]}{[H-H-C-C]} * \frac{[H-H-H-H]}{[H-H-H-C]}$, bzw. unter Berücksichtigung der Definitionen von s und σs folgt $K_{AON} = \sigma s^4$. Dementsprechend gilt für eine Kette mit N Segmenten $K_{AON} = \sigma s^N$ und mit der Beziehung $\theta = \frac{K_{AON}}{K_{AON} + 1}$ erhalten wir schließlich den Umwandlungsgrad

$$\theta = \frac{\sigma s^N}{\sigma s^N + 1} \quad (4.1)$$

Die nachfolgende Graphik zeigt die Abhängigkeit des Umsatzgrades θ von der Wachstumskonstanten s für zwei verschiedene Kettenlängen.

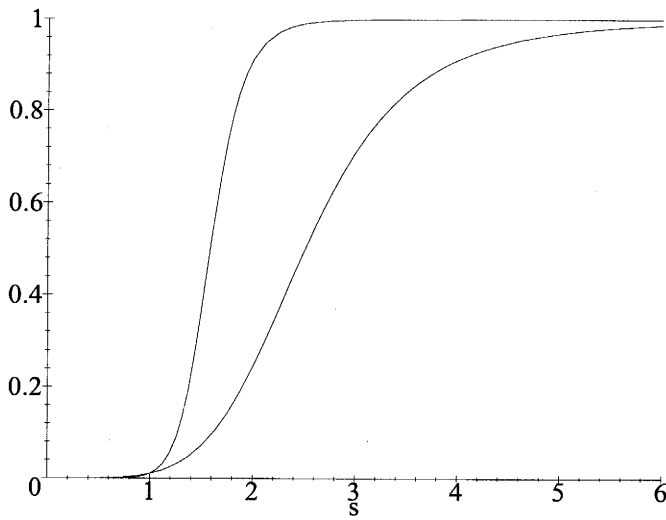


Abb. 3: Verlauf des Umsatzgrades θ in Abhängigkeit von s für $\sigma = 0.01$ und die Kettenlängen $N = 10$ (steilere Kurve) und $N = 5$.

Es ist zu beachten, daß Gleichung 4.1 nur für relativ kurze Peptidketten $N < \sigma^{-1/2}$ eine gute Beschreibung sein kann. Andernfalls ist die AON-Näherung nicht anwendbar. Allerdings liefert die einfache AON-Näherung in einigen Fällen ein qualitativ brauchbares Modell zur Beschreibung

der Umwandlung von längeren Ketten, so etwa für die Denaturierung und Renaturierung einer Doppelhelix aus zwei komplementären Polynucleotidsträngen (Reißverschlußmechanismus). Aus einer formalen Sicht ist bei diesen Prozessen der Keimbildungsparameter σ extrem klein.

(i) Aufgabe 3 Untersuchen Sie mit dem Simulationsprogramm 'Gleichgewicht' den Einfluß der Kettenlänge N , der Gleichgewichtskonstanten s sowie des Keimbildungsparameters σ auf die erzeugten Sequenzen. Eine Simulation benötigt mindestens N/σ Zeitschritte zur Einstellung des 'thermodynamischen' Gleichgewichtes. Die Kooperativität ist besonders am Umwandlungspunkt ($s = 1$ bzw. $\theta = 0.5$) am Auftreten längerer Folgen von H und C -Segmenten deutlich erkennbar, d. h. es bilden sich H und C -Cluster. Keine Kooperativität liegt vor, wenn $\sigma = 1$ gilt. In diesem Fall ist die Aufeinanderfolge von H und C -Segmenten am Umwandlungspunkt völlig unregelmäßig. Wie verändert sich die Kooperativität mit Verkleinerung von σ ?

Zeigen Sie mit dem Simulationsprogramm, daß die Alles-oder-Nichts-Näherung bei kurzen Ketten brauchbar ist, bei langen Ketten aber versagt. Hierzu können Sie die erzeugten Ketten einer Simulation für $s = 1, \sigma = 0.01$ und $N = 5$ mit denjenigen einer Simulation für $s = 1, \sigma = 0.01$ und $N = 50$ vergleichen.

Nach allgemeinen theoretischen Vorstellungen sollte für sehr lange Ketten die mittlere Länge ($\overline{N_H}$ bzw. $\overline{N_C}$) einer ununterbrochenen Sequenz am Umwandlungspunkt ($\theta = 0.5$) der Formel $\overline{N_H} = \overline{N_C} = 1 + \sigma^{-1/2}$ genügen, d. h. die H und C -Sequenzen werden mit Verringerung von σ immer länger. Versuchen Sie, diese Gesetzmäßigkeit mit Hilfe des Simulationsprogrammes zu bestätigen, indem Sie Simulationen mit verschiedenen Kooperativitätsparametern $\sigma = 1, 0.3, 0.1, 0.03$ und 0.01 (übrige Parameter: $N = 100$ und $s = 1$) untereinander und mit der Formel $\overline{N_H} = \overline{N_C} = 1 + \sigma^{-1/2}$ vergleichen. Für die Darstellung der Ergebnisse ist eine Auftragung $\log(\overline{N_H} - 1)$ gegen $\log\sigma$ geeignet.

C. Kooperative Umwandlung sehr langer Ketten

Wenn $N \gg \sigma^{-1/2}$ gilt, also für genügend lange Kette, ist das AON-Modell nicht anwendbar. Das mathematische Problem ist in der grundlegenden Arbeit von Zimm und Bragg [1] für den Fall beliebig langer Ketten gelöst worden. Wir geben hier eine etwas vereinfachte aber recht genaue Formel für den Umwandlungsgrad an [3]:

$$\theta = \frac{1}{2} \left(1 + \frac{s - 1}{\sqrt{(s - 1)^2 + 4\sigma s}} \right) \quad (4.2)$$

In der nachfolgenden Abbildung sind die Ergebnisse der Formel 4.1 des AON-Modells mit dem Ergebnis 4.2 der genauen Theorie verglichen.

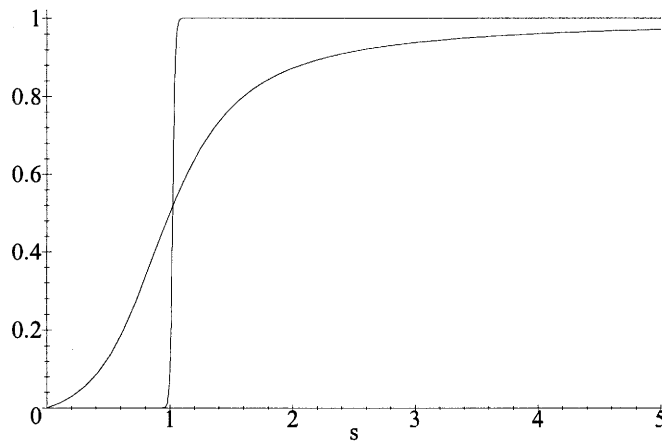


Abb. 4: Vergleich des AON-Modells (extrem steile Kurve, Beziehung 4.1) mit dem nach der Beziehung 4.2 bestimmten Verlauf. Der Umwandlungsgrad θ ist jeweils gegen s für $N = 100$ und $\sigma = 0.1$ aufgetragen.

(i) Aufgabe 4 Zeigen Sie mit dem Simulationsprogramm 'Gleichgewicht', daß im Fall $N \gg \sigma^{-1/2}$ Gleichung 4.2 besser die Abhängigkeit des Umsatzgrades θ von der Gleichgewichtskonstanten s beschreibt als die entsprechende Beziehung 4.1 des AON-Modells.

5 Geschwindigkeit des Helix-Knäuel-Überganges

Es sei vorausgesetzt, daß zum Zeitpunkt $t = 0$, an dem noch (fast) alle Kettensegmente im Helixzustand H sind ($\theta(t = 0) = 1$), die Temperatur plötzlich erhöht wird. Die Polymerkette relaxiert dann in ein neues Gleichgewicht mit einem kleineren Umsatzgrad $\theta_G < 1$, bei dem nur noch ein Anteil der Segmente in der helikalen Konfiguration ist. Eine Formel für Relaxation in das neue Gleichgewicht folgt aus den Beziehungen 3.4 und $\theta(t) = \frac{[H]}{[H]_0}$. Man erhält das Ergebnis

$$\theta(t) - \theta_G = (1 - \theta_G) \exp(-t/\tau)$$

mit $\tau^{-1} = k_{hin} + k_{zur} = k$. Die Relaxationszeit τ gibt den Zeitraum an, innerhalb dessen eine Auslenkung aus einem Gleichgewicht $\Delta\theta$ auf den Wert $\Delta\theta/e$ (mit $e \simeq 2.72$) abgefallen ist. Nach dem einfachen kinetischen Modell ohne Kooperativität (3. Abschnitt) sollte die Geschwindigkeitskonstante k und damit auch τ unabhängig von der Kettenlänge N sein. Wie aber bereits festgestellt wurde, ist das einfache nichtkooperative Modell auf den Helix-Knäuel-Übergang nicht

anwendbar. Ein erweitertes Modell unter Berücksichtigung der Kooperativität des Übergangsprozesses führt im Grenzfall sehr langer Ketten ($N \gg \sigma^{-1/2}$) auf die Relaxationszeit [3]

$$\tau = \frac{\tau_0}{\sigma}, \quad (5.1)$$

wobei τ_0 von σ unabhängig ist. Die Relaxationszeit τ ist eine physikalische Größe, die mit verschiedenen spektroskopischen Methoden bestimmt werden kann.

(ii) Aufgabe 5 Verwenden Sie das Programm 'Kinetik', um die Relaxation vom Ausgangszustand $\theta(t=0) = 1$ in einen neuen Gleichgewichtszustand θ_G zu untersuchen. Es soll gezeigt werden, daß die Relaxationszeit τ mit anwachsender Kooperativität (d. h. mit Verkleinerung von σ) größer wird. Tragen Sie τ gegen σ^{-1} auf und versuchen Sie die Proportionalität $\tau \propto \sigma^{-1}$ (Beziehung 5.1) nachzuweisen. Z. B. könnten die Parameter folgendermaßen gewählt werden: $s = 1$ (damit $\theta_G = 0.5$), $N = 100$ oder 50 , $\sigma = 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01$ und eventuell $\sigma = 0.003$ für $N = 100$. Die Segmentzahl N sollte in jeder Simulation genügend groß sein, d. h. der Ungleichung $N \gg \sigma^{-1/2}$ genügen.

Es können anstatt $s = 1$ auch andere Werte für s ($s = 0.5, 0.1$; übrige Parameter z. B. $N = 50$ und $\sigma = 0.1$ oder $\sigma = 0.01$) gewählt werden. Hierbei ist anzumerken, daß gemäß der Beziehung 4.2 der Wert von θ_G von s abhängig ist.

6 Literatur

- [1] B. H. Zimm and J. K. Bragg: Theory of the Phase Transition between Helix and Random Coil in Polypeptide Chains. J. Chem. Phys. 31 (1959) 526
- [2] C. R. Cantor und P. R. Schimmel: Biophysical Chemistry. Part III: The behaviour of biological macromolecules. W. H. Freeman and Company, San Francisco 1980, S.1041ff
- [3] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl und H. Ziegler (Hrsg.): Biophysik, 2. Auflage, Springer-Verlag 1982, S. 243ff
- [4] T. Ackermann: Physikalische Biochemie, Springer-Verlag 1992, S. 249ff

