

---

Physik-Department  
Lehrstuhl für Experimentalphysik IV  
der Technischen Universität München

Zur Druckdissoziation von Proteinkomplexen:  
Lichtstreuung und thermodynamische Analyse am Beispiel von  
Arthropoden-Hämocyaninen und Kasein-Mizellen

Ronald Gebhardt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik  
der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. H. Friedrich

Prüfer der Dissertation:

1. Priv. - Doz. Dr. W. Doster
2. Univ. - Prof. Dr. J. Friedrich

Die Dissertation wurde am 24.03.05 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 03.06.05 angenommen.

---

## Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Herrn PD Dr. Doster für das interessante Promotionsthema, die ständige Diskussionsbereitschaft und Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Friedrich vom Lehrstuhl für Physik in Weihenstephan und Herrn Prof. Dr. Kulozik vom Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie danke ich für die vielen wissenschaftlichen Hinweise und Ratschläge in Bezug auf die Experimente zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle. Bei Frau Budjarek möchte ich mich für die erfolgreiche Durchführung der AFM-Messungen bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Petry und Herrn Prof. Dr. Meyer, allen Mitarbeitern des Institutes E13 am Physikdepartment und der DFG-Forschergruppe „Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln“.

Für Ihr Verständnis und ihre liebe Unterstützung möchte ich mich bei meiner Familie und insbesondere bei Renata bedanken.

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Zur Druckdissoziation und Thermodynamik von Proteinkomplexen .....	5
3	Experimentelle Methoden .....	13
3.1	Statische und dynamische Lichtstreuung.....	13
3.1.1	Lichtstreuung an isolierten Dipolen (Gas).....	13
3.1.2	Statische Lichtstreuung von Makromolekülen in Lösung .....	15
3.1.3	Dynamische Lichtstreuung.....	19
3.1.4	Aufbau des Lichtstreuexperiments.....	25
3.2	AFM- Atomic-Force-Microscopy .....	27
4	Zur Druckstabilität des 12-meren Hämocyanins aus <i>Homarus americanus</i> und des 24-meren Hämocyanins aus <i>Eurypelma californicum</i> .....	29
4.1	Allgemeiner Aufbau und Funktion der Arthropoden-Hämocyanine .....	29
4.1.1	Struktur des 12-meren Hämocyanins aus <i>Homarus americanus</i> und des 24-meren Hämocyanins aus <i>Eurypelma californicum</i> .....	30
4.1.2	Stabilisierende Kräfte der Quartärstruktur.....	31
4.2	Analyse der Hämocyanin-Dissoziation .....	32
4.3	Ergebnisse und Diskussion zur Druckdissoziation des 12 meren Hämocyanins aus <i>Homarus americanus</i> .....	34
4.4	Ergebnisse und Diskussion zu Lichtstreu- und Stabilitätsmessungen des 24-meren Hämocyanins aus <i>Eurypelma californicum</i> .....	57
4.5	Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse.....	62
4.6	Probenpräparation .....	64
5	Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle .....	65
5.1	Allgemeine Übersicht.....	65
5.1.1	Supra-molekulare Struktur der Kasein-Mizelle.....	67
5.1.2	Wechselwirkungen innerhalb der Kasein-Mizelle.....	69
5.1.3	Einfluss von Hochdruck auf die Kasein-Mizelle .....	71
5.2	Experimente zur Druckstabilität von Kasein-Mizellen .....	72
5.2.1	Messdatenerfassung und deren weitere Behandlung.....	73
5.2.2	Besonderheiten der Auswertung der druckabhängigen Dissoziationskurven .....	77

---

5.2.3	Lichtstreuexperimente an Kasein-Mizellen in Abhängigkeit von Druck, Temperatur, Kalzium- und Protonenkonzentration .....	80
5.2.4	Paralleles Modell zur Beschreibung des zweistufigen Druckdissoziationsprozesses .....	95
5.2.5	Analyse der temperaturabhängigen Druckdissoziation mit dem parallelen Übergangsmodell .....	97
5.2.6	Analyse der kalziumabhängigen Druckdissoziation bei 20 °C mit dem parallelen Übergangsmodell .....	105
5.2.7	Analyse des pH-Effektes auf die kalziumabhängige Druckdissoziation von Kasein-Mizellen.....	108
5.2.8	Analyse der Druckdissoziation von Kasein-Mizellen in Abhängigkeit der Temperatur und der Kalziumkonzentration .....	111
5.2.9	Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse.....	114
5.2.10	Zur Frage der Reversibilität druckbehandelter Kasein-Mizellen.....	118
5.2.11	Interpretation der AFM- und Lichtstremessungen zur Reversibilität druckbehandelter Kasein-Mizellen .....	124
5.3	Probenpräparation .....	128
6	Zusammenfassung .....	129
6.1	Druckdissoziation von Arthropoden-Hämocyaninen .....	129
6.2	Druckdissoziation von Kasein-Mizellen.....	131
7	Anhang .....	135
7.1	Formalismus für den sequentiellen dodekameren Dissoziationprozess ...	135
7.2	Druckdissoziationsmodelle des Kasein-Mizellen-Zerfalls .....	137
7.2.1	Sequentielles Dissoziationsmodell.....	137
7.2.2	Paralleles Übergangsmodell.....	139
7.2.3	Erstellte Anpassungsprogramme und Fit-Routinen .....	141
	Literaturverzeichnis .....	145

## 1 Einleitung

Proteinkomplexe (Oligomere) stellen eine häufig untersuchte Substanzklasse in den Lebenswissenschaften dar. Im Unterschied zur räumlichen Gestalt von monomeren Proteinen, die als Tertiärstruktur bezeichnet wird, ist bei Proteinkomplexen zusätzlich die räumliche Anordnung mehrerer identischer oder nichtidentischer Polypeptidketten (Untereinheiten) zueinander zu beachten. Die Anzahl der Proteinuntereinheiten kann Werte zwischen 2 und 2000 (Viren) annehmen. Der dadurch entstandene höhere Organisationsgrad wird als Quartärstruktur bezeichnet.

In dieser Arbeit werden Hämocyanine und die Kasein–Mizelle untersucht, zwei Proteinkomplexe, die sich grundlegend in ihrem strukturellen Aufbau unterscheiden. Die Hämocyanine sind wichtige Vertreter der respiratorischen Proteinkomplexe (Antonini E., Chiancone E., 1977) in der Hämolymphe von Arthropoden (Gliederfüßler). Sie bestehen aus einer definierten Anzahl von Proteinuntereinheiten, die über eine bestimmte Sekundär- und Tertiärstruktur verfügen. Dagegen bauen die nahezu strukturlosen Kaseine eine Protein-Mizelle auf, die in Bezug auf die Anzahl ihrer Untereinheiten eine breite Verteilung aufweist (Schmidt D. G., 1982; Walstra P., 1990; Holt C., 1992 und Horne D.S., 1992).

Die Anwendung hydrostatischen Drucks ermöglicht es, Proteinkomplexe in die einzelnen Untereinheiten zu dissoziieren (Silva J., Weber G., 1993). Die Ursache dafür liegt in der Schwächung intermolekularer Wechselwirkungen, die im Wesentlichen aus nichtkovalenten Bindungskräften bestehen. Im ersten Teil des zweiten Kapitels wird der Einfluss hydrostatischen Drucks auf die einzelnen Protein-Protein-Kontakte beschrieben.

Im weiteren Verlauf des zweiten Kapitels werden allgemeine Grundlagen zur Thermodynamik unter Druck (Doster W., Friedrich J., 2004) und insbesondere zur Druckdissoziation von Proteinkomplexen (Weber G., 1992) beschrieben, die für die Auswertung der druckabhängigen Experimente in den späteren Kapiteln von Bedeutung sind. Neben der Ermittlung charakteristischer, thermodynamischer Größen für die Druckdissoziation, wie molares Dissoziationsvolumen und der Dissoziationskonstante bei Normaldruck, können auch Assoziationsmechanismen und Ligandengleichgewichte untersucht und identifiziert werden. Um bestimmte molekulare Wechselwirkungen zu erforschen, ist es darüber hinaus erforderlich,

neben dem Druck auch noch die Temperatur sowie die Konzentration der beteiligten Liganden zu variieren. Die Dissoziation kann aber auch von einer Aggregation oder Präzipitation der Dissoziate begleitet sein (Balny C., 2004).

Die Untereinheitenstruktur oligomerer Proteinkomplexe wird durch Protein-Protein-Wechselwirkungen, die zwischen den Aminosäuren bestimmter Domänen der Proteinuntereinheiten bestehen, stabilisiert. Sie ermöglichen die Strukturbildung, Funktion, Kommunikation und Regulation sowie das Wachstum und die Entwicklung lebender Systeme. Für die Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen stehen eine Reihe biochemischer und biophysikalischer Methoden zur Verfügung. Diese umfassen Mutationsstudien und chromatographische Methoden, eine Reihe von optischen (OD, Fluoreszenz, Lichtstreuung) und abbildenden Techniken (AFM, optische Mikroskopie) sowie analytische Ultrazentrifugation, isotherme Titrationskalorimetrie als auch Techniken in Kombination mit hohem hydrostatischem Druck. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Erforschung oligomerer Proteinkomplexe die statische und dynamische Lichtstreuung und die Rasterkraftmikroskopie in Kombination mit Hochdrucktechnologie eingesetzt. Die Methoden werden detailliert im Kapitel 3 vorgestellt.

Die Vorteile des Aufbaus oligomerer Proteinkomplexe sind vielfältig. Makromolekulare Transportproteine und Multienzymkomplexe können, da sie aus mehreren mit einer oder mehreren Substrat- bzw. Ligandenbindungsplätzen besetzten Proteinuntereinheiten bestehen, kooperativ und allosterisch reguliert werden. Kooperativ Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten erleichtern die Substrat- bzw. Ligandenbindung, indem sie in das Gleichgewicht der Konformationen eingreifen. Sind bereits Bindungsplätze einiger Untereinheiten besetzt, vollziehen die anderen Untereinheiten einen Konformationswechsel, der die weitere Substrat- und Ligandenbindung erleichtert. Greifen kleine organische oder anorganische Moleküle (allosterische Effektoren) zusätzlich in das Konformationsgleichgewicht ein, so spricht man von allosterischer Regulation. Infolgedessen vollzieht der Proteinkomplex einen allosterischen Übergang (Monod J. et al., 1963). Da kooperativ und allosterische Wechselwirkungen durch Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt werden, kann auch das allosterische Gleichgewicht durch hydrostatischen Druck beeinflusst und zu Gunsten einer Konformation verschoben werden. Das Dissoziationsgleichgewicht eines allosterisch und kooperativ arbeitenden Proteinkomplexes wurde unter Hochdruck z.B. von Catherine

Royer und Gregorio Weber (1986) anhand des tetrameren Lactose Repressor Tetramers untersucht. Dieses Oligomer kontrolliert die Expression metabolischer Enzyme durch spezifische Interaktion mit der Operator-Bindungsstelle im Genom. Die kooperative Bindung allosterischer Effektoren führt zu Konformationsänderungen und damit zur Modulation der Affinität zur DNA-Bindungsstelle.

Neben der kooperativen und allosterischen Regulation liegt ein weiterer Vorteil der Oligomerisierung von Untereinheiten darin, dass Strukturen ausgebildet werden können, deren Längen im Bereich der Dimension eukaryotischer Zellen ( $\mu\text{m}$ -Bereich) liegen (z.B. Aktinfilamente und Mikrotubuli). Erst durch diese Größenausdehnung können diese Proteine wichtige zellbiologische Funktionen wie Formhaltung, Zellteilung oder Zellpolarität steuern und beeinflussen. Dabei befinden sich, z.B. im Fall von F-Aktin, Oligomere und Untereinheiten in einem dynamischen Gleichgewicht. Durch Schwächung oder Verstärkung der Protein-Protein-Kontakte kann der Oligomerisierungsgrad gemäß den Ansprüchen in der Zelle reguliert werden. Der depolymerisierende Effekt hydrostatischen Drucks auf F-Aktin wurde von Ikai T. und Ooi T. (1966) unter dem Einfluss von verschiedenen Effektoren und Substraten gezeigt. Im Fall einiger Viren konnte nachgewiesen werden, dass nach einer reversiblen Druckdissoziation von diesen Viren keine Infektionsgefahr mehr ausgeht (Silva J. L., et.al, 1992).

Weiterhin werden durch Protein-Protein-Wechselwirkungen, die zwischen Domänen verschiedener Proteine stattfinden, komplexe Prozesse sowohl innerhalb der Zelle als auch zwischen Zellverbänden, Geweben und Organen vermittelt. Die als heterolog bezeichneten Proteinkontakte finden als Reaktion auf chemische oder physikalische Reize u.a. bei Prozessen regulativer Natur wie z.B. bei der Signaltransduktion, dem Membrantransport und der Genexpression, bzw. kommunikativer Natur wie der Immunantwort und der Reizleitung statt.

Nicht zuletzt durch das Auftreten einer Reihe neurodegenerativer Krankheiten wie BSE, Alzheimer- und Creutzfeld-Jacob-Krankheit stehen Aggregationsphänomene, die auf unerwünschten Protein-Protein-Wechselwirkungen beruhen, im Fokus der gegenwärtigen biomedizinischen und biophysikalischen Hochdruckforschung (Silva J. L. et al., 2004, Smeller L. et al., 1999; Gebhardt R., Doster W. et al., 2003).

Im vierten Kapitel werden die Ergebnisse der druckabhängigen Dissoziation von Arthropoden-Hämocyaninen beschrieben und diskutiert. Hämocyanine sind allosterisch und hoch-kooperativ regulierte Sauerstofftransporter in der Hämolymphe.

Die monomeren Untereinheiten stehen mit vier weiteren Untereinheiten in Kontakt und sind in hexameren Einheiten organisiert. Die Quartärstruktur der Hämocyanine wird durch Vielfache dieser hexameren Einheiten aufgebaut. Eine genauere Einführung in die Struktur und Funktion der Hämocyanine erfolgt im Kapitel 4.1.

Um die Wirkung allosterischer und kooperativer Effekte zu verstehen, müssen die Untereinheitenkontakte innerhalb der strukturellen Hierarchien der Hämocyanine untersucht werden. Druckabhängige Dissoziationsstudien bieten ein ideales Werkzeug, um Stabilität und Dissoziationsvolumina der einzelnen Kontakte zu studieren. Zu diesem Zweck werden bestehende Assoziationsmechanismen der Hämocyanine in Bezug auf die Variable Druck thermodynamisch erweitert und getestet. Dabei wird auch der Einfluss von Liganden und Effektoren auf die Stabilität der oligomeren Komplexe untersucht.

Im fünften Kapitel wird die Druckdissoziation von trüben Kaseinlösungen untersucht. Kaseine, die in Mizellen organisiert sind, sind wichtige Bestandteile der Milch und essentiell für den Nährstofftransport. Die Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln ist von volkswirtschaftlichem Interesse, da sie z.B. in Bezug auf die Keimabtötung eine schonende Alternative zur Hochtemperaturbehandlung darstellt (Huppertz T. et al., 2002; Hendrickx M. et al., 1998). Durch *in-situ* Hochdruckuntersuchungen von 3%igen trüben Kasein-Lösungen in Abhängigkeit von Temperatur, pH und Kalziumkonzentration werden die Wechselwirkungen innerhalb der Kasein-Mizelle während der Druckdissoziation identifiziert und thermodynamisch untersucht. Unterstützt durch *ex-situ* rasterkraftmikroskopische Messungen wird die Reversibilität der Druckdissoziation von Kaseinlösungen getestet.

## 2 Zur Druckdissoziation und Thermodynamik von Proteinkomplexen

Eine Vielzahl von Untersuchungen an Proteinkomplexen, angefangen von Proteindimeren, -tetrameren und -oligomeren über höher aggregierte Proteinkomplexe wie Tubulin und F-Aktin bis hin zu Ribosomen und Viren, haben gezeigt, dass die durch die Quartärstruktur festgelegte Untereinheitenstruktur, abgesehen von einigen Ausnahmen, unter Anwendung von hydrostatischem Druck dissoziiert werden kann (Silva J., Weber G., 1993; Shao-Min Tian et al., 2000).

Die Quartärstruktur wird, wie die Tertiärstruktur eines Proteins, hauptsächlich durch nichtkovalente Bindungskräfte stabilisiert. Dazu zählen Ionenbindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen sowie hydrophoben Wechselwirkungen. Kovalente Bindungskräfte, welche die Primärstruktur stabilisieren, können in einzelnen Fällen auch am Aufbau der Quartärstruktur in Form von Disulfid-Brückenbindungen beteiligt sein.

Im Folgenden wird der Einfluss vom hydrostatischen Druck auf die einzelnen Wechselwirkungen diskutiert.

**Kovalente Bindungen** sind bis ca. 1 GPa nahezu inkompressibel, wie Stabilitätsuntersuchungen an der Primärstruktur von Hühnereiweiß zeigen konnten (Gross M., Jaenicke R., 1994).

Entgegengesetzt geladenen Ionenpaare, wie negativ und positiv geladene Aminosäure-Seitenketten, ziehen sich aufgrund der **elektrostatischen Wechselwirkung** an. Während im Proteininneren ( $\epsilon_r = 4$ ) die elektrostatische Anziehung groß ist, erfährt sie in wässriger Umgebung, aufgrund der hohen Dielektrizitätszahl von Wasser ( $\epsilon_r = 78$ ), eine starke Abschwächung.

Die Dissoziation eines Ionenpaares in wässriger Lösung führt zur Ausrichtung der benachbarten Wasserdipole durch das Coulombsche Feld der Ladungen. Dieser als Elektrostriktion bekannte Effekt bewirkt ein Zusammenziehen des Lösungsmittels Wasser und damit eine Volumenreduktion. Das molare Volumen von Wasser beträgt 18 ml/mol. Bei einfach geladenen Ionen liegt die Volumenreduktion in der

## 2. Druckdissoziation von Proteinkomplexen

---

Größenordnung von  $-10 \text{ ml/mol}$  (Mozhaev V. et al, 1996). Die Dissoziation eines Ionenpaars hat entsprechend eine Volumenreduktion um das Doppelte zur Folge. Aufgrund der Abnahme des Volumens wird der elektrostriktive Effekt durch Druck befördert. Die druckinduzierte reversible Dissoziation einer Salzbrücke in der Proflavin-Bindungstasche von Chymotrypsin geht mit einer Volumenänderung von  $\Delta V = -30 \text{ ml/mol}$  einher und inaktiviert das Enzym (Heremans K, 1980; Heremans K, 1989). Viele Puffersubstanzen wie z.B. Phosphatpuffer dissoziieren aufgrund elektrostriktiver Effekte unter Druck (Neuman R. C. et al., 1973). Dies führt sowohl zur Abnahme des Volumens als auch zu pH-Verschiebungen. Ein nahezu druckunempfindlicher Puffer ist Tris-HCl.

Aufgrund der Fluktuation der Elektronendichte kommt es im Bereich atomarer Abstände zu schwachen Anziehungen zwischen Atomen und Molekülen, den **van-der-Waals-Wechselwirkungen**. Das momentane Dipolmoment eines Moleküls induziert dabei eine Verschiebung der Elektronendichte im Nachbarmolekül und damit ein weiteres Dipolmoment. Beide Dipolmomente ziehen sich einander an, wobei die Stärke der Wechselwirkung von den Polarisierbarkeiten der Atome und von der sechsten Potenz des Abstandes abhängt. Je näher die Atome zusammenrücken, umso stärker wird die van-der-Waals-Anziehung. Die Wechselwirkungsenergie kann durch ein Lennard-Jones-Potential angenähert werden. Erst bei sehr kleinen Abständen, wenn sich die Elektronenwolken der wechselwirkenden Atome überlappen, kommt es zur Abstoßung. Van-der-Waals-Wechselwirkungen verbessern die Packungsdichte des hydrophoben Inneren eines Proteins und reduzieren damit das Volumen, weshalb sie unter Druck stabilisiert werden sollten (Boonyaratanakornit B. et al, 2002). Andererseits können van-der-Waals-Wechselwirkungen unter Druck auch destabilisiert werden, da Protein-Protein-Kontakte im Zuge der Druckbehandlung hydratisiert werden.

**Wasserstoffbrückenbindungen**, bei denen sich zwei ungeladene oder geladene benachbarte Moleküle ein Proton teilen, werden durch hydrostatischen Druck stabilisiert. Dabei kommt es mit zunehmendem Druck zu einer Verkürzung der Bindungslänge, wie durch NMR-Untersuchungen am flüssigen Wasser (Linowski J. et al., 1976) und am Pankreas Trypsin Inhibitor (Li H. et al., 1998) nachgewiesen werden konnte.

## 2. Druckdissoziation von Proteinkomplexen

---

Unpolare Moleküle, wie z.B. unpolare Aminosäuren, tendieren dazu, sich in wässriger Umgebung zusammenzulagern. Dieses Phänomen wird als **hydrophober Effekt** bezeichnet. Er basiert auf der Zunahme der Entropie. Da sich um ein unpolares Molekül ein geordneter Wasserkäfig bildet, der zu einer Entropieerniedrigung beiträgt, ist es für ein zweites unpolares Molekül energetisch günstiger, sich mit dem ersten zusammenzulagern, anstatt einen weiteren Wasserkäfig aufzubauen. Die Ausbildung hydrophober Kontakte geht mit einer Volumenvergrößerung einher, weshalb hydrophobe Wechselwirkungen unter Druck destabilisiert werden sollten (Mozhaev V.V. et al., 1996).

Dem Dissoziationsprozess eines Proteinoligomers liegt ein chemisches Gleichgewicht zwischen einem assoziierten und einem dissoziierten Zustand zugrunde (Wyman J., Gill S. J., 1990). Für den Fall eines Oligomers, welches aus  $n$  Untereinheiten besteht, lässt sich das chemische Gleichgewicht über folgende Reaktionsgleichung formulieren.



Dabei bestimmt die Gleichgewichtskonstante  $K$  das Stoffmengenverhältnis von dissoziierter und assoziierter Phase im chemischen Gleichgewicht:

$$K = \frac{[M]^n}{[M_n]} \quad (2.2)$$

Das chemische Gleichgewicht kann durch die Änderung des Drucks  $p$ , der Temperatur  $T$  bzw. der Konzentration  $c_i$  der Reaktanden zu Gunsten einer der beiden Phasen verschoben werden. Der Antrieb für den notwendigen Stoffstrom ist die Differenz des chemischen Potentials zwischen beiden Phasen  $\Delta\mu$  (Doster W., Friedrich J., 2005). Das chemische Potential  $\mu$  einer Phase ist für eine ideale Lösung definiert über

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln(c_i) \quad (2.3)$$

## 2. Druckdissoziation von Proteinkomplexen

---

Das chemische Potential  $\mu_i$  erhöht sich logarithmisch mit zunehmender Konzentration  $c_i$ . Dabei bezeichnet  $\mu_i^0$  das chemische Standardpotential,  $R$  die molare Gaskonstante und  $T$  die Temperatur.

Verhält sich das Volumen  $V$  der Phase  $i$  druckunabhängig, so steigt bei der Referenztemperatur  $T_0$  dessen chemisches Potential linear mit zunehmendem hydrostatischen Druck an.

$$\mu_i(T_0, p) = \mu_i^0(T_0, p_0) + V_i(p - p_0) \quad (2.4)$$

Die Temperaturabhängigkeit des chemischen Potentials ist am Referenzdruck  $p_0$  gegeben über

$$\mu_i(T, p_0) = \mu_i^0(T_0, p_0) - S_i(T - T_0) \quad (2.5)$$

Da die Entropie  $S$  grundsätzlich positiv ist, sinkt das chemische Potential mit zunehmender Temperatur.

Für die temperatur- und druckabhängige Differenz des chemischen Potentials der Phasen  $i$  und  $j$ ,  $\Delta\mu_{i,j}$ , ergibt sich unter Berücksichtigung der Formeln (2.3) – (2.5) schließlich:

$$\begin{aligned} \Delta\mu_{i,j}(T, p) = & \Delta\mu_{i,j}^0(T_0, p_0) - \Delta S_{i,j}(T - T_0) - \Delta C_{i,j} \ln\left(\frac{T}{T_0}\right)(T - T_0) + \Delta V_{i,j}(p - p_0) + \\ & \frac{\Delta\beta_{i,j}}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\alpha_{i,j}(T - T_0)(p - p_0) \end{aligned} \quad (2.6)$$

Formel (2.6) berücksichtigt auch die unterschiedliche Druck- und Temperaturabhängigkeit der Volumina und Entropien beider Phasen. Dabei steht  $\Delta C$  für die Differenz der isobaren Wärmekapazitäten,  $\Delta\beta$  für die Differenz der Kompressibilitätsfaktoren und  $\Delta\alpha$  für die Differenz der isobaren thermischen Ausdehnungskoeffizienten beider Phasen. Im chemischen Gleichgewicht gilt  $\Delta\mu_{i,j}(T, p) = 0$ , da in diesem Fall beide Phasen ein gleiches chemisches Potential haben.

## 2. Druckdissoziation von Proteinkomplexen

---

In diesem Fall gilt:

$$\Delta\mu_{i,j}^0 = -RT \ln(K_{i,j}) \quad (2.7)$$

Mit Formel (2.7) ist eine Verbindung zwischen der Differenz des chemischen Potentials und der in Formel (2.2) definierten Gleichgewichtskonstante  $K_{i,j}$  hergestellt. Dabei bezeichnet  $i$  z.B. die dissoziierte und  $j$  die assoziierte Phase.

Der Druckeffekt auf das chemische Gleichgewicht zwischen den Proteinaggregaten und den Untereinheiten unterliegt dem Prinzip von *Le Chatelier*. Dabei versucht ein System, welches sich im chemischen Gleichgewicht befindet, auf eine Störung zu reagieren, indem die Wirkung der Störung möglichst gering wird. Eine Erhöhung des Drucks wird deshalb das chemische Gleichgewicht auf die Seite der Reaktionspartner verschieben, die das geringere Volumen einnehmen. Andererseits ändert sich das chemische Gleichgewicht unter Druck nicht, wenn beide Reaktionspartner gleiche Volumina haben.

Die druckabhängige Gleichgewichtskonstante  $K$  ist abhängig von der Volumendifferenz zwischen dem molaren Volumen der Proteinuntereinheiten  $V_{UE}$  und dem molaren Volumen des Proteinoligomers  $V_A$ . Die molare Volumendifferenz  $\Delta V_p$  ist gegeben über

$$\Delta V_p = V_{UE} - V_A = \left(\frac{\partial \Delta\mu_{UE,A}}{\partial p}\right)_T = -RT \left(\frac{\partial \ln K_{UE,A}}{\partial p}\right)_T \quad (2.8)$$

In Abb. 2.1 sind die Verhältnisse während der Druckdissoziation graphisch zusammengefasst. Unter Vernachlässigung von Kompressibilitätsunterschieden vergrößert sich das chemische Potential der assoziierten und der dissoziierten Phase bei einer bestimmten Referenztemperatur  $T_0$  mit zunehmendem Druck linear. Der Anstieg des chemischen Potentials mit dem Druck bestimmt das Volumen der Phase. Wie aus Abb. 2.1 hervorgeht, ist das Volumen der Proteinoligomere größer als die Summe der Volumina der dissoziierten Untereinheiten. Im Niederdruckbereich, welcher den Normaldruck  $p_0$  mit einschließt, ist das chemische Potential des Assoziates kleiner als das der dissoziierten Untereinheiten. Im Niederdruckbereich, welcher den Normaldruck  $p_0$  mit einschließt, ist das chemische Potential des Assoziates kleiner als das der dissoziierten Untereinheiten.

## 2. Druckdissoziation von Proteinkomplexen

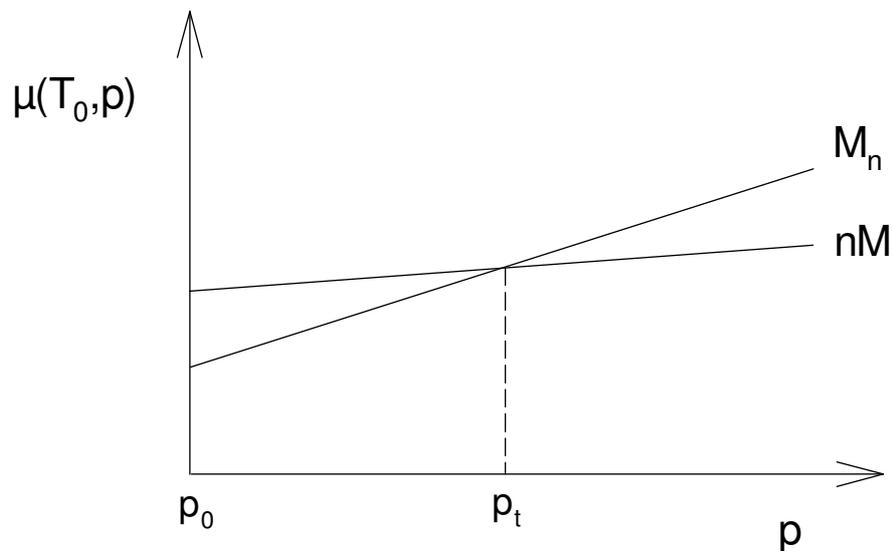


Abb. 2.1: Druckabhängigkeit des chemischen Potentials der assoziierten und dissoziierten Phase. Der Druck  $p_t$  markiert den Phasenübergang, an dem sich die chemischen Potentiale entsprechen.

Bis zum Übergangsdruck  $p_t$ , an welchem beide Phasen das gleiche chemische Potential haben, sind die Proteinoligomere die dominierende Fraktion im Dissoziationsgleichgewicht. Oberhalb des Druckübergangs dominiert die dissoziierte Phase aufgrund ihres kleineren chemischen Potentials.

Anhand des Dissoziationsgrades  $\alpha_p$  kann der Verlauf der Dissoziation während des Druckaufbaus bzw. Druckabbaus verfolgt werden. Für die Dissoziation eines  $n$ -meren Oligomers ist  $\alpha_p$  über

$$\ln(\alpha_p^n / (1 - \alpha_p)) = p(\Delta V_p / RT) + \ln(K_0 / n^n C^{n-1}) \quad (2.9)$$

definiert (Silva J, Weber G., 1993). Dabei ist  $K_0$  die Dissoziationskonstante bei Normaldruck,  $C$  die Konzentration an eingesetztem Oligomer und  $\Delta V_p$  die anhand des Druckexperiments bestimmte Volumendifferenz. Das molare Dissoziationsvolumen  $\Delta V_p$  und die Dissoziationskonstante unter Normalbedingungen  $K_0$  lassen sich graphisch nach Umstellung von Formel (2.9) ermitteln (Abb. 2.2).

Das Dissoziationsvolumen entspricht dem Anstieg der Kurve, die Dissoziationskonstante unter Normalbedingungen wird aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse ermittelt.

## 2. Druckdissoziation von Proteinkomplexen

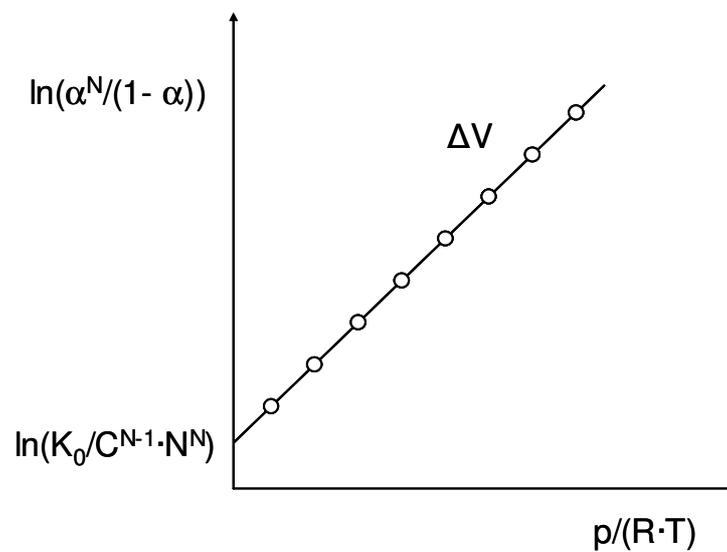


Abb. 2.2: Plot zur graphischen Bestimmung des Dissoziationsvolumens  $\Delta V$  (Anstieg) und der Gleichgewichtskonstante der Dissoziation unter Normalbedingungen  $K_0$  (Schnittpunkt mit der y-Achse).

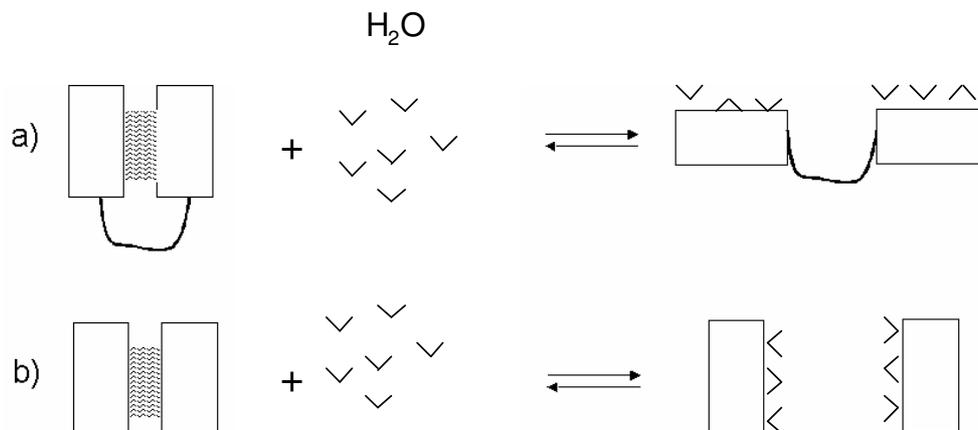


Abb. 2.3: Druckeffekt bei der Proteindenaturierung und -dissoziation. a) Bei der Proteindenaturierung kommt es zur Separierung zusammenhängender intramolekularer Segmente. b) Bei der Dissoziation eines dimeren Proteins entstehen zwei separierte Untereinheiten (nach Silva J. L., Foguel D., Royer C.A., 1993).

In Abb. 2.3 sind die Verhältnisse für die Proteindenaturierung ( $n = 1$ ) und für die Dissoziation ( $n = 2$ ) schematisch gezeigt. Bei der Denaturierung/ Dissoziation von Proteinen werden die Protein-Protein-Bindungen, die zwischen den Untereinheiten

## 2. Druckdissoziation von Proteinkomplexen

---

bestehen, durch Protein-Wasser-Bindungen ersetzt. Für die druckinduzierte Dissoziation von Protein-Dimeren (Silva J, 1986; Silva J, 1992) konnte eine Konzentrationsabhängigkeit nach Formel (2.9) bestätigt werden. Dagegen wird im Allgemeinen für Oligomere, die aus mehr als 2 Untereinheiten bestehen, keine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet (Garcia C. R. et. al, 1992; Silva J. L. et al., 1989). Dieser experimentelle Befund kann durch eine heterogene Population von Proteinoligomeren mit unterschiedlichen Druckstabilitäten erklärt werden (Erijman L., Weber G., 1991).

### 3 Experimentelle Methoden

#### 3.1 Statische und dynamische Lichtstreuung

Informationen zu diesem Kapitel wurden folgenden Quellen entnommen (Johnson C.S., Gabriel D.A., 1995; Dörfler H., 2002; Winter R., Noll F., 1998).

Abhängig von der Größe der streuenden Teilchen unterscheidet man in der statischen Lichtstreuung verschiedene Streubereiche. Wenn die streuenden Teilchen viel kleiner sind als die Wellenlänge des anregenden Lichts ( $d \ll \lambda$ ), spricht man von Rayleighstreuung. Die Teilchen können als Punktstreuer behandelt und die Streuintensitäten addiert werden. Bei Teilchen mit Dimensionen im Bereich der Lichtwellenlänge  $\lambda$  muss aufgrund von Interferenzeffekten zusätzlich noch die Teilchenform berücksichtigt werden. Anstelle von Intensitäten werden die Amplituden der Streuwellen addiert. Entsprechend der unterschiedlichen theoretischen Behandlung spricht man vom Rayleigh-Gans-Debye-Bereich.

Mit Hilfe der Methode der dynamischen Lichtstreuung werden Schwankungen in der Lichtstreuintensität gemessen. Die Auswertung erfolgt über die Analyse der gemessenen zeitlichen Intensitätskorrelationsfunktion. Als Ergebnis lassen sich Diffusionskoeffizienten sowie Radien und Radienverteilungen der streuenden Probe ermitteln.

##### 3.1.1 Lichtstreuung an isolierten Dipolen (Gas)

Eine ebene, in z - Richtung polarisierte Lichtwelle, die sich in x - Richtung mit dem Wellenvektors  $k_{0x}$  ausbreitet, lässt sich schreiben als

$$E_z = E_{0z} \cdot \cos(\omega_0 \cdot t - k_{0x} \cdot x), \quad (3.1)$$

mit E der elektrischen Feldstärke,  $\omega$  der Kreisfrequenz des Lichts und c der Lichtgeschwindigkeit. Der Betrag des Wellenvektors k ist  $2\pi/\lambda$ , wobei  $\lambda$  die Lichtwellenlänge im Vakuum ist.

### 3. Experimentelle Methoden

---

Die Lichtwelle regt die Elektronenwolke der Probe zu erzwungenen Schwingungen an. Dadurch wird im Probeteilchen ein elektrisches Dipolmoment  $\mu_z$  induziert, welches mit der Kreisfrequenz  $\omega$  des Lichts zu oszillieren beginnt.

$$\mu_z = \alpha \cdot E_z = \alpha \cdot E_{0z} \cdot \cos(\omega_0 \cdot t - k_{0x} \cdot x) \quad (3.2)$$

Das elektrische Dipolmoment ist proportional zum angelegten elektrischen Feld und zur Polarisierbarkeit  $\alpha$ .

Der schwingende Dipol sendet seinerseits eine Streuwelle aus, deren elektrischer Feldstärkevektor  $E_S$  bei großen Entfernungen  $R \gg \lambda$  proportional zur zweiten zeitlichen Ableitung des Dipolmoments  $\mu$  ( $d^2\mu/dt^2 = -\omega_0^2\mu$ ) und invers proportional zur Entfernung des Detektors ist.

$$E_S = \frac{-\omega_0^2 \mu \sin(\varphi_z)}{(4\pi\epsilon_0)c^2 R} \quad (3.3)$$

Dabei bezeichnen  $\epsilon_0$  die elektrische Feldkonstante im Vakuum und  $\varphi_z$  den Winkel zwischen der x, y-Ebene und der z-Achse. Im Fall vertikal polarisierter einfallender Strahlung erhält man für die Intensität des gestreuten Lichts die Rayleigh-Gleichung:

$$\frac{I_S}{I_0} = \frac{\alpha^2 \pi^2 \sin^2(\varphi_z)}{\epsilon_0^2 \lambda_0^4 R^2} \quad (3.4)$$

Diese Gleichung kann in Abhängigkeit der Brechungsindexänderung ( $dn/dc$ ) formuliert werden. Dazu kann im optischen Frequenzbereich zunächst die Polarisierbarkeit mit dem Brechungsindex ( $n$ ) über die Clausius-Mosotti-Gleichung:

$$n_L^2 - n_0^2 = \frac{N\alpha}{\epsilon_0} \quad (3.5)$$

verknüpft werden, wobei  $N$  [ $\text{cm}^{-3}$ ] für die Anzahl der streuenden Teilchen pro Volumenelement,  $n_L$  für den Brechungsindex der Lösung und  $n_0$  für den Brechungsindex des Lösungsmittels steht. Nach Einführung der Massenkonzentration

### 3. Experimentelle Methoden

---

$c$  [ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ] und Ersetzen von  $(n_L - n_0)/c = (dn_L/dc)$  bzw.  $(n_L + n_0) \approx 2n_0$  sowie Auflösung nach  $\alpha$  gelangt man zu

$$\alpha = 2\varepsilon_0 n_0 \left( \frac{dn_L}{dc} \right) \cdot \frac{M}{N_A} \quad (3.6)$$

mit dem Molekulargewicht  $M$  und der Avogadro-Konstante  $N_A$ . Für Gase bei niedrigem Druck ist die Polarisierbarkeit mit der Brechungsindexänderung verknüpft über:  $\alpha = 2\varepsilon_0^* (dn/dc) \cdot c/N$ . Einsetzen dieses Zusammenhangs in Formel (3.4) und Multiplikation mit der Teilchenzahl  $N$  führt zu

$$\frac{I_S}{I_0} = \frac{4\pi^2 c_N \cdot M^2 \sin^2(\varphi_z)}{\lambda_0^4 R^2 N_A} \left( \frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \quad (3.7)$$

Diese Formel beschreibt die Lichtstreuung von Gasteilchen pro Einheitsvolumen, mit  $c_N$ , der Teilchenzahldichte.

#### 3.1.2 Statische Lichtstreuung von Makromolekülen in Lösung

Das gesamte beleuchtete Streuvolumen kann in Volumenelemente unterteilt werden, deren Abmessungen klein im Verhältnis zur Laserlichtwellenlänge  $\lambda$  sind. Die Streuanteile der einzelnen Volumenelemente werden durch destruktive Interferenz nahezu ausgelöscht. Aufgrund der Brownscher Molekularbewegung fluktuiert die Teilchenzahl in den Streuvolumina, was zu kurzzeitigen optischen Inhomogenitäten führt. Bedingt durch diese Inhomogenitäten ist es einem kleinen Streulichtanteil möglich der destruktiven Interferenz zu entgehen. Die Teilchenzahlfuktuationen führen zu einer Fluktuation in der Polarisierbarkeit:

$$\delta\alpha = \alpha - \langle \alpha \rangle \quad (3.8)$$

wobei  $\langle \alpha \rangle$  das Zeitmittel der Polarisierbarkeit ist. Die instantane Polarisierbarkeit  $\alpha$  schwankt als gaussverteilte Zufallsgröße um den Mittelwert. Die mittlere

### 3. Experimentelle Methoden

---

Streuintensität hängt nach Formel (3.4) quadratisch von der Polarisierbarkeit ab. Indem Formel (3.8) nach  $\alpha$  umgestellt, quadriert und über die Zeit gemittelt wird, gelangt man zu

$$\langle \alpha^2 \rangle = \langle \alpha \rangle^2 + \langle 2\alpha \cdot \delta\alpha \rangle + \langle \delta\alpha^2 \rangle. \quad (3.9)$$

Da im Zeitmittel  $\delta\alpha = 0$  ist, fällt der Kreuzterm weg. Damit gilt

$$\langle \alpha^2 \rangle = \langle \alpha \rangle^2 + \langle \delta\alpha^2 \rangle. \quad (3.10)$$

Die mittlere quadratische Fluktuation der Polarisierbarkeit eines Volumenelements ist von der mittleren quadratischen Konzentrationsfluktuation des gelösten Stoffs sowie von Druck-, und Temperaturfluktuationen abhängig.

$$\langle \delta\alpha^2 \rangle = \left( \frac{\partial \alpha}{\partial p} \right)_{T, c_2}^2 \langle \delta p^2 \rangle + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{p, c_2}^2 \langle \delta T^2 \rangle + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial c_2} \right)_{p, T}^2 \langle \delta c_2^2 \rangle. \quad (3.11)$$

Der Index 2 steht für die Konzentration des gelösten Stoffs, während der Index 1 nach Konvention für das Lösungsmittel reserviert ist. Die Beiträge der Druck- und Temperaturfluktuationen sind für gelösten Stoff und Lösungsmittel in etwa gleich und können unberücksichtigt bleiben. Damit gilt

$$\langle \delta\alpha^2 \rangle = \left( \frac{\partial \alpha}{\partial c_2} \right)_{p, T}^2 \langle \delta c_2^2 \rangle. \quad (3.12)$$

Durch Ableitung der Clausius-Mosotti-Gleichung (Formel (3.5)) nach der Konzentration des gelösten Stoffs und unter Benutzung von Formel (3.12) wird ein Zusammenhang zwischen der mittleren quadratischen Konzentrationsfluktuation und der mittleren quadratischen Fluktuation der Polarisierbarkeit erhalten:

$$\langle \delta\alpha^2 \rangle = \left( \frac{2n_0 \epsilon_0}{N} \right)^2 \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \langle \delta c^2 \rangle. \quad (3.13)$$

### 3. Experimentelle Methoden

---

Dieser Zusammenhang kann nun unter Berücksichtigung von Formel (3.10) in Formel (3.4) eingesetzt werden:

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left( \frac{\partial n_L}{\partial c} \right)^2 \langle \delta c^2 \rangle}{N \cdot \lambda^4 R^2} \quad (3.14)$$

Damit ist ein Zusammenhang zwischen der Streuintensität und der mittleren quadratischen Konzentrationsfluktuation hergestellt. Die mittlere quadratische Konzentrationsfluktuation hängt von der zweiten Ableitung der freien Energie nach der Konzentration  $(\partial^2 G / \partial c^2)_{T,P}$  und der ersten Ableitung des chemischen Potentials des Lösungsmittels  $(\partial \mu_1 / \partial c)_{T,P}$  nach der Konzentration ab, gemäß

$$\langle \delta c^2 \rangle = \frac{k_B T}{\left( \frac{\partial^2 G}{\partial c^2} \right)_{T,P}} \quad \text{mit} \quad \left( \frac{\partial^2 G}{\partial c^2} \right)_{T,P} = - \frac{\delta V}{V_1 \cdot c} \left( \frac{\partial \mu_1}{\partial c} \right)_{T,P} \quad (3.15)$$

( $\delta V$  ist das Volumen eines Volumenelements,  $V_1$  das partielle molare Volumen des Lösungsmittels).

Die lokale konzentrationsabhängige Fluktuation des chemischen Potentials  $\delta \mu_1 / \delta c$  kann der Fluktuation des osmotischen Drucks  $\delta \pi / \delta c$  gleich gesetzt und dieser in einer Virialentwicklung dargestellt werden.

$$\frac{I_\Theta}{I_0} \sim c \cdot \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \cdot (M^{-1} + 2A_2 \cdot c + \dots)^{-1} \quad (3.16)$$

Der Parameter  $A_2$  quantifiziert die Wechselwirkung zwischen den streuenden Teilchen. Unter Einführung der Konstante  $K$

$$K = 4\pi^2 n_0^2 \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 / (N_A \cdot \lambda_0^4), \quad (3.17)$$

die alle optischen Konstanten zusammenfasst und dem Rayleigh-Verhältnis  $R_\Theta$ ,

$$R_{\Theta} = \frac{I_s}{I_0} R^2 \quad (3.18)$$

welches alle Messparameter einschließt, erhält man den allgemein üblichen Ausdruck für Formel (3.14):

$$\frac{K \cdot c}{R_{\Theta}} = \frac{1}{M} + 2A_2 \cdot c + 3A_3 c + \dots \quad (3.19)$$

Formel (3.19) stellt einen Zusammenhang zwischen der Lichtstreuintensität und dem Molekulargewicht der streuenden Probenteilchen her. Im Falle einer polydispersen Probe ist die gestreute Lichtintensität unter Vernachlässigung der intermolekularen Wechselwirkungen proportional zum gewichtsgemittelten Molekulargewicht, gemäß

$$\frac{R_{\Theta}}{K \cdot c} = \frac{\sum_i p_i M_i}{\sum_i p_i} = \overline{M_w} \quad \text{mit } p_i = N_i M_i \quad (3.20)$$

Das statistische Gewicht  $p_i$  ist sowohl vom Molekulargewicht  $M$  als auch von der Anzahl der Moleküle  $N$  abhängig.

Wird die Größe der Teilchen vergleichbar mit der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts, kommt es auch innerhalb des streuenden Teilchens zur Anregung einzelner Streuzentren. Die Streuzentren werden phasenverschoben angeregt und strahlen das Streulicht entsprechend phasenverschoben wieder ab. Phasenverschiebungen führen allgemein zu verstärkenden und schwächenden Interferenzen, die durch den statischen Strukturfaktor  $S(q)$  beschrieben werden:

$$S(q) = \sum_i^n \sum_j^n \langle \exp(iqr_{ij}) \rangle \quad (3.21)$$

Dabei steht  $n$  für die Anzahl der Punktstreuer im Streuvolumen und  $r_{ij}$  bezeichnet die Distanz zwischen den Streuzentren  $i$  und  $j$ . Die oben erwähnte intramolekulare Interferenz lässt sich bei verdünnten Proben durch den Formfaktor  $P(q)$  nach

$$P(q) = \frac{S(q)}{S(0)} = \frac{1}{N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle \exp(iqr_{ij}) \rangle \quad (3.22)$$

beschreiben, wobei N die Zahl der Streuelemente pro Molekül ist. Damit lässt sich für polydisperse Systeme Formel (3.19) erweitern zu

$$\frac{K \cdot c}{R_\theta} = \frac{1}{M \cdot P_z(q)} + 2A_2 \cdot c + 3A_3 c^2 + \dots \quad (3.23)$$

mit

$$P_z(q) = \frac{\sum m_i M_i P_i(q)}{\sum m_i M_i} \quad (3.24)$$

dem sogenannten z-Mittel von P(q).

#### 3.1.3 Dynamische Lichtstreuung

Unter Verwendung eines Korrelators werden bei der dynamischen Lichtstreuung die Intensitätsfluktuationen des Streulichts gemessen und analysiert.

Die streuenden Teilchen sind in sinusförmigen Zonen wechselnder Dichte angeordnet. Im Lichtstreuexperiment wird durch die Einstellung des Streuwinkels eine Konzentrationswelle c

$$c = A(q) \cdot \sin(q \cdot x) \quad (3.25)$$

mit der Wellenlänge d

$$d = \frac{2\pi}{q} \quad (3.26)$$

### 3. Experimentelle Methoden

---

selektiert. Dabei bezeichnet  $q$  den Wellenvektor, der in die Ausbreitungsrichtung der Konzentrationswelle zeigt. Unter einem bestimmten Winkel  $\theta_s$  tragen nur Konzentrationswellen mit der Wellenlänge  $2\pi/q$  bei, sodass die Bragg-Bedingung

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin(\theta_s / 2) \quad (3.27)$$

für  $n=1$  erfüllt ist. Für den Betrag des Wellenvektors folgt damit

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \cdot \sin(\theta_s / 2) . \quad (3.28)$$

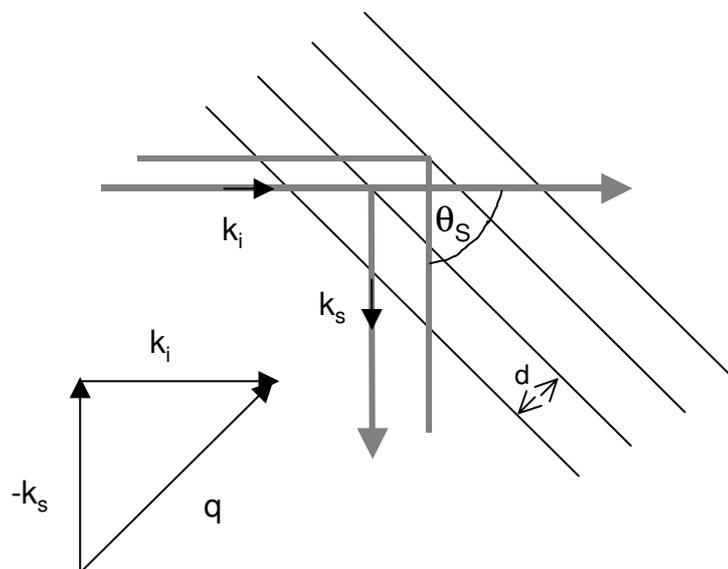


Abb. 3.1: Streuung an einer Konzentrationswelle, deren Maxima den Abstand  $d=2\pi/q$  haben,  $q$  zeigt in die Ausbreitungsrichtung der Konzentrationswelle und hat den Betrag  $q=4\pi n \cdot \sin(\theta_s/2)/\lambda$ .

Die Konzentrationsfluktuationen gemäß Formel (3.12) führen zu statistischen Schwankungen der Konzentrationswellen. Mit Hilfe des zweiten Fickschen Gesetzes kann der Zerfall der Konzentrationswelle ermittelt werden. Die Ficksche Differentialgleichung lautet:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} , \quad (3.29)$$

### 3. Experimentelle Methoden

---

wobei  $D$  die Diffusionskonstante bezeichnet. Die Lösung für die Konzentrationsfluktuation lautet:

$$\delta c(x,t) = \sum_q A(q) \cdot \cos(q \cdot x) \cdot e^{-Dq^2 t} \quad (3.30)$$

Die räumliche Konzentrationsfluktuation  $\delta c(x,t)$  kann in einzelne Elementarmoden zerlegt werden, die mit der Rate  $\tau_r^{-1} = D \cdot q^2$  zerfallen. Die Autokorrelationsfunktion der Intensität des Streulichts kann durch direkte Messung bestimmt werden. Sie ist definiert als

$$\langle I(0)I(\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t+\tau) dt, \quad (3.31)$$

wo  $\tau$  die Korrelationszeit des Korrelators ist, die der Zeit entspricht, in der Intensitätssignale vom Korrelator verarbeitet werden. Dabei ergeben sich zwei Grenzfälle. Erstens gilt für

$$\tau = 0: \quad \langle I(0)I(\tau) \rangle = \langle I(0)^2 \rangle = \langle I^2 \rangle,$$

d.h. die Intensitäten zweier Messwerte sind bei kleinem zeitlichen Abstand ( $\tau$ ) noch stark korreliert. Zweitens zerfällt die Korrelation für sehr große  $\tau$  gemäß:

$$\tau \rightarrow \infty: \quad \lim_{\tau \rightarrow \infty} \langle I(0)I(\tau) \rangle = \langle I \rangle^2.$$

Im Falle eines exponentiellen Abfalls erhält man:

$$\langle I(0)I(\tau) \rangle = \langle I \rangle^2 + \left\{ \langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2 \right\} \exp(-\tau / \tau_r), \quad (3.32)$$

wobei  $\tau_r$  die Relaxationskonstante ist.

### 3. Experimentelle Methoden

---

Die zeitliche Korrelationsfunktion steht mit dem Realteil der spektralen Dichte über eine Kosinus-Fourier-Transformation in Beziehung:

$$A_I(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \langle I(0)I(t) \rangle \cdot \cos(\omega t) dt \quad (3.33)$$

Die Zeitkorrelationsfunktion  $\langle I(0)I(t) \rangle$  ergibt sich aus dem optischen Doppler-Shift-Spektrum  $A(\omega)$  durch Rücktransformation

$$\langle I(0)I(t) \rangle = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} A_I(\omega) \cdot \cos(\omega t) d\omega \quad (3.34)$$

Zur Auswertung und physikalischen Interpretation betrachtet man die Feldkorrelationsfunktion  $g_1(t)$ . Sie kann, wenn die Polarisierbarkeit Gauss-artig um ihren Mittelwert fluktuiert (viele Streuzentren), aus der Intensitätskorrelationsfunktion gewonnen werden. Dann gilt die Siegert-Relation:

$$g_1(t) = \sqrt{g_2(t) - 1} \quad (3.35)$$

Für im Verhältnis zur eingesetzten Lichtwellenlänge kleine, monodisperse Streuer ist  $g_1(t)$  eine einfache exponentiell abfallende Funktion.

$$g_1(t) = \exp(-\Gamma t) \quad (3.36)$$

Die Relaxationsrate  $\Gamma$  der einfachen Translationsdiffusion ist mit dem Diffusionskoeffizienten  $D_m$  über

$$\Gamma = \tau_r^{-1} = q^2 D_m \quad (3.37)$$

verknüpft.

### 3. Experimentelle Methoden

---

Es stehen mehrere Methoden zur Verfügung, um die Feldkorrelationsfunktion zu analysieren. Durch einen nichtlinearen Fit kann ein Modell (z.B. eine Exponentialfunktion) direkt angepasst und deren Zerfallsrate bestimmt werden.

Bei der Kummulanten-Methode wird die Funktion  $\ln[g_1(t)]$  typischerweise durch ein Polynom dritten Grades approximiert:

$$\ln[g_1(t)] = \ln(A) - \mu_1 t + \frac{\mu_2}{2} t^2 + \frac{\mu_3}{6} t^3 \dots \quad (3.38)$$

Dabei definiert A die Amplitude und  $\mu_1$ ,  $\mu_2$  und  $\mu_3$  sind gegeben durch:

$$\begin{aligned} \mu_1 &= \langle \Gamma \rangle \\ \mu_2 &= \langle (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^2 \rangle \\ \mu_3 &= \langle (\Gamma - \langle \Gamma \rangle)^3 \rangle \end{aligned} \quad (3.39)$$

Der erste Kummulant  $\mu_1$  ist die mittlere Relaxationszeit  $\langle \Gamma \rangle$ . Der zweite Kummulant  $\mu_2$  entspricht dem zweiten zentralen Moment der Verteilung, der Varianz. Der erste und zweite Kummulant sind grundsätzlich positiv. Der dritte Kummulant  $\mu_3$  kann entweder positiv oder negativ sein und repräsentiert die Asymmetrie (Schiefe) der Verteilung. Der Polydispersitätsgrad der Probe lässt sich aus dem zweiten Kummulanten nach

$$PD = \frac{\mu_2}{\langle \Gamma \rangle^2} \quad (3.40)$$

ermitteln.

Im Fall von polydispersen Proben ist  $g_1(\tau)$  eine gewichtete Summe von Exponentialfunktionen:

$$g_1(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma \quad (3.41)$$

Durch eine inverse Laplace-Transformation der Feldkorrelationsfunktion  $g_1(t)$  ist es möglich, Verteilungen der Zerfallsraten  $G(\Gamma)$  zu ermitteln. Dafür wurde das Programm Contin (Provencher S.W., 1982) eingesetzt, welches im ALV-Software-Paket verfügbar ist.

Die erhaltenen mittleren Zerfallszeiten (Kummulanten-Methode) bzw. Zerfallszeitenverteilungen (inverse Laplace-Transformation) lassen sich unter Verwendung von Formel (3.37) in mittlere Diffusionskoeffizienten bzw. Verteilungen umrechnen. Der ermittelte apparente Diffusionskoeffizient  $D_{\text{exp}}$  ist abhängig vom Streuwinkel und der Konzentration der streuenden Partikel.  $D_{\text{exp}}$  entspricht dem wahren Diffusionskoeffizienten  $D_0$  im Limit  $q \rightarrow 0$ ,  $c \rightarrow 0$ . Der hydrodynamische Radius  $R_H$  und der Diffusionskoeffizient  $D_0$  sind miteinander über die Stokes-Einstein Gleichung verknüpft:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (3.42)$$

Hier bezeichnet  $k_B$  die Boltzmann-Konstante und  $\eta$  die Viskosität des Lösungsmittels. Wenn eine Radienverteilung  $f_i$  vorliegt, kann sie unter Berücksichtigung des Formfaktors  $P(q, R_i)$  in Bezug auf das Molekulargewicht

$$f_{i,m} = \frac{f_i}{R_i^3 P(q, R_i)} \quad (3.43)$$

oder in Bezug auf die Anzahl  $n$  der streuenden Teilchen

$$f_{i,n} = \frac{f_i}{R_i^6 P(q, R_i)} \quad (3.44)$$

gewichtet werden.

### 3. Experimentelle Methoden

#### 3.1.4 Aufbau des Lichtstreuexperimentes

In Abb. 3.2 ist der optische Aufbau für statische und dynamische Lichtstremessungen gezeigt, die bei Normaldruck winkelabhängig bzw. bei druckabhängigen Messungen unter den Streuwinkeln von  $90^\circ$  und  $177^\circ$  durchgeführt werden können. Als Lichtquellen stehen ein He-Neon-Laser (632 nm, 35 mW) bzw. ein Nd-Yag-Laser (532 nm, 500 mW) zur Verfügung. Der Laserstrahl durchläuft zunächst eine Umlenkspiegeleinheit, die bestehend aus den Justierspiegeln S1 und S2 eine vom Laser unabhängige Korrektur der Strahlage gewährleistet. Danach passiert der Laser eine Laser-Monitordiioden-Abschwächereinheit. Sie bewirkt durch Überlagerung zweier Keile die Abschwächung des Strahls. Um unabhängig von der Abschwächung die Ausgangsintensität und die Strahlage kontrollieren zu können, werden danach ca. 1% der Laserintensität durch einen halbdurchlässigen Spiegel ausgekoppelt und von einer Vier-Quadranten-Diode detektiert.

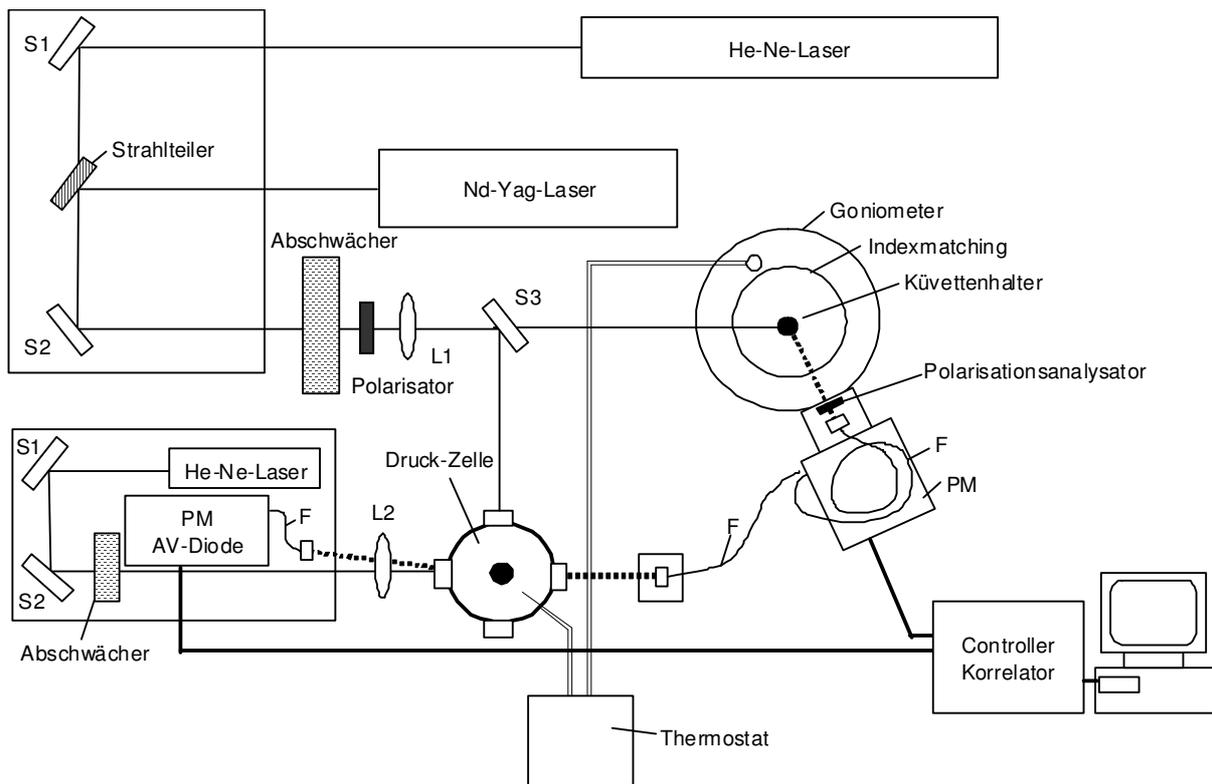


Abb. 3.2: Optischer Aufbau der Lichtstreuanlage (L: Linse, S: Spiegel, F: Monomodfaser, PM: Photomultiplier, AV: Avelange-Diode)

Im weiteren Verlauf bündelt die Focussierlinse L1 den Strahl, um mögliche Reflexe an der Küvettenwand zu minimieren. Nun trifft der Laser zentrisch auf die aus Quarzglas bestehende zylindrische Küvette. Diese steht in einem Indexmatchinggefäß, welches mit Toluol oder Wasser gefüllt ist. Dadurch wird ein Brechungsindexsprung an der Küvettenaußenwand verhindert. Das Indexmatchinggefäß ist wiederum in einem temperierbaren und justierbaren Zellgehäuse des Goniometers integriert. Nach erfolgtem Streuprozess passiert das gestreute Licht einen Polarisationsanalysator. Im Fall der für Diffusionsmessungen wichtigen VV-Konfiguration steht dieser senkrecht auf der Streuebene. Danach gelangt das Streulicht über eine Einkopplungslinse in die Monomodlichtleiterfaser. Von dort wird es zur Analyse über einen Beamsplitter auf zwei Photomultiplier übertragen. Alle drei Komponenten, Polarisationsanalysator, Lichtleiterfaser und Detektoreinheit sind auf dem Goniometerarm befestigt. Dieser kann den gewünschten Streuwinkel mit Hilfe eines Schrittmotors auf ein tausendstel Grad genau anfahren. Für die druckabhängigen Lichtstreuversuche wurde eine optische Druckzelle der Firma SITEC in den Aufbau integriert. Für die Vermessung klarer Proteinlösungen konnte der bereits bestehende optische Aufbau genutzt werden. Um den Laser der Wahl auf die Probe innerhalb der Druckzelle zu richten, wurde der Spiegel S3 in den Strahlengang eingesetzt. Für die im Folgenden nicht beschriebene Vermessung kleiner globulärer Proteine war es weiterhin sinnvoll, den Laser-Strahl zusätzlich über eine dem Spiegel S3 nachgeschalteten Linse zu fokussieren. Das unter einem Beobachtungswinkel von  $90^\circ$  gestreute Licht gelangt nach Einkopplung in die Monomod-Faser zur Detektionseinheit auf dem Goniometerarm.

Für die Lichtstremessungen an konzentrierten, trüben Proteinproben wurde ein ALV-NIBS Rückstredetektor (ALV-Laser GmbH, Langen) eingesetzt. Um störende Effekte bedingt durch Vielfachstreuung zu vermeiden, wird der im Rückstredetektor integrierte He-Ne-Laser auf die Oberfläche der Probe direkt hinter dem Saphirfenster der Druckzelle fokussiert. Das gestreute Licht wird in  $177^\circ$ -Geometrie in eine Monomodlichtleiterfaser eingekoppelt und entweder über einen Photomultiplier oder eine Avelange-Diode detektiert.

Das durch den Photomultiplier bzw. die Avelange-Diode detektierte Lichtstreusignal wird an einen ALV-multiple-Tau-Korrelator weitergegeben, wo es abhängig vom Betriebsmodus in den Zeitbereichen  $0.2 \mu\text{s}$  bzw.  $12.5 \text{ ns}$  bis  $3221 \text{ Sekunden}$  korreliert wird.

Druckabhängige Messungen wurden in einer thermostatisierten, optischen Hochdruckzelle (SITEC-Schweiz) durchgeführt. Der zulässige Druckbereich liegt zwischen 0.1-700 MPa. Der hydrostatische Druck wird durch eine integrierte Hochdruckspindel (SITEC-Schweiz) mechanisch aufgebaut und anhand eines Hochdrucksensors (E. Brosa Messgeräte-Tettang, Germany) gemessen. Der Probenraum wird durch Saphirgläser begrenzt, welche im optischen Bereich durchlässig sind.

#### 3.2 AFM- Atomic-Force-Microscopy

Die Rasterkraftmikroskopie erlaubt es, biologische Proben unter physiologischen Bedingungen molekular aufzulösen und abzubilden. Als Messgröße wird dabei ein Kraftgradient ( $dF/dz$ ) zwischen einer Silizium-Spitze und der Oberfläche der Probe ausgemessen. Das Lennard-Jones-Potential beschreibt in guter Näherung die Interaktionen zwischen den Atomen der Probe und der detektierenden Spitze. Es ist gegeben durch

$$w(d) = \frac{C_1}{d^{12}} - \frac{C_2}{d^6}, \quad (3.45)$$

wobei  $d$  der Abstand zwischen den Atomen ist und  $C_1$  und  $C_2$  zwei Konstanten sind. Der erste Term ist proportional zu  $1/d^{12}$  und beschreibt die kurzreichweitige Abstoßung von Probe und Spitze. Bei größeren Abständen dominiert der zweite anziehende Term der proportional zu  $1/d^6$  ist.

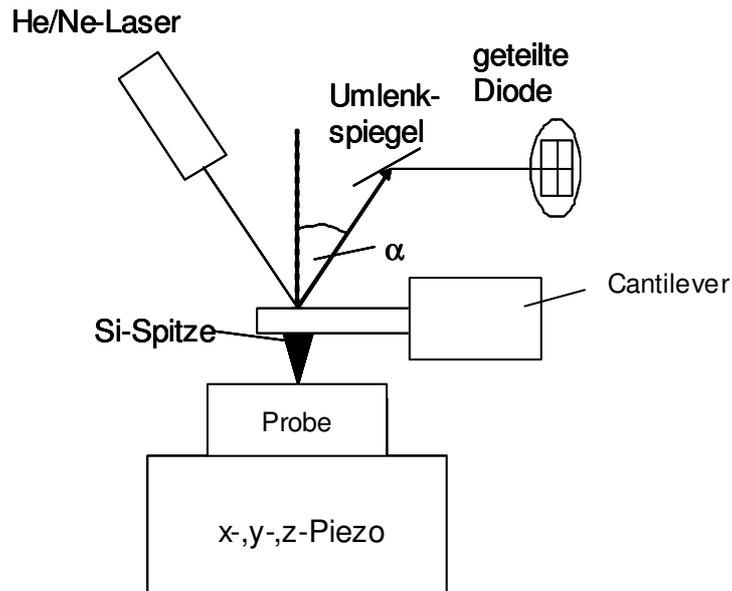


Abb. 3.3: Aufbau eines Rasterkraftmikroskops aus (Winter/Noll)

Abb. 3.3 zeigt den schematischen Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Kasein-Experimente wurde das Modell Contact AFM-3/780 von Digital Instruments verwendet, mit der Software Version (4.42r4). Die Scanfrequenz lag im Bereich 2 – 3 Hz und der Federbalken hatte eine Federkonstante von 0.06 N/m. Die Spitze des Cantilevers folgt während des Abrasterns dem Oberflächenprofil der Probe. Die Schwingungen des Federbalkens werden mit Hilfe eines vom Cantilevers reflektierten Lasers auf einer geteilten Photodiode detektiert. Aufgrund der Bewegung der Spitze während des Abscannvorgangs verändert sich der Reflexionswinkel  $\alpha$  ständig. Die Ablenkung des Lasers wird über eine geteilte Photodiode detektiert. Aus dem Differenzsignal der Photodiodenfelder wird dann die Oberflächentopographie der Probe gewonnen.

## **4 Zur Druckstabilität des 12-meren Hämocyanins aus *Homarus americanus* und des 24-meren Hämocyanins aus *Eurypelma californicum***

Im Folgenden werden Experimente zur Druckstabilität der 12- und 24-meren Arthropoden-Hämocyanine beschrieben. Um Änderungen im Molekulargewicht und in der Partikelgröße entlang des Dissoziationsübergangs zu verfolgen, wurden statische und dynamische Lichtstreuungsmessungen unter Druck durchgeführt. Nach einer kurzen Einleitung über die Struktur und Funktion der Hämocyanine, soll zunächst der Frage nachgegangen werden, ob eine Änderung der Quartärstruktur, die z.B. durch Liganden- bzw. Effektorbindung bewirkt werden kann, Unterschiede in der Druckdissoziation hervorruft. Danach werden die erhaltenen Dissoziationskuren in Bezug auf Zerfallsmodelle getestet, mit Hilfe derer Dissoziationsvolumina und Dissoziationskonstanten bestimmt werden können. Zur Interpretation der Ergebnisse wird auf bestehende Struktur- bzw. Funktionsanalysen zurückgegriffen und auf strukturelle Ähnlichkeiten im hierarchischen Aufbau der Hämocyanine eingegangen.

### **4.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion der Arthropoden-Hämocyanine**

Hämocyanine sind allosterische kooperative Kupfer-Proteine, die in der Hämolymphe von Arthropoden (Gliederfüßlern) als Hexamere oder Oligo-Hexamere respiratorische Funktionen ausüben (Van Holde K.E., Miller K.I., 1995). Ihre komplexe Struktur besteht aus heterogenen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa. Die Untereinheiten sind in drei Domänen gefaltet, wobei die zentrale zweite Domäne hochkonserviert ist und eine binukleare Kupfer-Bindungsstelle (CuA, CuB) für ein Sauerstoffmolekül enthält. Somit bindet ein Hexamer sechs Sauerstoffmoleküle, ein 24-mer vierundzwanzig. Das Sauerstoffbindungsverhalten ist kooperativ und allosterisch reguliert. Es lässt sich gut mit einem eingebetteten MWC-Modell (nested MWC-model: Decker H., Sterner R., 1990) beschreiben, welches die hierarchische Struktur innerhalb des Proteins berücksichtigt. Das Modell sieht für das dodekamere Hämocyanin vier verschiedene Konformationen für das Halbmolekül vor, die mit rR, tR, rT und tT bezeichnet werden

und verschiedene Affinitäten zum Liganden Sauerstoff haben (*t-tense*, bezeichnet den gespannten Zustand; *r-relaxed* den entspannten Zustand). Sie stehen miteinander über die Gleichgewichtskonstanten  $L$ ,  $I_R$  und  $I_T$  im allosterischen Gleichgewicht und können 6 strukturelle Gesamtkombinationen bilden. Eine Liganden- oder Effektorbindung verschiebt im „Nesting-Modell“ nur diese allosterischen Gleichgewichte. Die Bindungskonstanten der Konformationen bleiben dabei unverändert. Generelle Effektoren für Hemocyanine sind Protonen, welche die Sauerstoffaffinität im Allgemeinen verringern. Auf das Krebs-Hämocyanin aus *Homarus americanus* wirken zusätzlich auch L-Laktat und Urat als Effektoren, wobei sie die Sauerstoffaffinität erhöhen. Schließlich kann auch der Hydratisierungsgrad einen Einfluss auf das funktionelle Verhalten eines kooperativen Moleküls ausüben, indem verschiedene Zustände des Oligomers unterschiedlich mit Wasser interagieren.

Aufgrund der Größe der Hämocyanine ist bislang keine Kristall- bzw. NMR-3d-Struktur eines 12- bzw. 24-meren Hämocyanins verfügbar. Es gelang lediglich die Aufklärung der Kristallstruktur der Untereinheit II aus der Strandkrabbe *L. polyphemus* mit einer Auflösung von 0,22 nm (Hazes B., et al., 1993). Aus diesem Grund ist man auf alternative, weniger hoch auflösende Methoden wie X-ray (SAXS), Neutronenkleinwinkel- oder Lichtstreuexperimente angewiesen, mit Hilfe derer Konformationsänderungen von verschiedenen kooperativen und allosterischen Proteinen detektiert werden können.

##### 4.1.1 Struktur des 12-meren Hämocyanins aus *Homarus americanus* und des 24-meren Hämocyanins aus *Eurypelma californicum*

Das Hämocyanin des nordamerikanischen Lobsters *Homarus americanus* besteht aus 12 Hämocyanin-Untereinheiten, die in zwei Basis-Hexameren organisiert sind. Die Untereinheiten werden im Protein-Komplex durch nichtkovalente Wechselwirkungen stabilisiert. Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge (Morimoto K., Kegeles G., 1971) und Lichtstremessungen (Herskovits T.T et al., 1981; Herskovits T.T. et al., 1984) haben gezeigt, dass die Untereinheiten-Dissoziation als sequentieller Prozess angesehen werden kann.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Das Hämocyanin aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum* ( $M_w$  1800 kDa) setzt sich aus insgesamt sieben verschiedenen Untereinheiten zusammen, die von a bis g indiziert im stöchiometrischen Verhältnis 4:2:2:4:4:4:4 vorkommen. Die Untereinheiten unterscheiden sich in ihren immunologischen und physikochemischen Eigenschaften, weisen aber isoliert ein gleiches Sauerstoffbindungsverhalten auf. Die Untereinheiten assoziieren in einem Selbstassemblierungsprozess über vier Hexamere zu zwei Dodekameren, die sich schließlich zum funktionellen 24-mer zusammenlagern.

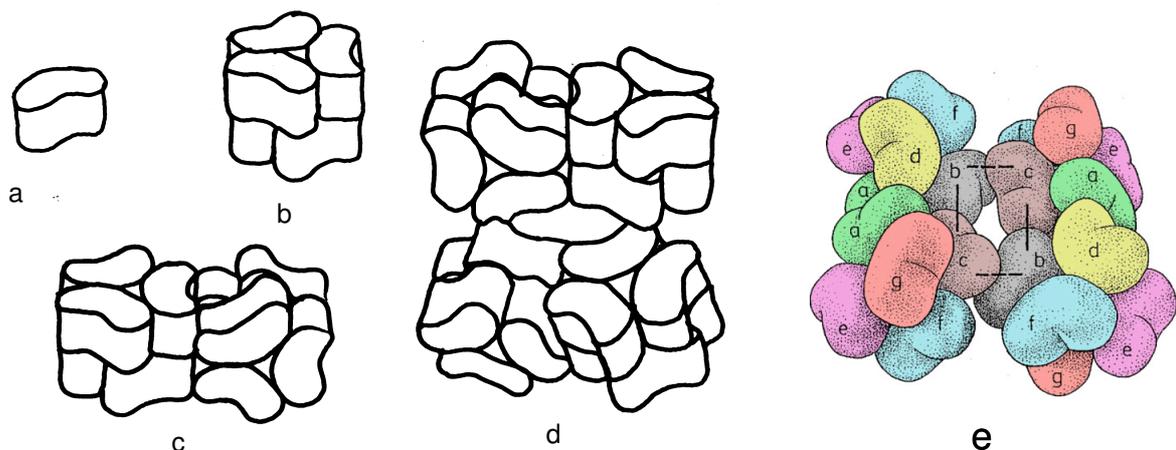


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der strukturellen Anordnung der Arthropoden-Hämocyanine nach (Lamy J. et al., 1981) a) einzelne Untereinheit b) Hexamer (2 x 3mer) c) 12-mer und d) 24-mer e) Untereinheitenstruktur des 24-meren Hämocyanins aus *Eurypelma californicum*. Hervorgehoben sind die für den Zusammenhalt der Halbmoleküle wichtigen b,c-Kontakte

Die Untereinheiten können unter Ausnutzung von Positionsbestimmungen aus elektronenmikroskopischen (Decker H. et al., 1996) und immunelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Markl J. et al., 1981) zu 3d-Modellen zusammengesetzt werden, welche in Abb. 4.1 dargestellt sind.

##### 4.1.2 Stabilisierende Kräfte der Quartärstruktur

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hämocyaninen haben drei wichtige Kontaktflächen für den quarternären Zusammenhalt aufgezeigt. Dabei handelt es

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

---

sich um Kontaktflächen zwischen den einzelnen Untereinheiten innerhalb eines Hexamers, Hexamer-Hexamer-Kontakte innerhalb der 12-meren Halbmoleküle und schließlich um die Wechselwirkungen beider Halbmoleküle, die über die Untereinheiten b und c vermittelt werden (siehe Abb. 4.1).

Die intrahexameren und interhexameren Wechselwirkungen wurden für dodekamere Hämocyanine aus Krebstieren (*Crustaceen*) untersucht (Herskovits T.T. et al., 1989). Ihr Dissoziationsverhalten wurde gegenüber Denaturantien wie Urea und Guanidinium Chlorid sowie Salzen der Hofmeister-Serie getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich hydrophile und polare Wechselwirkungen zur Stabilität beitragen.

Für das 24-mere Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* wurden analoge Experimente durchgeführt (Hübler R. et al., 1998). Ähnlich wie bei den 12-meren Crustaceen-Hämocyaninen wird das 24-mere Spinnen-Hämocyanin viel effektiver durch hydrophile als durch hydrophobe Reagenzien dissoziiert, so dass auch in diesem Fall elektrostatische Wechselwirkungen für den Zusammenhalt ausschlaggebend sind. Die Ergebnisse wurden durch Immungelektrophorese- und Fluoreszenzmessungen bestätigt, welche gezeigt hatten, dass die Oligomere unter dem Einfluss von Denaturantien dissoziieren, bevor ein Denaturierungsprozess einsetzt.

#### 4.2 Analyse der Hämocyanin-Dissoziation

Das 12-mere Hämocyanin aus *Homarus americanus* zeigt nach Herskovitz T.T. et al, (1981) ein sequentielles Dissoziationsgleichgewicht zwischen Dodekamer ( $HC_{12}$ ), den Hexameren ( $HC_6$ ) und Monomeren ( $HC_1$ ).



Das Dodekamer-Hexamer-Gleichgewicht und das Hexamer-Monomer-Gleichgewicht werden über die Dissoziationskonstanten  $K_1^{12,6}$

$$K_1^{12,6} = \frac{4c[\alpha_1(1-\alpha_2)]^2}{(1-\alpha_1)} \quad (4.1)$$

und  $K_2^{6,1}$

$$K_2^{6,1} = \frac{6^6 c^5 (\alpha_1 \alpha_2)^6}{\alpha_1 (1 - \alpha_2)} \quad (4.2)$$

beschrieben. Dabei bezeichnet  $\alpha_1$  den Dissoziationsgrad im Dodekamer-Dimer-Gleichgewicht und  $\alpha_2$  den Dissoziationsgrad im Hexamer-Monomer-Gleichgewicht. Die Werte für  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  lassen sich über die gemessene Lichtstreuintensität, die bei Assoziations-Dissoziationsgleichgewichten in erster Näherung proportional zum Molekulargewicht ist, nach den Formeln

$$\alpha_1 = 2 \left( 1 - \frac{M_w}{940000} \right) \quad (4.3)$$

und

$$\alpha_2 = \left( \frac{6}{5} \right) \left( 1 - \frac{M_w}{470000} \right) \quad (4.4)$$

bestimmen. Dabei wurde auf folgende Literaturwerte (Morimoto K., Kegeles G., 1971) für die Molekulargewichte des Dodekamers  $M_{12}=9.4 \cdot 10^5$ , des Hexamers  $M_6=4.7 \cdot 10^5$  und des Monomers  $M_1=0.8 \cdot 10^5$  aus *Homarus americanus* zurückgegriffen.

Die Verteilungen der einzelnen Hämocyanin-Spezies ( $f_{12}$  für  $HC_{12}$ ,  $f_6$  für  $HC_6$  und  $f_1$  für  $HC_1$ ) lassen sich über folgende Formeln berechnen.

$$f_{12} = 1 - \alpha_1 \quad (4.5)$$

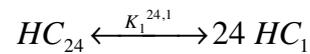
$$f_6 = \alpha_1 (1 - \alpha_2) \quad (4.6)$$

$$f_1 = \alpha_1 \alpha_2 \quad (4.7)$$

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

---

Für das 24-mer Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* wird ein 24-mer-Monomer-Gleichgewicht ohne intermediäre Gleichgewichtszustände postuliert (Hübler R. et al., 1998):



Für das 24-mer-Monomer-Gleichgewicht ist die Gleichgewichtskonstante gegeben durch

$$K_1^{24,1} = \frac{24^{24} c^{23} \alpha^{24}}{(1 - \alpha_1)} \quad (4.8)$$

Der hydrostatische Druck verschiebt das Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht in Richtung der dissoziierten Untereinheiten, indem er auf die Gleichgewichtskonstante  $K_0$  über

$$K_p = \frac{24^{24} c^{24-1} \alpha^N}{(1 - \alpha)} \cdot e^{\left(\frac{-p\Delta V}{RT}\right)} = K_0 \cdot e^{\left(\frac{-p\Delta V}{RT}\right)} \quad (4.9)$$

wirkt. Dabei ist  $c$  die eingesetzte Konzentration und  $N$  bezeichnet die Anzahl der Untereinheiten des Oligomers.

#### 4.3 Ergebnisse und Diskussion zur Druckdissoziation des 12-meren Hämocyanins aus *Homarus americanus*

Abb. 4.2 zeigt die Druckdissoziation des 12-meren Hummer-Hämocyanins in Abhängigkeit der Liganden CO und O<sub>2</sub> bzw. des Effektors L-Laktat. Nach einer Untergrundkorrektur wurden die Dissoziationskurven auf Normaldruck normiert, um sie direkt miteinander vergleichen zu können.

Alle Dissoziationskurven fallen bei hohem Druck auf ein Niveau von ca. 1/10  $I_0$  ab. Bei einer vollständigen Dissoziation des 12-meren Hämocyanins in die isolierten Untereinheiten erwartet man einen Endwert von (1/12  $I_0$ ). Dass dieser Wert nicht genau erreicht wird, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann die

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Dissoziation noch nicht vollständig abgeschlossen sein, sodass die Lichtstreuintensität von höher aggregierten Protein-Spezies beeinflusst wird. Zum anderen können auch die Konzentrationsabhängigkeit der Lichtstreuintensität oder eine mögliche irreversible Proteinaggregation nach einer Druckdenaturierung das Lichtstreusignal verfälschen. Weitere Fehlerquellen können sich aufgrund der Untergrundkorrektur ergeben. Die Untergrundmessung wurde separat zur eigentlichen Probenmessung durchgeführt. Dabei kann durch eine veränderte Küvettenposition innerhalb der Druckzelle einerseits oder durch unterschiedliche Staubanteile andererseits die Korrektur ungünstig beeinflusst werden. Insgesamt belaufen sich die Ungenauigkeiten in Bezug auf den vollständigen dodekameren Dissoziationsprozess auf ca. 5%. Wie aus Abb. 4.2 hervorgeht, unterscheiden sich die Liganden CO und O<sub>2</sub> kaum in ihrem Effekt auf das Druck-Dissoziationsgleichgewicht, während der Effektor L-Laktat eine deutliche Stabilitätsverminderung verursacht. Die Zugabe von 40 mM L-Laktat senkt den Druck, der erforderlich ist, um die Lichtstreuintensität auf die Hälfte des Anfangswertes zu bringen von ca. 150 MPa ohne L-Laktat auf 70 MPa bei pH 7.3.

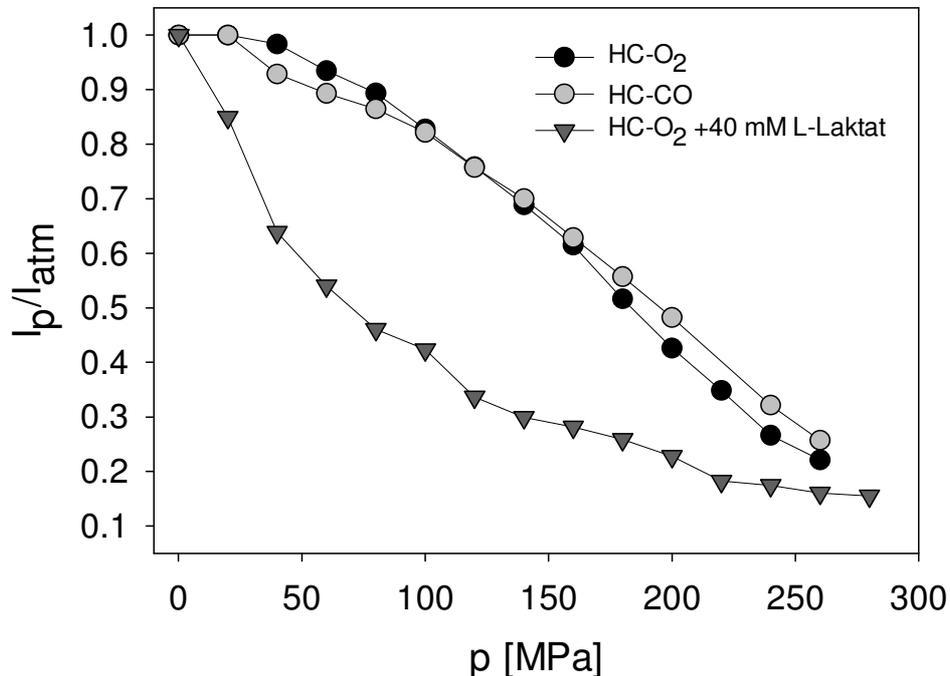


Abb. 4.2: Effekt der Liganden O<sub>2</sub> und CO bzw. des Effektors L-Laktat auf die Druckdissoziation des 12-meren Hämocyanins aus *Homarus americanus*, pH 7.3.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Zunächst soll die Druckdissoziation des 12-meren Hämocyanins ohne weiteren Effektor betrachtet werden. In Abb. 4.3 ist die Abhängigkeit des Molekulargewichts während der Hämocyanin-Dissoziation als Funktion des ausgeübten Drucks gezeigt. Das Molekulargewicht (Morimoto K., Kegeles G., 1971) wird aus der Proportionalität zum gemessenen Lichtstreusignal bestimmt.

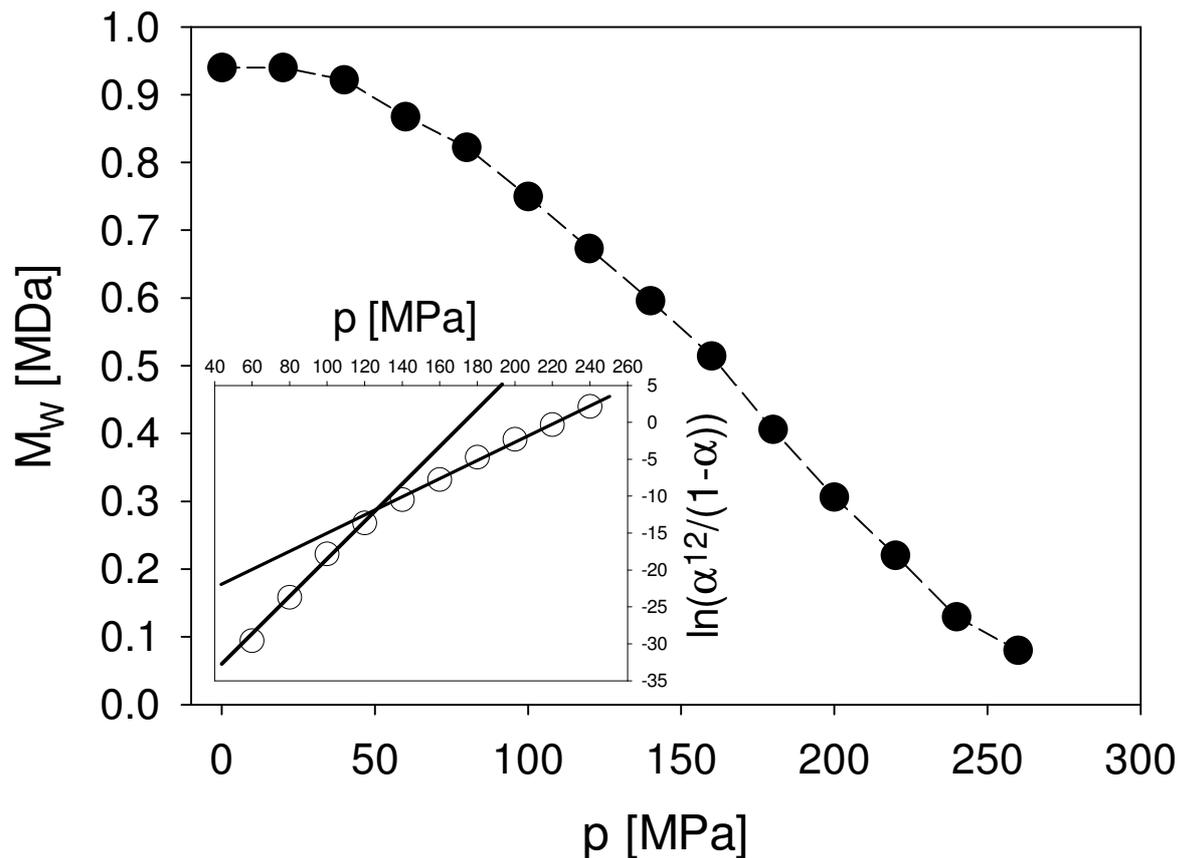


Abb. 4.3: Molekulargewicht aufgetragen über Druck der Hämocyanin-Dissoziation aus *Homarus americanus*, pH 7.3. Ein zweiphasischer Übergang ist zu erkennen, der besonders deutlich im Plot zur  $\Delta V$ -Bestimmung zum Ausdruck kommt (Bild in der linken unteren Ecke).

Die Druck-Übergangskurve zeigt einen zweistufigen Verlauf. Dieser ist besonders deutlich in der logarithmischen Auftragung des einfachen Zerfalls (12-mer/ Monomer) (kleines Bild in der linken unteren Ecke von Abb. 4.3) in Form von zwei linearen Bereichen zu sehen. Während des ersten Übergangs fällt das Molekulargewicht von 950 kDa bei 0.1 MPa auf ca. 500 kDa bei 150 MPa ab. Dies entspricht dem Zerfall des Dodekamers ( $MW = 940$  kDa) in zwei Hexamere ( $MW = 470$  kDa). Der zweite Übergang entspricht dem hexameren Zerfall in sechs Monomere ( $MW = 80$  kDa), der

bei ca. 260 MPa abgeschlossen ist. Der Druckdissoziationsprozess des 12-meren Hummer-Hämocyanins läuft somit sequentiell über einen hexameren Zwischenzustand ab. Der sequentielle Prozess wurde bereits anhand von Stabilitätsuntersuchungen (Herskovitz T.T. et al., 1981; Herskovits T.T. et al., 1984) mit verschiedenen denaturierenden Detergenzien identifiziert und kann nun durch diese Druckuntersuchung bestätigt werden.

Der Dissoziationsprozess des Hämocyanins lässt sich weiterhin mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung über die Veränderung der hydrodynamischen Radien verfolgen. In Abb. 4.4 sind die Intensitätskorrelationsfunktionen in Abhängigkeit des Drucks dargestellt. Mit zunehmendem Druck verschiebt sich die Korrelationsfunktion zu kürzeren Korrelationszeiten. Dieser Effekt ist auf die Dissoziation der Proteinkomplexe zurückzuführen. Während die Streuintensität großer Teilchen, aufgrund ihrer langsameren Bewegung, länger korreliert ist, zerfällt die Korrelation der neu entstandenen schnellen kleineren Teilchen schon bei kürzeren Zeiten (siehe Kapitel 3.1.3). Für die genaue Analyse war es erforderlich, den Dissoziationsübergang möglichst gut auszumessen.

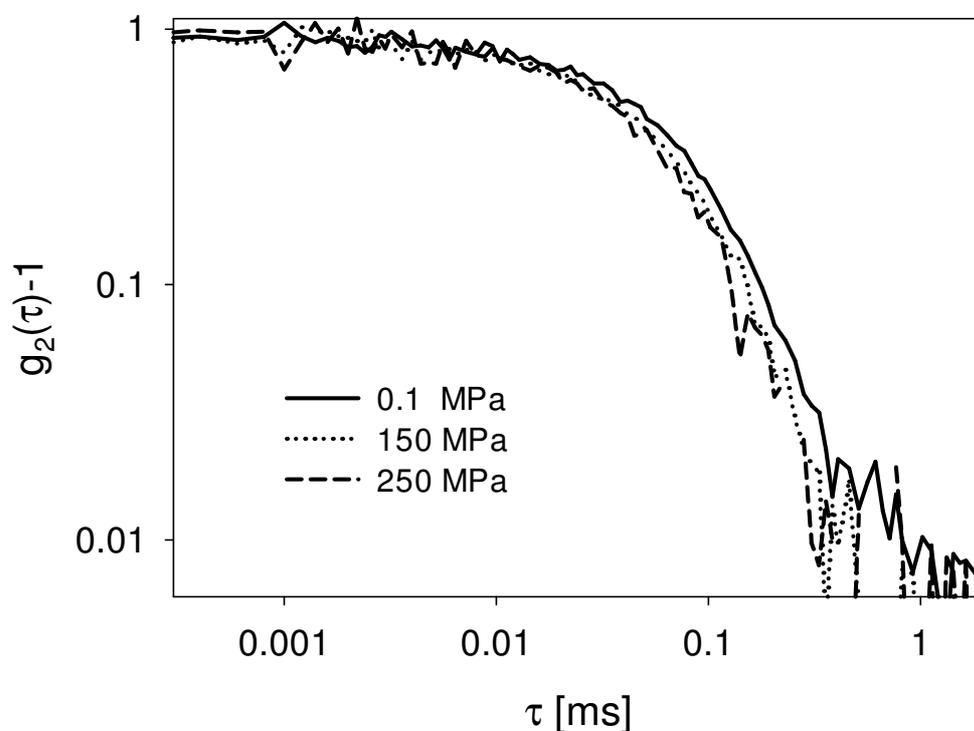


Abb. 4.4: Intensitätskorrelationsfunktion des 12-meren Hämocyanins aus *Homarus americanus* in Abhängigkeit vom Druck.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Aufgrund der geringen Lichtstreuintensitäten musste deshalb bei den dynamischen Lichtstremessungen ein Kompromiss auf Kosten der Statistik der Korrelationsfunktionen eingegangen werden.

Zur ersten Charakterisierung wurden die Feldkorrelationsfunktionen einer Kumulanten-Analyse (Formeln 3.38 – 3.39) unterzogen und deren Verteilungsbreite bzw. der Polydispersitätsindex PI (Formel 3.40) bestimmt (Abb. 4.5). Im Falle einer monodispersen Probe liegen die Messdaten der logarithmierten Feldkorrelationsfunktion exakt auf einer Geraden und der Polydispersitätsindex ist  $PI = 0$ . Für die Analyse in Abb. 4.5 wurden alle Messdaten  $>0.1$  der Intensitätskorrelationsfunktion herangezogen. Der ermittelte PI-Wert von 2.3 deutet auf eine breite Verteilung der Probe hin und erschwert die genaue Bestimmung einer einzelnen Teilchengröße.

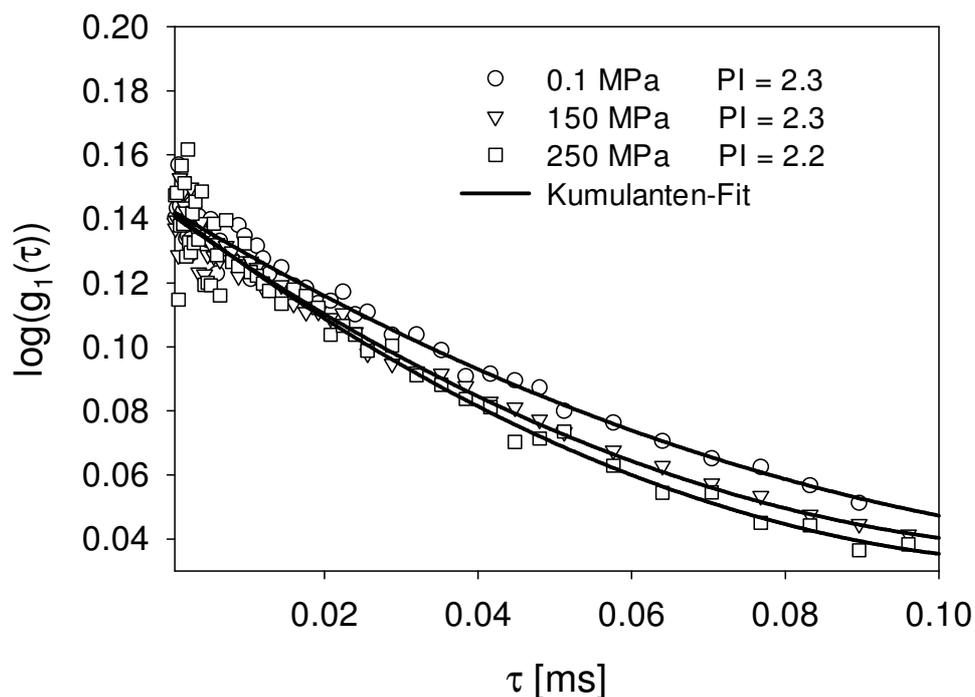


Abb. 4.5: Feld-Korrelationsfunktionen mit Kumulanten-Fit. Der Polydispersitätsindex (PI) ist mit 2.3 sehr hoch und zeigt eine breite Verteilung an.

Der Fit der Feldkorrelationsfunktion mit zwei Exponentialfunktionen und die weitere Analyse (Formeln 3.37 und 3.42) zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius, lieferte dennoch akzeptable Ergebnisse (Abb. 4.6, links) für die Dissoziation des 12-meren Hämocyanins. Auch auf der Ebene der Radien wird der sequentielle Charakter

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

der Dissoziation des 12-meren Hummer-Hämocyanins sichtbar. Zwischen 70 MPa und 200 MPa liegen die gemessenen Radien auf einem Plateau. In diesem Druckbereich ist das 12-merer Hämocyanin in seine zwei Basis-Hexamere dissoziiert. Wird der Druck weiter erhöht, dissoziieren die Hexamere in die Hämocyanin - Untereinheiten, deren hydrodynamische Radien ca. 2 bis 3 nm groß sind. Mit Hilfe des Contin-Algorithmus lassen sich auch Radienverteilungen von polydispersen Proben bestimmen. In Abb. 4.6, rechts sind die anzahlsgewichteten Radienverteilungen für den Anfangszustand bei 0.1 MPa bzw. für den Endzustand bei 240 MPa gezeigt. Der Modus der Radienverteilungen ist in guter Übereinstimmung mit den hydrodynamischen Radien, die durch den Fit mit 2 Exponentialfunktionen erhalten wurden (Abb. 4.6, links).

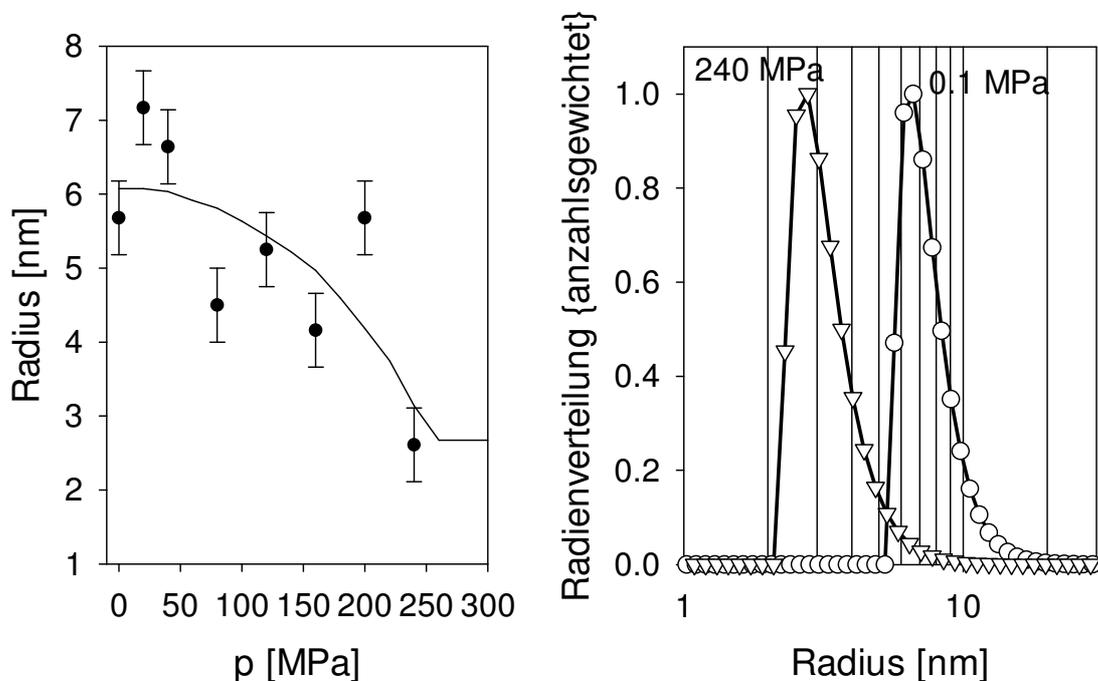


Abb. 4.6: Hydrodynamische Radien während der Druckdissoziation des 12-meren Hämocyanins aus *Homarus americanus*. Links: Hydrodynamische Radien, erhalten durch Exponentialfit der Feldkorrelationsfunktionen. Rechts: Radienverteilung, erhalten nach inverser Laplace-Transformation der Korrelationsfunktion.

Bei Drücken über 260 MPa kommt es in Abwesenheit des Effektors L-Laktat zur Aggregation der Probe (Abb. 4.7). Der Aggregationsprozess ist auf die Denaturierung isolierter Hämocyanin-Untereinheiten zurückzuführen. Sie macht sich in einem Anstieg der Lichtstreuintensität (Abb. 4.7, links) bzw. durch eine Verschiebung der

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Korrelationsfunktion zu größeren Korrelationszeiten (Abb. 4.7, rechts) bemerkbar. Die Denaturierung von Hämocyanin-Untereinheiten wurde ebenfalls bei Stabilitätsmessungen (Herskovits T.T. et al., 1984) erwähnt. Aufgrund der Denaturierung konnte die Reassoziierung des Hämocyanins beim Druckabbau nicht weiter verfolgt werden.

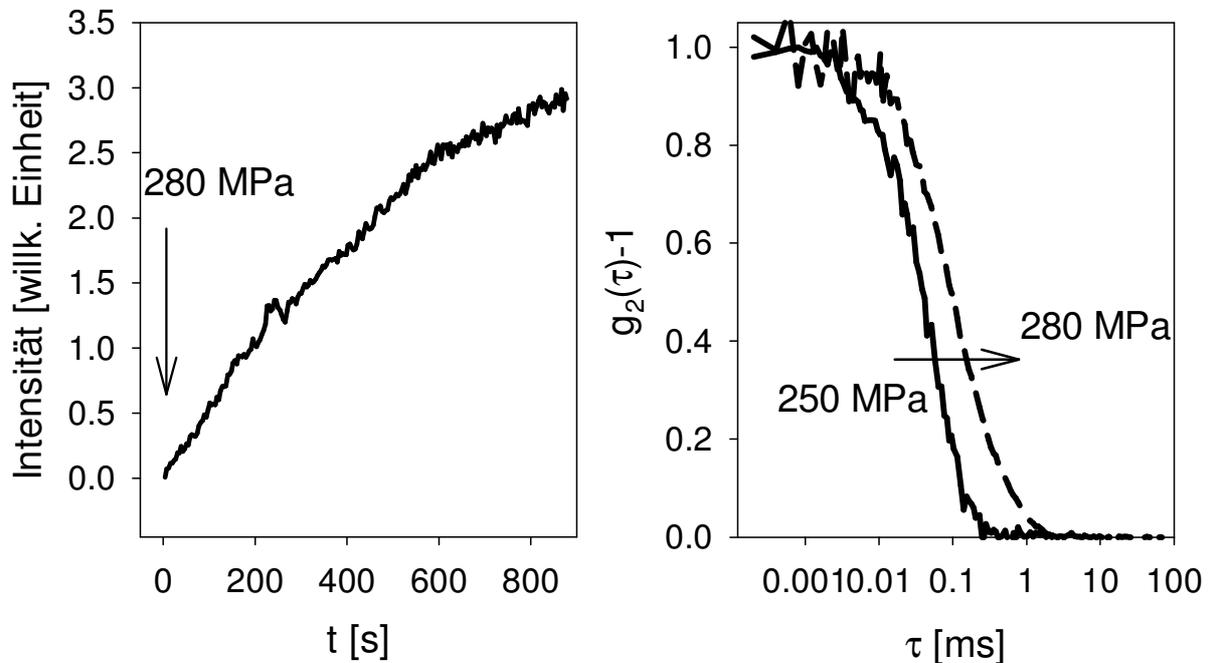


Abb. 4.7: Aggregationseffekte aufgrund der Denaturierung von Hämocyanin-Untereinheiten. Links: Intensitätsanstieg aufgrund von Aggregation. Rechts: Shift der Intensitäts-Korrelationsfunktion zu längeren Korrelationszeiten aufgrund aggregierter Hämocyanin-Untereinheiten.

Für die Analyse der sequentiellen dodekameren Druckdissoziation über den hexameren Zwischenzustand wurden zunächst die Dissoziationsgrade  $\alpha_1$  für den Zerfall Dodekamer  $\rightarrow$  Hexamer bzw.  $\alpha_2$  für den Zerfall Hexamer  $\rightarrow$  Monomer über die Gleichungen (4.3) und (4.4) bestimmt. Diese sind wiederum über die Formel (4.1) und Formel (4.2) mit den Dissoziations-Gleichgewichtskonstanten  $K_1$  (Dodekamer/Hexamer) und  $K_2$  (Hexamer/Monomer) verknüpft. Nach einer Erweiterung in Bezug auf die Druckabhängigkeit gemäß Formel (4.9) lassen sich die Dissoziations-Gleichgewichtskonstanten unter Normalbedingung und die molaren Dissoziationsvolumina für beide Prozesse graphisch nach Abb. 2.2 bestimmen. In Abb. 4.8 ist die Druckdissoziation des dodekameren Hämocyanins in die zwei Basis-Hexamere mit und ohne den Effektor L-Laktat dargestellt.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

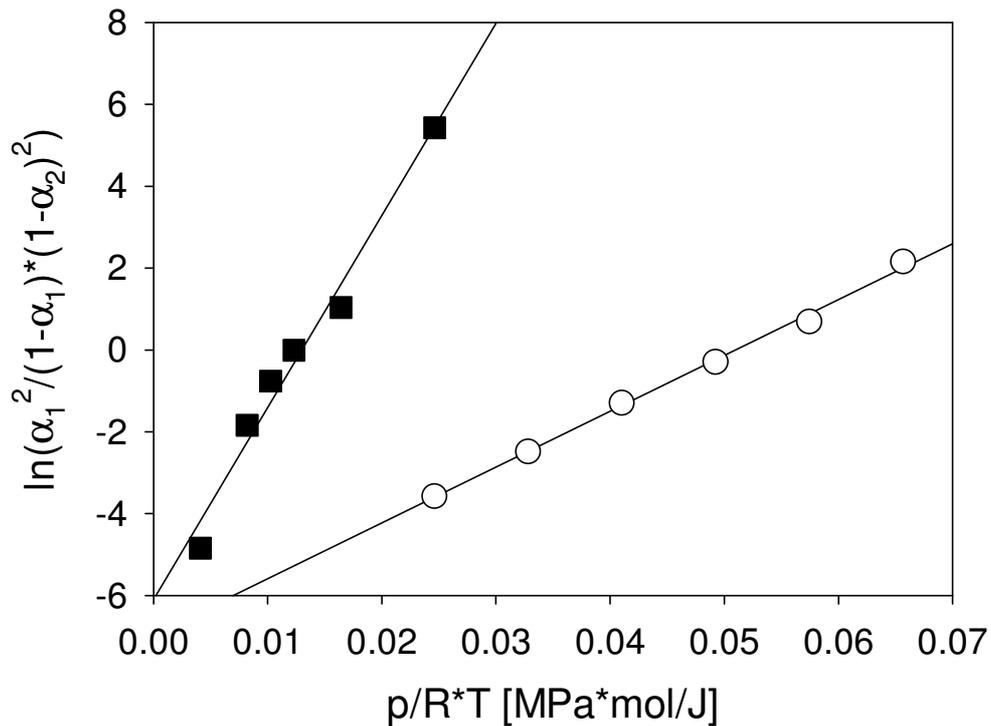


Abb. 4.8: Plot zur Bestimmung der Dissoziationskonstante und des Dissoziationsvolumens für den Hämocyanin-Zerfall (Dodekamer/Hexamer) mit (■) und ohne (○) L-Laktat.

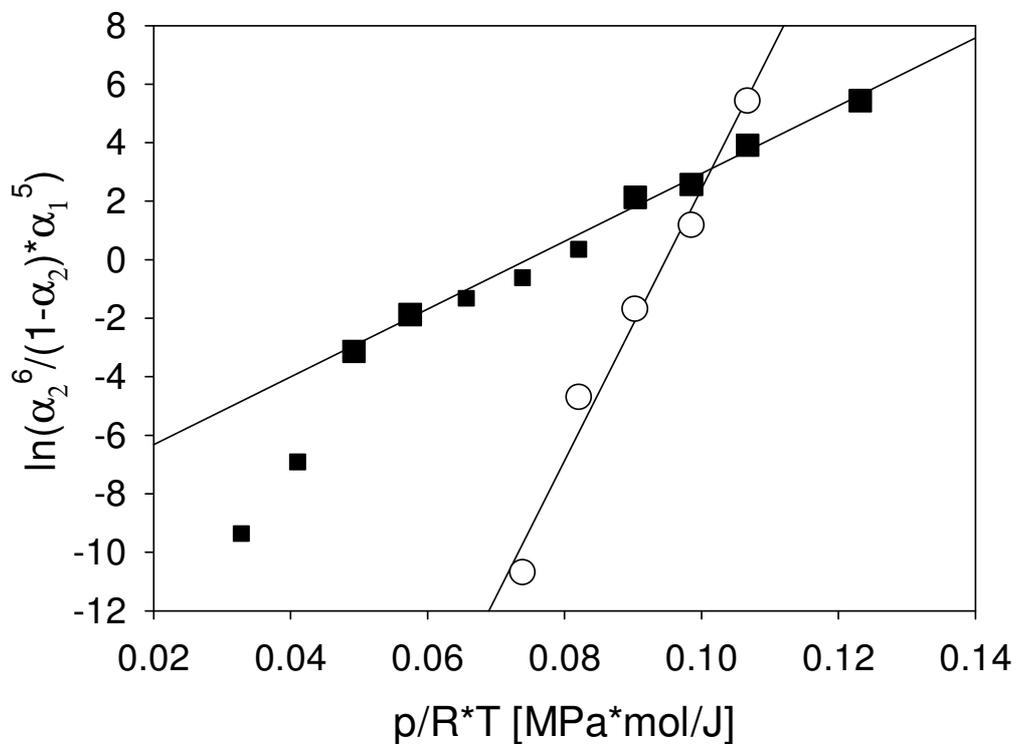


Abb. 4.9: Plot zur Bestimmung der Dissoziationskonstante und des Dissoziationsvolumens für den Hämocyanin-Zerfall (Hexamer/Monomer) mit (■) und ohne (○) L-Laktat. Unter dem Einfluss von L-Laktat kommt es zu deutlichen Abweichungen von der Gerade.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Unter dem Einfluss von L-Laktat kommt es zu einer Zunahme des Anstieges, der mit einer Vergrößerung des Dissoziationsvolumens von -136 ml/mol auf -470 ml/mol einhergeht (Tabelle 4.1). Zusätzlich kommt es zu einer Verdopplung der Dissoziationskonstante von  $K_0 = 4 \cdot 10^{-9}$  M auf  $K_0 = 9.5 \cdot 10^{-9}$  M, die mit einer Absenkung der in Bezug auch Stöchiometrie und Konzentration unkorrigierten freien molaren Dissoziationsenergie von  $\Delta\mu^\# = 16.9$  kJ/mol auf  $\Delta\mu^\# = 14.8$  kJ/mol korrespondiert. Das Bestimmtheitsmaß aus der linearen Regression ist mit  $R^2 = 0.97$  beim Zerfall in Anwesenheit von L-Laktat niedriger als beim Zerfall ohne Effektor ( $R^2 = 0.998$ ).

Abb. 4.9 zeigt auf analoge Weise den Druckzerfall des Hexamers in die Monomere. In Abwesenheit des Effektors wurde ein Dissoziationsvolumen von  $\Delta V = -464$  ml/mol ermittelt. Unter dem Einfluss von L-Laktat verringert es sich auf ca.  $\Delta V = -116$  ml/mol um den Faktor 4. Für die Dissoziationskonstante (Hexamer/Monomer) wurde ohne Effektor ein Wert von  $K_0 = 1.6 \cdot 10^{-43}$  M<sup>5</sup> und mit Effektor ein Wert von  $K_0 = 3.6 \cdot 10^{-28}$  M<sup>5</sup> ermittelt.

	$\Delta V$ HC [ml/mol]	$\Delta V$ HC+40 mM L-Laktat [ml/mol]
12->6	-136.39	-469.27
6->1	-464.36	-115.88

Tabelle 4.1: Vergleich der Dissoziationsvolumina ohne und mit dem Effektor L-Laktat für die sequentielle Dissoziation des 12-meren Hämocyanins.

	$K_0$ HC	$K_0^\#$ HC	$\Delta\mu^\#$ [kJ/mol]
12->6	$4.0 \cdot 10^{-9}$ [M]	$9.54 \cdot 10^{-4}$	16.9
6->1	$1.6 \cdot 10^{-43}$ [M] <sup>5</sup>	$7.72 \cdot 10^{-20}$	107.3

Tabelle 4.2: Graphisch ermittelte Dissoziationskonstanten mit und ohne (#) Korrektur in Bezug auf Stöchiometrie und Konzentration sowie korrespondierende molare Dissoziationsenergien  $\Delta\mu^\#$  bei Normaldruck, für die sequentielle Dissoziation des 12-meren Hämocyanins.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

	$K_0$ HC+ 40 mM L- Laktat	$K_0^\#$ HC+ 40 mM L-Laktat	$\Delta\mu^\#$ [kJ/mol]
12->6	$9.5 \cdot 10^{-9}$ [M]	$2.24 \cdot 10^{-3}$	14.8
6->1	$3.6 \cdot 10^{-28}$ [M] <sup>5</sup>	$1.76 \cdot 10^{-4}$	21.0

Tabelle 4.3 Graphisch ermittelte Dissoziationskonstanten mit und ohne (#) Korrektur in Bezug auf Stöchiometrie und Konzentration sowie korrespondierende molare Dissoziationsenergien  $\Delta\mu^\#$  bei Normaldruck, für die sequentielle Dissoziation des 12-meren Hämocyanins in Anwesenheit von 40 mM L-Laktat.

Die in Bezug auch Stöchiometrie und Konzentration unkorrigierte freie molare Dissoziationsenergie verringert sich in Folge der Effektorbindung von  $\Delta\mu^\# = 107$  kJ/mol auf  $\Delta\mu^\# = 21$  kJ/mol. Aus Abb. 4.9 geht deutlich hervor, dass es in Anwesenheit von L-Laktat zu einer signifikanten Abweichung vom linearen Verhalten kommt. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression ist mit  $R^2 = 0.95$  (klein dargestellte Datenpunkte ausgenommen) niedriger als  $R^2 = 0.98$ , welches für den effektorfreien Zerfall ermittelt wurde. Mit Hilfe der graphisch ermittelten Werte für die Dissoziationsvolumina  $\Delta V$  und die Dissoziationskonstanten  $K$  können nun die Dissoziationsgleichgewichte unter Druck berechnet werden. Zur Ermittlung des Dissoziationsgrades  $\alpha_2$  wurde die folgende Gleichung numerisch gelöst:

$$\left(\alpha_2^{Hex/Mon}\right)^2 - 2 \cdot \alpha_2^{Hex/Mon} + 1 - \frac{K_0^{\#Dod/Hex} \cdot e^{\left(\frac{dV^{Dod/Hex} \cdot p}{RT}\right)} \left(1 - \alpha_1^{Dod/Hex}\right)}{\left(\alpha_1^{Dod/Hex}\right)^2} = 0 \quad (4.10)$$

mit

$$\alpha_1^{Dod/Hex} = \sqrt[5]{\frac{K_0^{\#Hex/Mon} \cdot e^{\left(\frac{dV^{Hex/Mon} \cdot p}{RT}\right)} \cdot \left(1 - \alpha_2^{Hex/Mon}\right)}{\left(\alpha_2^{Hex/Mon}\right)^6}} \quad (4.11)$$

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Die kalkulierten Daten für  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  sind den aus der Messung ermittelten Werten in den Abb. 4.10 und Abb. 4.11 gegenübergestellt. Die 12-meren Hämocyanin-Dissoziation, pH 7.3, kann in guter Näherung durch einen Dodekamer/Hexamer- ( $\alpha_1$ ) und einen Hexamer/Monomer-Zerfall ( $\alpha_2$ ) beschrieben werden (Abb. 4.10). Dagegen zeigen sich in Anwesenheit des Effektors L-Laktat deutliche Differenzen zwischen den gemessenen und den modellierten Dissoziationsgraden (siehe Abb. 4.11). Schon bei der graphischen Bestimmung der Dissoziationskonstante und des Dissoziationsvolumens (Abb. 4.9) hatten sich diese Differenzen als nichtlineare Abweichungen bemerkbar gemacht. Besonders auffallend ist, dass der modellierte Dissoziationsgrad des Hexamer/Monomer-Zerfalls bereits von einem Plateauwert von ca. 0.3 bei Normaldruck startet. Außerdem können die gemessenen Daten für  $\alpha_2$  nicht durch einen einfachen Übergang beschrieben werden, sondern zeigen einen zweistufigen Verlauf. In Abb. 4.12 sind die sequentiellen Modell-Fits mit und ohne Effektor L-Laktat im Vergleich zu den gemessenen Dissoziationskurven gezeigt.

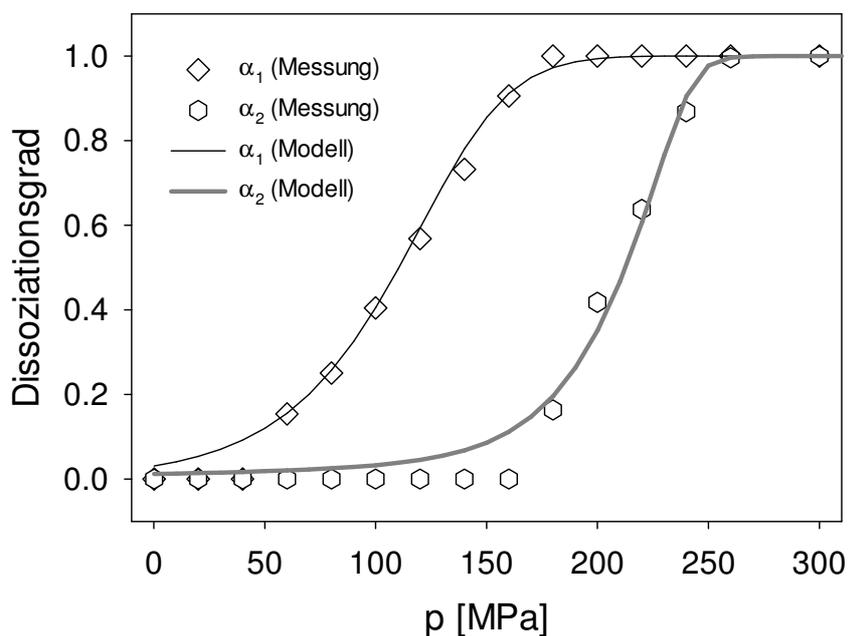


Abb. 4.10: Dissoziationsgrad  $\alpha_1$  (Dodekamer/Hexamer) und  $\alpha_2$  (Hexamer/Monomer) bestimmt aus der Messung im Vergleich mit den kalkulierten Werten nach den Formeln (4.10) und (4.11) für Hämocyanin, ohne Effektor.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

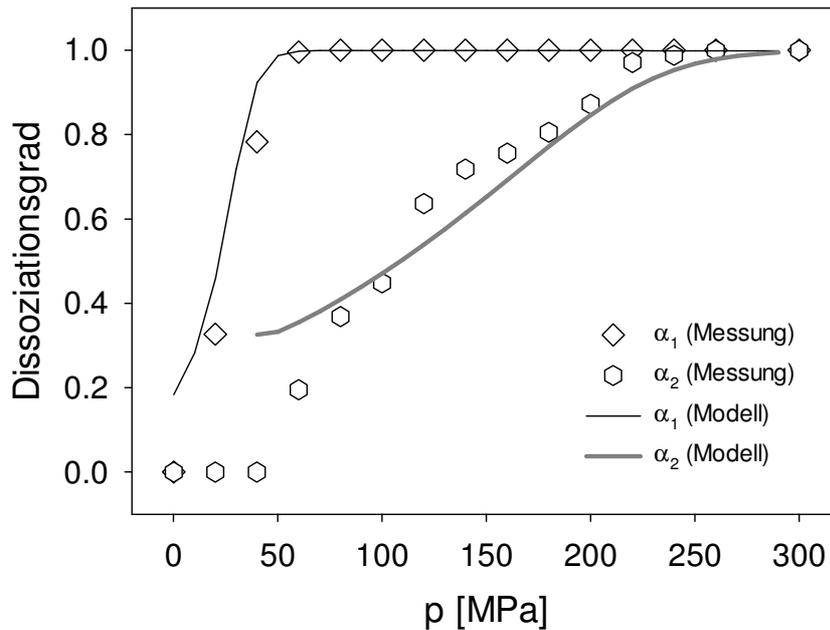


Abb. 4.11: Dissoziationsgrad  $\alpha_1$  (Dodekamer/Hexamer) und  $\alpha_2$  (Hexamer/Monomer) bestimmt aus der Messung im Vergleich zu den kalkulierten Werten nach den Formeln (4.10) und (4.11) für Hämocyanin aus *Homarus americanus*, +40 mM L-Laktat. Deutliche Abweichungen sind zu erkennen.

Dafür wurden zunächst die kalkulierten Dissoziationsgrade, die nun für den gesamten Druckbereich definiert sind, über

$$M_w = M_{12} \left( 1 - \frac{1}{2} \alpha_1^{Dod/Hex} - \frac{5}{12} \alpha_1^{Dod/Hex} \cdot \alpha_2^{Hex/Mon} \right) \quad (4.12)$$

in Molekulargewichtswerte  $M_w$  überführt. Die Dissoziationskurve für das Hummer-Hämocyanin lässt sich gut über das sequentielle Dodekamer/Hexamer/Monomer-Modell beschreiben. In Anwesenheit von L-Laktat weist die modellierte Dissoziationskurve, besonders im niederen Druckbereich, deutlich kleinere Molekulargewichte als die Messdaten auf. Diese Abweichungen sind die Auswirkungen der ungenau bestimmten Dissoziationskonstanten bzw. -volumina, die dann letztendlich in diesem Druckbereich zu große Dissoziationsgrade von  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  ergeben.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

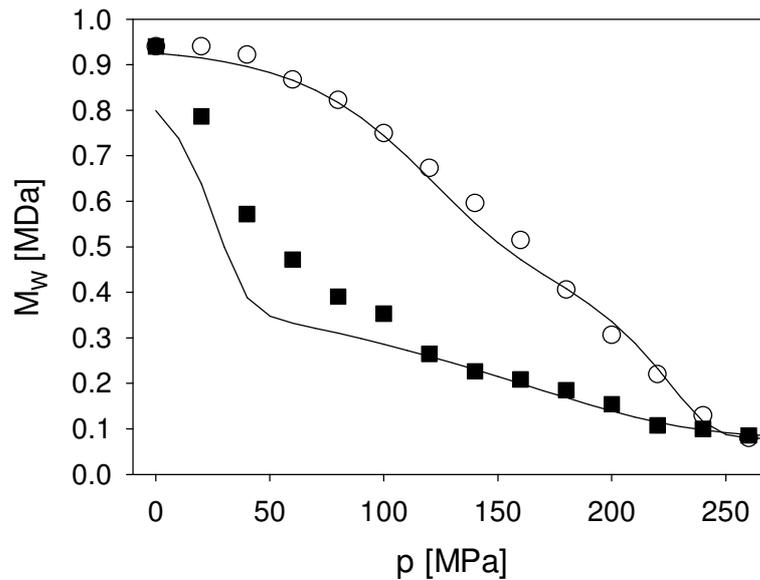
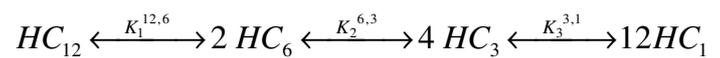


Abb. 4.12: Gemessene Druck-Dissoziation ohne (o) und mit (■) 40 mM L-Laktat im Vergleich zur numerisch kalkulierten DHM-Dissoziation (—) nach den Formeln (4.10 - 4.12) des 12-meren Hämocyanins aus *Homarus americanus*, pH 7.3.

Diese zeigen bereits bei Normaldruck einen 20%-igen Zerfall von Dodekameren in Hexamere und einen ca. 30%-igen Zerfall von Hexameren in Monomere an, was zu einer Verringerung des Molekulargewichts von 940 kDa auf ca. 800 kDa führt (siehe Abb. 4.12). Der zweistufige Verlauf des Dissoziationsgrads  $\alpha_2$  in Abb. 4.11 deutet auf einen zusätzlichen Zwischenzustand innerhalb des Hexamer/Monomer-Zerfalls hin. Dieser korrespondiert in der Dissoziationskurve in Abb. 4.12 mit einem deutlichen Plateau im Druckbereich von 120-170 MPa und einem Molekulargewicht von 230 kDa. Diesem Molekulargewicht kann der trimere Zustand zugeordnet werden, der aufgrund der strukturellen Anordnung der Untereinheiten innerhalb des Hexamers ausgezeichnet ist (Kapitel 4.1.1). Die sequentielle Dissoziation des 12-meren Hämocyanins aus *Homarus americanus* kann infolgedessen um einen weiteren Zwischenzustand erweitert werden, gemäß



Der Formalismus zu diesem Reaktionsschema (DHTM-Zerfall) wurde im Rahmen der Arbeit abgeleitet und ist im Anhang (Kapitel 7.1) detailliert aufgeführt.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

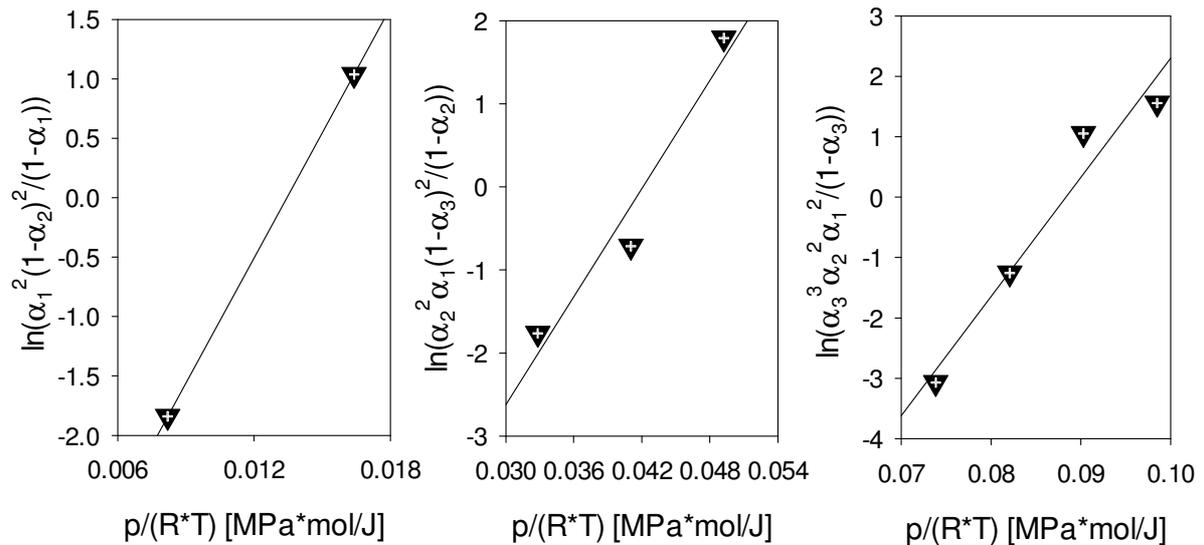


Abb. 4.13: Graphische Ermittlung von Dissoziationskonstante  $K_0^\#$  und molarem Dissoziationsvolumen  $\Delta V$  des sequentiellen DHTM-Zerfalls. Links: Dodekamer/Hexamer- Mitte: Hexamer/Trimer- Rechts: Trimer/Monomer-Dissoziation.

Die Dissoziationskonstanten  $K_0^\#$  und die Dissoziationsvolumina  $\Delta V$  für die sequenziellen Zerfälle lassen sich wiederum graphisch über einen begrenzten Druckbereich aus den Messdaten gewinnen (Abb. 4.13).

	$K_0$	$K_0^\#$	$\Delta\mu^\#$ [kJ/mol]	$\Delta V$ [ml/mol]
12->6	$3.8 \cdot 10^{-8}$ [M]	$8.9 \cdot 10^{-3}$	11.5	-350.74
6->3	$2.2 \cdot 10^{-8}$ [M]	$2.6 \cdot 10^{-3}$	14.5	-128.02
3->1	$3.1 \cdot 10^{-12}$ [M] <sup>2</sup>	$2.7 \cdot 10^{-8}$	42.5	-197.18

Tabelle 4.4: Graphisch ermittelte Dissoziationskonstanten mit und ohne (<sup>#</sup>) Korrektur in Bezug auf Stöchiometrie und Konzentration, molare Dissoziationsenergien  $\Delta\mu^\#$  bei Normaldruck sowie molare Dissoziationsvolumina  $\Delta V$ , bestimmt nach dem DHTM-Modell für Hämocyanin aus *Homarus americanus* in Anwesenheit von 40 mM L-Laktat, pH 7.3.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

In Tabelle 4.4 sind die Werte für die Dissoziationskonstanten ohne und mit Korrektur in Bezug auf die Stöchiometrie und Konzentration bzw. Dissoziationsvolumina und molare Dissoziationsenergien bei Normaldruck für die druckabhängigen Dissoziationsprozesse zusammengefasst.

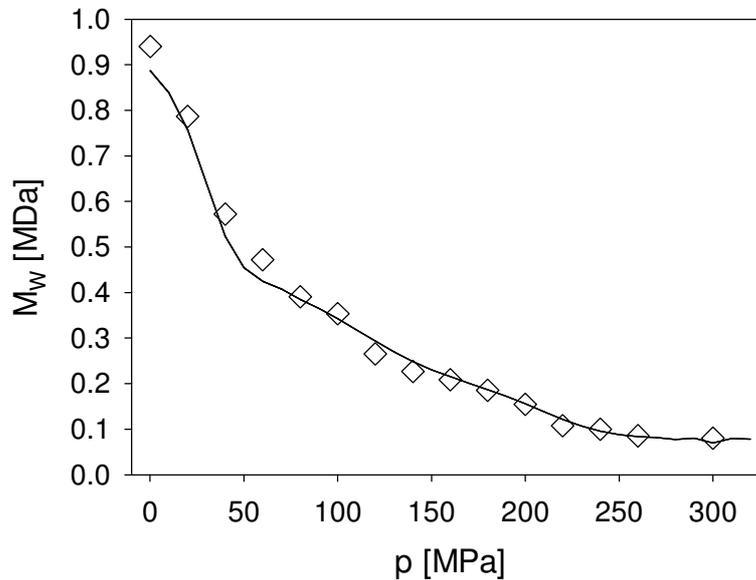


Abb. 4.14: Gemessene Druck-Dissoziation von 12-meren Hämocyanin aus *Homarus americanus* mit 40 mM L-Laktat ( $\diamond$ ) und numerisch kalkulierte Dissoziationskurve nach dem DHTM-Modell.

Die ermittelten Werte für die Dissoziationskonstanten bei Normaldruck sowie die molaren Dissoziationsvolumina wurden verwendet, um eine Dissoziationskurve nach dem DHTM-Modell zu berechnen (siehe Anhang, Kapitel 7.1). Das Ergebnis ist in Abb. 4.14 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Messdaten durch einen zusätzlichen trimeren Zwischenzustand besser beschrieben werden können.

Aus den berechneten Dissoziationsgraden lassen sich die Fraktionsverteilungen (Abb. 4.15) der am Dissoziationsprozess teilnehmenden Proteinspezies berechnen (Formeln 7.10 – 7.13, siehe Anhang). Besonders deutlich ist die Verteilung der Trimere ausgeprägt, welche sich über den gesamten interessanten Druckbereich erstreckt und ihr Stabilitätsmaximum bei 150 MPa erreicht.

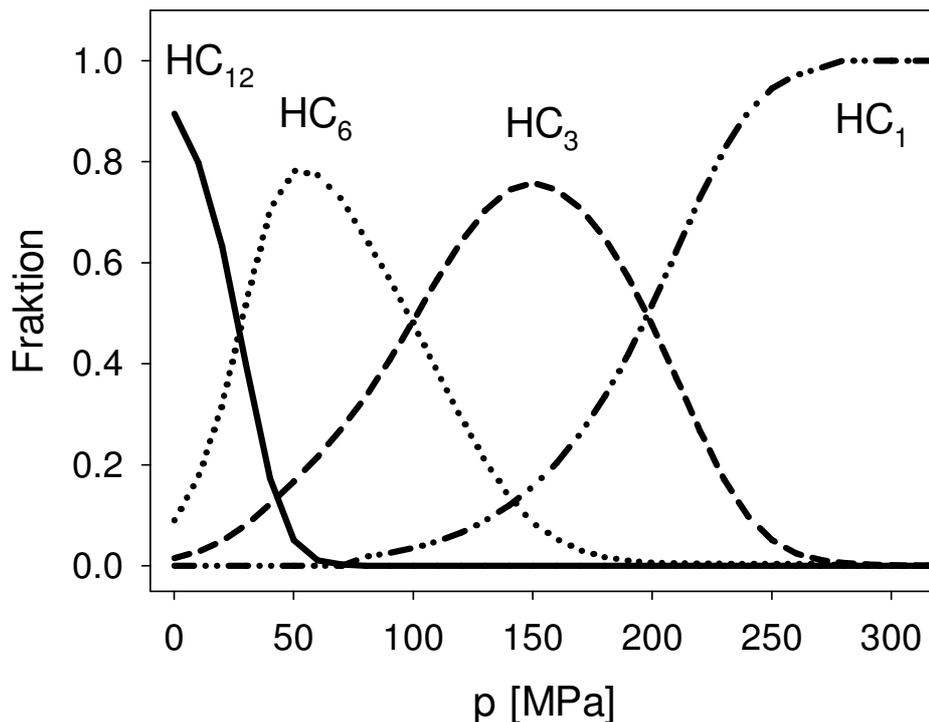


Abb. 4.15: Verteilungen des *Homarus* Hämocyanins von Dodekamer (HC<sub>12</sub>), Hexamer (HC<sub>6</sub>), Trimer (HC<sub>3</sub>) und Monomer (HC<sub>1</sub>) gemäß des DHTM-Modells in Abhängigkeit vom Druck.

Die Existenz eines trimeren Zwischenzustandes in der Druckdissoziation, der durch Effektorbindung induziert wird, könnte Aufschluss über die noch ungeklärte Frage liefern, wie viele L-Laktat-Moleküle pro allosterische Einheit (Hexamer) innerhalb des Gesamtmoleküls (Dodekamer) binden. Da eine Kristallstruktur fehlt, konnte diese Anzahl bisher nur indirekt, z.B. über Sauerstoffbindungsexperimente, abgeschätzt werden. Dabei ergaben sich gute Übereinstimmungen mit 6, 2 bzw. 1 L-Laktat-Molekül pro Hexamer. Unter der Annahme, dass die Dissoziationskonstante für L-Laktat in Bezug auf dessen Hämocyanin-Bindungsstelle viel kleiner ist als die Dissoziationskonstante des Hexamer-Zerfalls, würden 2 Moleküle L-Laktat pro Hexamer die Stabilisierung je eines trimeren Zustandes am besten erklären. Im Folgenden soll der L-Laktat-Effekt zwecks Vergleichbarkeit mit Hämocyanin ohne Effektor innerhalb des DHM-Modells diskutiert werden.

Die L-Laktat-Bindung führt zu einer Verringerung der Stabilitäten aller Fraktionen. Dabei wird aber nur eine geringfügig kleinere Gesamtvolumendifferenz (3%) während der DHM-Druckdissoziation beobachtet. Der Druckeinfluss auf die sequentiellen Dissoziationsschritte wird in Abb. 4.16 deutlich, in welcher die einzelnen Fraktionen, die nach den Formeln (4.5 - 4.7) berechnet wurden, in

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Abhängigkeit von Druck bzw. Effektor oder Ligand gezeigt sind. Die effektorfreie 12-merer Hämocyanin-Fraktion dominiert im Bereich von Normaldruck bis ca. 100 MPa. Sie zerfällt in die hexamere Fraktion, welche ihr Maximum bei 150 MPa erreicht. Eine weitere Druckerhöhung führt schließlich zum Zerfall in die monomere Fraktion, welcher bei ca. 260 MPa abgeschlossen ist. Wie schon die Dissoziationskurven (Abb. 4.2) zeigten, hat der Ligand CO kaum Einfluss auf die Fraktionsverteilung (Abb. 4.16, links). Dagegen führt die Bindung des Effektors L-Laktat zu einer deutlich sichtbaren Destabilisierung des dodekameren Hämocyanins, was sich durch eine Verschiebung der Fraktionen zu kleineren Drücken bemerkbar macht (Abb. 4.16, rechts).

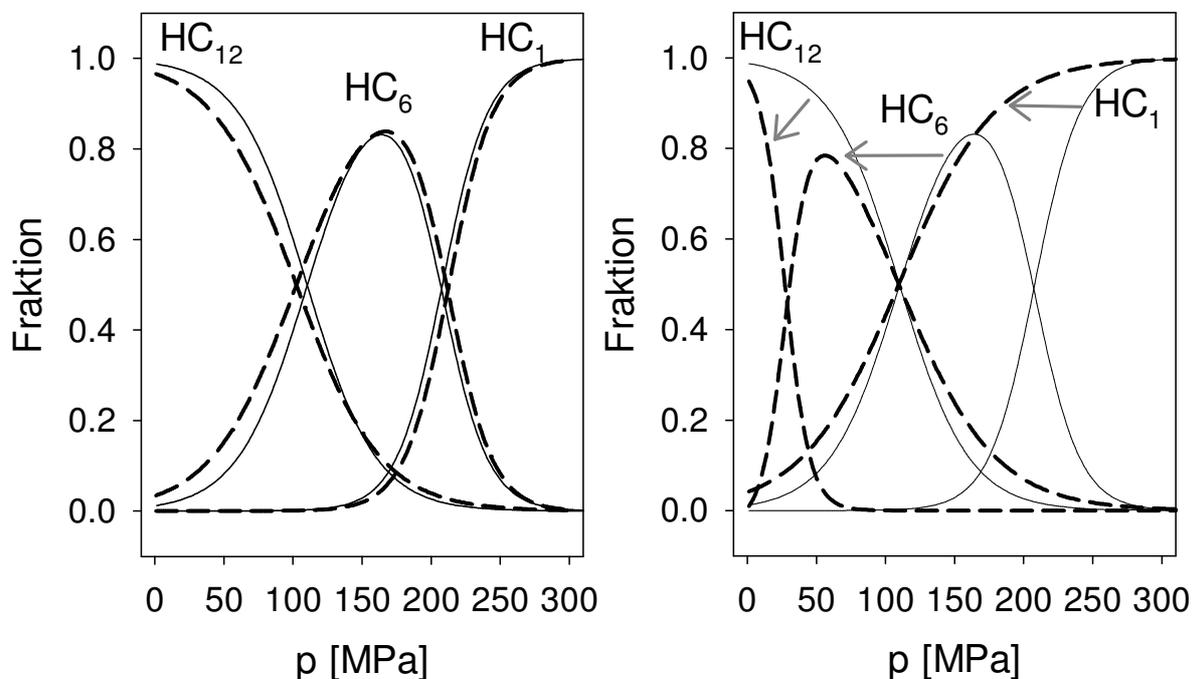


Abb. 4.16: Verteilungen des *Homarus* Hämocyanins von Dodekamer (HC<sub>12</sub>), Hexamer (HC<sub>6</sub>) und Monomer (HC<sub>1</sub>) gemäß dem DHM-Modell in Abhängigkeit vom Druck. Links: Einfluss von CO (---) auf die Dissoziationsgleichgewichte, Rechts: L-Laktat-Effekt (---) auf die Dissoziationsgleichgewichte; (—) HC, pH 7.3, 50 mM CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub>.

Diese Destabilisierung spiegelt sich in den gemessenen Dissoziationskonstanten wieder, die in Tabelle 4.5 Dissoziationskonstanten aus Stabilitätsmessungen mit Denaturantien wie Urea, GndCl und Hofmeister-Salzen gegenübergestellt sind. Für den Zerfall des Dodekamers in die Hexamere in Anwesenheit von 50 mM Ca<sup>++</sup>, pH

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

---

7.3 wurde eine Dissoziationskonstante von  $K_0 = 4 \cdot 10^{-9}$  M ermittelt. Diese Konstante ist ca. 1 bis 2 Größenordnungen kleiner, als die Dissoziationskonstanten, die durch chemische Dissoziation ermittelt wurden. Ein Grund für die größere Stabilität des druckdissoziierten Hämocyanins könnte darin bestehen, dass bei der Dissoziation durch Denaturantien ein gewisser Anteil der Tertiär- bzw. Sekundärstruktur des Proteins denaturiert, sodass die Dissoziation begünstigt wird. Dieser Effekt lässt sich veranschaulichen, indem ein Gleichgewicht zwischen einer assoziierten [A] und einer dissoziierten Form [D], welche wiederum mit einer denaturierten, evtl. aggregierten Form [D\*] im Gleichgewicht steht, angenommen wird.



Das Reaktionsschema entspricht im Ansatz dem einfachsten irreversiblen Modell der thermischen Denaturierung (Lumry R., Eyring H., 1954), wobei in diesem Modell der Aggregationsschritt als irreversibel angenommen wird. Während der Dissoziation wird der erste Prozess betrachtet, welcher durch die Dissoziationskonstante  $K_1$  charakterisiert ist. Aufgrund der Zugabe von Urea, GndCl oder Hofmeister-Salzen steht die dissoziierte Form noch mit der denaturierten Form [D\*] über die Konstante  $K_2$  im Gleichgewicht, sodass effektiv nicht  $K_1$ , sondern das Produkt  $K_1 \cdot K_2$  beobachtet wird. Die Druckdissoziation ist in Bezug auf Denaturierungsprozesse eine schonende Methode, da die Protein-Denaturierung unter physiologischen Bedingungen in der Regel erst bei Drücken über 300 MPa einsetzt. Damit ist sichergestellt, dass tatsächlich nur die Dissoziationskonstante  $K_1$  gemessen wird. Aber auch die Kalzium- und Protonenkonzentration spielen für die Oligomer-Stabilität eine wichtige Rolle. Die Erhöhung der Kalziumkonzentration bei der Urea-Denaturierung um den Faktor 10 von 1 mM auf 10 mM, führt zu einer Abnahme der Dissoziationskonstante des Dodekamer/Hexamer-Zerfalls von  $K_0 = 2 \cdot 10^{-7}$  [M] auf  $K_0 = 5 \cdot 10^{-8}$  [M]. Im Druckexperiment wurde mit 50 mM eine 5 mal höhere Kalziumkonzentration eingesetzt. Da die Bindungskonstanten für Kalziumionen im Bereich von 0.04-0.09  $\mu\text{M}^{-1}$  für die hochaffinen Bindungsplätze und für die niedrigaffinen im Bereich von 0.2 -1  $\text{mM}^{-1}$  liegen (Brouwer M., Bonaventura C., Bonaventura J., 1983), kann davon ausgegangen werden, dass bei 10 mM alle Bindungsplätze bei Normaldruck besetzt sind.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Methode / Reagenzien	$K_0$ 12->6	$K_0$ 6->1
Druck/ pH 7.3, 50mM $\text{Ca}^{++}$	$4.0 \cdot 10^{-9}$ [M]	$1.6 \cdot 10^{-43}$ [M] <sup>5</sup>
Druck/ pH 7.3 50mM $\text{Ca}^{++}$ , + 40mM L-Laktat	$9.5 \cdot 10^{-9}$ [M]	$3.6 \cdot 10^{-28}$ [M] <sup>5</sup>
Urea*/ pH 7.8 10mM $\text{Ca}^{++}$	$5 \cdot 10^{-8}$ [M]	$1 \cdot 10^{-43}$ [M] <sup>5</sup>
Urea*/ pH 7.8 1mM $\text{Ca}^{++}$	$2 \cdot 10^{-7}$ [M]	$1 \cdot 10^{-40}$ [M] <sup>5</sup>

\* Daten aus Herskovits et al. (1984)

Tabelle 4.5: Dissoziationskonstanten (stöchiometrisch korrigiert) für den Dodekamer/Hexamer und den Hexamer/Monomer-Zerfall für das Hämocyanin aus *Homarus americanus* im Vergleich mit Dissoziationskonstanten, die aus Stabilitätsuntersuchungen mit Urea gewonnen wurden.

Weitere Druckdissoziationsstudien in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration müssen aber zeigen, wie stark der Druck die Bindungskonstanten für Kalziumionen, und diese wiederum das Dissoziationsgleichgewicht beeinflussen.

Durch Zugabe von 40 mM L-Laktat vergrößert sich die Dissoziationskonstante des Dodekamer/Hexamer-Zerfalls von  $K_0^\# = 9.5 \cdot 10^{-4}$  auf  $K_0^\# = 2.2 \cdot 10^{-3}$ , was mit einer Absenkung der freien molaren Dissoziationsenergie von 16.9 auf 14.8 kJ/mol korrespondiert (Abb. 4.18). Dadurch verschiebt sich das Dodekamer-Hexamer-Gleichgewicht in Richtung der Hexamere. Der Druck, bei welchem Dodekamere und Hexamere zu gleichen Anteilen vorliegen, verschiebt sich unter dem Einfluss des Effektors um 90 MPa von 120 MPa auf ca. 30 MPa (Abb. 4.16, rechts). Die Differenz des chemischen Potentials zwischen Dodekamer und Hexamer ist unter diesen Bedingungen  $\Delta\mu_p = 0$  (Abb. 4.18, links).

Die druckabhängige Dodekamer/Hexamer-Dissoziation führt in Anwesenheit des Effektors L-Laktat zu einer Volumendifferenz von  $\Delta V = -470$  ml/mol. In Abwesenheit des Effektors wurde ein Dissoziationsvolumen von  $\Delta V = -136$  ml/mol gemessen. Die größere Volumendifferenz in Anwesenheit des Effektors kann durch strukturelle Änderungen in der Quartärstruktur erklärt werden, die mittels SAXS-Messungen gezeigt werden konnten (Hartmann H. et al., 2001). In Abb. 4.17, links ist der Differenzplot der Abstandsverteilungsfunktionen des Hämocyanins ohne Effektor und

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

der Abstandsverteilungsfunktion mit L-Laktat gezeigt. Die dazugehörige molekulare Interpretation ist auf der rechten Seite von Abb. 4.17 schematisch veranschaulicht. Unter dem Einfluss von L-Laktat rücken die beiden Hexamere um ca. 1.1 nm dichter zusammen, wodurch die größeren Abstände in ihrer Wahrscheinlichkeit abnehmen.

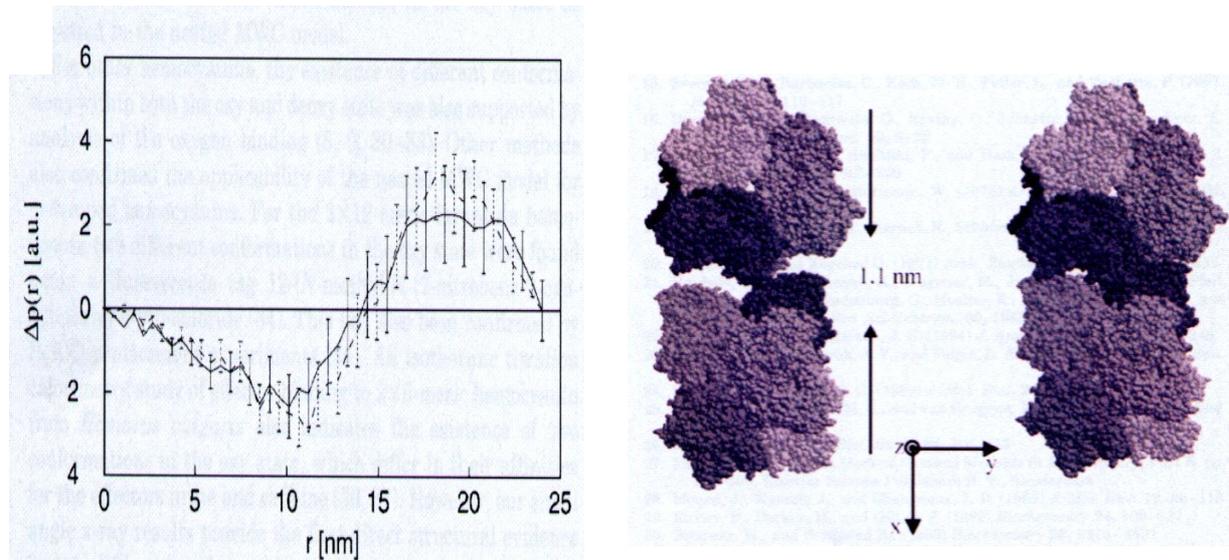


Abb. 4.17, Links: Differenzplot der Abstandsverteilungsfunktionen gemessen mit small angle x-ray scattering ohne und mit 40 mM L-Laktat. Rechts: HC-Modell zur Erklärung des Effektor-Einflusses. Abb. aus Hartmann et.al. (2000), *JBC*.

Das führt zu positiven Werten im Differenzplot der Abstandsverteilungsfunktionen ab Abständen von ca. 15 nm. 23 nm entspricht dem längsten Abstand innerhalb des Gesamtmoleküls, entlang der Längsachse des Moleküls. Gleichzeitig vergrößert L-Laktat durch das induzierte Zusammenrücken die gemeinsame Kontaktfläche der Hexamere. Dissoziieren beide Hexamere voneinander, wird deshalb eine größere Kontaktfläche gegenüber dem Lösungsmittel exponiert, welche hydratisiert. Die damit einhergehende Volumenverminderung führt zum beobachteten größeren Dissoziationsvolumen.

Im Folgenden soll der Hexamer/Monomer-Dissoziationsprozess näher betrachtet werden. Die ermittelte Gleichgewichtskonstante (siehe Tabelle 4.5) für das effektorfreie Hämocyanin in Anwesenheit von 50 mM  $\text{Ca}^{++}$  entspricht in guter Näherung der Gleichgewichtskonstanten, welche durch Dissoziationsstudien mit Urea in Anwesenheit von 10 mM  $\text{Ca}^{++}$ , pH 7.8 ermittelt wurden. Dagegen zeigt die

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Urea-Dissoziation, welche in Anwesenheit von 1 mM  $\text{Ca}^{++}$  durchgeführt wurde, eine um 3 Größenordnungen verminderte Stabilität. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die niedrig-affinen  $\text{Ca}^{++}$ -Bindungsplätze bei 10 mM abgesättigt sind und damit mit großer Wahrscheinlichkeit auch nicht für das oben besprochene labilere Dodekamer/Hexamer-Gleichgewicht verantwortlich sind.

Analog zum Dodekamer/Hexamer-Gleichgewicht bewirkt L-Laktat eine drastische Verschiebung des Hexamer/Monomer-Gleichgewichts, wobei dieses zur Monomer-Fraktion verschoben wird. Die unkorrigierte Dissoziationskonstante unter Normalbedingungen  $K_0^\#$  erhöht sich durch die Anwesenheit des Effektors um ca. 16 Größenordnungen. Aufgrund des ungenauen Fits des sequentiellen DHM-Modells kann diese Erhöhung allerdings nur als grober Richtwert angesehen werden. In Abb. 4.18, rechts entspricht dies einer Verringerung der freien molaren Dissoziationsenergie bei Normaldruck um 80 kJ/mol. Das Maximum der hexameren Fraktionsverteilung in Abb. 4.16 wird durch L-Laktat von 150 MPa auf 50 MPa verschoben. Dadurch verlagert sich der Übergang der monomeren Fraktion von 215 MPa auf ca. 110 MPa. Der Nulldurchgang der chemischen Potentialdifferenz (Abb. 4.18, rechts) wird korrespondierend dazu von 230 MPa auf ca. 180 MPa verschoben. Dieser Wert ist um ca. 70 MPa zu klein. Die Diskrepanz lässt sich wiederum durch den ungenauen Fit und die damit ungenau bestimmten Dissoziationsgrade erklären (Abb. 4.11).

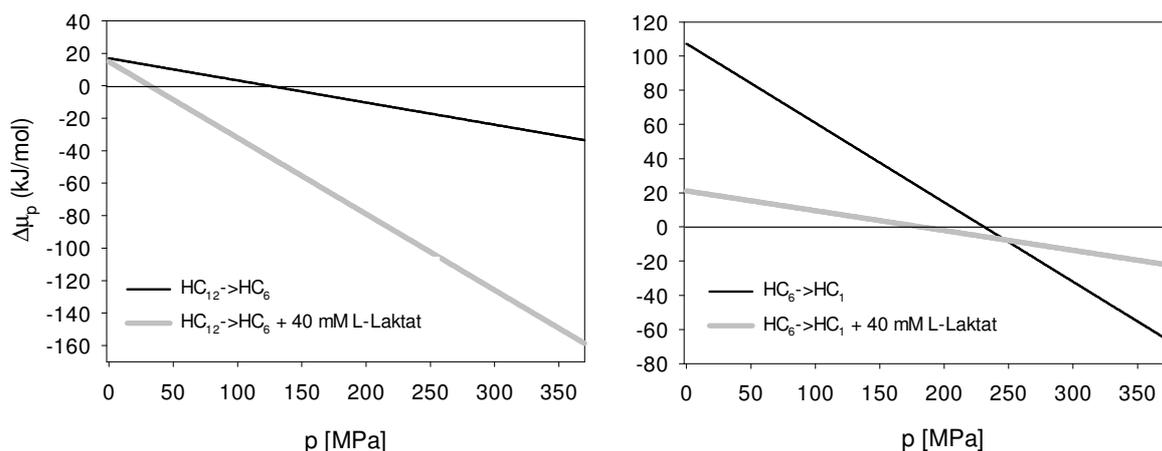


Abb. 4.18: Druckabhängige chemische Potentialdifferenz für die Dissoziation des 12-meren Hämocyanins mit und ohne L-Laktat. Links: Dodekamer-Hexamer-Zerfall. Rechts: Hexamer-Monomer-Zerfall.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

---

Wie aus Abb. 4.17 hervorgeht, steigt aufgrund des durch L-Laktat bedingten Zusammenrückens der Hexamere die Anzahl kürzerer Abstände im Gesamtmolekül. Diese bestehen zum Großteil aus neu geknüpften Hexamer-Hexamer-Kontakten. Da die Stabilität aber dabei insgesamt abnimmt, müssen stabilisierende Hexamer-Hexamer-Bindungen aufgrund des durch L-Laktat induzierten Konformationsübergangs destabilisiert werden. Zusammengefasst sind somit die Hexamer-Hexamer-Kontakte in Anwesenheit von L-Laktat trotz dichter Packung und zahlenmäßiger Überlegenheit in der Summe energetisch ungünstiger als die zahlenmäßig geringeren Hexamer-Hexamer-Kontakte des effektorfreien Hämocyanins.

Das Dissoziationsvolumen ist für den Hexamer/Monomer-Zerfall in Abwesenheit von L-Laktat ( $\Delta V = -464$  ml/mol) deutlich größer als in Anwesenheit des Effektors ( $\Delta V = -116$  ml/mol). Dieser Befund kann anhand bestehender funktioneller Studien und Modelle erklärt werden. Das erfolgreichste Modell zur Erklärung von Funktion-Struktur-Beziehungen innerhalb von Arthropoden-Hämocyaninen – das Nesting-Modell, wurde bereits im Kapitel 4.1 kurz erwähnt. Es fordert die Existenz einer allosterischen Einheit. Innerhalb dieser allosterischen Einheit, welche im dodekameren Hämocyanin aus *Homarus americanus* durch ein Hexamer repräsentiert wird, nehmen alle Untereinheiten dieselbe Konformation an. Im Nesting (eingebettet)-Konzept (Wyman, 1964, 1968, 1972) wird diesem Umstand Rechnung getragen, indem der Konformationszustand des Dodekamers durch die Konformation des Gesamtmoleküls (R oder T) bzw. des Halbmoleküls (r oder t) charakterisiert wird. Liegt das Gesamtmolekül in der R-Konformation vor, ergeben sich somit 3 verschiedene Konformations-Zustände rRrR, rRtR bzw. tRtR.

Sauerstoffbindungskurven können Auskunft über die Konformationsverteilung geben. In Abb. 4.19 ist die Konformationsverteilung ohne (links) und mit L-Laktat (rechts) des dodekameren Hämocyanins aus *Homarus americanus* über dem Sauerstoffpartialdruck aufgetragen. Bei 150 Torr ( $O_2$ -Normaldruck), in Abwesenheit des Effektors, wird die Sauerstoffbindung durch 60% rT- und je 20% tR und rR-Konformationen bestimmt. Die Zugabe von 40 mM L-Laktat liest selektiv die rR-Konformation aus, welche bei Normaldruck das Sauerstoffverhalten mit 100%igen Anteil bestimmt. Durch Hämoglobin-Sauerstoffbindungsstudien in Abhängigkeit unterschiedlicher Wasseraktivitäten (Colombo M.F., Seixas F.A.V. ,1999) konnte gezeigt werden, dass die Konformationen R und T, welche analog zum Hämocyanin

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

in Bezug auf ihre Sauerstoffaffinität definiert sind, unterschiedlich mit Wasser interagieren. Infolge des Oxygenierungsprozesses kommt es je nach Anionenkonzentration zur Anlagerung von 25 bis 72 Wassermolekülen an das Hämoglobin-Molekül. Das oxygenierte Hämoglobin im R-Zustand weist damit eine größere Hydratisierung auf als der deoxygenierte T-Zustand. Ein analoger Effekt konnte beim 24-meren Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* gemessen werden (Hellmann N., Raithel K., Decker H., 2003). Infolge der Dissoziation des hexameren Hämocyanins vollziehen die isolierten Untereinheiten einen Konformationsübergang in die hochaffine R-Konformation. Infolgedessen kommt es zur Hydratisierung – ein Prozess der mit einer Volumenverkleinerung einhergeht, und damit das Dissoziationsvolumen erhöht. Da in Anwesenheit von 40 mM L-Laktat bereits alle Untereinheiten in der R-Konformation vorliegen, ist durch den Hydratisierungsprozess infolge des Konformationsübergangs kein Beitrag zu erwarten. Das Dissoziationsvolumen besteht in diesem Fall nur aus Beiträgen, welche infolge der Dissoziation der Untereinheiten-Kontaktfächen entstehen.

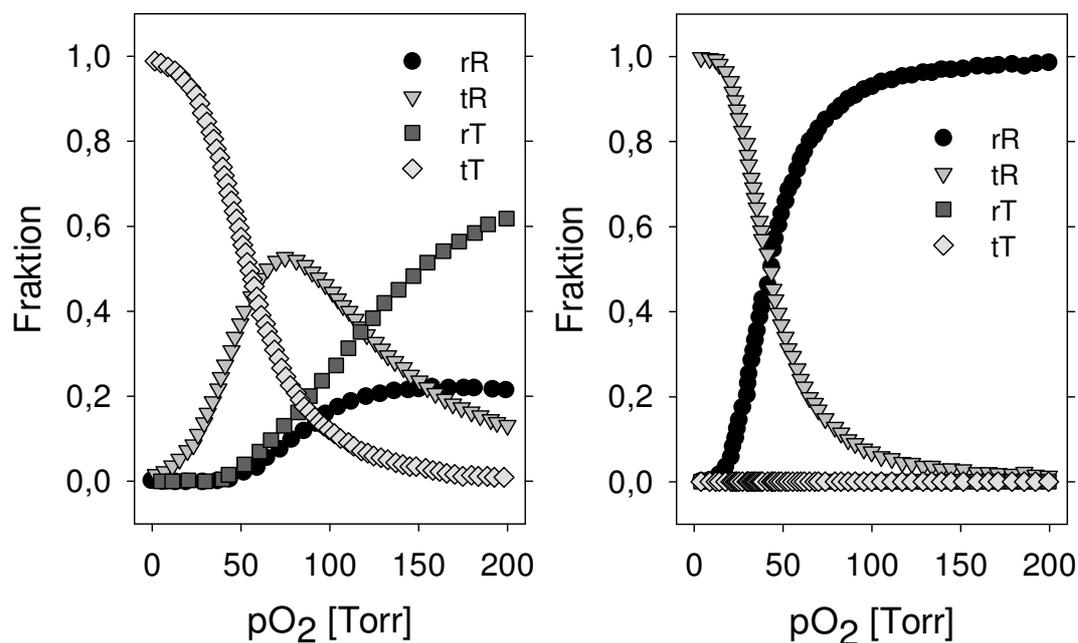


Abb. 4.19: Konformationsverteilung: Links, ohne Einfluss von L-Laktat; Rechts, bei Zugabe von 40 mM L-Laktat aus Gebhardt R. (2000) Diplomarbeit.

##### 4.4 Ergebnisse und Diskussion zu Lichtstreu- und Stabilitätsmessungen des 24-meren Hämocyanins aus *Eurypelma californicum*.

Anhand dynamischer Lichtstremessungen kann überprüft werden, ob die durch Funktionsstudien vorhergesagten, unterschiedlichen Konformationen auf der Ebene der Quartärstruktur direkt nachzuweisen sind. Dazu wurde eine oxygenierte und mit Dithionit deoxygenierte Hämocyaninprobe (1 mg/ml, pH 7.3, 20 °C, 1 bar) über einen Winkelbereich von 30° bis 150° vermessen. Um Verfälschungen durch Staubpartikel vorzubeugen, wurden für den Fit zwei Exponentialfunktionen herangezogen. Allerdings zeigte die Analyse, dass die Amplitude des langsameren, durch Staub hervorgerufenen Prozesses bei weniger als 4% lag. Die aus dem Fit erhaltenen Zerfallsraten sind in Abb. 4.20 über  $q^2$  aufgetragen. Nach dem Streugesetz (Formel 3.37) ergibt sich bei monodispersen Proben ein linearer Zusammenhang, aus dessen Anstieg sich der Diffusionskoeffizient ermitteln lässt.

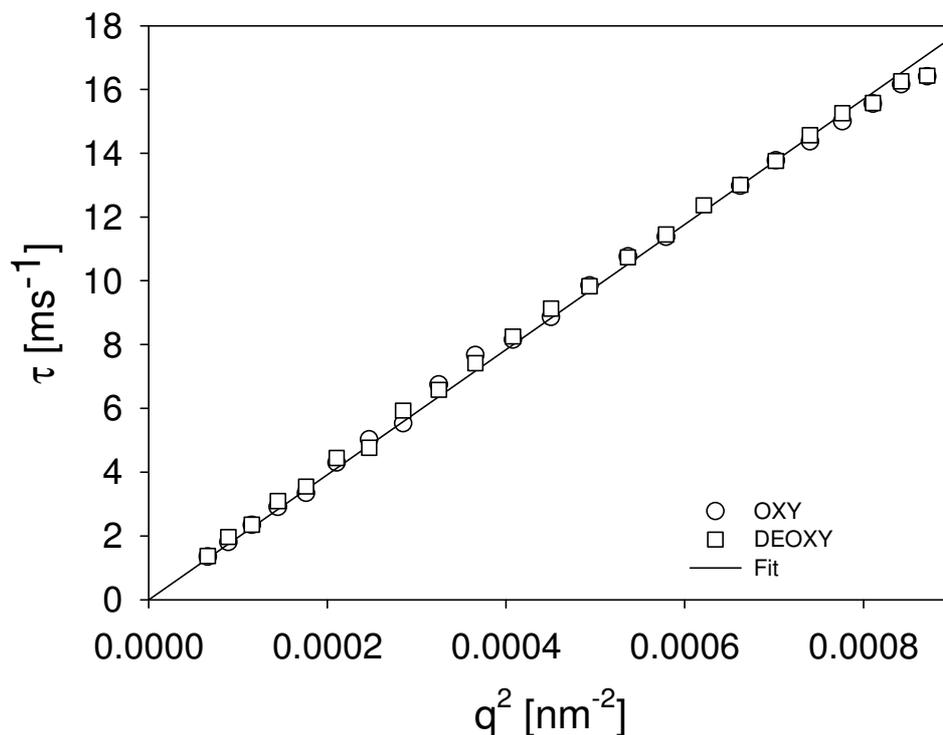


Abb. 4.20: Linearer Zusammenhang zwischen den Korrelationsraten des 24-mer und dem Quadrat des Streuvektors  $q$  bei 20 °C.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

---

Wie aus Abb. 4.20 direkt abzulesen ist, unterscheiden sich die Zerfallskonstanten für die oxygenierte bzw. deoxygenierte Form über den gesamten Winkelbereich nicht. Die Diffusionskoeffizienten wurden nach Formel (3.42) in hydrodynamische Radien umgerechnet und die Fehler aus der linearen Regression bestimmt. Für deoxygeniertes Hämocyanin wurde ein Radius von  $11.45 \pm 1$  nm und für oxygeniertes Hämocyanin ein Radius von  $11.55 \pm 1$  nm bestimmt. Im Rahmen der Fehler ist damit kein Größenunterschied zwischen oxygeniertem und deoxygeniertem Hämocyanin festzustellen.

Zwei Konzentrationen (0.8 bzw. 2.6 mg/ml) des 24-meren Hämocyanins aus *Eurypelma californicum* wurden im Druckexperiment einer Druckdissoziation unterzogen. Wie aus Abb. 4.21 zu entnehmen ist, erfolgt die Druckdissoziation konzentrationsunabhängig. Dieser Befund ist im Einklang mit früheren Druckdissoziationsstudien (Silva J.L., Weber G., 1993) an Proteinkomplexen. Sie haben gezeigt, dass der Dissoziationsprozess von Komplexen mit einer Untereinheitenzahl  $>2$  eine geringe bzw. keine Konzentrationsabhängigkeit aufweisen. Eine strenge Konzentrationsabhängigkeit der Dissoziationskonstante gemäß Formel (2.9) konnte bisher nur für Dimere experimentell nachgewiesen werden.

Die Daten der Druckdissoziation lassen sich mit einem einfachen Übergangsmodell für den Zerfall eines 24-mers in 24 Untereinheiten ohne Zwischenzustand beschreiben. Die Dissoziationskonstante  $K_0^\#$  und das molare Dissoziationsvolumen  $\Delta V$  wurden gemäß Abb. 2.2 für diesen Modellansatz bestimmt (kleine Grafik – in Abb. 4.21). Mit Hilfe dieser Werte (Tabelle 4.6) konnte der Dissoziationsgrad  $\alpha^{24,1}$  modelliert werden, indem folgende Gleichung vom Grad vierundzwanzig

$$0 = \alpha^{24} + K_0 \cdot e^{\left(\frac{-p\Delta V}{RT}\right)} \alpha - K_0 \cdot e^{\left(\frac{-p\Delta V}{RT}\right)} \quad (4.13)$$

numerisch gelöst wurde. Die Ergebnisse der Kalkulation beschreiben die Messdaten in guter Übereinstimmung.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

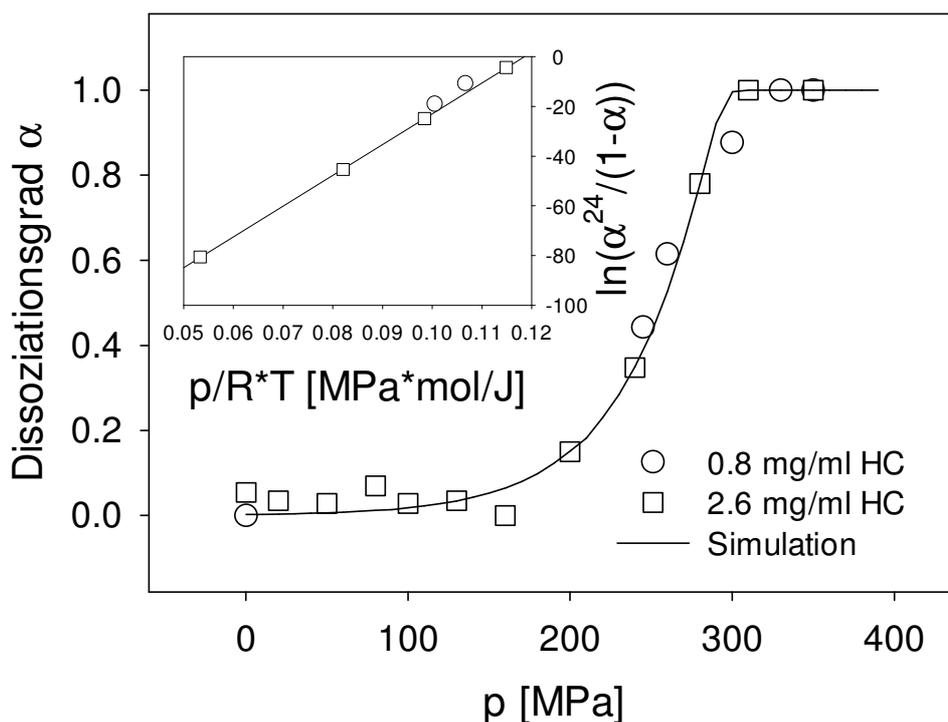


Abb. 4.21: Konzentrationsunabhängiger Druckeffekt auf den Dissoziationsgrad bei 90°-Streugeometrie des 24-meren Hämocyanins (0.8 bzw. 2,5 mg/ml). Nebenbild:  $\ln(\alpha^{24}/(1-\alpha))$  aufgetragen über Druck zur graphischen Bestimmung des Dissoziationsvolumens und der Dissoziationskonstante.

	$\Delta V$ HC [ml/mol]	$K_0$ HC [ $M^{23}$ ] (1mg/ml)	$K_0^\#$ HC	$\Delta\mu^\#$ [kJ/mol]
24->1	-1237.14	$1.28 \cdot 10^{-175}$	$1.94 \cdot 10^{-64}$	357.5

Tabelle 4.6: Molares Dissoziationsvolumen  $\Delta V$  und in Bezug auf die Stöchiometrie und Konzentration korrigierte und nichtkorrigierte (#) Dissoziationskonstante sowie die daraus berechnete freie molare Dissoziationsenergie (bei Normaldruck)  $\Delta\mu^\#$ , bestimmt aus der Druckdissoziation des 24-meren Hämocyanins aus *Eurypelma californicum*.

Stabilitätsuntersuchungen (Hübler R. et al., 1998), welche mit verschiedenen Denaturantien wie Urea, GdnHCl und Salzen der Hofmeister-Serie durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass das 24-mere Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* in die intakten Untereinheiten zerfällt, ohne dass intermediäre Zwischenzustände daran beteiligt wären. Dieser Befund konnte durch die hier beschriebenen

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

---

Druckexperimente bestätigt werden. Für die Stabilitätsuntersuchungen in (Hübler et al., 1998) wurde allerdings kein Dissoziationsmodell zur Interpretation herangezogen. Infolgedessen kann die hier durch Druckexperimente bestimmte Dissoziationskonstante auch nicht direkt mit einer durch chemische Dissoziation ermittelten Konstante, verglichen werden. Der aus Tabelle 4.6 in Bezug auf die Stöchiometrie korrigierte Wert der Dissoziationskonstante von  $K_0 = 2.58 \cdot 10^{-175} \text{ M}^{23}$  deutet aber an, dass sich das Dissoziationsgleichgewicht unter Normalbedingungen stark verschoben auf der Seite des 24-mers befindet. Im Vergleich zum 12-meren Hummer-Hämocyanin ähnelt die Stabilität des 24-meren Spinnen-Hämocyanins mehr der Stabilität des hexameren Halbmoleküls ( $K_0 = 1 \cdot 10^{-43} \text{ M}^5$ ) als der des dodecameren Gesamt-moleküls ( $K_0 = 4 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ ). Dazu lässt sich ein physiologischer Bezug herstellen. Funktionelle Untersuchungen konnten zeigen, dass der Hexamer/Dodekamer-Anteil der Hämocyanine in der Hämolymphe von Krebstieren reguliert werden kann und deshalb neben Allosterie und Kooperativität die Sauerstoffbindung maßgeblich beeinflusst (Decker H, Föll R., 2000).

Im Gegensatz zum 12-meren Hummer-Hämocyanin denaturieren bzw. aggregieren die isolierten Untereinheiten unter Druck nicht. Deshalb konnte die Reassozi-ation des Hämocyanins nach der Druckentspannung verfolgt werden. In Abb. 4.22 sind die druckabhängige Dissoziation und die Assoziation vergleichend dargestellt. Nach der Druckentspannung kommt es bei Normaldruck zu einem Anstieg der relativen Lichtstreuintensität um den Faktor 1.8. Dieser Effekt ist auf einige wenige größere Aggregate zurückzuführen. Es ist deutlich zu erkennen, dass Assoziation und Reassozi-ation nicht dieselbe Druckabhängigkeit haben, sondern eine Hysterese zeigen. Der Druck in Abb. 4.22, bei welchem das Molekulargewicht auf die Hälfte des Ausgangs- bzw. Endwertes abgefallen/ bzw. angestiegen ist, verschiebt sich infolge dieses Hystereseeffektes von 250 MPa auf ca. 30 MPa. Abb. 4.23 zeigt die häufigsten Radien, die im Gleichgewicht bei 240 MPa im Verlauf des Druckaufbaus und der Entspannung gemessen wurden. Bei 240 MPa, während der Druckaufbauphase, herrschen Partikel mit Radien von 10 nm vor. Dagegen weisen die Partikel bei 240 MPa, während der Druckabbauphase, Radien von 3.5 nm auf. Diese können Hämocyanin-Untereinheiten zugeordnet werden.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

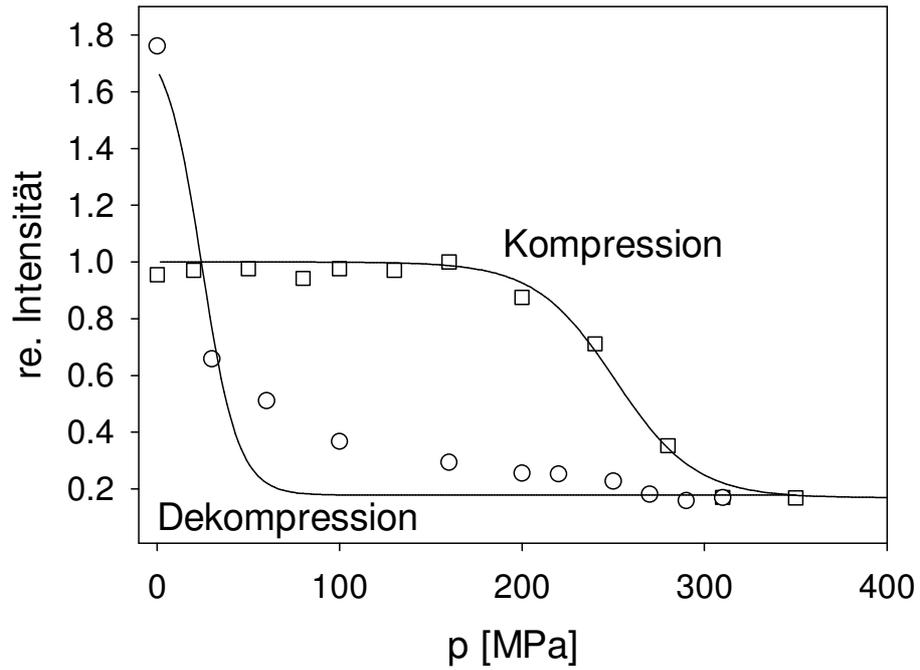


Abb. 4.22: Hysterese des Kompressions- und Dekompressionszyklus von 24-meren Hämocyanin. Messdaten für die Hinreaktion (□) und Rückreaktion (○) sind zur besseren Veranschaulichung durch einen einfachen Übergang angenähert.

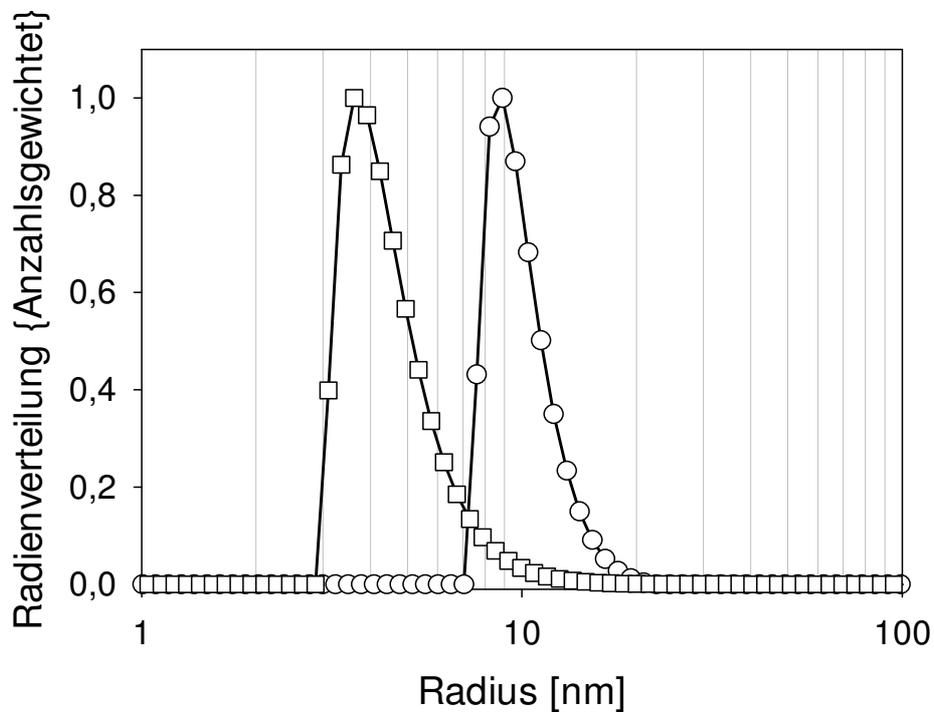


Abb. 4.23: Anzahlsgewichtete Radienverteilung bei 240 MPa, gemessen während des Druckaufbaus (-○-) bzw. während der Druckentspannung (-□-).

### 4.5 Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse

Abb. 4.24 zeigt eine allgemeine Übersicht der Dissoziationsvolumina aus den untersuchten Hämocyanin-Dissoziationsgleichgewichten. Die strukturelle Hierarchie der Hämocyanine spiegelt sich in drei wichtigen Kontaktflächen wieder.

#### 1. Die Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten innerhalb eines Hexamers:

Für die Hexamer-Monomer-Dissoziation wurde ein Dissoziationsvolumen von -464 ml/mol bestimmt. Aufgeteilt auf die 6 Untereinheiten entspricht das einer Volumendifferenz von  $\Delta V_{UE} \approx 77$  ml/mol. Alle Untereinheiten stehen über 4 Kontaktflächen mit 4 weiteren Untereinheiten in Wechselwirkung. Jeder Kontaktfläche kann nach

$$\Delta V_{UE.Kontakt} = 2 \cdot \frac{\Delta V_{UE}}{n} \quad n: \text{Anzahl der Kontaktflächen}$$

ein Dissoziationsvolumen von 39 ml/mol zugeordnet werden, was dem Volumen von 2 Bulk-Wassermolekülen bzw. im Mittel 2.5 an der Proteinoberfläche gebundenen Wassermolekülen entspricht (Gerstein M., Chothia C., 1996).

#### 2. Der Hexamer-Hexamer-Kontakt innerhalb eines identischen Halbmoleküls:

Für die Dissoziation des Dodekamers in zwei Hexamere wurde ein Dissoziationsvolumen von -136 ml/mol ermittelt. Dies entspricht dem Volumen von 8 Bulk-Wassermolekülen bzw. 9 an der Proteinoberfläche gebundenen Wassermolekülen.

#### 3. Die Kontaktfläche zwischen zwei Halbmolekülen im 24-mer:

Der Kontakt zwischen zwei Dodekameren besteht im 24-meren Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* über die Untereinheiten b und c. Im Vergleich zu den anderen Untereinheitenkontakten innerhalb des Gesamtmoleküls ist dieser der stabilste.

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Eine ähnliche Dissoziationsenergie wurde für die Monomere innerhalb des 24-meren Hämocyanins aus *Eurypelma californicum* ermittelt (14.8 kJ/mol).

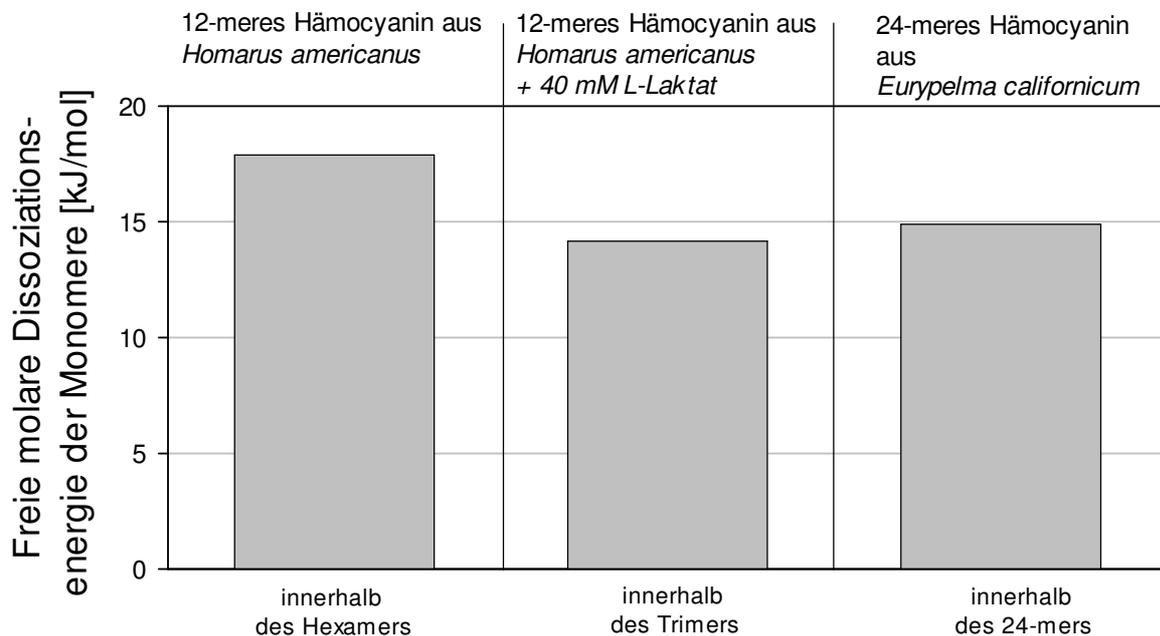


Abb. 4.25: Vergleich der freien molaren Dissoziationsenergien der monomeren Untereinheiten innerhalb der strukturellen Hierarchien der Arthropoden-Hämocyanine.

#### 4.6 Probenpräparation

Der amerikanische Hummer (*Homarus americanus*) wurde in einem lokalen Fischgeschäft („Poseidon“ am Viktualienmarkt, München) gekauft. Die Hämolymphe wurde dem auf Eis gelagerten Tier mittels einer Kanüle am hinteren Ende des Carapax entnommen. Zur Gerinnung wurde die Hämolymphe für ca. 2h in einer U-Glasschale stehengelassen. Das Gerinnungsprodukt wurde zerkleinert und bei 30000 g für 40 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Gelchromatographie aufgereinigt und der Hauptpeak mit 12-meren Hämocyanin selektiert und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Der verwendete Laufpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 0.1 M Tris/HCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.3. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 279 nm bzw. 340 nm bestimmt.

Das 24-mere Spinnen-Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* wurde vom Institut für Molekulare Biophysik, Mainz bezogen. Die Präparation ist beschrieben z.B. in Hellmann N. et al., (2000).

## 5 Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

### 5.1 Allgemeine Übersicht

Kaseine bilden ca. 80% des Gesamtproteingehalts der Milch. Ihre Aufgabe ist, Kalzium und Phosphat zum Neugeborenen zu transportieren. Mit Hilfe der Ultrazentrifuge konnte 1936 Petersen die Uneinheitlichkeit des Kaseins nachweisen. Im Jahre 1939 gelang es Mellander, drei wichtige Hauptfraktionen,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Kaseine elektrophoretisch zu trennen. Von der  $\alpha$ -Kasein-Fraktion existieren die Typen  $\alpha_{S1}$ - und  $\alpha_{S2}$ -, die wiederum ähnlich wie  $\beta$ - und  $\kappa$ -Kaseine noch in verschiedenen Varianten vorkommen. Sie unterscheiden sich in einzelnen Aminosäuren und im Phosphorylierungsgrad. Im Vergleich zu anderen Proteinen weisen Kaseine einige Besonderheiten auf. Allgemein werden Kaseine als strukturlos angesehen. Aufgrund ihrer extrem flexiblen Struktur, die eine Kristallisation unmöglich macht, existieren keine hochaufgelösten Strukturdaten. NMR-Messungen konnten, aufgrund der hohen Tendenz der Kaseine zur Selbstassoziation, nur an Kasein-Peptiden durchgeführt werden. Kaseine können als random coil (Zufallskneul) mit wenig oder keiner regulären Sekundärstruktur angesehen werden (Herskovits T.T., 1966). Abweichungen von einer reinen Zufallsstruktur wurden durch CD- (Alaimo M. H. et al., 1999; Farrell Jr. H. M. et al., 2002), Raman- (Smyth E. et al., 2000), und IR-Spektroskopie (Curley D. M. et al., 1998) sowie „Molekular modeling-Methoden“ (Kumosinski T. F. et al., 1993; Kumosinski\* T. F. et al., 1993) und NMR (Huq N. L., Cross K. J., Reynolds E. C., 1995) gefunden, die auf kurzlebige Sekundärstrukturen hinweisen.

Bedeutsam für die Struktur in Kaseinen sind zum einen Prolinreste, die die Sekundärstrukturen brechen. Zum anderen haben kalziumionen-bindende bzw. hydrophobe Aminosäuren einen starken Einfluss auf das Assoziationsverhalten der Kaseine. Im Folgenden sollen die einzelnen Kaseine aus der Kuhmilch hinsichtlich dieser Kriterien beschrieben werden.

Das  $\alpha_{S1}$ -Kasein besteht aus einer 199 Aminosäurereste umfassenden Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 23600 Da. Sie verfügt über zwei hydrophobe Randbereiche, die alle vorkommenden Prolinreste enthalten und einer

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

---

zentral gelegenen polaren Region, die 7 von 8 Phosphoserinresten und 12 Carboxylgruppen aufweist (Abb. 5.1, links).

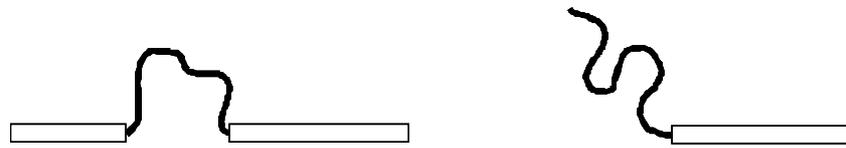


Abb. 5.1: Repräsentation polarer (Linie) und unpolarer (Kästen) Bereiche der Kasein-Polypeptidketten; Links: schematische Darstellung des  $\alpha_{S1}$ -Kaseins: zwei hydrophobe, unpolare Regionen begrenzen einen polaren Sequenzabschnitt (train-loop-train); Rechts: schematische Darstellung des  $\beta$ - und  $\kappa$ -Kaseins: eine polare gefolgt von einer ungeladenen hydrophoben Region (tail-train-Struktur)

Das  $\alpha_{S2}$ -Kasein mit einem Molekulargewicht von 25000 Da besteht aus 207 Aminosäuren. Es weist eine stark dipolare Struktur auf, mit einer Anhäufung negativ geladener Aminosäuren am N-terminalen Ende und positiv geladener Aminosäuren am C-Terminus. Es enthält zwei Cystein-, elf Phosphoserin- und zehn Prolinreste.

$\alpha$ -Kaseine sind sehr sensitiv auf  $\text{Ca}^{++}$  und präzipitieren schon bei geringen Kalziumkonzentrationen, wobei  $\alpha_{S2}$ - noch leichter als  $\alpha_{S1}$ -Kasein ausfällt.

Das  $\beta$ -Kasein besteht aus 209 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 24000 Da. Die Polypeptidkette besitzt eine stark geladene N-terminale Region und einen hydrophoben C-Terminus (Abb. 5.1, rechts). Die fünf Phosphoserine, die als  $\text{Ca}^{++}$ -Bindungsstellen in Betracht kommen, befinden sich in der N-terminalen Region, die darüber hinaus fast die gesamten ionisierbaren Reste des Moleküls enthält. Unter den Kaseinen ist  $\beta$ -Kasein das am stärksten hydrophobe Protein.

Das  $\kappa$ -Kasein ist als einziges Kasein bei den in der Milch vorkommenden Kalziumkonzentrationen löslich. Es ist in der Lage  $\alpha_{S1}$ - und  $\beta$ -Kasein durch Komplexbildung vor der Ausfällung zu schützen. Die Polypeptidkette verfügt über 169 Aminosäurereste und ein Molekulargewicht von 19000 Da. In der Hydrophobizität (Dickinson E., Horne D. S., Pinfield V. J., Leermakers F. A. M., 1997; Dickinson E., Pinfield V. J., Horne D. S., Leermakers F. A. M., 1997) ist  $\kappa$ -Kasein ein Spiegelbild von  $\beta$ -Kasein, bestehend aus einer hydrophoben N-terminalen Region und einem hydrophilen, hoch geladenen C-Terminus. Beide Teile lassen sich durch

Lysozym an der Peptidbindung -Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup>- in das hydrophobe para- $\kappa$ -Kasein und das hydrophile  $\kappa$ -Kasein-Glykopeptid separieren.

### 5.1.1 Supra-molekulare Struktur der Kasein-Mizelle

Kaseine liegen hauptsächlich als kolloidale Partikel vor, die Kasein-Mizellen genannt werden. Die Radien der Mizellen sind breit verteilt. Das Maximum der Radienverteilung liegt bei ca. 100 nm, was durch Lichtstreuungsmessungen bestätigt wurde (Bauer R. et al., 1995). Die supra-molekulare Struktur der Kasein-Mizelle ist immer noch eine wissenschaftliche Herausforderung und wird ausführlich besprochen von Schmidt D. G. (1982), Walstra P. (1990), Holt C. (1992) und Horne D.S.(1992). Generell können drei Arten von Modellen unterschieden werden: Coat-Core-Modelle, Untereinheiten-Modelle und innere Struktur-Modelle.

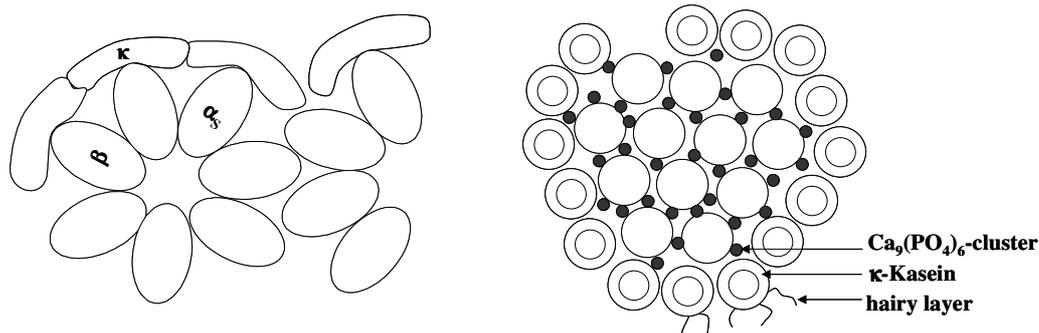


Abb. 5.2: Links: Coat-Core-Modell; Rechts: Kasein-Submizell-Modell.

Das erste Kasein-Modell war ein sogenanntes Coat-Core-Modell und wurde von Waugh und Noble Mitte der 60er Jahre vorgeschlagen. In diesem Modell sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kaseine durch hydrophobe Wechselwirkungen assoziiert und von einer  $\kappa$ -Kaseinschicht bedeckt (Abb. 5.2, links). Grösse und Wachstum der Mizelle sind stark von der frei verfügbaren Menge an  $\kappa$ -Kasein abhängig. Über die Lokalisation von Kalziumphosphat innerhalb der Mizelle gibt das Modell noch keine Auskunft.

Kasein-Submizell-Modelle (Abb. 5.2, rechts), die auf Überlegungen von Schmidt, Walstra und Morr basieren, sind in der Lage, Einbau und Verbleib von Kalziumphosphat in der Mizelle zu erklären. Sie nehmen an, dass die Kasein-Mizellen aus kleineren sphärischen Untereinheiten aufgebaut sind. Die

#### 4. Zur Druckstabilität des 12- und 24-meren Hämocyanins

Stabilitätsuntersuchungen (Hübler et.al, 1998) haben gezeigt, dass das 24-mer Hämocyanin aus *Eurytelma californicum* unter dem Einfluss von Denaturantien wie Urea oder GdnHCl komplett in die einzelnen Untereinheiten dissoziiert. Der Befund wird durch die oben beschriebenen Druckexperimente bestätigt. Die Dissoziation des 24-meren Hämocyanin kann durch einen einfachen Übergang ohne stabilen Zwischenzustand beschrieben werden. Aus den Messungen wurde ein Dissoziationsvolumen des 24-mers von -1237 ml/mol ermittelt, welches in etwa dem doppelten Wert des Zerfallsvolumens für das Dodekamer (-600 ml/mol) aus *Homarus americanus* entspricht. Damit weisen beide Arthropoden-Hämocyanine bezogen auf die monomere Untereinheit ein gleiches Dissoziationsvolumen von -50 ml/mol auf.

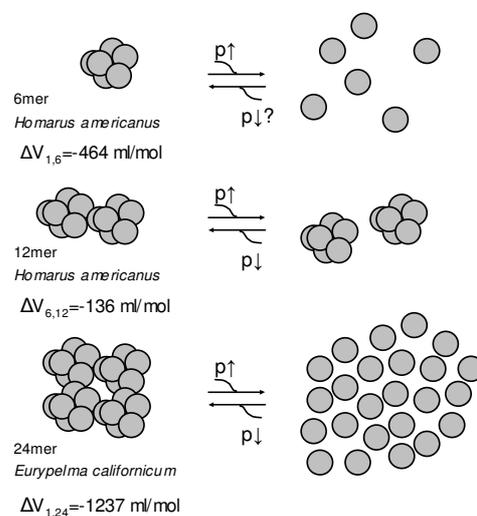


Abb. 4.24: Ermittelte Dissoziationsvolumina für die Hexamer/Monomer, Dodekamer/Hexamer und 24-mer/Monomer-Dissoziationsgleichgewichte der Arthropoden-Hämocyanine,  $\Delta V_{i,j} = V_i - V_j$ .

Abb. 4.25 zeigt zusammenfassend die Stabilitäten der monomeren Untereinheiten innerhalb des strukturellen Aufbaus der untersuchten Arthropoden – Hämocyanine. Beim Hämocyanin aus *Homarus americanus* liegt die freie molare Dissoziationsenergie bezogen auf ein Monomer unter normalen effektorfreien Bedingungen innerhalb der Hexamere bei ca. 18 kJ/mol. Der allosterische Effektor L-Laktat senkt beim Hämocyanin aus *Homarus americanus* die freie molare Dissoziationsenergie der Monomere innerhalb des Trimers auf 14.1 kJ/mol ab.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

Untereinheiten, die auch Kasein-Submizellen genannt werden, zeigen eine Variabilität in ihrer Zusammensetzung. Es können grob zwei Haupttypen unterschieden werden: Submizell-Typ 1: enthält hauptsächlich  $\alpha_s$ - und  $\beta$ -Kasein; Submizell-Typ 2: enthält  $\alpha_s$  und  $\kappa$ -Kasein (Walstra, P., 1999).

Die Submizellen haben einen Durchmesser von 10-15 nm und sind über colloidales Kalziumphosphat verbunden. Die annähernd kugelförmigen Kalziumphosphatcluster mit der chemischen Zusammensetzung  $(Ca_9(PO_4)_6)$  (Schmidt D.G., 1982) weisen einen Durchmesser von ca. 1 nm auf.

An der Außenseite der Mizelle lagern sich Submizellen an, die  $\kappa$ -Kasein enthalten. Das C-terminale Ende der  $\kappa$ -Kaseinkette ragt aus der Oberfläche der Mizelle heraus und bildet eine haarige Schicht. Sie verhindert durch elektrostatische und sterische Abstoßung ein weiteres Anlagern von Submizellen. Weiterhin dient sie als Emulgator zwischen dem hydrophoben Inneren der Mizelle und der wässrigen Umgebung. Für das Kasein-Submizell-Modell sprechen elektronenmikroskopische Befunde. Sie zeigen sowohl Unebenheiten von der Dimension der Submizellen auf der Oberfläche der Mizelle als auch frei in Lösung vorkommende Submizellen (Schmidt, Walstra, Buchheim, 1973).

Die dritte große Modellgruppe, die „inneren Strukturmodelle“ beschreiben spezifische Interaktionen zwischen Kaseinen (Abb. 5.3).

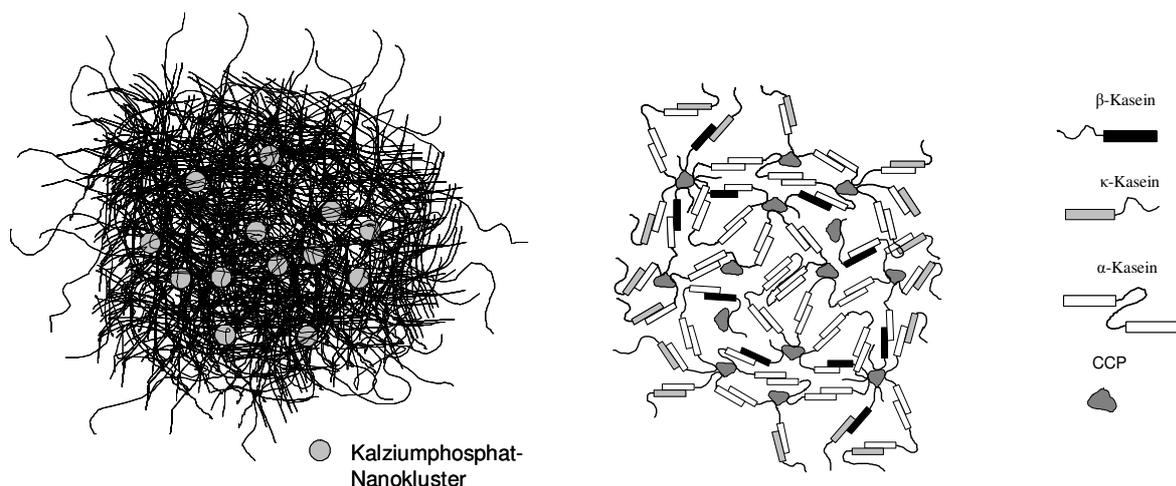


Abb. 5.3: Links: Inneres Strukturmodell; Rechts: Abgeleitetes Inneres Strukturmodell von Horne D. S, 1998.

Die Kasein-Mizelle wird als dreidimensionales Netzwerk ungeordneter Polypeptidketten angesehen, welches zur Oberfläche hin zunehmend diffuser wird. Analog zu den Coat-Core- und Kasein-Submizell-Modellen wird die Mizelle von einer haarigen Schicht, die hauptsächlich aus  $\kappa$ -Kasein besteht, umgeben. Im Gegensatz zur ihrer Funktion in Kasein-Submizell-Modellen wirken Kalziumphosphat-Nanocluster nicht als Bindeglied zwischen Kasein-Submizellen sondern werden als Cross-Linker und Wachstumszentren für Kaseine betrachtet. Die Wechselwirkung erfolgt über Phosphoserinreste (Walstra P., 1999), die dabei neutralisiert werden. Dadurch werden wiederum auch hydrophobe Kontakte ermöglicht (Horne D. S., 1998), die neben den elektrostatischen Wechselwirkungen für den Zusammenhalt der Mizelle von großer Bedeutung sind.

### 5.1.2 Wechselwirkungen innerhalb der Kasein-Mizelle

In der Mizelle kommen  $\alpha_{S1-}$ ,  $\alpha_{S2-}$ ,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Kasein im Verhältnis (3 : 0.8 : 3 : 1) vor. Der kolloidale Zustand wird durch die Selbstassoziation der Kaseine erreicht. Der hohe Gehalt an hydrophoben Aminosäuren und der Aminosäure Prolin ist essentiell, um die Ausbildung einer globulären Struktur zu verhindern, die anderenfalls nichtpolare Aminosäuren im Inneren vergraben würde (Holt, Sawyer, 1989).

Die Interaktionen zwischen den Kaseinen innerhalb der Mizelle werden durch eine Balance zwischen anziehenden hydrophoben und abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen (Horne D.S., 1998) beherrscht. Während die hydrophoben Interaktionen die Selbstassoziation bewirken, bestimmen die elektrostatischen Interaktionen den Assoziationsgrad und limitieren das Wachstum. Zum Beispiel bewirkt ein erhöhter pH-Wert eine erhöhte Ladung bei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kaseinen und damit eine Verringerung der Mizellen-Größe, während eine erhöhte Ionenstärke die elektrostatische Abstoßung vermindert, was wiederum zur Vergrößerung der Mizelle führt (Payens T.A., Brinkhuis J.A., van Markwijk B.W., 1969; Schmidt D.G., 1970a; Schmidt D.G., 1970b). Neben der Absenkung des pH-Wertes kann die elektrostatische Abstoßung im Falle der phosphorylierten Mitglieder der Kasein-Familie durch Zugabe von  $Ca^{++}$  unterdrückt werden, wobei die  $Ca^{++}$ -Sensitivität in folgender Reihenfolge abnimmt ( $\alpha_{S2-} > \alpha_{S1-} > \beta$ - Kasein).

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

---

Das  $\alpha_{S1}$ -Kasein zeigt eine deutliche Lag-Phase in der Aggregationskinetik (Horne D.S., Dalgleish D.G., 1980). Dies fordert die Existenz einer Keimbildung und einen sequentiellen Wachstumsmechanismus (Dalgleish D.G., Paterson E., Horne D. S., 1981).

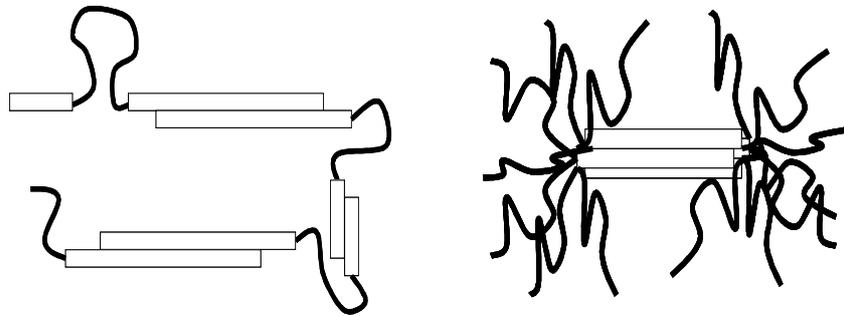


Abb. 5.4: Links: Möglicher Assoziationsmechanismus für  $\alpha_{S1}$ -/ $\alpha_{S2}$ -Kasein; Rechts: Assoziations-mechanismus für  $\beta$ -/ $\kappa$ -Kasein

Die in Abb. 5.4, links skizzierte Struktur für  $\alpha_{S1}$ -Kasein mit zwei hydrophoben Enden bildet gemäß dem Horne-Modell eine wurmartig assoziierte Polypeptidkette. Auch  $\alpha_{S2}$ -Kasein sollte mit ähnlicher Ladungsverteilung und Hydrophobizität nach diesem Mechanismus assoziieren. Im Gegensatz dazu, ist für  $\beta$ -Kasein ein Monomer-Mizell-Gleichgewicht gefunden worden (Abb. 5.4, rechts) (Vreeman H.J. et al., 1977).  $\kappa$ -Kasein ist trotz des strukturellen Spiegelbildcharakters zu  $\beta$ -Kasein nicht in der Lage zu aggregieren, da es nicht in der Lage ist  $Ca^{++}$  in signifikanten Mengen zu binden, um die elektrostatische Abstoßung zu überwinden.

Kaseinmizellen werden durch einen Bürstensaum (*salted brush*), der zum Großteil aus  $\kappa$ -Kasein besteht, sterisch stabilisiert. Die  $\kappa$ -Kasein-Moleküle sind in der Oberfläche der Mizelle verankert und ragen in das Lösungsmittel.

Die Ladungen entlang der  $\kappa$ -Kasein-Kette sind gut abgeschirmt, so dass benachbarte Ladungen, sowohl derselben als auch verschiedener Ketten, nur schwach interagieren. Der Bürstensaum kann einen scharfen Konformationswechsel vollziehen (de Kruif C. G., Zhulina E. B., 1996), von einem stark ausgeweiteten in einen kollabierten Zustand. Dieser Übergang kann entweder durch Verminderung der Ionenstärke in der Lösung oder durch Verringerung der Bürstensaumdicke induziert werden. Während letzteres z.B. durch enzymatischen Abbau mittels Labenzyme

geschehen kann, ist es möglich die Ladungsdichte am Bürstensaum durch Variation des pH-Wertes zu ändern. Der Übergang zum kollabierten Bürstensaum ist typischerweise von der vollständigen Destabilisierung des kolloidalen Zustands begleitet.

### 5.1.3 Einfluss von Hochdruck auf die Kasein-Mizelle

Erste statische Lichtstreuuntersuchungen an assoziiertem  $\beta$ -Kasein unter hohem Druck konnten zeigen, daß diese wichtige Komponente der Kasein-Mizelle bei Raumtemperatur und Drücken bis 150 MPa kontinuierlich dissoziiert (Payens T.A.J., Heremans K., 1969). Bei Drücken über 150 MPa kommt es zur Reassoziierung des dissoziierten  $\beta$ -Kaseins. Dagegen konnte bei niedrigen Temperaturen keine Druckdissoziation beobachtet werden. Ähnlich wie bei Raumtemperatur setzt aber bei Drücken über 200 MPa eine Assoziation ein. Die Dissoziation und Reassoziierung des  $\beta$ -Kaseins unter Druck werden von den Autoren als verschiedene Phänomene angesehen.

Bei Kasein-Mizellen führt die Hochdruckbehandlung zum irreversiblen Zerfall in kleinere Bestandteile. Dies konnte durch die Anwendung abbildender Verfahren wie Elektronenmikroskopie (Needs E.C. et al., 2000) oder AFM (Regnault S. et al., 2004), durch Trübungsmessungen (Anema S.G., et al., 1997) sowie durch direkte Messung der Partikelgrößen (Desobry-Banon S., Richard F., Hardy J., 1994) jeweils nach der Hochdruckbehandlung nachgewiesen werden. Anhand elektronenmikroskopischer Messungen wurde der Zerfall von 100-300 nm großen Kasein-Mizellen in Cluster von Kasein-Submizellen mit einer breiten Größenverteilung beobachtet (Shibauchi, Y., Yamamoto, W. and Sagara Y., 1997; Gaucheron, F. et al., 1997). Andererseits gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass dem Druckzerfall der Mizellen eine Vergrößerung des Mizellenradius vorausgeht (Anema S.G. et al., 1997; Anema S.G., Lowe E.K., Stockmann R., 2004).

Die Kasein-Mizellen-Dissoziation geht mit einer Exponierung hydrophober Gruppen der Milchproteine einher (Shibauchi, Y., Yamamoto, W. and Sagara Y., 1997; Needs E.C. et al., 2000; Anema S.G. et al., 1997).

Das Mineralgleichgewicht in Kasein-Mizellen wird durch die Druckanwendung verschoben. Dabei können zwei Effekte unterschieden werden, die zur Ionisierung

aufgrund elektrostriktiver Effekte führen (Huppertz T. et al., 2002). Zum einen wird das Gleichgewicht zwischen löslichem Kalzium und colloidal-gebundenem Kalziumphosphat beeinflusst. Zum anderen kommt es unter Druck zur Dissoziation von an Kaseinen assoziiertem Kalzium. Einige Autoren haben keinen (Johnston D.E., Austin B.A., Murphy R.J. 1992b) bzw. nur einen geringen Einfluss (Lopez-Fandino R., 1998) der Hochdruckbehandlung auf die freie Kalziumkonzentration in Milch gefunden. Dagegen zeigen Experimente von (Needs E.C. et al., 2000), dass nach einer Druckbehandlung mit 200 MPa die freie Kalziumkonzentration ansteigt. Der Nachweis der Kalziumkonzentration wurde bei allen Experimenten nach der Druckbehandlung (*ex-situ*) durchgeführt. Aus diesem Grund kann der wahre Druckeffekt auf die freie Kalziumkonzentration durch die teilreversible, kalziumabhängige Reassoziation der dissoziierten Kaseine verdeckt sein.

### 5.2 Experimente zur Druckstabilität von Kasein-Mizellen

Am Anfang dieses Kapitels wird die Behandlung der Lichtstreudaten beschrieben und auf Probleme, die sich bei der Messung von milchig-trüben, unfiltrierten Proben ergeben, hingewiesen. Danach werden die experimentellen Ergebnisse zur Druckstabilität der Kasein-Mizellen beschrieben und interpretiert.

Zunächst wird der Druckdissoziationsprozess der Kasein-Mizellen in Abhängigkeit von pH, Kalziumkonzentration und Temperatur untersucht. Die Ergebnisse werden anhand thermodynamischer Modelle diskutiert. Die Modelle wurden in Anlehnung an das Kasein-Submizellen-Modell (Walstra P., 1999) bzw. an das innere Strukturmodell-Konzept (Horne D.S., 1998) entwickelt.

Danach werden AFM-Messungen an Kasein-Mizellen beschrieben, welche nach einer Hochdruckbehandlung durchgeführt wurden. Ziel der Untersuchung war, die irreversiblen Druckeffekte sichtbar zu machen. Zur Interpretation der Ergebnisse werden *in-situ* Lichtstreuexperimente, die parallel zu den *ex-situ* AFM-Messungen durchgeführt wurden, herangezogen.

### 5.2.1 Messdatenerfassung und deren weitere Behandlung

Die Druckdissoziation der Kasein-Mizellen macht sich in der Lichtstreuung durch eine Abnahme der Lichtstreuintensität bemerkbar. Da Lichtstreuexperimente das z-Mittel erfassen, wird die gemessene mittlere Lichtstreuintensität durch einige wenige große Partikel dominiert. In Abb. 5.5.a ist der Druckeinfluss auf die Breite der Kasein-Radienverteilung dargestellt. Eine Druckerhöhung von Normaldruck auf 200 MPa führt zu einer Verschmälerung der Radienverteilung und zu einer Abnahme des maximalen Radius von 150 nm auf ca. 110 nm (Abb. 5.5.b). Beide Effekte bewirken eine Aufklärung der unter Normaldruck milchig-trüben Kasein-Probe (Abb. 5.5.c). Unter Normaldruck entspricht die Intensität des transmittierten Lichts ( $I_{(650\text{nm})}$ ) einem Zehntel der Intensität des einfallenden Lichts ( $I_0$ ). Nach einer Druckerhöhung bis 100 MPa ist die Trübung der Probe praktisch verschwunden und die Intensität des transmittierten Lichts gleich der des einfallenden Lichts. Die logarithmische Darstellung der Radienverteilung in Abb. 5.5.d zeigt, dass es nach einer Druckerhöhung auf 100-200 MPa zur Bildung einer zusätzlichen Fraktion von Partikeln mit ca. 10-15 nm Radien kommt. Sie tragen mit ca. 5% zum mittleren Lichtstreusignal bei. Nach einer Druckerhöhung auf 300-400 MPa erhöht sich der Beitrag der 10-20 nm-Partikel am mittleren Lichtstreusignal auf 10-20% (Abb. 5.6.a). Der logarithmischen Auftragung der Radienverteilungen in Abb. 5.6.b kann entnommen werden, dass ab 300 MPa auch Radien von ca. 1 nm in den Verteilungen auftreten. Der Hauptbeitrag zur Lichtstreuintensität im Druckbereich ab 300 MPa wird aber durch Teilchen mit maximalen Häufigkeitswerten der Radien um 200-300 nm geliefert. Bei diesen Partikeln handelt es sich um Staub, welcher sich aus präparativen Gründen in der Probe befindet. Die Größe der Staubpartikel liegt im selben Bereich wie die Größe der Kasein-Mizellen. Deshalb ist eine Beseitigung durch Filtern unmöglich. Der Anteil bleibt aber durch die Druckbehandlung unbeeinflusst. Bedingt durch die Dissoziation der 150 nm großen Kasein-Mizellen wächst der Streuanteil des Staubs am Gesamtsignal. Eine weitere Druckerhöhung über 300 MPa ändert die Lichtstreuintensität nicht, wie druckabhängige Kontrollmessungen bei Streuwinkeln von  $177^\circ$  und  $90^\circ$  zeigen. Der Staub kann deshalb als konstanter Beitrag zur Lichtstreuintensität behandelt und korrigiert werden.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

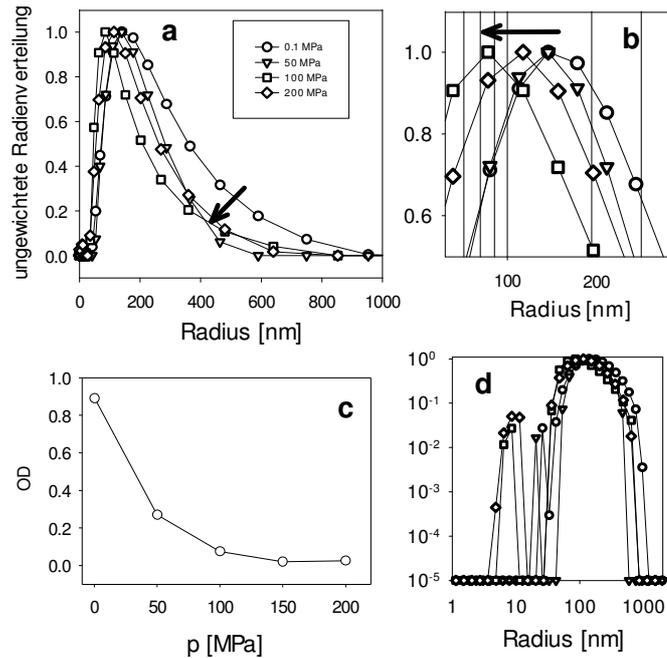


Abb. 5.5: Druckeffekt bis 200 MPa auf die Radienverteilung einer 3% Kasein-Mizellen-Lösung. a) Die Verteilung verschmälert sich mit zunehmendem Druck (siehe Pfeil). b) Der maximale Radius der Verteilung verringert sich nach Druckerhöhung auf 200 MPa um ca. ein Drittel (siehe Pfeil). c) Druckabhängigkeit der optischen Dichte d) Logarithmische Auftragung der druckabhängigen Radienverteilungen.

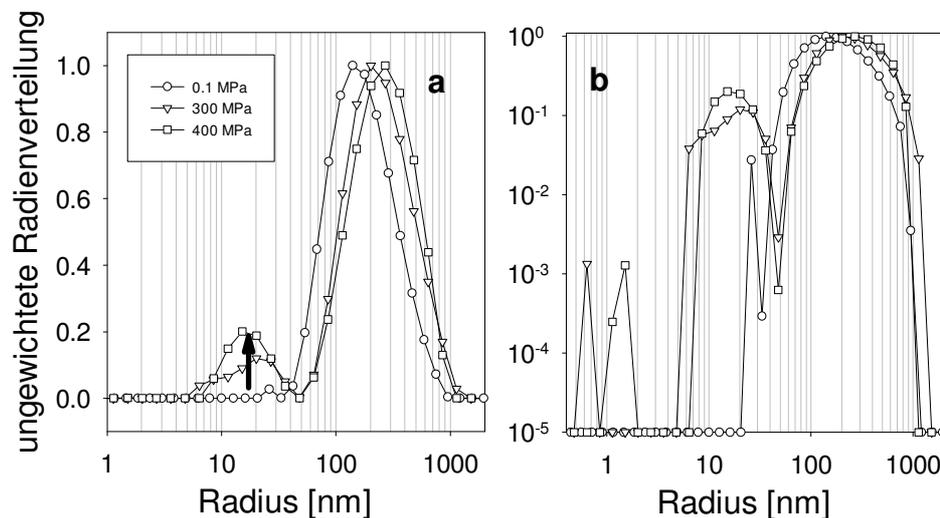


Abb. 5.6: Hochdruckeffekt (300 und 400 MPa) auf die Radienverteilung der Kasein-Mizellen. a) Ab 300 MPa tragen 10 nm Partikel mit ca. 10-20% zur mittleren Lichtstreuintensität bei. Zusätzlich gibt es eine dominierende Komponente mit 200-300 nm Partikelgröße. b) In der logarithmischen Auftragung erkennt man ab 300 MPa 1 nm Partikel, die das Zahlenmittel dominieren.

Abb. 5.7 zeigt mittlere druckabhängige Streuintensitäten, welche in  $177^\circ$  Rückstreugeometrie detektiert wurden. Ohne Untergrundkorrektur fällt die Streuintensität unter Druck auf ca. 1/6-tel ihres Anfangswertes ab (Abb. 5.7, links). Wie die schon diskutierten druckabhängigen Transmissionsmessungen zeigen, kommt es im Druckbereich bis 200 MPa zur Aufklärung der Kasein-Lösung. Die Abnahme der Trübung korrespondiert mit dem Abfall der Streuintensität um den Faktor 3. Es wurden relative Intensitäten aus den häufigsten Radien der Größenverteilungen unter der Annahme kompakter, sphärischer Kasein-Mizellen berechnet. Sie sind in Abb. 5.7, links vergleichend mit den gemessenen Intensitätswerten aufgetragen. Eine weitere Druckerhöhung von 200 MPa auf 300 MPa führt zu einer Abnahme der Lichtstreuintensität um den Faktor 2. In diesem Druckbereich zerfällt die Kasein-Mizelle vollständig in ihre Bestandteile. Aufgrund ihrer geringen Größe bestimmen aber nicht sie, sondern überwiegend die in der Lösung verbliebenen Staubpartikel sowie ein durch die Rückstremethode bedingter Lichtreflex, die Lichtstreuung. Da beide Effekte druckunabhängig sind, können sie als Untergrund abgezogen werden. Aufgrund des unbekanntem Anteils an Staub in der Probe ist diese Korrektur schwierig. Abb. 5.7, rechts zeigt den Effekt eines vollständigen Untergrundabzugs auf die gemessenen und berechneten Streuintensitäten. Im unteren Druckbereich bis ca. 200 MPa wirkt sich die Korrektur kaum auf das Verhältnis der Streuintensitäten zwischen 200 MPa und 0.1 MPa (Normaldruck) aus, wie die vergleichende Betrachtung von gemessener und berechneter Streuintensität in den Abb. 5.7, links und Abb. 5.7, rechts zeigt. Größere Abweichungen ergeben sich im höheren Druckbereich zwischen 200 und 400 MPa. In Abb. 5.8 sind dazu vergleichend die relativen Streuintensitäten der Kasein-Druckdissoziation mit und ohne Untergrundkorrektur dargestellt. Der maximale relative Fehler lässt sich auf 3% abschätzen. Er ist damit etwas kleiner als der experimentelle Fehler, der bei 5% liegt.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

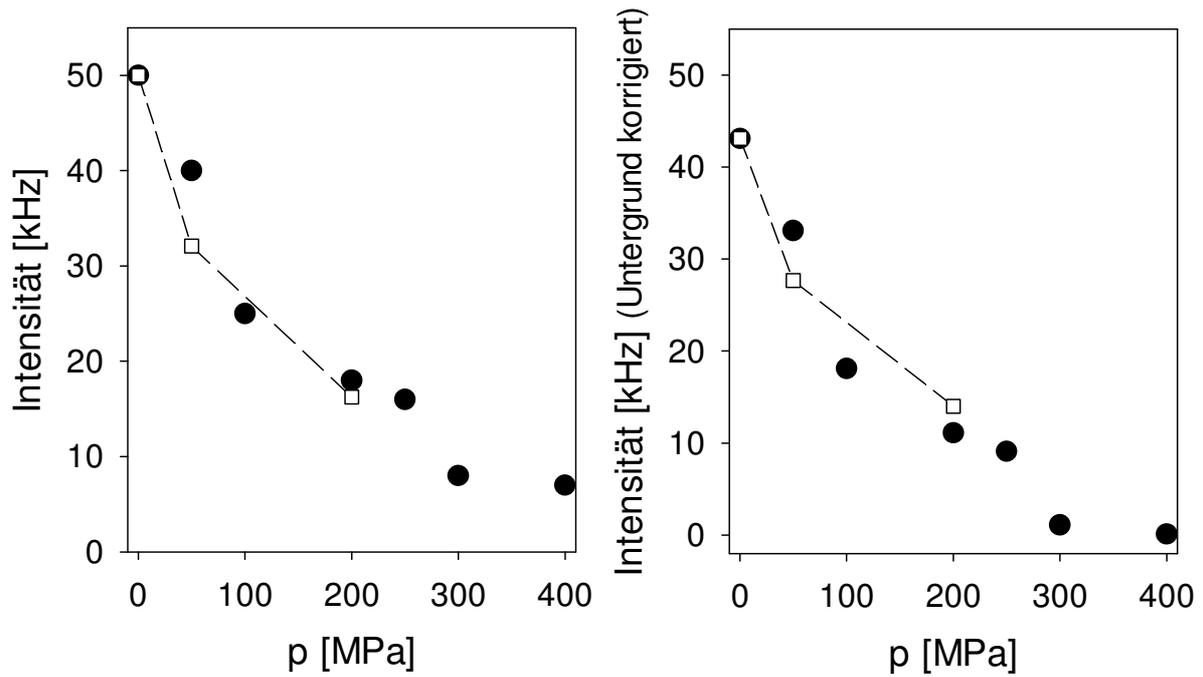


Abb. 5.7: Links: Mittlere Streuintensität (•) aufgetragen über Druck im Vergleich zu der kalkulierten Streuintensität aus den Radienverteilungen (-□-); Rechts: Streuintensität mit korrigiertem Untergrund – das Verhältnis der Streuintensitäten zwischen Normaldruck und 200 MPa bleibt in guter Näherung konstant.

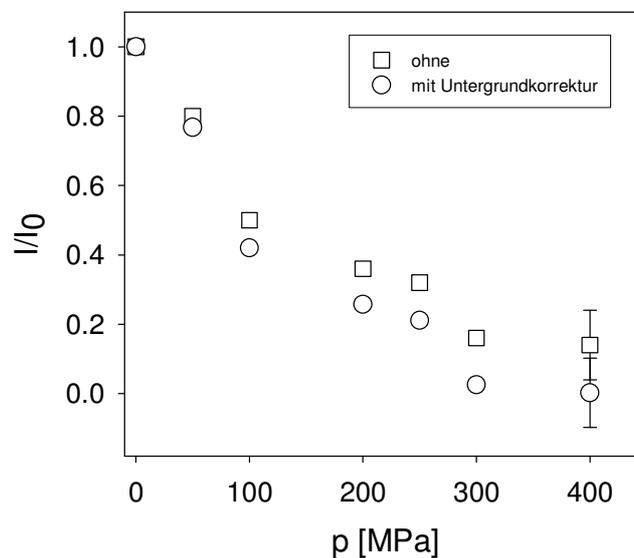


Abb. 5.8: Relative Streuintensitätsänderung unter Druck mit (○) und ohne (□) Untergrundkorrektur. Die größte Abweichung tritt bei 400 MPa auf. Der systematische Fehler aufgrund der Untergrundkorrektur liegt im Bereich des Messfehlers.

### 5.2.2 Besonderheiten der Auswertung der druckabhängigen Dissoziationskurven

Die Auswertung der Dissoziationskurven wird durch die Größe der Kasein-Mizelle und durch die hohe Konzentration der streuenden Teilchen erschwert. Da die Dimension der Kasein-Mizelle im Bereich der Lichtwellenlänge liegt, wirkt sich der Formfaktor der Mizelle auf das Lichtstreusignal aus. Eine Proportionalität zwischen gestreuter Lichtintensität und Molekulargewicht ist daher für die trübe Kaseinlösung nicht gegeben.

Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aufgrund der hohen Polydispersität der Probe. Im Folgenden soll der Einfluss einer Stabilitätsverteilung auf das Dissoziationsvolumen und die Dissoziationskonstante bei Normaldruck eines einfachen Druckübergangs getestet werden, wobei die Anzahl der Untereinheiten vernachlässigt wird. Die freie Energie der Dissoziation ist aufgrund der Polydispersität um einen mittleren Wert verteilt.

$$\delta\Delta G^{D,N} = \Delta G_j^{D,N} - \langle \Delta G^{D,N} \rangle_j \quad (5.1)$$

Die Dichte wird als gaussförmig angenommen. Zwei Übergangskurven können anhand der Formel

$$\alpha = \frac{k_0^{D,N} \cdot \exp\left(\frac{-p \cdot \Delta V}{RT}\right)}{1 + k_0^{D,N} \cdot \exp\left(\frac{-p \cdot \Delta V}{RT}\right)} \quad (5.2)$$

berechnet werden. Sie sind zusammen mit den sie bestimmenden Werten  $\Delta V$  und  $k_0$  in Abb.5.9 dargestellt. Die Kurve mit dem schärferen Übergang besitzt die größere Volumendifferenz und die kleinere Gleichgewichtskonstante und entspricht der wahren Übergangskurve.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

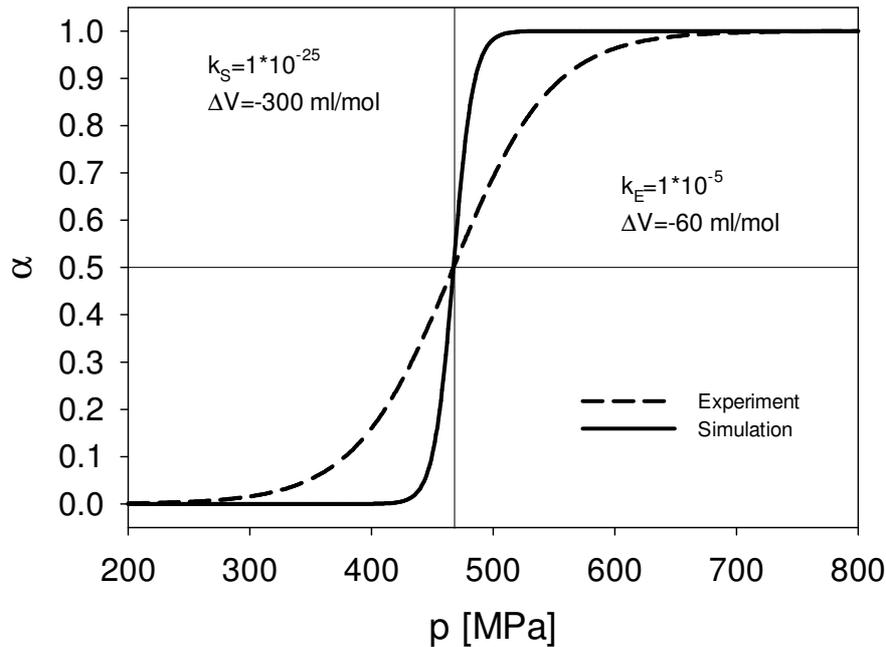


Abb.5.9: Zwei druckabhängige Übergangskurven, die sich in der Schärfe und damit in der Volumendifferenz  $\Delta V^{D,N}$  unterscheiden.

Um die Übergangskurve mit der kleineren Volumendifferenz zu erhalten, wurden gaussförmige Dichten der freien Energie  $\Delta G^{D,N}$  anhand von 100000 Zufallszahlen in 30 Klassen mit einer Standardabweichung von 2.8, 7, 14 und 17.5 kJ/mol um einen mittleren Wert der freien Übergangsenergie von 140 kJ/mol (errechnet aus  $k_S = 1 \cdot 10^{-25}$  nach Formel 2.7) erzeugt. Der neue Dissoziationsgrad lässt sich unter Berücksichtigung der Dichte der freien Energie berechnen nach

$$\alpha = \frac{\sum_j x_j \cdot \alpha_j}{\sum_j x_j}, \quad (5.3)$$

$x_j$  steht für die absolute Häufigkeit der j-ten Klasse,  $\alpha_j$  wird nach Formel (5.2) berechnet unter Benutzung der Gleichgewichtskonstante aus der j-ten Klasse. Der Wert für die Gleichgewichtskonstante  $k_j$  wurde über

$$k_j = \exp\left(-\frac{\Delta G_j^{D,N}}{RT}\right) \quad (5.4)$$

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

bestimmt. Die resultierenden Übergangskurven sind in Abb. 5.10 dargestellt. Trotz konstanter Volumendifferenz von  $\Delta V = -300$  ml/mol flacht der Anstieg der Übergangskurve zunehmend ab, indem die Verteilungsbreite der freien Energie des Übergangs vergrößert wird.

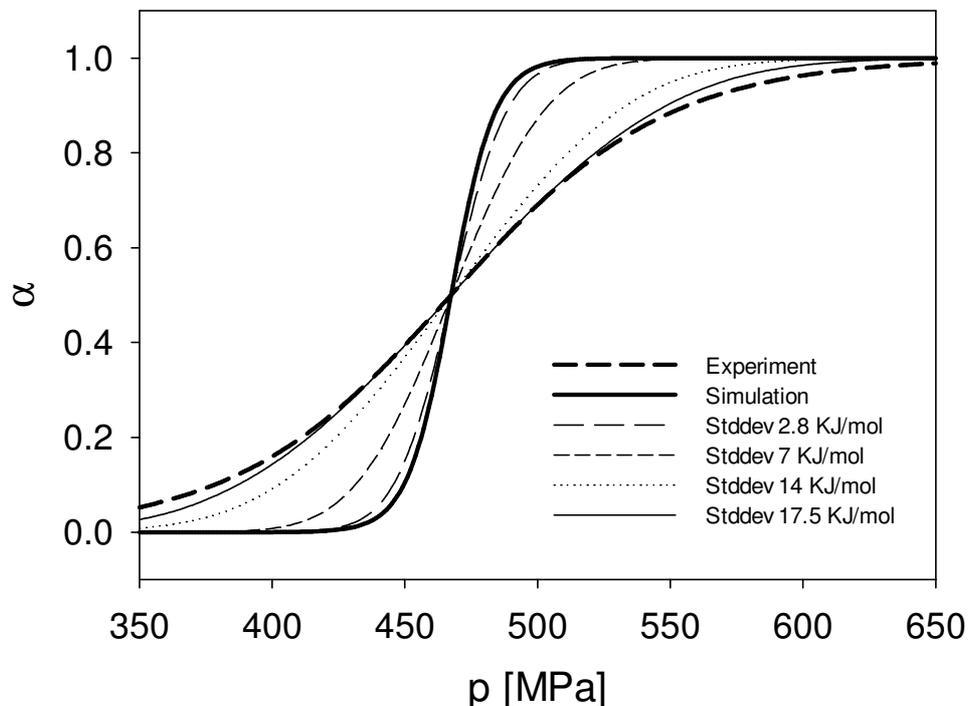


Abb. 5.10: Druckabhängige Übergangskurven. Der Anstieg der steilen Übergangskurve (—) wird zunehmend flacher je breiter die freie Energie des Übergangs verteilt ist.

Eine Verteilung der freien Energiedifferenz um 140 kJ/mol mit einer Standardabweichung von 17.5 kJ/mol führt zu einer scheinbaren Verkleinerung der Volumendifferenz von  $\Delta V = -300$  ml/mol auf  $\Delta V = -60$  ml/mol. Aufgrund der starken Polydispersität der Kasein-Mizellen ist auch von einer starken Heterogenität in der Druckstabilität auszugehen. In Bezug auf die in den folgenden Kapiteln beschriebene Druckdissoziation der Kasein-Mizellen sind die apparenten Dissoziationsvolumina deshalb möglicherweise kleiner als die wahren Dissoziationsvolumina.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

### 5.2.3 Lichtstreuexperimente an Kasein-Mizellen in Abhängigkeit von Druck, Temperatur, Kalzium- und Protonenkonzentration

Im Folgenden sollen die druckabhängigen Dissoziations-Gleichgewichtsmessungen an Kasein-Mizellen in Abhängigkeit der Einflussgrößen Temperatur, Protonen- sowie Kalziumkonzentration beschrieben werden. Obwohl Kasein-Mizellen über einen weiten Bereich dieser Einflussgrößen stabil sind, kommt es bereits bei Normaldruck unter bestimmten Bedingungen zu Stabilitäts- und Größenänderungen. Sie werden im Folgenden zunächst beschrieben.

#### Der Einfluss der Temperatur auf die Kasein-Mizelle unter Normaldruck

Kasein-Mizellen stehen mit frei im Serum vorkommenden Kaseinen in einem temperaturabhängigen Gleichgewicht. Eine Abkühlung auf 5°C führt dazu, dass ein Großteil der  $\beta$ -Kaseine aufgrund der Schwächung hydrophober Kontakte die Kasein-Mizelle verlässt und im Serum gelöst wird (Visser H. 1992; Dalgleish D.G., 1998). Noelken und Reibstein (1968) haben gezeigt, dass  $\beta$ -Kasein bei 2 °C in monomerer Form vorliegt. Der Dissoziationsprozess ist reversibel. Nach einer Erwärmung kommt es wieder zur schrittweisen Reassoziaton der  $\beta$ -Kaseine und zur Integration in die Kasein-Mizelle.

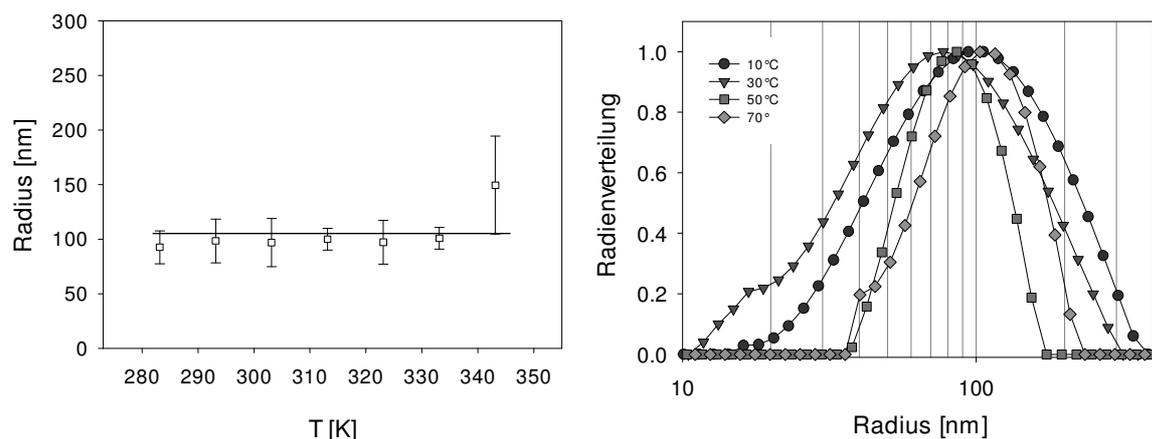


Abb. 5.11: Temperaturabhängigkeit der Radien einer hochverdünnten Kasein-Mizell-Lösung, pH 7.3. Links: Radien, erhalten durch Exponentialfit der Korrelationsfunktion; Rechts: Radienverteilung, errechnet über inverse Laplace-Transformation der Korrelationsfunktion.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

---

Innerhalb des Temperaturbereichs von 10-70°C wurden die statische und dynamische Lichtstreuung einer Kasein-Lösung bei pH 7.3 unter Normaldruck gemessen. In Abb. 5.11 sind die Ergebnisse der temperaturabhängigen Größenbestimmung gezeigt. Die Radien wurden aus den winkelabhängig gemessenen Photonen-Korrelationsfunktionen durch Fit mit zwei Exponentialfunktionen bestimmt (Abb. 5.11, links). Der Radius der Mizellen beträgt ca. 100 nm und zeigt keine temperaturabhängige Änderung. Dagegen ändert sich die Breite der Radienverteilungen, die durch inverse Laplace-Transformation der Korrelationsfunktionen berechnet wurden (Abb. 5.11, rechts). Sie verschmälert sich mit zunehmender Temperatur.

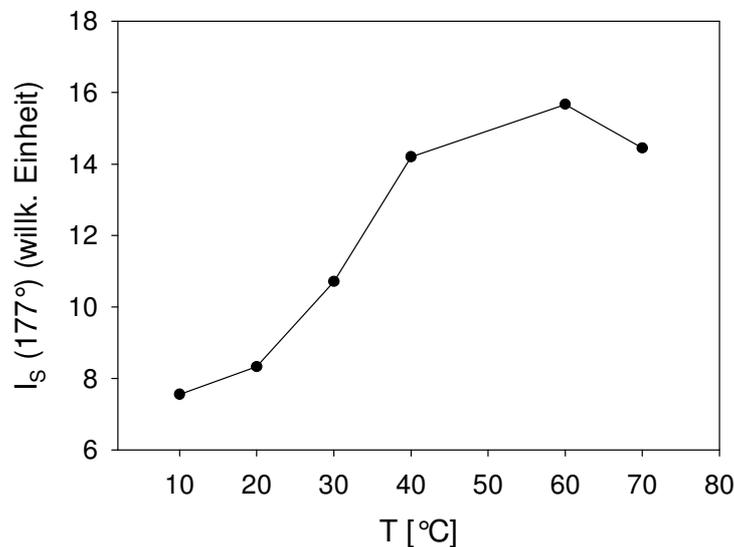


Abb. 5.12: Temperaturabhängige Lichtstreuintensität (w/v 3% Kasein, pH 7.3, 20°C), gemessen in 177° Rückstreugeometrie.

Nach einer Temperaturerhöhung von 10°C auf 70°C kommt es zur Verdopplung der Lichtstreuintensität (Abb. 5.12). Unter Vernachlässigung des molekularen Formfaktors, entspricht diesem Effekt eine Verdopplung des Molekulargewichts der Kasein-Mizelle. Eine wahrscheinliche Ursache für die temperaturabhängige Molekulargewichtsänderung ist das Reassoziationsverhalten von  $\beta$ -Kasein. Diese Hauptkomponente innerhalb der Kasein-Mizelle (38%) vollzieht in monomerem Zustand einen temperaturabhängigen Konformationsübergang in einen zur Selbstassoziation befähigten Zustand. Die Halbttemperatur des

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

---

Konformationsübergangs wurde mit 24°C (Garnier J., 1966) bzw. mit 33°C (Farrell H.M. et al., 2001) mittels sekundärstruktur-sensitiver Methoden bestimmt.

Korrespondierend zum Konformationsübergang zeigt  $\beta$ -Kasein ein temperaturabhängiges Übergangsverhalten vom monomeren zum mizellaren Zustand. Der temperaturabhängige Übergang ist konzentrationsabhängig und liegt im Bereich zwischen 15-30°C (de Kruif C. G., Grinberg V.Y., 2002).

### Der Einfluss der Kaseinkonzentration auf die Kasein-Mizelle unter Normaldruck

Neben dem Selbstassoziationsübergang der Basiskaseine, welcher z.B. für  $\beta$ -Kasein im Konzentrationsbereich von w/v  $\sim$ 0.05 % stattfindet (O'Connell J. E., 2003), vollzieht die Gesamtmizelle noch einen Übergang vom „mizellaren“ zum „gelartigen“ Zustand. Zur Charakterisierung dieses Übergangs wurde der Einfluss der Kaseinkonzentration auf die Größe der Kasein-Mizellen getestet. Dazu wurden Kaseinlösungen im Konzentrationsbereich von ca. 0.1 bis 20 Gewichtsprozent in einem 0.1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.3 hergestellt. Die dynamische Lichtstreuung der hochverdünnten Kasein-Probe (ca. 0.1 %) wurde bei 90°, die trüben Proben mit Gewichtsprozenten von 3% und höher in Rückstreuung gemessen. Die Korrelationsfunktionen wurden mit zwei Exponentialfunktionen analysiert. In einem Konzentrationsbereich bis w/v = 10% bleibt der hydrodynamische Radius der Kasein-Mizellen konstant mit ca. 100 nm. Höhere Kaseinkonzentrationen führen zu einem Anwachsen der Kasein-Mizellen. Begleitend dazu ändert sich die Konsistenz der Kaseinlösung von „flüssig“ zu „gelartig“.

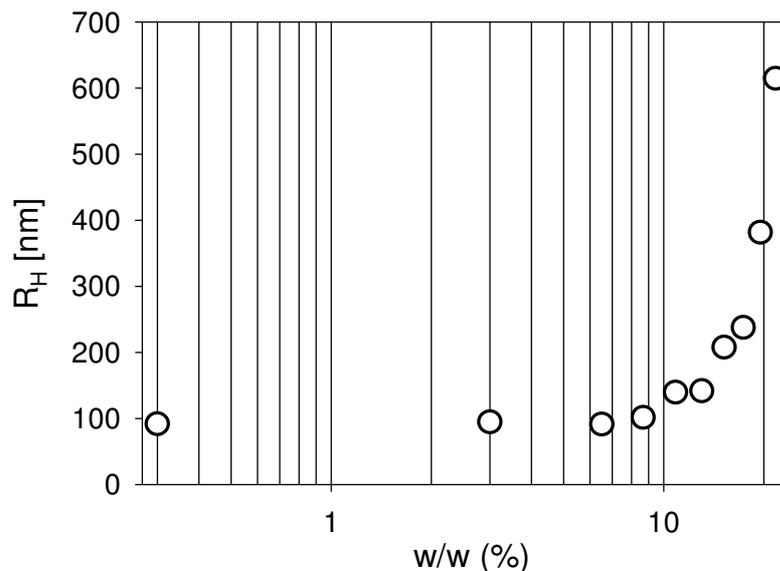


Abb. 5.13: Konzentrationsabhängigkeit der hydrodynamischen Radien der Kasein-Mizellen in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.3 und 20°C.

### Der Einfluss des pH-Wertes auf die Kasein-Mizelle unter Normaldruck

Um den Einfluss der Protonenkonzentration auf die Radien der Kasein-Mizellen bei Normaltemperatur zu untersuchen, wurden 3% Kaseinlösungen im pH-Bereich (pH 5.5 – pH 9.3) hergestellt und die dynamische Lichtstreuung in 177° Rückstreuung gemessen. Für den unteren pH-Bereich bis pH 6.6 wurde ein 0.1 M Mes/Tris-Puffer, für die höheren pH-Werte ein 0.1 M Tris-Puffer gewählt. Die Radien der Kasein-Mizelle vergrößern sich mit abnehmender Protonenkonzentration von 85 nm bei pH 5.5 auf 250 nm bei pH 9.3 (Abb. 5.14). Als Trendlinie können die Datenpunkte mit einem Polynom zweiter Ordnung angenähert werden. Eine Absenkung des pH-Wertes unter pH 5.0 führt zur Flokulation und Gelbildung (de Kruif C. G., 1998). Die hydrodynamischen Radien der in Abb. 5.14 gezeigten Literaturdaten wurden in Magermilch gemessen. Sie weichen leicht von den in dieser Arbeit gemessenen hydrodynamischen Radien im überlappenden pH-Bereich ab. Sie zeigen aber ebenfalls den Aufwärtstrend mit zunehmendem pH-Wert. Die pH-abhängige Stabilität und Größenänderung der Kasein-Mizelle wird über den aus  $\kappa$ -Kaseinen bestehende Bürstensaum vermittelt. Abhängig von der Ladungsdichte entlang der Polypeptidkette kann er einen Übergang von einem ausgeweiteten zu einem kollabierten Zustand vollziehen.

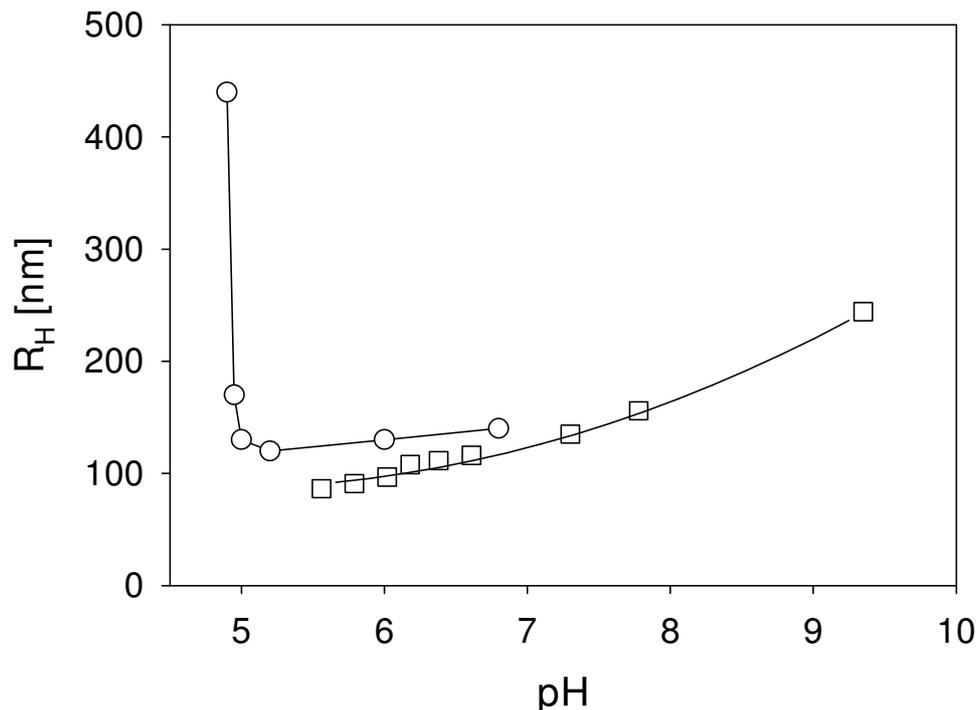


Abb. 5.14: pH-Abhängigkeit der hydrodynamischen Radien von Kasein-Mizellen unter Normaldruck. □ (w/v 3%) Kasein in 0.1 M Tris/Mes-HCl, 20°C; ○ (de Kruif C.G., 1998), gemessen in Magermilch

Unterhalb von pH 5.0 liegt der Bürstensaum im kollabierten, nahezu ungeladenen Zustand vor. Dadurch verliert er die Fähigkeit, die Kasein-Mizelle zu stabilisieren. Infolgedessen dominieren anziehende gegenüber abstoßenden Kräften zwischen den Kasein-Mizellen. Der dadurch einsetzende Aggregationsvorgang wird bei der Jogurtherstellung durch die Zugabe milchsäurebildender Bakterien initiiert.

### Der Einfluss der freien Kalziumkonzentration auf die Kasein-Mizelle unter Normaldruck

Ein ähnlicher Effekt, der bei der Käseproduktion eine wichtige Rolle spielt, kann durch die Zugabe von Kalziumionen erzielt werden. Analog zum pH-Effekt kommt es mit zunehmender Kalziumkonzentration zu einer Vergrößerung der Kasein-Mizelle (Abb. 5.15). Die hydrodynamischen Radien wachsen von 130 nm (10 mM Ca<sup>++</sup>) auf 310 nm (110 mM Ca<sup>++</sup>) an. Die Datenpunkte lassen sich über eine exponentielle

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

---

Trendlinie annähern. Höhere Kalziumkonzentrationen als 110 mM führen zur Ausflockung der Kasein-Mizelle.

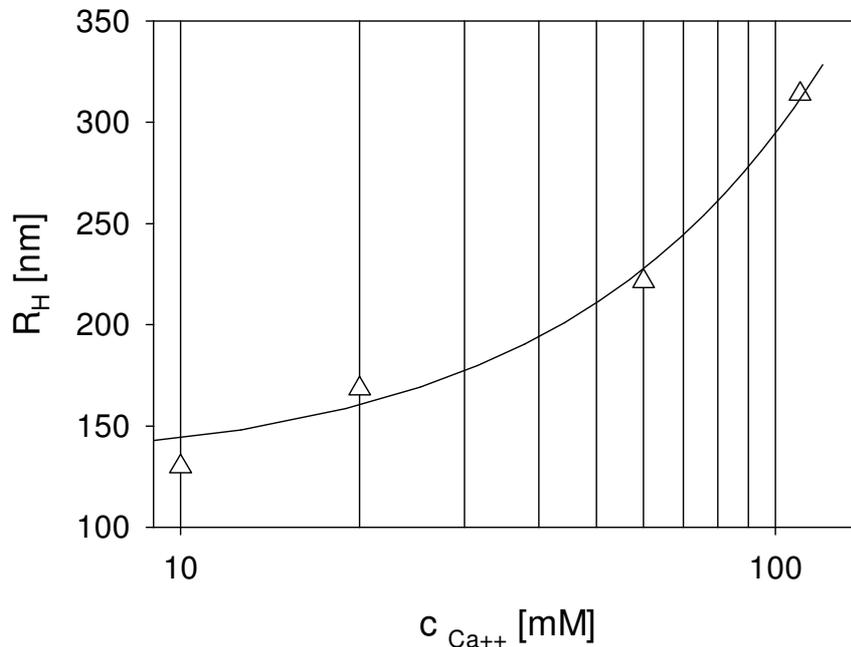


Abb. 5.15: Kalziumabhängigkeit der hydrodynamischen Radien von Kasein-Mizellen (3%), gemessen unter Normaldruck bei pH 7.3 und 20 °C.

### Die temperaturabhängige Druckdissoziation der Kasein-Mizellen

Die bisher beschriebenen Experimente wurden durchgeführt, um den Ausgangszustand für die folgenden Druckexperimente zu charakterisieren. Dabei wurden Kasein-Mizellen (w/v 3%) in Abhängigkeit von Temperatur, Kalzium- und Protonenkonzentration (pH-Wert) dissoziiert. Die Messdaten sind als Dissoziationsgrad über dem Druck aufgetragen. Abb. 5.16, links zeigt die temperaturabhängige Druckdissoziation bei pH 7.3. Mit zunehmender Temperatur verschiebt sich der Halbwert der Druckdissoziationskurve zu höheren Druckwerten (von 100 MPa bei 10 °C auf 280 MPa bei 60 °C). Es ist deutlich zu erkennen, dass zu dem einfachen Übergang bei niedrigen Temperaturen (10-20 °C) noch ein weiterer Übergang bei höheren Temperaturen (30-50 °C) dazukommt, sodass sich ein zweistufiger Verlauf der Dissoziationskurven ergibt. Die Druckdissoziation bei Temperaturen zwischen 60 °C-80 °C kann wieder über einen einfachen Übergang beschrieben werden.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

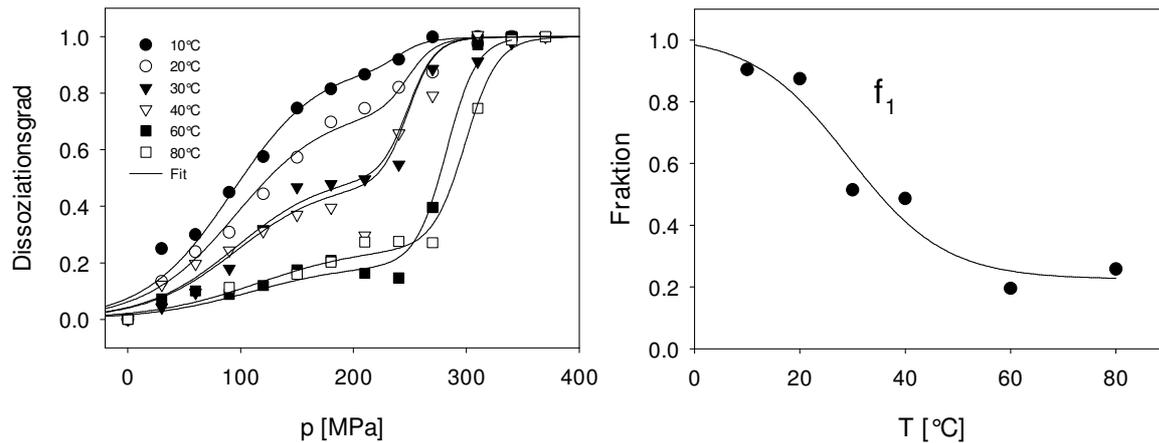


Abb. 5.16: Links - Temperaturabhängige Druckdissoziation von Kasein-Mizellen (w/v 3%, pH 7.3) mit Zwei - Komponentenfit. Rechts - Fit-Analyse: Fraktionsgrad über Temperatur.

Der maximale Temperatureffekt in Bezug auf die Druckstabilität ist bei ca. 60°C erreicht. Eine weitere Temperaturerhöhung stabilisiert die Kasein-Mizelle nicht. Damit vollzieht die Mizelle in Bezug auf ihre Stabilität auch einen Temperaturübergang. Zur ersten Analyse wurden die temperaturabhängigen Dissoziationsdaten mit einem Zwei-Komponentenfit analysiert. Beide Komponenten beschreiben einen einfachen Druckübergang gemäß Formel (5.2) und sind unabhängig voneinander. Die Druckübergänge ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) werden jeweils durch ein Dissoziationsvolumen  $\Delta V$  und eine Dissoziationskonstante  $k_0$  bestimmt. Die Anteile beider Druckübergänge am Gesamtdissoziationsgrad  $\alpha$  werden durch  $f_1$  festgelegt, gemäß  $\alpha = f_1 \cdot \alpha_1 + (1 - f_1) \cdot \alpha_2$ . Die einfachste Beschreibung der Daten konnte erhalten werden, indem nur der Anteil  $f_1$  variiert, die Dissoziationsvolumina ( $\Delta V_1 = -61$  ml/mol,  $\Delta V_2 = -204$  ml/mol) und Dissoziationskonstanten ( $k_1 = 0.09$ ,  $k_2 = 9.5 \cdot 10^{-10}$ ) aber für alle Temperaturen konstant gelassen wurden. In Abb. 5.16, rechts ist der Anteil  $f_1$  in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Die Werte liegen auf einer temperaturabhängigen Übergangskurve.

Im Vergleich zur Druckdissoziation bei pH 7.3, ist der Temperatureffekt einer Kaseinlösung bei pH 6.1 nicht so stark ausgeprägt. Eine Temperaturerhöhung von 10°C auf 60°C verschiebt den Halbwert der Druckdissoziationskurve lediglich von 90 MPa auf 150 MPa (Abb. 5.17). Bei 71°C, pH 6.1 kommt es unter Normaldruck zur Dissoziation der Kasein-Mizelle.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

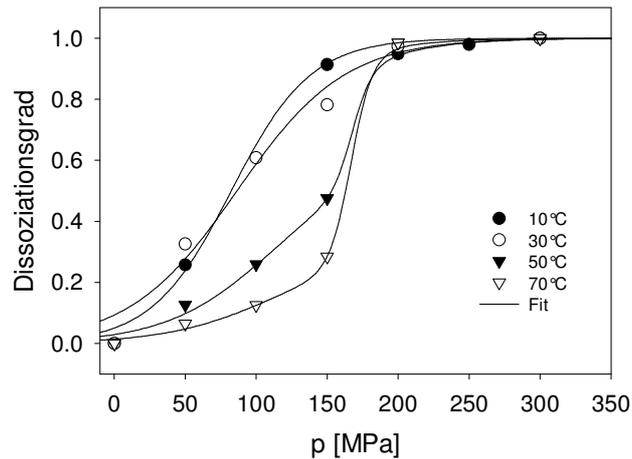


Abb. 5.17: Temperaturabhängige Druckdissoziation von Kasein-Mizellen (w/v 3%, pH 6.1).

### Die kalziumabhängige Druckdissoziation der Kasein-Mizellen

Abb. 5.18 zeigt die Druckdissoziation in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration. Analog zur Temperaturabhängigkeit verschiebt sich der Halbwert der Druckdissoziationskurve mit zunehmender Kalziumkonzentration zu höheren Drücken. Wie bei den temperaturabhängigen Messungen kann ein sättigender Stabilitätseffekt beobachtet werden. Er tritt ab einer freien Kalziumkonzentration von ca. 60 mM auf.

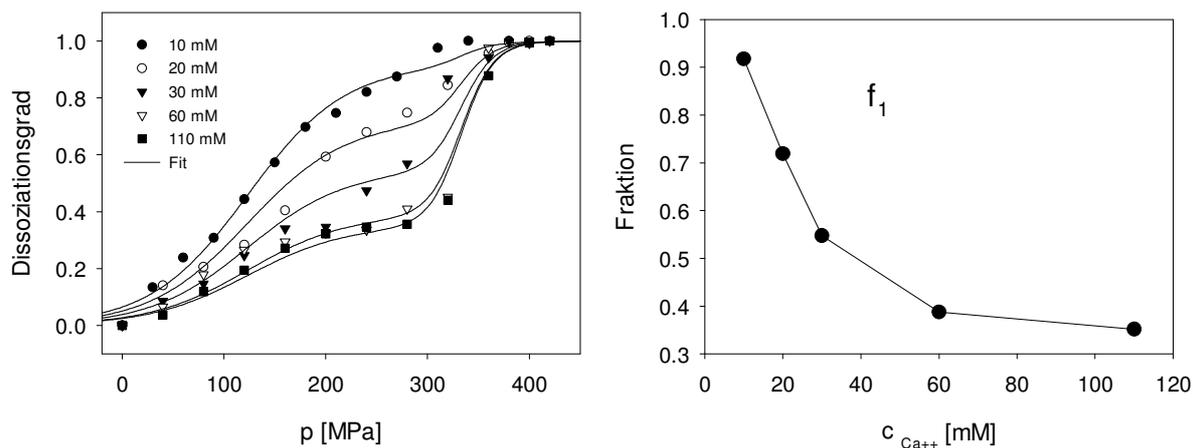


Abb. 5.18, Links: Kalziumabhängige Druckdissoziation von Kasein-Mizellen (pH 7.3, 20°C) mit Zwei-Komponentenfit. Rechts: Fit-Analyse: Fraktionsgrad über Kalziumkonzentration.

Analog zu den temperaturabhängigen Messungen wurde zur ersten Charakterisierung der Dissoziationsdaten ein unabhängiger Zwei-Komponentenfit

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

gewählt. Die einfachste Möglichkeit die Daten zu beschreiben besteht darin, Dissoziationsvolumina ( $\Delta V_1 = -50.9 \text{ ml/mol}$ ,  $\Delta V_2 = -152 \text{ ml/mol}$ ) und Dissoziationskonstanten ( $k_1 = 0.076$ ,  $k_2 = 8.7 \cdot 10^{-10}$ ) für alle Kalziumkonzentrationen unverändert zu lassen und nur den Anteil  $f_1$  (Fraktion) zu variieren (Abb. 5.18). Die durch einen nichtlinearen Fit gewonnenen Werte liegen auf einer kalziumabhängigen Übergangskurve (Abb. 5.18, rechts).

In Abb. 5.19 ist die Druckstabilität der Kasein-Mizelle bei maximalem Kalzium- bzw. Temperatureffekt im Vergleich mit der Mischung beider Effekte dargestellt. Unter dem Einfluss von  $60 \text{ mM Ca}^{++}$  und  $80^\circ\text{C}$  erhöht sich die Druckstabilität nochmals deutlich. Bei  $60^\circ\text{C}$  und geringer Kalziumkonzentration bleibt die Kasein-Mizelle bis ca.  $260 \text{ MPa}$  stabil. Der Dissoziationsgrad verringert sich nur geringfügig auf ca.  $0.2$ . Höhere Drücke als  $260 \text{ MPa}$  führen zur kompletten Dissoziation. Unter dem Einfluss sättigender Kalziumkonzentrationen bei  $20^\circ\text{C}$  kommt es zur vollständigen Dissoziation ab ca.  $320 \text{ MPa}$ . Bei diesem Druck ist der Dissoziationsgrad bereits auf einen Wert von  $0.4$  angestiegen. Das mittlere Molekulargewicht der Mizelle ist damit in Bezug auf den anfänglichen Wert bei Normaldruck um die Hälfte reduziert.

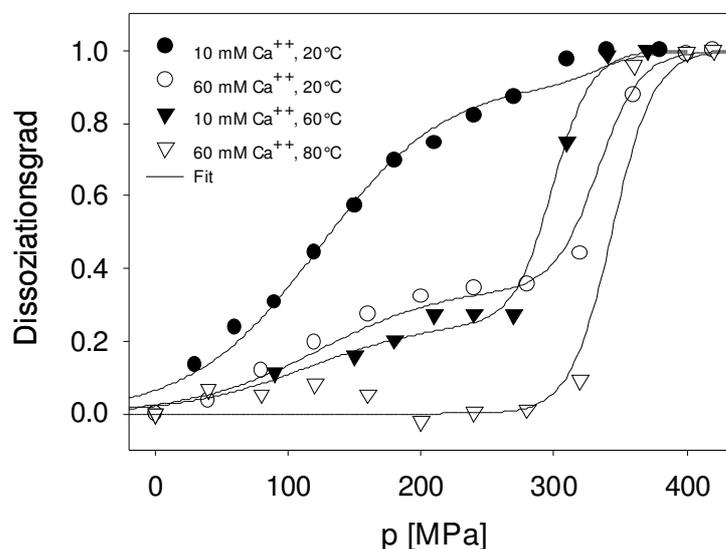


Abb. 5.19: Kalzium- und temperaturabhängige Druckdissoziation von Kasein-Mizellen (w/v 3%, pH 7.3) mit Zweikomponentenfit.

Werden maximaler Temperatur- und Kalziumeffekt gemischt, so bleibt die ursprüngliche Kasein-Mizelle bis ca.  $320 \text{ MPa}$  stabil, d.h. sie besitzt die maximale

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

Druckstabilität, die durch den Kalziueffekt vermittelt wird, ohne das ihr ursprüngliches mittleres Molekulargewicht bei 0.1 MPa verringert wird. Dies ist auf den Temperatureinfluss zurückzuführen. Die Daten lassen sich gut mit einem einfachen Übergangsmodell beschreiben. Eine gute Anpassung konnte mit einem Dissoziationsvolumen von  $\Delta V = -190 \text{ ml/mol}$  und einer Dissoziationskonstanten  $k_0 = 3 \cdot 10^{-10}$  erhalten werden.

### Der Einfluss des pH-Wertes auf die Druckdissoziation der Kasein-Mizellen

In Abb. 5.20, links ist die Druckdissoziation von Kasein-Mizellen bei den pH-Werten pH 6.1, 7.3 und 8.1 in Tris/Mes-Puffer +10 mM  $\text{Ca}^{++}$  vergleichend dargestellt.

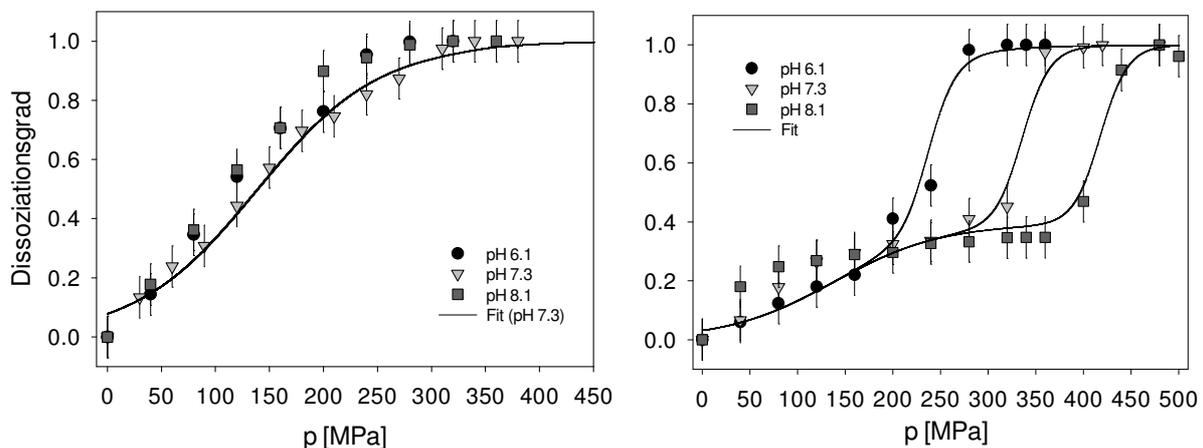


Abb. 5.20: pH-abhängige Druckdissoziation von Kasein-Mizellen (w/v 3%, 20°C) mit Zweikomponentenfit; Links: in Anwesenheit von 10 mM  $\text{Ca}^{++}$ ; Rechts: in Anwesenheit von 60 mM  $\text{Ca}^{++}$ .

Bei dieser geringen Kalziumkonzentration liegen alle Druckdissoziationskurven übereinander, sodass kein pH-Effekt festgestellt werden kann. Nach Zugabe von 60 mM  $\text{Ca}^{++}$ , einer Kalziumkonzentration, die den maximalen Druckeffekt bei pH 7.3 bewirkt, kommt es zu einem deutlichen pH-Effekt (Abb. 5.20, rechts). Mit zunehmenden pH-Wert verschiebt sich die Dissoziationkurve zu höheren Druckwerten (von 250 MPa bei pH 6.1 auf 400 MPa bei pH 8.1). Der pH-Effekt wirkt sich dabei vor allem auf den oberen Teil der Dissoziationskurve aus, während die Dissoziationsgrade  $< 0.4$  bei allen drei pH-Werten kaum voneinander abweichen.

### Modellanalyse zur Druckdissoziation der Kasein-Mizelle

Zur Interpretation der Druckdissoziationsdaten der Kasein-Mizelle wurden ein paralleles bzw. ein sequentielles Übergangsmodell abgeleitet, die im Ansatz dem inneren Strukturmodell (Abb. 5.3) bzw. dem Kasein-Submizell-Modell (Abb. 5.2, rechts) entsprechen.

Für die vier Basis-Kaseine ist die Selbstassoziation unter Normaldruck untersucht worden (Tai M., Kegeles G., 1984; O'Connell J.E. et al., 2003; Euston S.R., Horne D.S., 2005). Die wesentlichen Grundzüge der Mizellenbildung unter besonderer Berücksichtigung der Kaseine werden im Folgenden kurz vorgestellt. Die Mizellenbildung ist ein kooperativer Assoziationsprozess, der aus mehreren hundert stufenweisen Einzelreaktionen bestehen kann, gemäß:



Für jeden einzelnen Assoziationsschritt existiert dann eine Assoziationskonstante:

$$K_n = \frac{[A_n]}{[A_0][A_{n-1}]} \quad (5.6)$$

Um die Situation für große Aggregationszahlen  $n$  unkomplizierter zu beschreiben, existieren vereinfachte Modelle (Evans D. F., Wennerström H., 1999).

Im **isodesmischen Modell** sind die Assoziationskonstanten unabhängig von der Aggregationszahl  $n$ . Das Produkt aus absoluter Konzentration  $[A_0]$  und Assoziationskonstante  $K$  ist kleiner als eins. Die Dichte der Aggregationszahl fällt exponentiell ab. Ein Nachteil des Modells ist, dass es nicht in der Lage ist, den kooperativen Prozess der Mizellenbildung und die korrespondierende kritische Konzentration vorherzusagen. Die kritische Mizellenkonzentration CMC ist die Konzentration, ab welcher zugesetzte Monomere bevorzugt in die mizellare, aggregierte Phase eintreten.

Im Folgenden soll das „Shell – Modell“ (Kegeles G., 1979) betrachtet werden, welches erfolgreich für die Beschreibung der Selbstassoziation von  $\beta$ -Kasein eingesetzt wurde (Tai M., Kegeles G., 1984; de Kruif C. G., Grinberg V.Y., 2002;

O'Connell J.E. et al., 2003). Kegeles betrachtete die Mizellenbildung als eine Reihe aufeinanderfolgender Assoziationsschritte, gemäß Formel (5.5). Im Unterschied zum Zwei-Zustands-Modell kommt es dabei zu einer ganzen Reihe (Verteilung) von Mizellen unterschiedlicher Aggregationszahl. Im Gegensatz zum isodesmischen Modell wird das Produkt aus der Assoziationskonstante, welche die Anlagerung eines Monomers an ein Oligomer beschreibt, und der Konzentration der freien Monomere  $K[A_0] > 1$  angenommen. Dadurch ist ein kooperatives Wachstum gewährleistet. Durch die Einführung eines Wahrscheinlichkeitsfaktors, der die Anlagerung der Monomere an eine schalenartige („shell“) Oberfläche regelt, wird der Assoziationsprozess limitiert. Wenn  $n$  die maximale Anzahl von Monomeren beschreibt, die angelagert werden können und  $i$  Monomere bereits assoziiert sind, so ist die Wahrscheinlichkeit ein weiteres Monomer anzulagern  $(n-i)/n$ . Weiterhin wird ein statistischer Faktor für die Anlagerung bzw. Dissoziation eines Monomers an ein Oligomer eingeführt. Für die Anlagerung entspricht dieser der Anzahl der Monomere im Oligomer, an welches angelagert wird, für die Dissoziation der Anzahl der Monomere im Oligomer, von welchem dissoziiert wird. Für die Anteile der  $i$ -Oligomere relativ zu den Monomeren ergibt sich nach Ableitung (Kegeles G., 1979):

$$[A_i]/[A_0] = f \frac{n!}{(n-i)!} \frac{1}{i+1} (K[A_0])^i \quad (5.7)$$

Der Faktor  $f$  kann Werte von  $f \leq 1$  annehmen und wirkt einer Keimbildung und damit der Bildung eines Dimers aus zwei Monomeren entgegen. Anhand von Formel (5.7) wurden die Dichten der Mizellen für  $n = 800$ ,  $f = 1$  und verschiedene  $k[A_0]$ -Werte im Bereich (1..2) berechnet (Abb. 5.21, links). Für  $k[A_0] \leq 1$  ergibt sich eine monoton abfallende Verteilung mit einem Maximum der monomeren Fraktion bei  $n = 0$ . Vollständige Mizellenbildung liegt bei  $k[A_0] = 2$  vor (Kegeles G., 1979), mit einem Maximum der Verteilung bei  $n/2$ . In Abb. 5.21, rechts ist der Druckeinfluss auf die Mizellenverteilung simuliert.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

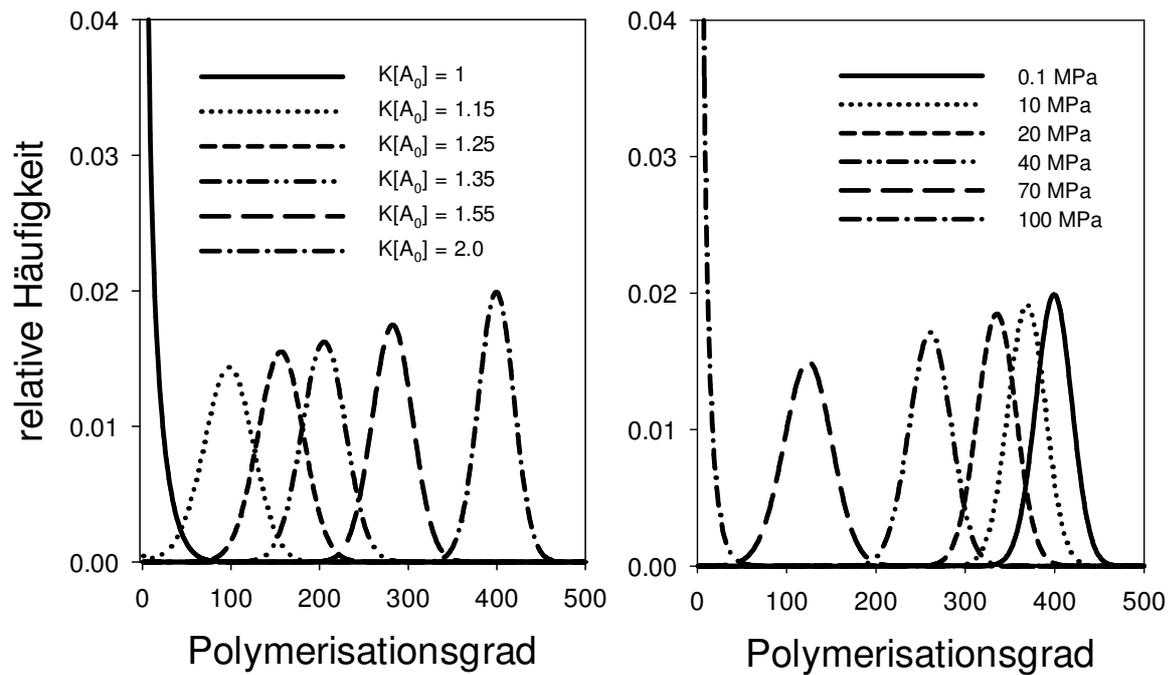


Abb. 5.21: Berechnete Dichten der Aggregationszahl nach dem „Shell Modell“ (Kegeles G., 1979),  $n = 800$ ,  $f = 1$ ; Links: für verschiedene  $k[A_0]$ -Werte; Rechts: für verschiedene Druckwerte für  $k[A_0] = 2$ ,  $\Delta V = -18$  ml/mol (erweitertes Modell).

Dafür wurde das Kegeles-Modell durch die Einführung einer druckabhängigen Assoziationskonstante modifiziert. Das Dissoziationsvolumen für jeden Assoziationsprozess wird dabei als konstant angenommen ( $\Delta V_{A_{i-1}, A_i} = \text{konst.}$ ). Mit zunehmendem Druck zerfällt die Mizelle in kleinere Aggregate, wobei es zu einer Verbreiterung der Verteilung kommt. Für  $n = 800$ ,  $f = 1$ ,  $k[A_0] = 2$  und  $\Delta V = -18$  ml/mol sind die aus im Mittel 400 Monomeren bestehenden Mizellen bei ca. 100 MPa komplett in die monomere Fraktion zerfallen. Das um den Druckeffekt erweiterte „Shell-Modell“ kann benutzt werden, um die druckabhängigen Dissoziationskurven der Kasein-Mizellen zu analysieren. Der gewichtete mittlere Assoziationsgrad wurde für den Fall eines temperaturabhängigen Assoziationsgleichgewichts abgeleitet (de Kruif C. G., Ginberg V. Y., 2002). Analog ist dieser für ein druckabhängiges Gleichgewicht definiert über:

$$N_w(p) = \frac{\sum_{i=1}^n (i+1) \frac{n!}{(n-i)!} \left( \frac{PK_p \beta_p}{n} \right)^i}{\sum_{i=1}^n \frac{n!}{(n-i)!} \left( \frac{PK_p \beta_p}{n} \right)^i} \quad (5.8)$$

mit der totalen Proteinkonzentration

$$P = [A_0] + \sum_{i=1}^n (i+1)[A_i] \quad (5.9)$$

und dem Anteil der Monomere

$$\beta_p = [A_0] / P \quad (5.10)$$

im Ansatz. Abb. 5.22 zeigt exemplarisch die Modellanpassung an die Druckübergangskurve bei 20°C aus Abb. 5.16, die mit folgenden Parametern durchgeführt wurde ( $n = 240$ ,  $f = 1$ ,  $k[A_0] = 2$ ,  $\Delta V = -8$  ml/mol). Die Anzahl der Kasein-Mizellen-Untereinheiten wurde bei 0.1 MPa mit  $N = n/2 = 120$  angenommen. Ein Problem bei der Analyse der druckabhängigen Übergangskurven besteht darin, dass der druckabhängige monomere Anteil  $\beta_p$  aufgrund der in Abschnitt 5.2.1 erwähnten messtechnischen Schwierigkeiten nicht bestimmt werden konnte und deshalb als konstant angenommen wurde. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass die Kasein-Mizelle aus fünf verschiedenen Komponenten besteht, die unterschiedliche Assoziationsmechanismen aufweisen. Aufgrund dieser Tatsachen wurde das Konzept, die Druckdissoziationsdaten anhand des „Shell-Modells“ zu beschreiben, nicht weiter verfolgt.

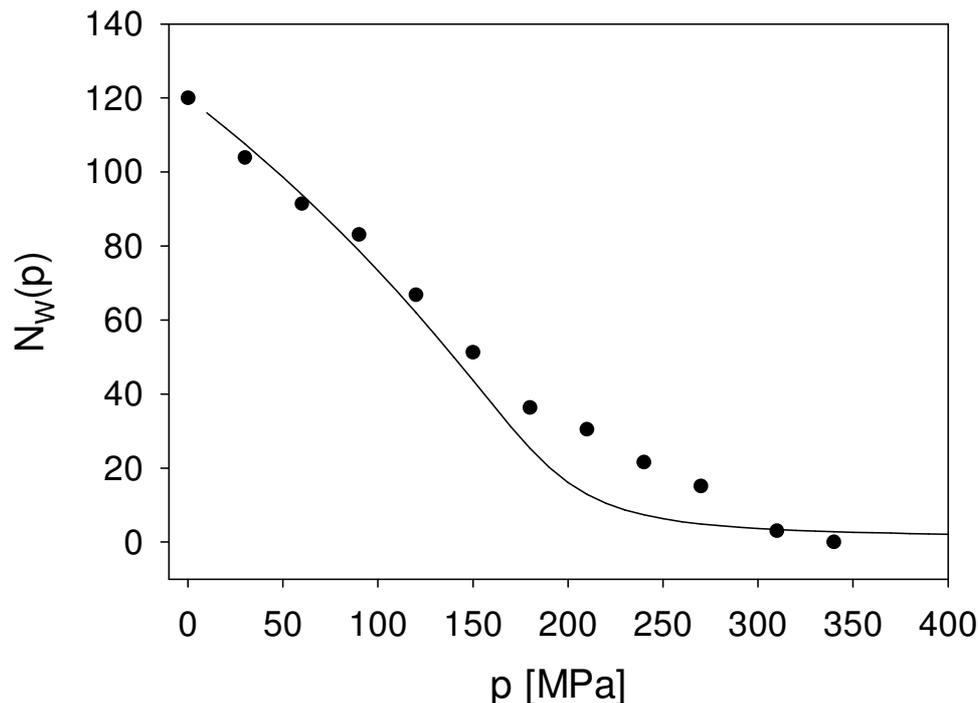


Abb. 5.22: Mittlerer Assoziationsgrad als Funktion des Drucks für Kasein-Mizellen (w/v 3%, 20°C) analysiert mit dem „Shell-Modell“ (  $n = 240$ ,  $f = 1$ ,  $k[A_0] = 2$ ,  $\Delta V = - 8$  ml/mol).

Das **Phasenseparationsmodell** geht von der Ausbildung einer neuen Phase als Folge des Aggregationsprozesses aus. Es wird angenommen, dass Aggregate, die aus vielen Untereinheiten bestehen gegenüber jenen mit weniger Untereinheiten, dominieren. Während des Aggregationsprozesses wird die Anlagerung eines Monomers immer günstiger. Damit ist das Phasenseparationsmodell in der Lage, einen kooperativen Anlagerungsprozess zu beschreiben. Die Differenz der chemischen Potentiale der Monomere in der mizellaren bzw. in der löslichen Phase ist gegeben über:

$$\Delta\mu = \mu(\text{Mizelle}) - \mu(\text{Lösung}) = RT \cdot \ln(K) = RT \cdot \ln(\text{CMC}) \quad (5.11)$$

Unter Vernachlässigung von Dimeren und Oligomeren entspricht der Gleichgewichtskonstanten  $K$  die kritische Mizellenkonzentration  $\text{CMC}$ . Während die Startphase der Assoziation gut wiedergegeben wird, ist das Modell dagegen nicht in der Lage, die End- oder Stopphase zu erklären.

Dieser Mangel wird im **geschlossenen Assoziationsmodell** behoben (Evans D. F., Wennerström H., 1999). Die Annahme des Modells ist, dass nur eine

Aggregationszahl dominiert, sodass nur ein Monomer/n-Mer-Gleichgewicht betrachtet wird, gemäß der Formel (2.1) und Formel (2.2). Dieses Gleichgewichtsmodell wurde bereits zur Analyse der oligomeren Druckdissoziation des 24-meren Spinnen-Hämocyanins (Abb. 4.21) benutzt. Das Modell ist in der Lage, sowohl die Start- als auch die Endphase des kooperativen Assoziationsprozesses zu beschreiben.

Abgesehen von Viren weisen oligomere Proteine deutlich kleinere Assoziationszahlen auf als mizellare Systeme. Für letztere liegen diese typischerweise im Bereich zwischen  $N = 30 - 100$ . Für den Fall  $N > 30$  nähert sich das Verhalten mizellarer Systeme dem isodesmischen Modell an, wobei die Gleichgewichtskonstanten unabhängig von der Aggregationszahl  $n$  werden. Im Rahmen dieser Näherung ist es möglich, die Druckdissoziation von Kasein-Mizellen mittels einfacher Übergangskurven zu beschreiben. Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Dissoziations-Modelle benutzen diese Näherung.

### 5.2.4 Paralleles Modell zur Beschreibung des zweistufigen Druckdissoziationsprozesses

Die einfachste Interpretation der beobachteten zweistufigen Dissoziationsverläufe liefert das parallele Übergangsmodell, welches im Rahmen dieser Arbeit abgeleitet wurde. Eine erste Analyse in Abschnitt 5.2.3 hatte ergeben, dass sich die druckabhängigen Dissoziationskurven am besten mit zwei einfachen druckabhängigen Übergangskurven beschreiben lassen. Der Temperatur- und Kalziumeinfluss konnte am einfachsten berücksichtigt werden, indem nur die Anteile beider Übergänge variiert und Dissoziationsvolumina und -konstanten nicht verändert wurden. Aufbauend darauf fordert das parallele Modell die Existenz von zwei Kasein-Mizell-Fractionen, die eine unterschiedliche Druckstabilität aufweisen und unabhängig voneinander unter Druck dissoziieren. Wie bereits in Abschnitt 5.2.3 erwähnt wurde, steht die Kasein-Mizelle mit frei in Lösung vorkommenden Kaseinen in einem temperatur- und kalziumabhängigen Assoziations-/Dissoziationsgleichgewicht. Die An- und Ablagerungsprozesse werden durch veränderte molekulare Wechselwirkungen initiiert. Während durch Temperaturvariation hauptsächlich die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

den Kaseinen verändert werden, wirkt sich eine veränderte Kalziumkonzentration besonders auf die elektrostatischen Wechselwirkungen aus. Die Druckdissoziation wird, ohne Rücksichtnahme auf den Aggregationsgrad der Mizelle, durch zwei einfache unabhängige Dissoziationsprozesse beschrieben (Abb. 5.23). Dabei werden zur Kennzeichnung der Druckdissoziation beider Kasein-Mizellen-Fractionen im weiteren Verlauf die Buchstaben A und B benutzt. Prozess A, bei welchem die Kasein-Mizellen MA in die monomeren Kaseine A zerfallen, ist durch die Dissoziationskonstante  $k_{MA,A}$  bei Normaldruck und durch das molare Dissoziationsvolumen  $\Delta V_{MA,A}$  charakterisiert. Analog dazu ist für Prozess B ein  $k_{MB,B}$  und ein  $\Delta V_{MB,B}$  definiert. Beide Dissoziationsprozesse stehen über die Konstante  $L_{MB,MA}$  im chemischen Gleichgewicht. Temperatur und Kalziumkonzentration beeinflussen die Druckdissoziation, indem sie auf die Gleichgewichtskonstante  $L$  wirken und damit die Besetzung der beiden Kasein-Fractionen verschieben.

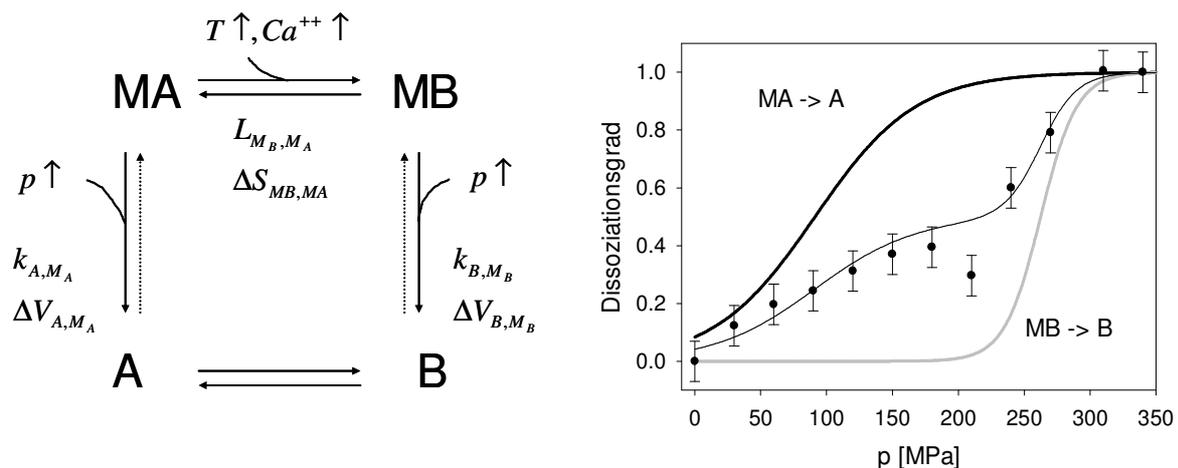


Abb. 5.23: Links: Reaktionsschema des parallelen Zwei-Übergangsmodells zur Beschreibung der Druckdissoziation von Kasein-Mizellen. Rechts: Prinzip des parallelen Übergangsmodells. Die Dissoziationskurve setzt sich aus zwei Anteilen zusammen, deren Verhältnis über den gesamten Druckbereich konstant bleibt. Im gezeigten Beispiel setzt sich die Kurve jeweils zu ca. 50% aus einem druckinstabileren ( $\{ \rightarrow \}$  MA  $\rightarrow$  A) und einem druckstabileren ( $\{ \rightarrow \}$  MB  $\rightarrow$  B) Dissoziationsprozess zusammen.

Die Veränderung beider Anteile wirkt sich auf die Gesamtdissoziation aus. In Abb. 5.23, rechts ist exemplarisch dargestellt, wie aus zwei einfachen

Dissoziationsprozessen mit einem Anteil von jeweils 50% ein zweistufiger Dissoziationsprozess konstruiert werden kann. Die dafür abgeleiteten Formeln sind im Anhang (Kapitel 7.2.2) aufgelistet und beschrieben.

Alternativ zum parallelen Modell wurde für die Beschreibung der zweistufigen Dissoziationskurven ein sequentielles Dissoziationsmodell, welches einen zusätzlichen Zwischenzustand vorsieht, abgeleitet. Der Formalismus ist im Anhang (Kapitel 7.2.1) beschrieben. Da das sequentielle Übergangsmodell die Daten zwar mit gleicher Güte beschreibt, aufgrund einer größeren Anzahl von anzupassenden Parametern aber komplizierter ist, wurde das einfachere parallele Übergangsmodell für die weitere Datenanalyse benutzt.

### 5.2.5 Analyse der temperaturabhängigen Druckdissoziation mit dem parallelen Übergangsmodell

Die Ergebnisse des parallelen Modell-Fits sind für die temperaturabhängige Druckdissoziation der Kasein-Mizellen in Abb. 5.24 für pH 7.3 und in Abb. 5.26 für pH 6.1 gezeigt. Die temperaturabhängigen Dissoziationsdatensätze wurden simultan mit Formel (7.28) gefittet. Die Druck-Dissoziationsübergänge für Mizell-Fraktion  $M_A$  bzw.  $M_B$  sind dabei über Formel (7.24), die Besetzung beider Übergänge über Formel (7.26) definiert. In den Spalten zwei und drei von Tabelle 5.1 sind die durch nichtlineare Regression erhaltenen Fitparameter gezeigt.

Zunächst wurden die Dissoziationsdatensätze bei pH 7.3 gefittet. Für die druckinstabilere Form, welche bei niedrigen Temperaturen dominiert, wurde eine Dissoziationskonstante von  $k_{A,MA} = 0.0916$  und ein Dissoziationsvolumen von  $\Delta V_{A,MA} = -68.2$  ml/mol bestimmt. Für die druckstabilere Form, welche bei hohen Temperaturen stabil ist, wurden eine Dissoziationskonstante  $k_{B,MB} = 5.2 \cdot 10^{-9}$  bzw. ein Dissoziationsvolumen  $\Delta V_{B,MB} = -189.2$  ml/mol erhalten. Die Übergangstemperatur  $T_0$ , bei welcher die Populationen der beiden Kasein-Formen gleich sind, wurde mit 307 K und die Entropiedifferenz  $\Delta S_{MB,MA}$  mit 125 J/(mol\*K) bestimmt.

Für den Fit der temperaturabhängigen Dissoziationskurven bei pH 6.1 wurden lediglich die Dissoziationskonstante für den druckstabileren Dissoziationsprozess  $k_{B,MB}$  sowie  $T_0$  und  $\Delta S_{MB,MA}$  variiert. Die restlichen drei Parameter wurden konstant gehalten. Damit können vier weitere temperaturabhängige Dissoziationskurven bei

pH 6.1 durch die Variation von nur drei Parametern beschrieben werden. Durch die pH-Absenkung kommt es einerseits zu einer Verschiebung der Übergangstemperatur von 307 K auf 320 K. Andererseits verdoppelt sich die Entropiedifferenz von 125 J/(mol\*K) auf 268 J/(mol\*K). Weiterhin erhöht sich die Dissoziationskonstante  $k_{B,MB}$  infolge der pH-Absenkung um vier Größenordnungen auf  $1.4 \cdot 10^{-5}$ . Folglich verschiebt sich das Dissoziationsgleichgewicht bei hohen Temperaturen mehr auf die Seite der dissoziierten Form.

Abb. 5.25, links zeigt das Ergebnis der simultanen Datenanpassung. In Abb. 5.25, rechts sind die dazugehörigen Residuenplots in Abhängigkeit von Temperatur, Druck und den wahren Messwerten (Dissoziationsgrad) dargestellt. Die Residuen in Abhängigkeit des Drucks und der Messdaten liegen gut verteilt um Null und zeigen keine eindeutige Tendenz. Dagegen weisen die temperaturabhängigen Residuen im mittleren Temperaturbereich ein leichtes Minimum auf, was auf unaufgefangene Variabilität seitens des Modells hindeutet. Mit Ausnahme der thermischen Denaturierung von tRNA (Privalov P. L., 1979) zeigen viele biopolymere Übergänge (z.B. die Protein Denaturierung) eine Differenz in den Wärmekapazitäten beider Übergangsformen. Aus diesem Grund wurde das Modell durch die Einführung unterschiedlicher Wärmekapazitäten für beide Kaseinformen um einen zusätzlichen Term erweitert. Die Differenz in der Wärmekapazität wirkt auf die Gleichgewichtskonstante  $L_T$  gemäß:

$$\ln(L_T) = \frac{1}{RT} \left( \Delta S_{B,A}(T_0) \cdot (T - T_0) + \Delta C_{B,A} \cdot \ln\left(\frac{T}{T_0}\right) \cdot (T - T_0) \right). \quad (5.12)$$

Wie aus der Abb. 5.24, rechts zu entnehmen ist, werden die Daten durch das erweiterte Modell besser beschrieben. Das Bestimmtheitsmaß erhöht sich von  $R^2 = 0.97$  auf 0.98. Die kleine systematische Abweichung der temperaturabhängigen Residuen in Abb. 5.25, rechts verschwindet durch die Einführung des Zusatzterms fast vollständig. Allerdings erfolgte diese Verbesserung unter Hinzunahme eines zusätzlichen Fitparameters. Damit werden sechs temperaturabhängige Dissoziationskurven durch simultane Variation von sieben freien Parametern beschrieben.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

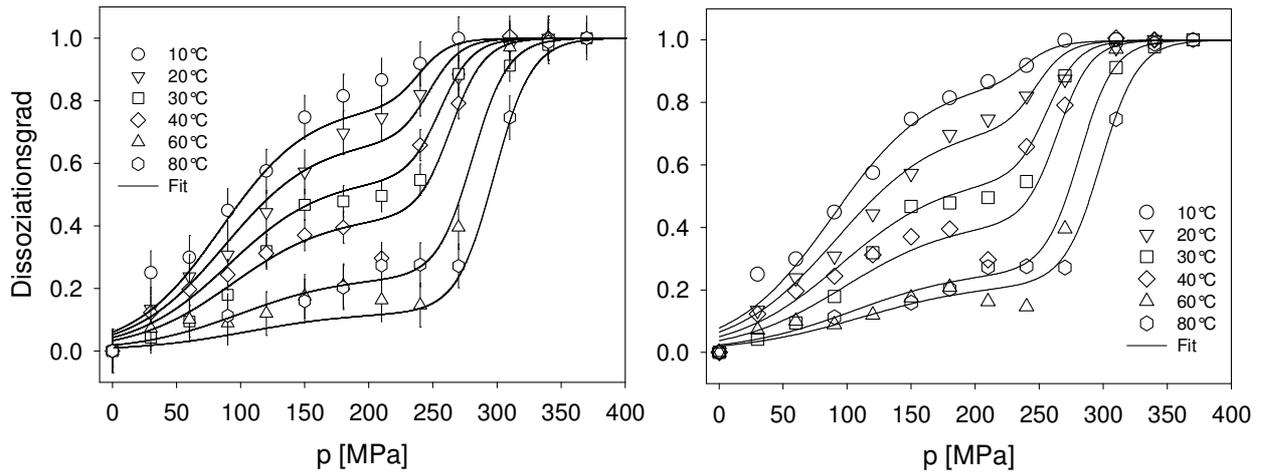


Abb. 5.24: Temperaturabhängige Druckdissoziationskurven einer 3% igen Kasein-Lösung, pH 7.3, Tris-HCl. Links: Paralleles Übergangmodell ohne Berücksichtigung der Wärmekapazitätsdifferenz beider Kasein-Mizellen-Formen. Rechts: Paralleles Übergangmodell mit Berücksichtigung der Wärmekapazitätsdifferenz

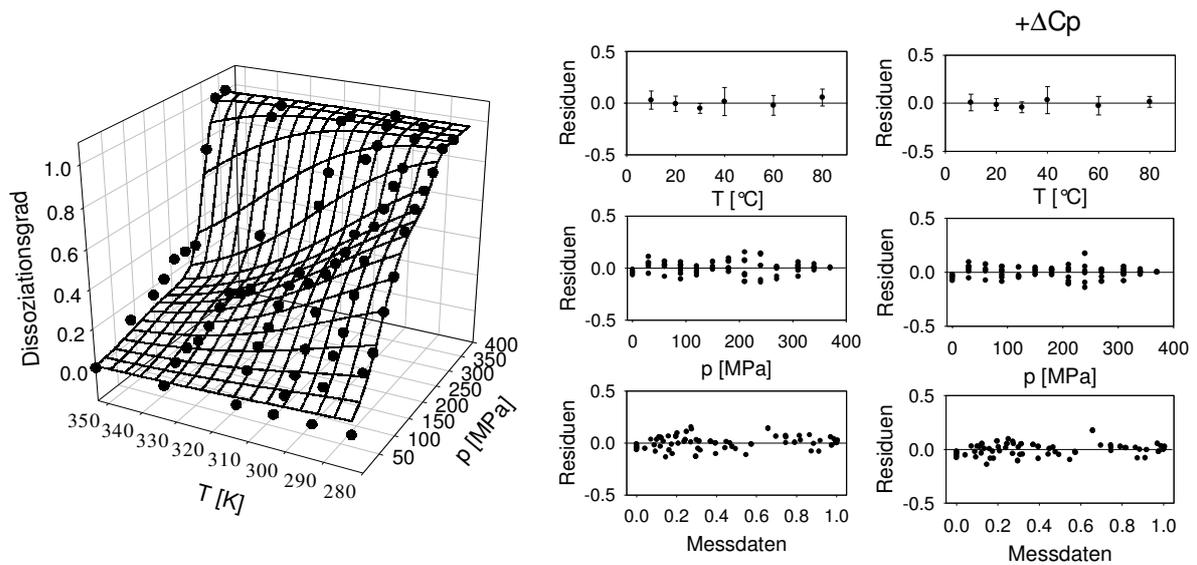


Abb. 5.25, Links: Simultanfit der temperaturabhängigen Druckdissoziation. Rechts: Vergleich der Residuenplots in Abhängigkeit von Temperatur, Druck und wahren Messwerten (Dissoziationsgrad) für das parallele Übergangmodell ohne bzw. mit Berücksichtigung der Wärmekapazitäten der Kasein-Mizellen-Formen.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

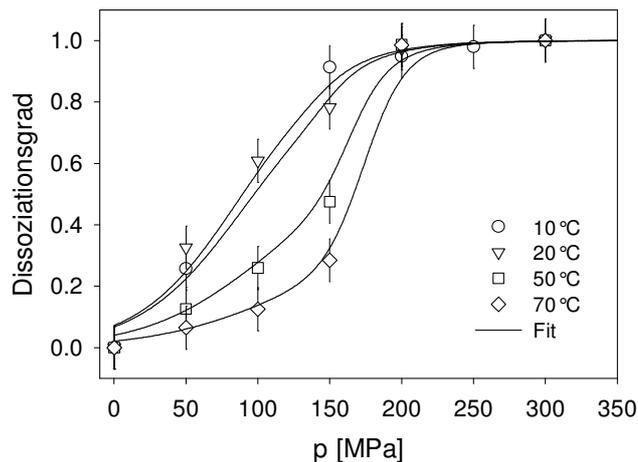


Abb. 5.26: Temperaturabhängige Druckdissoziationsdaten einer 3%igen Kasein-Lösung, pH 6.1, Tris-HCl und Simultanfit.

Parameter	Werte (pH 7.3)	Werte (pH 6.1)	Werte (pH 7.3) + $\Delta C_p$	Werte (pH 6.1) + $\Delta C_p$
$k_{A,MA}$	0.0916	0.0916	$0.09 \pm 0.02$	0.098
$\Delta V_{A,MA}$	-68.2 ml/mol	-68.2 ml/mol	$-61 \pm 7$ ml/mol	-61.1 ml/mol
$k_{B,MB}$	$5.2 \cdot 10^{-9}$	<b><math>1.4 \cdot 10^{-5}</math></b>	$9.5 \cdot 10^{-10}$	<b><math>5.5 \cdot 10^{-6}</math></b>
$\Delta V_{B,MB}$	-189.2 ml/mol	-189.2 ml/mol	$-204 \pm 3$ ml/mol	-204.4 ml/mol
$T_0$	307.5 K	<b>320.5 K</b>	$307 \pm 2$ K	<b><math>322 \pm 2</math> K</b>
$\Delta S_{MB,MA}$	125.2 J/(mol*K)	<b>268.4 J/(mol*K)</b>	$149 \pm 10$ J/(mol*K)	<b>647.2 J/(mol*K)</b>
$\rightarrow \Delta H_{MB,MA}(T_0)$	38.5 kJ/mol	<b>86.0 kJ/mol</b>	45.9 kJ/mol	<b>208.3 kJ/mol</b>
$\Delta C_{MB,MA}$			$-0.5 \pm 0.15$ kJ/(mol*K)	<b><math>-7.3 \pm 0.15</math> kJ/(mol*K)</b>

Tabelle 5.1: Fitparameter für die temperaturabhängige Druckdissoziation einer 3% Kasein-Lösung bei pH 7.3 und pH 6.1, ohne und mit Berücksichtigung von  $\Delta C_p$ . Für den Fit bei pH 6.1 wurden nur die schwarz hervorgehobenen Werte variiert.

Für die Wärmekapazitätsdifferenz wurde ein Wert von  $\Delta C_p = -0.502$  kJ/(mol\*K) ermittelt. Das negative Vorzeichen zeigt an, dass die Kaseinform  $M_B$ , welche bei höheren Temperaturen ( $>34^\circ\text{C}$ ) vorherrschend ist, eine kleinere Wärmekapazität besitzt, als die bei Normaltemperatur ( $<34^\circ\text{C}$ ) stabilisierte Kasein-Form  $M_A$ . Diese Tatsache steht im Gegensatz zu thermischen Proteindenaturierungsexperimenten, bei denen neben einem positiven  $\Delta S$  auch ein positives  $\Delta C_p$  gemessen wird. Der durch hohe Temperaturen aufgefaltete, denaturierte Zustand verfügt im Vergleich

zum gefalteten, nativen Zustand über mehr Freiheitsgrade und besitzt daher auch die größere Entropie. Die Änderung der Wärmekapazität beruht auf der Hydratisierung von Seitenketten, die während der Auffaltung mit Lösungsmittel in Kontakt kommen. Dagegen befinden sich die Kaseine bereits im denaturierten Zustand. Das thermodynamische Verhalten der Kaseine ähnelt mehr der Kältedenaturierung von Proteinen (Wyman J, Gill S. J., 1990). Die native Form, die in diesem Fall der Kaseinform  $M_B$  entspricht, verfügt über eine höhere Entropie und eine geringere Wärmekapazität als die kältedenaturierte Form, die der Kaseinform  $M_A$  zugeordnet werden kann. Ein Grund für das analoge Verhalten könnte ein unterschiedlicher Hydratisierungsgrad beider Mizellen-Formen sein.

Aus den gefitteten Parametern lassen sich Verteilungen der einzelnen Fraktionen für die Kasein-Dissoziation erstellen (Abb. 5.28). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Fraktionen der Kasein-Mizellen veranschaulicht. Da es sich aber um einfache Übergänge handelt, lässt sich die dissoziierte Fraktion  $f_X$  ( $X = A, B$ ) der Kasein-Monomere sofort über  $f_X = 1 - f_{MX}$  ermitteln.

Wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben wurde, vollzieht  $\beta$ -Kasein bei Normaldruck einen temperaturabhängigen Übergang in eine Konformation, die zur Selbstassoziation befähigt ist. Infolge dieses Übergangs assoziiert  $\beta$ -Kasein mit der Kasein-Mizelle (Abb. 5.12). Die Übergangstemperatur  $T_0$  für diesen Prozess liegt bei ca. 32°C und entspricht damit in guter Näherung der Übergangstemperatur  $T_0$ , die durch Simultanfit aus den druck- und temperaturabhängigen Dissoziationsdaten gewonnen wurde (Tabelle 5.1, Spalte 2). Somit kann als möglicher Grund für die erhöhte Druckstabilität der Kasein-Mizelle nach einer Temperaturerhöhung die Anlagerung von  $\beta$ -Kasein betrachtet werden. Im parallelen Übergangsmodell wird diese Tatsache durch einen Konformationsübergang von der Kasein-Mizellen-Form  $M_A$  in die Form  $M_B$  berücksichtigt. Weiterhin induziert eine Temperaturerhöhung eine Verschiebung des chemischen Gleichgewichts der Kalziumionen von der löslichen freien Phase in die colloidale gebundene Phase. Zum anderen sind die hydrophoben Wechselwirkungen stark temperaturabhängig. Deshalb kommt es infolge einer Temperaturerhöhung zur Verstärkung der elektrostatischen und hydrophoben Kontakte zwischen den Kaseinen innerhalb der Kasein-Mizelle.

Abb. 5.27 zeigt temperaturabhängige Fraktionenverteilungen der Mizellen  $M_A$  und  $M_B$ . Zunächst werden die Verhältnisse der Kasein-Probe bei pH 7.3 betrachtet (Abb.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

5.27, links). Bei 10°C dominiert mit ca. 80% die druckinstabilere Kasein-Mizellen-Form  $M_A$  gegenüber der druckstabileren Form  $M_B$ . Bei Temperaturen zwischen 30 und 40°C liegen beide Formen der Kasein-Mizelle zu jeweils gleichen Anteilen im Ansatz vor. Höhere Temperaturen verschieben das Gleichgewicht weiter auf die Seite der druckstabilen Form  $M_B$ , in welcher bei 80°C ca. 90% aller Kasein-Mizellen vorliegen. Vergleichend dazu ist der Effekt auf die Fraktionenverteilung dargestellt, der durch die Berücksichtigung der Wärmekapazitätsdifferenz im parallelen Übergangsmodell entsteht. Während die Form und Schärfe des Übergangs beeinflusst wird, bleibt die Übergangstemperatur unverändert ca. 34°C. Die veränderte Fraktionenverteilung bei niedrigen (10 - 20°C) und hohen Temperaturen (60 - 80°C) verbessern den Fit in Abb. 5.24 deutlich.

In Abb. 5.27, rechts ist der pH-Einfluss auf die Fraktionenverteilung veranschaulicht. Die Übergangstemperatur wird aufgrund der kleineren Gleichgewichtskonstanten von 34°C auf 47°C verschoben. Aufgrund der größeren Entropiedifferenz ist die Steilheit des Übergangs bei pH 6.1 erhöht.

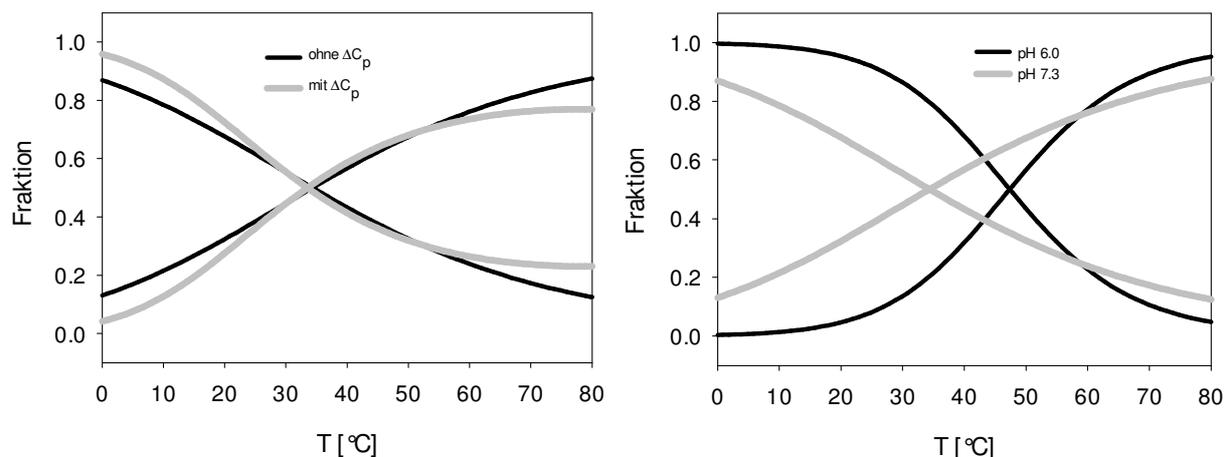


Abb. 5.27: Fraktionenverteilung des Mizellgleichgewichts  $M_B/M_A$ . Links: Einfluss der Wärmekapazitätsdifferenz  $\Delta C_p$ , Rechts: Einfluss des pH-Wertes.

Die temperaturabhängige Druck-Dissoziation der Kasein-Fraktionen ist in Abb. 5.28 für die pH-Werte 6.1 bzw. 7.3 dargestellt. Unabhängig vom pH-Wert zerfällt bei niedrigen Temperaturen die dominierende  $M_A$ -Fraktion nach einer Druckerhöhung bis 200 MPa vollständig. Die pH-abhängigen Unterschiede im Dissoziationsverhalten der Kasein-Mizellen treten bei höheren Temperaturen auf und werden durch die  $M_B$ -Fraktion vermittelt. Wie bereits erwähnt, ist die Dissoziationskonstante des  $M_B$ -Zerfalls bei pH 6.1 mit  $k_{B,MB} = 1.4 \cdot 10^{-5}$  um vier Größenordnungen größer als die

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

Dissoziationskonstante bei pH 7.3. Dadurch wird das Dissoziationsgleichgewicht bei geringem pH-Wert stärker auf die Seite der dissoziierten Kaseine verschoben. Der Dissoziationsdruck, bei welchem die  $M_B$ -Fraktion zur Hälfte zerfallen ist, verschiebt sich bei 70°C von ca. 280 MPa bei pH 7.3 auf 170 MPa bei pH 6.1.

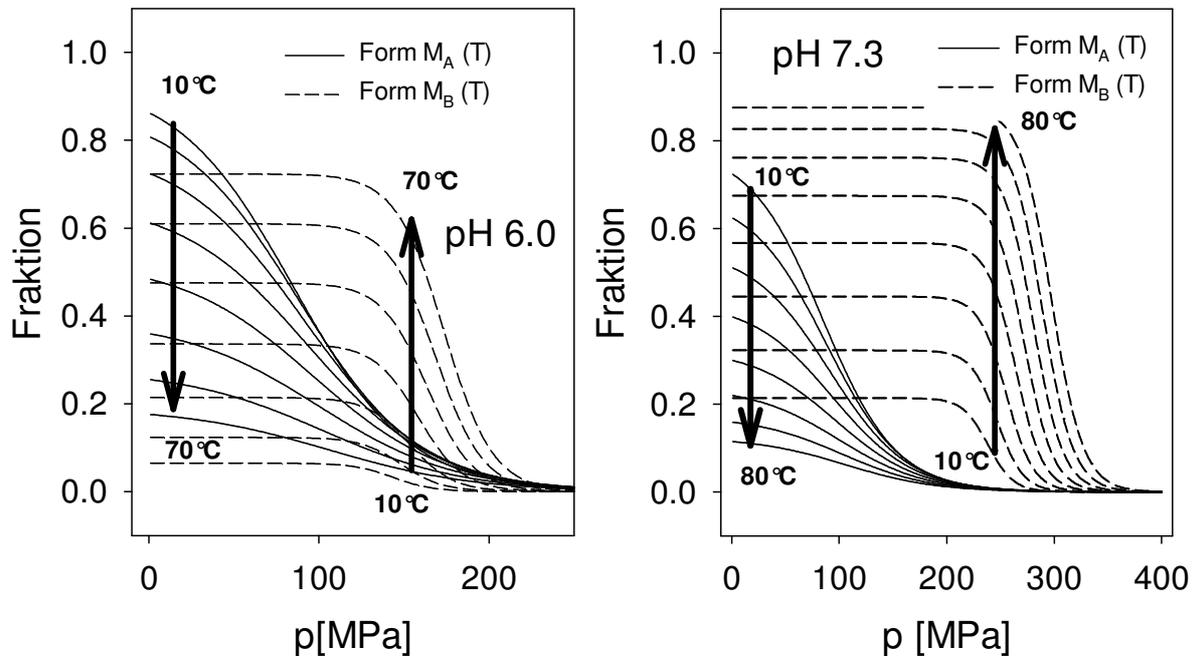


Abb. 5.28: Druckabhängige und temperaturabhängige Fraktionenverteilung der Kasein-Mizellen für die pH-Werte pH 6.1 und pH 7.3. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Fraktionen der Mizellen  $M_A$  und  $M_B$ , nicht aber die der dissoziierten Kaseine A und B gezeigt.

Das parallele Übergangsmodell fordert, dass die temperaturabhängige Fraktionenverteilung der Mizellen-Formen  $M_A$  und  $M_B$  druckunabhängig ist. Um diese Annahme des Modells zu überprüfen, wurde das in Abb. 5.12 gezeigte temperaturabhängige Experiment bei einem Druck von 150 MPa wiederholt. Wie der Abb. 5.28, rechts zu entnehmen ist, sind bei diesem Druck nahezu alle  $M_A$ -Mizellen dissoziiert. Bei 20°C und 150 MPa liegen ca. 30%  $M_B$ -Mizellen im Ansatz vor. Durch eine Temperaturerhöhung auf 80°C sollte sich der Anteil der  $M_B$ -Mizellen auf ca. 90% erhöhen. Abb. 5.29 zeigt das Ergebnis des Experiments im Vergleich mit der Fraktionenverteilung der  $M_B$ -Mizelle, die anhand der Fitparameter aus Tabelle 5.1 berechnet wurde. In guter Näherung ist die Annahme des Modells, dass die Fraktionenverteilung druckunabhängig ist, erfüllt.

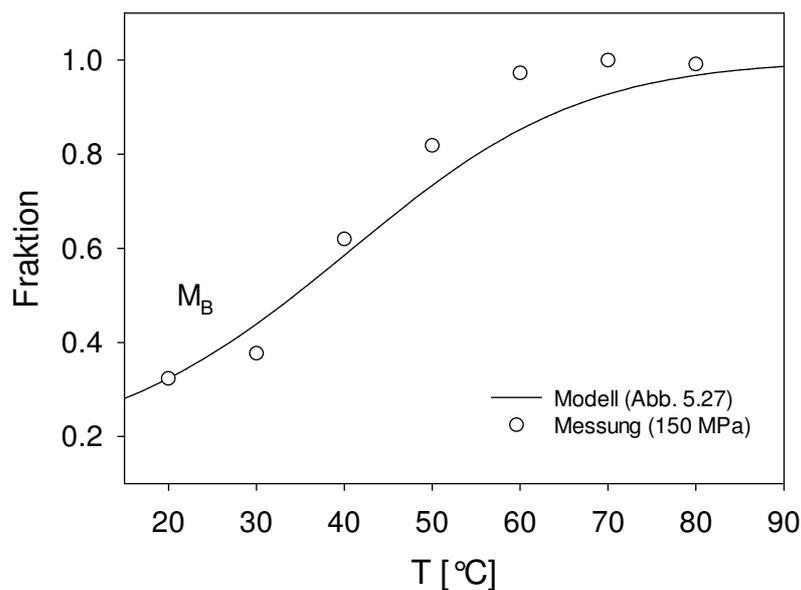


Abb. 5.29: Temperaturabhängige Messung der Mizellen-Form  $M_B$  bei 150 MPa im Vergleich mit der aus dem Simultanfit (Abb. 5.24) berechneten Fraktionenverteilung (Abb. 5.27, links).

Im parallelen Übergangsmodell wird der pH-Effekt bei geringen Kalziumkonzentrationen zum Großteil durch die Destabilisierung der Kasein-Mizellen-Form  $M_B$  beschrieben. In der größeren Dissoziationskonstante  $k_{B,MB}$  bei pH 6.1 im Vergleich zu pH 7.3 kommt die Schwächung der  $CaPO_4$ -Bindung durch die Absenkung des pH-Wertes zum Ausdruck. Auf diesen Sachverhalt wird in Kapitel 5.2.7 genauer eingegangen.

Trotzdem hat das durch pH-Änderung verschobene Temperaturgleichgewicht beider Mizellen-Formen nur einen geringen Einfluss auf die Druckstabilität. Bei pH 6.1 liegt die Übergangstemperatur mit 47°C um 13°C über der Übergangstemperatur bei pH 7.3.

Die durch die pH-Absenkung bewirkte Destabilisierung der  $CaPO_4$ -Bindung wird durch die größere Übergangstemperatur kompensiert. Da aber durch die erhöhte Entropieänderung auch die Steilheit des Übergangs zunimmt, bleibt der Einfluss auf die Druckstabilität gering (Abb. 5.27, rechts).

### 5.2.6 Analyse der kalziumabhängigen Druckdissoziation bei 20°C mit dem parallelen Übergangsmodell

Die kalziumabhängigen Dissoziationsdaten sind in Abb. 5.30, links zusammen mit den modellierten Daten des parallelen Übergangsmodells gezeigt. Die als Ergebnis der simultanen Datenanpassung erhaltene Hyperfläche ist in Abb. 5.31, links zusammen mit den Messdaten dargestellt. Die dazugehörigen Residuen sind auf der rechten Seite über dem Druck, der Kalziumkonzentration und den Messdaten aufgetragen. Die Residuen des Fits sind zufällig um Null verteilt und zeigen keine systematischen Abweichungen. Analog zum temperaturabhängigen Dissoziationsmodell setzt sich der Dissoziationsprozess aus zwei einfachen Übergängen zusammen, die dem Zerfall eines Referenzzustandes und einer mit Kalzium beladenen Kasein-Mizellen-Form entsprechen. Der Referenzzustand wird im Folgenden als  $\text{Ca}^{++}$ -unbeladene Form bezeichnet und entspricht dem Zustand, den die Kasein-Mizellen ohne Zugabe von freiem  $\text{CaCl}_2$  einnehmen.

In Tabelle 5.2 sind die sechs durch nichtlineare Regression bestimmten Modellparameter gezeigt. Für die druckinstabilere,  $\text{Ca}^{++}$ -unbeladene Form wurde eine Dissoziationskonstante von  $k_{A,MA} = 0.076$  und ein Dissoziationsvolumen von  $\Delta V_{A,MA} = -50.8$  ml/mol ermittelt. Die Werte stimmen in guter Näherung mit denen überein, die beim Fit der temperaturabhängigen Dissoziationsdaten für die Druckdissoziation der instabileren Kasein-Mizellen-Form  $\text{MA}_T$  bestimmt wurden. Dagegen gibt es zwischen kalzium- und temperaturabhängiger Druckdissoziation deutliche Unterschiede in den Werten für  $k_{B,MB}$  und  $\Delta V_{B,MB}$ . Bei hohen Kalziumkonzentrationen ist die Dissoziationskonstante mit  $k_{B,MB} = 7.9 \cdot 10^{-10}$  um eine Größenordnung kleiner als bei hohen Temperaturen und geringer Kalziumkonzentration. Das Dissoziationsvolumen ist mit  $\Delta V_{B,MB} = -148.1$  ml/mol ca. 40 ml geringer als beim Dissoziationsübergang bei hohen Temperaturen.

Für die Gleichgewichtskonstante  $L_0$ , die sich auf den Referenzzustand bezieht, wurde ein Wert von  $L_0 = 0.18$  ermittelt. Ohne Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  liegen damit im chemischen Gleichgewicht ca. 85 %  $\text{M}_A$ - und 15 %  $\text{M}_B$ - Mizellen vor.

Für die Beladung wurde ein Wert von  $\Delta X_{B,A} = 1.1$  bestimmt, d.h. ca. 1.1 mol  $\text{Ca}^{++}$  binden an einem mol Kasein. Unter der Annahme, dass nur eine  $\text{Ca}^{++}$ -Bindungsstelle pro Kasein-Mizelle/-Monomer vorliegt, kann die  $\text{Ca}^{++}$ -Bindungskurve für die Kasein-Mizelle rekonstruiert werden. Die in Formel (7.27) definierte Gleichgewichtskonstante

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

steht mit der  $\text{Ca}^{++}$ -Bindungskonstante  $\beta$  und der Kalziumkonzentration  $c_{\text{Ca}^{++}}$  im Fall einer Bindungsstelle pro Molekül über

$$L_{\text{Ca}^{++}}^{A,B} = \beta \cdot c_{\text{Ca}^{++}}^i \quad i=1 \quad (5.13)$$

in Verbindung (Wyman J., Gill S. J., 1990). Die Kalziumbeladung  $X_{\text{Ca}^{++}}$  ist definiert als

$$X_{\text{Ca}^{++}} = \frac{L_{\text{Ca}^{++}}^{A,B}}{1 + L_{\text{Ca}^{++}}^{A,B}} = \frac{\beta \cdot c_{\text{Ca}^{++}}^i}{1 + \beta \cdot c_{\text{Ca}^{++}}^i}. \quad (5.14)$$

Anhand dieser Formel kann die  $\text{Ca}^{++}$ -Bindungskurve aus der Gleichgewichtskonstante  $L$  kalkuliert und die Bindungskonstante  $\beta$  durch einen nichtlinearen Fit bestimmt werden.

Abb. 5.30, rechts zeigt die berechnete Bindungskurve und den Datenfit. Die Bindungskonstante wurde mit  $\beta = 23 \text{ mol}^{-1}$  bestimmt. Eine Halbbeladung der Kasein-Mizelle mit Kalzium ist damit bei einer Kalziumkonzentration  $1/\beta \approx 40 \text{ mM}$  erreicht.

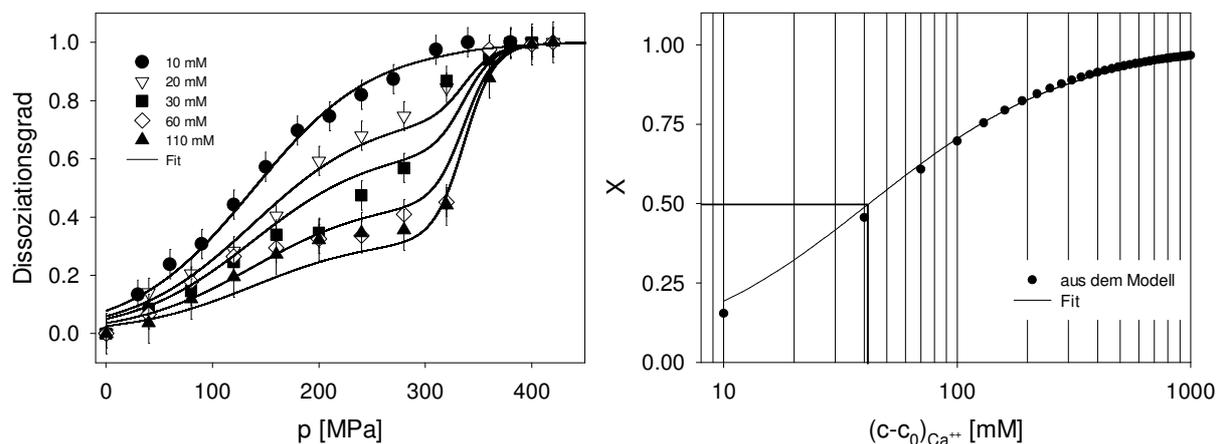


Abb. 5.30, Links: Druckdissoziation einer Kasein-Lösung (w/v 3%) in Abhängigkeit von der freien Kalziumkonzentration bei pH 7.3 und 20°C. Rechts:  $\text{Ca}^{++}$ -Bindungskurve, modelliert durch ein Bindungspolynom für eine  $\text{Ca}^{++}$ -Bindungsstelle (Formeln 5.13 und 5.14).

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

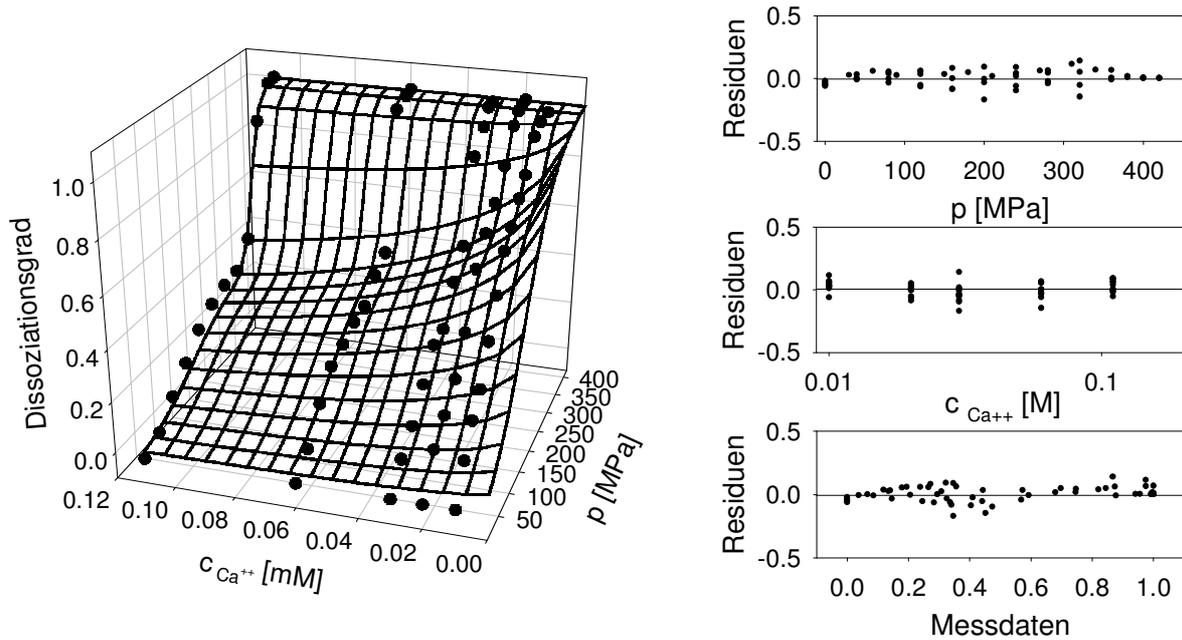


Abb. 5.31, Links: Simultanfit der  $Ca^{++}$ -abhängigen Druckdissoziation. Rechts: Vergleich der Residuenplots in Abhängigkeit von Druck, Kalziumkonzentration und wahren Messwerten (Dissoziationsgrad) für das parallele Übergangsmodell.

Parameter	Werte (pH 7.3)
	$c_{0(Ca^{++})}=0.01$ M
$k_{A,MA}$	0.0764
$\Delta V_{A,MA}$	-50.7 ml/mol
$k_{B,MB}$	$7.99 \cdot 10^{-10}$
$\Delta V_{B,MB}$	-148.1 ml/mol
$L_0$	0.181
$\Delta X_{B,A}$	1.1

Tabelle 5.2: Fitparameter für die kalziumabhängige Druckdissoziation einer 3% Kasein-Lösung bei 20°C, pH 7.3.

Die aus den Parametern des parallelen Übergangsmodells berechneten Fraktionsverteilungen der Kasein-Mizellen sind in Abb. 5.32 als Funktion der Kalziumkonzentration bzw. des Drucks gezeigt. Die halblogarithmische Auftragung in Abb. 5.32, links zeigt einen kalziumabhängigen Übergang zwischen den beiden Mizellen-Formen  $M_A$  und  $M_B$ . Die Mizellen-Form  $M_A$ , die bei geringen

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

Kalziumkonzentrationen stabil ist, entspricht der druckinstabileren Fraktion beim temperaturabhängigen Mizellen-Übergang. Die Kasein-Fraktion  $M_B$  repräsentiert die druckstabilere Kasein-Mizelle, die maximal mit Kalzium beladen ist. Aufgrund der Schwächung hydrophober Kontakte dissoziiert Fraktion  $M_A$  im niedrigen Druckbereich bis 200 MPa vollständig. Hohe Kalziumkonzentrationen verstärken die elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb der Mizelle. Zur Dissoziation dieser Kontakte werden bei 20 °C und pH 7.3 Drücke zwischen 250-300 MPa benötigt (Abb. 5.32, rechts).

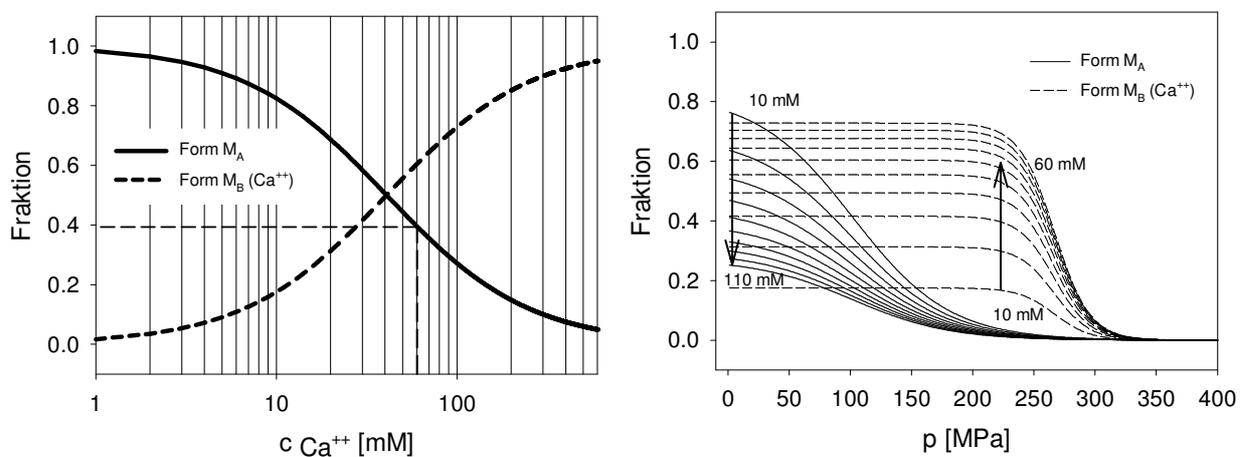


Abb. 5.32: Fraktionenverteilung der Kasein-Mizellen bei pH 7.3 in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration (links) bzw. des Drucks und der Kalziumkonzentration (rechts).

### 5.2.7 Analyse des pH-Effektes auf die kalziumabhängige Druckdissoziation von Kasein-Mizellen

Alle Dissoziationskurven, gemessen bei pH-Werten zwischen pH 6.1 und pH 8.1, und einer Kalziumkonzentration von 10 mM, lassen sich in guter Näherung durch den Modell-Fit aus Tabelle 5.2 beschreiben (Abb. 5.20, links). Der nach einer Erhöhung der freien Kalziumkonzentration auf 60 mM auftretende pH-Effekt bei der Druckdissoziation von Kasein-Mizellen lässt sich ebenfalls durch die in Tabelle 5.2 aufgeführten Fit-Parameter beschreiben. Die typische pH-abhängige Aufspreizung im

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

---

oberen Teil der Dissoziationskurven (Abb. 5.20, rechts) kann modelliert werden, indem in Abhängigkeit vom pH-Wert lediglich die Dissoziationskonstante  $k_{B,MB}$  variiert wird. Sie nimmt von  $k_{B,MB} = 1.8 \cdot 10^{-13}$  bei pH 8.1 bis  $k_{B,MB} = 5.8 \cdot 10^{-8}$  bei pH 6.1 um fünf Größenordnungen zu (Abb. 5.33, links). Der Einfluss der Protonen auf das Dissoziationsgleichgewicht der Kasein-Mizellen lässt sich durch allgemeine Bindungsregeln (linkage rules) (Wyman J., 1964) beschreiben. Die unterschiedliche Protonenbindung an die assoziierte bzw. dissoziierte Form bestimmt die Änderung der Protonenkonzentration während des allosterischen Übergangs. Bei gegebener Temperatur und gegebenem Druck ist die Menge absorbierter Protonen über die *Linkage*-Beziehung gegeben:

$$\left( \frac{\partial \log(k_{B,MB})}{\partial \log(c_{H^+})} \right)_{T, p, n_{Ca^{++}}} = \Delta n_{B,MB}(H^+) \quad (5.15)$$

mit

$$\Delta n_{B,MB}(H^+) = N_B(H^+) - N_{MB}(H^+). \quad (5.16)$$

Anhand dieser Beziehung wird das parallele Kasein-Dissoziationsmodell um den pH-Effekt vervollständigt. Die Erweiterung des Formalismus ist im Anhang dokumentiert (Formel 7.30). Abb. 5.33, rechts zeigt die Ergebnisse des Simultanfits der pH-abhängigen Dissoziationskurven aus Abb. 5.20, rechts. Lediglich durch die Variation des Parameters  $\Delta n_{B,MB}$  konnten alle drei Datensätze anhand der Parameter in Tabelle 5.2 mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R=0.97$  modelliert werden. Sowohl die lineare Regression als auch der Simultanfit ergeben ein  $\Delta n_{B,MB}(H^+) = 2.2 \text{ mol}^{-1}$ . Der positive Wert von  $\Delta n_{B,MB}$  bedeutet, dass es zur Aufnahme von 2.2 Protonen pro dissoziierter Bindung kommt.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

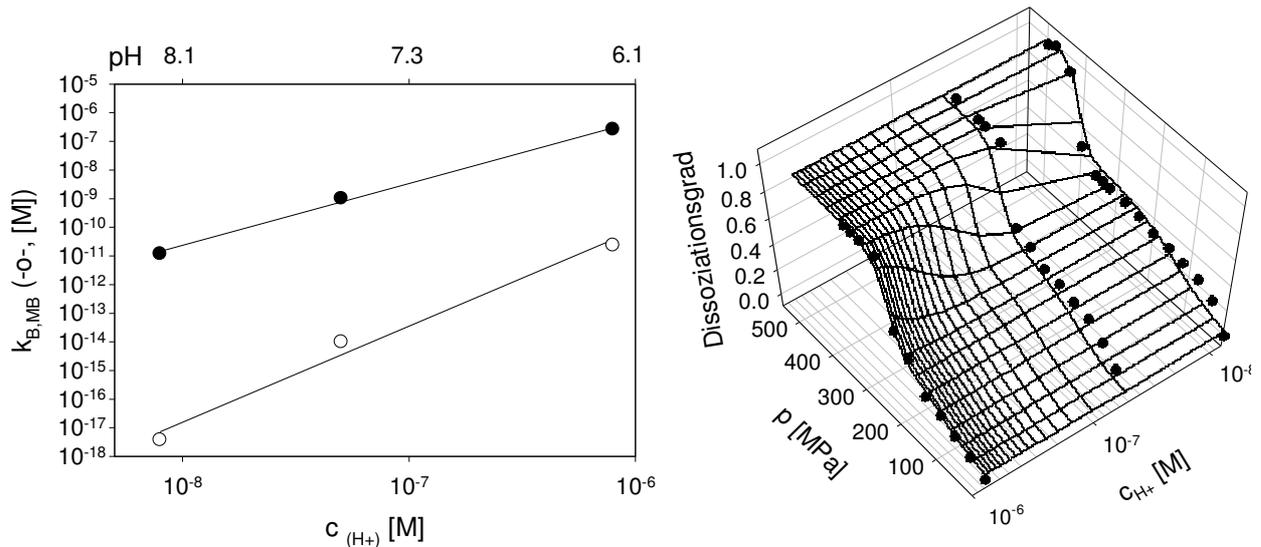


Abb. 5.33, Links: Abhängigkeit der Dissoziationskonstante  $k_{B,MB}$  von der Protonenkonzentration bzw. dem pH-Wert (-•- Monomer-Monomer-Modell ; -o- Dimer-Monomer-Modell). Rechts: Simultanfit der pH-abhängigen Kasein-Dissoziation nach Erweiterung des parallelen Dissoziations-Modells

Da die Dissoziation einer Bindung zu zwei Reaktionspartnern führt, wurde die pH-Abhängigkeit von  $k_{B,MB}$  auch für den Fall eines Dimer-Monomer-Zerfalls bestimmt. Dafür wurde Formel (7.25) für den einfachen Monomer-Monomer-Übergang durch die Formel für den Dimer-Monomer-Übergang

$$\alpha_{Ca^{++}}^{2B,MB} = -\frac{1}{2} \cdot k_{Ca^{++}}^B \cdot e^{\left(\frac{-(p-p_0)\Delta V_{Ca^{++}}^{B,M}}{R \cdot T}\right)} + \frac{1}{2} \cdot \sqrt{\left(k_{Ca^{++}}^B \cdot e^{\left(\frac{-(p-p_0)\Delta V_{Ca^{++}}^{B,M}}{R \cdot T}\right)}\right)^2 + 4 \cdot k_{Ca^{++}}^B \cdot e^{\left(\frac{-(p-p_0)\Delta V_{Ca^{++}}^{B,M}}{R \cdot T}\right)}} \quad (5.17)$$

ersetzt. Wie aus Abb. 5.33, links hervorgeht, wird durch die Dimer-Monomer-Übergangsanalyse die Steigung kaum verändert. Der Wert liegt mit  $\Delta n_{B,MB}(H^+) = 2.8$  zwischen 2 und 3 und ist, aufgrund der Dimension von  $k_{B,MB}$ , dimensionslos. Damit kann er als Protonenzahl aufgefasst werden, um die sich der assoziierte und dissoziierte Zustand unterscheiden.

Wie die Analyse der kalziumabhängigen Druckdissoziation ergab, wird der Zerfall der Kasein-Mizellen  $M_B$  durch die Schwächung der Kalziumphosphat-Kontakte bestimmt.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

---

Diese bestehen sowohl innerhalb von colloidalen Kalziumphosphat-Partikeln als auch zwischen einer phosphorylierten Aminosäure und Kalzium.

Abb. 5.34 zeigt für beide Reaktionen die Dissoziationsgleichgewichte. Da es sich um eine hydrolytische Dissoziation handelt, kommt es auf Seiten der Dissoziationsprodukte zur Basen- bzw. Säurebildung. Während die phosphorylierten Aminosäuren 2 Protonen binden, lagert dissoziiertes Kalziumphosphat 3 Protonen an. Die nachstehenden Reaktionen in Abb. 5.34 sollen verdeutlichen, dass die entstandenen Säuren unter Druck infolge Elektrostriktion wiederum dissoziieren. Aufgrund des 0.1 M Tris-Puffers bleibt aber die Protonenkonzentration unter Druck konstant. Die Dissoziationsgleichgewichte befinden sich daher auf der Seite der Phosphorsäure bzw. des Hydrogenphosphates.

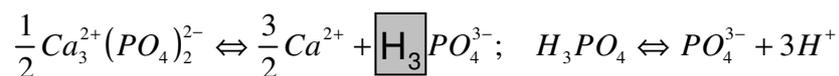


Abb. 5.34: Beispiele für ionische Kalziumkontakte innerhalb der Kasein-Mizelle. Oben: Kalziumbindung an eine phosphorylierte Aminosäure (z.B. Serin) Unten: Dissoziation von  $Ca_3(PO_4)_2$  als Bestandteil des colloidalen Kalziumphosphats.

Unter der Annahme, dass die Kalziumphosphatkontakte innerhalb der Kasein-Mizelle zu einer Hälfte innerhalb colloidaler Kalziumpartikel, zur anderen Hälfte aus Kontakten zwischen Kalziumionen und phosphorylierten Aminosäuren bestehen, kommt man zu einer mittleren Protonenbindungszahl von 2.5. Der Wert stimmt recht gut mit dem experimentell ermittelten Ergebnis überein.

### 5.2.8 Analyse der Druckdissoziation von Kasein-Mizellen in Abhängigkeit der Temperatur und der Kalziumkonzentration

Das dreidimensionale Reaktionsschema in Abb. 5.35 veranschaulicht die Kasein-Fractionen, die sich unter Druck, Temperatur- und  $Ca^{++}$ -Einfluss ausprägen. Die Kasein-Mizellen MA sind unter Normalbedingungen (0.1 MPa, 20°C, 10 mM  $Ca^{++}$ )

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

stabil. Nach einer Temperaturerhöhung bzw. einer  $\text{Ca}^{++}$ -Anlagerung erhöht sich die Druckstabilität der Kasein-Mizellen. Diese Tatsache wurde in den vorherigen Kapiteln (5.2.5 und 5.2.6) anhand von kalzium- bzw. temperaturabhängigen Übergängen analysiert, die zu den druckstabileren Kasein-Mizellen  $\text{MB}_{\text{Ca}^{++}}$  und  $\text{MB}_{\text{T}}$  führten.

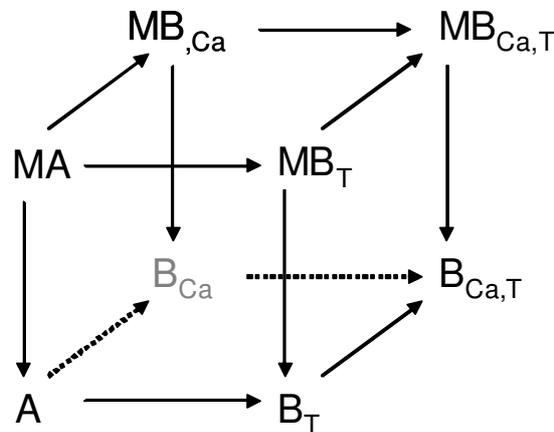


Abb. 5.35: Reaktionsschema des parallelen Zwei-Übergangmodells zur Beschreibung der Druckdissoziation von Kasein-Mizellen bei hohen Temperaturen und Kalziumkonzentrationen.

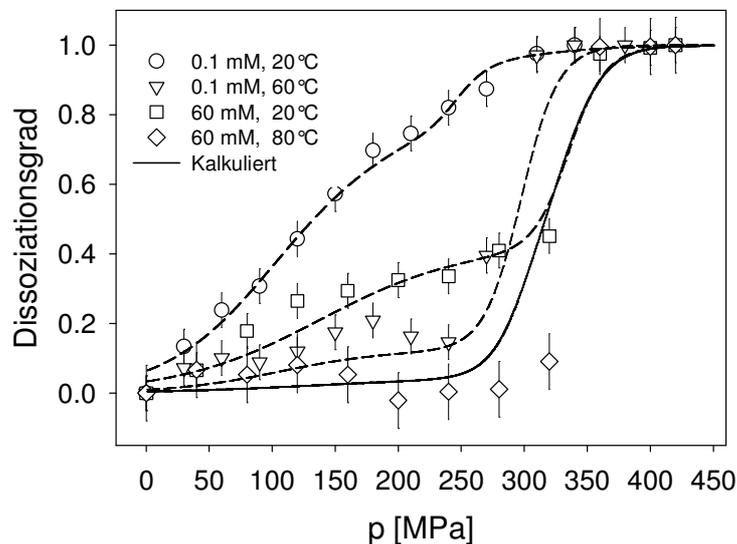


Abb. 5.36: Druckdissoziation einer 3%igen Kasein-Lösung in Abhängigkeit von Kalziumkonzentration (mM) und Temperatur; (—): berechneter maximaler Effekt von Temperatur und  $\text{Ca}^{++}$  zusammen.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

---

Durch Mischung des Temperatur- und  $\text{Ca}^{++}$ -Effekts kann die Druckstabilität der Kasein-Mizellen weiter gesteigert werden. Im parallelen Übergangsmodell wird dieser experimentelle Befund berücksichtigt, indem eine weitere Mizellen-Fraktion  $\text{MB}_{\text{Ca}^{++},\text{T}}$  gemäß Abb. 5.35 eingeführt wird. Sie steht über die bereits analysierten temperatur- und kalziumabhängigen Gleichgewichte mit den Mizellen  $\text{MB}_{\text{T}}$  und  $\text{MB}_{\text{Ca}^{++}}$  in Beziehung. Unter der Annahme, dass Temperatur- und Kalzium-Effekt unabhängig voneinander sind, gelangt man von Kasein-Mizelle  $\text{MB}_{\text{T}}$  zu  $\text{MB}_{\text{Ca}^{++},\text{T}}$  auf analogem Weg, wie von MA zu  $\text{MB}_{\text{Ca}^{++}}$ . Die Druck-Dissoziationskurve  $\alpha_{\text{Ca}^{++},\text{T}}^{\text{G}}$ , welche bei  $80^\circ\text{C}$  und  $60\text{ mM Ca}^{++}$  gemessen wurde, kann daher über

$$\alpha_{\text{Ca}^{++},\text{T}}^{\text{G}} = \frac{1}{(1 + L_{\text{Ca}^{++}}^{\text{A,B}})} \cdot \alpha_{\text{T}}^{\text{G}} + \frac{L_{\text{Ca}^{++}}^{\text{A,B}}}{(1 + L_{\text{Ca}^{++}}^{\text{A,B}})} \cdot \alpha_{\text{Ca}^{++}}^{\text{B}} \quad (5.18)$$

kalkuliert werden. In Formel (7.29) wird dabei  $\alpha_{\text{Ca}^{++}}^{\text{A}}$  durch  $\alpha_{\text{T}}^{\text{G}}$  (Formel 7.28) ersetzt. Die berechnete Kurve in Abb. 5.36 ist nicht in der Lage, die Druckstabilität der Kasein-Fraktion  $\text{MB}_{\text{Ca}^{++},\text{T}}$  vollständig zu beschreiben. Daraus kann geschlossen werden, dass Temperatur und Kalziumkonzentration nicht unabhängig, sondern vielmehr synergistisch wechselwirken. Diese Synergieeffekte finden auf zwei Ebenen statt. Zum einen ist das Gleichgewicht zwischen Kalziumionen in Lösung und gebundenem Kalzium temperaturabhängig. Mit steigender Temperatur kommt es zur Abnahme der freien Kalziumkonzentration und das Dissoziationsgleichgewicht der Kalziumphosphatbindung verschiebt sich auf die Seite des assoziierten Zustands. Andererseits führt eine Kalziumbindung zur Absättigung negativer Ladungen. Dadurch wird die elektrostatische Abstoßung der Kaseine minimiert und die Ausbildung von zusätzlichen hydrophoben Kontakten ermöglicht (Horne D. S, 1998). Der beobachtete synergistische Temperatur- und Kalziumeffekt kann modelliert werden, indem ein Vorfaktor für die Gleichgewichtskonstante L eingeführt wird. In Abb. 5.37 ist der Einfluss des Verstärkungsfaktors auf die Dissoziationskurve gezeigt.

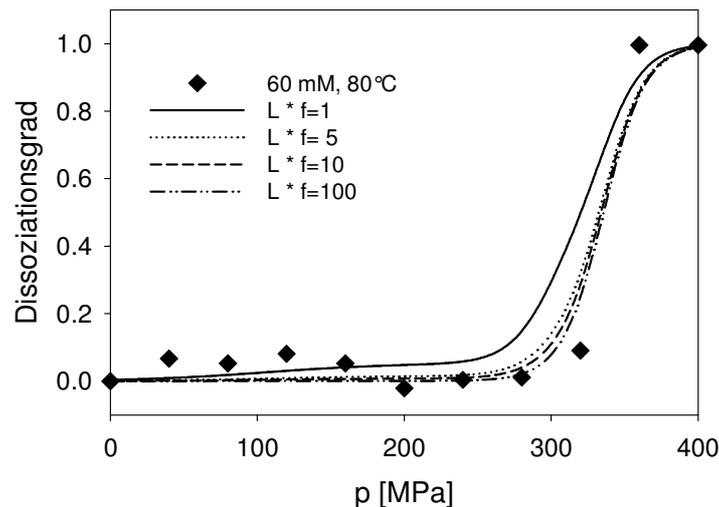


Abb. 5.37: Modellierung des synergistischen Effekts durch Einführung eines Verstärkungsfaktors  $f$ .

### 5.2.9 Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse

Für die Analyse der in den Kapiteln 5.2.5-5.2.8 beschriebenen Experimente zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle in Abhängigkeit von Temperatur, Kalziumkonzentration und pH-Wert wurde ein einfaches paralleles Übergangsmodell entwickelt und angewendet. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist die temperaturabhängige Konformationsänderung von  $\beta$ -Kasein, die zur Selbstassoziation führt, für den thermischen Übergang der Kasein-Mizelle verantwortlich (Kapitel 5.2.5). Dafür sprechen eine ähnliche Übergangstemperatur  $T_0$  und eine in derselben Größenordnung liegende positive Entropiedifferenz. Mit der temperaturabhängigen Integration der  $\beta$ -Kaseine in die Mizelle geht eine Verstärkung der hydrophoben Kontakte einher. Die gleiche Ursache kommt für das Übergangsverhalten der Kasein-Mizelle in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration in Betracht, da neben der Temperatur auch die Anhebung der Kalziumkonzentration die Assoziation der Kaseine auslöst. In diesem Fall kommt es zur Verstärkung der elektrostatischen Kontakte zwischen den Kaseinen innerhalb der Mizelle.

Anhand der durchgeführten *in-situ* Druckexperimente war es möglich, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zu separieren. Aus der in Abb. 5.20, links gezeigten pH-unabhängigen Druckdissoziation kann gefolgert werden, dass die Mizelle bei niedrigen Kalziumkonzentrationen und 20°C hauptsächlich durch

hydrophobe Kontakte stabilisiert wird. Bei niedrigen Kalziumkonzentrationen macht sich der pH-Effekt erst bei hohen Temperaturen bemerkbar (Abb. 5.24 und Abb. 5.26). Ein möglicher Grund dafür ist die temperaturabhängige Verschiebung des Kalzium-Gleichgewichts. Abb. 5.38, links-oben zeigt für die temperaturabhängige Druckdissoziation bei pH 7.3 das Reaktionsschema und abgeleitete thermodynamische Größen. Das Dissoziationsvolumen der bei niedrigen Temperaturen vorherrschenden Kasein-Mizellen-Form  $M_A$  ist mit  $-61$  ml/mol deutlich kleiner als das Dissoziationsvolumen der druckstabileren Kasein-Mizellen-Form  $M_B$  ( $-204$  ml/mol). Eine Ursache dafür ist die größere Polydispersität der Kasein-Mizellen bei niedrigen Temperaturen (Abb. 5.11, rechts) und die damit einhergehende Verbreiterung des Dissoziationsüberganges (Kapitel 5.2.2). Andererseits sind die Kaseine innerhalb der Kasein-Mizelle stark hydratisiert. Die mit der Temperaturerhöhung einsetzende Verstärkung hydrophober Kontakte zwischen den Kaseinen könnte mit einer Abnahme der Hydratisierung einhergehen. Während einer Druckdissoziation würden diese Kontaktflächen hydratisiert werden und somit einen Beitrag zum negativen Dissoziationsvolumen liefern (Kapitel 2). Ein weiterer Beitrag könnte elektrostatischer Natur sein, da es mit steigender Temperatur zu einer Verschiebung des Kalzium-Gleichgewichts von der freien in die colloidal-gebundene Phase kommt. Aus den ermittelten Dissoziationskonstanten  $k_{A,MA}$  und  $k_{B,MB}$  (Tabelle 5.1) können freie molare Dissoziationsenergien berechnet werden, die chemischen Potentialdifferenzen zwischen Kasein-Monomeren und der Kasein-Mizelle bei Normaldruck entsprechen. Die molare Dissoziationsenergie für die Kasein-Mizellen-Form  $M_A$  ist bei Normaldruck und  $20^\circ\text{C}$  mit  $\Delta\mu_{A,MA} = 5.8$  kJ/mol geringer als für die Kasein-Mizellen-Form  $M_B$  mit  $\Delta\mu_{B,MB} = 46$  kJ/mol. Abb. 5.38, oben-rechts zeigt für den Temperaturbereich von  $10^\circ\text{C}$  bis  $80^\circ\text{C}$  die berechnete chemische Potentialdifferenz bei Normaldruck. Aufgrund des zunehmenden Anteils der druckstabilen Kasein-Mizellen-Form  $M_B$  (Abb. 5.27, links), erhöht sich die effektive Stabilität der Kasein-Mizelle mit zunehmender Temperatur von  $15$  kJ/mol bei  $10^\circ\text{C}$  auf  $50$  kJ/mol bei  $80^\circ\text{C}$ .

Für die Mizellenformen  $M_B$  und  $M_A$  wurde eine positive Entropiedifferenz von  $\Delta S_{MB,MA} = 125$  J/(mol\*K) ermittelt. Bei der Übergangstemperatur  $T_0$  ergibt sich aus  $T_0 \cdot \Delta S_{MB,MA}$  eine Enthalpiedifferenz  $\Delta H_{MB,MA}(T_0)$ , die der Differenz des chemischen Standardpotentials zwischen den Mizellen-Formen  $M_A$  und  $M_B$  von  $\Delta\mu_{MB,MA}^0 = 38.5$

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

kJ/mol entspricht. Die Differenz der molaren Dissoziationsenergien bei Normaldruck, die durch Analyse der isothermen Druckdissoziationskurven errechnet wurden, beträgt  $\Delta\mu_{B,MB} - \Delta\mu_{A,MA} = 40.2$  kJ/mol und entspricht damit in etwa der Enthalpiedifferenz beider Mizellenformen  $\Delta H_{MB,MA}(T_0) = 38.5$  kJ/mol an der Übergangstemperatur  $T_0$ , innerhalb eines Fehlers von 5%.

Nach einer Erhöhung der freien Kalziumkonzentration auf 60 mM kommt es ab 200 MPa zu einer pH-Abhängigkeit der Druckdissoziationskurven (Abb. 5.20, rechts). Bis 200 MPa verläuft die Dissoziation jedoch unabhängig vom pH-Wert. Der pH-unabhängige Teil der Dissoziationskurve entspricht nach der Analyse der kalziumabhängigen Dissoziationsdaten (Kapitel 5.2.6) dem Zerfall der Kasein-Mizellen-Form  $M_A$ . Bei Normaldruck und 60 mM freier Kalziumkonzentration liegen ca. 40%  $M_A$  – und 60%  $M_B$  - Mizellen im Ansatz vor (Abb. 5.32, links). Wird der Druck auf 200 MPa erhöht, so liegen alle  $M_A$ -Mizellen im dissoziierten, die  $M_B$ -Mizellen jedoch noch im mizellaren Zustand vor (Abb. 5.32, rechts).

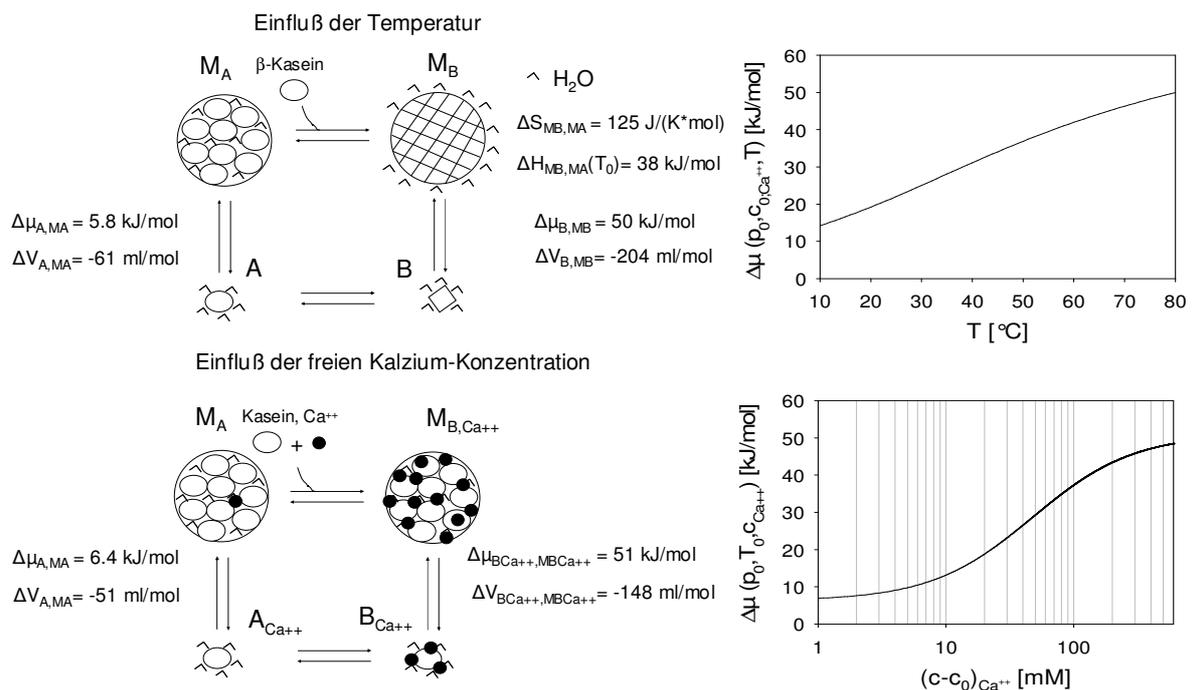


Abb. 5.38: Einfluss von Druck, Temperatur und der freien Kalziumkonzentration auf die Stabilität von Kasein-Mizellen. Links-oben: Einfluss der Temperatur auf die Druckstabilität. Rechts-oben: Temperaturabhängiger Verlauf der chemischen Potentialdifferenz zwischen Kasein-Mizelle und Kasein-Monomeren. Links-unten: Einfluss der freien Kalziumkonzentration auf die Druckstabilität bei 20 °C. Rechts-unten: Kalziumabhängiger Verlauf der chemischen Potentialdifferenz zwischen Kasein-Mizelle und Kasein-Monomeren.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

---

Somit dissoziieren bei 20 °C und Drücken bis 200 MPa Kasein-Mizellen vom  $M_A$ -Typ, die hauptsächlich durch pH-unabhängige hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert sind. Bei Drücken über 200 MPa werden die vom pH-Wert abhängigen elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb der Mizelle destabilisiert und damit auch Mizellen vom  $M_B$ -Typ dissoziiert. In Abb. 5.38, unten-links sind die zum Modell korrespondierenden thermodynamischen Größen gezeigt. Die Druckdissoziation der Kasein-Form  $M_A$  ist durch ein Dissoziationsvolumen von  $\Delta V_{A,MA} = -51$  ml/mol und eine freie molare Dissoziationsenergie von  $\Delta\mu_{A,MA} = 6.4$  kJ/mol charakterisiert. Die Werte der Größen entsprechen nicht exakt denen, die für die temperaturabhängige Druckdissoziation ermittelt wurden (Abb. 5.38, oben-links), was aus den vom Simultanfit errechneten Fehlern resultiert (St.Abw. ( $\Delta V_{A,MA}$ ) = 7 ml/mol, St.Abw. ( $\Delta\mu_{A,MA}$ ) = 0.5 kJ/mol; siehe Tabelle 5.1, Spalte 4). Die Werte überlappen sich aber innerhalb einer Standardabweichung. Für die druckstabilere Kasein-Mizelle  $M_B$  wurde ein Dissoziationsvolumen  $\Delta V_{B,MB} = -148$  ml/mol und eine chemische Standardpotentialdifferenz von  $\Delta\mu_{B,MB} = 51$  kJ/mol ermittelt. Die größeren Werte der Dissoziationsenergie sowie des Dissoziationsvolumens im Vergleich zur Situation bei geringer Kalziumkonzentration, beruhen auf zusätzlichen elektrostatischen Kalziumphosphat-Kontakten innerhalb der Mizelle (Abb. 5.34).

Mit zunehmender Kalziumkonzentration erhöht sich die Stabilität der Kasein-Mizelle. In Abb. 5.38, unten-rechts ist der nach dem parallelen Übergangsmodell berechnete Verlauf der molaren Dissoziationsenergie bei Normaldruck dargestellt.

### 5.2.10 Zur Frage der Reversibilität druckbehandelter Kasein-Mizellen

#### Druckabhängige *in-situ* Lichtstreuexperimente

Um die Reversibilität der Druckdissoziation von Kasein-Mizellen zu testen, wurden Lichtstremessungen unter Druck in Kombination mit AFM-Messungen bei Normaldruck durchgeführt.

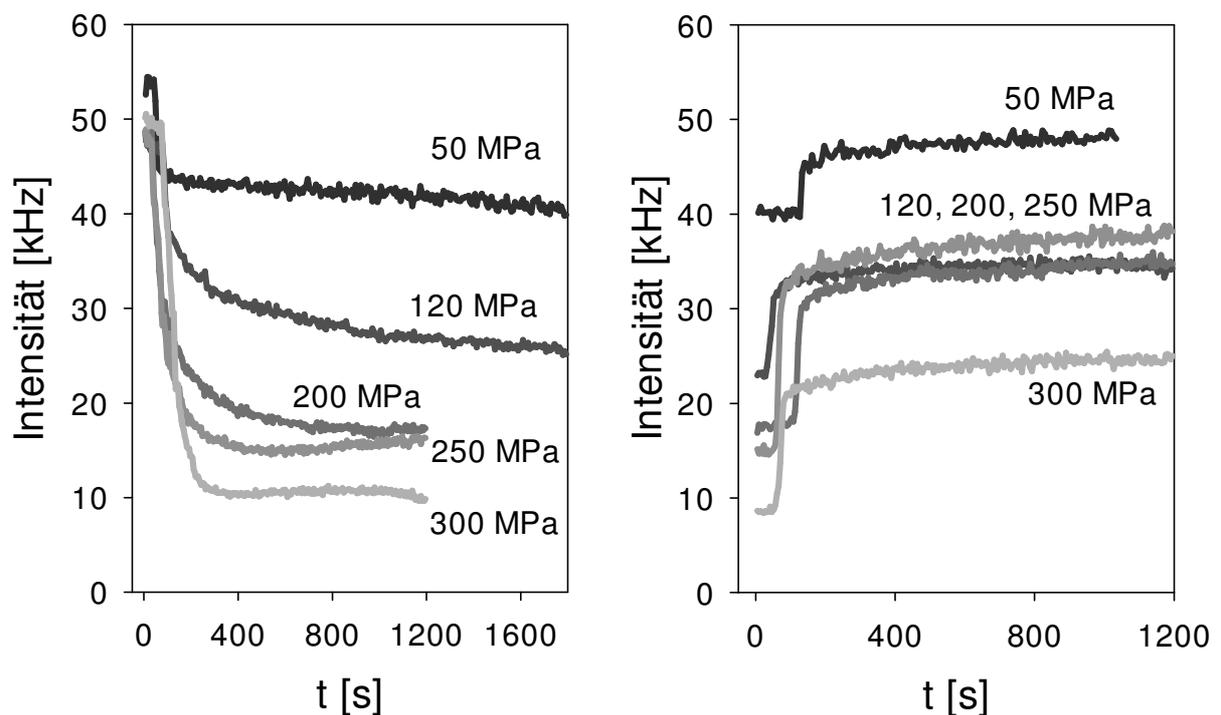


Abb. 5.39: Lichtstremessungen einer 3%igen Kasein-Mizellen-Lösung bei pH 7.3 in  $177^\circ$  Rückwärtsstreuung unter Druck. Links: Kinetik nach Druckaufbau von 50 MPa, 120 MPa, 200 MPa, 250 MPa und 300 MPa. Rechts: Kinetik nach Druckentspannung auf 0.1 MPa Normaldruck.

Abb. 5.39, links zeigt die zeitliche Entwicklung der Lichtstreuintensität, nachdem der Druck innerhalb der ersten 20 s von Normaldruck auf 50 MPa, 120 MPa, 200 MPa, 250 MPa und 300 MPa angehoben wurde. Eine Druckerhöhung führt zur Abnahme der Lichtstreuintensität, wobei gleichzeitig die ursprünglich trübe Kaseinlösung aufklärt. Die Gleichgewichtszustände unter Druck werden nach ca. 30 min erreicht. Sie beschreiben unter den hier gewählten Bedingungen einen einfachen Übergang

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

gemäß (Abb. 5.16, links), welcher bei ca. 320 MPa vollendet ist. In Abb. 5.39, rechts ist die Kinetik aus diesen Gleichgewichtszuständen heraus nach der Druckentspannung auf Normaldruck gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Druckbehandlung von Kasein-Mizellen bei Drücken größer als 40 MPa nicht reversibel ist. Nach der Entspannung von Drücken zwischen 120-250 MPa konvergieren die Lichtstreu kinetiken gegen einen konstanten Intensitätswert. Nach einer Druckbehandlung mit 300 MPa wird nach der Druckentspannung nur noch ca. die Hälfte dieses Niveaus erreicht. Aus den Lichtstreu kinetiken wird ersichtlich, dass dem kontinuierlichen Übergang der Druckdissoziation zwei diskrete Übergänge der Reassoziati on bei Normaldruck gegenüberstehen.

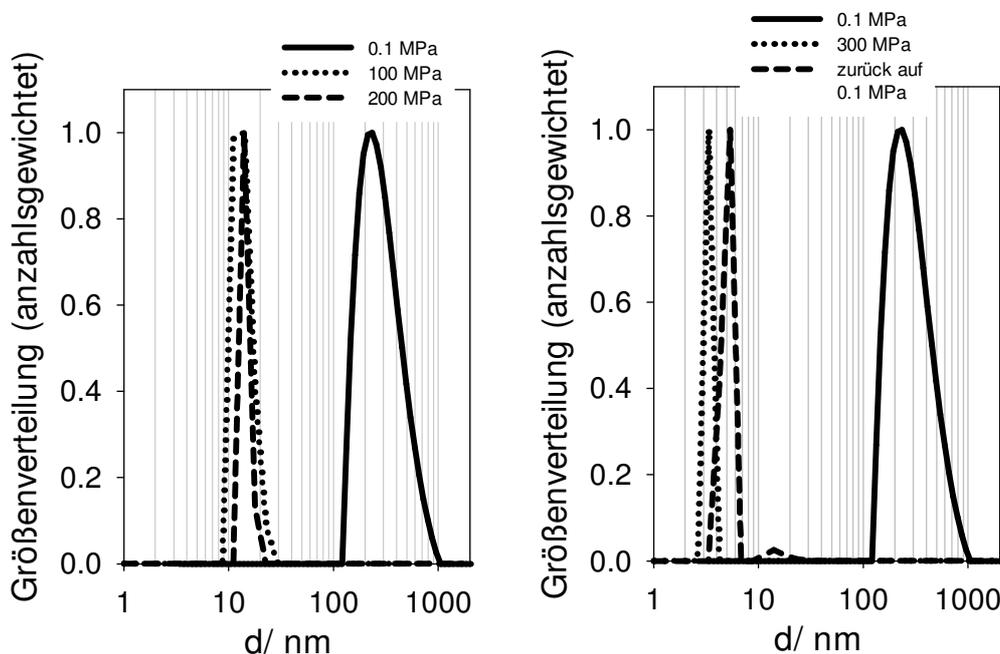


Abb. 5.40: Anzahlsgewichtete (100-300 MPa) und ungewichtete (0.1 MPa) Größenverteilungen der Kasein-Mizellen-Dissoziation bei pH 7.3, 20°. Links: Druckdissoziation bis 200 MPa, Rechts: Druckdissoziation bis 300 MPa und anschließende Reassoziati on nach Druckentspannung.

Über dynamische *in-situ* Lichtstremessungen wurden die Größen der Kaseinpartikel während der Druckdissoziation bzw. -assoziati on ermittelt (Abb.5.40). In Abb.5.40, links sind die auf Teilchenanzahl gewichteten Größenverteilungen bei Normaldruck mit denen bei 100 bzw. 200 MPa vergleichend dargestellt. Bei Drücken von 100 bis 200 MPa dissoziiert die breite Verteilung der ca. 150 bis 400 nm großen Mizellen in ca. 10-20 nm große Partikel. Eine Druckbehandlung mit 300 MPa führt zur

Dissoziation der Kasein-Mizellen in Partikel mit hydrodynamischen Durchmessern von 1-2 nm (Abb.5.40, rechts). Nach einer Druckentspannung von 300 MPa auf Normaldruck werden zu ca. 96 % 5 nm großen Partikel bzw. zu 3% 10-20 nm große Partikel gebildet. Die Kinetiken der mittleren Streuintensität und die dynamischen Lichtstremessungen an den Gleichgewichtszuständen zeigen damit eindeutig, dass die Druckdissoziation der Kasein-Mizelle ein irreversibler Prozess ist.

### Ex-situ AFM-Experimente

Die irreversiblen Endzustände wurden mit AFM als Funktion des Drucks, mit welchem die vorausgegangene Druckbehandlung erfolgte, näher untersucht (Abb.5.41). Zur quantitativen Auswertung wurden die Strukturen auf den AFM-Bildern ausgemessen und die Häufigkeiten in den einzelnen Abstandsklassen bestimmt. Es wurden dafür Daten aus jeweils bis zu 5 AFM-Messungen pro Druck herangezogen. Die erstellten Histogramme der Kasein-Größen sind symmetrisch und lassen sich durch Gauss-Fits gut beschreiben. Die errechneten Mittelwerte stimmen in guter Näherung mit den Werten aus den Gauss-Verteilungen überein. Histogramme und Fits sind in Abb.5.41 neben einem repräsentativen AFM-Bild der jeweiligen Versuchsreihe dargestellt.

Auf dem AFM-Bild der druckunbehandelten Kasein-Probe sind Kasein-Mizellen zu erkennen, welche eine Untereinheitenstruktur aufweisen. Die Mizellen erscheinen als lockerer, fragiler Verbund kleinerer Fragmente. Mehrmaliges Abrastern der Probe führt zu einem steigenden Anteil dieser kleineren Sub-Partikel, welche ca. 10 nm groß sind. Sie wurden aus diesem Grund bei der Erstellung der ersten beiden Histogramme (0.1 und 0.4 MPa) in Abb.5.41 nicht berücksichtigt. Die AFM-Bilder der Proben, die mit 120-240 MPa behandelt wurden, zeigen kompakte homogene Mizellen. Sie weisen keine Untereinheitenstruktur auf und ähneln kompakten Kugeln. Auf den AFM-Aufnahmen von Kasein-Proben, die einer Druckbehandlung mit 280-400 MPa unterzogen wurden, können keine Kasein-Mizellen mehr nachgewiesen werden. Die detektierten Partikel haben Durchmesser von 20-30 nm und liegen damit in der Dimension von Kasein-Submizellen.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

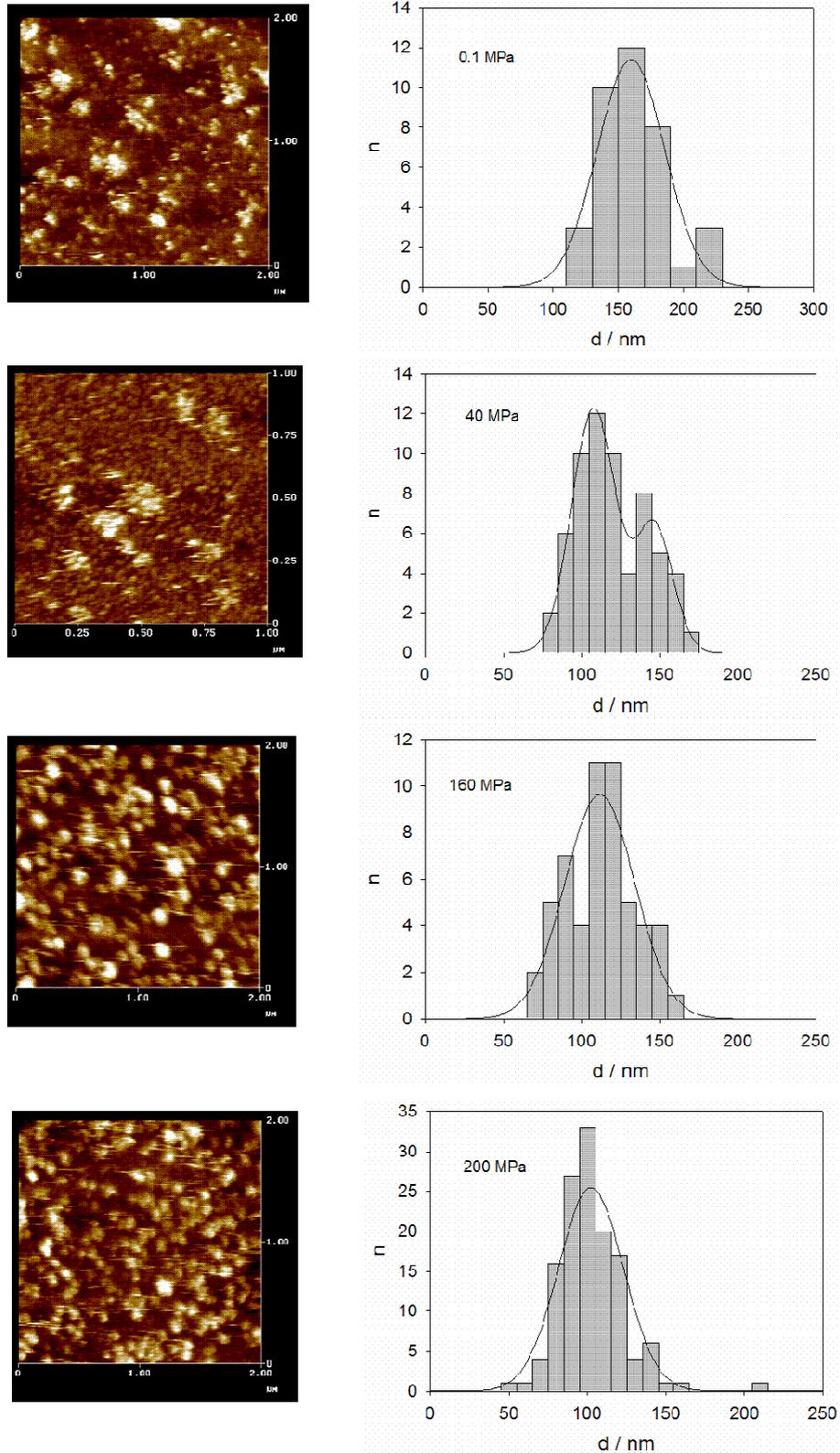


Abb.5.41-A: AFM-Bilder (links) und daraus erstellte Histogramme der Kaseinmizellen-Partikelgrößen (rechts) für die Vergleichsprobe bei 1 bar bzw. nach Druckbehandlung mit 40 MPa, 160 MPa und 200 MPa.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

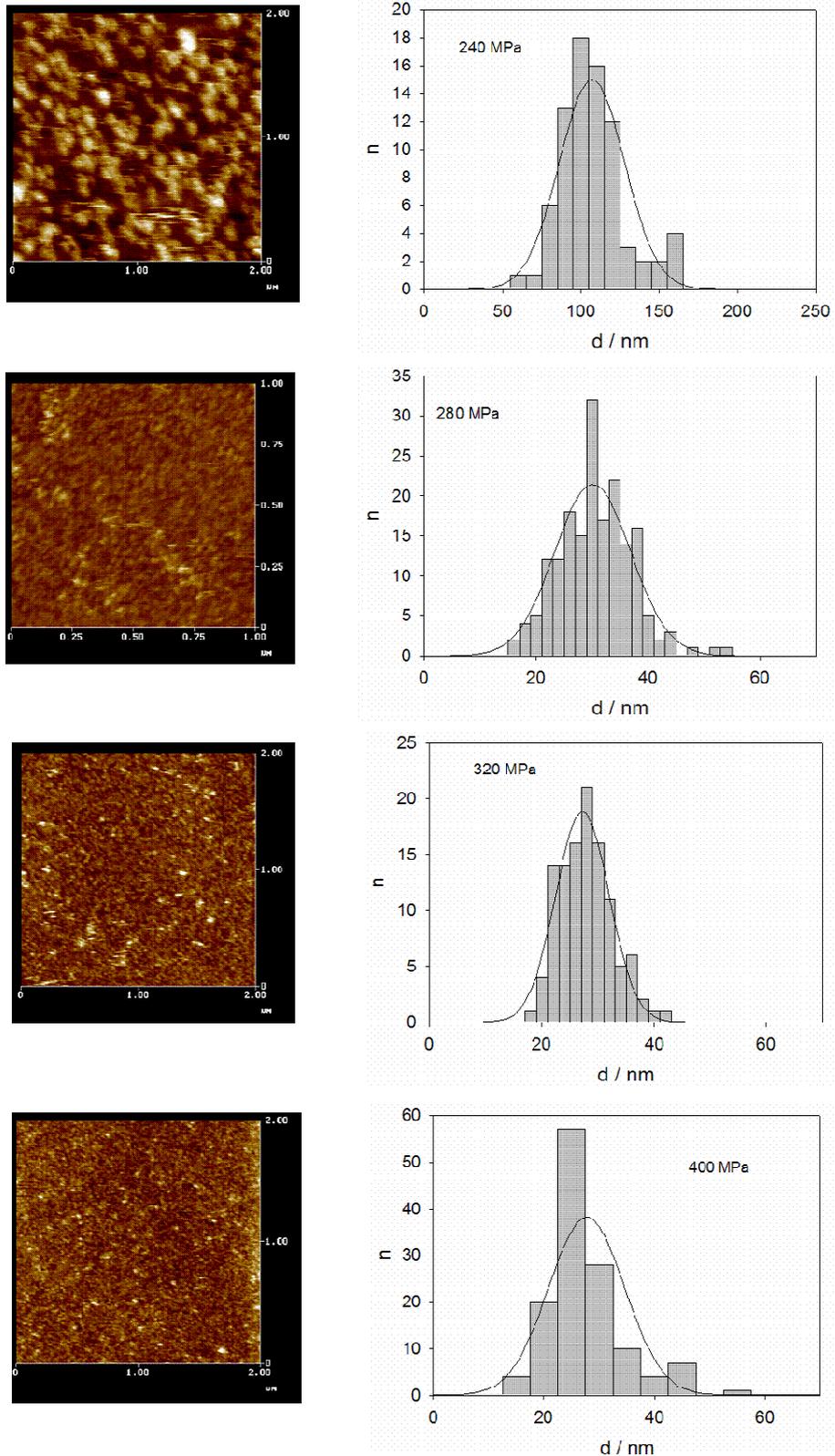


Abb.5.41-B: AFM-Bilder (links) und daraus erstellte Histogramme der Kaseinmizellen-Partikelgrößen (rechts) nach Druckbehandlung mit 240 MPa, 280 MPa, 320 MPa und 400 MPa.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

Die aus den AFM-Messungen erstellten Histogramme der reassozierten druckbehandelten Kasein-Proben (Abb.5.41, rechts) sind in Abb. 5.42 als flächennormierte Dichten vergleichend dargestellt. Abb. 5.42, links zeigt den Effekt einer Druckbehandlung bis 240 MPa auf die Kasein-Mizellen. Das Maximum der druckunbehandelten Probe mit einem mittleren Mizellen-Durchmesser von ca. 160 nm verschiebt sich auf ca. 110 nm. Die Wahrscheinlichkeitsdichte der mit 40 MPa behandelten Probe liegt im Übergangsbereich zwischen den beiden Zuständen und zeigt eine bimodale Form. Auf der rechten Seite von Abb. 5.42 ist der Einfluss der Druckbehandlung mit 280-400 MPa auf die Mizellengröße dargestellt. Die Durchmesser der Kasein-Mizellen sind trotz unterschiedlicher Druckbehandlung nahezu deckungsgleich um einen mittleren Wert von 25 nm verteilt.

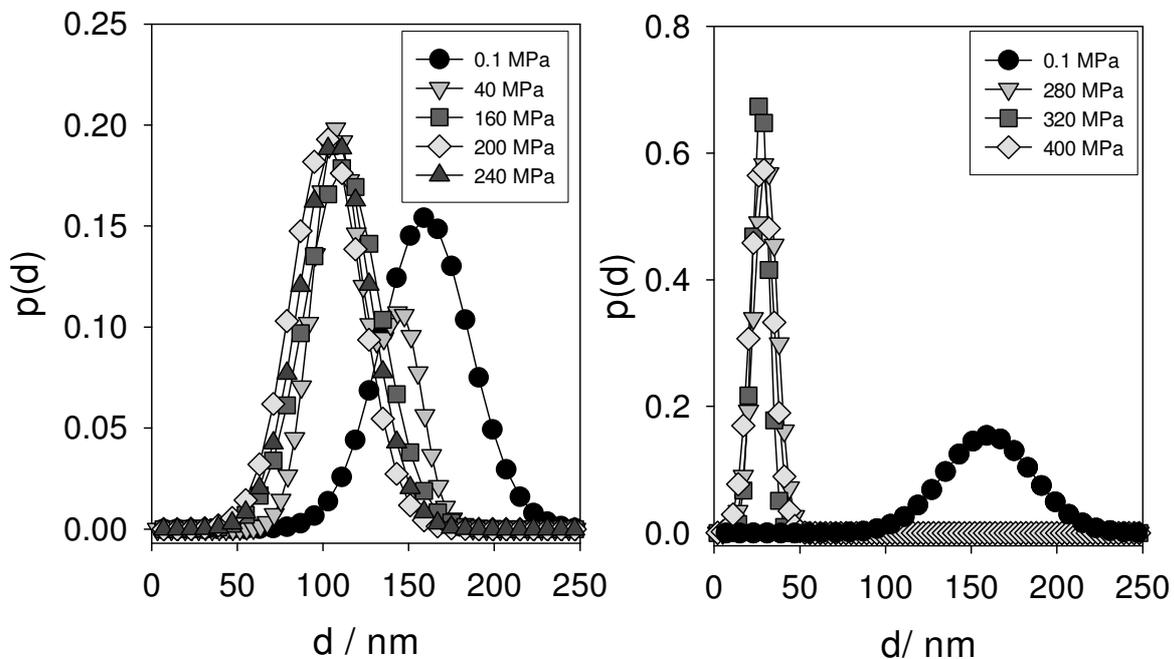


Abb. 5.42. Vergleich der Wahrscheinlichkeitsdichten, welche durch Gaussfit aus den Histogrammen ermittelt wurden. Links: Druckdissoziation bis 240 MPa; Rechts: Druckdissoziation bis 400 MPa.

Zusammenfassend zeigen die AFM-Messungen, dass Kasein-Mizellen unter Druck irreversibel dissoziieren. Es können zwei diskrete Endzustände detektiert werden, welche sich von druckunbehandelten Kasein-Mizellen nicht nur in Bezug auf die Größe, sondern auch im Erscheinungsbild unterscheiden.

### 5.2.11 Interpretation der AFM- und Lichtstremessungen zur Reversibilität druckbehandelter Kasein-Mizellen

Anhand der beschriebenen statischen und dynamischen Lichtstreuexperimente sowie der AFM-Messungen lassen sich Mechanismen der Druckdissoziation von Kasein-Mizellen ableiten. Zunächst haben die AFM-Messungen der druckunbehandelten Probe gezeigt, dass die etwa 150 nm großen Kasein-Mizellen aus einem fragilen Verbund kleiner, ca. 20 nm großer Partikel bestehen. Dieser Befund unterstützt das Kasein-Submizellen-Modell. Basierend auf Annahmen aus diesem Modell und Beobachtungen aus den AFM-Aufnahmen ist in Abb. 5.43 eine schematische Darstellung der Kasein-Mizelle bei Normalbedingungen gezeigt.

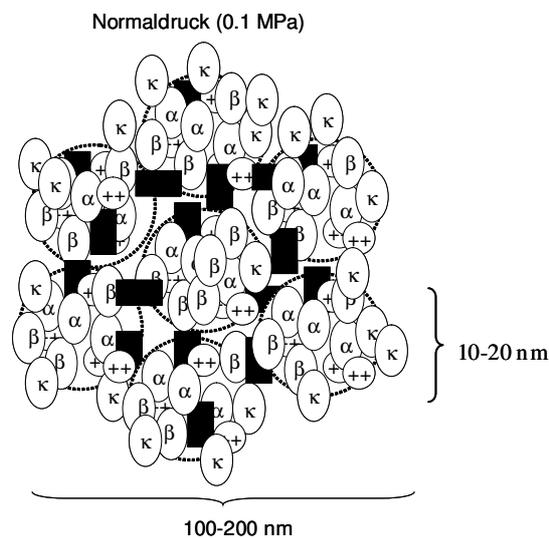


Abb. 5.43. Schematische Darstellung der Kasein-Mizelle unter Normalbedingungen (20°C, 0.1 MPa, 10 mM Ca<sup>++</sup>, pH 7.3)

Nach dem Kasein-Submizellen-Modell entstehen die ca. 20 nm großen Kasein-Submizellen durch Ca<sup>++</sup>-induzierte Selbstassoziation der 3 Basis-Kaseine. Die einzelnen Submizellen sind über colloidales Phosphat verbunden. Aus der Sicht der inneren Strukturmodelle ist diese Kompartimentierung nicht vorhanden. Die anhand von Neutronenkleinwinkelstreuexperimenten (Holt C. et al., 2003) nachgewiesenen Abstände von 20 nm werden als mittlere Abstände der ca. 1-2 nm großen Kalziumphosphatpartikel innerhalb der Kasein-Mizelle interpretiert. Sie fungieren als Wachstumskeime und fördern die Anlagerung von α-, und β-Kaseinen. Das κ-Kasein

ist durch hydrophobe Kontakte im Mizellen-Verbund assoziiert. Bedingt durch die tail-train-Struktur und die schwache Bindungsaffinität zu  $\text{Ca}^{++}$  lagert es sich häufig entfernt von  $\text{Ca}^{++}$ -reichen Wachstumszentren an der Außenseite von Kasein-Submizellen an. Innerhalb der Mizellen ordnen sich die Sub-Mizellen mit Kalziumphosphat-bindenden  $\alpha$ -, und  $\beta$ -Kasein-reichen Regionen nach innen. Die  $\kappa$ -Kasein-reichen Regionen, welche den  $\kappa$ -Kasein-Bürstensaum bilden, liegen im Gegensatz dazu bevorzugt an der Außenseite der Kasein-Mizelle. Unter Druck dissoziiert die Kasein-Mizelle in ihre Bestandteile. Anhand der Lichtstreu- und AFM-Messungen kann man zwei diskrete Zustände unterscheiden, welche nach einer Druckbehandlung von 280-400 MPa bzw. von 50-240 MPa entstehen. Diese sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

In Abb. 5.44 sind die wesentlichen Details einer Druckbehandlung mit 280-400 MPa schematisch wiedergegeben. Die dynamischen Lichtstremessungen haben gezeigt, dass durch Druckbehandlung mit 300 MPa die ca. 100-200 nm großen Kasein-Mizellen vollständig in die monomeren Kaseine, mit hydrodynamischen Radien von 1-2 nm, zerfallen. Dabei kommt es einerseits zur Dissoziation der hydrophoben Kontakte zwischen den einzelnen Kaseinen. Andererseits werden auch die elektrostatischen Kontakte zerstört, die innerhalb des colloidalen Kalziumphosphats, zwischen den phosphorylierten Gruppen der Kaseine und colloidalem Phosphat sowie zwischen Kaseinen und  $\text{Ca}^{++}$  bestehen. Dies führt zum Anstieg der freien Kalzium- und Phosphatkonzentration (Keenan R. D. et al., 2003). Die Lichtstrekinetiken der mit 300 MPa behandelten Kaseinprobe zeigen, dass bei Normaldruck die Streuintensität ansteigt und damit eine Reassoziierung der isolierten Kaseine stattfindet. Wie die AFM-Aufnahmen zeigen, bestehen die reassozierten Endzustände aus 10-20 nm großen Kasein-Partikeln. Diese entstehen durch Kalzium-induzierte Selbstassoziierung der Kasein-Monomere. Eine weitere Assoziierung zu 100 nm großen Kasein-Mizellen findet nicht statt. Dafür können zwei Ursachen angeführt werden. Einerseits kann aufgrund der Absättigung der 10 nm großen Sub-Partikel mit  $\kappa$ -Kasein die weitere Kasein-Anlagerung zu großen Mizellen unterbunden sein. Andererseits verhindert die irreversible Dissoziation von colloidalem Kalziumphosphat die Ausbildung der Phosphat-Brückenbindungen zwischen den Subpartikeln.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

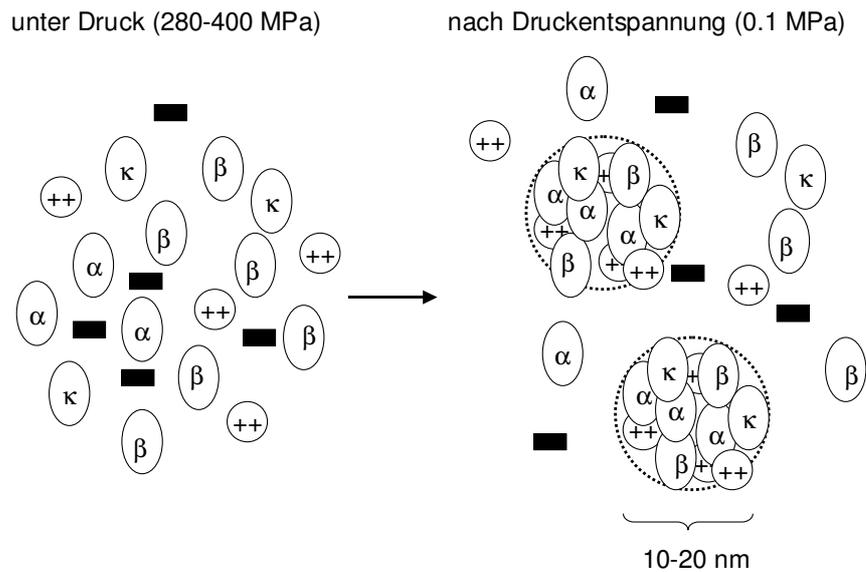


Abb. 5.44. Reassoziierung der Kasein-Bestandteile nach einer Druckbehandlung von 280-400 MPa (20°C, 10 mM Ca<sup>++</sup>, pH 7.3).

Dagegen ist die Reassoziierung zu kompakten Kasein-Mizellen nach einer 50-250 MPa Druckbehandlung noch möglich. Im Druckbereich zwischen 50 und 250 MPa zeigen die dynamischen Lichtstreuungsmessungen Größenverteilungen um mittlere Radien von ca. 10 nm. Weiterhin haben frühere Druckstudien an Kasein-Mizellen gezeigt, dass die freie Kalzium- und Kaseinmonomerkonzentration ansteigt. Eine Druckentspannung von 50 - 250 MPa auf Normaldruck führt zu einem definierten Endzustand, was z.B. anhand von Lichtstreu kinetiken (Abb. 5.39) nachgewiesen werden konnte. Wie die AFM-Aufnahmen zeigen, handelt es sich um etwas kleinere, kompakte Kasein-Mizellen, die äußerlich keine Untereinheitenstruktur aufweisen. Im Gegensatz zu den ursprünglichen, druckunbehandelten Kasein-Mizellen kommt es im Verlauf der AFM-Messungen nicht zur Dissoziation aufgrund von mechanischen Effekten. Die erhöhte Stabilität und die veränderte Morphologie der Mizelle soll anhand von Abb. 5.45 erklärt werden.

## 5. Zur Druckstabilität der Kasein-Mizelle

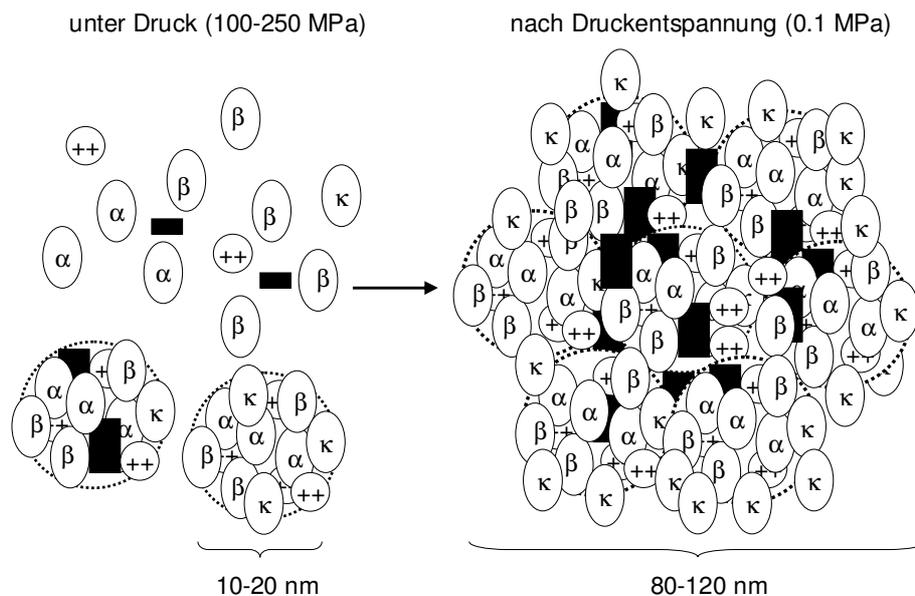


Abb. 5.45. Reassoziierung der Kasein-Bestandteile zu einer kompakten Kasein-Mizelle nach einer Druckbehandlung von 100-250 MPa (20°C, 10 mM  $Ca^{++}$ , pH 7.3).

Einige der 20 nm großen Mizellen, die infolge der Druckbehandlung mit bis zu 250 MPa entstehen, sind noch mit colloidalem Kalziumphosphat assoziiert. Diese wirken nach einer Druckentspannung als Wachstumskeime, an die sich andere Sub-Partikel anlagern.

Infolge der Druckbehandlung kommt es aufgrund von Elektrostriktion zum Zerfall von colloidalem Kalziumphosphat bzw. aufgrund der Schwächung hydrophober Wechselwirkungen zur Dissoziation von Protein-Kontakten. Beides führt zur Erhöhung der löslichen Kalzium- und Kaseinkonzentration. Dadurch entstehen einerseits Sub-Partikel, welche arm an colloidalem Kalziumphosphat sind. Andererseits führt die bereits beschriebene Kalzium-induzierte Selbstassoziation der löslichen Kaseine nach der Druckentspannung zu Kasein-Submizellen, welche kein colloidales Kalziumphosphat mehr enthalten. Beide Submizellen-Typen lagern sich unter Normalbedingungen an die noch vorhandenen Wachstumszentren an. Dadurch entstehen Mizellen, deren Sub-Struktur, bedingt durch colloidales Kalziumphosphat, auf das Innere beschränkt ist. Die äußere Hülle ist strukturlos und als eine Protein-Matrix anzusehen, welche hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird. Das Fehlen einer äußeren Untereinheitenstruktur und die dichte Packung der Matrix führen zu einer kompakteren, stabileren Kasein-Mizelle.

### 5.3 Probenpräparation

Die Proben wurden vom Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie in Weihenstephan bezogen. Die Kasein-Mizellen wurden nach kombinierter einfacher Transmembran-Druck-Mikrofiltration (mittlerer Porendurchmesser  $0.1 \mu\text{m}$ ), sowie fünf anschließenden Wasch- und einem abschließenden Trocknungsprozess aus kommerziell erhältlicher Magermilch extrahiert. Die Reinigungsprozedur ist detailliert beschrieben von Tolkach und Kulozik (2005).

Das getrocknete Kasein-Pulver wurde mit einer Massenkonzentration von  $w/v = 3\%$  in gefilterter  $0.1 \text{ M}$  Mes/Tris-HCl Lösung gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl eingestellt. Alle Proben wurden durch vorsichtiges Rühren für fünf Stunden bei  $20^\circ\text{C}$  ins Gleichgewicht gebracht.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Druckdissoziation von Arthropoden-Hämocyaninen

Hämocyanine sind große, oligomere Proteinkomplexe, die frei gelöst in der Hämolymphe von Arthropoden vorkommen. Ihre physiologische Aufgabe ist der Sauerstofftransport, der kooperativ und oftmals auch allosterisch reguliert ist. Eine einzelne Hämocyanin-Untereinheit ist nierenförmig und hat ein Molekulargewicht von 75 kDa. Sie kann in einem zum Liganden Sauerstoff affinen (R-Konformation) bzw. in einem weniger affinen strukturellen Zustand (T-Konformation) vorliegen. Innerhalb der Hämocyanin-Oligomere stellen die Hexamere die kleinste allosterische Einheit dar. In dieser Einheit nehmen alle Untereinheiten dieselbe Konformation ein. Abhängig von der Spezies und von den physiologischen Bedingungen kombinieren diese Hexamere zu Vielfachen von Hexameren (2 - 8 x 6).

In dieser Arbeit wurde die Druckdissoziation des dodekameren Hämocyanins (2 x 6) aus dem amerikanischen Hummer *Homarus americanus* bzw. des 24-meren Hämocyanins (4 x 6) aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum* untersucht. Das Ziel der Untersuchungen war, zunächst die Art der druckabhängigen Dissoziationsmechanismen für beide Proteine zu ermitteln und entsprechende thermodynamische Modelle zu entwickeln. Anhand dieser Modelle wurden im zweiten Schritt molare Dissoziationsenergien und Dissoziationsvolumina für die einzelnen Dissoziationsschritte ermittelt. Schließlich wurden die Ergebnisse mit bestehenden strukturellen und funktionellen wissenschaftlichen Erkenntnissen verglichen und diskutiert.

#### Ergebnisse:

- Die Dissoziation des 12-meren Hämocyanins erfolgt sequentiell über einen hexameren Zwischenzustand. Diese Erkenntnis wurde durch Stabilitätsuntersuchungen mit Denaturantien und Salzen der Hofmeister-Serie gewonnen (Herskovits T.T. et al., 1984, 1989). Sie konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für die druckinduzierte Dissoziation des 12-meren Hämocyanins bestätigt werden.

- Die Dissoziation des 24-meren Hämocyanins erfolgt direkt in die isolierten Untereinheiten ohne Zwischenzustände, wie Stabilitätsuntersuchungen mit Denaturantien und Salzen der Hofmeister-Serie gezeigt haben (Hübler R. et al., 1998). Dieser Dissoziationsmechanismus konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für die druckinduzierte Dissoziation des 24-meren Hämocyanins bestätigt werden.
- Der Formalismus für den 12-meren sequentiellen und den 24-meren einfachen Dissoziationsmechanismus wurde in Bezug auf die zusätzliche Variable Druck erweitert. Für alle druckinduzierten Zerfallsreaktionen wurden Dissoziationskonstanten und Dissoziationsvolumina bestimmt. Für die Druckdissoziation des dodekameren Hummer-Hämocyanins in das Hexamer wurde eine Dissoziationskonstante von  $k = 9.5 \cdot 10^{-4}$  ermittelt. Der in Bezug auf Stöchiometrie und Konzentration unkorrigierten Dissoziationskonstanten entspricht eine Differenz des chemischen Potentials zwischen Hexameren und Dodekamer von  $\Delta\mu = 16.9$  kJ/mol bei Normaldruck. Das korrespondierende molare Dissoziationsvolumen beträgt  $\Delta V = -136$  ml/mol. Für die Dissoziation des Hexamers in die Monomere wurde eine Dissoziationskonstante von  $k = 7.7 \cdot 10^{-20}$  ermittelt. Aus der in Bezug auf Stöchiometrie und Konzentration unkorrigierten Dissoziationskonstante lässt sich eine Differenz des chemischen Potentials zwischen Monomeren und Hexamer von  $\Delta\mu = 107.3$  kJ/mol bei Normaldruck ermitteln. Das entsprechende molare Dissoziationsvolumen beträgt  $\Delta V = -464$  ml/mol.  
Für die Dissoziation des 24-meren Hämocyanins aus *Eurypelma californicum* wurde eine unkorrigierte Dissoziationskonstante von  $k = 1.9 \cdot 10^{-64}$  bestimmt, die einer Differenz des chemischen Potentials bei Normaldruck zwischen Monomeren und 24-mer von  $\Delta\mu = 358$  kJ/mol entspricht. Für das molare Dissoziationsvolumen wurde ein Wert von  $\Delta V = -1237$  ml/mol ermittelt.
- Der allosterische Effektor L-Laktat destabilisiert das 12-meren Hämocyanin. Während sich das Dissoziationsvolumen des Dodekamer/Hexamer-Zerfalls verkleinert, vergrößert sich das Dissoziationsvolumen des Hexamer/Monomer-Zerfalls in Bezug auf die effektorfreie Dissoziation.
- Der Ligand CO hat keinen Effekt auf das druckinduzierte Dissoziationsgleichgewicht in Bezug auf die Stabilität und das Dissoziationsvolumen.

- Innerhalb des druckinduzierten Dissoziationsprozesses des 12-meren Hämocyanins konnte ein L-Laktat induzierter trimerer Zwischenzustand identifiziert werden. Der Formalismus für den druckabhängigen, L-Laktat induzierten Zerfall des 12-meren Hämocyanins aus *Homarus americanus* über einen hexameren und trimeren Zwischenzustand wurde hergeleitet. Folgende korrigierte und unkorrigierte Dissoziationskonstanten bzw. korrespondierende Differenzen des chemischen Potentials bei Normaldruck und molare Dissoziationsvolumina wurden ermittelt:

Dodekamer/Hexamere:  $k_0 = 3.8 \cdot 10^{-8}$  [M],  $k_0^\# = 8.9 \cdot 10^{-3}$  entspricht  $\Delta\mu = 12$  kJ/mol,  
 $\Delta V = -350$  ml/mol;

Hexamer/Trimer:  $k_0 = 2.2 \cdot 10^{-8}$  [M],  $k_0^\# = 2.6 \cdot 10^{-3}$  entspricht  $\Delta\mu = 15$  kJ/mol,  
 $\Delta V = -128$  ml/mol;

Trimer/Monomer:  $k_0 = 3.1 \cdot 10^{-12}$  [M]<sup>2</sup>,  $k_0^\# = 2.7 \cdot 10^{-8}$  entspricht  $\Delta\mu = 43$  kJ/mol,  
 $\Delta V = -197$  ml/mol.

### 6.2 Druckdissoziation von Kasein-Mizellen

Kaseine sind nahezu strukturlose Proteine, die in 100-200 nm großen Kasein-Mizellen organisiert sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Druckdissoziation von Kasein-Mizellen in Abhängigkeit der Temperatur, der Kalziumkonzentration sowie des pH-Wertes anhand von Lichtstreuexperimenten untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß die Druckstabilität der Kasein-Mizellen mit zunehmender Kalziumkonzentration und Temperatur sowie abnehmender Protonenkonzentration verstärkt wird. Mit Hilfe der durchgeführten Experimente war es möglich, die hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen, welche die Mizelle stabilisieren, zu separieren und zu analysieren.

#### Ergebnisse:

- Für die Datenanalyse wurde in Anlehnung an das in der Literatur vorhandene „innere Strukturmodell“ ein paralleles einfaches Übergangsmodell sowie in

Anlehnung an das „Kasein-Submizellen-Modell“ ein sequentielles Übergangsmodell entwickelt. Die Datenanalyse hat ergeben, dass das parallele Übergangsmodell eine bessere und einfachere Beschreibung der Daten ermöglicht.

- Anhand des parallelen Übergangsmodells konnte in Abhängigkeit der Temperatur und der Kalziumkonzentration die freie molare Dissoziationsenergie der Mizellen bei Normaldruck sowie das molare Dissoziationsvolumen abgeleitet werden. Die molare Dissoziationsenergie steigt bei niedrigen Kalziumkonzentrationen von 15 kJ/mol bei 10 °C auf 50 kJ/mol bei 80 °C. Das Dissoziationsvolumen der Kasein-Mizellen verringert sich dabei von ca. -61 ml/mol auf ca. -204 ml/mol. Mit steigender freier Kalziumkonzentration kommt es bei 20 °C zu einer Zunahme der Stabilität von ca. 6 kJ/mol bei 10 mM Ca<sup>++</sup> auf 51 kJ/mol bei 110 mM Ca<sup>++</sup>. Dabei kommt es zu einer Vergrößerung des molaren Dissoziationsvolumens von ca. -51 ml/mol auf ca. -148 ml/mol.

Anhand von druckabhängigen *ex-situ* AFM-Messungen sowie dynamischer und statischer *in-situ* Lichtstremessungen wurde die Reversibilität der druckinduzierten Kaseindissoziation untersucht.

### Ergebnisse:

- Es können drei unterschiedliche Druckbereiche identifiziert werden. Druckeffekte bis 50 MPa waren reversibel. Eine Druckbehandlung > 50 MPa ist dagegen nur teilweise reversibel. Im Druckbereich zwischen 150 und 250 MPa konnte ein neuer Kasein-Mizellen-Zustand identifiziert werden. Nach einer Druckbehandlung mit Drücken die größer als 250 MPa sind, konnte keine Reassoziationsmechanismen der Kaseinmizelle unter Druck abgeleitet werden.
- Anhand der *ex-situ* AFM- und *in-situ* Lichtstremessungen wurden mögliche Dissoziations- und Reassoziationsmechanismen der Kaseinmizelle unter Druck abgeleitet.

Ausblick:

Wie bereits in Kapitel 5.2.3 erwähnt wurde, kommt es bei pH 6.1 und 72°C bereits bei Normaldruck zur Dissoziation der Kasein-Mizelle. Die temperaturabhängige Destabilisierung des kolloidalen Zustands ist stark pH-, und kalziumabhängig und geht häufig mit der Koagulation der Kaseine einher (Walstra P., 1990). In Industrie und Forschung wird die Hitze-Stabilität von Kasein-Proben über die Koagulationszeit (HCT-*heat coagulation time*) typischerweise im Bereich zwischen 120-140°C gemessen. Bei einem niedrigen pH-Wert erfolgt der Zerfall (Kinetik) der Kasein-Mizellen schneller als bei höheren pH-Werten. Die Gleichgewichtsmessungen bei pH 6.1 (Abb. 5.17) haben gezeigt, dass die Kasein-Mizellen bereits bei 72 °C und Normaldruck dissoziieren (Abb.6.1). Dagegen konnte bei pH 7.3 bis 80°C keine Dissoziation festgestellt werden. Durch die zusätzliche Betrachtung der Wärmekapazitätsdifferenz  $\Delta C_p$  konnte der Simultanfit der druck- und temperaturabhängigen Dissoziation der Kasein-Mizelle in Abb.5.24 verbessert werden. In Abb. 6.1, rechts ist die temperaturabhängige chemische Potentialdifferenz  $\Delta\mu_{MB,MA}$  gezeigt, die unter Berücksichtigung der negativen Wärmekapazitätsdifferenz  $\Delta C_p$  (Tabelle 5.1) berechnet wurde.

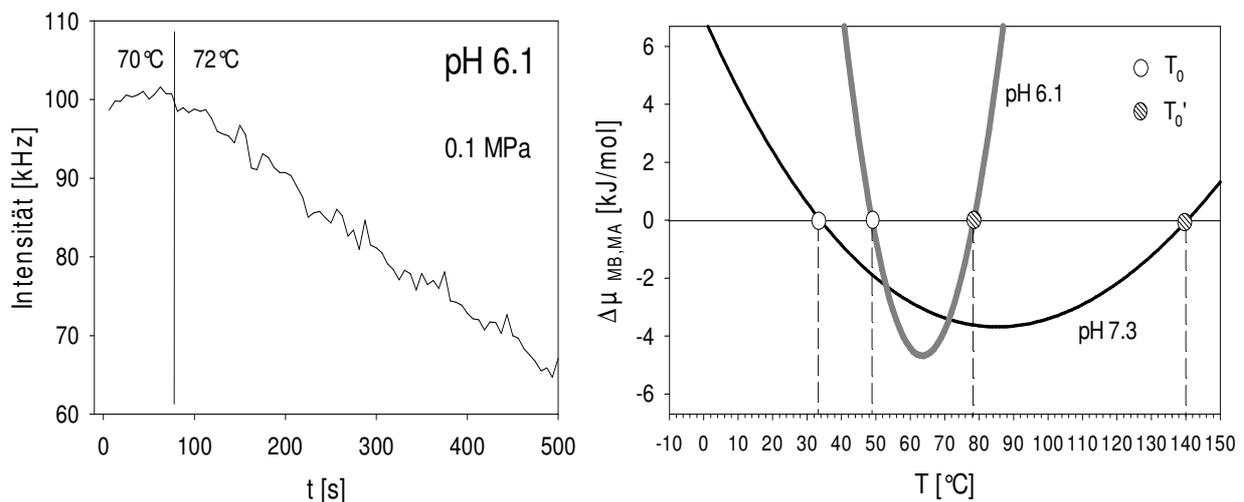


Abb. 6.1, Links: Temperaturinduzierte Dissoziation von Kasein-Mizellen bei Normaldruck, pH 6.1; Rechts: Temperaturabhängigkeit der chemischen Potentialdifferenz zwischen den Kasein-Mizellen-Formen  $M_B$  und  $M_A$ , berechnet unter Berücksichtigung der Wärmekapazitäten (Tabelle 5.1) beider Mizellen-Formen mit dem parallelen Übergangsmodell.

Neben der Übergangstemperatur  $T_0$  fordert die Analyse noch eine Übergangstemperatur  $T_0'$  für den Übergang der  $M_B$ -Mizellen-Form zurück zur  $M_A$ -Mizellen-Form. Wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben wurde, unterscheidet sich  $M_B$  durch assoziiertes  $\beta$ -Kasein von  $M_A$ . Somit assoziieren Kaseine oberhalb von  $T_0$  an  $M_A$  und bilden  $M_B$ , während sie oberhalb von  $T_0'$  von  $M_B$  dissoziieren, um  $M_A$  zu bilden.

Die kalkulierte Übergangstemperatur  $T_0'$  liegt bei pH 6.1 bei 78 °C (Abb. 6.1, rechts) und damit nahe der Temperatur, die für die Dissoziation der Kasein-Mizellen bei Normaldruck ermittelt wurde (Abb. 6.1, links).

Dagegen liegt die Übergangstemperatur  $T_0'$  bei pH 7.3 bei 140 °C und damit in dem Temperaturbereich, der für die HCT-Analyse eingesetzt wird.

Weitere Experimente könnten zeigen, inwieweit die hier beschriebenen Ergebnisse zur Interpretation und zum Verständnis der Hitzestabilität von Kasein-Mizellen herangezogen werden können.

## 7 Anhang

7.1 Formalismus für den sequentiellen dodekameren Dissoziationsprozess über den hexameren und trimeren Zwischenzustand, welcher im Rahmen dieser Arbeit abgeleitet wurde.

Die Dissoziationsgrade für den Dodekamer /Hexamer-Zerfall  $\alpha_1$ , für den Hexamer /Trimer-Zerfall  $\alpha_2$  und den Trimer /Monomer-Zerfall  $\alpha_3$  lassen sich über einen beschränkten Druckbereich über die Formeln

$$\alpha_1 = 2(1 - M_w / M_{12}) \quad (7.1)$$

$$\alpha_2 = 2(1 - M_w / M_6) \quad (7.2)$$

$$\alpha_3 = (3/2)(1 - M_w / M_3) \quad (7.3)$$

bestimmen. Die Molekulargewichte für das 12-mer  $M_{12}$ , das Hexamer  $M_6$  und das Trimer  $M_3$  wurden aus der Literatur (Morimoto et. al., 1979; Herskovits et. al., 1981 b) entnommen.

Die Gleichgewichtskonstante für den dodekameren Dissoziationsprozess in seine 12 Untereinheiten  $K_{DM}$  kann, um dem sequentiellen Dissoziationsmechanismus über den hexameren und trimeren Zwischenzustand gerecht zu werden, aufgelöst werden, gemäß

$$K_{DM} = K_{DH} \cdot (K_{HT} \cdot K_{TM}^2)^2.$$

Die druckabhängigen Gleichgewichtskonstanten für das Dodekamer/Hexamer-, das Hexamer/Trimer- und das Trimer/Monomer-Dissoziationsgleichgewicht  $K_{DH}$ ,  $K_{HT}$ ,  $K_{TM}$  sind ohne Berücksichtigung der Stöchiometrie- und Konzentrationsabhängigkeit gegeben durch

$$K_{DH,p}^{\circ} = \frac{\alpha_1^2 (1 - \alpha_2)^2}{(1 - a_1)} \cdot e^{\left(\frac{\Delta V_{DH} \cdot p}{RT}\right)} \quad (7.4)$$

$$K_{HT,p}^{\circ} = \frac{\alpha_1 \alpha_2^2 (1 - \alpha_3)^2}{(1 - a_2)} \cdot e^{\left(\frac{\Delta V_{HT} \cdot p}{RT}\right)} \quad (7.5)$$

$$K_{TM,p}^{\circ} = \frac{\alpha_1^2 \alpha_2^2 \alpha_3^3}{(1 - a_3)} \cdot e^{\left(\frac{\Delta V_{TM} \cdot p}{RT}\right)} \quad (7.6)$$

Die numerische Kalkulation der Dissoziationsgrade  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  erfolgte mit  $\alpha_3 = 0$  im Druckbereich 0.1 MPa bis 70 MPa nach

$$0 = \frac{\left( \frac{K_{HT,0}^{\circ} \cdot e^{\left(\frac{\Delta V_{HT} \cdot p}{RT}\right)} \cdot (1 - \alpha_2)}{\alpha_2^2} \right)^2 \cdot \alpha_2^2}{\left( 1 - \frac{K_{HT,0}^{\circ} \cdot e^{\left(\frac{\Delta V_{HT} \cdot p}{RT}\right)} \cdot (1 - \alpha_2)}{\alpha_2^2} \right)} \cdot (1 - \alpha_2)^2 - K_{DH,0}^{\circ} \cdot e^{\left(\frac{\Delta V_{DH} \cdot p}{RT}\right)} \quad (7.7)$$

und im Druckbereich 80 MPa bis 330 MPa für  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  mit  $\alpha_1 = 0$  nach

$$0 = \frac{\frac{K_{TM,0}^{\circ} \cdot e^{\left(\frac{\Delta V_{TM} \cdot p}{RT}\right)} \cdot (1 - \alpha_3)}{\alpha_3^3} \cdot (1 - \alpha_3)^2}{\left( 1 - \sqrt[2]{\frac{K_{TM,0}^{\circ} \cdot e^{\left(\frac{\Delta V_{TM} \cdot p}{RT}\right)} \cdot (1 - \alpha_3)}{\alpha_3^3}} \right)} - K_{HT,0}^{\circ} \cdot e^{\left(\frac{\Delta V_{HT} \cdot p}{RT}\right)} \quad (7.8)$$

Der Gesamtdissoziationsgrad  $\alpha_G$ , ausgedrückt als Molekulargewicht, für den sequentiellen dodekameran Zerfall in Monomere lässt sich schreiben als

$$\alpha_G^{M_w} = M_{12} \left( 1 - \frac{1}{2} \alpha_1 - \frac{1}{4} \alpha_1 \alpha_2 - \frac{1}{6} \alpha_1 \alpha_2 \alpha_3 \right). \quad (7.9)$$

Für die Fraktionenverteilungen  $f_i$  von Dodekamer, Hexamer, Trimer und Monomer erhält man

$$f_{12} = (1 - \alpha_1) \quad (7.10)$$

$$f_6 = \alpha_1 \cdot (1 - \alpha_2) \quad (7.11)$$

$$f_3 = \alpha_1 \alpha_2 \cdot (1 - \alpha_3) \quad (7.12)$$

$$f_4 = \alpha_1 \alpha_2 \alpha_3 \quad (7.13)$$

## 7.2 Druckdissoziationsmodelle des Kasein-Mizellen-Zerfalls

### 7.2.1 Sequentielles Dissoziationsmodell

Folgende druckabhängige Gleichgewichtskonstanten können unter Nichtberücksichtigung des Assoziationsgrades definiert werden als:

$$k_1 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot \Delta V_1}{RT}\right)} = \frac{[S]}{[M]} \quad , \quad (7.14)$$

mit  $K_1$  der Dissoziationskonstante bei Normaldruck für das Mizelle/Submizelle-Gleichgewicht,  $\Delta V_1$  dem entsprechenden Dissoziationsvolumen und  $[S]$  bzw.  $[M]$  den Konzentrationen der Submizellen- bzw. Mizellenfraktion.

Für den Submizellen/Kasein-Monomer-Zerfall gilt entsprechend

$$k_2 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot \Delta V_2}{RT}\right)} = \frac{[K]}{[S]} \quad , \quad (7.15)$$

wobei  $[K]$  für die Konzentration der monomeren Kaseinfraktion und  $K_2$  und  $\Delta V_2$  für die korrespondierenden Parameter Gleichgewichtskonstante bzw. Dissoziationsvolumen stehen.

Die Summe aller Zustände im Ansatz ist gegeben durch:

$$\Sigma = [M] + [S] + [K] \quad , \quad (7.16)$$

welche unter Verwendung von Formel (7.14) und Formel (7.15) geschrieben werden kann als

$$\Sigma = [M] + k_1 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot \Delta V_1}{R \cdot T}\right)} \cdot [M] + k_1 \cdot k_2 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot (\Delta V_1 + \Delta V_2)}{R \cdot T}\right)} \cdot [M] \quad . \quad (7.17)$$

Indem man die Zustandssumme auf den Referenzzustand  $[M]$  bezieht, gelangt man zur *partition function*  $Q$

$$Q = 1 + k_1 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot \Delta V_1}{R \cdot T}\right)} + k_1 \cdot k_2 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot (\Delta V_1 + \Delta V_2)}{R \cdot T}\right)} \quad . \quad (7.18)$$

Die Volumenänderung in Bezug auf den Referenzzustand  $M$  während der Druckdissoziation erhält man nach Bildung der ersten Ableitung von  $Q$  nach  $p$  analog zur van't Hoff-Gleichung über

$$V - V_0 = R \cdot T \cdot \frac{\partial \ln(Q)}{\partial p} \quad . \quad (7.19)$$

Der Gesamtdissoziationsgrad  $\alpha$  ergibt sich dann nach

$$\alpha = \frac{k_1 \cdot \frac{V_1}{R \cdot T} \cdot e^{\left(\frac{p \cdot \Delta V_1}{R \cdot T}\right)} + k_1 \cdot k_2 \cdot \frac{V_1}{R \cdot T} \cdot e^{\left(\frac{p \cdot (\Delta V_1 + \Delta V_2)}{R \cdot T}\right)} + k_1 \cdot k_2 \cdot \frac{V_2}{R \cdot T} \cdot e^{\left(\frac{p \cdot (\Delta V_1 + \Delta V_2)}{R \cdot T}\right)}}{1 + k_1 \cdot \frac{V_1}{R \cdot T} \cdot e^{\left(\frac{p \cdot \Delta V_1}{R \cdot T}\right)} + k_1 \cdot k_2 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot (\Delta V_1 + \Delta V_2)}{R \cdot T}\right)}} \cdot \frac{R \cdot T}{(\Delta V_1 + \Delta V_2)} \quad . \quad (7.20)$$

Die Fraktionenverteilungen  $f_i$  erhält man, indem man die partition function  $Q_i$  ( $i= M, S, K$ ) der einzelnen Spezies auf die gesamte partition function  $Q$  bezieht, gemäß

$$f_M = \frac{Q_M}{Q} = \frac{1}{1 + k_1 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot \Delta V_1}{R \cdot T}\right)} + k_1 \cdot k_2 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot (\Delta V_1 + \Delta V_2)}{R \cdot T}\right)}} \quad \text{für die Mizelle,} \quad (7.21)$$

$$f_S = \frac{Q_S}{Q} = \frac{k_1 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot \Delta V_1}{R \cdot T}\right)}}{1 + k_1 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot \Delta V_1}{R \cdot T}\right)} + k_1 \cdot k_2 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot (\Delta V_1 + \Delta V_2)}{R \cdot T}\right)}} \quad \text{für die Sub-Mizelle und} \quad (7.22)$$

$$f_K = \frac{Q_K}{Q} = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot (\Delta V_1 + \Delta V_2)}{R \cdot T}\right)}}{1 + k_1 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot \Delta V_1}{R \cdot T}\right)} + k_1 \cdot k_2 \cdot e^{\left(\frac{p \cdot (\Delta V_1 + \Delta V_2)}{R \cdot T}\right)}} \quad \text{für die Kasein-Monomere.} \quad (7.23)$$

### 7.2.2 Paralleles Übergangsmodell

Es werden zwei Kasein-Mizellen-Fraktionen angenommen, bei welchen es sich im Falle der temperaturabhängigen Messungen um eine Niedertemperatur- bzw. eine Hochtemperaturform oder bei den kalziumabhängigen Messungen um eine mit Kalzium unbeladene bzw. beladene Form handelt. Die beiden Kaseinfraktionen (A bzw. B) dissoziieren unter Druck nach

$$\alpha_T^A = \frac{k_T^A \cdot e^{\left(\frac{-(p-p_0) \Delta V_T^{A,M}}{R \cdot T}\right)}}{\left(1 + k_T^A \cdot e^{\left(\frac{-(p-p_0) \Delta V_T^{A,M}}{R \cdot T}\right)}\right)}, \quad \alpha_T^B = \frac{k_T^B \cdot e^{\left(\frac{-(p-p_0) \Delta V_T^{B,M}}{R \cdot T}\right)}}{\left(1 + k_T^B \cdot e^{\left(\frac{-(p-p_0) \Delta V_T^{B,M}}{R \cdot T}\right)}\right)}, \quad (7.24)$$

und im Fall der kalziumabhängigen Messungen nach

$$\alpha_{Ca^{++}}^A = \frac{k_{Ca^{++}}^A \cdot e^{\left(\frac{-(p-p_0)\Delta V_{Ca^{++}}^{A,M}}{RT}\right)}}{\left(1 + k_{Ca^{++}}^A \cdot e^{\left(\frac{-(p-p_0)\Delta V_{Ca^{++}}^{A,M}}{RT}\right)}\right)}, \quad \alpha_{Ca^{++}}^B = \frac{k_{Ca^{++}}^B \cdot e^{\left(\frac{-(p-p_0)\Delta V_{Ca^{++}}^{B,M}}{RT}\right)}}{\left(1 + k_{Ca^{++}}^B \cdot e^{\left(\frac{-(p-p_0)\Delta V_{Ca^{++}}^{B,M}}{RT}\right)}\right)}. \quad (7.25)$$

Dabei bezeichnen k die Dissoziationskonstanten und  $\Delta V$  die Dissoziationsvolumina. Beide Kaseinformen stehen miteinander in einem Gleichgewicht, welches durch die Temperatur über

$$L_T^{A,B} = L_0 \cdot e^{\left(\frac{\Delta H^{A,B}}{R} \left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0}\right)\right)} \quad \text{mit } \tau = 1/T \quad \text{bzw.} \quad \ln(L_T) = \frac{1}{RT} (\Delta S_{B,A}(T_0) \cdot (T - T_0)) \quad (7.26)$$

bzw. durch Kalzium über

$$L_{Ca^{++}}^{A,B} = L_0 \cdot e^{\left(\Delta X \cdot \ln\left(\frac{c_{Ca^{++}}}{c_0^{Ca^{++}}}\right)\right)} \quad (7.27)$$

beeinflusst wird. Diese Gleichgewichte sind aber in Bezug auf den Druck arretiert, d.h. das Verhältnis der beiden Formen im Ansatz ändert sich nicht während der Dissoziation. Der Dissoziationsgrad des Gesamtzerfalls ist für die temperaturabhängige Messung über

$$\alpha_T^G = \frac{1}{(1 + L_T^{A,B})} \cdot \alpha_T^A + \frac{L_T^{A,B}}{(1 + L_T^{A,B})} \cdot \alpha_T^B \quad (7.28)$$

bzw. für den Fall der Kalziumabhängigkeit über

$$\alpha_{Ca^{++}}^G = \frac{1}{(1 + L_{Ca^{++}}^{A,B})} \cdot \alpha_{Ca^{++}}^A + \frac{L_{Ca^{++}}^{A,B}}{(1 + L_{Ca^{++}}^{A,B})} \cdot \alpha_{Ca^{++}}^B \quad (7.29)$$

gegeben.

Der pH-Effekt bei hohen Kalziumkonzentrationen wird über

$$k_{Ca^{++}}^{B,MB} = 10^{\left( \Delta N_{B,MB}(H^+) \cdot \log\left(\frac{c_{H^+}}{c_{H^+}^{pH 7.3}}\right) + \log\left(k_{Ca^{++}}^{B,MB}(60mM Ca^{++}, 20^\circ C, pH 7.3)\right) \right)} \quad (7.30)$$

berücksichtigt.

### 7.2.3 Erstellte Anpassungsprogramme und Fit-Routinen

Benutzte *Maple V* - Routine zur numerischen Lösung des Dodekamer – Hexamer – Monomer - Gleichgewichts ((4.10 - (4.11)

```
for p from 0.1 by 10 to 50 do
```

```
  r[p]:=solve(a^2-2*a+1-(exp(-6.9541071102)*
  exp(136.3930934809*p/(8.314*293)))^(1-(exp(-44.0073955169)*
  exp(464.3629582694*p/(8.314*293))))^(1/5)*(1-a)^(1/5)/a^(6/5))/((exp(-44.0073955169)*
  exp(464.3629582694*p/(8.314*293))))^(1/5)*(1-a)^(1/5)/(a)^(6/5))^2,a);
```

```
od;
```

```
writedata(terminal,r[p],float);
```

Benutzte *Maple V* - Routinen zur numerischen Lösung des Dodekamer - Hexamer- Trimer – Monomer - Gleichgewichts (7.7-7.8).

```
for p from 0.1 by 10 to 160 do
```

```
  r[p]:=solve((exp(-5.9658959226)*
  exp(128.0193584139*p/(8.314*293.13))^(1-b)/b^2)^2/(1-(exp(-5.9658959226)*
  exp(128.0193584139*p/(8.314*293.13))^(1-b)/b^2))^(1-b)^2-exp(-4.7193754554)*
  exp(350.7466166536*p/(8.314*293.13))),b);
```

```
od;
```

```
writedata(terminal,r[p],float);
```

```
for p from 80.1 by 10 to 340 do
```

```
  r[p]:=solve(exp(-17.4197643309)*
  exp(197.177060498*p/(8.314*293.13))^(1-c)/c^3*(1-c)^2/(1-(exp(-17.4197643309)*
  exp(197.177060498*p/(8.314*293.13))^(1-c)/c^3)^0.5)-exp(-5.9658959226)*
```

## 7. Anhang

---

```
exp(128.0193584139*p/(8.314*293.14)),c);  
od;  
writedata(terminal,r[p],float);
```

Benutzte *Sigma-Plot* Makros zur Datensimulation und –anpassung des „Shell-Models“ (Kegeles G., 1979)

### Berechnung der Mizellen-Dichten unter Druck

```
col(1)=data(1,1200,1)  
p=80  
n=800  
KA=2  
V=-18  
for i=1 to 800 do  
  cell(2,i)=((n-(i-1))/n)*((i)/(i+1))*KA  
  cell(3,1)=cell(2,1)  
  cell(5,i)=((n-(i-1))/n)*((i)/(i+1))*KA*exp(p*V/(8.314*293.14))  
  cell(6,1)=cell(5,1)  
end for  
col(4)=col(3)/total(col(3))  
for j=1 to 800 do  
  cell(3,j+1)=cell(2,j+1)*cell(3,j)  
  cell(6,j+1)=cell(5,j+1)*cell(6,j)  
end for  
col(7)=col(6)/total(col(6))
```

### Datenanpassung der gewichteten Verteilungsfunktion

```
col(6)=data(1,1200,1)  
n=240  
KA=2  
V=-8  
x=7  
for p1 = 1 to 40 do  
  for i=1 to 800 do  
    cell(x,i)=((n-(i-1))/n)*KA*exp(p1*10*V/(8.314*293.14))  
    cell(x+1,1)=cell(x,1)  
  end for
```

## 7. Anhang

---

```
for j=1 to 800 do
  cell(x+1,j+1)=cell(x,j+1)*cell(x+1,j)
end for
cell(x+3,p1)=p1*10
col(x+2)=col(x+1)*col(6)
cell(x+4,p1)=total(col(x+2))/total(col(x+1))
end for
```

Erstellte Fit – Routinen (*Sigma – Plot*) zur simultanen Datenanpassung mit dem parallelen Übergangsmodell

### Kalzium-Effekt (Formeln 7.25, 7.27, 7.29)

#### [Parameters]

```
V1 = -51.5
V2 = -167.6
k1 = 0.07
k2 = 1.075e-8
L0 = 33.72
i = 1.1
```

#### [Variables]

```
x=col(1)
y=col(2)
r=col(3)
```

#### [Equations]

```
L=L0*exp(i*(ln(r)))
a1=k1*exp(-V1*x/(293.14*8.314))
a2=k2*exp(-V2*x/(293.14*8.314))
f1=a1/(1+a1)
f2=a2/(1+a2)
f=1/(1+L)*f1+L/(1+L)*f2
fit f to y
```

#### [Constraints]

```
k1>0
k2>0
```

Erstellte Fit – Routinen (*Sigma – Plot*) zur Datenanpassung mit dem sequentiellen Übergangsmodell ((7.20)

## 7. Anhang

---

### [Parameters]

$$k1 = 0.09$$

$$k2 = 2e-8$$

$$V1 = 150$$

$$V2 = 202$$

### [Variables]

$$x = \text{col}(1)$$

$$y = \text{col}(2)$$

### [Equations]

$$R = 8.314$$

$$T = \text{cell}(3,1)$$

$$z1 = k1 * V1 / (R * T) * \exp(x * V1 / (R * T)) + k1 * V1 / (R * T) * \exp(x * V1 / (R * T)) * k2 * \exp(x * V2 / (R * T)) + k2 * V2 / (R * T) * \exp(x * V2 / (R * T)) * k1 * \exp(x * V1 / (R * T))$$

$$z2 = 1 + k1 * \exp(x * V1 / (R * T)) + k1 * \exp(x * V1 / (R * T)) * k2 * \exp(x * V2 / (R * T))$$

$$f = (z1 / z2) / ((V1 + V2) / (R * T))$$

fit f to y

### [Constraints]

$$k1 > 0$$

$$k2 > 0$$

---

## Literaturverzeichnis

- Alaimo M. H., Wickham E. D., Farrell Jr. H. M. (1999) *Biochim. et Biophys. Acta* 1431, 395-409
- Anema S.G., Lee S.K., Schrader K. and Buchheim W. (1997) *Milchwissenschaft*, 52, 141-146
- Anema S.G., Lowe E.K., Stockmann R. (2004) *Food Hydrocolloids*, 1-11 in Press
- Balny C. (2004) *J. Phys.: Condens. Matter* 16, 1245-1253
- Bauer R., Hansen M., Hansen S., Øgøndal L., Lomholt S., Qvist K., Horne D. (1995) *J. Chem. Phys.* 103, 2725- 2737
- Boonyaratanakornkit B. B., Park C.B., Clark D.S. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 235-249
- Brouwer M., Bonaventura C., Bonaventura J. (1983) *Biochemistry*, 22, 4713-4723
- Colombo M.F., Seixas F.A.V. (1999) *Biochemistry*, 38, 11741-11747
- Curley D. M., Kumosinski T. F., Unruh J. J., Farrell H. M. (1998) *J. Dairy Sci.* 81, 3154-3162
- Dalgleish D.G. (1998) *Journal of Dairy Science*, 81: 3013-3018
- Dalgleish D.G., Paterson E., Horne D. S. (1981) *Biophysical Chemistry* 13, 307-314
- de Kruif C. G., (1998) *J. Dairy Sci.* 81, 3019-3028
- de Kruif C. G., Grinberg V.Y. (2002) *Colloids and Surfaces A*, 210, 183-190
- de Kruif C.G., Zhulina E. B. (1996) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 117, 151-159
- Decker H, Föll R. (2000) *CBP*, 127 (2), 147-154
- Decker H., Hartmann H., Sterner R., Schwarz E., and Pilz I. (1996) *FEBS Lett.* 393, 226-230
- Decker H., Sterner R. (1990) *J. Mol.Biol.* 211, 281-293.
- Desobry-Banon S., Richard F., Hardy J. (1994) *Journal of Dairy Science*, 77, 3267-3274
- Dickinson E., Horne D. S., Pinfield V. J., Leermakers F. A. M. (1997) *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 93(3), 425-432
- Dickinson E., Pinfield V. J., Horne D. S., Leermakers F. A. M. (1997) *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 93(9), 1785-1790
- Doster W., Friedrich J. (2005) *Handbook of Protein Folding* J. Wiley Ed. Buchner, Kiefhaber
- Dörfler H. -D. (2002) *Springer*
- Erijman L., Weber G. (1991) *Biochemistry*, 30, 1595-1599
- Euston S. R., Horne D. S. (2005) *Food Hydrocolloids*, 19, 379-386
- Evans D. F., Wennerström H. (1999) The colloidal domain. Second edition, *WILEY-VHC*
- Farrell Jr. H. M., Qi P. X., Brown E. M., Cooke P. H., Tunick M. H., Wickham E. D. Unruh J.J. (2002) *J. Dairy Sci.* 85, 459-471
- Garcia C. R., Amaral J. A., Abrahamssohn P., Verjovski – Almeida S. (1992) *Eur. J. Biochem.* 209, 1005-1011
- Gaucheron, F., Famelart, M.H., Mariette F., Raulot K., Michel F., Le Graet Y.(1997): *Food Chem.* 59, 439-447
- Gebhardt R. (2000) *Diplomarbeit*, Uni-Mainz

- 
- Gebhardt R., Doster W., Friedrich J., Petry W., Schulte A. (2003) *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, Editor R. Winter, Springer Verlag, 33-36
- Gerstein M., Chothia C. (1996) *PNAS* 93, 10167-10172
- Gross M., Jaenicke R. (1994) *Eur. J. Biochem.* 221, 617-630
- Hartmann H., Lohkamp B., Hellmann N., Decker H. (2001) *JBC*, 276, 23, 19954-19958
- Hazes B., Magnus K.A., Bonaventura C., Bonaventura J., Dauter Z., Kalk K.H., and Hol W.G. (1993) *Protein Sci.* 2, 597-61
- Hellmann N., Raithel K., Decker H. (2003) *CBP*, 136, 725-734
- Hendrickx M., Ludikhuyze L., van den Broeck I., Weemaes C. (1998) *Trends in Food Science & Technology* 9, 197-203
- Heremans K. (1980) *Rev. Phys. Chem. Jpn.* 50, 259-273
- Heremans L., Heremans K., (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 999, 192-197
- Herskovits T.T. (1966) *Biochemistry*, 5, 1018-1026
- Herskovits T.T., (1989) *Comp. Biochem. Physiol.* 91 B, 597-611
- Herskovits T.T., Russell M.W., Carberry S.E. (1984) *Biochemistry*, 23, 1875- 1881
- Herskovits T.T., San George R.C., Erhunmwunsee L.J. (1981) *Biochemistry*, 20, 2580-2587
- Holt C., de Kruif C.G., Tuinier R., Timmins P.A. (2003) *Colloids and Surfaces A* 213, 275-284
- Holt C., Sawyer (1989) *J.Chem.Soc.*
- Horne D.S., Dalgleish D.G.(1980) *International Journal of Biological Makromolecules* 2, 154-160
- Horne D.S. (1998) *Int. Dairy Journal* 8, 171-177
- Horne, D.S. (1992) *Advanced Dairy Chemistry-1*, 657-689, London: Elsevier Applied Science
- Hübler R., Fertl B., Hellmann N., Decker H. (1998) *BBA*, 1383, 327-339
- Huppertz T., Kelly A. L., Fox P. F. (2002) *International Dairy Journal*, 12, 561-572
- Huq N. L., Cross K. J., Reynolds E. C. (1995) *Biochim. et Biophys. Acta* 1247, 201-208
- Johnston D.E., Austin B.A., Murphy R.J. (1992b) *Milchwissenschaft*, 47, 760-763 Kapitel 2,3
- Johnston C. S., Gabriel D. A. (1995) *Dover Publications*
- Keenan R.D., Hubbard C.D., Mayes D.M., Tier C.M. (2003) *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge pp. 109-118
- Kegeles G. (1979) *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 83, No. 13
- Koppel D. (1972) *The Journal of Chemical Physics*. Vol 57, No 11
- Kumosinski T. F., Brown E. M., Farrell Jr. H. M. (1993) *J. Dairy Sci.* 76, 931-945
- Kumosinski\* T. F., Brown E. M., Farrell Jr. H. M. (1993) *J. Dairy Sci.* 76, 2507-2520
- Lamy J., Bijholt M.M.C., Sizaret P-Y, Lamy J., van Bruggen E.F.J. (1981) *Biochemistry*, 20, 1849-1856
- Leitner M.(1997): *Diplomarbeit* , TU-München
- Li H. Yamada H., Akasaka K. (1998) *Biochemistry* 37, 1167-1173
- Linowski J.W., Liu N.I., Jonas J. (1976) *J. Chem. Phys.* 65, 3383-3384
- Lopez-Fandino R., De la Fuente M.A., Ramos M., Olano A. (1998) *Journal of Dairy Research*, 65, 69-78
- Lumry R., Eyring H. (1954) *Journal of Physical Chemistry*, 58, 110-120

- 
- Markl J., Decker H., Stöcker W., Savel A., Linzen B., Schutter W.G., and van Bruggen E.F. (1981) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362, 185-188
- Monod J., Changeux J.P. and Jacob F. (1963) *J. Mol. Biol.* 6, 306-329
- Morimoto K., Kegeles G. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 247-257
- Mozhaev V., Heremans K., Frank J., Masson P., Balny C. (1996) *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 24: 81-91
- Needs E.C., Stenning R.A., Gill A.L, Ferragut V. and Rich G.T. (2000) *Journal of Dairy Research*, 67, 31-42
- Neuman R. C, Kauzmann W., Zipp A. (1973) *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 77, No. 22
- Noelken M., Reibstein M. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, 123, 397
- O'Connell J. E., Grinberg V. Ya., de Kruif C. G. (2003) *Journal of Colloid and Interface Science*, 258, 33-39
- Payens T.A., Brinkhuis J.A., van Markwijk B.W. (1969) *Biochimica et Biophysica Acta* 175, 434-437
- Peters R. (1993): Introduction to the Multiple Tau Correlation Technique. ALV-Laser-Vertriebsgesellschaft, *Referenze Manual*
- Privalov P. L. (1979) *Adv. Protein Chem.* 33, 167-241
- Provencher S. W. (1982) *Comput. Phys. Comm.*, 27, 213, 229
- Regnault S., Thiebaud M., Dumay E., Cheftel J.C. (2004) *International Dairy Journal*, 14, 55-68
- Schätzel K. (1987): *Appl. Phys. B* 42, 193-213
- Schätzel K., and Schulz-DuBois (1991) *Infrared Phys.* Vol. 32, 409-416
- Schmidt D.G. (1970a) *Biochimica et Biophysica Acta* 207, 130-138
- Schmidt D.G. (1970b) *Biochimica et Biophysica Acta* 221, 140-141
- Schmidt (1982): *Developments in Dairy Chemistry-1*, 61-86) London: Elsevier Applied Science
- Schmidt, Walstra, Buchheim (1973) *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 27, 128-142
- Shao-Min Tian, Kang-Cheng Ruan, Jian-Fei Qian, Guo-Qing Shao, Claude Balny (2000) *FEBS*, 267, 4486-4494
- Shibauchi, Y., Yamamoto, W. and Sagara Y. (1997) Pp. 239-242, John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, France
- Silva J., Foguel D., Royer C. (2001) *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 26 no.10
- Silva J., Foguel D., Suarez M., Gomes A., Oliveira A. (2004) *J. Phys.: Condens. Matter* 16, 929-944
- Silva J., Luan L., Glaser P., Voss M., Weber G. (1992) *J. Virol.* 66: 2111-2117
- Silva J., Miles E., Weber G. (1986) *Biochemistry* 25, 5780-5786
- Silva J., Villas – Boas, Bonafe M., Meirelles N.C. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 15863-15867
- Silva J., Silveira C., Correia A. Pontes L. (1992) *J. Mol. Biol.* 223, 545-555
- Silva J., Weber G. (1993) *Annual Reviews Phys. Chem.* 44, 89-113
- Smeller L., Rubens P., Heremans K. (1999) *Biochemistry* 38, 3816-3820
- Smyth E., Syme C. D., Blanch E. W., Hecht L., Vašák, Barron L. D. (2000) *Biopolymers* 58, 138-151
- Tai M., Kegeles G. (1984) *Biophysical Chemistry*, 20, 81-87
- Tolkach A., Kulozik U. (2005) *J. Food Eng.* 67, 13-20
- Van Holde K.E., Miller K.I. (1995) *Adv. Protein Chem.* 47, 1-81

- 
- Visser H. (1992) *VCH Verlagsgesellschaft mbH*, D-6940 Weinheim
- Vreeman H.J., Both P., Brinkhuis J.A., van der Spek C. (1977) *Biochimica et Biophysica Acta* 491, 93-103
- Walstra P. (1990) *Journal of Dairy Science*, 73, 1965-1979
- Walstra P. (1999) *International Dairy Journal*, 189-192
- Waugh, D.F., R.W. Noble, Jr. 1965. *J. Am. Chem. Soc.* 87: 2246-2257
- Winter R., Noll F. (1998) *Teubner Studienbücher Chemie*, Stuttgart
- Wyman J., Gill S. J. (1990) *University Science Book*