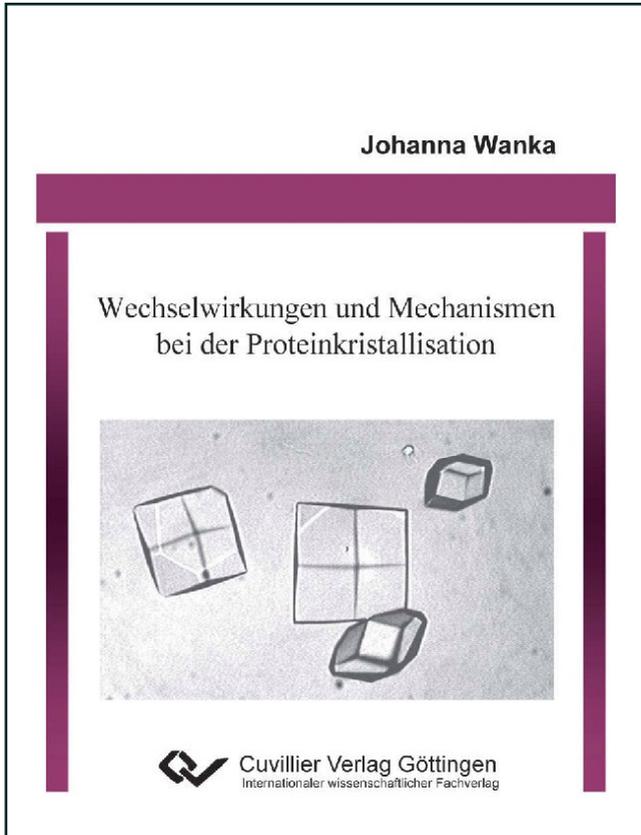




Johanna Wanka (Autor)
**Wechselwirkungen und Mechanismen bei der
Proteinkristallisation**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/684>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

2 Grundlagen

2.1 Proteine

Proteine, umgangssprachlich auch Eiweiße genannt, sind komplex aufgebaute biologische Makromoleküle. Sie sind die Grundbausteine aller Zellen und erfüllen viele Aufgaben. Sie verleihen der Zelle nicht nur Struktur, sondern sind die molekularen „Maschinen“, die Stoffe transportieren, Ionen pumpen, chemische Reaktionen katalysieren und Signalstoffe erkennen.

Proteine sind zusammengesetzt aus den proteinogenen (proteinaufbauenden) Aminosäuren. Im Menschen sind 22 verschiedene proteinogene Aminosäuren bekannt. Sie sind über eine Peptidbindung zu einer langen Kette verbunden. Die Abfolge der verschiedenen Aminosäuren nennt man Proteinsequenz oder Primärstruktur. Aufgrund intramolekularer Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidbindungen des Polypeptid-Rückgrates der verschiedenen Aminosäuregruppen bilden sich lokale Strukturen aus, die in alpha-Helix, beta-Faltblatt, beta-Schleifen und ungeordnete, so genannte Random-Coil-Strukturen eingeteilt werden. Man spricht dabei von der Sekundärstruktur. Die räumliche Anordnung und charakteristische 3-D-Faltung eines jeden Proteins nennt man Tertiärstruktur. Lagern sich mehrere Proteine zu einem Proteinkomplex zusammen, wird dies als Quartärstruktur bezeichnet. Bekanntes Beispiel sind die Immunglobuline (Antikörper), bei denen jeweils zwei identische schwere und zwei identische leichte Proteine über insgesamt vier Disulfidbrücken zu einem funktionsfähigen Antikörper verbunden sind.

Die Faltung eines Proteins oder Proteinkomplexes führt zu aktiven (z.B. enzymaktiven) Stellen, die für die Wirkungsweise des Proteins eine große Rolle spielen. Faltet sich das Protein auf oder um aufgrund von denaturierenden Bedingungen, geht die (enzymatische) Aktivität reversibel oder irreversibel verloren [84, 173].

Proteine mit weniger als 100 Aminosäuren nennt man Peptide.

2.2 Wechselwirkungen

2.2.1 Intramolekulare Wechselwirkungen

Bei den Proteinen sind die intramolekularen Wechselwirkungen, also die Wechselwirkungen innerhalb des Proteinmoleküls ausschlaggebend für die räumliche Gestalt des Moleküls. Sie bestimmen die Sekundär- und Tertiärstruktur vor allem durch Wasserstoffbrückenbindungen und kovalente Disulfidbindungen. Zusätzlich spielen hydrophobe, ionische und Van-der-Waals-Kräfte eine wichtige Rolle. Die Struktur eines Proteins ist keineswegs als starr anzusehen, es gibt vielmehr einen Zustand mit minimaler Energie, abhängig

von den Umgebungsbedingungen. Die (dynamische) Faltung eines Proteins ist häufig entscheidend für seine Aufgaben und ist Gegenstand molekulardynamischer Untersuchungen.

2.2.2 Intermolekulare Wechselwirkungen

2.2.2.1 Allgemeines

Als intermolekulare Wechselwirkungen werden Wechselwirkungen zwischen Molekülen bezeichnet. Sie bestimmen die Struktur und den Aufbau der Materie, ebenso wie thermodynamische Gleichgewichtsgrößen und dadurch die Möglichkeiten der Stoffwandlung. Viele Grundvorgänge der Verfahrenstechnik können auf intermolekulare Wechselwirkungen zurückgeführt werden, wie Adsorption und auch Kristallisation bzw. Aggregation von Molekülen wie Proteinen.

Das Wechselwirkungspotential zwischen zwei Körpern beschreibt die potentielle Energie in Abhängigkeit von ihrer Distanz zueinander. Folgende Wechselwirkungspotentiale können im Allgemeinen zwischen Kolloiden auftreten und werden additiv zum Gesamtwechselwirkungspotential (siehe Gleichung 2.1) zusammengefasst [159].

- Starrkugel-Potential φ_{hs}
- Van-der-Waals-Potential φ_{vdw}
- elektrostatisches Potential φ_{el}
- osmotisches Potential φ_{osm}
- hydrophobes Potential
- ...

$$\varphi(r) = \varphi_{hs}(r) + \varphi_{vdw}(r) + \varphi_{el}(r) + \varphi_{osm}(r) + \dots \quad (2.1)$$

Die ersten drei Potentiale werden im DLVO-Modell zusammengefasst, das von Derjaguin und Landau [38] und unabhängig von Verwey und Overbeek [166, 167] entwickelt wurde. Unter Berücksichtigung von weiteren Potentialen wird das Modell erweitert zum xDLVO-Modell (extended DLVO).

Da Proteinmoleküle große und nicht-isotrope Makromoleküle sind, die sich normalerweise in einem Medium befinden, bedient man sich häufig des „potential of mean force“ (pmf). Es ist definiert als das Potential zwischen zwei Molekülen (in Flüssigkeit) bei unendlicher Verdünnung, integriert über alle möglichen Konfigurationen der Lösemittel-Moleküle [108].

Die Proteine werden im weiteren notwendigerweise vereinfacht beschrieben als starre Kugeln mit dem Durchmesser x_P (bzw. Radius R_P) und einer gleichmäßig verteilten Oberflächenladungsanzahl der Elementarladungen Z , die sich in einem kontinuierlichen dielektrischen Medium mit Punktladungen (Salzionen) befinden [32].

2.2.2.2 Starrkugelpotential

Das Starrkugelpotential, oder auch „hard sphere“ oder Harte-Kugel-Potential genannt, besagt, dass sich harte Kugeln nicht verformen oder durchdringen können. Bei sehr kleinen Abständen zwischen Atomen, Molekülen oder Partikel überlappen sich die Elektronenwolken der beteiligten Atome geringfügig, was zu sehr starker, aber kurzreichweitiger Abstoßung dieser Atome führt. Sie wird bei Ionen auch sterische Abstoßung genannt. Ihre Abstandsabhängigkeit wird durch empirische Potentialfunktionen beschrieben. Am bekanntesten ist das Starrkugelpotential, das inverse Potenzpotential und das exponentielle Potential. Im Folgenden wird mit dem Starrkugelpotential gerechnet: bei einem Mittelpunktsabstand r von zwei (gleichen) Proteinen, der größer als die zwei Radien R_P sind, ist das Potential Null, bei Überlappung der Proteine (Abstand kleiner als die Summe der Radien) ist das Potential unendlich groß (d.h. abstoßend) [81].

$$\varphi_{hs}(r) = \begin{cases} 0 & : r > 2R_P \\ \infty & : r < 2R_P \end{cases} \quad (2.2)$$

2.2.2.3 Van-der-Waals-Potential

Die Existenz einer allgemeinen Anziehungskraft zwischen neutralen Atomen wurde zuerst von van der Waals 1873 postuliert. Er entdeckte diese Anziehungskraft aufgrund des abweichenden Verhaltens vom realen zum idealen Gas, woraufhin diese Abweichung auf die Van-der-Waals-Kraft zurückgeführt wurde. Weitere Forschungen ergaben, dass diese Kraft drei verschiedene aber nahverwandte Phänomene beinhalten, Kräfte zwischen:

- Dipol - Dipol (Keesom Kräfte)
- Dipol - induzierter Dipol (Debye Kräfte)
- instantaner, fluktuierender Dipol - induzierter Dipol (London Dispersions-Kräfte).

Da Keesom und Debye Kräfte nur bei permanenten Dipolen auftreten, spielen die Van-der-Waals-London (Dispersions-)Kräfte zwischen ungeladenen (makroskopischen) Körpern ohne permanente Dipole eine wichtige Rolle in „dichten“ konzentrierten Systemen. In elektrolythaltigen wässrigen Medien werden die Keesom-Kräfte fast vollständig abgeschirmt [159].

Das Dispersions-Potential φ_{vdw} lässt sich nach Hamaker [75] mit Gleichung 2.3 abhängig vom Mittelpunktsabstand r berechnen (z.B. [32]):

$$\varphi_{vdw}(r) = -\frac{A_H}{12} \left[\frac{x_P^2}{r^2 - x_P^2} + \frac{x_P^2}{r^2} + 2 \ln \left(1 - \frac{x_P^2}{r^2} \right) \right] \quad (2.3)$$

Dabei ist A_H die Hamakerkonstante. Sie ist genau genommen nicht nur abhängig vom Material der betrachteten Moleküle oder Partikel. Zusätzlich muss das umgebende Medium

berücksichtigt werden. Dabei finden häufig Mischungsregeln von Hamakerkonstanten Anwendung. Die Hamakerkonstante zwischen zwei Partikel (1) in Medium (2) lässt sich nach Gleichung 2.4 mit den materialspezifischen Hamakerkonstanten $A_{H,11}$ für das Partikel und $A_{H,22}$ für das Medium berechnen [103, 159].

$$A_{H,121} = A_{H,11} + A_{H,22} - 2\sqrt{A_{H,11}A_{H,22}} \quad (2.4)$$

Da Hamakerkonstanten, vor allem für Proteine und Elektrolytlösungen häufig nicht bekannt sind, ist die Beschreibung mit Hilfe des dispersiven Anteils der Oberflächenenergien γ^d nach van Oss [159] sehr hilfreich (Gleichung 2.5).

$$A_H = 24\pi l_0^2 \gamma^d \quad (2.5)$$

Dabei ist l_0 der minimale Kontaktabstand, für den bei van Oss und auch in der vorliegenden Arbeit der Wert 0,1568 nm verwendet wurde.

Somit lässt sich mit der Kenntnis des dispersiven Anteils der Oberflächenenergien die Hamakerkonstanten $A_{H,11}$ und $A_{H,22}$ von unterschiedlichen Proteinen und Elektrolytlösungen als Funktion der Elektrolyt-Lösung, d.h. der Art und Konzentration berechnen und somit ihr Einfluss auf die Gesamthamakerkonstante $A_{H,121}$ bestimmen, was in Kapitel 4.2.2 näher beschrieben wird.

2.2.2.4 Elektrostatisches Potential

Das elektrostatische Potential zwischen zwei Körpern wird bestimmt durch deren Ladungen. In einem Medium (mit Ionen oder Dipolen) bildet sich eine elektrostatische Doppelschicht um die geladenen Partikel aus, die das elektrostatische Potential beeinflusst. Nach der Debye-Hückel Theorie [167] ist das elektrostatische Potential φ_{el} von zwei gleichen Kugeln der selben Anzahl Z der Elementarladungen e repulsiv und berechnet sich zu:

$$\varphi_{el}(r) = \frac{Z^2 e^2 \exp(\kappa(x_P - r))}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r (1 + \kappa x_P/2)^2} \quad (2.6)$$

Die Debye-Hückel-Theorie vereinfacht dabei die Salzionen zu Punktladungen. Bei Ionenstärken größer 0,1 mol/l ist diese Vereinfachung zwar ungenau, jedoch ist die elektrostatische Abstoßung gering bei diesen Salzkonzentrationen, sodass der Fehler in der Annahme von geringer Bedeutung ist [32].

κ beschreibt die inverse Debye-Länge, d.h. anschaulich die Dicke der elektrostatischen Doppelschicht, abhängig von der Ionenstärke I der Lösung, nach Gleichung 2.7.

$$\kappa^2 = \frac{2N_A e^2 I}{\epsilon_0\epsilon_r k_B T} \quad (2.7)$$

N_A bezeichnet die Avogadrozahl, $\epsilon_0\epsilon_r$ die Dielektrizität des Mediums, hier Wasser, k_B die Boltzmannkonstante und T die Temperatur.

der Proteinlösung verändert werden. Die Zugabe von Salzen, die im untersuchten Bereich als Fällungsmittel (salting-out) wirken, verursacht die Ausbildung einer elektrostatischen Doppelschicht um die gleichsinnigen (und damit abstoßenden Netto-)Ladungen der Proteine und schirmt die Ladungen somit ab, was die repulsiven Wechselwirkungen des Proteins reduziert und dadurch die Gesamt-Potentialbarriere verkleinert. Da verschiedene Fällungsmittel unterschiedliche Doppelschichten ausbilden, spielt auch die Fällungsmittelart eine Rolle [88, 131].

Die Temperaturabhängigkeit der Dielektrizitätskonstante von Wasser lässt sich nach [96] empirisch beschreiben:

$$\epsilon_r(T/K) = 0,72997 \cdot 10^{-3} \cdot T^2 - 0,79069 \cdot T + 249,21 \quad (2.11)$$

Die Salzabhängigkeit der Dielektrizitätskonstante wird ausgelöst durch den Verlust der Orientierungspolarisation der Lösungsmittelmoleküle in der Umgebung eines Ions. Dies kann durch zusätzliche so genannte Reduktionsfaktoren δ_i für jedes Ion i mit der Konzentration c_i berücksichtigt werden [30, 148].

$$\epsilon_{r,mod} = (\epsilon_r - 1) \cdot \left[\left(\sum_i \delta_i \cdot c_i \right) \frac{1}{\epsilon_r - 1} \right] + 1 \quad (2.12)$$

2.2.2.5 Osmotisches Potential

Bei sehr hohen Elektrolytkonzentrationen spielt auch das ausgeschlossene Volumen (excluded volume) der Ionen eine Rolle. Wenn zwei Proteine sich nahezu berühren, werden die Salzionen aus dem Zwischenraum gedrückt. Dadurch kommt es zu lokalen Salzkonzentrationsunterschieden, die ein (osmotisches) Druckungleichgewicht verursachen. Dies führt zu einem attraktiven Potential zwischen den Proteinmolekülen, um den Zwischenraum zu verkleinern, den Salzkonzentrationsunterschied und den osmotischen Druck auszugleichen. Eine Möglichkeit dies zu beschreiben ist das anziehende osmotische Potential nach Asakura und Oosawa [5, 6]. Es ist hergeleitet durch Näherung der osmotischen Druckdifferenz mit dem idealen osmotischen Druck $p = k_B T \rho_s$, wobei $\rho_s = c_s N_A / M_{w,s}$ die Anzahldichte der Salzionen ist. $M_{w,s}$ ist das Molekulargewicht des Salzes.

Damit ergibt sich

$$\varphi_{osm}(r) = -\frac{4}{3} \pi r_{23}^3 \rho_s k_B T \left(1 - \frac{3r}{4r_{23}} + \frac{r^3}{16r_{23}^3} \right) \quad (2.13)$$

mit dem Minimalabstand $2r_{23}$ zwischen zwei Proteinmolekülen mit einem Salzion im Zwischenraum

$$r_{23} = \frac{x_P + x_s + l_0}{2} \quad (2.14)$$

der sich aus dem Proteindurchmesser x_P und dem Durchmesser der Salzionen (Gegenionen) x_s und dem Minimalabstand l_0 zusammensetzt. Das Potential gilt ausschließlich für kurze Entfernungen, in denen dieser osmotische Effekt auftritt, also für $x_P + l_0 < r < 2r_{23}$.

2.2.3 Berechnung thermodynamischer Parameter

2.2.3.1 Der zweite osmotische Virialkoeffizient B_{22}

Die Virialkoeffizienten B_{22}, C_{222}, \dots stammen von der Reihenentwicklung der idealen Gasgleichung mit dem osmotischen Druck Π und dem Molekulargewicht M_w . Sie beschreiben die Abweichung vom idealen Verhalten, also die Berücksichtigung von Wechselwirkungen in Abhängigkeit der Konzentration.

$$\frac{\Pi}{RT} = \frac{c_P}{M_w} + B_{22}c_P^2 + C_{222}c_P^3 + \dots \quad (2.15)$$

Die statistische Thermodynamik leitet den Zusammenhang zu den Wechselwirkungen ab, wobei der zweite Virialkoeffizient B_{22} die Wechselwirkung zwischen zwei, der dritte C_{222} zwischen drei Molekülen, usw. beschreibt. Bei Gasen wird die Virialentwicklung häufig nach dem zweiten Glied abgebrochen werden, da (nahe) Wechselwirkungen zwischen drei Gasmolekülen eher selten sind [111]. Für die Beschreibung von Flüssigkeitsmolekülen wäre der 3. und oft auch noch der 4. Virialkoeffizient interessant. Die höheren Virialkoeffizienten sind jedoch im Gegensatz zum 2. Virialkoeffizienten experimentell schwer zugänglich. Zur Beschreibung von Makromolekülen in Flüssigkeit wird häufig lediglich der zweite Virialkoeffizient berücksichtigt, was bei verdünnten Konzentrationen eine sinnvolle Vereinfachung darstellt.

Der quantitative Zusammenhang zum Wechselwirkungspotential beschreibt die McMillan-Mayer Lösungstheorie [70, 74, 79, 102, 108]:

$$B_{22} = 2\pi \frac{N_A}{M_w^2} \int_0^\infty \left(1 - e^{\frac{-\varphi(r)}{k_B T}} \right) r^2 dr \quad (2.16)$$

wobei B_{22} die Einheit $ml \, mol \, g^{-2} = m^3 \, mol \, kg^{-2}$ besitzt. B_{22} ist als Integral über das Wechselwirkungspotential eine Größe, die räumlich gemittelt die Wechselwirkungsenergie zwischen zwei Proteinen beschreibt. Negative Werte weisen auf anziehende Interaktionen hin, wohingegen positive Werte ein Zeichen dafür sind, dass abstoßende Kräfte überwiegen [23].

George et. al. [63] untersuchte die Wechselwirkungen von unterschiedlichen Proteinlösungen anhand des zweiten osmotischen Virialkoeffizienten und stellte fest, dass Bedingungen, in denen analytische Proteinkristalle entstanden, einen Virialkoeffizienten in einem bestimmten Bereich, dem so genannten „crystallization slot“ ($-8 \cdot 10^{-4} \, mol \, ml \, g^{-2}$ bis 0) ausweisen. Diese leicht attraktiven Wechselwirkungen führen demnach bevorzugt zu Kristallbildung, während bei repulsiveren Wechselwirkungen ($B_{22} \geq 0$) keine Niederschlagsbildung beobachtet wird. Bei stärker attraktiven Wechselwirkungen ($B_{22} \leq -8 \cdot 10^{-4} \, mol \, ml \, g^{-2}$) wird meistens amorphe Präzipitation beobachtet (siehe Abb. 2.1) [23, 63, 126, 176].

Systematische Untersuchungen mit unterschiedlichen Proteinen zeigen, dass größere Proteine bevorzugt Kristalle bilden im oberen Bereich des „crystallization slots“, also bei

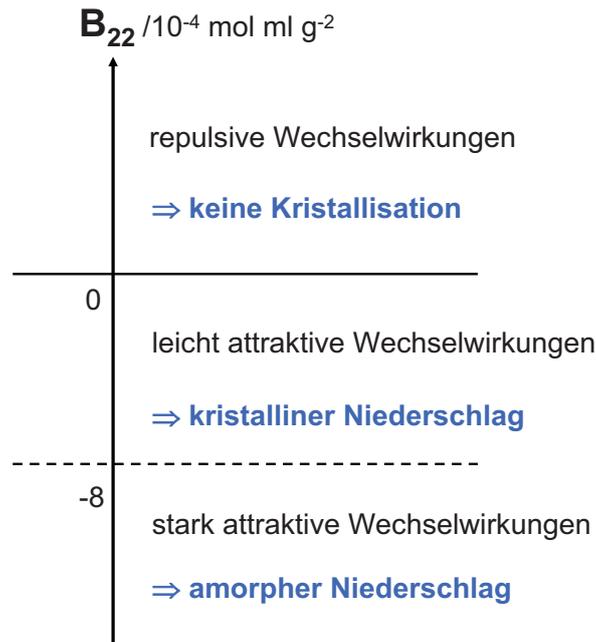


Abbildung 2.1: Zusammenhang zwischen zweitem osmotischen Virialkoeffizienten B_{22} , Wechselwirkungen und Kristallisationsverhalten (schematische Ergebnisdarstellung nach [63]).

weniger attraktiven Bedingungen [46, 132, 168]. Diese Erkenntnisse werden auch durch die theoretische Arbeit von Haas und Drenth [71] bestätigt, die auf der Annahme basiert, dass die Keimbildung bei der Proteinkristallisation über eine flüssig-flüssig Phasentrennung (LLPS) erfolgt. Die Autoren sagen damit einen Kristallisationsbereich für B_{22} von $-9,0$ bis $-3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol ml g}^{-2}$ für ein kleines Protein mit 14 kDa (z.B. Lysozym) und von $-0,9$ bis $-0,35 \cdot 10^{-4} \text{ mol ml g}^{-2}$ für ein großes Protein mit 140 kDa voraus.

Der zweite osmotische Virialkoeffizient ist eine vergleichsweise leicht zu bestimmende Größe, die in den genannten Untersuchungen im analytischen Bereich eine vielversprechende Eignung gezeigt hat, das Phasenverhalten von Proteinen vorherzusagen. Als integraler Parameter der Wechselwirkungen zwischen den Proteinen stellt der Virialkoeffizient eine physikalisch sinnvolle Vereinfachung der Interaktionen der komplex aufgebauten Makromoleküle dar. Auch für die industrielle Fällung, an die andere Anforderungen gestellt wird als im analytischen Bereich (keine perfekten Kristalle, ausreichende Härte und Größe, dafür geringere Prozesszeiten [82, 174]), lässt sich der zweite osmotische Virialkoeffizient mit geeigneten Bedingungen korrelieren.

Bei der Korrelation des thermodynamischen Gleichgewichtsparameter B_{22} und des Phasenverhaltens bei der Kristallisation ist in den oben genannten Untersuchungen der analytischen Proteinkristallisation in der Literatur die Übersättigung als Parameter nicht berücksichtigt worden. Das liegt vor allem daran, dass die Bestimmung der dafür notwendigen Löslichkeit bei der Fülle an Einflussparametern sehr material- und zeitintensiv ist.