

Übungen in physikalischer Chemie für B. Sc.-Studierende	
Versuch Nr.: S13	Version 2019 (060319)
Kurzbezeichnung: Denaturierung	

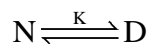
# Ermittlung von Reaktionsgrößen der Proteindenaturierung

## Aufgabenstellung

Bei 293 nm ist die Extinktion einer  $\alpha$ -Chymotrypsinogen-Lösung mit einem Gehalt von ca. 1 mg/ml bei pH 3 im Temperaturintervall von 45-65 °C aufzunehmen, die Schmelztemperatur und das Schmelzintervall zu ermitteln, und daraus sind die *apparente* Standardreaktionsenthalpie und -entropie zu berechnen.

## Grundlagen

Das einfachste Modell für eine Proteindenaturierung ist die Annahme eines Gleichgewichts zwischen der nativen (N) und der denaturierten (D) Form:



Die Lage dieser Gleichgewichte ist neben der Temperatur auch stark vom eingestellten pH-Wert und der Ionenstärke abhängig. Gleichgewichtskonstanten und Reaktionsgrößen, die bei festgelegten Konzentrationen dieser Einflussgrößen ermittelt werden, werden deswegen als „apparente“ Reaktionsgrößen bezeichnet und mit einem Apostroph gekennzeichnet.

Für die Gleichgewichtskonstante gilt das Massenwirkungsgesetz.

$$K' = \frac{[D]}{[N]}$$

Das Verhältnis von nativer und denaturierter Konzentration wird im vorliegenden Versuch über Extinktionsmessungen ermittelt. Die Extinktion bei 293 nm widerspiegelt Absorptionsveränderungen, die durch das Ausklappen von Histidin-Gruppen aus hydrophoben Domänen in die wässrige Lösung entstehen.

Es gilt zunächst:

$$\frac{[N]}{[N]_0} = \frac{E(T) - E(D)}{E(N) - E(D)} \quad (1)$$

Mit

$$K' = \frac{[D]}{[N]} = \frac{[N]_0 - [N]}{[N]} = \frac{1 - \frac{[N]}{[N]_0}}{\frac{[N]}{[N]_0}}$$

erhält man daraus

$$K' = \frac{\frac{E(N) - E(D)}{E(N) - E(D)} - \frac{E(T) - E(D)}{E(N) - E(D)}}{\frac{E(T) - E(D)}{E(N) - E(D)}} \quad (2)$$

$$\boxed{K' = \frac{E(N) - E(T)}{E(T) - E(D)}}$$

Nach der van't Hoff'schen Reaktionsisobare ist

$$\Delta_R H' = RT^2 \frac{\partial \ln K}{\partial T}$$

Setzt man hier die Beziehung für  $K'$  ein, erhält man:

$$\Delta_R H' = RT^2 \frac{\partial \ln K}{\partial T} = RT^2 \left[ -\frac{dE(T)}{dT} \left( \frac{1}{E(N) - E(T)} - \frac{1}{E(T) - E(D)} \right) \right]$$

Da die Denaturierungsenthalpie *meist temperaturabhängig* ist, ist es auch sinnvoll, sie einer bestimmten Temperatur zuzuordnen. Wählt man dafür die sogenannte Schmelztemperatur  $T_D$ , bei der die Konzentration der nativen und der denaturierten Form untereinander gerade gleich sind, wird  $K'=1$ , und es gelten folgende Beziehungen:

$$K'_{T_D} = 1$$

$$E(N) - E(T_D) = E(T_D) - E(D)$$

$$E(T_D) = \frac{E(N) + E(D)}{2}$$

Für die Berechnung von  $\Delta_R H'_{T_D}$  resultiert dann:

$$\boxed{\Delta_R H'_{T_D} = \frac{4RT_D^2}{E(D) - E(N)} \left( \frac{dE(T)}{dT} \right)_{T=T_D}} \quad (3)$$

Nach der van't Hoff'schen Reaktionsisobare wird

$$\Delta_{\text{R}} G'_{\text{TD}} = -RT_{\text{D}} \ln K_{\text{TD}} = 0$$

und aus der Gibbs-Helmholtz-Gleichung erhält man somit

$$\Delta_{\text{R}} S'_{\text{TD}} = \frac{\Delta_{\text{R}} H'}{T_{\text{D}}} \quad (4)$$

### Vorbereitungsfragen

- Informieren Sie sich über die Konzentrationsfestlegungen für apparente Größen in der biochemischen Thermodynamik.
- Informieren Sie sich über den Aufbau von UV/Vis-Spektrometern.
- Wie lautet das Lambert-Beer'sche Gesetz, und unter welchen Bedingungen ist es gültig?

**LITERATUR:** C. Czeslik, H. Seemann, R. Winter, Basiswissen Physikalische Chemie, 4., aktualisierte Auflage, Vieweg+Teubner, Wiesbaden, 2010, Kap. 2.4  
P.W. Atkins, J.de Paula, Kurzlehrbuch Physikalische Chemie, 4., vollständig überarbeitete Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2008

N. Poklar, G. Vesnaver, S. Lapanje, *J. Prot. Chem.* 14(1995)709-19

### Durchführung

Falls noch nicht geschehen, sind folgende Geräte einzuschalten:

1. Spektral SHIMADZU mit dem Einschaltknopf an der linken Geräteseite
2. Thermostat mittels Einschaltknopf in Betrieb setzen.  
Durch Drücken der SET-Taste und durch Betätigen der  $\Delta$ -Taste ist die Temperatur auf 45° einzustellen und anschließend mit der SET-Taste zu bestätigen
3. Computer mittels Einschaltknopf,  
(die erforderliche Anmeldung erfolgt durch einen Praktikumsmitarbeiter!)  
auf dem Desktop ist das Icon "START SHIMADZU" doppelt anzuklicken,  
(die erforderliche Anmeldung erfolgt durch einen Praktikumsmitarbeiter!)  
im neu geöffneten Fenster ist das für den Betrieb notwendige Programm durch Anklicken des Icons "UVPC" zu starten und der erfolgreich durchgeführte Selbsttest (Initialisierung) ist abzuwarten.

### Probenvorbereitung:

In der Zeit der Temperierung des Gerätes ist die Untersuchungslösung herzustellen. Dazu erfolgt die Einwaage von 2 mg ( $\pm 0,5$  mg) des Protein  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A direkt in den auf die Analysenwaage gestellten Maßkolben mit 2 ml Volumen. Die in der Abb.1 dargestellte Menge auf dem Spatel entspricht ca. 2 mg.



Abb. 1

Anschließend ist mittels einer Tropfpipette der Maßkolben bis zum Halsansatz (ca. 1 ml) mit der bereitgestellten 0,01 M Glycin/NaCl-Puffer-Lösung zu füllen und das Protein unter Schütteln zu lösen. Mehrmals ist der Glasstopfen zu öffnen, damit gebildete Schaumbläschen entweichen können. Ist eine vollständige Auflösung des Proteins erfolgt, wird das Endvolumen von 2 ml durch weitere Zugabe von Glycin-Lösung bis genau zur Eichmarkierung des Maßkolbens aufgefüllt und nochmals gründlich geschüttelt.

### **Vorbereitung der Messung**

Nach erfolgter Initialisierung sind am Spekol folgende Einstellungen vorzunehmen:

4. In der oberen Menüleiste im Menüpunkt Methode ist „Quantitativ“, unter Konfiguration – „Parameter laden“ ist die Datei „protein.cfg“ auszuwählen und die Mitteilung über eine erfolgte Modifizierung ist zu schließen.
5. Nochmals zur Überprüfung unter „Konfiguration“ und „Parameter“ die Messeinstellungen ansehen.

Im neu geöffneten Fenster sollten nun die Einstellungen überprüft, bzw. eingestellt sein: Methode „Rohdatenmessung“

Zahl der Zellen: 1

Min. 0,000 Max: 1,000

Wiederholungen : 1

Diese Einstellungen sind mit OK zu bestätigen.

6. Beide Quarzküvetten sind leer in die Probenhalterungen zu stellen
7. Durch Klickern auf den Button „AUTO Zero“ wird die Extinktion bei der nun eingestellten Wellenlänge von 293 nm neu kalibriert

### **Durchführung der Messung**

Zur Untersuchung ist die gesamte Flüssigkeit aus dem Maßkolben in die aus der Halterung des Spekols entnommene Quarzküvette (ohne Kennzeichnung) zu füllen, der Teflon-Deckel aufzulegen und in die vordere Probenhalterung einzubringen. In die hintere Probenhalterung wird die mit „R“ gekennzeichnete und mit Glycin/NaCl-Puffer-Lösung (Referenz-Lösung) gefüllte Quarzküvette (mit Deckel) eingesetzt und der Gehäusedeckel des Spekols geschlossen.

Das Temperaturmessgerät VOLTcraft VC 920 (auf dem Spekol stehend) ist mit der blauen Taste einzuschalten (und im Falle einer automatischen Abschaltung auch wieder einzuschalten!).

Nach erfolgter Temperierung der Probe (konstante Temperaturanzeige nach ca. 3 Minuten!) erfolgt die 1. Messung der Extinktion durch Klicken auf den Button „Messung“. Im linken Fenster erscheinen in der Tabelle die Nr. der Messung (ID), die Konzentration (irrelevant) und der Messwert der Extinktion, welcher in das Datenblatt zu notieren ist.

Nach der Durchführung der 1. Messung bei 45 °C ist am Thermostat, wie unter 2. beschrieben, nun eine Temperatur von 65 °C zu programmieren. Während der Aufheizphase ist regelmäßig bei Erreichen einer um 1 °C erhöhten Temperatur erneut auf den Button "Messung" zu klicken. Dies geschieht immer dann, wenn der schwankende Messwert der Temperatur nicht mehr unterhalb der um 1 °C höheren Temperatur abfällt, d.h. wenn die neue Temperatur z.B. zwischen 46,1 und 46,5 und nicht mehr unterhalb 46 °C schwankt. Die erhaltenen Messwerte sind ins Datenblatt einzutragen.

Nach der Durchführung der letzten Messung bei 65 °C ist der Thermostat auszuschalten und das Spekol auszuschalten. Danach sind nacheinander folgende Buttons anzuklicken:

1. STOP (zur Beendigung des Messprogramms)
2. das Messprogramm uvpc ist zu schließen (unter DATEI beenden)
3. der Startbutton in der linken unteren Ecke des Menüfensters und BEENDEN und HERUNTERFAHREN ausgewählt haben, ist wieder der WINDOWS-7-Modus erreicht.

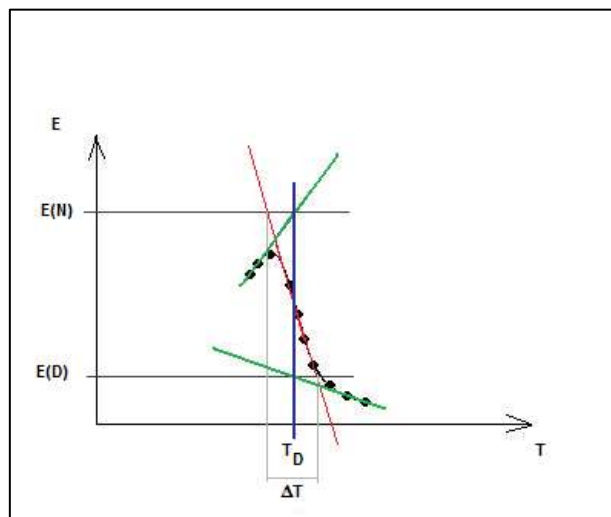
Auf diesem Desktop ist das Programm "Denaturierung-Formular" durch Doppelklick zu öffnen und die Vorauswertung auszuführen. Die erforderliche Anleitung liegt am Computer.

### Hinweise zur Versuchsauswertung

Bei der Auswertung von Gleichung (2) muss man beachten, dass die molaren Extinktionskoeffizienten der nativen und der denaturierten Formen selbst temperaturabhängig sind.

Diese Temperaturabhängigkeit kann allerdings im Denaturierungsbereich zufriedenstellend durch Geradengleichungen ausgedrückt werden.

Abb. 2



Die Auswertung von Gleichung 3 durch das Vorauswertungsprogramm, die mit Hilfe der Abbildung 2 erläutert werden soll, beruht nun darauf, dass zunächst der Verlauf dieser **Geraden** anhand der Messpunkte festgestellt wird, die vor bzw. hinter dem Denaturierungsbereich liegen.

Als nächstes wird die **Senkrechte gesucht**, deren Schnittpunkt mit der Messkurve denselben Abstand zur Extinktionsgerade der nativen und der denaturierten Form aufweist, wodurch  $T_D$ ,  $E(N)$  und  $E(D)$  bestimmt sind.

Schließlich wird bei  $T_D$  eine **Tangente** an die Messkurve gelegt. Der Anstieg dieser Tangente entspricht  $\left(\frac{dE(T)}{dT}\right)_{T=T_D}$ . Bezeichnet man mit  $\Delta T$  das Temperaturintervall zwischen den Schnittpunkten der Tangente mit den waagerechten Geraden, die zu  $E(N)$  und  $E(D)$  führen, dann ist  $\left(\frac{dE(T)}{dT}\right)_{T=T_D} = \frac{E(D) - E(N)}{\Delta T}$  und Gleichung 3 vereinfacht sich zu;

$$\boxed{\Delta_R H'_{TD} = \frac{4RT_D^2}{\Delta T}} \quad (5)$$

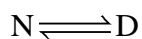
( $\Delta T$  und  $T_D$  sind also bereits im ausgerechneten Formular der Vorauswertung enthalten.)

Die apparente Standardreaktionsentropie erhält man aus Gleichung 4.

### Nachbereitungsfragen

Leiten Sie Gleichung (1) her.

Gehen Sie dazu von der Stöchiometrie der Reaktion



und davon aus, dass gilt:

$$E(T) = E(M) + f_N[N] + f_D[D]$$

$$E(D) = E(M) + f_D[N]_0$$

$$E(N) = E(M) + f_N[N]_0$$

$E(M)$  ist die Extinktion der „Matrix“ (Gesamtheit der Substanzen, deren Konzentrationen nicht durch die Reaktion bestimmt werden, z.B. Lösungsmittel, Verunreinigungen),  $f_D$  und  $f_N$  sind die Proportionalitätsfaktoren zwischen Konzentration und Extinktion der jeweils reinen Komponenten (Produkt aus molarem Extinktionskoeffizienten und der Küvettdicke).

### Symbole

Symbol	Bedeutung
N	native Form
D	denaturierte Form
$K'$	apparente Denaturierungskonstante
$[N]_0$	Anfangs- bzw. Totalkonzentration
$E(N)$	Extinktion der reinen nativen Form bei $[N]_0$
$E(D)$	Extinktion der reinen denaturierten Form bei $[D]=[N]_0$
$E(T)$	Extinktion einer Lösung bei der Temperatur T und $[N]_0$
$\Delta_R H'$	apparente Denaturierungsenthalpie
$\Delta_R S'$	apparente Denaturierungsentropie
$T_D$	Denaturierungs- bzw. "Schmelz"temperatur

**Übungen in physikalischer Chemie für B. Sc.- Studierende****Datenblatt: Proteindenaturierung** *Anmeldung nicht vergessen!***Gruppe:.....****Datum:.....**

$\theta$ in °C	E(T)
45	
46	
47	
48	
49	
50	
51	
52	
53	
54	
55	
56	
57	
58	
59	
60	
61	
62	
63	
64	
65	

**Der Versuch wurde ordnungsgemäß durchgeführt, die Daten in das Excel-Formular eingetragen und der Arbeitsplatz übergeben.**

Unterschrift:.....

 *Abmeldung nicht vergessen!*